

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกกลุ่ม โคพื้นเมืองไทยด้วยไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ

Genetic variation and cluster analysis of Thai native cattle using mitochondrial DNA (mtDNA)

ภูวณณ กรพันธุ์¹, รัชฎาพร เอกบุตร¹, มนต์ชัย ดวงจินดา^{1*}, ยุพิน ผาสุข¹ และ ปาวดี ปักดี¹

Phuwadon Kornphan¹, Pradchayaporn Akaboot¹, Monchai Duangjinda^{1*},

Yupin Phasuk¹ and Pawadee Pakdee¹

บทคัดย่อ: ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (mtDNA) มีโครงสร้างเป็น circular DNA ที่อยู่ในไมโทคอนเดรียของสิ่งมีชีวิต ซึ่งได้รับการถ่ายทอดผ่านทางแม่ การวิเคราะห์ความหลากหลายของ mtDNA สามารถนำมาอธิบายพันธุกรรมภายในและระหว่างประชากรได้ดี วัตถุประสงค์ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจำแนกกลุ่มโคพื้นเมืองไทยกลุ่มต่างๆ ในประเทศไทย ด้วย mtDNA ซึ่งพบว่า โคพื้นเมืองไทย กลุ่มโคภาคกลาง และกลุ่มอีสานมีความหลากหลายภายในกลุ่มสูง และจากการจำแนกกลุ่มด้วยวิธี Maximum Likelihood พบว่า กลุ่มโคพื้นเมืองภาคเหนือและภาคใต้สามารถจำแนกจากกลุ่มอื่นได้ค่อนข้างชัดเจน

คำสำคัญ: โคพื้นเมืองไทย, ไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ

ABSTRACT: Mitochondrial DNA (mtDNA) is a circular DNA within mitochondria and maternally inheritance. The analysis of mtDNA polymorphism can be used to describe genetic structure within and between populations. The objective of this study was to investigate the genetic variation and cluster analysis of Thai Native Cattle with mtDNA. The result showed that Thai Native Cattle from Central group and North Eastern group were highly genetic variation. The cluster analysis with Maximum Likelihood found that Northern and Southern Native Cattle were separated clearly from another group.

Keyword: Thai Native Cattle, mitochondrial DNA

บทนำ

การจัดจำแนกกลุ่มของโคพื้นเมืองมีความสำคัญในด้านปศุสัตว์ ทั้งนี้เพื่อให้ทราบถึงสัตว์ชนิดนั้นๆ ควรจะเป็นโคพื้นเมืองในกลุ่มใด ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการวางแผนการคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์โค

นอกจากนี้การจัดจำแนกกลุ่มจะช่วยให้เราไปถึงสภาพความหลากหลายของประชากรนั้น ซึ่งความหลากหลายของประชากรมีความสำคัญต่อการเกิดวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตเมื่อสภาวะแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปสัตว์ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงจะมีความสามารถในการปรับตัวได้

¹ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น 40002

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, KhonKaen University, KhonKaen, 40002

* Corresponding author: monchai@kku.ac.th

สูงกว่าสัตว์ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ ซึ่งจะช่วยลดโอกาสการสูญเสียพันธุ์ ช่วยลดความสูญเสียทางพันธุกรรม เช่น ลดการสูญเสียที่เกิดจากการผสมระหว่างเครือญาติ และเป็นทรัพยากรที่มีคุณค่าต่อวิถีมนุษย์ทางด้านเศรษฐกิจ

โคพื้นเมืองไทยซึ่งจัดอยู่ในตระกูล *Bos indicus* รูปร่างโดยทั่วไป มีขนาดเล็ก ซึ่งการจำแนกกลุ่มของโคพื้นเมืองสามารถทำได้หลายวิธี เช่นการจำแนกกลุ่มจากแหล่งที่อยู่อาศัย การจำแนกกลุ่มจากลักษณะปรากฏ การจำแนกกลุ่มจากองค์ประกอบเลือด และการจำแนกกลุ่มจากข้อมูลพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ การศึกษาเกี่ยวกับพันธุกรรมของโคพื้นเมืองในประเทศไทยมีข้อมูลค่อนข้างจำกัดจากการศึกษาของกิตติ (2546) จำแนกกลุ่มตามลักษณะปรากฏ จำแนกได้ 4 กลุ่มได้แก่ กลุ่มโคพื้นเมืองภาคกลาง กลุ่มโคพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียง กลุ่มโคพื้นเมืองภาคเหนือ และกลุ่มโคพื้นเมืองภาคใต้ ทำให้เห็นได้ว่าโคพื้นเมืองน่าจะจำแนกได้ 4 กลุ่มดังกล่าว นอกจากนี้มีรายงานของกัลยา และคณะ (2548) ใช้เทคนิค microsatellite โดยใช้ตัวอย่างโคพื้นเมืองที่เลี้ยงในสถานียอดสอบพบว่าพันธุกรรมของโคทั้ง 4 กลุ่มมีแนวโน้มที่แตกต่างกัน การศึกษาข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทป์ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ (mitochondrial DNA; mtDNA) บริเวณ displacement loop (D-loop) ก็นิยมนำมาใช้เป็นเครื่องมือศึกษาความหลากหลาย และการจัดจำแนกกลุ่มสัตว์กันอย่างกว้างขวาง (Loftus et al., 1994) ซึ่ง Tsuji et al. (2004) รายงานว่าพันธุกรรมโคพื้นเมืองในประเทศญี่ปุ่นที่ผ่านการผสมพันธุ์แบบ grading up 15 รุ่น ส่วนใหญ่ถูกแทนที่ด้วยพันธุกรรมโคไฮสไตส์ ฟรีเซียนพันธุ์แท้ แต่มี mtDNA บริเวณ D-loop บางรูปแบบที่พบเฉพาะในโคญี่ปุ่น (Japanese Black cattle) โดยไม่พบในโคยุโรปหรือโคแอฟริกันและเพื่อให้การจำแนกกลุ่มโคพื้นเมืองไทยมีความชัดเจนยิ่งขึ้น การศึกษาครั้งนี้จึงเก็บตัวอย่างจากเกษตรกรในแต่ละภูมิภาคของประเทศไทย โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจำแนกกลุ่มโคพื้นเมืองไทยกลุ่มต่างๆ ในประเทศไทย ด้วย mtDNA บริเวณ D-loop ซึ่ง

ข้อมูลทางพันธุกรรมที่ได้จะช่วยให้การจัดจำแนกกลุ่มโคพื้นเมืองมีความถูกต้องยิ่งขึ้น ทั้งยังจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาพันธุ์ การอนุรักษ์ และการใช้ประโยชน์ต่างๆ จากโคพื้นเมืองอย่างยั่งยืน

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างเนื้อเยื่อหรือเม็ดเลือดขาวโคพื้นเมืองไทยจากพื้นที่ต่างๆ ของประเทศไทย 73 ตัว โดยแบ่งเป็นกลุ่มโคภาคเหนือ (เชียงใหม่) 18 ตัว, กลุ่มโคภาคกลาง (พิษณุโลกและประจวบคีรีขันธ์) 13 ตัว, กลุ่มโคภาคอีสาน (ขอนแก่น, อุบลราชธานี) 9 และ 16 ตัว, กลุ่มโคภาคใต้ (สงขลา) 17 ตัว และตัวอย่างเลือดโคไฮสไตส์ฟรีเซียน 5 ตัว, โคบราห์มัน 5 ตัว, ไคลูกผสม (TMZ) 2 ตัวและลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง (reference) คือดีเอ็นเออ้างอิงของโคอินเดีย (Zebu) จาก GenBANK, โคพื้นเมืองไทยสายพันธุ์ขาวลำพูน (CMU16) และโคนมพันธุ์ไฮสไตส์ (HF)

การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างด้วยชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป PURE-GENETM (GENTRA Inc., USA) สำหรับการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดโคปั่นแยกเอาเฉพาะเม็ดเลือดขาวแล้วล้างด้วย 0.9% NaCl และทำลายเม็ดเลือดแดงที่ปนมา ส่วนเนื้อเยื่อเก็บรักษาไว้ใน absolute alcohol เริ่มการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อโดยล้างเอา alcohol ออกและทำลายโปรตีนด้วย proteinase K จากนั้นจึงนำตัวอย่างเลือดและเนื้อเยื่อมาทำลายผนังเซลล์และตกตะกอนโปรตีนแล้วจึงตกตะกอนดีเอ็นเอด้วย iso-propanol และล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 75% ethanol นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้มาผึ่งให้แห้ง แล้วจึงละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย DNA hydration และปรับความเข้มข้นเป็น 50 ng/μl เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอการใช้งานในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 1 ลักษณะต่างๆ ของโคพื้นเมืองไทยแต่ละสายพันธุ์

สายพันธุ์	ลักษณะประจำพันธุ์
โคพื้นเมืองภาคเหนือ (ชาวลำพูน)	เขาและกีบเท้ามีสีน้ำตาลส้ม ขอบตาและเนื้อจมูกมีสีชมพูส้ม ขนฟูหางสีขาว ไม่เหนียงสะดือ เหนียงคอปานกลางไม่พับย่นมากเหมือนกับโคบราห์มัน
โคพื้นเมืองภาคกลาง (วัณลาน)	สีขนแดง น้ำตาลอ่อน น้ำตาลแก่ ดำและดำไม่มีเหนียงสะดือ มีเหนียงคอบาง นิสัยเปรี้ยว ตื่นตกใจง่าย ลำตัวยาวบาง
โคพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือสีขนหลายสี เช่น ดำแดง น้ำตาล ขาว เหลือง เป็นต้น หน้ายาวขอบบาง	หน้าผากแคบตะโพนกเล็ก เหนียงคอและหนังใต้ท้องไม่มากนัก
โคพื้นเมืองภาคใต้(โคชน)	สีขนแดง น้ำตาลอ่อน ดำ และดำ ไม่มีเหนียงสะดือ มีเหนียงคอบาง

แหล่งที่มา:กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (ค้นจาก<http://www.thaicattle.org/managefarm/cowdetail.php> เมื่อวันที่ 24 กันยายน 2554)

ปฏิกิริยา PCR

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยเทคนิค PCR ด้วยไพรเมอร์ D-loop F 5' ACATTAATTATATGCCCCATGC 3' และ Dloop R 5' AGCTCGTGATCTAATGGTAAGA 3' (Tsuij et al., 2004) ในแต่ละปฏิกิริยา (10 µl) ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่มีความเข้มข้น 50 ng/µl ปริมาตร 1 µl, 50 mM MgCl₂ ปริมาตร 0.8 µl, 10XPCR-buffer ปริมาตร 1 µl, 1 mM/each dNTPs ปริมาตร 1 µl, 5 µM/µl Forward และ Reverse primer (QIAGEN, Germany) อย่างละ 1 µl, 5 U Taq DNA polymerase (BIOTOOLS B&B Labs, S. A., Spain) ปริมาตร 0.1 µl และสุดท้ายปรับปริมาตรด้วยน้ำ R.O. clave ปริมาตร 4.1 µl โดยมีวงรอบการทำ PCR ดังนี้ เริ่ม initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C 3 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 35 รอบ มีรายละเอียดดังนี้ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 °C 30 วินาที, primer annealing 45 วินาที, primer extension ที่อุณหภูมิ 72 °C 45 วินาที และจบด้วย final extension ที่อุณหภูมิ 72 °C 5 นาที จากนั้นจึงนำ PCR ที่ได้มาตรวจสอบด้วย 6 % acrylamide gel electrophoresis และย้อมสีด้วย gel starTM

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และการวิเคราะห์ข้อมูลความหลากหลาย

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสาย Forward และ reverse ของแต่ละตัวอย่างด้วยเครื่องรุ่น ABI3730XL

ซึ่งเป็นบริการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MacroGen Inc., (เกาหลี) จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และความหลากหลายลำดับนิวคลีโอไทด์ของ mtDNA โดยเทียบกับดีเอ็นเออ้างอิงของโคอินเดีย (Zebu) จาก GenBANK, โคพื้นเมืองไทยสายพันธุ์ชาวลำพูน (CMU16) และโคนมพันธุ์ไฮลัสไดน์ (HF) ด้วยการทำ multiple alignment และวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยโปรแกรม DNAMAN version 5.2.2 โดยวิธี Maximum Likelihood

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากข้อมูลลำดับเบสบริเวณ D-loop ของ mtDNA เมื่อนำมาวิเคราะห์การจำแนกกลุ่มโคพื้นเมืองไทยเมื่อเปรียบเทียบกับโคนมไฮลัสไดน์ ฟรีเซียน, โคบราห์มัน, โคลูกผสม และลำดับนิวคลีโอไทด์อ้างอิง พบว่าโคพื้นเมืองไทยสามารถจำแนกกลุ่มออกจากโคนมไฮลัสไดน์ ฟรีเซียน, โคบราห์มันและโคลูกผสมได้อย่างชัดเจน นอกจากนี้โคพื้นเมืองไทยส่วนใหญ่ยังมีพันธุกรรมที่แตกต่างกันตามแหล่งที่อยู่โดยเฉพาะกลุ่มโคพื้นเมืองภาคใต้และกลุ่มโคภาคเหนือที่แยกออกจากโคพื้นเมืองกลุ่มอื่นได้อย่างชัดเจน และพบว่าพันธุกรรมในกลุ่มโคภาคกลางและกลุ่มโคภาคอีสานมีพันธุกรรมกระจายตัวปะปนกันมาก ซึ่งทำให้จำแนกกลุ่มได้ยาก (ดังรูปที่ 1) ทั้งนี้ น่าจะเนื่องมาจากวิถีการเลี้ยงของโคพื้นเมืองทั้ง 4 กลุ่มที่แตกต่างกัน (กิตติ, 2546) กลุ่มโค

ภาคเหนือนิยมเลี้ยงเพื่อเทียมเกวียน และเพื่อความสวยงาม จึงมีการคัดเลือกโคอยู่ตลอดทำให้โอกาสในการเคลื่อนย้ายโคข้ามพื้นที่เป็นไปได้ยาก เช่นเดียวกับกลุ่มโคภาคใต้ที่นิยมเลี้ยงเพื่อการกีฬา จึงนิยมคัดเลือกพ่อแม่โคที่ให้ลูกที่ชนเก่งมาเป็นพ่อแม่พันธุ์ จึงเป็นการผสมพันธุ์ภายในโคกลุ่มภาคใต้ ในขณะที่กลุ่มโคภาคกลางและภาคอีสานจะเลี้ยงไว้ตามครัวเรือนเพื่อช่วยเหลือในการทำการเกษตร และปัจจุบันยังนิยมนำเนื้อไปบริโภค ทำให้มีการค้าขายโคพื้นเมืองมีชีวิต ทำให้มีโอกาสในการอพยพย้ายถิ่นระหว่างโคได้รวมทั้งอาจจะมีการผสมพันธุ์กัน เป็นผลทำให้พันธุกรรมของกลุ่มโคพื้นเมืองภาคอีสานกับภาคกลางมีการปะปนกันอยู่ดังกล่าว

โคไฮสไตล์ ฟรีเซียน (HF) เป็นโคในตระกูล *Bostaurus* ส่วนโคบราห์มันเป็นโคที่จัดเป็น *Bosindicus* ซึ่งจัดว่าเป็นโคต่างชนิดพันธุ์ (species) กัน แต่จากผลการศึกษาด้วย mtDNA กลับพบว่าโคทั้ง 2 มีความใกล้เคียงกัน ทั้งนี้อาจเนื่องเมื่อ 10,000 ปีที่ผ่านมาจากโคทั้ง 2 กลุ่มมีจุดกำเนิดพันธุกรรมเดียวกัน (Epstein, 1971; Epstein and Mason, 1984 อ้างโดย Meirelles et al., 1999) จึงทำให้พันธุกรรมบางส่วนยังคงเหมือนกัน หรืออาจเกิดเนื่องจากในช่วงแรกของการเลี้ยงโคทั้ง 2 กลุ่มนี้อาจมีการผสมข้ามพันธุ์ และเมื่อได้พันธุกรรมที่ดีจึงแยกการเลี้ยงดู ทำให้พันธุกรรมบางส่วนปะปนกัน แต่สามารถจำแนกความแตกต่างระหว่างพันธุกรรมของ *Bos taurus* และ *Bos indicus* ได้ด้วยข้อมูลของ mtDNA (Meirelles et al., 1999)

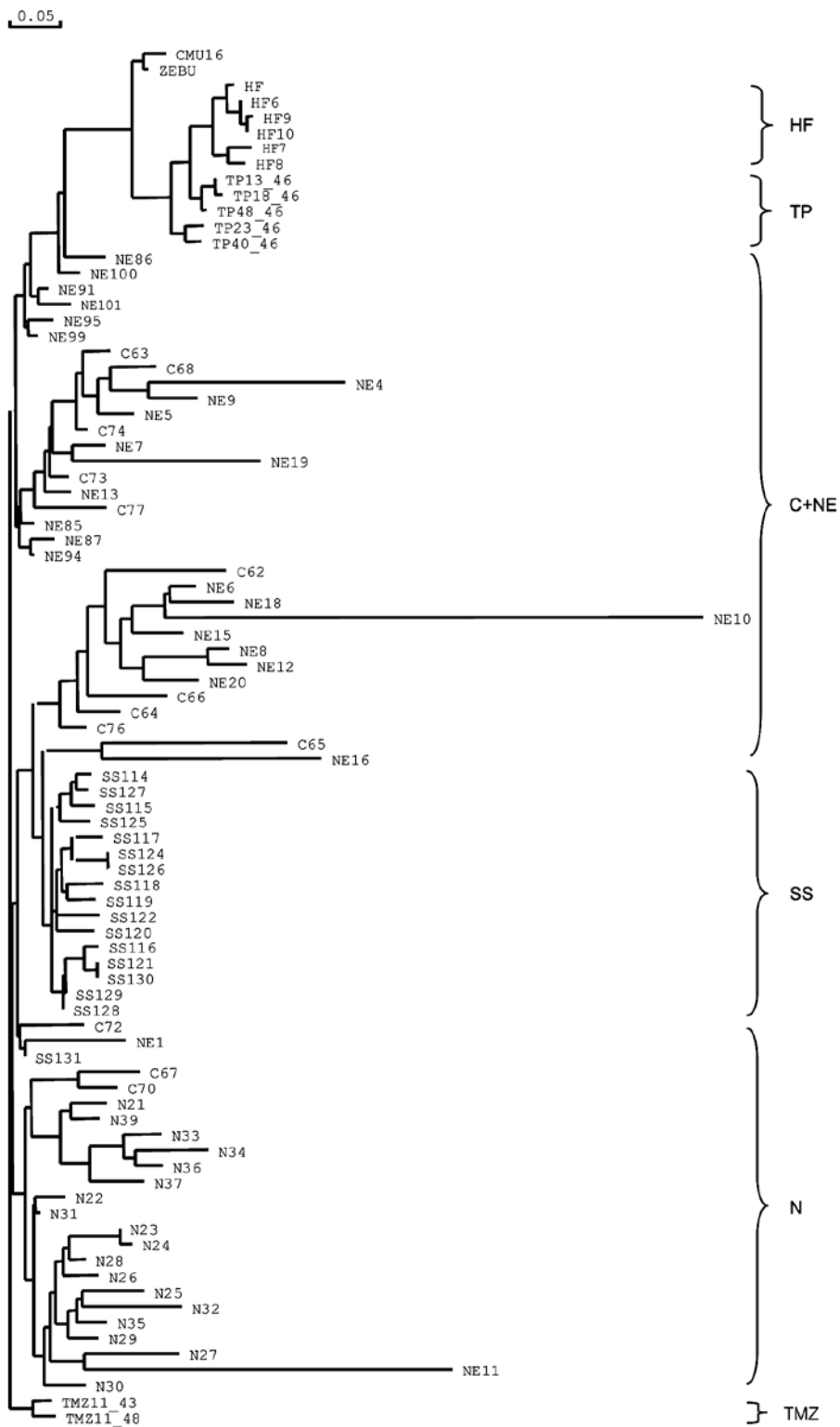
สรุป

โคพื้นเมืองไทยสามารถจัดจำแนกได้ 4 กลุ่ม โดยกลุ่มโคพื้นเมืองภาคใต้และกลุ่มโคภาคเหนือที่แยกออกจากโคพื้นเมืองกลุ่มอื่นได้อย่างชัดเจน ส่วนกลุ่มโคภาคกลางและกลุ่มโคภาคอีสานยังแยกจากกันไม่ชัดเจน โคพื้นเมืองไทยสามารถจำแนกกลุ่มออกจากโคนมไฮสไตล์ ฟรีเซียน, โคบราห์มันและโคลูกผสมได้อย่างชัดเจน ข้อมูล mtDNA นอกจากจะนิยมใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมก็ยังสามารถใช้

ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของ mtDNA กับการให้ผลผลิต ซึ่งหากนำข้อมูลความสัมพันธ์ mtDNA กับการให้ผลผลิตมาร่วมพิจารณาในการจำแนกกลุ่มโคพื้นเมืองไทยด้วย น่าจะทำให้การจัดจำแนกกลุ่มโคพื้นเมืองมีความถูกต้องยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์, 2554. มาตรฐานลักษณะประจำพันธุ์โคเนื้อ. กลุ่มวิจัยและพัฒนาโคเนื้อ กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (ค้นจาก <http://www.thaicattle.org/managefarm/cowdetail.php> เมื่อวันที่ 24 กันยายน 2554)
- กัลยา บุญญานุวัตร, สมมาตร สุวรรณมาโจ และวินิจ คำสังข์. 2548. ความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนในโคพื้นเมือง 4 สายพันธุ์. รายงานผลการวิจัยการปศุสัตว์ สาขาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์และการจัดการฟาร์ม ประจำปี 2548. กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- กิตติ อรรถชาติ .2546 .การจำแนกกลุ่มสายพันธุ์และการประมาณค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมของลักษณะการเจริญเติบโตและสัดส่วนร่างกายในโคพื้นเมืองไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- Loftus, R.T., D.E. MacHugh, D.G. Bradley, P.M. Sharp, P. Cunningham. 1994. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91: 2757-2761.
- Mannen, H., T. Kojima, K. Oyama, F. Mukai, T. Ishida and S. Tsuji. 1998. Effect of mitochondrial DNA variation on carcass traits of Japanese Black cattle. *J. Anim. Sci.* 76: 36-41.
- Meirelles, F. V., A. J. M. Rosa, R. B. Lôbo, J. M. Garcia, L. C. Smith and F. A. M. Duarte. 1999. Is the American Zebu really *Bos indicus*? *Genet. Mol. Biol.* 22: 543-546.
- Simonsen, B. T., H. R. Siegmund, and P. Arctander. 1998. Population structure of African buffalo inferred from mtDNA sequences and microsatellite loci: high variation but low differentiation. *Mol. Eco.* 7:225-237.
- Tsuji, S., H. Mannen, F. Mukai, M. Shoji, K. Oyama, T. Kojima, C. Kano, Y. Kinoshita, and E. Yamaguchi. 2003. Trace of Native Cattle in Japanese Holstein assessed by mitochondrial DNA sequence polymorphism. *J. Dairy Sci.* 87:3071-3075.



รูปที่ 1 แผนภาพการจัดกลุ่มจากข้อมูล mtDNA ด้วยวิธี Maximum Likelihood (HF =ไฮสไตล์ ฟรีเซียน, TP=บราห์มัน, NE =ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, C=ภาคกลาง, SS=ภาคใต้, N= ภาคเหนือ, TMZ=ลุ่มผสม)