

## ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *CHD-W* และ *CHD-Z* เพื่อการระบุเพศของนกปรอดหัวโขน

### Partial nucleotide sequences of *CHD-W* and *CHD-Z* genes for sex identification of Red-whiskered Bulbul (*Pycnonotus jocosus*)

สมชาติ ธนะ<sup>1</sup> ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์<sup>2,3\*</sup>

Somchart Tana<sup>1</sup>, Dutrudi Panprommin<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา พะเยา 56000

<sup>2</sup>สาขาวิชาการประมง คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา พะเยา 56000

<sup>3</sup>ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

<sup>1</sup>Division of Animal Science, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao 56000, Thailand

<sup>2</sup>Division of Fisheries, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao, Phayao 56000, Thailand

<sup>3</sup>Center of Excellence on Agricultural Biotechnology (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand

\*Corresponding author: dutrudeep@yahoo.com

#### บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน Chromo-helicase-DNA-binding protein (*CHD*) คือ *CHD-W* และ *CHD-Z* เพื่อการระบุเพศของนกปรอดหัวโขน โดยเพิ่มปริมาณยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ และใช้ไพรเมอร์ P8/P2 จากปลายรากขนของนกทั้งตัวโตเต็มวัยที่ทราบเพศแล้ว และลูกนกที่ยังไม่ทราบเพศ โดยไม่ผ่านขบวนการสกัดดีเอ็นเอหรือการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ ทำให้ประหยัดระยะเวลาได้มาก เมื่อศึกษาในนกโตเต็มวัยที่ทราบเพศแล้ว จำนวน 20 ตัว พบว่า นกเพศเมียมีผลผลิตพีซีอาร์ 2 แถบ คือ แถบของยีน *CHD-W* ที่มีขนาด 384 คู่เบส และ *CHD-Z* ที่มีขนาด 332 คู่เบส ในขณะที่นกเพศผู้มีผลผลิตพีซีอาร์เพียงแถบเดียวเท่านั้น คือ แถบของยีน *CHD-Z* ที่มีขนาด 332 คู่เบส ซึ่งตรงกับเพศของนกที่ทราบเพศแล้ว 100 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการศึกษาในลูกนกที่ยังไม่ทราบเพศก็ให้ผลเช่นเดียวกัน ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ในการวางแผนการเพาะขยายพันธุ์และอนุรักษ์นกชนิดนี้ต่อไป นอกจากนี้จากการเปรียบเทียบ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHD-W* และ *CHD-Z* กับสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีความคล้ายคลึงกับนกปรอดจีน (*Pycnonotus sinensis*) ที่อยู่ในสกุลเดียวกันมากที่สุด และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHD-W* และ *CHD-Z* ในนกชนิดต่างๆ จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ นกปรอดหัวโขน (*Pycnonotus jocosus*) นกปรอดจีน (*Pycnonotus sinensis*) นก skylark (*Alauda arvensis*) และนก common swift (*Apus apus*) พบว่าสามารถแยกความแตกต่างและแบ่งกลุ่มของนกได้อย่างถูกต้องตามหลักอนุกรมวิธาน

#### ABSTRACT

This study aimed to determine the partial nucleotide sequences of chromo-helicase-DNA-binding protein (*CHD*) genes for sex identification of red-whiskered bulbul (*Pycnonotus jocosus*) using polymerase chain reaction technique. The partial sequences of *CHD-W* and *CHD-Z* genes were

amplified with the P8/P2 primers from root hairs of known sex adults and unknown sex chicks. This process was carried out without the DNA extraction or DNA purification, thus saving time. Twenty known sex adults were used. Two DNA fragments were amplified in females and one in males. In females, a 384-bp fragment of *CHD-W* and a 332-bp fragment of *CHD-Z* genes were amplified. In contrast, only one 332-bp fragment of *CHD-Z* gene was amplified in males. The sex identification using PCR method gave 100% accuracy. The sexes of unknown sex chicks were also identified and resulted in the same fragments. The results of this study can be used in the breeding and conservation plan of this species. In addition, the *CHD-W* and *CHD-Z* sequences of red-whiskered bulbul showed the highest similarity to the light-vented bulbul (*Pycnonotus sinensis*), belonging to the same genus *Pycnonotus*. The phylogenetic tree of four bird species including red-whiskered bulbul (*Pycnonotus jocosus*) light-vented bulbul (*Pycnonotus sinensis*) skylark (*Alauda arvensis*) and common swift (*Apus apus*) was constructed for evolutionary analysis. The nodes of tree were clearly separated following the bird taxonomic system.

**คำสำคัญ:** ยีน *CHD-W* และ *CHD-Z*; การระบุเพศ; นกปรอดหัวโขน; เทคนิค polymerase chain reaction

**Keywords:** *CHD-W* and *CHD-Z* genes; sex identification; Red-whiskered Bulbul (*Pycnonotus jocosus*); polymerase chain reaction

## บทนำ

นกปรอดหัวโขน หรือนกกรงหัวจุก มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pycnonotus jocosus* และชื่อสามัญว่า Red-whiskered Bulbul เป็นนกที่มีความสวยงามมากชนิดหนึ่งที่กำลังได้รับความนิยมในการเลี้ยง เนื่องจากนกเพศผู้มีเสียงร้องเป็นท่วงทำนองที่ไพเราะ โดยส่วนมากมักตกจับจากธรรมชาติ ทำให้จำนวนของนกชนิดนี้

น้อยลง ประกอบกับในปัจจุบันได้กำหนดให้นกปรอดหัวโขนเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 ที่สามารถครอบครองและเพาะพันธุ์ได้เมื่อได้รับอนุญาต ดังนั้นการเพาะขยายพันธุ์นกปรอดหัวโขนจึงมีความสำคัญอย่างมาก ซึ่งการระบุเพศของนกที่โตเต็มวัยสามารถทำได้โดยการสังเกตจากลักษณะรูปร่าง เช่น ส่วนหัว ส่วนอก ส่วนหางที่นกเพศผู้จะมีสัดส่วนที่ใหญ่กว่านกเพศเมีย นกเพศผู้มีขนแต่มีสีแดงที่ใต้ตา ขนพัดที่โคนหางด้านล่างมีสีแดงเข้ม และมีขนาดใหญ่กว่านกเพศเมีย เป็นต้น (สุชาติ และ วิเชียร, 2544) แต่เนื่องจากลูกนกที่ยังไม่โตเต็มวัยทั้งเพศผู้และเมียมีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก ต้องใช้ความเชี่ยวชาญและประสบการณ์ของผู้คัดแยกเป็นสำคัญ

ในปัจจุบันการระบุเพศของนกมีหลายวิธี ได้แก่ การศึกษาจากลักษณะภายนอก การคลำตรวจกระดูกเชิงกราน การปลิ้นกัน เป็นต้น โดยแต่ละวิธีมีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกันไป ซึ่งการระบุเพศของนกด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction) เป็นอีกหนึ่งวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง ให้ผลถูกต้องแม่นยำ และสามารถระบุเพศของนกได้ในทุกช่วงอายุ โดยการเพิ่มปริมาณยีน Chromo-helicase-DNA-binding protein (*CHD*) ที่พบบนโครโมโซมเพศของนกแทบทุกชนิด ยกเว้นนกในกลุ่ม ratites ได้แก่ นกในอันดับ Struthioniformes, Casuariiformes (Griffiths *et al.*, 1998; Kahn *et al.*, 1998) เป็นต้น และเนื่องจากโครโมโซมเพศของนกเพศผู้เป็น ZZ เพศเมียเป็น ZW ดังนั้นเทคนิคพีซีอาร์จึงสามารถเพิ่มปริมาณยีน *CHD* ได้ในนกเพศผู้เพียงแถบเดียวเท่านั้น คือ แถบของยีน *CHD-Z* ในขณะที่นกเพศเมียสามารถเพิ่มปริมาณยีน *CHD* ได้ 2 แถบ คือ แถบของยีน *CHD-Z* และ *CHD-W* (Griffiths *et al.*, 1998; Kahn *et al.*, 1998; Fridolfsson and Ellegren, 1999) ซึ่งเทคนิคนี้สามารถระบุเพศของนกได้หลายชนิด เช่น นกแก้ว นกเงือก นกคุรส์โซ (Miyaki *et al.*, 1998) นกเลิฟเบิร์ด (นำดี และคณะ, 2544) นก *Nymphicus hollandicus* (Cerit and Avanus, 2007) นก *Spilornis cheela hoya* นกปรอดจีน (Chang *et al.*, 2008) เป็นต้น ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน *CHD-W* และ *CHD-Z* เพื่อการระบุเพศของนกปรอดหัวโขนจากปลายรากขน

จากเทคนิคพีซีอาร์ โดยตรวจสอบในนกที่ทราบเพศแล้วที่รวบรวมได้ในพื้นที่จังหวัดพะเยาจากเกษตรกรผู้เลี้ยงนก และในลูกนกที่ยังไม่ทราบเพศ ซึ่งสามารถนำผลที่ได้จากการศึกษานี้ไปใช้เป็นต้นแบบในการระบุเพศของนกปรอดหัวโขน และสามารถระบุเพศได้ตั้งแต่อายุยังน้อย เพื่อใช้ในการขยายพันธุ์และอนุรักษ์ต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การเก็บตัวอย่างขนนก

ทำการรวบรวมตัวอย่างนกปรอดหัวโขน (*Pycnonotus jocosus*) ท้องถิ่นที่ทราบเพศ และลูกนกที่ยังไม่ทราบเพศจากเกษตรกรผู้เลี้ยงที่มีใบอนุญาตให้สามารถครอบครองและเพาะพันธุ์ได้ในเขตพื้นที่จังหวัดพะเยา จำนวน 20 ตัว โดยเก็บขนอ่อนที่มีปลอกขน และรากขนติดมาด้วย ตัวละ 5-6 เส้น เก็บตัวอย่างขนที่ได้ไว้ในถุงพลาสติกที่สะอาด

### การเพิ่มปริมาณยีน *CHD-W* และ *CHD-Z* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

ทำการเพิ่มปริมาณยีน *CHD-W* และ *CHD-Z* ด้วยไพรเมอร์ P8 (5'CTCCAAGGATGAGRAAYTG3') และ P2 (5'TCTGCATCGCTAAATCCTTT3') (Griffiths *et al.*, 1998) จากตัวอย่างขนนกที่รวบรวมได้ โดยไม่ต้องผ่านขบวนการสกัดดีเอ็นเอ ด้วยชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป Phire Animal Tissue Direct PCR kit (Thermo Scientific, USA) โดยใช้กรรไกรผ่าตัดที่สะอาดตัดปลายรากขน ยาวประมาณ 0.5 มิลลิเมตร ใส่ลงในสารละลายที่มีปริมาตรรวม 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 2X Phire Animal Tissue PCR Buffer ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ไพรเมอร์แต่ละชนิดที่มีความเข้มข้น 10 ไมโครโมล ปริมาตรอย่างละ 2.5 ไมโครลิตร Phire Hot Start II DNA Polymerase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ Dilution protocol ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาใส่ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่มีสภาวะการควบคุมอุณหภูมิจำนวน 40 รอบ ดังนี้ อุณหภูมิ 98 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที, 52 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที (ดัดแปลงจาก Cerit and Avanus, 2007) จากนั้นทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยวิธี 2% agarose gel

electrophoresis และทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit (RBC Bioscience Corp., Taiwan)

### การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่บริสุทธิ์ของยีน *CHD-W* และ *CHD-Z* จากนกเพศเมีย และยีน *CHD-Z* จากนกเพศผู้ อย่างละ 3 ตัวอย่างไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ด้วยชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป Thermo Sequence Fluorescent Labeled Primer Cycle Sequencing kit (Amersham Pharmacia Biotech, USA) จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank โดยใช้โปรแกรม BLASTn (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Altschul *et al.*, 1990) และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHD-W* และ *CHD-Z* จากนกเพศเมีย และยีน *CHD-Z* จากนกเพศผู้ที่ได้อย่างละ 1 ตัวอย่างใส่ในฐานข้อมูล GenBank ทำการศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHD-W* และ *CHD-Z* ด้วยโปรแกรม ClustalW (Thomson *et al.*, 1994) และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม Genetyx version 5.0 (Genetyx Corp., Japan) วิธี Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean (UPGMA)

## ผลการทดลองและวิจารณ์

### การระบุเพศของนกปรอดหัวโขน

การศึกษาครั้งนี้เป็นการระบุเพศของนกปรอดหัวโขนจากขนนกโดยเทคนิคพีซีอาร์ ที่ไม่ผ่านขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอหรือการทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ เป็นการนำส่วนของปลายรากขนที่มีความยาวเพียง 0.5 มิลลิเมตร มาเพิ่มปริมาณยีน *CHD* โดยใช้ชุดวิเคราะห์สำเร็จรูป Phire Animal Tissue Direct PCR kit สามารถเพิ่มปริมาณยีนได้ในทุกตัวอย่าง แสดงว่าขนเพียงหนึ่งเส้นมีปริมาณดีเอ็นเอเพียงพอแล้วต่อการเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (อุคเดช และปิยะนันท์, 2548) นอกจากนี้แล้วยังเป็นวิธีการที่ง่าย รวดเร็ว สามารถประหยัดค่าใช้จ่ายได้ และส่งผลกระทบต่อตัวนกน้อยกว่าการใช้เลือดในการตรวจสอบ

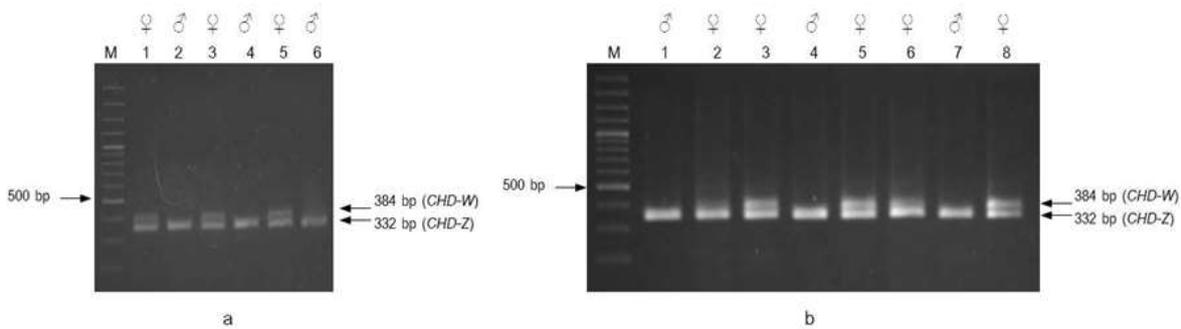
จากการตรวจสอบขนาดและลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณยีน CHD ด้วยไพรเมอร์ P8/P2 ในนกปรอดหัวโขนที่ทราบเพศแล้วจำนวน 20 ตัว พบว่านกเพศเมียมีผลผลิตพีซีอาร์ 2 แถบคือ แถบของยีน *CHD-W* ที่มีขนาด 384 คู่เบส (accession no. KM196531) และแถบของยีน *CHD-Z* ที่มีขนาด 332 คู่เบส (accession no. KM196532) ในขณะที่นกเพศผู้มีเพียงแถบเดียวเท่านั้นคือ แถบของยีน *CHD-Z* ที่มีขนาด 332 คู่เบส (accession no. KM058237) (Figure 1a) โดยทั้งนกเพศเมียและผู้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHD-Z* เหมือนกัน ซึ่งผลที่ได้ตรงกับเพศของนกที่ทราบเพศแล้ว 100 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับการระบุเพศในนกเลิฟเบิร์ดที่ทราบเพศแน่นอนด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (นำดี และคณะ, 2544) นอกจากนี้แถบทั้งสองนี้มีขนาดใกล้เคียงกับการศึกษาของ Griffiths *et al.* (1998) ที่ระบุเพศของนกชนิดต่างๆ โดยใช้ไพรเมอร์ P8/P2 ในเทคนิคพีซีอาร์คือ 396 และ 344 คู่เบส ของยีน *CHD-W* และ *CHD-Z* ตามลำดับ และการศึกษาของ Miyaki *et al.* (1998) และ Cerit and Avanus (2007) ที่ใช้ไพรเมอร์ชนิดเดียวกัน

สำหรับการระบุเพศของลูกนกที่ยังไม่ทราบเพศโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน กล่าวคือ ลูกนกเพศเมียมีผลผลิตพีซีอาร์ 2 แถบ และลูกนกเพศผู้มีเพียงแถบเดียวเท่านั้น (Figure 1b) ดังนั้นเทคนิคพีซีอาร์จึงสามารถระบุเพศของลูกนกที่ยังไม่ทราบเพศได้อย่าง

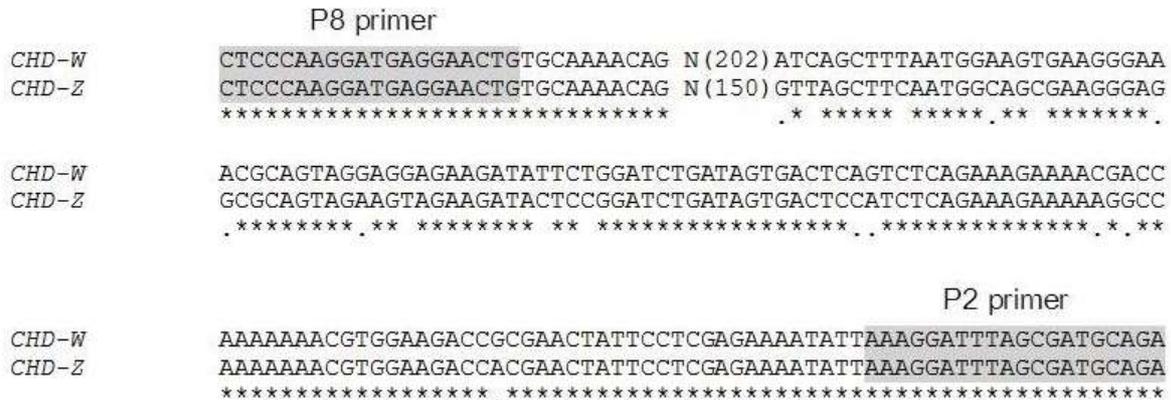
แน่นอน เนื่องจากนกทุกช่วงอายุมีสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอเหมือนกันทุกประการ ไม่ว่าจะเป็นไข่ ลูกนก หรือนกโตเต็มวัยก็ตาม และการใช้ขนนกก็ให้ผลแม่นยำมากกว่าการระบุเพศจากของเสียในเปลือกไข่และมูล (เฉลิมชาติ และคณะ, 2548) เนื่องจากในขนมีปริมาณดีเอ็นเอมากกว่า และมีการปนเปื้อนของโปรตีนน้อยกว่านั่นเอง

**การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHD-W* และ *CHD-Z***

เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHD-W* และ *CHD-Z* ของนกปรอดหัวโขนที่ได้ไปเปรียบเทียบกับความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล GenBank พบว่า มีความคล้ายคลึงกับนกปรอดจีน (*Pycnonotus sinensis*) ที่อยู่ในสกุลเดียวกันมากที่สุด โดยมีค่าความคล้ายคลึงเท่ากับ 98 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *CHD-W* และ *CHD-Z* ของนกปรอดหัวโขนด้วยโปรแกรม ClustalW พบว่า ไพรเมอร์ P8/P2 สามารถเพิ่มปริมาณยีน *CHD-W* และ *CHD-Z* ได้ในบริเวณที่ประกอบด้วย 2 แอ็กซอน และ 1 อินทรอน (Figure 2) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Griffiths *et al.* (1998) ซึ่งบริเวณของอินทรอนจะมีความยาวไม่เท่ากัน ทำให้ผลผลิตพีซีอาร์ของยีนทั้งสองนี้ยาวไม่เท่ากัน ส่งผลต่อการประสบความสำเร็จในการจำแนกเพศของนกด้วยไพรเมอร์ดังกล่าว



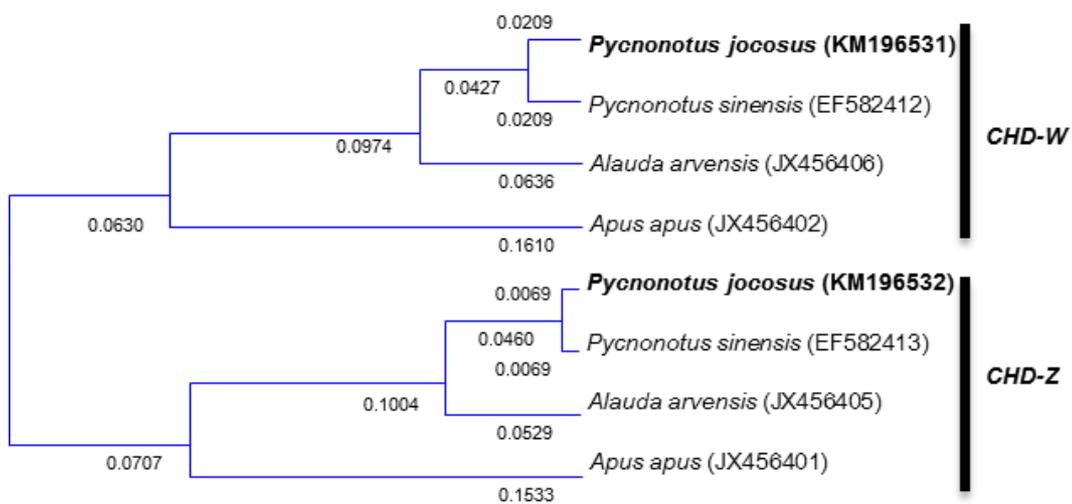
**Figure 1** Sex identification of known sex (a) and unknown sex (b) Individuals using PCR with P8/P2 primers. The PCR products were separated on a 2 % agarose gel. Female samples produced two bands (*CHD-W* and *CHD-Z*) and male samples produced one band (*CHD-Z*). One-hundred bp DNA ladder was used as marker (M).



**Figure 2** Alignment of CHD-W and CHD-Z sequences from *P. jocosus*. Accession numbers used for sequences of CHD-W and CHD-Z are KM196531 and, KM196532, respectively. Identical nucleotides are marked with asterisk (\*). The P8 and P2 primers are shown in grey highlight. The sizes of intron are shown in N (numbers).

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CHD-W และ CHD-Z ของนกปรอดหัวโขนกับนกชนิดต่างๆ จำนวน 3 ชนิด คือ นกปรอดจีน (*Pycnonotus sinensis*) นก skylark (*Alauda arvensis*) และนก common swift (*Apus apus*) โดยการสร้าง Phylogenetic tree พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CHD-W กับ CHD-Z ของนกแต่ละชนิดถูกแยกออกจากกันอย่างชัดเจน (Figure 3) เนื่องจากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ของอินทรอนนั่นเอง นอกจากนี้แล้วยังสามารถแบ่ง

นกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ นกในอันดับ Passeriformes ได้แก่ นกปรอดหัวโขน (*Pycnonotus jocosus*) นกปรอดจีน (*P. sinensis*) skylark (*A. arvensis*) และนกในอันดับ Apodiformes ได้แก่ common swift (*A. apus*) โดยนกปรอดหัวโขนและนกปรอดจีนมีความใกล้ชิดกันมากที่สุด เนื่องจากเป็นนกที่อยู่ในสกุล *Pycnonotus* เดียวกันนั่นเอง (Figure 3) ซึ่งจะเห็นได้ว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน CHD-W และ CHD-Z สามารถแบ่งกลุ่มของนกทั้ง 4 ชนิดนี้ ได้อย่างถูกต้องตามหลักอนุกรมวิธาน



**Figure 3** Phylogenetic tree of CHD-W and CHD-Z nucleotide sequences from four bird species constructed by UPGMA method. The sequences from common swift (*Apus apus*) were used as an outgroup.

จากผลของการศึกษานี้ จะเห็นได้ว่าการเพิ่มปริมาณยีน *CHD* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสูงที่ใช้ในการระบุเพศจากปลายรากขนของนกปรอดหัวโขนทั้งนกโตเต็มวัยและลูกนกที่ยังไม่ทราบเพศ โดยนกเพศเมียจะมีผลผลิตพีซีอาร์ 2 แถบที่มีขนาด 384 และ 332 คู่เบส ในขณะที่นกเพศผู้จะมีผลผลิตพีซีอาร์เพียงแถบเดียวเท่านั้นที่มีขนาด 332 คู่เบส ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ในการระบุเพศของนกเพื่อการเพาะขยายพันธุ์และอนุรักษ์ต่อไป

### กิตติกรรมประกาศ

คณะนักวิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2555 มหาวิทยาลัยพะเยา ที่ให้การสนับสนุน และงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนานวัตกรรมการศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการกลาง และคณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

### เอกสารอ้างอิง

เฉลิมชาติ สมเกิด ขวัญเรือน ดวงสอาด ตูลยวรรธ สุธธิแพทย์ ณ์รัฐฉวี สถิตเมธี (2548) เทคนิคที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่ตัวสัตว์สำหรับการสกัดดีเอ็นเอ และการตรวจแยกเพศในนก เรื่องเติมการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43: สาขาสัตวแพทยศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์, 1–4 กุมภาพันธ์ 2548 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ น. 51–60

นำดี แซ่เฮง เฉลิมชาติ สมเกิด ดุสิต คราวะพงษ์ ปรมินทร์ วินิจฉัยกุล เพิ่มศักดิ์ วัฒนาราม ประพฤษ ตั้งมันคง (2544) การตรวจแยกเพศนกโดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction วารสารสัตวแพทย์ 11: 1–8.

สุชาติ โชคคณาพิทักษ์ วิเชียร อุดลย์ประสาทร (2544) การขยายพันธุ์นกปรอดหัวโขนเคราแดงในสภาพการเลี้ยงแบบขังกรง การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39: สาขาสัตว

สาขาสัตวแพทยศาสตร์, 5-7 กุมภาพันธ์ 2544 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ น. 257–262

อุคเดช บุญประกอบ ปิยะนันท์ ลีแก้ว (2548) การใช้ขนเป็นแหล่งดีเอ็นเอสำหรับศึกษาพันธุกรรมของสัตว์ปีก วารสารสัตวแพทย์ 15: 146–154.

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215: 403–410.

Cerit H, Avanus K (2007) Sex determination by *CHDW* and *CHDZ* genes of avian sex chromosomes in *Nymphicus hollandicus*. *Turk J Vet Anim Sci* 31: 371–374.

Chang HW, Cheng CA, Gu DL, Chang CC, Su SH, Wen CH, Chou YC, Chou TC, Yao CT, Tsai CL, Cheng CC (2008) High-throughput avian molecular sexing by SYBR green-based real-time PCR combined with melting curve analysis. *BMC Biotechnol* 8: 12 doi:10.1186/1472-6750-8-12

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

Griffiths R, Double MC, Orr K, Dawson RJG (1998) A DNA test to sex most birds. *Mol Ecol* 7: 1071–1075.

Kahn NW, John JS, Quinn TW (1998) Chromosome-specific intron size differences in the avian *CHD* gene provide an efficient method for sex identification in birds. *The Auk* 115: 1074–1078.

Miyaki CY, Griffiths R, Orr K, Nahum LA, Pereira SL, Wajntal A (1998) Sex identification of parrots, toucans, and curassows by PCR: Perspectives for wild and captive population studies. *Zoo Biol* 17: 415–423.

Thomson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22: 4673–4680.