บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่เหลืองหางขาว ไก่ประดู่หางดำ ไก่แดง และไก่ชี สายพันธุ์ละ 56 ตัว (เพศละ 28 ตัว) โดยไก่เหลืองหางขาว และไก่แดงได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ กบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี ไก่ชีได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ท่าพระ จังหวัดขอนแก่น ไก่ประดู่หางดำได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการการพัฒนาฝูงพ่อแม่พันธุ์ไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์ ประดู่หางดำและชีด้วยดัชนีการคัดเลือก โดยไก่พื้นเมืองเป็นไก่ได้จากการสุ่มจากพื้นที่ต่างๆ ทั่วประเทศไทยและเลี้ยงดูแลโดยศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และไก่ป่า 2 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่ป่าตุ้มหูขาวและตุ้มหูแดง สายพันธุ์ละ 53 (เพศเมีย 27 ตัว เพศผู้ 26 ตัว) และ 49 ตัว (เพศเมีย 25 ตัว เพศผู้ 24 ตัว) ตามลำดับ ซึ่งไก่ป่าตุ้มหูแดงได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาค้อ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช และไก่ป่าตุ้มหูขาวได้รับความอนุเคราะห์จากสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าจุฬาภรณ์ กรมอุทยานแห่งชาติสัตว์ป่าและพันธุ์พืช โดยเป็นไก่ป่าที่จับได้จากธรรมชาติ ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในป่าตามชายแดนของประเทศไทย ดังนั้นสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้จำนวนทั้งหมด 6 สายพันธุ์

3.2 การเก็บข้อมูลและตัวอย่างเลือดไก่

เก็บข้อมูลพันธุ์ประวัติ ได้แก่ เบอร์สัตว์ เพศ พันธุ์ ทั้งไก่ป่าและไก่พื้นเมืองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นไก่ที่ผ่านการตรวจสอบพันธุ์ประวัติแล้วว่า ไม่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดกัน แล้วเจาะเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณใต้ปีก โดยใช้เข็มฉีดยา เบอร์ 24 ยาว 1 นิ้ว ปริมาตร 500-1,000 ไมโครลิตร ใส่ microtube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 0.5M EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำเลือดที่ได้แช่น้ำแข็งทันที

3.3 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือดไก่

สัตว์ปีกมีดีเอ็นเอทั้งในเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว จึงสามารถนำมาสกัดเอาดีเอ็นเอจากเลือดทั้งหมดโดยไม่ต้องปั่นแยกชนิดเม็ดเลือด การสกัดดีเอ็นเอดัดแปลงจาก Goodwin et al., (2007) มีขั้นตอนโดยสรุปดังนี้ คือ ดูดตัวอย่างเลือด 30 ไมโครลิตร ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่น 10,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ดูดส่วนบนที่เป็นสีแดงใสทิ้ง) เติม Solution I (5M GuHCl, 20 mM Tris-HCl, 0.5M EDTA, 99%Silicon dioxide) ปริมาตร 470 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่น 10,000 rpm นาน 1 นาที

เทส่วนใสทิ้งแล้วเติม Solution II (70% ethanol+1M NaCl) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วปั่น 10,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (หากสารละลายยังไม่ใส อาจต้องล้างด้วย Solution II อีกแต่ล้างไม่เกิน 3 รอบ) จากนั้นเติม Solution III (95% ethanol) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่น 10,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง ตั้งหลอดและตะกอนสีขาวในหลอดทิ้งไว้ให้แห้ง ประมาณ 30 นาที เติมสารละลาย DNA hydration (Tris + EDTA) ประมาณ 30-50 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 55 ^{o}C นาน 2 ชั่วโมง ปั่น 10,000 rpm นาน 5 นาที ดูดส่วนใสลงในหลอดใหม่ แล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C

3.4 ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณดีเอ็นเอ

3.4.1 Agarose gel electrophoresis

ดีเอ็นเอที่สกัดได้ถูกนำมาตรวจคุณภาพด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis โดยใช้ดีเอ็นเอ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร กับ 1X loading dye ปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยอดลงในหลุมบนแผ่นเจล ซึ่งเป็นตัวกลางสำหรับแยกขนาดดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ 0.5X TAE ผ่านสนามไฟฟ้า โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำแผ่นเจลที่ได้ไปย้อมดีเอ็นเอด้วย gel star (Gelstar INC. NY) เพื่อดูการเคลื่อนที่ของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ทำการบันทึกภาพการปรากฏของแถบดีเอ็นเอ เพื่อนำไปปรับความเข้มข้นให้เหมาะสมกับการนำไปเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอต่อไป

3.4.2 Spectrophotometer

ตรวจสอบปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (UV-Visible spectrophotometer, Camspec M350 Double Beam) โดยเตรียมดีเอ็นเอให้มีความเข้มข้น 1:100 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร (ดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร กับ น้ำกลั่น 198 ไมโครลิตร) เพื่อวัดความเข้มข้นแล้วอ่านค่า optical density (OD) หรือค่า absorbance (A) ที่มีความยาวคลื่น 260 และ 280 นาโนเมตร เพื่อคำนวณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ วัดความบริสุทธิ์ของ DNA จากค่า OD ratio โดย

$$\text{OD ratio} = A_{260} / A_{280}$$

เมื่อ A_{260} = ค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอ, A_{280} = ค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีน

ค่าความบริสุทธิ์ของ DNA พิจารณาจาก

OD ratio น้อยกว่า 1.65 แสดงว่า ดีเอ็นเอมีโปรตีนปนเปื้อน

OD ratio มีค่าระหว่าง 1.65-1.85 แสดงว่า ดีเอ็นเอมีความบริสุทธิ์ เหมาะที่จะนำไปใช้งานต่อไป

OD ratio มากกว่า 1.85 แสดงว่า ดีเอ็นเอมีอาร์เอ็นเอปนเปื้อน (สิรินดา, 2541)

3.5 การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนไมโครแซทเทิลไลท์ดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ PCR

เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยไพรเมอร์ 20 โลไซ ที่ FAO (2004) แนะนำเพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของไก่ (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่ป่าและไก่พื้นเมืองไทย

ไพรเมอร์	ลำดับเบสจาก 5' → 3'	อุณหภูมิ (°ซ)	เบสซ้ำ	โครโมโซม
MCW0081	F : GTTGCTGAGAGCCTGGTGCAG	60	-	5
	R : CCTGTATGTGGAATTACTTCTC			
MCW0034	F : TGCACGCACTTACATACTTAGAGA	60	$(TG)_{24}$	2
	R : TGTCCTTCCAATTACATTCATGGG			
MCW0069	F : GCACTCGAGAAAACTTCCTGCG	60	$(TG)_{11}$	26
	R :ATTGCTTCAGCAAGCATGGGAGGA			
MCW0222	F : GCAGTTACATTGAAATGATTCC	60	$(TG)_{10}$	3
	R : TTCTCAAAACACCTAGAAGAC			
MCW0295	F : ATCACTACAGAACACCCTCTC	60	$(TG)_{10}$	4
	R : TATGTATGCACGCAGATATCC			
ADL0268	F : CTCCACCCCTCTCAGAACTA	60	-	1
	R : CAACTTCCCATCTACCTACT			
MCW0037	F : ACCGGTGCCATCAATTACCTATTA	60	$(TG)_{8}$	3
	R:GAAAGCTCACATGACACTGCGAAA			
MCW0183	F : ATCCCAGTGTCGAGTATCCGA	60	$(TG)_{10}$	7
	R : TGAGATTTACTGGAGCCTGCC			
MCW0111	F: GCTCCATGTGAAGTGGTTTA	60	-	1
	R: ATGTCCACTTGTCAATGATG			
MCW0104	F : TAGCACAACTCAAGCTGTGAG	60	$(TG)_{16}$	13
	R: AGACTTGCACAGCTGTGACC			
LEI0166	F : AAGCAAGTGCTGGCTGTGCTC	60	-	3
	R : TCCTGCCCTTAGCTACGCAC			

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่ป่าและไก่พื้นเมืองไทย (ต่อ)

ไพรเมอร์	ลำดับเบสจาก 5' → 3'	อุณหภูมิ (°ซ)	เบสซ้ำ	โครโมโซม
ADL117	F : TCTTGTTTTCCTTTTGTTGT	61	$(TTG)_{10}$	Z
	R : GCATACGGCTCCTTCAGTTG			
ADL127	F : GAACCAGCAATTATATTAAATA	57	$(AT)_{12}(AC)_{18}$	3
	R : TTAACACAAAAGAACCAGGCAG			
ADL147	F : CTGGTGAATGAGAAGCGATG	57	-	13
	R : GCTGCGGCAATAAACTCCCT			
MCW0248	F : GTTGTTCAAAAGAAGATGCATG	60	-	1
	R : TTGCATTAACTGGGCACTTTC			
ADL244	F : AGGGTCTGAAGAGAGTGTT	55	$(GT)_9$	6
	R : GCAAGATGCAAAGAGATTTC			
MCW0014	F : AAAATATTGGCTCTAGGAACTGTC	64	$(TG)_{18}$	6
	R : ACCGGAAATGAAGGTAAGACTAGC			
MCW0123	F : GGAACCACTAGAAAAGAACATCC	60	$(AC)_{10}$	14
	R : AATGTATTTCCACCCCCAAAG			
ADL123	F : GCTGTGTCAAGATTAGAATCAC	60	$(TG)_{13}$	11
	R : AACAATGAAAAACACTACCTGA			
ADL0372	F : CGCCCCCGTTTACTGATTTG	60	-	12
	R : GGCGCCGTTCAAGGAAGCAC			

การเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR ปริมาตรการทำปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตร ในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่สกัดได้จากเลือดไก่ที่มีความเข้มข้น 50 ng/µl 1 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer 1 ไมโครลิตร, 25 mM $MgCl_2$ 0.8 ไมโครลิตร, 1 mM dNTPs 1 ไมโครลิตร (Promega, USA), 5 µM/ µl Forward และ Reverse primer (QIAGEN, Germany) อย่างละ 1 ไมโครลิตร, 5 U Taq polymerase ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร (Biotools B&M labs, S.A.) ปรับปริมาตรด้วย sterile water ปริมาตร 4.1 ไมโครลิตร วงรอบการทำ PCR มีดังนี้

เริ่ม initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 30 รอบ ดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, primer annealing โดยอุณหภูมิขึ้นกับชนิดไพรเมอร์ (ตามตารางที่ 3.1) นาน 45 วินาที, primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที และสิ้นสุดด้วย final

extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้ว denaturing ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที ด้วย denature loading dye 3 ไมโครลิตร

3.6 ตรวจสอบไมโครแซทเทิลไลท์ดีเอ็นเอ

ไมโครแซทเทิลไลท์ดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR นำมาตรวจด้วย 6% acrylamide gel electrophoresis (6% PAGE) ในสนามไฟฟ้าความต่างศักย์ 90 โวลต์ นาน 60 นาที ต่อจากนั้นย้อมด้วย gel star (Gelstar INC. NY) แล้วทำการบันทึกภาพการปรากฏของแถบดีเอ็นเอด้วย Gel Documentation System (Lab Focus, INC.) และบันทึกขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ แล้วแปลงข้อมูลขนาดของแถบดีเอ็นเอให้อยู่ในรูป 0 หรือ 1 (binary data)

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูล

1. วิเคราะห์สภาพความหลากหลายทางพันธุกรรม

การวิเคราะห์สภาพความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่ป่าและไก่พื้นเมืองไทย ด้วยพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้

1.1 หาความถี่ของ allele ต่างๆ ที่พบ

$$X_{ij} = \frac{2D + H}{2N}$$

เมื่อ X_{ij} = ความถี่อัลลีลที่ i ที่โลกัส j, D = จำนวนอัลลีลที่มีจีโนไทป์แบบโฮโมไซโกต, H = จำนวนอัลลีลที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซโกต และ N = จำนวนอัลลีลทั้งหมด

1.2 วิเคราะห์จำนวนอัลลีลเฉลี่ยของประชากร

$$MNA = \frac{TNA}{N}$$

เมื่อ MNA = จำนวนอัลลีลเฉลี่ยจากทุกโลกัสในทุกประชากร, TNA = จำนวนอัลลีลจากทุกโลกัสในทุกประชากร และ N = จำนวนโลกัส

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

1.3 วิเคราะห์ข้อมูลการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เพื่อคำนวณหาค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ (heterozygosity)

- คำนวณค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้ ที่ได้จากการสังเกต (Observed Heterozygosity : Ho) ในแต่ละโลกัสของแต่ละประชากร

$$Ho = \frac{N_H}{N}$$

เมื่อ Ho = ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้ที่ได้จากการสังเกต, N_H = จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัส และ N = จำนวนตัวอย่างที่ให้ข้อมูลทั้งหมด

- คำนวณค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้คาดหมาย (Expected Heterozygosity : H_E) ในแต่ละโลกัสของแต่ละประชากร

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^{n} Pi^2$$

เมื่อ H_E = ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้คาดหมาย, Pi = ค่าความถี่อัลลีลใดๆ ที่โลกัสนั้น และ n = จำนวนของอัลลีล

1.4 การทดสอบ Hardy – Weinberg equilibrium

Hardy – Weinberg equilibrium (HWE) ใช้เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนหรือความถี่ของจีโนไทป์ในประชากรว่าเปลี่ยนแปลงหรือไม่ โดยมีใจความว่า "ในประชากรขนาดใหญ่ที่มีการผสมพันธุ์แบบสุ่ม ไม่มีการกลายยีนและไม่มีการคัดเลือกโดยธรรมชาติ ประชากรดังกล่าวถือได้ว่าอยู่ในสภาวะสมดุลที่สุด และหากประชากรนี้มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเพื่อถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมไปสู่ลูกในรุ่นถัดไป ประชากรของสิ่งมีชีวิตนี้ จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงของความถี่ยีนหรือความถี่ของจีโนไทป์ในประชากรทุกรุ่น" การทดสอบ Hardy – Weinberg equilibrium ทดสอบด้วยค่า Chi-square (χ^2-test) (Falconer and Mackay,1996)

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{n} \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

เมื่อ O_i = จำนวนตัวอย่างสังเกตที่ให้ข้อมูลพันธุกรรมแบบเฮทเทอโรไซกัสที่โลกัส i, E_i = จำนวนตัวอย่างคาดหวังที่ให้ข้อมูลพันธุกรรมแบบเฮทเทอโรไซกัสที่โลกัส i และ n = จำนวนโลไซที่ศึกษา

2. วิเคราะห์จำนวนกลุ่มจากข้อมูลพันธุกรรม

2.1 วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ โดยนำค่าความถี่อัลลีลของแต่ละโลไซมาวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ด้วยวิธี Nei's UB (Nei's, 1978) ตามสูตร

$$I = \frac{(2n-1)\sum_l\sum_u \tilde{p}_{lu_1}\tilde{p}_{lu_2}}{\sqrt{\sum_l(2n\sum_u \tilde{p}^2_{lu_1}-1)\sum_l(2n\sum_u \tilde{p}^2_{lu_2}-1)}}$$

และสร้างแผนภาพความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) ระหว่างไก่แต่ละสายพันธุ์โดยวิธี Neighbor-Joining ด้วยโปรแกรม NTSYSpc V 2.10

2.2 วิเคราะห์จำนวนกลุ่มของสายพันธุ์ไก่ด้วยข้อมูลพันธุกรรมรายตัว มีขั้นตอนดังนี้ คือ

2.2.1 แปลงข้อมูลการปรากฏของแถบดีเอ็นเออยู่ในรูปค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรม โดยวิธีของ Dice ด้วยโปรแกรม NTSYSpc V 2.10 ซึ่งมีสูตรดังนี้

$$S_{xy} = \frac{2a}{2a+b+c}$$

เมื่อ a = จำนวนสัตว์ที่พบแถบดีเอ็นเอตรงกันทั้งในสายพันธุ์ X และ สายพันธุ์ Y

b, c = จำนวนสัตว์ที่พบแถบดีเอ็นเอในกลุ่มสายพันธุ์ X แต่ไม่พบในสายพันธุ์ Y หรือ พบในกลุ่มสายพันธุ์ Y แต่ไม่พบในสายพันธุ์ X

หมายเหตุ : Dice จะไม่คำนึงถึงจำนวนสัตว์ที่ไม่พบแถบดีเอ็นเอทั้งใน X และ Y

2.2.2 นำค่าสัมประสิทธิ์ความเหมือนทางพันธุกรรมที่ได้จากข้อ 2.2.1 มาวิเคราะห์กลุ่ม (Clustering analysis) ของสายพันธุ์ไก่ โดยการพิจารณาจากค่า Cubic Clustering Criterion (CCC), ค่า Coefficient of determination (R^2), ค่า Pseudo F statistic (F), ค่า Pseudo T^2 statistic (T^2) และแผนภาพ (Scatter plot) ที่วิเคราะห์ได้ด้วยวิธี Principal Component Analysis plot (PCA-plot) ตามวิธีของ กิตติ (2546) ด้วยโปรแกรม SAS (1998) ซึ่งค่าต่างๆ มีสูตรการคำนวณดังนี้

- สูตรการคำนวณค่า CCC

$$CCC = \ln\left(\frac{1-E(R^2)}{1-R^2}\right) * \sqrt{\frac{np}{2}} * \left(\frac{1}{[0.001+E(R^2)]^{1.2}}\right)$$

- สูตรการคำนวณค่า R^2

$$R^2 = 1 - trW / trT$$

เมื่อ trW = trace of sum square error, and sum of square and cross-product matrix, trT = trace of total sum square, and sum of square and cross-product matrix

- สูตรการคำนวณค่า F

$$F = [trG/(g-1)]/[trW/(n-g)]$$

เมื่อ trG = trace of group sum square and sum of square and cross-product matrix, trW = trace of sum square error, and sum of square and cross-product matrix, n = จำนวนข้อมูล และ g = จำนวน cluster

- สูตรการคำนวณค่า T^2

$$T^2 = \frac{[SSW_t - SSW_r - SSW_s](n_r + n_s - 2)}{[SSW_r + SSW_s]}$$

เมื่อ $SSW_t = \sum_{m=1}^{n_r+n_s}\sum_{j=1}^{p}(X_{tjm} - \overline{X}_{tj})^2$, $SSW_r = \sum_{m=1}^{n_{rs}}\sum_{j=1}^{p}(X_{rjm} - \overline{X}_{rj})^2$,

$SSW_s = \sum_{m=1}^{n_s}\sum_{j=1}^{p}(X_{sjm} - \overline{X}_{sj})^2$

การวิเคราะห์แผนภาพการกระจายตัวด้วย principal component analysis plot

1. นำข้อมูลการปรากฏของแถบดีเอ็นเอในไก่ทุกสายพันธุ์มาแปลงเป็นตัวแปรใหม่ (PRIN1 และ PRIN2) โดยวิธี Principal Component Analysis plot ด้วยโปรแกรม SAS (1998)
2. สร้าง Scatter plot ระหว่าง 2 ตัวแปร
3. พิจารณาจำนวนกลุ่มที่เกิดขึ้น

หลักการพิจารณาจำนวนกลุ่ม (Cluster) ที่เหมาะสม

1. จำนวนที่ให้ค่า CCC มากกว่า 3 ขึ้นไป (Sarle, 1983)
2. จำนวนที่ให้ค่า R^2 ไม่ต่ำกว่า 75 %
3. จำนวนที่ให้ค่า F สูง
4. พิจารณาจำนวนที่ให้ค่า T^2 สูงสุดแล้วเลือกจำนวนที่ N+1
5. จำนวนกลุ่มมีความสอดคล้องกับจำนวนกลุ่มที่ได้จากแผนภาพ Scatter plot

3. วิเคราะห์การเกิดประชากรกลุ่มย่อย (subpopulation)

พิจารณาจากค่า F_{ST} ซึ่งเป็นค่าที่ใช้ประมาณค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรย่อย (subpopulation) คือ วัดอัตราการผสมเลือดชิดภายในประชากรย่อย เปรียบเทียบกับประชากรทั้งหมด (total population) ซึ่งค่านี้มีค่าอยู่ในช่วง 0-1 (สุรินทร์, 2552) หากมีค่าระหว่าง 0 ถึง 0.1 แสดงว่าเกิดอิทธิพลจากประชากรกลุ่มย่อยเพียงเล็กน้อย หากมีค่าอยู่ในช่วง 0.1 ถึง 0.3 แสดงว่าเกิดอิทธิพลจากประชากรกลุ่มย่อยปานกลาง และหากมากกว่า 0.3 แสดงว่าเกิดอิทธิพลจากประชากรกลุ่มย่อยสูง กล่าวคือ มีการแยกกลุ่มย่อยของประชากรชัดเจน ส่งผลให้เกิด species ใหม่ได้ โดยคำนวณตามวิธีของ Nei (1978)

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

เมื่อ H_S = ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้คาดหมายในประชากรย่อย และ H_T = ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้คาดหมายในทุกประชากร

4. วิเคราะห์หาเครื่องหมายดีเอ็นเอในไก่แต่ละสายพันธุ์

ตรวจสอบหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ 3 ชนิด คือ อัลลีลที่พบเฉพาะในไก่สายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่ง (unique allele) (Tadano et al., 2007b) อัลลีลความถี่สูง (most frequent allele) ในไก่แต่ละสายพันธุ์ และอัลลีลที่มีสัดส่วนโดดเด่น (dominant allele) โดย unique allele เป็นอัลลีลที่พบเฉพาะในไก่สายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งและไม่พบในสายพันธุ์อื่นๆ ส่วน most frequent allele เป็นอัลลีลที่พบในไก่ทุกๆ สายพันธุ์และพบด้วยความถี่ที่สูงที่สุด สำหรับ dominant allele เป็นอัลลีลที่พบในทุกๆ สายพันธุ์ และเป็นอัลลีลที่พบในสัดส่วนที่สูงในสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่ง โดยมีความถี่อัลลีลสูงกว่าความถี่อัลลีลของไก่สายพันธุ์อื่นมากกว่า 50% ซึ่งอัลลีลทั้งสามชนิดนี้จะพิจารณาจากค่าความถี่อัลลีลในแต่ละโลคัสของไก่แต่ละสายพันธุ์

3.8 สถานที่ทำการวิจัย

1. สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าเขาค้อ เพชรบูรณ์, สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าจุฬาภรณ์ ศรีสะเกษ สำนักอนุรักษ์สัตว์ป่า กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช

2. ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ท่าพระ, ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์กบินทร์บุรี กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

3. โครงการการพัฒนาฝูงพ่อแม่พันธุ์ไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์ประดู่หางดำและชีด้วยดัชนีการคัดเลือก

4. ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

5. ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น