บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 เก็บรวบรวมตัวอย่างไก่

ทำการเก็บตัวอย่างเลือดไก่ทั้งหมด 220 ตัว (ภาพที่ 3) โดยไก่ที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์ คือ ไก่กระดูกดำ จากพื้นที่ฟาร์มปศุสัตว์ งานพัฒนาและส่งเสริมปศุสัตว์ มูลนิธิโครงการหลวง ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ จำนวน 114 ตัว และพื้นที่ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่สะป๊อก ต. แม่วิน อ. แม่วาง จ. เชียงใหม่ จำนวน 40 ตัว และไก่ปาปาซุงจำนวน 12 ตัว จากฟาร์มปศุสัตว์ มูลนิธิโครงการหลวง ต.แม่เหียะ ส่วนไก่ที่มีลักษณะไม่ตรงตามพันธุ์ คือไก่กลุ่มควบคุม (ไก่ประดู่หางดำ ไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า ไก่ไข่ ไก่ชี และไก่ซี้ฟ้า) ดังตารางที่ 1 ไก่กระดูกดำ จำนวน 60 ตัว ถูกเลือกมาชำแหละซาก เพื่อเก็บตัวอย่างสีของกล้ามเนื้ออกไก่ ลักษณะสีของกล้ามเนื้ออกไก่ ถูกให้คะแนน 3 ระดับ ตามลักษณะความเข้มจาง (สีชมพู = 1 คะแนน, สีเทา = 2 คะแนน และสีดำ = 3 คะแนน) ดังภาพที่ 4 พบว่าลักษณะสีของกล้ามเนื้ออกไก่มีการกระจายตัวของข้อมูลโดย ไก่กระดูกดำที่มีสีกล้ามเนื้อหน้าอกเป็นสีชมพูจำนวน 16 ตัว สีเทา จำนวน 25 ตัว และสีดำจำนวน 19 ตัว ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 แสดงตัวอย่างไก่ที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์ และ ไก่ที่มีลักษณะไม่ตรงตามพันธุ์

ลักษณะไก่	สายพันธุ์ไก่	จำนวน (ตัว)	แหล่งที่มา
ไก่กระดูกดำที่มีลักษณะตรงตามพันธุ์	ไก่กระดูกดำ	114	ฟาร์มปศุสัตว์ มูลนิธิโครงการหลวง ต.แม่เหียะ
		40	ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงแม่สะป๊อก
	ไก่ปาปาซุง	12	ฟาร์มปศุสัตว์ มูลนิธิโครงการหลวง ต.แม่เหียะ
ไก่กระดูกดำที่มีลักษณะไม่ตรงตามพันธุ์	ไก่ประดู่หางดำ	15	ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่
	ไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า	15	ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มช
	ไก่ไข่	10	ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มช
	ไก่ชี	10	ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่
	ไก่ซี้ฟ้า	4	ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์เชียงใหม่

ก

ข

ค

ง

ภาพที่ 3 ตัวอย่างไก่กระดูดำ (ก) ไก่ปาปาซุง (ค) และการเก็บเลือดไก่กระดูกดำ (ข) ไก่ปาปาซุง (ง) จากพื้นที่ฟาร์มปศุสัตว์ งานพัฒนาและส่งเสริมปศุสัตว์ มูลนิธิโครงการหลวง (แม่เหียะ)

ก

ข

ค

ภาพที่ 4 แสดงระดับสีกล้ามเนื้ออกไก่กระดูกดำมี 3 ระดับ คือ สีชมพู (ก) สีเทา (ข) และ สีดำ (ค)

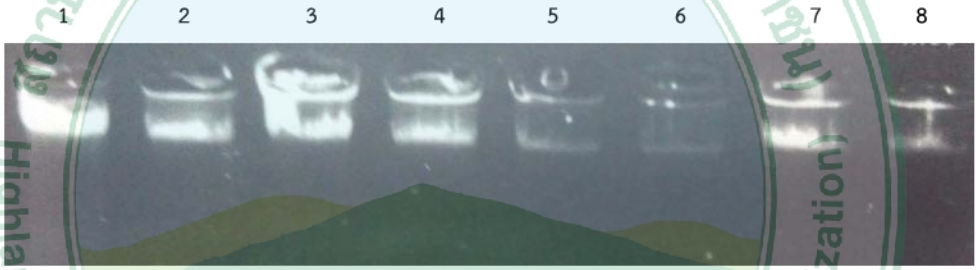
สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)

ตารางที่ 2 แสดงการกระจายตัวของสีกล้ามเนื้ออกไก่

สีกล้ามเนื้อ	การให้คะแนน	จำนวน (ตัว)
สีชมพู	1	16
สีเทา	2	25
สีดำ	3	19

4.2 สกัดตัวอย่างดีเอ็นเอ พร้อมทั้งตรวจวัดคุณภาพดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างเลือดไก่กระดูกดำที่เก็บได้ ทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี phenol-chloroform จากนั้นนำมาตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอของไก่กระดูกดำแต่ละตัว บน Agarose gel ที่ความเข้มข้น 1.2% (ภาพที่ 5) และวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ เพื่อปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้ได้ประมาณ 50-100 ng/µl ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์



ภาพที่ 5 ผลการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอของไก่กระดูกดำที่สกัดได้บน Agarose gel ที่ความเข้มข้น 1.2% โดยที่ หมายเลข 1 ตัวอย่างสารละลายดีเอ็นเอมาตรฐานเข้มข้น 100 ng/ml หมายเลข 2 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอไก่กระดูกดำ (ขนสีดำ) หมายเลข 3 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอไก่กระดูกดำ (ขนสีขาว) หมายเลข 4 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอไก่ประดู่หางดำ หมายเลข 5 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอไก่เนื้อ หมายเลข 6 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอไก่ไข่ หมายเลข 7 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอไก่ซี และหมายเลข 8 คือ ตัวอย่างดีเอ็นเอไก่ดำซี้ฟ้า

4.3 การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอสำหรับไก่กระดูกดำ

4.3.1 ผลการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอสำหรับไก่กระดูกดำ ไพรเมอร์ถูกออกแบบจำนวน 6 เครื่องหมาย ประกอบด้วย *PMEL17* และ *MC1R* (*MC1R*-1, *MC1R*-2, *MC1R*-4, *MC1R*-5 และ *MC1R*-6) แสดงดังตารางที่ 3

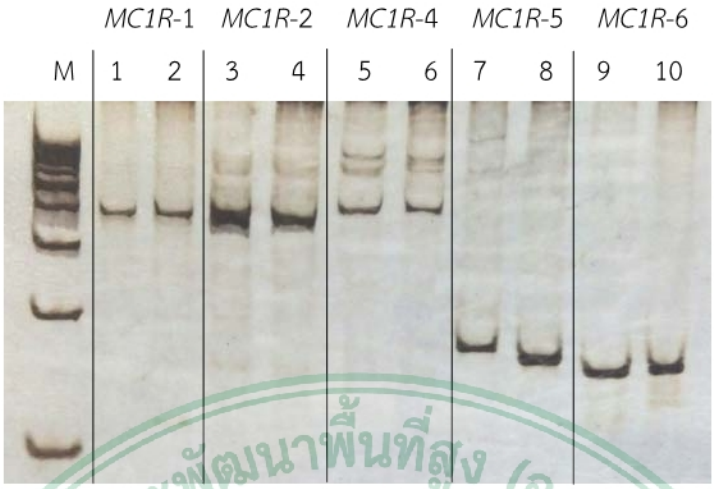
ตารางที่ 3 ไพรเมอร์ที่ใช้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในปฏิกิริยา PCR ของยีนเป้าหมายในไก่กระดูกดำ

ยีน	ไพรเมอร์	รายละเอียดปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส	ขนาดแถบดีเอ็นเอ
PMEL17	F: AGCATCCCCAGCCGCCAG R: CTGTGTTCTCCCCGTGTCT	(94 °C 30s / 58 °C 30s / 72 °C 30s) จำนวน 35 รอบ	154 bp
MC1R-1	F: CTTTGTAGGTGCTGCAGTTG R: CAGCAGCATGAAGAGCGTC	(94 °C 30s / 58 °C 30s / 72 °C 30s) จำนวน 35 รอบ	370 bp
MC1R-2	F: ACATGCTGGTGAGCGTCAG R: GCGAACATGTGAATGTAGAG	(94 °C 30s / 58 °C 30s / 72 °C 30s) จำนวน 35 รอบ	385 bp
MC1R-4	F: TGATCTATGCCTTCCGGAG R: GGAACCGGTGCTTGCATTG	(94 °C 30s / 58 °C 30s / 72 °C 30s) จำนวน 35 รอบ	411 bp
MC1R-5	F: GTGCTGTGCTCCTGGTAG R: CCCAACCCCAGCTGCTGCAC	(94 °C 30s / 58 °C 30s / 72 °C 30s) จำนวน 35 รอบ	162 bp
MC1R-6	F: AACGCCATCCTGCTCTGC R: CTGCTGGTGCGGTAGATG	(94 °C 30s / 58 °C 30s / 72 °C 30s) จำนวน 35 รอบ	149 bp

4.3.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเครื่องหมายโมเลกุล โดยใช้ไพรเมอร์ที่ได้จากรายงานทางวิชาการ จำนวน 6 เครื่องหมาย ประกอบด้วย *PMEL17* และ *MC1R* (*MC1R*-1, *MC1R*-2, *MC1R*-4, *MC1R*-5 และ *MC1R*-6) แสดงดังภาพที่ 6

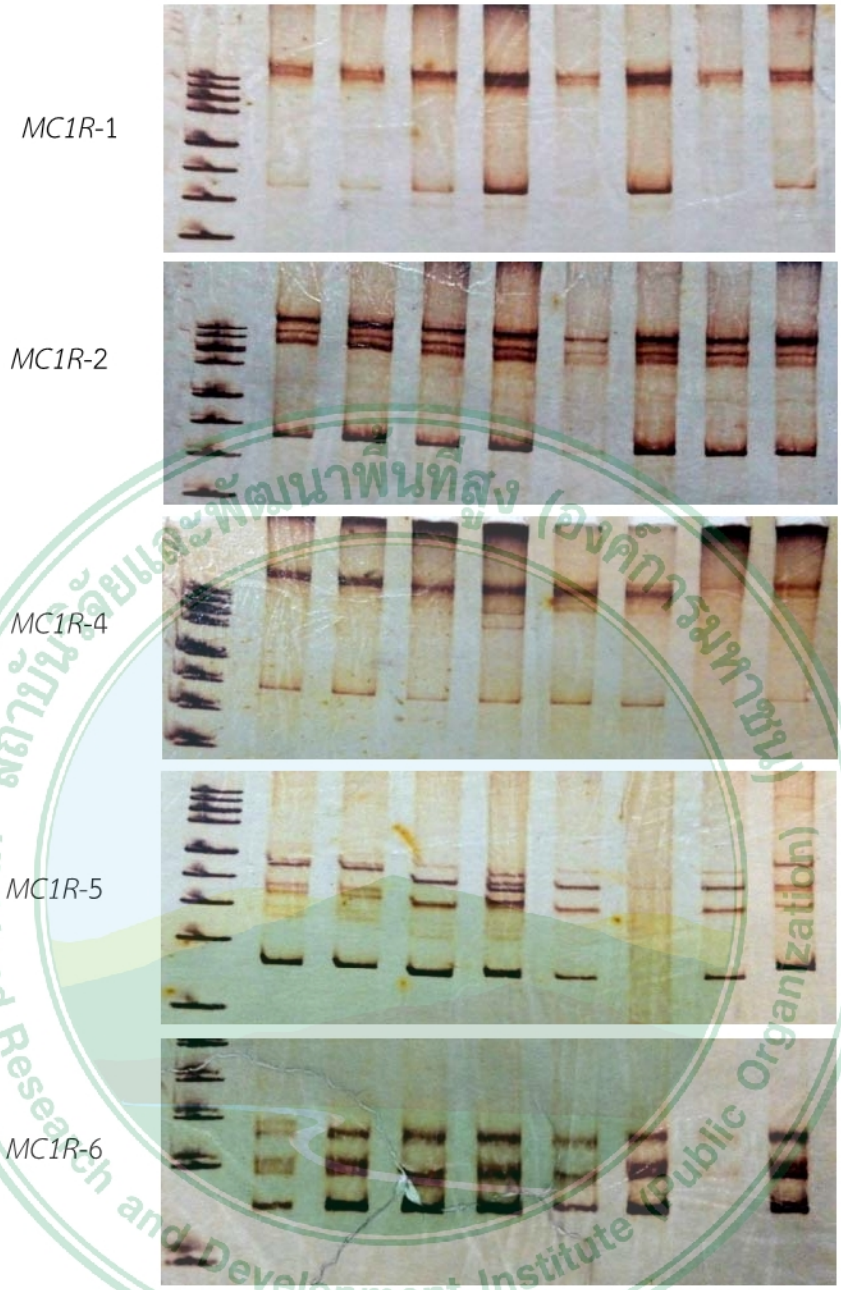
สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน) Highland Research and Development Institute (Public Organization)



ภาพที่ 6 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลของยีน *MC1R* จำนวน 5 เครื่องหมาย โดยที่ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp หมายเลข 1-2 คือ แถบพีซีอาร์ของไพรเมอร์ *MC1R*-1 จากไก่กระดูกดำ (1) ไก่เนื้อ (2) หมายเลข 3-4 คือ แถบพีซีอาร์ของไพรเมอร์ *MC1R*-2 จากไก่กระดูกดำ (3) ไก่เนื้อ (4) หมายเลข 5-6 คือ แถบพีซีอาร์ของไพรเมอร์ *MC1R*-4 จากไก่กระดูกดำ (5) ไก่เนื้อ (6) หมายเลข 7-8 คือ แถบพีซีอาร์ของไพรเมอร์ *MC1R*-5 จากไก่กระดูกดำ (7) ไก่เนื้อ (8) และ หมายเลข 9-10 คือ แถบพีซีอาร์ของไพรเมอร์ *MC1R*-6 จากไก่กระดูกดำ (9) ไก่เนื้อ (10)

4.3.3 ผลการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ บนยีน *MC1R* ของไก่กระดูกดำ ด้วยเทคนิค SSCP

การค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ บนยีน *MC1R* ในเบื้องต้นด้วยเทคนิค SSCP ในไก่กระดูกดำที่ตรงตามสายพันธุ์ และไม่ตรงตามสายพันธุ์ อย่างละ 4 ตัว ตามลำดับ พบว่าคู่ไพรเมอร์ *MC1R*-2 *MC1R*-4 และ *MC1R*-6 ให้รูปแบบ SSCP ที่ไม่แตกต่างกัน และ คู่ไพรเมอร์ *MC1R*-1 และ *MC1R*-5 ให้รูปแบบ SSCP ที่แตกต่างกัน โดย *MC1R*-1 ให้รูปแบบ SSCP จำนวน 3 รูปแบบ และ *MC1R*-5 ให้รูปแบบ SSCP จำนวน 3 รูปแบบ (ภาพ 7)

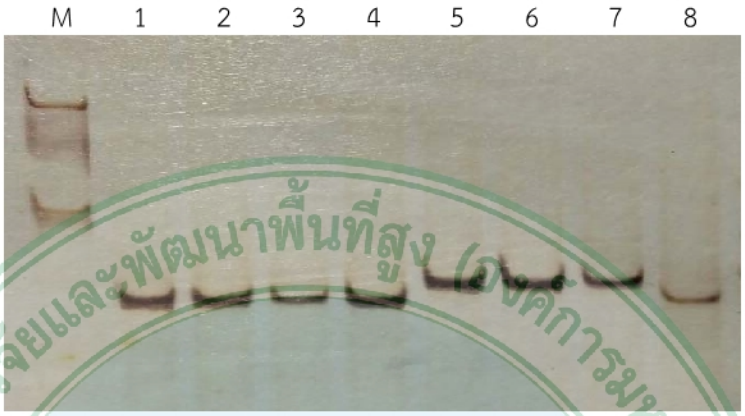


ภาพที่ 7 แสดงรูปแบบ SSCP บนยีน *MC1R* ในไก่กระดูกดำที่ตรงตามสายพันธุ์ และไม่ตรงตามสายพันธุ์ อย่างละ 4 ตัว ตามลำดับ

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

4.3.4 ความผันแปรทางพันธุกรรมบนยีนเป้าหมาย

ผลการศึกษาความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทป์บนยีน *PMEL17* พบว่า ความผันแปรทางพันธุกรรมบนยีน *PMEL17* มีการเพิ่ม (insertion) ของนิวคลีโอไทป์จำนวน 9 bp บนยีน *PMEL17* ในไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า ไก่ชี และไก่ไข่ ซึ่งแตกต่างจากไก่กระดูกดำ และ ไก่ประดู่หางดำ แสดงในภาพที่ 8

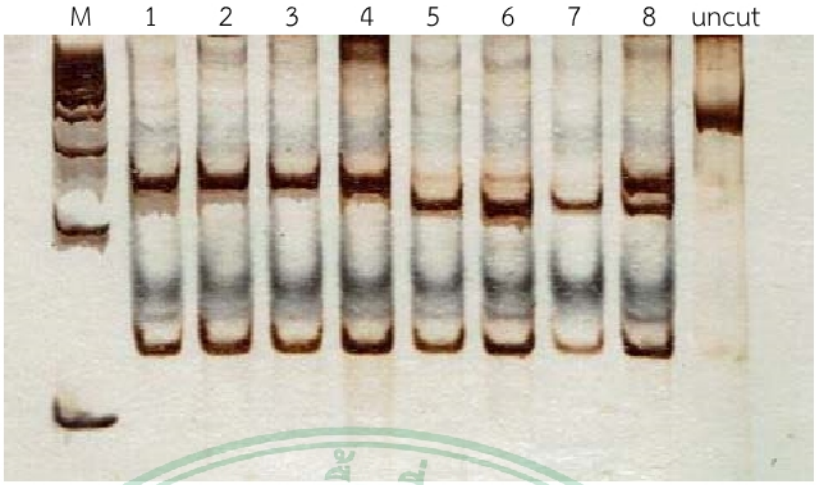


ภาพที่ 8 ผลการตรวจสอบความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทป์บนยีน *PMEL17* โดยที่ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp หมายเลข 1 คือ แถบ PCR ของไก่กระดูกดำ(ขนขาว) หมายเลข 2 คือ แถบ PCR ของไก่กระดูกดำ (ขนดำ) หมายเลข 3 คือ แถบ PCR ของไก่กระดูกดำ (ไก่ภูพาน) หมายเลข 4 คือ แถบ PCR ของไก่ชี้ฟ้า (ไก่กระดูกดำพื้นเมืองไทย) หมายเลข 5 คือ แถบ PCR ของไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า หมายเลข 6 คือ แถบ PCR ของ ไก่ชี หมายเลข 7 คือ แถบ PCR ของไก่ไข่ และ หมายเลข 8 คือ แถบ PCR ของไก่ประดู่หางดำ

4.3.5 ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *MC1R*

ผลผลิต PCR ของเครื่องหมายโมเลกุล *MC1R* จำนวน 5 คู่ไพรเมอร์ ถูกนำมาตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเทคนิค polymerase chain reaction - restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) โดยไพรเมอร์ *MC1R-2* สามารถตรวจสอบจีโนไทป์ได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MscI* ได้ 2 รูปแบบ คือ อัลลีล A และ B โดยอัลลีล A ไม่มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ดังกล่าว ได้แถบดีเอ็นเอที่มีความยาว 246 และ 139 bp ในขณะที่อัลลีล B มีตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ *MscI* ผลการตัดแถบดีเอ็นเอได้ความยาว 219, 139 และ 27 bp ตามลำดับ (ภาพที่ 9) สำหรับไพรเมอร์ *MC1R-1*, *MC1R-4*, *MC1R-5* และ *MC1R-6* จะถูกศึกษาเพิ่มเติมในครั้งต่อไป

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



ภาพที่ 9 ผลการตรวจสอบจีโนไทป์เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *MC1R-2* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *MscI* โดยจีโนไทป์แบบ AA แสดงดังตัวอย่างที่ 1, 2, 3 และ 4 จีโนไทป์แบบ AB แสดงดังตัวอย่างที่ 8 ส่วนจีโนไทป์แบบ BB แสดงดังตัวอย่างที่ 5, 6 และ 7 ตามลำดับ สำหรับ M คือ แถบดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp และ uncut คือ แถบ PCR ของยีน *MC1R-2* ที่ไม่ผ่านการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ข้อมูลจีโนไทป์เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *PMEL17* และ *MC1R-2* ในไก่ จำนวน 2 เครื่องหมาย ถูกนำไปวิเคราะห์ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีล เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอกับลักษณะไก่กระดูกดำ

4.3.6 ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของยีนเป้าหมาย *PMEL17* และ *MC1R*

ความถี่จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *PMEL17* และ *MC1R-2* ในไก่แต่ละสายพันธุ์ แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายในไก่กระดูกดำและไก่กระดูกไม่ดำ

marker	Breed	Genotype frequencies			Allele frequencies	
		AA	AB	BB	f(A)	f(B)
PMEL17	ไก่กระดูกดำ	0.05	0.13	0.82	0.12	0.88
	ไก่กระดูกดำไม่ดำ	0.64	0.02	0.34	0.65	1.35
MC1R-2	ไก่กระดูกดำ	0.95	0.05	0.00	0.98	0.02
	ไก่กระดูกดำไม่ดำ	0.15	0.63	0.22	0.46	0.54

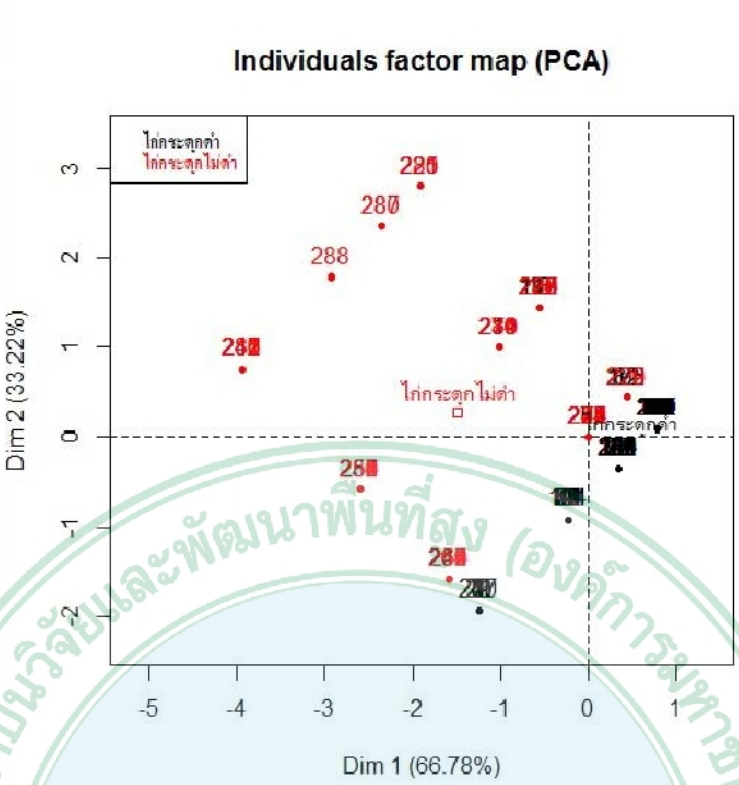
4.3.7 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *PMEL17* และ *MC1R-2* กับลักษณะไก่กระดูกดำ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *PMEL17* และ *MC1R-2* กับลักษณะไก่กระดูกดำ ด้วยวิธี chi- square ซึ่งถูกพิจารณา 3 รูปแบบด้วยกัน คือ โมเดล additive, dominance และ recessive พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *PMEL17* และ *MC1R-2* มีความสัมพันธ์กับลักษณะไก่กระดูกดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในโมเดลการวิเคราะห์ทั้ง 3 รูปแบบ โดยเครื่องหมายโมเลกุล *PMEL17* มีความสัมพันธ์กับลักษณะไก่กระดูกดำแบบโมเดล recessive อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมากที่สุด ในขณะที่เครื่องหมายโมเลกุล *MC1R-2* มีความสัมพันธ์กับลักษณะไก่กระดูกดำแบบโมเดล additive อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมากที่สุด สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล *PMEL17* และ *MC1R-2* มีความสัมพันธ์กับลักษณะไก่กระดูกดำแบบ dominance อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติน้อยที่สุด (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอกับลักษณะไก่กระดูกดำ

Marker	P-values		
	Additive model	Dominance model	Recessive model
PMEL17	1.10×10^{-22}	5.66×10^{-11}	1.36×10^{-35}
MC1R-2	4.28×10^{-35}	2.67×10^{-11}	3.34×10^{-34}

สำหรับผลการการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของไก่กระดูกดำออกจากไก่กระดูกไม่ดำ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *PMEL17* และ *MC1R-2* ด้วยวิธี principal component analysis พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอดังกล่าว ไม่สามารถจำแนกไก่กระดูกดำออกจากไก่กระดูกไม่ดำได้อย่างชัดเจน แสดงดังภาพที่ 9 โดยแผนภาพดังกล่าวแสดงความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอหลักที่สามารถแยกความแตกต่าง หรืออธิบายความแปรปรวนของตัวอย่างไก่กระดูกดำและไก่กระดูกไม่ดำได้สูงสุด (Dim.1) มีค่าเท่ากับ 66.78 % ร่วมกับองค์ประกอบของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอรองที่สามารถแยกความแตกต่าง หรืออธิบายความแปรปรวนของตัวอย่างไก่กระดูกดำ และไก่กระดูกไม่ดำได้ (Dim.2) มีค่าเท่ากับ 33.22 % เมื่อพิจารณาเครื่องหมายโมเลกุลในองค์ประกอบหลักและรองร่วมกันสามารถอธิบายความแปรปรวนของตัวอย่างข้อมูลไก่กระดูกดำและไก่กระดูกไม่ดำได้เท่ากับ 100 % และพบว่าเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวไม่สามารถแยกตัวอย่างไก่กระดูกดำออกจากตัวอย่างไก่กระดูกไม่ดำได้ชัดเจน (ภาพที่ 10) และความแม่นยำของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายพบว่า ยีน *PMEL17* สามารถแยกไก่กระดูกดำได้ถูกต้อง 72.84 เปอร์เซ็นต์ สำหรับยีน *MC1R* สามารถแยกไก่กระดูกดำได้ถูกต้อง 82.03 เปอร์เซ็นต์ จากผลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอดังกล่าวสามารถแยกไก่กระดูกดำออกจากไก่กระดูกไม่ดำได้



ภาพที่ 10 การจำแนกไก่กระดูกดำออกจากไก่ที่มีกระดูกไม่ดำ ตามวิธี principal component analysis โดย จุดสีดำ คือตัวอย่างไก่กระดูกดำ และจุดสีแดง คือตัวอย่างไก่กระดูกไม่ดำ ตัวเลขสีดำและสีแดง คือสมาชิกของตัวอย่างไก่กระดูกดำ และไก่กระดูกไม่ดำ ตามลำดับ

4.3.8 ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *PMEL17* และ *MC1R*-2 กับลักษณะสีกล้ามเนื้ออกของไก่กระดูกดำ

ลักษณะสีกล้ามเนื้ออกของไก่กระดูกดำในพื้นที่ของโครงการหลวง ถูกบันทึกจากตัวอย่างไก่กระดูกดำที่ถูกชำแหละซาก จำนวน 60 ตัว พบว่าสีกล้ามเนื้อมีการกระจายตัว และได้มีการให้คะแนนสีกล้ามเนื้ออก 3 ระดับ ซึ่งผันแปรจากสีชมพู เทา และดำ เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *PMEL17* และ *MC1R*-2 ถูกใช้ศึกษาความสัมพันธ์กับลักษณะสีกล้ามเนื้ออกของไก่ดังกล่าว ทั้งนี้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *PMEL17* ในกลุ่มตัวอย่าง พบจีโนไทป์เพียงรูปแบบเดียว ทำให้ไม่สามารถใช้ศึกษาความสัมพันธ์กับสีกล้ามเนื้ออกไก่กระดูกดำได้ สำหรับเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *MC1R*-2 มีความสัมพันธ์กับลักษณะสีของกล้ามเนื้ออกไก่ (P=0.0002) โดยไก่ที่มีจีโนไทป์ E/E มีกล้ามเนื้ออกสีเข้มกว่าไก่ที่จีโนไทป์ E/e (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *MC1R*-2 กับลักษณะสีกล้ามเนื้ออกไก่กระดูกดำ

Markers	Pigmentation levels of breast muscles			*P*-value
	E/E	E/e	e/e	
MC1R-2	2.19±0.09	1.00±0.28	-	0.0002

ข้อเสนอแนะ

ลักษณะสีผิวและสีกล้ามเนื้ออกของไก่ มีความซับซ้อน (complex traits) และถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไป ควรศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลยีน *MC1R* ตำแหน่งอื่น (*MC1R-1*, *MC1R-4*, *MC1R-5* และ *MC1R-6*) เพิ่มเติม รวมถึงยีนเป้าหมายอื่นๆ อาทิเช่น tyrosinase (*TYR*) หรือ agouti signaling protein (*ASIP*) เป็นต้น

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

บทที่ 5
วิจารณ์ผลการวิจัย

ลักษณะไก่กระดูกดำในพื้นที่ของโครงการหลวง สามารถแบ่งตามรูปร่างลักษณะภายนอกออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ ไก่กระดูกดำที่มีขนสีดำ ไก่กระดูกดำที่มีขนสีขาว (ปาปาซุง) และไก่กระดูกดำภูพาน โดยลักษณะใบหน้า หงอน เหนียง ผิวหนัง เพดานปาก และแข้ง ของไก่ทั้งสามกลุ่มดังกล่าวมีสีดำ อย่างไรก็ตามลักษณะสีดำมีความผันแปรในไก่แต่ละตัว โดยเฉพาะไก่กระดูกดำในกลุ่มที่มีขนสีขาวและไก่กระดูกดำภูพาน ยังมีลักษณะใบหน้า หงอน เหนียง มีสีดำอมแดง เมื่อมีการชำแหละซากไก่กระดูกดำที่มีขนสีดำ พบว่าสีกล้ามเนื้ออกของไก่กระดูกดำยังมีความแปรปรวนจะมีสีตั้งแต่สีชมพู เทา และดำ จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นลักษณะสีดำของไก่กระดูกดำในพื้นที่ของโครงการหลวง ยังคงมีกระจายตัวอยู่

จากการศึกษาในปีที่ผ่านมาได้ทำการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน fibromelanosis gene (*Fm* gene) และ sex-linked inhibitor of dermal melanin gene (*Id* gene) สามารถใช้จำแนกไก่กระดูกดำออกจากไก่กระดูกไม่ดำได้ แต่เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอดังกล่าวยังไม่สามารถใช้จำแนกระดับสีกล้ามเนื้ออกของไก่กระดูกดำได้ จึงทำให้มีการศึกษาเพิ่มเติมในปีนี้เพื่อต้องการศึกษาและค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมของยีน *PMEL17* และ *MC1R* สำหรับบ่งชี้เอกลักษณ์ไก่กระดูกดำในพื้นที่โครงการหลวง

5.1 ความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *PMEL17* และ *MC1R* ในไก่กระดูกดำ

ผลการตรวจสอบจีโนไทป์ของยีน *PMEL17* ในไก่กระดูกดำในพื้นที่โครงการหลวง พบว่าไก่กระดูกดำดังกล่าวส่วนมากมีจีโนไทป์ในรูปแบบ *i/i* สำหรับจีโนไทป์ของไก่ประดู่หางดำ (ไก่พื้นเมือง) มีรูปแบบจีโนไทป์ i/i ซึ่งมีรูปแบบเหมือนกับไก่กระดูกดำของโครงการหลวง แต่ในขณะที่ไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า ไก่ไข่ และไก่ชีมีจีโนไทป์ในรูปแบบ *I/I* จากผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับเอกสารวิชาการของ Kerje *et al*. (2004) ที่มีการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง Dominant white locus ซึ่งมีอัลลีลอยู่ 3 ชนิดด้วยกันคือ Dominant white Dun และ Smoky ที่มีการเพิ่มขึ้นหรือการสูญหายไป (insertion/deletion) ของลำดับเบสบนยีน *PMEL17* ในไก่เล็กฮอร์นขาว พบว่าในไก่เล็กฮอร์นขาวที่มีจีโนไทป์ *I/I* มีการเพิ่มขึ้น (insertion) ของนิวคลีโอไทด์จำนวน 9 bp ใน exon10 บนยีน *PMEL17* สำหรับไก่พันธุ์แบล็คแลงชาน (black langshan) มีรูปแบบจีโนไทป์ *i/i* เนื่องจากยีน *PMEL17* เป็นโปรตีนชนิด type I ที่เยื่อหุ้มเซลล์โปรตีนเป็นส่วนประกอบในเมลาโนโซม และ เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์เซลล์เม็ดสี (Berson *et al*., 2003; Du *et al*., 2003)

ผลการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *MC1R* ในไก่กระดูกดำในพื้นที่โครงการหลวง จำนวน 5 ชุดไพรเมอร์ ดังภาพที่ 7 และการตรวจสอบจีโนไทป์ของยีน *MC1R*-2 ในไก่กระดูกดำพบว่า รูปแบบจีโนไทป์ส่วนใหญ่ เป็น *E/E* สอดคล้องกับรายงานของ Yang *et al*., 2008 และ Kerje *et al*., 2003 พบว่าไก่ป่าที่มีขนสีดำมีอัลลีลเป็น dominant *E* และ *E/-* เนื่องจาก ยีน *melanocortin 1 receptor* (*MC1R*) หรือ extended black (E) locus ควบคุมสมดุลเม็ดสีระหว่าง eumelanin (สีดำ) และ phaeomelanin (สีแดง) ในร่างกาย

ส่วนแถบเครื่องหมายโมเลกุล *MC1R-1*, *MC1R-4*, *MC1R-5* และ *MC1R-6* จะถูกค้นเครื่องหมายโมเลกุลเพิ่มเติมในการศึกษาครั้งถัดไป

5.2 ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายกับลักษณะไก่กระดูกดำ

ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *PMEL17* และ *MC1R*-2 กับลักษณะไก่กระดูกดำ พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *PMEL17* และ *MC1R*-2 เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์พบว่าในรูปแบบโมเดล additive มีความสัมพันธ์กับลักษณะไก่กระดูกดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมากที่สุด คือ ยีน *MC1R*-2 ในขณะที่โมเดล recessive ให้ผลความสัมพันธ์กับลักษณะไก่กระดูกดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมากที่สุด คือ ยีน *PMEL17* ส่วนโมเดล dominance ให้ผลความสัมพันธ์กับลักษณะไก่กระดูกดำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติน้อยที่สุด คือยีน *PMEL17* และ *MC1R*-2 นอกจากนี้มีการจำแนกระหว่างสายพันธุ์ไก่กระดูกดำและไก่กระดูกไม่ดำด้วยเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอด้วยวิธี principal component analysis สามารถจำแนกไก่กระดูกดำออกจากไก่กระดูกไม่ดำได้ แต่ยังมีบางส่วนที่ยังซ้อนทับกัน และความแม่นยำของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายพบว่า ยีน *PMEL17* สามารถแยกไก่กระดูกดำได้ถูกต้อง 72.84 เปอร์เซ็นต์ สำหรับยีน *MC1R* สามารถแยกไก่กระดูกดำได้ถูกต้อง 82.03 เปอร์เซ็นต์ จากผลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอดังกล่าวสามารถแยกไก่กระดูกดำออกจากไก่กระดูกไม่ดำได้

5.3 ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *MC1R* กับลักษณะสีกล้ามเนื้ออกของไก่กระดูกดำ

เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *PMEL17 และ MC1R*-2 ถูกใช้ศึกษาความสัมพันธ์กับลักษณะสีกล้ามเนื้ออกของไก่ดังกล่าว พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *PMEL17* ไม่สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับสีกล้ามเนื้ออกไก่กระดูกดำได้ สำหรับเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *MC1R*-2 มีความสัมพันธ์กับลักษณะสีของกล้ามเนื้ออกไก่ (P=0.0002) โดยไก่ที่มีจีโนไทป์ E/E มีกล้ามเนื้ออกสีเข้มกว่าไก่ที่มีจีโนไทป์ E/e สอดคล้องกับรายงานของ Smyth (1996) ว่า loci Dominant white (I) และ Extended black (E) เป็น loci หลักที่ควบคุมสีขน และยังมีรายงานว่า อีลลีล E มีความสัมพันธ์กับลักษณะสีขนสีดำในไก่ (Yang *et al*., 2008)

เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีนเป้าหมาย เพื่อบ่งชี้ลักษณะไก่กระดูกดำในการศึกษาที่ผ่านมา (ปีงบประมาณ 2558) และเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอในครั้งนี้ (ปีงบประมาณ 2559) พบว่า

1) เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *FM* assay A, *FM* assay B และ *Id542* (ปีงบประมาณ 2558) สามารถจำแนกไก่กระดูกดำได้ถูกต้องมากที่สุด (92-95 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งสูงกว่าเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *MC1R และ PMEL17* (ในครั้งนี้) ซึ่งสามารถแยกไก่กระดูกดำได้ถูกต้อง 82.03 และ 72.84 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

2) เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *FM* assay A และ *FM* assay B ไม่สามารถจำแนกลักษณะสีของกล้ามเนื้อได้ ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *Id542* มีแนวโน้มแสดงความสัมพันธ์กับลักษณะสีของกล้ามเนื้ออกไก่ (P=0.08) (ปีงบประมาณ 2558) ในขณะที่เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *MC1R*-2 (ในการศึกษาครั้งนี้) มีความสัมพันธ์กับลักษณะสีของกล้ามเนื้ออกไก่ (P=0.0002) โดยไก่ที่มีจีโนไทป์ E/E มีกล้ามเนื้อออกสีเข้มกว่าไก่ที่จีโนไทป์ E/e และเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *PMEL17* ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะสีของกล้ามเนื้ออกไก่

การประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอคัดเลือกไก่กระดูกดำนั้น เครื่องหมายโมเลกุล *FM* assay A และ *FM* assay B อาจจะสามารถใช้จำแนกไก่กระดูกดำออกไก่กระดูกไม่ดำได้ สำหรับการคัดเลือกลักษณะสีของกล้ามเนื้ออกไก่กระดูกดำ เครื่องหมายโมเลกุล *MC1R-2* แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะดังกล่าว เครื่องหมายโมเลกุล *MC1R-2* เป็นเครื่องหมายโมเลกุลเพียงหนึ่งตำแหน่ง แต่ลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะทางปริมาณ มีความซับซ้อน (complex traits) และถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ ทั้งนี้การประยุกต์ใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอสำหรับการคัดเลือกลักษณะสีของกล้ามเนื้ออกไก่กระดูกดำให้ได้ผลดี ควรใช้เครื่องหมายโมเลกุลมากกว่า 1 ตำแหน่ง เพื่อเพิ่มแม่นยำในการคัดเลือก ดังนั้นการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุล ดีเอ็นเอสำหรับบ่งชี้ลักษณะสีของกล้ามเนื้อไก่กระดูกดำ จึงมีความจำเป็นที่ต้องศึกษาเพิ่มเติม

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

บทที่ 6
สรุปผลการทดลอง

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีนเป้าหมาย *PMEL17* และ *MC1R* เพื่อบ่งชี้ลักษณะไก่กระดูกดำ พบว่า

1) เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *PMEL17* และ *MC1R* มีความสัมพันธ์กับลักษณะไก่กระดูกดำอย่างมีนัยสำคัญ

2) เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *PMEL17* สามารถแยกไก่กระดูกดำได้ถูกต้อง 72.84 เปอร์เซ็นต์ สำหรับยีน *MC1R* สามารถแยกไก่กระดูกดำได้ถูกต้อง 82.03 เปอร์เซ็นต์

3) เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *PMEL17* ไม่สามารถวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับสีกล้ามเนื้อออกไก่กระดูกดำได้ สำหรับเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *MC1R*-2 มีความสัมพันธ์กับลักษณะสีของกล้ามเนื้ออกไก่ (P=0.0002) โดยไก่ที่มีจีโนไทป์ E/E มีกล้ามเนื้ออกสีเข้มกว่าไก่ที่จีโนไทป์ E/e

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