

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน Vasoactive Intestinal Peptide Receptor-1 (VIPR-1) ในไก่ชี ไก่ประดู่ และไก่เล็กฮอร์น

Genetic polymorphism of Vasoactive Intestinal Peptide Receptor-1 gene (VIPR-1 in Chee, Pradu and Leghorn chicken)

สรินวล คณานิตย์¹, มนต์ชัย ดวงจินดา^{1*}, บัญญัติ เหล่าไพบูลย์¹, และปรัชญาพร เอกบุตร¹
Srinuan Kananit¹, Monchai Duangjinda^{1*}, Banyat Laopaiboon¹ and Pradchayaporn Akaboot¹

บทคัดย่อ: การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน VIPR-1 ตำแหน่ง C+598T และ C+53327T ในไก่ชี ไก่ประดู่ อย่างละ 100 ตัว และไก่เล็กฮอร์น 50 ตัว ด้วยวิธี PCR-RFLP พบว่า ยีน VIPR-1 ตำแหน่ง C+598T และ C+53327T ในไก่ที่ทำการศึกษาพบรูปแบบอัลลีล 2 รูปแบบ คือ C กับ T และจำแนกรูปแบบจีโนไทป์ได้ทั้งหมด 3 รูปแบบ ได้แก่ CC, CT และ TT พบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน VIPR-1 ตำแหน่ง C+598T ในไก่พื้นเมืองและไก่เล็กฮอร์น ซึ่งมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีเท่ากับ 0.452, 0.483 และ 0.369 ในไก่ชี ไก่ประดู่และไก่เล็กฮอร์น ตามลำดับ แต่ที่ตำแหน่ง C+53327T ในไก่เล็กฮอร์นไม่พบความหลากหลาย ซึ่งมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีเท่ากับ 0.495, 0.413 และ 0.000 ในไก่ชี ไก่ประดู่และไก่เล็กฮอร์น ตามลำดับ และจากการศึกษาพบว่าที่ตำแหน่ง C+53327T ไก่ชี ไก่ประดู่ไม่อยู่ในภาวะสมดุลตามกฎของ Hardy-Weinberg

คำสำคัญ : ความหลากหลายทางพันธุกรรม, ยีน Vasoactive Intestinal Peptide Receptor-1

Abstract: The objective of this study was to determine the polymorphism of Vasoactive Intestinal Peptide Receptor-1 (VIPR-1) gene at position C+598T and C+53327T in Chee (n=100), 100 Pradu (n=100) and Leghorn (n=50) chicken, by a polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). Two VIPR-1 alleles of C and T were classified into 3 genotypes, CC, CT and TT. The results showed that C+598T in Chee, Pradu and Leghorn chicken had high VIPR-1 polymorphism. The heterozygosities were 0.452, 0.483 and 0.369 in Chee, Pradu and Leghorn chicken, respectively. C+53327T in Leghorn chicken had non polymorphism, the heterozygosities were 0.495, 0.413 and 0.000 in Chee, Pradu and Leghorn chicken, respectively. It was found that the allele frequencies of C+53327T in Chee and Pradu chicken did not follow Hardy-Weinberg's Law of Equilibrium.

Keywords: genetic polymorphism, Vasoactive Intestinal Peptide Receptor-1 gene

¹ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

* Corresponding author: monchai@kku.ac.th

บทนำ

พฤติกรรมการฟักไข่ (broodiness หรือ incubation behavior) ในไก่พื้นเมืองเป็นลักษณะที่ถือได้ว่าเป็นสาเหตุที่ทำให้ไก่พื้นเมืองมีสมรรถนะการให้ผลผลิตไข่ต่ำ เนื่องจากไก่พื้นเมืองจะแสดงพฤติกรรมการฟักไข่ ทำให้ยืดยาวระยะเวลาการออกไข่ในรอบต่อไป ซึ่งเมื่อไก่มีเปอร์เซ็นต์การฟักต่ำจะมีผลผลิตไข่สูงตามไปด้วย (Xu et al., 2010) พฤติกรรมการฟักไข่เกิดขึ้นภายใต้การทำงานของระบบประสาทและการหลั่งของฮอร์โมน และมียีนหลายยีนเข้ามาเกี่ยวข้องในการควบคุมพฤติกรรมนี้ เช่น ยีน Vasoactive Intestinal Peptide (VIP) และ Vasoactive Intestinal Peptide Receptor (VIPR) (Zhou et al., 2008) ยีน Prolactin (PRL) และ Prolactin receptor (PRLR) (Jiang et al., 2005) dopamine D1 receptor (DRD1) (Xu et al., 2010) Luteinizing Hormones (LH), Follicle-Stimulating Hormones (FSH), Progesterone (P4), Estradiol (E2) (Onagbesan et al., 2006) โดยที่ P4 จะไปกระตุ้นให้ไก่มีพฤติกรรมสร้างรัง (nesting) ส่วน E2 จะไปกระตุ้นให้มีการหลั่งของ VIP และจากนั้น VIP ก็จะไปกระตุ้นให้ PRL หลั่งทำให้ไก่แสดงพฤติกรรมการฟักไข่ออกมา โดยถือว่า VIP เป็น PRL-releasing factor (El Halawani et al., 2000) Vasoactive intestinal peptide receptor-1 (VIPR-1) ผลิตโดยยีน VIPR-1 ซึ่งมีการแสดงออกที่บริเวณต่อมใต้สมองส่วนหน้าและไฮโปทาลามัส และพบว่ามี ความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนที่ควบคุม วงรอบการสืบพันธุ์ในไก่ (Chaiseha et al., 2004) ปัจจุบันนักวิจัยทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลได้นำองค์ความรู้ด้านความแตกต่างของการจัดเรียงตัวของลำดับเบสภายในยีนและความหลากหลายในระดับดีเอ็นเอของสัตว์แต่ละตัว มาใช้เพื่อค้นหารูปแบบที่ทำให้การแสดงออกของสัตว์แต่ละตัวแตกต่างกัน และตรงตามเป้าหมายและทิศทางการคัดเลือกเพื่อปรับปรุงลักษณะทางเศรษฐกิจนั้นๆ การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน VIPR-1 ในไก่ซี ไก่ประดู่และไก่เล็กฮอร์น เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานใน

การศึกษาและพัฒนาเป็นเครื่องหมายโมเลกุล (Molecular marker หรือ DNA marker) สำหรับพฤติกรรมการฟักไข่ (broodiness)

วิธีการศึกษา

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาและการสกัดดีเอ็นเอ

สุ่มเก็บตัวอย่างเลือดไก่ซี ไก่ประดู่ ชนิดละ 100 ตัว จากศูนย์เครือข่ายวิจัยและพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์ (ไก่พื้นเมือง) เพื่อเป็นตัวแทนไก่พื้นเมืองที่ยังมีพฤติกรรมการฟักไข่ และไก่ไข่เล็กฮอร์น 50 ตัว จากฟาร์มสัตว์วิจัยหลวงสุวรรณวาจกกสิกิจ ภาควิชาสัตวบาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ แทนไก่ที่ไม่มีพฤติกรรมการฟัก นำมาสกัดดีเอ็นเอโดยวิธี สกัดดีเอ็นเอตามวิธีของห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ โดยดัดแปลงจาก Goodwin et al. (2007) จากนั้นตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้ agarose gel electrophoresis และตรวจสอบปริมาณและคุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่อง spectrophotometer

การตรวจจีโนไทป์ของยีน Vasoactive Intestinal Peptide Receptor-1 gene

ตรวจหาจีโนไทป์ของยีน VIPR-1 ด้วยวิธี PCR-RFLP โดยทำการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วย primer 2 ชุด ดังนี้ 1) F: 5'-AGAGGAACGCAGCCAGTG-3' และ R: 5'-CCCACCTAACATAAAAGCTCAAC-3' ศึกษาตำแหน่ง C+598T 2) F: 5'-CTCCTCAGGCAGACCATCATG-3' และ R: 5'-CTTGCACGTATCCTTGGGT AGC-3' ตำแหน่ง C+5332T หลังจากปฏิกิริยาลิ้นสุดแล้ว นำ PCR product ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ ไปทำการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) *HaeIII* (ตำแหน่ง C+598T) และ *TaqI* (ตำแหน่ง C+5332T) เพื่อวิเคราะห์รูปแบบของยีน VIPR-1 ทั้งสองตำแหน่งและทำการตรวจสอบชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วย 3.0% agarose gel electrophoresis จากนั้นทำการบันทึกภาพและวิเคราะห์ผล

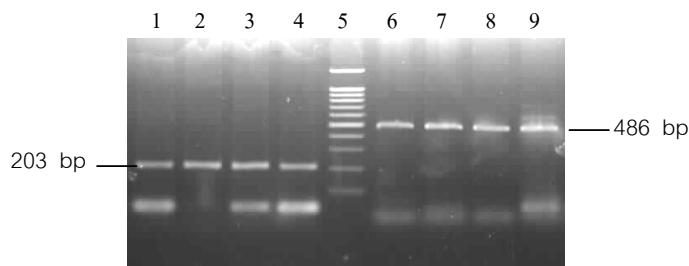
การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีล เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมและโครงสร้างของประชากร วิเคราะห์ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากค่าคาดหวัง (Expected Heterozygosity; H_e) และค่าเฮเทอโรไซโกซิตีจากการสังเกต (Observed Heterozygosity; H_o) เพื่อประเมินความหลากหลายทางพันธุกรรมในสัตว์กลุ่มที่ทำการศึกษา และทดสอบสมมติฐานของยีนในประชากร (Hardy-Weinberg equilibrium) ซึ่งใช้การทดสอบด้วย Chi-square (χ^2)

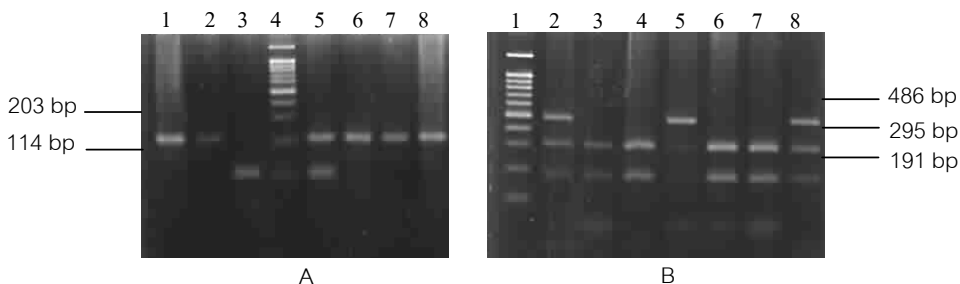
ผลการศึกษาและวิจารณ์

ผลการตรวจสอบความหลากหลายของยีน VIPR-1

ที่ตำแหน่ง C+598T จะได้ขนาดชิ้นยีน VIPR-1 ขนาด 203 bp ส่วนที่ตำแหน่ง C+53327T ได้ขนาดชิ้นยีน 486 bp ดังแสดงในภาพที่ 1 และ เมื่อนำยีน VIPR-1 ที่ได้จากการทำ PCR มาศึกษารูปแบบอัลลีลโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าทั้งสองตำแหน่งของยีน VIPR-1 ที่นำมาศึกษา พบอัลลีล 2 ชนิด คือ อัลลีล C กับ อัลลีล T และจำแนกได้ 3 จีโนไทป์ ดังแสดงในภาพที่ 2A และ ภาพที่ 2B



ภาพที่ 1 ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของยีน VIPR-1 โดย Lane ที่ 1-4 แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน VIPR-1 ตำแหน่ง C+598T, Lane ที่ 5 คือ marker ขนาด 100 bp, Lane ที่ 6-9 แสดงแถบดีเอ็นเอของยีน VIPR-1 ตำแหน่ง C+53327T



ภาพที่ 2A ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของยีน VIPR-1 ตำแหน่ง C+598T ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *HaeIII* โดย Lane ที่ 1,2,6, 7 และ 8 คือ ไก่ที่มีรูปแบบจีโนไทป์ CC, Lane ที่ 3 คือ ไก่ที่มีรูปแบบจีโนไทป์ TT, Lane ที่ 4 คือ marker ขนาด 100 bp และ Lane ที่ 5 คือ ไก่ที่มีรูปแบบจีโนไทป์ CT

ภาพที่ 2B ตัวอย่างแถบดีเอ็นเอของยีน VIPR-1 ตำแหน่ง C+53327T ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *TaqI*, Lane ที่ 1 คือ marker ขนาด 100 bp, Lane ที่ 2 และ 8 คือ ไก่ที่มีรูปแบบจีโนไทป์ CT, Lane ที่ 3, 4, 6 และ 7 คือ ไก่ที่มีรูปแบบจีโนไทป์ TT, Lane ที่ 5 คือ ไก่ที่มีรูปแบบจีโนไทป์ CC

ตารางที่ 1 แสดงความถี่อัลลีล ความถี่จีโนไทป์ ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีของยีน VIPR-1 ตำแหน่ง C+598T

สัตว์ที่ศึกษา		ความถี่อัลลีล		ความถี่จีโนไทป์			เฮตเทอโรไซโกซิตี		χ^2
		C	T	CC(N)	CT(N)	TT(N)	Ho	He	
ไก่ซี	100 ตัว	0.655	0.345	0.430(43)	0.450(45)	0.120(12)	0.450	0.452	0.001
ไก่ประดู่	100 ตัว	0.755	0.245	0.590(59)	0.330(33)	0.080(8)	0.330	0.369	1.166
ไก่เล็กฮอร์น	50 ตัว	0.410	0.590	0.180(9)	0.460(23)	0.360(18)	0.480	0.483	0.121

หมายเหตุ: ค่า χ^2 จากตารางที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ degree of freedom เท่ากับ 1 มีค่า 3.841

ตารางที่ 2 แสดงความถี่อัลลีล ความถี่จีโนไทป์ ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีของยีน VIPR-1 ตำแหน่ง C+53327T

สัตว์ที่ศึกษา		ความถี่อัลลีล		ความถี่จีโนไทป์			เฮตเทอโรไซโกซิตี		χ^2
		C	T	CC(N)	CT(N)	TT(N)	Ho	He	
ไก่ซี	96 ตัว	0.292	0.708	0.198(19)	0.188(18)	0.615(59)	0.187	0.413	27.827
ไก่ประดู่	99 ตัว	0.545	0.455	0.505(50)	0.081(8)	0.414(41)	0.080	0.495	71.105
ไก่เล็กฮอร์น	50 ตัว	0	1	0.000(0)	0.000(0)	1.000(50)	0	0	-

หมายเหตุ: ค่า χ^2 จากตารางที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ degree of freedom เท่ากับ 1 มีค่า 3.841

จากตารางที่ 1 และ ตารางที่ 2 พบว่ายีน VIPR-1 ทั้งสองตำแหน่งในไก่พื้นเมืองมีความหลากหลายสูง และเมื่อพิจารณาค่าความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์พบว่าในไก่ซึ่งไม่มีพฤติกรรมการฟักไข่แล้ว พบเพียงจีโนไทป์ TT ซึ่งจากการศึกษาของ Zhou et al. (2008) พบว่าอัลลีล C ของยีน VIPR-1 บน C+598T และ C+53327T มีความสัมพันธ์กับช่วงของการฟักไข่ (duration of broodiness) และจำนวนไก่ที่ฟักไข่ (broody frequency) โดยตรงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ไม่พบอัลลีลนี้ในไก่เล็กฮอร์น (ซึ่งไม่มีพฤติกรรมการฟัก) อาจเป็นไปได้ว่าไก่เล็กฮอร์นถูกคัดเลือกเพื่อลดพฤติกรรมการฟัก เพื่อเพิ่มผลผลิตไข่ ทำให้ไม่พบอัลลีลที่ควบคุมพฤติกรรมการฟักแล้ว อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของยีน VIPR-1 กับลักษณะการฟักไข่ จึงไม่สามารถบอกได้ว่ารูปแบบใดที่น่าจะใช้จำแนกพฤติกรรมการฟักไข่ของไก่พื้นเมืองของไทยได้ และจากการศึกษาครั้งนี้เห็นว่าการกระจายความถี่จีโนไทป์ของตำแหน่งเกิด walund effect ซึ่งหมายถึงการสูญเสียสภาพ heterozygosity ที่ไม่เป็นไปตามที่คาดไว้ อาจเป็นผลเนื่องจากการคัดเลือกที่เน้นเพื่อจำแนกไก่เป็นสายไข่และสายเนื้อ

สรุปและข้อเสนอแนะ

ยีน VIPR-1 ตำแหน่ง C+598T และ C+53327T ในไก่ที่ทำการศึกษาพบรูปแบบอัลลีล 2 รูปแบบ คือ C กับ T และจำแนกรูปแบบจีโนไทป์ได้ทั้งหมด 3 รูปแบบ ได้แก่ CC, CT และ TT และพบว่าในไก่พื้นเมืองมีความหลากหลายทางพันธุกรรมของยีน VIPR-1 สูง อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงข้อมูลพื้นฐานเพื่อศึกษารูปแบบของยีน VIPR-1 ที่ปรากฏในประชากรที่สนใจ หากต้องการทราบว่ายีน VIPR-1 มีความสัมพันธ์กับลักษณะใดๆ เช่น พฤติกรรมการฟักไข่ เป็นต้น จำเป็นต้องพิจารณารูปแบบของยีน VIPR-1 ที่พบในประชากรที่ศึกษาร่วมกับลักษณะทางฟีโนไทป์ของประชากร เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทป์กับจีโนไทป์ เพื่อพัฒนาเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมสำหรับใช้เป็นเครื่องหมายในการคัดเลือกและการปรับปรุงการให้ผลผลิตไข่ในไก่พื้นเมืองต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืนที่ได้จัดสรรเงินสนับสนุน ศูนย์เครือข่ายวิจัยและพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์ (ไก่พื้นเมือง) และฟาร์มสัตว์วิจัยหลวงสุวรรณ-

วาทกมลกิจ ภาควิชาสัตวบาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ที่สนับสนุนสัตว์ทดลองในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Chaiseha, Y., O. M. Youngren, and M. E. El Halawani. 2004. Expression of vasoactive intestinal peptide receptor messenger RNA in the hypothalamus and pituitary throughout the turkey reproductive cycle. *Biol. Reprod.* 70:593–599.
- El Halawani, M. E., S. E. Whiting, J. L. Silsby, G. R. Pitts, and Y. Chaiseha. 2000. Active immunization with vasoactive intestinal peptide in turkey hens. *Poult. Sci.* 79:349–354.
- Goodwin, W., L. Adrian, and H. Sibte. 2007. *An Introduction to Forensic Genetics*. John Wiley & Sons Ltd, Oxford.
- Jiang, R.S., G.Y. Xu, X.Q. Zhang, and N. Yang. 2005. Association of Polymorphisms for Prolactin and Prolactin Receptor Genes with Broody Traits in Chickens. *Poultry Science* 84:839–845.
- Onagbesan, O. M., S. Metayer, K. Tona, J. Williams, E. Decuypere, and V. Bruggeman. 2006. Effects of Genotype and Feed Allowance on Plasma Luteinizing Hormones, Follicle-Stimulating Hormones, Progesterone, Estradiol Levels, Follicle Differentiation, and Egg Production Rates of Broiler Breeder Hens. *Poultry Science* 85:1245–1258.
- Xu, H., X. Shen, M. Zhou, M. Fang, H. Zeng, Q. Nie, and X. Zhang. 2010. The genetic effects of the dopamine D1 receptor gene on chicken egg production and broodiness traits. *BMC Genetics*. 11:17.
- Zhou, M., M. Lei, Y. Rao, Q. Nie, H. Zeng, M. Xia, F. Liang, D. Zhang, and X. Zhang. 2008. Polymorphisms of Vasoactive Intestinal Peptide Receptor-1 Gene and Their Genetic Effects on Broodiness in Chickens. *Poultry Science* 87:893–903.