# การระบุเพศนกในสกุลนกหัวโตเล็ก

## Sex Identification of Birds in Genus *Charadrius*

**ณิชาภัทร ชอบอาภรณ์**[1], **สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม**[1], **ไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ**[2] **และสมชาย นิ่มนวล**[2]

Nichapat Chobarporn, Supattra Poeaim, Krairat Eiamampai and Somchai Nimnuan

[1]*สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520;* [2]*กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กรุงเทพฯ 10900*

[1]*Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of technology Ladkrabang, Bangkok 10520;* [2]*Wildlife Research Division, Wildlife conservation office, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, Bangkok 10900*

**Corresponding author: pay_pae_cap@hotmail.com*

**บทคัดย่อ**

นกหัวโตเล็กเป็นนกชายเลนที่อพยพเข้ามาประเทศไทยในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ ซึ่งเป็นช่วงที่นกเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่เหมือนกัน (sexually monomorphic) ยากต่อการระบุเพศ จึงต้องอาศัยเทคนิคทางโมเลกุล ในการศึกษาครั้งนี้เก็บตัวอย่างเลือดนกในสกุลนกหัวโตเล็ก 3 สปีชีส์ คือ หัวโตทรายเล็ก (*Charadrius mongolus*) หัวโตทรายใหญ่ (*C. leschenaultii*) และหัวโตขาดำ (*C. alexandrinus*) ด้วยกระดาษสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (FTA® card) และเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในส่วน intron ของยีน *chromo-helicase-DNA binding* (*CHD*) สามารถตรวจสอบเพศนกในสกุลนี้ได้ด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R พบว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์จากเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส นกเพศเมียมีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีชิ้นดีเอ็นเอขนาด 450 คู่เบส (*CHD-W*) และขนาดประมาณ 650 คู่เบส (*CHD-Z*) และนกเพศผู้มีแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ ประมาณ 650 คู่เบส (*CHD-Z*) นอกจากนั้นพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *CHD-Z* ของ *C. alexandrinus* มีขนาดแตกต่างจาก *C. mongolus* และ *C. leschenaultii* อยู่ 13 คู่เบส

ABSTRACT

*Charadrius* spp. are small shorebirds which wintering in Thailand during non-breeding period. outside the breeding season the adult is nearly sexually monomorphic that sex is difficult to identify. Therefore, sex identification using molecular technique is recommended. In this study, using FTA®card, genomic DNA was collected from blood samples of three *Charadrius* spp., including lesser sand plover (*Charadrius mongolus*), greater sand plover (*C. leschenaultii*) and kentish plover (*C. alexandrinus*). The 2550F/2718R primer can be used to amplify the intronic region of the *chromo-helicase-DNA binding* (*CHD*) gene and the resulting PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis. The females produced two bands, which are 450 bp (*CHD-W*) and around 650 bp (*CHD-Z*), whereas samples from the males produced only a single band at around 650 bp (*CHD-Z*). Additionally, the nucleotides sequence of *CHD-Z* of *C. alexandrines* is different from *C. mongolus* and *C. leschenaultii* is 13 bp.

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

**Keywords**: sex identification, *chromo-helicase-DNA binding* (*CHD*) gene, *Charadrius* sp

## บทนำ

การสำรวจและการเก็บข้อมูลประชากรนกที่อพยพมายังประเทศไทยนั้น จะทำการเก็บข้อมูลด้านชีวสัณฐาน ได้แก่ ชนิดสายพันธุ์ เพศ วัดขนาดต่างๆ ที่สำคัญของนกแต่ละตัว เช่น ความยาวปาก ความยาวหน้าแข้ง ความยาวปีก การผลัดขน และน้ำหนัก เป็นต้น รวมทั้งมีการติดเครื่องหมายติดตามเพื่อระบุตัวนกและเพื่อศึกษาเส้นทางการอพยพของนก (ฑิฐิ และคณะ, 2554) แต่อย่างไรก็ตามมีนกบางสกุลที่ช่วงเวลาในการอพยพอยู่นอกฤดูผสมพันธุ์ นกเพศผู้และเพศเมียจะมีลักษณะทางภายนอกที่เหมือนกัน (sexually monomorphic) ทำให้เกิดปัญหาการระบุเพศในภาคสนาม จึงจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคทางโมเลกุลช่วยในการระบุเพศ เพื่อกาศึกษาความแตกต่างทางชีวสัณฐานต่อไป ในการกำหนดเพศนกจากโครโมโซมเพศ นกเพศผู้มีโครโมโซมแบบ homogametic sex (ZZ) นกเพศเมียมีโครโมโซมแบบ heterogametic sex (ZW) ซึ่งโครโมโซมเพศมีตำแหน่งของยีน *chromo-helicase-DNA binding* (*CHD*) จึงอาศัยหลักการที่มีความแตกต่างของความยาวบริเวณ intron ของยีน *CHD* ระหว่างโครโมโซม Z (*CHD-Z*) กับโครโมโซม W (*CHD-W*) มาใช้ในการระบุเพศในระดับโมเลกุลได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction: PCR technique) (Dubiec และNeubauer, 2006) โดยไพรเมอร์ที่นิยมนำมาใช้ได้แก่ 2550F/2718R (Wang และคณะ, 2007) P2/P8 (Griffiths และคณะ, 1998) และ 1237L/1272H (Kahn และคณะ, 1998) ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุเพศนกชายเลนอพยพสกุลนกหัวโตเล็ก (Genus *Charadrius*) ด้วยเทคนิคทางโมเลกุล

## วิธีการทดลอง

### 1. การเก็บตัวอย่างเลือดนก

ดับจับนกชายเลนอพยพสกุลนกหัวโตเล็ก ด้วยเทคนิคการจับนกด้วยท่อส่งตาข่าย (ฑิฐิ และคณะ, 2554) และระบุสายพันธุ์นกร่วมกับเจ้าหน้าที่ของสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด โดย ดักจับนกบริเวณนาเกลือสมุทรมณีรัตน์ จังหวัดสมุทรสาคร และบริเวณแหลมผักเบี้ย จังหวัดเพชรบุรี ช่วงเดือนตุลาคม พ.ศ.2555 และเก็บตัวอย่างเลือดโดยเจาะที่บริเวณปลายนิ้วเท้าด้วยเข็มเบอร์ 26 และใช้ FTA Card ซับหรือป้ายที่หยดเลือด แล้วเก็บไว้ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง พร้อมจดบันทึกรหัสห่วงขานก หลังจากจดบันทึกข้อมูลชีวสัณฐานและเก็บตัวอย่างเลือดแล้ว ทำการปล่อยนกกลับคืนสู่ธรรมชาติในบริเวณเดียวกับที่ดักจับ

### 2. การทำดีเอ็นเอใน FTA Card ให้บริสุทธิ์

ทำความสะอาด Poucher ขนาด 2 มิลลิเมตร และนำไปเจาะบน FTA card ที่มีตัวอย่างเลือด ใส่ชิ้นกระดาษตัวอย่างลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร และทำดีเอ็นให้บริสุทธิ์ โดยการเติม FTA purification reagent (Whatman, US) ปริมาตร 125 ไมโครลิตร นำไป vortex แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลานำไป vortex ดูดสารละลายออก ทำซ้ำจำนวน 2 รอบ จากนั้นหยุดการทำงานของ FTA purification reagent ด้วย 0.1 mM TE buffer ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำซ้ำจำนวน 2 รอบ ก่อนจะนำไปทำให้แห้งใน heat box ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

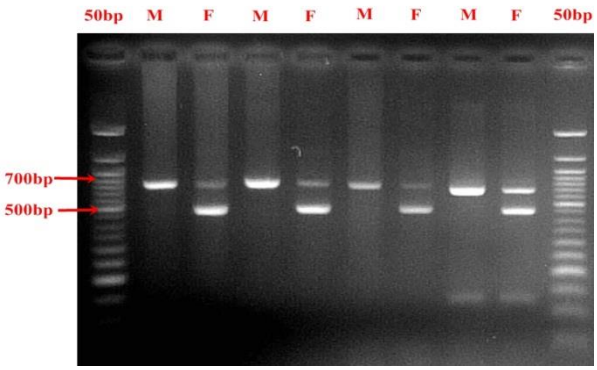
### 3. การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำหลอดตัวอย่าง FTA card ที่ผ่านขั้นตอนการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์แล้ว และดีเอ็นเอของไก่เพศผู้และเพศเมียที่ใช้เป็นตัวควบคุม มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมในตำแหน่งยีน *CHD* ด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R (Wang และคณะ, 2007) P2/P8 (Griffiths และคณะ, 1998) และ 1237L/1272H (Kahn และคณะ, 1998) โดยแต่ละไพรเมอร์มีความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ใช้ในการทำพีซีอาร์ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง จากนั้นใส่สารที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ซึ่งประกอบไปด้วย 2x *Taq* Master mix (Vivantis) ปริมาตร 12.5 และ nuclaese free water ปริมาตร 10.5 ไมโครลิตรต่อตัวอย่าง ก่อนนำไปเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมในแต่ละไพรเมอร์ และทำการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสโดยใช้เจลอะกาโรสความเข้มข้น 1.5% จากนั้นนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด GF-1 PCR clean-up kit ของบริษัท Vivantis เพื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบข้อมูลในฐานข้อมูล NCBI วิเคราะห์แก้ไขลำดับนิวคลีโอไทด์และจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม Bioedit และ Clustal X

## ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการเก็บตัวอย่างเลือดนกสกุลนกหัวโตเล็กในภาคสนามสามารถเก็บตัวอย่างได้จำนวน 3 สปีชีส์ และจากการระบุเพศนกสกุลนกหัวโตเล็กด้วยเทคนิคพีซีอาร์ที่ใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ มีเฉพาะ 2550F/2718R สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งยีน *CHD* ของนกสกุลนี้ได้ เมื่อนำไปวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส นกเพศผู้เกิดชิ้นดีเอ็นเอ 1 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 650 คู่เบส ส่วนนกเพศเมียเกิดชิ้นดีเอ็นเอ 2 แถบ ที่มีขนาดประมาณ 650 และ 450 คู่เบส ดังรูปที่ 1 ซึ่งตัวอย่างนกที่ศึกษาสามารถระบุเพศนกได้ทั้งหมด แบ่งออกเป็น *C. mongolus* จำนวน 24 ตัว แบ่งเป็นเพศผู้ 20 ตัว เพศเมีย 14 ตัว *C. leschenaultii* จำนวน 23 ตัว แบ่งเป็นเพศผู้ 7 ตัว เพศเมีย 16 ตัว และ *C. alexandrinus* จำนวน 3 ตัว แบ่งเป็นเพศผู้ 2 ตัว เพศเมีย 1 ตัว เมื่อนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของ *CHD-Z* และ *CHD*-W ทั้ง 3 สายพันธุ์ มาวิเคราะห์และจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ายีน *CHD-W* ของนกทั้ง 3 สายพันธุ์ มีขนาดเท่ากัน ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ *CHD-Z* ของ *C. alexandrinus* แตกต่างจาก *C. mongolus* และ *C. leschenaultii* อยู่ 13 คู่เบส ดังรูปที่ 2 และพบว่า *CHD-Z* และ *CHD-W* ของนกทั้ง 3 สายพันธุ์ แตกต่างกันอยู่ประมาณ 162-175 คู่เบส

การระบุเพศนกด้วยการตรวจสอบยีน *CHD* ของนกต่างสายพันธุ์หรือต่างสกุลกัน จะมีขนาดอินตรอนต่างกัน เช่นงานวิจัยของ Wang และคณะ (2007) ที่ใช้ไพรเมอร์ 2550F/2718R ในการระบุเพศนก 59 สายพันธุ์ พบว่าแต่ละสายพันธุ์มีขนาดอินตรอนที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามอาจจะมีข้อผิดพลาดเกิดขึ้นในบางกรณีนกบางสายพันธุ์พบว่ายีน *CHD* บนโครโมโซม Z มีลักษณะเป็น polymorphisms ทำให้เกิดการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ผิดพลาดได้ อาจจะต้องแก้ปัญหาโดยใช้ชุด multiple primer ในการทำพีซีอาร์ เพื่อให้มีความจำเพาะมากขึ้นและแยกความแตกต่างได้ (Casey และคณะ, 2009) การระบุเพศนกด้วยเทคนิคทางโมเลกุลมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เพื่อให้มีความเหมาะสมต่อการระบุเพศในแต่ละสายพันธุ์ได้อย่างถูกต้อง และแม่นยำมากยิ่งขึ้น




**รูปที่** 1 แสดงผลการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (เจลอะกาโรส 1.5%) ช่องที่ 1และ 10 คือ marker DNA 50 bp ช่องที่ 2 และ 3 คือ *C. mongolus* ช่องที่ 4 และ 5 คือ *C. leschenaultii* ช่องที่ 6 และ 7 คือ *C. alexandrinus* ช่องที่ 8 และ 9 คือ ไก่ที่ใช้เป็นตัวควบคุม (M คือ เพศผู้ และ F คือ เพศเมีย)

```
                                250        260        270        280        290        300
                         ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....| ....|....|
C. mongolus CHD-Z        AGTTAGAAAA GATGATCTCC AAAGGTCCCT TCCAACCTCA ACTGTTTTGT ATTATGGCAT
C. leschenaultii CHD-Z   AGTTAGAAAA GATGATCTCC AGAGGTCCCT TCCAACCTCA ACTGTTTTGT ATTATGGCAT
C. alexandrinus CHD-Z    AGTTAGAAAA GATGACCTCC A--------- ----ACCTCA ACTGTTTTGT ATTATGGCAT
```

**รูปที่** 2 แสดงการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอโทด์ช่วงที่แตกต่างกันของ *CHD-Z* ในนก *C. mongolus* (แถวบน) *C. leschenaultii* (แถวกลาง) และ *C. alexandrinus* (แถวล่าง)

## สรุปผลการทดลอง

การระบุเพศนกหัวโตเล็กจากการตรวจสอบยีน *CHD* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ คือ ไพรเมอร์ 2550F/2718R, P2/P8 และ 1237L/1272H พบว่าเฉพาะไพรเมอร์ 2550F/2718R สามารถระบุเพศนกทั้ง 3 สปีชีส์ คือ หัวโตทรายเล็ก (*C. mongolus*) หัวโตทรายใหญ่ (*C. leschenaultii*) และหัวโตขาดำ (*C. alexandrinus*) ได้ โดยยีน *CHD-Z* และ *CHD-W* มีขนาดแตกต่างกันประมาณ 162-175 คู่เบส ซึ่งการระบุเพศนกสกุลนกหัวโตเล็กสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในด้านฐานข้อมูลประชากรนก เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงประชากร อัตราส่วนระหว่างเพศ จัดการสายพันธุ์ และอนุรักษ์สายพันธุ์นก ต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช และเจ้าหน้าที่จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างเลือดนก และจำแนกสายพันธุ์นก

## เอกสารอ้างอิง

ฑิฐิ สอนสา, ไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ และสมชาย นิ่มนวล. เทคนิคการจับนกด้วยท่อส่งตาข่าย (Cannon Net) ในประเทศไทย. ผลงานวิจัยและรายงานความก้าวหน้างานวิจัยประจำปี 2553. กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ. 2554; 113-123.

Casey A.E., Jones, K.L., Sandercock, B.K. and Wisely, S.M. Heteroduplex molecules cause sexing errors in a standard molecular protocol for avian sexing. Molecular Ecology Resources 2009; 9: 61-65.

DuBiec, A. and Neubauer, M.Z. Molecular techniques for sex identification in birds. Biological. Lett. 2006; 43: 3-12.

Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K. and Dawson, R.J. A DNA test to sex most birds. Molecular Ecology 1998; 7: 1071-1075.

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

Morinha, F., Cabral, J.A. and Bastos, E. Molecular sexing of birds: A comparative review of polymerase chain reaction (PCR)-based methods. Theriogenology 2012; 78: 703-714.

Wang, L.C., Severinghaus, L.L., Chen, C.T., Liu, L.Y., Pan C.H., Huang D., Lee, H.Y., Lir, J.T., Chin, S.C., Pu, C.E. and Wang C.H.

Sexing a wider range of avian species based on two *CHD*1 introns with a unified reaction condition. Zoo Biology 2007; 26: 425-431.