

ความหลากหลายทางพันธุกรรมสายแม่ในโคพื้นเมืองไทย ด้วยการวิเคราะห์ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ

Genetic diversity of maternal lineages in Thai-native cattle by mitochondrial DNA analysis

ณชัย สราธพันธุ์^{1*}, สายใจ ชื่นสุข¹, มาลี อภิเมธีธำรง¹, วิบูลย์ เยี่ยงวิศวกร¹, สร ธีปภูมิกร²
และ สุกัญญา ยุ่งระแหง³

Nachai Sarataphan^{1*}, Saijai Chuensuk¹, Malee Apimeteetumrong¹,
Wiboon Yiengvisawakul¹, Sorn Teepatimakorn² and Sukanya Yungrahang³

บทคัดย่อ: ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากแม่เท่านั้น จึงนำมาใช้ศึกษาวิวัฒนาการและความหลากหลายทางพันธุกรรมสายแม่ของคนและสัตว์ ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อหาความหลากหลายทางพันธุกรรมสายแม่และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในโคขาวลำพูน 30 ตัว โคลาน 35 ตัว โคชนใต้ 15 ตัว โคอีสาน 18 ตัวและโคลูกผสมแองกัสพื้นเมืองไทย 7 ตัว รวมทั้งสิ้น 105 ตัว ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ที่มีความผันแปรสูงจำนวน 297 คู่เบส เปรียบเทียบกับลำดับเบสของโคสายพันธุ์ต่างๆ พบว่ามีตำแหน่งคู่เบสที่แตกต่างกันจำนวน 50 ตำแหน่ง สามารถจำแนกได้ 21 Haplotype ซึ่ง Haplotype10 พบมากที่สุด โควขาวลำพูน โคลาน โคชนใต้ โคอีสานและโคลูกผสมแองกัสพื้นเมืองไทย มี 8, 11, 6, 4 และ 4 Haplotype ตามลำดับ ความหลากหลายของ Haplotype เท่ากับ 1.5599 ความหลากหลายทางพันธุกรรมรวมและภายในแต่ละสายพันธุ์โดยมีค่า Nucleotide diversity เท่ากับ 0.3997 และ 0.4351 ตามลำดับ ส่วนค่าสัมประสิทธิ์ของความแตกต่างพันธุกรรมมีค่าเท่ากับ -0.0885 แสดงว่าโคพื้นเมืองไทยมีความหลากหลายของ Haplotype ความหลากหลายทางพันธุกรรมสายแม่สูงมาก และมีพันธุกรรมสายแม่ไม่แตกต่างกัน ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่าโคพื้นเมืองไทยส่วนใหญ่มีพันธุกรรมสายแม่จัดอยู่ในกลุ่ม *Bos indicus* จากการศึกษาทางวิวัฒนาการพบว่า โคลานที่อยู่ใน Haplotype22 เป็นต้นกำเนิดส่วนใหญ่ของโคพื้นเมืองไทย รวมทั้งโค Red Chittagong, Tharparkar, Hariana และ Sahiwal ในประเทศบังกลาเทศ ปากีสถาน และอินเดีย ตามลำดับ

คำสำคัญ: โคพื้นเมืองไทย, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ, สายแม่

ABSTRACT: Mitochondrial DNA which inherited only from maternal lineages had been used in evolution and genetic diversity study in human and animals. The objective of this study was to verify genetic diversity and phylogenetic tree based on mitochondrial DNA (mtDNA) of Thai-native cattle and Thai-native crossbred cattle. A total of 105 animals including 30 Khao Lamphun (KLP) cattle, 35 racing cattle (LAN), 15 Southern fighting cattle (CHON), 18 Northeastern cattle (E-SAN) and 7 Angus x Thai-native crossbred (AgxTNT) cattle were used in this study. D-loop mtDNA of high variable region (297 bp) was aligned with different cattle breeds. The result revealed that 50 single

¹ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ 91 ถนนติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000

Bureau of Biotechnology in Livestock Production, 91 Tiwanon road, Banga Dee, Muang, Pathumthani 12000

² ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคโครงการหลวงอินทนนท์ หมู่ 12 ต.แม่วิน อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่ 50360

Inthanon King Project Frozen Bull Semen Production Center, 195 Moo 1, Muang, Chiangmai 50300

³ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture at Kampaeng Saen, Kasetsart University, Kampaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

* Corresponding author: nachaisarataphan@gmail.com

nucleotide polymorphisms (SNPs) was found and classified into 21 haplotypes. Haplotype10 was found in high frequency. The numbers of haplotype in KLP, LAN, CHON, E-SAN and AgxTNT were 8, 11, 6, 4 and 4 haplotypes respectively. Haplotype diversity of cattle in this study was 1.5599. Nucleotide diversity of entire population and within population were 0.3997 and 0.4351 respectively. Coefficient of differentiation among animals in this study was -0.0885. The result indicated that haplotype and nucleotide diversity were very high in Thai-native cattle and Angus x Thai-native crossbred cattle, whereas maternal lineages was closely related among them. Phylogenetic tree revealed most of Thai-native cattle located in *Bos indicus* clade. Evolution study based on D-loop mtDNA revealed that the Haplotype22 of LAN cattle was origin of the most Thai-native cattle as well as Red Chittagong, Tharparkar, Hariana and Sahiwal cattle in Bungaladesh, Pakistan and India, respectively.

Keywords: Thai-native cattle, genetic diversity, mitochondrial DNA, maternal lineages

บทนำ

ประเทศไทยเป็นภาคีอนุสัญญาว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ (Convention on Biological Diversity) ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2547 ประเทศที่เป็นภาคีจะต้องดำเนินการในมาตรา 7-10 คือ การจำแนกระบุและการติดตามตรวจสอบ การอนุรักษ์ถิ่นที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ การอนุรักษ์นอกถิ่นที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ และการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน โคเป็นสัตว์เลี้ยงที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย โคพื้นเมืองไทยจัดแบ่งออกได้เป็น 4 ประเภท ตามรูปร่างลักษณะ และถิ่นที่อยู่อาศัย และการใช้ประโยชน์ โคพื้นเมืองของไทยประกอบด้วย โคขาวลำพูน โคลาน โคน และโคอีสาน (กองบำรุงพันธุ์สัตว์, 2547) การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนของโคขาวลำพูน คือ นำมาใช้เป็นพระโคในพิธีจรดพระนังคัลแรกนาขวัญ โคลานใช้ในประเพณีวิ่งลานในเขตภาคกลาง โคนใช้เป็นกัฟพื้นเมืองอย่างหนึ่งทางภาคใต้ ส่วนโคอีสานยังไม่มีมีการใช้ประโยชน์ตามประเพณี แต่ใช้เป็นแม่พันธุ์พื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมพันธุ์ด้วยพ่อพันธุ์จากต่างประเทศเพื่อให้ได้ผลผลิตตามต้องการโดยอาศัยพันธุกรรมสายพ่อ แต่การถ่ายทอดพันธุกรรมสายแม่ในโคเนื้อยังมีผู้ทำศึกษาน้อยมาก มีแต่การศึกษาการถ่ายทอดพันธุกรรมสายแม่ในโคนมเท่านั้น มีการศึกษาการถ่ายทอดพันธุกรรมสายแม่ (Maternal lineages) ในโคนมไฮลส์ไตนในประเทศเยอรมัน พบว่ามีผลต่อเปอร์เซ็นต์ไขมันในน้ำนม (Schutz et al., 1992) ต่อมาได้มีการศึกษาการถ่ายทอดพันธุกรรมสายแม่ในโคนมไฮลส์ไตนในประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่า มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ไขมันในน้ำนมเช่นเดียวกัน (Boettcher et al., 1996) ซึ่งเป็นเครื่องบ่งชี้ถึงการถ่ายทอด

พันธุกรรมทางไซโตพลาสซึม (Cytoplasmic inheritance) นอกเหนือจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรมทางนิวเคลียสดีเอ็นเอ (Nuclear DNA) ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ (Mitochondrial DNA) ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากแม่เท่านั้น (Cummins, 2002; Giles et al., 1980) ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้ส่งผลให้บุคคลที่มีสายเลือดแม่ หรือยายคนเดียวกันจะมีลักษณะพันธุกรรมไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเหมือนกันทุกคน กระบวนการคัดเลือกไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเกิดจากกระบวนการปฏิสนธิ ในขณะที่มีการปฏิสนธินั้นตัวสุจิจะแทรกเฉพาะส่วนหัวเข้าไปในไข่ที่สุกและทำการปฏิสนธิ ซึ่งขั้นตอนนี้เองเป็นด่านแรกในการป้องกันไม่ให้ไมโทคอนเดรียของเพศผู้เข้าไปในไข่ได้ เพราะไมโทคอนเดรียของตัวสุจิจะสามารถพบได้ในส่วนคอของตัวสุจิเป็นส่วนใหญ่ แม้ว่าอาจมีบางส่วนของไมโทคอนเดรียของตัวสุจิเข้าไปในไข่ได้ไม่ว่ากรณีใดก็ตามก็จะมีกระบวนการที่กำจัดทิ้งหรือทำให้ไม่สามารถทำงานได้ กระบวนการกำจัดไมโทคอนเดรียของตัวสุจิที่ผลัดหลงเข้าไปในไข่แล้วนั้นจะมีกระบวนการกำจัดแต่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ มีส่วน D-loop เป็นส่วนควบคุมรหัสที่สำคัญในการแสดงออกของยีนต่างๆ ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ ซึ่งมีอัตราการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์สูงกว่าดีเอ็นเอที่อยู่ในนิวเคลียส 5 ถึง 10 เท่า (Brown et al., 1979) ดังนั้นการวิเคราะห์การเรียงลำดับดีเอ็นเอส่วน D-loop จะเป็นประโยชน์มากในการศึกษาจุดกำเนิด ประวัติการเคลื่อนย้าย และความหลากหลายทางพันธุกรรมสายแม่ของประชากรโคในปัจจุบันได้ (Loftus et al., 1994; Bradley et al., 1998; Troy et al., 2001) ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายพันธุกรรมสายแม่ด้วยไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

ส่วน D-loop ในโคพีนเมืองไทยและโคลูกผสมแองกัส x พื้นเมืองไทย จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจำแนกและศึกษาเส้นทางวิวัฒนาการพันธุกรรมสายแม่ หวังว่าผลการศึกษานี้จะให้ข้อมูลซึ่งจะมีประโยชน์สำหรับการวางแผนการอนุรักษ์และวางแผนการใช้ประโยชน์ของโคพีนเมืองไทยในการศึกษาผลของพันธุกรรมสายแม่ต่อผลผลิตในโคเนื้อต่อไป

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างที่ทำการศึกษาเป็นโคพีนเมืองไทยที่หน่วยราชการ และเอกชนได้อนุรักษ์ไว้เพื่อการศึกษาและใช้ประโยชน์ ดังนี้ โคบาลำพูนจำนวนรวม 30 ตัว จากศูนย์ย้ายฝากตัวอ่อน สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์จำนวน 8 ตัว สถานีวิจัยและทดสอบพันธุ์สัตว์จังหวัดแพร่จำนวน 18 ตัว และเป็นพระโคที่ใช้ในพิธีจรดพระนังคัลแรกนาขวัญจำนวน 4 ตัว โคลานจำนวนรวม 35 ตัว จากกลุ่มผู้เลี้ยงและแข่งขันจังหวัดสมุทรสงครามและราชบุรี โคชนไต้จำนวน 15 ตัว จากฟาร์มเพาะขยายพันธุ์ ล. สุวรรณรักษ์จังหวัดเพชรบูรณ์ โคอีสานจำนวน 18 ตัว จากสถานีวิจัยและทดสอบพันธุ์สัตว์อุบลราชธานี และโคลูกผสมแองกัส x พื้นเมืองจำนวน 7 ตัว จากสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ รวมทั้งสิ้น 105 ตัวอย่าง การดำเนินเก็บตัวอย่างเลือดในระหว่างปีพ.ศ. 2558 สกัดดีเอ็นเอจาก

ตัวอย่างเลือดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIAprep. Spin Miniprep Kit (Qiagen, USA) และรวบรวมเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C. จนกว่านำไปทดสอบวิเคราะห์ในเดือนมกราคม พ.ศ. 2560

สำหรับ Figure 1 แสดงการออกแบบไพรเมอร์ (oligonucleotide) จากฐานข้อมูล *Bos taurus* complete mitochondrial genome (GenBank accession V00654) ด้วยโปรแกรม Primer 3 ที่ระหว่างตำแหน่ง 15855 ถึง 16878 คือ Fw primer: 5'-CCAATAACTCAACACAGAATTTGC-3' และ ที่ระหว่างตำแหน่ง 16348 ถึง 16368 คือ Rv primer: 5'- TAAGAGGAAAGAATGGACCGTTT-3' ในส่วนผสมปฏิกิริยาถูกใช้โพลีเมอเรส จำนวน 50 µl ประกอบด้วย 100 ng ของตัวอย่างดีเอ็นเอ 1. PCR buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs 0.4 pM of each primer และ 1 U Taq polymerase (Ampli Taq Gold™, Applied Biosystems, USA) ตัวอย่างดีเอ็นเอที่แยกได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา DNA Purification Kit (NucleoSpin, Macherey-Nagel, Germany) และทำการเรียงลำดับเบสด้วยชุดน้ำยา Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (v3.0, Applied Biosystems, CA, USA) และทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง 3010 DNA sequencer (Applied Biosystems, CA, USA)

Nucleotide position

```

1
5
8
5
5
TATTAAATTTATCAAAAATCCCAATAACTCAACACAGAATTTGCACCCCTAACCAAAATATT
ACAAACACCACTAGCTAACATAACACGCCCATACACAGACCACAGAATGAATTACCTACG
CAAGGGGTAATGTACATAACATTAATGTAATAAGACATAATATGTATATAGTACATTAA
AT TATATGCCCCATGCATATAAGCAAGTACATGACCTCTATAGCAGTACATAATACATAT
AATTATTGACTGTACATAGTACATTATGTCAAATTCATTCTTGATAGTATATCTATTATA
TATTCCTTACCATTAGATCACGAGCTTAATTACCATGCCGCGTGAACACAGCAACCCGCT
AGGCAG-GGATCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCCATAAACCGTGGGGGTGCGTATCCCAATGA
ATTTTACCAGGCATCTGGTTCTTTCTTCAGGGCCATCTCATCTAAACGGTCCATTCTTT
CCTCTTAAATAAGACATCTCGATGGACTAATGGCTAATCAGCCCATGCTCACACATAACT

```

Figure 1 Specific primers (underline letters) were designed to amplify mtDNA D-loop region at the nucleotide position 15855 of GenBank accession V00654. DNA fragment size of 297 bp (bold italic letters) was performed sequence alignment.

ข้อมูลลำดับเบสของตัวอย่างจำนวน 105 ตัวอย่างนำไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสจำนวน 297 เบสกับลำดับเบส mtDNA D-loop ของโคสายพันธุ์ต่างๆ วิเคราะห์หาตำแหน่งความผันแปรจำแนก Haplotype ระยะห่างทางพันธุกรรม วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic trees) หาความหลากหลาย (Nucleotide diversity) และสัมประสิทธิ์ความแตกต่าง (Coefficient of differentiation) ของสายพันธุ์ด้วยโปรแกรม MEGA version 6.0 (Tamura et al., 2013) คำนวณความหลากหลาย (Haplotype diversity) จากสูตร $H = \frac{N}{N-1}(1 - \sum p_i^2)$ (Nei and Tajima, 1981) ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสายแม่และการศึกษาวิวัฒนาการของโคพื้นเมืองไทยกับสายพันธุ์โคอื่นๆ ด้วยโปรแกรม Network version 5 (Bandelt et al., 1999) ลำดับเบสของโคสายพันธุ์อื่น ได้จากข้อมูลใน GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) ได้แก่ โคขาวลำพูน (GenBank accession HM173342-HM173351) โคสายพันธุ์อินเดีย (Zebu) เช่น Red Chittagong, Tharparkar, Hariana, Sahiwal (GenBank accession :

DQ985396, L27736, L27722, L27732) โคสายพันธุ์ยุโรป (Taurine) เช่น Angus, Charolais, Freisian, Jersey, Simmental, Hanwoo, Japanese Black (GenBank accession : L27712, L27716, L27718, L27726, L27734, AF499252, AB003793) และโคสายพันธุ์อาฟริกา เช่น White Fulani, N'Dama, Kenana, Butana (GenBank accession : L27720, L27730, L27728, L27714)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การผันแปรของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอส่วน D-loop

สำหรับ Figure 2 แสดงการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอส่วน D-loop ด้วยปฏิกิริยา ลูกโซ่โพลีเมอเรส และแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส หลังจากการย้อมสีด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 467 คู่เบส

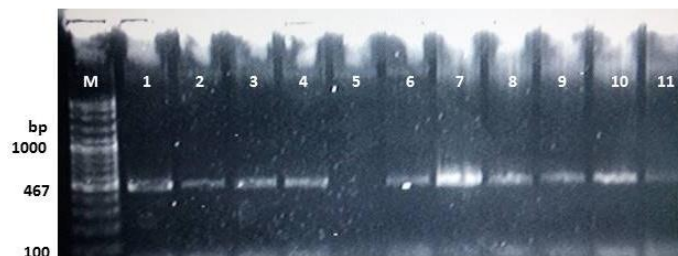


Figure 2 DNA fragment size of 467 bp obtained from PCR (M= 100 bp DNA ladder)

สำหรับ Figure 3 แสดงเมื่อนำชิ้นส่วนตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์และนำไปหาการเรียงลำดับเบสได้ 414 คู่เบส เมื่อนำลำดับเบสที่มีความผันแปรสูงจำนวน 297 คู่เบส มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ D-loop ของโคสายพันธุ์ต่างๆ พบว่ามีตำแหน่งคู่เบสที่แตกต่างกันจำนวน 50 ตำแหน่ง คือ ตั้งแต่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 16019 ถึง 16303 อ้างอิงตาม GenBank accession number V00654 บางตำแหน่ง

เป็น deletion และ Insertion ของเบส เช่นที่ตำแหน่ง 16143 โค *Bos indicus* มี deletion ของเบส A และที่ตำแหน่ง 16201 โค *Bos taurus* มี deletion ของเบส A ตำแหน่งที่แตกต่างกัน 50 ตำแหน่งนี้สามารถจำแนกเป็น deletion/insertion 2 ตำแหน่ง ที่เหลือ 48 ตำแหน่งเป็น Transition (32 T>C, 16G>A) เมื่อนำข้อมูลลำดับเบสของ D-loop โคพื้นเมืองไทยมาจำแนกกับสายพันธุ์โคอื่นๆ สามารถจำแนกได้ 21 Haplotypes

Table 1 Number of haplotype and haplotype frequencies in 105 of Thai-native cattle and Angus x Thai-native crossbred cattle (AgxTNT)

Haplotype (H)	n	Frequencies	KLP	LAN	CHON	E-SAN	AgxTNT
1	2	0.0190	2	0	0	0	0
2	4	0.0381	0	1	0	2	1
3	1	0.0095	1	0	0	0	0
4	0	0.0000	0	0	0	0	0
5	1	0.0095	1	0	0	0	0
6	3	0.0286	1	1	0	0	1
7	0	0.0000	0	0	0	0	0
8	1	0.0095	1	0	0	0	0
9	0	0.0000	0	0	0	0	0
10	60	0.5714	20	17	5	14	4
11	1	0.0095	0	1	0	0	0
12	1	0.0095	0	1	0	0	0
13	1	0.0095	0	1	0	0	0
14	1	0.0095	0	1	0	0	0
15	3	0.0286	3	0	0	0	0
16	1	0.0095	0	0	0	1	0
17	1	0.0095	0	0	1	0	0
18	3	0.0286	0	0	3	0	0
19	12	0.1143	1	6	4	1	0
20	1	0.0095	0	0	1	0	0
21	1	0.0095	0	0	1	0	0
22	2	0.0190	0	2	0	0	0
23	4	0.0381	0	3	0	0	1
24	1	0.0095	0	1	0	0	0
Total number	105	1.0000	30	35	15	18	7
Total Haplotype			8	11	6	4	4

* KLP = Kkao Lumphun cattle, LAN = Racing cattle, CHON = Southern fighting cattle, E-SAN = Northeastern cattle, and AgxTNT = Angus x Thai-native cattle

สำหรับ **Table 2** แสดงจำนวนและชนิด Haplotype พบว่าโคขาวลำพูน โคลาน โคชนได้ โคอีสานและโคโคลูกผสมแองกัสพื้นเมืองไทย มี 8, 11, 6, 4 และ 4 Haplotypes ตามลำดับ แสดงว่าในการศึกษาครั้งนี้ โคลานมีจำนวน Haplotype มากที่สุด รองลงมาเป็นโคขาวลำพูน โคชนได้ และโคอีสาน

Table 2 Number of haplotype (H) in Thai-native and Angus x Thai-native crossbred cattle (AgxTNT)

Cattle type	Number of haplotype	Haplotype (H)
KLP	8	1, 3, 5, 6, 8, 10, 15, 19
LAN	11	2, 6, 10, 11, 12, 13, 14, 19, 22, 23, 24
CHON	6	10, 17, 18, 19, 20, 21
E-SAN	4	2, 10, 16, 19
AgxTNT	4	2, 6, 10, 23

* KLP = Kkao Lumphun cattle, LAN = Racing cattle, CHON = Southern fighting cattle, E-SAN = Northeastern cattle, and AgxTNT = Angus x Thai-native cattle

ความหลากหลายทางพันธุกรรมรวมและภายในแต่ละสายพันธุ์โดยมีค่า Nucleotide diversity (ntd) เท่ากับ 0.3997 และ 0.4351 ตามลำดับ ซึ่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสายแม่สูง ในขณะที่โคพื้นเมืองบังคลาเทศชื่อ Red Chittagong ที่ดีเอ็นเอส่วน D-loop มีตำแหน่งคู่เบสแตกต่างกัน 44 ตำแหน่ง มี 25 Haplotype และมีค่า ntd เท่ากับ 0.0055 (Bhuiyan et al., 2007) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Lai et al. (2006) ในโคสายพันธุ์อินเดีย จำนวน 13 สายพันธุ์ พบว่ามีค่า ntd เท่ากับ 0.0042 ถึง 0.0063 และการศึกษาของ Jia et al. (2007) ในโคของจีน 12 สายพันธุ์ จำนวน 123 ตัว พบว่ามีค่า ntd เท่ากับ 0.0251 และมีค่า Haplotype diversity เท่ากับ 0.888 ซึ่งจัดว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง

ในการศึกษาครั้งนี้ โคพื้นเมืองไทยมีค่า Haplotype diversity (h) เท่ากับ 1.5599 ซึ่ง มีค่าสูงใกล้เคียงกับการศึกษาของ Henkes et al. (2005) ในโคพันธุ์ Nellore มีค่า h เท่ากับ 1.0027 อาจเป็นไปได้ว่าตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของส่วน D-loop ที่ทำการศึกษามีขนาดและอยู่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นคือ โคพื้นเมืองไทยศึกษาจำนวน 297 นิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 16017-16314 ส่วนโคพันธุ์ Nellore จำนวน 277 นิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 15964-16240 ดังนั้นแสดงว่า โคพื้นเมืองไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสายแม่สูงมาก

ค่าสัมประสิทธิ์ของความแตกต่างพันธุกรรม (Coefficient of differentiation, F_{ST}) มีค่าเท่ากับ -0.0885 ซึ่งค่า F_{ST} มากกว่า 0.1 หมายถึง มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสูง (Corte's et al., 2008) แสดง

ว่าโคพื้นเมืองไทยไม่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมสายแม่ ดังนั้นโคเหล่านี้ น่าจะมีพันธุกรรมมาจากสายแม่เดียวกัน

ระยะห่างทางพันธุกรรม

สำหรับ Table 3 แสดงระยะห่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างเป็นคู่ด้วยโมเดลของพารามิเตอร์คิมูราในโคพื้นเมืองไทยและโคลูกผสมแองกัสพื้นเมืองไทย พบว่าในกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาโคขาวลำพูน โคลาน โชน โคีสาน และโคลูกผสมแองกัสพื้นเมืองไทย มีระยะห่างทางพันธุกรรมภายในแต่ละสายพันธุ์เท่ากับ 0.0000-0.0442, 0.0000-0.9699, 0.0000-0.0162, 0.0000-0.0162 และ 0.0000-0.9464 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า โคขาวลำพูน โชน โคีสาน มีระยะห่างทางพันธุกรรมน้อยกว่า 0.5 แสดงว่าโคแต่ละสายพันธุ์ มีพันธุกรรมสายแม่ใกล้ชิดกัน เช่นเดียวกับ Sari et al. (2016) ได้ศึกษาวิเคราะห์ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอส่วน D-loop ในโคพื้นเมืองของอินโดนีเซียที่มีชื่อว่า Aceh cattle มีระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.0040-0.1500 และมีระยะห่างทางพันธุกรรมกับโคอินเดียเท่ากับ 0.0193

ส่วนโคลานและโคลูกผสมแองกัสพื้นเมืองไทย บางตัวที่มีระยะห่างทางพันธุกรรมสูง เนื่องจากมีโคลาน 4 ตัว ได้กำหนดหมายเลข COLAN406, COLAN407 และ COLAN-TB1533 โคลูกผสมแองกัสพื้นเมืองไทย หมายเลข TB1660 จัดอยู่ในกลุ่ม (Clade) โค Bos taurus ซึ่งอยู่คนละกลุ่มกับโคพื้นเมืองไทยส่วนใหญ่ของโคขาวลำพูน โคลาน โชนใต้ และโคีสาน

Table 3 The genetic distance of 3 Thai-native cattle and Angus x Thai-native crossbred cattle (AgxTNT) based on 2 parameter Kimura methods

	KLP	LAN	CHON	E-SAN	AgxTNT
KLP	0.0000-0.0442				
LAN	0.0000-0.9464	0.0000-0.9699			
CHON	0.0000-0.0384	0.0000-0.9121	0.0000-0.0162		
E-SAN	0.0000-0.0440	0.0000-0.8547	0.0000-0.0162	0.0000-0.0162	
AgxTNT	0.0000-0.9464	0.0000-0.9464	0.0000-0.8773	0.0000-0.8547	0.0000-0.9464

* KLP = Kkao Lumphun cattle, LAN = Racing cattle, CHON = Southern fighting cattle, E-SAN = Northeastern cattle, and AgxTNT = Angus x Thai-native cattle

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

สำหรับ Figure 4 แสดงผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic analysis) โดยวิธี UPGMA (Figure 4A) และ Maximum likelihood (Figure 4B) จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาและจากฐานข้อมูลใน GenBank พบว่าโคมี 2 สายแม่ (Clades) คือ *Bos indicus* (Z) และ *Bos taurus* (T) โคสาย *B. indicus* จำแนกได้เป็น 2 clusters (Z1 และ Z2) จากการศึกษานี้ จำแนกเป็น 2 clusters คือ Cluster Z1 ประกอบด้วย 4 Haplotype ได้แก่ โคพื้นเมืองไทย Haplotype 4, 5, 6, 8, 11, และ 12 รวมทั้งโค Sahiwal ใน Cluster Z2 ประกอบด้วย

Haplotype 1, 2, 3, 7, 9, 10, 13-22 และโค Red Chittagong, Tharparkar, Hariana ส่วน Haplotype 23 และ 24 จัดอยู่ในกลุ่ม *Bos taurus* (Clade T) Haplotype 23 เป็นโคหลานหมายเลข COLAN-TB1533 และโคลูกผสมแองกัสพื้นเมืองไทย หมายเลข TB1660 ส่วน Haplotype 24 เป็นโคหลาน 3 ตัว ได้แก่ หมายเลข COLAN406-408

ส่วนโคขาวลำพูนที่เป็นพระโคจำนวน 4 ตัว จัดอยู่ใน Haplotype 10 จำนวน 3 ตัว ซึ่งพันธุกรรมสายแม่ Haplotype 10 เป็นพันธุกรรมสายแม่หลักของโคพื้นเมืองในประเทศไทย และ Haplotype 15 หนึ่งตัว

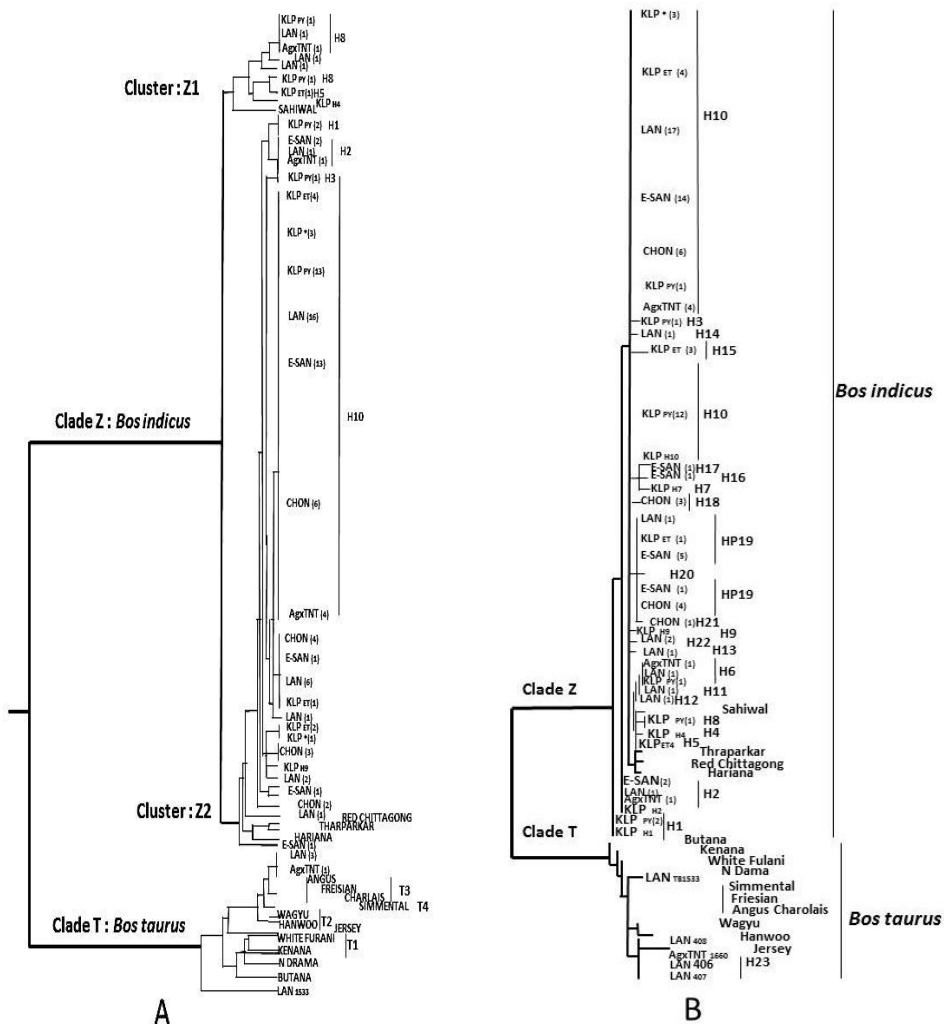


Figure 4 UPGMA tree [A] and Maximum likelihood tree [B] based on 297 bp of mtDNA D-loop from 105 samples

สำหรับ Figure 5A แสดงผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic analysis) โดยวิธี Median joining network พบว่าโคมี 2 สายแม่ (Clades) คือ *Bos indicus* และ *Bos taurus* (T) โคสาย *B. indicus* และแสดงจำนวนตำแหน่งลำดับเบสของ D-loop (CH) ที่มีการกลายพันธุ์ จะเห็นได้

ว่าระหว่างโคกลุ่ม *Bos indicus* และ *Bos taurus* มีวิวัฒนาการโดยมีการกลายพันธุ์จำนวน 20 ตำแหน่ง สำหรับ Figure 5B แสดงวิวัฒนาการโดยการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งต่างๆ ของ D-loop ในกลุ่มโค *Bos indicus*

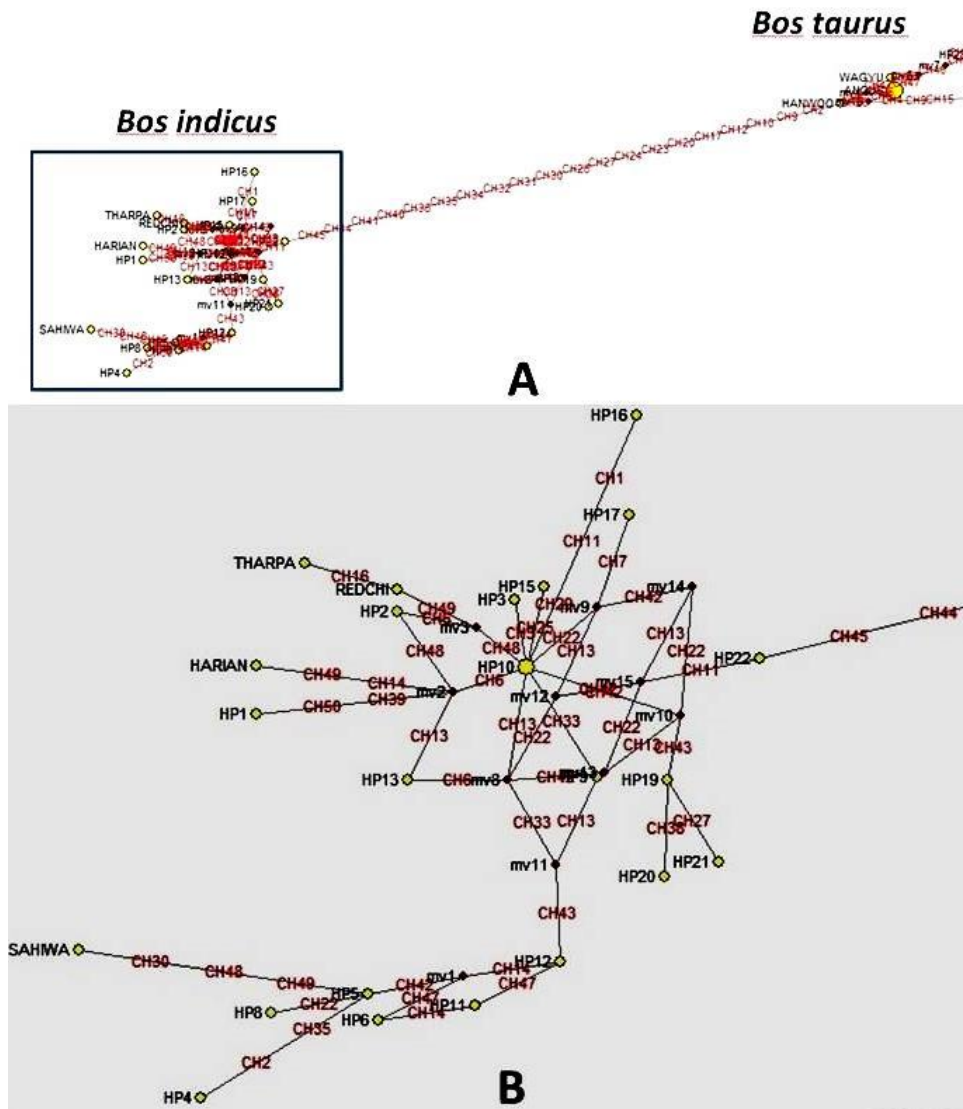


Figure 5 Median joining network of 24 haplotypes from 105 samples and reference sequences showing *Bos indicus* and *Bos taurus* clade (A) and mutation positions (CH) of D-loop sequences (297 bp)

สำหรับ Figure 6A แสดง Haplotype22 เป็นโคลาน 2 ตัว หมายเลข COLAN-TB1528, COLAN-TB1518 ชื่อลูกเสียบ กับมดแดง จากจังหวัดราชบุรี เป็นต้นกำเนิดของโคพื้นเมืองไทย Haplotype10 ดังจะเห็นได้จากเส้นทางวิวัฒนาการโดยมีการกลายพันธุ์รวมจำนวน 4 ตำแหน่ง จากจุดกำเนิด (Ancestral node) คือ Haplotype22

สำหรับ Figure 6B แสดงโค Tharparkar ประเทศปากีสถาน มีเส้นทางวิวัฒนาการมาจากโคลาน Haplotype22 เช่นกัน ผ่านโคพื้นเมืองไทย Haplotype10 และโค Red Chittagong ประเทศบัง

คลาเทศ ซึ่งมีการกลายพันธุ์รวมจำนวน 7 ตำแหน่ง

สำหรับ Figure 6C แสดงโค Hariana ประเทศอินเดีย มีเส้นทางวิวัฒนาการมาจากโคลาน Haplotype22 เช่นกัน ผ่านโคพื้นเมืองไทย Haplotype13 ซึ่งมีการกลายพันธุ์รวมจำนวน 7 ตำแหน่ง

สำหรับ Figure 6D แสดงโค Sahiwal ประเทศอินเดีย มีเส้นทางวิวัฒนาการมาจากโคลาน Haplotype22 เช่นกัน ผ่านโคพื้นเมืองไทย Haplotype12 และ 5 ซึ่งมีการกลายพันธุ์รวมจำนวน 10 ตำแหน่ง

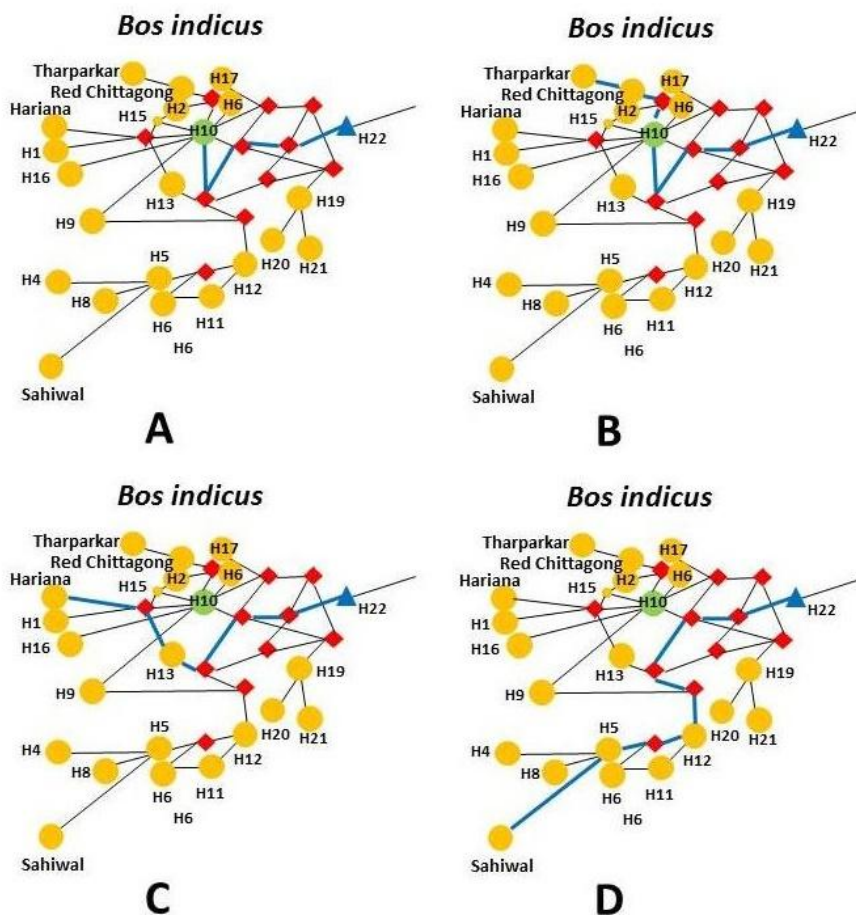


Figure 6 Evolution route (Bold line) from ancestral node (▲) to descendent node (●) [A] Haplotype22 to Haplotype10 [B] Haplotype22 to Tharparkar [C] Haplotype22 to Hariana [D] Haplotype22 to Sahiwal

สรุปและข้อเสนอแนะ

โคพื้นเมืองไทย (โคขาวลำพูน โคลาน โคชนใต้) ส่วนใหญ่จัดอยู่ในกลุ่มโค *Bos indicus* โดยพบว่า มีความหลากหลายของ Haplotype สูง แต่มีค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างพันธุกรรมของประชากรต่ำ แสดงให้เห็นว่าโคทั้ง 4 สายพันธุ์ มีวิวัฒนาการมาจากแหล่งกำเนิดเดียวกัน คือ โคลาน Haplotype 22 ซึ่งเป็นต้นกำเนิดของโคขาวลำพูน โคอีสาน โคชนใต้ ซึ่งมีการกระจายตัวไปตามถิ่นที่อยู่อาศัยต่างๆ และมีลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นการอนุรักษ์สัตว์ประจำถิ่นเหล่านี้จึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อคงความหลากหลายของโคพื้นเมืองไทยและสามารถใช้ประโยชน์สำหรับการวางแผนการอนุรักษ์และวางแผนการใช้ประโยชน์ของโคพื้นเมืองไทยในการศึกษาผลของพันธุกรรมสายแม่ต่อผลผลิตในโคเนื้อต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าของสัตว์กลุ่มผู้เลี้ยงโคลานอำเภอมัว จังหวัดสมุทรสงคราม เจ้าของฟาร์มคุณชาญยุทธ์ ปิดตานัง อำเภोजอมบึง จังหวัดราชบุรี และเจ้าของฟาร์มโคชน คุณสมพงษ์ สุวรรณรักษ์ อำเภอมือง จังหวัดเพชรบูรณ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างที่นำมาศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- กองบำรุงพันธุ์สัตว์. 2547. มาตรฐานของลักษณะประจำพันธุ์โคเนื้อ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ปศุสัตว์เกษตร. 35: 44-49.
- Bandelt, H.J., P. Forster, and A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37-48.
- Boettcher, P.J., D.W. Steverink, D.C. Beitz, A.E. Freeman, and B.T. McDaniel. 1996. Multiple herd evaluation of the effects of maternal lineage on yield traits of Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 79: 655-662.
- Bradley, D.G., R.T. Loftus, E.P. Cunningham, and D.E. MacHugh. 1998. Genetics and domestic cattle origins. *Evol. Anthropol.* 6: 79-86.
- Bradley D.G., D.E. MacHugh, P. Cunningham, and R.T. Loftus. 1996. Mitochondrial diversity and the origins of African and European cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93: 5131-5135.
- Bhuiyan, M.S.A., A.K.F. Bhuiyan, D.H. Yoon, J.T. Jeon, C.S. Park, and L.H. Lee. 2007. Mitochondrial DNA diversity and origin of Red Chittagong cattle. *Asean-Aus. J. Anim. Sci.* 20: 1478-1484.
- Brown, W.M., M. George, and A.C. Wilson. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 1967-1971.
- Corte's, O., I. Tupac-Yupanqui, S. Dunner, M.A. Garci'a-Atance, D. Garci'a, J. Ferna'ndez, and J. Can'on. 2008. Ancestral matrilineages and mitochondrial DNA diversity of the Lidia cattle breed. *Anim. Genet.* 39: 649-654.
- Cummins, J.M. 2002. The role of maternal mitochondria during oogenesis, fertilization and embryogenesis. *Reprod. Biomed. Online.* 4: 176-182.
- Giles R.E., H. Blanc, H.M. Cann, et al. 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 6715-6719.
- Henkes, L.E., W.A. Siva, J.C.F. Moraes, and T.A. Weimer. 2005. Mitochondrial control region genetic diversity and maternal ancestry of a Brangus Ibage cattle population. *Genet. and Mol. Biol.* 28: 60-66.
- Jia, S., H. Chen, G. Zhang, Z. Wang, C. Lei, R. Yao, and H. Han. 2007. Genetic variation of mitochondrial D-loop region and evolution analysis in some Chinese cattle breeds. *J. Genet. Genomics.* 34: 510-518.
- Lai, S.J., Y.P. Liu, Y.X. Liu, X.W. Li, and Y.G. Yao. 2006. Genetic diversity and origin of Chinese cattle revealed by mtDNA D-loop sequence variation. *Mol. Phyl. Evol.* 38: 146-154.
- Loftus R.T., D. E. MacHugh, D.G. Bradley, P.M. Sharp, and P. Cunningham. 1994. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 2757-2761.
- Nei, M., and F. Tajima. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genet.* 97: 145-163.

- Sari, E.M., H. Jianlin, R.R. Noor, C. Sumantri, and E.T. Margawati. 2016. Phylogenetic analysis of Aceh cattle breed of Indonesia through mitochondrial D-loop region. *J. Genet. Eng. Biotech.* (In press).
- Schutz, M.M., A.E. Freeman, D.C. Beitz, and J.E. Mayfield. 1992. The importance of maternal lineage on milk yield traits of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 75: 1331-1341.
- Tamura, K., G., D. Stecher, A. D. Peterson, A. Fillipski, and S. Kumar. 2013. Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- Troy C.S., D.E. MacHugh, J.F. Bailey, D.A. Magee, R.T., P. Cunningham, A.T. Chamberlain, B.C. Sykes, and D.G. Bradley. 2001. Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature.* 410: 1088-1091.