Thai J. Genet. 2012, 5(2) : 194-202

การระบุเพศในนกแก้วบางชนิด

Sex identification of some parrots

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม* ณิชาภัทร ชอบอาภรณ์ ตฤณเศรษฐ์ วีระพันธุ์ นาถสุดา พุทธรักษ์ และ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม

Supattra Poeaim*, Nichapat Chobarporn, Trinset Weeraphan, Natsuda Puttharak and Anurug Poeaim

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

**Corresponding author: poeaim@hotmail.com*

บทคัดย่อ

การเพาะขยายพันธุ์ในนกที่มีลักษณะภายนอกเหมือนกันทั้งในเพศผู้ และเพศเมีย (sexually monomorphic) นั้น การใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียวมีความเสี่ยงสูงต่อการระบุเพศผิดพลาด ดังนั้นจึงต้องใช้เทคนิคในระดับโมเลกุล โดยอาศัยหลักการที่มีความแตกต่างของความยาวบริเวณ intron ของยีน chromo-helicase-DNA binding (*CHD*) ระหว่างโครโมโซม Z (*CHD-Z*) กับโครโมโซม W (*CHD-W*) มาใช้ในการระบุเพศ การศึกษาในครั้งนี้เก็บตัวอย่างเลือดนก sun conure (*Aratinga solstitialis*), monk parakeet (*Myiopsitta monachus*) และ crimson-bellied conure (*Pyrrhura perlata*) ด้วยกระดาษสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (FTA® card) และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในส่วน intron ของยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R สามารถตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่านกเพศเมียมีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 500 คู่เบส (*CHD-W*) และขนาดใหญ่ประมาณ 650-700 คู่เบส (*CHD-Z*) และนกเพศผู้มีแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ ประมาณ 650-700 คู่เบส (*CHD-Z*) อาจกล่าวได้ว่าเทคนิคนี้สามารถบ่งชี้เพศในวงศ์นกแก้วที่นิยมนำมาเพาะเลี้ยงได้ ซึ่งการบ่งชี้เพศมีความจำเป็นในการเพาะขยายพันธุ์เนื่องจากเพศผู้ และเพศเมียของนกวงศ์นี้มีลักษณะไม่แตกต่างกัน

ABSTRACT

Sex identification of sexually mono morphic avian species for captive breeding by morphological traits alone has a high risk of misidentification. Therefore, sex identification using molecular techniques is recommended, using intron length polymorphism of chromo-helicase-DNA binding (*CHD*) gene located on

the Z (*CHD-Z*) and W (*CHD-W*) homologous chromosomes. In this study, using FTA® card, genomic DNA was collected from blood samples of sun conure (*Aratinga solstitialis*), monk parakeet (*Myiopsitta monachus*) and crimson-bellied conure (*Pyrrhura perlata*). The 2550F/2718R primer pair was used to amplify the intronic region of the *CHD* gene and the resulting PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. Samples from the females produced two bands, which are 500 bp (*CHD-W*) and 650-700 bp (*CHD-Z*), whereas samples from the males produced only a single band at around 650-700 bp (*CHD-Z*). Thus, this technique can be used for sex identification of parrots, which is required for successful captive breeding programms, as they do not exhibit sexual dimorphism.

คำสำคัญ: การระบุเพศ, ยีน chromo-helicase-DNA binding (*CHD*), นกแก้ว

Keywords: sex identification; chromo-helicase-DNA binding (*CHD*) gene, parrot

บทนำ

การระบุเพศในนกเป็นประโยชน์ในการติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรนก อัตราส่วนของเพศ พฤติกรรมการผสมพันธุ์ นิเวศวิทยา การอนุรักษ์ และวิวัฒนาการ รวมทั้งความถูกต้องแม่นยำในการจับคู่เพื่อเพาะขยายพันธุ์เพื่อการค้า ซึ่งการระบุเพศของนกเป็นไปได้ยากในขณะที่ยังไม่แสดงลักษณะเฉพาะของเพศ นอกจากนี้ยังพบว่าประมาณ 50% ของนกทั้งหมดมีลักษณะภายนอกเหมือนกันทั้งในเพศผู้และเพศเมีย (sexually monomorphic) ทำให้ไม่สามารถระบุเพศโดยดูจากลักษณะภายนอกได้ แม้ได้พยายามหาความสัมพันธ์ของลักษณะและพฤติกรรมระหว่างเพศ เช่น นกเพศผู้จะมีสีสันที่เข้มและสดใสกว่าเพศเมีย และมีขนาดที่ใหญ่กว่านกเพศเมีย การศึกษาเกี่ยวกับฮอร์โมน การตรวจโครโมโซมเพศ การผ่าหรือส่องกล้องเพื่อตรวจดูอวัยวะเพศภายใน ซึ่งนอกจากทำให้นกบาดเจ็บแล้ว ยังมีปัจจัยที่ทำให้การแปลผลคลาดเคลื่อนได้ เช่น อายุ ฤดูกาลผสมพันธุ์ และขนาดของลำตัว เป็นต้น รวมทั้งมีผลทำให้นกบาดเจ็บได้ (Bermúdez-Humarán *et al*., 2002) ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาการระบุเพศด้วยเทคนิคทางโมเลกุลขึ้น (Cerit and Avanus, 2007) โดยเทคนิคที่นิยมนำมาใช้ในการระบุเพศนกนั้นเกิดขึ้นหลังการค้นพบยีน chromo-helicase-DNA binding (*CHD*) บนโครโมโซม W (Griffiths and Tiwari, 1995) และโครโมโซม Z (Griffiths and Korn, 1997) เนื่องจากนกมีลักษณะของโครโมโซมเพศแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยนกเพศเมียมีโครโมโซมเพศที่แตกต่างกัน (heterogametic sex: ZW) ในขณะที่นกเพศผู้มีโครโมโซมเพศที่เหมือนกัน (homogametic sex: ZZ) ร่วมกับหลักการที่มีความแตกต่างของความยาวบริเวณ intron ของยีน *CHD* ระหว่างโครโมโซม Z (*CHD-Z*) กับโครโมโซม W (*CHD-W*) (Griffiths and Tiwari, 1995; Ellegren, 1996; Griffiths and Korn, 1997) จึงนำมาใช้ในการระบุเพศนกได้เป็นอย่างดี ยกเว้นนกที่บินไม่ได้

วงศ์นกแก้ว (Family Psittacidae: parrots และ parakeets) เช่น เลิฟเบิร์ด (lovebird) หงส์หยก (budgerigar) คอนัวร์ (conure) และมาคอว์ (macaw) เป็นต้น เป็นกลุ่มนกที่ได้รับความนิยมนำมาเลี้ยงในปัจจุบัน เนื่องจากความสามารถในการเลียนแบบเสียง และสีสันที่สวยงามของขน ทำให้นกในวงศ์นี้มีราคาสูง และเป็นที่สนใจในการเพาะขยายพันธุ์ ซึ่งนอกจากปัจจัยด้านสถานที่และอาหารสำหรับคู่นกที่พร้อมผสมพันธุ์แล้ว ปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่

จะทำให้มีการเพิ่มจำนวนลูกนกได้ตามระยะเวลาที่กำหนด และลดต้นทุน คือการระบุเพศนกเพื่อการจับคู่ระหว่างเพศผู้และเพศเมียอย่างถูกต้องแม่นยำ แต่เนื่องจากนกวงศ์นี้มีลักษณะเหมือนกันทั้งสองเพศไม่สามารถระบุเพศผู้และเพศเมีย ด้วยการสังเกตจากลักษณะภายนอกเพียงอย่างเดียว ตัวอย่างการระบุเพศในนกวงศ์นี้ด้วยเทคนิคทางโมเลกุล เช่น Miyaki *et al*. (1998) ที่สามารถบ่งชี้เพศในนกแก้ว นกเงือก (toucan) และนกคูรัสโซ (curassow) ด้วยไพรเมอร์ P2/P8 ได้ โดยนกแก้วและนกเงือกสามารถตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสแบบมาตรฐาน แต่สำหรับนกคูรัสโซต้องตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเจลพอลิอะคริลาไมด์ (polyacrylamide gel) และในนกมาคอว์ (*Ara* sp.) ด้วยไพรเมอร์ P2/P3 และเทคนิค restriction fragment length polymorphism (RFLP) โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะชนิด *Dde*I, *Xho*I และ *Hae*III (Bermúdez-Humarán *et al*., 2002)

การสกัดดีเอ็นเอในการระบุเพศของนกสามารถสกัดได้จากตัวอย่างจากเลือด (Ellegren, 1996; Wang *et al*., 2007) ขน (Jensen *et al*., 2003; Sacchi *et al*., 2004; Costantini *et al*., 2008) เนื้อเยื่อ (Kahn *et al*., 1998; Fridolfsson and Ellegren, 1999; Wang *et al*., 2007) และเส้นเลือดบริเวณเปลือกไข่ (Jensen *et al*., 2003) โดยเลือดเป็นแหล่งตัวอย่างที่เหมะสม และสะดวกในการนำมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ แต่โดยส่วนใหญ่แล้วต้องใช้เลือดในปริมาณมากพอสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้นกได้รับบาดเจ็บ และเกิดภาวะเครียดได้ กระดาษสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (FTA® card) เป็นกระดาษที่มีสารเคมีที่สามารถย่อยเซลล์และตรึงดีเอ็นเอไว้บนเส้นของใยกระดาษ ซึ่งนิยมนำมาใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ของมนุษย์ (Hedman *et al*., 2008) โดยในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการระบุเพศในวงศ์นกแก้วที่นิยมนำมาเลี้ยงด้วยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R โดยเก็บตัวอย่างเลือดด้วย FTA® card

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่างเลือดนก

เก็บตัวอย่างเลือดจากนก ในวงศ์นกแก้วที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทยจำนวน 3 ชนิด คือ sun conure (*Aratinga solstitialis*) จำนวน 52 ตัว, monk parakeet (*Myiopsitta monachus*) จำนวน 12 ตัว และ crimson-bellied conure (*Pyrrhura perlata* หรือ *P. rhodogaster*) จำนวน 6 ตัว รวมทั้งสิ้น 70 ตัว จากทีบีฟาร์ม อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา โดยใช้อุปกรณ์คล้ายกระบอก ที่สามารถครอบลงบนตัวนก เพื่อป้องกันการตีปีกขณะเจาะเลือดบริเวณปลายนิ้วเท้า ด้วยเข็มเบอร์ 26 จากนั้นใช้ FTA® card (Whatman, USA) ซับที่หยดเลือดเพื่อเก็บตัวอย่าง นำกระดาษที่มีตัวอย่างเลือดใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เปิดฝาทิ้งไว้ให้ตัวอย่างแห้งที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นปิดฝาหลอดทดลองให้สนิท และเก็บไว้ในถุงพลาสติกที่มีสารกันความชื้นที่อุณหภูมิห้อง จนกว่าจะนำมาทดลองในขั้นตอนต่อไป

การทำให้ดีเอ็นเอบน FTA® card บริสุทธิ์

วิธีการทดลองดัดแปลงจากวิธีที่ระบุในเอกสารแนะนำของบริษัทผู้ผลิต โดยการใช้ poucher ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร เจาะลงบน FTA® card บริเวณที่มีตัวอย่างเลือด และใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร เติม FTA purification reagent (Whatman, USA) ปริมาตร 125 ไมโครลิตร นำไป vortex ก่อนบ่มที่อุณหภูมิระหว่าง 60-80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที ดูดสารละลายทิ้ง ทำซ้ำขั้นตอนนี้ 2 ครั้ง และ

เติม 0.1 mM TE buffer ปริมาตร 125 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 5 นาที ดูดสารละลายทิ้ง ทำซ้ำขั้นตอนนี้อีก 1 ครั้ง และทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 5 นาที หรือจนกว่าจะแห้ง

การเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ในบริเวณยีน *CHD* ด้วย forward primer (2550F): 5´-GTTACT GATTCGTCTACGAGA-3´ และ reverse primer (2718R): 5´-ATTGAAATGATCCAGTGCTTG-3´ (Fridolfsson and Ellegren, 1999) โดยปฏิกิริยาในปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบ ด้วย FTA® card ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตร ที่ผ่านขั้นตอนการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์แล้วจำนวน 1 แผ่น ไพรเมอร์อย่างละ 0.8 *p*M, 200 μM dNTPs, *Taq* DNA polymerase (Biolabs) 0.2 U และ 1X PCR buffer นำใส่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่ตั้งโปรแกรมในขั้นต่างๆ ดังนี้ รอบที่ 1 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที รอบที่ 2-35 ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 45 วินาที 50 องศาเซลเซียส 45 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที และรอบสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที (Wang *et al*., 2007) ผลผลิตพีซีอาร์ถูกแยกขนาดด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรสเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1X TBE buffer เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส

ผลการทดลองและวิจารณ์

เมื่อนำ FTA® card ที่มีตัวอย่างเลือดจากนก *A. solstitialis* จำนวน 52 ตัว, *M. monachus* จำนวน 12 ตัว และ *P. perlata* จำนวน 6 ตัว รวมทั้งสิ้น 70 ตัว ไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมโดยใช้ไพรเมอร์ 2550F/2718R พบว่าตัวอย่างดีเอ็นเอที่อยู่บน FTA® card นั้นนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ในบางตัวอย่างเท่านั้น โดยมีค่าเฉลี่ยประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และในตัวอย่างที่เพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ จะให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีลักษณะแถบที่จางและไม่ชัดเจน ซึ่งหมายถึงมีดีเอ็นเอเริ่มต้นในปริมาณที่น้อย จึงดัดแปลงวิธีการทำให้ดีเอ็นบน FTA® card บริสุทธิ์ โดยบ่มด้วย FTA purification reagent ที่อุณหภูมิระหว่าง 60-80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที แทนการบ่มที่อุณหภูมิห้อง เมื่อนำไปเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมพบว่าที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส สามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้และให้แถบที่ชัดเจนดีที่สุด และสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้สำเร็จ ในทุกตัวอย่าง อาจเนื่องจากสามารถกำจัดเศษเซลล์และไพรเมอร์ที่เข้าทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอได้มากขึ้น

ผลจากการระบุเพศโดยใช้ไพรเมอร์ 2550F/2718R ในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม ในส่วน intron ของยีน *CHD* และตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอของตัวอย่างที่ศึกษา เปรียบเทียบกับขนาดของแถบดีเอ็นเอมาตราฐาน พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมได้ในนกทั้ง 3 ชนิด โดยแต่ละชนิดให้ความแตกต่างระหว่างขนาดชิ้นดีเอ็นเออย่างชัดเจน โดยผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จาก intron ของโครโมโซม W มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 500 คู่เบส และของโครโมโซม Z มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 650-700 คู่เบส ดังนั้นเมื่อพบผลผลิตพีซีอาร์ 2 แถบ ขนาดประมาณ 650-700 และ 500 คู่เบส จะระบุเป็นนกเพศเมีย หากพบผลผลิตพีซีอาร์ ขนาดประมาณ 650-700 คู่เบส เพียงแถบเดียวจะระบุเป็นนกเพศผู้ (Figure 1) ซึ่งจากการศึกษาตัวอย่างจำนวน 70 ตัวอย่าง พบเพศเมียจำนวน 28 ตัวอย่าง และเพศผู้จำนวน 42 ตัวอย่าง โดย *A. solstitialis*, *M. monachus* และ *P. perlata* พบเพศเมียจำนวน 19, 7 และ 2 ตัวอย่าง และเพศผู้จำนวน 33, 5 และ 4 ตัวอย่าง ตามลำดับ เมื่อนำไปเทียบข้อมูลจากฟาร์มในการจับคู่ผสมก่อนการศึกษาการระบุเพศ ด้วย

เทคนิคทางโมเลกุล พบว่ามีการจับคู่ผิดประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์

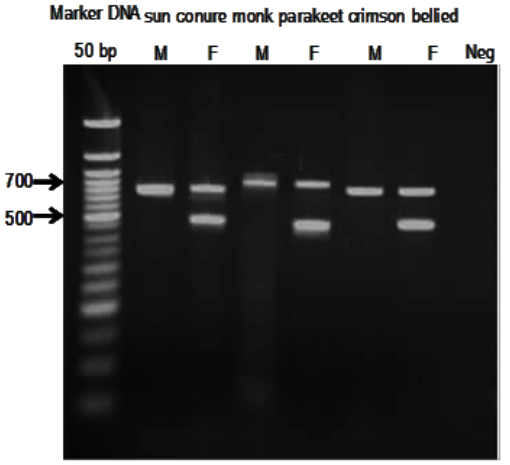

Figure 1 Sex identification of sun conure (*A. solstitialis*), monk parakeet (*M. monachus*) and crimson-bellied conure (*P. perlata*) with 2550F/2718R primers for the *CHD* gene. The PCR products were separated on a 2% agarose gel. Neg = negative, F = female, M = male.

ในการออกแบบไพรเมอร์จะให้จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ upstream และ downstream บริเวณ intron ของยีน *CHD* ซึ่งเป็นบริเวณที่อนุรักษ์สูง (highly conserved region) เมื่อมีการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมจะได้จำนวนและความยาวของแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ทำให้สามารถระบุเพศนกได้ โดยเพศเมียจะพบแถบจำนวน 2 แถบ ที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอของบริเวณ intron ที่แตกต่างกันสองขนาดจาก *CHD-Z* และ *CHD-W* ในขณะที่เพศผู้พบเพียงแถบเดียวของขนาดชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ intron ที่มาจาก *CHD-Z* และโดยส่วนใหญ่แล้ว intron บริเวณ *CHD-W* จะมีความยาวมากกว่าบริเวณ *CHD-Z* ขึ้นกับสปีชีส์ของนก และชนิดของไพรเมอร์ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้พบว่า *CHD-W* (แถบล่าง) จะมีขนาดที่สั้นกว่า *CHD-Z* (แถบบน) รวมทั้งพบว่า *CHD-Z* ของ *M. monachus* มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 700 คู่เบส ซึ่งมีขนาดยาวกว่า *A. solstitialis* และ *P. perlata* ที่มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 650 คู่เบส โดยไพรเมอร์ P2/P3 เป็นไพรเมอร์คู่แรกที่นำมาใช้ในการระบุเพศนก (Griffiths and Tiwari, 1995) แต่ไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากเป็นการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในส่วนของ exon ของยีน *CHD* ที่ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอระหว่าง *CHD-W* และ *CHD-Z* แตกต่างกันประมาณ 60-110 คู่เบส ขึ้นอยู่กับแต่ละสปีชีส์ และได้มีการพัฒนา universal primer ที่สามารถนำมาใช้ในการระบุเพศนก ได้แก่ P2/P8 (Griffiths *et al*., 1998), 1237L/1272H (Kahn *et al*., 1998) และ 2550F/2718R (Fridolfsson and Ellegren, 1999) ซึ่งไพรเมอร์ P2/P8 และ 1237L/1272H จะเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *CHD* บริเวณ intron เดียวกัน และไพรเมอร์ 2550F/2718R จะเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมของยีน *CHD* บริเวณ intron ที่ต่างไป สำหรับ universal primer ทั้ง 3 คู่นี้เหมาะกับการระบุเพศในนกแตกต่างกันไป เช่น ไพรเมอร์ P2/P8 ให้ผลแม่นยำกว่าไพรเมอร์ 2550F/2718R ในนก red-billed oxpecker (*Buphagus erythrorhynchus*)(Dalton *et al*., 2010), eurasian blackbird (*Turdus merula*) (Dawson *et al*., 2001) รวมทั้งในวงศ์นกเป็ดน้ำ (Anatidae family) (Ong and Vellayan, 2008) Wang *et al*. (2007) ได้ศึกษาการนำไพรเมอร์มาใช้ในการระบุเพศนกจำนวน 73 สปีชีส์ รวม 19 วงศ์ พบว่าไพรเมอร์ 1237L/1272H สามารถระบุเพศนกได้ถึง 78.75 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถระบุเพศได้ 21.25 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่สามารถระบุเพศในนกวงศ์ Ciconiidae, Muscicapidae, Timaliidae และบางส่วนของ Psittacidae ซึ่งสามารถระบุเพศได้ด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R แต่สำหรับไพรเมอร์

2550F/2718R สามารถระบุเพศนกได้เพียง 73.75 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่สามารถใช้ไพรเมอร์นี้ในนกวงศ์ Accipitridae, Cracidae, Caprimulgidae, Musophagidae, Pycnonotidae และบางส่วนของ Threskiornithidae, Anatidae, Phasianidae และ Psittacidae แต่อย่างไรก็ตาม universal primer นี้ไม่สามารถนำมาใช้ในการระบุเพศนกบินไม่ได้ เช่น นกกระจอกเทศ (ostrich: *Struthio camelus*) (Griffiths *et al*., 1998) สำหรับในวงศ์ Psittacidae สามารถระบุเพศด้วยไพรเมอร์ P2/NP/MP (Thammakarn *et al*., 2007) อีกด้วย

อย่างไรก็ตามการระบุเพศนกด้วยลักษณะภายนอกมีโอกาสผิดพลาดได้ การใช้เทคนิคทางโมเลกุลอาจมีข้อผิดพลาดได้เช่นเดียวกัน โดยในกรณีของไพรเมอร์ P2/P8 นั้น แม้ว่านิยมนำมาใช้ในการระบุเพศนกในหลายสปีชีส์ แต่ต้องมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะที่เหมาะสมในปฏิกิริยาพีซีอาร์ โดยเฉพาะอุณหภูมิ annealing และความเข้มข้นของ $MgCl_2$ (Griffiths *et al*., 1998; Jensen *et al*., 2003) รวมทั้งในบางครั้งไม่สามารถแสดงความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอ เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เนื่องจากขนาดของชิ้นดีเอ็นเอระหว่าง *CHD-Z* กับ *CHD-W* ไม่แตกต่างกันมาก ทำให้แสดงผลผลิตพีซีอาร์ของเพศเมียมีแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว เกิดการระบุเพศผิดพลาดจากเพศเมียเป็นเพศผู้ได้ (Fridolfsson and Ellegren, 1999) และเนื่องจากไพรเมอร์ P2/P8 และ 1237L/1272H จะให้ชิ้นดีเอ็นเอบริเวณ intron เดียวกัน ดังนั้นการแปลผลมักไม่แตกต่างกันระหว่างสองไพรเมอร์นี้ แม้ว่าขนาดของชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ 1237L/1272H จะมีขนาดยาวมากกว่าก็ตาม (Jensen *et al*., 2003) โดยทั่วไปการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ P2/P8 จะให้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอระหว่าง *CHD-Z* กับ *CHD-W* แตกต่างกันตั้งแต่ 10-80 คู่เบส ซึ่งแยกความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอ ด้วยเจลพอลิอะคริลาไมด์ (Kahn *et al*., 1998) เช่น การระบุเพศในนก common swift (*Apus apus*), morepork (*Ninox novaeseelandiae*), tawny owl (*Strix aluco*) (Griffiths *et al*., 1998), curassow (Miyaki *et al*., 1998) และ auklet (Dawson *et al*., 2001) เป็นต้น หรือการนำผลผลิตพีซีอาร์มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ เช่น นก short-toed eagle (*Circaetus gallicus*) ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *CHD-W* และ *CHD-Z* แตกต่างกันเพียง 9 คู่เบส (Sacchi *et al*., 2004) และ humboldt penguin (*Spheniscus humboldti*) ที่ *CHD-W* และ *CHD-Z* มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดความยาว 380 และ 370 คู่เบส ตามลำดับ ซึ่งมีขนาดแตกต่างกันเพียง 10 คู่เบส (Costantini *et al*., 2008) ทำให้ไม่สามารถระบุเพศได้อย่างชัดเจน จำเป็นต้องอาศัยเทคนิค RFLP โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III และ *Asp*700 (Sacchi *et al*., 2004; Costantini *et al*., 2008) รวมทั้งในนก takahe (*Porphyrio mantelli*) ที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาดความยาว 390 คู่เบส ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย แต่สามารถระบุเพศได้หลังการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae*III (Eason *et al*., 2001) แต่สำหรับไพรเมอร์ 2550F/2718R นั้นจะให้ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอแตกต่างกันถึง 150-250 คู่เบส (Fridolfsson and Ellegren, 1999; Jensen *et al*., 2003) การศึกษาครั้งนี้จึงนับว่ามีความเหมาะสมที่ใช้ไพรเมอร์ 2550F/2718R มาระบุเพศในวงศ์นกแก้ว เนื่องจากแสดงความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอระหว่าง *CHD-Z* กับ *CHD-W* ประมาณ 150-200 คู่เบส สามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจนด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

นอกจากนั้นแล้วยังพบว่า การใช้ไพรเมอร์ P2/P8 ระบุเพศในนก whiskered auklet (*Aethia pygmaea*), least auklet (*A. pusilla*), crested auklet (*A. cristatella*) และ parakeet auklet

(*Cyclorrhynchuspsittacula*)จะพบความหลากหลาย (polymorphism) ของขนาดชิ้นดีเอ็นเอของ *CHD-Z* ในนกเพศผู้ได้ (Dawson *et al*., 2001) โดยรูปแบบการเกิด polymorphism ของ *CHD-Z* นี้มีผลให้เพศผู้เห็นลักษณะแถบเป็นสองแถบ เช่นเดียวกับเพศเมีย ทำให้การระบุเพศจากเพศผู้เป็นเพศเมียได้ ซึ่งสามารถพบในกรณีนี้ในนกมากกว่า 18 สปีชีส์ เช่น นก upland sandpiper (*Bartramia longicauda*) *CHD-Z* มีขนาดความยาวของชิ้นดีเอ็นเอถึง 3 รูปแบบ คือ 335, 331 และ 330 คู่เบส ที่เกิดจาก insertion-deletion ในขณะที่ *CHD-W* มีขนาดความยาวของชิ้นดีเอ็นเอ 370 คู่เบส (Casey *et al*., 2009) ซึ่งกรณีที่กล่าวมาจะทำให้การระบุเพศคลาดเคลื่อนได้

ในการเพาะขยายพันธุ์นกนั้นหากการผลิตลูกนกไม่เป็นไปตามเป้าที่ตั้งไว้ จะกระทบถึงต้นทุนและเวลาในการดูแลนก ดังนั้นการระบุเพศนกที่ถูกต้องสามารถเพิ่มจำนวนลูกนกได้ในระยะเวลาที่กำหนด อีกทั้งเป็นการลดต้นทุนในการผลิตอีกด้วย และเนื่องจากมีความแตกต่างของราคาขายระหว่างนกเพศผู้และเพศเมีย ดังนั้นการระบุเพศนกจะทำให้เกิดผลกำไรเพิ่มขึ้น ซึ่งการระบุเพศด้วยดีเอ็นเอจะให้ความถูกต้อง หากมีการเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสม แต่อย่างไรก็ตามข้อเสียของการตรวจสอบด้วยดีเอ็นเอที่สำคัญ คือการใช้ตัวอย่างจากเลือด (Ellegren, 1996; Wang *et al*., 2007) เพื่อใช้ในการสกัดดีเอ็นเอทำให้นกได้รับการบาดเจ็บและเกิดภาวะเครียด แม้ว่าจะมีการหลีกเลี่ยงการใช้ตัวอย่างจากเลือดแล้วก็ตาม เช่น การใช้ดีเอ็นเอที่สกัดจากขนนก (Jensen *et al*., 2003; Sacchi *et al*., 2004; Costantini *et al*., 2008) เนื้อเยื่อ (Kahn *et al*., 1998; Fridolfsson and Ellegren, 1999; Wang *et al*., 2007) เส้นเลือดบริเวณเปลือกไข่ (Jensen *et al*., 2003) และอุจจาระ (Robertson *et al*., 1999; Idaghdour, *et al*., 2003) ซึ่งเป็นวิธีที่นกไม่ได้รับการบาดเจ็บ

ถึงแม้ว่าเลือดจะเป็นแหล่งตัวอย่างที่เหมาะสม แต่ต้องใช้ในปริมาณมากพอสำหรับการสกัดดีเอ็นเอ ซึ่งมีปริมาตรประมาณ 80-100 ไมโครลิตร (Harvey *et al*., 2006; Wang *et al*., 2007) ส่วนใหญ่ต้องเจาะจากบริเวณปีกทำให้นกได้รับบาดเจ็บ และเกิดภาวะเครียดได้ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ลดภาวะเครียดจากลักษณะการจับ โดยการใช้อุปกรณ์คล้ายกระบอก ที่สามารถครอบลงบนตัวนก เพื่อป้องกันการตีปีกในขณะเจาะเลือดด้วยเข็มขนาดเล็กบริเวณปลายนิ้วเท้า ในการสกัดดีเอ็นเอโดยวิธีมาตรฐาน คือการใช้ lysis buffer และ phenol/chloroform ที่ต้องใช้เวลาในการสกัด แม้ว่ามีการนำ Chelex มาใช้ในการสกัด รวมทั้งชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปที่มีความสะดวก และรวดเร็วมากยิ่งขึ้น แต่ยังคงมีค่าใช้จ่ายสูง การนำ FTA® card มาใช้เก็บตัวอย่างเลือด เพื่อลดปริมาตรของเลือด โดยใช้เพียงประมาณ 1-2 หยด จากการเจาะด้วยเข็มเบอร์ 26 หรือเมื่อหยดเลือดลงบนกระดาษแล้วมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่น้อยกว่า 2 มิลลิเมตร สามารถ นำมาประยุกต์ใช้ในการระบุเพศในวงศ์นกแก้วได้ ซึ่งสะดวกและง่ายกว่าการเจาะเลือดใส่หลอดทดลอง ดังนั้นจึงสามารถเก็บตัวอย่างได้คราวละจำนวนมาก และการใช้ FTA® card ระบุเพศนกจะใช้เวลารวดเร็วเนื่องจากสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยตรงจากกระดาษ โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอแบบมาตรฐานที่ใช้ระยะเวลานาน มีเพียงขั้นตอนการล้างที่ทำให้ดีเอ็นเอบน FTA® card บริสุทธิ์เท่านั้น แต่มีคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอเพียงพอในการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ นอกจากนั้นการเก็บรักษาและการขนส่งจากภาคสนามไปยังห้องปฏิบัติการก็เป็นไปอย่างสะดวก ประหยัดพื้นที่

และรวดเร็ว และสามารถจัดส่งทางไปรษณีย์ได้ (Gutiérrez-Corchero *et al*., 2002) และสามารถเก็บตัวอย่างได้ที่อุณหภูมิห้อง โดยวิธีการของงานวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับนกชนิดต่างๆ ทั้งเพื่อการระบุเพศ การเพาะขยายพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์ ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของประชากรนก รวมทั้งการศึกษาวิวัฒนาการ หรือการนำวิธีการไปประยุกต์ใช้กับการเก็บตัวอย่างจากแหล่งอื่น เช่น ขน หรือเส้นเลือดที่เปลือกไข่ เพื่อลดภาวะเครียดและอันตรายของนกต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณภคพงษ์ สุขกมล จากทีบีฟาร์ม อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดนก

เอกสารอ้างอิง

Bermúdez-Humarán, L.G., García-García, A., Leal-Garza, C.H., Riojas-Váldez, V., Jaramillo-Rangel, G. and Montes-de-Oca-Luna, R. 2002. Molecular sexing of monomorphic endangered *Ara* birds. *J Exp Zool* 292: 677–680.

Casey, A.E., Jones, K.L., Sandercock, B.K. and Wisely, S.M. 2009. Heteroduplex molecules cause sexing errors in a standard molecular protocol for avian sexing. *Mol Ecol Resour* 9: 61–65.

Cerit, H. and Avanus, K. 2007. Sex identification in avian species using DNA typing methods. *World Poult Sci J* 63: 91–99.

Costantini, V., Guaricci, A.C., Laricchiuta, P., Rausa, F. and Lacalandra, G.M. 2008. DNA sexing in Humboldt Penguins (*Spheniscus humboldti*) from feather samples. *Anim Reprod Sci* 106: 162–167.

Dalton, D.L., Kotzé, A. and Howitt, M. 2010. Assessment of *CHD*-specific primers for gender determination in Red-billed Oxpeckers *Buphagus erythrorhynchus*. *OSTRICH* 81: 251–257.

Dawson, D.A., Darby, S., Hunter, F.M., Krupa, A.P., Jones, I.L. and Burke, T. 2001. A critique of avian *CHD*-based molecular sexing protocols illustrated by a Z-chromosome polymorphism detected in auklets. *Mol Ecol Notes* 1: 201–204.

Eason, D., Millar, C.D., Cree, A., Halverson, J. and Lambert, D.M. 2001. A comparison of five methods for assignment of sex in the takahe (Aves: *Porphyrio mantelli*). *J Zool., Lond* 253: 281–292.

Ellegren, H. 1996. First gene on the avian W chromosome (CHD) provides a tag for universal sexing of non-ratite birds. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 263: 1635–1641.

Fridolfsson, A.K. and Ellegren, H. 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *J Avian Biol* 30: 116–121.

Griffiths, R. and Tiwari, B. 1995. Sex of the last wild Spix's macaw. *Nature* 375: 454.

Griffiths, R. and Korn, R.M. 1997. A *CHD1* gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus domesticus*. *Gene* 197: 225–229.

Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K. and Dawson, R.J.G. 1998. A DNA test to sex most birds. *Mol Ecol* 7: 1071–1075.

Gutie'rrez-Corchero, F., Arruga, M.V., Sanz, L., Garc'ia, C., Herna'ndez, M.A. and Campos, F. 2002. Using FTA® cards to store avian blood samples for genetic studies. Their application in sex determination. *Mol Ecol Notes* 2: 75–77.

Harvey, M.G., Bonter, D.N., Stenzler, L.M. and Lovette, I.J. 2006. A comparison of plucked feathers versus blood samples as DNA sources for molecular sexing. *J Field Ornithol* 77: 136–140.

Hedman, J., Albinsson, L., Ansell, C., Tapper, H., Hansson, O., Holgersson, S. and Ansell, R. 2008. A fast analysis system for forensic DNA reference samples. *J Forensic Sci Int Genet* 2: 184–189.

Idaghdour, Y., Broderick, D. and Korrida, A. 2003. Faeces as a source of DNA for molecular studies in a threatened population of great bustards. *Conserv Genet* 4: 789–792.

Jensen, T., Pernasetti, F.M. and Durrant, B. 2003. Conditions for rapid sex determination in 47 avian species by PCR of genomic DNA from blood, shell-membrane blood vessels and feathers. *Zoo Biol* 22: 561–571.

Kahn, N.W., St. John, J. and Quinn, T.W. 1998. Chromosome-specific intron size differences in the avian *CHD* gene provide an efficient method for sex identification in birds. *Auk* 115: 1074–1078.

Miyaki, C.Y., Griffiths, R., Orr, K., Nahum, L.A., Pereira, S.L. and Wajntal, A. 1998. Sex identification of parrots, toucans and curassows by PCR: Perspectives for wild and captive population studies. *Zoo Biol* 17: 415–423.

Ong, A.H. and Vellayan, S. 2008. An evaluation of CHD-specific primer sets for sex typing of birds from feathers. *Zoo Biol* 27: 62–69.

Robertson, B.C., Minot, E.O. and Lambert, D.M. 1999. Molecular sexing of individual kakapo, *Strigops habroptilus* Aves, from faeces. *Mol Ecol* 8: 1349–1350.

Sacchi, P., Soglia, D., Maione, S., Meneguz, G., Campora, M. and Rasero, R. 2004. A non-invasive test for sex identification in Short-toed Eagle (*Circaetus gallicus*). *Mol Cell Probes* 18: 193–196.

Thammakarn, C., Punchukrang, A., Jirajaroenrat, K. and Srikijkasemwat, K. 2007. Sex identification of some Psittacine birds by polymerase chain reaction. *J Mahanakorn Vet Med* 2: 30–34.

Wang, L.C., Chen, C.T., Lee H.Y., Li, S.H., Lir, J.T., Chin, S.C., Pu, C.E. and Wang, C.H. 2007. Sexing a wider range of avian species based on two CHD1 introns with a unified reaction condition. *Zoo Biol* 26: 425–431.