

การจำแนกกลุ่มพันธุกรรมและการตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ ของไก่กระดูกดำไทยโดยใช้ไมโครแซทเทลไลต์

Genetic clustering and DNA marker detection of Thai black-bone chicken by microsatellites

ภาณุวัฒน์ คัมภีรวัฒน์^{1*}

Panuwat Khumpeerawat^{1*}

บทคัดย่อ: การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกกลุ่มพันธุกรรมและตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอของไก่กระดูกดำไทย ด้วยการวิเคราะห์ความหลากหลายของขนาดไมโครแซทเทลไลต์ โดยศึกษาในไก่กระดูกดำ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่ดำภูพาน ไก่ดำชีฟ้า และไก่ดำฟ้าหลวง ทำการสุ่มไก่ 50 ตัว/สายพันธุ์ รวมทั้งสิ้น 150 ตัว นำมาวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 20 ตำแหน่ง พบอัลลีลทั้งหมด 158 อัลลีล และยังพบอัลลีลใหม่ ๆ ที่ยังไม่มีการรายงาน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในไก่กระดูกดำไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง เมื่อพิจารณาค่า heterozygosity ของไก่กระดูกดำแต่ละสายพันธุ์พบว่า อยู่ในระดับสูง และการกระจายตัวของจีโนไทป์โดยส่วนใหญ่ไม่เป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg เมื่อจัดกลุ่มตามค่าระยะห่างทางพันธุกรรมด้วยแผนภาพต้นไม้ พบว่าสามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยที่ไก่ดำชีฟ้า และไก่ดำฟ้าหลวงถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรม พบว่าไก่กระดูกดำแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างทางพันธุกรรมไม่มากนัก ($F_{st} = 0.029$) แต่มีความหลากหลายของพันธุกรรมรายตัวภายในแต่ละพันธุ์ค่อนข้างสูง และจีโนไทป์ของไมโครแซทเทลไลต์แต่ละตำแหน่งเริ่มอยู่ในสภาพโฮโมไซกัส ($F_{is} = 0.159$) จากการศึกษาครั้งนี้พบอัลลีลที่สามารถบ่งชี้ลักษณะเฉพาะของไก่ดำฟ้าหลวง และไก่ดำภูพาน จำนวน 5 อัลลีล และสามารถใช้จ่ายจำแนกได้แม่นยำมากกว่า 80% แต่ในขณะที่ไก่ดำชีฟ้าไม่พบว่ามีอัลลีลใดที่มีความจำเพาะที่จะนำไปใช้บ่งชี้การเป็นไก่ดำชีฟ้าได้

คำสำคัญ: ไก่กระดูกดำ, การจำแนกกลุ่มพันธุกรรม, เครื่องหมายดีเอ็นเอ, ไมโครแซทเทลไลต์

ABSTRACT: This research aimed to cluster the genetic and DNA marker detection of Thai black-bone chicken using fragment polymorphisms of microsatellites. The sample size in this study was 150 chickens selected from three breeds of chicken: Phuparn, Cheepah and Fahlueng with fifty chickens from each breed. The samples were analyzed based on 20 loci of microsatellites. A total of 158 alleles were found and also several new alleles which undiscovered in previous reports were presented. This result showed that Thai black-bone chicken provided high genetic diversity. Each breed of chicken provided high heterozygosity and distribution of genotype which opposed to Hardy-Weinberg rules. The phylogenetic analysis found that the genetic distance could be classified into two groups. The Cheefah and Fahlueng were classified into same group. The analysis of genetic structure found that the breeds of chicken were the lightly of genetic different ($F_{st}=0.029$). However, the individual genetic diversity was found rather high and the genotype of loci of microsatellite were starting to homozygous ($F_{is}=0.159$). This study also found the specific 5 alleles to indicate Fahlueng and Phuparn, which were able to classify greater than 80% compare to Cheefah, which was not found the specific alleles.

Keywords: Black-boned chicken, Genetic clustering, DNA marker, Microsatellites

¹ ภาควิชาเกษตรและทรัพยากร คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร 47000

Department of Agriculture and Resources, Faculty of Natural resources and Agro Industry Kasetsart University Chalermphrakiat Sakon Nakorn Province Campus 47000

* Corresponding author: fnapwk@ku.ac.th

บทนำ

ไก่กระดูกดำ (Black-boned chicken) เป็นสัตว์ปีกที่นิยมบริโภคในหมู่ชาวจีนมาช้านานจนจนถึงปัจจุบัน เนื่องจากมีความเชื่อกันว่าถ้ารับประทานไก่กระดูกดำมาผ่านการปรุงอาหารแบบวิธีโบราณจะช่วยบำรุงสุขภาพและรักษาโรคต่างๆ ได้เป็นอย่างดี ซึ่งสีดำที่ปรากฏในไก่กระดูกดำนั้นเป็นผลเนื่องมาจากการทำงานของสารสีเมลานิน (melanin) ปัจจุบันมีรายงานผลการวิจัยพบว่า เมลานินสามารถทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Rasmussen et al., 1999; Hung et al., 2002) และเกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Sava et al., 2001; Pugh et al., 2005) ด้วยเหตุนี้จึงอาจเป็นคำตอบต่อความเชื่อของชาวจีนเรื่องการบริโภคไก่กระดูกดำมีผลต่อสุขภาพ และในทำนองเดียวกันก็อาจมีบทบาทสำคัญต่อการอยู่รอดของสายพันธุ์ไก่กระดูกดำมาจนถึงปัจจุบัน ต้นกำเนิดของไก่กระดูกดำที่พบในประเทศไทยมีหลักฐานที่ไม่แน่ชัด แต่มีการสันนิษฐานว่าไก่กระดูกดำได้เข้าสู่ประเทศไทยพร้อมๆ กับการอพยพของจีนซึ่งมีมาช้านานแล้ว จากนั้นจึงมีการเลี้ยงสืบเนื่องกันตั้งแต่นั้นเป็นต้นมา และได้ผสมพันธุ์กับไก่พื้นเมืองไทยที่มีอยู่เดิม อีกทั้งได้รับการปรับปรุงพันธุ์และคัดเลือกพันธุ์เพื่อให้เหมาะสมต่อการเลี้ยงในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทย แต่ยังคงมีลักษณะความเป็นไก่กระดูกดำอยู่ คือ หนังดำ เนื้อดำ และกระดูกดำ จึงทำให้ปัจจุบันมีไก่กระดูกดำในประเทศไทยหลากหลายสายพันธุ์ ได้แก่ ไก่ดำซีฟู้ด ไก่ดำฟ้าหลวง และไก่ดำภูพาน โดยมีการจำแนกจากลักษณะภายนอกได้แก่ สีขน ขนาด และรูปร่างของร่างกาย ที่แตกต่างกัน แต่ยังขาดข้อมูลทางพันธุกรรมเพื่อนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ให้มีความชัดเจนเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งการจำแนกกลุ่มยังช่วยให้ทราบถึงสภาพความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรเพื่อนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนการจัดการต่อไป ปัจจุบันได้มีการนำเทคนิค ไมโครแซทเทลไลท์ (Microsatellites) มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในไก่และนำไปสู่การจำแนก

กลุ่มและการคัดเลือกเพื่อรักษาพันธุกรรมไว้ให้คงอยู่ (Rosenberg et al., 2001) เนื่องจาก Microsatellites มีคุณสมบัติที่ดีในการเป็นเครื่องหมาย (Markers) ที่มีการกระจายและความหลากหลายสูง (Highly Polymorphism) (Cheng et al., 1995) สามารถนำมาประยุกต์ใช้บ่งชี้ในการตรวจหาพื้นที่ควบคุมการแสดงออก เพื่อบ่งชี้ลักษณะใดลักษณะหนึ่งได้ (Liu, 2000) รวมทั้งสามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ด้วยคุณสมบัติดังกล่าว ปัจจุบันจึงนิยมใช้ในการตรวจสอบ และวินิจฉัยพื้นที่ควบคุมการแสดงออกของลักษณะต่างๆ รวมทั้งลักษณะเฉพาะทางพันธุกรรม ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) เพื่อบ่งชี้ลักษณะเฉพาะทางพันธุกรรมของไก่ดำซีฟู้ด ไก่ดำฟ้าหลวง และไก่ดำภูพานได้ เพื่อให้การจำแนกกลุ่มไก่ดำไทยและการคัดเลือกเพื่อสร้างไก่ดำสายพันธุ์แท้แต่ละสายพันธุ์เป็นไปอย่างรวดเร็วและแม่นยำขึ้น ดังนั้นการศึกษาเพื่อจำแนกกลุ่มพันธุกรรม และการตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะต่อไก่กระดูกดำไทยแต่ละสายพันธุ์จึงเป็นสิ่งสำคัญ ซึ่งจะนำไปสู่การอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนของไก่กระดูกดำไทยต่อไปในอนาคต

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดสอบและการเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณใต้ปีกของไก่กระดูกดำ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่ดำซีฟู้ด และไก่ดำฟ้าหลวง จากชาวเขาที่มีการเลี้ยงอยู่โดยแม่สลอง อำเภอแม่ฟ้าหลวง จังหวัดเชียงราย และ ไก่ดำภูพาน จากศูนย์ศึกษาการพัฒนาภูพาน อันเนื่องมาจากพระราชดำริ ที่มีการรวบรวมไก่ดำมีการเลี้ยงอยู่ในหมู่บ้านรอบๆ ศูนย์ฯ และนำมาสร้างฝูง เพื่อพัฒนาสายพันธุ์ไก่ดำภูพาน โดยสุ่มตัวอย่างสายพันธุ์ละ 50 ตัว (เพศเมีย 25 ตัว และเพศผู้ 25 ตัว) รวมทั้งหมด 150 ตัว เก็บตัวอย่างเลือดในหลอดขนาด 1.5 ml ปริมาณ

500-1000 μ l ที่มีสาร 0.5M EDTA ปริมาณ 100 μ l เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด

การสกัดดีเอ็นเอและการตรวจสอบรูปแบบ จีโนไทป์ด้วย Microsatellites

นำตัวอย่างเลือดมาสกัดดีเอ็นเอโดยดัดแปลงจากวิธีของ Goodwin et al. (2007) และตรวจสอบ genomic DNA ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis จากนั้นตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ของ Microsatellites ทั้งหมด 20 ตำแหน่ง (Table 1) โดยใช้ primers ที่ FAO (2004) แนะนำเพื่อใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของไก่ Microsatellite DNA ที่ได้จากปฏิกิริยา PCR 10 μ l ประกอบด้วย genomic DNA ที่มีความเข้มข้น 50 ng/ μ l ปริมาตร 1 μ l, 10X PCR buffer ปริมาตร 1.5 μ l, 25 mM MgCl₂ ปริมาตร 0.8 μ l, ไพรมเมอร์ (forward และ reverse, Table 1) ความ

เข้มข้น 2.5 μ M ปริมาตร 1 μ l, dNTP เข้มข้น 1 mM (Promega, USA) ปริมาตร 1 μ l, 5 U Taq DNA polymerase (RBC®) ปริมาตร 0.1 μ l และปรับปริมาตรให้ครบ 10 μ l ด้วยน้ำกลั่น (Ultrapure water) โดยแต่ละตำแหน่งมีวงรอบการทำ PCR ดังนี้ เริ่ม initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 30-35 รอบ ได้แก่ denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 30 วินาที, primer annealing 60-68°C นาน 30 วินาที, primer extension 72°C นาน 30-45 วินาที และ final extension 72°C นาน 7 นาที จากนั้นนำ PCR ไปตรวจสอบด้วย 6% acrylamide gel และย้อมด้วย gel star® และแปลงข้อมูลของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏให้อยู่ในรูปของ 0 หรือ 1 (binary data) เพื่อแสดงการปรากฏของแต่ละอัลลีล และวิเคราะห์จีโนไทป์ตามวิธีของ ปรัชญาพร (2550)

Table 1 Characterization of the 20 microsatellite markers used in the current study

No.	primer	Sequence from 5' to 3'	Tm	Chr.
1	ADL0268	F : CTCCACCCCTCTCAGAACTA R : CAACTTCCCATCTACCTACT	60	1
2	MCW0206	F : ACATCTAGAATTGACTGTTTAC R : CTTGACAGTGATGCATTAAATG	60	2
3	LEI0166	F : CTCCTGCCCTTAGCTACGCA R : TATCCCCTGGCTGGGAGTTT	60	3
4	MCW0295	F : ATCACTACAGAACCCCTCTC R : TATGTATGCACGCAGATATCC	60	4
5	MCW0081	F : GTTGCTGAGAGCCTGGTGAG R : CCTGTATGTGGAATTACTTCTC	60	5
6	MCW0014	F : TATTGGCTCTAGGAAGTGC R : GAAATGAAGTAAGACTAGC	58	6
7	MCW0183	F : ATCCAGTGTGAGTATCCGA R : TGAGATTTACTGGAGCCTGCC	58	7
8	ADL0278	F : CCAGCAGTCTACCTTCCTAT R : TGTCATCCAAGAACAGTGTG	60	8
9	MCW0067	F : GCACTACTGTGTGCTGCAGTTT	60	10

No.	primer	Sequence from 5' to 3'	Tm	Chr.
10	MCW0104	R : GAGATGTAGTTGCCACATTCCGAC	60	13
		F : TAGCACAACTCAAGCTGTGAG		
11	MCW0123	R: AGACTTGACAGCTGTGTACC	60	14
		F : CCACTAGAAAAGAACATCCTC		
12	MCW0330	R : GGCTGATGTAAGAAGGGATGA	60	17
		F : TGGACCTCATCAGTCTGACAG		
13	MCW0165	R : AATGTTCTCATAGAGTTCCTGC	60	23
		F : CAGACATGCATGCCCAGATGA		
14	MCW0069	R : GATCCAGTCCTGCAGGCTGC	60	E60C04W23
		F : GCACTCGAGAAAATTCCTGCG		
15	MCW0111	R : ATTGCTTCAGCAAGCATGGGAGGA	60	1
		F : GCTCCATGTGAAGTGGTTTA		
16	MCW0034	R : ATGTCCACTTGTCAATGATG	60	2
		F : TGCACGCACTTACATACTTAGAGA		
17	MCW0222	R : TGTCTTCCAATTACATTCATGGG	60	3
		F : GCAGTTACATTGAAATGATTCC		
18	MCW0078	R : TTCTCAAACACCTAGAAGAC	60	5
		F : CCACACGGAGAGGAGAAGGTCT		
19	ADL0112	R : TAGCATATGAGTGTACTGAGCTTC	58	10
		F : GGCTTAAGCTGACCCATTAT		
20	MCW0216	R : ATCTCAAATGTAATGCGTGC	60	13
		F : GGGTTTTACAGGATGGGACG		
		R : AGTTTCACTCCCAGGGCTCG		

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลอัลลีลที่ได้จาก Microsatellite แต่ละตำแหน่งมาวิเคราะห์สภาพความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรที่ศึกษาโดยพิจารณาจากข้อมูลการเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนได้จากค่าต่างๆ ได้แก่ จำนวนอัลลีล, ค่า heterozygosity, ค่าความหลากหลายของไพรเมอร์ PIC (polymorphism information content) และทดสอบสมมติ Hardy-Weinberg ด้วยโปรแกรม CERVUS (V3.0.3) คำนวณหาความระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ด้วยวิธีการของ Nei

(1987) จากนั้นวิเคราะห์แผนภาพด้วยวิธี Neighbor Join และ UPGMA ด้วยโปรแกรม NTSYS (V2.1) ประเมินค่า F-statistic เพื่อทดสอบโครงสร้างทางพันธุกรรม (genetic structure) และการเกิดประชากรกลุ่มย่อย (sub-population) ด้วยโปรแกรม GENEPOP (V4.2) และวิเคราะห์หาดีเอ็นเอเครื่องหมายที่มีความจำเพาะกับไก่ดำจากความสัมพันธ์ของอัลลีลกับการแสดงออกของไก่กระดูกดำแต่ละกลุ่มด้วยวิธี logistic regression ด้วยโปรแกรม SAS (V6.12) ซึ่งมีรูปแบบสมการดังนี้

$$\ln \left(\frac{P_i}{1-P_i} \right) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_i X_i + \varepsilon_{ij}$$

เมื่อ P_i = ความน่าจะเป็นที่จะเป็นไก่กระดูกดำสายพันธุ์ i เมื่อเทียบกับสายอื่นๆ; β_0 = จุดตัดแกน y ; $\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_i$ = ค่าสัมประสิทธิ์ regression ของอัลลีลที่ $1, 2, \dots, i$; $X_1, X_2, \dots, X_i$ = ตัวแปรต้นของการปรากฏอัลลีลที่ $1, 2, \dots, i$; ε_{ij} = ค่าความคลาดเคลื่อน (random error term)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ผลการศึกษาในครั้งนี้ พบขนาดและจำนวนอัลลีล (allele) ของ Microsatellite แต่ละตำแหน่ง (Table 2)

มีขนาดอัลลีล ตั้งแต่ 84-449 คู่เบส (base pair) และจำนวนอัลลีลทั้งหมด 158 อัลลีล โดยมีจำนวนอยู่ระหว่าง 4-14 อัลลีล/ตำแหน่ง (locus) เฉลี่ยเท่ากับ 7.9 อัลลีล/ตำแหน่ง แสดงให้เห็นว่า Microsatellite ในไก่กระดูกดำที่มีการเลี้ยงอยู่ในประเทศไทยนั้นมีความหลากหลาย โดยที่พบส่วนใหญ่จะมีจำนวนอัลลีล/ตำแหน่ง น้อยกว่าจำนวนอัลลีลที่มีการอ้างอิง แต่มีบางตำแหน่งที่พบมีจำนวนอัลลีลมากกว่าจำนวนอัลลีลที่มีการอ้างอิงไว้ อีกทั้งขนาดของอัลลีลที่พบในบางตำแหน่งมีความแตกต่างจากขนาดอัลลีลอ้างอิงด้วยเช่นกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามี Microsatellite อัลลีลใหม่ๆ ที่ยังไม่มีการรายงานอยู่หลายอัลลีล อีกทั้งยังแสดงให้เห็นว่าไก่กระดูกดำที่มีการเลี้ยงอยู่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง

Table 2 Number of alleles and range of allele sizes (bp) for each of the 20 microsatellite markers in 3 Black-bone chicken breeds

No.	Locus	Observed			Reference		
		sizes (bp)	Phuphan	Cheefah	Fahleung	Size(bp)	Highest number of Alleles
1	MCW0069	147-208	7	7	8	147-220 ² , 155-179 ¹ , 158-176 ³	18 ⁵
2	MCW0330	247-326	6	8	10	158-176 ⁸ , 254-286 ⁶ , 256-300 ³	7 ⁸
3	MCW0216	140-195	6	7	7	137-149 ⁷ , 139-149 ³	8 ⁷
4	MCW0222	205-282	7	9	10	188-301 ² , 300-316 ⁸	15 ²
5	MCW0034	208-279	8	9	9	207-296 ² , 212-246 ³	17 ⁷
6	MCW0206	102-132	4	3	4	221-249 ³	11 ⁷
7	MCW0295	93-132	5	5	5	85-134 ² , 88-106 ³	12 ⁷
8	MCW0081	107-205	7	10	9	101-190 ² , 109-131 ⁶ , 112-135 ³	12 ²
9	MCW0014	172-235	8	8	8	165-180 ⁸ , 164-182 ³	15 ⁵
10	MCW0183	269-362	8	8	10	257-394 ² , 296-326 ³	18 ²
11	MCW0067	168-227	6	8	8	172-178 ⁶ , 176-186 ³	9 ⁷
12	MCW0104	182-266	11	11	11	184-281 ² , 190-234 ³ , 195-216 ¹	19 ⁷
13	MCW0123	84-114	4	4	4	76-100 ³ , 113-143 ¹ , 137-202 ²	11 ⁷
14	MCW0165	116-186	4	7	9	112-116 ⁶ , 114-118 ³	3 ⁶

No.	Locus	Observed			Reference	
		sizes (bp)	Phuphan	Cheefah	Fahleung	Size(bp) Highest number of Alleles
15	MCW0111	99-138	4	5	5	96-120 ³ , 97-130 ² 12 ⁷
16	MCW0078	136-188	5	6	7	135-147 ³ , 138-142 ⁶ 5 ⁷
17	ADL0268	101-140	5	5	5	102-116 ³ , 104-118 ⁷ 8 ⁷
18	ADL0278	110-155	5	4	6	109-119 ⁶ , 114-126 ³ 109-125 ⁸ 12 ⁷
19	ADL0112	121-165	5	6	6	120-134 ³ 4 ⁷
20	LEI0166	340-449	14	12	13	227-340 ² , 354-370 ³ 15 ²

¹ปริญญพร (2550), ² เกศรา (2553), ³FAO (2004), ⁴Cuc et al. (2006), ⁵ Lujiang et al.(2006), ⁶ Tadano et al. (2007), ⁷ Chen et al. (2008), ⁸ Davila et al. (2009)

เมื่อพิจารณาค่า heterozygosity เป็นค่าที่แสดงความถี่ของเฮเทอโรไซโกต/ยีน 1 ตำแหน่ง ที่ทำการศึกษาซึ่งใช้บ่งบอกถึงสภาพความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากร จาก Table 3 จะเห็นว่า Microsatellite โดยส่วนใหญ่ที่พบในแต่ละตำแหน่งของไก่กระดูกดำทุกสายพันธุ์จะมีความเป็น heterozygosity อยู่ในระดับสูง ซึ่งพบว่าค่าเฉลี่ย expected heterozygosity (H_E) ซึ่งเป็นค่าความถี่ของเฮเทอโรไซโกต/ยีนในประชากรนั้นจะต้องอยู่ในสภาพสมดุลของ Hardy-Weinberg ของไก่ดำภูพาน (Phuphan) ไก่ดำซำฟ้า (Cheefah) และไก่ดำฟ้าหลวง (Fahleung) มีค่าเท่ากับ 0.69, 0.75 และ 0.76 ตามลำดับ ส่วนค่า Polymorphism information content (PIC) ของ Microsatellite บอกรถึงความหลากหลายและประสิทธิภาพในการนำไปใช้ประโยชน์ของไพรเมอร์ แต่ละตำแหน่งในไก่ดำภูพาน ไก่ดำซำฟ้า และไก่ดำฟ้าหลวง มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.635, 0.706 และ 0.718 ตามลำดับ ซึ่งค่า PIC ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สูงกว่า 0.5 แสดงให้เห็นว่า Microsatellite แต่ละตำแหน่งที่นำมาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้สามารถใช้จำแนกความแตกต่างของจีโนไทป์ได้ในระดับสูง (Botstein et al., 1980) และพบว่าที่ตำแหน่ง LEI0166 มีค่า PIC สูงที่สุดในทุกสายพันธุ์ ค่าเฉลี่ยของ H_E และ PIC ของไก่กระดูกดำทั้ง 3 สายพันธุ์

ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะเห็นว่ามีค่าใกล้เคียงและค่อนข้างสูง แสดงว่าประชากรไก่กระดูกดำที่นำมาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่สูง และเมื่อพิจารณาภาวะสมดุลภายใต้กฎของ Hardy-Weinberg พบว่า การกระจายตัวของจีโนไทป์ของ Microsatellite ในแต่ละตำแหน่งที่ทำการศึกษาในประชากรไก่กระดูกดำแต่ละสายพันธุ์โดยส่วนใหญ่ไม่สมดุลหรือไม่เป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg เนื่องมาจากประชากรไก่ดำภูพานที่เลี้ยงอยู่ ณ ศูนย์ศึกษาการพัฒนาภูพานอันเนื่องมาจากพระราชดำริ มีการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์เพื่อนำมาใช้ในการทดแทนฝูงในรุ่นถัดไปและมีการนำเข้าพ่อแม่พันธุ์บางส่วนจากภายนอก ส่วนไก่ดำซำฟ้าและไก่ดำฟ้าหลวงที่มีการเลี้ยงอยู่บนดอยแม่สลอง จังหวัดเชียงรายนั้น ชาวเขาที่เลี้ยงในแต่ละหมู่บ้าน จะมีการแบ่งปันและแลกเปลี่ยนพ่อแม่พันธุ์ไก่ และในขณะที่ชาวเขาที่อพยพมีการนำไก่มาจากดอยอื่นเขามาเลี้ยงในพื้นที่ดอยแม่สลองอีกด้วย จึงส่งผลให้การกระจายตัวของจีโนไทป์แต่ละตำแหน่งโดยส่วนใหญ่ไม่เป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg ส่วนตำแหน่งที่ไม่เบี่ยงเบนจากสมดุลหรืออยู่ภายใต้กฎของ Hardy-Weinberg ซึ่งให้เห็นว่าการคัดเลือก การอพยพของประชากร การกลายพันธุ์ หรือการสูญหายของยีนเนื่องจากประชากรมีขนาดเล็ก ที่เกิดขึ้นในประชากรไก่ดำที่ศึกษาในครั้งนี้ ไม่มี

อิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนในตำแหน่งเหล่านั้น ค่า H_E ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สูงกว่าที่มีการศึกษาไว้ในไก่กระดูกดำสายพันธุ์ต่างๆในประเทศจีนมีค่าอยู่ในช่วง 0.539 - 0.671 ซึ่งค่า heterozygosity ที่ต่ำสะท้อนให้เห็นถึงการคัดเลือกที่เกิดขึ้นเพื่อให้ได้ลักษณะภายนอกตรงตามสายพันธุ์ที่กำหนดไว้ อีก

ทั้งมีการคัดเลือกเพื่อให้มีคุณภาพเนื้อตรงตามความต้องการของผู้บริโภค และเพิ่มประสิทธิภาพการให้ผลผลิตในไก่กระดูกดำ (Tang et al., 2005; Kuan-wei et al., 2006; Lujiang et al., 2006; Ya-Bo et al., 2006; Wei et al., 2013)

Table 3 The Genetic variation of 20 microsatellite markers in 3 Black-boned chicken breeds

Locus	Phuphan				Cheefah				Fahleung			
	H_o	H_E	HWE test	PIC	H_o	H_E	HWE test	PIC	H_o	H_E	HWE test	PIC
MCW0069	0.452	0.748	*	0.699	0.641	0.797	*	0.755	0.600	0.803	*	0.775
MCW0330	0.031	0.681	***	0.623	0.171	0.804	***	0.764	0.101	0.765	***	0.725
MCW0216	0.333	0.559	NS	0.526	0.561	0.793	**	0.756	0.490	0.744	***	0.703
MCW0222	0.472	0.721	NS	0.679	0.450	0.761	***	0.718	0.541	0.781	**	0.750
MCW0034	1.000	0.748	***	0.695	0.902	0.846	NS	0.816	0.949	0.807	***	0.779
MCW0206	0.500	0.548	NS	0.491	0.375	0.501	NS	0.435	0.443	0.465	NS	0.423
MCW0295	0.405	0.726	***	0.667	0.707	0.713	NS	0.650	0.710	0.751	NS	0.701
MCW0081	0.702	0.792	*	0.749	0.854	0.828	NS	0.795	0.897	0.844	NS	0.820
MCW0014	0.333	0.811	***	0.772	0.902	0.820	**	0.783	0.890	0.830	*	0.803
MCW0183	0.043	0.836	***	0.793	0.243	0.735	***	0.686	0.383	0.745	***	0.714
MCW0067	0.848	0.788	***	0.740	0.976	0.797	NS	0.756	0.960	0.807	*	0.775
MCW0104	0.317	0.787	***	0.750	0.842	0.855	NS	0.828	0.713	0.827	*	0.805
MCW0123	0.500	0.572	NS	0.486	0.732	0.635	NS	0.563	0.677	0.638	NS	0.579
MCW0165	0.419	0.425	NS	0.390	0.800	0.688	***	0.627	0.710	0.812	NS	0.785
MCW0111	0.489	0.606	NS	0.535	0.854	0.727	NS	0.667	0.861	0.695	***	0.640
MCW0078	0.476	0.555	NS	0.515	0.585	0.719	*	0.663	0.414	0.687	***	0.632
ADL0268	0.941	0.736	**	0.674	0.850	0.765	*	0.712	0.838	0.769	NS	0.727
ADL0278	0.162	0.498	***	0.443	0.293	0.662	***	0.590	0.396	0.715	***	0.661
ADL0112	0.333	0.671	***	0.601	0.897	0.761	***	0.707	0.949	0.775	***	0.733
LEI0166	0.706	0.899	NS	0.876	0.789	0.871	NS	0.845	0.692	0.857	NS	0.837
Average	0.473	0.685	-	0.635	0.671	0.754	-	0.706	0.661	0.756	-	0.718

¹ H_o = Observed Heterozygosity, H_E = Expected Heterozygosity, HWE test= loci deviating from Hardy - Weinberg equilibrium (* = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$, *** = $P < 0.001$, NS = non-significant).

การวิเคราะห์ Genetic distance และ Phylogenetic tree

จากการวิเคราะห์ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) จากค่าความถี่ยัลลีด้วยวิธี Nei's genetic distance (Nei, 1978) ระหว่างไก่ดำภูพาน ไก่ดำชีฟ้า และไก่ดำฟ้าหลวง (Table 4) พบว่า ไก่กระดูกดำทั้ง 3 สายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ในช่วง 0.017-0.146 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไก่กระดูกดำทั้ง 3 สายพันธุ์มีความสัมพันธ์กันทางพันธุกรรมกันอย่างใกล้ชิด อาจเนื่องมาจากไก่กระดูกดำที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีพื้นฐานทางพันธุกรรมที่เหมือนกัน และพบว่าไก่ดำภูพานมีระยะห่างทางพันธุกรรมจากไก่กระดูกดำสายพันธุ์อื่น ๆ มากที่สุด ส่วนไก่ดำชีฟ้าและไก่ดำฟ้าหลวงมีระยะห่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด นอกจากนี้การวิเคราะห์แผนภาพต้นไม้ (phylogenetic tree) จากค่าระยะห่างทาง

พันธุกรรม ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) พบว่าสามารถจำแนกไก่กระดูกดำได้เป็น 2 กลุ่ม (Figure 1) โดยที่ไก่ดำชีฟ้า และไก่ดำฟ้าหลวงถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน ซึ่งไก่กระดูกดำทั้ง 2 สายนี้เดิมมีการเลี้ยงอย่างแพร่หลายอยู่ในพื้นที่เดียวกัน และอาจจะมีบรรพบุรุษร่วมกัน ก่อนที่จะมีการนำมาพัฒนาสายพันธุ์ และจำแนกโดยพิจารณาจากลักษณะภายนอก ส่วนไก่ดำภูพานพัฒนามาจากไก่ลูกผสมระหว่างไก่กระดูกดำและไก่บ้านไทย จึงทำให้พันธุกรรมมีความแตกต่างจากไก่ดำชีฟ้าและฟ้าหลวง

Table 4 The genetic distance between each pair of 3 Black-boned chicken breeds

Population	Phuphan	Cheefah
Cheefah	0.146	-
Fahleung	0.145	0.017

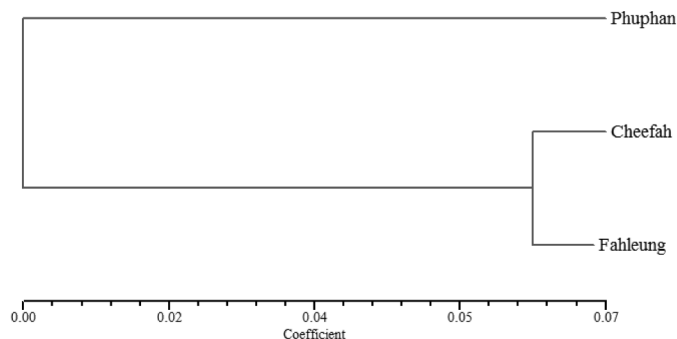


Figure 1 Phylogenetic tree showing the genetic relationships among 3 Black-boned chicken breeds on genetic distance.

การวิเคราะห์การเกิดประชากรกลุ่มย่อย (sub-division)

ผลการวิเคราะห์ (Table 5) เมื่อพิจารณาความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างไก่กระดูกดำทั้ง 3 สายพันธุ์ที่นำมาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าค่าเฉลี่ย F_{st} เป็นค่าที่วัดความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรในการเกิดประชากรกลุ่มย่อย มีค่าเท่ากับ 0.029 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าความผันแปรทางพันธุกรรมในไก่กระดูกดำที่เกิดขึ้นเป็นผลเนื่องมาจากความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ 2.9% และอีก 97.1% เป็นความผันแปรทางพันธุกรรมที่เกิดเนื่องมาจากความแตกต่างภายในสายพันธุ์ ค่า F_{st} ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีค่าอยู่ในระดับต่ำ แสดงให้เห็นว่าไก่กระดูกดำทั้ง 3 สายพันธุ์ มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมเพียงเล็กน้อย หรือยังมีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมอยู่สูง โดยที่ระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นยังไม่เพียงพอที่จะแยกเป็นประชากรกลุ่มย่อยได้ ซึ่งโดยทั่วไปค่า F_{st} ต่ำกว่า 0.05 แสดงว่าพันธุกรรมมีความแตกต่างกัน

ต่างกันเล็กน้อย 2.9% และอีก 97.1% เป็นความผันแปรทางพันธุกรรมที่เกิดเนื่องมาจากความแตกต่างภายในสายพันธุ์ ค่า F_{st} ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มีค่าอยู่ในระดับต่ำ แสดงให้เห็นว่าไก่กระดูกดำทั้ง 3 สายพันธุ์ มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมเพียงเล็กน้อย หรือยังมีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมอยู่สูง โดยที่ระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นยังไม่เพียงพอที่จะแยกเป็นประชากรกลุ่มย่อยได้ ซึ่งโดยทั่วไปค่า F_{st} ต่ำกว่า 0.05 แสดงว่าพันธุกรรมมีความแตกต่างกัน

เพียงเล็กน้อย แต่ถ้ามากกว่า 0.25 แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูงมากเพียงพอที่จะเกิดประชากรกลุ่มย่อยได้ (Weir, 1996; Frankham et al., 2002) แต่ในขณะเดียวกันพบความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากรหรือสายพันธุ์อยู่สูง แสดงให้เห็นว่าในประชากรไก่อกระดุกดำทั้ง 3 สายพันธุ์นั้นยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาสายพันธุ์ไก่อกระดุกดำได้ต่อไปในอนาคต ส่วนค่า F_{is} เป็นค่าที่บอกระดับการเบี่ยงเบนจากสมดุล Hardy-Weinberg ของประชากรกลุ่มย่อย

ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการผสมเลือดชิด (inbreeding) ในไก่อัญพาน ไก่ดำซึ่ฟ้า และไก่อ่าฟ้าหลวงที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ามีความเฉลี่ยเท่ากับ 0.313, 0.111 และ 0.126 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าจีโนไทป์ของ Microsatellite แต่ละตำแหน่งโดยเฉลี่ยหรือสภาพทางพันธุกรรมเริ่มอยู่ในสภาพ homozygous ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากการคัดเลือกคู่ผสมเพื่อให้ได้ไก่อกระดุกดำที่มีลักษณะตรงตามความต้องการของตลาด และตรงตามสายพันธุ์ที่กำหนดไว้ หรือในบางครั้งอาจหลีกเลี่ยงไม่ได้ที่จะต้องมีการผสมเลือดชิด

Table 5 F-statistics for each microsatellite markers

Locus	F_{ST}	F_{IS}		
		Phuphan	Cheefah	Fahleung
MCW0069	0.016	0.400	0.197	0.254
MCW0330	0.047	0.955	0.790	0.869
MCW0216	0.074	0.408	0.295	0.342
MCW0222	0.037	0.349	0.412	0.308
MCW0034	0.002	-0.344	-0.068	-0.178
MCW0206	0.001	0.088	0.254	0.046
MCW0295	0.013	0.446	0.009	0.054
MCW0081	0.006	0.114	-0.032	-0.064
MCW0014	0.019	0.592	-0.102	-0.073
MCW0183	0.063	0.949	0.672	0.487
MCW0067	0.004	-0.078	-0.228	-0.191
MCW0104	0.028	0.600	0.016	0.138
MCW0123	0.009	0.127	-0.155	-0.061
MCW0165	0.071	0.014	-0.165	0.126
MCW0111	0.009	0.195	-0.177	-0.241
MCW0078	0.034	0.143	0.187	0.398
ADL0268	0.012	-0.284	-0.113	-0.091
ADL0278	0.046	0.677	0.561	0.447
ADL0112	0.020	0.506	-0.183	-0.226
LEI0166	0.040	0.218	0.095	0.193
Average	0.029	0.313	0.111	0.126

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเครื่องหมายเพื่อบ่งชี้ไก่กระดูกดำแต่ละสายพันธุ์

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างอัลลีลของ Microsatellite 20 ตำแหน่ง 158 อัลลีล ที่ปรากฏกับการแสดงออกของไก่กระดูกดำแต่ละสายพันธุ์ ด้วยวิธี logistic regression analysis (Table 6) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการทำนายความน่าจะเป็นที่อัลลีลนั้นๆ จะมีความจำเพาะกับไก่ดำสายพันธุ์ใดๆ เพื่อบ่งชี้ลักษณะเฉพาะของไก่กระดูกดำแต่ละสายพันธุ์ การศึกษาครั้งนี้พบว่ามี 6 ตำแหน่ง ที่สัมพันธ์กับการแสดงออกของไก่กระดูกดำและนำไปใช้ในการบ่งชี้การเป็นไก่กระดูกดำแต่ละสายพันธุ์ ได้แก่ MCW0014, MCW0165, MCW0183, MCW0216, MCW0295 และ LEI0166 โดยพบอัลลีลที่มีความจำเพาะที่มีนัยสำคัญ

($P < 0.01$) สามารถนำไปใช้บ่งชี้การเป็นไก่ดำฟ้าหลวง จำนวน 5 อัลลีล ได้แก่ MCW0014.A7(223bp), MCW0165.A2(128bp), MCW0183.A10(345bp), MCW0295.A4(120bp) และ LEI0166.A4(368bp) ซึ่งอัลลีลเหล่านี้ให้ความแม่นยำในการทำนายถูกต้อง 81.50% และอัลลีลที่มีความจำเพาะสามารถนำไปใช้บ่งชี้การเป็นไก่ดำภูพาน พบจำนวน 5 อัลลีล ได้แก่ MCW0014.A6(215bp), MCW0014.A7(223bp), MCW0216.A3(160bp), LEI0166.A4(368bp) และ LEI0166.A5(375bp) ซึ่งอัลลีลเหล่านี้ให้ความแม่นยำในการทำนายถูกต้อง 93.50% ส่วนผลการวิเคราะห์ในไก่ดำฟ้าที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าไม่มีอัลลีลใดที่มีความจำเพาะ ที่จะนำไปใช้บ่งชี้การเป็นไก่ดำฟ้าได้

Table 6 The specific alleles of microsatellite markers to predict each Black-boned chicken breed by Logistic regression analysis

Breed	Estimates	SE	Pr>Chi-square	Odds
Fahleung				
Intercept	-0.46	0.34	0.1704	.
MCW0295.A4	1.58	0.46	0.0007	4.86
MCW0014.A7	1.19	0.37	0.0014	3.29
MCW0183.A10	3.35	1.09	0.0022	28.55
MCW0165.A2	-1.41	0.38	0.0003	0.24
LEI0166.A4	2.12	0.49	0.0001	8.39
%Concordance ^{1/}	81.50%			
Correlation (c) ^{2/}	0.84			
Phuparn				
Intercept	2.66	0.60	0.0001	.
MCW0216.A3	-3.76	0.79	0.0001	0.02
MCW0014.A6	-5.07	1.20	0.0001	0.01
MCW0014.A7	-3.78	0.75	0.0001	0.02
LEI0166.A4	-5.09	1.19	0.0001	0.01
LEI0166.A5	-2.84	0.83	0.0007	0.05
%Concordance	93.50%			
Correlation (c)	0.95			

^{1/}accuracy in prediction of equation.

^{2/}correlation between observed and predicted value from equation.

สรุป

ไก่กระดูกดำทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ ไก่ดำภูพาน ไก่ดำซำฟ้า และไก่ดำฟ้าหลวง ที่มีการเลี้ยงอยู่ในประเทศไทยนั้นยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในระดับสูง และการกระจายตัวของจีโนไทป์โดยส่วนใหญ่ไม่เป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg และเมื่อจัดกลุ่มตามค่าระยะห่างทางพันธุกรรมสามารถจำแนกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยที่ไก่ดำซำฟ้า และไก่ดำฟ้าหลวงถูกจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกัน และเมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรม พบว่าความแตกต่างของพันธุกรรม (F_{st}) ระหว่างสายพันธุ์มีค่าเท่ากับ 2.9% มีค่าอยู่ในระดับต่ำ แสดงให้เห็นว่าระดับความแตกต่างของพันธุกรรมที่เกิดขึ้นยังไม่เพียงพอที่จะแยกเป็นประชากรกลุ่มย่อยได้ และจีโนไทป์แต่ละตำแหน่งเริ่มอยู่ในสภาพ homozygous ($F_{is} = 0.159$) อาจเนื่องมาจากการคัดเลือกเพื่อให้ได้ลักษณะตรงตามความต้องการของตลาด และตรงตามสายพันธุ์ที่กำหนด และนอกจากนี้การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเครื่องหมายเพื่อบ่งชี้ลักษณะเฉพาะของไก่กระดูกดำแต่ละสายพันธุ์ พบอัลลีลที่มีความจำเพาะสามารถนำไปใช้บ่งชี้การเป็นไก่ดำฟ้าหลวง จำนวน 5 อัลลีล และในไก่ดำภูพาน พบจำนวน 5 อัลลีล ให้ความแม่นยำในการทำนายถูกต้อง 81.50% และ 93.50% ตามลำดับ แต่ในไก่ดำซำฟ้าไม่พบมีอัลลีลใดที่มีความจำเพาะที่จะนำไปใช้บ่งชี้การเป็นไก่ดำซำฟ้าได้

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาข้อมูลพันธุกรรมและตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะกับไก่กระดูกดำที่มีการเลี้ยงอยู่ในประเทศไทยเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการจำแนกกลุ่ม อีกทั้งเพื่อให้ทราบถึงโครงสร้างพื้นฐานทางพันธุกรรมของประชากรไก่กระดูกดำ เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาในไก่ดำซำฟ้า และไก่ดำฟ้าหลวง ที่มีการเลี้ยงภายใต้สภาพแวดล้อมของเกษตรกร อีกทั้งประชากรไก่ดำภูพานยังมีการรวบรวมและนำเข้าจากแหล่งต่างๆอยู่อย่างสม่ำเสมอ จึงทำให้ยังมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมสูง ดังนั้นเพื่อความแม่นยำจึงควรทำการ

ศึกษาในไก่กระดูกดำรุ่นต่อไป รวมทั้งเพิ่มจำนวน Microsatellite ที่ใช้ในการตรวจสอบอีกด้วย และนอกจากนี้ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่กระดูกดำไทยที่พบยังแสดงให้เห็นถึงความสำคัญของทรัพยากรทางพันธุกรรม ที่ควรค่าแก่การอนุรักษ์ และศึกษาการใช้ประโยชน์จากพันธุกรรมต่อไปในอนาคต

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารอ้างอิง

- เกศรา อำพากรณ์. 2553. การศึกษาความหลากหลายและเปรียบเทียบโครงสร้างทางพันธุกรรมระหว่างไก่ป่าและไก่พื้นเมืองไทยโดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ปรัชญาพร เอกบุตร. 2550. การจำแนกสายพันธุ์และการตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอของไก่พื้นเมืองไทย โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick, and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J. Hum. Genet.* 32: 314-31.
- Chen, G., W. Bao, J. Shu, C. Ji, M. Wang, H. Eding, F. Muchadeyi, and S. Weigend. 2008. Assessment of Population Structure and Genetic Diversity of 15 Chinese Indigenous Chicken Breeds Using Microsatellite Markers. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 21: 331-339.
- Cheng, H. H., I. Levin, R.L., Vallejo, H., Khatib, J. J., Dodgson, L. B., Crittenden, and J. Hillel. 1995. Development of a genetic map of the chicken with markers of high utility. *Poult. Sci.* 74: 1855-1874.
- Cuc, N.T.K, F.C. Muchadeyi, U. Baulain, H. Eding, S. Weigend, and C.B.A. Wollny. 2006. An Assessment of Genetic Diversity of Vietnamese H'mong Chickens. *Poult. Sci.* 10: 912-920.
- Davila, S. G., M. G. Gil, P. Resino-Talavan, and J. L. Campo. 2009. Evaluation of Diversity Between Dif-

- ferent Spanish Chicken Breeds, a Tester Line, and a White Leghorn Population Based on Microsatellite Markers. *Poultry Sci.* 88: 2518–2525.
- Frankham, R., J. D. Ballou, and D. A. Briscoe. 2002. Introduction to conservation genetics. Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.
- Goodwin, W., L. Adrian, and H. Sibte. 2007. An introduction to forensic genetics. John Wiley & Sons Ltd, Oxford.
- Hung, Y.C., V. M. Sava, S.Y. Makan, T.H.J.Chen, M. Y. Hong, and G. S. Huang. 2002. Antioxidant activity of melanins derived from tea: comparison between different oxidative states. *Food Chemistry*. 78: 233-240.
- FAO. 2004. Secondary guideline for development of national farm animal genetic resources management plans. Measurement of domestic animal diversity (MoDAD): Original working group report. Available: <http://dad.fao.org/en/refer/library/guideline/workgrp.pdf>.
- Kuan-wei, C., L. Hui-fang, W. Jin-yu, T. Qing-ping, S. Jian-cheng, and Z. Shuang-jie. 2006. Study on genetic diversity of 27 indigenous chicken breeds or strains in East China. *Acta veterinaria et zootechnica sinica*. 37: 7-11.
- Lui, B. H., 1998. Statistical genomics: linkage, mapping and QTL analysis. CRC Press LLC, Florida.
- Luijiang, Q., L. Xianyao, X. Guifang, C. Kuanwei, Y. Hongjie, Z. Longchao, W. Guiqin, H. Zhuocheng, X. Guiyun, and Y. Ning. 2006. Evaluation of genetic diversity in Chinese indigenous chicken breeds using microsatellite markers. *Sci. China. C. Life. Sci.* 49: 332-341.
- Nei, M. 1987. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genet.* 89: 583-590.
- Pugh, N. D., P. Balachandran, H. Lata, F.E. Dayan, V. Joshi, E. Bedir, T. Makino, R. Moraes, I. Khan, and D.S. Pascoa. 2005. Melanin: Dietary mucosal immune modulator from *Echinacea* and other botanical supplements. *Int Immunopharmacol.* 5: 637–647.
- Rasmussen, N., F. Nelson, P. Govitrapong, and M. Ebadi. 1999. The Actions of melanin and melanocyte stimulating hormone (MSH). *Neuro Endocrinol Lett.* 20: 265-282.
- Rosenberg, N. A, T. Burke, K. Elo, M.W. Feldman, P.J. Freidlin, M.A. Groenen, J. Hillel, A. Mäki-Tanila, M. Tixier-Boichard, A. Vignal, K. Wimmers, and S. Weigend. 2001. Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. *Genet.* 159: 699-713.
- Sava, V.M., B. N. Galkin, M. Y. Hong, P. C. Yang, and G.S. Huang. 2001. A novel melanin-like pigment derived from black tea leaves with Immuno-stimulating activity. *Food Res Int.* 34: 337–343.
- Tadano, R., M. Sekino, M. Nishibori, and M. Tsudzuki. 2007. Microsatellite Marker Analysis for the Genetic Relationships Among Japanese Long-Tailed Chicken Breeds. *Poult. Sci.* 86: 460-469.
- Tang, Q. P., K. W. Chen, H. F. Li, S. J. Zhang, and D. W. Zhao. 2005. Analysis of the genetic diversity of 12 Chinese indigenous black-bone chicken breeds using microsatellite marker. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica* 36: 755-760.
- Wei, L., B. Chen, L. Xiao-ying, L. Sheng-gui, and W. Jing-jing. 2013. Genetic diversity of four protected indigenous chicken breeds in China using microsatellite markers. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 43: 464-472.
- Weir, B. S. 1996, Genetic data analysis 2: Methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts. p. 109-117.
- Ya-Bo, Y., W. Jin-Yu, D. M. Mekki, T. Qing-Ping, L. Hui-Fang, G. Rong, G. Qing-Lian, Z. Wen-Qi, and C. Kuan-Wei. 2006. Evaluation of genetic diversity and genetic distance between twelve Chinese indigenous chicken breeds based on microsatellite markers. *International J. Poult. Sci.* 5: 550-556.