

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระบือพื้นเมืองไทยด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโทคอนเดรีย

Study of genetic diversity of Thai native buffaloes using mitochondrial DNA marker

กมลพรรณ เจือกวั่น¹ มนต์ชัย ดวงจินดา^{1*} ยูพิน ผาสุก¹ วิโรจน์ ภัทรจินดา¹ สรายุทธ วรรณสูตร² และ กิตติ กุบแก้ว³

Kamonpun Chauckwon¹, Monchai Duangjinda^{1*}, Yupin Phasuk¹, Virote Pattarajinda¹, Sarayut, Wonnasuit², and Kitti Koobkaew³

¹ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

²สำนักงานปศุสัตว์ สว่างอารมณ์ อุทัยธานี 61150

³สำนักสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยที่ 4 ขอนแก่น 40000

¹Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand.

²The Department of livestock Development, Sawang Arom, Uthaitхани 61150, Thailand.

³Regional Bureau of Animal Health and Sanitation, Region Four, Khon Kaen, 40000, Thailand.

* Corresponding author: monchai@kku.ac.th

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และจำแนกกลุ่มพันธุกรรมของกระบือพื้นเมืองไทย ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโทคอนเดรีย (mtDNA) บริเวณ D-loop พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอขนาด 300 คู่เบส ได้ทั้งสิ้น 165 ตัวอย่าง จากกระบือ 6 แหล่งที่อยู่อาศัย คือ กระบือพื้นเมืองจังหวัดเชียงราย (C, n=30) ขอนแก่น (K, n=39) สุรินทร์ (S, n=29) อุทัยธานี (U, n=26) นครศรีธรรมราช (N, n=17) และตรัง (T, n=24) พบความหลากหลายของดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียบริเวณ D-loop จำนวน 7 แฮปโลไทป์ (haplotype) ปรากฏตำแหน่ง SNP ทั้งหมด 32 ตำแหน่ง และตำแหน่ง insertion-deletion 1 ตำแหน่งแสดงให้เห็นว่ากระบือพื้น

เมืองไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมแตกต่างกันในแต่ละแหล่งที่อยู่อาศัยและมีแหล่งพันธุกรรมเริ่มต้นที่แตกต่างกัน เมื่อจำแนกกลุ่มพันธุกรรมของกระบือพื้นเมืองไทย โดยใช้ระยะห่างทางพันธุกรรมตามวิธี Nei's genetic distance ด้วย phylogenetic tree ควบคู่กับลักษณะของถิ่นที่อยู่อาศัย สามารถจำแนกกระบือพื้นเมืองไทยได้เป็น 3 กลุ่ม คือ (1) กลุ่มกระบือคอยได้แก่ กระบือพื้นเมืองจังหวัดเชียงราย (2) กลุ่มกระบือทะเล ได้แก่ กระบือพื้นเมืองจังหวัดตรัง และ (3) กลุ่มกระบือลุ่มน้ำ ได้แก่ กระบือพื้นเมืองจังหวัดขอนแก่น สุรินทร์ อุทัยธานี และนครศรีธรรมราช ส่วนการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมพบว่ากระบือพื้นเมืองในแต่ละแหล่งที่อยู่มีความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับปานกลาง ($G_{ST} = 0.257$) ดังนั้น

การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นข้อมูลพื้นฐานพันธุกรรม ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุ์ และการรวบรวมพันธุกรรมของกระบือพื้นเมืองไทย

ABSTRACT

The aim of this study was to study diversity and genetic classification of Thai native buffaloes using mitochondrial DNA marker. From 165 buffaloes of 6 different habitats of Thailand represented by Chaingrai (C, n=30), Khon Kaen (K, n=39), Surin (S, n=29), Uthaitхани (U, n=26), Nakhon Si Thammarat (N, n=17) and Trang province (T, n=24), 300 bp fragments of mtDNA (D-loop) were successfully amplified. Analysis of mtDNA (D-loop) sequences revealed 7 different haplotypes resulting from 32 polymorphic sites and one insertion-deletion. This result showed that Thai native buffaloes have flourishing of genetic diversity. The phylogenetic tree analysis from Nei's genetic distance and characteristics of habitat revealed that Thai native buffaloes could be classified into 3 groups: (1) mountain buffalo: the Chiangrai native buffaloes, (2) ocean buffalo: the Trang native buffaloes, and (3) river basin buffalo: the Khon Kaen, Surin, Uthaitхани, Nakhon Si Thammarat native buffaloes. The analysis of genetic structure showed moderate genetic differentiation between six groups ($G_{ST} = 0.257$). The information generated by this study will greatly aid in the establishment of effective breeding programs and conservation genetics of Thai native buffaloes.

คำสำคัญ: ความหลากหลายทางพันธุกรรม กระบือพื้นเมืองไทย ดีเอ็นเอไมโทคอนเดรีย

Key words: genetic diversity, Thai native buffalo, mitochondrial DNA

บทนำ

กระบือพื้นเมืองไทยเป็นสัตว์เลี้ยงที่อยู่คู่กับเกษตรกรในชนบทมาเป็นเวลานาน เนื่องจากกระบือมีความดีเด่นหลายประการ เช่น สามารถปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ดี ใช้ประโยชน์จากอาหารหยาบคุณภาพต่ำได้ดี มีความแข็งแรงต้านทานโรคและแมลง และคุณภาพเนื้อดีมีโคเลสเตอรอลต่ำ (สุทธิพงศ์, 2545) แต่เมื่อความเจริญของสังคมที่พัฒนาจากระบบเกษตรกรรมมาเป็นระบบอุตสาหกรรม ส่งผลกระทบต่อการลดจำนวนของกระบือพื้นเมืองไทย ซึ่งการลดลงของจำนวนประชากรกระบือทำให้โอกาสที่กระบือจะผสมพันธุ์ในหมู่เครือญาติ (inbreeding) มีมากขึ้น รวมทั้งการเลี้ยงกระบือพื้นเมืองไทยในปัจจุบัน มีการเลี้ยงในสภาพฝูงขนาดเล็ก ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมระหว่างกระบือแต่ละพื้นที่เกิดขึ้นได้ยาก ซึ่งส่งผลให้ลักษณะที่ดีบางลักษณะสูญหายไปได้ง่ายและอาจส่งผลให้ยีนในสภาพเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) ลดลง นำไปสู่การสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรม (จินตนา, 2548) ซึ่งความหลากหลายทางพันธุกรรมเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อบอกถึงการเตรียมความพร้อมในการสนองตอบต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมรอบตัว รวมถึงเพื่อการอยู่รอดของตัวเองและเผ่าพันธุ์ (วิสุทธิ, 2538) ดังนั้นหากกระบือพื้นเมืองไทยยังคงสภาพความหลากหลายทางพันธุกรรมไว้ได้ อาจเป็นไปได้ว่า กระบือพื้นเมืองได้ผ่านกระบวนการวิวัฒนาการ เพื่อความอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา เป็นที่น่าเสียดายหากกระบือพื้นเมืองจะต้องสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมไป นั่นก็อาจหมายถึง การสูญเสียพันธุกรรมของกระบือที่สามารถใช้ประโยชน์ได้ การสูญเสียคุณลักษณะของเฮเทอโรไซกัส หรือการสูญเสียศักยภาพในกระบวนการเกิดวิวัฒนาการ ในกระบวนการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์กระบือพื้นเมืองให้เป็นอย่างดีมีประสิทธิภาพนั้น จำเป็นจะต้องมีข้อมูลพื้นฐานด้านพันธุกรรมเหมือนหรือแตกต่างกันมากน้อยเพียงใดในแต่ละพื้นที่ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการ

กำหนดแผนการในการวางแผนอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์กระบือพื้นเมือง (อลงกต และเรืองวิทย์, 2543) ในอดีตได้มีการจำแนกกระบือตามแหล่งที่อยู่อาศัย (ประสบ, 2520) ซึ่งเป็นข้อมูลที่ไม่สามารถจำแนกกลุ่มพันธุ์ออกจากกันได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Zhang *et al.*, 2008) ดังนั้นในปัจจุบันมีการนำเทคนิคอนุพันธุศาสตร์มาตรวจสอบหาความหลากหลายทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ เพื่อจำแนกสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ได้ประสบความสำเร็จ อาทิเช่น โค จามรี กระบือแม่น้ำ แกะ แพะ อุฐ หนูและไก่ เป็นต้น (Groeneveld *et al.*, 2010) เครื่องหมายพันธุกรรมที่นิยมใช้ คือ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอไมโทคอนเดรีย (mtDNA) ซึ่งถูกนำมาใช้ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรม การติดตามแหล่งพันธุกรรมเริ่มต้นของสัตว์ (Amano *et al.*, 1994) ในการศึกษาความหลากหลายของดีเอ็นเอไมโทคอนเดรีย นิยมเลือกใช้ตรงตำแหน่งของบริเวณควมคุม (displacement loop) หรือ D-loop เนื่องจากบริเวณดังกล่าวเป็นส่วนที่มีความผันแปรสูงภายในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน (Parfitt and Huismans, 1998) ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของกระบือพื้นเมืองไทย และหาความสัมพันธ์ของกระบือพื้นเมืองไทยในแต่ละแหล่งที่อยู่อาศัย พร้อมทั้งจำแนกกลุ่มพันธุ์กระบือพื้นเมืองไทยที่กระจายอยู่ในส่วนต่างๆ ของประเทศไทยได้ด้วย

อุปกรณ์และวิธีการ

การสุ่มตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างเลือดจากกระบือพื้นเมือง 6 แหล่งที่อยู่อาศัยในประเทศไทย (Table1) ได้แก่ อำเภอมะนัง จังหวัดเชียงราย (C, n=30), ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์สุรินทร์ อำเภอมือง จังหวัดสุรินทร์ (S, n=30), อำเภอบ้านไผ่ จังหวัดขอนแก่น (K, n=46), อำเภอหนองขาหย่าง จังหวัดอุทัยธานี (U, n=30), อำเภอทุ่งใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช (N, n=30) และอำเภอปะเหลียน จังหวัดตรัง (T, n=30) เจาะเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) ปริมาตร

10-15 มิลลิลิตร ใส่หลอดเก็บตัวอย่างเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัว 0.5M EDTA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

การสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย

นำตัวอย่างเลือดมาปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที จากนั้นนำส่วนของเม็ดเลือดขาว (buffy coat) มาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีที่ดัดแปลงจาก Goodwin *et al.* (2007) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยกระบวนการ polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ไพรเมอร์ BovA: 5' GACCTCTATAGCAGTACATA 3' และ BovB: 5' CATTAGTCCATCGAGATGTC 3' (Lau *et al.*, 1998) หลังจากนั้นจัดรูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP) พร้อมกับหาลำดับเบสของดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียในแต่ละรูปแบบ SSCP (Macrogen ประเทศเกาหลี) และนำข้อมูลลำดับเบสมาเปรียบเทียบกับลำดับเบสอ้างอิงที่มีรายงานแล้วของ *Bos Taurus* และ swamp buffalo (GenBank accession number AF309773 และ NC_006295 ตามลำดับ) เพื่อหาดำแหน่ง single nucleotide polymorphisms (SNPs) และตรวจสอบตำแหน่ง SNPs ด้วยกระบวนการ polymerase chain reaction–restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) เพื่อตรวจสอบการปรากฏของจำนวนแฮพลไทป์ หลังจากนั้นแปลงข้อมูลของ SNPs ในแต่ละแฮพลไทป์ให้อยู่ในรูปแบบ binary data เพื่อจัดกลุ่มทางพันธุกรรมด้วยโปรแกรม NTSYSpc 2.1 ต่อไป

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระบือพื้นเมืองไทย

นำข้อมูลลำดับเบสในแต่ละแฮพลไทป์มาเปรียบเทียบ เพื่อตรวจสอบตำแหน่ง SNPs ด้วยโปรแกรม ClustalW2 (Kim *et al.*, 2010)

Table 1 The characteristics of 6 habitats of Thai native buffaloes.

Habitat	Common name	Geography	Specification
Mae Chan, Chiang Rai	Mountain buffalo	Plateau surface, mountainous terrain	- height above sea level about 410-580 meters - source of feed is natural grassland and leaves (e.g. bamboo leaf) - management is grazing in natural grassland
Ban Pai, Khon Kaen	River basin buffalo	Chi, Phong and Sern river basin area, flat river plains	- height above sea level about 100-200 meters - source of feed is natural grassland and straw - management is grazing in natural grassland
Surin livestock Breeding and Research Center, Surin	River basin buffalo	Chi river basin area	- height above sea level about 100-200 meters - source of feed is concentrate and natural grassland - management is grazing in natural grassland and housing
Nong Khayang, Uthaithani	River basin buffalo	Chao Phraya river basin area, plains	- height above sea level about 120-170 meters - source of feed is natural grassland and rice straw - management is grazing in natural grassland
Thung Yai, Nakhon Si Thammarat	River basin buffalo	The shore of the Gulf of Thailand, rugged hilly forest area	- source of feed is natural grassland - management is grazing in natural grassland
Koh Sukorn, Trang	Ocean buffalo	Sub-continental land surrounded by water	- source of feed is natural grassland and water grass (e.g. lotus and sea grass) - management is grazing in natural grassland

การจำแนกกลุ่มกระบือพื้นเมืองไทย

จัดกลุ่มสายพันธุ์กระบือพื้นเมืองไทยจากระยะห่างทางพันธุกรรมรายตัว จากค่า coefficient ของ DICE โดยนำมาแปลงเป็นตัวแปรใหม่ (m1 และ m2) โดยวิธี principal component analysis plot ด้วยโปรแกรม SAS 9.12 จากนั้นสร้าง scatter plot ระหว่าง 2 ตัวแปร

และพิจารณาจำนวนกลุ่มที่เกิดขึ้นจากกราฟที่ปรากฏ จากนั้นประเมินค่าระยะห่างทางพันธุกรรมด้วยวิธี Nei's minimum distance (Nei, 1978) ระหว่างกระบือพื้นเมืองไทยแต่ละแหล่งที่อยู่อาศัย จากการวิเคราะห์แผนภาพด้วยวิธี neighbor joining ด้วยโปรแกรม NTSYSpc2.1

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างระยะห่างทางพันธุกรรมและระยะห่างทางภูมิศาสตร์

ทดสอบความสัมพันธ์ของระยะห่างทางพันธุกรรมของกระบือแต่ละแหล่งที่อยู่อาศัย กับระยะห่างทางภูมิศาสตร์ของกระบือในแต่ละแหล่ง ด้วยกราฟความสัมพันธ์ทั้ง 2 ตัวแปร

ผลการทดลองและวิจารณ์

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระบือพื้นเมืองไทย

การศึกษาครั้งนี้สุ่มเก็บตัวอย่างเลือดกระบือพื้นเมือง 4 ภูมิภาคของประเทศไทยจำนวน 196 ตัวอย่าง สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียบริเวณ D-loop ได้ทั้งหมด 165 ตัวอย่าง ประกอบด้วย C, K, S, U, N และ T จำนวน 30, 39, 29, 26, 17 และ 24 ตัวอย่าง ตามลำดับ พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียบริเวณ D-loop มีความยาว 300 คู่เบส ผลจากการเปรียบเทียบข้อมูลนิวคลีโอไทด์ดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียบริเวณ D-loop ในกระบือพื้นเมืองไทย กับข้อมูลพันธุกรรมจากฐานข้อมูลของ GenBank พบว่ามีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Bos Taurus* (GenBank accession number AF309773) และ swamp buffalo (*Bubalus Bubalis*, GenBank accession number NC_006295) ประมาณ 96.67% และ 95.72% ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียบริเวณ D-loop ทั้ง 7 รูปแบบ มีความคล้ายคลึงกันประมาณ 96.80%

สุ่มตัวอย่างจากรูปแบบ SSCP ที่ปรากฏจากการทำ PCR-SSCP ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำมาเปรียบเทียบกันเพื่อหาตำแหน่งที่แตกต่างกัน โดยเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *Bos Taurus* และ *Bubalus Bubalis* ด้วย พบจำนวน SNPs ทั้งหมด 32 ตำแหน่ง และอีก 1 ตำแหน่งของ insertion-deletion บริเวณตำแหน่งเบสที่ 71-78 (Figure 1)

การวิเคราะห์หาเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ

วิเคราะห์ตำแหน่งเอ็นไซม์ตัดจำเพาะบริเวณ insertion-deletion (ตำแหน่งเบสที่ 71-78) ด้วยโปรแกรม NEB cutter v2.0 (Vincze et al., 2003) พบว่าสามารถใช้เอ็นไซม์ *Hpy188III* (5' TCNNGA 3') ตรวจสอบความหลากหลายบริเวณ insertion-deletion ได้ ขนาดของชิ้นดีเอ็นเอหลังจากตัดด้วยเอ็นไซม์ *Hpy188III* มี 2 แบบ คือ ถ้าเกิด insertion พบจำนวนชิ้นดีเอ็นเอ 4 ชิ้น คือ ขนาด 180, 69, 37 และ 14 คู่เบส ถ้าเกิด deletion พบจำนวนดีเอ็นเอ 3 ชิ้น คือ 188, 98 และ 14 คู่เบส (Figure 2)

จากการตรวจสอบดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียบริเวณ D-loop ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ในกระบือทั้งหมด 165 ตัว เพื่อตรวจสอบการเกิด insertion และ deletion ของลำดับนิวคลีโอไทด์ พบว่ารูปแบบแอสไพโลไทป์ที่ 1, 3 และ 5 เกิดกระบวนการ deletion ของเบสตรงตำแหน่ง 71-78 และรูปแบบแอสไพโลไทป์ที่ 2, 4, 6 และ 7 เกิดกระบวนการ insertion สามารถสรุปผลความหลากหลายทางพันธุกรรมของดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียบริเวณ D-loop ด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hpy188III* ได้ 7 แอสไพโลไทป์ (Table 2)

จากการทดสอบความสัมพันธ์ของรูปแบบดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียบริเวณ D-loop กับแหล่งอยู่อาศัยของกระบือ พบว่าแหล่งที่อยู่อาศัยมีอิทธิพลให้เกิดรูปแบบดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียบริเวณ D-loop ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และจาก Table 1 ซึ่งให้เห็นว่า กระบือพื้นเมืองไทยมีพันธุกรรมของ mtDNA (D-loop) แตกต่างกันตามแหล่งที่อยู่อาศัย และพบว่ารูปแบบดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียบริเวณ D-loop บางรูปแบบมีความจำเพาะต่อแหล่งที่อยู่บางแหล่ง กล่าวคือ รูปแบบที่ 1 จำเพาะต่อกระบือพื้นที่เชียงราย รูปแบบที่ 3 จำเพาะต่อกระบือพื้นที่ตรัง และรูปแบบที่ 4 จำเพาะต่อกระบือพื้นเมืองสุรินทร์

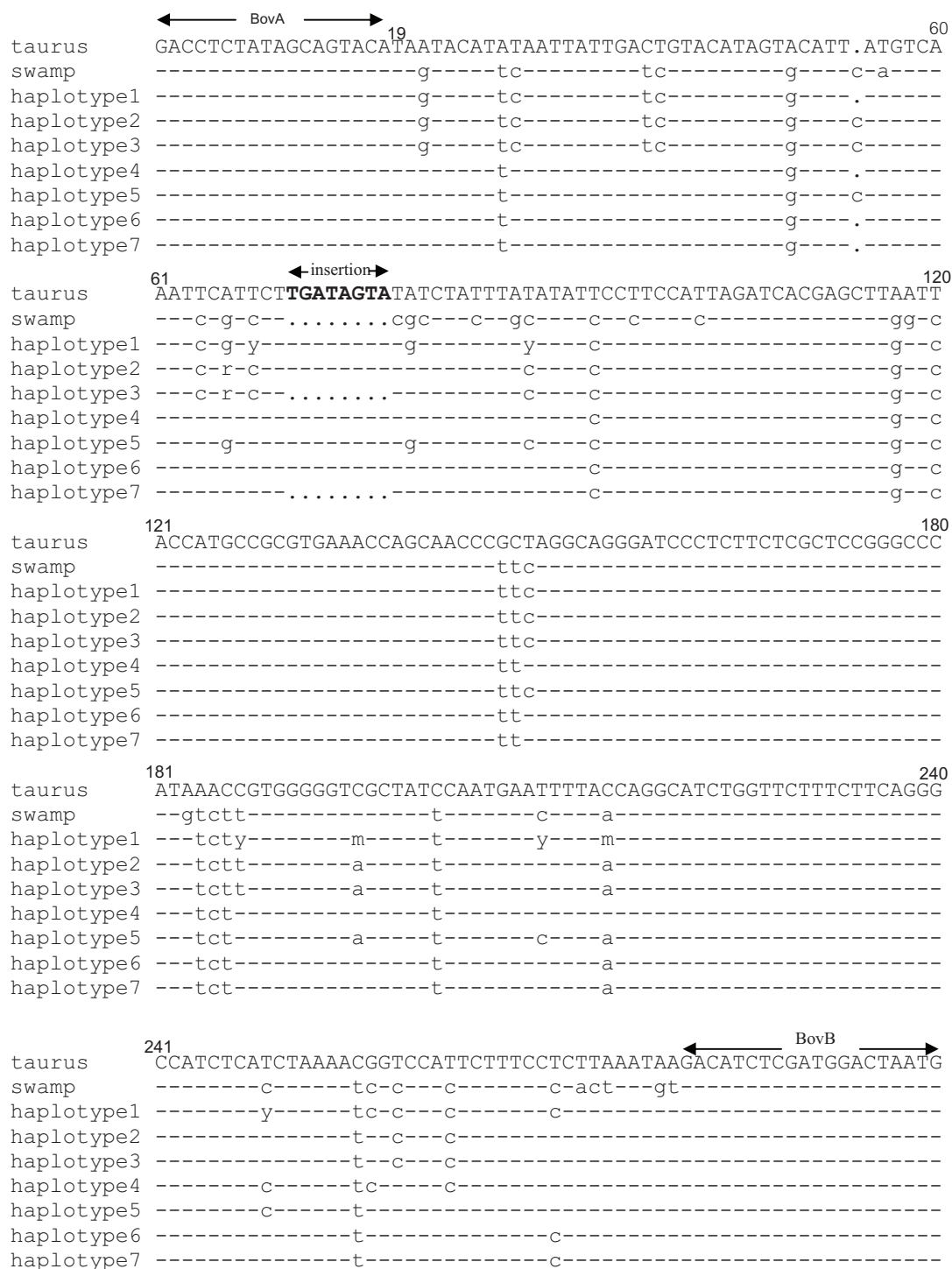


Figure 1 Polymorphic nucleotide sites for 7 D-loop haplotypes observed in 165 Thai native buffaloes compared with *Bos Taurus* (GenBank accession number AF309773) and swamp buffalo (*Bubulus Bubalis*, GenBank accession number NC_006295). r = A or G, m = A or C and y = C or T.

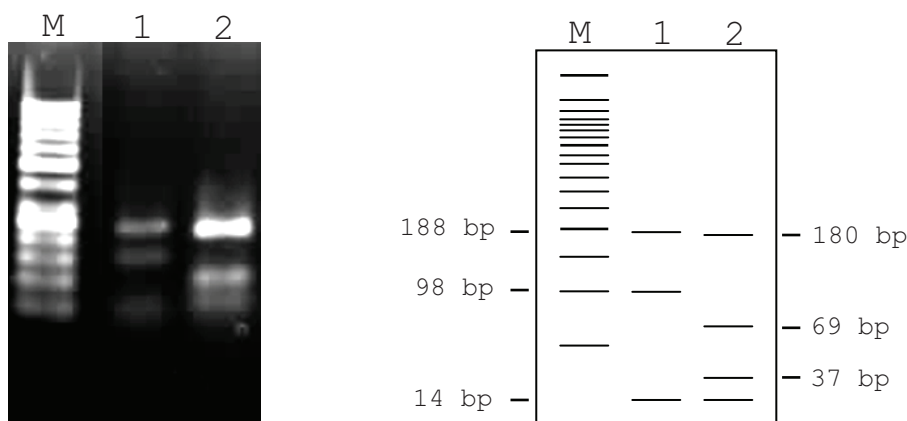


Figure 2 *Hpy188III* restriction pattern of the PCR amplified mtDNA (D-loop) of Thai native buffaloes. Lane M, 50 bp DNA ladder (Promega); Lane 1, deletion; Lane 2, insertion. (14 bp fragment was invisible).

Table 2 Percentage distribution of mtDNA (D-loop) by using restriction enzyme *Hpy188III* in 6 Thai native buffalo populations (Chiang Rai, C; Khon Kaen, K; Surin, S; Uthaitхани, U; Nakhon Si Thammarat, N and Trang, T)

Pattern	Location					
	C	K	S	U	N	T
1	63.33	10.26	6.90	26.92	0.00	0.00
2	3.33	10.26	6.90	3.85	0.00	8.33
3	0.00	5.13	0.00	7.69	0.00	58.33
4	3.33	28.21	82.76	26.92	35.29	0.00
5	10.00	20.51	0.00	3.85	58.82	0.00
6	20.00	7.69	3.45	30.77	5.88	8.33
7	0.00	17.95	0.00	0.00	0.00	25.00

ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกระบือพื้นเมืองไทย

จากการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของกระบือพื้นเมืองไทยจาก 6 แหล่งที่อยู่อาศัย ด้วยวิธีการ Nei's genetic distance พบความแตกต่างทางพันธุกรรมมีค่าอยู่ในช่วง 0.041-0.701 (Table 3) ซึ่งกระบือพื้นเมืองจังหวัดเชียงรายมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมจากกระบือพื้นเมืองจังหวัดนครราชสีมามากที่สุดเท่ากับ 0.701 ส่วนกระบือพื้นเมืองจังหวัดอุทัยธานีและจังหวัดขอนแก่นมีความ

แตกต่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด เท่ากับ 0.041 สำหรับการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมจากข้อมูลไมโทคอนเดรีย พบว่าความผันแปรของพันธุกรรมกระบือที่เกิดขึ้น เป็นผลเนื่องมาจากความแตกต่างของแหล่งที่อยู่อาศัยระดับปานกลาง ($G_{ST} = 0.257$) ค่าที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ มีค่าสูงกว่าการศึกษาในกระบือไทยในพื้นที่ลุ่มแม่น้ำโขงจากข้อมูลไมโทคอนเดรีย ซึ่งมีความเท่ากับ 0.066 (กิตติ และมนต์ชัย, 2553)

Table 3 Nei's genetic distance between six Thai native buffalo populations: Chiangrai (C), Khon Kaen (K), Surin (S) Uthaithani (U), Nakhon Si Thammarat (N) and Trang (T)

	C	K	S	U	N	T
C	0.000					
K	0.366	0.000				
S	0.592	0.105	0.000			
U	0.186	0.041	0.121	0.000		
N	0.701	0.088	0.186	0.228	0.000	
T	0.507	0.266	0.605	0.289	0.613	0.000

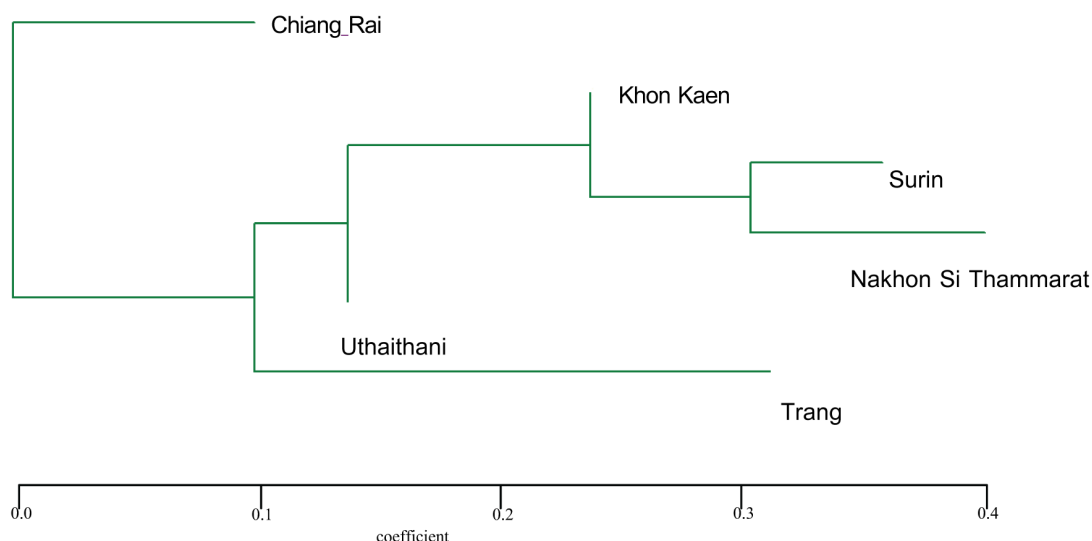
การวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมและการสร้าง phylogenetic tree

เมื่อสร้าง phylogenetic tree โดยใช้ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม Nei's genetic distance ด้วยวิธีการ neighbor-joining ของกระบือพื้นเมืองที่มาจาก 6 แหล่งที่อยู่อาศัยในประเทศไทย (Figure 3) พบว่าสามารถจำแนกกลุ่มทางพันธุกรรมได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ คือ (1) กลุ่มกระบือพื้นเมืองจังหวัดเชียงราย (2) กลุ่มกระบือพื้นเมืองจังหวัดตรัง และ (3) กลุ่มกระบือพื้นเมืองจังหวัดขอนแก่น สุรินทร์ นครศรีธรรมราช และ อุทัยธานี ซึ่งยังไม่สามารถจำแนกกลุ่มกระบือพื้นเมืองในแต่ละแหล่งออกจากกัน จากผลการศึกษา

สามารถสรุปได้ว่ากระบือพื้นเมืองไทยในแต่ละแหล่งมีแหล่งพันธุกรรมเริ่มต้นที่แตกต่างกันและพบว่ารูปแบบดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียบริเวณ D-loop ที่พบค่อนข้างมีความจำเพาะกับกระบือพื้นเมืองเชียงรายและตรัง ซึ่งเป็นกระบือที่มีพันธุกรรมที่แตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ

การจำแนกกลุ่มด้วยวิธี principal component analysis plot

นำค่าเฉลี่ยรายกลุ่มของข้อมูลระยะห่างทางพันธุกรรมรายตัวมาวิเคราะห์ด้วย principal component analysis plot พบว่า สามารถจำแนกกระบือพื้นเมืองไทยทั้ง 6 แหล่งที่อยู่อาศัย ได้เป็น 3 กลุ่ม (Figure 4)

**Figure 3** Phylogenetic tree of six Thai native buffalo populations: Chiangrai, Khon Kaen, Surin, Uthaithani, Nakhon Si Thammarat and Trang

คือ (1) กลุ่มกระบือพื้นเมืองจังหวัดนครศรีธรรมราช สุรินทร์ ขอนแก่น และอุทัยธานี (2) กลุ่มกระบือพื้นเมืองจังหวัดดรง และ (3) กลุ่มกระบือพื้นเมืองจังหวัดเชียงราย ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการจัดกลุ่มด้วย phylogenetic tree (Figure 4) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า กระบือพื้นเมืองไทยสามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม ซึ่งสามารถนำไปเป็นแนวทางในการวางแผนการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

การทดสอบความสัมพันธ์ของค่าระยะห่างทางพันธุกรรมกับค่าระยะทางภูมิศาสตร์

เมื่อหาความสัมพันธ์ของค่าระยะห่างทางพันธุกรรมกับค่าระยะทางภูมิศาสตร์ (geographic distance) พบว่าค่าทั้ง 2 มีแนวโน้มมีความสัมพันธ์กันทางสถิติ ($P < 0.1$ และ $r = 0.407$) แสดงว่ากระบือพื้นเมืองที่มีระยะทางภูมิศาสตร์ที่ห่างกัน ย่อมมีผลทำให้สัตว์แต่ละแหล่ง มีความแตกต่างทางพันธุกรรมกันตามไปด้วย ในขณะเดียวกัน จากกราฟความสัมพันธ์แสดงให้เห็นว่าค่าทั้ง (Figure 5) ยังคงพบการ

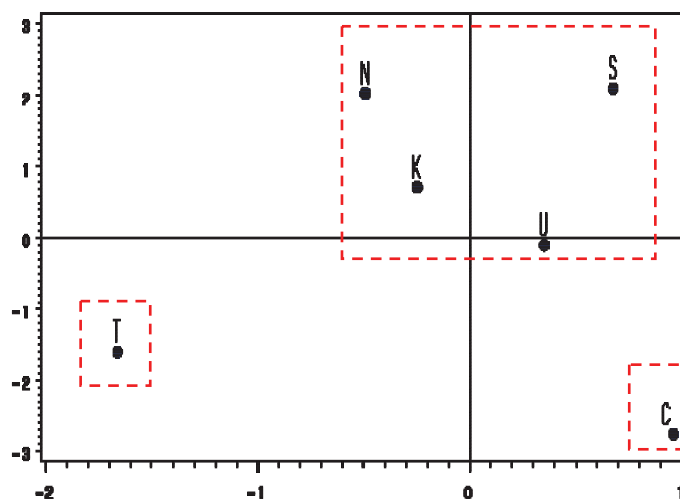


Figure 4 Principle component analysis plot from individual genetics of six Thai native buffalo populations: Chiangrai (C), Khon Kaen (K), Surin (S) Uthaitхани (U), Nakhon Si Thammarat (N) and Trang (T).

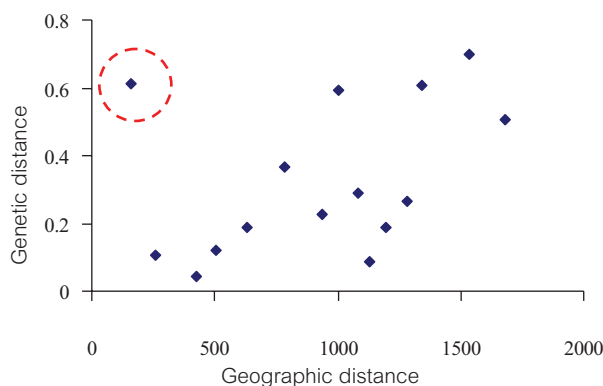


Figure 5 Scatter plot between geographic distance (kilometer) and genetic distance (Nei's distance) by mitochondrial DNA marker in six Thai native buffaloes.

กระจายของกราฟที่ไม่สัมพันธ์กัน โดยเฉพาะกระบือพื้นเมืองจังหวัดตรังและนครศรีธรรมราช (วงกลมประ Figure 5) แม้ว่าระยะทางภูมิศาสตร์จะห่างกันเพียง 161 กิโลเมตร แต่กระบือพื้นเมืองทั้งสองมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของทั้ง 2 ประชากรแตกต่างกันสูง (0.613) ดังนั้นจากการทดสอบระยะทางภูมิศาสตร์ของข้อมูลเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียสามารถสรุปได้ว่า ไม่สามารถจำแนกกลุ่มพันธุ์ของกระบือจากระยะห่างทางภูมิศาสตร์เพียงอย่างเดียวได้

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาความหลากหลายของกระบือพื้นเมืองไทยจาก 6 แหล่งที่อยู่อาศัย คือ จังหวัดเชียงราย ขอนแก่น สุรินทร์ อุทัยธานี นครศรีธรรมราช และตรังด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียพบจำนวน SNPs 32 ตำแหน่ง บริเวณ insertion-deletion 1 ตำแหน่ง ซึ่งชี้ให้เห็นว่า กระบือพื้นเมืองไทยยังคงมีความหลากหลายทางพันธุกรรม สามารถจัดกลุ่มทางพันธุกรรมของกระบือพื้นเมืองได้เป็น 3 กลุ่ม ด้วย phylogenetic tree ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับลักษณะถิ่นที่อยู่อาศัย คือ กลุ่มที่ 1 กระบือคอยหรือกระบือภูเขา ได้แก่ กลุ่มกระบือพื้นเมืองจังหวัดเชียงราย กลุ่มที่ 2 กระบือทะเล ได้แก่ กระบือพื้นเมืองจังหวัดตรัง และกลุ่มที่ 3 กระบือลุ่มน้ำ ซึ่งเป็นกระบือกลุ่มใหญ่ที่สุด ได้แก่ กระบือพื้นเมืองจังหวัดขอนแก่น สุรินทร์ อุทัยธานี และนครศรีธรรมราช เมื่อพิจารณาโครงสร้างทางพันธุกรรม (genetic structure) ของกระบือพื้นเมืองไทยทั้ง 6 แหล่งที่อยู่อาศัย พบว่าความผันแปรทางพันธุกรรมในกระบือพื้นเมืองที่เกิดจากความแตกต่างของแหล่งที่อยู่อาศัยมีค่าเท่ากับ 0.257 ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากระบือพื้นเมืองไทย น่าจะมีพันธุกรรมเริ่มต้นที่แตกต่างกันในแต่ละแหล่งที่อยู่อาศัย จากข้อมูลข้างต้นจะเห็นได้ว่า กระบือพื้นเมืองเป็นสัตว์ประจำถิ่นที่ยังคงสภาพความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สามารถใช้ประโยชน์ในด้านการคัดเลือกพันธุ์ และการรวบรวมพันธุกรรมของกระบือพื้นเมืองไทยเพื่อ

ใช้ประโยชน์ต่อไปในอนาคต

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษา และวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว.) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น และขอขอบคุณสำนักงานปศุสัตว์อำเภอบ้านไผ่ จังหวัดขอนแก่น ปศุสัตว์อำเภอหนองขาหย่าง จังหวัดอุทัยธานี ปศุสัตว์อำเภอเมือง จังหวัดตรัง และศูนย์วิจัยบำรุงพันธุ์สัตว์จังหวัดพะเยา สุรินทร์ และขอขอบคุณเกษตรกรกรายย่อยผู้เลี้ยงกระบือที่อนุเคราะห์ให้เก็บตัวอย่างเลือดกระบือ

เอกสารอ้างอิง

- กิตติ กุบแก้ว และ มนต์ชัย ดวงจินดา. 2553. การศึกษาความหลากหลายและการจำแนกกลุ่มพันธุกรรมของกระบือไทยในพื้นที่ลุ่มน้ำโขงจากข้อมูลไมโครแซทเทลไลท์. *วารสารแก่นเกษตร มข.* 38: 65-76.
- จินตนา อินทรมงคล. 2548. *กระบือไทยเพื่อการพัฒนาอย่างยั่งยืน*. กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- ประสพ บุณมานัส. 2520. *กระบือ (Bos bubalis)*. สำนักพิมพ์ ไทยวัฒนาพานิช จำกัด. กรุงเทพฯ.
- วิสุทธิ ไบไม้. 2538. *สถานภาพความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทย*. สำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย. กรุงเทพฯ.
- สุทธิพงศ์ อริยะพงศ์สรรค์. 2545. การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกระบือ. *วารสารวิจัย มข.* 4: 5-7.
- อลงกลด แทนอมทอง และ เรืองวิทย์ บรรจงรัตน์. 2543. แนวทางการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของสุกรพื้นเมืองไทย. *วารสารสัตวบาล.* 10: 18-22.

- Amano, T., Miyakoshi, Y., Takada, T., Kikkawa, Y. and Suzuki, H. 1994. Genetic variants of ribosomal DNA and mitochondrial DNA between swamp and river buffaloes. *J Anim Genet* 25: 29-36.
- Goodwin, W., Adrian, L. and Sibte, H. 2007. *An Introduction to Forensic Genetics*. John Wiley & Sons, Oxford.
- Groeneveld, L.F., Lenstra, J.A., Eding, H., Toro, M.A., Scherf, B., Pilling, D., Negrini, R., Finlay, E.K., Jianlin, H., Groeneveld, E., Weigend, S. and The GLOBALDIV Consortium. 2010. Genetic diversity in farm animals – a review. *J Anim Genet* 41: 6-31.
- Kim, E., Cheong, H.S., Bae, J. S., Chun, J., Park, T.J., Lee, K., Yun, Y. and Shin, H.D. 2010. Identification of genetic polymorphisms in bovine mitochondrial deoxyribonucleic acid. *J Anim Sci* 88: 2551-2555.
- Lau, G.H., Drinkwater, R.D., Yusoff, K., Tan, S.G.D., Hetzel, J.S. and Barker, J.S.F. 1998. Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): mitochondrial DNA D-loop and cytochrome b sequence variation. *Anim Genet* 29: 253-264.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Parfitt, S. C. and Huismans, H.H. 1998. Mitochondrial DNA analysis of two Southern African indigenous cattle breeds. *J Anim Sci* 28: 67-73.
- Vincze, T., Posfai, J. and Roberts, R.J. 2003. NEBcutter: a program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Res* 31: 3688-3691.
- Zhang, G.X., Chen, W., Xue, M., Wang, Z., Chang, H., and Han, X. 2008. Analysis of genetic diversity and population structure of Chinese yak breeds (*Bos grunniens*) using microsatellite marker. *J Genet Genomics* 35: 233-238.