การตรวจแยกเพศนกโดยใช้เทคนิค Polymerase chain reaction

Bird Sexing by Polymerase chain reaction

นำดี แซ่เฮง[1] เฉลิมชาติ สมเกิด[2] ดุสิต คราวะพงษ์[2] ปรมินทร์ วินิจฉัยกุล[2]
เพิ่มศักดิ์ วัฒกนารา[2] และประพฤกษ์ ตั้งมั่นคง[3]

Namdee Sae-Heng[1] Chaleamchat Somgird[2], Dusit Kravapong[2], Paramintra Vinitchaikul[2]
Permsak Wataganara[2] and Prapeuk Tang-Munkhong[3]

บทคัดย่อ

ทำการตรวจแยกเพศนกโดยใช้นกเลิฟเบิร์ด(*Agapornis spp.*)ที่ทราบเพศแน่นอนจำนวน 21 ตัวเป็นตัวอย่างในการศึกษา ซึ่งแบ่งเป็นนกเพศผู้ 12 ตัว นกเพศเมีย 9 ตัว จากการแยกเพศด้วยการคลำตรวจกระดูกเชิงกรานได้ผลเป็นนกเพศผู้ 11 ตัวและนกเพศเมีย 10 ตัว จากนั้นนำนกทั้งหมดไปตรวจแยกเพศด้วยวิธี Polymerase Chain Reaction(PCR) โดยให้ผลเป็นเพศผู้ 12 ตัวและเพศเมีย 9 ตัว ซึ่งการแยกเพศด้วยวิธีการคลำตรวจกระดูกเชิงกราน ให้ผลถูกต้องเพียง 76.19% ส่วนการแยกเพศด้วยวิธี PCR ถูกต้อง 100% เมื่อเทียบกับนกที่ทราบเพศแน่นอน

ABSTRACT

Sex identification was performed in 21 known sex lovebirds(*Agapornis* spp.) including 12 males and 9 females. Two sexing methods were evaluated including vent sexing (pelvic length evaluation) and Polymerase Chain Reaction(PCR) .The vent sexing method found 11 male birds and 10 female birds compared to PCR method, which found 12 males and 9 females(The results showed that the vent sexing method had 76.19% accuracy and 100% accuracy in PCR method.)The accuracy of sexing showed that PCR method were 100% compared to 76.19% in vent sexing method.

1 หน่วยชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
Veterinary Diagnostic Laboratory , Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University.

2 นิสิตชั้นปีที่ 6 ปีการศึกษา 2543 คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
6th -- year student; 2000-2001, Faculty of veterinary medicine, Kasetsart university.

3 ภาควิชาสัตวแพทยสาธารณสุขศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
Department of Veterinary Public Health. Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University.

คำนำ

ปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งในการจัดการฝูงนกทั้งในฟาร์มเพาะเลี้ยง สวนสัตว์และองค์กรหรือหน่วยงานอนุรักษ์ต่างๆ ตลอดจนภายในธรรมชาติจริงๆนั้นคือ การที่จะต้องทราบถึงเพศของนกที่ถูกต้องทั้งนี้ทั้งนั้น เพื่อที่ให้ง่ายต่อการทำความเข้าใจถึงลักษณะทางสังคม พฤติกรรม นิเวศน์วิทยาของนกแต่ละชนิด ตลอดจนลักษณะทางพันธุกรรม การวิวัฒนาการ ความไวต่อโรคบางอย่าง และที่สำคัญเพื่อให้ง่ายต่อการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์โดยเฉพาะนกที่หายากใกล้สูญพันธุ์หรือนกที่ขยายพันธุ์ได้ยาก ซึ่งถึงแม้ว่านกส่วนใหญ่จะมีลักษณะทางเพศที่แสดงให้เห็นจากภายนอกที่แตกต่างกันทั้งเพศผู้และเพศเมีย(dimorphic bird) ที่พบเห็นได้ง่ายๆ เช่น นกในวงศ์ไก่(Gallus) และวงศ์เป็ด(Anatidea) ที่เพศผู้และเพศเมียมีลักษณะที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน แต่นกอีกส่วนหนึ่งมีลักษณะทางเพศที่แสดงให้เห็นจากภายนอกนั้นคล้ายคลึงกันหรือเหมือนกันทั้งเพศผู้และเพศเมีย(monomorphic bird) เช่นนกในวงศ์เหยี่ยว(Accipitridae) และวงศ์นกเค้าแมว(Strigidae) ส่วนใหญ่รวมถึงลูกนกทุกชนิดและนกที่มีลักษณะทางเพศที่แตกต่างกันบางชนิด ตัวผู้ที่อายุน้อยยังไม่ถึงวัยเจริญพันธุ์จะมีลักษณะคล้ายคลึงกับนกเพศเมีย(Fridolfsson และคณะ,1999) ซึ่งนกเลิฟเบิร์ด *Agapornis spp.* เป็นนกอีกกลุ่มหนึ่งที่แยกเพศนกได้ยาก นกเลิฟเบิร์ดจัดอยู่ในพวกนกแก้วขนาดเล็ก มีถิ่นอาศัยอยู่ในอัฟริกาซึ่งมีอยู่ 9 ชนิดด้วยกัน ทั้งที่สามารถแยกเพศจากลักษณะทางเพศที่แสดงออกภายนอกได้และไม่ได้(รูปที่ 1) ปัจจุบันนี้ได้มีการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์นกเลิฟเบิร์ด ทำให้ได้สายพันธุ์และสีต่างๆเพิ่มมากขึ้น แต่มีส่วนน้อยที่สามารถแยกเพศได้จากลักษณะทางเพศที่แสดงให้เห็น หรือจากการคลำตรวจกระดูกเชิงกราน(นกเพศเมียที่ผ่านการวางไข่มาแล้วจะมีช่องกระดูกเชิงกรานกว้างกว่าเพศผู้) ที่มีข้อผิดพลาดได้มากอีกทั้งจำเป็นต้องให้นกวางไข่เสียก่อน ดังนั้นการตรวจแยกเพศจึงมีความสำคัญอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้.

การตรวจแยกเพศนกในปัจจุบันนี้ มีอยู่หลายวิธีด้วยกัน ยกตัวอย่างเช่น vent sexing และ surgical sexing เป็นต้น ซึ่งแต่ละวิธีการมีทั้งข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป ตลอดจนมีความเหมาะสมในนกแต่ละชนิดแต่ละกลุ่มไม่เหมือนกัน วิธีการการตรวจแยกเพศนกวิธีการหนึ่งที่มีการใช้กันอย่างแพร่หลายคือวิธีการทำ Polymerase Chain Reaction หรือ PCR เนื่องด้วย PCR เป็นวิธีการที่สามารถทำได้ง่ายได้ผลที่รวดเร็วและถูกต้องแม่นยำสูง(Griffiths และ Phil, 2000, Fridolfsson และคณะ, 1999) ตลอดจนสามารถใช้ได้กับนกทุกช่วงอายุ จากแต่เดิม PCR ที่ใช้ในการแยกเพศนกนั้น อาศัยความแตกต่างของโครโมโซม 2 ชนิดคือ W-chromosome และ Z-chromosome ซึ่งในนกเพศเมียจะมีลักษณะของโครโมโซมเพศเป็น ZW(heterogamatic female) ส่วนนกเพศผู้จะมีลักษณะโครโมโซมเพศเป็น ZZ(homogamatic male) การปรากฏของ W-chromosome นั้นแสดงว่านกตัวนั้นเป็นนกเพศเมีย ซึ่งการตรวจหา W-chromosome นี้มีความจำเพาะต่อชนิดของนก เนื่องด้วย ลำดับเบสบน W-chromosome นี้จะแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิดของนก ดังนั้นทำให้การตรวจแยกเพศมีความจำเพาะในนกชนิดใดชนิดหนึ่งหรือชนิดของนกที่ใกล้เคียงกันเท่านั้น ต่อมาในภายหลังได้มีการค้นพบ W-link avian gene ที่เรียกว่า Chromo-helicase-DNA binding protein ในนก(Griffiths และ Phil, 2000, Fridolfsson และ

คณะ, 1999, Cortes และคณะ, 1999) ทำให้การตรวจแยกเพศนกด้วย PCR สามารถใช้กับนกที่มีความหลากหลายทางชนิดมากขึ้น

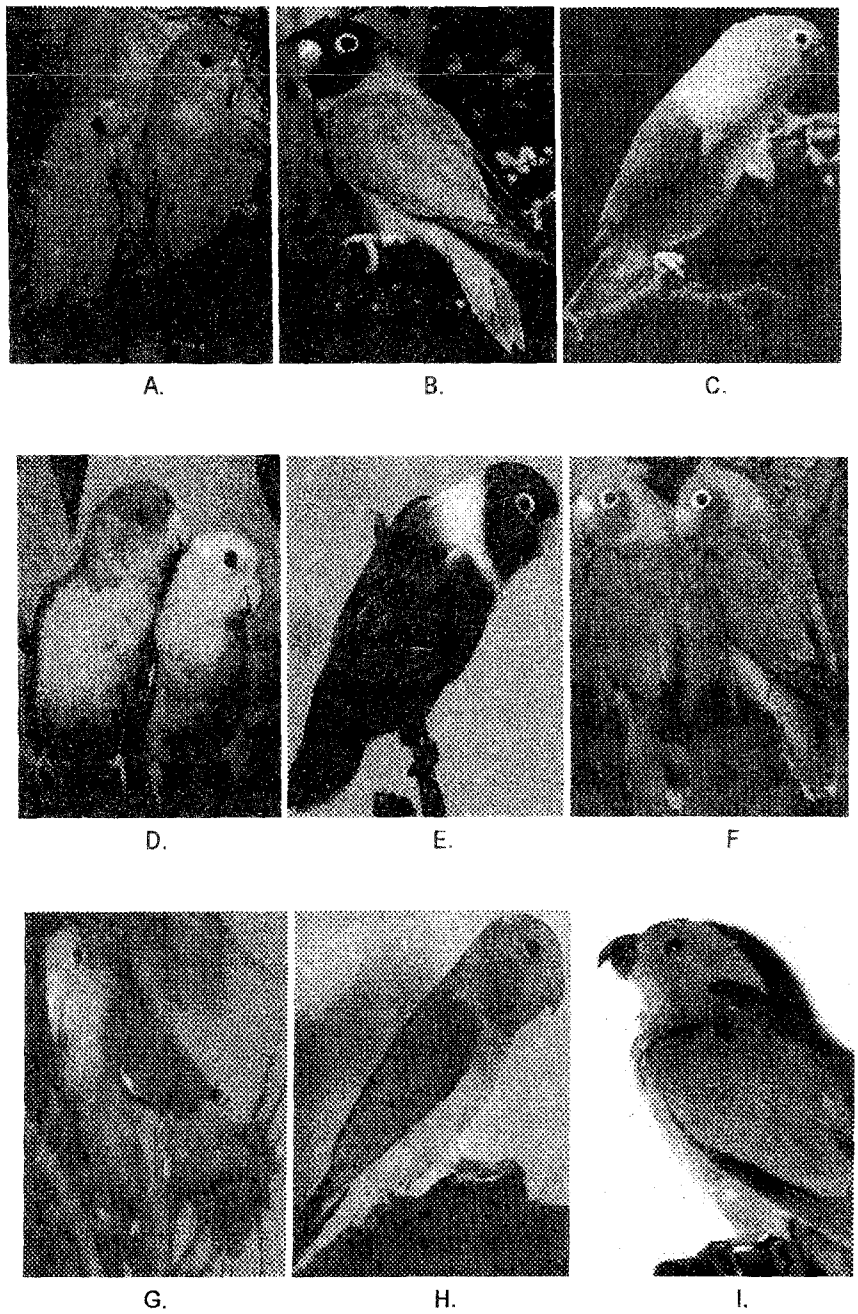

Figure1. Agapornis demonstrating species. A. Abyssinian Lovebirds *Agapornis taranta*, B. Black-Cheek Lovebird *Agapornis nigrigensis*, C. Fischer's Lovebirds *Agapornis fischeri*, D. Madagascar Lovebirds *Agapornis cana*, E. Masked Lovebirds *Agapornis personata*, F. Nyasa Lovebird *Agapornis lilianae*, G. Peachface Lovebirds *Agapornis roseicollis*, H. Red-Face Lovebird *Agapornis pullaria*, I. Swinderen's Lovebird *Agapornis swinderniana* [Sexaul dimorphism ; A., D. และ H.]

Chromo-helicase-DNA binding protein(CHD)เป็น conserved gene(Fridolfsson และคณะ, 1999, Cortes และคณะ, 1999) ที่พบได้ในกลุ่มนกที่เรียกว่า non-ratite birds ทุกชนิด(นกที่พบได้โดยทั่วไป) สำหรับนกในกลุ่มที่เรียกว่า ratite birds (นกกระจอกเทศ นกเรีย นกอีมู นกคาสโซวารี และนกกีวี) จะไม่พบยีนชนิดนี้ ส่วนของ CHD จะพบอยู่บน W-chromosome โดยจะเป็นลักษณะที่เรียกว่า W-link gene ซึ่ง CHD ที่อยู่บน W-chromosome นี้มีความคล้ายคลึงกับ CHD ที่พบในหนูที่มีชื่อว่า CHD1 (Griffiths และ Phil, 2000) ดังนั้น CHD ที่อยู่บน W-chromosome ของนกนี้จึงได้ชื่อว่า CHD1-W โดย CHD1-W ในนกกลุ่ม non-ratite birds นั้นมีความแตกต่างกันน้อยมาก ตัวอย่างเช่นในไก่และนกแก้วมาคอว์มีลำดับเบสบน CHD1-W ที่ไม่เข้ากันแค่ 5% ดังนั้น CHD1-W จึงใช้เป็นตัวแยกเพศนกที่สำคัญ ต่อมาภายหลังได้มีการค้นพบ CHD1-Z ที่มีความคล้ายคลึงกับ CHD1-W บน Z-chromosome และโครโมโซมร่างกาย (Griffiths และ Phil, 2000) ดังนั้นการแยกเพศนกจะอาศัยความแตกต่างของ CHD1-W กับ CHD1-Z นี้ ซึ่งนกเพศเมียจะพบทั้ง CHD1-W กับ CHD1-Z ส่วนนกเพศผู้จะพบเพียงแต่ CHD1-Z ที่สามารถทำได้ด้วยวิธีการ PCR และเทคนิค Gel electrophoresis ดูลักษณะและจำนวนแถบของยีนที่ปรากฏ โดยนกเพศเมียจะพบแถบของยีนอยู่ 2 แถบ คือ CHD1-W และ CHD1-Z ส่วนนกเพศผู้จะพบเพียงแถบเดียวคือCHD1-Z ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อสามารถแยกเพศนกเลิฟเบิร์ดได้ถูกต้องโดยการใช้เทคนิค PCR ร่วมกับการใช้ gel electrophoresis และ เพื่อเป็นแนวทางในการศึกษาและพัฒนาวิธีการแยกเพศนกชนิดอื่นๆต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ตัวอย่างนก

ตัวอย่างนกเลิฟเบิร์ดทั้งหมดที่ทำการศึกษาครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างจากนกเลิฟเบิร์ด 21 ตัว จากฟาร์มนกในจังหวัดสมุทรสาครจำนวน 12 ตัว และจากกรงนกโครงการวิจัยนกสวยงามของคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อีกจำนวน 9 ตัว โดยตัวอย่างนกทั้งหมดแบ่งออกเป็นนกที่ทราบเพศแน่นอนจากประวัติและการจับคู่ให้ลูกโดยมีนกเพศผู้ 12 ตัว นกเพศเมีย 9 ตัว ตัวอย่างนกที่ทราบเพศทั้งหมดจะถูกนำมาทำการแยกเพศด้วยการคลำตรวจกระดูกเชิงกรานอีกครั้ง โดยผู้เลี้ยงซึ่งไม่ใช่ผู้เลี้ยงนกกลุ่มนี้ ต่อจากนั้นทำการเก็บตัวอย่าง ซึ่งตัวอย่างนกทั้งหมดจะถูกนำมาทำการตรวจแยกเพศโดยการเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำที่ปีก(wing vein)ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย Lysis buffer(4 M guanidine isothiocyanate, 25 mM sodium citrate, 0.5 % sarcosyl, pH 7.0) เพื่อที่จะนำไปสกัดแยก DNA ที่จะใช้ในขั้นตอนการทำ PCR ต่อไปขั้นตอนในการเก็บเลือดทั้งหมดทำแบบเทคนิคปลอดเชื้อ

การสกัด DNA จากตัวอย่างเลือด

ทำการสกัด DNA จากตัวอย่างเลือดในสารละลาย lysis buffer ด้วย phenol และ chloroform แล้วทำการดูดเก็บ supernatant มาทำการตกตะกอน DNA ใน isopropanol

ปั่นล้างตะกอน DNA ด้วย 75% alcohol แล้วตั้งตะกอน DNA ทิ้งไว้ให้แห้ง โดยการคว่ำหลอดทิ้งไว้ จากนั้นจึงนำมาเติมสารละลาย TE(Tris EDTA) แล้วเขย่าผสมให้เข้ากัน จะได้ DNA ใน TE ไว้ใช้ในกระบวนการทำ PCR ต่อไป

คู่ Primer

Primer1	2551 F	5'-GTT ACT GAT TCG TCT ACG AGA–3'
Primer2	2719 R	5'-ATT GAA ATG ATC CAG TGC TTG-3'

Polymerase Chain Reaction

ในขั้นตอนนี้เราจะทำการผสมตัวอย่าง DNA ที่แยกมาได้ (DNA samples) กับสารละลายผสม (Master- Mixer) เพื่อเข้าขั้นตอนการเพิ่มจำนวน Sex Chromosome ในกระบวนการ Polymerase Chain Reaction(PCR) โดยมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้คือ Sterile water , 10x PCR Buffer (TaKaRa®) , dNTP Mixture 2.5 mM (TaKaRa®) , Primer1 , Primer2 และ Taq DNA Polymerase (FINNZYMES®) ผสมสารทั้งหมดให้เข้ากัน จากนั้นนำ DNA samples ที่ต้องการศึกษาผสมลงใน Master - Mixer ในสัดส่วน 1.5 :13.5 μl

ทำการปรับแต่งขั้นตอนของเครื่อง PCR Machine Gene Amp PCR System 2400 (PERKIN ELMER®) ดังนี้คือ ขั้นตอนที่ 1 Initial denaturation ที่ 94 ^{0}C เป็นเวลา 5 นาที ขั้นตอนที่ 2 Denature ที่ 94 ^{0}C เป็นเวลา 30 วินาที, Annealing ที่ 58 ^{0}C เป็นเวลา 30 วินาที และ Extension ที่ 72 ^{0}C เป็นเวลา 30 วินาที ทำการทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2 นี้เป็นจำนวน 35 รอบ และขั้นตอนที่ 3 final extension ที่ 72 ^{0}C เป็นเวลา 7 นาที

Agarose gel electrophoresis

การวิเคราะห์หา แถบ DNA โดยการนำ PCR product ที่ได้มาทำการแยกวิเคราะห์ด้วยวิธี Electrophoresis ใน 1 เปอร์เซ็นต์ Agarose gel ที่ผสมสีย้อม Ethidium bromide (1ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

ผลการทดลอง

จากตัวอย่างนกที่ทราบเพศทั้งหมด 21 ตัว(*Agapornis spp.*) พบว่าผลจากการแยกเพศด้วยวิธีการคลำตรวจกระดูกเชิงกราน มีนกเพศผู้ 11 ตัวและนกเพศเมีย 10 ตัว และจากการแยกเพศด้วยการทำ PCR มีนกเพศผู้ 12 ตัว และนกเพศเมีย 9 ตัว (ตารางที่1) ผลที่ได้จากการแยกเพศด้วยวิธีการทำ PCR พบว่าให้ผลตรงกับเพศนกที่ทราบเพศทุกตัวโดยทราบจากประวัติจากการจับคู่และวางไข่ให้ลูก แต่สำหรับการแยกเพศด้วยวิธีการคลำกระดูกเชิงกราน พบว่าให้ผลไม่ตรงกันกับเพศของนกที่ทราบเพศ(ตารางที่ 2) โดยที่ผลจากการคลำกระดูกเชิงกรานพบว่ามีนกเพศผู้ 11 ตัวและนกเพศเมีย 10 ตัว โดยนกที่รู้เพศจากการคลำตรวจกระดูกเชิงกรานทั้งนกเพศผู้และเพศเมียจำนวน 21 ตัวให้ผลตรงกับผลที่ได้จากนกที่ทราบเพศเพียง 16 ตัว(76.19%) และเมื่อทำการแยกเป็นเฉพาะนกเพศผู้กับเฉพาะนกเพศเมียพบว่านกเพศผู้จำนวน 11 ตัวให้ผลตรงกับผลที่ให้จากนกที่ทราบเพศ 9 ตัว(81.82%) และนกเพศเมีย 10 ตัวให้ผลตรงกับผลที่ได้จากนกที่ทราบเพศ 7 ตัว(70.00%) ซึ่งนกที่เหลือจะให้ผลจากการคลำตรวจกระดูกเชิงกราน เป็นเพศที่ตรงกันข้ามกับเพศของนกที่ทราบเพศ คือ นกเพศผู้ 2 ตัวให้ผลจาก เป็นนกเพศเมีย (18.18 %) และนกเพศเมีย 3 ตัวให้ผลจากนกที่ทราบเพศ เป็นนกเพศผู้(30.00 %)

ลักษณะที่แสดงให้เห็นบนเจล จากการทำ Gel electrophoresis (รูปที่ 2) พบว่านกเพศเมียให้ลักษณะแถบของยีนที่แตกต่างกัน 2 แถบ คือแถบที่มีขนาดประมาณ 400 bp(CHD1-W) กับแถบที่มีขนาดประมาณ 600 bp(CHD1-Z) ส่วนนกเพศผู้ให้ลักษณะของแถบยีนเพียงแถบเดียวที่ 600 bp. (CHD1-Z).

Table 1. Sexing comparison between vent sexing method and Polymerase chain reaction method in known sex birds

Sex	Known sex	Vent sexing	PCR
male	12	11	12
female	9	10	9

Table 2. Sexing comparison between vent sexing method and known sex birds

Sex	Vent sexing		total
	male	female	
male	9 (81.82 %)	3 (30.00 %)	12
female	2 (18.18 %)	7 (70.00 %)	9
total	11	10	21

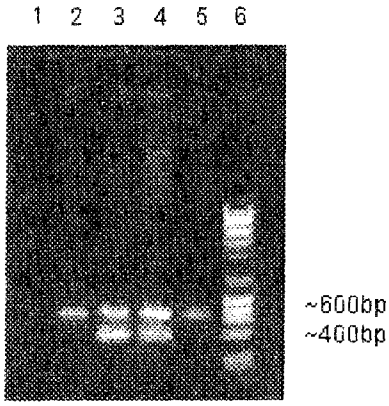

Figure2.DNA sex identification using PCR the known sex of each individual is indicated; bird with two bands(CHD1-Z and CHD1-W) is female and with one band (CHD1-Z) is male

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากผลการทดลองการตรวจแยกเพศนกด้วยการทำ PCR ให้ผลตรงกับเพศนกที่ทราบเพศแน่นอนทุกตัว(100%) แต่การแยกเพศด้วยการคลำตรวจกระดูกเชิงกราน พบว่าให้ผลตรงกับเพศนกที่ทราบเพศแน่นอนเพียง 76.19% หรือมีความผิดพลาดเกิดขึ้นได้ 1 ตัวจาก 4 ตัวที่ทำการตรวจ ดังนั้นวิธีการตรวจด้วยวิธี PCR มีความเหมาะสมในการตรวจแยกเพศมากกว่าการคลำตรวจ

จากการทำ Gel electrophoresis ลักษณะของแถบยีนที่ปรากฏบนแผ่นเจลมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งเพศผู้จะมี 1 แถบ (CHD1-Z) ส่วนเพศเมียจะมี 2 แถบ(CHD1-Z และ CHD1-W) โดยลักษณะของแถบที่ปรากฏของทั้งสองยีนมีระยะห่างที่เห็นได้อย่างชัดเจน เนื่องจากมีความแตกต่างกันของจำนวนเบสบนยีนนั้นๆโดย CHD1-W จะมีแถบยีนขนาดประมาณ 400 bp และ CHD1-Z มีแถบยีนขนาดประมาณ 600 bp จากการทำ PCR ด้วยการใช้ primer 2551F และ 2719R ในการตรวจแยกเพศในนกเลิฟเบิร์ดนี้จากรายงานการศึกษาอื่นๆ (Fridolfsson และคณะ 1999)พบว่าแม้ primer คู่นี้จะมีความเหมาะสมในการตรวจหาเพศนกโดยที่สามารถที่จะใช้ได้กับนกในกลุ่ม non-ratite bird ได้ทุกชนิด แต่ในนกบางสายพันธุ์อาจจะมีจำนวนของเบสบนยีนทั้งสองนี้แตกต่างกันไม่มากนัก ทำให้แถบยีนที่ปรากฏนั้นไม่ชัดเจน มีการซ้อนทับกันเป็นแถบเดียวได้ โดยเฉพาะนกในวงศ์นกจับคอน(Passeriformes) จึงต้องมีการทำ PCR ตั้งแต่ส่วนเริ่มต้นของยีนเพื่อที่จะให้เห็นความแตกต่างของแถบยีนชัดขึ้นจากแถบของ CHD1-W บาง ๆ ที่เกิดขึ้น ตลอดจน primer นี้ไม่สามารถที่จะแยกเพศของนกในกลุ่ม ratite bird ได้ถึงแม้ว่าจะมีการค้นพบยีนที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับ CHD1-W และ CHD1-Z ในนกกลุ่มนี้ จึงได้มีการออกแบบและปรับปรุง primer ใหม่ (2987F/3007F และ 3112R) แต่ก็ไม่สามารถแยกเพศนกกลุ่มนี้ได้

จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า การตรวจแยกเพศนกเลิฟเบิร์ดสามารถทำได้โดยการใช้เทคนิค PCR ได้อย่างได้ผล สามารถที่จะแยกเพศได้อย่างถูกต้องกว่าการคลำตรวจกระดูกเชิงกราน ตลอดจนสามารถทำได้ในนกทุกช่วงอายุ เพราะฉะนั้นเทคนิค PCR จึงมีความเหมาะสมในการตรวจแยกเพศนกเลิฟเบิร์ด ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้อาจใช้เป็นแนวทางในการศึกษาและพัฒนาการตรวจแยกเพศในนกชนิดอื่น ๆ ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

นิโลบล เฟื่องต้น. 2542. *ชีวเคมี 1*, พิมพ์ครั้งที่ 5. บริษัทธรรมสารจำกัด, กรุงเทพมหานคร.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2541. *พันธุศาสตร์*. สำนักพิมพ์มหาวิทยาเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

วาสนา ศิริรังษี. 2539. *วิทยาการทันสมัยในการตรวจวินิจฉัยโครโมโซมและยีน*. พงษ์สวัสดิ์การพิมพ์ ,เชียงใหม่.

อังคณา ฉายประเสริฐ. 2537.*PCR ในโรคติดต่อ*. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

Altman Robert B. 1997. *Avian medicine and surgery*. W.B.Saundens Company, Philadelphia.

Cortes, O., A. Barroso and S. Dunner .1999. Avian sexing : an optimized protocol using polymerase chain reaction-single-strain conformation polymorphism. J. Vet Diag Invest 11 (3) ; 297-299

Fridolfsson, A.K. and H. Ellegren. 1999. *A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds*. Journal of Avian Biology. 30 ; 1.

Griffiths, R. and D. Phil.2000. *Sex identification in birds*, Seminar in avian and exotic pet medicine. 9 (1) ; 14-26.

Khatib, H. and Y. Gruenbaum 1996. *Chicken red blood cell as a substrate for direct polymerase chain reaction*. Animal Genetics. 27; 53-54.

Mateman, C. and K. Lessells. 1996. *Molecular sexing of birds*. Nature. 383 : 281-287

Petitte, J.N. and A. Elizabeth Kegelmeyer. 1995. *Rapid sex determination chick embryos using the polymerase chain reaction*. Animal Biotechnology. 6(2) ; 119-130.

Rupley, A.E. 1997. *Manual of avian practice*. W.B. Saundens Company, Philadelphia.

Tiwari, B. and G. Richard. 1996. *Sex of the last spix's macaw*. Nature. 375.

Vanrompay, D. 2000. *Advances in nucleic Acids-Based Diagnosis*. Seminar in avian and exotic pet medicine. 9 (1) ; 1-13.

White Bruce A. 1993. *PCR protocols, Current methods and applications*. Humana Press Inc,New Jersey.