

# ความผันแปรของไมโครแซทเทลไลท์ และไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ ในแพะ 3 สายพันธุ์ของพื้นที่ภาคใต้ประเทศไทย

## Microsatellite and mitochondrial DNA variation in three goat breeds of Southern Thailand

ศิริรัตน์ นอสูงเนิน<sup>1,2</sup>, ไชยวรรณ วัฒนจันทร์<sup>2,3</sup>, ประชญาพร เอกบุตร์<sup>2,4\*</sup>  
Sirirat Norsungnoen<sup>1,2</sup>, Chaiyawan Wattanachant<sup>2,3</sup>, Pradchayaporn Akaboot<sup>2,4\*</sup>

Received: 18 February 2021 ; Revised: 26 April 2021 ; Accepted: 19 May 2021

### บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยเพื่อสำรวจเครื่องหมายดีเอ็นเอ สำหรับใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในแพะพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทยสามสายพันธุ์ คือ แพะเนื้อลูกผสมทรพี-ม.อ.1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะแองโกลนูเบียเนียน เก็บตัวอย่างเลือดแพะทั้งหมด 90 ตัว ผลการวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 15 ตำแหน่ง พบความหลากหลายทางพันธุกรรม 11 ตำแหน่ง และผลการวิเคราะห์ไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *Bmrl*, *ASel* และ *FokI* พบการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bmrl* แสดงแอสไพโลไทป์ 2 รูปแบบ และสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ *ASel* และ *FokI* แสดงแอสไพโลไทป์เพียงรูปแบบเดียว

**คำสำคัญ:** ความหลากหลายทางพันธุกรรม ไมโครแซทเทลไลท์ ไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ

### Abstract

The objective of the research was to investigate a DNA Marker used for study genetic diversity of goats in Southern Thailand. Three breeds were studied ; crossbred meat goat Sup-PSU-1, Thai-native southern goat and Anglo-Nubian goat A total of 90 goat blood samples were collected. The results revealed 11 of 15 microsatellite loci were polymorphic. The result of mitochondrial DNA that was cut with 3 restriction enzymes ; *Bmrl*, *ASel* and *FokI* revealed that *Bmrl* disclosed two haplotype patterns. However, *ASel* and *FokI* showed only one haplotype pattern.

**Keywords:** Genetic diversity, Microsatellite markers, mitochondrial DNA

<sup>1</sup> นักวิชาการสัตวบาล, ศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก อำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา 90230

<sup>2</sup> ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงาน คณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900

<sup>3</sup> ผู้ช่วยศาสตราจารย์, สาขาวิชานวัตกรรมการผลิตสัตว์และการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

<sup>4</sup> อาจารย์, สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตรและอุตสาหกรรมอาหาร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ อำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราช 80160

<sup>1</sup> Animal Husbandry Technical Officer, Small Ruminant Research and Development Center Khlong Hoi Khong District, Songkhla 90230, Thailand.

<sup>2</sup> Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand.

<sup>3</sup> Asst. Prof., Animal Production Innovation and Management Division, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai Campus, Songkhla 90110, Thailand.

<sup>4</sup> Lecturer, School of Agricultural Technology and Food Industry, Walailak University, Tha Sala District, Nakhon Si Thammarat 80160, Thailand.

\* Corresponding author: pradchayaporn.ak@wu.ac.th

## บทนำ

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellite marker) และไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ที่ใช้บ่งชี้ความจำเพาะของสิ่งมีชีวิต สายพันธุ์หนึ่ง สปีชีส์หนึ่ง หรือในระดับต่างสปีชีส์ (หทัยรัตน์ อุไรรงค์ และ ฉวีหทัย เอพาณิช, 2548) ซึ่งการใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายเกิดเนื่องจากความแปรปรวนของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอหรือเกิดโพลิมอร์ฟิซึม (polymorphism) ของลำดับเบสในโมเลกุลของดีเอ็นเอที่ทำให้สิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกัน (อลงกรณ์ ศรีพลแทน, 2557) ผลของความแตกต่างดังกล่าวมีประโยชน์ต่อการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) และความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) สำหรับนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ในหลายด้าน เช่น การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ การศึกษาจุดกำเนิดและวิวัฒนาการ การศึกษาหาความแตกต่างทางพันธุกรรม และการจัดกลุ่มประชากร เป็นต้น ทั้งนี้ การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากใช้ระยะเวลาที่สั้นและมีความถูกต้องแม่นยำสูงกว่าวิธีการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (พัชรี หมั่นอินกุด และกิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ, 2561)

ปัจจุบันมีการศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมจากเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ และไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ เพื่อหาความหลากหลายทางพันธุกรรมในแพะ เช่น Bolormaa *et al.* (2008) ใช้ไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 14 ตำแหน่ง ศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในแพะ 5 สายพันธุ์ (Angora, Cashmere, Bayandelger, Zavkhan buural and Gobi Gurvan Saikhan goat) Aljumaah *et al.* (2012) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแพะ (Ardi goat) ในประเทศซาอุดีอาระเบีย ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 14 ตำแหน่ง El-Sayed *et al.* (2016) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรแพะพื้นเมืองสองกลุ่ม (Farafra and Siwa goat) นอกจากนี้ Seilsuth *et al.* (2016) มีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมแพะนมในประเทศไทย จำนวน 5 สายพันธุ์ ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 5 ตำแหน่ง และพบมีการใช้เครื่องหมายไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและแหล่งกำเนิดของแพะในสาธารณรัฐประชาชนจีน จำนวน 13 สายพันธุ์ (Liu *et al.*, 2007) รวมทั้ง Oka *et al.* (2011) มีการศึกษาความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างแพะพันธุ์แท้ (Gembrong and Kacang goat) และแพะลูกผสม (Kacang x Etawah) โดยใช้เครื่องหมายไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ ทั้งนี้การศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแพะ

มีความสำคัญเนื่องจากสามารถนำไปใช้ตรวจสอบเอกลักษณ์ ตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และสามารถนำไปประยุกต์ในด้านต่างๆ อีกมากมาย รวมถึงยังสามารถบ่งบอกถึงศักยภาพของประชากรในการอยู่รอดในอนาคตได้

อย่างไรก็ตาม รายงานการใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ และไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในแพะพื้นที่ภาคใต้ของประเทศไทย ยังมีข้อมูลอย่างจำกัด ดังนั้น จึงควรมีการสำรวจเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ และไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ ที่เหมาะสมกับการนำมาใช้ศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมในแพะพื้นที่ภาคใต้ เนื่องจากผลของการศึกษาจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการเลือกใช้เครื่องหมายและตำแหน่งที่เหมาะสม ซึ่งจะช่วยลดการคลาดเคลื่อนของผลที่ศึกษาได้ อีกทั้งเป็นการช่วยลดค่าใช้จ่ายในการศึกษา

## วิธีดำเนินงานวิจัย

### การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดแพะ จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ แพะเนื้อลูกผสมทรพี-ม.อ.1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน จำนวนพันธุ์ละ 30 ตัว (เลือกใช้แพะจำนวน 30 ตัวต่อสายพันธุ์ ตามคำแนะนำของ ISAG/FAO (2011) ด้วยการประมาณค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม ความถี่ของอัลลีลที่เชื่อถือได้ ควรมาจากการสุ่มตัวอย่างจากสายพันธุ์ที่มีประชากรไม่ต่ำกว่า 40 ตัว และสุ่มตัวอย่างอย่างน้อย 25 ตัวต่อสายพันธุ์) จากศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก อำเภอลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา และศูนย์วิจัยและพัฒนาแพะแกะ อำเภอรามัน จังหวัดยะลา

### การเตรียมตัวอย่างเลือด และการสกัดดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างเลือดแพะรายตัว โดยเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณคอ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีสาร EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นนำตัวอย่างเลือดแพะไปแยกเม็ดเลือดขาว และล้างเลือด (whole blood) โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดเก็บบัฟไฟโคท (buffy coat) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (microcentrifuge tube) เติมน้ำ DI (Deionized water) ปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง เก็บตะกอนเม็ดเลือดขาว

จากนั้นสกัดดีเอ็นเอโดยประยุกต์จากวิธีของ Goodwin *et al.* (2007) อ้างโดย (ปรัชญาพร เอกบุตร, 2550) แล้ววัดปริมาณดีเอ็นเอจากการดูดกลืนแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ปรับค่าความเข้มข้นให้มีค่า 50

นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) บนวุ้นอะกาโรส (agarose gel) ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เก็บรักษาดีเอ็นเอที่สกัดได้ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

#### การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ (polymerase chain reaction: PCR) โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 15 ตำแหน่ง และไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ จำนวน 2 ตำแหน่ง (Table 1) ในปฏิกิริยาพีซีอาร์มีปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) 1 ไมโครลิตร, ไพรมเมอร์ 1 ไมโครลิตร (forward 0.5 ไมโครลิตร และ reverse 0.5 ไมโครลิตร), dNTPs 0.5 ไมโครลิตร, 10X PCR-buffer 2.5 ไมโครลิตร, Taq DNA polymerase 0.125 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำ DI 4.875 ไมโครลิตร ใช้อุณหภูมิและเวลาในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ ดังนี้ initial activation 95°C 5 นาที, denature 95°C 30 วินาที, annealing ที่ระดับอุณหภูมิตามแต่ละไพรมเมอร์ (Table 1) 45 วินาที, extension 72°C 45 วินาที และ final extension 72°C เป็นเวลา 7 นาที

นำผลผลิตของปฏิกิริยาพีซีอาร์ ที่ได้ไปตรวจสอบด้วยอิเล็กโทรโฟรีซิสบนแผ่นวุ้นอะกาโรส ที่มีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ละลายใน TBE buffer โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที ย้อมแถบดีเอ็นเอด้วยเอธิเดียม

โบรไมด์ (ethidium bromide) ตรวจสอบการปรากฏของแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต 260 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง gel documentation อ่านผลโดยเทียบขนาดกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 DNA ladders

#### การตรวจสอบรูปแบบแฮพโลไทป์ของไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี

นำข้อมูลลำดับเบสของไพรมเมอร์ GQ1 (Accession No. NC0050442.2) จากฐานข้อมูล GenBank มาออกแบบเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยโปรแกรม NEB cutter v2.0 สำหรับการศึกษานี้เลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *Bmrl*, *ASel* และ *FokI* ซึ่งมีตำแหน่งตัดและขนาด ดังแสดงใน Table 2 (ไพรมเมอร์ CAP ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้) ส่วนประกอบในปฏิกิริยาพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี (restriction fragment length polymorphism: PCR-RFLP) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มีดังนี้ น้ำ DI 6.5 ไมโครลิตร, 10X buffer 1 ไมโครลิตร, restriction enzyme 0.5 U และผลผลิตจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 150, 120 และ 60 นาที ตามลำดับ จากนั้นวัดการปรากฏของแถบดีเอ็นเอด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที แล้วนำเจลที่ได้ย้อมด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ ภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต และบันทึกภาพ

**Table 1** Primer, sequence, temperature and their expected sizes

| Locus Name             | Primer sequence (5'→3')  | Annealing Temp. (°C) | Allele Size (bp)                             |
|------------------------|--|----------------------|--|
| Microsatellite markers |  |                      |  |
| SRCRSP5                | F: GGACTCTACCAACTGAGCTACAAG<br>R: TGAAATGAAGCTAAAGCAATGC         | 55                   | 158-182 <sup>1</sup><br>156-178 <sup>4</sup> |
| INRA063                | F: GACCACAAAGGGATTTGCACAAGC<br>R: AAACCACAGAAATGCTTGGAAG         | 56                   | 164-172 <sup>1</sup><br>164-186 <sup>2</sup> |
| INRABERN185            | F: CAATCTTGCTCCCACTATGC<br>R: CTCCTAAAACACTCCCACACTA             | 53                   | 266-284 <sup>1</sup><br>261-289 <sup>2</sup> |
| ETH225                 | F: GATCACCTTGCCACTATTTCT<br>R: ACATGACAGCCAGCTGCTACT             | 53                   | 141-159 <sup>5</sup><br>146-160 <sup>6</sup> |
| MAF70                  | F: CACGGAGTCACAAAGAGTCAGACC<br>R: GCAGGACTCTACGGGCCCTTTGC        | 62                   | 120-190 <sup>3</sup><br>134-168 <sup>4</sup> |
| OarFCB48               | F: GAGTTAGTACAAGGATGACAAGAGGCAC<br>R: GACTCTAGAGGATCGCAAAGAACCAG | 58                   | 149-173 <sup>4</sup><br>149-181 <sup>6</sup> |
| INRA023                | F: GAGTAGAGCTACAAGATAAAGCTTC<br>R: TAACTACAGGGTGTAGATGAAT        | 52                   | 196-215 <sup>2</sup><br>196-215 <sup>3</sup> |

**Table 1** Primer, sequence, temperature and their expected sizes (cont.)

| Locus Name               | Primer sequence (5'→3')                                      | Annealing Temp. (°C) | Allele Size (bp)                             |
|--------------------------|--|----------------------|--|
| ILSTS011                 | F:GCTTGCTACATGGAAAGTGC<br>R:CTAAAATGCAGAGCCCTACC             | 54                   | 250-300 <sup>3</sup><br>256-294 <sup>7</sup> |
| ILSTS005                 | F:GGAAGCAATTGAAATCTATAGCC<br>R:TGTTCTGTGAGTTTGTAAAGC         | 51                   | 174-190 <sup>6</sup><br>174-218 <sup>7</sup> |
| TGLA53                   | F:GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA<br>R:ATCTTCACATGATATTACAGCAGA     | 51                   | 142-166 <sup>3</sup><br>154-188 <sup>5</sup> |
| ETH10                    | F:GTTCCAGGACTGGCCCTGCTAACA<br>R:CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC      | 60                   | 212-224 <sup>5</sup><br>192-216 <sup>6</sup> |
| SPS113                   | F: CCTCCACACAGGCTTCTCGACTT<br>R: CCTAACTTGCTTGAGTTATTGCC     | 58                   | 134-158 <sup>2</sup><br>134-158 <sup>3</sup> |
| OarFCB20                 | F: GGAAAACCCCATATATACCTATA<br>R: AAATGTGTTTAAGATTCCATACATGTG | 52                   | 82-124 <sup>1</sup><br>93-112 <sup>2</sup>   |
| ILSTS029                 | F: TGTTTTGATGGAACACAG<br>R: TTGATTTAGACCAGGGTTGG             | 51                   | 135-185 <sup>3</sup><br>148-170 <sup>4</sup> |
| BM1818                   | F: AGCTGGGAATATAACCAAAGG<br>R: AGTGCTTTCAAGGTCCATGC          | 54                   | 250-270 <sup>1</sup><br>253-272 <sup>5</sup> |
| Mitochondrial DNA marker |  |                      |  |
| GQ1                      | F: TACAATCAATACACTGGTCTT<br>R: ATTACGTTTATGCTGGATT           | 66                   | 470 <sup>8</sup>                             |
| CAP                      | F: CGTGATGCAAGTACATTAC<br>R: CTGATTAGTCATTAGTCCATC           | 61                   | 550 <sup>9</sup>                             |

<sup>1</sup>Bolormaa *et al.* (2008), <sup>2</sup>ISAG/FAO (2011), <sup>3</sup>Aljumaah *et al.* (2012), <sup>4</sup>El-Sayed *et al.* (2016), <sup>5</sup>Seilsuth *et al.* (2016), <sup>6</sup>Jayashree *et al.* (2019),

<sup>7</sup>Mahmoud *et al.* (2020), <sup>8</sup>Liu *et al.* (2007), <sup>9</sup>Oka *et al.* (2011)

**Table 2** Restriction enzymes used for PCR-RFLP analysis by NEB cutter v2.0 program

| Restriction enzyme | Sites in sequence | Cut position       | Fragment size              |
|--------------------|-------------------|--------------------|----------------------------|
| Bmrl               | 1 cutter          | 173/172            | 172 and 298                |
| ASel               | 1 cutter          | 147/149            | 147 and 323                |
| FokI               | 2 cutters         | 258/262<br>368/372 | 258 and 212<br>368 and 102 |

### เก็บข้อมูลและการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ข้อมูลนำผลแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ได้หลังจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ และผลแถบดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ ที่ได้หลังจากทำปฏิกิริยาพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี แปลงให้อยู่ในรูปข้อมูลตัวเลข โดยแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏแทนด้วย 1 และแถบดีเอ็นเอ

ที่ไม่ปรากฏในแถวเดียวกันแทนด้วย 0 สำหรับเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์นำมาวิเคราะห์หาความหลากหลายของขนาดอัลลีล จำนวนอัลลีล และ ค่า polymorphism information content (PIC) และเครื่องหมายไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ นำมาวิเคราะห์หาความถี่แฮพโลไทป์ (haplotype frequency)

## ผลการศึกษาและวิจารณ์

### ผลของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ใน ปฏิกิริยาพีซีอาร์

จากการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเข้าจับของไพรเมอร์ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จำนวน 11 ตำแหน่ง จาก 15 ตำแหน่ง คิดเป็นร้อยละ 73.33 คือ ตำแหน่ง SRCRSP5, MAF70, OarFCB48, INRA023, INRA063, ILSTS011, ILSTS005, TGLA53, ETH10, INRABERN185 และ ETH225 ส่วน 4 ตำแหน่งที่เหลือ พบไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ คือ BM1818 และเป็น monomorphic allele คือ SPS113, OarFCB20 และ ILSTS029

### ความหลากหลายของขนาดและจำนวนอัลลีล ของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์

จากการวิเคราะห์พบเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ จำนวน 11 ตำแหน่ง พบขนาดของอัลลีลมีขนาดอยู่ระหว่าง 129-340 คู่เบส (Table 3) นอกจากนี้ขนาดอัลลีลที่พบในแพะที่ศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดอัลลีลอ้างอิง (Table 1) มีขนาดเริ่มต้นเล็กกว่าและขนาดสุดท้ายที่ใหญ่กว่าอัลลีลอ้างอิงในทุกไพรเมอร์ แสดงให้เห็นว่าแพะที่ศึกษามีความหลากหลายในด้านของขนาดอัลลีลสูง ทั้งนี้จากการศึกษาพบอัลลีลรวมทั้งหมด 62 อัลลีล ซึ่งมีจำนวนของอัลลีลอยู่ระหว่าง 4-8 อัลลีลต่อตำแหน่ง (Table 3) โดยพบตำแหน่ง ILSTS011 เป็นตำแหน่งที่พบอัลลีลมากที่สุด คือ 8 อัลลีล ตำแหน่ง SRCRSP5, TGLA53 และ INRABERN185 เป็นตำแหน่งที่

พบอัลลีล น้อยที่สุด คือ 4 อัลลีล ทั้งนี้จากจำนวนอัลลีลที่พบสามารถบ่งบอกได้ถึงประสิทธิภาพของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ คือ ความหลากหลายของเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ตำแหน่งหนึ่ง ๆ อาจมีจำนวนอัลลีลที่แตกต่างกัน โดยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ที่ให้จำนวนอัลลีล 4 อัลลีลขึ้นไป สามารถนำมาใช้ศึกษาแยกความแตกต่างได้ดีกว่าเครื่องหมายที่ให้จำนวนอัลลีล 2 อัลลีล

นอกจากนี้ค่า PIC ซึ่งแสดงถึงความเหมาะสมของเครื่องหมายที่ใช้ในการศึกษาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมในครั้งนี้พบในแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1 (SUP) มีค่าระหว่าง 0.486-0.818 แพะพื้นเมืองภาคใต้ (TN) มีค่าระหว่าง 0.499-0.817 และแพะพันธุ์แองโกลนูเบีย (AN) มีค่าระหว่าง 0.187-0.759 ทั้งนี้พบค่า PIC ของเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ที่ศึกษาอยู่ในระดับปานกลาง (0.3-0.59) และระดับสูง (>0.60) ยกเว้นที่ตำแหน่ง INRABERN185 เฉพาะในแพะพันธุ์แองโกลนูเบีย ที่มีค่า PIC อยู่ในระดับต่ำ (<0.29) คือ 0.187 แต่อย่างไรก็ตามค่า PIC เฉลี่ยในแพะทั้ง 3 กลุ่ม มีค่าเท่ากับ 0.657, 0.660 และ 0.604 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในระดับสูง ซึ่งให้เห็นว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์มีประสิทธิภาพในการนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแพะทั้งสามสายพันธุ์ได้ เนื่องจากวิธีหาค่า PIC ขึ้นอยู่กับจำนวนและความถี่ของอัลลีลในเครื่องหมาย ดังนั้นค่า PIC ที่สูงของเครื่องหมายบ่งบอกถึงประโยชน์สำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

**Table 3** Genetic variability parameters of crossbred meat goat Sup-PSU-1, Thai native goat and Anglo-Nubian goat

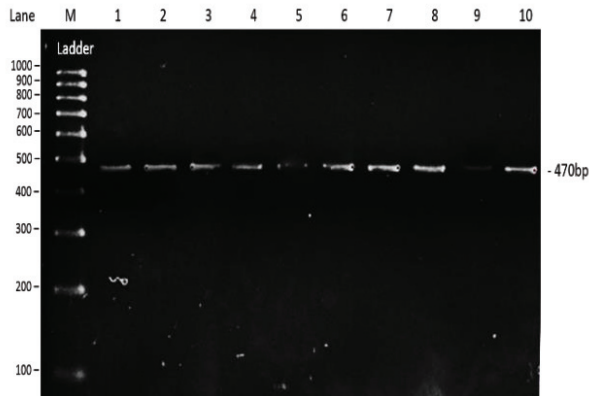
| Locus name             | Allele Size (bp) | Observed number of alleles | polymorphism information content (PIC) |       |       |
|------------------------|------------------|----------------------------|--|-------|-------|
|                        |                  |                            | SUP                                    | TN    | AN    |
| SRCRSP5                | 153-228          | 4                          | 0.673                                  | 0.608 | 0.559 |
| MAF70                  | 129-199          | 7                          | 0.818                                  | 0.810 | 0.759 |
| OarFCB48               | 138-200          | 6                          | 0.761                                  | 0.701 | 0.734 |
| INRA023                | 179-263          | 6                          | 0.778                                  | 0.688 | 0.733 |
| INRA063                | 171-218          | 5                          | 0.705                                  | 0.534 | 0.595 |
| ILSTS011               | 260-340          | 8                          | 0.759                                  | 0.817 | 0.693 |
| ILSTS005               | 151-222          | 7                          | 0.682                                  | 0.620 | 0.751 |
| TGLA53                 | 132-175          | 4                          | 0.574                                  | 0.659 | 0.447 |
| ETH10                  | 202-253          | 6                          | 0.486                                  | 0.607 | 0.627 |
| INRABERN185            | 176-267          | 4                          | 0.499                                  | 0.499 | 0.187 |
| ETH225                 | 130-221          | 5                          | 0.497                                  | 0.719 | 0.561 |
| Mean number of alleles |                  | 5.64                       | 0.657                                  | 0.660 | 0.604 |

SUP-PSU 1: crossbred meat goat Sup-PSU-1, TN: Thai native goat, AG: Anglo Nubian goat



**ผลของเครื่องหมายไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ ในปฏิกิริยาพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี**

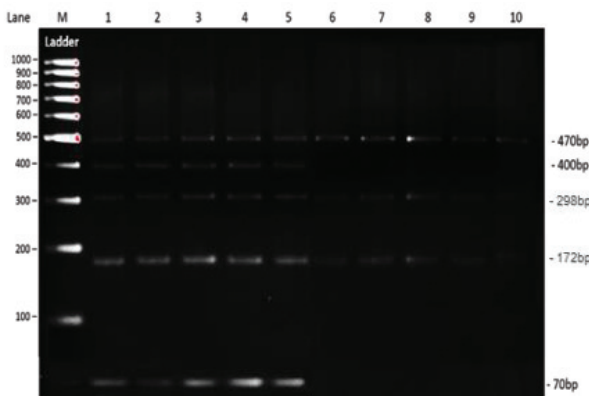
จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอในปฏิกิริยาพีซีอาร์ จำนวน 2 ไพรเมอร์ พบไพรเมอร์ GQ1 สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ ส่วนไพรเมอร์ CAP ไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอได้ ซึ่งผลจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบขนาดดีเอ็นเอของไพรเมอร์ GQ1 มีขนาดเท่ากับ 470bp ในประชากรแพะทั้งสามกลุ่ม ดังแสดงใน Figure 1



**Figure 1** PCR size of 470bp (Lane M: 100bp DNA ladder)

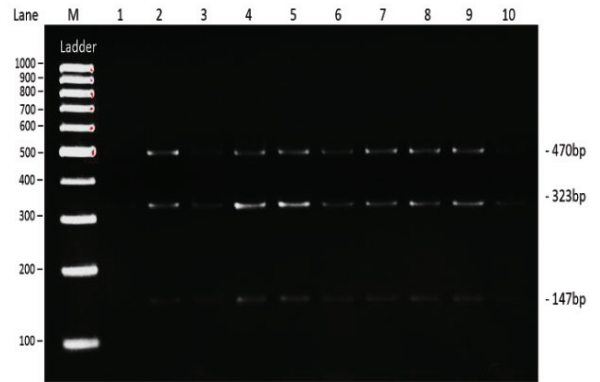
สำหรับผลปฏิกิริยาพีซีอาร์-อาร์เอฟแอลพี ในการวิเคราะห์หาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยการนำผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาพีซีอาร์ มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 3 ชนิด คือ *Bmrl*, *AseI* และ *FokI* สามารถตรวจพบรูปแบบแฮพโลไทป์ (haplotype) ดังนี้

(1) *Bmrl* สามารถตรวจพบจีโนไทป์ 2 รูปแบบคือ GG ที่มีขนาด 470bp, 298bp และ 172bp และ GC ที่มีขนาด 470bp, 400bp, 298bp, 172bp และ 70bp ดังแสดงใน Figure 2



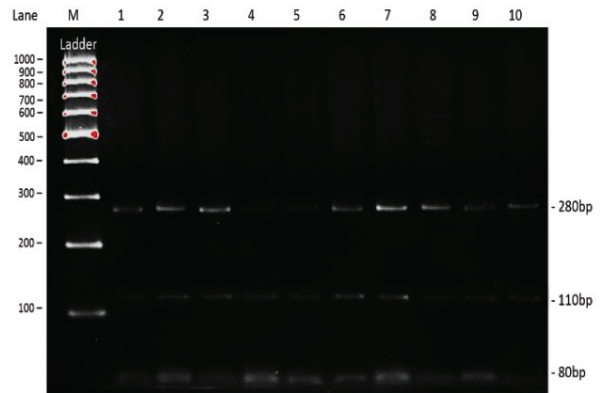
**Figure 2** PCR-RFLP patterns of mitochondrial DNA digested by *Bmrl*. (Lane M: 100bp DNA Ladder, Lane 1-5 patterns genotype GC and Lane 6-10 patterns genotype GG)

(2) *AseI* สามารถตรวจพบรูปแบบแฮพโลไทป์ที่มีขนาด 470bp, 323bp และ 147bp ดังแสดงใน Figure 3



**Figure 3** PCR-RFLP patterns of mitochondrial DNA digested by *AseI*. (Lane M: 100bp DNA Ladder, Lane 1: PCR product, Lane 2-4: Thai native goat, Lane 5-7: Anglo Nubian goat and Lane 8-9: Sup-PSU-1 goat)

(3) *FokI* สามารถตรวจพบรูปแบบแฮพโลไทป์ ที่มีขนาด 280bp, 110bp และ 80bp ดังแสดงใน Figure 4



**Figure 4** PCR-RFLP patterns of mitochondrial DNA digested by *FokI*. (Lane M: 100bp DNA Ladder, Lane 1: PCR product, Lane 2-4: Thai native goat, Lane 5-7: Anglo Nubian goat and Lane 8-9: Sup-PSU-1 goat)

อย่างไรก็ตามพบขนาดดีเอ็นเอหลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bmrl* และ *FokI* ให้ขนาดดีเอ็นเอที่แตกต่างจากอ้างอิงใน Table 2 ซึ่งอาจเป็น single nucleotide polymorphisms (SNPs) ตำแหน่งใหม่ ทั้งนี้เพื่อยืนยันผลจึงอาจต้องส่งวิเคราะห์หีนลำดับต่อไป และทั้งนี้พบว่าหลังตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AseI* และ *FokI* พบแฮพโลไทป์เพียงรูปแบบเดียว ในประชากรแพะทั้ง 3 กลุ่ม ทำให้มีความถี่อัลลีลเท่ากันในประชากรทั้ง 3 กลุ่มจึงไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างกลุ่มประชากรแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียันได้ ค่าความถี่อัลลีล ดังแสดงใน Table 4

**Table 4** Haplotype frequencies of mitochondrial DNA in crossbred meat goat Sup-PSU 1, Thai native and Anglo-Nubian goat breeds

| Restriction enzyme | Haplotype                  | Haplotype frequencies |              |              |
|--------------------|----------------------------|-----------------------|--------------|--------------|
|                    |                            | SUP-PSU 1<br>(n=30)   | TN<br>(n=30) | AG<br>(n=30) |
| <i>Bmrl</i>        | G (470bp, 298bp and 172bp) | 0.70                  | 1.00         | 0.73         |
|                    | C (470bp, 400bp and 70bp)  | 0.30                  | 0.00         | 0.27         |
| <i>AseI</i>        | A (470bp, 323bp and 147bp) | 1.00                  | 1.00         | 1.00         |
| <i>FokI</i>        | B (280bp, 110bp and 80bp)  | 1.00                  | 1.00         | 1.00         |

SUP-PSU 1: crossbred meat goat Sup-PSU-1, TN: Thai native goat, AG: Anglo Nubian goat

จาก Table 4 แสดงให้เห็นถึงค่าความถี่ของ แสพโพลไทป์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bmrl* พบ แสพโพลไทป์ G มีค่าความถี่สูงกว่าแสพโพลไทป์ C ทั้งนี้อาจเกิดจากการคัดเลือกบางลักษณะของแต่ละประชากรที่อาจส่งผลกระทบต่อความถี่อัลลีล (หนึ่งฤทัย พรหมวาทิ และคณะ, 2554) และค่าความถี่ของแสพโพลไทป์ได้อย่างไรก็ตามการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bmrl* ซึ่งให้เห็นว่าประชากรแพะทั้ง 3 กลุ่ม มีความหลากหลายทางพันธุกรรมซึ่งเป็นประโยชน์อย่างมากหากมีการคัดเลือกประชากร และมีความแตกต่างทางพันธุกรรมที่สามารถนำไปใช้ศึกษาเพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการจำแนกพันธุ์ได้ อย่างไรก็ตามค่าความถี่ของ แสพโพลไทป์จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AseI* และ *FokI* พบมีค่าความถี่เท่ากับ 1.00 ซึ่งเท่ากันในทุกประชากร ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากการตรวจพบรูปแบบแสพโพลไทป์เพียงรูปแบบเดียว แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ตัดจำเพาะที่เลือกใช้ ไม่เหมาะสมแก่การนำมาศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรม

## สรุป

ผลจากการสำรวจเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ พบเครื่องหมายที่ตำแหน่ง SRCRSP5, MAF70, OarFCB48, INRA023, INRA063, ILSTS011, ILSTS005, TGLA53, ETH10, INRABERN185 และ ETH225 รวม 11 ตำแหน่ง เป็นตำแหน่งที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถนำมาศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมในแพะเนื้อลูกผสม ทรัพย์-ม.อ.1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียญได้ ยกเว้นเครื่องหมายที่ตำแหน่ง BM1818, SPS113, OarFCB20 และ ILSTS029 ไม่เหมาะสมที่จะนำมาศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรแพะทั้ง 3 กลุ่ม สำหรับผลการสำรวจเครื่องหมายไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ จำนวน 2 ตำแหน่ง คือ GQ1 และ CAP พบตำแหน่ง CAP ไม่สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา PCR ได้

และ GQ1 หลังจากทำปฏิกิริยา PCR-RFLP จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bmrl* พบสามารถให้รูปแบบแสพโพลไทป์สองรูปแบบ ที่สามารถนำไปใช้ศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมในแพะทั้งสามกลุ่มได้ สำหรับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *AseI* และ *FokI* พบปรากฏรูปแบบแสพโพลไทป์เพียงรูปแบบเดียว หรือกล่าวได้ว่าเป็น monomorphic จึงไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมในแพะเนื้อลูกผสม ทรัพย์-ม.อ. 1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียญได้

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงการอุดมศึกษา วิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม และขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาแพะแกะ จังหวัดยะลา และศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก อำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา ที่สนับสนุนตัวอย่างเลือดแพะ

## เอกสารอ้างอิง

- ปรัชญาพร เอกบุตร. (2550). การจำแนกสายพันธุ์และการตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอของไก่พื้นเมืองโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ [วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต]. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- พัชรี หมื่นอินกุด และ กิตติพัฒน์ อุโฆษกิจ. (2561). การพัฒนาเครื่องหมาย ILP จากยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางลำต้นในอ้อย เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและโครงสร้างทางพันธุกรรมในอ้อย. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 26, 1162-1175.
- หทัยรัตน์ อุไรรงค์ และ ณัฐหทัย เอพาณิช. (2548). การวิจัยสายพิมพ์ดีเอ็นเอของพันธุ์ข้าวไทย. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร.

- หนึ่งฤทัย พรหมวาที, มนต์ชัย ดวงจินดา, วุฒิไกร บุญคุ้ม และ บัญญัติ เหล่าไพบูลย์. (2554). ความสัมพันธ์ระหว่างจุดกลายพันธุ์ (SNPs) ของยีน GHSR, IGFI, cGH และ IGFBP2 ต่อการเจริญเติบโตในไก่พื้นเมืองไทย (ซีและประดู่หางดำ). *แก่นเกษตร*, 39, 261-270.
- อลงกรณ์ ศรีพลแทน (2557). การประยุกต์ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ในการระบุสายพันธุ์งูที่จัดทำไว้ในประเทศไทย [วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต] มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.
- Aljumaah, R.S., Musthafa, M.M., Al-Shaikh, M.A., Badri, O.M., & Hussein, M.F. (2012). Genetic diversity of Ardi goat based on microsatellite analysis. *African Journal of Biotechnology*, 11(100), 16539-16545.
- Bolormaa, S., Ruvinsky, A., Walkden-Brown, S., & Van der Werf, J. (2008). Genetic relationships among Australian and Mongolian fleece-bearing goats. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 21(11), 1535-1543.
- El-Sayed, M., Al-Soudy, A., & El Badawy, A. (2016). Microsatellite markers Polymorphism between two Egyptian goat populations (*Capra hircus*). *Egyptian Journal of Genetics and Cytology*, 45(1), 89-103.
- IASG/FAO. (2011, February 1). *Molecular genetic characterization of animal genetic resources*. <http://www.fao.org/docrep/014/i2413e/i2413e00.pdf>
- Jayashree, R., Jayashankar, M. R., Nagaraja, C.S., Shrikrishna, I., & Satyanarayana, K. (2019). Genetic characterization of local goats of Karnataka by microsatellite marker analysis1. *Indian Journal of Animal Research*, 53(1), 19- 23.
- Liu, R.Y., Lei, C.Z., Liu, S.H., & Yang, G.S. (2007). Genetic diversity and origin of Chinese domestic goats revealed by complete mtDNA D-loop sequence variation. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 20(2), 178-183.
- Mahmoud, A.H., Farah, M.A., Rady, A., Alanazi, K.M., Mohammed, O., Amor, N., & Alarjani, K.M. (2020). Molecular characterization of goats from Saudi Arabia using microsatellite markers. *Journal of King Saud University-Science*, 32(2), 1681-1686.
- Oka, I.G.L., Yupardhi, W.S., Mantra, I.B., Suyasa, N., & Dewi, A.A.S. (2011). Genetic relationship between gembrong goat, kacang goat and kacang x etawah crossbred (PE) based on their mitochondrial DNA. *Journal of Veterinary Medical Science*, 12(3), 180-184.
- Seilsuth, S., Seo, J.H., Kong, H.S., & Jeon, G.J. (2016). Microsatellite analysis of the genetic diversity and population structure in dairy goats in Thailand. *Asian-Australasian journal of animal sciences*, 29(3), 327.