

การระบุเพศและความหลากหลายทางพันธุกรรมในนกสกุล *Charadrius* โดยใช้ยีน *CHD*

Sexing and genetic diversity in the genus *Charadrius* based on *CHD* gene

นิชภัทร ชอบอารมณ์¹ ไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ² สมชาย นิ่มนวล² ทิฐิ สอนสา² และสุพัตรา โพธิ์เอี่ยม^{1*}

Nichapat Chobarporn¹, Krairat Eiamampai², Somchai Nimnuan² Thiti Sornsa² and Supattra Poeaim^{1*}

¹สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

²กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช กรุงเทพฯ 10900

¹Department of Biology, Faculty of Science, King Mongkut's Institute of technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

²Wildlife Research Division, Wildlife conservation office, Department of National Parks, Wildlife and Plant Conservation, Bangkok 10900, Thailand

*Corresponding author: poeaim@hotmail.com

บทคัดย่อ

นกสกุลหัวโตเล็ก (*Charadrius* spp.) เป็นนกชายเลนที่อพยพเข้ามาประเทศไทยในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่นกเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะสัณฐานวิทยาที่คล้ายกัน ยากต่อการระบุเพศ ในการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุเพศนก และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุล โดยเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนอินทรอนของยีน *chromo-helicase-DNA binding* (*CHD*) ทั้งบนโครโมโซม W และ Z ของนก 3 ชนิด คือ นกหัวโตทรายเล็ก (*Charadrius mongolus*)

จำนวน 87 ตัว หัวโตทรายใหญ่ (*C. leschenaultii*) จำนวน 27 ตัว และหัวโตชาดำ (*C. alexandrinus*) จำนวน 3 ตัว พบว่าขนาดชิ้นดีเอ็นเอระหว่างแอลลีล *CHD-W* และ *CHD-Z* ที่เพิ่มด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอแตกต่างกัน 200 คู่เบส โดยนกเพศผู้แสดงแถบดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ ขนาด 650 คู่เบส (*CHD-Z*) สำหรับเพศเมียที่มีชนิดของโครโมโซมเพศต่างกัน (heterogametic sex) มีแถบดีเอ็นเอเพิ่มอีก 1 แถบ มีขนาดความยาวประมาณ 450 คู่เบส (*CHD-W*) เมื่อนำชิ้นดีเอ็นเอของแอลลีล *CHD-Z* มาทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์

ลำดับนิวคลีโอไทด์ และเปรียบเทียบข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์โดยใช้โปรแกรม ClustalX และ PHYLIP พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์จากแอลลีล *CHD-Z* สัมพันธ์กับลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสามารถใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้ โดยผลจากการระบุเพศในระดับโมเลกุล และการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมมีความสำคัญต่อการจัดการและการอนุรักษ์นกชายเลนต่อไป

คำสำคัญ: การระบุเพศในนก; ยีน *chromo-helicase-DNA binding (CHD)*; สกูลหัวโตเล็ก

ABSTRACT

Charadrius spp. are migratory shorebirds in Thailand during the non-breeding season in which adult plumages are not clearly sexually dimorphic. In this work, a molecular approach was used to determine the gender and genetic diversity. Amplification of intron length polymorphisms in *chromo-helicase-DNA-binding (CHD)* genes on both Z and W chromosomes of three *Charadrius* spp. included 87 lesser sand plover (*Charadrius mongolus*), 27 greater sand plover (*C. leschenaultii*) and 3 kentish plover (*C. alexandrinus*). The resulting PCR products from 2550F/2718R primer showed fragments on a conventional agarose gel electrophoresis with size differences ranging from 200 bp between the two respective ZW allele. Males were identified by the presence of a single band about 650 bp (*CHD-Z*). Heterogametic females were identified by the presence of a second

additional fragment length of approximately 450 bp (*CHD-W*). The *CHD-Z* fragments were purified and analysed by sequencing. The multiple sequence comparison was accomplished using ClustalX and PHYLIP software. These data demonstrated that the *CHD-Z* sequence correlated with morphology and can be used for genetic diversity study, of which the results are important for shorebird conservation.

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

บทนำ

การสำรวจประชากรนกชายเลนอพยพและการศึกษาเส้นทางอพยพของนก เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้านจำนวนประชากร การกระจายตัวของชนิดนกในแต่ละภาคพื้นทวีป ซึ่งเป็นประโยชน์ในการจัดการและอนุรักษ์นก รวมทั้งเป็นการประเมินและคาดคะเนการเปลี่ยนแปลงด้านสิ่งแวดล้อม จากการสำรวจของสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช พบว่าในแต่ละปีมีนกชายเลนอพยพสกุนกหัวโตเล็ก (*Charadrius* spp.) อพยพหนีความหนาวเย็นเข้ามาในประเทศไทยจำนวนมากตลอดฤดูหนาวตั้งแต่เดือนกันยายนเป็นต้นไป และจะอพยพกลับในเดือนมีนาคม เพื่อแสวงหาพื้นที่ที่มีสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการดำรงชีวิต ซึ่งเป็นวัฏจักรเช่นเดียวกันทุกปี (วัลยาและคณะ, 2549)

การเก็บข้อมูลนกอพยพในแต่ละปี จะทำการเก็บข้อมูลชีวสัณฐาน ได้แก่ การจำแนกชนิด เพศ วัฏขนาดของอวัยวะต่างๆที่สำคัญของนกแต่ละตัว

เช่น ความยาวปาก ความยาวหน้าแข้ง ความยาวปีก การผลิตขน อายุ น้ำหนัก และทำการติดเครื่องหมายติดตามเพื่อง่ายต่อการติดตามนกอพยพในแต่ละปี (ทิจู และคณะ, 2553) การเก็บข้อมูลเพศนกในภาคสนามไม่สามารถทำได้เนื่องจากนกสกุลนกหัวโตเล็กอพยพมาในประเทศไทยอยู่ในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ ซึ่งเป็นช่วงที่นกเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะทางภายนอกเหมือนกัน (monomorphic) ยากต่อการระบุเพศ ในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจใช้เทคนิคระดับโมเลกุลในการระบุเพศนก โดยตรวจสอบยีน *CHD* (*Chromo-helicase-DNA binding protein*) ที่อยู่บนโครโมโซมเพศนก (Ellegren and Sheldon, 1997; Griffiths *et al.*, 1997) ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction: PCR) พบว่านกเพศผู้ ซึ่งมีโครโมโซมเพศแบบโฮโมแกมิต (homogametic: ZZ) จะพบแอลลีลของยีน *CHD-Z* เพียงแบบเดียว ส่วนเพศเมียมีโครโมโซมเพศแบบเฮเทอโรแกมิต (heterogametic: ZW) จะพบแอลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* จากโครโมโซม Z และ W โดยขนาดความยาวของแอลลีล *CHD-W* จะมีขนาดแตกต่างกับแอลลีล *CHD-Z* ทำให้สามารถระบุเพศนกได้ (Griffiths *et al.*, 1998) การตรวจสอบนี้จะอาศัยความแตกต่างของขนาดอินตรอน (intron) ภายในยีน *CHD* ที่อยู่ระหว่างบริเวณ helicase และ DNA binding ซึ่งพบได้ในนกทุกชนิด และพบว่ามีไพรเมอร์ที่นิยมใช้ในการตรวจสอบยีน *CHD* มีจำนวนหลายคู่ เช่น ไพรเมอร์ P2/P8 (Griffiths *et al.*, 1998) ไพรเมอร์ 1237L/1272H (Kahn *et al.*, 1998) และไพรเมอร์ 2550F/2718R (Fridolfsson and Ellegren, 1999) เป็นต้น

จากการสำรวจพบว่านกสกุลนกอพยพมาอาศัยอยู่บริเวณอ่าวไทยตอนในและชายฝั่งทะเลอันดามัน (สมชาย และคณะ, 2553) จึงทำให้เกิดสมมติฐานที่เป็นไปได้ว่านกชายเลนที่อพยพมาใน

ประเทศไทยทั้งฝั่งอ่าวไทยตอนในและฝั่งอันดามันมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในแต่ละพื้นที่หรือไม่ เนื่องจากประเทศไทยตั้งอยู่ในเส้นทางการบินอพยพเอเชียตะวันออก-ออสเตรเลีย (East Asian-Australasian Flyway: EAAF) คล้ายกับการอพยพของนกชายเลนในทวีปเอเชีย คือ อยู่ระหว่างในแนวเหนือ-ใต้ เป็นส่วนใหญ่ และยังพบวากในสกุลนกหัวโตเล็ก เช่น หัวโตทรายใหญ่ (*Charadrius leschenaultii*) หัวโตทรายเล็ก (*C. mongolus*) และหัวโตชาดำ (*C. alexandrinus*) เป็นนกที่มีชนิดย่อยที่มีลักษณะสัณฐานใกล้เคียงกันมาก (Hirschfeld *et al.*, 2000; Rheindt *et al.*, 2011) ซึ่งอาจจะเกิดการระบุชนิดผิดพลาดได้ จึงสนใจศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกสกุลนกหัวโตเล็กในระดับโมเลกุล การศึกษาความหลากหลายในระดับโมเลกุลที่นิยมศึกษา คือการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในนิวเคลียสและไมโทคอนเดรียตำแหน่งต่างๆ ซึ่งพบยีนหลายตำแหน่งที่นิยมใช้ในการศึกษานกชายเลน เช่น ยีนในนิวเคลียสบริเวณตำแหน่ง *recombination-activating gene 1* (*RAG-1*) (Paton *et al.*, 2006) ตำแหน่ง *CHD* (*Chromo-helicase-DNA binding protein*) (Kupper *et al.*, 2009) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อระบุเพศในนกชายเลนอพยพสกุลนกหัวโตเล็ก และศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

วิธีการทดลอง

การเก็บตัวอย่างเลือดนก

ดักจับนกชายเลนอพยพสกุลหัวโตเล็กด้วยท่อส่งตาข่าย (ทิจู และคณะ, 2554) และระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานร่วมกับเจ้าหน้าที่ของสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด โดยดักจับนกจาก 3 พื้นที่ คือ บริเวณนาเกลือสมุทรเจริญรัตน์ จังหวัดสมุทรสาคร บริเวณแหลมผักเบี้ย จังหวัดเพชรบุรี

และบริเวณปากแม่น้ำกันตัง จังหวัดตรัง ช่วงเดือนกันยายน ถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ.2555 และเก็บตัวอย่างเลือดโดยเจาะที่บริเวณปลายนิ้วเท้าด้วยเข็มเบอร์ 26 และใช้ FTA[®] card (Whatman) ซับหยดเลือดแล้วเก็บไว้ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นจดบันทึกรหัสห้วงขานกและข้อมูลชีวสณฐาน หลังจากเก็บตัวอย่างเลือดแล้ว ทำการปล่อยนกกลับคืนสู่ธรรมชาติในบริเวณเดียวกับที่จับ

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

นำ FTA[®] card ที่มีตัวอย่างเลือดที่ผ่านขั้นตอนการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ ซึ่งอ้างอิงตามสุพัตรา และคณะ (2012) มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน *CHD* ที่ใช้ในการระบุเพศนก โดยใช้ไพรเมอร์ 3 คู่ ได้แก่ไพรเมอร์ P2/P8 (Griffiths *et al.*, 1998) ไพรเมอร์ 1237L/1272H (Kahn *et al.*, 1998) และไพรเมอร์ 2550F/2718R (Fridolfsson and Ellegren, 1999) เพื่อหาไพรเมอร์คู่ที่เหมาะสมในการระบุเพศในสกุลนกหัวโตเล็ก ซึ่งต้องสามารถแยกความแตกต่างของเพศผู้และเพศเมียได้อย่างชัดเจน โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปริมาตร 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยไพรเมอร์ความเข้มข้น 20 พิโคโมลต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 2x

Taq master mix (Vivantis) ปริมาตร 12.5 ไมโครลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วย nuclease free water ปริมาตร 10.5 ไมโครลิตร ก่อนที่จะนำใส่เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (thermal cycler) โดยใช้สภาวะในการทำพีซีอาร์ที่ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Wang และคณะ (2007) ดังรายละเอียดใน Table 1 นำผลผลิตพีซีอาร์มาแยกขนาดด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้เจลอะกาโรสเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย 1XTBE buffer เปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 50 คู่เบส

การหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคระดับโมเลกุล

นำตัวอย่างนกสกุลหัวโตเล็กที่เก็บได้ทั้ง 3 ชนิด และตัวอย่างนกหัวโตสีเทา (*Pluvialis squatarola*) ที่ใช้เป็นตัวอย่างนอกสกุล (outgroup) มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่ง *CHD* ด้วยคู่ไพรเมอร์ 2550F/2718R จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด GF-1 PCR clean-up kit (Vivantis) ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (บริษัท First Base) นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) วิเคราะห์แก้ไข

Table 1 PCR conditions for three universal primer sets amplified *CHD* gene

Condition	Primers		
	P2/P8	1237L/1272H	2550F/2718R
Pre-denaturation	95 °C 3 min	95 °C 3 min	95 °C 3 min
Denaturation	95 °C 45 sec	95 °C 45 sec	95 °C 45 sec
Annealing	56 °C 45 sec	54 °C 45 sec	50 °C 45 sec
Extension	72 °C 45 sec	72 °C 45 sec	72 °C 45 sec
Final extension	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 10 min

ลำดับนิวคลีโอไทด์ และจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยใช้โปรแกรม Bioedit และ ClustalX จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้ชุดโปรแกรม PHYLIP

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการเก็บตัวอย่างเลือดในนกสกุลหัวโตเล็กในภาคสนามสามารถเก็บตัวอย่างได้จำนวน 3 ชนิด จำนวน 117 ตัว ได้แก่ *C. mongolus* จำนวน 87 ตัว (สมุทรสาคร 49 ตัว, เพชรบุรี 2 ตัว, ตรัง 36 ตัว) *C. leschenaultii* จำนวน 27 ตัว (เพชรบุรี 3 ตัว, ตรัง 24 ตัว) และ *C. alexandrinus* จำนวน 3 ตัว (เพชรบุรี 1 ตัว, ตรัง 2 ตัว) รวมทั้งตัวอย่างนกหัวโตสีเทา (*P. squatarola*) จำนวน 1 ตัวอย่าง ที่ใช้เป็นตัวอย่างนอกสกุล ในช่วงแรกของการทดลองทำการระบุเพศโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในตำแหน่งยีน *CHD* ในตัวอย่างเพียง 4 ตัวอย่าง (ยกเว้น *C. alexandrinus*) ด้วยไพรเมอร์ 3 คู่ ได้แก่ ไพรเมอร์ P2/P8, 1237L/1272H และ 2550F/2718R โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ ดัง Table 2 เพื่อหาคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการระบุเพศนกในสกุลนี้ จากนั้นนำผลผลิตพีซีอาร์ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิสพบว่านกทั้ง 3 ชนิด ให้ผลผลิตพีซีอาร์ในนกเพศผู้

เกิดขึ้นดีเอ็นเอ 1 แถบจากแอลลีล *CHD-Z* นกเพศเมียเกิดขึ้นดีเอ็นเอ 2 แถบ จากแอลลีล *CHD-Z* และแอลลีล *CHD-W* ดังแสดงใน Figure 1 โดยไพรเมอร์ทั้ง 3 คู่ สามารถใช้ในการระบุเพศนกได้ ซึ่งให้ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ทั้งจากแอลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ดัง Table 2 โดยผลผลิตพีซีอาร์ของแอลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ในคู่ไพรเมอร์ P2/P8 และ 1237L/1272H ให้ความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอเท่ากัน คือ 50 คู่เบส และพบว่าแอลลีล *CHD-Z* มีขนาดสั้นกว่าแอลลีล *CHD-W* สอดคล้องกับ Jensen *et al.* (2003) ที่ทำการระบุเพศนกทั้งหมด 47 ชนิด พบว่าไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่นี้ ให้ความแตกต่างของขนาดชิ้นดีเอ็นเอของแอลลีล *CHD-Z* และ *CHD-W* ที่เท่ากัน จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *CHD* บริเวณอินทรอนเดียวกัน ส่วนผลการระบุเพศด้วยไพรเมอร์ 2550F/2718R ผลผลิตพีซีอาร์ของแอลลีล *CHD-Z* และแอลลีล *CHD-W* มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอแตกต่างกันประมาณ 200 คู่เบส ทำให้สามารถแยกความแตกต่างของนกเพศผู้และเพศเมียได้อย่างชัดเจน โดยขนาดของชิ้นดีเอ็นเอของแอลลีล *CHD-Z* มีขนาดยาวกว่าแอลลีล *CHD-W* ดังนั้นจึงเลือกใช้ไพรเมอร์ 2550F/2718R มาใช้ในการระบุเพศนกต่อไป

Table 2 Primer sequences and the product sizes of PCR

Primer (Nucleotide sequence)	Size of PCR products	
	<i>CHD-Z</i>	<i>CHD-W</i>
P2 (5'TCTGCATCGCTAAATCCTTT3')	350 bp	400 bp
P8 (5'CTCCCAAGGATGAGRAAYTG3')		
1237L (5'GAGAACTGTGCAAAACAG3')	250 bp	300 bp
1272H (5'TCCAGAATATCTTCTGCTCC3')		
2550F (5'GTTACTGATTCGTCTACGAGA3')	650 bp	450 bp
2718R (5'ATTGAAATGATCCAGTGCTTG3')		

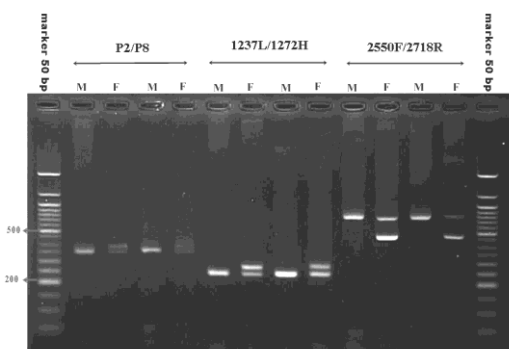


Figure 1 Comparison of PCR products in genus *Charadrius* from P2/P8 primers, 1237L/1272H primers and 2550F/2718R primers by 1.5% agarose gel electrophoresis. M = male and F = female.

ผลจากการระบุเพศโดยใช้ไพรเมอร์ 2550F/2718R ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนอินทรอนของยีน *CHD* พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในนกทั้ง 3 ชนิด โดยแต่ละชนิดให้ความแตกต่างระหว่างขนาดชิ้นดีเอ็นเออย่างชัดเจน โดยผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากแอลลิลของโครโมโซม W มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 450 คู่เบส และของโครโมโซม Z มีขนาดชิ้นดีเอ็นเอประมาณ 650 คู่เบส ดังนั้นเมื่อพบผลผลิตพีซีอาร์ 2 แถบ ขนาดประมาณ 650 คู่เบส และ 450 คู่เบส จะระบุเป็นนกเพศเมีย หากพบผลผลิตพีซีอาร์ขนาดประมาณ 650 คู่เบส เพียงแถบเดียวจะระบุเป็นนกเพศผู้ ดังแสดงใน Figure 2 ซึ่งจากการศึกษาตัวอย่างจำนวน 117 ตัว พบเพศเมียจำนวน 50 ตัว และเพศผู้จำนวน 67 ตัว แบ่งเป็น *C. mongolus* พบเพศผู้ 54 ตัว และเพศเมีย 33 ตัว *C. leschenaultii* พบเพศผู้ 11 ตัว และเพศเมีย 16 ตัว และ *C. alexandrinus* แบ่งเป็นเพศผู้ 2 ตัว และเพศเมีย 1 ตัว สำหรับนกหัวโตสีเทา (*P. squatarola*) พบว่าเป็นเพศผู้ นำมาเป็นตัวอย่างนอกสกุล

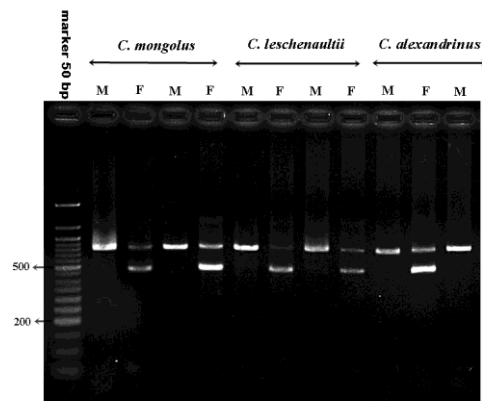


Figure 2 Sex identification in genus *Charadrius* with 2550F/2718R primers for *CHD* gene. The PCR products were separated on a 1.5% agarose gel. M = male and F = female.

การใช้ไพรเมอร์ต่างๆ ในการเพิ่มจำนวนยีน *CHD* จะให้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีขนาดแตกต่างกันนั้นขึ้นอยู่กับวิธีการออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับตำแหน่งบนยีน *CHD* และความจำเพาะของไพรเมอร์ในแต่ละชนิด (Figure 3) ดังนั้นการเลือกใช้ไพรเมอร์จึงเป็นสิ่งสำคัญในการระบุเพศนก อีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญคือความแตกต่างขนาดอินทรอนของแอลลิล *CHD-Z* และ *CHD-W* จำเป็นต้องมีความแตกต่างกันชัดเจน เพื่อระบุเพศนกได้อย่างถูกต้อง (Wang *et al.*, 2007) การใช้ไพรเมอร์หลายชุดเพื่อป้องกันข้อผิดพลาดที่เกิดขึ้นในการระบุเพศนกตรงกับคำแนะนำของ Casey *et al.* (2009) ซึ่งพบปัญหาจากการระบุเพศนก *Bartramia longicauda* พบว่าแอลลิล *CHD-Z* เกิดลักษณะ polymorphisms ทำให้ผลการวิเคราะห์ผลผลิตพีซีอาร์ผิดพลาด ปกตินกเพศผู้จะเกิดขึ้นดีเอ็นเอ 1 แถบ แต่ให้ผลชิ้นดีเอ็นเอ 2 แถบ ซึ่งให้ผลเป็นเพศเมีย การเกิดขึ้นดีเอ็นเอขนาดต่างกันมีสาเหตุมาจากการเกิด deletion ของแอลลิล *CHD-Z* บนโครโมโซมใดโครโมโซม

หนึ่งที่มีเบสบางตำแหน่งเกิดการหายไป ทำให้ผลการระบุเพศผิดพลาดขึ้น ดังนั้นจำเป็นต้องแก้ปัญหาโดยใช้ไพรเมอร์หลายชุดในการระบุเพศ

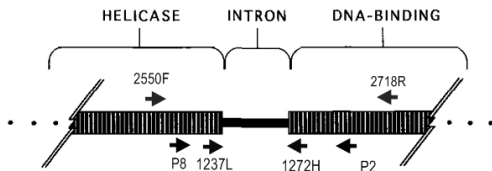


Figure 3 The region in *CHD* gene showing the binding sites for the three primer pairs used (modified from Kahn *et al.*, 1998).

จากงานวิจัยของ Lee *et al.* (2010) พบความแปรปรวนของยีน *CHD* ในนกแต่ละชนิด โดยทำการศึกษานก 3 ชนิด (*Alcippe morrisonia*, *Aegithalos concinnus* และ *A. nipalensis*) ในงานครั้งนี้จึงศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอลลิล *CHD-Z* และสร้าง Phylogenetic tree จากการชุดโปรแกรม PHYLIP โดยใช้วิธี Neighbor Joining และใช้ Bootstrap จำนวน 100 ซ้ำ พบว่า Phylogenetic tree มีความสัมพันธ์กับลักษณะสัณฐานของนก กล่าวคือ *C. mongolus* และ *C. leachenaultii* มีความใกล้ชิดกันในระดับพันธุกรรมและมีลักษณะสัณฐานที่ใกล้เคียงกันมาก ซึ่งจะแตกต่างกันเพียงลักษณะของปาก โดย *C. leachenaultii* มีปากยาวกว่าและปลายปากแหลมกว่า *C. mongolus* (Hirschfeld *et al.*, 2000) ส่วน *C. alexandrinus* มีความแตกต่างจาก *C. mongolus* และ *C. leachenaultii* อย่างชัดเจนทั้งในระดับพันธุกรรมและลักษณะสัณฐาน (Figure 4) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของแอลลิล *CHD-Z* ยังไม่สามารถศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมใน

แต่ละพื้นที่ได้ หรือยังไม่สามารถศึกษาในระดับชนิดย่อยได้ เนื่องจากแอลลิล *CHD-Z* มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีขนาดสั้น จำเป็นต้องศึกษาโดยใช้ยีนตำแหน่งอื่นๆ ที่มีขนาดยาวมากขึ้น เพื่อเปรียบเทียบหาความแตกต่างได้มากยิ่งขึ้น (Paton *et al.*, 2006) รวมทั้งการวิเคราะห์มากกว่า 1 ตำแหน่ง ดังเช่น Kupper *et al.* (2009) ทำการวิเคราะห์ยีนที่อยู่ในไมโทคอนเดรีย 2 ตำแหน่ง คือ ยีน *NADH dehydrogenase subunit 3 (ND3)* ที่มีขนาดประมาณ 400 คู่เบส และยีน *ATPase subunit 6/8 (ATPase 6/8)* ที่มีขนาดประมาณ 1200 คู่เบส พบว่าสามารถแยกชนิดย่อยของ *C. alexandrinus* ได้ 2 ชนิดย่อย คือ *C. a. nivosus* และ *C. a. alexandrinus* อีกทั้งจำเป็นต้องศึกษาตัวอย่างในแต่ละพื้นที่ในจำนวนที่มากขึ้น เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมได้อย่างถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

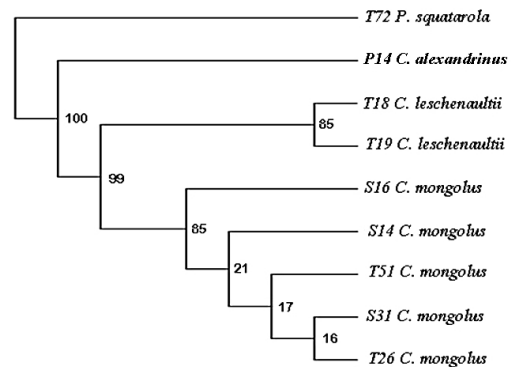


Figure 4 Phylogenetic tree of genus *Charadrius* including *C. mongolus*, *C. leachenaultia* and *C. alexandrinus* (P = Phetchaburi, S = Samut sakorn, T= Trang).

สรุปผลการทดลอง

การระบุเพศในนกสกุลนกหัวโตเล็กจากการตรวจสอบยีน *CHD* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพร

เมอร์ 3 คู่ (P2/P8, 1237L/1272H และ 2550F/2718R) สามารถระบุเพศนกได้ทั้ง 3 ชนิด คือ หัวโตทรายเล็ก (*C. mongolus*) หัวโตทรายใหญ่ (*C. leschenaultii*) และหัวโตชาดำ (*C. alexandrinus*) โดยไฟรเมอร์ 2550F/2718R เหมาะสมในการระบุเพศในสกุลนกหัวโตเล็กมากที่สุด เนื่องจากสามารถแยกความแตกต่างขนาดขึ้น ดีเอ็นเอระหว่าง CHD-Z และ CHD-W ได้อย่างชัดเจน และพบว่า *C. mongolus* มีความใกล้ชิดกับ *C. leschenaultii* ทั้งระดับพันธุกรรมและลักษณะสัณฐาน โดยรายงานนี้เป็นฐานข้อมูลระดับโมเลกุลในการศึกษานกชายเลนอพยพในประเทศไทยฉบับแรก ซึ่งสามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อยอดในด้านฐานข้อมูลระดับโมเลกุลและข้อมูลประชากรนก เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของประชากร อัตราส่วนระหว่างเพศ และเพื่อการอนุรักษ์นกชายเลนต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช ที่อนุญาตในการเก็บตัวอย่าง (ทส 0909.302/21733) และเจ้าหน้าที่จากสถานีวิจัยสัตว์ป่าบึงบอระเพ็ด จังหวัดนครสวรรค์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างเลือดนก และระบุชนิดของนก

เอกสารอ้างอิง

ทิว สอนสา ไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ และ สมชาย นิ่มนวล. 2554. เทคนิคการจับนกด้วยทอส่งตาข่าย (Cannon Net) ในประเทศไทย. ผลงานวิจัยและรายงานความก้าวหน้างานวิจัยประจำปี 2553. กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ. น. 113-123.
วัลยา ชนิตดาวงศ์ และ มงคล ไชยภักดี. 2549. นก

อพยพในประเทศไทย (Migratory Birds of Thailand). ผลงานวิจัยและรายงานความก้าวหน้างานวิจัยประจำปีประจำปี 2548. กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ. น. 207-233.

สมชาย นิ่มนวล ตวงรัตน์ โพธิ์เที่ยง ไกรรัตน์ เอี่ยมอำไพ ศิริพร ทองอารีย์ ทิว สอนสา วัลยา ไชยภักดี และฟิลลิป ดี ราวด์. 2554. การศึกษาเส้นทางการอพยพของนกชายเลนด้วยวิธีการติดเครื่องหมายธงสีในประเทศไทย. ผลงานวิจัยและรายงานความก้าวหน้างานวิจัยประจำปีประจำปี 2553. กลุ่มงานวิจัยสัตว์ป่า สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ. น.137-147.

สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ณิชาภัทร ขอบอารมณ ตฤณ เศรษฐ์ วีระพันธุ์ นาดสุตา พุทธรักษ์ และอนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม. 2012. การระบุเพศในนกแก้วบางชนิด. Thai J Genet 5: 194-202.

Casey AE, Jones KL, Sandercock BK and Wisely SM (2009) Heteroduplex molecules cause sexing errors in a standard molecular protocol for avian sexing. Mol Ecol Resour 9: 61-65.

Chandler R (2009) Shorebirds of North America, Europe and Asia: a photographic guide. Lion productions Ltd, China. pp 447.

Ellegren H and Sheldon B (1997) New tools for sex identification and the study of sex allocation in birds. Tree 12: 255-259.

Fridolfsson AK 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 Korn RM (1997) A *CHD1* gene is Z chromosome linked in the chicken *Gallus domesticus*. *Gene* 197: 225–229.
- Griffiths R, Double MC, Orr K and Dawson RJ (1998) A DNA test to sex most birds. *Mol Ecol* 7: 1071–1075.
- Hirschfeld E, Roselaar CS and Shiriha H (2000) Identification, taxonomy and distribution of greater and lesser sand plovers. *Br Birds* 93: 162–189.
- Jensen T, Pernasetti FM 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 NW, John JS and Quinn TW (1998) Chromosome-specific intron size differences in the avian *CHD1* gene provide an efficient method for sex identification in birds. *The Auk* 115: 1074–1078.
- Kupper C, Augustin J, Kosztolanyi A, Burke T, Figuerola J and Szekely T (2009) Kentish versus snowy plover: phenotypic and genetic analyses of *Charadrius alexandrinus* reveal divergence of Eurasian and American subspecies. *The Auk* 126: 839–852.
- Lee MY, Hong YJ, Park SK, Kim YJ, Choi TY, Lee H and Min MS (2010) Application of two complementary molecular sexing methods for East Asian bird species. *Genes Genomics* 30: 365–372.
- Paton TA and Baker AJ (2006) Sequences from 14 mitochondrial genes provide a well-supported phylogeny of the Charadriiform birds congruent with the nuclear RAG-1 tree. *Mol Phylogenet Evol* 39: 657–667.
- Wang LC, Severinghaus LL, Chen CT, Liu LY, Pan CH, Huang D, Lee HY, Lir JT, Chin SC, Pu CE and Wang CH (2007) Sexing a wider range of avian species based on two *CHD1* introns with a unified reaction condition. *Zoo Biol* 26: 425–431.