

การจำแนกบี-แฮปโลไทป์ ของไก่ด้วยโพลีโคลนอล แอนติซีรัม

Identification of Chicken B-Haplotype with Polyclonal Anti-serum

วรวิทย์ สิริพลวัฒน์^{1,2} ยศ ไชยพันธุ์¹ และ ธวัชชัย สักดีภู่อารัม³

Voravit Siripholvat, Yos Chaipan, and Tawatchai Sakpooaram

ABSTRACT

Blood of the Thai Native, Rhode Island Red (RIR), Barred Plymouth Rock (BPR) and Commercial Layer chickens were identified for the B-haplotype by hemagglutination technique against B², B⁶, B⁹, B¹¹ and B²² polyclonal anti-serum. It was found that the Thai Native chicken revealed 4 types (B², B⁶, B⁹ and B¹¹) of the B-haplotype polymorphism, while the RIR and BPR breeds each possessed 2 types B², B⁶ and B⁹, B¹¹ respectively. However, the Commercial Layer chickens were not found to have any B-haplotype in this experiment.

Key words: B-haplotype, chicken, anti-serum, hemagglutination

บทคัดย่อ

ไก่พันธุ์พื้นเมือง พันธุ์โร้ดแดง พันธุ์บาร์พลีมัธร็อก และพันธุ์ไก่ไข่ทางการค้า ได้ถูกนำมาเจาะเลือดเพื่อจำแนกชนิดของ บี-แฮปโลไทป์ โดยใช้หลักทดสอบแบบ ฮีแมกกลูตินชันด้วย โพลีโคลนอล

แอนติซีรัม B², B⁶, B⁹, B¹¹ และ B²² พบว่าไก่พื้นเมืองจะมีความหลากหลายของ บี-แฮปโลไทป์ (B², B⁶, B⁹ และ B¹¹) ถึง 4 ชนิด ส่วนไก่โร้ดแดง และบาร์พลีมัธร็อกจะพบพันธุ์ละ 2 ชนิดคือ B² กับ B⁶ และ B⁹ กับ B¹¹ ตามลำดับ อย่างไรก็ตามในไก่ไข่ทางการค้าจะไม่พบ บี-แฮปโลไทป์ใด ๆ ในการทดสอบครั้งนี้

¹ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิตสัตว์ปีก สถาบันสุวรรณวาลกิจ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Poultry Production Research and Development Center, Suwan Wajokasikit Institute, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

³ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Medecine, Faculty of Veterinary, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

คำนำ

ยีนของไก่ที่มีบทบาทสำคัญและเกี่ยวข้องต่อการสร้างภูมิคุ้มกันและการเข้ากันได้ของเนื้อเยื่อคือกลุ่มยีน B ซึ่งควบคุมเลือดกรุป B ในจำนวนเลือดไก่ 13 กรุป ด้วย (Somes, 1980) ดังนั้นจึงถูกเรียกเป็น Major histocompatibility B complex (MHC) ซึ่ง MHC ของไก่จะครอบคลุมยีน 3 โคลัส คือ B-G, B-F และ B-L โดย B-G จะควบคุมการสร้างแอนติเจนเฉพาะบนผิวเซลล์เม็ดเลือดแดง ในขณะที่ B-F จะเกี่ยวข้องกับการสร้าง แอนติเจน บนผิวเซลล์ทั้งหมด ส่วน B-L จะควบคุมเฉพาะผิวเซลล์ B ลิมโฟไซต์ และ โมโนไซต์ (Briles *et al.*, 1982)

Nordskog *et al.*, (1973) พบว่าไก่ที่มียีน B¹B¹ จะมีเปอร์เซ็นต์การตายในช่วงไก่สาวสูงและยังให้ผลผลิตไข่ต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับ ยีน B¹B¹ ที่อยู่ในรูปเฮเทอโรไซกัสของ B¹ Bacon *et al.*, (1981) รายงานว่าไก่ที่มี B² แฮปโลไทป์ (haplotype) จะมีเปอร์เซ็นต์เล็้งรอดได้ดีและให้ผลผลิตไข่ดี ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองต่าง ๆ ที่พบว่า B² แฮปโลไทป์ จะแสดงผลต้านทานต่อเชื้อ Rous sarcoma virus (RSV) ซึ่งเป็นรีโทรไวรัสที่ก่อให้เกิดสาเหตุของโรคลิวโคซิสในไก่ ในขณะที่ B¹, B⁵, B¹⁵ และ B¹⁹ จะอ่อนแอต่อเชื้อ และพบเปอร์เซ็นต์การตายสูง (Brown *et al.*, 1984; Collins and Zsigray, 1984; Gebriel *et al.*, 1979). Schierman *et al.*, (1977) ได้แสดงให้เห็นว่า gene ที่ควบคุมการขยายตัวหรือการทำลายเนื้องอกที่เกิดจากเชื้อ RSV จะเกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิดกับ MHC ของไก่ นอกจากนั้นยังพบว่า MHC ของไก่ที่มี แฮปโลไทป์แบบ B²¹ จะต้านทานต่อโรค Marek's (Hansen *et al.*, 1967; Longenecker and Mosmann, 1981) และ MHC ของไก่อีกยังจะเกี่ยวข้องอยู่กับลักษณะการต้านทานต่อโรคหิวคืดไก่ด้วย (Lamont *et al.*, 1987).

จากความหลากหลาย หรือ polymorphism ของ

บี-แฮปโลไทป์ ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานหรืออ่อนแอต่อโรค รวมทั้งเกี่ยวข้องกับลักษณะการให้ไข่ จึงเป็นจุดประสงค์ของการทดลองครั้งนี้เพื่อจำแนกชนิด บี-แฮปโลไทป์ ของไก่พันธุ์ต่าง ๆ ที่เลี้ยงอยู่ในฟาร์มสัตว์ปีก วิทยาเขต กำแพงแสนว่ามีชนิดใดบ้าง เพื่อใช้สำหรับการศึกษาต่อ ๆ ไป

อุปกรณ์และวิธีการ

พันธุ์ไก่ ไก่ที่ใช้เป็นไก่ที่อยู่ในระหว่างการให้ไข่ ซึ่งประกอบด้วยพันธุ์พื้นเมืองเทศเมีย 50 ตัว เพศผู้ 30 ตัว พันธุ์โรดแดง 20 ตัว พันธุ์บาร์พลัมหรือค 15 ตัว และพันธุ์ไก่ไข่ทางการค้า 20 ตัว

Anti-serum เป็นชนิด โพลีโคลนอล B², B⁶, B⁹, B¹¹ และ B²² ซึ่งได้รับความเอื้อเฟื้อจากศาสตราจารย์ I. Okada มหาวิทยาลัยอิโรชิม่า ประเทศญี่ปุ่น เมื่อนำแอนติซีรัมมาใช้ จะทำให้เจือจางด้วย phosphate buffer saline (PBS) ระหว่าง 2-8 เท่า ยกเว้น B⁶ จะไม่เจือจางตามคำแนะนำของ I. Okada.

Hemagglutination test ไก่จะถูกเจาะเลือดบริเวณ wing vein ใส่ในขวดที่เคลือบด้วย EDTA ปริมาณตัวละ 1-2 ลบ.ซม. เม็ดเลือดแดงถูกนำไปล้างด้วย PBS ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 500 g เป็นเวลา 5 นาที ทำการล้างซ้ำ 4 ครั้ง ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง นำเม็ดเลือดแดงไปเจือจางด้วย PBS ให้ได้ความเข้มข้น 3.3 % นำเม็ดเลือดแดงของไก่แต่ละตัวแบ่งไปทดสอบกับ แอนติซีรัม ทั้ง 5 ชนิด บนแผ่นสไลด์ โดยใช้น้ำเกลือ 0.9 % เป็นตัวเปรียบเทียบ บันทึกผลการตกตะกอน

หาความถี่ของ บี-แฮปโลไทป์ ชนิดต่าง ๆ เป็นไปตามวิธีของ Falconer (1972) โดยกำหนดให้ไก่ที่แสดง บี-แฮปโลไทป์ ใด ๆ จะมี ยีน B¹B¹ อยู่ในรูปเฉพาะของโฮโมไซโกด

ผล

การทดสอบการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดงพบว่า ไก่พื้นเมืองเทศเมียนจำนวน 8 ตัว จะเกิดผลบวกกัน แอนติซีรัม 2 ชนิด โดย 6 ตัว เป็นชนิด B⁶ และอีก 2 ตัวเป็นชนิด B⁹ ส่วนเพศผู้จะเกิดผลบวกกับ B² จำนวน 4 ตัว และ B¹¹ จำนวน 6 ตัว พันธุ์โรดแดงจะพบเกิดผลบวกกับ B² และ B⁶ ชนิดละ 2 ตัว แต่พันธุ์บาร์พลัมหรือจะแสดงผลบวกกับ B⁹ และ B¹¹ จำนวน 6 และ 3 ตัว ตามลำดับ ในขณะที่พันธุ์ไก่ไข่ทางการค้าจะแสดงผลลบกับ แอนติซีรัม ทุกชนิด และเช่นเดียวกัน แอนติซีรัม B²² จะแสดงผลลบกับ

ไก่ทุกพันธุ์ (Table 1)

เมื่อคำนวณหาความถี่ อัลลีล ของ บี-แฮปโลไทป์ ชนิดต่าง ๆ ในไก่แต่ละพันธุ์พบว่า ความถี่ อัลลีลของ B⁹ และ B¹¹ จะมีค่าสูงสุดในไก่พันธุ์บาร์พลัมหรือค (Table 2)

วิจารณ์

ไก่พื้นเมืองจะมีความหลากหลายของ บี-แฮปโลไทป์ (B², B⁶, B⁹ และ B¹¹) มากกว่าพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งเป็นผลเนื่องจากยังไม่มีมีการคัดเลือกพันธุ์ โดยส่วนมากมักปล่อยให้มีการผสมแบบสุ่ม หรือจะมีการคัด

Table 1 Numbers of various chicken breeds shown positive hemagglutination with B-haplotype antiserum.

Breeds B-haplotype	Native		RIR	BPR	Commercial layer
	Male	Female			
B ²	4	-	2	-	-
B ⁶	-	6	2	-	-
B ⁹	-	2	-	6	-
B ¹¹	6	-	-	3	-
B ²²	-	-	-	-	-

Table 2 Allelic frequency of B-haplotype of the chicken breeds.

Breeds B-haplotype	Native	RIR	BPR	Commercial layer
B ²	0.05	0.10	-	-
B ⁶	0.075	0.10	-	-
B ⁹	0.025	-	0.40	-
B ¹¹	0.075	-	0.20	-
B ²²	-	-	-	-

เลือกบ้างก็คิดในลักษณะของรูปทรงคือให้ชนแก่ง ในขณะที่พันธุ์โร้ดแดง และพันธุ์บาร์พลิมัทร็อค จะพบ บี-แฮปโลไทป์ พันธุ์ละ 2 ชนิด และในพันธุ์ไก่ไข่ทางการค้าจะไม่พบว่ามี บี-แฮปโลไทป์ ใด ๆ อันอาจเนื่องมาจากพันธุ์ไก่ไข่ทางการค้าจะมีการคัดเลือกลักษณะการให้ไข่ดก และความอยู่รอดมาเป็นระยะเวลานานจากบริษัท ดังนั้น บี-แฮปโลไทป์ ใดที่เกี่ยวข้องกับ ความอ่อนแอหรือให้ผลผลิตต่ำจะถูกคัดทิ้ง มีผลทำให้ความหลากหลายของ บี-แฮปโลไทป์ ลดลง จึงอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้ตรวจไม่พบ บี-แฮปโลไทป์ ในไก่ไข่ที่ทดลอง ซึ่งย่อมเป็นการสนับสนุนงานของ Nordskog *et al.*, (1973) ที่พบว่า บี-แฮปโลไทป์ จะเกี่ยวข้องอยู่กับลักษณะผลผลิตของไก่

ในเพศผู้และเพศเมียของไก่พื้นเมืองจะพบมี บี-แฮปโลไทป์ ต่างชนิดกัน โดยเพศผู้จะเป็น B² กับ B¹¹ ขณะที่เพศเมียเป็น B⁶ กับ B⁹ นั้น อาจเป็นเพราะประชากรไก่เพศผู้และเพศเมียที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มาจากแหล่งชนบทที่แตกต่างกัน และเมื่อพิจารณาถึงผลรวมความถี่ อัลลีล ของ บี-แฮปโลไทป์ ชนิดต่าง ๆ ที่ทดลองในครั้งนี้จะมีค่าเพียง 0.225 ซึ่งเทียบได้ประมาณ 22.5 % ของความถี่ อัลลีล ของ บี-แฮปโลไทป์ ทั้งหมด ดังนั้น อีกประมาณ 77.5 % จะเป็น บี-แฮปโลไทป์ ของ B อัลลีล ชนิดอื่น ๆ ที่ยังไม่ได้มีการตรวจสอบ

ในไก่พันธุ์บาร์พลิมัทร็อคพบว่า ความถี่ อัลลีล ของ B⁹ กับ B¹¹ เมื่อรวมกันจะเท่ากับ 0.6 หรือประมาณ 60 % ของ บี-แฮปโลไทป์ ทั้งหมด ส่วนที่เหลืออีก 40 % จะเป็นของ บี-แฮปโลไทป์ ชนิดอื่นๆ จึงพอคาดการณได้ว่าความหลากหลายของ บี-แฮปโลไทป์ ในพันธุ์บาร์พลิมัทร็อคยังมีไม่มากเมื่อเทียบกับพันธุ์โร้ดแดง และพันธุ์พื้นเมือง

แฮปโลไทป์ B² ได้ถูกใช้เป็น marker gene ที่แสดงถึงความต้านทานต่อเชื้อ RSV ซึ่งก่อให้เกิดโรค Leukosis (Collin and Zsigray, 1984; Brown *et al.*, 1984)

ในไก่พื้นเมืองและโร้ดแดงก็พบว่า มี แฮปโลไทป์ B² เช่นกัน แต่มีในระดับความถี่ต่ำคือ 0.05 และ 0.1 ซึ่งก็ยังพอเปิดโอกาสให้สามารถทำการวางแผนผสมและคัดเลือกพันธุ์ไก่พื้นเมืองและไก่โร้ดแดงที่ต้านทานต่อเชื้อ RSV ซึ่งเป็นเชื้อโรไวรัสที่ยังไม่ประสบความสำเร็จในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อดังกล่าว ดังนั้นการใช้ marker gene B² ช่วยในการคัดเลือกพันธุ์จึงเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการสร้างภูมิคุ้มกันต้านทานต่อเชื้อ RSV ซึ่งทั้งพันธุ์โร้ดแดงและพันธุ์พื้นเมืองต่างก็เป็นสายพันธุ์หนึ่งในการผลิตไก่ลูกผสมพื้นเมืองสุวรรณ 6 (วรวิทย์, 2536) ดังนั้นถ้าสายพันธุ์ทั้งสองได้รับการคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์ให้ต้านทานต่อเชื้อ RSV แล้ว ไก่ลูกผสมพื้นเมืองที่ได้ย่อมจะมีความต้านทานต่อเชื้อ RSV ด้วย ซึ่งย่อมจะส่งผลประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงไก่ที่สามารถเลี้ยงรอดในเปอร์เซ็นต์ที่สูงขึ้น

สรุป

ความหลากหลายของ B-haplotype จะพบมากในไก่พันธุ์พื้นเมือง ในขณะที่จะไม่พบในพันธุ์ไก่ไข่ทางการค้า

พบ B²-haplotype เฉพาะในพันธุ์พื้นเมืองและพันธุ์โร้ดแดง ซึ่ง B² ได้ถูกจัดเป็น marker gene ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อเชื้อ RSV

การวางแผนผสมและคัดเลือกไก่พื้นเมืองและไก่โร้ดแดงให้ต้านทานต่อเชื้อ RSV ย่อมมีความเป็นไปได้

ยังจำเป็นต้องมีการจำแนก B-haplotype ด้วย anti-serum ชนิดอื่น ๆ โดยเฉพาะ B²¹ ที่เป็น marker gene ที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานต่อโรค Marek's

คำขอบคุณ

ผลการทดลองครั้งนี้จะไม่สามารถสำเร็จลุล่วงไปได้หากปราศจากความเอื้อเฟื้อของ Prof. I. Okada ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ antiserum สำหรับการทดลอง ซึ่งทางคณะผู้ดำเนินการวิจัยต้องขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้ และงานวิจัยนี้จัดเป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัย KIP 23.37 ซึ่งได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

- วรวิทย์ สิริพลวัฒน์. 2536. คู่มือการเลี้ยงไก่ลูกผสมพื้นบ้านสุวรรณ 6. โครงการไก่-เกษตร 50 ปี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 31 น.
- Bacon, L.D., R.L. Witter, L.B. Crittenden, A. Fadly, and J. Motta, 1981. B-haplotype influence on Marek's disease, Rous sarcoma, and Lymphoid leukemia virus - induced tumours in chickens. *Poultry Sci.* 60 : 1132-1139.
- Briles, W.E., N. Bumstead, D.L. Ewert, D.G. Gilmour, J. Gogusev, K. Hala, C.Koch, B.L. Longenecker, A.W. Nordskog, J.R.L. Pink, L.W. Schierman, M. Simonsen, A. Toivanen, P. Toivanen, O. Vainio, and G. Wick. 1982. Nomenclature for chicken major histocompatibility (B) complex. *Immunogenetics* 15 : 441 - 447.
- Brown, D.W., W.M. Collins, and W.E. Briles, 1984. Specificity of B genotype response to tumors induced by each of three subgroups of RSV. *Immunogenetics* 19 : 141-147.
- Collins, W.M., and R.M. Zsigray, 1984. Genetics of the response to Rous sarcoma virus -induced tumours in chickens. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics* 15 : 159-171.
- Falconer, D.S. 1972. Introduction to quantitative genetics. Ronald Press Company, New York.
- Gebriel, G.M., I.Y. Pevzner, and A.W. Nordskog, 1979. Genetic linkage between immune response to GAT and the fate of RSV - induced tumors in chickens. *Immunogenetics* 9 : 327-334.
- Hansen, M.P., J.N. Van Zandt, and G.R.J. Law, 1967. Differences in susceptibility to Marek's disease in chickens carrying two different B locus blood group alleles. *Poultry Sci.* 46-1268 (Abstract)
- Lamont, S.J., C. Bolin, and N. Cheville, 1987. Genetic resistance to fowl cholera is linked to the major histocompatibility complex. *Immunogenetics* 25 : 284-289.
- Longenecker, B.M., and T.R. Mosmann. 1981. Structure and properties of the major histocompatibility complex of the chicken. Speculations on the advantages and evolution of polymorphism. *Immunogenetics* 13 : 1-23.
- Nordskog, A.W., W.A. Rishell, and D.M. Briggs, 1973. Influence of B blood groups on adult mortality and egg production in the White Leghorn chicken. *Genetics* 75 : 181-189.
- Schierman, L.W., D.H. Watanabe, and R.A. McBride, 1977. Genetic Control of Rous sarcoma regression in chickens : Linkage with the major histocompatibility complex. *Immunogenetics* 5 : 325-332.
- Somes, Jr. R.G. 1980. Alphabetical list of the genes of domestic fowl. *J. Hered.* 71 : 168-174.