

การวิเคราะห์ยีนไมโทคอนเดรียโดยใช้ยีน D-loop, Phe-tRNA, 12S-rRNA (bar2) ในไก่กระดูกดำเปรียบเทียบกับพันธุ์ไก่จากธนาคารยีน

Analysis of the D-loop, Phe-tRNA, 12S-rRNA (bar2) mitochondrial gene in black-bone chickens compared to other chickens from gene banks

ปาลิดา วาจะเสน¹ วิราวรรณ นุชนารถ¹ สิริวดี พรหมน้อย² ธนพล พวงมาลี³ และ วันวิสา ชุ่มเงิน^{1*}
Palida Vajasen¹, Wirawan Nuchchanart¹, Siriwadee Phromnoi², Thanaphon Puangmalee³
and Wanwisa Chumngoen^{1*}

บทคัดย่อ

ไก่ดำเป็นสัตว์เศรษฐกิจสายพันธุ์หนึ่งที่มีความนิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีสรรพคุณทางยา ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและเกี่ยวข้องกับการทำงานของภูมิคุ้มกัน ไก่ดำจึงเป็นที่นิยมบริโภคในกลุ่มของคนใส่ใจสุขภาพ ไก่กระดูกดำมีความหลากหลายทางสายพันธุ์ของไก่ที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทยในขณะที่ไก่ดำมีราคาที่สูงเมื่อเทียบกับไก่สายพันธุ์อื่น โดยเฉพาะไก่ดำอินโดนีเซียที่เป็นไก่ที่มีสีดำตลอดทั้งตัวจนถึงขน กระดูกและเนื้อที่มีสีดำจึงมีความต้องการไก่ดำอินโดนีเซียที่เป็นสายพันธุ์แท้ แต่ในประเทศไทยขาดข้อมูลทางความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่กระดูกดำที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทย การศึกษาจึงมีวัตถุประสงค์หาความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน D-loop, Phe-tRNA และ 12S-rRNA (bar2) ซึ่งเป็นยีนไมโทคอนเดรียเพื่อหาเครื่องหมายพันธุกรรม (genetic marker) ที่แตกต่างกันในไก่สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยใช้ไก่ดำอินโดนีเซียที่เลี้ยงในประเทศไทยจำนวน 14 ตัว เปรียบเทียบกับข้อมูลไก่จากฐานข้อมูล GenBank จำนวน 70 ตัวอย่าง โดยทำการวิเคราะห์โดยใช้ PCR และนำ PCR product ไปวิเคราะห์หาลำดับเบส ทำการหา haplotype โดยใช้ DnaSP6 และสร้างต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้ MEGA 11 ผลการวิเคราะห์พบว่า ไก่ดำอินโดนีเซียส่วนใหญ่มีลำดับนิวคลีโอไทป์ในส่วนที่ยีนเป้าหมายมีความแตกต่างอย่างจำเพาะจากไก่นอกอื่น (outgroup) แต่มีลำดับนิวคลีโอไทป์ใกล้เคียงกับไก่นอกที่แสดงโดยดูจากผลที่แสดงใน phylogenetic tree ผลของ haplotype พบว่าในไก่ดำอินโดนีเซียถูกแบ่งออกเป็น 7 haplotypes จึงสามารถบ่งบอกถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีสูงของไก่ดำอินโดนีเซียในประเทศไทยได้ และพบว่าลำดับเบสตรงตำแหน่งที่ 812 bp มีลำดับเบสเฉพาะใน haplotypes 1-7 ของไก่ดำอินโดนีเซียโดยมีเบสเป็น T ทั้งหมด ในขณะที่ haplotypes 8-14 ของไก่จากฐานข้อมูล GenBank มีเบสเป็น C ทั้งหมด ดังนั้น ในงานวิจัยต่อไปสามารถนำลำดับนิวคลีโอไทป์ของไก่ดำอินโดนีเซียในตำแหน่ง 812 bp ที่เป็นตำแหน่งสโนปส์ (SNPs) สามารถพัฒนาเป็น molecular marker ใช้ในการคัดเลือกไก่ดำได้ในอนาคต

คำสำคัญ: ไก่กระดูกดำ ความหลากหลายทางพันธุกรรม ไก่ดำอินโดนีเซีย ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ

¹ คณะเกษตร กำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

¹ Faculty of Agriculture at Kamphaeng Saen, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus

² คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์

² Faculty of Science and Technology, Uttaradit Rajabhat University

³ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

³ Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus

* Corresponding author. E-mail: wanwisa.c@ku.th

Abstract

Black chickens are an economically important animal species that are extensively grown, having high nutritional value and therapeutic characteristics, which work as an antioxidant and play a role in immunological function. They are popular among health-conscious individuals. Black-bone chicken is a variety of chicken breeds raised in Thailand, while black chickens are expensive compared to other chicken breeds, especially Indonesian black chickens which are black throughout the body even the feathers, bones and meat. So, there is a demand for pure breed Indonesian black chickens. However, there is a lack of information on the genetic diversity of black-bone chickens raised in Thailand. This study aimed to find the genetic diversity of the D-loop, Phe-tRNA and 12S-rRNA (bar2) genes located in the mitochondria. The 14 Indonesian black chickens grown in Thailand were compared to 70 samples of chicken data from the GenBank database to identify genetic markers that differ in different chicken breeds. The analysis was performed using PCR and then the PCR product was analyzed to determine the base sequence. The haplotypes were determined using DnaSP6 and the phylogenetic tree was constructed using MEGA 11. The results found that most Indonesian black chickens had nucleotide sequences of their target genes that were uniquely different from those of other chickens (outgroup). On the other hand, they had nucleotide sequences that were closest to the Silkie chickens, based on the results shown in the phylogenetic tree. The results of the haplotype found that Indonesian black chickens were divided into 7 haplotypes, indicating the high genetic diversity of Indonesian black chickens in Thailand. It also was found that the sequence at position 812 bp had a specific sequence in haplotypes 1-7 of Indonesian black chickens with T bases, while haplotypes 8-14 of chickens from the GenBank database had all C bases. In future study, the nucleotide sequence of Indonesian chickens at the 812 bp location, specifically the SNPs, can be utilized as a molecular marker to identify and select black chickens.

Keywords: black-bone chicken, genetic diversity, Indonesian black chicken, mitochondrial DNA

บทนำ

ไก่กระดูกดำ (black-bone chicken) มีลักษณะเด่นที่แตกต่างจากไก่ทั่วไป คือ มีการสะสมเม็ดสีเมลานิน (melanin) ในปริมาณสูงกว่าปกติหรือเรียกว่า hyperpigmentation บริเวณผิวหนังและอวัยวะภายในร่างกาย รวมทั้งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันต่าง ๆ ภายในร่างกาย จึงทำให้บริเวณที่มีการสะสมเม็ดสีเหล่านั้นมีสีดำ เป็นผลเนื่องมาจากการกลายพันธุ์ในระดับยีน (gene mutation) และการทำงานร่วมกันระหว่างยีน (gene interaction) (Dorshorst, Okimoto, & Ashwell, 2010) ลักษณะปรากฏของการสะสมเม็ดสีที่ผิดปกติบริเวณเนื้อเยื่อต่าง ๆ เหล่านี้ถูกเรียกว่า fibromelanosis

(Fm) (Muroya, Tanabe, Nakajima, & Chikuni, 2000) ต้นกำเนิดของไก่กระดูกดำถูกสันนิษฐานว่ามาจากประเทศจีน อินเดีย และอินโดนีเซีย ไก่กระดูกดำมีหลากหลายสายพันธุ์ ซึ่งสายพันธุ์ไก่กระดูกดำที่ถูกบันทึกลงในฐานข้อมูล DAD-IS (domestic animal diversity information system) ของ FAO (food and agriculture organization of the united nations) มีทั้งหมด 25 สายพันธุ์ (Lukanov, & Genchev, 2013) เกือบทั้งหมดมีต้นกำเนิดมาจากเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ไก่กระดูกดำถูกยกให้เป็นสัตว์เศรษฐกิจสายพันธุ์หนึ่ง ที่ได้รับความนิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย เนื่องจากเป็นสัตว์ที่เลี้ยงง่ายเหมือนไก่บ้านทั่วไป

และสามารถขายได้ราคาดี รูปร่างค่อนข้างแตกต่างจากไก่พื้นเมืองทั่วไป ตรงที่มีผิวหนังสีดำ สรรพคุณทางยามากมาย ทั้งการเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของร่างกาย บำรุงสุขภาพผู้สูงอายุ หญิงมีครรภ์ และผู้ป่วย อีกทั้งยังมีคุณค่าทางโภชนาการสูง ทั้งนี้สีดำที่ปรากฏในเนื้อและกระดูกนั้นเป็นผลมาจากการทำงานของสารเมลานิน (melanin) ซึ่งพบว่าทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระและเกี่ยวข้องกับการทำงานของภูมิคุ้มกัน และเมื่อรับประทานไก่ดำจะช่วยลดการเกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจ ทำให้ไก่ดำเป็นที่นิยมบริโภคในกลุ่มของคนที่ไม่ใส่ใจสุขภาพทั้งในประเทศและต่างประเทศ (Shii et al., 2022; Yu, Wang, Liao, & Tang, 2018) แต่ในปัจจุบันไก่ดำยังไม่มีข้อมูลทางความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่กระดูกดำที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทยรวมทั้งข้อมูลของต้นกำเนิดที่แท้จริงของไก่ดำสายพันธุ์แท้จึงมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและข้อมูลทางพันธุกรรมของไก่ดำในประเทศไทยเพิ่มมากขึ้น

ไก่ดำอินโดนีเซีย เป็นที่รู้จักกันในชื่อ Ayam Cemani หรือ Ayam Kedu เป็นไก่ท้องถิ่นที่เกิดจากการเลี้ยงไก่ป่า 4 สายพันธุ์มานานเป็นเวลาหลายปี ประกอบด้วยไก่ป่าสีเขียว (*Gallus varius*), ไก่ป่าสีแดง (*Gallus gallus*), ไก่ป่าสีเทาอินเดีย (*Gallus soneratti*) และไก่ป่าสีส้มซีลอน (*Gallus lavayetti*) (Muladno, 2008) โดยมีต้นกำเนิดมาจากเมืองเตมันกุง (Temanggung) ในชวากลาง (Habsari, Nugroho, & Azizah, 2018) ชาวอินโดนีเซียเชื่อว่าไก่ดำมีความเกี่ยวข้องกับเรื่องลึกลับในอินโดนีเซีย บางภูมิภาคมักใช้ไก่พันธุ์นี้ในงานทางศาสนาหรือประเพณีของชาวอินโดนีเซีย และเป็นไก่ที่มีเอกลักษณ์ที่สุดในอินโดนีเซียโดยมี

สีดำตลอดทั้งตัวจนถึงกระดูก ขน จะอวบปาก ผิวหนัง เล็บ และเนื้อที่มีสีดำ เมื่อไก่อายุมากขึ้นสีก็จะดำมากขึ้น จึงเรียกว่าไก่ดำ ไก่ดำอินโดนีเซียมีราคาค่อนข้างสูงเพราะเป็นไก่หายากที่เชื่อกันว่ามีคุณค่าทางการแพทย์ ได้แก่ การรักษาโรคหัวใจ หลอดเลือด และระบบทางเดินหายใจ เป็นเหตุผลที่คนจำนวนมากต้องการไก่ดำอินโดนีเซียเพื่อบริโภคและเลี้ยงเพื่อการปศุสัตว์ (Kostaman, Sopiyan, Isbandi, & Pasaribu, 2021)

จีโนมไมโทคอนเดรียของไก่เป็นโมเลกุล DNA ทรงกลมมีความยาวลำดับเบสทั้งหมด 16,785 bp (Bao, Zhao, Li, & Wu, 2008) ซึ่งประกอบด้วยยีนส์โปรตีนจำนวน 13 ยีน, ribosomal RNA (rRNA) จำนวน 2 ยีน และ transfer RNA (tRNA) จำนวน 22 ยีน ในลักษณะเดียวกับไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (mtDNA) ชนิดอื่นของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Desjardins, & Morais, 1990) mtDNA เป็นการถ่ายทอดทางพันธุกรรมจากมารดา (maternal inheritance) (Miao et al., 2013) ทำให้ไก่มีรหัสพันธุกรรมของ mtDNA เหมือนกัน นอกจากนี้ mtDNA ไม่มีการ recombination (lack of recombination) และมีความผันแปรของลำดับเบส (mutation rate) สูงกว่าใน nuclear DNA (Meerasen, Duangjit, & Yasothonsrikul, 2009) บริเวณ control region หรือ displacement loop (D-loop) ใน mtDNA มีข้อมูลความหลากหลายสูงเป็นบริเวณที่นิยมวิจัยทรัพยากรพันธุกรรมที่สำคัญในการหาความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการ ตรวจสอบต้นกำเนิดของมารดา ประเมินความหลากหลายของประชากร และกำหนดโครงสร้างสายวิวัฒนาการ (Groeneveld et al., 2010; Wilkinson, Wiener, Teverson, Haley, & Hocking, 2012)

mtDNA เป็นหนึ่งในเครื่องหมายบน DNA ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายมากที่สุดในการศึกษาทางพันธุกรรมเพื่อการอนุรักษ์ เพื่อประเมินวิวัฒนาการ ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากร และความสัมพันธ์ของบุคคล (Arif et al., 2011) และตั้งแต่ปี 1990 เป็นต้นมา mtDNA D-loop ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการติดตามประวัติการเลี้ยงไก่เนื่องจากมีอัตราการกลายพันธุ์สูง (Di Lorenzo, Ceccobelli, Panella, Attard, & Lasagna, 2015; Lan, Hu, Zhu, & Liu, 2017) การหาเครื่องหมายพันธุกรรม (genetic marker) ที่แตกต่างกันในไก่สายพันธุ์ต่าง ๆ และการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและการสืบต้นกำเนิดของไก่สายพันธุ์ต่าง ๆ นอกจากนี้ Cui, Ibtisham, Xu, Huang, & Su (2017) ได้พัฒนา DNA barcoding เพื่อใช้คัดเลือก ไก่พื้นเมืองของจีนโดยได้ออกแบบไพรเมอร์ของ PCR จากยีน cytochrome c oxidase I (COI) ออกมา 2 ชุดคือ bar1 และ bar2 หลังจากนั้นมีการนำ bar2 มาใช้เพื่อหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองในประเทศไทยหลายงานวิจัยเช่น Likittrakulwong, Poolprasert, & Roytrakul (2018) ได้นำ bar2 มาใช้เพื่อศึกษาความหลากหลายของไก่ไข่ ไก่ต้อ และไก่เหลืองหางขาวและได้รายงานว่ bar2 นั้นไม่ได้มาจากยีน COI แต่มาจาก mtDNA D-loop และ Siriwadee, Wirot, Thanapol, & Wirawan (2023) ได้นำ bar2 มาใช้เพื่อศึกษาความหลากหลายของไก่เขียวพาลิปกับไก่พื้นเมืองของประเทศไทย และแสดงว่า bar2 มาจาก 3 ส่วนของยีนใน mtDNA คือ ยีน D-loop, Phe-tRNA และ 12S-rRNA จึงมีการนำ bar2 มาใช้เพื่อหาความหลากหลายทางพันธุกรรมในงานวิจัยนี้ ซึ่งงานวิจัยนี้สามารถเป็นแนวทางที่จะช่วยในการ

อนุรักษ์และหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมเพื่อช่วยในการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์ไก่โดยการประยุกต์ใช้ข้อมูล SNPs มาใช้จะช่วยให้สามารถคัดเลือกสัตว์ได้ตั้งแต่อายุยังน้อย (Wolc et al., 2011) และลดการเกิดอัตราเลือดชิด (Daetwyler, Villanueva, Bijma, & Woolliams, 2007) รวมทั้งยังเป็นข้อมูลทางความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่กระดูกดำที่เพาะเลี้ยงในประเทศไทยในอนาคตต่อไป

ดังนั้นวัตถุประสงค์ในงานวิจัยนี้จึงเพื่อหาความหลากหลายและศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของไก่กระดูกดำโดยศึกษาในยีน D-loop, Phe-tRNA และ 12S rRNA ของไก่คอนเดรียในไก่กระดูกดำ และไก่สายพันธุ์พื้นเมืองจากฐานข้อมูล GenBank

วิธีการศึกษา

การสุ่มตัวอย่างและการเก็บรวบรวมข้อมูล

งานวิจัยนี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยบรรณและมาตรฐานการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (เลขที่ ACKU65-AGK-027) โดยทำการเก็บเลือดไก่ดำอินโดนีเซีย จากฟาร์มไก่เอกชน อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ระบบการเลี้ยงแบบปล่อย แบ่งเป็น 3 คอก ๆ ละ 10 ตัว ทำการคัดเลือกไก่เพศเมีย อายุ 7-8 เดือน น้ำหนักประมาณ 1.70-2 กิโลกรัม จำนวน 20 ตัว ทำการเจาะเส้นเลือดดำที่ปีกโดยใช้เข็มฉีดยาที่ปลอดเชื้อและเก็บไว้ในหลอดเก็บเลือด จากนั้นเก็บไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตัวอย่างเลือด (1 มิลลิลิตร) ผสมกับสารละลายด้านการแข็งตัวของเลือด 0.50 มิลลิลิตร [กรดเอทิลีนไดอามีนเตตราอะซิติก (ethylene diamine tetra-acetic acid: EDTA)] เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์

ทางพันธุกรรม และจากนั้นเก็บไว้ที่ตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนำไปสกัดดีเอ็นเอต่อไป

การวิเคราะห์ทางพันธุกรรมโดยใช้ลำดับ mtDNA

1. การสกัด DNA

นำตัวอย่างเลือดที่เก็บมาจากฟาร์มละลาย แล้วดูดใส่หลอดใหม่ 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนที่เหลวออก เติม CTAB buffer 600 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง เติม proteinase K ที่ความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร โดยเติม 20 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง แล้ว vortex ให้เข้ากัน นำไปต้มข้ามคืนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง heatblock แล้วนำแช่ที่ตู้เย็น อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง แล้วทำให้ละลายที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นใส่ chloroform : isoamyl alcohol (IAA)(24:1) 500 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง vortex ให้เข้ากัน แล้วนำเข้าเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนใน tube ใหม่ ประมาณ 400 ไมโครลิตร เติม isopropanol 1000 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง แล้ว invert ให้เข้ากัน แล้วนำแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน นำออกมา centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทของเหลวออกให้เหลือ ตะกอน เติม 70 เปอร์เซ็นต์ ethanol นำ centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทของเหลวเพื่อนำไปตากตะกอนให้แห้ง เมื่อตะกอนแห้งใส่ TE buffer 120 ไมโครลิตรต่อ 1 ตัวอย่าง เพื่อให้ตะกอนละลายและ vortex ให้เข้ากัน (Robertson, Shore, & Miller, 1997)

2. การทำ PCR และหาลำดับเบส DNA

วัดความเข้มข้น DNA ที่สกัดได้จากการสกัด DNA โดยใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่มีค่าการดูดกลืนที่ 260/280 นาโนเมตร และปรับความเข้มข้นของ DNA ให้เท่ากันทุกตัวอย่าง นำไปทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่คู่จำเพาะกับยีน D-loop, Phe-tRNA และ 12S-rRNA ในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (mtDNA) มีขนาดของ PCR product ที่ 648 bp (bar2 F 5'-TCA AGT GAA GCC TGG ACT AC-3', bar2 R 5'-TGC GGA TAC TTG CAT GTA TAT- 3') (Likittrakulwong, Poolprasert, & Roytrakul, 2018) ปฏิบัติ PCR แต่ละปฏิกิริยาถูกดำเนินการโดยใช้ปริมาตรสุดท้าย 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยน้ำบริสุทธิ์ที่ปราศจากเชื้อ 10.50 ไมโครลิตร, มาสเตอร์มิกซ์ RealStartDNA 17.50 ไมโครลิตร, F ไพรเมอร์ 1 ไมโครลิตร (10 มิลลิโมลาร์), R ไพรเมอร์ 1 ไมโครลิตร (10 มิลลิโมลาร์) และเทมเพลต DNA 5 ไมโครลิตร โปรแกรมของ PCR ประกอบด้วย pre denaturing 5 นาทีที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส ตามด้วย denaturing 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส, annealing 30 วินาที ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส, extension 1 นาที ที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส วนกลับไป denaturing ทำซ้ำ 35 รอบ และสุดท้าย final extension 5 นาทีที่อุณหภูมิ 68 องศาเซลเซียส PCR product ตรวจสอบผลภายใต้แสงยูวีหลังจากทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ (Robertson, Shore, & Miller, 1997) ส่งไปเพื่อทำ PCR product gel extraction และหาลำดับเบสโดยการส่งไปยังบริษัท เอ ที จี ซี จำกัด กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย ที่ใช้เครื่อง 3730XL ในการวิเคราะห์ดีเอ็นเอ

การจัดข้อมูล DNA sequencing และหา haplotype

จัดข้อมูล DNA sequencing ของไก่กระดูกดำอินโดนีเซียและข้อมูลลำดับเบสจากฐานข้อมูล NCBI โดยใช้โปรแกรม molecular evolutionary genetics analysis 11 (MEGA 11) เพื่อทำการ multiple sequence alignment โดยใช้ CLUSTALW และตัดลำดับเบสส่วนเกินที่ไม่เข้ากันออก จากนั้นยืนยันตำแหน่งสลับ (SNP) และหา haplotype โดยการใช้โปรแกรม DNA sequence polymorphism 6 (DnaSP6) (Rozas et al., 2017) เพื่อทำการหา haplotype และหาตำแหน่งของ haplotype จากการทำ DNA sequencing เปรียบเทียบกับข้อมูลอ้างอิงจาก NCBI

การทำต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

ใช้โปรแกรม molecular evolutionary genetics analysis 11 (MEGA 11) เพื่อทำการวิเคราะห์ phylogenetic tree โดยใช้วิธี maximum likelihood (Tamura et al., 2011) และใช้โมเดล

Tamura-Nei (Tamura, & Nei, 1993) +G, parameter เพื่อทำให้ผลออกมาเป็นกราฟต้นไม้วิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

ผลการทำ PCR และหาลำดับเบส DNA ของไก่ดำ

ผลการทำ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีน D-loop, Phe-tRNA และ 12S-rRNA ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (mtDNA) มีขนาดของ PCR product ที่ 648 bp และถูกทำให้มองเห็นภายใต้แสงยูวี หลังจากทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนเจลอะกาโรส 2 เปอร์เซ็นต์ ที่ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ พบว่าบาร์โค้ด DNA ของตัวอย่างไก่ดำอินโดนีเซียจาก 20 ตัว เมื่อมองภายใต้แสงยูวีพบ PCR product ของไก่ดำอินโดนีเซีย 14 ตัวที่ความเข้มของแบนเพียงพอต่อการนำไปหาลำดับเบส และมีขนาดของ PCR product อยู่ในขนาดประมาณ 650 bp ดัง (Figure 1)

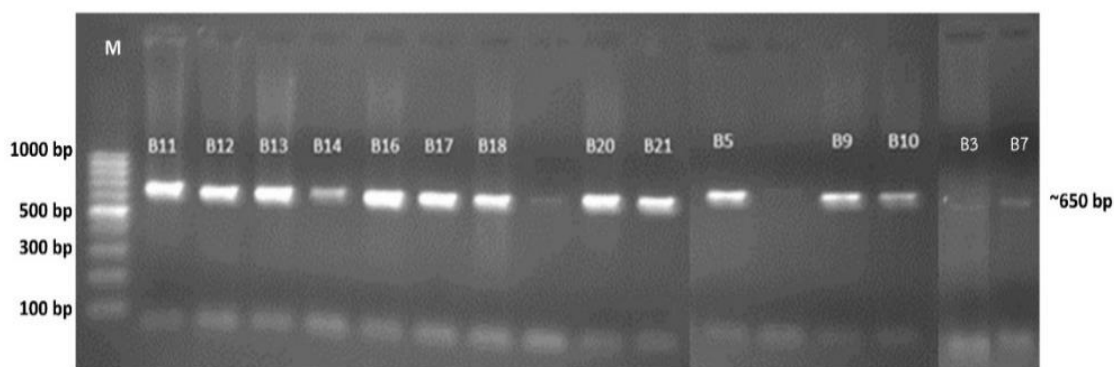


Figure 1 Electrophoresis on a 2% agarose gel of D-loop, tRNA, and rRNA genes in mitochondrial DNA (mtDNA) of 14 Indonesian black chickens. PCR product size of 648 bp. (M:DNA marker 100 bp ladder).

ผลการหา haplotype

การวิเคราะห์ความหลากหลายลำดับนิวคลีโอไทป์ของยีน D-loop, Phe-tRNA และ 12S-rRNA จากไก่ดำอินโดนีเซีย 14 ตัวอย่าง และข้อมูลไก่จากฐานข้อมูล GenBank 70 ตัวอย่าง รวมทั้งหมดในการวิเคราะห์การหา haplotype 84 ตัวอย่าง พบ haplotype ทั้งหมด 14 haplotype ไก่ดำอินโดนีเซียมี haplotype ทั้งหมด 7 haplotype อยู่ใน haplotype 1-7 โดย haplotype 1 มีไก่ดำอินโดนีเซียมากที่สุด คือ B5, B11, B13, B14, B18 และ B21 ส่วนของ haplotype 2 มีไก่ดำอินโดนีเซียจำนวน 2 ตัว คือ B3 และ B7 ส่วนของ haplotype 3 มีไก่ดำอินโดนีเซียจำนวน 2 ตัว คือ B9 และ B16 ส่วนของ haplotype 4-7 มีไก่ดำอินโดนีเซียจำนวน 1 ตัว คือ B10, B12, B17 และ B20 ตามลำดับ และไก่ส่วนใหญ่จากฐานข้อมูล GenBank อยู่ใน haplotype 9 และ haplotype 13 จำนวน 28 และ 34 ตัวอย่าง ตามลำดับ และตำแหน่งของนิวคลีโอไทป์ต่างกัน 17 ตำแหน่ง คือ 801, 802, 803, 812, 834, 907, 919, 930, 1149, 1151, 1255, 1256, 1310, 1318, 1347, 1381 และ 1392 bp ดัง (Table 1) ผล haplotypes ทั้งหมดทำให้พบว่าลำดับเบสตรงตำแหน่งที่ 812 bp มีลำดับเบสเฉพาะสำหรับไก่ดำอินโดนีเซีย โดยที่ใน haplotypes 1-7 ของไก่ดำมีเบสเป็น T ทั้งหมด ในขณะที่ haplotypes 8-14 ของไก่จากฐานข้อมูล GenBank มีเบสเป็น C ทั้งหมด จากการทดลองแสดงให้เห็นได้อย่างชัดเจนว่าไก่ดำอินโดนีเซียที่เลี้ยงในประเทศไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูงโดยดูจากผลที่แสดงไก่ดำอินโดนีเซียมี haplotype ทั้งหมด 7 haplotype การที่ไก่สายพันธุ์เดียวกันสามารถมี haplotype ในไมโทคอนเดรียต่างกันได้นั้นเกิดจากการที่มีบรรพบุรุษต่างกันเพราะ mtDNA เป็นการถ่ายทอด

ทางพันธุกรรมจากมารดา (maternal inheritance) (Miao et al., 2013) และไม่มี recombination จะทำให้ไก่มีรหัสพันธุกรรมของ mtDNA เหมือนกันจึงสามารถใช้เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมได้

ผลการวิเคราะห์ต้นไม้วิวัฒนาการ phylogenetic tree

การวิเคราะห์ลำดับเบสของไก่ดำอินโดนีเซีย 14 ตัว ได้แก่ B3, B5, B7, B9, B10, B11, B12, B13, B14, B16, B17, B18, B20 และ B21 ใน mtDNA บริเวณยีน D-loop, Pre-tRNA และ 12S-rRNA นำข้อมูลลำดับเบสที่ได้ส่งเข้าฐาน GenBank ภายใต้หมายเลข OP661325.1, OP661327.1, OP661326.1, OP661328.1, OP661329.1, OP661330.1, OP661331.1, OP661332.1, OP661333.1, OP661334.1, OP661335.1, OP661336.1, OP661337.1 และ OP661338.1 ตามลำดับ แล้วนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทป์จากฐานข้อมูล GenBank และเป็นยืนยันว่าลำดับนิวคลีโอไทป์ที่ได้จากไก่ดำคือลำดับนิวคลีโอไทป์ของยีน D-loop, Phe-tRNA และ 12S-rRNA จากไก่สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยมีลำดับเบสคล้ายกันและพบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทป์ที่คล้ายกับตัวอย่างในงานวิจัย 99-100 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 70 ตัวอย่าง จากนั้นใช้โปรแกรม Molecular evolutionary genetics analysis 11 (MEGA 11) เพื่อทำการวิเคราะห์ phylogenetic tree

ผลการวิเคราะห์ phylogenetic tree ดัง (Figure 2) ตัวอย่าง B5, B9, B10, B11, B12, B13, B14, B16, B17, B18, B20 และ B21 เปรียบเทียบกับข้อมูลจากฐานของ NCBI ผลการวิเคราะห์พบว่า ไก่ดำอินโดนีเซียส่วนใหญ่มีลำดับนิวคลีโอไทป์ในส่วนของยีนเป้าหมายมีความแตกต่างอย่างจำเพาะจากไก่ชนิดอื่น (outgroup) แต่ไก่ดำอินโดนีเซียส่วนใหญ่มีระดับวิวัฒนาการที่

ใกล้เคียงกับไกชิลก็จากประเทศจีน เมื่อเปรียบเทียบลักษณะภายนอกพบว่าไกทั้งสองชนิดมีผิวหนังและอวัยวะภายในที่เป็นสีดำเหมือนกัน งานวิจัยของ Prakash et al. (2023) ได้แสดงให้เห็นว่าไกชิลก็มีถิ่นจำเพาะที่ทำให้เกิดรอยดำจากการเพิ่มจำนวนของยีน endothelin 3 (EDN3) ซึ่งทำให้เกิดเม็ดสีเมลานิน (melanin) สีดำหรือสีเข้มจำนวนมากในเนื้อเยื่อทั้งภายในและภายนอก (ผิวหนัง) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Dharmayanthi et al. (2017) กล่าวว่าไกดำอินโดนีเซียแสดงรอยดำ

บนผิวหนังหรือ fibromelanosis คล้ายกับไกชิลก็ของประเทศจีน เนื่องจากมียีน endothelin 3 (EDN3) มี 2 ชุดบนโครโมโซมที่ 20 และไกดำอินโดนีเซีย B3 และ B7 มีระดับวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกับไกแจ้ (Kai-Tor), ไก่เหลืองหางขาว (WTY), ไก่ไข่ (HL) ซึ่งเป็นไก่พื้นเมืองของประเทศไทยและไกแจ้หยางจากประเทศจีน ทำให้สันนิษฐานได้ว่าไกดำอินโดนีเซียในประเทศไทยอาจมีการผสมข้าม (crossbreed) กับไก่พื้นเมืองของประเทศไทย

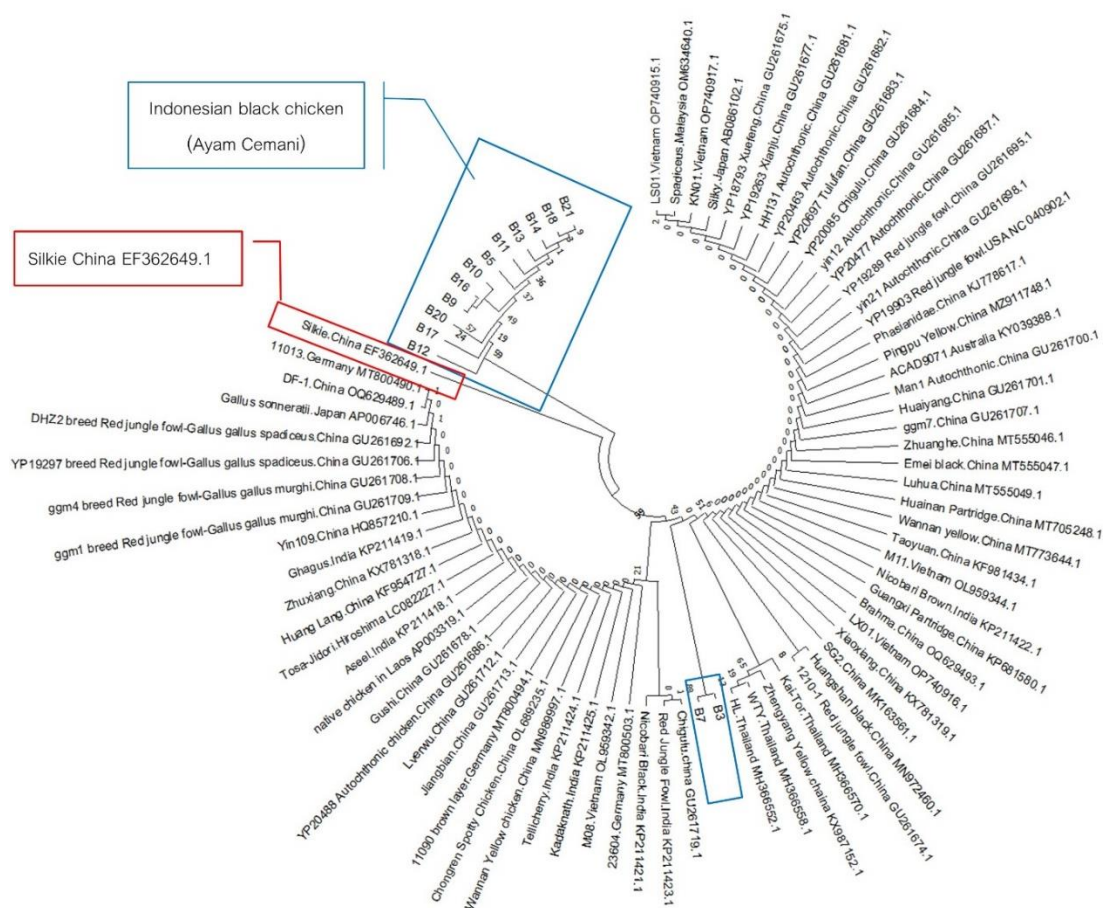


Figure 2 Phylogenetic tree of chicken breeds from mitochondrial genes using the Tamura-Nei model (Tamura, & Nei, 1993) +G, parameter, repeated at 100 bootstrap.

Table 1 Polymorphic sites of haplotypes.

haplotype	polymorphic nucleotide site																	no. birds
	801	802	803	812	834	907	919	930	1149	1151	1255	1256	1310	1318	1347	1381	1392	
1	A	G	T	T	G	T	G	T	A	G	T	G	A	G	A	A	G	6
2	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	*	G	*	G	G	*	2
3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	2
4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	*	*	*	A	*	*	*	1
5	G	T	C	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	A	1
6	T	T	C	*	*	*	*	*	*	A	*	*	*	*	*	*	*	1
7	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	*	*	1
8	G	T	C	C	*	*	*	*	G	*	C	A	G	*	G	G	*	3
9	G	T	C	C	*	*	*	*	G	*	*	*	G	*	G	G	*	28
10	G	T	C	C	*	*	A	*	G	*	C	*	G	*	G	G	*	1
11	G	T	C	C	A	*	*	*	G	*	C	A	G	*	G	G	*	1
12	G	T	C	C	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	G	G	*	1
13	G	T	C	C	*	*	*	*	G	*	C	*	G	*	G	G	*	34
14	G	T	C	C	*	*	*	C	G	*	C	*	G	*	G	G	*	1

note: * indicates nucleotides that are identical to haplotype 1.

สรุป

ผลของ phylogenetic tree พบว่าไก่ดำอินโดนีเซีย (B5, B9, B10, B11, B12, B13, B14, B16, B17, B18, B20 และ B21) มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับไก่ซิลก็่มากที่สุด สันนิษฐานได้ว่าไก่ดำอินโดนีเซียและไก่ซิลก็มีบรรพบุรุษร่วมกัน และไก่ดำอินโดนีเซีย (B3 และ B7) มีการผสมข้ามสายพันธุ์ (crossbreed) กับไก่พื้นเมืองของประเทศไทย ทำให้มีนิวคลีโอไทด์ในส่วนของไมโทคอนเดรียใกล้เคียงกับไก่ประจำถิ่นของประเทศไทย และผลของ haplotypes พบว่าไก่ดำอินโดนีเซียมีความหลากหลายทางพันธุกรรมเนื่องจากสามารถแบ่ง haplotype ได้ออกเป็น 7 haplotype จากไก่ดำอินโดนีเซียทั้งหมด 14 ตัว ซึ่งสามารถบ่งบอกถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มีสูงของไก่ดำอินโดนีเซียในประเทศไทยได้ และสามารถพบเบสที่มีความจำเพาะกับไก่ดำอินโดนีเซียที่ลำดับเบสตรงตำแหน่งที่ 812 bp มีลำดับเบสจำเพาะใน haplotypes 1-7 ของไก่ดำ

โดยมีเบสเป็น T ทั้งหมด ในขณะที่ haplotypes 8-14 ของไก่ดำอินโดนีเซียมีเบสเป็น C ทั้งหมด ดังนั้นในงานวิจัยต่อไปสามารถนำลำดับนิวคลีโอไทป์ของไก่ดำอินโดนีเซียในตำแหน่ง 812 bp ที่เป็นตำแหน่ง snipส์ (SNPs) ไปพัฒนาเป็น molecular marker ใช้ในการคัดเลือกไก่ดำได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

- Arif, I. A., Khan, H. A., Bahkali, A. H., Al Homaidan, A. A., Al Farhan, A. H., Al Sadoon, M., & Shobrak, M. (2011). DNA marker technology for wildlife conservation. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 18(3), 219-225.
- Bao, H., Zhao, C., Li, J., & Wu, C. (2008). Sequencing and alignment of mitochondrial genomes of Tibetan chicken and two lowland chicken breeds. *Science in China Series C: Life Sciences*, 51, 47-51.
- Cui, H., Ibtisham, F., Xu, C., Huang, H., & Su, Y. (2017). DNA barcoding of Chinese native chicken

- breeds through COI gene. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 47(1), 123-129.
- Daetwyler, H. D., Villanueva B., Bijma P., & Woolliams J. A. (2007). Inbreeding in genome-wide selection. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 124(6), 369-376.
- Desjardins, P., & Morais, R. (1990). Sequence and gene organization of the chicken mitochondrial genome: a novel gene order in higher vertebrates. *Journal of Molecular Biology*, 212(4), 599-634.
- Dharmayanthi, A. B., Terai, Y., Sulandari, S., Zein, M. S. A., Akiyama, T., & Satta, Y. (2017). The origin and evolution of fibromelanosis in domesticated chickens: genomic comparison of Indonesian cemani and Chinese silkie breeds. *PLOS ONE*, 12(4), e0173147.
- Di Lorenzo, P., Ceccobelli, S., Panella, F., Attard, G., & Lasagna, E. (2015). The role of mitochondrial DNA to determine the origin of domestic chicken. *World's Poultry Science Journal*, 71(2), 311-318.
- Dorshorst, B., Okimoto, R., & Ashwell, C. (2010). Genomic regions associated with dermal hyperpigmentation, polydactyly and other morphological traits in the Silkie chicken. *Journal of Heredity*, 101(3), 339-350.
- Groeneveld, L. F., Lenstra, J. A., Eding, H., Toro, M. A., Scherf, B., Pilling, D., Negrini, R., Finlay, E. K., Jianlin, H., Groeneveld, E., Weigend, S., & The GLOBALDIV Consortium. (2010). Genetic diversity in farm animals--a review. *Animal Genetics*, 41(s1), 6-31.
- Habsari, I. K., Nugroho, B. A., & Azizah, S. (2018). Supply chain analysis of cemani chickens in Temanggung, Central Java, Indonesia. *IOSR Journal of Economics and Finance*, 9(4), 44-49.
- Kostaman, T., Sopiyan, S., Isbandi, & Pasaribu, T. (2021). Ex-situ exploration of cemani chicken in Balai Penelitian Ternak (Balitnak), Bogor-West Java. *BIO Web of Conferences*, 33, 01001.
- Lan, D., Hu, Y., Zhu, Q., & Liu, Y. (2017). Mitochondrial DNA study in domestic chicken. *DNA Mapping, Sequencing, and Analysis*, 28(1), 25-29.
- Likitrakulwong, W., Poolprasert, P., & Roytrakul, S. (2018). Morphological trait, molecular genetic evidence and proteomic determination of different chickens (*Gallus gallus*) breeds. *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 7(1), 65-70.
- Lukanov, H., & Genchev, A. (2013). Fibromelanosis in domestic chickens. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 5(3), 239-246.
- Meerasen, S., Duangjit, S., & Yasothonsrikul, S. (2009). *Analysis of the mutation rate of the mitochondrial DNA region. hypervariable region in the lower northern region of Thailand* (research report). Phitsanulok: Naresuan University. (in Thai)
- Miao, Y. W., Peng, M. S., Wu, G. S., Ouyang, Y. N., Yang, Z. Y., Yu, N., Liang, J. P., Pianchou, G., Beja-Pereira, A., Mitra, B., Palanichamy, M. G., Baig, M., Chaudhuri, T. K., Shen, Y. Y., Kong, Q. P., Murphy, R. W., Yao, Y. G., & Zhang, Y. P. (2013). Chicken domestication: an updated perspective based on mitochondrial genomes. *Heredity*, 110, 277-282.
- Muladno, M. (2008). *Local chicken genetic resources and production systems in Indonesia*. Retrieved 21 October 2023, from <http://www.fao.org/docrep/013/al695e/al695e00.pdf>.
- Muroya, S., Tanabe, R. I., Nakajima, I., & Chikuni, K. (2000). Molecular characteristics and site specific distribution of the pigment of the Silky fowl. *Journal of Veterinary Medical Science*, 62(4), 391-395.

- Prakash, A., Singh, Y., Chatli, M. K., Sharma, A., Acharya, P., & Singh M. (2023). Review of the black meat chicken breeds: Kadaknath, Silkie, and Ayam Cemani. *World's Poultry Science Journal*, 79(4), 879-891.
- Robertson, D., Shore, S., & Miller, D. M. (1997). *Manipulation and expression of recombinant DNA; a laboratory manual*. Raleigh (USA): Academic Press.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sanchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sanchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular Biology and Evolution*, 34(12), 3299-3302.
- Siriwadee, P., Wirot L., Thanapol P., & Wirawan N. (2023). Genetic diversity among five native Thai chickens and Khiew-Phalee chickens in lower-northern Thailand using mitochondrial DNA barcodes. *Biodiversitas*, 24(4), 1962-1970.
- Shi, H., Fu, J., He, Y., Li, Z., Kang, J., Hu, C., Zi, X., Liu, Y., Zhao, J., Dou, T., Jia, J., Duan, Y., Wang, K., & Ge, C. (2022). Hyperpigmentation inhibits early skeletal muscle development in Tengchong snow chicken breed. *Genes*, 13(12), 2253.
- Tamura, K., & Nei, M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3), 512-526.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetic analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731-2739.
- Wilkinson, S., Wiener, P., Teverson, D., Haley, C. S., & Hocking, P. M. (2012). Characterization of the genetic diversity, structure and admixture of British chicken breeds. *Animal Genetics*, 43(5), 552-563.
- Yu, S., Wang, G., Liao, J., & Tang, M. (2018). Transcriptome profile analysis identifies candidate genes for the melanin pigmentation of breast muscle in Muchuan black-boned chicken. *Poultry Science*, 97(10), 3446-3455.
- Wolc, A., Stricker C., Arango J., Settar P., Fulton J. E., O'Sullivan N. P., Preisinger R., Habier D., Fernando R., Garrick D. J., Lamont S. J., & Dekkers J. C. M. (2011). Breeding value prediction for production traits in layer chickens using pedigree or genomic relationships in a reduced animal model. *Genetics Selection Evolution*, 43, 5.