



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร

โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะเชิงการต่อสู้ในไก่พื้นเมือง
ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี

Detection DNA Bands Related to Fighting Trait in Thai-Native Chicken
by AFLP Technique

นามผู้วิจัย นายศิริวัฒน์ ไทยสนธิ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รongศาสตราจารย์รวิทย์ สิริพลวัฒน์, D.Agr.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รongศาสตราจารย์รวิทย์ วัชชวัลคุ, D.M.S.)

ประธานสาขาวิชา

(รongศาสตราจารย์พงศ์เทพ อัครธนกุล, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รongศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะเชิงการต่อสู้ในไก่พื้นเมืองด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี

Detection DNA Bands Related to Fighting Trait in Thai-Native Chicken by AFLP Technique

โดย

นายศิริวัฒน์ ไทยสนธิ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2553

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศิริวัฒน์ ไทยสนธิ 2553: การตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะเชิงการต่อสู้
ในไก่พื้นเมืองด้วยเทคนิคเอฟแอลพี ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยี
ชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์วรวิทย์ สิริพลวัฒน์, D.Agr.
54 หน้า

งานวิจัยนี้ศึกษาเพื่อหาแถบดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะเชิงการต่อสู้ในไก่พื้นเมืองโดย
อาศัยการทำงานร่วมกันของเทคนิคเอฟแอลพีและบีเอสเอ โดยใช้ตัวอย่างไก่ 34 ตัว จากทั้งหมด
5 ครอบครัว ภายในครอบครัวเดียวกันแบ่งดีเอ็นเอเป็น 2 กลุ่ม คือ ไก่เชิงดีและเชิงไม่ดี นำมา
ทดสอบกับไพรเมอร์ทั้งหมด 24 คู่ เป็น *EcoRI/MseI* 16 คู่ และ *EcoRI/TaqI* 8 คู่ ผลจากการศึกษา
พบว่า *EcoRI/MseI* ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 10-19 แถบ โดยคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบ
ดีเอ็นเอเฉลี่ยมากที่สุดคือ E-ACA/M-TCA และคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยน้อยที่สุด
คือ E-AGC/M-TCA โดยให้แถบดีเอ็นเอเฉลี่ย 15.2 และ 13.4 แถบตามลำดับ สำหรับ *EcoRI/TaqI*
ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 5-14 แถบ โดยคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยมากที่สุด
คือ E-ACA/T-CGA และคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยน้อยที่สุดคือ E-AGC/T-CTG
โดยให้แถบดีเอ็นเอเฉลี่ย 11.2 และ 9.1 ตามลำดับ

EcoRI/MseI ให้จำนวน โพลิมอร์ฟิซึม คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 11.31 แถบต่อครอบครัว
EcoRI/TaqI ให้จำนวน โพลิมอร์ฟิซึมคิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 12.25 แถบต่อครอบครัว เมื่อนำ
แถบ โพลิมอร์ฟิซึมมาเปรียบเทียบพบว่า *EcoRI/TaqI* ให้ 2 แถบดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะ
เชิงการต่อสู้คือไพรเมอร์ E-ATA/T-CTG และ E-ACA/T-CGA ที่ให้แถบดีเอ็นเอขนาด 290 และ
400 bp ตามลำดับ อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า *EcoRI/TaqI* combination เหมาะ
ที่จะนำมาใช้ศึกษาในไก่พื้นเมืองมากกว่า *EcoRI/MseI* combination

Siriwat Thaisonthi 2010: Detection DNA Bands Related to Fighting Trait in Thai-Native Chicken by AFLP Technique. Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Voravit Siripholwat, D.Agr. 54 pages.

This study is to detect DNA bands related to fighting trait in Thai-native chicken by coactions of AFLP and BSA technique. In this study, a total 24 primers of 16 *EcoRI/MseI* and 8 *EcoRI/TaqI* combinations were used to screen 34 Thai-native chickens from 5 families which were classified into 2 different groups according to their fighting trait. The results are 10-19 bands and 5-14 bands given by *EcoRI/MseI* and *EcoRI/TaqI*, respectively. E-ACA/M-TCA is the primer that gives the most average DNA bands and E-AGC/M-TCA is the primer that gives the least average DNA bands with 15.2 and 13.4 average DNA bands, respectively for *EcoRI/MseI*. E-ACA/T-CGA is the primer that gives the most average DNA bands and AGC/T-CTG is the primer that gives the least average DNA bands with 11.2 and 9.1 average DNA bands, respectively for *EcoRI/TaqI*.

The average polymorphic bands from *EcoRI/MseI* and *EcoRI/TaqI* combination are 11.31 and 12.25 bands/family, respectively. However, there are 2 bands of all polymorphic bands were identified to relate to fighting trait in Thai-native chicken which from *EcoRI/TaqI* combination. These are E-ATA/T-CTG and E-ACA/T-CGA with 290 and 400bp, respectively. The results from this study indicated that *EcoRI/TaqI* combination is more suitable for study in Thai-native chicken than *EcoRI/MseI* combination.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว.) สำนักงาน คณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความสนับสนุนจากบุคคลหลายฝ่าย ผู้วิจัยใคร่ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. วรวิทย์ สิริพลวัฒน์ ประธานกรรมการที่ปรึกษาเป็นอย่างสูง ที่ให้ความกรุณาและเอาใจใส่อย่างดีในการให้คำปรึกษาแนะนำ และแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ มาโดยตลอด

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. วรวิทย์ วัชชวัลลภ กรรมการวิทยานิพนธ์ร่วม ขอขอบคุณคุณ ศาโรจน์ เกียรติระดมน์ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาไก่พื้นเมืองบ้านบึง จ. ชลบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์และช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเลือดไก่พื้นเมือง

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณคุณแม่ ตลอดจนเพื่อนๆ ทุกคนที่ให้การสนับสนุนในทุกๆ ด้าน และคอยให้กำลังใจจนประสบผลสำเร็จในการศึกษาระดับปริญญาโทตามความตั้งใจ

ศิริวัฒน์ ไทยสนธิ
กุมภาพันธ์ 2553

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	21
อุปกรณ์	21
วิธีการ	22
ผลและวิจารณ์	33
ผล	33
วิจารณ์	39
สรุปและข้อเสนอแนะ	42
สรุป	42
ข้อเสนอแนะ	42
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	43
ภาคผนวก	50
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	54

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แสดงจำนวนไก่พื้นเมืองในเขตปศุสัตว์ที่ 1-9 ตั้งแต่ปี 2542-2548	7
2	แสดงสถิติการส่งออกไก่ชน เป็นรายประเทศตั้งแต่ปี 2541-2545	8
3	ลักษณะชั้นเชิงของไก่พื้นเมือง 34 ตัว จาก 5 ครอบครัวย โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ต่อ 1 ครอบครัวย	23
4	adapters ที่ใช้ในการวิเคราะห์เอเอฟแอลพี	25
5	ปริมาณและชนิดของสารที่ใช้ในการตัดดีเอ็นเอ	26
6	ปริมาณและชนิดของสารที่ใช้ในการเชื่อมต่อกับ adapter	26
7	ปริมาณและชนิดของสารที่ใช้ในการทำ preselective amplification	27
8	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์เอเอฟแอลพีในขั้นตอน preselective amplification	28
9	ปริมาณและชนิดของสารที่ใช้ในการทำ selective amplification	29
10	ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์เอเอฟแอลพีในขั้นตอน selective amplification	29
11	จำนวนแถบดีเอ็นเอของดีเอ็นเอไก่ 2 กลุ่มจาก 5 ครอบครัวย ที่ได้จาก <i>EcoRI/MseI</i> combination	34
12	จำนวนแถบดีเอ็นเอของดีเอ็นเอไก่ 2 กลุ่มจาก 5 ครอบครัวย ที่ได้จาก <i>EcoRI/TaqI</i> combination	36
13	จำนวนโพลีเมอร์พีซิมของดีเอ็นเอไก่ 2 กลุ่มจาก 5 ครอบครัวย ที่ได้จาก <i>EcoRI/MseI</i> combination	37
14	จำนวนโพลีเมอร์พีซิมของดีเอ็นเอไก่ 2 กลุ่มจาก 5 ครอบครัวย ที่ได้จาก <i>EcoRI/TaqI</i> combination	38

สารบัญตาราง

ตารางผนวกที่		หน้า
1	ไถ่พื้นเมืองจำนวน 34 ตัว 5 ครอบครัวที่ใช้ในการวิเคราะห์เอเอฟแอลพี	51

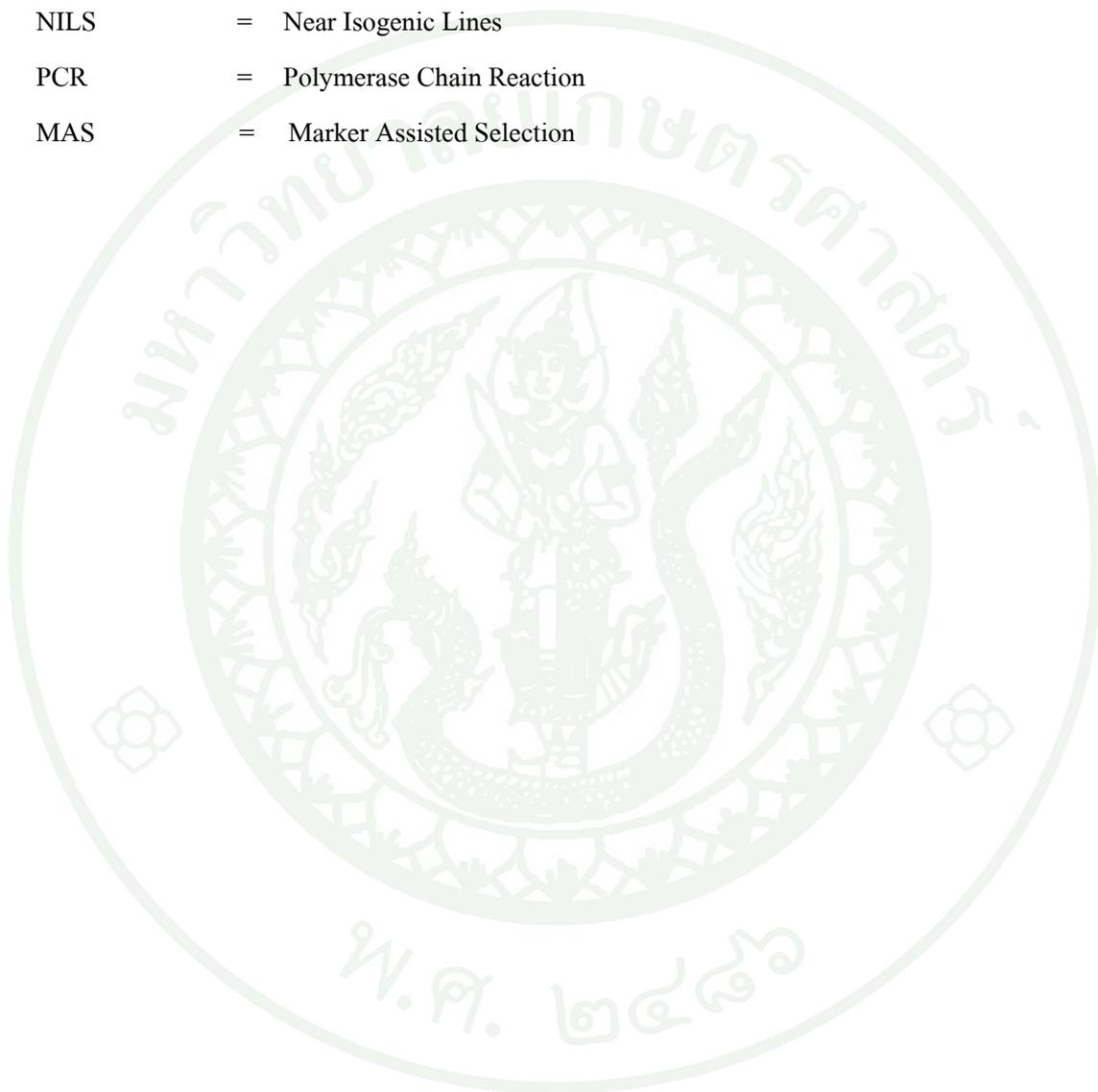


สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดตั้งแต่ครอบครัวที่ 1-5 ที่ได้จาก คู่ไพรเมอร์ E-ATA/M-TCA	35
2	แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดตั้งแต่ครอบครัวที่ 1-5 ที่ได้จาก คู่ไพรเมอร์ E-ATA/T-CTG	36
3	แสดงแถบดีเอ็นเอที่อาจจะสัมพันธ์กับลักษณะเชิงการต่อสู้ในไก่พื้นเมือง ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-ATA/T-CTG	38
4	แสดงแถบดีเอ็นเอที่อาจจะสัมพันธ์กับลักษณะเชิงการต่อสู้ในไก่พื้นเมือง ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-ACA/T-CGA	39

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

- AFLP = Amplified Fragment Length Polymorphism
- BSA = Bulked Segregant Analysis
- NILS = Near Isogenic Lines
- PCR = Polymerase Chain Reaction
- MAS = Marker Assisted Selection



การตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะเชิงการต่อสู้ในไก่พื้นเมือง
ด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี

Detection DNA Bands Related to Fighting Trait in Thai-Native Chicken
by AFLP Technique

คำนำ

ไก่พื้นเมืองหรือไก่พื้นบ้านเป็นสัตว์เลี้ยงคู่บ้านคู่เมืองของคนไทยมาตั้งแต่บรรพบุรุษ โดยคาดว่าน่าจะมิมีวิวัฒนาการมาจากไก่ป่า เมื่อประมาณ 5,400 ปีก่อนคริสตกาล (Liu *et al.* 2006) ไก่พื้นเมืองไทยเป็นไก่ที่มีวิวัฒนาการมาตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบัน มีการปรับปรุงเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ โดยอาศัยการเกิดวิวัฒนาการ เช่น การเกิดการกลายพันธุ์ ทำให้ไก่พื้นเมืองมีหลากหลายสายพันธุ์ และมีจุดเด่นหลายประการ เช่น ความต้านทานต่อโรค แข็งแรง ทนทานต่อสภาพภูมิอากาศได้ดี

การเลี้ยงไก่พื้นเมืองนั้นมีประโยชน์นอกจากการนำมาเป็นอาหารแล้วยังเลี้ยงเพื่อความเพลิดเพลิน เพื่อเป็นเกมสันทนาการ ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน จึงถือว่าการนำไก่มาชนกันนั้นเป็นวิถีชีวิต และเป็นส่วนหนึ่งของวัฒนธรรมไทย ซึ่งนอกจากไทยที่มีการนำไก่มาเล่นเป็นกีฬาแล้ว ในต่างประเทศก็มีการนำไก่มาเล่นเพื่อเป็นกีฬาเช่นเดียวกัน เช่น ในประเทศพม่า, อินโดนีเซีย, เวียดนาม, จีน เป็นต้น ประโยชน์ของกีฬาชนไก่นั้นมีอยู่หลายประการ เช่น เป็นการสร้างความเพลิดเพลิน การเพิ่มค่าทางเศรษฐกิจ และอีกสิ่งหนึ่งที่ได้จากกีฬาชนไก่และการเลี้ยงไก่ คือ การอนุรักษ์และพัฒนาสายพันธุ์ของไก่พื้นเมืองต่างๆ ให้สามารถดำรงอยู่ได้ เป็นแหล่งพันธุกรรมที่ทำให้เกิดความหลากหลายของพันธุ์ไก่พื้นเมืองไทย

เนื่องจากไก่พื้นเมืองที่เรียกว่าไก่ชนนี้มีลักษณะเชิงการต่อสู้ที่ดีกว่าไก่พื้นเมืองชนิดอื่นๆ ถ้าหากสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ไก่ให้มีลักษณะเชิงการต่อสู้ที่ดีได้ ก็จะทำให้สามารถสร้างและพัฒนาให้ได้สายพันธุ์ไก่ที่ดี เก่ง และยังอนุรักษ์พันธุ์ไก่พื้นเมืองให้ดำรงอยู่ต่อไปด้วย จะเห็นได้ว่าไก่ที่ชนดี ชนเก่ง จะเป็นไก่ที่มีมูลค่ามาก แต่การที่จะทราบว่าไก่นั้นชนเก่งหรือไม่ ในทางปฏิบัติจำเป็นจะต้องรอให้ไก่โตพอที่จะมีการทดสอบความสามารถและเชิงการต่อสู้ของไก่ ซึ่งต้องใช้เวลานานในการเลี้ยงดูเป็นเวลาหลายเดือน ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายโดยไม่จำเป็น โดยเฉพาะในกรณีที่ไก่นั้นไม่มีเชิงการต่อสู้ที่ดี ดังนั้นเพื่อเป็นการลดค่าใช้จ่าย และสามารถคัดเลือกไก่ที่มีความสามารถได้เร็ว

อีกทั้งการเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือก การศึกษาค้นหาแถบดีเอ็นเอที่จะเกี่ยวข้องกับลักษณะเชิงการต่อสู้ของไก่จึงน่าจะนำมาช่วยให้สามารถคัดเลือกไก่ได้เร็วขึ้นตั้งแต่อายุน้อย ไม่เสียเวลาและค่าใช้จ่าย อีกทั้งยังเพิ่มมูลค่าให้กับไก่ด้วย โดยอาศัยเทคนิคเอฟแอลพีซึ่งเทคนิคนี้ถูกนำมาใช้ในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง เช่น พืช แบคทีเรีย หนู ปลา กุ้ง ไก่ เป็นต้น การศึกษานี้จะทำการเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอของไก่ที่ได้จากไก่เชิงดีเปรียบเทียบกับไก่เชิงไม่ดีภายในครอบครัวเดียวกัน เพื่อเลือกแถบดีเอ็นเอมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุล สำหรับช่วยในการคัดเลือก (marker – assisted selection) ไก่ที่มีเชิงดี ชนเก่ง เพื่อลดเวลาและค่าใช้จ่าย เพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือกและยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ไก่พื้นเมืองของไทยให้ดีขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาจำนวนของแถบสีเอ็นเอที่แตกต่างกันในกลุ่มไก่เชิงดีและเชิงไม่ดีจากครอบครัวเดียวกันด้วยเทคนิคเอฟแอลพี
2. เพื่อค้นหาแถบสีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับลักษณะเชิงการต่อสู้ของไก่พื้นเมือง



การตรวจเอกสาร

ไก่ถูกจัดให้เป็นสัตว์ประเภทเดียวกับนกทั้งหลาย โดยในทางสัตวศาสตร์จัดให้อยู่ในจำพวก เอเวส (Aves มาจากภาษาละติน avis แปลว่า นก) ซึ่งแบ่งออกเป็นหลาย orders และ families ตาม ลักษณะรูปร่างที่แตกต่างกันออกไป ไก่อยู่ใน order แกลลิฟอร์ม (Galliforms) พวกเดียวกันกับไก่ป่า ไก่ฟ้า นกยูง ไก่วง (วิเชียร, 2542)

1. ต้นกำเนิดของไก่พื้นเมือง

ไก่พื้นเมืองตามประวัติศาสตร์ มีรายงานไว้ว่าเป็นไก่ที่มีวิวัฒนาการมาจากไก่ป่าที่มีต้นกำเนิดมาจากแถบประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ไทย มาเลเซีย และจีนตอนใต้ หลังจากที่ไก่ป่าได้เข้ามาเก็บกินผลผลิตพืชที่มนุษย์ปลูก ไก่และมนุษย์จึงอยู่ในรูปพึ่งพาอาศัยกัน ไก่อาศัยอาหาร การเลี้ยงดูและป้องกันอันตรายจากมนุษย์ ในขณะที่เดียวกันมนุษย์อาศัยไก่และไข่เป็นอาหารเป็นการพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันเรียกว่าเป็นกระบวนการวิวัฒนาการของสัตว์และมนุษย์ให้อยู่ร่วมกันอย่างต่อเนื่อง การวิวัฒนาการของไก่เป็นไปตามวิถีชีวิตของมนุษย์เจ้าของ ซึ่งก็ขึ้นอยู่กับธรรมชาติ บางปีเกิดภัยธรรมชาติอย่างรุนแรง สัตว์เลี้ยงจะตายมาก หรือบางปีเกิดโรคระบาดอย่างรุนแรง ไก่จะตายมาก แต่ก็ตายไม่หมด จะเหลือตัวที่แข็งแรงทนทานอยู่ขยายพันธุ์ขึ้นมาใหม่ จึงเป็นการคัดเลือกโดยธรรมชาติจนเป็นไก่พื้นเมืองสืบทอดมาให้เราได้ใช้ประโยชน์ถึงทุกวันนี้ ดังนั้นไก่พื้นเมืองจึงเป็นมรดกวัฒนธรรมและเทคโนโลยีชีวภาพที่หลากหลายเป็นทรัพย์สินภูมิปัญญาของชาวบ้าน โดยแท้ เป็นเทคโนโลยีที่เหมาะสมกับชาวไร่ ชาวนาที่อาศัยอยู่ตามชนบท ที่มีแหล่งอาหารตามธรรมชาติมาก (กรมปศุสัตว์, 2552)

สำหรับไก่พื้นเมืองที่นำมาเล่นเป็นกีฬาเป็นไก่ที่มีคุณลักษณะการต่อสู้แตกต่างจากไก่พันธุ์เนื้อ พันธุ์ไข่ หรือพันธุ์อื่นๆ แม้ว่าต้นกำเนิดดั้งเดิมของไก่แทบทุกชนิด ทุกพันธุ์จะสืบเชื้อสายมาจากไก่ป่าเหมือนกันก็ตาม แต่มาภายหลังเมื่อเป็นไก่เลี้ยงหรือไก่บ้าน ได้มีการเลือกพันธุ์เพาะพันธุ์ เพื่อให้ได้ไก่ที่มีลักษณะและคุณสมบัติดีตามจุดประสงค์ที่มนุษย์ต้องการ ในจำนวนไก่หลายๆ พันธุ์เหล่านี้ ก็มีไก่อยู่พันธุ์หนึ่ง เป็นไก่ประเภทนักสู้ ชอบตีชอบชน คนไทยเรียกไก่พื้นเมืองนี้ว่า ไก่ชน

ไถ่ชนนั้น มาจากไถ่พันธุ์พื้นเมือง ที่เรียกว่า “ไถ่กู” โดยปกติไถ่กูจะมีนิสัยใจคอผิดแผกแตกต่างจากไถ่อย่างอื่น ไม่ว่าจะเป็นไถ่ตะเภา ไถ่แจ้ เป็นต้น ไถ่กูเป็นไถ่ที่มีรูปร่างประเปรียวแข็งแรงมีนิสัยเป็นนักสู้ ชอบตี ชอบชน บินเก่ง และทรหด การเลือกไถ่เพื่อเอาไปชนกัน จะเพื่อความสนุกสนาน หรือเพื่อเอาไปเพาะคัดพันธุ์ไถ่ชน ก็จะเลือกจากไถ่กูทั้งสิ้น (วิเชียร, 2542)

2. ลักษณะโดยทั่วไป

ไถ่พื้นเมืองหรือไถ่ชนนี้ โดยทั่วไปจะมีลักษณะแตกต่างจากไถ่ชนิดอื่นๆ คือ

- 2.1 มีลักษณะทะมัดทะแมง แข็งแรง
- 2.2 ท่วงทีในการขึ้นจะเด่นมีสง่าราศีกว่าไถ่ชนิดอื่นๆ
- 2.3 มีความทรหดอดทนชอบต่อสู้กันมาตั้งแต่เล็ก

3. ความเหมาะสมในการเลี้ยงไถ่พื้นเมือง

ประเทศไทยเหมาะสมต่อการเลี้ยงไถ่ เพราะมีทรัพยากรอุดมสมบูรณ์ ประชากรประกอบอาชีพการเกษตร ผลผลิตและผลพลอยได้จากการเกษตร ใช้เป็นอาหารไถ่ได้มากมาย และมีราคาถูกกว่าที่อื่นๆ ซึ่งแสดงถึงความสอดคล้องกันของการเลี้ยงไถ่พื้นเมืองกับระบบเกษตรผสมผสาน อีกทั้งยังมีการส่งเสริมในอาชีพการเลี้ยงสัตว์ และการมีไถ่ป่าต่างๆ อาศัยอยู่ในทุกถิ่นของเมืองไทย จึงแสดงถึงความเหมาะสมของอาชีพการเลี้ยงไถ่ของเกษตรกรในชนบทในเมืองไทย

วัตถุประสงค์ของการเลี้ยงไถ่พื้นเมืองในชนบทมีดังนี้

1. เป็นอาหารและรายได้เสริม ชาวบ้านสามารถนำไถ่ที่เลี้ยงมาบริโภคเป็นอาหาร หรืออาจนำไปขายเมื่อมีความจำเป็นต้องใช้เงิน
2. เป็นออมสินหรือสิ่งประกัน การนำข้าวเปลือก ปลาช่อนที่ไม่ต้องหาซื้อมาใช้เพื่อเลี้ยงไถ่ ทำให้มีรายได้คือ ไถ่จะเป็นสิ่งประกันที่แสดงว่าเกษตรกรจะสามารถขายไถ่เพื่อซื้อข้าวไว้สำหรับปีต่อไปได้

3. เป็นอาชีพเสริมการเพาะปลูก เช่นการปล่อยไก่ไล่ทุ่ง เพื่อให้ไก่ได้หากินข้าวเปลือกตกหล่นจากท้องนา
4. เพื่อเป็นประเพณีหรือกีฬา คนชนบทนิยมเลี้ยงไก่เพื่อเป็นไก่ชน ซึ่งการเลี้ยงและพัฒนาไก่พื้นเมืองนับว่าเป็นการช่วยอนุรักษ์สายพันธุ์ไก่ได้เป็นอย่างดี
5. มีอัตราการเลี้ยงต่ำ เนื่องจากการเลี้ยงไก่พื้นเมืองในชนบท เป็นการเลี้ยงที่ใช้ของที่มีอยู่ในครัวเรือน จึงมีการลงทุนน้อยหรือไม่ต้องลงทุนเลย ดังนั้น ความเสี่ยงต่อการขาดทุนจึงมีน้อยมาก

4. สถานการณ์การเลี้ยงไก่พื้นเมือง

ไก่พื้นเมืองนั้นมีการเลี้ยงมาตั้งแต่อดีต จนถึงปัจจุบันและมีแนวโน้มว่าจะยังคงมีการเลี้ยงต่อไปในอนาคต จากตารางที่ 1 จะเห็นได้ว่าการเลี้ยงไก่พื้นเมืองเป็นจำนวนมาก อาจจะมีลดจำนวนลงบ้าง เนื่องจากโรคไข้หวัดนก แต่จะเห็นได้ว่าในปีถัดไป จำนวนไก่พื้นเมืองก็มีจำนวนเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นได้ว่าไก่พื้นเมืองนั้นยังมีความสำคัญและเหมาะสมต่อวิถีชีวิตของคนไทย

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนไถ่พื้นเมืองในเขตปศุสัตว์ที่ 1-9 ตั้งแต่ปี 2545-2551

ปี	เขตปศุสัตว์									รวมทั้งประเทศ
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
2545	6,000,067	3,284,868	13,961,078	8,838,498	7,886,485	8,775,911	2,280,887	3,845,786	2,887,727	57,761,307
2546	6,736,293	3,880,535	15,854,087	9,697,006	8,599,356	9,468,173	2,575,749	3,634,360	2,646,015	63,091,574
2547	4,053,990	2,322,613	15,591,991	10,338,013	10,744,995	5,457,696	2,432,747	2,856,564	2,395,562	56,194,171
2548	4,376,215	3,926,842	15,306,440	13,331,816	10,734,141	7,766,255	3,039,865	4,119,564	2,718,619	65,319,757
2549	3,374,030	3,762,758	14,734,659	11,008,956	8,511,104	5,212,373	2,786,190	2,352,766	2,470,582	54,213,418
2550	4,069,454	3,061,007	15,888,076	12,962,189	11,195,189	6,483,984	2,359,629	4,788,851	2,579,780	63,388,159
2551	4,009,109	2,623,332	18,259,163	10,309,951	8,564,300	6,086,344	2,384,538	2,615,832	2,164,544	57,017,113

ที่มา: ดัดแปลงจากข้อมูลกรมปศุสัตว์ (2552)

5. การส่งออกไก่ชน

ตารางที่ 2 แสดงสถิติการส่งออกไก่ชน เป็นรายประเทศตั้งแต่ปี 2541-2545

ประเทศส่งออก	ปี 2541 (1998)		ปี 2542 (1999)		ปี 2543 (2000)		ปี 2544 (2001)		ปี 2545 (2002)	
Export Country	จำนวน - ตัว	บาท	จำนวน - ตัว	บาท	จำนวน - ตัว	บาท	จำนวน - ตัว	บาท	จำนวน - ตัว	บาท
ขอรรวม	1,937	953,900	3,628	4,702,260	5,437	6,446,000	5,516	8,138,000	5,666	3,089,900
อินโดนีเซีย	1,737	863,500	3,513	4,572,000	5,204	6,212,500	5,272	7,801,000	4,459	2,219,900
มาเลเซีย	25	12,500	-	-	75	37,500	112	194,000	266	359,000
สหรัฐอเมริกา	6	3,000	7	6,500	17	31,000	18	14,000	30	15,000
ฟิลิปปินส์	11	3,000	-	-	-	-	-	-	-	-
พม่า	-	-	-	-	-	-	20	30,000	45	51,500
เวียดนาม	-	-	-	-	2	2,000	-	-	2	1,000
บรูไน	10	5,000	26	31,220	14	7,000	14	7,000	31	15,500
ลาว	2	400	-	-	-	-	-	-	-	-
กัมพูชา	-	-	20	4,000	-	-	-	-	1	500
ฮ่องกง	-	-	-	-	55	65,000	-	-	-	-
จีน	-	-	-	-	14	10,000	-	-	-	-

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ประเทศส่งออก Export Country	ปี 2541 (1998)		ปี 2542 (1999)		ปี 2543 (2000)		ปี 2544 (2001)		ปี 2545 (2002)	
	จำนวน - ตัว	บาท								
ฝรั่งเศส	-	-	-	-	17	20,000	10	20,000	11	5,500
สหรัฐอเมริกา	-	-	-	-	15	23,000	12	6,000	23	11,500
คูเวต	-	-	-	-	2	4,000	-	-	505	252,500
บาร์เรน	-	-	-	-	5	-	42	58,000	286	154,500
สวิตเซอร์แลนด์	-	-	-	-	13	26,000	-	-	-	-
อื่น ๆ	146	66,500	62	88,540	4	8,000	16	8,000	7	3,500

ที่มา: กรมปศุสัตว์ (2545)

ตารางที่ 2 แสดงให้เห็นว่ามีการส่งออกไก่เป็นจำนวนมากพอสมควร ในปี 2545 ถึงแม้ว่าจำนวนไก่จะมีการส่งออกมากขึ้นแต่จำนวนเงินที่ได้น้อยกว่าปี 2544 เนื่องมาจากราคาต่อตัวที่ลดลง อย่างไรก็ตามจากตารางแสดงให้เห็นว่าไก่ชนสามารถพัฒนาให้เป็นสินค้าส่งออกได้ ทำให้เป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับตัวไก่ด้วย

6. Genetic markers

ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคและวิธีการต่างๆ มาใช้ในการหาความสัมพันธ์และความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิต โดยดูจากเครื่องหมายพันธุกรรม อาศัยเทคนิคนี้ทำให้เกิดความแตกต่างขึ้นของจีนดิเอ็นเอ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการบ่งชี้ และจำแนกสิ่งมีชีวิตได้ (สจี, 2543)

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) หรือความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) เป็นที่มาของเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) ซึ่งสามารถตรวจสอบได้ที่ระดับทางสัณฐานวิทยา (morphological marker) ระดับชีวเคมี (biological marker) และระดับโมเลกุล (molecular marker หรือ DNA marker) (อรรรัตน์, 2548)

ดังนั้นจึงแบ่ง genetic marker ได้เป็น 3 ชนิด ดังนี้

1. Morphological marker เป็นเครื่องหมายที่แสดงออกของลักษณะภายนอกที่แตกต่างกันของสิ่งมีชีวิต สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกได้ และข้อได้เปรียบของ marker ชนิดนี้คือไม่จำเป็นต้องใช้วิธีการใดมาตรวจสอบ เพราะสามารถเห็นความแตกต่างจากภายนอกได้ แต่มีข้อจำกัด เช่น มีจำนวน marker จำกัด ได้รับผลกระทบจากสภาพแวดล้อม เช่น ลักษณะความสูงของสิ่งมีชีวิต ปริมาณผลผลิต ซึ่งได้รับผลกระทบโดยตรงจากอาหาร เป็นต้น นอกจากนั้นแล้วบางลักษณะยังแสดงออกในบางระยะของการเจริญเติบโตเท่านั้น จึงจำเป็นต้องใช้ผู้มีความชำนาญพิเศษและต้องมีวิธีการที่จะบอกจีโนไทป์ที่ถูกต้องจากฟีโนไทป์ที่ตรวจสอบได้ อย่างไรก็ตามแม้ว่าการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาจะเป็นการตรวจสอบที่มีความคลาดเคลื่อนได้ง่ายแต่ยังมีความจำเป็นที่ต้องทำในอันดับแรก จากนั้นจึงใช้วิธีอื่นประกอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ขึ้น (อัญญา, 2549)

2. Biochemical marker เป็นเครื่องหมายที่สร้างขึ้นจากการศึกษาวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในสิ่งมีชีวิต ได้แก่ เอนไซม์ต่างๆ เนื่องจากเอนไซม์เป็นโปรตีน ดังนั้นการตรวจสอบทำได้โดยอาศัยความแตกต่างของโมเลกุลของ โปรตีน โดยใช้วิธีแยกขนาดของโปรตีนด้วยเทคนิค อิเล็กโทรโฟริซิส (electrophoresis) แล้วจึงย้อมดูแถบของโปรตีนจำเพาะ โดยใช้สารที่เหมาะสม เช่น การตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนในเลือด โปรตีนสะสมในเมล็ดพืช วิธีการศึกษาเอนไซม์ค่อนข้างง่ายและจัดว่าไม่แพง และแถบของโปรตีนหรือไอโซไซม์นี้ยังมีการข่มร่วมกันแบบ codominant ช่วยให้แยกความแตกต่างระหว่างแถบโปรตีนแบบโฮโมไซกัส (homozygous) และเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) ได้ (สุรินทร์, 2545) แต่มีข้อจำกัดคือ ความจำเพาะเจาะจงต่ำ กล่าวคือ ถ้ายีนที่ควบคุมการสร้างเอนไซม์นั้นมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสไปเล็กน้อย ซึ่งอาจมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของชนิดกรดอะมิโน หรืออาจไม่มีก็ตาม การเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสเพียงเล็กน้อยนี้ไม่สามารถตรวจสอบได้ (อรรถน์, 2548) นอกจากนั้นจำนวนยีนที่ตรวจสอบได้ยังมีไม่มากนัก ไม่กระจายครอบคลุมทั้งจีโนม และต้องมีการแสดงออกของยีนที่ศึกษา จึงต้องเลือกเนื้อเนื้อและระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ผลที่ได้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อ ระยะของการเจริญเติบโตและสิ่งแวดล้อมด้วย นอกจากนี้โปรตีนและไอโซไซม์ยังสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ง่าย จึงต้องวิเคราะห์ผลในเวลาที่ยังจำกัด ในแง่ของโอกาสการตรวจพบความแตกต่างในระดับโปรตีนยังมีค่าต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการตรวจสอบระดับดีเอ็นเอ เนื่องจากอัลลีลหรือรูปแบบของยีนที่แตกต่างกันนั้น นิเวศวิทยาที่แตกต่างกันอาจไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน หรือบางครั้งแม้ว่าจะมีการเปลี่ยนชนิดกรดอะมิโนที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งแล้วก็ตาม อาจจะไม่มผลต่อระยะทางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลเมื่อทำอิเล็กโทรโฟริซิส ทำให้ไม่สามารถตรวจพบความแตกต่างนั้นๆ ได้ (สุรินทร์, 2545)

3. Molecular marker เป็นเครื่องหมายที่ได้มาจากซันดีเอ็นเอ ดังนั้นในความหมายเดียวกัน marker ชนิดนี้จึงถูกเรียกว่า DNA marker ด้วย molecular marker มีข้อได้เปรียบกว่า marker 2 ชนิดแรกตรงที่มีจำนวนมากมายมหาศาล มีความจำเพาะเจาะจงมากกว่า มีความเสถียรกว่าโปรตีน จึงเก็บไว้ได้นานกว่า สามารถศึกษาจากเนื้อเยื่อใดก็ได้ เนื่องจากดีเอ็นเออยู่ในทุกเซลล์ สามารถตรวจสอบได้ไม่จำกัด ครอบคลุมทั้งจีโนม ประกอบกับมีวิธีตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่างๆ ให้เลือกมากมาย ทำให้การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมาย ทำได้อย่างกว้างขวาง และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในวงการเกษตรได้อย่างดี

เครื่องหมายดีเอ็นเอ เป็นดีเอ็นเอที่อยู่ตำแหน่งต่างๆ บน โครโมโซม (nuclear DNA) หรือดีเอ็นเอในออร์แกเนลล์ ได้แก่ mitochondria DNA และ chloroplast DNA การที่สามารถใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายได้เนื่องจากเกิดความแปรปรวนของนิวคลีโอไทด์ใน โมเลกุลของดีเอ็นเอ หรือเกิด โพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับเบสใน โมเลกุลของดีเอ็นเอนั้นเอง

เทคนิคเครื่องหมายโมเลกุลมีอยู่หลายชนิด และแต่ละชนิดก็มีความแตกต่างกัน ในเรื่องของวิธีการ เวลาที่ใช้ ค่าใช้จ่าย และบุคลากร แต่ละชนิดนั้นก็จะมีข้อดีข้อเสียแตกต่างกัน และข้อมูลที่ได้ก็จะขึ้นอยู่กับผู้ใช้ว่าจะเลือกใช้วิธีใด

3.1 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นวิธีตรวจสอบความแตกต่างหรือความหลากหลายของชิ้นดีเอ็นเอหลังจากถูกย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ความแตกต่างนี้อาจเกิดจากการกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ ซึ่งมีผลให้ตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไป โดยอาศัยหลักการเข้าคู่ (hybridization) ของเส้นดีเอ็นเอคู่สม (complementary) โดยอาศัยชิ้นดีเอ็นเอตรวจสอบ (probe) ชิ้นดีเอ็นเอตรวจสอบเป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายเดี่ยวขนาดเล็กที่ทราบลำดับเบส ซึ่งจะเข้าคู่กับสายดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเป็นคู่สม ซึ่งเป็นดีเอ็นเอเป้าหมายที่ถูกตัดย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การวิเคราะห์อาร์เอฟแอลพีทำได้โดยการสกัดแยกดีเอ็นเอจากตัวอย่างที่สนใจ นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ แยกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยใช้อะกาโรส เจล อิเล็กโทรโฟรีซิส ต่อมาทำการย้ายชิ้นส่วนดีเอ็นเอจากเจล เข้าสู่แผ่นกระดาษกรองพิเศษ (filter membrane) ที่มีคุณสมบัติที่สามารถจับกับกรดนิวคลีอิกได้ โดยใช้เทคนิค southern blot ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยการทำ nucleic acid hybridization กับดีเอ็นเอเครื่องหมายตรวจสอบ เช่น radioactive labeled clone probe ทำการประเมินอาร์เอฟแอลพี ที่ปรากฏจากการตรวจการเรืองแสงบนแผ่นฟิล์ม X-ray ด้วยวิธี autoradiograms

อาร์เอฟแอลพีถูกนำมาใช้ในการศึกษาสัตว์ปีก เช่น Babak and Ghodrat (2009) ใช้เทคนิคนี้ในการศึกษา growth hormone ในไก่พื้นเมืองประเทศอิหร่าน พบว่า growth hormone ที่พบในไก่พื้นเมืองนี้มีความแตกต่างกับ growth hormone ที่เคยรายงานไว้ก่อนหน้านี้ โดย growth hormone ที่พบในไก่พื้นเมืองจะเกิด deletion ขนาด 118 bp จึงทำให้ growth hormone ที่พบในไก่พื้นเมืองมีขนาดสั้นกว่า นอกจากนั้นแล้ว deletion ที่เกิดขึ้นยังทำให้เกิด restriction site ของเอนไซม์

SacI ด้วย Gokben *et al.* (2003) ใช้เทคนิคนี้ในการหาความแปรผันทางพันธุกรรมของ infectious bursal disease virus (IBDV) ที่ได้จากไก่พันธุ์การค้าของประเทศตุรกี พบว่า เมื่อใช้เอนไซม์ *MboI* ไวรัสส่วนใหญ่มีแถบดีเอ็นเอที่เหมือนกัน Anna-Karin *et al.* (1998) ได้ใช้เทคนิคนี้ในการศึกษาวิวัฒนาการของโครโมโซมเพศในสัตว์ปีก โดยการเพิ่มจำนวน (amplify) ยีน *ATP5A1* และ *CHD1* แล้วนำไปสร้างแผนที่ โดยยีนทั้งสองเป็น female-specific W chromosome พบว่า ยีนทั้งสองนี้พบบน Z chromosome ด้วย จึงสรุปว่า โครโมโซมเพศของสัตว์ปีกนี้มีวิวัฒนาการมาจาก ancestral pair ของโครโมโซมร่างกาย

ข้อจำกัดของเทคนิคนี้ คือจำเป็นต้องทราบลำดับเบสของจีโนมเป้าหมาย เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมายตรวจสอบ และสำหรับทำพีซีอาร์ (PCR) ดังนั้นสำหรับการทดลองที่ต้องการหาจีโนมใหม่ ลักษณะ (trait) ใหม่ หรือสิ่งมีชีวิตใหม่ จะไม่สามารถใช้เทคนิคนี้ได้

3.2 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นเทคนิคที่ใช้พีซีอาร์โดยไม่จำเป็นต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย เนื่องจากใช้ไพรเมอร์ที่ไม่จำเพาะเจาะจงกับดีเอ็นเอบริเวณใด โดยไพรเมอร์ที่ใช้เป็นไพรเมอร์เพียงข้างเดียว ไพรเมอร์มีขนาดสั้นๆ เพียง 8-10 เบส และเป้าหมายการเกาะของไพรเมอร์ก็คือบริเวณที่มีลำดับเบสเป็นคู่สมกันเท่านั้น โดยไม่ต้องคำนึงถึงทิศทางของไพรเมอร์ที่เกาะกับเส้นแม่พิมพ์ เนื่องจากไพรเมอร์มีขนาดสั้นๆ จึงสามารถเกาะได้หลายตำแหน่ง ทำให้สามารถสร้างดีเอ็นเอผลผลิตได้หลายชิ้น ข้อดีคือทำได้ง่าย รวดเร็ว และให้ข้อมูลได้มาก แต่ผลที่ได้จะขึ้นกับสภาพของห้องทดลอง ทำให้ผลที่ได้จากการทดลองซ้ำไม่เหมือนเดิม และแถบดีเอ็นเอที่เกิดจากเทคนิคนี้ยังแสดงการข่มต่อการไม่เกิดแถบดีเอ็นเอ ซึ่งทำให้ไม่สามารถบอกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซกัสและเฮเทอโรไซกัสได้

อาร์เอฟดีถูกนำมาใช้ศึกษาในสัตว์ปีกอย่างกว้างขวาง เช่น Bahy *et al.* (2003) ใช้เทคนิคนี้ในการศึกษาหา genetic similarity ในไก่พื้นเมือง พบว่า มีไก่ 3 สายพันธุ์ที่มี egg-production เหมือนกัน และมี 2 สายพันธุ์ที่มี meat production เหมือนกัน Mollah *et al.* (2005) ใช้เทคนิคนี้ในการหาความแตกต่างของไก่ 4 กลุ่ม พบว่า จาก 4 ไพรเมอร์ จะให้ 39 fragments โดยมี 25 fragments ที่แสดงว่าเป็นโพลิมอร์ฟิซึม Mohamed *et al.* (2001) ได้ใช้เทคนิคนี้แยกสายพันธุ์ไก่พื้นเมือง 5 สายพันธุ์ พบว่า 12 ไพรเมอร์ ให้แถบดีเอ็นเอ 176 แถบ และมี 159 แถบที่เป็นโพลิมอร์ฟิซึม คิดเป็น 90.3% Chatterjee *et al.* (2007) ใช้เทคนิคนี้ในการศึกษาพันธุกรรมของไก่ highly inbred พบว่า

จาก 41 ไพรเมอร์ มี 21 ไพรเมอร์ที่ให้โพลิมอร์ฟิซึม แสดงให้เห็นว่าอาร์เอพีดีเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพในการหาโพลิมอร์ฟิซึม

ข้อเสียของอาร์เอพีดี คือ ผลที่ได้จากการทำซ้ำอาจจะไม่เหมือนกัน

3.3 Microsatellite คือ satellite DNA ที่ core sequence ประกอบด้วยลำดับดีเอ็นเอ ขนาด 1-6 เบส ที่มีจำนวนซ้ำๆกัน อัตราการเกิดมิวเทชันของ microsatellite อยู่ระหว่าง 5×10^{-4} ถึง 10^{-5} ซึ่งมีค่าต่ำจึงสามารถนำไปใช้สำหรับ linkage studies ได้ มีการใช้ microsatellite DNA เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอในการศึกษาจีโนม และมีชื่อเรียกแตกต่างกันออกไป เช่น microsatellite marker, simple sequence repeat (SSR), simple sequence length polymorphism (SSLP) และ sequence-tagged microsatellite (STMS) เป็นต้น สามารถตรวจสอบได้ด้วยพีซีอาร์โดยการออกแบบไพรเมอร์ที่สามารถใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่เป็น microsatellite แล้วใช้ไพรเมอร์นั้นในปฏิกิริยาพีซีอาร์ ข้อดีของเทคนิคนี้คือ เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ให้ความแตกต่างสูง และแสดงให้เห็นสภาพข่มร่วมกันของยีน ทำได้ง่าย พบกระจายทั่วทั้งจีโนม ไพรเมอร์ที่จำเพาะในแต่ละตำแหน่งของ microsatellite marker สามารถใช้ได้โดยทั่วไปเพียงแค่มีลำดับเบสของไพรเมอร์ และเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย แต่มีข้อเสียคือ ค่าใช้จ่ายสูงในการพัฒนา โดยเฉพาะสิ่งมีชีวิตที่ยังไม่เคยมีข้อมูลลำดับเบส

Nakamura *et al.* (2006) ใช้เทคนิคในการแยกความแตกต่างของไก่สายพันธุ์ Nagoya จากการ ใช้ microsatellite marker พบว่ามี 5 marker ที่ให้ผลแบบ single allele โดยเมื่อนำ 5 marker นี้ไปศึกษากับไก่สายพันธุ์อื่นๆ พบว่าไม่มีไก่สายพันธุ์ใดเลยที่ให้ allele แบบเดียวกับ Nagoya แสดงว่า microsatellite ดังกล่าวสามารถนำไปใช้แยกไก่ Nagoya ออกจากไก่สายพันธุ์อื่น Liu *et al.* (2008) ใช้เทคนิคนี้ในการวิเคราะห์ genetic diversity ของไก่ Yangzhou พบว่า microsatellite ให้ข้อมูล ที่แสดงว่ามี genetic variation มาก ในไก่ Yangzhou ใช้เทคนิคนี้ในการทำสร้างแผนที่ เช่น Kent *et al.* (2000) ได้ใช้ microsatellite ในการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างไก่กับไก่วง พบว่า microsatellite marker ของไก่ประมาณ 20% สามารถนำไปใช้สร้างแผนที่จีโนมของไก่วงได้ นอกจากนี้จากการหาลำดับเบสยังพบว่าไก่กับไก่วงนั้นมีความยาวของจำนวนซ้ำที่แตกต่างกัน Jaroslaw *et al.* (2007) ได้ใช้ 29 microsatellite marker เพื่อหาลำดับเบสที่เหมือนกันระหว่างไก่กับนกกระทา พบว่าไม่มี microsatellite ใดเลยที่ให้ลำดับเบสเหมือนกัน

เห็นได้ว่า microsatellite marker นั้นนำมาใช้ได้อย่างกว้างขวาง อย่างไรก็ตาม microsatellite ก็ยังมีข้อจำกัด โดยถ้าเป็นการหาชนิดใหม่ ลักษณะใหม่ๆ ก็จะไม่สามารถใช้เทคนิคนี้ได้

3.4 Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP) เป็นวิธีตรวจหาโพลิมอร์ฟิซึม จากดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณโดยพีซีอาร์ที่มีความแตกต่างกันเฉพาะเบสตัวใดตัวหนึ่งในชนิดเอ็นเอ นั้น (point mutation) ในกรณีที่เบสที่แตกต่างกัน เป็นส่วนของเบสในบริเวณจุดจำของเอนไซม์ ตัดจำเพาะ สามารถบอกความแตกต่างโดยใช้เอนไซม์ดังกล่าวตัดดีเอ็นเอ แต่ถ้าเป็นการเปลี่ยนแปลงของเบสในบริเวณที่ไม่มีผลต่อการตัดของเอนไซม์ หรือเป็นการเปลี่ยนแปลงในตำแหน่งที่ไม่ทราบแน่ชัด สามารถตรวจโพลิมอร์ฟิซึมได้ด้วยเอสเอสซีพี

เทคนิคนี้อาศัยหลักที่ว่าดีเอ็นเอสายเดี่ยวในสภาพธรรมชาติ (nondenaturing condition) จะมีการขดหรือพันกันภายในโมเลกุล เกิดเป็น โครงสร้างจำเพาะขึ้นกับองค์ประกอบของเบสของดีเอ็นเอสายนั้นๆ หรือมีโครงสร้าง (conformation) ที่จำเพาะ ซึ่งจะมีผลต่อการเคลื่อนที่ในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสบน nondenaturing polyacrylamide gel โมเลกุลของดีเอ็นเอที่มีเบสแตกต่างกันแม้เพียงเบสเดียวก็สามารถทำให้เกิดโครงสร้างแตกต่างกัน ซึ่งจะส่งผลให้การเคลื่อนที่ในระหว่างการทำอิเล็กโทรโฟรีซิสเร็วช้าต่างกัน ขั้นตอนการทำเอสเอสซีพี คือ ออกแบบไพรเมอร์ที่จำเพาะกับชนิดดีเอ็นเอที่ต้องการ เพิ่มจำนวนชนิดดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยพีซีอาร์ หลังจากนั้นนำ PCR product มาทำอิเล็กโทรโฟรีซิส บน nondenaturing polyacrylamide gel แล้วตรวจหาแถบดีเอ็นเอ โดยใช้ radioactive labeling หรือ silver stain

Hassan and Guo (2007) ได้ใช้เทคนิคเอสเอสซีพีในการหาความสัมพันธ์ของ apoVLDL-II ของไก่กับน้ำหนักร่างกายและน้ำหนักรั้วไขมันหน้าท้อง พบว่าเอสเอสซีพี แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างของยีน VLDL ระหว่างประชากรและ Hassan *et al.* (2007) ได้ใช้เทคนิคเดียวกันนี้ในการหาความสัมพันธ์ของ avian lipoprotein lipase gene กับน้ำหนักร่างกายและไขมันหน้าท้อง นอกจากนี้ Hassan *et al.* (2009) ยังใช้เอสเอสซีพีในการหาความแตกต่างของ intron I ของ apoVLDL-II Goto *et al.* (2002) ได้ใช้เทคนิคนี้ในการทำ genotyping ของ major histocompatibility complex B ในไก่ โดยรายงานว่าเทคนิคนี้มีประโยชน์อย่างมากในการนำมาใช้หา MHC B haplotypes

เห็นได้ว่าเทคนิคนี้ถูกนำมาใช้ในการหาความแตกต่างของลักษณะต่างๆ ได้อย่างกว้างขวางเช่นเดียวกับ molecular marker อื่น แต่เนื่องจากเทคนิคนี้จำเป็นต้องรู้ลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย จึงทำให้เป็นข้อจำกัดในการศึกษาชนิดใหม่ หรือลักษณะใหม่

7. เทคนิค Amplified fragment length polymorphism

เอเอฟแอลพี (AFLP) เป็นเทคนิคของเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบหนึ่ง พื้นฐานของเอเอฟแอลพีคือการตรวจสอบชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยการเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนั้นจึงรวมเอาความน่าเชื่อถือของเทคนิคอาร์เอฟแอลพีและประสิทธิภาพของพีซีอาร์เข้าด้วยกัน เทคนิคเอเอฟแอลพีพัฒนาขึ้นโดย Zabeau และ Vos นักวิจัยของบริษัท Keygene N.V. ประเทศเนเธอร์แลนด์ และได้จดสิทธิบัตรในปี ค.ศ. 1993 (สุรินทร์, 2545) เทคนิคนี้ประกอบด้วย 4 ขั้นตอน ได้แก่ การตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ซึ่งจะใช้อินไซม์ 2 ชนิด คือ rare cutter ที่จะตัดที่ตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส และ frequent cutter ที่จะตัดที่ตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส, การเชื่อมต่อกับ oligonucleotide adapter, การเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วย restriction enzyme โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์และการวิเคราะห์ชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มจำนวนด้วยพีซีอาร์ (Vos *et al.*, 1995) แบบของแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากการทำพีซีอาร์ โดยใช้ primer คู่หนึ่งๆ เรียกว่าลายพิมพ์เอเอฟแอลพี (AFLP fingerprint) ดังนั้นเทคนิคนี้จึงเป็นวิธีตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอวิธีหนึ่ง แถบดีเอ็นเอในลายพิมพ์ของแต่ละตัวอย่างบ่งบอกถึงความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะจึงสามารถใช้เป็นเครื่องหมายเรียกว่า เครื่องหมายเอเอฟแอลพี (AFLP marker) หรือเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ใช้ศึกษาความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตได้เช่นเดียวเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบอื่น (สุรินทร์, 2545)

เอเอฟแอลพีเป็นเทคนิคที่รวดเร็วและเชื่อถือได้ในการตรวจสอบจีโนมเพื่อหาความแตกต่างของแถบดีเอ็นเอที่จำเพาะต่อลักษณะที่สนใจ ด้วยหลักการของเทคนิคนี้จะทำให้ได้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างและได้แถบดีเอ็นเอจำนวนมาก (Fumiere *et al.*, 2003) และให้ระดับความหลากหลายและข้อมูลที่ดีกว่า marker ชนิดอื่นๆ (Liu *et al.*, 2003) เอเอฟแอลพีจำเป็นต้องใช้คู่ของเอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อตัดดีเอ็นเอและนำไปใช้ในการเป็น template เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ประกอบด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด คือ เอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส เรียกว่า rare cutter และเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส เรียกว่า frequent cutter (Vos *et al.*, 1995) โดยการเลือกใช้เอนไซม์จะขึ้นอยู่กับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม

Fumiere *et al.* (2003) กล่าวว่า *EcoRI/MseI* เป็นคู่ของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้กันแพร่หลายในการศึกษาเอเอฟแอลพี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพืช แต่การใช้ในสัตว์จะทำให้เกิดรูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ผลได้ยาก ดังนั้นเพื่อลดจำนวนชิ้นและได้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ผลได้ง่ายขึ้น การใช้ *EcoRI/TaqI* จึงถูกแนะนำให้ใช้เมื่อตัวอย่างเป็นปศุสัตว์หรือเป็ดไก่ เช่นเดียวกับ Ajmone-Marsan *et al.* (1997) ที่กล่าวว่าคู่ของเอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับใช้กับพืชคือ *EcoRI/MseI* ในขณะที่สำหรับสัตว์นั้นคู่ของเอนไซม์ที่เหมาะสมคือ *EcoRI/TaqI* ซึ่งจะให้รูปแบบของแถบดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ผลได้ง่ายกว่า

การเลือกใช้คู่เอนไซม์ตัดจำเพาะจะขึ้นอยู่กับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม Willems *et al.* (2000) ใช้ *EcoRI/CfoI* ในการศึกษาความจำเพาะของโฮสต์ต่อความต้านทานต่อ Vancomycin ของ *Enterococcus faecium* โดยพบว่ามีจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นเท่ากับ 13-37 แถบ โดยมีขนาดระหว่าง 50-500 bp คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 27 แถบ

Menz *et al.* (2004) ใช้คู่เอนไซม์ *PstI/MseI* ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของข้าวฟ่าง โดยกล่าวว่า *EcoRI/MseI* จะให้ AFLP marker ที่กระจายอยู่บน physical map แต่สำหรับ genetic map แล้วจะเห็นเป็นกลุ่มในบริเวณ hypermethylated เช่นรอบเซนโตรเมียร์ซึ่งตรงข้ามกับ *PstI/MseI* จะให้ marker ที่กระจายตัวอยู่บน genetic map ยกเว้นบริเวณของโครโมโซมที่มีการ methylated

Gzyl *et al.* (2005) ใช้ *HindIII/TaqI*, *ApaI/TaqI*, *MfeI/BglIII*, *HindIII/HindIII*, *PstI/TaqI*, *SpeI/ApaI* และ *EcoRI/MseI* เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์และภายในสายพันธุ์ของ *Bordetella* โดยนำคู่เอนไซม์ *SpeI/ApaI* และ *EcoRI/MseI* มาใช้ทำ genotyping คู่เอนไซม์ *EcoRI/MseI* นั้นให้จำนวนแถบดีเอ็นเอมากกว่า คือ 16-39 แถบและคู่เอนไซม์ *SpeI/ApaI* ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอน้อยกว่าคือ 6-25 แถบ ซึ่งกล่าวโดยสรุปว่าคู่เอนไซม์ *EcoRI/MseI* ดูเหมือนจะเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ของ *Bordetella*

เทคนิคเอเอฟแอลพีได้ถูกนำมาใช้ในสัตว์หลายๆ ชนิด รวมไปถึงพืชและแบคทีเรียด้วย เนื่องจากเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการนำมาหา molecular marker เอเอฟแอลพีถูกนำไปประยุกต์ใช้เพื่อศึกษา genetic linkage map ใน Atlantic salmon (Moen *et al.*, 2004), สุกกร (Rothschild, 2004), ไก่ (Knorr *et al.*, 2001) ใช้สร้าง genome mapping ในไก่ (Knorr *et al.*, 1999) ใช้หา genome sex

ใน giant tiger shrimp (Khamnamtong *et al.*, 2006) ใช้หา genetic diversity ของไก่ (De Marchi *et al.*, 2006 and Mekchay *et al.*, 2005) จะเห็นได้ว่าเทคนิคเอเอฟแอลพี นั้นสามารถนำมาใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ ที่ใช้ในการศึกษาทางพันธุศาสตร์ได้หลายประเภท เช่น การศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร, ศึกษาเอกลักษณ์ของสิ่งมีชีวิต, ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ, ความหลากหลายทางชีวภาพ (สุรินทร์, 2545) และใช้ในการสร้างแผนที่จีโนมที่มีประสิทธิภาพสูง (Knorr *et al.*, 2001) โดยเทคนิคเอเอฟแอลพี นั้นมีข้อดีอยู่หลายประการ ได้แก่ การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเอเอฟแอลพี ไม่ต้องการข้อมูลลำดับเบสดีเอ็นเอทำให้ไม่เป็นข้อจำกัดในการศึกษาหาชนิดใหม่ หรือลักษณะใหม่, ทำได้รวดเร็ว ใช้ปริมาณดีเอ็นเอเริ่มต้นน้อย, มีประสิทธิภาพ, ให้แถบดีเอ็นเอมากทำให้ตรวจสอบดีเอ็นเอได้หลายตำแหน่งพร้อมกัน, ทำให้เกิดโพลิมอร์ฟิซึมได้จำนวนมาก ซึ่งสามารถใช้บอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตของแต่ละตัวได้อย่างดี, ใช้กับจีโนมขนาดใดก็ได้ (สุรินทร์, 2545) และดีสำหรับนำมาใช้เพื่อพัฒนาหา marker ที่สัมพันธ์กับลักษณะทางการเกษตรที่สำคัญ (Altinkut *et al.*, 2003) แต่ข้อด้อยของเอเอฟแอลพีนั้นก็มิได้อยู่เช่นเดียวกัน เช่น ค่าใช้จ่ายสูง, เกิดแถบดีเอ็นเอจำนวนมาก ซึ่งอาจมีขนาดเท่ากันแต่มาจากชิ้นดีเอ็นเอคนละตำแหน่งกัน ทำให้การวิเคราะห์ผิดพลาดได้, ไม่เหมาะกับสิ่งมีชีวิตที่มีความเหมือนมากหรือน้อยเกินไป (สุรินทร์, 2545), เกิด biallelic ได้ง่าย (Knorr *et al.*, 1999 and De Marchi *et al.*, 2006) และเอเอฟแอลพีนั้นส่วนใหญ่จะถูกจัดเป็น dominance marker (Knorr *et al.*, 1999) ทำให้แยกแถบดีเอ็นเอแบบโฮโมไซกัสกับเฮเทอโรไซกัสได้ยาก

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่เกิดจากการทำเอเอฟแอลพีมีลักษณะเป็นลายพิมพ์แบบสุ่ม (random fingerprint) ซึ่งใช้กับดีเอ็นเอใดๆ ก็ได้ ไม่ขึ้นกับขนาดและความซับซ้อนของจีโนม สามารถปรับให้เกิดลายพิมพ์ที่เหมาะสมได้โดยปรับจำนวนเบสคัดเลือกว่า 3' ของไพรเมอร์ที่ใช้ ผลที่ได้สามารถทำซ้ำได้ผลคงเดิม (reproducible) และสามารถเลือกคู่ของไพรเมอร์ได้หลายแบบ ทำให้เกิดลายพิมพ์ที่แตกต่างกันจำนวนมาก (สุรินทร์, 2545)

8. เทคนิค bulked segregant analysis

Bulked segregant analysis (BSA) ถูกพัฒนาขึ้น โดย Michelmore *et al.* (1991) เป็นวิธีการที่ใช้หา marker ในตำแหน่งจำเพาะหรือตำแหน่งที่ต้องการในจีโนมได้อย่างรวดเร็ว วิธีการนี้เป็น การเปรียบเทียบดีเอ็นเอ 2 กลุ่ม จากประชากรที่มีการกระจายตัว ที่เกิดจากพ่อแม่เดียวกัน ภายในแต่ละกลุ่มดีเอ็นเอของแต่ละตัวจะมีความเหมือนกันในลักษณะหรือยีนที่สนใจ ซึ่งยีนอื่นๆ จะเป็น

แบบใดก็ได้ไม่ต้องเหมือนกัน ความแตกต่างของลักษณะที่สนใจในดีเอ็นเอทั้ง 2 กลุ่ม คือการวิเคราะห์เพื่อหา marker ที่ใช้แยกความแตกต่างของดีเอ็นเอ ทั้ง 2 กลุ่ม marker ที่เกิดขึ้นระหว่างดีเอ็นเอ ทั้ง 2 กลุ่มจะเป็นโพลิมอร์ฟิซึม ซึ่งจะสัมพันธ์กับตำแหน่งที่ใช้บอกถึงลักษณะที่ถูกใช้ในการสร้างกลุ่มดีเอ็นเอ ดังนั้นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับบริเวณที่สนใจก็จะแสดงโพลิมอร์ฟิซึมระหว่างกลุ่มดีเอ็นเอ และในทางตรงกันข้ามเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ไม่มีความสัมพันธ์กับบริเวณที่สนใจก็จะปรากฏขึ้นทั้ง 2 กลุ่มดีเอ็นเอ (monomorphic) (อรรถรัตน์, 2548) บีเอสเอมีการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาการสร้าง genetic map รายละเอียดต่างๆของ genetic map สำหรับสัตว์ชนิดต่างๆ กำลังถูกพัฒนาขึ้น โดยการวิเคราะห์การกระจายตัวของ molecular marker ที่ถูกเลือกอย่างสุ่มใน single population เทคนิคบีเอสเอเป็นวิธีที่ใช้เพื่อเลือกพื้นที่ที่สนใจซึ่งมี marker อยู่บ่อย ทั้งยังเป็นวิธีที่หายีนซึ่งไม่แยกตัวในประชากรที่ใช้เพื่อการสร้าง genetic maps ได้อย่างรวดเร็ว

บีเอสเอเป็นการหาความแตกต่างระหว่างดีเอ็นเอ 2 กลุ่ม ที่ได้จากประชากรที่มีการกระจายตัวซึ่งมาจากพ่อแม่เดียวกัน แต่ละกลุ่มจะประกอบด้วยดีเอ็นเอของแต่ละตัวที่มีจีโนไทป์ที่เหมือนกันในส่วนที่เป็นเป้าหมาย แต่ในตำแหน่งที่ไม่สัมพันธ์กับส่วนที่สนใจหรือส่วนที่เลือกจะมีจีโนไทป์เป็นแบบสุ่ม ดังนั้นดีเอ็นเอทั้ง 2 กลุ่มจะแตกต่างทางพันธุกรรมในส่วนที่เลือกเท่านั้น ส่วนตำแหน่งอื่นๆ จะเป็นเฮเทอโรไซกัสและเป็นโมโนมอร์ฟิซึม ทั้ง 2 กลุ่มจะถูกตรวจหาความแตกต่างในทิศทางเหมือนกับ near isogenic lines (NILS) โพรบหรือไพรเมอร์สำหรับตำแหน่งที่เป็นโพลิมอร์ฟิซึม และสัมพันธ์กับยีนจะพบความแตกต่างอย่างชัดเจนในระหว่างกลุ่ม ในทางกลับกัน ตำแหน่งที่ไม่สัมพันธ์จะปรากฏแบบเฮเทอโรไซกัส ซึ่งประมาณว่ามีความเข้มของแถบดีเอ็นเอเท่ากันทั้ง 2 กลุ่ม การเกิด recombination ระหว่าง marker เป้าหมายกับตำแหน่งโพลิมอร์ฟิซึมจะเป็นผลให้ทั้ง 2 กลุ่มเกิดความแตกต่างลดลง ซึ่งการลดลงของความสัมพันธ์ทำให้ตำแหน่งนั้นกลายเป็น unlink เทคนิคบีเอสเอไม่บอกชนิดของความแปรปรวนแต่ช่วยให้สามารถหาคำแหน่งได้มากและได้อย่างรวดเร็วซึ่งทำให้หา marker ที่กระจายตัวในบริเวณเป้าหมายได้

9. การประยุกต์ใช้เทคนิคเอฟแอลพีและบีเอสเอ

เทคนิคบีเอสเอได้ถูกพัฒนาขึ้นเพื่อนำไปใช้กับเทคนิคต่างๆ เพื่อใช้ในการหา molecular marker ตัวอย่างของการนำเทคนิคบีเอสเอมาใช้ร่วมกับเทคนิคอื่นๆ เช่น นำมาใช้เพื่อหา marker ที่สัมพันธ์กับยีนต้านทานโรค โดยใช้ร่วมกับเทคนิคอาร์เอฟแอลพีและอาร์เอฟพีดี (Michelmore *et al.*, 1991) และสำหรับการนำเทคนิคบีเอสเอมาใช้ร่วมกับเอฟแอลพีก็พบได้เช่นกัน เช่น

Bavornlak *et al.* (2006) ได้นำทั้ง 2 เทคนิคมาใช้ในการหา sex-specific expression marker ของ giant tiger shrimp หรือ การหา AFLP marker ที่สัมพันธ์กับความทนต่อความเครียดจากน้ำในข้าวบาเร่ (Altinkut *et al.*, 2003) ใช้หาฮีนต้านทานหญ้าแม่คซึ่งเป็นปรสิตในถั่ว (Ouedraogo *et al.*, 2000)



อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ไข่ฟืนเมืองที่ทราบพันธุ์ประวัติจากศูนย์วิจัยและพัฒนาไข่ฟืนเมืองบ้านบึง จำนวน 34 ตัว เป็นไข่เชิงดี 16 ตัว และเป็นไข่เชิงไม่ดี 18 ตัว จาก 5 ครอบครัวโดยแต่ละครอบครัวจะมีพ่อเดียวกัน แต่ต่างแม่ (half-sib)
2. agarose gel electrophoresis tank
3. polyacrylamide gel electrophoresis tank
4. centrifuge
5. eppendorf tube
6. vortex mixer
7. PCR tube
8. PCR plate
9. gel document
10. hot air oven
11. thermocycler
12. cylinder
13. digital balance
14. filter paper
15. stirring rod
16. เขี่ยอกน้ำ
17. ถาด
18. บีกเกอร์
19. ขวดรูปชมพู่

วิธีการ

1. การเก็บตัวอย่างจากเลือดไก่

เก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 25 เจาะเลือดบริเวณเส้นเลือดใต้ปีก (wing vein venipuncture) ปริมาตร 0.5-1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มี EDTA ในอัตราส่วน 1.5 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด แล้วนำเลือดแช่ในน้ำแข็งทันที และนำไปแช่ไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพของดีเอ็นเอในกรณีที่ไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ทันที

2. การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอให้นำเลือดมาตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิเพื่อให้เลือดที่แข็งตัวละลาย แล้วดูด ตัวอย่างเลือด 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน eppendorf tube ใหม่ แล้วเติม lysis buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไป vortex หลังจากนั้นจึงนำไป incubate ที่ 55-60 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วเติม proteinase K (Fermentas) 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร vortex ให้เข้ากัน แล้ว incubate ที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จึงนำมาเติม phenol : chloroform : isoamyl (25:24:1) ปริมาตร 600 ไมโครลิตร vortex แล้ว centrifuge ที่ 1006 g นาน 10 นาที ดูดส่วนใส ด้านบนใส่หลอด eppendorf tube ใหม่ เติม 95% ethanol ที่เย็นจัดประมาณ 2 เท่าของส่วนใสที่ดูด มาได้ เอียงหลอดไปมาเบาๆ จะเห็นสายดีเอ็นเอ แล้วดูดของเหลวทิ้ง ล้างดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol 2 ครั้ง ทิ้งไว้ให้แห้ง เติม TE buffer 100 ไมโครลิตร แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 55-60 องศาเซลเซียส จนดีเอ็นเอละลาย เก็บดีเอ็นเอที่ได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Sambrook and Russell, 2001)

3. การตรวจปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอโดย agarose gel electrophoresis

การตรวจสอบความเข้มข้นของสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ ทำได้โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอ มาตรฐาน (DNA marker) ที่ทราบความเข้มข้นแล้ว ในการตรวจสอบใช้สารละลายดีเอ็นเอ 2 ไมโครลิตร ผสมกับ tracking dye 8 ไมโครลิตร ใช้ 0.8 agarose gel เป็นตัวกลางสำหรับแยกความเข้มข้นของดีเอ็นเอใน 0.5X TBE buffer ผ่านสนามไฟฟ้าขนาด 100 โวลต์นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำ เจลไปย้อมด้วยเอทิลเบรไมด์ (EtBr) ที่ละลายอยู่ในน้ำอัตราส่วน 10 กรัมต่อน้ำ 100 มิลลิลิตร

ตรวจดูแถบความเข้มข้นดีเอ็นเอในเจลภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง Gel Document แล้วถ่ายรูปเก็บไว้เพื่อประมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

4. การรวมดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอของไก่ 5 ครอบครัวที่สกัดได้จะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มภายในแต่ละครอบครัว คือ ดีเอ็นเอไก่เชิงดี และดีเอ็นเอไก่เชิงไม่ดี (ตารางที่ 3) ดีเอ็นเอไก่เชิงดีและไก่เชิงไม่ดีภายในครอบครัวเดียวกันจะถูกผสมรวมกันเพื่อนำไปใช้ทำบีเอสเอ โดยแบ่งกลุ่มไก่เชิงดีและเชิงไม่ดีโดยอาศัยตารางที่ 3 ในการรวมดีเอ็นเอ

ตารางที่ 3 ลักษณะชั้นนเชิงของไก่พื้นเมือง 34 ตัว จาก 5 ครอบครัว โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ต่อ 1 ครอบครัว

ครอบครัว	ลำดับ	เบอร์ขา/ปีก	เชิงชน	ตำแหน่ง
1	1	141704	เชิงบน เลี้ยว กัดป่าดี	ตัว ท้ายทอย
	2	137233	เชิงบน เลี้ยว ขี้	หน้า คอ หลัง
	3	144640	เชิงไม่ดี	-
	4	145060	เชิงไม่ดี	-
	5	144401	เชิงไม่ดี	-
	6	146947	เชิงไม่ดี	-
2	1	142462	เชิงล่าง พานขึ้นพานลง	ตัว ท้ายทอย
	2	141843	พานขึ้นพานลง ดีหน้าตรง	วงแดง หน้าคอ ตัว
	3	138540	เชิงบน กัดป่าดี	ตัว หลัง
	4	138883	เชิงบน กัดป่าดี	หน้า คอ ตัว สวาป
	5	145116	เชิงไม่ดี	-
	6	145118	เชิงไม่ดี	-
	7	145119	เชิงไม่ดี	-
	8	145239	เชิงไม่ดี	-
	9	145242	เชิงไม่ดี	-

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ครอบครัว	ลำดับ	เบอร์จำ/ปีก	เชิงชน	ตำแหน่ง
3	1	145424	เชิงบน ดีหน้าตรง เลี้ยว	วงแดง หน้า คอ ท้ายทอย
	2	141947	เชิงบน เลี้ยว มุคมัด เข้าปีก	วงแดง ข้อหัว
	3	144264	เชิงไม่ดี	-
	4	144269	เชิงไม่ดี	-
4	1	136403	เชิงบน กัดบ่าดี	ตัว
	2	136084	เชิงบน ดีหน้าตรง เลี้ยว	สามเหลี่ยม ตัว หลังคอ
	3	129965	เชิงบน กัดบ่าดี	ตัว ท้ายทอย
	4	136423	เชิงบน กัดบ่าดี	หน้า คอ ตัว ท้ายทอย
	5	143759	เชิงไม่ดี	-
	6	143764	เชิงไม่ดี	-
	7	144183	เชิงไม่ดี	-
	8	145261	เชิงไม่ดี	-
	9	145260	เชิงไม่ดี	-
5	1	143328	เชิงบน ดีหน้าตรง เลี้ยว	สามเหลี่ยม ตัว หลังคอ
	2	143475	เชิงบน ดีหน้าตรง เลี้ยว	หน้า คอ ตัว
	3	142850	เชิงบน กัดบ่าดี ดีหน้าตรง	หน้า คอ สามเหลี่ยม ตัว
	4	142866	เชิงบน ดีหน้าตรง เลี้ยว	ตัว หลัง
	5	144673	เชิงไม่ดี	-
	6	145386	เชิงไม่ดี	-

5. การวิเคราะห์เอเอฟแอลพี

นำดีเอ็นเอที่ต้องการตรวจสอบมาทำปฏิกิริยาตามขั้นตอนดังนี้

5.1 การเตรียม adapter

adapter เป็นสายดีเอ็นเอคู่สั้นๆ โดยในการสังเคราะห์จะสังเคราะห์เป็นสายเดี่ยวแต่ละสายก่อนแล้วจึงนำมา incubate รวมกันที่ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นเพื่อให้เกิดเป็นเกลียวคู่ โดยลำดับเบสของ adapter ที่ใช้เป็นดังนี้ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 adapter ที่ใช้ในการวิเคราะห์เอเอฟแอลพี

	ชื่อ	ลำดับเบส
<i>EcoRI</i> adaptor	<i>EcoRI</i> top strand	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
	<i>EcoRI</i> bottom strand	5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'
<i>MseI</i> adaptor	<i>MseI</i> top strand	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
	<i>MseI</i> bottom strand	5'-TACTCAGGACTCAT-3'
<i>TaqI</i> adaptor	<i>TaqI</i> top strand	5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'
	<i>TaqI</i> bottom strand	5'-CGCTCAGGACTCAT-3'

5.2 การนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะและการเชื่อมต่อดีเอ็นเอกับ adapter

ดีเอ็นเอที่สกัดได้นำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (*EcoRI*, *MseI* และ *TaqI*) ทำโดยใส่ดีเอ็นเอและสารละลายแต่ละชนิดใน eppendorf tube ดังตารางที่ 5 แล้วนำไป incubate ที่ 37 องศาเซลเซียสอีก 2 ชั่วโมง กรณีที่ใช้เอนไซม์ *TaqI* แทน *MseI* ให้เติมเอนไซม์ *TaqI* ก่อนแล้วนำไป incubate ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาทีแล้วจึงเติม *EcoRI*

ตารางที่ 5 ปริมาณและชนิดของสารที่ใช้ในการตัดดีเอ็นเอ

สารที่ใช้	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
สารละลายดีเอ็นเอ (100 ng/μl)	2.5
5X reaction buffer (Fermentas)	5.00
<i>EcoRI</i> (Fermentas) (10U/μl)	0.25
<i>MseI</i> (Fermentas) (5U/μl) (<i>TaqI</i> 5U/μl)	0.5
dH ₂ O	16.75
ปริมาตรรวม	25.00

นำดีเอ็นเอที่ตัดแล้วมาเชื่อมกับ adapter มาเติมสารต่างๆ ดังตารางที่ 6 แล้วนำไป incubate ไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ตารางที่ 6 ปริมาณและชนิดของสารที่ใช้ในการเชื่อมต่อกับ adapter

สารที่ใช้	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ	25
<i>EcoRI</i> adapter (5 pmole/μl)	1
<i>MseI</i> (<i>TaqI</i>) adapter (25 pmole/μl)	2
5X T4 ligase buffer (Fermentas)	10
T4 DNA ligase (Fermentas) (1U/μl)	1
dH ₂ O	11
ปริมาตรรวม	50

5.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยวิธี PCR

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอจะทำ 2 ชั้น คือ preselective amplification และ selective amplification

5.3.1 การทำ preselective amplification เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเฉพาะส่วนที่ต้องการทำโดยแบ่งดีเอ็นเอบางส่วนจากข้อ 4.2 มาทำปฏิกิริยา PCR I โดยใส่สารต่างๆ ดังตารางที่ 7 โดย primer ที่ใช้จะถูกเพิ่มเบสที่ปลาย 3' จำนวน 1 เบส ดังตารางที่ 8 แล้วนำมาทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณโดยโปรแกรมดังนี้

94 องศาเซลเซียส 30 วินาที

56 องศาเซลเซียส 60 วินาที

72 องศาเซลเซียส 60 วินาที

ทำตามโปรแกรมนี้ทั้งหมด 20 รอบ

ตารางที่ 7 ปริมาณและชนิดของสารที่ใช้ในการทำ preselective amplification

สารที่ใช้	ปริมาตร (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอที่เชื่อมกับ adapter	2.00
Primer <i>EcoRI</i> (5 pmole/ μ l)	1.00
Primer <i>MseI</i> (<i>TaqI</i>) (5 pmole/ μ l)	1.00
dNTP mix (Fermentas) (2mM)	2.50
10X PCR buffer (Fermentas)	2.50
MgCl ₂ (Fermentas) (50mM)	0.75
<i>Taq</i> polymerase (Fermentas) (5U/ μ l)	0.10
dH ₂ O	15.15
ปริมาตรรวม	25.00

ตารางที่ 8 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์เอเอฟแอลพีในขั้นตอน preselective amplification

	ชื่อ	ลำดับเบส
<i>EcoRI</i> preamplification primer	Pre- <i>EcoRI</i>	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
<i>MseI</i> preamplification primer	Pre- <i>MseI</i>	5'-GATGAGTCCTGAGTAAT-3'
<i>TaqI</i> preamplification primer	Pre- <i>TaqI</i>	5'-GATGAGTCCTGAGCGAC-3'

5.3.2 การทำ Selective amplification ให้แบ่งดีเอ็นเอจากข้อ 4.3.1 บางส่วนมาทำให้เจือจาง 20 เท่าด้วยสารละลาย TE สำหรับเป็นต้นแบบในการเพิ่มปริมาณขั้นที่ 2 ส่วนที่เหลือเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาทำปฏิกิริยา PCR II โดยใส่สารต่างๆ ดังตารางที่ 9 โดยไพรมเมอร์ที่ใช้จะถูกเพิ่มเบสที่ปลาย 3' จำนวน 3 เบสดังตารางที่ 10 แล้วนำมาทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณโดยโปรแกรม touch down

94 องศาเซลเซียส 30 วินาที

65 องศาเซลเซียส 30 วินาที

72 องศาเซลเซียส 60 วินาที

ทำปฏิกิริยา 1 รอบ แล้วลดอุณหภูมิในขั้น annealing ลงรอบละ 0.7 องศาเซลเซียส จำนวน 12 รอบ แล้วนำมาทำปฏิกิริยาต่อด้วย

94 องศาเซลเซียส 30 วินาที

56 องศาเซลเซียส 30 วินาที

72 องศาเซลเซียส 60 วินาที

ทำปฏิกิริยา 23 รอบ เมื่อจบปฏิกิริยาพีซีอาร์แล้ว นำมาเติม AFLP loading buffer 20 ไมโครลิตร นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วแช่ในน้ำแข็งทันทีพร้อมสำหรับทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

ตารางที่ 9 ปริมาณและชนิดของสารที่ใช้ในการทำ selective amplification

สารที่ใช้	ปริมาณ (ไมโครลิตร)
ดีเอ็นเอที่เจือจางแล้วจาก PCR I	5.0
Primer <i>EcoRI</i> (5 pmole/ μ l)	1.0
Primer <i>MseI</i> (<i>TaqI</i>) (5 pmole/ μ l)	1.0
dNTP mix (2mM)	2.0
10X PCR buffer	2.0
MgCl ₂ (50mM)	0.6
<i>Taq</i> polymerase (5U/ μ l)	0.1
dH ₂ O	8.3
ปริมาตรรวม	20.0

ตารางที่ 10 ไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์เอพแอลพีในขั้นตอน selective amplification

	ชื่อ	ลำดับเบส
<i>EcoRI</i> amplification primer	E-ATA	5'-GACTGCGTACCAATTCATA-3'
	E-AGC	5'-GACTGCGTACCAATTCAGC-3'
	E-AAG	5'-GACTGCGTACCAATTC AAG-3'
	E-ACA	5'-GACTGCGTACCAATTCACA-3'
<i>MseI</i> amplification primer	M-TCA	5'-GATGAGTCCTGAGTAATCA-3'
	M-TGC	5'-GATGAGTCCTGAGTAATGC-3'
	M-TAG	5'-GATGAGTCCTGAGTAATAG-3'
	M-TCG	5'-GATGAGTCCTGAGTAATCG-3'
<i>TaqI</i> amplification primer	T-CGA	5'-GATGAGTCCTGAGCGACGA-3'
	T-CTG	5'-GATGAGTCCTGAGCGACTG-3'

5.4 การแยกดีเอ็นเอ โดย denaturing polyacrylamide gel

การเตรียมกระจกสำหรับเทเจล

- 1) ล้างแผ่นกระจกสำหรับเทเจลให้สะอาด แล้วเช็ดด้วยเอทานอล 95% ให้สะอาด ทั้งกระจกและ chamber
- 2) เช็ดกระจกด้วย bind silane เพื่อให้เจลเกาะติดกับกระจก
- 3) เช็ด chamber ด้วย repel silane เพื่อป้องกันไม่ให้เจลเกาะติดกับกระจก ปล่อยให้แห้งประมาณ 5-10 นาที
- 4) ประกอบกระจกและ chamber เข้าชุดกัน โดยวาง spacer ไว้ทั้งสองข้างเพื่อให้เกิดช่องว่างระหว่างกระจกทั้งสอง
- 5) เตรียมโพลิอะครีลาไมด์เจลเข้มข้น 4.5 % โดยผสม 30% acrylamid gel (Bio-Rad) 9 มิลลิลิตร 5X TBE 12 มิลลิลิตร และยูเรีย 27 กรัมในบีกเกอร์เขย่าเบาๆ ในน้ำอุ่นจนยูเรียละลายหมด รอจนอุณหภูมิตกลง แล้วจึงเติมสารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (promega) เข้มข้น 10% 1 มิลลิลิตร และ TEMED (Bio Basic. INC)60 ไมโครลิตร ผสมในขวดสำหรับเทเจลให้เข้ากัน ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ
- 6) เทเจลใส่ลงในช่องระหว่างกระจกจนเต็ม ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ แล้วใส่หวีเข้าด้านบน ปล่อยให้เจลแข็งตัวประมาณ 2 ชั่วโมง

การทำอิเล็กโทรโฟรีซิส

- 1) เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้วใช้น้ำล้างกระจกด้านนอกให้สะอาด ดึงหวีออก และประกอบกระจกเข้ากับเครื่องอิเล็กโทรโฟรีซิส และเติมบัฟเฟอร์ 1X TBE ลงในช่องด้านบนและด้านล่าง ระวังอย่าให้มีฟองอากาศอยู่ใต้กระจก

2) ต่อสายไฟเข้ากับเครื่องอิเล็กทรอนิกส์ โพรไฟรีซิส เปิดกระแสไฟฟ้าทำ pre-run ที่กำลังไฟฟ้า 100 วัตต์ เป็นเวลา 30 นาที

3) ปิดเครื่องใช้เข็มฉีดยาคูคัพเฟอร์มาล้างผิวหน้าของเจล ใส่หัวแบบพันฉลาม โดยให้หัวด้านที่เป็นฟันลงไปสัมผัสกับผิวหน้าเจลเพียงเล็กน้อย และใช้เข็มฉีดยาคูคัพเฟอร์ล้างยูเรียที่ช่องหัวแต่ละช่องออกให้หมด

4) หยอดตัวอย่างดีเอ็นเอจากการทำ selective amplification ที่เติม AFLP loading buffer ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม จากนั้นเปิดเครื่องอิเล็กทรอนิกส์ โดยใช้กำลังไฟฟ้า 60 วัตต์ เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมงจนกว่าสี xylene cyanol (สีที่อยู่ด้านบน) เคลื่อนที่ลงมาประมาณ 2 ใน 3 ส่วนของเจล

5) ปิดเครื่อง เทบัฟเฟอร์จากช่องด้านบนออก นำกระจกออกจากเครื่อง แยกกระจกออกจาก chamber นำเจลไปย้อมสีด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท

การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอด้วยสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท

1) เขย่ากระจกเจลเบาๆ ในสารละลายกรดอะซิติกเข้มข้น 10% เป็นเวลา 30 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที บนเครื่องเขย่า

2) ล้างในน้ำกลั่น 30 นาที เปลี่ยนน้ำล้างใหม่และล้างต่ออีก 5 นาที

3) ย้อมเจลด้วยการนำกระจกเจลแช่ในสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท เป็นเวลา 30 นาที กรณีที่ใช้ซิลเวอร์ไนเตรทซ้ำอาจเพิ่มเวลาได้จนถึง 1 ชั่วโมง เขย่าอย่างสม่ำเสมอตลอดเวลา ถ้าที่ใช้ย้อมซิลเวอร์ไม่ควรใช้กรดเดียวกับที่แช่สารละลายกรดอะซิติก เพราะอาจมีการปนเปื้อนของกรดอะซิติก ทำให้ย้อมได้ไม่ดี

4) ล้างแผ่นกระจกเจลด้วยน้ำ deionized เพื่อล้างซิลเวอร์ไนเตรทส่วนเกินออก

5) แชนแผ่นกระจกเจลในสารละลาย developer ที่เตรียมใหม่และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสเยื่ออย่างสม่ำเสมอจนมองเห็นแถบดีเอ็นเอ

6) หยดปฏิกิริยาโดยนำแผ่นกระจกเจลใส่ในสารละลายกรดอะซิติก 10% เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ deionized 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ผึ่งให้แห้ง

5.5 การอ่านผลจากการวิเคราะห์เอเอฟแอลพี ตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไก่พื้นเมือง ทั้ง 34 ตัว 5 ครอบครัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มต่อ 1 ครอบครัว เปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอโดยให้แถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเป็น 1 และแถบดีเอ็นเอที่ไม่ปรากฏเป็น 0 แล้วนำข้อมูลมาเปรียบเทียบหาแถบดีเอ็นเอที่น่าจะเกี่ยวข้องกับลักษณะเชิงการต่อสู้ทั้งภายในครอบครัวและต่างครอบครัวภายใต้คู่มือเปรียบเทียบ

ผลและวิจารณ์

ผล

1. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ต่างๆ

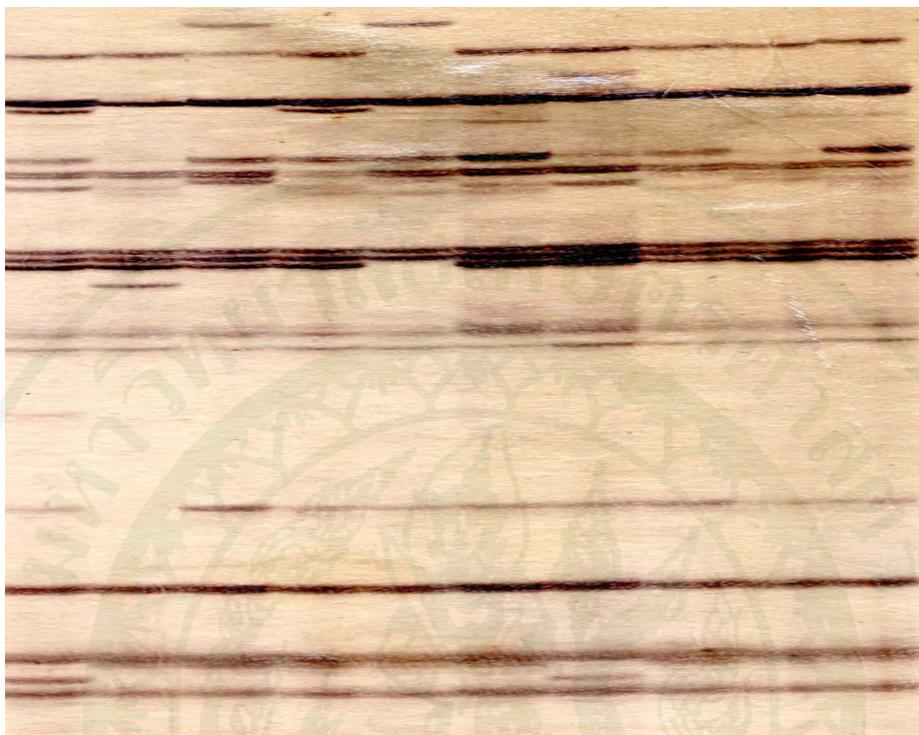
การนับจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดจากไก่พื้นเมืองทั้ง 5 ครอบครัวยังได้จากไพรเมอร์ *EcoRI/MseI* combination พบว่า คู่ไพรเมอร์ E-ATA/M-TCA ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 13-18 แถบ คู่ไพรเมอร์ E-ATA/M-TGC ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 11-17 แถบ คู่ไพรเมอร์ E-ATA/M-TAG ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 11-19 แถบ คู่ไพรเมอร์ E-ATA/M-TCG ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 10-17 แถบ คู่ไพรเมอร์ E-AGC/M-TCA ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 10-16 แถบ คู่ไพรเมอร์ E-AGC/M-TGC ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 11-16 แถบ คู่ไพรเมอร์ E-AGC/M-TAG ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 11-19 แถบ คู่ไพรเมอร์ E-AGC/M-TCG ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 12-18 แถบ คู่ไพรเมอร์ E-AAG/M-TCA ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 11-18 แถบ คู่ไพรเมอร์ E-AAG/M-TGC ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 13-18 แถบ คู่ไพรเมอร์ E-AAG/M-TAG ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 13-19 แถบ คู่ไพรเมอร์ E-AAG/M-TCG ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 10-18 แถบ คู่ไพรเมอร์ E-ACA/M-TCA ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 13-19 แถบ คู่ไพรเมอร์ E-ACA/M-TGC ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 11-17 แถบ คู่ไพรเมอร์ E-ACA/M-TAG ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 12-19 แถบ คู่ไพรเมอร์ E-ACA/M-TCG ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 12-18 แถบ (ตารางที่ 11) โดยคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนของแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยมากที่สุดคือ E-ACA/M-TCA และคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนของแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยน้อยที่สุดคือ E-AGC/M-TCA ที่ให้แถบดีเอ็นเอระหว่าง 13-19 และ 10-16 แถบตามลำดับ

ตารางที่ 11 จำนวนแถบดีเอ็นเอของดีเอ็นเอไก่อ่ 2 กลุ่มจาก 5 ครอบครั้ว ที่ได้จากไพรมเมอร์

EcoRI/MseI combination

คู่ไพรมเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด									
	ครอบครั้วที่ 1		ครอบครั้วที่ 2		ครอบครั้วที่ 3		ครอบครั้วที่ 4		ครอบครั้วที่ 5	
	F	N	F	N	F	N	F	N	F	N
E-ATA/M-TCA	18	14	15	16	14	16	16	14	13	14
E-ATA/M-TGC	13	16	11	13	16	16	14	17	12	16
E-ATA/M-TAG	14	13	18	16	15	19	12	15	11	14
E-ATA/M-TCG	10	15	13	15	13	14	16	14	14	17
E-AGC/M-TCA	10	13	14	15	12	16	12	13	16	13
E-AGC/M-TGC	13	16	16	12	11	15	16	14	15	16
E-AGC/M-TAG	11	15	15	14	19	17	13	14	13	13
E-AGC/M-TCG	15	18	17	16	13	12	14	16	13	17
E-AAG/M-TCA	16	17	16	13	11	15	12	11	15	18
E-AAG/M-TGC	15	14	13	15	18	14	15	17	14	15
E-AAG/M-TAG	12	14	14	16	12	13	16	16	19	15
E-AAG/M-TCG	10	13	16	13	14	15	14	11	13	18
E-ACA/M-TCA	13	15	13	15	15	13	17	19	15	17
E-ACA/M-TGC	11	15	12	14	17	14	12	16	17	12
E-ACA/M-TAG	13	12	17	15	15	18	14	19	13	15
E-ACA/M-TCG	16	16	13	17	13	15	12	18	16	14

ครอบครั้วที่ 1 ครอบครั้วที่ 2 ครอบครั้วที่ 3 ครอบครั้วที่ 4 ครอบครั้วที่ 5
 F N F N F N F N F N



ภาพที่ 1 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดตั้งแต่ครอบครั้วที่ 1-5 ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-ATA/M-TCA (F = เชิงดี N = เชิงไม่ดี)

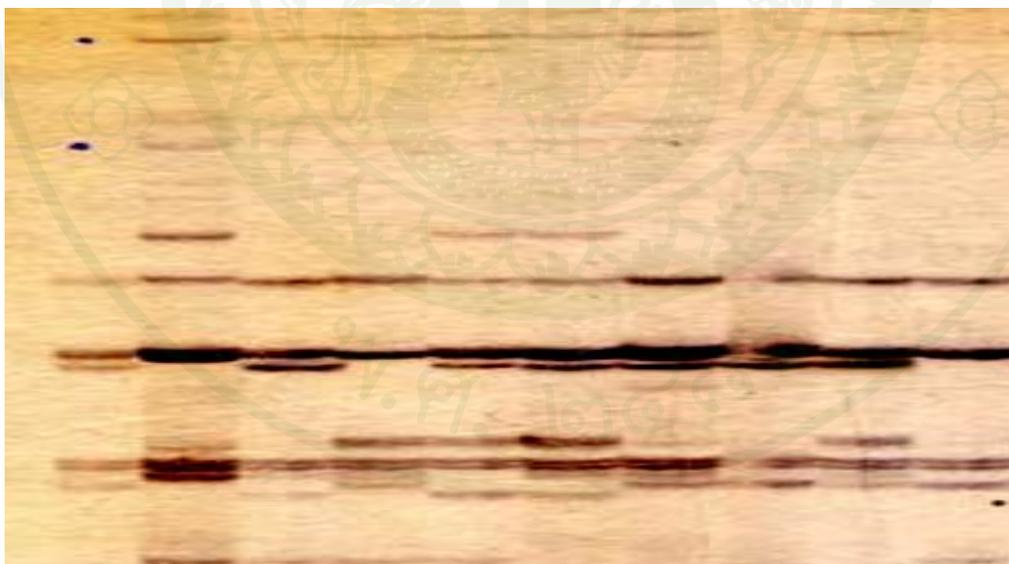
การนับจำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดจากทั้ง 5 ครอบครั้วที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ *EcoRI/TaqI* combination พบว่า คู่ไพรเมอร์ E-ATA/T-CGA ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 7-14 แถบ คู่ไพรเมอร์ E-ATA/T-CTG ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 6-13 แถบ คู่ไพรเมอร์ E-AGC/T-CGA ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 7-14 แถบ คู่ไพรเมอร์ E-AGC/T-CTG ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 5-13 แถบ คู่ไพรเมอร์ E-AAG/T-CGA ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 6-14 แถบ คู่ไพรเมอร์ E-AAG/T-CTG ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 6-13 แถบ คู่ไพรเมอร์ E-ACA/T-CGA ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 8-14 แถบ คู่ไพรเมอร์ E-ACA/T-CTG ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 8-13 แถบ (ตารางที่ 12) โดยคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยมากที่สุดคือ E-ACA/T-CGA และคู่ไพรเมอร์ที่ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอเฉลี่ยน้อยที่สุดคือ E-AGC/T-CTG

ตารางที่ 12 จำนวนแถบดีเอ็นเอของดีเอ็นเอไก่อ 2 กลุ่มจาก 5 ครอบครั้ว ที่ได้จากไพรเมอร์

EcoRI/TaqI combination

คู่ไพรเมอร์	จำนวนแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมด									
	ครอบครั้วที่ 1		ครอบครั้วที่ 2		ครอบครั้วที่ 3		ครอบครั้วที่ 4		ครอบครั้วที่ 5	
	F	N	F	N	F	N	F	N	F	N
E-ATA/T-CGA	11	14	8	7	9	12	10	5	10	6
E-ATA/T-CTG	6	13	9	10	11	10	13	6	9	6
E-AGC/T-CGA	10	14	12	10	10	7	10	9	11	11
E-AGC/T-CTG	8	10	10	13	10	6	9	13	5	7
E-AAG/T-CGA	7	7	10	11	14	6	12	14	10	12
E-AAG/T-CTG	13	9	11	7	6	7	13	10	13	6
E-ACA/T-CGA	14	12	11	9	8	11	14	11	10	12
E-ACA/T-CTG	9	11	8	12	12	13	13	9	9	8

ครอบครั้วที่ 1 ครอบครั้วที่ 2 ครอบครั้วที่ 3 ครอบครั้วที่ 4 ครอบครั้วที่ 5
 F N F N F N F N F N



ภาพที่ 2 แสดงแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นทั้งหมดตั้งแต่ครอบครั้วที่ 1-5 ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-ATA/T-CTG (F = เจริญดี N = เจริญไม่ดี)

2. จำนวน โพลีเมอร์ฟิซิม

จำนวนคู่ไพรเมอร์ทั้งหมด 24 คู่ ซึ่งเป็น *EcoRI/MseI* 16 คู่ พบว่าให้จำนวนโพลีเมอร์ฟิซิมระหว่าง 8-15 แถบ (ตารางที่ 13) โดยคู่ไพรเมอร์ที่ให้โพลีเมอร์ฟิซิมมากที่สุดคือ E-ACA/M-TAG และคู่ไพรเมอร์ที่ให้โพลีเมอร์ฟิซิมน้อยที่สุดคือ E-ATA/M-TAG และ E-ACA/M-TCA ส่วน *EcoRI/TaqI* จะให้จำนวนโพลีเมอร์ฟิซิมระหว่าง 9-16 แถบ (ตารางที่ 14) โดยคู่ไพรเมอร์ที่ให้โพลีเมอร์ฟิซิมมากที่สุดคือ E-AGC/T-CGA และคู่ไพรเมอร์ที่ให้โพลีเมอร์ฟิซิมน้อยที่สุดคือ E-AGC/T-CTG

ตารางที่ 13 จำนวนโพลีเมอร์ฟิซิมของดีเอ็นเอไก่อ่ 2 กลุ่มจาก 5 ครอบครั้ว ที่ได้จาก *EcoRI/MseI* combination

คู่ไพรเมอร์	จำนวนโพลีเมอร์ฟิซิม
ATA/TCA	14
ATA/TGC	11
ATA/TAG	8
ATA/TCG	12
AGC/TCA	12
AGC/TGC	10
AGC/TAG	9
AGC/TCG	11
AAG/TCA	10
AAG/TGC	14
AAG/TAG	13
AAG/TCG	12
ACA/TCA	8
ACA/TGC	12
ACA/TAG	15
ACA/TCG	10

ตารางที่ 14 จำนวนโพลีเมอร์ฟิซิมของดีเอ็นเอไก่อ่ 2 กลุ่มจาก 5 ครอบครั้ว ที่ได้จาก *EcoRI/TaqI* combination

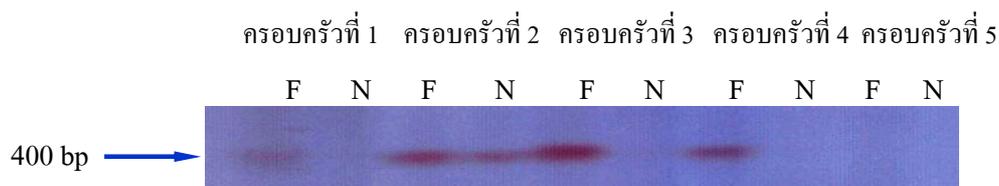
คู่ไพรเมอร์	จำนวนโพลีเมอร์ฟิซิม
ATA/CGA	13
ATA/CTG	14
AGC/CGA	16
AGC/CTG	9
AAG/CGA	10
AAG/CTG	12
ACA/CGA	11
ACA/CTG	13

3. แถบดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับเชิงการต่อสู

เมื่อนำแถบดีเอ็นเอที่เป็นโพลีเมอร์ฟิซิมทั้งหมดมาเปรียบเทียบกับครอบครั้วอื่นๆ ภายใน combination เดียวกันแล้วพบว่า คู่ไพรเมอร์ที่ให้แถบดีเอ็นเอที่อาจจะสัมพันธ์กับลักษณะเชิงการต่อสู ในไก่อ่พื้นเมืองมีเพียง 2 แถบดีเอ็นเอ คือ แถบดีเอ็นเอที่ได้จาก คู่ไพรเมอร์ E-ATA/T-CTG ที่มีขนาด 290 bp (ภาพที่ 3) และคู่ไพรเมอร์ E-ACA/T-CGA ที่มีขนาด 400 bp (ภาพที่ 4) โดยทั้ง 2 แถบที่ได้เกิดจากคู่ไพรเมอร์ของ *EcoRI/TaqI* combination สำหรับ *EcoRI/MseI* combination ไม่มีไพรเมอร์คู่ใดเลยที่ให้แถบดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะเชิงการต่อสู



ภาพที่ 3 แสดงแถบดีเอ็นเอที่อาจจะสัมพันธ์กับลักษณะเชิงการต่อสูในไก่อ่พื้นเมืองที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-ATA/T-CTG (F = เชิงดี N = เชิงไม่ดี)



ภาพที่ 4 แสดงแถบดีเอ็นเอที่อาจจะสัมพันธ์กับลักษณะเชิงการต่อสู้ในไก่พื้นเมืองที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-ACA/T-CGA (F = เชิงดี N = เชิงไม่ดี)

วิจารณ์

การใช้คู่ไพรเมอร์ *EcoRI/MseI* 16 combination พบว่า 16 คู่ไพรเมอร์ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 10-19 แถบ คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 14.6 แถบ (ตารางที่ 11) ในขณะที่ Murtaza (2006) ที่ใช้คู่เอนไซม์ *EcoRI/MseI* ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของฝ้าย พบว่าได้แถบดีเอ็นเอ 40-80 แถบ โดยมีขนาดตั้งแต่ 50-500 bp และ Portier *et al.* (2006) ใช้คู่เอนไซม์ *EcoRI/MseI* ในการจำแนกสายพันธุ์ *Agrobacterium* พบว่าคู่ *EcoRI/MseI* combination ให้แถบดีเอ็นเอตั้งแต่ 45-76 แถบ อย่างไรก็ตามผลการศึกษาในการตรวจหาแถบดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะเชิงการต่อสู้ในไก่พื้นเมืองนี้สอดคล้องกับ Fumiere *et al.* (2003) และ Ajmone-Marsan *et al.* (1997) ที่กล่าวว่า คู่ไพรเมอร์ *EcoRI/MseI* เหมาะสำหรับนำมาใช้กับพืชมากกว่าสัตว์

การใช้คู่ไพรเมอร์ *EcoRI/TaqI* 8 combination พบว่า 8 คู่ไพรเมอร์ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 5-14 แถบ คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.925 แถบ (ตารางที่ 12) ในขณะที่ Loh *et al.* (1999) ใช้ combination ของ *EcoRI/TaqI* ศึกษาใน *Caladium bicolor* พบว่าแต่ละคู่ primer combination ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอสูงถึง 110 แถบ เนื่องจากอาจมีบริเวณที่เป็น CpG มากทำให้เกิดการตัดได้แถบดีเอ็นเอเป็นจำนวนมาก อย่างไรก็ตาม Razzoli *et al.* (2003) กล่าวว่า *EcoRI/TaqI* เป็นคู่ไพรเมอร์ที่เหมาะสมกับสัตว์มีกระดูกสันหลังมากที่สุด โดยจากการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของหนู Gerbil (*Meriones unguiculatus*) พบว่าคู่ไพรเมอร์ *EcoRI/TaqI* ให้จำนวนแถบดีเอ็นเออยู่ในช่วง 24-50 แถบ ซึ่งสอดคล้องกับ Foulley *et al.* (2006) ที่กล่าวเช่นเดียวกันว่า *EcoRI/TaqI* combination เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของสัตว์มีกระดูกสันหลัง และเช่นเดียวกับการศึกษาของ Cameron *et al.* (2003) ที่พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ได้จากไพรเมอร์ของ *EcoRI/TaqI* เหมาะสำหรับนำมาใช้แยกความแตกต่างของสายพันธุ์สุกร นอกจากนี้ Herberge *et al.* (1999) ยังได้รายงานว่าการวิเคราะห์ดีเอ็นเอของไก่คู่เอนไซม์ที่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้คือ *EcoRI/TaqI* ซึ่งจะให้ผล

ของแถบดีเอ็นเอที่วิเคราะห์ผลได้ง่ายกว่าเมื่อนำไปแยกขนาดบน polyacrylamid gel และการใช้ *TaqI* แทน *MseI* โดยทั่วไปจะให้ผลที่ดีกว่าเพราะจีโนมของไก่มี CpG dinucleotides ต่ำ และเนื่องจากตำแหน่งจดจำของ *TaqI* คือ 5'-TCGA-3' ดังนั้นการตัดด้วยเอนไซม์ *TaqI* จึงไม่ให้ชิ้นดีเอ็นเอมาจนเกินไป ส่วน *MseI* นั้นมีตำแหน่งจดจำคือ 5'-TTAA-3' ซึ่งสิ่งมีชีวิตชั้นสูงมักจะมี AT มาก ดังนั้น *MseI* จึงตัดได้มากทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอมาก จึงทำให้วิเคราะห์ผลได้ยากกว่า

เมื่อพิจารณาเฉพาะในส่วนของโพลีมอร์ฟิซึม พบว่าคู่ไพรเมอร์ *EcoRI/MseI* ให้ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 11.31 แถบ ในขณะที่คู่ไพรเมอร์ *EcoRI/TaqI* ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 12.25 แถบ ซึ่งเป็นค่าเฉลี่ยที่มากกว่า Razzoli *et al.* (2003) ศึกษาในหนู *Gerbil* ที่คู่ไพรเมอร์ *EcoRI/TaqI* ให้ค่าเฉลี่ยของโพลีมอร์ฟิซึมเท่ากับ 7.5 แถบ จากทั้งหมด 45 คู่ไพรเมอร์ แต่การศึกษานี้ใช้เพียง 8 คู่ไพรเมอร์ ซึ่งเป็นภาพสะท้อนถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองมากกว่าในหนู *Gerbil*

การทำเอพแอลพีเพื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอของเชิงการต่อสู้ในไก่พื้นเมืองกลุ่มเชิงดีและเชิงไม่ดี พบว่า *EcoRI/MseI* combination ไม่ให้แถบดีเอ็นเอใดๆ ที่แสดงถึงความสัมพันธ์กับลักษณะเชิงการต่อสู้ ส่วน *EcoRI/TaqI* combination ให้แถบดีเอ็นเอ 2 แถบที่จะแสดงถึงความสัมพันธ์กับลักษณะเชิงการต่อสู้ในไก่พื้นเมือง (ภาพที่ 3 และ 4) โดยจะพบแถบดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-ATA/T-CTG เกิดขึ้นกับไก่เชิงดี ในทุกครอบครัว ถึงแม้จะพบแถบดีเอ็นเอในไก่เชิงดีในครอบครัวที่ 3 และ 4 และที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-ACA/T-CGA จะพบแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้นกับไก่เชิงไม่ดี ในทุกครอบครัว และถึงแม้ว่าจะพบแถบดีเอ็นเอในไก่เชิงไม่ดีในครอบครัวที่ 2 ซึ่งในกรณีของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-ATA/T-CTG ที่ปรากฏในไก่เชิงไม่ดีครอบครัวที่ 3 และ 4 และแถบดีเอ็นเอที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ E-ACA/T-CGA ที่ปรากฏในไก่เชิงไม่ดีในครอบครัวที่ 2 อาจเป็นความผิดพลาดในการคัดไก่เลือกที่มีผลต่อการรวมดีเอ็นเอเข้าด้วยกัน อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้พบว่าคู่ไพรเมอร์ *EcoRI/TaqI* นั้นเหมาะกับการนำมาใช้ศึกษาในสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น ไก่ มากกว่าคู่ไพรเมอร์ *EcoRI/MseI*

ปัจจัยที่ส่งผลให้เกิดแถบดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะเชิงการต่อสู้ในไก่พื้นเมืองน้อยได้แก่

1. ลำดับเบสที่มีความเหมือนกันมาก โดยถ้ลำดับเบสของสิ่งมีชีวิตที่ใช้ในการทดลองเหมือนกันมากจะทำให้ได้แถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันน้อย โดยในการทดลองนี้เป็นการนำไก่ที่เป็น half-sib มาใช้ในการทดลอง

2. จำนวนคู่ไพรเมอร์น้อย อาจกล่าวได้ว่ายิ่งลำดับเบสมีความเหมือนกันมาก จำนวนของ คู่ไพรเมอร์ยิ่งต้องใช้จำนวนมากขึ้นด้วย เพราะขั้นตอนของการทำเอเอฟแอลพีเอ็นนั้นจะใช้การเพิ่ม ซีนติเอ็นเอ 2 ขั้นตอน คือ preselective amplification หรือ PCR I และ selective amplification หรือ PCR II ซึ่งกระบวนการในการเพิ่มซีนติเอ็นเอเป้าหมายทั้ง 2 ขั้นตอนนี้จะต้องใช้ไพรเมอร์ที่จะถูก เพิ่มเบสที่ปลาย 3' ซึ่งถึงแม้ว่าในธรรมชาติจะมีเบสอยู่เพียง 4 ชนิด คือ A, T, C และ G แต่ถ้า การเลือกเบสไม่สัมพันธ์กับซีนติเอ็นเอเป้าหมายทั้งใน PCR I และ PCR II แถบซีนติเอ็นเอหรือ ซีนติเอ็นเอเป้าหมายก็จะไม่ปรากฏขึ้นเช่นเดียวกับ Razzoli *et al.* (2003) ที่กล่าวว่าจำนวนของ แถบซีนติเอ็นเอที่ได้ขึ้นอยู่กับคู่ของไพรเมอร์ที่ใช้ในการศึกษา

3. การเกิดมิวเทชันที่ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะ Chaisalee *et al.* (2005) รายงาน ว่ามีความเป็นไปได้ที่ความแตกต่างของแถบซีนติเอ็นอนั้นมาจากการเกิดมิวเทชันที่ตำแหน่งจดจำของ เอนไซม์ตัดจำเพาะ ดังนั้นถ้าไม่เกิดมิวเทชันในการทดลองที่ใช้สิ่งมีชีวิตที่มีความเหมือนกันมาก จำนวนแถบซีนติเอ็นเอที่แตกต่างก็จะน้อยหรือ ไม่เกิดเลย เช่นเดียวกับที่ Money *et al.* (1996) ได้ รายงานว่าลำดับเบสของยีนที่เหมือนกันเกิดความแตกต่างกันเช่นที่ตำแหน่งเอนไซม์ตัดจำเพาะ ก็จะทำให้ได้ AFLP fingerprint ที่ง่ายต่อการแยกความแตกต่างและสามารถสร้างแผนที่ของยีนได้

4. ลักษณะเชิงการต่อสู้ของไก่เป็นลักษณะที่ต้องการผู้คัดเลือกที่มีความชำนาญ และ ประสิทธิภาพสูง การคัดเลือกที่ไม่แม่นยำอาจทำให้ไก่ที่ใช้ในการทดลองไม่ได้เป็นตัวแทนที่ดีของ ไก่ที่มีชั้นเชิงและไม่มีชั้นเชิง

การศึกษานี้ได้แถบซีนติเอ็นเอที่อาจจะสัมพันธ์กับลักษณะเชิงการต่อสู้ในไก่พื้นเมืองเพียงแค่ 2 แถบ เท่านั้น แต่จากการศึกษาบอกได้ว่าเทคนิคเอเอฟแอลพีเอ็นสามารถที่จะนำมาใช้เพื่อช่วยค้นหา marker ในไก่พื้นเมืองได้และแถบซีนติเอ็นเอที่ได้จำนวน 2 แถบนี้ก็อาจจะนำไปใช้สำหรับช่วยในการ คัดเลือกไก่ที่มีชั้นเชิงได้ ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. เทคนิคเอเอฟแอลพีสามารถสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอของไก่พื้นเมืองที่นำมาทดสอบได้จากการใช้คู่ไพรเมอร์ของ *EcoRI/MseI* 16 combination พบว่า ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 10-19 แถบ คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 14.6 แถบ คู่ไพรเมอร์ *EcoRI/TaqI* combination ให้จำนวนแถบดีเอ็นเอระหว่าง 5-14 แถบ คิดเป็นค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.925 แถบ

2. *EcoRI/MseI* 16 คู่ไพรเมอร์ให้โพลิมอร์ฟิซึมระหว่าง 8-15 แถบ ในขณะที่คู่ไพรเมอร์ *EcoRI/TaqI* จะให้โพลิมอร์ฟิซึมระหว่าง 9-16 แถบ

3. มี 2 แถบดีเอ็นเอที่แสดงถึงความสัมพันธ์กับลักษณะเชิงการต่อสู้ ซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่ได้จาก คู่ไพรเมอร์ E-ATA/T-CTG และ E-ACA/T-CGA โดย E-ATA/T-CTG ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 290 bp ส่วน E-ACA/T-CGA ให้แถบดีเอ็นเอที่มีขนาด 400 bp โดยทั้ง 2 แถบที่ได้ เกิดจากคู่ไพรเมอร์ของ *EcoRI/TaqI* combination สำหรับ *EcoRI/MseI* combination ไม่มีไพรเมอร์คู่ใดเลยที่ให้แถบดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะเชิงการต่อสู้

ข้อเสนอแนะ

เพื่อให้ได้ผลการศึกษาที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น จำนวน combination ของคู่ไพรเมอร์ที่เพิ่มขึ้นมีความจำเป็นต่อการศึกษาในสิ่งมีชีวิตที่มีลำดับเบสใกล้เคียงกัน เพื่อเพิ่มความละเอียด ความถูกต้อง และความชัดเจนของข้อมูล

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กรมปศุสัตว์. ม.ป.ป. แหล่งที่มา: <http://www.tkc.go.th/pageconfig/viewcontent/viewcontent1.asp?pageid=152&directory=1159&contents=1942>, 10 มิถุนายน 2552.

วิเชียร สันตศิรี. 2542. การเลี้ยงไก่ชน. สำนักพิมพ์เพื่อนเกษตร, กรุงเทพฯ.

สจี กัณหาเรียง. 2543. การศึกษาหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการฟักไข่ในไก่ลูกผสมรุ่นแบครอส (BACKCROSS) ของไก่พันธุ์พื้นเมืองกับไก่ไข่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2545. จีโนมและเครื่องหมายดีเอ็นเอ: ปฏิบัติการอาร์เอพีดีและเอเอฟแอลพี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อรรถัน มงคลพร. 2548. เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. สำนักพิมพ์จรัสนิทวงศ์การพิมพ์, กรุงเทพฯ. 95 น.

อัญชญา รอดรัมย์. 2549. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของถั่วหรั่ง (*Vigna subterranean* (L.) Verdc.) โดยใช้เทคนิค AFLP และลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางประการ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Ajmone-Marsan, P., G. Vecchilttoi-Antaldi, G. Bertoni, A. Valentini, M. Cassandro and M. Kuiper. 1997. AFLP markers for DNA fingerprinting in cattle. **Animal Genetics** 28: 418-426.

Altinkut, A., K. Kazan and N. Gozukirmizi. 2003. AFLP marker linked to water-stress-tolerant bulks in Barley. **Genetics and Molecular Biology** 26: 77-82.

Anna-Karin, F., C. Hans, G.C. Neal, A.J. Nancy, L. Hsiao-Ching, R. Terje, W. Trevor, C.

- Bhanu, H. Joy and E. Hans. 1998. Evolution of the avian sex chromosomes from an ancestral pair of autosomes. **Proceedings of The National Academy of Sciences** 95: 8147-8152.
- Babak, E., and R.M. Ghodrat. 2009. Genomic growth hormone, growth hormone receptor and transforming growth factor β -3 gene polymorphism in breeder hens of Mazandaran native fowls. **African Journal of Biotechnology** 8: 3154-3159.
- Bahy, A.A., M.M.A. Mohamed and M.A. Osama. 2003. Relationship between genetic similarity and some productive traits in local chicken strains. **African Journal of Biotechnology** 2: 46-47.
- Cameron, N.D., M.J.T. Van Eijk, B. Brugmans and J. Peleman. 2003. Discrimination between selected lines of pigs using AFLP® markers. **Heredity** 91: 494-501.
- Chaisalee, B., S. Sraphet, S. Panyim and K. Triwitayakorn. 2005. Conversion of AFLP markers for growth trait of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) to scar markers. **31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of technology.**
- Chatterjee, R.N., R.P. Sherma, B.L.N. Reddy, M. Niranjana, Shivaprasad and S.K. Mishra. 2007. Genetic analysis of highly inbred chicken using RAPD-PCR and Immunocompetence. **International Journal of Poultry Science** 6: 967-972.
- De Marchi, M., C. Dalvit, C. Targhetta and M. Cassandro. 2006. Assessing genetic diversity in indigenous Veneto chicken breeds using AFLP markers. **Animal Genetics** 37: 101-105.

- Foulley, J.L., M.G.M. Van Schriek, L. Alderson, Y. Amigues, M. Bagga, M.Y. Boscher, B. Brugmans, R. Cardellino, R. Davoli, J.V. Delgado, E. Fimland, G.C. Gandini, P. Glodek, M.A.M. Groenen, K. Hammond, B. Harlizius, H. Heuven, R. Joosten, A.M. Martinez, D. Matassino, J.N. Meyer, J. Peleman, A.M. Ramos, A.P. Rattink, V. Russo, K.W. Siggens, J.L. Vega-Pla and L. Ollivier. 2006 Genetic diversity analysis using lowly polymorphic dominant markers: the example of AFLP in pigs. **Journal of Heredity** 97: 244-252.
- Fumiere, O., M. Dubois, D. Gregoire, A. Thewis and G. Berben. 2003. Identification on Commercialized Products of AFLP Markers Able to Discriminate Slow-from Fast-Growing Chicken Strains. **Agricultural and Food Chemistry** 51: 1115-1119.
- Gokben, O., H.B. Ertas, A. Muz. 2003. Restriction fragment length polymorphism analysis of isolates of infectious bursal disease viruses from turkey. **Veterinary Medicine** 48: 359-362.
- Goto, R.M., M. Afanassieff, J. Ha, G.M. Iglesias, S.J. Ewald, W.E. Briles and M.M. Miller. 2002. Single-strand conformation polymorphism (SSCP) assays for major histocompatibility complex B genotyping in chickens. **Poultry Science** 81: 1832-1841.
- Gzyl, A., E. Augustynowicz, E. Mosiej, M. Zawadka, G. Gniadek, A. Nowaczek and J. Slusarczyk. 2005. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) versus randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) as new tools for inter- and intra- species differentiation within *Bordetella*. **Journal of Medical Microbiology** 54: 333-346.
- Hassan, H.M. and H.C. Guo. 2007. Association of polymorphisms in avian apoVLDL-II gene with body weight and abdominal fat weight. **African Journal of Biotechnology** 6: 2009-2013.

- Hassan, H.M., H.C. Guo, A.H. Suleiman and D.M. Mekki. 2007. PCR-SSCP analysis of avian lipoprotein lipase gene (intron 8) and its relation with body weight and abdominal fat. **Research Journal of biological Sciences** 2: 91-95.
- Hassan, H.M., H.C. Guo, H.C. Jin, B.B. Wen and H.S. Adam. 2009. Single strand conformation polymorphism in intron I of the chicken apo VLDL-II gene, and its relationship with triglyceride and very low density lipoprotein concentrations. **Turkey Journal Veterinary Animal Science** 33: 253-255.
- Herbergs, J., M. Siwek, R.P.M.A. Crooijmans, J.J. Van der Poel and M.A.M. Groenen. 1999. Multicolour fluorescent detection and mapping of AFLP markers in chicken (*Gallus domesticus*). **Animal Genetics** 30: 274-285.
- Jaroslawa, O.V., K. Magdalena, S. Mariusz, G.C. Ross, B. Kinga, P. Rafal and J. Kazimierz. 2007. A search for sequence similarity between chicken (*Gallus domesticus*) and ostrich (*Struthio camelus*) microsatellite marker. **Animal Science Papers and Reports** 25: 283-288.
- Kent, M.R., M.M. Kristelle and W.B. Craig. 2000. Comparative analysis of microsatellite loci in chicken and turkey. **Genome** 43: 796-802.
- Khamnamtong, B., S. Thumrungrtanakit, S. Klinbunga, T. Aoki, I. Hirono and P. Menasveta. 2006. Identification of sex-specific expression markers in the giant tiger shrimp (*Penaeus monodon*). **Journal of Biochemistry and Molecular Biology** 39: 37-45.
- Knorr, C., H.H. Cheng and J.B. Dodgson. 1999. Application of AFLP markers to genome mapping in poultry. **Animal Genetics** 30: 28-35.
- Knorr, C., H.H. Cheng and J.B. Dodgson. 2001. DNA cloning and sequence analysis of chicken AFLP. **Animal Genetics** 32: 156-159.

- Liu, G.Q., X.P. Jiang, J.Y. Wang, Z.Y. Wang, G.Y. Liu and Y.J. Mao. 2008. Analysis genetic diversity of Yangzhou chicken by microsatellite markers. **International Journal of Poultry Science** 7: 1237-1241.
- Liu, Y.P., G.S. Wu, Y.G. You, Y.W. Miao, G. Luikart, M. Baig, A. Beja-Pereira, Z.L. Ding, M.G. Palanichamy and Y.P. Zhang. 2006. Multiple maternal origins of chickens: out of the Asian junkles. **Molecular ylogenetics and Evolution** 38: 12-19.
- Liu, Z., A. Karsi, P. Li, D. Cao and R. Dunham. 2003. An AFLP-Based genetic linkage map of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) constructed by using an interspecific hybrid resource family. **Genetic Society of America** 165: 687-694.
- Loh, J.P., R. Kiew, A. Kee, L.H. Gan and Y.Y. Gan. 1999. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) provides molecular markers for the identification of *Caladium* bicolor cultivars. **Annals of Botany** 84: 155-161.
- Mekchay, S., A. Leotarakul, A. Wongsa and P. Krutmuang. 2005. Molecular marker-based genetic diversity assessment of Thai native chicken and broiler chicken. **Conference on International Agricultural Research for Development**. 11-13 October 2005
- Menz, M.A., R.R. Klein, N.C. Unruh, W. L. Rooney, P. E. Klein and J. E. Mullet. 2004. Genetic diversity of public inbreds of sorghum determined by mapped AFLP and SSR markers. **Crop Science** 44: 1236-1244.
- Michelmore, R.W., I. Paran and R.V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regiona by using segregating populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America** 88: 9828-9832.

- Moen, T., B. Hoyheim, H. Munck and L. Gomez-Raya. 2004. A linkage map of Atlantic salmon (*Salmo salar*) reveals an uncommonly large difference in recombination rate between the sexes. **Animal Genetics** 35: 81-92.
- Mollah, M.B.R., M.S. Alam, F.B. Islam and M.A. Ali. 2005. Effectiveness of RAPD markers in generating polymorphism in different chicken population. **Biotechnology** 4: 73-75.
- Money, T., S. Reader, L. Jia Qu, R.P. Dunford and G. Moore. 1996. AFLP-based mRNA fingerprinting. **Nucleic Acid Research** 24: 2616-2617.
- Mohamed, N.A., E.N. El-sayed, N.T. Hamdoon and K.A. Amein. 2001. Chicken strains identification using SDS-PAGE protein and RAPD-PCR markers. **Assiut Journal of Agriculture Science** 32.
- Murtaza, N. 2006. Cotton genetic diversity study by AFLP markers. **Electronic Journal of Biotechnology** 9: 456-460.
- Nakamura, A., K. Kino, M. Minezawa, K. Noda and H. Takahashi. 2006. A method for discriminating a Japanese chicken, the Nagoya breed, using microsatellite markers. **Poultry Science** 85: 2124-2129.
- Ouedraogo, J.T., V. Maheshwari, D.K. Berner, C.A. St-pierre, F. Belzile and M.P. Timko. 2000. Identification of AFLP markers linked to resistance of cowpea (*Vigna unguiculata* L.) to parasitism by *Striga gesnerioides*. **Theoretical and Applied Genetic** 102: 1029-1036.
- Portier, P., M.F.L. Saux, C. Mougel, C. Lerondelle, D. Chapulliot, J. Thioulouse and X. Nesme. 2006. Identification of genomic species in *Agrobacterium* biovar 1 by AFLP genomic markers. **Applied and Environmental Microbiology** 71: 7123-7131.

Razzoli, M., R. Papa, P. Valsecci II and F. Nonnis Marzano. 2003. AFLP to assess genetic variation in laboratory Gerbils (*Meriones unguiculatus*). **Journal of Heredity** 94: 507-511.

Rothschild, M.F. 2004. Porcine genomics delivers new tools and results: this little piggy did more than just go to market. **Genetical research** 83: 1-6.

Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. **Molecular cloning a laboratory manual**. 3rd ed. Cold spring laboratory press, New York.

Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, Th. van der. Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research** 23: 4407-4414.

Willems, R. J. L., J. Top, N.V.D. Braak, A.V. Belkum, H. Endtz, D. Mevius, E. Stobberingh, A.V.D. Bogaard and J.D.A. Embden. 2000. Host specificity of Vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. **Journal of Infectious Diseases** 182: 816-823.



ตารางผนวกที่ 1 ไก่พื้นเมืองจำนวน 34 ตัว 5 ครอบครัวที่ใช้ในการวิเคราะห์เอเอฟแอลพี

ครอบครัว	ลำดับ	เบอร์ขา/ปีก	อายุ (เดือน)
1	1	141704	14
	2	137233	18
	3	144640	12
	4	145060	11
	5	144401	12
	6	146947	9
2	1	142462	14
	2	141843	14
	3	138540	17
	4	138883	17
	5	145116	11
	6	145118	11
	7	145119	11
	8	145239	11
	9	145242	11
3	1	145424	14
	2	141947	14
	3	144264	12
	4	144269	12
4	1	136403	19
	2	136084	19
	3	129965	25
	4	136423	19
	5	143759	12
	6	143764	12
	7	144183	12
	8	145261	11
	9	145260	11

ตารางผนวกที่ 1 (ต่อ)

ครอบครัว	ลำดับ	เบอร์งาน/ปีก	อายุ (เดือน)
5	1	143328	13
	2	143475	13
	3	142850	14
	4	142866	13
	5	144673	11
	6	145386	11

การเตรียมสารเคมี

1. lysis buffer

250 mM NaCl pH 8.0

100 mM Tris-HCl

100mM EDTA pH 8.0

0.5% SDS

2. TE buffer

10mM Tris-HCl pH 8.0

1mM EDTA pH 8.0

3. 10X TBE buffer 1 Liters

108g Tris base

55g Boric acid

40mls 0.5M EDTA (pH 8.0)

autoclave for 20 min

4. AFLP loading buffer

98% formamide

10mM EDTA

0.01% (w/v) bromophenol blue

0.01% (w/v) xylene cyanol FF

5. สารละลาย silver nitrate

1% silver

0.56% formaldehyde

6. developer

30% sodiumcarbonate

0.1% sodiumthiosulfate

0.56% formaldehyde

7. tracking dye

10mM Tris-HCl pH 7.6

0.03% bromophenol blue

0.03% xylene cyanol FF

60% glycerol

60mM EDTA

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ	นายศิริวัฒน์ ไทยสนธิ
เกิดวันที่	วันที่ 14 สิงหาคม 2525
สถานที่เกิด	จังหวัดราชบุรี
ประวัติการศึกษา	ปริญญาตรี มหาวิทยาลัยศิลปากร คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร

