แก่นเกษตร 40 ฉบับพิเศษ : 25-30 (2555). KHON KAEN AGR. J. 40 SUPPLMENT : 25-30 (2012).

Phylogenetic tree ของเมทาโนเจนในกระเพาะรูเมนโคพื้นเมืองไทยกับโคนมโฮลส์ไตน์ฟรีเชี่ยน

A phylogenetic tree of methanogens in the rumen of Thai-native cattle and Holstein cattle

ฉัตรชัย แก้วพิลา[1], Takumi Shinkai[2], Makoto Otsuka[3], Makoto Mitsumori[2], Akio Takenaka[3] และ กฤตพล สมมาตย์[1*]

Chatchai Kaewpila[1], Takumi Shinkai[2], Makoto Otsuka[3], Makoto Mitsumori[2], Akio Takenaka[3] and Kritapon Sommart[1*]

บทคัดย่อ: วัตถุประสงค์ในการศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษาความหลากหลายของประชากรเมทาโนเจนในกระเพาะรูเมนโคพื้นเมืองไทยที่ปล่อยแทะเล็มพืชอาหารตามธรรมชาติกับโคนมโฮลส์ไตน์ฟรีเชี่ยนที่ได้รับหญ้าแห้งร่วมกับอาหารข้น โดยการสร้าง Phylogenetic tree จากห้องสมุดยีน mcrA พบว่า ทั้ง 456 clone ที่ได้รับมีความยาวในช่วง 464-491 คู่เบส ซึ่งกระจายตัวภายใต้ 5 คลัสเตอร์ โดยเรียงจากมากไปหาน้อย ได้แก่ *Methanobacteriales* (64.04%), Uncultured-mcrA (27.19%), *Methanomicrobiales* (7.02%), *Methanosarcinales* (1.10%) และ *Methanococcales* and *Methanosphaera* (0.66%) ซึ่ง clone ส่วนมากของโคทั้งสองชนิดเป็น *Methanobrevibacter* spp. นอกจากนี้ยังพบว่า โคพื้นเมืองไทยมี clone ที่อยู่ภายใต้คลัสเตอร์ Uncultured-mcrA สูงถึงร้อยละ 39.47

คำสำคัญ: แก๊สมีเทน, เมทาโนเจน, Phylogenetic tree, โคพื้นเมืองไทย, โคนมโฮลส์ไตน์ฟรีเชี่ยน

Abstract: The objective of this study was to study the diversity of methanogens in the rumen of Thai-native cattle grazing natural forage and Holstein cattle fed hay with concentrate. A phylogenetic tree was constructed by using cloned-mcrA gene libraries of rumen methanogens. The results found that, 456 cloned-mcrA gens ranged from 464-491 bp and contributed into 5 clusters namely: *Methanobacteriales* (64.04%), Uncultured-mcrA (27.19%), *Methanomicrobiales* (7.02%), *Methanosarcinales* (1.10%), and *Methanococcales* and *Methanosphaera* (0.66%); the most of cloned-mcrA gen relate to *Methanobrevibacter* spp. In addition, 39.47% of Thai-native's clone related to Uncultured-mcrA cluster.

[1]ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 40002

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

[2]Rumen Microbiology Laboratory Molecular Nutrition Research Team, National Institute of Livestock and Grassland Science, National Agricultural and Food Research Organization, Tsukuba, Ibaraki, 305-0901, Japan.

[3]Animal Production and Glass Land Division, Japan International Research Center for Agriculture Sciences, Tsukuba, Ibaraki, 305-8686, Japan.

*Corresponding author E-mail: kritapon@kku.ac.th

Keywords: Methane, Methanogen, Phylogenetic tree, Thai-native cattle, Holstein cattle

บทนำ

โคพื้นเมืองไทยและโคบราห์มันมีการผลิตแก๊สมีเทนอยู่ในช่วง 44-229 L/h/d หรือ 3.6-12.2 %GEI (Chaokaur, 2011) กระบวนการสังเคราะห์แก๊สมีเทน (methanogenesis) ในกระเพาะรูเมนต้องใช้เอนไซม์ methyl-coenzyme M reductase A (mcrA) ที่ผลิตโดย *Archaea* หรือที่เรียกว่า เมทาโนเจน (Methanogen) (Friedrich, 2005) ดังนั้นยีน mcrA จึงถูกใช้เป็น marker ในการศึกษาเมทาโนเจนในกระเพาะรูเมนได้เป็นอย่างดี (Luton et al., 2002) งานศึกษาที่ผ่านมาพบว่า เมทาโนเจนในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องมีสัดส่วนของ *Methanobrevibacter* spp. มากที่สุด (Friedrich, 2005; Wright et al., 2008) แต่อย่างไรก็ตามความหลากหลายของประชากรเมทาโนเจนในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องจะขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์และสภาพแวดล้อมด้านอาหารเป็นหลัก (Friedrich, 2005) ซึ่งในโคพื้นเมืองไทยยังมีรายงานการศึกษาอยู่อย่างจำกัด ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ วิเคราะห์ Phylogenetic tree ของเมทาโนเจนในกระเพาะรูเมนโคพื้นเมืองไทยที่ปล่อยแทะเล็มพืชอาหารสัตว์ตามธรรมชาติ ซึ่งเป็นวิธีการเลี้ยงที่นิยมมากในประเทศไทย และโคนมโฮลส์ไตน์ฟรีเชี่ยนที่ได้รับอาหารและการจัดการที่แตกต่างออกไปจากโคพื้นเมืองไทย

วิธีการศึกษา

งานศึกษานี้จัดทำขึ้นเมื่อ กันยายน พ.ศ.2553 ถึง มีนาคม พ.ศ. 2554 โดยสุ่มเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนจากโคโตเต็มวัย จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ โคนมโฮลส์ไตน์ฟรีเชี่ยน จำนวน 2 ตัว (อายุเฉลี่ย 6 ปี 7 เดือน) ที่ได้รับฟางข้าวแห้งร่วมกับอาหารข้นในสัดส่วน 7:3 (Group 1) และจำนวน 3 ตัว (อายุเฉลี่ย 7 ปี 2 เดือน) ที่ได้รับหญ้า Timothy แห้งร่วมกับอาหารข้นในสัดส่วน 4:6 (Group 2) ซึ่งเลี้ยง ณ ฟาร์มทดลอง National Institute of Livestock and Grassland Science, National Agricultural and Food Research Organization, Tsukuba, Ibaraki, Japan และโคพื้นเมืองไทยที่ปล่อยแทะเล็มพืชอาหารตามธรรมชาติ (Group 3) จำนวน 3 ตัว (อายุเฉลี่ยประมาณ 1 ปี 10 เดือน)ที่เลี้ยง ณ ฟาร์มโคเนื้อ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น โคแต่ละตัวถูกเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมนด้วย stomach tube ผ่านทางปากก่อนให้อาหารเช้าตัวละ 500 ml แล้วกรองผ่านผ้าขาวบางพับ 4 ชั้น สุ่มมา 1 ml เพื่อสกัดเอา total DNA ด้วย FastDNA kit (Q-BIO gene, Quebac, Canada) ตามวิธีการที่อธิบายไว้ใน Denman and McSweeney (2006) ตัวอย่างประกอบด้วย total DNA ที่ได้จากกระเพาะรูเมนของโคแต่ละตัวของ Group 3 (Lib#3, Lib#4 และ Lib#5), โคแต่ละตัวของ Group 1 นำมารวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง (Lib#1) และโคแต่ละตัวของ Group 2 นำมารวมกันเป็น 1 ตัวอย่าง (Lib#2) นำไปสร้างห้องสมุดยีนตามขั้นตอนดังนี้ คือ เพิ่มจำนวนยีน mcrA โดยใช้ไพรเมอร์ตาม Luton et al. (2002) แล้วจึงนำ PCR product มาแยกเอาเฉพาะยีน mcrA ที่มีความยาวประมาณ 470 bp ก่อนนำมาทำ ligation เข้าไปใน vector และ transform เข้าไปใน *Escherichia coli* ตามลำดับ โดยใช้อุปกรณ์และวิธีการใน TA Cloning® Kit (with pCR®2.1 vector) with One Shot® INVaF′ Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen™; www.invitrogen.com) แล้วนำ *Escherichia coli* ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (LB Broth Base; Difco™) แล้วสุ่ม active colony จาก Lib#1, Lib#2, Lib#3, Lib#4 และ Lib#5 ละ 98 colony รวม 490 colony มาเป็น template เพื่อสร้าง 490 PCR

product โดยใช้ M13 primer ใน TA Cloning® Kit ข้างต้น ต่อมานำไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย Nucleotide sequencer ด้วยกระบวนการมาตรฐาน ซึ่งยีน mcrA ที่ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์จาก Lib#1 มีจำนวน 94 clone จาก Lib#2 มีจำนวน 96 clones และจาก Lib#3, Lib#4 และ Lib#5 รวมกันมีจำนวน 266 clone รวมทั้งหมด 456 clone (มีการสูญเสียจากกระบวนการ Nucleotide sequencer) ถูกนำมาเรียบเรียงร่วมกับยีน mcrA ของเมทาโนเจนที่ปรากฏใน GenBank (http:// www.ncbi.nlm.nih.gov/) ด้วยการสร้าง Phylogenetic tree โดยวิธีการ neighbor-joining algorithm ด้วย Kimura model โดยโปรแกรม CLUSTAL W (http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html) ซึ่งกำหนดค่า bootstrap analysis ไว้ที่ 1,000 ครั้ง

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากการทำห้องสมุดยีน mcrA พบว่า ยีนที่ได้รับมีความยาวในช่วง 464-491 bp ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Luton et al. (2002) แสดงให้เห็นว่า ยีน mcrA ที่ได้มีความสมบูรณ์ โดย Phylogenetic tree ของเมทาโนเจนที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงใน Figure 1 (ดู Table 1 ประกอบ) พบว่า clone กระจายอยู่ภายใต้ 5 คลัสเตอร์หลัก โดยคลัสเตอร์ *Methanobacteriales* มีมากที่สุด ซึ่งมีสัดส่วนเท่ากับ 64.0% ของทั้งหมด (292 clone จาก 456 clone) ในลำดับต่อมาคือ Uncultured-mcrA เท่ากับ 27.19% ของทั้งหมด (124 clone จาก 456 clone) และกระจายตัวอยู่ภายใต้คลัสเตอร์อื่น ๆ ได้แก่ *Methanomicrobiales*, *Methanosarcinales* และ *Methanococcales* and *Methanosphaera* หากพิจารณาที่คลัสเตอร์ *Methanobacteriales* พบว่า clone ทั้งหมดเป็น *Methanobrevibacter* spp. ซึ่ง Lib#1 และ Lib#2 เป็น clone จากโคนมโฮลส์ไตน์ฟรีเซี่ยนมีสัดส่วนเท่ากับ 64.89 และ 91.67% ตามลำดับ และ Lib#3, Lib#4 และ Lib#5 มีผลในทิศทางเดียวกันคือ มีสัดส่วนเท่ากับ 53.76% (173 clone จาก 266 clone) และหากพิจาณาที่ *Methanosaeta* spp. พบว่า มีเฉพาะ clone ที่มาจาก Group 2 เท่านั้น โดยมีสัดส่วนเท่ากับ 5.21% (5 clone จาก 96 clone)

ในการศึกษาครั้งนี้โคพื้นเมืองไทยและโคนมโฮลส์ไตน์ฟรีเซี่ยนมีปัจจัยด้าน พันธุ์สัตว์ อาหาร การจัดการ และอาจรวมไปถึงชนิดของเมทาโนเจนที่ปะปนในอาหารมีความแตกต่างกัน ส่งผลให้ Phylogenetic tree ของเมทาโนเจนในกระเพาะรูเมนมีสัดส่วนของของคลัสเตอร์ต่าง ๆ ไม่เท่ากัน สำหรับงานศึกษาที่ผ่านมาของ กัลยา และคณะ (2555ก) พบว่า โคขาวลำพูนที่เลี้ยงด้วยหญ้าอย่างเดียวหรือเสริมด้วยอาหารข้นพบ *Methanobrevibacter smithii* มากกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ นอกจากนี้ กัลยา และคณะ (2555ข) ยังพบว่า โคขุนกบินทร์บุรีเพศผู้ไม่ตอนขุนด้วยหญ้าเสริมอาหารข้นจะมีเมทาโนเจน *Candidatus Methanoregula boonei, Halorubrum lacusprofundi, Ignicoccus hospitalis* และ *Methanosarcina barkeri* มากกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ

ในการศึกษาครั้งนี้ยังพบว่า โคพื้นเมืองไทยมีสัดส่วนของ clone ที่อยู่ภายใต้คลัสเตอร์ Uncultured-mcrA ถึง 39.47% (105 clone จาก 266 clone) ในขณะที่โคนมโฮลส์ไตน์ฟรีเซี่ยน Lib#1 มีสัดส่วนเท่ากับ 19.15% (18 clone จาก 96 clone) และ Lib#2 มีสัดส่วนเท่ากับ 1.04% (1 clone จาก 94 clone) ตามลำดับ โดย clone ที่อยู่ภายใต้คลัสเตอร์นี้เป็นเมทาโนเจนที่ยังไม่สามารถแยกเชื้อได้ ชี้ให้เห็นว่ามีโอกาสสูงที่จะสามารถแยกเชื้อเมทาโนเจนใหม่ในกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมืองไทยได้ในงานศึกษาในอนาคต

สรุป

เมทาโนเจนในกระเพาะรูเมนของโคที่ถูกนำมาศึกษามีสัดส่วนประชากรของ *Methanobrevibacter* spp. มากที่สุดคือร้อยละ 64.04 และเมทาโนเจนในกระเพาะรูเมนของโคพื้นเมืองไทยที่ปล่อยแทะเล็มพืชอาหารตามธรรมชาติมีสัดส่วนของเมทาโนเจนที่ยังไม่สามารถแยกเชื้อได้ 39.47%

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, National Institute of Livestock and Grassland Science และ Japan International Research Center for Agriculture Sciences สำหรับการสนับสนุนการกศึกษาในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

กัลยา บุญญานุวัตร, ศุภฤกษ์ สายทอง, และ สิริวดี ชมเดช. 2555ก. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ Methanogen ในกระเพาะรูเมนของโคขาวลำพูน. http://www.dld.go.th/breeding/pdf/methanogen1.pdf. ค้นเมื่อ 9 มกราคม 2555.

กัลยา บุญญานุวัตร, อำนวย พุทธรัตนัง, เยาวลักษณ์ เลไพจิตร และ สิริวดี ชมเดช. 2555ข. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ Methanogen ในกระเพาะรูเมนของโคกบินทร์บุรี. http://www.dld.go.th/breeding/pdf/methanogen_kabinburi.pdf. ค้นเมื่อ 9 มกราคม 2555.

Chaokaur, A. 2011. Current status of methane emission from cattle in Thailand. Page 197 in: Proc. The 3rd International Conference on Sustainable Animal Agriculture for Developing Countries (SAADC 2011), Suranaree University of Technology, Nakorn Ratchasima, Thailand.

Denman, S. E., and C. S. McSweeney. 2006. Development of a real-time PCR assay for monitoring anaerobic fungal and cellulolytic bacterial populations within the rumen. FEMS Microbiol Ecol. 58:572–582.

Friedrich, M. W. 2005. Methyl-coenzyme M reductase genes: unique functional markers for methanogenic and anaerobic methane-oxidizing *Archaea*. Methods Enzymol. 397:428–442.

Luton, P. E., J. M. Wayne, R. J. Sharp, and P. W. Riley. 2002. The *mcrA* gene as an alternative to 16S rRNA in the phylogenetic analysis of methanogen populations in landfill. Microb. 148:3521–3530.

Wright, G. A-D., X. Ma, and N. E. Obispo. 2008. *Methanobrevibacter* phylotypes are the dominant methanogens in sheep in Venezuela. Microb. Ecol. 56:390–394.

Table 1. The cloned methyl coenzyme M reductase A (mcrA) gene libraries of methanogen in the rumen samples of Thai-native cattle and Holstein cattle[1/].

Items	Cloned-mcrA libraries		
	Group 1 (Lib#1)	Group 2 (Lib#2)	Group 3 (Lib#3, 4, 5)
Total amount of cloned-mcrA sequence	94	96	266
Clones relate to cluster of			
Methanococcales and *Methanosphaera* (0.66% of total clone)			
Methanosphaera stadtmanae	-	2	-
Un-relative	-	-	1
Methanobacteriales (64.04% of total clone)			
Methanobrevibacter millerae	37	36	114
Methanobrevibacter ruminantium M1	9	47	3
Methanobrevibacter woesei	-	2	-
Un-relative	15	3	26
Uncultured-mcrA (27.19% of total clone)			
Bovine Rumen Clone CLI12	16	-	57
Bovine Rumen Clone CLI34	2	-	35
Bovine Rumen Clone CLI52	-	-	9
Wallaby Foregut Clone TWM-NOV.04	-	1	-
Un-relative	-	-	4
Methanosarcinales (1.10% of total clone)			
Methanosaeta concilii	-	2	-
Un-relative	-	3	-
Methanomicrobiales (7.02% of total clone)			
Methanomicrobium mobile	15	-	17

[1/]Group 1, Group 2, and Group 3 were Holstein cattle which fed rice straw plus with concentrate (7:3), Holstein cattle fed timothy grass hay with concentrate (4:6), and Thai-native cattle grazing natural forage, respectively.

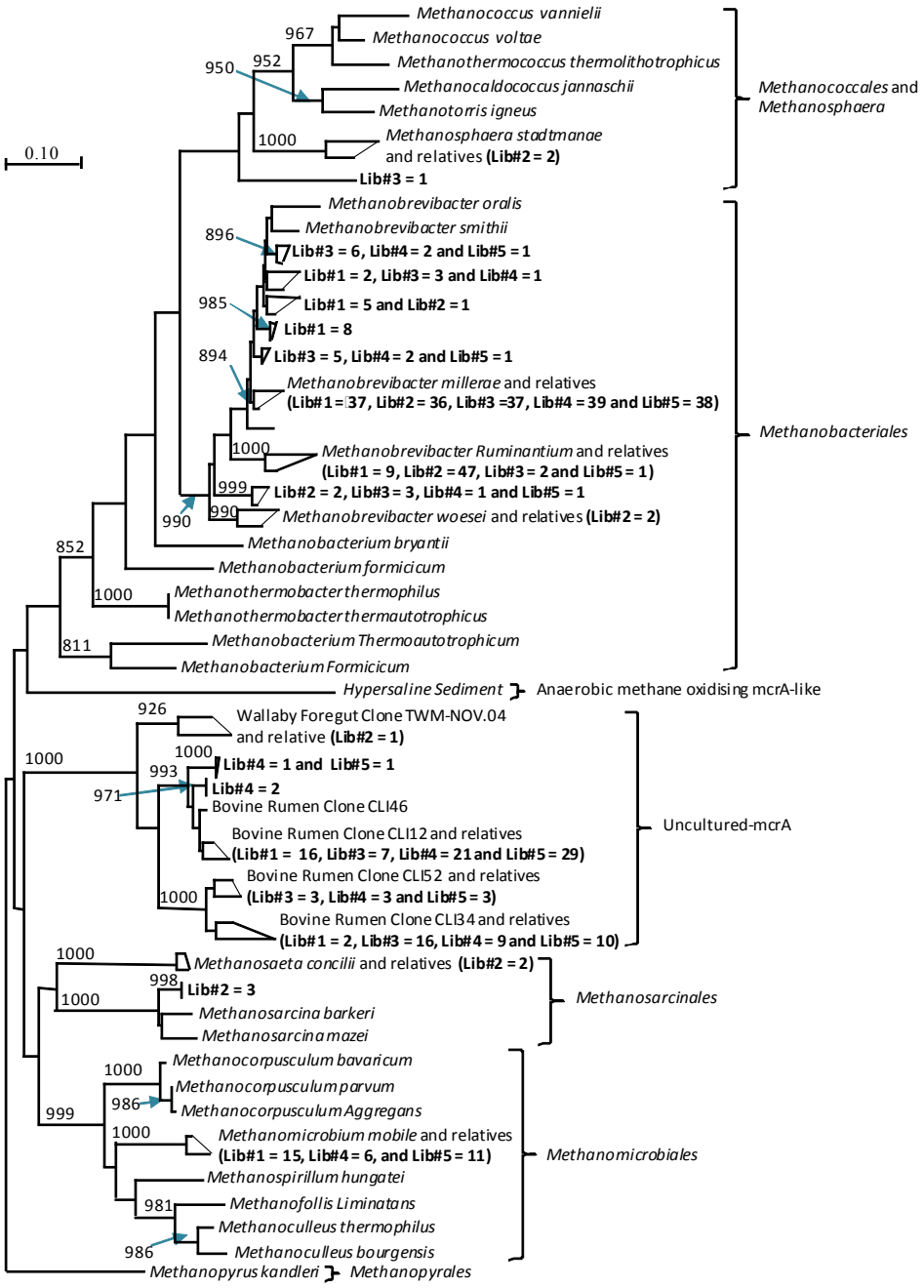

Figure 1. Phylogenetic tree indicating the relationship among 456 methyl coenzyme M reductase A (mcrA) gene sequences of cloned rumen samples libraries which are indicated in boldface text (Lib#1 = Holstein cattle fed rice straw with concentrate (7:3) included 94 cloned mcrA sequences, Lib#2 = Holstein cattle fed timothy grass hay with concentrate (4:6) included 96 cloned mcrA sequences, and Lib#3 + Lib#4 + Lib#5 = Thai-native cattle grazing natural forage included 266 (from 83 + 87 + 96, respectively) cloned mcrA sequences), with known methanogen sequences in GenBank. *Methanopyrus kandleri* was selected as outgroup (bootstrap values <800 not shown). The scale bar indicates 0.10 inferred nucleotide substitutions per position.