บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การจำแนกลำดับวงศ์ (Classification) ของสัตว์ปีก

ในทางสัตวศาสตร์ได้จัดสัตว์ปีกทั้งหลายให้อยู่ในจำพวก aves (มาจากภาษาลาติน avis แปลว่า นก) ซึ่งแบ่งออกเป็นหลายเหล่า (order) และวงศ์ (families) ตามลักษณะรูปร่างที่แตกต่างกันไป ไก่พื้นเมือง (Domestic chicken) จัดอยู่ใน Species *Gallis domesticus* Genus *Gallus* Family *Phasianidae* Order *Galliformes* Sub-class *Carinatae* Class *Aves* (Smith., 1990)

ลำดับวงศ์วานของสัตว์ปีกที่มนุษย์ใช้เป็นอาหารมีดังนี้ (Hutt, 1949)

Kingdom Animallia

Subkingdom Mtazoa

Phylum Chordata

Subphylum Vertebrata

Class	Oder	Family	Genus	Spcies	ชื่อสามัญ
Aves	Anseriforms	Anatidae	*Anser*	*anser*	ห่าน
			Anas	*platyrhuclus* (Johnsgard, 1978)	เป็ด
	Galliforms	Phasianidae	*Gallus*	*gallus* (Crawford, 1990)	ไก่ป่าขนสีแดง
				domesticus (Stevens, 1996)	ไก่บ้าน
				gallus domesticus (Moran, 1993)	(ปัจจุบัน)
		Meleagrididae	*Melagris*	*gallopavo* (Howard and Moore, 1984)	ไก่งวง

อภิชัย รัตนวราหะ (2540) รายงานไว้ว่าต้นตะกูลของไก่พื้นเมืองนั้นอยู่ในทวีปเอเชียตะวันตกเฉียงใต้บริเวณอินเดีย พม่า ไทย มาเลเซีย อินโดนีเซีย ลาว เขมร และเวียดนาม ซึ่งประกอบด้วยไก่ป่า 4 กลุ่ม คือ

1. ไก่ป่าสีแดง *(Gallus gallus)* หรือ Red Junglefowl ไก่ป่าชนิดนี้ตัวผู้จะมีลักษณะหน้าอกและหน้าท้องดำ ตัวเมียหน้าอกสีน้ำตาลแกมแดง บนหลังอาจมีลายแต่ไม่ชัดเจนและสามารถแบ่งออกเป็น 5 ชนิด และมีอยู่ 2 ชนิดที่มีในประเทศไทย คือ (1) ไก่ป่าตุ้มหูขาว หรือไก่ป่า

อีสาน พบในภาคอีสานและภาคตะวันออก ตัวผู้จะมีขนบนหัวและมีสร้อยคอเป็นขนเส้นยาวปลายแหลมบนหัว และคอตอนบนเป็นสีทองออกแดง และจะเป็นสีเหลืองมากขึ้นในตำแหน่งที่ต่ำลง ส่วนบนของหลังเป็นขนยาวปลายแหลมสีทองค่อนข้างแดง ขนปกคลุมปีกเป็นสีแดงเลือดหมูคล้ำถัดไปเป็นสีเหลืองเขียว ขนปลายปีกเป็นสีน้ำตาลแกมแดงทางครึ่งนอก และสีดำแกมน้ำตาลที่ครึ่งในของขน โคนหางสีดำเหลือบเขียวน้ำเงินมีเส้นยาว 2 เส้น ปลายแหลมโค้งงดงาม ส่วนล่างของลำตัวสีดำตลอด หน้าเกลี้ยงสีแดง หงอนใหญ่แดงมีเหนียงสีแดงใต้คางข้างละอัน มีตุ้มหูสีขาวเห็นได้ชัด (2) ไก่ป่าตุ้มหูขาว หรือไก่ป่าแดงพันธุ์พม่า มีลักษณะคล้ายไก่ป่าตุ้มหูขาวมาก แต่ผิดกันตรงมีตุ้มหูสีแดง พบในเขตทางภาคใต้ ภาคตะวันตก จนถึงภาคเหนือ นอกจากนั้นพบในประเทศพม่าและสุมาตราตอนเหนือ

2. ไก่ป่าชีลอน *(Gallus lafayettii)* หรือไก่ป่าศรีลังกา (La Fayette's Junglefowl) ไก่ป่าชนิดนี้มีสีแดงแทบทั้งตัวโดยเฉพาะหน้าอก และใต้ท้อง ปลายปีก และหางมีสีดำแกมม่วง กลางหงอนเป็นสีเหลือง ตุ้มหูขาว ส่วนตัวเมียหน้าอกเป็นลายเลือนๆ สีน้ำตาล ปลายปีกและหางมีลายขวางมีเฉพาะในเกาะลังกา

3. ไก่ป่าสีเทา *(Gallus sonnerati)* หรือไก่ป่าอินเดีย (Sonnerat's Junglefowl) ตัวผู้สร้อยคอกลมมน และมีจุดสีขาวบนหลัง หน้าอกและใต้ท้องเป็นสีเทามีลายตามขอบบนดำๆ ปลายปีกและหางเป็นสีดำแกมเขียว แข้งสีดำ ตุ้มหูสีแดง ตัวเมียหน้าอกสีขาวลายขอบดำ ปีก และหางมีลายเลือนๆ พบในภาคกลางและภาคใต้ของอินเดีย

4. ไก่ป่าชวา *(Gallus varius)* หรือไก่ป่าเขียว (Green Junglefowl) ตัวผู้สร้อยคอสั้นและกลมมนสีเขียว ตัวเมียหน้าอกสีน้ำตาลคล้ำๆ ส่วนบนของลำตัวมีลายดำทั่วไปมีลักษณะผิดกับไก่ป่าชนิดอื่นคือมีเหนียงอันเดียว หงอนไม่จักร ขนสร้อยคอไม่แหลม และมีขนหางพิเศษอีก 1 คู่ พบในหมู่เกาะชวาและหมู่เกาะเล็กๆ ทางตะวันตกของอินโดนีเซีย เพราะชอบอยู่ป่าใกล้ชายฝั่งทะเล

2.2 พันธุ์ไก่พื้นเมืองไทย

จากการศึกษาโดยใช้การเปรียบเทียบทางสัณฐานวิทยาและพฤติกรรม ตลอดจนการศึกษาทางชีวเคมีและพันธุศาสตร์ เชื่อว่าไก่ป่าสีแดงเป็นบรรพบุรุษหลักของไก่พันธุ์ต่างๆ ในปัจจุบันและจากหลักฐานทางโบราณคดี เชื่อว่ามนุษย์ได้นำไก่มาเป็นสัตว์เลี้ยงครั้งแรกในทวีปเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เมื่อประมาณ 6,000 ปีก่อน และมีการพัฒนาสายพันธุ์กลายเป็นไก่พื้นบ้าน ไก่ชู ไก่ตะเภา

และไก่แจ้ดังเช่นปัจจุบัน จากสภาพภูมิประเทศทำให้รูปร่าง ขนาดของไก่แตกต่างกัน ไก่พื้นเมืองไทยสามารถจำแนกได้หลายประเภท (อภิชัย รัตนวราหะ, 2540) ดังเช่น

1. ไก่อู เป็นไก่พันธุ์หนัก ลำตัวใหญ่ ตัวเมียมีขนสีดำปกคลุมทั้งตัว ตัวผู้มีลักษณะเป็นไก่ชน มีนิสัยชอบจิกตีหรือชน มีสีขนแตกต่างกันไป เช่น มีสีแดงสลับกับเขียว สีดำ สีเทา สีเหลืองออกขาว หางสีดำ หรือสลับกับสีลายอื่นๆ เชื่อกันว่าเป็นต้นตระกูลของไก่ชน

2. ไก่ตะเภา เป็นไก่ขนาดใหญ่ สีสวย สีน้ำตาลออกเหลือง มีขนอ่อนนุ่มละเอียด มีขนที่หน้าแข้ง เนื้อนุ่มรสชาดอร่อย สันนิษฐานว่าเป็นไก่ที่มีถิ่นกำเนิดมาจากประเทศจีน นำเข้ามาในประเทศไทย ช่วงที่ติดต่อค้าขายระหว่างประเทศกับจีนโดยบรรทุกไก่มากับเรือสำเภา จึงเรียกไก่พันธุ์นี้ว่าไก่ตะเภา ปัจจุบันสายพันธุ์แท้เกือบไม่มีแล้ว

3. ไก่แจ้ไทย มีลักษณะลำตัวเล็ก เตี้ยน้ำหนักประมาณ 500-600 กรัม มีสีต่างๆกัน นิยมเลี้ยงเป็นไก่สวยงาม เพศผู้และเพศเมียมีลักษณ

4. ไก่ป่าตุ้มหูขาว หรือไก่ป่าอีสาน พบในภาคอีสานและภาคตะวันออก ตัวผู้จะมีขนบนหัวและมีสร้อยคอเป็นขนเส้นยาวปลายแหลมบนหัว และคอตอนบนเป็นสีทองออกแดงและจะเป็นสีเหลืองมากขึ้นในตำแหน่งที่ต่ำลง หงอนใหญ่แดงมีเหนียงสีแดงใต้คางข้างละอัน มีตุ้มหูขาวเห็นได้ชัดเจน

5. ไก่ป่าตุ้มหูแดง หรือไก่ป่าแดงพม่า มีลักษณะคล้ายไก่ป่าตุ้มหูขาวแต่ผิดกันตรงตุ้มหูแดง พบในเขตทางภาคใต้ ภาคตะวันตกจนถึงภาคเหนือ นอกจากนั้นพบในประเทศพม่า และสุมาตราตอนเหนือ

6. ไก่ชน เป็นสายพันธุ์ไก่พื้นเมืองที่ผ่านการคัดเลือกและผสมพันธุ์อย่างเข้มงวดมาหลายชั่วอายุ (เน้นการชนเป็นหลัก) มีสายพันธุ์ที่ค่อนข้างนิ่ง มีลักษณะลำตัวใหญ่ หน้าอกใหญ่ เนื้อแน่น โตเร็ว ใหญ่ ทนต่อสภาพแวดล้อม หากินเก่ง และเลี้ยงลูกเก่ง สายพันธุ์ไก่ชนที่คนไทยนิยมเลี้ยงไว้ชนกันมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันมีอยู่ด้วยกันหลายพันธุ์ โดยยึดเอาสีขน และลักษณะของขนตามลำตัวเป็นเกณฑ์ซึ่งสามารถแยกออกเป็นสายพันธุ์ที่สำคัญๆ คือ ไก่เหลืองหางขาว ไก่ประดู่หางดำ ไก่เขียวแมงภู่หางดำ ไก่เขียวเลาหางขาว ไก่ลายข้าวตอก ไก่ดอกหมากหางขาว เป็นต้น (พน นิลผึ้ง ,2542) การเลี้ยงไก่พื้นเมืองให้ประโยชน์หลายอย่างเช่น เลี้ยงไว้เพื่อการบริโภคเป็นแหล่งอาหาร

โปรตีน และเลี้ยงเป็นอาชีพเสริมเพราะเป็นการลงทุนที่น้อย ลักษณะการเลี้ยงแบบปล่อยให้หากินเองในบริเวณบ้านได้ ดังนั้นกรมปศุสัตว์ (2546) จึงได้มีโครงการวิจัยสร้างฝูงพ่อแม่พันธุ์ไก่พื้นเมืองแท้จำนวน 4 สายพันธุ์ซึ่งเป็นสายพันธุ์สายพันธุ์ของไก่ชน โดยลักษณะทั่วไปของไก่แต่ละสายพันธุ์เป็นดังนี้

6.1. ไก่พื้นเมืองพันธุ์ประดู่หางดำ มีลักษณะเด่นประจำพันธุ์ คือ เพศผู้มีปาก แข้งเล็บเดือย มีสีน้ำตาลแก่ หรือมะขามไหม้ ขนพื้นลำตัวสีดำ ขนสร้อยคอ สร้อยปีก สร้อยหลัง และระย้ามีสีประดู่ หางพัด และหางกระรวยสีดำสนิท ไก่ประดู่หางดำเพศเมียมีขนพื้นลำตัว และขนปีกสีดำ ขนคอจะมีประดู่แซมปลายเล็กน้อย หางยาวสีดำสนิท

6.2. ไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว มีลักษณะเด่นประจำพันธุ์ คือ ไก่เหลืองหางขาวเพศผู้มีรูปร่างสง่างาม ปาก แข้ง เกล็ด เล็บ เดือย มีสีขาวอมเหลือง ขนพื้นลำตัวสีดำสนิท ขนสร้อยคอ สร้อยปีก สร้อยหลัง และระย้า มีสีเหลือง หางพัดยาวดำ หางกระรวยดกยาวมีสีขาว ปีกท่อนในมีสีดำ ปีกไชนอกแซมขาว ที่สำคัญมีหย่อมกระ 5 แห่งที่หัว หัวปีก และข้อขา ไก่เหลืองหางขาวเพศเมียมีขนพื้นลำตัวเป็นสีดำตลอดลำตัวมีขนสีขาวแซม

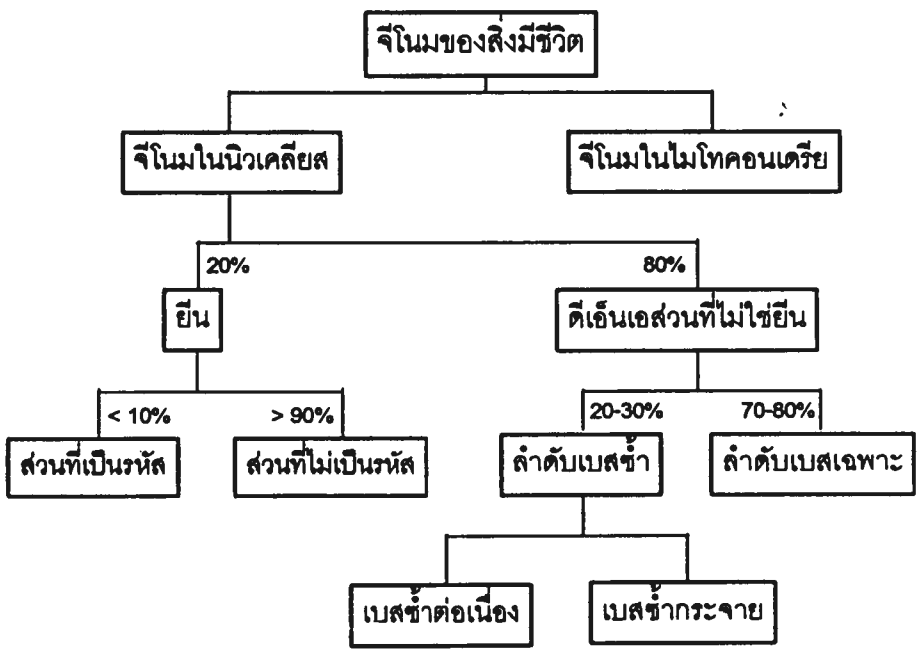
6.3. ไก่พื้นเมืองพันธุ์ชี มีลักษณะเด่นประจำพันธุ์ คือ เพศผู้มีปาก แข้ง เดือย มีสีขาวอมเหลือง ขนพื้นลำตัว ขนสร้อยคอ สร้อยปีก สร้อยหลัง ขนปีก หางพัด และหางกระรวยมีสีขาวตลอด ไก่ชีเพศเมียมีลักษณะเช่นเดียวกับไก่ชนเพศเมียทั่วไป มีขนสีขาวตลอดลำตัว

6.4. ไก่พื้นเมืองพันธุ์แดง มีลักษณะเด่นประจำพันธุ์ คือ ไก่แดงเพศผู้มีลำตัวกลม ไหล่หนาและใหญ่ ปาก แข้ง เกล็ด เล็บ เดือย มีสีเหลืองอมแดง ขนพื้นลำตัวสีแดง ขนสร้อยคอ สร้อยปีก สร้อยหลัง มีสีแดงสด ขนปีก ขนหางพัด และหางกระรวยมีสีแดง เพศผู้และเพศเมียมีขนบริเวณลำตัวเป็นสีแดงเหมือนเพศผู้แต่มีสีไม่แดงเข้ม หางยาวสีดำสนิท

2.3 ลักษณะจีโนมของสิ่งมีชีวิต

จีโนม คือ ส่วนที่เป็นดีเอ็นเอซึ่งบรรจุอยู่ในเซลล์ ยีโนมของสิ่งมีชีวิตประกอบด้วยส่วนที่อยู่ในนิวเคลียสและในไมโตรคอนเดรีย ส่วนที่อยู่ในนิวเคลียสเป็นดีเอ็นเอเส้นยาวเกลียวคู่ ยีโนมในไมโตรคอนเดรียดีเอ็นเอเป็นวงกลมไม่ได้ถูกถ่ายทอดไปยังรุ่นอื่นๆทางสายพ่อ เมื่อเซลล์อยู่ในช่วงแบ่งตัวระยะเมตาเฟสจะเรียกว่าโครโมโซม ซึ่งจะถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไปทั้งทางสายพ่อและสายแม่

ดีเอ็นเอในนิวเคลียสส่วนใหญ่เป็นลำดับเบสที่ไม่ใช่รหัส (non-coding sequences) ซึ่งในจีโนมมนุษย์มียีนอยู่เพียง 50,000-100,000 ยีน หรือ 5-10% ของจีโนมทั้งหมด ขนาดของยีนแต่ละยีนจะแตกต่างกันมากตั้งแต่ขนาดเล็กเพียง 0.1 กิโลเบส ไปจนถึงยีนขนาด 2,000 กิโลเบส ภายในยีนจะมีลำดับเบสบางส่วนที่ไม่ใช่รหัสและถูกตัดออกคือ อินทรอน (intron) และส่วนที่เป็นรหัส (coding sequences) หรือเรียกว่า เอ็กซอน (exon) ส่วนของจีโนมเกือบ 80% ไม่ใช่รหัส และพบอยู่นอกยีน เรียกว่า ส่วนที่ไม่ใช่ยีน (extragenic) ซึ่งในบริเวณนี้จะพบลำดับเบสซ้ำ (repetitive sequences) ที่ยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจน ดังรูป 2.1.



รูปที่ 2.1 การจัดเรียงตัวของจีโนมซึ่งประกอบด้วยส่วนที่อยู่ในนิวเคลียสและส่วนจีโนมที่อยู่ในไมโตคอนเดรีย

ดีเอ็นเอที่เป็นเบสซ้ำ (repetitive DNA) ประมาณ 30% ของดีเอ็นเอในจีโนมของคนประกอบด้วยส่วนที่มีลำดับเบสซ้ำ (repetitive) บางชนิดมีจำนวนซ้ำมากกว่า 100,000 ครั้ง ลำดับเบสซ้ำเหล่านี้มีความแตกต่างกันทั้งขนาดและจำนวนซ้ำ แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่ เบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeats) และเบสซ้ำกระจาย (interspersed repeats)

1. เบสซ้ำต่อเนื่อง คือเบสซ้ำที่มีการเรียงตัวกันเป็นช่วงยาวแบ่งได้ตามจำนวนซ้ำและความยาวได้แก่ แซทเทลไลท์ (satellite) มินิแซทเทลไลท์ (minisatellite) และไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite)

1.1 แซทเทลไลท์ เป็นเบสซ้ำขนาด 1-6 เบส หรือหลายร้อยเบส โดยมีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งตั้งแต่ $10^3 - 10^7$ ครั้ง ซึ่งจัดเป็นดีเอ็นเอที่มีการซ้ำของเบสสูงมาก (highly repetitive DNA) แซทเทลไลท์แต่ละแบบจะพบเพียง 1 หรือ 2 ตำแหน่งต่อโครโมโซมและมักพบบริเวณเซนโทรเมียร์

1.2 มินิแซทเทลไลท์ เป็นเบสซ้ำขนาด 9-100 เบสที่มีจำนวนซ้ำตั้งแต่ 10 ครั้ง แต่ไม่เกิน 1000 ครั้ง จัดอยู่ในกลุ่มที่มีกรซ้ำของเบสระดับปานกลาง มินิแซทเทลไลต์จำนวนมากมีความคล้ายคลึงกันของลำดับเบส หรือมีลำดับเบสแกน (core sequence) เดียวกัน ดีเอ็นเอบริเวณนี้มีความหลากหลายสูง เนื่องจากความแตกต่างในจำนวนซ้ำจึงอาจเรียกว่า variable number tandem repeat หรือ VNTR

1.3 ไมโครแซทเทลไลท์ เป็นเบสซ้ำขนาด 1-6 เบส โดยที่จำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ครั้ง จึงเรียก SSR (simple sequence repeats) เบสซ้ำชนิดนี้พบกระจายอยู่ในบริเวณต่างๆของจีโนมประมาณ $10^4 - 10^5$ โลกัส ความหลากหลายของจำนวนซ้ำที่พบในบริเวณนี้สามารถนำมาใช้ประยุกต์ในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ และเนื่องจากไมโครแซทเทลไลท์จำนวนมากถูกพบกระจายอยู่ทั่วไปในโครโมโซมทำให้มีการนำมาใช้ในการทำแผนที่จีโนม (genome mapping)

2. เบสซ้ำกระจาย เป็นกลุ่มของเบสซ้ำที่พบกระจายอยู่บริเวณต่างๆ ในจีโนม ในลักษณะที่ต่างจากกลุ่มเบสซ้ำต่อเนื่องโดยจะอยู่ในลักษณะเดียว (ไม่ต่อเนื่อง) และกระจายทั่วไป แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อยตามความยาวของเบสซ้ำ ได้แก่เบสซ้ำกระจายแบบสั้น (short interspered elements หรือ SINES) มีขนาดประมาณ 130-300 เบส และเบสซ้ำกระจายแบบยาว (long interspersed elements หรือ LINES) มีขนาดประมาณ 500 เบสขึ้นไป (วิชัย และคณะ, 2545)

2.4 Microsatellite DNA

Microsatellite DNA หมายถึง ดีเอ็นเอส่วนที่มีการซ้ำกันหลายๆชุดในจีโนม โดยชุดที่ซ้ำนี้จะอยู่ติดกัน แบบหัวต่อหาง โดยไม่มีรหัสอื่นมาแทรกระหว่างกลาง มักมีขนาด 2-6 เบส เช่น (CA)n, (TAA)n, (GGGA)n เมื่อ n เป็นจำนวนซ้ำ โดยมีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ครั้ง เบสซ้ำชนิดนี้พบกระจายอยู่ในบริเวณต่างๆของจีโนมประมาณ 10^4-10^5 ตำแหน่ง ขนาดของยีโนมที่แตกต่างกันจะมีอิทธิพลต่อความถี่และจำนวนซ้ำของ microsatellite DNA (Moran, 1993)

โดยปกติ microsatellite DNA จะเกิดการกลาย (mutation) ในระหว่างการวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต และเกิดขึ้นในอัตราที่สูงเมื่อขนาดความยาวของ microsatellite DNA เพิ่มขึ้น การกลายของ microsatellite DNA เพียงเบสเดียวอาจทำให้ขนาดของชุดซ้ำของ microsatellite DNA เปลี่ยนแปลงไป (Schlötterer and Tautz., 1992; Viguera *et al.*, 2001) ซึ่งสาเหตุการกลายที่เกิดมากที่สุดคือ การเลื่อนของเบส (slippage bases) ขณะที่มีการจำลองตัวของโมเลกุลดีเอ็นเอ (DNA replication) ส่งผลให้เกิดการขาดหายไป (deletion) หรือการสอดแทรก (insertion) ของเบส นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของยีน และอัตราการไขว้เปลี่ยนที่ไม่เท่ากันของซิสเตอร์โครมาทิด (unequal crossing over) ล้วนเป็นกลไกที่ทำให้ตำแหน่งของ microsatellite markers มีความหลากหลายของอัลลีล (allelic variation) นอกจากนี้พบว่าขนาดชุดซ้ำของ microsatellite DNA ที่ต่างกันมีผลต่อการกลายของ microsatellite DNA โดยพบว่า microsatellite DNA ที่มีขนาดชุดซ้ำ 2 เบส (CA)n เรียก dinucleotide มีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่า microsatellite DNA ที่มีขนาดชุดซ้ำ 3 เบส (TAA)n เรียก trinucleotide และ microsatellite DNA ชนิด trinucleotide มีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่า microsatellite DNA ที่มีขนาดชุดซ้ำ 4 เบส (GGGA)n เรียก tetranucleotide (Chakraborty *et al.*, 1997; Lai *et al.*, 2003)

การเพิ่มปริมาณ microsatellite DNA ด้วยเทคนิค PCR จะพบว่าแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นบางครั้งมีลักษณะเป็น ladder band คือ เกิดแถบดีเอ็นเอหลายแถบติดกันซึ่งแถบดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นนี้เรียกว่า stutter band เกิดขึ้นจากการเลื่อนของตำแหน่งเบส ในกระบวนการ PCR เช่นเดียวกับการกลายและการเกิดแถบดีเอ็นเอในลักษณะเช่นนี้เป็นลักษณะที่พบทั่วไปจากการตรวจสอบดีเอ็นเอ โดยเฉพาะ microsatellite DNA ชนิด dinucleotide (Walsh *et al.*, 1996)

ปัจจุบันมีการนำ microsatellite markers มาใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจาก microsatellite markers จะมีรูปแบบความหลากหลาย (polymorphism)สูง มีจำนวนอัลลีลมาก เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว และแม่นยำ สามารถจำแนกอัลลีลในแต่ละตำแหน่งได้ ทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานของพันธุศาสตร์ประชากร เช่น ความถี่อัลลีล เป็นต้น microsatellite markers ถูกนำมา

ประยุกต์ใช้ในสัตว์หลายชนิดอย่างกว้างขวาง เช่น โค สุกร กวาง สุนัข และไก่ เพื่อประโยชน์ในงานด้านต่างๆ เช่น การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) ซึ่งสามารถใช้ระบุเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมของแต่ละบุคคล การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม วิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมเพื่อหาความแตกต่างทางพันธุกรรม และความแตกต่างทางพันธุกรรมในรูปของ phylogenetic tree

จากการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตที่ผ่านมาใช้ microsatellite markers ชนิด dinucleotide เป็นส่วนใหญ่ ดังที่กล่าวมาแล้วว่า microsatellite DNA ชนิด dinucleotide มีอัตราการกลายพันธุ์สูงกว่า microsatellite DNA ชนิด tetranucleotide (Chakraborty *et al.*, 1997; Lai *et al.*, 2003) ทำให้เกิดการแปรผันของลำดับเบสสูง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Archie และคณะ (2003) ที่ศึกษาลักษณะของ microsatellite markers ชนิด tetranucleotide ในช้างแอฟริกันซาวานา (African Savannah) เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรช้างแอฟริกันเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์ ผู้ทำการวิจัยกล่าวว่าการศึกษาโดยใช้ microsatellite markers ในช้างแอฟริกันที่ผ่านมาโดยส่วนมากเป็น microsatellite markers ชนิด dinucleotide ซึ่งมีแนวโน้มทำให้ผลการศึกษาผิดพลาดได้ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Pongsomboon และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาลักษณะของ microsatellite markers ชนิด trinucleotide และชนิด tetranucleotide ในกุ้งกุลาดำ เพื่อนำไปใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการปรับปรุงพันธุ์กุ้งกุลาดำ และกล่าวว่า microsatellite markers ชนิด dinucleotide ในกุ้งกุลาดำมีจำนวนซ้ำที่ยาวมากทำให้ยากที่จะพัฒนาเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้

2.5 ความหลากหลายรูปแบบของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ

ในสิ่งมีชีวิตจะมีการเรียงตัวของดีเอ็นเอแตกต่างกัน โดยการเรียงตัวของเบสเป็นลักษณะเฉพาะพิเศษที่มีแบบซ้ำๆกันอย่างต่อเนื่อง เช่น ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ สัตว์แต่ละตัวจะมีความแตกต่างของจำนวนซ้ำของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอตำแหน่งหนึ่งๆอย่างมากได้เพียง 2 อัลลีล ที่ได้รับมาจากพ่อ 1 อัลลีลแม่ 1 อัลลีล ซึ่งไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอที่มีจำนวนซ้ำแตกต่างกันทำให้เกิดรูปแบบความหลากหลาย(polymorphism) และจำนวนซ้ำของไมโครแซทเทลไลท์ที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้ขนาดของอัลลีลเพิ่มขึ้น ทำให้ได้อัลลีลมาก กว่า 2 แบบ ซึ่งปัจจัยที่ทำให้ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเกิดรูปแบบความหลากหลาย ได้แก่

1) การเปลี่ยนของเบสตัวเดียว พบทั้งการแทนที่เบสปกติด้วยเบสอื่น และการเพิ่มหรือหายไปของเบสเพียง 1 ตัว สาเหตุสำคัญของการเปลี่ยนของเบสตัวเดียวกันเกิดจาก ความผิดพลาดระหว่างการจำลองตัวของดีเอ็นเอ หรือเกิดจากการกระตุ้นให้เปลี่ยนแปลงด้วยสิ่งก่อการกลาย (mutagen)

2) การขาดหายไปหรือการสอดแทรกของดีเอ็นเอ การขาดหายไปของชิ้นดีเอ็นเอ (deletion) พบในโรคต่างๆ หลายชนิดเช่น โรคธาลัสซีเมีย โรคกล้ามเนื้อฝ่อดูเค็น (duchenny muscular dystrophy) เป็นต้น เชื่อว่ามีสาเหตุจากความผิดปกติเมื่อมีการแลกเปลี่ยนส่วนของดีเอ็นเอในกระบวนการรีคอมบิเนชั่น (recombination) ส่วนการสอดแทรกของชิ้นดีเอ็นเอ (insertion) ที่เป็นสาเหตุของดีเอ็นเอเกิดรูปแบบความหลากหลาย พบน้อยกว่าการขาดหายไปของชิ้นดีเอ็นเอ และมักเกี่ยวข้องกับเบสกระจาย

3) การขาดหายไปหรือการขยายจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอในกระบวนการรีคอมบิเนชั่น ความผิดปกติของดีเอ็นเอแบบนี้มักจะพบในส่วนของดีเอ็นเอที่ไม่ใช่รหัส ในยีนที่เป็นกลุ่มของยีนเดียวกัน (multigene families) เบสซ้ำชนิดต่างๆ เมื่อเกิดการแลกเปลี่ยน ส่วนของดีเอ็นเอระหว่างการครอสซิงโอเวอร์ (crossing over) ของโครโมโซมคู่เหมือน อาจมีการเรียงตัวผิด (mis-align) ของลำดับเบสที่เหมือนหรือคล้ายกัน ทำให้มีการไขว้เปลี่ยนของ ซิสเตอร์โครมาทิด (sister chromatid) ที่ไม่เท่ากัน เป็นผลให้ชิ้นดีเอ็นเอขาดหายไป หรือขยายจำนวนขึ้น การไขว้เปลี่ยนของโครมาทิด (chromatid) ที่ไม่เท่ากันนี้เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้มินิแซทเทลไลท์ มีความแตกต่างของจำนวนซ้ำในแต่ละบุคคล จึงมีการนำมินิแซทเทลไลต์มาเป็นดีเอ็นเอตรวจสอบในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถบอกความแตกต่างระหว่างบุคคลได้

4) การขยายจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่เกิดจากการเลื่อนของเบส (Slippage bases) ในบริเวณเบสซ้ำที่มีเบสแกนขนาดเล็กเรียงตัวอยู่ด้วยกันหลายๆ หน่วยซ้ำนั้น อาจมีการเลื่อนของเบสทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ของดีเอ็นเอได้ การเลื่อนของเบสทำให้เกิดการซ้ำกันของเบส และมีปลายยื่นเหลื่อมออกมา เชื่อกันว่าเบสซ้ำของไมโคร-แซทเทลไลท์มีความแตกต่างของจำนวนซ้ำ เนื่องมาจากการเลื่อนของเบสโดยกลไกนี้ (วิชัย และคณะ, 2545)

2.6 เครื่องหมายทางพันธุกรรม (Genetic Marker) กับการปรับปรุงพันธุ์สัตว์

Genetic markers หมายถึง ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ความจำเพาะอย่างใดอย่างหนึ่งของสิ่งมีชีวิต เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ในตำแหน่งหนึ่งๆบนโครโมโซม (nuclear DNA) รูปแบบความหลากหลาย (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอสามารถนำไปใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรม เพื่อช่วยในการศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตได้ ในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์นั้นสามารถใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมมาช่วยในการคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์ได้ โดยสามารถแบ่งชนิดของเครื่องหมายทางพันธุกรรมได้ดังนี้

1. เครื่องหมายติดตามทางลักษณะแสดงออก (Phenotypic Markers หรือ Morphological Markers) คือ ตัวเครื่องหมายที่สามารถจะวัดได้โดยตรงโดยดูลักษณะต่างๆ ภายนอกที่สัตว์มีการแสดงออก

2. เครื่องหมายติดตามโดยใช้ตัวบ่งชี้ทางชีวเคมี (Biochemical Markers หรือ Protein Markers) คือ ลักษณะที่ตรวจสอบได้โดยขบวนการทางชีวเคมี เนื่องจากโปรตีนที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากการแสดงออกของยีน ดังนั้นการตรวจสอบความแตกต่างของโปรตีนสามารถตรวจสอบได้จากดูความแตกต่างจากอัลลีลของยีน Protein Markers โดยใช้การวิเคราะห์ Isozyme และ Allozyme เป็นต้น แต่ในปัจจุบันวิธีการนี้ได้รับความนิยมน้อยมาก วิธีการมีข้อจำกัด คือ มีความหลากหลาย (polymorphism) น้อยมาก

3. เครื่องหมายพันธุศาสตร์โมเลกุล (Molecular genetic markers) เป็นวิธีการใหม่ที่ให้ผลที่แม่นยำกว่าวิธีอื่นๆ ในเชิงประยุกต์แล้ว ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) มีข้อดีกว่าการตรวจสอบโปรตีน เนื่องจากโมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรกว่าจึงเก็บไว้ได้นาน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลายาวนานได้ และเนื่องจากดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อใดๆ ระยะการเจริญเติบโต หรือสภาพทางสรีรวิทยาใดก็ได้ โดยไม่ขึ้นกับสิ่งแวดล้อม ตรวจสอบดีเอ็นเอจากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีนก็ได้ จึงตรวจสอบได้โดยไม่จำกัดคลอบคลุมทั้งจีโนม ประกอบกับมีวิธีตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่างๆ ให้เลือกมากมาย เช่น Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Variable Number Tendem Repeat (VNTR) และ microsatellite markers เป็นต้น ทำให้การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายที่ทำได้อย่างกว้างขวาง

ปัจจุบันมีการนำเอาเทคนิคทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์เพื่อย่นระยะเวลาในการคัดเลือก โดยการตรวจสอบพันธุกรรมของสัตว์โดยตรง เรียกว่า Marker Assisted Selection (MAS) (Soller, 1994 ; Dodson et al., 1997 and Vint , 1997) โดยใช้เครื่องหมายที่เป็นยีนหรือชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ (DNA fragment) ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ (QTL; Crooijmans *et al.*, 1996b; Kühn *et al.*, 1999) ลักษณะของ markers ที่นิยมนำมาเป็นตัวคัดเลือกสำหรับ MAS จะต้องเป็น markers ที่มีความหลากหลายสูง (High polymorphism) ทั้งภายในสายพันธุ์ และภายในกลุ่มประชากร (Dekker and Dentine., 1990) ตัวอย่าง markers ที่นิยมใช้เช่น Minisatellites, Microsatellite, RAPD และ RFLP (Crooijmans *et al.*, 1996b)

Genetic Markers มีความสำคัญสำหรับการพัฒนาทำแผนที่ยีน ซึ่งปัจจุบันมีการพัฒนาและสร้าง Genetic Linkage Maps ในสัตว์เพิ่มมากขึ้นเพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้สำหรับการปรับปรุงพันธ์ให้เร็วขึ้น มีเป้าหมายหลักคือ การจัดหาตำแหน่งยีนที่มีความผันแปรสำหรับลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจ (Soller., 1994)

นอกจากนี้สามารถใช้ Genetic markers เพื่อประโยชน์อื่นๆ เช่น การตรวจสอบความสัมพันธ์พ่อแม่ลูก (parentage testing) ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) การจำแนกสายพันธุ์ (breed clasification) และความแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variation) เป็นต้น โดยทั่วไปการใช้ประโยชน์ของ Genetic markers จะใช้ร่วมกับเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยเทคนิคนี้เป็นเทคนิคพื้นฐานที่สามารถใช้งานได้สะดวกมากในการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

2.7 วิธีการตรวจหาความหลากหลายทางพันธุกรรม

ปัจจุบันมีเทคนิคหลายอย่างในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ที่ช่วยในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมระดับโมเลกุล เพื่อประโยชน์ต่อการรวบรวมลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตต่างๆ Microsatellite marker เป็นเทคนิคหนึ่งที่ใช้ร่วมกับเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่หรือ PCR เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ซึ่งประกอบด้วย 4 ขั้นตอนได้แก่

1. การสกัดดีเอ็นเอ
2. การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์
3. การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซีส
4. การแปลผล

2.7.1 การสกัดดีเอ็นเอ

หลักการของการสกัดดีเอ็นเอด้วยสารละลายคีเล็กซ์เรซิน คือการทำลายเซลล์เมมเบรนให้นิวเคลียสออกจากเซลล์ แล้วต้มเพื่อให้นิวเคลียสปล่อยดีเอ็นเอ โลหะหนักที่มีค่าประจุ 2^{+} เช่น Hg^{++} Cd^{++} Zn^{++} ซึ่งเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ จะถูกปล่อยออกมาจากเซลล์ขณะต้ม ประจุเหล่านั้นสามารถทำลายดีเอ็นเอได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อดีเอ็นเออยู่ในสภาวะที่อุณหภูมิสูง สารละลายคีเล็กซ์เรซินจะทำหน้าที่จับไอออนเหล่านี้ไว้ เนื่องจากเซลล์แต่ละชนิดในร่างกายมีองค์ประกอบภายในแตกต่างกัน จึงทำให้ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอของเซลล์แต่ละชนิด แตกต่างกันไปตามลักษณะของเซลล์นั้นๆ ดังต่อไปนี้

(ก) สิ่งส่งตรวจประเภทเลือดหรือคราบเลือด

การสกัดจะเริ่มด้วยการทำให้เม็ดเลือดแดงแตกโดยใส่เลือด 3-10 ไมโครลิตร ลงในน้ำกลั่น แล้วปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง เพื่อตกตะกอนเซลล์เม็ดเลือดขาว จากนั้นจึงต้มเซลล์เม็ดเลือดขาวในสารละลายคีเล็กซ์เรซินนาน 8 นาที จะได้สารละลายดีเอ็นเอเพื่อนำไปใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสต่อไป หากเป็นคราบเลือดให้ใช้ส่วนของเศษผ้าหรือชิ้นส่วนที่มีคราบเลือดติดอยู่ ขนาดประมาณ 3-5 ตารางมิลลิเมตร แช่ในน้ำกลั่นเพื่อทำลายเม็ดเลือดแดงแล้วปั่นตกตะกอน สำหรับขั้นตอนอื่นๆ เหมือนการสกัดดีเอ็นเอจากเลือด

(ข) สิ่งส่งตรวจประเภทน้ำอสุจิหรือคราบเลือด

การสกัดจะเริ่มด้วยการใช้น้ำอสุจิประมาณ 3-5 ไมโครลิตร หรือคราบอสุจิ หรือคราบเลือดบนเศษผ้าขนาด 3-5 ตารางมิลลิเมตร นำมาต้มในสารละลายคีเล็กซ์เรซินและไดไธโอธรีอิทอล

เพื่อให้มีการทำลายเซลล์เมมเบรนอย่างสมบูรณ์และมีการปล่อยดีเอ็นเอออกมามากที่สุด (สารเคมีไดไธ-โอธรีอิทอล มีคุณสมบัติในการทำลายพันธะไดซัลไฟด์ซึ่งมีอยู่ในตัวอสุจิ) แล้วใส่สารละลายโปรตีนเนสเค เพื่อย่อยโปรตีนที่อยู่ในสารละลายหลังจากที่เซลล์เมมเบรนแตก จึงจะได้สารละลายดีเอ็นเอเพื่อนำมาใช้ในปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสต่อไป

(ค) สิ่งส่งตรวจประเภทเส้นผมหรือเส้นขน

การสกัดดีเอ็นเอจากเส้นผมหรือเส้นขนจำเป็นต้องใช้รากผม หรือรากขนด้วย เนื่องจากส่วนรากเป็นส่วนที่มีดีเอ็นเอ นำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 1-2 ครั้ง แล้วต้มในสารละลายคีเล็กซ์เรซิน นาน 8 นาที ขณะต้มต้องระวังให้รากผม/ขน จมอยู่ในสารละลายเพื่อให้การสกัดดีเอ็นเอมีประสิทธิภาพสูงสุด

2.7.2 **หลักการของเทคนิคพีซีอาร์** (PCR)

เทคนิคพีซีอาร์มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอให้มีปริมาณมากเพียงพอต่อการวิเคราะห์ผล มีองค์ประกอบสำคัญต่างๆได้แก่

1. ดีเอ็นเอที่ใช้เป็นแม่พิมพ์ (template DNA) สำหรับจำนวนดีเอ็นเอที่ใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ควรมีประมาณ 100-500 นาโนกรัม (Rolfs และคณะ, 1992)

2. ไพรเมอร์ (primer) เป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกับปลายทั้ง 2 ด้านของบริเวณดีเอ็นเอที่สนใจ โดยมีลำดับเบสเป็นตัวกำหนดช่วงความจำเพาะของการสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการสำหรับการออกแบบ primer ที่ดีต้องไม่ให้เกิดการจับคู่กันเอง (self dimer) หรือจับกับสาย primer อีกสายหนึ่งได้ (heterodimer)

3. เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอร์เรส (DNA polymerase) ทำหน้าที่สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่โดยใช้ดีเอ็นเอสายเดี่ยวเป็นแม่แบบ (DNA template) ซึ่งเป็นตัวกำหนดลำดับโมเลกุลของ deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) โดยการเชื่อมโมเลกุลด้านปลาย 3' อิสระ ทำให้มีการเพิ่มความยาวของดีเอ็นเอสายใหม่ในทิศทาง 5'→ 3' นอกจากนี้ยังพบว่าเอ็นไซม์นี้มีคุณสมบัติ 3' → 5' exonuclease ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการย่อยโมเลกลของ dNTP ออกจากปลาย 3' อิสระของดีเอ็นเอสายเดี่ยวหนึ่งโมเลกุล ในขณะที่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่และทำหน้าที่

ซ่อมแซมดีเอ็นเอบริเวณที่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอผิดพลาด (error-correcting) เป็นกลไกป้องกันมิให้เกิดการกลายพันธุ์ เรียกกลไกนี้ว่า proofreading

4. ดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (deoxynucleotidetriphosphates, dNTPs) ที่ใช้ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอมี 4 ชนิด ได้แก่ deoxyadenosine triphosphate (dATP) deoxyguanosine triphosphate (dGTP) deoxycytidine triphosphate (dCTP) และ deoxythymidine triphosphate (dTTP) ซึ่งทั้งหมดทำหน้าที่เป็นสารต้นตอสำหรับการสังเราะห์ดีเอ็นเอ (Rolfs และคณะ, 1992) สำหรับ dNTP แต่ละตัวในปฏิกิริยาพีซีอาร์ควรมีความเข้มข้นเท่ากัน เพื่อให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นจำเพาะอย่างถูกต้องในกรณีที่มีความเข้มข้นของ dNTP สูงเกินไปเกิดการสังเคราะห์อย่างไม่จำเพาะขึ้น แต่ถ้ามีความเข้มข้นน้อยเกินไปจะมีปริมาณ dNTP ไม่เพียงพอสำหรับการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (วัชรี อัตถทิพพหลคุณ, 2536ก) ปริมาณที่เหมาะสมของ dNTP แต่ละตัวในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ควรอยู่ที่ระดับ 20 มิลลิโมล (millimole) ซึ่งเพียงพอสำหรับสังเคราะห์ดีเอ็นเอน้ำหนัก 2.6 กรัม ขนาดความยาว 400 คู่เบส (base pair ; Micheal และ Gelfand, 1992)

5. สารละลายบัฟเฟอร์ เป็นสารที่สำคัญในการทำหน้าที่เร่งการทำงานและรักษาสภาพเอนไซม์ *Taq* DNA polymerase ประกอบด้วยสาร

5.1 Tris-HCl pH 8.3-8.8 ความเข้มข้น 10-15 มิลลิโมลาร์

5.2 สาร KCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

5.3 แมกนีเซียมอิออน (Mg^{2+}) ซึ่งพบว่าถ้ามีปริมาณมากเกินไป ทำให้เกิดการสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเกิดขึ้นอย่างไม่มความจำเพาะ แต่ถ้ามีปริมาณน้อยเกินไป ทำให้เกิดการสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอน้อยลง เนื่องจากแมกนีเซียมอิออนมีผลต่อกระบวนการพีซีอาร์ ในขั้นตอน DNA denaturation primer annealing และ primer extension สำหรับความเข้มข้นของแมกนีเซียมอิออนที่แนะนำคือประมาณ 0.5-2.5 มิลลิโมลาร์ (Micheal และ Gelfand, 1992)

ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นซ้ำๆ กันหลายรอบ แต่ละรอบประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ ดังนี้

1. denaturation เป็นขั้นตอนที่ทำให้ดีเอ็นเอต้นแบบและไพรเมอร์สายคู่แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว โดยควบคุมด้วยความร้อน อุณหภูมิในขั้นตอนนี้จะอยู่ที่ประมาณ 94-95 องศาเซลเซียส

2. annealing เป็นขั้นตอนที่ไพรเมอร์จะเข้าไปจับกับบริเวณของดีเอ็นเอต้นแบบที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกัน อุณหภูมิที่ใช้ในขั้นตอนนี้มีความสำคัญ ถ้าอุณหภูมิที่ใช้สูงเกินไปไพรเมอร์จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้ไม่ดี ทำให้ได้ผลผลิตน้อย แต่อุณหภูมิที่ใช้ต่ำเกินไปไพรเมอร์จะเข้าไปจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้หลายบริเวณ ทำให้มีการเพิ่มจำนวนส่วนของดีเอ็นเอต้นแบบจากบริเวณที่ไม่ต้องการ อุณหภูมิที่ใช้โดยทั่วไปควรจะต่ำกว่าอุณหภูมิ ณ จุดสลายตัวของไพรเมอร์ (melting temperature,Tm) 3-5 องศาเซลเซียส โดยปกติอุณหภูมิจะอยู่ที่ 48-60° C ซึ่งสามารถคำนวณได้โดยใช้กฎ the rule of – thumb calculation (Thein and Wallace, 1986) จากสูตร

$$Tm\ (^{\circ}C) = 2\ (\text{จำนวน A+T}) + 4\ (\text{จำนวน C+G})$$

หมายเหตุ: จำนวน A T C และ G นับได้จากชิ้นส่วนของไพรเมอร์ที่ใช้

3. extension เป็นขั้นตอนของการสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ที่เป็นคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งอยู่ภายในบริเวณระหว่างคู่ไพรเมอร์ เรียกว่า ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย โดยการทำงานของเอ็นไซม์ DNA polymerase อุณหภูมิที่เหมาะสำหรับขั้นตอนนี้จะอยู่ที่ 72องศาเซลเซียส

ในแต่ละรอบของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ ปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายจะเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ดังนั้น PCR จำนวน n รอบจะได้ชินส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย 2^n เท่าของดีเอ็นเอเริ่มต้น ซึ่งโดยทั่วไปจำนวนรอบที่ใช้ประมาณ 30-35 รอบ จะได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการจำนวนมากพอสำหรับการวิเคราะห์ผล

2.7.3 การแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟริซิส

อิเล็กโตโฟริซิส (electrophoresis) เป็นเทคนิคที่ใช้แยกโมเลกุลของสารที่มีประจุออกจากกันโดยใช้กระแสไฟฟ้า โดยให้สารที่มีประจุนั้นเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางชนิดหนึ่งในสารละลาย สารที่มีประจุต่างกันจะเคลื่อนที่ไปในทิศทางตรงข้ามกัน นอกจากประจุแล้วอัตราการเคลื่อนที่ยังขึ้นอยู่กับขนาด รูปร่างโมเลกุล แรงเคลื่อนไฟฟ้าและตัวกลางที่ใช้ด้วยเมื่อปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสยุติแล้วจะได้ผลผลิตคือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดแตกต่างกัน เนื่องจากมีจำนวนของลำดับเบสไม่เท่ากัน นำผลผลิตดังกล่าวมาแยกได้โดยใช้กระแสไฟฟ้า ซึ่งมีวิธีการแยกเป็น 2 ประเภท

การแยกผลผลิตพีซีอาร์โดยใช้อะกาโรสเจล (agarose gel) ความเข้มข้น 2-3 เปอร์เซ็นต์เป็นตัวกลางให้กระแสไฟฟ้าขนาด 5 โวลต์/ซม. ผ่าน การใช้กระแสไฟฟ้าที่มีโวลต์ต่ำจะช่วยให้มี

ประสิทธิภาพในการแยกผลผลิตที่มีขนาดใกล้เคียงกัน เมื่อผ่านกระแสไฟฟ้าลงในตัวกลางที่แช่ในบัฟเฟอร์ ชิ้นดีเอ็นเอที่มีประจุลบจะเคลื่อนที่ไปทางขั้วบวก และชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าชิ้นดีเอ็นเอขนาดใหญ่ สำหรับเวลานั้นจะแตกต่างกันไปขึ้นกับขนาดของผลผลิตแต่ละโลกัส กล่าวคือโลกัสที่มีลำดับเบสแกนขนาดเล็ก จะใช้เวลานานกว่าโลกัสที่มีลำดับเบสแกนขนาดใหญ่ เมื่อชิ้นดีเอ็นเอถูกแยกโดยสมบูรณ์แล้วจึงนำตัวกลาง อะกาโรสเจล มาย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) แล้วบันทึกผลด้วยแสงอุลตราไวโอเลต เพื่อดูลักษณะของผลผลิตที่ได้

แต่การแยกผลผลิตพีซีอาร์ที่ได้จากส่วนที่เป็นไมโครแซทเทลไลท์ จะใช้ตัวกลางชนิดโพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide gel) ซึ่งเป็นตัวกลางที่มีความสามารถในการแยกดีเอ็นเอที่มีความแตกต่างของเบสเพียง 1 เบสได้ โดยใช้ตัวกลางมีความเข้มข้น 4-6 เปอร์เซ็นต์ ผ่านกระแสไฟฟ้าขนาด 40 วัตต์ นาน 45-60 นาที แล้วตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น(วิชัย และคณะ, 2541) โดยโพลีอะคริลาไมด์เจลเกิดจากการรวมตัวของอะคริลาไมด์ (acrylamide) และบิสอะคริลาไมด์ (N,N'-methylene bisacrylamide หรือเรียกสั้นๆว่า bisacrylamide) การจับตัวเป็นโพลีเมอร์ (polymerization) ของอะคริลาไมด์และบิสอะคริลาไมด์เริ่มต้นโดยเติมสารแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (ammonium persulfate) หรือไรโบฟลาวิน (riboflabin) และใส่ N,N,N',N'-tetramethylethlenediamine (TEMED) หรือ 3'-dimethylamino-propionitrile (DMAPN) เพื่อเร่งปฏิกิริยาการจับตัวเป็นโพลีเมอร์ ปฏิกิริยาการจับตัวเป็นโพลีเมอร์จะเกิดได้ช้าหรือไม่เกิดเลยถ้าค่า pH ต่ำและปฏิกิริยายังถูกยับยั้งด้วยออกซิเจน ดังนั้นบางครั้งจึงต้องกำจัดออกซิเจนก่อนโดยใช้ปั๊มดูดอากาศออก ก่อนที่จะเติม TEMED และแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟตหรือไรโบฟลาวิน เนื่องจากอะคริลาไมด์และบิสอะคริลาไมด์โมเลกุลเดี่ยว เป็นสารที่เป็นพิษและสามารถดูดซึมผ่านทางผิวหนังได้ จึงควรสวมถุงมือขณะปฏิบัติงาน

2.7.4 การแปลผล

การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอหรือชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นภายหลังจากวิธีอิเล็กโตโฟริซิส เพื่อให้เห็นแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นในแผ่นเจลและเพื่อการแปลผลสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่

1. การย้อมด้วยสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์ (ethidium bromide) โมเลกุลของเอธิเดียมโบรไมด์จะเข้าไปแทรกอยู่ในเกลียวคู่ของดีเอ็นเอ และเมื่อนำไปส่องแสงอัลตร้าไวโอเลตจะเกิดการเรืองแสง โดยความเข้มของแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณดีเอ็นเอและสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่า

2. การย้อมด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท (silver staining) เป็นสารเคมีที่มีความไวสูงในการตรวจสอบดีเอ็นเอสามารถอ่านผลได้ด้วยตาเปล่าภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต

3. การติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorescent dye) แล้วทำการตรวจสอบโดยใช้เครื่องมืออ่าน (fluorescent detector)

สำหรับการการแยกผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเทคนิคพีซีอาร์นั้น จะได้ผลผลิตพีซีอาร์เป็นแถบดีเอ็นเอจำนวน 2 แถบต่อหนึ่งโลกัส เรียกแถบดีเอ็นเอแต่ละแถบว่า อัลลีล (allele) ดังนั้นในแต่ละโลกัสจะแสดงจีโนไทป์ (genotype) ที่ประกอบด้วยอัลลีล 2 อัลลีล

2.8 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการวิเคราะห์ผลหรือการวิเคราะห์ข้อมูลทางพันธุศาสตร์เพื่อประมาณค่าความแปรผันทางพันธุกรรม สามารถวัดได้จาก

2.8.1 จำนวนอัลลีล (number of allele)

จีโนไทป์ของไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอจะถูกเก็บข้อมูลด้วยตาเปล่าเพื่อพารามิเตอร์ทุกตัวต่อไป แถบดีเอ็นเอที่ขึ้น 2 แถบอย่างชัดเจนเป็นจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซโกต (heterozygote) เช่นเดียวกับที่จีโนไทป์แบบโฮโมไซโกต (homozygote) ก็จะแสดงแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวเท่านั้น (Sukamol *et al.*, 1996) ซึ่งแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏขึ้นของแต่ละอัลลีลจะถูกระบุขนาดและทำการเปรียบเทียบทั้งภายในสายพันธุ์และระหว่างสายพันธุ์เพื่อนับจำนวนอัลลีลที่เกิดขึ้น ณ ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอตำแหน่งนั้นๆ

2.8.2 ค่าความถี่อัลลีล (allele frequency)

ความถี่อัลลีลในประชากรสิ่งมีชีวิตที่เป็นดิพพลอยด์ สามารถคำนวณได้จากสูตร (Hedrick , 1985)

$$\text{ความถี่อัลลีล (allelic frequency ; AF)} = \frac{2n^{homozygote} + n^{heterozygote}}{2n^{total}}$$

โดยที่ $n^{homozygote}$ คือ จำนวนไก่พื้นเมืองที่มีจีโนไทป์แบบ homozygote

$n^{heterozygote}$ คือ จำนวนไก่พื้นเมืองที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygote

n^{total} คือ จำนวนไก่พื้นเมืองทั้งหมด

2.8.3 ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้ (heterozygosity)

เฮทเทอโรไซโกซิตี้จากการสังเกต (Observed heterozygosity; H_o) เป็นค่าที่ใช้วัดความหลากหลายของการกระจายตัวของอัลลีลใน marker แต่ละตำแหน่ง มีค่าตั้งแต่ 0-1 ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้จากการสังเกต มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามจำนวนอัลลีลที่พบเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตามค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้จากการสังเกตขึ้นอยู่กับค่าความถี่ของอัลลีลที่แตกต่างกัน ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้จากการสังเกตมีค่าสูงสุดเมื่อทุกอัลลีล ณ ตำแหน่งนั้นมีความถี่เท่ากัน คำนวณได้จากสูตรดังนี้ (Nei et al., 1978)

$$H_o = 1 - \sum_{i=1}^{k} x_i^2$$

โดยที่ H_o = ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้จากการสังเกต

X_i = ความถี่อัลลีลที่ i

k = จำนวนของอัลลีล

และค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้จากทฤษฎี (Expected heterozygosity; H_e) ซึ่งเป็นค่าที่วัดการกระจายตัวของอัลลีลในกลุ่มประชากรจาก marker ทุกตำแหน่ง คำนวณได้จากสูตรดังนี้ (Nei et al., 1978)

$$H_e = [2n/2n-1]\left[1 - \sum_{i=1}^{k} X_i^2\right]$$

โดยที่ H_e = ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้จากทฤษฎี

X = ความถี่อัลลีล

n = จำนวนตัวสัตว์ต่อสายพันธุ์

k = จำนวนของอัลลีล

และทำการคำนวณค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้เฉลี่ยที่ได้จากทฤษฎี $(\overline{H_e})$ สำหรับแต่ละประชากร เพื่อศึกษาความแปรผันทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองแต่ละสายพันธุ์ ตามสูตร

$$\overline{H_e} = \frac{\sum H_e}{number\ of\ locus}$$

นอกจากนี้การศึกษารูปแบบความหลากหลายของ microsatellite markers ชนิด tetranucletide ในไก่พื้นเมืองไทยยังช่วยในการประมาณความแปรผันทางพันธุกรรม (genetic variation) ภายในประชากรของสัตว์ต่างสายพันธุ์ได้โดยพิจารณาจาก จำนวนอัลลีลในแต่ละตำแหน่ง ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้จากการสังเกตและค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้จากทฤษฎี (Wolfus *et al.*, 1997)

2.9 การตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายทางพันธุกรรม

ในการตรวจสอบประสิทธิภาพของ microsatellite markers พิจารณาได้จากการประเมินการใช้ประโยชน์ของเครื่องหมายพันธุกรรม โดยทั่วไปสามารถวัดได้จาก จำนวนอัลลีล ค่าความถี่อัลลีล ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้ (heterozygosity) และ Polymorphism Information Content (PIC) โดยค่า PIC เป็นการวัดการใช้ประโยชน์ของเครื่องหมายพันธุกรรมอีกวิธีหนึ่งที่วัดความหลากหลายของชิ้นส่วนอัลลีลของ marker นั้นๆ มีค่าตั้งแต่ 0-1 คำนวณได้จากสูตร ดังนี้ (Botstein et al.,1980)

$$PIC = 1 - \left[\sum_{i=1}^{k} X_i^2\right] - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^{k} 2X_i^2 X_j^2$$

โดยที่ X_i = ความถี่อัลลีลของอัลลีลที่ i

X_j = ความถี่อัลลีลของอัลลีลที่ j

k = จำนวนของอัลลีล

ถ้า marker มีค่า PIC ต่ำกว่า 0.25 แสดงว่า marker ณ ตำแหน่งนั้นมีรูปแบบความหลากหลาย (polymorphism) ต่ำ มากกว่า 0.25 แต่น้อยกว่า 0.50 แสดงว่า marker ณ ตำแหน่งนั้นมีรูปแบบความหลากหลายปานกลาง และค่า PIC มากกว่า 0.50 แสดงว่า marker ณ ตำแหน่งนั้นมีรูปแบบความหลากหลายสูง (Chen *et al.*, 2004) อย่างไรก็ตามถ้าจำนวนจำนวนอัลลีลที่เกิดขึ้นของ marker นั้นมีจำนวนน้อยจะทำให้ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้สูงกว่าค่า PICและเช่นเดียวกันถ้าจำนวนอัลลีลของ marker นั้นมีจำนวนมากจะทำให้ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้ มีค่าใกล้เคียงกับค่า PIC และ marker ที่สามารถนำไปใช้ได้ดี มีความแม่นยำในการวิเคราะห์สูง มีค่า PIC ต่ำกว่าค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้เสมอ

2.10 การประยุกต์ใช้ Microsatellite Markers ในสัตว์ปีก

ไก่พื้นเมืองเป็นสัตว์อีกชนิดหนึ่งที่มีการนำ microsatellite markers มาใช้ประโยชน์เพื่อศึกษาลักษณะทางพันธุกรรม โดยที่ microsatellite markers ที่นำมาใช้ในการศึกษาที่ผ่านมาจะเป็นชนิด dinucleotide เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้มีการนำ microsatellite markers ชนิด tetranucleotide มาใช้ศึกษา ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ต่างๆ ในประชากรไก่ (McConnell *et al.*, 1999) ซึ่ง microsatellite markers ชนิด tetranucleotide จะมีอัตราการกลายเกิดขึ้นน้อยกว่า microsatellite markers ชนิด dinucleotide ทำให้เกิดการแปรผันของลำดับเบสน้อยกว่า สามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีคุณภาพ และมีความแม่นยำมากกว่า (Walsh *et al.*, 1996) ซึ่งที่ผ่านมามีผู้ทำการวิจัยถึงรูปแบบความหลากหลาย (polymorphism) และความหลากหลายทางพันธุกรรมในไก่พื้นเมืองทั้งต่างประเทศและภายในประเทศไทย โดยมีผู้วิจัยไว้ดังนี้

Cheng และคณะ (1995) ได้จัดทำแผนผังยีนของประชากรไก่ขึ้นจาก microsatellite ที่ใช้เป็นเครื่องหมายเพื่อหาตำแหน่งของยีนที่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกของลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจ พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของ microsatellite เป็น 3 กลุ่มได้แก่ 1) microsatellite ที่เกี่ยวข้องกับยีนของโรคมาเร็กซ์ (Marek's Disease) 2) microsatellite ที่เกี่ยวข้องกับยีนของการสะสมไขมันในช่องท้อง (Abdominal Fat) 3) microsatellite ที่เกี่ยวข้องกับยีนลักษณะการให้ผลผลิต (Production traits) จากโคลนที่มี microsatellite จำนวน 404 clones เหลือเพียง 219 clones เท่านั้นที่ถือว่าเหมาะสมต่อการเป็น microsatellite markers

ปิยมาศ การสมดี (2542) ได้ทำการวิเคราะห์ความแปรผันทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทย (*Gallus gallus domesticus*) ได้แก่ ไก่ประดู่หางดำ ไก่เหลืองหางขาว ไก่เบตง และไก่แจ้

โดยศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างไก่พื้นเมืองไทยด้วยกันเองและระหว่างกับไก่ป่าตุ้มหูขาว (*Gallus gallus gallus*) โดยใช้ microsatellite marker ชนิด dinucleotide จำนวน 4 ตำแหน่ง พบจำนวนอัลลีลสำหรับทุกตำแหน่งอยู่ในช่วง 6-13 อัลลีล และพบว่าภายในไก่พื้นเมืองไทยมีความแตกต่างทางพันธุกรรมภายใน subspecies มาก แต่มีความแตกต่างระหว่าง subspecies น้อย

Marle-Koster และ Nei (2000) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองแอฟริกาใต้ 5 สายพันธุ์ คือ Koekoek, New Hamshire, Naked Neck, Lebowa-Venda และ Ovamda และประชากรของไก่จากเมือง Mozambique และ Botswana โดยใช้ microsatellite marker ชนิด dinucleotide จำนวน 27 ตำแหน่ง พบว่า microsatellite marker จำนวน 23 ตำแหน่ง แสดงรูปแบบความหลากหลาย พบจำนวนอัลลีลสำหรับทุกตำแหน่งอยู่ในช่วง 2-11 อัลลีล พบว่าไก่พื้นเมืองที่มาจากเมือง Mozambique และ Botswanaมีความแปรผันทางพันธุกรรมสูงสุด และต่ำที่สุดในสายพันธุ์ Koekoek ซึ่งอาจเพราะเป็นกลุ่มประชากรปิดและเนื่องจากค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลของ microsatellite ทุกตำแหน่งน้อยที่สุด คือ 2.3 จึงทำให้ได้ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้ที่บ่งบอกความแปรผันทางพันธุกรรมมีค่าต่ำลงด้วย

Wimmers และคณะ (2000) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองในประเทศต่างๆจากทวีปแอฟริกา เอเชีย และอเมริกาใต้ ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาได้มาจากประเทศโบลิเวีย อินเดีย แคเมอรูน ไนจีเรีย แทนซาเนีย และเยอรมัน โดยใช้ microsatellite marker ชนิด dinucleotide จำนวน 22 ตำแหน่ง พบจำนวนอัลลีลสำหรับทุกตำแหน่งอยู่ในช่วง 2-11 อัลลีล และพบว่าทุกประชากรที่มาจากประเทศต่างๆ มีระดับเฮทเทอโรไซโกซิตี้สูงอยู่ระหว่าง 0.45-0.71 สำหรับระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรประเทศอินเดียและแอฟริกามีมากอาจเนื่องมาจากมีถิ่นกำเนิดที่ห่างไกลกัน และระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรจากประเทศในทวีปแอฟริกาเหมือนกันคือไนจีเรียและแทนซาเนียมีน้อยที่สุด น่าจะมีผลมาจากมีการผสมข้ามระหว่างไก่พื้นเมืองกับไก่ทางการค้าเช่นเดียวกัน

สจี กัณหาเรียง (2543) ศึกษาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการฟักไข่ ในไก่ลูกผสมรุ่นแบคครอส (Backcross) ของไก่พื้นเมืองกับไก่ไข่ด้วย microsatellite marker ชนิด dinucleotide จำนวน 28 ตำแหน่ง พบว่ามี microsatellite marker จำนวน 24 ตำแหน่งที่สามารถตรวจพบรูปแบบความหลากหลาย จำนวนอัลลีลสำหรับทุกตำแหน่งอยู่ในช่วง 2-5 อัลลีล พบว่า microsatellite marker จำนวน 20 ตำแหน่งที่แสดงการถ่ายทอดจากพ่อแม่มาสู่รุ่นลูกเป็นไปตามกฎของเมนเดล และนำมาใช้ในการตรวจสอบลักษณะจีโนไทป์ของตัวอย่างไก่ 2 กลุ่ม

คือ กลุ่มที่ไม่แสดงการฟักไข่และกลุ่มที่แสดงการฟักไข่ พบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอในสภาพหลากรูปแบบที่แตกต่างกันระหว่างไก่ทั้ง 2 กลุ่ม

เยาวลักษณ์ เลไพจิตร (2544) ศึกษาความเหมือนทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมือง ไก่ไข่ ไก่เนื้อ และไก่เบตง โดยใช้ microsatellite marker ชนิด dinucleotide จำนวน 20 ตำแหน่ง พบจำนวนอัลลีลสำหรับทุกตำแหน่งอยู่ในช่วง 2-9 อัลลีล เมื่อนำจำนวนแถบดีเอ็นเอที่ได้ในไก่พื้นเมืองแต่ละสายพันธุ์มาประมาณค่าเปอร์เซ็นความเหมือนทางพันธุกรรมภายในสายพันธุ์ พบว่าประชากรไก่เบตงมีความเหมือนทางพันธุกรรมต่อกันมากที่สุด อาจเนื่องมาจากประชากรไก่เบตงที่ใช้ศึกษามีอัตราการผสมเลือดชิดสูง ทั้งนี้เนื่องมาจากประชากรไก่เบตงที่เลี้ยงในศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตว์ปีก แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์มีขนาดเล็ก มีพ่อแม่พันธุ์เพียงไม่กี่ตัวเพื่อเพิ่มจำนวนประชากรในฝูง

Romanov และ Weigend (2001) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างประชากรต่างๆของไก่พื้นบ้าน และไก่ป่าขนสีแดง ในประเทศยูเครนและประเทศเยอรมันทั้งหมด 20 กลุ่มประชากร โดยใช้ microsatellite marker ชนิด dinucleotide จำนวน 14 ตำแหน่ง พบจำนวนอัลลีลสำหรับทุกตำแหน่งอยู่ในช่วง 2-21 อัลลีล พบว่าสามารถใช้ microsatellite marker มาจัดแบ่งกลุ่มประชากรไก่ได้ ซึ่งจากผลของ phylogenic tree สามารถแบ่งกลุ่มประชากรไก่ทั้งหมดได้เป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ สายพันธุ์ไก่ป่าขนสีแดง , สายพันธุ์ไก่ไข่ทางการค้า หรือมีบรรพบุรุษเป็นสายพันธุ์ทางการค้า และสายพันธุ์ไก่พื้นเมืองของประเทศเยอรมัน

Zhang และคณะ (2002) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองจีน 9 สายพันธุ์ ได้แก่ Huiyang Bearded, Xinghua, Qingyuan Partridge, Taihe Silkies, Black Silkies. Beijing Fatty, Gushiu, Wenchung และ Yangshan ไก่เนื้อ 2 สายพันธุ์ได้แก่ White Recessive Rock และ Avain Parental และไก่สายพันธุ์ Hy-Line โดยใช้ microsatellite marker ชนิด dinucleotide จำนวน 9 ตำแหน่ง พบจำนวนอัลลีลสำหรับทุกตำแหน่งอยู่ในช่วง 4-19 อัลลีล พบว่าค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้จากทฤษฎีในแต่ละสายพันธุ์มีค่าต่ำสุดใน White Recessive Rock คือ 0.6289 และมีค่าสูงสุดใน Wenchung คือ 0.8614 แสดงว่าข้อมูลรูปแบบความหลากหลายของ microsatellite แสดงให้เห็นว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงในไก่พื้นเมืองของจีนและต่ำในไก่ไข่ สำหรับการประมาณค่าระยะห่างทางพันธุกรรม โดยผลจาก phylogenic tree พบว่าไก่พื้นเมืองจีนและไก่เนื้อมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน เนื่องจากไก่พื้นเมืองจีนและไก่เนื้อมีเป้าหมายในการคัดเลือกเหมือนกันคือ การให้เนื้อ แต่ไก่พื้นเมืองไม่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับไก่ไข่

Pandey และคณะ (2002) ศึกษาการวิเคราะห์ microsatellite marker ของไก่พื้นเมืองอินเดีย 3 สายพันธุ์ คือ Aseel, Miri และ Nicobari โดยใช้ microsatellite marker ชนิด dinucleotide จำนวน 15 ตำแหน่ง พบจำนวนอัลลีลสำหรับทุกตำแหน่งอยู่ในช่วง 3-9 อัลลีล พบว่าค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้จากทฤษฎีในทุกสายพันธุ์มีค่าอยู่ระหว่าง 0.57-0.61 แสดงให้เห็นว่าในประชากรไก่ทั้ง 3 สายพันธุ์ มีค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้จากทฤษฎีสูง ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่าไก่ทั้ง 3 สายพันธุ์มีระดับเลือดชิดต่ำ มีขนาดของประชากรที่ใหญ่เพียงพอ ไม่มีแรงกดดันจากการคัดเลือกสำหรับลักษณะทางเศรษฐกิจ และมีจำนวนอัลลีลที่แสดงในทุกประชากรมาก นอกจากนี้ผลจากการศึกษาความใกล้ชิดหรือความเหมือนทางพันธุกรรมด้วยวิธี phylogenic tree พร้อมทั้งการสนับสนุนจากข้อมูงทางประวัติศาสตร์และภูมิศาสตร์ สรุปได้ว่าไก่พื้นเมืองอินเดียสายพันธุ์ Aseel และ Nicobari มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกันมากกว่า เนื่องจากไก่ทั้งสองสายพันธุ์มีถิ่นกำเนิดใกล้กัน

ชัชวาล สิงหะพล (2546) ศึกษาจำแนกลักษณะทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่ประดู่หางดำ และไก่เหลืองหางขาว เปรียบเทียบกับไก่เนื้อลูกผสมพื้นเมืองและไก่ไข่ โดยใช้ microsatellite marker จำนวน 16 ตำแหน่ง ชนิด dinucleotide จำนวน 13 ตำแหน่ง และชนิด trinucleotide จำนวน 3 ตำแหน่ง พบจำนวนอัลลีลสำหรับทุกตำแหน่งอยู่ในช่วง 5-25 อัลลีล พบว่าไก่พื้นเมืองไทยมีความแตกต่างทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับไก่เนื้อลูกผสมพื้นเมืองมากกว่าไก่ไข่ทางการค้า

เฉลิมชัย หอมตา (2546) ทำการจำแนกสายพันธุ์ไก่พื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 5 จังหวัดได้แก่ นครราชสีมา ขอนแก่น ยโสธร สกลนคร และเลย ด้วย microsatellite marker ชนิด dinucleotide จำนวน 6 ตำแหน่ง พบจำนวนอัลลีลสำหรับทุกตำแหน่งอยู่ในช่วง 5-9 อัลลีล พบว่าไก่พื้นเมืองใน 5 จังหวัดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรสูง และความเหมือนทางพันธุกรรมภายในกลุ่มไก่พื้นเมืองทั้ง 5 จังหวัดมีระดับ

ทัศนีย์ ตรัยรัตน์อภิวัน (2547) ได้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทย 7 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่ประดู่หางดำ ไก่เหลืองหางขาว ไก่ชี ไก่แจ้ ไก่เบตง ไก่คอเปลือย และไก่ขนหยอง รวมทั้งไก่เนื้อลูกผสมพันธุ์อาร์เบอร์เอเคอร์ ไก่ไข่ ไก่ลูกผสมพันธุ์อีซ่าบราวน์ และไก่ป่าสีแดงตุ้มหูขาว โดยใช้ microsatellite marker จำนวน 20 ตำแหน่ง พบว่าทุกตำแหน่งแสดงรูปแบบความหลากหลาย จำนวนอัลลีลสำหรับทุกตำแหน่งอยู่ในช่วง 3-15 อัลลีล ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้จากการสังเกตเฉลี่ยของไก่พื้นเมืองอยู่ระหว่าง 0.400-0.510 ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้จากทฤษฎีเฉลี่ย

ของไก่พื้นเมืองอยู่ระหว่าง 0.531-0.638 และค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทยอยู่ระหว่าง 0.1120-0.3593 li6xwfhว่าไก่พื้นเมืองมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง

ปาริชาติ ศรีจำเริญ (2547) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่ประดู่หางดำ ไก่เหลืองหางขาว ไก่ชี และไก่นกแดงหางแดง ด้วย microsatellite marker ชนิด dinucleotide จำนวน 15 ตำแหน่ง พบจำนวนอัลลีลสำหรับทุกตำแหน่งอยู่ในช่วง 2-9 อัลลีล ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้จากการสังเกตเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.399-0.613 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์อยู่ในช่วง 0.1636 -0.3202 สรุปได้ว่าไก่พื้นเมืองไทยทั้ง 4 สายพันธุ์ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมปานกลาง และมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกัน อาจเนื่องมาจากมีวิวัฒนาการมาจากต้นกำเนิดเดียวกัน