



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การศึกษความหลากหลายและการจำแนกกลุ่ม
พันธุ์กรรมของโคพื้นเมืองไทยจากข้อมูลไมโครแซทเทลไลต์
และไมโตคอนเดรีย”

โดย

รศ.ดร.มนต์ชัย ดวงจินดา

ผศ.ดร.ยุพิน ฝาสุข

มิถุนายน 2551

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การศึกษาความหลากหลายและการจำแนกกลุ่ม
พันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยจากข้อมูลไมโครแซทเทลไลต์
และไม่โตคอนเดรีย”

รศ.ดร.มนต์ชัย ดวงจินดา

ผศ.ดร.ยุพิน ผาสุข

ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทสรุปผู้บริหาร

โครงการศึกษาความหลากหลายและการจำแนกกลุ่มพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์ความหลากหลายในระดับพันธุกรรมด้วยข้อมูลทางอณูพันธุศาสตร์ (molecular data) ซึ่งพบว่าข้อมูลความหลากหลายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำๆ ที่เรียกว่าไมโครแซทเทลไลต์ เป็นข้อมูลที่นิยมใช้ในทางสัตวมากที่สุด นอกจากนี้ข้อมูลความหลากหลายของลำดับเบสของดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียที่บริเวณ D-loop เป็นข้อมูลอีกแบบหนึ่งที่นิยมใช้ในการศึกษาความหลากหลายและการวิวัฒนาการระดับโมเลกุล การวิจัยครั้งนี้ใช้โคพื้นเมืองจาก 4 สายพันธุ์หลัก ได้แก่ สายภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (อีสาน) ภาคกลาง และภาคใต้ ภายใต้โครงการการศึกษาลดผลผลิตและระบบการผลิตโคพื้นเมืองของเกษตรกรโดยการสนับสนุนจากกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) โดยใช้โคประมาณ 20-30 ตัวต่อสายพันธุ์ รวมโคที่ใช้ในการศึกษานี้ 108 ตัว ทำการสุ่มเก็บชิ้นเนื้อโคประมาณ 200 กรัมต่อตัว เพื่อทำการวิเคราะห์ดีเอ็นเอและตรวจสอบจีโนไทป์ด้วยเทคนิค microsatellite และวิเคราะห์ลำดับเบสของไมโทคอนเดรียที่บริเวณ D-loop ของโคแต่ละตัว

การวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 20 ตำแหน่ง (ตามคำแนะนำของ ISAG/FAO) รวม 193 อัลลีล และการวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรม (genetic structure) ของประชากรโคพื้นเมืองจากกลุ่มตัวอย่างที่ได้จากแต่ละภาคด้วยการทดสอบ Wright's F-statistics ร่วมกับการวิเคราะห์ cluster analysis และการสร้าง phylogenetic tree พบว่าขนาด (fragment size) และจำนวนอัลลีลของไมโครแซทเทลไลต์ที่พบในการศึกษานี้มีความหลากหลายกว่าที่เคยมีรายงานไว้ในโคพันธุ์ต่างประเทศอื่นๆ ในทุกตำแหน่ง โดยพบอัลลีลใหม่ที่แตกต่างจากโคพันธุ์ต่างประเทศหลายอัลลีล ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโคพื้นเมืองไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง เมื่อพิจารณาจากค่า heterozygosity index ซึ่งแสดงถึงสภาพเฮเทอโรไซกัสของยีนแต่ละตำแหน่ง พบว่าพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยในแต่ละภาคมีความหลากหลายของยีนแต่ละตำแหน่งแตกต่างกัน โดยโคพื้นเมืองในบางพื้นที่มีค่า heterozygosity ของบางตำแหน่งสูงมากในขณะที่บางสายพันธุ์พบว่าเป็น homozygosity ทั้งหมด เป็นต้น

การวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมด้วยแผนภาพ phylogenetic tree จากค่าระยะห่างทางพันธุกรรม (Nei's genetic distance) ในระดับสายพันธุ์พบว่า โคพื้นเมืองภาคใต้มีพันธุกรรมแตกต่างจากโคพื้นเมืองกลุ่มอื่นๆ มากที่สุด โดยมีระยะห่างทางพันธุกรรมมากกว่า 63% โคภาคเหนือนั้นสามารถจำแนกออกจากโคกลุ่มอื่นๆ ได้เช่นกัน ขณะที่โคภาคกลางและโคภาคอีสานมีพันธุกรรมใกล้ชิดกันและยังไม่สามารถจำแนกพันธุกรรมออกจากกันได้อย่างชัดเจน ซึ่งการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนหนึ่งของบริเวณ D-loop ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอจำนวน 73 ตัวพบว่าโคพื้นเมืองไทยกลุ่มภาคใต้และภาคนี้นั้นมีพันธุกรรมที่สามารถจำแนกออกจากโคกลุ่มอื่นๆ ในขณะที่กลุ่มโคภาคอีสานและภาคกลางนั้นยังไม่สามารถจำแนกพันธุกรรมออกจากกันได้อย่างชัดเจนเช่นกัน ซึ่งสอดคล้องกับพันธุกรรมในส่วน of ไมโครแซทเทลไลต์ อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ต่อเนื่องด้วยเทคนิคทาง clustering พบว่าจำนวนกลุ่มโคพื้นเมืองไทยมีพันธุกรรมที่แตกต่างกันเพียงพอในการจำแนกออกเป็นกลุ่มได้โดยจำนวนกลุ่มที่เหมาะสมควรเป็น 4 กลุ่ม

เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรม (genetic structure) ระหว่างโคพื้นเมือง 4 กลุ่ม พบว่าพันธุกรรมรายตัวของโคพื้นเมืองไทยภายในแต่ละกลุ่มมีความคล้ายคลึงกันค่อนข้างสูง โดยมีความแตกต่างระหว่างกลุ่มพันธุ์ไม่สูงนัก โดยมีค่าความผันแปรของพันธุกรรมโคพื้นเมืองอันเป็นผลเนื่องจากความแตกต่างระหว่างกลุ่มพันธุ์เท่ากับ 4.8% อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ค่า gene diversity พบว่าประชากรโคพื้นเมืองไทยมีความหลากหลายของพันธุกรรมระหว่างโคแต่ละตัวสูงภายในแต่ละกลุ่มพันธุ์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโคพื้นเมืองไทยเป็นสัตว์ประจำถิ่นที่มีความ

หลากหลายทางพันธุกรรมที่ควรแก่การอนุรักษ์และการศึกษาอย่างจริงจังต่อไป นอกจากนี้การศึกษครั้งนี้พบอัลลีลที่สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอเบ่งชี้โคพื้นเมืองในแต่ละกลุ่มได้โดยมีความน่าจะเป็นในการทำนายถูกต้องแตกต่างกัน โดยพบว่า microsatellite จำนวน 5 ตำแหน่งที่มีความเกี่ยวข้องกับการจำแนกโคพื้นเมือง และใช้ในการทำนายโคกลุ่มภาคเหนือและภาคกลางได้แม่นยำมากกว่า 70% โดยพบว่าอัลลีล HEL1.A1, BOLADRB2.A5, BOLADRB2.A1 และ ETH255.A8 มีความจำเพาะต่อการเป็นโคพื้นเมืองสายภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคอีสาน และภาคใต้ตามลำดับ

ผลงานวิจัยจากการศึกษานี้เป็นประโยชน์ทั้งในกลุ่มนักวิจัยด้านการอนุรักษ์และด้านการใช้ประโยชน์ของโคพื้นเมือง การวิเคราะห์ความหลากหลายและการจำแนกกลุ่มทางพันธุกรรมจากข้อมูล microsatellite และ mtDNA ในโคพื้นเมืองครั้งนี้ช่วยให้การวางแผนการปรับปรุงพันธุ์มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น และมีความมั่นใจว่าโคพื้นเมืองควรจำแนกออกเป็น 4 กลุ่มโดยอิงหลักการทางวิชาการ ผลของค่า heterozygosity และการวิเคราะห์ genetic structure ครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าประชากรโคพื้นเมืองไทยจัดอยู่ในกลุ่มสิ่งมีชีวิตที่ง่ายต่อการเกิดการสูญหายของยีน (genetic drift) และการตรวจหาดีเอ็นเอเครื่องหมายเพื่อบ่งชี้ความจำเพาะของกลุ่มของโคพื้นเมืองในครั้งนี้ช่วยให้เป็นแนวทางเริ่มต้นในการจดสิทธิบัตร หรือการขึ้นทะเบียนพันธุ์และคุ้มครองความหลากหลายของโคพื้นเมืองไทยในอนาคต

**การศึกษาความหลากหลายและการจำแนกกลุ่มพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยจากข้อมูล
ไมโครแซทเทลไลต์และไมโทคอนเดรีย**
Study of Genetic Diversity and Genetic Classification of Thai Native Beef Cattle
Using Microsatellite and Mitochondrial Data

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจำแนกกลุ่มพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยด้วยการวิเคราะห์ความหลากหลายของขนาดไมโครแซทเทลไลต์และความหลากหลายของลำดับเบสของดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียที่บริเวณ D-loop การวิจัยครั้งนี้ใช้โคพื้นเมืองจาก 4 สายพันธุ์หลัก ได้แก่ โคขาวลำพูน โคอีสาน โคลาน และโคชน จากภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ ภายใต้โครงการการศึกษาผลผลิตและระบบการผลิตโคพื้นเมืองของเกษตรกรโดยการสนับสนุนจากกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ทำการสุ่มโคประมาณ 20-30 ตัวต่อสายพันธุ์จากแต่ละพื้นที่ รวมโคที่ใช้ในการศึกษานี้ 108 ตัว การวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 20 ตำแหน่ง รวม 193 อัลลีล พบว่าขนาด (fragment size) และจำนวนอัลลีลของไมโครแซทเทลไลต์ที่พบในการศึกษานี้มีความหลากหลายกว่าที่เคยมีรายงานไว้ในโคพันธุ์ต่างประเทศอื่นๆ ในทุกตำแหน่ง โดยพบอัลลีลใหม่ที่แตกต่างจากโคพันธุ์ต่างประเทศหลายอัลลีล ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโคพื้นเมืองไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง เมื่อพิจารณาจากค่า heterozygosity พบว่าพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยในแต่ละภาคมีความหลากหลายของยีนแต่ละตำแหน่งแตกต่างกัน การวิเคราะห์การจัดกลุ่มโคพื้นเมืองจากระยะห่างทางพันธุกรรม (Nei's genetic distance) ด้วย phylogenetic tree พบว่า โคพื้นเมืองภาคใต้มีพันธุกรรมแตกต่างจากโคพื้นเมืองกลุ่มอื่นๆ มากที่สุด โดยมีระยะห่างทางพันธุกรรมมากกว่า 63% โคภาคเหนือนั้นสามารถจำแนกออกจากโคกลุ่มอื่นๆ ได้เช่นกัน ขณะที่โคภาคกลางและโคภาคอีสานมีพันธุกรรมใกล้ชิดกันและยังไม่สามารถจำแนกพันธุกรรมออกจากกันได้อย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับพันธุกรรมของบริเวณ D-loop ของไมโทคอนเดรีย ซึ่งพบว่าโคพื้นเมืองไทยกลุ่มภาคใต้และภาคเหนือมีพันธุกรรมที่สามารถจำแนกออกจากโคกลุ่มอื่นๆ ในขณะที่กลุ่มโคภาคอีสานและภาคกลางนั้นยังไม่สามารถจำแนกพันธุกรรมออกจากกันได้อย่างชัดเจนเช่นกัน อย่างไรก็ตามผลการวิเคราะห์พันธุกรรมรายตัวด้วยการวิเคราะห์ CCC-plot (Cubic Criterion Clustering – Plot) พบว่าจำนวนกลุ่มโคพื้นเมืองไทยมีพันธุกรรมที่แตกต่างกันเพียงพอในการจำแนกออกเป็นกลุ่ม โดยจำนวนกลุ่มที่เหมาะสมควรเป็น 4 กลุ่ม การวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรมพบว่าโคพื้นเมืองในแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างทางพันธุกรรมไม่มากนัก ($F_{ST} = 0.043$) แต่มีความหลากหลายของพันธุกรรมของโครายตัวภายในแต่ละพันธุ์ค่อนข้างสูง การศึกษานี้พบอัลลีลที่สามารถใช้เป็นดีเอ็นเอบ่งชี้โคพื้นเมืองในแต่ละกลุ่มได้โดยมีความน่าจะเป็นในการทำนายถูกต้องแตกต่างกัน โดยพบว่ามี microsatellite จำนวน 5 ตำแหน่งที่มีความเกี่ยวข้องกับการจำแนกโคพื้นเมือง และใช้ในการทำนายโคกลุ่มภาคเหนือและภาคกลางได้แม่นยำมากกว่า 70%

ABSTRACT

This research aimed to study the genetic diversity and genetic classification of Thai Native cattle using fragment polymorphisms of microsatellites and nucleotide polymorphisms at D-loop of mitochondria. Four varieties of native cattle: North, Northeast (Esarn), Central, and South from the North, Northeast, Central, and South of Thailand under TRF production system project were used in the study. Twenty to thirty cattle per area was sampled. A total of 108 cattle were used. The analysis of 193 alleles from 20 loci of microsatellites found that the fragment size and number of alleles in Thai native cattle were higher than previous reports in exotic breeds in all loci. Several new alleles were found. This result showed that Thai native cattle have flourishing of genetic diversity. The analysis of heterozygosity revealed that each variety of Thai native cattle has different allelic polymorphisms. The phylogenetic analysis from Nei's genetic distance showed that Southern native cattle group was different from other groups with genetic distance between groups over 63%. The Northern native cattle could also be classified into different group. The cattle from Esarn and Central were difficult to show the differentiation. The nucleotide analysis at D-loop of mitochondria showed that Southern and Northern native cattle could be notably classified from other groups while Esarn and Central native cattle were difficult to differentiate, which was agreeable with the microsatellite analysis. However, the CCC plot revealed that Thai native cattle should be genetically divided into four groups. The analysis of genetic structure showed the lightly of genetic difference between four groups ($F_{ST} = 0.043$), however, the genetic diversity in individual level was found very high. This study also found the specific alleles for using as marker to indicate the genetic group of Thai native cattle with the various percent of correctness. It was found that five loci of microsatellite were found associate the genetic group. The markers from this study could be used to classify Thai native cattle from the North and Central with concordance greater than 70%.

สารบัญ

บทที่		หน้า
	บทสรุปผู้บริหาร	2
	บทคัดย่อ	4
	Abstract	5
	สารบัญ	6
	สารบัญตาราง	7
	สารบัญภาพ	8
1	บทนำ	9
2	การตรวจเอกสาร	11
3	วิธีการดำเนินการวิจัย	13
4	ผลการวิจัยและวิจารณ์	19
5	สรุปและข้อเสนอแนะ	30
	เอกสารอ้างอิง	32
	ภาคผนวก ก : สรุปการทำงานและกิจกรรมตลอดโครงการ	
	ภาคผนวก ข : ภาพประกอบการดำเนินงาน	
	ภาคผนวก ค: ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์และกิจกรรมที่วางแผนไว้	

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ลำดับเบสและ annealing temperature (T_m) ของ microsatellite ที่ใช้ในการศึกษา	15
2	ความหลากหลายของขนาดและจำนวนอัลลีลของ microsatellite ในโคพื้นเมืองไทย	19
3	ขนาดอัลลีล (เลขตัวหนา) และความถี่อัลลีลของ microsatellite แต่ละตำแหน่งจำนวน 20 ตำแหน่งของโคพื้นเมือง	20
4	การวิเคราะห์ค่า heterozygosity จากข้อมูล microsatellite ในโคพื้นเมืองไทย	23
5	การวิเคราะห์ค่า F_{IS} , F_{ST} , F_{IT} , ค่า gene diversity ภายในโคพื้นเมือง ($1-Q_{INTRA}$) และค่า gene diversity ระหว่างกลุ่มพันธุ์ ($1-Q_{INTER}$) จากข้อมูล microsatellite ในโคพื้นเมืองไทย	28
6	การวิเคราะห์ microsatellite marker เพื่อบ่งชี้โคพื้นเมืองสายพันธุ์ต่างๆ ด้วย logistic regression	29

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	การวิเคราะห์ phylogenetic tree จากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยในระดับสายพันธุ์	24
2	การวิเคราะห์ phylogenetic tree จากค่าความเหมือนทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยในระดับรายตัว	25
3	กราฟความสัมพันธ์ของค่า cubic clustering criterion (CCC) กับจำนวนกลุ่มจำแนกที่คาดคะเน	26
4	การวิเคราะห์ phylogenetic tree จากค่าความเหมือนทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยในระดับรายตัวด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D-loop	27

1. บทนำ

โคพื้นเมืองไทยจัดอยู่ในตระกูล *Bos indicus* หรือกลุ่มโคอินเดีย เป็นโคขนาดเล็ก มีความสำคัญในด้านการพัฒนาพันธุ์โคของประเทศไทย ทั้งนี้เนื่องจากโคพื้นเมืองมีความดีเด่นทางด้านความสมบูรณ์พันธุ์ การทนความเครียดเนื่องจากความร้อน และการต้านทานต่อโรคและแมลงเขตร้อน ทำให้นักปรับปรุงพันธุ์ใช้เป็นพันธุ์พื้นฐานในการสร้างลูกผสม เช่น การสร้างโคเนื้อสายพันธุ์กำแพงแสน โคตาก โคนมลูกผสมโฮลส์ไธน์ สาย TMZ ฯลฯ นอกจากนี้โคพื้นเมืองยังมีความสำคัญกับระบบวิถีปศุสัตว์ในระบบการเกษตรแบบยั่งยืน ทั้งนี้เนื่องจาก โคพื้นเมืองนิยมเลี้ยงเป็นฝูงในระบบปล่อยแปลงให้หากินเองตามธรรมชาติ เนื่องจากหากินเก่งและมีการเติบโตชดเชย (compensatory growth) ที่ดี ทำให้โคพื้นเมืองยังมีการเลี้ยงในกลุ่มเกษตรกรทั่วไปในทุกภาคของประเทศ

เนื่องด้วยโคพื้นเมืองที่มีการเลี้ยงตามพื้นที่ต่างๆของประเทศไทยนั้น มีลักษณะแตกต่างกันจากรูปร่างลักษณะภายนอก ซึ่งทางกรมปศุสัตว์ได้แบ่งคร่าวๆ ได้เป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ โคลาน (ภาคกลาง) โคอีสาน (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) โคชาวลำพูน (ภาคเหนือ) และโคชน (ภาคใต้) และจากการจำแนกกลุ่มด้วยลักษณะทางปริมาณอื่นๆ โดย กิตติ (2545) ช่วยแสดงว่าโคพื้นเมืองน่าจะจำแนกได้เป็น 4 กลุ่มดังกล่าว นอกจากนี้จากรายงานดังกล่าว ยังทำให้ทราบว่าโคทั้ง 4 กลุ่มมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามการศึกษาความหลากหลายและการจำแนกกลุ่มของโคพื้นเมืองในประเทศไทยยังมีจำกัด โดยพบรายงานจากกรมปศุสัตว์โดย กัลยา และคณะ (2548) โดยใช้ตัวอย่างโคที่เลี้ยงในสถานียทดสอบโดยศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค microsatellite และพบว่าพันธุกรรมของโคทั้ง 4 กลุ่มมีแนวโน้มที่แตกต่างกัน เพื่อให้การจำแนกกลุ่มพันธุ์มีความชัดเจนยิ่งขึ้น การศึกษารั้วนี้จึงต้องการศึกษาโดยใช้กลุ่มตัวอย่างที่อยู่กับเกษตรกรในมาจากพื้นที่จริงโดยไม่ผ่านระบบการคัดเลือก และเลือกใช้เทคนิค microsatellite โดยเลือกตำแหน่งที่มีการเสนอแนะ (recommend) ไว้โดย ISAG/FAO เพื่อศึกษาทางด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคโดยเฉพาะ ร่วมกับการศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียบริเวณ D-loop ซึ่งพบว่ามีศึกษากันมากในกลุ่มสัตว์พื้นเมืองในหลายประเทศ ซึ่งข้อมูลทางพันธุกรรมที่ได้จะช่วยให้การประเมินความหลากหลายและการศึกษาการจำแนกกลุ่มพันธุ์มีความถูกต้องยิ่งขึ้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาพันธุ์และการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ประชากรอื่นๆ รวมถึงการจดทะเบียนพันธุ์โคพื้นเมืองต่อไปได้ในอนาคต

2. วัตถุประสงค์

1. วิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและจำแนกกลุ่มโคพื้นเมืองแต่ละสายพันธุ์ โดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมภายในนิวเคลียส ได้แก่ ไมโครแซทเทลไลต์ และพันธุกรรมนอกนิวเคลียส ได้แก่ ดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ของไมโทคอนเดรีย
2. ค้นหาดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) เพื่อบ่งชี้ความเป็นโคพื้นเมืองไทยในแต่ละสายพันธุ์

3. สมมุติฐานงานวิจัย

โคพื้นเมืองไทยจากภาคต่างๆ (เหนือ กลาง อีสาน ใต้) มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน และสามารถจำแนกออกเป็นกลุ่มต่างๆ ได้ โดยพบดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) ที่ชี้เฉพาะต่อความเป็นโคพื้นเมืองสายต่างๆ

4. ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. การวิเคราะห์หลากหลายและการจำแนกกลุ่มทางพันธุกรรมในโคพื้นเมืองช่วยให้การวางแผนการปรับปรุงพันธุ์โคเนื้อในอนาคตมีประสิทธิภาพ
2. ข้อมูลทางด้านพันธุกรรมของโคพื้นเมืองแต่ละกลุ่มสายพันธุ์ช่วยในการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ประชากรอื่นๆ เช่น การประมาณ genetic drift, gene flow และทาง molecular evolution เป็นต้น
3. การตรวจหาดีเอ็นเอบ่งชี้ของโคพื้นเมืองช่วยให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อโคพื้นเมืองไทย และเป็นประโยชน์ในการจดสิทธิบัตร หรือการขึ้นทะเบียนพันธุ์และใช้ในการตรวจสอบโคลูกผสมได้
4. ได้ผลงานวิจัยที่สามารถเผยแพร่ในวงการวิชาการทางสัตวศาสตร์หรือตีพิมพ์ได้อย่างน้อย 1 เรื่อง

โคพื้นเมืองไทยจัดอยู่ในตระกูล *Bos indicus* หรือกลุ่มโคอินเดีย เป็นโคขนาดเล็ก ซึ่งจะมีน้ำหนักตัวเบากว่าโคอินเดียอื่นๆมาก มีนิสัย ปราดเปรี้ยว ว่องไว (เจริญ และคณะ, 2515) กรมปศุสัตว์ (2545) แบ่งโคพื้นเมืองไทยออกเป็น 4 กลุ่มตามแหล่งที่เกษตรกรเลี้ยง ได้แก่ กลุ่มโคพื้นเมืองภาคกลาง (โคลาน) กลุ่มโคพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (โคอีสาน) กลุ่มโคพื้นเมืองภาคเหนือ (โคชาวลำพูน) และกลุ่มโคพื้นเมืองภาคใต้ (โคชน) มีรายงานว่าโคเพศผู้มีน้ำหนักแรกเกิดสูงกว่าน้ำหนักเพศเมีย (เกรียงเดช, 2531; สุวัฒน์, 2537) และบางรายงานที่พบว่าเพศเมียมีผลต่อน้ำหนักแรกเกิดของโคพื้นเมืองอย่างไม่มีนัยสำคัญ (มนต์ชัย และคณะ, 2537; สมมาตร และคณะ, 2537) และพบว่าโคพื้นเมืองไทยจะมีน้ำหนักแรกเกิดสูงสุดในช่วงที่แม่โคให้ลูกครั้งที่ 4-5 โดยมีค่าเท่ากับ 14-15 กิโลกรัม (มนต์ชัย และคณะ, 2537) จากรายงานการจำแนกกลุ่มของโคพื้นเมืองด้วยสัดส่วนร่างกายและลักษณะทางปริมาณอื่นๆของ กิตติ และคณะ (2547) แสดงว่าโคพื้นเมืองน่าจะจำแนกได้เป็น 4 กลุ่ม และพบว่าโคพื้นเมืองไทยทุกกลุ่มมีค่าพันธุกรรมเนื่องจากแม่ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับโคเนื้ออื่นๆ โคสายภาคกลางมีค่าอัตราพันธุกรรมเนื่องจากอิทธิพลโดยตรงสูงทั้งในน้ำหนักแรกเกิดและหย่านม โคสายภาคใต้มีพันธุกรรมเนื่องจากแม่สูงที่สุด โคชาวลำพูนมีจุดเด่นที่พันธุกรรมของอัตราการเจริญเติบโตก่อนหย่านมสูง ส่วนโคสายอีสานพบว่ามีค่าสหสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของน้ำหนักแรกเกิด-น้ำหนักหย่านม-และน้ำหนัก 1 ปี สูงกว่าทุกกลุ่ม การจำแนกกลุ่มชนิดของสัตว์มีรายงานไว้หลายวิธีด้วยกัน เช่น จำแนกจากลักษณะภายนอก เช่น ลักษณะเขา เหนียงคอ และตะโพนก (Alberro, 1983; Manwell and Baker, 1980) จำแนกจากค่าชีวเคมี (Kemenes et al., 1999; Kotze et al., 2000) และการจำแนกกลุ่มของสัตว์จากข้อมูลในระดับ DNA (MacHugh et al., 1994; Schellander and Wimmer, 2002; Plastow et al., 2003)

การจำแนกกลุ่มจะช่วยให้เราเข้าถึงสภาพความหลากหลายของประชากรนั้น ซึ่งความหลากหลายของประชากรมีความสำคัญต่อเกิดวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ทำให้เกิดการวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตเช่นเมื่อสภาวะแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปสัตว์ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงจะมีความสามารถในการเกิดวิวัฒนาการได้สูงกว่าสัตว์ที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำซึ่งจะช่วยลดโอกาสการสูญพันธุ์เมื่อสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไป, ช่วยลดความสูญเสียทางพันธุกรรม เช่น ลดการสูญเสียที่เกิดจากการผสมระหว่างเครือญาติ และเป็นทรัพยากรที่มีคุณค่าต่อวิถีมมนุษย์ทั้งทางด้านเศรษฐกิจ สังคม และวัฒนธรรม (ปรีชา, 2543) นอกจากนี้ยังมีประโยชน์ในการวางแผนคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ เพราะเมื่อทราบว่โคแต่ละชนิดจัดอยู่ในกลุ่มเดียวกันหรือต่างกลุ่ม จะได้นำข้อมูลมาวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมแบบแยกกลุ่มหรือรวมกลุ่ม ซึ่งจะทำให้ได้ค่าพารามิเตอร์ที่ใกล้เคียงความเป็นจริงของสัตว์กลุ่มนั้นมากที่สุด การจำแนกกลุ่มของสัตว์สามารถทำได้หลายวิธี เช่นการจำแนกกลุ่มสัตว์จากที่อยู่อาศัย การจำแนกกลุ่มสัตว์จากลักษณะปรากฏ การจำแนกกลุ่มสัตว์จากองค์ประกอบเลือด และการจำแนกกลุ่มสัตว์จากข้อมูลพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เช่น microsatellite และ mitochondrial DNA (mtDNA) ได้รับความนิยมในการนำไปใช้เพื่อศึกษาพันธุกรรม ซึ่งสามารถอธิบายพันธุกรรมภายในและระหว่างประชากรได้ดี (Simonsen et al., 1998)

Microsatellite marker ได้รับความนิยมในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในทางสัตวกรรมถึงในโค โดย FAO/ISAG (1998) ได้รายงาน microsatellite marker ที่ควรใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในสัตว์แต่ละชนิดไว้ ในประเทศไทยมีรายงานการศึกษาโดย กัลยา และคณะ (2548) ซึ่งศึกษาใช้ตัวอย่างโคจากกรมปศุ

สัตว์ โดยใช้ microsatellite 30 ตำแหน่งพบว่าพันธุกรรมของโคทั้ง 4 กลุ่มมีแนวโน้มที่แตกต่างกัน โดยพบค่า heterozygosity เฉลี่ยสูงกว่า 0.5 จากการศึกษาของ MacHugh et al. (1997) ด้วย microsatellite 20 ตำแหน่ง พบว่าโคทางยุโรปมีความหลากหลายกว่าทางแอฟริกา นอกจากนี้ยังพบว่ามีการใช้ microsatellite เพื่อศึกษาความหลากหลายและจำแนกกลุ่มพันธุกรรมในโคหลายชนิด เช่น โคพื้นเมือง (Burriel et al., 1999) โคเนื้อ-โคนม (Ashwell et al., 1998; Kuhn et al., 1998; Vukasinovi et al., 1999) ปัจจุบันพบว่าความหลากหลายของดีเอ็นเอของนอกนิวเคลียส ซึ่งได้แก่ดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียที่บริเวณ D-loop มีการศึกษากันมากในสัตว์พื้นเมือง (Tsuiji et al., 2003; Mannen et al., 1998) ซึ่งจากรายงานของ Tsuiji et al. (2004) พบว่าพันธุกรรมโคพื้นเมืองในประเทศญี่ปุ่นที่ผ่านการผสมพันธุ์แบบ grading up มา 15 รุ่น ส่วนใหญ่ถูกแทนที่ด้วยพันธุกรรมโคไฮสไตน์พันธุ์แท้ และรายงานว่ามี mtDNA บริเวณ displacement loop (D-loop) บางรูปแบบที่พบเฉพาะในโคญี่ปุ่น (Japanese Black cattle) โดยไม่พบในโคยุโรปหรือโคแอฟริกัน (Japanese Holstein) Mannen (1998) รายงานว่า รูปแบบที่แตกต่างกันของ mtDNA บริเวณ D-loop มีผลต่อลักษณะซาก (longissimus muscle area และ beef marbling score) ในโค Japanese Black cattle สำหรับวัตถุประสงค์ในการศึกษานี้คือ ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจำแนกกลุ่มโคพื้นเมืองไทยกลุ่มต่างๆ ในประเทศไทย ด้วย mtDNA บริเวณ D-loop

1. การเก็บตัวอย่างและข้อมูลประจำตัว

สุ่มตัวอย่างเลือดหรือชิ้นเนื้อโคพื้นเมืองสายพันธุ์ต่างๆจากทั่วประเทศ ได้แก่ ภาคเหนือ อีสาน กลาง และใต้ จากพื้นที่ศึกษาจำนวน 6-8 จุดภายใต้โครงการการศึกษาผลผลิตและระบบการผลิตโคพื้นเมืองของเกษตรกรโดยการสนับสนุนจากกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) โดยมีวิธีการดังนี้

1. ข้อมูลประจำตัวสัตว์ทั่วไป เช่น เบอร์สัตว์ เพศ สายพันธุ์ สี พื้นที่เก็บตัวอย่าง ว/ด/ปที่เก็บตัวอย่าง
2. เก็บตัวอย่างเลือดโดยเจาะจากเส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) หรือที่หาง (tail vein) ปริมาณ 5-10 ลบ.ซม. โดยใส่ 0.5M EDTA เป็นสารป้องกันเลือดแข็งตัวปริมาณ 10% หรือเก็บตัวอย่างชิ้นบริเวณสันหรือตะโพกขนาด 2x2x2 ซม. หรือน้ำหนักประมาณ 20-50 กรัม บรรจุลงในขวดสารละลาย absolute ethanol

การศึกษารั้งนี้ ใช้ตัวอย่างโคพื้นเมือง 4 สายพันธุ์จากแหล่งต่างๆ ดังนี้ โคสายภาคเหนือ ($n = 20$), สายภาคกลาง ($n = 20$), สายภาคอีสานตอนบน/ขอนแก่น ($n = 20$), สายภาคอีสานตอนล่าง/อุบลราชธานี ($n = 20$), สายภาคใต้ตอนบน/นครศรีธรรมราช ($n = 8$) และสายภาคใต้ตอนล่าง/สงขลา ($n = 20$) รวมโคพื้นเมืองทั้งสิ้น 108 ตัวอย่าง

2. การสกัดดีเอ็นเอจากเลือด

นำตัวอย่างเลือดของโคพื้นเมืองแต่ละตัวมาปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบ/นาที ประมาณ 20 นาที จากนั้นนำส่วนของเม็ดเลือดขาว (buffy coat) ไปแยกสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป PURE-GENE™ (Gentra Inc., MA) ซึ่งประกอบด้วยสารละลายในการทำลายเม็ดเลือดแดง (RBC lysis buffer) ทำลายเซลล์ (cell lysis buffer) และตกตะกอนโปรตีน (protein precipitation buffer) ทำการตกตะกอน DNA ด้วย isopropanol ผึ่งตะกอนให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นจึงละลายด้วยสารละลาย DNA hydration แล้วตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วย 0.8 % agarose gel electrophoresis จากนั้นตรวจสอบความเข้มข้นดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างด้วยเครื่อง spectrophotometer ปรับความเข้มข้นสารละลายดีเอ็นเอที่สกัดได้ให้มีความเข้มข้น 50 ng/μl เก็บสารละลายไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส ก่อนที่จะนำไปใช้งานในขั้นตอนต่อไป

3. การสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อ

นำตัวอย่างชิ้นเนื้อของโคพื้นเมืองแต่ละตัวมาย่อย cell lysis buffer และบ่มที่อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วย่อยด้วย proteinase K และ 10% SDS ในสารที่อุณหภูมิ 54 °C เป็นเวลาข้ามคืน จากนั้นมาปั่นตกตะกอนโปรตีนและตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป PURE-GENE™ (Gentra Inc., MA) และตรวจสอบความเข้มข้นและเก็บรักษาเช่นเดียวกับดีเอ็นเอที่เก็บจากเลือด

4. การเพิ่มจำนวน microsatellite DNA

เพิ่มจำนวนไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคการเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (Polymerase chain reaction) โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ที่ ISAG/FAO (FAO, 1998) เสนอแนะในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ

จำนวน 20 ชุด โดยพยายามเลือกไพรเมอร์ให้มีการกระจายตัวทั่วทั้งจีโนม ซึ่งลำดับเบสของไพรเมอร์จาก 5' ไป 3' แสดงไว้ในตารางที่ 1

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่งของ microsatellite ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction, PCR) ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่มีความเข้มข้น 50 ng/μl ปริมาณ 1 μl, 50 mM MgCl₂ ปริมาณ 0.8 μl, 10XPCR-buffer ปริมาณ 1 μl, 1.25 mM/each dNTPs ปริมาณ 1 μl, 5 μM/μl Forward และ Reverse primer (QIAGEN, Germany) อย่างละ 1 μl, 0.5 U Taq DNA polymerase ปริมาณ 0.1 μl (Promega, San Diego, CA) และสุดท้ายปรับปริมาตรน้ำปริมาณ 4.1 μl รวมส่วนผสมทั้งหมดจำนวน 10 μl การทำปฏิกิริยาลูกโซ่ใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (GeneAmp PCR System 9600, Perkin-Elmer Applied Biosystems, CA) ก่อนการทำงานของปฏิกิริยาลูกโซ่ กำหนดอุณหภูมิ 94 °C นาน 5 นาที เพื่อเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาลูกโซ่ จำนวน 35 รอบ ตามวงรอบที่อุณหภูมิต่างๆ กันคืออุณหภูมิ 94 °C นาน 30 วินาที (ดีเอ็นเอเสียสภาพแยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว) จากนั้นลดอุณหภูมิลงในช่วง 48-56 °C (ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมขึ้นกับไพรเมอร์ของแต่ละตำแหน่งดังแสดงในตารางที่ 1) เพื่อให้เส้นดีเอ็นเอต้นแบบจับตัวอย่างเหมาะสมกับไพรเมอร์ ใช้เวลานาน 45 วินาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นที่ระดับ 72 °C นาน 45 วินาที ขั้นตอนนี้เพื่อให้มีการเพิ่มจำนวนเบสจากการจับตัวกันอย่างเหมาะสมของไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาลูกโซ่ทำงานครบ 35 รอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72 °C นาน 5 นาทีจำนวน 1 รอบ ซึ่งถือได้ว่าขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่เสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์

5. การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของไมโครแซทเทลไลต์และการบันทึกข้อมูล

ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอและขนาดของชิ้นส่วนไมโครแซทเทลไลต์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส (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 50 นาที ที่กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ ความจุไฟฟ้า 300 mA เมื่อครบกำหนดเวลาย้อมแผ่นเจล polyacrylamide ด้วย GelStarTM นาน 10 นาที จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้เครื่อง UV trans-illuminator เปรียบเทียบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการสังเคราะห์กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน GeneRulerTM 100 bp DNA ladder (Fermentas, CA)

ถ่ายรูปการปรากฏของอัลลีลของโคแต่ละตัวจากแต่ละตำแหน่งของ microsatellite ด้วยเครื่องบันทึกอัตโนมัติ (Gel Documentary System, SYNGENE, UK) พร้อมทั้งบันทึกขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏและแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูป binary data เมื่อ 0 และ 1 หมายถึงการไม่พบและพบอัลลีลนั้นตามลำดับ

ตารางที่ 1 ลำดับเบสและ annealing temperature (Tm) ของ microsatellite ที่ใช้ในการศึกษา

No	Locus	Primer	Tm (°C)	Size	Chromosome
1*	ETH152	TACTCGTAGGGCAGGCTGCCTG GAGACCTCAGGGTTGGTGATCAG	59	191-211	5
2*	ETH225	GATCACCTTGCCACTATTTCTCCT ACATGACAGCCAGCTGCTACT	57	140-160	9
3*	HEL1	AGTCCATGGGATTGAAAGAGTTGG CTTTTATTCAACAGCTATTTAACAAGG	55	101-117	15
4	HRH1	GGCTTCAACTCACTGTAACACATT TTCTTCAAGTATCACCTCTGTGGCC	55	180-190	22
5	ILSTS001	GGTGCTGTTATCTAGAATTTGG GGAGTCATACACAAGTGAAGC	58	77-97	7
6*	ILSTS005	GGAAGCAATGAAATCTATAGCC TGTTCTGTGAGTTTGTAAGC	55	181-193	10
7	ILSTS014	CTGACTATGGTGATAATCCC TCTTTTCCCTTTCTTCCCC	58	128-134	19
8	OCAM	CCTGACTATAATGTACAGATCCCTC GCAGAATGACTAGGAAGGATGGCA	57	178-190	25
9*	BM2113	GCTFCCTTCTACCAAATACCC CTTCCTGAGAGAAGCAACACC	55	123-147	2
10	BOLADRB2	AGGCAGCGCCGAGGTGAGCGA TCCAACACTCACCTGGACGTAGC	60	144-152	23
11	ETH131	GTGGACTATAGACCATAAGGTC GCTGTGATGGTCTACGAATGA	55	138-168	21
12*	HEL5	GGTAATGGTTTTTCAGACGTTAGTG GTAGCAGGATCACTTGTTAGGG	54	161-181	21
13	RBP3	TGTATGATCACCTTCTATGCTTC GCTTTAGGTAATCATCAGATAGC	55	141-153	28
14	TGLA116	GCACAGTAAGAGTGATGGCAGA TGGAGAAGATTTGGCTGTGTACCCA	57	79-85	4
15	BM203	GGGTGTGACATTTTGTTCCTC CTGCTCGCCACTAGTCCTTC	58	100-120	3
16	HUJII77	TCCATCAAGTATTTGAGTGCAA ATAGCCCTACCCACTGTTTCTG	58	120-140	3
17	TGLA153	GGAGTGGGAGAAAGGVTCAAA TGCTTTACAGTGTTGTGTTAGTTT	60	119-153	20
18	IGF1	GCTTGGATGGACCATGTTG CACTTGAGGGGCAAATGATT	48	225-231	5
19	CSSM065	TTCCTGCTTGGTGAACTTTGAAC CAACTCAAGTTCAACAGCAGCC	58	154-174	6
20	UWCA9	CCTTCTCTGAATTTTGTGAAAGC GGACAGAAGTGAGTGACTGAGA	58	83-107	9

ที่มา: ISAG (1999), *ISAG (2004)

6. การเพิ่มจำนวน mitochondrial DNA (mtDNA) บริเวณ D-loop

เพิ่มจำนวนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ด้วยเทคนิคการเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (Polymerase chain reaction) โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ที่เสนอโดย Tsuji et al. (2004) ดังนี้

Forward primer: 5' – ACA TTA AAT TAT ATG CCC CAT GC – 3'

Reverse primer: 5' – AGC TCG TGA TCT AAT GGT AAG GA – 3'

ในแต่ละปฏิกิริยา (10 µl) ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่มีความเข้มข้น 50 ng/µl ปริมาณ 1 µl, 50 mM MgCl₂ ปริมาณ 0.8 µl, 10XPCR-buffer ปริมาณ 1 µl, 1.25 mM/each dNTPs ปริมาณ 1 µl, 5 µM/µl Forward และ Reverse primer (QIAGEN, Germany) อย่างละ 1 µl, 0.5 U Taq DNA polymerase ปริมาณ 0.1 µl (Promega, San Diego, CA) และสุดท้ายปรับปริมาตรน้ำปริมาณ 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 และย้อมแถบดีเอ็นเอด้วย GelStar™

7. การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียบริเวณ D-loop

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ของโคพื้นเมืองแต่ละตัวจะถูกนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง ABI-377 Automated Sequencer (Perkin-Elmer Applied Biosystems, CA)

8. การวิเคราะห์ทางสถิติ

8.1. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมและการจำแนกกลุ่มโคพื้นเมือง

1) การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคพื้นเมือง

นำข้อมูลทางอนุพันธุศาสตร์ของโคทั้งจากการวิเคราะห์ไมโครแซทเทลไลต์และไมโทคอนเดรียจากแต่ละสายพันธุ์ที่ได้มาคำนวณความถี่ของอัลลีลต่างๆที่พบในแต่ละตำแหน่งของ microsatellite ตามวิธีของ Falconer and Mackay (1996) จากสูตร $p_i = \frac{\sum n_i}{N}$ เมื่อ p_i = ความถี่อัลลีลที่ i, n_i = จำนวนอัลลีล i ที่พบ, N = จำนวนอัลลีลทั้งหมด

วิเคราะห์ข้อมูลของแถบดีเอ็นเอที่ได้จากชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เพื่อคำนวณหาค่า เฮตเทอโรไซโกซิตี (heterozygosity) และ ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ระหว่างโคแต่ละกลุ่ม (Nei, 1978) เพื่อทำ dendrogram ต่อไป

วิเคราะห์ค่าความหลากหลายของไพรเมอร์จากค่า PIC (polymorphic information content) ตามวิธีของ Botstein et al. (1980) จากสูตร $PIC = 1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2p_i^2 p_j^2$ เมื่อ p_i, p_j = ความถี่ของอัลลีลที่ i และ j และ k = จำนวนอัลลีลที่พบในตำแหน่งนั้นๆ หากพบ microsatellites ตำแหน่งใดมีค่า PIC ต่ำเกินไป จะตัดข้อมูล ณ ตำแหน่งนั้นออกจากการวิเคราะห์ขั้นต่อไป

จากนั้นทำการวิเคราะห์ค่าทางสถิติเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบความหลากหลายของโคพื้นเมืองจากค่า heterozygosity index ทั้งประชากรและเปรียบเทียบแยกแต่ละสายพันธุ์

2) การจำแนกกลุ่มโคพื้นเมือง

2.1 การจำแนกกลุ่มโดยใช้การวิเคราะห์ phylogenetic tree

ประเมินค่าระยะห่างทางพันธุกรรมด้วยวิธี Net's minimum distance (Nei, 1987) ระหว่างโคพื้นเมืองแต่ละสายพันธุ์ จากนั้นวิเคราะห์แผนภาพด้วยวิธี Neighbor Join และ UPGMA (Sneath and Sokal, 1973)

2.2 การจำแนกกลุ่มโดยใช้เทคนิคทาง cluster analysis

ศึกษาการจำแนกกลุ่มสายพันธุ์โคพื้นเมืองไทยโดยวิเคราะห์จากข้อมูลการปรากฏของอัลลีลต่างๆรวมทุกตำแหน่งจากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างโคแต่ละตัวภายในแต่ละสายพันธุ์ เพื่อตรวจสอบจำนวนกลุ่มของสายพันธุ์ที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากค่า Cubic Clustering Criterion (CCC) ซึ่งเสนอโดย Johson (1998)

2.3 การวิเคราะห์ genetic sub-division

ทดสอบการจำแนกกลุ่มหรือสายพันธุ์ของโคพื้นเมืองจากการวิเคราะห์ sub-population division ของโคพื้นเมืองด้วยการวิเคราะห์ AMOVA (analysis of molecular data) และประเมินค่า Wright's F-statistic เพื่อทดสอบโครงสร้างทางพันธุกรรม (genetic structure) จากค่า fixation index (F_{IS} , F_{IT} , F_{ST}) เพื่อทดสอบการเกิดกลุ่มย่อยทางพันธุกรรมตามวิธีการของ Cockerham and Weir (1993) และ Hartle (2000) การวิเคราะห์ค่า gene diversity within individual ($1-Q_{INTRA}$) และ among individual ($1-Q_{INTRA}$) ใช้โปรแกรม GENEPOP 4.0

8.2. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเครื่องหมายเพื่อบ่งชี้โคพื้นเมืองสายพันธุ์ต่างๆ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้อมูลการปรากฏของแถบดีเอ็นเอของไมโครแซทเทลไลต์ กับการแสดงออกของโคแต่ละกลุ่มด้วยวิธี logistic regression โปรแกรม ด้วย PROC LOGISTIC โดยสำเร็จรูป SAS 6.12 ตามวิธีของ Allison (1997) ซึ่งมีรูปแบบสมการดังนี้

$$\ln\left(\frac{P_i}{1-P_i}\right) = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \dots + \beta_i X_i + \varepsilon_{ij}$$

เมื่อ P_i = เป็นความน่าจะเป็นที่จะเป็นโคพื้นเมืองสายพันธุ์ i เมื่อเทียบกับสายอื่นๆ

β_0 = จุดตัดแกน y (intercept)

$\beta_1, \beta_2, \beta_3, \dots, \beta_i$ = ค่าสัมประสิทธิ์ regression ของอัลลีลที่ 1, 2, ..., i

$X_1, X_2, X_3, \dots, X_i$ = ตัวแปรต้นของการปรากฏอัลลีลที่ 1, 2, ..., i

ε_{ij} = ค่าความคลาดเคลื่อน (random error term)

8.3. การวิเคราะห์ความหลากหลายของลำดับเบสบริเวณ D-Loop ของ mtDNA

วิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ D-loop ของ mtDNA โดยเทียบกับดีเอ็นเออ้างอิงของโคอินเดีย (Zebu) จาก GenBank และจากโคพื้นเมืองไทยสายพันธุ์ขาวลำพูน (CMU16) และโคนมพันธุ์ไฮลสไตร์ (HF) โดยความเอื้อเฟื้อจาก ดร.ศุภมิตร เมฆฉาย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จากนั้นทำ multiple alignment และวิเคราะห์การจัดกลุ่มด้วยโปรแกรม DNAMAN version 5.2.2 โดยวิธี Maximum Likelihood

8.4. อุปกรณ์ที่มีอยู่และสถานที่ใช้ดำเนินการ

การเพิ่มขยายดีเอ็นเอบริเวณ microsatellites และ D-loop ของ mitochondrial DNA ทำที่ห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพทางสัตว์ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

1. การวิเคราะห์ความหลากหลายของโคพื้นเมืองด้วย microsatellite

การวิจัยครั้งนี้สุ่มตัวอย่างโคพื้นเมืองไทยเพื่อสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อที่ได้จากโค 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายภาคเหนือ (n = 20), สายภาคกลาง (n = 20), สายภาคอีสานตอนบน/ขอนแก่น (n = 20), สายภาคอีสานตอนล่าง/อุบลราชธานี (n = 20), สายภาคใต้ตอนบน/นครศรีธรรมราช (n = 8) และสายภาคใต้ตอนล่าง/สงขลา (n = 20) รวมโคพื้นเมืองทั้งสิ้น 108 ตัวอย่าง การวิเคราะห์ microsatellite จำนวน 20 ตำแหน่งครั้งนี้พบอัลลีลรวมทั้งหมด 193 อัลลีล พบว่าอัลลีล (allele) ที่พบในแต่ละตำแหน่ง (locus) ของ microsatellite อยู่ในช่วง 6-12 อัลลีลต่อตำแหน่ง โดยมีค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลเท่ากับ 9.67 อัลลีลต่อตำแหน่ง และพบว่าขนาด (size) และจำนวนอัลลีล (allele number) ของ microsatellite ที่วิเคราะห์ในโคพื้นเมืองไทยมีความหลากหลายกว่าที่ได้รายงานไว้ในโคพันธุ์ต่างประเทศอื่นๆ ในทุกตำแหน่ง การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ามี microsatellite อัลลีลใหม่ๆ ที่ไม่มีการรายงานในต่างประเทศอยู่หลายอัลลีล ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโคพื้นเมืองไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างสูง (ตารางที่ 2) โดยการกระจายของความถี่อัลลีลในแต่ละตำแหน่งของโคพื้นเมืองทั้ง 4 กลุ่มแสดงไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ความหลากหลายของขนาดและจำนวนอัลลีลของ microsatellite ในโคพื้นเมืองไทย

Primer No.	Name	Reference Size (bp)	Observed Size (bp)	Number of Alleles
P1	ETH152	191-211	183-241	10
P2	ETH225	140-160	149-205	10
P3	HEL1	101-117	100-146	8
P4	HRH1	180-190	159-230	12
P5	ILSTS001	77-97	78-126	8
P6	ILSTS005	181-193	181-272	11
P7	ILSTS014	128-134	129-175	8
P8	OCAM	178-190	167-217	8
P9	BM2113	123-147	127-185	10
P10	BOLADRB2	144-152	130-183	9
P11	ETH131	138-168	128-198	12
P12	HEL5	161-181	158-221	9
P13	RBP3	141-153	140-192	9
P14	TGLA116	79-85	74-109	6
P15	BM203	100-120	200-287	14
P16	HUJII77	120-140	198-271	12
P17	TGLA153	119-153	105-161	9
P18	IGF1	225-231	228-287	10
P19	CSSM065	154-174	158-195	7
P20	UWCA	83-107	81-164	11

ตารางที่ 3 ขนาดอัลลีล (เลขตัวหนา) และความถี่อัลลีลของ microsatellite แต่ละตำแหน่งจำนวน 20 ตำแหน่งของ โคพื้นเมืองสายอีสาน (NORTH EAST, n=40), สายเหนือ (NORTH, n=20), สายภาคกลาง (CENTRAL, n=20) และ สายใต้ (SOUTH, n=28)

No	Locus name	Microsatellite Allele													
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14
1	ETH152	183	189	195	201	207	213	219	225	231	237				
	NORTH	0.00	0.05	0.26	0.11	0.11	0.32	0.08	0.05	0.03	0.00				
	CENTRAL	0.10	0.05	0.00	0.10	0.05	0.35	0.10	0.05	0.05	0.15				
	NORTH EAST	0.05	0.05	0.03	0.05	0.05	0.22	0.27	0.11	0.08	0.08				
	SOUTH	0.00	0.00	0.05	0.10	0.12	0.31	0.21	0.07	0.12	0.02				
2	ETH225	149	155	161	167	173	179	185	191	197	203				
	NORTH	0.05	0.03	0.21	0.03	0.26	0.26	0.08	0.03	0.05	0.00				
	CENTRAL	0.12	0.06	0.06	0.00	0.35	0.35	0.00	0.00	0.06	0.00				
	NORTH EAST	0.18	0.07	0.07	0.18	0.15	0.21	0.06	0.03	0.06	0.00				
	SOUTH	0.02	0.12	0.12	0.10	0.17	0.04	0.15	0.14	0.10	0.06				
3	HEL1	100	106	112	118	124	130	136	142						
	NORTH	0.21	0.16	0.50	0.00	0.13	0.00	0.00	0.00						
	CENTRAL	0.05	0.11	0.11	0.21	0.05	0.11	0.21	0.16						
	NORTH EAST	0.03	0.07	0.14	0.14	0.31	0.18	0.11	0.03						
	SOUTH	0.00	0.25	0.27	0.17	0.23	0.00	0.06	0.02						
4	HRH1	159	165	171	177	183	189	195	201	207	213	219	225		
	NORTH	0.00	0.00	0.06	0.00	0.06	0.06	0.19	0.11	0.11	0.22	0.06	0.14		
	CENTRAL	0.00	0.05	0.20	0.05	0.15	0.00	0.00	0.25	0.20	0.05	0.00	0.05		
	NORTH EAST	0.08	0.03	0.01	0.04	0.12	0.09	0.26	0.01	0.07	0.12	0.08	0.09		
	SOUTH	0.04	0.00	0.10	0.06	0.06	0.10	0.21	0.06	0.14	0.08	0.04	0.14		
5	ILSTS001	78	84	90	96	102	108	114	120						
	NORTH	0.00	0.20	0.45	0.10	0.20	0.05	0.00	0.00						
	CENTRAL	0.00	0.26	0.16	0.26	0.16	0.05	0.11	0.00						
	NORTH EAST	0.19	0.23	0.18	0.21	0.10	0.06	0.00	0.03						
	SOUTH	0.08	0.10	0.21	0.06	0.14	0.27	0.10	0.06						
6	ILSTS005	181	187	193	199	205	211	217	223	229	235	241			
	NORTH	0.00	0.06	0.08	0.17	0.03	0.25	0.17	0.06	0.03	0.14	0.03			
	CENTRAL	0.03	0.06	0.11	0.08	0.08	0.31	0.06	0.08	0.08	0.06	0.06			
	NORTH EAST	0.10	0.24	0.14	0.17	0.01	0.14	0.10	0.10	0.00	0.01	0.00			
	SOUTH	0.02	0.00	0.15	0.24	0.00	0.02	0.04	0.24	0.28	0.00	0.00			
7	ILSTS014	129	135	141	147	153	159	165	171						
	NORTH	0.10	0.05	0.25	0.10	0.25	0.05	0.10	0.10						
	CENTRAL	0.00	0.00	0.00	0.17	0.19	0.33	0.17	0.14						
	NORTH EAST	0.13	0.24	0.11	0.22	0.18	0.05	0.07	0.00						
	SOUTH	0.08	0.18	0.20	0.14	0.16	0.16	0.08	0.00						
8	OCAM	167	173	179	185	191	197	203	209						
	NORTH	0.05	0.05	0.40	0.25	0.15	0.10	0.00	0.00						
	CENTRAL	0.22	0.31	0.06	0.19	0.13	0.00	0.00	0.09						
	NORTH EAST	0.07	0.15	0.14	0.39	0.07	0.06	0.06	0.07						
	SOUTH	0.00	0.00	0.52	0.16	0.08	0.08	0.12	0.04						

ตารางที่ 3 (ต่อ)

No	Locus name	Microsatellite Allele													
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14
9	BM2113	127	133	139	145	151	157	163	169	175	181				
	NORTH	0.06	0.03	0.06	0.06	0.42	0.00	0.28	0.11	0.00	0.00				
	CENTRAL	0.11	0.05	0.05	0.05	0.16	0.32	0.05	0.05	0.16	0.00				
	NORTH EAST	0.04	0.07	0.16	0.11	0.15	0.14	0.10	0.11	0.08	0.05				
	SOUTH	0.00	0.10	0.17	0.04	0.25	0.06	0.17	0.06	0.10	0.06				
10	BOLADRB2	130	136	142	148	154	160	166	172	178					
	NORTH	0.00	0.00	0.11	0.28	0.06	0.17	0.39	0.00	0.00					
	CENTRAL	0.05	0.00	0.00	0.10	0.70	0.05	0.05	0.00	0.05					
	NORTH EAST	0.13	0.23	0.10	0.05	0.10	0.08	0.10	0.05	0.18					
	SOUTH	0.00	0.00	0.00	0.04	0.37	0.33	0.08	0.12	0.08					
11	ETH131	128	134	140	146	152	158	164	170	176	182	188	194		
	NORTH	0.24	0.18	0.12	0.21	0.00	0.12	0.06	0.00	0.00	0.00	0.06	0.03		
	CENTRAL	0.00	0.00	0.25	0.00	0.00	0.40	0.05	0.05	0.25	0.00	0.00	0.00		
	NORTH EAST	0.00	0.03	0.00	0.01	0.09	0.17	0.13	0.17	0.17	0.12	0.09	0.01		
	SOUTH	0.00	0.00	0.02	0.04	0.02	0.02	0.22	0.12	0.18	0.08	0.16	0.14		
12	HEL5	168	174	180	186	192	198	204	210	216					
	NORTH	0.00	0.00	0.00	0.00	0.35	0.12	0.06	0.29	0.18					
	CENTRAL	0.00	0.00	0.16	0.11	0.32	0.05	0.11	0.21	0.05					
	NORTH EAST	0.08	0.08	0.09	0.12	0.15	0.30	0.03	0.08	0.09					
	SOUTH	0.02	0.02	0.19	0.58	0.02	0.12	0.06	0.00	0.00					
13	RBP3	140	146	152	158	164	170	176	182	188					
	NORTH	0.00	0.11	0.00	0.31	0.17	0.11	0.17	0.08	0.06					
	CENTRAL	0.12	0.12	0.00	0.35	0.00	0.06	0.29	0.00	0.06					
	NORTH EAST	0.05	0.09	0.39	0.16	0.11	0.05	0.07	0.04	0.04					
	SOUTH	0.04	0.29	0.10	0.12	0.21	0.04	0.06	0.15	0.00					
14	TGLA116	74	80	86	92	98	104								
	NORTH	0.35	0.32	0.24	0.06	0.03	0.00								
	CENTRAL	0.35	0.24	0.29	0.00	0.06	0.06								
	NORTH EAST	0.03	0.13	0.34	0.31	0.09	0.09								
	SOUTH	0.04	0.30	0.33	0.04	0.22	0.07								
15	BM203	200	206	218	224	230	236	242	248	254	260	266	272	278	284
	NORTH	0.00	0.00	0.03	0.08	0.13	0.11	0.05	0.13	0.08	0.21	0.00	0.11	0.03	0.05
	CENTRAL	0.00	0.00	0.08	0.08	0.13	0.11	0.03	0.11	0.16	0.18	0.00	0.08	0.05	0.00
	NORTH EAST	0.04	0.01	0.10	0.10	0.11	0.06	0.03	0.07	0.14	0.06	0.15	0.07	0.04	0.03
	SOUTH	0.07	0.05	0.04	0.13	0.14	0.14	0.05	0.00	0.04	0.09	0.05	0.11	0.07	0.02
16	HUJII77	198	204	210	216	222	228	234	240	246	252	258	270		
	NORTH	0.18	0.05	0.00	0.13	0.16	0.05	0.18	0.00	0.05	0.03	0.11	0.05		
	CENTRAL	0.03	0.00	0.06	0.15	0.12	0.09	0.15	0.00	0.09	0.15	0.12	0.06		
	NORTH EAST	0.08	0.14	0.10	0.13	0.15	0.14	0.08	0.00	0.08	0.04	0.04	0.03		
	SOUTH	0.00	0.04	0.12	0.20	0.14	0.24	0.08	0.10	0.00	0.04	0.04	0.00		
17	TGLA153	105	111	117	129	135	141	147	153	159					
	NORTH	0.00	0.00	0.00	0.00	0.05	0.34	0.13	0.42	0.05					
	CENTRAL	0.00	0.00	0.00	0.16	0.21	0.18	0.24	0.13	0.08					
	NORTH EAST	0.00	0.01	0.08	0.07	0.31	0.11	0.17	0.21	0.04					
	SOUTH	0.09	0.28	0.06	0.02	0.02	0.04	0.32	0.15	0.04					

ตารางที่ 3 (ต่อ)

No	Locus name	Microsatellite Allele													
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13	A14
18	IGF1	228	234	240	246	252	258	264	270	276	282				
	NORTH	0.07	0.00	0.00	0.00	0.07	0.00	0.33	0.20	0.27	0.07				
	CENTRAL	0.35	0.00	0.29	0.00	0.18	0.06	0.12	0.00	0.00	0.00				
	NORTH EAST	0.31	0.18	0.09	0.09	0.12	0.04	0.03	0.06	0.03	0.06				
	SOUTH	0.00	0.07	0.14	0.21	0.05	0.12	0.12	0.14	0.07	0.07				
19	CSSM065	158	164	170	176	182	188	194							
	NORTH	0.24	0.08	0.21	0.08	0.16	0.24	0.00							
	CENTRAL	0.06	0.00	0.06	0.21	0.44	0.18	0.06							
	NORTH EAST	0.08	0.23	0.12	0.15	0.35	0.03	0.05							
	SOUTH	0.03	0.07	0.20	0.03	0.20	0.33	0.13							
20	UWCA	81	87	93	99	105	111	129	135	147	153	159			
	NORTH	0.21	0.24	0.15	0.18	0.00	0.12	0.06	0.06	0.00	0.00	0.00			
	CENTRAL	0.00	0.19	0.19	0.31	0.06	0.06	0.03	0.16	0.00	0.00	0.00			
	NORTH EAST	0.06	0.06	0.23	0.24	0.14	0.06	0.04	0.04	0.04	0.03	0.06			
	SOUTH	0.09	0.02	0.13	0.13	0.11	0.11	0.02	0.17	0.04	0.11	0.07			

เมื่อพิจารณาจากค่า heterozygosity (ตารางที่ 4) จะเห็นว่าพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยในแต่ละพื้นที่มีความหลากหลายแตกต่างกัน โดยพบว่า microsatellite บางตำแหน่งโคพื้นเมืองในบางสายพันธุ์จะมีความเป็น heterozygosity ของบางตำแหน่งสูงมากในขณะที่บางสายพันธุ์พบว่าเป็น homozygosity ทั้งหมด นอกจากนี้เมื่อพิจารณาในภาพรวมทุกตำแหน่งของ microsatellite เห็นได้ว่าการกระจายของจีโนไทป์ (genotype distribution) ในโคพื้นเมืองแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน (0.16-0.54) การศึกษาครั้งนี้พบว่าค่า average heterozygosity มีค่าค่อนข้างสูงและใกล้เคียงกันในทุกกลุ่ม (0.79-0.85) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประชากรโคพื้นเมืองไทยมีความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) สูง อย่างไรก็ตามการศึกษานี้พบว่าค่า observed heterozygosity มีค่าไม่สูงนัก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโคพื้นเมืองที่ศึกษาครั้งนี้แม้จะมีความหลากหลายในด้านของรูปแบบขนาดของอัลลีล (จำนวนซ้ำของเบสแตกต่างกัน) ค่อนข้างสูงแต่อัลลีลเหล่านั้นส่วนใหญ่อยู่ในสภาพ homozygous โดยมีการกระจายของจีโนไทป์ในประชากรไม่สมดุลหรือไม่เป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg ทั้งที่เป็นประชากรที่ไม่มีการคัดเลือก (non-selection population) ค่า F-statistic แสดงให้เห็นว่าโคในกลุ่มภาคเหนือและภาคกลางมีจีโนไทป์อยู่ในสภาพ homozygous มากที่สุด ในขณะที่โคภาคใต้มีจีโนไทป์อยู่ในสภาพ heterozygous สูงสุด อย่างไรก็ตาม โคพื้นเมืองที่มีพันธุกรรมอยู่ในสภาพ homozygous สูงอาจส่งผลให้เกิดการการสูญหายของยีน (genetic lost) ได้ง่ายในอนาคต หากเกิดเหตุการณ์ให้ประชากรโคเหล่านั้นต้องลดลงอย่างรวดเร็ว

ตารางที่ 4 การวิเคราะห์ค่า heterozygosity จากข้อมูล microsatellite ในโคพื้นเมืองไทย^{1/}

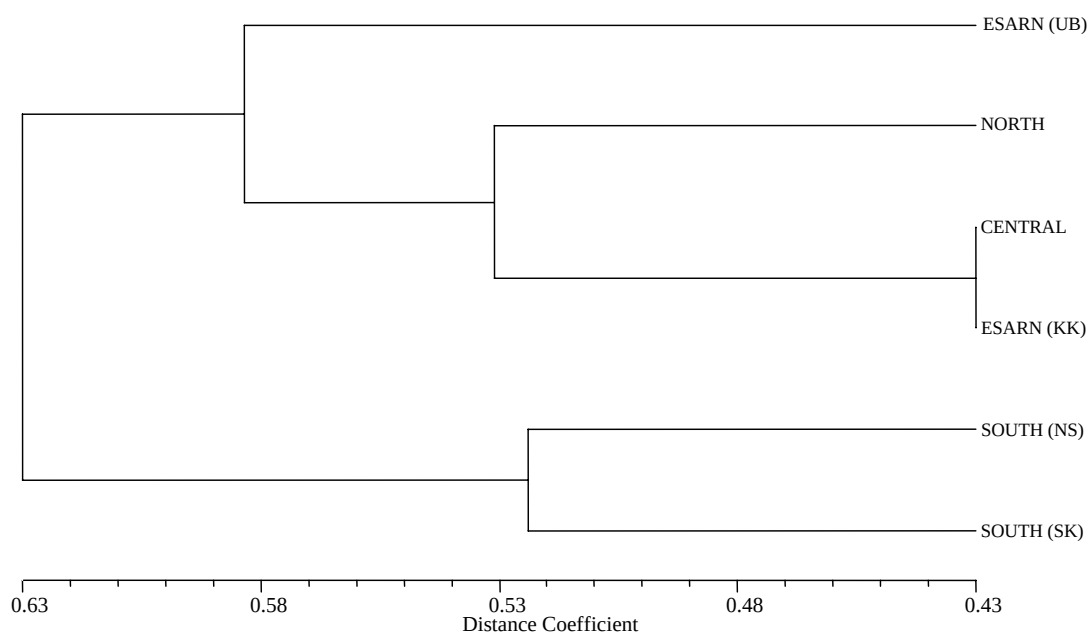
NAME	Observed Heterozygosity (Ho)				Expected Heterozygosity (He)			
	NORTH	CENTRAL	ESARN	SOUTH	NORTH	CENTRAL	ESARN	SOUTH
ETH152	0.05	0.00	0.15	0.71	0.82	0.84	0.85	0.83
ETH225	0.37	0.00	0.29	0.73	0.83	0.75	0.87	0.90
HEL1	0.05	0.11	0.06	0.50	0.68	0.87	0.83	0.80
HRH1	0.17	0.20	0.55	0.85	0.88	0.85	0.88	0.90
ILSTS001	0.25	0.00	0.10	0.77	0.48	0.82	0.83	0.85
ILSTS005	0.62	0.61	0.58	0.83	0.87	0.88	0.86	0.80
ILSTS014	0.00	0.06	0.42	1.00	0.83	0.80	0.84	0.86
OCAM	0.00	0.13	0.25	0.16	0.76	0.82	0.80	0.69
BM2113	0.06	0.11	0.51	0.69	0.75	0.85	0.90	0.86
BOLADRB2	0.00	0.00	0.00	0.08	0.75	0.50	0.87	0.75
ETH131	0.18	0.10	0.53	0.72	0.86	0.73	0.87	0.87
HEL5	0.00	0.00	0.41	0.12	0.76	0.83	0.85	0.62
RBP3	0.00	0.00	0.32	0.19	0.84	0.78	0.80	0.84
TGLA116	0.06	0.00	0.00	0.00	0.73	0.75	0.76	0.76
BM203	0.89	0.84	0.72	1.00	0.90	0.90	0.92	0.92
HUJII77	0.32	0.18	0.15	0.04	0.89	0.91	0.90	0.86
TGLA153	0.05	0.32	0.33	0.85	0.70	0.84	0.82	0.80
IGF1	0.00	0.24	0.03	0.81	0.79	0.76	0.85	0.89
CSSM065	0.32	0.19	0.36	0.53	0.83	0.74	0.79	0.81
UWCA	0.12	0.30	0.43	0.65	0.85	0.82	0.86	0.91
AVERAGE	0.18	0.17	0.31	0.56	0.79	0.80	0.85	0.83
F-statistic^{2/}					0.77	0.79	0.64	0.33

^{1/} ESARN (UB) = โคพื้นเมืองภาคอีสาน (อุบล), ESARN (KK) = โคพื้นเมืองภาคอีสาน (ขอนแก่น), NORTH = โคพื้นเมืองภาคเหนือ, CENTRAL = โคพื้นเมืองภาคกลาง, SOUTH (NS) = โคพื้นเมืองภาคใต้ (นครศรีธรรมราช), SOUTH (SK) = โคพื้นเมืองภาคใต้ (สงขลา)

^{2/} F-statistic คำนวณจาก $\frac{H_e - H_o}{H_e}$

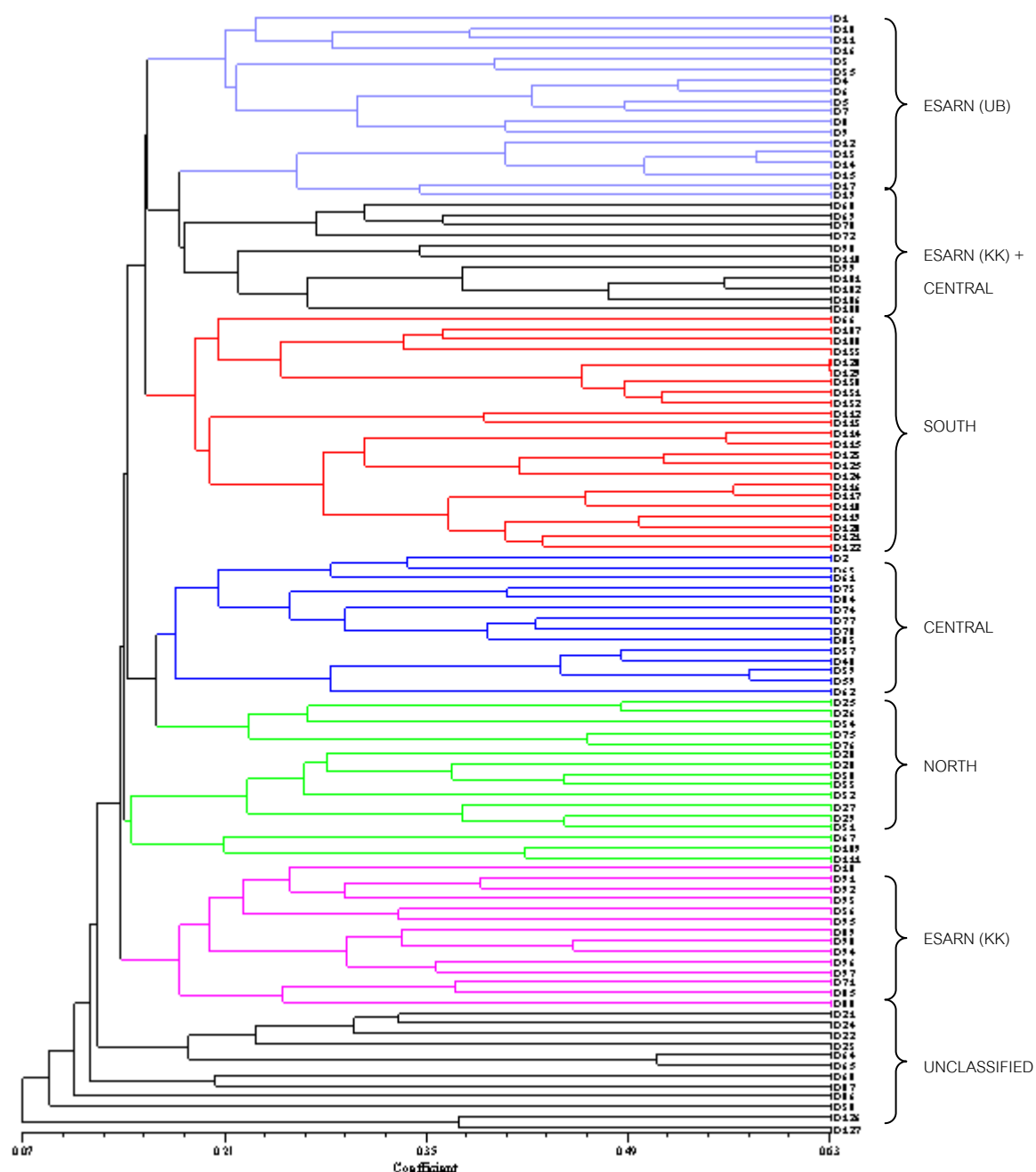
2. การวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรมและ phylogenetic tree ด้วย microsatellite

จากการวิเคราะห์แผนภาพต้นไม้ (phylogenetic tree) จากค่าแตกต่างทางพันธุกรรม (Nei's genetic distance) ของโคพื้นเมืองที่มาจากแหล่งต่างๆของประเทศไทยในระดับสายพันธุ์ พบว่าโคพื้นเมืองภาคใต้มีพันธุกรรมแตกต่างจากโคพื้นเมืองกลุ่มอื่นๆ มากที่สุด โดยมีระยะห่างทางพันธุกรรมหรือความแตกต่างทางพันธุกรรมมากกว่า 63% เมื่อเปรียบเทียบกับภายในกลุ่มโคพื้นเมืองภาคกลาง-อีสาน-เหนือ พบว่าโคพื้นเมืองภาคอีสาน (อุบล) มีพันธุกรรมแตกต่างจากโคพื้นเมืองภาคเหนือและภาคกลาง และพบว่าโคพื้นเมืองภาคเหนือแตกต่างจากภาคกลาง โดยมีความแตกต่างทางพันธุกรรมของแต่ละกลุ่มมากกว่า 50% นอกจากนี้ยังพบว่าโคพื้นเมืองภาคกลางมีพันธุกรรมใกล้เคียงกับโคพื้นเมืองภาคอีสาน (ขอนแก่น) มากที่สุด (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การวิเคราะห์ phylogenetic tree จากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยในระดับสายพันธุ์ เมื่อ ESARN (UBON) = โคพื้นเมืองภาคอีสาน (อุบล), ESARN (KK) = โคพื้นเมืองภาคอีสาน (ขอนแก่น), NORTH = โคพื้นเมืองภาคเหนือ, CENTRAL = โคพื้นเมืองภาคกลาง, SOUTH (NS) = โคพื้นเมืองภาคใต้ (นครศรีธรรมราช), SOUTH (SK) = โคพื้นเมืองภาคใต้ (สงขลา)

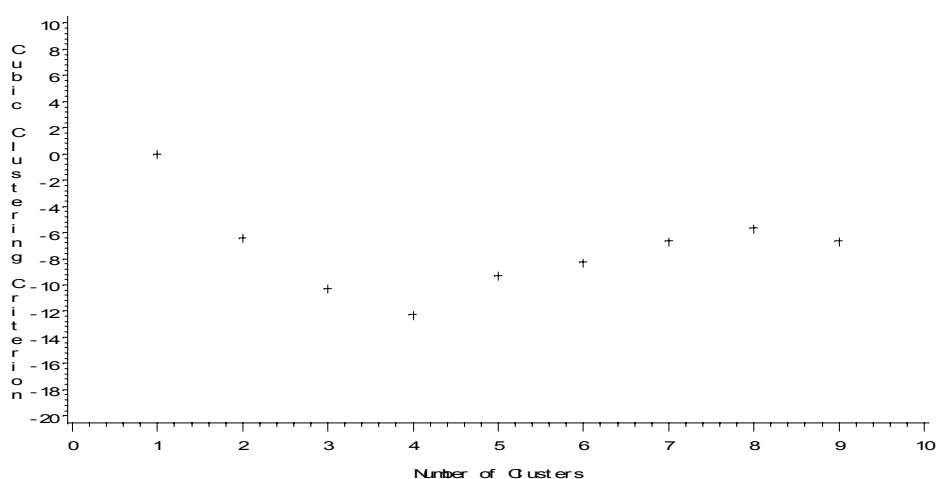
นอกจากนี้ การวิเคราะห์แผนภาพต้นไม้ (phylogenetic tree) จากค่าความเหมือนกันทางพันธุกรรม (Dice's similarity coefficient) ของโคพื้นเมืองรายตัว พบการจัดจำแนกเป็นกลุ่มได้ใกล้เคียงกับการจัดกลุ่มในระดับสายพันธุ์ (ภาพที่ 2) โดยพบว่าหากทำการจัดกลุ่มโคพื้นเมืองตามลักษณะทางพันธุกรรม (genetic makeup) รายตัวแล้วพบว่า โคพื้นเมืองสายภาคเหนือและภาคใต้มีพันธุกรรมที่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มพันธุ์และสามารถจำแนกออกจากกลุ่มโคพื้นเมืองอื่นๆได้อย่างชัดเจน ในขณะที่กลุ่มโคภาคกลางและกลุ่มโคภาคอีสานบางส่วนไม่สามารถจำแนกออกจากกันได้



ภาพที่ 2 การวิเคราะห์ phylogenetic tree จากค่าความเหมือนทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยในระดับรายตัวด้วยข้อมูล microsatellite เมื่อ ESARN (UBON) = โคพื้นเมืองภาคอีสาน (อุบล), ESARN (KK) = โคพื้นเมืองภาคอีสาน (ขอนแก่น), NORTH = โคพื้นเมืองภาคเหนือ, CENTRAL = โคพื้นเมืองภาคกลาง, SOUTH (NS) = โคพื้นเมืองภาคใต้ (นครศรีธรรมราช), SOUTH (SK) = โคพื้นเมืองภาคใต้ (สงขลา)

3. การวิเคราะห์กลุ่มโคพื้นเมืองไทยด้วยเทคนิค clustering

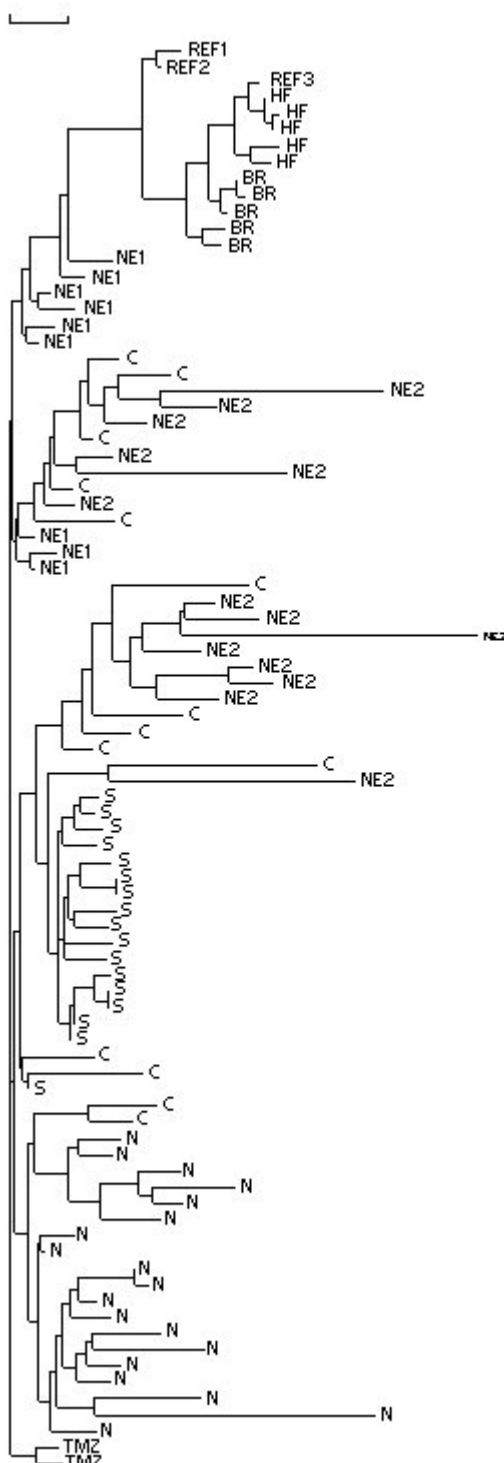
แม้ว่าการจำแนกกลุ่มโคพื้นเมืองไทยด้วยวิธี phylogenetic จากข้อมูล microsatellite พบว่าโคพื้นเมืองกลุ่มภาคอีสานและภาคกลางยังจำแนกได้ไม่ชัดเจนนัก แต่เมื่อพิจารณาค่า Cubic Clustering Criterion (CCC) ใน **ภาพที่ 3** แสดงให้เห็นว่าจำนวนกลุ่มโคพื้นเมืองที่เหมาะสมที่สุดในประชากรที่ศึกษาครั้งนี้ควรเป็น 4 กลุ่ม (พิจารณาจากค่า CCC ที่ต่ำสุด) ข้อได้เปรียบของการวิเคราะห์การจัดกลุ่มพันธุกรรมด้วยค่า CCC ได้แก่ เป็นการวิเคราะห์การจัดกลุ่มจากระยะห่างทางพันธุกรรมของโครายตัวโดยไม่มีการอ้างอิงกลุ่มพันธุ์ล่วงหน้า ในขณะที่การวิเคราะห์ phylogenetic จำเป็นต้องทราบว่าจะแต่ละตัวอยู่กลุ่มพันธุ์ใดก่อนล่วงหน้าซึ่งอาจมีความอคติ (bias) เนื่องจากการจัดกลุ่มผิดตั้งแต่เริ่มแรก การศึกษาครั้งนี้กล่าวได้ว่าโคพื้นเมืองไทยมีพันธุกรรมที่แตกต่างกันเพียงพอในการจำแนกออกเป็น 4 กลุ่ม ดังนั้นปัจจุบันการจำแนกพันธุกรรมออกเป็น กลุ่มโคภาคเหนือ โคภาคกลาง โคอีสาน และโคจากภาคใต้ นั้นน่าจะมีความเหมาะสมแล้ว โดยการจำแนกเป็นกลุ่มย่อยมากขึ้น เช่น กลุ่มโคอีสานตอนบน/ตอนล่าง หรือโคภาคใต้ตอนบน/ตอนล่าง อาจยังไม่จำเป็น เนื่องจากระยะห่างทางพันธุกรรมของโครายตัวยังไม่แตกต่างอย่างชัดเจนนัก



ภาพที่ 3 กราฟความสัมพันธ์ของค่า cubic clustering criterion (CCC) กับจำนวนกลุ่มจำแนกที่คาดคะเน

4. การวิเคราะห์ mitochondria DNA บริเวณ D-Loop

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของบริเวณ D-loop ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของโคพื้นเมืองจำนวน 73 ตัวอย่างร่วมกับโคพันธุ์อื่น ๆ เพื่อเป็นตัวอย่างอ้างอิง (โคบราห์มัน 5 ตัว, โคนมลูกผสม TMZ 2 ตัว, โคนมไฮลด์สไตร์พันธุ์แท้ 6 ตัว) รวม 86 ตัว (**ภาพที่ 4**) พบว่าโคพื้นเมืองสามารถแยกกลุ่มจากโคนมไฮลด์ส (HF), โคบราห์มัน (BR) และ โคลูกผสม (TMZ) ได้อย่างชัดเจน และพบว่าโคพื้นเมืองไทยส่วนใหญ่มีพันธุกรรมของไมโทคอนเดรียแตกต่างกันตามแหล่งที่อยู่โดยเฉพาะกลุ่มโคพื้นเมืองภาคใต้ (S) และกลุ่มโคภาคเหนือ (N) ที่สามารถจำแนกออกจากโคพื้นเมืองกลุ่มอื่นได้อย่างชัดเจน ในขณะที่กลุ่มโคภาคอีสาน (NE2) และภาคกลาง (C) นั้นยังไม่สามารถจำแนกพันธุกรรมออกจากกันได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามการศึกษานี้พบว่าโคภาคอีสานในกลุ่มชายแดนที่มาจากจังหวัดอุบล (NE1) นั้นมีความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน D-Loop โดยสามารถจำแนกออกจากกลุ่ม NE2 และ C ได้ค่อนข้างชัดเจน ซึ่งผลที่ได้ยังคงสอดคล้องกับพันธุกรรมในส่วนของไมโครแซทเทลไลท์ที่พบว่าโคภาคอีสานสองกลุ่มนี้มีพันธุกรรมจำแนกออกจากกันได้ จึงเป็นไปได้ว่าโคภาคอีสานสองกลุ่มนี้มีที่มาของพันธุกรรมเริ่มต้นที่ต่างกัน



ภาพที่ 4 การวิเคราะห์ phylogenetic tree จากค่าความเหมือนทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยในระดับรายตัวด้วยข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D-loop เมื่อ NE1 = โคพื้นเมืองภาคอีสาน (อุบล), NE2 = โคพื้นเมืองภาคอีสาน (ขอนแก่น), N = โคพื้นเมืองภาคเหนือ, C = โคพื้นเมืองภาคกลาง, S = โคพื้นเมืองภาคใต้, HF = โคนมโฮลส์ไตน์ฟรีเซียน, BR = โคเนื้อบราห์มัน, TMZ = โคลูกผสมโฮลส์ไตน์ (Thai Milking Zebu), REF1 = โคชาวลำพูน, REF2 = *Bos indicus*, และ REF3 = *Bos taurus* (Holstein Friesian) และ REF3 ได้จาก GENBANK (accession number AF492437 และ AF492432 ตามลำดับ)

5. การวิเคราะห์ genetic sub-division

เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรม (genetic structure) ระหว่างโคพื้นเมือง 4 กลุ่ม ด้วยวิธีการของ Weir and Cockerham (1984) แสดงในตารางที่ 5 พบว่าพันธุกรรมรายตัวของโคพื้นเมืองไทยภายในแต่ละกลุ่มมี microsatellite genotype ในรูปของ homozygous ค่อนข้างสูงโดยมีค่า F_{IS} เท่ากับ 0.613 ในขณะที่ F_{ST} มีค่า 0.048 แสดงให้เห็นว่าความผันแปรของพันธุกรรมโคพื้นเมืองที่เกิดขึ้นเป็นผลเนื่องมาจากความแตกต่างระหว่างกลุ่มพันธุ์ 4.8% ซึ่งจัดอยู่ในระดับปานกลาง (0.05-0.15) การศึกษาครั้งนี้พบว่าค่า $1-Q_{INTRA}$ มีค่าปานกลาง (0.322) แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างของสภาพอัลลีลของ microsatellite ภายในโคตัวเดียวกันไม่แตกต่างกันนัก ในขณะที่ค่า $1-Q_{INTER}$ ที่สูง (0.836) แสดงให้เห็นว่าสภาพอัลลีลระหว่างตำแหน่งของโคแต่ละตัวมีความแตกต่างกันสูง กล่าวได้ว่ามีความหลากหลายของพันธุกรรมระหว่างโคแต่ละตัวสูง ดังนั้นแสดงให้เห็นว่าสภาพ homozygous ของโคแต่ละตัวไม่น่าจะเป็นผลมาจากความสัมพันธ์ทางสายเลือด ตัวสถิติ F_{ST} แสดงให้เห็นว่าโคพื้นเมืองทั้ง 4 กลุ่มยังมีพันธุกรรมความคล้ายคลึงกันในด้านความเป็นสัตว์พื้นเมือง ความแตกต่างระหว่างกลุ่มพันธุ์ที่พบยังไม่เพียงพอถึงระดับแยกเป็นต่างชนิดพันธุ์ (species หรือ subspecies) กัน แต่ความหลากหลายที่สูงระหว่างโคแต่ละตัวแสดงให้เห็นว่าโคพื้นเมืองไทยเป็นสัตว์ประจำถิ่นที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ควรแก่การอนุรักษ์และการศึกษาอย่างจริงจัง

ตารางที่ 5 การวิเคราะห์ค่า F_{IS} , F_{ST} , F_{IT} , ค่า gene diversity ภายในโคแต่ละตัว ($1-Q_{INTRA}$) และค่า gene diversity ระหว่างโคแต่ละตัว ($1-Q_{INTER}$) ภายในกลุ่มพันธุ์จากข้อมูล microsatellite ในโคพื้นเมืองไทย

NAME	F_{IS}	F_{ST}	$1-Q_{INTRA}$	$1-Q_{INTER}$
ETH152	0.734	0.006	0.227	0.852
ETH225	0.562	0.026	0.375	0.856
HEL1	0.787	0.060	0.173	0.814
HRH1	0.446	0.023	0.490	0.886
ILSTS001	0.661	0.034	0.279	0.824
ILSTS005	0.224	0.049	0.663	0.855
ILSTS014	0.509	0.029	0.416	0.847
OCAM	0.801	0.070	0.155	0.777
BM2113	0.536	0.025	0.400	0.862
BOLADRB2	0.975	0.144	0.019	0.764
ETH131	0.494	0.074	0.430	0.850
HEL5	0.761	0.116	0.188	0.786
RBP3	0.797	0.060	0.169	0.830
TGLA116	0.986	0.053	0.011	0.770
BM203	0.067	0.005	0.853	0.914
HUJII77	0.824	-0.003	0.160	0.906
TGLA153	0.483	0.071	0.416	0.805
IGF1	0.701	0.072	0.253	0.845
CSSM065	0.571	0.041	0.345	0.805
UWCA	0.523	0.009	0.418	0.875
AVG	0.613	0.048	0.322	0.836

6. การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเครื่องหมายเพื่อบ่งชี้โคพื้นเมือง

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการปรากฏแต่ละอัลลีลของไมโครแซทเทลไลต์กับการแสดงออกของโคแต่ละกลุ่ม ด้วยวิธี logistic regression แสดงใน ตารางที่ 6 การศึกษาครั้งนี้พบอัลลีลที่สามารถใช้ดีเอ็นเอบ่งชี้โคพื้นเมืองในแต่ละกลุ่มได้ โดยให้ความน่าจะเป็นในการทำนายกลุ่มได้ถูกต้องในระดับต่างกัน การศึกษาครั้งนี้พบว่า มี microsatellite จำนวน 5 ตำแหน่งที่มีความเกี่ยวข้องกับการจำแนกโคพื้นเมือง ได้แก่ HEL1, ILSTS001, BOLADRB2, ETH131 และ ETH225 โดยอัลลีลที่สัมพันธ์กับโคกลุ่มต่างๆ โดยพบอัลลีลจำเพาะที่มีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) สามารถใช้บ่งชี้การเป็นโคพื้นเมืองภาคเหนือ 3 อัลลีล ได้แก่ HEL1.A1 (100bp), HEL1.A3 (112 bp) และ ILSTS001.A3 (90bp), พบอัลลีลที่ใช้บ่งชี้การเป็นโคภาคกลาง 2 อัลลีล ได้แก่ BOLADRB2.A5 (154bp) และ ETH131.A6 (158bp), พบอัลลีลที่ใช้บ่งชี้การเป็นโคสายอีสาน 2 อัลลีล ได้แก่ BOLADRB2.A1 (130bp) และ ILSTS001.A1 (78bp), และพบอัลลีลที่ใช้บ่งชี้การเป็นโคภาคใต้ 2 อัลลีล ได้แก่ ETH225.A8 (191bp) และ ETH131.A7 (164bp) โดยให้ความแม่นยำหรือสัดส่วนที่ทำนายถูกต้อง (%concordance) แล้ว การใช้ microsatellite allele เป็นเครื่องหมายในการบ่งชี้การเป็นโคพื้นเมืองกลุ่มภาคเหนือ, ภาคกลาง ภาคอีสาน และภาคใต้ให้ความแม่นยำในการทำนายถูกต้องเท่ากับ 74.90%, 73.40%, 31.40% และ 54.80% พบอัลลีลที่ให้ค่า odd ratio สูงในทุกกลุ่ม แสดงให้เห็นระดับ (degree) และความจำเพาะที่จะพบอัลลีลนั้นในโคแต่ละกลุ่ม โดยพบว่าอัลลีลที่มีความจำเพาะค่อนข้างสูงในโคภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคอีสาน และภาคใต้ ได้แก่ HEL1.A1, BOLADRB2.A5, BOLADRB2.A1 และ ETH225.A8 ตามลำดับ

ตารางที่ 6 การวิเคราะห์ microsatellite marker เพื่อบ่งชี้โคพื้นเมืองสายพันธุ์ต่างๆ ด้วย logistic regression

Breed	Estimates	SE	Pr>Chi-square	Odds
NORTH				
INTERCEPT	-3.19	0.58	0.0001	.
HEL1.A1	3.68	1.05	0.0004	39.67
HEL1.A3	2.09	0.64	0.0010	8.10
ILSTS001.A3	1.76	0.63	0.0053	5.79
%Concordance ^{1/}	74.90%			
Correlation (c) ^{2/}	0.82			
CENTRAL				
INTERCEPT	-3.14	0.56	0.0001	.
BOLADRB2.A5	2.64	0.64	0.0001	14.05
ETH131.A6	1.97	0.68	0.0038	7.17
%Concordance	73.40%			
Correlation (c)	0.83			
ESARN				
INTERCEPT	-0.88	0.23	0.0001	.
ILSTS001.A1	2.26	0.82	0.0059	9.63
BOLADRB2.A1	2.49	1.12	0.0262	12.04
%Concordance	31.40%			
Correlation (c)	0.64			
SOUTH				
INTERCEPT	-1.73	0.31	0.0001	.
ETH225.A8	2.75	0.87	0.0015	15.66
ETH131.A7	1.56	0.54	0.0038	4.77
%Concordance	54.80%			
Correlation (c)	0.74			

1/ ร้อยละกลุ่มโคที่ทำนายถูกต้องจากความน่าจะเป็นที่ได้จากสมการ

2/ ค่าสหสัมพันธ์แบบ contingency (c) แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าสังเกตกลุ่มโคที่ทำนายได้ความน่าจะเป็นที่ได้จากสมการกับค่าสังเกตจริง

ผลการศึกษาความหลากหลายของโคพื้นเมืองไทย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ สายภาคเหนือ, สายภาคกลาง, สายภาคอีสาน, และสายภาคใต้ รวม 108 ตัวอย่างด้วยเทคนิค microsatellite จำนวน 20 ตำแหน่ง รวม 193 อัลลีล พบว่า ขนาด (size) และจำนวนอัลลีล (allele number) ของ microsatellite ที่วิเคราะห์ในโคพื้นเมืองไทยมีความหลากหลายกว่าที่ได้รายงานไว้ในโคพันธุ์ต่างประเทศอื่นๆ ในทุกตำแหน่ง โดยโคแต่ละกลุ่มมีการกระจายของความถี่อัลลีลและจีโนไทป์ในแต่ละตำแหน่งค่อนข้างแตกต่างกัน ค่า heterozygosity ที่วิเคราะห์ได้แสดงให้เห็นว่าพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยในแต่ละพื้นที่มีความหลากหลายแตกต่างกัน การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแม้โคพื้นเมืองในแต่ละกลุ่มมีความหลากหลายในด้านของรูปแบบขนาดของอัลลีล แต่อัลลีลเหล่านั้นส่วนใหญ่จะอยู่ในสภาพ homozygous โดยมีการกระจายของจีโนไทป์ในประชากรไม่สมดุลหรือไม่เป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg ทั้งที่เป็นประชากรที่ไม่มีการคัดเลือก (non-selection population) และโคพื้นเมืองที่มีพันธุกรรมอยู่ในสภาพ homozygous สูงอาจส่งผลให้เกิดการการสูญหายของยีน (genetic lost) ได้ง่ายในอนาคต หากเกิดเหตุการณ์ให้ประชากรโคเหล่านั้นต้องลดลงอย่างรวดเร็ว

การจัดกลุ่มโคพื้นเมืองตามลักษณะทางพันธุกรรมด้วย phylogenetic dendrogram จากข้อมูล microsatellite พบว่า โคพื้นเมืองภาคใต้มีพันธุกรรมแตกต่างจากโคพื้นเมืองกลุ่มอื่นๆ มากที่สุด ในขณะที่กลุ่มโคภาคกลางและกลุ่มโคภาคอีสานบางส่วนไม่สามารถจำแนกออกจากกันได้ และการจัดกลุ่มโคพื้นเมืองตามลักษณะทางพันธุกรรมด้วย phylogenetic dendrogram จากข้อมูล ลำดับเบสบริเวณ D-loop ของ mitochondria พบว่าโคพื้นเมืองไทยส่วนใหญ่มีพันธุกรรมของไมโทคอนเดรียแตกต่างกันตามแหล่งที่อยู่ โดยเฉพาะกลุ่มโคพื้นเมืองภาคใต้และกลุ่มโคภาคเหนือที่สามารถจำแนกออกจากโคพื้นเมืองกลุ่ม ในขณะที่ยังไม่สามารถจำแนกพันธุกรรมออกจากกันได้อย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูล microsatellite อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ต่อเนื่องด้วยเทคนิคทาง clustering โดยการทำ CCC-plot พบว่าจำนวนกลุ่มโคพื้นเมืองไทยมีพันธุกรรมที่แตกต่างกันเพียงพอในการจำแนกออกเป็นกลุ่มได้โดยจำนวนกลุ่มที่เหมาะสมควรเป็น 4 กลุ่ม

เมื่อวิเคราะห์โครงสร้างทางพันธุกรรม (genetic structure) ระหว่างโคพื้นเมือง 4 กลุ่ม พบว่าความผันแปรของพันธุกรรมโคพื้นเมืองที่เกิดขึ้นเป็นผลเนื่องจากความแตกต่างระหว่างกลุ่มพันธุ์ 4.8% (พิจารณาจากค่า F_{ST}) ซึ่งใกล้เคียงในระดับปานกลางแต่ยังไม่แตกต่างถึงระดับที่จำแนกเป็นต่างชนิดพันธุ์กันได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายังมีพันธุกรรมของความเป็นโคพื้นเมืองร่วมกันอยู่ การวิเคราะห์ค่า gene diversity แสดงให้เห็นว่า แสดงให้เห็นว่ารูปแบบพันธุกรรมของ microsatellite ภายในโคแต่ละตัวนั้นมีลักษณะคล้ายกันในทุกตำแหน่ง (ค่า Q_{INTRA} ที่ต่ำ) และส่วนใหญ่อยู่ในรูป homozygous (ค่า F_{IS} ที่สูง) และเนื่องจากความหลากหลายของพันธุกรรมระหว่างโคที่ค่อนข้างสูง (ค่า Q_{INTER} ที่สูง) จึงแสดงให้เห็นว่าสภาพ homozygous genotype ของโคแต่ละตัวไม่ได้เกิดจากเลือดชิดหรือความสัมพันธ์ทางสายเลือด แต่น่าจะเป็นสภาพของการเป็นสายพันธุ์แท้ ดังนั้นโคพื้นเมืองไทยจึงเป็นสัตว์ประจำถิ่นที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ควรแก่การอนุรักษ์และการศึกษาอย่างจริงจังต่อไป

การศึกษานี้พบอัลลีลที่สามารถใช้ดีเอ็นเอบ่งชี้โคพื้นเมืองในแต่ละกลุ่มได้โดยให้ความน่าจะเป็นในการทำนายกลุ่มได้ถูกต้องในระดับต่างๆ กัน โดยพบว่ามี microsatellites จำนวน 5 ตำแหน่งที่มีความเกี่ยวข้องกับการจำแนกโคพื้นเมือง ได้แก่ HEL1, ILSTS001, BOLADRB2, ETH131 และ ETH225 โดยพบว่าใช้ในการทำนายกลุ่มโคภาคเหนือและภาคกลางได้

แม่นยำมากกว่า 70% และพบว่าอัลลีล HEL1.A1, BOLADRB2.A5, BOLADRB2.A1 และ ETH255.A8 มีความจำเพาะต่อการเป็นโคพื้นเมืองสายภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคอีสาน และภาคใต้ตามลำดับ

ข้อจำกัดประการสำคัญของการศึกษาค้างนี้ ได้แก่ การที่ไม่สามารถใช้จำนวน microsatellites ได้ถึง 30 ตำแหน่งตามที่ ISAG/FAO (2004) แนะนำ ซึ่งอาจนำไปสู่ข้อสงสัยทางวิชาการได้ว่าผลสรุปจากงานวิจัยนี้ได้มาตรฐานของ ISAG/FAO หรือไม่ อย่างไรก็ตามมีหลายรายงานวิจัยที่ใช้จำนวน microsatellites ที่ต่ำกว่า 30 ตำแหน่งซึ่งเป็นที่ยอมรับและมีการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารทางวิชาการทั่วไป และจากการโครงการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมสัตว์ร่วม 9 ประเทศในกลุ่มยุโรป (N-EURO-CAD) ได้เลือกใช้เพียง 20 ตำแหน่ง ซึ่งเป็นจำนวนเดียวกับการศึกษาในค้างนี้ ข้อจำกัดอีกประการหนึ่งของการศึกษาค้างนี้ ได้แก่ จำนวนตัวอย่างโคพื้นเมืองที่ถูกจำกัดเพียงกลุ่มละ 20-25 ตัว ทำให้มีโอกาสในการตรวจสอบพันธุกรรมได้ไม่ครบสมบูรณ์โดยเฉพาะ microsatellite ที่มีความถี่อัลลีลต่ำๆ ซึ่งหากมีการศึกษาเพิ่มเติมตัวอย่างอย่างต่อเนื่องจะช่วยให้ข้อสรุปมีความถูกต้องแม่นยำและสามารถนำไปใช้ในอนาคตได้อย่างมีประสิทธิภาพ

การศึกษาคความหลากหลายของโคพื้นเมือง 4 สายพันธุ์ค้างนี้ มีข้อเด่นที่แตกต่างจากการศึกษาที่ผ่านมาในประเทศไทยหลายประการ เช่น การศึกษาที่ผ่านมาส่วนใหญ่จะใช้โคจากฝูงเก็บรักษาพันธุ์ในหน่วยงานราชการหรือพื้นที่อนุรักษ์ ในขณะที่ตัวอย่างโคที่ใช้ในการศึกษาค้างนี้เป็นกลุ่มโคภายใต้โครงการการศึกษาผลผลิตและระบบการผลิตโคพื้นเมืองของเกษตรกรโดยการสนับสนุนจากกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ซึ่งเป็นโคพื้นเมืองที่ได้จากเกษตรกรที่อยู่ในพื้นที่จริง ดังนั้นจึงเป็นการศึกษาพันธุกรรมของโคพื้นเมืองจากท้องถิ่นต่างๆของประเทศไทยอย่างแท้จริง นอกจากนี้ ผลจากการข้อมูลทางพันธุศาสตร์โมเลกุลและพันธุศาสตร์สถิติช่วยให้ข้อสรุปด้านการจัดกลุ่มพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยอย่างชัดเจนว่าควรจำแนกเป็น 4 กลุ่ม และข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยที่มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มยังแสดงให้เห็นความสำคัญของทรัพยากรทางพันธุกรรม (genetic resources) และควรค่าแก่การอนุรักษ์และศึกษาการใช้ประโยชน์จากพันธุกรรมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Alberro, M. 1983. The indigenous cattle of Mozambique. *World animal review*. 48: 12-17.
- Ashwell, M.S., Y. Da, C.P. Van Tassell, P.M. VanRaden, R.H. Miller, and C.E. Rexroad. 1998. Detection of putative loci affecting milk production and composition, health, and types traits in a United States Holstein population. *J. Dairy Sci.* 81:3309-3314.
- Burriel, I.M., E.G. Mura, and P.Zaragoza. 1999. Genetic diversity analysis of six Spanish native cattle breeds using microsatellite. *Anim. Genet.* 30:177-182.
- FAO/ISAG. 1998. Secondary guidelines for development of national farm animal genetic resources management plans. FAO.
- Kemenes, P.A., L.C.A. Regitano, A.J.M. Rosa, I.U. Packer, A.G. Razook, L.A. Figueiredo, N.A. Silva, M.A.L. Etchegaray and L.L. Continho. 1999. -casein, -lacto globulin and growth hormone allele genetic distance in Nelore, Gyr, Guzera, Caracu, Charolais, Canchim and Santa Gertrudis cattle. *Genet. Mol. Biol.* 22: 539-541.
- Kotze, A., M. Harum, F. Otto and F.H. Van der Bank. 2000. Genetic relationships between three indigenous cattle breeds in Mozambique. *South African Journal of Animal Science*. 30: 92-97.
- Kuhn, C.H., G. Greyer, R. Weikard, T. Goldammer, and M. Schwerin. 1999. Detection of QTL for milk production traits in cattle by application of specifically developed marker map of BTA6. *Anim. Genet.* 30:333-340.
- MacHugh, D.E., M.D. Shriver, R.T., Loftus, P. Cunningham, and D. G. Bradley. 1997. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of Taurine and Zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics* 146: 1071-1086.
- Machugh, D.E., R.T. Loftus, D.G. Bradley, P.M. Sharp and P. Cunningham. 1994. Microsatellite DNA variation within and among European cattle breeds. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 256: 25-31.
- Mannen, H., S. Tsuji., R.T. Loftus, and D.G. Bradley. 1998. Mitochondrial DNA variation and evolution of Japanese black cattle (*Bos taurus*). *Genetics* 150:1169-1175.
- Manwell, C. and C. M. A Baker. 1980. Chemical classification of cattle. 2. Phylogenetic tree and specific status of the Zebu. *Anim. Blood Grps. Biochem. Genet.* 11: 151-162.
- Schellander, K. and K. Wimmers. 2002. The integration of molecular genetic in to farm animal breeding programs. *Proceeding of the 3 rd animal science conference quality assurance in animal production: from farm to table Chiang Mai university, Chiang Mai, Thailand.*
- Simoson, 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. *Mole. 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.

กรมปศุสัตว์. 2542. การอนุรักษ์และพัฒนาสัตว์พื้นเมืองของกรมปศุสัตว์. โครงการวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพด้านการปศุสัตว์ 2542-2546. กรมปศุสัตว์. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

กัลยา บุญญานวัตร, สมมาตร สุวรรณมาโจ และ วินิจ คำสังข์. 2548. ความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนในโคพื้นเมือง 4 สายพันธุ์. รายงานผลงานวิจัยการปศุสัตว์ สาขาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์และการจัดการฟาร์ม ประจำปี 2548. กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

กิตติ อรรถชาติ, มนต์ชัย ดวงจินดา, เทวินทร์ วงษ์พระดับ, พรชัย ล้อวิสัย และสมมาตร สุวรรณมาโจ. 2547.

ค่าประมาณพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมของลักษณะการเจริญเติบโตในโคพื้นเมืองไทย. การประชุมสัมมนาวิชาการเกษตรแห่งชาติ ประจำปี 2547 สาขาสัตวศาสตร์/สัตวบาล. มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 128-135
เกรียงเดช ลำแดง. 2531. ผลของการเสริมอาหารขึ้นต่อการเจริญเติบโตและซากโคขุนโคพื้นเมืองไทยและพันธุ์อเมริกันบราห์มันที่เลี้ยงในทุ่งหญ้าระหว่างฤดูแล้ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาสัตวศาสตร์. บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เจริญ จันทลักษณ์, ประเสริฐ เจริญพร และบุญเหลือ เร่งศิริกุล. 2515. การผลิตโคเนื้อ. ภาควิชาสัตวบาล, คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ปรีชา ประเทพา. 2543. พันธุศาสตร์ยุคใหม่ เทคโนโลยีเอ็นเอ เพื่อการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรม. อภิชาติการพิมพ์, มหาสารคาม.

มนต์ชัย ดวงจินดา, ไชยวรรณ วัฒนจันทร์ และเวชสิทธิ์ ไทบุราณ. 2537. การศึกษาสมรรถภาพของโคพื้นเมืองในสภาพการเลี้ยงแบบปล่อยแปลงหญ้า. ภาควิชาสัตวศาสตร์, คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สมมาตร สุวรรณมาโจ, วิทวัส เวชบุษกร และปิยศักดิ์ สุวรรณ. 2537. การปรับปรุงคุณภาพโคพื้นเมือง 2.

อิทธิพลของปัจจัยอื่นที่ไม่ใช่พันธุกรรมที่มีผลต่อสมรรถภาพการเจริญเติบโตระยะก่อนหย่านมของโคพื้นเมือง. งานค้นคว้าและวิจัยการผลิตสัตว์ ประจำปี 2537. สาขาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์และการจัดการฟาร์ม. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สุวัฒน์ รัตนธนาชาติ. 2537. ความสำคัญของน้ำนมแม่ที่มีต่อสมรรถนะก่อนหย่านมของโคขาวลำพูน. วารสารเกษตร (มหาวิทยาลัยเชียงใหม่). 10: (2) 129-135.

ภาคผนวก ก

สรุปการทำงานโครงการ “การศึกษาความหลากหลายและการจำแนกกลุ่มพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทย จากข้อมูลไมโครแซทเทลไลท์และไมโทคอนเดรีย”

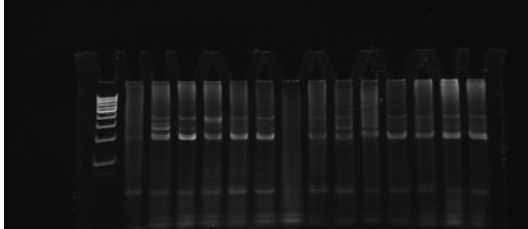
เดือน / ปี	วันที่	กิจกรรม
กันยายน 2549	13	- ได้รับสัญญาอนุญาตทุนอุดหนุนการวิจัย “สัญญาเลขที่ RDG4920055” โดยเริ่มสัญญาวันที่ 15 กันยายน 2549 – 14 มีนาคม 2550
	28	- ประชุมครั้งที่ 1/2549 - เปิดบัญชีออมทรัพย์ของธนาคารกรุงศรีอยุธยาชื่อบัญชีว่า “นายมนต์ชัย ดวงจินดา – RDG4920055” ซึ่งระบุผู้มีอำนาจสั่งจ่ายอย่างน้อย 2 ใน 3 และหนึ่งในนั้นจะต้องเป็นนายมนต์ชัย ดวงจินดา โดยมีรายชื่อผู้มีอำนาจเบิกจ่ายดังนี้ 1.นายมนต์ชัย ดวงจินดา 2. นางยุพิน ผาสุข และ 3.นายเทวินทร์ วงษ์พระลับเป็นเงิน 500 บาท
ตุลาคม 2549	1-7	- จัดเตรียมสิ่งอำนวยความสะดวกต่าง ๆ ที่จำเป็นต้องใช้ในการวิจัย
	2	- ดำเนินการส่งสัญญาอนุญาตทุนอุดหนุนการวิจัย “สัญญาเลขที่ RDG4920055” ให้รองคณบดีฝ่ายวิจัยคณะเกษตรศาสตร์ลงนาม
	5	- ดำเนินการส่งสัญญาอนุญาตทุนอุดหนุนการวิจัย “สัญญาเลขที่ RDG4920065” ให้รองอธิการบดีฝ่ายวิจัยลงนาม
	12	- ดำเนินการส่งสัญญาอนุญาตทุนอุดหนุนการวิจัย “สัญญาเลขที่ RDG4920065” คืนสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยเพื่อลงนามในส่วนผู้ให้ทุนและพยาน
พฤศจิกายน 2549	6	- ได้รับสัญญาอนุญาตทุนอุดหนุนการวิจัย “สัญญาเลขที่ RDG4920065” ที่ลงนามครบจำนวน 1 ฉบับ พร้อมทั้งเช็คทุนอุดหนุนโครงการงวดที่ 1 จำนวน 525,000 บาท - นำเช็คเข้าธนาคารกรุงศรีอยุธยา
	1	- เงินเข้าจำนวน 485,111.40 โดนหักค่าโอนเข้า 485.6 บาท รวมกับเงินเปิดบัญชี 500 บาท รวมเป็นเงิน 485,614.40
	29	- ทำเรื่องขออนุมัติเบิกจ่ายค่าใช้จ่ายในการดำเนินโครงการจำนวน 2 รายการเป็นจำนวนเงิน 65,000 บาท ได้แก่ 1. ค่าตอบแทน 15,000 บาท (เดือนพฤศจิกายน) และ 2. ค่าวัสดุ 50,000 บาท (ค่า primer จำนวน 20 คู่)

ธันวาคม 2549	1	- รับตัวอย่างชิ้นเนื้อโคพื้นเมืองสายอีสาน (อุบลฯ) จำนวน 20 ตัวอย่าง
	3	- ทำเรื่องขออนุมัติเบิกจ่ายค่าชิ้นเนื้อ
	18	- ทำเรื่องขออนุมัติเบิกจ่ายค่าใช้จ่ายในการดำเนินโครงการจำนวน 2 รายการเป็นจำนวนเงิน 35,000 บาท ได้แก่ 1. ค่าตอบแทน 15,000 บาท (เดือนธันวาคม) และ 2. ค่าวัสดุ 20,000 บาท (ค่าเอ็นไซม์ taq)
มกราคม 2550	20	- รับตัวอย่างชิ้นเนื้อโคพื้นเมืองสายอีสานใต้ (ขอนแก่น) จำนวน 20 ตัวอย่าง
	30	- ทำเรื่องขออนุมัติเบิกจ่ายค่าใช้จ่ายในการดำเนินโครงการจำนวน 1 รายการเป็นจำนวนเงิน 15,000 บาท ได้แก่ 1. ค่าตอบแทน 15,000 บาท (เดือนมกราคม)
กุมภาพันธ์ 2550	6	- ทำเรื่องขออนุมัติเบิกจ่ายค่าใช้จ่ายในการดำเนินโครงการจำนวน 2 รายการเป็นจำนวนเงิน 23,000 บาท ได้แก่ 1. ค่าใช้สอย 4,700 บาท (ไปราชการร่วมประชุมโครงการโคพื้นเมือง สกว.) และ 2. ค่าวัสดุสารเคมี 18,300 บาท (ค่าตัวอย่างชิ้นเนื้อโคพื้นเมืองสายอีสานใต้กับสารเคมีและวัสดุอื่นๆ)
	18	- รับตัวอย่างชิ้นเนื้อโคพื้นเมืองสายภาคเหนือจำนวน 20 ตัวอย่าง
	23	- ทำเรื่องขออนุมัติเบิกจ่ายค่าใช้จ่ายในการดำเนินโครงการ จำนวน 3 รายการเป็นจำนวนเงิน 21,000 บาท ได้แก่ 1. ค่าตอบแทนประจำเดือนกุมภาพันธ์ 15,000 บาท 2. ค่าใช้สอย 1,600 บาท และ 3. ค่าวัสดุน้ำมันเชื้อเพลิง (ไปราชการ) 4,400 บาท
มีนาคม 2550	5	- รับตัวอย่างชิ้นเนื้อโคพื้นเมืองสายใต้จำนวน 28 ตัวอย่าง
	28	- ทำเรื่องขออนุมัติเบิกจ่ายค่าใช้จ่ายในการดำเนินโครงการ จำนวน 2 รายการเป็นจำนวนเงิน 140,700 บาท ได้แก่ 1. ค่าตอบแทนประจำเดือน 15,000 บาท และ 2. ค่าวัสดุ 125,700 บาท (ค่าอุปกรณ์พลาสติก, polyacrylamide gel, สีย้อม, ชุดวัสดุทำ PCR, เอ็นไซม์, ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอ)
เมษายน 2550		- วิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ
พฤษภาคม 2550		ส่งรายงานความก้าวหน้า 6 เดือน
มิถุนายน		- วิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ
กรกฎาคม		- วิเคราะห์ห่อหุ้มแซมส่วนข้อมูลส่วน microsatellite ที่ไม่สมบูรณ์
สิงหาคม-กันยายน		- วิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสของ mtDNA
ตุลาคม-ธันวาคม		- วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ
มกราคม-มีนาคม 51		- วิเคราะห์ห่อหุ้มแซมข้อมูลส่วนลำดับเบสของไมโทคอนเดรีย
เมษายน -พฤษภาคม 51		- เขียนรายงานฉบับสมบูรณ์

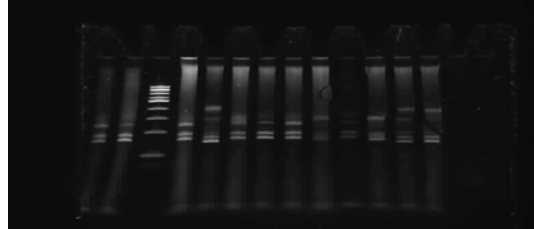
ภาคผนวก ข
ภาพตัวอย่างประกอบการทำงาน

1. ภาพตัวอย่างตัวอย่างผลของการเพิ่มขยายยีนในแต่ละคู่ microsatellite primer

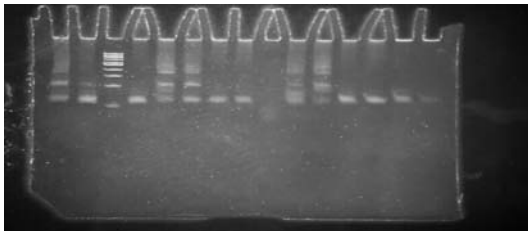
P1:ETH152



P2:ETH225



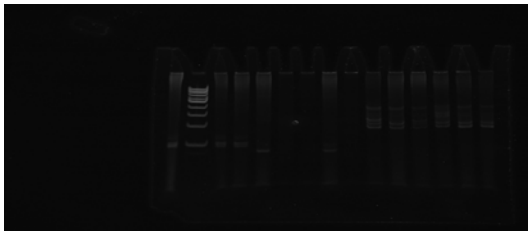
P3:HEL1



P4:HRH1



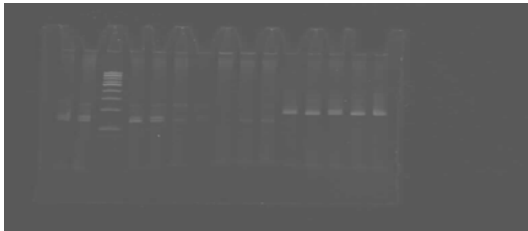
P5:ILSTS001



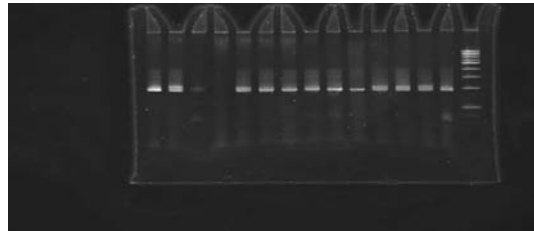
P6:ILSTS005



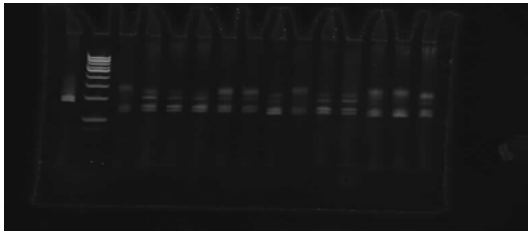
P7:ILSTS014



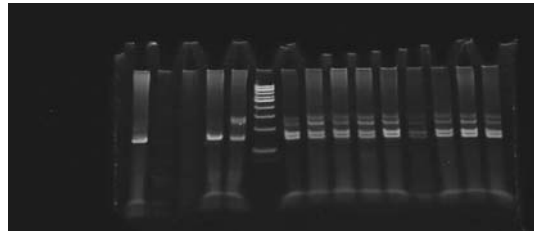
P8:OCAM



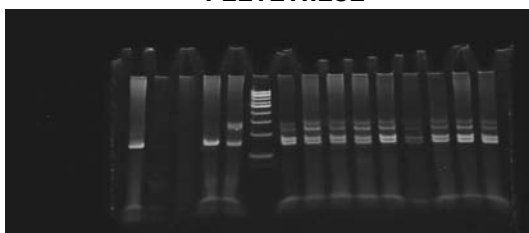
P9:BM2113



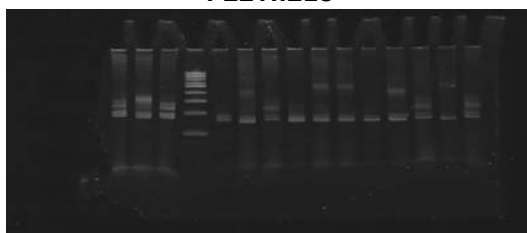
P10:BOLADRB2



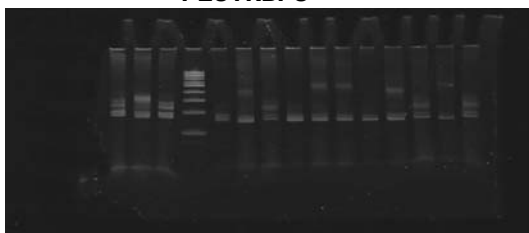
P11:ETH131



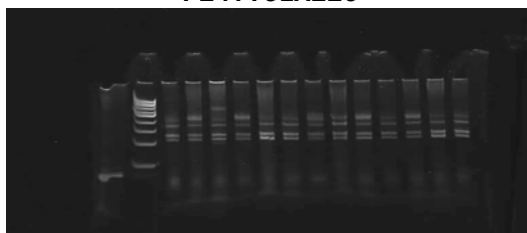
P12:HEL5



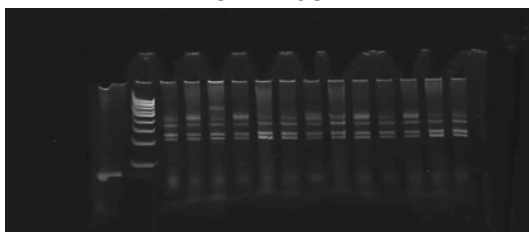
P13:RBP3



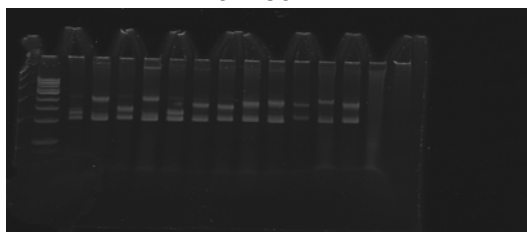
P14:TGLA116



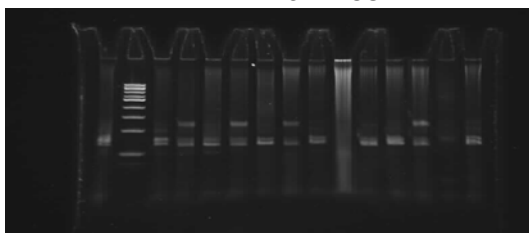
P15:BM203



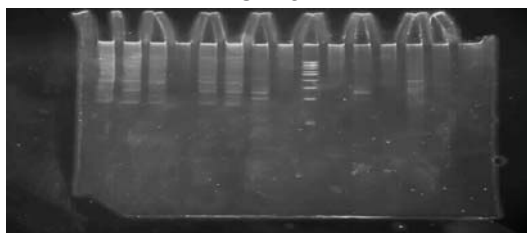
P16:HUJII77



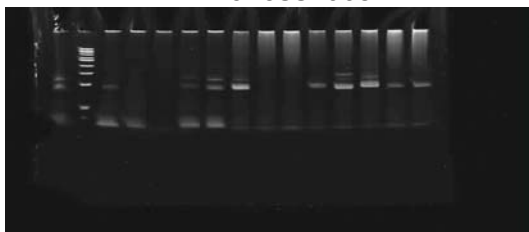
P17:TGLA153



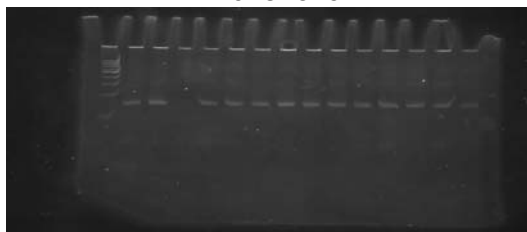
P18:IGF1



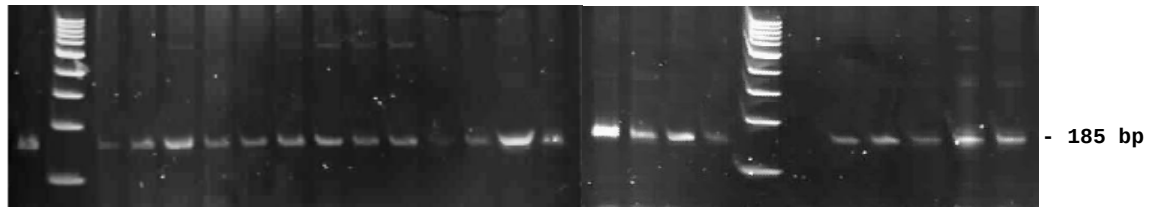
P19:CSSM065



P20:UWCA9



2. ภาพตัวอย่างตัวอย่างผลของการเพิ่มขยายยีนในบริเวณ D-loop ของ mitochondria DNA



3. ภาพตัวอย่างวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ microsatellites และ mitochondria DNA

เครื่อง Thermal cycler	ชุด electrophoresis
เครื่องวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ	เครื่องอ่านแถบดีเอ็นเอและวิเคราะห์ผลจากเจล

ตอบข้อคิดเห็นจากผู้ทรงคุณวุฒิ
โครงการ “การศึกษาความหลากหลายและการจำแนกกลุ่มพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยจากข้อมูลไมโครแซทเทลไลต์และไมโทคอนเดรีย”

ข้อเสนอแนะจากผู้ทรงคุณวุฒิ

1. ขอให้ตรวจสอบความถูกต้องของการเขียนรายงาน เช่น ในส่วนของบทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) และเนื้อหาภายในรายงาน เพื่อให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น โดยภาพประกอบควรเป็นภาพสี
 - ดำเนินการตรวจสอบและแก้ไขอีกครั้งตามคำแนะนำ ส่วนภาพประกอบบางภาพในรายงานได้จัดทำเป็นภาพสีตามคำแนะนำแล้ว
2. การเลือกใช้ DNA marker ไม่เป็นไปตามข้อแนะนำปัจจุบันของ ISAG 2004 ซึ่งจำนวน marker ที่แนะนำให้ใช้ในการศึกษาความหลากหลายพันธุกรรมในโคนั้นมีประมาณ 30 markers แต่ผู้วิจัยเลือกมาใช้เพียง 20 markers ดังนั้นอาจทำให้ผลการวิจัยไม่เป็นไปตามมาตรฐานที่ ISAG วางไว้
 - แม้ว่าปัจจุบัน ISAG และ CaDBase จะแนะนำให้ใช้ 30 marker แต่ขณะที่เสนอโครงการนี้ผู้วิจัยเลือกใช้จำนวน marker ต่ำสุดที่ยอมรับได้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในโคเพื่อประหยัดงบประมาณและค่าใช้จ่าย ซึ่งจากรายงานของ Barker (1994): A global protocol for determining genetic distances among domestic livestock breeds. In: Proceedings of the 5th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, Guelph and Ontario, Canada, vol. 21, pp. 501–508. เสนอขึ้นต่ำไว้ที่ 25 marker อย่างไรก็ตามผู้วิจัยพบว่าโครงการ “Analysis and Comparison of Genetic Diversity in Cattle Breeds of the Northern European Area (N-EURO-CAD)”. (<http://neurocad.lva.it>) ซึ่งเป็นโครงการร่วม 9 ประเทศในกลุ่มยุโรปตอนเหนือและอยู่ในความดูแลของ FAO ซึ่งศึกษาตัวอย่างประมาณ 1,200 ตัวจากโค 35 กลุ่มสายพันธุ์ได้เลือกใช้เพียง 20 marker ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงเห็นว่าจำนวน 20 marker จึงเป็นจำนวนขั้นต่ำที่ยอมรับได้ในทางวิชาการ แต่ถ้าต้องการให้ยอมรับถึงมาตรฐาน ISAG คงต้องใช้จำนวน 30 maker ตามที่ผู้ทรงคุณวุฒิแนะนำและเพิ่มค่าใช้จ่ายขึ้นตามลำดับ
3. ผลจากภาพแถบดีเอ็นเอในทุกตำแหน่งพบว่ามีความหลากหลายไม่สูง แต่เนื่องจากภาพที่แสดงไม่ใช่เป็นตัวแทนของโคในทุกท้องที่จึงทำให้เกิดข้อสงสัยว่าทำไมในแต่ละตำแหน่งของ primer ที่ใช้มีความหลากหลายมาก แต่เมื่อดูจากภาพไม่ปรากฏเป็นเช่นนั้น ขอให้อธิบายด้วย
 - ภาพแถบดีเอ็นเอมีความหลากหลายไม่สูง สอดคล้องกับค่า observed heterozygosity ที่มีค่าค่อนข้างต่ำโดยเฉพาะในโคพื้นเมืองในกลุ่มภาคกลางและภาคเหนือ แสดงให้เห็นว่า degree of heterozygosity ของโคพื้นเมืองที่ศึกษาครั้งนี้มีค่าต่ำ แต่ความหลากหลายของโคพื้นเมืองไทยเป็นความหลากหลายด้านจำนวน allele หรือจำนวนซ้ำ (repeat) ของ microsatellite โดยส่วนใหญ่อยู่ในสภาพ homozygous (อธิบายรายละเอียดเพิ่มเติมในหน้า 22-23 ของรายงาน)
4. ตำแหน่ง microsatellite เป็นแบบ single locus แต่การรายงานมีขนาดที่แตกต่างกันของแถบ 6-10 เบส ซึ่งผลดังกล่าวเป็นเพียง allele เดียว แต่อยู่ใน stagger band ที่อาจทำให้การอธิบายคลาดเคลื่อนได้ ขอให้อธิบายด้วย

- ผู้วิจัยคาดว่า stagger band ที่ผู้ประเมินอ้างถึงนั้นคือค่าเดียวกับ stutter band การศึกษาครั้งนี้ประเมินขนาดอัลลีลด้วยโปรแกรม GENETOOLS และทำการคัดกรอง (screen) แถบที่เป็น stutter band และ splitting band จาก electropherogram โดยตรวจสอบ peak height และ peak area ก่อนกำหนดเป็นอัลลีล ส่วนการจัดกลุ่ม (group) อัลลีลเป็นไปตามค่า boundary ของ software
 - ความคลาดเคลื่อนจากการนับอัลลีลตามขนาดดีเอ็นเอจากแผ่นเจลนับเป็นปัญหาสำคัญของการวิเคราะห์ข้อมูล microsatellite การใช้ electropherogram และ software ช่วยในการจัดกลุ่มอัลลีล ช่วยลดความอคติของผู้วิจัยในการใช้ความรู้สึก ซึ่งมีโอกาสทำให้เกิด false negative allele กล่าวคือมีอัลลีลหายไปทั้งที่มีแถบปรากฏ (เนื่องจากไปถูกจัดอยู่ในกลุ่มอัลลีลเดียวกัน) ในขณะที่การใช้วิธีการนับทุกอัลลีลที่มีขนาดแตกต่างกัน ก็มีโอกาสทำให้เกิด false positive allele กล่าวคือนับเป็นอัลลีลใหม่ในขณะที่อาจเป็นอัลลีลเดียวกัน และพบจำนวนอัลลีลมากเกินไปจริง ทั้งที่อัลลีลใหม่ที่พบนั้นอาจเป็นผลจากความคลาดเคลื่อนของการประเมินขนาดของอัลลีลที่มาจาก gel ต่างแผ่นกัน
5. ในส่วนสรุปและข้อเสนอแนะ ควรเสนอแนะประเด็นต่างๆที่เกี่ยวข้องกับผลงานวิจัยให้มากกว่านี้ เพื่อให้เห็นภาพรวมและประเด็นที่เป็นข้อดีของโครงการ รวมถึงข้อจำกัดในงานวิจัย เช่น จำนวนตัวอย่างมีจำนวนค่อนข้างน้อย (8-20 ตัวอย่าง) จึงควรคำนึงถึงความถูกต้องและแม่นยำก่อนที่จะนำไปศึกษาวิจัยต่อและการนำไปประยุกต์ใช้ในอนาคต
- ได้เขียนข้อเสนอแนะทั้งในส่วนข้อดีและข้อด้อยของโครงการเพิ่มเติมในฉบับแก้ไข