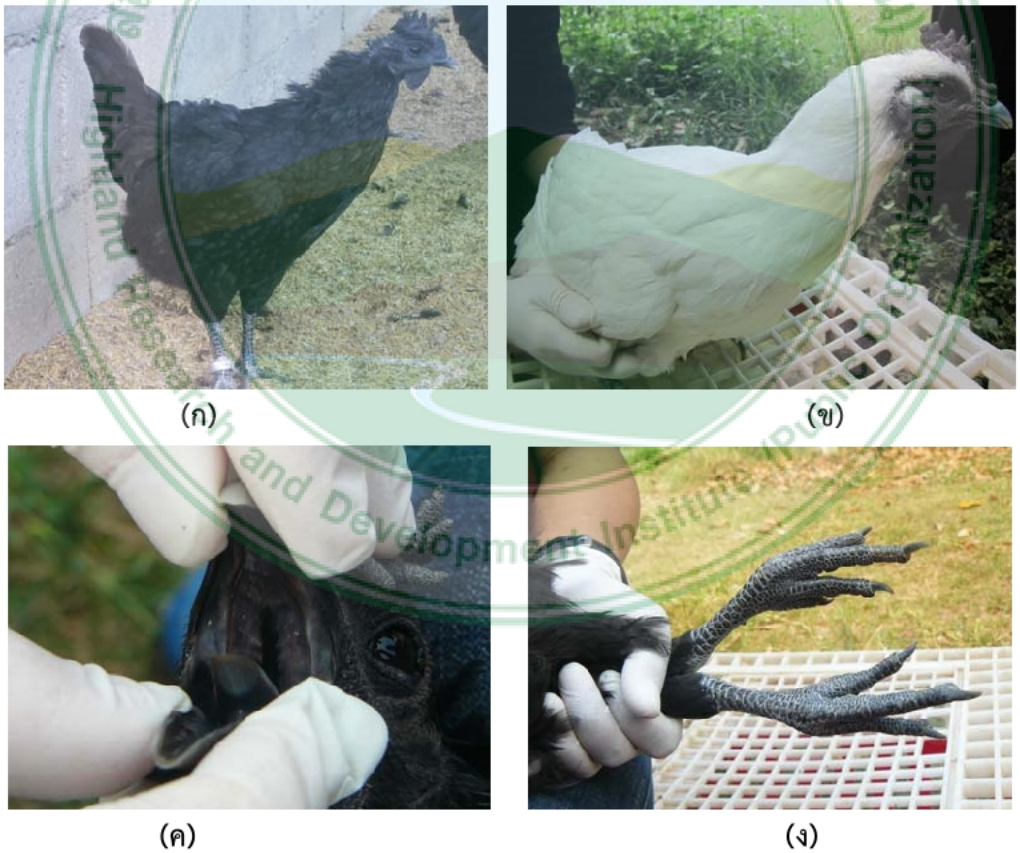
บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การเก็บรวบรวมตัวอย่างเลือดไก่กระดูกดำ

ไก่กระดูกดำที่ใช้ในการศึกษามีจำนวนทั้งหมด 169 ตัว โดยมาจาก 3 พื้นที่ คือ 1) พื้นที่ฟาร์มปศุสัตว์งานพัฒนาและส่งเสริมปศุสัตว์ มูลนิธิโครงการหลวง ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ จำนวน 116 ตัว 2) พื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่สะป๊อก จำนวน 23 ตัวอย่าง และ 3) พื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงห้วยเสี้ยว จำนวน 30 ตัวอย่าง ส่วนไก่กลุ่มควบคุมในการศึกษาครั้งนี้ใช้ไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า ไก่พื้นเมืองประดู่หางดำ และไก่ชี้ฟ้า (ไก่กระดูกดำพื้นเมืองไทย) สำหรับไก่กระดูกดำในพื้นที่ของโครงการหลวงสามารถแบ่งตามรูปร่างลักษณะภายนอกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ ไก่กระดูกดำที่มีขนสีดำ และไก่กระดูกดำที่มีขนสีขาว (ปาปาซุง) (ภาพที่ 1-2) ส่วนลักษณะใบหน้า หงอน เหนียง ผิวหนัง เพดานปาก และแข้ง ของไก่ทั้งสองกลุ่มดังกล่าวมีสีดำ แต่ลักษณะสีดำมีความผันแปรในไก่แต่ละตัว โดยเฉพาะไก่กระดูกดำในกลุ่มที่มีขนสีขาว มีลักษณะใบหน้าหงอน เหนียง มีดำอมแดง ไก่ทั้งหมดถูกการเก็บตัวอย่างเลือดจากบริเวณเส้นเลือดใต้ปีก แสดงภาพที่ 3



ภาพที่ 1 ลักษณะรูปร่างของไก่กระดูดำในพื้นที่โครงการหลวง (ก) ลักษณะสีขนดำ (ข) ลักษณะขนสีขาว (ไก่กระดูกดำปาปาซุง (ค) ลักษณะสีเพดานปาก และ (ง) ลักษณะสีแข้ง

(ก) (ข)

ภาพที่ 2 ลักษณะปรากฏของไก่กระดูดำ (ก) ลักษณะสีภายนอกบริเวณกล้ามเนื้ออกของไก่กระดูกดำ (ข) ลักษณะบริเวณใบหน้าของไก่กระดูกดำ

ภาพที่ 3 การเก็บตัวอย่างเลือดไก่กระดูกดำจากบริเวณเส้นเลือดใต้ปีก

4.2 การสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอ พร้อมทั้งตรวจวัดคุณภาพดีเอ็นเอ

ตัวอย่างเลือดไก่ถูกนำ มาทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform และตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอของไก่แต่ละตัวอย่างบน agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 1% ดังภาพที่ 4 และวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ เพื่อปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้ประมาณ 50-100 ng/μl เพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายด้วยปฏิกิริยา PCR

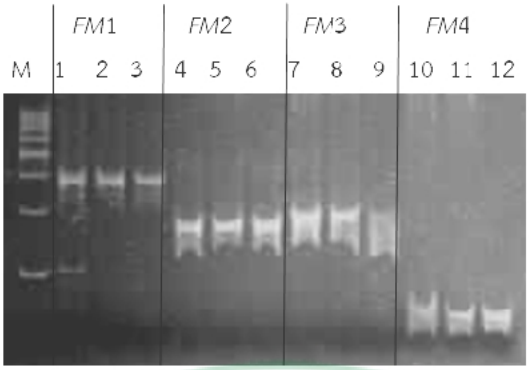
ภาพที่ 4 ผลการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอของไก่ที่สกัดบน agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 1 % โดยที่ หมายเลข 1 ตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐาน ที่ความเข้มข้น 100 ng/μl หมายเลข 2, 3 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของไก่กระดูกดำ (ขนสีดำ) หมายเลข 4, 5 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของไก่กระดูกดำ (ขนสีขาว) หมายเลข 6, 7 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า หมายเลข 8, 9 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของไก่ประดู่หางดำ หมายเลข 10, 11 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอของไก่ชี้ฟ้า

4.3 การตรวจสอบคามผันแปรของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอสำหรับบ่งชี้ลักษณะไก่กระดูกดำ

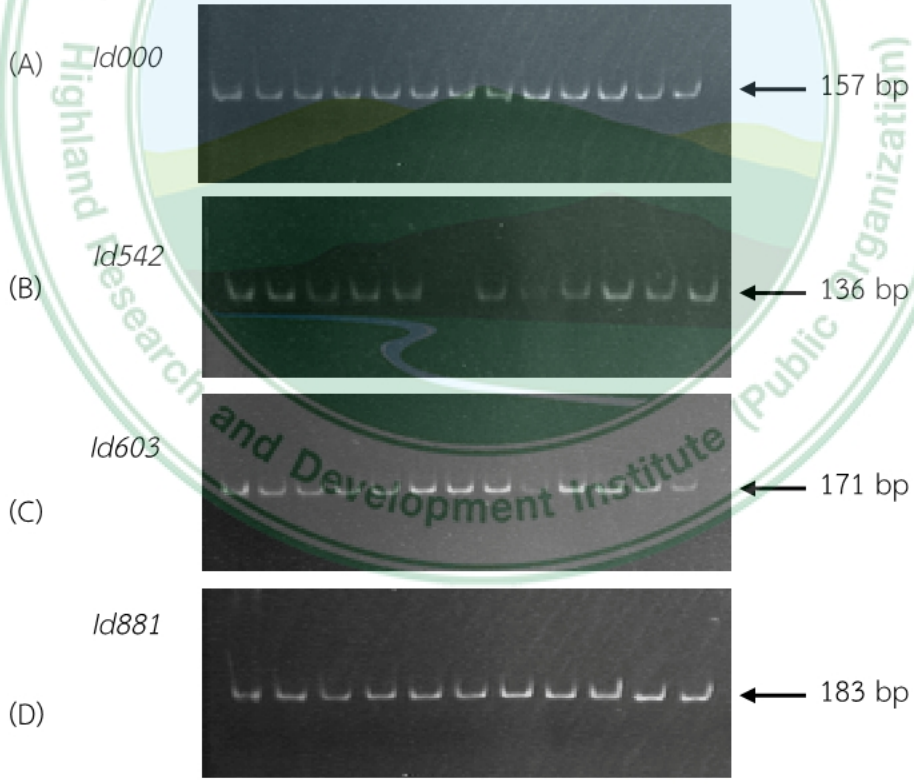
การตรวจสอบความผันแปรของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอสำหรับไก่กระดูกดำ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 8 เครื่องหมาย ประกอบด้วย *FM* (*FM*1, *FM*2, *FM*3 และ *FM*4) (ตารางที่ 2) และ *Id* (*Id000*, *Id542*, *Id603* และ *Id881*) (ตารางที่ 2)

4.3.1 ผลการสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR

ผลการทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็เอโดยใช้ไพรเมอร์สำหรับบ่งชี้ลักษณะไก่กระดูกดำ จำนวน 8 เครื่องหมาย ประกอบด้วย *FM* (*FM*1, *FM*2, *FM*3 และ *FM*4) และ *Id* (*Id*000, *Id*542, *Id*603 และ *Id*881) แสดงดังภาพที่ 5 และ 6



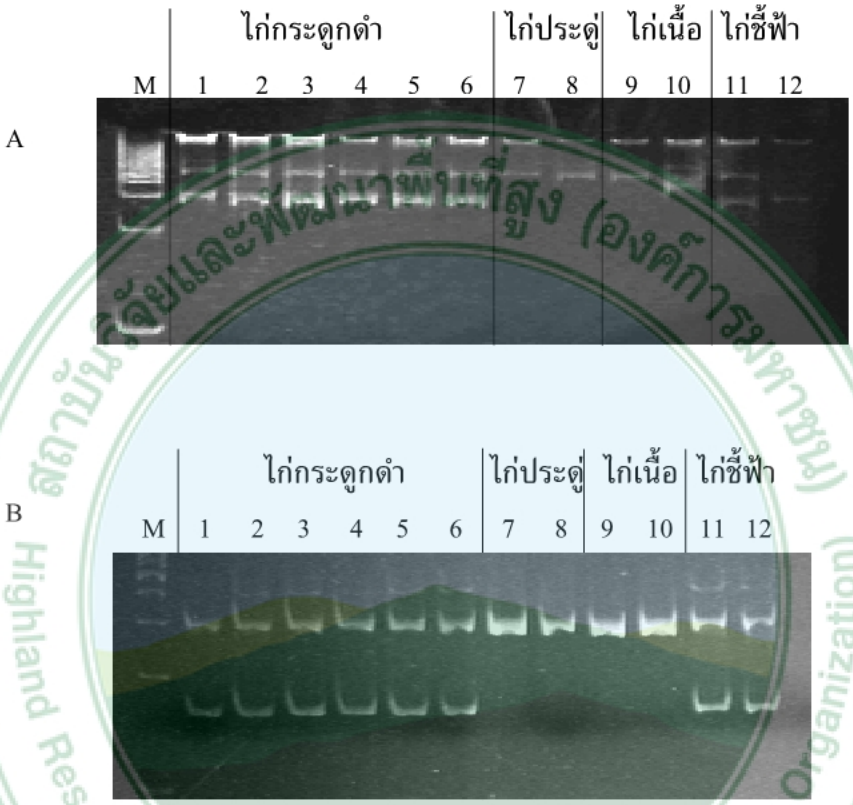
ภาพที่ 5 ผลการทดสอบการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลของยีน *FM* จำนวน 4 เครื่องหมาย โดยที่ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp หมายเลข 1-3 คือ ผลผลิต PCR-*FM1* ของ (1) ไก่กระดูกดำ (2) ไก่เนื้อ และ (3) ไก่ชี้ฟ้า หมายเลข 4-6 คือ ผลผลิต PCR-*FM*2 ของ (4) ไก่กระดูกดำ (5) ไก่เนื้อ และ (6) ไก่ชี้ฟ้า หมายเลข 7-9 คือ ผลผลิต PCR-*FM*3 ของ (7) ไก่กระดูกดำ (8) ไก่เนื้อ และ (9) ไก่ชี้ฟ้า หมายเลข 10-12 คือ ผลผลิต PCR-*FM*4 ของ (10) ไก่กระดูกดำ (10) ไก่เนื้อ และ (11) ไก่ชี้ฟ้า ตามลำดับ



ภาพที่ 6 ตัวอย่างผลผลิต PCR จากเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *Id* จำนวน 4 เครื่องหมาย ประกอบด้วย (A) *Id000,* (B) *Id*542, (C) *Id*603 และ (D) *Id*881 ของไก่กระดูกดำ

4.3.2 ความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน FM

ผลการศึกษาความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทป์บนยีน *FM* ด้วยชุดไพรเมอร์ จำนวน 2 ชุด คือ (1) ไพรเมอร์ *FM*1 และ *FM*2 และ (2) ไพรเมอร์ *FM*3 และ *FM*4 โดยพบว่าไพรเมอร์ทั้งสองชุด สามารถจำแนกไก่กระดูกดำออกจากไก่ประดู่หางดำ และไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า แต่รูปแบบแถบดีเอ็นเอของไก่กระดูกดำ มีลักษณะเหมือนกับไก่ชี้ฟ้า (ไก่กระดูกดำพื้นเมืองไทย) แสดงในภาพที่ 7

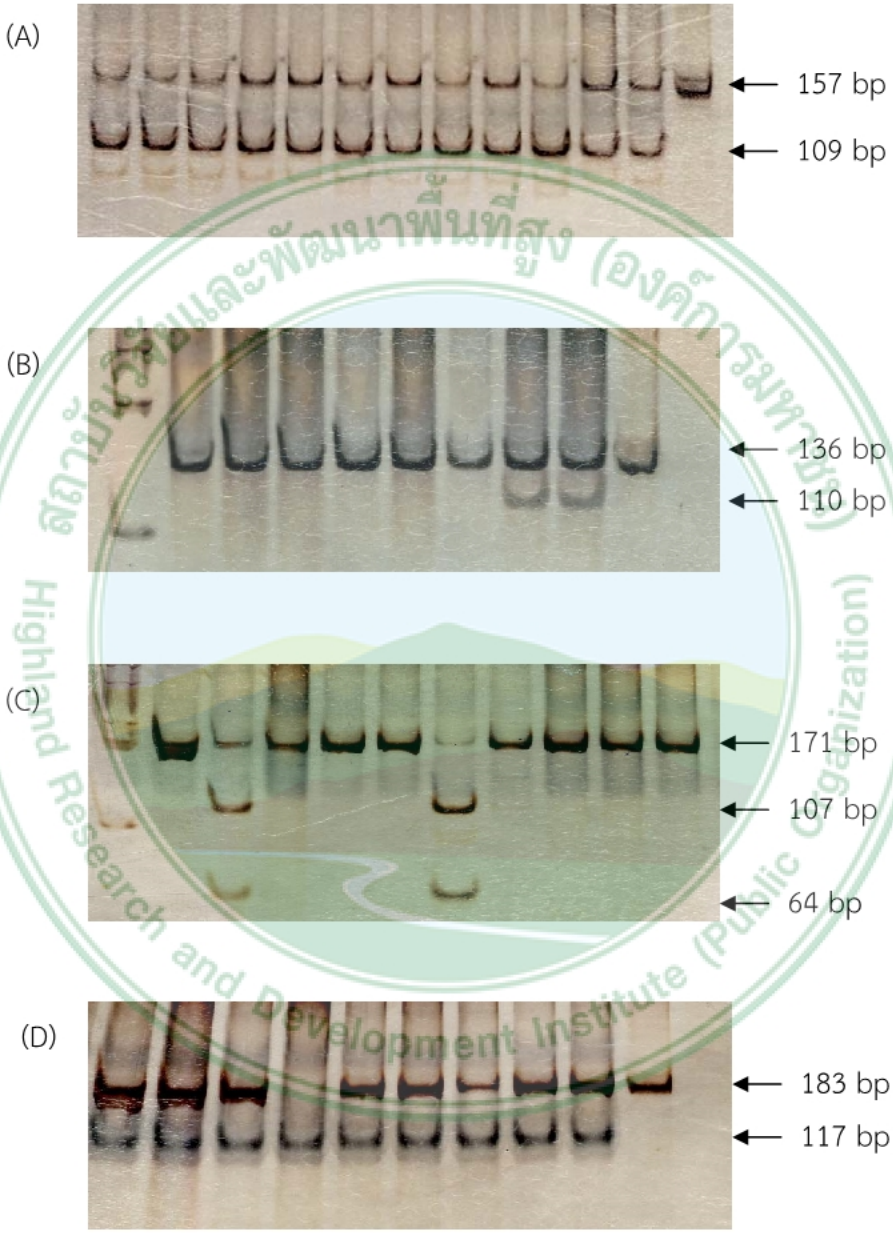


ภาพที่ 7 ผลการตรวจสอบความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทป์บนยีน *FM* ด้วย (A) ไพรเมอร์ *FM*1 และ *FM*2 และ (B) ไพรเมอร์ *FM*3 และ *FM*4 โดยที่ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp หมายเลข 1-6 คือ แถบ PCR ของไก่กระดูกดำ หมายเลข 7-8 คือ แถบ PCR ของไก่ประดู่หางดำ หมายเลข 9-10 คือ แถบ PCR ของไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า หมายเลข 11-12 คือ แถบ PCR ของไก่ชี้ฟ้า

4.3.3 ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *Id*

ผลผลิต PCR ของเครื่องหมายโมเลกุล *Id*000, *Id*542, *Id*603 และ *Id*881 ถูกนำมาตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) โดยยีน *Id000*, *Id542*, *Id603* และ *Id881* สามารถตรวจสอบจีโนไทป์ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*1II, *Mbo*I, *Rsa*I และ *Hin1*II ตามลำดับ (ภาพที่ 8) ผลผลิต PCR-*Id000* มีความยาว 157 bp เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin1*II สามารถตัดแถบ PCR-*Id000* ได้ ออกเป็น 2 แถบ ซึ่งมีขนาด 109 และ 48 bp ในขณะที่ ผลผลิต PCR-*Id542* มีความยาว 136 bp เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Rsa*I สามารถตัดแถบ PCR-*Id*542 ได้ ออกเป็น 2 แถบ

ซึ่งมีขนาด 110 และ 26 bp สำหรับผลผลิต PCR-*Id603* มีความยาว 171 bp เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mbo*I สามารถตัดแถบ PCR-*Id603* ได้ ออกเป็น 2 แถบ ซึ่งมีขนาด 107 และ 64 bp ส่วนผลผลิต PCR-*Id881* มีความยาว 183 bp เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin1*II สามารถตัดแถบ PCR-*Id881* ได้ ออกเป็น 2 แถบ ซึ่งมีขนาด 117 และ 66 bp



ภาพที่ 8 ผลการตรวจสอบจีโนไทป์เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *Id* ในไก่กระดูกดำ

ข้อมูลจีโนไทป์เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *FM* และ *Id* ในไก่ จำนวน 6 ชุดเครื่องหมาย ถูกนำไปวิเคราะห์ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีล เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอกับลักษณะไก่กระดูกดำ

4.3.4 ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของยีนเป้าหมาย *FM* และ *Id*

ความถี่จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *FM* assay A, *FM* assay B, *Id*000, *Id*542, *Id*603 และ *Id*881 ในไก่แต่ละสายพันธุ์ แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายในไก่แต่ละพันธุ์

marker	Breed	Genotype frequencies			Allele frequencies	
		AA	AB	BB	f(A)	f(B)
FM assay A	ไก่กระดูกดำ	0	0.95	0.05	0.48	0.52
	ไก่เนื้อ	1.00	0	0	1.00	0
	ไก่ประดู่หางดำ	0.85	0.15	0	0.93	0.07
	ไก่ชี้ฟ้า	0	1.00	0	0.50	0.50
FM assay B	ไก่กระดูกดำ	0	0.92	0.08	0.46	0.54
	ไก่เนื้อ	1.00	0	0	1.00	0
	ไก่ประดู่หางดำ	0.90	0.1	0	0.95	0.05
	ไก่ชี้ฟ้า	0	0.5	0.5	0.25	0.75
Id000	ไก่กระดูกดำ	0	0.97	0.03	0.48	0.52
	ไก่เนื้อ	0	1.00	0	0.5	0.5
	ไก่ประดู่หางดำ	0.22	0.33	0.45	0.38	0.62
	ไก่ชี้ฟ้า	0.5	0.5	0	0.75	0.25
Id542	ไก่กระดูกดำ	0.99	0.01	0	1.00	0.00
	ไก่เนื้อ	0	0.56	0.44	0.28	0.72
	ไก่ประดู่หางดำ	0	0	1.00	0	1.00
	ไก่ชี้ฟ้า	0	0.67	0.33	0.34	0.66
Id603	ไก่กระดูกดำ	0.87	0.09	0.04	0.92	0.08
	ไก่เนื้อ	0.87	0.09	0.04	0.92	0.08
	ไก่ประดู่หางดำ	0	1.00	0	0.5	0.5
	ไก่ชี้ฟ้า	0	1.00	0	0.5	0.5
Id881	ไก่กระดูกดำ	0	0.93	0.07	0.47	0.53
	ไก่เนื้อ	0	0.3	0.7	0.15	0.85
	ไก่ประดู่หางดำ	0.71	0.29	0	0.85	0.15
	ไก่ชี้ฟ้า	0	0.67	0.33	0.34	0.66

4.3.5 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายกับลักษณะไก่กระดูกดำ

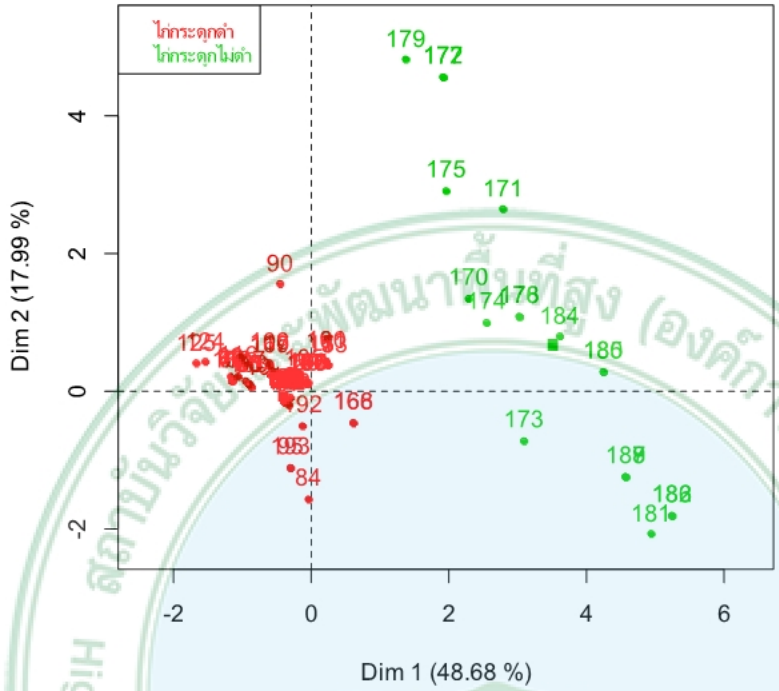
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *FM* และ *Id* กับลักษณะไก่กระดูกดำ ถูกพิจารณาใน 3 รูปแบบ คือ โมเดล additive, dominance และ recessive พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *FM* และ *Id* ในรูแบบโมเดล additive มีความสัมพันธ์กับลักษณะไก่กระดูกดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมากที่สุด จำนวน 6 ชุดเครื่องหมาย ในขณะที่โมเดล recessive ให้ผลความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *FM* และ *Id* กับลักษณะไก่กระดูกดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จำนวน 4 ชุดเครื่องหมาย ส่วนโมเดล dominance ให้ผลความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *FM* และ *Id* กับลักษณะไก่กระดูกดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติน้อยที่สุด จำนวน 2 ชุดเครื่องหมาย (ดังตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอกับลักษณะไก่กระดูกดำ

Marker	P-values		
	Additive model	Dominance model	Recessive model
FM assay A	1.36×10^{-35}	0.69	1.36×10^{-35}
FM assay B	5.41×10^{-24}	0.87	5.62×10^{-24}
*Id*000	0.02	0.37	0.20
*Id*542	3.09×10^{-15}	1.98×10^{-8}	9.45×10^{-15}
*Id*603	6.65×10^{-20}	0.68	2.69×10^{-16}
*Id*881	1.77×10^{-5}	0.01	0.007

ผลการใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *FM* และ *Id* จำนวน 6 ชุดเครื่องหมาย (FM assay A, FM assay B, *Id000*, *Id542*, *Id603* และ *Id881*) เพื่อจำแนกไก่กระดูกดำออกจากไก่สายพันธุ์อื่น (ไก่กระดูกไม่ดำ) ตามวิธี principal component analysis พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอดังกล่าว สามารถจำแนกไก่กระดูกดำออกจากไก่กระดูกไม่ดำได้ แสดงดังภาพที่ 9 โดยแผนภาพดังกล่าวเป็นการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบของเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่าง หรืออธิบายความแปรปรวนของตัวอย่างไก่กระดูกดำและไก่กระดูกไม่ดำได้สูงสุด (Dim.1) ร่วมกับองค์ประกอบของเครื่องหมายโมเลกุลที่สามารถแยกความแตกต่าง หรืออธิบายความแปรปรวนของตัวอย่างไก่กระดูกดำ และไก่กระดูกไม่ดำได้รองลงมา (Dim.2) ในที่นี้องค์ประกอบของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอหลัก (Dim.1) สามารถอธิบายความแปรปรวนของไก่กระดูกดำและไก่กระดูกไม่ดำ มีค่าเท่ากับ 48.68 % ในขณะที่องค์ประกอบเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอรอง (Dim.2) สามารถอธิบายความแปรปรวนของไก่กระดูกดำและไก่กระดูกไม่ดำ มีค่าเท่ากับ 17.99 % เมื่อพิจารณาเครื่องหมายโมเลกุลในองค์ประกอบหลักและรองร่วมกัน สามารถอธิบายความแปรปรวนของตัวอย่าง

ข้อมูลไก่กระดูกดำและไก่กระดูกไม่ดำได้เท่ากับ 66.67 % และพบว่าเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวสามารถแยกตัวอย่างไก่กระดูกดำออกจากตัวอย่างไก่กระดูกไม่ดำได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 การจำแนกไก่กระดูกดำออกจากไก่ที่มีกระดูกไม่ดำ ตามวิธี principal component analysis โดยจุดสีแดง คือตัวอย่างไก่กระดูกดำ และจุดสีเขียว คือตัวอย่างไก่กระดูกไม่ดำ ตัวเลขสีแดงและสีเขียวคือสมาชิกของตัวอย่างไก่กระดูกดำ และไก่กระดูกไม่ดำ ตามลำดับ

ความแม่นยำในการจำแนกไก่กระดูกดำออกจากไก่พันธุ์อื่นๆ ที่มีกระดูกไม่ดำ (ไก่พื้นเมืองประดู่หางดำ และไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า) โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *FM* และ *Id* จำนวน 6 ชุดเครื่องหมาย (*FM* assay A, *FM* assay B, *Id000*, *Id542*, *Id603* และ *Id881*) โดยพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล *FM* assay A และ *FM* assay B สามารถจำแนกไก่กระดูกดำได้ถูกต้อง 92-95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะเดียวกันเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอดังกล่าวสามารถจำแนกไก่สายพันธุ์ที่มีลักษณะกระดูกไม่ดำได้ถูกต้อง 85-90 เปอร์เซ็นต์

4.3.7 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *FM* และ *Id* กับลักษณะสีกล้ามเนื้ออกของไก่กระดูกดำ

ลักษณะสีกล้ามเนื้ออกของไก่กระดูกดำในพื้นที่ของโครงการหลวง ถูกบันทึกจากตัวอย่างไก่ที่ชำแหละซาก จำนวน 60 ตัว พบว่าสีกล้ามเนื้อมีกระจายตัว ผันแปรจากสีชมพู เทา และดำ เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *FM* และ *Id* จำนวน 4 ชุดเครื่องหมาย ประกอบด้วย (*FM* assay A, *FM* assay B, *Id*542 และ *Id*603) ถูกใช้ศึกษาความสัมพันธ์กับลักษณะสีกล้ามเนื้ออกของไก่ดังกล่าว พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *Id542* มีแนวโน้มสัมพันธ์กับลักษณะสีของกล้ามเนื้ออกไก่ (P=0.08) โดยไก่ที่มีจีโนไทป์ AA มีกล้ามเนื้ออกสีเข้มกว่าไก่ที่จีโนไทป์ AB ในขณะที่เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *FM* assay A (*FM1* และ *FM2*), *FM* assay B (*FM3* และ *FM4*) และ *Id603* ไม่มีความสัมพันธ์กับสีกล้ามเนื้ออกไก่กระดูกดำ (ดังตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *FM* และ *Id* กับลักษณะสีกล้ามเนื้ออกไก่กระดูกดำ

Markers	Pigmentation levels of breast muscles			*P*-value
	AA	AB	BB	
FM assay A	-	2.04+0.10	2.25+0.38	0.59
FM assay B	-	2.02+0.11	2.16+0.32	0.70
Id000	ND[1]	ND	ND	ND
Id542	2.07+0.10	1.00+0.53	-	0.08
Id602	2.14+0.11	1.89+0.25	2.00+0.75	0.12
Id881	ND	ND	ND	ND

[1]ND = non determination

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

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการวิจัย

ลักษณะไก่กระดูกดำในพื้นที่ของโครงการหลวง สามารถแบ่งตามรูปร่างลักษณะภายนอกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ ไก่กระดูกดำที่มีขนสีดำ และไก่กระดูกดำที่มีขนสีขาว (ปาปาซุง) ลักษณะใบหน้า หงอน เหนียง ผิวหนัง เพดานปาก และแข้ง ของไก่ทั้งสองกลุ่มดังกล่าวมีสีดำ อย่างไรก็ตามลักษณะสีดำมีความผันแปรในไก่แต่ละตัว โดยเฉพาะไก่กระดูกดำในกลุ่มที่มีขนสีขาว มีลักษณะใบหน้า หงอน เหนียง มีดำอมแดง เมื่อชำแหละซากไก่กระดูกดำที่มีขนสีดำ พบว่าสีกล้ามเนื้อออกของไก่กระดูกดำ มีตั้งแต่สีชมพู เทา และดำ จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นลักษณะสีดำของไก่กระดูกดำในพื้นที่ของโครงการหลวง ยังคงมีกระจายตัวอยู่

ในการศึกษาครั้งนี้ต้องการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน fibromelanosis gene (*Fm* gene) และ sex-linked inhibitor of dermal melanin gene (*Id* gene) ในการบ่งชี้ลักษณะของไก่กระดูกดำในพื้นที่โครงการหลวง

5.1 ความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *FM* และ *Id* ในไก่กระดูกดำ

ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของยีน *FM* ในไก่กระดูกดำในพื้นที่โครงการหลวง ด้วยไพรเมอร์ *FM* assay A และ *FM* assay B วิธีการของวิธีการ Dorshorst *et al*. (2011) พบว่าไก่กระดูกดำดังกล่าวส่วนมากมีจีโนไทป์ในรูปแบบ *FM/_* (*FM/FM* และ *FM/N*) ในขณะที่ไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า และไก่พื้นเมืองประดู่หางดำ มีจีโนไทป์ในรูปแบบ *N/N* ส่วนไก่ชี้ฟ้า (ไก่กระดูกดำพื้นเมืองไทย) มีจีโนไทป์ในรูปแบบ *FM/_* เช่นเดียวกับไก่กระดูกดำของโครงการหลวง ผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับรายการศึกษาก่อนหน้าของ Dorshorst *et al*. (2011) ซึ่งพบว่าไก่กระดูกดำ มีจีโนไทป์แบบ *FM/_* และการสะสมเม็ดสี melanin ที่ผิวหนังมากกว่า (hyperpigmentation) ไก่สายพันธุ์อื่นๆ ที่ไม่มีลักษณะกระดูกดำ เช่นเดียวกันกับรายงานของ Shinomiya *et al*. (2012) พบว่าไก่ที่มีจีโนไทป์ *FM/FM* และ *FM/N* มีการสะสมเม็ดสี melanin ในลักษณะแบบ hyperpigmentation ยีน *FM* ตั้งอยู่บนโครโมโซมร่างกายคู่ที่ 20 โดยยีนดังกล่าวเกี่ยวข้องกับกระบวนการการเกิดเม็ดสี (pigmentation) ซึ่งมีผลต่อการสะสมเม็ดสีเมลานินในอวัยะภายในของไก่ อาทิเช่น หลอดลม, เยื่อหุ้มหัวใจ และ กล้ามเนื้อ (Dorshorst *et al*., 2011)

ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของยีน *Id* ในไก่กระดูกดำในพื้นที่โครงการหลวง ด้วยไพรเมอร์จำนวน 4 ชุด ประกอบด้วย *Id000*, *Id542*, *Id603* และ *Id881* ซึ่งสอดคล้องกับ SNP ที่ตำแหน่ง rs315850000, rs14685542, rs14686603 และ rs317250881 บนโครโมโซม Z ของไก่ (Dorshorst *et al*., 2010; Li *et al*., 2014) พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอดังกล่าว มีความผันแปรในประชากรไก่กระดูกดำ ไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า ไก่ประดู่หางดำ และไก่ชี้ฟ้า ดังตารางที่ 2

5.2 ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายกับลักษณะไก่กระดูกดำ

ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *FM* และ *Id* กับลักษณะไก่กระดูกดำ พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *FM* และ *Id* ในรูแบบโมเดล additive มีความสัมพันธ์กับลักษณะไก่กระดูกดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติสูงที่สุด (จำนวน 6 ชุดเครื่องหมาย) ในขณะที่โมเดล recessive และ dominance ให้ผลความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *FM* และ *Id* กับลักษณะไก่กระดูกดำ จำนวน 4 และ 2 ชุดเครื่องหมาย ตามลำดับ จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่ารูปแบบโมเดลการวิเคราะห์มีอิทธิพลต่อความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอกับลักษณะไก่กระดูกดำ นอกจากนี้การจำแนกสายพันธุ์ไก่กระดูกดำ ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ โดยวิเคราะห์แบบ principal component analysis สามารถจำแนกไก่กระดูกดำออกจากไก่กระดูกไม่ดำได้อย่างชัดเจน ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการวิเคราะห์โดยวิธี logistic regression ซึ่งพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล *FM* assay A และ *FM* assay B สามารถจำแนกไก่กระดูกดำได้ถูกต้อง 92-95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะเดียวกันเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอดังกล่าวสามารถจำแนกไก่สายพันธุ์ที่มีลักษณะกระดูกไม่ดำได้ถูกต้อง 85-90 เปอร์เซ็นต์ ผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าว สามารถใช้จำแนกไก่กระดูกดำออกจากไก่พันธุ์อื่นๆ ได้

5.3 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *FM* และ *Id* กับลักษณะสีกล้ามเนื้ออกของไก่กระดูกดำ

เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *FM* และ *Id* จำนวน 4 ชุดเครื่องหมาย FM assay A, FM assay B, Id542, และ Id603 ถูกใช้ศึกษาความสัมพันธ์กับลักษณะสีกล้ามเนื้ออกของไก่กระดูกดำ พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *Id542* มีแนวโน้มสัมพันธ์กับระดับสีของกล้ามเนื้ออกไก่ โดยไก่ที่มีจีโนไทป์ AA มีกล้ามเนื้ออกสีเข้มกว่าไก่ที่จีโนไทป์ AB (2.07 vs. 1.00) ในขณะที่เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *FM* assay A (*FM1* และ *FM2*), *FM* assay B (*FM3* และ *FM4*) และ *Id603* ไม่มีความสัมพันธ์กับระดับสีกล้ามเนื้ออกไก่กระดูกดำ จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอยีน *FM* และ *Id* อาจอยู่ในสภาพ linkage equilibrium กับระดับการแสดงออกสีกล้ามเนื้ออกไก่กระดูกดำ อย่างไรก็ Dorshorst *et al*. (2010) ได้รายงานว่ายีน *Id* เป็นยีนที่ตั้งอยู่บนโครโมโซมเพศ ทำหน้าที่ในการยับยั้งการสร้างเม็ดสีเมลานิน โดยไก่ที่มีจีโนไทป์ id^+ จะให้สีดำ, จีโนไทป์ Id/id^+ จะให้สีเทา และจีโนไทป์ *Id/Id* จะมีสีขาว

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีนเป้าหมาย fibromelanosis gene (*FM* gene) และ sex-linked inhibitor of dermal melanin gene (*Id* gene) สำหรับบ่งชี้ลักษณะไก่กระดูกดำ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 6 ชุดเครื่องหมาย ประกอบด้วย *FM* assay A, *FM* assay B, *Id*000, *Id*542, *Id*603 และ *Id*881 พบว่า

1) เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *FM* และ *Id* ในรูปแบบโมเดล additive มีความสัมพันธ์กับลักษณะไก่กระดูกดำอย่างมีนัยสำคัญ

2) การจำแนกสายพันธุ์ไก่กระดูกดำด้วยเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ โดยวิเคราะห์แบบ principal component analysis สามารถจำแนกไก่กระดูกดำออกจากไก่กระดูกไม่ดำได้อย่างชัดเจน

3) เครื่องหมายโมเลกุล *FM* assay A และ *FM* assay B สามารถจำแนกไก่กระดูกดำได้ถูกต้อง 92-95 เปอร์เซ็นต์ และเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอดังกล่าวสามารถจำแนกไก่สายพันธุ์ที่มีลักษณะกระดูกไม่ดำได้ถูกต้อง 85-90 เปอร์เซ็นต์

4) เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *Id542* มีแนวโน้มสัมพันธ์กับลักษณะสีของกล้ามเนื้ออกไก่ (P=0.051) โดยไก่ที่มีจีโนไทป์ AA มีกล้ามเนื้ออกสีเข้มกว่าไก่ที่จีโนไทป์ AB

Highland Research and Development Institute (Public Organization)