บทที่ 2

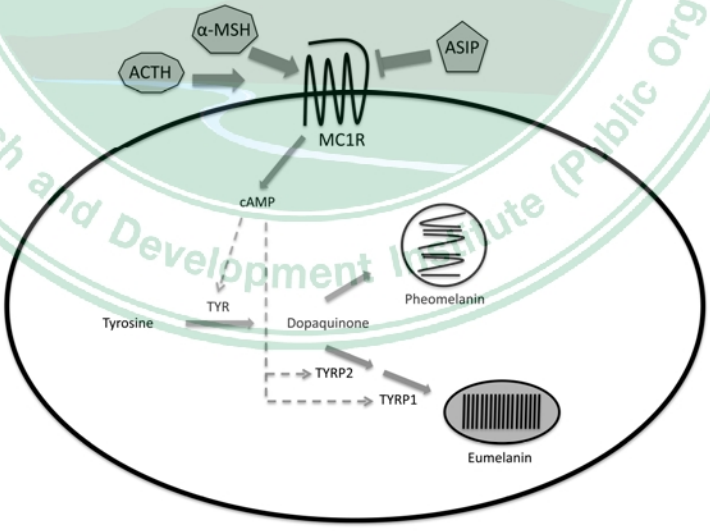
การตรวจเอกสาร

เครื่องหมายทางพันธุกรรม หรือที่เรียกว่า genetics markers เป็นเครื่องมือที่สามารถใช้ในการชี้วัดความแตกต่าง ในการจำแนกลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) และลักษณะทางพันธุกรรม (genetics) ของสิ่งมีชีวิตได้ ซึ่งเครื่องหมายทางพันธุกรรมดังกล่าว สามารถถ่ายทอดทางพันธุกรรมไปสู่รุ่นลูกรุ่นหลานได้ (ศุภมิตร, 2555) เครื่องหมายทางพันธุกรรมสามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ (1) เครื่องหมายทางลักษณะสัณฐานวิทยา (morphological markers) คือ ลักษณะปรากฏภายนอก ที่สามารถใช้จำแนกลักษณะความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต (2) เครื่องหมายทางชีวเคมี (biochemical markers) ซึ่งเป็นผลผลิตของยีน และ (3) เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) คือ ตำแหน่งความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บนโมเลกุลดีเอ็นเอ อาทิเช่น single strand conformational polymorphisms (SSCP), amplified fragment length polymorphisms (AFLP), restriction fragment length polymorphism (RFLPs), single Nucleotide Polymorphism (SNPs) และ DNA sequence เป็นต้น โดยวิธีการที่ศึกษาความผันแปรของยีนส่วนใหญ่ คือ วิธี PCR, PCR- RFLP และ PCR-SSCP เป็นต้น (ศุภมิตร, 2555; หนึ่งฤทัย และคณะ, 2557)

ปัจจุบันในทางปศุสัตว์ได้มีการศึกษาเครื่องหมายทางพันธุกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอสำหรับบ่งชี้ลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจ (ศุภมิตร, 2555) และการจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของสัตว์ จากหลักฐานทางวิชาการ มีการศึกษาการใช้เครื่องหมายโมเลกุลในการประเมินความหลากหลายของไก่พื้นเมืองไทยและไก่เนื้อ (Mekchay *et al*., 2005) การใช้เทคนิค AFLP fingerprinting ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของไก่ (Gao *et al*., 2008) การใช้ mitochondrial DNA markers ศึกษาลักษณะโมเลกุล (Yacoub *et al*., 2014) รวมไปถึงปัจจุบันได้มีการใช้ microsatellite markers ศึกษาความหลายหลายทางพันธุกรรม (Ohwojakpor *et al*., 2012; Wei *et al*., 2013) และใช้ในการตรวจสอบโมเลกุลของประชากร (Gruszczyńska and Michalska, 2012) จากการศึกษาการเกิดของลักษณะไก่กระดูกดำ พบว่าลักษณะสีดำที่ปรากฏขึ้น เกิดมาจากการสะสมเม็ดสีของเมลานิน (melanin) หรือกระบวนการ fibromelanosis (dermal hyperpigmentation) ใน connective tissue (เนื้อ หนัง และกระดูก) จากรายงานทางวิชาการบ่งชี้ว่าลักษณะที่เกิดขึ้นมีความเกี่ยวข้องกับยีน fibromelanosis gene (*Fm* gene) หรือ endothelin 3 (*EDN3* gene) และ sex-linked inhibitor of dermal pigment gene (*Id* gene) ซึ่งทำหน้าที่สัมพันธ์กับการสะสมเม็ดสีของเมลานิน (dermal hyperpigmentation หรือ fibromelanosis), กระบวนการเกิด melanoblast proliferation และ melanocytic regulation (Arora *et al*., 2011; Dorshorst *et al*., 2011; Shinomiya *et al*., 2012; Lukanov and Genchev *et al*., 2013) จากข้อมูลศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน fibromelanosis (*FM*) และ sex-linked inhibitor of dermal melanin gene (*Id*) สำหรับบ่งชี้ลักษณะไก่กระดูกดำ พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *FM* และ *Id* สามารถใช้จำแนกไก่กระดูกดำออกจากไก่กระดูกไม่ดำได้

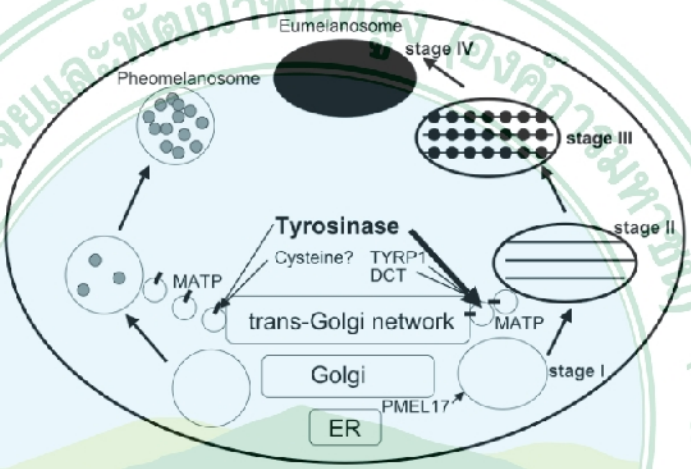
อย่างไรก็ตามเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอดังกล่าว ยังไม่สามารถใช้จำแนกระดับความเข้มของสีกล้ามเนื้ออกไก่กระดูกดำได้ (ศุภมิตร และคณะ, 2558) ลักษณะสีขนและเม็ดสีของไก่ น่าจะถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนหลายคู่ จากหลักฐานทางวิชาการระบุว่า

ยีน Melanocortin 1 receptor (*MC1R*) หรือ extended black (E) locus เป็นตำแหน่งหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้างรงควัตถุ melanin ซึ่งประกอบด้วย eumelanin และ phaeomelanin ภายในเซลล์ melanocyte ซึ่งในไก่พบว่ามีผลต่อลักษณะสีขน (Tekeuchi *et al*., 1996a; 1996b) โดย eumelanin ให้รงควัตถุสีดำ ส่วน phaeomelanin ให้รงควัตถุสีแดง/สีเหลือง โดย *MC1R* ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมน α-melanocortin stimulating hormone (α-MSH) และ adrenocorticotropic hormone (ACTH) มาจากสารตั้งต้น pro-opiomelanocortin precursor (POMC) และถูกยับยั้งด้วยฮอร์โมน agouti signalling protein (ASIP) เมื่อ α-MSH และ ACTH กระตุ้น *MC1R* ส่งผลให้ระดับ cyclic AMP (cAMP) สูงขึ้นและส่งผลต่อการแสดงออกของ tyrosinase (TYR) และผลิต eumelanin เพิ่มขึ้น tyrosinase จะกระตุ้นให้เกิดออกซิเดชันของ tyrosine และผลิต dopaquinone (eumelanin และ pheomelanin) มากขึ้น เมื่อมี cAMP ปริมาณสูงจะส่งผลต่อการแสดงออกของ tyrosinase-related enzymes (TYRP1 และ TYRP2) เพิ่มขึ้นมีผลต่อการกระตุ้นการเกิดออกซิเดชันในการเกิด eumelanin มากขึ้น สำหรับ ASIP เกี่ยวข้องกับ α-MSH และ *MC1R* โดยเปลี่ยน eumelanin pheomelanin เป็น cAMP ได้น้อยลง (ภาพที่ 1) (Barsh, 1996; Sundström 2010) และพบว่าเมื่อเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) บนยีน *MC1R* เป็นสาเหตุให้ขนมีสีดำและเกิดการผลิตเม็ดสีที่ผิวหนังมากเกินไป (dermal hyperpigmentation) (Luo *et al*., 2013)



ภาพที่ 1 แสดงการควบคุมกระบวนการสร้างเมลามิน (*Melanogenesis*) ในเซลล์เมลาโนไซต์ (*Melanocyte*) (ดัดแปลงจาก Barsh, 1996; Sundström 2010)

ยีน promelanin 17 (*PMEL17*) เป็นเมมเบรนโปรตีนชนิด type I ที่กำหนดการสร้างโปรตีนเกี่ยวกับการสังเคราะห์เม็ดสี (melanocyte-specific protein) และเป็น positional candidate gene สำหรับการพัฒนาของกลุ่มเซลล์ผลิตเม็ดสี โดย *PMEL17* ถูกควบคุมด้วย microphthalmia-associated transcription factor (MITF) และเพียงพอที่จะทำให้เกิดการสะสมเส้นใยใน premelanosome ซึ่งเป็นส่วนสำคัญต่อกระบวนการ premelanosome biogenesis เมื่อเกิดปฏิกิริยา *PMEL17* polymerizes ใน fibrillar arrays (the eumelanosome backbone) ซึ่งมีเม็ดสีเมลานินเป็นส่วนประกอบ มีผลต่อการพัฒนาเส้นใยของ pheomelanosomes และ eumelanosomes ใน melanocyte (ภาพที่ 2) (Gunnarsson, 2009)



ภาพที่ 2 แสดงการพัฒนาของ pheomelanosomes และ eumelanosomes ใน melanocyte (ดัดแปลงจาก Gunnarsson, 2009)

นอกจากนี้ kerje *et al*. (2004) ได้ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *PMEL17* ที่ตำแหน่ง *dominant white* locus ซึ่งมีอัลลีล 3 ชนิด ได้แก่ dominant white, Dun และ Smoky โดนเฉพาะการเพิ่มหรือการหายไป (insertion/deletion) ของลำดับเบสบนยีน *PMEL17* ในไก่เล็กฮอร์นขาวซึ่งมีอัลลีลของ *dominant white* แบบ homozygous พบว่าบน exon10 มีการเพิ่มขึ้นของนิวคลีโอไทด์จำนวน 9 bp ซึ่งทำให้เกิดการเพิ่มจำนวน 3 กรดอะมิโน บน *PMEL17* transmembrane region ในทำนองเดียวกันอัลลีลของ Dun พบว่ามีการหายไปจำนวน 5 กรดอะมิโน บน transmembrane region ในขณะที่อัลลีลของ Smoky มีการเพิ่มขึ้นของนิวคลีโอไทด์จำนวน 9 bp บน exon10 (เหมือน *dominant white*) และมีการหายไปของนิวคลีโอไทด์จำนวน 12 bp บน exon6 ซึ่งทำให้กรดอะมิโนหายไป 5 กรดอะมิโน ซึ่งความผันแปรทางพันธุกรรมเหล่านี้พบในลักษณะด้วยของอัลลีล silver ในหนู mouse ด้วยเช่นกัน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ ต้องการศึกษาความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลของยีน *MC1R* และ *PMEL17* กับลักษณะไก่กระดูกดำ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ไก่กระดูกดำ เพื่อผลิตลูกไก่กระดูกดำที่มีลักษณะตรงตามสายพันธุ์ไก่กระดูกดำได้ด้วยเช่นกัน