การศึกษาความหลากหลายและการจำแนกกลุ่มพันธุกรรมของควายไทยในพื้นที่ลุ่มน้ำโขงจากข้อมูลไมโครแซทเทิลไลท์

Study of genetic diversity and genetic classification of Thai Swamp Buffalo in Mekong sub region using microsatellite data

กิตติ กุบแก้ว[1] และ มนต์ชัย ดวงจินดา[2*]

Kitti Koobkaew[1] and Monchai Duangjinda[2*]

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของควายพื้นเมืองไทย จาก 6 แหล่งในพื้นที่ลุ่มน้ำโขง จำนวน 160 ตัวอย่าง โดยสุ่มจากจังหวัดนครราชสีมา(NR) เลย (LE) นครพนม (NP) ศรีสะเกษ (SK) สุรินทร์ (SR) และขอนแก่น (KK) ศึกษาโดยใช้เทคนิค microsatellites จำนวน 10 คู่ไพรเมอร์ และตรวจสอบชิ้นส่วนไมโครแซทเทิลไลท์ด้วย 6% polyacrylamide gel โดยพบอัลลีลทั้งหมด 84 อัลลีล เฉลี่ย 8.4 อัลลีลต่อโลกัส ทั้งนี้ไพรเมอร์ HEL13 มีจำนวนอัลลีลมากที่สุด คือ 12 อัลลีล ส่วนไพรเมอร์ BM2213 พบจำนวนอัลลีลน้อยที่สุด คือ 6 อัลลีล ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้คาดหมายในควายจากนครราชสีมา เลย นครพนม ศรีสะเกษ สุรินทร์ และขอนแก่น มีค่า 0.763, 0.798, 0.788, 0.790, 0.777 และ0.773 ตามลำดับ ชี้ให้เห็นว่าประชากรควายที่ทำการศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง และผลจากการจำแนกกลุ่มด้วยระยะห่างทางพันธุกรรมด้วย phylogenetic tree และจำแนกกลุ่มจากข้อมูลพันธุกรรมรายตัว ด้วย principle component ให้ผลสอดคล้องกันคือ ควายจากนครพนมกับศรีสะเกษมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันมากที่สุด ส่วนควายจากขอนแก่นมีพันธุกรรมที่แตกต่างจากควายกลุ่มอื่นๆ มากที่สุด และจากการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมควายแต่ละกลุ่ม พบว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมไม่มากนัก (F_{ST} = 0.066) แต่มีความหลากหลายของพันธุกรรมของควายรายตัวภายในแต่ละกลุ่มค่อนข้างสูง การทดสอบไค-สแควร์ (χ^2) เพื่อตรวจสอบสภาพทางพันธุกรรมของประชากร พบว่าควายทุกกลุ่มอยู่ในสมดุล Hardy-Weinberg ข้อมูลจากการศึกษาความหลากหลายและโครงสร้างทางพันธุกรรมของควายไทยที่ตรวจด้วยไมโครแซทเทิลไลท์นี้ จะเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนปรับปรุงพันธุ์และอนุรักษ์พันธุกรรมของควายต่อไป

คำสำคัญ: ความหลากหลายทางพันธุกรรม, ควายปลักไทย, ไมโครแซทเทิลไลท์

ABSTRACT: The objective of this investigated was to study the genetic diversity in Thai Native Buffalo from 6 locations in Mekong subregion. A total of 160 buffaloes DNA samples were collected from Nakhonratchasima (NR), Loei (LE), Nakornpanom (NP), Sisaket (SK), Surin (SR) and (KhonKaen (KK), provinces. Microsatellites technique with 10 primers and separating on 6% polyacrylamide gel were used in this study. The results showed that 84 alleles were found for loci, the mean number of alleles per locus was 8.4 alleles. The highest number of alleles was 12 (HEL13 primer) and the lowest number of alleles was 6 (BM2213 primer). The expected heterozygosities of NR,

[1] สำนักสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยที่ 4 ขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40000
Regional Bureau of Animal Health and Sanitation, Region Four, Khon Kaen, 40000

[2] ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002
Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002

[*] Corresponding author: monchai@kku.ac.th

LE, NP, SK, SR and KK were 0.763, 0.798, 0.788, 0.790, 0.777 and 0.773 respectively. All populations had relatively high genetic diversity. The phylogenetic tree from Neiís genetic distance and clusterization from individual genetics by Principle Component Analysis plot analysis from Neiís showed that the population from the Nakornpanom and Sisaket were the closest genetic, while KhonKaen were differentiate from the other group. The analysis of genetic structure showed the lightly of genetic difference between 6 groups (F_{ST} = 0.066), however, the genetic diversity in individual level was found very high. The tested of χ^2 show that all population did follow Hardy Weinbergís Law of Equilibrium. The information about genetic diversity and genetic structures estimated by microsatellites analysis may be useful for developing conservation strategies.
Keywords: genetic diversity,Swamp buffalo, microsatellites

บทนำ

ควายปลัก (Swamp buffalo, Bubalus bubalis) มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ดีเด่นอยู่หลายประการ เช่น สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งได้ดี สามารถใช้ประโยชน์จากอาหารคุณภาพต่ำได้ดี มีความแข็งแรงทนทานต่อโรคและแมลงและคุณภาพเนื้อมีปริมาณคลอเลสเตอรอลน้อย (สุทธิพงศ์, 2545) โดยทั่วไปการเลี้ยงควายมักพบในเขตชนบทเป็นส่วนมาก โดยเลี้ยงเป็นฝูง ขนาดเล็ก ไม่มีการนำเข้าฝูงผสมพันธุ์ และปล่อยให้มีการผสมกันเองภายในฝูง ดังนั้นโอกาสของการเกิดการสูญหายของพันธุกรรมโดยบังเอิญ (genetic drift) และการผสมแบบเลือดชิด (inbreeding) จึงเกิดขึ้นได้ง่าย และอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดสภาพยีนแบบ heterozygosity ลดลง ทำให้ความแปรปรวนทางพันธุกรรม (genetic variations) ของสัตว์ลดลงนำไปสู่การสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรม ส่วนมากสัตว์ที่มีอัตราเลือดชิดเกิดขึ้นจะส่งผลทำให้ความสามารถในการให้ผลผลิตลดต่ำลง โดยเฉพาะลักษณะที่เกี่ยวข้องกับระบบความสมบูรณ์พันธุ์ (fertility) และความสามารถในด้านการอยู่รอด (survivability) (Falconer and Mackay,1996) อัญชลี และคณะ (2540) รายงานว่า การใช้ควายพ่อแม่พันธุ์ในฝูงผสมพันธุ์นาน มีการนำสัตว์เข้าทดแทนในฝูงแต่ละปีน้อย ทำให้พันธุกรรมในฝูงมีการเปลี่ยนแปลงช้า เป็นสาเหตุทำให้ความก้าวหน้าทางพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์ช้าลง ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของควายจึงเป็นสิ่งจำเป็นประการหนึ่งในการค้นหาควายที่มีประสิทธิภาพทางการให้ผลผลิตดีเด่น เพื่อเป็นทางเลือกในการปรับปรุงพันธุ์และเนื่องจากมีปัจจัยหลายปัจจัยที่มีผลกระทบให้ควายในแต่ละพื้นที่มีศักยภาพการให้ผลผลิตแตกต่างกันออกไป เช่น พันธุ์ อาหาร การจัดการ และสิ่งแวดล้อม (Jainudeen and Hafez, 2000) การตรวจดูความหลากหลายทางพันธุกรรมในเบื้องต้น จะทำให้คาดเดาได้ว่าควายในแต่ละพื้นที่มีความแตกต่างกันในด้านการให้ผลผลิต

ในปัจจุบันเทคโนโลยีอณูชีววิทยาและพันธุศาสตร์มีความเจริญก้าวหน้าไปมาก และถูกนำมาประยุกต์เพื่อการคัดเลือกและพัฒนาสายพันธุ์มากขึ้น เนื่องจากส่งผลให้การพัฒนาสายพันธุ์สัตว์มีความถูกต้องตรงตามวัตถุประสงค์ของการปรับปรุงพันธุ์ที่กำหนด อีกทั้งยังช่วยรุ่นระยะเวลาการพัฒนาพันธุ์ให้สั้นลง ประหยัดงบประมาณ รวมถึงสามารถใช้ข้อมูลที่ได้มาทำนายอนาคตที่จะเกิดขึ้นกับพันธุกรรมควายได้ ดังนั้นการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและจำแนกกลุ่มควาย โดยอาศัยข้อมูลไมโครแซทเทิลไลท์อาจเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยจำแนกกลุ่มของควายได้ชัดเจนขึ้น เนื่องจากควายไทยจากจังหวัดต่างๆ (นครราชสีมา เลย นครพนม ศรีสะเกษ สุรินทร์ ขอนแก่น) อาจมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน และอาจนำประโยชน์ในด้านความหลากหลายพันธุกรรมนี้ไปประยุกต์ใช้เพื่อการคัดเลือกควายลักษณะดีต่อไป

วิธีการศึกษา

การเก็บตัวอย่างและข้อมูลประจำตัว

สุ่มตัวอย่างเลือดควายจากเกษตรกร 6 แหล่ง จำนวน 160 ตัวอย่าง ได้แก่ บ้านแจ้งเจริญ หมู่ที่ 4 ตำบลหนองแจ้งใหญ่ อำเภอบัวใหญ่ จังหวัดนครราชสีมา (n = 25) บ้านห้วยดัง หมู่ที่ 2 ตำบลอาฮี อำเภอท่าลี่ จังหวัดเลย (n = 26) บ้านเสียว หมู่ที่ 3 และ หมู่ที่ 6 ตำบลหาดแพง อำเภอศรีสงคราม จังหวัดนครพนม (n = 27) บ้านเดียงตะวันออก หมู่ที่ 2 ตำบลเวียงเหนือ อำเภอกันทรลักษณ์ จังหวัดศรีสะเกษ (n = 27) บ้านใหม่เรือทอง หมู่ที่ 16 ตำบลด่าน อำเภอกาบเชิง จังหวัดสุรินทร์ (n = 25) บ้านไผ่ ตำบลบ้านไผ่ อำเภอบ้านไผ่ จังหวัดขอนแก่น (n = 30) รวมทั้งสิ้น 160 ตัวอย่าง โดยข้อมูลที่เก็บบันทึกมีดังนี้ ข้อมูลประจำตัวสัตว์ทั่วไป เช่น อายุ เพศ พื้นที่เก็บตัวอย่าง วัน เดือน ปี ที่เก็บตัวอย่าง และเก็บตัวอย่างเลือดโดยเจาะจากเส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) หรือที่หาง (tail vein) ใส่หลอดเก็บตัวอย่างเลือด ขนาด 15 มล. ที่มีสารป้องกันการแข็งตัว 0.5M EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid) ปริมาตร 1 มล.

การสกัดดีเอ็นเอจากเลือด

นำตัวอย่างเลือดมาวางทิ้งไว้ในตู้เย็นที่ 4 °ซ รอให้ตกตะกอนเม็ดเลือดขาว จากนั้นดูดเก็บส่วนที่เป็นเม็ดเลือดขาว (white blood cell) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ใส่หลอด 1.5 มล. เติม solution No.1 (4% silica gel ใน 5 M guanidium HCl และ 20 mM Tris-HCl pH 8, 10 mM EDTA pH 8) ปริมาตร 390 ไมโครลิตร เพื่อทำลายเยื่อหุ้มของเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เม็ดเลือดขาว ทำให้ดีเอ็นเอออกมาจับกับ silica gel ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดเบาๆ และตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (กลับหลอดทุกๆ 5 นาที) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือเฉพาะผลึกสีขาว จากนั้นเติม solution No.2 (70% EtOH และ 10 mM NaCl) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนให้สะอาดขึ้น นำไป vortex ประมาณ 5-10 วินาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือเฉพาะผลึกสีขาว ทำซ้ำ 2 ครั้ง (ขึ้นกับความหนืดของเลือด) จากนั้นเติม solution No.3 (95% EtOH) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อล้างและทำให้ตะกอนดีเอ็นเอที่เป็นผลึกสีขาวแห้งเร็วขึ้น โดยนำไป vortex ประมาณ 5-10 วินาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้งให้เหลือเฉพาะผลึกสีขาว จากนั้นผึ่งตะกอนทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ 15 นาที และเมื่อตะกอนแห้งแล้วเติม TE buffer (10 mM tris-HCl, 0.5 M EDTA) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำไปต้มใน water bath ที่อุณหภูมิ 55 °ซ นาน 3 ชั่วโมง หรือข้ามคืน (over night) จากนั้นนำมา vortex 5 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงครั้งสุดท้ายที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที แล้วดูดเอาเฉพาะส่วนใสของสารละลายดีเอ็นเอใส่ในหลอดใหม่ และเก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ แล้วตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis จากนั้นตรวจสอบความเข้มข้นดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างด้วยเครื่อง spectrophotometer ปรับความเข้มข้นสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ให้มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เก็บสารละลายไว้ที่ -20 °ซ ก่อนที่จะนำไปใช้งานในขั้นตอนต่อไป

การเพิ่มจำนวน microsattelite DNA

เพิ่มจำนวนไมโครแซทเทิลไลท์ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคการเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase chain reaction) ซึ่งเลือกใช้ไพรเมอร์ จำนวน 10 ชุด โดยพยายามเลือกไพรเมอร์ให้มีการกระจายตัวทั่วทั้งจีโนม ซึ่งลำดับเบสของไพรเมอร์จาก 5' ไป 3' แสดงไว้ใน **Table 1** จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่งของ microsatellite ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่มี

ความเข้มข้น 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10XPCR-buffer ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร, 1.25 mM/each dNTPs ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 5 ไมโครโมลต่อไมโครลิตร Forward และ Reverse primer (QIAGEN, Germany) อย่างละ 1 ไมโครลิตร, 0.5 ยูนิต *Taq* DNA polymerase (Promega, San Diego, CA) และสุดท้ายปรับปริมาตรด้วยน้ำจน 10 ไมโครลิตรจากนั้นทำปฏิกิริยาลูกโซ่ด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (GeneAmp PCR System 9600) ซึ่งก่อนการทำงานของปฏิกิริยาลูกโซ่ กำหนดอุณหภูมิ 94 °ซ นาน 5 นาที เพื่อเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาลูกโซ่จำนวน 30 รอบ ตามวงรอบที่อุณหภูมิต่างๆ กัน คือ อุณหภูมิ 94 °ซ นาน 30 วินาที (ดีเอ็นเอเสียสภาพแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว)จากนั้นลดอุณหภูมิลงในช่วง 48-56 °ซ (ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นกับไพรเมอร์ของแต่ละตำแหน่งดังแสดงใน **Table 1**) เพื่อให้เส้นดีเอ็นเอต้นแบบจับตัวอย่างเหมาะสมกับไพรเมอร์ใช้เวลานาน 30 วินาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นที่ระดับ 72 °ซ นาน 1 นาที ขั้นตอนนี้เพื่อให้มีการเพิ่มจำนวนเบสจากการจับตัวกันอย่างเหมาะสมของไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาลูกโซ่ทำงานครบ 30 รอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72 °ซ นาน 5 นาทีจำนวน 1 รอบ ซึ่งถือได้ว่าขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่เสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์

การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของไมโครแซทเทิลไลท์และการบันทึกข้อมูล

ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอและขนาดของชิ้นส่วนไมโครแซทเทิลไลท์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่ด้วยเครื่องอิเล็ก โทรโฟรีซิส (vertical electrophoresis) (Mini-Protein III, Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA) ด้วย 6 % polyacrylamide gel (Sigma, Inc., CA) ผ่านสารละลายตัวกลาง 1 M TBE buffer (0.089 M Tris base, 0.089 M boric acid, 0.002 M EDTA, pH 8.0) เป็นเวลา 70 นาที ด้วยกระแสไฟฟ้า 90 โวลท์ ความจุไฟฟ้า 400 mA เมื่อครบกำหนดเวลาย้อมแผ่นเจล polyacrylamide ด้วย GelStar™ นาน 10 นาที จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอผ่านใต้เครื่อง UV trans-illuminator เปรียบเทียบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRuler™ 100 bp DNA ladder (Fermentas, CA) ถ่ายรูปการปรากฏของอัลลีลของควายแต่ละตัวจากแต่ละตำแหน่งของ microsatellite ด้วยเครื่องบันทึกอัตโนมัติ (Gel Documentary System, SYNGENE, UK) พร้อมทั้งบันทึกขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ

สถานที่ใช้ดำเนินงานวิจัย

ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพทางสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์สภาพความหลากหลายทางพันธุกรรมของควาย

การวิเคราะห์สภาพความหลากหลายทางพันธุกรรมของควายในแต่ละกลุ่ม ด้วยพารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้ หาความถี่ของอัลลีลต่างๆ ที่พบ

$$X_{ij} = \frac{2D + H}{2N}$$

เมื่อ X_{ij} = ความถี่อัลลีลที่ i ที่โลกัส j, D = จำนวนอัลลีลที่มีจีโนไทป์แบบโฮโมไซโกต, H = จำนวนอัลลีลที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซโกต และ N = จำนวนอัลลีลทั้งหมด

วิเคราะห์ข้อมูลการปรากฏของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เพื่อคำนวณหาค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี้ (heterozygosity) คำนวณค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้ ที่ได้จากการสังเกต (Observed Heterozygosity : Ho) ในแต่ละโลกัสของแต่ละประชากร

Table 1 List of microsatellite loci studied, their primer sequences, annealing temperature, allele size and their location in chromosome.

No.	primer	Chr.	Nucleotide sequence 5'-3'	Annealing Temp. (^{0}C)	Min size(bp)	Max size (bp)
1	BMS2213	2	F: ATGGGCAGCTTAGGGATTG	60	118	146
			R: CTTCAAGAGCCTTCAGTGGG			
2	BMS1987	18	F: TGATGCAGAGAACGTTTTAATTT	58	108	124
			R: CTTGGGGTAGGCAGAGATTT			
3	BM1329	6	F: TTGTTTAGGCAAGTCCAAAGTC	56	137	161
			R: AACACCGCAGCTTCATCC			
4	CSSM033	17	F: CACTGTGAATGCATGTGTGTGAGC	61	152	174
			R: CCCATGATAAGAGTGCAGATGACT			
5	CSSM045	2	F: TAGAGGCACAAGCAAACCTAACAC	61	111	139
			R: TTGGAAAGATGCAGTAGAACTCAT			
6	CSSM08	19	F: CTTGGTGTTACTAGCCCTGGG	54	169	217
			R: GATATATTTGCCAGAGATTCTGCA			
7	ILSTS005	10	F: GGAAGCAATGAAATCTATAGCC	60	181	185
			R: TGTTCTGTG AGTTTGTAAGC			
8	HEL13	11	F: TAAGGACTTGAGATAAGGAG	54	177	197
			R: CCATCTACCTCCATCTTAAC			
9	HUAT27	26	F: TTTTATGTTCATTTTTTGACTGG	54	127	155
			R: AACTGCTGAAARCTCCATCTTA			
10	MAF50	4	F: GTAGACTACTCATGAAAATCAGGTCTTAGG	62	152	168
			R: GGG ACATGCAGCTATACACTTGAG			

Source : US Meat Animal Research Center (USMARC)(2010)

$$Ho = \frac{N_H}{N}$$

เมื่อ H° = ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้ที่ได้จากการสังเกต, N_H = จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบเฮทเทอโรไซกัส และ N = จำนวนตัวอย่างที่ให้ข้อมูลทั้งหมด

คำนวณค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้คาดหมาย (Expected Heterozygosity : H_E) ในแต่ละโลกัสของแต่ละประชากร

$$H_E = 1 - \sum_{i=1}^{n} Pi^2$$

เมื่อ H_E = ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้คาดหมาย, Pi = ค่าความถี่อัลลีลใดๆ ที่โลกัสนั้น และ n = จำนวนของอัลลีล

การทดสอบ Hardy Weinberg equilibrium

Hardy - Weinberg equilibrium (HWE) ใช้เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนหรือความถี่ของจีโนไทป์ในประชากรว่าเปลี่ยนแปลงหรือไม่ โดยมีใจความว่า "ในประชากรขนาดใหญ่ที่มีการผสมพันธุ์แบบสุ่ม ไม่มีการกลายยีนและไม่มีการคัดเลือกโดยธรรมชาติ ประชากรดังกล่าวถือได้ว่าอยู่ในสภาวะสมดุลที่สุด และหากประชากรนี้มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเพื่อถ่ายทอดลักษณะพันธุกรรมไปสู่ลูกในรุ่นถัดไป ประชากรของสิ่งมีชีวิตนี้ จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงของความถี่ยีนหรือความถี่ของจีโนไทป์ในประชากรทุกรุ่น" การทดสอบ Hardy - Weinberg equilibrium ทดสอบด้วยค่า Chi-square (χ^2-test) (Falconer and Mackay,1996)

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^{n} \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

เมื่อ O_i = จำนวนตัวอย่างสังเกตที่ให้ข้อมูลพันธุกรรมแบบเฮทเทอโรไซกัสที่โลกัส i, = E_i จำนวนตัวอย่างคาดหวังที่ให้ข้อมูลพันธุกรรมแบบเฮทเทอโรไซกัสที่โลกัส i และ n = จำนวนโลไซที่ศึกษา

การจำแนกกลุ่มควายจากความถี่อัลลีลและข้อมูลพันธุกรรมรายตัว

วิเคราะห์ความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มโดยนำค่าความถี่อัลลีลของแต่ละโลไซมาวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ด้วยวิธี Nei's Unbiased (Nei's, 1978) และสร้างแผนภาพความสัมพันธ์ (phylogenetic tree) ระหว่างควายแต่ละกลุ่มโดยวิธี Neighbor-Joining ด้วยโปรแกรม NTSYSpc V 2.10

วิเคราะห์จำนวนกลุ่มของควายด้วยข้อมูลพันธุกรรมรายตัว โดยนำข้อมูลการปรากฏของแถบดีเอ็นเอในควายทุกกลุ่มมาแปลงเป็นตัวแปรใหม่ (PRIN1 และ PRIN2) โดยวิธี Principal Component Analysis plot ด้วยโปรแกรม SAS (1998) จากนั้นสร้าง Scatter plot ระหว่าง 2 ตัวแปรและพิจารณาจำนวนกลุ่มที่เกิดขึ้น

วิเคราะห์การเกิดประชากรกลุ่มย่อย (subpopulation)

พิจารณาจากค่า F_{ST} ซึ่งเป็นค่าที่ใช้ประมาณค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างประชากรย่อย (subpopulation) คือ วัดอัตราการผสมเลือดชิดภายในประชากรย่อย เปรียบเทียบกับประชากรทั้งหมด (total population) ซึ่งค่านี้มีค่าอยู่ในช่วง 0-1 (สุรินทร์, 2552) หากมีค่าระหว่าง 0 ถึง 0.1 แสดงว่าเกิดอิทธิพลจากประชากรกลุ่มย่อยเพียงเล็กน้อย หากมีค่าอยู่ในช่วง 0.1 ถึง 0.3 แสดงว่าเกิดอิทธิพลจากประชากรกลุ่มย่อยปานกลาง และหากมากกว่า 0.3 แสดงว่าเกิดอิทธิพลจากประชากรกลุ่มย่อยสูง กล่าวคือ มีการแยกกลุ่มย่อยของประชากรชัดเจน ส่งผลให้เกิดสปีชีส์ใหม่ได้ โดยคำนวณตามวิธีของ Nei (1978)

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}$$

เมื่อ H_S = ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้คาดหมายในประชากรย่อย และ H_T = ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้คาดหมายในทุกประชากร

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การวิเคราะห์ความหลากหลายของควายด้วย microsattellite

การวิจัยครั้งนี้สุ่มตัวอย่างควายจากเกษตรกร 6 แหล่ง ในพื้นที่ลุ่มน้ำโขง ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา (n = 25) จังหวัดเลย (n = 26) จังหวัดนครพนม (n = 27) จังหวัดศรีสะเกษ (n = 27) จังหวัดสุรินทร์ (n = 25) จังหวัดขอนแก่น (n = 30) รวมทั้งสิ้น 160 ตัวอย่าง การวิเคราะห์ microsatellite จำนวน 10 ตำแหน่งครั้งนี้พบอัลลีลรวมทั้งหมด 84 อัลลีล (allele) พบว่าอัลลีลที่พบในแต่ละตำแหน่ง (locus) ของ microsatellite อยู่ในช่วง 6-12 อัลลีลต่อตำแหน่ง (**Table 2**) ส่วนใน Sraphet et al (2008) ศึกษาในควายจาก 8 พื้นที่ (พะเยา, ลพบุรี, บุรีรัมย์, ศรีสะเกษ, สุรินทร์, สุราษฎร์ธานี เกาะสมุย และเผ่าอาข่า) ซึ่งเป็นหน่วยงานภายใต้กรมปศุสัตว์ จำนวน 105 ตัวอย่าง พบเพียง 2-9 อัลลีล หรือเฉลี่ย 4.7 อัลลีลต่อตำแหน่ง สอดคล้องกับรายงานในควายพื้นเมืองของเวียดนามของ Berthouly et al. (2010) ที่พบเพียงเฉลี่ย 5.7 อัลลีลต่อตำแหน่ง ซึ่งความแตกต่างของผลที่ได้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของแหล่งประชากรและตำแหน่งของ microsatellite ที่ใช้ในการศึกษา

ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้ (heterozygosity) เป็นค่าหนึ่งที่ใช้บ่งบอกถึงสภาพความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรที่ศึกษา จากการศึกษาครั้งนี้ (**Table 3**) พบว่าค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้คาดหมายของควายทั้ง 6 กลุ่มในเขตพื้นที่ลุ่มน้ำโขง มีค่าใกล้เคียงกันมาก

Table 2 Observed number of alleles in each of the 6 sampled buffalo groups and detected allele size range.

Primer No.	Name	Reference Size (bp)	Observed Size (bp)	Number of Alleles
P1	BMS2213	191-211	183-241	6
P2	BMS1987	140-160	149-205	7
P3	BM1329	101-117	100-146	8
P4	CSSM033	180-190	159-230	9
P5	CSSM045	77-97	78-126	7
P6	CSSM08	181-193	181-272	9
P7	HEL13	178-190	167-217	12
P8	HUAT27	225-231	228-287	8
P9	ILSTS005	128-134	129-175	10
P10	MAF50	83-107	81-164	8

Table 3 Heterozygosity of 10 loci microsatellite on Nakhonratchasima (NR), Loei (LE), Nakornpanom (NP), Sisaket (SK), Surin (SR) and KhonKaen (KK).

	Observed Heterozygosity (Ho)						Expected Heterozygosity (He)					
NAME	NR	LE	NP	SK	SR	KK	NR	LE	NP	SK	SR	KK
BMS2213	1.000	1.000	1.000	0.930	0.600	0.800	0.818	0.768	0.789	0.845	0.729	0.762
BMS1987	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.900	0.613	0.752	0.796	0.743	0.784	0.844
BM1329	0.360	0.538	1.000	0.704	0.600	0.130	0.761	0.781	0.704	0.681	0.719	0.728
CSSM033	1.000	1.000	1.000	0.926	1.000	0.800	0.834	0.840	0.845	0.833	0.834	0.844
CSSM045	0.280	0.500	0.890	0.704	0.600	0.470	0.628	0.757	0.732	0.742	0.786	0.691
CSSM08	0.750	1.000	0.850	1.000	1.000	0.930	0.753	0.793	0.860	0.807	0.689	0.841
HEL13	0.890	1.000	1.000	1.000	1.000	0.970	0.810	0.843	0.813	0.851	0.859	0.806
HUAT27	0.890	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.706	0.863	0.825	0.788	0.808	0.701
ILSTS005	0.560	0.815	0.780	0.704	0.880	0.130	0.861	0.800	0.781	0.819	0.805	0.763
MAF50	0.880	0.580	0.520	0.740	1.000	0.730	0.854	0.789	0.741	0.800	0.764	0.755
AVERAGE	**0.761**	**0.8433**	**0.904**	**0.8708**	**0.868**	**0.686**	**0.763**	**0.798**	**0.788**	**0.790**	**0.777**	**0.773**

(0.76-0.79) และค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้สังเกต มีค่าตั้งแต่ 0.68-0.90 ซึ่งจากค่าที่ได้แสดงให้เห็นว่าประชากรควายที่ทำการศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ค่อนข้างสูง ซึ่งค่าเฉลี่ยเฮทเทอโรไซโกซิตี้ที่ได้ในครั้งนี้ (0.782) สูงกว่าในรายงานของ Sraphet et al (2008) (0.523) แต่ต่ำกว่าในรายงานของกมลพรรณ และคณะ (2552) (0.833) ซึ่งศึกษาในควายไทยเช่นเดียวกันแต่แตกต่างพื้นที่กัน และการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า microsatellite แต่ละตำแหน่งให้ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้แตกต่างกันเล็กน้อยในแต่ละกลุ่มควาย แต่ CSSM033 และ HEL13 เป็นตำแหน่งที่ให้ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้สูงในทุกกลุ่ม และพบว่า microsatellite บางตำแหน่งในควายในบางกลุ่มเป็น heterozygosity สูงมาก ซึ่งการกระจายของจีโนไทป์ในประชากรในควายทุกกลุ่มเป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากประชากรควายในพื้นที่ลุ่มน้ำโขงที่ศึกษานี้ยังไม่มีแผนการคัดเลือกเพื่อปรับปรุงพันธุ์มาก่อนอย่างชัดเจน

ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสายพันธุ์

ผลการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของควายจากแหล่งต่างๆ ด้วยวิธี Nei's Unbiased ดังแสดงใน **Table 4** พบว่า ขอนแก่นกับนครพนมมีความแตกต่างทางพันธุกรรมกันมากที่สุด ซึ่งมีค่า 0.43 ส่วนกลุ่มควายนครพนมกับศรีสะเกษมีความแตกต่างทางพันธุกรรมกันน้อยที่สุด คือมีค่า 0.06 ซึ่งความแตกต่างทางพันธุกรรมที่พบส่วนหนึ่งอาจเป็นไปได้ที่ 1) มีการเคลื่อนย้ายด้วยการซื้อขายโดยพ่อค้าประจำหมู่บ้าน (นายฮ้อย) ข้ามหมู่บ้าน ตำบลหรืออำเภอใกล้เคียงกัน เนื่องจากเป็นธรรมชาติของเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ที่อาจมีการขายยกฝูง เพราะความจำเป็นบางอย่าง และเมื่อมีความเหมาะสมก็จะซื้อกลับเข้ามาเลี้ยงใหม่ได้ และ 2) บางหมู่บ้านที่เก็บตัวอย่างเลือดมีการนำสัตว์ตามโครงการธนาคารโค-กระบือเพื่อเกษตรกร ตามพระราชดำริมาเลี้ยง ซึ่งอาจมีหลงเข้ามาในกลุ่มตัวอย่างได้ อย่างไรก็ตามก็มีไม่มากนัก

การจำแนกกลุ่มสายพันธุ์จากความถี่อัลลีล

เมื่อนำค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมของควายพื้นที่ลุ่มน้ำโขงแต่ละกลุ่ม มาสร้างเป็นแผนภาพความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ ด้วยวิธี Neighbor-joining (NJ) เห็นได้ว่าควายจากขอนแก่นมีพันธุกรรมที่แตกต่างจากควายกลุ่มอื่นๆ มากที่สุด โดยมีความแตกต่างทางพันธุกรรมจากกลุ่มอื่นๆ ประมาณ 40% และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มควายได้อีก 2 กลุ่มซึ่งถือว่ามีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันคือ ควายจากนครราชสีมากับเลย และควายจากนครพนม ศรีสะเกษ และสุรินทร์โดยที่ควายจากนครพนมมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับควายจากศรีสะเกษมากที่สุด ซึ่งมีระยะห่างทางพันธุกรรมหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมเพียง 6% ดังแสดงใน **Figure 1**

การจำแนกกลุ่มด้วยข้อมูลพันธุกรรมรายตัวด้วยวิธี Principal component

เป็นการวิเคราะห์การจัดกลุ่มจากค่าเฉลี่ยระยะห่างทางพันธุกรรมของควายรายตัวที่ได้มาจากแต่ละกลุ่ม ซึ่งจากผลการวิเคราะห์ที่ได้แสดงให้เห็นว่าได้ผลสอดคล้องกันกับผลการจำแนกกลุ่มควายจากค่าความถี่อัลลีลของประชากร นั่นคือควายจากขอนแก่นมีพันธุกรรมที่แตกต่างจากควายกลุ่มอื่นๆ มากที่สุด และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มควายได้อีก 2 กลุ่มซึ่งถือว่ามีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกัน คือ ควายจากนครราชสีมากับเลย และควายจากนครพนม ศรีสะเกษ และสุรินทร์ โดยที่ควายจากนครพนมมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับควายจากศรีสะเกษมากที่สุด ดังแสดงใน **Figure 2**

Table 4 Genetic distances between Nakhonratchasima (NR), Loei (LE), Nakornpanom (NP), Sisaket (SK), Surin (SR) and KhonKaen (KK).

	NR	LE	NP	SK	SR	KK
NR	0.00					
LE	0.07	0.00				
NP	0.14	0.09	0.00			
SK	0.22	0.15	0.06	0.00		
SR	0.22	0.13	0.11	0.11	0.00	
KK	0.42	0.31	0.43	0.38	0.41	0.00

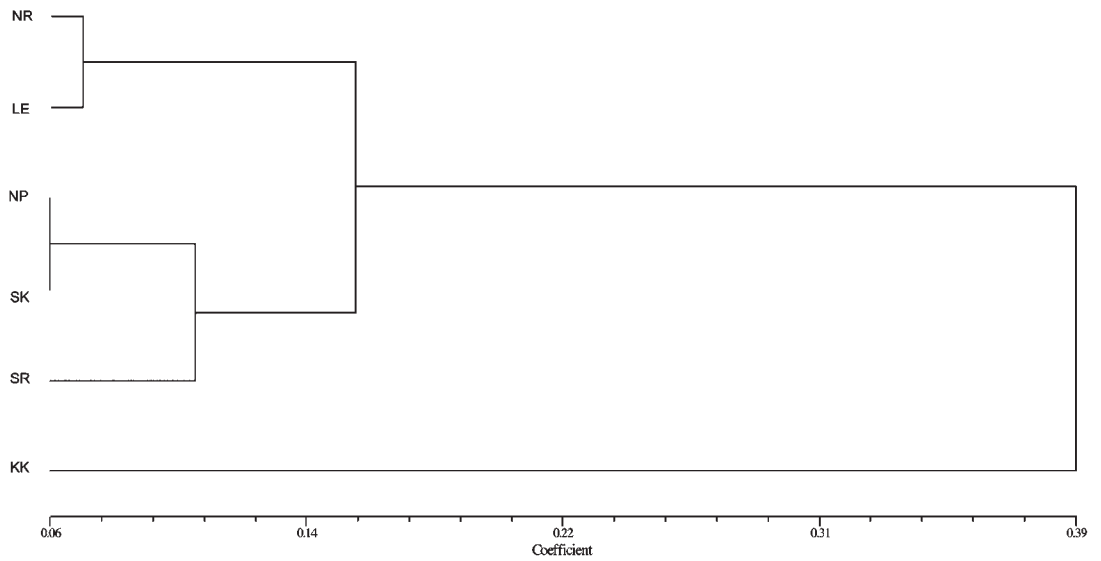

Figure 1 Neighbor-joining tree of Nakhonratchasima (NR), Loei (LE), Nakornpanom (NP), Sisaket (SK), Surin (SR) and KhonKaen (KK).

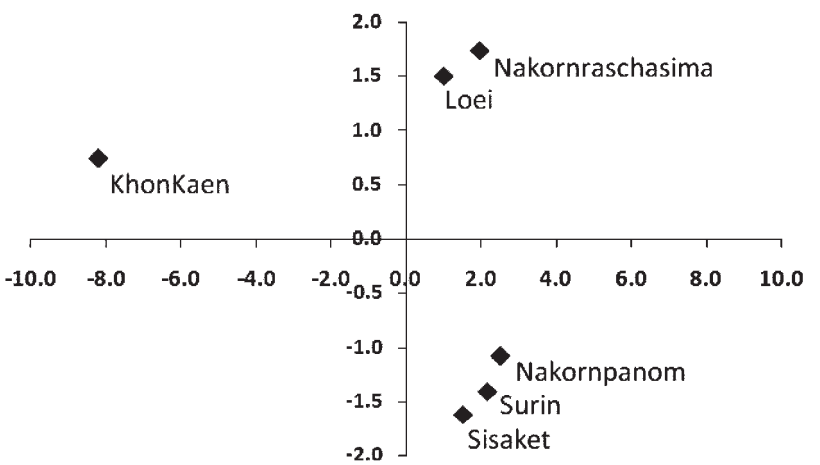

Figure 2 Scatter plot from individual genetics by Principle Component Analysis plot analysis of Nakhonratchasima, Loei, Nakornpanom, Sisaket, Surin and KhonKaen.

Table 5 Wright's F-statistics (F_{ST}), 1-$_{QINTRA}$ and 1-$_{QINTER}$ for each locus.

NAME	F_{ST}	1-$_{QINTRA}$	1-$_{QINTER}$
BMS2213	0.074	0.888	0.785
BMS1987	0.027	0.981	0.759
BM1329	0.086	0.570	0.714
CSSM033	0.015	1.000	0.838
CSSM045	0.096	0.575	0.722
CSSM08	0.037	0.943	0.793
HEL13	0.038	0.646	0.784
HUAT27	0.116	1.000	0.843
ILSTS005	0.037	0.919	0.726
MAF50	0.070	0.747	0.783
Average	0.066	0.828	0.776

การเกิดประชากรกลุ่มย่อย

ค่า F_{ST} เป็นค่าที่ใช้ตรวจสอบอิทธิพลทางพันธุกรรมของการเกิดประชากรกลุ่มย่อยและค่านี้จะแสดงถึงการลดลงของเฮทเทอโรไซโกซิตี้ในประชากรย่อยที่มีสาเหตุมาจากการสูญหายทางพันธุกรรมของยีนเนื่องจากประชากรขนาดเล็ก (genetic drift) มีค่าอยู่ในช่วง 0-1 และเมื่อวิเคราะห์พันธุกรรมของควายทั้ง 6 กลุ่ม ดังแสดงใน **Table 5** พบว่าความผันแปรของพันธุกรรมของควายที่เกิดขึ้น เป็นผลเนื่องจากความแตกต่างระหว่างกลุ่มพันธุ์ที่แตกต่างกันเพียง 6.6 % ซึ่งจัดอยู่ในระดับต่ำ (<10%) แสดงให้เห็นว่าประชากรควายทั้ง 6 กลุ่มในเขตพื้นที่ลุ่มน้ำโขง มีการเกิดประชากรกลุ่มย่อยเพียงเล็กน้อย และแสดงให้เห็นว่าแม้ว่าประชากรควายของประเทศจะลดลงแต่ระบบการผสมพันธุ์ของควายในแต่ละกลุ่มยังคงความหลากหลายโดยเป็นไปได้ที่เกษตรกรหลีกเลี่ยงการผสมพันธุ์ภายในเครือญาติหรือมีการเปลี่ยนพ่อพันธุ์อย่างต่อเนื่อง ในขณะที่การศึกษาในควายมูร่าห์และควายพื้นเมือง (Banni) ในอินเดีย (F_{ST} = 0.19) (Mishra et al. 2009) มีพันธุกรรมที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มย่อยปากกลาง ซึ่งเห็นได้ว่าประชากรควายของอินเดียเริ่มมีการสูญหายของความหลากหลายในลักษณะการลดลงของค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้ ในขณะที่ประชากรควายในพื้นที่ลุ่มน้ำโขงของไทยยังคงความหลากหลายไว้ได้

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่า 1-Q_{INTRA} ซึ่งเป็นค่าที่แสดงให้เห็นความแตกต่างของสภาพอัลลีลของไมโครแซทเทิลไลท์ภายในสัตว์ตัวเดียวกันพบว่ามีค่าสูง (0.823) แสดงว่าสภาพอัลลีลของไมโครแซทเทิลไลท์ภายในสัตว์ตัวเดียวกันมีความหลากหลายสูง (>0.80) ในขณะที่ค่า 1-Q_{INTER} มีค่าปานกลาง (0.776) แสดงให้เห็นว่าสภาพอัลลีลระหว่างตำแหน่งของ microsateliite ของควายแต่ละตัวมีความหลากหลายปานกลาง ซึ่งอาจสรุปได้ว่าควายแต่ละตัวมีความหลากหลายของพันธุกรรมลดลงบ้าง ทั้งนี้ในอดีตประชากรควายไทยน่าจะมีความหลากหลายที่สูงกว่าปัจจุบัน

จากค่าทางสถิติที่ได้ทั้งค่า F_{ST}, 1-Q_{INTRA} และ 1-Q_{INTER} แสดงให้เห็นว่าพันธุกรรมของควายแต่ละกลุ่มในเขตพื้นที่ลุ่มน้ำโขง ไม่มีความแตกต่างกันจนแยกเป็นกลุ่มสายพันธุ์เฉพาะถิ่นได้ แต่ควายแต่ละตัวในทั้ง 6 กลุ่มยังคงมีความหลากหลายที่สูง ซึ่งถือว่าเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงพันธุ์โดยเฉพาะการคัดเลือกเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากยิ่งสัตว์มีความแตกต่างกันมากก็จะมีตัวเลือกในการคัดเลือกได้มากขึ้นนั่นเอง

สรุปและข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาความหลากหลายของควายทั้ง 6 กลุ่ม ได้แก่ จังหวัดนครราชสีมา จังหวัดเลย จังหวัดนครพนม จังหวัดศรีสะเกษ จังหวัดสุรินทร์ และจังหวัดขอนแก่น รวมทั้งสิ้น 160 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิคไมโครแซทเทิลไลท์ จำนวน 10 ตำแหน่ง รวม 84 อัลลีล พบว่าค่าไมโครแซทเทิลไลท์ที่วิเคราะห์ได้แสดงให้เห็นว่าพันธุกรรมของควายในแต่ละพื้นที่มีความหลากหลายแตกต่างกัน โดยอีลลีลส่วนใหญ่จะอยู่ในสภาพเฮทเทอโรไซกัส และเมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมระหว่างควาย 6 กลุ่ม พบว่าความผันแปรของพันธุกรรมควายที่เกิดขึ้นเป็นผลเนื่องจากความแตกต่างระหว่างกลุ่มเพียง 6.6% ซึ่งถือว่ายังไม่แตกต่างถึงระดับที่จะจำแนกเป็นต่างสายพันธุ์กันได้และจากค่า Q_{INTRA} และค่า Q_{INTER} ที่สูงแสดงว่าควายแต่ละตัวมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่สูง และจากการจัดกลุ่มควายตามลักษณะทางพันธุกรรมด้วย phylogenetic tree และจำแนกกลุ่มจากข้อมูลพันธุกรรมรายตัว ด้วย principle component ให้ผลสอดคล้องกัน ซึ่งพบว่าควายจากขอนแก่นมีพันธุกรรมแตกต่างจากกลุ่มอื่นมากที่สุด และควายจากนครพนมและศรีสะเกษมีความใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมาก ซึ่งจากผลดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่าแม้ว่าจะไม่พบความแตกต่างกันมากในควายแต่ละกลุ่ม แต่ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าควายแต่ละตัวมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งที่ส่งผลให้การแสดงออกทางผลผลิตด้านต่างๆ เช่น การเจริญเติบโต การสืบพันธุ์ฯ แตกต่างกันไป และมีความเป็นไปได้ในการวางแผนการคัดเลือกโดยกำหนดวัตถุประสงค์การปรับปรุงพันธุ์ (breeding objective) ที่เหมาะสม จึงเห็นว่าควรมีการศึกษาวิจัยพันธุกรรมควายไทยอย่างจริงจัง และครอบคลุมทั้งประเทศ เพื่อการอนุรักษ์และพัฒนาให้สามารถใช้ประโยชน์ได้อย่างยั่งยืนต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณปศุสัตว์อำเภอบัวใหญ่ อำเภอท่าลี่ อำเภอศรีสงคราม อำเภอกันทรลักษณ์ อำเภอกาบเชิง อำเภอบ้านไผ่ พร้อมคณะทุกท่าน ที่ได้ช่วยประสานงานและสนับสนุนการเก็บตัวอย่าง ขอบคุณเกษตรกรผู้เลี้ยงควายที่อนุเคราะห์ให้คณะผู้วิจัยได้เก็บตัวอย่างเลือดควายสำหรับใช้ในการวิจัย และขอบคุณภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เป็นอย่างสูงที่สนับสนุนให้ใช้ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพทางสัตว์ ขอบคุณ คุณศรีนวล คณานิตย์ ผู้ช่วยวิจัย พร้อมคณะนักศึกษาระดับปริญญาเอก และปริญญาโท ทุกๆ ท่านที่สนับสนุนการวิจัย และสุดท้ายขอขอบคุณผู้อำนวยการสำนักสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยที่ 4 นายทศพร ศรีศักดิ์ ที่ให้คำปรึกษาแนะนำ และสนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กมลพรรณ เจือกโว้น, มนต์ชัย ดวงจินดา, ยุพิน ผาสุข, วิโรจน์ ภัทรจินดา, ชำนาญ ดงปาลี และฉลองชัย ชุ่มชื่น. 2552. การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของกระบือพื้นเมืองไทย. หน้า109-111. ใน การสัมมนาวิชาการเกษตรประจำปี 2552 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

สุทธิพงศ์ อุริยะพงศ์สรรค์. 2545. การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกระบือ. วารสารวิจัย มข. 4 : 5-7.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อัญชลี ณ เชียงใหม่ สำเริง ค้าดี และนิทัศน์ อ่อนหวาน. 2540. ค่าทางพันธุกรรมและผลตอบสนองจากการคัดเลือกจากลักษณะการเจริญเติบโตของกระบือปลัก. น. 1- 22. ใน รายงานผลการวิจัยค้นคว้าและวิจัยการผลิตสัตว์ประจำปี 2540. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์: แหล่งที่มา: http://www.dld.go.th/research- AHD/Webpage/2540/Genetic%20Parameters%20and%20 Response%20to%20Selection%20on%20Growth%20Traits%20of%20Swamp%20Buffalos.pdf ค้นเมื่อ 15 พฤษภาคม 2553.

Berthouly C., X. Rognon, T. Nhu Van, A. Berthouly, H. Thanh Hoang, B. Bed'Hom, D. Laloe, C. Vu Chi, E. Verrier, and J.-C. Maillard. 2010. Genetic and morphometric characterization of a local Vietnamese Swamp Buffalo population. J. Anim. Breed. Genet. 127: 74-84

Falconer, D. S., and Trudy F. C. Mackay. 1996. Introduction to Quantitative Genetics. Longman Group Ltd, Oxford.

Jainudeen, M. R. and E. S. E., Hafez. 2000. Cattle and Buffalo. In, Reproduction in farm animals. B. Hafez, E.S.E. Hafez. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins.

Mishra B. P., R. S. Kataria, P. Kathiravan, S. S. Bulandi, K. P. Singh, D. K. Sadana. 2009. Evaluation of genetic variability and mutation drift equilibrium of Banni buffalo using multi locus microsatellite markers. Trop Anim Health Prod. 41:1203-1211.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genet. 89:583-590.

SAS. 1998. User's guide: statistics. V.6.12. Cary, NC.

Sraphet, S., B. Moolmuang, A. Na-Chiangmai, S. Panyim, D. R. Smith, and K. Triwitayakorn. 2008. Use of Cattle Microsatellite Markers to Assess Genetic Diversity of Thai Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*). Asian-Aust. J. Anim. Sci. 21, 177-180.

US Meat Animal Research Center (USMARC). 2010. Cattle Genome Mapping Project. Available : http://www.marc.usda.gov/genome/cattle/cattle.html. Accessed 13 May 2010.