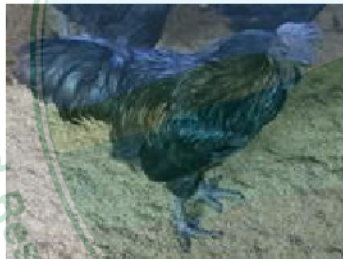


บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 เก็บรวบรวมตัวอย่างไก่กระดูกดำ

4.1.1 เก็บรวบรวมตัวอย่างเลือดไก่กระดูกดำ

- 1) เก็บรวบรวมตัวอย่างเลือดไก่กระดูกดำที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์ (ภาพที่ 1) จาก
 - พื้นที่ฟาร์มปศุสัตว์ งานพัฒนาและส่งเสริมปศุสัตว์ มูลนิธิโครงการหลวง ต.แม่เหิยะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ จำนวนทั้งสิ้น 60 ตัว ประกอบไปด้วย ไก่กระดูกดำ (ชนดำ) จำนวน 48 ตัว และไก่กระดูกดำ (ชนขาว) หรือไก่ป่าปาซุง จำนวน 12 ตัว
- 2) เก็บรวบรวมตัวอย่างเลือดไก่ที่มีลักษณะไม่ตรงตามพันธุ์ (ภาพที่ 2) จาก
 - ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่ จำนวนทั้งสิ้น 30 ตัว ประกอบไปด้วย ไก่ประดู่หางดำ จำนวน 15 ตัว และไก่ซี จำนวน 15 ตัว
 - ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มช. จำนวนทั้งสิ้น 20 ตัว ประกอบไปด้วย ไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า จำนวน 10 ตัว และไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า จำนวน 10 ตัว



(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 1: ตัวอย่างไก่กระดูกดำ (ก) ไก่ป่าปาซุง (ค) และการเก็บเลือดไก่กระดูกดำ (ข) ไก่ป่าปาซุง (ง) จากพื้นที่ฟาร์มปศุสัตว์ งานพัฒนาและส่งเสริมปศุสัตว์ มูลนิธิโครงการหลวง (แม่เหิยะ)



(ก)



(ข)



(ค)



(ง)

ภาพที่ 2: ตัวอย่างไก่ที่มีลักษณะไม่ตรงตามพันธุ์ (ก) ไก่ประดู่หางดำ (ข) ไก่ซี (ค) ไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า (ง) ไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า

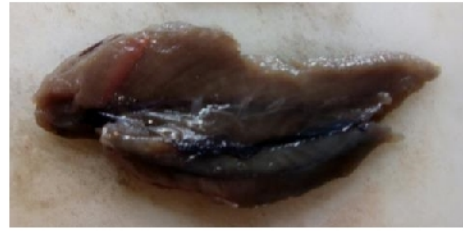
4.1.2 เก็บรวบรวมตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่กระดูกดำ

เก็บรวบรวมตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่กระดูกดำที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์ และไม่ตรงตามพันธุ์

ภาพที่ 3 แสดงตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่กระดูกดำที่มีลักษณะตรงตามสายพันธุ์และไม่ตรงตามสายพันธุ์จากพื้นที่ฟาร์มปศุสัตว์ของงานพัฒนาและส่งเสริมปศุสัตว์ มูลนิธิโครงการหลวง ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ. เชียงใหม่ จำนวนทั้งสิ้น 20 ตัว ประกอบไปด้วย ไก่กระดูกดำ (กล้ามเนื้อดำสนิท) จำนวน 10 ตัว และ ไก่กระดูกดำ (กล้ามเนื้อสีเทา) จำนวน 10 ตัว



(ก)

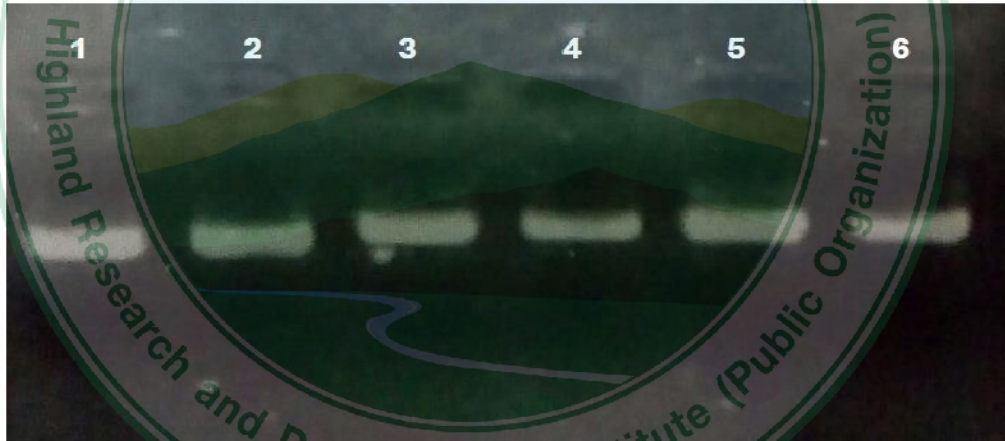


(ข)

ภาพที่ 3: ตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่อกระดุกดำสีดำสนิท (ก) และตัวอย่างกล้ามเนื้อไก่อกระดุกดำสีเทา (ข) จากพื้นที่ฟาร์มปศุสัตว์ งานพัฒนาและส่งเสริมปศุสัตว์ มูลนิธิโครงการหลวง

4.2 สกัดตัวอย่างดีเอ็นเอ พร้อมทั้งตรวจวัดคุณภาพดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างเลือดไก่อกระดุกดำจำนวน 110 ตัวอย่าง ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform จากนั้นนำมาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอของไก่อกระดุกดำแต่ละตัวบน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1.2% (ภาพที่ 4) และวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ เพื่อปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้ประมาณ 50-100 ng/ μ l ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์



ภาพที่ 4: ผลการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอของไก่อกระดุกดำที่สกัดได้ บน agarose gel ที่ความเข้มข้น 1.2% โดยที่ หมายเลข 1 ตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานเข้มข้น 100 ng/ml หมายเลข 2-3 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอไก่อกระดุกดำ และหมายเลข 4-6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอไก่อกระดุกไม่ดำ

4.3 สกัดตัวอย่างอาร์เอ็นเอ พร้อมทั้งตรวจวัดคุณภาพอาร์เอ็นเอ

นำตัวอย่างกล้ามเนื้ออกไก่กระดูกดำจำนวน 20 ตัวอย่าง ทำการสกัดอาร์เอ็นเอด้วยโดยใช้ trizol จากนั้นนำมาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอของไก่กระดูกดำแต่ละตัว บน formaldehyde agarose gel ที่ความเข้มข้น 1.2% (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5: ผลการตรวจสอบคุณภาพอาร์เอ็นเอของไก่กระดูกดำที่สกัดได้บน formaldehyde agarose gel ที่ความเข้มข้น 1.2% โดยที่ หมายเลข 1 ตัวอย่างสารละลายอาร์เอ็นเอมาตรฐานเข้มข้น 100 ng/ml หมายเลข 2-5 คือ ตัวอย่างอาร์เอ็นเอไก่กระดูกดำ และ หมายเลข 6-8 คือ ตัวอย่างอาร์เอ็นเอไก่กระดูกไม่ดำ

4.4 การค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมสำหรับไก่กระดูกดำ

4.4.1 ผลการค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมสำหรับไก่กระดูกดำ ไพรเมอร์ถูกออกแบบ จำนวน 9 เครื่องหมาย ประกอบด้วย *TYR* (*TYR-1*, *TYR-2*, *TYR-3*, *TYR-4*, *TYR-5* และ *TYR-6*) และ *MC1R* (*MC1R-69*, *MC1R-212* และ *MC1R-636*) แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR ของยีนเป้าหมายในไก่กระดูกดำ

ยีน	ไพรเมอร์	อุณหภูมิปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรส	ขนาดแถบ ดีเอ็นเอ
<i>TYR-1</i>	up: TCTCCATGCACTGAAGCATA dw: TCCTTCTCACTGATGGTGAG	(94°C 30s / 58°C 30s / 72°C 30s) จำนวน 35 รอบ	440 bp
<i>TYR-2</i>	up: GCTTCTCAGGACAAAAGTGC dw: CTGCCATGAGGAGAAAATG	(94°C 30s / 58°C 30s / 72°C 30s) จำนวน 35 รอบ	503 bp
<i>TYR-3</i>	up: CTGCAACTTTGCTAATAGAAAA dw: CGACAGAAATGTCATAGCAG	(94°C 30s / 58 °C 30s / 72°C 30s) จำนวน 35 รอบ	284 bp
<i>TYR-4</i>	up: CTATGCATTGTCGTATCAGC dw: GCAGTTTTGAAGCGTAAGTG	(94°C 30s / 58 °C 30s / 72°C 30s) จำนวน 35 รอบ	271 bp
<i>TYR-5</i>	up: CTGCCAGTCTCTGCCATTA dw: TCTGCAGACATAATTCATGAG	(94°C 30s / 58°C 30s / 72°C 30s) จำนวน 35 รอบ	288 bp
<i>TYR-6</i>	up: CACTGGTACTGCATTGCATC dw: ACTGCATGCTTGACTAGCAC	(94°C 30s / 58 °C 30s / 72°C 30s) จำนวน 35 รอบ	328 bp
<i>MC1R-69</i>	up: GTGAGGGCAACCAGAGCCA dw: TGCAGATTCCTGTTCTTGAG	(94°C 30s / 58°C 30s / 72°C 30s) จำนวน 35 รอบ	154 bp
<i>MC1R-212</i>	up: GAGAACCTGCTGGTGGTG dw: TCCATGTGGCGGACGATG	(94°C 30s / 60°C 30s / 72°C 30s) จำนวน 35 รอบ	188 bp
<i>MC1R-636</i>	up: ATTCACATGTTTCGCGCTGGT dw: TAGAAGAAGACTCCCAGCAG	(94°C 30s / 58°C 30s / 72°C 30s) จำนวน 35 รอบ	131 bp

4.4.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเครื่องหมายโมเลกุล โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 9 เครื่องหมาย ประกอบด้วย *TYR* (*TYR-1*, *TYR-2*, *TYR-3*, *TYR-4*, *TYR-5* และ *TYR-6*) แสดงดังภาพที่ 6 และ *MC1R* (*MC1R-69*, *MC1R-212* และ *MC1R-636*) แสดงดังภาพที่ 7



ภาพที่ 6: ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลของยีน *TYR* จำนวน 6 เครื่องหมาย โดยที่ หมายเลข 1-2 คือ แถบพีซีอาร์ของไพรเมอร์ *TYR-1* จากโกักระดุกดำ (1) โกักระดุกไม่ดำ(2) หมายเลข 3-4 คือ แถบพีซีอาร์ของไพรเมอร์ *TYR-2* จากโกักระดุกดำ (3) โกักระดุกไม่ดำ (4) หมายเลข 5-6 คือ แถบพีซีอาร์ของไพรเมอร์ *TYR-3* จากโกักระดุกดำ (5) โกักระดุกไม่ดำ (6) หมายเลข 7-8 คือ แถบพีซีอาร์ของไพรเมอร์ *TYR-4* จากโกักระดุกดำ (7) โกักระดุกไม่ดำ (8) หมายเลข 9-10 คือ แถบพีซีอาร์ของไพรเมอร์ *TYR-5* จากโกักระดุกดำ (9) โกักระดุกไม่ดำ (10) หมายเลข 11-12 คือ แถบพีซีอาร์ของไพรเมอร์ *TYR-6* จากโกักระดุกดำ (11) โกักระดุกไม่ดำ (12)



ภาพที่ 7: ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลของยีน *MC1R* จำนวน 3 เครื่องหมาย โดยที่ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp หมายเลข 1-4 คือ แถบพีซีอาร์ของไพรเมอร์ *MC1R-212* จากโกักระดุกดำ (1,2) โกักระดุกไม่ดำ(3,4) หมายเลข 5-8 คือ แถบพีซีอาร์ของไพรเมอร์ *MC1R-69* จากโกักระดุกดำ (5,6) โกักระดุกไม่ดำ (7,8) หมายเลข 9-12 คือ แถบพีซีอาร์ของไพรเมอร์ *MC1R-636* จากโกักระดุกดำ (9,10) โกักระดุกไม่ดำ (11,12)

4.4.3 ผลการค้นหาคความผันแปรทางพันธุกรรมของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *TYR* ของไก่กระดูกดำ ด้วยเทคนิค SSCP

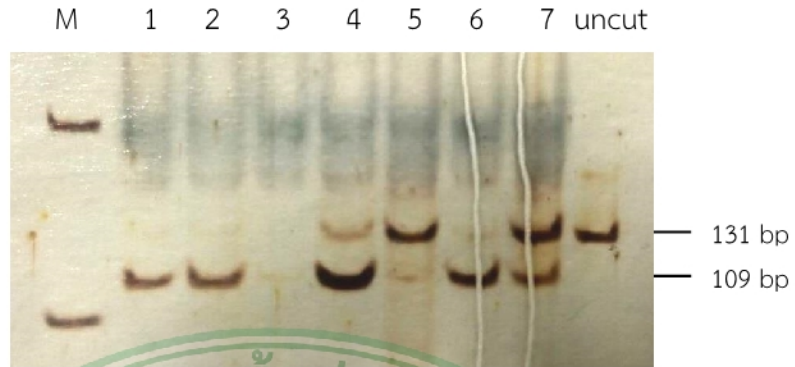
การค้นหาคำเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ บนยีน *TYR* ในเบื้องต้นด้วยเทคนิค SSCP ในไก่กระดูกดำที่ตรงตามสายพันธุ์ และไม่ตรงตามสายพันธุ์ อย่างละ 3 ตัว ตามลำดับ พบว่าคู่ไพรเมอร์ *TYR-2* *TYR-5* และ *TYR-6* ให้รูปแบบ SSCP ที่ไม่แตกต่างกัน และ คู่ไพรเมอร์ *TYR-1* *TYR-3* และ *TYR-4* ให้รูปแบบ SSCP ที่แตกต่างกัน โดยให้รูปแบบ SSCP จำนวน 2 รูปแบบ (ภาพ 8)



ภาพที่ 8: รูปแบบ SSCP บนยีน *TYR* ในไก่กระดูกดำที่ตรงตามสายพันธุ์ และไม่ตรงตามสายพันธุ์ อย่างละ 3 ตัว ตามลำดับ

4.4.4 ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *MC1R* และ *TYR*

ผลผลิต PCR ของเครื่องหมายโมเลกุล *MC1R* จำนวน 3 คู่ไพรเมอร์ ถูกนำมาตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยไพรเมอร์ *MC1R-636* สามารถตรวจสอบจีโนไทป์ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* ได้ 3 รูปแบบ คือ อัลลีล A และ B โดยอัลลีล A ไม่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ดังกล่าว ได้แถบดีเอ็นเอที่มีความยาว 131 bp ในขณะที่อัลลีล B มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *RsaI* ผลการตัดแถบดีเอ็นเอได้ความยาว 109 และ 22 bp ตามลำดับ (ภาพที่ 9) สำหรับ SNP ที่ตำแหน่ง 69 และ 212 เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hsp92II* และ *MscI* ไม่สามารถตรวจพบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างไก่กระดูกดำและไก่กลุ่มควบคุม



ภาพที่ 9: ผลการตรวจสอบจีโนไทป์เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *MC1R-636* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *RsaI* โดยจีโนไทป์แบบ AA แสดงดังตัวอย่างที่ 5 จีโนไทป์แบบ AB แสดงดังตัวอย่างที่ 4 และ 7 ส่วนจีโนไทป์แบบ BB แสดงดังตัวอย่างที่ 1, 2, 3 และ 6 ตามลำดับ สำหรับ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp และ uncut คือ แถบ PCR ของยีน *MC1R-636* ที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ผลผลิต PCR ของเครื่องหมายโมเลกุล *TYR* จำนวน 6 คู่ไพรเมอร์ ถูกนำมาตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเทคนิค (PCR-RFLP) โดยไพรเมอร์ *TYR-2* สามารถตรวจสอบจีโนไทป์ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HpyCH4V* ได้ 3 รูปแบบ คือ จีโนไทป์ AA ได้แถบดีเอ็นเอที่มีความยาว 98 bp จีโนไทป์ AB ได้แถบดีเอ็นเอที่มีความยาว 98 bp และ 19 bp และจีโนไทป์ BB ได้แถบดีเอ็นเอที่มีความยาว 19 bp (ภาพที่ 10) สำหรับ *TYR-1*, *TYR-3*, *TYR-4*, *TYR-5* และ *TYR-6* ไม่มีเอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมได้



ภาพที่ 10: ผลการตรวจสอบจีโนไทป์เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *TYR-2* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HpyCH4V* โดยจีโนไทป์แบบ AA แสดงดังตัวอย่างที่ 1 และ 7 จีโนไทป์แบบ AB แสดงดังตัวอย่างที่ 2, 3, 5, 6 และ 8 ส่วนจีโนไทป์แบบ BB แสดงดังตัวอย่างที่ 4 และ 9 ตามลำดับ สำหรับ uncut คือ แถบ PCR ของยีน *TYR-2* ที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

4.4.5 ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของยีนเป้าหมาย *MC1R-636* และ *TYR-2*
ความถี่จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *MC1R-636* และ *TYR-2* ในไก่แต่ละสายพันธุ์ แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายในไก่กระดูกดำและไก่กระดูกไม่ดำ

marker	Breed	Genotype frequencies			Allele frequencies	
		AA	AB	BB	f(A)	f(B)
<i>MC1R-636</i>	ไก่กระดูกดำ	0.06	0.06	0.88	0.09	0.91
	ไก่กระดูกไม่ดำ	0.50	0.25	0.25	0.63	0.38
<i>TYR-2</i>	ไก่กระดูกดำ	0.30	0.50	0.20	0.55	0.54
	ไก่กระดูกไม่ดำ	0.30	0.50	0.20	0.55	0.54

4.4.6 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *MC1R-636* และ *TYR-2* กับลักษณะไก่กระดูกดำ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *MC1R-636* และ *TYR-2* กับลักษณะไก่กระดูกดำ ด้วยวิธี chi-square ซึ่งถูกพิจารณา 3 รูปแบบด้วยกัน คือ โมเดล additive, dominance และ recessive พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *MC1R-636* ในรูปแบบโมเดล dominance มีความสัมพันธ์กับลักษณะไก่กระดูกดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมากที่สุด และในรูปแบบโมเดล recessive มีความสัมพันธ์กับลักษณะไก่กระดูกดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติน้อยที่สุด ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *TYR-2* ไม่มีความแตกต่างกันในรูปแบบโมเดลทั้ง 3 รูปแบบ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอกับลักษณะไก่กระดูกดำ

Marker	P-values		
	Additive model	Dominance model	Recessive model
<i>MC1R-636</i>	0.0085	0.0022	0.0128
<i>TYR-2</i>	0.12	0.22	0.15

ความแม่นยำของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีนเป้าหมาย พบว่าเครื่องหมายโมเลกุล *MC1R-636* สามารถแยกไก่กระดูกดำได้ถูกต้อง 83.74 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เครื่องหมายโมเลกุล *TYR-2* สามารถแยกไก่กระดูกดำได้ถูกต้องเพียง 68.83 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เครื่องหมายโมเลกุล *MC1R-636* มีความสัมพันธ์กับระดับสีออกของกล้ามเนื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

สำหรับความผันแปรทางพันธุกรรมของเครื่องหมายโมเลกุลของยีนเป้าหมายของการศึกษาที่ผ่านมา (ปีงบประมาณ 2558-2559) ได้ศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอสำหรับจำแนกลักษณะไก่กระดูกดำ จำนวน 8 เครื่องหมาย ประกอบด้วย *FM assay A*, *FM assay B*, *Id000*, *Id542*, *Id603*, *Id881*, *PMEL17*, *MC1R-2* ผลแสดงดังตารางที่ 4 เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอดังกล่าวสามารถจำแนกไก่กระดูกดำได้ถูกต้องประมาณ 70-95 เปอร์เซ็นต์ โดยที่เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *FM assay A*, *FM assay B* สามารถจำแนกไก่กระดูกดำได้ถูกต้องมากที่สุด (92-95 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *Id000*, *Id542* และ *Id603* สามารถแยกไก่กระดูกดำได้ถูกต้อง 70-88 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *MC1R* และ *PMEL17* สามารถแยกไก่กระดูกดำได้ถูกต้อง 82.03 และ 72.84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายกับลักษณะไก่กระดูกดำ

Marker	ความแม่นยำ (%)	P-values		
		Additive model	Dominance model	Recessive model
<i>FM assay A</i>	92-95	1.36×10^{-35}	0.69	1.36×10^{-35}
<i>FM assay B</i>	85-90	5.41×10^{-24}	0.87	5.62×10^{-24}
<i>Id000</i>	70-80	0.02	0.37	0.20
<i>Id542</i>	88.58	3.09×10^{-15}	1.98×10^{-8}	9.45×10^{-15}
<i>Id603</i>	82.58	6.65×10^{-20}	0.68	2.69×10^{-16}
<i>Id881</i>	70-80	1.77×10^{-5}	0.01	0.007
<i>PMEL17</i>	72.84	1.10×10^{-22}	5.66×10^{-11}	1.36×10^{-35}
<i>MC1R-2</i>	82.03	4.28×10^{-35}	2.67×10^{-11}	3.34×10^{-34}

4.5 การแสดงออกของยีน *MC1R* และ *TYR* ในกล้ามเนื้อ

4.5.1 การแสดงออกของยีน *MC1R* และ *TYR* ในกล้ามเนื้อไก่ ไพรเมอร์ถูกออกแบบ จำนวน 2 ไพรเมอร์ ประกอบด้วย *MC1R_{ma}* และ *TYR_{ma}* เปรียบเทียบกับยีน beta actin (house keeping gene) แสดงดังตารางที่ 5

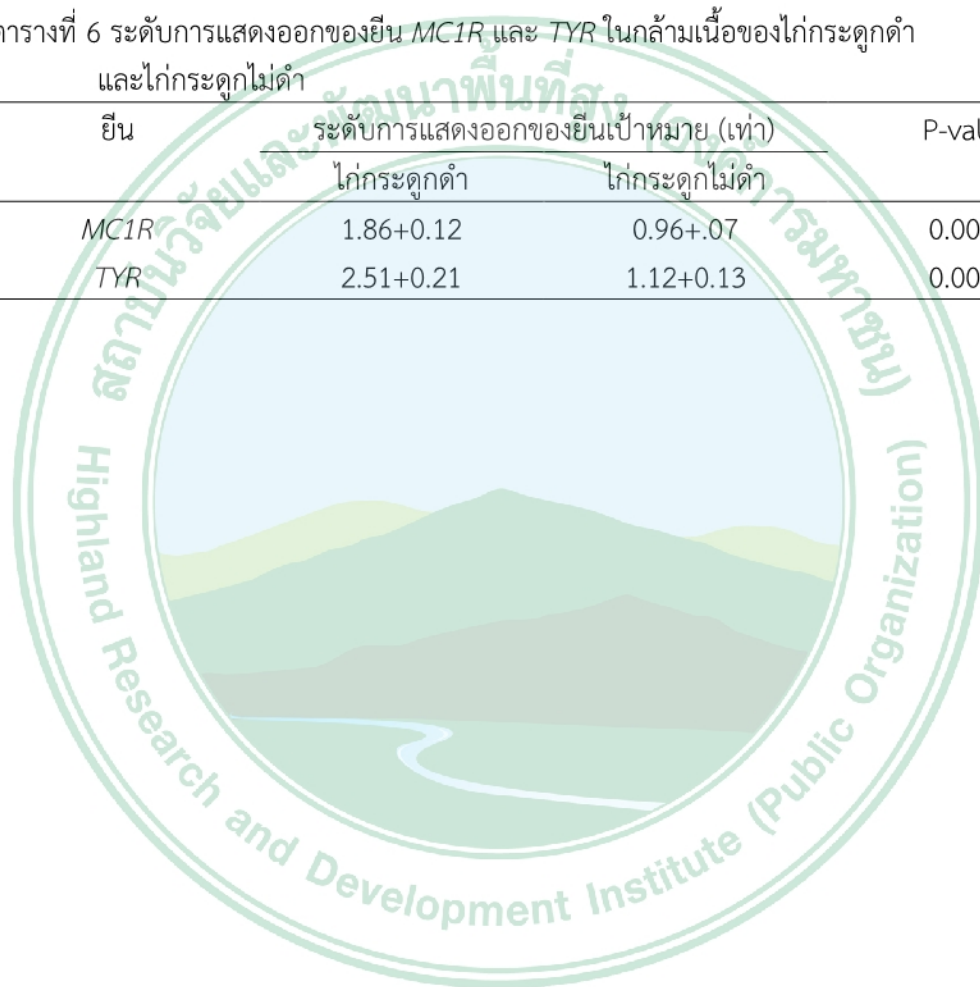
ตารางที่ 5 ไพรเมอร์ที่ใช้วัดการแสดงออกของยีน *MC1R* และ *TYR* ในกล้ามเนื้อของไก่กระดูกดำ

ยีน	ไพรเมอร์	อุณหภูมิของปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรส	ขนาดแถบ ดีเอ็นเอ
<i>MC1R_{ma}</i>	up: GTGAGGGCAACCAGAGCCA	(94°C 30s/58°C 30s/72°C 30s) จำนวน 35 รอบ	154 bp
	dw: TGCAGATTCCTGTTCTTGAG		
<i>TYR_{ma}</i>	up: CTATGCATTGTCGTATCAGC	(94°C 30s/58 °C 30s/72°C 30s) จำนวน 35 รอบ	271 bp
	dw: GCAGTTTTGAAGCGTAAGTG		
<i>Beta-actin</i>	up: TGAACCCCAAGCCAACAGA	(94°C 30s/60°C 30s/72°C 30s) จำนวน 35 รอบ	184 bp
	dw: GAGGGCGTAGCCTTCATAG		

4.5.2 ระดับการแสดงออกของยีน *MC1R* และ *TYR* ในกล้ามเนื้อไก่กระดูกดำและไก่กระดูกไม่ดำ แสดงดังตารางที่ 6 พบว่ายีน *MC1R* และ *TYR* ในกล้ามเนื้อของไก่กระดูกดำมีระดับการแสดงออกสูงกว่าในกล้ามเนื้อของไก่ที่มีกระดูกไม่ดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยระดับการแสดงออกของยีน *MC1R* ในกล้ามเนื้อของไก่กระดูกดำมีค่าเท่ากับ 1.86 ± 0.12 เท่า ในขณะที่ไก่กระดูกไม่ดำ มีค่าเท่ากับ 0.96 ± 0.07 เท่า เช่นเดียวกับระดับการแสดงออกของยีน *TYR* ในกล้ามเนื้อของไก่ของไก่กระดูกดำ มีค่าเท่ากับ 2.51 ± 0.21 เท่า ส่วนไก่กระดูกไม่ดำ มีค่าเท่ากับ 1.12 ± 0.13 เท่า

ตารางที่ 6 ระดับการแสดงออกของยีน *MC1R* และ *TYR* ในกล้ามเนื้อของไก่กระดูกดำและไก่กระดูกไม่ดำ

ยีน	ระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมาย (เท่า)		P-value
	ไก่กระดูกดำ	ไก่กระดูกไม่ดำ	
<i>MC1R</i>	1.86 ± 0.12	0.96 ± 0.07	0.0047
<i>TYR</i>	2.51 ± 0.21	1.12 ± 0.13	0.0001



บทที่ 5 วิจารณ์ผลการวิจัย

ลักษณะภายนอกไก่กระดูกดำในพื้นที่ของโครงการหลวง เช่น ใบหน้า หงอน เหนียง ผิวหนัง เพดานปาก และแข้ง ยังพบความผันแปรของลักษณะสีดำ เช่นเดียวกับกล้ามเนื้อ เมื่อมีการชำแหละซากพบกล้ามเนื้อที่มีความแปรปรวนตั้งแต่กล้ามเนื้อสีชมพู เทา และดำ ขึ้นอยู่กับไก่กระดูกดำแต่ละตัว ลักษณะสีดำของกล้ามเนื้อออกเป็นลักษณะทางปริมาณ มีความซับซ้อน (complex traits) และถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ ทั้งนี้การประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอสำหรับการคัดเลือกลักษณะสีของกล้ามเนื้อไก่กระดูกดำให้ได้ผลดี ควรใช้เครื่องหมายโมเลกุลมากกว่า 1 ตำแหน่ง เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือก

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้ทำการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน fibromelanosis gene (*Fm* gene) sex-linked inhibitor of dermal melanin gene (*d* gene) promelanin 17 (*PMEL17*) และ melanocortin 1 receptor (*MC1R*) พบว่า สามารถใช้จำแนกไก่กระดูกดำออกจากไก่กระดูกดำไม่ได้ แต่เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอดังกล่าวยังไม่สามารถใช้จำแนกระดับสีกล้ามเนื้อของไก่กระดูกดำได้ และพบว่าเครื่องหมายโมเลกุลของยีน melanocortin 1 receptor (*MC1R*) ที่ตำแหน่ง 274 มีความสัมพันธ์กับลักษณะสีของกล้ามเนื้อไก่ ($P=0.0002$) จึงทำให้มีการศึกษายีน melanocortin 1 receptor (*MC1R*) ตำแหน่งอื่น และยีน tyrosinase (*TYR*) เพิ่มเติมในปีนี้เพื่อต้องการศึกษาและค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรม (DNA marker) สำหรับบ่งชี้เอกลักษณ์ไก่กระดูกดำในพื้นที่โครงการหลวง

5.1 ความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *MC1R* และ *TYR* ในไก่กระดูกดำ

ผลการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *MC1R* ในไก่กระดูกดำในพื้นที่โครงการหลวง จำนวน 3 ชุดไพรเมอร์ คือ *MC1R*-69 *MC1R*-212 และ *MC1R*-636 พบว่า เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *MC1R*-69 และ *MC1R*-212 ไม่พบความผันแปรในประชากรตัวอย่าง ซึ่งไม่สอดคล้องกับรายงานของ Yang et al. (2008) ที่พบความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *MC1R* ตำแหน่ง T69C และ C212T แต่เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *MC1R*-636 พบความผันแปรทางพันธุกรรมเช่นเดียวกับ Yang et al. (2008) ที่พบความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *MC1R* ตำแหน่ง G636A โดยความถี่จีโนไทป์ GG มีชนิดดำมากที่สุด

จากการค้นหาความผันแปรทางพันธุกรรมของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายยีน *TYR* ด้วยวิธี SSCP นำไปสู่การออกแบบไพรเมอร์จำนวน 6 เครื่องหมายโมเลกุล (*TYR*-1, *TYR*-2, *TYR*-3, *TYR*-4, *TYR*-5, *TYR*-6) เพื่อใช้ในการค้นหาความผันแปรทางพันธุกรรมในไก่กระดูกดำของโครงการหลวง พบเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 1 เครื่องหมาย คือ *TYR*-2 แสดงความผันแปรในประชากรไก่กระดูกดำของโครงการหลวง โดยมีรูปแบบจีโนไทป์ทั้ง 3 รูปแบบ คือ AA, AB และ BB

5.2 ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *MC1R-636* และ *TYR-2* กับลักษณะไก่กระดูกดำ

ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *MC1R-636* และ *TYR-2* กับลักษณะไก่กระดูกดำ พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *MC1R-636* ในรูปแบบโมเดล dominance มีความสัมพันธ์กับลักษณะไก่กระดูกดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมากที่สุด สำหรับโมเดล recessive มีความสัมพันธ์กับลักษณะไก่กระดูกดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติน้อยที่สุด ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *TYR-2* ไม่มีความแตกต่างกันในรูปแบบโมเดล additive, dominance และ recessive โดยที่เครื่องหมายโมเลกุล *MC1R-636* สามารถแยกไก่กระดูกดำได้ถูกต้องด้วยค่าความแม่นยำ 83.74 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เครื่องหมายโมเลกุล *TYR-2* สามารถแยกไก่กระดูกดำได้ถูกต้องเพียง 68.83 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เครื่องหมายโมเลกุล *MC1R-636* มีความสัมพันธ์กับระดับสีออกของกล้ามเนื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

5.3 ระดับการแสดงของยีน *MC1R* และ *TYR* ในกล้ามเนื้อไก่กระดูกดำ

ระดับการแสดงออกของยีน *MC1R* และ *TYR* ในกล้ามเนื้อของไก่กระดูกดำมีระดับการแสดงออกสูงกว่าไก่กระดูกดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยยีน *MC1R* ในกล้ามเนื้อของไก่กระดูกดำมีระดับการแสดงออกสูงกว่าไก่กระดูกดำ ประมาณ 1 เท่า ในขณะที่ระดับการแสดงออกของยีน *TYR* ในกล้ามเนื้อของไก่กระดูกดำสูงกว่าไก่กระดูกดำ เท่ากับ 1.39 เท่า ผลศึกษาดังกล่าวแสดงบ่งชี้ว่าไก่กระดูกดำมีการแสดงออกของยีน *MC1R* และ *TYR* มีการแสดงออกสูงกว่าไก่กระดูกดำ ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับลักษณะสีตัวของกล้ามเนื้อของไก่กระดูกดำ

5.4 ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอยีนเป้าหมายกับลักษณะไก่กระดูกดำ

ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีนเป้าหมาย สำหรับบ่งชี้ลักษณะไก่กระดูกดำ ในการศึกษาที่ผ่านมา (ปีงบประมาณ 2558-2559) และเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอในครั้งนี้ (ปีงบประมาณ 2560) รวมจำนวน 10 เครื่องหมาย ซึ่งประกอบด้วย *FM assay A*, *FM assay B*, *Id000*, *Id542*, *Id603*, *Id881* *MC1R-2*, *PMEL17*, *MC1R-636* และ *TYR-2* พบว่า

1) เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *FM assay A*, *FM assay B* และ *Id542* (ปีงบประมาณ 2558) สามารถจำแนกไก่กระดูกดำได้ถูกต้องมากที่สุด (88-95 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสูงกว่าเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *MC1R* และ *PMEL17* (ปีงบประมาณ 2559) ซึ่งสามารถแยกไก่กระดูกดำได้ถูกต้อง 82.03 และ 72.84 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *MC1R-636* และ *TYR-2* มีความแม่นยำในการจำแนกไก่กระดูกดำได้ถูกต้องเท่ากับ 83.74 และ 68.83 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *FM assay A*, *FM assay B* และ *Id542* มีความเหมาะสมสำหรับการจำแนกไก่กระดูกดำ

2) เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *FM assay A* และ *FM assay B* ไม่สามารถจำแนกลักษณะสีของกล้ามเนื้อได้ ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *Id542* มีแนวโน้มแสดงความสัมพันธ์กับลักษณะสีของกล้ามเนื้อออกไก่ ($P=0.08$) (ปีงบประมาณ 2558) ในขณะที่เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *MC1R-2* (ปีงบประมาณ 2559) มีความสัมพันธ์กับลักษณะสีของกล้ามเนื้อออกไก่ ($P=0.0002$) โดยไก่

ที่มีจีโนไทป์ E/E มีกลิ่นเนื้อออกสีเข้มกว่าไก่ที่จีโนไทป์ E/e และเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *PMEL17* ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะสีของกล้ามเนื้ออกไก่ สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล *MC1R-636* มีความสัมพันธ์กับระดับสีออกของกล้ามเนื้ออกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ปีงบประมาณ 2560)

เนื่องจากลักษณะของไก่กระดูกดำเป็นลักษณะทางปริมาณ มีความซับซ้อนสูง (complex traits) และถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ โดยยีนแต่ละคู่ต่างมีอิทธิพลต่อลักษณะดังกล่าวร่วมกันในลักษณะบวกแบบสะสม (additive gene) จึงทำให้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายหลายตำแหน่ง อาทิเช่น *PMEL17*, *MC1R-2*, *MC1R-636* และ *TYR-2* แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะของไก่กระดูกดำ แต่เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวมีความแม่นยำในจำแนกไก่กระดูกดำสูงน้อยกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นการใช้เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวร่วมกันในการคัดเลือก อาจจะสามารถช่วยเพิ่มเปอร์เซ็นต์ความแม่นยำในการจำแนกไก่กระดูกดำให้เพิ่มสูงขึ้นได้

จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้นบ่งชี้ว่า เครื่องหมายโมเลกุล *FM assay A*, *FM assay B* และ *Id542* สามารถใช้จำแนกไก่กระดูกดำออกไก่กระดูกไม่ดำได้ถูกต้องสูงสุด (88-95 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่เครื่องหมายโมเลกุล *MC1R-2* และ *MC1R-636* มีความสัมพันธ์กับลักษณะสีของกล้ามเนื้ออกของไก่กระดูกดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังนั้นการประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอคัดเลือกไก่กระดูกดำควรใช้เครื่องหมายโมเลกุล *FM assay A*, *FM assay B* และ *Id542* สามารถใช้จำแนกไก่กระดูกดำ และควรใช้เครื่องหมายโมเลกุล *MC1R-2* และ *MC1R-636* คัดเลือกลักษณะสีของกล้ามเนื้ออกของไก่กระดูกดำ

บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีนเป้าหมาย *MC1R* และ *TYR* สำหรับบ่งชี้ลักษณะสีตาของไก่กระดุกดำ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 9 เครื่องหมาย ประกอบด้วย *MC1R* (*MC1R-69*, *MC1R-212* และ *MC1R-636*) และ *TYR* (*TYR-1*, *TYR-2*, *TYR-3*, *TYR-4*, *TYR-5* และ *TYR-6*) พบว่า

1) เครื่องหมายโมเลกุล *MC1R-636* มีค่าความแม่นยำในการแยกไก่กระดุกดำได้ถูกต้องสูงที่สุด คือ 83.74 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เครื่องหมายโมเลกุล *TYR-2* สามารถแยกไก่กระดุกดำได้ถูกต้องเพียง 68.83 เปอร์เซ็นต์

2) เครื่องหมายโมเลกุล *MC1R-636* มีความสัมพันธ์กับระดับสีออกของกล้ามเนื้อไก่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3) ระดับการแสดงออกของยีน *MC1R* ในกล้ามเนื้อของไก่กระดุกดำมีค่าสูงกว่า ประมาณ 1 เท่า ในขณะที่ระดับการแสดงออกของยีน *TYR* ในกล้ามเนื้อของไก่ของไก่กระดุกดำสูงกว่าไก่กระดุกไม่ดำ เท่ากับ 1.39 เท่า

4) เครื่องหมายโมเลกุลของยีน *FM assay A*, *FM assay B* และ *Id542* มีความแม่นยำในการจำแนกไก่กระดุกดำสูงสุด เท่ากับ 88-95 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะสีกล้ามเนื้อไก่ (ผลการศึกษารายปี 2558)

5) เครื่องหมายโมเลกุลของยีน *MC1R-2* (ผลการศึกษารายปี 2559) และ *MC1R-636* (ผลการศึกษารายปี 2560) มีความสัมพันธ์กับลักษณะสีของกล้ามเนื้อไก่กระดุกดำ