

ความหลากหลายทางพันธุกรรมสายแม่ในโคพื้นเมืองไทย ด้วยการวิเคราะห์ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

ณชัย ศรารัตน์^{1*} สายใจ ชื่นสุข¹ มาลี อภิเมธีธำรง¹ วิบูลย์ เยี่ยงวิศกร¹
ศร ธิปฏิมาร² สุกัญญา ยุ่งระแหง³

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

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

³ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

* ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ : 0632152243 โทรสาร : 029679719 E-mail : nachaisarataphan@gmail.com

บทคัดย่อ

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมที่ได้รับการถ่ายทอดมาจากแม่เท่านั้น จึงนำมาใช้ศึกษาวิวัฒนาการและความหลากหลายทางพันธุกรรมสายแม่ของคนและสัตว์ วัตถุประสงค์ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ เพื่อหาความหลากหลายทางพันธุกรรมสายแม่และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในโคขาวลำพูน 30 ตัว โคลาน 35 ตัว โคชนไต้ 15 ตัว โคอีสาน 18 ตัว และโคลูกผสมแองกัส x พื้นเมืองไทย 7 ตัว รวมทั้งสิ้น 105 ตัว ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ที่มีความผันแปรสูงจำนวน 285 คู่เบส เปรียบเทียบกับลำดับเบสของโคสายพันธุ์ต่างๆ พบว่ามีตำแหน่งคู่เบสที่แตกต่างกันจำนวน 50 ตำแหน่ง สามารถจำแนกได้จำนวน 21 Haplotype โดยพบ Haplotype10 มากที่สุด โคขาวลำพูน โคลาน โคชนไต้ โคอีสาน และโคลูกผสมแองกัส x พื้นเมืองไทย มีจำนวน 8, 11, 6, 4 และ 4 Haplotype ตามลำดับ ค่าความหลากหลายของ Haplotype เท่ากับ 1.5599 ค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ได้แก่ ค่าพันธุกรรมรวมและภายในแต่ละสายพันธุ์เท่ากับ 0.3997 และ 0.4351 ตามลำดับ ส่วนค่าสัมประสิทธิ์ของความแตกต่างพันธุกรรมมีค่าเท่ากับ -0.0885 แสดงว่าโคพื้นเมืองไทยมีความหลากหลายของ Haplotype ความหลากหลายทางพันธุกรรมสายแม่สูงมาก และมีพันธุกรรมสายแม่ไม่แตกต่างกัน ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมพบว่าโคพื้นเมืองไทยส่วนใหญ่มีพันธุกรรมสายแม่จัดอยู่ในกลุ่ม *Bos indicus* จากการศึกษาทางวิวัฒนาการพบว่า โคลานที่อยู่ใน Haplotype22 เป็นต้นกำเนิดส่วนใหญ่ของโคพื้นเมืองไทยรวมทั้งโค Red Chittagong, Tharparkar, Hariana และ Sahiwal ในประเทศบังคลาเทศ ปากีสถาน และอินเดียตามลำดับ

คำสำคัญ : โคพื้นเมืองไทย ความหลากหลายทางพันธุกรรม ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ สายแม่

บทนำ

ประเทศไทยเป็นภาคีอนุสัญญาว่าด้วยความหลากหลายทางชีวภาพ (Convention on Biological Diversity) ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2547 ประเทศที่เป็นภาคีจะต้องดำเนินการในมาตรา 7-10 คือ การจำแนกระบุและการติดตามตรวจสอบ การอนุรักษ์ในถิ่นที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ การอนุรักษ์นอกถิ่นที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติและการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน โคเป็นสัตว์เลี้ยงที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย โคพื้นเมืองไทยจัดแบ่งออกได้เป็น 4 ประเภท ตามรูปร่าง ลักษณะ และถิ่นที่อยู่อาศัย และการใช้ประโยชน์ โคพื้นเมืองของไทย ประกอบด้วย โคขาวลำพูน โคลาน โคชน และ โคอีสาน (กองบำรุงพันธุ์สัตว์, 2547) การใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนของโคขาวลำพูน คือนำมาใช้เป็นพระโคในพิธี จรดพระนังคัลแรกนาขวัญ โคลานใช้ในประเพณีวิ่งลานในเขตภาคกลาง โคชนใช้เป็นกีฬาพื้นเมืองอย่างหนึ่งทางภาคใต้ ส่วนโคอีสานยังไม่มีการใช้ประโยชน์ตามประเพณี แต่ใช้เป็นแม่พันธุ์พื้นฐานในการปรับปรุงพันธุ์โดยการผสมพันธุ์ด้วย พ่อพันธุ์จากต่างประเทศ เพื่อให้ได้ผลผลิตตามต้องการโดยอาศัยพันธุกรรมสายพ่อ แต่การถ่ายทอดพันธุกรรมสายแม่ใน โคเนื้อยังมีผู้ทำการศึกษาอยู่น้อยมาก มีแต่การศึกษาการถ่ายทอดพันธุกรรมสายแม่ในโคนมเท่านั้น มีการศึกษาการ ถ่ายทอดพันธุกรรมสายแม่ (Maternal lineages) ในโคนมโฮลสไตน์ในประเทศเยอรมัน พบว่ามีผลต่อเปอร์เซ็นต์ไขมัน ในน้ำนม (Schutz et al., 1992) ต่อมาได้มีการศึกษาการถ่ายทอดพันธุกรรมสายแม่ในโคนมโฮลสไตน์ในประเทศ สหรัฐอเมริกา พบว่ามีผลต่อเปอร์เซ็นต์ไขมันในน้ำนมเช่นเดียวกัน (Boettcher et al., 1996) ซึ่งเป็นเครื่องบ่งชี้ถึงการ ถ่ายทอดพันธุกรรมทางไซโตพลาสซึม (Cytoplasmic inheritance) นอกเหนือจากการถ่ายทอดทางพันธุกรรมทาง นิวเคลียสดีเอ็นเอ (Nuclear DNA) ไมโทคอนเดรียล ดีเอ็นเอ (Mitochondrial DNA) ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่ได้รับการ ถ่ายทอดมาจากแม่เท่านั้น (Cummins, 2002; Giles et al., 1980) ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้ส่งผลให้บุคคลที่มีสายเลือดแม่ หรือยายคนเดียวกันจะมีลักษณะพันธุกรรมไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเหมือนกันทุกคน กระบวนการการคัดเลือก ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอเกิดจากกระบวนการปฏิสนธิ ในขณะที่มีการปฏิสนธินั้นตัวสุจิจะแทรกเฉพาะส่วนหัวเข้าไปในไข่ ที่สุกและทำการปฏิสนธิ ซึ่งขั้นตอนนี้เองเป็นด่านแรกในการป้องกันไม่ให้ไมโทคอนเดรียของเพศผู้เข้าไปในไข่ได้ เพราะ ไมโทคอนเดรียของตัวสุจิจะสามารถพบได้ในส่วนคอของตัวสุจิเป็นส่วนใหญ่ แม้ว่าอาจมีบางส่วนของไมโทคอนเดรีย ของตัวสุจิเข้าไปในไข่ได้ ไม่ว่ากรณีใดก็ตามก็จะมีกระบวนการที่กำจัดทิ้งหรือทำให้ไม่สามารถทำงานได้ กระบวนการ กำจัดไมโทคอนเดรียของตัวสุจิที่ผลิตหลงเข้าไปในไข่นั้นจะมีกระบวนการกำจัดแต่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ มีส่วน D-loop เป็นส่วนควบคุมรหัสที่สำคัญในการแสดงออกของยีนต่างๆ ใน ไมโทคอนเดรียของเซลล์มีอัตราการเปลี่ยนแปลงนิวคลีโอไทด์สูงกว่าดีเอ็นเอที่อยู่ในนิวเคลียส 5 ถึง 10 เท่า (Brown et al., 1979) ดังนั้นการวิเคราะห์การเรียงลำดับดีเอ็นเอส่วน D-loop จะเป็นประโยชน์มากในการศึกษา จุดกำเนิด ประวัติการเคลื่อนย้าย และความหลากหลายทางพันธุกรรมสายแม่ของประชากรโคในปัจจุบันได้ (Loftus et al., 1994; Bradley et al., 1998; Troy et al., 2001) ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายพันธุกรรม สายแม่ด้วยไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอส่วน D-loop ในโคพื้นเมืองไทยและโคลูกผสมแองกัส x พื้นเมืองไทย จึงมี วัตถุประสงค์เพื่อจำแนก และศึกษาเส้นทางวิวัฒนาการพันธุกรรมสายแม่ จากผลการศึกษานี้จะให้ข้อมูลซึ่งจะมี ประโยชน์สำหรับการวางแผนการอนุรักษ์ และวางแผนการใช้ประโยชน์ของโคพื้นเมืองไทยในการศึกษาผลของ พันธุกรรมสายแม่ต่อผลผลิตในโคเนื้อต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บตัวอย่าง

ดำเนินการเก็บตัวอย่างเลือดโคพื้นเมืองไทยที่หน่วยราชการและเอกชนได้อนุรักษ์ไว้เพื่อการศึกษาและใช้ประโยชน์ ในระหว่างปีพ.ศ. 2558-2559 ดังนี้ โคขาวลำพูนจำนวนรวม 30 ตัว จากศูนย์ย้ายฝากตัวอ่อน สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์จำนวน 8 ตัว สถานีวิจัยและทดสอบพันธุ์สัตว์จังหวัดแพร่จำนวน 18 ตัว และเป็นพระโคที่ใช้ในพิธีจรดพระนังคัลแรกนาขวัญจำนวน 4 ตัว โคลานจำนวนรวม 35 ตัว จากกลุ่มผู้เลี้ยงและแข่งขันจังหวัดสมุทรสงครามและราชบุรี โคชนได้จำนวน 15 ตัว จากฟาร์มเพาะขยายพันธุ์ ล.สุวรรณรักษ์จังหวัดเพชรบูรณ์ โคอีสานจำนวน 18 ตัว จากสถานีวิจัยและทดสอบพันธุ์สัตว์อุบลราชธานี และโคลูกผสมแองกัส x พื้นเมืองจำนวน 7 ตัว จากสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ รวมทั้งสิ้น 105 ตัว

การเตรียมตัวอย่าง

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดโคจำนวน 105 ตัวอย่างด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIAprep. Spin Miniprep Kit (Qiagen®, USA) ตามคำแนะนำของบริษัท และรวบรวมเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C จนกว่านำไปทดสอบวิเคราะห์

การตรวจตัวอย่าง

ทำการเพิ่มขยายชิ้นส่วนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ D-loop โดยการออกแบบไพรเมอร์ (Oligo nucleotide) 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' ในส่วนผสมปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสจำนวน 50 µl ประกอบด้วย 100 ng ของตัวอย่างดีเอ็นเอ 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) ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้ถูกนำไปทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุดน้ำยา 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)

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลลำดับเบสจำนวน 285 เบส จากตัวอย่างทั้งหมด 105 ตัวอย่าง ไปเปรียบเทียบกับลำดับเบสกับลำดับเบสของ mtDNA D-loop ของโคสายพันธุ์ต่างๆ วิเคราะห์หาตำแหน่งความผันแปร จำแนก Haplotype ระยะห่างทางพันธุกรรม วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic trees) ความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide diversity) และสัมประสิทธิ์ความแตกต่าง (Coefficient of differentiation) ของสายพันธุ์ด้วยโปรแกรม MEGA version 6.0 (Tamura et al., 2013) คำนวณความหลากหลาย (Haplotype diversity) จากสูตร
$$H = \frac{N}{N-1} (1 - \sum_i x_i^2)$$
 (Nei and Tajima, 1981) ในการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมสายแม่และการศึกษาวิวัฒนาการของโคพื้นเมืองไทยกับโคสายพันธุ์อื่นๆ ด้วยโปรแกรม Network version 5 (Bandelt et al., 1999) ลำดับเบสของโคสายพันธุ์อื่น ได้จากข้อมูลใน GenBank ([https:// www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/](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) และโคสายพันธุ์แอฟริกา เช่น White Fulani, N'Dama, Kenana, Butana (GenBank accession : L27720, L27730, L27728, L27714)

Nucleotide position
1
5
8
5
5

TATTAAATTTATCAAAAATCCCAATAACTCAACACAGAATTTGCACCCCTAACCAAATATT
ACAAACACCACTAGCTAACATAACACGCCCATACACAGACCACAGAATGAATTACCTACG
CAAGGGGTAATGTACATAACATTAATGTAATAAGACATAATATGTATATAGTACATTAA
ATTATATGCCCATGTCATATAAGCAAGTACATGACCTCTATAGCAGTACATAATACATAT
AATTATTGACTGTACATAGTACATTATGTCAAATTCATTCTTGATAGTATATCTATTATA
TATTCCTTACCATTAGATCAGGAGCTTAATTACCATGCGCGTGAAACCAGCAACCCGCT
AGGCAG - GGATCCCTCTTCTCGCTCCGGGCCATAAACCGTGGGGGTGCGTATCCAATGA
ATTTTACCAGGCATCTGGTTCTTCTTCAGGGCCATCTCATCTAAACGGTCCATTCTTT
CCTCTTAATAAGACATCTCGATGGACTAATGGCTAATCAGCCCATGCTCACACATAACT

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 285 bp (bold italic letters) was performed sequence alignment

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การผันแปรของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอส่วน D-loop

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอส่วน D-loop ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส และแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอแต่ละตัวอย่างด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส หลังจากการย้อมสีด้วยเอธิเดียมโบรไมด์ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาด 467 คู่เบส (Figure 2)

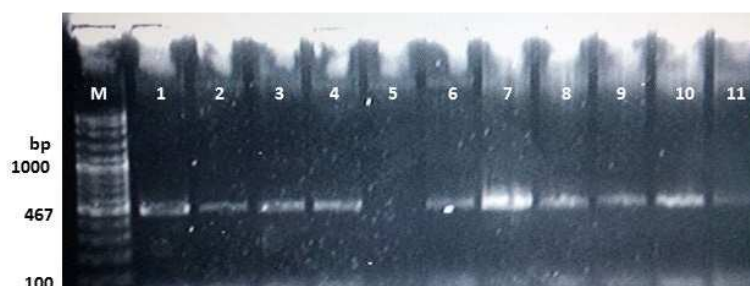
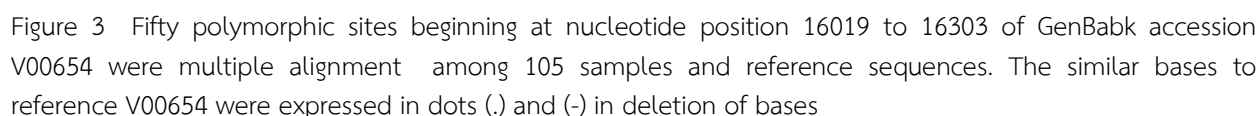


Figure 2 DNA fragment size of 467 bp obtained from PCR (M= 100 bp DNA ladder, 1-11 Samples)

เมื่อนำชิ้นส่วนตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์และนำไปหาการเรียงลำดับเบสได้ 467 คู่เบส เมื่อนำลำดับเบสที่มีความผันแปรสูงจำนวน 285 คู่เบส คือตั้งแต่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 16019 ถึง 16303 อ้างอิงตาม GenBank accession number V00654 มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของ D-loop ของโคสายพันธุ์ต่างๆ พบว่ามีตำแหน่งคู่เบสที่แตกต่างกันจำนวน 50 ตำแหน่ง บางตำแหน่งเป็น 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 (Figure 3)



Haplotype10 มีความถี่สูงสุด (0.5714) ซึ่งเป็นโค 60 ตัว ประกอบด้วยโคขาวลำพูน โคลาน โชนใต้ โคอีสาน และโคลูกผสมแองกัส x พื้นเมืองไทยจำนวน 20 ตัว (33.3%), 17 ตัว (28.3%), 5 ตัว (8.3%), 14 ตัว (23.3%) และ 4 ตัว (6.7%) ตัว ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าพันธุกรรมสายแม่ Haplotype10 เป็นพันธุกรรมสายแม่หลักของโคพื้นเมืองในประเทศไทย ส่วน Haplotype อื่นๆ มีจำนวนน้อยกว่าซึ่งเกิดจากการกลายพันธุ์กรรมในเวลาต่อมา

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

จำนวนและชนิด Haplotype พบว่าโคขาวลำพูน โคลาน โคนใต้ โคอีสานและโคโคลูกผสมแอ่งก๊ส x พื้นเมืองไทย มี 8, 11, 6, 4 และ 4 Haplotypes ตามลำดับ แสดงว่าในการศึกษาครั้งนี้โคลานมีจำนวน Haplotype มากที่สุด รองลงมาเป็นโคขาวลำพูน โคนใต้ และโคอีสาน (Table 2)

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

ค่าความหลากหลายของนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide diversity, ntd) ได้แก่ค่าพันธุกรรมรวมและภายในแต่ละสายพันธุ์ 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 อาจเป็นได้ว่าตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ของส่วน D-loop ที่ทำการศึกษา มีขนาดและอยู่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นโคพื้นเมืองไทยศึกษาจำนวน 285 นิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 16019-16303 ส่วนโคพันธุ์ Nellore จำนวน 277 นิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 15964-16240 ดังนั้น แสดงว่าโคพื้นเมืองไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสายแม่สูงมาก

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

ระยะห่างทางพันธุกรรม

ระยะห่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างเป็นคู่ด้วยโมเดลของพารามิเตอร์คิมูลา ในโคพื้นเมืองไทยและโคลูกผสมแอ่งก๊ส x พื้นเมืองไทย พบว่าในกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาโคขาวลำพูน โคลาน โคนใต้ โคอีสาน และโคลูกผสมแอ่งก๊ส x พื้นเมืองไทย มีระยะห่างทางพันธุกรรมภายในแต่ละสายพันธุ์เท่ากับ 0.0000-0.0442, 0.0000-

0.9699, 0.0000-0.0162, 0.0000-0.0162 และ 0.0000-0.9464 ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 3 จะเห็นได้ว่า โคขาวลำพูน โคชนใต้ โคอีสาน มีระยะห่างทางพันธุกรรมน้อยกว่า 0.5 แสดงว่าโคแต่ละสายพันธุ์มีพันธุกรรมสายแม่ใกล้เคียงกัน เช่นเดียวกับ Sari et al. (2016) ได้ศึกษาวิเคราะห์หิโมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอส่วน D-loop ในโคพื้นเมืองของอินโดนีเซียที่มีชื่อว่า Aceh cattle มีระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.0040–0.1500 และมีระยะห่างทางพันธุกรรมกับโคอินเดียเท่ากับ 0.0193

ส่วนโคลาน และโคลูกผสมแองกัส x พื้นเมืองไทยบางตัวที่มีระยะห่างทางพันธุกรรมสูง เนื่องจากมีโคลาน 4 ตัวได้แก่หมายเลข COLAN406, COLAN407 และ COLAN-TB1533 โคลูกผสมแองกัส x พื้นเมืองไทย หมายเลข TB1660 จัดอยู่ในกลุ่ม (Clade) โค *Bos Taurus* ซึ่งอยู่คนละกลุ่มกับโคพื้นเมืองไทยส่วนใหญ่ของ โคขาวลำพูน โคลาน โคชนใต้ และโคอีสาน

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

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic analysis) ดังแสดงใน Figure 4 โดยวิธี Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Average (UPGMA) ใน Figure 4A และ Maximum likelihood ใน Figure 4B จากข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้และจากฐานข้อมูลใน GenBank พบว่าโคมี 2 สายแม่ (Clades) คือ *Bos indicus* (Z) และ *Bos taurus* (T) โคสาย *B. indicus* จำแนกได้เป็น 2 clusters (Z1 และ Z2) จากการศึกษานี้ครั้งนี้ จำแนกเป็น 2 clusters คือ Cluster Z1 ประกอบด้วย 4 Haplotype ได้แก่โคพื้นเมืองไทย 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 Haplotype23 และ 24 จัดอยู่ในกลุ่ม *Bos taurus* (Clade T) Haplotype23 เป็นโคลาน หมายเลข COLAN-TB1533 และโคลูกผสมแองกัส x พื้นเมืองไทย หมายเลข TB1660 ส่วน Haplotype24 เป็นโคลาน 3 ตัวได้แก่หมายเลข COLAN406-408

ส่วนโคขาวลำพูนที่เป็นพระโคจำนวน 4 ตัว จัดอยู่ใน Haplotype10 จำนวน 3 ตัว และอยู่ใน Haplotype 15 จำนวน 1 ตัว

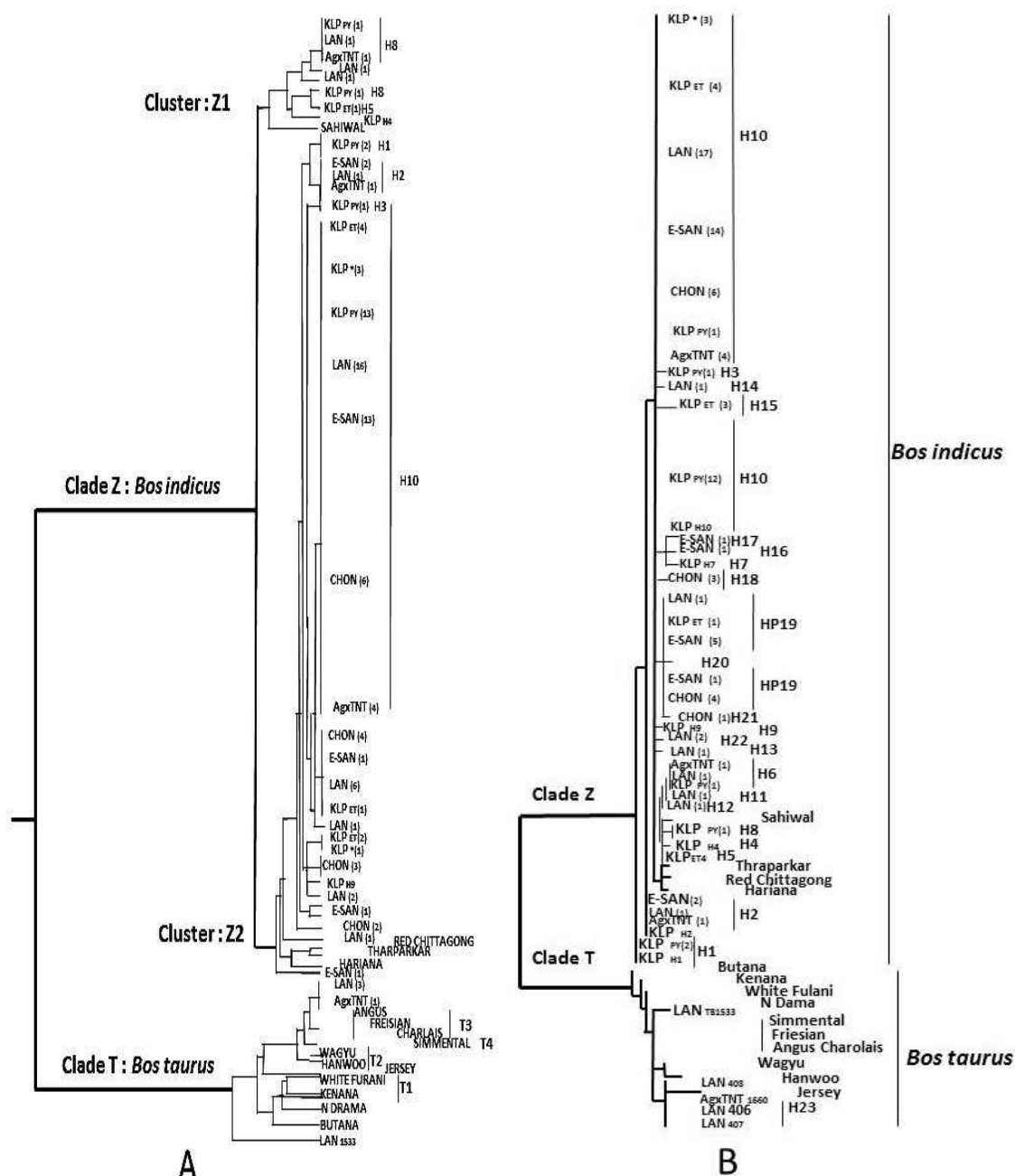


Figure 4 UPGMA tree [A] and Maximum likelihood tree [B] based on 285 bp of mtDNA D-loop from 105 samples

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Phylogenetic analysis) โดยวิธี Median joining network พบว่าโคมี 2 สายแม่ (Clades) คือ *Bos indicus* และ *Bos taurus* โคสาย *Bos indicus* และแสดงจำนวน ตำแหน่งลำดับเบสของ D-loop (CH) ที่มีการกลายพันธุ์กรรม จะเห็นได้ว่าระหว่างโคกลุ่ม *Bos indicus* และ *Bos taurus* มีวิวัฒนาการโดยมีการกลายพันธุ์กรรมจำนวน 20 ตำแหน่ง ดังแสดงใน Figure 5A ส่วน วิวัฒนาการโดยการกลายพันธุ์กรรมที่ตำแหน่งต่างๆของ D-loop ในกลุ่มโค *Bos indicus* (Figure 5B)

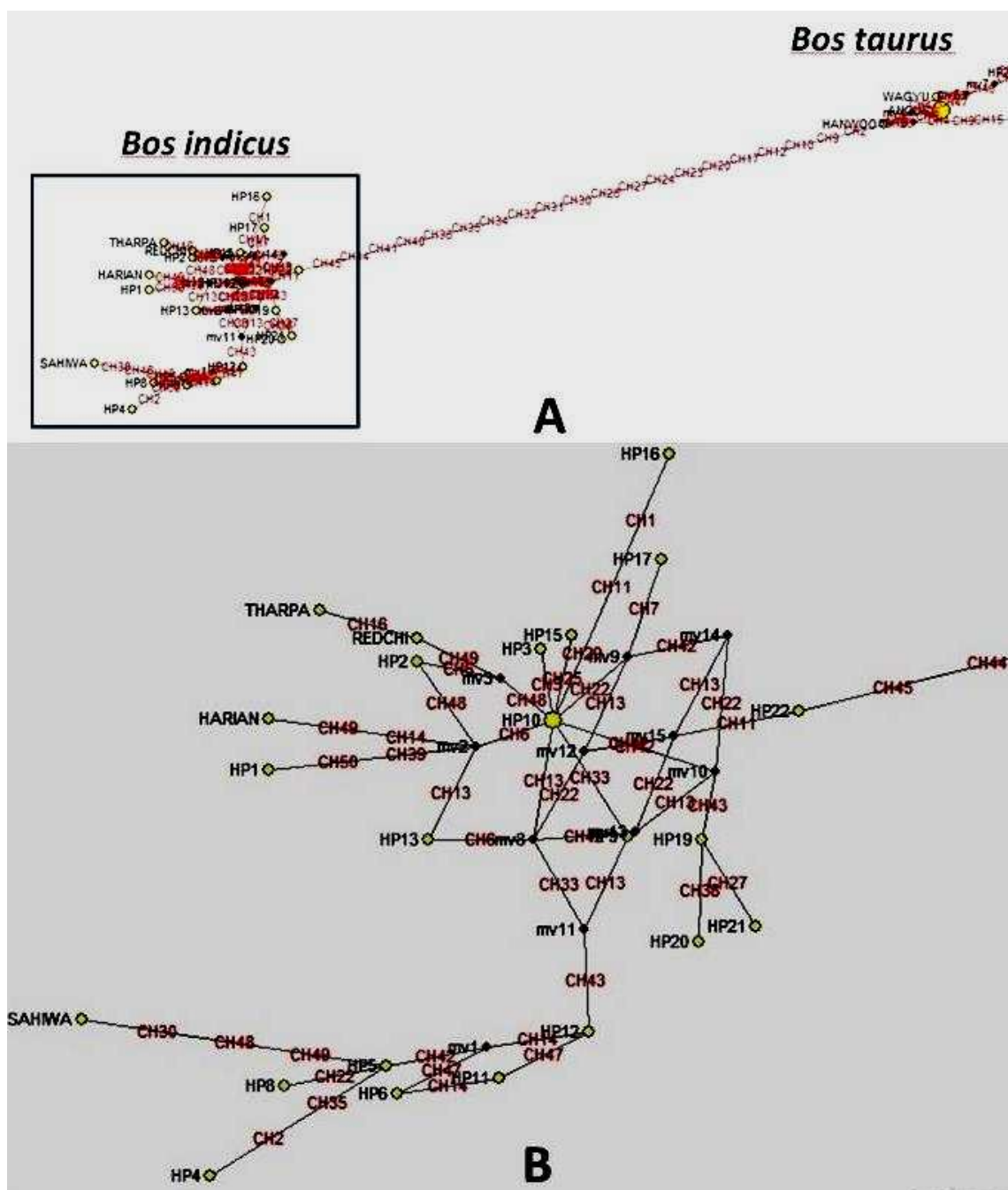


Figure 5 Median joining network of 24 haplotypes from 105 samples and reference sequences showing *Bos indicus* and *Bos taurus* clade (A) and mutation positions (CH) of D-loop sequences (285 bp)

Haplotype22 เป็นโคลาน 2 ตัว หมายเลข COLAN-TB1528, COLAN-TB1518 ซึ่งถูกสืบ กับมดแดง จากจังหวัดราชบุรีเป็นต้นกำเนิดของโคพื้นเมืองไทย Haplotype10 ดังจะเห็นได้จากเส้นทางวิวัฒนาการโดยมีการกลายพันธุ์กรรมจำนวน 4 ตำแหน่ง จากจุดกำเนิด (Ancestral node) คือ Haplotype22 (Figure 6 A)

โค Red Chittagong ประเทศบังคลาเทศ และโค Tharparkar ประเทศปากีสถาน มีเส้นทางวิวัฒนาการมาจากโคลาน Haplotype22 ผ่านโคพื้นเมืองไทย Haplotype10 (Figure 6B)

โค Haryana ประเทศอินเดีย มีเส้นทางวิวัฒนาการมาจากโคลาน Haplotype22 เช่นกัน ผ่านโคพื้นเมืองไทย Haplotype13 (Figure 6C)

โค Sahiwal ประเทศอินเดีย มีเส้นทางวิวัฒนาการมาจากโคลาน Haplotype22 เช่นกัน ผ่านโคพื้นเมืองไทย Haplotype12 และ 5 (Figure 6D)

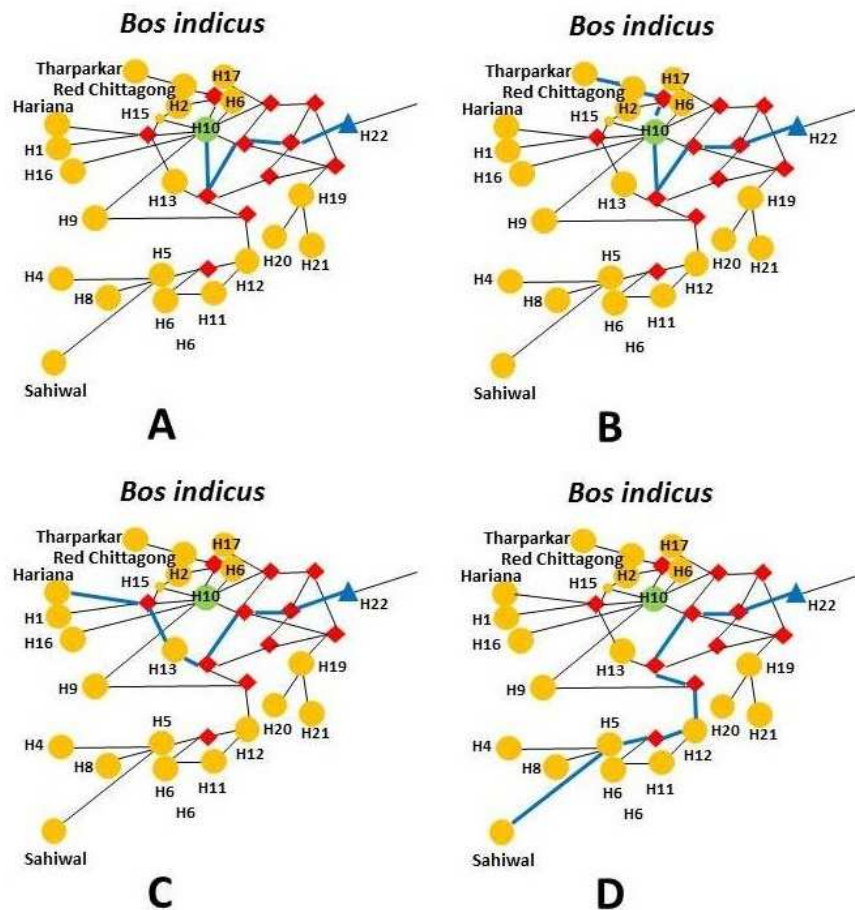


Figure 6 Evolution route (Bold line) from ancestral node (Δ) to descendent node ($\bigcirc$) [A] Haplotype22 to Haplotype10, [B] Haplotype22 to Tharparkar, [C] Haplotype22 to Haryana, [D] Haplotype22 to Sahiwal

สรุป

โคพื้นเมืองไทย (โคขาวลำพูน โคลาน โคนไต้ โคอีสาน) ส่วนใหญ่ จัดอยู่ในกลุ่มโค *Bos indicus* โดยพบที่มีความหลากหลายของ Haplotype สูง แต่มีค่าสัมประสิทธิ์ความแตกต่างพันธุกรรมของประชากรต่ำแสดงให้เห็นว่าโคทั้ง 4 สายพันธุ์มีวิวัฒนาการมาจากแหล่งกำเนิดเดียวกัน คือ โคลาน Haplotype22 ซึ่งเป็นต้นกำเนิดของโคขาวลำพูน โคอีสาน โคนไต้ โคอีสาน ซึ่งมีการกระจายตัวไปตามถิ่นที่อยู่อาศัยต่างๆ และมีลักษณะภายนอกที่เปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นการอนุรักษ์สัตว์ประจำถิ่นเหล่านี้จึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อคงความหลากหลายของโคพื้นเมืองไทยและสามารถใช้ประโยชน์สำหรับการวางแผนการอนุรักษ์ และวางแผนการใช้ประโยชน์ของโคพื้นเมืองไทยในการศึกษาผลของพันธุกรรมสายแม่ต่อผลผลิตในโคเนื้อต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณกลุ่มผู้เลี้ยงโคลานจังหวัดสมุทรสงคราม ยุทธพาร์มโคลานจังหวัดราชบุรี และฟาร์มโคนไต้ ส.สุวรรณภักดี จังหวัดเพชรบูรณ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างเลือดโคที่ใช้ศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- กองบำรุงพันธุ์สัตว์. 2547. มาตรฐานของลักษณะประจำพันธุ์โคเนื้อ, ปศุสัตว์เกษตร. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 35: 44-49.
- Bandelt, H.J., Forster, P. and Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37-48.
- Bhuiyan, M.S.A., Bhuiyan, A.K.F., Yoon, D.H., Jeon, J.T., Park, C.S. and Lee, L.H. 2007. Mitochondrial DNA diversity and origin of Red Chittagong cattle. *Asean-Aus. J. Anim. Sci.* 20: 1478-1484.
- Boettcher, P.J., Steverink, D.W., Beitz, D.C., Freeman, A.E. and McDaniel, B.T. 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., Loftus, R.T., Cunningham, E.P. and MacHugh, D.E. 1998. Genetics and domestic cattle origins. *Evol. Anthropol.* 6: 79-86.
- Brown, W.M., George, M. and Wilson, A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76: 1967-1971.
- Corte's, O., Tupac-Yupanqui, I., Dunner, S., Garci'a-Atance, M.A., Garci'a, D., Ferna'ndez, J. and Can'on, J. 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.* 4: 176-182.
- Giles, R.E., Blanc, H. and Cann, H.M. 1980. Maternal inheritance of human mitochondrial DNA. *Proc. Nati. Acad. Sci. U.S.A.* 77: 6715-6719.

- Henkes, L.E., Siva, W.A., Moraes, J.C.F. and Weimer, T.A. 2005. Mitochondrial control region genetic diversity and maternal ancestry of a Brangus Ibage cattle population. *Genet. and Mol. Biol.* 28: 60-66.
- Jia, S., Chen, H., Zhang, G., Wang, Z., Lei, C., Yao, R. and Han, H. 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., Liu, Y.P., Liu, Y.X., Li, X.W. and Yao, Y.G. 2006. Genetic diversity and origin of Chinese cattle revealed by mtDNA D-loop sequence variation. *Mol. Phyl. Evol.* 38: 146-154.
- Loftus R.T., MacHugh, D.E., Bradley, D.G., Sharp, P.M. and Cunningham, P. 1994. Evidence for two independent domestications of cattle. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 2757-2761.
- Nei, M. and Tajima, F. 1981. DNA polymorphism detectable by restriction endonucleases. *Genet.* 97: 145.
- Sari, E.M., Jianlin, H., Noor, R.R., Sumantri, C. and Margawati, E.T. 2016. Phylogenetic analysis of Aceh cattle breed of Indonesia through mitochondrial D-loop region. *J. Genet. Eng. Biotech.* (In press)
- Schutz, M.M., Freeman, A.E., Beitz, D.C. and Mayfield, J.C. 1992. The importance of maternal lineage on milk yield traits of dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 75: 1331-1341.
- Tamura, K., Stecher, D.G., Peterson, A.D., Fillipski, A. and Kumar, S. 2013. Molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
- Troy, C.S., MacHugh, D.E., Bailey, J.F., Magee, D.A., Cunningham, P., Chamberlain, A.T., Sykes, B.C. and Bradley, D.G. 2001. Genetic evidence for Near-Eastern origins of European cattle. *Nature.* 410: 1088-1091.

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

Nachai Sarataphan^{1*} Saijai Cheunsuk¹ Malee Apimeteetumrong¹
Viboon Yiengvisavakul¹ Sorn Teepatimakorn² Sukanya Yungrahang³

¹ Bureau of Biotechnology in Livestock Production, 91 Tiwanon road, Banga Dee, Muang, Pathumthani 12000

² Inthanon King Project Frozen Bull Semen Production Center, 195 Moo 1, Muang, Chiangmai 50300

³ Department of Animal Science, Faculty of Agriculture at Kampaeng Saen, Kasetsart University,
Kampaeng Saen Campus, Nakhon Pathom 73140

* Corresponding author : Tel : 0632152243, Fax : 029679719 E-mail : nachaisarataphan@gmail.com

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 (285 bp) was aligned with different cattle breeds. The result revealed that 50 single 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 Bangladesh, Pakistan and India, respectively.

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