สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การจำแนกเพศนกสวยงามด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์

Sex Identification of Pet Birds by Polymerase Chain Reaction Technology

คณะผู้วิจัย

ดร. กนกรัตน์ ศรีกิจเกษมวัฒน์

ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์

น.สพ. ชนาธิป ธรรมการ

RCH
SF
461
ก125ก

เลขทะเบียน 83654
วัน,เดือน,ปี 10 ก.ย. 2551

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กรุงเทพมหานคร 10520

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1198108

คำนำ

โครงการวิจัยเรื่องการจำแนกเพศนกสวยงามด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์นี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2550 คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าเราทหารลาดกระบัง โดยมุ่งหวังเพื่อการพัฒนาแนวทางที่สามารถตรวจเพศนกสวยงามได้อย่างถูกต้องแม่นยำ รวดเร็ว ประหยัดค่าใช้จ่าย และเพื่ออำนวยความสะดวกแก่ผู้เลี้ยงนกสวยงามในการที่ช่วยให้สามารถตรวจได้ในประเทศไม่ต้องส่งตรวจถึงต่างประเทศ

คณะผู้วิจัยยังมีโครงการศึกษาพัฒนาต่อเนื่องเพื่อให้ครอบคลุมสามารถตรวจเพศนกได้มากชนิดขึ้นโดยดำเนินการวิจัยต่อและหวังว่าผู้ที่ได้ศึกษางานวิจัยนี้จะสามารถนำไปพัฒนาต่อเพื่อประโยชน์แก่ประเทศต่อไป

คณะผู้วิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การจำแนกเพศนกสวยงามด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์

บทคัดย่อ

การตรวจสอบการแยกเพศนกสวยงามจำนวน 19 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) จากตัวอย่างเลือดของนก โดยใช้ไพรเมอร์ NP, MP และ P2 ที่ออกแบบโดยอาศัยความแตกต่างระหว่างยีน CHD1W และ CHD1Z จากการเกิด point mutation ที่บริเวณปลายด้าน 3' ของยีน CHD1W ในนกเพศเมีย ผลการทดสอบดังกล่าวให้ผลที่มีความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างเพศผู้และเพศเมียในนก Sun conure, Black-capped Conure, Hahn's Macaw, Blue & Gold Macaw, Yellow-tailed Black Cockatoo, Eastern Rosella, Red Rosella, Alexandrine Parakeet, African Ring-necked Parakeet, Green-cheeked conure, Monk Parakeet, Cockatiel และ Zebra Finch แต่ไพรเมอร์ดังกล่าวไม่สามารถแยกเพศนกอีกจำนวน 6 สายพันธุ์ได้ คือ Rainbow Lory, Red Lory, Yellow-backed Lory, Cadinal Lory , Congo African Grey และ Black Swan ดังนั้นการจำแนกเพศในนกชนิดนี้จึงจำเป็นต้องมีการทดสอบต่อไปในอนาคต จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าไพรเมอร์ดังกล่าวสามารถใช้ในการจำแนกเพศนกสวยงามบางชนิดได้ และอาจนำไปประยุกต์ใช้ในนกสวยงามชนิดอื่นต่อไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sex Identification of Pet Birds by Polymerase Chain Reaction Technology

ABSTRACT

Blood samples from many pet birds included total of 19 species were collected for sex identification by PCR – based method, the P2/NP/MP primers was based on differences in sequences between CHD1W and CHD1Z genes using 3'-terminal mismatch primer on point mutation of the female CHD1W gene. We tested this sets of primers with DNA samples extracted from a variety of these birds. The PCR amplification using the P2/NP/MP primers showed clearly different patterns of the PCR products between male and female birds of Sun conure (*Aratinga solstitialis*), Black-capped Conure (*Pyrrhura rupicola rupicola*), Hahn's Macaw (*Diopsttaca nobilis nobilis*), Blue & Gold Macaw (*Ara ararauna*), Yellow-tailed Black Cockatoo (*Clyptorhynchus funereus*), Eastern Rosella (*Platycercus spp.*), Red Rosella (*Platycercus spp.*), Alexandrine Parakeet (*Psittacula eupatria*), African Ring-necked Parakeet (*Psittacula krameri*), Green-cheeked conure (*Pyrrhura molinae*), Monk Parakeet (*Myiopsitta monachus*), Cockatiel (*Nymphicus hollandicus*) and Zebra Finch (*Taeniopygia guttata*). The results of six species included Rainbow Lory (*Trichoglossus haematodus*), Red Lory (*Eos bornea*), Yellow-backed Lory (*Lorius garrulous flavopalliatus*), Cadinal Lory (*Chalcopsitta cardinalis*), Congo African Grey (*Psittacus erithacus erithacus*) and Black Swan (*Cygnus atratus*) did not confirmed by these set of primers. The results of these six species need to be confirmed by further testing. The result clarify that the PCR method using the P2/NP/MP primers is suitable for sex identification of some pet birds. This method may possible to be applied for sexing of other psittacine bird species in the future.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....II

สารบัญ.....III

สารบัญตาราง.....V

สารบัญรูปภาพ.....VI

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2

1.3 สถานที่ดำเนินงานวิจัย.....2

1.4 ขั้นตอนการวิจัย.....2

1.5 ระยะเวลาในการวิจัย.....2

1.6 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....2

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3

2.1 นกสวยงาม.....3

2.2 การจำแนกกลุ่มและโครโมโซมเพศของสัตว์ปีก.....3

2.2.1 การจำแนกตามลักษณะที่แสดงออกภายนอกทางเพศ.....3

2.2.2 โครโมโซมเพศในสัตว์ปีก (Sex chromosome).....4

2.2.3 ยีนที่อยู่บนโครโมโซมเพศ.....4

2.3 วิธีการแยกเพศในสัตว์ปีก.....5

2.3.1 การสังเกตลักษณะทางกายภาพ (Anatomical Sign).....5

2.3.2 การตรวจกระดูกเชิงกราน (Vent sexing).....5

2.3.3 การสังเกตพฤติกรรม (Behavior Signs).....5

2.3.4 การคัดเพศโดยการตรวจดูอวัยวะภายใน.....5

2.3.5 การตรวจสอบฮอร์โมน (Steroid Sexing).....6

2.4 วิธีการแยกเพศด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา.....6

2.4.1 ดีเอ็นเอตัวอย่างและการสกัด.....6

2.4.2 เทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ใช้ในการแยกเพศ.....8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน.....13

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา.....13

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี.....14

3.2.1 อุปกรณ์.....14

3.2.2 สารเคมี.....14

3.3 วิธีการ.....15

3.3.1 การเก็บตัวอย่างเลือดนก.....15

3.3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดนก.....15

3.3.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ CHD1 ยีน.....16

3.3.4 ขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Marker).....17

3.3.5 การแยกและการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ.....18

บทที่ 4 ผลการทดลอง.....19

4.1 ผลการตรวจสอบแยกเพศนกสวยงามโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่.....19

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง.....24

บทที่ 6 สรุปและข้อเสนอแนะ.....25

บรรณานุกรม.....27

ภาคผนวก ก.....29

ภาคผนวก ข.....31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ชนิดของนกที่ใช้ในการแยกเพศ.....10

3.1 สายพันธุ์นกสวยงาม และจำนวนตัวอย่าง.....12

3.2 ไพร์เมอร์ที่ใช้สำหรับการตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณ CHD1 ยีน.....15

3.3 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์.....16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 แสดงลักษณะโครโมโซมเพศของสัตว์ปีก.....4

2.2 แสดงตำแหน่งของ CHDยีนบนโครโมโซมเพศ.....5

2.3 แสดงตำแหน่งปลายขนที่มีดีเอ็นเอ.....7

3.1 แสดงขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100bp Plus DNA Ladder.....17

4.1 ผลการตรวจพีซีอาร์ของเลือดนก Sun conure (SC), Black-capped Conure (BC), Hahn's Macaw (HM), Blue & Gold Macaw (BM) และ Yellow-tailed Black Cockatoo (YC).....20

4.2 ผลการตรวจพีซีอาร์ของเลือดนก Eastern Rosella (ER) และ Red Rosella (RR).....20

4.3 ผลการตรวจพีซีอาร์ของเลือดนก Alexandrine Parakeet (AP), African Ring-necked Parakeet (RP) และ Green-cheeked Parakeet (GP).....21

4.4 ผลการตรวจพีซีอาร์ของเลือดนก Monk Parakeet (MP), Cockatiel (Ck) และ Zebra Finch (ZF).....21

4.5 ผลการตรวจพีซีอาร์ของเลือดนก Rainbow Lory (Rb), Red Lory (RL), Yellow-backed Lory (YL) และ Cadinal Lory (CL).....22

4.6 ผลการตรวจพีซีอาร์ของเลือดนก Congo African Grey (CG).....23

4.7 ผลการตรวจพีซีอาร์ของเลือดหงษ์ Black Swan (BS).....23

ข.1 แสดงเส้นเลือดปีก (Wing vein).....32

ข.2 แสดงการใช้เข็มสะกิดบริเวณเส้นเลือดปีก.....32

ข.3 แสดงการใช้กระดาษกรองซับเลือด.....33

ข.4 แสดงการเก็บตัวอย่างเลือดใส่หลอด Eppendrof tube.....33

ข.5 แสดงตัวอย่างเลือดที่จะนำไปเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส.....34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงาน

ปัจจุบันกระแสการเลี้ยงนกสวยงามประเภทต่างๆ ได้รับความนิยมกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย ทำให้เกิดธุรกิจการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์นกสวยงามเกิดขึ้น ซึ่งปัญหาที่พบในฟาร์มนกสวยงามที่สำคัญปัญหาหนึ่งได้แก่ การตรวจแยกเพศ ซึ่งในนกสวยงามบางสายพันธุ์พบว่าลักษณะภายนอกของเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะที่คล้ายคลึงกันมาก (monomorphic bird) โดยเฉพาะในกรณีที่สัตว์มีอายุน้อยลักษณะทางเพศยังไม่ชัดเจน จึงเป็นการยากมากที่จะตรวจแยกเพศเพื่อเข้าจับคู่ผสมพันธุ์ ทำให้การเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์และการพัฒนาสายพันธุ์ (breeding) เป็นไปได้ยาก (Cerit and Avanus. 2006) เทคนิคการแยกเพศสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การสังเกตลักษณะทางกายวิภาค การจับตะเกียบ และการสังเกตพฤติกรรม ซึ่งวิธีเหล่านี้ต้องอาศัยความชำนาญและมักเกิดความผิดพลาดได้มาก นอกจากนี้ยังมีการใช้กล้อง Endoscope ซึ่งนับว่าเป็นวิธีที่ให้ผลแม่นยำ แต่จำเป็นต้องวางยาสลบและมีข้อจำกัดคือใช้ได้เฉพาะกับนกขนาดใหญ่ (ธนากร ฤทธิ์ไธสง. 2546)

จากความก้าวหน้าทางด้านอนุชีววิทยาที่ผ่านมา ได้มีการนำเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) เข้ามาใช้ในการตรวจแยกเพศในสัตว์ปีก โดยใช้ความแตกต่างของโครโมโซมเพศระหว่างเพศเมียซึ่งมีลักษณะโครโมโซมเพศเป็น ZW กับเพศผู้ที่มีลักษณะโครโมโซมเพศเป็น ZZ ซึ่งลำดับดีเอ็นเอที่ปรากฏบนโครโมโซมเพศ W ของเพศเมียนั้นมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของนก ทำให้มีความจำเพาะในการตรวจแยกเพศด้วยเทคนิค PCR-based แต่สามารถตรวจแยกเพศนกได้เฉพาะบางชนิดเท่านั้น (Itoh *et al.* 2001)

จากการค้นพบ chromo-helicase-DNA-binding protein (CHD1) ยีน ซึ่งเป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซมเพศของนกทุกชนิด ยกเว้นนกประเภทที่ไม่สามารถบินได้หรือนกในกลุ่มที่เรียกว่า ratite birds โดยยีน CHD-W นั้นจะพบอยู่บนโครโมโซม W ซึ่งจะพบเฉพาะในเพศเมียเท่านั้น ส่วนยีน CHD-Z จะพบอยู่บนโครโมโซม Z โดยสามารถพบได้ทั้งในเพศผู้และเพศเมียทำให้สามารถนำข้อแตกต่างดังกล่าว มาใช้ในการคัดแยกเพศด้วยเทคนิค PCR (Griffiths *et al.* 1998 และ Ito *et al.* 2003) ยีนดังกล่าวนี้สามารถนำมาใช้ในการคัดแยกเพศและมีความหลากหลายของชนิดนกได้มากขึ้น ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้นำเทคนิค PCR มาใช้ในการแยกเพศนกสวยงาม โดยวิธี amplification refractory mutation system (ARMS) ซึ่งใช้ขนาดที่แตกต่างของตำแหน่ง intron ระหว่างยีน CHD1-Z และ CHD1-W (Ito *et al.* 2003) มาประยุกต์ใช้ในการคัดแยกเพศในนกสวยงาม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 วัตถุประสงค์

1. ศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ร่วมกับการใช้วิธี CHD-based ในการตรวจแยกเพศนกสวยงาม

2. เพื่อศึกษาถึงแนวทางความเป็นไปได้ในการพัฒนาใช้ในการแยกเพศนกชนิดอื่นต่อไป

1.3 สถานที่ดำเนินงาน

ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางสัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

1.4 ขั้นตอนการวิจัย

1.4.1 เลือกและออกแบบไพร์เมอร์ที่จะนำมาใช้ในการสังเคราะห์ดีเอนเอแล้วให้ผลแตกต่างระหว่างเพศนก

1.4.2 เก็บตัวอย่างนกสายพันธุ์ต่างๆมาสกัดดีเอนเอ

1.4.3 ตรวจสอบหาสภาวะและอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์

1.4.4 วิเคราะห์ผลการทดลอง

1.5 ระยะเวลาในการดำเนินงาน

ใช้ระยะเวลาในการวิจัย 12 เดือน เริ่มตั้งแต่เดือน ตุลาคม 2549 ถึงเดือน กันยายน 2550

1.6 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถตรวจแยกเพศนกสวยงามโดยการใช้เทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ร่วมกับการใช้วิธี CHD-based ได้

2. สามารถทราบถึงแนวทางในการพัฒนาเพื่อใช้ในการแยกเพศสัตว์ปีกชนิดอื่นต่อไป

3. เพื่อนำผลการศึกษามาพัฒนาเป็นหน่วยรับตรวจเพศนกเพื่อเพิ่มแหล่งรับตรวจภายในประเทศที่มีความถูกต้องแม่นยำและประหยัดค่าใช้จ่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 นกสวยงาม

ปัจจุบันกระแสการเลี้ยงนกสวยงามประเภทต่างๆ ได้รับความนิยมกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย นกแก้วหลายชนิดได้กลายเป็นสัตว์เลี้ยงประจำบ้านของมนุษย์แทบทุกประเทศ โดยเฉพาะนกหงษ์หยก นอกจากนี้ก็มีนกกระตั้ว (Cockatoos) นกโนรี (Lories) นกเลิฟเบิร์ด (Lovebirds) นกค็อกคาทีล (Cockatiel) นกแก้วมาคอว์ นกแก้วในสกุล Psittacula, Psittacus และ Amazona และนกแก้วโลรี่คีท (Lorikeets) ในสกุล Trichoglossus มาคอว์ ทำให้เกิดธุรกิจการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์นกสวยงามเกิดขึ้นพร้อมๆ กับกระแสความนิยมเลี้ยงนกสวยงามประเภทต่างๆ

2.2 การจำแนกกลุ่มและโครโมโซมเพศของสัตว์ปีก

ในการจัดแบ่งกลุ่มนกแบบง่ายๆ จะใช้การจัดกลุ่มนกโดยอาศัยลักษณะร่วมของนกที่ปรากฏให้เห็นภายนอก สำหรับในทางวิทยาศาสตร์ นักชีววิทยาใช้หลักอนุกรมวิธาน ในการจำแนกกลุ่มและชนิดของนกเช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตทุกชนิดบนโลก โดยอาศัยหลักฐานทางการวิวัฒนาการ (Phylogeny) โดยสิ่งมีชีวิตที่มาจากสายวิวัฒนาการพวกเดียวกัน จะมีลักษณะทางอนุกรมวิธาน (Taxonomic character) เหมือนกันหรือคล้ายคลึงกัน ส่วนสิ่งมีชีวิตที่มาจากสายวิวัฒนาการต่างกันจะมีลักษณะทางอนุกรมวิธานต่างกัน ปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้จัดหมวดหมู่ของนกขึ้นใหม่ ซึ่งเป็นการจัดหมวดหมู่ทางชีวเคมี (Biochemical Classification) โดยนำผลจากการวิเคราะห์ยีน (gene) คือ DNA ของนกชนิดต่างๆ มาเปรียบเทียบกัน จนทำให้ทราบถึงวิวัฒนาการของ DNA ของนกชนิดต่างๆ และทำให้ทราบถึงความใกล้ชิดหรือห่างไกลของเชื้อสายนกชนิดต่างๆ ด้วย (สมาคมอนุรักษ์นก และธรรมชาติ แห่งประเทศไทย. 2550)

2.2.1 การจำแนกตามลักษณะที่แสดงออกภายนอกทางเพศ

การจำแนกลักษณะทางเพศตามลักษณะที่แสดงออกในนกสวยงาม สามารถแบ่งได้เป็นสองกลุ่มคือ dimorphic และ monomorphic

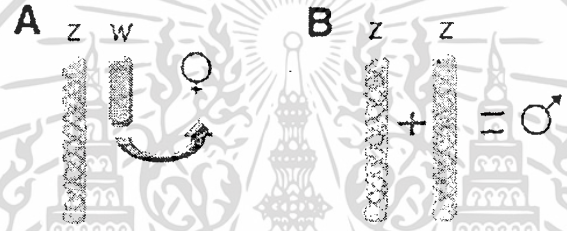
Dimorphic เป็นกลุ่มที่มีลักษณะภายนอกสามารถแยกเพศผู้และเพศเมียออกจากกันได้ โดยดูจากลักษณะที่แตกต่างกันของลักษณะสีขนหรือลักษณะรูปแบบของปีกที่แตกต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น นกในกลุ่ม Cockatiels โดยประเภท Lutino ในเพศผู้จะพบมีสีเทา และเพศผู้ในประเภท Albino จะพบว่าบริเวณปลายปีกล่างจะมีสีเหลืองบาร์ ส่วนในเพศเมียทั้ง Lutino และAlbino ปีกจะมีลักษณะการเรียงขนปีกที่หนาและแน่นมากกว่าทางเพศผู้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Monomorphic เป็นกลุ่มที่ลักษณะภายนอกไม่สามารถแยกเพศผู้และเพศเมียออกจากกันได้ เนื่องจากลักษณะทางกายภาพภายนอกเช่น สีขนหรือลักษณะรูปแบบของปีกไม่มีความแตกต่างกัน (Harris. 2007)

2.2.2 โครโมโซมเพศในสัตว์ปีก (Sex chromosome)

โครโมโซมเพศของสัตว์ปีกที่ควบคุมลักษณะเพศ จะมีความแตกต่างกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ โครโมโซมของสัตว์ปีกเพศผู้จะมีโครโมโซมเพศที่เหมือนกันคือ ZZ ส่วนในสัตว์ปีกเพศเมียจะมีโครโมโซมเพศที่แตกต่างกันคือ ZW (ภาพที่ 2.1) ในลักษณะการกำหนดเพศนี้ก็จะแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมด้วย โดยเซลล์อสุจิของสัตว์ปีกนั้นจะมีโครโมโซมเป็น Z โครโมโซมเหมือนกันหมด ในขณะที่ไข่ของสัตว์ปีกจะมีโครโมโซมที่แตกต่างกันคือ ครึ่งหนึ่งของไข่จะมี Z โครโมโซม ส่วนอีกครึ่งหนึ่งจะเป็น W โครโมโซม (ธนากร ฤทธิ์ไธสง. 2546)



ภาพที่2.1 ลักษณะโครโมโซมเพศของสัตว์ปีก โดยที่ A เป็นโครโมโซมของสัตว์ปีกเพศเมีย และ B เป็นโครโมโซมของสัตว์ปีกเพศผู้

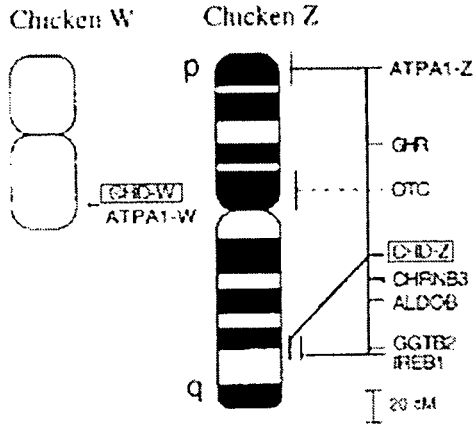
ที่มา: Ellegren (2001)

2.2.3 ยีนที่อยู่บนโครโมโซมเพศ

ยีน Chromo-helicase-DNA binding 1 หรือ CHD1 ยีน เป็นส่วนของโปรตีนอนุรักษ์ซึ่งสันนิษฐานกันว่าทำหน้าที่เป็นโครงสร้าง chromatin โดยพบว่าในหนู mouse , *Drosophila* และยีสต์มีลักษณะควบคุมเพียง homologues เดียว ส่วนในสัตว์ปีกนั้นจะมีลักษณะที่แตกต่างออกไป โดยพบว่าจะควบคุมทั้งสอง homologues

เป็นที่ทราบกันว่าในสัตว์ปีกจะมีโครโมโซมเพศอยู่ 2 แบบ โดยเพศเมียจะพบโครโมโซมเพศ ZW ส่วนเพศผู้จะปีนโครโมโซมเพศแบบ ZZ ซึ่งต่อมาได้มีการพบยีน CHD-W ในสัตว์ปีกเพศเมียบนโครโมโซมเพศ W โดยพบอยู่ตำแหน่งแขนข้างยาวของโครโมโซม W ในส่วนของยีน CHD-Z นั้น เป็นยีนที่พบบนโครโมโซมเพศ Z โดยพบได้ทั้งในสัตว์ปีกทั้งเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งตำแหน่งยีนที่พบนี้สามารถนำมาใช้เป็นประโยชน์ในการจำแนกเพศได้ (Griffiths and Korn. 1997และ Griffiths *et al.* 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่2.2 แสดงตำแหน่งของ CHD ยีนบนโครโมโซมเพศ

ที่มา: Fridolfsson *et al.* (1998)

2.3 วิธีการแยกเพศในสัตว์ปีก

2.3.1 การสังเกตลักษณะทางกายภาพ (Anatomical Sign)

การสังเกตลักษณะทางกายภาพ เป็นวิธีการแยกเพศที่ง่ายที่สุด โดยการสังเกตลักษณะที่แตกต่างกันในนกเพศผู้และเพศเมีย โดยส่วนมากแล้วลักษณะที่จะสามารถสังเกตได้ง่าย ได้แก่ ขนาดของหัวเมื่อนกโตเต็มที่ ความแตกต่างของลักษณะสีของนกซึ่งตัวผู้จะมีลักษณะสีเข้มกว่าตัวเมีย ลักษณะสรีระของร่างกายตัวผู้รูปร่างเพรียวยาวส่วนตัวเมียลักษณะค่อนข้างอ้วน บริเวณอกค่อนข้างใหญ่ ก้นย้อย เป็นต้น (ธนากร ฤทธิ์ไธสง. 2546)

2.3.2 การตรวจกระดูกเชิงกราน (Vent sexing)

การตรวจกระดูกเชิงกรานเป็นวิธีที่นิยมกันมากตั้งแต่ปี ค.ศ.1930 โดย ศาสตราจารย์ Kiyoshi Masui แห่งประเทศญี่ปุ่น และปีนวิธีที่ใช้กันมากจนถึงปัจจุบัน โดยการใช้มือจับกระดูกเชิงกรานบริเวณทวารหนัก แต่วิธีนี้จะไม่สามารถแยกได้ในขณะที่นกยังไม่โตเต็มวัย และยังต้องอาศัยความชำนาญของผู้ตรวจสอบ โดยพบว่าให้ผลความแม่นยำในการตรวจสอบอยู่ที่ 60% - 70% อย่างไรก็ตามก็ยังให้ผลที่ผิดพลาดในการแยกเพศอยู่ (Bramwell. 2003)

2.3.3 การสังเกตพฤติกรรม (Behavior Signs)

วิธีนี้เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพน้อยที่สุด เพราะพฤติกรรมของนกที่ถูกจับอยู่ด้วยกันนานอาจเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากธรรมชาติได้ ซึ่งวิธีนี้อาจสังเกตได้จาก ตัวผู้จะกระโดดเกี้ยวตัวเมีย และโก่งคอร้องเพลง แต่ก็พบว่าไม่แน่นอนเสมอไป (ธนากร ฤทธิ์ไธสง. 2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4 การคัดเพศโดยการตรวจดูอวัยวะภายใน

การคัดเพศด้วยวิธีนี้ต้องใช้วิธีพิเศษในการตรวจแยกเพศ และต้องอาศัยควเมชำนาญเป็นพิเศษจึงได้ผลที่ดี ซึ่งทำได้โดยสอดเครื่องมือตรวจเพศเข้าไปทางทวารตรวจหาอัณฑะหรือรังไข่ โดยการมองผ่านผนังลำไส้ ซึ่งทำให้มีโอกาสทำให้สัตว์ได้รับความกระทบกระเทือนได้มาก และถ้าขาดความชำนาญจะทำไห้สัตว์ที่ได้รับการตรวจเพศแล้วได้รับความบอบช้ำมาก และมีโอกาสตายได้มากด้วย (วรวิทย์ วณิชาภิชาติ. 2531)

2.3.5 การตรวจสอบฮอร์โมน (Steroid Sexing)

การคัดแยกเพศด้วยวิธีการตรวจสอบฮอร์โมนของสัตว์ปีกนี้ สามารถตรวจสอบฮอร์โมนจากสองแหล่งที่ต่างกันได้แก่ Faecal steroid sexing และ Steroid analysis in eggs

Faecal steroid sexing การคัดแยกเพศด้วยวิธีนี้เป็นการแยกเพศโดยใช้หลักการความแตกต่างของระดับฮอร์โมน estrogen และ testosterone (E และ T) ในมูลของสัตว์ปีก ซึ่งโดยปกติแล้วระดับของฮอร์โมน estrogen และ testosterone ในเพศเมียจะสูงกว่าในเพศผู้ การตรวจสอบด้วยวิธีนี้จะต้องใช้มูลสดใหม่มาใช้ในการตรวจ และในการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ความแตกต่างในเรื่องของฤดูกาลและอายุสัตว์จะมีผลต่อการตรวจสอบ เพราะพบว่าระดับของฮอร์โมนนั้นจะไม่มีความแตกต่างกันหากตรวจสอบในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ ซึ่งวิธีการนี้จะให้ผลที่ดีก็ต่อเมื่อต้องเป็นมูลของนกที่โตเต็มวัยและอยู่ในช่วงของฤดูผสมพันธุ์เท่านั้น (Cerit and Avanus, 2006)

Steroid analysis in eggs โดยวิธีการนี้จะใช้ความแตกต่างของระดับฮอร์โมนที่แตกต่างกันของเพศผู้และเมียภายในไข่ระหว่างการพัฒนาของตัวอ่อน ซึ่งระดับของฮอร์โมนจะมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นและลดลงอยู่เสมอ โดยจะทำการผลิตและได้รับมาจากตัวอ่อน การตรวจสอบวิธีนี้จะใช้การสกัดฮอร์โมนจากไข่แดง เพื่อนำมาวัดระดับของฮอร์โมนที่แตกต่างกันในไข่แดงของเพศผู้และเพศเมีย (Cerit and Avanus, 2006)

2.4 วิธีการแยกเพศด้วยเทคนิคทางอณูชีววิทยา

2.4.1 ดีเอ็นเอตัวอย่างและการสกัด

วิธีการเก็บตัวอย่างในนกเพื่อนำมาทำการตรวจแยกเพศ โดยทั่วไปการเก็บตัวอย่างมีอยู่ 2 วิธีหลัก ๆ คือ แบบที่มีการกระทำกับตัวสัตว์ (invasive) คือการเก็บตัวอย่างที่ต้องมีการจับ ควบคุมสัตว์ ได้แก่ ตัวอย่างเลือด และขน และแบบที่ไม่กระทำกับตัวสัตว์หรือที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่ตัวสัตว์ (non-invasive) คือการเก็บตัวอย่างแบบที่ไม่ต้องมีการควบคุมบังคับนก ได้แก่ ตัวอย่างปัสสาวะ มูล และของเสียในเปลือกไข่ เป็นต้น โดยในแต่ละวิธีก็พบว่ามีข้อดี – ข้อเสียที่แตกต่างกันไป ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.1.1 การสกัดดีเอ็นเอจากของเสียในเปลือกไข่และมูล

การสกัดดีเอ็นเอในวิธีดังกล่าวจะทำการเก็บของเสียจากเปลือกไข่ ภายหลังที่สัตว์ปีกฟักไข่ โดยจะทำการทำการล้างเก็บตัวอย่างของเสียในส่วนที่เป็นมูลและส่วนที่เป็นสิ่งคัดหลั่งและเลือดด้วยการใช้ก้านสำลีที่ชุบด้วย 0.9 % NaCl หรือ Phosphate Buffer Solution (PBS) ส่วนตัวอย่างปัสสาวะและมูล ทำการเก็บเช่นเดียวกับของเสียในเปลือกไข่ แต่เก็บเฉพาะส่วนที่เป็นปัสสาวะและผิวด้านนอกของมูลนก ซึ่งเป็นส่วนที่คาดว่าเป็นส่วนที่มีเซลล์เยื่อบุลำไส้ที่ลอกหลุดอยู่ โดยสามารถสกัดดีเอนเอและตรวจแยกเพศนกจากตัวอย่างได้ แต่จะมีบางตัวอย่างที่ไม่สามารถแยกเพศได้นั้น พบว่ามีการปนเปื้อนของโปรตีนในปริมาณที่มากและมีปริมาณดีเอนเอที่สกัดได้ปริมาณน้อยในขั้นตอนของการสกัดดีเอนเอในบางตัวอย่าง (เฉลิมชาติ และคณะ. 2548)

2.4.1.2 การสกัดดีเอ็นเอจากขน (Feather sexing)

การสกัดดีเอ็นเอจากขนนั้นสามารถทำเช่นเดียวกับการสกัดจากเนื้อเยื่อ ในวิธีนี้การใช้ขนที่มีขนาดเล็กและถอนออกมาใหม่ๆ นั้นจะเป็นการเหมาะสมต่อการนำเซลล์ออกมาวิเคราะห์ วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากขนนี้สามารถทำได้ยากเพราะจะมีเพียงส่วนปลายขนเท่านั้นที่จะมีส่วนประกอบของดีเอ็นเอ ซึ่งส่วนที่อยู่ด้านนอกของขนนั้นจะเป็นผิวเซลล์ที่แก่ ส่วนภายในนั้นจึงจะเป็นเซลล์เม็ดเลือด ในการสกัดดีเอ็นเอแต่ละครั้งนั้นจะใช้ขนบริเวณทรวงอกประมาณ 3 - 5 เส้น ซึ่งสายพันธุ์ของนกแต่ละชนิดก็จะมีขนาดของขนที่แตกต่างกันออกไป (Cerit and Avanus. 2006)

ภาพที่2.3 แสดงตำแหน่งปลายขนที่มีดีเอ็นเอ

ที่มา: Cerit and Avanus. (2006)

2.4.1.3 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือด

Dubiec และ Neubaure (2006) กล่าวไว้ว่า ในการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดของนกนั้นนิยมใช้การเจาะเลือดจากบริเวณปีก (wing vein) หรือจากขา (leg vein) ซึ่งขึ้นอยู่กับอายุของนกหรือสายพันธุ์ ตัวอย่างของเลือดที่เก็บมามักจะเติมสารป้องกันการสลายตัวของดีเอ็นเอ โดยทั่วไปจะเติม 96% ethanol, EDTA หรือ Queen's lysis buffer (10 mM Tris, 10 mM NaCl, 10 mM EDTA, 1% n-lauroylsarcosine ปรับ pH ที่ 7.5 (Seutin *et al.* 1991) ตัวอย่างเลือดที่เก็บไว้ในเอธานอลนั้นจะสามารถเก็บไว้ได้นานหลายปีที่อุณหภูมิห้อง ถ้าเป็นเลือดที่เก็บไว้ใน EDTA นั้นต้องแช่แข็งไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส หรือ -80 องศาเซลเซียส หากจะทำการสกัดดีเอ็นเอหลังจากเก็บตัวอย่างไม่นานก็

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถเก็บที่ 4 องศาเซลเซียสได้ ส่วนตัวอย่างที่เติม Queen's lysis buffer นั้นสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้ หรืออีกวิธีเป็นการใช้กระดาษ FTA® cards (Whatman International) กระดาษดังกล่าวจะมีส่วนผสมของสารเคมีเพื่อป้องกันการเติบโตของแบคทีเรียและป้องกันการสลายตัวของดีเอ็นเอด้วย โดยที่สามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องแต่ไม่สามารถเก็บไว้เป็นเวลานานได้

ในการสกัดดีเอ็นเอนั้นปัจจุบันมีวิธีการให้ลือกใช้ได้หลายวิธี รวมทั้งชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปที่มีคุณภาพสูงให้เลือกใช้มากขึ้น ซึ่งการจะเลือกใช้วิธีการใดก็ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของแต่ละห้องปฏิบัติการ

2.4.2 เทคนิคทางอณูชีววิทยาที่ใช้ในการแยกเพศ

2.4.2.1 ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase chain reaction : PCR)

ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสหรือพีซีอาร์เป็นเทคนิคที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายโดยไม่จำเป็นต้องทำให้ดีเอ็นเอดังกล่าวบริสุทธิ์ก่อน การทำพีซีอาร์คือการสังเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรสซ้ำหลาย ๆ รอบ เพื่อให้ได้ดีเอ็นเอปริมาณเพิ่มขึ้นเป็นทวีคูณ โดยอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบเป็นจุดเริ่มต้นและมีเอ็นไซม์พวก DNA polymerase ช่วยทำให้สายดีเอ็นเอยาวออกไปโดยเลือกจับเอานิวคลีโอไทด์ตัวใดตัวหนึ่งใน 4 ชนิด dATP, dGTP, dCTP, dTTP เข้ามาต่อเป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอสายต้นแบบ (template) ส่วนประกอบต่างๆ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอมีดังนี้คือ ดีเอ็นเอต้นแบบ (template DNA), thermostable DNA polymerase, deoxynucleotide, triphosphate (dNTPs) ทั้งสี่ชนิด, Oligonucleotide primer อย่างน้อย 1 คู่ และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม ปริมาณดีเอ็นเอจะเพิ่มมากขึ้นได้ ต้องอาศัยปฏิกิริยาที่ต่อเนื่องหลายๆรอบ ซึ่งแต่ละรอบจะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ

1. ขั้นตอน denaturation : เป็นขั้นตอนการทำให้ DNA สายคู่แยกเป็นสายเดี่ยว โดยอาศัยความร้อนที่อุณหภูมิประมาณ 90-95 องศาเซลเซียส

2. ขั้นตอน Primer annealing : เป็นขั้นตอนที่มีการลดอุณหภูมิลงมาที่ประมาณ 45-60 องศาเซลเซียส เพื่อให้ Primer สามารถเกาะติดกับดีเอ็นเอ ต้นแบบตรงบริเวณลำดับเบสคู่สม

3. ขั้นตอน Primer extension : เป็นขั้นตอนการขยายสายดีเอ็นเอโดยการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์เข้าที่ปลาย 3' ของ Primer แล้วมีการขยายสายดีเอ็นเอสายใหม่จากทิศทาง 5' ไป 3' โดยอาศัยเอ็นไซม์ Thermostable DNA polymerase เช่น Tag polymerase ซึ่งปกติใช้อุณหภูมิอยู่ในช่วง 70-75 องศาเซลเซียส

ถ้าพิจารณาสายดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น โดยเริ่มจากสายดีเอ็นเอต้นแบบ 1 คู่ เมื่อสิ้นสุดรอบที่ 1 จะได้สายดีเอ็นเอเป็น 2 คู่ เมื่อทำเช่นนี้หลายๆรอบของ PCR ดีเอ็นเอก็จะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ของทุกๆรอบลักษณะทวีคูณเป็น 2^n เมื่อ n เป็นจำนวนรอบของปฏิกิริยา ดังนั้นถ้าปฏิกิริยา ดำเนินไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

20 รอบ จะได้ดีเอ็นเอ 2^{20} ชุด หรือมีปริมาณของดีเอ็นเอประมาณ 1 ล้านเท่า (จริยา ชมวารี และคณะ. 2540)

Itoh *et al.* (2001) ได้นำเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) เข้ามาใช้ในการตรวจแยกเพศในสัตว์ปีก โดยใช้ความแตกต่างของโครโมโซมเพศ ระหว่างเพศเมียซึ่งมีลักษณะโครโมโซมเพศเป็น ZW กับเพศผู้ที่มีลักษณะโครโมโซมเพศเป็น ZZ โดยสามารถตรวจแยกเพศนกได้เฉพาะบางชนิดเท่านั้น

2.4.2.2 Random amplification of polymorphic DNA (RAPD)

อาร์เอพีดีปีนวิธีวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์อีกแบบหนึ่ง ซึ่งคิดค้นโดย William และคณะในปี ค.ศ. 1990 โดยใช้ไพรเมอร์ขนาด 10 นิวคลีโอไทด์เพียงชนิดเดียวเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ แล้วแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสในอะกาโรสเจล ซึ่งวิธีนี้สามารถนำมาใช้ในการศึกษาการแยกเพศ โดยใช้การคัดเลือกแบบ RAPD marker บนตำแหน่ง W โครโมโซม ซึ่งจะพบว่าสามารถเพิ่มปริมาณได้เฉพาะในเพศเมียเท่านั้น (Cerit and Avanus. 2006)

2.4.2.3 Amplified fragment length polymorphism (AFLP)

เอเอฟแอลพีเป็นวิธีการหนึ่งที่ได้มีการนำมาใช้ในการคัดแยกเพศในสัตว์ปีก โดยในปี ค.ศ. 1999 Griffiths และ Orr ได้นำวิธีการเอเอฟแอลพีนี้มาใช้ในการแยกเพศของนกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) (Cerit and Avanus, 2006)

2.4.2.4 Restriction fragment length polymorphism (RFLP)

วิธีดังกล่าวเป็นการหาความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอต่างๆ ที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ซึ่งการทำ RFLP จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดต่างๆ ได้มีการนำเทคนิคนี้มาใช้ในการคัดแยกเพศ โดยใช้ร่วมกับวิธี minisatellite และ DNA probes ใช้ในการคัดแยกเพศห่าน, นกจำพวก *Catharacta* และหงษ์ (Cerit and Avanus. 2006)

2.2.2.5 CHD-based sex identification

CHD-based sex identification เป็นที่ทราบกันว่าโครโมโซมนกมี 2 ชนิดคือ W-chromosome และ Z- chromosome โดยโครโมโซมเพศทั้งสองชนิดมี conserved gene ที่มีชื่อว่า chromo-helicase DNA binding protein 1 หรือ CHD ยีน และสามารถพบได้ในนกที่เป็นนกกลุ่มของนกที่บินได้ (non-ratite) ทุกชนิด โดย CHD ยีน พบครั้งแรกในสัตว์ปีกบนโครโมโซมเพศ W (CHD-W) และพบบนโครโมโซมเพศ Z (CHD-Z) ในเวลาต่อมา การตรวจแยกเพศนกสมัยใหม่ได้อาศัยอาศัยความแตกต่างของยีน 2 ชนิดนี้ ร่วมกับเทคนิคทางอณูชีววิทยา คือ PCR และ gel electrophoresis

Griffiths *et al.* (1998) ได้มีการทดลองการใช้วิธี PCR โดยใช้ primers เพียงคู่เดียว ซึ่งได้แก่ P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') และ P8 (5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3') ใช้ในการเพิ่มปริมาณของส่วน intron ตรงตำแหน่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

homologous ในยีนบนโครโมโซมเพศทั้งสองยีน (CHD-W และ CHD-Z) และเมื่อนำผลมาตรวจสอบด้วย gel electrophoresis พบว่า เกิดแถบจำนวนหนึ่งแถบในนกเพศผู้ที่เป็น CHD-Z ยีน ส่วนในเพศเมียพบสองแถบซึ่งเป็นในส่วนของยีน CHD-W ในการทดลองครั้งนี้ได้ทดลองแยกเพศในนกทั้งหมด 28 สายพันธุ์ โดยสามารถทำการแยกเพศได้ถึง 27 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ที่ไม่สามารถทำการแยกเพศได้แก่ นกกระจอกเทศ (*Struthio camelus*) ซึ่งสายพันธุ์ของนกที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ทั้งหมดแสดงดังตารางที่ 1

ต่อมา Hudon *et al.* (2007) ได้ทดลองทำการแยกเพศในนกสายพันธุ์ Pin-tailed Manakin *(Ilicura militaris)* โดยใช้ CHD ยีน บนตำแหน่งโครโมโซมเพศ W และ Z ของสัตว์ปีก ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็นสองส่วนคือ ส่วนที่หนึ่งนำผลผลิตที่ได้จากการทำ PCR มาทำการเช็คด้วย gel electrophoresis ทันที และส่วนที่สองทำการตัดในตำแหน่งตัดจำเพาะในส่วน intron ด้วยเอนไซม์ Hae *III* ผลการทดลองในส่วนที่หนึ่งพบว่าเพศเมียจะแสดงผลสองแถบ ส่วนเพศผู้แสดงผลเพียงหนึ่งแถบบนเจล และในส่วนของการทดลองที่สองพบว่าเมื่อทำการตัดด้วยเอนไซม์ Hae *III* แล้ว ส่วนของเพศเมียจะแสดงผลสามแถบ ส่วนเพศผู้แสดงผลสองแถบเมื่อทำการตรวจสอบด้วย gel electrophoresis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ชนิดของนกที่ใช้ในการแยกเพศ

Order	Family	Species
Struthioniformes	Struthionidae	ostrich (*Struthio camelus*)*
Galliformes	Phasianidae	domestic chicken (*Gallus domesticus*)
Anseriformes	Anatidae	mute swan (*Cygnus olor*)
Coraciiformes	Alcedinidae	laughing kookaburra (*Dacelo novaeguineae*)
	Meropidae	European bee-eater (*Merops apiaster*)
Psittaciformes	Psittacidae	Spix's macaw (*Cyanopsitta spixii*)
		crimson rosella (*Platycercus elegans*)
		glossy black-cockatoo (*Calyptorhincus lathami*)
Apodiformes	Apodidae	swift (*Apus apus*)†
Strigiformes	Strigidae	tawny owl (*Strix aluco*)†
		morepork (*Ninox novaeseelandiae*)†
Columbiformes	Columbidae	rock pigeon (*Columba livia*)
Gruiformes	Otididae	houbara bustard (*Chlamydotis undulata*)
Ciconiiformes	Burhinidae	bush stone-curlew (*Burhinus grallarius*)
	Laridae	lesser black-backed gull (*Larus fuscus*)
	Alcidae	black guillimot (*Cepphus grylle*)
	Accipitridae	marsh harrier (*Circus aeruginosus*)
	Falconidae	kestrel (*Falco tinnunculus*)
Passeriformes	Maluridae	superb fairy-wren (*Malurus cyaneus*)
	Pardalotidae	white-browed scrubwren (*Sericornis frontalis*)
		brown thornbill (*Acanthiza pusilla*)
	Sylviidae	african marsh warbler (*Acrocephalus baeticatus*)
	Corvidae	white-winged chough (*Corcorax melanorhamphos*)
	Callaeatidae	North Island kokako (*Callaeas cinerea*)
	Sturnidae	starling (*Sturnus vulgaris*)
	Paridae	blue tit (*Parus caeruleus*)
	Passeridae	zebra finch (*Taeniopygia guttata*)

*Cannot be sexed.
†Sexed using an acrylamide gel.

ที่มา: Griffiths *et al.* (1998)

Ito *et al.* (2003) ได้ทำการศึกษาการแยกเพศในนกประเภทเหยี่ยวและนกในกลุ่ม Monomorphic อื่นๆ ได้แก่ Peregrine falcon, Kstrel, Black kite, Goshawk, Marsh harrier, Golden eagle, Eurasian sparrowhawk และ Mountain nawk-eagle ในการทดลองนี้ได้แบ่งการทดลองเป็นสองวิธีคือ การทดลองที่หนึ่งใช้ขนาดที่แตกต่างของตำแหน่ง intron ระหว่างยีน *CHD1-Z* และ *CHD1-W* มาทำการเพิ่มปริมาณของตำแหน่งดังกล่าวด้วยวิธี PCR โดยใช้ primer P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') และ NP (5'-GAGAAACTGTGCAAAACAG-3') พบว่าสามารถแยกเพศในกลุ่มของนกเหยี่ยวได้สองสายพันธุ์ คือ Peregrine falcon และ Kestrel ส่วนที่เหลือไม่สามารถแยกเพศได้ ในส่วนของการทดลองที่สองใช้วิธีการ amplification refractory mutation system (ARMS) คือการออกแบบ primer ที่เป็นคู่สมกับตำแหน่ง 3'-terminal ในตำแหน่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มีการกลายพันธุ์เป็นลำดับอนุรักษ์ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ sequence ของนกสายพันธุ์ดังกล่าว ผลการศึกษาพบว่าสามารถประสบความสำเร็จในการแยกเพศด้วยวิธีดังกล่าว เพราะจากการใส่ primer เข้าไปสามเส้นนั้น primer NP (5'-GAGAAACTGTGCAAAACAG-3') และ MP (5'-AGTCACTATCAGATCCGGAA-3') ไม่เพียงแต่ amplifies ส่วนของ *CHD1W* ได้ผลแถบดีเอ็นเอเท่านั้น ในส่วนของ primer P2 (5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3') และ NP (5'-GAGAAACTGTGCAAAACAG-3') ก็ยังสามารถ amplifies ในส่วนของ *CHD1Z* ได้ผลแถบดีเอ็นเอเช่นเดียวกัน ดั้งนั้นในเพศเมียที่มีโครโมโซมเป็น ZW จึงแสดงผลแถบดีเอ็นเอเป็นสองแถบ ส่วนในเพศผู้ที่มีโครโมโซมเป็น ZZ จึงแสดงผลแถบของดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวเท่านั้น วิธีดังกล่าวจึงสามารถทำการแยกเพศในสายพันธุ์ที่ใช้วิธีการแยกด้วยขนาดของตำแหน่ง intron ระหว่างยีน *CHD1-Z* และ *CHD1-W* ได้

He *et al.* (2005) ได้ทำการศึกษาการแยกเพศในหงษ์ดำ *(Cygnus atratus)* โดยใช้เทคนิค PCR และ *CHD1* ยีน ร่วมกับวิธี amplification refractory mutation system (ARMS) จากผลการศึกษาดังกล่าวพบว่าสามารถทำการแยกเพศหงษ์ดำได้สำเร็จ โดยเพศเมียจะพบแถบหนึ่งแถบ ส่วนเพศผู้จะพบแถบทั้งหมดสองแถบในการทดสอบด้วย gel electrophoresis

Jirajaroenrat and Thammakarn (2007) ทำการศึกษาการแยกเพศนกสวยงามโดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ CHD1 ยีน โดยใช้ไพรเมอร์สามเส้นได้แก่ NP, MP และ P2 พบว่าสามารถทำการแยกเพศนกสวยงาม ได้ทั้งหมดจำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ Sun conure, African Ring-necked Parakeet และ Green-cheeked โดยพบว่าเพศผู้จะปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว ส่วนเพศเมียจะปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวนสองแถบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงาน

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ นกสวยงามจำนวน 19 สายพันธุ์ รวมจำนวนทั้งหมด ตัว โดยตัวอย่างทั้งหมดได้รับความอนุเคราะห์จากตลาดนัดจตุจักร 2 (มีนบุรี) ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สายพันธุ์นกสวยงาม และจำนวนตัวอย่าง

ชื่อสามัญ	ชื่อวิทยาศาสตร์	จำนวนตัวอย่าง
Sun conure	*Avatinga solstitialis solstitialis*	22
Hahn's Macaw	*Diopsttaca nobilis nobilis*	6
Alexandrine Parakeet	*Psittacula eupatria*	2
African Ring-necked Parakeet	*Psittacula krameri*	2
Cockatiel	*Nymphicus hollandicus*	2
Black Swan	*Cygnus atratus*	7
Zebra Finch	*Taeniopygia guttata*	4
Black-capped Conure	*Pyrrhura rupicola rupicola*	2
Rainbow Lory	*Trichoglossus haematodus*	2
Red Lory	*Eos bornea*	4
Yellow-backed Lory	*Lorius garrulous flavopalliatus*	2
Cadinal Lory	*Chalcopsitta cardinalis*	2
Congo African Grey	*Psittacus erithacus erithacus*	3
Yellow-tailed Black Cockatoo	*Clyptorhynchus funereus*	2
Eastern Rosella	*Platycercus eximius cecilae*	4
Red Rosella	*Platycercus eximius eximius*	2
Green-cheeked Parakeet	*Brotogeris pyrrhopterus*	4
Blue & Gold Macaw	*Ara ararauna*	2
Monk Parakeet	*Myiopsitta monachus*	2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 อุปกรณ์

1. หลอดใส่สาร ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Eppendrof tube)
2. หลอดพีซีอาร์ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (PCR tube)
3. ไมโครปิเปต (Micropipette)
4. เครื่องให้ความร้อน (Heat block ; Labnet)
5. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer ; VORTEX-GENIE®2)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge ; SERVALL® Biofuge *pico*)
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometry ; Ultrospec 1100 *pro*)
8. เครื่องพีซีอาร์ (PCR ; Biometra® Tpersonal)
9. เครื่องอิเล็คโตรโฟเรซีส (Electrophoresis ; Gel Mate 2000)
10. กระดาษกรองสาร (Whatman®)

3.2.2 สารเคมี

3.2.2.1 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการเก็บตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่

1. ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (QIAGEN® FlexiGene DNA Kit)
2. Proteinase k
3. Isopropanal
4. 70% ethanol
5. น้ำกลั่น

3.2.2.2 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ได้แก่

1. 10X PCR buffer (Vivantis® Taq DNA Polymerase)
2. 25mM $MgCl_2$
3. 10mM dNTP
4. 5U/µl Taq polymerase (Vivantis® Taq DNA Polymerase)
5. forward primer และ reverse primer

3.2.2.3 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการแยกและการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ ได้แก่

1. Bromophenol blue
2. Xylene cyanol
3. Glycerol
4. Tris base
5. Boric acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. Disodium ethylenediaminnetetraacetate (EDTA)

7. Ethidium Bromide

3.3 วิธีการ

3.3.1 การเก็บตัวอย่างเลือดนก

ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 24 สะกิดบริเวณเส้นเลือดปีก (Wing vein) จากนั้นใช้กระดาษกรองขนาดกว้างประมาณ 0.5 เซนติเมตร ยาว 4 เซนติเมตร ซับเลือดที่ซึมออกมา ใส่ลงในหลอดใส่สารขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Eppendrof tube) ที่ใส่น้ำกลั่นปริมาตร 300 ไมโครลิตร ประมาณ 30 วินาที จากนั้นนำตัวอย่างเลือดไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดนก

ก่อนทำการสกัดดีเอ็นเอจะต้องนำเลือดตัวอย่างมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เลือดละลาย จากนั้นจึงนำมาทำการสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีการของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (QIAGEN® FlexiGene DNA Kit) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำ FG1 Buffer ปริมาตร 750 ใส่ลงใน Eppendrof tube ที่ใส่น้ำกลั่นละลายตัวอย่างเลือดนก ตามข้อ 3.3.1 ทำการผสมให้เข้ากันโดยทำการกลับหลอด (invert) ประมาณ 5 ครั้ง

2. นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที

3. เทสารละลายใสส่วนบนทิ้งเหลือส่วนที่ตกตะกอนก้นหลอดไว้ และวางซับบนกระดาษซับ เป็นเวลา 2 นาที

4. เติม FG2 buffer ปริมาตร 150 ไมโครลิตร และ Proteinase k (20 mg/ml) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมสาร (vortex) ที่ความเร็วปานกลาง

5. นำไปวางบนเครื่องให้ความร้อน (Heat block) ไว้ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

6. เติม isopropanol (100%) ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเบาๆ

7. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที

8. เทสารละลายใสส่วนบนทิ้งเหลือส่วนที่ตกตะกอนก้นหลอดไว้ และวางซับบนกระดาษซับ เป็นเวลา 2 นาที

9. เติม 70% ethanol ลงไปกลับหลอดไปมา เพื่อล้างดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

10. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอนที่ก้นหลอด

11. เท 70% ethanol ทิ้ง แล้วผึ่งดีเอ็นเอให้แห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 30 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ เพื่อให้ดีเอ็นเอละลาย

จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบคุณภาพและปริมาตรโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometry) และรักษาสภาพของดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้งานต่อไป

3.3.3 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ CHD1 ยีน

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือดและผ่านขั้นตอนการตรวจสอบคุณภาพและปริมาตรแล้ว มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ (template DNA) ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณ CHD1 ยีน โดยใช้ไพรเมอร์ดังที่แสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ไพร์เมอร์ที่ใช้สำหรับการตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณ CHD1 ยีน

ไพรเมอร์	Sequence (5' to 3')	อ้างอิง
NP (Forward)	GAGAAACTGTGCAAAACAG	Ito และคณะ (2003)
MP (Reverse)	AGTCACTATCAGATCCGGAA	Ito และคณะ (2003)
P2 (Reverse)	TCTGCATCGCTAAATCCTTT	Griffiths และคณะ (1998)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ เริ่มจากการผสมส่วนประกอบของปฏิกิริยาลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (PCR tube) ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 3.3 ในการทำพีซีอาร์ในแต่ละครั้งจะทำเป็นจำนวนมาก จึงได้ทำการผสมส่วนประกอบทุกอย่างยกเว้นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ลงในหลอดเดียวกันในปริมาณที่พอเพียงกับจำนวนตัวอย่างก่อน (Master mixture) แล้วจึงแบ่งใส่ PCR tube แต่ละหลอดจากนั้นจึงทำการเติมดีเอ็นเอแม่พิมพ์แต่ละตัวอย่างลงไป นำส่วนผสมที่ได้เข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยทำการกำหนดอุณหภูมิและเวลาภายในเครื่องสำหรับแต่ละขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
2. denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที
3. primer annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที
4. primer extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที
5. ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2-4 จำนวน 34 รอบ
6. final extention ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
7. เก็บรักษาผลผลิตพีซีอาร์ (PCR product) ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (hold)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

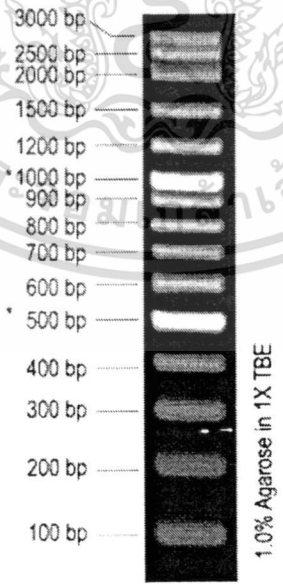
สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

สาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10X PCR buffer	2.5	1x
25 mM $MgCl_2$	1.5	1.5 mM
10 mM dNTP	0.5	200 µM
10 µM Primer NP	1	0.4 µM
10 µM Primer MP	1	0.4 µM
10 µM Primer P2	1	0.4 µM
5 U/µl Tag polymerase(Vivantis®)	0.2	0.04 U
100 ng/µl DNA template	10	40 ng
น้ำกลั่น	7.3	
รวม	25	

3.3.4 ขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน (DNA Marker)

ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ใช้เป็นตัวประมาณขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากกระบวนการ PCR ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ DNA Marker ของ Vivantis® 100bp Plus DNA Ladder ซึ่งมีขนาดความยาวอยู่ในช่วง 100-3000 คู่เบส ดังภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 แสดงขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100bp Plus DNA Ladder

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
83654

3.3.5 การแยกและการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ

นำ PCR Product มาทำการแยกโดยใช้เทคนิคอิเล็คโตรโฟเรซีส โดยใช้อะกาโรสเจล 1 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวกลาง ในบัฟเฟอร์ 1x Tris-boric-EDTA (TBE buffer, ภาคผนวก ก) เชื่อมต่อกระแสไฟฟ้าเพื่อให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นตรวจสอบการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง Gel Photodocumentation System ซึ่งสามารถมองเห็นแถบสีของดีเอ็นเอ จากนั้นทำการบันทึกภาพด้วยโปรแกรม Gene snap และนำไปวิเคราะห์ผลต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

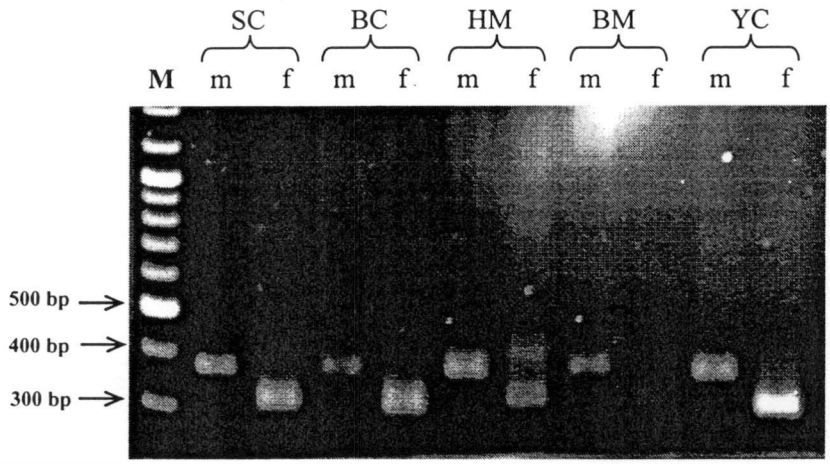
ผลการทดลอง

4.1 ผลการตรวจสอบแยกเพศนกสวยงามโดยแทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่

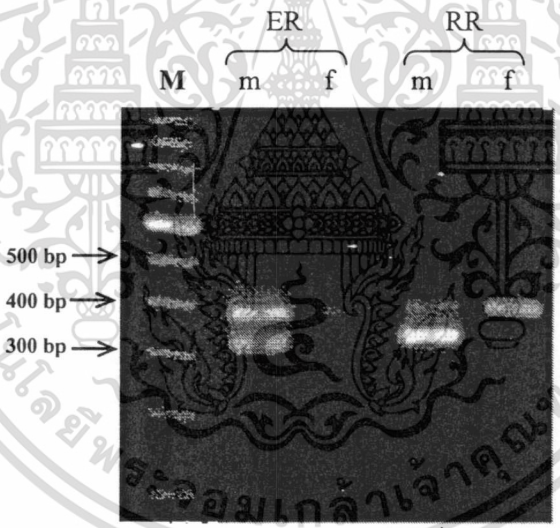
นำตัวอย่างนกสวยงาม Sun conure (SC), Black-capped Conure (BC), Hahn's Macaw (HM), Blue & Gold Macaw (BM), Yellow-tailed Black Cockatoo (YC), Eastern Rosella, (ER)Red Rosella (RR) , Alexandrine Parakeet (AP), African Ring-necked Parakeet (RP), Green-cheeked Parakeet (GP), Monk Parakeet (MP), Cockatiel (Ck) และ Zebra Finch (ZF) มาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีการของชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (QIAGEN® FlexiGene DNA Kit) หลังจากนั้นนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร นำตัวอย่างดีเอ็นเอเลือดนกมาเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ NP , MP และ P2 จากนั้นนำไปแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซีส (Electrophoresis ; Gel Mate 2000) โดยใช้ 1%Agarose gel ผ่านสารละลายตัวกลาง 1xTBE buffer pH 8.3 เป็นเวลา 60 นาที ที่กระแสไฟฟ้า 100 โวลท์ ตรวจสอบการเรืองแสงของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอุลตราไวโอเลตด้วยเครื่อง Gel Documentation System เปรียบเทียบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน

จากการทดลองการตรวจสอบแยกเพศนกสวยงามด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) สายพันธุ์ Sun conure (SC), Black-capped Conure (BC), Hahn's Macaw (HM), Blue & Gold Macaw (BM), Yellow-tailed Black Cockatoo (YC), Eastern Rosella, (ER)Red Rosella (RR) , Alexandrine Parakeet (AP), African Ring-necked Parakeet (RP), Green-cheeked Parakeet (GP), Monk Parakeet (MP), Cockatiel (Ck) และ Zebra Finch (ZF) ที่ได้รับการยืนยันเพศแน่นอนแล้วสายพันธุ์ละคู่โดยการให้ลูกมาก่อน และตัวอย่างที่ยังไม่ได้รับการยืนยันเพศ พบว่าปรากฏแถบของดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน โดยเพศผู้ปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียว ส่วนเพศเมียจะปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวนสองแถบ (แสดงดังภาพที่ 4.1, 4.2, 4.3 และภาพที่ 4.4)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

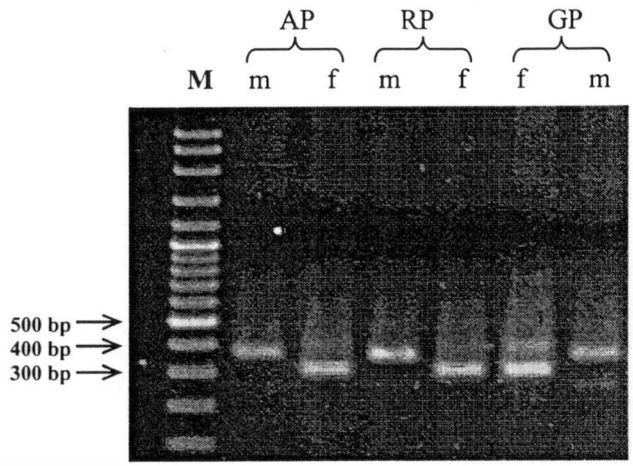


ภาพที่ 4.1 ผลการตรวจพีซีอาร์ของเลือดนก Sun conure (SC), Black-capped Conure (BC), Hahn's Macaw (HM), Blue & Gold Macaw (BM) และ Yellow-tailed Black Cockatoo (YC) ส่วนในช่องแรก (**M**) ได้แก่แถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100bp โดยที่ m เป็นเพศผู้ และ f เป็นเพศเมีย

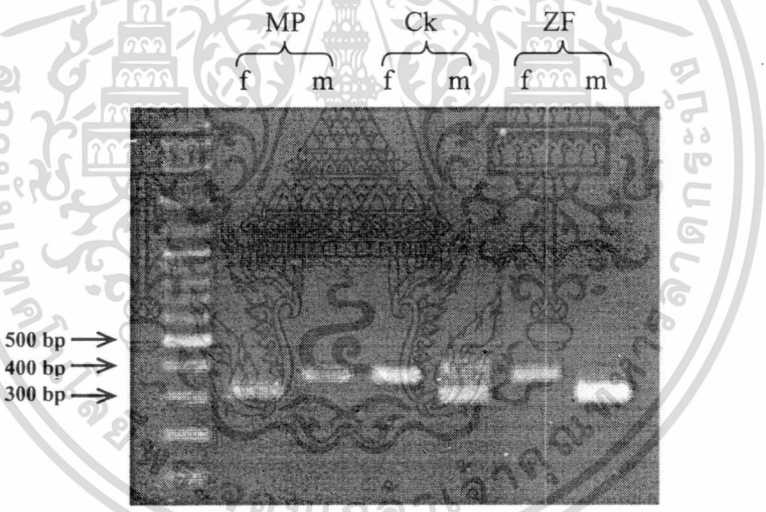


ภาพที่ 4.2 ผลการตรวจพีซีอาร์ของเลือดนก Eastern Rosella (ER) และ Red Rosella (RR) ส่วนในช่องแรก (**M**) ได้แก่แถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100bp โดยที่ m เป็นเพศผู้ และ f เป็นเพศเมีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



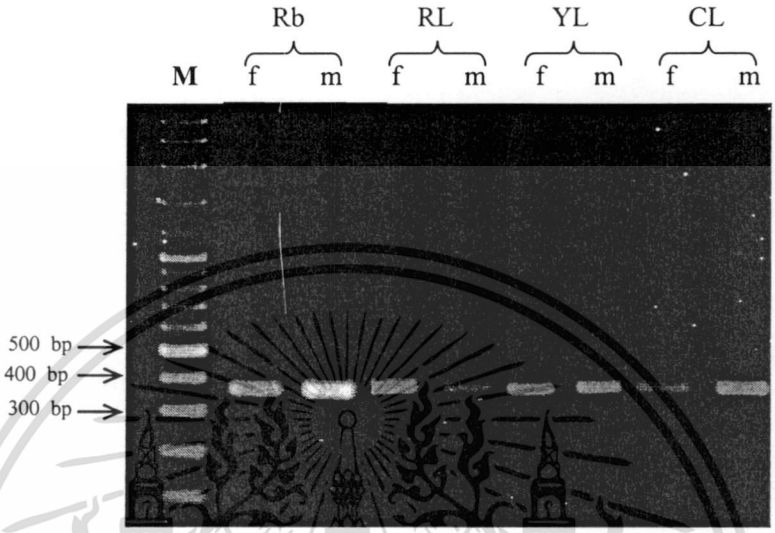
ภาพที่ 4.3 ผลการตรวจพีซีอาร์ของเลือดนก Alexandrine Parakeet (AP), African Ring-necked Parakeet (RP) และ Green-cheeked Parakeet (GP) ส่วนในช่องแรก (**M**) ได้แก่แถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100bp โดยที่ m เป็นเพศผู้ และ f เป็นเพศเมีย



ภาพที่ 4.4 ผลการตรวจพีซีอาร์ของเลือดนก Monk Parakeet (MP), Cockatiel (Ck) และ Zebra Finch (ZF) ส่วนในช่องแรก (**M**) ได้แก่แถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100bp โดยที่ m เป็นเพศผู้ และ f เป็นเพศเมีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

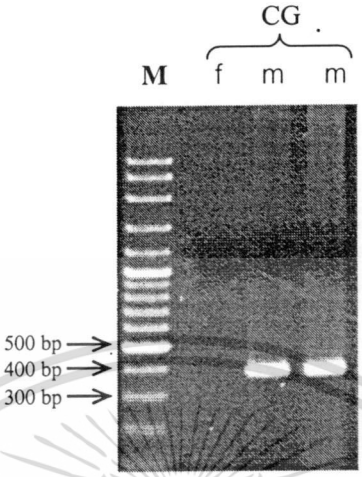
อย่างไรก็ตามผลการทดลองตรวจสอบแยกเพศนกสวยงามสายพันธุ์ Rainbow Lory (Rb), Red Lory (RL), Yellow-backed Lory (YL) และ Cadinal Lory (CL) ที่ได้รับการยืนยันเพศแน่นอนแล้ว สายพันธุ์ละคู่ และตัวอย่างที่ยังไม่ได้รับการยืนยันเพศ พบว่าปรากฏแถบของดีเอ็นเอที่มีขนาดเดียวกันทั้งเพศผู้และเพศเมีย คือปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวเท่านั้น (แสดงดังภาพที่ 4.5)



ภาพที่ 4.5 ผลการตรวจพีซีอาร์ของเลือดนก Rainbow Lory (Rb), Red Lory (RL), Yellow-backed Lory (YL) และ Cadinal Lory (CL) ส่วนในช่องแรก (**M**) ได้แก่แถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100bp โดยที่ m เป็นเพศผู้ และ f เป็นเพศเมีย

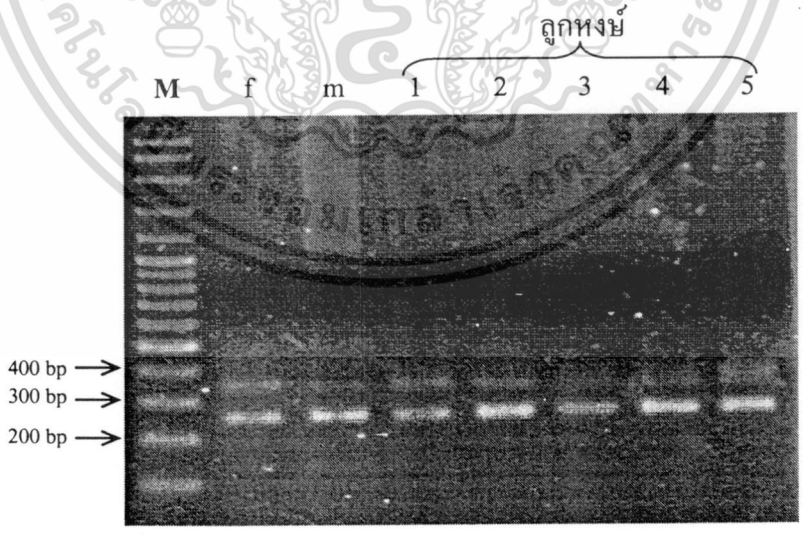
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทดลองตรวจสอบแยกเพศนกสวยงามสายพันธุ์ Congo African Grey (CG) ที่ได้รับการยืนยันเพศแน่นอนจำนวน 3 ตัว ผลการทดลองพบว่า เพศเมียไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขึ้น ส่วนในเพศผู้ปรากฏแถบดีเอ็นเอขึ้นแถบเดียว (แสดงดังภาพที่ 4.6)



ภาพที่ 4.6 ผลการตรวจพีซีอาร์ของเลือดนก Congo African Grey (CG) ส่วนในช่องแรก (M) ได้แก่ แถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100bp โดยที่ m เป็นเพศผู้ และ f เป็นเพศเมีย

ส่วนผลการทดลองการตรวจสอบเพศในหงษ์ Black Swan (BS) จำนวน 7 ตัว ซึ่งเป็นพ่อ-แม่พันธุ์จำนวน 1 คู่ และลูกอีกจำนวน 5 ตัว พบว่าปรากฏแถบของดีเอ็นเอที่มีขนาดเดียวกันทั้งเพศผู้และเพศเมียรวมทั้งลูกหงษ์ทั้ง5 ตัว คือปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวนสองแถบ (แสดงดังภาพที่ 4.7)



ภาพที่ 4.7 ผลการตรวจพีซีอาร์ของเลือดหงษ์ Black Swan (BS) ส่วนในช่องแรก (M) ได้แก่แถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100bp โดยที่ m เป็นเพศผู้ และ f เป็นเพศเมีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการตรวจสอบการแยกเพศนกสวยงามจำนวน 19 สายพันธุ์ โดยใช้ไพรเมอร์ NP, MP และ P2 พบว่าสามารถทำการแยกเพศได้ทั้งหมดจำนวน 13 สายพันธุ์ ได้แก่ Sun conure (SC), Black-capped Conure (BC), Hahn's Macaw (HM), Blue & Gold Macaw (BM), Yellow-tailed Black Cockatoo (YC), Eastern Rosella, (ER)Red Rosella (RR) , Alexandrine Parakeet (AP), African Ring-necked Parakeet (RP), Green-cheeked Parakeet (GP), Monk Parakeet (MP), Cockatiel (Ck) และ Zebra Finch (ZF) ซึ่งสอดคล้องกับ Jirajaroenrat and Thammakarn (2007) ที่รายงานว่าสามารถทำการแยกเพศนกสวยงามสายพันธุ์ Sun conure, African Ring-necked Parakeet และ Green-cheeked โดยใช้ไพรเมอร์ดังกล่าว เช่นเดียวกับที่ Griffiths *et al.* (1998) ได้มีการทดลองการใช้วิธี PCR โดยใช้ primers คู่เดียว ได้แก่ P2 และ P8 ในการเพิ่มปริมาณของส่วน intron ตรงตำแหน่ง homologous ในยีนบนโครโมโซมเพศทั้งสองยีน (CHD-W และ CHD-Z) พบว่าสามารถแยกเพศนกสวยงามสายพันธุ์ Zebra Finch รวมทั้ง Swan ได้อีกด้วย

ส่วนผลการตรวจสอบการแยกเพศนกสวยงามอีกจำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ Congo African Grey (CG), Rainbow Lory (Rb), Red Lory (RL), Yellow-backed Lory (YL), Cadinal Lory (CL) และ Black Swan (BS) พบว่า Congo African Grey ไม่สามารถสรุปผลการตรวจแยกเพศได้ ซึ่งอาจเกิดจากไพรเมอร์ใช้ไม่มีความเหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในการตรวจแยกเพศในนกสวยงาม ดังรายงานของ Griffiths *et al.* (1998) ได้ใช้ primers คู่ P2 และ P8 แยกเพศในหงษ์ (Swan) ได้สำเร็จ เช่นเดียวกับ He *et al.* (2005) ซึ่งได้ทำการศึกษาการแยกเพศในหงษ์ดำ (Black Swan) โดยใช้ primers F1, F2, และ R โดยสามารถแยกเพศในสายพันธุ์ดังกล่าวได้เช่นเดียวกัน หรือเหตุผลอีกประการที่ทำให้ไม่สามารถสรุปผลการตรวจแยกเพศได้นั้น พบว่าอาจเป็นเพราะมีการปนเปื้อนของโปรตีนในปริมาณที่มากและมีปริมาณดีเอนเอที่สกัดได้ปริมาณน้อยในขั้นตอนของการสกัดดีเอนเอในบางตัวอย่าง (เฉลิมชาติ และคณะ. 2548)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุปผลการทดลอง

จากการตรวจสอบการแยกเพศนกสวยงามจำนวน 19 สายพันธุ์ ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่ (PCR) ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ บริเวณ conserved gene ที่มีชื่อว่า chromo-helicase DNA binding protein 1 (CHD1 gene) บนโครโมโซมเพศ และแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซีส พบว่าสามารถตรวจสอบแยกเพศนกสวยงาม จากแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ CHD1 ยีน โดยใช้ไพรเมอร์ NP, MP และ P2 ได้ทั้งหมดจำนวน 13 สายพันธุ์ ได้แก่ Sun conure (SC), Black-capped Conure (BC), Hahn's Macaw (HM), Blue & Gold Macaw (BM), Yellow-tailed Black Cockatoo (YC), Eastern Rosella, (ER)Red Rosella (RR) , Alexandrine Parakeet (AP), African Ring-necked Parakeet (RP), Green-cheeked Parakeet (GP), Monk Parakeet (MP), Cockatiel (Ck) และ Zebra Finch (ZF)

ส่วนผลการตรวจสอบการแยกเพศนกสวยงามอีกจำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ Congo African Grey (CG), Rainbow Lory (Rb), Red Lory (RL), Yellow-backed Lory (YL), Cadinal Lory (CL) และ Black Swan (BS) พบว่า Congo African Grey ไม่สามารถสรุปผลการตรวจแยกเพศได้ เนื่องจาก ตัวอย่างของ Congo African Grey ในเพศเมียไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขึ้น โดยจะปรากฏแถบดีเอ็นเอในเพศผู้เท่านั้น และผลของการการตรวจแยกเพศในนก Rainbow Lory (Rb), Red Lory (RL), Yellow-backed Lory (YL) และ Cadinal Lory (CL) พบว่าไม่สามารถทำการตรวจแยกเพศได้ เนื่องจาก Rainbow Lory , Red Lory และ Yellow-backed Lory พบว่าปรากฏแถบของดีเอ็นเอที่มีขนาดเดียวกันทั้งเพศผู้และเพศเมีย คือปรากฏแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวเท่านั้น ส่วนผลของการการตรวจแยกเพศใน Black Swan (BS) ก็ไม่สามารถทำการตรวจแยกเพศได้ เนื่องจากแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ CHD1 ยีน ปรากฏแถบของดีเอ็นเอที่มีขนาดเดียวกันทั้งเพศผู้และเพศเมีย คือปรากฏแถบดีเอ็นเอจำนวนสองแถบ

6.2 ข้อเสนอแนะ

ผลการตรวจสอบแยกเพศนกสวยงามจำนวน 13 สายพันธุ์ ที่สามารถตรวจสอบแยกเพศโดยการใช้ไพรเมอร์ NP, MP และ P2 ได้นั้น มีนกสวยงามจำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ Sun conure (SC), Black-capped Conure (BC), Blue & Gold Macaw (BM), Yellow-tailed Black Cockatoo (YC), Alexandrine Parakeet (AP), African Ring-necked Parakeet (RP), Cockatiel (Ck) และ Zebra Finch (ZF) ที่ปรากฏแถบของดีเอ็นเอของเพศผู้จำนวนสองแถบไม่ชัดเจน ทั้งนี้อาจเกิดจากผลของการสกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดีเอ็นเอจากเลือดนกของตัวอย่างดังกล่าวมีการปนเปื้อนที่สูง เนื่องจากค่าที่ได้จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometry) พบว่าอัตราส่วนของค่า A_{260} ต่อ A_{280} มีค่ามากกว่า 2.0 จึงทำให้ผลของการตรวจแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส มีปื้นของดีเอ็นเอ และปรากฏแถบของดีเอ็นเอแถบบนไม่ชัดเจน

ส่วนผลการตรวจสอบการแยกเพศนก Congo African Grey ที่ไม่สามารถสรุปผลได้เนื่องจากในเพศเมียไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอขึ้นนั้น อาจเกิดจากตัวอย่างเลือดที่เก็บมามีปริมาณที่น้อยจนเกินไป หรือเกิดจากการผิดพลาดในการสกัดขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่ง

และผลของการตรวจแยกเพศในนก Rainbow Lory, Red Lory , Yellow-backed Lory และ Cadinal Lory ที่พบว่าไม่สามารถทำการตรวจแยกเพศได้นั้น อาจเกิดจากไพรเมอร์ NP, MP และ P2 ที่ใช้ไม่มีความเหมาะสม ต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ CHD1 ยีน บนโครโมโซมเพศ ของนกสายพันธุ์ดังกล่าว ดังนั้นจึงควรมีการออกแบบไพรเมอร์ให้มีความเหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ เพิ่มใช้ในการตรวจแยกเพศในนกสวยงามสายพันธุ์ดังกล่าวต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

จริยา ชมวารี, ชาญวิทย์ ลีลายุวัฒน์ และเต็มดวง ลิ้มไพบูรย์ .2540. " **PCR technology and Applications**" ขอนแก่น: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เฉลิมชาติ สมเกิด, ขวัญเรือน ดวงสอาด, ตุลยวรรธ สุทธิแพทย์ และณัฐวุฒิ สถิตเมธี. 2548. "**เทคนิคที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่ตัวสัตว์สำหรับการสกัดดีเอ็นเอและการตรวจแยกเพศในนก**" ในการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43 สาขาสัตว์และสาขาสัตวแพทย์ศาสตร์. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ธนากร ฤทธิ์ไธสง. 2546. **นกสวยงาม คู่มือการเพาะเลี้ยงนกสวยงาม**. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์บริษัท ก. พล (1996) จำกัด

วรวิทย์ วณิชาภิชาติ. 2531. **ไข่และการฟักไข่**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์รั้วเขียว.

สมาคมอนุรักษ์นก และธรรมชาติ แห่งประเทศไทย. 2550. **คู่มือดูนกเบื้องต้น**.[Online]. Available:http://www.bcst.or.th/birding/birding3.htm [cited 6 July 2007; 14:48 EST]

Anna, D., and Zagalska-Neubauer, M. 2006. "Molecular techniques for sex identification in birds." **Biological Lett.** 43(1): 3-12

Bramwell, R.K. 2003. "Sexing chicks in the backyard flock." **Avian Advice.** 5: 4-5.

Cerit, H. and Avanus, K. 2006. "Sex identification of parrots from feather DNA using CHDW and CHDZ genes of avian sex chromosomes". **Turkish J. of Vet. and Anim. Sci.**

Ellegren, H. 2001. "Hens, cocks and avian sex determination. A quest for genes on Z or W ?." **EMBO reports.** 2: 192-196.

Fridolfsson, A.K., Cheng, H., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., Ching Liu, H., Raudsepp,T., Woodage,T., Chowdhary, B., Halverson, J., and Ellegren, H. 1998. "Evolution of the avian sex chromosomes from an ancestral pair of autosomes." **Proc. Natl. Acad. Sci.** 95: 8147-8152.

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

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

Harris, J. 2007. "Sex parrots via coloration, surgery or DNA testing." [Online]. Available:http://www.parrotchronicles.com/departments/sexidentification_askdrharris.htm [cited 28 July 2007; 15:51 EST]

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

He, P.J., Yu, J.Q., and Fang, S.G. 2005 "Sex identification of the black swan (Cygnus atratus) using the locus-specific PCR and implications for its reproduction." **Repro. in domestic anim.** 40:196-198.

Hudon, J., Anciães, M., Bertacche, V., and Stradi, R. 2007. "Plumage carotenoids of the Pin-tailed Manakin (Ilicura militaris): Evidence for the endogenous production of rhodoxanthin from a colour variant" **Comparative Biochem. and Physio.** 147: 402–411

Ito H, Sudo-Yamaji A, Abe M, Murase T. and T Tsubota. 2003. "Sex identification by alternative polymerase chain reaction methods in Falconiformes." **Zool. Sci.** 20, 339–344.

Itoh Y., Suzuki M., Ogawa A., Munechika I., Murata K. and S. Mizuno.2001. "Identification of the Sex of a Wide Range of Carinatae Birds by PCR Using Primer Sets Selected from Chicken EE0.6 and Its Related Sequences". **The American Genetic Association**

Jirajaroenrat, K. and C. Thammakarn. 2007. "Sex identification of some pet birds by Polymerase Chain Reaction-based methods" **International Conference on Integration of Science & Technology for Sustainable Development.** KMITL. Bangkok. Thailand. 26-27 April : 376-379.

Seutin G., White, B. N., And Boag P. T. 1991. "Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analyses. **Can. J. Zool.**" 69: 82-90.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป (QIAGEN® FlexiGene DNA Kit)

1. บัฟเฟอร์ FG1 (solubilization buffer)
2. บัฟเฟอร์ FG2 (wash buffer)
3. บัฟเฟอร์ FG3 (elution buffer)

2. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์ดีเอ็นเอในเจลอกาโรสภายใต้กระแสไฟฟ้า

1. สารละลาย TBE (5x TBE)

Tris base	54 กรัม
Boric acid	27.5 กรัม
0.5M EDTA(pH 8.0)	20 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที เมื่อใช้งานปรับความเข้มข้นสารเป็น 1 เท่า ด้วยน้ำ

2. สารละลาย loading buffer

Bromophenol blue	0.25%
Glycerol	30 %
ในน้ำกลั่น	1 มิลลิลิตร
Ethdium bromide (0.5 µg/ml)	1 หยด

เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

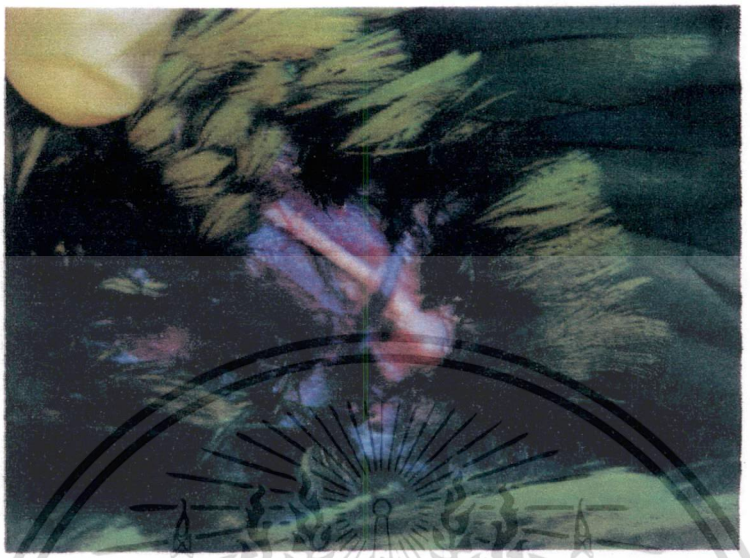
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

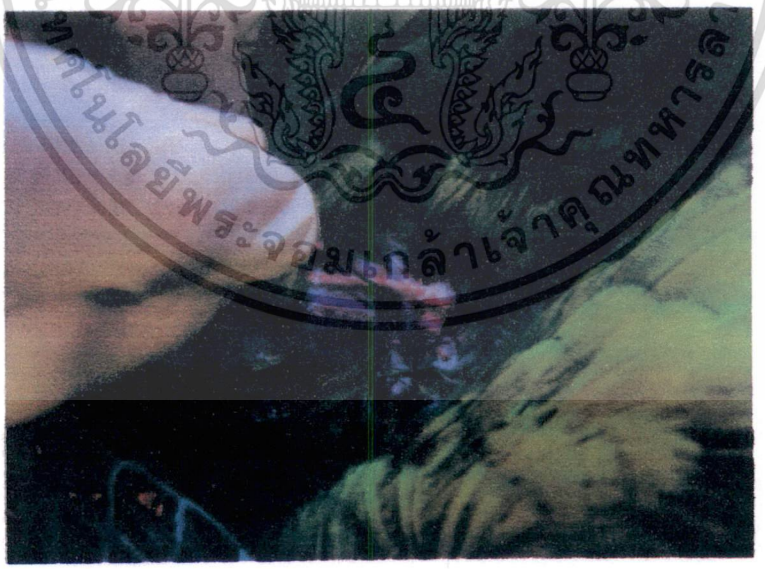
1. การเก็บตัวอย่างเลือดนก

หาเส้นเลือดปีกบริเวณ Wing vein ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใช้ในการเจาะเลือดเก็บตัวอย่าง



ภาพที่ ข.1 แสดงเส้นเลือดปีก (Wing vein)

ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 24 สะกิดบริเวณเส้นเลือดปีก (Wing vein)



ภาพที่ ข.2 แสดงการใช้เข็มสะกิดบริเวณเส้นเลือดปีก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้กระดาษกรองขนาดกว้างประมาณ 0.5 เซนติเมตร ยาว 4 เซนติเมตร ซับเลือดที่ซึมออกมา

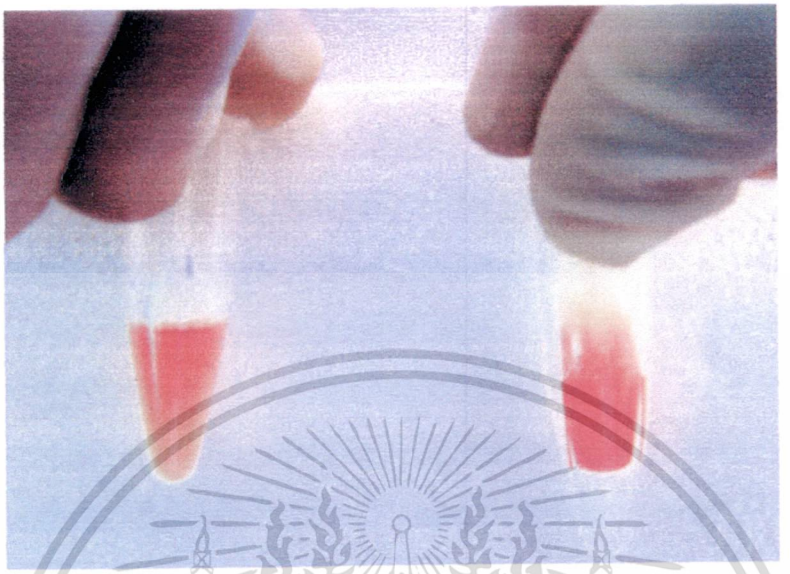
ภาพที่ ข.3 แสดงการใช้กระดาษกรองซับเลือด

ใส่กระดาษลงในหลอดใส่สารขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Eppendrof tube) ที่ใส่น้ำกลั่นปริมาตร 300 ไมโครลิตร ประมาณ 30 วินาที

ภาพที่ ข.4 แสดงการเก็บตัวอย่างเลือดใส่หลอด Eppendrof tube

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างเลือดที่จะนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปใช้ในขั้นต่อไป



ภาพที่ ข.5 แสดงตัวอย่างเลือดที่จะนำไปเก็บรักษาที่ -20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้