ความสัมพันธ์ระหว่างจุดกลายพันธุ์ (SNPs) ของยีน *GHSR, IGFI, cGH* และ *IGFBP2* ต่อลักษณะการเจริญเติบโตในไก่พื้นเมืองไทย (ชีและประดู่หางดำ)

Association of single nucleotide polymorphisms in *GHSR, IGFI, cGH* and *IGFBP2* genes on growth traits in Thai Native Chickens (Chee and Pradu Hang Dam)

หนึ่งฤทัย พรหมวาที[1,2], มนต์ชัย ดวงจินดา[1,3*], วุฒิไกร บุญคุ้ม[1,3] และ บัญญัติ เหล่าไพบูลย์ [3]

Neungrutai Promwatee[1,2], Monchai Duangjinda[1,3*], Wuttigrai Boonkum[1,3] and Banyat Loapaiboon[3]

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาความผันแปรของจุดกลายพันธุ์ของยีน *GHSR*, *IGFI*, *cGH* และ *IGFBP2* ต่อลักษณะการเจริญเติบโต (น้ำหนักตัวที่อายุ 0, 4, 8, 12 และ 16 สัปดาห์ อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันที่ช่วงอายุ 0-4, 0-8, 0-12 และ 0-16 สัปดาห์ และความกว้างอก) ในไก่พื้นเมืองไทย (ชี และประดู่หางดำ) ตัวอย่างเลือดไก่พื้นเมืองพันธุ์ละ 60 ตัว นำมาตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ของแต่ละยีนด้วยวิธี PCR-RFLP โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อตำแหน่งของจุดกลายพันธุ์ที่ต้องการตรวจสอบความผันแปรของแต่ละยีน จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างจุดกลายพันธุ์ของแต่ละยีนกับลักษณะการเจริญเติบโตด้วยโมเดลแบบสุ่ม โดยในไก่ชี พบว่า ยีน *GHSR* ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะการเจริญเติบโต ในขณะที่ยีน *IGFI* มีความสัมพันธ์กับน้ำหนักตัวที่อายุ 12 และ 16 สัปดาห์ รวมถึง ADG ช่วงอายุ 0-12 และ 0-16 สัปดาห์ ส่วนยีน *cGH* มีความสัมพันธ์กับน้ำหนักตัวที่อายุ 4, 8, 12 และ 16 สัปดาห์ และ ADG ช่วงอายุ 0-4, 0-8, 0-12 และ 0-16 สัปดาห์ อย่างไรก็ตามการนำยีนนี้ไปประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกอาจยังไม่สมบูรณ์ เนื่องจากรูปแบบจีโนไทป์ที่พบจากการศึกษาครั้งนี้มีเพียง 2 รูปแบบ (AG และ GG) เท่านั้น และยีน *IGFBP2* มีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักตัวที่อายุ 4 สัปดาห์ ADG ช่วงอายุ 0-4 สัปดาห์ และความกว้างอกที่อายุ 16 สัปดาห์ ในขณะที่ไก่ประดู่หางดำไม่พบความสัมพันธ์ของยีนกับลักษณะใดๆ ดังนั้น ยีน *IGFI* และ *IGFBP2* สามารถที่จะใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมในโปรแกรมการคัดเลือกของลักษณะการเจริญเติบโตในประชากรไก่ชีได้

คำสำคัญ: ไก่พื้นเมืองไทย, *IGFI*, *IGFBP2*, *cGH*, *GHSR*, ลักษณะการเจริญเติบโต

[1] ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002
Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

[2] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900 และศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น 40002
Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand and Agricultural Biotechnology Research Center for Sustainable Economy, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

[3] ศูนย์เครือข่ายวิจัยและพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ (ไก่พื้นเมือง) มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002
Research and Development Network Center for Animal breeding (Native Chicken), Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

* Corresponding author: monchai@kku.ac.th

ABSTRACT: The objective of this study was to detect the SNPs of *GHSR*, *IGFI*, *cGH* and *IGFBP2* genes and their association with growth traits (body weight at 0, 4, 8, 12 and 16 weeks of age, ADG during 0-4, 0-8, 0-12 and 0-16 weeks of growth) and carcass trait (breast width) of Thai native chickens (Chee and Pradu Hang Dam). Blood samples were randomly collected from 60 chickens/breed. The genotypes were detected using PCR-RFLP methods with specific primers for each gene. A mixed model was used to analyze the associations of candidate genes with growth traits. In Chee, the *GHSR* gene was not significantly associated with growth traits, while, the *IGFI* gene was significantly associated with body weight at 12 and 16 weeks of age and ADG during 0-12 and 0-16 weeks of age. The *cGH* gene was significantly associated with body weight at 4, 8, 12 and 16 weeks of age and ADG during 0-4, 0-8, 0-12 and 0-16 weeks of age. However, the implementation of this gene for selection program might not be complete because it found only 2 genotypes (AG and GG) in this study. The *IGFBP2* gene was significantly associated with body weight at 4 weeks of age, ADG during 0-4 weeks of age and breast width at 16 weeks of age. On the other hand, the SNPs in all genes were not significantly associated with any growth traits in Pradu Hang Dam population. Therefore, it was concluded from this study that *IGFI* and *IGFBP2* genes could be apply as candidate gene marker for chicken growth traits in Chee population selection program.
Keywords: Thai Native Chicken, *IGFI*, *IGFBP2*, *cGH*, *GHSR*, Growth traits

บทนำ

ไก่พื้นเมืองเป็นไก่ที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภค เนื่องจากมีคุณภาพเนื้อที่โดดเด่น เช่น เนื้อมีรสชาติดี เนื้อแน่น ไม่ยุ่ย และมีการสะสมไขมันต่ำกว่าไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า (เกรียงไกร และคณะ, 2543; Jaturasitha et al., 2002) ส่งผลให้ราคาของไก่พื้นเมืองสูงกว่าไก่เนื้อทางการค้า 2-3 เท่า (Wattanachant et al., 2004) อย่างไรก็ตามไก่พื้นเมืองยังมีข้อด้อยในด้านการเจริญเติบโตที่ต่ำกว่าไก่เนื้อทางการค้า (Jaturasitha et al., 2008) แม้ว่าปัจจุบันการคัดเลือกด้วยวิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม (conventional breeding) จะประสบความสำเร็จโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ช่วยในการประเมินพันธุกรรมและการคัดเลือก อย่างไรก็ตามลักษณะการเจริญเติบโต เช่น น้ำหนักตัวที่อายุต่างๆ อัตราการเจริญเติบโต และความกว้างอกเป็นลักษณะเชิงปริมาณที่ถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ ประกอบกับสิ่งแวดล้อมมีอิทธิพลต่อลักษณะดังกล่าวค่อนข้างสูง ดังนั้นการนำความรู้ด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลเข้ามาใช้ร่วมกับการประเมินพันธุกรรม โดยการตรวจหาตำแหน่งที่มีความผันแปร (polymorphism) ของยีนที่มีอิทธิพลต่อลักษณะต่างๆ เพื่อนำมาใช้ในการคัดเลือกสัตว์ด้วยวิธี marker assisted selection (MAS) จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการคัดเลือก ทำให้สามารถคัดเลือกสัตว์ได้อย่างแม่นยำและมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น (Dekkers, 2004)

การศึกษาเกี่ยวกับวิธีการ candidate gene คือ การหายีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่สนใจศึกษา เพื่อใช้เป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกสัตว์รายตัว โดยยีนที่ศึกษาจะมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของลักษณะทั้งทางตรงและ/หรือทางอ้อม (Gao et al., 2007) ซึ่งถือเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพมากในปัจจุบัน (Zhu and Zhao, 2007) และมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับ candidate gene ที่สัมพันธ์กับลักษณะการเจริญเติบโตของไก่เป็นจำนวนมาก เช่น ยีน ghrelin receptors หรือ growth hormone secretagogue receptor (*GHSR*) (Fang et al., 2010) ยีน insulin-like growth factor I (*IGFI*) (Zhou et al., 2005) ยีน chicken growth hormone (*cGH*) (Nie et al., 2005) และยีน insulin-like growth factor-binding protein 2 (*IGFBP2*) (Li et al., 2006) เป็นต้น โดยยีน *GHSR*, *IGFI*, *cGH* และ *IGFBP2* ตั้งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 9, 1, 27 และ 7 ตามลำดับ โดยจุด SNPs ของทุกยีนอยู่บนตำแหน่ง intron ยกเว้นยีน *IGFI* อยู่บริเวณ 5'UTR (Fang et al., 2010; Zhou et al., 2005; Nie et al., 2005; Li et al., 2006)

ยีน *IGFI* และ *cGH* มีความสำคัญต่อบทบาททางสรีรวิทยา โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่งผลต่อการพัฒนากล้ามเนื้อโครงร่างทั้งก่อนและหลังคลอด (Saxena et al., 2009) ส่วน *IGFBP2* เป็นโปรตีนที่จับกับฮอร์โมน

IGFI เพื่อช่วยปกป้อง *IGFI* ให้มีช่วงอายุที่ยาวนานขึ้น และส่งผลให้ *IGFI* สามารถที่จะไปจับกับ receptor ที่อยู่ที่เซลล์เป้าหมายทำให้การทำงานของฮอร์โมนเป็นไปอย่างเต็มประสิทธิภาพ (Eddy and Johan, 2005) นอกจากนี้ receptor ของฮอร์โมนเกรลิน (ghrelin) หรือ *GHSR* มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการทำงานของฮอร์โมนเกรลิน โดยที่ฮอร์โมนนี้จะส่งผลต่อระบบควบคุมสมดุลพลังงาน เช่น การควบคุมความอยากอาหารทำให้สัตว์กินอาหารได้มากขึ้น นอกจากนี้ฮอร์โมนเกรลินมีผลต่อการควบคุมการสร้างและหลั่ง GH (Lengyel, 2006; Andersson, 2003) โดยยีนเหล่านี้มีการศึกษาจุดกลายพันธุ์ที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับลักษณะการเจริญเติบโตของไก่พันธุ์ต่างๆ (Fang et al., 2010; Zhou et al., 2005; Nie et al., 2005; Li et al., 2006)

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาความสัมพันธ์ของจุดกลายพันธุ์ของยีน *GHSR*, *IGFI*, *cGH* และ *IGFBP2* ต่อลักษณะการเจริญเติบโตในไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์ประดู่หางดำและชี ซึ่งเป็นไก่ของศูนย์เครือข่ายวิจัยและพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ (ไก่พื้นเมือง) ในโครงการ “การพัฒนาฝูงพ่อแม่พันธุ์ไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์ประดู่หางดำและชีด้วยดัชนีการคัดเลือก” เป็นไก่ที่นำมาพัฒนาเพื่อใช้ประโยชน์จากโครงการการสร้างฝูงไก่พื้นเมืองที่เกิดขึ้นจากความร่วมมือระหว่างสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และกรมปศุสัตว์ ซึ่งไก่พันธุ์ประดู่หางดำเป็นไก่ที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคในเรื่องของสี ลักษณะรูปร่าง รวมถึงรสชาติ ส่วนไก่พื้นเมืองพันธุ์ชี มีความเป็นไปได้สูงที่จะผลิตไก่เนื้อไทย เนื่องจากมีขนสีขาวปลอดทั้งตัว ดังนั้นจึงได้ศึกษาความสัมพันธ์ของยีนดังกล่าวเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปประยุกต์ใช้เป็น marker assisted selection (MAS) สำหรับการปรับปรุงลักษณะการเจริญเติบโตในไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์ประดู่หางดำและชีต่อไป

วิธีการศึกษา

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาและการสกัดดีเอ็นเอ

ไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์ชีและประดู่หางดำรุ่นพ่อแม่พันธุ์ จากศูนย์เครือข่ายวิจัยและพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ (ไก่พื้นเมือง) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น สุ่มเก็บตัวอย่างเลือดสายพันธุ์ละ 60 ตัว โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณใต้ปีก (wing vein) ปริมาณ 500-1000 ไมโครลิตร/ตัว โดยเก็บใน microtube 1.5 มล. ที่บรรจุ 0.5M EDTA 100 ไมโครลิตร เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด และนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อรอการสกัดดีเอ็นเอต่อไป ก่อนการสกัดดีเอ็นเอมีการปั่นแยกซีรั่มและเก็บเฉพาะเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว และเติม 0.9% NaCl เพื่อลดความหนืดของเลือดที่จะนำมาสกัดดีเอ็นเอ จากนั้นนำเลือดมาสกัดดีเอ็นเอ (genomic DNA) ด้วยวิธี Silica gel

ลักษณะสมรรถนะการผลิต

การศึกษาครั้งนี้ใช้ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการเจริญเติบโตของไก่ทั้งสองพันธุ์ ประกอบด้วยน้ำหนักตัว (body weight, BW) ที่อายุ 0, 4, 8, 12 และ 16 สัปดาห์ อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (average daily gain, ADG) ที่ช่วงอายุ 0-4, 0-8, 0-12, และ 0-16 สัปดาห์ และความกว้างอกที่อายุ 16 สัปดาห์ (Breast width, BrW) โดยแบ่งข้อมูลออกเป็น 2 ชุดข้อมูล ได้แก่ ข้อมูลลักษณะปรากฏ (phenotypic data) และข้อมูลค่าการผสมพันธุ์ estimate breeding value (EBV) ซึ่งเป็นค่าอิทธิพลเนื่องจากยีนแบบบวกสะสม (additive gene) โดยประเมินได้จากแต่ละลักษณะทั้งไก่ชีและไก่ประดู่หางดำ ซึ่งวิเคราะห์ด้วยโมเดลตัวสัตว์ (animal model) ที่มีการปรับด้วยอิทธิพลสุ่ม (random effect) เนื่องจากตัวสัตว์ และอิทธิพลคงที่ (fixed effects) ได้แก่ ชั่วรุ่น (generation) ชุดฟัก (hatch) และเพศ (sex) โดยมีรูปแบบโมเดลการวิเคราะห์ดังนี้ $y=X\beta + Za + \varepsilon$ เมื่อ y = ค่าสังเกต, β = อิทธิพลคงที่, a = อิทธิพลสุ่มเนื่องจากตัวสัตว์, X,Z = incident

matrix ที่แสดงการปรากฏอิทธิพลของ β และ a ในค่าสังเกตตามลำดับ และ ε = ความคลาดเคลื่อน ทำการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป BLUPF90-ChickenPAK 2.5 (Duangjinda et al., 2005) การเลือกใช้ข้อมูลทั้งสองชุดในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ เนื่องจากข้อมูลลักษณะปรากฏเป็นข้อมูลที่ใช้วิเคราะห์โดยปกติทั่วไป แต่ชุดข้อมูล EBV เป็นค่าประมาณของพันธุกรรมที่เป็นอิทธิพลแบบบวกสะสมที่มีการปรับอิทธิพลอื่นๆ ออกไปแล้ว จึงอาจจะสามารถใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง marker กับอิทธิพลของยีนต่อลักษณะที่ศึกษาได้โดยตรง

การตรวจสอบจีโนไทป์ของยีนเป้าหมายด้วยวิธี PCR-RFLP

ยีน *GHSR*, *IGFI*, *cGH* และ *IGFBP2* ถูกตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยวิธี PCR-RFLP โดยปฏิกิริยา PCR 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย genomic DNA ที่มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร, 25 mM $MgCl_2$ ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร, ไพรเมอร์ (forward และ reverse, **Table 1**) ความเข้มข้น 2.5 μM ปริมาตร 1 ไมโครลิตร dNTP เข้มข้น 1 mM (Promega, USA) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 5 U Taq DNA polymerase (RBC®) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรให้ครบ 10 ไมโครลิตร ด้วยน้ำ โดยแต่ละยีนมีวงรอบการทำ PCR ดังนี้ เริ่ม initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °ซ นาน 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 30-35 รอบ ได้แก่ denaturation ที่อุณหภูมิ 95 °ซ นาน 30 วินาที, primer annealing 60-68 °ซ นาน 30 วินาที (**Table 1**), primer extension ที่อุณหภูมิ 72 °ซ นาน 30-45 วินาที และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 °ซ นาน 7 นาที จากนั้นนำ PCR ที่ได้ไปตรวจสอบด้วย agarose gel electrophoresis ด้วยความเข้มข้น 2% และย้อมด้วย gel star® (Gelstar INC. NY) จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้มาตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะของยีนแต่ละชนิด (**Table 1**) ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร ต่อปฏิกิริยาประกอบด้วย 10x buffer ปริมาตร 2 ไมโครลิตร, 100X BSA ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร, เอนไซม์ 1-2 Units, ผลิต PCR ปริมาตร 3 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรให้ครบ 20 ไมโครลิตรด้วยน้ำ จากนั้นนำหลอดปฏิกิริยาไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ นานอย่างน้อย 4 ชม. เพื่อให้เอ็นไซม์ทำงานได้อย่างเต็มประสิทธิภาพ และตรวจสอบจีโนไทป์ด้วย agarose gel electrophoresis ด้วยความเข้มข้น 2% และย้อมด้วย gel star® และบันทึกภาพเจลและบันทึกจีโนไทป์ของสัตว์แต่ละตัวเพื่อนำไปวิเคราะห์ผลต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของไก่แต่ละพันธุ์ จากสูตร

ความถี่จีโนไทป์ = $\frac{\text{จำนวนสัตว์ที่มีจีโนไทป์ที่กำหนด}}{\text{จำนวนสัตว์ทั้งหมด}}$

ความถี่อัลลีล = $D + \frac{1}{2}H$

เมื่อ D = ความถี่ homozygous genotype และ H = ความถี่ heterozygous genotype

ทดสอบ Hardy-Weinberg equilibrium เพื่อทดสอบความสมดุลของยีนในประชากรของไก่แต่ละพันธุ์ ด้วย Chi-square test (χ^2) (Falconer and Mackey, 1996) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบจีโนไทป์ของแต่ละยีนกับลักษณะการเจริญเติบโต ด้วยโมเดลสุ่ม (linear mixed model) โดยชุดข้อมูลลักษณะปรากฏ (Phenotypic data) และชุดข้อมูล EBV มีการปรับด้วยอิทธิพลคงที่ต่างๆ ด้วยโมเดลดังนี้

$y = \mu + G + S + H + Sr + e$; Phenotypic data

$y = \mu + G + Sr + e$; EBV data

เมื่อ y = ค่าสังเกตของแต่ละลักษณะ, μ = ค่าเฉลี่ยทั้งหมด (overall mean), G = อิทธิพลคงที่เนื่องจากรูปแบบจีโนไทป์, S = อิทธิพลคงที่เนื่องจากเพศ, H = อิทธิพลคงที่เนื่องจากชุดฟัก, Sr = อิทธิพลสุ่มเนื่องจากพ่อพันธุ์ และ e = ความคลาดเคลื่อน เหตุที่ชุดข้อมูล EBV ไม่มีการปรับอิทธิพลคงที่ต่างๆ เช่นเดียวกันกับชุดข้อมูล Phenotype เนื่องจากค่า EBV มีการปรับด้วยอิทธิพลคงที่ต่างๆ เหล่านั้นเรียบร้อยแล้ว ซึ่งเป็นผลเนื่องจากอิทธิพลของ additive gene เท่านั้น

Table 1 Primer characteristics.

Primer	Sequence (forward/ reverse) (5'-3')	AT[5/] (°C)	Poly-Morphisms site	Restriction enzyme	Restriction enzyme production size (bp)
GHSR[1/]	CCCACAAAGTTAGCTGCAGAC/ CACCTCTCCATCTGGCTCATT	66	Chr.9 T>C c.739+726 Intron1	*Hha*I	TT: 537 CT: 537, 358, 179 CC: 358, 179
IGFI[2/]	CATTGCGCAGGCTCTATCTG/ TCAAGAGAAGCCCTTCAAGC	68	Chr.1 A>C 5'UTR	*Hin*fI	CC: 622, 191 AC: 622, 378, 244, 191 AA: 378, 244, 191
cGH[3/]	TCCCAGGCTGCGTTTTGTTACTC/ ACGGGGGTGAGCCAGGACTG	66	Chr.27G>A +1705 Intron3	*Eco*RV	GG: 429 AG: 429, 296, 133 AA: 296, 133
IGFBP2[4/]	GTCCCAGATAAACCTTGCT/ GCTGGCAAGGGGTCTG	60	Chr.7 C>T +1032 Intron2	*Pml* I	AA: 367 AB: 367, 265, 102 BB: 265, 102

[1/]Fang et al., 2010, [2/]Zhou et al., 2005, [3/]Nie et al., 2005, [4/]Li et al., 2006; [5/]Annealing temperature

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้น

ข้อมูลลักษณะการเจริญเติบโตของไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์ชีและประดู่หางดำ จากศูนย์วิจัยและพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ (ไก่พื้นเมือง) มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประกอบด้วย ลักษณะน้ำหนักตัว (BW) ที่อายุ 0, 4, 8, 12 และ 16 สัปดาห์ อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (ADG) ช่วงอายุ 0-4, 0-8, 0-12 และ 0-16 สัปดาห์ และความกว้างอกที่อายุ 16 สัปดาห์ (BrW) โดยใช้ข้อมูลพันธุ์ละ 60 ตัว ซึ่งค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานแสดงใน **Table 2** ซึ่งไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์ประดู่หางดำมีการเจริญเติบโตสูงกว่าไก่พันธุ์ชีในทุกช่วงอายุ

ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีล

จากการศึกษารูปแบบจีโนไทป์ของยีน *GHSR*, *IGFI*, *cGH* และ *IGFBP2* ด้วยวิธี PCR-RFLP พบว่าแต่ละยีนมีจีโนไทป์ 3 รูปแบบ ซึ่งขนาดและรูปแบบของแถบแบนดีเอ็นเอแสดงใน **Figure 1** สำหรับไก่ชีพบว่ายีน *GHSR* และ *cGH* ไม่สามารถตรวจพบจีโนไทป์ CC และ AA ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องจากยีนดังกล่าวมีความถี่ของอัลลีล C และ A ต่ำ (**Table 3**) ส่วนไก่ประดู่หางดำ พบว่ายีน *GHSR* และ *IGFI* ไม่สามารถตรวจพบจีโนไทป์ CC และ AA ตามลำดับ ซึ่งความถี่ของอัลลีล C และ A มีค่าต่ำเช่นเดียวกัน (**Table3**) โดยอัลลีล C ของยีน *GHSR* มีค่าต่ำในไก่ทั้งสองพันธุ์สอดคล้องกับการศึกษาของ Fang et.al. (2010) ซึ่งศึกษาในไก่ลูกผสมพื้นเมืองของจีนกับ White recessive rock ในรุ่น F2 พบว่ายีน *GHSR* มีความถี่จีโนไทป์ CC เพียง 0.01 จากตัวอย่างที่ศึกษาจำนวน 452 ตัว พบจีโนไทป์ CC 5 ตัว จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าอัลลีลพื้นฐาน (common allele) ของยีน *GHSR* คืออัลลีล T เช่นเดียวกับงานของ Fang et al. (2010) ที่พบอัลลีล T 83% ส่วนยีน *IGFI* อัลลีลพื้นฐานคือ C แต่ Zhou et al. (2005) ไม่รายงานจำนวนสัตว์ของแต่ละจีโนไทป์ จึงทำให้ไม่สามารถทราบได้ว่าในไก่ลูกผสม Leghorn และ Fayoumi มีอัลลีลใดเป็นอัลลีลพื้นฐาน ในขณะที่ยีน *cGH* มีอัลลีล G เป็นอัลลีลพื้นฐานเช่นเดียวกับ Nie et al.,(2005) ที่ศึกษาในไก่ลูกผสมรุ่น F2 จำนวน 451 ตัว พบอัลลีล G 86% และยีน *IGFBP2* มีอัลลีล B เป็นอัลลีลพื้นฐาน แต่ Li et al. (2006) ศึกษาในไก่ลูกผสมรุ่น F2 จำนวน 1,028 ตัว พบว่ามีความถี่อัลลีล

A และ B ใกล้เคียงกัน ดังนั้นความถี่อัลลีลของแต่ละยีนในแต่ละประชากรอาจมีความแตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับอัลลีลพื้นฐานของแต่ละประชากร หรือการคัดเลือกบางลักษณะของแต่ละประชากรที่อาจส่งผลกระทบต่อความถี่อัลลีลได้ รวมถึงจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษามีจำนวนไม่มากพอที่จะตรวจพบอัลลีลที่มีความถี่ต่ำได้

การทดสอบสมดุลความถี่ยีนตามกฎของ Hardy-Weinberg ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าในไก่ทั้งสองพันธุ์ทุกยีนที่ศึกษายังอยู่ในภาวะสมดุลตามกฎของ Hardy-Weinberg แม้ว่าประชากรนี้มีการคัดเลือกด้านการเจริญเติบโต และการให้ผลผลิตไข่ (มนต์ชัย และคณะ, 2551) ดังนั้นแม้จะมีการคัดเลือกในด้านการเจริญเติบโตมาระยะหนึ่งแล้ว แต่ยังไม่ถึงระดับที่กระทบต่อความถี่ยีนของประชากร หรืออาจเป็นไปได้ว่ายีนที่ถูกคัดเลือกอาจจะเป็นยีนกลุ่มอื่นนอกเหนือจากยีนที่ศึกษาในครั้งนี้

Table 2 Means and standard deviation (S.D.) for growth traits in Chee and Pradu Hang Dam.

Traits[1/]	Chee		Pradu Hang Dam	
	Means	S.D.	Means	S.D.
BW0 (g)	30.38	2.63	35.23	3.03
BW4 (g)	197.21	42.46	217.83	39.15
BW8 (g)	552.62	117.51	577.00	108.40
BW12 (g)	1,005.57	178.42	1,070.00	193.57
BW16 (g)	1,301.64	283.13	1,546.00	295.87
ADG0-4 (g/day)	5.96	1.50	6.52	1.38
ADG0-8(g/day)	9.33	2.09	9.67	1.93
ADG0-12 (g/day)	11.61	2.13	12.32	2.30
ADG0-16 (g/day)	11.35	2.53	13.49	2.64
BrW (mm)	60.51	5.65	57.45	6.15

[1/]BW 0, 4, 8, 12, 16 = body weight at 0, 4, 8, 12 and 16 weeks of age; ADG 0-4, 0-8, 0-12, 0-16 = average daily gain during 0-4, 0-8, 0-12 and 0-16 weeks of growth; BrW = Breast width at 16 weeks of age

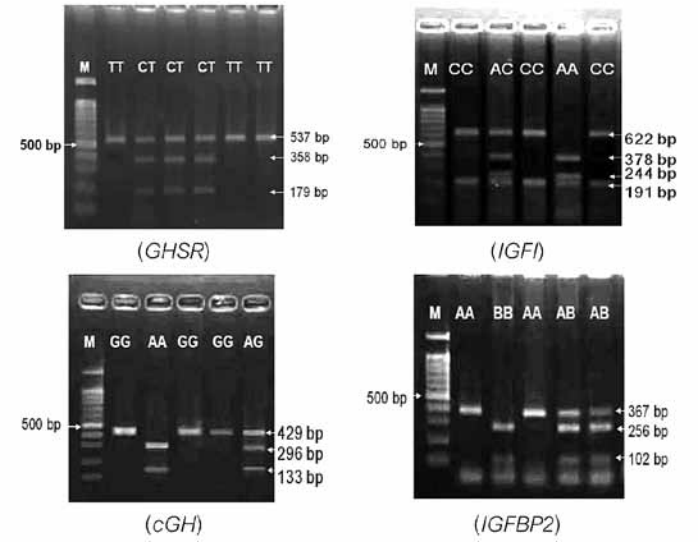


Figure 1 The PCR-RFLP pattern of *GHSR*, *IGFI*, *cGH* and *IGFBP2* genes (M = 100 bp markers).

Table 3 Genotype and allele frequency in difference gene in Thai native chickens.

Breeds[1/]	Genes	n	Genotypes			Alleles		$\chi^2_{(1, 0.05)}$=3.841
CH	*GHSR*	60	0 (CC)	0.083 (CT)	0.917 (TT)	0.042 (C)	0.958 (T)	0.113
	IGFI	59	0.085 (AA)	0.339 (AC)	0.576 (CC)	0.254 (A)	0.746 (C)	0.664
	cGH	60	0 (AA)	0.283 (AG)	0.717 (GG)	0.142 (A)	0.858 (G)	1.634
	IGFBP2	60	0.133 (AA)	0.567 (AB)	0.300 (BB)	0.417 (A)	0.583 (B)	1.648
PD	*GHSR*	60	0 (CC)	0.217 (CT)	0.783 (TT)	0.108 (C)	0.892 (T)	0.886
	IGFI	60	0 (AA)	0.050 (AC)	0.950 (CC)	0.025 (A)	0.975 (C)	0.039
	cGH	60	0.017 (AA)	0.167 (AG)	0.817 (GG)	0.100 (A)	0.900 (G)	0.329
	IGFBP2	60	0.100 (AA)	0.550 (AB)	0.350 (BB)	0.375 (A)	0.625 (B)	1.803

[1/] CH = Chee, PD = Pradu Hang Dam

อิทธิพลของรูปแบบจีโนไทป์ต่อลักษณะการเจริญเติบโต

จากการวิเคราะห์อิทธิพลของรูปแบบจีโนไทป์ของแต่ละยีนต่อลักษณะการเจริญเติบโตในไก่ชีและไก่ประดู่หางดำแสดงใน **Table 4** และ **Table 5** ตามลำดับ พบว่ามีเพียงชุดข้อมูล EBV ของไก่ชีเท่านั้นที่ยีน *IGFI*, *cGH* และ *IGFBP2* มีความสัมพันธ์กับลักษณะการเจริญเติบโตบางลักษณะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนไก่ประดู่หางดำ พบว่ายีน *GHSR*, *IGFI*, *cGH* และ *IGFBP2* ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะการเจริญเติบโต (**Table 5**) ในทั้งสองชุดข้อมูล

ยีน *IGFI* เกิด SNPs ที่ A570T บริเวณ 5'UTR ตรวจหารูปแบบจีโนไทป์พบว่ามีความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักตัวที่อายุ 12 และ 16 สัปดาห์ และอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันที่ช่วงอายุ 0-12 และ 0-16 สัปดาห์ ในชุดข้อมูล EBV ของไก่ชี (P<0.05) จากจีโนไทป์ 3 รูปแบบ พบว่าจีโนไทป์ AA ให้ค่า Least square means ของลักษณะการเจริญเติบโตดังกล่าวสูงกว่าจีโนไทป์ AC และ CC ตามลำดับ (**Table 4**) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhou et.al. (2005) และไก่ที่มีจีโนไทป์ AA จาก 60 ตัวมีเพียง 5 ตัวหรือประมาณ 8% ดังนั้นยีน *IGFI* จึงน่าจะมีความเหมาะสมที่จะนำไปคัดเลือกไก่และสร้างฝูงพันธุ์ให้มีการเจริญเติบโตที่สูงขึ้นได้

ยีน *cGH* เกิด SNPs ที่ G+1705A บริเวณ intron3 พบจีโนไทป์เพียง 2 รูปแบบ (AG และ GG) พบว่าจีโนไทป์ GG มีความสัมพันธ์กับลักษณะการเจริญเติบโตของไก่ชีเท่านั้น ได้แก่ลักษณะความกว้างอก (breast width) น้ำหนักตัวที่อายุ 4, 8, 12 และ 16 สัปดาห์ รวมถึงอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันที่ช่วงอายุ 0-4, 0-8, 0-12 และ 0-16 สัปดาห์ แต่อิทธิพลของรูปแบบจีโนไทป์ GG ไม่สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nie et.al. (2005) ที่พบว่าจีโนไทป์ GG มีน้ำหนักตัวต่ำที่สุด ในขณะที่จีโนไทป์ AA มีน้ำหนักตัว และอัตราการเจริญเติบโตสูงกว่าจีโนไทป์ AG และ GG ตามลำดับ แต่การศึกษาครั้งนี้พบว่าไก่ที่มีจีโนไทป์ GG มีการเจริญเติบโตสูงกว่าจีโนไทป์ AG ทั้งนี้อาจเนื่องจากยีน *cGH* ตรวจพบรูปแบบจีโนไทป์เพียง 2 จีโนไทป์ *ดังนั้นจึงควรมีการตรวจสอบอีกครั้งเพื่อเป็นการยืนยันผล ว่าอิทธิพลของ cGH เป็นลักษณะแบบบวกสะสม (โดยทดสอบในประชากรที่มีจีโนไทป์* AA *เพิ่มเติม) หรือเป็นลักษณะที่จำเพาะต่อสายพันธุ์ (จีโนไทป์เดียวกันอาจแสดงออกในไก่พื้นเมืองและไก่ทางการค้าแตกต่างกัน)* ดังนั้นการนำยีน *cGH* ไปประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกอาจยังไม่สมบูรณ์ เนื่องจากรูปแบบจีโนไทป์ที่พบจากการศึกษาครั้งนี้มีเพียง 2 รูปแบบ (AG และ GG) เท่านั้น

Table 4 Least squares means of *GHSR*, *IGFI*, *cGH* and *IGFBP2* gene on growth traits in Chee.

Genes	n	BrW[1/] (mm)	Body weight (weeks) (g)					ADG (weeks) (g/day)			
			0	4	8	12	16	0-4	0-8	0-12	0-16
GHSR											
CT	7	60.46	29.48	205.52	522.07	989.88	1,286.89	6.29	8.79	11.45	11.23
TT	54	57.96	29.78	179.19	523.1	969.37	1,268.56	5.34	8.81	11.18	11.06
SEM		1.67	1.02	14.99	38.42	45.96	64.15	0.53	0.69	0.55	0.57
IGFI											
AA	5	61.26	28.65	211.66	533.74	1,124.45a	1,474.34a	6.51	9.02	13.05a	12.91a
AC	20	58.54	29.35	194.24	508.96	976.10b	1,285.83b	5.89	8.56	11.27b	11.22b
CC	34	57.73	30.01	173.29	528.53	959.81b	1,251.41b	5.12	8.9	11.07b	10.91b
SEM		1.68	1.04	14.78	39.84	44.09	62.2	0.52	0.71	0.53	0.56
cGH											
AG	17	55.21b	30.26	164.84b	442.37b	894.08b	1,148.44b	4.81b	7.36b	10.28b	9.98b
GG	42	58.78a	29.63	189.17a	542.68a	989.73a	1,299.83a	5.71a	9.16a	11.43a	11.34a
SEM		1.29	0.84	11.93	28.56	35.52	48.8	0.42	0.51	0.42	0.44
IGFBP2											
AA	8	53.68b	29.94	149.62c	470.68	864.78	1,141.24	4.27c	7.87	9.94	9.92
AB	34	58.63a	29.74	181.57b	516.41	976.57	1,281.59	5.42b	8.69	11.27	11.18
BB	17	58.87a	29.73	212.72a	570.2	993.06	1,278.83	6.53a	9.65	11.47	11.15
SEM		1.48	0.98	12.43	35.42	41.81	59.8	0.44	0.63	0.5	0.53

[a,b,c] within a column in each gene with no common superscript are different ($P<0.05$);

[1/] Breast width

ยีน IGFBP2 เกิด SNPs *ที่* C1032T *บริเวณ* intron2 จีโนไทป์ 3 รูปแบบพบว่ามีความสัมพันธ์กับลักษณะการเจริญเติบโตของไก่ชีเท่านั้น ได้แก่ลักษณะความกว้างอก ที่อายุ 16 สัปดาห์ น้ำหนักตัวที่อายุ 4 สัปดาห์ และอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันที่ช่วงอายุ 0-4 สัปดาห์ ซึ่งอิทธิพลของจีโนไทป์ของยีน *IGFBP2* ให้ผลสอดคล้องกับ Li et.al. (2006) โดยพบว่า ไก่ที่มีจีโนไทป์ BB มีน้ำหนักตัวสูงกว่าจีโนไทป์ AB และ AA ตามลำดับ ยีนนี้มีความน่าสนใจคือ จีโนไทป์มีผลต่อลักษณะความกว้างอกที่อายุ 16 สัปดาห์ ซึ่งถือว่าเป็นลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจาก ความกว้างอกเป็นลักษณะหนึ่งที่แสดงให้เห็นถึงปริมาณเนื้ออก (Zerehdaran et al., 2005) อย่างไรก็ตามยังมีข้อควรคำนึงคือ จีโนไทป์ BB มีผลต่อการสะสมไขมันในช่องท้องสูงกว่าจีโนไทป์อื่นๆ (Li et.al., 2006) ดังนั้นถ้าต้องการใช้ยีนนี้ในการคัดเลือกให้ไก่มีความกว้างอกมากขึ้นย่อมส่งผลให้มีการสะสมไขมันในช่องท้องเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย

ยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการเจริญเติบโตที่นำมาศึกษา candidate gene ในไก่ชีและไก่ประดู่หางดำในครั้งนี้พบว่าอิทธิพลของความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญเติบโตของแต่ละยีนมีความจำเพาะในแต่ละประชากร ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทดสอบอิทธิพลของยีนนั้นต่อลักษณะที่ศึกษา ก่อนที่จะนำรูปแบบของจีโนไทป์ไปประยุกต์ใช้ใน MAS ของแต่ละประชากร เพื่อป้องกันความผิดพลาดที่อาจเกิดขึ้น หรือเพื่อประโยชน์สูงสุดในการคัดเลือกสัตว์ได้อย่างถูกต้องตรงตามอิทธิพลของ marker ที่ใช้อย่างแท้จริง และชุดข้อมูล EBV เป็นชุดข้อมูลที่สามารถใช้ได้ในการวิเคราะห์ข้อมูล เช่นเดียวกับการศึกษาของศรีนวล (2553) เพราะข้อมูล EBV เป็นค่าประมาณของพันธุกรรมที่เป็นอิทธิพลแบบบวกสะสม (additive effect) ที่มีการปรับอิทธิพลอื่นๆ ออกไปแล้ว จึงทำให้การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง marker กับอิทธิพลของยีนต่อลักษณะที่ศึกษาได้โดยตรง

Table 5 Least squares means of *GHSR*, *IGFI*, *cGH* and *IGFBP2* gene on growth traits in Pradu Hang Dam.

Genes	n	BrW[1/]	Body weight (weeks) (g)					ADG (weeks) (g/day)			
		(mm)	0	4	8	12	16	0-4	0-8	0-12	0-16
GHSR											
CT	13	57.06	35.6	217.8	590.5	1,081.42	1,537.02	6.51	9.91	12.5	13.4
TT	47	57.46	35.6	215.9	576.7	1,084.85	1,563.04	6.44	9.66	12.5	13.6
SEM		1.22	0.79	8.81	22.44	34.71	39.93	0.32	0.40	0.41	0.36
IGFI											
AC	3	56.95	36.3	202	543.7	922.01	1,421.04	5.92	9.07	10.6	12.4
CC	57	57.42	35.5	218.4	584.8	1,106.45	1,576.24	6.53	9.81	12.8	13.8
SEM		2.00	1.26	14.71	38.15	57.03	66.05	0.52	0.68	0.68	0.59
cGH											
AA	1	54.12	40.8	228	666.3	1,222.33	1,721.24	6.66	11.2	14.1	15
AG	10	57.65	36.3	238.9	608	1,147.73	1,605.01	7.24	10.2	13.2	14
GG	49	57.45	35.3	212.7	572.8	1,070.33	1,544.01	6.34	9.6	12.3	13.5
SEM		2.67	1.68	18.81	49.49	75.85	87.62	0.68	0.88	0.90	0.78
IGFBP2											
AA	6	57.41	35.4	229.4	606.5	1,096.35	1,542.02	6.94	10.2	12.6	13.5
AB	33	57.75	35.7	218.2	590.7	1,096.35	1,578.17	6.52	9.91	12.6	13.8
BB	21	56.9	35.4	212.3	563.2	1,068.01	1,536.49	6.32	9.43	12.3	13.4
SEM		1.5	0.97	10.78	27.29	42.49	48.3	0.39	0.49	0.5	0.43

[1/] Breast width

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการตรวจสอบความผันแปรของยีน 2 ตำแหน่งคือ intron และ 5'UTR โดยตำแหน่ง intron ได้แก่ยีน *GHSR*, *cGH* และ *IGFBP2* ส่วน 5'UTR คือยีน *IGFI* การเกิดความผันแปรของยีนที่ตำแหน่งดังกล่าว เป็นส่วนที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดอะมิโน ดังนั้นตำแหน่งนี้จึงไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนแต่อาจจะเป็นส่วนที่ส่งสัญญาณในการควบคุมการแสดงออกของยีน ซึ่ง Qui et al. (2006) พบว่า การผันแปรของเบส C>T ของยีน MC4R ทำให้ NF-E2 ที่เป็น transcription factor มาเกาะที่ตำแหน่ง 5'UTR มากขึ้น นอกจากนี้ Zhou et al. (2005) พบว่า จีโนไทป์ที่แตกต่างกันของยีน *IGFI* ส่งผลให้ระดับฮอร์โมนของยีน *IGFI* ที่อยู่ในกระแสเลือดแตกต่างกันไปด้วย ดังนั้นเป็นไปได้ว่าความผันแปรของยีน *IGFI* ส่งผลต่อการเจริญเติบโตได้ด้วยการมีปริมาณฮอร์โมนที่มากขึ้นหรือเนื่องจากการแสดงออกของยีนที่เพิ่มมากขึ้นนั่นเอง

สรุป

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ยีน *IGFI* และ *IGFBP2* สามารถที่จะนำไปประยุกต์ใช้เป็น MAS ในประชากรไก่ชีเพื่อคัดเลือกให้มีการเจริญเติบโตและความกว้างอกที่เพิ่มมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามยีน *IGFBP2* ยังมีข้อควรคำนึงคือถ้าความกว้างอกเพิ่มมากขึ้นจะส่งผลให้มีการสะสมไขมันเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย ในขณะที่ไก่ประดู่หางดำยังไม่สามารถใช้ยีนใดๆ ที่ศึกษาครั้งนี้เป็น MAS ในการคัดเลือกได้

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

กระทรวงศึกษาธิการและศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น และได้รับการสนับสนุนสัตว์ทดลองจากศูนย์เครือข่ายวิจัยและพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ (ไก่พื้นเมือง) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารอ้างอิง

เกรียงไกร โชประการ, วัชรพงษ์ วัฒนกูล, กิตติ วงส์วิเชษฐ และ วรพงษ์ สุริยจันทราทอง. 2541. ไก่พื้นเมืองและไก่ลูกผสมพื้นเมือง : อดีตและปัจจุบัน. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพฯ.

มนต์ชัย ดวงจินดา, บัญญัติ เหล่าไพบูลย์, เทวินทร์ วงษ์พระลับ, พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา, เกษม นันทชัย, สุจิตรา สราวิช และ วรวิทย์ รักสงฆ์. 2551. การพัฒนาฝูงพ่อแม่พันธุ์ไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์ประดู่หางดำและชีด้วยดัชนีการคัดเลือก. การประชุมเชิงปฏิบัติการ การอนุรักษ์และใช้ประโยชน์ไก่พื้นเมือง ครั้งที่ 2, กรุงเทพฯ.

ศรีนวล คณานิตย์. 2553. การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ของกระบือปลัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

Andersson, L.. 2003. Melanocortin receptor variants with phenotypic effects in horse, pig, and chicken. Ann. N. Y. Acad. Sci. 994:313-318.

Dekkers, J.C.M. 2004. Commercial aplication of marker-and gene-assisted selection in livestock: Strategies and lessons. J. Anim. Sci. 82: E313-E328.

Duangjinda, M., I. Misztal and S. Tsuruta. 2005. BLUPF90-ChickenPAK 2.5 [computer programs]. Khon kaen University, Thailand. Available: http://agserver.kku.ac.th/monchai. Accessed March 23, 2010.

Eddy, D., and B. Johan. 2005. Endocrine control of postnatal growth in poultry. J. Poult. Sci. 42:1-13.

Falconer, D.S., and T. F. C. Mackey, 1996. Introduction to quantitative genetics. Fourth edition. Longman. Oxford.

Fang, M., Q. Nie, C. Luo, D. Zhang and X. Zhang. 2010. Associations of *GHSR* gene polymorphisms with chicken growth and carcass traits. Mol. Biol. Rep. 37:423-428.

Gao, Y., R. Zhang, X. Hu and N. Li. 2007. Application of genomic technologies to the improvement of meat quality of farm animals. Meat Science. 77:36-45.

Jaturasitha, S., T. Srikanchai, M. Kreuzer and M. Wicke. 2008. Differences in carcass and meat characteristics between chicken indigenous to northern Thailand (Black-boned and Thai native) and imported extensive breeds (Bresse and Rhode Island Red) Poult. Sci. 87:160–169.

Jaturasitha, S., V. Leangwunta, A. Leotaragul, A. Phongphaew, T. Apichartsrungkoon, N. Simasathikul, T. Vearasilp, L. Worachai and U. ter Meulen. 2002. A comparative study of Thai native chicken and Broiler on porductive performance, carcass and meat quality. Deutsher Tropentag Witzenhausen, October 9 -11, 2002

Lengyel, A. M. J. 2006. From growth hormone-releasing peptides to ghrelin: discovery of new modulators of GH secretion. Arq. Bras. Endocrinol. Metab. 50:17-24.

Li Z.H., H. Li, H. Zhang, S.Z. Wang, Q.G. Wang and Y.X. Wang. 2006. Identification of a single nucleotide polymorphism of the insulin-like growth factor binding protein 2 gene and its association with growth and body composition traits in the chicken. J. Anim. Sci. 84:2902-2906.

Nie, Q., B. Sun, D. Zhang, C. Luo, N. A. Ishag, M. Lei, G. Yang and X. Zhan. 2005. High diversity of the chicken growth hormone gene and effects on growth and carcass traits. J. Hered. 96:698-703.

Qiu, X., N. Li, X. Deng, X. Zhao, Q. Meng, and X. Wang. 2006. The single nucleotide polymorphisms of chicken melanocortin-4 receptor (MC4R) gene and their association analysis with carcass traits. Science in China Series C: Life Sciences. 49:560-566.

Saxena, V.K., A.K. Sachdev, R. Gopal, and A.B. Pramod. 2009. Roles of improtant candidate gene on broiler meat quality. World's Poult. Sci. J. 65:37-50.

Wattanachant, S., S. Benjakul and D.A. Ledward. 2004. Composition, color, and texture of Thai indigenous and broiler chicken muscles. Poult. Sci. 83:123 -128.

Zerehdaran, S., A. L. J. Vereijken, J. A. M. van Arendonk, H. Bovenhuis, and E.H. van der Waaij. 2005. Broler breeding steategies using indirect carcass measurements. Poult. Sci. 84:1214-1221.

Zhou H., A.D. Mitchell, J.P. McMurtry, C.M. Ashwell and S.J. Lamont. 2005. Insulin-like growth factor-I gene polymorphism associations with growth, body composition, skeleton integrity, and metabolic traits in chickens. Poult. Sci. 84:212–219.

Zhu, M., and S. Zhao. 2007. Candidate Gene Identification approach: progress and challenges. Int. J. Biol. Sci. 3:420-427.