

เทคนิคอย่างง่ายในการแยกเพศไก่พื้นเมืองด้วยวิธี Triple-Primer PCR

Simple technique for sexing native chicken with Triple-Primer PCR Method

ทองสา บัวสุข¹, มนต์ชัย ดวงจินดา^{1,2}, ยุพิน ผาสุก^{1,2} และ สจี กัณหหาเรียง^{1,2*}

Thongsa Buasook¹, Monchai Duangjinda^{1,2}, Yupin Phasuk and Sajee Kunhareang^{1,2*}

บทคัดย่อ: การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกเพศไก่พื้นเมืองด้วยวิธี Triple-Primer PCR โดยใช้ Sex-linked marker (SLM) ในไก่พื้นเมืองและไก่สายพันธุ์สังเคราะห์ จำนวน 60 ตัวอย่าง ผลการศึกษาพบวิธี Triple-Primer PCR สามารถเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมายได้ ในไก่พื้นเมืองและไก่สายพันธุ์สังเคราะห์เพศเมีย (ZW) จะพบแถบดีเอ็นเอ 2 แถบ ขนาด 107 bp และ 202 bp แต่ในเพศผู้ (ZZ) พบแถบดีเอ็นเอ 1 แถบ ขนาด 107 bp เมื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอของ SLM กับลักษณะปรากฏของเพศ พบแถบดีเอ็นเอของ SLM ในแต่ละเพศมีความสอดคล้องกับลักษณะปรากฏในไก่พื้นเมืองทั้งเพศผู้และเพศเมีย ดังนั้นวิธี Triple-Primer PCR สามารถนำไปใช้ในการแยกเพศไก่พื้นเมืองและเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว

คำสำคัญ: ไก่พื้นเมือง การแยกเพศ วิธี Triple-Primer PCR

ABSTRACT: The objective of this study was to identify sex of native chickens using Triple-Primer PCR with Sex-linked marker (SLM). A total of 60 blood samples were investigated from Thai native chickens and synthetic lines. The result were shown two DNA fragments of 107 bp and 202 bp (ZW) in female, whereas only one band was observed in male (ZZ). A detection of DNA banding was matched with their morphology in each breed. Therefore, Triple-Primer PCR can be used for sexing, and it is considered as a simple and rapid technique for sex identification in native chickens.

Keywords: Native chicken, sex identification, Triple-Primer PCR Method

บทนำ

ศูนย์เครือข่ายวิจัยและพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ (ไก่พื้นเมือง) ร่วมกับ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และกรมปศุสัตว์ ได้มีโครงการพัฒนาไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์ประจำถิ่นและ

พันธุ์ซี เพื่อใช้ประโยชน์พันธุ์กรรมไก่พื้นเมืองไทยโดยไก่พื้นเมืองประจำถิ่นมีความโดดเด่นด้านลักษณะรูปร่าง สีขน รวมถึงรสชาติของเนื้อ ส่วนไก่พื้นเมืองพันธุ์ซี มีขนสีขาวปลอดทั้งตัว มีความเป็นไปได้สูงที่จะใช้ผลิตไก่เนื้อไทย (หนึ่งก๊วยและคณะ, 2554) เพื่อเพิ่มทางเลือกสำหรับผู้ผลิตไก่ในเชิงการค้าและเพื่อรองรับ

¹ ศูนย์เครือข่ายวิจัยและพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ (ไก่พื้นเมือง) มหาวิทยาลัยขอนแก่นขอนแก่น 40002
Research and Development Network Center for Animal Breeding (Native Chicken), Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

² ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002
Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kean University 40002

* Corresponding author: ksajee@kku.ac.th

การผลิตในระดับอุตสาหกรรม ด้วยคุณลักษณะเด่นดังกล่าวในไก่ซึ่งจึงได้พัฒนาไก่ลูกผสมพื้นเมืองสายพันธุ์สังเคราะห์จากไก่พ่อพันธุ์พื้นเมืองไทย (ไก่ซี) ผสมกับแม่พันธุ์ทางการค้าเกิดไก่ลูกผสมที่มีความหลากหลายของสีขนและสามารถจัดกลุ่มตามสีขนและวางแผนการผสมพันธุ์ภายในชั่วรุ่นเดียวกันจนถึงชั่วรุ่นที่ 4 เกิดเป็นไก่สายพันธุ์สังเคราะห์ 4 สายพันธุ์ได้แก่ไก่ทองไข่มุกอีสานสร้อยนิลและสร้อยเพชรแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างด้านลักษณะรูปร่าง สีขน มีสมรรถนะการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตไข่ ในอนาคตคาดว่าสายพันธุ์ไก่ทอง จะถูกพัฒนาเพื่อเป็นสายแม่พันธุ์สำหรับผลิตไข่ สายพันธุ์ไข่มุกอีสานพัฒนาไปเป็นไก่เนื้อไทย สายพันธุ์สร้อยนิลและสร้อยเพชร จะใช้เป็นไก่พ่อแม่พันธุ์พื้นฐานสำหรับสร้างไก่พื้นเมืองลูกผสมการ

แยกเพศไก่พื้นเมืองจึงมีความสำคัญต่อการคัดเลือกพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ไก่เพื่อให้ตรงตามวัตถุประสงค์ของผู้ผลิต

การแยกเพศในสัตว์ปีก มีหลายวิธี เช่น การตรวจโดยวิธีเปิดกันตรวจ (Miller and Wagner, 1955) การใช้เครื่องมือตรวจ (Richner, 1989) การสังเกตพฤติกรรม (Gray and Hamer, 2001) การดูความแตกต่างของลักษณะสัณฐานวิทยาเช่น หงอน สีขน และรูปร่าง (Reynolds et al., 2008) ซึ่งต้องใช้ระยะเวลานาน ค่าใช้จ่ายสูงและบางวิธีอันตรายต่อตัวสัตว์ สำหรับไก่พื้นเมืองไทยนั้นสามารถแยกเพศได้จากการสังเกตลักษณะรูปร่าง สีขน และหงอน ที่ปรากฏออกมา เช่น ไก่พันธุ์ประดู่หางดำ จะสามารถแยกเพศได้เมื่อไก่อายุ 8 สัปดาห์และไก่ซี ที่อายุ 12 สัปดาห์ขึ้นไป (Figure 1)

A. Pradoo Hang Dam



B. Chee



Figure 1 Identification of sex in Thai native chickens based on morphology of comb, feather color and body conformation. A small shape of comb and body conformation presents in female of Pradoo Hang Dam at 8 weeks (A1) and Chee at 12 weeks (B1) and a large character in male (A2 and B2)

นอกจากนี้ความแม่นยำในการคัดเพศยังขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพและความชำนาญของผู้ปฏิบัติงาน ในการคัดเพศลูกไก่ตั้งแต่อายุ 1 วัน ด้วยลักษณะของยีนที่อยู่บนโครโมโซมเพศ (sex-linked gene) เช่น การคัดเพศจากลักษณะขนปีกสั้น-ยาว ในไก่เนื้อและไก่ไข่สายพันธุ์ทางการค้า (MacArthur, 1932) ในไก่พื้นเมืองยังไม่สามารถคัดเพศด้วยวิธีดังกล่าวได้อย่างไรก็ตามการแยกเพศลูกไก่พื้นเมืองได้เร็วขึ้นจะช่วยเพิ่มมูลค่าตัวสัตว์และผลกำไรของผู้ประกอบการ และสะดวกต่อการจัดการ โดยลูกไก่เพศเมียคัดเลือกเพื่อมุ่งเน้นให้ผลิตไข่ ส่วนลูกไก่เพศผู้ผลิตเป็นสายนเนื้อ

ปัจจุบันการแยกเพศสัตว์ปีกด้วยลำดับเบสที่จำเพาะบนโครโมโซมเพศได้รับความนิยมเพิ่มขึ้น ซึ่งในสัตว์ปีกโครโมโซมเพศ จะประกอบด้วย Chromosome Z และ Chromosome W โดยเพศผู้จะมีการเข้าคู่ของโครโมโซมเป็น homogametic (ZZ) เพศเมียจะเป็น heterogametic (ZW) เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจคัดเพศสัตว์ปีก (Griffiths et al., 1996) โดยศึกษาลำดับเบสจำเพาะบนโครโมโซมเพศที่ใช้แยกความแตกต่างของเพศผู้และเพศเมีย (Kahn et al., 1998, Fridolfsson and Ellegren, 1999) เช่น Single strand conformation polymorphism (SSCP), Restriction fragment length polymorphism (RFLP), Microsatellites, Amplified fragment length polymorphism (AFLP) และเทคนิค Triple-Primer PCR (Li et al., 2012) ส่วนยีนที่ใช้เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับคัดเพศสัตว์ปีก เช่น Chromo-helicase DNA – binding Protein gene (Griffiths et al., 1996) และ Pheasant sex-linked marker (PSL) (Li et al., 2012) เป็นต้น

วัตถุประสงค์ในครั้งนี้จึงเพื่อแยกเพศไก่พื้นเมืองและไก่สายพันธุ์สังเคราะห์ด้วยวิธี Triple-Primer PCR ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างของลำดับเบสที่จำเพาะโดยอาศัยเทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มจำนวนสายดีเอ็นเอ ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะกับอัลลีลปกติ (wild-type allele) และอัลลีลที่มีการกลายพันธุ์ (mutant allele) ของ sex-linked marker เพื่อใช้

เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับคัดเพศไก่พื้นเมืองต่อไป

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดลอง

การศึกษครั้งนี้ใช้ตัวอย่างไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์ประดู่หางดำอายุ 8 สัปดาห์ ไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์และไก่สายพันธุ์สังเคราะห์ได้แก่ แก่นทอง (Kaen Thong) ไช้มุกอีสาน (Khai Mook Esan) สร้อยนิล (Soi Nin) และสร้อยเพชร (Soi Pet) อายุ 10 สัปดาห์ สายพันธุ์ละ 10 ตัวอย่าง (เพศผู้ 5 ตัวอย่างและเพศเมีย 5 ตัวอย่าง) รวม 60 ตัวอย่าง จากศูนย์เครือข่ายวิจัยและพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ (ไก่พื้นเมือง) สกว.- มช. คณะเกษตรศาสตร์

การเก็บตัวอย่างเลือดและการสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างเลือดไก่ ปริมาตร 100-200 ไมโครลิตร/ตัว ใส่หลอดทดลองที่ใส่สารป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นล้างเซลล์เม็ดเลือดด้วย 0.9% NaCl สกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนดังนี้ ดูดตัวอย่างเลือด 30 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตรเติม 5M Guanidine HCl ปริมาตร 655 ไมโครลิตร 20% SDS ปริมาตร 70 ไมโครลิตร 7.5M Na-acetate ปริมาตร 50 ไมโครลิตรและ 1% proteinase K (1mg/ml) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมให้สารเข้ากันดี นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 3-6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm นาน 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม absolute isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตรกลับหลอดเบาๆ จนเห็นตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm นาน 5 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 75% Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตรนำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ล้างตะกอนดีเอ็นเอ ซ้ำอีกครั้ง) ผึ่งตะกอนให้แห้ง 10-15 นาที จากนั้นเติม TE buffer ปริมาตร 20 μ l นำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 3-6 ชั่วโมง ตรวจสอบความเข้มข้นและคุณภาพดีเอ็นเอ

ที่สกัดได้ด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (Nano-Drop2000, Wilmington, Delaware USA)

การตรวจรูปแบบของ sex-linked marker ด้วยเทคนิค Triple-Primer PCR

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มชิ้นส่วนยีนโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่มีความเข้มข้น 50 ng/μl ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10X PCR-buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร MgCl₂ ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร dNTPs (1.0 mM/each) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ชุด Triple-Primer PCR (Li et al., 2012) อย่างละปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร 5 U/μl Taq DNA Polymerase (MBI Fermentas) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่น บริสุทธิ์ ผ่านการอบฆ่าเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 10 ไมโครลิตร โดยมีวงรอบการทำ PCR ดังนี้ เริ่ม initial

denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 30 รอบ รายละเอียดดังนี้ denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Primer annealing อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที Primer extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ Final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป้าหมาย แล้วตรวจสอบผลบนแผ่นเจล 2% agarose gel โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์เป็นเวลา 35 นาที เมื่อครบกำหนดเวลานำแผ่นเจลไปย้อมด้วย Gelstar (Gelstar INC.NY) เป็นเวลา 5-10 นาที บันทึกภาพแถบ DNA ที่เกิดขึ้นภายใต้แสง UV ด้วย Gel Documentation System (Lab Focus, INC) จากนั้นบันทึกและวิเคราะห์รูปแบบของผลที่เกิดขึ้น

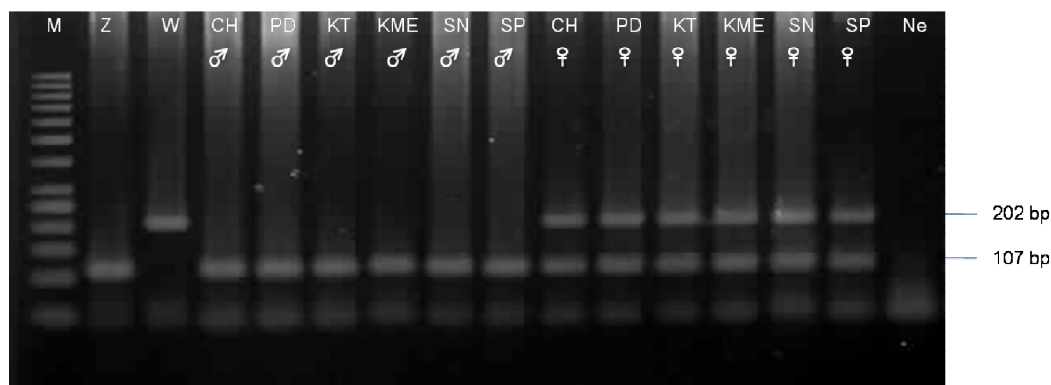


Figure 2 Pattern of sex-linked marker (SLM) on 2% agarose gel using Triple-Primer PCR method. A capital letter "Z" is a specific fragment of SLM on chromosome Z and "W" is a specific fragment of SLM on chromosome W. Male is represented by symbol ♂ and female is represented by symbol ♀. (M = 50 bp DNA ladder, CH = Chee, PD = Pradoo Hang Dam, KT = Kaen Thong, KME = KhaiMookEsan, SN = Soi Nin and SP = SoiPet)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลการเพิ่มชิ้นส่วน sex-linked marker (SLM) โดยใช้วิธี Triple-Primer PCR ในไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์ ประดู่หาง-ดำไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์ซี ไก่สายพันธุ์แก่นทองสายพันธุ์ไข่มุกอีสาน สายพันธุ์สร้อยนิล และสายพันธุ์สร้อยเพชร พบว่า SLM สามารถเพิ่มชิ้นส่วนได้ด้วยวิธี Triple-Primer PCR จำนวน 2 แถบ ขนาด 107 bp และ 202 bp (Figure2)

จากภาพจะปรากฏเห็นแถบดีเอ็นเอของ SLM บนแผ่น 2% agarose gel ที่ชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอของ SLM พบว่าแถบดีเอ็นเอขนาด 107 bp จะพบในไก่พื้นเมืองทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ขณะที่แถบดีเอ็นเอขนาด 202 bp จะพบเฉพาะไก่พื้นเมืองเพศเมียเท่านั้น ซึ่งแถบดีเอ็นเอขนาด 107 bp พบมีความจำเพาะกับโครโมโซม Z ส่วนแถบดีเอ็นเอขนาด 202 bp มีความจำเพาะกับโครโมโซม W ดังนั้นในการจำแนกไก่พื้นเมืองเพศผู้จะปรากฏแถบดีเอ็นอบนเจล 1 แถบ (ขนาด 107 bp) แต่หากตัวอย่างที่นำมาศึกษาเป็นเพศเมียจะปรากฏเห็นแถบดีเอ็นอบนเจล 2 แถบ เมื่อเปรียบเทียบแถบดีเอ็นเอของ SLM กับลักษณะปรากฏของเพศ พบแถบดีเอ็นเอของ SLM ในแต่ละเพศมีความสอดคล้องกับลักษณะปรากฏในไก่พื้นเมืองแต่ละสายพันธุ์ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย

สรุป

การจำแนกเพศไก่พื้นเมืองด้วยวิธี Triple-Primer PCR สามารถใช้แยกเพศไก่พื้นเมืองและไก่สายพันธุ์สังเคราะห์ได้อย่างชัดเจนโดยสามารถจำแนกตั้งแต่ลูกไก่อายุ 4 สัปดาห์หรือน้อยกว่า ในการจำแนกจะวิเคราะห์ผลจากแถบดีเอ็นเอที่ได้อย่างชัดเจน ให้ผลถูกต้องและแม่นยำ ซึ่งในอนาคตการคัดเพศลูกไก่จะช่วยเพิ่มมูลค่าตัวสัตว์และผลกำไรแก่ผู้ประกอบการได้ และช่วยย่นระยะเวลาในการคัดเพศไก่ นอกจากนี้วิธีการดังกล่าวสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในสัตว์ปีกชนิดอื่นๆต่อไปได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์เครือข่ายวิจัยและพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ (ไก่พื้นเมือง) สกว.- มข. คณะเกษตรศาสตร์ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลและตัวอย่างเลือดไก่พื้นเมืองและขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่สนับสนุนสถานที่และเครื่องมือในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- หนึ่งฤทัย พรหมวาทิ, มนต์ชัย ดวงจินดา, วุฒิไกร บุญคุ้มและบัญญัติเหล่าไพบูลย์. 2554. ความสัมพันธ์ระหว่างจุดกลายพันธุ์ (SNPs) ของยีน *GHSR*, *IGFI*, *cGH* และ *GFBP2* ต่อกิจกรรมการเจริญเติบโตในไก่พื้นเมืองไทย (ซีและประดู่หางดำ). แก่นเกษตร 39:261-270.
- Fridolfsson, A.K. and H. Ellegren. 1999. A simple and universal method for molecular sexing of non-ratite birds. *J Avian Biol.* 30:116-21.
- Gray, C.M. and K.C. Hamer. 2001. Food-provisioning behavior of male and female Manx shearwaters, *Puffinus puffinus*. *Anim Behav.* 62: 117-21.
- Griffiths, R., S. Daan and C. Dijkstra. 1996. Sex identification in birds using two CHD genes. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 263: 1251-6.
- Kahn, N.W., J.S. John and T.W. Quinn. 1998. Chromosome-specific intron size differences in the avian CHD gene provide an efficient method for sex identification in birds. *Auk.* 115: 1074-8.
- Li, W., F. Xue, L. Li, X. Li, B. Yue and J. Li. 2012. A triple - primer PCR approach for the sex identification of endangered Phasianidae birds. *Eur J Wildl Res.* 58:289-294.
- Macarthur, J.W. 1933. Sex-Linked Genes in the Fowl. *Genetics.* 18: 210-220.
- Miller, W.J. and F.H. Wagner. 1955. Sexing mature Columbigiformes by cloacal characters. *Auk.* 72: 279-85.
- Reynolds, S.J., G.R. Martin, L.L. Wallace, C.P. Wearn and B.J. Hughes. 2008. Sexing sooty terns on Ascension island from morphometric measurements. *J Zool.* 274: 2-8.
- Richner, H. 1989. Avian laparoscopy as a field technique for sexing birds and an assessment of its effects on wild birds. *J Field Ornithol.* 60: 137-42.