



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ
โคพื้นเมืองไทยในเขตภาคกลาง”

โดย

ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์ และคณะ

นำเสนอ

สำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.)

กรกฎาคม 2551

สัญญาเลขที่ RDG 5020004

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของ
โคพื้นเมืองไทยในเขตภาคกลาง”

คณะผู้จัดทำ

ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์

รศ.ดร.กัญญา ตันติวิสุทธิกุล

หน่วยงาน

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร สจล.

ภาควิชาครุศาสตร์เกษตร

คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สจล.

สนับสนุนงานโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

Executive Summary

หัวข้องานวิจัย: การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยใน เขตภาคกลาง

ความสำคัญของเรื่อง

โคพื้นเมืองเป็นพื้นฐานโคเนื้อที่สำคัญของประเทศไทย เพราะมีอยู่เป็นจำนวนมาก สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมและอาหารที่หาได้ในท้องถิ่นได้เป็นอย่างดี ระบบการเลี้ยงและการจัดการโคเนื้อพื้นเมืองของเกษตรกรในประเทศไทยมีความแตกต่างกันตามสภาพแวดล้อม ได้แก่ สภาพพื้นที่ ภูมิประเทศ ภูมิอากาศ และสภาพสังคมของแต่ละท้องถิ่น โคพื้นเมืองจัดอยู่ในเผ่า *Bos indicus* ซึ่งเป็นเผ่าเดียวกับโคอินเดีย ซึ่งเป็นโคที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมในประเทศไทย มีขนาดเล็ก ทนร้อน ทนต่อโรคและแมลง หากินเก่ง ให้ลูกดก สามารถใช้ประโยชน์จากอาหารหยาบได้ดี การเลี้ยงโคพื้นเมืองเป็นทางเลือกหนึ่งที่เกษตรกรรายย่อยนำมาเป็นอาชีพเสริมให้กับครอบครัวได้ (กองบำรุงพันธุ์สัตว์. ม.ป.ป.) แต่ปัจจุบันพบว่าโคพื้นเมืองมีจำนวนลดลง เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของระบบการเกษตรและการเพิ่มของจำนวนประชากรในประเทศเป็นสาเหตุทำให้จำนวนโคพื้นเมืองถึงแม้จะเพิ่มขึ้นแต่ก็ไม่เพียงพอต่อการบริโภค นอกจากนี้โคพื้นเมืองไทยมีแนวโน้มที่จะลดลงเนื่องจากมีความสามารถในการแข่งขันด้านการตลาดน้อยกว่าโคที่นำเข้าจากต่างประเทศเช่น โคบราห์มัน เกษตรกรนิยมผสมโคพื้นเมืองกับโคพันธุ์ต่างประเทศ จึงเป็นสาเหตุให้โคพื้นเมืองพันธุ์แท้ลดจำนวนลงเรื่อยๆ และการลดจำนวนลงของโคพื้นเมืองเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการสูญเสียแหล่งพันธุกรรมของโคพื้นเมือง (กัลยา บุญญานุวัตร และคณะ. 2548) ในประเทศไทยการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยยังมีอยู่น้อยมากและถ้าหากยังไม่มีการศึกษาถึงสภาพที่แท้จริงของความหลากหลายทางพันธุกรรมและส่งเสริมให้มีการอนุรักษ์โคพื้นเมืองอย่างจริงจังแล้ว เราอาจต้องสูญเสียแหล่งพันธุกรรมที่ดีไปโดยไม่สามารถนำกลับคืนมาได้

ในปัจจุบันการศึกษาคความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถทำได้ละเอียดถึงระดับดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถใช้เครื่องหมายพันธุกรรมได้หลายชนิด อีกทั้งในการแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของสัตว์เศรษฐกิจโดยการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพนั้น ต้องใช้เวลา และ ค่าใช้จ่ายเป็นจำนวนมาก และในบางครั้งยังอาจเกิดความคลาดเคลื่อนจากลักษณะที่แปรปรวนปัจจุบันเทคโนโลยีทางด้านดีเอ็นเอ จึงได้เข้ามามีบทบาทกับการศึกษาคความหลากหลายทางชีวภาพมากขึ้น ซึ่งมีความแม่นยำและรวดเร็วสูงจึงกลายเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจเช่น การใช้เครื่องหมาย “ไมโครแซทเทลไลท์” ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมใช้ในการศึกษาคความหลากหลายทางพันธุกรรมในโคอย่างแพร่หลาย (Visscher *et al.*, 2002) รวมทั้งการตรวจสอบข้อมูลลำดับเบสที่บริเวณ D-loop ของไมโทคอนเดรียลดี

เอ็นเอก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและใช้กันมากในสัตว์พื้นเมืองในหลายประเทศ (Tsuji *et al.*, 2003) ทำให้มีประโยชน์ในการใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามเพื่อศึกษาการถ่ายทอดลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจในสัตว์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการใช้ปรับปรุงพันธุ์สัตว์ เช่น การจำแนกชนิดสัตว์ และ การศึกษาวิวัฒนาการพันธุกรรมของสัตว์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาแถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ของโคพื้นเมืองภาคกลาง
2. เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรและระหว่างประชากรของโคพื้นเมืองภาคกลาง
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโคพื้นเมืองภาคกลางโดยใช้ข้อมูลไมโทคอนเดรีย

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

สุ่มตัวอย่างโคพื้นเมืองจากภาคกลาง ได้แก่ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี นครปฐม และราชบุรี ภายใต้โครงการการศึกษาผลผลิตและระบบการผลิตโคพื้นเมืองของเกษตรกรโดยการสนับสนุนจากกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) จำนวน 25 ตัว ทำการเก็บข้อมูลประจำตัวสัตว์ทั่วไป เช่น เบอร์สัตว์ เพศ สายพันธุ์ สี พื้นที่เก็บตัวอย่าง วัน/เดือน/ปีที่เก็บตัวอย่าง และเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อบริเวณสันนอกขนาด 2x2x2 ซม. หรือน้ำหนักประมาณ 20-50 กรัม บรรจุลงในขวดสารละลาย absolute ethanol

2. การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างเนื้อสัตว์ 50 มิลลิกรัมผสม TNEs buffer 500 ไมโครลิตร ย่อยด้วยเอนไซม์ proteinase K ที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 1.5 ชั่วโมง โดยเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลาย 5.3 M NaCl และ isopropanol ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 70% ethanol และละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 50 ไมโครลิตร นำไปวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. การเพิ่มจำนวนไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ

เพิ่มจำนวนไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอโดยเลือกใช้ไพรเมอร์ที่ FAO/ISAG (1998) เสนอแนะในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ จำนวน 20 ชุด โดยพยายามเลือกไพรเมอร์ให้มีการกระจายตัวทั่วทั้งจีโนม ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลต์ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์ (polymerase chain reaction) ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ 200 ng, 1xAmpliBufferA (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.01% TritonTM-x-100, Stabilizers), 5 mM dNTP, 3mM MgCl₂, 1U Taq

polymerase (Vivantis), 2.5 μ M forward primer, 2.5 μ M reverse primer และ น้ำกลั่น (sterilized distilled water) การทำปฏิกิริยาถูกใช้จะใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ กำหนดอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ เริ่มปฏิกิริยาถูกใช้ จำนวน 35 รอบ ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ที่ 48-56 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที และที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที สิ้นสุดปฏิกิริยาที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ

4. การวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอของไมโครแซทเทลไลต์และการบันทึกข้อมูล

ตรวจสอบแถบดีเอ็นเอและขนาดของชิ้นส่วนไมโครแซทเทลไลต์ที่ได้จากปฏิกิริยาถูกใช้ด้วย เครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิสด้วย 12 % polyacrylamide gel ผ่านสารละลาย 1 M TBE buffer เป็นเวลา 50 นาที ที่กระแสไฟฟ้า 80 โวลต์ ความจุไฟฟ้า 300 มิลลิแอมแปร์ เมื่อครบกำหนดเวลาย้อมแผ่นเจล polyacrylamide ด้วย ethidium bromide (10 mg/ml) นาน 10 นาที จากนั้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอผ่าน ได้เครื่อง UV trans-illuminator เปรียบเทียบชิ้นดีเอ็นเอที่ได้กับแถบดีเอ็นเอมาตรฐาน DNA ladder; ϕ XHinfI ถ่ายรูปการปรากฏของอัลลีลของโคแต่ละตัวจากแต่ละตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลต์ ด้วย เครื่องบันทึกอัตโนมัติ Gel Documentary System SYNGENE พร้อมทั้งบันทึกขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏและแปลงข้อมูลให้อยู่ในรูป binary data เมื่อ 0 และ 1 หมายถึง การไม่พบและพบอัลลีลนั้น ตามลำดับ

5. การเพิ่มจำนวนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop

เพิ่มจำนวนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ด้วยเทคนิคการเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ที่เสนอโดย Tsuji *et al.* (2004) ซึ่งลำดับเบสจาก 5' ไป 3' ของ forward primer เป็น ACATTAAATTATATGCCCCATGC และ reverse primer เป็น AGCTCGTGATCTAATGGTAAGGA ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ของโคพื้นเมืองแต่ละตัวด้วยเครื่อง DNA sequencer

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ไมโครแซทเทลไลต์

นำข้อมูลทางอนุพันธุศาสตร์ของโคที่ได้มาคำนวณความถี่ของอัลลีลต่างๆที่พบในแต่ละตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลต์และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี (The Hardy-Weinberg expected heterozygosity) หรือ Gene Diversity ตามวิธีของ Nei (1978) และ ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) ตามวิธีของ Nei (1972) โดยใช้โปรแกรม POPGEN V. 1.32 และ วิเคราะห์แผนภาพ phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor-Joining (Saitou and Nei, 1987) และ UPGMA (Sneath and Sokal, 1973)

2. การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

เปรียบเทียบลำดับเบสของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอที่ได้กับฐานข้อมูล GenBank (Multiple sequence alignment) ด้วยโปรแกรม ClustalW2 และวิเคราะห์ระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) ด้วยโปรแกรม DNADIST ผ่านทางโปรแกรม BioEdit วิเคราะห์ค่าความถี่ของแฮปโลไทป์ (Haplotype frequency) ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop และแผนภาพความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ด้วยโปรแกรม MEGA4.0 (Tamura *et al.*, 2007) โดยเปรียบเทียบกับ D-loop ของโคจากประเทศอื่นๆ ในเอเชียที่ปรากฏในฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ *B. taurus* จากเกาหลี (AF499261) และ *B. indicus* จากอินเดีย (AY972131, AY972136, AY972137, AY378136 และ AY378137), จีนตะวันตกเฉียงใต้ (EF417971, EF417977-EF417978 และ EF417986) จีนตอนใต้ (EF524185) ฟิลิปปินส์ (AB079325-AB079327), เนปาล (AB085921-AB085923), มองโกเลีย (AB117091-AB117092) และ ภูฏาน (AB268580-AB268581) โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของกระบือ (EF464437) เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม (outgroup)

ผลการวิจัยและวิจารณ์

1. การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์

ผลการวิจัยในส่วนนี้ ซึ่งใช้ไพรเมอร์ที่เสนอแนะโดย FAO/ISAG (1998) จำนวน 20 โลไซนั้น พบว่า มีเพียง 18 โลไซที่สามารถตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอได้ โดยโลไซ IGF1 และ ILST001 ไม่สามารถตรวจสอบได้ โดยจำนวนของอัลลีลในแต่ละโลคัสที่ศึกษา มีความผันแปรอยู่ระหว่าง 2-6 อัลลีล โลคัส ILSTS014, BOLADRB2, RBP3 และ CSSM065 มีจำนวนของอัลลีลน้อยที่สุด คือ 2 อัลลีล ส่วนโลคัส ETH225 และ UWCA9 มีมากที่สุด คือ 6 อัลลีล จำนวนของอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัสของประชากรโคกลุ่มตัวอย่างเท่ากับ 2.652 โดยโคจาก จ.ราชบุรี มีจำนวนของอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัสต่ำที่สุด คือ 2.055 และจาก จ.ประจวบคีรีขันธ์ มีจำนวนของอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัสสูงที่สุด คือ 3.000 ซึ่งเป็นจำนวนที่แตกต่างกันไม่มากนัก แสดงว่า โคพื้นเมืองไทยจากภาคกลางมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของกัลยา บุญญานุวัตร และคณะ (2548) ที่พบว่า โคลานหรือโคภาคกลาง มีจำนวนของอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัสเท่ากับ 3.20

การทดสอบการเข้าสู่สภาพสมดุลของยีนตามกฎของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg Equilibrium) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ เมื่อพิจารณาค่า Fis และ p-value พบว่าค่า Fis มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.2303 และมี 15 โลคัสที่เข้าสู่สภาพสมดุลตามกฎของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ได้แก่ ETH152 UWCA9 HUJII77 ILSTS014 BOLADRB2 ETH225 HRH1 ILSTS005 CSSM065 BM2113 TGLA153 TGLA153 ETH131 RBP3 HEL1 และ BM203 แสดงให้เห็นว่า กลุ่มประชากรโคพื้นเมืองภาคกลางทั้ง 4 จังหวัดความถี่ของยีนมีค่าคงที่ จึงควรทำการอนุรักษ์พันธุ์ของโคในกลุ่มนี้ไว้เพื่อไม่ให้เกิดการสูญเสียแหล่งพันธุกรรม

เมื่อทำการตรวจสอบโครงสร้างทางพันธุกรรมภายในประชากรโคทั้ง 4 จังหวัด ด้วยไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ จำนวน 18 โลไซ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ พบว่า ที่โลคัส ETH152 HRH1 และ BM203 มีความแตกต่างของอัลลีลในโคคัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และโลคัส HUII77 และ ETH225 มีแนวโน้มที่อัลลีลจะมีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งโลคัส BM203 มีอิทธิพลต่อการสร้างไขมันในน้ำมันของโค (Zhang *et al.*, 1998) และการสร้าง marbling ในเนื้อโค (Casas *et al.*, 2000) สำหรับที่โลคัส ETH152 นั้นมีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์ไขมันน้ำโค (Olsen *et al.*, 2002) และต่อผลผลิตน้ำมันในโค (Viitala *et al.*, 2003) ส่วนที่โลคัส HUII77 มีรายงานว่า มีอิทธิพลต่อผลผลิตน้ำมันในโค (Rodriguez-Zas *et al.*, 2002) และต่อเปอร์เซ็นต์โปรตีนในน้ำมันโคด้วย (Heyen *et al.*, 1999; Rodriguez-Zas *et al.*, 2002; Mosig *et al.*, 2001)

จากการศึกษาเปอร์เซ็นต์โพลีเมอร์ฟิคโลไซ พบว่า โคจาก จ.ราชบุรีมีเปอร์เซ็นต์โพลีเมอร์ฟิคโลไซต่ำที่สุด คือ 77.78 เปอร์เซนต์และโคจาก จ.ประจวบคีรีขันธ์ มีเปอร์เซ็นต์โพลีเมอร์ฟิคโลไซสูงที่สุด คือ 100 เปอร์เซนต์ แสดงว่าตัวอย่างโคจาก จ.ประจวบคีรีขันธ์ เกิดโพลีเมอร์ฟิคทุกตัวอย่าง ขณะที่ตัวอย่างโคจาก จ.ราชบุรีเกิดเพียง 77.78 เปอร์เซนต์เท่านั้น

ค่าเฮตเทอไรโซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตของโคพื้นเมืองภาคกลางจาก 4 จังหวัด เฉลี่ยเท่ากับ 0.348 โดยโคจาก จ.ราชบุรีมีค่าเฮตเทอไรโซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยต่ำที่สุด และโคจาก จ.ประจวบคีรีขันธ์ มีค่าดังกล่าวสูงที่สุด คือ เท่ากับ 0.324 และ 0.378 ตามลำดับ ซึ่งชี้ให้เห็นว่า โคพื้นเมืองภาคกลางไทย 4 จังหวัดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรค่อนข้างต่ำ เนื่องจากค่าที่ได้ใกล้เคียงกัน หากพิจารณาจากกัลยา บุญญานุวัตร และคณะ (2548) ที่พบว่า ค่าเฮตเทอไรโซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยของโคพื้นเมืองไทยภาคกลางมีค่าเท่ากับ 0.415 อาจเนื่องจากกัลยา บุญญานุวัตร และคณะ (2548) ใช้ตัวอย่างในการศึกษาที่เป็นฝูงโคพื้นเมืองของกรมปศุสัตว์ ในขณะที่การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างเป็นฝูงโคพื้นเมืองที่เลี้ยงโดยเกษตรกรอย่างแท้จริง จึงอาจมีผลให้ค่าเฮตเทอไรโซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยมีความแตกต่างกัน หรืออาจเนื่องจากการเลือกใช้ไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมาใช้ในการศึกษาจึงทำให้ค่าเฉลี่ยดังกล่าวสูงกว่าค่าที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้

สำหรับค่าเฮตเทอไรโซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยของโคพื้นเมืองทั้ง 4 จังหวัด ซึ่งเป็นค่าที่จากการคำนวณทางอ้อมโดยมีสมมติฐานว่าประชากรอยู่ในสภาวะสมดุล มีค่าเท่ากับ 0.500 โดยโคจาก จ.ราชบุรี มีค่าเฮตเทอไรโซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยต่ำที่สุด และโคจาก จ.นครปฐม มีค่าดังกล่าวสูงที่สุด คือเท่ากับ 0.464 และ 0.536 ตามลำดับ ค่านี้ชี้ให้เห็นว่าโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรที่ใกล้เคียงกัน และจัดว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในระดับปานกลาง หากเปรียบเทียบกับผลการศึกษาของกัลยา บุญญานุวัตร และคณะ (2548) ที่รายงาน

ว่า โคพื้นเมืองไทยภาคกลางมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยเท่ากับ 0.519 จะเห็นว่า ค่าที่ได้จากการวิจัยครั้งนี้ต่ำกว่าเล็กน้อย

ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรระหว่างโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด พบว่า โคจาก จ.ประจวบคีรีขันธ์และจาก จ. นครปฐมมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด คือ 0.0299 และโคจาก จ.นครปฐมและกาญจนบุรี มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมมากที่สุด คือ 0.1035 ซึ่งสอดคล้องกับค่าความเหมือนทางพันธุกรรมที่พบว่า โคจาก จ.ประจวบคีรีขันธ์และจาก จ.นครปฐมมีความเหมือนทางพันธุกรรมมากที่สุด คือมีค่าเท่ากับ 0.9706 และโคจาก จ.กาญจนบุรีและจาก จ. นครปฐมมีความเหมือนทางพันธุกรรมค่าน้อยที่สุด คือ 0.9017 แสดงให้เห็นว่า โคพื้นเมือง จ. ประจวบคีรีขันธ์ และนครปฐมมีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกันมากที่สุด

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโคทั้ง 4 จังหวัด ที่ได้จากการคำนวณโดยใช้ Nei's genetic distance มาสร้างแผนภาพความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี UPGMA พบว่า ประชากรตัวอย่างสามารถจัดแบ่งเป็น 2 กลุ่ม โดย กลุ่มแรกประกอบด้วย โคพื้นเมืองประจวบคีรีขันธ์ นครปฐม และราชบุรี และกลุ่มที่ 2 คือ โคพื้นเมืองกาญจนบุรี นั่นหมายถึง โคจาก 3 จังหวัดในกลุ่มแรกมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันทางพันธุกรรมมากกว่าโคในกลุ่มที่ 2 คือ จาก จ.กาญจนบุรี โดยโค จาก จ. ประจวบคีรีขันธ์และจาก จ. นครปฐมมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกันมากที่สุด

2. การตรวจสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอของโคพื้นเมืองภาคกลางจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี นครปฐม และราชบุรี จำนวน 25 ตัว ถูกประเมินด้วยการเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างกลุ่มของลำดับเบส (sequence alignment) และค่าคะแนนความเหมือนของลำดับเบส (sequence identity) พบว่าลำดับเบสของโคพื้นเมืองภาคกลางมีความเหมือนกับลำดับเบสของโคในสปีชีส์ *Bos indicus* ซึ่งยืนยันได้ว่าโคพื้นเมืองของไทยอยู่ในตระกูล *Bos indicus* (จรัญ จันทลักษณ์, 2515)

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ของโคพื้นเมืองจากภาคกลางของไทย มีความแตกต่างของลำดับเบสอยู่ทั้งหมด 18 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถจำแนกตัวอย่างโคได้เป็น 7 แอปไฟไทป์ ได้แก่ แอปไฟไทป์ ct1 ถึง ct7 ตามลำดับ ซึ่งสามารถแยกได้เป็น 2 กลุ่มตามความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ คือ โคกลุ่ม ct1 เป็นโคส่วนใหญ่ที่นำมาจาก จ. ประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งเป็นมีการวิวัฒนาการอยู่ในช่วงเวลาเดียวกับโคที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย ฟิลิปปีนส์ เนปาล และโคกลุ่มที่สอง เป็นโคกลุ่ม ct2 ถึง ct7 เป็นโคที่นำมาจาก จ. กาญจนบุรี นครปฐม ราชบุรี และบางตัวนำมาจากประจวบคีรีขันธ์ กลุ่มนี้มีวิวัฒนาการแยกมาจากกลุ่มแรก ซึ่งจากการศึกษาโคพื้นเมืองสปีชีส์ *B. indicus* ของ Lai *et al* (2006) ได้จำแนกกลุ่มของโคพื้นเมือง *B. indicus* ที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเอเชียได้เป็น 2 clade คือ I1 และ I2 โดย clade I1 เป็นโคพื้นเมืองที่พบในอินเดีย ฟิลิปปีนส์ เนปาล เกาหลี มองโกเลีย จีนตอนกลาง จีนตะวันตก จีนตะวันออกเฉียงเหนือ จีนตอนใต้ และจีนตะวันตกเฉียงใต้ ขณะที่ clade I2 เป็นโคพื้นเมืองที่ พบเฉพาะ

ในอินเดีย ฟิลิปินส์ เนปาล จีนตอนใต้ และจีนตะวันตกเฉียงใต้ จากข้อมูลดังกล่าวบอกได้ว่า โคพื้นเมืองไทยภาคกลางกลุ่ม ct1 น่าจะเป็นโคใน clade I1 ขณะที่โคพื้นเมืองไทยภาคกลางกลุ่ม ct2-ct7 น่าจะเป็นโคในกลุ่ม clade I2

นอกจากนี้ยังพบว่า โคพื้นเมืองไทยภาคกลางกลุ่ม ct1 อาจจะเป็นโคที่นำมาจากแถบอินเดีย ตั้งแต่ในอดีต ขณะที่โคพื้นเมืองไทยภาคกลางกลุ่ม ct2-ct7 เป็นโคที่มีการวิวัฒนาการในตอนหลังและมี กิ่งวิวัฒนาการแยกไปจากโคพื้นเมืองที่พบในจีนตอนใต้และตะวันตกเฉียงใต้ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจาก อินเดียเช่นกัน เป็นไปได้ว่า โคพื้นเมืองภาคกลางของไทยในกลุ่มที่สองอาจมีการวิวัฒนาการเพื่อให้มีการปรับตัวให้เข้ากับท้องถิ่น หรืออาจเป็นโคที่อยู่ประจำถิ่นมาก่อน อย่างไรก็ตามการศึกษาโคพื้นเมืองของไทยในท้องถิ่นอื่นๆ รวมทั้งการนำข้อมูลไปเปรียบเทียบกับโคพื้นเมืองของประเทศเพื่อนบ้านของไทย เช่น พม่า เขมร ลาว และ เวียดนาม ซึ่งยังไม่มีข้อมูลปรากฏในฐานข้อมูลยีนเลย น่าจะได้ข้อมูลในการบ่งบอก ที่มาของโคพื้นเมืองของไทยที่ชัดเจนขึ้น

สรุปผลการวิจัย

1. ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ไมโครแซทเทลไลต์

1) จากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ พบว่าสามารถตรวจสอบได้ 18 โลไซ จำนวนของอัลลีลในแต่ละโลคัสที่ศึกษามีความผันแปรอยู่ระหว่าง 2-6 อัลลีล โดยโลคัส ILSTS014 BOLADRB2 RBP3 และ CSSM065 มีจำนวนของอัลลีลน้อยที่สุด คือ 2 อัลลีล และที่โลคัส ETH225 และ UWCA9 มีจำนวนของอัลลีลมากที่สุด คือ 6 อัลลีล

2) การทดสอบสภาพสมดุลของยีนตามกฎของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg Equilibrium) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ พบว่ามี 15 โลคัส ที่เข้าสู่สภาพสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

3.) โครงสร้างภายในประชากรที่ทำการทดสอบโดยใช้ Chi-square ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ พบว่าโลคัส ETH152 HRH1 และ BM203 สามารถเลือกใช้เป็นดีเอ็นเอบ่งชี้ (DNA marker) ได้

4) กลุ่มโคจาก จ. ประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี นครปฐม และราชบุรี มีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรค่อนข้างต่ำ โดยมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.324-0.378 และมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.464-0.536

5) โคพื้นเมืองจาก จ.ประจวบคีรีขันธ์ และ จ.นครปฐมมีความเหมือนทางพันธุกรรมมากที่สุด คือมีค่าเท่ากับ 0.9706 และโคพื้นเมืองจาก จ.กาญจนบุรีและนครปฐมมีความเหมือนทางพันธุกรรมค่าน้อยที่สุด คือ 0.9017 แสดงให้เห็นว่า โคพื้นเมืองจาก จ.ประจวบคีรีขันธ์ และนครปฐมมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันมากที่สุด

6) แผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่สร้างขึ้นนั้น พบว่า โคพื้นเมืองทั้ง 4 จังหวัด ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มแรกประกอบด้วยโคจาก จ. ประจวบคีรีขันธ์ นครปฐม และราชบุรี และกลุ่มที่ 2 คือ โคจาก จ. กาญจนบุรี

2. ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

1) โคพื้นเมืองจากภาคกลางของไทยที่ศึกษามีลำดับเบสของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop เหมือนกับโคในสปีชีส์ *B. indicus* มากกว่าโคในสปีชีส์ *B. taurus* และกระบือ โดยมีค่าความเหมือนเท่ากับ 90-99%, 80-88% และ 64-70% ตามลำดับ

2) ลำดับเบสของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ของโคสปีชีส์ *B. taurus* และ *B. indicus* มีตำแหน่งที่แตกต่างกันอยู่ 14 ตำแหน่ง ซึ่งน่าจะใช้ในการจำแนกสปีชีส์ของโค *B. taurus* และ *B. indicus* ได้

3) ลำดับเบสของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ของโคพื้นเมืองจากภาคกลางของไทย มีความแตกต่างอยู่ 18 ตำแหน่ง ซึ่งจำแนกได้เป็น 7 แอปไฟลไทป์ ได้แก่ แอปไฟลไทป์ ct1 ถึง ct7 ตามลำดับ โดยโคในแอปไฟลไทป์ ct1 ส่วนใหญ่เป็นโคพื้นเมืองที่มาจาก จ. ประจวบคีรีขันธ์

4) โคและกระบือมีระยะห่างทางพันธุกรรมประมาณ 0.30-0.41 โคในสปีชีส์ *B. taurus* มีระยะห่างพันธุกรรมจาก *B. indicus* เท่ากับ 0.1301-0.2368 และโคพื้นเมืองไทยภาคกลางมีระยะห่างทางพันธุกรรมจากโค *B. indicus* ในประเทศเอเชียอยู่ในช่วง 0.0072-0.0950

5) ประชากรโคพื้นเมืองไทยภาคกลางมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับโคในสปีชีส์ *Bos indicus* และแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 เป็นโคพื้นเมืองที่มาจาก จ. ประจวบคีรีขันธ์ และพบว่ามีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับโคในสปีชีส์ *Bos indicus* มากที่สุด และกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มโคจากทั้งสี่จังหวัดที่ศึกษา

6) โคพื้นเมืองจากภาคกลางของไทยโคกลุ่มที่ 1 มีความวิวัฒนาการมาจากโคพื้นเมืองของประเทศภูฏาน มองโกเลีย และอินเดีย ขณะที่โคกลุ่มที่ 2 มีวิวัฒนาการมาแยกมาจากโคพื้นเมืองของประเทศจีนตอนใต้ จีนตะวันตกเฉียงใต้ อินเดีย เนปาลและฟิลิปปินส์

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่สนับสนุนเงินทุนวิจัย ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการทำวิจัย รศ.ดร. ญาณิน โอภาสพัฒนกิจ ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย รศ.ดร.มนต์ชัย ดวงจินดา ที่ อนุเคราะห์ไฟรเมอร์ และ รศ.ดร.จุฑารัตน์ เศรษฐกุล ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำในการวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และนักศึกษาทุกท่านที่ได้ช่วยให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่า รายงานฉบับนี้จะเป็นประโยชน์ต่อองค์กร หน่วยงาน นักวิชาการ และผู้ที่สนใจในการนำผลจากการวิจัยครั้งนี้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป

คณะผู้วิจัย

กรกฎาคม 2551

บทคัดย่อ

โคพื้นเมืองไทยเป็นพื้นฐานโคเนื้อที่สำคัญของประเทศไทยซึ่งสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมและอาหารที่หาได้ในท้องถิ่นได้เป็นอย่างดี ปัจจุบันเกษตรกรรมผสมกับโคพันธุ์ต่างประเทศทำให้โคพื้นเมืองพันธุ์แท้ลดจำนวนลงและทำให้เกิดการสูญเสียแหล่งพันธุกรรมของโคพื้นเมือง ในประเทศไทยข้อมูลทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองยังมีอยู่น้อยมาก งานวิจัยนี้ได้จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองโดยเฉพาะในเขตภาคกลางของไทยโดยใช้ข้อมูลของไมโครแซทเทลไลต์และไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ ตัวอย่างโคพื้นเมืองที่ใช้ในการศึกษานำมาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี นครปฐม และราชบุรี ทำการสกัดดีเอ็นเอจากชิ้นเนื้อและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน of ไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 20 โลไซและไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอในบริเวณ D-loop โดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่พีซีอาร์ หลังจากวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรและระหว่างประชากรโดยใช้โปรแกรม POPGENE v.1.32 พบว่า ไมโครแซทเทลไลต์ทุกโลไซเป็นโพลิมอร์ฟิก จำนวนของอัลลีลในแต่ละโลคัสมีความผันแปรอยู่ระหว่าง 2-6 อัลลีล ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.324-0.378 และค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.464-0.536 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมอยู่ระหว่าง 0.0299-0.1039 โดยประชากรโคจาก จ. ประจวบคีรีขันธ์ มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับโคจาก จ. นครปฐม ราชบุรี และกาญจนบุรี ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายและความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop โดยวิธี UPGMA พบว่าโคพื้นเมืองจากภาคกลางของไทยมีค่าความเหมือนของลำดับเบสเทียบกับโคตระกูล *Bos indicus*, โคตระกูล *Bos taurus* และกระบือ (*Bubalus bubalis*) เท่ากับ 90-99%, 80-88% และ 64-70% ตามลำดับ ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยภาคกลางกับโค *B. indicus* ของประเทศอื่นๆ ในเอเชียอยู่ระหว่าง 0.0072-0.0950 ลำดับเบสของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของโคพื้นเมืองไทยภาคกลางจำแนกได้ 7 แสพไทป์ โดยโคในแอสเปคไทป์ ct1 ส่วนใหญ่เป็นโคพื้นเมืองที่มาจาก จ. ประจวบคีรีขันธ์ และมีความใกล้ชิดกับโคพื้นเมืองที่มาจากประเทศภูฏาน มองโกเลีย และอินเดีย ขณะที่แอสเปคไทป์ ct2 ถึง ct7 เป็นกลุ่มโคจากทั้งสี่จังหวัดและมีวิวัฒนาการแยกจากโคพื้นเมืองของประเทศจีนตอนใต้ จีนตะวันตกเฉียงใต้ อินเดีย เนปาล และฟิลิปปินส์ งานวิจัยนี้ยืนยันได้ว่าโคพื้นเมืองในเขตภาคกลางของประเทศไทยเป็นโคประจำถิ่นเอเชียตอนใต้ การนำข้อมูลพันธุกรรมที่ได้ไปศึกษาเปรียบเทียบกับข้อมูลของโคพื้นเมืองจากเขตภาคอื่นของประเทศและกับประเทศเพื่อนบ้านของไทยจะทำให้ทราบแหล่งพันธุกรรมของโคพื้นเมืองของไทยที่ชัดเจนขึ้นซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์สายพันธุ์โคพื้นเมืองของไทยอย่างจริงจัง

คำสำคัญ: ไมโครแซทเทลไลต์, ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ, ความหลากหลายทางพันธุกรรม, โคพื้นเมือง

Abstract

Thai native cattle are an important basic beef breed of Thailand which have a good ability to adapt to environment and local feedstuff. Thai farmer tend to cross them with foreign breeds causing reduction of Thai native pure breed and loss of genetic resource. Nowadays, little genetic data on Thai native cattle has been gathered. This research was performed to study the genetic diversity of the native cattle especially in the central region of Thailand using the information of microsatellite and mitochondrial DNA. The native cattle samples were collected from Prachuapkhirikhan, Kanchanaburi, Nakornpathom and Ratchaburi provinces. DNA was extracted from meat and then amplified for 20 loci of microsatellite and a D-loop mitochondrial DNA by PCR technique. After analysis of genetic diversity within and between populations by POPGENE v.1.32, it was found that microsatellite loci had polymorphic vary from 2-6 alleles with the average of 4 alleles per locus. The H-W equilibrium of the population at each locus was tested, and found that fifteen loci had no significant deviation. The observed heterozygosity value was 0.324-0.378 and the expected heterozygosity value was 0.464-0.536. The genetic distance was 0.0299-0.1039. The cattle from Prachuapkhirikhan were closely related to those from Nakornpathom, Ratchaburi and Kanchanaburi respectively. The mtDNA D-loop diversity and phylogenetic tree analysed by UPGMA method showed that the sequence identity of the Central Thailand cattle were 90-99%, 80-88% and 64-70% compared to *Bos indicus* cattle, *Bos taurus* cattle and buffalo (*Bubalus bubalis*) respectively. The genetic distance values between the Central Thailand cattle and the other Asian cattle were 0.0072-0.0950. The sequence of Central thai cattle were identified into 7 haplotypes, the haplotype ct1 harbored most of samples from Prachuapkhirikhan and closely related to the *B. indicus* cattle from Bhutan, Mongolia and India. The rest of the haplotypes (ct2 - ct7) fell into another cluster located apart from the *B. indicus* cattle from South China, Southwest China, Nepal, Phillippins and India. This research confirmed that the Central Thailand cattle belonged to the South Asian cattle. Comparison of the obtained results and the data of cattle from other regions of Thailand and the neighbor countries will clarify the origin of Thai native cattle which benefit to the strict conservation of the Thai native cattle breeds

Keywords: microsatellite, mitochondrial DNA, genetic diversity, native cattle

สารบัญ

หน้า

Executive Summary.....	I
กิตติกรรมประกาศ.....	IX
บทคัดย่อภาษาไทย.....	X
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	XI
สารบัญ.....	XII
สารบัญตาราง.....	XIV
สารบัญภาพ.....	XV
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ปัญหาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
1.4 การดำเนินการวิจัย.....	2
1.5 ระยะเวลาและสถานที่ในการดำเนินงานวิจัย.....	3
บทที่ 2 การศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 ข้อมูลทั่วไปของโคพื้นเมือง.....	4
2.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคจากข้อมูลไมโครแซทเทลไลท์.....	10
2.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคจากข้อมูลไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ	15
บทที่ 3 การดำเนินงานวิจัย.....	17
3.1 การเก็บตัวอย่าง.....	17
3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์.....	17
3.3 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเครื่องหมายและความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองภาค กลางด้วยไมโครแซทเทลไลท์.....	18
3.4 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองภาคกลางด้วยข้อมูลไมโทคอน เดรียลดีเอ็นเอ.....	25
3.5 สถานที่ทำการทดลอง.....	28
3.6 ระยะเวลาในการศึกษา.....	28

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	29
4.1 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์.....	29
4.2 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ.....	35
บทที่ 5 วิจัยผลการวิจัย.....	44
5.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ข้อมูลไมโครแซทเทลไลท์.....	44
5.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ.....	48
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย.....	50
6.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ข้อมูลไมโครแซทเทลไลท์.....	50
6.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ.....	51
ข้อเสนอแนะ.....	52
ปัญหาและอุปสรรค.....	52
บรรณานุกรม.....	53
ภาคผนวก.....	60
ภาคผนวก ก ตัวอย่างโคพื้นเมืองที่ใช้ในการศึกษา.....	61
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี.....	64
ภาคผนวก ค ความถี่ของอัลลีล จำนวนอัลลีล ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีในแต่ละโลคัส.....	67
ภาคผนวก ง แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์.....	75
ภาคผนวก จ ค่าความเหมือนของลำดับเบสของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ.....	96
ประวัติผู้วิจัย.....	115

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3.1 โปรแกรมที่ใช้สำหรับการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ.....	18
4.1 จำนวนอัลลีลในแต่ละโลคัส ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยและค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ย ค่า Fis และค่า p-value.....	30
4.2 ค่า chi-square และ p-value ของอัลลีลในแต่ละโลคัส.....	31
4.3 จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัส เปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิซึม ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ย และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ย.....	32
4.4 ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด.....	33
4.5 ค่าความเหมือนทางพันธุกรรมระหว่างโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด.....	33
4.6 ระยะทางของความห่างระหว่างประชากรโคพื้นเมืองภาคกลาง 4 จังหวัด.....	34
4.7 ความหลากหลายทางพันธุกรรมบางโลคัสของโคพื้นเมืองภาคกลางและโคพื้นเมืองต่างประเทศ.....	45
ตารางภาคผนวกที่	หน้า
ก.1 ข้อมูลตัวอย่างโคพื้นเมืองที่ใช้ในการศึกษา.....	61
ค.1 ความถี่ของอัลลีลในแต่ละโลคัสของโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 5 จังหวัด.....	68
ค.2 จำนวนอัลลีล ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีในแต่ละโลคัสของโคพื้นเมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์.....	71
ค.3 จำนวนอัลลีล ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีในแต่ละโลคัสของโคพื้นเมือง จ.กาญจนบุรี.....	72
ค.4 จำนวนอัลลีล ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีในแต่ละโลคัสของโคพื้นเมือง จ.นครปฐม.....	73
ค.5 จำนวนอัลลีล ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีในแต่ละโลคัสของโคพื้นเมือง จ.ราชบุรี.....	74

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 โคพื้นเมืองภาคเหนือหรือโคขาวลำพูนเพศผู้และเพศเมีย.....	7
2.2 โคพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือเพศผู้และเพศเมีย.....	7
2.3 โคพื้นเมืองภาคกลางหรือโคลานเพศผู้และเพศเมีย.....	8
2.4 โคพื้นเมืองภาคใต้หรือโคชนเพศผู้และเพศเมีย.....	8
4.1 แผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด.....	34
4.2 ผลผลิตพีซีอาร์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop.....	35
4.3 การเปรียบเทียบลำดับเบสของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจากโคพื้นเมืองภาคกลางของไทยกับกระบือและโคในฐานข้อมูลอื่น.....	37
4.4 ความถี่ของแฮปไทป์ของไมโทคอนเดรียลบริเวณ D-loop ของโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง.....	39
4.5 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองภาคกลางของไทยกับกระบือ และโคในฐานข้อมูลอื่น....	41
4.6 แผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างโคพื้นเมืองไทยภาคกลางกับโคพื้นเมืองในเอเชีย....	43
ภาพภาคผนวกที่	หน้า
ก.1 โคพื้นเมือง จ.นครปฐม เบอร์ 21.....	62
ก.2 โคพื้นเมือง จ.นครปฐม เบอร์ 22.....	62
ก.3 โคพื้นเมือง จ.กาญจนบุรี เบอร์ 23.....	63
ก.4 โคพื้นเมือง จ.กาญจนบุรี เบอร์ 24.....	63
ง.1 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส ETH152.....	76
ง.2 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส ILSTS005.....	77
ง.3 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส IGF1.....	78
ง.4 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส TLSTS014.....	79
ง.5 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส BM2113.....	80
ง.6 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส HUUJ177.....	81
ง.7 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส TGLA116.....	82
ง.8 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส UWCA9.....	83
ง.9 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส OCAM.....	84
ง.10 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส HEL5.....	85

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพภาคผนวกที่	หน้า
ง.11 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส CSSM065.....	86
ง.12 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส HEL1.....	87
ง.13 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส BM203.....	88
ง.14 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส ETH131.....	89
ง.15 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส RBP3.....	90
ง.16 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส TGLA153.....	91
ง.17 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส HRH1.....	92
ง.18 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส ETH225.....	93
ง.19 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส BOLADRB2.....	94
ง.20 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส ILST001.....	95

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ปัญหาและความสำคัญของปัญหา

โคพื้นเมืองไทย หมายถึง โคที่มีถิ่นกำเนิดในเมืองไทยและเป็นโคที่อยู่ในเมืองไทยมานานแล้ว อาจเป็นโคซึ่งอยู่ในท้องถิ่นแต่เดิมหรือโคซึ่งนำมาจากที่อื่นนานมาแล้ว หรือโคที่เกิดจากการผสมข้ามอย่างใดอย่างหนึ่งซึ่งไม่อาจแยกแยะหรือแจกแจงเข้ากับพันธุ์โคพันธุ์หนึ่งซึ่งมีอยู่ในท้องถิ่น (จรัญ จันทลักษณ์. 2515)

โคพื้นเมืองเป็นพื้นฐานโคเนื้อที่สำคัญของประเทศไทย เพราะมีอยู่เป็นจำนวนมาก สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมและอาหารที่หาได้ในท้องถิ่นได้เป็นอย่างดี ระบบการเลี้ยงและการจัดการโคเนื้อพื้นเมืองของเกษตรกรในประเทศไทยมีความแตกต่างกันตามสภาพแวดล้อม ได้แก่ สภาพพื้นที่ภูมิประเทศ ภูมิอากาศ และสภาพสังคมของแต่ละท้องถิ่น โคพื้นเมืองจัดอยู่ในเผ่า *Bos indicus* ซึ่งเป็นเผ่าเดียวกับโคอินเดีย ซึ่งเป็นโคที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมในประเทศไทย มีขนาดเล็ก หนาแน่น ทนร้อน ทนต่อโรคและแมลง หากินเก่ง ให้ลูกดก สามารถใช้ประโยชน์จากอาหารหยาบได้ดี การเลี้ยงโคพื้นเมืองเป็นทางเลือกหนึ่งที่เกษตรกรรายย่อยนำมาเป็นอาชีพเสริมให้กับครอบครัวได้ (กองบำรุงพันธุ์สัตว์. ม.ป.ป.) แต่ปัจจุบันพบว่าโคพื้นเมืองมีจำนวนลดลง เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงของระบบการเกษตรและการเพิ่มของจำนวนประชากรในประเทศเป็นสาเหตุทำให้จำนวนโคพื้นเมืองถึงแม้จะเพิ่มขึ้นแต่ก็ไม่เพียงพอต่อการบริโภค นอกจากนี้โคพื้นเมืองไทยมีแนวโน้มที่จะลดลงเนื่องจากมีความสามารถในการแข่งขันด้านการตลาดน้อยกว่าโคที่นำเข้าจากต่างประเทศเช่น โคบราห์มัน เกษตรกรนิยมผสมโคพื้นเมืองกับโคพันธุ์ต่างประเทศ จึงเป็นสาเหตุให้โคพื้นเมืองพันธุ์แท้ลดจำนวนลงเรื่อย ๆ และการลดจำนวนลงของโคพื้นเมืองเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการสูญเสียแหล่งพันธุกรรมของโคพื้นเมือง (กัลยา บุญญานุวัตร และคณะ. 2548) ในประเทศไทยการศึกษาเกี่ยวกับความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยยังมีอยู่น้อยมากและถ้าหากยังไม่มีการศึกษาถึงสภาพที่แท้จริงของความหลากหลายทางพันธุกรรมและส่งเสริมให้มีการอนุรักษ์โคพื้นเมืองอย่างจริงจังแล้ว เราอาจต้องสูญเสียแหล่งพันธุกรรมที่ดีไปโดยไม่สามารถนำกลับมาได้อีก

ในปัจจุบันการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมสามารถทำได้ละเอียดถึงระดับดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถใช้เครื่องหมายพันธุกรรมได้หลายชนิด อีกทั้งในการแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของสัตว์เศรษฐกิจโดยการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพนั้น ต้องใช้เวลา และ ค่าใช้จ่ายเป็นจำนวนมาก และในบางครั้งยังอาจเกิดความคลาดเคลื่อนจากลักษณะที่แปรปรวนปัจจุบันเทคโนโลยีทางด้านดีเอ็นเอจึงได้เข้ามามีบทบาทกับการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพมากขึ้น ซึ่งมีความแม่นยำและ

รวดเร็วสูงจึงกลายเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจเช่น การใช้เครื่องหมาย “ไมโครแซทเทลไลต์” ซึ่งเป็นเครื่องหมายดีเอ็นเอที่นิยมใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในโคอย่างแพร่หลาย (Visscher *et al.*, 2002) รวมทั้งการตรวจสอบข้อมูลลำดับเบสที่บริเวณ D-loop ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีประสิทธิภาพและใช้กันมากในสัตว์พื้นเมืองในหลายประเทศ (Tsuji *et al.*, 2003) ทำให้มีประโยชน์ในการใช้เป็นดีเอ็นเอติดตามเพื่อศึกษาการถ่ายทอดลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจในสัตว์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการใช้ปรับปรุงพันธุ์สัตว์ เช่น การจำแนกชนิดสัตว์และการศึกษาวิวัฒนาการพันธุกรรมของสัตว์

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อศึกษาแถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ของโคพื้นเมืองภาคกลาง
- 1.2.2 เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรและระหว่างประชากรของโคพื้นเมืองภาคกลาง
- 1.2.3 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโคพื้นเมืองภาคกลางโดยใช้ข้อมูลไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.3.1 การวิเคราะห์หลากหลายและการจำแนกกลุ่มทางพันธุกรรมในโคพื้นเมืองช่วยให้การวางแผนการปรับปรุงพันธุ์โคเนื้อในอนาคตมีประสิทธิภาพ
- 1.3.2 ข้อมูลทางด้านพันธุกรรมของโคพื้นเมืองแต่ละกลุ่มสายพันธุ์ช่วยในการศึกษาด้านพันธุศาสตร์ประชากรอื่นๆ เช่น การประมาณ genetic drift, gene flow และทาง molecular evolution เป็นต้น
- 1.3.3 การตรวจหาดีเอ็นเอบ่งชี้ของโคพื้นเมืองช่วยให้ทราบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่จำเพาะต่อโคพื้นเมืองไทยและเป็นประโยชน์ในการจดสิทธิบัตรหรือการขึ้นทะเบียนพันธุ์และใช้ในการตรวจสอบโคลูกผสมได้

1.4 การดำเนินการวิจัย

- 1.4.1 วิเคราะห์จีโนมไทป์ด้วยเทคนิคไมโครแซทเทลไลต์ จำนวน 20 ตำแหน่ง ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์
- 1.4.2 เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของไมโตคอนเดรียบริเวณ D-loop ด้วยเทคนิคพีซีอาร์และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

1.4.3 วิเคราะห์ดีเอ็นเอเครื่องหมายและความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองภาคกลาง

1.5 ระยะเวลาและสถานที่ดำเนินการวิจัย

1.5.1 ระยะเวลาในการศึกษา

6 เดือน จากเดือน ตุลาคม พ.ศ.2549 ถึง เดือนมิถุนายน พ.ศ.2550

1.5.2 สถานที่ทำการทดลอง

- 1) ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางสัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- 2) ห้องปฏิบัติการโครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทที่ 2

การศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปของโคพื้นเมือง

2.1.1 การจำแนกโคทางสัตววิทยา

Fries and Ruvinsky (1999) กล่าวว่า โคเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องที่มีกระเพาะระบบย่อยอาหารที่พิเศษกว่าสัตว์อื่นๆ คือ มีกระเพาะย่อยอาหาร 4 กระเพาะที่สามารถย่อยอาหารจำพวกหญ้าหรือใบไม้ให้เป็นอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ Ensminger (1993) กล่าวว่า โคถูกมนุษย์นำมาเลี้ยงครั้งแรกในแถบประเทศยุโรป และเอเชียในช่วงยุคหินใหม่ (New Stone Age) ซึ่งก่อนหน้านี้โคถูกมนุษย์ล่าเพื่อใช้เป็นอาหารเช่นเดียวกับสัตว์อื่น Fries and Ruvinsky (1999) กล่าวว่า มีการค้นพบฟอสซิลของโค-กระบือที่มีอายุเก่าแก่ที่สุดถึง 50-60 ล้านปี Blakely and Bade (1994) รายงานการจำแนกโคตามหลักสัตววิทยา มีดังนี้

Kingdom	: Animal, สัตว์
Phylum	: Chordata, มีกระดูกสันหลัง
Class	: Mammalia, เลี้ยงลูกด้วยนม
Order	: Artiodactyla, มีกีบเป็นคู่
Suborde	: Ruminantia, กระเพาะมี 4 ส่วน
Family	: Bovidae
Genus	: Bos
Species	: <i>Bos taurus</i> (อยู่ในเขตอบอุ่น, หนาว) <i>Bos indicus</i> (อยู่ในเขตร้อน)

Fries and Ruvinsky (1999) กล่าวว่า พันธุ์โคที่เลี้ยงทั่วโลกมีประมาณ 800 พันธุ์ โดยพบว่าประมาณ 1 ใน 4 เป็นพันธุ์โคในทวีปเอเชีย และประมาณ 18 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่สามารถจำแนกพันธุ์ได้อย่างชัดเจน พันธุ์โคทั้งหมดในเอเชียเป็นโคในกลุ่ม *Bos indicus* ที่มีลักษณะเด่นคือ มีตะโหนดจึงมักถูกเรียกว่า โคชีบู (Zebu cattle) ผิวหนังมีหลายสี มีเขาสั้น ในปัจจุบันพบว่าโคพันธุ์พื้นเมืองเอเชียมีจำนวนลดลงเนื่องจากถูกผสมข้ามพันธุ์ เมื่อโคโตเต็มวัยจะมีน้ำหนักอยู่ในช่วง 200-400 กิโลกรัม

2.1.2 ประวัติโคพื้นเมืองไทย

โคพื้นเมืองไทยเป็นโคที่อยู่ในตระกูล *Bos indicus* ซึ่งจากหลักฐานในอดีต พอสันนิษฐานได้ว่า โคพื้นเมืองไทยสืบเชื้อสายมาจากเผ่าพันธุ์โคที่มีชีวิตอยู่ในอดีตเมื่อหลายร้อยปีมาแล้ว เพราะตามประวัติบรรพบุรุษของไทยนั้นปรากฏว่ามีความเกี่ยวข้องกับสัตว์ประเภทนี้มานานแต่โบราณกาล อาชีพหลักของคนไทยคือการทำนา ทำไร่ ซึ่งต้องใช้โคเป็นแรงงานลากเข็นปรับพื้นที่ทำการเกษตรและการเดินทาง เชื่อว่าโคพื้นเมืองไทยคงมีความเป็นมาพร้อมกับคนไทยซึ่งอาจมีการปะปนของโคจากถิ่นอื่นๆเกิดขึ้นแน่นอน แต่เป็นประวัติที่ไม่มีการบันทึก จึงไม่ทราบประวัติที่แน่นอน อย่างไรก็ตามเข้าใจว่ามีการปะปนของโคถิ่นอื่นในอัตราที่ต่ำ การปะปนของโคซึ่งนำมาจากประเทศอื่นส่วนใหญ่แล้วพบในครึ่งหลังของพุทธศตวรรษที่ 25 โคสายเลือดใหม่นี้ส่วนมากเป็นโคอินเดียหรือโคแขก ซึ่งนำเข้าโดยชาวจีนที่อพยพเข้ามาตั้งรกรากถิ่นฐานในเมืองไทย (จรัญ จันทลักษณ์. 2515)

2.1.3 การจำแนกประเภทโคพื้นเมืองไทยทางวิทยาศาสตร์

สุรัช ชาศรีรัตย์ (2545) กล่าวว่า ศาสตราจารย์ ดร.ฟิชเชอร์ (Fischer, H) ชาวเยอรมันนี้ได้เดินทางเข้ามาสำรวจโคและกระบือพื้นเมืองของไทยหลายครั้ง ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1967-1970 ทั้งรูปร่างลักษณะที่ปรากฏแสดงออกภายนอกและจากการศึกษาทางโครโมโซม และต่อมาศาสตราจารย์ ดร.เพน (Payne, W.J.A) ชาวอังกฤษได้เข้ามาทำการศึกษาต่อจากศาสตราจารย์ ดร.ฟิชเชอร์ สรุปได้ว่าโคพื้นเมืองของไทยรวมทั้งโคชาวลำพูนนั้นเป็นกลุ่มโคประเภทเดียวกับโคที่พบในประเทศจีน และประเทศในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ทั้งหมด โดยกลุ่มโคดังกล่าวสามารถแยกออกเป็น 5 ประเภทใหญ่ๆ ได้ดังนี้

กลุ่มโคที่พบในประเทศจีน และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (China and Southeast Asia)

1) ประเภทที่ไม่มีตะโหนด (Humpless Cattle) เป็นโคที่สืบเชื้อสายมาจาก *Bos taurus* ได้แก่ โค Chinese yellow cattle

2) ประเภทที่มีตะโหนด (Humped Cattle) เป็นโคที่สืบเชื้อสายมาจาก *Bos indicus* ได้แก่ โคพันธุ์ South Chinese Zebu และโคพันธุ์ Taiwan Zebu

3) ประเภทลูกผสมระหว่างประเภทที่มีตะโหนดและไม่มีตะโหนด เป็นโคที่สืบเชื้อสายจากต้นตระกูลของประเภทที่ 1 และ 2 ผสมกัน แตกต่างกันไปตามลักษณะทางภูมิประเทศ อาณาเขตติดต่อของพรมแดน ความนิยมจำเพาะของท้องถิ่น ซึ่งโคประเภทนี้ตามความเห็นของศาสตราจารย์ ดร.เพน นั้นสามารถจำแนกได้อีก 2 ประเภทย่อย คือ

3.1) ประเภทที่มีลักษณะประจำพันธุ์เด่นชัดที่แน่นอนแล้ว (Stabilized indigineous) ได้แก่ โคพันธุ์บาตังกัส (Batangug) ของประเทศฟิลิปปินส์ โคพันธุ์พื้นเมืองของพม่า (Burmese) ประเทศ

เมียนมาร์ โคพันธุ์พื้นเมืองของอินโดจีน (Indo-chinese) เป็นโคพันธุ์พื้นเมืองที่ยังไม่ระบุแน่ชัดนักเช่น โคพันธุ์พื้นเมืองของเวียดนาม โคพันธุ์พื้นเมืองของมาเลเซีย โคพันธุ์พื้นเมืองของไทย ซึ่งสามารถแยกย่อยไปตามเขตของภูมิภาคที่พบอีก เช่น โคชนภาคใต้ของประเทศไทย โคขาวลำพูน ซึ่งอัตราส่วนของยีนส์ที่ได้รับการถ่ายทอดจากสายเลือดโคอินเดีย (โคชีบู) มีอัตราส่วนสูงกว่าโคพันธุ์พื้นเมืองอื่นๆ ของไทย เช่น โคขาวลำพูนสามารถพบได้ในโคชนในภาคใต้ของประเทศไทย

3.2) ประเภทที่ยังไม่มีการพัฒนาพันธุ์ (Intermedaite)

4) ประเภทที่สืบเชื้อสายมาจากโคป่า โคประเภทนี้ได้แก่ โคบาลี โคบันเตงเกอร์หรือกระทิงเขาทุย และกูปรี

5) ประเภทลูกผสมที่อาจเกิดขึ้นจากโคประเภทที่สืบเชื้อสายมาจากโคป่ากับโคประเภทที่ 1 หรือโคประเภทที่ 2 โคประเภทนี้ได้แก่ โคพันธุ์มาดูล่า และการตี

2.1.4 รูปร่างลักษณะโคพื้นเมืองไทย

ศรเทพ ธีรवास (2548) กล่าวว่า โคพื้นเมืองโดยทั่วไปเป็นโคขนาดเล็ก ตัวผู้มีน้ำหนักโตเต็มที่ประมาณ 300-350 กิโลกรัม ตัวเมียมีน้ำหนักโตเต็มที่ประมาณ 200-250 กิโลกรัม หน้ายาว บอบบาง หน้าผากแคบ ตาขนาดปานกลาง ขนหน้าสั้นเกรียน จมูกแคบ ใบหูแหลม โดยทั่วไปมีเขาสั้นถึงยาวปานกลาง ตัวมักมีเขาสั้นหรือไม่มีเขา เขาโดยทั่วไปมีลักษณะตั้งขึ้นแล้วปลายงุ้มเข้า แต่ก็ต่างกันออกไปบ้าง โคไทยมีลำคอบอบบาง ค่อนข้างยาว ใต้คอมีเหนียงคอ (dewlap) แต่เป็นแบบแคบเล็กกว่าโคอินเดีย ส่วนต่อระหว่างคอกับไหล่ค่อนข้างเห็นได้ชัด ส่วนบนหลังเหนือไหล่ (wither) มีโหนก โหนกเป็นกลุ่มเนื้อเยื่อที่แทรกด้วยไขมันบาง โหนกมีตั้งแต่ขนาดเล็กจนถึงขนาดใหญ่ ตัวเมียมีร่องรอยของโหนก แต่ไม่เด่นชัดอย่างในตัวผู้หรืออาจพูดได้ว่าตัวเมียไม่มีโหนก กระดูกขาบอบบางค่อนข้างยาว ข้อเท้าระหว่างกีบและแข้งค่อนข้างยาวแต่อ่อนแอ ส่วนหน้าบอบบาง มีกล้ามเนื้อน้อย ซอกขาอยู่สูงและเป็นมุมเล็ก เมื่อมองจากด้านหน้าหรือด้านหลังลำตัวดูป่องตรงกลาง เมื่อมองจากด้านบนพื้นที่สันหลังแคบไม่เป็นรูปสี่เหลี่ยม เป็นมุมแหลมพุ่งออกจากด้านท้ายสู่ส่วนด้านหน้า ส่วนหลังที่ค่อนไปทางซ้าย (loin) ค่อนข้างสั้น บั้นท้าย (rump) ลาดลงเล็กน้อย โคนหางสูงขึ้น หากมองจากด้านท้ายจะเห็นบั้นท้ายค่อนข้างเป็นรูปหกเหลี่ยม กล้ามเนื้อขาหลังน้อย หางเล็กแต่ยาวกล้ามเนื้อส่วนขนอ่อน (round) มีน้อย ขาหลังค่อนข้างโก่งเป็นรูปเคียวเมื่อมองจากด้านข้าง

กองบำรุงพันธุ์สัตว์ (ม.ป.ป.) จัดแบ่งโคพื้นเมืองไทยตามลักษณะรูปร่างภายนอก ตามภูมิภาคและวัตถุประสงค์ของการเลี้ยงได้ 4 สายพันธุ์ คือ

1) โคพื้นเมืองภาคเหนือ หรือโคขาวลำพูน

ขนลำตัวมีสีขาวเกรียน ผิวหนังสีชมพูส้ม ขนตามีสีขาวแต่สีนัยน์ตาดำ ขนพู่หางมีสีขาว ขอบตา เนื้อจมูก เนื้อทวารต่างมีสีชมพูส้ม ไม่มีจุดต่าง น้ำหนักเมื่อโตเต็มที่ เพศผู้หนัก 350-450 กิโลกรัม และเพศเมียหนัก 300-350 กิโลกรัม พบเลี้ยงในจังหวัดลำพูน ลำปาง เชียงใหม่ พะเยา (ภาพที่ 2.1)



ภาพที่ 2.1 โคพื้นเมืองภาคเหนือหรือโคขาวลำพูนเพศผู้และเพศเมีย (กองบำรุงพันธุ์สัตว์. ม.ป.ป.)

2) โคพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ขนลำตัวมีหลายสี ได้แก่ สีน้ำตาล น้ำตาลแดง ดำ ขนมีลักษณะสั้นเกรียน ผิวหนังสีชมพูส้ม ขนตาขนพู่หางมีสีดำหรือน้ำตาล เนื้อขาและเนื้อกีบสีดำหรือน้ำตาลแกมดำ ขอบตา เนื้อจมูก เนื้อทวารต่างมีสีดำ น้ำตาลหรือน้ำตาลแกมดำ น้ำหนักเมื่อโตเต็มที่ เพศผู้หนัก 350-400 กิโลกรัม เพศเมียหนัก 200-250 กิโลกรัม พบเลี้ยงกระจายทั่วไปทั้งภาคอีสาน แต่เลี้ยงหนาแน่นตามเขตแนวชายแดนจังหวัดอุบลราชธานี สุรินทร์ ศรีสะเกษ อำนาจเจริญ มุกดาหาร นครพนม และหนองคาย (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 โคพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือเพศผู้และเพศเมีย (กองบำรุงพันธุ์สัตว์. ม.ป.ป.)

3) โคพื้นเมืองภาคกลาง หรือโคลาน

ชนลำตัวมีหลายสี ได้แก่ สีน้ำตาล น้ำตาลแดง ขนมีลักษณะสั้นเกรียน ผิวหนัง ขนตา และขนพู่หางมีสีดำหรือสีน้ำตาล เนื้อเขาและเนื้อกีบมีสีดำหรือน้ำตาลดำ ขอบตา เนื้อจมูก มีสีดำ น้ำตาลหรือน้ำตาลดำ มีโหนกเล็ก น้ำหนักเมื่อโตเต็มที่ เพศผู้หนัก 300-350 กิโลกรัม เพศเมียหนัก 200-260 กิโลกรัม พบเลี้ยงในจังหวัดเพชรบุรี ราชบุรี กาญจนบุรี นครปฐม และสุพรรณบุรี (ภาพที่ 2.3)



ภาพที่ 2.3 โคพื้นเมืองภาคกลางหรือโคลานเพศผู้และเพศเมีย (กองบำรุงพันธุ์สัตว์. ม.ป.ป.)

4) โคพื้นเมืองภาคใต้

โคในภาคนี้ตามการสันนิษฐานกล่าวว่า อาจมีเลือดผสมจากโคแขกพันธุ์โคพื้นฐ์หนึ่งนานมาแล้ว แต่ไม่หลักฐานที่แน่นอน โคภาคนี้มีโหนกใหญ่ บั้นท้ายเล็ก บั้นหน้าค่อนข้างใหญ่ ชนลำตัวมีหลายสีต่างกันน้ำหนักเมื่อโตเต็มที่ เพศผู้หนัก 350-400 กิโลกรัม เพศเมียหนัก 230-280 กิโลกรัม โคในภาคนี้นอกจากเลี้ยงเพื่อใช้แรงงาน เลี้ยงเพื่อใช้เนื้อแล้วยังเลี้ยงเพื่อเกมส์กีฬาด้วย พบเลี้ยงกระจายทั่วไปในเขตภาคใต้โดยเฉพาะจังหวัดนครศรีธรรมราช ตรัง พัทลุง กระบี่ สงขลา (ภาพที่ 2.4)



ภาพที่ 2.4 โคพื้นเมืองภาคใต้หรือโคชนเพศผู้และเพศเมีย (กองบำรุงพันธุ์สัตว์. ม.ป.ป.)

2.1.5 สีของโคพื้นเมือง

ศรเทพ ธรรมวาสร (2548) กล่าวว่า ขนของโคไทยมีลักษณะสั้นเกรียน มีสีต่างๆกัน เช่น ดำ น้ำตาลอ่อน ต่าง เป็นต้น สีที่พบเห็นโดยทั่วไป คือ สีน้ำตาลแกมแดง ขนใต้ท้องและซอกขา มักสีจางกว่าส่วนอื่นๆ ขนของโคไทยส่วนใหญ่เป็นลักษณะที่ถูกบังคับโดยหน่วยพันธุกรรมหรือยีน ที่เป็นยีนด้อย ดังนั้น เมื่อผสมกับโคเผ่าอื่น เช่น เฮอร์ฟอร์ด ชาร์โรเลส์ ลูกโคซึ่งเป็นลูกผสมมักแสดงสีของโคพันธุ์นั้น ไม่แสดงสีของโคไทย เช่น ลักษณะหน้าขาวของโคพันธุ์เฮอร์ฟอร์ดขมลักษณะสีของโคไทยอย่างเห็นได้ชัด ลักษณะขนสีดำในโคไทยแสดงออกเป็นลักษณะเด่นหากผสมกับโคไทยด้วยกัน แต่อย่างไรก็ตาม สีของโคไทยไม่เป็นลักษณะเด่นโดยสมบูรณ์ (Complete dominance) เพราะในบางครั้งเมื่อผสมกับโคไทยสีดำกับสีแดง ลูกโคมักออกมาเป็นสีดำ แต่อาจมีขนสีแดงแทรกอยู่บ้าง เช่น ลำคอ หรือส่วนท้อง

2.1.6 อุปนิสัย

ศรเทพ ธรรมวาสร (2548) กล่าวว่า โคไทยโดยทั่วไปมีนิสัยขี้ตื่น ปราดเปรี้ยว บางครั้งก็มี ความดุร้ายโดยเฉพาะเวลาออกลูกใหม่ๆ มักไล่ขวิดคนที่เข้าใกล้ การวัดหรือชั่งโคไทยทำได้ยากมาก หากไม่มีเครื่องมือที่พร้อมเพรียง เช่น คอกคัดสัตว์ ตาชั่งที่มีของบีบ เป็นต้น เวลาโคไทยตกใจสามารถ กระโดดข้ามรั้วสูงๆ ขนาด 1.5 เมตรได้อย่างสบาย โคไทยเมื่อเลี้ยงแบบฝูงก็จะมีความรักฝูงมากและมีความจำฝูงอย่างพิเศษ ทั้งนี้โดยอาศัยกลิ่นเป็นส่วนใหญ่ โคไทยนี้เมื่อนำมาเลี้ยงในโรงเรือนก็อาจเชื่องขึ้นได้แต่ถึงอย่างไรก็เชื่องยากกว่าโคเผ่าอื่นๆ

2.1.7 ลักษณะจีโนมของโค

Fries and Ruvinsky (1999) กล่าวว่า โคมียังมีจำนวนโครโมโซมทั้งหมด 30 คู่ แบ่งเป็นโครโมโซม ร่างกาย 29 คู่ และโครโมโซมเพศ 1 คู่ โครโมโซมทุกโครโมโซมเป็น acrocentric ยกเว้นโครโมโซม X ทำให้ยากต่อการจำแนกชนิดโค ภายในนิวเคลียสมีดีเอ็นเอ จำนวน 6×10^{12} กรัมต่อดิพลอยด์โดยมีจำนวนใกล้เคียงกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆ

ในจีโนมของสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น โค ภายในจีโนมจะพบว่ามีลำดับเบสที่เป็นบริเวณซ้ำ (repetitive sequences) กระจายอยู่ทั่วทั้งจีโนม ทำให้โคแต่ละตัวมีลักษณะภายนอกที่แตกต่างกัน โดยในจีโนมโคจะพบลำดับเบสที่เป็นบริเวณซ้ำอย่างน้อย 50 เปอร์เซ็นต์ของจีโนมทั้งหมด ซึ่งลำดับเบสที่เป็นบริเวณซ้ำนี้จะพบอยู่ในบริเวณส่วนที่ไม่ใช่รหัสของโปรตีน (non – coding region) ในจีโนม โดยลำดับเบสที่ซ้ำๆกันจะเป็นท่อนสั้นๆที่เป็นส่วนสำคัญในกระบวนการตัดต่อของเอ็กซอน (Splicing) ในสัตว์มีกระดูกสันหลังพบว่า ลำดับเบสที่เป็นบริเวณซ้ำที่พบอยู่ในบริเวณ non-coding จะมีท่อนยาวกว่าลำดับเบสที่เป็นบริเวณซ้ำที่พบอยู่ในบริเวณ coding region วิชัย บุญแสงและคณะ. (2545) กล่าว

ว่าลำดับเบสที่เป็นบริเวณซ้ำเหล่านี้มีความแตกต่างกันทั้งขนาดและจำนวนซ้ำ สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ 1) เบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeats) 2) เบสชนิดที่มีชุดซ้ำกระจายทั่วไปในจีโนม (inspread repeat) แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ short inspread repeat (SINEs) และ long inspread repeat (LINEs)

2.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคจากข้อมูลไมโครแซทเทลไลท์

วิชัย บุญแสง และคณะ. (2545) กล่าวว่า ไมโครแซทเทลไลท์ คือเบสซ้ำขนาด 1-6 เบส เช่น (A) n , (CA) n , (TAA) n , (GATA) n เมื่อ n เป็นจำนวนซ้ำ โดยที่มีจำนวนซ้ำแต่ละตำแหน่งไม่เกิน 100 ครั้ง บางครั้งอาจเรียกเบสซ้ำชนิดนี้ว่า simple sequence repeats (SSR) หรือ short tandem repeats (STR) เบสซ้ำชนิดนี้พบกระจายอยู่ในบริเวณต่างๆของจีโนมประมาณ 10^4 - 10^5 โคลัส ความหลากหลายของบริเวณซ้ำที่พบในบริเวณนี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอได้ และเนื่องจากไมโครแซทเทลไลท์จำนวนมากพบกระจายอยู่ทั่วไปในโครโมโซมทำให้มีการนำมาใช้ในการสร้างแผนที่จีโนม (genome mapping)

Ciampolini *et al.* (1995) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคสายพันธุ์อิตาลีเลียนจำนวน 4 พันธุ์ ได้แก่ Chianina, Marchigiana, Romagnola และ Piemontese จำนวน 220 ตัว ในการศึกษาครั้งนี้ตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ จำนวน 17 โลไซ ผลจากการศึกษา พบว่า โคทั้ง 4 พันธุ์มีค่าเฉลี่ยของอัลลีลต่อโคลัส เป็น 10.59 โดยโคพันธุ์ Piemontese และ Marchigiana มีค่าเฉลี่ยของอัลลีลต่อโคลัส (8.06 และ 7.76) สูงกว่าโคพันธุ์ Chianina และ Romagnola (6.65 และ 6.53) สำหรับการประเมินค่าระยะห่างทางพันธุกรรม พบว่าโคแต่ละพันธุ์มีความสัมพันธ์กันสูง โดย โคพันธุ์ Marchigiana และพันธุ์ Romagnola มีค่ามากที่สุด คือ 0.36 และมีค่าน้อยที่สุดในโคพันธุ์ Chianina และพันธุ์ Piemontese คือ 0.22

Moazami-Goudarzi *et al.* (1997) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคจำนวน 10 พันธุ์ ได้แก่ Charolais, Limousin, Breton Black Pied, Parthenais, Montbeliard, Vosgien, Maine-Anjou, Normande, Jersey และ Holstein จำนวน 490 ตัว ในการศึกษาครั้งนี้ทำการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ จำนวน 17 โลไซ ผลจากการศึกษาพบว่า โคพันธุ์ Jersey มีค่าจำนวนของอัลลีลเฉลี่ยต่อโคลัสต่ำสุดคือ 6.0 และโคพันธุ์ Charolais มีค่าจำนวนของอัลลีลเฉลี่ยต่อโคลัสสูงสุดคือ 7.7 ส่วนค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีเฉลี่ยต่ำสุดในโคพันธุ์ Jersey คือ 0.53 และมีค่าสูงสุดในโคพันธุ์ Parthenais คือ 0.66 จากแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่า โคพันธุ์ Holstein และ Maine-Anjou มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันถึง 74 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่โคพันธุ์ Montbeliard และ Vosgien มี

ความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน 57 เปอร์เซ็นต์ และโคพันธุ์ Parthenais และ Charolais มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน 40 เปอร์เซ็นต์

Martin-Burriel *et al.* (1999) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองสายพันธุ์ Spanish จำนวน 6 พันธุ์ โดยแบ่งโคเป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกได้แก่ Brown orthoid (Asturian Mountain, Asturain Lowland และ Northwest Brown) กลุ่มที่ 2 Red convex (Pyrenean และ Menorquina) กลุ่มที่ 3 Iberian bovine (Fighting bull) จำนวนทั้งหมด 279 ตัว ในการศึกษาครั้งนี้ทำการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ จำนวน 30 โลไซ ผลจากการศึกษาพบว่า โคพันธุ์ Pyrenean มีค่าจำนวนของอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัสสูงสุดคือ 6.0 และโคพันธุ์ Menorquina มีค่าจำนวนของอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัสต่ำสุดคือ 4.9 ส่วนค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยในแต่ละพันธุ์มีค่าต่ำสุดในโคพันธุ์ Fighting bull คือ 0.590 มีค่าสูงสุดในโคพันธุ์ Asturain Lowland คือ 0.681 สำหรับการประเมินค่าระยะห่างทางพันธุกรรม พบว่า ระยะห่างระหว่างพันธุกรรมมีค่าระหว่าง 0.071 ถึง 0.283 และโคพันธุ์ Asturian Mountain และ Asturain Lowland มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมากที่สุด และเมื่อพิจารณาจากแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่า มีความสัมพันธ์กันใกล้เคียงถึง 100 เปอร์เซ็นต์

Sabrina *et al.* (2000) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคพันธุ์ Brangus Ibage จำนวน 100 ตัว ในการศึกษาครั้งนี้ทำการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ จำนวน 4 โลไซ ได้แก่ BMS3013, BMS3004, HEL10 และ TGLA122 ผลจากการศึกษาพบว่า โลไซ BMS3013 มีความถี่ของอัลลีลต่ำสุด โดยพบเพียง 2 อัลลีล ส่วนโลไซ BMS3004, HEL10 และ TGLA122 มีความถี่อัลลีลสูงในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน ส่วนค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยในแต่ละโลไซ พบว่า โลไซ TGLA122 มีค่าสูงสุด คือ 0.881 และมีค่าต่ำสุดในโลไซ BMS3013 คือ 0.113

Kim *et al.* (2002) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคสายพันธุ์ north-east Asian จำนวน 4 พันธุ์ จำนวนรวม 200 ตัว ได้แก่ โคพันธุ์ Korean, Chinese, Japanese Black และ European Holstein ในการศึกษาครั้งนี้ทำการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ จำนวน 13 โลไซ ผลการศึกษาพบว่า พบความหลากหลายของอัลลีลทั้งสิ้น 127 อัลลีล สำหรับค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยในแต่ละพันธุ์ พบว่า มีค่าต่ำสุดในโคพันธุ์ Japanese Black คือ 0.515 และมีค่าสูงสุดในโคพันธุ์ Chinese คือ 0.745 ส่วนค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยในแต่ละพันธุ์ พบว่า มีค่าต่ำสุดในโคพันธุ์ Japanese Black คือ 0.471 และมีค่าสูงสุดในโคพันธุ์ Chinese คือ 0.744 และจากแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่า โคพันธุ์ Korean และ Chinese มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันมากที่สุด ส่วนโคพันธุ์ Japanese Black มีความสัมพันธ์กับโคพันธุ์ Korean และ Chinese ต่ำ

Maudet *et al.* (2002) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองสายพันธุ์ French cattle จำนวน 6 พันธุ์ จำนวนรวม 317 ตัว ได้แก่ โคพันธุ์ Abondance, Tarentaise, Villard de Lans, Montbeliarde, Limousin และ Charolais ในการศึกษานี้ทำการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ จำนวน 23 โลไซ ผลการศึกษาพบว่า พบความหลากหลายของอัลลีลทั้งสิ้น 215 อัลลีล จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัส คือ 9.4 สำหรับค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยในแต่ละพันธุ์ พบว่า มีค่าต่ำสุดในโคพันธุ์ Charolais คือ 0.640 มีค่าสูงสุดในโคพันธุ์ Villard de Lans คือ 0.693 ส่วนค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยในแต่ละพันธุ์ พบว่า มีค่าต่ำสุดในโคพันธุ์ Abondance คือ 0.650 และมีค่าสูงสุดในโคพันธุ์ Tarentaise คือ 0.699 สำหรับการประเมินค่าระยะห่างทางพันธุกรรม พบว่า ระยะห่างระหว่างพันธุ์กรรมมีค่าระหว่าง 0.125 ถึง 0.325 โดยโคพันธุ์ Abondance และ Tarentaise มีค่าระยะห่างระหว่างพันธุ์กรรมต่ำสุด คือ 0.102 และเมื่อพิจารณา จากแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่า โคพันธุ์ Abondance และ Tarentaise มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน 70 เปอร์เซ็นต์

Machado *et al.* (2003) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคสายพันธุ์ *Bos indicus* จำนวน 3 พันธุ์ ได้แก่ Gyr, Nellore และ Guzerat จำนวน 80 ตัว โดยทำการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ จำนวน 9 โลไซ ผลการศึกษาพบว่า โคทั้ง 3 พันธุ์มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.3055-0.3871 และมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.5055-0.5498 โดยโคพันธุ์ Gyr มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยต่ำสุดโดยมีค่าเท่ากับ 0.3055 และโคพันธุ์ Guzerat มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยต่ำสุดซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.3871 สำหรับค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยพบว่า โคพันธุ์ Nellore มีค่าต่ำสุด เท่ากับ 0.5055 และโคพันธุ์ Guzerat มีค่าสูงสุด เท่ากับ 0.5562

Mukesh *et al.* (2004) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองสายพันธุ์ อินเดีย (*Bos indicus*) จำนวน 136 ตัว ได้แก่พันธุ์ Sahiwal, Haryana และ Deoni โดยทำการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ จำนวน 20 โลไซ ผลการศึกษาพบว่า โคพันธุ์ Sahiwal, Haryana และ Deoni มีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัส เท่ากับ 5.2, 6.5 และ 5.9 ตามลำดับ สำหรับค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยมีค่าอยู่ระหว่าง 0.42-0.59 และมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.61-0.70

Metta *et al.* (2004) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองสายพันธุ์ อินเดีย (*Bos indicus*) จำนวน 30 ตัว ได้แก่พันธุ์ Ongle และ Deoni โดยทำการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ จำนวน 10 โลไซ ผลการศึกษาพบว่า โคพันธุ์ Ongle และ Deoni มีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัสเท่ากับ 4.5 และ 4.1 ตามลำดับ สำหรับค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎี พบว่าโคพันธุ์

Ongle และ Deoni มีค่าเท่ากับ 0.46 และ 0.50 ตามลำดับ ค่า Polymorphic Information Content(PIC) พบว่า โคพันธุ์ Ongle มีค่าระหว่าง 0.15-0.79 และ โคพันธุ์ Deoni มีค่าระหว่าง 0.13-0.80

Mateus *et al.* (2004) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองสายพันธุ์ Portuguese จำนวน 10 พันธุ์ จำนวนรวม 470 ตัว ได้แก่พันธุ์ Alentejana, Arouquesa, Barrosa, Brava de Lide, Garvonesa, Minhota, Marinho, Mertolenga, Maronesa และ Mirandesa ในการศึกษาครั้งนี้ทำการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ จำนวน 30 โลไซ ผลการศึกษาพบว่า พบความหลากหลายของอัลลีลทั้งสิ้น 390 อัลลีล จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัสสูงสุดพบในโคพันธุ์ Mertolenga คือ 8.07 ต่ำสุดในโคพันธุ์ Mirandesa คือ 5.67 สำหรับค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยและที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยในแต่ละพันธุ์ พบว่า มีค่าระหว่าง 0.5533 ถึง 0.7430 และ 0.6276 ถึง 0.7451 ตามลำดับ โดยโคพันธุ์ Brava de Lide (0.6484 และ 0.5533) และ Mirandesa (0.6276 0.6127) มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยและที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยต่ำสุด สำหรับการประเมินค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรม พบว่า โคพันธุ์ Arouquesa และ Barrosa มีค่าระยะห่างระหว่างพันธุกรรมต่ำสุด คือ 0.099

Mukesh *et al.* (2005) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคทางตะวันตกของอินเดีย (*Bos indicus*) ได้แก่พันธุ์ Red Kandhari และ Deoni โดยตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 22 โลไซ ผลการศึกษาพบว่า โคพันธุ์ Red Kandhari และ Deoni มีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัสเท่ากับ 5.82 และ 5.86 ตามลำดับ สำหรับค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกต พบว่า โคพันธุ์ Red Kandhari และ Deoni มีค่าเท่ากับ 0.47 และ 0.57 ตามลำดับ ส่วนค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎี มีค่าเท่ากับ 0.64 และ 0.69 ตามลำดับ

Cervini *et al.* (2006) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคสายพันธุ์ Brazillian Nellore (*Bos indicus*) จำนวน 200 ตัว ในการศึกษาครั้งนี้ทำการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ จำนวน 10 โลไซ ผลการศึกษาพบว่า พบความหลากหลายของอัลลีลทั้งสิ้น 94 อัลลีล จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัส คือ 9.4 มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ย 0.679

Armstrong *et al.* (2006) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคสายพันธุ์ Uruguayan Creole bull (*Bos taurus*)จำนวน 600 ตัวในการศึกษาครั้งนี้ทำการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ จำนวน 17 โลไซ ผลการศึกษาพบว่า พบความหลากหลายของอัลลีลทั้งสิ้น 73 อัลลีล โดยโลคัส CSSM66 และ TGLA227 พบว่ามีความหลากหลายของอัลลีลมากที่สุดถึง 7 อัลลีลต่อโลคัส แต่โลคัส BM8125 พบว่ามีความหลากหลายของอัลลีลต่ำที่สุด คือ 2 อัลลีลต่อโลคัสสำหรับค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยต่อโลคัสอยู่ระหว่าง 0.286 ถึง 1.000 และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้

จากการสังเกตเฉลี่ย คือ 0.584 ส่วนค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยต่อโลคัสอยู่ระหว่าง 0.465 ถึง 0.801 และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ย คือ 0.623

Karthickeyan *et al.* (2006) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคพันธุ์ Krishna Valley (*Bos indicus*) จำนวน 50 ตัว ในการศึกษาครั้งนี้ทำการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ ดีเอ็นเอ จำนวน 25 โลไซ ผลการศึกษาพบว่า มีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัสเท่ากับ 4.72 โดยโลคัส ILSTS054 มีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่ำสุดเท่ากับ 0.0116 และโลคัส ILSTS030 มีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 0.8128 สำหรับค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตและจากทฤษฎีเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.6683 และ 0.6569 ตามลำดับ

Brenneman *et al.* (2007) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโค 5 พันธุ์ ได้แก่ Angus, American Brahman, Senepol, Upgraded Romosinuano และ Purebred Romosinuano ในการศึกษาครั้งนี้ทำการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ จำนวน 26 โลไซ ผลการศึกษาพบว่า พบความหลากหลายของอัลลีลทั้งสิ้น 313 อัลลีล มีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัส คือ 12.0 สำหรับค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยในแต่ละพันธุ์ พบว่าโคพันธุ์ American Brahman มีค่าสูงสุด คือ 0.75 มีค่าต่ำสุดในโคพันธุ์ Upgraded Romosinuano คือ 0.64

กัลยา บุญญานวัตร และคณะ (2548) ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ โคขาวลำพูน โคลาน โคอีสาน และโคชน ซึ่งเลี้ยงในสถานีวิจัยทดสอบพันธุ์สัตว์ของกรมปศุสัตว์ โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ 30 โลไซ จากผลการศึกษาพบว่า โคทั้ง 4 สายพันธุ์มีจำนวนอัลลีลต่อโลคัสเฉลี่ย 4.70 โดยจำนวนอัลลีลต่อโลคัสของโคขาวลำพูน โคลาน โคอีสานและโคชนเฉลี่ย 4.00, 3.20, 2.60 และ 3.50 ตามลำดับ ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.600 โดยค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีเฉลี่ยที่ได้จากการสังเกตของโคขาวลำพูน โคลาน โคอีสาน และโคชนมีค่าเท่ากับ 0.565, 0.415, 0.525 และ 0.543 ตามลำดับค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ย 0.598 โดยค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีเฉลี่ยที่ได้จากทฤษฎีของโคขาวลำพูน โคลาน โคอีสาน และโคชนเท่ากับ 0.599, 0.519, 0.408 และ 0.537 ตามลำดับ โคขาวลำพูนแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงที่สุด และโคอีสานแสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำที่สุด เนื่องจากแผนการผสมพันธุ์และวัตถุประสงค์การคัดเลือกพันธุ์ โคที่มีความสัมพันธ์ที่มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุดคือโคชน และโคลาน โดยความเหมือนของพันธุกรรมของโคทั้ง 2 พันธุ์มีค่า 0.9028 และค่าความห่างทางพันธุกรรมมีค่า 0.102

2.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคจากข้อมูลไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

การหาลำดับเบสโดยใช้ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจะตรวจในบริเวณที่เรียกว่า ไฮเปอร์แวลูเอเบิล (hypervariable region หรือ HVR) หรือ D-loop ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีความหลากหลายสูง การตรวจทำได้ด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์และการอ่านลำดับเบสด้วยเครื่องอัตโนมัติ โดยหากเป็นสัตว์ที่สืบเชื้อสายมาจากสปีชีส์เดียวกันจะมีลำดับเบสบริเวณ D-loop ตรงกัน ในทางตรงกันข้ามหากไม่ใช่เชื้อสายเดียวกันลำดับเบสบริเวณ D-loop จะต่างกัน (สสวท.และสมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย. 2548)

Loftus *et al.* (1993) ศึกษาความเป็นอิสระของโค 2 สายพันธุ์ คือ zebu และ taurine ด้วยการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop โดยตัวอย่างที่นำมาศึกษามาจากสายพันธุ์ยุโรป (taurine) 6 ตัว, สายพันธุ์อินเดีย (zebu) 3 ตัว และสายพันธุ์แอฟริกา (taurine และ zebu) 4 ตัว พบว่ามีการจัดแบ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่ คือ taurine และ zebu ซึ่งสายพันธุ์ยุโรปและสายพันธุ์แอฟริกาเป็นกลุ่มเดียวกัน อีกกลุ่มเป็นสายพันธุ์อินเดีย

Kim *et al.* (2003) ศึกษาความสัมพันธ์ทางแผนภูมิพันธุกรรมของโคทางตะวันออกเฉียงเหนือของเอเชียกับประชากรโคอื่นๆ (*Bos taurus*, *Bos indicus* และ *Bison bison*) ด้วยการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop โดยสร้างแผนภูมิด้วย Neighbor-Joining จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Cheju Black 4 ตัว, Cheju Yellow 4 ตัว, Korean Yellow cattle (*Bos taurus*) 4 ตัว และ American Brahman cattle (*Bos indicus*) 2 ตัว และลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่มีการตีพิมพ์แล้ว คือ Japanese Black cattle 31 ตัว, European breed cattle 41 ตัว, African zebus 6 ตัว, African taurines 2 ตัว และ Indian zebus 6 ตัว และใช้ American bisons (*Bison bison*) เป็น out group จากแผนภูมิ Neighbor-Joining แสดงว่า American bisons และ Indian zebus แยกออกจากโคสายพันธุ์อื่นอย่างชัดเจน ส่วน African cattle รวมเข้าเป็นกลุ่มเดียวกัน การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าโคในแถบตะวันออกเฉียงเหนือของเอเชีย ยุโรป และแอฟริกา มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันแต่แยกออกจาก Indian zebus

Lei *et al.* (2004) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ บริเวณ D-loop ของโคในประเทศจีน ทั้งหมด 22 ตัว 8 สายพันธุ์ พบว่ามี A% + T% ประมาณ 61.65% การเปรียบเทียบทั้งลำดับเบสทั้ง 22 เส้น และมี polymorphic 66 ตำแหน่ง ซึ่งมีการกลายพันธุ์ 5 แบบ คือ transition 81.82%, transversion 6.06%, insertion 7.57%, deletion 3.03% และ coexistence site of transition กับ transversion 1.52% จากการเปรียบเทียบลำดับเบส 22 เส้น ได้ผลเป็น 19 mitochondrial haplotypes คิดเป็น 86.36% พบว่าขอบเขตความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในกลุ่ม Chinese cattle และสร้างแผนภูมิด้วยวิธี Neighbor-Joining ซึ่งสามารถชี้ให้เห็นว่า ลำดับเบสของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอนี้แบ่งได้ 3 haplotypes โดยมีต้นกำเนิดมาจาก *Bos taurus* และ *Bos*

indicus

Mannen *et al.* (2004) ศึกษาความหลากหลายและต้นกำเนิดของโคทางตะวันออกเฉียงเหนือของเอเชีย โดยทำการศึกษากการเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วน mitochondrial displacement loop และความถี่ของ *Bos taurus* และ *Bos indicus* Y chromosome haplotypes ในโคพื้นเมืองของประเทศญี่ปุ่น, มองโกลเลีย และเกาหลี พบว่า 20% ของโคจากมองโกลเลียอยู่ใน *B. indicus* mitochondrial haplotypes แต่โคของญี่ปุ่นและเกาหลีอยู่ใน *B. taurus* haplotypes ในทางตรงกันข้ามพบว่าตัวอย่างทั้งหมดอยู่ใน *B. taurus* Y chromosome haplotypes อาจเนื่องมาจากการเข้ามาของโค zebu และโคอื่นๆจากอาณาจักรมองโกลซึ่งมีการผสมกับโค taurine พื้นเมือง

Lai *et al.* (2006) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและต้นกำเนิดของโคจีนโดยตรวจสอบความแตกต่างของลำดับเบสส่วน D-loop ในไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ จากโค 84 ตัว 14 สายพันธุ์ ที่มาจากทางตะวันตกเฉียงใต้และใต้ของประเทศจีน ผลที่ได้พบว่าสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ สปีชีส์ *Bos taurus* และ *Bos indicus* อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์เครือข่ายสายทายาทในทั้ง 2 สปีชีส์ก็ยังสามารถแบ่งออกเป็นอีกหลาย clades โดย *Bos taurus* แบ่งกลุ่มได้เป็น clades T2, T3 และ T4 ส่วน *Bos indicus* แบ่งเป็น clades I1 และ I2 ซึ่งรูปแบบแผนภูมิพันธุกรรมมีความสอดคล้องกับประชากรโคทางตะวันออกเฉียงเหนือของเอเชียที่มีการศึกษามาก่อนหน้านี้

Lei *et al.* (2006) ศึกษาต้นกำเนิดและโครงสร้างแผนภูมิภูมิศาสตร์ของโคจีน โดยใช้ลำดับเบสไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ D-loop จากโคในประเทศจีน 231 ตัวอย่าง จากการวิเคราะห์แผนภูมิพันธุกรรมแสดงให้เห็นว่ามีรูปแบบของทั้ง *Bos taurus* และ *Bos indicus* ในโคของประเทศจีน การศึกษานี้สามารถสนับสนุนว่า Yunnan-Guizhou Plateau เป็นบริเวณที่มีการเลี้ยง Chinese zebu และยังพบว่าโค Tibetan มีต้นกำเนิดมาจากโคสายพันธุ์ taurine และ zebu

Liu *et al.* (2006) ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ของโคในมณฑล Guizhou ทั้งหมด 82 ตัว 4 สายพันธุ์ ได้ผลเป็น 31 mitochondrial haplotypes และมี polymorphic 65 ตำแหน่ง ครอบคลุม 7.14% ของความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ มี 62 transitions, 2 transversions และ 1 coexistent site ของ transition กับ transversion ความหลากหลายของลำดับนิวคลีโอไทด์ (pi value) และความหลากหลายของ haplotype (H) ประมาณจากบริเวณไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอ บริเวณ D-loop ในโค 4 สายพันธุ์ในมณฑล Guizhou แปรผันอยู่ที่ 2.16%-2.61% และ 0.695-0.909 ตามลำดับ แสดงว่าขอบเขตความหลากหลายทางพันธุกรรมของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอยังคงอยู่ในโคสายพันธุ์ Guizhou และสร้างแผนภูมิด้วยวิธี Neighbor-Joining ซึ่งสามารถชี้ให้เห็นว่า ลำดับเบสของ mtDNA นี้แบ่งได้ 31 haplotypes โดยมีต้นกำเนิดมาจาก *Bos taurus* และ *Bos indicus*

บทที่ 3

การดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย มีขั้นตอนดังนี้

- 1) เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อจากโคพื้นเมืองในเขตภาคกลางและสกัดจีโนมดีเอ็นเอ
- 2) วิเคราะห์จีโนมโดยใช้เทคนิคไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 20 ตำแหน่ง ด้วยเทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่พีซีอาร์
- 3) เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียบริเวณ D-loop ด้วยวิธีเทคนิคปฏิกิริยา ลูกโซ่พีซีอาร์ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์
- 4) วิเคราะห์ดีเอ็นเอเครื่องหมายและความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองภาคกลาง

3.1 การเก็บตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ใช้ศึกษา คือ โคพื้นเมืองภาคกลาง เก็บตัวอย่างจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จังหวัด นครปฐม กาญจนบุรีและจังหวัดราชบุรี รวมจำนวน 25 ตัว ภายใต้โครงการการศึกษาผลผลิตและระบบการผลิตโคพื้นเมืองของเกษตรกรโดยการสนับสนุนจากกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ทำการเก็บข้อมูลประจำตัวสัตว์ทั่วไป เช่น เบอร์สัตว์ เพศ สายพันธุ์ สี พื้นที่เก็บตัวอย่าง วัน/เดือน/ปีที่เก็บตัวอย่าง และเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อบริเวณสัน *Longissimus dorsi* บริเวณซี่โครงที่ 12-13 โดยตัดให้มีขนาด 2x2x2 ซม. หรือน้ำหนักประมาณ 20-50 กรัม ใส่ลงในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย absolute ethanol จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะสกัดดีเอ็นเอ

3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์

วิธีการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อสัตว์ดัดแปลงมาจาก Long-Cheng (2006) โดยนำตัวอย่างเนื้อสัตว์ 50 มิลลิกรัมผสม TNEs buffer 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร จากนั้นเติม 20 mg/ml proteinase K จำนวน 15 ไมโครลิตร นำไปเข้าเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ ที่ 60 องศาเซลเซียส จำนวน 200 รอบต่อนาที นาน 1 ชั่วโมง 30 นาที เติม 5.3 M NaCl จำนวน 190 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร นาน 15 วินาที จากนั้นนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10-15 นาที เก็บส่วนน้ำส่วนใสใสหลอดใหม่ ตกตะกอนดีเอ็นเอโดยเติม isopropanol จำนวน 600 ไมโครลิตร (1 เท่าของปริมาณน้ำส่วนใสที่เก็บได้) จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที นำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 รอบต่อนาที นาน 20-30 นาที จากนั้นเทส่วนน้ำทิ้ง (เก็บตะกอน) ล้างตะกอนด้วย 70 % ethanol 500 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมาให้เข้ากัน นำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่

13,0000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง เก็บตะกอนดีเอ็นเอ รอให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 50 ไมโครลิตร แล้วนำไปวัดความเข้มข้นดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer; Ultrospec 1100 *pro*) เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้งานในขั้นตอนต่อไป

3.3 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอเครื่องหมายและความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองภาคกลางด้วยไมโครแซทเทลไลท์

3.3.1 การเพิ่มปริมาณไมโครแซทเทลไลท์ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พหิวัณ

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชิ้นเนื้อและผ่านขั้นตอนการตรวจสอบคุณภาพแล้วมาใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบในการเพิ่มจำนวนไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิคเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (Polymerase chain reaction) โดยเลือกใช้ไพรเมอร์ที่ ISAG/FAO (FAO, 1998) เสนอแนะในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ จำนวน 20 โลไซ โดยเลือกไพรเมอร์ให้มีการกระจายตัวทั่วทั้งจีโนม ไพรเมอร์ที่ใช้แสดงในตารางที่ 3.1 ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.มนต์ชัย ดวงจินดา ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ตารางที่ 3.1 ไพรเมอร์ที่ใช้สำหรับการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ

Locus	Primer	Ta(°C)	Size	chromosome
ETH152	TACTCGTAGGGCAGGCTGCCTG GAGACCTCAGGGTTGGTGATCAG	59	191-211	5
ETH225	GATCACCTTGCCACTATTTTCCT ACATGACAGCCAGCTGCTACT	57	140-160	9
HEL1	AGTCCATGGGATTGAAAGAGTTGG CTTTTATTCAACAGCTATTTAACAAGG	55	101-117	15
HRH1	GGCTTCAACTCACTGTAACACATT TTCTTCAAGTATCACCTCTGTGGCC	55	180-190	22
LLSTS001	GGTGCTGTTATCTAGAATTTGG GGAGTCATACACAAGTGAAGC	58	77-97	7
LLSTS005	GGAAGCAATGAATCTATAGCC TGTTCTGTGAGTTTGTAAGC	55	181-193	10
LLSTS014	CTGACTATGGTGATAATCCC TCTTTTCCCTTTCCTTCCCC	58	128-134	19

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

Locus	Primer	Ta(°C)	Size	chromosome
OCAM	CCTGACTATAATGTACAGATCCCTC GCAGAATGACTAGGAAGGATGGCA	57	178-190	25
BM2113	GCTTCCTTCTACCAAATACCC CTTCCTGAGAGAAGCAACACC	55	123-147	2
BOLADRB2	AGGCAGCGCCGAGGTGAGCGA TCCAACACTCACCTGGACGTAGC	60	144-152	23
ETH131	GTGGACTATAGACCATAAGGTC GCTGTGATGGTCTACGAATGA	55	138-168	21
HEL5	GGTAATGGTTTTTCAGACGTTAGTG GTAGCAGGATCACTTGTTAGGG	54	161-181	21
RBP3	TGTATGATCACCTTCTATGCTTC GCTTAGGTAATCATCAGATAGC	55	141-153	28
TGLA116	GCACAGTAAGAGTGATGGCAGA TGGAGAAGATTTGGCTGTGTACCCA	57	79-85	4
BM203	GGGTGTGACATTTTGTTCCC CTGCTCGCCACTAGTCCTTC	58	100-120	3
HUJII77	TCCATCAAGTATTTGAGTGCAA ATAGCCCTACCCACTGTTTCTG	58	120-140	3
TGLA153	GGAGTGGGAGAAAGGVTCAAA TGCTTTACAGTGTTGTGTTAGTTT	60	119-153	20
IGF1	GCTTGGATGGACCATGTTG CACTTGAGGGGCAAATGATT	48	225-231	5
CSSM065	TTCCTGCTTGGTGAACTTTGAAC CAACTCAAGTTCAACAGCAGCC	58	154-174	6
UWCA9	CCTTCTCTGAATTTTGTGAAAGC GGACAGAAGTGAGTGAAGTGA	58	83-107	9

ทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณตำแหน่งของไมโครแซทเทลไลต์ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ (Polymerase chain reaction; PCR) ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 200 ng, 1xAmpliBufferA (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.01%Triton™x-100, Stabilizers) , 5 mM dNTP, 3mM MgCl₂, 1U *Taq* polymerase(Vivantis), 2.5 μM primer forward, 2.5 μM primer reverse และ น้ำกลั่น (sterilized distilled water)

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่ใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (Tpersonal combi-block; Biometra) ก่อนการทำงานของปฏิกิริยาลูกโซ่ กำหนดอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาลูกโซ่ จำนวน 35 รอบ ตามวงรอบที่อุณหภูมิต่างๆกัน คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (ดีเอ็นเอเสียสภาพแยกเป็นสายเดี่ยว) จากนั้นลดอุณหภูมิลงในช่วง 48-56 องศาเซลเซียส (ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมกับไพรเมอร์ของแต่ละตำแหน่งดังแสดงในตารางที่ 1 เพื่อให้ดีเอ็นเอต้นแบบจับตัวอย่างเหมาะสมกับไพรเมอร์ ใช้เวลานาน 45 วินาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นที่ระดับ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที เพื่อให้มีการเพิ่มจำนวนเบสจากการจับตัวอย่างเหมาะสมของแต่ละไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาลูกโซ่ทำงานครบ 35 รอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ เป็นขั้นตอนการทำปฏิกิริยาลูกโซ่ที่เสร็จสมบูรณ์

ทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ของไมโครแซทเทลไลต์และไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส ด้วย 1% อะกาโรสเจล โดยผสมผลผลิตพีซีอาร์ และสีติดตามที่มีเอทิลเดียมโบรไมด์ให้มีปริมาตรเป็นอัตราส่วน 5:2 บนกระดาษพาราฟิล์ม จากนั้นจึงหยอดลงในหลุมบนอะกาโรสเจล ผ่านสารละลายตัวกลาง 1X TBE เป็นเวลา 40 นาที ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ จากนั้นตรวจแถบดีเอ็นเอผ่านเครื่อง UV trans-illuminator โดยเทียบขนาดกับ 100 bp DNA ladder

3.3.2 การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลต์

การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอและขนาดชิ้นส่วนไมโครแซทเทลไลต์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่ด้วยเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส (Vertical electrophoresis) โดยใช้โพลีอะคริลาไมด์เจลเป็นตัวกลาง จากนั้นทำการตรวจสอบแถบดีเอ็นเอโดยนำไปย้อมด้วยวิธี Silver-staining เพื่อให้สามารถมองเห็นแถบดีเอ็นเอ ขั้นตอนการเตรียม 4.5% Denaturing polyacrylamide gel การทำอิเล็กโตรโฟรีซิส และการย้อมเจลด้วยวิธี Silver-staining ดัดแปลงจากวิธีการของ Promega Corporation (n.d) และ Sambrook and Russell (2001) โดยห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ. นครปฐม) ตามวิธีการดังต่อไปนี้

3.3.2.1 การเตรียม 4.5% Denaturing polyacrylamide gel

เตรียม 4.5% Denaturing polyacrylamide gel โดยใช้ 4.5% Bis-Acrylamide (4.5% Bis-Acrylamide, 7 M Urea, 1XTBE buffer) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เมื่อเตรียมกระจกสำหรับเทเจลเรียบร้อยแล้วจึงเติม 10% Ammonium persulfate (APS) ปริมาตร 300 ไมโครลิตร และ TEMED ปริมาตร 80 ไมโครลิตร เขย่าหรือคนให้เข้ากัน ระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ นำส่วนผสมที่ได้ค่อยๆ เทลงในช่องว่างระหว่างกระจกและ chamber โดยระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ แล้วเสียบด้านเรียบของหวีแบบพื้นฉลามเข้าไปเพื่อให้ผิวหน้าเจลเรียบเสมอกัน ตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้องเพื่อให้เจลแข็งตัวเป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง

3.3.2.2 การแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า

เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว นำมาประกอบเข้ากับชุดอิเล็กโตรโฟรีซิส เท 1XTBE buffer (5XTBE buffer; 0.45 M Tris-base, 0.01 M EDTA) ลงใน upper buffer chamber และ lower buffer chamber ดึงหวีออกและฉีดล้างผิวหน้าของเจลด้วย 1XTBE buffer ต่อสายเข้ากับเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า เปิดเครื่อง ตั้งกระแสไฟฟ้าที่ 100 วัตต์ และตั้งอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส (pre-run) เมื่อใกล้ถึงอุณหภูมิที่ตั้งไว้ให้น้ำ ผลผลิตพีซีอาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ที่ผสมด้วย Loading buffer (95% Formamide, 20 mM EDTA, 0.05% Bromophenol blue, 0.05% Xylene cyanol) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แล้วแช่เย็นในน้ำแข็งทันที หลังจาก pre-run เสร็จเรียบร้อยแล้ว เปิดฝาเครื่องออก ฉีดล้างผิวหน้าเจลด้วย 1XTBE buffer อีกครั้ง เสียบด้านปลายแหลมของหวีแบบพื้นฉลามเข้าไป โดยให้ปลายแหลมแต่ละที่ผิวเรียบของเจลพอดี load ตัวอย่าง ปริมาตร 2.5 ไมโครลิตรลงในแต่ละช่อง (well) โดย load marker(α -174/HinfI) ไว้ในช่องซ้ายสุดและขวาสุด เพื่อใช้เป็นตัวประมาณขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ เปิดฝาเครื่อง ตั้งกระแสไฟฟ้าที่ 60 วัตต์ สำหรับเวลาที่ใช้นั้นขึ้นอยู่กับขนาดของดีเอ็นเอ เมื่อได้ระยะทางที่ต้องการแล้ว ปิดเครื่องจ่ายกระแสไฟฟ้า นำเจลออกจากเครื่องและแยก chamber ออกจากกระจก โดยแผ่นเจลจะติดอยู่กับกระจก

3.3.2.3 การย้อมแผ่นเจลด้วยวิธี Silver-staining

นำแผ่นเจลที่ติดกับกระจกแช่ในสารละลาย Fixative (10% Acetic acid) เป็นเวลา 30 นาที นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าเพื่อตรึงดีเอ็นเอบนเจล เมื่อครบเวลาให้เทสารละลาย Fixative ออกเก็บไว้ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆละ 2 นาที นำแผ่นเจลแช่ในสารละลาย Silver nitrate (0.1% Silver nitrate, 0.05% Formamide) นาน 30 นาที เขย่าเบาๆบนเครื่องเขย่า เมื่อครบเวลาเทสารละลาย Silver nitrate ลงในขวดป้องกันแสง ล้างแผ่นเจลด้วยน้ำกลั่นอย่างรวดเร็วเพื่อล้าง Silver nitrate ที่มากเกินไป

พอลออก นำแผ่นเจลแช่ในสารละลาย Developer (3% Sodium carbonate, 0.05% Formaldehyde, 200 ไมโครลิตร/ลิตร Sodium thiosulfate) ที่เตรียมใหม่และแช่เย็นจัด เขย่าเบาๆบนเครื่องเขย่า ประมาณ 5 นาที หรือจนกว่าจะเห็นแถบดีเอ็นเอชัดเจน เทสารละลาย Fixative (10% Acetic acid) ที่เหลือจากข้อ 1) ลงไป เขย่าต่อไปจนกระทั่งหมดฟองอากาศเพื่อเป็นการหยุดปฏิกิริยา ล้างแผ่นเจลด้วย น้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที แล้วผึ่งให้แห้ง

3.3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลไมโครแซทเทลไลต์

3.3.3.1 การจัดเตรียมข้อมูล

ทำการแปลงข้อมูลจากแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นให้เป็นข้อมูลจีโนไทป์ โดยตัวอย่างที่มีแถบดีเอ็นเอเพียงแถบเดียวแสดงว่าเป็นโฮโมไซกัส และตัวอย่างที่มีแถบดีเอ็นเอ 2 แถบแสดงว่าเป็นเฮเทอโรไซกัสที่โลคัสนั้นๆ

3.3.3.2 การคำนวณค่าทางพันธุกรรม

นำข้อมูลจีโนไทป์มาคำนวณค่าต่างๆ โดยใช้โปรแกรม POPGENE version 1.32 (Yeh *et al.* 1999) ดังนี้

1) การคำนวณความถี่ของอัลลีล (allele frequency)

คำนวณความถี่ของอัลลีลในแต่ละโลคัส สำหรับแต่ละประชากร ตามสูตร

$$X_i = \frac{2H_o + H_e}{2N}$$

เมื่อ X_i = ความถี่ของอัลลีลที่ i

H_o = จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบโฮโมไซกัส

H_e = จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัส

N = จำนวนตัวอย่างทั้งหมด

2) จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัส (number of allele per locus, N) ในแต่ละประชากร

คำนวณตามสูตร

$$N = \frac{\text{จำนวนของอัลลีลรวมทุกโลคัส}}{\text{จำนวนโลคัสทั้งหมดที่ศึกษา}}$$

3) โครงสร้างภายในประชากร

เปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่าง Ho และ He โดยทดสอบไคสแควร์ ตามสูตร

$$(X^2) = \frac{(Ho-He)^2}{He}$$

4) เปอร์เซ็นต์โพลิมอร์ฟิกโลไซ (percentage of polymorphic loci, P)

คำนวณในแต่ละประชากรคำนวณตามสูตร

$$P = \frac{\text{จำนวนโลคัสที่มีความถี่ของอัลลีลใดอัลลีลหนึ่ง} < 0.95 \times 100}{\text{จำนวนโลคัสทั้งหมดที่ศึกษา}}$$

5) ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกต (observed heterozygosity, Ho)

คำนวณในแต่ละโลคัสสำหรับแต่ละประชากร ตามสูตร

$$Ho = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซกัส}}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}}$$

และคำนวณค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยต่อโลคัส (Ho) สำหรับแต่ละประชากร ตามสูตร

$$(\overline{Ho}) = \frac{\sum Ho}{\text{จำนวนโลคัสทั้งหมดที่ศึกษา}}$$

6) ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎี (expected heterozygosity, He)

คำนวณในแต่ละโลคัสสำหรับแต่ละประชากร ตามสูตร

$$He = 2n (1 - \sum Xi^2) / (2n - 1)$$

$$\text{เมื่อ } Xi = \text{ความถี่ของอัลลีลที่ } i$$

$$N = \text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}$$

และคำนวณค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยแต่ละโลคัสสำหรับแต่ละประชากร
ตามสูตร

$$\overline{H_e} = \frac{\sum H_e}{\text{จำนวนโลคัสทั้งหมดที่ศึกษา}}$$

7) ระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance, D)

เป็นค่าที่แสดงความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร ค่า Nei's
genetic distance ตามสูตร (Nei, 1972)

$$D = -\ln I$$

$$\text{เมื่อ } I = \frac{J_{xy}}{\sqrt{J_x J_y}}$$

$$\text{โดย } J_x = \text{ค่าเฉลี่ยของ } \sum x_i^2 \text{ ทุกโลคัส}$$

$$J_y = \text{ค่าเฉลี่ยของ } \sum y_i^2 \text{ ทุกโลคัส}$$

$$J_{xy} = \text{ค่าเฉลี่ยของ } \sum x_i y_i \text{ ทุกโลคัส}$$

$$\text{เมื่อ } x_i = \text{ความถี่ของอัลลีล } i \text{ ในประชากร } x$$

$$y_i = \text{ความถี่ของอัลลีล } i \text{ ในประชากร } y$$

3.3.3.3 การสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

นำข้อมูลระยะห่างทางพันธุกรรมมาสร้างแผนผังทางวิวัฒนาการโดยวิธี UPGMA
(unweighted pair group method with arithmetic mean) โดยใช้โปรแกรม NEIGHBOR ของ
PHYLIP version 3.5c (Felsenstein, 1993)

3.4 การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองภาคกลางด้วยข้อมูลไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

3.4.1 การเพิ่มปริมาณไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์

ทำการเพิ่มจำนวนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop โดยเลือกใช้ 1U TaqDNA polymerase (Vivantis), 2.5 μ M primer forward, 2.5 μ M primer reward และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ไพโรเมอร์ที่ใช้ในการทดลองเสนอโดย Tsuji *et al.* (2004) โดยไพโรเมอร์ทั้งสองเส้นได้รับการอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.มนต์ชัย ดวงจินดา ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้แก่

Dloop-F 5'-ACATTAAATTATATGCCCCATGC-3'

Dloop-R 5'AGCTCGTGATCTAATGGTAAGGA-3'

ทำการเพิ่มปริมาณไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ ปริมาตรรวม 25 ไมโครลิตร ประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบความเข้มข้น 200 ng, 1xAmpliBufferA (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, 0.01%TritonTMx-100, Stabilizers) , 5 mM dNTP, 3mM MgCl₂ และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

การทำปฏิกิริยาลูกโซ่ใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (T-personal combi-block; Biometra) ก่อนการทำงานของปฏิกิริยาลูกโซ่ กำหนดอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เพื่อเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาลูกโซ่ จำนวน 35 รอบ ตามวงรอบที่อุณหภูมิต่างๆกัน คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที (ดีเอ็นเอเสียสภาพแยกเป็นสายเดี่ยว) จากนั้นลดอุณหภูมิลงในช่วง 55 องศาเซลเซียส (ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมกับไพโรเมอร์) เพื่อให้ดีเอ็นเอต้นแบบจับตัวอย่างเหมาะสมกับไพโรเมอร์ ใช้เวลานาน 45 วินาที และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นที่ระดับ 72 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที เพื่อให้มีการเพิ่มจำนวนเบสจากการจับตัวอย่างเหมาะสมของแต่ละไพโรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยาลูกโซ่ทำงานครบ 35 รอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ เป็นขั้นตอนการทำปฏิกิริยา ลูกโซ่ที่เสร็จสมบูรณ์

ทำการตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์ของไมโตคอนเดรียลบริเวณ D-loop ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่ ด้วยเครื่องอิเล็กโทรโฟเรซิส ด้วย 1% อะกาโรสเจล โดยผสมผลผลิตพีซีอาร์และสียติดตามที่มีเอทิลเดียมโบรไมด์ให้มีปริมาตรเป็นอัตราส่วน 5:2 บนกระดาษพาราฟิล์ม จากนั้นจึงหยอดลงในหลุมบนอะกาโรส

เจล ผ่านสารละลายตัวกลาง 1X TBE เป็นเวลา 40 นาที ความต่างศักย์ไฟฟ้า 50 โวลต์ จากนั้นตรวจแถบดีเอ็นเอผ่านเครื่อง UV trans-illuminator โดยเทียบขนาดกับ 100 bp DNA ladder

3.4.2 การแยกผลผลิตพีซีอาร์ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอจากเจล

ทำการแยกสกัดผลผลิตพีซีอาร์จากชิ้นเจลด้วย QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, USA) โดยตัดแถบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการใส่หลอดไมโครเซ็นทรีฟิวจ์ เดิมบัฟเฟอร์ QG ปริมาตร 3 เท่าของน้ำหนักเจลที่ตัดได้ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลละลายหมด ปิดฝาหลอดดีเอ็นเอใส่ใน Spin column ที่วางอยู่ในหลอด Collection tube ขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่อยู่ภายใน collection tube จากนั้นเติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตรใน spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้ง ย้าย spin column ไปใส่หลอดไมโครเซ็นทรีฟิวจ์หลอดใหม่ เดิม บัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่แยกได้ไปทำการวิเคราะห์ปริมาณและวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.4.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จะถูกติดสลากด้วยสารฟลูออเรสเซนต์จาก ABI Prism® BigDye™ Terminator Cycle Sequencing ready Reaction Kits (Applied Biosystem; USA) โดยใช้ primer Dloop-F ทำการวิเคราะห์โดย ห้องปฏิบัติการดีเอ็นเอเทคโนโลยี (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน และหน่วยบริการชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

3.4.4 การวิเคราะห์ข้อมูลไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

3.4.4.1 การเปรียบเทียบลำดับเบส (Multiple sequence alignment)

ทำการเปรียบเทียบลำดับเบสของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ของโคพื้นเมืองไทยภาคกลางกับโคจากประเทศในแถบเอเชียที่ปรากฏในฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ *B. taurus* จากประเทศเกาหลี (AF499261) และ *B. indicus* จากประเทศอินเดีย (AY972131, AY972136, AY972137, AY378136 และ AY378137), จีนตะวันตกเฉียงใต้ (EF417971, EF417977-EF417978 และ EF417986) จีนตอนใต้ (EF524185) ฟิลิปปินส์ (AB079325-AB079327), เนปาล

(AB085921-AB085923), มอญโกเลีย (AB117091-AB117092) และ ภูพาน (AB268580-AB268581) ทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ClustalW2 (Thompson *et al.*, 1994) ในโปรแกรมสำเร็จรูป BioEdit version 7.0 (Hall, 2007)

3.4.4.2 ความถี่ของแฮปโลไทป์ (Haplotype frequency)

วิเคราะห์ค่าความถี่ของแฮปโลไทป์ (Haplotype frequency) ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ บริเวณ D-loop ด้วยโปรแกรม MEGA4.0.2 (Tamura *et al.*, 2007) โดยใช้ลำดับเบสของโคพื้นเมืองจากประเทศจีนตะวันตกเฉียงใต้ (EF417986) เป็นลำดับเบสอ้างอิง

3.4.4.3 ระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance)

ทำการวิเคราะห์อัตราการเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมบนไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอของโคพื้นเมืองภาคกลางของไทยเทียบกับกระบือและโคเผ่า *B. taurus* และ *B. indicus* ในฐานข้อมูล GenBank ตามข้อ 3.4.4.1 ด้วยโปรแกรม DNADIST version 3.5c (Felsenstein, 1993) ในโปรแกรมสำเร็จรูป BioEdit version 7.0 (Hall, 2007) โดยใช้ The Kimura 2-parameter model:

To:	A	G	C	T

A	1-a-2b	a	b	b
From: G	a	1-a-2b	b	b
C	b	b	1-a-2b	a
T	b	b	a	1-a-2b

เมื่อ a = อัตราการเปลี่ยนแปลงเบสแบบ transitions

b = ครึ่งหนึ่งของอัตราการเปลี่ยนแปลงเบสแบบ transversions

และกำหนดให้ ความถี่ของเบส A:G:C:T = 0.25:0.25:0.25:0.25

ค่า transition/transversion ratio = 2.0

ค่า transition/transversion parameter = 1.5

3.4.4.4 การสร้างแผนภาพความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

นำข้อมูลจากการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสของโคพื้นเมืองภาคกลางของไทย และโคจากประเทศอื่นๆในเอเชียมาสร้างแผนภาพความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยวิธี NJ/UPGMA (Neighbor joining / Unweighted pair method with arithmetic mean) ด้วยโปรแกรม MEGA4.0.2 โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของกระบือ (EF464437) เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม (outgroup) และกำหนดให้ Bootstrap test = 1000

3.5 สถานที่ทำการทดลอง

- 1) ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางสัตว์ ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- 2) ห้องปฏิบัติการโครงการบัณฑิตศึกษาและวิจัยสาขาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.6 ระยะเวลาในการศึกษา

- 1) ใช้ระยะเวลาในการเก็บตัวอย่างและทำการวิจัยในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 4 เดือน
- 2) ใช้ระยะเวลาในการวิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผลเป็นเวลา 2 เดือน

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ไมโครแซทเทลไลต์

4.1.1 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์

เมื่อนำตัวอย่างเนื้อโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด ได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี นครปฐม และราชบุรี มาทำการสกัดดีเอ็นเอตามวิธีการที่ดัดแปลงมาจาก Long-Cheng (2006) พบว่าวิธีการดังกล่าวสามารถสกัดดีเอ็นเอได้อย่างมีประสิทธิภาพและเป็นดีเอ็นเอที่มีคุณภาพดี ดีเอ็นเอที่สกัดได้นำมาปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ 200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรซึ่งจะนำไปใช้ในการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ต่อไป โดยการศึกษาครั้งนี้จะตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 20 โลไซ ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์และแยกขนาดผลผลิตดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่าสามารถตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากไมโครแซทเทลไลต์ได้ 18 โลไซ แถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นมีลักษณะเป็นหลายแถบติดกัน (ladder band) ดังแสดงในภาคผนวก ง

4.1.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากร

4.1.2.1 จำนวนอัลลีลในแต่ละโลคัส

จำนวนของอัลลีลในแต่ละโลคัสสำหรับทุกประชากรที่ศึกษามีความผันแปรอยู่ระหว่าง 2-6 อัลลีล จำนวนอัลลีลเฉลี่ยในต่อโลคัสสำหรับทุกประชากรคือ 4 ที่โลคัส ILSTS014, BOLADRB2, RBP3 และ CSSM065 มีจำนวนของอัลลีลน้อยที่สุด คือ 2 อัลลีล และที่โลคัส ETH225 และ UWCA9 มีจำนวนของอัลลีลมากที่สุด คือ 6 อัลลีล สำหรับการทดสอบการเข้าสู่สภาพความสมดุลของยีนตามกฎของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg Equilibrium) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ เมื่อพิจารณาค่า Fis และ p-value พบว่าค่า Fis มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.2303 และมี 15 โลคัสที่เข้าสู่สภาพสมมูลยีนดังต่อไปนี้ ETH152, UWCA9, HUII77, ILSTS014, BOLADRB2, ETH225, HRH1, ILSTS005, CSSM065, BM2113, TGLA153, TGLA153, ETH131, RBP3, HEL1 และ BM203 (ตารางที่ 4.1)

4.1.2.2 โครงสร้างภายในประชากร (population structure)

โครงสร้างภายในกลุ่มประชากรโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด ได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี นครปฐม และราชบุรี เมื่อตรวจสอบด้วยไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ จำนวน 18 โลไซ ที่ ISAG/FAO (FAO, 1998) เสนอแนะในการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพ โดยทำการทดสอบความแตกต่างทางสถิติของอัลลีลในแต่ละโลคัส ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ พบว่า อัลลีล

ในโลคัส ETH152 HRH1 และ BM203 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) สำหรับโลคัส HUII77 ETH225 มีแนวโน้มที่อัลลีลจะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.1 จำนวนอัลลีลในแต่ละโลคัส ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกต (Obs_Het) ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎี (Exp_Het) ค่า Fis และค่า p-value (Hardy-Weinberg Equilibrium)

โลคัส	จำนวนอัลลีล	Obs_Het	Exp_Het	Fis	p-value
OCAM	3	0.6000	0.5282	-0.2532	0.0215
TGLA116	3	0.1667	0.4113	0.6560	0.0272
HEL5	3	0.3200	0.6327	0.3691	0.0278
UWCA9	6	0.5600	0.6808	0.1018	0.0530
ILSTS005	5	0.2917	0.6410	0.5396	0.0665
BOLADRB2	2	0.2500	0.2837	0.0135	0.0851
RBP3	2	0.6400	0.5094	-0.5160	0.0859
ETH131	3	0.6400	0.5527	-0.1608	0.0878
HEL1	4	0.1250	0.3324	0.5505	0.0919
TGLA153	4	0.3750	0.5541	0.2211	0.1162
CSSM065	2	0.2727	0.5116	0.5575	0.1210
ETH225	6	0.5200	0.6571	0.2029	0.1268
ETH152	3	0.3600	0.6180	0.2425	0.1278
BM203	4	0.1250	0.3963	0.6387	0.1376
HUII77	5	0.4000	0.7861	0.3248	0.1431
HRH1	4	0.2800	0.3780	0.1887	0.2878
ILSTS014	2	0.0400	0.0400	-0.0526	0.3080
BM2113	4	0.4583	0.7092	0.3611	0.4143
เฉลี่ย	4	0.3569	0.5124	0.2303	

ตารางที่ 4.2 ค่า chi-square และ ค่า p-value ของอัลลีลในแต่ละโลคัส

Locus	DF	Chi-square	p-value
ETH152	6	13.37	0.037*
ETH225	15	24.62	0.055
HEL1	9	8.84	0.452
HRH1	9	16.88	0.050*
LLSTS005	12	9.90	0.624
LLSTS014	3	1.53	0.675
OCAM	6	4.78	0.572
BM2113	9	8.85	0.450
BOLADRB2	3	4.44	0.217
ETH131	6	4.27	0.639
HEL5	6	2.31	0.888
RBP3	3	4.09	0.251
TGLA116	6	2.35	0.884
BM203	9	18.50	0.029*
HUJII77	12	20.83	0.052
TGLA153	9	15.88	0.069
CSSM065	3	4.22	0.238
UWCA9	15	14.13	0.515

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

4.1.2.3 จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัส (number of alleles per locus)

จำนวนของอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัสของโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด ได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี นครปฐม และราชบุรี ดังแสดงในตารางที่ 4.3 โดยโคพื้นเมือง จ.ราชบุรี มีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัสต่ำที่สุด คือ 2.055 และโคพื้นเมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์ มีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัสสูงที่สุด คือ 3.000

4.1.2.4 เปอร์เซนต์โพลิมอร์ฟิกโลไซ (percentage of polymorphic loci)

เปอร์เซนต์โพลิมอร์ฟิกโลไซ ของโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด ได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี นครปฐม และราชบุรี ดังแสดงในตารางที่ 4.3 โดยโคพื้นเมือง จ.ราชบุรี มีเปอร์เซนต์โพลี

มอร์ฟิคโลไซต่ำที่สุด คือ 77.78 เปอร์เซ็นต์ และโคพื้นเมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์มีเปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิคโลไซสูงที่สุด คือ 100 เปอร์เซ็นต์ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างโคพื้นเมืองที่เก็บจาก จ.ประจวบคีรีขันธ์แสดงโพลีมอร์ฟิคทุกโลคัส

ตารางที่ 4.3 จำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัส เปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิคโลไซ ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ย และค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ย

จังหวัด	จำนวนอัลลีล เฉลี่ยต่อโลคัส	เปอร์เซ็นต์โพลี มอร์ฟิคโลไซ	ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีเฉลี่ย	
			จากการสังเกต	จากทฤษฎี
ประจวบคีรีขันธ์	3.000	100.00	0.378	0.508
กาญจนบุรี	2.833	88.89	0.349	0.494
นครปฐม	2.722	94.44	0.344	0.536
ราชบุรี	2.055	77.78	0.324	0.464
เฉลี่ย	2.652	90.27	0.348	0.500

4.1.2.5 ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ย (observed heterozygosity)

ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยของโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด ได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี นครปฐม และราชบุรี ดังแสดงในตารางที่ 4.3 โดยโคพื้นเมืองไทย จ.ราชบุรี มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยต่ำที่สุด คือ 0.324 และโคพื้นเมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์ มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 0.378 จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า โคพื้นเมืองไทย 4 จังหวัดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำและมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในระดับใกล้เคียงกัน

4.1.2.6 ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ย (expected heterozygosity)

ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยของโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด ได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี นครปฐม และราชบุรี ดังแสดงในตารางที่ 4.3 โดยโคพื้นเมืองไทย จ.ราชบุรี มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยต่ำที่สุด คือ 0.464 และโคพื้นเมือง จ.นครปฐม มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 0.536 จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า โคพื้นเมืองไทย 4 จังหวัดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมค่อนข้างต่ำและมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน

4.1.3 ความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากร

ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมและค่าความเหมือนทางพันธุกรรมจากการคำนวณ โดยใช้ Nei genetic distance (Nei, 1978) ระหว่างโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด ได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี นครปฐม และราชบุรี เมื่อเปรียบเทียบทุกคู่ของประชากร พบว่า ระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง จ.ประจวบคีรีขันธ์ และนครปฐมมีค่าน้อยที่สุด คือ 0.0299 และระยะห่างทางพันธุกรรมระหว่างโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง จ.นครปฐมและกาญจนบุรี มีค่ามากที่สุด คือ 0.1035 (ตารางที่ 4.4) สอดคล้องกับค่าความเหมือนทางพันธุกรรมที่พบว่า โคพื้นเมืองไทยภาคกลาง จ.ประจวบคีรีขันธ์ และนครปฐมมีค่ามากที่สุด คือ 0.9706 และโคพื้นเมือง จ.กาญจนบุรีและนครปฐมมีค่าน้อยที่สุด คือ 0.9017 (ตารางที่ 4.5) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า โคพื้นเมืองจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์และนครปฐม มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันมากที่สุด

ตารางที่ 4.4 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรม ระหว่างโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด

	กาญจนบุรี	นครปฐม	ราชบุรี
ประจวบคีรีขันธ์	0.0557	0.0299	0.0769
กาญจนบุรี	****	0.1035	0.0781
นครปฐม		****	0.0710
ราชบุรี			****

ตารางที่ 4.5 ค่าความเหมือนทางพันธุกรรม ระหว่างโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด

	กาญจนบุรี	นครปฐม	ราชบุรี
ประจวบคีรีขันธ์	0.9458	0.9706	0.9260
กาญจนบุรี	****	0.9017	0.9249
นครปฐม		****	0.9315
ราชบุรี			****

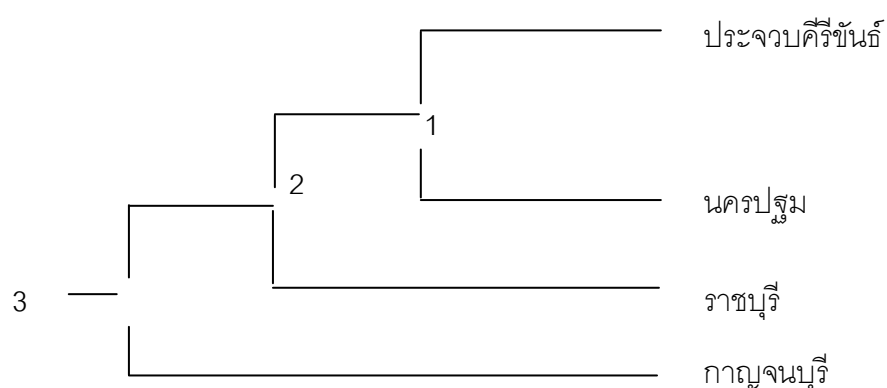
4.1.4 แผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

ระยะห่างทางพันธุกรรมจากการคำนวณโดยใช้ Nei's genetic distance มาสร้าง ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้วิธี UPGMA (unweighted pair group with arithmetic mean) จะได้แผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด ได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี นครปฐม และราชบุรี ดังแสดงในภาพที่ 4.1 และระยะทางของความห่างระหว่างประชากร แสดงในตารางที่ 4.6 จากแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่า ประชากรโค

พื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด มีการจัดแบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ กลุ่มแรก ประกอบด้วย โคพื้นเมืองไทย จ.ประจวบคีรีขันธ์ นครปฐม และราชบุรี และกลุ่มที่ 2 คือ โคพื้นเมืองไทย จ.กาญจนบุรี

ตารางที่ 4.6 ระยะทางของความห่างระหว่างประชากรโคพื้นเมืองภาคกลาง 4 จังหวัด

กลุ่มประชากร			ระยะทาง
กลุ่ม 3	และ	กลุ่ม 2	0.25915
กลุ่ม 2	และ	กลุ่ม 1	2.20187
กลุ่ม 1	และ	ประจวบคีรีขันธ์	1.49358
กลุ่ม 1	และ	นครปฐม	1.49358
กลุ่ม 2	และ	ราชบุรี	3.69544
กลุ่ม 3	และ	กาญจนบุรี	3.95459

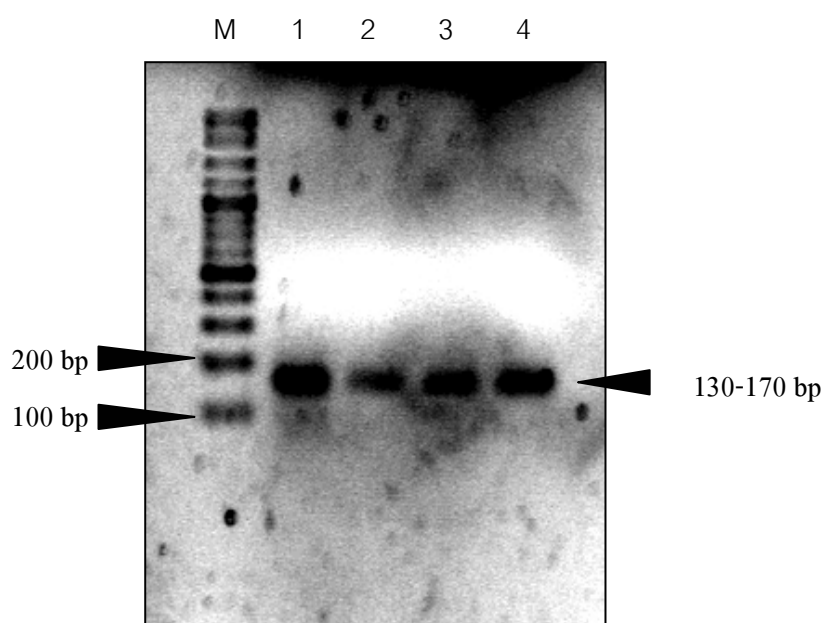


ภาพที่ 4.1 แผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด

4.2.ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

4.2.1 แถบดีเอ็นเอจากการเพิ่มจำนวนไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop

เมื่อนำตัวอย่างเนื้อของโคพื้นเมืองภาคกลางมาทำการสกัดดีเอ็นเอ พบว่าดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้นประมาณ 300-1200 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ซึ่งจะนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนบริเวณ displacement loop (D-loop) ต่อไป โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และผลผลิตพีซีอาร์ ที่ได้จากคู่ primers Dloop-F และ Dloop-R มีขนาดของแถบดีเอ็นเอ 130-170 คู่เบสดังแสดงในภาพที่ 4.2 และหาลำดับเบสจากผลผลิตพีซีอาร์ในส่วนบริเวณ displacement loop (D-loop)



ภาพที่ 4.2 ผลผลิตพีซีอาร์ของไมโตคอนเดรียลบริเวณ D-loop มีความยาวของลำดับเบส 130-170 bp จากการตรวจสอบด้วย 1% agarose gelelectrophoresis แถบ M คือ 100 bp DNA ladder Marker แถบที่ 1-4 คือ ตัวอย่างที่ได้จากโคพื้นเมือง 4 ตัวอย่าง

4.2.2 การเปรียบเทียบลำดับเบส (Multiple sequence alignment)

การเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ที่เพิ่มจำนวนได้ด้วยพีซีอาร์ พบว่า ผลผลิตพีซีอาร์ของ D-loop ของโคพื้นเมืองภาคกลางจากจังหวัดนครปฐม ราชบุรี กาญจนบุรีและประจวบคีรีขันธ์ มีความยาวประมาณ 140 bp ซึ่งตรงกับลำดับเบสที่ 217-359 ของโคในสปีชีส์ *B. indicus* (EF417986) ที่บริเวณส่วน displacement loop (D-loop) ของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ (ภาพที่ 4.4)

เมื่อศึกษาลำดับเบสของโคพื้นเมืองจากภาคกลางของไทยทั้ง 25 ตัว เปรียบเทียบกับลำดับเบสของโคในสปีชีส์ *B. taurus* และโคพื้นเมืองจากประเทศในแถบเอเชียที่ปรากฏในฐานข้อมูล GenBank ได้แก่ *B. taurus* จากประเทศเกาหลี (AF499261) และ *B.indicus* จากประเทศอินเดีย (AY972131, AY972136, AY972137, AY378136 และ AY378137), จีนตะวันตกเฉียงใต้ (EF417971, EF417977-EF417978 และ EF417986), จีนตอนใต้ (EF524185) ฟิลิปปินส์ (AB079325-AB079327), เนปาล (AB085921-AB085923), มองโกเลีย (AB117091-AB117092) และ ภูฏาน (AB268580-AB268581) นอกจากนี้ยังทำการเปรียบเทียบกับลำดับเบสของกระบือ *Bubalus bubalis* ด้วย (EF464437) ทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ClustalW2 (ภาพที่ 4.4) พบว่า โคพื้นเมืองจากภาคกลางของไทยทั้ง 25 ตัวอย่าง มีลำดับเบสของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop เหมือนกับโคในสปีชีส์ *B. indicus* มากกว่าโคในสปีชีส์ *B. taurus* และกระบือ โดยมีค่าความเหมือนเท่ากับ 90-99%, 80-88% และ 64-70% ตามลำดับ (ภาคผนวกที่ จ) จากข้อมูลดังกล่าวมานี้ยืนยันได้ว่าโคพื้นเมืองที่นำมาศึกษาทุกตัวอย่างเป็นโคในสปีชีส์ *B. indicus*

เมื่อพิจารณาลำดับเบสของโคทั้ง *B. taurus* และ *B. indicus* เทียบกับลำดับเบสของกระบือ พบว่า โคมีตำแหน่งของเบสอนุรักษ์ที่แตกต่างจากกระบืออยู่ถึง 24 ตำแหน่งบนดีเอ็นเอที่ศึกษา ซึ่งตำแหน่งเหล่านี้จะใช้ในการจำแนก Genus ของโคและกระบือได้ ขณะที่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างลำดับเบสของโคสปีชีส์ *B. taurus* และ *B. indicus* พบว่า ลำดับเบสของโคทั้งสองสปีชีส์มีตำแหน่งที่แตกต่างกันอยู่ 14 ตำแหน่ง ซึ่งตำแหน่งของเบสที่แตกต่างกันนี้น่าจะเป็นประโยชน์ในการจำแนกสปีชีส์ของโค *B. taurus* และ *B. indicus* ได้เช่นกัน

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
Bubalus bubalis_EF464437	TACATTACATTATATGCCCCATGCGTATTAAGCAAGTACATAA	CGATTGATAGTACATAGTACATATAATTATTGATCGTACATAGCACATTTTAAGTC								
Bos taurus_KR_AF499261	-.....A.....A.....A.....G.C..CT..AGC.....A.....CT.....T.....T.....									
SC_EF524185	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A..T.....T.....TA..									
ML_AB117092	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....A.....A..T.....T.....TA..									
ML_AB117091	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....A.....A..T.....T.....TA..									
BT_AB268581	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....N.....A.....C.....A.C.....T.....TA..									
BT_AB268580	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....A.....A..T.....T.....TA..									
SWC_EF417986	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A..T.....T.....TA..									
SWC_EF417978	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A..T.....T.....TA..									
SWC_EF417977	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A..T.....T.....TA..									
SWC_EF417971	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A..T.....T.....TA..									
NP_AB085923	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A..T.....T.....TA..									
NP_AB085922	-.....A.....A.....A.....G.C..CT..A.....A.....C.....A.C.....T.....TA..									
NP_AB085921	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A.C.....T.....TA..									
PL_AB079326	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A..T.....T.....TA..									
PL_AB079325	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A..T.....T.....TA..									
ID_AY378136	-.....A.....A.....A.....G.....G.TT..CT..A.....A.....C.....A.C.....T.....TA..									
ID_AY378137	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A..T.....T.....C..TA..									
ID_AY972136	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A.C.....T.....TA..									
ID_AY972149	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A.CT.....T.....TA..									
ID_AY972131	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A.C.....T.....TA..									
NC1_Pk	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A..T.....T.....TA..									
NC2_Pk	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A..T.....T.....TA..									
NC3_Pk	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A..T.....T.....TA..									
NC4_Pk	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A..T.....T.....TA..									
NC5_Pk	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A..T.....T.....TA..									
NC6_Kj	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A..T.....T.....TA..									
NC12_Kj	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A..T.....T.....TA..									
NC15_Np	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A..T.....T.....TA..									
NC16_Pk	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A..T.....T.....TA..									
NC19_Pk	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A..T.....T.....TA..									
NC20_Pk	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A..T.....T.....TA..									
NC21_Np	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A..T.....T.....TA..									
NC24_Kj	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A..T.....T.....TA..									
NC25_Rj	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..A.....A.....C.....A..T.....T.....TA..									
NC8_Kj	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..TT.CCC..G.A.....GC..T.A..T.....T.....TA..									
NC10_Rj	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..TT.CCC..G.A.....GC..T.A..T.....T.....TA..									
NC11_Rj	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..TT.CCC..G.A.....GC..T.A..T.....T.....TA..									
NC22_Np	-.....A.....A.....A.....C.....CG.GG.CCT..TT.CC..G.A.....C..T.A..T.....T.....TA..									
NC18_Pk	-.....A.....A.....A.....G.T..CT..TT.CC..GG.A.....C..T.A..T.....T.....TA..									
NC9_Np	-.....A.....A.....A.....G.TG.C.T..T.CC..GG.A.....GC..T.A..T.....T.....TA..									
NC13_Kj	-.....A.....A.....A.....G.TG.C.T..T.CC..GG.A.....GC..T.A..T.....T.....TA..									
NC14_Np	-.....A.....A.....A.....G.TG.C.T..T.CC..GG.A.....GC..T.A..T.....T.....TA..									
NC17_Pk	-.....A.....A.....A.....G.TG.C.T..T.CC..GG.A.....GC..T.A..T.....T.....TA..									

ภาพที่ 4.3 การเปรียบเทียบลำดับเบสของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจากโคพื้นเมืองภาคกลางของไทยกับกระบือและโคในฐานข้อมูลยีน

	110	120	130	140	150
Bubalus bubalis_EF464437	AAATCCATTCTCGTCAACATGCGTATCCCTTCCATTAGATCACGAGCT				
Bos taurus_KR_AF499261	...T...T...AT...G...ATC...TATA.ATTCCTT.C...TT..A.CACGAGC				
SC_EF524185	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
ML_AB117092	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
ML_AB117091	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
BT_AB268581	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
BT_AB268580	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
SWC_EF417986	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
SWC_EF417978	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
SWC_EF417977	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
SWC_EF417971	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NP_AB085923	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NP_AB085922	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NP_AB085921	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
PL_AB079326	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
PL_AB079325	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
ID_AY378136	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
ID_AY378137	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
ID_AY972136	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
ID_AY972149	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
ID_AY972131	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NC1_Pk	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NC2_Pk	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NC3_Pk	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NC4_Pk	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NC5_Pk	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NC6_Kj	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NC12_Kj	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NC15_Np	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NC16_Pk	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NC19_Pk	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NC20_Pk	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NC21_Np	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NC24_Kj	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NC25_Rj	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NC8_Kj	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NC10_Rj	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NC11_Rj	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NC22_Np	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NC18_Pk	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NC9_Np	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NC13_Kj	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NC14_Np	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NC17_Pk	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				
NC23_Kj	...C...AA...ATC...CTATA.A.CCCCTT-C...T..				

ภาพที่ 4.3 (ต่อ) การเปรียบเทียบลำดับเบสของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอจากโคพื้นเมืองภาคกลางของไทยกับกระบือและโคในฐานข้อมูลยีน

4.2.3 ความถี่ของแฮปโลไทป์ (Haplotype frequency)

ค่าความถี่ของแฮปโลไทป์ (Haplotype frequency) ของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ของโคพื้นเมืองจากภาคกลางของไทยทั้ง 25 ตัวอย่าง วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม MEGA4.0.2 (Tamura *et al.*, 2007) โดยใช้ลำดับเบสของโคพื้นเมืองจากประเทศจีนตะวันตกเฉียงใต้ (EF417986) เป็นลำดับเบสอ้างอิง (ภาพที่ 4.3) จากการเปรียบเทียบพบว่า ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ของโคพื้นเมืองจากภาคกลางของไทย มีความแตกต่างของลำดับเบสอยู่ทั้งหมด 18 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถจำแนกตัวอย่างโคได้เป็น 7 แฮปโลไทป์ ได้แก่ แฮปโลไทป์ ct1 ถึง ct7 ตามลำดับ โดยแฮปโลไทป์ ct1 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเออ้างอิงมากที่สุด โดยมีความแตกต่างของลำดับเบสเพียงตำแหน่งเดียว ซึ่งเป็นการแทนที่ของเบส A ด้วย เบส G ที่ตำแหน่ง 231 ของดีเอ็นเออ้างอิง แฮปโลไทป์ ct1 นี้พบในตัวอย่างทั้งหมด 15 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างเนื้อโคหมายเลข NC1, NC2, NC3, NC4, NC5, NC6, NC12, NC15, NC16, NC19, NC20, NC21, NC24 และ NC25 โดยตัวอย่างเนื้อโคในแฮปโลไทป์ ct1 นี้จำนวน 8 ตัวอย่างเป็นโคพื้นเมืองที่นำมาจาก จ. ประจวบคีรีขันธ์ แฮปโลไทป์ที่มีจำนวนตัวอย่างของเนื้อโครองลงมาคือ แฮปโลไทป์ ct6 โดยพบในตัวอย่างเนื้อโค 4 ตัวอย่าง (16%) ได้แก่ NC9, NC13, NC14 และ NC17 ส่วนแฮปโลไทป์ ct3 พบในตัวอย่างเนื้อโคจำนวน 2 ตัวอย่าง ได้แก่ NC10 และ NC11 นอกจากนี้ยังพบว่า แฮปโลไทป์ ct2, ct4, ct5 และ ct7 พบในตัวอย่างเนื้อเพียงแบบละ 1 ตัวอย่าง ได้แก่ หมายเลข NC8, NC22, NC18 และ NC23 ตามลำดับ โดยในจำนวนนี้พบว่า แฮปโลไทป์ ct4 มีความแตกต่างจากลำดับเบสอ้างอิงมากที่สุด โดยมีการแทนที่ของเบสสูงถึง 12 ตำแหน่ง

	222222222	22222223		
	345556666	67777880		
	1858901568	90347283		
ST	AATTCTCAAA	GTATTAAT	N	Sample number
ct1	G.		15	NC1, NC2, NC3, NC4, NC5, NC6, NC12, NC15, NC16, NC19, NC20, NC21, NC24, NC25
ct2	TTC	CC.G.GT.	1	NC8
ct3	G.....TTC	CC.G.GT.	2	NC10, NC11
ct4	GCCGGC.TTC	C..G..T.	1	NC22
ct5	G.....TTC	C.GG..T.	1	NC18
ct6	GCGT.C	C.GG.GT.	4	NC9, NC13, NC14, NC17
ct7	TG	CC.GGGTG	1	NC23

ภาพที่ 4.4 ความถี่ของแฮปโลไทป์ของไมโทคอนเดรียลบริเวณ D-loop ของโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง (ct)

ตัวเลขในแถวบนแสดงตำแหน่งของเบสในไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ N แทนจำนวนตัวอย่างที่มีแฮปโลไทป์เดียวกัน โดยหมายเลขของตัวอย่างแสดงทางด้านขวามือของภาพ ST เป็นลำดับเบสของโค (EF417986) ที่ใช้เป็นมาตรฐานในการอ้างอิง จุดไข่ปลา (.) แสดงตำแหน่งของเบสที่เหมือนกับลำดับเบสอ้างอิง

4.2.4 ระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance)

ระยะห่างทางพันธุกรรมหรืออัตราการเปลี่ยนแปลงของรหัสพันธุกรรมบนไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอของโคพื้นเมืองภาคกลางของไทยเทียบกับกระบือ (EF464437), โคในสปีชีส์ *B. taurus* (AF499261) และ *B. indicus* (EF417986) วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม DNADIST version 3.5c ผ่านทางโปรแกรมสำเร็จรูป BioEdit version 7.0 โดยใช้ The Kimura 2-parameter model (ภาพที่ 4.5) พบว่า โคและกระบือมีระยะห่างทางพันธุกรรมประมาณ 0.30-0.41 โดยที่โคในสปีชีส์ *B. taurus* มีระยะห่างพันธุกรรมจาก *B. indicus* เท่ากับ 0.1301-0.2368 เมื่อพิจารณาโคพื้นเมืองจากภาคกลางของไทยเปรียบเทียบกับโค *B. indicus* ที่ใช้อ้างอิง พบว่า โคพื้นเมืองจากภาคกลางของไทยมีระยะห่างทางพันธุกรรมกับโค *B. indicus* อ้างอิงอยู่ในช่วง 0.0072-0.0950 โดยโคพื้นเมืองหมายเลข NC1, NC2, NC3, NC4, NC5, NC6, NC12, NC15, NC16, NC19, NC20, NC21, NC24 และ NC25 มีระยะห่างทางพันธุกรรมกับโค *B. indicus* ที่ใช้อ้างอิงน้อยที่สุด เท่ากับ 0.0072 ขณะที่โคพื้นเมืองหมายเลข NC22 มีระยะห่างทางพันธุกรรมกับโค *B. indicus* ที่ใช้อ้างอิงมากที่สุด เท่ากับ 0.0950

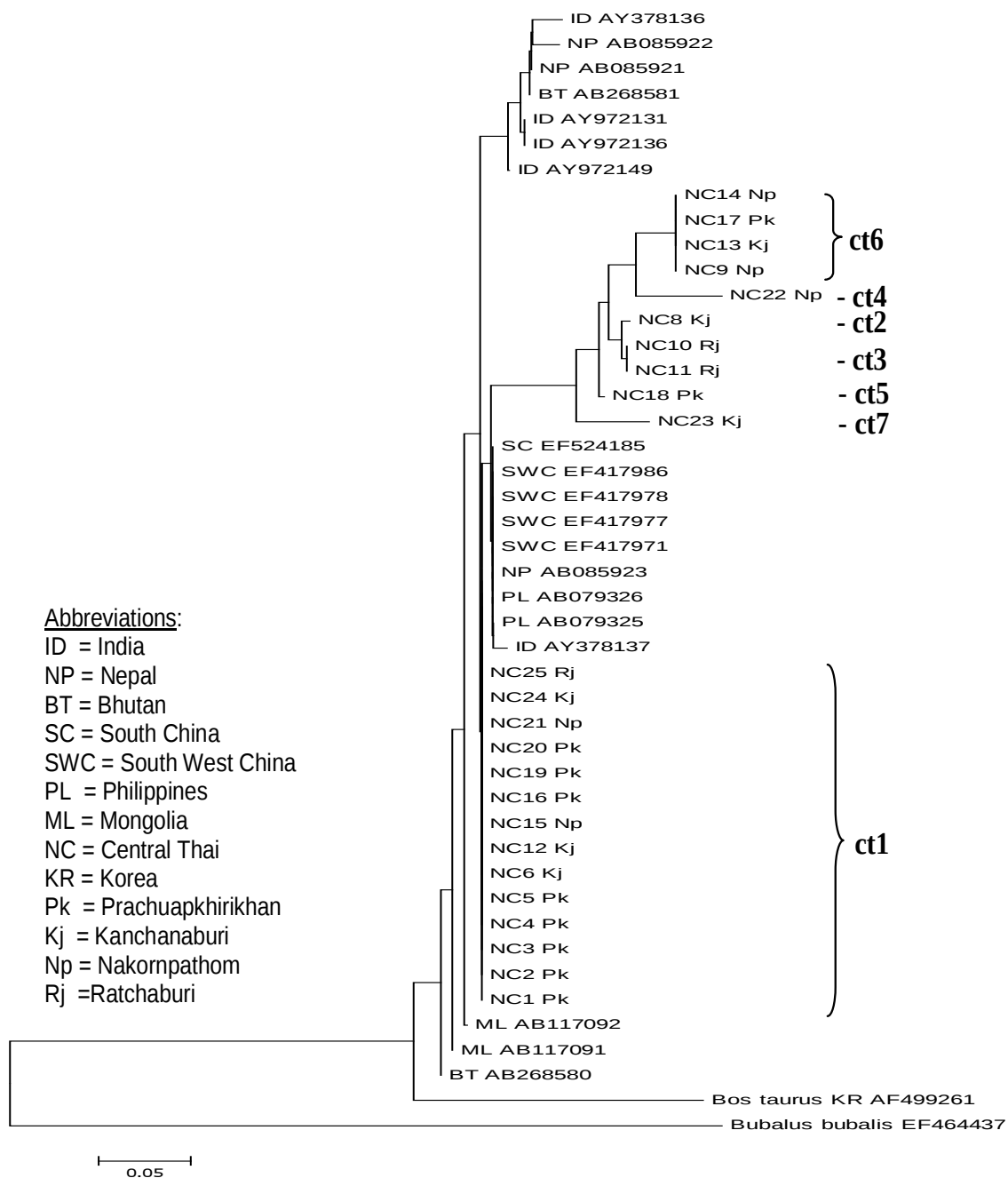
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1. Bb	0.0000	0.3208	0.3038	0.2910	0.2910	0.2910	0.2910	0.2910	0.2910	0.2910	0.2910	0.2910	0.2910	0.2910	0.2910	0.2910	0.2910	0.3964	0.3810	0.3810	0.4087	0.3698	0.3898	0.3898	0.3898	0.3898	0.4075
2. Bt		0.0000	0.1392	0.1301	0.1301	0.1301	0.1301	0.1301	0.1301	0.1301	0.1301	0.1301	0.1301	0.1301	0.1301	0.1301	0.1301	0.2061	0.1956	0.1956	0.2190	0.1867	0.2358	0.2358	0.2358	0.2358	0.2158
3. Bi			0.0000	0.0072	0.0072	0.0072	0.0072	0.0072	0.0072	0.0072	0.0072	0.0072	0.0072	0.0072	0.0072	0.0072	0.0072	0.0611	0.0688	0.0688	0.0950	0.0609	0.0778	0.0778	0.0778	0.0778	0.0692
4. NC1				0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0688	0.0605	0.0605	0.0861	0.0528	0.0857	0.0857	0.0857	0.0857	0.0770
5. NC2					0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0688	0.0605	0.0605	0.0861	0.0528	0.0857	0.0857	0.0857	0.0857	0.0770
6. NC3						0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0688	0.0605	0.0605	0.0861	0.0528	0.0857	0.0857	0.0857	0.0857	0.0770
7. NC4							0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0688	0.0605	0.0605	0.0861	0.0528	0.0857	0.0857	0.0857	0.0857	0.0770
8. NC5								0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0688	0.0605	0.0605	0.0861	0.0528	0.0857	0.0857	0.0857	0.0857	0.0770
9. NC6									0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0688	0.0605	0.0605	0.0861	0.0528	0.0857	0.0857	0.0857	0.0857	0.0770
10. NC12										0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0688	0.0605	0.0605	0.0861	0.0528	0.0857	0.0857	0.0857	0.0857	0.0770
11. NC15											0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0688	0.0605	0.0605	0.0861	0.0528	0.0857	0.0857	0.0857	0.0857	0.0770
12. NC16												0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0688	0.0605	0.0605	0.0861	0.0528	0.0857	0.0857	0.0857	0.0857	0.0770
13. NC19													0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0688	0.0605	0.0605	0.0861	0.0528	0.0857	0.0857	0.0857	0.0857	0.0770
14. NC20														0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0688	0.0605	0.0605	0.0861	0.0528	0.0857	0.0857	0.0857	0.0857	0.0770
15. NC21															0.0000	0.0000	0.0000	0.0688	0.0605	0.0605	0.0861	0.0528	0.0857	0.0857	0.0857	0.0857	0.0770
16. NC24																0.0000	0.0000	0.0688	0.0605	0.0605	0.0861	0.0528	0.0857	0.0857	0.0857	0.0857	0.0770
17. NC25																	0.0000	0.0688	0.0605	0.0605	0.0861	0.0528	0.0857	0.0857	0.0857	0.0857	0.0770
18. NC8																		0.0000	0.0070	0.0070	0.0591	0.0285	0.0440	0.0440	0.0440	0.0440	0.0292
19. NC10																			0.0000	0.0000	0.0512	0.0212	0.0514	0.0514	0.0514	0.0514	0.0366
20. NC11																				0.0000	0.0512	0.0212	0.0514	0.0514	0.0514	0.0514	0.0366
21. NC22																					0.0000	0.0438	0.0590	0.0590	0.0590	0.0590	0.0926
22. NC18																						0.0000	0.0438	0.0438	0.0438	0.0438	0.0595
23. NC9																							0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0765
24. NC13																								0.0000	0.0000	0.0000	0.0765
25. NC14																									0.0000	0.0000	0.0765
26. NC17																										0.0000	0.0765
27. NC23																											0.0000

ภาพที่ 4.5 ค่าระยะห่างทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองภาคกลางของไทยกับกระบือ และโคในฐานข้อมูลยีน

Bb = *Bubalus bubalis* (EF464437) Bt = *Bos taurus* (AF499261) และ Bi = *Bos indicus* (EF417986)

4.2.5 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโคพื้นเมืองไทยภาคกลางกับและโคพื้นเมืองในเอเชีย

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโคพื้นเมืองไทยภาคกลางกับโคพื้นเมืองในเอเชียทั้งกลุ่ม *B. taurus* และ *B. indicus* วิเคราะห์โดยวิธี Neighbor joining / Unweighted pair method with arithmetic mean (NJ/UPGMA) ด้วยโปรแกรม MEGA 4.0.2 โดยใช้ลำดับเบสของกระบือ (EF464437) เป็นสิ่งมีชีวิตนอกกลุ่ม (outgroup) และกำหนดให้ค่า Bootstrap test = 1000 ผลของการสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ พบว่า โคพื้นเมืองจากภาคกลางของไทยทั้ง 25 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาจัดเป็นเครือญาติเดียวกันกับโคพื้นเมืองในเอเชียในสปีชีส์ *B. indicus* ทั้งจากประเทศประเทศอินเดีย (AY972131, AY972136, AY972137, AY378136 และ AY378137), จีนตะวันตกเฉียงใต้ (EF417971, EF417977-EF417978 และ EF417986), จีนตอนใต้ (EF524185) ฟิลิปปินส์ (AB079325-AB079327), เนปาล (AB085921-AB085923), มองโกเลีย (AB117091-AB117092) และ ภูฏาน (AB268580-AB268581) โดยโคพื้นเมืองไทยภาคกลางสามารถจัดแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อย ซึ่งโคกลุ่มแรกมีวิวัฒนาการมาก่อนโคกลุ่มที่ 2 และมีวิวัฒนาการมาจากโคพื้นเมืองของประเทศภูฏาน มองโกเลีย และอินเดีย โดยสมาชิกของโคในกลุ่มที่ 1 เป็นโคที่มีแฮปไทป์ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอเป็นแบบ ct1 และส่วนใหญ่เป็นโคที่มาจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ขณะที่โคกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มโคที่มีวิวัฒนาการหลังสุดและวิวัฒนาการมาจากโคพื้นเมืองของประเทศจีนและฟิลิปปินส์ โดยสมาชิกของโคในกลุ่มที่ 2 เป็นโคที่มีแฮปไทป์ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอเป็นแบบ ct2-ct7 เมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ภายในตัวอย่างของโคกลุ่มนี้พบว่า โคที่มีแฮปไทป์ของไมโทคอนเดรียดีเอ็นเอเป็นแบบ ct7 มีลำดับการวิวัฒนาการมาก่อน ตามด้วยโค ct5, ct3, ct2, ct4 และ ct6 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.6)



ภาพที่ 4.6 แผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่างโคพื้นเมืองไทยภาคกลางกับโคพื้นเมืองในเอเชีย
 กระบือ (EF454437) เป็นสัตว์นอกกลุ่ม

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการวิจัย

5.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ข้อมูลไมโครแซทเทลไลต์

เมื่อทำการสกัดดีเอ็นเอจากเนื้อโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด ได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี นครปฐม และราชบุรี ดีเอ็นเอที่ได้นำไปใช้ในการตรวจสอบด้วยไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอจำนวน 20 โลไซ โดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ในการเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอ และแยกผลผลิตดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอิเล็กโตรโฟรีซิส พบว่า สามารถตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นจากไมโครแซทเทลไลต์ได้ 18 โลไซ โดยโคพื้นเมืองไทยภาคกลางมีจำนวนของอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัสเท่ากับ 2.652 โดยโคพื้นเมือง จ. ราชบุรี มีจำนวนของอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัสต่ำที่สุด คือ 2.055 และโคพื้นเมืองไทย จ.ประจวบคีรีขันธ์ มีจำนวนของอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัสสูงที่สุด คือ 3.000 จากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า โคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรที่ใกล้เคียงกัน แต่ค่าที่ได้จากการศึกษานี้แตกต่างจากผลการศึกษาของ กัลยา บุญญานุวัตร และคณะ (2548) ที่ทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทย 4 สายพันธุ์ ได้แก่ โคขาวลำพูน โคอีสาน โคลาน (โคภาคกลาง) และโคชน โดยใช้ไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ 30 โลไซ ซึ่งพบว่า โคขาวลำพูน โคอีสาน โคลาน (โคภาคกลาง) และโคชน มีจำนวนของอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัสเท่ากับ 4.00, 2.60, 3.20 และ 3.50 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนของอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัสของประชากรโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัดกับโคพื้นเมืองประเทศอื่นๆ เช่น โคพื้นเมืองอินเดียพันธุ์ Sahiwal, Hariana และ Deoni มีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัส เท่ากับ 5.2, 6.5 และ 5.9 ตามลำดับ (Mukesh *et al.*, 2004) โคพื้นเมืองอินเดียพันธุ์ Ongle และ Deoni มีจำนวนอัลลีลเฉลี่ยต่อโลคัส เท่ากับ 4.5 และ 4.1 ตามลำดับ (Metta *et al.*, 2004) ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าที่ได้จากการศึกษาสูงกว่าค่าที่ได้จากการศึกษารั้งนี้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโคพื้นเมืองประเทศอินเดียอาจมีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรมากกว่าโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด

การทดสอบการเข้าสู่สภาพสมดุลของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg Equilibrium) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ เมื่อพิจารณาค่า Fis และ p-value พบว่า ค่า Fis มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.2303 และมี 15 โลคัสที่เข้าสู่สภาพสมดุลตามกฎของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก ดังต่อไปนี้ ETH152, UWCA9, HUII77, ILSTS014, BOLADRB2, ETH225, HRH1, ILSTS005, CSSM065, BM2113, TGLA153, TGLA153, ETH131, RBP3, HEL1 และ BM203 แสดงให้เห็นว่ากลุ่มประชากรโคพื้นเมืองภาคกลาง 4 จังหวัดความถี่ของยีนมีค่าคงที่ จึงควรทำการอนุรักษ์พันธุ์ของโคในกลุ่มนี้ไว้เพื่อไม่ให้เกิดการสูญเสียแหล่งพันธุกรรม

ตารางที่ 4.7 ความหลากหลายทางพันธุกรรมบางโลคัสของโคพื้นเมืองไทยภาคกลางและโคพื้นเมืองต่างประเทศ

Locus	โคพื้นเมืองไทยภาคกลาง				โคพื้นเมืองต่างประเทศ	
	กลาง				ประเภท/พันธุ์โค	เอกสารอ้างอิง
	อัลลีลต่อ โลคัส	He	อัลลีลต่อ โลคัส	He		
ILSTS005	5	0.6410	4	0.7433	<i>Bos indicus</i>	Karthickeyan <i>et al</i> , 2006
			5	0.5800	Sahiwal	Mukesh <i>et al</i> , 2004
					(<i>Bos indicus</i>)	
ETH152	3	0.6180	4	0.3459	<i>Bos indicus</i>	Karthickeyan <i>et al</i> , 2006
ETH225	6	0.6571	4	0.7193	<i>Bos indicus</i>	Karthickeyan <i>et al</i> , 2006
			5	0.5800	Sahiwal	Mukesh <i>et al</i> , 2004
					(<i>Bos indicus</i>)	
			10	0.7240	<i>Bos indicus</i>	Cervini <i>et al</i> , 2006
HEL1	4	0.3324	4	0.6827	<i>Bos indicus</i>	Karthickeyan <i>et al</i> , 2006
HEL5	3	0.6327	4	0.5988	<i>Bos indicus</i>	Karthickeyan <i>et al</i> , 2006
			4	0.2300	Sahiwal	Mukesh <i>et al</i> , 2004
					(<i>Bos indicus</i>)	
BM2113	4	0.7092	6	0.7340	<i>Bos indicus</i>	Cervini <i>et al</i> , 2006

โครงสร้างทางพันธุกรรมภายในประชากรโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด เมื่อทำการตรวจสอบด้วยไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ จำนวน 18 โลไซ โดยทำการทดสอบที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ พบว่าที่โลคัส ETH152 HRH1 และ BM203 มีความแตกต่างของอัลลีลในโลคัสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) และโลคัส HUII77 ETH225 มีแนวโน้มที่อัลลีลจะมีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งโลคัส BM203 พบว่ามีอิทธิพลต่อการสร้างไขมันในน้ำมันของโค (Zhang *et al.*, 1998) และยังมีอิทธิพลการสร้าง marbling ในเนื้อโคด้วย (Casas *et al.*, 2000) สำหรับที่โลคัส ETH152 Olsen *et al.* (2002) รายงานว่ามีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์ไขมันน้ำโค และ Viitala *et al.* (2003) รายงานว่ามีอิทธิพลต่อผลผลิตน้ำมันโค และที่โลคัส HUII77 พบว่ามีอิทธิพลต่อผลผลิตน้ำมันโค (Rodriguez-Zas *et al.*, 2002) และยังมีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์โปรตีนในน้ำมันโคด้วย (Heyen *et al.*, 1999; Rodriguez-Zas *et al.*, 2002; Mosig *et al.*, 2001)

เปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิกโลไซ เป็นค่าที่บอกถึงสัดส่วนของยีนที่มีอัลลีลมากกว่า 1 อัลลีลในโลคัส จากการศึกษเปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิกโลไซของโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัดโดยโคพื้นเมือง จ.ราชบุรีมีเปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิกโลไซต่ำที่สุด คือ 77.78 เปอร์เซนต์และโคพื้นเมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์ มี

เปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิกโลไซสูงที่สุด คือ 100 เปอร์เซ็นต์ สำหรับโคพื้นเมือง จ.นครปฐม มีเปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิกโลไซเท่ากับ 94.44 เปอร์เซ็นต์ และโคพื้นเมือง จ.กาญจนบุรี มีเปอร์เซ็นต์โพลีมอร์ฟิกโลไซเท่ากับ 88.89 เปอร์เซ็นต์ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างโคพื้นเมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์ เกิดโพลีมอร์ฟิกทุกตัวอย่าง ส่วนตัวอย่างโคพื้นเมือง จ.ราชบุรีเกิดโพลีมอร์ฟิกเพียง 77.78 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น

ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ย เป็นค่าสัดส่วนของ heterozygous genotype เฉลี่ยต่อตำแหน่ง โดยได้จากการคำนวณจากข้อมูลที่มีอยู่จริง จากการศึกษาค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยของโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด พบว่า โคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด มีค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยเท่ากับ 0.348 โดยโคพื้นเมือง จ.ราชบุรีมีค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยต่ำที่สุด คือ 0.324 และโคพื้นเมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์ มีค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 0.378 จากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโคพื้นเมืองภาคกลางไทย 4 จังหวัดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรค่อนข้างต่ำและอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน ผลจากการศึกษาครั้งนี้แตกต่างจากการศึกษาของ กัลยา บุญญานุวัตร และคณะ(2548) ที่รายงานว่า ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยของโคพื้นเมืองไทยภาคกลางมีค่าเท่ากับ 0.525 อาจมีสาเหตุมาจากการศึกษาของ กัลยา บุญญานุวัตร และคณะ(2548) ใช้ตัวอย่างในการศึกษาเป็นฝูงโคพื้นเมืองของกรมปศุสัตว์ ในขณะที่การศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างเป็นฝูงโคพื้นเมืองที่เลี้ยงโดยเกษตรกรอย่างแท้จริง จึงอาจมีผลให้ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยมีความแตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยจากการศึกษาของ Karthickeyan *et al.* (2006) ที่รายงานว่า ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตของโคพันธุ์ Krishna Valley (*Bos indicus*) มีค่าเท่ากับ 0.6683 Mukesh *et al.* (2005) รายงานว่าโคพันธุ์ Red Kandhari และ Deoni (*Bos indicus*) ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตมีค่าเท่ากับ 0.47 และ 0.57 ตามลำดับ Mukesh *et al.* (2004) กล่าวว่า โคพันธุ์ Sahiwal, Haryana และ Deoni (*Bos indicus*) มีค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยมีค่าอยู่ระหว่าง 0.42-0.59 สาเหตุที่ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตดังกล่าวมีค่าสูงกว่าค่าที่ได้จากผลการครั้งนี้ อาจเนื่องมาจากตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่า และยังอาจมีสาเหตุมาจากการเลือกใช้ไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมาใช้ในการศึกษาด้วย

ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ย เป็นค่าที่จากการคำนวณทางอ้อมโดยมีสมมติฐานว่าประชากรอยู่ในสภาพสมดุลย์ จากการศึกษาค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ย ของโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด ได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี นครปฐม และราชบุรี มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.500 โดยโคพื้นเมือง จ.ราชบุรี มีค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยต่ำที่สุด คือ 0.464

และโคพื้นเมือง จ.นครปฐม มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยสูงสุด คือ 0.536 จากค่าดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัดมีความหลากหลายทางพันธุกรรมในประชากรอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน และจัดว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่ในระดับค่อนข้างต่ำ และผลที่ได้จากการศึกษาค้างนี้ มีค่าต่ำกว่าเล็กน้อยจากผลการศึกษาของ กัลยา บุญญานุวัตร และคณะ (2548) ที่รายงานค่า โคพื้นเมืองไทยภาคกลางมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยเท่ากับ 0.519 และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาของ Mukesh *et al.* (2004) ที่รายงานค่าโคพันธุ์ Sahiwal, Haryana และ Deoni มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.61-0.70 Metta *et al.* (2004) รายงานค่าโคพันธุ์ Ongle และ Deoni มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.46 และ 0.50 ตามลำดับ Mukesh *et al.* (2005) รายงานค่าโคพันธุ์ Red Kandhari และ Deoni มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.64 และ 0.69 ตามลำดับ และ Karthickeyan *et al.* (2006) กล่าวว่า โคพันธุ์ Krishna Valley มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 0.6683 และ 0.6569 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าค่าที่ได้จากการศึกษาดังกล่าวมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยสูงกว่าแสดงว่าตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษามีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรตัวอย่างสูงกว่าผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการเลือกใช้ไม่โครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงมาใช้ในการศึกษา และนอกจากนี้อาจยังมีปัจจัยอื่นร่วมด้วย เช่น จำนวนและโครงสร้างของไม่โครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอ จำนวนตัวอย่างที่ใช้ และเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบ

ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมระหว่างประชากรจากการคำนวณโดยใช้ Nei's genetic distance (Nei, 1978) ระหว่างโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด พบว่า โคพื้นเมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์และนครปฐมมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด คือ 0.0299 และโคพื้นเมือง จ.นครปฐมและกาญจนบุรี มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมมากที่สุด คือ 0.1035 สอดคล้องกับค่าความเหมือนทางพันธุกรรมที่พบว่า โคพื้นเมืองไทยภาคกลาง จ.ประจวบคีรีขันธ์ และ จ.นครปฐมมีความเหมือนทางพันธุกรรมมากที่สุด คือมีค่าเท่ากับ 0.9706 และโคพื้นเมือง จ.กาญจนบุรีและนครปฐมมีความเหมือนทางพันธุกรรมค่าน้อยที่สุด คือ 0.9017 แสดงให้เห็นว่า โคพื้นเมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์ และ นครปฐมมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกันมากที่สุด กัลยา บุญญานุวัตร และคณะ (2548) รายงานว่า โคพื้นเมืองภาคกลางและโคชนมีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมมากที่สุดโดยมีค่าความเหมือนทางพันธุกรรม เท่ากับ 0.9028 และมีค่าความห่างทางพันธุกรรม เท่ากับ 0.102 และโคขาวลำพูนกับโคอีสานมีความใกล้เคียงทางพันธุกรรมน้อยที่สุดโดยมีค่าความเหมือนทางพันธุกรรม เท่ากับ 0.5718 มีค่าความห่างทางพันธุกรรม เท่ากับ 0.559

ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด ที่ได้จากการคำนวณโดยใช้ Nei's genetic distance (Nei, 1978) มาสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี UPGMA พบว่าประชากรโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัด มีการจัดแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกประกอบด้วย โคพื้นเมืองประจวบคีรีขันธ์ นครปฐม และราชบุรี และกลุ่มที่ 2 คือ โคพื้นเมืองกาญจนบุรี ซึ่งแสดงให้เห็นว่า โคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 4 จังหวัดมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ยกเว้น โคพื้นเมือง จ. กาญจนบุรี โดยโคพื้นเมืองไทยภาคกลางที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันมากที่สุดคือ ประจวบคีรีขันธ์และนครปฐม

5.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ข้อมูลไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอของโคพื้นเมืองภาคกลางจากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี นครปฐม และราชบุรี จำนวน 25 ตัว ถูกประเมินด้วยการเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างกลุ่มของลำดับเบส (sequence alignment) และค่าคะแนนความเหมือนของลำดับเบส (sequence identity) พบว่าลำดับเบสของโคพื้นเมืองภาคกลางมีความเหมือนกับลำดับเบสของโคในสปีชีส์ *Bos indicus* ซึ่งยืนยันได้ว่าโคพื้นเมืองของไทยอยู่ในตระกูล *Bos indicus* (จรัญ จันทลักษณ์. 2515)

ไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ของโคพื้นเมืองจากภาคกลางของไทย มีความแตกต่างของลำดับเบสอยู่ทั้งหมด 18 ตำแหน่ง ซึ่งสามารถจำแนกตัวอย่างโคได้เป็น 7 แสพโพลไทป์ ได้แก่ แสพโพลไทป์ ct1 ถึง ct7 ตามลำดับ เมื่อนำไปสร้างแผนผังความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี UPGMA สามารถแยกได้เป็น 2 กลุ่มที่มีการวิวัฒนาการแยกจากกัน คือ โคกลุ่มแรก เป็นโคที่แอสปโพลไทป์ ct1 เป็นโคส่วนใหญ่ที่นำมาจาก จ. ประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งเป็นมีการวิวัฒนาการอยู่ในช่วงเวลาเดียวกับโคที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศอินเดีย ฟิลิปปินส์ เนปาล และโคกลุ่มที่สอง เป็นโคที่แอสปโพลไทป์ ct2 ถึง ct7 เป็นโคที่นำมาจาก จ. กาญจนบุรี นครปฐม ราชบุรี และบางตัวนำมาจากประจวบคีรีขันธ์ กลุ่มนี้มีวิวัฒนาการแยกมาจากกลุ่มแรก ซึ่งจากการศึกษาโคพื้นเมืองสปีชีส์ *B. indicus* ของ Lai *et al* (2006) ได้จำแนกกลุ่มของโคพื้นเมือง *B. indicus* ที่มีถิ่นกำเนิดอยู่ในเอเชียได้เป็น 2 clade คือ I1 และ I2 โดย clade I1 เป็นโคพื้นเมืองที่พบในอินเดีย ฟิลิปปินส์ เนปาล เกาหลี มองโกเลีย จีนตอนกลาง จีนตะวันตก จีนตะวันตกเฉียงเหนือ จีนตอนใต้ และจีนตะวันตกเฉียงใต้ ขณะที่ clade I2 เป็นโคพื้นเมืองที่พบเฉพาะในอินเดีย ฟิลิปปินส์ เนปาล จีนตอนใต้ และจีนตะวันตกเฉียงใต้ จากข้อมูลดังกล่าวบ่งชี้ได้ว่า โคพื้นเมืองไทยภาคกลางกลุ่ม ct1 น่าจะเป็นโคใน clade I1 ขณะที่โคพื้นเมืองไทยภาคกลางกลุ่ม ct2-ct7 น่าจะเป็นโคในกลุ่ม clade I2

นอกจากนี้จากแผนผังวิวัฒนาการยังแสดงให้เห็นว่า โคพื้นเมืองไทยภาคกลางกลุ่ม ct1 อาจจะเป็นโคที่นำเข้ามาจากแถบอินเดียตั้งแต่ในอดีต ขณะที่โคพื้นเมืองไทยภาคกลางกลุ่ม ct2-ct7

เป็นโคที่มีการวิวัฒนาการในตอนหลังและแยกกลุ่มไปจากโคพื้นเมืองที่พบในจีนตอนใต้และตะวันตกเฉียงใต้ซึ่งมีต้นกำเนิดมาจากอินเดียเช่นกัน เป็นไปได้ว่า โคพื้นเมืองภาคกลางของไทยในกลุ่มที่สอง อาจมีการวิวัฒนาการเพื่อให้มีการปรับตัวให้เข้ากับท้องถิ่น หรืออาจเป็นโคที่อยู่ประจำถิ่นมาก่อน อย่างไรก็ตามการศึกษาโคพื้นเมืองของไทยในท้องถิ่นอื่นๆ รวมทั้งการนำข้อมูลไปเปรียบเทียบกับโคพื้นเมืองของประเทศเพื่อนบ้านของไทย เช่น พม่า เขมร ลาว และ เวียดนาม ซึ่งยังไม่มีข้อมูลปรากฏในฐานข้อมูลอื่นๆ น่าจะได้ข้อมูลของที่มาของโคพื้นเมืองของไทยที่ชัดเจนขึ้น

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

6.1 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไมโครแซทเทลไลต์

6.1.1 สามารถทำการตรวจสอบได้ 18 จาก 20 โลไซ ซึ่งจำนวนของอัลลีลในแต่ละโลคัสมีความผันแปรอยู่ระหว่าง 2-6 อัลลีล โดยโลคัส ILSTS014 BOLADRB2 RBP3 และ CSSM065 มีจำนวนของอัลลีลน้อยที่สุด คือ 2 อัลลีล และที่โลคัส ETH225 และ UWCA9 มีจำนวนของอัลลีลมากที่สุด คือ 6 อัลลีล

6.1.2 การทดสอบสภาพสมดุลย์ของยีนตามกฎของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก (Hardy-Weinberg Equilibrium) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ พบว่ามี 15 โลคัสที่เข้าสู่สภาพสมดุลย์ของฮาร์ดี-ไวน์เบิร์ก

6.1.3 โครงสร้างภายในประชากรที่ทำการทดสอบโดยใช้ Chi-square ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์ พบว่าโลคัส ETH152 HRH1 และ BM203 สามารถเลือกใช้เป็นตัวเอนโดปิ้ง (DNA marker) ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในโคพื้นเมืองไทยภาคกลางได้ โลคัสดังกล่าวเกี่ยวข้องกับลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจของโค ได้แก่ เปอร์เซนต์ไขมันและโปรตีนในน้ำมัน ปริมาณผลผลิตน้ำมัน และการสร้าง marbling ในเนื้อ

6.1.4 กลุ่มโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง จากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ กาญจนบุรี นครปฐม และราชบุรี มีความหลากหลายทางพันธุกรรมภายในประชากรปานกลาง โดยมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกตเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.324-0.378 และมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากทฤษฎีเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 0.464-0.536

6.1.5 จากค่าระยะห่างทางพันธุกรรมจากการคำนวณโดยใช้ Nei's genetic distance โคพื้นเมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์และนครปฐมมีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด คือ 0.0299 และโคพื้นเมือง จ.นครปฐมและกาญจนบุรี มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมมากที่สุด คือ 0.1035 สอดคล้องกับค่าความเหมือนทางพันธุกรรมที่พบว่า โคพื้นเมืองไทยภาคกลาง จ.ประจวบคีรีขันธ์ และ จ.นครปฐมมีความเหมือนทางพันธุกรรมมากที่สุด คือมีค่าเท่ากับ 0.9706 และโคพื้นเมือง จ.กาญจนบุรีและนครปฐมมีความเหมือนทางพันธุกรรมค่าน้อยที่สุด คือ 0.9017 จึงแสดงให้เห็นว่า โคพื้นเมืองจาก จ.ประจวบคีรีขันธ์ มีความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับโคจาก จ. นครปฐม ราชบุรี และกาญจนบุรี ตามลำดับ

6.2 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ

6.2.1 โคพื้นเมืองจากภาคกลางของไทยที่ศึกษามีลำดับเบสของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอ บริเวณ D-loop เหมือนกับโคในสปีชีส์ *B. indicus* มากกว่าโคในสปีชีส์ *B. taurus* และกระบือ โดยมีค่าความเหมือนเท่ากับ 90-99%, 80-88% และ 64-70% ตามลำดับ

6.2.2 ลำดับเบสของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ของโคสปีชีส์ *B. taurus* และ *B. indicus* มีตำแหน่งที่แตกต่างกันอยู่ 14 ตำแหน่ง ซึ่งน่าจะใช้ในการจำแนกสปีชีส์ของโค *B. taurus* และ *B. indicus* ได้

6.2.3 ลำดับเบสของไมโตคอนเดรียลดีเอ็นเอบริเวณ D-loop ของโคพื้นเมืองจากภาคกลางของไทย มีความแตกต่างอยู่ 18 ตำแหน่ง ซึ่งจำแนกได้เป็น 7 แสพโพลไทป์ ได้แก่ แสพโพลไทป์ ct1 ถึง ct7 ตามลำดับ โดยโคในแสพโพลไทป์ ct1 ส่วนใหญ่เป็นโคพื้นเมืองที่มาจาก จ. ประจวบคีรีขันธ์

6.2.4 โคและกระบือมีระยะห่างทางพันธุกรรมประมาณ 0.30-0.41 โคในสปีชีส์ *B. taurus* มีระยะห่างพันธุกรรมจาก *B. indicus* เท่ากับ 0.1301-0.2368 และโคพื้นเมืองไทยภาคกลางมีระยะห่างทางพันธุกรรมจากโค *B. indicus* ในประเทศเอเชียอยู่ในช่วง 0.0072-0.0950

6.2.5 ประชากรโคพื้นเมืองไทยภาคกลางมีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับโคในสปีชีส์ *Bos indicus* และแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 เป็นโคพื้นเมือง ct1 ที่มาจาก จ. ประจวบคีรีขันธ์ และพบว่ามีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับโคในสปีชีส์ *Bos indicus* มากที่สุด และกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มโค ct2 ถึง ct7 ที่นำมาจากทั้งสี่จังหวัดที่ศึกษา

6.2.6 โคพื้นเมืองจากภาคกลางของไทยโคกลุ่มที่ 1 มีความวิวัฒนาการมาจากโคพื้นเมืองของประเทศภูฏาน มองโกเลีย และอินเดีย ขณะที่โคกลุ่มที่ 2 มีวิวัฒนาการมาแยกมาจากโคพื้นเมืองของประเทศจีนตอนใต้ จีนตะวันตกเฉียงใต้ อินเดีย เนปาลและ ฟิลิปปินส์

ข้อเสนอแนะ

1. ควรเพิ่มจำนวนตัวอย่างที่ศึกษาและควรเพิ่มจำนวนไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอที่ตรวจสอบให้มากขึ้นเพื่อให้ข้อมูลความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ถูกต้องและได้ผลแม่นยำ
2. ควรทำการเปรียบเทียบข้อมูลโคพื้นเมืองจากภาคกลางกับโคพื้นเมืองจากภาคอื่นๆของประเทศไทย เพื่อให้การจัดกลุ่มโคพื้นเมืองมีความชัดเจนมากขึ้น
3. ควรจัดเก็บรวบรวมข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและข้อมูลทางพันธุกรรมเพื่อใช้ในการจัดจำแนกกลุ่มโคพื้นเมืองอย่างมีระบบและใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงของโคพื้นเมืองไทยในอนาคต

ปัญหาและอุปสรรค

1. สามารถตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ได้ 18 โลไซ จากไมโครแซทเทลไลต์ที่ต้องตรวจสอบทั้งสิ้น 20 โลไซ เนื่องจากแถบดีเอ็นเอที่ได้จากการรันด้วยอิเล็กโตรโฟรีซิสมีขนาดเล็กและมีสีจางมากจนทำให้อ่านแถบดีเอ็นเอไม่ได้ จากปัญหานี้ผู้วิจัยได้ทำการปรับสภาวะต่างๆให้เหมาะสมแล้วแต่ก็ยังไม่สามารถอ่านแถบดีเอ็นเอได้

บรรณานุกรม

- กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์. ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์. **สัตว์พื้นเมืองไทย มรดกไทย มรดกโลก**. กรมปศุสัตว์.
- กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์. ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์. 2550. [Online]. Available: <http://www.dld.go.th>, 26/04/50.
- กัลยา บุญญานุวัตร, สมมาตร สุวรรณมาใจ และวินิจ คำสังข์. 2548. **ความหลากหลายทางพันธุกรรมเพื่อการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืนในโคพื้นเมือง 4 สายพันธุ์**. รายงานผลงานวิจัยการปศุสัตว์ สาขาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์และการจัดการฟาร์ม ประจำปี 2548. กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์.
- จรัญ จันทลักขณา. 2515. **การผลิตโคเนื้อ**. กรุงเทพฯ. ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วิชัย บุญแสง, อัญชลี ทัศนาวจร, ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์, นุสรา สิทธิดิถีรัตน์ และสกล พันธุ์ยิ้ม. 2545. **ลายพิมพ์ดีเอ็นเอจากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล**. กรุงเทพฯ. สำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ.
- สมาคมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย และ สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 2548. **สารานุกรมพันธุศาสตร์**. เท็กซ์ แอนด์ เจอร์นัล พับลิเคชั่น, กรุงเทพฯ.
- สุรัช ชาศรีวิทยะ. 2545. **การสืบพันธุ์และการผสมเทียมโค-กระบือ**. กรุงเทพฯ. สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศรเทพ ธีมวาส. 2548. **การเลี้ยงโคเนื้อ แนวทางการพัฒนาอาชีพของเกษตรกรไทย**. พิมพ์ครั้งที่ 3. อักษรสยามการพิมพ์, กรุงเทพฯ.
- Armstrong, E., Postiglioni, A., Martinez, A., Rincon, G. and Vega-Pla, J. L. 2006. "Microsatellite analysis of a sample of Uruguayan Creole bulls (*Bos taurus*).” **Genet. Mol. Biol.** 29: 267-272.

- Blakely, J. and Bade, D. H. 1994. **The science of Animal Husbandry**. 6th Edition. Prentice Hall Career and Technology, Prentice-Hall, Inc., New Jersey, USA.
- Brenneman, R. A., Chase, Jr. C. C., Olson, T. A., Riley, D. G. and Coleman, S. W. 2007. "Genetic diversity among Angus, American Brahman, Senepol and Romosinuano cattle breeds." **Anim. Genet.** 38: 50-53.
- Casas, E., Shackelford, S.D., Keele, J.W, Stone, R.T., Kappes, S.M. and Koohmaraie, M. 2000. "Quantitative Trait Loci Affecting Growth and Carcass Composition of Cattle Segregating Alternate Forms of Myostatin." **J. Anim. Sci.** 78: 560-569.
- Cervini, M., Henrique-Silva, F., Mortari, N. and Matheucci, E. 2006. "Genetic variability of 10 microsatellite markers in the characterization of Brazillion Nellore cattle (*Bos indicus*)." **Genet. Mol. Biol.** 29: 486-490.
- Ciampolini, R., Moazami-Goudarzi, K., Vaiman, D., Dillmnn, C., Mazzanti, E., Foulley, J., Leveziel, H. and Cianci, D. 1995. **J. Anim. Sci.** 73: 3259-3268.
- Ensminger, M. E. 1993. **Dairy Cattle Science**. 5th Edition. The Interstate Printer and Publisher, Inc. Danville, Illinois, USA. 550p.
- FAO/ISAG. 1998. Secondary guidelines for development of national farm animal genetic resources management plans. [Online]. Available: <http://dad.fao.org/en/refer/library/guidelin/workgrp.pdf>.
- Felsenstein, J. 1993. **PHYLIP: Phylogyny Inference Package version 3.5c**. Department of Genetics, University of Washington, Seattle.
- Fries, R. and Ruvinsky, A. 1999. **The Genetics of Cattle**. CABI Publishing, New York.
- Hall, T. 2007. BioEdit: Biological Sequence Alignment Editor for Windows 95/98/NT/XP. [Online]. Available: <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>.

- Heyen, D.W., Weller, J.I., Ron, M., Band, M., Beever, J.E., Feldmesser, E., Da, Y., Wiggans, G.R., VanRaden, P.M. and Lewin, H.A. 1999. "A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairycattle." **Physiol Genomics**. 1(3):165-75.
- Karthickeyan, S.M.K., Saravanan, R. and Thangaraju, P. 2006. "Characteriztion of Krishna Valley breed of cattle (*Bos indicus*) in south India using microsatellite markers." **Live. Res. Rural Dev.** 18(11):1-5.
- Kim, K. S., Yeo, J. S. and Choi, C. B. 2002. "Genetic diversity of north-east Asian cattle based on microsatellite data." **Anim. Genet.** 33: 201-204.
- Kim, K-I, Lee, J. H., Lee, S.S. and Yang, Y.H. 2003. "Phylogenetic Relationships of Northeast Asian Cattle to Other Cattle Populations Determined Using Mitochondrial DNA D-Loop Sequence Polymorphism." **Biochem. Genet.** 41:91-98
- Lai, S-J., Liu, Y.P., Liu, Y.X., Li, X.W. and Yoa, Y.G. 2005. "Genetic diversity and origin of Chinese cattle revealed by mtDNA D-loop sequence variation." **Mol. Phylogenet. Evol.** 38:146-154.
- Lei, C.Z., Chen, H., Yang, G.H., Song, L.S., Lei, X.Q., Sun, W.B., Li., R.B. and Liu, X.L. 2004. "Study on mitochondrial DNA genetic diversity of some cattle breeds in China." **Acta. Genet. Sin.** 31:57-62. (in Chinese)
- Lei, C.Z., Chen, H., Zhang, H.C., Cai, X., Liu, R.Y., Luo, L.Y., Wang, C.F., Zhan, W., Ge, Q.L., Zhang, R.F., Lan, X.Y. and Sun, W.B. 2006. "Origin and Phylogeographical structure of Chinese cattle." **Anim. Genet.** 37:579-582.
- Liu, R.Y., Xia, X.L., Lei, C.Z., Zhang, M.Z., Chen, H. and Yang, G.S. 2006. "Genetic diversity of mitochondrial DNA D-loop sequences in cattle breeds in Guizhou." **Acta. Genet. Sin.** 28(3):279-84.

- Loftus, R.T., Machugh, D.E., Bradley, D.G., Sharp, P.M. and Cunningha, P. 1994. "Evidence for two independent domestications of cattle." **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 91:2757-2761.
- Long-Cheng, L. 2006. Simplified DNA Extraction from cell or Tissue. [Online]. Available : <http://www.protocol-online.org/prot/Detailed/1157.html>.
- Machado, M.A., Schuster, I., Martinez, M.L. and Campos, A.L. 2003. "Genetic diversity of four cattle breed using microsatellite markers." **R. Bras. Zootec.** 32(1): 93-98.
- Mannen, H., Kohno, M., Nagata, Y., Tsuji, S., Bradley, D.G., Yeo, J.S., Nyamsamba, D., Zagdsuren, Y., Yokohama, M., Nomura, K. and Amano, T. 2004. "Independent mitochondrial origin and historical genetic differentiation in North Eastern Asian cattle." **Mol. Phylogenet. Evol.** 32(2) :539-544
- Martin-Burriel, I., Garcia-Muro, E. and Zaragoza, P. 1999. "Genetic diversity analysis of six Spanish native cattle breeds using microsatellites." **Anim. Genet.** 30: 177-182.
- Mateus, J. C., Penedo, M. C. T., Alves, V. C., Ramos, M. and Rangel-Figueiredo, T. 2004. "Genetic diversity and differentiation in Portuguese cattle reeds using microsatellites." **Anim. Genet.** 35: 106-113.
- Matos Almeida, S. E., Machado, M. S. N., Steigleder, C. S., Gama, C. L., Hutz, M. H., Henkes, L. E., Moraes, J. C. F. and de Azevedo Weimer, T. 2000. "Genetic diversity in a Brazilian bovine herd based on four microsatellite loci." **Genet. Mol. Biol.** 23: 347-350.
- Maudet, C., Luikart, G. and Taberlet, P. 2002. "Genetic diversity and assignment tests among seven French cattle breeds based on microsatellite DNA analysis." **J. Anim. Sci.** 80: 942-950.

- Metta, M., Kanginakudru, S., Gudiseva, N. and Nagaraju, J. 2004. "Genetic characterization of the Indian breeds, Ongole and Deoni (*Bos indicus*), using microsatellite markers-a preliminary study." **BMC genetics**. 5: 16-20.
- Moazami-Goudarzi, K., Laloë, D., Furet, J. P. and Grosclaude, F. 1997. "Analysis of genetic relationships between 10 cattle breeds with 17 microsatellites." **Anim. Genet.** 28: 338-345.
- Mosig, M.O., Lipkin, E., Khutoreskaya, G., Tchourzyna, E., Soller, M. and Friedmann, A. 2001. "A whole genome scan for quantitative trait loci affecting milk proteinpercentage in Israeli-Holstein cattle, by means of selective milk DNA pooling in a daughter design, using an adjusted false discovery rate criterion. **Genetics**. 157(4):1683-1698.
- Mukesh, M., Sodhi, M., Bhatia, S. and Mishra, B.P. 2004. "Genetics diversity of Indian native cattle breeds as analysed with 20 microsatellite loci." **J. Anim.Breed. Genet.** 121: 416-424.
- Mukesh, M., Mishra, B.P., Prakash, B., Ahlawat, S.P.S., Mitkari, K.R. and Sodhi, M. 2005. "Evaluation of genetic differentiation in *Bos indicus* cattle breeds from Marathwada Region of India using microsatellite polymorphism." **Anim. Biot.** 16(2): 127-137.
- Nei, M. 1972. "Genetic Distance Between Populations." **Amer. Nat.** 106: 283-292.
- Nei, M. 1978. "Estimation of Average Heterozygosity and Genetic from a Small Number of Individual." **Genetics**. 89:583:590.
- Olsen, H.G., Gomez-Raya, L., Vage, D.I., Olsaker, I., Klungland, H., Svendsen, M., Adnøy, T., Sabry, A., Klemetsdal, G., Schulman, N., Kramer, W. and Thalle. 2002. "A genome scan for quantitative trait loci affecting milk production in Norwegian dairy cattle. **J. Dairy Sci.** 85(11):3124-3130.

- Rodriguez-Zas, S.L., Southey, B.R., Heyen, D.W. and Lewin, H.A. 2002. "Detection of quantitative trait loci influencing dairy traits using a model for longitudinal data. **J. Dairy Sci.** 85(10):2681-2691.
- Sambrook, J. and Russell, D. W. 2001. **Molecular cloning A Laboratory Manual**. Vol. 1,2. 3rded. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sabrina, E.M., Almeida, M. Machdo, M.S.N., Steigleder, C.S., Gama, C.L., Hutz, M.H., Henkes, L.E., Moraes, J.C.F. and de Azevedo W.T. 2000. Genetic diversity in Brazilian bovine herd based on four microsatellite loci. **Genet. Mol. Biol.** 23(2): 347-350.
- Sbisa, E.F., Tanzariello, A., Reyes, G., Pesole, and Saccone, C. 1997. "Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications" **Gene**. 205: 125-40.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M. and Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Mol. Biol. and Evol.** 24:1596-1599.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.** 22:4673-4680.
- Tsuji, S.H., Mannen, F., Mukai, M., Shoji, K., Oyama, T., Kojima, C., Kano, Y., Kinoshita and Yamaguchi, E. 2003. "Trace of native cattle in Japanese Holstein assessed by mitochondrial DNA Sequence polymorphism" **J. Dairy Sci.** 87:3071-3075.
- Viitala, S.M., Schulman, N.F., de Koning, D.J., Elo, K., Kinos, R., Virta, A., Virta, J., Maki-Tanila, A., and Vilkki, J.H. 2003. "Quantitative trait loci affecting milk production traits in Finnish Ayrshiredairy cattle." **J. Dairy Sci.** 86(5):1828-1836.

- Visscher, P.M., Woolliams, J. A., Smith, D. and William, J. L. 2002. "Estimation of pedigree errors in the UK dairy population using microsatellite makers and the impact on selection." **J. Dairy Sci.** 85: 2368-2375.
- Yeh, F. C., Yang, R. and Boyle, T. 1999. **POPGENE version 1.32**. [Online]. Available: [http://www. Ualberta.ca](http://www.Ualberta.ca).
- Zhang, Q., Boichard, D., Hoeschele, I., Ernst, C., Eggen, A., Murkve, B., Pfister-Genskow, M., Witte, L.A., Grignola, F.E., Uimari, P., Thaller, G. and Bish. 1998. "Mapping quantitative trait loci for milk production and health of dairy cattle in a large outbred pedigree." **Genetics**. 149(4):1959-1973.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
ตัวอย่างโคพื้นเมืองที่ใช้ในการศึกษา

ตารางภาคผนวกที่ ก.1 ข้อมูลตัวอย่างโคพื้นเมืองที่ใช้ในการศึกษา

เบอร์ โค	พันธุ์โค	จังหวัด	น้ำหนักก่อน ฆ่า (กิโลกรัม)	ลักษณะของโค
1		ประจวบคีรีขันธ์		
2		ประจวบคีรีขันธ์		
3		ประจวบคีรีขันธ์		
4		ประจวบคีรีขันธ์		
5		ประจวบคีรีขันธ์		
6	โคเถดูร่อน	กาญจนบุรี	216	หนังสือขาว เขาสัน
7	โคเถดูร่อน	กาญจนบุรี	163	หนังสือขาว เขายาว
8	โคเถดูร่อน	กาญจนบุรี	202	หนังสือน้ำตาล
9	โคเถดูร่อน	นครปฐม	166	หน้าโพธิ์
10	โคเถดูร่อน	ราชบุรี	150	หนังสือขาว ลำตัวเล็ก
11	โคเถดูฝน	ราชบุรี	170	หนังสือแดง หน้าดำ
12	โคเถดูฝน	กาญจนบุรี	235	ดำล้วน
13	โคเถดูฝน	กาญจนบุรี	190	หนังสือดำ ปากขาว
14	โคเถดูฝน	นครปฐม	147	หนังสือขาว
15	โคเถดูฝน	นครปฐม	191	หนังสือน้ำตาล หน้าดำ
16	โคเถดูฝน	ประจวบคีรีขันธ์		
17	โคเถดูฝน	ประจวบคีรีขันธ์		
18	โคเถดูฝน	ประจวบคีรีขันธ์		
19	โคเถดูฝน	ประจวบคีรีขันธ์		
20	โคเถดูฝน	ประจวบคีรีขันธ์		
21	โคเถดูหนาว	นครปฐม	173	หนังสือดำ ต่าง
22	โคเถดูหนาว	นครปฐม	182	หนังสือเทา
23	โคเถดูหนาว	กาญจนบุรี	196	หนังสือขาว
24	โคเถดูหนาว	กาญจนบุรี	153	หนังสือแดง
25	โคเถดูหนาว	ราชบุรี	211	หนังสือน้ำตาลอ่อน



ภาพภาคผนวกที่ ก.1 โคพื้นเมือง จ.นครปฐม เบอร์ 21



ภาพภาคผนวกที่ ก.2 โคพื้นเมือง จ.นครปฐม เบอร์ 22



ภาพภาคผนวกที่ ก.3 โคพื้นเมือง จ.กาญจนบุรี เบอร์ 23



ภาพภาคผนวกที่ ก.4 โคพื้นเมือง จ.กาญจนบุรี เบอร์ 24

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. stock TNEs buffer

สาร	ปริมาณ (กรัม)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้น สุดท้าย
Sodium Chloride	11.68	100	2 M
EDTA, pH 8.0	18.61	100	500 mM
Tris-Hydrochloride, pH 7.5	6.06	100	100 mM
SDS, pH 7.2	10	90	10 %

เตรียมสารแต่ละชนิดตามปริมาณที่กำหนด เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เก็บสารละลายในขวดดูแรนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ในตู้เก็บสารที่ป้องกันแสง โดยเก็บที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

2. working TNEs buffer

ปริมาตรรวม 100 มิลลิลิตร

สาร	ปริมาตร	ความเข้มข้นสุดท้าย
2 M Sodium Chloride	20 ml	400 mM
EDTA, pH 8.0	1 ml	5 mM
Tris-Hydrochloride, pH 7.5	10 ml	10 mM
10% SDS, pH 7.2	1 ml	0.1 %

ผสมสารต่างๆ ในขวดดูแรนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ให้ครบปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3. 5xTBE buffer

สาร	ปริมาณ	ความเข้มข้นสุดท้าย
Tris-base	54 กรัม	0.45 M
Boric acid	27.5 กรัม	
0.5 M EDTA, pH 8.0	20 มิลลิลิตร	0.01 M

ผสมสารตามปริมาณที่กำหนด เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

4. 40% Acrylamide (Acrylamide : *N,N'*-methylenebisacrylamide อัตรา 19:1)

ผสมสาร Acrylamide 380 กรัม กับ *N,N'*-methylenebisacrylamide 20 กรัม เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ให้ครบปริมาตร 1000 ไมโครลิตร เก็บสารละลายไว้ในขวดป้องกันแสง โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

5. 4.5% Acrylamide

สาร	ปริมาณ	ความเข้มข้นสุดท้าย
40% Acrylamide	112.5 มิลลิลิตร	4.5%
10xTBE buffer	100 มิลลิลิตร	1x
Urea	420 กรัม	7 M

ผสมสารตามปริมาณที่กำหนด เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ให้ครบปริมาตร 800 ไมโครลิตร นำไปอุ่นที่อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เพื่อให้ยูเรียละลายหมด ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 1000 ไมโครลิตร กรองสารละลายด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 และเก็บสารละลายไว้ในขวดป้องกันแสง โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

6. Loading buffer

สาร	ปริมาณ	ความเข้มข้นสุดท้าย
Formamide	9.5 มิลลิลิตร	95%
0.5 M EDTA, pH 8.0	400 ไมโครลิตร	20 mM
Bromophenol blue	0.005 กรัม	0.05%
Xylene cyanol	0.005 กรัม	0.05%

ผสมสารตามปริมาณที่กำหนด เติมน้ำกลั่นให้ครบปริมาตร 10 มิลลิลิตร เก็บสารละลายไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

7. สารละลาย Silver nitrate

ผสม Silver nitrate 1 กรัม ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (0.1% Silver nitrate) เติม 37% Formaldehyde ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เก็บสารละลายไว้ในขวดป้องกันแสง สารละลาย Silver nitrate ที่ใช้แล้ว สามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้ 2-3 ครั้ง

8. สารละลาย Developer สำหรับย้อมเจลSDS-PAGE

ผสม Sodium carbonate ปริมาณ 30 กรัม กับน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร (3% Sodium carbonate) เติม 50% mg/ml Sodium thiosulfate ปริมาตร 200 ไมโครลิตร นำไปแช่ให้เย็นจัด ก่อนใช้เติม 37% Formaldehyde ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร เตรียมใหม่ก่อนใช้งานทุกครั้ง

ภาคผนวก ค

ความถี่ของอัลลีล จำนวนอัลลีล ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีในแต่ละโลคัส

ตารางภาคผนวกที่ ค.1 ความถี่ของอัลลีลในแต่ละโลคัสของโคพื้นเมืองไทยภาคกลาง 5 จังหวัด

โคคัส	อัลลีล	ความถี่ของอัลลีล			
		ประจวบคีรีขันธ์	กาญจนบุรี	นครปฐม	ราชบุรี
ETH152	A	0.3000	0.5000	0.3000	0.5000
	B	0.1000	0.3571		
	C	0.6000	0.1429	0.7000	0.5000
ETH225	A		0.0714	0.1000	
	B		0.0714	0.1000	
	C	0.6000	0.7143	0.4000	0.1667
	D	0.1000			0.3333
	E	0.3000	0.1429	0.2000	0.1667
	F			0.2000	0.3333
HEL1	A	0.0500			
	B	0.0500	0.1429	0.1000	
	C	0.7000	0.8571	0.9000	0.1000
	D	0.2000			
HRH1	A	0.1500	0.0714	0.2000	
	B		0.2857		
	C	0.8500	0.6429	0.7000	0.1000
	D			0.1000	
ILSTS005	A	0.1000		0.2000	
	B	0.3000	0.5000	0.1000	0.5000
	C	0.4500	0.5000	0.6000	0.5000
	D	0.1000		0.1000	
	F	0.0500			
ILSTS014	A	0.9500	0.1000	0.1000	1.0000
	B	0.0500			
OCAM	A		0.0714		0.1667
	B	0.4500	0.2857	0.4000	0.3333
	C	0.5500	0.6429	0.6000	0.5000

ตารางภาคผนวกที่ ค.1 (ต่อ)

โลคัส	อัลลีล	ความถี่ของอัลลีล			
		ประชากรศิริราช	กาญจนบุรี	นครปฐม	ราชบุรี
BM2113	A	0.4500	0.4167	0.5000	0.1667
	B	0.1000	0.1667		
BM2113(ต่อ)	C	0.2500	0.0833	0.4000	0.3333
	D	0.2000	0.3333	0.1000	0.5000
BOLADRB	A	0.8000	0.1000	0.7000	0.7500
	B	0.2000		0.3000	0.2500
ETH131	A	0.1000	0.0714	0.1000	
	B	0.2500	0.4286	0.5000	0.1667
	C	0.6500	0.5000	0.4000	0.8333
HEL5	A	0.1500	0.1429	0.3000	0.8333
	B	0.5500	0.5714	0.4000	0.8333
	C	0.3000	0.2857	0.3000	0.8333
RBP3	A	0.5000	0.2857	0.7000	0.5000
	B	0.5000	0.7143	0.3000	0.5000
	C			0.4000	
TGLA116	A	0.1000	0.0833	0.1000	
	B	0.8000	0.7500	0.7000	0.6667
	C	0.1000	0.1667	0.2000	0.3333
BM203	A		0.7414	0.3000	
	B	0.8333	0.7143	0.6000	1.0000
	C		0.2143	0.1000	
	D	0.1667			
HUJII77	A	0.2500	0.2143		
	B	0.1000	0.3571	0.3000	0.1667
	C	0.1000	0.2143		
	D	0.4000	0.2143	0.4000	
	E	0.1500		0.3000	0.3333
TGLA153	A		0.2143		0.1667
	B	0.5000	0.6429	0.6000	0.8333

ตารางภาคผนวกที่ ค.1 (ต่อ)

โดคัส	อัลลิล	ความถี่ของอัลลิล			
		ประจวบคีรีขันธ์	กาญจนบุรี	นครปฐม	ราชบุรี
CSSM065	C	0.5000	0.1429	0.3000	
	D			0.1000	
	A	0.4444	0.6667	0.2500	0.6667
	B	0.5556	0.3333	0.7500	0.3333
UWCA9	A	0.0500	0.0714		
	B	0.2000	0.1429	0.4000	0.5000
	C	0.5000	0.5000	0.5000	0.5000
	D	0.4000	0.1429		
	E	0.1500			
	F		0.1429	0.1000	

ตารางภาคผนวกที่ ค.2 จำนวนอัลลีล ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีในแต่ละโลคัสของโคพื้นเมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์

โลคัส	จำนวนของอัลลีล	ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี	
		จากการสังเกต	จากทฤษฎี
ETH152	3.0000	0.2000	0.5684
ETH225	3.0000	0.6000	0.5684
HEL1	4.0000	0.2000	0.4895
HRH1	2.0000	0.3000	0.2684
ILSTS005	5.0000	0.3000	0.7211
ILSTS014	2.0000	0.1000	0.1000
OCAM	2.0000	0.5000	0.5211
BM2113	4.0000	0.6000	0.7211
BOLADRB2	2.0000	0.4000	0.3368
ETH131	3.0000	0.7000	0.5316
HEL5	3.0000	0.3000	0.6258
RBP3	2.0000	0.6000	0.5263
TGLA116	3.0000	0.2000	0.3579
BM203	5.0000	0.1111	0.2941
HUJII77	5.0000	0.3000	0.7737
TGLA153	2.0000	0.5556	0.5294
CSSM065	2.0000	0.4444	0.5229
UWCA9	5.0000	0.4000	0.7105
เฉลี่ย	3.0000	0.3784	0.5087
SD	1.1376	0.1833	0.1790

ตารางภาคผนวกที่ ค.3 จำนวนอัลลีล ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีในแต่ละโลคัสของโคพื้นเมือง จ.กาญจนบุรี

โลคัส	จำนวนของอัลลีล	ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี	
		จากการสังเกต	จากทฤษฎี
ETH152	3.0000	0.4286	0.6484
ETH225	4.0000	0.4286	0.4945
HEL1	2.0000	0.0000	0.2637
HRH1	3.0000	0.2857	0.5385
ILSTS005	2.0000	0.1429	0.5385
ILSTS014	1.0000	0.0000	0.0000
OCAM	3.0000	0.7143	0.5385
BM2113	4.0000	0.5000	0.7424
BOLADRB2	1.0000	0.0000	0.0000
ETH131	3.0000	1.0000	0.6044
HEL5	3.0000	0.0000	0.6154
RBP3	2.0000	0.5714	0.4396
TGLA116	3.0000	0.1667	0.4394
BM203	3.0000	0.1429	0.4725
HUJII77	4.0000	0.5714	0.7912
TGLA153	3.0000	0.1429	0.5604
CSSM065	2.0000	0.3333	0.4848
UWCA9	5.0000	0.8571	0.7363
เฉลี่ย	2.8333	0.3492	0.4949
SD	1.0432	0.3070	0.2193

ตารางภาคผนวกที่ ค.4 จำนวนอัลลีล ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีในแต่ละโลคัสของโคพื้นเมือง จ.นครปฐม

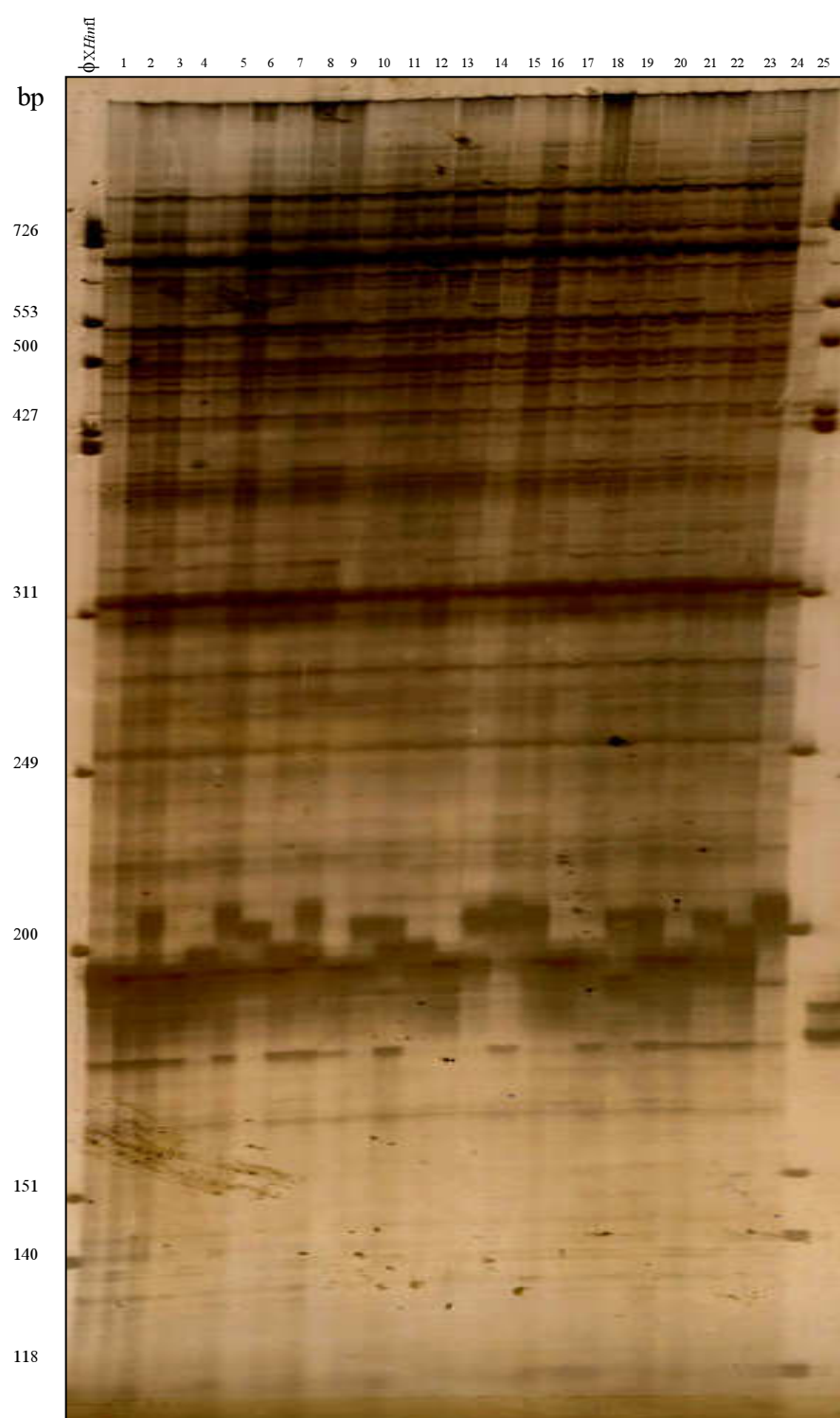
โลคัส	จำนวนของอัลลีล	ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี	
		จากการสังเกต	จากทฤษฎี
ETH152	2.0000	0.6000	0.4667
ETH225	5.0000	0.6000	0.8222
HEL1	2.0000	0.2000	0.2000
HRH1	3.0000	0.4000	0.5111
ILSTS005	4.0000	0.6000	0.6444
ILSTS014	1.0000	0.0000	0.0000
OCAM	2.0000	0.4000	0.5333
BM2113	3.0000	0.2000	0.6444
BOLADRB2	2.0000	0.2000	0.4667
ETH131	3.0000	0.2000	0.6444
HEL5	3.0000	0.6000	0.7333
RBP3	2.0000	0.6000	0.4667
TGLA116	3.0000	0.2000	0.5111
BM203	3.0000	0.2000	0.6000
HUJII77	3.0000	0.2000	0.7333
TGLA153	3.0000	0.4000	0.6000
CSSM065	2.0000	0.0000	0.4286
UWCA9	3.0000	0.6000	0.6444
เฉลี่ย	2.7222	0.3444	0.5362
SD	0.8948	0.2148	0.1944

ตารางภาคผนวกที่ ค.5 จำนวนอัลลิล ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีในแต่ละโลคัสของโคพื้นเมือง จ.ราชบุรี

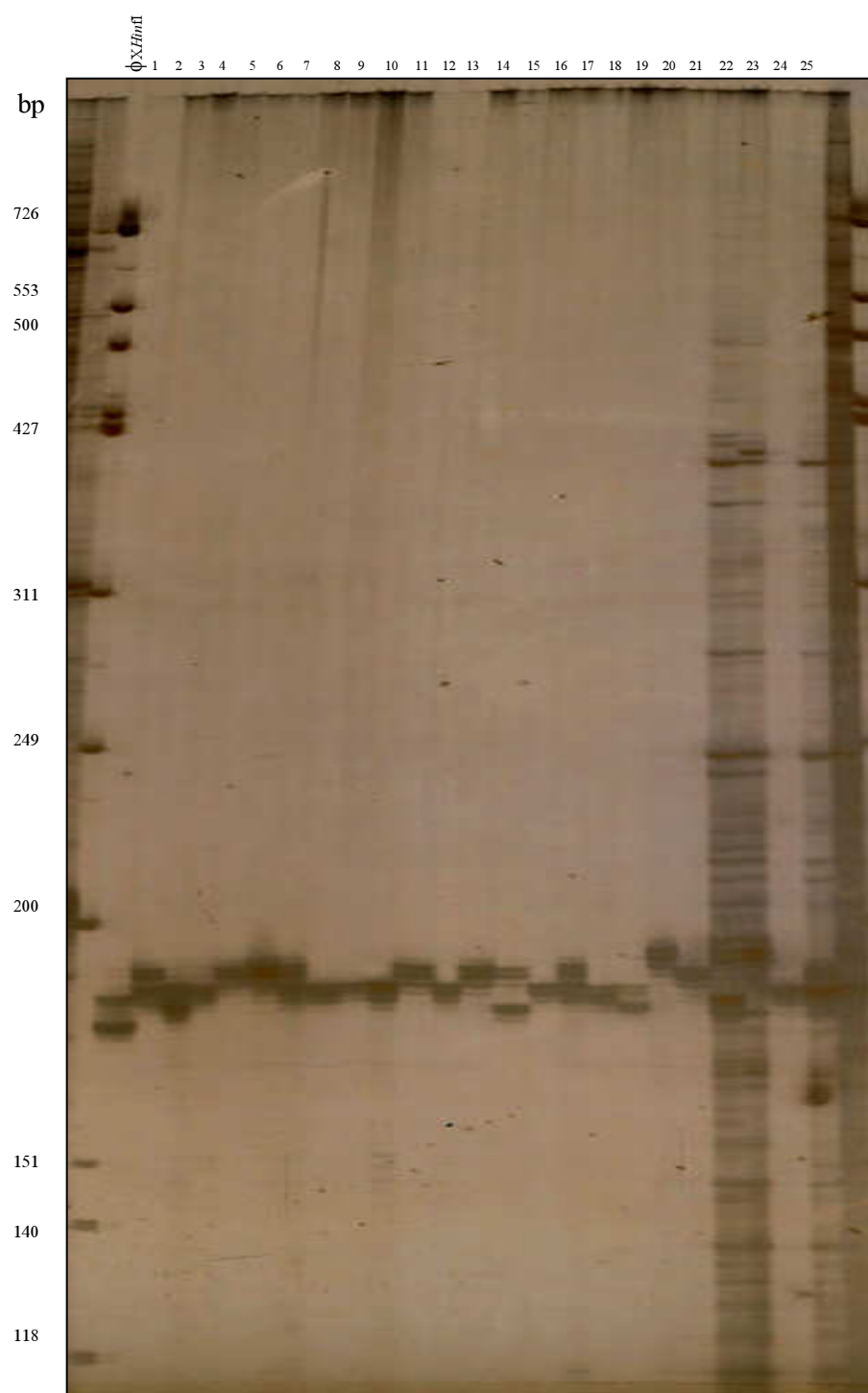
โลคัส	จำนวนของอัลลิล	ค่าเฮตเทอโรไซโกซิตี	
		จากการสังเกต	จากทฤษฎี
ETH152	2.0000	0.3333	0.6000
ETH225	4.0000	0.3333	0.8667
HEL1	1.0000	0.0000	0.0000
HRH1	1.0000	0.0000	0.0000
ILSTS005	2.0000	0.0000	0.6667
ILSTS014	1.0000	0.0000	0.0000
OCAM	3.0000	1.0000	0.7333
BM2113	3.0000	0.3333	0.7333
BOLADRB2	2.0000	0.5000	0.5000
ETH131	2.0000	0.3333	0.3333
HEL5	3.0000	0.6667	0.8000
RBP3	2.0000	1.0000	0.6000
TGLA116	2.0000	0.0000	0.5333
BM203	1.0000	0.0000	0.0000
HUJII77	2.0000	0.6667	0.5333
TGLA153	2.0000	0.3333	0.3333
CSSM065	2.0000	0.0000	0.5333
UWCA9	2.0000	0.3333	0.6000
เฉลี่ย	2.0556	0.3241	0.4648
SD	0.8024	0.3356	0.2898

ภาคผนวก ง

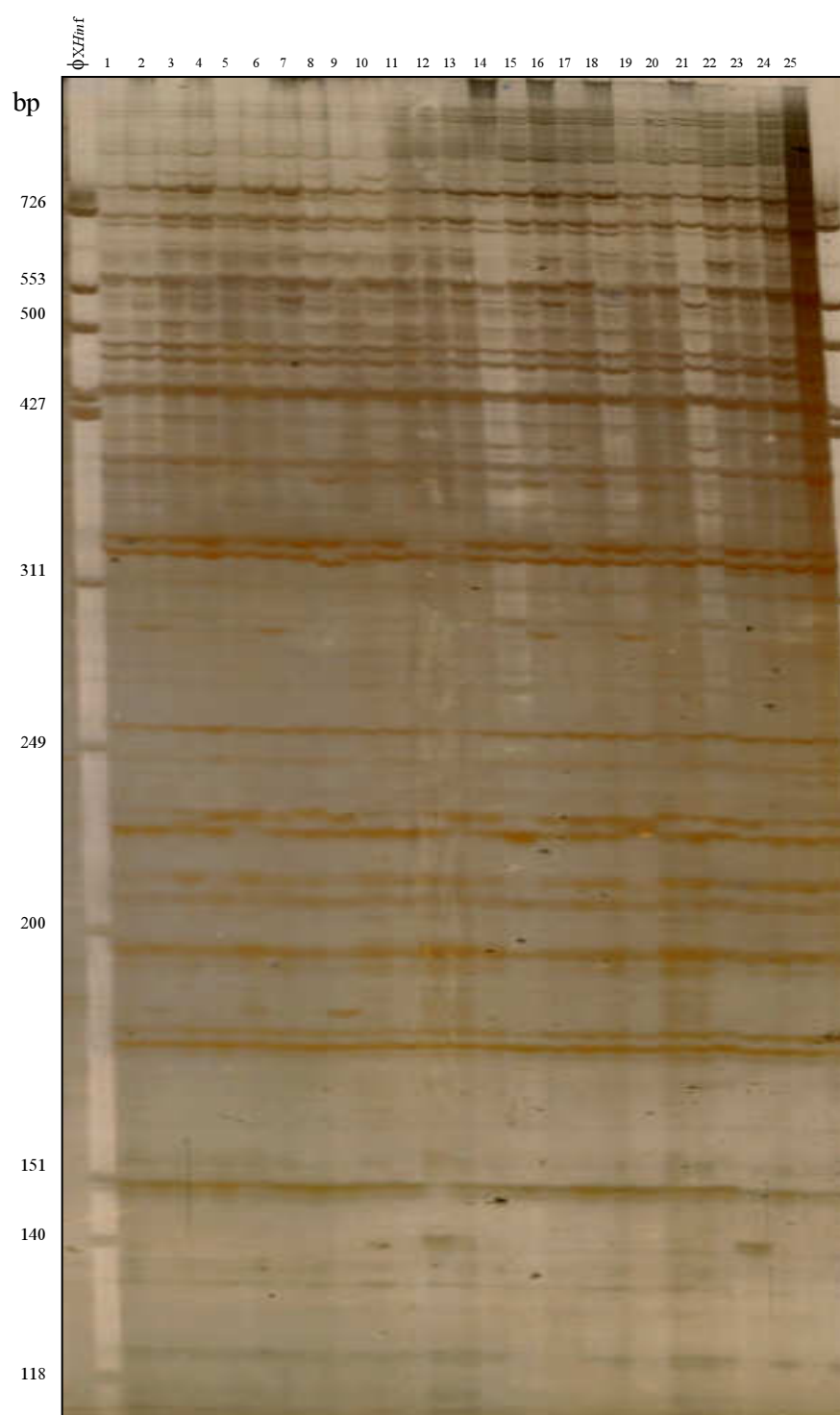
แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์



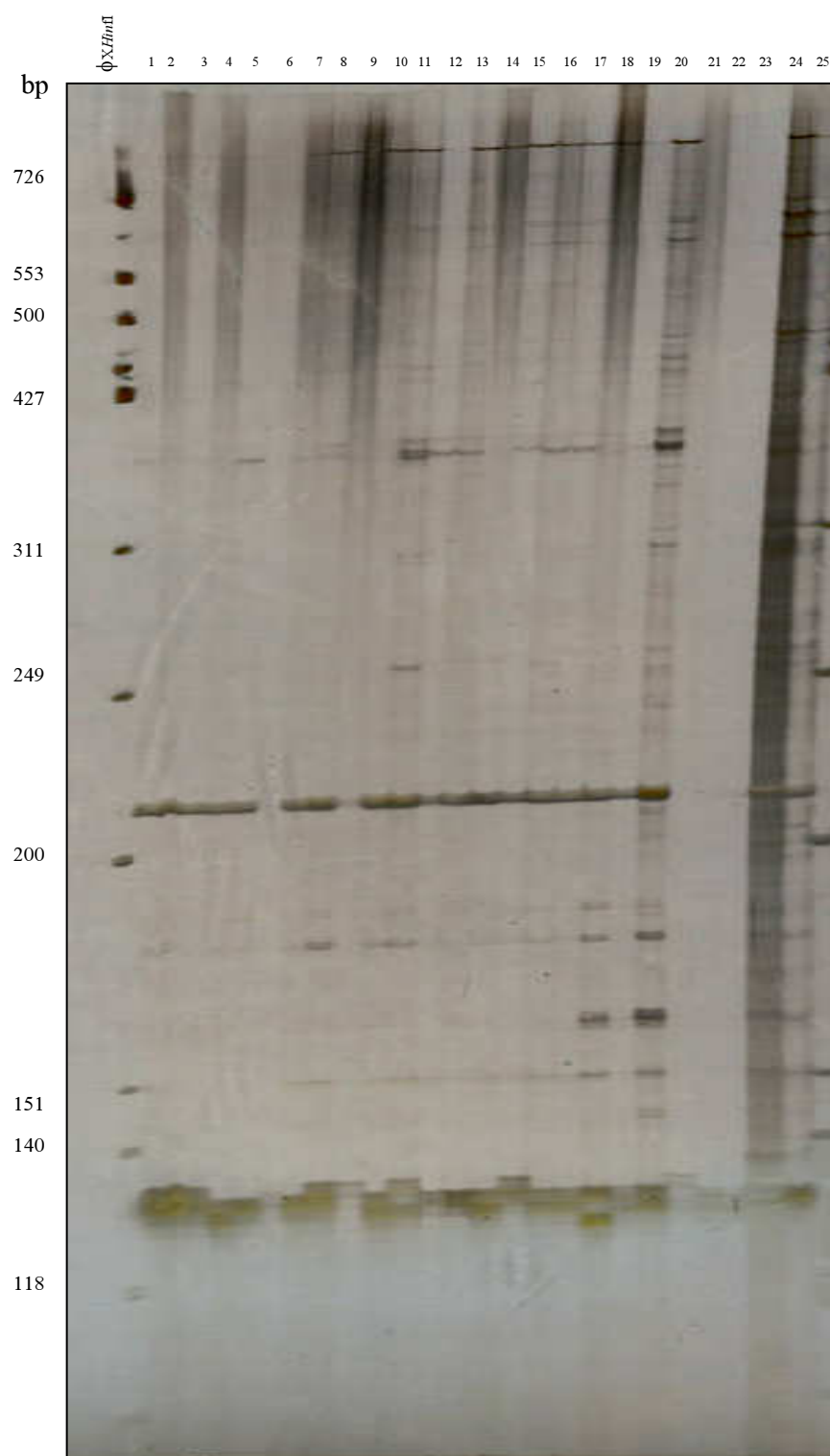
ภาพภาคผนวกที่ ง.1 แลบบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส ETH152



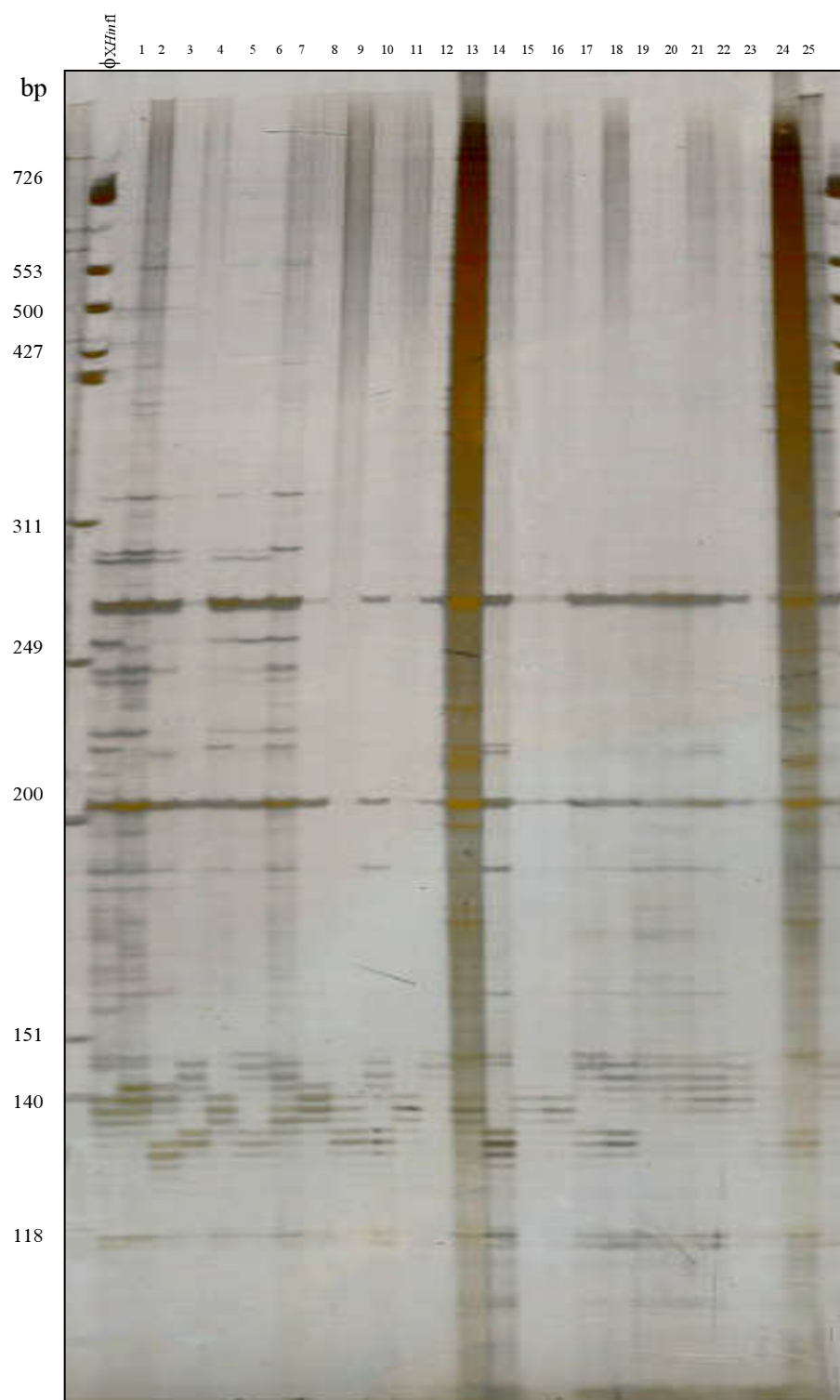
ภาพภาคผนวกที่ ง.2 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส ILSTS005



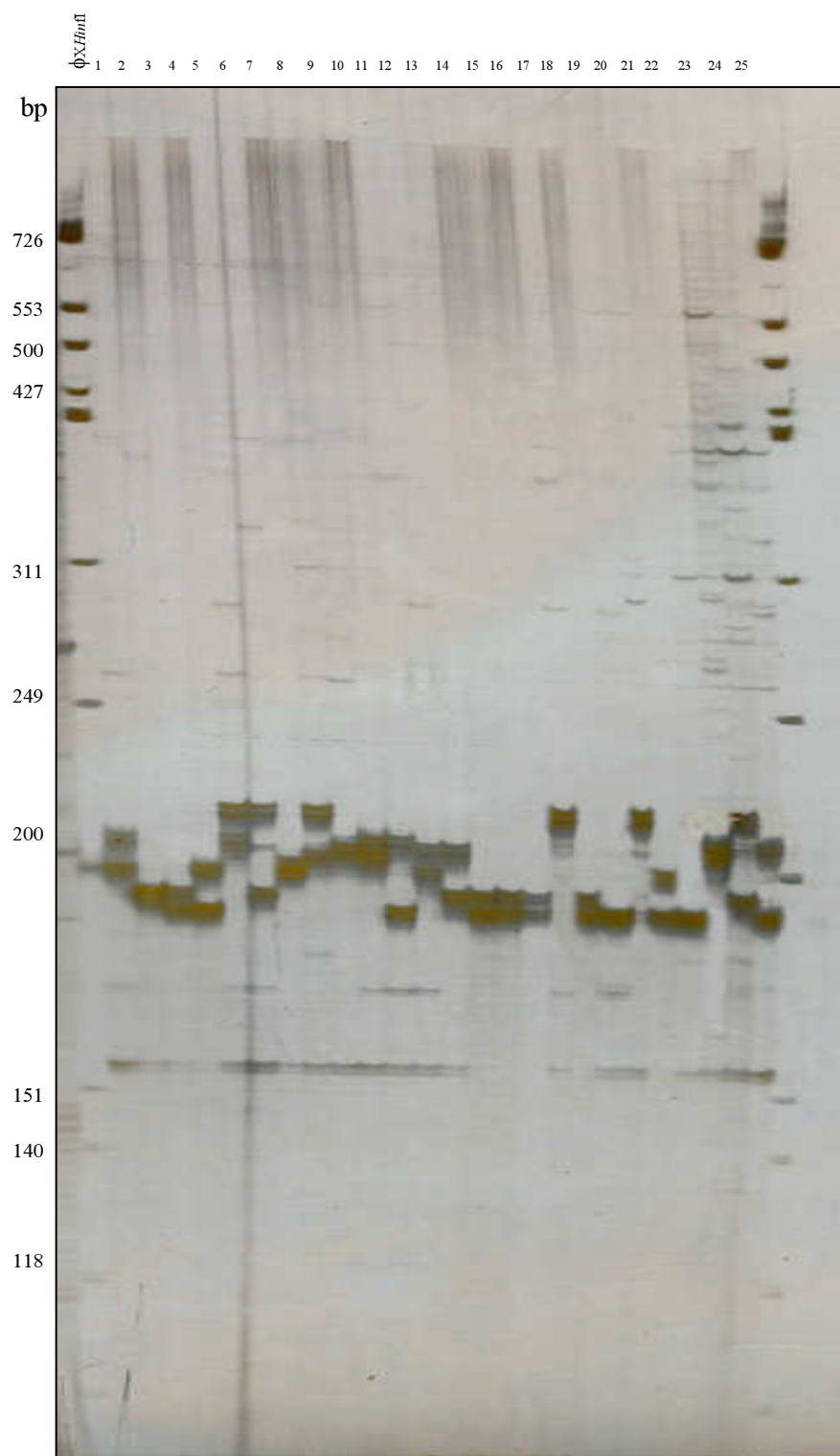
ภาพภาคผนวกที่ ง.3 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส IGF1



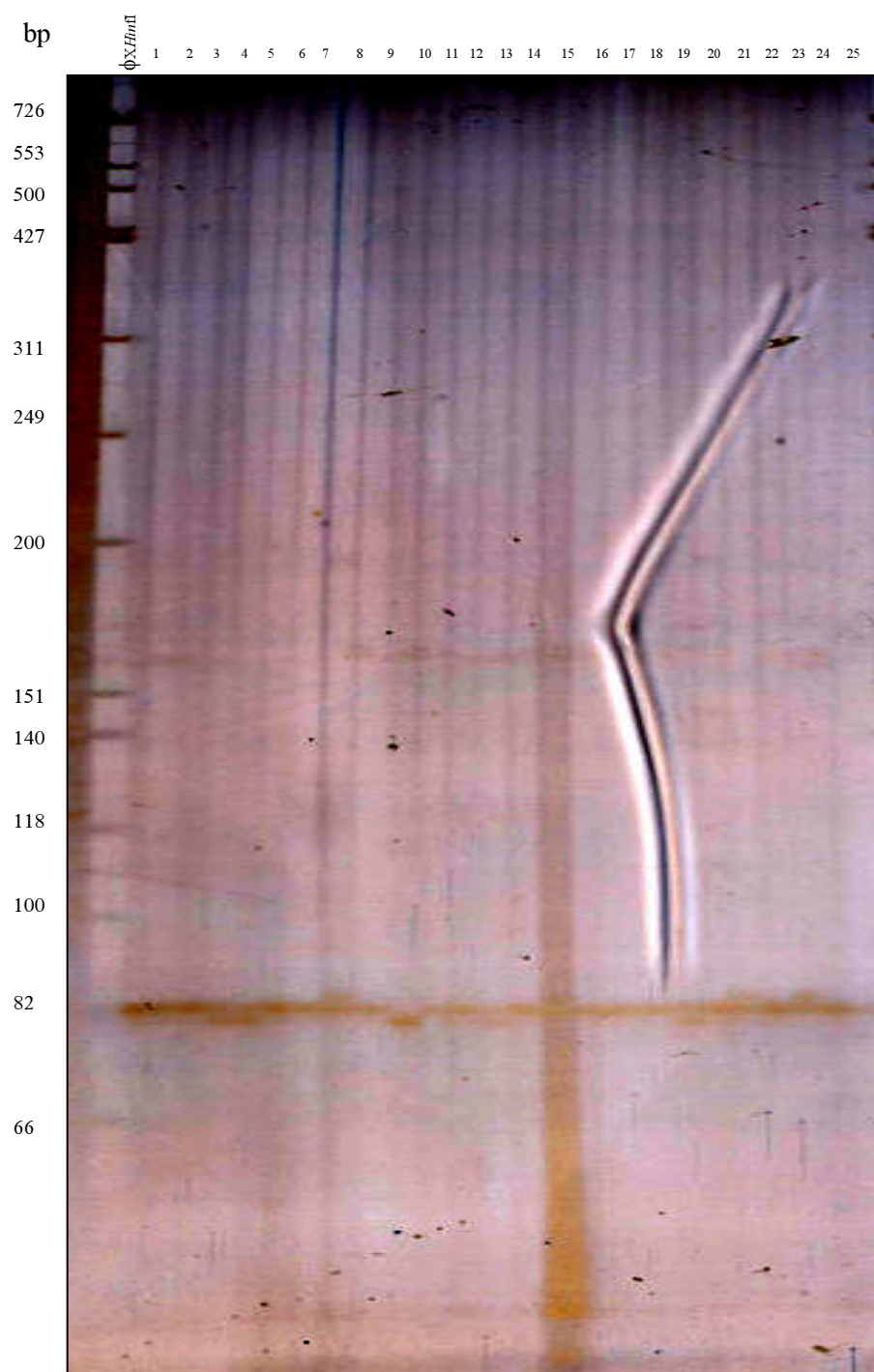
ภาพภาคผนวกที่ ง.4 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส TLSTS014



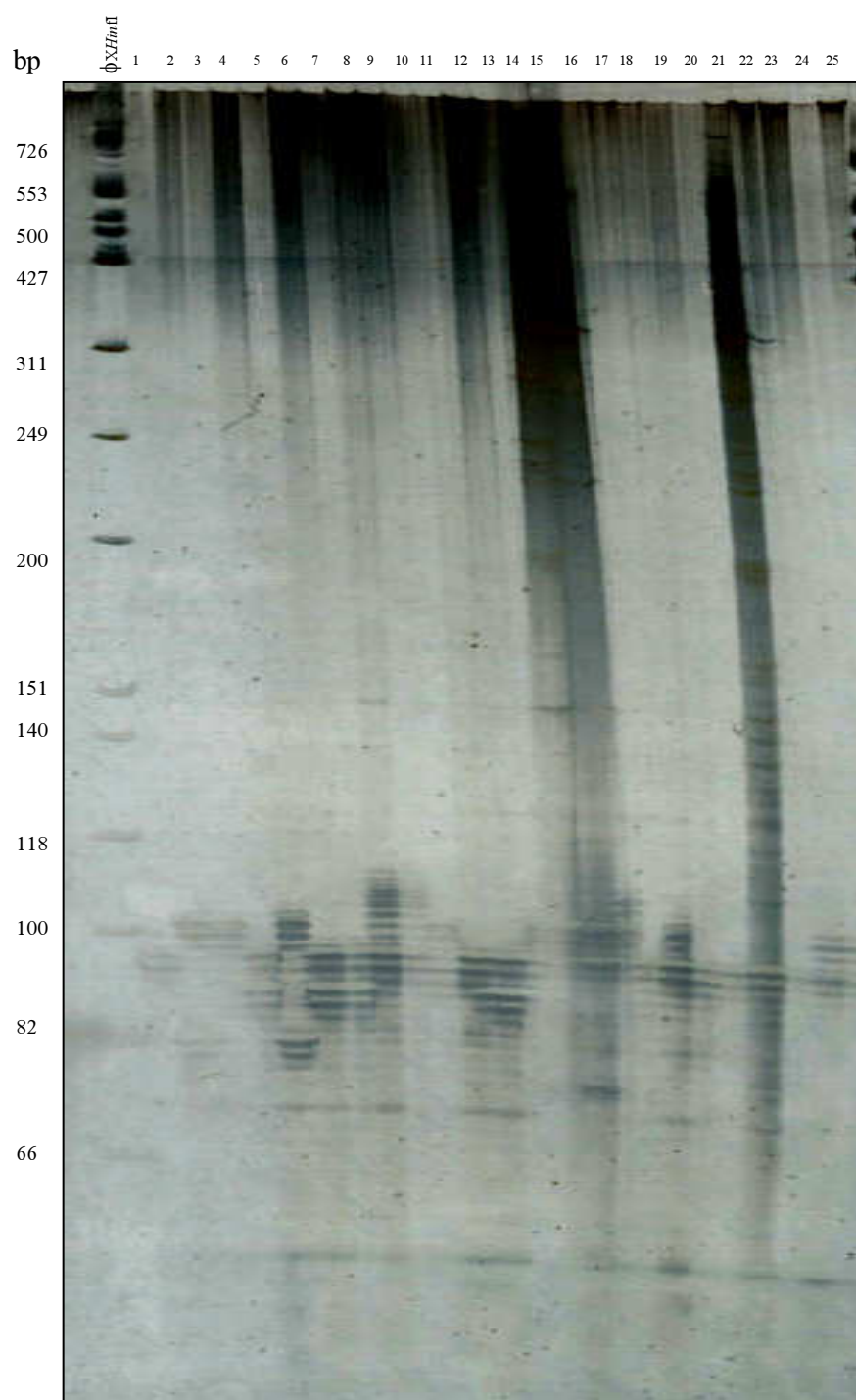
ภาพภาคผนวกที่ ง.5 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส BM2113



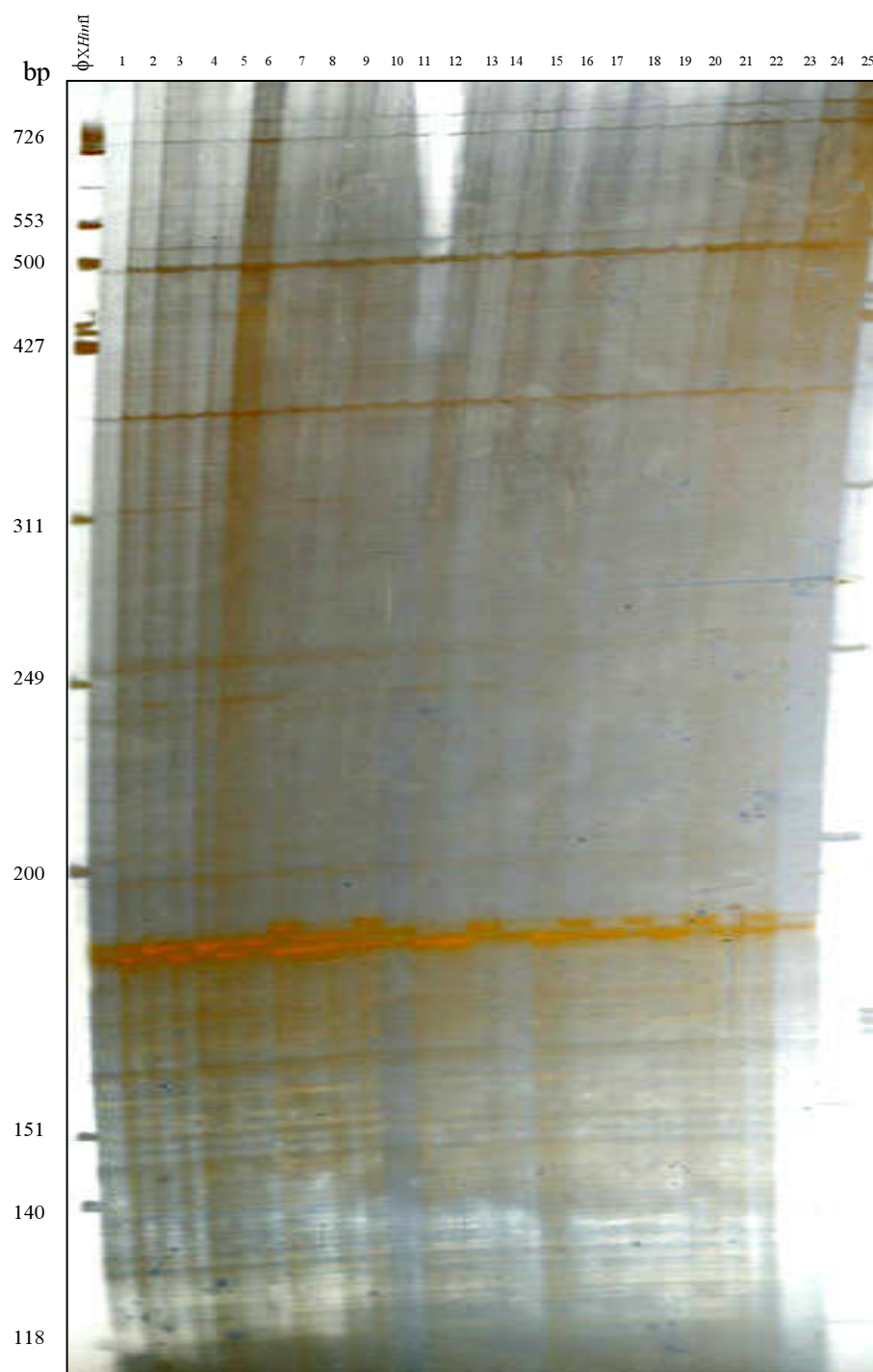
ภาพภาคผนวกที่ ง.6 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส HUJII77



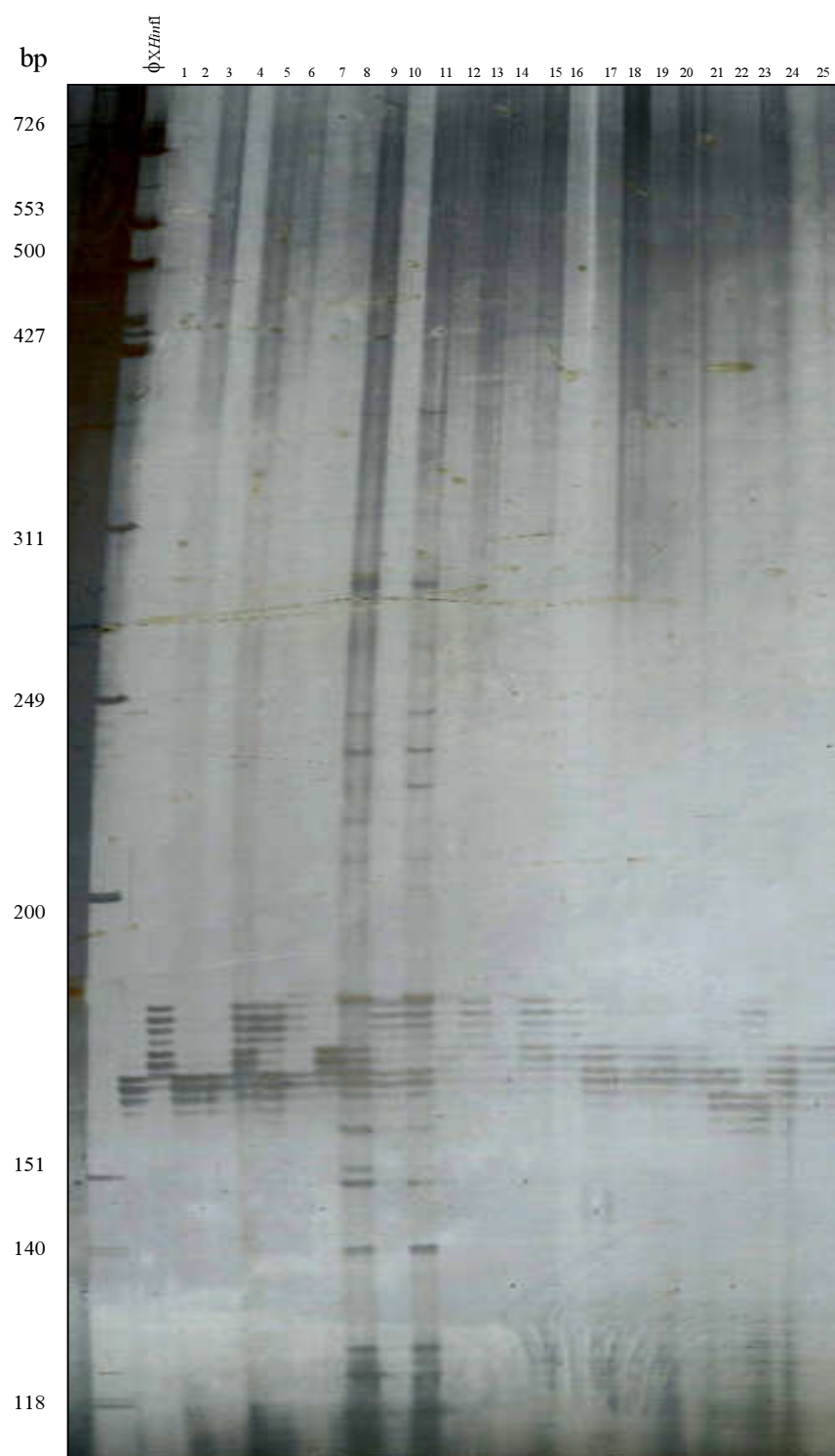
ภาพภาคผนวกที่ ง.7 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส TGLA116



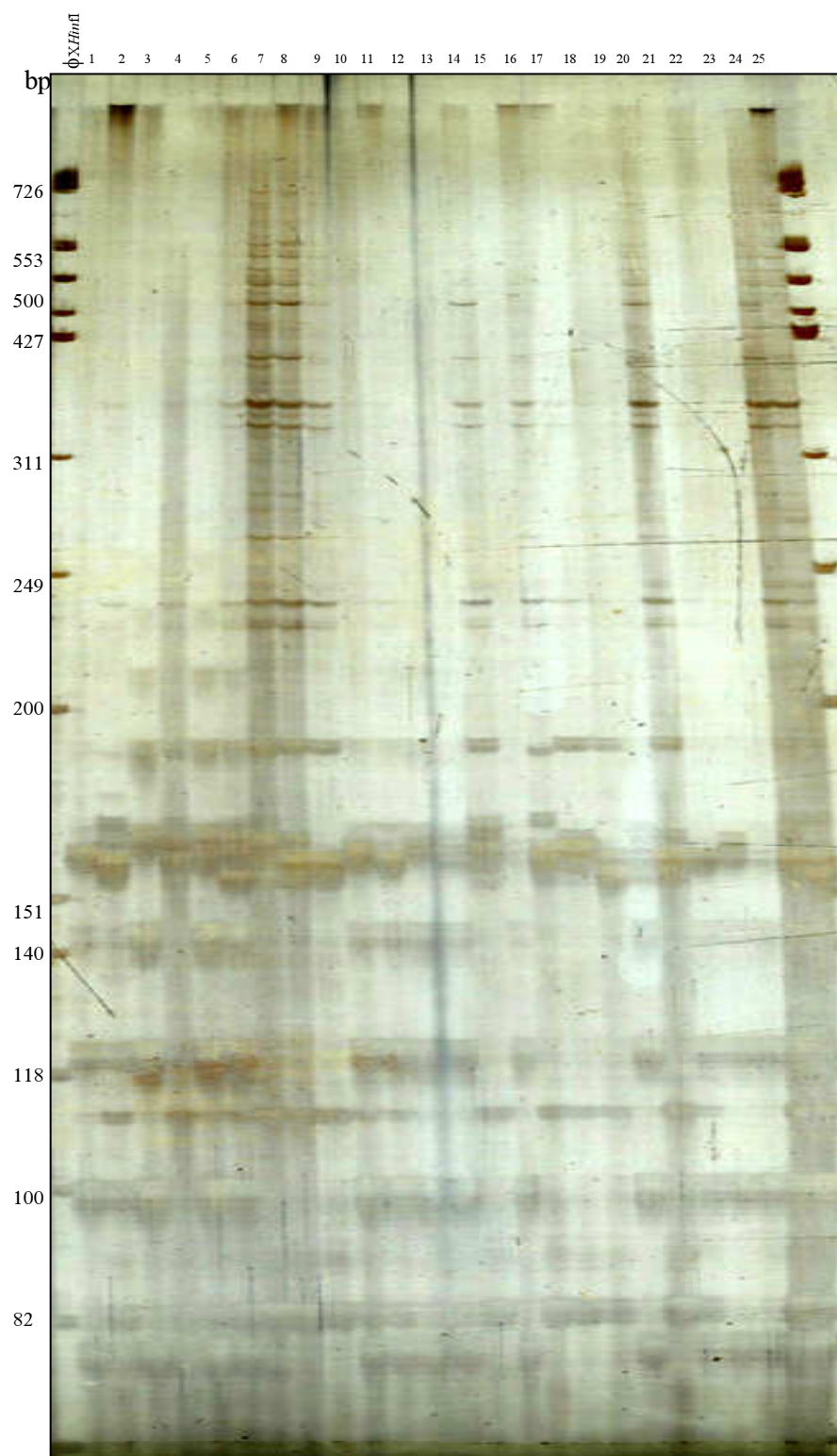
ภาพภาคผนวกที่ ง.8 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส UWCA9



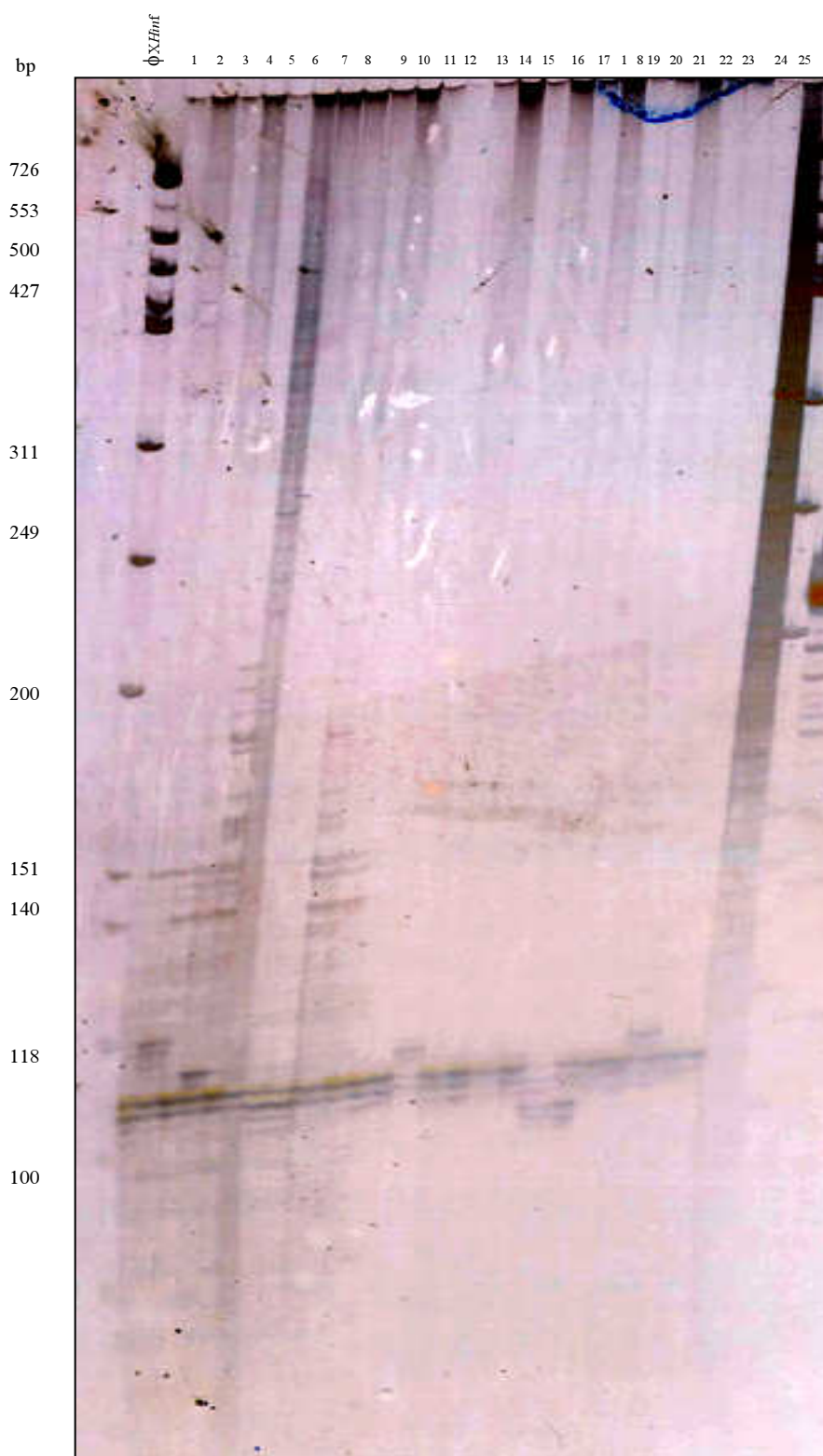
ภาพภาคผนวกที่ ง.9 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส OCAM



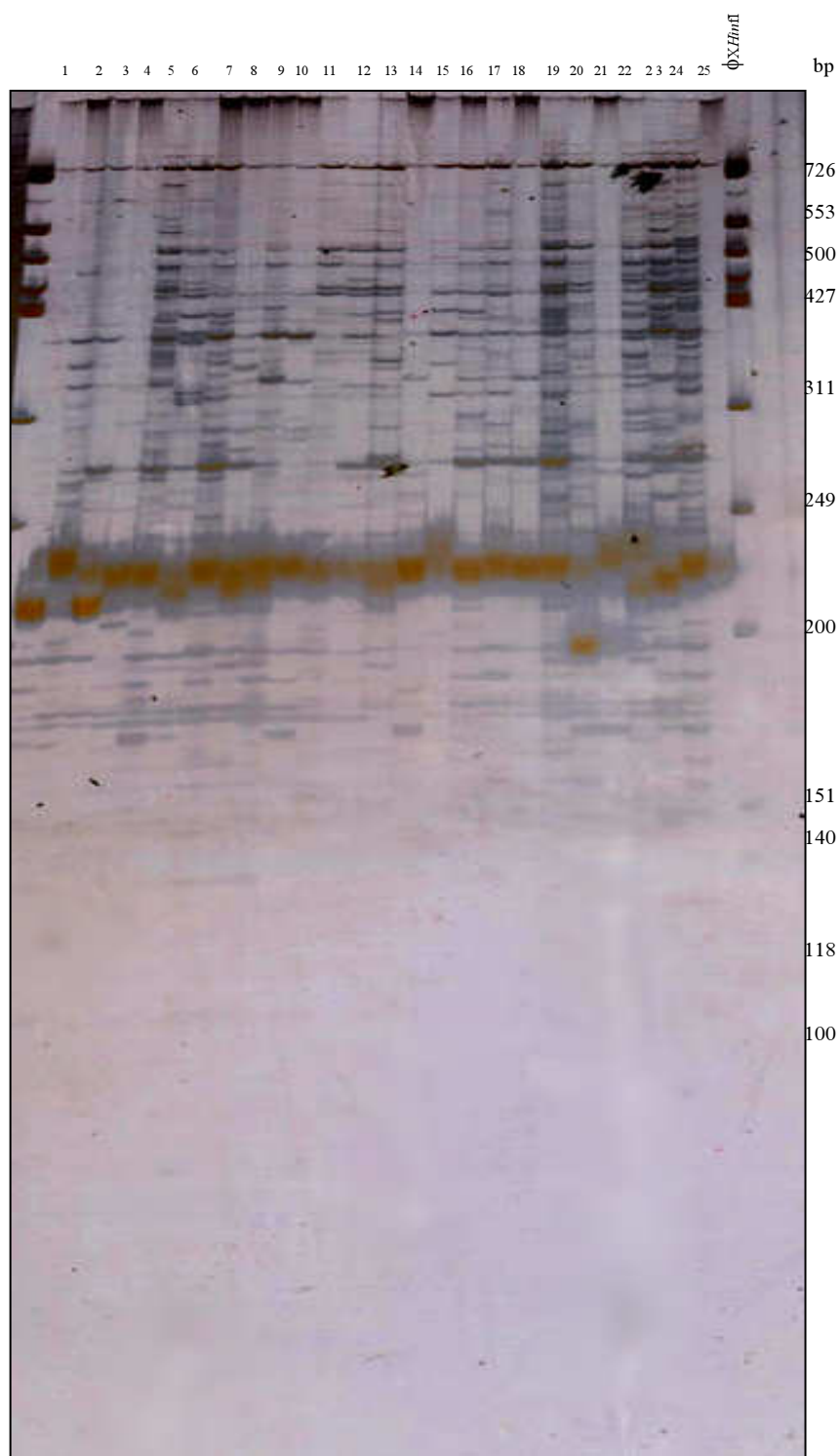
ภาพภาคผนวกที่ ง.10 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส HEL5



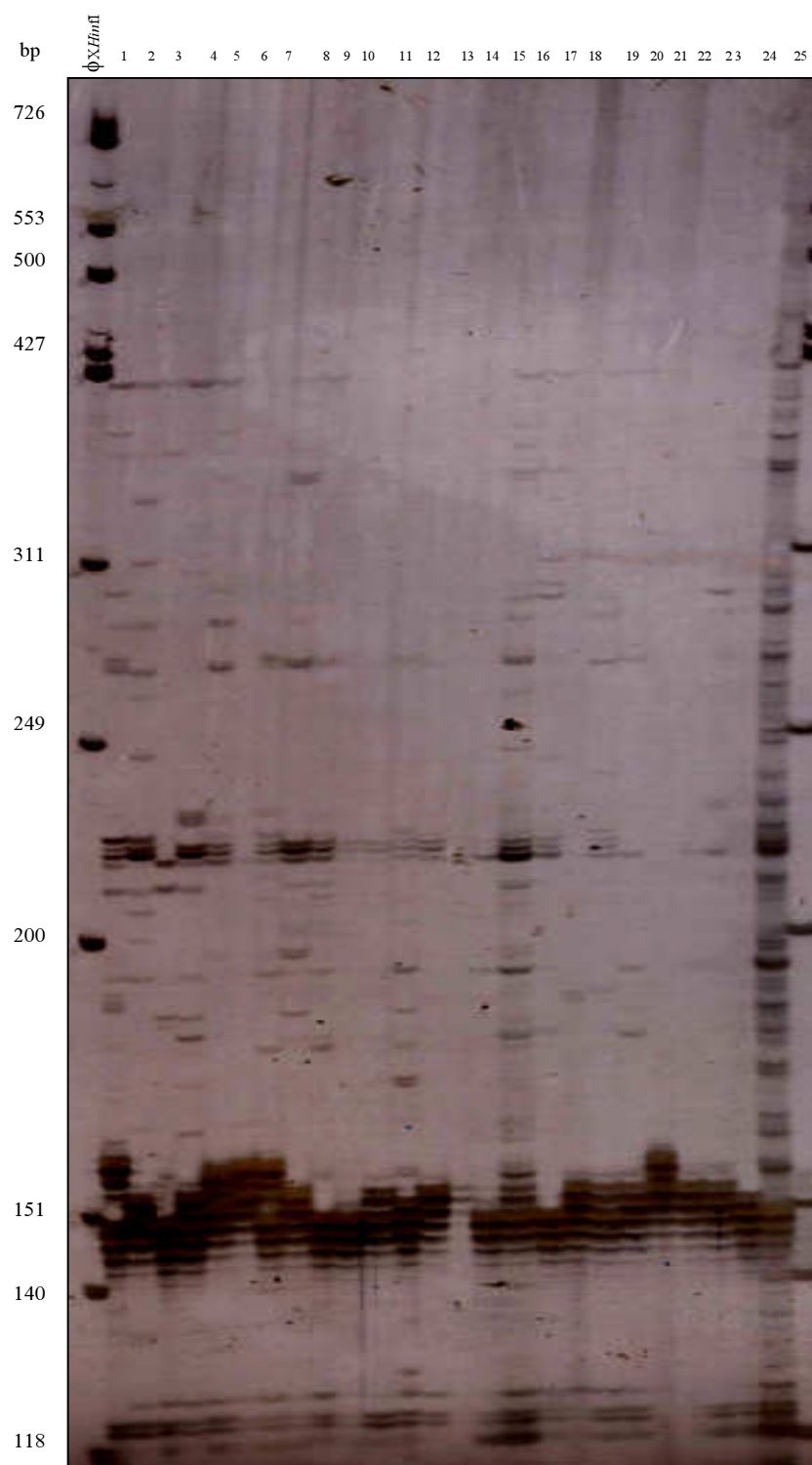
ภาพภาคผนวกที่ ง.11 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส CSSM065



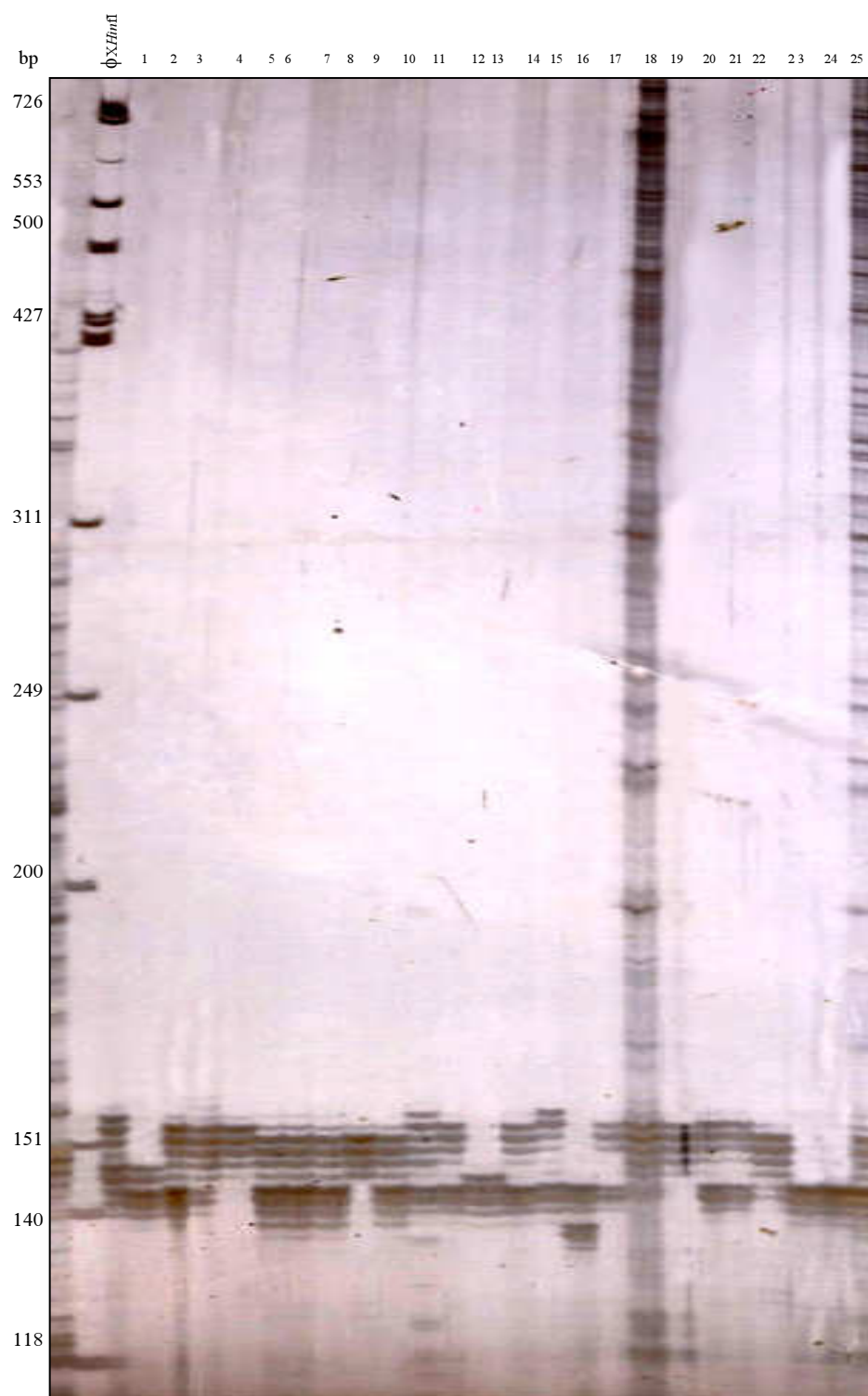
ภาพภาคผนวกที่ ง.12 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส HEL1



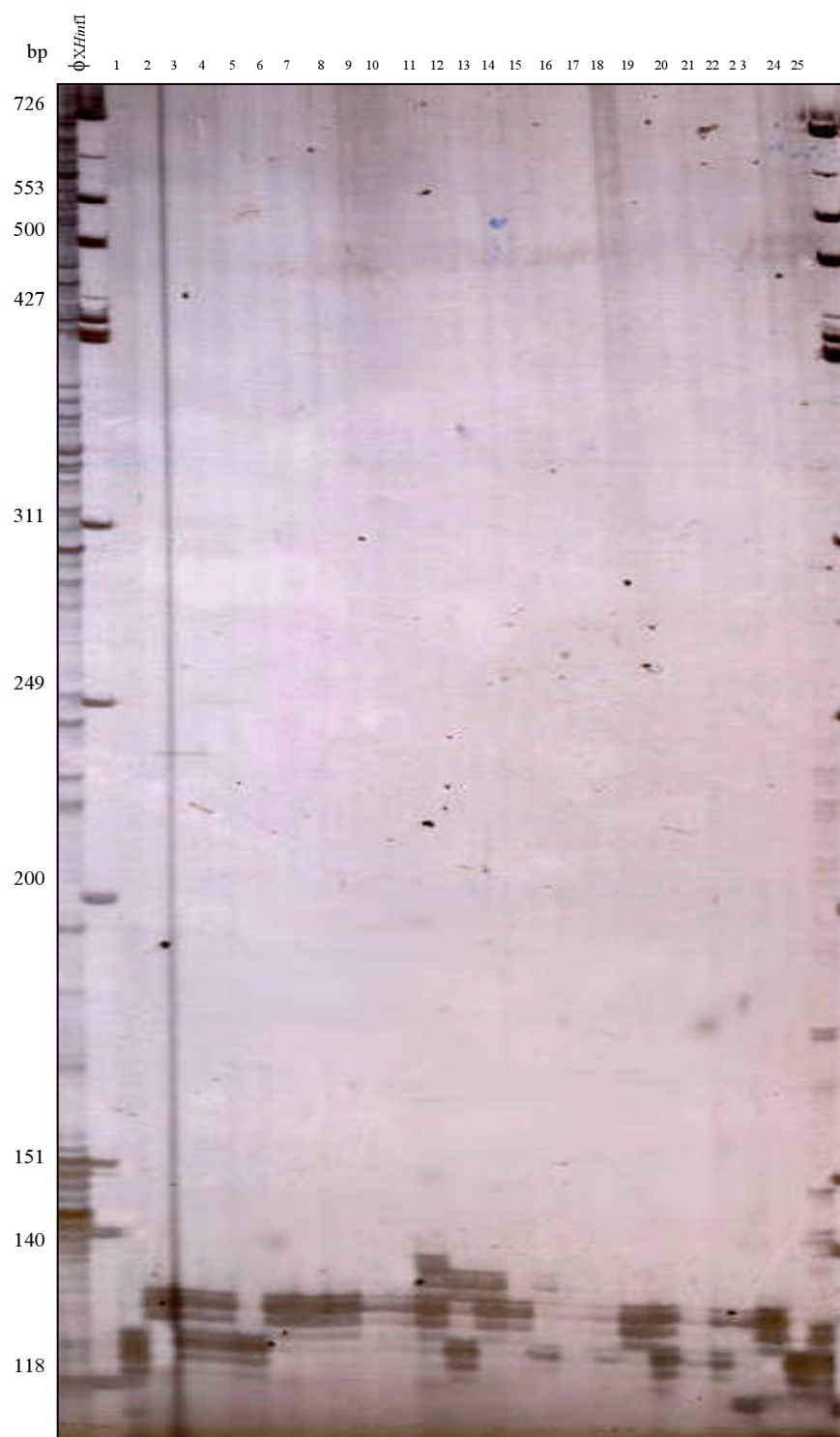
ภาพภาคผนวกที่ ง.13 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ที่โลคัส BM203



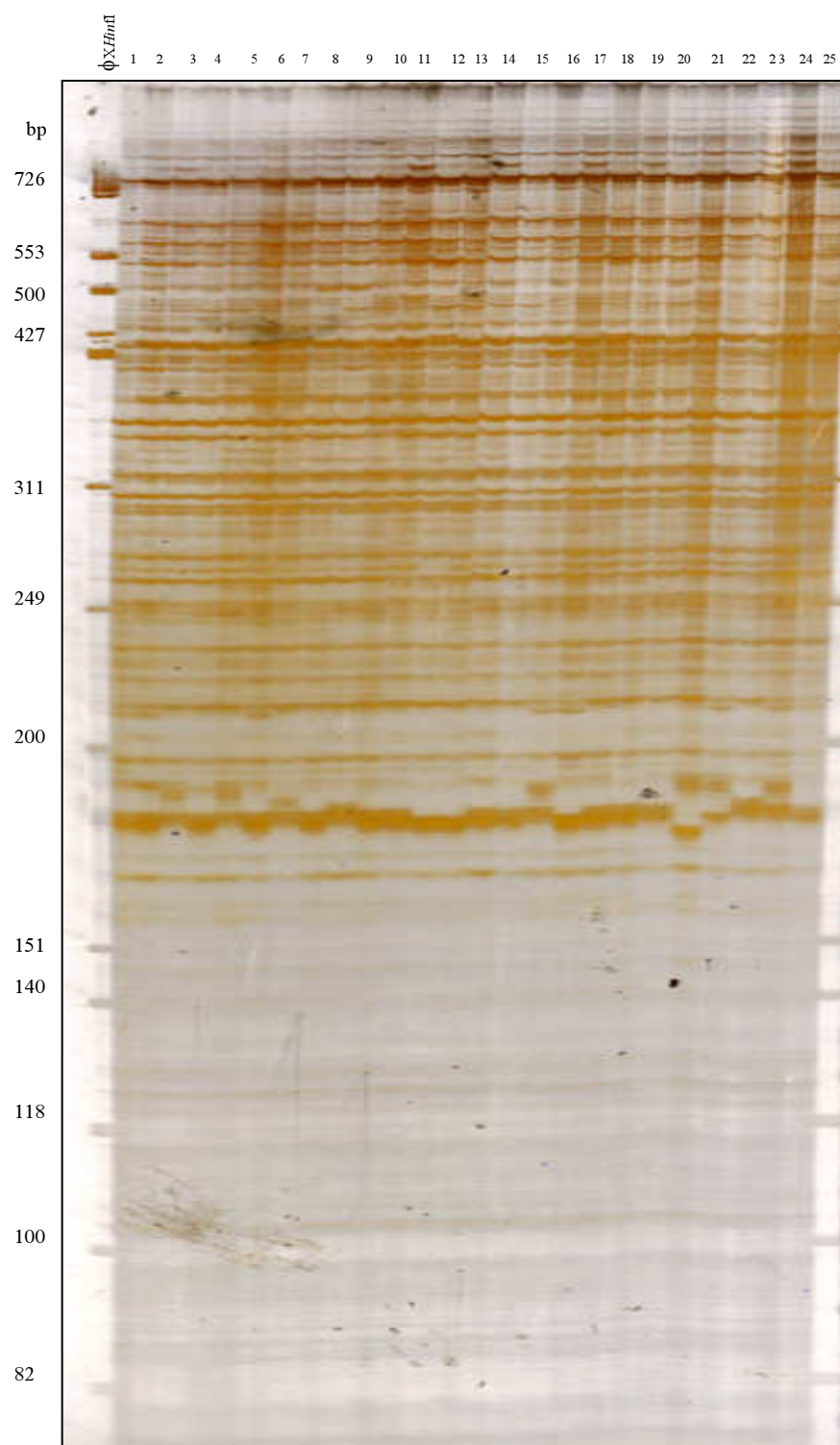
ภาพภาคผนวกที่ ง.14 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส ETH131



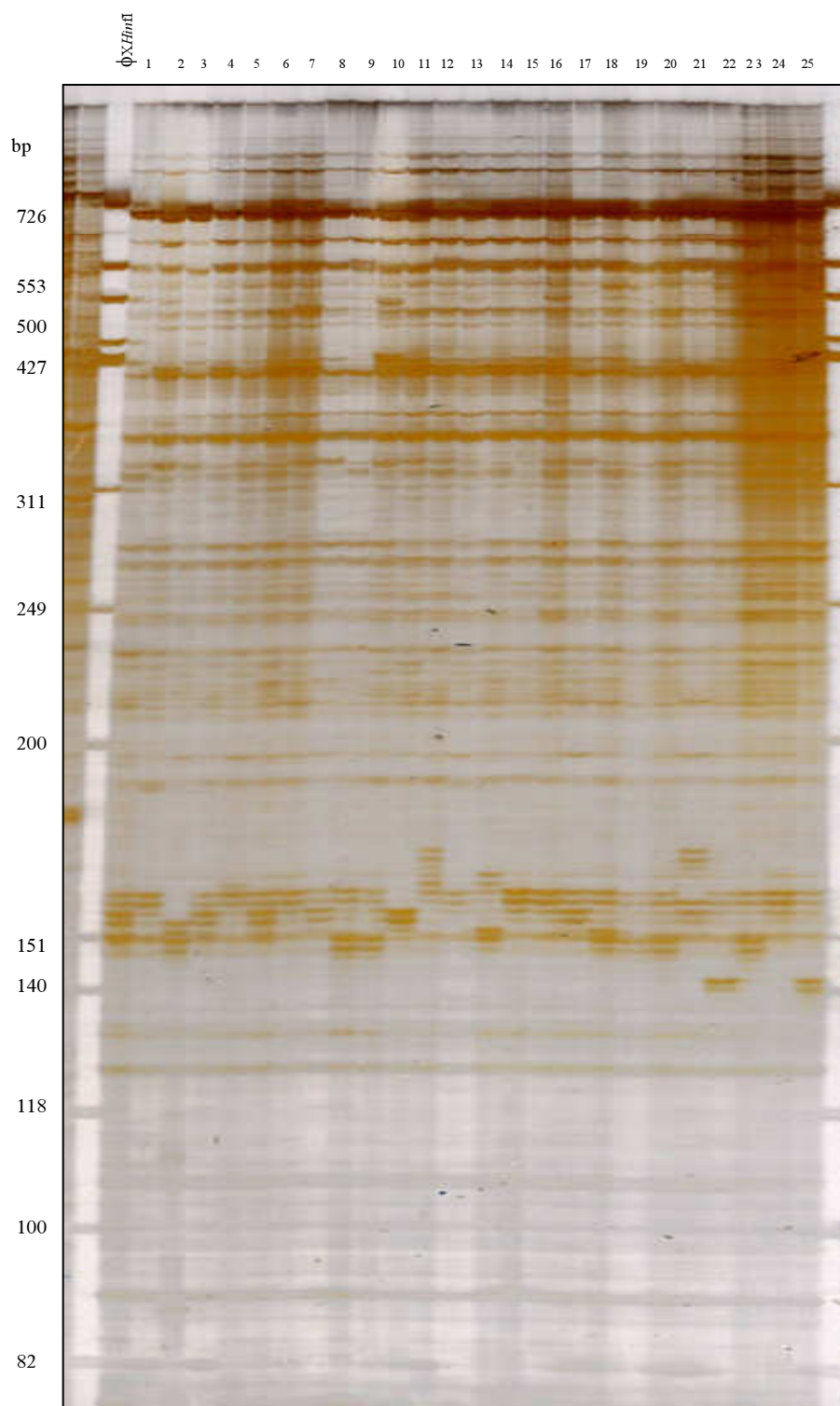
ภาพภาคผนวกที่ ง.15 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ที่โลคัส RBP3



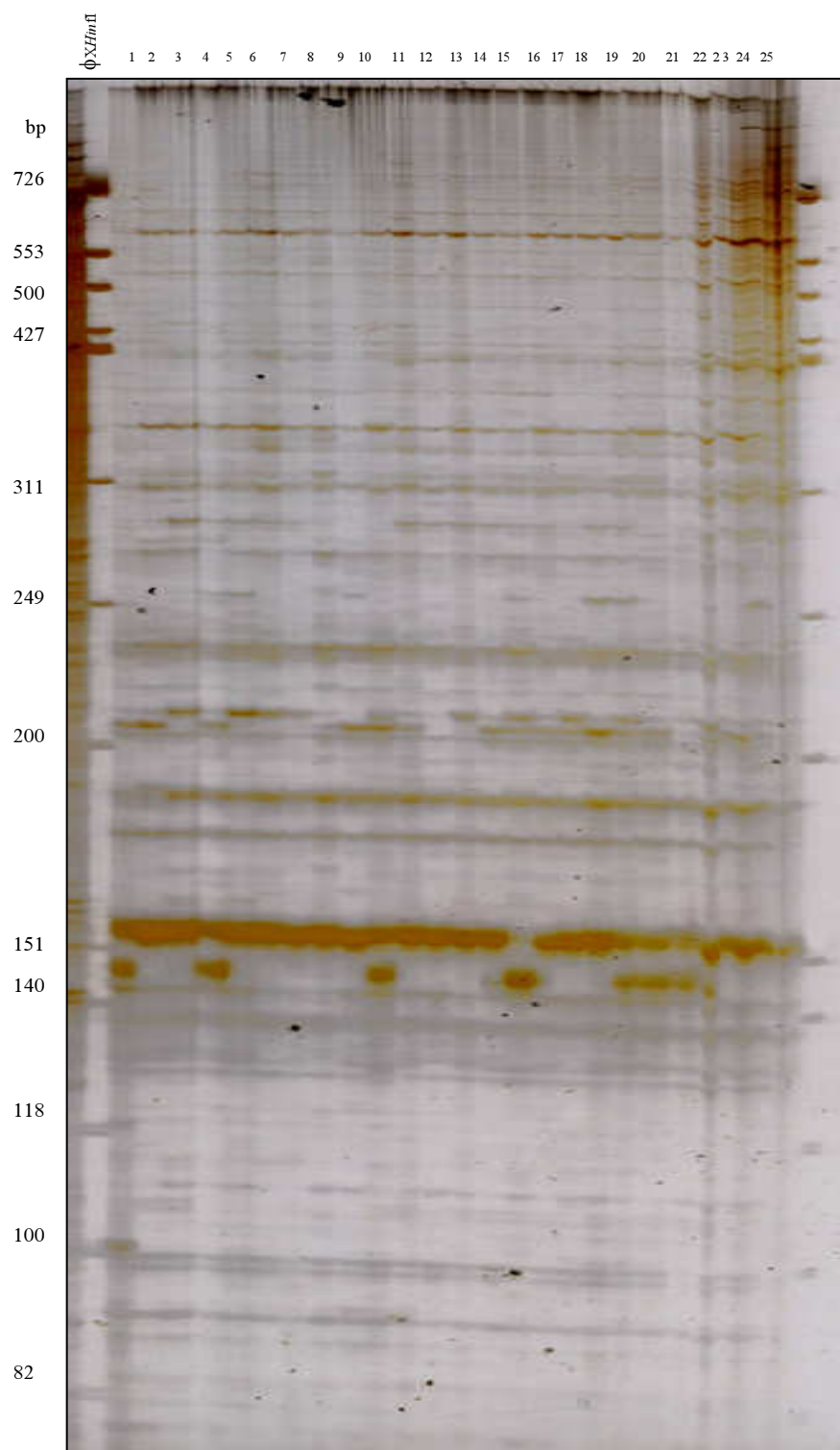
ภาพภาคผนวกที่ ง.16 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส TGLA153



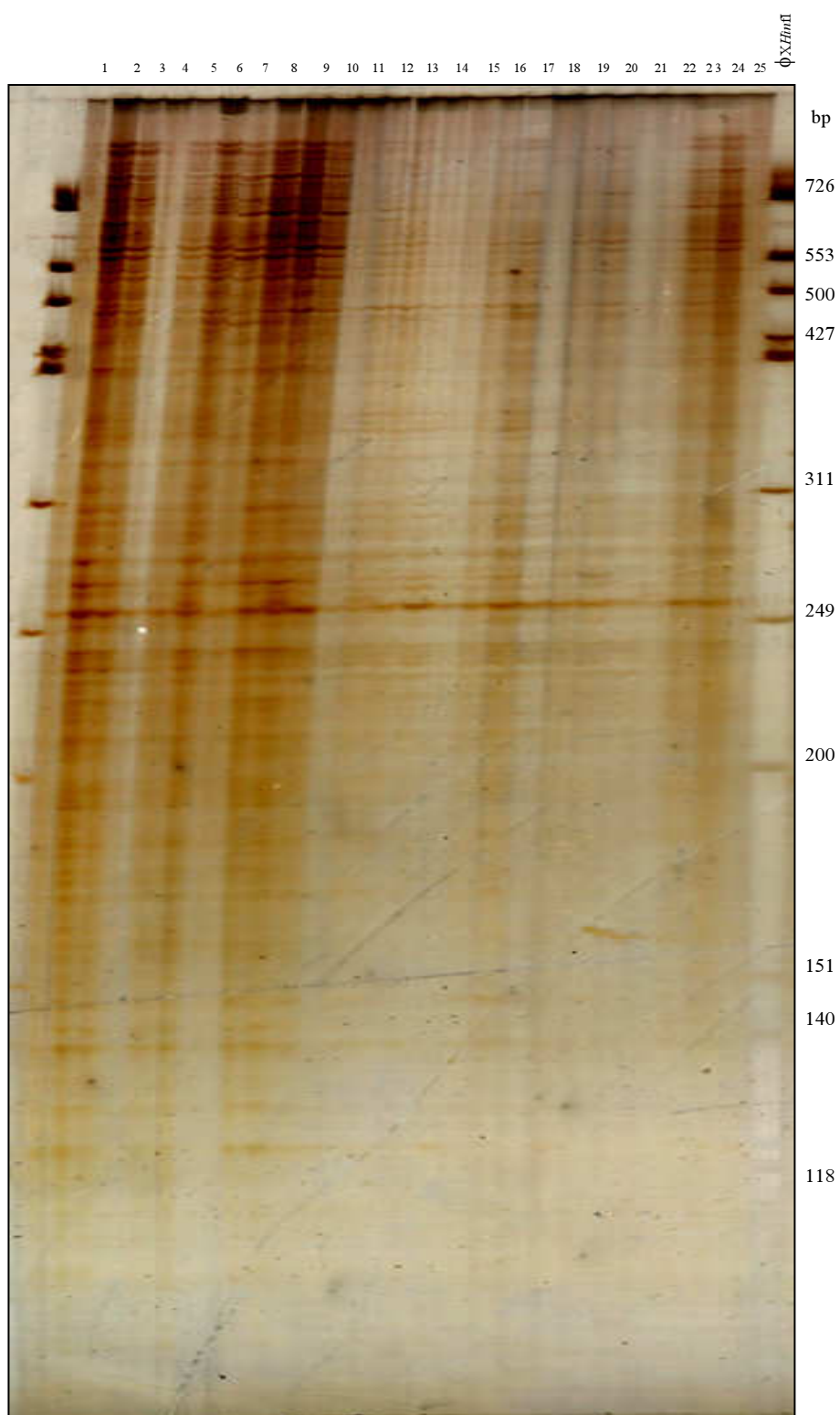
ภาพภาคผนวกที่ ง.17 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลท์ที่โลคัส HRH1



ภาพภาคผนวกที่ ง.18 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส ETH225



ภาพภาคผนวกที่ ง.19 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส BOLADRB2



ภาพภาคผนวกที่ ง.20 แถบดีเอ็นเอจากการตรวจสอบไมโครแซทเทลไลต์ที่โลคัส ILST001

ภาคผนวก จ

ค่าความเหมือนของลำดับเบสของไมโทคอนเดรียลดีเอ็นเอ

วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม CLUSTALW 2.0.8 Multiple Sequence Alignments โดยลำดับเบสที่ใช้ในการวิเคราะห์ได้แก่

Bubalus bubalis (EF464437)

Bos taurus: เกาหลี่ (KR_AF499261)

Bos indicus: อินเดีย (ID_AY972131, AY972136, AY972137, AY378136 และ AY378137)

จีนตะวันตกเฉียงใต้ (SWC_EF417971, EF417977-EF417978 และ EF417986)

จีนตอนใต้ (SC_EF524185)

ฟิลิปปินส์ (PH_AB079325-AB079327)

เนปาล (NL_AB085921-AB085923)

มองโกเลีย (ML_AB117091-AB117092)

ภูฏาน (BT_AB268580-AB268581)

โคพื้นเมืองไทยภาคกลาง (NC1-25) จากจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (Pk),

CLUSTAL 2.0.8 Multiple Sequence Alignments

SeqA Name	Len(nt)	SeqB Name	Len(nt)	Score
=====				
1 Bubalus	155	2 Bos	155	81
1 Bubalus	155	3 SC_EF524185	155	69
1 Bubalus	155	4 ML_AB117092	155	70
1 Bubalus	155	5 ML_AB117091	155	71
1 Bubalus	155	6 BT_AB268581	155	69
1 Bubalus	155	7 BT_AB268580	155	71
1 Bubalus	155	8 SWC_EF417986	155	69
1 Bubalus	155	9 SWC_EF417978	155	69
1 Bubalus	155	10 SWC_EF417977	155	69
1 Bubalus	155	11 SWC_EF417971	155	69
1 Bubalus	155	12 NP_AB085923	155	69
1 Bubalus	155	13 NP_AB085922	155	70
1 Bubalus	155	14 NP_AB085921	155	69
1 Bubalus	155	15 PL_AB079326	155	69
1 Bubalus	155	16 PL_AB079325	155	69
1 Bubalus	155	17 ID_AY378136	155	68
1 Bubalus	155	18 ID_AY378137	155	69
1 Bubalus	155	19 ID_AY972136	155	70
1 Bubalus	155	20 ID_AY972149	155	69
1 Bubalus	155	21 ID_AY972131	155	70
1 Bubalus	155	22 NC1_Pk	155	70
1 Bubalus	155	23 NC2_Pk	155	70
1 Bubalus	155	24 NC3_Pk	155	70
1 Bubalus	155	25 NC4_Pk	155	70
1 Bubalus	155	26 NC5_Pk	155	70
1 Bubalus	155	27 NC6_Kj	155	70
1 Bubalus	155	28 NC12_Kj	155	70
1 Bubalus	155	29 NC15_Np	155	70
1 Bubalus	155	30 NC16_Pk	155	70
1 Bubalus	155	31 NC19_Pk	155	70
1 Bubalus	155	32 NC20_Pk	155	70
1 Bubalus	155	33 NC21_Np	155	70
1 Bubalus	155	34 NC24_Kj	155	70
1 Bubalus	155	35 NC25_Rj	155	70
1 Bubalus	155	36 NC8_Kj	155	64
1 Bubalus	155	37 NC10_Rj	155	65
1 Bubalus	155	38 NC11_Rj	155	65
1 Bubalus	155	39 NC22_Np	155	64
1 Bubalus	155	40 NC18_Pk	155	66
1 Bubalus	155	41 NC9_Np	155	64
1 Bubalus	155	42 NC13_Kj	155	64
1 Bubalus	155	43 NC14_Np	155	64
1 Bubalus	155	44 NC17_Pk	155	64
1 Bubalus	155	45 NC23_Kj	155	64
2 Bos taurus	155	3 SC_EF524185	155	87
2 Bos taurus	155	4 ML_AB117092	155	88
2 Bos taurus	155	5 ML_AB117091	155	88
2 Bos taurus	155	6 BT_AB268581	155	85
2 Bos taurus	155	7 BT_AB268580	155	88
2 Bos taurus	155	8 SWC_EF417986	155	87
2 Bos taurus	155	9 SWC_EF417978	155	87
2 Bos taurus	155	10 SWC_EF417977	155	87
2 Bos taurus	155	11 SWC_EF417971	155	87
2 Bos taurus	155	12 NP_AB085923	155	87
2 Bos taurus	155	13 NP_AB085922	155	86
2 Bos taurus	155	14 NP_AB085921	155	86

SeqA	Name	Len(nt)	SeqB	Name	Len(nt)	Score
=====						
2	Bos taurus	155	15	PL_AB079326	155	87
2	Bos taurus	155	16	PL_AB079325	155	87
2	Bos taurus	155	17	ID_AY378136	155	85
2	Bos taurus	155	18	ID_AY378137	155	86
2	Bos taurus	155	19	ID_AY972136	155	87
2	Bos taurus	155	20	ID_AY972149	155	88
2	Bos taurus	155	21	ID_AY972131	155	87
2	Bos taurus	155	22	NC1_Pk	155	88
2	Bos taurus	155	23	NC2_Pk	155	88
2	Bos taurus	155	24	NC3_Pk	155	88
2	Bos taurus	155	25	NC4_Pk	155	88
2	Bos taurus	155	26	NC5_Pk	155	88
2	Bos taurus	155	27	NC6_Kj	155	88
2	Bos taurus	155	28	NC12_Kj	155	88
2	Bos taurus	155	29	NC15_Np	155	88
2	Bos taurus	155	30	NC16_Pk	155	88
2	Bos taurus	155	31	NC19_Pk	155	88
2	Bos taurus	155	32	NC20_Pk	155	88
2	Bos taurus	155	33	NC21_Np	155	88
2	Bos taurus	155	34	NC24_Kj	155	88
2	Bos taurus	155	35	NC25_Rj	155	88
2	Bos taurus	155	36	NC8_Kj	155	82
2	Bos taurus	155	37	NC10_Rj	155	83
2	Bos taurus	155	38	NC11_Rj	155	83
2	Bos taurus	155	39	NC22_Np	155	81
2	Bos taurus	155	40	NC18_Pk	155	83
2	Bos taurus	155	41	NC9_Np	155	80
2	Bos taurus	155	42	NC13_Kj	155	80
2	Bos taurus	155	43	NC14_Np	155	80
2	Bos taurus	155	44	NC17_Pk	155	80
2	Bos taurus	155	45	NC23_Kj	155	81
3	SC_EF524185	155	4	ML_AB117092	155	99
3	SC_EF524185	155	5	ML_AB117091	155	98
3	SC_EF524185	155	6	BT_AB268581	155	97
3	SC_EF524185	155	7	BT_AB268580	155	98
3	SC_EF524185	155	8	SWC_EF417986	155	100
3	SC_EF524185	155	9	SWC_EF417978	155	100
3	SC_EF524185	155	10	SWC_EF417977	155	100
3	SC_EF524185	155	11	SWC_EF417971	155	100
3	SC_EF524185	155	12	NP_AB085923	155	100
3	SC_EF524185	155	13	NP_AB085922	155	96
3	SC_EF524185	155	14	NP_AB085921	155	97
3	SC_EF524185	155	15	PL_AB079326	155	100
3	SC_EF524185	155	16	PL_AB079325	155	100
3	SC_EF524185	155	17	ID_AY378136	155	96
3	SC_EF524185	155	18	ID_AY378137	155	99
3	SC_EF524185	155	19	ID_AY972136	155	97
3	SC_EF524185	155	20	ID_AY972149	155	97
3	SC_EF524185	155	21	ID_AY972131	155	97
3	SC_EF524185	155	22	NC1_Pk	155	99
3	SC_EF524185	155	23	NC2_Pk	155	99
3	SC_EF524185	155	24	NC3_Pk	155	99
3	SC_EF524185	155	25	NC4_Pk	155	99
3	SC_EF524185	155	26	NC5_Pk	155	99
3	SC_EF524185	155	27	NC6_Kj	155	99
3	SC_EF524185	155	28	NC12_Kj	155	99
3	SC_EF524185	155	29	NC15_Np	155	99
3	SC_EF524185	155	30	NC16_Pk	155	99

SeqA	Name	Len(nt)	SeqB	Name	Len(nt)	Score
3	SC_EF524185	155	31	NC19_Pk	155	99
3	SC_EF524185	155	32	NC20_Pk	155	99
3	SC_EF524185	155	33	NC21_Np	155	99
3	SC_EF524185	155	34	NC24_Kj	155	99
3	SC_EF524185	155	35	NC25_Rj	155	99
3	SC_EF524185	155	36	NC8_Kj	155	94
3	SC_EF524185	155	37	NC10_Rj	155	93
3	SC_EF524185	155	38	NC11_Rj	155	93
3	SC_EF524185	155	39	NC22_Np	155	91
3	SC_EF524185	155	40	NC18_Pk	155	94
3	SC_EF524185	155	41	NC9_Np	155	92
3	SC_EF524185	155	42	NC13_Kj	155	92
3	SC_EF524185	155	43	NC14_Np	155	92
3	SC_EF524185	155	44	NC17_Pk	155	92
3	SC_EF524185	155	45	NC23_Kj	155	93
4	ML_AB117092	155	5	ML_AB117091	155	99
4	ML_AB117092	155	6	BT_AB268581	155	96
4	ML_AB117092	155	7	BT_AB268580	155	99
4	ML_AB117092	155	8	SWC_EF417986	155	99
4	ML_AB117092	155	9	SWC_EF417978	155	99
4	ML_AB117092	155	10	SWC_EF417977	155	99
4	ML_AB117092	155	11	SWC_EF417971	155	99
4	ML_AB117092	155	12	NP_AB085923	155	99
4	ML_AB117092	155	13	NP_AB085922	155	95
4	ML_AB117092	155	14	NP_AB085921	155	97
4	ML_AB117092	155	15	PL_AB079326	155	99
4	ML_AB117092	155	16	PL_AB079325	155	99
4	ML_AB117092	155	17	ID_AY378136	155	95
4	ML_AB117092	155	18	ID_AY378137	155	98
4	ML_AB117092	155	19	ID_AY972136	155	96
4	ML_AB117092	155	20	ID_AY972149	155	97
4	ML_AB117092	155	21	ID_AY972131	155	96
4	ML_AB117092	155	22	NC1_Pk	155	98
4	ML_AB117092	155	23	NC2_Pk	155	98
4	ML_AB117092	155	24	NC3_Pk	155	98
4	ML_AB117092	155	25	NC4_Pk	155	98
4	ML_AB117092	155	26	NC5_Pk	155	98
4	ML_AB117092	155	27	NC6_Kj	155	98
4	ML_AB117092	155	28	NC12_Kj	155	98
4	ML_AB117092	155	29	NC15_Np	155	98
4	ML_AB117092	155	30	NC16_Pk	155	98
4	ML_AB117092	155	31	NC19_Pk	155	98
4	ML_AB117092	155	32	NC20_Pk	155	98
4	ML_AB117092	155	33	NC21_Np	155	98
4	ML_AB117092	155	34	NC24_Kj	155	98
4	ML_AB117092	155	35	NC25_Rj	155	98
4	ML_AB117092	155	36	NC8_Kj	155	93
4	ML_AB117092	155	37	NC10_Rj	155	92
4	ML_AB117092	155	38	NC11_Rj	155	92
4	ML_AB117092	155	39	NC22_Np	155	90
4	ML_AB117092	155	40	NC18_Pk	155	93
4	ML_AB117092	155	41	NC9_Np	155	92
4	ML_AB117092	155	42	NC13_Kj	155	92
4	ML_AB117092	155	43	NC14_Np	155	92
4	ML_AB117092	155	44	NC17_Pk	155	92
4	ML_AB117092	155	45	NC23_Kj	155	92
5	ML_AB117091	155	6	BT_AB268581	155	95
5	ML_AB117091	155	7	BT_AB268580	155	100

SeqA	Name	Len(nt)	SeqB	Name	Len(nt)	Score
=====						
5	ML_AB117091	155	8	SWC_EF417986	155	98
5	ML_AB117091	155	9	SWC_EF417978	155	98
5	ML_AB117091	155	10	SWC_EF417977	155	98
5	ML_AB117091	155	11	SWC_EF417971	155	98
5	ML_AB117091	155	12	NP_AB085923	155	98
5	ML_AB117091	155	13	NP_AB085922	155	95
5	ML_AB117091	155	14	NP_AB085921	155	96
5	ML_AB117091	155	15	PL_AB079326	155	98
5	ML_AB117091	155	16	PL_AB079325	155	98
5	ML_AB117091	155	17	ID_AY378136	155	95
5	ML_AB117091	155	18	ID_AY378137	155	97
5	ML_AB117091	155	19	ID_AY972136	155	97
5	ML_AB117091	155	20	ID_AY972149	155	97
5	ML_AB117091	155	21	ID_AY972131	155	97
5	ML_AB117091	155	22	NC1_Pk	155	99
5	ML_AB117091	155	23	NC2_Pk	155	99
5	ML_AB117091	155	24	NC3_Pk	155	99
5	ML_AB117091	155	25	NC4_Pk	155	99
5	ML_AB117091	155	26	NC5_Pk	155	99
5	ML_AB117091	155	27	NC6_Kj	155	99
5	ML_AB117091	155	28	NC12_Kj	155	99
5	ML_AB117091	155	29	NC15_Np	155	99
5	ML_AB117091	155	30	NC16_Pk	155	99
5	ML_AB117091	155	31	NC19_Pk	155	99
5	ML_AB117091	155	32	NC20_Pk	155	99
5	ML_AB117091	155	33	NC21_Np	155	99
5	ML_AB117091	155	34	NC24_Kj	155	99
5	ML_AB117091	155	35	NC25_Rj	155	99
5	ML_AB117091	155	36	NC8_Kj	155	92
5	ML_AB117091	155	37	NC10_Rj	155	93
5	ML_AB117091	155	38	NC11_Rj	155	93
5	ML_AB117091	155	39	NC22_Np	155	91
5	ML_AB117091	155	40	NC18_Pk	155	94
5	ML_AB117091	155	41	NC9_Np	155	91
5	ML_AB117091	155	42	NC13_Kj	155	91
5	ML_AB117091	155	43	NC14_Np	155	91
5	ML_AB117091	155	44	NC17_Pk	155	91
5	ML_AB117091	155	45	NC23_Kj	155	92
6	BT_AB268581	155	7	BT_AB268580	155	95
6	BT_AB268581	155	8	SWC_EF417986	155	97
6	BT_AB268581	155	9	SWC_EF417978	155	97
6	BT_AB268581	155	10	SWC_EF417977	155	97
6	BT_AB268581	155	11	SWC_EF417971	155	97
6	BT_AB268581	155	12	NP_AB085923	155	97
6	BT_AB268581	155	13	NP_AB085922	155	97
6	BT_AB268581	155	14	NP_AB085921	155	99
6	BT_AB268581	155	15	PL_AB079326	155	97
6	BT_AB268581	155	16	PL_AB079325	155	97
6	BT_AB268581	155	17	ID_AY378136	155	97
6	BT_AB268581	155	18	ID_AY378137	155	96
6	BT_AB268581	155	19	ID_AY972136	155	98
6	BT_AB268581	155	20	ID_AY972149	155	97
6	BT_AB268581	155	21	ID_AY972131	155	98
6	BT_AB268581	155	22	NC1_Pk	155	96
6	BT_AB268581	155	23	NC2_Pk	155	96
6	BT_AB268581	155	24	NC3_Pk	155	96
6	BT_AB268581	155	25	NC4_Pk	155	96
6	BT_AB268581	155	26	NC5_Pk	155	96

SeqA	Name	Len(nt)	SeqB	Name	Len(nt)	Score
6	BT_AB268581	155	27	NC6_Kj	155	96
6	BT_AB268581	155	28	NC12_Kj	155	96
6	BT_AB268581	155	29	NC15_Np	155	96
6	BT_AB268581	155	30	NC16_Pk	155	96
6	BT_AB268581	155	31	NC19_Pk	155	96
6	BT_AB268581	155	32	NC20_Pk	155	96
6	BT_AB268581	155	33	NC21_Np	155	96
6	BT_AB268581	155	34	NC24_Kj	155	96
6	BT_AB268581	155	35	NC25_Rj	155	96
6	BT_AB268581	155	36	NC8_Kj	155	91
6	BT_AB268581	155	37	NC10_Rj	155	90
6	BT_AB268581	155	38	NC11_Rj	155	90
6	BT_AB268581	155	39	NC22_Np	155	88
6	BT_AB268581	155	40	NC18_Pk	155	91
6	BT_AB268581	155	41	NC9_Np	155	90
6	BT_AB268581	155	42	NC13_Kj	155	90
6	BT_AB268581	155	43	NC14_Np	155	90
6	BT_AB268581	155	44	NC17_Pk	155	90
6	BT_AB268581	155	45	NC23_Kj	155	90
7	BT_AB268580	155	8	SWC_EF417986	155	98
7	BT_AB268580	155	9	SWC_EF417978	155	98
7	BT_AB268580	155	10	SWC_EF417977	155	98
7	BT_AB268580	155	11	SWC_EF417971	155	98
7	BT_AB268580	155	12	NP_AB085923	155	98
7	BT_AB268580	155	13	NP_AB085922	155	95
7	BT_AB268580	155	14	NP_AB085921	155	96
7	BT_AB268580	155	15	PL_AB079326	155	98
7	BT_AB268580	155	16	PL_AB079325	155	98
7	BT_AB268580	155	17	ID_AY378136	155	95
7	BT_AB268580	155	18	ID_AY378137	155	97
7	BT_AB268580	155	19	ID_AY972136	155	97
7	BT_AB268580	155	20	ID_AY972149	155	97
7	BT_AB268580	155	21	ID_AY972131	155	97
7	BT_AB268580	155	22	NC1_Pk	155	99
7	BT_AB268580	155	23	NC2_Pk	155	99
7	BT_AB268580	155	24	NC3_Pk	155	99
7	BT_AB268580	155	25	NC4_Pk	155	99
7	BT_AB268580	155	26	NC5_Pk	155	99
7	BT_AB268580	155	27	NC6_Kj	155	99
7	BT_AB268580	155	28	NC12_Kj	155	99
7	BT_AB268580	155	29	NC15_Np	155	99
7	BT_AB268580	155	30	NC16_Pk	155	99
7	BT_AB268580	155	31	NC19_Pk	155	99
7	BT_AB268580	155	32	NC20_Pk	155	99
7	BT_AB268580	155	33	NC21_Np	155	99
7	BT_AB268580	155	34	NC24_Kj	155	99
7	BT_AB268580	155	35	NC25_Rj	155	99
7	BT_AB268580	155	36	NC8_Kj	155	92
7	BT_AB268580	155	37	NC10_Rj	155	93
7	BT_AB268580	155	38	NC11_Rj	155	93
7	BT_AB268580	155	39	NC22_Np	155	91
7	BT_AB268580	155	40	NC18_Pk	155	94
7	BT_AB268580	155	41	NC9_Np	155	91
7	BT_AB268580	155	42	NC13_Kj	155	91
7	BT_AB268580	155	43	NC14_Np	155	91
7	BT_AB268580	155	44	NC17_Pk	155	91
7	BT_AB268580	155	45	NC23_Kj	155	92
8	SWC_EF417986	155	9	SWC_EF417978	155	100

SeqA	Name	Len(nt)	SeqB	Name	Len(nt)	Score
8	SWC_EF417986	155	10	SWC_EF417977	155	100
8	SWC_EF417986	155	11	SWC_EF417971	155	100
8	SWC_EF417986	155	12	NP_AB085923	155	100
8	SWC_EF417986	155	13	NP_AB085922	155	96
8	SWC_EF417986	155	14	NP_AB085921	155	97
8	SWC_EF417986	155	15	PL_AB079326	155	100
8	SWC_EF417986	155	16	PL_AB079325	155	100
8	SWC_EF417986	155	17	ID_AY378136	155	96
8	SWC_EF417986	155	18	ID_AY378137	155	99
8	SWC_EF417986	155	19	ID_AY972136	155	97
8	SWC_EF417986	155	20	ID_AY972149	155	97
8	SWC_EF417986	155	21	ID_AY972131	155	97
8	SWC_EF417986	155	22	NC1_Pk	155	99
8	SWC_EF417986	155	23	NC2_Pk	155	99
8	SWC_EF417986	155	24	NC3_Pk	155	99
8	SWC_EF417986	155	25	NC4_Pk	155	99
8	SWC_EF417986	155	26	NC5_Pk	155	99
8	SWC_EF417986	155	27	NC6_Kj	155	99
8	SWC_EF417986	155	28	NC12_Kj	155	99
8	SWC_EF417986	155	29	NC15_Np	155	99
8	SWC_EF417986	155	30	NC16_Pk	155	99
8	SWC_EF417986	155	31	NC19_Pk	155	99
8	SWC_EF417986	155	32	NC20_Pk	155	99
8	SWC_EF417986	155	33	NC21_Np	155	99
8	SWC_EF417986	155	34	NC24_Kj	155	99
8	SWC_EF417986	155	35	NC25_Rj	155	99
8	SWC_EF417986	155	36	NC8_Kj	155	94
8	SWC_EF417986	155	37	NC10_Rj	155	93
8	SWC_EF417986	155	38	NC11_Rj	155	93
8	SWC_EF417986	155	39	NC22_Np	155	91
8	SWC_EF417986	155	40	NC18_Pk	155	94
8	SWC_EF417986	155	41	NC9_Np	155	92
8	SWC_EF417986	155	42	NC13_Kj	155	92
8	SWC_EF417986	155	43	NC14_Np	155	92
8	SWC_EF417986	155	44	NC17_Pk	155	92
8	SWC_EF417986	155	45	NC23_Kj	155	93
9	SWC_EF417978	155	10	SWC_EF417977	155	100
9	SWC_EF417978	155	11	SWC_EF417971	155	100
9	SWC_EF417978	155	12	NP_AB085923	155	100
9	SWC_EF417978	155	13	NP_AB085922	155	96
9	SWC_EF417978	155	14	NP_AB085921	155	97
9	SWC_EF417978	155	15	PL_AB079326	155	100
9	SWC_EF417978	155	16	PL_AB079325	155	100
9	SWC_EF417978	155	17	ID_AY378136	155	96
9	SWC_EF417978	155	18	ID_AY378137	155	99
9	SWC_EF417978	155	19	ID_AY972136	155	97
9	SWC_EF417978	155	20	ID_AY972149	155	97
9	SWC_EF417978	155	21	ID_AY972131	155	97
9	SWC_EF417978	155	22	NC1_Pk	155	99
9	SWC_EF417978	155	23	NC2_Pk	155	99
9	SWC_EF417978	155	24	NC3_Pk	155	99
9	SWC_EF417978	155	25	NC4_Pk	155	99
9	SWC_EF417978	155	26	NC5_Pk	155	99
9	SWC_EF417978	155	27	NC6_Kj	155	99
9	SWC_EF417978	155	28	NC12_Kj	155	99
9	SWC_EF417978	155	29	NC15_Np	155	99
9	SWC_EF417978	155	30	NC16_Pk	155	99
9	SWC_EF417978	155	31	NC19_Pk	155	99

SeqA	Name	Len(nt)	SeqB	Name	Len(nt)	Score
9	SWC_EF417978	155	32	NC20_Pk	155	99
9	SWC_EF417978	155	33	NC21_Np	155	99
9	SWC_EF417978	155	34	NC24_Kj	155	99
9	SWC_EF417978	155	35	NC25_Rj	155	99
9	SWC_EF417978	155	36	NC8_Kj	155	94
9	SWC_EF417978	155	37	NC10_Rj	155	93
9	SWC_EF417978	155	38	NC11_Rj	155	93
9	SWC_EF417978	155	39	NC22_Np	155	91
9	SWC_EF417978	155	40	NC18_Pk	155	94
9	SWC_EF417978	155	41	NC9_Np	155	92
9	SWC_EF417978	155	42	NC13_Kj	155	92
9	SWC_EF417978	155	43	NC14_Np	155	92
9	SWC_EF417978	155	44	NC17_Pk	155	92
9	SWC_EF417978	155	45	NC23_Kj	155	93
10	SWC_EF417977	155	11	SWC_EF417971	155	100
10	SWC_EF417977	155	12	NP_AB085923	155	100
10	SWC_EF417977	155	13	NP_AB085922	155	96
10	SWC_EF417977	155	14	NP_AB085921	155	97
10	SWC_EF417977	155	15	PL_AB079326	155	100
10	SWC_EF417977	155	16	PL_AB079325	155	100
10	SWC_EF417977	155	17	ID_AY378136	155	96
10	SWC_EF417977	155	18	ID_AY378137	155	99
10	SWC_EF417977	155	19	ID_AY972136	155	97
10	SWC_EF417977	155	20	ID_AY972149	155	97
10	SWC_EF417977	155	21	ID_AY972131	155	97
10	SWC_EF417977	155	22	NC1_Pk	155	99
10	SWC_EF417977	155	23	NC2_Pk	155	99
10	SWC_EF417977	155	24	NC3_Pk	155	99
10	SWC_EF417977	155	25	NC4_Pk	155	99
10	SWC_EF417977	155	26	NC5_Pk	155	99
10	SWC_EF417977	155	27	NC6_Kj	155	99
10	SWC_EF417977	155	28	NC12_Kj	155	99
10	SWC_EF417977	155	29	NC15_Np	155	99
10	SWC_EF417977	155	30	NC16_Pk	155	99
10	SWC_EF417977	155	31	NC19_Pk	155	99
10	SWC_EF417977	155	32	NC20_Pk	155	99
10	SWC_EF417977	155	33	NC21_Np	155	99
10	SWC_EF417977	155	34	NC24_Kj	155	99
10	SWC_EF417977	155	35	NC25_Rj	155	99
10	SWC_EF417977	155	36	NC8_Kj	155	94
10	SWC_EF417977	155	37	NC10_Rj	155	93
10	SWC_EF417977	155	38	NC11_Rj	155	93
10	SWC_EF417977	155	39	NC22_Np	155	91
10	SWC_EF417977	155	40	NC18_Pk	155	94
10	SWC_EF417977	155	41	NC9_Np	155	92
10	SWC_EF417977	155	42	NC13_Kj	155	92
10	SWC_EF417977	155	43	NC14_Np	155	92
10	SWC_EF417977	155	44	NC17_Pk	155	92
10	SWC_EF417977	155	45	NC23_Kj	155	93
11	SWC_EF417971	155	12	NP_AB085923	155	100
11	SWC_EF417971	155	13	NP_AB085922	155	96
11	SWC_EF417971	155	14	NP_AB085921	155	97
11	SWC_EF417971	155	15	PL_AB079326	155	100
11	SWC_EF417971	155	16	PL_AB079325	155	100
11	SWC_EF417971	155	17	ID_AY378136	155	96
11	SWC_EF417971	155	18	ID_AY378137	155	99
11	SWC_EF417971	155	19	ID_AY972136	155	97
11	SWC_EF417971	155	20	ID_AY972149	155	97

SeqA Name	Len(nt)	SeqB Name	Len(nt)	Score
=====				
11 SWC_EF417971	155	21 ID_AY972131	155	97
11 SWC_EF417971	155	22 NC1_Pk	155	99
11 SWC_EF417971	155	23 NC2_Pk	155	99
11 SWC_EF417971	155	24 NC3_Pk	155	99
11 SWC_EF417971	155	25 NC4_Pk	155	99
11 SWC_EF417971	155	26 NC5_Pk	155	99
11 SWC_EF417971	155	27 NC6_Kj	155	99
11 SWC_EF417971	155	28 NC12_Kj	155	99
11 SWC_EF417971	155	29 NC15_Np	155	99
11 SWC_EF417971	155	30 NC16_Pk	155	99
11 SWC_EF417971	155	31 NC19_Pk	155	99
11 SWC_EF417971	155	32 NC20_Pk	155	99
11 SWC_EF417971	155	33 NC21_Np	155	99
11 SWC_EF417971	155	34 NC24_Kj	155	99
11 SWC_EF417971	155	35 NC25_Rj	155	99
11 SWC_EF417971	155	36 NC8_Kj	155	94
11 SWC_EF417971	155	37 NC10_Rj	155	93
11 SWC_EF417971	155	38 NC11_Rj	155	93
11 SWC_EF417971	155	39 NC22_Np	155	91
11 SWC_EF417971	155	40 NC18_Pk	155	94
11 SWC_EF417971	155	41 NC9_Np	155	92
11 SWC_EF417971	155	42 NC13_Kj	155	92
11 SWC_EF417971	155	43 NC14_Np	155	92
11 SWC_EF417971	155	44 NC17_Pk	155	92
11 SWC_EF417971	155	45 NC23_Kj	155	93
12 NP_AB085923	155	13 NP_AB085922	155	96
12 NP_AB085923	155	14 NP_AB085921	155	97
12 NP_AB085923	155	15 PL_AB079326	155	100
12 NP_AB085923	155	16 PL_AB079325	155	100
12 NP_AB085923	155	17 ID_AY378136	155	96
12 NP_AB085923	155	18 ID_AY378137	155	99
12 NP_AB085923	155	19 ID_AY972136	155	97
12 NP_AB085923	155	20 ID_AY972149	155	97
12 NP_AB085923	155	21 ID_AY972131	155	97
12 NP_AB085923	155	22 NC1_Pk	155	99
12 NP_AB085923	155	23 NC2_Pk	155	99
12 NP_AB085923	155	24 NC3_Pk	155	99
12 NP_AB085923	155	25 NC4_Pk	155	99
12 NP_AB085923	155	26 NC5_Pk	155	99
12 NP_AB085923	155	27 NC6_Kj	155	99
12 NP_AB085923	155	28 NC12_Kj	155	99
12 NP_AB085923	155	29 NC15_Np	155	99
12 NP_AB085923	155	30 NC16_Pk	155	99
12 NP_AB085923	155	31 NC19_Pk	155	99
12 NP_AB085923	155	32 NC20_Pk	155	99
12 NP_AB085923	155	33 NC21_Np	155	99
12 NP_AB085923	155	34 NC24_Kj	155	99
12 NP_AB085923	155	35 NC25_Rj	155	99
12 NP_AB085923	155	36 NC8_Kj	155	94
12 NP_AB085923	155	37 NC10_Rj	155	93
12 NP_AB085923	155	38 NC11_Rj	155	93
12 NP_AB085923	155	39 NC22_Np	155	91
12 NP_AB085923	155	40 NC18_Pk	155	94
12 NP_AB085923	155	41 NC9_Np	155	92
12 NP_AB085923	155	42 NC13_Kj	155	92
12 NP_AB085923	155	43 NC14_Np	155	92
12 NP_AB085923	155	44 NC17_Pk	155	92
12 NP_AB085923	155	45 NC23_Kj	155	93

SeqA Name	Len(nt)	SeqB Name	Len(nt)	Score
13 NP_AB085922	155	14 NP_AB085921	155	98
13 NP_AB085922	155	15 PL_AB079326	155	96
13 NP_AB085922	155	16 PL_AB079325	155	96
13 NP_AB085922	155	17 ID_AY378136	155	97
13 NP_AB085922	155	18 ID_AY378137	155	95
13 NP_AB085922	155	19 ID_AY972136	155	97
13 NP_AB085922	155	20 ID_AY972149	155	97
13 NP_AB085922	155	21 ID_AY972131	155	97
13 NP_AB085922	155	22 NC1_Pk	155	95
13 NP_AB085922	155	23 NC2_Pk	155	95
13 NP_AB085922	155	24 NC3_Pk	155	95
13 NP_AB085922	155	25 NC4_Pk	155	95
13 NP_AB085922	155	26 NC5_Pk	155	95
13 NP_AB085922	155	27 NC6_Kj	155	95
13 NP_AB085922	155	28 NC12_Kj	155	95
13 NP_AB085922	155	29 NC15_Np	155	95
13 NP_AB085922	155	30 NC16_Pk	155	95
13 NP_AB085922	155	31 NC19_Pk	155	95
13 NP_AB085922	155	32 NC20_Pk	155	95
13 NP_AB085922	155	33 NC21_Np	155	95
13 NP_AB085922	155	34 NC24_Kj	155	95
13 NP_AB085922	155	35 NC25_Rj	155	95
13 NP_AB085922	155	36 NC8_Kj	155	90
13 NP_AB085922	155	37 NC10_Rj	155	90
13 NP_AB085922	155	38 NC11_Rj	155	90
13 NP_AB085922	155	39 NC22_Np	155	88
13 NP_AB085922	155	40 NC18_Pk	155	90
13 NP_AB085922	155	41 NC9_Np	155	89
13 NP_AB085922	155	42 NC13_Kj	155	89
13 NP_AB085922	155	43 NC14_Np	155	89
13 NP_AB085922	155	44 NC17_Pk	155	89
13 NP_AB085922	155	45 NC23_Kj	155	90
14 NP_AB085921	155	15 PL_AB079326	155	97
14 NP_AB085921	155	16 PL_AB079325	155	97
14 NP_AB085921	155	17 ID_AY378136	155	98
14 NP_AB085921	155	18 ID_AY378137	155	97
14 NP_AB085921	155	19 ID_AY972136	155	99
14 NP_AB085921	155	20 ID_AY972149	155	98
14 NP_AB085921	155	21 ID_AY972131	155	99
14 NP_AB085921	155	22 NC1_Pk	155	97
14 NP_AB085921	155	23 NC2_Pk	155	97
14 NP_AB085921	155	24 NC3_Pk	155	97
14 NP_AB085921	155	25 NC4_Pk	155	97
14 NP_AB085921	155	26 NC5_Pk	155	97
14 NP_AB085921	155	27 NC6_Kj	155	97
14 NP_AB085921	155	28 NC12_Kj	155	97
14 NP_AB085921	155	29 NC15_Np	155	97
14 NP_AB085921	155	30 NC16_Pk	155	97
14 NP_AB085921	155	31 NC19_Pk	155	97
14 NP_AB085921	155	32 NC20_Pk	155	97
14 NP_AB085921	155	33 NC21_Np	155	97
14 NP_AB085921	155	34 NC24_Kj	155	97
14 NP_AB085921	155	35 NC25_Rj	155	97
14 NP_AB085921	155	36 NC8_Kj	155	92
14 NP_AB085921	155	37 NC10_Rj	155	91
14 NP_AB085921	155	38 NC11_Rj	155	91
14 NP_AB085921	155	39 NC22_Np	155	89
14 NP_AB085921	155	40 NC18_Pk	155	92

SeqA	Name	Len(nt)	SeqB	Name	Len(nt)	Score
14	NP_AB085921	155	41	NC9_Np	155	90
14	NP_AB085921	155	42	NC13_Kj	155	90
14	NP_AB085921	155	43	NC14_Np	155	90
14	NP_AB085921	155	44	NC17_Pk	155	90
14	NP_AB085921	155	45	NC23_Kj	155	91
15	PL_AB079326	155	16	PL_AB079325	155	100
15	PL_AB079326	155	17	ID_AY378136	155	96
15	PL_AB079326	155	18	ID_AY378137	155	99
15	PL_AB079326	155	19	ID_AY972136	155	97
15	PL_AB079326	155	20	ID_AY972149	155	97
15	PL_AB079326	155	21	ID_AY972131	155	97
15	PL_AB079326	155	22	NC1_Pk	155	99
15	PL_AB079326	155	23	NC2_Pk	155	99
15	PL_AB079326	155	24	NC3_Pk	155	99
15	PL_AB079326	155	25	NC4_Pk	155	99
15	PL_AB079326	155	26	NC5_Pk	155	99
15	PL_AB079326	155	27	NC6_Kj	155	99
15	PL_AB079326	155	28	NC12_Kj	155	99
15	PL_AB079326	155	29	NC15_Np	155	99
15	PL_AB079326	155	30	NC16_Pk	155	99
15	PL_AB079326	155	31	NC19_Pk	155	99
15	PL_AB079326	155	32	NC20_Pk	155	99
15	PL_AB079326	155	33	NC21_Np	155	99
15	PL_AB079326	155	34	NC24_Kj	155	99
15	PL_AB079326	155	35	NC25_Rj	155	99
15	PL_AB079326	155	36	NC8_Kj	155	94
15	PL_AB079326	155	37	NC10_Rj	155	93
15	PL_AB079326	155	38	NC11_Rj	155	93
15	PL_AB079326	155	39	NC22_Np	155	91
15	PL_AB079326	155	40	NC18_Pk	155	94
15	PL_AB079326	155	41	NC9_Np	155	92
15	PL_AB079326	155	42	NC13_Kj	155	92
15	PL_AB079326	155	43	NC14_Np	155	92
15	PL_AB079326	155	44	NC17_Pk	155	92
15	PL_AB079326	155	45	NC23_Kj	155	93
16	PL_AB079325	155	17	ID_AY378136	155	96
16	PL_AB079325	155	18	ID_AY378137	155	99
16	PL_AB079325	155	19	ID_AY972136	155	97
16	PL_AB079325	155	20	ID_AY972149	155	97
16	PL_AB079325	155	21	ID_AY972131	155	97
16	PL_AB079325	155	22	NC1_Pk	155	99
16	PL_AB079325	155	23	NC2_Pk	155	99
16	PL_AB079325	155	24	NC3_Pk	155	99
16	PL_AB079325	155	25	NC4_Pk	155	99
16	PL_AB079325	155	26	NC5_Pk	155	99
16	PL_AB079325	155	27	NC6_Kj	155	99
16	PL_AB079325	155	28	NC12_Kj	155	99
16	PL_AB079325	155	29	NC15_Np	155	99
16	PL_AB079325	155	30	NC16_Pk	155	99
16	PL_AB079325	155	31	NC19_Pk	155	99
16	PL_AB079325	155	32	NC20_Pk	155	99
16	PL_AB079325	155	33	NC21_Np	155	99
16	PL_AB079325	155	34	NC24_Kj	155	99
16	PL_AB079325	155	35	NC25_Rj	155	99
16	PL_AB079325	155	36	NC8_Kj	155	94
16	PL_AB079325	155	37	NC10_Rj	155	93
16	PL_AB079325	155	38	NC11_Rj	155	93
16	PL_AB079325	155	39	NC22_Np	155	91

SeqA Name	Len(nt)	SeqB Name	Len(nt)	Score
=====		=====		
16 PL_AB079325	155	40 NC18_Pk	155	94
16 PL_AB079325	155	41 NC9_Np	155	92
16 PL_AB079325	155	42 NC13_Kj	155	92
16 PL_AB079325	155	43 NC14_Np	155	92
16 PL_AB079325	155	44 NC17_Pk	155	92
16 PL_AB079325	155	45 NC23_Kj	155	93
17 ID_AY378136	155	18 ID_AY378137	155	95
17 ID_AY378136	155	19 ID_AY972136	155	97
17 ID_AY378136	155	20 ID_AY972149	155	97
17 ID_AY378136	155	21 ID_AY972131	155	97
17 ID_AY378136	155	22 NC1_Pk	155	95
17 ID_AY378136	155	23 NC2_Pk	155	95
17 ID_AY378136	155	24 NC3_Pk	155	95
17 ID_AY378136	155	25 NC4_Pk	155	95
17 ID_AY378136	155	26 NC5_Pk	155	95
17 ID_AY378136	155	27 NC6_Kj	155	95
17 ID_AY378136	155	28 NC12_Kj	155	95
17 ID_AY378136	155	29 NC15_Np	155	95
17 ID_AY378136	155	30 NC16_Pk	155	95
17 ID_AY378136	155	31 NC19_Pk	155	95
17 ID_AY378136	155	32 NC20_Pk	155	95
17 ID_AY378136	155	33 NC21_Np	155	95
17 ID_AY378136	155	34 NC24_Kj	155	95
17 ID_AY378136	155	35 NC25_Rj	155	95
17 ID_AY378136	155	36 NC8_Kj	155	90
17 ID_AY378136	155	37 NC10_Rj	155	90
17 ID_AY378136	155	38 NC11_Rj	155	90
17 ID_AY378136	155	39 NC22_Np	155	88
17 ID_AY378136	155	40 NC18_Pk	155	90
17 ID_AY378136	155	41 NC9_Np	155	90
17 ID_AY378136	155	42 NC13_Kj	155	90
17 ID_AY378136	155	43 NC14_Np	155	90
17 ID_AY378136	155	44 NC17_Pk	155	90
17 ID_AY378136	155	45 NC23_Kj	155	90
18 ID_AY378137	155	19 ID_AY972136	155	96
18 ID_AY378137	155	20 ID_AY972149	155	97
18 ID_AY378137	155	21 ID_AY972131	155	96
18 ID_AY378137	155	22 NC1_Pk	155	98
18 ID_AY378137	155	23 NC2_Pk	155	98
18 ID_AY378137	155	24 NC3_Pk	155	98
18 ID_AY378137	155	25 NC4_Pk	155	98
18 ID_AY378137	155	26 NC5_Pk	155	98
18 ID_AY378137	155	27 NC6_Kj	155	98
18 ID_AY378137	155	28 NC12_Kj	155	98
18 ID_AY378137	155	29 NC15_Np	155	98
18 ID_AY378137	155	30 NC16_Pk	155	98
18 ID_AY378137	155	31 NC19_Pk	155	98
18 ID_AY378137	155	32 NC20_Pk	155	98
18 ID_AY378137	155	33 NC21_Np	155	98
18 ID_AY378137	155	34 NC24_Kj	155	98
18 ID_AY378137	155	35 NC25_Rj	155	98
18 ID_AY378137	155	36 NC8_Kj	155	93
18 ID_AY378137	155	37 NC10_Rj	155	92
18 ID_AY378137	155	38 NC11_Rj	155	92
18 ID_AY378137	155	39 NC22_Np	155	90
18 ID_AY378137	155	40 NC18_Pk	155	93
18 ID_AY378137	155	41 NC9_Np	155	92
18 ID_AY378137	155	42 NC13_Kj	155	92

SeqA	Name	Len(nt)	SeqB	Name	Len(nt)	Score
=====						
18	ID_AY378137	155	43	NC14_Np	155	92
18	ID_AY378137	155	44	NC17_Pk	155	92
18	ID_AY378137	155	45	NC23_Kj	155	92
19	ID_AY972136	155	20	ID_AY972149	155	99
19	ID_AY972136	155	21	ID_AY972131	155	100
19	ID_AY972136	155	22	NC1_Pk	155	97
19	ID_AY972136	155	23	NC2_Pk	155	97
19	ID_AY972136	155	24	NC3_Pk	155	97
19	ID_AY972136	155	25	NC4_Pk	155	97
19	ID_AY972136	155	26	NC5_Pk	155	97
19	ID_AY972136	155	27	NC6_Kj	155	97
19	ID_AY972136	155	28	NC12_Kj	155	97
19	ID_AY972136	155	29	NC15_Np	155	97
19	ID_AY972136	155	30	NC16_Pk	155	97
19	ID_AY972136	155	31	NC19_Pk	155	97
19	ID_AY972136	155	32	NC20_Pk	155	97
19	ID_AY972136	155	33	NC21_Np	155	97
19	ID_AY972136	155	34	NC24_Kj	155	97
19	ID_AY972136	155	35	NC25_Rj	155	97
19	ID_AY972136	155	36	NC8_Kj	155	91
19	ID_AY972136	155	37	NC10_Rj	155	92
19	ID_AY972136	155	38	NC11_Rj	155	92
19	ID_AY972136	155	39	NC22_Np	155	90
19	ID_AY972136	155	40	NC18_Pk	155	92
19	ID_AY972136	155	41	NC9_Np	155	90
19	ID_AY972136	155	42	NC13_Kj	155	90
19	ID_AY972136	155	43	NC14_Np	155	90
19	ID_AY972136	155	44	NC17_Pk	155	90
19	ID_AY972136	155	45	NC23_Kj	155	90
20	ID_AY972149	155	21	ID_AY972131	155	99
20	ID_AY972149	155	22	NC1_Pk	155	98
20	ID_AY972149	155	23	NC2_Pk	155	98
20	ID_AY972149	155	24	NC3_Pk	155	98
20	ID_AY972149	155	25	NC4_Pk	155	98
20	ID_AY972149	155	26	NC5_Pk	155	98
20	ID_AY972149	155	27	NC6_Kj	155	98
20	ID_AY972149	155	28	NC12_Kj	155	98
20	ID_AY972149	155	29	NC15_Np	155	98
20	ID_AY972149	155	30	NC16_Pk	155	98
20	ID_AY972149	155	31	NC19_Pk	155	98
20	ID_AY972149	155	32	NC20_Pk	155	98
20	ID_AY972149	155	33	NC21_Np	155	98
20	ID_AY972149	155	34	NC24_Kj	155	98
20	ID_AY972149	155	35	NC25_Rj	155	98
20	ID_AY972149	155	36	NC8_Kj	155	92
20	ID_AY972149	155	37	NC10_Rj	155	92
20	ID_AY972149	155	38	NC11_Rj	155	92
20	ID_AY972149	155	39	NC22_Np	155	90
20	ID_AY972149	155	40	NC18_Pk	155	93
20	ID_AY972149	155	41	NC9_Np	155	90
20	ID_AY972149	155	42	NC13_Kj	155	90
20	ID_AY972149	155	43	NC14_Np	155	90
20	ID_AY972149	155	44	NC17_Pk	155	90
20	ID_AY972149	155	45	NC23_Kj	155	91
21	ID_AY972131	155	22	NC1_Pk	155	97
21	ID_AY972131	155	23	NC2_Pk	155	97
21	ID_AY972131	155	24	NC3_Pk	155	97
21	ID_AY972131	155	25	NC4_Pk	155	97

SeqA Name	Len(nt)	SeqB Name	Len(nt)	Score
=====				
21 ID_AY972131	155	26 NC5_Pk	155	97
21 ID_AY972131	155	27 NC6_Kj	155	97
21 ID_AY972131	155	28 NC12_Kj	155	97
21 ID_AY972131	155	29 NC15_Np	155	97
21 ID_AY972131	155	30 NC16_Pk	155	97
21 ID_AY972131	155	31 NC19_Pk	155	97
21 ID_AY972131	155	32 NC20_Pk	155	97
21 ID_AY972131	155	33 NC21_Np	155	97
21 ID_AY972131	155	34 NC24_Kj	155	97
21 ID_AY972131	155	35 NC25_Rj	155	97
21 ID_AY972131	155	36 NC8_Kj	155	91
21 ID_AY972131	155	37 NC10_Rj	155	92
21 ID_AY972131	155	38 NC11_Rj	155	92
21 ID_AY972131	155	39 NC22_Np	155	90
21 ID_AY972131	155	40 NC18_Pk	155	92
21 ID_AY972131	155	41 NC9_Np	155	90
21 ID_AY972131	155	42 NC13_Kj	155	90
21 ID_AY972131	155	43 NC14_Np	155	90
21 ID_AY972131	155	44 NC17_Pk	155	90
21 ID_AY972131	155	45 NC23_Kj	155	90
22 NC1_Pk	155	23 NC2_Pk	155	100
22 NC1_Pk	155	24 NC3_Pk	155	100
22 NC1_Pk	155	25 NC4_Pk	155	100
22 NC1_Pk	155	26 NC5_Pk	155	100
22 NC1_Pk	155	27 NC6_Kj	155	100
22 NC1_Pk	155	28 NC12_Kj	155	100
22 NC1_Pk	155	29 NC15_Np	155	100
22 NC1_Pk	155	30 NC16_Pk	155	100
22 NC1_Pk	155	31 NC19_Pk	155	100
22 NC1_Pk	155	32 NC20_Pk	155	100
22 NC1_Pk	155	33 NC21_Np	155	100
22 NC1_Pk	155	34 NC24_Kj	155	100
22 NC1_Pk	155	35 NC25_Rj	155	100
22 NC1_Pk	155	36 NC8_Kj	155	93
22 NC1_Pk	155	37 NC10_Rj	155	94
22 NC1_Pk	155	38 NC11_Rj	155	94
22 NC1_Pk	155	39 NC22_Np	155	92
22 NC1_Pk	155	40 NC18_Pk	155	95
22 NC1_Pk	155	41 NC9_Np	155	92
22 NC1_Pk	155	42 NC13_Kj	155	92
22 NC1_Pk	155	43 NC14_Np	155	92
22 NC1_Pk	155	44 NC17_Pk	155	92
22 NC1_Pk	155	45 NC23_Kj	155	92
23 NC2_Pk	155	24 NC3_Pk	155	100
23 NC2_Pk	155	25 NC4_Pk	155	100
23 NC2_Pk	155	26 NC5_Pk	155	100
23 NC2_Pk	155	27 NC6_Kj	155	100
23 NC2_Pk	155	28 NC12_Kj	155	100
23 NC2_Pk	155	29 NC15_Np	155	100
23 NC2_Pk	155	30 NC16_Pk	155	100
23 NC2_Pk	155	31 NC19_Pk	155	100
23 NC2_Pk	155	32 NC20_Pk	155	100
23 NC2_Pk	155	33 NC21_Np	155	100
23 NC2_Pk	155	34 NC24_Kj	155	100
23 NC2_Pk	155	35 NC25_Rj	155	100
23 NC2_Pk	155	36 NC8_Kj	155	93
23 NC2_Pk	155	37 NC10_Rj	155	94
23 NC2_Pk	155	38 NC11_Rj	155	94

SeqA	Name	Len(nt)	SeqB	Name	Len(nt)	Score
23	NC2_Pk	155	39	NC22_Np	155	92
23	NC2_Pk	155	40	NC18_Pk	155	95
23	NC2_Pk	155	41	NC9_Np	155	92
23	NC2_Pk	155	42	NC13_Kj	155	92
23	NC2_Pk	155	43	NC14_Np	155	92
23	NC2_Pk	155	44	NC17_Pk	155	92
23	NC2_Pk	155	45	NC23_Kj	155	92
24	NC3_Pk	155	25	NC4_Pk	155	100
24	NC3_Pk	155	26	NC5_Pk	155	100
24	NC3_Pk	155	27	NC6_Kj	155	100
24	NC3_Pk	155	28	NC12_Kj	155	100
24	NC3_Pk	155	29	NC15_Np	155	100
24	NC3_Pk	155	30	NC16_Pk	155	100
24	NC3_Pk	155	31	NC19_Pk	155	100
24	NC3_Pk	155	32	NC20_Pk	155	100
24	NC3_Pk	155	33	NC21_Np	155	100
24	NC3_Pk	155	34	NC24_Kj	155	100
24	NC3_Pk	155	35	NC25_Rj	155	100
24	NC3_Pk	155	36	NC8_Kj	155	93
24	NC3_Pk	155	37	NC10_Rj	155	94
24	NC3_Pk	155	38	NC11_Rj	155	94
24	NC3_Pk	155	39	NC22_Np	155	92
24	NC3_Pk	155	40	NC18_Pk	155	95
24	NC3_Pk	155	41	NC9_Np	155	92
24	NC3_Pk	155	42	NC13_Kj	155	92
24	NC3_Pk	155	43	NC14_Np	155	92
24	NC3_Pk	155	44	NC17_Pk	155	92
24	NC3_Pk	155	45	NC23_Kj	155	92
25	NC4_Pk	155	26	NC5_Pk	155	100
25	NC4_Pk	155	27	NC6_Kj	155	100
25	NC4_Pk	155	28	NC12_Kj	155	100
25	NC4_Pk	155	29	NC15_Np	155	100
25	NC4_Pk	155	30	NC16_Pk	155	100
25	NC4_Pk	155	31	NC19_Pk	155	100
25	NC4_Pk	155	32	NC20_Pk	155	100
25	NC4_Pk	155	33	NC21_Np	155	100
25	NC4_Pk	155	34	NC24_Kj	155	100
25	NC4_Pk	155	35	NC25_Rj	155	100
25	NC4_Pk	155	36	NC8_Kj	155	93
25	NC4_Pk	155	37	NC10_Rj	155	94
25	NC4_Pk	155	38	NC11_Rj	155	94
25	NC4_Pk	155	39	NC22_Np	155	92
25	NC4_Pk	155	40	NC18_Pk	155	95
25	NC4_Pk	155	41	NC9_Np	155	92
25	NC4_Pk	155	42	NC13_Kj	155	92
25	NC4_Pk	155	43	NC14_Np	155	92
25	NC4_Pk	155	44	NC17_Pk	155	92
25	NC4_Pk	155	45	NC23_Kj	155	92
26	NC5_Pk	155	27	NC6_Kj	155	100
26	NC5_Pk	155	28	NC12_Kj	155	100
26	NC5_Pk	155	29	NC15_Np	155	100
26	NC5_Pk	155	30	NC16_Pk	155	100
26	NC5_Pk	155	31	NC19_Pk	155	100
26	NC5_Pk	155	32	NC20_Pk	155	100
26	NC5_Pk	155	33	NC21_Np	155	100
26	NC5_Pk	155	34	NC24_Kj	155	100
26	NC5_Pk	155	35	NC25_Rj	155	100
26	NC5_Pk	155	36	NC8_Kj	155	93

SeqA	Name	Len(nt)	SeqB	Name	Len(nt)	Score
26	NC5_Pk	155	37	NC10_Rj	155	94
26	NC5_Pk	155	38	NC11_Rj	155	94
26	NC5_Pk	155	39	NC22_Np	155	92
26	NC5_Pk	155	40	NC18_Pk	155	95
26	NC5_Pk	155	41	NC9_Np	155	92
26	NC5_Pk	155	42	NC13_Kj	155	92
26	NC5_Pk	155	43	NC14_Np	155	92
26	NC5_Pk	155	44	NC17_Pk	155	92
26	NC5_Pk	155	45	NC23_Kj	155	92
27	NC6_Kj	155	28	NC12_Kj	155	100
27	NC6_Kj	155	29	NC15_Np	155	100
27	NC6_Kj	155	30	NC16_Pk	155	100
27	NC6_Kj	155	31	NC19_Pk	155	100
27	NC6_Kj	155	32	NC20_Pk	155	100
27	NC6_Kj	155	33	NC21_Np	155	100
27	NC6_Kj	155	34	NC24_Kj	155	100
27	NC6_Kj	155	35	NC25_Rj	155	100
27	NC6_Kj	155	36	NC8_Kj	155	93
27	NC6_Kj	155	37	NC10_Rj	155	94
27	NC6_Kj	155	38	NC11_Rj	155	94
27	NC6_Kj	155	39	NC22_Np	155	92
27	NC6_Kj	155	40	NC18_Pk	155	95
27	NC6_Kj	155	41	NC9_Np	155	92
27	NC6_Kj	155	42	NC13_Kj	155	92
27	NC6_Kj	155	43	NC14_Np	155	92
27	NC6_Kj	155	44	NC17_Pk	155	92
27	NC6_Kj	155	45	NC23_Kj	155	92
28	NC12_Kj	155	29	NC15_Np	155	100
28	NC12_Kj	155	30	NC16_Pk	155	100
28	NC12_Kj	155	31	NC19_Pk	155	100
28	NC12_Kj	155	32	NC20_Pk	155	100
28	NC12_Kj	155	33	NC21_Np	155	100
28	NC12_Kj	155	34	NC24_Kj	155	100
28	NC12_Kj	155	35	NC25_Rj	155	100
28	NC12_Kj	155	36	NC8_Kj	155	93
28	NC12_Kj	155	37	NC10_Rj	155	94
28	NC12_Kj	155	38	NC11_Rj	155	94
28	NC12_Kj	155	39	NC22_Np	155	92
28	NC12_Kj	155	40	NC18_Pk	155	95
28	NC12_Kj	155	41	NC9_Np	155	92
28	NC12_Kj	155	42	NC13_Kj	155	92
28	NC12_Kj	155	43	NC14_Np	155	92
28	NC12_Kj	155	44	NC17_Pk	155	92
28	NC12_Kj	155	45	NC23_Kj	155	92
29	NC15_Np	155	30	NC16_Pk	155	100
29	NC15_Np	155	31	NC19_Pk	155	100
29	NC15_Np	155	32	NC20_Pk	155	100
29	NC15_Np	155	33	NC21_Np	155	100
29	NC15_Np	155	34	NC24_Kj	155	100
29	NC15_Np	155	35	NC25_Rj	155	100
29	NC15_Np	155	36	NC8_Kj	155	93
29	NC15_Np	155	37	NC10_Rj	155	94
29	NC15_Np	155	38	NC11_Rj	155	94
29	NC15_Np	155	39	NC22_Np	155	92
29	NC15_Np	155	40	NC18_Pk	155	95
29	NC15_Np	155	41	NC9_Np	155	92
29	NC15_Np	155	42	NC13_Kj	155	92
29	NC15_Np	155	43	NC14_Np	155	92

SeqA	Name	Len(nt)	SeqB	Name	Len(nt)	Score
29	NC15_Np	155	44	NC17_Pk	155	92
29	NC15_Np	155	45	NC23_Kj	155	92
30	NC16_Pk	155	31	NC19_Pk	155	100
30	NC16_Pk	155	32	NC20_Pk	155	100
30	NC16_Pk	155	33	NC21_Np	155	100
30	NC16_Pk	155	34	NC24_Kj	155	100
30	NC16_Pk	155	35	NC25_Rj	155	100
30	NC16_Pk	155	36	NC8_Kj	155	93
30	NC16_Pk	155	37	NC10_Rj	155	94
30	NC16_Pk	155	38	NC11_Rj	155	94
30	NC16_Pk	155	39	NC22_Np	155	92
30	NC16_Pk	155	40	NC18_Pk	155	95
30	NC16_Pk	155	41	NC9_Np	155	92
30	NC16_Pk	155	42	NC13_Kj	155	92
30	NC16_Pk	155	43	NC14_Np	155	92
30	NC16_Pk	155	44	NC17_Pk	155	92
30	NC16_Pk	155	45	NC23_Kj	155	92
31	NC19_Pk	155	32	NC20_Pk	155	100
31	NC19_Pk	155	33	NC21_Np	155	100
31	NC19_Pk	155	34	NC24_Kj	155	100
31	NC19_Pk	155	35	NC25_Rj	155	100
31	NC19_Pk	155	36	NC8_Kj	155	93
31	NC19_Pk	155	37	NC10_Rj	155	94
31	NC19_Pk	155	38	NC11_Rj	155	94
31	NC19_Pk	155	39	NC22_Np	155	92
31	NC19_Pk	155	40	NC18_Pk	155	95
31	NC19_Pk	155	41	NC9_Np	155	92
31	NC19_Pk	155	42	NC13_Kj	155	92
31	NC19_Pk	155	43	NC14_Np	155	92
31	NC19_Pk	155	44	NC17_Pk	155	92
31	NC19_Pk	155	45	NC23_Kj	155	92
32	NC20_Pk	155	33	NC21_Np	155	100
32	NC20_Pk	155	34	NC24_Kj	155	100
32	NC20_Pk	155	35	NC25_Rj	155	100
32	NC20_Pk	155	36	NC8_Kj	155	93
32	NC20_Pk	155	37	NC10_Rj	155	94
32	NC20_Pk	155	38	NC11_Rj	155	94
32	NC20_Pk	155	39	NC22_Np	155	92
32	NC20_Pk	155	40	NC18_Pk	155	95
32	NC20_Pk	155	41	NC9_Np	155	92
32	NC20_Pk	155	42	NC13_Kj	155	92
32	NC20_Pk	155	43	NC14_Np	155	92
32	NC20_Pk	155	44	NC17_Pk	155	92
32	NC20_Pk	155	45	NC23_Kj	155	92
33	NC21_Np	155	34	NC24_Kj	155	100
33	NC21_Np	155	35	NC25_Rj	155	100
33	NC21_Np	155	36	NC8_Kj	155	93
33	NC21_Np	155	37	NC10_Rj	155	94
33	NC21_Np	155	38	NC11_Rj	155	94
33	NC21_Np	155	39	NC22_Np	155	92
33	NC21_Np	155	40	NC18_Pk	155	95
33	NC21_Np	155	41	NC9_Np	155	92
33	NC21_Np	155	42	NC13_Kj	155	92
33	NC21_Np	155	43	NC14_Np	155	92
33	NC21_Np	155	44	NC17_Pk	155	92
33	NC21_Np	155	45	NC23_Kj	155	92
34	NC24_Kj	155	35	NC25_Rj	155	100
34	NC24_Kj	155	36	NC8_Kj	155	93

SeqA	Name	Len(nt)	SeqB	Name	Len(nt)	Score
34	NC24_Kj	155	37	NC10_Rj	155	94
34	NC24_Kj	155	38	NC11_Rj	155	94
34	NC24_Kj	155	39	NC22_Np	155	92
34	NC24_Kj	155	40	NC18_Pk	155	95
34	NC24_Kj	155	41	NC9_Np	155	92
34	NC24_Kj	155	42	NC13_Kj	155	92
34	NC24_Kj	155	43	NC14_Np	155	92
34	NC24_Kj	155	44	NC17_Pk	155	92
34	NC24_Kj	155	45	NC23_Kj	155	92
35	NC25_Rj	155	36	NC8_Kj	155	93
35	NC25_Rj	155	37	NC10_Rj	155	94
35	NC25_Rj	155	38	NC11_Rj	155	94
35	NC25_Rj	155	39	NC22_Np	155	92
35	NC25_Rj	155	40	NC18_Pk	155	95
35	NC25_Rj	155	41	NC9_Np	155	92
35	NC25_Rj	155	42	NC13_Kj	155	92
35	NC25_Rj	155	43	NC14_Np	155	92
35	NC25_Rj	155	44	NC17_Pk	155	92
35	NC25_Rj	155	45	NC23_Kj	155	92
36	NC8_Kj	155	37	NC10_Rj	155	99
36	NC8_Kj	155	38	NC11_Rj	155	99
36	NC8_Kj	155	39	NC22_Np	155	94
36	NC8_Kj	155	40	NC18_Pk	155	97
36	NC8_Kj	155	41	NC9_Np	155	95
36	NC8_Kj	155	42	NC13_Kj	155	95
36	NC8_Kj	155	43	NC14_Np	155	95
36	NC8_Kj	155	44	NC17_Pk	155	95
36	NC8_Kj	155	45	NC23_Kj	155	97
37	NC10_Rj	155	38	NC11_Rj	155	100
37	NC10_Rj	155	39	NC22_Np	155	95
37	NC10_Rj	155	40	NC18_Pk	155	97
37	NC10_Rj	155	41	NC9_Np	155	95
37	NC10_Rj	155	42	NC13_Kj	155	95
37	NC10_Rj	155	43	NC14_Np	155	95
37	NC10_Rj	155	44	NC17_Pk	155	95
37	NC10_Rj	155	45	NC23_Kj	155	96
38	NC11_Rj	155	39	NC22_Np	155	95
38	NC11_Rj	155	40	NC18_Pk	155	97
38	NC11_Rj	155	41	NC9_Np	155	95
38	NC11_Rj	155	42	NC13_Kj	155	95
38	NC11_Rj	155	43	NC14_Np	155	95
38	NC11_Rj	155	44	NC17_Pk	155	95
38	NC11_Rj	155	45	NC23_Kj	155	96
39	NC22_Np	155	40	NC18_Pk	155	95
39	NC22_Np	155	41	NC9_Np	155	94
39	NC22_Np	155	42	NC13_Kj	155	94
39	NC22_Np	155	43	NC14_Np	155	94
39	NC22_Np	155	44	NC17_Pk	155	94
39	NC22_Np	155	45	NC23_Kj	155	91
40	NC18_Pk	155	41	NC9_Np	155	95
40	NC18_Pk	155	42	NC13_Kj	155	95
40	NC18_Pk	155	43	NC14_Np	155	95
40	NC18_Pk	155	44	NC17_Pk	155	95
40	NC18_Pk	155	45	NC23_Kj	155	94
41	NC9_Np	155	42	NC13_Kj	155	100
41	NC9_Np	155	43	NC14_Np	155	100
41	NC9_Np	155	44	NC17_Pk	155	100
41	NC9_Np	155	45	NC23_Kj	155	92

SeqA	Name	Len(nt)	SeqB	Name	Len(nt)	Score
42	NC13_Kj	155	43	NC14_Np	155	100
42	NC13_Kj	155	44	NC17_Pk	155	100
42	NC13_Kj	155	45	NC23_Kj	155	92
43	NC14_Np	155	44	NC17_Pk	155	100
43	NC14_Np	155	45	NC23_Kj	155	92
44	NC17_Pk	155	45	NC23_Kj	155	92

ประวัติผู้วิจัย

1. ดร.กัญญา จิระเจริญรัตน์

ความรับผิดชอบในโครงการ: หัวหน้าโครงการ

คุณสมบัติทางวิชาการ: อาจารย์ (พนักงานสถาบัน)

หน่วยงานต้นสังกัด:

ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

โทรศัพท์: 02-7377000 ต่อ 6047

มือถือ: 089-7514162

โทรสาร: 02-3264313

อีเมล: kjkanya@kmitl.ac.th

ประวัติการศึกษา:

ปีการศึกษา 2533-2536: วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล

ปีการศึกษา 2541-2543: วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาอณูพันธุศาสตร์และพันธุวิศวกรรมศาสตร์
มหาวิทยาลัยมหิดล

ปีการศึกษา 2543-2547: Doctor of Philosophy (Animal Science)
University of Nottingham ประเทศอังกฤษ

สาขาวิชาการที่ชำนาญ: Animal genetic engineering

ผลงานวิจัย:

Pongjaroenkit, S., K. Jirajaroenrat, C. Boonchaui, U. Chanama, S. Leetachewa, L. Prapanthadara and A.J. Ketterman. 2001. Genomic organization and putative promoters of highly conserved glutathione S-transferases originating by alternative splicing in *Anopheles dirus*. Insect Biochem. Mol. Biol. 31(1):75-85.

- Jirajaroenrat, K., S. Pongjaroenkit, C. Krittanai, L. Prapanthadara and A.J. Kettermann.** 2001. Heterologous expression and characterization of alternatively spliced glutathione S-transferases from a single *Anopheles* gene. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 31(9):867-875.
- Oakley, A.J., K. Jirajaroenrat, T. Harnnoi, A.J. Kettermann and M.C. Wilce.** 2001. Crystallization of two glutathione S-transferases from an unusual gene family. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 57(Pt 6):870-872.
- Oakley, A.J., T. Harnnoi, R. Udomsinprasert, K. Jirajaroenrat, A.J. Kettermann, and M.C. Wilce.** 2001. The crystal structures of glutathione S-transferases isozymes 1-3 and 1- 4 from *Anopheles dirus* species B. *Protein Sci.* 10(11):2176-2185.
- Jirajaroenrat, K., C. Denning, M. Hamshire and K.H.S. Campbell.** 2003. Selection of accessible cleavage sites on alpha1,3-galactosyltransferase gene. In The 8th RNA Society Conference. Austria: Vienna.
- Thammakarn, C., A. Punchukrang, K. Jirajaroenrat and K. Srikijkasemwat.** 2007. Sex identification of some Psittacine birds by polymerase chain reaction. *Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine.* 2(2):30-34.
- Jirajaroenrat, K. and C. Thammakarn.** 2007. Sex identification of some pet birds by Polymerase Chain Reaction-based methods. 376-379. In International Conference on Integration of Science & Technology for Sustainable Development. Bangkok: King Monkut's Institute of Technology Ladkrabang.
- Jirajaroenrat, K., Y. Opatpatanakit, L. Srisuwan and J. Sethakul.** 2007. Myofibrillar protein degradation over ageing period of Kampaengsaen beef. 193-194. In Proceeding of 53rd International Congress of Meat Science and Technology. China: Beijing.
- Jirajaroenrat, K., S. Satitmanwiwat, K. Tuntivisoottikul.** 2008. Genetic Diversity of Central Thailand Beef Cattle Revealed by Mitochondrial DNA Data. In The 13th Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. Hanoi: Vietnam.

- Jirajaroenrat, K., P. Boonwong and K. Tuntivisoottikul. 2008. Genetics Diversity of Thai Indigenous Beef Cattle Lines Using Microsatellites. In The 13th Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. Hanoi: Vietnam.
- Tuntivisoottikul, K. and K. Jirajaroenrat. 2008. Genetic Characterization of Five Goat Breeds Using some Microsatellite DNA Markers. In The 13th Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. Hanoi: Vietnam.
- Promthep, K., K. Jirajaroenrat and R. Sitthigripong. 2008. Fertility Efficiency of Bovine X-bearing Spermatozoa after Sexing by Percoll Density Gradient Centrifugation. In The 13th Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. Hanoi: Vietnam.
- Pokathikorn, P., S Tanapongpipat. L. Eurwilaichitr and K. Jirajareonrat. 2008. Isolation of a Gene Encoding Beta-endoglucanase from Bovine Rumenal Bacteria Using Molecular Approach. In The 13th Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. Hanoi: Vietnam.
- Artchawakom, C., Y. Opatpatanakij, J. Sethakul and K. Jirajaroenrat. 2008. Myofibrillar Protein Profiles of Kampaengsaen Beef and Thai Native Beef During Aging Period. In The 13th Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. Hanoi: Vietnam.
- Satitmanwiwat, S., T. Thongaram, L. Eurwilaichitr and K. Jirajaroenrat. 2008. Genetic Diversity of Bacterial Population in Swamp Buffalo (*Bubalus bubalis*) Rumen. In The 13th Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. Hanoi: Vietnam.
- กัญญา จิระเจริญรัตน์ สุภาพนา เขมนิพิฐพนธ์ และ จุฑารัตน์ เศรษฐกุล. 2551. "การจำแนกสปีชีส์ของสัตว์ในส่วนผสมเนื้อสัตว์ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาพีซีอาร์เชิงซ้อน" วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 36(2):162-169.
- กัญญา จิระเจริญรัตน์. 2551. "การย้ายฝากยีนผ่านทางตัวอสุจิในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม" วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 26(1): 116-123. บทความ.

ฐาปนา เขมนิพิฐพนธ์ และ กัญญา จิระเจริญรัตน์. 2551. “การตรวจสอบการปนเปื้อนของดีเอ็นเอสุกรในผลิตภัณฑ์อาหารฮาลาลด้วยเทคนิคพีซีอาร์” หน้า 164-168. ใน การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 4. ขอนแก่น: คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ฐาปนา เขมนิพิฐพนธ์ จุฑารัตน์ เศรษฐกุล และ กัญญา จิระเจริญรัตน์. 2551. “การจำแนกสปีชีส์ของเนื้อสัตว์ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปโดยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ไพรม์เออร์เชิงซ้อน” ใน การประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 9. ชลบุรี: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา. CD-ROM.

2. รศ.ดร. กันยา ตันติวิสุทธิกุล

ความรับผิดชอบในโครงการ: ผู้ร่วมวิจัย

คุณสมบัติทางวิชาการ: รองศาสตราจารย์

หน่วยงานต้นสังกัด:

ภาควิชาครุศาสตร์เกษตร คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

โทรศัพท์ : 02-737-7000 ต่อ 3699

มือถือ: 081-433-4774

โทรสาร : 02-326-4324

อีเมล : ktkunya@kmitl.ac.th

ประวัติการศึกษา:

ปีการศึกษา 2520-2523 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ปีการศึกษา 2524-2527 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาการผลิตสัตว์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปีการศึกษา 2533-2538 Doctor of Agricultural Science (Animal Breeding)

Humboldt University Berlin ประเทศเยอรมนี

สาขาวิชาการที่ชำนาญ: Animal breeding

ผลงานวิจัย:

Tuntivisoottikul, K., J. BUNNAK and T. KUME. 2001. Minimum inhibitory concentration of irradiated silk protein powder for bacterial activity. Proceedings of the Takasaki Symposium on Radiation Application of Natural Polymers in Asia. October 1 and 2, 2001, Jaeri, Takasaki, Japan: 105-109.

Tuntivisoottikul, K., C. Chaosap and M. Chaisupakitsin. 2006. Molecular weight and amino acid composition of sericin protein in Thai silks. Laos Journal on Applied Science (Special issue). On printing process.

Chaisupakitsin, M., K. Tuntivisoottikul and P. Putawang. 2006. Swelling and mechanical property of poly(Vinyl alcohol) hydrogel blend with various protein sericins from Thai silk. . Laos Journal on Applied Science (Special issue). On printing process.

Jirajaroenrat, K., S. Satitmanwiwat, K. Tuntivisoottikul. 2008. Genetic Diversity of Central Thailand Beef Cattle Revealed by Mitochondrial DNA Data. In The 13th Animal Science congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. Hanoi: Vietnam.

Jirajaroenrat, K., P. Boonwong and K. Tuntivisoottikul. 2008. Genetics Diversity of Thai Indigenous Beef Cattle Lines Using Microsatellites. In The 13th Animal Science congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. Hanoi: Vietnam.

Tuntivisoottikul, K. and K. Jirajaroenrat. 2008. Genetic Characterization of Five Goat Breeds Using some Microsatellite DNA Markers. In The 13th Animal Science congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. Hanoi: Vietnam.

กัญญา ตันติวิสุทธิกุล และจันทร์พร เจ้าทรัพย์. การศึกษาคุณภาพเนื้อสุกรพื้นเมืองของไทย สุกรป่า และสุกรลูกผสมสายพันธุ์ยุโรป. ประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44. วันที่ 30 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์ 2549.

จันทร์พร เจ้าทรัพย์ และ กันยา ดันติวิสุทธิกุล. คุณภาพเนื้อของไก่กระທง ไก่พื้นเมือง ไก่
สีทอง และไก่ตะนาวศรี. ประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44. วันที่
30 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์ 2549.

จันทร์พร เจ้าทรัพย์ และ กันยา ดันติวิสุทธิกุล. คุณภาพซาก สี และส่วนประกอบทางเคมี
ของเนื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์พม่า ไก่กระທง และไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ไทย. ประชุม
วิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44. วันที่ 30 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์
2549.

จันทร์พร เจ้าทรัพย์ และ กันยา ดันติวิสุทธิกุล. การศึกษาคุณภาพเนื้อของไก่พื้นเมือง
สายพันธุ์พม่า ไก่กระທง และไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ไทย. ประชุมวิชาการ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 44. วันที่ 30 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์ 2549.