

Research Article

การแยกเพศนกสวยงามจากขนด้วยวิธีพีซีอาร์

Sex Identification of Beautiful Birds from Feathers by PCR Method

กิตติกร ไกรเทพ ปณิก หมวดทองอ่อน และ อุมพร ขิมมากทอง *

Kittikorn Kraithep, Panik Muadthongon and Umaporn Khimmakthong *

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช อำเภอทุ่งใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช 80240

Faculty of Veterinary Science, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Nakhon Si Thammarat Campus, Thung-Yai, Nakhon Si Thammarat 80240, Thailand.

ABSTRACT

Article history:

Received: 2023-01-12

Revised: 2024-08-07

Accepted: 2025-06-20

Keywords:

sex-identification;

bird;

feathers;

PCR

PCR is an accurate and effective method for sex identification of young birds. However, extracting DNA from birds' blood samples can cause stress and injury to the birds. Using feathers instead of blood for DNA extraction is a more convenient and safer alternative for birds. When comparing DNA extraction from blood and chicken feathers, DNA from feathers was found to be as effective as that from blood in amplifying DNA using PCR. Sex identification was performed by extracting DNA from their feathers and used two pairs of primers, P2-P8 and 2550F-2718R, specific to the CHD gene in birds, with the 18s rRNA gene primer as a control. The results showed that the P2-P8 primer pair could only be used to identify the sexes of Sun Conure parrots. Female sun conures have a DNA band of approximately 350 base pairs corresponding to the CHD gene. The 2550F-2718R primer pair can be used to identify the sexes of both Sun Conures and Green Cheek Normal parrots. The female Sun Conure parrot has a DNA band of the CHD gene measuring approximately 650 base pairs, and the female Green Cheek Normal parrot has a DNA band of the CHD gene measuring approximately 450 base pairs.

© 2025 Kraithep, K., Muadthongon, P. and Khimmakthong, U. Recent Science and Technology published by Rajamangala University of Technology Srivijaya

* Corresponding author.

E-mail address: tal_biot@hotmail.com

Cite this article as:

Kraithep, K., Muadthongon, P. and Khimmakthong, U. 2025. Sex-Identification of Beautiful Bird from Feathers by PCR Method. **Recent Science and Technology** 17(3): 257545.

บทคัดย่อ

พีซีอาร์เป็นวิธีการแยกเพศนกอายุที่น้อยที่แม่นยำและมีประสิทธิภาพ แต่การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดของนกทำให้เกิดความเครียดและบาดเจ็บ การใช้ขนแทนการใช้เลือดในการสกัดดีเอ็นเอจึงเป็นทางเลือกที่สะดวกและปลอดภัยต่อขนมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดและขนไก่ พบว่าดีเอ็นเอจากขนมีประสิทธิภาพในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ได้ดีไม่ต่างจากเลือด และเมื่อทำการตรวจเพศของนกโดยสกัดดีเอ็นเอจากขน และใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ P2-P8 และ 2550F-2718R ที่จำเพาะต่อยีน CHD ในนก โดยมีไพรเมอร์ของยีน 18s rRNA เป็นไพรเมอร์ควบคุม ผลการทดลองพบว่าไพรเมอร์ P2-P8 สามารถใช้แยกเพศของนกแก้วชันคอเนอร์ได้เท่านั้น โดยนกแก้วชันคอเนอร์เพศเมียเกิดแถบดีเอ็นเอของยีน CHD ขนาดประมาณ 350 คู่เบส ในขณะที่ไพรเมอร์ 2550F-2718R สามารถใช้แยกเพศได้ทั้งนกแก้วชันคอเนอร์และนกแก้วกรีนชัตนอมอล โดยนกแก้วชันคอเนอร์เพศเมียเกิดแถบดีเอ็นเอของยีน CHD ขนาดประมาณ 650 คู่เบส และนกแก้วกรีนชัตนอมอลเพศเมียเกิดแถบดีเอ็นเอของยีน CHD ขนาดประมาณ 450 คู่เบส

คำสำคัญ: การแยกเพศ, นก, ขน, พีซีอาร์

1. บทนำ

ปัจจุบันนกสวยงามหลายชนิดเป็นสัตว์เลี้ยงที่ได้รับความนิยมอย่างกว้างขวางในประเทศไทย การแยกเพศนกสวยงามเป็นสิ่งสำคัญในการบริหารจัดการประชากรนก การเพาะพันธุ์ และการทำวิจัยด้านชีววิทยา เนื่องจากนกหลายชนิดในช่วงอายุน้อยจะมีลักษณะภายนอกที่คล้ายคลึงกันระหว่างเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งทำให้การแยกเพศด้วยการสังเกตลักษณะภายนอกเป็นเรื่องยาก ดังนั้นการใช้เทคนิคที่แม่นยำและมีประสิทธิภาพในการแยกเพศจึงเป็นสิ่งจำเป็น วิธีการแยกเพศนกนั้นสามารถทำได้หลายวิธีการ เช่น จากการสังเกตจากลักษณะภายนอก (Reynolds *et al.*, 2008) การคลำตรวจลักษณะทางกายวิภาคของช่องเชิงกรานและทวารรวม นอกจากนี้วิธีการตรวจแยกเพศนกที่ได้รับความนิยมในปัจจุบันคือ การใช้กล้องส่องตรวจอวัยวะเพศผ่านทางช่องท้อง (Divers, 2015) และ การใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล เช่น การวิเคราะห์ดีเอ็นเอ เป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูงและเป็นที่นิยมมากที่สุดในปัจจุบัน (Jensen *et al.*, 2003) ไพรเมอร์ที่นิยมใช้และมีรายงานความสำเร็จมากมายคือ ไพรเมอร์ P2-P8 และ 2550F-2718R โดยมีรายงานการใช้ไพรเมอร์ 2 คู่นี้ในการตรวจเพศตัวอย่างนก 58 สายพันธุ์ พบว่าประสบความสำเร็จในนก 50 สายพันธุ์ (Vucicevic *et al.*, 2013) นอกจากนี้ ในการตรวจเพศตัวอย่างนก 70 สายพันธุ์ พบว่า ไพรเมอร์ 2550F-2718R ประสบความสำเร็จในนก 49 สายพันธุ์ และไพรเมอร์ P2-P8 ประสบความสำเร็จในนก 46 สายพันธุ์ (Çakmak *et al.*, 2017) แต่ยังไม่มียานงานการใช้ไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่นี้ในนกแก้วชันคอเนอร์ และนกแก้วกรีนชัตนอมอล

วิธีการตรวจจากการสังเกตลักษณะภายนอกและทางกายวิภาคให้ผลไม่แม่นยำนัก และสามารถตรวจได้เมื่อสัตว์ปีกเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ ในสัตว์อายุน้อยแม้จะมีการตรวจด้วยกล้องส่องตรวจอวัยวะเพศผ่านทางช่องท้องหรือการใช้เลือดในการตรวจด้วยวิธีพีซีอาร์ แต่การตรวจด้วยวิธีเหล่านี้ส่งผลกระทบต่อร่างกายสัตว์และความเจ็บปวดของสัตว์ ดังนั้นหากสามารถหาวิธีการอื่น ๆ เพื่อแยกเพศสัตว์ปีกโดยลดความเจ็บปวด และผลกระทบอื่น ๆ ต่อตัวสัตว์ปีกได้ จะเป็นวิธีการที่ดีสอดคล้องต่อหลักสวัสดิภาพสัตว์ และหาก

สามารถตรวจแยกเพศในช่วงอายุที่ยังน้อยได้ วิธีการนี้อาจเป็นทางเลือกที่น่าสนใจทางหนึ่ง (TehSwee and Kumaran, 2010) ในอดีตการแยกเพศนกโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลมักจะสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดของนก ซึ่งมีขั้นตอนการเก็บตัวอย่างที่ซับซ้อนและต้องใช้ความระมัดระวังสูงเพื่อไม่ให้เกิดความเครียดหรือบาดเจ็บ (Jensen *et al.*, 2003) อย่างไรก็ตาม การใช้ขนแทนการใช้เลือดในการสกัดดีเอ็นเอเพื่อการแยกเพศนกเป็นทางเลือกที่สะดวกและปลอดภัยมากกว่า เนื่องจากการเก็บตัวอย่างขนนั้นง่ายและไม่เป็นอันตรายต่อนก (Harvey *et al.*, 2006)

เทคนิคการสกัดดีเอ็นเอจากขนเพื่อนำมาใช้ในการแยกเพศนกโดยวิธี PCR ได้รับการพัฒนาและปรับปรุงให้มีประสิทธิภาพและความแม่นยำสูง การใช้ไพรเมอร์ที่เฉพาะเจาะจงกับยีนเพศของนกจะช่วยให้การระบุเพศของนกได้อย่างถูกต้องและรวดเร็ว (Horváth *et al.*, 2005) ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการตรวจเพศของนกโดยสกัดดีเอ็นเอจากขน และใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ คือ P2-P8 และ 2550F-2718R ที่จำเพาะต่อยีน CHD ในนก โดยมีไพรเมอร์ของยีน 18s rRNA เป็นไพรเมอร์ควบคุม

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

ไก่ไข่ม้วนแม่พันธุ์ อีซ่าบราวน์ (ISA Brown) จากสาขาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย จ.นครศรีธรรมราช จำนวน 3 คู่ (ตัวผู้ 3 ตัว ตัวเมีย 3 ตัว) และนกแก้วจากชมรมกลุ่มนกบินอิสระ จ.ตรัง จำนวน 2 คู่ ประกอบด้วย นกแก้วชันคอเนอร์ (*Aratinga solstitialis*) ตัวผู้ 1 ตัว ตัวเมีย 1 ตัว และนกแก้วกรีนชัตนอมอล (*Pyrrhura molinae*) ตัวผู้ 1 ตัว ตัวเมีย 1 ตัว การดำเนินการกับสัตว์ในงานวิจัยนี้เป็นไปตามพระราชบัญญัติสัตว์เพื่อนงานทางวิทยาศาสตร์ พ.ศ. 2558 ภายใต้การควบคุมของสัตวแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ

2.2 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้มีทั้งหมด 3 คู่ ได้แก่ 18s rRNA, P2-P8 และ 2550F-2718R ดังแสดงใน Table 1 ออกแบบ

Table 1 Primers for sex-identification used in this study.

Target genes	Primer sequence (5'-3')	T _m (°C)	PCR products size (bp)	Reference
18s rRNA	18s rRNA avian-F: TTTCTCGATTCCGTGGGTGG	59.4	208	This study
	18s rRNA avian-R: CCCGGACATCTAAGGGCATC	61.4		
CHD	P2: TCTGCATCGCTAAATCCTTT	53.2	species dependent	Griffiths <i>et al.</i> , 1998
	P8: CTCCCAAGGATGAGRAAYTG	57.3		
CHD	2550F: GTTACTGATTCTGTCTACGAGA	55.9	species dependent	Fridolfsson and Ellegren, 1999
	2718R: ATTGAAATGATCCAGTGCTTG	54.0		

ไพรเมอร์ 18s rRNA โดยใช้ยีน *Columba livia* 18S ribosomal RNA (GenBank no. AF173630.1) ออกแบบด้วยโปรแกรมออนไลน์ Primer Blast และพิจารณาการเกิด self-complementary จะใช้โปรแกรมออนไลน์ oligonucleotide properties calculator ซึ่งไพรเมอร์ที่สามารถนำไปใช้ได้จะต้องไม่เกิด self-complementary ไพรเมอร์ 18s rRNA ใช้เป็นไพรเมอร์ควบคุม เพื่อยืนยันว่าดีเอ็นเอที่สกัดมาได้มีคุณภาพที่ดี ทุกตัวอย่างที่นำมาทดสอบจะต้องมีแถบดีเอ็นเอของ 18s rRNA เกิดขึ้นเสมอ

2.3 การเก็บตัวอย่างเลือดและขน

เก็บเลือดไก่จากเส้นเลือดดำใหญ่ใต้ปีก (brachial vein) โดยใช้เข็มขนาด 25G ก่อนเจาะเลือดใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์ทาผิวหนังเหนือเส้นเลือด เพื่อเป็นการฆ่าเชื้อที่ผิวหนัง และช่วยทำให้เส้นเลือดขยายใหญ่ขึ้น วางเข็มเป็นมุมเฉียงเล็กน้อยตรงตำแหน่งที่จะเจาะ หายปลายเข็มขึ้นแทงเขี่ยออกจากหัวใจ เข้าสู่เส้นเลือดและดูดเลือดออกมาช้า ๆ จนได้เลือดปริมาณ 0.5-1 มล. ดึงเข็มออกและกดห้ามเลือด นำเลือดใส่ในหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การทดลองในไก่ทำเพื่อเปรียบเทียบว่าการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดและขนจะให้ผลการทดลองออกมาเหมือนหรือต่างกัน เพื่อบ่งชี้ว่าจะสามารถใช้แทนการใช้เลือดสำหรับการตรวจเพศในไก่ได้หรือไม่

เก็บขนไก่และขนนกโดยดึงขนจากบริเวณปลายปีก สวมถุงมือปลอดเชื้อทุกครั้ง เก็บขนตัวละ 2-3 เส้น (เลือกใช้เฉพาะเส้นที่มีตุ่มเซลล์ขนเท่านั้น) ใส่ถุงซิปล็อคและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.4 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดและขน

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดและขนจะใช้วิธีเดียวกัน คือใช้ชุดสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอสำเร็จรูป (New England Biolabs, UK) โดยขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างให้เติมบัฟเฟอร์สกัด 200 ไมโครลิตร ลงในตัวอย่าง แล้วนำมาบดด้วยแท่งบดพลาสติกเป็นเวลา 10 วินาที แล้วดูดสารละลายตัวอย่างใส่ลงในหลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอโดยเติม

Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง Vortex นาน 30 วินาที จากนั้นนำไปบ่มใน water bath อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วย้ายส่วนใสไปยังหลอดใหม่ เติมน้ำละลาย RNase A ลงไป แล้วบ่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที เติมน้ำ binding solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน และบ่มใน water bath อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำ ethanol 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงย้ายตัวอย่างลงใน spin column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ทั้งส่วนที่ผ่านตัวกรอง แล้วเติมน้ำ binding solution ปริมาตร 300 ไมโครลิตร ไปยัง spin column แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ทั้งส่วนที่ผ่านตัวกรอง แล้วเติมน้ำ wash solution ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที (ทำซ้ำอีกครั้ง) ทั้งส่วนที่ผ่านตัวกรอง แล้วปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อกำจัดเอทานอลที่ตกค้าง จากนั้นให้ย้าย spin column ไปยังหลอดใหม่ และเติมน้ำ Elution solution ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และรอ 2 นาที (ให้ความร้อน Elution solution 60-70 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาใช้) นำตัวอย่างปั่นเหวี่ยงที่ 14,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ซึ่งจะได้น้ำดีเอ็นเอออกมา และวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop แล้วนำดีเอ็นเอเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

2.5 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์

เตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอสำหรับการทำพีซีอาร์ โดยใช้ TopTaq Master Mix Kit (QIAGEN, Germany) ในหลอดปฏิกิริยา 12.5 ไมโครลิตร ประกอบด้วย Toptaq Master Mix (2X) 6.25 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ F (10 µM) 0.5 ไมโครลิตร ไพรเมอร์ R (10 µM) 0.5 ไมโครลิตร CoralLoad Concentration (10X) 1.25 ไมโครลิตร และดีเอ็นเอต้นแบบ 4 ไมโครลิตร สำหรับ Negative control ให้เติมน้ำ DPC water 4 ไมโครลิตร แทนดีเอ็นเอ จากนั้นนำหลอดพีซีอาร์ใส่ลงในเครื่องพีซีอาร์ (FlexCycler²) เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยตั้งค่าโปรแกรมตามโปรโตคอลของไพรเมอร์แต่ละคู่ โดยใช้อุณหภูมิช่วง annealing ที่แตกต่างกันคือ 55, 50 และ 50 องศาเซลเซียส สำหรับไพรเมอร์ 18s rRNA, P2-P8 และ 2550F-

2718R ตามลำดับ สภาวะพีซีอาร์ที่ใช้คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที อุณหภูมิ annealing เป็นเวลา 45 วินาที และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 40 รอบ และอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ไปรันเจล (agarose gel electrophoresis) โดยใช้เจลความเข้มข้น 1.5% ภายใต้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

2.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองจะแสดงในรูปของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์เทียบกับ 100 bp markers โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของไพรเมอร์ P2-P8 และ 2550F-2718R จะถูกนำมารันในเจลหลุมเดียวกันกับผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของไพรเมอร์ 18s rRNA (ทำแยกหลอดปฏิกิริยากันเนื่องจากไพรเมอร์แต่ละคู่มีค่า T_m ต่างกัน แต่นำมารันเจลด้วยกัน) เพื่อให้สามารถวิเคราะห์ผลได้ง่ายขึ้น

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

3.1 การทดสอบไพรเมอร์ 18s rRNA ในเลือดไก่ ขนไก่ และขนนก

เมื่อทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอนแบบที่สกัดจากขนไก่และเลือดไก่ พบว่าได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 208 คู่เบส เหมือนกันในทุกตัวอย่าง บ่งชี้ว่าการใช้ขนแทนการใช้เลือดในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์นั้นทำได้ และเมื่อทำการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอนแบบที่สกัดจากขนนก ก็ได้แถบดีเอ็นเอขนาดประมาณ 208 คู่เบส เช่นเดียวกัน (Figure 1) แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ไพรเมอร์ 18s rRNA เป็นไพรเมอร์ควบคุมสำหรับการตรวจเพศในการทดลองต่อไปได้

การใช้ไพรเมอร์ 18s rRNA เป็นไพรเมอร์ควบคุมนั้นมีความจำเป็น เนื่องจากหากในสปีชีส์ของนกที่นำมาตรวจเพศให้ผลการทดสอบไปในแนวทางที่เพศหนึ่งขึ้นแถบดีเอ็นเอของยีน CHD ส่วนอีกเพศไม่ขึ้น การที่มีแถบดีเอ็นเอของ 18s rRNA ก็จะช่วยยืนยันว่าผลการตรวจเพศนี้มีความน่าเชื่อถือ การที่แถบดีเอ็นเอของ CHD ไม่ขึ้นนั้นเป็นความจริง ไม่ได้เกิดจากคุณภาพของดีเอ็นเอที่ไม่ดี ดังนั้นในทุกตัวอย่างที่ทดสอบจะต้องมีแถบดีเอ็นเอของ 18s rRNA เสมอ ส่วนแถบดีเอ็นเอของ CHD นั้นจะขึ้นหรือไม่ก็ได้ ขึ้นอยู่กับเพศและสปีชีส์ของนกที่นำมาทดสอบ

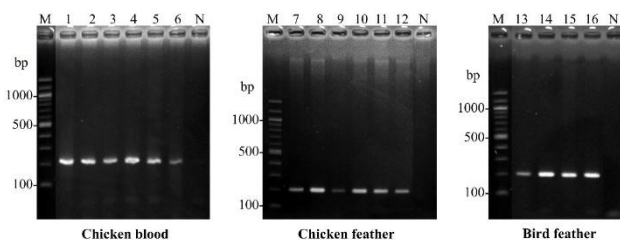


Figure 1 PCR product, approximately 208 base pairs, of the primer 18s rRNA in chicken blood, chicken feather, and bird feather samples. M: 100 bp markers, 1-3, 7-9: male chickens, 4-6, 10-12: female chickens, 13: male Sun Conure parrot, 14: male Green Cheek Normal parrot, 15: female Sun Conure parrot, 16: female Green Cheek Normal parrot and N: negative control.

3.2 การตรวจเพศนกด้วยไพรเมอร์ P2-P8 โดยใช้ขน

นกแก้วชั้นคอนัวร์ และนกแก้วกรีนชีคโนมอล ทั้งสองสายพันธุ์อยู่ในวงศ์ *Psittacidae* ซึ่งเป็นวงศ์ของนกแก้วที่มีความหลากหลายมากที่สุดและกระจายอยู่ทั่วโลก นกแก้วในวงศ์นี้มีลักษณะร่วมกันหลายประการ เช่น จะงอยปากโค้งแข็งแรง ขนสีสดใส และนิ้วเท้าที่เรียกว่า zygodactylous (สองนิ้วหน้า สองนิ้วหลัง) นกทั้งสองชนิดอยู่ในสกุล *Aratinga* ซึ่งบ่งบอกว่าทั้งสองสายพันธุ์นี้มีบรรพบุรุษร่วมกันและมีความใกล้ชิดกันในเชิงวิวัฒนาการ (Ribas and Miyaki, 2004)

P2-P8 และ 2550F-2718R เป็นไพรเมอร์ที่ออกแบบมาให้จำเพาะกับยีน chromo-helicase-DNA binding (CHD) เหมือนกัน โดยที่ยีน CHD พบได้ทั้งบนโครโมโซม Z (CHD-Z) และโครโมโซม W (CHD-W) แตกต่างกันที่ความยาวบริเวณ intron ของยีน CHD ระหว่างโครโมโซม Z (CHD-Z) กับโครโมโซม W อีกทั้งนกแต่ละสปีชีส์ก็มี ลำดับเบสและความยาวของยีน CHD ที่แตกต่างกัน ดังนั้นขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากไพรเมอร์ทั้ง 2 คู่จึงแตกต่างกันไปตามสปีชีส์ของนก (species dependent) (Poeaim *et al.*, 2012)

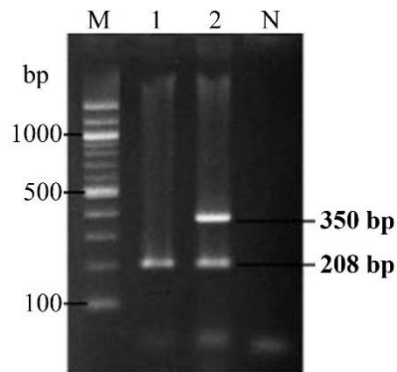


Figure 2 PCR product of primer 18s rRNA and P2-P8 in feather samples of Sun Conure parrot. M: 100 bp markers, 1: male Sun Conure parrot, 2: female Sun Conure parrot and N: negative control.

จากการทดสอบไพรเมอร์ P2-P8 ในนกแก้วชันคอเนอร์ และนกแก้วกรีนชีคโนมอล พบว่าไพรเมอร์ P2-P8 สามารถแยกเพศของนกแก้วชันคอเนอร์ได้เท่านั้น ไม่สามารถแยกเพศของนกแก้วกรีนชีคโนมอลได้ (ไม่มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น) โดยนกแก้วชันคอเนอร์เพศผู้ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอของยีน CHD ส่วนนกแก้วชันคอเนอร์เพศเมียเกิดแถบดีเอ็นเอของยีน CHD ขนาดประมาณ 350 คู่เบส และมีแถบดีเอ็นเอของยีนควบคุม (18s rRNA) ขนาด 208 คู่เบสในทั้งสองตัวอย่าง (Figure 2) ขณะที่ในนกแก้วกรีนชีคโนมอลไม่เกิดแถบดีเอ็นเอของยีน CHD ทั้งเพศผู้และเพศเมีย มีเพียงแถบดีเอ็นเอของยีน 18s rRNA เท่านั้น (Figure 3) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ P2-P8 มีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อการตรวจเพศนกแก้วชันคอเนอร์เท่านั้น แต่ไม่สามารถใช้กับนกแก้วกรีนชีคโนมอลได้ สาเหตุที่เป็นไปได้คือความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์นกแก้วที่ทำให้ไพรเมอร์ P2-P8 ไม่สามารถจับกับดีเอ็นเอของนกแก้วกรีนชีคโนมอลได้ ความจำเพาะเจาะจงอาจเป็นข้อจำกัดในการใช้ไพรเมอร์ P2-P8 สำหรับการตรวจเพศในนกแก้วชนิดอื่น ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Oktanella (2019) ที่ศึกษาการตรวจเพศนกเกาะคอนและนกแก้วจากชนก 13 ตัวอย่าง จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนยีน CHD ด้วยไพรเมอร์ P2 และ P8 ซึ่งเป็นไพรเมอร์สากลสำหรับการตรวจเพศด้วยดีเอ็นเอ ผลการศึกษาพบว่า เพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายได้สำเร็จในทุกตัวอย่าง ขนาดแถบดีเอ็นเอที่ได้อยู่ในช่วง 365-500 คู่เบส โดยเพศผู้ปรากฏแถบเดียว เพศเมียปรากฏแถบคู่ ความแตกต่างในผลการทดสอบอาจเกิดจากความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์นกแก้วชันคอเนอร์และนกที่ศึกษาโดย Oktanella การที่เพศผู้ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ และเพศเมียปรากฏเพียง 1 แถบในนกแก้วชันคอเนอร์อาจบ่งบอกถึงความแตกต่างในโครงสร้างยีน CHD ระหว่างสายพันธุ์เหล่านี้ ไพรเมอร์ P2-P8 เป็นไพรเมอร์สากลที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการตรวจเพศนก แต่ผลการทดสอบที่แตกต่างกันระหว่างการศึกษาสองครั้งนี้อาจบ่งชี้ว่า การเลือกใช้

ไพรเมอร์ควรพิจารณาสายพันธุ์ของนกด้วย โดยเฉพาะเมื่อมีความแตกต่างทางพันธุกรรมที่อาจส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของยีนเป้าหมาย

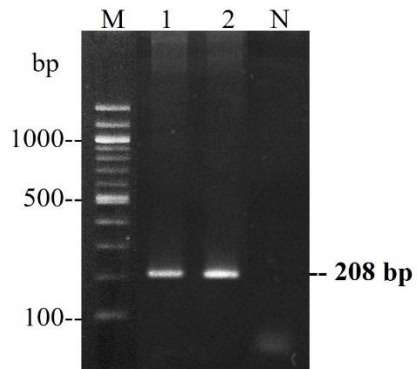


Figure 3 PCR product of primer 18s rRNA and P2-P8 in feather samples of Green Cheek Normal parrot. M: 100 bp markers, 1: male Sun Conure parrot, 2: female Sun Conure parrot and N: negative control.

3.3 การตรวจเพศนกด้วยไพรเมอร์ 2550F-2718R โดยใช้ขน

จากการทดสอบไพรเมอร์ 2550F-2718R ในนกแก้วชันคอเนอร์พบว่า นกแก้วชันคอเนอร์เพศผู้ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอของยีน CHD ส่วนนกแก้วชันคอเนอร์เพศเมียเกิดแถบดีเอ็นเอของยีน CHD ขนาดประมาณ 650 คู่เบส และมีแถบดีเอ็นเอของยีนควบคุม (18s rRNA) ขนาด 208 คู่เบส ในทั้งสองตัวอย่าง (Figure 4) ไพรเมอร์ 2550F-2718R สามารถแยกเพศของนกแก้วชันคอเนอร์ได้อย่างชัดเจน โดยพบแถบดีเอ็นเอของยีน CHD ขนาด 650 คู่เบสในนกเพศเมียเท่านั้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยก่อนหน้านี้ที่ระบุว่ายีน CHD เป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมเพศของนกและมีความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมีย (Çakmak *et al.*, 2017) ความแตกต่างนี้เกิดจากการที่เพศเมียของนกมีโครโมโซม ZW ในขณะที่เพศผู้มีโครโมโซม ZZ ทำให้สามารถใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะเจาะจงกับยีน CHD ในการแยกเพศได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การใช้ไพรเมอร์ของยีน 18s rRNA เป็นไพรเมอร์ควบคุมในการทดลองนี้ ช่วยยืนยันความถูกต้องของการสกัดและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เนื่องจากพบแถบดีเอ็นเอขนาด 208 คู่เบสในตัวอย่างทั้งเพศผู้และเพศเมีย แสดงให้เห็นว่ากระบวนการ PCR ทำงานได้อย่างถูกต้องและเชื่อถือได้ การใช้ไพรเมอร์ควบคุมนี้เป็นขั้นตอนสำคัญในการตรวจสอบคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดและกระบวนการ PCR เอง

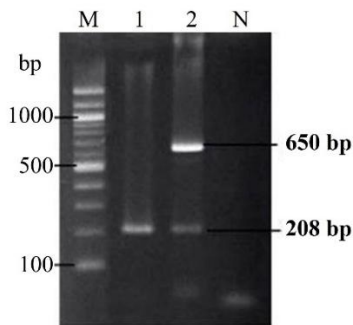


Figure 4 PCR product of primer 18s rRNA and 2550F-2718R in feather samples of Sun Conure parrot. M: 100 bp markers, 1: male Sun Conure parrot, 2: female Sun Conure parrot and N: negative control.

จากการทดสอบไพรเมอร์ 2550F-2718R ในนกแก้วกรีนชีคอนมอล พบว่านกแก้วกรีนชีคอนมอลเพศผู้ไม่เกิดแถบดีเอ็นเอของยีน CHD ส่วนนกแก้วกรีนชีคอนมอลเพศเมียเกิดแถบดีเอ็นเอของยีน CHD ขนาดประมาณ 450 คู่เบส และมีแถบดีเอ็นเอของยีนควมคุม (18s rRNA) ขนาด 208 คู่เบส ในทั้งสองตัวอย่าง (Figure 5) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Vucicevic *et al.* (2013) ที่ทำการสกัดดีเอ็นเอจากขนนก และทำการเพิ่มจำนวนยีน CHD ด้วยชุดไพรเมอร์ 2 ชุด คือ 2550F/2718R และ P2/P8 ในนก 58 สายพันธุ์ พบว่าสามารถแยกเพศนกด้วยไพรเมอร์ 2 ชุดนี้ได้ประสบความสำเร็จใน 50 สายพันธุ์ บ่งชี้ว่าไพรเมอร์ 2550F/2718R และ P2/P8 มีความแม่นยำและประสิทธิภาพสูงในการแยกเพศนกในหลายสายพันธุ์ อย่างไรก็ตาม ควรพิจารณาว่าประสิทธิภาพของไพรเมอร์อาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความหลากหลายทางพันธุกรรมของนกในแต่ละสายพันธุ์ การที่ไพรเมอร์ 2 ชุดนี้ไม่สามารถแยกเพศใน 8 สายพันธุ์ได้ แสดงให้เห็นว่ามีข้อจำกัดในการใช้ไพรเมอร์นี้กับนกบางสายพันธุ์ อาจเกิดจากความแตกต่างในลำดับยีน CHD หรือปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างทางพันธุกรรมของนกในสายพันธุ์เหล่านั้น การศึกษาเพิ่มเติมและการพัฒนาไพรเมอร์ใหม่หรือการปรับปรุงไพรเมอร์ที่มีอยู่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกเพศนกในทุกสายพันธุ์จึงเป็นสิ่งสำคัญ

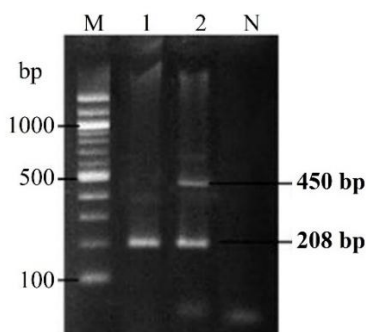


Figure 5 PCR product of primer 18s rRNA and 2550F-2718R in feather samples of Green Cheek Normal parrot. M: 100 bp

markers, 1: male Green Cheek Normal parrot, 2: female Green Cheek Normal parrot and N: negative control.

4. สรุป

เราสามารถตรวจสอบเพศนกได้อย่างมีประสิทธิภาพเช่นเดียวกับเลือด แต่สะดวกและปลอดภัยกับนกมากกว่า ไพรเมอร์ P2-P8 สามารถใช้แยกเพศของนกแก้วชันคอนัวร์ได้เท่านั้น โดยนกแก้วชันคอนัวร์เพศเมียเกิดแถบดีเอ็นเอของยีน CHD ขนาดประมาณ 350 คู่เบส ในขณะที่ไพรเมอร์ 2550F-2718R สามารถใช้แยกเพศได้ทั้งนกแก้วชันคอนัวร์และนกแก้วกรีนชีคอนมอล โดยนกแก้วชันคอนัวร์เพศเมียเกิดแถบดีเอ็นเอของยีน CHD ขนาดประมาณ 650 คู่เบส และนกแก้วกรีนชีคอนมอลเพศเมียเกิดแถบดีเอ็นเอของยีน CHD ขนาดประมาณ 450 คู่เบส

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย และสถานที่ในการทำวิจัยคือห้องปฏิบัติการไวรัสวิทยาทางสัตวแพทย์ และห้องปฏิบัติการชีวเคมีทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช ทุ่งใหญ่

6. เอกสารอ้างอิง

- Çakmak, E., PekŞen, Ç.A. and Bilgin, C.C. 2017. Comparison of three different primer sets for sexing birds. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation** 29(1): 59-63.
- Divers, S.J. 2015. Endoscopic sex identification in chelonians and birds (psittacines, passerines, and raptors). **Veterinary Clinics of North America: Exotic Animal Practice** 18(3): 541-554.
- Fridolfsson, A.K. and Ellegren, H. 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. **Journal of Avian Biology** 30(1): 116-121.
- Griffiths, R., Double, M.C., Orr, K. and Dawson, R.J.G. 1998. A DNA test to sex most birds. **Molecular Ecology** 7(8): 1071-1075.
- 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. **Journal of Field Ornithology** 77(2): 136-140.
- Horváth, M.B., Martínez-Cruz, B., Negro, J.J., Kalmár, L. and Godoy, J.A. 2005. An overlooked DNA source for

- non-invasive genetic analysis in birds. **Journal of Avian Biology** 36: 84-88.
- 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 Biology** 22: 561-571.
- Oktanella, Y. 2019. Sex identification based on molecular marker of CHDZ and CHDW gene in some species of Indonesian birds. **Advances in Animal and Veterinary Sciences** 7(10): 844-847.
- Poeaim, S., Chobarporn, N., Weeraphan, T., Puttharak, N. and Poeaim, A. 2012. Sex identification of some parrots. **Thai Journal of Genetics** 5(2): 194-202.
- Reynolds, S.J., Martin, G.R., Wallace, L.L., Wearnand, C.P., and Hughes, B.J. 2008. Sexing sooty terns on Ascension Island from morphometric measurements. **Journal of Zoology** 274: 2-8.
- Ribas, C.C. and Miyaki, C.Y. 2004. Molecular systematics in *Aratinga* parakeets: species limits and historical biogeography in the "*solstitialis*" group, and the systematic position of *Nandayus nenday*. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 30(2004): 663-675.
- TehSwee, A. and Kumaran, J. 2010. Gender identification of domesticated chicken using a PCR-based method. **Pertanika Journal of Tropical Agricultural Science** 33(2): 329-336.
- Vucicevic, M., Stevanov-Pavlovic, M., Stevanovic, J., Bosnjak, J., Gajic, B., Aleksic, N. and Stanimirovic, Z. 2013. Sex determination in 58 bird species and evaluation of CHD gene as a universal molecular marker in bird sexing. **Zoo Biology** 32(3): 269-276.