

แนวทางการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม ในสัตว์พื้นเมือง

The Way to Study Genetic Diversity in Local Animals

ศิริลักษณ์ พรสุขศิริ "

Siriluck Pornsuksiri "

Abstract : Genetic diversity is the major requirement of any progress in animal breeding. Genetic diversity in commercial line is limited by selection for production traits. Thus, before the genetic diversity, which still maintain in the nature in the form of local animals, will be extinguish. The way in the conservation of genetic diversity and the marker for studying both at the protein and DNA level are proposed.

บทคัดย่อ : ความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นปัจจัยที่สำคัญซึ่งนำไปสู่การปรับปรุงพันธุ์ แต่ความหลากหลายทางพันธุกรรมในสัตว์สายพันธุ์ทางการค้าถูกจำกัดโดยการคัดเลือกพันธุ์ที่เน้นลักษณะทางผลผลิต ฉะนั้นเพื่อมิให้ความหลากหลายทางพันธุกรรมซึ่งอยู่ในรูปสัตว์พื้นเมืองต่าง ๆ ที่ยังคงหลงเหลือในธรรมชาตินั้นต้องสูญหายไป บทความนี้จึงเสนอแนะหนทางในการอนุรักษ์ และวิธีการหรือตัวบ่งชี้ที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมเหล่านั้นไม่ว่าจะเป็นวิธีการที่ศึกษาในระดับโปรตีน หรือระดับ DNA

Index words : ความหลากหลายทางพันธุกรรม, ตัวบ่งชี้ระดับโปรตีน, ตัวบ่งชี้ระดับ DNA, Genetic diversity, Protein markers, DNA markers

" ภาควิชาสัตวศาสตร์, คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่ 50200

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University. 50200.

บทนำ

ความหลากหลายทางชีวภาพเป็นปัจจัยหนึ่งซึ่งนำไปสู่การปรับปรุงพันธุ์ในสัตว์เศรษฐกิจพันธุ์ต่าง ๆ ผลผลิตที่ได้จากสัตว์เหล่านี้ไม่ว่าจะเป็นเนื้อ นม ไข่ ขน หนัง หรือแม้แต่การใช้แรงงาน เหล่านี้ส่วนใหญ่มาจากสัตว์ประมาณ 30 - 40 สายพันธุ์ แต่ยังมีสัตว์สายพันธุ์ต่าง ๆ อีกมากมาย ซึ่งถูกละเลยและกำลังจะสูญพันธุ์ไป ซึ่งสัตว์สายพันธุ์ต่าง ๆ เหล่านี้ส่วนใหญ่จะเป็นสัตว์พื้นเมือง ซึ่งยังคงมีอยู่ในประเทศที่กำลังพัฒนาทั้งหลาย

ทำไมเราต้องปกป้องและรักษาสัตว์พื้นเมืองเหล่านี้ ในเมื่อผลผลิตที่ได้จากสัตว์เหล่านี้ ถ้าเทียบกับสัตว์สายพันธุ์ทางการค้าแล้วจะให้ผลผลิตน้อยกว่ามาก ก่อนอื่นเราต้องเข้าใจว่าในปัจจุบันจำนวนประชากรโลกได้เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจะมีวิธีการอย่างไรในการเพิ่มผลผลิตต่าง ๆ ให้มากขึ้นในอนาคตเพื่อให้ทันกับการเพิ่มของจำนวนประชากร ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นแล้วว่าความหลากหลายทางชีวภาพเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ความหลากหลายทางชีวภาพในสัตว์สายพันธุ์ทางการค้าได้ถูกจำกัดโดยการคัดเลือกพันธุ์ที่เน้นในเรื่องของผลผลิตไม่ว่าจะเป็น เนื้อ นม หรือไข่ ซึ่งการคัดเลือกดังกล่าวอาจทำให้ความหลากหลายทางชีวภาพในด้านอื่น ๆ ลดลงได้หรือพันธุกรรมของบางลักษณะถูกคัดทิ้งไป ซึ่งลักษณะที่ถูกคัดทิ้งไปเหล่านี้อาจเป็นประโยชน์ ต่อไปในอนาคต เช่น ความต้านทานโรค หรือความอยู่รอด และความทนทานในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ หรือความต้องการทางด้านอื่น ซึ่งยังคาดคะเนไม่ถึงในอนาคต ดังนั้นจึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ความหลากหลายทางชีวภาพเหล่านี้ต้องได้รับการรักษาไว้

ความหลากหลายทางพันธุกรรมเหล่านี้เป็นผลจากการเกิดมิวเตชัน (Franklin, 1981; Hill and Keighley, 1988) ซึ่งสะสมและผ่านขบวนการวิวัฒนาการอื่นที่ยาวนาน จนสามารถจำแนกออกเป็นกลุ่ม พวก สายพันธุ์ หรือพันธุ์ ดังนั้นการสูญเสียความหลากหลายเหล่านี้ไป ย่อมหมายถึงการสูญพันธุ์ของสัตว์เหล่านั้น และไม่สามารถที่จะทำให้เกิดขึ้นใหม่ได้

การลดความหลากหลายทางชีวภาพ ซึ่งแสดงออกในรูปของการลดหรือสูญพันธุ์ของสัตว์บางชนิดหรือสายพันธุ์นั้นได้มีองค์กรต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นองค์กรภายในประเทศหรือต่างประเทศ เช่น FAO ได้มีกิจกรรมต่อเนื่องตั้งแต่ปี 1980 (FAO, 1981) ในการจัดตั้งโปรแกรมการจัดการและอนุรักษ์ไว้ซึ่งความหลากหลายในทางด้านพันธุกรรมหรือทางชีวภาพในสัตว์พันธุ์หรือชนิดต่าง ๆ (Animal genetic resources) จุดใหญ่ที่ FAO เน้นก็คือการอนุรักษ์ไว้ซึ่งพันธุ์เก่าแก่ดั้งเดิม การคงไว้ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรม และการปรับปรุงพันธุ์สัตว์เหล่านั้น (FAO, 1992)

แนวทางในการอนุรักษ์

จุดหลักของทรัพยากรทางพันธุกรรมที่จะเน้นถึงคือ พันธุ์ สายพันธุ์ หรือกลุ่มประชากรที่แตกต่างกัน ตามภูมิภาคพื้นที่ ในความหมายของพันธุ์ หรือสายพันธุ์ ในประเทศที่พัฒนาแล้วจะหมายถึง กลุ่มประชากรที่มีลักษณะพิเศษเฉพาะร่วมกัน ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างจากกลุ่มประชากรอื่นได้ แต่สำหรับในประเทศที่กำลังพัฒนา ความหมายของพันธุ์ หรือสายพันธุ์ยังไม่ชัดเจน เช่น ประชากรอาจจะแบ่งแยกตามภูมิภาคพื้นที่ ประชากรหรือสัตว์เหล่านี้ก็จะถูกเรียก

ชื่อแตกต่างกันไป ทั้ง ๆ ที่บางครั้งรูปร่างลักษณะต่าง ๆ อาจจะคล้าย ๆ กัน หรือในทางตรงข้ามรูปร่างต่าง ๆ อาจจะแตกต่างกันไป แต่ชื่อที่เรียกตามพื้นบ้านเหล่านั้นก็ไม่ได้เปลี่ยนแปลงไป ฉะนั้น เพื่อเข้าใจเป็นอันหนึ่งอันเดียวกัน จะใช้คำว่า พันธุ์ เป็นความหมายรวม ๆ ถึง สายพันธุ์ หรือกลุ่มประชากร ซึ่งแตกต่างกันตามภูมิภาคพื้นที่หรือจุดประสงค์ในการใช้งาน

เนื่องจากจำนวนพันธุ์สัตว์ชนิดต่าง ๆ นั้นมีมากมายการที่จะตัดสินใจว่าจะคัดเลือกพันธุ์ไหนในการอนุรักษ์ หรือคงไว้นั้นก็มีแนวทางในการตัดสินใจมากมาย ยกตัวอย่าง เช่น ในโลกที่พัฒนาแล้วการตัดสินใจอาจพิจารณาจากเหตุผลทางด้านเศรษฐกิจ หรือเป็นพันธุ์ที่หายากและกำลังจะสูญพันธุ์ หรืออาจทดสอบจากความต้องการของตลาด แต่สำหรับในประเทศที่กำลังพัฒนามีพันธุ์สัตว์หลายชนิดที่กำลังถูกคุกคาม เนื่องจากความไม่สามารถแบ่งแยกความแตกต่างของแต่ละพันธุ์ให้ชัดเจน หรือเกิดจากนโยบายส่งเสริมการผสมข้ามพันธุ์ ซึ่งทำให้ลักษณะพันธุ์แท้ ๆ ดั้งเดิมหายไป หรืออาจเนื่องมาจากความไม่แน่นอน หรือความไม่ชัดเจนของนโยบายรัฐบาลในการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์

อย่างไรก็ตาม FAO ได้ให้ข้อเสนอแนะโดยทั่ว ๆ ไปถึงการตัดสินใจที่จะอนุรักษ์หรือคงไว้ซึ่งพันธุ์ไหนนั้น ไม่ควรเน้นเฉพาะเหตุผลทางด้านประโยชน์ในปัจจุบันเท่านั้น แต่ควรจะต้องพิจารณาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมที่มากที่สุด (Maximum genetic diversity) ในสัตว์แต่ละประเภทด้วย ทั้งนี้เพื่อกำหนดถึงความต้องการในอนาคตที่ยังคาดคะเนไม่ถึง

การคำนวณความหลากหลายทางพันธุกรรม (Measures of genetic diversity)

วิธีการวัดความหลากหลายทางพันธุกรรมที่นิยมใช้กันมากแบ่งออกเป็น 2 ระดับด้วยกัน คือการวัดความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรภายในสัตว์สายพันธุ์เดียวกัน (Genetic variation within populations) และการวัดระยะห่างทางพันธุกรรมของสัตว์ระหว่างสายพันธุ์ (Genetic distance between populations) การวัดความแปรปรวนทางพันธุกรรม สามารถวัดได้จากข้อมูลจากตัวบ่งชี้ (Marker) ได้ ในหลายระดับเช่น ในระดับผลผลิตของยีน (กรู๊ปเลือดหรือโปรตีน) หรือในระดับยีน (DNA level) ซึ่งในแต่ละระดับก็จะมีความสามารถในการแยกแยะได้ต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น เมื่อเรานำสัตว์พันธุ์เดียวกันมาวิเคราะห์หากรู๊ปเลือดหรือโปรตีน โอกาสที่สัตว์เหล่านี้จะมีกรู๊ปเลือดหรือโปรตีนที่เหมือนกันจะมีมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ ในระดับ DNA ซึ่งหมายถึงระดับ Polymorphism ของตัวบ่งชี้ (Marker) จะแตกต่างกัน

ตัวบ่งชี้ที่ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม (Markers for studying genetic diversity)

วิธีการต่าง ๆ ที่นำมาประยุกต์ใช้ในการหาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่จะเห็นในที่นี้คือ Protein electrophoresis, Mitochondrial DNA และ High variable nuclear DNA sequence ซึ่งรวมเทคนิคต่าง ๆ หลายเทคนิคเช่น Restriction fragment length polymorphism (RFLP), DNA fingerprinting, และ Microsatellite

1. Protein electrophoresis

ในช่วง 30 ปีที่ผ่านมาวิธีการทาง Protein electrophoresis เป็นวิธีการที่ใช้มากในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมไม่ว่าในพืชหรือสัตว์ เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ไม่แพง สามารถใช้ศึกษาตัวอย่างประชากรได้มาก การตีความหรืออ่านแบน (Band) ได้ง่าย นอกจากนี้ยังสามารถพิสูจน์ได้ว่าการถ่ายทอดตามกฎเมนเดล อย่างไรก็ตาม Marker ตัวนี้มีข้อเสียอยู่ หลายประการ เช่น ไม่สามารถ Detect alleles ได้มาก หรือระดับ Polymorphisms ที่ Detect ได้ต่ำเนื่องจากการวัดในระดับนี้เป็น การวัดระดับผลผลิตของยีน (Post translation) นอกจากนี้ยังขึ้นกับเนื้อเยื่อ อายุ และปัจจัยอื่น ๆ

ตัวอย่างการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ใช้ในสัตว์พันธุ์ต่าง ๆ โดยเฉพาะในพวกสัตว์ป่าหายาก O'Brien และคณะ (1985, 1987a) ได้ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมในเสือแฉ่ว (*Acinonyx julatus*) พบว่าทุก loci ที่ศึกษาจะเป็น Monomorphicหมด ซึ่งแสดงว่าสัตว์ป่าพวกนี้มีสายเลือดชิดค่อนข้างสูง ซึ่งถ้าใช้วิธีการทาง Protein electrophoresis อย่างเดียวศึกษา จะไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ สำหรับในสัตว์ปีกก็มีผู้ศึกษาถึงกลุ่มเลือด (Hashiguchi et al., 1970; Washburn, 1968) และโปรตีนจากไข่ (Baker, 1968; Washburn, 1979) ในการหาความแปรปรวนทางพันธุกรรมในไก่สายพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งส่วนใหญ่พบว่าเมื่อใช้ Marker ดังกล่าวความแปรปรวนจะต่ำหรือไม่มี Polymorphism

นอกจากการใช้ Protein electrophoresis ในการหาความแปรปรวนทางพันธุกรรมแล้วยังใช้หาระยะห่างทางพันธุกรรมในไก่สายพันธุ์ต่าง ๆ

ว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างไร เช่น Hashiguchi et al., (1981) ศึกษาโปรตีนของกลุ่มเลือดจำนวน 18 loci ในไก่ 15 สายพันธุ์ จากจำนวนโปรตีนของกลุ่มเลือด 18 Loci ที่ศึกษา พบว่ามีเพียง 8 Loci เท่านั้นที่ Polymorphism ซึ่งได้แก่ Plasma esterase (Eo-1), Plasma anylase (Ang - 1), Plasma alkaline phosphatase (Akp-akp; Akp-2), plasma albumin (Alb), Plasma transferrin (Tf), Erythrocyte 6-phosphogluconate dehydrogenase (6-PGD) และ Erythrocyte esterase (ES-8) อีก 10 Loci ที่เหลือจะเป็น Monomorphic ระยะห่างทางพันธุกรรมที่ประเมินได้แสดงให้เห็นว่าไก่ป่าสีเทา (Grey Jungle Fowl) และ ไก่ป่าซีลอน (Ceylonese Jungle Fowl) มีความใกล้ชิดกันมากกว่าเมื่อเทียบกับ ไก่ป่าสีแดง (Red Jungle Fowl) หรือไก่ป่าสีเขียว (Green Jungle Fowl) สำหรับทางเอเชีย Shiu et al (1992) ได้ศึกษาโปรตีนของกลุ่มเลือด 4 loci และกลุ่มเลือดกรุป B ในไก่จำนวน 419 ตัวจาก 6 สายพันธุ์ของไก่พันธุ์พื้นเมืองได้หวัน และศึกษาเปรียบเทียบกับไก่พันธุ์เล็กฮอร์น, ซิลกี้, สเกลเล็ค, นาโกย่า และบาร์พลีมัธร็อค พบว่าไก่พันธุ์พื้นเมืองของได้หวัน มีความใกล้ชิดกับไก่พันธุ์ซิลกี้ และสเกลเล็คมากกว่าสายพันธุ์อื่น Ma และ Lu (1993) ศึกษาโปรตีนจากกลุ่มเลือดจำนวน 5 Loci ในไก่พื้นเมือง รายงานว่าระยะห่างทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองในเอเชียจะต่ำ

2. Mitochondrial DNA (mtDNA)

ถึงแม้การศึกษาความหลากหลาย โดยวิธีศึกษาจาก Mitochondrial DNA จะเป็นวิธีที่แพง และต้องการความชำนาญมากกว่าการศึกษาจาก Protein electrophoresis แต่วิธีนี้จะมีลักษณะเฉพาะพิเศษที่ใช้ประมาณความแปรปรวนทางพันธุกรรม

ทั้งภายในและระหว่างสายพันธุ์ได้ดี

สำหรับข้อได้เปรียบของการใช้ mtDNA คือจะมีการถ่ายทอดผ่านเฉพาะทางแม่เท่านั้น (Maternally inherited) ดังนั้นจะไม่มี Recombination เกิดขึ้น ซึ่งหมายความว่าเราสามารถย้อนหาต้นกำเนิดทางสายแม่ได้ในประชากรที่ศึกษา นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการทดแทนนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide substitution) สูงกว่า Nuclear DNA 5 ถึง 10 เท่า เนื่องจาก mtDNA มีอัตราการวิวัฒนาการและ Polymorphism สูง ฉะนั้นจึงสามารถใช้ mtDNA ในการตรวจเช็คสภาพโครงสร้างของประชากรหรือความแปรปรวนทางพันธุกรรมของประชากรซึ่งมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน เมื่อ Protein electrophoresis ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้

ลักษณะทั่ว ๆ ไปของ mtDNA ในสัตว์จะมีลักษณะเป็นวงกลมปิดโดยปกติมีความยาวประมาณ 15 - 20 กิโลเบสและประกอบด้วยยีนต่าง ๆ ที่ควบคุมขบวนการหายใจ

ในการวิเคราะห์ Restriction fragment length polymorphism (RFLP) ของ mtDNA โดยใช้เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ในการตัด วิธีการนี้สามารถประยุกต์ใช้และให้ผลสำเร็จมาแล้วในการศึกษาความสัมพันธ์และวิวัฒนาการของสัตว์หลายชนิดด้วยกัน คือ แพะและแกะ (Upholt and David, 1977) หนู (Hayashi et al., 1979), หนู (Watanabe et al., 1985), สัตว์ปีก (Glaus et al., 1980) และปลา (Graves et al., 1984 ; Bermingham et al., 1991)

สำหรับในสัตว์ปีก Glaus et al (1980) และ

Wakana et al (1986) ได้ศึกษา mtDNA จากไก่สายพันธุ์ต่าง ๆ 15 สายพันธุ์ โดยใช้เอนไซม์ (Restriction endonucleases) 11 ชนิดในการตัดสาย mtDNA พบว่าในไก่ 14 สายพันธุ์ Pattern ต่าง ๆ ของ Fragment ที่ได้จะเหมือนกัน ยกเว้นไก่พันธุ์เล็กฮอร์น (Leghorn) จากการใช้เอนไซม์ MspI ตัด ซึ่ง Wakana et al (1986) ยืนยันว่าการที่ไก่พันธุ์เล็กฮอร์นแตกต่างจากสายพันธุ์อื่น เนื่องจาก Genetic drift (ขนาดประชากร) และการคัดเลือกที่มุ่งลักษณะใดลักษณะหนึ่ง และจากการศึกษาดังกล่าว ทั้ง Glaus et al (1980) และ Wakana et al (1986) ก็ยืนยันว่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมในไก่สายพันธุ์ต่าง ๆ ต่ำมาก เมื่อศึกษาด้วย mtDNA ซึ่งก็เป็นเรื่องไม่น่าแปลกเมื่อพบว่า mtDNA ของไก่ป่าสีแดง (Red Jungle fowl) ก็มี Restriction map เหมือนกัน จากการค้นพบนี้ให้ข้อสรุปว่าต้นตระกูลของไก่ปัจจุบันนี้มาจากไก่ป่าสีแดงเท่านั้น

3. Highly variable nuclear DNA

ในยีนอมของสัตว์ชั้นสูงทุกชนิดสามารถแบ่งรหัสทางพันธุกรรม (Sequence) อย่างคร่าว ๆ ตามหน้าที่เป็น 2 ชนิดคือ Coding sequence กับ Noncoding sequence, Coding sequence จะเป็นรหัสทางพันธุกรรมที่ถูกถอดและแปลข้อความเป็นกรดอะมิโนและโปรตีนชนิดต่างๆ และระดับการแสดงออก (Expression) ของยีนเหล่านี้จะขึ้นกับเนื้อเยื่อและระยะเวลาสำหรับ Noncoding sequence จะประกอบด้วย รหัสทางพันธุกรรมที่ส่วนใหญ่ไม่มีหน้าที่ใด ๆ และ รหัสดังกล่าวจะไม่ถูกถอดหรือแปลข้อความ ซึ่งรหัสดังกล่าวอาจอยู่เดี่ยว ๆ (Single copy) หรือเกิดขึ้นซ้ำ ๆ กันหลายครั้ง (Multiple copies) ซึ่งบางครั้งอาจเรียกว่า Repetitive DNA

3.1 Coding DNA Sequence

ความผันแปรระหว่างยีนในลำดับ DNA สามารถแสดงได้โดย Restriction fragment length polymorphism (RFLP) โดยทั่ว ๆ ไป จะหมายถึงการใช้เอนไซม์ (Restriction enzymes) ในการตัด DNA ซึ่งเอนไซม์ แต่ละชนิดจะตัดเฉพาะจุด (Recognized site) DNA ที่ถูกตัด (Fragment) จะถูกนำไปแยกใน Gel electrophoresis ตามขนาดความยาว หลังจากนั้น DNA fragment จะถูกย้ายไปยังแผ่น Nylon โดยวิธี Southern blot (Southern, 1975) ซึ่ง DNA ในแผ่น nylon ดังกล่าวอยู่ในสายคู่ก็จะถูกแยกออกด้วยด่าง จากนั้นจะนำ Probes ซึ่งอาจ Label ด้วยสารกัมมันตรังสีหรือ สารอื่น ๆ ที่ไม่ใช้กัมมันตรังสี มาจับกับสาย DNA ที่ถูกแยกจากกัน ขั้นตอนสุดท้ายจะเป็นขั้นตอน การ Detect fragment ดังกล่าว เนื่องจากปัจจุบันนี้มีเทคนิคที่เรียกว่า Polymerase Chain Reaction (PCR) การทำ RFLP ไม่จำเป็นต้องใช้เทคนิคอย่าง Southern blot หรือการใช้ probes มาเป็นตัวจับ เพียงแค่ทราบ primer ของยีนที่สนใจ ผ่านขบวนการขยายรหัสทางพันธุกรรม (PCR) ผลจาก PCR ถูกนำมาทดสอบตัดกับ Restriction enzyme ชนิดต่าง ๆ แล้วนำไปแยก Fragment ใน Gel ซึ่งมีสาร Ethidium Bromide อยู่ ก็สามารถมองเห็น Fragment เมื่อผ่านแสงยูวี (UV light) เหตุผลที่ทำให้เกิด RFLP คือ เมื่อเกิดมิวเตชันที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งในรหัสทางพันธุกรรม เอนไซม์ที่ใช้ตัดซึ่งมีจุดตัดเฉพาะก็อาจจะตัดหรือไม่ตัด ตำแหน่งเดิมซึ่งจะทำให้ Fragment ที่ได้สั้นยาวต่างกัน นอกจากนี้ อาจเกิดจากขบวนการเพิ่ม หรือลดของรหัสทางพันธุกรรมเดิม ซึ่งจะทำให้ Fragment ที่ได้ สั้นยาวต่างกัน

RFLP ใน Coding DNA Sequence จะแสดงระดับของ Polymorphism ต่ำแต่ก็มากกว่าเมื่อวิเคราะห์จากโปรตีนในตำแหน่งเดียวกัน การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยใช้ RFLP พบมากในคน โดยเฉพาะยีนที่ควบคุมฮีโมโกลบิน (Haemoglobin) และระบบภูมิคุ้มกัน (Major histocompatibility complex, MHC) (Summers, 1987) สำหรับ RFLP ในสัตว์เลี้ยงจะพบรายงานใน วัวและแกะ ในสัตว์ปีกจะมีรายงานน้อย (Bulfield, 1990)

3.2 Noncoding DNA sequence

Noncoding DNA sequence แบ่งได้เป็นสองส่วนตามจำนวน DNA copies คือ Single copy DNA กับ Multiple copy DNA หรือบางครั้งเรียกว่า Repetitive sequence จุดที่จะนำไปใช้ในเทคนิคต่าง ๆ ในที่นี้ คือ Tandemly repetitive sequence คือ รหัสทางพันธุกรรมที่เหมือนกันหรือคล้ายกัน เกิดขึ้นซ้ำ ๆ หลาย ๆ ครั้งโดยรหัสเหล่านี้จะอยู่เรียงกันไป Tandemly repetitive sequence สามารถแบ่งออก เป็น 3 กลุ่ม คือ Classical satellites, Minisatellites และ Microsatellites ที่จะนำมาใช้ประโยชน์และกล่าวถึงในที่นี้คือ

3.2.1 Minisatellites คือ กลุ่มของรหัสพันธุกรรมที่คล้ายกันเกิดขึ้นซ้ำ ๆ หลายครั้งและอยู่เรียงกันไป โดยจะมีรหัสร่วมหรือเรียกว่า "Core" sequence ประมาณ 16-33 คู่ Polymorphism ที่เกิดขึ้นเนื่องจากจำนวน Repeat units ที่ต่างกัน โดยเอนไซม์ที่ใช้ตัดจะตัดนอกบล็อกลูกของ Tandem repeats ฉะนั้นความผันแปรที่เกิดขึ้น เนื่องจากจำนวน Repeat ที่ต่างกัน หรือบางครั้งเรียก Variable number of tandem repeats (VNTR)

เทคนิคในการทำ DNA Fingerprints

คล้าย RFLP เพียงแต่เลือกเอ็นไซม์ที่ใช้ตัดที่
ตัดเฉพาะบริเวณนอกบล็อกของ Tandem repeats
หรือเอ็นไซม์ที่เหมาะสมและ Probe ที่ใช้จะเป็น
"Polycore" probe (Minisatellite probe) probe
นี้จะจับไม่เฉพาะที่ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง แต่จะ
จับทั่วไปในบริเวณที่มี Tandem repeats (Multiple
loci) Patterns ที่ได้ภายหลังการ Detect fragment
จะอยู่ในลักษณะคล้ายบาร์โค้ด (Genetic "finger-
print") (Jeffreys et al., 1985) อย่างไรก็ตาม ตามที่
ได้กล่าวมาแล้วการใช้เทคนิค DNA fingerprints
มีปัญหาเรื่องไม่สามารถแยกได้ว่า Alleles ใดขึ้นกับ
Locus ไหน ฉะนั้น แทนที่จะใช้ Probes ที่เป็น
Multilocus probes ก็หันมาใช้ Probes ที่เฉพาะ
เจาะจงสำหรับ Locus ใด Locus หนึ่ง ซึ่ง Probe
ดังกล่าวจะ Detect เพียง 1 หรือ 2 Fragments
เท่านั้น

3.2.2 Microsatellites หรือ Simple
repetitive DNA sequence คือกลุ่มของรหัส
พันธุกรรมที่คล้ายกันเกิดขึ้นซ้ำ ๆ หลายครั้ง
และเป็นรหัสสั้น ๆ ซึ่ง Tandemly repeated units
ยาวตั้งแต่ 2 ถึง 10 คู่เบส (Epplen, 1988) ในการ
ทำ DNA Fingerprints Probes ที่ใช้นอกจาก
Minisatellite probes ยังสามารถใช้ Microsatellites
probes แทนได้ Microsatellites probes ที่ใช้
ยกตัวอย่างเช่น (CA)_n, (GGAT)_n, (GACA)_n
หรือ (CAC)_n เป็นต้น สำหรับ Probes ชนิดนี้
จะมีข้อดีกว่าใช้ Minisatellites ที่ว่า Microsatellites
probes สามารถสังเคราะห์ได้ง่ายเมื่อเทียบกับ
Minisatellite probe ซึ่งเป็น Probes ที่มีความยาว
มากจำเป็นต้องใช้การขยาย Probes โดยใช้ *E. coli*
นอกจากนี้ยังพบว่าจากการทำ in situ Hybridiza-
tion โดยใช้ Minisatellite probes จะพบตำแหน่ง
ที่ตั้งอยู่บริเวณปลายของโครโมโซมเป็นส่วนใหญ่
เมื่อเทียบกับ Microsatellite probe จะจับกับ

Complementary sequence ทั้งทั้งยีน (Schaefer
et al., 1988 ; Ali et al., 1986) ดังที่ได้กล่าว
มาแล้วว่า DNA fingerprints ไม่ว่าจะใช้ Probes
ชนิดใดก็ไม่สามารถแยกความแตกต่างว่า Alleles
ใด ขึ้นกับ Locus ใดอย่างไรก็ตามก็ได้มีการ
ใช้ DNA fingerprinting เทคนิคในการ
หาความแปรปรวนและศึกษาระยะห่างทางพันธุกรรม
ในสัตว์ต่าง ๆ มากมาย (Ponsuksili, 1995;
Dunnington et al., 1994; Siegel et al., 1992)
ถึงแม้ว่าในปัจจุบันจะหัน มาใช้ Monolocus
probes แทน

ในเวลาต่อมาเทคนิคการขยายรหัส
ทางพันธุกรรม (Polymerase Chain Reaction,
PCR) ถูกนำมาใช้มากขึ้น เนื่องจากวิธีการดังกล่าว
สามารถขยายรหัสทางพันธุกรรมตรงจุดที่เรา
ต้องการได้เมื่อเรารู้รหัสตรงจุดเริ่มต้น (Flanking
sequence) หรือที่เรียกว่า Primer ซึ่งรหัสตรงนี้
จะเป็นรหัสเฉพาะสำหรับ Locus หนึ่ง ๆ เทคนิค
PCR ถูกนำมาเชื่อมโยง กับ Monolocus System
ในการใช้ประโยชน์กับตัวบ่งชี้ (Markers) ตัวนี้

เนื่องจาก PCR ยังมีข้อจำกัดในการ
ขยายรหัสทางพันธุกรรม ถ้าวัดรหัสทางพันธุกรรม
ยาวเกินไปความสามารถในการขยายก็ต่ำลง ซึ่ง
Allele ของ Minisatellite บางตัวก็ไม่สามารถ
ขยายได้ ฉะนั้น Repeat ที่เหมาะสมสำหรับ
เทคนิค PCR ก็คือ Simple Tandem Repeats
หรือ Microsatellite ซึ่งก็คือกลุ่มรหัสสั้น ๆ
ทางพันธุกรรมที่คล้ายกันและเกิดขึ้น ซ้ำ ๆ
กันหลายครั้ง ซึ่งกลุ่มดังกล่าวจะมีขนาดตั้งแต่ 1 ถึง
4 คู่เบส (Size of repeated motif) ซึ่งที่พบบ่อย ๆ
จะเป็น (CA)_n เมื่อ n คือจำนวนซ้ำที่เกิดขึ้น ซึ่ง
Polymorphism ที่เกิดขึ้น เนื่องจากจำนวนซ้ำที่

แตกต่างกันไป ส่วนใหญ่จะยาวระหว่าง 100 - 200 คู่เบส เมื่อได้ PCR product ก็นำมาแยก Fragment แล้ว Detect fragment ดังกล่าว

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ Microsatellite ซึ่งในปัจจุบันเป็นที่เข้าใจกันว่าหมายถึงการใช้ PCR และ Primer ของ Locus ใด Locus หนึ่ง ในการ Detected หา Alleles ต่าง ๆ มีการศึกษามากในคน โดยศึกษาถึงความแปรปรวนทางพันธุกรรมของชนิดต่าง ๆ การกระจายของความถี่ของ Alleles ต่าง ๆ ในประชากร (Edwards *et al.*, 1992 ; Bowcock *et al.*, 1994) สำหรับในสัตว์เลี้ยงต่าง ๆ ไม่ว่า จะเป็น วัว แพะ แกะ สุกร หรือไก่ที่ได้มีรายงานเกี่ยวกับ Primer ของตำแหน่งต่าง ๆ มากมาย และมีการศึกษาถึง Linkage group ของแต่ละ Microsatellite ว่าตั้งอยู่บน Linkage group ไหน และบาง Linkage group ก็ทราบแล้วว่าอยู่บนโครโมโซมใด ยกตัวอย่างการใช้ Microsatellite ในการหาระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) ในแกะพันธุ์ต่าง ๆ Buchanan *et al* (1994) ได้แสดงการใช้ 8 Microsatellites loci ในการวัดระยะ ห่างทางพันธุกรรมของแกะพันธุ์ Australian, New Zealand Merino, Romney, Border Liaster, Suffolk และ Anassi พบว่าระยะ เวลาที่แกะพันธุ์ Anstralian และ New Zealand Merino แยกจากกันมาประมาณ 227 ปี สำหรับ ในสัตว์ปีก Groen และคณะ (1994) ได้ใช้ Microsatellite จำนวน 8 loci ในการหาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของไก่กระทง 9 สายพันธุ์ และไก่ไข่ 6 สายพันธุ์พบว่าค่าเฉลี่ยของ Alleles/ marker ในไก่กระทงและ ไก่ไข่คือ 4.1 และ 2.1 ตามลำดับ สำหรับ Heterozygosity ในไก่กระทง และไก่ไข่คือ 55 และ 28% ตามลำดับ Ponsuksili

และคณะ (1995) ศึกษาความแปรปรวนทางพันธุกรรมของไก่สายพันธุ์ต่างๆ โดยเปรียบเทียบ ข้อมูลที่ได้จาก Microsatellite และ DNA fingerprinting พบว่ามีค่าสหสัมพันธ์สูง (0.93)

สรุป

จะเห็นได้ว่ามีวิธีการต่างๆ มากมายที่จะใช้ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมตั้งแต่ระดับของโปรตีน ถึงระดับของ DNA ส่วนจะเลือก ใช้วิธีใดนั้นขึ้นกับจุดประสงค์ในการศึกษาว่าต้องการหาความแปรปรวนหรือความหลากหลายในสัตว์ที่มีความแตกต่างทางระดับพันธุกรรมเท่าไร เช่น พันธุ์เดียวกัน สายพันธุ์เดียวกัน หรือประชากรเดียวกัน ยังมีความแตกต่างทางพันธุกรรมเพิ่ม ขึ้น ตัวบ่งชี้ในระดับโปรตีนก็เพียงพอในการแยกแยะ และเมื่อต้องการรายละเอียดในการแยกแยะ เพิ่มขึ้น ตัวบ่งชี้ในระดับ DNA โดยเฉพาะ Microsatellite marker จะเป็นวิธีหนึ่งที่เหมาะสม

เอกสารอ้างอิง

- Ali, S., Miller, C. R. and Epplen, J. T. (1986). DNA fingerprinting by oligonucleotide probes specific for simple repeats. *Hum. Genet.* 74:239-243.
- Baker, C. M. A. (1968). Molecular genetics of avian proteins- IX. Interspecific and intraspecific variation of egg white proteins of the genus *Gallus*. *Genetics* 58:221-226.
- Bermingham, E., Forbes, S. H., Friedland, K. and Pla, C. (1991). Discrimination between Atlantic salmon (*Salmo salar*) of North American and European origin using restriction

- analyses of mitochondrial DNA. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 48: 884-893.
- Bowcock, A. M., Ruiz-Linares, A., Tomfohrde, J., Minch, E., Kidd, J. R. and Cavalli-Sforza, L. L. (1994). High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nature* 368:455-457.
- Buchanan, F. C., Adams, L. J., Littlejohn, R. P., Maddox, J. F. and Crawford, A. M. (1994). Determination of evolutionary relationships among sheep breeds using microsatellites. *Genomics* 22(2): 397-403.
- Bulfield, G. (1990). Molecular genetics. In *Poultry Breeding and Genetics* (ed. R. D. Crawford). Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
- Dunnington, E. A., Stallard, L. C., Hillel, J. and Siegel, P. B. (1994). Genetic diversity among commercial chicken populations estimated from DNA fingerprints. *Poultry Sci.* 73: 1218-1225.
- Edwards A., Hammond, H. A., Jin, L., Caskey, T. and Chakraborty, R. (1992). Genetic variation at five trimeric and tetrameric tandem repeat loci in four human population groups. *Genomic* 12: 241-253.
- Epplen, J. T. (1988). On simple repeated GATA/GACA sequences: a critical reappraisal. *J. Heredity* 79: 409-417.
- FAO (1981) Animal genetic resources conservation and management. *Proceedings of the FAO/ UNEP Technical Consultation*. FAO Animal Production and Health paper 24. FAO, Rome, 388 pp.
- FAO (1992) The management of global animal genetic resources. *FAO Animal Production and Health Paper 108*. FAO, Rome, 309 pp.
- Franklin, I.R. (1981). Population size and the genetic improvement of animal. In *Future Developments in the Genetic Improvement of Animals*, Eds J. F. Barker, K. Hammond and A. E. McClintock, Academic Press Australia, Sydney. pp. 181-196.
- Glaus, K. R. (1980). The structure, organization and evolution of avian mitochondrial DNA. Ph. D. Thesis, Ohio State University. USA.
- Graves, J. E., Ferris, S. D. and Dizon, A.E. (1984). Close genetic similarity of Atlantic and Pacific skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*) demonstrated with restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA. *Mar. Biol.* 79: 315-319.
- Groen, A. F. Crooijmans, R. P. M. A. Van Kampen, A. J. A. Van der Beek, S. Van der Poel, J. J. and Groenen, M. A. N. (1994). Microsatellite polymorphism in commercial broiler and layer lines. *Proceedings of the 5th World congress on genetics applied to livestock production*. Guelph, 7-12 August 1994. 21: 94-97.
- Hashiguchi, T., Tsuneyoshi, M., Nishida, T., Higashiawatoko, H. and Hiraoka, E. (1981). Phylogenetic relationships determined by the blood protein types of fowls. *Japan. J. Zootech. Sci.* 52(10): 713-729.
- Hashiguchi, T., Yanagida, M., Maeda, Y. and Taketomi, M. (1970). Genetical studies on serum amylase isozyme in fowls. *Japan. J. Genet.* 45: 341-349.
- Hayashi, J. I. Yonekawa, H., Gotoh, O., Tagashira, Y., Moriwaki, K. and Yoshida, T.

- H.(1979). Evolutionary aspects of variant types of rat mitochondrial DNAs. *Biochimica et Biophysica Acta* 56 4: 202-211.
- Hill, W.G. and Keightley, P.D. (1988). Interrelations of mutation, population size, artificial and natural selection. *Proc. Second Internat. Conf. Quant. Genet.* (eds B. S. Weir, E. J. Eisen, M.M. Goodman and G. Namkoong), Sinauer, Sunderland. pp. 57-70.
- Jeffreys, A. J., Wilson, V. and Thein, S. L. (1985). Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA. *Nature*. 314: 67-73.
- Ma J. G. and Lu X. Z. (1993). Studies on serum protein polymorphism and genetic relationships among black-bone fowls. *Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica*. 24(1): 12-16.
- O'Brien, S. J., Roelke, M. E., Marker, L., Newman, A., Winkler, C. A., Meltzer, D., Colly, L., Evermann, J. F., Bush, M. and Wildt, D. E. (1985). Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. *Science* 227: 1428-1434.
- O'Brien, S. J., Wildt, D.E., Bush, M., Cavo, T. M., FitzGibbon, C., Aggundey, I. and Leakey, R. E. (1987a). East African cheetahs: evidence for two population bottlenecks. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 508-511.
- Ponsuksili, S. (1995). Estimation of genetic variation within and between different chicken lines by DNA fingerprinting. Ph. D. Thesis. University of Humboldt, Germany.
- Ponsuksili, S., Wimmers, K. and Horst, P. (1995). Genetic variation within difference lines of chickens: Comparative Microsatellite markers and Oligonucleotide DNA fingerprinting. *Animal Genetic* (in press).
- Schaefer, R., Zischler, H. and Epplen, J. T. (1988). (CAC)₅, a very informative oligonucleotide probe for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 16: 5196.
- Shiue, Y. L. Chang, H. L. Sung, Y. Y. and Tai, C. (1992). Studies on blood types of Taiwan native chicken. *J. Chin. Soci. Anim. Sci.* 21(4): 385-401.
- Siegel, P. B., Haberland, A., Mukherjee, T. K., Stallard, L. C., Marks, H. L., Anthony, N. B. and Dunnington, E. A. (1992). Jungle fowl domestic fowl relationships - a use of DNA fingerprinting. *World Poultry Science Journal* 48: 147-155.
- Siegel, P. B., Haberland, A., Mukherjee, T. K., Stallard, L. C., Marks, H. L., Anthony, N. B. and Dunnington, E. A. (1992). Jungle fowl domestic fowl relationships - a use of DNA fingerprinting. *World Poultry Science Journal* 48: 147-155.
- Southern, E. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-517.
- Summers, K. M. (1987). DNA polymorphisms in human population studies: a review. *Annals of Human Biology* 14(3): 203-217.
- Upholt, W. B. and David, I. B. (1977). Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goats: rapid evolution in the D-loop region. *Cell* 11: 571-583.
- Wakana, S., Watanabe, T., Hayashi, Y. and Tomita, T. (1986). A variant in the restriction endonuclease cleavage pattern of mitochondrial DNA in the

