รายงานฉบับสมบูรณ์

(Final Report)

โครงการย่อยที่ 2: โครงการศึกษาและค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรม (DNA Markers) สำหรับบ่งชี้เอกลักษณ์ไก่กระดูกดำ

Sub-Project 2: Identification of molecular markers for black boned chicken

ภายใต้ชุดโครงการ : วิจัยเพื่อเสริมสร้างประสิทธิภาพการผลิตไก่กระดูกดำบนพื้นที่สูง

แผนงานวิจัย: เพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพของผลิตผลเกษตร

โดย ศุภมิตร เมฆฉาย และคณะ

สนับสนุนทุนวิจัยโดย สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

รายงานฉบับสมบูรณ์

(Final Report)

โครงการย่อยที่ 2: โครงการศึกษาและค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรม (DNA Markers) สำหรับบ่งชี้เอกลักษณ์ไก่กระดูกดำ

Sub-Project 2: Identification of molecular markers for black boned chicken

ภายใต้ชุดโครงการ : วิจัยเพื่อเสริมสร้างประสิทธิภาพการผลิตไก่กระดูกดำบนพื้นที่สูง

แผนงานวิจัย: เพื่อเพิ่มผลผลิตและคุณภาพของผลิตผลเกษตร

คณะผู้วิจัย	สังกัด
1. ศุภมิตร เมฆฉาย	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
2. กรวรรณ ศรีงาม	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
3. สุชน ตั้งทวีวิพัฒน์	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

กันยายน 2560

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 ผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักงานพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ เครื่องมือ และสถานที่สำหรับการวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณศูนย์บำรุงพันธุ์เชียงใหม่ อ.สันป่าตอง จ.เชียงใหม่ ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดไก่ประดู่หางดำ และไก่ชี ขอขอบคุณภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดไก่เนื้อและไก่ไข่ และขอขอบคุณนักศึกษาห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพด้านสัตว์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คุณนันทนา โปธาคำ และคุณวรรักษ์ หน่อสีดา

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2560

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

คณะผู้วิจัย

1. หัวหน้าโครงการ หน่วยงานสังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ และ E-mail

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย)	นายศุภมิตร เมฆฉาย
ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ)	Mr. Supamit Mekchay
คุณวุฒิ	ปริญญาเอก
ตำแหน่ง (ทางวิชาการ/ราชการ)	รองศาสตราจารย์
หน่วยงาน	ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ที่อยู่	239 ถนนห้วยแก้ว ต. สุเทพ อ .เมือง จ. เชียงใหม่
โทรศัพท์/โทรสาร	0-5394-4090 ต่อ 34 / 0-5322-5221
E-mail	supamitmekchay@gmail.com

2. นักวิจัย หน่วยงานสังกัด ที่อยู่ หมายเลขโทรศัพท์ และ E-mail

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย)	นางสาวกรวรรณ ศรีงาม
ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ)	Miss Korawan Sringarm
คุณวุฒิ	ปริญญาเอก
ตำแหน่ง (ทางวิชาการ/ราชการ)	อาจารย์
หน่วยงาน	ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ที่อยู่	239 ถนนห้วยแก้ว ต. สุเทพ อ. เมือง จ. เชียงใหม่
โทรศัพท์/โทรสาร	0-5394-4091 ต่อ 21
E-mail	korawan.s@cmu.ac.th, kanok70@hotmail.com

3. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นายสุชน ตั้งทวีวิพัฒน์

ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ)	Mr.Suchon Tangtaweewipat
คุณวุฒิ	ปริญญาเอก
ตำแหน่ง (ทางวิชาการ/ราชการ)	รองศาสตราจารย์
หน่วยงาน	ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ที่อยู่	239 ถนนห้วยแก้ว ต. สุเทพ อ.เมือง จ.เชียงใหม่
E-mail	suchon.t@cmu.ac.th, agani002@gmail.com

บทสรุปผู้บริหาร

ที่มาโครงการ

ไก่กระดูกดำ เป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีศักยภาพในเชิงการค้า และมีมูลค่าทางการตลาดสูงกว่าไก่พื้นเมืองและไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้าหลายเท่าตัว อย่างไรก็ตามการผลิตไก่กระดูกดำในพื้นที่โครงการหลวง ยังประสบปัญหาทางด้านสายพันธุ์ของไก่กระดูกดำ ซึ่งมีความแปรปรวนสูง กล่าวคือ เมื่อนำไก่พ่อแม่พันธุ์กระดูกดำ ที่ถูกคัดเลือกเอาไว้ไปผสมพันธุ์ แต่กลับให้ลูกไก่ที่มีลักษณะไม่ตรงตามลักษณะของไก่กระดูกดำ ทำให้ไก่ที่ผลิตได้ ไม่สามารถจำหน่ายเป็นไก่กระดูกดำ ส่งผลกระทบให้สูญเสียมูลค่าทางเศรษฐกิจ และทำให้ไม่เป็นที่ยอมรับจากผู้บริโภค ซึ่งปัญหาเหล่านี้เป็นอุปสรรคที่สำคัญต่อการพัฒนาตลาดของไก่กระดูกดำเป็นอย่างมาก

จากการศึกษาเครื่องหมายทางพันธุกรรม สำหรับบ่งชี้เอกลักษณ์ไก่กระดูกดำในปี 2558-2559 ที่ผ่านมา เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *FM, Id, PMEL17 and MC1R-2* ถูกวิเคราะห์ในไก่กระดูกดำ เครื่องหมายโมเลกุล *FM* assay A, *FM* assay B และ *Id542* สามารถจำแนกไก่กระดูกดำได้ถูกต้อง 88-95 เปอร์เซ็นต์ สำหรับเครื่องหมายพันธุกรรมของยีน *PMEL17* และ *MC1R* มีความสัมพันธ์กับลักษณะไก่กระดูกดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเครื่องหมายพันธุกรรมของยีน *PMEL17 และ MC1R-2* สามารถแยกไก่กระดูกดำได้ถูกต้อง 73-82 เปอร์เซ็นต์

สำหรับโครงการวิจัยในปีนี้ ต้องศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน tyrosinase (*TRY*) และศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน melanocortin 1 receptor (*MC1R*) เพิ่มเติมสำหรับบ่งชี้เอกลักษณ์ของไก่กระดูกดำ

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายทางพันธุกรรมบนยีน *MC1R* และ *TYR* สำหรับบ่งชี้เอกลักษณ์ไก่กระดูกดำ

วิธีวิจัย

ยีนเป้าหมาย *MC1R* และ *TYR* ถูกออกแบบไพรเมอร์ จำนวน 3 และ 6 คู่ไพรเมอร์ ตามลำดับ ประกอบด้วย *MC1R*-69, *MC1R*-212, *MC1R*-636, *TYR-1, TYR-2, TYR-3, TYR-4, TYR-5* และ *TYR-6* ไพรเมอร์ดังกล่าวนี้ถูกใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR เพื่อทดสอบความผันแปรในไก่กระดูกดำและไก่กระดูกไม่ดำ (กลุ่มควบคุม) เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่แสดงความผันแปรในประชากรไก่จะถูกนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับลักษณะของไก่กระดูกดำ นอกจากนี้ระดับการแสดงออกของยีน *MC1R* และ *TYR* ในกล้ามเนื้ออกของไก่กระดูกดำถูกวัดด้วยเทคนิค real time PCR เปรียบเทียบกับไก่กระดูกไม่ดำ

ผลการวิจัย

ผลการวิจัยในปี 2558 เครื่องหมายโมเลกุล *FM* assay A, *FM* assay B และ *Id542* สามารถจำแนกไก่กระดูกดำได้ถูกต้อง 88-95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ I) เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *Id542* มีแนวโน้มสัมพันธ์กับลักษณะสีของกล้ามเนื้ออกไก่ (P=0.08) ในขณะที่เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *FM* assay A และ *FM* assay B ไม่มีความสัมพันธ์กับสีกล้ามเนื้ออกไก่กระดูกดำ

ผลการวิจัยในปี 2559 เครื่องหมายพันธุกรรมของยีน *PMEL17* และ *MC1R* มีความสัมพันธ์กับลักษณะไก่กระดูกดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เครื่องหมายพันธุกรรมของยีน *PMEL17 และ MC1R-2* สามารถแยกไก่กระดูกดำได้ถูกต้อง 72.84 และ 82.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ I) เครื่องหมายพันธุกรรมของยีน *MC1R-2* มีความสัมพันธ์กับลักษณะสีของกล้ามเนื้ออกไก่ (P=0.0002) โดยไก่ที่มีจีโนไทป์ E/E มีกล้ามเนื้ออกสีเข้มกว่าไก่ที่มีจีโนไทป์ E/e

ผลการวิจัยในปี 2560 ความผันแปรของเครื่องหมายพันธุกรรมของยีน *MC1R* จำนวน 3 เครื่องหมาย (*MC1R*-69, *MC1R*-212 และ *MC1R*-636) และเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *TYR* ถูกวิเคราะห์ในแถบ PCR จำนวน 6 แถบ (*TYR-1, TYR-2, TYR-3, TYR-4, TYR-5* และ *TYR-6*) ถูกทดสอบในไก่กระดูกดำและไก่กระดูกไม่ดำ (กลุ่มควบคุม) เครื่องหมายโมเลกุล *MC1R-636* และ *TYR-2* จำนวน 2 เครื่องหมาย แสดงความผันแปรในไก่กระดูกดำและไก่กระดูกไม่ดำ เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าว ถูกนำมาวิเคราะห์จีโนไทป์ในไก่กระดูกดำจำนวน 60 ตัวอย่าง และไก่กระดูกไม่ดำ (กลุ่มควบคุม) จำนวน 50 ตัวอย่าง พบว่าเครื่องหมายพันธุกรรมของยีน *MC1R*-636 มีความสัมพันธ์กับลักษณะไก่กระดูกดำอย่างมีนัยสำคัญ เครื่องหมายพันธุกรรมของยีน *MC1R*-636 สามารถแยกไก่กระดูกดำได้ถูกต้อง 83.73 เปอร์เซ็นต์ สำหรับยีน *TYR*-2 สามารถแยกไก่กระดูกดำได้ถูกต้อง 68.83 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เครื่องหมายโมเลกุล *MC1R-636* มีความสัมพันธ์กับระดับสีของกล้ามเนื้ออกไก่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับระดับการแสดงออกของยีน *MC1R* และ *TYR* ในกล้ามเนื้อของไก่กระดูกดำสูงกว่าไก่กระดูกไม่ดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ประมาณ 1 และ 1.38 เท่า ตามลำดับ ผลการศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ว่าเครื่องหมายทางพันธุกรรมของยีน *MC1R* และ *TYR* ดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับลักษณะของไก่กระดูกดำ

ตารางที่ I. ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายกับลักษณะไก่กระดูกดำ

เครื่องหมายโมเลกุล	ไพรเมอร์	ความแม่นยำ (%)	P-values		
			Additive model	Dominance model	Recessive model
FM assay A	*FM1* F: AGAAACAAGGGTCAAGGTGAGC R: TGGATCATTGGAGGAAGTGTTG *FM2* R: GGGATGGCTCTCACATAAAAGG R: TGGATCATTGGAGGAAGTGTTG	92-95	1.36×10^{-35}	0.69	1.36×10^{-35}
FM assay B	*FM3* F: CTTGGCTCAGATATTCGCCTCT R: AGGCACAGTCTGGCACATTAAA *FM4* F: GCAGCCTTTATTATTGCGTGTG F: CTTGGCTCAGATATTCGCCTCT	85-90	5.41×10^{-24}	0.87	5.62×10^{-24}
*Id*000	F: TTCCTTAGACTTAATGGTCAG R: GGCATGGAAGTTATTGGTCT	70-80	0.02	0.37	0.20
*Id*542	F: CTTTGGGAAATGTGAGTCAA R: ATGGAGGCTAGATGTATAAC	88.58	3.09×10^{-15}	1.98×10^{-8}	9.45×10^{-15}
*Id*603	F: GGTTCTAGGATAGTTGCCAA R: AGTAGCTAATCTCACAATAGC	82.58	6.65×10^{-20}	0.68	2.69×10^{-16}
*Id*881	F: GGAAAACTAGAGAATTTGTGT R: ATACAGAAAGGAGGCTCCA	70-80	1.77×10^{-5}	0.01	0.007
PMEL17	F: AGCATCCCCAGCCGCCAG R: CTGTGTTCTCCCCGTGTCT	72.84	1.10×10^{-22}	5.66×10^{-11}	1.36×10^{-35}
MC1R-2	F: ACATGCTGGTGAGCGTCAG R: GCGAACATGTGAATGTAGAG	82.03	4.28×10^{-35}	2.67×10^{-11}	3.34×10^{-34}
MC1R-636	F: ATTCACATGTTCGCGCTGGT R: TAGAAGAAGACTCCCAGCAG	83.74	0.0085	0.0022	0.0128
TYR-2	F: GCTTCTCAGGACAAAACTGC R: CTGCCATGAGGAGAAAAATG	68.83	0.12	0.22	0.15

บทสรุป

1) เครื่องหมายโมเลกุล *MC1R*-636 และ *TYR-2* สามารถจำแนกไก่กระดูกได้ถูกต้องด้วยค่าความแม่นยำ เท่ากับ 83.74 และ 68.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2) เครื่องหมายโมเลกุล *MC1R*-636 มีความสัมพันธ์กับระดับสีออกของกล้ามเนื้อไก่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3) ระดับการแสดงออกของยีน *MC1R* และ *TYR* ในกล้ามเนื้อของไก่กระดูกดำ มีค่าสูงกว่าไก่กระดูกไม่ดำ เท่ากับ 1 และ 1.39 เท่า

ข้อเสนอแนะ

ในการจำแนกไก่กระดูกดำควรใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *MC1R*-636 และ *TYR-2* ร่วมกับเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเออื่น ๆ (อาทิเช่น *FM assay A, FM assay B, Id542*) ส่วนการคัดเลือกลักษณะสีกล้ามเนื้ออกของไก่กระดูกดำ ควรใช้เครื่องหมายโมเลกุล *MC1R-636* ร่วมกับ *MC1R-2* (ผลจากการศึกษาในปี 2559)

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

Executive summary

Introduction

Black boned chicken is one economically important species and it has higher market values than the indigenous and commercial broiler chickens. The major problem of the black boned chicken production on highland area is high variation of characteristics. The selected sire and dam of black boned chickens could be not produced the purebred black boned chicks. The growing chickens could not sell as the black boned chickens. It has effects on economic losses and unacceptability for consumers. This problem is still a major obstacle on market development of black boned chickens.

In previous studies (2015-2016), the molecular markers of *FM*, *Id, PMEL17 and MC1R-2* genes were analyzed in the black boned chicken. The *FM assay A, FM assay B* and *Id542* markers could be classified the black boned with 88-95 % accuracy. The *PMEL17* and *MC1R-2* markers could be identified the black boned chicken with 73-82 % accuracy, respectively.

In this study was to study the molecular markers of tyrosinase (*TRY*) and addition of melanocortin 1 receptor (*MC1R*) genes for identifying of black boned chicken.

Objective

To study the association of *MC1R* and *TYR* genes with characteristics of black boned chicken.

Methodology

The target genes of *MC1R* and *TYR* were designed primers with 3 and 6 primer pairs, respectively and consist of *MC1R*-69, *MC1R*-212, *MC1R*-636 *TYR-1, TYR-2, TYR-3, TYR-4, TYR-5* and *TYR-6*. These primers were used to amplify with PCR technique for polymorphism identification in black boned- and non-black boned chickens (control group). The polymorphic molecular markers were used to association analysis with black boned chicken characteristics. Moreover, the expression levels of *MC1R* and *TYR* genes in breast muscles of the black boned chicken were measured with real time PCR technique and compared with non-black boned chickens.

Results

In 2015, the results showed the *FM assay A, FM assay B* and *Id542* markers could be classified the black boned with 88-95% accuracy (Table I). The *Id542* marker had tended toward an association with the breast muscle color trait of black boned chickens (*P*=0.08). No association of *FM* assay A and *FM* assay B markers with the breast muscle color of black boned chickens were observed.

In 2016, the results revealed the *PMEL17* and *MC1R-2* markers could be identified the black boned chicken with 72.84 and 82.02% accuracy, respectively (Table I). Moreover, the *MC1R*-2 marker was significantly associated with breast muscle color trait of black boned chickens (*P*=0.0002). The chickens with the E/E genotype had darker the breast muscular color values than those the chickens with the E/e genotype.

In 2017, three *MC1R (MC1R*-69, *MC1R*-212, *MC1R*-636) and six *TYR* fragments *(TYR-1, TYR-2, TYR-3, TYR-4, TYR-5* and *TYR-6*) were tested for polymorphism in the black boned chickens and non-black boned chickens (control group). Two SNP markers of *MC1R-636* and *TYP-2* were found to be segregated in the black and non-black boned chickens. These two markers were used to genotyped in 60 black boned chickens and 50 non-black boned chickens (control group). The results showed that the molecular *MC1R*-636 marker was significantly associated with characteristics of black boned chicken. The *MC1R*-636 and *TYR-2* markers could be identified the black boned chicken with 83.74 and 68.83 % accuracy, respectively. Moreover, the *MC1R-636* marker was associated with the meat color of chicken meat. Expression levels of *MC1R* and *TYR* genes in the black boned chicken had significant higher than the non-black boned chickens about 1 and 1.38 folds, respectively. The results indicate that these genetic markers of *MC1R* and *TYR* are related to the black boned chicken characteristics.

Table I. Association of molecular markers with black boned chicken characteristics.

Markers	Primers	Accuracy (%)	P-values		
			Additive model	Dominance model	Recessive model
FM assay A	*FM1*	92-95	1.36×10^{-35}	0.69	1.36×10^{-35}
	F: AGAAACAAGGGTCAAGGTGAGC				
	R: TGGATCATTGGAGGAAGTGTTG				
	FM2				
	R: GGGATGGCTCTCACATAAAAGG				
	R: TGGATCATTGGAGGAAGTGTTG				
FM assay B	*FM3*	85-90	5.41×10^{-24}	0.87	5.62×10^{-24}
	F: CTTGGCTCAGATATTCGCCTCT				
	R: AGGCACAGTCTGGCACATTAAA				
	FM4				
	F: GCAGCCTTTATTATTGCGTGTG				
	F: CTTGGCTCAGATATTCGCCTCT				
*Id*000	F: TTCCTTAGACTTAATGGTCAG	70-80	0.02	0.37	0.20
	R: GGCATGGAAGTTATTGGTCT				
*Id*542	F: CTTTGGGAAATGTGAGTCAA	88.58	3.09×10^{-15}	1.98×10^{-8}	9.45×10^{-15}
	R: ATGGAGGCTAGATGTATAAC				
*Id*603	F: GGTTCTAGGATAGTTGCCAA	82.58	6.65×10^{-20}	0.68	2.69×10^{-16}
	R: AGTAGCTAATCTCACAATAGC				
*Id*881	F: GGAAAACTAGAGAATTTGTGT	70-80	1.77×10^{-5}	0.01	0.007
	R: ATACAGAAAGGAGGCTCCA				
PMEL17	F: AGCATCCCCAGCCGCCAG	72.84	1.10×10^{-22}	5.66×10^{-11}	1.36×10^{-35}
	R: CTGTGTTCTCCCCGTGTCT				
MC1R-2	F: ACATGCTGGTGAGCGTCAG	82.03	4.28×10^{-35}	2.67×10^{-11}	3.34×10^{-34}
	R: GCGAACATGTGAATGTAGAG				
MC1R-636	F: ATTCACATGTTCGCGCTGGT	83.74	0.0085	0.0022	0.0128
	R: TAGAAGAAGACTCCCAGCAG				
TYR-2	F: GCTTCTCAGGACAAAACTGC	68.83	0.12	0.22	0.15
	R: CTGCCATGAGGAGAAAAATG				

Conclusion

1) The *MC1R-636* and *TYR-2* markers could be identified the black boned chicken with 83.74 and 68.83 % accuracy, respectively.

2) The *MC1R-636* marker showed significant association with the breast muscle color trait.

3) The expression levels of MC1R and *TYR* genes in black boned chicken were 1 and 1.39 folds compared with non-black boned chickens.

Suggestion

To apply, the molecular markers of *MC1R-636* and *TYR-2* genes should be used with another molecular markers (e.g. *FM assay A*, *FM assay B* and *Id542*) for identification of the black boned chickens. Moreover, the *MC1R-636* marker should be used with the *MC1R-2* marker (from results of 2016) for selection the color of breast muscle in the black boned chickens.

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน)
Highland Research and Development Institute (Public Organization)

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
คณะผู้วิจัย	ข
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	ค
Executive summary	ช
สารบัญ	ฎ
สารบัญตาราง	ฏ
สารบัญภาพ	ฐ
บทคัดย่อ	ฑ
Abstract	ฒ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	6
บทที่ 4 ผลการวิจัย	9
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการวิจัย	20
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	23
เอกสารอ้างอิง	24
ภาคผนวก	27
ตารางสรุปเปรียบเทียบแผนงานวิจัยกับผลงานวิจัย	34

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR ของยีนเป้าหมายในไก่กระดูกดำ	13
ตารางที่ 2	ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายในไก่กระดูกดำและไก่กระดูกไม่ดำ	17
ตารางที่ 3	ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *MC1R* และ *TYR* กับลักษณะไก่กระดูกดำ	17
ตารางที่ 4	ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายกับลักษณะไก่กระดูกดำ	18
ตารางที่ 5	ไพรเมอร์ที่ใช้วัดการแสดงออกของยีน *MC1R* และ *TYR* ในกล้ามเนื้อของไก่กระดูกดำ	18
ตารางที่ 6	ระดับการแสดงออกของยีน *MC1R* และ *TYR* ในกล้ามเนื้อของไก่กระดูกดำและไก่กระดูกไม่ดำ	19
ตารางที่ 7	สรุปเปรียบเทียบผลงานวิจัยกับแผนงานวิจัย	34

สถาบันวิจัยและพัฒนาที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ตัวอย่างไก่กระดูกดำ และการเก็บเลือดไก่กระดูกดำ	9
ภาพที่ 2	ตัวอย่างไก่ที่มีลักษณะไม่ตรงตามพันธุ์	10
ภาพที่ 3	ตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่กระดูดำ	11
ภาพที่ 4	ผลการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอของไก่กระดูกดำที่สกัดได้บน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1.2%	11
ภาพที่ 5	ผลการตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอของไก่กระดูกดำที่สกัดได้บน formaldehyde agarose gel ที่ความเข้มข้น 1.2%	12
ภาพที่ 6	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลของยีน *TYR*	14
ภาพที่ 7	ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลของยีน *MC1R*	14
ภาพที่ 8	รูปแบบ SSCP บนยีน *TYR*	15
ภาพที่ 9	ผลการตรวจสอบจีโนไทป์เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *MC1R*-636 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI*	16
ภาพที่ 10	ผลการตรวจสอบจีโนไทป์เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *TYR-2* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HpyCH4V*	16

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายทางพันธุกรรมบนยีนเป้าหมาย (*FM, Id*, *PMEL17,* MC1R และ *TYR*) สำหรับบ่งชี้เอกลักษณ์ไก่กระดูกดำ ผลการศึกษาในปี 2558 เครื่องหมายโมเลกุล *FM* assay A, *FM* assay B และ *Id542* สามารถจำแนกไก่กระดูกดำได้ถูกต้อง 88-95 เปอร์เซ็นต์ เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *Id542* มีแนวโน้มสัมพันธ์กับลักษณะสีของกล้ามเนื้ออกไก่ (*P*=0.08) ในขณะที่เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *FM* assay A และ *FM* assay B ไม่มีความสัมพันธ์กับสีกล้ามเนื้ออกไก่กระดูกดำ ผลการศึกษาในปี 2559 เครื่องหมายพันธุกรรมของยีน *PMEL17* และ *MC1R* มีความสัมพันธ์กับลักษณะไก่กระดูกดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เครื่องหมายพันธุกรรมของยีน *PMEL17 และ MC1R-2* สามารถแยกไก่กระดูกดำได้ถูกต้อง 72.84 และ 82.03 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เครื่องหมายพันธุกรรมของยีน *MC1R*-2 มีความสัมพันธ์กับลักษณะสีของกล้ามเนื้ออกไก่ (*P*=0.0002) โดยไก่ที่มีจีโนไทป์ E/E มีกล้ามเนื้ออกสีเข้มกว่าไก่ที่มีจีโนไทป์ E/e สำหรับผลการศึกษาในปี 2560 ความผันแปรของเครื่องหมายพันธุกรรมของยีน *MC1R* เพิ่มเติมจำนวน 3 เครื่องหมาย (*MC1R*-69, *MC1R*-212 และ *MC1R*-636) ถูกทดสอบในไก่กระดูกดำเช่นเดียวกันเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *TYR* ถูกวิเคราะห์ในแถบ PCR จำนวน 6 แถบ (*TYR-1, TYR-2, TYR-3, TYR-4, TYR-5* และ *TYR-6*) เครื่องหมายโมเลกุล MC1R-636 และ TYR-2 จำนวน 2 เครื่องหมาย แสดงความผันแปรในไก่กระดูกดำและไก่กระดูกไม่ดำ เครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 2 เครื่องหมายดังกล่าว ถูกนำมาวิเคราะห์จีโนไทป์ในไก่กระดูกดำจำนวน 60 ตัวอย่าง และไก่กระดูกไม่ดำ (กลุ่มควบคุม) จำนวน 50 ตัวอย่าง พบว่าเครื่องหมายพันธุกรรมของยีน *MC1R*-636 มีความสัมพันธ์กับลักษณะไก่กระดูกดำอย่างมีนัยสำคัญ เครื่องหมายพันธุกรรมของยีน *MC1R*-636 สามารถแยกไก่กระดูกดำได้ถูกต้อง 83.73 เปอร์เซ็นต์ สำหรับยีน *TYR*-2 สามารถแยกไก่กระดูกดำได้ถูกต้อง 68.83 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เครื่องหมายโมเลกุล *MC1R-636* มีความสัมพันธ์กับระดับสีของกล้ามเนื้ออกไก่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับระดับการแสดงออกของยีน *MC1R* และ *TYR* ในกล้ามเนื้อของไก่กระดูกดำสูงกว่าไก่กระดูกไม่ดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ประมาณ 1 และ 1.38 เท่า ตามลำดับ ผลการศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ว่าเครื่องหมายทางพันธุกรรมของยีน *MC1R* และ *TYR* ดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับลักษณะของไก่กระดูกดำ

Abstract

The objective of this study was to study the association of candidate genes with (*FM, Id*, *PMEL17, MC1R* and *TYR*) with characteristics of black boned chicken. In 2015, the results showed the *FM assay A, FM assay B* and *Id542* markers could be classified the black boned with 88-95 % accuracy. The *Id542* marker had tended toward an association with the breast muscle color trait of black boned chickens (*P*=0.08). No association of *FM* assay A and *FM* assay B markers with the breast muscle color of black boned chickens were observed. In 2016, the results showed the *PMEL17* and *MC1R-2* markers could be identified the black boned chicken with 72.84 and 82.02% accuracy, respectively. Moreover, the *MC1R*-2 marker was significantly associated with breast muscle color trait of black boned chickens (*P*=0.0002). The chickens with the E/E genotype had darker the breast muscular color values than those the chickens with the E/e genotype. In 2017, three polymorphisms of *MC1R* gene *(MC1R-69*, *MC1R*-212, *MC1R*-636) were tested in the black boned chickens, as well as single nucleotide polymorphism of *TRY* gene were analyzed within six PCR fragments *(TYR-1, TYR-2, TYR-3, TYR-4, TYR-5* and *TYR-6)*. Two SNP markers of *MC1R-636* and *TYP-2* were found to be segregated in the black and non-black boned chickens. These two markers were used to genotyped in 60 black boned chickens and 50 non-black boned chickens (control group). The results showed that the molecular *MC1R-636* marker was significantly associated with characteristics of black boned chicken. The *MC1R*-636 and *TYR-2* markers could be identified the black boned chicken with 83.74 and 68.83 % accuracy, respectively. Moreover, the *MC1R-636* marker was associated with the meat color of chicken meat. Expression levels of *MC1R* and *TYR* genes in the black boned chicken had significant higher than the non-black boned chickens about 1 and 1.38 folds, respectively. The results indicate that these genetic markers of *MC1R* and *TYR* are related to the black boned chicken characteristics.