

ความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *MC5R* ต่ออัตรา การเจริญเติบโตในไก่พื้นเมือง (ประดู่หางดำ)

Genetic Polymorphism of *MC5R* Gene on Growth Rate of Indigenous Chicken (Praduhangdum)

วิทย์พงษ์ เปี้ยวงศ์^{1/} ปุณเรศวร์ รัตนประดิษฐ์^{1/} และ สัญชัย จตุรสีทธา^{1/}
Wittapong Peawong^{1/}, Punnares Ratanapradit^{1/} and Sanchai Jaturasitha^{1/}

Abstract: The *melanocortin-5 receptor (MC5R)* gene is a key factor in the regulation of exocrine gland function which controls gastric juice production and cooperates with enzyme from pancreas. In this study, the genetic polymorphisms of *MC5R* genes in 220 indigenous chickens (Praduhangdum) were identified. The associations of *MC5R* genes with growth Rate in indigenous chickens were studied. Three single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the chicken *MC5R* genes were found in 5'-flanking regions at the position of 78(A>G), 249(A>G), and 388(T>A). One position of SNPs was developed as the simple DNA marker for genotyping. The *Hin6I* Restriction enzyme was used to detect SNPs at the position of 249(A>G). The allele frequencies were 0.52 for A and 0.48 for G. The results indicated that the polymorphisms of *MC5R* markers associated with average daily gain. It showed that average daily gain in indigenous chickens with genotype GG was higher than that of AA ($P<0.05$).

Keywords: genetic polymorphism, *MC5R*, Praduhangdum

^{1/}ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตวน้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200

^{1/}Department of Animal Science and Aquaculture, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

บทคัดย่อ: ยีน Melanocortin-5 receptor (*MC5R*) มีบทบาทต่อการควบคุมการทำงานของต่อมมีท่อที่ควบคุมการสร้างน้ำย่อยและการทำงานร่วมกับเอนไซม์จากตับอ่อน การศึกษาครั้งนี้ต้องการค้นหาความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *MC5R* ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ประดู่หางดำ จำนวน 220 ตัวและวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน *MC5R* กับอัตราการเจริญเติบโต ผลการศึกษาพบว่ายีน *MC5R* ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ประดู่หางดำมี single nucleotide polymorphism (SNPs) ในบริเวณ 5' flanking region จำนวน 3 ตำแหน่ง คือ 78(A>G), 249(A>G) และ 388(T>A) จากความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *MC5R* ดังกล่าว SNPs จำนวน 1 ตำแหน่ง ถูกคัดเลือกมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเออย่างง่ายเพื่อตรวจสอบจีโนไทป์โดยใช้ enzyme ตัดจำเพาะ *Hin6I* ตรวจสอบความผันแปรของ SNPs ที่ตำแหน่ง 249(A>G) พบว่ามีความถี่อัลลีล A และ G เท่ากับ 0.52 และ 0.48 ผลการศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ว่าความผันแปรของเครื่องหมายโมเลกุล *MC5R* มีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน โดยพบว่าไก่พื้นเมืองที่มีจีโนไทป์ GG มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันสูงกว่าไก่พื้นเมืองที่มีจีโนไทป์ AA อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

คำสำคัญ: ความผันแปรทางพันธุกรรม, *MC5R*, ไก่ประดู่หางดำ

คำนำ

ปัจจุบันประชาชนนิยมรับประทานไก่พื้นเมืองกันมาก เนื่องจากมีรสชาติดี อร่อย เนื้อแน่น มีมันน้อย (Jaturasitha *et al.*, 2008) แต่ไก่พื้นเมืองก็ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด ทั้งนี้เพราะไก่พื้นเมืองมีอัตราการเจริญเติบโตช้า ซึ่งเป็นข้อจำกัดทางด้านการผลิตที่สำคัญของไก่พื้นเมือง ในปัจจุบันองค์ความรู้พื้นฐานทางพันธุกรรม อนุพันธุศาสตร์ และเทคโนโลยีชีวภาพ ได้เข้ามามีบทบาทในการศึกษาหน่วยทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุลของดีเอ็นเอเพื่อระบุตำแหน่งที่ตั้งของยีน รวมถึงการค้นหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งเป็นสาเหตุโดยตรงของความผันแปรในลักษณะปรากฏ (ศุภมิตร, 2548) สำหรับช่วยคัดเลือกไก่พื้นเมืองเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

Melanocortin receptor (MCRs) เป็นยีนในกลุ่ม G protein coupled receptor superfamily (Voisey *et al.*, 2003) ยีน MCRs ประกอบไปด้วยยีนจำนวน 5 ยีนคือ *MC1R*, *MC2R*, *MC3R*, *MC4R* และ *MC5R* (Malek, 2001; Chaki and Okuyama, 2005; Cerda-Reverter *et al.*, 2003) *MC1R* มีผลต่อสีผิวและสีขน (Cone *et al.*, 1996) *MC2R* มีผลต่อการหลั่ง corticosteroid (Desarnaud *et al.*, 1994) และ steroid (Beuschlein *et al.*, 2001) *MC3R*

และ *MC4R* เกี่ยวข้องกับการควบคุมสมดุลพลังงาน (Roselli-Reh fuss *et al.*, 1993) *MC5R* มีการแสดงออกใน peripheral tissues (Chaki and Okuyama, 2005) exocrine gland และใน skeletal muscle (Chen *et al.*, 1997) การศึกษา ยีน *MC5R* พบว่าในหนูที่ถูก knockouts ยีน *MC5R* มีผลก่อให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของต่อม exocrine gland และมีการผลิต sebaceous lipid ลดลง (Chen *et al.*, 1997) ส่วนการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของยีนในไก่พื้นเมืองยังไม่ปรากฏรายงานแต่อย่างใด ดังนั้นในการศึกษานี้จึงต้องการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมในระดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MC5R* และความสัมพันธ์ของยีน *MC5R* กับอัตราการเจริญเติบโตในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ประดู่หางดำ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรม ในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ไก่พื้นเมืองในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีทดลอง

เก็บตัวอย่างเลือดและบันทึกลักษณะทางการผลิตที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต ซึ่งประกอบด้วย น้ำหนักตัว อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (ADG) รวมทั้งความกว้างหน้าอก และความยาวแข้งของไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ประดู่หางดำ จำนวน 220 ตัว และสกัด

ดีเอ็นเอ (DNA) จากเลือด โดยดัดแปลงจากวิธีการของ
ศิริลักษณ์ และคณะ (2539) ออกแบบไพรเมอร์ (Primer
design) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MC5R* ของไก่
ซึ่งมีความยาว 2033 bp (GenBank accession no. AB012868)
ให้มีขนาดประมาณ 400-500 bp ทั้งนี้ให้ครอบคลุมส่วน
ของ start codon open reading frame และ stop codon
(ตารางที่ 1) โดยใช้โปรแกรม Primer 3 เพื่อใช้เพิ่มปริมาณ
DNA ของยีน *MC5R* ด้วยปฏิกิริยา PCR ซึ่งมีปริมาตรรวม
20 µl ประกอบด้วย DNA template 50 ng, 1x PCR
buffer, 200 mM dNTPs, 2.5 mM MgCl₂, 4 µM primer
forward, 4 µM primer reverse, 5 U/µl Taq polymerase
(Fermentus) ทำปฏิกิริยา PCR ด้วยอุณหภูมิ (94 °C 30
วินาที/ 58 °C 30 วินาที / 72 °C 30 วินาที) จำนวน 35
รอบ และค้นหาเครื่องหมายโมเลกุล DNA บนยีน *MC5R*
ด้วยเทคนิค single stranded conformation polymorphism
(SSCP) ในไก่ที่มีน้ำหนักตัวมาก-น้อย ในการตรวจสอบ
ความผันแปรทางพันธุกรรม ผลผลิต PCR ที่รูปแบบ
SSCP แตกต่างกันนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์
(sequence analysis) ด้วยเครื่อง CEQ 8000 Automated
Sequencer จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์เลือก restriction
enzyme ที่จำเพาะต่อ single nucleotide polymorphisms
(SNPs) ของแต่ละ fragment เพื่อพัฒนาเครื่องหมาย

โมเลกุล DNA อย่างง่าย จากนั้นวิเคราะห์ความสัมพันธ์
ของอัลลีลจากยีน *MC5R* ที่มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต
ในไก่ประจวบคีรีขันธ์ด้วย general linear model โดยใช้
SPSS software package โดยมีโมเดลทางสถิติที่ใช้
ทดสอบความสัมพันธ์มีรายละเอียดดังนี้

$$Y_{ijk} = \mu + \text{Season}_i + \text{Sex}_j + \text{Genotype}_k + e_{ijk}$$

โดย Y_{ijk} คือ ลักษณะสมรรถภาพการเจริญเติบโต
 μ คือ ค่าเฉลี่ยของลักษณะที่ทำการศึกษา
 Season_i คือ fixed effect ของฤดูกาล
 Sex_j คือ fixed effect ของเพศ
 Genotype_k คือ fixed effect ของ genotype
 e_{ijk} คือ error

ผลการทดลอง

ผลผลิต PCR ของยีน *MC5R* ในไก่พื้นเมือง

จากผลการทดลองได้ ผลผลิต PCR ของยีน
MC5R ที่ได้จากคู่ไพรเมอร์ทั้ง 4 คู่ (*MC5R-1-MC5R-4*)
มีความยาว 443, 479, 493 และ 518 bp ตามลำดับ
(ภาพที่ 1)

Table 1 Primer sequence of *MC5R1-4*.

Primer	Location	PCR Size (bp)	Sequence
<i>MC5R-1</i>	start codon	443	Forward: 5'- CCTCCTACTGATTCTGTAATC -3' Reverse: 5'- TTTTCTGCTCATCTGTACTGG -3'
<i>MC5R-2</i>	start codon - open reading frame	479	Forward: 5'- ATGTCTTCATTAGTCTGTGG -3' Reverse: 5'- TCTTGTTCCTTAATATTGCAC -3'
<i>MC5R-3</i>	open reading frame	493	Forward: 5'- GTTCCTAATCCTGGGCATTG -3' Reverse: 5'- GATGTACAGTGAAACCATGAG -3'
<i>MC5R-4</i>	stop codon	518	Forward: 5'- CACTATGTTTTTACCATGCTG -3' Reverse: 5'- GCCACAGAAATCTTGACAGC -3'

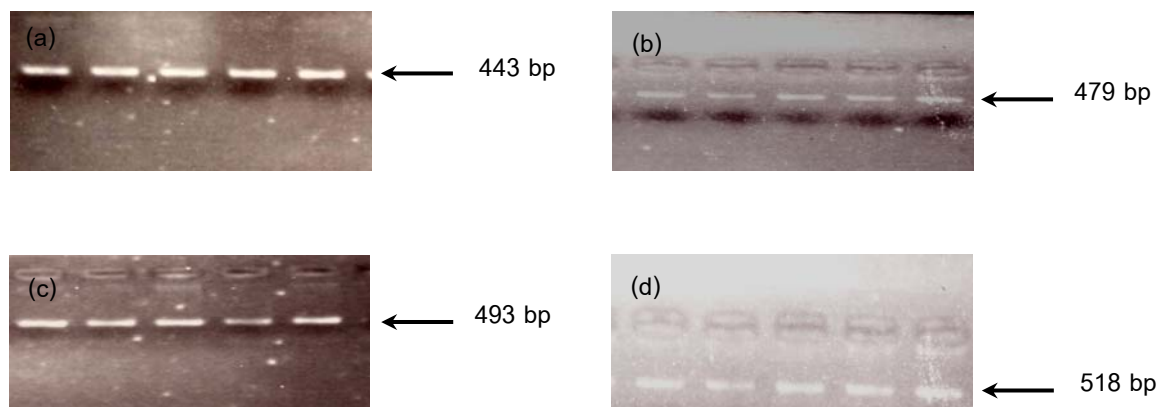


Figure 1 PCR product of (a) *MC5R-1*, (b) *MC5R-2*, (c) *MC5R-3* and (d) *MC5R-4* on agarose gel electrophoresis.

ผลการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุล DNA บนยีน *MC5R* ด้วยเทคนิค SSCP

ตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *MC5R* ด้วยเทคนิค SSCP มีขั้นตอนดังนี้ ผลผลิต PCR ของยีน *MC5R* ทั้ง 4 คู่ไพรเมอร์ จำนวน 2 μ l ถูกผสมกับ SSCP loading buffer จำนวน 8 μ l และนำไป denature ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที และแช่ในน้ำแข็งทันที เพื่อรักษาสภาพของ DNA ที่เป็นสายเดี่ยว (single-stranded DNA) จากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าวจำนวน 5 μ l load บน non-denaturing gel electrophoresis (ความเข้มข้น 10%) ที่ควบคุมอุณหภูมิ 10°C และกระแสไฟฟ้า 120 V เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมง จากนั้นย้อมสีด้วยวิธี silver staining ผลการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุล DNA บนยีน *MC5R* ในเบื้องต้นด้วยเทคนิค SSCP ในไก่พื้นเมืองพบว่า คู่ไพรเมอร์ *MC5R-1* และ *MC5R-3* ให้รูปแบบ SSCP ที่แตกต่างกัน จำนวน 3 รูปแบบ ส่วนคู่ไพรเมอร์ *MC5R-2* และ *MC5R-4* ให้รูปแบบ SSCP ที่ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 2)

ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MC5R* ในไก่พื้นเมือง

ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างไก่พื้นเมืองที่มีน้ำหนักตัวมาก และไก่พื้นเมืองที่มีน้ำหนักตัวน้อย พบ SNPs จำนวน 3 ตำแหน่ง โดยพบที่บริเวณ 5' flanking region คือ ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 78(A>G), 249(A>G), 388(T>A)

การพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุล DNA อย่างง่าย

เครื่องหมายโมเลกุล DNA อย่างง่ายถูกพัฒนาขึ้นเพื่อใช้จำแนก genotype ของ SNPs บนยีน *MC5R* ในไก่พื้นเมือง จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *MC5R* ในไก่พื้นเมือง พบ SNPs จำนวน 3 ตำแหน่ง ซึ่งถูกครอบคลุมอยู่ในส่วนไพรเมอร์ *MC5R-1* และเอนไซม์ *Hin6I* สามารถตัดแถบ DNA ดังกล่าวได้ 1 ตำแหน่งคือ นิวคลีโอไทด์ที่ 243 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สอดคล้องกับตำแหน่ง SNPs ที่ 249(A>G) ของยีน *MC5R* ซึ่งปรากฏแถบ DNA ที่มีความยาวดังนี้ (ภาพที่ 3) ส่วนตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 78(A>G) และ 388(T>A) ไม่พบเอนไซม์ที่สามารถตัดแถบ DNA ดังกล่าวได้

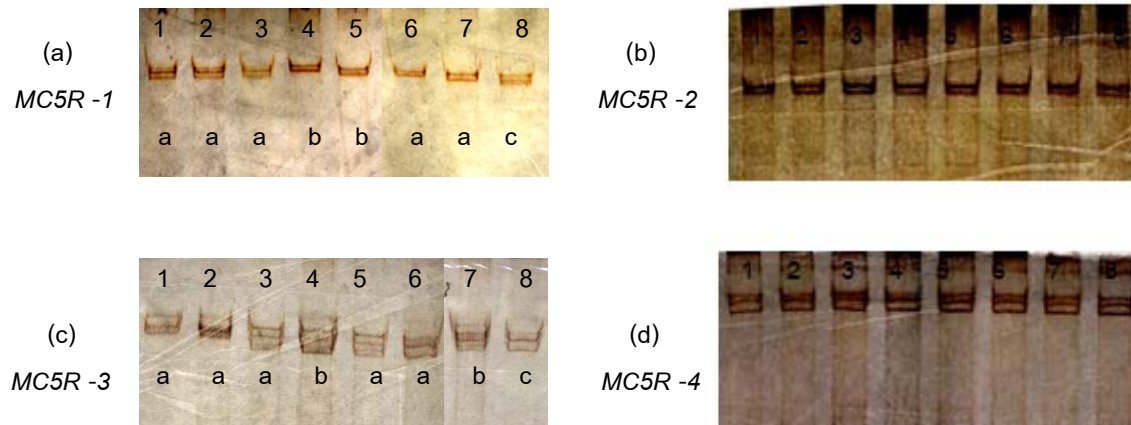


Figure 2 SSCP pattern form PCR products of (a) *MC5R* -1, (b) *MC5R* -2, (c) *MC5R*-3 and (d) *MC5R* -4 on non-denaturing gel electrophoresis.

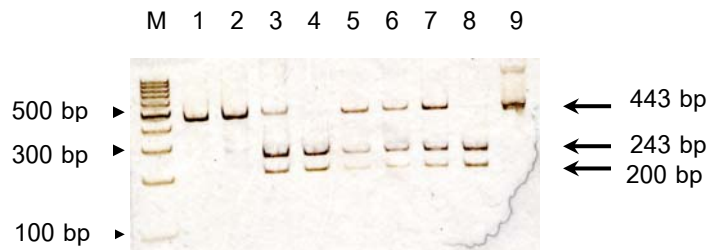


Figure 3 *Hin6I* restriction enzyme digest of *MC5R*-1 with Lane 1,2 and 9 show genotype AA; Lane 3, 5 ,6 and 7 show genotype G/A; Lane 4 and 8 show genotype GG; Lane M show 1kb ladder maker (Fermentus).

ผลการตรวจสอบ genotype ด้วยเครื่องหมายโมเลกุล DNA ของยีน *MC5R* ในไก่พื้นเมือง

ผลการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *MC5R* ที่ตำแหน่ง 249(A>G) ของยีน *MC5R* ในไก่พื้นเมืองจำนวน 220 ตัว พบว่ามี genotype AA 66 ตัว genotype GA 97 ตัว และ genotype GG 57 ตัว คิดเป็นความถี่ genotype AA, GA และ GG มีค่าเท่ากับ 0.3, 0.44 และ 0.26 ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นความถี่อัลลีล G และ A มีค่าเท่ากับ 0.52 และ 0.48 ตามลำดับ

ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล DNA ของยีน *MC5R* กับสมรรถภาพการเจริญเติบโตในไก่พื้นเมือง

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล DNA ของยีน *MC5R* กับลักษณะทางการผลิตในไก่พื้นเมืองจำนวน 220 ตัว ซึ่งประกอบด้วย น้ำหนักตัว อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน (ADG) รวมทั้งความกว้างหน้าอกโดยวัดความกว้างตั้งแต่โคนขาด้านซ้ายถึงโคนขาด้านขวา และความยาวแข้ง พบว่าเครื่องหมาย

โมเลกุล *Hin6I* มีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันของไก่พื้นเมืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในช่วงอายุ 4 สัปดาห์ (0-4, 4-8, 8-16, 16-20) ($P=0.018, 0.011, 0.005, 0.020$ และ 0.043) ตามลำดับ ช่วงอายุ 12 สัปดาห์ (0-12) ($P=0.001$) และช่วงอายุ 24 สัปดาห์ (0-24) ($P=0.020$) โดยไก่พื้นเมืองที่มี genotype เป็น GG มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน สูงที่สุดรองลงมาคือ genotype AA และ genotype AG มีลักษณะทางการผลิตต่ำ (ตารางที่ 3) แต่ความผันแปรของเครื่องหมายโมเลกุล *Hin6I* นั้นไม่มีผลต่อน้ำหนักตัว (ตารางที่ 2) ความกว้างหน้าอก (ตารางที่ 4) และความยาวแข้งของไก่ (ตารางที่ 5)

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการค้นหาความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *MC5R* ในไก่พื้นเมือง ซึ่งมีความยาว 2033 bp ถูกเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิค PCR ให้ได้แถบ DNA ที่มีขนาดพอเหมาะจำนวน 4 แถบ (*MC5R-1* ถึง *MC5R-4*) เพื่อใช้ศึกษารูปแบบของแถบ SSCP ที่ปรากฏแตกต่างกัน รวมถึงการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ระหว่างไก่พื้นเมืองที่มีน้ำหนักตัวมากกับไก่พื้นเมืองที่มีน้ำหนักตัวน้อย พบว่าคู่ไพรเมอร์ *MC5R-1* และ *MC5R-2* ให้รูปแบบ SSCP ที่แตกต่างกันจำนวน 3 รูปแบบ ส่วนคู่ไพรเมอร์ *MC5R-3* และ *MC5R-4* ให้รูปแบบ SSCP ที่ไม่แตกต่างกัน เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบ single nucleotide polymorphisms (SNPs) ในบริเวณ 5' flanking region จำนวน 3 ตำแหน่ง คือ 78(A>G), 249(A>G) และ 388(T>A) SNP ที่อยู่ใกล้กันมีแนวโน้มที่จะถูกถ่ายทอดไปด้วยกันเป็นชุดโดยไม่เปลี่ยนแปลง (haplotype) โดยเฉพาะเมื่อตรวจ SNP เหล่านั้นในกลุ่มประชากรที่ไม่มีการอพยพหรือเคลื่อนย้าย Takeuchi and Takahashi (1998) รายงานว่ายีน *MC5R* ในไก่พื้นเมืองของประเทศญี่ปุ่นมีการแสดงออกในตับ ไต สมอง เนื้อเยื่อไขมัน ต่อม adrenal gland และ ต่อม uropygial gland ซึ่งมีผลต่อการทำงานของสมอง และ เนื้อเยื่อ peripheral tissues ที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ส่วนในมนุษย์ยีน *MC5R* มีการแสดงออกในม้าม ปอด รังไข่

อัณฑะ สมอง ต่อม adrenal cortex ต่อม thymus และ ต่อม pituitary gland (Chhajlani, 1996) และในปลาคาร์พ ยีน *MC5R* มีการแสดงออกในสมอง ผิวหนัง ไต และต่อม pituitary gland (Juriaan *et al.*, 2005)

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีน *MC5R* ระหว่างไก่ที่มีน้ำหนักตัวมาก และไก่ที่มีน้ำหนักตัวน้อย พบ SNPs จำนวน 3 ตำแหน่ง ในจำนวนนี้ถูกเลือกมาพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุล DNA อย่างง่าย (PCR-RFLP) จำนวน 1 ตำแหน่ง คือ SNPs ที่ตำแหน่ง 249(A>G) ซึ่งพบว่าสามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin6I* สำหรับการจำแนก genotype ของ SNPs บนยีน *MC5R* ในไก่พื้นเมืองด้วยการใช้เครื่องหมายโมเลกุล DNA อย่างง่ายถูกพัฒนาขึ้น พบว่าการใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin6I* บนแถบยีน *MC5R-1* นั้น สามารถจำแนก genotype ของ SNPs ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 249 (A>G) ได้รูปแบบ genotype AA, AG และ GG ความถี่อัลลีลของยีนเท่ากับ 0.3, 0.44 และ 0.26 ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นความถี่อัลลีล G และ A มีค่าเท่ากับ 0.52 และ 0.48 ตามลำดับ ในสุกร Kim *et al.* (2000) รายงานว่าพบ SNPs 2 ตำแหน่งบนยีน *MC5R* ที่ตำแหน่ง 303(A>G) และที่ตำแหน่ง 841(C>T) โดย SNPs ที่ตำแหน่ง 303(A>G) ทำให้กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 109 เปลี่ยนจาก Alanine เป็น Threonine (Ala109Thr)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุล DNA บนยีน *MC5R* กับลักษณะทางการผลิตในไก่พื้นเมือง โดยพบว่าเครื่องหมายโมเลกุล *Hin6I* มีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันของไก่พื้นเมืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในช่วงอายุ 4 สัปดาห์ (0-4, 4-8, 8-16, 16-20) ($P=0.018, 0.011, 0.005, 0.020, 0.043$) ตามลำดับ ช่วงอายุ 12 สัปดาห์ (0-12) ($P=0.001$) และช่วงอายุ 24 สัปดาห์ (0-24) ($P=0.20$) โดยพบว่าไก่พื้นเมืองที่มี genotype GG มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันสูงที่สุด รองลงมาคือ genotype AA และ genotype A/G มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันต่ำที่สุด ในขณะที่เครื่องหมายโมเลกุล *Hin6I* กับน้ำหนักตัว ความกว้างหน้าอกและความยาวแข้งไม่มีความสัมพันธ์กัน นอกจากนี้ในสัตว์ชนิดอื่นมีรายงานการศึกษาในหนูที่ถูก knockouts ยีน *MC5R* พบว่ามีผล

Table 2 Least square mean (mean $\pm$ standard error) of indigenous chicken body weight.

Weight (Weeks)	No.	Body weight (g)			P-value
		A/A	G/A	G/G	
0	220	32.701 $\pm$ 0.393	33.012 $\pm$ 0.320	32.115 $\pm$ 0.426	0.244
1	220	61.687 $\pm$ 0.951	61.482 $\pm$ 0.784	60.161 $\pm$ 1.027	0.494
2	220	107.677 $\pm$ 1.938	106.930 $\pm$ 1.597	105.01 $\pm$ 2.101	0.637
3	220	154.926 $\pm$ 3.338	157.911 $\pm$ 2.749	149.08 $\pm$ 3.642	0.156
4	220	226.125 $\pm$ 5.376	233.136 $\pm$ 4.479	220.48 $\pm$ 5.853	0.217
5	220	319.647 $\pm$ 7.296	374.934 $\pm$ 5.951	308.401 $\pm$ 7.910	0.249
6	220	401.088 $\pm$ 8.962	414.507 $\pm$ 7.347	408.431 $\pm$ 9.624	0.512
7	220	502.010 $\pm$ 10.715	515.868 $\pm$ 8.596	500.784 $\pm$ 12.170	0.474
8	220	611.593 $\pm$ 13.432	623.275 $\pm$ 10.957	606.797 $\pm$ 14.563	0.624
10	220	835.385 $\pm$ 16.511	838.875 $\pm$ 13.469	838.286 $\pm$ 17.902	0.986
12	220	1108.861 $\pm$ 20.208	1106.820 $\pm$ 16.110	1104.704 $\pm$ 21.347	0.990
14	220	1308.617 $\pm$ 25.077	1318.605 $\pm$ 19.731	1287.378 $\pm$ 25.250	0.622
16	220	1522.317 $\pm$ 28.979	1528.011 $\pm$ 22.898	1514.020 $\pm$ 28.383	0.929
20	220	1856.624 $\pm$ 31.372	1894.087 $\pm$ 25.642	1883.944 $\pm$ 32.843	0.648

Table 3 Least square mean (mean $\pm$ standard error) of indigenous chicken average daily gain (ADG).

Age (Weeks)	No.	ADG (g/d)			P-value
		A/A	G/A	G/G	
0-4	220	7.053 $\pm$ 0.202	6.697 $\pm$ 0.165	7.480 $\pm$ 0.219	0.018*
4-8	220	14.390 $\pm$ 0.414	13.116 $\pm$ 0.339	14.612 $\pm$ 0.454	0.011*
8-12	220	18.066 $\pm$ 0.488	16.447 $\pm$ 0.395	18.320 $\pm$ 0.525	0.005*
12-16	220	15.573 $\pm$ 0.606	13.681 $\pm$ 0.487	15.501 $\pm$ 0.639	0.020*
16-20	220	12.591 $\pm$ 0.675	11.351 $\pm$ 0.520	13.497 $\pm$ 0.700	0.043*
20-24	220	10.317 $\pm$ 0.980	10.293 $\pm$ 0.775	10.153 $\pm$ 0.981	0.991
0-12	220	13.231 $\pm$ 0.307	12.172 $\pm$ 0.249	13.656 $\pm$ 0.331	0.001*
12-24	220	13.058 $\pm$ 0.537	11.805 $\pm$ 0.442	13.309 $\pm$ 0.54	0.066
0-24	220	13.249 $\pm$ 0.415	12.197 $\pm$ 0.342	13.689 $\pm$ 0.448	0.020*

* $P < 0.05$

Table 4 Least square mean (mean $\pm$ standard error) of indigenous chicken breast width.

Age (Weeks)	No.	Breast width (cm)			P-value
		A/A	G/A	G/G	
8	220	4.122 $\pm$ 0.040	4.122 $\pm$ 0.033	4.117 $\pm$ 0.044	0.996
12	220	5.040 $\pm$ 0.042	4.990 $\pm$ 0.033	4.987 $\pm$ 0.044	0.591
16	220	5.810 $\pm$ 0.045	5.780 $\pm$ 0.036	5.817 $\pm$ 0.044	0.781
20	220	6.238 $\pm$ 0.050	6.347 $\pm$ 0.041	6.235 $\pm$ 0.053	0.136
24	220	6.527 $\pm$ 0.061	6.440 $\pm$ 0.048	6.401 $\pm$ 0.062	0.326

Table 5 Least square mean (mean $\pm$ standard error) indigenous chicken leg length.

Age (Weeks)	No.	Leg length (cm)			P-value
		A/A	G/A	G/G	
8	220	5.868 $\pm$ 0.046	5.940 $\pm$ 0.038	5.930 $\pm$ 0.050	0.455
12	220	7.646 $\pm$ 0.055	7.649 $\pm$ 0.044	7.666 $\pm$ 0.058	0.965
16	220	8.992 $\pm$ 0.065	9.061 $\pm$ 0.051	9.064 $\pm$ 0.064	0.651
20	220	9.446 $\pm$ 0.070	9.578 $\pm$ 0.057	9.512 $\pm$ 0.073	0.340
24	220	9.975 $\pm$ 0.087	10.012 $\pm$ 0.068	10.076 $\pm$ 0.088	0.713

ก่อให้เกิดความผิดปกติในการทำงานของต่อม exocrine gland และการลดลงของปริมาณไขมันในขนหนู (Chen *et al.*, 1997) ส่วนความบกพร่องบนยีน *MC5R* ในหนูนั้น ส่งผลต่อพฤติกรรมความก้าวร้าวอย่างเด่นชัด (Morgan and Cone, 2006) ในการศึกษาความผันแปรของยีน *MC5R* ในมนุษย์พบว่ามีความสัมพันธ์กับการสะสมไขมันในร่างกายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Morgan *et al.*, 2004)

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *MC5R* ในไก่พื้นเมือง พบ single nucleotide polymorphisms (SNPs) ในบริเวณ 5' flanking region

จำนวน 3 ตำแหน่ง คือ 78(A>G), 249(A>G) และ 388(T>A) เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอในตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 249 ถูกตรวจสอบความผันแปรได้ด้วย restriction enzyme *Hin6I* ในไก่พื้นเมือง จำนวน 220 ตัว พบว่าเครื่องหมายโมเลกุล *Hin6I* มีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันในไก่พื้นเมืองอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยมีความถี่ genotype AA, GA และ GG เท่ากับ 0.3, 0.44 และ 0.26 ตามลำดับ คิดเป็นความถี่อัลลีล G และอัลลีล A เท่ากับ 0.52 และ 0.48 ตามลำดับ และพบว่าไก่พื้นเมืองที่มีจีโนไทป์ GG มีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันสูงสุด เครื่องหมายโมเลกุลที่ค้นพบนี้อาจเป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรมที่มีศักยภาพสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ไก่พื้นเมืองเพื่อคัดเลือกลักษณะการเจริญเติบโตต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

งานนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- ศิริลักษณ์ พรสุขศิริ เพทาย พงษ์เพียจันทร์ สุภูมิตร เมฆฉาย และสุรภี ทองหลอม. 2539. การประชุมเชิงปฏิบัติการ Molecular genetics in farm animal breeding. ภาควิชาสัตวศาสตร์ และโครงการจัดตั้งศูนย์บริการวิชาการ และเทคโนโลยีเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 20-27 พฤษภาคม 2539. 235 หน้า.
- สุภูมิตร เมฆฉาย. 2548. การปรับปรุงพันธุ์สัตว์. ภาควิชาสัตวศาสตร์, คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่. 187 หน้า.
- Beuschlein, F., M. Fassnacht, A. Klink, B. Allolio and M. Reincke. 2001. ACTH-receptor expression, regulation and role in adrenocortical tumor formation. *Eur. J. Endocrinol.* 144: 199-206.
- Carte, I.F. and P.B. Siegel. 1968. Correlation-heritabilities of unselected traits: a check on procedure. *Poultry Sci.* 47: 1821 – 1827.
- Cerda-Reverter, J.M., M.K. Ling, H.B. Schioth and R.E. Peter. 2003. Molecular cloning, characterization and brain mapping of the melanocortin 5 receptor in the goldfish. *J. Neurochemistry.* 10: 1354-1366.
- Chaki, S. and S. Okuyama. 2005. Involvement of melanocortin-4 receptor in anxiety and depression. *Peptides.* 26: 1952-1964.
- Chen, W., M.A. Kelly, X.O. Araya, R.E. Thomas, M.J. Low and R.D. Cone. 1997. Exocrine gland dysfunction in MC5-R deficient mice:

evidence for coordinated regulation of exocrine gland function by melanocortin peptides. *Cell.* 91: 789-798.

- Chhajlani, V. and J.E. Wikberg. 1996. Molecular cloning and expression of the human melanocyte stimulating hormone receptor cDNA. *FEBS Lett.* 309: 417-420.
- Collins, W.M., C.I. Bliss and H.M. Scott. 1950. Genetic selection for breast width in a strain of Rhode Island reds. *Poultry Sci.* 29: 881 – 887.
- Cone, R. D., D. Lu, S. Koppula, D.I. Vage, H. Klungland, B. Boston, W. Chen, D.N. Orth, C. Pouton and R. Kestereson. 1996. The melanocortin receptors: agonist, antagonists, and the hormonal control of pigmentation. *Recent Prog. Horm. Res.* 51: 287-318.
- Desarnaud, F., O. Labbe, D. Eggerickx, G. Vassart and M. Parmentier. 1994. Molecular cloning, function expression and pharmacological characterization of a mouse melanocortin receptor gene. *Biochem. J.* 299: 367-373.
- Jaturasitha, S., T. Srikanthai, 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.
- Jurjaan, R.M., J. Edwin, W. Geven, H. Erwin and G. Flik. 2005. ACTH, α -MSH, and control of cortisol release: cloning, sequencing, and functional expression of the melanocortin-2 and melanocortin-5 receptor in *Cyprinus carpio*. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 289: 814-826.
- Kim, H.S., S. Marklund and M.F. Rothschild. 2000. The porcine melanocortin-5 receptor (MC5R)

- gene: polymorphisms, linkage and physical mapping. *Anim. Genet.* 31: 230-231.
- Malek, Z.A. 2001. Melanocortin receptor: their functions and regulation by physiological agonists and antagonists. *Cell. Mol. Life Sci.* 58: 434-441.
- Morgan, C. and R.D. Cone. 2006. Melanocortin-5 receptor deficiency in mice blocks a novel pathway influencing pheromone-induced aggression. *Behav. Genet.* 36: 291-299.
- Morgan, C., R.E. Thomas and R.D. Cone. 2004. Melannocortin-5 receptor deficiency promotes defensive behavior in male mice. *Hormon. Behav.* 45: 58-63.
- Roselli-Rehfuss, L., K.G. Mountjoy, L.S. Robbins, M.T. Moutrud, M.J. Low, J.B. Tatro, M.L. Entwistle, R.B. Simerly and R.D. Cone. 1993. Identification of a receptor for γ malanotropin and other proopiomelanocortin peptides in the hypothalamus and limbic system. *Pro. Natl. Acad. Sci.* 90: 8856-8860.
- Takeuchi, S. and S. Takahashi. 1998. Melanocortin receptor genes in the chicken-tissue distributions. *Gen. Comp. Endocrinol.* 112: 220-231.
- Voisey, J., L. Carroll and A. Daal. 2003. Melanocortins and their receptors and antagonists. *Current Drug Targets.* 4: 586-597.
-