DEVELOPMENT OF AFLP MARKERS FOR A FERTILITY TRAIT IN THAI SWAMP BUFFALO (BUBALUS BUBALIS)

BENCHAMART MOOLMUANG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2004

ISBN 974-04-5340-6
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

การพัฒนาเครื่องหมายทางพันธุกรรม AFLP ที่จำเพาะต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ของกระบือปลัก (DEVELOPMENT OF AFLP MARKERS FOR A FERTILITY TRAIT IN THAI SWAMP BUFFALO (BUBALUS BUBALIS))

เบญจมาศ มูลเมือง 4536674 MBMG/M

วท.ม. (อณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: กนกพร ไตรวิทยากร, Ph.D., สกล พันธุ์ยิ้ม, Ph.D., DUNCAN R. SMITH, Ph.D., ALBERT J. KETTERMAN, Ph.D.

บทคัดย่อ

ในปัจจุบัน จำนวนกระบือปลักในประเทศไทยได้ลดลงอย่างรวดเร็วซึ่งอาจส่งผลต่อการสูญพันธุ์ในอนาคตได้ ดังนั้นการประยุกต์ใช้เครื่องหมายพันธุกรรมเพื่อใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์จึงเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มจำนวนและการอนุรักษ์กระบือปลักได้ ในการวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP ที่จำเพาะต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ของกระบือปลัก และการเปลี่ยนเครื่องหมายพันธุกรรมชนิด AFLP ไปเป็นเครื่องหมายชนิด SCAR โดยได้ทำการคัดเลือกและจำแนกกระบือเพศเมียออกเป็นสองกลุ่มที่มีช่วงวันของการมีลูกแตกต่างกัน คือกลุ่มที่มีความสมบูรณ์พันธุ์สูงและต่ำ ดีเอ็นเอจากแต่ละกลุ่มถูกสกัดและนำมารวมกันเป็นตัวแทนของกลุ่มเพื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์หาความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค AFLP โดยใช้ไพรเมอร์เพื่อเพิ่มปริมาณ DNA ในกระบวนการพีซีอาร์จำนวน 256 คู่ ผลการวิเคราะห์พบเครื่องหมายพันธุกรรมซึ่งเป็นแถบดีเอ็นเอที่แตกต่างกันระหว่างตัวอย่างกระบือสองกลุ่มจำนวน 19 เครื่องหมายในจำนวนนี้ 6 เครื่องหมายพัฒนาจากกลุ่มสมบูรณ์พันธุ์สูง และ 13 เครื่องหมายจากกลุ่มสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ เครื่องหมายพันธุกรรมที่พบทั้งหมดถูกเปลี่ยนเป็นชนิด SCAR และพบว่าเครื่องหมาย SAFE12M29 สามารถให้ผลจีโนไทพ์ที่สอดคล้องกับฟีโนไทพ์ได้ประมาณร้อยละ 60 ของตัวอย่างทดสอบ ส่วนการวิเคราะห์ลำดับเบสของแถบดีเอ็นเอ AFLP ในฐานข้อมูล พบว่ามีความคล้ายคลึงกับยีนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ เช่น prostaglandin f2α receptor gene และ follicle stimulating hormone gene และเมื่อนำเครื่องหมายพันธุกรรม AFLP ทั้งหมดมาทดสอบกับตัวอย่างทั้ง 24 ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์ AFLP เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างฟีโนไทพ์และจีโนไทพ์ พบว่าเครื่องหมาย AFE14M30, AFE10M22, AFE12M25 และ AFE16M25 ให้ค่าความสัมพันธ์ถึงร้อยละ 70-80 ดังนั้นเครื่องหมายพันธุกรรมทั้งชนิด AFLP และ SCAR ที่พัฒนาได้จากการศึกษาครั้งนี้จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกกระบือปลักที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ได้ในอนาคต

103 หน้า ISBN 974-04-5340-6

DEVELOPMENT OF AFLP MARKERS FOR A FERTILITY TRAIT IN THAI SWAMP BUFFALO (BUBALUS BUBALIS)

BENCHAMART MOOLMUANG 4536674 MBMG/M

M.Sc. (MOLECULAR GENETICS AND GENETIC ENGINEERING)

THESIS ADVISORS : KANOKPORN TRIWITAYAKORN, Ph.D., SAKOL PANYIM, Ph.D., DUNCAN R. SMITH, Ph.D., ALBERT J.KETTERMAN, Ph.D.

ABSTRACT

The population of Thai swamp buffalo is steadily decreasing in Thailand and this may result in the loss of genetic diversity in this species in the future. The use of marker assisted selection in animal breeding programs can be exploited in the conservation of the Thai swamp buffalo. The objectives of this study were to develop the Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) markers that are specific to a fertility trait, and to convert the AFLPs to Sequence Characterized Amplified Region (SCAR) markers. Primer combinations of *Eco*RI-ANN and *Mse*I-CNN were used to screen two sets of pooled DNA from high and low fertility buffalo classified according to calving interval. A total of 6 AFLP markers were identified from the high fertility pool whereas the other 13 markers were from the low fertility pool. The AFLP polymorphic bands were converted to SCAR primers and tested with individual DNA samples. The results showed polymorphisms that were identified from the SAFE12M29 SCAR marker with approximately 60% accuracy of phenotype prediction. Sequence analysis using BLAST searches showed that the sequence of some markers were similar to known genes of reproductive performance such as the prostaglandin f2α receptor gene and the follicle stimulating hormone receptor gene. The identified AFLPs were tested with individual samples contributing to the pooled DNAs and a correlation between the phenotype and the genotype results was found on the following markers: AFE14M30 (80%), AFE10M22 (75%), AFE12M25 (70.8%), and AFE16M25 (70.8%). The identified SCAR and AFLP markers that showed high correlation between genotype and phenotype should be useful tools in a marker assisted selection program for high fertility trait of the Thai swamp buffalo.

KEYWORDS: THAI SWAMP BUFFALO / FERTILITY TRAIT / AFLP/ SCAR

103 pp. ISBN 974-04-5340-6