รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการวิจัย

เรื่อง

การพัฒนาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโคลานโดยวิธีการทางอนูพันธุศาสตร์เพื่อการอนุรักษ์โคลาน

ผู้วิจัย

ดำรงศักดิ์ อาลัย

จันทร์จิรา ภวภูตานนท์

ธีระพล ศิรินฤมิตร

มนัญญา ปริยวิชญภักดี

สุดธิดา เหล่าเปี่ยม

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัย

คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ การพัฒนาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโคลานโดยวิธีการทางอนูพันธุศาสตร์เพื่อการอนุรักษ์โคลาน

(ภาษาอังกฤษ) Development of DNA fingerprints of Whoa-Lan cattle by using microsatellite markers for native cattle conservation

ชื่อผู้วิจัย

1. ดำรงศักดิ์ อาลัย 2. มนัญญา ปริยวิชญภักดี 3. ธีระพล ศิรินฤมิตร 4. จันทร์จิรา ภวภูตานนท์ 5. สุดธิดา เหล่าเปี่ยม

ภาษาไทย โคลาน ถือเป็นหนึ่งในสัตว์วัฒนธรรมเฉพาะถิ่นของคนในภาคกลางของประเทศไทยที่กำลังประสบปัญหาการปนเปื้อนทางพันธุกรรมจากโคที่มาจากต่างประเทศ อันเนื่องจากค่านิยมเกษตรกรในการเลี้ยงโคที่ลักษณะตอบสนองความต้องการตลาด และขาดการวางแผนอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ที่เหมาะสม จึงมีผลทำให้พันธุกรรมของโคลานพันธุ์ดั้งเดิมลดจำนวนลง ปัจจุบันไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่นิยมเลือกใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมสัตว์พื้นเมือง ดังนั้นประสิทธิภาพของไมโครแซทเทลไลท์ไพร์เมอร์สำหรับโคลานจึงมีความสำคัญในการเลือกเครื่องหมายพันธุกรรมที่สามารถใช้ประโยชน์ได้คือทดสอบได้จากค่าความหลากหลาย (Polymorphic information content; PIC) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ใช้เครื่องหมายทั้งหมด 20 คู่ พบว่าไมโครแซทเทลไลท์ที่มีความหลากหลายสูง (PIC >0.6) มี 7 ตำแหน่งคือ ETH225, BM1237, BMC1222, ILSTS006, BMC8012, BM226, TGLA122 และเครื่องหมายที่มีความหลากหลายในระดับปานกลาง (PIC 0.30- 0.59) มี 9 ตำแหน่ง คือ TGLA126, CSSM66, TGLA53, BM848, BM6436, BM2113, BM1824, BM1818, INRA023 และเครื่องหมายที่ความหลากหลายในระดับต่ำ (PIC <0.30) มี 4 ตำแหน่งคือ BM6445, BM1260, BM2515 และ BM6117 โดยเมื่อนำทั้ง 20 คู่ มาวิเคราะห์หาค่า PIC ของโคลานรวม (เพชรบุรี ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์) พบว่ามีเท่ากับ 0.504 ซึ่งถือว่าในระดับปานกลาง และผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมจากค่า heterozygosity ในโคลานทั้ง 3 แหล่งพบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน คือ 0.484, 0.478 และ 0.488 ในโคลานจากเพชรบุรี ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์ตามลำดับ นอกจากนี้พบว่าค่าสัมประสิทธิ์เลือดชิดสูงสุดในโคลานจากราชบุรี (0.134) รองลงมาคือจากเพชรบุรี (0.126) และประจวบคีรีขันธ์ (0.067) ความหลากหลายทางพันธุกรรมและสัมประสิทธิ์เลือดชิดในภาพรวมในโคลานทั้ง 3 แหล่ง คือ 0.484 และ 0.129 ตามลำดับ และผลจากการวิเคราะห์ความเหมือนทางพันธุกรรม (genetic identity) และระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) พบว่าโคลานจากเพชรบุรี

และประจวบมีความเหมือนทางพันธุกรรมมากที่สุด (0.965) รองลงมาคือโคลานจากราชบุรี (0.930) จากแผนภูมิ Genetic distance: (UPGMA) โคลานจากเพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์มีระยะห่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด (1.79) เมื่อวิเคราะห์ลักษณะโครงสร้างประชากรเป็น K=2, K=3 และ K=4 ไม่สามารถแบ่งประชากรโคลานทั้ง 3 แหล่งออกจากกันได้ แสดงให้เห็นว่าประชากรโคลานทั้ง 3 แหล่งยังมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน

คำสำคัญ: โคลาน, ไมโครแซทเทลไลท์ไพร์เมอร์, ความหลากหลายของเครื่องหมายดีเอ็นเอ

Abstract

Whua-Lan cattle is one breed of the endemic animals of Central Thailand. These breed are suffering from genetic contamination with cattle from overseas. Because, the farmer's preference of the cattle that high economic trait and lack of proper animal breeding plan. Thus, the heredity of traditional herd decreases. Nowadays, Microsatellite DNA is a popular genetic marker for studying genetic diversity of native animals. Therefore, the efficiency of microsatellite markers for Whua-Lan cattle is essential for genetic study. Polymorphic information content (PIC) is data that test the polymorphism of the marker and show the power of the makers. In this study, a total of 20 markers were used. The result found 7 microsatellite markers with high levels of diversity (PIC> 0.6) (ETH225, BM1237, BMC1222, ILSTS006, BMC8012, BM226, TGLA122), 9 markers with moderate levels of diversity (PIC 0.30- 0.59) (TGLA126, CSSM66, TGLA53, BM848, BM6436, BM2113, BM1824, BM1818, INRA023) and 4 markers with low level of diversity (PIC <0.30) (BM6445, BM1260, BM2515 and BM6117). The average PIC value analysis of 20 microsatellite markers of total Who-Lan cattle (Phetchaburi, Ratchaburi and Prachuap Khirikhan) were 0.504, which is considered moderate levels. Therefore, the 20 microsatellite primers are sufficiently effective to be used for future studying of the genetic diversity of Whua-Lan cattle in the central region of Thailand. And the results of genetic diversity analysis of the value. Heterozygosity in all three sources was found to be 0.484, 0.478 and 0.488 in Whua-Lan cattle from Petchaburi,

Ratchaburi and Prachuap Kirikhan respectively. In addition, it was found that the highest blood cohort ratio in Whua-Lan cattle (0.134), followed by Phetchaburi (0.126) and Prachuap Khiri Khan (0.067). Genetic diversity and inbreeding coefficient in Whua-Lan cattle were 0.484 and 0.129 respectively. As a result of the genetic identity and genetic distance analysis, koala from Phetchaburi and Prachuap Kirikhan is genetically similar. From the Genetic Distance: (UPGMA) chart, Whua-Lan cattle from Petchaburi and Prachuap Khirikhan has the lowest genetic distance (1.79). When analyzing population structure, it is K = 2, K = 3 and K = 4 cannot divide the three colonies. It shows that the three populations of the Whua-Lan cattle have the same genetic characteristics.

Keywords: Who-Lan cattle, microsatellite marker, Polymorphic information content (PIC)

กิตติกรรมประกาศ

(Acknowledgement)

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) และสถาบันวิจัยและส่งเสริมศิลปวัฒนธรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรีที่ให้การสนับสนุนด้านเงินทุนสำหรับโครงการวิจัยในครั้งนี้ อาจารย์ในสาขาสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี และอาจารย์คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสนที่ได้ให้แนวคิดข้อคิดเห็นต่างๆของโครงการวิจัยครั้งนี้มาโดยตลอด คณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิที่พิจารณาให้ทุนทุกท่าน รวมถึงคณะทำงานประสานงานวิจัย นักวิชาการ เจ้าหน้าที่ พนักงานคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรีทุกๆท่าน ที่ได้อำนวยความสะดวกในด้านต่างๆ ระหว่างการทดลอง สุดท้าย

คณะผู้วิจัยมีความซาบซึ้งและยังคงระลึกถึงความร่วมมือจากการได้รับการสนับสนุนด้วยดีมาตลอดการทำโครงการวิจัยจากทุกๆท่าน ทางคณะผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง มา ณ โอกาสนี้

คณะผู้วิจัย

สิงหาคม 2560

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
สารบัญภาพภาคผนวก	ซ

บทที่ 1 บทนำ	1
ที่มาและความสำคัญของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการทำวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
คำนิยามเฉพาะที่ใช้ในการทดลอง	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
ความสำคัญสัตว์พื้นเมือง	4
ชนิดและลักษณะทั่วไปของสัตว์พื้นเมือง	4
โคพื้นเมืองภาคกลาง (โคลาน)	4
ประวัติความเป็นมาของโคลานจังหวัดเพชรบุรี	7
ข้อดีข้อเสียโคพื้นเมือง	11
แนวทางการพัฒนาสัตว์พื้นเมืองและการอนุรักษ์	12
การพัฒนาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสัตว์	14
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย	
วิธีการและขอบเขตของงานวิจัย	17
การเก็บตัวอย่างเลือดโค	24
เครื่องหมายดีเอ็นเอ	24
การทดสอบไพร์เมอร์ และตรวจสอบแถบไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอโคลาน	25
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	25
การวัดความเหมือนทางพันธุกรรม และระยะห่างทางพันธุกรรม	26
การศึกษาโครงสร้างประชากรและความหลากหลายทางพันธุกรรมโคลาน	26

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 4 ผลการวิจัย

ข้อมูลสัตว์ทดลอง 27
ผลการวิเคราะห์ข้อมูลจีโนไทป์โคลานด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ 34
ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม 36
ผลการวัดความเหมือนทางพันธุกรรม และระยะห่างทางพันธุกรรม 38
ลักษณะโครงสร้างประชากรโคลานในจังหวัดเพชรบุรี ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์ 40
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผล 41

บรรณานุกรม 48

ภาคผนวก 51

ประวัติผู้วิจัย 59

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

ตารางที่ 1 ลำดับเบส และอุณหภูมิ Annealing temperature (Tm) ของไมโครแซทเทลไลท์ ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ 25

ตารางที่ 2 ความถี่ของอัลลีลหลัก (MAF), จำนวนอัลลีลและความแตกต่างทางพันธุกรรม (PIC) ที่วิเคราะห์ด้วยไมโครแซทเทลไลค์จำนวน 20 เครื่องหมายโคลานจังหวัดเพชรบุรี ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์ 35

ตารางที่ 3 ค่า Observed Heterozygosity, ค่า Expected Heterozygosity และ ค่าสัมประสิทธิ์เลือดชิด (inbreeding coefficient) เมื่อวิเคราะห์ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ 20 เครื่องหมายในโคลาน จ. เพชรบุรี จ.ราชบุรี และ จ. ประจวบคีรีขันธ์ 38

ตารางที่ 4 แสดงค่า Nei's genetic identity และค่าความห่างของพันธุกรรมของโคลานจังหวัดเพชรบุรี (Pet) จังหวัดราชบุรี (Rat) และ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (Pra) 40

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

ภาพที่ 1 การละเล่นโคลาน 18

ภาพที่ 2 การเก็บตัวอย่างเลือดโคลานบางส่วนในพื้นที่ อ.เมือง จ.เพชรบุรี 29

ภาพที่ 3 การเก็บตัวอย่างเลือดโคลานบางส่วนในพื้นที่ อ. เขาย้อย และ อ. หนองหญ้าปล้อง จ.เพชรบุรี 30

ภาพที่ 4 การเก็บตัวอย่างเลือดโคลานบางส่วนในพื้นที่ อ.บ้านลาด จ.เพชรบุรี 31

ภาพที่ 5 การเก็บตัวอย่างเลือดโคลานบางส่วนในพื้นที่ อ.ท่ายาง จ.เพชรบุรี 32

ภาพที่ 6 การเก็บตัวอย่างเลือดโคลานบางส่วนในพื้นที่ อ.ปราณบุรี และ อ.กุยบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์ 33

ภาพที่ 7 การเก็บตัวอย่างเลือดโคลานบางส่วนในพื้นที่ อ.ปากท่อ และ อ.เมือง จ.ราชบุรี 34

ภาพที่ 8 แสดงค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (PIC) เมื่อวิเคราะห์ด้วยไมโครแซทเทลไลท์แต่ละเครื่องหมายจากตัวอย่างโคลาน จ.เพชรบุรี จ. ราชบุรี และ จ. ประจวบคีรีขันธ์ 37

ภาพที่ 9 แสดงค่า Observed Heterozygosity และ ค่าสัมประสิทธิ์เลือดชิดของโคลานใน จ.เพชรบุรี จ.ราชบุรี และ จ. ประจวบคีรีขันธ์ และผลรวมทั้ง 3 จังหวัด 39

ภาพที่ 10 แสดงแผนภูมิต้นไม้ Phylogenetic tree ของโคลานจาก จ.เพชรบุรี จ.ราชบุรี และ จ.ประจวบคีรีขันธ์ 40

ภาพที่ 11 การจำแนกกลุ่มตัวแปรของระยะห่างทางพันธุกรรมในรูปแบบ Cluster analysis ระหว่างโคลาน จ.เพชรบุรี (Petchaburi) จ.ราชบุรี (Ratchaburi) จ .ประจวบคีรีขันธ์ (Prachuabkirikan) 41

สารบัญภาพภาคผนวก

ภาพภาคผนวกที่	**หน้า**
ภาพภาคผนวกที่ 1 การเตรียมอุปกรณ์เจาะเลือด	52
ภาพภาคผนวกที่ 2 การเจาะเก็บตัวอย่างเลือดโค	52
ภาพภาคผนวกที่ 3 การสกัดดีเอ็นเอ	53
ภาพภาคผนวกที่ 4 การเตรียมดีเอ็นเอก่อนเริ่มปฏิกิริยา PCR	53
ภาพภาคผนวกที่ 5 การปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm/s นาน 5 นาที	54
ภาพภาคผนวกที่ 6 เครื่อง Thermal cycle	54
ภาพภาคผนวกที่ 7 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR	55
ภาพภาคผนวกที่ 8 เครื่องอิเล็คโตรโพรีซิส	55
ภาพภาคผนวกที่ 9 การวิเคราะห์ผล PCR ด้วย Agarose gel electrophoresis	56
ภาพภาคผนวกที่ 10 เครื่องกำเนิดไฟ 100W ใช้เพิ่มความต่างศักย์ให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ผ่านวุ้นเจล	56
ภาพภาคผนวกที่ 11 เครื่อง Capillary gel electrophoresis device	57
ภาพภาคผนวกที่ 12 การวิเคราะห์ PCR และตรวจชิ้น ดีเอ็นเอ	57

ภาพภาคผนวกที่ 13 การประมวลผลความแตกต่างของไมโครแซทเทลไลท์ของโคลานด้วย โปรแกรม Bio Calculator Analysis software 58

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา : โคพื้นเมืองถือเป็นส่วนหนึ่งของอารยะธรรมการทำเกษตรกรรมและทรัพยากรพันธุกรรมที่สำคัญของประเทศไทยที่ยังคงเหลืออยู่ในปัจจุบันนี้ โดยโคพื้นเมืองมีการเลี้ยงกันมานานตั้งแต่ในอดีตของไทย เป็นโคที่มีลักษณะเฉพาะคือ มีรูปร่างเล็ก แต่มีความสมบูรณ์พันธุ์สูง ความทนทานต่อสภาพภูมิอากาศร้อน โรคพยาธิ และแมลงรบกวนได้ดีกว่าโคเนื้อลูกผสมที่มีการนำมาเลี้ยงเพื่อผลิตเป็นโคขุนในปัจจุบัน นอกจากนี้โคพื้นเมืองของไทยยังมีความสามารถในการใช้อาหารหยาบคุณภาพต่ำได้ดี โดยเฉพาะวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว, หญ้า, ใบกระถิน และเศษพืชผลทางการเกษตรต่างๆ แต่เนื่องจากในปัจจุบันสถานการณ์การลดลงของจำนวนประชากรโคพื้นเมืองที่ลดลงอย่างมาก โดยจากข้อมูลของกรมปศุสัตว์ที่ได้รายงานจำนวนโคพื้นเมืองไว้ในปี พ.ศ. 2549 พบว่าโคพื้นเมืองไทยมีจำนวนเหลืออยู่ประมาณ 5,655,470 ตัว และมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยพบว่าในปี พ.ศ. 2553 มีจำนวนลดลงเหลืออยู่เพียง 4,610,395 ตัว ซึ่งถือเป็นสถานการณ์ที่น่าเป็นห่วงต่อทรัพยากรพันธุกรรมสัตว์พื้นเมืองของไทยที่เหลืออยู่ ซึ่งหากไม่มีการจัดการอนุรักษ์พันธุกรรมโคพื้นเมืองอย่างเหมาะสมแล้ว อาจทำให้พันธุกรรมของโคพื้นเมืองเกิดการปนเปื้อนกับโคเนื้อพันธุ์ต่างประเทศที่ปัจจุบันนิยมนำมาเลี้ยงกันมากขึ้นได้ และนอกจากนี้อาจนำไปสู่การสูญพันธุ์ของโคพื้นเมืองไทยในอนาคต

โคลาน เป็นหนึ่งในโคพื้นเมืองของไทยที่มีถิ่นที่อยู่อาศัยอยู่ในเขตพื้นที่ภาคกลาง โดยเฉพาะจังหวัดเพชรบุรี จังหวัดราชบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จังหวัดกาญจนบุรี และจังหวัดนครปฐม ซึ่งการทำนาของเกษตรกรในจังหวัดภูมิภาคนี้มีการสืบทอดมากันมาตั้งแต่สมัยโบราณ จนเกิดเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นที่เกิดขึ้นมาจากการสั่งสมประสบการณ์เป็นมรดกตกทอด โดยมีการใช้โคลานเป็นส่วนประกอบการทำเกษตรกรรม เช่นการใช้แรงงานสัตว์ในการทำงานต่างๆ นับตั้งแต่ไถ พรวน ฉุดระหัดน้ำ นวดข้าว สีข้าว ลากเข็น ตลอดไปจนถึงการขนส่งผลิตผลจากท้องถิ่นห่างไกล ไปสู่ถนนหลวงหรือตลาด และเมื่อสิ้นฤดูทำนาจะมีการใช้แรงโคมาช่วยนวดข้าวบนลานดินเหนียวที่มีลักษณะวงกลมที่อัดแน่นเป็นพื้นเรียบ ซึ่งการใช้โคลานเพื่อการนวดข้าวจะช่วยแยกเมล็ดข้าวออกจากรวงหลังจากเกี่ยวข้าว โดยชาวนาจะผูกโคเรียงเป็นแถวหน้ากระดานไว้กับเสากลางลานบ้าน โคที่อยู่ใกล้จุดศูนย์กลาง ไม่ต้องใช้กำลังและฝีเท้ามาก เพราะอยู่ในช่วงหมุนรอบสั้นวนเป็นรอบ ๆ ไปเรื่อย ๆ จนกว่าข้าวจะหลุดออกจากรวงข้าวหมด แต่โคตัวที่อยู่นอกสุดอยู่ห่างจากจุดศูนย์กลาง ระยะทางที่ต้องหมุนจะยาวกว่า จึงต้องเลือกโคตัวที่มีกำลังและฝีเท้าดีด้วยเหตุนี้ โคหมุนรอบ และเหยียบย่ำจนเมล็ดข้าวเปลือกหลุด

ออกจากรวงข้าว เมล็ดข้าวเปลือก โคหมุนรอบและเหยียบย่ำจนเมล็ดข้าวเปลือกหลุดออกจากรวงข้าว เมล็ดข้าวเปลือกจะหล่นบนพื้นลานที่ปราบไว้ดีแล้ว ดังนั้นด้วยภูมิปัญญาท้องถิ่นของการนวดข้าวด้วยโคนี้เอง จึงมีการพัฒนาเป็นเกิดการละเล่นพื้นบ้านโคลานขึ้น โดย “การละเล่นโคลาน” ถือเป็นเวทีแห่งศิลปะ ชั้นเชิงและประสบการณ์ของนักสู้เสาเกียดเมืองเพชร เป็นกีฬาที่นิยมเล่นเพื่อหารายได้ให้ทางวัด และในท้องนา โดยนิยมเล่นในช่วงเวลาประมาณ 22:00 - 8:00 น. โคทั้งหมดจะวิ่งเป็นวงกลมรอบๆ ลานซึ่งมีเสาอยู่ตรงกลาง จะมีสองกลุ่ม คือโคนอก 1 ตัว กับโคคาน ทั้งหมดมี 18 ตัว (ตัวที่ 18 เรียกว่า โครอง) นำโคคาน 18 ตัว มาผูก แล้วก็นำโคนอก (ตัวที่ 19) มาผูกวิ่งเป็นวงนอกสุด หลังจากนั้นก็ปล่อยให้มันวิ่ง โดยมีกติกาการแพ้ชนะคือ เช่น โคนอกหมดแรง หรือ โคคานเชือกหลุด หรือโครองโดนโคนอกแซงแล้วเบียดเข้ามาข้างในแทนตำแหน่งที่ 18 จึงถือว่าโคนอกชนะ แต่เนื่องสถานการณ์ของโคลานในปัจจุบันนั้นมีจำนวนไม่แตกต่างจากโคพื้นเมืองในภูมิภาคอื่นๆ ของประเทศไทยที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ ซึ่งจำนวนที่ลดลงของโคลาน ย่อมส่งผลต่อแหล่งพันธุกรรมที่ดีของโคลานในเรื่องของลักษณะที่ควรแก่การอนุรักษ์ และพัฒนาให้เกิดประโยชน์อย่างยั่งยืนได้ ดังนั้นจึงควรศึกษาพันธุกรรมของสายพันธุ์โคลาน เพื่อการอนุรักษ์สัตว์พื้นเมืองในถิ่นกำเนิด และเพื่อนำมาใช้ในการวางแผนปรับปรุงพันธุ์ฝูงโคลานในเขตพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี จังหวัดราชบุรี และจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ โดยการศึกษาครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาไพรเมอร์ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอสำหรับทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพ่อโคลาน แม่โคลาน และลูกโคลาน โดยแต่ละตัวซึ่งไม่เหมือนกันจากตัวอย่างจำนวนกลุ่มประชากรโคลานในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์ ที่มีการละเล่นโคลานอย่างหนาแน่น มาศึกษาและพัฒนาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) เพื่อนำมาใช้ในการระบุตัวโค ระบุพ่อแม่โคลาน (Individual characteristic) โดยผลทางตรงที่เกษตรกรจะได้รับคือเพื่อการนำพันธุกรรมของโคลานไปใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน เช่นการนำไปใช้สำหรับข้อมูลพื้นฐานของการวางแผนการอนุรักษ์ และการปรับปรุงพันธุ์ เช่นการทำพันธุ์ประวัติ และการวางแผนการผสมพันธุ์ให้กับโคลาน จนนำมาซึ่งการพัฒนารูปแบบการเลี้ยงโคลานในพื้นที่ภาคกลางอย่างยั่งยืน

วัตถุประสงค์ของการทำวิจัย

1. เพื่อพัฒนาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโคลานในเขตจังหวัดเพชรบุรี ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์ โดยใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ ในการระบุโคแบบรายตัว เพื่อใช้สำหรับวางแผนเพื่อการอนุรักษ์พันธุกรรมโคลานในท้องถิ่น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. อนุรักษ์พันธุกรรมโคลาน และศึกษาการใช้ประโยชน์จากพันธุกรรมโคลานให้เกิดผลอย่างยั่งยืนต่อเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์

2. สามารถนำข้อมูลพันธุกรรมโคลานมาช่วยในการตัดสินใจสำหรับการวางแผนผสมพันธุ์ให้กับโคลาน เพื่อหาแนวทางป้องกันการผสมเลือดชิดในสายพันธุ์โคลานต่อไป

นิยามศัพท์เฉพาะที่ใช้ในการทดลอง

1.ความหลากหลายทางพันธุกรรม, ไมโครแซทเทลไลท์, โคลานในจังหวัดเพชรบุรี ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์

คำจำกัดความ:

1) ความหลากหลายทางพันธุกรรม หมายถึง ความหลากหลายของหน่วยพันธุกรรมหรือยีน(genes) ที่มีอยู่ในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันอาจมียีนแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์
2) ไมโครแซทเทิลไลท์ หมายถึง เครื่องหมายทางพันธุกรรม
3) โคลาน หมายถึง โคพื้นเมืองของประเทศไทยที่ใช้ในการวิ่งแข่งขันกันใน จังหวัดเพชรบุรี ประจวบคีรีขันธ์ และราชบุรี

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความสำคัญสัตว์พื้นเมือง

กระแสการพัฒนาเพื่อนำไปสู่ความทันสมัยหลังสงครามโลก ครั้งที่ ๒ ทำให้ประเทศไทยให้ความสำคัญการพัฒนาการผลิตแบบอุตสาหกรรมเป็นหลัก นักเศรษฐศาสตร์รวมทั้งนักธุรกิจส่วนใหญ่มองว่าการทำการเกษตรแบบตั้งเดิมของเกษตรกรไทยเป็นการผลิตไม่มีคุณภาพ (low productivity) เพราะให้ผลผลิตต่ำ จึงได้ทำการพัฒนาโดยให้เกษตรกรใช้พันธุ์พืชและสัตว์ที่ให้ผลผลิตสูงจากต่างประเทศมาใช้ เนื่องจากพันธุ์ที่นำเข้าส่วนใหญ่มีความอ่อนแอต่อสภาพแวดล้อมในประเทศทำให้ต้องใช้ปุ๋ย อาหารสัตว์ สารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช ยาและสารเคมีในการป้องกันจำกัดโรคสัตว์ รวมทั้งปัจจัยการผลิตอื่นๆ ตามมา

ในระยะแรกปริมาณผลผลิตที่ผลิตได้โดยรวมยังมีน้อยและเป็นที่ต้องการของตลาดจึงขายได้กับราคาที่คุ้มกับค่าใช้จ่ายที่เพิ่มขึ้น เมื่อเกษตรกรผลิตกันจำนวนมากขึ้น ราคาผลผลิตก็ลดลงในขณะที่ปัจจัยการผลิตมีราคาสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องเกษตรกรส่วนใหญ่จึงเป็นหนี้สินล้นพ้นตัว ทั้งยังสร้างผลกระทบภายนอกต่อสังคม

และประเทศเช่น นอกจากการที่ต้องเสียเงินตราต่างประเทศซื้อปุ๋ย ยาฆ่าแมลง และ ยากำจัดวัชพืชมาสร้างมลภาวะต่อสภาพแวดล้อมแล้ว ยังทำลายสุขภาพทั้งของเกษตรกร และผู้บริโภคอีกด้วย ในการผลิตสัตว์พื้นเมืองก็ถูกมองว่าเพียงแค่ว่าเป็นพันธุ์ที่ให้ผลผลิตต่ำและไม่สนองกระแสการพัฒนาสู่ความทันสมัยดังกล่าว ทำให้การผลิตสัตว์ของเกษตรกรไทยที่เคยเป็นการเลี้ยงสัตว์พื้นเมืองแบบการยังชีพเพื่อการบริโภคในครอบครัวมาเป็นการนำพันธุ์สัตว์จากต่างประเทศมาเลี้ยงเป็นการค้าเพื่อสนองผู้บริโภคในเมือง ในขณะเดียวกันก็มีการนำเทคโนโลยีการเลี้ยงสัตว์ระบบธุรกิจอุตสาหกรรมจากประเทศพัฒนาแล้วที่ต้องนำเข้าพันธุ์สัตว์ที่ให้ผลผลิตสูงมาใช้ สัตว์พื้นเมืองหลายพันธุ์ที่ไม่ถูกใช้ประโยชน์ก็จะสูญพันธุ์ไป แม้ว่าการผลิตสัตว์ระบบการค้าและธุรกิจอุตสาหกรรมจะสามารถผลิตสัตว์ได้เพียงพอต่อการบริโภคของประชากรในประเทศ รวมทั้งยังส่งออกสร้างรายได้เข้าประเทศ แต่นอกจากการเกิดผลกระทบภายนอกดังกล่าวแล้ว การทำลายสิ่งแวดล้อมที่เห็นได้ชัดเจนได้แก่ ความต้องการธัญพืชเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์จำนวนมาก ได้จูงใจให้เกษตรกรบุกรุกพื้นที่ป่าเพื่อปลูกข้าวโพดและธัญพืชอื่นมาสนองการผลิตสัตว์ในประเทศ ที่ใดที่เริ่มมีพ่อค้าไปตั้งโกดังรับซื้อธัญพืชที่ใช้เป็นอาหารสัตว์อีกเพียง 2-3 ปี พื้นที่ป่าในแถบนั้นก็จะถูกบุกรุกทำลายอย่างมโหฬาร รวมพื้นที่ป่าในประเทศเพื่อนบ้านที่มีชายแดนติดกันด้วย ผลของการพัฒนาสู่ความทันสมัยดังกล่าวทำให้เกิดคำถามในระดับนานาชาติถึงการพัฒนาแบบยั่งยืน ความหลากหลายทางพันธุกรรมพืชและสัตว์ และการผลิตอาหารที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคในประเทศพัฒนาแล้วได้มีกี่ผลิตแบบเกษตรอินทรีย์และปศุสัตว์อินทรีย์กันมากขึ้น ซึ่งโดยหลักการส่วนใหญ่แล้วก็คือ การปลูกพืชและการเลี้ยงสัตว์ที่บรรพบุรุษของเราได้ทำกันมาแต่ตั้งเดิมนั่นเอง

ความสำคัญของการผลิตสัตว์พื้นเมืองในด้านของการมีคุณภาพการผลิตที่แท้จริง ว่าควรจำนำปัจจัยการผลิตทั้งหมดมาพิจารณา ไม่ใช่เฉพาะการให้ผลผลิตสูงเท่านั้น รวมทั้งการที่สามารถตอบโจทย์การพัฒนาแบบยั่งยืนและความปลอดภัยด้านอาหารต่อผู้บริโภค โดยได้กล่าวถึงชนิดและลักษณะทั่วไปของสัตว์พื้นเมือง ความสำคัญของสัตว์พื้นเมือง แนวทางการพัฒนาสัตว์พื้นเมือง และได้เสนอแนวทางการใช้ประโยชน์จากสัตว์พื้นเมืองในการใช้ปรับปรุงพันธุ์ในระบบการผลิตสัตว์แบบใช้ปัจจัยการผลิตต่ำ การปรับปรุงพันธุ์สัตว์เชิงอนุรักษ์ และการปรับปรุงพันธุ์สัตว์สำหรับเกษตรอินทรีย์ ทั้งนี้เพื่อให้ผู้กำหนดนโยบายด้านการผลิตสัตว์ให้ความสำคัญการผลิตสัตว์ในระบบอื่นที่มีความสำคัญต่อเกษตรกรรายย่อยและผู้เลี้ยงสัตว์ขนาดเล็กและขนาดกลาง (SME:Small and Medium Enterprise) ซึ่งมีจำนวนมากที่สุดบ้าง ไม่ใช่ให้ความสำคัญเฉพาะการผลิตเชิงธุรกิจอุตสาหกรรมของธุรกิจข้ามชาติและบริษัทขนาดใหญ่เพียงไม่กี่ราย รวมทั้งให้นักวิชาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ สามารถนำสัตว์พื้นเมืองไปใช้ในการผลิตและการพัฒนาสัตว์ได้

ชนิดและลักษณะทั่วไปของสัตว์พื้นเมือง

สัตว์พื้นเมือง (indigenous animal) โดยความหมายทั่วไป คือ สัตว์ที่มีอยู่เพียงในประเทศหนึ่งที่เลี้ยงอยู่ในถิ่นหรือประเทศนั้นมานานแล้ว ส่วนใหญ่จะเป็นสัตว์ที่ผ่านการคัดเลือกแบบธรรมชาติ (natural selection) ผสมผสานกับการคัดเลือกโดยมนุษย์ (artificial selection) ตามความต้องการของผู้เลี้ยงในท้องถิ่น ดังนั้นสัตว์พื้นเมืองจึงมีความแข็งแรงทนทาน เลี้ยงง่าย และให้ลูกดก เพื่อจะได้มีลูกจำนวนหนึ่งเหลือรอดจากความสูญเสียของการคัดเลือกโดยธรรมชาติ และสามารถสนองความต้องการต่างๆของผู้เลี้ยงในท้องถิ่นนั้นได้

คำว่า “สัตว์พันธุ์พื้นเมือง” มักมีความคลุมเครือความหมายที่ชัดเจนน่าจะเป็นนิยามของ Nozawa, Ken 1983 ได้แก่ “สัตว์เลี้ยงที่ไม่ได้รับผลกระทบทางพันธุกรรมที่เกิดจากการปรับปรุงสายพันธุ์ปศุสัตว์อันเกิดจากการผลิตพันธุ์ใหม่ที่ดำเนินไปในยุโรปและประเทศอื่นๆหรือได้รับผลกระทบน้อย” (ชมนาด, 2550) ทั้งนี้องค์การอาหารและเกษตร (Food and Agriculture Organization ย่อเป็น FAO)แห่งสหประชาชาติใช้คำว่า “สัตว์พันธุ์ท้องถิ่น (Local breed) หมายถึง “พันธุ์สัตว์ที่เลี้ยงมานานหรือพบได้ทั่วไปในท้องถิ่นหนึ่ง” สัตว์พื้นเมืองกำเนิดโดยเจ้าของฟาร์มขนาดเล็กและมีบทบาทสำคัญเป็นเวลานาน และผลผลิตของเขาเหล่านั้นยังเป็นสินค้าครัวเรือนที่คุ้นเคยกันมาอย่างยาวนาน นอกจากนี้ความเกี่ยวข้องกับสัตว์ในท้องถิ่น ดูเหมือนทางพันธุกรรมของสัตว์พื้นเมืองสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ในอนาคต แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อเร็วๆนี้ปศุสัตว์ในประเทศไทยถูกสลับจากระบบเลี้ยงแบบ การเลี้ยงในบริเวณหลังบ้านได้กลายมาเป็นการเลี้ยงแบบอุตสาหกรรมและการ นำเข้าสัตว์จากต่างประเทศเข้ามาเพื่อปรับปรุงการผลิตให้มีประสิทธิภาพและประสพความสำเร็จในด้านเศรษฐกิจและได้รับผลกำไรมากมาย จึงทำให้สัตว์ที่นำเข้าจากต่างประเทศเหล่านั้นเข้ามาทำหน้าที่ผสมข้ามสายพันธ์แทนสัตว์พื้นเมือง กลยุทธ์การผสมพันธุ์แบบนี้เป็นการจัดการเฉพาะกลุ่ม ซึ่งเป็นความแตกต่างของยีนซึ่งอาจจะเกิดการคุกคามและสูญเสียลักษณะทางพันธุกรรมและความหลากหลายของสายพันธุ์สัตว์พื้นเมือง โคพื้นเมืองของไทย มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Bos Taurus L.*มีลักษณะใกล้เคียงกับโคพื้นเมืองของประเทศเพื่อนบ้านในแถบเอเชียลักษณะรูปร่างกะทัดรัดลำตัวเล็ก ขาเรียวเล็ก ยาว เพศผู้มีหนอกขนาดเล็กมีเหนียงคอ แต่ไม่หย่อนยานมาก หูเล็ก หนังใต้ท้องเรียบ มีสีไม่แน่นอน เช่นสีแดงอ่อน เหลืองอ่อน ดำ ขาวนวล น้ำตาลอ่อน และอาจมีสีประรวมอยู่ด้วย (สำนักพัฒนาพันธุ์สัตว์, 2546)

โคพื้นเมืองภาคกลาง (โคลาน)

โคพื้นเมืองถือเป็นส่วนหนึ่งของอารยะธรรมการทำเกษตรกรรม และทรัพยากรพันธุกรรมที่สำคัญของประเทศไทยที่ยังคงเหลืออยู่ในปัจจุบันนี้ โดยโคพื้นเมืองมีการเลี้ยงกันมานานตั้งแต่ในอดีตของไทย เป็นโคที่มีลักษณะเฉพาะคือ มีรูปร่างเล็ก แต่มีความสมบูรณ์พันธุ์สูง ความทนทานต่อสภาพภูมิอากาศร้อน โรคพยาธิและแมลงรบกวนได้ดีกว่าโคเนื้อลูกผสมที่มีการนำมาเลี้ยงเพื่อผลิตเป็นโคขุนในปัจจุบัน นอกจากนี้โคพื้นเมืองของไทยยังมีความสามารถในการใช้อาหารหยาบคุณภาพต่ำได้ดี โดยเฉพาะวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว, หญ้า, ใบกระถิน และเศษพืชผลทางการเกษตรต่างๆ แต่เนื่องจากในปัจจุบันสถานการณ์การลดลงของจำนวนประชากรโคพื้นเมืองที่ลดลงอย่างมาก โดยจากข้อมูลของกรมปศุสัตว์ที่ได้รายงานจำนวนโคพื้นเมืองไว้ในปี พ.ศ. 2549 พบว่าโคพื้นเมืองไทยมีจำนวนเหลืออยู่ประมาณ 5,655,470 ตัว และมีแนวโน้มลดลงอย่างต่อเนื่อง โดยพบว่าในปี พ.ศ. 2553 มีจำนวนลดลงเหลืออยู่เพียง 4,610,395 ตัว ซึ่งถือเป็นสถานการณ์ที่น่าเป็นห่วงต่อทรัพยากรพันธุกรรมสัตว์พื้นเมืองของไทยที่เหลืออยู่ ซึ่งหากไม่มีการจัดการอนุรักษ์พันธุกรรมโคพื้นเมืองอย่างเหมาะสมแล้ว อาจทำให้พันธุกรรมของโคพื้นเมืองเกิดการปนเปื้อนกับโคเนื้อพันธุ์ต่างประเทศที่ปัจจุบันนิยมนำมาเลี้ยงกันมากขึ้นได้ และนอกจากนี้อาจนำไปสู่การสูญพันธุ์ของโคพื้นเมืองไทยในอนาคต ในส่วนระบบการเลี้ยงส่วนใหญ่เป็นแบบลงทุนน้อยของเกษตรรายย่อยเพื่อขายให้พ่อค้าท้องถิ่นซึ่งไปรับซื้อถึงคอกเลี้ยง (สมปอง และไพโรจน์, 2553) ได้แก่ การเลี้ยงจำแนกได้เป็นกลุ่มที่เลี้ยงในที่ราบและกลุ่มที่เลี้ยงบนที่สูง โดยกลุ่มโคพื้นเมืองที่เลี้ยงบนพื้นที่สูงเป็นโคมีร่างเล็ก คล่องตัว หากินเก่ง และปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี การเริ่มต้นเลี้ยงโคพื้นเมือง มี 3 ลักษณะคือ (1) เลี้ยงต่อจากบรรพบุรุษหรือรับมรดก (2) จากการรับเลี้ยงผ่า คือได้รับค่าจ้างเลี้ยงเป็นลูกโคจากผู้ที่ตนเองรับจ้างเลี้ยง และ (3) ซื้อมาเลี้ยงโดยทุนตนเองหรือกู้ยืมมา จำนวนรายที่เลี้ยงโคน้อยที่สุดคือ 2 ตัว มากที่สุด มากกว่า 100 ตัว บางรายเริ่มต้นเลี้ยง 1 ถึง 3 แม่ แม่โคมีสัดส่วนประมาณ 40% ของโคในฝูง เลี้ยงโดยใช้แรงงานในครอบครัวเฉลี่ย 1 คน/ครอบครัวเกือบทั้งหมดปล่อยให้ฝูงเดินทะเล็มหญ้าตามพื้นที่สาธารณะ ที่นาที่ไม่มีการเพาะปลูกสวนผลไม้ริมถนน ทุ่งหญ้าสาธารณะในเขตป่าและภูเขา อาหารหยาบในฤดูแล้งได้แก่ ตอซังข้าว ตอหญ้า เศษใบไม้สีเขียว กาบต้นไผ่ เศษผัก และผลไม้สุกที่ร่วงลงดิน การเลี้ยงในภาคอื่นก็มีลักษณะใกล้เคียงกัน (ยอดชาย, 2556)

โคลาน เป็นโคพื้นเมืองของไทยที่มีถิ่นที่อยู่อาศัยอยู่ในเขตพื้นที่ภาคกลาง โดยเฉพาะจังหวัดเพชรบุรี จังหวัดราชบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งการทำนาของเกษตรกรในจังหวัดเพชรบุรี จังหวัดราชบุรี และจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ที่สืบทอดมากันมาตั้งแต่สมัยโบราณ จนเกิดเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นที่เกิดขึ้นมาจากการสั่งสมประสบการณ์เป็นมรดกตกทอด โดยมีการใช้โคลานเป็นส่วนประกอบการทำเกษตรกรรม เช่นการใช้แรงงานสัตว์ในการทำงานต่างๆ นับตั้งแต่ไถ พรวน ฉุดระหัดน้ำ นวดข้าว สีข้าว ลากเข็น ตลอดไปจนถึงการขนส่งผลิตผลจากท้องถิ่นห่างไกล ไปสู่ถนนหลวงหรือตลาด และเมื่อสิ้นฤดูทำนาจะมีการใช้แรงโคมาช่วยนวดข้าวบนลานดินเหนียวที่มีลักษณะวงกลมที่อัดแน่นเป็นพื้นเรียบ ซึ่งการใช้โคลานเพื่อการนวดข้าวจะช่วยแยกเมล็ดข้าวออกจากรวงหลังจากเกี่ยวข้าว โดยชาวนาจะผูกโคเรียงเป็นแถวหน้ากระดานไว้กับเสากลางลานบ้าน โคที่อยู่ใกล้จุดศูนย์กลาง ไม่ต้องใช้กำลังและฝีเท้ามาก เพราะอยู่ในช่วงหมุนรอบสั้นวนเป็นรอบ ๆ ไปเรื่อย ๆ จนกว่า

ข้าวจะหลุดออกจากรวงข้าวหมด แต่โคตัวที่อยู่นอกสุดอยู่ห่างจากจุดศูนย์กลาง ระยะทางที่ต้องหมุนจะยาวกว่า จึงต้องเลือกโคตัวที่มีกำลังและฝีเท้าดีด้วยเหตุนี้ โคหมุนรอบ และเหยียบย่ำจนเมล็ดข้าวเปลือกหลุดออกจากรวงข้าว เมล็ดข้าวเปลือก โคหมุนรอบและเหยียบย่ำจนเมล็ดข้าวเปลือกหลุดออกจากรวงข้าว เมล็ดข้าวเปลือกจะหล่นบนพื้นลานที่ปราบไว้ดีแล้ว ดังนั้นด้วยภูมิปัญญาท้องถิ่นของการนวดข้าวด้วยโคนี้เอง จึงมีการพัฒนาเป็นเกิดการละเล่นพื้นบ้านโคลานขึ้น โดย “การละเล่นโคลาน” ถือเป็นเวทีแห่งศิลปะ ชั้นเชิงและประสบการณ์ของนักสู้เสาเกียดเมืองเพชร เป็นกีฬาที่นิยมเล่นเพื่อหารายได้ให้ทางวัด และในท้องนา

ประวัติความเป็นมาของโคลานจังหวัดเพชรบุรี

ต้นกำเนิดโคลานซึ่งเป็นการละเล่นพื้นบ้านที่เป็นอัฐลักษณ์ของจังหวัดเพชรบุรีเกิดมาจากการประยุกต์การใช้โคนวดข้าวในสมัยก่อนโดยข้าวนาจะนำมาฟ้อนข้าวมาวางเป็นวงกลมโดยวางเวียนต่อๆ กันให้เต็มลานที่ทำไว้ แล้วผูกโคไว้กับเสาที่ปักกลางลาน โดยผูกเรียงกันเป็นพวงยาวเต็มบริเวณพื้นลาน และให้โคนวด (ย่ำ) ฟ่อนข้าวที่วางไว้ในลาน ซึ่งจะอาศัยแสงสว่างจากดวงจันทร์ แสงจากตะเกียงเจ้าพายุ หรือคบเพลิงจากกระบอกไม้ไผ่ โดยชาวนาเมืองเพชรจะรวมกลุ่มกันระดมโคคนละตัวสองตัวในหมู่บ้านเพื่อมายช่วยกันนวดข้าวหมุนเวียนกันไป เรียกว่า การติดแรงหรือลงแขก ซึ่งเป็นวิถีชีวิตท้องถิ่นที่ก่อให้เกิดสัมพันธภาพที่ดีมีบรรยากาศและกิจกรรมเต็มไปด้วยความสนุกสนาน การพบปะ สังสรรค์หรือการเกี้ยวพาราสีของหนุ่มสาวร่วมกับการร้องเพลงพื้นบ้านกันบางครั้งมีการจัดกิจกรรมประลองกันว่าโคใครจะวิ่งได้เร็วกว่ากันอดทนกว่า โดยโคที่มีความแข็งแรงและ อดทน และมีพละกำลังดีจะเดินนวดข้าวรอบนอก และมีโคที่มี พละกำลังน้อยจะเดินวงใน (ใกล้เสาเกียด) ซึ่งการนวดข้าวจะดำเนินการไปจนเสร็จหรือรุ่งสางของอีกวันหนึ่ง ต่อมามีการริเริ่มที่ฝีเท้าดี มีความอดทนสูงมาแข่งขันกันในรูปแบบกีฬาพื้นถิ่นโดยในช่วงแรกมีการแข่งขันเพียงในระดับหมู่บ้านและตำบลก่อนจะขยายสู่จังหวัดและภูมิภาค อย่างไรก็ตามการติดแรงหรือลงแขกจะเว้นไว้เฉพาะวันพระ เนื่องจากไม่มีผู้มาร่วมลงแขกนวดข้าว จนกลายเป็นธรรมเนียมปฏิบัติที่มียกเว้นการละเล่นโคลานในวันพระการระดมโคมาช่วยลงแขกนี้ เป็นที่มาของ”โคระดอก” ซึ่งเป็นอีกชื่อของการละเล่นโคลานที่ปัจจุบันไม่ค่อยจะได้ยินกันแล้ว การเล่นโคละดอกในสมัยก่อนนั้นจะเล่นกันนอกฤดูทำนา หน้าแล้ง (ฤดูร้อน) หรือหลังฤดูเก็บเกี่ยวเนื่องจากระบบชลประทานยังไม่มีการพัฒนาเท่าที่ควร ต้องอาศัยน้ำฝนอย่างเดียวชาวนาจึงสามารถทำนาได้เพียงปีละครั้งเท่านั้น (นาปี)

อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีผู้ใดทราบว่าการละเล่นโคลานเริ่มต้นครั้งแรกเมื่อใด แต่มีการบันทึกเป็นลายลักษณ์อักษร คือ การละเล่น “โคเทียมเกรียน” บริเวณหน้าเขาวังในสมัยรัชกาลที่4ช่วงก่อนสงครามโลกครั้งที่2 และในสมัยรัชกาลที่เมื่อคราวเสด็จประพาสเมืองเพชรเมื่อ ร.ศ. 109ซึ่งหลักฐานทางประวัติศาสตร์ที่มีการ

บันทึกไว้เป็นลายลักษณ์อักษรดังกล่าวยังไม่สามารถยืนยันได้ว่ามีการละเล่นโคลานหรือไหมแต่จากการบอกเล่าสืบต่อกันกล่าวว่าการละเล่นโคลานเริ่มจากชาวบ้านเชื้อสายมุสลิมที่"แขกตานี "ซึ่งมีบรรพบุรุษมาจากหัวหน้ามลายูแถบเมืองปัตตานี สตูล ไทรบุรี ในช่วงที่หัวหน้าเมืองในภาคใต้เกิดกบฏแข็งเมื่อในสมัยรัฐกาลที่1 จึงทรงโปรดเกล้า ให้เทครัวมาอาศัยที่เพชรบุรีส่วนหนึ่ง โดยส่วนใหญ่มักตั้งถิ่นฐานในเขตพื้นที่อำเภอบ้านแหลม อำเภอเมือง บ้านท่าแร้ง โดยเฉพาะแถบบ้านท่าแร้งที่มีการทำนากันมากจนถึงปัจจุบันจึงน่าจะเป็นกลุ่มแรกที่ริเริ่มการละเล่นโคลาน สอดคล้องกับหลักฐานที่บันทึกเป็นลายลักษณ์อักษรในช่วงเดือนเมษายน พ.ศ 2475-2484 เพชรบุรีได้จัดส่งโคลาน ไปแสดงการเล่นโคเทียมเกวียนและโคระดอก (โคลาน) ในเทศกาลตรุษสงกรานต์ ณ ท้องสนามหลวง(ทุ่งพระเมรุ) โดยมีนายเทพ โช๊ะเหม มุสลิมบ้านท้าแร้งเป็นนายพวงหรือหัวหน้าจากตำบลต่างๆไปแสดงการละเล่นพื้นบ้านจึงน่าจะมีความเป็นไปได้สูงที่ตำบลท่าแร้งอำเภอบ้านแหลมจะเป็นต้นกำเนิดของการละเล่นโคลาน ซึ่งสอดคล้องกับการรวบรวมข้อมูลภูมิปัญญาจากคำบอกเล่าของประเชิญ เทพคีรี และการทบทวนเอกสารต่างๆ ที่มีผู้รวบรวมเกี่ยวกับความเป็นมาของวิธีคนเมืองเพชรกับโคพื้นเมือง (โคลาน) ร่วมกับการสนทนากลุ้มผู้รู้ นายพวงผู้เลี้ยง หมอตอนโคพื้นบ้าน และปราชญ์ท้องถิ่นที่เกี่ยวข้องกับการละเล่นโคลานจากทุกอำเภอในจังหวัดเพชรบุรี พบว่าการละเล่นโคลานครั้งแรกเกิดขึ้นที่ตำบลท่าแร้ง อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี โดยช่วงแรกการละเล่นโคลานมีเล่นเป็นแบบพื้นบ้านตามความสมัครใจ ยังไม่มีกฎกติกา ใช้แสงสว่างจากตะเกียงเจ้าพายุหรือคบเพลิงกระบอกไม้ไผ่ มีพวงโค (ทีมแข่งขัน) น้อย ต่อมาได้พัฒนาให้มีโฆษกหรือกรรมการสนามและกำหนดให้ให้มีโคมาวิ่งแข่งในสนาม 19 ตัว ใน1 พวง(ทีมที่นำโคเข้าแข่งขันกับโคนอก) ประกออบด้วยโคคาน 18 ตัว(โคตัวที่ 1-18 ที่นับจากโคนเสาเกรียดออกมาริมคานตามลำดับโดยโคตัวที่ 18 จะเรียกว่า "โครอง"ซึ่งจะคัดโคที่ฝีเท้าดีเพื่อมาแข่งขันกับโคนอก)และนอก 1 ตัว(โคตัวที่19 ซึ่งเป็นโคที่คัดเลือกฝีเท้ามาดีที่สุด เพื่อนำมาแข็งขันกับโคคาน) ต่อมามีการพัฒนากฎกติกาการเล่น อาทิ มีการนับรอบวิ่งของโค และมีการแจกรางวัลเสมือนของที่ระลึกเช่น ผ้าขาวม้า ในการจัดการแข่งขันในช่วงแรกจะมีการจัดอาหารมาเลี้ยงคนมาร่วมงานด้วย (งานในมัสยิด) ซึ่งในสมัยก่อนสถานที่ให้แข่งขันมักจะเป็นทุ่งนาเมืองเพชร โดยโคจะถูกต้อนเป็นขบวนจากหมู่บ้านไปอีกหมู่บ้านหนึ่งเพื่อนำโคฝีเท้าดี พละกำลังดี แข็งแรง และอดทนมาประชันการแข่งขันกันทั้งคืน จนสว่างเพราะในช่วงเวลาดังกล่าวไม่กระทบต่อการทำงานในช่วงปกติ ตลอดจนอากาศเย็นสบายทำให้โคไม่เครียด ต่อมาการละเล่นโคลานก็ได้รับความนิยมแพร่หลายมากจากระดับหมู่บ้านมาเป็นระดับตำบล และอำเภอ ซึ่งในระยะแรกมีพวงโคที่เป็นจุดเริ่มต้นหลัก 4 ดังนี้

พวงที่ 1 นายสมาน หะยีแถว ชาวอำเภอบ้านแหลม เป็นหัวหน้าพวงบ้านแหลม

พวงที่ 2 หะยีแจ้ง หะยีฉาบ ชาวอำเภอบ้านแหลม หัวพวงท่าแร้งกลาง

พวงที่ 3 ปู่เลียบ ปู่ฟุ่ง และผู้ใหญ่สวน ชาวอำเภอเมือง หัวหน้าพวงบางจาน

พวงที่ 4 ปู่ช้าง บุญโพธิ์ ตำบลบางแก้ว และบังเด๊ะ คลองมอญ หัวหน้าพวงบ้านแหลม

คนเมืองเพชรนิยมการเล่นโคลานทำให้ต่อมามีพวงโคเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง อาทิ พวงศิษย์ถ้ำแก้วของนายสามัคคี พวงแก้ว พวงปากตรอก พวงศิทย์หมอซอน พวงบ่อพราหมณ์ เป็นต้น ยิ่งมีพวงมากขึ้นก็ มีการจัดลานแข่งขันมากขึ้นเสมือนการนำโคฝีเท้าดี กำลังดี และโคสวยตามตำรามาประชันแข่งขันกัน ทำให้โคที่ชนะการแข่งขันนำชื่อเสียงมาให้เจ้าของจนเป็นตำนาน เล่าขานสืบต่อกันมา เช่น โคชื่อ “ดอกชะโอน” ของลุงชะโอน ปากตรอก “อาร์เอ็กซ์”ของผู้ใหญ่เนิ้น“เมฆขาว” ของเปี๊ยก แม่กิมไล้ “กลองยาวและนกนางนวล” ของวัดถ้ำแก้ว “โพธิ์อรุณ” ของกำนันอรุณ ไสกระดาน “ลูกแฟบ” ของเจ๊ฟ้า หัวนา เป็นต้น จนมีการนำมาประพันธ์เป็นบทเพลงท้องถิ่นได้แก่เพลงดอกชะโอนเพลงโคดีคนดัง ของเพชรบุรี เป็นต้น นอกจากนี้โคที่ชนะการแข่งขันมักมีผู้สนใจซื้อในราคาที่สูง ส่งผลด้านบวกต่อราคาโคที่ชนะต่อมาต้องจัดการแข่งขันโคลานยิ่งได้รับความนิยมแพร่หลายมากจนขยายการแข่งขันจากระดับหมู่ ตำบล อำเภอ ไปทั่วจังหวัด และภูมิภาค ด้วยความนิยม และความสนุกสนานนี้ โคถูกจัดอยู่ในฐานะที่เป็นมหรสพเฉลิมฉลองงานเทศกาลต่างๆเช่นงานวัดประจำปี ปิดทองฝังลูกนิมิต งานกฐิน งานลอยกระทง งานบวช งานขึ้นบ้านใหม่ หรืองานเลี้ยงอื่นๆปัจจุบันการละเล่นโคลานมักมีการพนันแข่งขันต่อเข้ามาเกี่ยวข้อง ซึ่งบางครั้งก่อให้เกิดปัญหาทางสังคมที่ต้องใช้ขบวนการมีส่วนร่วมของทุกฝ่ายที่เกี่ยวข้องมีการแก้ไขปัญหาอย่างไรก็ตามในมุมมองด้านวัฒนธรรม การละเล่นโคลานยังคงเป็นวิถีชีวิตท้องถิ่นที่มีความเป็นอัฐลักษณ์ ควรค่าแก่การรักษาให้คงความงดงามตามวิถีไทยทั้งยังเป็นแนวทางในการมีส่วนร่วมของคนพื้นถิ่นในการอนุรักษ์พันธุกรรมโคพื้นเมืองไทยให้เกิดความยั่งยืนสืบต่อไป (จักรพันธุ์, 2540)

โคลานนิสัยเปรียวตื่นตกใจง่าย ลำตัวยาวบาง มีสีแดง สีน้ำตาลอ่อน น้ำตาลแก่ ดำและด่างไม่มีเหนียงสะดือ มีเหนียงคอบาง น้ำหนักแรกเกิด 14 กก.น้ำหนักหย่านมเมื่ออายุ 200 วัน เฉลี่ย 78 กก. น้ำหนักโตเต็มที่เพศผู้ 280-300 กก. เพศเมีย 200-260 กก. อายุเมื่อให้ลูกตัวแรก 3 ปี ระยะการอุ้มท้อง 270-275 วันการกระจายของประชากรนิยมเลี้ยงกันมากในภาคกลางโดยเฉพาะจังหวัดเพชรบุรี ราชบุรี กาญจนบุรี ประจวบคีรีขันธ์ นครปฐม และสุพรรณบรีจากการที่เกษตรกรในจังหวัดดังกล่าวส่วนใหญ่ประกอบอาชีพทำนาเพื่อเพราะปลูกเสร็จแล้ว พอถึงฤดูเก็บเกี่ยวข้าวการเกษตรจะนำข้าวที่เก็บเกี่ยวแล้วมาวางเรียงวนในลักษณะวงกลมมีเสาไม้เป็นจุดศูนย์กลางสำหรับผูกโคราว (คาน) โดยใช้วิธีขอแรงงานจากโคของเพื่อนบ้านมาช่วยซึ่งจะผูกโคเรียงเป็นแถวรายตัวให้พอเพียงกับข้าวที่ตั้งกองรายล้อมไว้จากนั้นไล่โควิ่งวนเวียนรอบๆ เสาไม้ที่ปักไว้จนกว่าเมล็ดข้าวจะร่วงหล่นจากรวงเกษตรกรจะช่วยกันเก็บฟางออกจนหมดให้เหลือเฉพาะเมล็ดข้าวเปลือกหลังจากเสร็จสิ้นการเก็บข้าวแล้ว เกษตรกรจะมีเวลาว่างในช่วงเดือนมีนาคม-พฤษภาคมจึงได้มีผู้คิดนำวิธีการนี้มาใช้และเพิ่มจำนวนโคที่วิ่งได้มากขึ้น นิยมจัดการแข่งขันในบริเวณวัดต่อมาเริ่มจัดการแข่งขันนอกวัด จากเริ่มแรกเพื่อความสนุกสนานและต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการแข่งขันเรื่อยๆ จนถึงปี พ.ศ. 2500 จึงได้ริเริ่มเดิมพันการแข่งขันวิ่งโคลานกันขึ้น

ภาพที่ **1**

การละเล่นโคลาน

ที่มา: ฐานข้อมูลองค์ความรู้แม่น้ำเพชรบุรี (2556)

ข้อดีข้อเสียโคพื้นเมือง

ข้อดีของโคพื้นเมือง

1. เลี้ยงง่าย หากินเก่ง ไม่เลือกอาหารเพราะผ่านการคัดเลือกแบบธรรมชาติในการเลี้ยงแบบไล่ต้อนโดยเกษตรกรและสามารถปรับตัวให้เข้ากับการเลี้ยงโดยใช้ทรัพยากรที่มีอยู่ในพื้นที่มีอย่างจำกัดได้เป็นอย่างดี
2. ให้ลูกดก ส่วนใหญ่ให้ปีละตัวเพราะเกษตรกรคัดแม่โคที่ไม่ให้ลูกออกอยู่เสมอทนทานต่อโรคและแมลงและสภาพอากาศในบ้านเราได้ดี
3. ใช้แรงงานได้ดี
4. แม่โคพื้นเมืองเหมาะที่จะนำมาผสมพันธุ์กับพ่อพันธุ์หรือผสมเทียมกับพันธุ์อื่นเช่น บราห์มันโคพันธุ์ตาก โคกำแพงแสนหรือโคกบินทร์บุรี
5. มีเนื้อแน่น เหมาะกับการประกอบอาหารไทย
6. สามารถใช้งานได้

ข้อเสียของโคพื้นเมือง

1. เป็นโคขนาดเล็กเพราะถูกคัดเลือกมาในสภาพการเลี้ยงที่มีอาหารจำกัด

2. ไม่เหมาะที่จะนำมาเลี้ยงขุนเพราะมีขนาดเล็กไม่สามารถทำน้ำหนักซากได้ตามที่ตลาดโคขุนต้องการคือที่น้ำหนักมีชีวิต 450 กก.และเนื้อไม่มีไขมันแทรก
3. เนื่องจากแม่โคมีขนาดเล็กจึงไม่เหมาะสมที่จะผสมกับโคพันธุ์ที่มีขนาดใหญ่ เพราะอาจมีปัญหาการคลอดยาก

โคลานเป็นโคพื้นเมืองในเขตภาคกลางที่มีเลี้ยงอย่างหนาแน่นอยู่ในพื้นที่ 3 จังหวัดคือ เพชรบุรี ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์ เป็นที่มีรูปร่างเล็ก และมีความทนทานต่อสภาพภูมิอากาศร้อนชื้นแบบประเทศไทย มีความทนทานต่อโรค และแมลง นอกจากนี้ยังมีความสมบูรณ์พันธุ์สูง ให้ลูกดก และสามารถเปลี่ยนอาหารหยาบคุณภาพต่ำที่มีอยู่ในท้องถิ่นมาเป็นเนื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ ลักษณะทั่วไปของโคลานจะมีขนสั้นเกรียน มีสีแตกต่างกันออกไป เช่นสีขาว ดำ ด่าง หรือน้ำตาล เป็นต้น ปัจจุบันโคลานพันธุ์แท้มีแนวโน้มลดลง เนื่องจากสถานการณ์การเลี้ยงโคลานมีแนวโน้มของลดลง อันเนื่องมาจากเกษตรกรส่วนใหญ่นิยมนำแม่โคลานไปผสมข้ามกับโคพันธุ์ต่างประเทศ ทั้งนี้เพื่อต้องการผลตอบแทนทางเศรษฐกิจเช่นปริมาณเนื้อแดงที่มากกว่าจากโคลูกผสมซึ่งมากกว่าโคพื้นเมืองพันธุ์แท้ ดังนั้นมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรีซึ่งเป็นหน่วยงานวิจัยในท้องถิ่น จึงได้จัดทำโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมโคลาน เพื่อต้องการอนุรักษ์พันธุกรรม และศึกษาการใช้ประโยชน์จากพันธุกรรมโคลานให้เกิดผลอย่างยั่งยืนต่อเกษตรกรรายย่อย และประชาชนในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์ ดังนั้นจึงควรศึกษาพันธุกรรมของสายพันธุ์โคลาน เพื่อการอนุรักษ์สัตว์พื้นเมืองในถิ่นกำเนิด และเพื่อนำมาใช้ในการวางแผนปรับปรุงพันธุ์ฝูงโคลานในเขตพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี จังหวัดราชบุรี และจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เพื่อลดปัญหาของการผสมเลือดชิด (Inbreeding) ผลทางตรงคือการพัฒนาพันธุ์ การอนุรักษ์ และการใช้ประโยชน์ต่างๆ จากโคลาน ซึ่งเป็นโคพื้นเมืองไทยอย่างยั่งยืน และเป็นทรัพยากรทางพันธุกรรมของโคไทยที่จะเป็นมรดกตกทอดไปยังรุ่นลูกหลานต่อไปในอนาคต เช่นการนำไปใช้สำหรับข้อมูลพื้นฐานของการวางแผนการอนุรักษ์ และการปรับปรุงพันธุ์ เช่นการทำพันธุ์ประวัติ และการวางแผนการผสมพันธุ์ให้กับโคลาน จนนำมาซึ่งการพัฒนารูปแบบการเลี้ยงโคลานในพื้นที่ภาคกลางอย่างยั่งยืน

แนวทางการพัฒนาสัตว์พื้นเมืองและการอนุรักษ์

การพัฒนาให้มีสัตว์พื้นเมืองมากขึ้นทำให้มีความหลากหลายทางชีวภาพมากขึ้นและเป็นการพัฒนาแบบยั่งยืน ปัญหาในการพัฒนาสัตว์พื้นเมืองในอดีตเกิดจาก การบิดเบือนทางนโยบายที่เน้นการพัฒนาด้านอุตสาหกรรม การขาดองค์ความรู้เกี่ยวกับสัตว์พื้นเมืองที่ชัดเจน และขาดการเข้าถึงเกษตรกรโดยการใช้ประโยชน์จากสัตว์พื้นเมืองทำได้ 3 แนวทาง ได้แก่ การเพิ่มผลผลิตจากพันธุ์สัตว์พื้นเมืองที่มีอยู่ การใช้สัตว์พื้นเมืองเป็นฐานสนับสนุนการผลิตเชิงการค้า และการอนุรักษ์เพื่อเป็นเอกลักษณ์ทางวัฒนธรรมและสนองการผลิตสัตว์ที่อาจเปลี่ยนแปลงไปในอนาคต การดำเนินการพัฒนาควรเป็นการพัฒนาแบบครบวงจรทั้งระบบ โดยให้ผู้เกี่ยวข้องทุกระดับมีส่วนร่วม รวมทั้งสนับสนุนให้สตรีและเด็กได้เข้ามามีบทบาทด้วยความสำคัญของ

การพัฒนาสัตว์พื้นเมืองการมีสัตว์พื้นเมืองมากขึ้นมีความสำคัญต่อความหลากหลายทางชีวภาพและการพัฒนาแบบยั่งยืนดังนี้

1.การเพิ่มความหลากหลายทางชีวภาพ

ความหลากหลายทางชีวภาพ (biodiversity) หมายถึง “ความแตกต่างหรือความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตในสภาพแวดล้อมหนึ่ง” ซึ่งเป็นสิ่งที่เกี่ยวข้องกับสิ่งมีชีวิตทุกชนิดในโลก เป็นตาข่ายนิรภัย (safety net) สำหรับคนยากจน เป็นแหล่งรายได้เสริมของชาวชนบท และทำให้ระบบนิเวศเกษตรเกิดความยั่งยืน เช่น การอนุรักษ์ป่าไม้ทำให้คนจนและผู้ที่ไร้ที่ทำกินมีแหล่งอาหารสำหรับใช้บริโภคหรือเก็บไปขาย การมีไก่และหมูพื้นเมืองทำให้ชาวบ้านเลี้ยงไว้เป็นอาหารโปรตีนบริโภคภายในครอบครัวและในท้องถิ่น โดยให้เศษอาหารจากครัวเรือนหรือผลพลอยได้จากการเกษตรเป็นอาหาร การเลี้ยงโค กระบือ แพะ แกะ แบบไล่ต้อนไปแทะเล็มหญ้าตามท้องไร่ ท้องนา หรือ ทุ่งหญ้า นอกจากจะช่วยให้สังคมมีเนื้อสัตว์บริโภคในราคาที่ถูกแล้วยังช่วยกำจัดวัชพืชในพื้นที่ ทำให้ลดความรุนแรงเมื่อเกิดไฟไหม้ และช่วยปรับสภาพภูมิทัศน์ของพื้นที่นั้นอีกด้วย การเพิ่มขึ้นของความหลากหลายทางชีวภาพจึงมีผลดีต่อคนยากจนโดยตรง

ความหลากหลายทางชีวภาพการเกษตร (agro biodiversity) จำแนกได้ 3 ระดับ คือ

1.1) ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) ได้แก่ความหลากหลายของพันธุ์ (variety) และการเปลี่ยนแปลง (variability) ของสัตว์ พืช และจุลินทรีย์ ที่ถูกใช้หรือเกี่ยวข้องกับการผลิตอาหารและการเกษตร เช่น ประเทศไทยเคยมีสุกรหลายพันธุ์ แต่ละพันธุ์มีข้อดีข้อเสียต่างกัน แต่การผลิตสุกรปัจจุบันส่วนใหญ่เป็นระบบเชิงการค้าแบบอุตสาหกรรมที่ใช้สุกรพันธุ์จากต่างประเทศไม่กี่สายพันธุ์ สุกรพื้นเมืองหลายพันธุ์ที่ไม่ได้ถูกใช้ประโยชน์ก็สูญพันธุ์ไป ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรไทยมีน้อยลง การมีสัตว์พื้นเมืองจึงเป็นการสร้างความหลากหลายทางพันธุกรรม ทำให้องค์การ FAO กำหนดให้สัตว์พื้นเมืองเป็นทรัพยากรพันธุกรรมสัตว์ของโลกอย่างหนึ่ง

สิ่งที่บ่งชี้ถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมสัตว์แสดงได้หลายระดับ ตั้งแต่จากลักษณะปรากฏ (phenotype) ไปจนถึงข้อมูลในระดับโมเลกุล ความก้าวหน้าทางเทคโนโลยีในปัจจุบันสามารถใช้จำแนกความแปรผันของพันธุ์ได้โดยใช้เครื่องหมาย (marker) ในระดับรูปร่างไปจนถึงระดับดีเอ็นเอ เช่น ลักษณะรูปร่าง (morphology ซึ่งเป็นการจำแนกตามลักษณะภายนอก) ลักษณะพอลิเมอร์ของโปรตีน (protein polymorphism) เครื่องหมายพันธุกรรมภูมิคุ้มกัน (immunology genetic marker) และเครื่องหมายระดับโมเลกุล (molecular marker)

1.2) ความหลากหลายของชนิด (species diversity) ได้แก่ความหลากหลายของชนิดของสิ่งมีชีวิตที่สนับสนุนการผลิต เช่น ชีวชาติในดิน (soil biota เช่น ไส้เดือน จุลินทรีย์) พาหะถ่ายเรณู (pollinator เช่น ผึ้ง แมลงภู่) และผู้ล่าเหยื่อ (predator เช่น เสือ สิงโต) กับความหลากหลายของชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ไม่สนับสนุนการผลิตแต่เป็นส่วนร่วมของสภาพภูมิประเทศ เช่น แพะภูเขา

1.3) ความหลากหลายของระบบนิเวศ (ecosystem ecology) ได้แก่ ความหลากหลายของระบบนิเวศเกษตร (agro-ecosystem) และบทบาทของมันที่มีต่อภูมิประเทศ โดยในแต่ละระบบนิเวศมีปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพที่เหมาะสมเป็นถิ่นที่อยู่ และบทบาทของมันที่มีต่อภูมิประเทศ โดยในแต่ละระบบนิเวศมีปัจจัยทางกายภาพและชีวภาพที่เหมาะสมเป็นถิ่นที่อยู่ (habitat) ของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ ความหลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดและจำนวนสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศนั้น

2.เป็นการพัฒนาแบบยั้งยืน (sustainable development)

การพัฒนาแบบโลกาภิวัตน์ (globalization) เพื่อสนองระบบการค้าโลกจึงมีการมุ่งใช้ประโยชน์จากพื้นที่ดิน เฉพาะพื้นที่ที่มีผลตอบแทนทางเศรษฐกิจที่คุ้มค่าที่ผลตอบแทนส่วนหนึ่งได้มาจากเงินอุดหนุนทั้งทางตรงและทางอ้อมจากรัฐด้วย โดยไม่คำนึงถึงประโยชน์ทางนิเวศ เช่น การสร้างถนน ไฟฟ้า และเครือข่ายโทรคมนาคมไปสู่นิคมอุตสาหกรรมทั้งของภาครัฐและเอกชน ทำให้พื้นที่ที่ให้ผลตอบแทนไม่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจถูกปล่อยให้รกร้างว่างเปล่า หากระบบการค้าโลกยังเป็นเช่นนี้สภาพแวดล้อมโลกคงต้องถูกทำลายต่อไป จึงได้มีการสนใจ “การพัฒนาที่ยั่งยืน” และ “การพึ่งพาตนเอง” มากขึ้น โดยในการประชุม United Nations Conference on Environment and Development (UNCED) ที่กรุง ริโอ เดอ จาเนโร ในปี พ.ศ. 2523 ได้มีการสร้างกรอบและประกาศเกี่ยวกับ “การพัฒนาแบบยั่งยืน” โดยมีแนวคิดว่าการพัฒนาที่ยั่งยืนจะต้องเป็นการพัฒนาทั้ง 3 มิติ ได้แก่ การพัฒนาเศรษฐกิจ สังคม และรักษาสภาพแวดล้อม ในด้านเกษตร องค์การ FAO ได้กำหนดหลักการหรือแนวคิด (concept) ของการเกษตรยั่งยืน (sustainable agriculture) ว่าเป็น “การจัดการทรัพยากรเพื่อการผลิตทางการเกษตรที่ประสบความสำเร็จ เพื่อสนองความจำเป็นอันเปลี่ยนแปลงของมนุษย์ โดยสามารถดำรงหรือบำรุงคุณภาพสิ่งแวดล้อมและอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติ (ยอดชาย, 2556)

การพัฒนาลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสัตว์

เทคนิคทางด้านอนูพันธุศาสตร์ได้มีการนำมาใช้ในการศึกษาทางความหลากหลายทางพันธุกรรมทั้งจุลินทรีย์ พืช และสัตว์ ซึ่งสามารถนำมาใช้บอกลักษณะทางจีโนไทป์ของสัตว์ได้ เช่น heterozygosity

ระยะห่างของพันธุกรรม (genetic distance) อีกทั้งยังใช้ศึกษาเกี่ยวกับวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต (evolution) (Savolainen *et al.,* 2002; Georgiadis *et al.,*1994) ในอดีตการศึกษาเกี่ยวกับพันธุกรรมของสัตว์ มักใช้ลักษณะปรากฏ หรือการใช้คาริโอด์ (Karyotype) แต่พบว่ามีความยุ่งยากและต้องใช้เวลานานในการพัฒนา จนปัจจุบันนี้สามารถใช้เทคโนโลยี ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) เข้ามาใช้ในการจำแนกตัวบุคคล โดยอาศัยข้อมูลทางพันธุกรรมนำมาใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์บุคคล (Individual identification) ทั้งนี้เนื่องจากจีโนมของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดจะมีลำดับดีเอ็นเอช่วงซ้ำ (repetitive sequence) อยู่จำนวนมาก ซึ่งมีความผันแปรที่มีความแตกต่างในแต่ละบุคคล (polymorphism) ซึ่งรวมถึงพันธุกรรมของสัตว์ ซึ่งโดยธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตทุกชนิด จะมีลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ไม่เหมือนสัตว์ตัวใด และไม่มีสัตว์ตัวใดเหมือน เพราะรหัสพันธุกรรมของสัตว์แต่ละตัวจะได้รับจากพ่อและแม่มาอย่างละครึ่ง จึงกลายเป็นดีเอ็นเอที่มีความจำเพาะที่เรียกว่า "Tandem repeats" ที่มีจำนวนซ้ำแตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิต หรือสัตว์แต่ละตัว ทั้งขนาดและจำนวนซ้ำ ซึ่งลักษณะเฉพาะตัวส่วนนี้เอง จึงทำให้การนำตำแหน่งซ้ำเหล่านี้มาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์เฉพาะสายพันธุ์ในสิ่งมีชีวิตเดียวกัน

การนำเทคโนโลยี ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) มีการนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตปศุสัตว์อย่างกว้างขวาง โดยถูกนำมาใช้ในกรณีของการยืนยัน หรือเพื่อระบุตัวสัตว์ เช่นการพิสูจน์สายเลือดลูกโคนมว่าเกิดจากพ่อโคหรือแม่โคตัวที่ให้ผลผลิตน้ำนมสูงหรือไม่ โดยลายพิมพ์ดีเอ็นเอสามารถนำมาใช้สำหรับการปรับปรุงพันธุ์ให้ฝูงสัตว์ให้มีประสิทธิภาพได้ดียิ่งขึ้น เช่นศึกษาความผันแปรของพันธุกรรมของสัตว์ หรือเพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของประชากรพ่อแม่พันธุ์ การวางแผนจัดการพ่อแม่พันธุ์ หรือใช้ตรวจสอบพันธุ์ประวัติ การสร้างแผนที่โครโมโซมของสัตว์เพื่อการปรับปรุงพันธุ์แบบ Marker-Assisted selection (ศรีจรรยา, 2546) ทั้งนี้ในต่างประเทศมีการศึกษาจีโนมกันอย่างกว้างขวาง ทำให้ทราบข้อมูลว่าสายดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำๆกันเป็นช่วงๆ เรียกบริเวณนี้ว่า แซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ (Satellite-DNA) ซึ่งบริเวณดังกล่าวนี้ไม่มีหน้าที่ใช้เป็นรหัสของการสังเคราะห์โปรตีน ดังนั้นเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสในบางตัว สิ่งมีชีวิตนั้นๆจึงยังคงดำรงชีวิตได้ตามปกติ โดยส่วนของบริเวณที่มีความแปรปรวนของลำดับเบสสูงมาก (Hypervariable region) ซึ่งเป็นบริเวณที่บ่งบอกถึงความแตกต่างในสัตว์แต่ละตัวเมื่อมีการนำบริเวณนี้มาใช้เปรียบเทียบกัน จนสามารถพัฒนาเทคโนโลยี ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) มาใช้ในการออกใบรับรองพันธุ์ และสายเลือดลูกสัตว์ (โกวิทย์ และคณะ, 2543) ตลอดจนยืนยันเซลล์ชีวภัณฑ์ที่ได้มาจากพ่อแม่พันธุ์ชั้นเยี่ยมจริง

ปัจจุบันเทคนิคทางด้านอณูพันธุศาสตร์ (molecular genetic) ถูกนำมาประยุกต์ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ทั้งพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ เทคนิคที่นิยมใช้กันคือ เครื่องหมายโมเลกุล

ไมโครแซทเทิลไลท์ เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับดีเอ็นเอ ซึ่งสามารถแยกความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับสูงมากๆ เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทิลไทล์ คือส่วนหนึ่งของดีเอ็นเอ ที่มีการเรียงตัวของลำดับเบสซ้ำกันเป็นชุดสั้นๆ (Short Tandem Repeat) พบกระจายอยู่ทั่วทั้งจีโนม (Genome) ของสิ่งมีชีวิต โดยเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่ได้รับการยอมรับว่ามีประสิทธิภาพสูงในการนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในสัตว์ทุกชนิดเนื่องจากเป็นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำเรียงตัวกันประมาณ 1-6 นิวคลีโอไทด์ เรียกว่าไมโครแซทเทลไลท์ของดีเอ็นเอ (Microsatellite DNA) โดยมีลักษณะซ้ำติดต่อกันไปเรื่อยๆเป็นช่วงยาว โดยการซ้ำของเบสจะสามารถพบกระจายอยู่ในบริเวณต่างๆของจีโนม ซึ่งเบสที่มีการซ้ำกันมีลักษณะ Di-nucleotide, tri-nucleotide หรือ Tetra-nucleotide จึงทำให้เกิดความผันแปรสูง จนเกิดความแตกต่างที่มีลักษณะจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตตัวนั้นๆ และมีการถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกอย่างสอดคล้องกับกฎเมนเดล ลายพิมพ์ดีเอ็นเอนี้มีโอกาสเหมือนกันได้เฉพาะกรณีของฝาแฝด (Identical twin) แท้เท่านั้น นอกจากนี้ไมโครแซทเทลไลท์มีการแสดงผลแบบลักษณะข่มร่วม (Co-dominant) จึงสามารถแปรผลเป็นลักษณะยีโนไทป์คล้ายข้อมูลของไอโซไซม์ทำให้ข้อมูลที่ได้มีความเหมาะสมสำหรับการนำมาวิเคราะห์ประชากรหรือชนิดพันธุ์สัตว์ที่มีความใกล้ชิดกัน (โกวิทย์ และคณะ, 2543, O’ Reilly and Wright, 1995) ไมโครแซทเทลไลท์เป็นที่ยอมรับอย่างกว้างขวาง และประสบความสำเร็จในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในสัตว์หลายๆชนิด อาทิเช่น โค (Ibeagha-Awemu *et al.,* 2004; MacHugh *et al.,*1994) เสือโคร่ง (Xu *et al.,* 2005) และสุกร (Thuy *et al.,* 2006) ดังรายงานของ MacHugh *et al.,* (1994) ใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทิลไลท์ จำนวน 12 ตำแหน่ง สามารถแยกความแตกต่างของโคที่มีแหล่งกำเนิดที่แอฟริกา และยุโรปออกจากกันได้ ในขณะที่ Hansen et al.(2002) ใช้เครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซลเทิลไลท์ จำนวน15 ตำแหน่ง ศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของโคในประเทศแคนนาดาจำนวน 4 สายพันธุ์ (Caniadienne Brown Swiss, Holstein และ Jersey) พบว่าโคพันธุ์ Brown Swiss มีความใกล้ชิดกับโคพันธุ์ Holstein ส่วนโคพันธุ์ Caniadienneและ Jerseyมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ห่างกันมากที่สุด เช่นเดียวกันกับ Machado *et al.* (2003) ได้ใช้ไมโครแซทเทลไลท์ จำนวน 9 ตำแหน่ง เพื่อการจำแนกโคจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ Gyr, Nellore, Guzerat และ Holstein เครื่องหมายโมเลกุลดังกล่าวสามารถแยกโค Holstein (*Bos Taurus*) ออกจากโคพันธุ์ Gyr, Nellore, Guzerat (*Bos indicus*) ได้ ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาไพรเมอร์สำหรับไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอสำหรับทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพ่อโคลาน แม่โคลาน และลูกโคลาน จากตัวอย่างจำนวนกลุ่มประชากรโคลานในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์ ที่มีการละเล่นโคลานอย่างหนาแน่น มาศึกษาและพัฒนาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) เพื่อนำมาใช้ในการระบุตัวโคลานสายพันธุ์แท้ (Individual

characteristic) โดยผลทางตรงที่เกษตรกรจะได้รับคือการออกใบรับรองสายเลือดลูกโคลานว่ามาจากพ่อและแม่โคลานแชมป์จริง และเป็นสายพันธุ์แท้ให้แก่เกษตรกรผู้เป็นเจ้าของโค โดยเกษตรกรผู้เลี้ยงสามารถนำไปใช้เพื่อประกอบการซื้อขาย และสร้างความมั่นใจให้แก่เกษตรกรผู้ซื้อโคไปเลี้ยงต่อ และผลทางอ้อมคือการพัฒนาพันธุ์ การอนุรักษ์ และการใช้ประโยชน์ต่างๆ จากโคลาน ซึ่งเป็นโคพื้นเมืองไทยอย่างยั่งยืน และเป็นทรัพยากรทางพันธุกรรมของโคไทยที่จะเป็นมรดกตกทอดไปยังรุ่นลูกหลานต่อไปในอนาคต

บทที่ 3

วิธีการและขอบเขตงานวิจัย

3.1). การเก็บตัวอย่างเลือดโค

ตัวอย่างที่ได้จากเลือดโคลานในจังหวัดราชบุรี จังหวัดเพชรบุรี และจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ รวมโคลานทั้งหมด 76 ตัว ตัวละ 5 มิลลิลิตร นำมาสกัดดีเอ็นเอตามวิธี standard phenol-chloroform (Sambrook and Russell, 2001) และตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จะนำมาวัดความเข้มข้น และตรวจสอบความบริสุทธิ์ โดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 nm ปรับความเข้มข้นเป็น 50 ng/µl ด้วย TE buffer เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C เตรียมพร้อมสำหรับวิเคราะห์กับเครื่องหมายดีเอ็นเอต่อไป

3.2) เครื่องหมายดีเอ็นเอ

การคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทิลไลท์จำนวน 20 เครื่องหมาย ตำแหน่ง และลำดับเบสของไพร์เมอร์ โดยเลือกไพรเมอร์ให้มีการกระจายตัวในจีโนม ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลำดับเบส และอุณหภูมิ Annealing temperature (Tm) ของไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้ในการศึกษา

No	Marker	Chr.	Primer sequence (5'->3')	Tm (^{o}C)	Size (bp.)	Primer Reference
1	BM1824	1	F: GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC R: CATTCTCCAACTGCTTCCTTG	58	180-204	Barendse et al. (1994) Bishop et al. (1994)
2	BM2113	2	F: GCTGCCTTCTACCAAATACCC R: CTTCCTGAGAGAAGCAACACC	58	140-158	Peters-van der Sunden et al. (1993)

3	INRA023	3	F:GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC R: TAACTACAGGGTGTTAGATGAACTC	58	202-230	Vaiman et al. (1994)
4	BM1260	4	F: AAGTACATGCATGCTGCTGC R: TCCTAAGTTCCATCAACAGGTG	58	128-146	Bishop et al. (1994)
5	ILSTS006	7	F: TGTCTGTATTTCTGCTGTGG R: ACACGGAAGCGATCTAAACG	58	274-308	Brezinsky et al. (1993)
6	BM6117	7	F:GTTCTGAGGTTTGTAAAGCCC R: GGTGAGCTACAATCCATAGGG	58	124-146	Bishop et al. (1994)
7	ETH225	9	F:GATCACCTTGCCACTATTTCCT R: ACATGACAGCCAGCTGCTACT	58	153-187	Steffen et al. (1993)
8	BM1237	10	F: TCATCTTGGGCATAAGACAGG R: ATTGTTCCCAGCATCTTAGAGG	58	195-223	Bishop et al. (1994)
9	BM6445	11	F: GTGTCTGTCAAAAGATGAATGG R: GACAACTGCTTCTCGTTGGG	58	143-153	Bishop et al. (1994)
10	BMC1222	13	F: CCAATTTTGCAGATAAGAAAACA R: CCTGAGTGTTCCTCCTGAGT	58	276-324	Bishop et al. (1994)

ตารางที่ 1 ลำดับเบส และอุณหภูมิ Annealing temperature ไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้ในการศึกษา (ต่อ)

No	Marker	Chr.	Primer sequence (5’->3’)	Tm (^{o}C)	Size (bp.)	Primer Reference
11	CSSM66	14	F: AATTTAATGCACTGAGGAGCTTGG R: ACACAAATCCTTTCTGCCAGCTGA	58	192-232	Barendse et al. (1994)
12	BM848	15	F: TGGTTGGAAGGAAAACTTGG R: CCTCTGCTCCTCAAGACAC	58	219-245	Bishop et al. (1994)
13	TGLA153	16	F: GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA R: ATCTTCACATGATATTACAGCAGA	58	158-184	Georges & Massey (1992)
14	TGLA126	20	F: CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT R: TTGGTCCTCTATTCTCTGAATATTCC	58	117-151	Georges & Massey (1992)
15	TGLA122	21	F: AATCACATGGCAAATAAGTACATAC R: CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC	58	140-176	Georges & Massey (1992)
16	BM1818	23	F: AGCTGGGAATATAACCAAAGG R: AGTGCTTTCAAGGTCCATGC	58	245-295	Bishop et al. (1994)
17	BM226	24	F: ATTGCCTTGTCCGTGTATCC R: CCGGCTGAATTGCTATAAGC	58	142-182	Bishop et al. (1994)
18	BMC8012	25	F: AATTCCATGCACAGAGGACC R: GATTCCAGAAAGTTCCCCCA	58	205-229	Bishop et al. (1994)
19	BM2515	28	F: GATTCCCTGACTCTCTGTCCC R: AGTATTGGCAAGTCAATGGAGG	58	144-158	Bishop et al. (1994)
20	BM6436	29	F: AAAGACTGCTTGCCTGAAGC R: CAACCAGTGATGCTGTACTCTG	58	198-226	Bishop et al. (1994)

3.3) การทดสอบไพร์เมอร์ และตรวจสอบแถบดีเอ็นเอของไมโครแซทเลไลท์ดีเอ็นเอโคลาน

เครื่องหมายดีเอ็นเอไมโครแซทเทลไลท์จำนวน 20 มาทดสอบเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของโคลานจำนวน 76 ตัว ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิ และเวลาอัตโนมัติดังนี้ ขั้นตอนที่ 1) 94°C เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอนที่ 2) 94°C เป็นเวลา 30 วินาที, อุณหภูมิ annealing temperature 58°C เป็นเวลา 30 วินาที, 72°C เป็นเวลา 45 วินาที โดยขั้นตอนที่ 2) จะเกิดการทำงานแบบ cycle จำนวน 35 รอบ ขั้นตอนที่ 3) 72°C เป็นเวลา 5 นาที จำนวน 1 รอบ ภายหลังจากเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ต้องการโดยเทคนิคพีซีอาร์แล้ว นำแยกความแตกต่างของชิ้นดีเอ็นเอโดยใช้เครื่อง Capillary gel electrophoresis device และวิเคราะห์ข้อมูลผ่านโปรแกรม Bio Calculator Analysis software

3.4) การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการวิเคราะห์ข้อมูลผลจีโนไทป์ของโคลานมาประเมินความหลากหลายความถี่ของอัลลีลหลัก จำนวนอัลลีล และเพื่อประเมินคุณสมบัติของเครื่องหมายดีเอ็นเอได้ทำการวิเคราะห์หาค่า polymorphic information content (PIC) จากข้อมูลจีโนไทป์ที่ได้จากแต่ละเครื่องหมายดีเอ็นเอในโคลานทั้ง 3 แหล่ง นำมาคำนวณโดยใช้สูตรดังนี้

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^{n} p_i^2 - 2\left[\sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^{n} p_i^2 p_j^2\right]$$

กำหนดให้ *pi, pj* เป็นความถี่ของอัลลีล i และ j ตามลำดับ และ n คือจำนวนอัลลีล (Botstein, *et al.,* 1980) มาประเมินความหลากหลาย รูปแบบและความถี่ของอัลลีล จำนวนอัลลีล private allele ค่า polymorphic information content (PIC), heterozygosity, inbreeding coefficient โดยใช้โปรแกรม PowerMarkerV3.25

3.5) วัดความเหมือนทางพันธุกรรม (Genetic Identity) และระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance)

นำข้อมูลจีโนไทป์ที่ได้จากเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 20 ตำแหน่งนำมาวิเคราะห์ความเหมือนทางพันธุกรรม (Genetic Identity) และระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance) ด้วยโปรแกรม Popgen 32

3.6) ศึกษาโครงสร้างประชากรและความหลากหลายทางพันธุกรรมโคลาน

นำข้อมูลจีโนไทป์ที่ได้จากเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 20 ตำแหน่งนำมาวิเคราะห์ population structure และความหลากหลายทางพันธุกรรมในโคลานแต่ละแหล่งโดยใช้โปรแกรม Structure

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ข้อมูลสัตว์ทดลอง

ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคลานในครั้งนี้ ได้ทำการเก็บตัวอย่างเลือดโคลานในพื้นที่จังหวัดเพชรบุรี จังหวัดราชบุรี และจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ โดยนำเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์มาใช้ศึกษาพันธุกรรมของโคลาน ภายใต้โครงการ “การพัฒนาลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโคลานโดยวิธีการทางอณูพันธุศาสตร์เพื่อการอนุรักษ์โคลาน” โดยได้รับการสนับสนุนจากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา สยามบรมราชกุมารี (อพ.สธ.) โดยใช้โคลานในการศึกษาทั้งสิ้น 76 ตัว โดยแบ่งเป็นกลุ่มได้ดังนี้

1. โคลานจังหวัดเพชรบุรี เก็บตัวอย่างจากอำเภอเมืองเพชรบุรี อำเภอบ้านลาด อำเภอเขาย้อย รวม 40 ตัว (ภาพที่ 1, 2, 3 และ 4)

2. โคลานจังหวัดราชบุรี เก็บตัวอย่างจากอำเภอเมืองราชบุรี อำเภอปากท่อ 16 ตัว (ภาพที่ 5)

3. โคลานจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เก็บตัวอย่างจากอำเภอกุยบุรี อำเภอปราณบุรี 20 ตัว (ภาพที่ 6)

ภาพที่ 2 การเก็บตัวอย่างเลือดโคลานบางส่วนในพื้นที่ อ.เมือง จ.เพชรบุรี

ภาพที่ 3 การเก็บตัวอย่างเลือดโคลานบางส่วนในพื้นที่ อ.เขาย้อย และ อ.หนองหญ้าปล้อง จ.เพชรบุรี

ภาพที่ 4 การเก็บตัวอย่างเลือดโคลานบางส่วนในพื้นที่ อ.บ้านลาด จ.เพชรบุรี

ภาพที่ 5 การเก็บตัวอย่างเลือดโคลานบางส่วนในพื้นที่ อ.ท่ายาง จ.เพชรบุรี

ภาพที่ 6 การเก็บตัวอย่างเลือดโคลานบางส่วนในพื้นที่ อ.ปราณบุรี และ อ.กุยบุรี จ.ประจวบคีรีขันธ์

ภาพที่ 7 การเก็บตัวอย่างเลือดโคลานบางส่วนในพื้นที่ อ.ปากท่อ และ อ.เมือง จ.ราชบุรี

4.2 การวิเคราะห์ข้อมูลจีโนไทป์โคลานด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลจีโนไทป์โคลานด้วยเครื่องหมายโมเลกุลไมโครแซทเทลไลท์ จากตัวอย่างเลือดของโคลานในจังหวัดเพชรบุรี 40 ตัว จังหวัดราชบุรี 16 ตัว และจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ 20 ตัว รวมทั้งสิ้น 76 ตัว โดยใช้คู่ไพร์เมอร์ทั้งหมด 20 คู่ (Mzteescu *et al.,* 2005) แสดงผลการวิเคราะห์เครื่องหมายโมเลกุลของไมโครแซทเทลไลท์ของโคลานดังกล่าวประกอบด้วย อัลลีลหลัก (Major allele) จำนวนอัลลีล ค่า PIC (Polymorphic information content) แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความถี่ของอัลลีลหลัก (MAF), จำนวนอัลลีลและความแตกต่างทางพันธุกรรม (PIC) ที่วิเคราะห์ด้วยไมโครแซทเทลไลท์จำนวน20 เครื่องหมายโคลานจังหวัดเพชรบุรี ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์

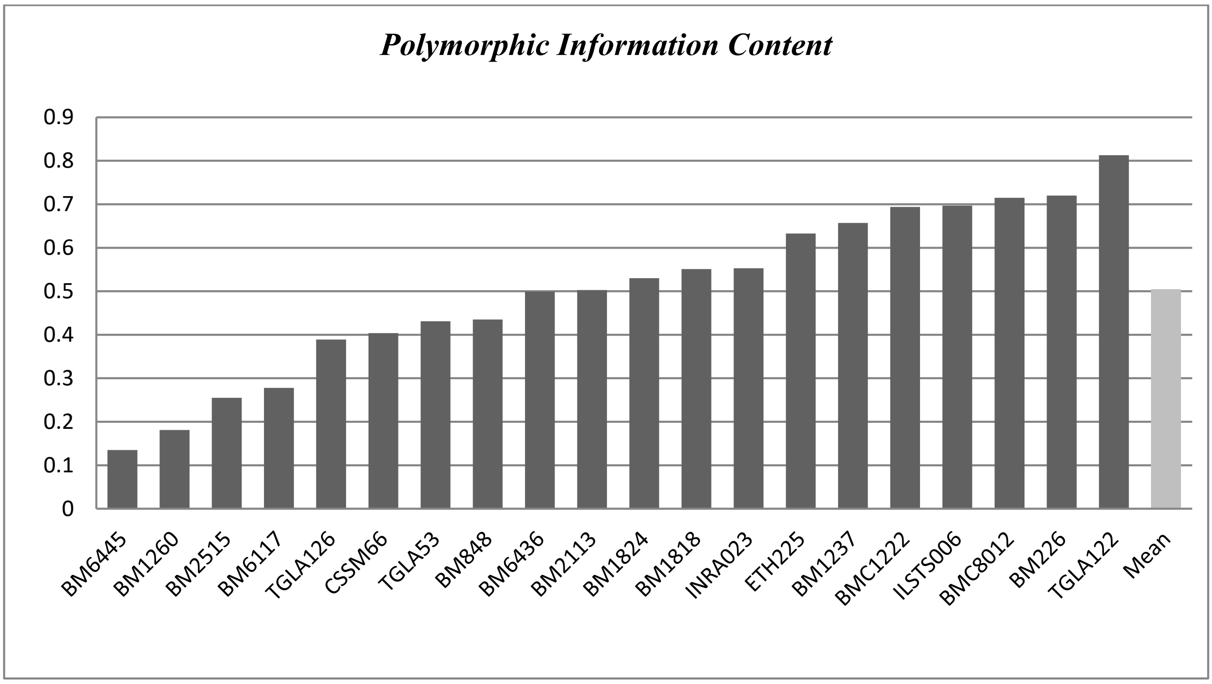
Marker	MAF				Allele number				PIC			
	Pet	Rat	Pra	T	Pet	Rat	Pra	T	Pet	Rat	Pra	T
BM1824	0.450	0.438	0.600	0.467	4	3	4	5	0.514	0.568	0.476	0.530
BM2113	0.600	0.563	0.725	0.625	4	4	4	4	0.516	0.556	0.406	0.503
INRA023	0.400	0.719	0.675	0.539	6	4	3	6	0.615	0.417	0.437	0.553
BM1260	0.950	0.688	0.950	0.895	2	3	2	3	0.090	0.427	0.090	0.181
ILSTS006	0.500	0.438	0.425	0.414	7	6	7	8	0.650	0.699	0.702	0.697
BM6117	0.750	0.781	0.900	0.796	3	2	2	3	0.317	0.283	0.164	0.278
ETH225	0.500	0.531	0.625	0.539	8	5	5	8	0.670	0.549	0.503	0.633
BM1237	0.400	0.656	0.400	0.414	5	4	4	6	0.656	0.475	0.651	0.657
BM6445	0.925	1.000	0.850	0.921	2	1	2	2	0.129	0.000	0.222	0.135
BMC1222	0.475	0.531	0.650	0.461	8	7	5	9	0.692	0.626	0.507	0.694
CSSM66	0.488	0.500	0.525	0.500	3	3	2	4	0.411	0.419	0.374	0.404
BM848	0.688	0.469	0.875	0.691	5	3	4	6	0.454	0.457	0.220	0.435
TGLA53	0.725	0.813	0.675	0.730	6	4	6	6	0.436	0.299	0.497	0.431
TGLA126	0.563	0.500	0.625	0.566	2	4	2	4	0.371	0.459	0.359	0.389
TGLA122	0.313	0.406	0.225	0.309	9	7	9	9	0.815	0.734	0.811	0.813
BM1818	0.600	0.688	0.500	0.592	5	5	5	6	0.542	0.447	0.588	0.551
BM226	0.438	0.313	0.550	0.441	9	7	6	9	0.736	0.734	0.606	0.720
BMC8012	0.375	0.781	0.400	0.382	5	2	6	6	0.698	0.283	0.721	0.715
BM2515	0.875	0.571	0.725	0.816	2	3	2	2	0.195	0.453	0.319	0.255
BM6436	0.474	0.375	0.425	0.473	4	5	4	4	0.462	0.679	0.575	0.499
Mean	**0.574**	**0.588**	**0.616**	**0.579**	**4.950**	**4.100**	**4.200**	**5.5**	**0.498**	**0.478**	**0.461**	**0.504**

หมายเหตุ: Pet = จังหวัดเพชรบุรี, Rat = จังหวัดราชบุรี, Pra = ประจวบคีรีขันธ์ และ T = Total (ผลรวม)

จากการวิเคราะห์เครื่องหมายดีเอ็นเอจำนวน 20 ตำแหน่งของโคลานในครั้งนี้ พบอัลลีลทั้งหมด 110 อัลลีล มีค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลเท่ากับ 5.5 อัลลีลต่อตำแหน่ง ส่วนค่าความถี่ของอัลลีลหลัก (MAF) พบว่ามีค่าตั้งแต่ 0.225 – 1.000 ในจำนวนนี้มี 1 ตำแหน่งคือ BM6445 ที่ให้ค่า MAF เท่ากับ 1 และมีอัลลีลเพียง 1 อัลลีล (monomorphic) ในโคลานจากราชบุรี จำนวนอัลลีลที่พบในแต่ละพื้นที่ (เพชรบุรี ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์) มีค่าตั้งแต่ 1-9 อัลลีล ค่าเฉลี่ยจำนวนอัลลีลทั้ง 20 ตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอ มีค่าเฉลี่ยต่ำสุด 4.100 อัลลีลในโคลานจากราชบุรี และมีค่าสูงสุด 4.950 อัลลีล ในโคลานจากเพชรบุรี ดังแสดงในตารางที่ 2

เมื่อเทียบความหลากหลายของเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 20 ตำแหน่งในโคลานแต่ละแหล่ง มีค่า PIC เฉลี่ยใกล้เคียงกันคือ 0.498 ในโคลานจากเพชรบุรี 0.478 ในโคลานจากราชบุรี 0.461 ในโคลานจาก

ประจวบฯ และ 0.504 จากโคลานทั้งหมด ตารางที่ 2 พบว่าในจำนวน 20 ตำแหน่ง เมื่อวิเคราะห์จากโคลานทั้งหมดพบ 7 ตำแหน่ง(ETH225, BM1237, BMC1222, ILSTS006, BMC8012, BM226, TGLA122) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นที่มีความหลากหลายสูง (PIC >0.6) 9 ตำแหน่ง (TGLA126, CSSM66, TGLA53, BM848, BM6436, BM2113, BM1824, BM1818, INRA023) มีความหลากหลายในระดับปานกลาง (PIC 0.30- 0.59) และ 4 ตำแหน่ง(BM6445, BM1260, BM2515, BM6117) มีความหลากหลายในระดับต่ำ (PIC <0.30) (Mateescu *et al.,* 2005)



ภาพที่ 8 แสดงค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (PIC) เมื่อวิเคราะห์ด้วยไมโครแซทเทลไลท์แต่ละเครื่องหมายจากตัวอย่างโคลานในจังหวัดเพชรบุรี ราชบุรี และ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์

เมื่อวิเคราะห์ความหลากหลายของเครื่องหมายดีเอ็นจากค่า Polymorphic information content (PIC) พบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ BM6445 ให้ค่า PIC เป็นศูนย์ในโคลานจากราชบุรี เครื่องหมายดีเอ็นเอที่มีความหลากหลายต่ำไปสูงเรียงลำดับตามค่า PIC คือ BM6445 < BM1260 < BM2515 <BM6117< TGLA126 < CSSM66 < TGLA53 < BM848 < BM6436 < BM2113 < BM1824 < BM1818 < INTA023 < ETH225 < BM1237 < BMC1222 < ILSTS006 >BMC8012 <BM226 <TGLA122 ดังแสดงในภาพที่ 8

ผลการวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Analysis of genetic diversity)

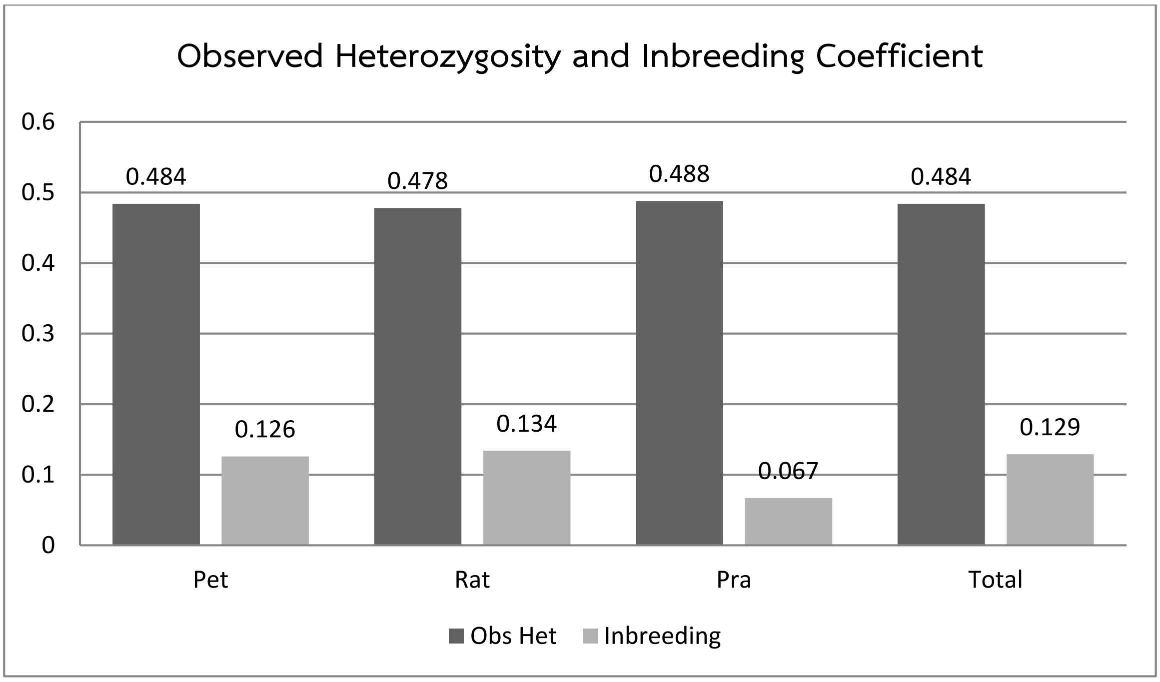
การวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมจากค่า Heterozygosity ในโคลานทั้ง 3 แหล่ง พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน คือ 0.484,0.478 และ 0.488 ในโคลานจากจังหวัดเพชรบุรี จังหวัดราชบุรี และจังหวัดประจวบฯตามลำดับ (ตารางที่ 3) ค่าสัมประสิทธิ์เลือดชิดสูงสุดในโคลานจากราชบุรี (0.134) รองลงมาคือจากเพชรบุรี (0.126) และต่ำสุดคือจากประจวบฯ (0.067) ความหลากหลายทางพันธุกรรมและสัมประสิทธิ์เลือดชิดในภาพรวมในโคลานทั้ง 3 แหล่ง คือ 0.484 และ 0.129 ตามลำดับ (ภาพที่ 9)

ตารางที่ 3 ค่า Observed Heterozygosity, ค่า expected Heterozygosity และ ค่าสัมประสิทธิ์เลือดชิด (inbreeding coefficient) เมื่อวิเคราะห์ด้วยไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอ 20 เครื่องหมายในโคลานจังหวัดเพชรบุรี ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์

Marker	Observed heterozygosity			Expected heterozygosity			Inbreeding coefficient		
	Pet	Rat	Pra	Pet	Rat	Pra	Pet	Rat	Pra
BM1824	0.250	0.313	0.200	0.598	0.643	0.545	0.590	0.537	0.648
BM2113	0.500	0.625	0.450	0.569	0.607	0.441	0.134	0.003	0.006
INRA023	0.600	0.375	0.550	0.676	0.451	0.489	0.125	0.200	-0.100
BM1260	0.100	0.375	0.100	0.095	0.477	0.095	-0.040	0.244	-0.027
ILSTS006	0.550	0.750	0.600	0.685	0.732	0.736	0.209	0.008	0.210
BM6117	0.500	0.438	0.200	0.381	0.342	0.180	-0.301	-0.250	-0.086
ETH225	0.625	0.625	0.650	0.698	0.611	0.550	0.117	0.010	-0.157
BM1237	0.650	0.438	0.800	0.707	0.520	0.705	0.093	0.189	-0.109
BM6445	0.150	0.000	0.300	0.139	0.000	0.255	-0.068	NaN	-0.152
BMC1222	0.600	0.313	0.450	0.719	0.660	0.540	0.178	0.550	0.191
CSSM66	0.975	0.938	0.950	0.524	0.529	0.499	-0.857	-0.758	-0.900
BM848	0.175	0.063	0.150	0.490	0.557	0.229	0.650	0.894	0.367
TGLA53	0.425	0.375	0.450	0.456	0.322	0.520	0.080	-0.132	0.160
TGLA126	0.575	0.625	0.450	0.492	0.557	0.469	-0.156	-0.091	0.066
TGLA122	0.700	0.688	0.750	0.833	0.762	0.833	0.172	0.129	0.124
BM1818	0.550	0.375	0.500	0.584	0.486	0.644	0.070	0.259	0.248
BM226	0.775	0.875	0.700	0.758	0.770	0.641	-0.010	-0.105	-0.066
BMC8012	0.400	0.500	0.450	0.740	0.725	0.754	0.469	0.339	0.424
BM2515	0.250	0.438	0.550	0.219	0.342	0.399	-0.130	-0.250	-0.357

BM6436	0.333	0.429	0.500	0.560	0.541	0.644	0.415	0.243	0.248
Mean	**0.484**	**0.478**	**0.488**	**0.546**	**0.532**	**0.508**	**0.126**	**0.134**	**0.067**

หมายเหตุ: Pet = จังหวัดเพชรบุรี, Rat = จังหวัดราชบุรี และ Pra = ประจวบคีรีขันธ์



ภาพที่ 9 แสดงค่า Observed Heterozygosity และ ค่าสัมประสิทธิ์เลือดชิดของโคในจังหวัดราชบุรีและผลรวมโคใน จ. เพชรบุรี จ. ราชบุรี และ จ. ประจวบคีรีขันธ์ และผลรวมของทั้ง 3 จังหวัด

หมายเหตุ: Pet = จังหวัดเพชรบุรี, Rat = จังหวัดราชบุรี, Pra = ประจวบคีรีขันธ์ และ T = Total (ผลรวม)

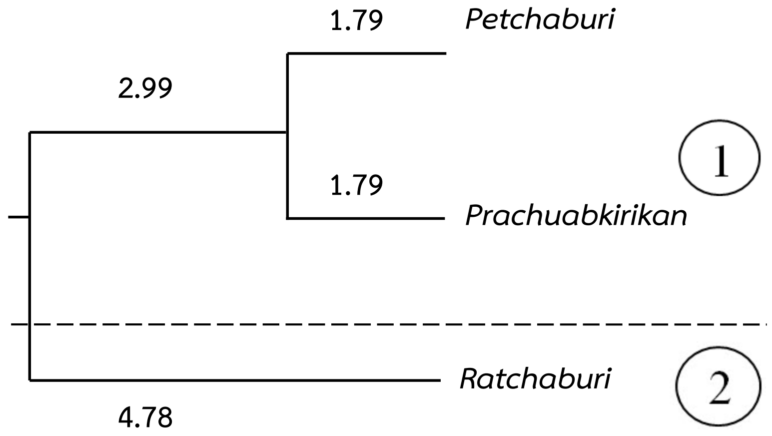
ผลการวัดความเหมือนทางพันธุกรรม (Genetic Identity) และระยะห่างทางพันธุกรรม (Genetic distance)

ผลจากการวิเคราะห์ความเหมือนทางพันธุกรรม (Genetic identity) และระยะห่างทางพันธุกรรม (genetic distance) โดยวิธี Nei's (1972) พบว่าสามารถจัดกลุ่มโคลานออกได้ 2 กลุ่ม คือกลุ่ม 1 ประกอบด้วยโคลานเพชรบุรี และโคลานประจวบคีรีขันธ์ และกลุ่ม 2 ประกอบด้วยโคลานราชบุรี โดยค่าเหมือนทางพันธุกรรม (genetic identity) ของโคลานจากเพชรบุรี และประจวบมีความเหมือน หรือความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด (0.965) รองลงมาคือโคลานจากราชบุรี (0.930) (ตารางที่ 4) จากแผนภูมิต้นไม้

ตามวิธี Based Nei's (1972) Genetic distance: (UPGMA) โคลานจากเพชรบุรีและประจวบมีระยะห่างทางพันธุกรรมน้อยที่สุด (1.79) (ภาพที่ 10)

ตารางที่ 4 แสดงค่า Nei's genetic identity และค่าความห่างของพันธุกรรมของโคลานจังหวัดเพชรบุรี (Pet) จังหวัดราชบุรี (Rat) และ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (Pra)

Pop ID	Pet	Rat	Pra
Pet	***	0.930	0.965
Rat	0.072	***	
Pra	0.036	0.119	***



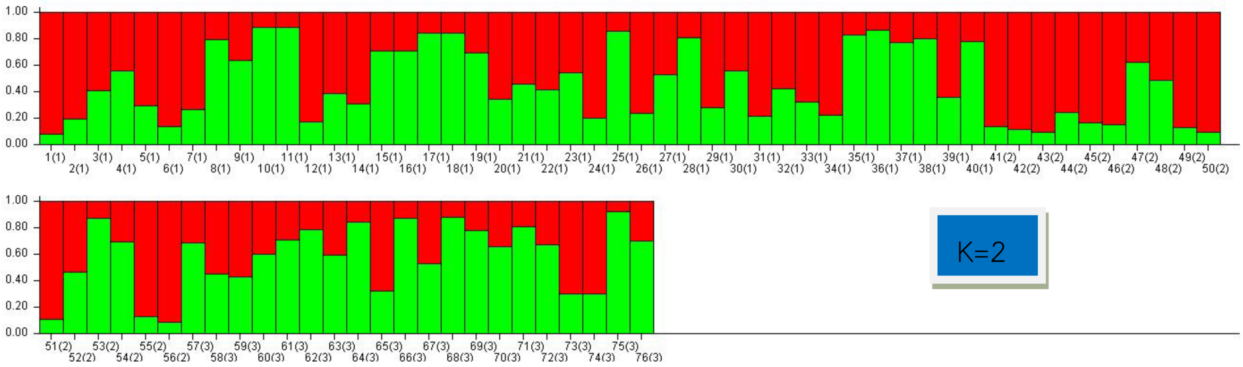
ภาพที่ 10 แสดงแผนภูมิต้นไม้ Phylogenetic tree ของโคลานจากจังหวัดเพชรบุรี จังหวัดราชบุรี และจังหวัดประจวบคีรีขันธ์

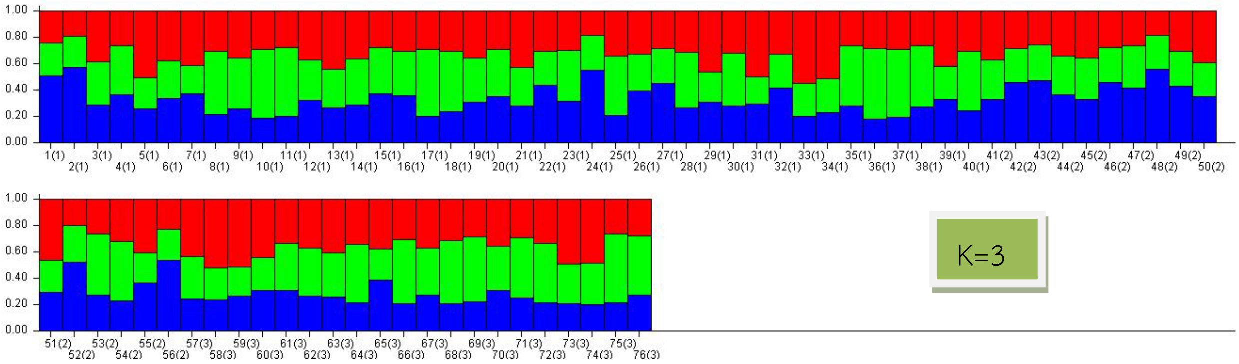
ดังนั้นจึงสามารถจัดกลุ่มโคลานออกได้ 2 กลุ่ม คือกลุ่ม 1 ประกอบด้วยโคลานเพชรบุรี และโคลานประจวบคีรีขันธ์ และกลุ่ม 2 ประกอบด้วยโคลานราชบุรี โดยค่าเหมือนทางพันธุกรรม (genetic identity)

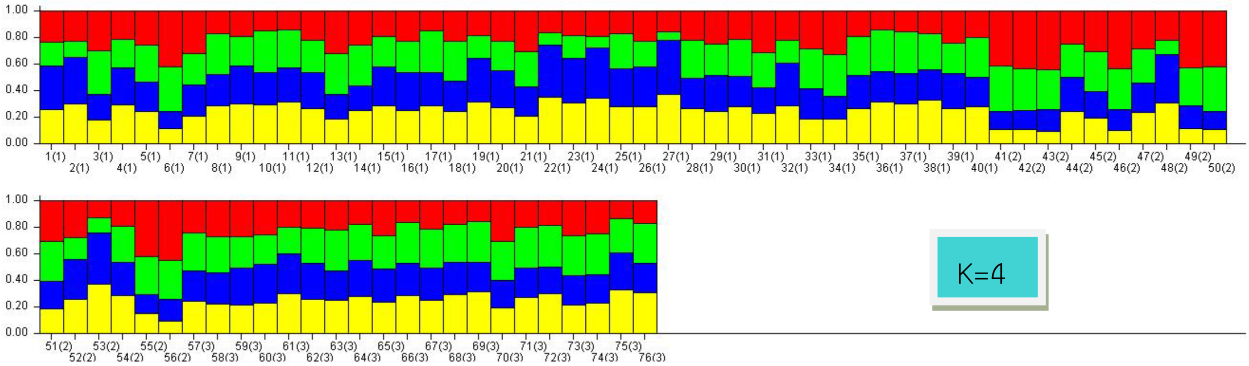
ของโคลานจากเพชรบุรี และประจวบมีความเหมือน หรือความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมากที่สุด (0.965) รองลงมาคือโคลานจากราชบุรี (0.930) ดังตารางที่ ซึ่งสอดคล้องกับแผนภูมิต้นไม้ Phylogenetic tree แสดงความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันของพันธุกรรมโคลาน (Genetic distance) จังหวัดเพชรบุรี และ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ (1.79) ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มโคลาน จังหวัดราชบุรี ที่มีค่าระยะห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 4.78 ซึ่งห่างออกไปและมีความสัมพันธ์กันน้อยจากกลุ่มของโคลาน จังหวัดเพชรบุรี และ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ภาพที่ 10

ลักษณะโครงสร้างประชากรโคลานในจังหวัดเพชรบุรี ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์

จากลักษณะโครงสร้างประชากรเมื่อกำหนดกลุ่มประชากรเป็นK=2, K=3 และ K=4 ไม่สามารถแบ่งประชากรโคลานทั้ง 3 แหล่งออกจากกันได้ (ภาพที่ 11) ผลจากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าประชากรโคลานทั้ง 3 แหล่งยังมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน







ภาพที่ 11 การจำแนกกลุ่มตัวแปรของระยะห่างทางพันธุกรรมในรูปแบบ Cluster analysis ระหว่างโคลาน จังหวัดเพชรบุรี (Petchaburi), ราชบุรี (Ratchaburi) และ ประจวบคีรีขันธ์ (Prachuabkirikan)

บทที่ 5

สรุป และวิจารณ์ผลการทดลอง

พันธุกรรมของโคพื้นเมืองภาคกลาง หรือ โคลาน เป็นสัตว์พื้นเมืองอีกชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญต่อรากฐานทางพันธุกรรมของประเทศที่กำลังถูกคุกคาม อันเนื่องมาจากความต้องการในปรับปรุงลักษณะทางเศรษฐกิจให้ตอบสนองความต้องการของตลาด จึงทำให้เกษตรกรเลี้ยงโคลานบางส่วนมีการนำน้ำเชื้อโคสายพันธุ์ต่างประเทศผสมกับแม่พันธุ์โคพื้นเมืองมากขึ้นเพื่อผลิตโคลูกผสมขายเป็นโคเนื้อ จนทำให้โคลานบางส่วนเกิดปัญหาการปนเปื้อนทางพันธุกรรม และอาจนำไปสู่การสูญเสียโคลานพันธุ์แท้ของโคพื้นเมืองภาคกลางไปในที่สุด แต่เนื่องด้วยโคลานเป็นสัตว์วัฒนธรรมเฉพาะถิ่น และมีความผูกพันกับวิถีชีวิตของคนในจังหวัดเพชรบุรี จังหวัดราชบุรี และจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จึงทำให้เกษตรกรมีการปรับปรุงพันธุ์โดยนำพ่อพันธุ์โคลานพื้นเมืองผสมกับแม่พันธุ์โคลานเท่านั้น ส่วนใหญ่รูปแบบในการปรับปรุงพันธุ์จะยึดเกษตรกรเจ้าของแม่พันธุ์โคลานเป็นหลัก (เหล่าแม่) ซึ่งเหล่าโคลานที่มีชื่อเสียง จะมีผู้ให้ความสนใจจะมาซื้อลูกโคลานเพศผู้ที่คลอดจากเหล่าแม่ไปฝึกซ้อมวิ่งแข่ง หรือเพื่อซื้อลูกโคเพศเมีย น้องสาว หรือพี่สาวของเหล่าแม่พันธุ์โคไปปรับปรุงพันธุ์เอง โดยเหล่าแม่พันธุ์ที่มีประวัติให้ลูกที่เป็นโคลานชนะหลายสนามแข่งขัน มักจะเป็นที่นิยมของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคลาน และมีราคาซื้อขายค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังมีรูปแบบที่ยึดเกษตรกรเจ้าของพ่อพันธุ์โคลานเป็นหลัก (เหล่าพ่อ) โดย

พ่อพันธุ์มีประวัติให้ลูกโคลานเพศผู้หลายตัวไปชนะการแข่งขันในหลายสนามวิ่งโคลาน แต่พ่อพันธุ์เหล่านี้จะถูกหมุนเวียนไปเรื่อยๆโดยการขายออกไปตามเหล่าแม่พันธุ์อื่นๆ แต่มีเกษตรกรบางรายอาจเก็บไว้ผสมภายในฝูง แต่ส่วนใหญ่พบว่าลูกที่คลอดออกมาจากแม่พันธุ์ภายในฟาร์มจะมีตัวเล็กลง นอกจากนี้เกษตรกรผู้เลี้ยงโคลานจะดูจากเหล่าแม่พันธุ์ หรือพ่อพันธุ์แล้ว ลักษณะมงคลภายนอกที่สามารถมองเห็นได้ก็เป็นส่วนประกอบสำหรับการคัดเลือกโคลานด้วยเช่นกัน จากภูมิปัญญาท้องถิ่นในการคัดเลือกโคลานที่สั่งสมกันมาตั้งแต่บรรพชนผ่านมาสู่อนุชนรุ่นหลัง จึงยังทำให้โคลานยังคงรักษาทรัพยากรทางพันธุกรรมของประเทศจนถึงปัจจุบัน ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคลานจึงมีความจำเป็นสำหรับใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการวางแผนการอนุรักษ์ และปรับปรุงพันธุ์เพื่อพัฒนาพันธุ์โคพื้นเมืองในภาคกลางได้อย่างยั่งยืน

ไมโครแซทเทลไลท์ดีเอ็นเอเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่ได้รับการยอมรับว่ามีประสิทธิภาพสูงในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์ โดยไมโครแซทเทลไลท์ เป็นดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสซ้ำเรียงตัวกันประมาณ 1-6 นิวคลีโอไทด์ ซ้ำติดต่อกันไปเรื่อยๆมีลักษณะเป็นช่วงๆ และพบว่าเบสซ้ำชนิดนี้จะมารกระจายตัวอยู่ในบริเวณต่างๆของจีโนม และมีความผันแปรค่อนข้างสูง ไมโครแซทเทลไลท์จะแสดงผลเป็นลักษณะร่วม (co-dominant) ซึ่งสามารถแปรผลเป็นลักษณะยีโนไทป์คล้ายข้อมูลของไอโอไซม์ ทำให้ได้ข้อมูลที่มีความเหมาะสมในการวิเคราะห์ประชากร หรือชนิดพันธุ์ที่มีความใกล้ชิดกัน (O’Reilly และ Wright, 1995) ซึ่งจากการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของโคลานในครั้งนี้เลือกใช้คู่ไพร์เมอร์ทั้งหมด 20 คู่ ที่โลคัสต่างๆ ของโครโมโซมร่างกายโคมาทดสอบ (Mzteescu *et al.,* 2005) สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายโมเลกุลของไมโครแซทเทลไลท์จากตัวอย่างเลือดโคลาน เมื่อพิจารณาถึงอัลลีลที่เกิดขึ้นเปรียบเทียบการศึกษาความหลากหลายพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยในงานวิจัยอื่นๆ จะเห็นได้ว่า พันธุกรรมของโคลาน (เพชรบุรี, ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์ รวม 76 ตัวอย่าง) มีความหลากหลาย ซึ่งแตกต่างไปจากการศึกษาความหลากหลาย และจำแนกพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทย (โคภาคเหนือ, โคภาคอีสาน, โคลานภาคกลาง และโคชนภาคใต้ รวม 108 ตัวอย่าง) ของ มนต์ชัย และยุพิน (2551) เช่นในการทดลองครั้งนี้ พบว่า ที่ตำแหน่งโลคัส BM2113 มี 4 อัลลิล, ที่ตำแหน่ง ETH225 มี 8 อัลลีล และที่ตำแหน่ง TGLA153 มี 6 อัลลีล แต่การศึกษาของมนต์ชัย และยุพิน (2551) พบว่าที่ตำแหน่งโลคัส BM2113 มี 10 อัลลีล, ที่ตำแหน่ง ETH225 มี 10 อัลลิล และที่ตำแหน่ง TGLA153 มี 9 อัลลีล ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าโลคัสทั้ง 3 ตำแหน่งของพันธุกรรมโคลาน (เพชรบุรี, ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์) ซึ่งศึกษาเป็นรายจังหวัดเป็นตัวแทนของโคภาคกลาง มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่น้อยกว่าการศึกษาของ มนต์ชัย และยุพิน (2551) ที่สุ่มเก็บตัวอย่างจากโคพื้นเมืองทุกภาคของประเทศไทย ซึ่งแต่ละภาคก็มีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน เมื่อนำตำแหน่งโลคัส BM2113, ที่ตำแหน่ง ETH225 และที่ตำแหน่ง TGLA153 มาใช้ศึกษาจึงพบความหลากหลายของอัลลีลมากกว่าการศึกษา

โคลานในครั้งนี้ สอดคล้องกับการศึกษาการวิเคราะห์ความหลากหลายพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยในเขตภาคเหนือ ซึ่งศึกษาเป็นรายจังหวัดเป็นตัวแทนของโคภาคภาคเหนือ (เชียงใหม่, แพร่, ลำพูน, ลำปางและพิษณุโลก รวม 38 ตัวอย่าง) ของ ศุภมิตร และคณะ (2550) พบว่าที่ตำแหน่งโลคัส BM2113 มี 9 อัลลิล, ที่ตำแหน่ง ETH225 มี 6 อัลลิล และที่ตำแหน่ง TGLA153 มี 3 อัลลีล ซึ่งโคพื้นเมืองในเขตภาคเหนือมีความหลากหลายทางพันธุกรรมที่น้อยกว่าการศึกษาของ มนต์ชัย และยุพิน (2551) เช่นกัน ทั้งอาจมีสาเหตุมาจากประชากรโคที่ใช้ในการศึกษาของแต่ละงานวิจัยเป็นประชากรคนละกลุ่มกัน จึงมีโอกาสที่จะพบอัลลีลแตกต่างกัน โดยเมื่อนำข้อมูลเบื้องต้นของงานวิจัยครั้งนี้, งานวิจัยของมนต์ชัย และยุพิน (2551) และงานวิจัยของศุภมิตร และคณะ (2550) มาวิเคราะห์ จะเห็นได้ว่าอัลลีลบนโลคัสเหล่านี้มีการกระจายอยู่ทั่วไปในประชากรโคทุกสายพันธุ์ นอกจากนี้อาจมีสาเหตุมาจากจำนวนตัวอย่างสัตว์ที่ใช้ในการศึกษาน้อยกว่าจึงทำให้โอกาสในการพบจำนวนอัลลีลต่อตำแหน่งน้อยลงไปตามจำนวนสัตว์ที่ศึกษา

เมื่อเทียบความหลากหลายของเครื่องหมายดีเอ็นเอทั้ง 20 ตำแหน่งในโคลานแต่ละแหล่ง มีค่า PIC เฉลี่ยใกล้เคียงกันคือ 0.498 ในโคลานจากเพชรบุรี 0.478 ในโคลานจากราชบุรี 0.461 ในโคลานจากประจวบฯ และ 0.504 จากโคลานทั้งหมด พบว่าในจำนวน 20 ตำแหน่ง เมื่อวิเคราะห์จากโคลานทั้งหมดพบ 7 ตำแหน่ง (ETH225, BM1237, BMC1222, ILSTS006, BMC8012, BM226, TGLA122) เป็นเครื่องหมายดีเอ็นที่มีความหลากหลายสูง (PIC >0.6) 9 ตำแหน่ง (TGLA126, CSSM66, TGLA53, BM848, BM6436, BM2113, BM1824, BM1818, INRA023) มีความหลากหลายในระดับปานกลาง (PIC 0.30- 0.59) และ 4 ตำแหน่ง(BM6445, BM1260, BM2515, BM6117) มีความหลากหลายในระดับต่ำ (PIC <0.30) (Mateescu *et al.,* 2005)

ในการทดสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมโคลานโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 20 ตำแหน่ง พบว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมโคลานทั้งหมด มีค่า PIC เฉลี่ยเท่ากับ 0.504 แสดงให้เห็นว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ 20 ตำแหน่งในครั้งนี้สามารถบอกความแตกต่างระหว่างจีโนไทป์ของโคลานอยู่ในระดับปานกลาง ทั้งอาจเป็นเพราะว่าเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ที่นำใช้ในการทดลองไม่ได้สร้างมาจากจีโนมิคไรบารี่ของโคพื้นเมืองในประเทศไทยโดยตรง แต่เป็นเครื่องหมาย เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ ที่พัฒนามาจากสายพันธุ์โคทั่วโลก จึงทำให้ประสิทธิภาพของเครื่องหมายอยู่ในระดับปานกลาง โดยพบ 7 ตำแหน่งมีประสิทธิภาพของเครื่องหมายอยู่ในระดับสูง (ETH225, BM1237, BMC1222, ILSTS006, BMC8012, BM226, TGLA122) (PIC >0.6) และ 9 ตำแหน่งมีประสิทธิภาพของเครื่องหมายอยู่ในระดับกลาง (TGLA126, CSSM66, TGLA53, BM848, BM6436, BM2113, BM1824, BM1818, INRA023) (PIC 0.30- 0.59) และ 4 ตำแหน่งมีประสิทธิภาพของเครื่องหมายอยู่ในระดับต่ำ (BM6445, BM1260, BM2515, BM6117) (PIC <0.30) จากผลการทดสอบความหลากหลายทางพันธุกรรมโคลานทั้งหมดโดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทล

ไลท์ มี 16 ตำแหน่งให้ค่า PIC ระหว่าง >0.6-0.30 ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการศึกษาพันธุกรรมและวางโปรแกรมปรับปรุงพันธุ์โคลานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เมื่อพิจารณาค่า เฉลี่ย observed heterozygosity ในโคลานในครั้งนี้ จะพบว่าพันธุกรรมของโคลานทั้ง 3 แหล่งมีค่าใกล้เคียงกัน และไม่สูงมากนัก มีค่าอยู่ระหว่าง 0.478-0.488 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับกับการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในโคพื้นเมืองในภาคเหนือถูกวิเคราะห์โดยใช้เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลท์ 20 ตำแหน่ง พบว่า observed heterozygosity ของโคพื้นเมืองภาคเหนือ มีค่าอยู่ระหว่าง 0.386-0.479 (ศุภมิตร และคณะ, 2550) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโคลานทั้ง 3 แหล่ง มีความหลากหลายในด้านของรูปแบบขนาดของอัลลีล (จำนวนซ้ำของเบสแตกต่างกัน) ไม่ต่างกันมากนัก อีกทั้งอัลลีลเหล่านี้ ส่วนใหญ่อยู่ในสภาพ homozygous ซึ่งโคพื้นเมืองที่มีพันธุกรรมอยู่ในสภาพ homozygous สูง อาจส่งผลให้เกิดการสูญหายของยีน (genetic lost) ได้ง่ายในอนาคต หากมีสถานการณ์ที่ทำให้ประชากรโคพื้นเมืองเหล่านี้ต้องลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้พบว่าค่า observed heterozygosity มีค่าน้อยกว่าค่า expected heterozygosity ซึ่งสามารถสรุปได้ว่าการกระจายตัวของประชากรโคลานมีความสมดุล หรือเป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg โดยค่าสัมประสิทธิเลือดชิด พบสูงที่สุดในโคลานจากราชบุรี (0.134) รองลงมาคือจากเพชรบุรี (0.126) และต่ำสุดคือจากประจวบฯ (0.067) ซึ่งจากการผลการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์เลือดชิดสูงในโคลานจากราชบุรี แสดงให้เห็นว่าประชากรโคที่เก็บตัวอย่าง อาจมีขนาดเล็ก มีพ่อพันธุ์ และแม่พันธุ์เพียงไม่กี่ตัว เมื่อต้องการจะเพิ่มประชากรในฝูงให้มากขึ้น เกษตรกรอาจมีการแลกเปลี่ยนกันใช้พ่อพันธุ์ และแม่พันธุ์กันน้อยฟาร์ม หรือใช้เฉพาะภายในฟาร์มตนเอง จึงมีโอกาสให้มีการนำพ่อพันธุ์ มาผสมกับแม่พันธุ์ หรือลูกของตัวเอง หรือไม่ก็อาจจะนำเอาลูกโคเพศผู้มาผสมกับลูกโคเพศเมียก็ได้ เป็นการผสมวนเวียนภายในฝูงจนเป็นเหตุให้อัตราการผสมเลือดชิดสูง ส่วนค่าสัมประสิทธิ์เลือดชิดโคลานเพชรบุรี และโคลานประจวบคีรีขันธ์ มีค่า 0.126 และ 0.067 ตามลำดับ

จากผลค่าความเหมือน หรือความใกล้ชิดทางพันธุกรรม และแผนภาพ Phylogenetic tree พบว่ามีความสอดคล้องกัน โดยโคลานจากเพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์มีความเหมือน หรือความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาก (0.965) แสดงให้เห็นว่าโคลานทั้ง 2 พื้นที่มีการแลกเปลี่ยนพันธุกรรมซึ่งกันและกัน ซึ่งแตกต่างออกไปจากโคลานจากราชบุรี ถึงแม้ว่าโคลานจากเพชรบุรี และประจวบคีรีขันธ์มีความเหมือน หรือความใกล้ชิดทางพันธุกรรมมาก แต่ค่าสัมประสิทธิ์เลือดชิดของโคลานประจวบ และโคลานเพชรบุรีมีค่า 0.067 และ 0.126 แสดงให้เห็นว่าโคลานประจวบ เกษตรกรมีการนำพ่อพันธุ์โคลาน หรือแม่พันธุ์โคลานจากเพชรบุรีมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์อยู่เสมอจึงมีผลให้ค่าสัมประสิทธิ์เลือดชิดต่ำ แต่ยังคงไว้ซึ่งมีความเหมือน หรือความใกล้ชิดทางพันธุกรรมกับโคลานเพชรบุรี ในขณะที่โคลานเพชรบุรี พบว่าค่าสัมประสิทธิ์เลือดชิดสูงรองลงมาจากโคลานราชบุรี ทั้งนี้อาจจะเกิดจากเกษตรกรอาจมีการแลกเปลี่ยนกันใช้พ่อพันธุ์ และแม่พันธุ์กันน้อยฟาร์ม หรือใช้

เฉพาะภายในฟาร์มตนเอง จึงมีโอกาสให้มีการนำพ่อพันธุ์ มาผสมกับแม่พันธุ์ หรือลูกของตัวเอง หรือไม่ก็อาจจะนำเอาลูกโคเพศผู้มาผสมกับลูกโคเพศเมียก็ได้ เป็นการผสมวนเวียนภายในฝูงจนเป็นเหตุให้อัตราการผสมเลือดชิดสูง

ในส่วนของผลการจัดกลุ่มโครงสร้างประชากรเป็น K=2, K=3 และ K=4 แสดงให้เห็นโคลานใน 3 แหล่ง (เพชรบุรี ราชบุรี และประจวบคีรีขันธ์) มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน หรือกล่าวได้ว่าไม่สามารถแยกได้ว่าโคลานพื้นที่ใดมีเอกลักษณ์ทางพันธุกรรมที่เฉพาะหรือเด่นกว่าโคพื้นที่ใดพื้นที่หนึ่งในสามพื้นที่ที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้

ข้อเสนอแนะจากงานวิจัยมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์โคลาน

เนื่องจากผลการตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโคลานในจังหวัดประจวบคีรีขันธ์สรุปมีอัตราการผสมเลือดชิดต่ำที่สุดถ้าเทียบกับของเพชรบุรีและราชบุรี ดังนั้นจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ควรรักษาแนวทางการผสมพันธุ์โคแบบนี้ต่อไปเพื่อไม่ให้อัตราการผสมเลือดชิดเพิ่มขึ้นโดยการนำพ่อพันธุ์ หรือแม่พันธุ์ที่มีสายเลือดต่างออกไปจากโคที่มีอยู่เข้ามาผสมพันธุ์เพื่อป้องกันอัตราการผสมเลือดชิดเพิ่มขึ้น ในส่วนของจังหวัดเพชรบุรี และราชบุรี ควรมีการตื่นตัวเกี่ยวกับปัญหาการผสมเลือดชิดเกิดขึ้น โดยการนำพ่อแม่พันธุ์โคลานมาแลกเปลี่ยนหมุนเวียนกันระหว่างพื้นที่ และควรมีการจดบันทึกข้อมูล และทำใบพันธุ์ประวัติประจำตัวโคทุกตัวเพื่อจะได้รู้ว่าโคแต่ละตัวมาจากสายเลือดไหน เพื่อป้องกันการเกิดการผสมเลือดชิดระหว่างสายเลือด โดยการจดทะเบียนยังส่งผลเห็นชัดในด้านการป้องกันปัญหาการผสมเลือดชิดได้ดีที่สุดอีกด้วย เพราะจากที่ผ่านมาเกษตรกรไม่มีใบประวัติที่ชัดเจน ทำให้ไม่มีแบบแผนในการปรับปรุงพันธุ์ที่ชัดเจน จนเกิดปัญหากับการพัฒนาสายพันธุ์โคลานเป็นอย่างมาก ซึ่งอาจส่งผลต่อความไม่สมบูรณ์พันธุ์ของโคได้ เช่น โคเพศผู้น้ำเชื้อไม่แข็งแรง โคเพศเมียก็ผสมติดยาก ไม่ค่อยแข็งแรง แท้งหรือตายก่อนคลอด ลูกโคโตช้า โครงสร้างไม่ดี ฯลฯ และที่สำคัญ แสดงลักษณะด้อยออกมา ส่วนใหญ่แล้วล้วนเกิดจากผลเสียของการผสมเลือดชิด ในทางหนึ่งคือทำให้ทราบว่าโคลานตัวนั้นๆ สายเลือดโคลานพันธุ์แท้จริงอันเป็นประโยชน์ในการพัฒนาพันธุ์โค เพื่อสร้างโคที่มีลักษณะดี ทั้งหัวหูโครงสร้างกล้ามเนื้อ เติบโตเร็ว แข็งแรง สมบูรณ์พันธุ์ดี และเพิ่มรายได้ให้แก่เจ้าของฟาร์ม ถึงแม้ว่าการผสมแบบเลือดชิดมักจะเป็นคู่ที่มีความสัมพันธ์ทางสายเลือดใกล้กัน เช่น พ่อกับลูก แม่กับลูก หรือ พี่กับน้อง แต่นักปรับปรุงพันธุ์จะใช้วิธีนี้เพื่อสร้างลักษณะเด่นไว้ในฝูง โดยเพิ่มความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะเด่นไปให้รุ่นต่อไป แต่ขณะเดียวกัน วิธีผสมแบบเลือดชิดนี้ ก็อาจส่งผลเสียด้านสุขภาพ ป่วยง่าย อายุสั้น การตายของลูก พิการ การผสมติดยาก น้ำเชื้อด้อยคุณภาพลง โตช้า ลักษณะด้อยก็จะโผล่ได้ชัด ดังนั้นหากเกษตรกรผู้เลี้ยงโคลานยังเลือกใช้วิธีผสมแบบเลือดชิด จะต้องเข้มงวดในการกำจัดคัดทิ้ง ผลผลิตที่ออกมาถ้าพบว่าเป็นลักษณะด้อย ซึ่งในความเป็นจริงแล้วต้องเป็นผู้เลี้ยงที่มีประสบการณ์สูง และที่จริงวิธีนี้ก็ไม่ค่อยมีใครนิยมใช้ เพราะแม้ว่าตัว

สัตว์ที่คาดหวังว่าจะได้ดีนั้น ถ้าได้ออกมาดั่งหวังก็จะให้ลูกโคที่มีสายเลือดนิ่งดีมาก แต่ทว่าโอกาสที่จะได้ตัวโคเด่นๆดีๆ มีน้อย เปอร์เซ็นต์ส่วนใหญ่แล้วจะออกมาเป็นลักษณะด้อยเสียมากกว่า ซึ่งหมายถึงต้องกำจัดโดยคัดทิ้งมากกว่าครึ่งเลยของสัตว์ที่มีอยู่ (ชินา, 2556) แต่หากเกษตรกรมีความจำเป็นที่ต้องผสมเลือดชิดเพื่อรักษาลักษณะที่ต้องการเก็บไว้ในฝูงโค สามารถทำได้โดยการผสมภายในสายเลือด ซึ่งเป็นการผสมภายในสายเลือดเดียวกันเพื่อรักษาลักษณะเด่นหรือยีนที่ดีของบรรพบุรุษตัวใดตัวหนึ่งให้เข้มข้นเอาไว้เป็นพิเศษ แต่จะแตกต่างกันตรงที่ความห่างของความสัมพันธ์จะมากกว่า เช่น ปู่กับหลาน ทวดกับเหลน หรือมีปู่กับตาเป็นตัวเดียวกัน โดยมีเป้าหมายคือดึงลักษณะของพ่อโคตัวนั้นๆ ให้กลับมาคงลักษณะโดดเด่นอยู่ในฝูง เช่นปู่เป็นพ่อโคที่สวยน่าประทับใจ เมื่อมีหลานหรือเหลนเพศเมีย ก็นำเอากลับมาผสมด้วยอีก ผลงานที่ได้ก็จะมีโอกาสเหมือนตัวพ่อพันธุ์นั้นมาก วิธีนี้จะทำให้โคในฝูงจะคงลักษณะของพ่อพันธุ์ตัวนั้นๆเอาไว้ได้ แต่วิธีการนี้ก็ต้องคัดลักษณะด้อยทิ้งอย่างเข้มงวดเช่นกัน สำหรับข้อเสียของวิธีการผสมแบบนี้ ก็คล้ายๆกับการผสมแบบเลือดชิดวิธีแบบที่หนึ่ง แต่ว่าเปอร์เซ็นต์ที่จะแสดงลักษณะไม่พึงประสงค์จะน้อยกว่าการผสมแบบเลือดชิดแบบที่หนึ่ง ดังนั้นนักปรับปรุงพันธุ์ก็ยังคงต้องคอยคัดเลือกและกำจัดคัดทิ้งตัวที่แสดงยีนด้อยออกมา นิรนาม ก. (2554)

ซึ่งหากพิจารณาข้อดีของการผสมข้ามในพันธุ์จะส่งผลต่อความสัมพันธ์ของสายเลือดจะห่างกัน ซึ่งจะช่วยลดความใกล้ทางสายเลือด วิธีนี้เป็นที่นิยมมากในปัจจุบัน ข้อดีของการผสมข้ามในพันธุ์ จะได้ลูกโคที่กินเก่งโตเร็ว ไม่เลือกอาหารสามารถเลี้ยงแบบธรรมชาติในการเลี้ยง แบบไล่ต้อน และสามารถปรับตัวให้เข้ากับการเลี้ยงโดยใช้ทรัพยากรที่มีอยู่อย่างจำกัดในพื้นที่ได้เป็นอย่างดียังทนทานต่อโรค และแมลง รวมถึงทนต่อสภาพอากาศร้อนชื้นในประเทศไทยได้เป็นอย่างดี ซึ่งการผสมข้ามพันธุ์จะใช้ข้อดีของลักษณะที่ดีของทั้งพ่อและแม่มาอยู่ร่วมกัน และต้องการให้สัตว์มีความแข็งแรงกว่าพ่อและแม่ ความสำเร็จในการผสมพันธุ์ขึ้นอยู่กับคุณภาพของพ่อแม่พันธุ์ ในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ต้องผ่านการพิจารณาเป็นพิเศษ โคแต่ละพันธุ์ต่างก็มีความแตกต่างกันมากในด้านพันธุกรรม (ชินา, 2556) ดังนั้นผลที่ได้จากการผสมแบบข้ามสายพันธุ์จึงเกิดขึ้นมากและเด่นชัดกว่าการผสมแบบเลือดชิด โดยผลที่เกิดขึ้นจากการผสมข้ามสายพันธุ์ทำให้ยีนในฝูงเป็นยีนคู่ต่างมากขึ้น จึงสามารถควบคุมไม่ให้ยีนด้อยที่นำลักษณะเสื่อมแสดงออกมาได้

บรรณานุกรม

โกวิทย์ นิธิชัย, จันทร์ทรา ตนันท์ยุทธวงศ์, กฤช พจนอารี, นพพร ศราธพันธ์ และ โกสุม จันทร์ศิริ. 2543. ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของโคนมสำหรับการพิสูจน์ความเป็นพ่อแม่ลูก, น.159-162. *ใน*การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38. สาขาสัตว์ และ สาขาสัตวแพทย์, 1-4 กุมภาพันธ์ 2543. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

จักรพันธุ์ กังวาฬ. 2540. ประวัติความเป็นมาของโคลาน. วารสารวิทยาศาสตร์แห่งมหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี. Vol. 8 (1). น.100-111.

ชมนาด ศีติสาร (ผู้แปล). 2550. ไก่กับคน จากมุมมองชีวชาติพันธุ์วิทยา. โดยเจ้าชายอะกิฌิโนะมียะฟุมิฮาโตะ. สำนักพิมพ์อัมรินทร์. กรุงเทพฯ. น 67.

ฐานข้อมูลองค์ความรู้แม่น้ำเพชรบุรี.2556.การแข่งขันโคลาน.(Online). https://catlovecatza.wordpress .com/tag/โคลาน. [21 กันยายน 2556]

มนต์ชัย ดวงจินดาและ ยุพิน ผาสุก.(2551).รายงานฉบับสมบรณ์ โครงการศึกษาความหลากหลายและการจำแนกกลุ่มพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยจากข้อมูลไมโครแซทเทลไลท์และไมโตคอนเดรีย.สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 33น.

สมปอง สรวมศิริ และไพโรจน์ ศิลมั่น. 2553. ระบบการเลี้ยงโคพื้นเมืองในจังหวัดเชียงใหม่. ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. จดหมายข่าวธุรกิจโคเนื้อ ปีที่ 2 ฉบับที่ 17 น. 45-102.

สำนักพัฒนาพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์. 2546.ประวัติความเป็นมา**.** (Online).www.breeding. dld.go.th[22 กรกฎาคม 2559]

ศุภมิตร เมฆฉาย, สิริวดี ชมเดช และ กรกฎ งานวงศ์พาณิช์. 2550.รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการการวิเคราะห์ความหลากหลายพันธุกรรมของโคพื้นเมืองไทยในเขตภาคเหนือโดยใช้ไมโครแซทเทลไลท์และไมโตคอนเดรียมาร์คเกอร์. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 62น.

ศรีจรรยา สุขมโนมนต์. 2546. การพัฒนาไมโครแซทเทลไลท์ไพรเมอร์ส าหรับปลาดุกอุยและการประยุกต์ เพื่อการศึกษาพันธุศาสตร์ประชากร. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ยอดชาย ทองไทยนันท์. 2556. ความสำคัญและแนวทางการใช้ประโยชน์จากสัตว์พื้นเมือง. วารสารสัตวบาล. Vol. 23. No. 104. ประจำเดือน กรกฎาคม-กันยายน. 11-34 น.

นิรนาม ก. (2554). การผสมเลือดชิด. วารสารเพื่อนชาวโค ฉบับที่ 77. 32น.

Barendse, W., S. M. Armitage and L. M. Kossarek. 1994. A genetic linkage map of the bovine genome. Nat. Genet. 6:227- 235.

Bishop, M. D., S. M. Kappes, J. W. Keele, R. T. Stone, S. L. F. Sunden, G. A. Hawkins, S. S. Toldo, R. Fries, M. D. Grosz, J. Yoo and C. W. Beattie. 1994. A genetic linkage map for cattle. Genet. 136:619-639.

Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick and R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic likage map in human using restriction fragment length polymorphisms. Anim. J. Hum. Genet. 32:314-331.

Brezinsky L. S., Kemp J. and Teale A. J. 1993. ILSTS005, a polymorphic bovine microsatellite. Animal Genetics 24: 73.

Georges M. and Massey J. M. 1992. Polymorphic DNA markers in Bovidae. Patent WO 92/13102 1992. Gêbczyñski M. and Tomaszewska-Guszkiewicz K. 1987. Genetic variability in the European bison. Biochemical Systematics and Ecology 15: 285–288.

Georgiadis,N., L. Bischaf, A. Templeton, J. Patton, W. Karesh, and D. Western. 1994. Structure and history of African elephant populations: I. Eastern and Southern Africa. J. Heredity 85.100-104.

Ibeagha-Awemu, E .and G. Erhardt. 2004. High genetic diversity indices of two wet/ central African cattle breeds-Hope for more future improvement option. Deutscher Tropentag.October5-7,2004,Humboldt-Universitat zu Berlin.

Machado, M.A., I. Schuster, M.L. Martinez, A.L. Campos. 2003. Genetic diversity of four cattle breeds using microsatellite markers. R. Bras. Zootec. 32: 93-98.

MacHugh, D.E., M. D. Shriver, R.T. Loftus, P. Cunningham and D.G. Bradley. 1997. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of Taurine and Zebu cattle *(Bos tuum* and *Bos indicus).* Genetics. 146: 1071-1086.

Mateescu, R.G., Z. Zhang, K. Tsai, J. Phavaphutanon, N.I. Burton-Wurster, G. Lust, R. Quaas, K. Murphy, G.M. Acland, and density of microsatellites in a genome-wide screening for hip dysplasia in a crossbreed pedigree. Journal of heredity 96: 847-853.

Nei M. 1972. Genetic distance between populations. American Naturalist 106:283–292.

O'Reilly, P. and J.M. Wright. 1995. The evolution technology of DNA fringerprinting and its application ot fisheries and aquaculture. J. Fish. Biol. 47 (suppl. A): 29-55.

Peters-van der Sanden, M.J., Kirby, M.L., Gittenberger-de Groot, A., Tibboel, D. 1993. Ablation of various regions within the avian vagal neural crest has differential effects on ganglion formation in the fore-, mid- and hindgut. Dev. Dyn. 196: 183–194.

Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001. Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 3rd ed. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.

Savolainen, P., Y. Zhang, J. Luo, J. Lundeberg and T. Leitner. 2002. Genetic evidence for an east asian origin of domestic dogs. Science 298: 1610-1613.

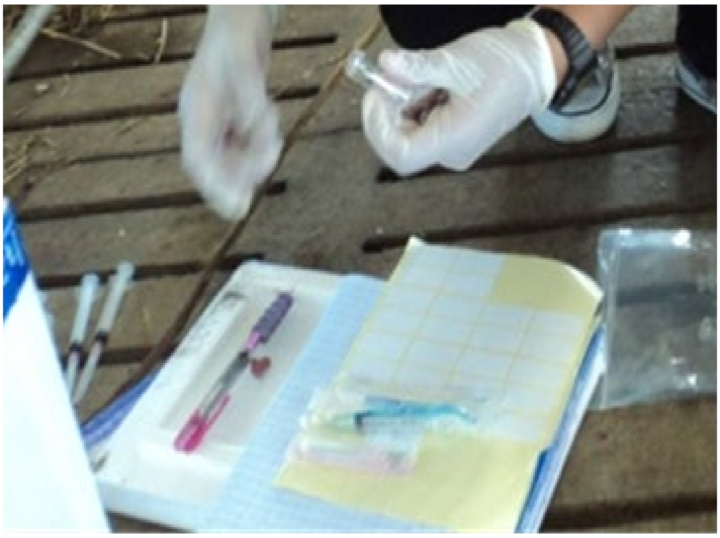
Steffen P., Eggen A., Dietz A. B., Womack J. E., Stranzinger G. and Fries R. 1993. Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. Animal Genetics 24: 121–124.

Thuy NTD, Melichinger-Wild E, Kuss AW, Cuong NV, Bartenschlager H, Geldermann H (2006) Comparison of Vietnamese and European pig breed using microsatellites. J Anim Sci 84, 2601-2608

Vaiman D., Mercier D., Moazami-Goudarzi K., Eggen A., Ciampolini R., Lepingle A., Velmala R., Kaukinen J., Varvio S. L., Martin P., Leveziel H. and Guerin G. 1994. A set of 99 cattle microsatellites, characterization, synteny mapping and polymorphism. Mammalian Genome 5: 288–297.

Xu, Y.C., L. Bo, L.S. Wan, B.Y. Su, J. Yu, L.P. Xiao, G.B. Mong, J.Y. Song and Z. Wei. (2005). Individualization of tiger by using microsatellites. Foresic Science International. 151: 45-51.

ภาคผนวก



ภาพภาคผนวกที่ 1 เตรียมอุปกรณ์เจาะเลือด

ภาพภาคผนวกที่ 2 การเจาะเลือดโคเก็บตัวอย่าง

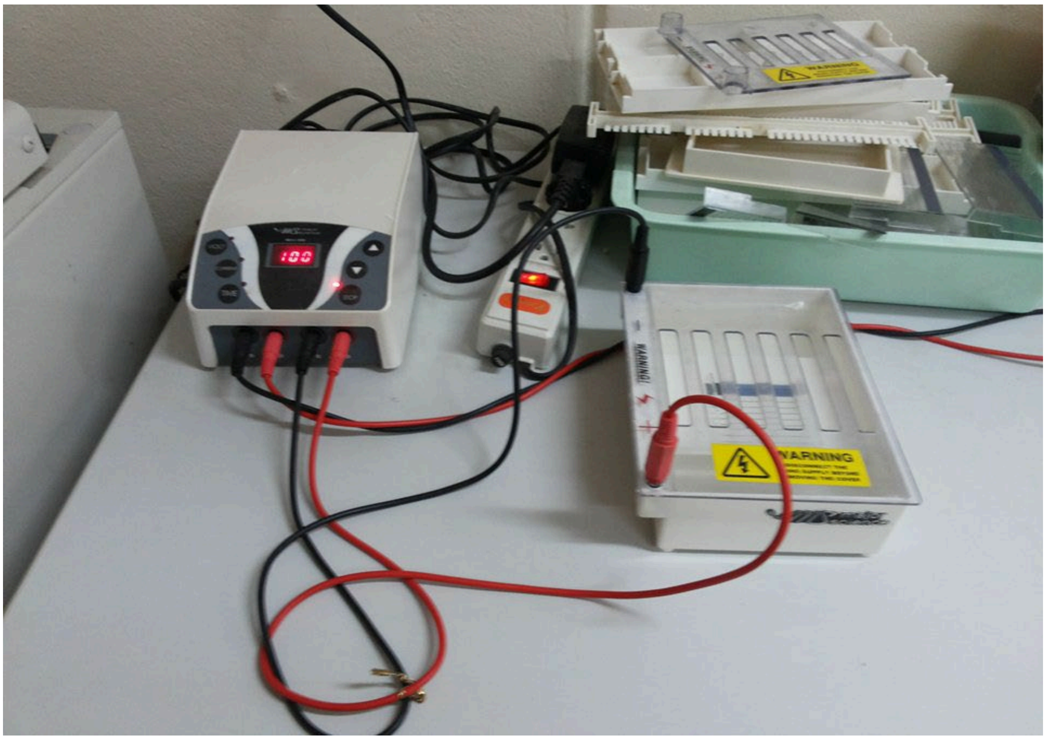
ภาพภาคผนวกที่ 3 การสกัด DNA

ภาพภาคผนวกที่4 การทำ PCR

ภาพภาคผนวกที่ 5 การปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที

ภาพภาคผนวกที่ 6 เครื่อง Thermal cycle

ภาพภาคผนวกที่ 7 การเพิ่มจำนวน DNA



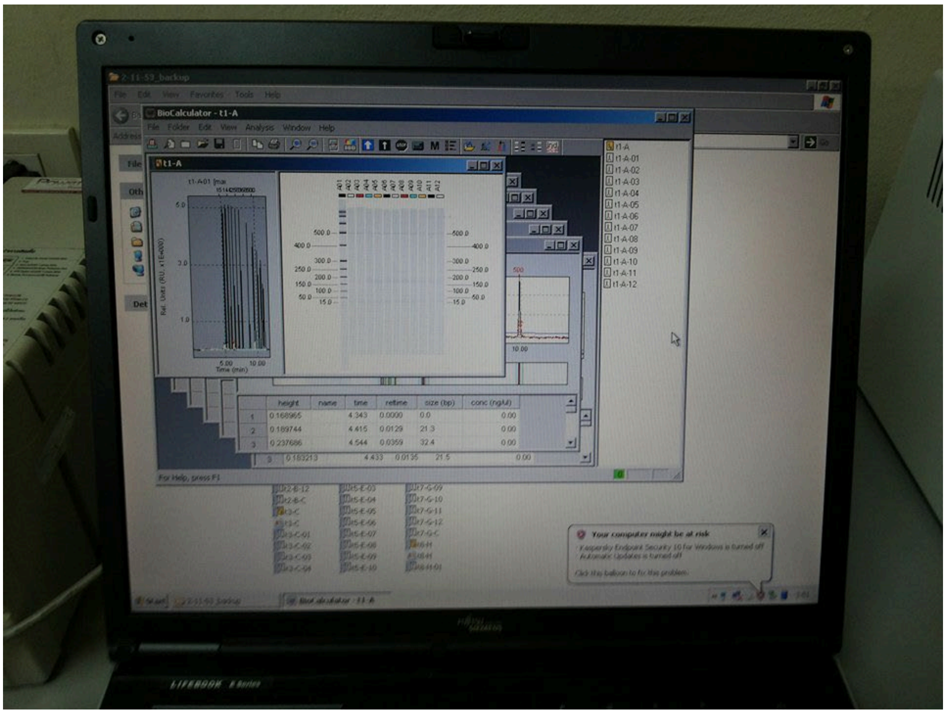
ภาพภาคผนวกที่ 8 เครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส (Electrophoresis)

ภาพภาคผนวกที่ 9 การวิเคราะห์ผลของ PCR ด้วยวิธี Agarose Gel Electrophoresis

ภาพภาคผนวกที่10 เครื่องกำเนิดไฟ 100 w ใช้เพิ่มความต่างศักย์ให้ดีเอ็นเคลื่อนที่บนวุ้นเจล

ภาพภาคผนวกที่ 11 เครื่อง Capillary gel electrophoresis device

ภาพภาคผนวกที่ 12 การวิเคราะห์พีซีอาร์และตรวจชิ้นดีเอ็นเอ



ภาพภาคผนวกที่ 13 การประมวลผลความแตกต่างของไมโครแซทเทลไลท์ของโคลานแต่ละตัวด้วยโปรแกรม Bio Calculator Analysis software

ประวัตินักวิจัย

นายดำรงศักดิ์ อาลัย

Mr. Damrongsak Arlai หมายเลขโทรศัพท์ 086-9721935 e-mail: arlaianisci_ku@hotmail.com

1. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3-7604-00244-711

2. ดำรงตำแหน่ง อาจารย์ประจำหลักสูตร สาขาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรีปี 2555-2559

3. ดำรงตำแหน่ง ประธานหลักสูตร สาขาสัตวศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรีปี 2560

4. ประวัติการศึกษา

1) วท.บ. (เกษตรศาสตร์) สาขาเอกสัตวบาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2) วท.ม. (เกษตรศาสตร์) สาขาเอกสัตวบาล มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
3) ปร.ด. (วิจัยและพัฒนาการเกษตร) คณะเกษตรกำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. งานวิจัยการตรวจสอบอสุจิสุกรที่นำโครโมโซมวายของสุกรด้วยเทคนิค Non-radioactive *in situ* hybridization

---

ตีพิมพ์

1. *Damrongsak Arlai*, *Sujate Chuanchom, Theerapol Sirinarumitr* .MARCH 2015.**Optimization of Cell Permeabilization for Rapid Detection of Salmonella in Pork by FISH**. THE THAI VETERINARY MEDICINE 45(1):91-99.

ผลงานวิชาการ

1. **ดำรงศักดิ์ อาลัย**, ศรีสุรรณ ชมชัย, ธีระพล ศิรินฤมิตร และ ชาญวิทย์ วัชระพุกก์. การเตรียมดีเอ็นเอติดตามสำหรับโคโมโซมวายของสุกรด้วยเทคนิค PCR. "การผลิตสัตว์ปลอดภัย ผู้เลี้ยงสัตว์ไทยมั่นคง" รายงานการประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ภาคใต้ ครั้งที่ 4 15-16 สิงหาคม 2549 ณ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา. 138 น.

2. **ดำรงศักดิ์ อาลัย**, ศรีสุวรรณ ชมชัย, ธีระพล ศิรินฤมิตร, สมศักดิ์ เพียบพร้อม และ ชาญวิทย์ วัชระพุกก์. 2550. การประเมินการคัดแยกอสุจิที่นำโครโมโซมวายในสุกรโดยผ่านความเข้มข้นต่าง ๆ ของโบวายซีรั่มอัลบูมิน. วิทยานิพนธ์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพ. 256 น.
3. สุเจตน์ ชื่นชม, เกรียงไกร วิฑูรย์เสถียร,ศศิธร นาคทอง,ศรีสมัย วิริยารัมภะ,ดำรงศักดิ์ อาลัย. 2551. รายงานการวิจัยโครงการพัฒนาวิธีการอินซิตูไฮบริไดเซชั่น ในการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลลาในอุตสาหกรรมการผลิตเนื้อสุกร.สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.62 น.
4. **Damrongsak Arlai. 2015.** DEVELOPMENT *IN SITU* HYBRIDIZATION FOR SALMONELLA DETECTION IN PORK. Thesis Ph.D. (Agricultural Research and Development). Kasetsart University. Thailand. 286p.
5. **ดำรงศักดิ์ อาลัย**, ปวีณา ถิ่นวงศ์เมือง และสุนิสา วิเศษสิงห์. 2557. การเตรียมดีเอ็นเอติดตามโครโมโซมวายของแพะด้วยเทคนิค พีซีอาร์. การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยระดับชาติและระดับนานาชาติ ครั้งที่ 2 เรื่อง“นานาวิทยาการวิจัย และนวตกรรมเพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืนสู่เอเชีย”. หัวข้อย่อยกลุ่ม CASNIC: วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. ณ บัณฑิตวิทยาลัย วิทยาลัยบัณฑิตเอเชีย. จังหวัดขอนแก่น.
6. **ดำรงศักดิ์ อาลัย**, พลวัต ระย้าแก้ว และณรงค์ อินทสังข์. 2558. การปนเปื้อนของเชื้อซัลโมเนลล่าในเนื้อสุกรจากโรงฆ่าสัตว์และเขียงจำหน่ายในเขตอำเภอเมือง จ.เพชรบุรี. การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยระดับชาติและระดับนานาชาติ ครั้งที่ 3 เรื่อง“การปฏิรูปการศึกษาเพื่อความยุติธรรมในสังคม: ความท้าทายใหม่”. หัวข้อย่อยกลุ่ม CASNIC: วิทยาศาสตร์สุขภาพ. ณ บัณฑิตวิทยาลัย วิทยาลัยบัณฑิตเอเชีย. จังหวัดขอนแก่น.
7. **ดำรงศักดิ์ อาลัย,** ศุภกฤต เอี่ยมสะอาด, อนุชิต ปี่แก้ว, ณัฐภวิกร ว่องไว, วิทวัส บุญมั่ง และ ณัฐวุฒิ ทองพลับ. อิทธิพลของโบวายซีรั่มอัลบูมินในสารละลายน้ำเชื้อ BTS ต่อคุณภาพน้ำเชื้อพ่อสุกร. พะเยาวิจัย6. การประชุมทางวิชาการระดับชาติ “ศิลปวัฒนธรรมวิจัย เพื่อประเทศไทย 4.0” 26-27 มกราคม 2560 ณ หอประชุมพระยาง้ำเมือง มหาวิทยาลัยพะเยา. จังหวัดพะเยา. 609-616 น.
8. **ดำรงศักดิ์ อาลัย,** มนัญญา ปริยวิชญภักดี, จันทร์จิรา ภวภูตานนท์, สุดธิษา เหล่าเปี่ยม, กาวิล นันท์กลาง และธีระพล ศิรินฤมิตร**. 2560. ประสิทธิภาพของไมโครแซทเทลไลท์ไพร์เมอร์สำหรับโคลาน**. งานประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 9 มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม. จังหวัดนครปฐม. ประเทศไทย. 28 - 29 กันยายน 2560.
9. พลวัต ระย้าแก้ว, ณรงค์ อินทสังข์ และ**ดำรงศักดิ์ อาลัย.** 2558. การปนเปื้อนของเชื้ออีโคไลในเนื้อสุกรจากโรงฆ่าสัตว์และเขียงจำหน่ายในเขตอำเภอเมือง จ.เพชรบุรี. The 2th Regional Undergraduate Conference on Agricultural Sciences and Technology; RUCA2. 26-27 March, KMITL, PCC, Chumphon.

10. จิราภา รักเมือง, จิรายุ เณรหลำ, เมธี ธิบดี, **ดำรงศักดิ์ อาลัย** และ พิชิต สุดตา. 2558. การเปรียบเทียบสารสกัดสมุนไพรสำหรับไล่เห็บสุนัข.การประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยระดับชาติและระดับนานาชาติ ครั้งที่ 3 เรื่อง“การปฏิรูปการศึกษาเพื่อความยุติธรรมในสังคม: ความท้าทายใหม่”. หัวข้อย่อยกลุ่ม CASNIC: วิทยาศาสตร์สุขภาพ. ณ บัณฑิตวิทยาลัย วิทยาลัยบัณฑิตเอเชีย. จังหวัดขอนแก่น.
11. จุฑาทิพย์ พลูเสริม, ศรีรักษ์ เรืองรักษ์, อุษณีย์ สืบอ่ำ และ**ดำรงศักดิ์ อาลัย**. 2560. ประสิทธิภาพสารสกัดสมุนไพรจากใบยาสูบและใบแมงลัคคาต่อการกำจัดเห็บสุนัข. The 4th Regional Undergraduate Conference on Agricultural Sciences and Technology; RUCA4. 30-31 มีนาคม 2560 ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบุรี. 57 น.
12. กันธาดา เลิศผสมสิทธ์, ธนากร ปุณณะนิธิ, **ดำรงศักดิ์ อาลัย**, พิชิต สุดตา. ประสิทธิภาพของสารสกัดใบน้อยหน่า และใบสาบเสือที่สกัดด้วยเมทานอลในการกำจัดเห็บสุนัข. โครงการ*ประชุมวิชาการและนำเสนอผลงาน*วิจัย*ระดับชาติ* ครั้งที่ 4 *ประจำปี 2560*. 30 เมษายน 2560 ในหัวข้อ “การวิจัยเพื่อสร้างองค์ความรู้สู่ยุคไทยแลนด์” ณ มหาวิทยาลัยปทุมธานี. จังหวัดปทุมธานี. 31น.

กำลังดำเนินการวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย “**การพัฒนา Dot-blot Hybridization เพื่อการตรวจหาเชื้อซัลโมเนลล่าในเนื้อสุกร**” สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปี 2561