

การเลือกเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ เพื่อตรวจสอบ สายเลือดของพันธุ์โฮลสไตน์โคนมลูกผสม

Microsatellite markers selection for detected of Holstein blood level in crossbred dairy cows

รัตติกาล สุวรรณสิงห์¹, พงษ์ชาญ ณ ลำปาง^{1*} และ อมรรัตน์ โมฬี¹

Rattikan Suwannasing¹, Pongchan Na-Lampang^{1*} and Amonrat Molee¹

บทคัดย่อ: วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ เพื่อหาเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ที่สามารถบ่งบอกถึงระดับสายเลือดของโคพันธุ์โฮลสไตน์ฟริเซียนที่แตกต่างกันในแม่โคนมลูกผสม โดยศึกษาจากแม่โค 3 กลุ่มระดับสายเลือดคือ 50%, 75% และ 100% กลุ่มละ 20 ตัวอย่าง โดยนำมาหาความสัมพันธ์กับเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 10 เครื่องหมาย ประกอบด้วย BM1824, BM2113, BM4305, BMS2684, ETH3, ETH152, ETH225, ILST096, TGLA122 และ TGLA126 ด้วยวิธีการ Binary Logistic Regression Analysis จากการศึกษาพบว่าเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ TGLA122 มีความเป็นไปได้ที่จะใช้บ่งบอกโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟริเซียนที่มีระดับสายเลือด 50% ได้ โดยมีความน่าจะเป็นของอัลลีล B และจีโนไทป์ BB เท่ากับ 91.83% และ 96% ตามลำดับ ส่วนในระดับสายเลือด 75% และ 100% นั้น ไม่พบว่ามีความสัมพันธ์กับเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ตัวใดในทั้ง 10 เครื่องหมายดังกล่าวที่จะใช้บ่งบอกระดับสายเลือดได้ อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าผลการศึกษานี้จะพบเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ในการตรวจสอบระดับสายเลือดเพียงเล็กน้อย แต่สามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานและนำไปใช้เป็นแนวทางในการแสวงหากลุ่มเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ที่สามารถตรวจสอบระดับสายเลือดของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟริเซียนได้ต่อไป

คำสำคัญ: โคนม, เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์, ระดับสายเลือด, ลูกผสมโฮลสไตน์ฟริเซียน

ABSTRACT: The objective of this study is to find the microsatellite markers which can detect the different blood levels of Holstein-Friesians in crossbred dairy cattle. Three groups of 20 crossbred dairy cattle with blood levels of 50%, 75% and 100%, respectively, were studied. The correlation between 10 microsatellite markers, i.e. BM1824, BM2113, BM4305, BMS2684, ETH3, ETH152, ETH225, ILST096, TGLA122 and TGLA126 was examined using Binary Logistic Regression Analysis. It was found that the marker TGLA122 has the possibility of identifying 50% Holstein-Friesian crossbred dairy cattle, with the probabilities of allele B and genotype BB at 91.83% and 96%, respectively. In 75% and 100% Holstein-Friesian crossbred dairy cattle, none of the 10 microsatellite markers were found to be capable of identifying these blood levels. However, even though the results of this study showed that only one microsatellite marker can be used for the detection of blood levels of Holstein-Friesians, these can form the basis and be used to find the microsatellite marker groups which can detect the blood levels of Holstein-Friesians in crossbred dairy cattle.

Keywords: Dairy cattle, Microsatellite marker, Blood level, Holstein-Friesian crossbred

¹ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา 30000
School of Animal Production Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, 30000

* Corresponding author: Pongchan@sut.ac.th

บทนำ

เกษตรกรรายย่อยในประเทศไทยนิยมปรับปรุงพันธุ์โคนมโดยการยกระดืบสายเลือดของโคพันธุ์ไฮสโตนให้เพิ่มสูง ขึ้น เพื่อหวังผลให้แม่โคนมมีความสามารถในการผลิตน้ำนมได้ในปริมาณมากขึ้น อย่างไรก็ตามพบว่าโคนมของเกษตรกรรายย่อยมักจะมีปัญหาด้านความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำและมีอัตราการเป็นโรคเต้านมอักเสบสูง ซึ่งคาดว่าเป็นผลส่วนหนึ่งมาจากการที่แม่โคนมเหล่านี้มีระดับเลือดของโคพันธุ์ไฮสโตนที่สูงเกินไป โดยมีรายงานว่าระดับสายเลือดพันธุ์ไฮสโตนที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้ความสมบูรณ์พันธุ์ลดลง (สมเกียรติ และคณะ, 2542; วิชัย และคณะ, 2547; Veerkamp et al., 2001) และในขณะเดียวกันก็มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของค่าเฉลี่ยของโซมาติกเซลล์ในน้ำนม (กัลยา และคณะ, 2549) ซึ่งส่งผลต่อการเกิดโรคเต้านมอักเสบสูงขึ้นไปด้วย แต่เกษตรกรรายย่อยส่วนใหญ่ในประเทศไทยมักไม่เจดบันทึกหรือไม่ทราบพันธุ์ประวัติของแม่โคนมของตน จึงทำให้ไม่สามารถทราบถึงระดับเลือดที่แท้จริงของแม่โคแต่ละตัวได้ และทำให้ขาดข้อมูลที่สำคัญในการวางแผนการปรับปรุงพันธุ์ ดังนั้นหากมีวิธีที่สามารถตรวจสอบระดับสายเลือดของโคพันธุ์ไฮสโตนของแม่โคที่ไม่มีพันธุ์ประวัติเหล่านี้ได้ จะสามารถช่วยแก้ไขปัญหาคาดข้อมูลที่จำเป็นในการวางแผนการปรับปรุงพันธุ์ได้ และยังสามารถใช้ป้องกันการปลอมแปลงพันธุ์ประวัติของแม่โคนมได้อีกด้วย

เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ (microsatellite marker) เป็นเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่นิยมใช้ในการศึกษาพันธุกรรมของสัตว์ โดยมีคุณสมบัติของการเป็นเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่ครบถ้วน ได้แก่ มีความหลากหลายของลักษณะจีโนไทป์ (Polymorphism) พหุสมควรร พบกระจายอยู่ทั่วไปตลอดทั้งจีโนม (Abundance) มีอิทธิพลการข่มแบบข่มร่วมกัน (Codominance หรือ Additive effect) สามารถตรวจสอบได้ง่ายโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ และต้องการดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจสอบเพียงเล็กน้อย

เท่านั้น (สุริพร, 2546) ผลปฏิบัติการที่ได้สามารถนำไปใช้ในการวิเคราะห์ได้เลย และสามารถทำซ้ำได้โดยผลไม่เปลี่ยนแปลง (จินตนา, 2553)

ปัจจุบันได้มีการศึกษาหาทางนำเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์มาใช้ในการจำแนกพันธุ์โคกันบ้างแล้ว ตัวอย่างเช่น MacHugh et al. (1997) ใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 20 เครื่องหมายในการจำแนกระหว่างโคยุโรป (*Bos taurus*) และโคอินเดีย (*Bos indicus*) Blott et al. (1999) ใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 20 เครื่องหมายในการจำแนกโคพันธุ์แท้ทั้งหมด 5 พันธุ์ได้แก่ Aberdeen Angus, Charolais, Holstein-Friesian, Hereford และ Simmental และจำแนกโคลูกผสมไฮสโตนที่ผสมกับโคเนื้อ 4 พันธุ์คือ Aberdeen Angus, Charolais, Hereford และ Simmental Cervini et al. (2006) ใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 10 เครื่องหมายในการจำแนกโคพันธุ์ Brazilian Nellore (*Bos indicus*) Citek et al. (2006) ใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 13 เครื่องหมายในการจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุ์โคในยุโรปตอนกลาง ได้แก่ พันธุ์ Czech Red, German Red, Czech Pied, Polish Red, Czech Black, Czech White, German Black และ German White Dalvit et al. (2008) ใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 21 เครื่องหมายในการจำแนกโคเนื้อพื้นเมืองอิตาลี 4 พันธุ์ ได้แก่ Chianina, Marchigiana, Romagnola และ Piemontese Machado et al. (2003) ใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 9 เครื่องหมายในการจำแนกโค 4 พันธุ์ ได้แก่ Gyr, Nellore, Guzarat และ Holstein เป็นต้น

แต่อย่างไรก็ตามพบว่าในขณะนี้ยังไม่มีรายงานวิจัยที่เกี่ยวกับการค้นพบเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ที่สามารถบ่งบอกถึงความแตกต่างของระดับสายเลือดในโคพันธุ์ผสมได้ เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ที่ใช้ศึกษาเกี่ยวกับการจำแนกพันธุ์นั้น อาจเป็นเครื่องหมายโมเลกุล

ไมโครแซทเทลไลต์ที่สามารถบ่งบอกถึงความแตกต่างของระดับสายเลือดในโคพันธุ์ผสมได้ ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ที่สามารถบ่งบอกถึงระดับสายเลือดที่แตกต่างกันในโคนมลูกผสมโฮลส์ไตน์ฟรีเซียนได้ โดยศึกษาจากเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ที่มีรายงานว่าสามารถจำแนกพันธุ์ได้

วิธีการศึกษา

ข้อมูลที่เก็บ

พันธุ์ประวัติของแม่โคนมลูกผสมโฮลส์ไตน์ฟรีเซียนจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสานวิทยาเขตสกลนครที่มีระดับสายเลือดพันธุ์โฮลส์ไตน์ตั้งแต่ 50%-100% โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 50%, 75% และ 100% กลุ่มละ 20 ตัวอย่าง โดยโคที่เป็นลูกผสมมีสายเลือดโคพันธุ์เรดซินดี้, อเมริกันบราห์มัน และชาร์โรเลส์ ผสมอยู่ด้วย แต่ไม่สามารถจำแนกเป็นรายตัวได้ว่ามีสายเลือดของโคพันธุ์เหล่านั้นอยู่ในสัดส่วนใดได้ชัดเจน

การเก็บตัวอย่างเลือด

เจาะเก็บตัวอย่างเลือดบริเวณโคนหางของแม่โคทั้ง 56 ตัว ตัวละ 10 ml เก็บตัวอย่างเลือดไว้ในหลอดที่เติม EDTA ไว้เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ - 20 °C ระหว่างที่รอนำไป

สกัดหา Genomic DNA ต่อไป การสกัด DNA ทำโดยวิธี Genomic DNA Mini Kit Fresh Protocol-Blood (Geneaid) ด้วยชุด kit ของ gene age biotech Co., Ltd.

การศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์

ทำการศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ที่สามารถบ่งบอกถึงความแตกต่างระหว่างโคพันธุ์ต่างๆ ได้จากรายงานการวิจัยต่างๆ จากนั้นคัดเลือกมาเพื่อใช้ในการศึกษาครั้งนี้ 10 เครื่องหมาย (Table 1) โดยทำการคัดเลือกจากเงื่อนไขดังต่อไปนี้

1. เป็นเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ที่พบว่ามีการใช้ในหลายงานวิจัย
2. มีความหลากหลาย (Polymorphism) ของอัลลีล หรือจีโนไทป์ ซึ่งสามารถตรวจสอบข้อมูลได้จากฐานข้อมูล UniSTS: Markers and Mapping data (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)
3. มีค่าเฮเทอโรไซโกซิตี (Heterozygosity) ที่สูง (>0.7) โดยคาดหวังว่าเมื่อนำเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์เหล่านั้นมาใช้กับประชากรนี้จะมีค่าสูงเช่นเดียวกัน
4. เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์นั้นๆ มีความสัมพันธ์หรือควบคุมลักษณะใดๆ ที่มีความสัมพันธ์กับระดับสายเลือด ซึ่งสามารถตรวจสอบข้อมูลได้จาก ฐานข้อมูล UniSTS: Markers and Mapping data (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

Table 1 Primer used for microsatellite genotyping

Markers	Primer information	Chromosome	Range (bp)	Heterozygosity
ILSTS096 ¹ (BOVILS96)	F: GTG ACC TGG AGA AGT TTT CC R: ACC ACG CTC TGA CTT GTA GC	3	192-208	0.862
BM4305 ²	F: CCA AGA CAT GAA AGC AAT CTG R: CTC TAG GTA CAT CCA TGT TGC A	14	148-168	0.861
TGLA126 ³	F: CTA ATT TAG AAT GAG AGA GGC TTC T R: TTG GTC TCT ATT CTC TGA ATA TTC C	20	116-122	0.760 - 0.847
TGLA122 ³	F: CCC TCC TCC AGG TAA ATC AGC R: AAT CAC ATG GCA AAT AGT ACA TAC	21	137-181	0.730-0.820
BMS2684 ⁴	F: CCA AAG TCA TTG TTG CAG C R: TGG GGA TTT GCT TCT CAG TC	15	80-110	0.740
BM2113 ⁵	F: GCT GCC TTC TAC CAA ATA CCC R: CTT CCT GAG AGA AGC AAC AAC	2	123-143	0.590-0.730
ETH225 ⁶	F: GAT CAC CTT GCC ACT ATT TCC T R: ACA TGA CAG CCA GCT GCT ACT	9	141-159	0.650-0.720
ETH3 ⁷	F: GGA CCT GCC TCT CCT GCA TTG G R: ACT CTG CCT GTG GCC AAG TAG G	19	105-125	0.650-0.710
BM1824 ⁸	F: GAG CAA GGT GTT TTT CCA ATC R: CAT TCT CCA ACT GCT TCC TTG	1	178-192	0.670-0.700
ETH152 ⁹ (BM43)	F: AGG GAG GGT CAC CTC TGC R: CTT GTA CTC GTA GGG CAG GC	5	157-169	0.510-0.700

¹ Thomas and Anikumar, 2008, ² Thomas and Anikumar, 2008, ³ Cervini et al. 2006; Dalait et al., 2008,

⁴ Machado et al., 2003, ⁵ Cervini et al., 2006; Blott et al., 1999; MacHugh et al.,1997; Karthickeyan et al., 2009, ⁶ Cervini et al., 2006; Blott et al., 1999; MacHugh et al.,1997; Karthickeyan et al., 2009; Dalvit et al., 2008, ⁷ Karthickeyan et al., 2009; Cervini et al., 2006; Dalvit et al., 2008, ⁸ Cervini et al., 2006; Dalvit et al., 2008, ⁹ Blott et al., 1999; MacHugh et al.,1997; Karthickeyan et al., 2009; Dalvit et al., 2008

นำเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ ที่ทำการคัดเลือกไปตรวจสอบความแตกต่างของแต่ละระดับสายเลือดด้วยเทคนิค PCR โดยเตรียมสารดังนี้ DNA Template 1µl, Forward primer 2 µl, Reverse primer 2 µl, DreamTaq™ Green PCR Master

Mix(2X) (Fermentas Life Sciences) 12.5 µl และ Water, nuclease-free 7.5 µl รวมทั้งหมด 25 µl

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุม อุณหภูมิตามวงรอบ (thermocycler) โดยมี รายละเอียดการตั้งโปรแกรมเครื่องดังแสดงใน Table 2

Table 2 Thermo-cycle used in each marker

Markers	cycle	thermo - cycle
ILSTS096	1 st	3 min at 94°C (denaturation)
TGLA126	2 nd -30 th	1 min at 94°C (denaturation) 1 min at 56°C (annealing) 1 min at 72°C (extension)
BM4305	1 st	3 min at 95°C (denaturation)
	2 nd -30 th	1 min at 95°C (denaturation) 1 min at 57°C (annealing) 1 min at 72°C (extension)
TGLA122	1 st	15 min at 95°C (denaturation)
BM1824	2 nd -30 th	35 s at 95°C (denaturation) 45 s at 57°C (annealing) 1 min at 72°C (extension)
BM2113	1 st	3 min at 94°C (denaturation)
	2 nd -30 th	1 min at 94°C (denaturation) 1 min at 58°C (annealing) 1 min at 72°C (extension)
ETH225	1 st	3 min at 95°C (denaturation)
	2 nd -30 th	30 s at 95°C (denaturation) 30 s at 59°C (annealing) 1 min at 72°C (extension)
ETH3	1 st	15 min at 95°C (denaturation)
	2 nd -30 th	45 s at 95°C (denaturation) 45 s at 63°C (annealing) 1 min at 72°C (extension)
BM1824	1 st	15 min at 95°C (denaturation)
	2 nd -30 th	35 s at 95°C (denaturation) 45 s at 61°C (annealing) 1 min at 72°C (extension)
BMS2684	-	No appropriate thermo – cycle found

การตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอ

ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ด้วยวิธีอะกาโรสเจล อิเล็กโตรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis) ที่ ความเข้มข้น 2% อะกาโรสเจล โดยใช้ผงอะกาโรสเจล

2 กรัม ละลายใน 0.5X TBE โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที นำแผ่นวุ้นไปตรวจดูแถบ ดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

การวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาหาความสัมพันธ์ของระดับสายเลือดกับเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์

ทำการหาความสัมพันธ์ของระดับสายเลือดกับเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 10 เครื่องหมายด้วยวิธีการ Binary Logistic Regression Analysis (Kaps and Lamberson, 2004) โดยใช้โปรแกรม SPSS ตามสูตรข้างล่าง

$$P_i = \frac{e^{n_i}}{1 + e^{n_i}}$$

$$n_i = \log \left[\frac{P_i}{1 - P_i} \right] = \beta_0 + \beta_1 X_1$$

เมื่อ : P_i = ความน่าจะเป็นของอัลลีลใดๆ และจีโนไทป์ใดๆ ที่มีความสัมพันธ์กับโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซียนที่ระดับสายเลือด 50%, 75% และ 100% โฮลสไตน์ซึ่งไม่ทราบพันธุ์ลูกผสมที่ชัดเจน

$e^{n_i} = \text{Exp}(\beta) =$ เป็นค่า odd ratio ที่เปลี่ยนแปลงเมื่อตัวแปรอิสระตัวที่ i มีค่าเพิ่มขึ้น 1 หน่วย

$\beta_0, \beta_1 =$ อิทธิพลเนื่องจากเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 10 เครื่องหมาย

$X =$ incidence matrix ที่แสดงการปรากฏของอิทธิพลเนื่องจากอัลลีล จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ทั้ง 10 เครื่องหมาย

การศึกษาหาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร

หาความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรโดยการหาค่าเฮเทอโรไซโกซิตี ซึ่งเป็นค่าที่แสดงถึงความถี่ของเฮเทอโรไซโกตต่อ 1 ตำแหน่งยีนที่ทำการศึกษา

$$\text{Observed Heterozygosity (Ho)} = \sum x_i / N$$

เมื่อ $Ho =$ ความถี่ของเฮเทอโรไซโกตต่อ 1 ตำแหน่งยีน ที่คำนวณจากข้อมูลจริง

$x =$ จำนวนของอัลลีลที่เป็นเฮเทอโรไซโกต

$N =$ จำนวนตัวอย่างทั้งหมด

ผลการศึกษา

ความถี่อัลลีลและจีโนไทป์ของแต่ละมาร์คเกอร์

ผลการหาความถี่อัลลีลและจีโนไทป์ของแต่ละมาร์คเกอร์ พบว่า ILST096 พบเพียงอัลลีล A อัลลีลเดียวจึงมีความถี่ของอัลลีล A และจีโนไทป์ AA สูงที่สุด BM4305 พบ 3 อัลลีล โดยมีความถี่ของอัลลีล A และจีโนไทป์ AA สูงที่สุด TGLA126, BM2113, ETH225 และ BM1824 พบ 2 อัลลีล โดยมีความถี่ของอัลลีล A และจีโนไทป์ AA สูงที่สุด TGLA122 พบ 3 อัลลีล โดยมีความถี่ของอัลลีล B และจีโนไทป์ BB สูงที่สุด ETH3 พบ 3 อัลลีล โดยมีความถี่ของอัลลีล A และจีโนไทป์ AC สูงที่สุด และ ETH152 พบ 2 อัลลีล โดยมีความถี่ของอัลลีล A และจีโนไทป์ AB สูงที่สุดดัง Table 3

Table 3 Allele frequency and genotype frequency of each marker in Holstein Friesian crossbred cows.

Markers	%HF	Allele frequency			Genotype frequency					
		A	B	C	AA	AB	BB	AC	BC	CC
ILSTS096	50	20	-	-	20	-	-	-	-	-
	75	20	-	-	20	-	-	-	-	-
	100	16	-	-	16	-	-	-	-	-
	All of HF	56	-	-	56	-	-	-	-	-
BM4305	50	19	2	0	18	1	1	0	0	0
	75	20	1	1	20	1	0	1	0	0
	100	15	0	2	13	0	0	2	0	0
	All of HF	54	3	3	49	2	1	3	0	0
TGLA126	50	18	1	-	18	0	1	-	-	-
	75	19	1	-	19	0	1	-	-	-
	100	16	0	-	16	0	0	-	-	-
	All of HF	53	2	-	53	0	2	-	-	-

Table 3 Allele frequency and genotype frequency of each marker in Holstein Friesian crossbred cows.
(Continued)

Markers	%HF	Allele frequency			Genotype frequency					
		A	B	C	AA	AB	BB	AC	BC	CC
TGLA122	50	5	18	1	1	4	14	0	0	1
	75	5	10	11	0	3	6	2	1	8
	100	8	6	13	0	2	1	6	3	4
	All of HF	18	34	25	1	9	21	8	4	13
BM2113	50	18	8	-	12	6	2	-	-	-
	75	16	4	-	16	0	4	-	-	-
	100	14	2	-	14	0	2	-	-	-
	All of HF	48	14	-	42	6	8	-	-	-
ETH225	50	20	5	-	15	5	0	-	-	-
	75	18	4	-	16	2	2	-	-	-
	100	16	0	-	16	0	0	-	-	-
	All of HF	54	9	-	47	7	2	-	-	-
ETH3	50	19	2	8	11	1	0	7	1	0
	75	20	0	3	17	0	0	3	0	0
	100	16	0	13	3	0	0	13	0	0
	All of HF	55	2	24	31	1	0	23	1	0
BM1824	50	20	1	-	19	1	0	-	-	-
	75	20	0	-	20	0	0	-	-	-
	100	16	0	-	16	0	0	-	-	-
	All of HF	56	1	-	55	1	0	-	-	-
ETH152	50	20	16	-	4	16	0	-	-	-
	75	17	14	-	5	12	2	-	-	-
	100	15	16	-	0	15	1	-	-	-
	All of HF	52	46	-	9	43	3	-	-	-

(-) = No allele or genotype found

ความสัมพันธ์ระหว่างระดับสายเลือดกับเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์

จากการวิเคราะห์ความน่าจะเป็นที่อัลลีลและจีโนไทป์ใดๆ ที่มีความสัมพันธ์กับระดับสายเลือด 50% ในโคนมลูกผสมไฮสไตน์ฟริเซียนในเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์แต่ละเครื่องหมาย พบว่ามีเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ 5 เครื่องหมายที่มีความหลากหลายของอัลลีล ได้แก่ BM2113, ETH152, ETH225, TGLA122 และ TGLA126 แต่มีเพียงอัลลีล B ของเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ TGLA122 เท่านั้นที่มีความสัมพันธ์กับระดับสายเลือด 50% ในโคนมลูกผสมไฮสไตน์ฟริเซียน โดยมีความน่าจะเป็น 91.83% ซึ่งเมื่อนำมาวิเคราะห์หาความน่าจะเป็นใน

รูปแบบจีโนไทป์พบว่าจีโนไทป์ BB มีความสัมพันธ์กับระดับสายเลือด 50% ในโคนมลูกผสมไฮสไตน์ฟริเซียน โดยมีความน่าจะเป็น 96% (Table 4)

จากการวิเคราะห์ความน่าจะเป็นที่อัลลีลและจีโนไทป์ใดๆ ที่มีความสัมพันธ์กับระดับสายเลือด 75% ในโคนมลูกผสมไฮสไตน์ฟริเซียน ในเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์แต่ละเครื่องหมาย พบว่ามีเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ 4 เครื่องหมายที่มีความหลากหลายของอัลลีล ได้แก่ BM4305, ETH3, ETH152 และ TGLA122 แต่ไม่พบว่ามีเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ใดๆ มีความสัมพันธ์กับระดับสายเลือดดังกล่าว (Table 5)

Table 4 Probability of alleles and genotype associated with 50% Holstein Friesian blood level in each marker *

markers	allele				genotype			
	allele	P-value	exp(β)	Prob(%)	genotype	P-value	exp(β)	Prob(%)
BM2113	A	0.499	1.800	64.286	AA	0.837	1.200	54.545
	B	0.060	3.333	76.921	AB	0.999	4.864	82.947
ETH152	A	0.999	1.010	50.249	AB	0.999	1.292	56.370
	B	0.755	0.800	44.444	BB	0.999	9.573	90.541
ETH225	A	0.999	9.503	90.479	AA	0.999	7.573	88.335
	B	0.185	2.667	72.730	AB	0.999	4.039	80.155
TGLA122	A	0.396	0.590	37.107	AA	1.000	1.939	65.975
	B	0.003	11.250	91.837	AB	0.068	9.600	90.566
	C	0.001	0.026	2.534	BB	0.005	24.000	96.000
TGLA126	A	0.281	0.257	20.446	AA	1.000	1.615	61.759
	B	0.672	1.842	64.814	BB	0.645	0.514	33.950

* Only markers that have polymorphism.

Table 5 Probability of alleles and genotype associated with 75% Holstein Friesian blood level in each marker *

markers	allele				genotype			
	allele	P-value	exp(β)	Prob(%)	genotype	P-value	exp(β)	Prob(%)
BM4305	A	0.999	9.503	95.030	AB	1	9.380	90.366
	B	0.930	0.895	89.500	AC	1	1.615	61.759
	C	0.930	0.895	89.500	BB	1	8.077	88.983
ETH3	A	1.000	9.231	92.310	AA	1	1.962	66.239
	C	0.004	0.126	12.600	AC	1	2.423	70.786
ETH152	A	0.127	0.162	13.941	AB	0.736	0.625	38.462
	B	0.087	0.292	22.601	BB	0.196	0.194	16.248
TGLA122	A	0.396	0.590	37.107	AB	0.200	0.312	23.780
	B	0.224	0.500	33.333	AC	0.115	0.208	17.219
	C	0.248	1.921	65.765	BB	0.064	0.250	20.000
					BC	0.223	0.208	17.219

* Only markers that have polymorphism.

จากการวิเคราะห์ความน่าจะเป็นที่อัลลีลและ จีโนไทป์ใดๆ มีความสัมพันธ์กับระดับสายเลือด 100% ในโคนมลูกผสมโฮสไตน์ฟรียันในเครื่องหมาย โมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์แต่ละเครื่องหมาย พบว่า มีเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ 3 เครื่องหมายที่มีความหลากหลายของอัลลีล ได้แก่ BM4305, ETH3 และ TGLA122 และพบว่าอัลลีล C ของเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ ETH3

และ TGLA122 มีสัมพันธ์กับโคนมโฮสไตน์ฟรียันที่มีระดับสายเลือด 100% ที่ความน่าจะเป็น 91.95% และ 90.99% ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำมา วิเคราะห์หาความสัมพันธ์ในรูปแบบจีโนไทป์ แล้ว ไม่พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ ทั้งสองเครื่องหมายมีสัมพันธ์กับโคนมโฮสไตน์ฟรียัน ที่มีระดับสายเลือด 100% แต่อย่างใด (Table 6)

Table 6 The probability of alleles and genotype to be associated with 100% Holstein Friesian blood level in each marker*

markers	allele				genotype			
	allele	P-value	exp(β)	Prob(%)	genotype	P-value	exp(β)	Prob(%)
BM4305	A	0.509	0.385	27.798	AA	0.999	2.61	72.299
	B	0.990	0.000	0.000	AB	1.000	5.834	85.367
	C	0.174	5.571	84.782	AC	1.000	1.000	50.000
ETH3	A	1.000	6.628	86.890	AA	1.000	1.731	63.383
	C	0.001	11.424	91.951	AC	1.000	2.100	67.742
TGLA122	A	0.076	3.000	75.000	AB	0.659	0.643	39.136
	B	0.029	0.257	20.446	AC	0.060	6.750	87.097
	C	0.001	10.111	91.000	BB	0.066	0.113	10.153
					BC	0.142	6.750	87.097

* Only markers that have polymorphism.

ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร

จากการคำนวณหาค่าเฮเทอโรไซโกซิตี (Ho) พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ ETH152 มีความหลากหลายที่สูงพอสมควร และสูงที่สุดในกลุ่มเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ที่ศึกษา ส่วนเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ BM1824, BM2113, BM4305, ETH3, ETH225, ILST096, TGLA122 และ TGLA126 มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ต่ำมาก (Table 7)

Table 7 Number of alleles and observed heterozygosity (Ho) in each marker.

Marker	No. alleles	Ho
BM1824	2	0.018
BM2113	2	0.107
BM4305	3	0.089
ETH3	3	0.429
ETH152	2	0.768
ETH225	2	0.125
ILST096	1	0.000
TGLA122	3	0.304
TGLA126	2	0.000

สรุปและวิจารณ์

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระดับสายเลือดกับเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ TGLA122 มีความเป็นไปได้ที่จะใช้บ่งบอกโคเนมลูกผสมโฮสไดน์ฟรีเซียนที่มีระดับสายเลือด 50% ได้ โดยมีความน่าจะเป็นของอัลลีล B และจีโนไทป์ BB เท่ากับ 91.83% และ 96% ตามลำดับ แต่ไม่พบว่ามีเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ใดๆ ทั้ง 10 เครื่องหมายที่ศึกษาจะใช้บ่งบอกโคเนมลูกผสมโฮสไดน์ฟรีเซียนที่มีระดับสายเลือด 75% และ 100% ได้อย่างไรก็ตาม

การศึกษานี้ไม่พบความหลากหลายของอัลลีล ซึ่งสอดคล้องกับที่พบว่าความถี่ของเฮเทอโรไซโกซิตีต่ำ สัตว์ที่ได้ทำการผสมตัวอย่างมา อาจไม่มีส่วนของเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์นั้นๆ และเงื่อนไขที่ใช้ในการเลือกเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์อาจยังไม่สมบูรณ์ ทำให้พบเครื่องหมายที่ไม่สามารถตรวจสอบระดับสายเลือดได้ ผลการศึกษาในครั้งนี้จึงพบเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลต์ที่จะนำไปใช้ในการตรวจสอบระดับสายเลือดเพียงเล็กน้อย แต่อย่างไรก็ตามสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานและสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงเพื่อพัฒนาต่อไปในการแสวงหาเครื่องหมาย

โมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ที่สามารถตรวจสอบระดับสายเลือดได้ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาต่อไปโดยใช้จำนวนตัวอย่างให้มากขึ้นเพื่อเพิ่มโอกาสการค้นพบความหลากหลาย ควรปรับเงื่อนไขการเลือกใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ให้มีความสมบูรณ์ เช่น ควรเลือกเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ที่มีการใช้จำแนกพันธุ์ที่เป็นลูกผสมกับโฮสต์ไคนฟรีย์เซียนในประชากรที่ศึกษา และอาจนำเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ที่พบว่ามีความเป็นไปได้ในการบ่งบอกระดับสายเลือดจากการศึกษานี้ไปทดลองศึกษากับเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์เครื่องหมายอื่นๆ ร่วมด้วย เพื่อให้ได้เป็นกลุ่มของเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ทั้งนี้เพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นในการค้นพบเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ที่สามารถใช้ในการตรวจสอบระดับสายเลือด

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี วิทยาเขตสกลนคร ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลและการเก็บตัวอย่างเลือด และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ใช้ห้องปฏิบัติการเพื่อการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด

เอกสารอ้างอิง

- กัลยา เก่งวิทยกรรม, ณรงค์กร เกษมสุข และ วิบูรณ์ ตูลารักษา. 2549. การประเมินพันธุกรรมของคำไฮมาติเซลลินน้ำนมของโคนมลูกผสมไทยโฮสต์ไคน. ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทยการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 32. หน้า 173-178.
- จินตนา ประคูกาญญา. 2553. DNA กับงานนิติเวชศาสตร์ (DNA applications in forensic medicine). portal.in.th/files/5/3/1/2010/02/04/Book09_7.pdf. ค้นเมื่อ 17 ธันวาคม 2553.
- วิชัย ทิพย์วงศ์. 2547. การประมาณค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมของลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ในโคนมลูกผสมโฮสต์ไคนฟรีย์เซียน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตมหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สมเกียรติ ประสานพานิช, ชลดา รัตนวิเชียร และ พิระ ไชยรัตน์. 2542. ผลผลิตและการสืบพันธุ์ของโคนมโฮสต์ไคนฟรีย์เซียนระดับเลือดต่างๆ ภายใต้การเลี้ยงขององค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37 สาขาสัตวแพทยศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุริพร เกตุงาม. 2546. เครื่องหมายดีเอ็นเอในงานปรับปรุงพันธุ์พืช (DNA Markers in Plant Breeding). วารสารวิชาการ ม.อ.บ. มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี. ปีที่ 5 ฉบับที่ 2. หน้า 36-59.
- Blott, S. C., J. L. Williams, and C. S. Haley. 1999. Discriminating among cattle breeds using genetic markers. *Heredity*. 82:613-619.
- Cervini, M., F. Henrigue-Silva, N. Mortari, and E. Matheucci. 2006. Genetic variability of 10 Microsatellite markers in the characterization of Brazilian Nelore cattle (*Bos indicus*). *Genetics and Molecular biology*. 29:486-490.
- Citek, J., L. Panicke, V. Rehout, and H. Prochazkova. 2006. Study of genetic distances between cattle breeds Central Europe. *Czech J. Anim. Sci.* 51:429-436.
- Dalvit, C., M. De Marchi, R. Dal Zotto, M. Gervaso, T. Meuwissen, and M. Cassandro. 2008. Breed assignment test in four Italian beef cattle breed. *Meat Sci.* 80:389-395.
- Kaps, M., and W.R. Lamberson. 2004. *Biostatistics for animal science*. CABI Publishing. UK. P.395-396.
- Karthickeyan. S. M. K., S. N. Sivaselvam, R. Selvam, and P. Thangaraju. 2009. Microsatellite analysis of Kangayam cattle (*Bos indicus*) of Tamilnadu. *Indian Journal of Science and Technology*. Vol.2 No.10
- Machado, M. A., I. Schuster, M. L. Martinez, and A. L. Campos. 2003. Genetic Diversity of four cattle breed using microsatellite markers. *R. Bras. Zootec.* 32:93-98.
- MacHugh, D. E., M. D. Shriver, R. T. Loftus, P. Cunningham, and D. G. Bradley. 1997. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos Taurus* and *Bos indicus*). *Genetics*. 146:1071-1086.
- Thomas. N., and K. Anilkumar. 2008. Genetic characteristics of five microsatellite markers associated with Milk production traits in crossbred dairy cattle of Kerala. *Veterinary World*. 1:245-247.
- Veerkamp, R. F., E. P. C. Koenen, and G. DeJong. 2001. Genetic correlation among body condition score, yield, and fertility in first-parity cows estimated by random regression models. *J. Dairy Sci.* 84:2327-2335