ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแพะเนื้อลูกผสม “ทรัพย์-ม.อ. 1” โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ และไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ

Genetic Variation of Crossbred Meat Goat “Sup-PSU 1” by Microsatellites and Mitochondrial DNA

ศิริรัตน์ นอสูงเนิน

Sirirat Norsungnoen

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Animal Science
Prince of Songkla University
2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแพะเนื้อลูกผสม “ทรัพย์-ม.อ. 1” โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ และไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ

Genetic Variation of Crossbred Meat Goat “Sup-PSU 1” by Microsatellites and Mitochondrial DNA

ศิริรัตน์ นอสูงเนิน

Sirirat Norsungnoen

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Animal Science
Prince of Songkla University
2562

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแพะเนื้อลูกผสม “ทรัพย์-ม.อ. 1” โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ และไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ

ผู้เขียน นางสาวศิริรัตน์ นอสูงเนิน

สาขาวิชา สัตวศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ดร.ปรัชญาพร เอกบุตร)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ไชยวรรณ วัฒนจันทร์)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สจี กัณหาเรียง)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กรกช นาคคนอง)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ไชยวรรณ วัฒนจันทร์)

.....กรรมการ

(ดร.ปรัชญาพร เอกบุตร)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์

.....

(ศาสตราจารย์ ดร. ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งสาง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ .....
(ดร.ปรัชญาพร เอกบุตร)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ .....
(นางสาวศิริรัตน์ นอสูงเนิน)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ .....
(นางสาวศิริรัตน์ นอสูงเนิน)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแพะเนื้อลูกผสม “ทรัพย์-ม.อ. 1” โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ และไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ

ผู้เขียน นางสาวศิริรัตน์ นอสูงเนิน

สาขาวิชา สัตวศาสตร์

ปีการศึกษา 2561

บทคัดย่อ

การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 (แพะพื้นเมืองภาคใต้ 50 เปอร์เซ็นต์ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน 50 เปอร์เซ็นต์) พัฒนาโดยศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ และไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ (บริเวณ D-loop) การศึกษาครั้งนี้ใช้แพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 จำนวน 48 ตัว แพะพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 30 ตัว และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน จำนวน 30 ตัว ผลการศึกษาไมโครแซทเทลไลท์ 11 โลไซ พบค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตี้สังเกต และค่าเฮตเทอโรไซโกตซิตี้คาดหมาย ในแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน มีค่า 0.296 (0.679), 0.338 (0.682) และ 0.329 (0.621) ตามลำดับ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าประชากรแพะทุกกลุ่มมีความหลากหลายสูง เมื่อวิเคราะห์การเกิดประชากรกลุ่มย่อย (F_{ST}) มีค่าเท่ากับ 0.138 แสดงให้เห็นว่าประชากรแพะทั้ง 3 กลุ่ม เกิดประชากรกลุ่มย่อยเล็กน้อย จากการศึกษานี้พบว่าประชาการแพะทั้ง 3 กลุ่ม ผลจาก PCR-RFLP ของไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ แสดงรูปแบบจีโนไทป์ 2 รูปแบบ คือ GG และ GC แต่ไม่พบจีโนไทป์ CC ในแพะทั้ง 3 กลุ่ม สำหรับแพะพื้นเมืองภาคใต้ไม่สามารถตรวจพบจีโนไทป์ GC ทั้งนี้อาจเนื่องจากอัลลีล C มีความจำเพาะต่อแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน นอกจากนี้แพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1 และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน พบอยู่ในสมดุลของฮาร์ดี และไวน์เบิร์ก ส่วนแพะพื้นเมืองภาคใต้ไม่สามารถทดสอบได้เนื่องจากพบรูปแบบอัลลีลและจีโนไทป์เพียงรูปแบบเดียว ทั้งนี้เมื่อนำผลค่าระยะห่างทางพันธุกรรมจากเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ และไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ สร้างแผนภาพความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยวิธี Neighbor Joining ด้วยโปรแกรม NTSYS V. 2.1 พบสามารถจำแนกกลุ่มแพะที่ศึกษาออกได้เป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกประกอบด้วยแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน และแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 กลุ่มที่สอง ได้แก่ แพะพื้นเมืองภาคใต้

จากผลการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า แพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับแพะแองโกลนูเบียนมากกว่าแพะพื้นเมืองภาคใต้

Thesis Genetic Variation of Crossbred Meat Goat Sup-PSU 1 by Microsatellites and Mitochondrial DNA

Author Ms. Sirirat Norsungneon

Major Program Animal Science

Academic Year 2018

ABSTRACT

The objective of this study was to investigate the genetic variation of crossbred meat goat Sup-PSU 1 (50% Thai native and 50% Anglo-Nubian goats) that developed by Ruminant Research and Development Center, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University using microsatellites and mitochondrial DNA (D-loop). Forty eight Sup-PSU 1 goats together with thirty Thai native goats and thirty Anglo-Nubian goats were used in this study. Results from the 11 microsatellites showed observed and expected heterozygosity value of Sup-PSU 1, Thai native and Anglo-Nubian goats were 0.296 (0.679), 0.338 (0.682) and 0.329 (0.621), respectively. All groups of goat populations showed high polymorphism. The comparision of subpopulations with the total populations (F_{ST}), a low value of F_{ST} (0.138) was indicated. This was probably related to the small subpopulation from three groups of goat. Also, this study revealed the polymorphism of three groups of goats. PCR-RFLP of mitochondrial DNA showed 2 patterns of genotype, GG and GC. The CC genotype was not indicated in all groups of goat, while GC was not found in Thai native goat. This may be due a specific allele C in Anglo-Nubian goats. Moreover, Sup-PSU 1 and Anglo-Nubian goats were in equilibrium of Hardy and Weinberg. Nevertheless, native goat could not be tested by Hardy and Weinberg equilibrium. Due to the only one allele and genotype pattern were found in the native group. When using the genetic distance from the microsatellite and mitochondria DNA to construct a phylogenetic tree using Neighbor Joining from program NTSYS V. 2.1. Two groups of goats could be divided. First group consisted of Sup-PSU 1 and Anglo-Nubian goats, while the second group was a native goat.

From the results could be concluded that Sup-PSU 1 had high polymorphism. In addition, Sup-PSU 1 goat had a closer relationship with Anglo-Nubian goat than Southern Thai native goat.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี ด้วยความช่วยเหลือ และความอนุเคราะห์จากคณาจารย์ และบุคคลหลายฝ่าย ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ดร.ปรัชญาพร เอกบุตร อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และผศ.ดร.ไชยวรรณ วัฒนจันทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ขอขอบพระคุณผศ. ดร. สจี กัณหาเรียง และผศ. ดร. กรกช นาคคนอง กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิที่กรุณาให้คำแนะนำต่างๆทางวิชาการ รวมทั้งช่วยปรับแก้ให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้มีความสมบูรณ์ทางวิชาการจนสำเร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก คลองหอยโข่ง และศูนย์วิจัยและพัฒนาแพะแกะ อำเภอรามัน จังหวัดยะลา ที่ให้การสนับสนุนตัวอย่างเลือดแพะ ตลอดจนบุคลากรในศูนย์วิจัยฯ ที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเลือด รวมถึงบุคลากรทุกท่านในภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ที่ให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ รวมถึงเจ้าหน้าที่และบุคลากรห้องปฏิบัติการวิเคราะห์คุณภาพอาหารสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำตลอดการทดลอง ขอขอบคุณ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนทุนวิจัยในการทำวิทยานิพนธ์

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการ

ขอขอบคุณเพื่อนๆนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือให้คำแนะนำตลอดการทำงานทดลอง รวมทั้งให้กำลังใจในระหว่างการเรียน และการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติพี่น้องของข้าพเจ้า ที่คอยเป็นกำลังใจเสมอมา รวมทั้งสนับสนุนค่าใช้จ่ายในระหว่างการศึกษา ความดีแห่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอมอบแด่บิดา มารดา ครูอาจารย์ และผู้มีพระคุณของข้าพเจ้าทั้งหลายที่ประสาทความรู้แก่ข้าพเจ้าตลอดมา

ศิริรัตน์ นอสูงเนิน

สารบัญ

		หน้า
สารบัญ		(10)
รายการตาราง		(11)
รายการภาพประกอบ		(12)
รายการภาพประกอบภาคผนวก		(13)
สัญลักษณ์คำย่อ และตัวย่อ		(16)
บทที่ 1	บทนำ	1
	บทต้นนำเรื่อง	1
	วัตถุประสงค์	3
บทที่ 2	การตรวจเอกสาร	4
บทที่ 3	วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	23
	วัสดุ และอุปกรณ์	23
	วิธีการทดลอง	25
บทที่ 4	ผล และวิจารณ์ผลการทดลอง	33
บทที่ 5	สรุป และข้อเสนอแนะ	47
เอกสารอ้างอิง		48
ภาคผนวก		55
	ก ภาพประกอบการเก็บตัวอย่างเลือดแพะ การแยกเม็ดเลือดขาว และการล้างเลือด	56
	ข ภาพประกอบสารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ และทำอิเล็กโตรโฟรีซิส	57
	ค ภาพประกอบอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	59
	ง ภาพประกอบการปรากฏแถบดีเอ็นเอของไมโครแซทเทลไลท์	60
ประวัติผู้เขียน		71

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สถิติการเลี้ยงแพะในประเทศไทย ระหว่าง พ.ศ. 2556-2561	5
2	จำนวนแพะเนื้อและแพะนมในประเทศไทย พ.ศ. 2561	5
3	สมรรถภาพการเจริญเติบโตในแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1	8
4	เปรียบเทียบสมรรถภาพการสืบพันธุ์ในแพะพื้นเมืองภาคใต้ แพะพันธุ์แองโกลนูเบียน และแพะเนื้อลูกผสมพื้นเมืองกับแองโกลนูเบียน	9
5	เปรียบเทียบสมรรถภาพการเจริญเติบโตในแพะพื้นเมืองภาคใต้ แพะพันธุ์แองโกลนูเบียน และแพะเนื้อลูกผสมพื้นเมืองกับแองโกลนูเบียน	10
6	ไพรเมอร์และลำดับเบสสำหรับการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแพะ	26
7	ไพรเมอร์ จำนวนและขนาดอัลลีลที่พบจากการศึกษาในครั้งนี้	33
8	ความถี่อัลลีล ในแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน	34
9	ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้สังเกต (Ho) และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้คาดหมาย (He) แยกตามไพรเมอร์	37
10	ค่า Capf (F_{IT}), Theta (F_{ST}) และ Smallf (F_{IS})	40
11	ความถี่จีโนไทป์และอัลลีล จากไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ ในแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน	45

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ที่ถูกคัดเลือกให้เป็นลักษณะประจำพันธุ์	2
2	ความหลากหลายของลักษณะสีขนในแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1	3
3	ลักษณะทั่วไปของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน	7
4	ลักษณะทั่วไปของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1	8
5	จัดกลุ่มแพะจากข้อมูลพันธุกรรมรายตัว โดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTYSY V 2.1	41
6	ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน	42
7	รูปแบบจีโนไทป์ในไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ หลังตัดด้วยเอมไซม์ตัดจำเพาะ *BmrI* ด้วยปฏิกิริยา PCR-RFLP	44
8	ความแตกต่างทางพันธุกรรมจากไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ ในแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน	46

รายการภาพประกอบภาคผนวก

ภาพที่		หน้า
1	เจาะเลือดแพะบริเวณเส้นเลือดดำที่คอ	56
2	เก็บเลือดใส่ในหลอดที่มีสาร EDTA	56
3	ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเม็ดเลือดขาว	56
4	ดูดเก็บ buffy coat	56
5	ล้างเลือดด้วยการเติมน้ำกลั่น	56
6	ตากตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิห้อง	56
7	Guanidine hydrochloride ใช้การทำให้เซลล์แตก	57
8	Proteinase K ใช้ย่อยโปรตีนและกำจัดสิ่งเจือปนจากตัวอย่างดีเอ็นเอ	57
9	Sodiam dodecyl sulfate ใช้ทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ	57
10	Sodium acetate ใช้ตกตะกอนโปรตีนในสภาพที่เป็นด่างจัด	57
11	Isopropanol ใช้ตกตะกอนดีเอ็นเอ	58
12	Ethanol ใช้ล้างตะกอนดีเอ็นเอ	58
13	Tris-acetate ใช้ละลายตะกอนดีเอ็นเอ	58
14	Ethidium bromide ใช้ละลายตะกอนดีเอ็นเอ	58
15	Agarose ใช้เป็นวุ้นตัวกลางผ่านสนามไฟฟ้า	58
16	TAE buffer ใช้เป็นตัวนำไฟฟ้ามีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ	58
17	เครื่อง PCR	59
18	เครื่อง Centrifuge	59
19	เครื่อง Spectrophotometer	59
20	เครื่อง Mini centrifuge	59
21	เครื่อง Gel documentation	59
22	เครื่อง Gel electrophoresis	59
23	แถบดีเอ็นเอของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ด้วยไพรเมอร์ SRCRSP5	60
24	แถบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ด้วยไพรเมอร์ SRCRSP5	60
25	แถบดีเอ็นเอของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ด้วยไพรเมอร์ SRCRSP5	60

รายการภาพประกอบภาคผนวก (ต่อ)

26	แถบดีเอ็นเอของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ด้วยไพรเมอร์ MAF70	61
27	แถบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ด้วยไพรเมอร์ MAF70	61
28	แถบดีเอ็นเอของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ด้วยไพรเมอร์ MAF70	61
29	แถบดีเอ็นเอของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ด้วยไพรเมอร์ OarFCB48	62
30	แถบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ด้วยไพรเมอร์ OarFCB48	62
31	แถบดีเอ็นเอของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ด้วยไพรเมอร์ OarFCB48	62
32	แถบดีเอ็นเอของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ด้วยไพรเมอร์ INRA023	63
33	แถบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ด้วยไพรเมอร์ INRA023	63
34	แถบดีเอ็นเอของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ด้วยไพรเมอร์ INRA023	63
35	แถบดีเอ็นเอของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ด้วยไพรเมอร์ INRA063	64
36	แถบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ด้วยไพรเมอร์ INRA063	64
37	แถบดีเอ็นเอของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ด้วยไพรเมอร์ INRA063	64
38	แถบดีเอ็นเอของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ด้วยไพรเมอร์ ILSTS011	65
39	แถบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ด้วยไพรเมอร์ ILSTS011	65
40	แถบดีเอ็นเอของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ด้วยไพรเมอร์ ILSTS011	65
41	แถบดีเอ็นเอของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ด้วยไพรเมอร์ ILSTS005	66
42	แถบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ด้วยไพรเมอร์ ILSTS005	66
43	แถบดีเอ็นเอของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ด้วยไพรเมอร์ ILSTS005	66
44	แถบดีเอ็นเอของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ด้วยไพรเมอร์ TGLA53	67
45	แถบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ด้วยไพรเมอร์ TGLA53	67
46	แถบดีเอ็นเอของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ด้วยไพรเมอร์ TGLA53	67
47	แถบดีเอ็นเอของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ด้วยไพรเมอร์ ETH10	68
48	แถบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ด้วยไพรเมอร์ ETH10	68
49	แถบดีเอ็นเอของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ด้วยไพรเมอร์ ETH10	68
50	แถบดีเอ็นเอของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ด้วยไพรเมอร์ INRABERN185	69
51	แถบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ด้วยไพรเมอร์ INRABERN185	69

รายการภาพประกอบภาคผนวก (ต่อ)

52	แถบดีเอ็นเอของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ด้วยไพรเมอร์ INRABERN18:	69
53	แถบดีเอ็นเอของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ด้วยไพรเมอร์ ETH225	70
54	แถบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ด้วยไพรเมอร์ ETH225	70
55	แถบดีเอ็นเอของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ด้วยไพรเมอร์ ETH225	70

สัญลักษณ์คำย่อ และตัวย่อ

AG	=	Anglo-Nubian goat (แพะพันธุ์แองโกลนูเบียน)
dATP	=	deoxyadenosine triphosphates (ดีออกซิอะดีโนซีน ไทรฟอสเฟต)
dCTP	=	deoxycytidne triphosphates (ดีออกไซทิดีนซีน ไทรฟอสเฟต)
dGTP	=	deoxyguanosine triphosphates (ดีออกซีกัวโนซีน ไทรฟอสเฟต)
dNTPs	=	deoxynucleotide triphosphates (ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ ไทรฟอสเฟต)
dTTP	=	deoxythymidine triphosphates (ดีออกซีไทมิดีน ไทรฟอสเฟต)
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid (กรดเอทิลีนไดอามีนเตตราอาเซติก)
F_{IS}	=	inbreeding coefficients (ความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในกลุ่ม)
F_{IT}	=	overall fixation index (ความแปรปรวนทางพันธุกรรมรายตัว)
F_{ST}	=	fixation index (ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรทั้งหมด)
GuHCl	=	guanidine hydrochloride (กวานีดีนไฮโดรคลอไรด์)
He	=	expected Heterozygosity (เฮตเทอโรไซโกซิตี้คาดหวัง)
H_I	=	mean observed heterozygosity per individual within subpopulations (เฮตเทอโรไซโกซิตี้สังเกตของประชากรทั้งหมด)
Ho	=	observed heterozygosity (เฮตเทอโรไซโกซิตี้สังเกต)
H_S	=	mean expected heterozygosity within random mating subpopulations (ค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตี้คาดหมาย ของทุกประชากรย่อย)
H_T	=	expected heterozygosity in random mating total population (ค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตี้คาดหมาย ของประชากรทั้งหมด)
HWE	=	Hardy-Weinberg equilibrium (สมดุลของฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก)
Mg^{2+}	=	Magnesium ion (แมกนีเซียม ไอออน)
PCR	=	polymerase chain reaction (ปฏิกิริยาพีซีอาร์)
SDS	=	sodium dodecyl sulfate (โซเดียม โดเดซิลซัลเฟต)
SUP	=	crossbred meat goat Sup-PSU 1 (แพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1)
TN	=	Thai native goat (แพะพื้นเมือง)
UPGMA	=	unweighted pair group method arithmetic mean (การวิเคราะห์แยกกลุ่ม)
χ^2	=	Chi-square (ไคสแควร์)

บทที่ 1

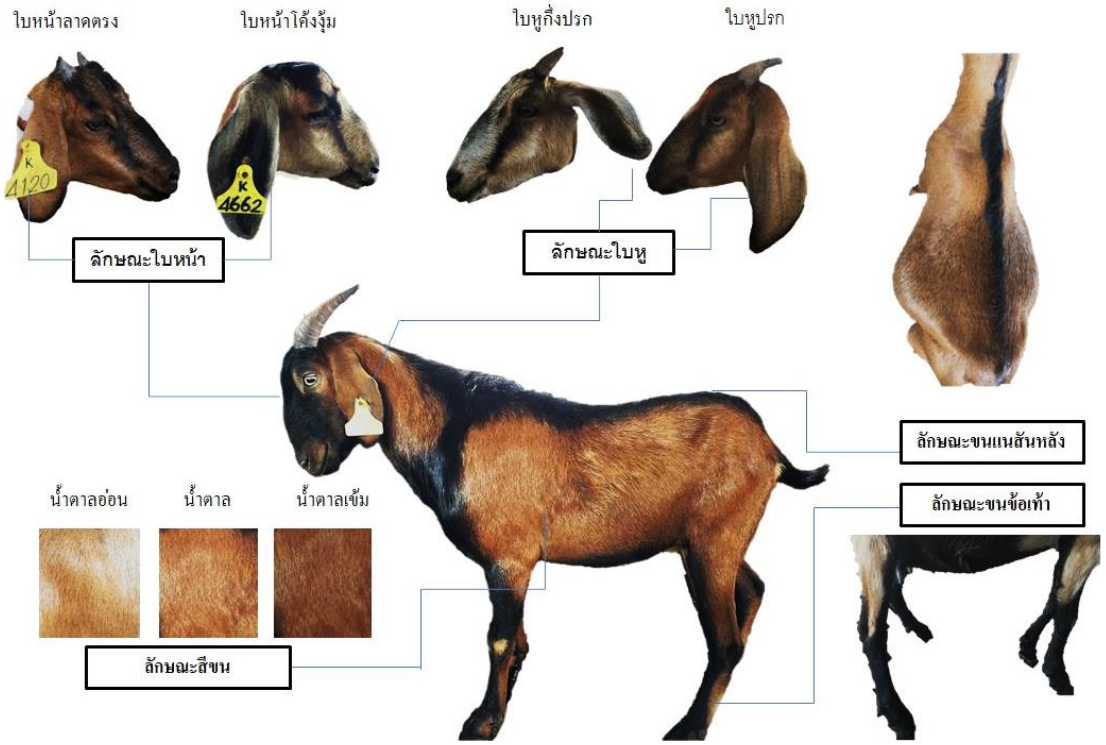
บทนำ

บทต้นนำเรื่อง

แพะ (domestic goat; *Capra aegagrus hircus*) เป็นสัตว์เศรษฐกิจทางเลือกที่มีปริมาณการเลี้ยงเพิ่มขึ้นในประเทศไทย ข้อมูลจากศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมปศุสัตว์ (2561) แสดงให้เห็นว่า ในปี พ.ศ. 2561 ประเทศไทยมีจำนวนแพะที่เลี้ยงเพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2556 จำนวน 280,595 ตัว หรือ 39.92 เปอร์เซ็นต์ แสดงในตารางที่ 1 โดยในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 9 ประกอบด้วยจังหวัดสงขลา สตูล ยะลา ปัตตานี และนราธิวาส มีการเลี้ยงแพะมากที่สุด ทั้งนี้เพราะแพะมีความเชื่อมโยงทางด้านสังคม ประเพณี และวัฒนธรรมของประชาชนภาคใต้ ซึ่งแรกเริ่มเกษตรกรส่วนใหญ่เลี้ยงแพะพื้นเมืองภาคใต้ (Thai native goat) เพราะสามารถปรับตัวได้ดีในพื้นที่ภาคใต้ของประเทศ แต่เนื่องจากแพะพื้นเมืองภาคใต้มีรูปร่างขนาดเล็ก และมีสมรรถภาพการให้ผลผลิตต่ำ ดังนั้นเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการให้ผลผลิต จึงมีการผสมข้ามสายพันธุ์ โดยการนำแพะเนื้อสายพันธุ์ของต่างประเทศเข้ามาผสมพันธุ์กับแพะพื้นเมืองภาคใต้ เพื่อปรับปรุงพันธุกรรมของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ทำให้ได้แพะลูกผสมที่มีสมรรถภาพการให้ผลิตสูงขึ้นทั้งในด้านการให้เนื้อ และการให้น้ำนม (สมเกียรติ, 2528) แต่เนื่องจากเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะในภาคใต้ส่วนใหญ่เป็นเกษตรกรรายย่อย มีต้นทุนการเลี้ยง และค่าอาหารไม่มาก จึงไม่สามารถเลี้ยงแพะเนื้อลูกผสมให้มีสมรรถภาพการให้ผลผลิตสูง ตามศักยภาพของพันธุกรรมแพะได้ (Wattanachant, 2008)

อนึ่ง เนื่องจากข้อจำกัดทางพันธุกรรมของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จึงได้ร่วมมือกับรัฐบาลประเทศออสเตรเลีย ในการพัฒนาแพะเนื้อลูกผสมระหว่างแพะพื้นเมืองภาคใต้กับแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน (Anglo-Nubian goat) เพื่อผลิตแพะเนื้อลูกผสมที่มีสมรรถภาพการให้ผลผลิตที่เหมาะสม มีรูปร่างขนาดกลาง และปรับตัวได้ดีในสภาพอากาศที่ร้อนชื้น โดยเริ่มต้นจากการศึกษาน้ำหนักแรกคลอด น้ำหนักหย่านม และอัตราการเจริญเติบโตก่อนหย่านม (เสาวนิต และคณะ, 2543) ทำให้ได้แพะเนื้อลูกผสมที่มีขนาดรูปร่างไม่ใหญ่เกินไป และต้องการอาหารไม่มาก เมื่อเปรียบเทียบกับแพะลูกผสมระหว่างพื้นเมืองภาคใต้กับพันธุ์บอร์ (Boer) จึงเหมาะกับการเลี้ยงของเกษตรกรรายย่อยในภาคใต้ และเหมาะสำหรับใช้เป็นแพะในการประกอบพิธีทางศาสนาอิสลาม

ในช่วงปี พ.ศ. 2552 – 2553 คณบดีคณะทรัพยากรธรรมชาติ ในขณะนั้น คือ รศ.ดร.วัลลภ สันติประชา ได้มีนโยบายให้พัฒนาพันธุ์แพะเนื้อของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ขึ้น โดยได้กำหนดลักษณะของแพะลูกผสม ให้มีสีขนลำตัวสีน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม ขนแนวสันหลังสีดำ ขนบริเวณข้อเท้าสีดำ ใบหูปรกหรือกึ่งปรก และใบหน้าโค้งงุ้มเล็กน้อย หรือลาดตรงคล้ายๆ แพะพื้นเมือง (ภาพที่ 1) และให้เรียกชื่อแพะลูกผสมนี้ว่า "ทรัพย์-ม.อ. 1" (Wattanachant, 2008)



ภาพที่ 1 ลักษณะของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ที่กำหนดให้เป็นลักษณะประจำพันธุ์

สำหรับการศึกษาลักษณะปรากฏดังกล่าวของแพะ ของศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก ม.อ. นั้น สุรศักดิ์ และคณะ (2543) พบว่าแพะลูกผสมพื้นเมือง-แองโกลนูเบียนที่ระดับสายเลือด 50:50 เปอร์เซ็นต์ มีขนสีน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ (ร้อยละ 49 – 60) รองลงมา คือ สีครีม และสีดำ เช่นเดียวกับธรรมนูญ และคณะ (2558) พบว่าแพะเนื้อลูกผสมพื้นเมือง-แองโกลนูเบียนของศูนย์ฯ ส่วนใหญ่มีขนสีน้ำตาลหลังดำ (ร้อยละ 68) รองลงมา คือ สีน้ำตาลผสมขาวหลังดำ และพบลักษณะใบหูส่วนใหญ่มีใบหูกึ่งปรก (ร้อยละ 86) รองลงมา คือ หูปรก (ร้อยละ 14) เห็นได้ว่าจากการศึกษาของธรรมนูญ และคณะ (2558) พบว่าสีขนที่ปรากฏมีความแปรปรวนน้อยกว่าการรายงานของสุรศักดิ์ และคณะ (2543) แต่ยังคงมีความแปรปรวนอยู่ และเนื่องจากในปัจจุบันความแปรปรวนของลักษณะต่างๆ ดังกล่าวยังคงปรากฏอยู่ (ภาพที่ 2)

ชี้ให้เห็นว่าแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 มีพันธุกรรมไม่คงที่ ทำให้ไม่สามารถจดทะเบียนรับรองสายพันธุ์ได้ ดังนั้นเพื่อพัฒนาแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1 ควรมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 เปรียบเทียบกับแพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ที่มีพันธุกรรมเป็นพันธุ์แท้ ซึ่งจะทำให้ทราบสภาพความแปรปรวนทางพันธุกรรมในแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ได้

ภาพที่ 2 ความหลากหลายของลักษณะสีขนในแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1

อนึ่งการใช้เครื่องหมายทางชีวโมเลกุลเข้ามาช่วยจะทำให้การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นไปอย่างรวดเร็วและแม่นยำ โดยใช้ คือ ไมโครแซทเทลไลท์ (microsatellites) และไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ (mitochondria DNA) เนื่องจากมีความหลากหลายสูง (highly polymorphism) มีอิทธิพลของการข่มแบบข่มร่วมกัน (codominance) สามารถช่วยแยกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตระหว่างกลุ่มที่เป็นโฮโมไซกัส (homozygous) และเฮตเทอโรไซกัส (heterozygous) ได้ (Tankslay *et al*., 1989; McCouch and Tankslay, 1991; USDA, 1994) นอกจากนี้สามารถใช้เทคนิคพีซีอาร์ (polymerase chain reaction) และเทคนิค PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) ตรวจสอบได้ (สุรีพร, 2546)

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1 เปรียบเทียบกับแพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน โดยใช้เครื่องหมายทางชีวโมเลกุล คือ ไมโครแซทเทลไลท์ และไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ

บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

แพะ และการเลี้ยงแพะในประเทศไทย

แพะชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Capra aegagrus hircus* อยู่ในวงศ์ Bovidae เป็นสัตว์กีบคู่ขนาดกลาง มีความอดทนแข็งแรง และทนทานต่อโรคได้ดีกว่าสัตว์กีบคู่ชนิดอื่น สามารถปีนป่ายที่สูงได้ ขยายพันธุ์ได้เร็ว อายุการเป็นหนุ่มสาวสั้น มีระยะตั้งท้อง 150 วัน และสามารถให้ลูกครั้งละ 1 – 4 ตัว (เกรียงศักดิ์ และคณะ, 2539) ซึ่งแพะจัดเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก ที่มีการเลี้ยงอยู่ทั่วไป ทั้งในพื้นที่เขตร้อน และกึ่งเขตร้อนของประเทศ ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะประเทศที่กำลังพัฒนา แพะจะมีความสำคัญเนื่องจากประเทศเหล่านั้นประชากรทำอาชีพเกษตรกรรมเป็นหลัก เกษตรกรส่วนใหญ่มีพื้นที่ถือครองที่มีอย่างจำกัด และมีรายได้ต่ำ ด้วยลักษณะของแพะเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก เลี้ยงง่าย ลงทุนต่ำ ให้ผลผลิตที่เร็ว จึงทำให้เกษตรกรนิยมเลี้ยงกันมาก นอกจากผลผลิตที่ได้จากแพะที่ใช้บริโภคในครัวเรือนแล้ว ยังสามารถนำมาขายเพื่อสร้างรายได้ ส่วนการเลี้ยงแพะในประเทศไทย มีแพะหลากหลายสายพันธุ์ แพะทางภาคตะวันตก เช่น ที่จังหวัดกาญจนบุรี เป็นแพะที่มาจากแถบประเทศอินเดีย หรือปากีสถาน มีรูปร่างสูงใหญ่กว่าแพะทางภาคใต้ ที่มีรูปร่างขนาดเล็ก คล้ายกับแพะพื้นเมืองของประเทศมาเลเซีย คือ พันธุ์แกมบิงกัตจัง (Kambing Katjang) และเนื่องจากแพะพื้นเมืองของประเทศไทยมีขนาดเล็กและให้ผลผลิตต่ำ กรมปศุสัตว์จึงมีเป้าหมายที่จะปรับปรุงพันธุ์แพะของประเทศไทยให้มีประสิทธิภาพการให้ผลผลิตสูงขึ้น ในด้านผลผลิตเนื้อและนม จึงได้นำแพะสายพันธุ์ต่างประเทศเข้ามาเลี้ยง และขยายพันธุ์ให้เกษตรกรนำไปผสมพันธุ์กับแพะพื้นเมือง เพื่อให้ได้แพะที่มีคุณภาพดี (สมเกียรติ, 2528)

ปัจจุบันการเลี้ยงแพะในประเทศไทยมีปริมาณเพิ่มขึ้น ซึ่งจากข้อมูลของศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมปศุสัตว์ (2561) แสดงให้เห็นว่า ในปี พ.ศ. 2561 ประเทศไทยมีจำนวนแพะที่เลี้ยงเพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2556 จำนวน 280,595 ตัว หรือคิดเป็น 38.92 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 1) โดยในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 9 ประกอบด้วยจังหวัดสงขลา สตูล ยะลา ปัตตานี และนราธิวาส มีการเลี้ยงแพะมากที่สุด ทั้งนี้เป็นเพราะแพะมีความเชื่อมโยงทางด้านสังคม ประเพณี และวัฒนธรรมของประชาชนในจังหวัดชายแดนภาคใต้ ซึ่งตั้งอยู่ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 9

ตารางที่ 1 สถิติการเลี้ยงแพะในประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2556 – 2561

จำนวนแพะที่เลี้ยงแต่ละภาคในประเทศไทย	ปี พ.ศ.				
	2556 (ตัว)	2557 (ตัว)	2558 (ตัว)	2560 (ตัว)	2561 (ตัว)
จำนวนแพะที่เลี้ยงในภาคเหนือ	32,921	34,681	38,876	49,424	57,610
จำนวนแพะที่เลี้ยงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	14,613	16,252	19,822	46,478	62,935
จำนวนแพะที่เลี้ยงในภาคกลาง	157,112	174,259	209,155	233,413	256,548
จำนวนแพะที่เลี้ยงในภาคใต้	235,631	243,185	271,730	323,631	343,779
ผลรวมจำนวนแพะที่เลี้ยงทั้งหมดในประเทศ	440,277	468,377	539,583	652,946	720,872

ที่มา: ดัดแปลงจาก กรมปศุสัตว์ (2561)

นอกจากนี้จากข้อมูลของศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมปศุสัตว์ (2561) แสดงการจำแนกแพะตามประเภท ชี้ให้เห็นว่า ในปี พ.ศ. 2561 ประเทศไทยมีการเลี้ยงแพะเนื้อมากกว่าแพะนม โดยพบแพะเนื้อในประเทศจำนวน 693,840 ตัว หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 96.38 เปอร์เซ็นต์ และแพะนมในประเทศจำนวน 26,032 ตัว หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ 3.62 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 2) และการเลี้ยงแพะเนื้อส่วนใหญ่อยู่ในพื้นที่ภาคใต้ รองลงมาคือ พื้นที่ภาคกลาง ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตามลำดับ ส่วนแพะนมส่วนใหญ่อยู่ในพื้นที่ภาคกลาง ภาคใต้ ภาคเหนือ และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตามลำดับ

ตารางที่ 2 จำนวนแพะเนื้อ และแพะนมในประเทศปี 2561

จำนวนแพะที่เลี้ยงแต่ละภาคในประเทศไทย	แพะเนื้อ		แพะนม	
	เพศผู้ (ตัว)	เพศเมีย (ตัว)	เพศผู้ (ตัว)	เพศเมีย (ตัว)
จำนวนแพะที่เลี้ยงในภาคเหนือ	15,403	40,926	261	1,020
จำนวนแพะที่เลี้ยงในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	16,250	45,633	263	789
จำนวนแพะที่เลี้ยงในภาคกลาง	58,754	182,567	5,011	10,216
จำนวนแพะที่เลี้ยงในภาคใต้	100,998	233,309	1,955	6,517
ผลรวมจำนวนแพะที่เลี้ยงทั้งหมดในประเทศ	191,405	502,435	7,490	18,542
ผลรวมคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ (%)	27	70	1	3

ที่มา : ดัดแปลงจาก กรมปศุสัตว์ (2561)

สำหรับการเลี้ยงแพะในภาคใต้ Wattanachant (2008) รายงานว่าการเลี้ยงแพะส่วนใหญ่เป็นการเลี้ยงโดยเกษตรกรรายย่อย แพะที่เลี้ยงเป็นแพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะลูกผสมระหว่างพื้นเมืองภาคใต้กับแพะพันธุ์ต่างประเทศ ซึ่ง ศิริชัย (2535) ให้ความเห็นว่าแพะพันธุ์ต่างประเทศที่ได้นำมาทดลองผสมข้ามกับแพะพันธุ์พื้นเมืองไทยให้ลูกผสมที่ดี และน่าจะเหมาะสมกับสภาพการเลี้ยงในประเทศไทย คือ แพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ลูกผสมที่มีเลือดแพะพื้นเมืองไทย 50 เปอร์เซ็นต์ และเลือดแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน 50 เปอร์เซ็นต์ จัดเป็นแพะที่เหมาะสมพอสมควร อย่างไรก็ตาม วินัย (2542) ให้ข้อเสนอแนะว่าพันธุ์แพะที่เหมาะสมกับการเลี้ยงของเกษตรกรควรจะต้องสอดคล้องกับวัตถุประสงค์ในการเลี้ยง หากเป็นการเลี้ยงแบบเกษตรกรรายย่อย การเลี้ยงแพะลูกผสม 50 เปอร์เซ็นต์ น่าจะเหมาะสมกว่าเพราะมีการเจริญเติบโต และให้ผลผลิตดีกว่าแพะพื้นเมือง

แพะพื้นเมืองภาคใต้

แพะพื้นเมืองภาคใต้ของประเทศไทยมีรูปร่างขนาดเล็ก ลักษณะคล้ายกับแพะพันธุ์กัตจังหรือแกมบิงกัตจัง ของประเทศมาเลเซีย เพศผู้เมื่อโตเต็มวัยมีน้ำหนักประมาณ 20 – 25 กิโลกรัม และสูงประมาณ 50 เซนติเมตร เพศเมียเมื่อโตเต็มวัยมีน้ำหนักตัวประมาณ 12.8 – 16.4 กิโลกรัม และสูงประมาณ 48.5 เซนติเมตร แพะพื้นเมืองภาคใต้มีลักษณะหากินเก่ง ผสมพันธุ์ได้ทุกฤดูกาล ให้ลูกแฝดสูง เลี้ยงลูกได้ดี ทนต่อสภาพภูมิอากาศร้อนชื้น และทนต่อพยาธิตัวกลมมากกว่าลูกแพะผสม (กองบำรุงพันธุ์สัตว์, 2553) ลักษณะทั่วไปของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ซึ่งเชื้อ (2533) กล่าวว่า แพะพื้นเมืองในภาคใต้ประมาณมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ มีขนสีดำ น้ำตาล หรือน้ำตาลสลับดำ ที่เหลือจะมีสีขาว มีเขา และพบมีติ่งใต้คอประมาณ 6 เปอร์เซ็นต์

อย่างไรก็ตามการเลี้ยงแพะพื้นเมืองภาคใต้ ภายใต้สภาพการเลี้ยงดูในชนบท แพะเพศเมียเมื่ออายุ 1 ปี มีน้ำหนักประมาณ 12.8 กิโลกรัม และนอกจากนี้ กฤษ (2547) ยังกล่าวว่าแพะพื้นเมืองภาคใต้ให้ผลผลิตทั้งเนื้อและนมต่ำ อัตราการเจริญเติบโตต่อวันต่ำมาก สาเหตุเนื่องจากมีการผสมเลือดชิด เกษตรกรไม่ได้คัดเลือกแพะที่มีอัตราการเจริญเติบโตที่ดีไว้ทำเป็นพ่อแม่พันธุ์ ไม่ค่อยมีการถ่ายพยาธิให้แพะ ให้อาหารที่มีคุณภาพต่ำ และไม่เพียงพอต่อความต้องการทางโภชนะของแพะ และการจัดการด้านอื่นๆ ไม่เหมาะสม เป็นต้น แต่หากนำแพะมาเลี้ยงในสภาพที่มีปัจจัยต่างๆ ดังกล่าวที่ดีขึ้น จะทำให้อัตราการเจริญเติบโต และน้ำหนักเมื่อถึงระยะเจริญพันธุ์สูงขึ้น

แพะพันธุ์แองโกลนูเบียน

แพะพันธุ์แองโกลนูเบียน เป็นแพะที่เกิดจากการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมพันธุ์ระหว่างแพะพันธุ์ซาไรบี (Zaraiby goat) ของประเทศอียิปต์ กับแพะพันธุ์จามนาปารี (Jamunapari goat) ของประเทศอินเดีย และแพะจากประเทศสวิสเซอร์แลนด์ พันธุ์ทอกเก็นเบิร์ก (Toggenburg goat) ซึ่งได้มีการพัฒนาสายพันธุ์ในประเทศอังกฤษ และเนื่องจากแพะพันธุ์แองโกลนูเบียนสืบเชื้อสายมาจากแพะในเขตร้อน จึงสามารถที่จะปรับตัวเข้ากับสภาพอากาศร้อนได้ดีกว่าแพะพันธุ์ยุโรป ลักษณะทั่วไปของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียนเป็นแพะขนาดใหญ่ ลำตัวยาว และกว้าง โดยมีน้ำหนักแรกเกิด 2.5 – 3.5 กิโลกรัม น้ำหนักหย่านม 15 – 18 กิโลกรัม ขนาดโตเต็มที่มีความสูง 75 – 100 เซนติเมตร เมื่อโตเต็มวัยเพศผู้มีน้ำหนักประมาณ 60 – 70 กิโลกรัม เพศเมียมีน้ำหนักประมาณ 50 – 60 กิโลกรัม ลักษณะประจำพันธุ์ของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน มีสีขนหลายสี ทั้งสีเดียวในตัว หรือมีสีด่าง สีดำ น้ำตาล เทา และสีขาว สันจมูกมีลักษณะโค้งงุ้ม ใบหูใหญ่ยาวและห้อยตกลง ดั้งจมูกโด่ง และสันจมูกโค้งงุ้ม ไม่มีติ่งใต้คอ ตัวผู้มักมีเคราแต่ตัวเมียไม่มี ปกติไม่มีเขาแต่บางตัวอาจมีเขาขนาดเล็ก เขาจะมีลักษณะสั้นเอนแนบติดกับหลังหัว (ภาพที่ 3) กรมปศุสัตว์นำเข้ามาในประเทศ เมื่อ พ.ศ. 2526 เพื่อปรับปรุงพันธุ์แพะพื้นเมืองให้มีขนาดใหญ่ขึ้น และให้ปริมาณน้ำนมเพิ่มขึ้น เพราะแพะแองโกลนูเบียนมีอัตราการให้ผลผลิตน้ำนมสูง โดยแพะพันธุ์นี้ให้นมเฉลี่ยประมาณวันละ 1 กิโลกรัม สามารถผลิตน้ำนมได้เฉลี่ยประมาณ 300 กิโลกรัม ตลอดระยะการให้นมนานประมาณ 300 วัน และแม่แพะมีอัตราของการคลอดลูกแฝดสูง โดยจะมีอัตราการคลอดลูกเฉลี่ยอยู่ที่ครอกละ 1.6 – 1.9 ตัว ข้อดีของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน คือ มีขนสั้นและนุ่มละเอียดเป็นมัน จึงสามารถทนทานและปรับตัวในสภาพอากาศร้อนได้ดี รวมทั้งแพะมีช่วงขายาวซึ่งเป็นลักษณะที่ดีจะช่วยทำให้การรีดนมง่าย อีกทั้งไม่เสี่ยงต่อการเป็นโรคเต้านมอักเสบ (กองบำรุงพันธุ์สัตว์, 2553)

ภาพที่ 3 ลักษณะทั่วไปของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน

แพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1

เป็นแพะเนื้อลูกผสมที่เป็นผลมาจากการนำแพะแองโกลนูเบียนที่มีจุดเด่นคือมีรูปร่างขนาดใหญ่ ให้ผลผลิตทั้งเนื้อและนม สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมในภาคใต้ได้ มาผสมกับแพะพื้นเมืองภาคใต้ซึ่งมีจุดเด่น คือ เลี้ยงง่าย หากินเก่ง ผสมติดง่าย ให้ลูกดก ทนร้อน ทำให้ได้แพะเนื้อลูกผสมที่สามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของภาคใต้ได้เป็นอย่างดี และให้เนื้อปริมาณมากกว่าเนื้อแพะพื้นเมือง และแพะลูกผสมนี้จึงได้รับการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ขึ้นโดยศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก โดยกำหนดลักษณะภายนอกของแพะไว้ดังนี้ คัดเลือกแพะลูกผสมที่มีลักษณะขนสั้น ลักษณะสีขนสีน้ำตาลหรือสีน้ำตาลเข้ม ลักษณะขนแนวสันหลังสีดำ ลักษณะใบหูแบบกึ่งปรกจนถึงปรก ลักษณะช่วงขาและลำตัวยาว ใบหน้าโค้งงุ้มเล็กน้อยหรือลาดตรงคล้ายๆ แพะพื้นเมือง (ภาพที่ 4) และเรียกแพะลูกผสมนี้ว่า “ทรัพย์-ม.อ.1”

จุดเด่นของแพะทรัพย์-ม.อ. 1 คือ มีขนาดรูปร่างไม่ใหญ่เกินไป และมีสมรรถภาพการเจริญเติบโตที่ดี (ตารางที่ 3) จึงเหมาะสมสำหรับการเลี้ยงของเกษตรกรรายใหม่ที่สนใจเลี้ยงแพะเนื้อ และเกษตรกรรายย่อยที่มีทุนในการเลี้ยงไม่มาก ยิ่งไปกว่านั้นจากขนาดที่ไม่ใหญ่มากจึงเหมาะสำหรับใช้เป็นแพะในพิธีทางศาสนาอิสลาม และสำหรับการบริโภคในระดับท้องถิ่น นอกจากนี้แพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 เพศเมียเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นแม่พันธุ์พื้นฐานเพื่อสร้างแพะลูกผสมสายต่างๆ เช่น แพะสายเนื้อ โดยการนำไปผสมกับพ่อแพะพันธุ์บอร์ และแพะสายนม โดยนำไปผสมกับพ่อแพะพันธุ์ซาแนน และพ่อแพะพันธุ์อัลไพน์ เป็นต้น (Wattanachant, 2008)

ตารางที่ 3 สมรรถภาพการเจริญเติบโตในแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1

สมรรถภาพการเจริญเติบโต	แพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1
น้ำหนักแรกเกิดอยู่ในช่วง (กก.)	2.20 – 2.40
น้ำหนักหย่านมอยู่ในช่วง (กก.)	9.0 – 10.0
น้ำหนักเมื่ออายุ 1 ปี อยู่ในช่วง (กก.)	23.0 – 25.0
น้ำหนักเมื่ออายุ 4 ปี อยู่ในช่วง (กก.)	43.0 – 45.0

ที่มา : Wattanachant (2008)

ภาพที่ 4 ลักษณะทั่วไปของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1

การเปรียบเทียบสมรรถภาพการให้ผลผลิต

จากการเปรียบเทียบสมรรถภาพการสืบพันธุ์ในแพะพื้นเมืองภาคใต้ แพะพันธุ์แองโกลนูเบียน และแพะเนื้อลูกผสมพื้นเมือง-แองโกลนูเบียน ที่ระดับสายเลือด 50 : 50 เปอร์เซ็นต์ ของสำนักงานปศุสัตว์เขต 9 พบแพะพื้นเมืองภาคใต้ มีอัตราการเกิดลูกสูงกว่าแพะพันธุ์แองโกล-นูเบียน และแพะเนื้อลูกผสมพื้นเมือง-แองโกลนูเบียน นอกจากนี้สมรรถภาพการสืบพันธุ์ อัตราการเกิดลูก จำนวนลูกเกิดต่อแม่ต่อปี และอัตราการเกิดลูกเดี่ยว ในแพะพื้นเมืองภาคใต้สูงกว่าแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน และแพะเนื้อลูกผสมพื้นเมือง-แองโกลนูเบียน ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบสมรรถภาพการสืบพันธุ์ในแพะพื้นเมืองภาคใต้ แพะพันธุ์แองโกลนูเบียน และแพะเนื้อลูกผสมพื้นเมือง-แองโกลนูเบียน

สมรรถภาพการสืบพันธุ์	แพะพื้นเมืองภาคใต้	แพะแองโกลนูเบียน	50% แองโกลนูเบียน-50% พื้นเมืองภาคใต้
อัตราการเกิดลูก (%)	97.4	84.3	83.34
จำนวนลูกเกิด/แม่/ปี (ตัว)	1.9	1.31	1.54
อัตราการเกิดลูกเดี่ยว (%)	41.4	37.1	18.42
อัตราการเกิดลูกแฝดสอง (%)	52.8	51.8	68.42
อัตราการเกิดลูกแฝดสาม (%)	5.8	11.1	13.16
อัตราการตายของลูกก่อนหย่านม (%)	3.2	7.8	2.5
อัตราการตายของลูกหลังหย่านม (%)	2.6	12.7	1.8
ช่วงห่างการให้ลูกระหว่างครอก (วัน)	238	247	261

ที่มา : สำนักงานปศุสัตว์เขต 9 (2555)

นอกจากนี้สมรรถภาพการเจริญเติบโตของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน มีอัตราการเจริญเติบโต (น้ำหนักแรกเกิด น้ำหนักหย่านม น้ำหนักเมื่ออายุ 6 เดือน น้ำหนักเมื่ออายุ 9 เดือน และน้ำหนักแรกเกิด – 9 เดือน) ที่ดีกว่าแพะอีกสองสายพันธุ์ และแพะเนื้อลูกผสมพื้นเมือง-แองโกลนูเบียน แสดงให้เห็นว่าการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างแพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ทำให้เกิดแพะลูกผสมมีสมรรถภาพการเจริญเติบโตดีกว่าแพะพื้นเมืองภาคใต้ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบสมรรถภาพการเจริญเติบโตในแพะพื้นเมืองภาคใต้ แพะพันธุ์แองโกล-นูเบียน และแพะเนื้อลูกผสมพื้นเมือง-แองโกลนูเบียน

สมรรถภาพการเจริญเติบโต	แพะพื้นเมืองภาคใต้	แพะแองโกลนูเบียน	50% แองโกลนูเบียน-50% พื้นเมืองภาคใต้
น้ำหนักแรกเกิดเฉลี่ย (กก.)	1.47	2.68	2.25
น้ำหนักหย่านมเฉลี่ย (กก.)	8.34	15.26	12.06
น้ำหนักเมื่ออายุ 6 เดือนเฉลี่ย (กก.)	12.8	23.87	19.03
น้ำหนักเมื่ออายุ 9 เดือนเฉลี่ย (กก.)	16.7	28.81	24.60
แรกเกิด – 9 เดือนเฉลี่ย (กรัม/วัน)	56.4	96.8	82.8

ที่มา : สำนักงานปศุสัตว์เขต 9 (2555)

อย่างไรก็ตาม นอกเหนือจากการศึกษาลักษณะปรากฏ หรือลักษณะที่แสดงออกภายนอก (trait performance) ดังกล่าวแล้วนั้น การศึกษาข้อมูลที่ระบุความหลากหลายหรือความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variation) ของประชากร จะเป็นข้อมูลอีกด้านหนึ่งที่บ่งบอกคุณภาพของสายพันธุ์ได้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ความหลากหลายทางพันธุกรรม

ความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นผลมาจากกระบวนการวิวัฒนาการที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความถี่ยีนในประชากร โดยอาจมีสาเหตุมาจากการกลายยีน (mutation) ซึ่งมีอัตราการเกิดที่ค่อนข้างต่ำและเกิดแตกต่างกันในสิ่งมีชีวิต การอพยพย้ายถิ่น (migration) การคัดเลือก (slection) ซึ่งก่อให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ทำให้ยีนเปลี่ยนแปลงไป และถูกถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกหลานต่อไป ความแตกต่างของลักษณะเหล่านี้เป็นผลมาจากการ

มีรูปแบบของอัลลีลที่แตกต่างกัน ซึ่งเป็นพื้นฐานของความหลากหลายทางพันธุกรรม นอกจากนี้ ความหลากหลายของอัลลีลเกี่ยวข้องกับความอยู่รอดระยะยาว (Allendorf, 1986) ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมมีความสำคัญ โดยเฉพาะในประชากรขนาดเล็ก การลดลงของความหลากหลายทางพันธุกรรม อาจส่งผลกระทบต่อความอยู่รอดของประชากรในอนาคตได้ (Frankham *et al*., 2002) กล่าวคือ ประชากรจะสามารถดำรงชีวิตให้สอดคล้องกับสภาพการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมรอบๆ ตัวได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งการต่อต้านโรค และการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมที่ต่างกันได้อย่างเหมาะสมในระยะยาว

ผลกระทบที่เด่นชัดที่สุดของประชากรที่ขาดแคลนความหลากหลายของพันธุกรรม คือการนำไปสู่ภาวะโฮโมไซโกซิตี้ (ภาวะพันธุ์แท้ ซึ่งอาจมียีนที่เป็นอันตรายต่อการอยู่รอดของประชากร) นอกจากนั้นประชากรที่ขาดความแปรผันทางพันธุกรรม ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ด้วย ดังนั้นความหลากหลายทางพันธุกรรมมีความสำคัญ คือ ช่วยลดการสูญพันธุ์ของสัตว์ ซึ่งในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอมาใช้บ่งบอกความหลากหลายของสิ่งมีชีวิต และเครื่องหมายที่ใช้ต้องมีความหลากหลายสูง (Crooijmans *et al*., 1996)

เครื่องหมายพันธุกรรม (Genetic marker)

เครื่องหมายเพื่อใช้บ่งชี้ความแตกต่าง และหลากหลายทางพันธุกรรม ของสิ่งมีชีวิตทั้งทางปริมาณ (quantitative trait) และคุณภาพ (qualitative Trait) จึงเป็นการจำแนกความแตกต่างระหว่างและภายในสปีชีส์ (species) ระหว่างและภายในประชากร หรือระหว่างแต่ละตัว ทั้งนี้เครื่องหมายที่บ่งบอกความแตกต่างนี้มี 2 ประเภท คือ เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา และเครื่องหมายทางโมเลกุล โดยมีรายละเอียดดังนี้ (สุรินทร์, 2552)

1. เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological marker)

การบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิต ใช้วิธีเปรียบเทียบลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยาหรือทางสรีรวิทยา ซึ่งลักษณะที่ตรวจสอบนี้มักจะขึ้นกับสภาพแวดล้อม ทำให้ตรวจสอบผิดพลาดได้ บางครั้งต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ และต้องมีวิธีที่จะบอกจีโนไทป์ (genotype) ที่ถูกต้องจากฟีโนไทป์ (phynotype) ที่ตรวจสอบได้ อย่างไรก็ตามการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยายังมีความจำเป็นต้องทำเป็นอันดับแรก แล้วจึงใช้วิธีอื่นประกอบเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สมบูรณ์ขึ้น

2. เครื่องหมายทางโมเลกุล (Molecular marker)

เครื่องหมายโมเลกุลมี 2 ระดับ คือระดับโปรตีน เป็นการตรวจสอบที่โมเลกุลของโปรตีนชนิดต่างๆ และระดับดีเอ็นเอ ซึ่งตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ

2.1 เครื่องหมายโปรตีน (protein marker)

การตรวจสองสิ่งมีชีวิตโดยใช้ความแตกต่างของโมเลกุลของโปรตีน ใช้วิธีแยกโมเลกุลของโปรตีนด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส (electrophoresis) แล้วจึงย้อมดูแถบของโปรตีนจำเพาะโดยใช้สารที่เหมาะสม เช่น การตรวจสอบรูปแบบของโปรตีนในเลือด โปรตีนสะสมในเมล็ดพืช เป็นต้น นอกจากนี้ยังนิยมตรวจสอบรูปแบบของเอมไซม์บางชนิด หรือ ไอโซไซม์ (isozyme) ต่างๆ ข้อดีของการตรวจสอบโปรตีน คือสามารถตรวจสอบได้หลายตำแหน่ง ค่าใช้จ่ายไม่สูงมากนัก และแถบของโปรตีนหรือไอโซไซม์นี้ยังมีการแบบข่มร่วมกัน ช่วยให้แยกความแตกต่างระหว่างแถบโปรตีนแบบโฮโมไซกัส (homozygous) และเฮตเทอโรไซกัส (heterozygous) ได้ ข้อจำกัดของการตรวจสอบโปรตีนหรือไอโซไซม์ คือ จำนวนยีนที่ตรวจสอบได้ยังมีไม่มากนักไม่กระจายครอบคลุมทั้งจีโนม และต้องมีการแสดงออกของยีนที่ศึกษา จึงต้องเลือกเนื้อเยื่อ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ผลที่ได้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อ ระยะของการเจริญเติบโตและสิ่งแวดล้อมด้วย นอกจากนี้โปรตีนยังสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ง่าย จึงต้องวิเคราะห์ผลในเวลาจำกัด ไม่สามารถเก็บตัวอย่างไว้นานได้ ในแง่ของโอกาส การตรวจสอบพบความแตกต่างในระดับโปรตีนยังมีค่าต่ำมากเมื่อเทียบกับการตรวจสอบระดับดีเอ็นเอ

2.2 เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker)

การตรวจสอบในระดับดีเอ็นเอมีข้อดีกว่าการตรวจสอบโปรตีน คือ โมเลกุลของดีเอ็นเอมีความเสถียรกว่าจึงเก็บไว้ได้นาน สามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลานานได้ และเนื่องจากดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อใดๆ ระยะการเจริญเติบโต หรือสภาพทางสรีรวิทยาใดก็ได้ โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม ตรวจสอบดีเอ็นเอจากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีนก็ได้ จะมีการแสดงออกหรือไม่ก็ได้จึงตรวจสอบได้โดยไม่จำกัด ครอบคลุมทั้งจีโนม (genome) ประกอบกับมีวิธีตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่างๆ ให้เลือกหลากหลายวิธี ทำให้การใช้ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายทำได้อย่างกว้าง ประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ได้ไม่จำกัด และเครื่องหมายดีเอ็นเอ คือสิ่งที่ใช้บอกความแตกต่างระหว่างสิ่ง 2 สิ่ง ซึ่งสามารถนำมาใช้กับสิ่งมีชีวิตได้ เช่นกันสำหรับ

เครื่องหมายโมเลกุลเป็นสิ่งที่บอกความแตกต่างในสิ่งมีชีวิต ซึ่งสามารถถ่ายทอดทาง พันธุกรรมได้ ความหลากหลายทางพันธุกรรม หรือความแปรปรวนทางพันธุกรรม เป็นที่มาของเครื่องหมายทางพันธุกรรม (genetic marker) ในปัจจุบันเทคนิคที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ RFLP (restriction fragment length polymorphisms), RAPD (random amplified polymorphic DNA), AFLP (amplified fragment length polymorphisms), microsatellites และ mitochondrial DNA เป็นต้น

2.2.1 Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) เป็นขั้นตอนที่เริ่มจากการตัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ด้วยเอนไซม์ ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) แล้วแยกขนาดของชิ้นดีเอ็นเอ โดยใช้อะกาโรสเจล (agarose gel) อิเล็กโตรโฟรีซิส ชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดจะถูกเรียงตามขนาดความยาว โดยชิ้นเล็กสุดหรือสั้นสุดจะเคลื่อนไปไกลสุดจากจุดเริ่มต้น จากนั้นย้ายดีเอ็นเอจากแผ่นเจลไปยังแผ่นไนล่อนเมมเบรน แล้วนำดีเอ็นเอติดตามที่เรียกว่าดีเอ็นเอโพรบ (DNA probe) ที่เป็นจีโนมิกดีเอ็นเอ หรือ complementary DNA (cDNA) ที่ติดฉลากด้วยสารรังสี (radioisotope) ไปจับ (hybridized) กับดีเอ็นเอคู่สม จากนั้นใช้ฟิล์ม เอ็กซ์เรย์ทาบกับแผ่นเมมเบรน เพื่อให้เกิดแถบดีเอ็นเอในตำแหน่งที่มีรังสีบนแผ่นฟิล์มเอ็กซ์เรย์เทคนิค นี้เรียก autoradiography รูปแบบของจีโนไทป์หรือแถบดีเอ็นเอเป็นแบบข่มสมบูรณ์ที่ปรากฏ หรือไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงนิวคลีไทด์ (nucleotide) บริเวณจุดจดจำที่เอ็นไซม์ตัดทำให้สัตว์แต่ละพันธุ์มีความแตกต่างกัน เทคนิค RFLP เป็นเทคนิคแรกที่ได้รับความนิยมสูงในอดีต แต่เนื่องจากขั้นตอนมีความสลับซับซ้อนและเสียเวลามาก ทำให้ความนิยมค่อยๆ ลดลง ปัจจุบันจึงมีการพัฒนาเทคนิคใหม่ๆ ที่มีความสะดวกรวดเร็วและให้ผลดีขึ้นมาใช้แทน (อรรัตน์, 2548)

2.2.2 Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) เป็นการนำเอาดีเอ็นเอเริ่มต้นสายเดี่ยวขนาด 8 – 10 นิวคลีโอไทด์ เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่ม (random amplification) จากนั้นจึงแยก ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยใช้กระแสไฟฟ้า ผ่านอะกาโรสเจล ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอจะปรากฏเป็นแถบ ศึกษาตำแหน่งและจำนวนแถบเพื่อดูความแตกต่างในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้ (Williams *et al*., 1990)

2.2.3 Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) เป็นเทคนิคที่รวมเอาเทคนิค RFLP และ RAPD เข้าด้วยกันโดยใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด ตามด้วยการเชื่อมต่อด้วย adapter ที่เป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้นไม่เกิน 20 เบส แล้วจึงเพิ่มปริมาณด้วยปฏิกริยาพีซีอาร์ โดยไพรเมอร์จะจับเฉพาะเจาะจงกับ adapter นั้นๆ เป็นการเลือกชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่จะเพิ่ม

ปริมาณจากนั้นจึงแยก ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอโดยใช้อะคิลาไมด์เจล (acrylamide gel) จะปรากฏชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป็นแถบ วิธีนี้สามารถใช้แยกความแตกต่างได้โดยพิจารณาจากขนาดและจำนวนของชิ้นดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน (สุรินทร์, 2552)

2.2.4 Microsatellites เป็นลำดับเบสที่มีลักษณะซ้ำกันเรียงต่อกันอย่างต่อเนื่องที่ตำแหน่งหนึ่งๆในจีโนม ประมาณ 1 – 6 คู่เบส กระจายตัวอยู่ทั่วทั้งจีโนมแบบไม่สม่ำเสมอ ทำให้เกิดความแตกต่างหรือพอลิมอร์ฟิซึมในสิ่งมีชีวิต พบมากในจีโนมของสิ่งมีชีวิตชั้นสูง ข้อดีของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดนี้ คือ สามารถแยกความแตกต่างแบบข่มร่วมได้ทำให้แยกความแตกต่างระหว่างลักษณะที่เป็นโฮโมไซกัส และเฮตเทอโรไซกัสได้วิธีการนี้สามารถตรวจสอบได้ง่ายโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ และต้องการดีเอ็นเอที่ใช้ตรวจสอบเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยจะพบภายในยีนหรือระหว่างยีน ไพรเมอร์ (primer) ที่สร้างขึ้นมาสำหรับสัตว์แต่ละชนิดมีความจำเพาะเจาะจง นอกจากนี้ Wayne และคณะ (1996) กล่าวว่า เครื่องหมายไมโครเซทเทลไลท์ สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกจีโนไทป์ที่ต้องการจากสัตว์ได้โดยตรง มีความถูกต้อง และแม่นยำสูงกว่าการคัดเลือกจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพียงอย่างเดียว โดยสามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบและคัดเลือกได้ในทุกช่วงการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิต สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ในด้านต่างๆได้ เช่น การศึกษาความหลากหลายและความแตกต่างทางพันธุกรรม เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการคัดเลือกคู่ผสมในการปรับปรุงพันธุ์ การสร้างแผนที่ทางพันธุกรรม และการหาตำแหน่งยีน

2.2.5 Mitochondrial DNA เป็นการใช้ดีเอ็นเอในไมโทคอนเดรีย เนื่องจากดีเอ็นเอในนิวเคลียสมีปริมาณดีเอ็นเอน้อยเกินไป เนื่องจากใน 1 เซลล์ จะมีนิวเคลียสดีเอ็นเออยู่เพียง 2 ชุด แต่ไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ ในเซลล์มีมากกว่าพันชุด และนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอมีความผันแปรสูง และมากกว่านิวเคลียร์ ดีเอ็นเอ จึงพบความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์เบสในไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ สูงระหว่างสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกัน (High Inter-species Variation) คุณสมบัติดังกล่าวมีความสำคัญในการจำแนกความแตกต่างระหว่างสิ่งมีชีวิตได้อย่างน่าเชื่อถือ นอกจากนี้ไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม(High Stability) รอบนอกมากกว่านิวเคลียร์ดีเอ็นเอ จึงถูกรักษาสภาพได้ดีกว่าและมีอัตราการเสื่อมสภาพน้อยกว่า ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างของไมโทคอนเดรียที่เป็นเยื่อหุ้มสองชั้นช่วยในการป้องกันการเสื่อมสภาพของไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอจากสภาพแวดล้อม เช่น แสงแดด ความร้อน หรือเอนไซม์จาก เชื้อจุลชีพต่างๆ เป็นต้น (จุฑาพร, 2555)

เครื่องหมายดีเอ็นเอมีความสำคัญในด้านพันธุศาสตร์ และการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ เนื่องจากการจัดกลุ่มหรือการจำแนกสิ่งมีชีวิตโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาในสัตว์อาจทำให้เกิดความผิดพลาดในการแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ได้ โดยเฉพาะสายพันธุ์สัตว์บางชนิดที่มีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรม การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอจะช่วยบ่งชี้ความแตกต่างของสายพันธุ์ ช่วยให้การจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น การเลือกใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของผู้วิจัย และคุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอแต่ละประเภท

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

เทคนิคพีซีอาร์เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นที่จำเพาะโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลีเมอเรส นักวิทยาศาสตร์ชาวอเมริกันชื่อ Kary Mullis ได้คิดค้นเทคนิคพีซีอาร์ เมื่อปี พ.ศ. 2527 หลักการ พีซีอาร์ คือ การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นได้นั้นก็ต้องอาศัยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) และไพเมอร์ (primer) ซึ่งเป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ มีลำดับเบสเป็นคู่สมทางด้านปลาย 3’ ของดีเอ็นเอต้นแบบ นอกจากนี้ปฏิกิริยาพีซีอาร์ยังใช้เอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรส (DNA polymerase) เช่น *Taq* polymerase ทำหน้าที่นำนิวคลีโอไทด์อิสระ (dNTP) คือ dATP, dCTP, dGTP และ dTTP เข้ามาต่อให้เป็นเบสคู่สมกับดีเอ็นเอต้นแบบ ทำให้เกิดดีเอ็นเอสายใหม่ขึ้น นอกจากนี้ยังมีส่วนประกอบอื่นที่จำเป็น เช่น $MgCl_2$, KCL และบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ เป็นปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นซ้ำๆกัน หลายๆ รอบแต่ละรอบประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้ (Sambrook and Russell, 2001)

1. denaturation เป็นขั้นตอนที่ทำลายพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) ที่ยึดให้ดีเอ็นเอต้นแบบซึ่งเป็นเส้นคู่แยกออกจากกันเป็นสายเดี่ยว โดยใช้อุณหภูมิ 94 – 97 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 – 60 วินาที

2. annealing เป็นขั้นตอนที่ให้ไพรเมอร์เข้าไปจับส่วนที่เป็นดีเอ็นเอเป้าหมายในดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยว โดยไพรเมอร์สาย forward จะเข้าไปจับดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวทางปลาย 3’ ส่วนไพรเมอร์สาย reverse จะเข้าไปจับดีเอ็นเอต้นแบบสายเดี่ยวอีกเส้นทางด้านปลาย 3’ ด้วยเช่นกัน เพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอเส้นใหม่ในทิศทางจาก 5’ ไป 3’ อุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในขั้นตอนนี้มีความสำคัญมาก ถ้าใช้อุณหภูมิสูงเกินไปไพรเมอร์จะจับกับดีเอ็นเอต้นแบบได้ไม่ดี ทำให้ดีเอ็นเอที่จำลองได้มีปริมาณน้อย แต่ถ้าใช้อุณหภูมิต่ำเกินไปไพรเมอร์จะเข้าไปจับดีเอ็นเอต้นแบบอย่างไม่

จำเพาะ ทำให้มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วนที่ไม่ต้องการ โดยทั่วไปใช้อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิแยกตัว (melting temperature; Tm) ประมาณ 3 – 5 องศาเซลเซียส และใช้เวลาประมาณ 30 – 45 วินาที เพื่อให้ไพรเมอร์เข้าจับคู่กับดีเอ็นเอคู่สมในสายดีเอ็นเอต้นแบบ

3. extension เป็นขั้นตอนการทำงานของ DNA polymerase และ deoxynucleotide triphosphates (dNTPs) เพื่อสังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ให้สมบูรณ์ในทิศทางจาก 5’ ไป 3’ ต่อจากไพรเมอร์ โดยทั่วไปใช้เวลา 30 – 45 วินาทีที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส

อนึ่งทั้ง 3 ขั้นตอนจะเกิดขึ้นซ้ำหมุนเวียนเป็นรอบ จำนวน 30 – 45 ในรอบของปฏิกิริยาการสังเคราะห์ดีเอ็นเอทำให้ได้ดีเอ็นเอเป้าหมาย จำนวน 2 เท่า ถ้าทำพีซีอาร์ จำนวน n รอบ เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาจำทำให้ได้ดีเอ็นเอเป้าหมายจำนวน 2^n เท่าของดีเอ็นเอต้นแบบ (สุรีพร, 2546)

องค์ประกอบการทำงานของพีซีอาร์

1. ดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template)

ดีเอ็นเอต้นแบบ คือ เส้นดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่มีบริเวณส่วนของดีเอ็นเอที่ต้องการเพิ่มปริมาณ โดยเส้นดีเอ็นเอที่สร้างขึ้นมาใหม่จะเกิดจากการจำลองตัวเองของดีเอ็นเอ จากดีเอ็นเอต้นแบบ ซึ่งในสัตว์นั้นดีเอ็นเอที่ใช้ในการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ สามารถใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้จาก เลือด เนื้อเยื่อ ปัสสาวะ อุจจาระ น้ำจากช่องท้องในร่างกาย น้ำคร่ำอสุจิ ตัวอ่อน และเยื่อเมือกของร่างกาย

2. ไพรเมอร์ (primer)

ไพรเมอร์เป็นนิวคลีโอไทด์สายสั้นๆ ที่มีความยาว 18 – 28 นิวคลีโอไทด์และมีลำดับเบสเป็นคู่สมทางปลาย 3’ ของดีเอ็นเอต้นแบบ โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์เป็นตัวกำหนดความจำเพาะในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมาย ดังนั้นจึงต้องทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาสังเคราะห์เป็นไพรเมอร์ การเลือกใช้ไพรเมอร์ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ต้องเลือกให้เหมาะสมกับวัตถุประสงค์ของการทำพีซีอาร์ เนื่องจากไพรเมอร์ที่นำมาใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ นั้นมีความเหมาะต่องานแต่ละลักษณะแตกต่างกัน

3. เอนไซม์โพลีเมอเรส (polymerase)

เอนไซม์โพลีเมอเรสในปฏิกิริยาพีซีอาร์ทำหน้าที่เหมือนเอนไซม์โพลีเมอเรสในสิ่งมีชีวิต คือ สังเคราะห์ดีเอ็นเอสายใหม่ต่อจากไพรเมอร์ ในปัจจุบันเอนไซม์โพลีเมอเรสที่นิยมใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์ คือ *Taq* DNA polymerase ที่แยกได้จากแบคทีเรีย *Themus aquaticus* ซึ่งสามารถเจริญได้ในน้ำพุร้อน เอนไซม์ที่ได้นี้จึงสามารถทนความร้อนได้สูงและไม่เสียคุณสมบัติของเอนไซม์ในขั้นตอน denaturation แต่ข้อจำกัดของ *Taq* DNA polymerase คือ ขาดคุณสมบัติในการตรวจสอบความถูกต้องของการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอ (proof reading) ดังนั้นความน่าเชื่อถือของ *Taq* DNA polymeraseจึงขึ้นกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาเรียงต่อกันถูกต้องมากหรือน้อย โดยขึ้นกับความเข้มข้นของ Mg^{2+} และ dNTPs

4. Deoxynucleotide triphosphates (dNTPs)

dNTPs ในปฏิกริยาพีซีอาร์ มี 4 ชนิด คือ deoxyadenosine triphosphates (dATP), deoxyguanosine triphosphates (dGTP), deoxycytidine triphosphate (dCTP) และ dexythymidine triphosphates (dTTP) ความเข้มข้นของ dNTPs แต่ละชนิดต้องสมดุลกัน เพื่อให้ปฏิกิริยาพีซีอาร์เกิดขึ้นได้อย่างถูกต้องและได้ปริมาณสูง แต่หากมีการใช้ dNTPs ที่มีความเข้มข้นสูงเกินไปและสัดส่วนไม่เหมาะสม จะทำให้ดีเอ็นเอที่ได้มีการต่อลำดับนิวคลีโอไทด์ผิด (misincorporation)

5. สารละลายบัฟเฟอร์ (buffer)

เป็นสารละลายที่ทำหน้าที่เร่งการทำงานและรักษาสภาพและ *Taq* DNA polymerase นิยมใช้ tris-HCL pH 8.3 – 8.8 ที่มีความเข้มข้น 10 – 15 มิลลิโมลาร์ และมีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เป็นองค์ประกอบโดย KCL (Potassium Chloride) จะทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาพีซีอาร์ในขั้นตอน annealing แต่ถ้า KCL มีความเข้มข้นมากเกินไป พบว่าจะไปยับยั้งการทำงานของ *Taq* DNA polymerase

6. แมกนีเซียมอิออน (Mg^{2+})

Mg^{2+} มีผลโดยตรงต่อขั้นตอน denaturation, annealing และ extension ในกระบวนการพีซีอาร์ หาก Mg^{2+} มีปริมาณมากเกินไป จะทำให้เกิดการสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขึ้นอย่างไม่มีความจำเพาะ (non-specific) แต่ถ้ามีปริมาน้อยเกินไป จะทำให้เกิดการสังเคราะห์ชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีปริมาณน้อยลง

การวัดขนาดดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส

เป็นวิธีทางเทคโนโลยีชีวภาพ ที่นำมาใช้ในการศึกษากรดนิวคลีอิก เช่น ดีเอ็นเอ และ อาร์เอ็นเอ ในด้านการแยกขนาด การหาปริมาณ การศึกษาถึงโครงสร้าง และคุณสมบัติบางประการ โดยอาศัยหลักการการเคลื่อนที่ของประจุไฟฟ้า เนื่องจากกรดนิวคลีอิกมีโครงสร้างที่ประกอบด้วยหมู่ฟอสเฟต (PO_{4-}) ทำให้มีประจุเป็นลบ เมื่ออยู่ในสนามไฟฟ้าจึงเกิดการเคลื่อนที่จากขั้วลบไปยังขั้วบวก จากหลักการดังกล่าวจึงนำไปใช้ในการแยกหรือวิเคราะห์กรดนิวคลีอิก โดยเฉพาะดีเอ็นเอ ภายใต้สนามไฟฟ้า ผ่านตัวกลางคือ วุ้น (gel) ตัวกลางที่ใช้กันทั่วไป คือ agarose และ polyacrylamide gel วุ้นชนิด agarose ที่สามารถแยกชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดมากกว่า 500 ถึง 1000 คู่เบส ขณะที่ polyacrylamide gel ใช้ศึกษาดีเอ็นเอที่มีขนาดมากกว่า 500 คู่เบส (ทิพย์วดี, 2547)

องค์ประกอบที่สำคัญของเทคนิคอิเล็กโทรโฟรีซิส ที่มีปัจจัยส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอผ่านตัวกลางของวุ้นมี ดังนี้

1. ขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่สามารถเคลื่อนที่ผ่านตัวกลางได้ช้ากว่าดีเอ็นเอขนาดเล็กในเวลาที่เท่ากัน การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอขนาดใหญ่จะเคลื่อนที่ได้ในระยะทางที่ใกล้กว่าดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก ในตัวกลางที่ทำให้สามารถแยกขนาดโมเลกุลของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้

2. รูปร่างของดีเอ็นเอ

ดีเอ็นเอที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากัน แต่มีรูปร่างที่ต่างกัน เช่น เป็นเส้น เป็นวงแหวน เมื่อเคลื่อนที่ผ่านสนามไฟฟ้าในตัวกลาง จะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วที่แตกต่างกัน ดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นวงแหวน (circular DNA) จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นเส้น (linear DNA) และดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นเส้นจะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าดีเอ็นเอที่มีลักษณะเป็นวงแหวนปิด (supercoil หรือ covalently closed circular)

3. ความเข้มข้น และขนาดรูพรุนของตัวกลาง

ลักษณะของวุ้นหรือตัวกลาง โมเลกุลภายในมีลักษณะเป็นโครงร่างตาข่าย เมื่อมีความเข้มข้นสูงตาข่ายจะสานตัวกันแน่นมากกว่าที่มีความเข้มข้นต่ำ ทำให้ขนาดของรูภายในตัวกลางมีขนาดเล็กลง จึงส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่หรือมีโครงสร้างที่ซับซ้อนจะเคลื่อนที่ในตัวกลางได้ช้ากว่าหรือใกล้กว่าดีเอ็นเอที่ขนาดเล็ก และมีเส้นตรง วุ้นที่มีความ

เข้มข้นสูง จึงนำมาใช้ในการแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็ก ขณะที่วุ้นที่มีขนาดความเข้มข้นต่ำจะเหมาะที่จะนำมาใช้ในการแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่

4. สารละลายที่ใช้เป็นตัวนำไฟฟ้า

สารละลายที่ใช้เป็นตัวนำไฟฟ้ามีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ เพราะใช้เป็นตัวกลางในการนำไฟฟ้าในสนามไฟฟ้า ถ้าใช้น้อยไม่ท่วมตัวกลาง การนำไฟฟ้าจะเกิดได้น้อยหรือไม่เกิดขึ้น การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอจะไม่เกิดขึ้น ขณะที่ความเข้มข้นของสารละลายมาก การนำไฟฟ้าจะเกิดขึ้นมาก จนอาจทำลายดีเอ็นเอและตัวกลาง สารละลายที่ใช้เป็นตัวนำไฟฟ้าที่นิยมใช้มีอยู่ 2 ชนิด คือ TAE buffer (Tris-acetate และ EDTA) และ TBE buffer (Tris-borate-EDTA) ที่มีความเป็นกรดด่าง (pH) ประมาณ 8.0

5. กระแสไฟฟ้า

สภาพแรงดันไฟฟ้ามีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ โดยมีความต้านทานของตัวกลางและสารละลายตัวนำไฟฟ้ามาเกี่ยวข้อง ถ้าใช้แรงดันไฟฟ้าที่สูงความสามารถในการแยกขนาดของดีเอ็นเอจะลดลง เพราะ การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอไม่สม่ำเสมอ การแยกดีเอ็นเอที่มีขนาดใหญ่มากกว่า 2 คู่เบส ควรใช้ไฟฟ้าแรงดันไม่เกิน 5 โวลต์ ต่อเซนติเมตร โดยใช้หลักการกว้างๆ คือ ใช้แรงดันไฟฟ้า 5 โวลต์ต่อระยะห่างจากขั้วอิเล็คโทรทั้งสองทุก 5 เซนติเมตร (ทิพย์วดี, 2547)

การประยุกต์ใช้ไมโครแซทเทลไลท์เพื่อเป็นเครื่องหมายพันธุกรรม

เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่สำคัญในการตรวจสอบและวินิจฉัยความผิดพลาดของยีนระหว่างสายพันธุ์ รวมทั้งหาความสัมพันธ์ของบางลักษณะที่มีความสำคัญในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดได้ เพราะเป็นดีเอ็นเอที่มีการกระจายทั่วทั้งจีโนม สามารถตรวจสอบได้แม้ว่าดีเอ็นเอมีปริมาณน้อย การแสดงออกของดีเอ็นเอสามารถแสดงออกให้เห็นสภาพข่มร่วมของยีน ทำให้แยกความแตกต่างระหว่างโฮโมไซโกต และเฮตเทอโรไซโกตได้ มีระดับเฮตเทอโรไซโกตซิตี้สูง นอกจากนี้ยังเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก มีความรวดเร็วและแม่นยำในการประเมินค่า score marker มีจำนวนอัลลีลมาก และมีความหลากหลายสูงโดยความหลากหลายรูปแบบนี้จะเป็นตัวบ่งชี้ความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตทางพันธุกรรมในระดับโมเลกุล (สุรินทร์, 2552) ในแพะมีการใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม การจัดกลุ่ม และอื่นๆ ดังเช่น

Bolormaa และคณะ (2008) ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของแพะประเทศออสเตรเลีย 2 สายพันธุ์ คือ Angora goat และ Cashmere goat กับแพะขนของประเทศมองโกเลีย 3 สายพันธุ์ คือ Bayandelger goat , Zavkhan goat และ Gobi Gurvan Saikhan goat เนื่องจากแพะทั้ง 5 สายพันธุ์ มีลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกันจึงต้องการศึกษาหาความสัมพันธ์พันธุกรรม โดยได้ศึกษาด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 14 ตำแหน่ง ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ พบจำนวนอัลลีลเฉลี่ยในประชากรแพะของประเทศมองโกเลีย ทั้งสามสายพันธุ์มีค่า 8.57, 9.07 และ 9.57 ตามลำดับ และแพะของประเทศออสเตรเลียสองสายพันธุ์ มีค่า 7.50 และ 8.79 ตามลำดับ แสดงถึงเครื่องหมายที่นำมาใช้มีความหลากหลาย ค่าเฮตเทอโรไซโกตซิตี้สังเกต และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้คาดหมายในแพะทั้ง Angora goat, Cashmere goatn Bayandelger goat , Zavkhan goat และ Gobi Gurvan Saikhan goat มีค่าใกล้เคียงกัน 0.743 (0.728), 0.717 (0.710), 0.744 (0.734), 0.711 (0.727) และ 0.737 (0.723) ตามลำดับ ชี้ให้เห็นถึงประชากรทั้ง 5 กลุ่มมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และเมื่อทดสอบสมดุลของฮาร์ดี ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg Equilibrium : HWE) พบว่ามีสภาพความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ภายใต้สมดุลของฮาร์ดี ไวน์เบิร์ก ($p < 0.001$) นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรทั้งหมดที่ศึกษา (fixation index: F_{ST}) พบค่า F_{ST} เฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.075 แสดงให้เห็นว่าประชากรทั้งหมด 5 กลุ่ม มีความคล้ายคลึงกันสูงมาก และมีเพียง 7.5% ของความผันแปรทางพันธุกรรมทั้งหมด ที่แสดงความแตกต่างระหว่างประชากร

Pramod และคณะ (2008) ศึกษาจำแนกกลุ่มแพะในประเทศอินเดีย ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 17 โลไซ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมของแพะอินเดีย โดยสุ่มตัวอย่างแพะจากถิ่นที่อยู่ตามธรรมชาติ ทั้งหมด 7 สายพันธุ์ ได้แก่ Barbari, Jamunapari, Black Bengal, Pashmina, Jakhrana, Marwari และ Sirihi จากการรายงานของ Pramod และคณะ (2008) พบจำนวนอัลลีลเฉลี่ยในแต่ละประชากรดังนี้ 8.1, 9.0, 8.9, 9.7, 8.7, 9.3, และ 7.6 ตามลำดับ ค่าเฮตเทอโรไซโกตซิตี้สังเกต และ ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้คาดหมาย ในแพะทั้ง 7 สายพันธุ์มีค่าใกล้เคียงกัน 0.384 (0.739), 0.381 (0.769), 0.384 (0.776), 0.387 (0.783), 0.426 (0.774), 0.386 (0.781) และ 0.375 (0.760) ตามลำดับ แสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง นอกจากนี้พบค่าระยะทางพันธุกรรมระหว่างคู่พันธุ์พบว่าระยะทางต่ำสุดอยู่ระหว่าง Marwari และ Sirohi (0.135) ระยะห่างสูงสุดระหว่าง Pashmina และ Black Bengal (0.246) และการวิเคราะห์ความแปรปรวนของโมเลกุลพบว่ามีความแปรปรวน 6.59 เปอร์เซ็นต์ ระหว่างสายแพะของอินเดีย จึงสรุปว่าไมโครแซทเทลไลท์ สามารถใช้เพื่อจำแนกประชากรแพะอินเดียเป็นกลุ่มพันธุกรรมหรือสายพันธุ์ที่แตกต่างกันได้

Aljumaah และคณะ (2012) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแพะอาร์ดิ (Ardi goat) ในภาคกลางของประเทศซาอุดีอาระเบีย ด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ 14 โลไซ พบว่าแพะอาร์ดิที่พบมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ เท่ากับ 0.675 นอกจากนี้ประชากรยังมีการเบี่ยงเบนไปจากสมดุลของฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก ใน 7 โลไซ จากการรายงานทั้งหมด 14 โลไซ และค่าสัมประสิทธิ์การสืบพันธุ์เท่ากับ 0.183 แสดงให้เห็นว่าระดับการสืบพันธุ์อยู่ในระดับปานกลาง ซึ่งผลจากการรายงานครั้งนี้แนะนำให้คงความแปรปรวนทางพันธุกรรมของแพะอาร์ดิไว้ สำหรับคงทรัพยากรพันธุกรรมที่มีเอกลักษณ์ และควรมีขอบเขตของการปรับปรุงประสิทธิภาพในการผลิต การจัดการและการผสมพันธุ์ที่เหมาะสม

Al-Atiyat และคณะ (2015) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสายแพะในประเทศจอร์แดน โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 6 คือ MB143, CSRD247, INRA40, OARAE54, ILSTS005 และ MCM527 ในแพะ 4 สายพันธุ์ ดังนี้ Jabali, Dhaiwi, Shami และ Sahrawi พบจำนวนอัลลีล ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้คาดหมาย และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้สังเกต เฉลี่ยทั้ง 4 กลุ่ม เท่ากับ 6.92, 0.703, 0.685 ตามลำดับ ผลจากการรายงานนี้แสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรม ค่าระยะทางพันธุกรรมมีค่ามากที่สุด (0.078) ระหว่าง Shami และ Sahrawi และมีต่ำสุด (0.024) ระหว่าง Jabali และ Dhaiwi รายงานนี้แสดงถึงความหลากหลายทางพันธุกรรม และความแตกต่างของสายพันธุ์แพะที่ศึกษาในทางตรงกันข้าม ระยะทางพันธุกรรมได้ยืนยันความแตกต่างระหว่างพันธุ์แพะ

Wang และคณะ (2017) วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแพะนมในสาธารณรัฐประชาชนจีน ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 15 โลไซ เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรม และความสัมพันธ์ของวิวัฒนาการของแพะ 6 สายพันธุ์ แบ่งเป็น สายพันธุ์ที่พัฒนาแล้ว 4 สายพันธุ์ ได้แก่ Wendeng dairy goat, Laoshan dairy goat, Guanzhong dairy goat และ Xinong Saanen dairy goat สายพันธุ์ที่นำเข้า 2 สายพันธุ์ ได้แก่ Saanen dairy goat และ Nubian dairy goat จากการรายงานครั้งนี้พบว่ามีจำนวนอัลลีลทั้งหมด 172 ในตัวอย่าง 347 ตัว และจำนวนอัลลีลเฉลี่ยในทุกประชากรเท่ากับ 8.067 ตำแหน่ง แสดงถึงไมโครแซทเทลไลท์ที่ศึกษามีความหลากหลาย ค่าเฮตเทอโรไซโกตซิตี้สังเกต และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้คาดหมาย มีค่า 0.701และ 0.754 ตามลำดับ แสดงถึงสายพันธุ์แพะทั้ง 6 สายพันธุ์มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง

จากการรายงานข้างต้นแสดงให้เห็นว่า การใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ สามารถนำมาศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรม ความแปรปรวนทางพันธุกรรม การจำแนกสายพันธุ์ และการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการในแพะได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้ศึกษาในพืชและสัตว์อื่นๆ ได้เช่น Margeta และคณะ (2018) ตรวจสอบพันธุกรรมของประชากรสุกรด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 18 โลไซ Fathi และคณะ (2018) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในไก่พื้นเมือง ด้วยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 20 โลไซ Zhao และคณะ (2017) ใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 16 โลไซ เพื่อการระบุชนิดสัตว์ และตรวจสอบสายพันธุ์โคเนื้อ 6 สายพันธุ์ สาธารณรัฐประชาชนจีน และ จรัสศรี และคณะ (2017) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และคัดเลือกพันธุ์ทุเรียนพื้นบ้านในเขตภาคใต้ของประเทศไทย ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 6 โลไซ เป็นต้น

การประยุกต์ใช้ไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ เพื่อเป็นเครื่องหมายพันธุกรรม

Zhao และคณะ (2011) ศึกษา ความหลากหลายทางพันธุกรรม และต้นกำเนิดของแพะภาคตะวันตกเฉียงใต้ของจีน (ยกเว้นทิเบต) 18 สายพันธุ์ ด้วยไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ จากการรายงานพบแพะทุกสายพันธุ์มีความหลากหลายสูง โดยเฉลี่ยความหลากหลายของ haplotype และความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ เท่ากับ 0.9829±0.0027 และ 0.03615±0.03257 ตามลำดับ

Harlistyo และคณะ (2014) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแพะ Kejobong ด้วย บริเวณ D-loop ในการศึกษาครั้งนี้รายงานว่าใช้ตัวอย่างเลือดแพะ 12 ตัว จาก 4 ตำแหน่ง ในประเทศอินโดนีเซีย ที่แตกต่างกันคือ Kejobong, Pangadegan, Bukateja และ Kaligondang และไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์ ใช้ไพรเมอร์ (5'-tcactatcagcacccaaagc-3') และ (5'-ggcattttcagtgccttgctctg-3') หลังทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ พบลำดับนิวคลีโอไทด์ 548 bp ซึ่งนิวคลีโอไทด์นั้นถูกจัดให้อยู่ในระดับเดียวกันกับ *Capra hircus* (GenBank Access No. KF952601.1) และเห็นได้ชัดว่ามี 11 ลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่แตกต่างกันในส่วนของไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ สามารถใช้เป็นเครื่องหมายเฉพาะเพื่อแยกแยะความแตกต่างระหว่างแพะ Capra hircus และแพะ Kejobong ได้ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ คือที่ 317 (A – G), 403 (T – C), 434 (T – C), 537 (C – T) และ 553 (A – G) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ยังมี 7 haplotypes ที่แตกต่างกัน สรุปได้ว่าการกระจายของพื้นที่ต่าง ๆ มีรูปแบบ haplotype แตกต่างกันในแพะ Kejobong

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ อุปกรณ์

1. ตัวอย่างสัตว์ทดลอง

แพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 จำนวน 48 ตัว จากศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน จำนวนสายพันธุ์ละ 30 ตัว จากศูนย์วิจัยและพัฒนาแพะแกะ อำเภอรามัน จังหวัดยะลา

2. อุปกรณ์เก็บตัวอย่างเลือดแพะ

ได้แก่ เข็มฉีดยา (เบอร์ 18) กระบอกฉีดยา ขนาด 10 มิลลิลิตร สำลี แอลกอฮอล์ และหลอดเซนติฟิวก์ ขนาด 15 มิลลิลิตร ที่บรรจุสาร ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

3. สารเคมีที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ

- sodium dodecyl sulfate (SDS)
- proteinase K
- guanidine hydrochloride (GuHCl)
- isopropanol
- ethanol
- TE buffer
- sodium chloride
- sodium acetate
- tris-base

4. สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยาพีซีอาร์

- dNTP (dATP, dTTP, dCTP และ dGTP),
- 10X buffer
- *Tag* DNA polymerase
- microsatellite primer
- mitochondrial primer

5. สารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR-RFLP

- restriction enzyme *BmrI*
- DNA ligase
- 10X ligase buffer (Promega, USA)

6. สารเคมีสำหรับ electrophoresis

- agarose gel
- 100 bp DNA ladder (operon, USA)
- TAE buffer
- ethidium bromide

7. อุปกรณ์สำหรับการทำวิจัย

- autoclave
- bioDrop DUO UV/VIS Spectrophotometer
- centrifuge
- gel electrophoresis
- gel documentation
- micropipette
- PCR Machine
- pH meter
- vortex mixer
- water bath
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

วิธีการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างเลือดแพะ

เก็บตัวอย่างเลือดแพะโดยใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 18 เจาะเลือดจากบริเวณเส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่หลอดเซนติฟิวก์ (centrifuge tube) ที่บรรจุสาร EDTA

2. การแยกเม็ดเลือดขาว และการล้างเลือด (whole blood)

นำตัวอย่างเลือดแพะมาแยกเม็ดเลือดขาว โดยปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ดูดเก็บ buffy coat ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่หลอดไมโครเซนติฟิวก์ (microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 900 ไมโครลิตร แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำซ้ำอีก 2 ครั้ง เก็บตะกอนเพื่อสกัดดีเอ็นเอ

3. การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอตามวิธีการของ Goodwin และคณะ (2007 อ้างโดย ปรัชญาพร, 2550) โดยนำตะกอนเม็ดเลือดขาวที่ได้ ไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยการเติม 20% SDS ปริมาตร 70 ไมโครลิตร 1% proteinase K ปริมาตร 25 ไมโครลิตร 3.5M Na-acetate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ 5M GuHCl ปริมาตร 625 ไมโครลิตร จากนั้นกลับหลอดไปมาเพื่อผสมสารให้เข้ากัน แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 – 3 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดเก็บส่วนใสใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวก์ใหม่ และตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 75% ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผึ่งตะกอนที่อุณหภูมิห้อง แล้วจึงละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 40 ไมโครลิตร

4. ตรวจสอบปริมาณ และคุณภาพดีเอ็นเอ โดยเครื่อง spectrophotometer

เจือจางดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่น 100 เท่า โดยดูดดีเอ็นเอ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 99 ไมโครลิตร ดูดดีเอ็นเอที่เจือจางลงใน cuvette อ่านค่า optical density (OD) หรือค่า absorbance (A) ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร วัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (DNA concentration) จากความเข้มข้นของดีเอ็นเอ (OD 260 = 50 µg /double strand DNA) วัดความบริสุทธิ์ของดีเอ็นเอ จากค่า OD ratio โดย OD ratio เท่ากับ A260/A280 เมื่อ A260 คือ ค่าดูดกลืนช่วงแสงของดีเอ็นเอ และ A280 คือ ค่าดูดกลืนช่วงแสงของโปรตีน (Ausubel *et al*., 1995)

5. เพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ ด้วยไพรเมอร์จากไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 15 โลไซ และไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ 2 โลคัส ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ไพรเมอร์และลำดับเบสสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแพะ

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส	อ้างอิง		อุณหภูมิ
		ขนาดอัลลีล	จำนวนอัลลีล	
SRCRSP5	F:GGACTCTACCAACTGAGCTACAAG R:TGAAATGAAGCTAAAGCAATGC	158-182[1], 156-178[2]	13[1]	55
MAF70	F:CACGGAGTCACAAAGAGTCAGACC R:GCAGGACTCTACGGGGCCTTTGC	134-168[2], 120-190[3]	8[3]	62
OarFCB48	F:GAGTTAGTACAAGGATGACAAGAGGCAC R:GACTCTAGAGGATCGCAAAGAACCAG	149-173[2], 149-173[3]	8[3]	58
INRA023	F:GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC R:TAACTACAGGGTGTTAGATGAACT	196-215[2], 196-215[3]	8[3]	52
INRA063	F:GACCACAAAGGGATTTGCACAAGC R:AAACCACAGAAATGCTTGGAAG	164-172[1], 164-186[3]	4[1]	56
ILSTS011	F:GCTTGCTACATGGAAAGTGC R:CTAAAATGCAGAGCCCTACC	250-300[2], 250-300[3]	8[3]	54
ILSTS005	F:GGAAGCAATTGAAATCTATAGCC R:TGTTCTGTGAGTTTGTAAGC	172-218[2], 160-230[3]	5[4]	51
TGLA53	F:GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA R:ATCTTCACATGATATTACAGCAGA	126-160[2], 142-166[3]	7[4]	51
ETH10	F:GTTCAGGACTGGCCCTGCTAACA R:CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC	200-210[2], 190-220[3]	7[4]	60
INRABERN185	F:CAATCTTGCTCCCACTATGC R:CTCCTAAAACACTCCCACACTA	266-284[1], 261-289[3]	5[1]	53
ETH225	F:GATCACCTTGCCACTATTTCCT R:ACATGACAGCCAGCTGCTACT	138-160[3]	4[3]	53
SPS113	F:CCTCCACACAGGCTTCTCTGACTT R:CCTAACTTGCTTGAGTTATTGCCC	134-158[1], 134-158[3]	7[1]	58
OarFCB20	F:GGAAAACCCCCATATATACCTATA R:AAATGTGTTTAAGATTCCATACATGTG	93-112[1], 96-108[4]	7[4]	52
ILSTS029	F:TGTTTTGATGGAACACAG R:TTGATTTAGACCAGGGTTGG	148-170[1], 154-186[4]	8[4]	51
BM1818	F:AGCTGGGAATATAACCAAAGG R:AGTGCTTTCAAGGTCCATGC	250-266[4]	8[4]	54
GQ1*	F:TACAATCAATACACTGGTCTT R:ATTACGTTTATGCTGGATT	470[5]		66

[1]Bolormaa และคณะ (2008), [2]ISAG/FAO (2012), [3]Aljumaah และคณะ (2012), [4]Riyadh และคณะ (2012), [5]Liu และคณะ (2007), *ไพรเมอร์จากไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ

ตารางที่ 6 ไพรเมอร์และลำดับเบสสำหรับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแพะ (ต่อ)

ชื่อไพรเมอร์	ลำดับเบส	อ้างอิง		อุณหภูมิ
		ขนาดอัลลีล	จำนวนอัลลีล	
CAP*	F:5CGTGTATGCAAGTACATTAC R:5CTGATTAGTCATTAGTCCATC	550[6]		61

[6]Oka และคณะ (2011), *ไพรเมอร์จากไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดไว้ มาเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์ ซึ่งในแต่ละปฏิกริยา (10 ไมโครลิตร) ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือดของแพะที่มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร 10X PCR-buffer ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตร dNTPs ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร forward และ reverse primer ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร *Taq* DNA polymerase ปริมาตร 0.125 ไมโครลิตร และปรับปริมาตรสุดท้ายด้วย DI water (Deionized water) ปริมาตร 4.875 ไมโครลิตร โดยมีวงรอบการทำปฏิกริยาพีซีอาร์ ดังนี้ เริ่ม initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 35 รอบ มีรายละเอียดดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที primer annealing ที่ระดับอุณหภูมิตามแต่ละไพรเมอร์ (ตารางที่ 6) 45 วินาที primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 45 วินาที และจบปฏิกิริยาด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที

6. ตรวจสอบการปรากฏแถบดีเอ็นเอ

ตรวจสอบขนาดไมโครเซทเทลไลท์ ที่ได้จากปฏิกริยาพีซีอาร์ ด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล โดยทำอิเล็กโตรโฟรีซิส สนามไฟฟ้าโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 50 โวลต์ 120 นาที จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมด้วย ethidium bromide แล้วบันทึกภาพการปรากฏแถบดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง gel documentation system และบันทึกขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ โดยแปลงข้อมูลแถบดีเอ็นเอให้อยู่รูป binary format (0 และ 1) โดย 0 หมายถึง ไม่ปรากฏแถบดีเอ็นเอ และ 1 หมายถึง การปรากฏแถบดีเอ็นเอของอัลลีล ณ ตำแหน่งของแถบดีเอ็นเอเดียวกัน

7. การตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ ด้วย PCR-RFLP

จากการนำข้อมูลไมโทรคอนเดรีย ดีเอ็นเอ (GenBank Accession No. NC005044.2) มาออกแบบเอมไซม์ตัดจำเพาะด้วยโปรแกรม NEB cutter เวอร์ชั่น 2 ซึ่งเลือกใช้เอมไซม์ตัดจำเพาะ *BmrI* ที่สามารถตัดได้ 1 ตำแหน่ง (173/172) ทำให้ได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 173bp และ 277bp โดยมีส่วนผสมในการทำปฏิกริยาดังนี้ DI water ปริมาตร 6.5 ไมโครลิตร 10X buffer ปริมาตร 1

ไมโครลิตร restriction enzyme 0.5 U และ ผลผลิตพีซีอาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 80 นาที จากนั้นวัดการปรากฏของแถบดีเอ็นเอด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล ที่ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่ 50 โวลต์ เป็นเวลา 120 นาที แล้วนำเจลที่ได้ย้อมด้วย ethidium bromide ภายใต้แสงยูวี และบันทึกภาพ

8. การวิเคราะห์ข้อมูลไมโครแซทเทลไลท์

ข้อมูลแถบดีเอ็นเอของเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซลเทลไลท์ นำไปคำนวณหาค่าความถี่อัลลีล (allele frequency), ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ (heterozygosity), ทดสอบสมดุลของฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium: HWE), วิเคราะห์การเกิดประชากรกลุ่มย่อย (sub population), วิเคราะห์ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมรายตัว (genetic similarity) และวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance)

8.1 ค่าความถี่ของอัลลีลต่างๆ ที่พบโดยวิธีของ Nei (1987) ด้วยโปรแกรม Fstst เวอร์ชั่น 2.9.3.2

$$X_{ij} = \frac{2Ho+He}{2N}$$

เมื่อ X_{ij} = ความถี่อัลลีลที่ i ที่โลกัส j

Ho = จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบโฮโมไซโกต

He = จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบเฮตเทอโรไซโกต

N = จำนวนตัวอย่างที่ให้ข้อมูล

8.2 คำนวณค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ โดยวิธีของ Nei (1987) ด้วยโปรแกรม Fstst เวอร์ชั่น. 2.9.3.2

8.2.1 คำนวณค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้สังเกต (observed heterozygosity: *Ho*)

$$Ho = \frac{1-\sum k \sum i P_{ki}}{np}$$

เมื่อ Ho = ค่าเฮตเทอโรไซโกตซิตี้ที่ได้จากการสังเกต

P_{ki} = ความถี่จีโนไทป์แบบโฮโมไซกัสที่โลกัส i ในประชากร k

np = จำนวนตัวอย่างที่ให้ข้อมูล

8.2.2 คำนวณค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้คาดหมาย (expected Heterozygosity: *He*)

$$He = \frac{\tilde{n}}{\tilde{n}-1}\left[1 - \Sigma_i \overline{P_i^2} - \frac{H_o}{2\tilde{n}}\right]$$

$$\overline{P_i^2} = \frac{\Sigma_k P_{ki}^2}{np}$$

$$\tilde{n} = \frac{np}{\Sigma_k \frac{1}{nk}}$$

เมื่อ He = ค่าเฮตเทอโรไซโกตซิตี้คาดหมาย

np = จำนวนตัวอย่างที่ให้ข้อมูล

$\tilde{n}$ = ค่าเฉลี่ยจำนวนตัวอย่างในประชากร k

8.3 ทดสอบสมดุลของฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก

เป็นการทดสอบสมดุลของยีนในประชากรที่มีความสัมพันธ์แบบสุ่ม ไม่มีการคัดเลือก ไม่มีการกลายยีน และไม่มีการอพยพของประชากร ภายใต้เงื่อนไขดังกล่าวจะส่งผลให้ประชากรมีความถี่ยีนและความถี่จีโนไทป์คงที่ในประชากรรุ่นถัดไป และเมื่อพิจารณายีน 1 คู่ ที่มี 2 อัลลีล (di-allele; p, q) พบว่าประชากรจะมีความถี่อัลลีลแบบ heterozygous (2pq) สูงสุดได้ไม่เกิน 0.5 ซึ่งจะส่งผลให้ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ที่ได้จากการสังเกต มีค่าได้ไม่เกิน 0.5 ด้วยเช่นกัน โดยทั่วไปนิยมใช้การทดสอบด้วย Chi-square (χ^2) (Falconer and Mackay,1996)

$$\chi 2 = \sum_{i=1}^{n} \frac{\left(O_j - E_j\right)^2}{E_j}$$

เมื่อ O = จำนวนตัวอย่างสังเกตที่ให้ข้อมูล heterozygous ที่โลกัส j

E = จำนวนตัวอย่างคาดหวังที่ให้ข้อมูล heterozygous ที่โลกัส j

n = จำนวนโลไซที่ศึกษา

8.4 วิเคราะห์การเกิดประชากรกลุ่มย่อย (sub population)

F coefficients เป็นค่าที่ใช้ตรวจสอบความแปรปรวนทางพันธุกรรม โดยทั่วไปมีการพิจารณา 3 ค่า ได้แก่ ค่าที่บ่งบอกความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรทั้งหมดที่ศึกษา (F_{ST}) ความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในกลุ่ม (F_{IS}) และความแปรปรวนทางพันธุกรรมรายตัว (F_{IT}) ตามลำดับ โดย F_{ST} เป็นค่าที่ใช้ตรวจสอบอิทธิพลทางพันธุกรรมของการเกิดประชากรกลุ่มย่อย และมักมีค่าเป็นบวกเสมอ หากมีค่า 0 ถึง 0.1 แสดงว่าเกิดอิทธิพลจากประชากรกลุ่มย่อยเล็กน้อย หากมีค่าอยู่ในช่วง 0.1 ถึง 0.3 แสดงว่าเกิดอิทธิพลจากประชากรกลุ่มย่อยปานกลาง และหากมากกว่า 0.3 แสดงว่าเกิดอิทธิพลจากประชากรกลุ่มย่อยสูง โดยทั่วไปการวิเคราะห์ค่า F_{ST} จากข้อมูลที่เป็น multiple allele ใช้วิธีการของ Wright (1939 อ้างโดย ปรัชญาพร, 2550) ส่วนค่า F_{IS} เป็นค่าที่ใช้ตรวจสอบค่าความเบี่ยงเบนทางพันธุกรรมระหว่างสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวภายในประชากรกลุ่มย่อย โดยทั่วไปมีค่า -1 ถึง +1 และค่า F_{IT} ใช้ตรวจสอบค่าความเบี่ยงเบนทางพันธุกรรมระหว่างสิ่งมีชีวิตแต่ละตัวภายในประชากรทั้งหมด มีค่าตั้งแต่ -1 ถึง + 1 (Halliburton, 2004)

8.4.1 F_{IS} ค่าที่บ่งบอกความแปรปรวนทางพันธุกรรมภายในกลุ่ม วัดอัตราการผสมเลือดชิด หรือความเบี่ยงเบนของแต่ละตัวอย่างเปรียบเทียบกับตัวอย่างอื่นๆ ในประชากรย่อย

$$F_{IS} = \frac{H_S - H_I}{H_S}$$

เมื่อ H_I = ค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตี้สังเกต ของทุกประชากรย่อย

H_S = ค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตี้คาดหมาย ของทุกประชากรย่อย

8.4.2 F_{ST} ค่าที่บ่งบอกความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรทั้งหมดที่ศึกษา ใช้ประมาณค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรย่อย เปรียบเทียบกับประชากรทั้งหมด

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

เมื่อ H_S = ค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตี้คาดหมาย ของทุกประชากรย่อย

H_T = ค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตี้คาดหมาย ของประชากรทั้งหมด

8.4.3 F_{IT} ค่าบ่งบอกความแปรปรวนทางพันธุกรรมรายตัว วัดอัตราการผสมเลือดชิด หรือความเบี่ยงเบนของแต่ละตัวอย่าง เปรียบเทียบกับประชากรทั้งหมด

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_I}{H_T}$$

เมื่อ H_I = ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้สังเกตของประชากรทั้งหมด ซึ่งก็คือค่าเฉลี่ยของเฮตเทอโรไซโกซิตี้สังเกต ของทุกประชากรย่อยนั่นเอง F_{IT} เป็นค่าเปรียบเทียบระหว่างแต่ละตัวอย่างเมื่อเทียบกับประชากรรวมทั้งหมด จึงมีค่าได้ตั้งแต่ -1 ถึง +1

8.5 วิเคราะห์ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมรายตัว

โดยวิธี UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) และแสดงความสัมพันธ์ระหว่างแพะแต่ละตัวเป็น phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม NTSYS เวอร์ชั่น 2.1 สูตรคำนวณค่า Dice similarity (มนต์ชัย, 2545)

$$S_{xy} = \frac{2a}{2a+b+c}$$

เมื่อ a = จำนวนสัตว์ที่พบอัลลีลปรากฏตรงกันในกลุ่มสายพันธุ์ X และ Y

b, c = จำนวนสัตว์ที่พบลักษณะปรากฏในกลุ่มสายพันธุ์ X แต่ไม่พบในสายพันธุ์ Y หรือพบในสายพันธุ์ Y แต่ไม่พบในสายพันธุ์ X

8.6 วิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรม

คำนวณค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์ โดยใช้วิธีการของ Lynch (1990 อ้างโดย ปรัชญาพร, 2550) จากนั้นนำค่าระยะห่างทางพันธุกรรมที่ได้มาสร้างแผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

$$D_{ij} = 1 - S_{ij}$$

เมื่อ Dij = ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์

Sij = ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลที่พบในแต่ละสายพันธุ์

9. การวิเคราะห์ข้อมูลไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ

9.1 วิเคราะห์ค่าความถี่จีโนไทป์

$$\text{ค่าความถี่จีโนไทป์} = \frac{\text{จำนวนสัตว์ที่มีจีโนไทป์ที่กำหนด}}{\text{จำนวนสัตว์ทั้งหมด}}$$

9.2 วิเคราะห์ค่าความถี่อัลลีล

$$f(Allele) = D + \frac{1}{2}\,H$$

เมื่อ D = ความถี่ homozygous genotype

H = ความถี่ heterozygous genotype

9.3 ทดสอบสมดุลของฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg equilibrium: HWE) โดยการทดสอบความสมดุลของยีนในประชากรของแพะแต่ละพันธุ์ด้วย ค่า Chi-square test (χ^2)

9.4 วิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distances) ด้วยวิธีของ NEI-UB แล้วสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยวิธี Neighbor joining

บทที่ 4

ผล และวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลท์

จากการสุ่มเลือกไมโครแซทเทลไลท์ 15 โลไซ ที่ ISAG/FAO (2012) เสนอแนะเพื่อใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของแพะ ผลการศึกษาพบสามารถนำมาวิเคราะห์ได้ 11 โลไซ (SRCRSP5, MAF70, OarFCB48, INRA023, INRA063, ILSTS011, ILSTS005, TGLA53, ETH10, INRABERN185 และ ETH225) ส่วนไมโครแซทเทลไลท์ 4 โลไซ พบเป็น monomorphic alleles จำนวน 3 โลไซ (SPS113, OarFCB20, และ ILSTS029) และไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ จำนวน 1 โลไซ (BM1818) สำหรับผลการศึกษาในครั้งนี้จากไมโครแซทเทลไลท์ 11 โลไซ พบมีจำนวนของอัลลีลอยู่ระหว่าง 4 – 8 อัลลีล และขนาดของอัลลีลที่พบมีขนาดอยู่ระหว่าง 129 – 340 คู่เบส (base pair) ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ไพรเมอร์ จำนวนและขนาดอัลลีลที่พบจากการศึกษาในครั้งนี้

ชื่อไพรเมอร์	จำนวนอัลลีลที่พบ	ขนาดอัลลีลที่พบ (คู่เบส)
SRCRSP5	4	153 – 228
MAF70	7	129 – 199
OarFCB48	6	138 – 200
INRA023	6	179 – 263
INRA063	5	171 – 218
ILSTS011	8	260 – 340
ILSTS005	7	151 – 222
TGLA53	4	132 – 175
ETH10	6	202 – 253
INRABERN185	4	176 – 267
ETH225	5	146 – 216

จากตารางที่ 7 แสดงให้เห็นว่าจำนวนอัลลีลที่พบในแต่ละตำแหน่งส่วนใหญ่ (SRCRSP5, MAF70, OarFCB48, INRA023, ILSTS011, TGLA53, ETH10 และ INRABERN185) มีจำนวนอัลลีลต่ำกว่าจำนวนอัลลีลที่มีการอ้างอิง (ตารางที่ 6) และมีบางตำแหน่ง (INRA063, ILSTS005 และ ETH225) มีจำนวนอัลลีลมากกว่าจำนวนอัลลีลที่มีการอ้างอิงไว้ในตารางที่ 6 นอกจากนี้ขนาดอัลลีลที่พบในแพะที่ศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับขนาดอัลลีลอ้างอิง (ตารางที่ 6) จะเห็นได้ว่าอัลลีลที่พบในแพะที่ศึกษามีขนาดเริ่มต้นเล็กกว่าและขนาดสุดท้ายที่ใหญ่กว่าอัลลีลอ้างอิงในทุกไพรเมอร์ของ ISAG/FAO (2012) อย่างไรก็ตาม แสดงให้เห็นว่ามีการพบอัลลีลใหม่ๆ ที่ยังไม่มีการรายงาน อีกทั้งแสดงให้เห็นว่าแพะที่ศึกษามีความหลากหลายในด้านของขนาดอัลลีลสูง รวมทั้งด้านจำนวนอัลลีล

ผลการวิเคราะห์ค่าความถี่อัลลีล

จากการศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 11 โลไซ โดยการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ และตรวจสอบหาแถบดีเอ็นเอด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ อะกาโรสเจล ในแพะทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่ามีค่าความถี่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ค่าความถี่อัลลีลในแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน

ไพรเมอร์	อัลลีล	ค่าความถี่อัลลีลในแต่ละสายพันธุ์		
		SUP	TN	AG
SRCRSP5	1	0.114	0.144	0.625
	2	0.421	0.524	0.083
	3	0.352	0.024	0.167
	4	0.113	0.310	0.125
MAF70	1	0.104	0.033	0.000
	2	0.302	0.083	0.183
	3	0.135	0.217	0.250
	4	0.135	0.150	0.067
	5	0.095	0.067	0.133
	6	0.177	0.167	0.350
	7	0.052	0.283	0.017

SUP = แพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1, TN = แพะพื้นเมืองภาคใต้ และ AG = แพะพันธุ์แองโกลนูเบียน

ตารางที่ 8 ค่าความถี่อัลลีลในแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน (ต่อ)

ไพรเมอร์	อัลลีล	ค่าความถี่อัลลีลในแต่ละสายพันธุ์		
		SUP	TN	AG
OarFCB48	1	0.160	0.087	0.000
	2	0.276	0.478	0.000
	3	0.255	0.152	0.354
	4	0.266	0.153	0.208
	5	0.032	0.130	0.250
	6	0.011	0.000	0.188
INRA023	1	0.178	0.000	0.367
	2	0.322	0.448	0.200
	3	0.244	0.276	0.283
	4	0.144	0.172	0.100
	5	0.056	0.069	0.050
	6	0.056	0.035	0.000
INRA063	1	0.321	0.227	0.042
	2	0.385	0.636	0.583
	3	0.191	0.046	0.229
	4	0.077	0.091	0.083
	5	0.026	0.000	0.063
ILSTS011	1	0.106	0.111	0.000
	2	0.288	0.111	0.300
	3	0.349	0.204	0.433
	4	0.105	0.296	0.100
	5	0.106	0.092	0.100
	6	0.046	0.000	0.067
	7	0.000	0.130	0.000
	8	0.000	0.056	0.000
ILSTS005	1	0.000	0.000	0.250
	2	0.000	0.000	0.117
	3	0.053	0.333	0.067
	4	0.319	0.500	0.367
	5	0.223	0.133	0.183
	6	0.405	0.034	0.016

ตารางที่ 8 ค่าความถี่อัลลีลในแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน (ต่อ)

ไพรเมอร์	อัลลีล	ค่าความถี่อัลลีลในแต่ละสายพันธุ์		
		SUP	TN	AG
TGLA53	1	0.174	0.462	0.269
	2	0.609	0.231	0.692
	3	0.087	0.269	0.039
	4	0.130	0.038	0.000
ETH10	1	0.583	0.217	0.000
	2	0.417	0.567	0.546
	3	0.000	0.083	0.182
	4	0.000	0.133	0.000
	5	0.000	0.000	0.182
	6	0.000	0.000	0.091
INRABERN185	1	0.000	0.474	0.000
	2	0.662	0.000	0.000
	3	0.220	0.000	0.896
	4	0.118	0.526	0.103
ETH225	1	0.538	0.083	0.483
	2	0.462	0.333	0.448
	3	0.000	0.083	0.069
	4	0.000	0.125	0.000
	5	0.000	0.376	0.000

SUP = แพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1, TN = แพะพื้นเมืองภาคใต้ และ AG = แพะพันธุ์แองโกลนูเบียน

ตารางที่ 8 เมื่อพิจารณาจำนวนอัลลีลที่ได้จากไมโครแซทเทลไลท์ 11 โลไซ ในแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน พบมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.275, 4.636 และ 4.545 ตามลำดับ ซึ่งจำนวนอัลลีลเฉลี่ยของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 มีค่าต่ำกว่าแพะทั้งสองสายพันธุ์ แสดงได้ให้เห็นว่าการคัดเลือกมีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม โดยส่งผลให้บางความถี่จีโนไทป์มีความถี่สูง และทำให้บางจีโนไทป์ลดลงด้วยในขณะเดียวกัน จึงทำให้เห็นการเปลี่ยนแปลงความถี่ของบางอัลลีลในทางเพิ่มขึ้น และบางอัลลีลลดลง อย่างไรก็ตามจากความถี่อัลลีลแสดงให้เห็นว่าไพรเมอร์ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้มีความหลากหลายสูง สามารถนำมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในแพะทั้ง 3 กลุ่มได้

นอกจากนี้พบไพรเมอร์ ILSTS005, TGLA53, ETH10, INRABERN185 และ ETH225 ให้ค่าความถี่ต่ำในประชากรแพะทั้ง 3 กลุ่ม โดยชี้ให้เห็นถึงสภาพความหลากหลายที่ไม่เพียงพอสำหรับการวิเคราะห์ และบ่งบอกถึงความไม่เหมาะสมของตำแหน่งที่เลือกสำหรับการประเมินความแปรปรวนทางพันธุกรรม (FAO, 2004; Seo *et al*., 2013)

ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร

ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้สังเกต และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้คาดหมาย เป็นค่าทางสถิติที่ช่วยบ่งบอกถึงค่าความหลากหลายทางพันธุกรรม ผลจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าค่าเฉลี่ยของเฮตเทอโรไซโกซิตี้สังเกต และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้คาดหมาย ในแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน มีค่าเท่ากับ 0.296 (0.679), 0.338 (0.682) และ 0.329 (0.621) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้สังเกต (H_O) ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้คาดหมาย (H_E) และค่าทดสอบสมดุลของฮาร์ดี และไวน์เบิร์ก (HWE) แยกตามไพรเมอร์

ไพรเมอร์	SUP		TN		AG		เฉลี่ย		HWE
	(H_O)	(H_E)	(H_O)	(H_E)	(H_O)	(H_E)	(H_O)	(H_E)	
SRCRSP5	0.364	0.685	0.667	0.623	0.667	0.569	0.566	0.627	0.4877
MAF70	0.917	0.826	0.900	0.822	0.967	0.768	0.928	0.806	0.0010*
OarFCB48	0.277	0.775	0.696	0.716	0.500	0.755	0.491	0.750	0.0463*
INRA023	0.511	0.790	0.517	0.703	0.200	0.755	0.409	0.749	1.0000
INRA063	0.385	0.720	0.250	0.573	0.292	0.614	0.308	0.637	0.0076*
ILSTS011	0.273	0.788	0.407	0.841	0.167	0.720	0.281	0.783	0.0000*
ILSTS005	0.191	0.776	0.000	0.641	0.067	0.776	0.086	0.731	0.0000*
TGLA53	0.304	0.584	0.077	0.685	0.077	0.463	0.153	0.577	0.0000*
ETH10	0.000	0.496	0.033	0.628	0.545	0.645	0.193	0.590	0.0000*
INRABERN185	0.029	0.514	0.000	0.526	0.000	0.192	0.010	0.410	0.0000*
ETH225	0.000	0.510	0.167	0.746	0.138	0.579	0.102	0.611	0.0000*
เฉลี่ย	0.296	0.679	0.338	0.682	0.329	0.621	0.321	0.661	

* = ประชากรมีการเบี่ยงเบนจากสมดุลของฮาร์ดี แลไวน์เบิร์ก ที่ระดับนัยสำคัญ $P<0.05$, SUP = แพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1, TN = แพะพื้นเมืองภาคใต้ และ AG = แพะพันธุ์แองโกลนูเบียน

ตารางที่ 9 ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้สังเกต และคาดหมาย แสดงให้เห็นว่าประชากรแพะทั้ง 3 กลุ่ม มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และใกล้เคียงกัน หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือ ปริมาณความแปรปรวนทางพันธุกรรมในประชากรแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน อยู่ในระดับเดียวกัน สะท้อนให้เห็นถึงคุณภาพทางพันธุกรรมในเชิงบวกของประชากรแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 สื่อถึงศักยภาพในการวิวัฒนาการของประชากรในการอยู่รอดในระยะยาวหากมีการคัดเลือกทั้งโดยมนุษย์และการคัดเลือกโดยธรรมชาติ (Allendorf, 1986) และในด้านการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์สามารถระบุได้ว่าประชากรแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1 มีสภาพความหลากหลายทางพันธุกรรมเพียงพอ สำหรับการเป็นประชากรพ่อแม่พันธุ์เริ่มต้นที่ดี โดยดูได้จากค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมที่พบมีค่าสูงพอสมควรอย่างน้อยที่สุดก็ไม่ต่ำกว่า และอยู่ในระดับเดียวกับค่าที่ปรากฏในแพะที่มีพันธุกรรมเป็นพันธุ์แท้ (พนม และคณะ, 2548) เมื่อพิจารณาค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้สังเกตในแพะแต่ละกลุ่ม พบว่าแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้สังเกตเฉลี่ยต่ำสุด (0.296) ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากการคัดเลือกภายในสายพันธุ์ ทำให้สัตว์มีความหลากหลายภายในสายพันธุ์ค่อนข้างแตกต่างจากสายพันธุ์อื่น

ทั้งนี้เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกซิตี้สังเกต และคาดหมาย แยกตามไพรเมอร์ พบในแต่ละไพรเมอร์ให้ค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกตซิตี้สังเกต และคาดหมายแตกต่างกัน โดยไพรเมอร์ MAF70 มีค่าสูงสุด คือ 0.928 และ 0.806 ตามลำดับ และไม่อยู่ในสมดุลของฮาร์ดี และไวน์เบิร์ก ($p<0.05$) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Aljumaah และคณะ (2012) โดยมีค่าเท่ากับ 0.867 และ 0.831 ตามลำดับ ที่ทำการศึกษาในแพะอาร์ดิ ของประเทศซาอุดีอาระเบีย ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ทั้งหมด 14 โลไซ พบมีค่าเฉลี่ยสูงสุดเช่นเดียวกัน ชี้ให้เห็นว่าการคัดเลือกมีผลทำให้ประชากรเบี่ยงเบนไปจากสมดุลของฮาร์ดี และไวน์เบิร์ก ทั้งนี้พบไพรเมอร์ INRABERN185 ให้ค่าเฉลี่ยเฮตเทอโรไซโกตซิตี้สังเกต และคาดหมายต่ำสุด มีค่าเท่ากับ 0.010 และ 0.410 ตามลำดับ

นอกจากนี้ Botstein และคณะ (1980) กล่าวว่าตำแหน่งข้อมูลที่เหมาะสมสำหรับการประยุกต์ใช้พันธุศาสตร์ ในการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม รวมทั้งการตรวจสอบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ควรมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้คาดหมายมากกว่า 0.6 ($H_E > 0.6$) สำหรับการศึกษาในครั้งนี้พบไพรเมอร์ ILSTS005, TGLA53, ETH10, INRABERN185 และ ETH225 มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้คาดหมายอยู่ระหว่าง 0.410 – 0.611 แต่ที่มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้สังเกตอยู่ระหว่าง 0 – 0.1 ชี้ให้เห็นว่าทั้ง 5 ไพรเมอร์ดังกล่าว มีสภาวะเฮตเทอโรไซกัสต่ำกว่าที่ควรจะเป็น กล่าวคือ พบรูปแบบจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัสมากกว่าแบบเฮตเทอโรไซกัส ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม ในสายพันธุ์แพะเนื้อลูกผสมทรัพย-ม.อ. 1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน สอดคล้องกับการรายงานของ Seilsuth และคณะ

(2016) ที่ศึกษาความหลากหลายในแพะนม 5 สายพันธุ์ ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 5 โลไซ พบไพรเมอร์ ETH255 มีค่าเฮตเทอโรไซโกตซิตี้ต่ำ ในแพะนมทั้ง 5 สายพันธุ์ (แพะพันธุ์แองโกลนูเบียน แพะพันธุ์อัลไพน์ แพะพันธุ์จามนาปารีแพะพันธุ์ซาแนน และแพะพันธุ์ทอกเก็นเบิร์ก) เช่นเดียวกัน

ทดสอบสมดุลของฮาร์ดี และไวน์เบิร์ก

ภายใต้สมดุลของยีนตามกฎฮาร์ดี และไวน์เบิร์ก ซึ่งกำหนดว่าค่าเฮตเทอโรซิตี้สังเกต (2pq) ในประชากรจะมีค่าสูงสุดไม่เกิน 0.5 แต่จากการรายงานของบางการศึกษา พบว่าค่าเฮตเทอโรซิตี้สังเกตมีค่าสูงกว่า 0.5 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก กฎของฮาร์ดี และไวน์เบิร์ก สนใจยีน 1 คู่ที่มี 2 อัลลีล (ปรัชญาพร, 2550) แต่ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลท์ พบอัลลีลที่ได้จาก 1 ไพรเมอร์ มีมากกว่า 2 อัลลีล จึงทำให้ค่าเฮตเทอโรไซโกตซิตี้สังเกตมีค่าสูงกว่า 0.5 และเมื่อพิจารณาสภาวะสมดุลภายใต้กฎของฮาร์ดี และไวน์เบิร์ก ด้วยค่าไคสแควร์ (chi-square) พบว่าการกระจายตัวของจีโนไทป์ ของไมโครแซทเทลไลท์ ในแต่ละตำแหน่งที่ทำการศึกษาในประชากรแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน จำนวน 9 โลไซ (MAF70, OarFCB48, INRA063, ILSTS011, ILSTS005, TGLA53, ETH10, INRABERN185 และETH225) ไม่เป็นไปตามกฎของฮาร์ดี และไวน์เบิร์ก ($p<0.05$) เนื่องมาจากประชากรแพะทั้ง 3 กลุ่ม มีการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ เพื่อนำมาใช้ในการทดแทนฝูงในรุ่นถัดไป จึงส่งผลให้การกระจายตัวของจีโนไทป์ ไม่เป็นไปตามกฎของฮาร์ดี และไวน์เบิร์ก

วิเคราะห์การเกิดประชากรกลุ่มย่อย

เมื่อพิจารณาถึงค่า F coefficients ซึ่งโดยทั่วไปมี 3 ค่า ได้แก่ F_{IS}, F_{ST} และ F_{IT} โดยพบค่า F_{ST} ที่บ่งบอกความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรทั้งหมดที่ศึกษา หรือค่าที่พิจารณาความแตกต่างระหว่างแพะทั้ง 3 สายพันธุ์ ในการศึกษาครั้งนี้มีค่า เท่ากับ 0.138 (ตารางที่ 10) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีค่าอยู่ในระดับต่ำกว่า <0.15 (Frankham *et al*., 2002) แสดงถึงความแปรปรวนทางพันธุกรรมในแพะที่เกิดขึ้น เป็นผลเนื่องมาจากความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์เพียง 13.8 % และอีก 86.2 % เป็นความผันแปรทางพันธุกรรมที่เกิดเนื่องมาจากความแตกต่างภายในสายพันธุ์ ทั้งนี้ยังชี้ให้เห็นว่าแพะทั้งสามสายพันธุ์ยังมีความคล้ายคลึงกันทางพันธุกรรมสูง โดยระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมที่เกิดขึ้นไม่เพียงพอที่จะแยกเป็นประชากรกลุ่มย่อยได้

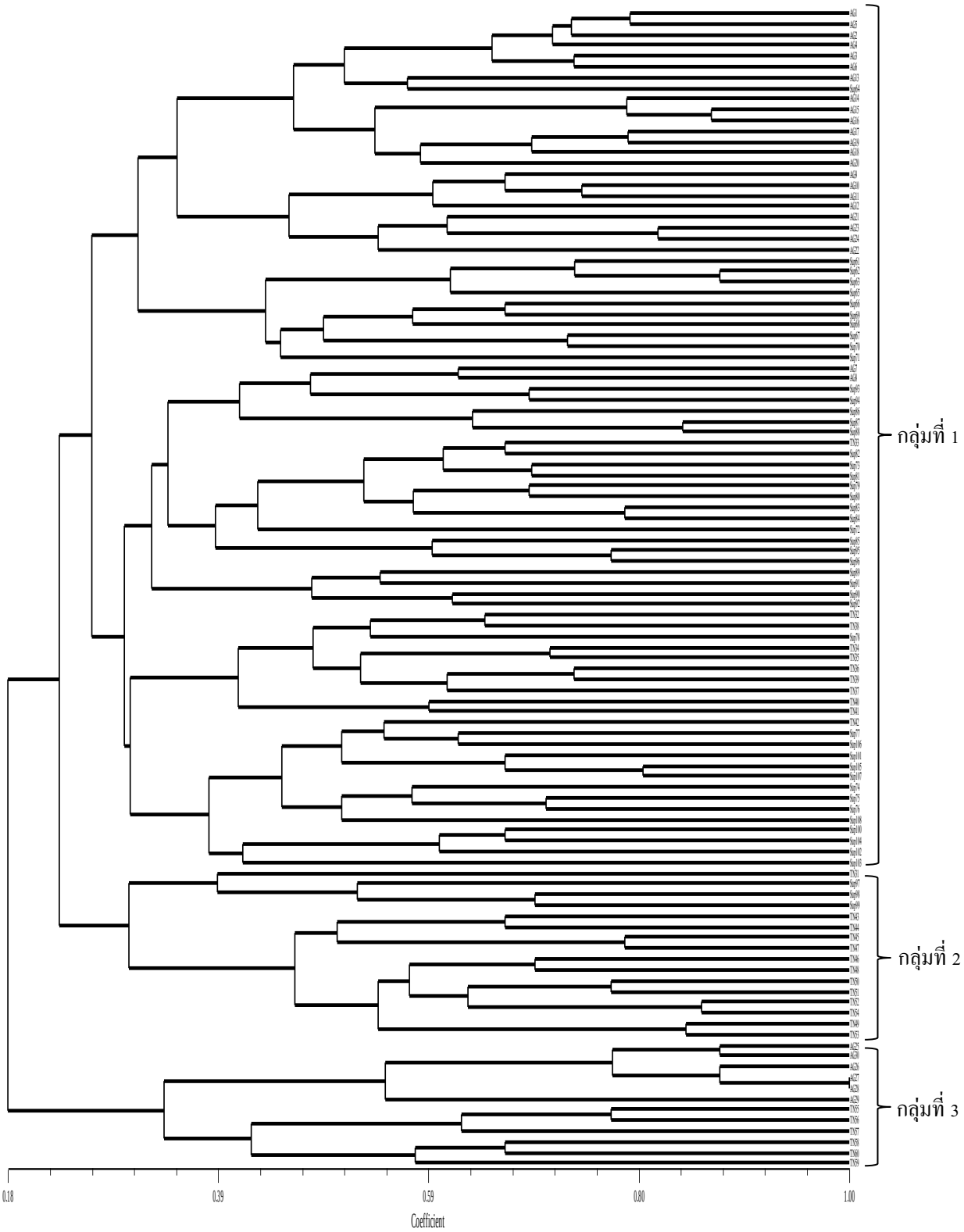
ตารางที่ 10 ค่า Capf (F_{IT}), Theta (F_{ST}), Smallf (F_{IS}) โดยวิธี Weir และ Cockerham, Bootstrapping และ Jackknifing

parameter	Weir and Cockerham	Bootstrapping				Jackknifing	
		95% confidence Interval		99% confidence Interval			
	mean	lower	upper	lower	upper	mean	S.E.
Theta (F_{ST})	0.138	0.068	0.239	0.059	0.276	0.138	0.049
Smallf (F_{IS})	0.531	0.329	0.714	0.263	0.759	0.528	0.105
Capf (F_{IT})	0.595	0.401	0.766	0.335	0.811	0.594	0.099

ตารางที่ 10 แสดงค่า F_{IS} ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่ามีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.531 มีค่าเป็นบวกอยู่ในระดับสูง แสดงให้เห็นว่าจีโนไทป์ ของไมโครแซทเทลไลท์ ในแต่ละตำแหน่งโดยเฉลี่ยหรือสภาพทางพันธุกรรมเริ่มอยู่ในสภาพโฮโมไซกัส ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากเริ่มมีการคัดเลือกคู่ผสมเพื่อให้ได้แพะที่มีลักษณะตรงตามสายพันธุ์ที่กำหนด อย่างไรก็ตามค่า F_{IT} ที่บ่งบอกความแปรปรวนทางพันธุกรรมรายตัวหรือค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในสายพันธุ์ ที่พบมีค่าเท่ากับ 0.595 ชี้ให้เห็นว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมภายในประชากรหรือสายพันธุ์ในระดับสูง

ผลการวิเคราะห์ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมรายตัว

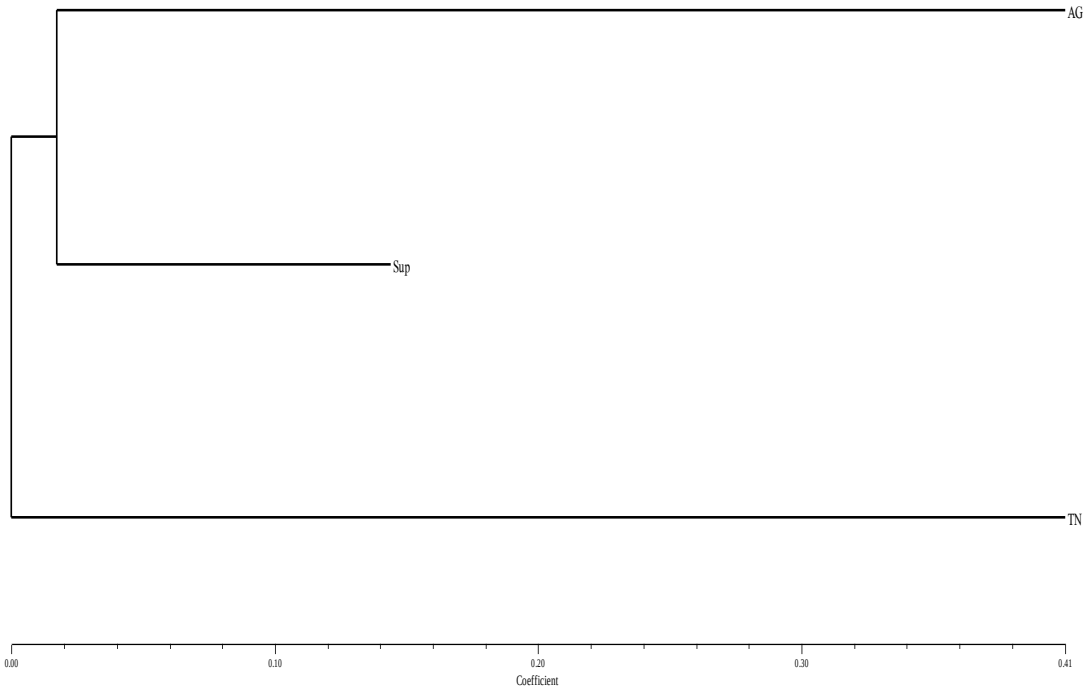
หาค่าความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างแพะทั้งหมดที่ศึกษา โดยใช้ข้อมูลรายตัวด้วยวิธี UPGMA และแสดงการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างแพะแต่ละตัวเป็น phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม NTYSY เวอร์ชั่น 2.1 (ภาพที่ 5) จากการจัดกลุ่มแพะจากข้อมูลพันธุกรรมรายตัว พบสามารถจัดกลุ่มแพะออกได้เป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 พบมีประชากรแพะมากที่สุด ซึ่งประกอบด้วยแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 จำนวน 45 ตัว แพะพันธุ์แองโกลนูเบียนจำนวน 24 ตัว และแพะพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 11 ตัว ส่วนกลุ่มที่ 2 พบแพะพื้นเมืองภาคใต้ จำนวน 13 ตัว และแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 จำนวน 3 ตัว ทั้งนี้ในกลุ่มที่ 3 พบแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน และแพะ พื้นเมืองภาคใต้ จำนวนสายพันธุ์ละ 6 ตัว แต่ไม่พบแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1



ภาพที่ 5 จัดกลุ่มแพะจากข้อมูลพันธุกรรมรายตัว โดยวิธี UPGMA ด้วยโปรแกรม NTYSY เวอร์ชั่น 2.1

แผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

เมื่อนำค่าระยะห่างทางพันธุกรรมมาวิเคราะห์แผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธีของ Nei-UB โดยวิธี Neighbor joining ด้วยโปรแกรม NTSYS เวอร์ชั่น 2.1 พบสามารถแบ่งประชากรแพะทั้งหมดที่ศึกษาออกได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 กับแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน และกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยแพะพื้นเมืองภาคใต้ (ภาพที่ 6) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับแผนผังการจัดกลุ่มแพะจากข้อมูลพันธุกรรมรายตัว (ภาพที่ 5) ที่ชี้ให้เห็นว่าแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับแพะแองโกลนูเบียนมากกว่าแพะพื้นเมืองภาคใต้ อย่างไรก็ตาม จากค่า coefficient มีค่าต่ำ (0.41) แสดงถึงพันธุกรรมของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ไม่แตกต่างกัน

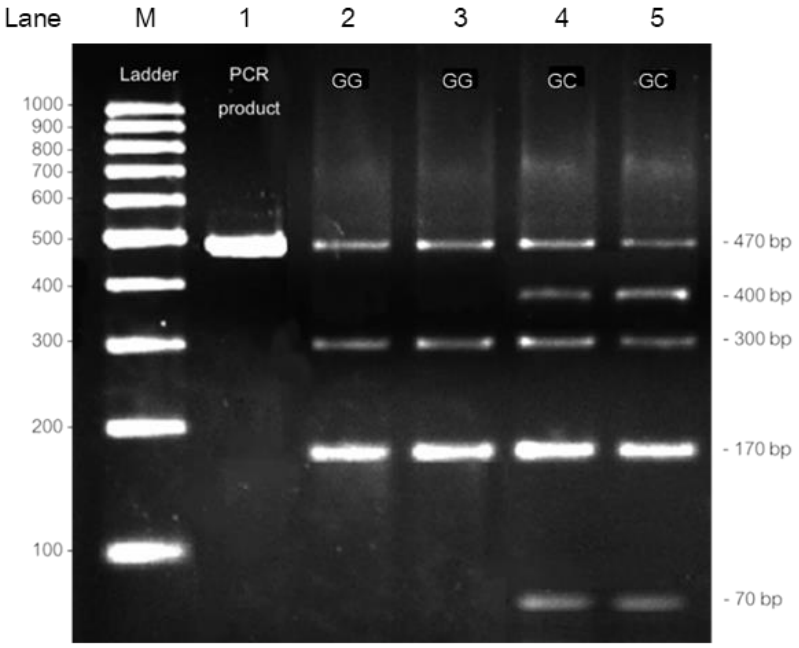


ภาพที่ 6 ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน

ภาพที่ 6 ชี้ให้เห็นว่าแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-มอ 1 มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแพะพันธุ์แองโกลนูเบียนมากกว่าแพะพื้นเมืองภาคใต้ อาจเนื่องจากมีการคัดเลือกเพื่อให้ได้แพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-มอ 1 ที่มีลักษณะตรงตามลักษณะประจำพันธุ์ที่กำหนดไว้ จึงมีการคัดทิ้งในลักษณะบางลักษณะที่ไม่ต้องการ ทำให้ยีนสูญหายไป และไม่ถูกถ่ายทอดมาในรุ่นต่อไป สอดคล้องกับการรายงานของ ศิริรัตน์ (2561) ที่พบว่ามีการถ่ายทอดลักษณะใบหน้าแบบโค้งงุ้มซึ่งเป็นลักษณะประจำพันธุ์ของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียนไปสู่รุ่นลูกมากกว่าการถ่ายทอดลักษณะใบหน้าแบบลาดตรง โดยพบในรุ่นพ่อแม่มีลักษณะใบหน้าแบบโค้งงุ้ม ร้อยละ 70 เปอร์เซ็นต์ รุ่น F1 พบ 82 เปอร์เซ็นต์ และ รุ่น F2 พบ 90 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าการถ่ายทอดลักษณะใบหน้าโค้งงุ้มเพิ่มขึ้นในรุ่นถัดไปอย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้อาจเป็นเหตุผลที่ทำให้แพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-มอ 1 มีพันธุกรรมเบี่ยงเบนไปในทิศทางของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน

ผลการวิเคราะห์ไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ

การศึกษารูปแบบจีโนไทป์ในไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ บริเวณ D-loop พบ PCR product มีขนาด 470 bp และหลังจากตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *BmrI* สามารถตรวจพบจีโนไทป์ 2 รูปแบบ คือ GG (470 bp, 300 bp และ 170 bp) และ GC (470 bp, 400 bp, 300 bp 170 bp และ 70 bp) ซึ่งจากการออกแบบตัดด้วยโปรแกรม NEBcutter จะมีขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้เท่ากับ 173bp และ 277bp แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบขนาด 400bp และ 70bp (ภาพที่ 7) ซึ่งอาจเป็น SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) ตำแหน่งใหม่ อย่างไรก็ตามเพื่อยืนยันผลจึงอาจต้องส่งวิเคราะห์ในลำดับต่อไป



ภาพที่ 7 รูปแบบจีโนไทป์ในไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ หลังตัดด้วยเอมไซม์ตัดจำเพาะ *BmrI* ด้วยปฏิกิริยา PCR-RFLP, Lane M: 100 bp DNA Ladder, Lane 1: ผลผลิตพีซีอาร์, Lane 2 and 3: แพะพื้นเมืองภาคใต้, Lane 4: แพะพันธุ์แองโกลนูเบียน และ Lane 5: แพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1

โดยพบว่าจีโนไทป์ CC ไม่สามารถตรวจพบในแพะทั้ง 3 กลุ่ม อาจเนื่องจากยีนดังกล่าวมีความถี่ของอัลลีล C ต่ำ (ตารางที่ 11) สำหรับแพะพื้นเมืองภาคใต้พบว่าไม่สามารถตรวจพบจีโนไทป์ GC ทั้งนี้อาจเนื่องจากอัลลีล C มีความจำเพาะ (specific) ต่อแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน

ตารางที่ 11 ความถี่จีโนไทป์และอัลลีล จากไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ ในแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน

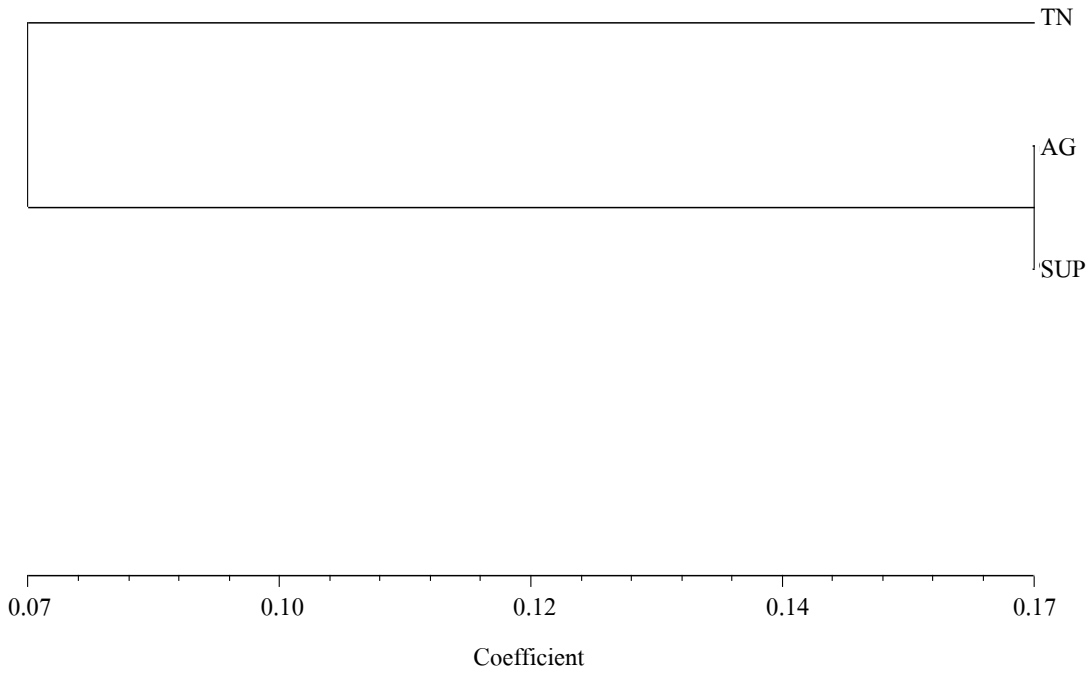
พันธุ์	จำนวน	จีโนไทป์		อัลลีล		$\chi^2_{(1,0.05)}$ = 3.841
		GG	GC	G	C	
SUP	48	0.400 (18)	0.600 (27)	0.700	0.300	0.0037
TN	30	1.000 (30)	0.000 (0)	1.000	0.000	-
AG	30	0.462 (12)	0.538 (14)	0.731	0.269	0.1349
ทั้งหมด	108	0.594 (60)	0.406 (41)	0.797	0.203	

SUP: แพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1 TN: แพะพื้นเมืองภาคใต้ AG: และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน

ตารางที่ 11 พบว่าประชากรทั้ง 3 กลุ่ม มีค่าความถี่ของอัลลีล G สูงกว่าอัลลีล C อาจเกิดจากอัลลีลพื้นฐานของประชากร หรือเกิดจากการคัดเลือกบางลักษณะของแต่ละประชากรที่อาจส่งผลกระทบต่อความถี่อัลลีลได้ รวมถึงจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษามีจำนวนไม่มากพอที่จะตรวจพบอัลลีลที่มีความถี่ต่ำได้ (หนึ่งฤทัย และคณะ, 2554) และเมื่อทดสอบสมดุลความถี่ยีนตามกฎของฮาร์ดี และไวน์เบิร์ก ในการศึกษาครั้งนี้พบประชากรแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ที่ศึกษายังอยู่ในภาวะสมดุลตามกฎของฮาร์ดี และไวน์เบิร์ก แม้ว่าประชากรแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ที่ศึกษาในครั้งนี้มีการคัดเลือกด้านการเจริญเติบโตและคัดเลือกลักษณะปรากฏ (เสาวนิต และคณะ 2543; Wattanachant, 2008) ดังนั้นแม้จะมีการคัดเลือกในด้านการเจริญเติบโตมาระยะหนึ่งแล้ว อาจไม่ถึงระดับที่กระทบต่อความถี่ยีนของประชากร หรืออาจเป็นไปได้ว่ายีนที่ถูกคัดเลือกอาจจะเป็นยีนกลุ่มอื่นนอกเหนือจากยีนที่ศึกษา ส่วนแพะพื้นเมืองภาคใต้ ไม่สามารถทดสอบสมดุลของฮาร์ดีและไวน์เบิร์ก ได้ เนื่องจากพบอัลลีลและจีโนไทป์รูปแบบเดียว

แผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ

ผลการวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมด้วยค่าความถี่จีโนไทป์ในประชากรแพะแต่ละกลุ่มด้วย วิธีของ Nei-UB (NTSYS เวอร์ชั่น 2.1) แล้วสร้างแผนผังความสัมพันธ์ ตามวิธี Neighbor joining ด้วยโปรแกรม NTSYS เวอร์ชั่น 2.1 พบว่าสามารถจำแนกกลุ่มแพะออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มแรกประกอบด้วยแพะพันธุ์แองโกลนูเบียนและแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 กลุ่มที่สอง คือ แพะพื้นเมืองภาคใต้ ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ความแตกต่างทางพันธุกรรมจากไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ ในแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน

ภาพที่ 8 ชี้ให้เห็นว่าแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับแพะพันธุ์แองโกลนูเบียนมากกว่าแพะพื้นเมืองภาคใต้ เนื่องจากแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างแม่แพะพันธุ์แองโกลนูเบียนกับพ่อแพะพื้นเมืองภาคใต้ และการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาในไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ ที่เป็นการถ่ายทอดจากแม่ไปสู่ลูก สอดคล้องกับผลการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยไมโครแซทเทลไลท์ 11 โลไซ ที่สามารถจำแนกแพะที่ศึกษาออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อยเช่นเดียวกัน

แพะทั้ง 3 กลุ่ม มีความแตกต่างทางพันธุกรรมต่ำ ทั้งที่แพะทรัพย์-ม.อ. 1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน มีความแตกต่างด้านสายพันธุ์ และต่างถิ่นที่อยู่อาศัย ซึ่งอาจเป็นผลมาจากประชากรแพะทั้ง 3 กลุ่ม มีบรรพบุรุษร่วมกัน เช่นเดียวกับ Pakpahan และคณะ (2015) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ของแพะในประเทศอินโดนีเซีย 8 สายพันธุ์ โดยใช้ไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ พบว่าแพะทุกสายพันธุ์มีความแตกต่างทางพันธุกรรมต่ำ โดยค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.02 เนื่องจากมีการศึกษาก่อนหน้ามีเชื้อสายแพะบางส่วนทั่วโลกเกิดจากแพะป่า และยังคงมีชีวิตอยู่มาจนถึงทุกวันนี้ ซึ่งบรรพบุรุษของแพะ domestication มีแพะ *Capra aegagrus* และ *Capra falconeri* เป็นบรรพบุรุษของแพะ *Capra hircus* (Xie, 1985; Yu, 1991 and Kang *et al.*, 2011) ทำให้แพะมีพันธุกรรมที่คล้ายคลึงกัน

บทที่ 5

สรุป และข้อเสนอแนะ

สรุป

ผลการศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมในแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 เปรียบเทียบกับแพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์ และไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ ข้อมูลพันธุกรรมจากไมโครแซทเทลไลท์ 11 โลไซ ชี้ให้เห็นถึงประชากรแพะทั้งสามกลุ่มมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง และประชากรส่วนใหญ่ไม่อยู่ในสมดุลของฮาร์ดี และไวน์เบิร์ก นอกจากนี้พบมีการเกิดประชากรกลุ่มเล็กน้อย

นอกจากนี้แผนภาพความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไมโครแซทเทลไลท์ และไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอ ให้ผลสอดคล้องกัน คือ พบว่าสามารถจำแนกกลุ่มแพะออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย โดยกลุ่มแรกประกอบด้วยแพะพันธุ์แองโกลนูเบียนและแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 กลุ่มที่สอง คือ แพะพื้นเมืองภาคใต้ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้เคียงกับแพะพันธุ์แองโกลนูเบียนมากกว่าแพะพื้นเมืองภาคใต้

ข้อเสนอแนะ

ควรมีการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในรุ่นต่อไป เพื่อติดตามความหลากหลายทางพันธุกรรมในแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ.1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูบียน

เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์. 2561. ข้อมูลสถิติกรมปศุสัตว์ (ออนไลน์). สืบค้นจาก: http://www.dld.go.th/home/stat _L3.html (เข้าถึงเมื่อวันที่ 12 ตุลาคม 2561).

กฤษ อังคนาพร. 2547. สรีรวิทยาของกระเพาะอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง (ออนไลน์). สืบค้นจาก: www. did.go.th (เข้าถึงเมื่อวันที่ 25 ตุลาคม 2561).

กองบำรุงพันธุ์สัตว์. 2553. พันธุ์สัตว์ กองบำรุงพันธุ์สัตว์. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด.

เกรียงศักดิ์ ปัทมเรขา, จิตผกา ธนปัญญารัชวงศ์, สมเกียรติ สายธนู และภูวดล สาลีเกษตร. 2539. รายงานการวิจัยอิทธิพลของโครงสร้างทางสังคมและสถานภาพทาง เศรษฐกิจและสังคมที่มีต่อการกระจายและการยอมรับวิธีการปฏิบัติการเลี้ยงแพะ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จรัสศรี นวลศรี, กรกช นาคคนอง, อมรรัตน์ จันทนาอรพินท์, รวีย์รัชต์ รักขันธุ์ และสุภาณี ชนะวีรวรรณ. 2560. รายงานการวิจัยการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และคัดเลือกพันธุ์ทุเรียนพื้นบ้านในเขต ภาคใต้ของประเทศไทย. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

จุฑาพร แสงประจักษ์. 2555. การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการปรับปรุงพันธุ์ข้าว. ว. แก่นเกษตร 40: 299 – 308.

เชื้อ ว่องส่งสาร. 2533. การจำแนกทางสัตววิทยาของแพะ (ออนไลน์). สืบค้นจาก: www.wikipedir.org (เข้าถึงเมื่อวันที่ 23 มกราคม 2561).

ทิพยวดี อรรถธรรม .2547. เอกสารประกอบการสอนเทคโนโลยีบีที. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

ธรรมนูญ ศรเลิศล้ำวาณิช, ธวัชชัย คุงโคกกรวด, วรโชติ หอประยูร และปกชน คีรีลักษณ์. 2558. น้ำหนักตัวและขนาดความยาวส่วนต่างๆของร่างกายของแพะลูกผสมพื้นเมือง-แองโกลนูเบียน ของศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. ว. สัตวศาสตร์แห่งประเทศไทย 4: 165 – 169.

ปรัชญาพร เอกบุตร. 2550. การจำแนกสายพันธุ์และการตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอของไก่พื้นเมืองโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พนม กระจ่าง, พจน์ สอดศุข, สุภัทรา อุไรวรรณ์ และศรีรัตน์ สอดศุข. 2548. วิเคราะห์ความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยใช้โมเลกุลเครื่องหมายในกระบวนการคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์กุ้งกุลาดำ. ใน: เอกสารวิชาการฉบับที่ 5/2548. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

มนต์ชัย ดวงจินดา. 2545. การวิเคราะห์ Phylogenetic tree จากข้อมูลแถบดีเอ็นเอด้วย NTSYS-PC. ใน: เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร เรื่องการประยุกต์ใช้เทคโนโลยี PCR ทางการเกษตร. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วินัย ประลมพ์กาญจน์. 2542. การผลิตแพะเนื้อและแพะนมในเขตร้อน. นครศรีธรรมราช: สำนักพิมพ์พิมพลักษณ์.

ศิริชัย ศรีพงพันธุ์. 2535. การตอนแพะผู้. ใน: เอกสารประกอบการอบรม เรื่องเทคโนโลยีการเลี้ยงแพะ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศิริรัตน์ นอสูงเนิน. 2561. การจัดกลุ่มพันธุกรรมแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์ - ม.อ.1 ด้วยลักษณะปรากฏ. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สมเกียรติ สายธนู. 2528. ลักษณะการเลี้ยงแพะในประเทศไทย. ว. สงขลานครินทร์ 7: 335 – 342.

สำนักงานปศุสัตว์เขต 9. 2555. การเปรียบเทียบสมรรถภาพการให้ผลผลิต. ใน: เอกสารประกอบรายงานการประชุม เรื่องการขับเคลื่อนยุทธศาสตร์แพะ-แกะระดับพื้นที่ปศุสัตว์เขต 9. กรมปศุสัตว์สงขลา.

สุรศักดิ์ คชภักดี, สุรพล ชลดำรงค์กุล, สมเกียรติ สายธนู, วันวิศาข์ งามผ่องใส, อภิชาติ หล่อเพชร, วินัย ประลมพ์กาญจน์ และเสาวนิต คูประเสิฐ. 2543. น้ำหนักแรกคลอด น้ำหนักหย่านมและอัตราการเจริญเติบโตก่อนหย่านมของแพะพื้นเมืองไทยและลูกผสมพื้นเมือง-แองโกลนูเบียน. ใน: รายงานการประชุมทางวิชาการ สาขาสัตวบาล สัตวศาสตร์ สัตวแพทย์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้น. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรีพร เกตงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในการปรับปรุงพันธุ์พืช. ว. วิชาการมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี 5: 37 –59.

เสาวนิต คูประเสริฐ, สุรศักดิ์ คชภักดี, อภิชาติ หล่อเพชร, สุรพล ชลดำรงค์กุล, สมเกียรติ สายธนู และจารุรัตน์ ชินาจริยวงศ์. 2543. การเจริญเติบโตหลังหย่านมของแพะพันธุ์ลูกผสมพื้นเมือง-แองโกลนูเบียน ที่ได้รับอาหารข้นเสริมที่มีระดับพลังงานและโปรตีนต่างกัน. ใน: ผลงานวิจัยการผลิตแพะ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

หนึ่งฤทัย พรหมวาที, มนต์ชัย ดวงจินดา, วุฒิไกร บุญคุ้ม และบัญญัติ เหล่าไพบูลย์. 2554. ความสัมพันธ์ระหว่างจุดกลายพันธุ์ (SNPs) ของยีน GHSR, IGFI, cGH และ IGFBP2 ต่อการเจริญเติบโตในไก่พื้นเมืองไทย (ชีและประดู่หางดำ). ว. แก่นเกษตร. 39: 261 – 270.

อรรัตน์ มงคลพร. 2548. เครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการปรับปรุงพันธุ์พืช. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์จรัลสนิทวงศ์การพิมพ์.

Al-Atiyat, R. M., H. J. Al-Tamimi, N. M. Salameh and M. J. Tabbaa. 2015. Genetic diversity of different Jordan goat breeds using microsatellite markers. J. Anim. Sci. 25: 1532 – 1539.

Aljumaah, R. S., M. M. Musthafa, M. A. Al-Shaikh, O. M. Badri and M. F. Hussein. 2012. Genetic diversity of Ardi goat based on microsatellite analysis. J. Anim. Sci. 11: 16539 – 16545.

Allendorf, F. W. 1986. Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. J. Zoo. Bio. 5: 181 – 190.

Ausubel, F., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smit and K. Struhl. 1995. Short protocols in molecular biology in Short protocols in molecular biology. Vol.lll. NewYork: Wiley-Sons.

Bolormaa, S., A. Ruvinsky, S. B. Walkden and J. W. Vander. 2008. Genetic relationships among Australian and Mongolian fleece-bearing goats. J. Anim. Sci. 21: 1535-1543.

Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick and R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map using restriction fragment length polymorphisms. J. Hum. Genet. 32: 314 – 31.

Crooijmans, R. P. M. A., A. B. F. Groen, A. J. Van-Kampen, S. V. D. Beek, J. J Van der Poelj and M. A. M. Groenen. 1996. Microsatllites polymorphism in commercial broiler and layer lines estimated using pools blood sample. Poult. Sci. 75: 904 – 909.

Falconer, D. S. and T. F. C. Mackay. 1996. Introduction to Quantitative Genetics. IV Edition, Addison Wesley Longman, Harlow.

FAO. 2004. Guidelines for development of national management of farm animal genetic resources plans. Measurement of Domestic Animal Genetic Diversity (MoDAD): Recommended microsatellite markers. Rome, Italy.

Fathi, M., M. El-Zarei, I. Al-Homidan and O. Abou-Emera. 2018. Genetic diversity of Saudi native chicken breeds segregating for naked neck and frizzle genes using microsatellite markers. J. Anim. Sci. 31: 1871.

Frankham, R., J. D. Ballou and D. A. Briscoe. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, Cambridge.

Halliburton, R. 2004. Introduction to population genetics. Western Connecticut state university.

Harlistyo, M. F., S. Sutopo and E. Kurnianto. 2014. Genetic diversity of Kejobong goat based on mitochondrial DNA D-loop sequence. J. Anim. Sci. 39: 204 – 209.

ISAG/ FAO. 2012. Secondary Guideline for development of National Farm Animal Genetic Resources management plans. Measurement of Domestic Animal Diversity (MoDAD): Original working group report. http://dad.fao.org/en/refer/ library/guideline/workgrp.pdf.

Kang, J. F., X. L. Li, R. Y. Zhou, L. H. Li, G. R. Zheng and H. Y. Zhao. 2011. Genetic diversity and differentiation of four goat lineages based on analysis of complete mtDNA D-loop. J. Agric. 5: 87 – 93.

Liu, R. Y., C. Z. Lei, S. H. Liu and G. S. Yang. 2006. Genetic diversity and origin of Chinese domestic goats revealed by complete mtDNA D-loop sequence variation. J. Anim. Sci. 20: 178 – 183.

Margeta, P., K. Gvozdanovic, I. D. Kusec, Z. Radisic, G. Kusek and V. Margeta. 2018 Genetic analysis of Croatian autochthonous pig breeds based on microsatellite markers. Archivos de zootecnia. 1: 13-16.

McCouch, S. and S. D. Tankslay. 1991. Development and use of restriction fragment length polymorphisms in rice breeding and genetic. In Rice biotechnology. Khush, G.S. and Toenniessen, G.H. (eds.) CAB International. Wallingford. Oxon, UK. pp. 109 – 133.

Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.

Oka, I. G., L. Sayang, W. YupardhiI, B. Mantra, N. Suyasa and A. A. S. Dewi. 2011. Genetic relationship between gembrong goat, kacang goat and kacang x etawah crossbred (PE) based on their mitochondrial DNA. J. Vet. 4: 180 – 184.

Pakpahan, S., W. T. Artama, R. Widayanti and I. G. Suparta. 2015. Genetic variations and theorigin of native Indonesian goat breeds on mtDNA D-loop sequences. J. Anim. Sci. 9: 341 – 350.

Pramod, K. R., B. J. Manjunath, M. D. L. Ajoy, S. Lalji and T. Kumarasamy. 2008. Microsatellite-based phylogeny of Indian domestic goats. BMC Genetics. 1: 1.

Sambrook J and D. Russell. 2001. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Seilsuth, S., J. H. Seo H. S. Kong and G. J. Jeon. 2016. Microsatellite analysis of the genetic diversity and population structure in dairy goats in Thailand. Asian-Australasian J. Anim. Sci. 29: 327.

Seo, D. W., M. R. Hoque, N. R. Choi, H. Sultana, H. B. Park, K. N. Heo, B. S. Kang, H. T. Lim, S. H. Lee, C. Jo and J. H. Lee. 2013. Discrimination of Korean native chicken lines using fifteen selected microsatellite markers. Asian Australas. J. Anim. Sci. 26: 316-322.

Tankslay, S. D., N. D. Young, A. H. Paterson and M. W. Bonierbale. 1989. RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. Biotechnology. 7: 257 – 264.

USDA. 1994. The USDA-ARS Plant Genome Research Programs. United States department of agriculture. Washington, D.C. U.S.A. pp. 24.

Wang, G. Z., S. S. Chen, T. L. Chao, Z. B. Ji, L. Hou, Z. J. Qin and J. M. Wang. 2017. Analysis of genetic diversity of Chinese dairy goats via microsatellite. J. Anim. Sci. 95: 2304 – 2313.

Wattanachant, C. 2008. Goat production in Thailand. In Proceedings of the International Seminar on Production Increases in Meat and Dairy Goats by Incremental Improvements in Technology and Infrastructure for Small-scale Farmers in Asia held at Ciawi, Bogor, Indonesia in August 4 – 8, 2008, pp. 84 – 104.

Wayne, P., C. M. Gordon and P. Jim. 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. Trends in Plant Sci. 1: 215 – 222.

Williams, J. G. K., A. R. Kubelik, K. J. Livak, J. A. Rafalski and S. V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res. 18: 6531 – 6535.

Xie, C. X. 1985. History of raising cattle, sheep and goat in China. (Attached history of raising deer). Agricultural publishing house of China. pp. 144 – 150.

Yu, F. 1991. Technique of raising goats in ancient China. Ancient Mod. Agric. 3: 54 – 59.

Zhao, J., C. Zhu, Z. Xu, X. Jiang, S. Yang and A. Chen. 2017. Microsatellite markers for animal identification and meat traceability of six beef cattle breeds in the Chinese market. Food control, 78: 469 – 475.

Zhao, Y., J. Zhang, E. Zhao, X. Zhang, X. Liu and N. Zhang. 2011. Mitochondrial DNA diversity and origins of domestic goats in Southwest China (excluding Tibet). Small ruminant research, 95: 40 – 47.

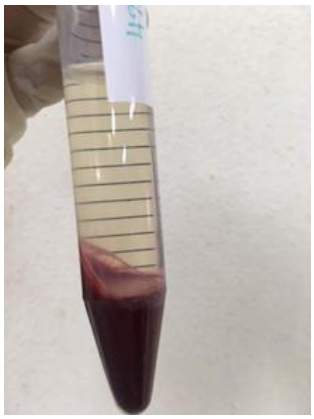
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

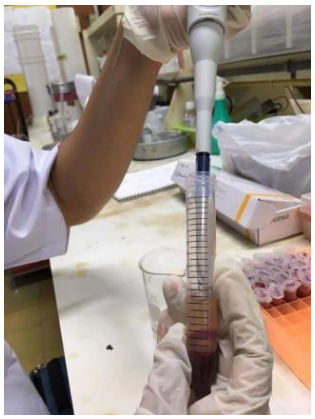
ภาพประกอบการเก็บตัวอย่างเลือดแพะ การแยกเม็ดเลือดขาว และการล้างเลือด

ภาพที่ 1 เจาะเลือดแพะบริเวณเส้นเลือดดำที่คอ

ภาพที่ 2 เก็บเลือดใส่ในหลอดที่มีสาร EDTA

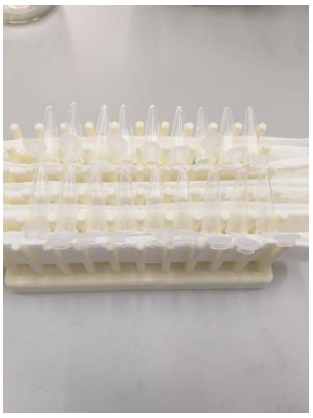


ภาพที่ 3 ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเม็ดเลือดขาว



ภาพที่ 4 ดูดเก็บ buffy coat

ภาพที่ 5 ล้างเลือดด้วยการเติมน้ำกลั่น



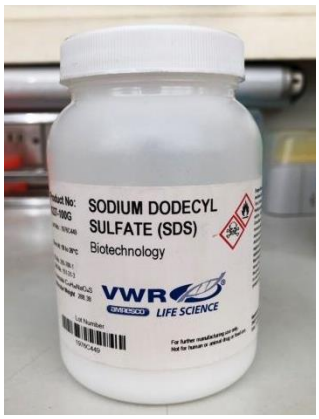
ภาพที่ 6 ตากตะกอนดีเอ็นเอที่อุณหภูมิห้อง

ภาคผนวก ข

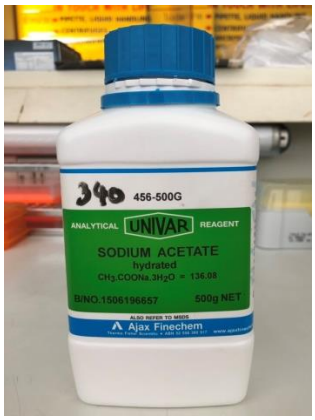
ภาพประกอบสารเคมีในการสกัดดีเอ็นเอ และทำอิเล็กโตรโฟรีซิส

ภาพที่ 7 Guanidine hydrochloride ใช้การทำให้เซลล์แตก

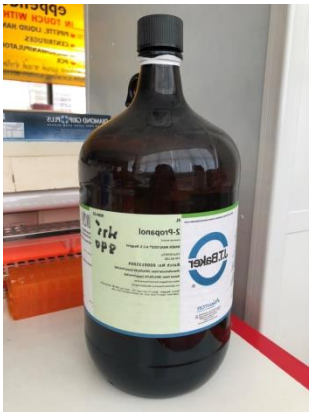
ภาพที่ 8 Proteinase K ใช้ย่อยโปรตีนและกำจัดสิ่งเจือปนจากตัวอย่างดีเอ็นเอ



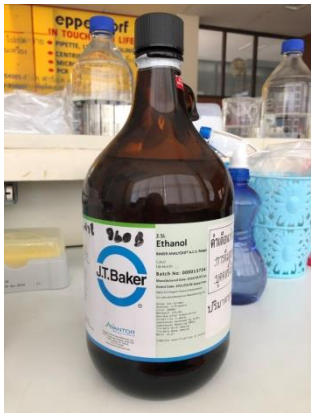
ภาพที่ 9 Sodiam dodecyl sulfate ใช้ทำให้โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติ



ภาพที่ 10 Sodium acetate ใช้ตกตะกอนโปรตีนในสภาพที่เป็นด่างจัด

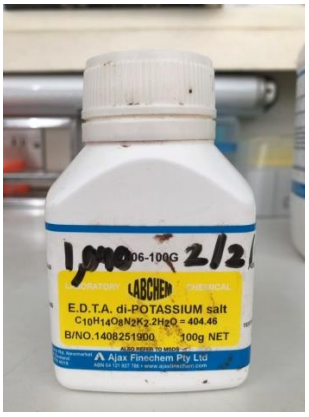


ภาพที่ 11 Isopropanol ใช้ตกตะกอนดีเอ็นเอ

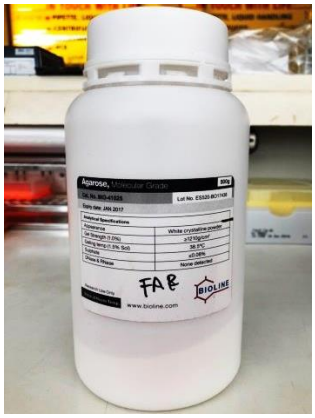


ภาพที่ 12 Ethanol ใช้ล้างตะกอนดีเอ็นเอ

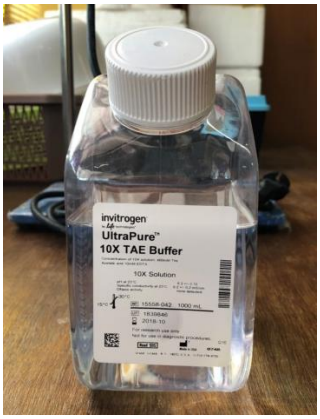
ภาพที่ 13 Tris-acetate ใช้ละลายตะกอนดีเอ็นเอ



ภาพที่ 14 EDTA dipotassium salt ใช้ละลายตะกอนดีเอ็นเอ



ภาพที่ 15 Agarose ใช้เป็นวุ้นตัวกลางผ่านสนามไฟฟ้า



ภาพที่ 16 TAE buffer ใช้เป็นตัวนำไฟฟ้ามีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ

ภาคผนวก ค

ภาพประกอบอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

ภาพที่ 17 เครื่อง PCR

ภาพที่ 18 เครื่อง Centrifuge

ภาพที่ 19 เครื่อง Spectrophotometer

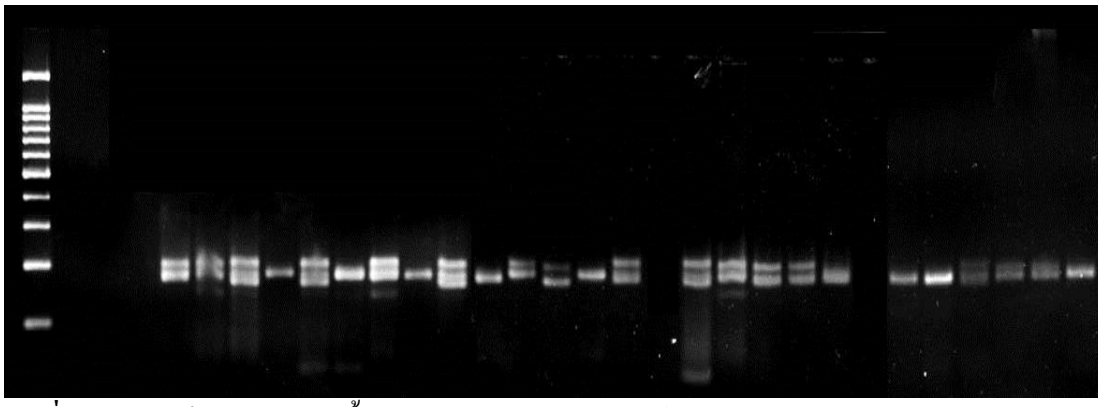
ภาพที่ 20 เครื่อง Mini centrifuge

ภาพที่ 21 เครื่อง Gel documentation

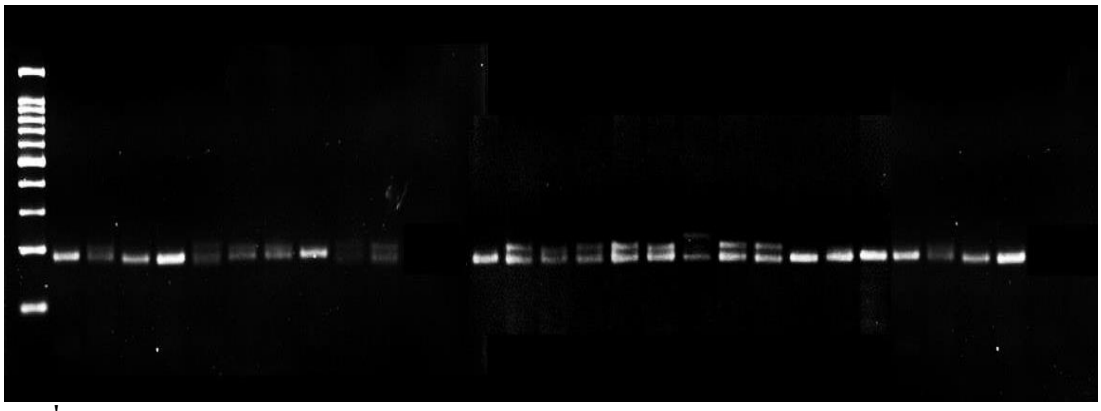
ภาพที่ 22 เครื่อง Gel electrophoresis

ภาคผนวก ง

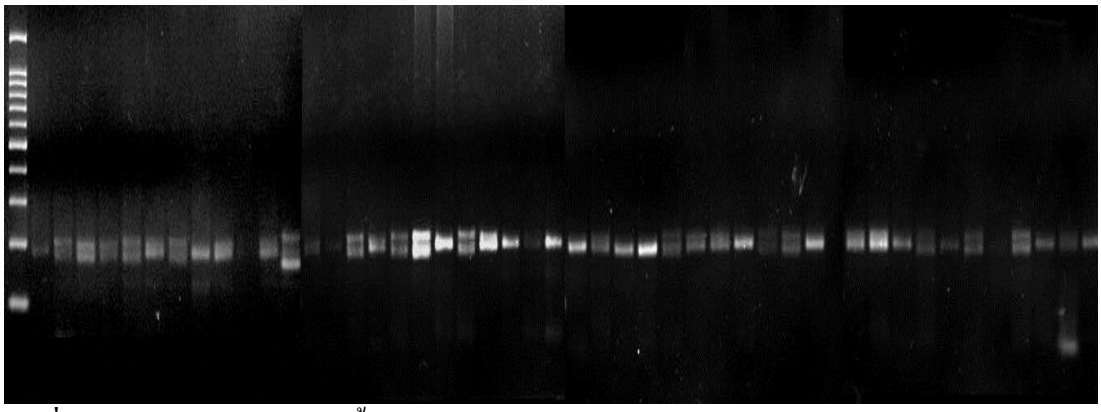
ภาพประกอบการปรากฏแถบดีเอ็นเอของไมโครแซทเทลไลท์



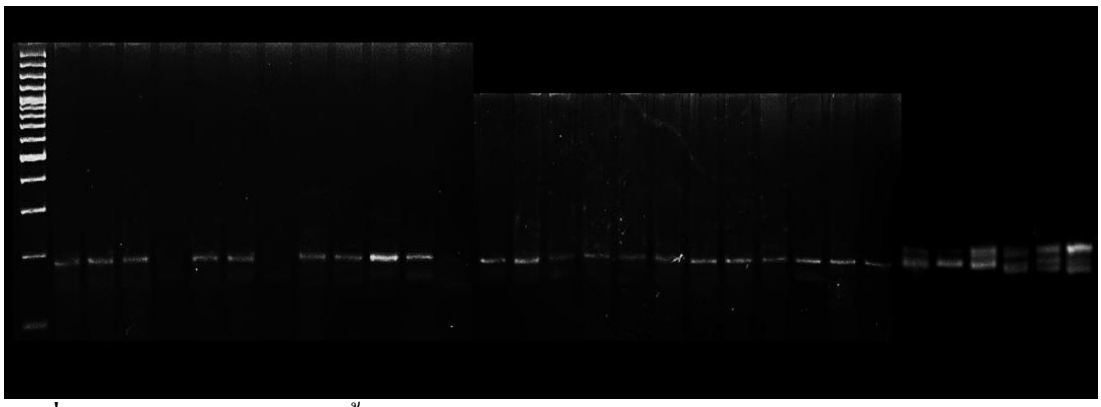
ภาพที่ 23 แถบดีเอ็นเอของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ด้วยไพรเมอร์ SRCRSP5



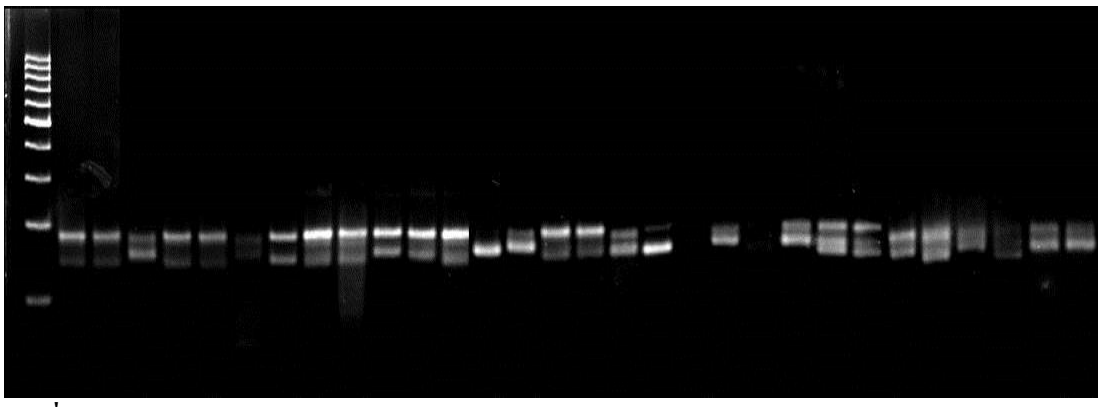
ภาพที่ 24 แถบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ด้วยไพรเมอร์ SRCRSP5



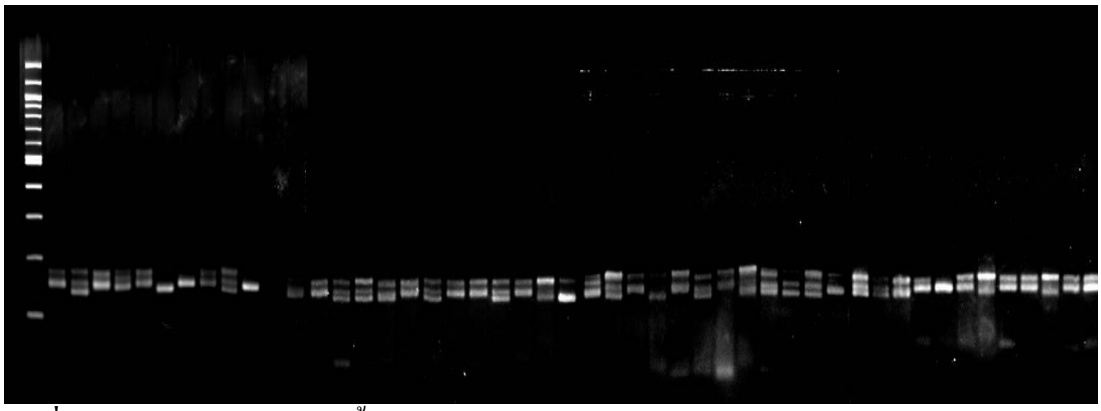
ภาพที่ 25 แถบดีเอ็นเอของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ด้วยไพรเมอร์ SRCRSP5



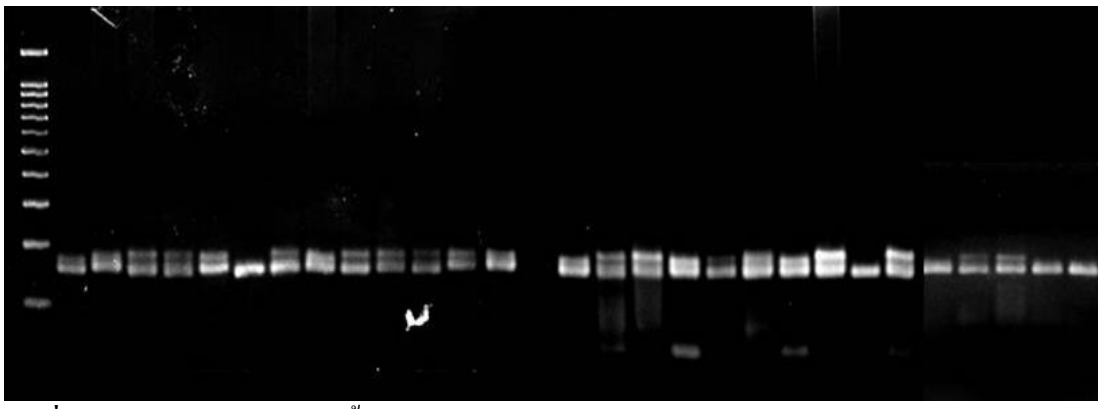
ภาพที่ 26 แถบดีเอ็นเอของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ด้วยไพรเมอร์ MAF70



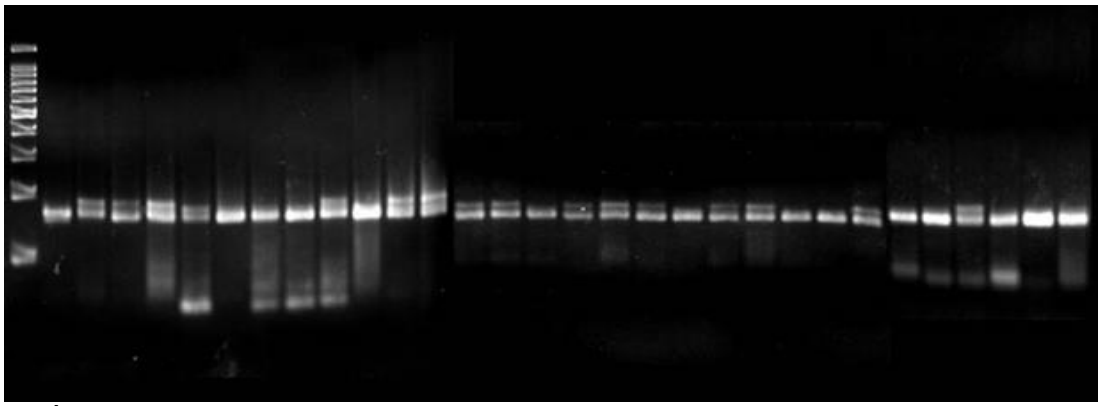
ภาพที่ 27 แถบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ด้วยไพรเมอร์ MAF70



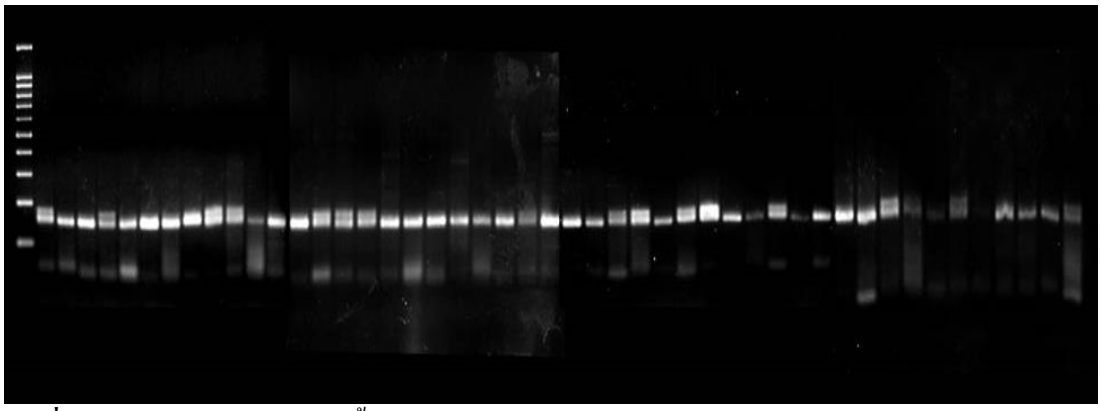
ภาพที่ 28 แถบดีเอ็นเอของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ด้วยไพรเมอร์ MAF70



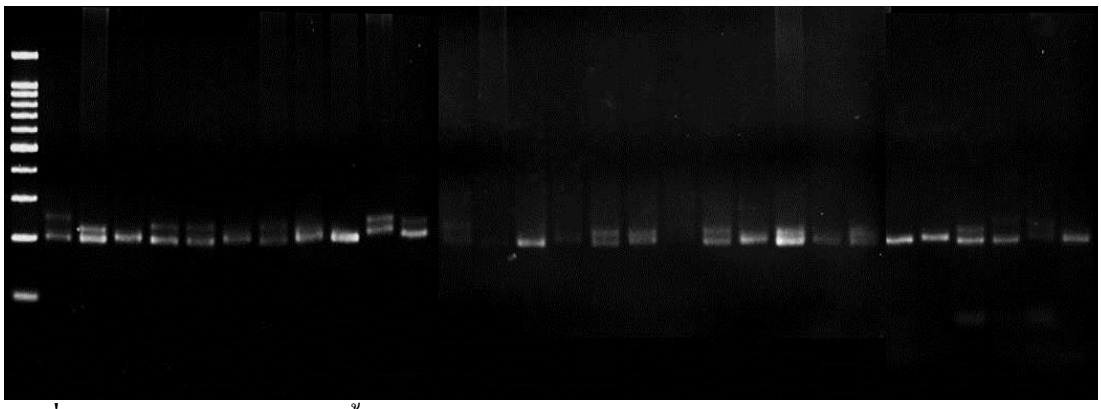
ภาพที่ 29 แถบดีเอ็นเอของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ด้วยไพรเมอร์ OarFCB48



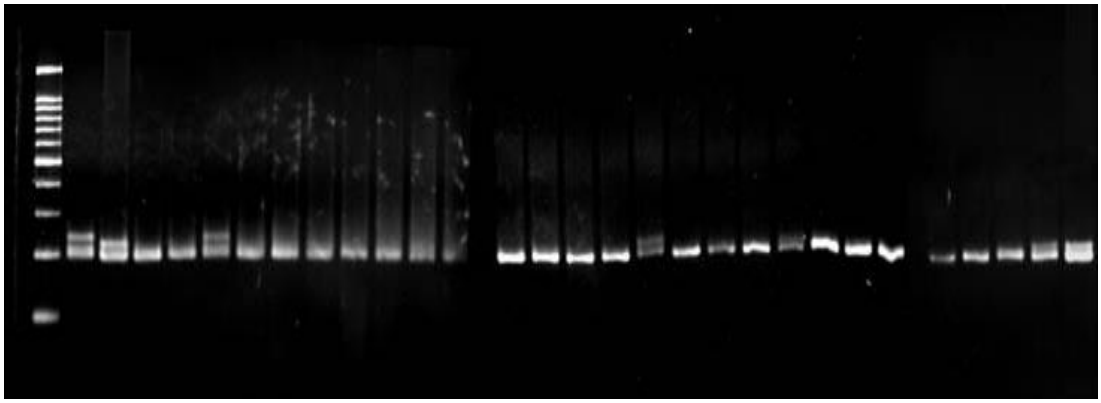
ภาพที่ 30 แถบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ด้วยไพรเมอร์ OarFCB48



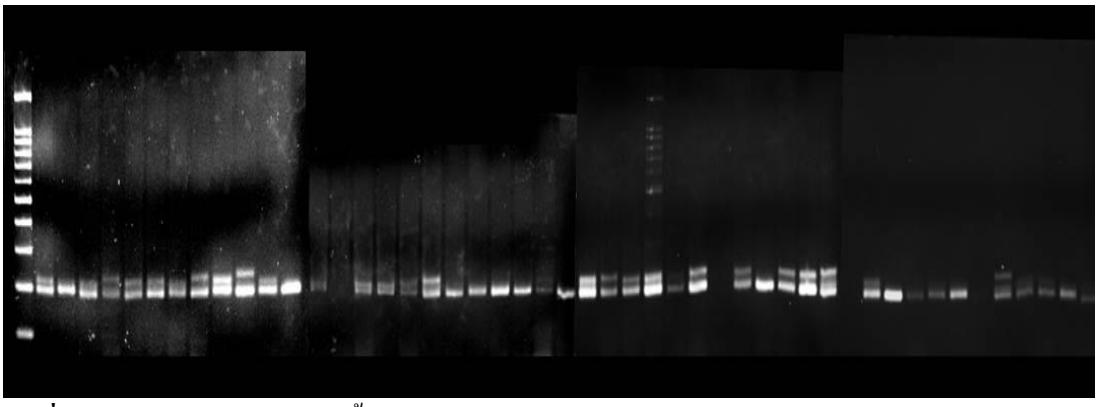
ภาพที่ 31 แถบดีเอ็นเอของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ด้วยไพรเมอร์ OarFCB48



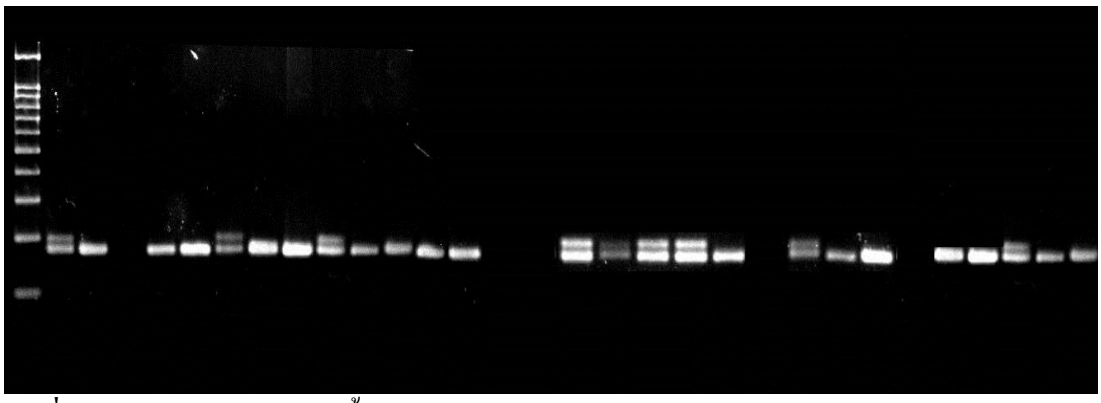
ภาพที่ 32 แถบดีเอ็นเอของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ด้วยไพรเมอร์ INRA023



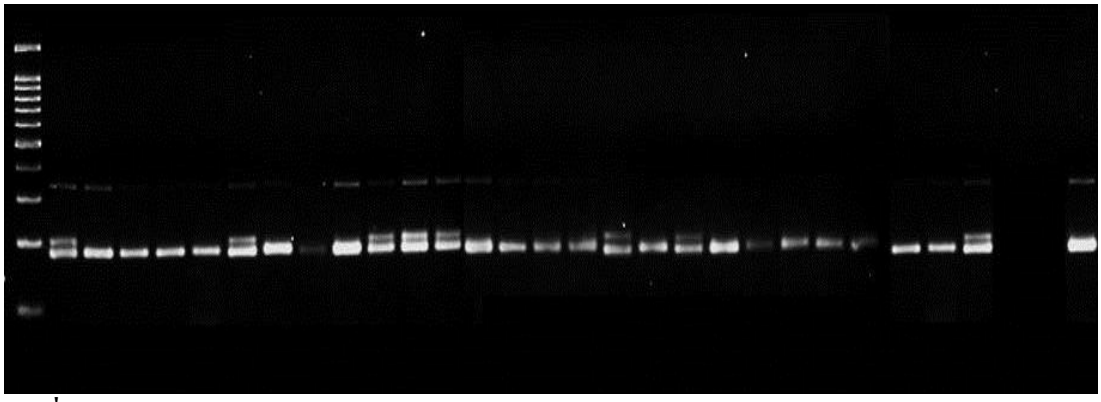
ภาพที่ 33 แถบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ด้วยไพรเมอร์ INRA023



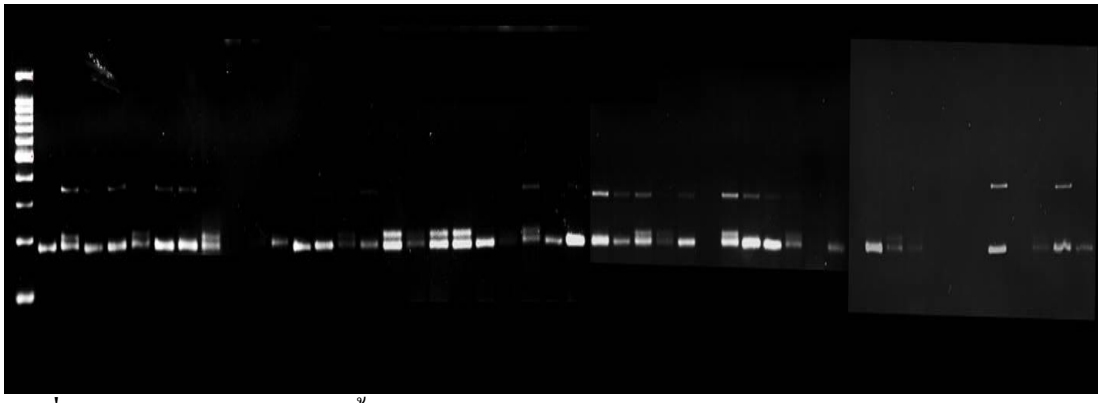
ภาพที่ 34 แถบดีเอ็นเอของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ด้วยไพรเมอร์ INRA023



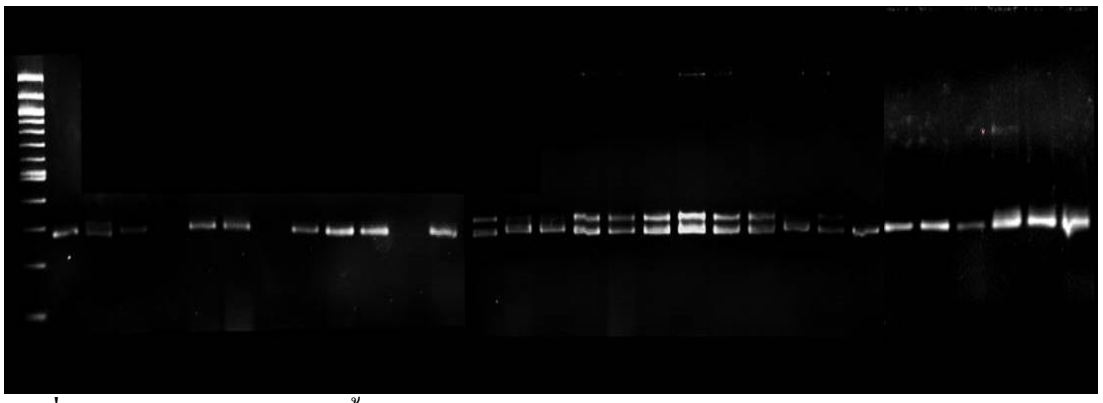
ภาพที่ 35 แถบดีเอ็นเอของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ด้วยไพรเมอร์ INRA063



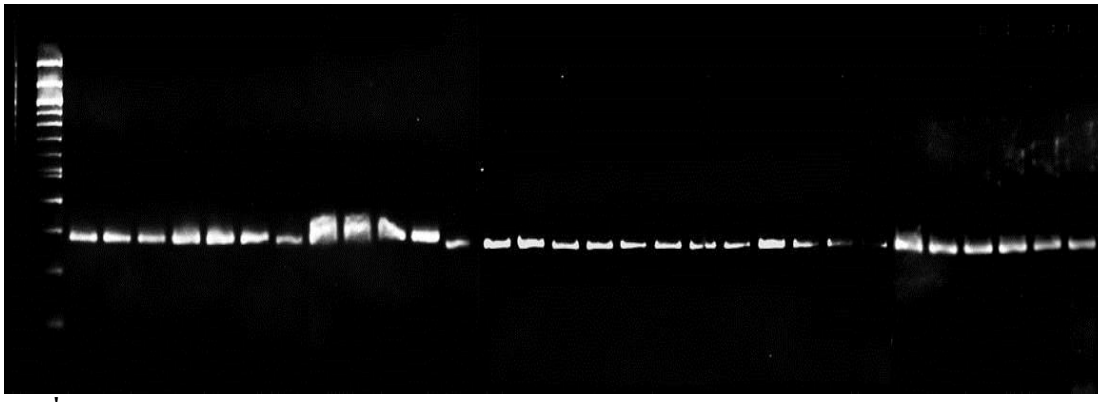
ภาพที่ 36 แถบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ด้วยไพรเมอร์ INRA063



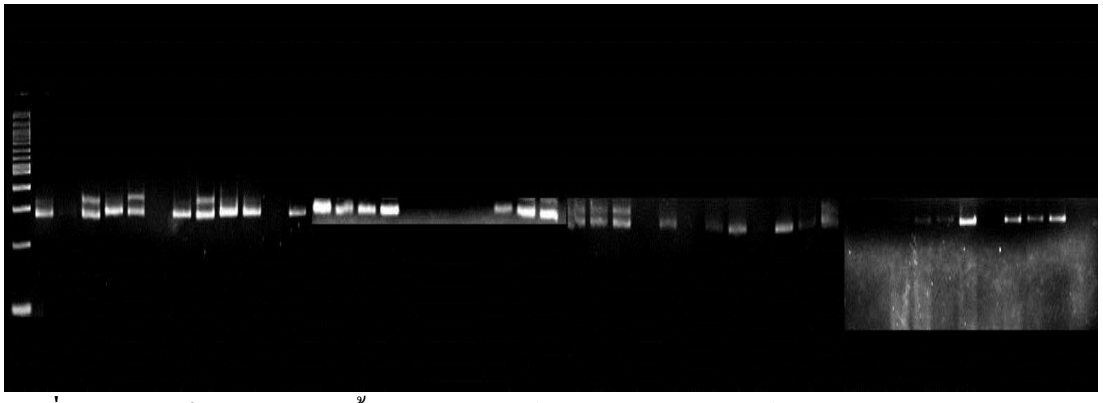
ภาพที่ 37 แถบดีเอ็นเอของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ด้วยไพรเมอร์ INRA063



ภาพที่ 38 แถบดีเอ็นเอของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ด้วยไพรเมอร์ ILSTS011

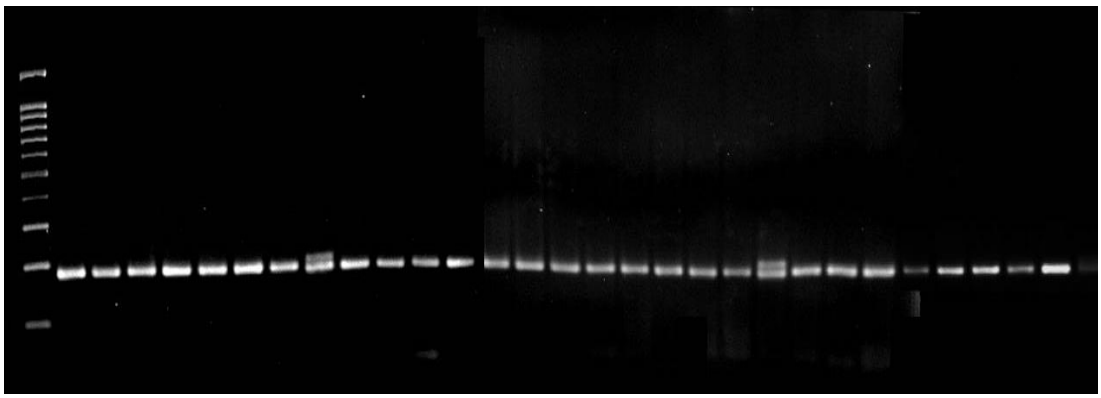


ภาพที่ 39 แถบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ด้วยไพรเมอร์ ILSTS011

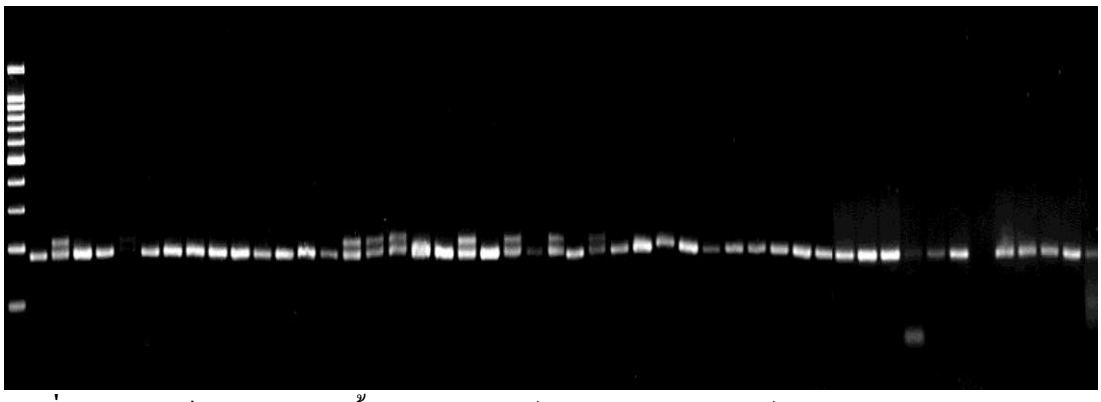


ภาพที่ 40 แถบดีเอ็นเอของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ด้วยไพรเมอร์ ILSTS011

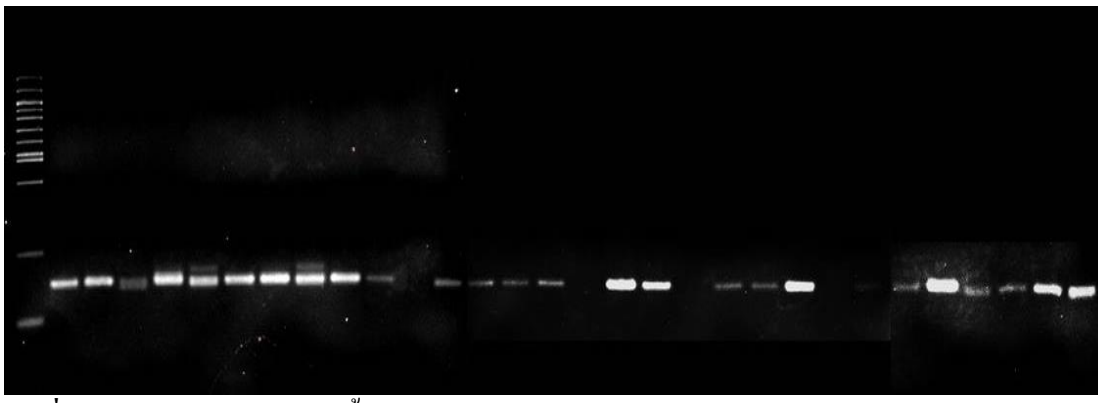
ภาพที่ 41 แถบดีเอ็นเอของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ด้วยไพรเมอร์ ILSTS005



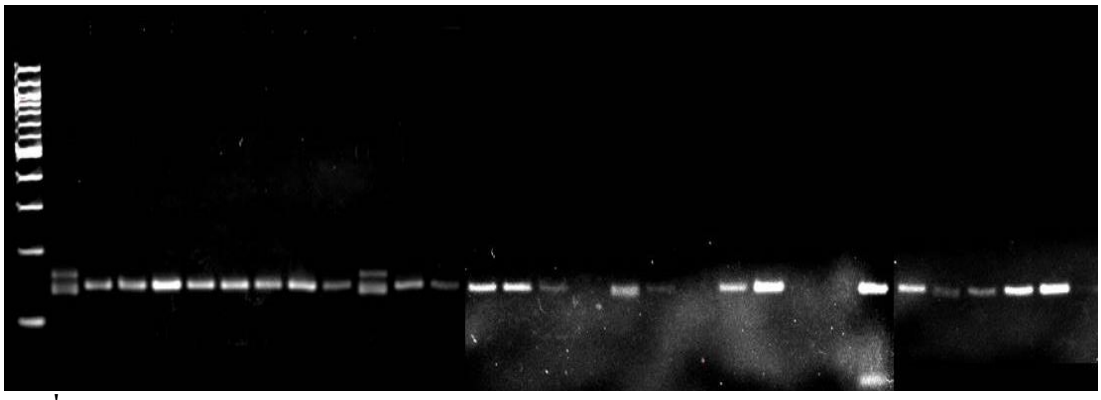
ภาพที่ 42 แถบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ด้วยไพรเมอร์ ILSTS005



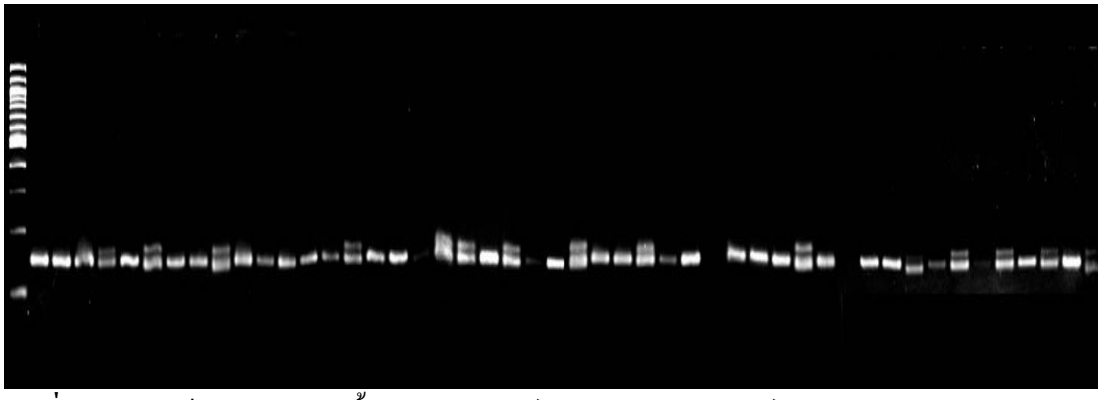
ภาพที่ 43 แถบดีเอ็นเอของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ด้วยไพรเมอร์ ILSTS005



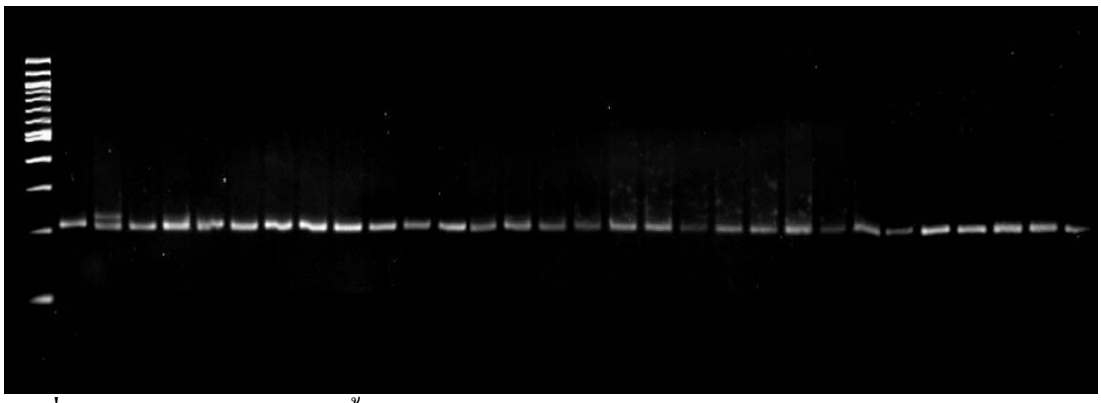
ภาพที่ 44 แถบดีเอ็นเอของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ด้วยไพรเมอร์ TGLA53



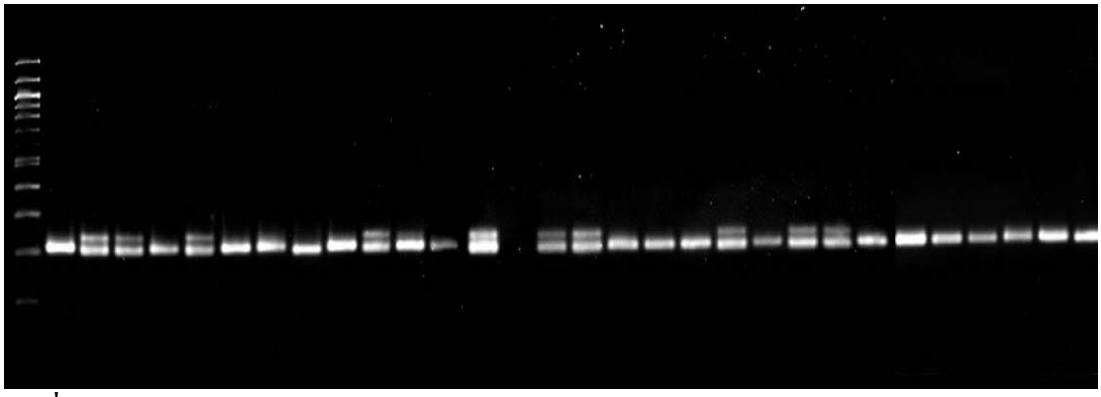
ภาพที่ 45 แถบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ด้วยไพรเมอร์ TGLA53



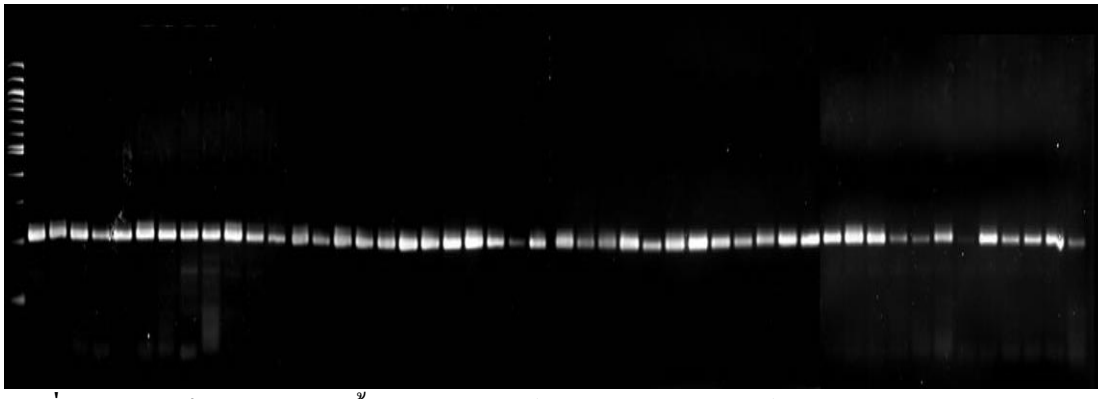
ภาพที่ 46 แถบดีเอ็นเอของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ด้วยไพรเมอร์ TGLA53



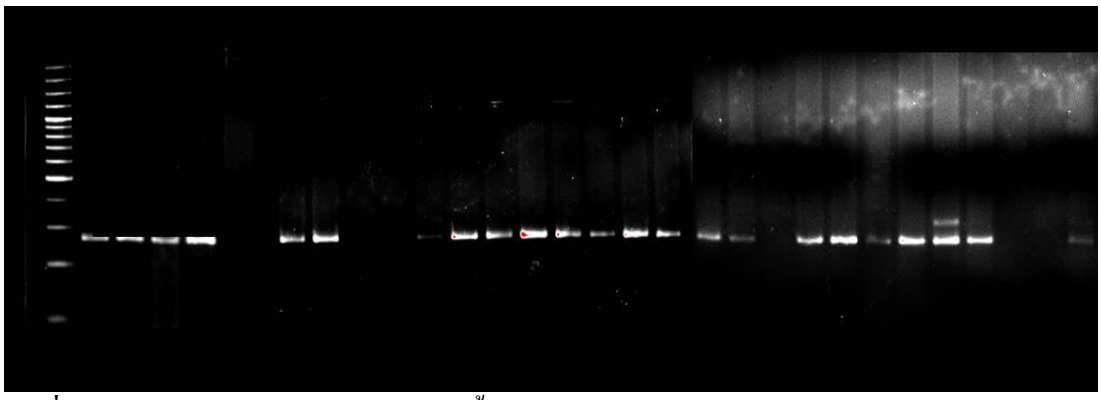
ภาพที่ 47 แถบดีเอ็นเอของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ด้วยไพรเมอร์ ETH10



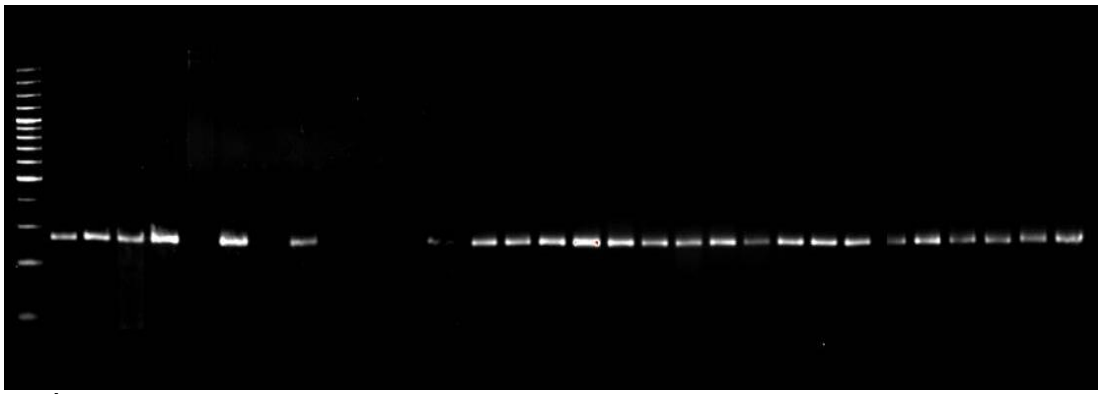
ภาพที่ 48 แถบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ด้วยไพรเมอร์ ETH10



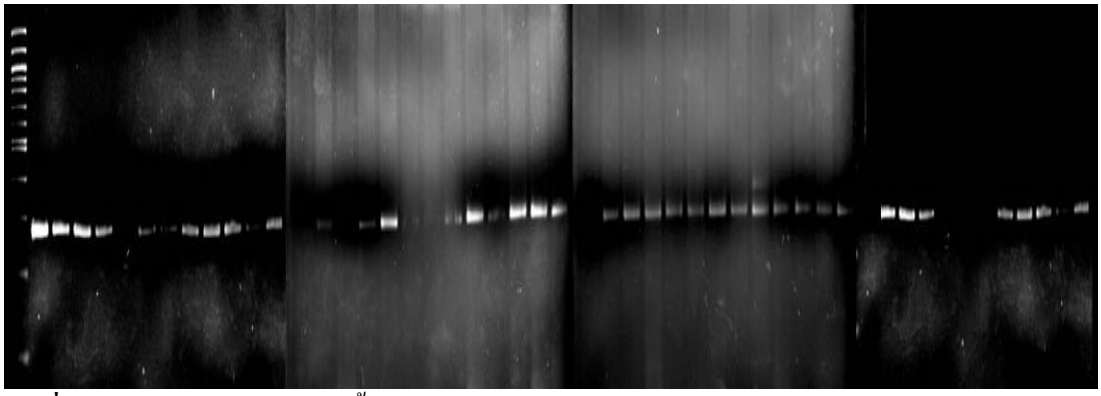
ภาพที่ 49 แถบดีเอ็นเอของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ด้วยไพรเมอร์ ETH10



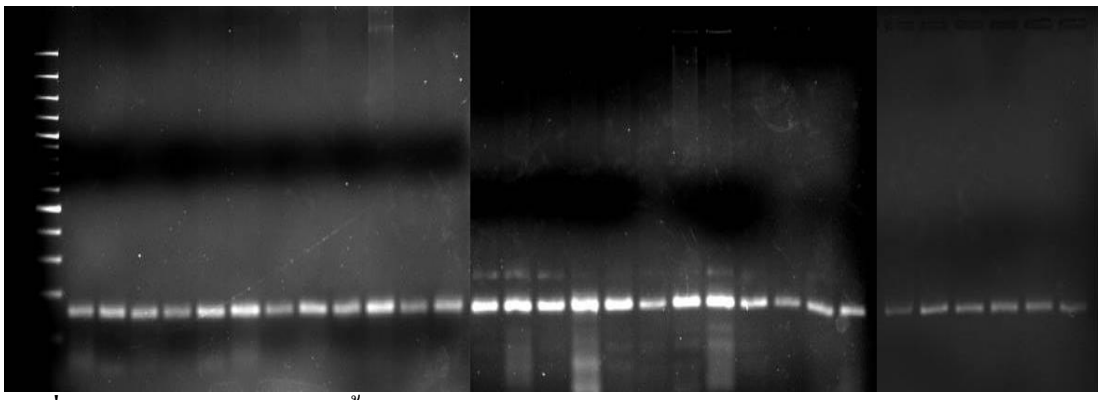
ภาพที่ 50 การปรากฏแถบดีเอ็นเอของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ด้วยไพร์เมอร์ INRABERN185



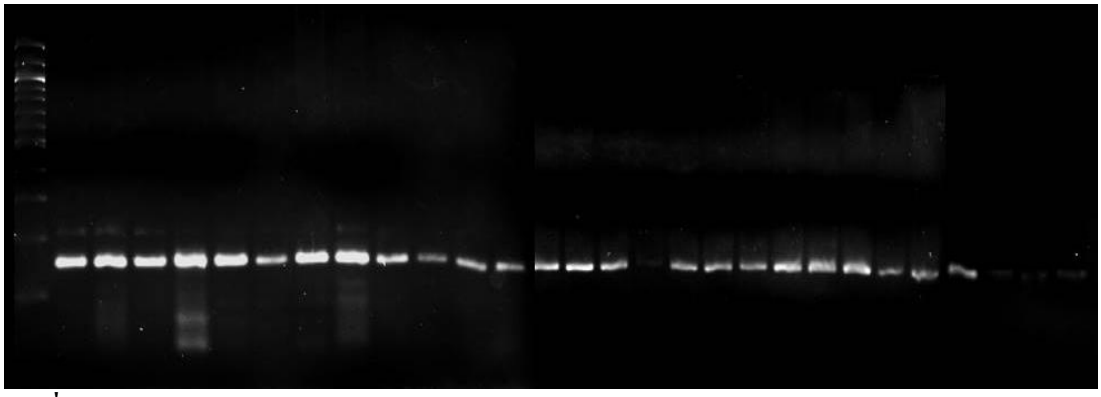
ภาพที่ 51 แถบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ด้วยไพร์เมอร์ INRABERN185



ภาพที่ 52 แถบดีเอ็นเอของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ด้วยไพร์เมอร์ INRABERN185



ภาพที่ 53 แถบดีเอ็นเอของแพะพื้นเมืองภาคใต้ ด้วยไพรเมอร์ ETH225



ภาพที่ 54 แถบดีเอ็นเอของแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน ด้วยไพรเมอร์ ETH225

ภาพที่ 55 แถบดีเอ็นเอของแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์-ม.อ. 1 ด้วยไพรเมอร์ ETH225

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวศิริรัตน์ นอสูงเนิน

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5910620030

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (สัตวศาสตร์)	มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม	2557

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

ศิริรัตน์ นอสูงเนิน, ปรัชญาพร เอกบุตร และ ไชยวรรณ วัฒนจันทร์. 2561. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแพะเนื้อลูกผสม “ทรัพย์-ม.อ. 1” โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์. ว. วิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร. 35 (ฉบับพิเศษ 2): 195 – 201.

Norsungnoen, S., P. Akaboot, and C. Wattanachant. 2018. Genetic diversity of crossbred meat goat SUP- PSU 1 compared to Anglo- Nubian and Thai native goat by microsatellites. Proceedings of the VIII AG- BIO/ PERD graduate conference on Agricultural biotechnology and the V KU- UT joint graduate conference on Agriculture, food engineering and environment, Nakhon pathom, 6 – 7 December 2018, pp. 36.

ศิริรัตน์ นอสูงเนิน, ปรัชญาพร เอกบุตร และ ไชยวรรณ วัฒนจันทร์. 2562. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์ ม.อ. 1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน โดยไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ. ว. แก่นเกษตร. 47 (ฉบับพิเศษ 1): 99 – 104

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวศิริรัตน์ นอสูงเนิน

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5910620030

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (สัตวศาสตร์)	มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม	2557

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

ศิริรัตน์ นอสูงเนิน, ปรัชญาพร เอกบุตร และ ไชยวรรณ วัฒนจันทร์. 2561. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของแพะเนื้อลูกผสม “ทรัพย์-ม.อ. 1” โดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์. ว. วิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร. 35 (ฉบับพิเศษ 2): 195 – 201.

Norsungnoen, S., P. Akaboot, and C. Wattanachant. 2018. Genetic diversity of crossbred meat goat SUP- PSU 1 compared to Anglo- Nubian and Thai native goat by microsatellites. Proceedings of the VIII AG- BIO/ PERD graduate conference on Agricultural biotechnology and the V KU- UT joint graduate conference on Agriculture, food engineering and environment, Nakhon pathom, 6 – 7 December 2018, pp. 36.

ศิริรัตน์ นอสูงเนิน, ปรัชญาพร เอกบุตร และ ไชยวรรณ วัฒนจันทร์. 2562. ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างแพะเนื้อลูกผสมทรัพย์ ม.อ. 1 แพะพื้นเมืองภาคใต้ และแพะพันธุ์แองโกลนูเบียน โดยไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ. ว. แก่นเกษตร. 47 (ฉบับพิเศษ 1): 99 – 104