

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่บ้านพื้นเมืองไทย  
(*Gallus gallus domesticus*) โดย RAPD MARKER

GENETIC DIVERSITY OF THAI NATIVE CHICKEN  
(*Gallus gallus domesticus*) BY RAPD MARKER



วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาดตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2560  
KMITL-2017-SC-M-020-036

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่บ้านพื้นเมืองไทย  
(*Gallus gallus domesticus*) โดย RAPD MARKER

GENETIC DIVERSITY OF THAI NATIVE CHICKEN  
(*Gallus gallus domesticus*) BY RAPD MARKER



วิทยานิพนธ์สำหรับการศึกษาด้านหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ  
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ปีการศึกษา 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้  
KMITL-2017-SC-M-020-036

GENETIC DIVERSITY OF THAI NATIVE CHICKEN  
(*Gallus gallus domesticus*) BY RAPD MARKER



A THESIS SUBMITTED IN FULFILLMENT OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY  
DEPARTMENT OF BIOLOGY  
FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG ACADEMIC  
2017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาด้านนี้ เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้  
KMITL-2017-SC-M-020-036



COPYRIGHT 2017

FACULTY OF SCIENCE

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์

“ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นบ้านเมืองไทย  
(*Gallus gallus domesticus*) โดย RAPD MARKER”  
(GENETIC DIVERSITY OF THAI NATIVE CHICKEN  
(*Gallus gallus domesticus*) BY RAPD MARKER)

ชื่อนักศึกษา

นางสาวกรกาญจน์ ชูมี

รหัสประจำตัว

58605049

ปริญญา


วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา

ชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร.วรภฤต วรรณนทกิจ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการ ผศ.ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา อาจารย์บัณฑิตประจำ (ในสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง) ดร.วรวิทย์ มณีพิทักษ์สันติ ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอกสถาบันฯ ผศ.ดร.วรภฤต วรรณนทกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	

วัน/ เดือน/ ปี ที่สอบ 13 กรกฎาคม พ.ศ. 2560 เวลา 09.00 - 12.00 น.

สถานที่สอบ ณ ห้อง 439 ตึกจุฬารณ 1

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว



(รองศาสตราจารย์ ดร.ดุชนิ ธนะบริพัฒน์)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่ 25 เดือน 7 พ.ศ. 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่บ้านพื้นเมืองไทย ( <i>Gallus gallus domesticus</i> ) โดย RAPD MARKER
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกรกาญจน์ ชูมี
รหัสประจำตัว	58605049
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ภาควิชา	ชีววิทยา
พ.ศ.	2560
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรกฤต วรรณทกิจ

### บทคัดย่อ

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่บ้านพื้นเมืองไทยโดยใช้ลักษณะภายนอกเป็นเกณฑ์อาจเกิดการผันแปรเนื่องจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป จึงมีการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ประกอบกับการศึกษาทางสัณฐานวิทยาเพื่อความถูกต้อง และแม่นยำมากขึ้น วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้จึงศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่บ้านพื้นเมืองไทยจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ ไก่ประดู่หางดำ เชียงใหม่ (PD) ไก่ชีท่าพระ (CT) ไก่เหลืองหางขาวกบินทร์บุรี (LK) และไก่แดงสุราษฎร์ (DS) สายพันธุ์ละ 15 ตัวอย่าง จำนวนรวม 60 ตัวอย่าง โดยใช้เครื่องหมาย RAPD นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากขนมาเพิ่มปริมาณด้วยไพรเมอร์ 4 ชนิด (OPA01, OPA11, OPA16 และ OPA18) หลังจากนั้นนำข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NTSYSpc รุ่น 2.01e พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนระหว่างประชากรของไก่พื้นเมืองไทยอยู่ระหว่าง 0.6597 ถึง 0.7802 แสดงให้เห็นว่าไก่พื้นเมืองทั้ง 4 สายพันธุ์มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรม และจากแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการสามารถแบ่งกลุ่มของไก่พื้นเมืองออกเป็น 4 กลุ่ม คือ DS, CT, PD และ LK

นอกจากนี้ยังนำข้อมูลจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทยทั้ง 4 สายพันธุ์ดังกล่าวมาโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจ หากลำดับนิวคลีโอไทด์ และทำการวิเคราะห์ พบว่านำมาออกแบบไพรเมอร์ครอบคลุมชิ้นดีเอ็นเอได้ คือ primerTS ซึ่งมีขนาด 1000 คู่เบส และพบตำแหน่งที่ทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของไก่พื้นเมืองไทยทั้ง 4 สายพันธุ์ ทั้งหมด 12 ตำแหน่ง ผลการศึกษาดังกล่าวสามารถนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลประจำสายพันธุ์ต่อไปได้

**คำสำคัญ :** ไก่พื้นเมืองไทย ความหลากหลายทางพันธุกรรม เครื่องหมาย RAPD เครื่องหมายทางพันธุกรรม

<b>Thesis Title</b>	GENETIC DIVERSITY OF THAI NATIVE CHICKEN ( <i>Gallus gallus domesticus</i> ) BY RAPD MARKER
<b>Student Name</b>	Miss Kornkan Choomee
<b>Student ID</b>	58605049
<b>Degree</b>	Master of Science (Biotechnology)
<b>Department</b>	Biology
<b>Year</b>	2017
<b>Thesis Advisor</b>	Asst. Prof. Dr. Worakrit Worananthakij

### Abstract

Genetic diversity of Thai native chickens (TNCs) using morphological classification has variation according to the changing environment. Genetic marker have been used to study morphological assembly to ensure the accuracy. The purpose of this study is to analyze genetic diversity of four species of TNCs: Pradu-Hangdam Chiangmai (PD), Chee Thapra (CT), Lueng-Hangkao Kabinburi (LK) and Dang Surat (DS). Each of the 15 samples included 60 samples were investigated using Random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker. The genomic DNA was extracted from feather chickens. Four RAPD primers (OPA-01, OPA11, OPA16 and OPA18) that were selected form OPA primers set (OPA01-OPA20) were used to amplify genomic DNA. Data analysis of genetic similarity and phylogenic dendrogram were analyzed with NTSYSpc version 2.01e program. The results indicated that the similarity coefficient between populations was in the range of 0.6597-0.7802 showing that the 4 strains were closely related. The dendrogram results could be separated into 4 clusters; DS, CT, PD and LK.

In addition, the DNA fragment was selected from genetic diversity of four species of TNCs using RAPD marker which we are interested, were cloned and analyzed of DNA sequence. It was found that DNA sequence was used for primer design as PrimerTS to amplify PCR products that is 1000 base pair product size. The DNA sequences were provided sufficient polymorphisms as 12 position to distinguish of the four species of TNCs. The results of this study could be facilitate further developments in genetic marker of species of the TNCs.

**Keywords :** Thai native chicken genetic diversity RAPD marker genetic marker

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากผู้จัดทำได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลผู้มีพระคุณหลายท่านดังนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วรภฤต วรนนท์กิจ อาจารย์ประจำภาคชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้ชี้แนะช่วยแก้ปัญหาตลอดจนให้ความรู้ แนะนำแก้ไขจนการทำเล่มวิทยานิพนธ์ สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.พนา โลหะทรัพย์ทวี ประธานกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคชัย กิตติวงศ์วัฒนา อาจารย์บัณฑิตประจำในการสอบหัวข้อและโครงร่าง วิทยานิพนธ์ และดร.วรวิทย์ มณีพิทักษ์สันติ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกที่ได้กรุณาให้คำแนะนำแก้ไข ทำให้เล่มวิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์พะเยา, ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ท่าพระ, ศูนย์วิจัย และบำรุงพันธุ์สัตว์กบินทร์บุรี และศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์สุราษฎร์ธานี ช่วยอนุเคราะห์ตัวอย่าง ไม้พื้นเมืองสายพันธุ์ประดู่หางดำเชียงใหม่ ไม้เท้าพระ ไม้เหลืองหางขาวกบินทร์บุรี และไม้แดงสุราษฎร์ ตามลำดับ

ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในการสนับสนุนทุนวิจัยบางส่วน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่อำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์ เครื่องมือวิทยาศาสตร์และคอยให้ความช่วยเหลือตลอดระยะเวลาในการทำปริญญาโท

ขอขอบพระคุณนายนเรศ ชูมี นางอนุสร์ ชูมี และนายภุชพงค์ ชูมี ที่ช่วยอนุเคราะห์หาตัวอย่าง ไม้เนื้อ และนกปรอทหัวโขนจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี ขอขอบคุณนางสาวบุษบา บัวเขียว เป็นเพื่อนร่วมทาง ในการเก็บตัวอย่างไม้พื้นเมืองสถานที่ต่างๆ และขอขอบคุณนางสาวจิราวรรณ ชูมี ในการสนับสนุนทุนในการเดินทางไปเก็บตัวอย่างไม้พื้นเมือง

สุดท้ายนี้ ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวชูมี ที่สนับสนุน และให้กำลังใจ ในการทำวิทยานิพนธ์จนสามารถสำเร็จได้อย่างที่คาดหวัง หากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ มีความผิดพลาดประการใดผู้จัดทำขออภัย ณ ที่นี้ ด้วย

นางสาวกรกาญจน์ ชูมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ข
กิตติกรรมประกาศ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ไก่พื้นเมือง.....	4
2.1.1 ความสำคัญในการเลี้ยงไก่พื้นเมือง.....	5
2.1.2 ลักษณะและการจำแนกไก่พื้นเมือง.....	5
2.2 ลักษณะจีโนมของไก่.....	9
2.3 การใช้เทคนิคทางโมเลกุลในการศึกษาหลากหลายของไก่พื้นเมือง.....	9
2.3.1 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Marker.....	10
2.3.2 Sequenced Characterized Amplified Region (SCAR) Marker.....	11
2.3.3 Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Marker.....	13
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	13
2.4.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่.....	14
2.4.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุล.....	17
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย.....	22
3.1 สถานที่เก็บตัวอย่างชนไก่พื้นเมืองไทย.....	22
3.2 อุปกรณ์.....	22
3.3 สารเคมี.....	23
3.4 วิธีการทดลอง.....	24
3.4.1 การเก็บตัวอย่างชนไก่พื้นเมือง.....	24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	หน้า
3.4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากชนไก่พื้นเมือง.....	25
3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส.....	25
3.4.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมือง โดยเทคนิค RAPD.....	25
3.4.5 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc .....	26
3.4.6 การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอ .....	27
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล .....	29
4.1 การทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอสำหรับปฏิกิริยา RAPD.....	29
4.2 ความจำเพาะของไพรเมอร์ RAPD .....	30
4.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทย .....	32
4.4 การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอ.....	43
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ .....	52
5.1 สรุปผลการวิจัย.....	52
5.2 ข้อเสนอแนะ .....	52
เอกสารอ้างอิง.....	53
ภาคผนวก .....	60
ภาคผนวก ก .....	61
ภาคผนวก ข .....	63
ภาคผนวก ค .....	67
ประวัติผู้เขียน .....	79

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 ตัวอย่างไก่พื้นเมืองที่สุ่มเก็บจากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์.....	22
3.2 ไพรเมอร์สำหรับเทคนิค RAPD.....	23
4.1 จำนวนแถบดีเอ็นเอของไก่พื้นเมืองโดยใช้ไพรเมอร์ RAPD 20 ชนิด .....	32
4.2 ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรม (genetic similarity) ของไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์ คือ ไก่แดงสุราษฎร์ (DS) ไก่ซีท่าพระ (CT) ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD) ไก่เหลืองหางขาว กบินทร์บุรี (LK) out group 2 กลุ่ม คือ ไก่เชิงพาณิชย์ (B1, B2) และนกปรอทหัวโขน (B3) ด้วยโปรแกรม NTSYSpC.....	38
4.3 ลักษณะประจำพันธุ์ของไก่พื้นเมืองเพศผู้ 4 สายพันธุ์ คือ ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD) ไก่เหลืองหางขาวกบินทร์บุรี (LK) ไก่ซีท่าพระ (CT) และไก่แดงสุราษฎร์ (DS) .....	42
4.4 การค้นหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างไก่พื้นเมือง สายพันธุ์ไก่แดงสุราษฎร์ (DS11) กับฐานข้อมูล NCBI .....	44
4.5 การค้นหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างไก่พื้นเมือง สายพันธุ์ไก่ซีท่าพระ(CT04) กับฐานข้อมูล NCBI.....	45
4.6 การค้นหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างไก่พื้นเมือง สายพันธุ์ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD11) กับฐานข้อมูล NCBI.....	46
4.7 การค้นหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างไก่พื้นเมือง สายพันธุ์ไก่เหลืองหางขาวกบินทร์บุรี (LK05) กับฐานข้อมูล NCBI .....	47

# สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะมาตรฐานไก่พื้นเมืองไทย 12 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่เหลืองหางขาว (ก) ไก่พระนเรศวร (ข) ไก่ประดู่หางดำ (ค) ไก่ประดู่เลาหางขาว (ง) ไก่เขียวเลาหางขาว (จ) ไก่เขียวหางดำ (ฉ) ไก่เทาหางขาว (ช) ไก่ทองแดงหางดำ (ซ) ไก่นกแดง (ฌ) ไก่นกกด (ญ) ไก่เลาหางขาว (ฎ) และไก่ซี (ฏ).....	8
2.2 ขั้นตอนการพัฒนา RAPD-SCAR marker.....	11
2.3 ตำแหน่ง single nucleotide polymorphism, SNP .....	13
3.1 ลักษณะของชนไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์ คือ ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD) ไก่เหลืองหางขาว กบินทร์บุรี (LK) ไก่ซีท่าพระ (CT) และไก่แดงสุราษฎร์ (DS) ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ.....	24
4.1 ความไวปฏิกิริยาของไพรเมอร์ที่ระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างต่างกัน โดยเลขที่ 1 ถึง 7 คือ ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ความเข้มข้น 100, 50, 40, 25, 20, 15 และ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส.....	29
4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของตัวอย่างโดยใช้ไพรเมอร์ RAPD (ก. OPA01-OPA05, ข. OPA06-OPA10, ค. OPA11-OPA15 และ ง. OPA15-OPA20).....	31
4.3 ไพรเมอร์ OPA01 ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์ คือ ไก่แดงสุราษฎร์ (DS) ไก่ซีท่าพระ (CT) ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD) ไก่เหลืองหางขาวกบินทร์บุรี (LK) out group 2 กลุ่ม คือ ไก่เชิงพาณิชย์ (B1, B2) และนกปรอทหัวโขน (B3) และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส.....	33
4.4 ไพรเมอร์ OPA01 ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์ คือ ไก่แดงสุราษฎร์ (DS) ไก่ซีท่าพระ (CT) ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD) ไก่เหลืองหางขาวกบินทร์บุรี (LK) out group 2 กลุ่ม คือ ไก่เชิงพาณิชย์ (B1, B2) และนกปรอทหัวโขน (B3) และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส.....	34
4.5 ไพรเมอร์ OPA16 ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์ คือ ไก่แดงสุราษฎร์ (DS) ไก่ซีท่าพระ (CT) ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD) ไก่เหลืองหางขาวกบินทร์บุรี (LK) out group 2 กลุ่ม คือ ไก่เชิงพาณิชย์ (B1, B2) และนกปรอทหัวโขน (B3) และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส.....	35

4.6	โปรแกรม OP18 ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์ คือ ไก่แดงสุราษฎร์ (DS) ไก่ชื้ท่าพระ (CT) ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD) ไก่เหลืองหางขาวกบินทร์บุรี (LK) out group 2 กลุ่ม คือ ไก่เชิงพาณิชย์ (B1, B2) และนกปรอทหัวโขน (B3) และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส.....	36
4.7	แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์ คือ ไก่แดงสุราษฎร์ (DS) ไก่ชื้ท่าพระ (CT) ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD) ไก่เหลืองหางขาวกบินทร์บุรี (LK) และ out group 2 กลุ่ม คือ ไก่เชิงพาณิชย์ (B1, B2) และนกปรอทหัวโขน (B3) ด้วยโปรแกรม NTSYSpc เลือกวิธีการจัดแบบ UPGMA.....	39
4.8	ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ประดู่หางดำเชียงใหม่ เพศผู้ (ชาย) และเพศเมีย (ขวา).....	40
4.9	ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวกบินทร์บุรี เพศผู้ (ชาย) และเพศเมีย (ขวา) .....	40
4.10	ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ชื้ท่าพระ เพศผู้ (ชาย) และเพศเมีย (ขวา).....	41
4.11	ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์แดงสุราษฎร์ เพศผู้ (ชาย) และเพศเมีย (ขวา).....	41
4.12	ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 1000 คู่เบส .....	43
4.13	แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์ คือ ไก่แดงสุราษฎร์ (DS), ไก่ชื้ท่าพระ(CT), ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD) และไก่เหลืองหางขาวกบินทร์บุรี (LK) โดยทำ Bootstrap 1000 และการจัดกลุ่มแบบ UPGMA ด้วยโปรแกรม MEGA7 .....	48
4.14	การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์ คือ ไก่แดงสุราษฎร์ (DS) ไก่ชื้ท่าพระ (CT) ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD) และไก่เหลืองหางขาวกบินทร์บุรี (LK) ด้วยโปรแกรม MEGA7 .....	49

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

ไก่พื้นเมืองหรือไก่บ้าน (*Gallus gallus domesticus*) มีต้นกำเนิดมาจากไก่ป่าสีแดงสายพันธุ์ต่างๆ (*Gallus gallus*) อาศัยอยู่ในเขตร้อนแถบทวีปเอเชีย โดยเฉพาะประเทศในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ไทย พม่า ลาว กัมพูชา เวียดนาม มาเลเซีย อินโดนีเซีย และจีนตอนใต้ ซึ่งมนุษย์ได้นำไก่พื้นเมืองมาเป็นสัตว์เลี้ยงเมื่อหลายพันปีก่อน วิวัฒนาการของไก่เป็นไปตามวิถีชีวิตของมนุษย์ และการคัดเลือกตามธรรมชาติ เมื่อเกิดโรคภัยจากธรรมชาติ หรือมีโรคระบาดที่รุนแรง ไก่พื้นเมืองตายลง ทำให้ไก่พื้นเมืองจำนวนที่เหลือรอดนี้จะขยายพันธุ์ และเพิ่มจำนวนต่อไปเป็นไก่พื้นเมืองสืบทอดมาให้ได้ใช้ประโยชน์จนถึงปัจจุบัน (กลุ่มวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพ สำนักพัฒนาพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์, 2558)

วิวัฒนาการของไก่พื้นเมืองมีการเปลี่ยนแปลง และปรับปรุงพันธุ์โดยอาศัยธรรมชาติเป็นหลัก มีเพียงบางส่วนเท่านั้นที่เกิดจากการกระทำของมนุษย์ ทำให้เกิดไก่พื้นเมืองหลากหลายสายพันธุ์ตามหมู่บ้านชนบททั่วทุกภาคของประเทศทั่วโลก โดยไก่พื้นเมืองในชนบทของประเทศไทยอาจแบ่งออกเป็น 5 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่ฮูหรือไก่ชน ไก่ดำ ไก่แจ้ ไก่ตะเภา และไก่เบตง (ปราโมทย์, 2551) ในการศึกษาครั้งนี้มุ่งศึกษาเฉพาะไก่ชน เพราะมีการเลี้ยงไก่ชนกระจายอยู่ทั่วไปตามหมู่บ้านเกษตรกรในทุกภูมิภาคของประเทศไทยนับเป็นสัตว์เศรษฐกิจระดับหมู่บ้าน และเป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่ดีของเกษตรกรไทย ปัจจุบันนักวิชาการ เกษตรกร และผู้ที่เกี่ยวข้องด้านการเลี้ยงสัตว์ของประเทศเริ่มตระหนักถึงความสำคัญของไก่พื้นเมืองมากขึ้น โดยเฉพาะไก่ชนทั้งในด้านการอนุรักษ์ด้านสุขภาพอนามัย และด้านเศรษฐกิจ และได้มีการศึกษาการจัดจำแนกสายพันธุ์ไก่พื้นเมืองจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) เป็นเกณฑ์ โดยเฉพาะสีขนที่แตกต่างกันในการจำแนกสายพันธุ์ไก่ ซึ่งในประเทศไทยได้มีการจัดจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไก่พื้นเมืองไว้ 12 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่เหลืองหางขาว ไก่พระนเรศวร ไก่ประดู่เลาหางขาว ไก่เขียวหางดำ ไก่ประดู่หางดำ ไก่เขียวเลาหางขาว ไก่เทาหางขาว ไก่ทองแดงหางดำ ไก่นกแดง ไก่นกกด ไก่ลายหางขาว และไก่ซี

จากสายพันธุ์ต่างๆที่กล่าวมาข้างต้น กรมปศุสัตว์ได้มีสำรวจในเชิงปริมาณ และคัดเลือกสายพันธุ์ให้เป็นไก่สายพันธุ์แท้ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มได้ 4 กลุ่ม คือ ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ ไก่เหลืองหางขาว กบินทร์บุรี ไก่แดงสุราษฎร์ และไก่ซีท่าพระ จากการศึกษาดังกล่าว ใช้ระยะเวลาในการคัดเลือกเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์ และอาจเกิดความคลาดเคลื่อนได้ เนื่องจากการจำแนกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีการผันแปรไปตามสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ และการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากลักษณะภายนอกได้ นอกจากนี้แล้วการเปรียบเทียบลักษณะภายนอก ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างของไก่พื้นเมืองบางชนิดที่มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมได้ (สสวท., 2011) ดังนั้นจึงมีการนำเครื่องหมายโมเลกุลมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม เพื่อแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ไก่พื้นเมืองที่มีความใกล้เคียงทางพันธุกรรม เช่น Random Amplified Polymorphic DNA; RAPD maker (Mohd Azmi *et al.*, 2000), Amplified Fragment Length Polymorphism; AFLP marker (De Marchi *et al.*, 2006) Single Nucleotide Polymorphism; SNP marker (Riztyan *et al.*, 2014) และ Microsatellite หรือ Simple Sequence Repeat; SSR marker (Ceccobelli *et al.*, 2015) จากการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าว เพื่อใช้ประกอบกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาให้มีความถูกต้อง และแม่นยำมากขึ้น

งานวิจัยครั้งนี้ได้วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในไก่พื้นเมืองด้วยเครื่องหมาย RAPD ซึ่งเป็นเครื่องหมายที่มีการสุ่มทั้งจีโนม และเป็นหนึ่งในเครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker) ที่มีการพิสูจน์แล้วว่าสามารถใช้เป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม การจำแนกสายพันธุ์สามารถทำได้รวดเร็ว ใช้เครื่องมือ และวิธีการไม่ยุ่งยากรวมทั้งค่าใช้จ่ายไม่แพงเมื่อเทียบกับวิธีอื่นๆ (จรัสศรี และวิจิตต์, 2558) แต่มีข้อจำกัดคือให้ผลลัพธ์ไม่สม่ำเสมอ และยากที่จะตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการปนเปื้อน ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเครื่องหมาย RAPD ให้มีลำดับเบสที่มีความจำเพาะกับสายพันธุ์มากขึ้นด้วยเครื่องหมายทางโมเลกุล (เฉลิมชัย, 2546; ศุภมิตร, 2555) ให้ผลที่มีความแม่นยำมากกว่าผลของเครื่องหมาย RAPD ทั้งยังมีความคงที่สม่ำเสมอ และสามารถตรวจสอบได้เมื่อทำการทดลองซ้ำ (วัลย์ลักษณ์, 2554)

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์ โดยเครื่องหมายโมเลกุล RAPD
- 2) เพื่อเป็นข้อมูลในการอนุรักษ์พันธุกรรม จัดจำแนก และปรับปรุงไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์แท้ ให้ได้ใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต
- 3) เพื่อนำข้อมูลจากเครื่องหมาย RAPD ไปประยุกต์ใช้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลประจำสายพันธุ์ของไก่พื้นเมืองทั้ง 4 สายพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาความสัมพันธ์ของโกพื้นเมืองไทยสายพันธุ์แท้ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์โกประตูทางดำเชียงใหม่ โกเหลืองหางขาวกบินทร์บุรี โกสีท่าพระ และโกแดงสุราษฎร์ สายพันธุ์ละ 15 ตัวอย่าง จำนวนรวม 60 ตัวอย่าง out group จำนวน 3 ตัวอย่าง ได้แก่ โกเนื้อ 2 ตัวอย่าง และนกปรอทหัวโขน 1 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมาย RAPD และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของโกพื้นเมืองไทยสายพันธุ์แท้ภายในสายพันธุ์เดียวกัน และระหว่างสายพันธุ์ได้เป็นแผนภูมิความสัมพันธ์ โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc และนำข้อมูลจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลประจำสายพันธุ์

### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ทราบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของโกพื้นเมืองไทยในแต่ละสายพันธุ์
- 2) ทราบข้อมูลสำหรับนำไปประยุกต์ใช้ในการคัดสรรพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ที่มีรูปร่างลักษณะสวยงามเพื่อเป็นการอนุรักษ์ และพัฒนาสายพันธุ์
- 3) ทราบข้อมูลจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโกพื้นเมือง และนำไปพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลประจำสายพันธุ์

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

### 2.1 ไก่พื้นเมืองไทย

ไก่พื้นเมืองมีการเลี้ยงในสังคมไทยมาเป็นเวลานาน เกษตรกรไทยในชนบทได้นำไก่พื้นเมืองมาเลี้ยงเกือบทุกครัวเรือน เพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงชีวิต เพื่อความสวยงาม เพื่อความสนุกสนาน และเกมกีฬา ซึ่งไก่พื้นเมืองส่วนใหญ่นำมาเล่นเกมกีฬาตั้งแต่สมัยกรุงศรีอยุธยา โดยสมเด็จพระนเรศวรมหาราชทรงนำไก่เหลืองหางขาวจากพิษณุโลกไปชนกับไก่ของพระมหาอุปราชาและยังมีสายพันธุ์ไก่ชนพระนเรศวร ไก่ประดู่หางดำ ไก่เขียวหางดำ และสายพันธุ์อื่นๆ เกิดขึ้นมากมายในยุคสมัยนั้น และยังคงอยู่มาจนถึงปัจจุบันนี้ เพราะชาวพิษณุโลกได้มีการอนุรักษ์ และพัฒนาสายพันธุ์ไก่เหลืองหางขาวมาโดยตลอด ทำให้ไก่เหลืองหางขาวเป็นที่รู้จักในวงการไก่ชนเป็นอย่างดี

ไก่ชนจึงมีบทบาทสำคัญต่อคนไทย เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ดีหลายประการ เช่น มีความสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมเป็นอย่างดี แข็งแรง ทนทานต่อโรคระบาด ฟ้าผ่า และเลี้ยงลูกเองได้ตามธรรมชาติ และมีความสามารถในการต่อสู้ จึงเป็นเหตุผลให้ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ไก่ชนมีความโดดเด่นมากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ในการเลี้ยงไก่พื้นเมืองในประเทศไทยทั้งเกษตรกร นักอนุรักษ์ หน่วยงานต่างๆ ทั้งภาครัฐ และเอกชน เช่น กรมปศุสัตว์ มหาวิทยาลัย และสถาบันเทคโนโลยีได้ให้ความสนใจในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับไก่พื้นเมือง เพื่อพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ และอนุรักษ์พันธุ์กรรมที่ดีของไก่พื้นเมืองไทยให้สามารถใช้ประโยชน์ได้สูงสุด และยั่งยืนต่อไป

จากการศึกษาของกรมปศุสัตว์ โดยกองบำรุงพันธุ์สัตว์ได้เริ่มโครงการศึกษา และวิจัยไก่พื้นเมืองในปี พ.ศ.2533 ได้รวบรวมไก่พื้นเมืองจากหมู่บ้านในชนบทของภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ เป็นสายพันธุ์ที่มีเลือดไก่ชนเป็นส่วนใหญ่ ไม่จำกัดเฉพาะไก่ที่ชนเก่งเท่านั้น เพียงแต่คัดเลือกพ่อพันธุ์ และแม่พันธุ์ที่มีขนาดใหญ่ สามารถจำแนกได้เป็นสายพันธุ์ไก่เหลืองหางขาว ประดู่หางดำ เขียวไขก่า เหลืองเลา ประดู่เลา ประดู่แดง และคละสี ซึ่งสายพันธุ์เหล่านี้มีกระจายอยู่ในหมู่บ้านต่างๆ ทั่วประเทศ สำหรับไก่พื้นเมืองทางภาคใต้ที่ประชาชนนิยมเลี้ยงกันแพร่หลาย ได้แก่ ไก่พันธุ์เบตง สามารถเลี้ยงได้ดีในภาคใต้ที่มีความชื้นสูง (สวัสดี และวนิดา, 2542) ในการศึกษาวิจัยของไก่พื้นเมืองในด้านต่างๆ จะต้องตระหนักถึงความสำคัญของความหลากหลายทางชีวภาพให้ดำรงอยู่ เพื่อประโยชน์ของมนุษย์ทั้งในปัจจุบัน และอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.1.1 ความสำคัญในการเลี้ยงไก่พื้นเมือง

ไก่พื้นเมืองเป็นสัตว์เลี้ยงที่มีความสำคัญอย่างหนึ่ง เนื่องจากประชาชนนิยมรับประทานกันอย่างแพร่หลาย และยังมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ จากข้อมูลของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ พบว่าประเทศไทยมีเกษตรกรผู้เลี้ยงไก่พื้นเมืองกว่า 2.36 ล้านครัวเรือน และมีไก่พื้นเมืองไม่น้อยกว่า 72.5 ล้านตัว ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้น และราคาซื้อขายของไก่พื้นเมืองจะสูงกว่าไก่เนื้อ หากระบบการผลิตมีมาตรฐานจะทำให้มีโอกาสในการเข้าสู่ตลาด และมีช่องทางจำหน่ายทั้งใน และต่างประเทศเพิ่มมากขึ้น (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2560) และยังมี การนำไก่พื้นเมืองไปเลี้ยงเพื่อการกีฬา เช่น ไก่ชน เนื่องจากพฤติกรรมค่อนข้างก้าวร้าว และยังเป็นสัตว์พื้นเมืองพันธุ์ที่ยังหลงเหลืออยู่เป็นจำนวนมากตามหมู่บ้านของเกษตรกรไทย เมื่อเทียบกับ สัตว์เลี้ยงชนิดอื่น ๆ ไก่พื้นเมืองยังเป็นสัตว์เลี้ยงที่เลี้ยงได้ง่าย ใช้วัตถุดิบจากธรรมชาติเป็นหลักในการเลี้ยง หรือเลี้ยงแบบปล่อยให้ไก่พื้นเมืองหากินเองตามธรรมชาติ นอกจากนี้ยังมีความต้านทานต่อโรคและความร้อนอีกด้วย

ปัจจุบันนักวิจัยได้เห็นถึงความสำคัญของไก่พื้นเมืองกันมากขึ้น และได้มีการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีต่างๆ ขึ้นมา เพื่อที่จะรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรม อนุรักษ์พันธุ์ไก่พื้นเมือง อนุรักษ์ลักษณะที่ดีต่างๆของไก่พื้นเมืองเอาไว้ เนื่องจากไก่พันธุ์ต่างกันก็มีความสมบูรณ์พันธุ์ที่ต่างกันเพราะมีการดำรงชีพต่างกัน ดังนั้นความสมบูรณ์ของพันธุ์ที่ดีก็จะแตกต่างกันไป

### 2.1.2 ลักษณะและการจำแนกไก่พื้นเมือง

ไก่พื้นเมือง หรือไก่บ้านในปัจจุบัน รวมทั้งไก่ที่เลี้ยงเป็นไก่การค้า ไก่เนื้อ ไก่ไข่ มีการปรับปรุงพันธุ์มาจากไก่ป่าสีแดง (Red jungle fowl) ทั้งสิ้น โดยอนุกรมวิธานของไก่ (ประภากร, 2560) แสดงดังนี้

Class : Aves

Order : Galliformese

Family : Phasianidae

Genus : *Gallus*

Species : *gallus*

*Gallus gallus* ; Red Jungle Fowl

*Gallus gallus domesticus* ; ไก่พื้นเมือง (Domestic fowl)

ไก่เนื้อ (Broiler) ไก่ไข่ (Layer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และสามารถพบไก่ป่าสีแดงในประเทศไทย อินเดีย พม่า อินโดนีเซีย ซึ่งมี 2 ชนิดย่อย คือ สายพันธุ์ไก่ป่าตุ้มหูขาว พบในภาคอีสานและภาคตะวันออก และไก่ป่าตุ้มหูแดง พบในเขตภาคเหนือ (Riztyan *et al.*, 2014; สัตว์เศรษฐกิจ, 2541; เกรียงไกร และคณะ, 2543) และจากหลักฐานทางโบราณคดี เชื่อว่ามนุษย์นำไก่มาเลี้ยงครั้งแรกในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และแถบชายฝั่งทะเลเมดิเตอร์เรเนียน (Riztyan *et al.*, 2014; Ceccobelli *et al.*, 2015)

สายพันธุ์ไก่พื้นเมืองไทย ได้แก่ พันธุ์ไก่คู ไก่ตะเภ่า ไก่แจ้(ไทย) ไก่กลายพันธุ์ และไก่ดำ จากการสำรวจพบว่าไก่ชนมีการผสมพันธุ์ และคัดเลือกพันธุ์อย่างเข้มงวดคาดว่ามีอยู่ประมาณ 91 เปอร์เซ็นต์ ของไก่พื้นเมืองทั้งหมดที่เหลืออีกประมาณ 9 เปอร์เซ็นต์ เป็นไก่แจ้ ส่วนไก่ตะเภ่า และไก่กลายพันธุ์ พบว่ามีน้อยมาก (บัญญัติ, 2525) และจากการศึกษาของกรมปศุสัตว์ได้จัดทำโครงการวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพด้านปศุสัตว์ (กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์, 2546) มีการรวบรวมลักษณะมาตรฐานไก่พื้นเมืองไทยเพียงส่วนหนึ่งได้ 12 สายพันธุ์ แสดงดังรูปที่ 2.1 โดยมีการจำแนกจากสีของไก่พื้นเมือง และลักษณะทั่วไปของไก่ เช่น เพศผู้มีลักษณะรูปทรงสูง คล่องแคล่ว ว่องไว มีหงอนเป็นหงอนแก้ว สีหน้าแดงถึงแดงอมดำ สีตาเหลืองอมน้ำตาลถึงน้ำตาลอมดำ สีปากสีขนลำตัวสีขนหางเป็นสีดำ สีขนคอ-หลังสีแดงประดู่ สีผิวหนังเหลืองอ่อน และสีแข้งเขียวอมดำถึงดำ ส่วนในเพศเมีย หงอนเป็นหงอนแก้ว สีใบหน้าแดงถึงดำ สีตาเหลืองอมน้ำตาลถึงดำ สีปากสีขนคอสีขนลำตัวสีขนหางเป็นสีดำ สีผิวหนังเหลืองอ่อน สีแข้งเขียวอมดำถึงดำ จะเห็นได้ว่าไก่พื้นเมืองไทยไม่ได้มีการจำแนกสายพันธุ์อย่างชัดเจนทั้งแง่ของลักษณะที่ปรากฏ (Phenotype) และในระดับพันธุกรรม (Genotype) โดยเฉพาะชื่อพันธุ์ที่เรียกในปัจจุบันสายพันธุ์ไก่พื้นเมืองเกิดจากผู้เลี้ยงไก่ในชนบทมีการผสมพันธุ์ คัดเลือกสายพันธุ์ และตั้งชื่อต่างๆกันไปตามสีของไก่พื้นเมืองเป็นส่วนใหญ่ (เกรียงไกร และคณะ, 2543) แต่เมื่อสำรวจในเชิงปริมาณ พบว่าที่มีจำนวนเป็นกลุ่มมีอยู่ 4 กลุ่ม คือ เหลืองหางขาว ประดู่หางดำ แดง และซี กลุ่มเหล่านี้ยังไม่สามารถระบุได้แน่นอนว่าเป็นพันธุ์ (breed) หรือสายพันธุ์ (strains) หรือตระกูล (family name) เพราะว่ายังไม่ได้รับการจำแนกอย่างมีหลักวิชาการที่ชัดเจนเพียงพอ ดังนั้นกลุ่มนักวิชาการจากกรมปศุสัตว์โดยการสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ร่วมกับกรมปศุสัตว์ จึงดำเนินการรวบรวมไก่พื้นเมืองในกลุ่มที่สำคัญๆ เหล่านี้ เพื่อสร้างเป็นฝูงพื้นฐานขึ้น 4 ฝูง โดยมีข้อสันนิษฐานเบื้องต้นว่าเป็นตัวแทนของไก่พื้นเมือง 4 พันธุ์ และคาดหวังว่าจะได้หลักฐานและข้อมูลเพียงพอที่จะจดทะเบียนในฐานะที่เป็นพันธุ์ (breed) จึงเป็นที่มาของการสร้างไก่พื้นเมืองสายพันธุ์แท้จำนวน 4 สาย คือ ไก่ประดู่หางดำ เชียงใหม่ ไก่เหลืองหางขาวกบินทร์บุรี ไก่แดงสุราษฎร์ และไก่ซีท่าพระ (อุดมศรี และคณะ, 2550; เอกสารนี้ อำนวย, 2555) ซึ่งมีลักษณะประจำพันธุ์ดังต่อไปนี้

เท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2.1 ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (Pradu-Hangdam Chiangmai) โดยมีลักษณะภายนอกดังนี้ เพศผู้มีสร้อยคอ-หลังสีแดงประดู่ ขนหางขนลำตัวแข็งปากสีดำ ใบหน้าสีแดง ตาสีเหลืองอมน้ำตาล ผิวหนังสีขาวอมเหลือง หงอนถั่ว ส่วนเพศเมียมีลักษณะเหมือนเพศผู้ ยกเว้นที่ไม่มีขนสร้อยคอ-หลัง และใบหน้าสีแดงอมดำ และลักษณะทางเศรษฐกิจ เมื่อเลี้ยงในระบบฟาร์ม อายุ 12 สัปดาห์ น้ำหนักตัวเพศผู้  $1,394 \pm 120$  กรัม เพศเมีย  $1,104 \pm 100$  กรัม อายุเมื่อให้ไข่ฟองแรก  $188 \pm 17$  วัน ผลผลิตไข่  $147 \pm 34$  ฟอง/แม่/ปี อัตราการตาย (Mortality) 1.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงในหมู่บ้าน อายุเมื่อให้ไข่ฟองแรก  $225 \pm 23$  วัน ให้ไข่  $42 \pm 16$  ฟอง/แม่/ปี ให้ลูกไก่  $29 \pm 14$  ตัว/แม่/ปี ซึ่งข้อดีของไก่พันธุ์แท้ (Pure breed) ขนลำตัว ปาก แข็ง สีดำ เมื่อเลี้ยงในระบบฟาร์มมีน้ำหนักตัวสูงกว่าไก่พื้นเมืองทั่วไป 33-36 เปอร์เซ็นต์ ให้ไข่มากกว่าไก่พื้นเมืองทั่วไป 40 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเลี้ยงในหมู่บ้านให้ลูกไก่อมากกว่าไก่พื้นเมืองทั่วไป 32 เปอร์เซ็นต์

2.1.2.2 ไก่เหลืองหางขาวบินทร์บุรี (Lueng-Hangkao Kabinburi) โดยมีลักษณะภายนอกดังนี้ เพศผู้มีสร้อยคอ สร้อยหลัง และสร้อยปีกสีเหลืองหรือเหลืองส้ม ขนลำตัวสีดำแซมกระขาว ขนหางสีดำแซมขาว ใบหน้าสีแดง หงอนถั่ว แข็งและปากสีเหลือง ในส่วนของเพศเมียมีปากเหลือง แข็งเหลือง ขนลำตัวดำ มีกระขาวเล็กน้อย และมีลักษณะทางเศรษฐกิจ น้ำหนักตัวเพศผู้  $1,252 \pm 159$  กรัม เพศเมีย  $1,101 \pm 122$  กรัม อัตราการตาย (Mortality) 1.2 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตไข่  $111 \pm 30$  ฟอง/แม่/ปี ซึ่งข้อดีของไก่พันธุ์แท้เป็นไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์ที่มีชื่อเสียงที่สุด แข็งสีเหลือง ปากเหลือง โดดและไข่ดกกว่าไก่พื้นเมืองทั่วไป

2.1.2.3 ไก่แดงสุราษฎร์ (Dang Surat) โดยมีลักษณะภายนอกดังนี้ เพศผู้มีสร้อยคอ สีแดง ขนหางสีแดงดำ ขนลำตัวสีแดงแข็ง ปาก สีเหลือง ใบหน้าสีแดง หงอนถั่ว เพศเมียมีลักษณะเหมือนเพศผู้ ยกเว้นไม่มีขนสร้อยคอและมีขนหางสีแดง และมีลักษณะทางเศรษฐกิจ น้ำหนักตัวเพศผู้  $1,238 \pm 155$  กรัม เพศเมีย  $964 \pm 107$  กรัม อัตราการตาย (Mortality) 2.5 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตไข่  $114 \pm 33$  ฟอง/แม่/ปี ซึ่งข้อดีของไก่พันธุ์แท้ มีสีขนที่เหมาะสมกับภาคใต้ของประเทศไทย แข็ง ปากเหลือง สีเหลือง โดดและไข่ดกกว่าไก่พื้นเมืองทั่วไป

2.1.2.4 ไก่ชีท่าพระ (Chee Thapra) โดยลักษณะภายนอก เพศผู้ มีสร้อยคอสีขาวหรือสีงาช้าง ขนหาง ขนลำตัวสีขาว แข็ง ปาก สีเหลือง ใบหน้าสีแดง หงอนถั่ว เพศเมีย ลักษณะเหมือนเพศผู้ยกเว้นที่ไม่มีขนสร้อยคอ และมีลักษณะทางเศรษฐกิจ น้ำหนักตัวเพศผู้  $1,271 \pm 148$  กรัม เพศเมีย  $1,019 \pm 125$  กรัม อัตราการตาย (Mortality) 2.5 เปอร์เซ็นต์ ผลผลิตไข่  $116 \pm 45$  ฟอง/แม่/ปี ซึ่งข้อดีของไก่พันธุ์แท้ ขนลำตัวสีขาว แข็งสีเหลือง ปากเหลือง ไม่มีปัญหาเรื่องขนหลุดเมื่อฆ่าทางพาณิชย์ โดด และไข่ดกกว่าไก่พื้นเมืองทั่วไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 ลักษณะมาตรฐานไก่พื้นเมืองไทย 12 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่เหลืองหางขาว (ก) ไก่พระนเรศวร (ข) ไก่ประดู่หางดำ (ค) ไก่ประดู่เลาหางขาว (ง) ไก่เขียวเลาหางขาว (จ) ไก่เขียวหางดำ (ฉ) ไก่เทาหางขาว (ช) ไก่ทองแดงหางดำ (ซ) ไก่ขนแดง (ฅ) ไก่ขนกต (ญ) ไก่เลาหางขาว (ฎ) และไก่ซี (ฏ)

หมายเหตุ: หมายเลข 1 แทน เพศผู้ และหมายเลข 2 แทน เพศเมีย

ที่มา: กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ (2546)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2 ลักษณะจีโนมของไก่

ปัจจุบันการใช้เทคโนโลยีทำให้ทราบได้ว่าจีโนมของไก่ประกอบด้วย โครโมโซม 39 คู่ ( 78 แห่ง) เป็นโครโมโซมร่างกาย 38 คู่ โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ โครโมโซมขนาดใหญ่ (macrochromosome) จำนวน 8 คู่ และโครโมโซมขนาดเล็ก (microchromosome) จำนวน 30 คู่ อีก 1 คู่ เป็นโครโมโซมเพศ (sex chromosome) ซึ่งในไก่เพศผู้จะมีโครโมโซม ZZ ส่วนเพศเมียจะเป็นโครโมโซม ZW (Bitgood and Shoffner, 1990; Smith and Burt, 1998) เมื่อเปรียบเทียบขนาดจีโนมของไก่กับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม พบว่าจีโนมของไก่มีขนาดเล็กกว่าจีโนมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Levin, 1980) ขนาดของจีโนมที่แตกต่างกันจะมีอิทธิพลต่อความถี่ และจำนวนซ้ำของไมโครแซทเทลไลท์ (Moran, 1993)

## 2.3 การใช้เทคนิคทางโมเลกุลในการศึกษาความหลากหลายของไก่พื้นเมือง

ไก่พื้นเมืองมีการศึกษาทางด้านความหลากหลายโดยใช้เทคนิคทางโมเลกุลมากที่สุดในกลุ่มของสัตว์ปีก งานวิจัยทางด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมในสัตว์ปีก ปัจจุบันพบว่าใช้วิธีการประเมินความหลากหลายจากข้อมูลทางอนุพันธุศาสตร์ โดยมีทั้งการศึกษาจากไมโครแซทเทลไลท์ ซึ่งเป็นบริเวณที่พบลำดับเบสซ้ำๆ (high repetitive sequence) ที่กระจายอยู่ทั่วจีโนม การใช้เครื่องหมาย RAPD และ การศึกษาความหลากหลายของยีนจำเพาะ (specific gene) เป็นต้น โดยส่วนใหญ่การใช้เทคนิคทางโมเลกุลเน้นการค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรม (Genetic markers) หรือศึกษาตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น การให้ผลผลิตไข่ พฤติกรรมการฟัก และลักษณะคุณภาพของเนื้อนุ่ม เป็นต้น

จากการรายงานของ ศุภมิตร (2552) ได้ศึกษาการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ เพื่อหาโปรตีนบ่งชี้คุณภาพเนื้อของไก่ไทยพันธุ์พื้นเมือง และไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า พบเครื่องหมายโมเลกุลโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความนุ่มของเนื้อไก่จำนวน 5 เครื่องหมาย และพบเครื่องหมายโมเลกุลโปรตีนที่มีระดับการเปลี่ยนแปลงสัมพันธ์กับอายุของไก่ มีจำนวน 8 เครื่องหมาย ซึ่งเป็นการบ่งชี้ถึงความสำคัญของเอนไซม์ในกระบวนการไกลโคไลซิสในเซลล์กล้ามเนื้อ อาจจะใช้เป็นเครื่องหมายทางโมเลกุล สำหรับบ่งชี้ลักษณะเนื้อนุ่มในไก่ไทยพันธุ์ลูกผสมได้ และจากการรายงานของ กิรติ (2552) ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ และการแสดงออกในเนื้อเยื่อของฮอร์โมนเลปติน และตัวรับในไก่พื้นเมืองไทย (*Gallus gallus domesticus*) ด้วยวิธี RT-PCR พบว่าการแสดงออกของยีนตัวรับของฮอร์โมนเลปตินชนิดยาวของไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวพบได้ในเนื้อเยื่อ

ที่ใช้ในการศึกษาและจากการพบตัวรับของฮอร์โมนเลปตินในเนื้อเยื่อต่างๆ แสดงให้เห็นถึงหน้าที่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทางสรีรวิทยาที่หลากหลายของฮอโมนเลปติน แม้ว่าปัจจุบันไม่มีหลักฐานที่ชัดเจนของหน้าที่ของฮอโมนดังกล่าวในสัตว์ปีก แต่อาจมีความเป็นไปได้ที่จะมีหน้าที่ใกล้เคียงกันกับที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม

นอกจากนี้ เทคนิคทางด้านลายพิมพ์ดีเอ็นเอยังนิยมนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายจากยีนที่เกี่ยวข้องโดยตรง พบว่าสามารถนำมาใช้ศึกษาวิจัยทางด้านความหลากหลายทางพันธุกรรม และการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลอีกมาก เช่น SNP (single nucleotide polymorphism) และ EST (expression sequence tag) เป็นต้น ซึ่งจากการรายงานของ Wong *et al.* (2004) ได้ศึกษาแผนที่ยีนการแปรผันทางพันธุกรรมของไก่ 3 สายพันธุ์ โดยใช้ตำแหน่ง SNP 2.8 ล้านตำแหน่ง พบว่าไก่ทางการค้าพบมากที่สุด รองลงมาไก่ตอน และน้อยที่สุดในไก่ซิลค์กี้ เมื่อนำทั้ง 3 สายพันธุ์มาหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการกับไก่ป่า พบว่าไก่ทางการค้ามีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด ไก่ตอน และไก่ซิลค์กี้ ตามลำดับ และจากการรายงานของ Smith *et al.* (2001) ได้ศึกษาจีโนมของไก่ไวท์เล็กฮอร์นขณะที่อายุของเอมบริโอ 10 วันด้วยเทคนิค EST พบว่ามีความสามารถในการวิเคราะห์ตำแหน่งของ SNP ได้สูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับฐานข้อมูลแผนที่จีโนมของไก่ และสามารถชี้ 37 ไพรเมอร์ในการระบุตำแหน่ง SNP ในไก่ได้ จากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าการใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมมีความเฉพาะเจาะจง สามารถนำมาใช้แยกความแตกต่างทางพันธุกรรม และสามารถถ่ายทอดลักษณะนั้นๆ ไปยังรุ่นลูกได้ และเป็นเครื่องมือที่มีความแม่นยำในการคัดเลือกเพราะเป็นการคัดเลือกจากจีโนไทป์ (genotype) โดยตรง (Beuzen *et al.*, 2000) โดยเทคนิคทางโมเลกุลที่นำมาใช้มีข้อดีข้อเสียแตกต่างกันไป ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้ได้นำเครื่องหมาย RAPD มาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมือง และพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลประจำสายพันธุ์

### 2.3.1 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Marker

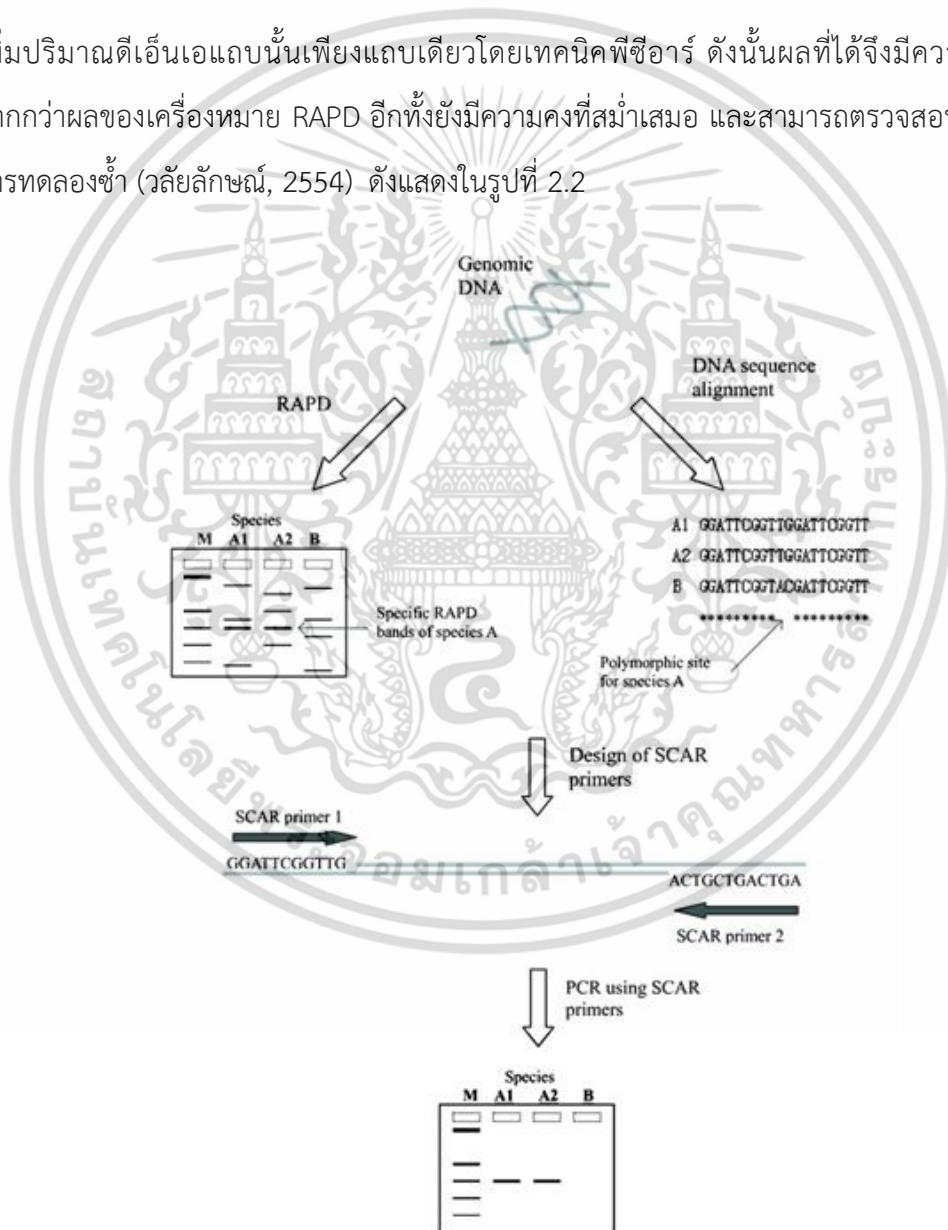
เครื่องหมาย RAPD เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ที่มีความยาวไม่เกิน 10 คู่เบส ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ใช้อุณหภูมิในขั้นตอนแอนนีลิ่งค่อนข้างต่ำ ซึ่งไพรเมอร์สามารถจับกับดีเอ็นเออย่างสุ่มทั่วทั้งจีโนม และผลิตภัณฑ์พีซีอาร์มีจำนวนมาก และมีขนาดความยาวแตกต่างกัน สามารถแยกขนาดของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส เครื่องหมาย RAPD สามารถทำได้ง่าย และมีราคาถูก ไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลลำดับดีเอ็นเอมาก่อน แต่มีข้อจำกัด คือ ให้ผลลัพธ์ไม่สม่ำเสมอ และยากที่จะตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากการปนเปื้อน ดังนั้นจึงมีการพัฒนาเครื่องหมาย RAPD ให้มีลำดับเบสที่มีความจำเพาะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับสายพันธุ์มากขึ้นด้วยเครื่องหมาย Sequenced Characterized Amplified Region (SCAR) ดังแสดงในรูปที่ 2.2 (เฉลิมชัย, 2546; ศุภมิตร, 2555) และการใช้ตำแหน่ง SNP เพื่อใช้ในการระบุสายพันธุ์ของไก่พื้นเมืองไทย

### 2.3.2 Sequenced Characterized Amplified Region (SCAR) Marker

เครื่องหมาย SCAR ใช้ตรวจสอบความผันแปรของแถบดีเอ็นเอที่ประยุกต์มาจากเครื่องหมาย RAPD หรือเทคนิคอื่นที่เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มหลายตำแหน่ง โดยการโคลนและหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของแถบดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษา เพื่อออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะสำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแถบนั้นเพียงแถบเดียวโดยเทคนิคพีซีอาร์ ดังนั้นผลที่ได้จึงมีความแม่นยำมากกว่าผลของเครื่องหมาย RAPD อีกทั้งยังมีความคงที่สม่ำเสมอ และสามารถตรวจสอบได้เมื่อทำการทดลองซ้ำ (วลัยลักษณ์, 2554) ดังแสดงในรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 ขั้นตอนการพัฒนา RAPD-SCAR marker

ที่มา: <http://www.cmjournal.orgcontent4121figureF3highres=y> (สืบค้นวันที่ 23/12/2558)  
 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับวิชาการใช้ในเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตเห็นไปใช้ประโยชน์อื่นการค่า  
 ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2.1 การโคลนยีน (Gene Cloning) หรือเทคโนโลยีการสร้างดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA technology) คือ การตัดต่อชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากโครโมโซม หรือยีนของสิ่งมีชีวิตใดๆ มาต่อกับดีเอ็นเอพาหะ (cloning vector) ในหลอดทดลอง โดยที่ดีเอ็นเอพาหะนี้ คือ โมเลกุลของดีเอ็นเอ ซึ่งมีความสามารถที่จะแบ่งตัวได้ (replicate) เมื่ออยู่ในเซลล์เจ้าบ้าน (host cell) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่นำมาเชื่อมต่อกับชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเข้ากับดีเอ็นเอพาหะนี้ ทำให้ได้ดีเอ็นเอสายผสมเกิดขึ้น และโมเลกุลของดีเอ็นเอสายผสมจะถูกนำเข้าไปเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งอาจเป็น *E. coli* (*Escherichia coli*) ยีสต์ เซลล์สัตว์หรือเซลล์พืช เมื่อมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เจ้าบ้านก็จะเป็นผลทำให้เกิดการแบ่งตัว (replicate) ของดีเอ็นเอสายผสมที่ถูกนำเข้าไปในเซลล์เจ้าบ้านนั้น เป็นผลให้มีการเพิ่มจำนวนของส่วนของดีเอ็นเอที่นำมาต่อกับดีเอ็นเอพาหะนั้นด้วย ทำให้เราสามารถที่จะศึกษาส่วนของดีเอ็นเอนั้นๆ ได้

2.3.2.3 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA nucleotide sequencing) ในการศึกษา ลำดับเบสของสายดีเอ็นเอในสิ่งมีชีวิตมีความสำคัญ และเป็นประโยชน์มาก เช่น ทำให้รู้ว่าลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด เพื่อที่จะเปรียบเทียบลำดับของเบสของดีเอ็นเอสายนั้นในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันและต่างชนิดกันได้ เป็นต้น

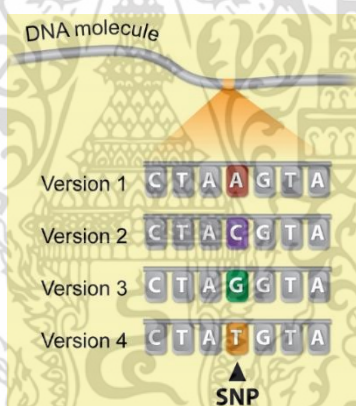
เทคนิคในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์มีการพัฒนาขึ้นตั้งแต่ปี 1970 โดยมี 2 วิธี ด้วยกัน คือ วิธีที่หนึ่งพัฒนาขึ้นโดย Allan Maxam และ Walter Gilbert โดยใช้สารเคมีตัดสายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งต่างๆ กัน วิธีนี้เรียกว่า Maxam-Gilbert sequencing ส่วนอีกวิธีหนึ่งนั้นเรียกว่า dideoxy sequencing หรือ Sanger sequencing ซึ่งพัฒนาขึ้นมาโดย Fred Sanger โดยวิธีการใช้ enzyme มาต่อสายดีเอ็นเอจากไพรเมอร์ ในปัจจุบันวิธี dideoxy เป็นวิธีที่นิยมใช้มากที่สุด วิธีการหาลำดับเบสนั้นได้รับการพัฒนาตลอด จนปัจจุบันนี้สามารถทำได้ง่าย และไม่ซับซ้อนยุ่งยากนัก การหาลำดับเบสนี้เป็นประโยชน์อย่างมากในการศึกษายีนต่างๆ ทั้งในคน สัตว์ และพืช โดยในคน human genome project เป็นโครงการที่จะศึกษาลำดับเบสทั้งหมดของคน ซึ่งได้เริ่มและดำเนินการติดต่อกันมาหลายปีแล้ว

ดังนั้นการตรวจพิสูจน์พันธุกรรมเพื่อระบุชนิดพันธุ์ของสัตว์จำเป็นต้องใช้เครื่องหมายพันธุกรรมที่มีความผันแปรทางพันธุกรรมที่มากเพียงพอที่จะใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างชนิดพันธุ์ภายในสกุล หรือชนิดพันธุ์ย่อยในชนิดพันธุ์นั้นๆ ได้ เป็นการใช้เทคนิควิธีการทางชีวโมเลกุลที่ใช้เป็นหลัก และเป็นที่ยอมรับในการตรวจพิสูจน์เพื่อระบุชนิดพันธุ์นี้ คือ “การหาลำดับนิวคลีโอไทด์” ซึ่งจำเป็นต้องใช้การเปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลพันธุกรรมสากลในการอ้างอิง โดยมีการเอกสารนี้ทดสอบเพื่อบอกระดับค่าความคล้ายคลึง (Similarity value) ฐานข้อมูลพันธุกรรมสากลที่เป็นที่รู้จัก ไม่ว่าจะเป็นกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และนิยมใช้กันมาก ได้แก่ ฐานข้อมูล NCBI, EMBL และ DDBJ เป็นต้น นอกจากนี้ ยังมีเทคนิควิธีการที่ใช้จำแนกชนิดพันธุ์ด้วยการสังเกตตำแหน่งจำเพาะบนลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่มีความแตกต่างกันเพียง 1 คู่เบส ที่เรียกว่า สนิปส์ (SNPs; Single Nucleotide Polymorphisms) (กณิตา, 2560)

### 2.3.3 Single nucleotide polymorphism (SNP) Marker

สนิปส์ (single nucleotide polymorphism, SNP หรือ snip) คือ ความแตกต่างของเบสเพียงตำแหน่งเดียวภายในยีนบนจีโนมของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด (Lohmann *et al.*, 2000; Genome News Network (GNN), 2017) ดังแสดงในรูปที่ 2.3 ซึ่งมีประโยชน์ในการตรวจสอบความแตกต่างระหว่างชนิดพันธุ์ภายในกลุ่มชนิดพันธุ์ที่กำหนด (Species detection) ด้วยประโยชน์ของวิธีการดังกล่าว ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิควิธีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) มาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคนิค SNP genotyping โดยการใช้คู่ไพรเมอร์จำเพาะ (Species-specific PCR primers) ที่ออกแบบให้เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ในช่วงที่เป็นตำแหน่งสนิปส์ของชนิดพันธุ์สัตว์กลุ่มเป้าหมาย (กณิตา, 2560)



รูปที่ 2.3 ตำแหน่ง single nucleotide polymorphism, SNP

ที่มา: <http://learn.genetics.utah.edu/content/precision/snips/> (สืบค้นวันที่ 15/07/2017)

## 2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยทางด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมในสัตว์ปีก พบว่าปัจจุบันเน้นการศึกษาทางด้านการใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ โดยการใช้เทคนิคการเพิ่มขึ้นดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ บริเวณไมโครแซทเทลไลท์ เป็นเทคนิคที่มีการใช้กันมากที่สุด นอกจากนี้ยังพบเทคนิคอื่นๆบ้าง เช่น เทคนิค single nucleotide polymorphism (SNP), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) และ การใช้วิธีทาง immunoassay เป็นต้น การศึกษาวิจัยทั้งหมดเน้นไปที่การจำแนกกลุ่มทางพันธุกรรม และการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุล (molecular marker) หรือเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) เพื่อประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์ และการอนุรักษ์ทางพันธุกรรมต่อไป (เปล่งศรี และคณะ, 2550)

เอกสารนี้เพื่อประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์ และการอนุรักษ์ทางพันธุกรรมต่อไป (เปล่งศรี และคณะ, 2550) ราคาไม่ต่ำกว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.4.1 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่

ชัชวาล (2546) ศึกษาการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมในไก่พื้นเมืองไทยเปรียบเทียบกับไก่เนื้อ และไก่ไข่โดยใช้ลักษณะเครื่องหมาย *microsatellite* ในการทดลองนี้ได้ตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทยในตระกูล *Gallus gallus domesticus* สองสายพันธุ์ คือ สายพันธุ์เหลืองหางขาว และประดู่หางดำ เมื่อตรวจสอบค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม และแผนภูมิความสัมพันธ์ พบว่าสามารถจำแนกกลุ่มของไก่ที่ผสมพันธุ์แบบมีระบบแต่ในไก่ของเกษตรกรที่เลี้ยงทั่วไปไม่สามารถจำแนกออกจากกันได้อย่างชัดเจน เนื่องจากการเลี้ยงในฟาร์มที่มีระบบการผสมพันธุ์ชัดเจน

เฉลิมชัย (2546) ศึกษาการจำแนกสายพันธุ์ไก่พื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือด้วย SSR marker จากลักษณะรูปพรรณสัณฐานภายนอกของไก่พื้นเมือง 5 จังหวัด พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในกลุ่มตัวอย่างไก่พื้นเมืองจังหวัดยโสธรมีค่าสูงสุดเท่ากับ  $0.583+0.293$  จังหวัดเลยมีค่าต่ำสุด เท่ากับ  $0.317+0.293$  จำนวนของอัลลีลในแต่ละโลคัสอยู่ระหว่าง 5–9 อัลลีลต่อไพรเมอร์ และมีค่าระหว่าง 1–6 อัลลีลต่อกลุ่มตัวอย่าง ค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนทางพันธุกรรมในกลุ่มไก่จังหวัดนครราชสีมา ขอนแก่น ยโสธร สกลนคร และ เลย มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 17.31, 24.58, 23.78, 27.11, และ 21.82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยอาจเนื่องมาจากความแตกต่างของการเลี้ยง การคัดเลือก และเป็นกลุ่มตัวอย่างจากคนละประชากร ซึ่งไก่พื้นเมืองที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ อยู่ในสภาพแวดล้อมที่เป็นธรรมชาติ และมีความอิสระมากกว่า

ปาริชาติ (2547) ศึกษาการประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างไก่พื้นเมืองไทย (*Gallus gallus domesticus*) พบว่าไมโครแซทเทลไลท์ทุกโลไซเป็นโพลีเมอร์ฟิกจำนวนอัลลีล แต่ละโลคัสสำหรับทุกสายพันธุ์อยู่ในช่วง 2 อัลลีล ถึง 9 อัลลีล จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัสสำหรับทุกประชากรเท่ากับ 6.33 ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยต่ำสุด คือ ไก่ซีและสูงสุดในไก่ประดู่หางดำ พบว่าค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์คำนวณโดยใช้ Nei's genetic distance ระหว่างไก่ประดู่หางดำกับไก่ซีมีค่าน้อยที่สุด และมีค่ามากที่สุดระหว่างไก่ประดู่หางดำกับไก่นกแดงหางแดง จากการศึกษาพบว่าไก่พื้นเมืองทั้ง 4 สายพันธุ์มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน จะแตกต่างกันอย่างชัดเจนตรงลักษณะภายนอกเท่านั้น อาจเนื่องมาจากมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันทางสายเลือด ซึ่งผลที่ได้นี้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการอนุรักษ์สายพันธุ์ให้เกิดพันธุ์แท้ เพื่อจดทะเบียนประวัติในอนาคต รวมถึงการนำไปใช้ในการทดลองที่ต้องการความแม่นยำสูง ในงานวิจัยที่ต้องการสัตว์ทดลองที่มีความเหมือนทางพันธุกรรมสูง และสามารถคัดเลือก

เอกสารนี้สายพันธุ์ตามที่ต้องการได้โดยไม่ต้องรอการแสดงออกทางฟีโนไทป์ที่จะนำมาคัดเลือกประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hillel *et al.* (2003) การประเมินความหลากหลายทางชีวภาพของไก่ 52 ประชากร โดย เครื่องหมาย microsatellite จากแหล่งรวมของดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ 22 ตำแหน่ง พบว่า ค่าเฉลี่ยความหลากหลายทางพันธุกรรมน้อยที่สุดในไก่สาย C และมากที่สุดในไก่สายพันธุ์ *Gallus gallus spadiceus* ดังนั้นจำนวนอัลลีล: ตำแหน่ง: ประชากร มีค่าเฉลี่ยความหลากหลายของ เครื่องหมายทางพันธุกรรม เท่ากับ 0.47 0.05 และ 0.64 และสัดส่วนความหลากหลายของ เครื่องหมายทางพันธุกรรม เท่ากับ 0.91 0.25 และ 1.0 ค่าที่ได้อยู่ในเกณฑ์ดี ดังข้อมูลการผสมพันธุ์ ของประชากร ยกตัวอย่างเช่น ประชากรที่ผสมพันธุ์ตามธรรมชาติมีความหลากหลายทางพันธุกรรม มากกว่าสายพันธุ์ที่มีการคัดเลือกสายพันธุ์ เช่น ไก่ไข่ แสดงให้เห็นความหลากหลายทางพันธุกรรมใน แหล่งรวมของดีเอ็นเอ สามารถทดสอบได้ และมีประโยชน์สำหรับการอนุรักษ์ความหลากหลายทาง พันธุกรรมร่วมกันระหว่างประชากร

Dai *et al.* (2005) ศึกษาในระดับโมเลกุลด้วย OPAY02-Scar Markers ที่เกี่ยวข้องกับ น้ำหนักแรกเกิดของไก่นิวหยางโจว โดยออกแบบไพรเมอร์ของ OPAY02-Scar Markers เพื่อเพิ่ม ปริมาณดีเอ็นเอของไก่นิวหยางโจว 86 ตัว ผลการเปรียบเทียบทั้งสองแบนบนลำดับนิวคลีโอไทด์กับ ฐานข้อมูลของไก่ป่า แสดงให้เห็นว่าแบนตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 3 ทำให้สามารถระบุลำดับนิวคลีโอ ไทด์ได้ถูกต้อง 98% และตรวจพบตำแหน่งการกลายพันธุ์ 8 SNPs ได้แก่ ตำแหน่ง 195(T/G) 316(A/T) 538(G/A) 731(T/A) 1147(G/A) 1329(T/C), 1927(C/T) และ 2081(C/T) ซึ่งเครื่องหมาย SCAR ได้รับการยืนยันว่าทั้งสองแบนของ OPAY02 สามารถนำไปใช้การวิเคราะห์ ทางพันธุกรรม เพราะมีความคงที่ และความน่าเชื่อถือในการทดสอบ

De Marchi *et al.* (2006) ศึกษาการแปรผันทางพันธุกรรมในสายพันธุ์พื้นเมืองแคว้น เวนโต ประเทศอิตาลี โดยใช้เครื่องหมาย AFLP ในการวิเคราะห์เครื่องหมายระบุสายพันธุ์ในแต่ละสาย พันธุ์ของไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์ไก่ (Emellinata, Padovana, Pe'poi และ Robusta) และใช้ไก่เนื้อ เป็นสายพันธุ์อ้างอิง พบว่าค่า heterozygosity ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และค่า สัมประสิทธิ์ของการเปลี่ยนแปลงของยีน (Gst) ของสายพันธุ์ไก่เนื้อ พบว่ามีความแปรปรวนเพียง ครั้งหนึ่งของสายพันธุ์ทั้งหมด และจากการหาค่าระยะห่างทางพันธุกรรม พบว่าไก่สายพันธุ์ Pe'poi กับสายพันธุ์ไก่เนื้อมีระยะห่างทางพันธุกรรมมากกว่าไก่พื้นเมืองอีกสามสายพันธุ์ ซึ่งจากการแบ่งกลุ่ม ของสายพันธุ์ไก่ขึ้นอยู่กับระยะห่างทางพันธุกรรม จากข้อมูลของเครื่องหมาย AFLP แสดงให้เห็นความ แตกต่างอย่างชัดเจนในทุกสายพันธุ์

Dorji *et al.* (2010) วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองภูฏาน โดยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ โดยใช้ตัวอย่างไก่พื้นเมืองภูฏานจำนวน 4 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ไก่ทางการค้า 2 สายพันธุ์ ด้วยไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลท์ 18 ตำแหน่ง ในการตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรม พบจำนวนอัลลีลทั้งหมด 160 อัลลีล และค่าเฉลี่ยของประชากรทั้งหมดอยู่ที่  $8.87 \pm 0.55$  ซึ่งความแตกต่างทางพันธุกรรมอยู่ในระดับปานกลางในประชากรทั้ง 6 สายพันธุ์ จากการทำแผนภูมิความสัมพันธ์ของไก่พื้นเมืองภูฏาน พบว่าไก่พื้นเมืองมีความแตกต่างจากสายพันธุ์ไก่ทางการค้า จึงสรุปได้ว่าไก่พื้นเมืองภูฏานเป็นตัวแทนของประชากรที่ไม่ซ้ำกันกับสายพันธุ์ทางการค้า จัดเป็นทรัพยากรทางพันธุกรรมที่มีคุณค่าในการอนุรักษ์ และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Ahmed *et al.* (2013) ใช้เครื่องหมาย Random amplified polymorphic DNA (RAPD) ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์สัตว์ปีก 3 สายพันธุ์ (ไก่ทางการค้า, Aseel และ Karknath) โดยใช้ไพรเมอร์ 30 ชนิด พบว่าสามารถเกิดแถบแบนทั้งหมด 198 แบน (136 polymorphic) พบแบนมีความแตกต่าง 96.96 เปอร์เซ็นต์ และค่า polymorphic อยู่ระหว่าง 0.23-0.47 ซึ่งมีค่าดัชนีความเหมือนเฉลี่ยเท่ากับ 49 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำมาจัดกลุ่มด้วยวิธี UPGMA พบว่าสัตว์ปีกที่นำมาศึกษานั้นมีความหลากหลายสูงทั้งภายในประชากรเดียวกัน และระหว่างกลุ่มประชากร จากข้อมูลดังกล่าวเป็นประโยชน์สำหรับใช้ในโครงการปรับปรุงพันธุ์สัตว์

Riztyan *et al.* (2014) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างไก่ป่าสีแดง และไก่บ้านในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยใช้เครื่องหมาย single nucleotide polymorphism (SNP) ด้วยเทคนิค PCR-RFLP พบว่าค่าเฉลี่ย heterozygosity ของไก่ป่าสีแดง ไก่พื้นเมือง และไก่สายพันธุ์ทางการค้า มีค่าเท่ากับ  $0.225 \pm 0.077$   $0.272 \pm 0.009$  และ  $0.211 \pm 0.037$  ตามลำดับ และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมจากแผนภูมิความสัมพันธ์ พบว่าสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มได้ 3 กลุ่มที่แตกต่างกัน คือ ไก่ป่าสีแดง แบ่งเป็นหนึ่งบรรพบุรุษ และมีความเกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิดกับไก่พื้นเมืองมากกว่าไก่สายพันธุ์ทางการค้า นอกจากนี้ผลของการวิเคราะห์โครงสร้างของประชากร แสดงให้เห็นว่าไก่พื้นเมืองในประเทศไทย จัดเป็นกลุ่มของบรรพบุรุษไก่ป่าสีแดงมากที่สุด จากไก่ทั้งหมด และการค้นพบหลักฐานทางโมเลกุลเหล่านี้ ทำให้สนับสนุนหลักฐานทางทฤษฎีว่า เหตุการณ์ในการเกิดไก่บ้านสายพันธุ์ดั้งเดิมเกิดขึ้นในประเทศไทย

El-Sabrou *et al.* (2015) วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ไก่ที่แตกต่างกันในประเทศอียิปต์ โดยใช้เครื่องหมาย RAPD และเครื่องหมาย SSR ด้วย 20 ไพรเมอร์ (10 RAPD และ 10 SSR) เครื่องหมาย RAPD พบไพรเมอร์จำนวน 8 ไพรเมอร์ที่ให้ความแตกต่างของไม่ต่ำกว่า 10% ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แถบดีเอ็นเอ 86 แบน และแถบดีเอ็นเอที่ไม่แตกต่างกันจำนวน 9 แบน และพบแถบดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ Fayoumi Alexandria และ Golden-Montaza ขณะที่เครื่องหมาย SSR พบ 6 ไพรเมอร์ มีจำนวนอัลลีลทั้งหมด 62 อัลลีล 10 ตำแหน่ง และจากผลของความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์เมื่อนำมาวิเคราะห์โดยใช้แผนภูมิความสัมพันธ์ สามารถแบ่งสายพันธุ์ที่ออกเป็น 2 กลุ่มคือ สายพันธุ์ Fayoumi กับ Alexandria และสายพันธุ์ Matrouh กับสายพันธุ์ Golden-Montazah ในการวิจัยครั้งนี้พบว่าทั้ง 2 เครื่องหมายโมเลกุลให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง อาจเป็นเพราะสายพันธุ์ไก่ในอียิปต์มาจากโครงสร้างที่แตกต่างกัน และเป็นสายพันธุ์ที่มีวัตถุประสงค์ในการปรับปรุงพันธุ์ที่แตกต่างกัน ซึ่งมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องเป็นเวลาหลายปี เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ท้องถิ่นเหล่านี้ โดยความรู้เกี่ยวกับระยะห่างทางพันธุกรรมของแต่ละกลุ่มเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์มากสำหรับการปรับปรุงพันธุกรรม

Maw *et al.* (2015) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างของประชากรไก่พื้นเมืองพม่า ไทย และลาว โดยใช้ 102 Indels Markers พบว่าค่า polymorphic ของ Indels Markers มีค่าประมาณ 71-96 เปอร์เซ็นต์ และความแปรผันทางพันธุกรรม พบว่าให้ค่าเฉลี่ยใกล้เคียงกันในทุกประชากร และจากการหาค่า observed heterozygosities ( $H_o$ ) และค่า expected heterozygosities ( $H_e$ ) อยู่ระหว่าง 0.205-0.263 และ 0.239-0.381 ตามลำดับ ในส่วนของค่าสัมประสิทธิ์ความต่างของพันธุกรรมของประชากรทั้งหมด ( $G_{st}$ ) เท่ากับ 0.125 และมีค่า  $G_{st}$  ในประชากรของไก่พื้นเมืองไทย (0.088) สูงกว่าไก่พื้นเมืองพม่า (0.041) และลาว (0.024) ตามลำดับ ค่าความห่างของพันธุกรรมระหว่างประชากร ( $F_{st}$ ) อยู่ในช่วง 0.144-0.308 เมื่อสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ พบว่าไก่พื้นเมืองไทยกับไก่พื้นเมืองลาวมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมสูง ขณะที่ไก่พื้นเมืองพม่ามีความแตกต่างจากสายพันธุ์อื่นมีความสอดคล้องกับการศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมือง จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม STRUCTURE พบว่าไก่พื้นเมืองจาก 3 เมือง มีถิ่นกำเนิดที่แตกต่างกัน สังเกตได้ว่าการผสมของพันธุกรรมในไก่ของไทยและลาวมีการผสมกันของสารพันธุกรรม ส่วนในไก่พื้นเมืองพม่ามีความบริสุทธิ์ เนื่องจากไม่มีการผสมข้ามสายพันธุ์ของไก่พื้นเมืองจากประเทศไทย และลาว

#### 2.4.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุล

เบญจพร และคณะ (2558) ได้ศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในการแยกพันธุ์ปลุกของข้าวพื้นเมืองที่เก็บมาจากแหล่งเพาะปลูกต่างกัน โดยใช้วิธี PCR และเปรียบเทียบความเหมือนหรือความแตกต่างเป็นรายคู่โดยใช้เทคนิค SNP (single nucleotide polymorphism) เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยโปรแกรม BioEdit ClustalW 2 และ BLAST ข้าวพื้นเมืองทั้ง 15 พันธุ์ แยกเป็นข้าวเจ้า 7 พันธุ์ พบว่า จากตัวอย่างข้าวทั้ง 15 พันธุ์ มีลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ที่สามารถแยกข้าว 15 พันธุ์ ออกเป็นข้าวเจ้า 7 พันธุ์ และข้าวเหนียว 8 พันธุ์ ผลของการสร้างแผนภาพต้นไม้แสดงวิวัฒนาการ สามารถแยกพันธุ์ได้ชัดเจนตรงกันเป็น 15 พันธุ์ ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *rbcl* ในข้าว พันธุ์ปลูกทั้ง 15 พันธุ์นี้ สามารถใช้เป็น molecular marker ในการตรวจสอบและปรับปรุงพันธุ์ข้าว ของไทยในอนาคตได้อย่างยั่งยืน

Fernandez *et al.* (2004) ศึกษาลักษณะของเครื่องหมาย SCAR ของโปรโตซัว (*Eimeria* spp.) ในสัตว์ปีก และสร้างฐานข้อมูลเชิงสัมพันธ์ใน *Eimeria* SCARdb เพื่อพัฒนาและ ศึกษาลักษณะของลำดับนิวคลีโอไทด์ 151 ของเครื่องหมาย SCAR พบว่ามี *Eimeria* 7 ชนิด ที่ติดเชื้อมีในสัตว์ปีก และพบเครื่องหมาย 84 เครื่องหมายที่มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์ *Eimeria* และพบเครื่องหมาย 67 ตำแหน่งมีความจำเพาะบางส่วน ซึ่งลำดับเบสที่มีความจำเพาะต่อ เครื่องหมาย SCAR พบว่ามี 22 ตำแหน่ง พบว่ามีตำแหน่งซ้ำกัน 5 หน่วยซ้ำที่แตกต่างกัน จากการ สังเกตมีเพียง 15 เครื่องหมายเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับกับฐานข้อมูลมีความคล้ายคลึงกันอย่างน้อย หนึ่งสำคัญ ดังนั้นในส่วนที่ยังไม่มีการระบุชื่อ และไม่พบลักษณะนี้เกิดขึ้น สามารถนำไปเก็บไว้เป็น ฐานข้อมูลเชิงสัมพันธ์ของเครื่องหมาย SCAR (*Eimeria* SCARdb) บริการออนไลน์บนอินเทอร์เน็ต เกี่ยวกับการพัฒนาเครื่องหมาย SCAR ซึ่งเป็นทรัพยากรที่มีคุณค่า สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ สำหรับ การวินิจฉัย อยุ่ระดับโมเลกุล สำหรับการเกิดระบาดวิทยาเกี่ยวกับสัตว์ ความแปรปรวนทางพันธุกรรม และการศึกษาเกี่ยวกับการทำแผนที่จีโนมของสัตว์

Smith *et al.* (2005) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในสายพันธุ์ไก่วง 5 สายพันธุ์ (Blue Slate, Bourbon Red, Narragansett, Royal Palm และ Spanish Black) โดยใช้ เครื่องหมายทางโมเลกุล RAPD microsatellite และ SNPs ที่ได้รับการสุ่มตัวอย่างจากลำดับ นิวคลีโอไทด์เป้าหมาย และชิ้นส่วนจากโคลนของเครื่องหมาย RAPD ซึ่งการวิเคราะห์โดย RAPD ใช้ไพรเมอร์ 5 ชนิดตามข้อมูลดีเอ็นเอทั้งหมด 14 ชนิดในประชากรทั้งหมด 5 กลุ่ม การวิเคราะห์ microsatellite เกี่ยวข้องกับอัลลีลที่ให้ข้อมูลสองอัลลีลจาก 3 คู่ไพรเมอร์ และการตรวจพบ SNP ทั้งหมด 9 ตำแหน่งซึ่งหนึ่งในนั้นเป็นสายพันธุ์ที่เฉพาะเจาะจง SNP นี้เป็นพื้นฐานของขั้นตอนการ สร้าง PCR-RFLP genotyping ที่พัฒนาขึ้นเพื่อแยกสายพันธุ์หนึ่งออกจากสายพันธุ์อื่น ๆ หลักฐาน จากการวิเคราะห์เหล่านี้รวมทั้ง SNL-based RFLP-PCR แสดงให้เห็นว่า Royal Palm แตกต่างจาก อีก 4 สายพันธุ์ แต่มีความใกล้ชิดกับ Narragansett มากมากที่สุด จากข้อมูลเหล่านี้เป็นครั้งแรก

เอกสารนี้ที่แสดงหลักฐานโมเลกุลของความสัมพันธ์ที่อาจเกิดขึ้นระหว่างสายพันธุ์ไก่วงที่เลี้ยงในประเทศ การค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lin *et al.* (2006) จำแนกชนิดของสายพันธุ์แมลงวัน โดยใช้เครื่องหมาย ISSR และเครื่องหมาย SCAR ในการวิเคราะห์ความแตกต่างดีเอ็นเอของแมลงจำนวน 5 สายพันธุ์ โดยใช้เครื่องหมาย ISSR พบว่ามี 9 ไพรเมอร์จากทั้งหมด 18 ไพรเมอร์ สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้ 105 แลบดีเอ็นเอที่ชัดเจน และมีเสถียรภาพ และให้แลบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันจำนวน 95 แลบบน ซึ่งบางไพรเมอร์สามารถใช้ในการแยกความแตกต่างกันได้อย่างสมบูรณ์ระหว่างสายพันธุ์ แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมาย ISSR สามารถใช้ในการระบุสายพันธุ์แมลงวันเหล่านี้ได้ และนำข้อมูลที่ได้ทำให้เกิดความน่าเชื่อถือมากขึ้นโดยมีการพัฒนาเป็นเครื่องหมาย SCAR เพื่อได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อสายพันธุ์แมลงวันมากขึ้น และสามารถนำมาใช้ในการวินิจฉัยระดับโมเลกุลของแมลงวันทั้ง 5 ชนิดได้

Muira *et al.* (2008) ได้การคาดการณ์การใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุกรรม และการรวมอุตสาหกรรมที่จะส่งผลกระทบต่อองค์ประกอบทางพันธุกรรมของไก่เชิงพาณิชย์ ดังนั้นคำถามที่เกิดขึ้นเป็นไปได้ว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมเพียงพอที่ยังคงอยู่ภายในอุตสาหกรรมเพื่อตอบสนองความต้องการในอนาคต ด้วยลำดับจีโนมของไก่ที่มีมากกว่า 2.8 ล้าน single-nucleotide polymorphisms (SNPs) พบว่า SNP ทำหน้าที่เป็นเครื่องหมายของความหลากหลายทางชีวภาพและให้การประเมินวัตถุประสงค์ของสายพันธุ์ที่มีคุณค่ามากที่สุดสำหรับการรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงทดลองครั้งแรกที่มีการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของสินค้าเกษตรทั้งหมด วิธีการที่นำเสนอเป็นครั้งแรกในการจำแนกความหลากหลายทางชีวภาพในด้านความหลากหลายของ allelic และเชื่อมโยงกับอัตราการสูญเสีย allele ด้วยสัมประสิทธิ์การผสมข้ามสายสัมพันธ์

Kiran *et al.* (2010) รายงานการพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลให้่ายต่อการทดสอบความถูกต้องของตัวยาสมุนไพร จากตัวยาสมุนไพรดั้งเดิม โดยเครื่องหมาย RAPD สามารถพัฒนาให้เป็นเครื่องหมายโมเลกุลที่ทำได้ง่าย แม้จะเป็นเครื่องหมายที่มีความน่าเชื่อถือน้อย นอกจากเครื่องหมาย RAPD ยังมีเครื่องหมายที่ได้รับความนิยม เช่น เครื่องหมาย AFLP, ISSR, SSR และ RFLP มีการนำมาใช้สำหรับการรับรองความถูกต้องของตัวยาสมุนไพร แต่เครื่องหมายเหล่านี้มีข้อเสีย คือ การใช้ไอโซโทปกัมมันตรังสี, ค่าใช้จ่ายสูง และต้องการความถูกต้องของข้อมูลลำดับของนิวคลีโอไทป์ จึงเป็นเหตุผลในการปรับปรุงเครื่องหมาย RAPD เป็นเครื่องหมาย SCAR เนื่องจากทำได้ง่ายและเชื่อถือได้ และทำซ้ำได้ จึงมีความได้เปรียบกว่าเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อรับรองความถูกต้องของสมุนไพร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Marieschi *et al.* (2011) ศึกษาการพัฒนาเครื่องหมาย SCAR สำหรับระบุสายพันธุ์ของ *Olea europaea* L. สามารถนำมาตรวจสอบการเจือปนในออริกาโนทางการค้าแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ซึ่งมีการนำเครื่องหมาย SCAR ที่มีการพัฒนามาจากเครื่องหมาย RAPD ให้มีความจำเพาะมาก เนื่องจากการสัง่ชื่อของ *Olea europaea* ต้องมีการตรวจสอบสารปนเปื้อนได้อย่างรวดเร็ว ละเอียด และน่าเชื่อถือได้ รวมถึงใช้ต้นทุนต่ำในการตรวจหาการปนเปื้อนของสินค้าตัวอย่างออริกาโนแห้งจากทะเลเมดิเตอร์เรเนียน

Riztyan *et al.* (2011) ได้ทำการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม และความแตกต่างของไก่พื้นเมืองอินโดนีเซีย 4 ชนิด ได้แก่ Black Kedu (BK) Kedu (KD) Kampung (LOC) และ Arab (AR) เก็บรวบรวมในภาคกลาง และตะวันตกของชวา ตำแหน่ง polymorphic และค่าเฉลี่ย heterozygosity ของแต่ละประชากรอยู่ในช่วง 0.765 โดยใช้เครื่องหมาย SNP 98 ชนิด พบว่ามีความแตกต่างกัน 87 ชนิด สัดส่วนของ ถึง 0.878 และ 0.224 ถึง 0.263 ตามลำดับ ไก่ของอินโดนีเซีย พบว่ามีจำนวน 4 คู่ ( $K = 3$ ): การจัดกลุ่มพันธุ์ BK และพันธุ์ AR แต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันในขณะที่พันธุ์ LOC และพันธุ์ KD มีการผสมกันประชากร สัดส่วนที่เหมือนกันของสมาชิกในประชากร ในส่วนของการวิเคราะห์องค์ประกอบจากการคำนวณ eigenvector พบว่า 1 กลุ่มที่แยกจากกัน คือ BK และ AR จาก 2 ประชากรอื่น ๆ จากการประเมินโดยใช้ค่าความห่างระหว่างประชากร ( $F_{ST}$ ) สำหรับแต่ละตัวอย่าง และระหว่างประชากรยืนยันว่าสายพันธุ์ LOC และพันธุ์ KD มีความสัมพันธ์กันอย่างใกล้ชิดในขณะที่พันธุ์ BK และ AR แตกต่างกันอย่างชัดเจน ผลการศึกษานี้ยังยืนยันถึงประโยชน์ของเครื่องหมาย SNP ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

Aslam *et al.* (2012) การค้นหาและการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของ SNP ในไก่วง ผลการศึกษาไก่วง 32 ตัวจากประชากรที่แตกต่างกัน สามารถค้นพบ 5.49 ล้านตำแหน่ง SNP แล้วนำมาใช้เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรที่ต่างกัน ในสายการค้าทั้งหมดแยกออกจากสายพันธุ์ดั้งเดิม และประชากรไก่วงทางเม็กซิกันตอนใต้ ซึ่งค่า heterozygosity ของทุกตัวจากประชากรไก่วงที่แตกต่างกันอยู่ระหว่าง 0.17-2.73 SNPs/Kb ในขณะที่ heterozygosity ของประชากรอยู่ระหว่าง 0.73-1.64 SNPs/Kb ความถี่เฉลี่ยของ SNP ที่มี heterozygous ในไก่วงแต่ละตัวมีค่าเท่ากับ 1.07 SNP/Kb พบบริเวณที่มีโครโมโซม 5 แห่งที่มีความแตกต่างของนิวคลีโอไทด์ต่ำมากในไก่วงภายในประเทศ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตำแหน่ง alleles มีความแตกต่างจาก allele ของสายพันธุ์ดั้งเดิม ดังนั้นความหลากหลายในสายพันธุ์สัตว์ในประเทศจึงมีความสำคัญมาก และจำเป็นสำหรับการปรับปรุงพันธุ์อย่างรวดเร็ว และถูกต้องของสายพันธุ์

เอกสารนี้ที่เลือกไว้ในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ในการปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วที่อาจเกิดขึ้นในไม่ช้ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป้าหมายการปรับปรุงพันธุ์ การเลือกจีโนมจะต้องมีเครื่องหมายทางพันธุกรรมจำนวนมาก ซึ่ง SNPs เป็นแหล่งกำเนิดความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ใหญ่ที่สุดในจีโนม

Cirillo *et al.* (2012) ได้ศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลที่ได้จากการตรวจผลิตภัณฑ์เนื้อในอิตาลีโดยการใช้เครื่องหมาย RAPD ในการตรวจผลิตภัณฑ์เนื้อเบื้องต้น และคัดเลือกผลิตภัณฑ์ฟิวเจอร์ที่มีความแตกต่างกันมาออกแบบไพรเมอร์ เพื่อได้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อผลิตภัณฑ์เนื้อมากขึ้น มีความไวต่อปฏิกิริยา และมีความน่าเชื่อถือมากกว่าใช้เพียงแค่เครื่องหมาย RAPD

Siang Ng *et al.* (2012) ได้ใช้ genotype ของ SNP ตรวจสอบพันธุ์ประวัติไก่ที่ได้จากพ่อพันธุ์ไก่ขนย่น (Frizzle feather) แบบ heterozygous ผสมกับแม่พันธุ์ปกติ พบ SNP 2 ชนิดที่มีตำแหน่งอยู่ใน linkage group E22C19W28 และ E50C23 เกี่ยวข้องอยู่กับลักษณะขนย่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และบริเวณใกล้เคียงดังกล่าวจะเป็นตำแหน่งของกลุ่มยีน keratin หลังการตรวจสอบยีน keratin ทั้ง 14 ชนิด พบ 1 ชนิดที่จะเป็นสาเหตุที่ก่อให้เกิดลักษณะขนย่น คือ ยีน KRT75 โดยพบว่าลำดับเบสของยีน KRT75 จะขาดหายไป 69 bps ในบริเวณรอยต่อระหว่าง exon 5 กับ intron 5 ส่วน ซึ่งการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของแนวทางในการระบุปัจจัยทางพันธุกรรมของรูปขนไก่

Cunha *et al.* (2015) นำเครื่องหมาย SCAR ซึ่งพัฒนาจากเครื่องหมาย RAPD สามารถใช้ในการระบุสายพันธุ์ของเชื้อราที่เกิดขึ้นในกล้วยของประเทศบราซิลได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งการใช้เทคนิคทางโมเลกุลมีประโยชน์สำหรับการคัดกรองพืชจำนวนมาก สามารถช่วยในการปรับปรุงพันธุ์พืชทั่วไป และคัดเลือกสายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว มีความถูกต้อง แม่นยำมากขึ้น

Joana *et al.* (2016) ตรวจสอบแหล่งกำเนิดของนมในผลิตภัณฑ์นม โดยใช้เครื่องหมาย RAPD และเครื่องหมาย SCAR เพื่อเป็นเครื่องมือที่มีศักยภาพสำหรับการค้นหาสายพันธุ์แกะที่มีการเจือปนในการผลิตชีส การค้นพบนี้มีบทบาทสำคัญการตรวจคุณภาพของชีสสามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบผลิตภัณฑ์นมคุณภาพสูงอื่นๆได้ เนื่องจากมีแนวโน้มที่จะเกิดการปลอมปนสูงในอุตสาหกรรม

### บทที่ 3

## วิธีการดำเนินงานวิจัย

### 3.1 สถานที่เก็บตัวอย่างชนไก่พื้นเมืองไทย

ในการเก็บตัวอย่างชนไก่ 60 ตัวอย่าง สายพันธุ์ละ 15 ตัวอย่าง โดยมีสายพันธุ์ไก่พื้นเมือง ดังนี้ สายพันธุ์ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (Pradu-Hangdam Chiangmai; PD) จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์พะเยา สายพันธุ์ไก่ชืท่าพระ (Chee Thapra; CT) จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ท่าพระ สายพันธุ์ไก่เหลืองหางขาวกบินทร์บุรี (Lueng-Hangkao Kabinburi; LK) จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์กบินทร์บุรี และสายพันธุ์ไก่แดงสุราษฎร์ (Dang Surat; DS) จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์สุราษฎร์ธานี และ out group 3 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างไก่เนื้อ 2 ตัวอย่าง และนกปรอทหัวโขน 1 ตัวอย่างจากจังหวัดสุราษฎร์ธานี แสดงดังตารางที่ 3.1 ในระหว่างเดือนธันวาคม 2558-กุมภาพันธ์ 2559

ตารางที่ 3.1 ตัวอย่างไก่พื้นเมืองที่สุ่มเก็บจากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์

ลำดับที่	สายพันธุ์	รหัสตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง
01-15	ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่	PD01-PD15	อ.เมือง จ.พะเยา
16-30	ไก่ชืท่าพระ	CT01-CT15	อ.ท่าพระ จ.ขอนแก่น
31-45	ไก่เหลืองหางขาวกบินทร์บุรี	LK01-LK15	อ.กบินทร์บุรี จ.ปราจีนบุรี
46-60	ไก่แดงสุราษฎร์	DS01-DS15	อ.เมือง จ.สุราษฎร์ธานี

### 3.2 อุปกรณ์

- 3.2.1. ออโตปิเปต (Autopipette) (Socorex acura825, Switzerland) ขนาดต่างๆ
- 3.2.2. เครื่องส่องเจล (Gel Documentation) (Syngene InGenius, USA)
- 3.2.3. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge) (Labnet Spectrafuge 16M, USA)
- 3.2.4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) (Hermle LaborTechnik GmbH - Z383K, Germany)
- 3.2.5. เครื่องรันเจล (Electrophoresis system) (Wealtec Corp, UAS)
- 3.2.6. เครื่องไมโครเวฟ (Microwave) (Panasonic NN-SM330M, Thailand)
- 3.2.7. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Spin down) (Labnet Prism Mini Centrifuge, USA)
- 3.2.8. เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Thermal cycler) (Biometra TProfessional Gradient 96, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA)

3.2.10 หลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร (Corning Aaygen PCR-02-C, USA) และขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Biomed Hycon Plastics, Thailand)

3.2.11 เครื่องผสมสาร (Vortex) (Scientific Industries Vortex Genie2 G560E, U.S.A)

3.2.12 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Mettler GmbH & Co. KG WNB 45, Germany)

3.2.13 ทิปขนาดต่างๆ (Biomed Hycon Plastics, Thailand)

### 3.3 สารเคมี

3.3.1 ชุดสกัดดีเอ็นเอ PureLink™ (Invitrogen, USA)

3.3.2 ชุดสกัดดีเอ็นเอจากเจลให้บริสุทธิ์ FavorPrep™ (BiotechCorp, Taiwan)

3.3.3 ชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ FavorPrep™ (BiotechCorp, Taiwan)

3.3.3 อะกาโรส (LE Agarose, (Biolabs, USA)

3.3.4 Tris-Borate-EDTA Buffer (TBE buffer)

3.3.5 6X loading dry

3.3.6 DNA marker ขนาด 100 คู่เบส (Invitrogen, U.S.A และ Bioneer, Korea)

3.3.7 เอธิเดียมโบรไมด์ (Bio-Rad, USA)

3.3.8 สีย้อม Neo green (Neoscience, Korea)

3.3.9 RAPD Primer (Kit A, Operon Technologies, USA) ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ไพรมเมอร์สำหรับเทคนิค RAPD

Primer code	Sequencen	Primer code	Sequence
OPA-01	5'-CAGGCCCTTC-3'	OPA-11	5'-CAATCGCCGT-3'
OPA-02	5'-TGCCGAGCTG-3'	OPA-12	5'-TCGGCGATAG-3'
OPA-03	5'-AGTCAGCCAC-3'	OPA-13	5'-CAGCACCCAC-3'
OPA-04	5'-AATCGGGCTG-3'	OPA-14	5'-TCTGTGCTGG-3'
OPA-05	5'-AGGGGTCTTG-3'	OPA-15	5'-TTCCGAACCC-3'
OPA-06	5'-GGTCCCTGAC-3'	OPA-16	5'-AGCCAGCGAA-3'
OPA-07	5'-GAAACGGGTG-3'	OPA-17	5'-GACCGCTTGT-3'
OPA-08	5'-GTGACGTAGG-3'	OPA-18	5'-AGGTGACCGT-3'
OPA-09	5'-GGGTAACGCC-3'	OPA-19	5'-CAAACGTCCG-3'
OPA-10	5'-GTGATCGCAG-3'	OPA-20	5'-GTTGCGATCC-3'

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.3.10 M13 primer (Promega, USA)
- 3.3.10 พลาสมิด pGEM-T (Promega, USA)
- 3.3.11 เอนไซม์ตัดจำเพาะ XcmI (Biolabs, USA)
- 3.3.12 เอนไซม์ T4 DNA ligase (Biolabs, USA)
- 3.3.13 บัฟเฟอร์ T4 DNA ligase (Biolabs, USA)
- 3.3.14 competent *Escherichia coli* XL1-Blue cells
- 3.3.15 อาหาร Luria-Bertani (LB medium)

### 3.4 วิธีการทดลอง

#### 3.4.1 การเก็บตัวอย่างขนไก่พื้นเมือง

ขนสัตว์ปีกมีหลายแบบรูปแบบ เช่น ขนคอนทัวร์ (contour feather) อยู่ชั้นนอกเรียงเหลื่อมเหมือนหลังคาบ้าน ขนอุย (down feather) อยู่ใต้ขนคอนทัวร์เป็นฉนวนป้องกันไม่ให้เสียความร้อน และขนบริสเทิล (bristles) แปรรูปมาจากขนคอนทัวร์คอยป้องกันสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่จมูก (nostrils) ซึ่งขนที่นำมาสกัดดีเอ็นเอเป็นขนที่มีการเจริญอยู่ตลอดเวลา หรือเรียกว่า ขนคอนทัวร์ มีการพบมากที่สุดบนตัวไก่ และปกคลุมอยู่ชั้นนอกสุดไม่ว่าจะเป็นขนปกคลุมลำตัว ขนปีก และขนหาง โดยการเก็บตัวอย่างของขนไก่พื้นเมืองไทยใช้คีบคีบถอนขนใส่ในถุงซิปล็อกประมาณ 10 เส้นต่อ 1 ตัวอย่าง แล้วเติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 5 มิลลิลิตรจากนั้นเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะได้รับการสกัดดีเอ็นเอ



**รูปที่ 3.1** ลักษณะของขนไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์ คือ ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD) ไก่เหลืองหางขาวบรินทร์บุรี (LK) ไก่สีท่าพระ (CT) และไก่แดงสุราษฎร์ (DS) ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.2 การสกัดดีเอ็นเอจากชนไก่พื้นเมือง

ในการสกัดดีเอ็นเอจากชนไก่ใช้ชุดสกัด PureLink™ โดยนำตัวอย่างมาตัดให้เป็นชิ้นเล็กประมาณ 25 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลอง เติม PureLink™ Genomic Digestion Buffer ปริมาตร 180 ไมโครลิตร และเติม Proteinase K ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ดูดส่วนใสใส่ในหลอดใหม่ เติม RNase ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้อง 2 นาที เติมสารผสม PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ต่อเอทานอล 99.5 เปอร์เซ็นต์ 200 มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วย้ายส่วนผสมทั้งหมดใส่ในคอลัมน์ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เทส่วนใสทิ้ง เติม Wash Buffer1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติม Wash Buffer2 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เทส่วนใสทิ้ง แล้วย้ายคอลัมน์ใส่ในหลอดใหม่ เติม PureLink™ Genomic Elution Buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เก็บดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงในหลุมของแผ่นวุ้นอะกาโรส 1 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่ใน 1X TBE บัฟเฟอร์ และให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นย้อมด้วย 0.5 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร Ethidium bromind เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่น้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที นำแผ่นวุ้นอะกาโรสไปวางบน UV transilluminator จะปรากฏแถบดีเอ็นเอผ่านจอตคอมพิวเตอรื แล้วเปรียบเทียบความเข้มของแถบดีเอ็นเอตัวอย่างกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส บันทึกผลการทดลอง

### 3.4.4 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองโดยเทคนิค RAPD

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์ โดยการคัดเลือกไพรเมอร์ของเครื่องหมาย RAPD ทั้งหมด 4 ไพรเมอร์ จาก 20 ไพรเมอร์ มีขั้นตอนดังนี้

3.4.4.1 ทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่เหมาะสมต่อปฏิกิริยา RAPD ในระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอเป้าหมายต่างๆ คือ 100, 50, 40, 25, 20 และ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยการเปรียบเทียบความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4.2 นำตัวอย่างดีเอ็นเอไก่พื้นเมืองมาคัดเลือกไพรเมอร์ด้วยเทคนิค RAPD โดยนำไพรเมอร์ 20 ชนิด (OPA1-20) มาทดสอบกับตัวอย่างไก่พื้นเมืองจำนวน 4 สายพันธุ์ โดยนำมาสายพันธุ์ละ 1 ตัวอย่าง เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมือง

3.4.4.3 นำไพรเมอร์ที่เหมาะสมมาทดสอบกับตัวอย่างทั้งหมด 4 สายพันธุ์จำนวน 60 ตัวอย่าง มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ โดยเติมสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบในการทำพีซีอาร์ดังนี้ ดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร 1X บัฟเฟอร์ แมกนีเซียมคลอไรด์ 0.5 มิลลิโมลาร์ dNTP 2 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ 4 ไมโครโมลาร์ *Taq* DNA Polymerase 0.025 ยูนิตต่อไมโครลิตร (ดัดแปลงจาก Mohd-Azmi. *et al.*, 2000) จากนั้นนำส่วนผสมใส่ในหลอดทดลอง 0.2 มิลลิลิตร หลอดละ 25 ไมโครลิตร เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Thermalcycler โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอดังต่อไปนี้ อุณหภูมิเริ่มต้น 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย 40 รอบที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 34 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที และรอบสุดท้ายตามด้วย 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 นาที (El-Sabrou *et al.*, 2015)

3.4.4.4 วิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยนำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ผสมกับ loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แล้วหยอดลงในหลุมของแผ่นวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ที่แช่ใน 1X TBE บัฟเฟอร์ และให้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 45 นาที หลังจากนั้นย้อมด้วย 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร Ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที แล้วแช่น้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที นำแผ่นวุ้นอะกาโรสไปวางบน UV transilluminator จะปรากฏแถบดีเอ็นเอผ่านจอกอมพิวเตอร์ บันทึกผลการทดลอง

### 3.4.5 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.01e

ทำการแปลผลแถบแบนดีเอ็นเอ โดยการให้คะแนนแบบ binary คือ เมื่อปรากฏแถบของดีเอ็นเอให้คะแนนเป็น 1 และเมื่อไม่ปรากฏแถบของดีเอ็นเอเกิดขึ้น 0 ตำแหน่งเดียวกันของแต่ละตัวอย่างให้คะแนนเป็น 0 จากนั้นนำคะแนนที่เกิดจากแต่ละไพรเมอร์มาเรียงใน Microsoft office Excel 2007 เพื่อคำนวณต่อกัน แล้วนำมาวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (similarity coefficient) โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc 2.01e (Rohlf, 1998) เลือกวิธีการจัดแบบ unweighted pair-group method using arithmetic average (UPGMA) ซึ่งจะแสดงผลในรูปแบบของแผนภูมิ dendrogram

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.6 การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอ

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองโดยใช้เครื่องหมาย RAPD อาจนำมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลประจำสายพันธุ์ของไก่พื้นเมืองได้ โดยการโคลนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาค้นหาตำแหน่งที่ทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของไก่พื้นเมืองไทย ซึ่งมีขั้นตอนดำเนินงานดังนี้

3.4.6.1 คัดเลือกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจจากเครื่องหมาย RAPD โดยการตัดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 1000 คู่เบส บนแผ่นวุ้นอะกาโรสที่ต้องการออกมา แล้วทำให้บริสุทธิ์ โดยใช้ชุด FavorPrep™ ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ ตัดส่วนที่ต้องการใส่ในหลอด เติม FADF buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที กลับหลอดทุกๆ 2-3 นาที จนชิ้นวุ้นอะกาโรสละลายได้อย่างสมบูรณ์ นำส่วนผสมตัวอย่างที่มีปริมาตรประมาณ 800 ไมโครลิตร ใส่ใน FADF column นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งส่วนใส่ เติม Wash buffer ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ใน FADF column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งส่วนใส่ ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที ให้เมทริกซ์ในคอลัมน์แห้ง นำ FADF column ใส่หลอดใหม่ เติม Elution buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร บ่มเป็นเวลา 1 นาที หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

3.4.6.2 การโคลนดีเอ็นเอ โดยนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 1000 คู่เบส มาเชื่อมต่อกับเวกเตอร์ pGEM-T (Promega, USA) ส่งถ่ายดีเอ็นเอสายผสม (recombinant DNA) เข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย *E. coli* สายพันธุ์ XL1-blue และนำไปเลี้ยงบนอาหาร LB ที่ใส่แอมพิซิลลินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร IPTG ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ X-gal ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นคัดเลือกโคลนด้วยเทคนิค blue-white screening แล้วนำโคลนที่คัดเลือกมาสกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด FavorPrep™ (Biotech corp, Taiwan) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ นำเชื้อแบคทีเรียที่เจริญอยู่บนอาหารแข็ง LB-Ampicillin ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี FAPD1 buffer 200 ไมโครลิตร เติม FAPD2 Buffer 200 ไมโครลิตร เติม FAPD3 buffer 300 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาทีที่ ย้ายส่วนใส่ใส่ใน FAPD Column นำไปปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที แล้วทิ้งสารที่ไหลผ่านคอลัมน์ และวางคอลัมน์ FAPD ไว้ใน Tube Collection Tubeg เติม W1 buffer 400 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งสารที่ไหลไหลผ่านคอลัมน์ และวางคอลัมน์ FAPD กลับเข้าไปใน Tube Collection Tube เติม 600 Wash Buffer ไมโครลิตรของ Wash Buffer ลงใน

คอลัมน์ FAPD ปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งสารที่ไหลผ่านคอลัมน์ และวางเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คอลัมน์ FAPD ไว้ใน Tube Collection Tube นำไปปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที วางคอลัมน์ FAPD ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม Elution Buffer 50 ไมโครลิตร ไปยังเมมเบรนของคอลัมน์ FAPD บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยง 14,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 นาที และนำไปวัดความเข้มข้นของพลาสมิดด้วยเครื่อง NanoDrop 2000, USA และเก็บพลาสมิดดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสเพื่อรอการตรวจสอบหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ตรวจสอบผลการโคลนยีนเพื่อความถูกต้องในการเข้าไปของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่สนใจ ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ M13 สำหรับเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สนใจ โดยเติมสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบในการทำพีซีอาร์ดังต่อไปนี้ โดยปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ซึ่งประกอบด้วย ดีเอ็นเอ 5 ไมโครลิตร 1X buffer แมกนีเซียมคลอไรด์ 0.8 มิลลิโมลต่อลิตร dNTP 2 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ M13 forward (5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3') 5 ไมโครโมลาร์ ไพรเมอร์ M13 reverse (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') 5 ไมโครโมลาร์ Taq DNA Polymerase 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร จากนั้นนำส่วนผสมที่ผสมได้ใส่ในหลอดทดลองเข้าเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ Thermalcycler โดยมีสภาวะที่เหมาะสมในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ดังต่อไปนี้ อุณหภูมิเริ่มต้น 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ตามด้วย 40 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที และรอบสุดท้ายตามด้วย 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้ความเข้มข้นวุ้นอะกาโรส 1.5 เปอร์เซ็นต์

3.4.6.3 การออกแบบไพรเมอร์ โดยนำตัวอย่างพลาสมิดจากการโคลนที่ผ่านการตรวจสอบผลที่ถูกต้องในการโคลนดีเอ็นเอ และส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด (Bioneer, Korea) หลังจากนั้นนำลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioEdit เพื่อให้ได้ลำดับเบสครบทั้ง 1000 คู่เบส แล้วนำมาออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer3 และทดสอบความเหมาะสมของไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม OligoCalc (Misener and Krawetz, 1992)

3.4.6.4 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของการโคลนที่ได้ผ่านการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioEdit มาค้นหาความเหมือน (Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)) ผ่านฐานข้อมูลทางชีวภาพจาก The National Center for Biotechnology Information (NCBI) รวมถึงการนำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมในไก่พื้นเมืองด้วยโปรแกรม MEGA7 version 7.0.21 (Kumar *et al.* 2016) เลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ unweighted pair-group method using arithmetic average (UPGMA) (Nei and Kumar, 2000) และแสดงผลในรูปของแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

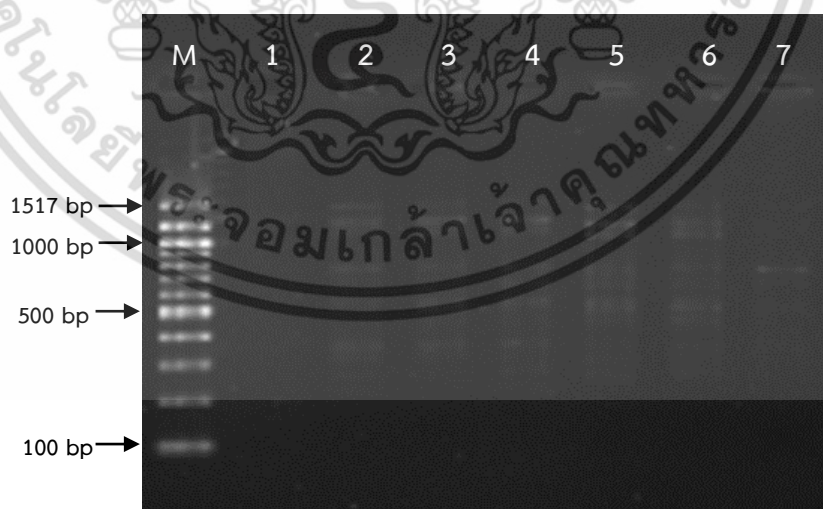
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 การทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอสำหรับปฏิกิริยา RAPD

จากการทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่มีผลต่อปฏิกิริยา RAPD ในระดับความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างต่างกัน คือ 100, 50, 40, 25, 20, 15 และ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10 ถึง 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร สามารถตรวจพบดีเอ็นเอตัวอย่าง ดังแสดงในรูปที่ 4.1 จะสังเกตเห็นแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจน และมีความเหมาะสมสำหรับการทำพีซีอาร์ โดยผลจากการศึกษาความเข้มข้นของดีเอ็นเอนั้นเป็นสิ่งสำคัญต่อกระบวนการทดลองในการทดลองต่อไป ดังนั้นจึงควรคำนึงถึงความเข้มข้นของดีเอ็นเอในการนำมาทำพีซีอาร์ เพื่อผลการทดลองที่มีความถูกต้อง และประสิทธิภาพสูง ซึ่งจากการรายงานของ Samar *et al.* (2013) มีการทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างที่เหมาะสมคือ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เพื่อใช้ในการศึกษาความแปรปรวนของพันธุกรรมในไก่ด้วยเครื่องหมาย RAPD นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอของตัวอย่างไก่ที่ 40 ถึง 100 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร โดยใช้เครื่องหมาย RAPD (Bahy *et al.*, 2003; El-Sabrou *et al.*, 2015.) ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้จึงใช้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอของปฏิกิริยา RAPD 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองต่อไป



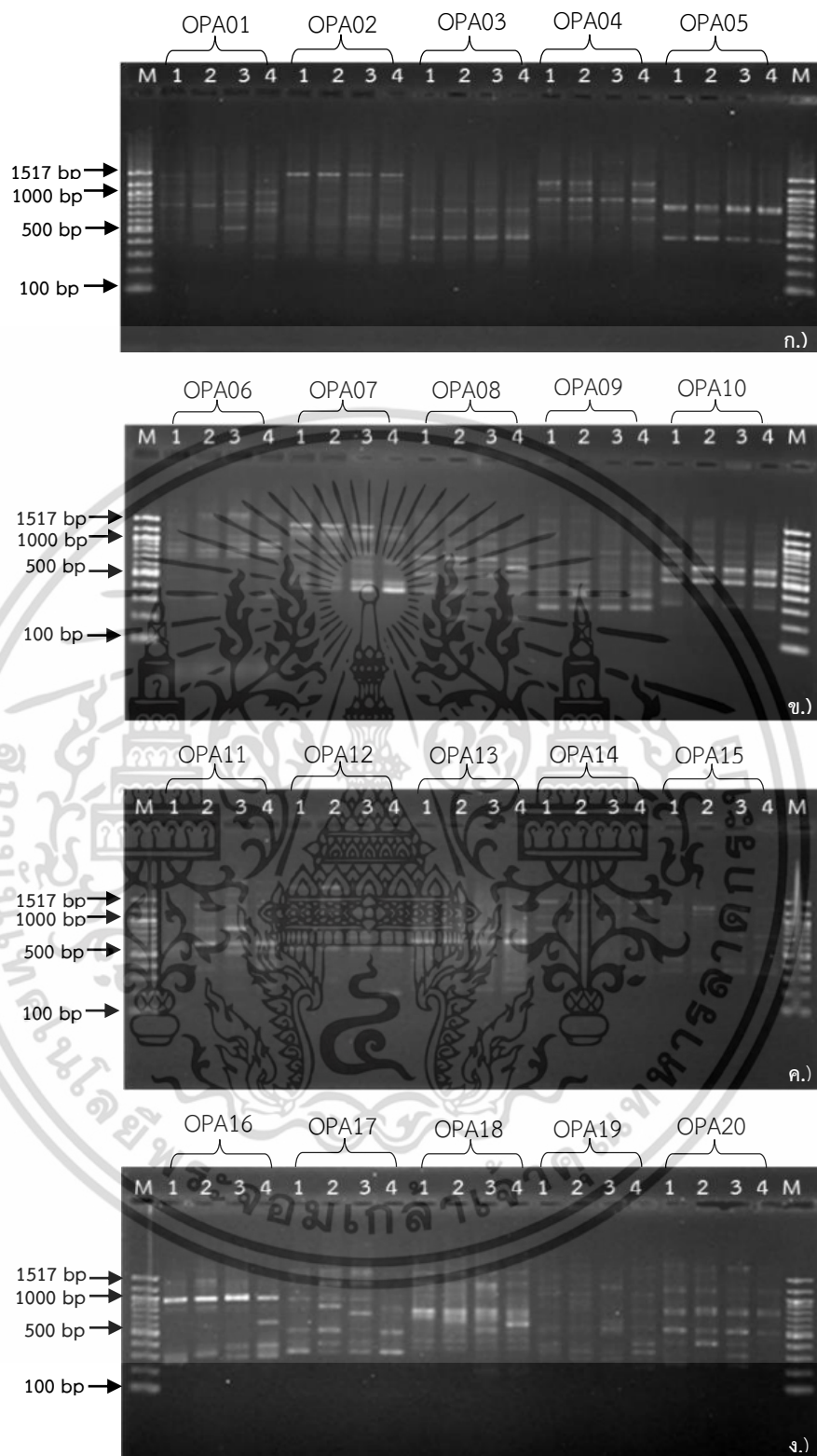
รูปที่ 4.1 ความเข้มข้นของดีเอ็นเอตัวอย่างต่างกันสำหรับปฏิกิริยา RAPD โดยหมายเลข 1 ถึง 7 คือ ดีเอ็นเอตัวอย่างที่ความเข้มข้น 100, 50, 40, 25, 20, 15 และ 10 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 ความจำเพาะของไพรเมอร์ RAPD

จากการนำไพรเมอร์ของเครื่องหมาย RAPD 20 ชนิด (OPA01-20) มาทดสอบกับตัวอย่างไก่พื้นเมืองจำนวน 4 สายพันธุ์ โดยนำมาสายพันธุ์ละ 1 ตัวอย่าง เพื่อคัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองต่อไป ดังแสดงในรูปที่ 4.2 พบว่าให้แถบดีเอ็นเอทุกไพรเมอร์ แต่จำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้แตกต่างกันไปตามไพรเมอร์ที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งจากการทดลองได้คัดเลือกมา 4 ไพรเมอร์ คือ OPA01, OPA11, OPA16 และ OPA18 เนื่องจากพบแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก สังเกตแถบดีเอ็นเอได้ชัดเจน ให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ไก่ และสามารถนำแถบดีเอ็นเอไปใช้ในการศึกษาต่อได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่าจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดความต่างระหว่างสายพันธุ์ของไพรเมอร์ OPA01, OPA11, OPA17, OPA18, OPA19 และ OPA20 มีจำนวนแถบดีเอ็นเอเท่ากัน ซึ่งในการวิจัยได้คัดเลือกไพรเมอร์ OPA01, OPA11 และ OPA18 เนื่องจากแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ OPA17, OPA19 และ OPA20 มีระยะห่างของแถบดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างกับแถบดีเอ็นเอที่ไม่ต้องการใกล้เคียงกันมาก ดังการรายงานของ Nikkhoo *et al.* (2011) มีการใช้ไพรเมอร์ของเครื่องหมาย RAPD 20 ชนิด ในการจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมในฝูงพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ของไก่เนื้อสายพันธุ์อาเรียน พบว่าไพรเมอร์ของเครื่องหมาย RAPD 4 ชนิด (OPA01, OPA02, OPA03 และ OPA04) ไม่มีแถบดีเอ็นเอใดเกิดขึ้น ในส่วนของไพรเมอร์ 3 ชนิด (OPA08, OPA18 และ OPA19) ไม่ได้แถบดีเอ็นเอที่มีเสถียรภาพ และไม่ได้รวมอยู่ในชุดข้อมูลสำหรับการนำไปวิเคราะห์ต่อไป อีก 13 ไพรเมอร์ จาก 20 ไพรเมอร์ (OPA05, OPA06, OPA07, OPA09, OPA10, OPA11, OPA12, OPA13, OPA14, OPA15, OPA16, OPA17 และ OPA20) พบว่าได้รับการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอ และเกิดแถบดีเอ็นเอที่มีเสถียรภาพ ง่ายต่อการทำคะแนน และทำซ้ำได้ผลของแถบดีเอ็นเอเหมือนเดิม จึงนำมาใช้สำหรับการทำ genotyping ของทุกตัวจากสายพันธุ์ไก่เนื้อ ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้ได้คัดเลือกไพรเมอร์ที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองจำนวน 4 ไพรเมอร์ คือ OPA01, OPA11, OPA16 และ OPA18 เนื่องจากให้แถบดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์อย่างชัดเจน และง่ายต่อการวิเคราะห์ผล



รูปที่ 4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยใช้ไพรเมอร์ RAPD [ก.) OPA01-OPA05, ข.) OPA06-OPA10 ค.) OPA11-OPA15 และ ง.) OPA16-OPA20]

หมายเหตุ: หมายเลข 1 แทนสายพันธุ์ไก่แดงสุราษฎร์ 2 แทนไก่สีท่าพระ 3 แทนไก่ประดู่

หางคำเชียงใหม่ 4 แทนไก่เหลืองหางขาวบึงนทร์บุรี และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

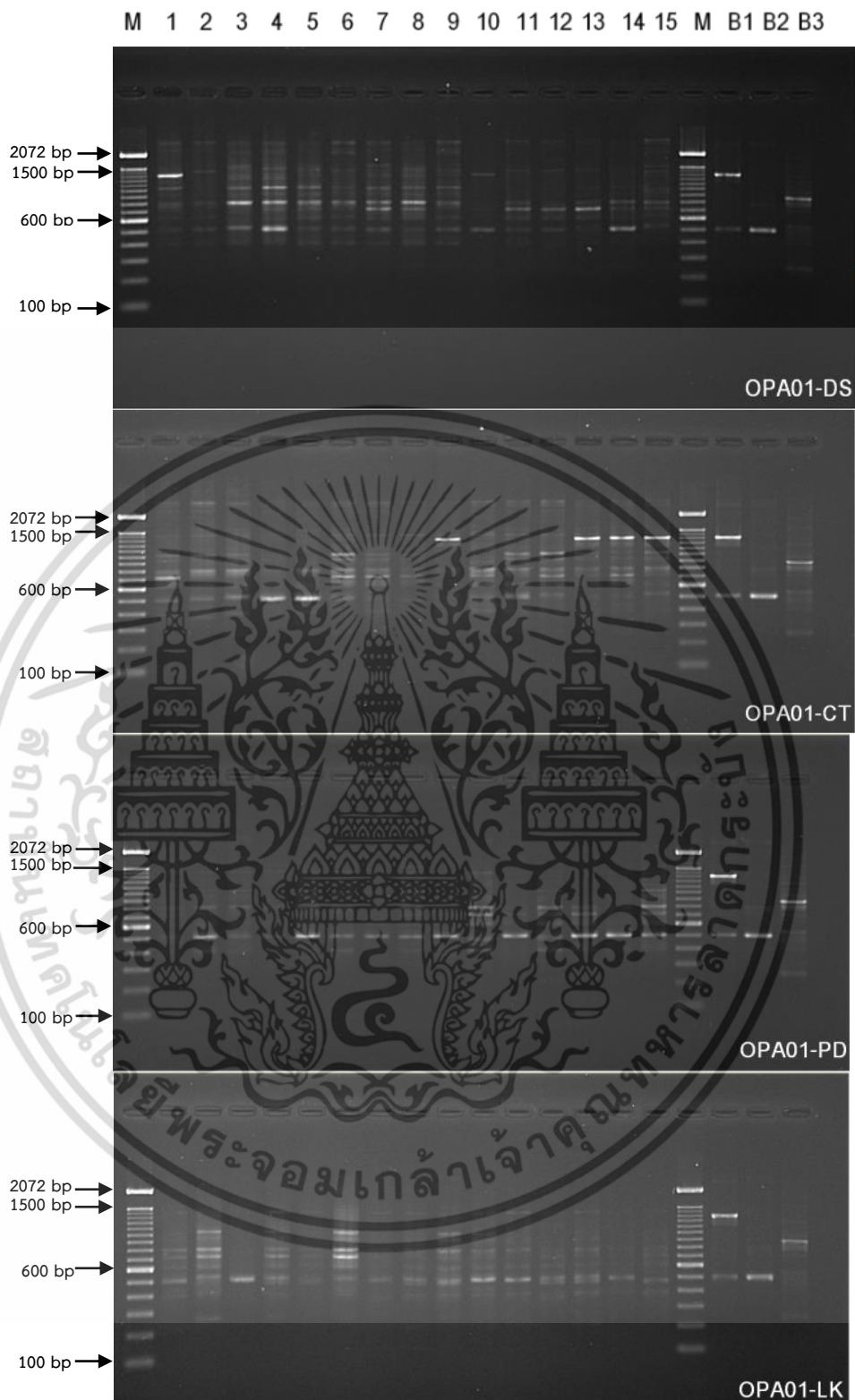
ตารางที่ 4.1 จำนวนแถบแบนของดีเอ็นเอของไก่พื้นเมืองของไพรเมอร์ RAPD 20 ชนิด

ไพรเมอร์	จำนวนแถบแบนทั้งหมด	แถบแบนที่เกิดความต่างระหว่างสายพันธุ์
OPA01	10	3
OPA02	13	2
OPA03	12	0
OPA04	9	0
OPA05	3	0
OPA06	9	1
OPA07	13	2
OPA08	13	1
OPA09	14	0
OPA10	12	0
OPA11	11	3
OPA12	9	2
OPA13	6	1
OPA14	4	2
OPA15	5	2
OPA16	6	1
OPA17	9	3
OPA18	10	3
OPA19	9	3
OPA20	14	3
Total	119	32

#### 4.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทย

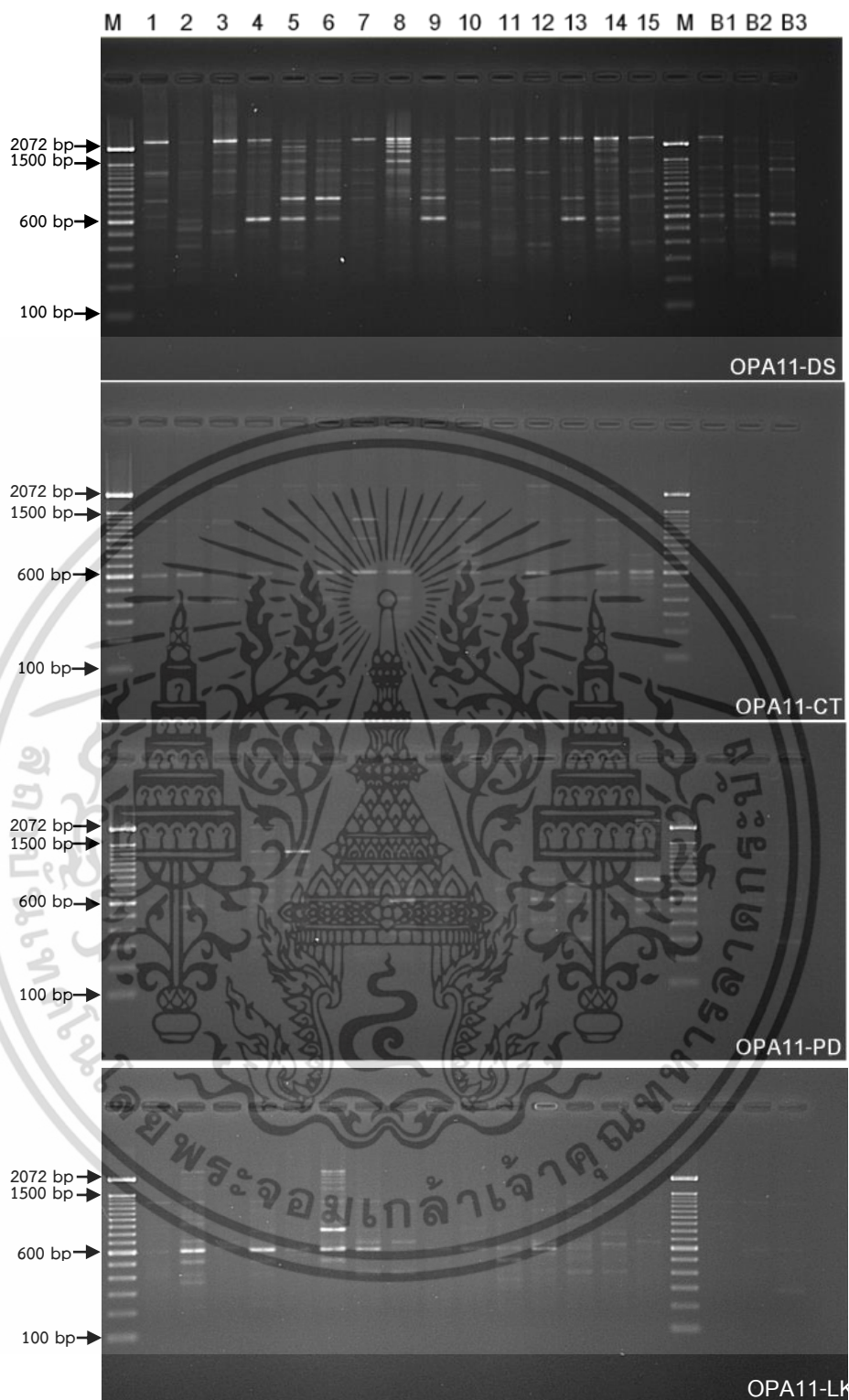
จากการนำไพรเมอร์จากการคัดเลือกมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์ จำนวน 60 ตัวอย่าง โดยเทคนิค RAPD พบว่าไพรเมอร์ 4 ชนิด (OPA01, OPA11, OPA16 และ OPA20) ไม่สามารถใช้เป็นเครื่องหมาย RAPD สำหรับจัดจำแนกพันธุ์ไก่พื้นเมืองได้ และให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่สามารถแยกความแตกต่างภายในสายพันธุ์ของไก่แดงสุราษฎร์ (DS) แต่ในสายพันธุ์ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD) สายพันธุ์ไก่เหลืองหางขาวกบินทร์บุรี (LK) และไก่สีท่าพระ (CT) ไม่สามารถแยกความแตกต่างภายในสายพันธุ์ได้ทั้งหมด ดังแสดงในรูปที่ 4.3-4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



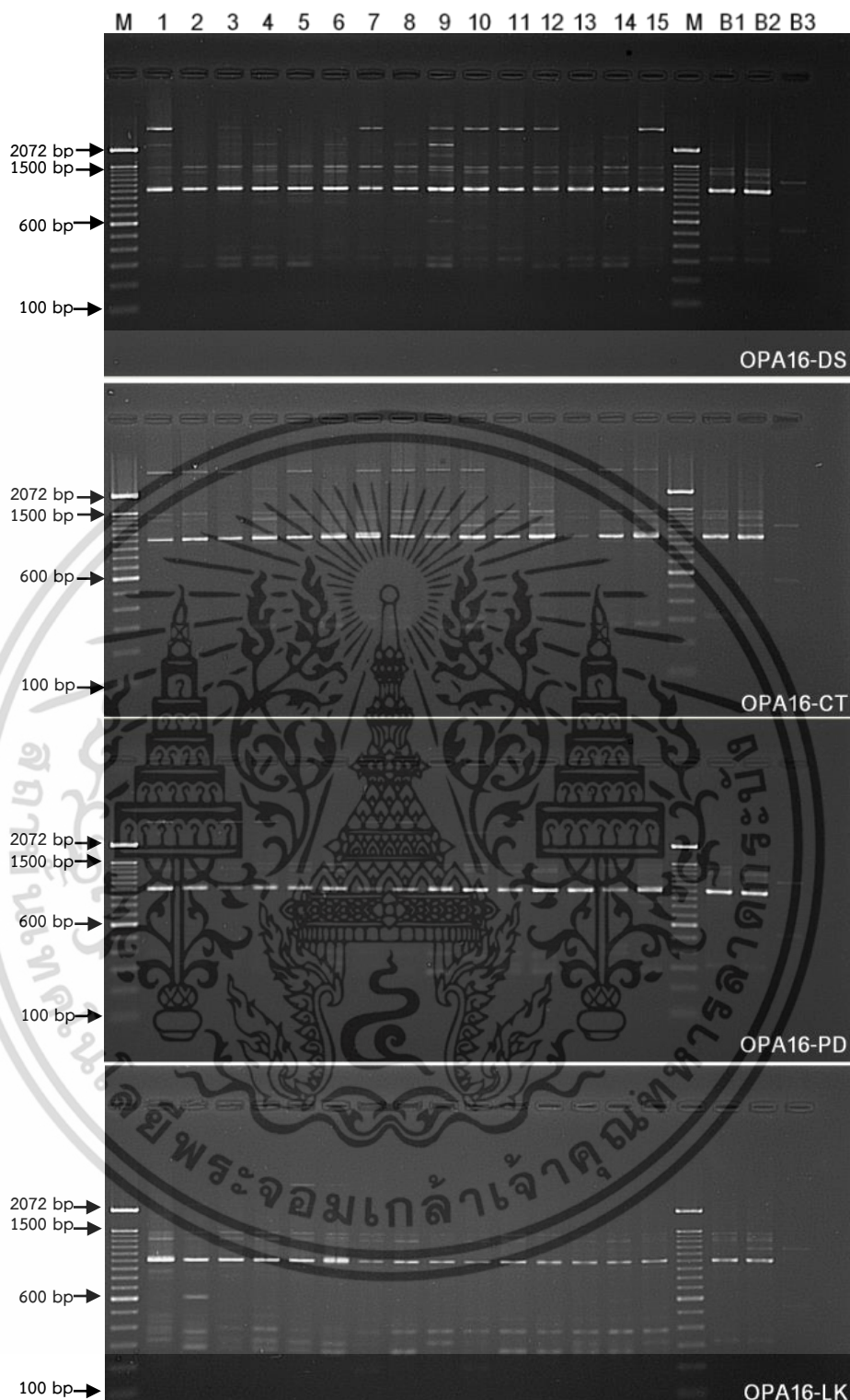
**รูปที่ 4.3** ไพรเมอร์ OPA01 ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD) ไก่เหลืองหางขาวกบินทร์บุรี (LK) ไก่แดงสุราษฎร์ (DS) out group 2 กลุ่ม คือ ไก่เนื้อ (B1, B2) และนกปรอทหัวโขน (B3) หมายเลข 1-15 คือ ตัวอย่างไก่พื้นเมืองในแต่ละสายพันธุ์ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



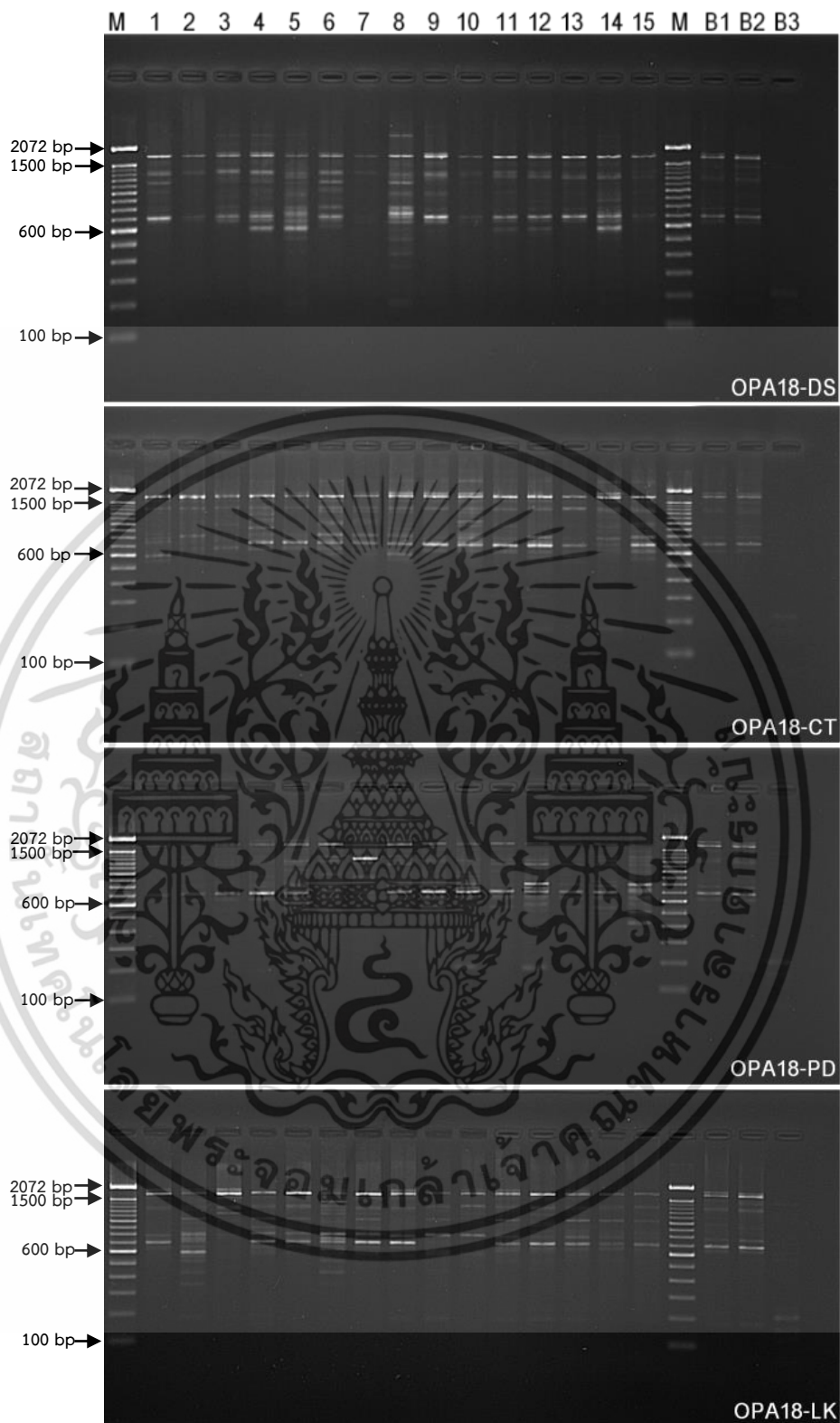
**รูปที่ 4.4** ไพรเมอร์ OPA11 ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยพื้นเมืองสายพันธุ์ กล้วยประดู่ทางดำเชียงใหม่ (PD) กล้วยเหลืองทางขาวกบินทร์บุรี (LK) กล้วยแดงสุราษฎร์ (DS) out group 2 กลุ่ม คือ กล้วยเนื้อ (B1, B2) และนกกปรอทหัวโขน (B3) หมายเลข 1-15 คือ ตัวอย่างกล้วยพื้นเมืองในแต่ละสายพันธุ์ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 4.5** ไพรเมอร์ OPA16 ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกล้วยพื้นเมืองสายพันธุ์ไก่อ่ประตูทางตำเชียงใหม่ (PD) ไก่อ่เหลืองหางขาวกบินทร์บุรี (LK) ไก่อ่แดงสุราษฎร์ (DS) out group 2 กลุ่ม คือ ไก่อ่เนื้อ (B1, B2) และนกปรอทหัวโขน (B3) หมายเลข 1-15 คือ ตัวอย่างกล้วยพื้นเมืองในแต่ละสายพันธุ์ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 โพรเมอร์ OPA18 ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD) ไก่เหลืองหางขาวกบินทร์บุรี (LK) ไก่แดงสุราษฎร์ (DS) out group 2 กลุ่ม คือ ไก่เนื้อ (B1, B2) และนกปรอทหัวโขน (B3) หมายเลข 1-15 คือ ตัวอย่างไก่พื้นเมืองในแต่ละสายพันธุ์ และ M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 คู่เบส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตเห็นไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลของเครื่องหมาย RAPD ด้วยโปรแกรม NTSYS-pc และเลือกวิธีจัดกลุ่มแบบ UPGMA โดยนำมาคำนวณค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน และสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ของไก่อพื้นเมือง 4 สายพันธุ์ คือ ไก่อประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD) ไก่ชีท่าพระ (CT) ไก่อเหลืองหางขาวบินทร์บุรี (LK) และไก่อแดงสุราษฎร์ (DS) สายพันธุ์ละ 15 ตัวอย่าง จำนวนรวม 60 ตัวอย่าง พบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือน (ตารางที่ 4.2) อยู่ระหว่าง 0.6597 ถึง 0.7802 และพบว่า CT และ PD มีความใกล้ชิดพันธุกรรมสูง ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ที่ 0.7802 เมื่อเปรียบเทียบกับ LK และ DS ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ที่ 0.7386 และ 0.6883 ตามลำดับ เนื่องมาจากทุกสายพันธุ์ในไก่อพื้นเมืองอาจมีต้นกำเนิดมาจากเหตุการณ์การเลี้ยงสัตว์ เกิดการอพยพจากภูมิภาคที่อยู่ใกล้เคียงกัน เกิดการแลกเปลี่ยนสารพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ไก่อ โดยตัวอย่างที่นำมาศึกษามีการผสมเก็บบรรวม และจัดหาไก่อพ่อ-แม่พันธุ์ของ CT, PD และ LK จากภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคตะวันออก และภาคกลางของประเทศไทย ทำให้ทั้งสามสายพันธุ์มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากกว่า DS เนื่องจากมีการรวบรวมไก่อพ่อ-แม่พันธุ์มาจากภาคใต้ทั้งหมด (อุดมศรี และคณะ, 2550) ด้วยเหตุนี้ทำให้ไก่อพื้นเมืองมีวิวัฒนาการแตกต่างกันออกไป และจะเห็นได้ว่าไก่อเนื้อ (B1) มีความใกล้ชิดกับสายพันธุ์ไก่อแดงสุราษฎร์มากที่สุดเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่น โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ที่ 0.7026 อาจจะเป็นเพราะว่าต้นกำเนิด หรือวิวัฒนาการของ B1 มาจากไก่อพื้นเมืองสายพันธุ์ DS ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Riztyan *et al.* (2014) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างไก่อป่าสีแดง และไก่อบ้านในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยใช้เครื่องหมาย SNP พบว่าสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มได้ 3 กลุ่มที่แตกต่างกัน คือ ไก่อป่าสีแดง ไก่อพื้นเมืองและไก่อเนื้อ โดยไก่อพื้นเมืองมีความเกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิดกับไก่อเนื้อมากกว่าไก่อป่าสีแดง ซึ่งค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรมอยู่ที่ 0.1463 และ 0.2620 ตามลำดับ

จากการสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของไก่อพื้นเมืองไทย พบว่าสามารถแบ่งตัวอย่างของไก่อพื้นเมืองทั้ง 60 ตัวอย่าง ออกเป็นเป็น 4 กลุ่ม คือ สายพันธุ์ไก่ชีท่าพระ (CT) ไก่อประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD) ไก่อเหลืองหางขาวบินทร์บุรี (LK) และไก่อแดงสุราษฎร์ (DS) และ out group 2 กลุ่ม คือ ไก่อเนื้อ (B1, B2) และนกปรอทหัวโขน (B3) แสดงดังรูปที่ 4.7 โดย CT, PD และ LK มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูง เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ DS และจะเห็นได้ว่า PD ไม่สามารถแยกความแตกต่างภายในสายพันธุ์เดียวกันได้ คือ PD01 และ PD02 เช่นเดียวกันกับ LK คือ LK12 และ LK13 เนื่องจากมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันทางสายเลือด จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการอนุรักษ์สายพันธุ์ให้เกิดพันธุ์แท้ เพื่อจดทะเบียนประวัติในอนาคต ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ปาริชาติ (2547) ศึกษาการประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างไก่อพื้นเมืองไทย 4

สายพันธุ์คือ ไก่อพันธุ์เหลืองหางขาว (LK) ไก่อพันธุ์ประดู่หางดำ (PD) ไก่อพันธุ์นกแดงหางแดง (ND) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์เพื่อการเชิงวิชาการเท่านั้น เมื่อเผยแพร่ให้ใช้ประโยชน์ในการศึกษา  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โก่งพันธุ์ซี (S) โดยใช้เครื่องหมาย microsatellite เมื่อนำมาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่า LK, PD, ND และ S พบว่าสามารถจัดแบ่งกลุ่มโก่งพันธุ์เมืองไทยออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ กลุ่มแรกประกอบด้วย LK และ ND ส่วนกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย PD และ S และพบว่าในสายพันธุ์ PD, LK และ ND มีความเหมือนทางพันธุกรรมภายในสายพันธุ์ในแต่ละสายพันธุ์สูงเช่นเดียวกัน คือ PD4 กับ PD6, LK9 กับ LK11 และ ND11 กับ ND12 ซึ่งจากการทดลองสรุปได้ว่าโก่งพันธุ์เมืองไทยทั้ง 4 สายพันธุ์ที่กล่าวมาข้างต้นมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมสูง เนื่องจากภูมิประเทศที่แตกต่างกัน กล่าวคือ CT, PD และ LK มีการกระจายพันธุ์ในภูมิภาคต่างๆของประเทศไทยได้มากกว่า DS และจากสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงโก่งที่ต่างกันอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของลักษณะภายนอก ลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจ และการทนทานต่อโรค ทำให้แต่ละสายพันธุ์มีบางส่วนที่เหมือนและแตกต่างกัน ซึ่งแสดงลักษณะภายนอกของตัวอย่างของโก่งพันธุ์เมืองแต่ละสายพันธุ์ ดังแสดงในรูปที่ 4.8-4.11 และลักษณะประจำพันธุ์ที่มีส่วนเหมือนกัน และแตกต่างกันสรุปได้ดังตารางที่ 4.3 (อุดมศรี และคณะ, 2550) แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ทำให้ทราบถึงสายพันธุ์ที่ให้ความแตกต่างเช่นสายพันธุ์โก่งเหลืองหางขาว กบินทร์บุรี (LK) กับโก่งแดงสุราษฎร์ (DS) จากแผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของโก่งพันธุ์เมืองไทย และจากค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ที่ 0.6597 ซึ่งมีความห่างทางพันธุกรรมมากกว่าโก่งพันธุ์เมืองสายพันธุ์อื่น ดังนั้นจากข้อมูลดังกล่าวสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงและพัฒนาสายพันธุ์ได้ โดยการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความห่างไกลทางพันธุกรรมมาปรับปรุงพันธุ์ให้มีลักษณะที่ดี และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ตามวัตถุประสงค์ต้องการ

**ตารางที่ 4.2** ความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมของโก่งพันธุ์เมือง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ โก่งแดงสุราษฎร์ (DS) โก่งสีท่าพระ(CT) โก่งประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD) โก่งเหลืองหางขาวกบินทร์บุรี (LK) out group 2 กลุ่ม คือ โก่งเนื้อ (B1, B2) และนกปรอทหัวโขน (B3) ด้วยโปรแกรม NTSYSpc

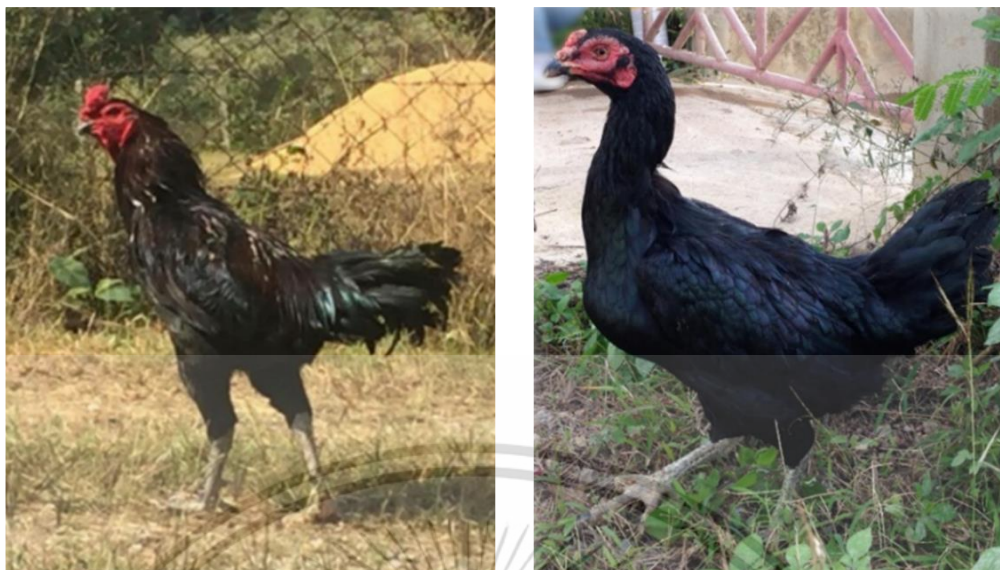
	DS	CT	PD	LK	B1	B2	B3
DS	1						
CT	0.6883	1					
PD	0.6824	0.7802	1				
LK	0.6597	0.7386	0.7675	1			
B1	0.7026	0.7680	0.7595	0.7288	1		
B2	0.6837	0.7359	0.7314	0.7438	0.9314	1	
B3	0.4464	0.5745	0.6249	0.5693	0.6078	0.5784	1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**รูปที่ 4.7** แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์ คือ ไก่ตุงสุราษฎร์ (DS) ไก่ชิวาพระ (CT) ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD) ไก่เหลืองหางขาวบึงทรัพย์ (LK) และ out group 2 กลุ่ม คือ ไก่เชิงพาณิชย์ (B1, B2) และนกปรอดหัวโขน (B3) ด้วยโปรแกรม NTSyspc โดยใช้การจัดกลุ่มแบบ UPGMA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ประดู่หางดำเชียงใหม่ เพศผู้ (ซ้าย) และเพศเมีย (ขวา)



รูปที่ 4.9 ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวกบินทร์บุรี เพศผู้ (ซ้าย) และเพศเมีย (ขวา)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ซีท่าพระ เพศผู้ (ซ้าย) และเพศเมีย (ขวา)



รูปที่ 4.11 ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์แดงสุราษฎร์ เพศผู้ (ซ้าย) และเพศเมีย (ขวา)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ลักษณะประจำพันธุ์ของไก่พื้นเมืองเทศผู้ และเทศเมีย 4 สายพันธุ์ คือ ไก่ประดู่หางดำ เชียงใหม่ (PD) ไก่เหลืองหางขาวกบินทร์บุรี (LK) ไก่สีท่าพระ (CT) และไก่แดงสุราษฎร์ (DS)

ไก่พื้นเมืองเทศผู้ 4 สายพันธุ์				
ลักษณะประจำพันธุ์	PD	LK	CT	DS
1. สีขนลำตัว	ดำปลอด	ดำมีกระขาว	ขาว	แดง
2. สีขนคอและสร้อยคอ	แดงเข้ม	เหลืองอดแดง	ขาว	แดง
3. สีขนหาง	ดำปรอท	ดำมีขนขาวแซม	ขาว	ดำแดง
4. สีขนปีก	ดำ	ดำแซมขาว	ขาว	แดง
5. สีปากและสีแข้ง	ดำ	เหลือง	น้ำตาลเหลือง	เหลือง
6. สีตา	น้ำตาลเข้ม	เหลืองอมน้ำตาล	เหลือง	เหลืองอมน้ำตาล
7. สีผิวหนัง	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน
8. ลักษณะหงอน	ถั่ว	ถั่ว	ถั่ว	ถั่ว
9. สีหน้า	แดง	แดง	แดง	แดง
10. รูปร่างและขนาด	รูปร่างสูง ลำตัวยาวไหล่กว้าง คอยาว ขายาว และขนหางยาว	รูปร่างสูง ลำตัวยาวไหล่กว้าง คอยาว ขายาว และขนหางยาว	รูปร่างสูง ลำตัวยาวไหล่กว้าง คอยาว ขายาว และขนหางยาว	รูปร่างสูง ลำตัวยาว ขายาว และขนหางยาว
ไก่พื้นเมืองเทศเมีย 4 สายพันธุ์				
ลักษณะประจำพันธุ์	PD	LK	CT	DS
1. สีขนลำตัว	ดำปลอด	ดำมีกระขาว	ขาว	แดง
2. สีขนคอและสร้อยคอ	ดำ	ดำ	ขาว	แดง
3. สีขนหาง	ดำ	ดำ	ขาว	แดง
4. สีขนปีก	ดำ	ดำแซมขาว	ขาว	แดง
5. สีปากและสีแข้ง	ดำ	เหลืองปนดำ	เหลือง	น้ำตาลเหลือง
6. สีตา	น้ำตาลเข้ม	เหลืองอมน้ำตาล	เหลืองอมน้ำตาล	เหลือง
7. สีผิวหนัง	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน	เหลืองอ่อน
8. ลักษณะหงอน	ถั่ว	ถั่ว	ถั่ว	ถั่ว
9. สีหน้า	แดงเข้ม	แดง	ชมพู	แดง
10. รูปร่างและขนาด	สูงเพรียว ออกกว้าง	สูงเพรียว ออกกว้าง	สูงเพรียว ออกกว้าง	สูงเพรียว ออกกว้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4 การศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอ

จากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์แล้วนั้น ไม่พบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ ดังนั้นจึงมีการศึกษาแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากันในทุกสายพันธุ์ และปรากฏแถบดีเอ็นเออย่างชัดเจนในทุกสายพันธุ์ได้ โดยการโคลนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการ และหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอนุรักษ์ของไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ไก่แดงสุราษฎร์ (DS11) ไก่ชิวาพระ (CT04) ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD11) และไก่เหลืองหางขาวบิรินทร์บุรี (LK05) พบว่าสามารถนำมาออกแบบไพรเมอร์ที่ครอบคลุมชิ้นดีเอ็นเอ คือ primerTS forward: 5'AGCCAGCGAACGGACTAG-3' และ reverse: 5'-TAGCCAGCGAATAACCTCAG-3' และเมื่อนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ พบว่าไพรเมอร์ที่ได้รับการออกแบบมานั้นมีความจำเพาะทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งมีขนาดประมาณ 1000 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 4.9 นอกจากนี้ยังมีการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาใช้สำหรับการจัดจำแนก คัดเลือกสายพันธุ์ไก่พื้นเมือง และพัฒนาเป็นเครื่องหมาย SNP ต่อไป



รูปที่ 4.12 ผลผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาด 1000 คู่เบส ของ primerTS

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มาค้นหาความเหมือนโดยการทำ BLAST ของไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ไก่แดงสุราษฎร์ (DS11) ซึ่งมีขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ 1005 คู่เบส ที่ได้จากการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่ามีความเหมือนกับสิ่งมีชีวิตหลายชนิด คือ นกกีวี (*Apteryx australis mantelli*; LK064658.1) ไก่ป่าสีแดง (*Gallus gallus*; XM\_015292590.1) นกกระทา (*Coturnix japonica*; XM\_015874240.1) ไก่ต็อกหมวกเหล็ก (*Numida meleagris*; XM\_021408162.1) ไก่วง (*Meleagris gallopavo*; XM\_010718153.2) และนกขุนแผนหางลาย (*Apaloderma vittatum*; XM\_009879324.1) พบว่าค่าคะแนนสูงที่สุดในการเปรียบเทียบระหว่างลำดับเบสของเอกสารนี้เป็นเอกสารรหัสฐานข้อมูลชีววิทยาเพื่อการศึกษา เมื่อผู้เขียนได้ค้นพบข้อมูลเหล่านี้แล้วพบว่ามีความคล้ายคลึงกันสูงมาก ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตัวอย่างกับลำดับเบสของข้อมูล (Max score) พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 150-285 ค่าความครอบคลุมของลำดับเบสที่ต้องการสืบค้นเทียบกับลำดับเบสของข้อมูล (Query cover) พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 17-25 เปอร์เซ็นต์ และค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสของตัวอย่างกับลำดับเบสของข้อมูล (%Identity) พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 91-100 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังตารางที่ 4.4 จากค่าที่กล่าวมาข้างต้นพบว่า DS11 มีความเหมือนกับสิ่งมีชีวิตไก่ป่าสีแดง (*Gallus gallus*; XM\_015292590.1) มากที่สุดคือมีค่า Query cover 25 เปอร์เซ็นต์ และ Identity 99 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้จะมีค่า Max score น้อยกว่า นกกีวี (*Apteryx australis mantelli*; LK064658.1) จากการศึกษาครั้งนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ระบุจากการ Blast พบว่าเป็นการทำนายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบ คือ ยีน nuclear factor of activated T cells 5 (NFAT5) ในไก่พื้นเมือง

ตารางที่ 4.4 การค้นหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ไก่แดง สุราษฎร์ (DS) กับฐานข้อมูล NCBI

Accession number	สิ่งมีชีวิตในฐานข้อมูล NCBI	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
LK064658.1	<i>Apteryx australis mantelli</i>	285	285	20%	2e-72	91%
XM_015292589.1	<i>Gallus gallus</i>	176	472	25%	1e-39	99%
XM_015874240.1	<i>Coturnix japonica</i>	165	318	18%	2e-36	97%
XM_021408162.1	<i>Numida meleagris</i>	150	301	17%	6e-32	95%
XM_010718153.2	<i>Meleagris gallopavo</i>	150	295	17%	6e-32	100%
XM_009879324.1	<i>Apaloderma vittatum</i>	150	270	17%	6e-32	100%

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มาค้นหาความเหมือนโดยการ BLAST ของไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ไก่ฟ้าพระ (CT04) ซึ่งมีขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ 1004 คู่เบส ที่ได้จากการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit เป็นพบว่ามีค่าความเหมือนกับสิ่งมีชีวิตหลายชนิด คือ นกกีวี (*Apteryx australis mantelli*; LK064658.1) ไก่ป่าสีแดง (*Gallus gallus*; XM\_015292590.1) นกกระทา (*Coturnix japonica*; XM\_015874240.1) ไก่ต๊อกหมวกเหล็ก (*Numida meleagris*; XM\_021408162.1) ไก่วง (*Meleagris gallopavo*; XM\_010718153.2) และนกขุนแผนหางลาย (*Apaloderma vittatum*; XM\_009879324.1) พบว่าค่าคะแนนสูงสุดในการเปรียบเทียบระหว่างลำดับเบสของตัวอย่างกับลำดับเบสของข้อมูล (Max score) พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 150-274 ค่าความ

ครอบคลุมของลำดับเบสที่ต้องการสืบค้นเทียบกับลำดับเบสของข้อมูล (Query cover) พบว่ามีค่าอยู่ไม่ต่ำกว่าครึ่งใด ๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระหว่าง 17-25 เปอร์เซ็นต์ และค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสของตัวอย่างกับลำดับเบสของข้อมูล (%Identity) พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 90-100 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังตารางที่ 4.5 จากค่าที่กล่าวมาข้างต้นพบว่า CT04 มีความเหมือนกับสิ่งมีชีวิตไก่ป่าสีแดง (*Gallus gallus*; XM\_015292590.1) มากที่สุด คือมีค่า Query cover 25 เปอร์เซ็นต์ และ Identity 100 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้จะมีค่า Max score น้อยกว่า นกกีวี (*Apteryx australis mantelli*; LK064658.1) จากการศึกษาครั้งนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ระบุจากการ Blast พบว่าเป็นการทำนายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบ คือ ยีน nuclear factor of activated T cells 5 (NFAT5) ในไก่พื้นเมือง

ตารางที่ 4.5 การค้นหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ไก่ชี่ท่าพระ (CT) กับฐานข้อมูล NCBI

Accession number	สิ่งมีชีวิตในฐานข้อมูล NCBI	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
LK064658.1	<i>Apteryx australis mantelli</i>	274	274	20%	4e-69	90%
XM_015292589.1	<i>Gallus gallus</i>	184	472	25%	2e-41	100%
XM_015874240.1	<i>Coturnix japonica</i>	159	312	18%	1e-34	96%
XM_021408162.1	<i>Numida meleagris</i>	156	306	17%	1e-33	96%
XM_010718153.2	<i>Meleagris gallopavo</i>	150	301	17%	6e-32	95%
XM_009879324.1	<i>Apaloderma vittatum</i>	150	275	17%	6e-32	100%

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มาค้นหาความเหมือนโดยการ BLAST ของไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD11) ซึ่งมีขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ 1004 คู่เบส ที่ได้จากการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit เป็นพบว่ามีค่าความเหมือนกับสิ่งมีชีวิตหลายชนิด คือ นกกีวี (*Apteryx australis mantelli*; LK064658.1) ไก่ป่าสีแดง (*Gallus gallus*; XM\_015292590.1) นกกระทา (*Coturnix japonica*; XM\_015874240.1) ไก่ต๊อกหมวกเหล็ก (*Numida meleagris*; XM\_021408162.1) ไก่วง (*Meleagris gallopavo*; XM\_010718153.2) และนกขุนแผนหางลาย (*Apaloderma vittatum*; XM\_009879324.1) พบว่าค่าคะแนนสูงสุดในการเปรียบเทียบระหว่างลำดับเบสของตัวอย่างกับลำดับเบสของข้อมูล (Max score) พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 150-285 ค่าความครอบคลุมของลำดับเบสที่ต้องการสืบค้นเทียบกับลำดับเบสของข้อมูล (Query cover) พบว่ามีค่าอยู่

ของข้อมูล (%Identity) พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 91-100 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังตารางที่ 4.6 จากค่าที่กล่าวมาข้างต้นพบว่า PD11 มีความเหมือนกับสิ่งมีชีวิตไก่ป่าสีแดง (*Gallus gallus*; XM\_015292590.1) มากที่สุด คือมีค่า Query cover 25 เปอร์เซ็นต์ และ Identity 100 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้จะมีค่า Max score น้อยกว่านกกีวี (*Apteryx australis mantelli*; LK064658.1) จากการศึกษาครั้งนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ระบุจากการ Blast พบว่าเป็นการทำนายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบ คือ ยีน nuclear factor of activated T cells 5 (NFAT5) ในไก่พื้นเมือง

ตารางที่ 4.6 การค้นหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD) กับฐานข้อมูล NCBI

Accession number	สิ่งมีชีวิตในฐานข้อมูล NCBI	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
LK064658.1	<i>Apteryx australis mantelli</i>	285	285	20%	2e-72	91%
XM_015292589.1	<i>Gallus gallus</i>	182	472	25%	2e-41	100%
XM_015874240.1	<i>Coturnix japonica</i>	159	312	18%	1e-34	96%
XM_021408162.1	<i>Numida meleagris</i>	156	306	17%	1e-33	96%
XM_010718153.2	<i>Meleagris gallopavo</i>	150	301	17%	6e-32	95%
XM_009879324.1	<i>Apaloderma vittatum</i>	150	275	17%	6e-32	100%

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์มาค้นหาความเหมือนโดยการ BLAST ของไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ไก่เหลืองหางขาวบินทร์บุรี (LK05) ซึ่งมีขนาดลำดับนิวคลีโอไทด์ 1004 คู่เบส ที่ได้จากการจัดเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยโปรแกรม BioEdit พบว่ามีค่าความเหมือนกับสิ่งมีชีวิตหลายชนิด คือ นกกีวี (*Apteryx australis mantelli*; LK064658.1) ไก่ป่าสีแดง (*Gallus gallus*; XM\_015292590.1) นกกระทา (*Coturnix japonica*; XM\_015874240.1) ไก่ต๊อกหมวกเหล็ก (*Numida meleagris*; XM\_021408162.1) ไก่วง (*Meleagris gallopavo*; XM\_010718153.2) และนกขุนแผนหางลาย (*Apaloderma vittatum*; XM\_009879324.1) พบว่าค่าคะแนนสูงสุดในการเปรียบเทียบระหว่างลำดับเบสของตัวอย่างกับลำดับเบสของข้อมูล (Max score) พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 150-285 ค่าความครอบคลุมของลำดับเบสที่ต้องการสืบค้นเทียบกับลำดับเบสของข้อมูล (Query cover) พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 17-20 เปอร์เซ็นต์ และค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของลำดับเบสของตัวอย่างกับลำดับเบส

ของข้อมูล (%Identity) พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 91-100 เปอร์เซ็นต์ แสดงดังตารางที่ 4.7 จากค่าที่เอกสารนี้เป็นการนำข้อมูลไปใช้เพื่อการศึกษาวิจัยในเชิงวิทยาศาสตร์เท่านั้น ไม่สามารถนำข้อมูลนี้ไปใช้เพื่อการพาณิชย์ใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กล่าวมาข้างต้นพบว่า LK05 มีความเหมือนกับสิ่งมีชีวิตไก่ป่าสีแดง (*Gallus gallus*; XM\_015292590.1) มากที่สุด คือมีค่า Query cover 25 เปอร์เซ็นต์ และ Identity 99 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้จะมีค่า Max score น้อยกว่า นกกีวี (*Apteryx australis mantelli*; LK064658.1) จากการศึกษาครั้งนี้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ระบุจากการ Blast พบว่าเป็นการทำนายของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองการอักเสบ คือ ยีน nuclear factor of activated T cells 5 (NFAT5) ในไก่พื้นเมือง

ตารางที่ 4.7 การค้นหาความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ไก่เหลืองหางขาวบินทร์บุรี (LK) กับฐานข้อมูล NCBI

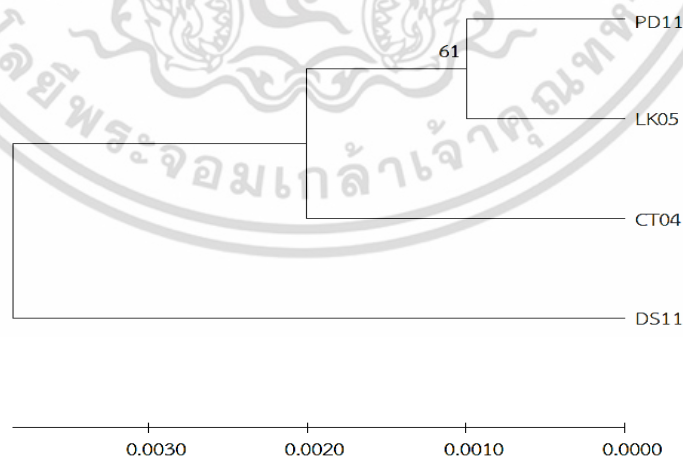
Accession number	สิ่งมีชีวิตในฐานข้อมูล NCBI	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident
LK064658.1	<i>Apteryx australis mantelli</i>	285	285	20%	2e-72	91%
XM_015292589.1	<i>Gallus gallus</i>	176	466	25%	1e-39	99%
XM_015874240.1	<i>Coturnix japonica</i>	154	306	18%	5e-33	95%
XM_021408162.1	<i>Numida meleagris</i>	150	301	17%	6e-32	96%
XM_010718153.2	<i>Meleagris gallopavo</i>	150	295	17%	6e-32	100%
XM_009879324.1	<i>Apaloderma vittatum</i>	150	273	17%	6e-32	100%

เมื่อนำลำดับเบสที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม BioEdit เพื่อให้ได้ลำดับเบสครบทั้ง 1000 คู่เบสของไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์ คือ ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD11) ไก่ชีท่าพระ (CT04) ไก่เหลืองหางขาวบินทร์บุรี (LK05) และไก่แดงสุราษฎร์ (DS11) มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์ ดังแสดงในรูปที่ 4.14 พบว่ามีตำแหน่งที่ทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ หรือตำแหน่ง SNP ทั้งหมด 12 ตำแหน่ง โดยตำแหน่งที่ 23, 442, 450, 455, 534, 834 และตำแหน่งที่ 942 พบการแทนที่ของเบสใน DS11 ซึ่งสามารถใช้แยกความแตกต่างออกจากไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ CT04, PD11 และ LK05 ได้ ในสายพันธุ์ CT04 พบลำดับเบสที่ใช้ในการแยกความแตกต่างจากไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ DS11, PD11 และ LK05 ได้คือ ตำแหน่งที่ 120, 247, 266 และพบการแทนที่ของเบสที่ใช้ในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ LK05 จากสายพันธุ์อื่น (DS11, CT04 และ PD11) 2 ตำแหน่งคือ ตำแหน่งที่ 355 และ 908 แต่ไม่พบลำดับเบสที่ใช้ในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ PD11 ได้ อาจเป็นไปได้ว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ขนาด 1000 คู่เบสไม่เหมาะสมต่อการใช้ศึกษาความแตกต่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของไก่สายพันธุ์ PD11 ซึ่งจากการงานวิจัยของ

Bonjongsat *et al.* (2013) ได้เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ของปลาการ์ตูน เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แต่ละชนิดในประเทศไทยแล้วพัฒนาเป็นฐานข้อมูลรหัสดีเอ็นเอ โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA และยีน Cytb พบว่าฐานข้อมูลรหัสดีเอ็นเอจากบริเวณยีน Cytb สามารถแยกชนิดของปลาการ์ตูนได้ชัดเจน แสดงให้เห็นว่าฐานข้อมูลรหัสดีเอ็นเอบริเวณยีน Cytb เป็นบริเวณที่ใช้ตรวจสอบชนิดของปลาการ์ตูนได้ แต่ฐานข้อมูลรหัสดีเอ็นเอจากบริเวณยีน 16S rRNA พบว่า ปลาการ์ตูนส้มขาวตัวหนึ่งมีค่าความแตกต่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์กับปลาการ์ตูนส้มขาวตัวอื่นๆ มาก ในขณะที่ปลาการ์ตูนส้มขาวดำไม่จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับปลาการ์ตูนส้มขาวตัวอื่นๆ อาจเป็นไปได้ว่า ยีน 16S rRNA อาจไม่เหมาะสมต่อการใช้ศึกษาความแตกต่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ในระดับชนิดของปลาการ์ตูน ดังนั้นสิ่งสำคัญในการใช้ลำดับของนิวคลีโอไทด์ในการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิต คือ การเลือกบริเวณใดบนตำแหน่งของจีโนม เพื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เนื่องจากจีโนมของสิ่งมีชีวิตประกอบด้วยส่วนที่มีวิวัฒนาการด้วยอัตราที่ต่างกัน มีผลทำให้ความสามารถในการแยกแตกต่างกัน ซึ่งการเปรียบเทียบลำดับของนิวคลีโอไทด์มีทั้งส่วนที่มีวิวัฒนาการน้อย (conserved region) และส่วนที่วิวัฒนาการมาก (variable region) ทำให้สามารถใช้บริเวณอนุรักษ์เป็นจุดอ้างอิง เพื่อเทียบหาความแตกต่างบริเวณผันแปรได้ (สาวิตรี, 2556)

จากการนำข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้มาหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมในโปรแกรม MEGA7 เลือกวิธีการจัดกลุ่มแบบ UPGMA ดังแสดงในรูปที่ 4.13 พบว่าสายพันธุ์ไก่อีต๊ะ (CT04) ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD11) และไก่เหลืองหางขาวบิรินทร์บุรี (LK05) มีความใกล้ชิดพันธุกรรมสูง เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ไก่แดงสุราษฎร์ (DS11) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้เครื่องหมาย RAPD (รูปที่ 4.7)



**รูปที่ 4.13** แผนภูมิความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่แดงสุราษฎร์ (DS) ไก่อีต๊ะ (CT) ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD) และไก่เหลืองหางขาวบิรินทร์บุรี (LK) โดยทำ Bootstrap 1000 และการจัดกลุ่มแบบ UPGMA ด้วยโปรแกรม MEGA7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่หรือใช้งานด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DS11	AGC CAG CGA ACG GAC TAG ATT CCG GTT TCG AAC CCT TGG	[ 39]
CT04	... .. .T. ....	[ 39]
PD11	... .. .T. ....	[ 39]
LK05	... .. .T. ....	[ 39]
DS11	GGG TCC GCA ACA GCT TCT CAG GAT GGC TGA TTC ATT CCT	[ 78]
CT04	... ..	[ 78]
PD11	... ..	[ 78]
LK05	... ..	[ 78]
DS11	GCA AAA TTT GGG TGG GAA TTT ATG GTT AAA TTA TTA ACA	[ 117]
CT04	... ..	[ 117]
PD11	... ..	[ 117]
LK05	... ..	[ 117]
DS11	ACA ATG ATA AGA ATC AAT TTA GTA CCT TTT ATA GCC TCT	[ 156]
CT04	..G .....	[ 156]
PD11	... ..	[ 156]
LK05	... ..	[ 156]
DS11	TCA AAA GAA CAA TGT TGG GCT GGG CTG GAG ATT TCC TTC	[ 195]
CT04	... ..	[ 195]
PD11	... ..	[ 195]
LK05	... ..	[ 195]
DS11	TTC ACA TTA ACA TTC AGA GTA CCA GCT GCT GAG ACA AAA	[ 234]
CT04	... ..	[ 234]
PD11	... ..	[ 234]
LK05	... ..	[ 234]
DS11	CAC ATT GAA AAC TTC CTT ATA TTA AAA CAG CAA ACA AGA	[ 273]
CT04	... .. C. .... .G. ....	[ 273]
PD11	... ..	[ 273]
LK05	... ..	[ 273]
DS11	AAA AAA ATC CTC AAA GCA AAC TCA AAC AGT TAC TTA TAC	[ 312]
CT04	... ..	[ 312]
PD11	... ..	[ 312]
LK05	... ..	[ 312]
DS11	CTT AAA GTA ATT AAA GCT TTT TTG AAA CTC ATA GAA GCA	[ 351]
CT04	... ..	[ 351]
PD11	... ..	[ 351]
LK05	... ..	[ 351]
DS11	TTC TGC AGT GTT CAT AAG CTT TCC TTA TGC CTG TGA ACA	[ 390]
CT04	... ..	[ 390]
PD11	... ..	[ 390]
LK05	... C. ....	[ 390]
DS11	CAC AGT TCA CAA AAC TGT GGG CAC TAC AGT TCA CAG TAT	[ 429]
CT04	... ..	[ 429]
PD11	... ..	[ 429]
LK05	... ..	[ 429]

รูปที่ 4.14 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์ ได้แก่

ไก่แดงสุราษฎร์ (DS11) ไก่ซีท่าพระ (CT04) ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD11) และ

ไก่เหลืองหางขาวบึงนาราง (LK05) ด้วยโปรแกรม MEGA7

หมายเหตุ : (.) แทนลำดับเบสที่เหมือนกัน, (-) ไม่พบเบสในลำดับนิวคลีโอไทด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ในวงกว้าง  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DS11	AA ATT GGT GCT GTT TTT CTG TTA TGT ATG TAT GTC TGT A	[ 586]
CT04	.. .. .	[ 586]
PD11	.. .. .	[ 586]
LK05	.. .. .	[ 586]
DS11	TC TGT ATG TAG GAT GCC TGC ATT TTT CCC TCT CAG CTT C	[ 625]
CT04	.. .. .	[ 625]
PD11	.. .. .	[ 625]
LK05	.. .. .	[ 625]
DS11	AT TTT GAA CCT TGT AGA AGA AAT GTT TAA GAA CAG CTT C	[ 664]
CT04	.. .. .	[ 664]
PD11	.. .. .	[ 664]
LK05	.. .. .	[ 664]
DS11	CAT CTG CAC TTC AA AAA TGA AGA AAC CAA AAA TGA AGT C	[ 469]
CT04	.. .. .G .. .G. ....	[ 469]
PD11	.. .. .G .. .G. ....	[ 469]
LK05	.. .. .G .. .G. ....	[ 469]
DS11	AA CAA TTG CAC TGC GTG TTG TCA TAT GAA TAA AGC AAC A	[ 508]
CT04	.. .. .	[ 508]
PD11	.. .. .	[ 508]
LK05	.. .. .	[ 508]
DS11	AA AAT ACA TGA CAT CAC GAA ACA TCA CTC CTT ACA GTA A	[ 547]
CT04	.. .. .G .. ..	[ 547]
PD11	.. .. .G .. ..	[ 547]
LK05	.. .. .G .. ..	[ 547]
DS11	TA CTG ATA CCT GTC AAT AGA TTT TGG TGA CAG CAC CAC G	[ 703]
CT04	.. .. .	[ 703]
PD11	.. .. .	[ 703]
LK05	.. .. .	[ 703]
DS11	CA GCT GAA GTT TGA GCT ACC CGC CAC ATA AAT GAA TAA T	[ 742]
CT04	.. .. .	[ 742]
PD11	.. .. .	[ 742]
LK05	.. .. .	[ 742]
DS11	GA AAC ATA AGG ACT TGA CTT TTC TTG GCA GAG CAA ATC T	[ 781]
CT04	.. .. .	[ 781]
PD11	.. .. .	[ 781]
LK05	.. .. .	[ 781]
DS11	TA ACC ACA AGA GGA GTC TGA AAA GAT CCT CAT TAT CTA A	[ 820]
CT04	.. .. .	[ 820]
PD11	.. .. .	[ 820]
LK05	.. .. .	[ 820]

**รูปที่ 4.14** (ต่อ) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่แดงสุราษฎร์ (DS11) ไก่ชีท่าพระ (CT04) ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD11) และ ไก่เหลืองหางขาวบึงบุรี (LK05) ด้วยโปรแกรม MEGA7

**หมายเหตุ :** (.) แทนลำดับเบสที่เหมือนกัน, (-) ไม่พบเบสในลำดับนิวคลีโอไทด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

DS11	CA TTT GTT ATA TGG ACT ATG AGA TTA GGA AAG AAA GGC T	[ 859]
CT04	.. ... ..A ... ..	[ 859]
PD11	.. ... ..A ... ..	[ 859]
LK05	.. ... ..A ... ..	[ 859]
DS11	GA GCA GGT CAA TGC CCA CTC CTT TCC CAT TTT CCA TTT T	[ 898]
CT04	.. ... ..	[ 898]
PD11	.. ... ..	[ 898]
LK05	.. ... ..	[ 898]
DS11	AC ATA CAT GTA TCT GGA GTG TAC GTG AAT TGC TGC ACA T	[ 937]
CT04	.. ... ..	[ 937]
PD11	.. ... ..	[ 937]
LK05	.. ... ..G ... ..	[ 937]
DS11	CA TGT GAT CGT CA GCA TTG GTC ACC ACA TAA ATT CCC AC	[ 977]
CT04	.. ..C ... ..	[ 977]
PD11	.. ..C ... ..	[ 977]
LK05	.. ..C ... ..	[ 977]
DS11	A GAA ACA GCT GAG GTT ATT CGC TGG CTA	[1005]
CT04	.. ..	[1005]
PD11	.. ..	[1005]
LK05	.. ..	[1005]

รูปที่ 4.14 (ต่อ) การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอของไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์

ได้แก่ ไก่แดงสุราษฎร์ (DS11) ไก่ชิวาพระ (CT04) ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD11) และ ไก่เหลืองหางขาวบึงบุรี (LK05) ด้วยโปรแกรม MEGA7

หมายเหตุ : (.) แทนลำดับเบสที่เหมือนกัน, (-) ไม่พบเบสในลำดับนิวคลีโอไทด์

## บทที่ 5

# สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

### 5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ไก่แดงสุราษฎร์ (DS), ไก่ซีท่าพระ (CT), ไก่ประดู่หางดำเชียงใหม่ (PD) และ ไก่เหลืองหางขาวกบินทร์บุรี (LK) สายพันธุ์ละ 15 ตัวอย่าง จำนวนรวม 60 ตัวอย่าง ด้วยเครื่องหมาย RAPD โดยใช้ 4 ไพรมเมอร์ พบว่าสามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ไก่พื้นเมืองได้

เมื่อนำมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่ามีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ระหว่าง 0.6597 ถึง 0.7802 โดยสายพันธุ์ CT และ PD มีความใกล้ชิดพันธุกรรมสูง ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ที่ 0.7802 เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ LK และ DS ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนอยู่ที่ 0.7386 และ 0.6883 ตามลำดับ

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของไก่พื้นเมืองไทยภายในสายพันธุ์เดียวกัน และระหว่างสายพันธุ์ได้เป็นแผนภูมิความสัมพันธ์ (Phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม NTSYSpc จากแผนภูมิความสัมพันธ์ของไก่พื้นเมืองที่ได้จากเทคนิค RAPD สามารถแบ่งตัวอย่างออกเป็น 4 กลุ่มคือ DS, CT, PD และ LK

นำข้อมูลจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์ โดยเครื่องหมาย RAPD มาคัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่สนใจ โดยการโคลนนิ่งดีเอ็นเอ หล้าลำดับนิวคลีโอไทด์ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 4 สายพันธุ์ดังกล่าว พบว่านำมาออกแบบไพรมเมอร์ได้ คือ primerTS ซึ่งมีขนาด 1000 คู่เบส และพบตำแหน่ง SNP ที่ทำให้เกิดความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของไก่พื้นเมืองไทยทั้ง 4 สายพันธุ์ ทั้งหมด 12 ตำแหน่ง จากข้อมูลจึงสามารถนำไปพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลประจำสายพันธุ์ต่อไปได้

### 5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรมีการเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่ศึกษาในไก่แต่ละสายพันธุ์ และเพิ่มจำนวนไพรมเมอร์ของเครื่องหมาย RAPD ในการตรวจสอบให้มากขึ้น เพื่อจะได้แถบดีเอ็นเอที่สามารถใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ได้ และนำไปพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลประจำสายพันธุ์จากแถบดีเอ็นเอ ที่ให้ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ที่เหมาะสมเพิ่มขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการระบุสายพันธุ์ และสามารถใช้ในการตรวจสอบสายพันธุ์ไก่พื้นเมืองไทยต่อไปได้ในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

กิริติ จิรวัดณ์จรรรยา. 2552. “การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์และการแสดงออกในเนื้อเยื่อของ  
**ฮอร์โมนเลปติน และตัวรับในไก่พื้นเมืองไทย (*Gallus gallus domesticus*).**”  
วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตววิทยาทางสัตว บัณฑิตวิทยาลัย  
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2560. ฟาร์มเลี้ยงไก่พื้นเมือง. [Online]. Available:  
[https://www.moac.go.th/ewt\\_snews.php?s=bW9hY0BAQDE4MZY2](https://www.moac.go.th/ewt_snews.php?s=bW9hY0BAQDE4MZY2).  
(30/05/2559)

กณิตา อู่ถาวร. การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของสัตว์ป่า เพื่อใช้จำแนกชนิดสัตว์ป่าของกลางที่พบใน  
ประเทศไทย. [Online]. Available: [http://portal.dnp.go.th/DNP/FileSystem/  
download?uuid=12d0449a-1282-4886-89b8-3105af7aefcd.pdf](http://portal.dnp.go.th/DNP/FileSystem/download?uuid=12d0449a-1282-4886-89b8-3105af7aefcd.pdf). (25/06/2560)

เกรียงไกร โชประการ, กิตติ วงศ์วิเศษฐ, วัชรพงษ์ วัฒนกุล และวรพงษ์ สุริยจันทร์ทอง. 2543.  
**ไก่พื้นเมืองและไก่ลูกผสมพื้นเมือง: อดีตและปัจจุบัน.** กรุงเทพฯ : สำนักงานกองทุน  
สนับสนุนการวิจัย (สกว.)

กลุ่มวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพ สำนักพัฒนาพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์. 2558. ไก่พื้นเมือง.  
[Online]. Available: [http://breeding.dld.go.th/biodiversity/new%20eLearning/  
native%20chicken.html](http://breeding.dld.go.th/biodiversity/new%20eLearning/native%20chicken.html). (07/06/2558)

กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์. 2546. **ลักษณะและมาตรฐานไก่พื้นเมืองไทย.** กรุงเทพฯ : สำนัก  
พัฒนาพันธุ์สัตว์.

จรัสศรี นวลศรี และวิจิตต์ วรรณชิต. 2558. “การศึกษาพันธุกรรมพืชผักพื้นบ้าน และไม่ผลพื้นเม  
ภาคใต้โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุล.”  
[Online]. Available: <http://www.natres.psu.ac.th/project/Molakul.htm>.  
(07/06/2558)

เฉลิมชัย หอมตา. 2546. “การจำแนกสายพันธุ์ไก่พื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือด้วยไมโคร  
แซทเทลไลท์มาร์กเกอร์.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการ  
ผลิตสัตว์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ชัชวาล สิงหะพล. 2546. “การจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมในไก่พื้นเมืองไทยเปรียบเทียบกับไก่  
เนื้อและไก่ไข่โดยใช้ลักษณะ MICROSATELLITE MARKER.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร  
มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บัญญัติ เหล่าไพบูลย์. 2525. “แนวทางบางประการในการปรับปรุงการเลี้ยงไก่พื้นเมืองในสภาพชนบท”. *แก่นเกษตร*. 10 (6) : 163-165.

เบญจพร ศรีสุวรรณมาศ, สมพงษ์ แสนเสนา, สุรเชษฐ์ เอี่ยมสำอาง. 2558. “การตรวจสอบเพื่อระบุชาวพันธุ์ปลุกพื้นเมืองเพชรบูรณ์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน rbcl.” Genomics, Bioinformatics, and System Biology Conference. วันที่ 10-11 พฤศจิกายน 2558 ณ ไบเทค บางนา กรุงเทพฯ

ปาริชาติ ศรีจำเริญ. 2547. “การประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างไก่พื้นเมืองไทย (*Gallus gallus domesticus*) ด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์-พีซีอาร์.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประภากร ธารฉาย. 2560. “กำเนิดและวิวัฒนาการของสัตว์ปีก.”

[Online]. Available : [http://www.as.mju.ac.th/E-Book/t\\_prapakorn.aspx](http://www.as.mju.ac.th/E-Book/t_prapakorn.aspx). (25/08/2559)

ปราโมทย์ ธนสวัสดิ์. 2551. *คู่มือไก่พื้นเมือง*. กรุงเทพฯ : เกษตรสยามบุ๊ค

เปล่งศรี อิงคินันท์, การุณ เสนชู, เครือวัลย์ พรหมงาม, สมศักดิ์ ภัคภิญโญ, ภาชิตา ตันธนวิกรัย และ จตุพงษ์ เจริญกิจไพบูลย์. 2550. *Analysis and Synthesizing of Poultry Research in Thailand*. กรุงเทพฯ : ตีรณสาร.

ศุภมิตร เมฆฉาย. 2555. “การประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์.” *แก่นเกษตร*. 40 (2) : 51-54.

ศุภมิตร เมฆฉาย. 2552. การวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์เพื่อหาโปรตีนตัวบ่งชี้คุณภาพเนื้อของไก่ไทยพันธุ์พื้นเมือง และไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วัลย์ลักษณ์ หัตถบุรณ์. 2554. “การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลสำหรับการจำแนกพืชสกุลระกำพันธุ์เศรษฐกิจ จากจังหวัดจันทบุรี.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

สวัสดิ์ ธรรมบุตร และวนิดา กำเนิดเพชร, 2542. การอนุรักษ์และพัฒนาสัตว์พื้นเมืองของกรมปศุสัตว์; ไก่พื้นเมือง. กรุงเทพฯ : สำนักพัฒนาพันธุ์สัตว์.

สัตว์เศรษฐกิจ. 2541. *ไก่น*. กรุงเทพฯ : พอร์ท ดอตจ แอนิมัล เฮลธ์ (ไทยแลนด์).

สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.). 2011. เครื่องหมายโมเลกุล. [Online]. Available : <http://www.scimath.org/socialnetwork/groups/viewbulletin/916เทคโนโลยีดีเอ็นเอ?groupid=221>. (25/07/2559)

สาวิตรี ลิ้มทอง. 2556. พันธุศาสตร์ของยีสต์และแนวทางการใช้ประโยชน์. การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 18, 17-19 กรกฎาคม 2556 ณ โรงแรมแอมบาสเดอร์ สุขุมวิท กทม.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุดมศรี อินทรโชติ, อำนวน เลี้ยวธารากุล, ธีระชัย ช่อไม้, ทวีศิลป์ จินตวง และชูศักดิ์ ประภาสวัสต์.

2550. โครงการ “การสร้างฝูงไก่พื้นเมืองจำนวน 4 พันธุ์” สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และกรมปศุสัตว์.

อำนวน เลี้ยวธารากุล. 2555. “พันธุ์สัตว์ปีกเด่นของสำนักพัฒนาพันธุ์สัตว์ (1)” วารสารสำนักพัฒนาพันธุ์สัตว์. 1 (1) : 1-12.

Ahmed Kareem Alatafi. Hayder Dawood Saleem. Ram Pal Singh. Herbert, S. and Singh, V.K. 2013. DNA polymorphism among three native Indian chickens using RAPD markers. *Research opinions in animal and veterinary sciences*. 3 (4) : 117-122.

Aslam, M.L. Bastiaansen, J.W.M. Elferink, M.G. Megens, H-J. Crooijmans, R.P.M.A. Blomberg, L.A. Fleischer, R.C. Tassell, C.P.V. Sonstegard, T.S. Schroeder, S.G. Groenen M.A.M. and Long J.A. 2012. Whole genome SNP discovery and analysis of genetic diversity in Turkey (*Meleagris gallopavo*). *BMC Genomics*. 13 : 39.

Bahy, A.A. 2003. Detection of DNA Alteration in Abnormal Phenotype of Broiler Chicken Male by Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD). *African Journal of Biotechnology*. 2(6): 153-156.

Beuzen, N. D., M. J. Stear, and K. C. Chang. 2000. Molecular markers and their use in animal breeding. *The Veterinary Journal*. 160 : 42-52.

Bitgood, J. and Shoffner, R.N. 1990: Cytology and cytogenetics, In: Poultry breeding and genetics. Crawford, R.D. (ed), Elsevier Science Publishers, Amsterdam-Oxford New York-Tokyo, 401-427.

Bonjongsat, N. Thongtam Na Ayudhaya, P. Ngaoburanawit, N. Indananda, C. Peyachoknagul S. and Srikulnath, K. 2013. Sequence divergence of some anemonefishes in Thailand to verify species from each other. [Online]. Available : <http://www.lib.ku.ac.th/KUCONF/2556/KC5005030.pdf>. (28/08/2559)

Ceccobelli, S. DiLorenzo, P. Lancioni, H. Monteagudolbáñez, L.V. Tejedor, M. T. Castellini, C. Landi, V. MartínezMartínez, A. DelgadoBermejo, J.V. VegaPla, J.L. LeonJurado, J.M García, N. Attard, G. Grimal, A. Stojanovic, S. Kumel, K. Panella, F. Weigendm, S. and Lasagna, E. 2015. Genetic Diversity and Phylogeographic Structure of Sixteen Mediterranean Chicken Breeds Assessed with Microsatellites and Mitochondrial DNA. *Livestock Science*. 175 : 27–36.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Cirillo, A. Gaudio, S.D. Bernardo, G.D. Galano, G. Galderisi, U. and Cipollaro, M. 2012. A new SCAR marker potentially useful to distinguish Italian cattle breeds. *Food Chemistry*. 130 : 172–176.
- Cunha, C.M.S. Hinz, R.H. Pereira, A. Tcacencob, F.A. Paulino, E.C. and Stadnika M.J. 2015. A SCAR marker for identifying susceptibility to *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* in banana. *Scientia Horticulturae*. 191 : 108–112.
- Dai, G.J. Wang, J.Y. Olajide, O. Li, Q.S. Shen, H. Xie, K.Z. Wang, Z.Y. Wu, S.L. Gu, Y.P. and Zhang, G.X. 2005. Study on Molecular OPAY02-Scar Markers Related to Early Body Weight of New Yangzhou Chickens. *International Journal of Poultry Science*. 4(9) : 683-688.
- De Marchi, M. Dalvit, C. Targhetta, C. and Cassandro, M. 2006. Assessing genetic diversity in indigenous Veneto chicken breeds using AFLP markers. *Animal Genetics*. 37 : 101–105.
- Dorji, N. Daungjinda, M. and Phasuk, Y. 2010. Analysis of Bhutanese native chickens genetic diversity by microsatellite markers. *Khon Kaen Agricultural Journal*. 38 : 76-80.
- El-Sabrou, K. Khalil, M.H. and Shebl, M. K. 2015. Analysis of Genetic Diversity among Different Egyptian Chicken Strains Using RAPD and SSR Markers. *Journal of American Science*. 11 (8) : 92-96.
- Fernandez, S. Katsuyama, A.M. Kashiwabara, A.Y. Madeira, A.M.B.N. Durham, A.M. and Gruber, A. 2004. Characterization of SCAR markers of *Eimeria* spp. of domestic fowl and construction of a public relational database (The *Eimeria* SCARdb). *FEMS Microbiology Letters*. 238 : 183–188.
- Hillel, J. Martien A.M. Groenen., Michèle Tixier-Boichard., Abraham B. Korol., Lior David., Valery M. Kirzhner., Terry Burke., Asili Barre-Dirie., Richard P.M.A. Crooijmans., Kari Elo., Marcus W. Feldman., Paul J. Freidlin., Asko MÄKI-Tanila., Marian Oortwijn., Pippa Thomson. , Alain Vignal. , Klaus Wimmers. , Steffen Weigend. 2003. Biodiversity of 52 chicken populations assessed by microsatellite typing of DNA pools. *Genetics Selection Evolution*. 35 : 533-557.

Genome News Network (GNN), [Online]. Available: [http://www.genomenewsnetwork.org/resources/whats\\_a\\_genome/Chp4\\_1.shtml](http://www.genomenewsnetwork.org/resources/whats_a_genome/Chp4_1.shtml). (25/06/2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ต่อสาธารณะ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Joana, T. Cunha. Tânia, I.B.Ribeiro. João, B.Rocha. João Nunes. José, A.Teixeira and Lucília Domingues. 2016. RAPD and SCAR markers as potential tools for detection of milk origin in dairy products: Adulterant sheep breeds in Serra da Estrela cheese production. *Food Chemistry*. 211 : 631–636.
- Kiran, U. Khan, S. Mirza, K.J. Ram, M. and Abdin M.Z. 2010. SCAR markers: A potential tool for authentication of herbal drugs. *Fitoterapia*. 81 : 969–976.
- Kumar, S. Stecher, G. and Tamura, K. 2016. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics. Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Molecular Biology and Evolution*. 33 (7) : 1870–1874.
- Levin, D. A., 1980 Polyploidy and distribution, pp. 45–60 polyploidy: Biological Relevance, edited by W. H. Lewis. Plenum, New University Press, New York.
- Lohmann, S. Lehmann, L. and Tabiti K. 2000. Fast and Flexible Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Detection with the LightCycler System. *Biochemica*. No. 4.
- Lin, H. Sibao, W. Xuex, M. Hong, W. and Yongping, H. 2006. Identification of necrophagous fly species using ISSR and SCAR markers. *Forensic Science International*. 168 : 148–153.
- Maw, A. A. Kawabe, K. Shimogiri, T. Rerkamnuaychoke, W. Kawamoto, Y. Masuda, S. and Okamoto, S. 2015. Genetic Diversity and Population Structure in Native Chicken Populations from Myanmar, Thailand and Laos by Using 102 Indels Markers. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*. 28 : 14-19.
- Marieschi, M. Torelli, A. Bianchi, A. and Bruni, R. 2011. Development of a SCAR marker for the identification of *Olea europaea* L.: A newly detected adulterant in commercial Mediterranean oregano. *Food Chemistry*. 126 : 705–709.
- Misener, S. and Krawetz, S.A. 1992. *Methods in Molecular Biology: Bioinformatics Methods and Protocols*. New Jersey: Humana Press Inc.
- Mohd-Azmi, M.L. Ali, A.S. and Kheng, W.K. 2000. DNA Fingerprinting of Red Jungle Fowl, village chicken and Broilers. *Asian Australasian Journal of Animal Sciences*. 13 (8) : 1040-1043.
- Moran, C., 1993. Microsatellite repeats in pig (*Sus domestica*) and chicken (*Gallus domestica*) genomes. *Journal of Heredity*. 84 : 274–280.

- Muira, W.M. Wong, G.K. Zhangc, Y. Wang, J. roenend, M.A.M. Crooijmans, R.P.M.A. Megens, H. Zhang, H. Okimoto, R. Vereijken, A. Jungerius, A. Albers, G.A.A. Lawley, C.T. Delanyi, M.E. MacEachern S. and Cheng, H.H. 2008. Genome-wide assessment of worldwide chicken SNP genetic diversity indicates significant absence of rare alleles in commercial breeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. November 11, 2008. 105 (45) : 17312–17317.
- Nei, M. and Kumar, S. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, New York.
- Riztyan, T. Katano, T. Shimogiri, K. Kawabe, and Okamoto, S. 2011. Genetic diversity and population structure of Indonesian native chickens based on single nucleotide polymorphism markers. *Poultry Science*. 90 : 2471–2478
- Riztyan, T. Kawabe, K. Shimogiri, T. Kawamoto, Y. Rerkamnuaychoke, W. Nishida, T. and Okamoto, S. 2014. Genetic Diversity and Ancestral Relationships of Red Junglefowls and Domestic Chickens in Southeast Asia. *Poultry Science*. 51: 369-374.
- Rohlf, F.J. 1998. “NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.0, Exeter Software.” New York, USA, Applied Biostatistics Inc.
- Roland, J.T.E. 2007. 6X DNA Loading Dye-10 ml. [Online]. Available : <http://www.cytographica.com/lab/solutions/loadingdye.htm>. (25/06/2559)
- Samar, H. Baloza<sup>1</sup>, S. A. Hemed<sup>2</sup>, G. A. Sosa<sup>3</sup> and Asmaa, Abo Shady. 2013. Assessment of Genetic Variability among Fayoumi, Rhode Island Red and their Crosses using RAPD-PCR. *Benha Veterinary Medical Journal*. 25 (2) : 232-239.
- Siang Ng, C. Wu, P. Foley, J. Foley, A. McDonald, M. Juan, W. Huang, C. Lai, Y. Lo, W. Chen, C. Leal, S.M. Zhang, H. Wideltz, R.B. Patel, P.I. Li, W. and Chuong, C. 2012. The chicken frizzle feather is due to an  $\alpha$ -keratin (KRT75) mutation that cause a defective rachis. *PLoS Genetics*. 8 (7) : e1002748.
- Smith, J., and Burt, D. W. 1998. Parameters of the chicken genome (*Gallus gallus*). *Animal Genetics*. 29 : 290–294.
- Smith, E.J. Shi, L. Drummond, P. Rodriguez, L. Hamilton, R. Ramlal, S. Smith, G. Pierce, K. and Foster J. 2001. Expressed Sequence Tags for the Chicken Genome from a Normalized 10-Day-Old White Leghorn Whole Embryo cDNA Library: 1. DNA Sequence Characterization and Linkage Analysis. *Journal of Heredity*. 92 (1) : 1-8.

- Smith, E. J. Geng, T. Long, E. Pierson, F. W. Sponenberg, D. P. Larson, C. and Gogal, R. 2005. Molecular Analysis of the Relatedness of Five Domesticated Turkey Strains. *Biochemical Genetics*. 43 : 35-47
- Wong, G. K. S., L. Hillier, M. Brandstrom, R. Croojmans, I. Ovcharenko, L. Gordon, L. Stubbs, S. Lucas, T. Glavina, P. Kaiser, U. Gunnarsson, C. Webber and I. Overton. 2004. A genetic variation map for chicken with 2.8 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. 432:717-722.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### การเตรียมสารเคมี

#### การเตรียม 0.5 M EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid)

ละลาย EDTA 7.306 กรัม ในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ปรับพีเอช 8.0 ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร

#### การเตรียม 10X TBE buffer

ละลาย Tris-base 54 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เติม Boric acid 27.5 กรัม ผสมเข้ากัน เติม EDTA ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปรับพีเอช 8.0 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

#### การเตรียม 1X TBE buffer

เมื่อต้องการใช้ 1X TBE buffer ในการเตรียมเจลสำหรับตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส เตรียมได้จาก Stock 10X TBE buffer 100 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร

#### การเตรียม 6X loading dry

เตรียม 6X loading dry ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยละลายโบรมอฟีนอลบลู 25 มิลลิกรัมในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ 6.7 มิลลิลิตร เติม 99% กลีเซอรอล 3.3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Roland, 2007)

#### การเตรียมเจลอะกาโรส

เตรียมอะกาโรสเจล 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยละลายอะกาโรส 0.75 กรัม ใน 1X TBE buffer 55 มิลลิลิตร (ใส่ 1X TBE buffer มากกว่าปริมาณที่ต้องการเนื่องจากการต้มจะมีการระเหยของบัฟเฟอร์) ต้มให้เดือด 2-3 นาที ทิ้งให้เย็นประมาณ 40 องศาเซลเซียส เทลงถาดเจลและเสียบหัว ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที เพื่อการแข็งตัวของอะกาโรสเจล หลังจากนั้นดึงหัวออก และวางเจลใน electrophoresis chamber โดยหันด้านที่มีหลุมไปทางขั้วลบของเครื่องรันเจล

#### การเตรียม 0.5 mg/μl Ethidium bromid

เอทิดียมโบรมไนด์ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ในน้ำกลั่นปริมาตร 400 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

### การเตรียมยาปฏิชีวนะ stock 200 mg/ml Ampicillin

ละลายแอมพิซิลลิน 0.1 กรัม ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที 0.5 มิลลิลิตร นำสารผสมมากรองผ่านตัวกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### การเตรียมยาปฏิชีวนะ 50 mg/ml Ampicillin ในอาหารแข็ง LB

เติม 200 mg/ml Ampicillin ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ในอาหารแข็ง LB ที่มีอุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียสที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ผสมให้เข้ากัน เทลงในเพลทขนาด 90 มิลลิเมตร รองอาหารแข็งตัว เก็บในที่มืดเพื่อนำไปใช้ในการคัดเลือก DNA cloning

### การเตรียม 25 mg/ml X-Gal

ละลาย X-gal 0.05 กรัม ใน dimethylformamide 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันในขวดสีชา เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### การเตรียม IPTG (20% w/v, 0.8 M)

ละลาย IPTG 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำสารผสมมากรองผ่านตัวกรอง 0.22 ไมโครเมตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### การเตรียม 0.1 M CaCl<sub>2</sub>

ละลาย CaCl<sub>2</sub> 5.549 กรัม ปรับปริมาตรในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### การเตรียม 0.1 M CaCl<sub>2</sub> + 15% Glycerol

เติมกลีเซอรอล 15 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรใน 0.1 M CaCl<sub>2</sub> 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

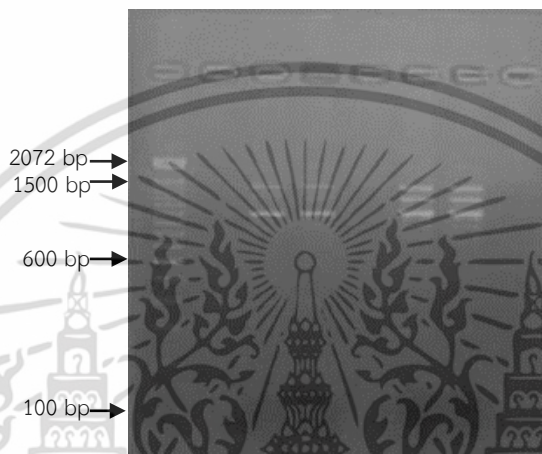
## ภาคผนวก ข

### การโคลนดีเอ็นเอ

มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

### การเตรียมดีเอ็นเอ

การตัดเจลขนาดดีเอ็นเอ 1000 คู่เบสที่ต้องการออกมา แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ชุด FavorPrep™



### การเตรียมอาหารเหลว LB (Luria Bertani)

ละลายเปปโติน 10 กรัม, โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัม และยีสต์สกัด 5 กรัม น้ำ 800 มิลลิลิตร ผสมเข้ากัน ปรับพีเอช 7.4 และปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### การเตรียม competent cell

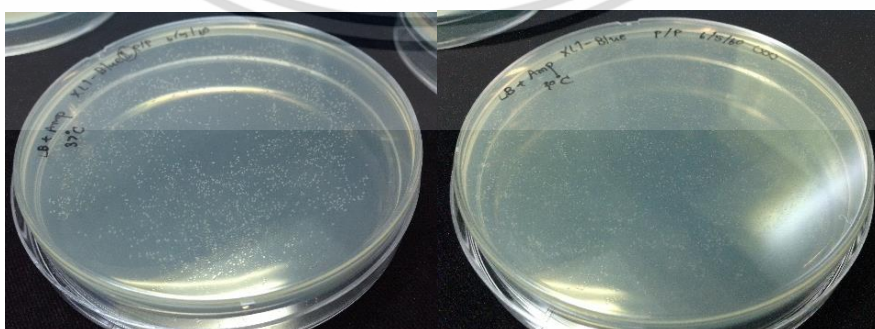


1. นำโคลนของเชื้อ *E.coli* XL1-Blue ใส่ลงไปในอาหาร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



2. นำเชื้อ เชื้อ *E. coli* XL1-Blue ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ย้ายมาเลี้ยงในอาหาร LB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที
3. วัดความขุ่นที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ซึ่งอยู่ในช่วง 0.3-0.4
4. นำ competent cell แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร
5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง
6. ทำซ้ำขั้นตอนที่ 1-2 จนกว่า competent cell หมด
7. เติม 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  (แช่เย็น) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ค่อยๆ ใส่น้ำแบคทีเรียไปเรื่อยๆ ให้ทั่วถึง
8. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง
9. ทำซ้ำขั้นตอนที่ 7-8
10. เติม 0.1 M  $\text{CaCl}_2$  + 15% Glycerol (แช่เย็น) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร กระจายเบาให้ทั่วถึง
11. แบ่งใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร
12. นำหลอดทดลองที่มี competent cell ใส่ไนโตรเจนเหลว
13. เก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส



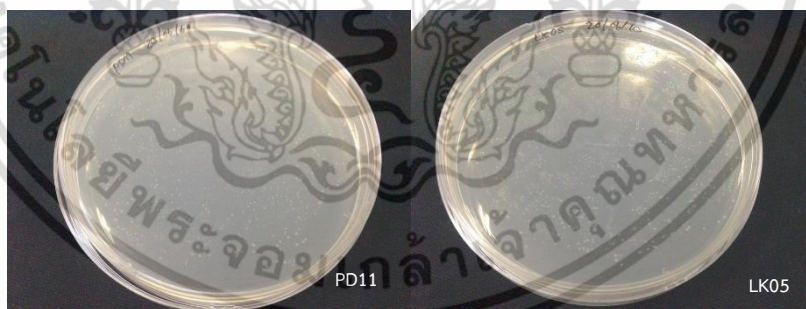
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### การทำ ligation

การทำ ligation ปริมาตร 10 ไมโครลิตร โดยเติมเอ็นเอ 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร เติมพลาสมิด pGEM-T (Promega, USA) ความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ ligase ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เติม ligase buffer 1 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียสข้ามคืน

### การ transformation ด้วยวิธี heat shock

1. นำสารละลาย ligation ใส่ใน competent cell ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที
2. นำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 2 นาที
3. นำไปแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 5 นาที
4. เติมอาหารเหลว LB ปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
5. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที
6. ดูดส่วนใสทิ้ง เซลล์ในอาหารเหลวประมาณ 100 ไมโครลิตร
7. นำเซลล์ไปเลี้ยง spread plate บนอาหารแข็ง ampicillin+LB โดยการเติม X-gal ปริมาตร 32 ไมโครลิตร เติม IPTG ปริมาตร 7 ไมโครลิตร
8. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
9. ตรวจสอบผลการ transformation



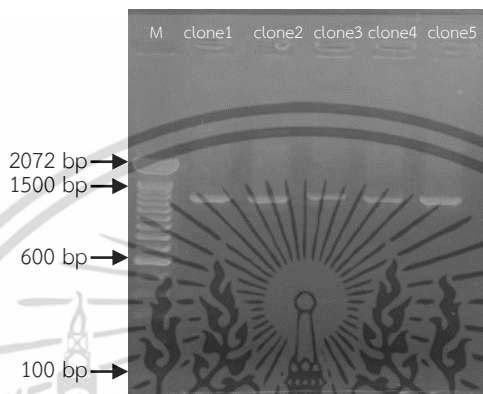
### การตรวจสอบ DNA cloning

1. คัดเลือกโคโลนีที่เป็นสีขาว 1 โคโลนีต่อ 1 หลอดทดลอง โดยใช้ไม้จิ้มฟันที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ใส่ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร
2. นำไปตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ M13
3. ตรวจสอบผลของพีซีอาร์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis
4. นำสารละลายเชื้อที่มีชิ้นส่วนของดีเอ็นเอมา streak plate บ่มบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

5. นำโคโลนีเดี่ยวไปตรวจสอบด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์ M13 เพื่อตรวจสอบความ  
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้เผยแพร่ไปยังประชาชน  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถูกต้องของดีเอ็นเอ

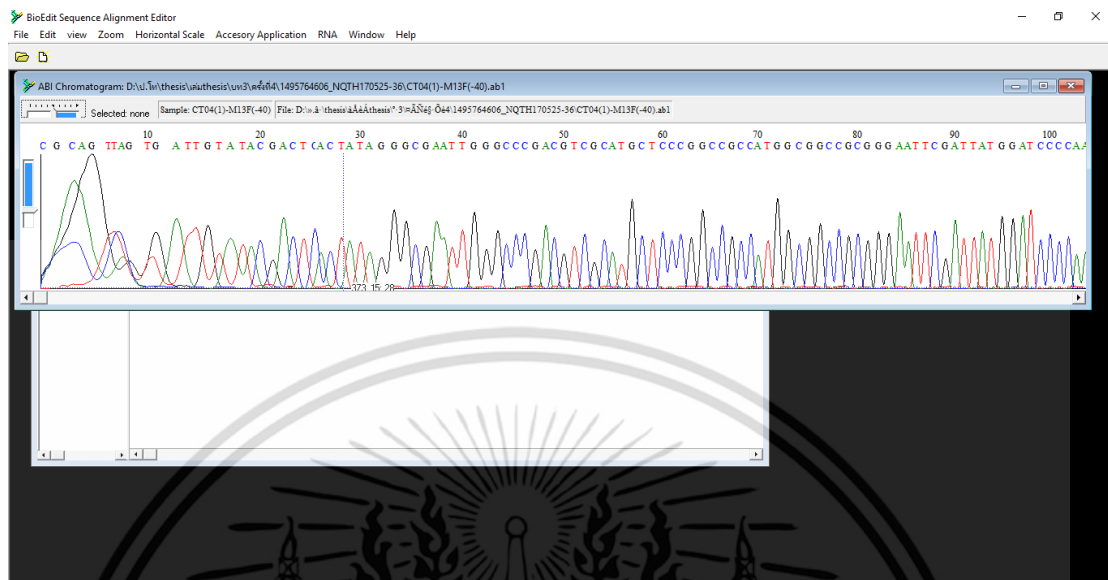
6. เมื่อตรวจสอบผลพีซีอาร์ที่ถูกต้อง แล้วนำโคลนีเดี่ยวมา single streak บ่มบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง
7. สกัดพลาสมิดด้วยชุดสกัดพลาสมิด FavorPrep™ (Biotech corp, Taiwan)
8. วัดปริมาณของพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยเครื่อง NanoDrop
9. ส่งตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Bioneer, Korea)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



### 1.3 AB1 file เป็นข้อมูล electropherogram ใช้เปิดในโปรแกรมที่สามารถแก้ไขเบสได้ เช่น โปรแกรม BioEdit



## 2. การนำข้อมูลลำดับเบสทั้งสองด้านมารวมกัน

เมื่อส่งตัวอย่าง DNA มาวิเคราะห์ทั้งสองด้าน และต้องการรวมข้อมูล ทั้งสองด้านเข้าด้วยกัน โดยโปรแกรมที่ใช้ในการรวมข้อมูลมีทั้งที่มีลิขสิทธิ์ และ free software ให้เลือกใช้ แต่ในงานวิจัยนี้ใช้โปรแกรม BioEdit เป็น free software มีขั้นตอนดังนี้

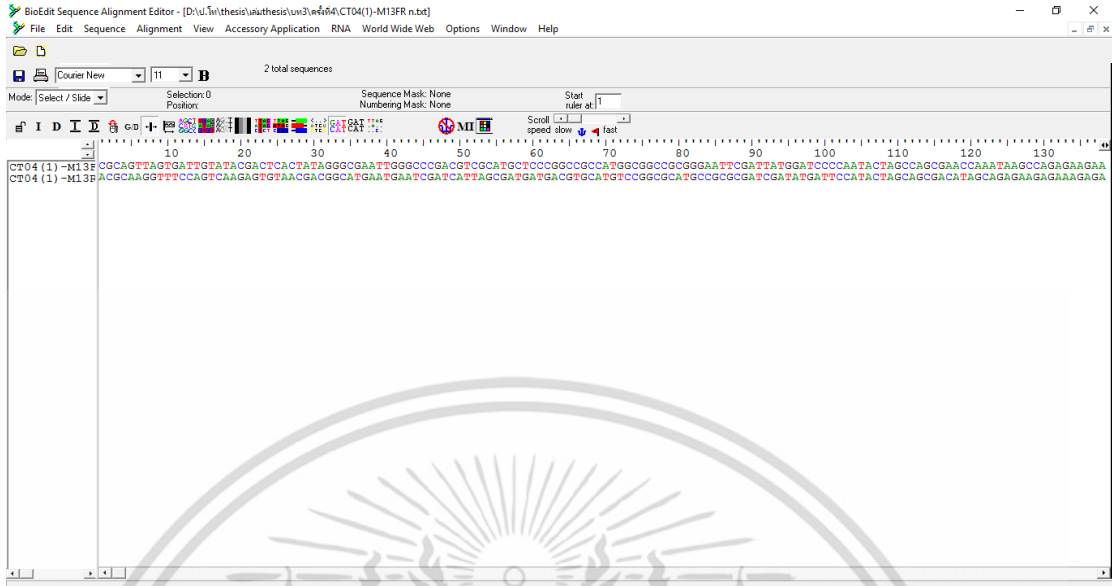
### 2.1 ใช้ข้อมูลที่เป็น text file ทั้งสองด้านมาจัดให้อยู่ในไฟล์เดียวกันในโปรแกรมที่เป็น Notepad

```

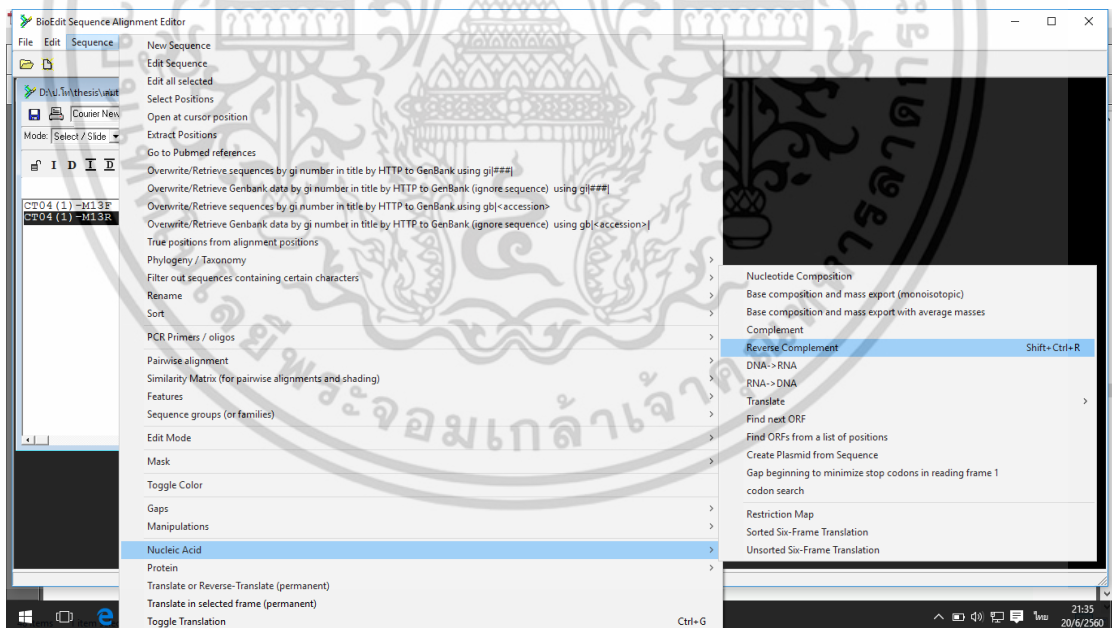
CT04(1)-M13FR - Notepad
File Edit Format View Help
>CT04(1)-M13F
CGCAGTTAGTGATTGTATACGACTCACTATAGGGCGAATTTGGGCCGACGTCGCATGCTCCCGGCCGCCATGGCGGCCG
GGGAATTCGATTATGGATCCCAATACTAGCCAGCGAACC AATAAGCCAGAGAAGAAGGAAAGAGGAATGGAGAAGCTC
TTTTCGCTCAAAGCTTTTACTGACTCCAGGAGGAGTTGTGCGTGCCCAACGCTGCTCCGTAAGCTTTCACCTCCATTGC
TTCTGGTGTGACATGAGGTCTTTCTCTGGGCGCTGGCTCTTTTCTGGAAGAGGCAGAGCACAAGTTTTGCAATACAG
TTTTTGAGGAAGTGTGAGAATTTGTACAGCTATACATGGCATTCTGCGGAGCTCAAGTTCCAAGTATTTCAATCTTTGAT
GTATTATAAATCTCTCTGTTTGTGCCATCAACAGGTGTGGGCATAATGTTTTTTATAGCACCTCCAGGTCCTTTGACT
GCAAGCTTCGTGGTCTTAGTGAACCTCTAATAGCAGTATGCCATCTTAGTAGGATAGTGCCATTATCTTTGCTTTGCGAG
ATGATATTACAGAAGAGGAAGGTATGTCTGGCTACTCATGCAGTAGTAAATGTGGAATGAAGCATCAGCTTGATCACT
GGGTAGGACTTGGTCACAGTCCCAACTATCCTTATGGTATCTGAATACAAGATGGATTTAGTCTACCCATCAAATATAG
GAAGTTTGGCTAATTTCTGCTTTCACATAATAAATTTAAAAAAGAAAAAATTCATGTGGTTTTCCATAAGATAT
GTATATAAATAGCTTTAGCTGACGATTTTTCTAAAGAATATTTTCAGTAACAGTGGAAGATCTGGTCCTTGAGCAATA
CTTCTATTAGCACTGTGTGATTTTACTGCTTTAAATTTGAACCTAACAGAGTACAGTTGACTTAGCTATTGATTGGTG
ATTCCATTTATCATAACTTTACGAATAACAAAAATGTATCAGTTGTGTATGTGATAAATGTGTGTTAGCTTTGCTG
TCATTTATGGCTAACATCTGAGCAAATTAAGAGTGTGACGATGAATGCTCTCTGTATGATGTCGCTGGCTAGTATGGA
TCTATCAGTATGATTCGCTGCGTGCAGTGCAGATGAAAGCTCATCGCTGAGTCTAGCTGAATCTAGTACCTAATGCTGGC
TATCATGTCATAGCCGTTTC
  
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2 เปิดไฟล์ ที่จัดแล้วนี้ในโปรแกรม BioEdit

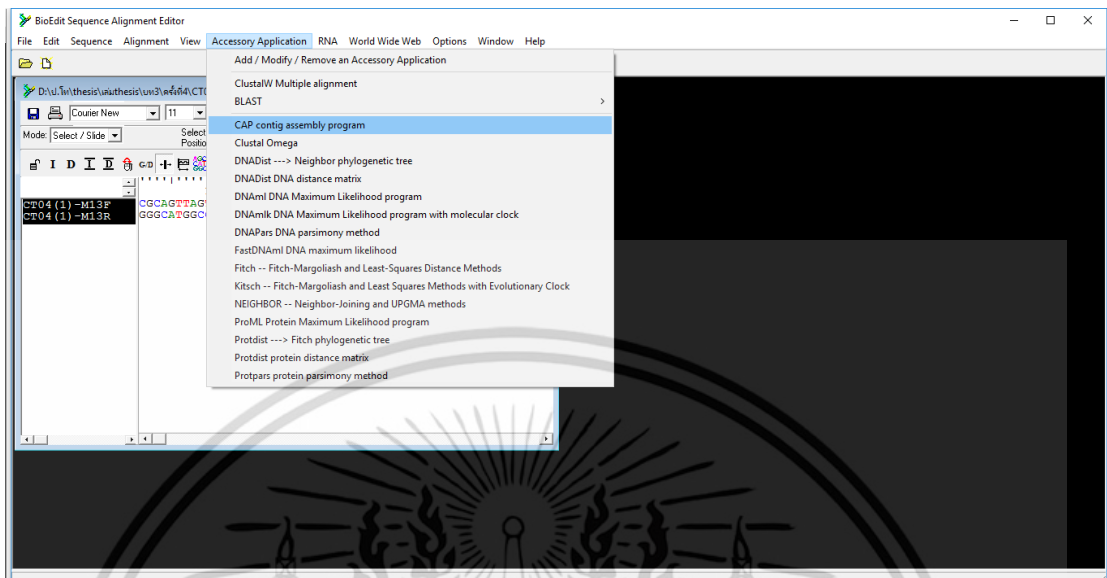


2.3 ก่อนที่จะนำข้อมูลทั้งสองมารวมกันได้ต้องเปลี่ยนข้อมูลลำดับเบสให้เป็นข้อมูลเส้นเดียวกันก่อนโดยใช้คำสั่ง reverse complement ในตัวอย่างนี้เลือกด้าน primer-R ในการเปลี่ยน

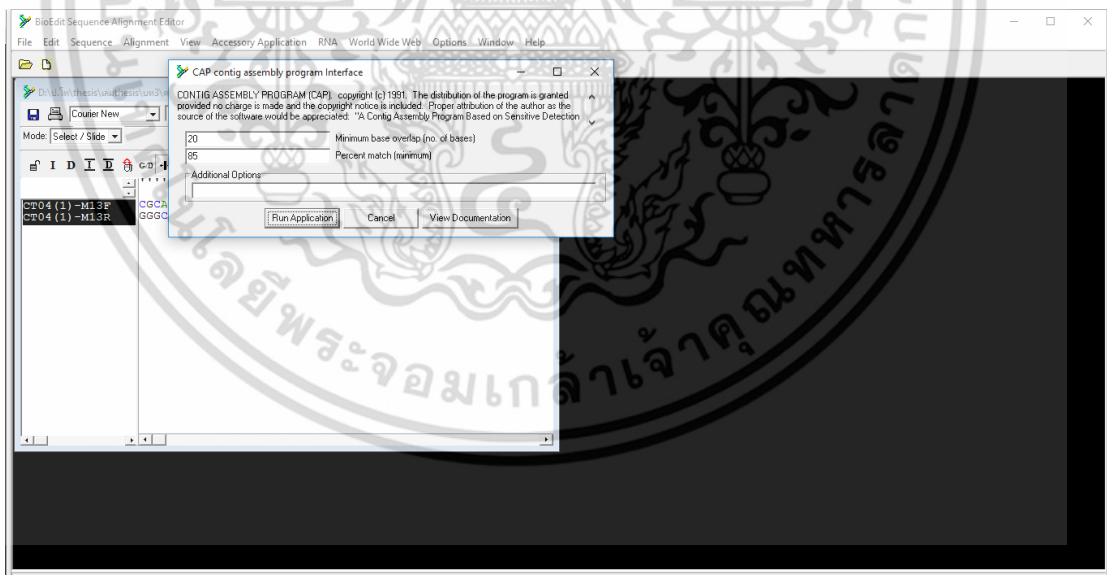


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 จากนั้นนำข้อมูลมารวมกัน โดยคลิกเลือกข้อมูลทั้งสองด้าน แล้วเลือก accessory application และ cap contig assembly program



2.5 จากนั้นเครื่องจะให้ใส่ค่า minimum base overlap และ percent match ตามค่า default ของโปรแกรม คือ 20 และ 85 ตามลำดับ ถ้าต้องการกด กด run application



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.6 การเริ่มทำงานของการวิเคราะห์ผล ถ้าต้องการกด enter

```

C:\Windows\system32\cmd.exe
C:\BioEdit\Temp>Echo off
Your application is being executed.
A batch file named accessory.bat will be left in your temp directory.
(C:\BioEdit\Temp)
After running, this window should close automatically.
Some programs, such as CAP, however, may expect user input.
If the program appears to be done, but the console window is hung,
Try pressing return, or closing the console window manually.
.
Some programs, such as fastDNAm1, do not give screen feedback.
Some programs, again such as fastDNAm1, may take a very long time to execute.
Closing the window may destroy your analysis if the program is not done.
.
Starting accessory app now ...

INIT
MAKE
PAIR
ASSEM
REPAIR
FORM_TREE
SHOW
  
```

2.7 ถ้าข้อมูลทั้งสองมีส่วนที่ซ้อนทับกันจะขึ้นคำว่า “contig-0” อย่างเดียว ถ้ามีคำอื่น เช่น contig-1 ด้วยแสดงว่าข้อมูลทั้งสองด้านไม่สามารถรวมกันได้ที่ได้เป็นลำดับเบสที่มีข้อมูลทั้งสองด้านรวมกัน และโปรแกรมจะแสดงลำดับเบสที่ซ้อนทับกันด้วย

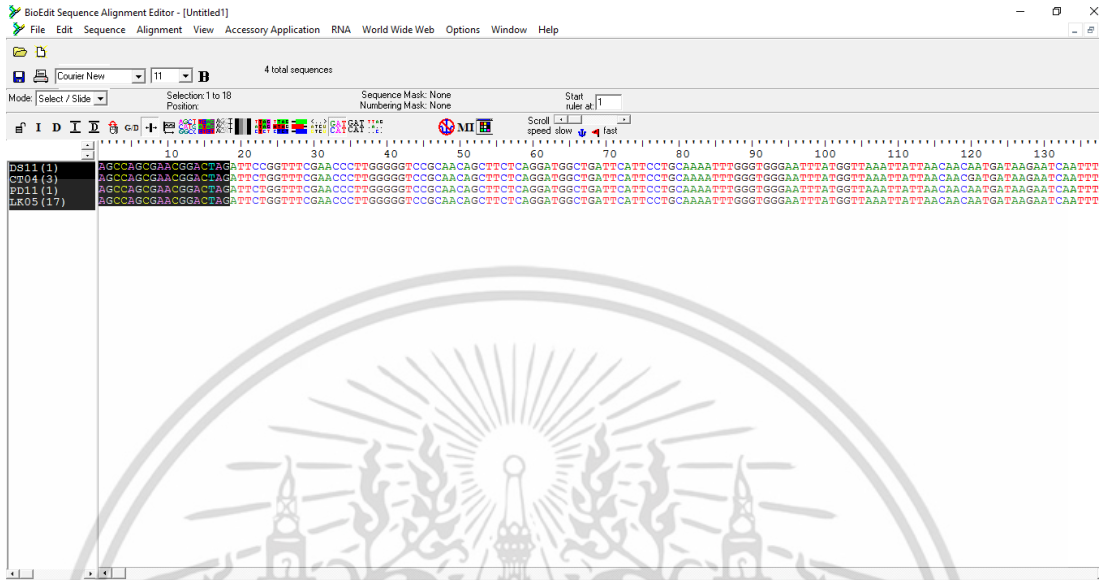
```

BioEdit Sequence Alignment Editor - [CAP contig assembly program Output]
File Edit Sequence Alignment View Accessory Application RNA World Wide Web Options Window Help
3 total sequences
Mode: Select / Slide Selection: 0 Position: Sequence Mask: None Numbering Mask: None Start ruler at: 1
cap CT04 (1)- AGATGTT AG CCTAAATGAC AGCAAAAGCTAAACGA CAC ATTATCACATACCACTGA TA CATTTTGTATTTCCTAAAGATTATGATATAATGGANT CACCAATCAAAGCTAAGTCAACTGACTCT
cap CT04 (1)- AGATGTTTAGGCCTAATTCACCAAGCTAAACGA CAC ATTATCACATACCACTGA TA CATTTTGTATTTCCTAAAGATTATGATATAATGGANT CACCAATCAAAGCTAAGTCAACTGACTCT
contig-0      AGATGTTTAGGCCTAATTCACCAAGCTAAACGA CAC ATTATCACATACCACTGA TA CATTTTGTATTTCCTAAAGATTATGATATAATGGANT CACCAATCAAAGCTAAGTCAACTGACTCT
  
```

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



2.10 นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างทั้งหมดมา alignment เพื่อหาส่วนที่มีวิวัฒนาการน้อย หรือบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) ของทั้งสองด้าน (Forward และ Reverse)

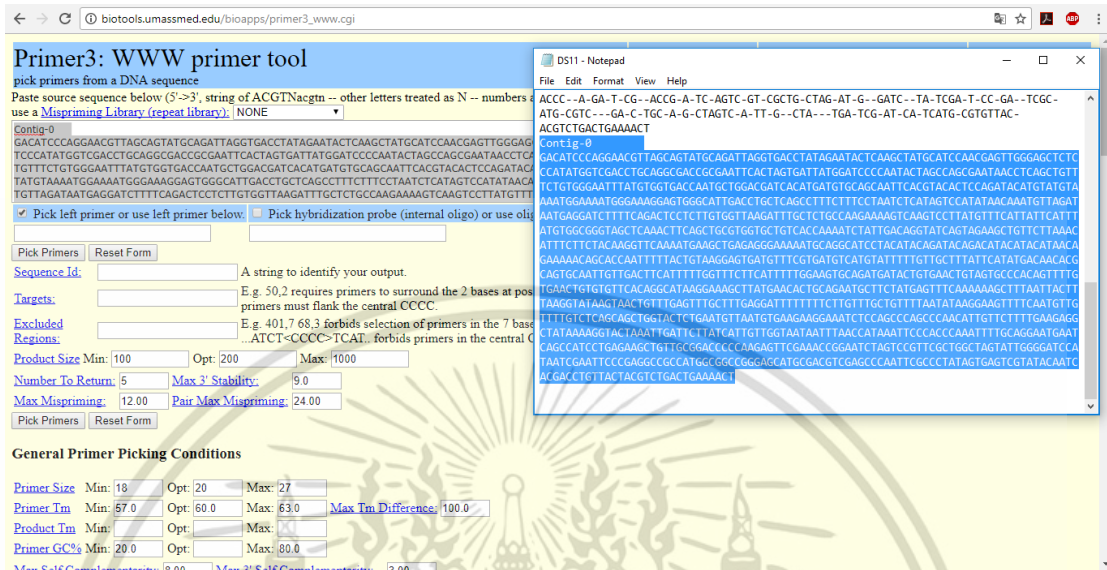


การออกแบบไพรเมอร์ด้วยโปรแกรม Primer3

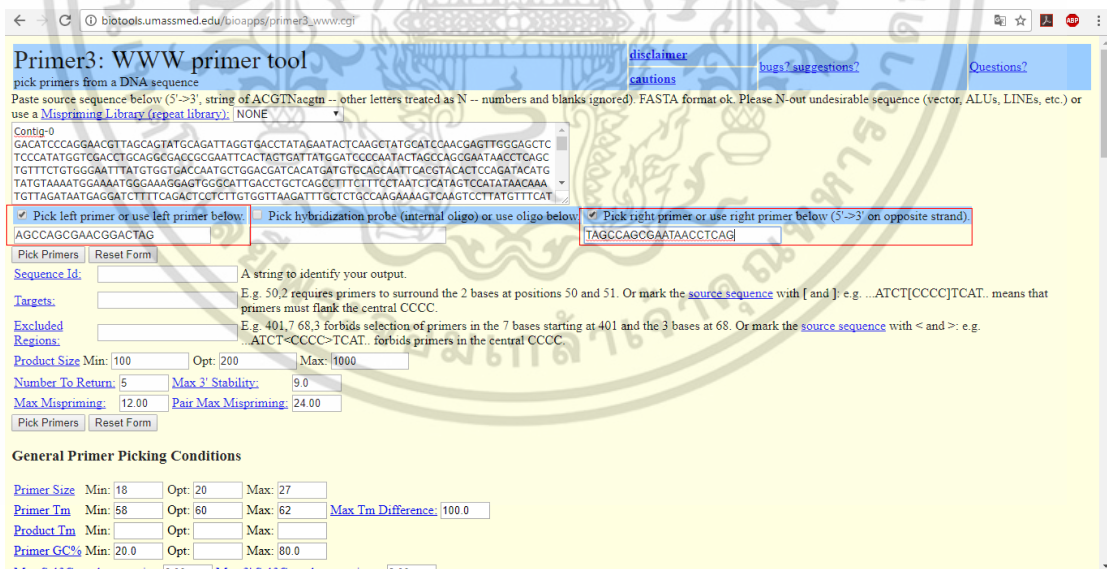
1. เปิดโปรแกรม Primer3 ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ใช้ข้อมูลที่ต้องการออกแบบไพรเมอร์ที่เป็น text file จากการรวมทั้งสองด้านในโปรแกรมที่เป็น Notepad มากรอกใส่ในโปรแกรม Primer3



3. ในกรณีกำหนดไพรเมอร์ที่ต้องการออกแบบเพื่อให้ได้ตำแหน่งที่ต้องการ ใส่ข้อมูลด้าน Forward และ Reverse ถ้าไม่ต้องการกำหนดไพรเมอร์สามารถผ่านขั้นตอนนี้ได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้





### 3. ใส่ลำดับเบสของไพรเมอร์คู่ที่ 1 สาย forward

Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator

Enter Oligonucleotide Sequence Below  
OD calculations are for single-stranded DNA or RNA

Nucleotide base codes

ใส่ลำดับเบสของไพรเมอร์

Reverse Complement Strand(5' to 3') is:

5' modification (if any) 3' modification (if any) Select molecule  
None None ssDNA

50 nM Primer 50 mM Salt (Na<sup>+</sup>) 1 Measured Absorbance at 260 nanometers

Calculate Swap Strands BLAST mfold

Physical Constants Melting Temperature (T<sub>m</sub>) Calculations

Length: 0 Molecular Weight: 4 GC content: % 1 °C (Basic)  
1 ml of a sol'n with an Absorbance of 1 at 260 nm 2 °C (Salt Adjusted)  
is microMolar and contains micrograms. 3 °C (Nearest Neighbor)

Thermodynamic Constants Conditions: 1 M NaCl at 25°C at pH 7.

RmK cal/(°K<sup>2</sup>mol) deltaH Kcal/mol  
deltaG Kcal/mol deltaS cal/(°K<sup>2</sup>mol)

Deprecated Hairpin/self dimerization calculations

5 (Minimum base pairs required for single primer self-dimerization)  
4 (Minimum base pairs required for a hairpin) Check Self-Complementarity

Citation: Kibbe WA: 'OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator'. (2007)  
Nucleic Acids Res. 35(webserver issue): May 25. [Abstract/Full text](#)

### 4. กด Calculate --> Check Self-Complementary

Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator

Enter Oligonucleotide Sequence Below  
OD calculations are for single-stranded DNA or RNA

Nucleotide base codes

AGCCAGCGAACGGACTAG

Reverse Complement Strand(5' to 3') is:

CTGACGACGTCAGCTTCA

5' modification (if any) 3' modification (if any) Select molecule  
None None ssDNA

50 nM Primer 50 mM Salt (Na<sup>+</sup>) 1 Measured Absorbance at 260 nanometers

Calculate Swap Strands BLAST mfold

Physical Constants Melting Temperature (T<sub>m</sub>) Calculations

Length: 0 Molecular Weight: 4 GC content: % 1 °C (Basic)  
1 ml of a sol'n with an Absorbance of 1 at 260 nm 2 °C (Salt Adjusted)  
is microMolar and contains micrograms. 3 °C (Nearest Neighbor)

Thermodynamic Constants Conditions: 1 M NaCl at 25°C at pH 7.

RmK cal/(°K<sup>2</sup>mol) deltaH Kcal/mol  
deltaG Kcal/mol deltaS cal/(°K<sup>2</sup>mol)

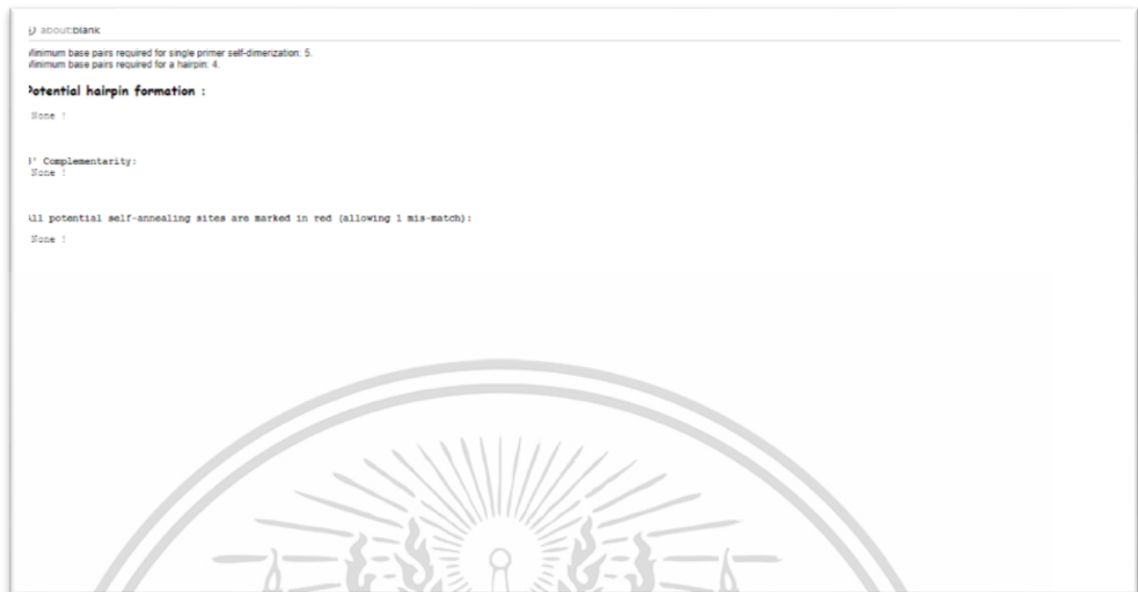
Deprecated Hairpin/self dimerization calculations

5 (Minimum base pairs required for single primer self-dimerization)  
4 (Minimum base pairs required for a hairpin) Check Self-Complementary

Citation: Kibbe WA: 'OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator'. (2007)  
Nucleic Acids Res. 35(webserver issue): May 25. [Abstract/Full text](#)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. จะแสดงความเหมาะสมของ primer ถ้าเป็น None ! แสดงว่าเหมาะสมที่จะนำมาใช้งาน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวกรกาญจน์ ชูมี
วัน เดือน ปีเกิด	15 มิถุนายน 2535
ที่อยู่ปัจจุบัน	132/1 หมู่ที่ 11 ตำบลข้างขวา อำเภอกาญจนดิษฐ์ จังหวัดสุราษฎร์ธานี
ประวัติการศึกษา	(2558) วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขา เทคโนโลยีชีวภาพ เกรดเฉลี่ย 3.05 สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนยกเว้นค่าธรรมเนียมการศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ สจล.
ผลงานทางวิชาการ	1. Choomee, K and Worananthakij, W. 2016. Genetic relationships of the Chee Thapra and the other Thai native chickens by RAPD technique. In Proceeding of the 28th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, 28 <sup>th</sup> - 30 <sup>th</sup> November 2016, The Empress Hotel, Chiang Mai, Thailand. Thai Society for Biotechnology and International Conference. pp 194-204.) 2. กรกาญจน์ ชูมี และ วรกฤต วรนนท์กิจ. 2560. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทยโดยใช้เทคนิค RAPD. การประชุมทางวิชาการครั้งที่ 55 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กทม., 31 มกราคม – 3 กุมภาพันธ์ 2560. หน้า 152-159.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้