สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทย จำนวน 5 สายพันธุ์โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์

A Study on Genetic Diversity of Five Thai Indigenous Chicken Lines by Microsatellites

โดย

รศ.ดร. สุชีพ สุขสุแพทย์

รศ.ดร. รณชัย สิทธิไกรพงษ์

น.ส. ทัศนีย์ ตรัยรัตน์อภิวัน

พ.ศ. 2547

RCH
SF
481.75
.T5
ส7635
เลขหมู่
เลขทะเบียน 58900
วัน,เดือน,ปี 17 ก.พ. 2549

.b 11418023
.i

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ
เรื่อง
การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทย จำนวน 5 สายพันธุ์โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์
A Study on Genetic Diversity of Five Thai Indigenous Chicken Lines by Microsatellites

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทยจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่เหลืองหางขาว ไก่ประดู่หางดำ ไก่แจ้ ไก่เบตง และไก่คอเปลือย ทำโดยการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอจากเลือดไก่แต่ละตัว นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 20 โลไซด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ทำการแยกและตรวจสอบแถบดีเอ็นเอแล้ว นำข้อมูลมาทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรและความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรโดยใช้โปรแกรม POPGENE version 1.32 พบว่าไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอทุกโลไซเป็นโพลีมอร์ฟิค จำนวนของอัลลิลในแต่ละโลคัสสำหรับทุกประชากรมีความผันแปรอยู่ระหว่าง 3-14 จำนวนของอัลลิลเฉลี่ยต่อโลคัสสำหรับทุกประชากร คือ 7 ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยของไก่พื้นเมืองไทยมีค่าอยู่ระหว่าง 0.400-0.505 โดยไก่แจ้มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยต่ำที่สุด และไก่เบตงมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยสูงที่สุด ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยของไก่พื้นเมืองไทยมีค่าอยู่ระหว่าง 0.566-0.618 โดยไก่แจ้มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยต่ำที่สุด และไก่ประดู่หางดำมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยสูงที่สุด สำหรับระยะห่างทางพันธุกรรมจากการคำนวณโดยใช้ Nei’s genetic distance ระหว่างไก่พื้นเมืองไทยมีค่าอยู่ระหว่าง 0.1120-0.3190 โดยระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างไก่เหลืองหางขาวและไก่ประดู่หางดำมีค่าน้อยที่สุด และระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างไก่แจ้และไก่เบตงมีค่ามากที่สุด เมื่อนำค่าระยะห่างทางพันธุกรรมจากการคำนวณโดยใช้ Nei’s genetic distance มาสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี UPGMA พบว่าประชากรไก่พื้นเมืองไทยมีการจัดแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ดังนี้ กลุ่มแรกประกอบด้วยไก่เหลืองหางขาว ไก่ประดู่หางดำ ไก่เบตง และไก่คอเปลือย และกลุ่มที่ 2 คือ ไก่แจ้

A Study on Genetic Diversity of Five Thai Indigenous Chicken Lines by Microsatellites

ABSTRACT

Genetic diversity of 5 Thai indigenous chicken lines (Luenghangkhoa, Praduhangdam, Bantam, Betong and Naked Neck) were evaluated on the basis of microsatellite DNA polymorphisms. The genomic DNA were extracted from individual chicken blood. Twenty microsatellite DNA markers were used to amplify the extracted genomic DNA by polymerase chain reaction. DNA bands were separated and detected. Genetic diversity within and between populations were analyzed by POPGENE version 1.32. All the microsatellite loci were found to be polymorphic. The number of alleles was varying from 3 to 14 per locus, and the mean number of alleles per locus was 7. The mean observed and expected heterozygosity of Thai indigenous chicken ranged from 0.400 (Bantam) to 0.505 (Betong) and 0.566 (Bantam) to 0.618 (Praduhangdam), respectively. Among the 5 Thai indigenous chicken lines, the genetic distance ranged from 0.1120 (between Luenghangkhoa and Praduhangdam) to 0.3190 (between Bantam and Betong). A phylogenetic tree was constructed based on Nei's genetic distance by UPGMA method. The lines were grouped into two clusters as following; the first group Luenghangkhoa, Praduhangdam, Betong and Naked Neck and the second group Bantam.

คำนิยม

ในการทำวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินรายได้ของหลักสูตรสัตวศาสตร์ ภาคพิเศษ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ประจำปี 2546 และงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงด้วยดี คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการชันสูตร โรคสัตว์ คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ และห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่อนุเคราะห์ให้ ผู้วิจัยได้เข้าดูงานและฝึกปฏิบัติการ ขอขอบพระคุณสถานีบำรุงพันธุ์สัตว์สุรินทร์ สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ยะลา ฟาร์มตัวอย่างในพระราชดำริ จังหวัดพัทลุง และเกษตรกร ที่กรุณาให้ผู้วิจัยได้ ทำการเก็บตัวอย่างเลือดไก่

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

หน้า

สารบัญ I

สารบัญตาราง II

สารบัญภาพ IV

คำนำ 1

วัตถุประสงค์ 2

การตรวจเอกสาร 3

อุปกรณ์และวิธีการ 16

ผลการทดลองและวิจารณ์ 29

สรุป 38

ข้อเสนอแนะ 39

เอกสารอ้างอิง 40

ภาคผนวก ก 45

ภาคผนวก ข 49

ภาคผนวก ค 54

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 สายพันธุ์ไก่ จำนวนตัวอย่าง และสถานที่เก็บตัวอย่าง 16

2 ไพร์เมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ 20

3 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 21

4 ตัวอย่างการแปลงข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเป็นข้อมูลจีโนไทป์ 25

5 จำนวนของอัลลิลเฉลี่ยต่อโลคัส เปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิคโลไซ ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ย และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยของไก่พื้นเมืองไทยจำนวน 5 สายพันธุ์ 35

6 ระยะห่างทางพันธุกรรมจากการคำนวณโดยใช้ Nei’s genetic distance ระหว่างไก่พื้นเมืองไทยจำนวน 5 สายพันธุ์ 36

ตารางผนวกที่

ข.1 ส่วนประกอบของ Lysis buffer 50

ข.2 ส่วนประกอบของ TE buffer 50

ข.3 ส่วนประกอบของ 5×TBE buffer 51

ข.4 ส่วนประกอบของ 4.5% Acrylamide 52

ข.5 ส่วนประกอบของ Loading buffer 52

ค.1 จำนวนของอัลลิลในแต่ละโลคัสสำหรับทุกประชากร 55

ค.2 ความถี่ของอัลลิลในแต่ละโลคัสของไก่พื้นเมืองไทยจำนวน 5 สายพันธุ์ 56

ค.3 จำนวนของอัลลิล ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกต และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีในแต่ละโลคัสสำหรับไก่เหลืองหางขาว 63

ค.4 จำนวนของอัลลิล ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกต และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีในแต่ละโลคัสสำหรับไก่ประดู่หางดำ 64

ค.5 จำนวนของอัลลิล ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกต และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีในแต่ละโลคัสสำหรับไก่แจ้ 65

ค.6 จำนวนของอัลลิล ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกต และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีในแต่ละโลคัสสำหรับไก่เบตง 66

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่ หน้า

ค.7 จำนวนของอัลลิล ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกต และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีในแต่ละโลคัสสำหรับไก่คอเปลือย 67

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า
1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 10
2 การตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ 11
3 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ที่โลคัส ADL166 30
4 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ที่โลคัส ADL185 30
5 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ที่โลคัส ADL115 31
6 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ที่โลคัส ADL160 31
7 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ที่โลคัส ADL231 32
8 แผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไก่พื้นเมืองไทยจำนวน 5 สายพันธุ์ 37

ภาพผนวกที่

ก.1 ไก่เหลืองหางขาว 46
ก.2 ไก่ประดู่หางดำ 46
ก.3 ไก่แจ้ 47
ก.4 ไก่เบตง 47
ก.5 ไก่คอเปลือย 48

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทย จำนวน 5 สายพันธุ์โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์

A Study on Genetic Diversity of Five Thai Indigenous Chicken Lines by Microsatellites

คำนำ

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) หมายถึง ความหลากหลายของยีนที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันอาจมียีนแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ (ประเวศ และคณะ, 2537) ซึ่งการแตกต่างกันของพันธุกรรมนั้นเป็นผลมาจากกระบวนการวิวัฒนาการ หากปราศจากความหลากหลายทางพันธุกรรมแล้ว สิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ อาจไม่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของโลกที่ผันแปรไปเรื่อยๆ และไม่สามารถพัฒนาความต้านทานต่อโรคใหม่ๆ ได้ (สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม, 2539) นอกจากนี้ความหลากหลายทางพันธุกรรมยังเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งสำหรับการปรับปรุงพันธุ์ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์จะเห็นได้จากการที่สัตว์มีมากมายหลายพันธุ์ แต่ในปัจจุบันสายพันธุ์ของสัตว์ได้ลดจำนวนหรือสูญพันธุ์ลงไปอย่างมาก ซึ่งสิ่งที่อันตรายที่สุดต่อการลดลงของความหลากหลายของสัตว์เลี้ยงคือการผลิตสัตว์สมัยใหม่ในประเทศที่พัฒนาแล้ว การทำฟาร์มเลี้ยงสัตว์เป็นการค้าจะเลี้ยงสัตว์เพียงไม่กี่พันธุ์ และสัตว์เหล่านี้ได้ถูกคัดเลือกสำหรับการผลิตเนื้อ นม ไข่ การแพร่หลายของการเลี้ยงสัตว์แบบที่ให้ผลผลิตสูงได้แพร่ไปในประเทศกำลังพัฒนา ทำให้สัตว์พื้นเมืองหลายชนิดได้สูญพันธุ์ลงหรือไม่ก็อยู่ในสภาวะเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (เอฟเอโอ, 2543) สำหรับประเทศไทยก็ได้รับเอาระบบการผลิตสัตว์เป็นการค้าเข้ามาเป็นเวลาช้านานแล้ว โดยมีการนำพันธุ์สัตว์จากต่างประเทศเข้ามาเลี้ยงเป็นจำนวนมากและให้ความเอาใจใส่ต่อพันธุ์ต่างประเทศเนื่องจากให้ผลผลิตและผลตอบแทนทางเศรษฐกิจที่ดีกว่า สัตว์พันธุ์พื้นเมืองจึงไม่ได้รับความสนใจและถูกละเลยจนเป็นสาเหตุให้สัตว์พันธุ์พื้นเมืองของไทยหลายพันธุ์ต้องสูญพันธุ์ไป และอีกหลายพันธุ์ก็กำลังอยู่ในภาวะใกล้จะสูญพันธุ์ ไก่พื้นเมืองนับได้ว่าเป็นสัตว์พันธุ์พื้นเมืองเพียงชนิดเดียวที่ยังคงมีการเลี้ยงกันอยู่ทั่วไป แต่การศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทยยังมีอยู่น้อยมาก และถ้าหากยังไม่มีการศึกษาถึงสภาพที่แท้จริงของความหลากหลายทางพันธุกรรมและส่งเสริมให้มีการอนุรักษ์ไก่พื้นเมืองกันอย่างจริงจังแล้ว เราอาจต้องสูญเสียแหล่งพันธุกรรมที่ดีไปโดยไม่สามารถนำกลับคืนมาได้อีก ทั้งนี้เพราะไก่พื้นเมืองมีคุณสมบัติที่ดี

หลายประการ เช่น มีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมได้เป็นอย่างดี ต้านทานต่อโรค และเนื้อมีคุณภาพดี เป็นต้น

ในปัจจุบันการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถทำได้ละเอียดถึงในระดับดีเอ็นเอ การตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์เป็นวิธีการหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและถูกใช้อย่างแพร่หลายในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาแถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 20 โลไซของไก่พื้นเมืองไทยจำนวน 5 สายพันธุ์
2. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรของไก่พื้นเมืองไทยจำนวน 5 สายพันธุ์
3. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรของไก่พื้นเมืองไทยจำนวน 5 สายพันธุ์
4. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไก่พื้นเมืองไทยจำนวน 5 สายพันธุ์

การตรวจเอกสาร

การจัดจำแนก (classification) ไก่

จากการศึกษาโดยใช้การเปรียบเทียบทางสัณฐานวิทยาและพฤติกรรม ตลอดจนการศึกษาทางชีวเคมีและพันธุศาสตร์ เชื่อว่าไก่ป่าสีแดง (Red Jungle Fowl) เป็นบรรพบุรุษหลักของไก่พันธุ์ต่างๆ ในปัจจุบัน (domestic chicken) และจากหลักฐานทางโบราณคดีเชื่อว่ามนุษย์ได้นำไก่มาเป็นสัตว์เลี้ยงครั้งแรกในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เมื่อประมาณ 6,000 ปีก่อน (Okada, 1994) สำหรับการจัดจำแนกไก่ที่มีการเลี้ยงกันอยู่ทั่วไปในปัจจุบันมีดังนี้ (Rose, 1997)

Kingdom	Animalia
Subkingdom	Metazoa
Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrata
Class	Aves
Order	Galliformes
Family	Phasianidae
Genus	*Gallus*
Species	*Gallus domesticus*

ลักษณะของไก่พื้นเมืองไทย

ไก่พื้นเมืองไทยเป็นสัตว์ที่อยู่คู่กับสังคมไทยมาเป็นเวลาช้านานและมีการเลี้ยงกันอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศ คนไทยเลี้ยงไก่พื้นเมืองไว้เพื่อวัตถุประสงค์หลายอย่าง เช่น เพื่อใช้เป็นอาหาร เพื่อความสวยงาม เพลิดเพลิน และเป็นเกมกีฬา สายพันธุ์ของไก่พื้นเมืองไทยที่เลี้ยงกันอยู่ในปัจจุบัน ได้แก่ ไก่ชน ไก่แจ้ ไก่เบตง และไก่กลายพันธุ์

1. ไก่ชน

ไก่ชนโดยทั่วไปจะมีลักษณะแตกต่างจากไก่ชนิดอื่นๆ คือ ไก่ชนจะมีลักษณะทะมัดทะแมง แข็งแรง และมีความทรหดอดทน ชอบการต่อสู้ การเรียกสีไก่ชนจะเรียกตามสีของขนสร้อยและหางไก่เป็นหลัก ยกเว้นไก่สีเทาและไก่สีแดงมักจะเรียกตามสีตัวและสีของขนสร้อยรวมกัน (วีระเดช, 2543) กองบำรุงพันธุ์สัตว์ (2546) ได้รวบรวมลักษณะและมาตรฐานของไก่พื้นเมืองไทยบางสายพันธุ์ขึ้นมาจำนวน 12 สายพันธุ์ ซึ่งมีรายละเอียดโดยสังเขป ดังนี้

1) ไก่เหลืองหางขาว มีลักษณะเด่นประจำพันธุ์ คือ ไก่เหลืองหางขาวเพศผู้มีรูปร่างสง่างาม ปาก แข้ง เกล็ด เล็บ เดือย มีสีขาวอมเหลือง ขนพื้นตัวสีดำสนิท ขนสร้อยคอ สร้อยปีก สร้อยหลัง และระย้า มีสีเหลืองสดใสสีเดียวกัน หางพัดยาวดำ หางกระรวยดกยาวมีสีขาว ปีกท่อนในมีสีดำ ปีกไชนอกแซมขาว ที่สำคัญมีหย่อมกระ 5 แห่งที่หัว หัวปีก และข้อขา ไก่เหลืองหางขาวเพศเมียมีขนพื้นตัวเป็นสีดำตลอดหรือบางตัวอาจมีจุดกระขาว 5 แห่งเหมือนเพศผู้

2) ไก่พระนเรศวร เป็นไก่ชนสายพันธุ์เหลืองหางขาว มีลักษณะเด่นประจำพันธุ์ คือ ไก่พระนเรศวรเพศผู้มีปาก แข้ง เล็บ เดือย สีขาวอมเหลือง ขนพื้นมีสีดำตลอดตัว มีหย่อมกระ 5 แห่งที่หัว หัวปีก และข้อขา ขนสร้อยคอ สร้อยปีก สร้อยหลัง มีสีเหลืองทอง เรียกว่าเหลืองประภัสสร สร้อยสังวาลย์ซึ่งเป็นสร้อยบริเวณด้านข้างลำตัวมีสีเดียวกับสร้อยคอและสร้อยหลัง หางพัดมีสีขาวเป็นจำนวนมาก หางกระรวยมีสีขาว ปีกในมีสีดำ ปีกไชมีสีขาวไม่น้อยกว่า 2 เส้น ไก่พระนเรศวรเพศเมียมีขนพื้นสีดำตลอดตัวมีขนสีขาวแซม

3) ไก่ประดู่หางดำ มีลักษณะเด่นประจำพันธุ์ คือ ไก่ประดู่หางดำเพศผู้มีรูปร่างสง่างาม ปาก แข้ง เล็บ เดือย มีสีน้ำตาลแก่ หรือมะขามไหม้ หรือมะขามคั่ว ขนพื้นตัวสีดำ ขนสร้อยคอ สร้อยปีก สร้อยหลัง และระย้า มีสีประดู่ หางพัดและหางกระรวยสีดำสนิท ไก่ประดู่หางดำเพศเมียมีขนพื้นตัวและขนปีกสีดำ ขนคอจะมีสีประดู่แซมปลายเล็กน้อย หางยาวสีดำสนิท

4) ไก่ประดู่เลาหางขาว มีลักษณะเด่นประจำพันธุ์ คือ ไก่ประดู่เลาหางขาวเพศผู้มีปาก แข้ง เกล็ด สีน้ำตาลอมเหลือง ขนพื้นตัวสีดำ ขนสร้อยคอ สร้อยปีก สร้อยหลัง มีสีประดู่เลา คือ โคนสร้อยสีขาว ปลายสร้อยสีประดู่ ขนปีกและขนหางพัดมีสีขาวปนดำ ขนกระรวยคู่กลางสีขาว คู่อื่นๆ สีขาวปลายดำ ไก่ประดู่เลาหางขาวเพศเมียมีขนพื้นตัว ขนปีก และหางสีดำ

5) ไก่เขียวเลาหางขาว มีลักษณะเด่นประจำพันธุ์ คือ ไก่เขียวเลาหางขาวเพศผู้มีปาก แข้ง เกล็ด เล็บ สีขาวอมเหลืองหรือขาวงาช้าง ขนพื้นตัวสีดำ ขนสร้อยคอ สร้อยปีก สร้อยหลัง มีสีเขียวเลา คือ ท่อนล่างสีขาว ท่อนปลายสีเขียว บางชนิดปลายสร้อยขลิบทอง หรือมีขนขาวขึ้นแซม หรือปลายสร้อยมีจุด ขนปีกและขนหางพัดมีสีดำ ขนกระรวยคู่กลางสีขาว คู่อื่นๆ สีขาวปลายดำ ไก่เขียวเลาหางขาวเพศเมียมีขนลำตัวสีดำ ปลายขนปีกมีสีขาว

6) ไก่เขียวหางดำ มีลักษณะเด่นประจำพันธุ์ คือ ไก่เขียวหางดำเพศผู้มีรูปร่างเพรียวยาว สูงระหง ปาก แข้ง เกล็ด เล็บ เดือย มีสีเขียวอมดำ ขนพื้นตัวสีดำ ขนสร้อยคอ สร้อยปีก สร้อยหลัง และระย้า มีสีเขียวอมดำ ขนปีก ขนหางพัด และหางกระรวย มีสีดำสนิท ไก่เขียวหางดำเพศเมียมีขนพื้นตัว ขนหาง เป็นสีดำ ขนคอ ขนหลัง มีปลายขนเป็นสีเขียวอมดำเล็กน้อยตามสีเพศผู้

7) ไก่เทาหางขาว มีลักษณะเด่นประจำพันธุ์ คือ ไก่เทาหางขาวเพศผู้มีรูปร่างลักษณะ 2 อย่าง อย่างหนึ่งรูปร่างเพรียวบางยาวระหง อีกลักษณะหนึ่งล่ำเตี้ย ปาก แข้ง เกล็ด เล็บ เดือย มีสีขาวอมเหลือง ขนพื้นฐานลำตัวสีเทาตามสายพันธุ์ ขนสร้อยคอ สร้อยปีก สร้อยหลัง และระย้า มีสีเดียวกันตามพันธุ์ เช่น ดำ ประดู่ ขี้เถ้า ทองแดง และเหลืองทอง ขนปีกและขนหางพัด มีสีเทา หางกระรวยมีสีขาวปนเทา ไก่เทาหางขาวเพศเมียมีสีขนพื้นลำตัว ขนหลัง ขนปีก ขนหาง และขนคอเป็นสีเทาเหมือนกันทั้งตัว โดยสีจะอ่อนแก่ต่างกันตามสายพันธุ์เหมือนขนพื้นลำตัวของเพศผู้ ส่วนที่แตกต่างกันเห็นได้ชัด คือ ขนคอจะมีขลิบสีไปตามพันธุ์เหมือนขนสร้อยคอเพศผู้

8) ไก่ทองแดงหางดำ มีลักษณะเด่นประจำพันธุ์ คือ ไก่ทองแดงหางดำเพศผู้มีรูปร่างทะมัดทะแมง ปาก แข้ง เกล็ด เล็บ เดือย มีสีเหลืองอมแดง ขนพื้นตัวสีแดง ขนสร้อยคอ สร้อยปีก สร้อยหลัง จะมีสีแดงเป็นมัน ขนไชปีก ขนหางพัด และหางกระรวย มีสีดำ ไก่ทองแดงหางดำเพศเมียมีขนพื้นตัวด้านล่างสีแดง ขนคอ ขนหลัง ขนปีก มีสีแดงแก่กว่าขนพื้นเล็กน้อย ขนคอจะมีสีแดงขลิบแลบออกมาเล็กน้อยตามเฉดสีแต่ละชนิด ขนไชปีกและขนหางพัดมีสีดำ

9) ไก่นกแดง มีลักษณะเด่นประจำพันธุ์ คือ ไก่นกแดงเพศผู้มีลำตัวกลม ไหล่หนาและใหญ่ ปาก แข้ง เกล็ด เล็บ เดือย มีสีเหลืองอมแดง ขนพื้นลำตัวสีแดง ขนสร้อยคอ สร้อยปีก สร้อยหลัง มีสีแดงสด ขนปีก ขนหางพัด และหางกระรวย มีสีแดง ไก่นกแดงเพศเมียมีขนบริเวณลำตัวเป็นสีแดงเหมือนเพศผู้แต่สีไม่แดงเข้มเท่า

10) ไก่นกกด มีลักษณะเด่นประจำพันธุ์ คือ ไก่นกกดเพศผู้มีรูปร่างสูงโปร่ง ปาก แข้ง เกล็ด เล็บ เดือย มีสีเหลืองอมแดง ขนพื้นลำตัวสีดำ ขนสร้อยคอ สร้อยปีก สร้อยหลัง และระย้า มีสีแดงอมน้ำตาล ขนปีกสีแดง ขนปลายปีกสีแดงอมน้ำตาลเข้ม หางพัดเรียงเป็นระเบียบมีสีดำ หางกระรวยดกยาวสีดำ ไก่นกกดเพศเมียมีขนพื้นตัวสีน้ำตาลแบบสีกาบอ้อย ขนคอ ขนหลัง ขนปีก เป็นสีน้ำตาล ขนปลายปีกจะมีสีน้ำตาลเข้มแบบสีแมลงสาบ ขนหางพัดมีสีดำ

11) ไก่ลายหางขาว มีลักษณะเด่นประจำพันธุ์ คือ ไก่ลายหางขาวเพศผู้มีปาก แข้ง เกล็ด เล็บ เดือย สีขาวอมเหลือง ขนพื้นตัวลายตลอด ขนสร้อยคอ สร้อยปีก สร้อยหลัง มีสีลายแตกต่างกันไปตามเฉดสี ขนปีกและขนหางพัดลายเหมือนขนพื้นตัว ขนกระรวยคู่กลางสีขาว คู่อื่นๆ สีขาวปลายลาย ไก่ลายหางขาวเพศเมียมีขนพื้นตัวสีดำสลับขาวคล้ายไก่พันธุ์บาร์พลีมัทร็อคหางยาวสีดำสลับขาว

12) ไก่ชี มีลักษณะเด่นประจำพันธุ์ คือ ไก่ชีเพศผู้เป็นไก่รูปร่างสูงใหญ่สง่างาม ปาก เกล็ด เดือย มีสีขาวอมเหลือง ขนลำตัว สร้อยคอ สร้อยปีก สร้อยหลัง ขนปีก หางพัด และหางกระรวย มีสีขาวตลอด ไก่ชีเพศเมียมีลักษณะเช่นเดียวกับไก่ชนเพศเมียทั่วไปแต่มีขนสีขาวตลอดลำตัว

2. ไก่แจ้

ไก่แจ้เป็นไก่พื้นเมืองไทยชนิดหนึ่ง เพศผู้มีน้ำหนักประมาณ 730 กรัม ถ้ามีน้ำหนักตัวสูงกว่ามาตรฐานเกิน 120 กรัมถือว่าไม่ได้มาตรฐาน หงอนมีขนาดใหญ่ หนา มีสีแดง ตั้งตรง หน้าหงอนยื่นจรดจงอยปาก ท้ายหงอนโค้งกดตามรูปหัว จักหงอนมี 4-5 จัก เหนียงมีขนาดใหญ่สมดุลกับหงอน คอสั้นมีขนสร้อยคอหนาแน่น สวยงาม ขนาดลำตัวเล็ก อกใหญ่กลมยื่นไปข้างหน้า หลังกว้างและสั้นมากจนแทบไม่มีช่องว่างระหว่างพุ่มสร้อยคอและโคนหาง สะโพกมีระย้าหนาแน่น ปีกหนาและยาวทอดขนานกับลำตัว ปลายปีกสัมผัสพื้นตรงส่วนปลายของลำตัว มีหางชัย 2 เส้นยาวคล้ายดาบชี้ขึ้นตรงสูงกว่าหัวประมาณ 1 ใน 3 ของความยาวทั้งหมด ขณะยืนหางจะแตะสัมผัสกับท้ายหงอน หางพัดมีลักษณะปลายมน หน้าแข้งสั้น สำหรับไก่แจ้เพศเมียโดยทั่วไปมีลักษณะเช่นเดียวกับไก่แจ้เพศผู้ จะมีข้อแตกต่างกันบ้างเล็กน้อย คือ มีน้ำหนักตัวประมาณ 610 กรัม ถ้าน้ำหนักตัวสูงกว่ามาตรฐานเกิน 120 กรัมถือว่าไม่ได้มาตรฐาน หงอนตั้งตรงหรือเอียงล้มไปข้างใดข้างหนึ่งก็ได้ หางยาว หางพัดใบใหญ่ปลายมน หัวโดยทั่วไปมีขนาดเล็กกว่าเพศผู้ ไก่แจ้ไทยมี 12 สี คือ สีไก่ป่าเหลือง สีไก่ป่าเข้ม สีไก่ป่าหูขาว สีโนรี สีประดู่ สีเหลืองหางขาว สีเบญจรงค์ สีสร้อยสุวรรณ สีเหลืองลูกปลา สีเหลืองดอกสโน สีกาบอ้อย และสีกาบหมาก (กองบำรุงพันธุ์สัตว์, 2544 ก)

3. ไก่เบตง

ไก่เบตงเป็นไก่ที่พบมากในอำเภอเบตง อำเภอธารโต จังหวัดยะลา และบางอำเภอในจังหวัดนราธิวาส ซึ่งเป็นไก่ที่มีเชื้อสายมาจากไก่พันธุ์แลนซาน ประเทศจีน ลักษณะประจำพันธุ์ คือ มีขนสีเหลืองทองถึงเหลืองอ่อนตลอดลำตัว ขนที่ขึ้นเป็นประเภทขนอ่อนและสั้นปกคลุมตลอดลำตัวทำให้มองดูเหมือนไก่ไม่มีหางไม่มีปีก ปากมีสีเหลือง จงอยปากงองุ้ม แข็งแรง ผิวหนังสีเหลืองหรือสีแดงเรื่อๆ แข้งและนิ้วสีเหลือง หงอนจักร น้ำหนักเมื่อโตเต็มที่เพศผู้หนัก 3 กิโลกรัม เพศเมียหนัก 2.7 กิโลกรัม (กองบำรุงพันธุ์สัตว์, 2545) ไก่เบตงมีชื่อเสียงมากในด้านรสชาติของเนื้อมีเนื้อนุ่มไม่แข็งเหมือนไก่พันธุ์พื้นเมืองของภาคอื่นๆ และไม่เหลวเหมือนไก่เนื้อ (ทวี และ อรพิน, 2538)

4. ไก่กลายพันธุ์

ไก่กลายพันธุ์เป็นไก่ที่เกิดจากการผสมระหว่างไก่บ้านหลายชนิดด้วยกัน ในบางตัวจะมีลักษณะแปลกไปจากไก่บ้าน เช่น ไม่มีขนที่คอหรือที่เรียกว่าไก่คอล่อน และไก่ขนกลับ เป็นต้น (อภิชัย, 2540)

1) ไก่คอเปลือยหรือไก่คอล่อน ลักษณะการไม่มีขนที่บริเวณคอของไก่เป็นผลจากยีน Naked Neck (Na) ซึ่งจัดเป็นยีนเด่นชนิดข่มไม่สมบูรณ์ (Horst, 1988 อ้างโดย อภิชัย, 2534) โดยจะขัดขวางการงอกของขนบริเวณคอของไก่ (Oklahoma State University, 1997) และทำให้ไก่มีขนลดลง 30-40 เปอร์เซ็นต์ (Bordas *et al.*, 1978)

2) ไก่ขนหยองหรือไก่ขนกลับ ลักษณะการหงิกงอของขนเป็นผลจากยีน Frizzle (F) ซึ่งจัดเป็นยีนเด่นชนิดข่มไม่สมบูรณ์ (Horst, 1988 อ้างโดย อภิชัย, 2534) ทำให้ขนของไก่งอกลับไปทางด้านหัวของไก่แทนที่จะตรงไปทางด้านหางตามธรรมชาติ (Moreng and Avens, 1985)

ลักษณะจีโนมของไก่

ไก่มีจำนวนโครโมโซมทั้งหมด 39 คู่ แบ่งออกเป็นโครโมโซมร่างกาย 38 คู่และโครโมโซมเพศ 1 คู่ โดยโครโมโซมเพศจะแทนด้วยสัญลักษณ์ Z และ W ไก่เพศผู้จะมีโครโมโซมเพศเป็น ZZ ส่วนไก่เพศเมียจะมีโครโมโซมเพศเป็น ZW (Moreng and Avens, 1985) ดังนั้นเพศผู้จึงเป็น homogametic sex ส่วนเพศเมียเป็น heterogametic sex ซึ่งตรงกันข้ามกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เพศผู้เป็น heterogametic sex (XY) และเพศเมียเป็น homogametic sex (XX) (Bitgood and Shoffer, 1990) โครโมโซมของไก่ยังสามารถแบ่งออกเป็นโครโมโซมที่มีขนาดใหญ่ (macrochromosome) จำนวน 8 คู่ โครโมโซมที่มีขนาดเล็ก (microchromosome) จำนวน 30 คู่ และโครโมโซมเพศจำนวน 1 คู่ (Smith and Burt, 1998) ภายในนิวเคลียสมีปริมาณดีเอ็นเอจำนวน 1.25 พิโครกรัม (pg) ต่อแฮพพลอยด์ (haploid, n) หรือ 2.5 พิโครกรัม (pg) ต่อดิพพลอยด์ (diploid, 2n) และมีขนาดจีโนมเท่ากับ 1.2×10^9 เบสแพร์ (bp) ต่อแฮพพลอยด์ (haploid, n) หรือ 2.4×10^9 เบสแพร์ (bp) ต่อดิพพลอยด์ (diploid, 2n) (Smith and Burt, 1998 ; Venkatesh *et al.*, 2000)

จีโนมของยูคาริโอทประกอบด้วยดีเอ็นเอซึ่งสามารถจัดเป็นกลุ่มตามจำนวนซ้ำที่พบได้ 3 กลุ่ม กลุ่มแรก คือ ส่วนของดีเอ็นเอที่พบเพียง 1 ครั้งต่อแฮพพลอยด์จีโนม เรียกว่า single copy sequences ได้แก่ ส่วนของยีนทั้งหมด กลุ่มที่ 2 คือ ส่วนของดีเอ็นเอที่พบจำนวนซ้ำปานกลาง เรียกว่า moderately repetitive sequences ได้แก่ ยีนที่มีลักษณะเป็นครอบครัว (multicopy gene families) เช่น ribosomal RNA (rRNA) genes ที่พบมากถึงหลายพันครั้งต่อแฮพพลอยด์จีโนม และกลุ่มที่ 3 คือ ส่วนของดีเอ็นเอที่พบจำนวนซ้ำมาก เรียกว่า highly repetitive sequences โดยทั่วไปเป็นดีเอ็นเอที่ไม่ถูกถอดและแปลข้อความเป็นกรดอะมิโนและโปรตีนชนิดต่างๆ

(noncoding DNA) repetitive DNA กลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่มีชุดซ้ำกระจายอยู่ทั่วไปในจีโนม (interspersed repeats) และชนิดที่มีชุดซ้ำเรียงต่อกันในลักษณะหัวต่อหาง (tandemly repetitive sequences)

interspersed repeats แบ่งออกเป็น 2 ชนิดย่อยตามขนาดของชุดซ้ำ คือ short interspersed repeats (SINEs) มีขนาดของชุดซ้ำน้อยกว่า 500 เบสแพร์ (bp) และ long interspersed repeats (LINEs) มีขนาดของชุดซ้ำมากกว่า 500 เบสแพร์ (bp) (Carter, 2000)

tandemly repetitive sequences แบ่งออกเป็น 3 ชนิดย่อยตามขนาดของชุดซ้ำและความยาว คือ แซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (satellite DNA) มีขนาดของชุดซ้ำอยู่ในช่วง 5-100 เบสแพร์ (bp) และมีความยาวมากถึง 100 เมกกะเบส (Mb) มินิแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (minisatellite DNA) มีขนาดของชุดซ้ำอยู่ในช่วง 15-70 เบสแพร์ (bp) และมีความยาวอยู่ระหว่าง 0.5-30 กิโลเบส (Kb) และไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (microsatellite DNA) มีขนาดของชุดซ้ำอยู่ในช่วง 2-6 เบสแพร์ (bp) และมีความผันแปรของความยาวสูง แต่จะมีความผันแปรของความยาวใกล้เคียงกับความยาวเฉลี่ย คือ 100 เบสแพร์ (bp) (Koreth *et al*., 1996) ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอมีชื่อเรียกอื่นๆ ได้แก่ simple sequence length polymorphisms (SSLPs), simple sequence repeats (SSRs) และ short tandem repeats (STRs) (McDonald and Potts, 1997)

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้การตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุลบางเทคนิคช่วยในการตรวจสอบ เทคนิคดังกล่าวได้แก่

1. เทคนิคอิเล็คโตรโฟเรซีส (electrophoresis)

อิเล็คโตรโฟเรซีสเป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ความผันแปรของโมเลกุลโปรตีนหรือดีเอ็นเอตามขนาด รูปร่าง หรือประจุของโมเลกุลที่ต้องการวิเคราะห์ หลักการของอิเล็คโตรโฟเรซีสใช้ประโยชน์จากการที่โมเลกุลของเอนไซม์หรือดีเอ็นเอมีขนาดประจุสุทธิ (net charge) รูปร่างและขนาดที่แตกต่างกัน ซึ่งเมื่อนำไปวางในสนามไฟฟ้าโดยมีเจลเป็นตัวกลาง โมเลกุลจะเคลื่อนที่ไปตามคุณสมบัติของโมเลกุล เช่น โมเลกุลขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ช้ากว่าโมเลกุลขนาดเล็ก โมเลกุลที่มีประจุบวกจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วลบของสนามไฟฟ้า เป็นต้น (จรัลธาดา, ม.ป.ป.) สำหรับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ดีเอ็นเอมีประจุเป็นลบทั้งหมดจึงแยกจากกันตามขนาดและรูปร่างเท่านั้น (อุทัยรัตน์, 2543) เจลที่ใช้ในการวิเคราะห์โปรตีน ได้แก่ สตาร์ชเจล (starch gel) โพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) และเซลลูโลสอะซิเตท (cellulose acetate) เป็นต้น

(Avisc, 1994) ส่วนเจลที่ใช้ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ ได้แก่ อะกาโรสเจล (agarose gel) โพลีอะคริลาไมด์เจล (polyacrylamide gel) และเจลที่เป็นส่วนผสมระหว่างอะกาโรสเจลและโพลีอะคริลาไมด์เจล (Sealey and Southern, 1990)

2. เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction, PCR)

polymerase chain reaction (PCR) เป็นเทคนิคที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนอย่างจำเพาะในหลอดทดลอง (*in vitro*) ซึ่งต้องอาศัยองค์ประกอบของปฏิกิริยา คือ ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ (template DNA) นิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับปลายด้าน 3' ของดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ (primer) เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรซ (DNA polymerase) ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไทรฟอสเฟต (deoxynucleotidetriphosphate, dNTPs) และบัฟเฟอร์ที่มีแมกนีเซียมเป็นส่วนประกอบ (Taylor, 1991)

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นซ้ำๆ กันหลายๆ รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ (Sambrook and Russell, 2001)

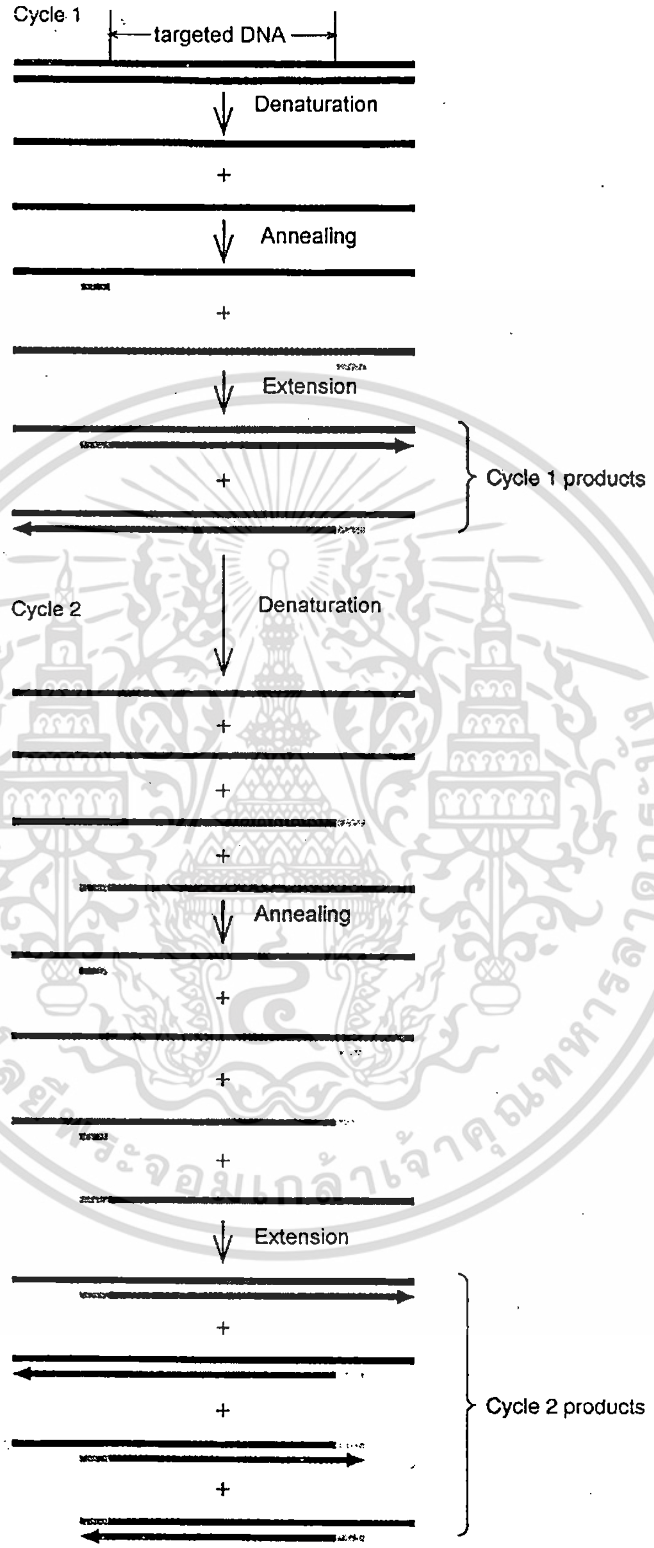
1) denaturation เป็นขั้นตอนการแยกสายคู่ของดีเอ็นเอแม่พิมพ์ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน อุณหภูมิในขั้นตอนนี้จะอยู่ที่ 94-95 องศาเซลเซียส

2) annealing เป็นขั้นตอนการให้ไพรเมอร์เข้าไปจับกับส่วนของดีเอ็นเอเป้าหมายในดีเอ็นเอแม่พิมพ์ที่เป็นสายเดี่ยว อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนนี้มีความสำคัญ ถ้าอุณหภูมิที่ใช้สูงเกินไปไพรเมอร์จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ได้ไม่ดี ทำให้ได้ผลผลิตน้อยมาก ถ้าอุณหภูมิที่ใช้ต่ำเกินไปไพรเมอร์อาจจะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์อย่างไม่จำเพาะ ทำให้มีการเพิ่มจำนวนส่วนของดีเอ็นเอที่เราไม่ต้องการ อุณหภูมิที่ใช้โดยทั่วไปควรจะต่ำกว่าอุณหภูมิแยกตัว (melting temperature, Tm) ของไพรเมอร์ 3-5 องศาเซลเซียส

melting temperature (Tm) ของแต่ละไพรเมอร์สามารถคำนวณได้จากสูตร Tm = 4 × (จำนวนของ G และ C) + 2 × (จำนวนของ A และ T) (Brown, 2001)

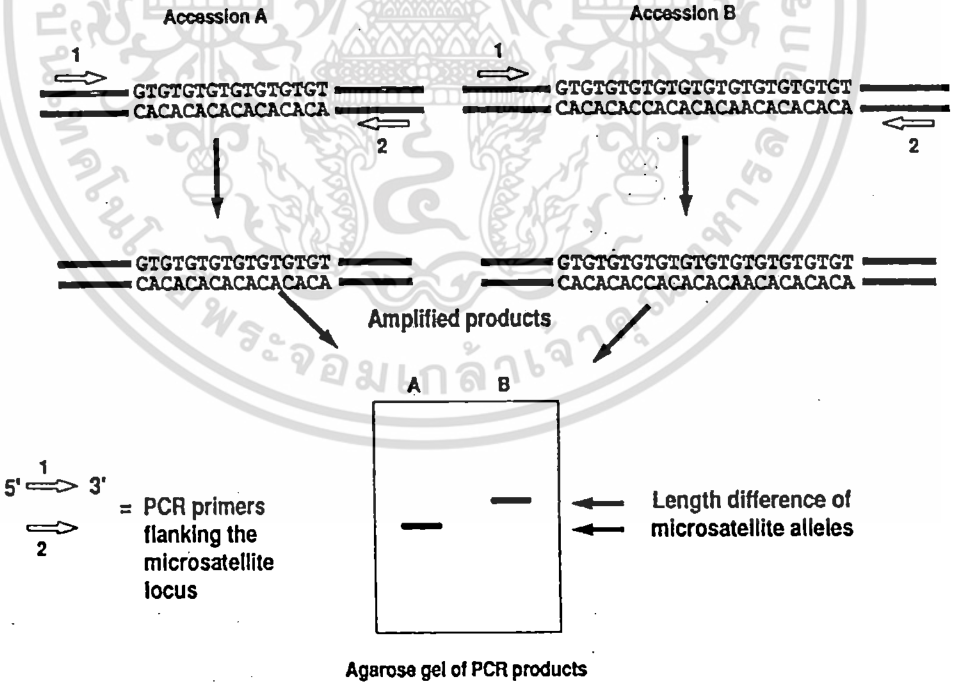
3) extension เป็นขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ โดยการทำงานของเอนไซม์ thermostable DNA polymerase ในกรณีที่ใช้ *Taq* DNA polymerase อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับขั้นตอนนี้จะอยู่ที่ 72-78 องศาเซลเซียส

ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ถ้าทำพีซีอาร์จำนวน n รอบจะได้ดีเอ็นเอเป้าหมาย 2^n เท่าของดีเอ็นเอเริ่มต้น (Arnheim *et al.*, 1990) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์แสดงในภาพที่ 1


Cycle 1
targeted DNA
Denaturation
+
Annealing
+
Extension
+
Cycle 1 products
Cycle 2
Denaturation
+
+
+
Annealing
+
+
+
Extension
+
+
+
Cycle 2 products

ภาพที่ 1 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (ดัดแปลงจาก Weaver, 1999)

การตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอสามารถทำได้โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยไพรเมอร์ที่ใช้ควรจะอยู่ห่างจากบริเวณชุดซ้ำของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอน้อยที่สุด และควรจะมีขนาดและ GC content พอเพียง เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าไปจับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ในตำแหน่งเดียวเท่านั้น (Scribner and Pearce, 2000) จากนั้นนำผลผลิตจากการทำพีซีอาร์มาแยกขนาดด้วยเทคนิคอิเล็คโตรโฟเรซีส ซึ่งเจลที่นิยมใช้โดยทั่วไป คือ โพลีอะคริลาไมด์เจล การตรวจสอบผลจะสามารถทำได้ 2 วิธี คือ วิธีที่ใช้สารกัมมันตภาพรังสีและวิธีที่ปลอดสารกัมมันตภาพรังสี ซึ่งวิธีที่ปลอดสารกัมมันตภาพรังสีอาจทำโดยการย้อมแผ่นเจลด้วยเอธิเดียมโบรไมด์หรือวิธี Silver-staining และการติดฉลากผลผลิตจากการทำพีซีอาร์ด้วยสารฟลูออเรสเซนท์ (Koreth *et al.*, 1996) การตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์แสดงในภาพที่ 2 ความแตกต่างกันในขนาดของแถบดีเอ็นเอหรือโพลีมอร์ฟีซึมระหว่างแต่ละตัวอย่างจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเกิดจากจำนวนชุดซ้ำที่ต่างกัน ซึ่งเป็นผลมาจากการเกิดการมิวเตชันในอัตราที่สูงและโดยการเกิดรีคอมบิเนชันระหว่างการแบ่งตัวในระยะไมโอซีส ทำให้มีการเพิ่มหรือลดจำนวนซ้ำของเบส (Jarman and Wells, 1989 อ้างโดย นภาพันธ์, 2543)


Accession A
Accession B
1
GTGTGTGTGTGTGTGT
CACACACACACACACA
2
1
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
CACACACCACACACAACACACACA
2
GTGTGTGTGTGTGTGT
CACACACACACACACA
GTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
CACACACCACACACAACACACACA
Amplified products
A
B
5'
1
3'
2
= PCR primers flanking the microsatellite locus
Length difference of microsatellite alleles
Agarose gel of PCR products

ภาพที่ 2 การตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Kochert, 1994)

Crooijmans *et al.* (1996) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่เนื้อที่ผ่านการคัดเลือกมาอย่างสูงจำนวน 9 สายพันธุ์ (Cornish และ Rock) และไก่ไข่ที่ผ่านการคัดเลือกมาอย่างสูงจำนวน 6 สายพันธุ์ (White Leghorn) โดยใช้วิธีการนำตัวอย่างเลือดจากไก่แต่ละตัวภายในสายพันธุ์มารวมกันก่อนทำการสกัดดีเอ็นเอ ในการศึกษานี้ตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 17 โลไซ พบว่าค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยในไก่เนื้อและไก่ไข่ คือ 53 และ 27 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งค่าดังกล่าวมีค่าใกล้เคียงกับผลจากการศึกษาของ Groen *et al.* (1994) อ้างโดย ศิริลักษณ์ (2537) ที่ตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 8 โลไซ เพื่อหาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของไก่เนื้อจำนวน 9 สายพันธุ์และไก่ไข่จำนวน 6 สายพันธุ์ พบว่าค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีในไก่เนื้อและไก่ไข่ คือ 55 และ 28 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

Vanhala *et al.* (1998) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่จำนวน 8 สายพันธุ์ โดยจำแนกเป็นไก่ลูกผสมสายพันธุ์ White Leghorn 3 สายพันธุ์ สายพันธุ์ Finnish Landrace 3 สายพันธุ์ สายพันธุ์ Rhode Island Red และไก่ลูกผสมทางการค้าสายพันธุ์ไก่เนื้อ (Ross) ในการศึกษานี้ตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 9 โลไซ ผลจากการศึกษาพบว่าค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยในแต่ละพันธุ์มีค่าต่ำสุดในไก่ White Leghorn สายพันธุ์หนึ่ง คือ 0.29 และมีค่าสูงสุดในไก่เนื้อ คือ 0.67 สำหรับการประเมินค่าระยะห่างทางพันธุกรรม พบว่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างไก่ลูกผสมสายพันธุ์ White Leghorn จะมีค่าต่ำในขณะที่ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างไก่สายพันธุ์ Finnish Landrace จะมีค่าสูงกว่า สำหรับไก่เนื้อจะมีความใกล้ชิดกับไก่สายพันธุ์ Rhode Island Red มากที่สุด คือ มีระยะห่างทางพันธุกรรม 0.306

Fulton and McCarron (1999) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่ไข่สายพันธุ์แท้จำนวน 11 สายพันธุ์ โดยจำแนกเป็นสายพันธุ์ White Leghorn 6 สายพันธุ์ สายพันธุ์ Rhode Island Red 2 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ White Plymouth Rock 3 สายพันธุ์ ในการศึกษานี้ตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 120 โลไซ แต่ผลที่นำไปคำนวณค่าต่างๆ ได้จาก 104 โลไซ ผลจากการศึกษาพบว่าค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีเฉลี่ยในแต่ละพันธุ์อยู่ในช่วง 0.081 ในสายพันธุ์ White Leghorn ถึง 0.515 ในสายพันธุ์ Rhode Island Red สำหรับการประเมินค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่ตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 68 โลไซ พบว่ามีการแบ่งกลุ่มของไก่ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ สายพันธุ์ไก่ไข่ที่มีเปลือกไข่สีขาว (White Leghorn) และสายพันธุ์ไก่ไข่ที่มีเปลือกไข่สีน้ำตาล (Rhode Island Red และ White Plymouth Rock)

Emara *et al.* (2002) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่เนื้อพันธุ์แท้ 3 สายพันธุ์ (ไม่ระบุชื่อพันธุ์) โดยตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 41 โลไซ พบว่าค่า

เฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยในแต่ละพันธุ์มีค่าอยู่ระหว่าง 0.30-0.37 ส่วนค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยในแต่ละพันธุ์มีค่าอยู่ระหว่าง 0.36-0.46 สำหรับการประเมินค่าระยะห่างทางพันธุกรรม พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 0.2161-0.4121

Ponsuksili *et al.* (1996) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่จำนวน 12 สายพันธุ์ โดยจำแนกเป็นสายพันธุ์เลือดชิด (inbred line) ได้แก่ White Leghorn inbred line สายพันธุ์ทางการค้า ได้แก่ broiler mail line, Rhode Island Red และ White Leghorn และสายพันธุ์จากต่างประเทศ ได้แก่ Bankiva, Fayoumi, Dandrawi, Kadaknath, Nunukan, Taiwan White, Taiwan Brown และ Silkies ในการศึกษานี้ตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่เป็นโพลีมอร์ฟิคจำนวน 8 โลไซ ผลจากการศึกษาพบว่าค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยในแต่ละพันธุ์มีค่าต่ำสุดใน White Leghorn inbred line คือ 15.4 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าสูงสุดใน Kadaknath คือ 62.9 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการประเมินค่าระยะห่างทางพันธุกรรม พบว่าระยะห่างทางพันธุกรรมมีค่าน้อยที่สุดระหว่าง Taiwan White และ Taiwan Brown และมีค่ามากที่สุดระหว่าง White Leghorn inbred line และ Silkies จากแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่าสายพันธุ์ไก่ทั้งหมดมีการจัดแบ่งเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วย broiler, Rhode Island Red, White Leghorn inbred line และ White Leghorn ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายพันธุ์อื่นๆ ที่เหลือทั้งหมด

Takahashi *et al.* (1998) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างไก่พื้นเมืองญี่ปุ่นจำนวน 10 พันธุ์ ได้แก่ Iwate-Jidori, Aizu-Jidori, Sadohige-Jidori, Siba-Tori, Onaga-Dori, Echigonankin, Hinai, Kinpa, Koeyoshi และ Tomaru และพันธุ์ที่นำเข้ามา คือ White Leghorn โดยตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 8 โลไซ ผลจากการศึกษาพบว่าไก่พื้นเมืองญี่ปุ่นมีการจัดแบ่งเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับพันธุ์ที่เป็นต้นกำเนิด

Marle-Köster and Nel (2000) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองแอฟริกาใต้ 5 สายพันธุ์ คือ Koekoek, New Hamshire, Naked Neck, Lebowa-Venda และ Ovamda และประชากรจาก Mozambique และ Botswana เมืองละ 1 ประชากร โดยตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 27 โลไซ พบว่าในจำนวนนี้มี 23 โลไซที่เป็นโพลีมอร์ฟิค ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยในแต่ละพันธุ์มีค่าต่ำสุดใน Koekoek คือ 31.4 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าสูงสุดในประชากรจาก Mozambique และ Botswana คือ 60.7 และ 61.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

Wimmers *et al.* (2000) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองในทวีปแอฟริกา เอเชีย และอเมริกาใต้ โดยตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาได้มาจากประเทศโบลิเวีย อินเดีย แคเมอรูน ไนจีเรีย แทนซาเนีย และเยอรมนี ในการศึกษานี้ตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ

จำนวน 22 โลไซ ผลจากการศึกษาพบว่าทุกประชากรที่มาจากประเทศต่างๆ มีระดับเฮตเทอโรไซโกซิตีสูง คือ 0.45-0.71 สำหรับระยะห่างทางพันธุกรรมมีค่าอยู่ระหว่าง 13.6-66.7 เมื่อพิจารณาระยะห่างทางพันธุกรรมของประชากรที่มาจากประเทศเดียวกัน พบว่าประชากรจากประเทศอินเดียมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมมากที่สุดและประชากรที่มาจากประเทศไนจีเรียมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด

Romanov and Weigend (2001) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรต่างๆ ของไก่บ้านและไก่ป่าสีแดง ในประเทศยูเครนและประเทศเยอรมนี รวมทั้งหมด 20 ประชากร โดยตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 14 โลไซ จากแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่าประชากรทั้งหมดมีการจัดแบ่งเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรก คือ ไก่ป่าสีแดง กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายพันธุ์ไก่ไข่ทางการค้า และสายพันธุ์ไก่ที่ผ่านการคัดเลือกมาอย่างเข้มข้น หรือมีบรรพบุรุษเป็นสายพันธุ์ทางการค้า กลุ่มที่ 3 ประกอบด้วยสายพันธุ์ไก่พื้นเมืองของประเทศเยอรมนี

Zhang *et al.* (2002) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองจีน 9 พันธุ์ ได้แก่ Huiyang Bearded, Xinghua, Qingyuan Partridge, Taihe Silkies, Black Silkies, Beijing Fatty, Gushiu, Wenchung และ Yangshan ไก่เนื้อ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ White Recessive Rock และ Avian Parental และไก่ไข่สายพันธุ์ Hy-Line โดยตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 9 โลไซ ผลจากการศึกษาพบว่าค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยในแต่ละพันธุ์มีค่าต่ำสุดใน White Recessive Rock คือ 0.6289 และมีค่าสูงสุดใน Wenchung คือ 0.8614 ในไก่พื้นเมืองจีนจะมีค่าต่ำสุดอยู่ที่ 0.7069 ใน Xinghua สำหรับการประเมินค่าระยะห่างทางพันธุกรรม พบว่าไก่ไข่มีระยะห่างจากประชากรอื่นๆ ทุกประชากรมาก จากแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่าไก่พื้นเมืองจีนและไก่เนื้อมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันแต่ไม่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไก่ไข่

สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทยยังมีผู้ศึกษาจำนวนน้อย ซึ่งมีรายงานดังต่อไปนี้

ปิยมาศ (2542) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่ประดู่หางดำ ไก่เหลืองหางขาว ไก่แจ้ และไก่เบตง โดยไก่ป่าตุ้มหูขาวจะรวมอยู่ในการศึกษาด้วย ในการศึกษานี้ตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 4 โลไซ ผลจากการศึกษาพบว่าค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยในแต่ละพันธุ์มีค่าต่ำที่สุดในไก่ป่าตุ้มหูขาว คือ 0.66 ส่วนในไก่พื้นเมืองไทยมีค่าอยู่ระหว่าง 0.72-0.76 ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยในแต่ละพันธุ์ในไก่ป่าตุ้มหูขาว คือ 0.72 และไก่พื้นเมืองไทยมีค่าอยู่ระหว่าง 0.70-0.76 สำหรับการประเมินค่าระยะห่างทางพันธุกรรม พบว่าระยะห่างทางพันธุกรรมมีค่า

น้อยที่สุดระหว่างไก่ประดู่หางดำและไก่เบตง คือ 0.0618 และมีค่ามากที่สุดระหว่างไก่แจ้และไก่ป่าตุ้มหูขาว คือ 0.1340 จากแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่าไก่พื้นเมืองไทยมีการจัดแบ่งเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วยไก่เหลืองหางขาวและไก่แจ้ กลุ่มที่ 2 คือ ไก่ประดู่หางดำ และกลุ่มที่ 3 คือ ไก่เบตง

เยาวลักษณ์ (2544) ประเมินค่าความเหมือนทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมือง ไก่ไข่ ไก่เนื้อ และไก่เบตง โดยตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 20 โลไซ พบว่าไก่พื้นเมือง ไก่ไข่ ไก่เนื้อ และไก่เบตง มีความเหมือนทางพันธุกรรมเฉลี่ยเท่ากับ 37 36 34 และ 51 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าประชากรไก่เบตงมีความเหมือนทางพันธุกรรมต่อกันมากที่สุด

Singhapol and Ketudat-Cairns (2003) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่เหลืองหางขาวและไก่ประดู่หางดำ โดยตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 18 โลไซ ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าไก่พื้นเมืองไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรสูง

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ ไก่พื้นเมืองไทยจำนวน 5 สายพันธุ์ๆ ละ 10 ตัว รวมจำนวนทั้งหมด 50 ตัว ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สายพันธุ์ไก่ จำนวนตัวอย่าง และสถานที่เก็บตัวอย่าง

สายพันธุ์	จำนวนตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง
1) ไก่เหลืองหางขาว	10	- สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์สุรินทร์ - เกษตรกรในจังหวัดนครปฐม
2) ไก่ประดู่หางดำ	10	- สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์สุรินทร์ - เกษตรกรในจังหวัดนครปฐม
3) ไก่แจ้	10	- ฟาร์มเลี้ยงสัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง - เกษตรกรในจังหวัดกรุงเทพมหานครและสกลนคร
4) ไก่เบตง	10	- สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ยะลา - เกษตรกรในจังหวัดยะลา
5) ไก่คอเปลือย	10	- ฟาร์มตัวอย่างในพระราชดำริ จังหวัดพัทลุง - เกษตรกรในจังหวัดสกลนคร

2. อุปกรณ์และสารเคมี

2.1 อุปกรณ์

1) กระบอกฉีดยา ขนาด 3 มิลลิลิตร และเข็มฉีดยาเบอร์ 25
2) หลอดใส่สาร ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Eppendrof tube)
3) หลอดพีซีอาร์ ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (PCR tube)

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

4) ไมโครปิเปต (Micropipette)
5) เครื่องชั่งอิเล็คโทรนิค (Digital balancing ; BP 221 S, BP 310 S)
6) เครื่องปรับค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter ; C 831)
7) เตาให้ความร้อน (Hot plate ; HS-101)
8) ตู้เย็น และตู้แช่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส
9) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้ความดันไอน้ำ (Autoclave ; HICLAVE)
10) ตู้ดูดควัน (Fume hood)
11) เครื่องผสมสาร (Vortex mixer)
12) เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge ; MIKRO 20)
13) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometry ; Ultrospec 1100 *pro*)
14) เครื่องพีซีอาร์ (PCR ; PTC-100)
15) เครื่องอิเล็คโตรโฟเรซีส (Electrophoresis)

2.2 สารเคมี

2.2.1 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการเก็บตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ ได้แก่

1) Disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA)
2) Guanidine thiocyanate
3) Sodium citrate
4) N-Lauroylsarcosine
5) Phenol
6) Chloroform
7) Isopropanol
8) Absolute ethanol
9) Tris-(hydroxy methyl) aminomethane

2.2.2 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ ได้แก่

1) PCR buffer
2) เอนไซม์ DNA polymerase
3) dNTP
4) forward primer และ reverse primer

58900

2.2.3 สารเคมีที่ใช้ในขั้นตอนการแยกและการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ ได้แก่

1) Bromophenol blue
2) Xylene cyanol
3) Formamide
4) Borric acid
5) Tris-(hydroxy methyl) aminomethane
6) Disodium ethylenediaminetetraacetate (EDTA)
7) Acrylamide
8) *N,N'*-methylenebisacrylamide
9) Urea
10) Ammonium persulfate (APS)
11) *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine (TEMED)
12) Absolute ethanol
13) Bind silane
14) น้ำยาเคลือบกระจก (Clear view)
15) Acetic acid
16) Silver nitrate
17) Formaldehyde
18) Sodium carbonate
19) Sodium thiosulfate

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างเลือดไก่

ใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 25 เจาะเลือดบริเวณเส้นเลือดปีก (Wing vein) ปริมาตร 0.5-1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดใส่สารขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Eppendrof tube) ที่ใส่สาร 10% EDTA ปริมาตร 30 ไมโครลิตรไว้เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด แช่ตัวอย่างเลือดในน้ำแข็งขณะทำการเก็บตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างเลือดไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2. การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดไก่

ก่อนทำการสกัดดีเอ็นเอจะต้องนำตัวอย่างเลือดมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เลือดละลาย เมื่อเลือดละลายดีแล้วจึงนำไปสกัดดีเอ็นเอ ตามวิธีการที่ดัดแปลงจากนรินทร์ และคณะ (2543) โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1) นำ Lysis buffer (4 M Guanidine thiocyanate, 25 mM Sodium citrate pH 7.0, 0.5% N-Lauroylsarcosine) ปริมาตร 300 ไมโครลิตรใส่ลงใน Eppendrof tube แล้วใส่ตัวอย่างเลือดปริมาตร 20 ไมโครลิตรลงไป เขย่าให้เข้ากัน นานประมาณ 20-30 นาที

2) เติม Phenol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และ Chloroform ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นานประมาณ 20-30 นาที

3) นำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

4) ใช้ไมโครปิเปตดึงสารละลายใสส่วนบนปริมาตร 150 ไมโครลิตรถ่ายลงใน Eppendrof tube อันใหม่ เติม Chloroform ปริมาตร 300 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นานประมาณ 20-30 นาที

5) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

6) ใช้ไมโครปิเปตดึงสารละลายใสส่วนบนปริมาตร 100 ไมโครลิตรถ่ายลงใน Eppendrof tube อันใหม่ เติม Isopropanol ที่แช่เย็นจัด ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันเบาๆ จะเห็นสายดีเอ็นเอ

7) ย้าย Isopropanol ออกจาก Eppendrof tube แล้วเติม 75% Alcohol (EtOH) ลงไป กลับหลอดไปมา 5-6 ครั้ง เพื่อล้างดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

8) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอตกตะกอนที่ก้นหลอด

9) เท 75% Alcohol ทิ้ง แล้วผึ่งดีเอ็นเอให้แห้ง

10)เติม TE buffer (10 mM Tris-base, 0.5 mM EDTA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ เพื่อให้ดีเอ็นเอละลาย

จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปตรวจสอบคุณภาพและปริมาณโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตรด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometry) และเก็บรักษาสภาพของดีเอ็นเอไว้ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้งานต่อไป

3. การเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือดและผ่านขั้นตอนการตรวจสอบคุณภาพและปริมาณแล้ว มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ในการเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ในการศึกษานี้ทำการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 20 โลไซ โดยคัดเลือกโดยสุ่มจากรายงานของกองบำรุงพันธุ์สัตว์ (2544 ข) และ Cheng *et al.* (1995) ไพรเมอร์ที่ใช้แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ไพร์เมอร์ที่ใช้สำหรับตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ

Locus	Forward primer	Reverse primer	Ta[1/] (°C)	Size[2/]
ADL115	GGATGAGAAGAAGAAAGGCA	CAATGGTGGTTCAGGTAATC	45	111
ADL123	GCTGTGTCAAGATTAGAATCAC	AACAATGAAAAACACTACCTGA	46	137
ADL142	CAGCCAATAGGGATAAAAGC	CTGTAGATGCCAAGGAGTGC	52	233
ADL146	GACCTGCATTGTCAGTGACC	TGCTTCCTACCCATTCTCCT	51	164
ADL155	GGTCCGACTGAAAGCATTAT	TTAAGACTGAAGCCAACCAG	49	109
ADL160	TGGCAGAAATAAGGCAGTGC	ATTCATCGCTGGCATCTTGC	51	129
ADL166	TGCCAGCCCGTAATCATAGG	AAGCACCACGACCCAATCTA	53	136
ADL181	CCAGTGAAATTCATCCTTTT	CAATCTTTTGTGGGGTATGG	48	181
ADL183	TTGTGAAGTGGATAAGATGA	ACAGAAATGGAAAGCGAGAC	47	110
ADL185	CATGGCAGCTGACTCCAGAT	AGCGTTACCTGTTCGTTTGC	52	137
ADL187	AATTGTTTGTTTACGCTTCT	GCTGGTGGCACAGATGAGAG	48	104
ADL190	TCAGCTCTTCAGGCAAAAAG	AACTTGGACCACAATCTTAT	47	221
ADL195	AGATGGAAGACAGGACAAAT	TAGCACAGACAATGTTATGC	46	118
ADL209	GGTTAGCTCCCTCCTTCCAG	TCACTCCAGCTTGAGACAGG	53	168
ADL210	ACAGGAGGATAGTCACACAT	GCCAAAAAGATGAATGAGTA	46	131
ADL231	ACTATTAGCCTGGGGAGAGC	AAGGAAACAAAGAGAAATCC	50	138
ADL234	CCCTGGGGCTCCCTCAGCAC	CTGGACGCGTGAAAAAGTTC	55	165
ADL246	GCAGGCTGATAGAAAAATGC	CTGCAAGCTGCTCTGGTATT	53	153
ADL252	AGCTCAGCCTCGGATACCTG	GTGAAGGGGTCTCTCCTCTG	55	191
ADL255	GGGTATTGGTCTTCAAAATG	GTAAAGGCCTTCCTCTTCTT	47	114

[1/] อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการที่ไพรเมอร์จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์

[2/] ขนาดของผลผลิตจากการทำพีซีอาร์โดยใช้ดีเอ็นเอของไก่พันธุ์ White Leghorn

ที่มา : Cheng *et al.* (1995)

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ เริ่มจากการผสมส่วนประกอบของปฏิกิริยาลงในหลอดพีซีอาร์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร (PCR tube) ส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยาแสดงในตารางที่ 3 เนื่องจากตัวอย่างที่จะทำพีซีอาร์ในแต่ละครั้งมีจำนวนมาก จึงทำการผสมส่วนประกอบทุกอย่างยกเว้นดีเอ็นเอแม่พิมพ์ลงในหลอดเดียวกันในปริมาณที่เพียงพอกับจำนวนตัวอย่างก่อน (Master mixture) แล้วจึงแบ่งใส่ PCR tube แต่ละหลอด จากนั้นเติมดีเอ็นเอแม่พิมพ์แต่ละตัวอย่างลงไป นำส่วนผสมที่ได้ไปเข้าเครื่องพีซีอาร์ โดยกำหนดอุณหภูมิและเวลาภายในเครื่องสำหรับแต่ละขั้นตอน ดังนี้

1) initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

2) denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

3) primer annealing ที่อุณหภูมิ Ta องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

Ta คือ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการที่ไพรเมอร์จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอแม่พิมพ์ ซึ่งอุณหภูมิจะแตกต่างกันไปในแต่ละไพรเมอร์ ดังแสดงในตารางที่ 2

4) primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที

5) ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 2)-4) จำนวน 35 รอบ

6) final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

7) เก็บรักษาผลผลิต (amplified หรือ PCR product) ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (hold)

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบของปฏิกิริยาการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

สาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10×PCR buffer	1.5	1 X
2 mM dNTP	1.5	200 µM
5 µM forward primer	0.6	0.2 µM
5 µM reverse primer	0.6	0.2 µM
2 U/µl DyNAzyme II DNA polymerase	0.15	0.3 U
50 ng/µl template	1	50 ng
น้ำกลั่น	9.65	
รวม	15	

4. การแยกและการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ

นำ PCR product มาทำการแยกขนาดโดยใช้เทคนิคอิเล็คโตรโฟเรซีส เนื่องจาก PCR product เป็นไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอซึ่งเป็นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก กล่าวคือมีขนาดเล็กกว่า 500 เบสแพร์ และแต่ละอัลลิลของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเออาจมีขนาดแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย จึงควรที่จะใช้โพลีอะคริลาไมด์เจลเป็นตัวกลาง หลังจากการทำอิเล็คโตรโฟเรซีสจะทำการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยการนำแผ่นเจลไปย้อมด้วยวิธี Silver-staining เพื่อให้สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอ วิธีการเตรียมกระจกสำหรับเทเจล การเตรียม 4.5% Denaturing polyacrylamide gel การทำอิเล็คโตรโฟเรซีส และการย้อมแผ่นเจลด้วยวิธี Silver-staining ดัดแปลงจากวิธีการของ Promega Corporation (n.d.) และ Sambrook and Russell (2001) โดยมีขั้นตอนดังนี้

4.1 การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

1) ทำความสะอาดแผ่นกระจก โดยการเช็ดด้วย 95% Alcohol จำนวน 2 ครั้ง

2) เช็ดแผ่นกระจกด้วย Bind silane (0.5% Acetic acid ใน 95% Alcohol : Bind silane อัตรา 1 มิลลิลิตร : 3 ไมโครลิตร) เพื่อให้เจลเกาะติดกับกระจก แล้วเช็ดตามด้วย 95% Alcohol อีก 3 ครั้ง

3) ทำความสะอาด chamber และ spacer โดยการเช็ดด้วย 95% Alcohol จำนวน 2 ครั้ง

4) เช็ด chamber และ spacer ด้วยน้ำยาเคลือบกระจก (Clear view) เพื่อป้องกันไม่ให้เจลเกาะติดกับ chamber

5) นำแผ่นกระจกและ chamber มาประกอบเข้าชุด วางในแนวนอน โดยหันด้านที่ทา Bind silane และน้ำยาเคลือบกระจกเข้าหากัน วาง spacer ไว้ระหว่างแผ่นกระจกและ chamber ทั้ง 2 ข้างเพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับเทเจล

หมายเหตุ การเช็ดกระจกและ chamber ในขั้นตอนต่างๆ ควรใช้กระดาษ kimwipes® เนื่องจากเป็นกระดาษที่ไม่เป็นขุย

4.2 การเตรียม 4.5% Denaturing polyacrylamide gel

1) เตรียม 40% Acrylamide (Acrylamide : *N,N'*-methylenebisacrylamide อัตรา 19 : 1) เพื่อเก็บไว้ใช้สำหรับเตรียม 4.5% Acrylamide

2) เตรียม 4.5% Acrylamide (4.5% Acrylamide, 7 M Urea, 1×TBE buffer) เพื่อเก็บไว้ใช้สำหรับเตรียม 4.5% Denaturing polyacrylamide gel

3) เตรียม 4.5% Denaturing polyacrylamide gel โดยใช้ 4.5% Acrylamide ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เมื่อเตรียมกระจกสำหรับเทเจลเรียบร้อยแล้วจึงเติม 10% Ammonium persulfate (APS) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และ TEMED ปริมาตร 80 ไมโครลิตรลงไป เขย่าหรือคนให้เข้ากัน โดยระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ

4) นำส่วนผสมที่ได้ค่อยๆ เทลงในช่องว่างระหว่างกระจกและ chamber โดยระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ แล้วเสียบด้านเรียบของหวีแบบฟันฉลาม (shark tooth comb) เข้าไปเพื่อให้ผิวหน้าของเจลเรียบเสมอกัน

5) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อให้เจลแข็งตัวเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง

หมายเหตุ ข้อ 1) และ 2) สามารถเตรียมไว้ล่วงหน้า โดยเก็บไว้ในขวดที่ป้องกันแสง

4.3 การทำอิเล็คโตรโฟเรซีส

1) เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว นำมาประกอบเข้ากับชุดอิเล็คโตรโฟเรซีส

2) เท 1×TBE buffer (5×TBE buffer; 0.45 M Tris-base, 0.01 M EDTA) ลงใน upper buffer chamber และ lower buffer chamber

3) ดึงหวีออกและฉีดล้างผิวหน้าของเจลด้วย 1×TBE buffer

4) ต่อสายเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เปิดเครื่อง โดยตั้งกระแสไฟฟ้าที่ 100 วัตต์ และตั้งอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส (pre-run) เพื่อเป็นการเตรียมเจลให้เหมาะสมต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ คือให้มีอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่อใกล้จะถึงอุณหภูมิที่ตั้งไว้ให้นำ PCR product ปริมาตร 2 ไมโครลิตรที่ผสมด้วย Loading buffer (95% Formamide, 20 mM EDTA, 0.05% Bromophenol blue, 0.05% Xylene cyanol) ปริมาตร 1 ไมโครลิตรแล้ว ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แช่เย็นในน้ำแข็งทันที

5) หลังจาก pre-run เสร็จเรียบร้อยแล้ว เปิดฝาเครื่องออก ฉีดล้างผิวหน้าของเจลด้วย 1×TBE buffer อีกครั้ง

6) เสียบด้านปลายแหลมของหวีแบบฟันฉลามเข้าไป โดยให้ปลายแหลมแตะที่ผิวเรียบของเจลพอดี

7) load ตัวอย่างปริมาตร 2.5 ไมโครลิตรลงในแต่ละช่อง (well) โดย load Marker (ØX-174/Hinf1) ไว้ในช่องซ้ายสุดและขวาสุด เพื่อใช้เป็นตัวประมาณขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

8) ปิดฝาเครื่อง ตั้งกระแสไฟฟ้าที่ 60 วัตต์ สำหรับเวลาที่ใช้ขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอ

9) เมื่อได้ระยะทางที่ต้องการแล้ว ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า นำเจลออกจากเครื่อง และแยก chamber ออกจากกระจก แผ่นเจลจะติดอยู่กับกระจก

4.4 การย้อมแผ่นเจลด้วยวิธี Silver-staining

1) นำแผ่นเจลซึ่งติดอยู่กับกระจกลงแช่ในสารละลาย Fixative (10% Acetic acid) เป็นเวลา 30 นาที เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า เพื่อตรึงดีเอ็นเอบนเจล เมื่อครบเวลาเทสารละลาย Fixative ออกเก็บไว้

2) ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที

3) นำแผ่นเจลลงแช่ในสารละลาย Silver nitrate (0.1% Silver nitrate, 0.05% Formamide) เป็นเวลา 30 นาที เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า เมื่อครบเวลาเทสารละลาย Silver nitrate เก็บไว้ในขวดที่ป้องกันแสง ซึ่งสามารถเก็บไว้ใช้ซ้ำได้อีก 2-3 ครั้ง

4) ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็วเพื่อล้าง Silver nitrate ที่มากเกินพอออก ในขั้นตอนนี้ไม่ควรใช้เวลาเกิน 5 วินาที เพราะถ้าล้างนาน Silver nitrate จะหลุดออกหมดทำให้ต้องย้อมเจลใหม่

5) นำแผ่นเจลลงแช่ในสารละลาย Developer (3% Sodium carbonate, 0.05% Formaldehyde, 200 ไมโครลิตร/ลิตร Sodium thiosulfate โดยเตรียมจาก stock ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ที่เตรียมใหม่และแช่เย็นจัด เขย่าเบาๆ บนเครื่องเขย่า ประมาณ 5 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน

6) เทสารละลาย Fixative (10% Acetic acid) ที่เหลือจากข้อ 1) ลงไป เขย่าต่อไปจนกระทั่งหมดฟองอากาศ เพื่อเป็นการหยุดปฏิกิริยา

7) ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที แล้วผึ่งให้แห้ง

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

5.1 การจัดเตรียมข้อมูล

ทำการแปลงข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นให้เป็นข้อมูลจีโนไทป์ โดยตัวอย่างที่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏขึ้นเพียงแถบเดียวแสดงว่าเป็นโฮโมไซโกต และตัวอย่างที่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏขึ้น 2 แถบแสดงว่าเป็นเฮตเทอโรไซโกตที่โลคัสนั้นๆ ดังตัวอย่างที่แสดงไว้ในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ตัวอย่างการแปลงข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเป็นข้อมูลจีโนไทป์

แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นที่โลคัสที่ 1				ข้อมูลจีโนไทป์ที่โลคัสที่ 1				
ตัวอย่างที่ 1	**ตัวอย่างที่ 2**	**ตัวอย่างที่ 3**	**ตัวอย่างที่ 4**	**อัลลิล**	**ตัวอย่างที่ 1**	**ตัวอย่างที่ 2**	**ตัวอย่างที่ 3**	**ตัวอย่างที่ 4**
▬		▬	▬	A	AA	CC	AB	AC
		▬		B				
	▬		▬	C				

5.2 การคำนวณ

นำข้อมูลจีโนไทป์มาทำการคำนวณค่าต่างๆ ดังต่อไปนี้ โดยใช้โปรแกรม POPGENE version 1.32 (Yeh *et al.*, 1999)

5.2.1 การคำนวณความถี่ของอัลลิล (allele frequency)

คำนวณความถี่ของอัลลิลใดๆ ในแต่ละโลคัส สำหรับแต่ละประชากร ตามสูตร

$$x_i = \frac{2\,Ho + He}{2N}$$

เมื่อ x_i = ความถี่ของอัลลิลที่ i

Ho = จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบโฮโมไซโกต

He = จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบเฮตเทอโรไซโกต

N = จำนวนตัวอย่างทั้งหมด

จากข้อมูลความถี่ของอัลลิลจะนำไปใช้ในการคำนวณค่าที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรและความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

5.2.2 การคำนวณค่าที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร

1) จำนวนของอัลลิลเฉลี่ยต่อโลคัส (number of alleles per locus, N)

คำนวณจำนวนของอัลลิลเฉลี่ยต่อโลคัสในแต่ละประชากร ตามสูตร

$$N = \frac{\text{จำนวนของอัลลิลรวมทุกโลคัส}}{\text{จำนวนโลคัสทั้งหมดที่ศึกษา}}$$

2) เปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิคโลไซ (percentage of polymorphic loci, P)

คำนวณเปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิคโลไซในแต่ละประชากร ตามสูตร

$$P = \frac{\text{จำนวนโลคัสที่มีความถี่ของอัลลิลใดอัลลิลหนึ่ง} \leq 0.95}{\text{จำนวนโลคัสทั้งหมดที่ศึกษา}} \times 100$$

3) ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกต (observed heterozygosity, H_o)

คำนวณค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตในแต่ละโลคัส สำหรับแต่ละประชากร ตามสูตร

$$H_o = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบเฮตเทอโรไซโกต}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}}$$

และคำนวณค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยต่อโลคัส $(\overline{H}_o)$ สำหรับแต่ละประชากร ตามสูตร

$$\overline{H}_o = \frac{\sum H_o}{\text{จำนวนโลคัสทั้งหมดที่ศึกษา}}$$

4) ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎี (expected heterozygosity, H_e)

คำนวณค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีในแต่ละโลคัส สำหรับแต่ละประชากร ตามสูตร (Nei, 1978)

$$H_e = 2n\,(1 - \sum x_i^2)/(2n - 1)$$

เมื่อ x_i = ความถี่ของอัลลิลที่ i

n = จำนวนตัวอย่างทั้งหมด

และคำนวณค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยต่อโลคัส $(\overline{H}_c)$ สำหรับแต่ละประชากร ตามสูตร

$$\overline{H}_c = \frac{\sum H_c}{\text{จำนวนโลคัสทั้งหมดที่ศึกษา}}$$

5.2.3 การคำนวณค่าที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance, D) เป็นค่าที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร ในการศึกษานี้จะคำนวณค่า Nei's genetic distance ตามสูตร (Nei, 1972)

$$D = -\ln I$$

เมื่อ $I = J_{XY}/\sqrt{J_X J_Y}$

โดยที่ J_X = ค่าเฉลี่ยของ $\sum x_i^2$ ทุกโลคัส

J_Y = ค่าเฉลี่ยของ $\sum y_i^2$ ทุกโลคัส

J_{XY} = ค่าเฉลี่ยของ $\sum x_i y_i$ ทุกโลคัส

เมื่อ x_i = ความถี่ของอัลลิล i ในประชากร X

y_i = ความถี่ของอัลลิล i ในประชากร Y

5.3 การสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

นำข้อมูลระยะห่างทางพันธุกรรมมาสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) โดยใช้โปรแกรม NEIGHBOR ของ PHYLIP version 3.5c (Felsenstein, 1993)

6. สถานที่ทำการทดลอง

1) ฟาร์มเลี้ยงสัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

2) ห้องปฏิบัติการโครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3) ห้องปฏิบัติการควบคุมผลิตภัณฑ์เกษตร ภาควิชาครุศาสตร์เกษตร คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

4) ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

7. ระยะเวลาในการศึกษา

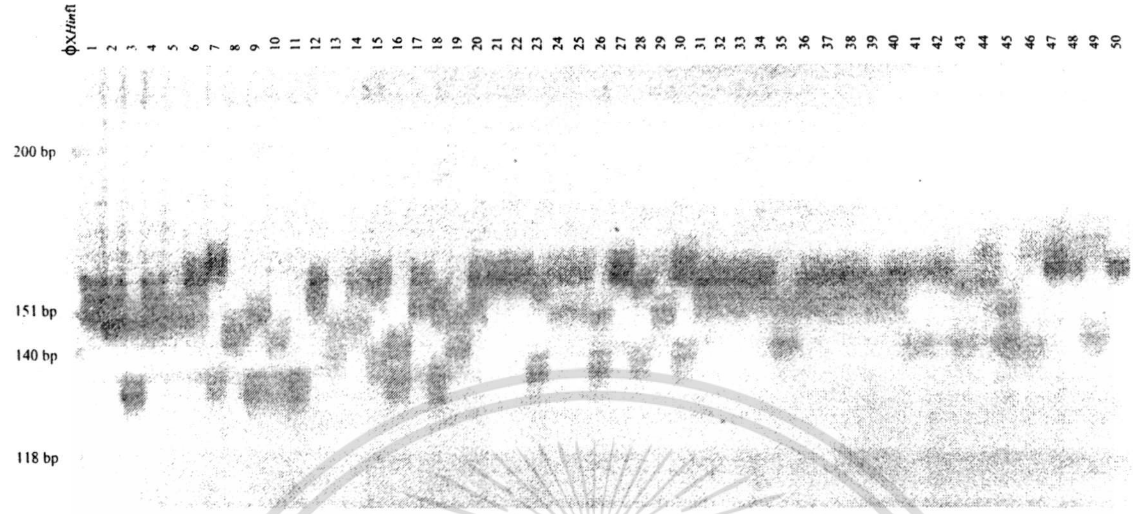
1) ใช้ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างและทำการวิจัยในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 8 เดือน

2) ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผลเป็นเวลา 4 เดือน

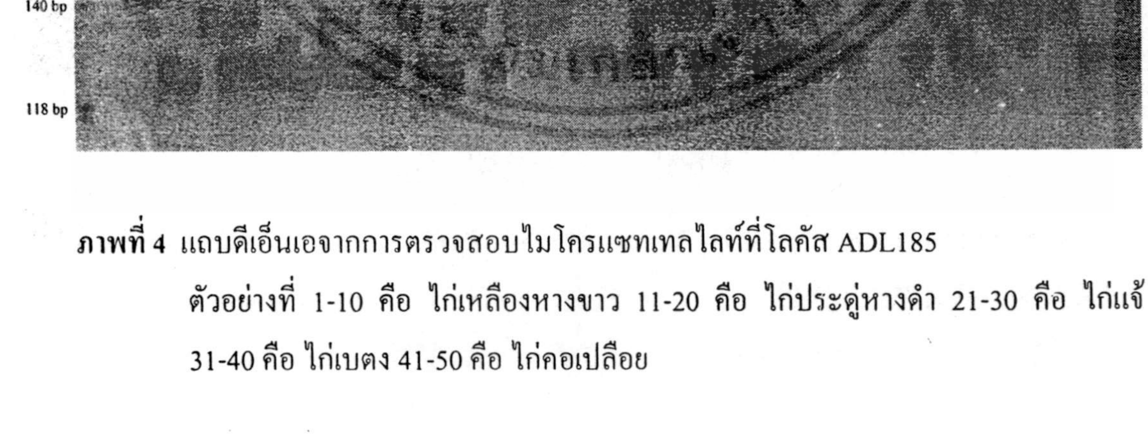
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์

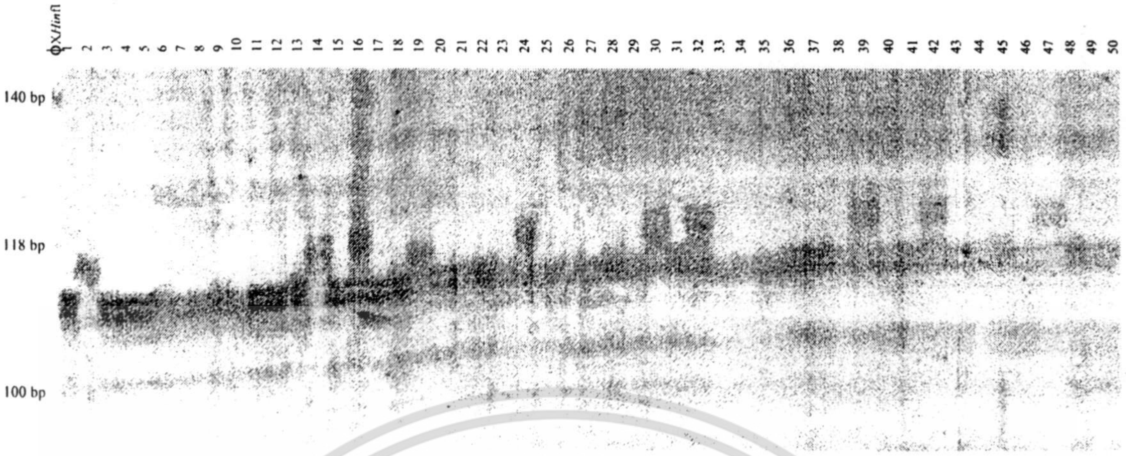
เมื่อนำตัวอย่างเลือดมาทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการที่ดัดแปลงจากนรินทร์ และคณะ (2543) พบว่าวิธีการดังกล่าวสามารถสกัดดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้ตัวอย่างเลือดเพียงเล็กน้อย ดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้นประมาณ 200-500 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร และจัดว่าเป็นดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี ซึ่งจะนำไปใช้ในการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอต่อไป โดยการศึกษานี้จะตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 20 โลไซ โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และแยกขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็คโตรโฟเรซีส หลังจากย้อมแผ่นเจลด้วยวิธี Silver-staining พบว่าสามารถตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอทั้ง 20 โลไซได้ โดยแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นส่วนมากไม่ได้มีลักษณะเป็น single band แต่มีลักษณะเป็น ladder band คือ เกิดแถบดีเอ็นเอหลายแถบติดกันดังตัวอย่างที่แสดงไว้ในภาพที่ 3 และ 4 แถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นนี้ เรียกว่า stutter band การเกิดแถบดีเอ็นเอในลักษณะเช่นนี้เป็นลักษณะที่พบทั่วไปจากการตรวจสอบดีเอ็นเอบริเวณที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ (ปิยะมาศ, 2542 ; จุฑารัตน์, 2544) โดยอาจมีผลมาจากการทำงานผิดพลาดของเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรซในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งการเกิด stutter band มักจะเกิดขึ้นในไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่เป็น dinucleotide มากกว่า trinucleotide หรือ tetranucleotide (University of Florida, 2004) และพบว่าจำนวนของอัลลิลในแต่ละโลคัสสำหรับทุกประชากรที่ศึกษามีความผันแปรอยู่ระหว่าง 3-14 อัลลิล ที่โลคัส ADL 115 และ ADL 160 มีจำนวนของอัลลิลน้อยที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 5 และ 6 และที่โลคัส ADL 231 มีจำนวนของอัลลิลมากที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 7 จำนวนของอัลลิลเฉลี่ยต่อโลคัสสำหรับทุกประชากร คือ 7 ซึ่งสอดคล้องกับ Weigend and Romanov (2001) ที่รายงานว่าการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจะทำให้เกิดอัลลิลจำนวนมาก เมื่อทำการแปลงข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นให้เป็นข้อมูลจีโนไทป์และนำไปคำนวณจะได้ข้อมูลความถี่ของอัลลิล ซึ่งจะใช้สำหรับคำนวณค่าที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรและความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร ค่าความถี่ของอัลลิลในแต่ละโลคัสของประชากรต่างๆ ที่ศึกษาแสดงไว้ในภาคผนวก ค


ϕX/HinfI
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50
200 bp
151 bp
140 bp
118 bp

ภาพที่ 3 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ที่โลคัส ADL166 ตัวอย่างที่ 1-10 คือ ไก่เหลืองหางขาว 11-20 คือ ไก่ประดู่หางดำ 21-30 คือ ไก่แจ้ 31-40 คือ ไก่เบตง 41-50 คือ ไก่คอเปลือย

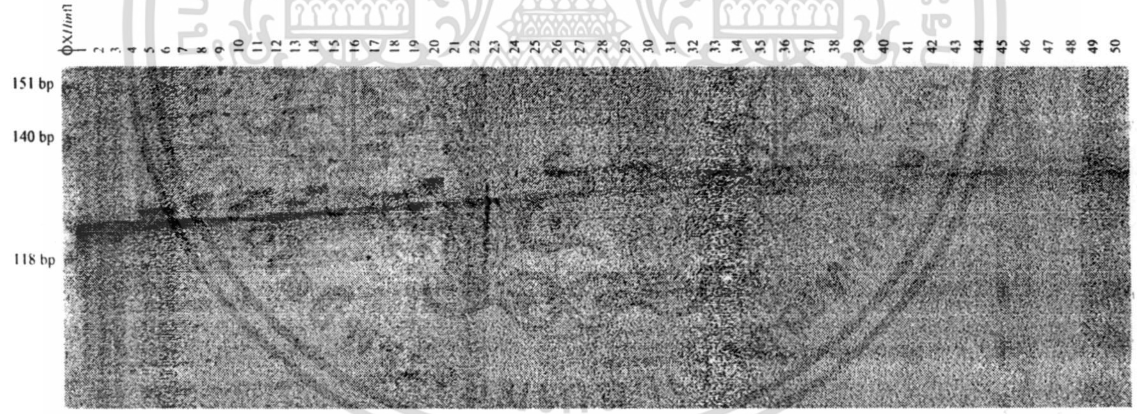

ϕX/HinfI
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50
200 bp
151 bp
140 bp
118 bp

ภาพที่ 4 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ที่โลคัส ADL185 ตัวอย่างที่ 1-10 คือ ไก่เหลืองหางขาว 11-20 คือ ไก่ประดู่หางดำ 21-30 คือ ไก่แจ้ 31-40 คือ ไก่เบตง 41-50 คือ ไก่คอเปลือย


φX/HinfI
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50
140 bp
118 bp
100 bp

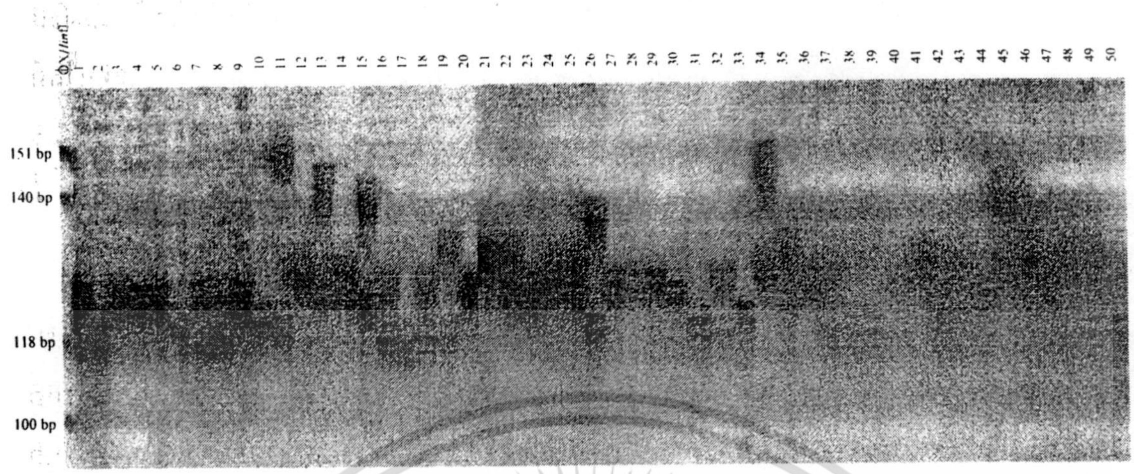
ภาพที่ 5 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ที่โลคัส ADL115

ตัวอย่างที่ 1-10 คือ ไก่เหลืองหางขาว 11-20 คือ ไก่ประดู่หางดำ 21-30 คือ ไก่แจ้ 31-40 คือ ไก่เบตง 41-50 คือ ไก่คอเปลือย


φX/HinfI
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50
151 bp
140 bp
118 bp

ภาพที่ 6 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ที่โลคัส ADL160

ตัวอย่างที่ 1-10 คือ ไก่เหลืองหางขาว 11-20 คือ ไก่ประดู่หางดำ 21-30 คือ ไก่แจ้ 31-40 คือ ไก่เบตง 41-50 คือ ไก่คอเปลือย



ภาพที่ 7 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ที่โลคัส ADL231
ตัวอย่างที่ 1-10 คือ ไก่เหลืองหางขาว 11-20 คือ ไก่ประดู่หางดำ 21-30 คือ ไก่แจ้ 31-40 คือ ไก่เบตง 41-50 คือ ไก่คอเปลือย

2. ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร

2.1 จำนวนของอัลลิลเฉลี่ยต่อโลคัส (number of alleles per locus)

จำนวนของอัลลิลเฉลี่ยต่อโลคัสของไก่พื้นเมืองไทยจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่เหลืองหางขาว ไก่ประดู่หางดำ ไก่แจ้ ไก่เบตง และไก่คอเปลือย แสดงในตารางที่ 5 โดยไก่แจ้และไก่เบตงมีจำนวนของอัลลิลเฉลี่ยต่อโลคัสต่ำที่สุด คือ 3.850 และไก่ประดู่หางดำมีจำนวนของอัลลิลเฉลี่ยต่อโลคัสสูงที่สุด คือ 4.550 จากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าไก่พื้นเมืองไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรใกล้เคียงกัน แต่ค่าที่ได้จากการศึกษานี้จะค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับผลจากการศึกษาของปิยะมาศ (2542) ที่รายงานว่า ไก่ประดู่หางดำ ไก่เหลืองหางขาว ไก่แจ้ และไก่เบตง มีจำนวนของอัลลิลเฉลี่ยต่อโลคัสเท่ากับ 8.75 8.50 6.25 และ 6.00 ตามลำดับ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากในการศึกษาของปิยะมาศ (2542) ได้คัดเลือกไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่มีจำนวนของอัลลิลต่อโลคัสสูงมาใช้ในการศึกษาจำนวน 4 โลไซ แต่ในการศึกษานี้ทำการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 20 โลไซที่คัดเลือกมาโดยสุ่มโดยไม่ได้คำนึงถึงจำนวนของอัลลิลต่อโลคัส ทำให้จำนวนของอัลลิลเฉลี่ยต่อโลคัสที่ได้จากการศึกษานี้มีค่าต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบจำนวนของอัลลิลเฉลี่ยต่อโลคัสของประชากรไก่พื้นเมืองไทยกับไก่พื้นเมืองจากประเทศอื่นๆ เช่น ไก่พื้นเมืองจีน พบว่าไก่พื้นเมืองจีนมีจำนวนของอัลลิลเฉลี่ยต่อโลคัสอยู่ระหว่าง 8.22-12.00 (Zhang *et al.*, 2002) ซึ่งค่าที่ได้จะสูงกว่า

ผลจากการศึกษานี้ ทั้งนี้มีหลายสาเหตุที่อาจทำให้ค่าดังกล่าวสูงกว่าในการศึกษานี้ เช่น ไก่พื้นเมืองจีนอาจมีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรมากกว่าไก่พื้นเมืองไทย ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษาของ Zhang *et al.* (2002) เป็นโลไซที่มีจำนวนของอัลลิลสูง และความแตกต่างระหว่างจำนวนตัวอย่าง จำนวนของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ และเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบ

2.2 เปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิคโลไซ (percentage of polymorphic loci)

เปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิคโลไซของไก่พื้นเมืองไทยจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่เหลืองหางขาว ไก่ประดู่หางดำ ไก่แจ้ ไก่เบตง และไก่คอเปลือย แสดงในตารางที่ 5 โดยไก่ทุกสายพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิคโลไซสูงสุด คือ 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าไก่พื้นเมืองไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรอยู่ในระดับเดียวกัน สำหรับสาเหตุสำคัญที่ทำให้เปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิคโลไซของไก่ทุกสายพันธุ์มีค่าสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์เป็นผลมาจากวิธีการที่ใช้ในการศึกษา ซึ่งการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจัดว่าเป็นวิธีที่แสดงความแตกต่างหรือโพลีมอร์ฟิซึมสูง (Weigend and Romanov, 2001)

2.3 ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ย (observed heterozygosity)

ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยของไก่พื้นเมืองไทยจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่เหลืองหางขาว ไก่ประดู่หางดำ ไก่แจ้ ไก่เบตง และไก่คอเปลือย แสดงในตารางที่ 5 โดยไก่แจ้มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยต่ำที่สุด คือ 0.400 และไก่เบตงมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 0.505 จากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าไก่พื้นเมืองไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรใกล้เคียงกัน และจัดว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรอยู่ในระดับปานกลาง แต่ค่าที่ได้จากการศึกษานี้มีค่าต่ำกว่าผลจากการศึกษาของปิยะมาศ (2542) ที่รายงานว่าไก่ประดู่หางดำ ไก่เหลืองหางขาว ไก่แจ้ และไก่เบตง มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยเท่ากับ 0.72 0.66 0.76 และ 0.72 ตามลำดับ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากในการศึกษาของปิยะมาศ (2542) ได้คัดเลือกไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่แสดงโพลีมอร์ฟิซึมสูงในไก่พื้นเมืองไทยมาใช้ในการศึกษาจำนวน 4 โลไซ แต่ในการศึกษานี้ทำการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจำนวน 20 โลไซที่คัดเลือกมาโดยสุ่ม โดยไม่ได้ทำการคัดเลือกโลไซที่แสดงโพลีมอร์ฟิซึมสูง ทำให้ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยที่ได้จากการศึกษานี้มีค่าต่ำกว่า

2.4 ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ย (expected heterozygosity)

ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยของไก่พื้นเมืองไทยจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่เหลืองหางขาว ไก่ประดู่หางดำ ไก่แจ้ ไก่เบตง และไก่คอเปลือย แสดงในตารางที่ 5 โดยไก่แจ้มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยต่ำที่สุด คือ 0.566 และไก่ประดู่หางดำมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 0.618 จากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าไก่พื้นเมืองไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรใกล้เคียงกัน และจัดว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรอยู่ในระดับปานกลาง แต่ค่าที่ได้จากการศึกษานี้มีค่าต่ำกว่าเล็กน้อยจากผลการศึกษาของปิยะมาศ (2542) ที่รายงานว่าไก่ประดู่หางดำ ไก่เหลืองหางขาว ไก่แจ้ และไก่เบตง มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยเท่ากับ 0.70 0.77 0.77 และ 0.76 ตามลำดับ ที่เป็นเช่นนี้คาดว่าเกิดจากเหตุผลเดียวกันกับการที่ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยในการศึกษานี้มีค่าต่ำกว่าค่าที่รายงานโดยปิยะมาศ (2542) เมื่อเปรียบเทียบค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยของประชากรไก่พื้นเมืองไทยกับไก่พื้นเมืองจากประเทศอื่นๆ เช่น ไก่พื้นเมืองจีน ไก่พื้นเมืองแอฟริกาใต้ และไก่พื้นเมืองจากทวีปแอฟริกา เอเชีย และอเมริกาใต้ พบว่าไก่พื้นเมืองจีนมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.707-0.849 (Zhang *et al.*, 2002) ไก่พื้นเมืองแอฟริกาใต้มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.314-0.612 (Marle-Köster and Nel, 2000) และไก่พื้นเมืองจากทวีปแอฟริกา เอเชีย และอเมริกาใต้มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.45-0.71 (Wimmers *et al.*, 2000) แสดงให้เห็นว่าไก่พื้นเมืองไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรใกล้เคียงกับไก่พื้นเมืองแอฟริกาใต้ และไก่พื้นเมืองจากทวีปแอฟริกา เอเชีย และอเมริกาใต้ แต่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรน้อยกว่าไก่พื้นเมืองจีน แต่ก็มีความเป็นไปได้ว่าค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีที่มีความแตกต่างกันนั้นอาจเกิดจากปัจจัยอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น ความแตกต่างระหว่างจำนวนตัวอย่าง จำนวนและโลคัสของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ และเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบ

ตารางที่ 5 จำนวนของอัลลิลเฉลี่ยต่อโลคัส เปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิคโลไซ ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ย และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยของไก่พื้นเมืองไทยจำนวน 5 สายพันธุ์ (ค่า standard deviation แสดงไว้ในวงเล็บ)

สายพันธุ์	จำนวนของอัลลิลเฉลี่ยต่อโลคัส	เปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิคโลไซ	ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีเฉลี่ย	
			จากการสังเกต	จากทฤษฎี
ไก่เหลืองหางขาว	4.350 (1.785)	100	0.488 (0.296)	0.583 (0.242)
ไก่ประดู่หางดำ	4.550 (1.960)	100	0.490 (0.229)	0.618 (0.220)
ไก่แจ้	3.850 (1.663)	100	0.400 (0.238)	0.566 (0.240)
ไก่เบตง	3.850 (1.461)	100	0.505 (0.214)	0.614 (0.185)
ไก่คอเปลือย	4.350 (1.694)	100	0.455 (0.248)	0.615 (0.204)

3. ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมจากการคำนวณโดยใช้ Nei's genetic distance (Nei, 1972) ระหว่างไก่พื้นเมืองไทยจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่เหลืองหางขาว ไก่ประดู่หางดำ ไก่แจ้ ไก่เบตง และไก่คอเปลือย แสดงในตารางที่ 6 เมื่อเปรียบเทียบทุกคู่ของประชากร พบว่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างไก่เหลืองหางขาวและไก่ประดู่หางดำมีค่าน้อยที่สุด คือ 0.1120 และระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างไก่แจ้และไก่เบตงมีค่ามากที่สุด คือ 0.3190 จากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าไก่พื้นเมืองไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรค่อนข้างต่ำ แต่ค่าที่ได้จากการศึกษานี้มีค่าสูงกว่าเล็กน้อยจากผลการศึกษาของปิยะมาศ (2542) ที่รายงานว่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างไก่ประดู่หางดำ ไก่เหลืองหางขาว ไก่แจ้ และ ไก่เบตง มีค่าอยู่ระหว่าง 0.0618-0.1108 ความไม่สอดคล้องกันของข้อมูลน่าจะเกิดจากในการศึกษานี้ทำการคำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรมโดยใช้ Nei's genetic distance (Nei, 1972) ในขณะที่การศึกษาของปิยะมาศ (2542) ทำการคำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรมโดยใช้ Cavilli-Sforza and Edwards' chord distance ซึ่งจากการศึกษาของ Martín-Burriel *et al.* (1999) ที่คำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรมโดยใช้ Nei's genetic distance และ Cavilli-Sforza and Edwards' chord distance ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองสเปน พบว่าระยะห่างทางพันธุกรรมจากการคำนวณโดยใช้ Nei's genetic distance จะมีค่าสูงกว่าจากการคำนวณโดยใช้ Cavilli-Sforza and Edwards' chord distance ในการศึกษานี้พบว่าไก่เหลืองหางขาวและไก่ประดู่หางดำ

มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด (ระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.1120) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการแบ่งประเภทของไก่ที่จัดไก่เหลืองหางขาวและไก่ประดู่หางดำอยู่ในประเภทไก่ชน สำหรับประชากรไก่พื้นเมืองไทยที่มีระยะห่างทางพันธุกรรมมากที่สุด คือ ระหว่างไก่แจ้และไก่เบตง (ระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.3190) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบระยะห่างทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทยกับระยะห่างทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองจากประเทศอื่นๆ เช่น ไก่พื้นเมืองจีน และไก่พื้นเมืองจากทวีปแอฟริกา เอเชีย และอเมริกาใต้ พบว่าไก่พื้นเมืองจีนมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.1842-0.7104 (Zhang *et al.*, 2002) และไก่พื้นเมืองจากทวีปแอฟริกา เอเชีย และอเมริกาใต้ มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.118-0.667 (Wimmers *et al.*, 2000) แสดงให้เห็นว่าไก่พื้นเมืองไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับไก่พื้นเมืองจีน และไก่พื้นเมืองจากทวีปแอฟริกา เอเชีย และอเมริกาใต้ แต่ก็มีความเป็นไปได้ว่าค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่แตกต่างกันอาจเกิดจากปัจจัยอื่นๆ ร่วมด้วย เช่น ความแตกต่างระหว่างจำนวนตัวอย่าง จำนวนและโลคัสของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ เทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบ และสูตรที่ใช้ในการคำนวณ

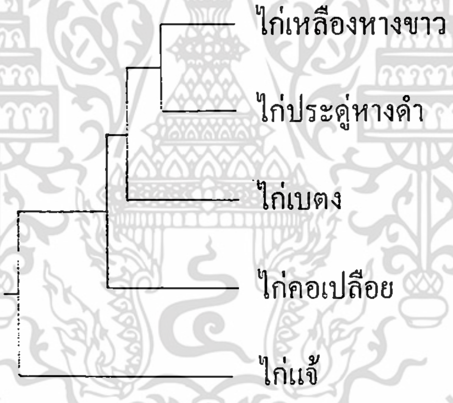
ตารางที่ 6 ระยะห่างทางพันธุกรรมจากการคำนวณโดยใช้ Nei's genetic distance ระหว่างไก่พื้นเมืองไทยจำนวน 5 สายพันธุ์

	ไก่เหลืองหางขาว	ไก่ประดู่หางดำ	ไก่แจ้	ไก่เบตง	ไก่คอเปลือย
ไก่เหลืองหางขาว	****				
ไก่ประดู่หางดำ	0.1120	****			
ไก่แจ้	0.2769	0.2340	****		
ไก่เบตง	0.1435	0.1610	0.3190	****	
ไก่คอเปลือย	0.1626	0.1836	0.2970	0.1827	****

4. แผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

เมื่อนำค่าระยะห่างทางพันธุกรรมจากการคำนวณโดยใช้ Nei's genetic distance มาสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) จะได้แผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างไก่พื้นเมืองไทยจำนวน

5 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่เหลืองหางขาว ไก่ประดู่หางดำ ไก่แจ้ ไก่เบตง และไก่คอเปลือย ดังแสดงในภาพที่ 8 จากแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่าประชากรไก่พื้นเมืองไทยมีการจัดแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ กลุ่มแรก ประกอบด้วยไก่เหลืองหางขาว ไก่ประดู่หางดำ ไก่เบตง และไก่คอเปลือย และกลุ่มที่ 2 คือ ไก่แจ้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไก่พื้นเมืองไทยทุกสายพันธุ์ยกเว้นไก่แจ้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน โดยไก่พื้นเมืองไทยที่มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกันมากที่สุด คือ ไก่เหลืองหางขาวและไก่ประดู่หางดำ ซึ่งสอดคล้องกับการที่ไก่เหลืองหางขาวและไก่ประดู่หางดำมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาใกล้เคียงกันและจัดอยู่ในประเภทไก่ชนเช่นเดียวกัน สำหรับไก่แจ้เป็นไก่พื้นเมืองไทยเพียงชนิดเดียวที่ไม่ได้จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์อื่นๆ ที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาตัวอย่างที่เก็บมาศึกษาอาจเป็นไก่แจ้ที่มีการผสมข้ามระหว่างไก่แจ้ไทยและไก่แจ้ญี่ปุ่นจึงทำให้ถูกจัดแยกออกจากไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์อื่นๆ



ภาพที่ 8 แผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไก่พื้นเมืองไทยจำนวน 5 สายพันธุ์

สรุป

1. สามารถตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอทั้ง 20 โลไซได้ โดยแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็น ladder band คือ เกิดแถบดีเอ็นเอหลายแถบติดกัน จำนวนของอัลลิลในแต่ละโลคัสสำหรับทุกประชากรที่ศึกษามีความผันแปรอยู่ระหว่าง 3-14 อัลลิล ที่โลคัส ADL115 และ ADL160 มีจำนวนของอัลลิลน้อยที่สุด และโลคัส ADL231 มีจำนวนของอัลลิลมากที่สุด จำนวนของอัลลิลเฉลี่ยต่อโลคัสสำหรับทุกประชากร คือ 7

2. ไก่พื้นเมืองไทยจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่เหลืองหางขาว ไก่ประดู่หางดำ ไก่แจ้ ไก่เบตง และไก่คอเปลือย มีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรปานกลาง โดยมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.400-0.505 และมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.566-0.618

3. ไก่พื้นเมืองไทยจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่เหลืองหางขาว ไก่ประดู่หางดำ ไก่แจ้ ไก่เบตง และไก่คอเปลือย มีความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรค่อนข้างต่ำ โดยมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมจากการคำนวณโดยใช้ Nei's genetic distance อยู่ระหว่าง 0.1120-0.3190

4. แผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างประชากรไก่พื้นเมืองไทยจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่เหลืองหางขาว ไก่ประดู่หางดำ ไก่แจ้ ไก่เบตง และไก่คอเปลือย สร้างขึ้นจากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่คำนวณโดยใช้ Nei's genetic distance โดยวิธี UPGMA พบว่าประชากรไก่พื้นเมืองไทยมีการจัดแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ กลุ่มแรกประกอบด้วยไก่เหลืองหางขาว ไก่ประดู่หางดำ ไก่เบตง และไก่คอเปลือย และกลุ่มที่ 2 คือ ไก่แจ้

ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ควรตรวจสอบตัวอย่างที่จะใช้ในการศึกษาให้มีลักษณะตรงตามสายพันธุ์นั้นๆ อย่างแท้จริง และตัวอย่างที่ใช้ไม่ควรมีความสัมพันธ์ทางเครือญาติกัน

2. การเลือกไพรเมอร์ที่ใช้ในการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ ควรเลือกจากที่มีรายงานว่าเป็นโลคัสที่เป็นโพลีมอร์ฟิค ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่าสามารถตรวจสอบแถบดีเอ็นเอจากไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอทั้ง 20 โลไซได้ และทุกโลไซเป็นโพลีมอร์ฟิคในประชากรไก่พื้นเมืองไทยทุกสายพันธุ์ ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษานี้จึงมีความเหมาะสมที่จะใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทยและทดลองใช้ในสัตว์ปีกชนิดอื่นๆ ต่อไป

3. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่ศึกษาในไก่แต่ละสายพันธุ์ และเพิ่มจำนวนไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่ตรวจสอบให้มากขึ้น เพื่อให้ได้ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีความแม่นยำมากขึ้น

4. การเพิ่มความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์เจล และการใช้ Sequencing marker จะช่วยให้สามารถแยกอัลลิลของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอได้ละเอียดและแม่นยำมากยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

กองบำรุงพันธุ์สัตว์. 2544 ก. ลักษณะมาตรฐานและสีไก่แจ้. พิมพ์ครั้งที่ 2, กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 26 น.

กองบำรุงพันธุ์สัตว์. 2544 ข. การสัมมนาวิชาการความหลากหลายทางชีวภาพด้านการปศุสัตว์ ครั้งที่ 2 เรื่อง Biotechnology for Animal Genetic Resources Conservation. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

กองบำรุงพันธุ์สัตว์. 2545. พันธุ์สัตว์. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและ สหกรณ์, กรุงเทพฯ. 39 น.

กองบำรุงพันธุ์สัตว์. 2546. ลักษณะและมาตรฐานไก่พื้นเมืองไทย. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 55 น.

จรัลธาดา กรรณสูต. ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์. พันธุกรรมของการกำเนิดชนิดพันธุ์และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง, กรุงเทพฯ. 60 น.

จุฑารัตน์ จันทบูรณ์. 2544. การศึกษาแถบดีเอนเอเอนโดจีนัสรีโทรไวรัส (อีวี-21) ในไก่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ทวี อบอุ่น และ อรพิน เวชชบุษกร. 2538. ไก่เบตงและลูกผสมเบตง. วารสารสัตวบาล 5(30) : 85-88.

นภาพันธ์ ไชยวงค์. 2543. เครื่องหมายพันธุกรรมเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 18(3) : 79-86.

นรินทร์ อุประกรินทร์, ธีระพล ศิรินฤมิตร, ปรีดา เลิศวัชระสารกุล, นำดี แซ่เฮง, วิไลรัตน์ ฉ่ำสิงห์, อรวรรณ บุตรดี, ภัทรา มูลจิตร และ วรวิทย์ วัชชวัลคุ. 2543. การสำรวจภาวะการติดเชื้อ subgroup J Avian leukosis virus ในไก่เนื้อและไก่พ่อแม่พันธุ์ด้วยวิธี PCR และ ELISA, น. 435-439. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 สาขาสัตว์และสาขาสัตวแพทย์ศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ประเวศ วะสี, วิสุทธิ์ ใบไม้, สมศักดิ์ สุขวงศ์, ฉลาดชาย รมิตานนท์, ชนวน รัตนวราหะ, ระพี สาคริก และ ยศ สันตสมบัติ. 2537. ความหลากหลายทางชีวภาพกับการพัฒนาอย่างยั่งยืน. สถาบันชุมชนท้องถิ่นพัฒนา, กรุงเทพฯ. 278 น.

ปิยะมาศ การสมดี. 2542. ความผันแปรทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมือง *Gallus gallus domesticus* ของไทยโดยไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

เยาวลักษณ์ เลไพจิตร. 2544. การประมาณค่าความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างไก่พื้นเมืองและไก่พันธุ์ทางการค้าด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์-พีซีอาร์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วีระเดช พะเยาศิริพงศ์. 2543. ไก่ชนยุคโลกาภิวัฒน์ ครบเครื่องเรื่องไก่ชน. ห้างหุ้นส่วนจำกัด กรีนพ้อยโปรดักท์ (1999), กรุงเทพฯ. 175 น.

ศิริลักษณ์ พรสุขศิริ. 2537. แนวทางการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในสัตว์พื้นเมือง. วารสารเกษตร 10(2) : 158-168.

สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม. 2539. อนุสัญญาว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ : คิดในระดับโลกและทำในระดับประเทศ. ฝ่ายทรัพยากรชีวภาพ กองประสานการจัดการทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม, กรุงเทพฯ. 174 น.

อภิชัย รัตนวราหะ. 2534. ไก่พื้นเมืองในระบบไร่นาผสม. สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้, เชียงใหม่. 108 น.

อภิชัย รัตนวราหะ. 2540. ไก่พื้นเมืองสัตว์เศรษฐกิจระดับชาวบ้าน. สำนักพิมพ์มติชน, กรุงเทพฯ. 95 น.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2543. พันธุศาสตร์สัตว์น้ำ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,. กรุงเทพฯ. 203 น.

เอฟเอโอ. 2543. ความหลากหลายทางชีวภาพด้านการเกษตร : การอนุรักษ์พันธุ์สัตว์เลี้ยง. แปลโดย แสนศักดิ์ นาคะวิสุทธิ์, วารสารสัตวบาล 10(51) : 1-4.

Arnheim, N., T. White and W.E. Rainey. 1990. Application of PCR : Organismal and Population Biology. Bioscience 40(3) : 174-182.

Avise, J.C. 1994. Molecular Markers, Natural History and Evolution. Chapman & Hall, New York. 511 p.

Bitgood, J.J. and R.N. Shoffner. 1990. Cytology and Cytogenetics, pp. 401-427. In R.D. Crawford (ed.). Poultry Breeding and Genetics. Elsevier, Amsterdam.

Bordas, A., P. Merat, D. Sergent and F.H. Richard. 1978. Influence of the Na Gene (naked neck) on Growth, Feed Consumption and Body Composition of Chicks According to Environmental Temperature. Ann. Genet. Sel. Anim. 10 : 209-231.

Brown, T.A. 2001. The Polymerase Chain Reaction, pp. 187-208. In T.A Brown (ed.). Essential Molecular Biology. Vol. 2. 2nd ed. Oxford University Press, Oxford.

Carter, R.E. 2000. DNA Fingerprinting Using Minisatellite Probes, pp. 113-135. In A.J. Barker (ed.). Molecular Methods in Ecology. Alden Press, Oxford.

Cheng, H.H., I. Levin, R.L. Vallejo, H. Khatib, J.B. Dodgson, L.B. Crittenden and J. Hillel. 1995. Development of a Genetic Map of the Chicken with Markers of High Utility. Poult. Sci. 74 : 1855-1874.

Crooijmans, R.P.M.A., A.F. Groen, A.J.A. Van kampen, S. Van der beek, J.J. Van der poel and M.A.M. Groenen. 1996. Microsatellite Polymorphism in Commercial Broiler and Layer Lines Estimated Using Pooled Blood Samples. Poult. Sci. 80 : 1057-1063.

Emara, M.G., H. Kim, J. Zhu, R.R. Lapierre, N. Lakshmanan and H.S. Lillehoj. 2002. Genetic Diversity at the Major Histocompatability Complex (*B*) and Microsatellite Loci in Three Commercial Broiler Pure Lines. Poult. Sci. 81 : 1609-1617.

Felsenstein. J. 1993. PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.5c. University of Washington.

Fulton, J.E. and A. McCarron. 1999. Microsatellite Marker Analysis of Commercial Pure-Line Chicken Populations. [Online]. Available : http://www.intl-pag.org/7/abstracts/pag7454.html

Koreth, J., J.J.O' Leary and J.O'D. McGee. 1996. Microsatellites and PCR Genomic Analysis. J. Pathol. 178 : 239-248.

Marle-Köster, E.V. and L.H. Nel. 2000. Genetic Characterization of Native Southern African Chicken Populations : Evaluation and Selection of Polymorphic Microsatellite Markers. S. Afr. J. Anim. Sci. 30(1) : 1-6.

Martín-Burriel, I., E. García-Muro and P. Zaragaza. 1999. Genetic Diversity Analysis of Six Spanish Native Cattle Breeds Using Microsatellites. Anim. Genet. 30 : 177-182.

McDonald, D.B. and W.K. Potts. 1997. DNA Microsatellites as Genetic Markers at Several Scales, pp. 29-48. In D.P. Mindell (ed.). Avian Molecular Evolution and Systematics. Academic Press, San Diago.

Moreng, R.E. and J.S. Avens. 1985. Poultry Science and Production. Reston Publishing Company, Virginia. 438 p.

Nei, M. 1972. Genetic Distance Between Populations. Amer. Nat. 106 : 283-292.

Nei, M. 1978. Estimation of Average Heterozygosity and Genetic from a Small Number of Individual. Genetics 89 : 583-590.

Okada, I. 1994. Current Status of Phylogenetic Studies in Chickens with Special Reference to Asian Native Chickens. J. Fac. Appl. Biol. Sci. 33 : 173-187.

Oklahoma State University. 1997. [Online]. Available : http://www.ansi.okste.edu/poultry/chickens/TURKEN/

Ponsuksili, S., K. Wimmers and P. Horst. 1996. Genetic Variability in Chickens Using Polymorphic Microsatellite Markers. Thai J. Agric. Sci. 29 : 571-580.

Promege Corporation. no date. Silver Sequence^{TM} DNA Sequencing System.

Romanov, M.N. and S. Weigend. 2001. Analysis of Genetic Relationships Between Various Populations of Domestic and Jungle Fowl Using Microsatellite Markers. Poult. Sci. 80 : 1057-1063.

Rose, S.P. 1997. Principles of Poultry Science. Biddles Ltd., Guildford. 135 p.

Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning A Laboratory Manual. Vol. 1,2. 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Scribner, K.T. and J.M. Pearce. 2000. Microsatellites : Evolutionary and Methodological Background and Empirical Applications at Individual, Population and Phylogenetic Levels, pp. 235-273. In A.J. Barker (ed.). Molecular Methods in Ecology. Alden Press, Oxford.

Sealey, P.G. and E.D. Southern. 1990. Gel Electrophoresis of DNA, pp. 51-59. In D. Rickwood and B.D. Hames (eds.). Gel Electrophoresis of Nucleic Acids A Practical Approach. 2nd ed. Oxford University Press, Oxford.

Singhapol, C. and M. Ketudat-Cairns. 2003. Microsatellite Polymorphism in Thai Native Fowl (*Gallus gallus domesticus*), p. 165. In Abstracts of BioThailand 2003 : Technology for Life. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Ministry of Science and Technology.

Smith, J. and D.W. Burt. 1998. Parameters of the Chicken Genome (*Gallus gallus*). Poult. Sci. 29 : 290-294.

Takahashi, H., K. Nirasawa, Y. Nagamine, M. Tsudzuki and Y. Yamamoto. 1998. Genetic Relationships Among Japanese Native Breeds of Chicken Based on Microsatellite DNA Polymorphisms. J. Hered. 89 : 543-546.

Taylor, G.R. 1991. Polymerase Chain Reaction : Basic Principles and Automation, pp. 1-14. In M.J. McPherson, P. Quirke and G.R. Taylor. (eds.). PCR A Practical Approach. Vol. 1. Oxford University Press, New York.

University of Florida. 2004. Molecular Markers and Mapping I. [Online]. Available : http://www.hos.ufl.edu/mooreweb/AdvancedGenetics/2003%20lectures/10-28-03/Molecular%20markers%206.htm

Vanhala, T., M. Tuiskula-Haavisto, K. Elo, J. Vilkki and A. Mäki-Tanila. 1998. Evaluation of Genetic Variability and Genetic Distances Between Eight Chicken Lines Using Microsatellite Markers. Poult. Sci. 75 : 579-584.

Venkatesh, B., P. Gilligan and S. Brenner. 2000. Genome Sizes of Model Vertebrates. [Online]. Available : http://bioll.bio.nagoya-u.ac.jp : 8000/compGOl.html

Weaver, R.F. 1999. Molecular Biology. The McGraw-Hill Companies, Inc., Boston. 788 p.

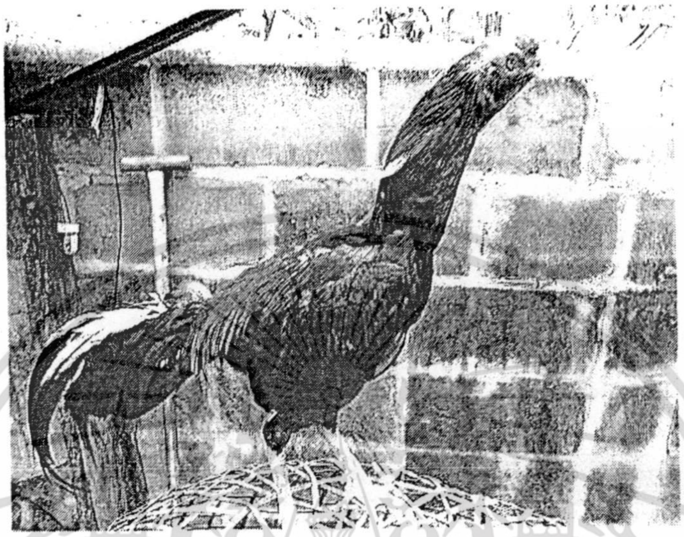
Wimmers, K., S. Ponsuksili, T. Hardge, A. Valle-Zarate, P.K. Mathur and P. Horst. 2000. Genetic Distinctness of African, Asian and South American Local Chickens. Anim. Genet. 31 : 159-165.

Yeh, F.C., R. Yang and T. Boyle. 1999. POPGENE version 1.32. [Online]. Available : http://www.ualberta.ca/~fyeh/

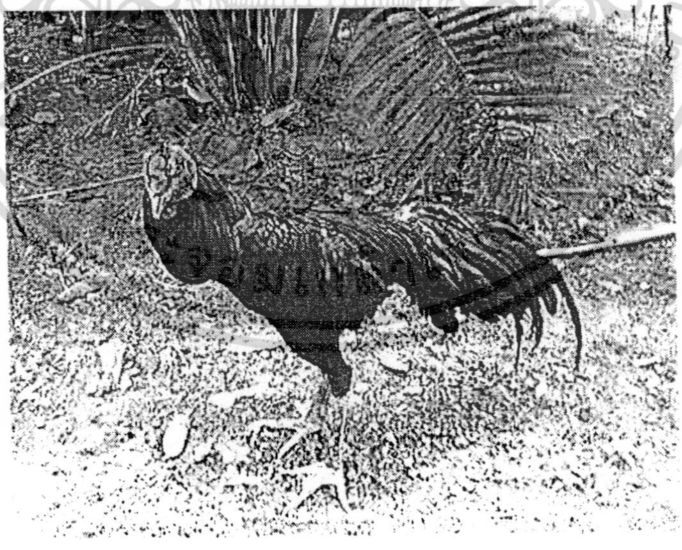
Zhang, X., F.C. Leung, D.K.O. Chan, G. Yang and C. Wu. 2002. Genetic Diversity of Chinese Native Chicken Breeds Based on Protein Polymorphism, Randomly Amplified Polymorphic DNA, and Microsatellite Polymorphism. Poult. Sci. 81 : 1463-1472.

ภาคผนวก ก

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

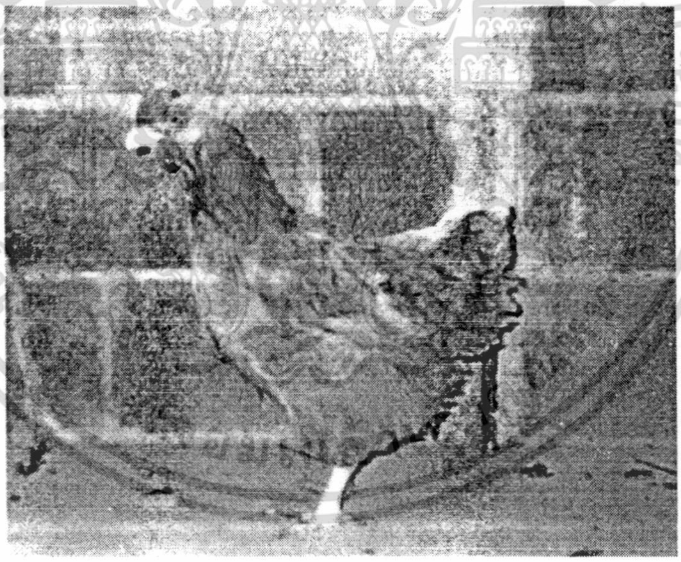


ภาพผนวกที่ ก.1 ไก่เหลืองหางขาว

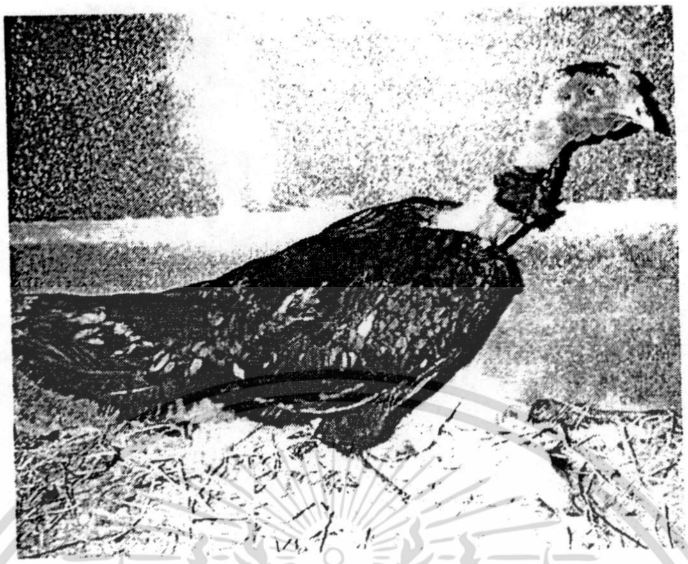


ภาพผนวกที่ ก.2 ไก่ประดู่หางดำ

ภาพผนวกที่ ก.3 ไก่แจ้



ภาพผนวกที่ ก.4 ไก่เบตง



ภาพผนวกที่ ก.5 ไก่คอเปลือย

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. Lysis buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

1) ผสมสารต่างๆ ดังแสดงในตารางผนวกที่ ข.1

2) เติมน้ำกลั่นที่อบด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีแล้ว ให้ครบปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

3) เก็บสารละลายไว้ในขวดที่ป้องกันแสง โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ตารางผนวกที่ ข.1 ส่วนประกอบของ Lysis buffer

สาร	ปริมาณ	ความเข้มข้นสุดท้าย
Guanidine thiocyanate	472.64 กรัม	4 M
N-Lauroylsarcosine	5 กรัม	0.5 %
1 M Sodium citrate, pH 7.0	25 มิลลิลิตร	25 mM

2. TE buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

1) ผสมสารต่างๆ ดังแสดงในตารางผนวกที่ ข.2

2) เติมน้ำกลั่นปริมาตร 800 มิลลิลิตร

3) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ที่ pH 8.0

4) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

5) อบด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ตารางผนวกที่ ข.2 ส่วนประกอบของ TE buffer

สาร	ปริมาณ	ความเข้มข้นสุดท้าย
Tris-base	1.211 กรัม	10 mM
EDTA	0.186 กรัม	0.5 mM

3. 5×TBE buffer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

1) ผสมสารต่างๆ ดังแสดงในตารางผนวกที่ ข.3

2) เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

3) อบด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

ตารางผนวกที่ ข.3 ส่วนประกอบของ 5×TBE buffer

สาร	ปริมาณ	ความเข้มข้นสุดท้าย
Tris-base	54 กรัม	0.45 M
Borric acid	27.5 กรัม	
0.5 M EDTA, pH 8.0	20 มิลลิลิตร	0.01 M

4. 40% Acrylamide (Acrylamide : *N,N'*-methylenebisacrylamide อัตรา 19 : 1) ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

1) ผสม Acrylamide 380 กรัม กับ *N,N'*-methylenebisacrylamide 20 กรัม

2) เติมน้ำกลั่นที่อบด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีแล้ว ให้ครบปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

3) เก็บสารละลายไว้ในขวดที่ป้องกันแสง โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. 4.5% Acrylamide ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

1) ผสมสารต่างๆ ดังแสดงในตารางผนวกที่ ข.4

2) เติมน้ำกลั่นที่อบด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาทีแล้ว ปริมาตร 800 มิลลิลิตร

3) นำไปอุ่นที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เพื่อให้ Urea ละลายหมด

4) ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

5) กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

6) เก็บสารละลายไว้ในขวดที่ป้องกันแสง โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

ตารางผนวกที่ ข.4 ส่วนประกอบของ 4.5% Acrylamide

สาร	ปริมาณ	ความเข้มข้นสุดท้าย
40% Acrylamide	112.5 มิลลิลิตร	4.5%
10×TBE buffer	100 มิลลิลิตร	1×
Urea	420 กรัม	7 M

6. Loading buffer ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

1) ผสมสารต่างๆ ดังแสดงในตารางผนวกที่ ข.5

2) เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร

3) เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ตารางผนวกที่ ข.5 ส่วนประกอบของ Loading buffer

สาร	ปริมาณ	ความเข้มข้นสุดท้าย
Formamide	9.5 มิลลิลิตร	95%
0.5 M EDTA, pH 8.0	400 ไมโครลิตร	20 mM
Bromophenol blue	0.005 กรัม	0.05%
Xylene cyanol	0.005 กรัม	0.05%

7. สารละลาย Silver nitrate ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

1) ผสม Silver nitrate 1 กรัม กับน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (0.1% Silver nitrate)

2) เติม 37% Formaldehyde ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร

3) เก็บสารละลายไว้ในขวดที่ป้องกันแสง สารละลาย Silver nitrate ที่ใช้แล้ว สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ 2-3 ครั้ง

8. สารละลาย Developer ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (เตรียมใหม่ก่อนใช้ทุกครั้ง)

1) ผสม Sodium carbonate 30 กรัม กับน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (3% Sodium carbonate)

ภาคผนวก ค

2) เติม 50 mg/ml Sodium thiosulfate ปริมาตร 200 ไมโครลิตร [illegible]
3) นำไปแช่ให้เย็นจัด
4) ก่อนใช้เติม 37% Formaldehyde ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร

ตารางผนวกที่ ค.2 ความถี่ของอัลลิลในแต่ละโลคัสของไก่พื้นเมืองไทยจำนวน 5 สายพันธุ์

โลคัส	อัลลิล	ความถี่ของอัลลิล				
		ไก่เหลืองหางขาว	ไก่ประดู่หางดำ	ไก่แจ้	ไก่เบตง	ไก่คอเปลือย
ADL115	A	0.1000	0.1500	0.1000	0.1000	0.1000
	B	0.0000	0.0500	0.0000	0.0000	0.0000
	C	0.9000	0.8000	0.9000	0.9000	0.9000
ADL123	A	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0500
	B	0.0500	0.0500	0.0000	0.0000	0.0500
	C	0.0000	0.0000	0.0500	0.1000	0.0500
	D	0.0000	0.0000	0.9500	0.0000	0.0000
	E	0.9500	0.9500	0.0000	0.9000	0.8500
ADL142	A	0.0000	0.0000	0.3000	0.0000	0.4000
	B	0.3000	0.3500	0.0000	0.2000	0.3000
	C	0.6000	0.6500	0.6500	0.7000	0.3000
	D	0.0500	0.0000	0.0500	0.0500	0.0000
	E	0.0500	0.0000	0.0000	0.0500	0.0000
ADL146	A	0.0000	0.0000	0.0000	0.1000	0.1500
	B	0.0000	0.0000	0.0000	0.1500	0.0000
	C	0.0500	0.0500	0.1500	0.0000	0.0000
	D	0.1500	0.0500	0.0000	0.1000	0.0000
	E	0.3000	0.3000	0.2000	0.3500	0.2000
	F	0.4000	0.1500	0.2000	0.2000	0.0000
	G	0.0000	0.3500	0.1000	0.0000	0.4000
	H	0.1000	0.1000	0.3500	0.1000	0.2500

ตารางผนวกที่ ค.1 จำนวนของอัลลิลในแต่ละโลคัสสำหรับทุกประชากร

โลคัส	จำนวนของอัลลิล
ADL115	3
ADL123	5
ADL142	5
ADL146	8
ADL155	4
ADL160	3
ADL166	11
ADL181	4
ADL183	6
ADL185	9
ADL187	11
ADL190	6
ADL195	8
ADL209	12
ADL210	8
ADL231	14
ADL234	4
ADL246	8
ADL252	4
ADL255	7
เฉลี่ย	7

ตารางผนวกที่ ค.2 (ต่อ)

โลคัส	อัลลิล	ความถี่ของอัลลิล				
		ไก่เหลืองหางขาว	ไก่ประดู่หางดำ	ไก่แจ้	ไก่เบตง	ไก่คอเปลือย
ADL183	A	0.0500	0.1000	0.0000	0.0000	0.1500
	B	0.3500	0.2500	0.3000	0.4500	0.4000
	C	0.0500	0.3500	0.4500	0.3500	0.2500
	D	0.1000	0.0000	0.1000	0.0000	0.0500
	E	0.1500	0.1000	0.0000	0.2000	0.1500
	F	0.3000	0.2000	0.1500	0.0000	0.0000
ADL185	A	0.0000	0.0500	0.0000	0.0000	0.0500
	B	0.3889	0.1500	0.0500	0.1500	0.1000
	C	0.0000	0.0000	0.1000	0.0000	0.0000
	D	0.1111	0.0000	0.1000	0.3000	0.0000
	E	0.1111	0.2500	0.3000	0.1000	0.3500
	F	0.0000	0.0500	0.1500	0.0000	0.1000
	G	0.0556	0.0000	0.0000	0.0000	0.1000
	H	0.2222	0.2000	0.1500	0.3500	0.2500
	I	0.1111	0.3000	0.1500	0.1000	0.0500
ADL187	A	0.0500	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	B	0.0500	0.1500	0.3000	0.0500	0.1500
	C	0.0000	0.0000	0.0000	0.0500	0.0000
	D	0.4000	0.2500	0.5500	0.3500	0.7000
	E	0.1500	0.5000	0.0000	0.0000	0.0000
	F	0.0000	0.0000	0.0000	0.1000	0.0000
	G	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.1000
	H	0.0000	0.0000	0.0000	0.4500	0.0000
	I	0.2500	0.0500	0.1000	0.0000	0.0500

ตารางผนวกที่ ค.2 (ต่อ)

โลคัส	อัลลิล	ความถี่ของอัลลิล				
		ไก่เหลืองหางขาว	ไก่ประดู่หางดำ	ไก่แจ้	ไก่เบตง	ไก่คอเปลือย
ADL155	A	0.0000	0.0500	0.0500	0.3000	0.1000
	B	0.9500	0.8500	0.9500	0.7000	0.8500
	C	0.0500	0.0500	0.0000	0.0000	0.0000
	D	0.0000	0.0500	0.0000	0.0000	0.0500
ADL160	A	0.0500	0.2000	0.3500	0.0000	0.0000
	B	0.1500	0.2000	0.0000	0.4500	0.2500
	C	0.8000	0.6000	0.6500	0.5500	0.7500
ADL166	A	0.0500	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	B	0.0500	0.0000	0.0000	0.0000	0.2500
	C	0.2000	0.3500	0.4500	0.0000	0.0000
	D	0.3500	0.1000	0.1000	0.3500	0.3500
	E	0.1000	0.1500	0.1000	0.4000	0.1000
	F	0.1000	0.0000	0.1500	0.2000	0.0000
	G	0.0000	0.0500	0.0000	0.0000	0.0500
	H	0.0000	0.1000	0.0000	0.0000	0.0000
	I	0.0000	0.0500	0.0000	0.0500	0.0000
	J	0.0500	0.0000	0.0000	0.0000	0.2000
	K	0.1000	0.2000	0.2000	0.0000	0.0500
ADL181	A	0.1000	0.2000	0.0000	0.0000	0.1000
	B	0.3500	0.5000	0.7000	0.6000	0.3000
	C	0.5500	0.3000	0.3000	0.3500	0.6000
	D	0.0000	0.0000	0.0000	0.0500	0.0000

ตารางผนวกที่ ค.2 (ต่อ)

โลคัส	อัลลิล	ความถี่ของอัลลิล				
		ไก่เหลืองหางขาว	ไก่ประดู่หางดำ	ไก่แจ้	ไก่เบตง	ไก่คอเปลือย
ADL209 (ต่อ)	I	0.1500	0.0000	0.0000	0.2000	0.1500
	J	0.0500	0.1000	0.0500	0.0500	0.0500
	K	0.4500	0.5000	0.6000	0.5500	0.2000
	L	0.1500	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
ADL210	A	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0500
	B	0.0000	0.0500	0.0000	0.1500	0.0500
	C	0.2000	0.2000	0.0500	0.1500	0.0000
	D	0.0000	0.0000	0.0500	0.1000	0.0000
	E	0.0500	0.0000	0.2500	0.0500	0.2500
	F	0.6500	0.7500	0.5000	0.5500	0.6000
	G	0.0000	0.0000	0.0500	0.0000	0.0500
	H	0.1000	0.0000	0.1000	0.0000	0.0000
ADL231	A	0.0000	0.0500	0.0000	0.0000	0.0000
	B	0.0000	0.0500	0.0000	0.0500	0.0000
	C	0.0000	0.0500	0.0000	0.0000	0.0500
	D	0.0000	0.0000	0.0500	0.0000	0.0000
	E	0.0000	0.0500	0.0000	0.0000	0.0000
	F	0.0000	0.0000	0.1500	0.0500	0.0500
	G	0.0000	0.1500	0.1000	0.0000	0.2000
	H	0.0000	0.0000	0.0000	0.0500	0.2500
	I	0.6000	0.3000	0.3000	0.2500	0.0500
	J	0.0000	0.0500	0.2500	0.0000	0.2500
	K	0.2000	0.0000	0.1000	0.0500	0.0000

ตารางผนวกที่ ค.2 (ต่อ)

โลคัส	อัลลิล	ความถี่ของอัลลิล				
		ไก่เหลืองหางขาว	ไก่ประดู่หางดำ	ไก่แจ้	ไก่เบตง	ไก่คอเปลือย
ADL187 (ต่อ)	J	0.0000	0.0500	0.0000	0.0000	0.0000
	K	0.1000	0.0000	0.0500	0.0000	0.0000
ADL190	A	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0500
	B	0.0000	0.0000	0.0000	0.1000	0.0000
	C	0.1500	0.1500	0.0000	0.3500	0.5000
	D	0.0500	0.0000	0.1000	0.0000	0.0000
	E	0.2500	0.6000	0.7500	0.2000	0.2500
	F	0.5500	0.2500	0.1500	0.3500	0.2000
ADL195	A	0.2500	0.2000	0.2000	0.0000	0.1000
	B	0.1000	0.0000	0.1000	0.1500	0.0500
	C	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0500
	D	0.0500	0.0500	0.0000	0.0000	0.0000
	E	0.3000	0.3500	0.2000	0.3500	0.4000
	F	0.1500	0.1000	0.2000	0.2000	0.2000
	G	0.0500	0.1000	0.0000	0.0000	0.0000
	H	0.1000	0.2000	0.3000	0.3000	0.2000
ADL209	A	0.0000	0.0500	0.0000	0.0000	0.0000
	B	0.0000	0.0000	0.1000	0.0000	0.0000
	C	0.0000	0.0000	0.0000	0.1000	0.0500
	D	0.0000	0.0500	0.0000	0.0000	0.0000
	E	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0500
	F	0.1000	0.2500	0.2000	0.0000	0.0000
	G	0.1000	0.0500	0.0000	0.1000	0.4000
	H	0.0000	0.0000	0.0500	0.0000	0.1000

ตารางผนวกที่ ค.2 (ต่อ)

โลคัส	อัลลิล	ความถี่ของอัลลิล				
		ไก่เหลืองหางขาว	ไก่ประดู่หางดำ	ไก่แจ้	ไก่เบตง	ไก่คอเปลือย
ADL231 (ต่อ)	L	0.0000	0.0500	0.0000	0.2000	0.0000
	M	0.2000	0.2000	0.0500	0.3500	0.1500
	N	0.0000	0.0500	0.0000	0.0000	0.0000
ADL234	A	0.0000	0.0500	0.0000	0.0000	0.0000
	B	0.1000	0.0500	0.1500	0.2500	0.1500
	C	0.1000	0.1000	0.0500	0.1000	0.1500
	D	0.8000	0.8000	0.8000	0.6500	0.7000
ADL246	A	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0500
	B	0.0000	0.0000	0.1000	0.0000	0.0000
	C	0.0000	0.0000	0.0000	0.1500	0.0000
	D	0.3500	0.1500	0.2500	0.1500	0.4500
	E	0.0000	0.2000	0.0000	0.0000	0.0000
	F	0.5500	0.2000	0.3000	0.3000	0.3000
	G	0.1000	0.3000	0.3500	0.4000	0.2000
	H	0.0000	0.1500	0.0000	0.0000	0.0000
ADL252	A	0.0500	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000
	B	0.4000	0.3500	0.5000	0.5000	0.5000
	C	0.0500	0.1000	0.0000	0.0000	0.0000
	D	0.5000	0.5500	0.5000	0.5000	0.5000
ADL255	A	0.2000	0.1000	0.2000	0.1000	0.2000
	B	0.3500	0.3000	0.3000	0.0500	0.3000
	C	0.1000	0.1500	0.4500	0.2500	0.2000
	D	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0500

ตารางผนวกที่ ค.2 (ต่อ)

โลคัส	อัลลิล	ความถี่ของอัลลิล				
		ไก่เหลืองหางขาว	ไก่ประดู่หางดำ	ไก่แจ้	ไก่เบตง	ไก่คอเปลือย
ADL255 (ต่อ)	E	0.2000	0.3500	0.0500	0.4000	0.2000
	F	0.0500	0.0000	0.0000	0.0000	0.0500
	G	0.1000	0.1000	0.0000	0.2000	0.0000

ตารางผนวกที่ ค.3 จำนวนของอัลลิล ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกต และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีในแต่ละโลคัสสำหรับไก่เหลืองหางขาว

โลคัส	จำนวนของอัลลิล	ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี	
		จากการสังเกต	จากทฤษฎี
ADL115	2.0000	0.0000	0.1895
ADL123	2.0000	0.1000	0.1000
ADL142	4.0000	0.3000	0.5737
ADL146	5.0000	0.5000	0.7526
ADL155	2.0000	0.1000	0.1000
ADL160	3.0000	0.4000	0.3526
ADL166	8.0000	0.6000	0.8421
ADL181	3.0000	0.6000	0.5947
ADL183	6.0000	0.6000	0.7895
ADL185	6.0000	0.6667	0.8039
ADL187	6.0000	0.6000	0.7789
ADL190	4.0000	0.8000	0.6421
ADL195	7.0000	0.8000	0.8421
ADL209	6.0000	0.9000	0.7684
ADL210	4.0000	0.6000	0.5526
ADL231	3.0000	0.2000	0.5895
ADL234	3.0000	0.2000	0.3579
ADL246	3.0000	0.1000	0.5947
ADL252	4.0000	1.0000	0.6158
ADL255	6.0000	0.7000	0.8158
เฉลี่ย	4.3500	0.4883	0.5828
SD	1.7852	0.2960	0.2420

ตารางผนวกที่ ค.4 จำนวนของอัลลิล ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกต และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีในแต่ละโลคัสสำหรับไก่ประดู่หางดำ

โลคัส	จำนวนของอัลลิล	ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี	
		จากการสังเกต	จากทฤษฎี
ADL115	3.0000	0.2000	0.3526
ADL123	2.0000	0.1000	0.1000
ADL142	2.0000	0.3000	0.4789
ADL146	6.0000	0.4000	0.7895
ADL155	4.0000	0.3000	0.2842
ADL160	3.0000	0.6000	0.5895
ADL166	7.0000	0.7000	0.8316
ADL181	3.0000	0.6000	0.6526
ADL183	5.0000	0.4000	0.7947
ADL185	6.0000	0.7000	0.8211
ADL187	5.0000	0.4000	0.6947
ADL190	3.0000	0.6000	0.5842
ADL195	6.0000	0.4000	0.8158
ADL209	6.0000	0.7000	0.7053
ADL210	3.0000	0.4000	0.4158
ADL231	10.0000	0.8000	0.8737
ADL234	4.0000	0.3000	0.3632
ADL246	5.0000	0.2000	0.8263
ADL252	3.0000	0.9000	0.5947
ADL255	5.0000	0.8000	0.7842
เฉลี่ย	4.5500	0.4900	0.6176
SD	1.9595	0.2292	0.2195

ตารางผนวกที่ ค.5 จำนวนของอัลลิล ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกต และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีในแต่ละโลคัสสำหรับไก่แจ้

โลคัส	จำนวนของอัลลิล	ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี	
		จากการสังเกต	จากทฤษฎี
ADL115	2.0000	0.2000	0.1895
ADL123	2.0000	0.1000	0.1000
ADL142	3.0000	0.4000	0.5105
ADL146	5.0000	0.4000	0.8053
ADL155	2.0000	0.1000	0.1000
ADL160	2.0000	0.3000	0.4789
ADL166	5.0000	0.6000	0.7526
ADL181	2.0000	0.4000	0.4421
ADL183	4.0000	0.1000	0.7105
ADL185	7.0000	0.8000	0.8632
ADL187	4.0000	0.4000	0.6263
ADL190	3.0000	0.4000	0.4263
ADL195	5.0000	0.7000	0.8211
ADL209	5.0000	0.4000	0.6158
ADL210	6.0000	0.3000	0.7053
ADL231	7.0000	0.4000	0.8421
ADL234	3.0000	0.4000	0.3526
ADL246	4.0000	0.5000	0.7526
ADL252	2.0000	1.0000	0.5263
ADL255	4.0000	0.1000	0.7000
เฉลี่ย	3.8500	0.4000	0.5661
SD	1.6631	0.2384	0.2395

ตารางผนวกที่ ค.6 จำนวนของอัลลีล ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกต และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีในแต่ละโลคัสสำหรับไก่เบตง

โลคัส	จำนวนของอัลลีล	ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี	
		จากการสังเกต	จากทฤษฎี
ADL115	2.0000	0.2000	0.1895
ADL123	2.0000	0.2000	0.1895
ADL142	4.0000	0.4000	0.4895
ADL146	6.0000	0.5000	0.8263
ADL155	2.0000	0.6000	0.4421
ADL160	2.0000	0.5000	0.5211
ADL166	4.0000	0.8000	0.7105
ADL181	3.0000	0.4000	0.5421
ADL183	3.0000	0.4000	0.6684
ADL185	5.0000	0.6000	0.7842
ADL187	5.0000	0.6000	0.6947
ADL190	4.0000	0.6000	0.7421
ADL195	4.0000	0.3000	0.7632
ADL209	5.0000	0.6000	0.6684
ADL210	5.0000	0.8000	0.6737
ADL231	7.0000	0.5000	0.8053
ADL234	3.0000	0.3000	0.5316
ADL246	4.0000	0.2000	0.7421
ADL252	2.0000	1.0000	0.5263
ADL255	5.0000	0.6000	0.7632
เฉลี่ย	3.8500	0.5050	0.6137
SD	1.4609	0.2139	0.1845

ตารางผนวกที่ ค.7 จำนวนของอัลลิล ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกต และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีในแต่ละโลคัสสำหรับไก่คอปลือย

โลคัส	จำนวนของอัลลิล	ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี	
		จากการสังเกต	จากทฤษฎี
ADL115	2.0000	0.2000	0.1895
ADL123	4.0000	0.3000	0.2842
ADL142	3.0000	0.0000	0.6947
ADL146	4.0000	0.2000	0.7526
ADL155	3.0000	0.3000	0.2789
ADL160	2.0000	0.3000	0.3947
ADL166	6.0000	0.8000	0.8000
ADL181	3.0000	0.5000	0.5684
ADL183	5.0000	0.5000	0.7684
ADL185	7.0000	0.7000	0.8211
ADL187	4.0000	0.4000	0.5000
ADL190	4.0000	0.5000	0.6789
ADL195	6.0000	0.5000	0.7842
ADL209	7.0000	0.7000	0.8000
ADL210	5.0000	0.3000	0.6000
ADL231	7.0000	0.6000	0.8474
ADL234	3.0000	0.1000	0.4895
ADL246	4.0000	0.6000	0.7000
ADL252	2.0000	1.0000	0.5294
ADL255	6.0000	0.6000	0.8263
เฉลี่ย	4.3500	0.4550	0.6154
SD	1.6944	0.2481	0.2038