การศึกษาความหลากหลายของยีน *HSP* 70 ในไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์ต่างๆ

Study of *HSP 70* gene polymorphism in various strains of Thai indigenous chickens

ศุภนนท์ ตู้นิ่ม[1], มนต์ชัย ดวงจินดา[1*]และ สุภร กตเวทิน[1]

Supanon Tunim[1], Monchai Duangjinda[1*] and Supon Katavatin[1]

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบการกระจายตัวและความหลากหลายของยีน *HSP* 70 ซึ่งเกี่ยวข้องกับความสามารถการทนร้อนในไก่พื้นเมืองไทย 4 สายพันธุ์ (ไก่ประดู่หางดำ ไก่เหลืองหางขาว ไก่แดง และ ไก่ชี) ด้วยเทคนิค PCR-RFLP พบการเกิด polymorphism ของยีน *HSP* 70 ทั้ง 2 ตำแหน่ง โดยโลกัส C พบจีโนไทป์ 3 รูปแบบ (C1C1, C1C2 และ C2C2) โดยความถี่อัลลีล C1 และ C2 ในแต่ละสายพันธุ์มีค่าใกล้เคียงกัน และโลกัส M พบ 2 รูปแบบจีโนไทป์คือ M1M2 และ M2M2 โดยมีการกระจายตัวของจีโนไทป์ต่างกันเล็กน้อย และจากการตรวจสอบ Hardy-Weinberg's equilibrium พบว่าไก่พื้นเมืองไทยส่วนใหญ่อยู่ในสมดุลยกเว้นไก่แดง สำหรับความหลากหลายของยีน *HSP* 70 ในแต่ละสายพันธุ์มีค่าใกล้เคียงกันโดยโลกัส C มีค่า H_E ในช่วง 0.389 - 0.502 ซึ่งสูงกว่าโลกัส M ที่มีค่าในช่วง 0.096 - 0.271 และการทดสอบความแตกต่างระหว่างประชากรด้วยค่า F_{ST} พบความแตกต่างระดับต่ำ จากการศึกษาสรุปได้ว่าไก่พื้นเมืองไทยทุกสายพันธุ์มีความเป็นไปได้สำหรับการสร้างไก่พื้นเมืองไทยสายทนร้อน โดยอาศัยยีน *HSP* 70 ในการทดสอบเพื่อค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนร้อน โดยโลกัส C มีโอกาสในการใช้ประโยชน์ได้มากกว่าโลกัส M

คำสำคัญ: ไก่พื้นเมืองไทย, ความหลากหลาย, ยีน *HSP* 70

Abstract: The objective of this study was to investigate the genetic distribution and diversity of *HSP* 70, which related to cellular heat tolerance, in 4 strains of Thai indigenous chicken (TIC; Pradu Hangdam, Lueng Hangkhao, Dang and Chee) genotyped by PCR-RFLP technique. The polymorphism of *HSP* 70 in 2 loci showed that C locus had three genotypes (C1C1, C1C2 and C2C2) with similar frequency among groups, whereas M locus had only M1M2 and M2M2 with a slightly difference in distribution between groups. The Hardy-Weinberg's equilibrium (HWE) test found most TIC population followed HWE except Dang. The expected heterozygosity (H_E) of both loci were similar. C locus was more H_E than M locus (0.389 - 0.502 and 0.096 - 0.271 for C and M locus respectively). The result from subpopulation differentiation by F_{ST} was implied the low differentiation among groups. Therefore, it was concluded that all TIC groups were probably able to construct heat tolerance line by using *HSP* 70 as genetic marker related to heat tolerance

Keywords: Thai indigenous chicken, diversity, *HSP* 70

[1] ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

* Corresponding author: monchai@kku.ac.th

บทนำ

ความสามารถในการทนร้อนเป็นลักษณะที่สำคัญต่อการผลิตสัตว์ปีกในประเทศไทยเนื่องจากมีสภาพอากาศร้อน โดยภาวะความเครียดจากความร้อน (heat stress) เป็นปัจจัยที่ส่งผลเสียต่อการผลิตสัตว์ปีก เช่น อัตราการกินได้และการเจริญเติบโตลดลง อัตราการตายเพิ่มสูงขึ้น (Al-Fataftah et al., 2007) ซึ่งการแก้ไขปัญหาที่สำคัญวิธีหนึ่งคือการปรับปรุงพันธุ์ด้วยการคัดเลือกโดยอาศัยความผันแปรของยีน *HSP* 70 (Heat shock protein 70) จากการศึกษาของชัยยุทธ (2551) ได้รายงานถึงอิทธิพลของรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *HSP* 70 ต่อความสามารถในการทนร้อนของไก่พื้นเมืองไทยสายพันธุ์ซีโดยไก่ที่มีรูปแบบจีโนไทป์เป็น C1C2/M2M2 มีความสามารถทนร้อนได้ดีกว่ารูปแบบอื่นที่ทำการศึกษา (C2C2/M2M2 และ C2C2/M1M2) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าข้อมูลความหลากหลายและการกระจายตัวของยีน *HSP* 70 ซึ่งจำเป็นในการพิจารณาโอกาสในการพัฒนาไก่พื้นเมืองไทย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่ประดู่หางดำ ไก่เหลืองหางขาว ไก่แดง และไก่ซี ให้มีความสามารถในการทนร้อนยังมีอยู่จำกัด ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาการกระจายตัวของยีน *HSP* 70 และความหลากหลายเพื่อประเมินความเป็นไปได้สำหรับการคัดเลือกโดยอาศัยเครื่องหมายทางพันธุกรรมช่วยในการคัดเลือก รวมถึงเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบจีโนไทป์ต่อความสามารถในการทนร้อนของไก่พื้นเมืองไทยต่อไป

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดลองและการเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณใต้ปีกของไก่พื้นเมืองไทย 4 สายพันธุ์ได้แก่ ไก่ประดู่หางดำ (PD) จาก ศูนย์เครือข่ายวิจัยและพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์ (ไก่พื้นเมือง)ไก่ซี (CH) จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ท่าพระ ไก่เหลืองหางขาว (LK) และไก่แดง (DA) จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์กบินทร์บุรี สายพันธุ์ละ50 ตัว (เพศละ25 ตัว)

การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ของไก่พื้นเมืองด้วยเทคนิค PCR-RFLP

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดโดยดัดแปลงจากวิธีของ Goodwin et al. (2007) และตรวจสอบ genomic DNA ด้วย 0.8 %agarose gel electrophoresis จากนั้นตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ยีน *HSP* 70 ของไก่พื้นเมืองด้วยวิธี PCR-RFLP โดยเริ่มจากกระบวนการ PCR โดยใช้ไพรเมอร์ตามการศึกษาของ Mazzi et al. (2003) ได้แก่ F: 5'- AACCGCACCACA CCCAGCTATG - 3'และ R : 5'CTGGGAGTCGTT GAAGTAAGCG - 3' ตามวงรอบ PCR โดยใช้อุณหภูมิ annealing 58^{0}C หลังจากนั้นตรวจสอบ PCR product ด้วย 2 % agarose gel electrophoresis และจำแนกรูปแบบจีโนไทป์ด้วยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cfr* I และ *Mme* ตามวิธีการของชัยยุทธ (2551) เพื่อจำแนกจีโนไทป์ในโลกัส C และ M ตามลำดับ จากนั้นบันทึกรูปแบบจีโนไทป์สำหรับการวิเคราะห์ความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของยีน *HSP* 70

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลจากรูปแบบจีโนไทป์ของไก่แต่ละสายพันธุ์ โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน ได้แก่ 1)ศึกษาโครงสร้างทางพันธุกรรมของประชากรจากความถี่จีโนไทป์และอัลลีล รวมถึงการทดสอบสมดุล Hardy-Weinberg's ในสภาวะร่วมกันทั้ง 2 loci เนื่องจากมีการเกิด linked ต่อกัน 2)วิเคราะห์ความหลากหลายของยีน *HSP* 70 โดยค่า expected heterozygosity และการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างประชากรไก่พื้นเมืองไทยแต่ละสายพันธุ์ด้วยโปรแกรม FSTAT (V.2.9.3.2)

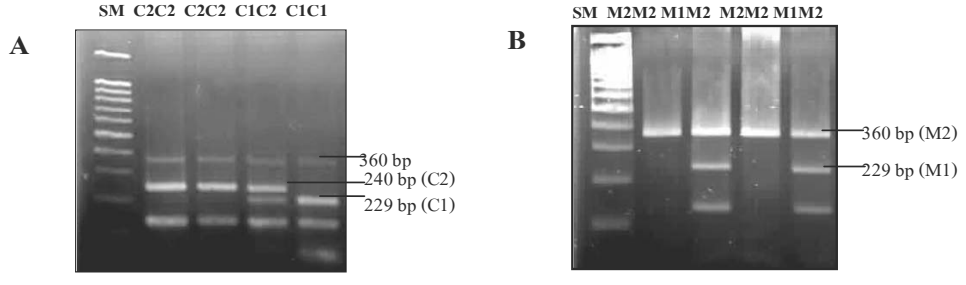
ผลการศึกษาและวิจารณ์

ความถี่จีโนไทป์และอัลลีลของยีน *HSP* 70 ในไก่พื้นเมืองไทยทั้ง 4 สายพันธุ์

ตรวจสอบจีโนไทป์ของไก่พื้นเมืองไทยทั้ง 4 สายพันธุ์ พบการเกิด polymorphism ของทั้ง 2 โลกัส ดัง**ภาพที่ 1** โดยโลกัส C พบจีโนไทป์ทั้ง 3 รูปแบบได้แก่ C1C1, C1C2 และ C2C2 แต่ที่โลกัส M พบเพียง 2 จีโนไทป์ได้แก่ M1M2 และ M2M2 โดยความถี่อัลลีลและจีโนไทป์แสดงใน**ตารางที่ 1** พบว่าการกระจายตัวของจีโนไทป์ในประชากรของไก่พื้นเมืองไทยแตกต่างกันเล็กน้อย โดยเฉพาะโลกัส M ซึ่งไก่ประดู่หางดำมีจีโนไทป์ M1M2 เพียง 10% ของประชากร ในขณะที่สายพันธุ์อื่นพบถึง 24% - 32% ทั้งนี้พบว่าโลกัส C ของทุกสายพันธุ์มีความถี่ของอัลลีล C1 และ C2 ใกล้เคียงกัน ยกเว้นสายพันธุ์ชี ดังนั้นชี้ให้เห็นว่าไก่พื้นเมืองไทยทั้ง 4 สายพันธุ์มีการกระจายตัวของจีโนไทป์แตกต่างกันเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามพบว่าไก่พื้นเมืองไทยทุกสายพันธุ์มีความเป็นไปได้สำหรับใช้คัดเลือกเพื่อสร้างไก่พื้นเมืองสายทนร้อน เนื่องจากมีจีโนไทป์หลากหลาย โดยโลกัส M มีโอกาสในการใช้ประโยชน์ได้ยากเนื่องจากจีโนไทป์พบเพียงรูปแบบ M2M2 เป็นส่วนใหญ่และมีไก่ที่มีอัลลีล M1 จำนวนน้อย ซึ่งอาจไม่เพียงพอในการใช้ประโยชน์ นอกจากนี้จากการตรวจสอบสมดุล Hardy-Weinberg's โดยค่า χ^2 แสดงดัง**ตารางที่ 1** พบว่าทุกสายพันธุ์อยู่ในสมดุลยกเว้นไก่แดงซึ่งอาจเกิดจากการได้รับผลกระทบจาก gene force รวมถึงไก่แดงอาจถูกรวบรวมสายพันธุ์จากไก่พื้นเมืองหลายกลุ่ม จึงทำให้ไม่เป็นตัวแทนที่ดีของประชากรในการทดสอบ

ความหลากหลายและความแตกต่างของโครงสร้างทางพันธุกรรมของยีน *HSP* 70

การศึกษาครั้งนี้ใช้ค่า Expected heterozygosity (H_E) บ่งชี้ถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *HSP* 70 ดัง**ตารางที่ 2** ซึ่งพบว่าความหลากหลายที่โลกัส C ในแต่ละสายพันธุ์มีค่าใกล้เคียงกันโดยมีค่าประมาณ 0.5 ยกเว้นสายพันธุ์ชี (0.389) ซึ่งพบความหลากหลายน้อยกว่าสายพันธุ์อื่น เช่นเดียวกับโลกัส M ซึ่งพบค่า H_E ในแต่ละสายพันธุ์มีค่าในช่วง 0.213 - 0.271 โดยสายพันธุ์ประดู่หางดำ (0.096) มีความหลากหลายน้อยกว่าสายพันธุ์อื่น แต่อย่างไรก็ตามพบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของทุกสายพันธุ์มีความหลากหลายสูงกว่าไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้า (broiler) โดย Akaboot et al. (2009) พบว่าไก่เนื้อสายพันธุ์ทางการค้ามีความหลากหลายของยีน *HSP* 70 ค่อนข้างต่ำโดยมีค่า H_E ในโลกัส C และ M เท่ากับ 0.14 และ 0.29 ตามลำดับ **(ตารางที่ 2)** โดยทั้งนี้อาจเนื่องมาจากไก่เนื้อสายพันทางการค้าได้รับการคัดเลือกลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจโดยอาจส่งผลทำให้อัลลีลในโลกัสต่างๆ ที่อาจเกี่ยวข้องมีความหลากหลายลดลง โดยจากข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ได้ว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน *HSP* 70 ในไก่พื้นเมืองไทยมีความหลากหลายสูงกว่าสายพันธุ์ทางการค้าจึงมีความเป็นไปได้สำหรับการคัดเลือกโดยอาศัยเครื่องหมายทางพันธุกรรมมากกว่าสายพันธุ์ทาง นอกจากนี้ยังพบว่าไก่พื้นเมืองทุกสายพันธุ์มีความหลากหลายของโลกัส C มากกว่าโลกัส M โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสายพันธุ์ประดู่หางดำซึ่งมีค่า H_E ในทั้ง 2 โลไซแตกต่างกันค่อนข้างมาก (H_E เท่ากับ 0.5 และ 0.09 สำหรับโลกัส C และ M ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังพบว่า



ภาพที่ 1 แสดงแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการจำแนกจีโนไทป์ยีน *HSP* 70 ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ด้วย *Cfr* I (A) และ *Mme* I (B)
SM หมายถึง standard marker 100 bp (100 bp ladder)

ตารางที่ 1 แสดงความถี่อัลลีล และค่า χ^2 ของยีน *HSP* 70 ในไก่พื้นเมืองไทยทั้ง 4 สายพันธุ์

Frequency		PD (n = 50)	CH (n = 50)	LK (n = 50)	DA (n = 50)
Genotype frequency	C1C1/M1M2	0	0	0.06	0
	C1C2/M1M2	0.06	0.04	0.18	0.14
	C2C2/M1M2	0.04	0.20	0.08	0.16
	C1C1/M2M2	0.18	0.06	0.24	0.34
	C1C2/M2M2	0.48	0.34	0.30	0.28
	C2C2/M2M2	0.24	0.36	0.14	0.08
Allele frequency	C1	0.45	0.25	0.54	0.55
	C2	0.55	0.75	0.46	0.45
	M1	0.05	0.12	0.16	0.15
	M2	0.95	0.88	0.84	0.85
	χ^2 [1/]	1.81	6.34	3.45	22.15* [2/]

[1/] ค่า χ^2 จากตารางที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ degree of freedom เท่ากับ 5 มีค่า 11.07

[2/] ค่า χ^2 ในประชากรที่เบี่ยงเบนจากสมดุล HWE (P<0.05)

ตารางที่ 2 แสดงค่า Expected heterozygosity (H_E) และค่า F_{ST} ของยีน *HSP* 70 ในแต่ละโลกัสและสายพันธุ์

Loci	Thai indigenous breed				Commercial breed[1/]	F_{ST}
	PD	CH	LK	DA	Broiler	
C	0.500	0.389	0.502	0.501	0.14	0.062
M	0.096	0.213	0.271	0.257	0.29	0.015

[1/] ข้อมูลจาก Akaboot et al. (2009)

ความหลากหลายของโลกัส C มีมากกว่าโลกัส M ในไก่พื้นเมืองทุกสายพันธุ์โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสายพันธุ์ประดู่หางดำ (0.500 และ 0.096 สำหรับโลกัส C และ M ตามลำดับ) จึงเป็นข้อมูลสนับสนุนว่าโลกัส C มีความเป็นไปได้มากกว่าโลกัส M สำหรับใช้ประโยชน์ในการค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรม ผลการวิเคราะห์ความแตกต่างของโครงสร้างทางพันธุกรรมของยีน *HSP* 70 ระหว่างประชากรของไก่พื้นเมืองไทยทั้ง 4 สายพันธุ์โดยพิจารณาจากค่า F_{ST} แสดงดัง**ตารางที่ 2** ซึ่งชี้ให้เห็นว่าความผันแปรของโลกัส C และ M ของไก่พื้นเมืองแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างเพียง 6.2% และ 1.5% ตามลำดับ ซึ่งจัดว่ามีความแตกต่างในระดับต่ำ จึงสรุปผลได้ว่าโครงสร้างทางพันธุกรรมของยีน *HSP* 70 ในไก่พื้นเมืองมีความแตกต่างกันน้อย

สรุป

การกระจายตัวของยีน *HSP* 70 ในประชากรไก่พื้นเมืองไทยทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่ประดู่หางดำ ไก่เหลืองหางขาว ไก่แดง และไก่ชี สรุปได้ว่าไก่พื้นเมืองไทยทุกสายพันธุ์มีความเป็นไปได้สำหรับการสร้างเป็นสายทนร้อน โดยอาศัยยีน *HSP* 70 สำหรับทดสอบเพื่อค้นหาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการทนร้อน โดยพิจารณายีน *HSP* 70 ในรูปแบบ combination โดยเน้นพิจารณาโลกัส C ซึ่งมีโอกาสใช้ประโยชน์ได้มากกว่าโลกัส M เนื่องจากมีการกระจายตัวและความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่า ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษาข้อมูลพื้นฐานสำหรับการทดสอบความสัมพันธ์ของรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *HSP* 70 กับความสามารถในการทนร้อน และจำเป็นต้องมีการศึกษา

ในแต่ละสายพันธุ์เพิ่มเติมเพื่อพัฒนาเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมสำหรับการคัดเลือกไก่พื้นเมืองให้มีความสามารถในการทนร้อนต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาตร์และเทคโนโลยี (สบว.) สำนักคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการและศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ศูนย์เครือข่ายวิจัยและพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์ (ไก่พื้นเมือง), ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์กบินทร์บุรี และ ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ท่าพระ กรมปศุสัตว์

เอกสารอ้างอิง

ชัยยุทธ ดวงเดือน. 2551. อิทธิพลของรูปแบบยีน *hsp* 70 ต่อความสามารถในการทนร้อนในไก่พื้นเมืองไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

Al-Fataftah, A.R.A., and Z.H.M. Abu-Dieyeh. 2007. Effect of chronic heat stress on broiler performance in Jordan. Int. J. Poul. Sci. 6: 64-70.

Akaboot, P., M. Dungjinda, and Y. Phasuk. 2010. Genetic comparison of functional genes in Red jungle fowl, Thai native chicken and commercial chicken. Proceeding the 14th AAAP Animal Science Congress. August 23-27, 2010. Pingtung, Taiwan, ROC.

Goodwin, W., L. Adrian, and H. Sibte. 2007. An Introduction to Forensic Genetics. John Wiley & Sons Ltd, Oxford.

Goudet, J., 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3).

Mazzi, C.M., J.A. Ferro, M.I.T. Ferro, V.J.M. Savino, A.A.D. Coelho and M. Macari. 2003. Polymorphism analysis of the hsp70stress gene in Broiler chickens (Gallus gallus) of different breeds. Gent. Mol. Biol. 26: 275-281.