

การตรวจหารูปแบบจีโนไทป์ของยีน *IGF-I*, *SCD*, *FABP4* และยีน *FASN* ในโคพื้นเมืองไทยและบราห์มัน

Detection of genotype patterns at *IGF-I*, *SCD*, *FABP4* and *FASN* genes in Thai native Cattle and Brahman

รัตติกาล สุวรรณสิงห์^{1*}, พงศธร กุณัน¹, ปิยวิทย์ เกษร¹, ฉัตรชัย แก้วพิลา¹, ไพโรจน์ ภัทรปรีชา¹ และทองสา บัวสุข²

Rattikan Suwannasing^{1*}, Pongsatorn Gunun¹, Piyawit Kesorn¹, Chatchai Kaewpila¹, Pairote Patarapreecha¹ and Thongsa Buasuk²

¹ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร จ.สกลนคร 47160

¹ Faculty of Natural Resources, Rajamangala University of Technology Isan Sakon Nakhon Campus, Sakon Nakhon 47160

² ศูนย์ศึกษาค้นคว้า วิจัยและห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002

² Research Center and Central Laboratory Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

บทคัดย่อ: โคพื้นเมืองไทยและโคบราห์มัน เป็นสายพันธุ์โคที่เกษตรกรรายย่อยนิยมเลี้ยง จึงมีการจัดการคัดเลือกพันธุ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต แต่พบปัญหาขาดการบันทึกพันธุ์ประวัติ และเก็บข้อมูลลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจ ในขณะที่การใช้เทคโนโลยีด้านอนุพันธุศาสตร์ เข้ามามีบทบาทช่วยในการคัดเลือกพันธุ์เพื่อการพัฒนาลักษณะการเจริญเติบโต และคุณภาพเนื้อในโค เป็นแนวทางช่วยเพิ่มมูลค่าของการผลิตโคเนื้อสำหรับเกษตรกร ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบจีโนไทป์ของยีน *IGF-I*, *SCD*, *FABP4* และยีน *FASN* ในโคพื้นเมืองอีสาน จำนวน 110 ตัวอย่าง และโคบราห์มัน จำนวน 50 ตัวอย่าง ด้วยเทคนิค Polymerase Chain reaction Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) ผลการศึกษาพบจีโนไทป์ 2 รูปแบบในยีน *IGF-I* (CT และ CC) และยีน *FASN* (AG และ GG) สำหรับยีน *SCD* พบจีโนไทป์ 3 รูปแบบ คือ CC, CT และ TT ส่วนยีน *FABP4* พบจีโนไทป์เพียงรูปแบบเดียว (GG) ค่าความถี่อัลลีลของยีน *IGF-I* มีค่าความถี่อัลลีล C อยู่ในช่วง 0.930-1.000 ส่วนยีน *SCD* มีค่าความถี่อัลลีล T อยู่ในช่วง 0.720-0.775 และยีน *FASN* มีค่าความถี่อัลลีล G อยู่ในช่วง 0.970-0.995 ในโคพื้นเมืองและบราห์มัน สำหรับยีน *FABP4* มีค่าความถี่อัลลีล G เท่ากับ 1.000 ในโคทั้งสองพันธุ์ ผลวิเคราะห์ค่า H_o , H_e , uH_e , PIC พบความหลากหลายพันธุกรรมระดับปานกลาง ในยีน *SCD* และมีความหลากหลายพันธุกรรมต่ำในยีน *IGF-I* และยีน *FASN* และผลทดสอบภาวะสมดุลของยีน พบว่ายีน *IGF-I*, *SCD* และยีน *FASN* อยู่ในภาวะสมดุลตามกฎ Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) ดังนั้นยีน *SCD* มีความเป็นไปได้ในการนำไปศึกษาความสัมพันธ์กับลักษณะคุณภาพเนื้อและองค์ประกอบกรดไขมัน เพื่อพัฒนาการผลิตโคเนื้อต่อไปในอนาคตได้

คำสำคัญ: โคพื้นเมืองไทย; โคอีสาน; โคบราห์มัน; เครื่องหมายดีเอ็นเอ

ABSTRACT: Thai native cattle and Brahman are common breeds for smallholder farmers. The management of breeding selection has been involved for improving the productive performance, but there is a lack information of pedigree records and data collection of important economic traits. At the same time, molecular genetics technology has a major role to find genetic markers for the development of growth traits and meat quality in cattle which could promote value added of cattle production for farmers. Hence, the purpose of this study was to investigate the genotype patterns of *IGF-I*, *SCD*, *FABP4*, and *FASN* genes in 110 Kho-Isaan cattle and 50 Brahman by Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP). The result found that two

* Corresponding author: rattikan.su@rmuti.ac.th

genotypes were identified in the *IGF-I* gene (CT and CC) and the *FASN* gene (AG and GG). For the *SCD* gene, three genotypes were identified: CC, CT, and TT. For the *FABP4* gene, only one genotype (GG) was found. The *IGF-I* has C allele frequencies with the range of 0.930-1.000, while the *SCD* gene has T allele frequencies with the range of 0.720-0.775 and the *FASN* gene has a G allele frequency of 0.970-0.995 in Kho-Isaan cattle and Brahman. For the *FABP4* gene, the G allele frequency was 1.000 in both breeds. The H_o , H_e , uH_e , and PIC analyses showed moderate polymorphism in *SCD* genes and low polymorphism in *IGF-I* and *FASN* genes, and the resulting equilibrium of genes revealed *IGF-I*, *SCD*, and *FASN* genes were in equilibrium according to the rules of Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE). Therefore, the *SCD* gene has the potential to be studied in association with meat quality and fatty acid composition to develop the production of beef cattle in the future.

Keywords: Thai native cattle; Kho-Isaan; Brahman; gene marker

บทนำ

โคพื้นเมืองเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีความสำคัญในระดับชุมชน โดยเฉพาะในเขตภาคอีสาน เนื่องจากเกษตรกรส่วนใหญ่มีอาชีพทำนา จึงนิยมเลี้ยงโคพื้นเมืองเป็นอาชีพเสริม โคพื้นเมืองมีความโดดเด่นในด้านการทนต่อสภาพแวดล้อมของประเทศไทย สามารถต้านทานต่อโรคและแมลงในเขตร้อนได้ ให้ลูกตก หากินเก่ง สามารถใช้ประโยชน์จากอาหารหยาบได้ดี เหมาะสมกับรูปแบบการเลี้ยงของเกษตรกรที่นิยมเลี้ยงแบบปล่อยแปลงให้หากินเองตามธรรมชาติ ซึ่งการเลี้ยงโคพื้นเมืองตามระบบธรรมชาติ ทำให้เนื้อโคพื้นเมืองมีจุดเด่นในด้านปริมาณไขมันและคลอเรสเตอรอลต่ำ และมีปริมาณกรดไขมันคอนจูเกตลิโนเลอิกสูง (Conjugated linoleic acid, CLA) (สุทธิพงศ์, 2555) แต่โคพื้นเมืองอีสานมีการเจริญเติบโตค่อนข้างช้า จึงมีการนำโคสายพันธุ์ต่างประเทศมาผสมข้าม เพื่อผลิตโคลูกผสมที่ให้ผลผลิตสูงขึ้น ซึ่งโคพันธุ์บราห์มัน เป็นโคเนื้ออีกสายพันธุ์ที่เกษตรกรให้ความสนใจ และนิยมนำมาใช้สร้างโคลูกผสมพื้นเมือง เพื่อให้การเจริญเติบโตเร็ว คุณภาพเนื้อและซากดี อย่างไรก็ตามรูปแบบการเลี้ยงของเกษตรกรรายย่อย ยังคงขาดการจดบันทึกพันธุ์ประวัติและบันทึกข้อมูลลักษณะปรากฏที่สำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ข้อมูลด้านการเจริญเติบโต น้ำหนักแรกเกิด น้ำหนักที่อายุต่าง ๆ อีกทั้งข้อมูลดังกล่าวต้องใช้ระยะเวลานานกว่าสัตว์จะให้ผลผลิตหรือบางลักษณะอาจจะต้องทำการฆ่าสัตว์เพื่อให้ได้ข้อมูลมา เช่น ลักษณะคุณภาพเนื้อ คุณภาพซาก ไขมันและองค์ประกอบกรดไขมัน ทำให้ไม่สามารถนำข้อมูลดังกล่าวมาประเมินพันธุ์กรรมและคัดเลือกลักษณะดังกล่าวในโคได้ ปัจจุบันนิยมนำเทคโนโลยีด้านอนุพันธุศาสตร์มาค้นหาเครื่องหมายพันธุกรรม (genetic marker) หรือเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA Marker) ที่มีอิทธิพลต่อลักษณะเชิงปริมาณและการให้ผลผลิตในโค และพัฒนาไปเป็น Marker-assisted selection (MAS) เพื่อใช้ในการคัดเลือกลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจ ซึ่งมีข้อดีคือ ช่วยย่นระยะเวลาในการคัดเลือกและมีความแม่นยำสูง โดยยีนที่มีบทบาทสำคัญและมีความสัมพันธ์กับลักษณะการเจริญเติบโตและลักษณะเนื้อ (meat traits) ได้แก่ ยีน bovine insulin-like growth factor I (*IGF-I*), stearoyl-CoA desaturase (*SCD*), fatty acid synthase (*FASN*), และ Fatty acid binding protein 4 (*FABP4*) (Pecina and Ivankovic, 2021; Zalewaska et al., 2021)

ยีน Insulin-like growth factor I (*IGF-I*) มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของกล้ามเนื้อ (Hennnebre et al., 2017; Yoshida and Delafontaine, 2020) และเป็นยีนที่มีการใช้เป็น candidate gene ในการคัดเลือกโคอย่างแพร่หลาย ยีน *IGF-I* ในโคตั้งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 5 มี 6 Exon และ 5 Intron (Putra et al., 2018) หลายงานวิจัยได้ศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *IGF-I* กับลักษณะต่างๆ ในโค พบว่ามีความสัมพันธ์กับน้ำหนักแรกเกิด น้ำหนักหย่านม และอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันในโคพันธุ์ Bali (Maskur et al., 2012) อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวันในโคพันธุ์ Pesisir (Yurnalis et al., 2017) คุณภาพเนื้อของโคพ่อพันธุ์ไฮลอสไต์ลฟรีเซียน (Ardicli et al., 2018) น้ำหนักตัวในโคพันธุ์ Chinese Simmental (Duan et al., 2021) พื้นที่หน้าตัดเนื้อสันในโคพันธุ์ Nellore (Frezarim et al., 2021) ลักษณะปริมาณอาหารที่คลาดเคลื่อนจากความต้องการ (residual feed intake; RFI) ในโคพันธุ์ชาร์โรเลส์ (Yang et al., 2022) เป็นต้น

ยีน *stearoyl-CoA desaturase* (*SCD*) ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกระบวนการแคตตาไลซิงค์และการเปลี่ยนกรดไขมันอิ่มตัว (Saturated fatty Acid: SFA) ไปเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวโมเลกุลเดี่ยว (Monounsaturated fatty Acid: MUFA) ในเนื้อเยื่อไขมันของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Alwiyah et al., 2016) ยีน *SCD* ในโคตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 26 มี 6 Exon และ 5 Intron (Taniguchi

et al., 2004; Oh et al., 2013) พบว่ามีความสัมพันธ์กับองค์ประกอบของกรดไขมันหลายชนิด เช่น C14:0, C14:1, C14:1 c9, C16:1, C18:0, C18:1 c12, C14:1/C14:0, C16:0/C14:0, C16:1/C16:0, MUFA, MUFA/SFA, SFA, UFA/SFA ในโคเนื้อ (Li et al., 2011; Oh et al., 2011; Wu et al., 2012; Kaplanova et al., 2013; Wang et al., 2019; Dawood et al., 2021) มีความสัมพันธ์กับลักษณะคุณภาพเนื้อและไขมันแทรก (Wu et al., 2012; Alwiyah et al., 2016)

ยีน Fatty acid binding protein 4 (*FABP4*) ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของไขมัน ลิพิดแคตตาลิซึม (Casas et al., 2003; Fortes et al., 2009) ลิพิดไฮโดรไลซิสและการขนส่งกรดไขมันภายในเซลล์ (Tansy et al., 2003) ยีน *FABP4* ในโคตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 14 พบความสัมพันธ์กับลักษณะน้ำหนักมีชีวิต น้ำหนักซากอ่อน และน้ำหนักซากเย็น ของโคพ่อพันธุ์ฮิสโตล (Ardicli et al., 2017) คุณภาพเนื้อ คุณภาพซาก และค่าคะแนนไขมันแทรกของโคสายพันธุ์ต่าง ๆ (Oh et al., 2012a; Shin et al., 2012; Yu, 2017; Yu et al., 2018; Yin et al., 2020)

และยีน fatty acid synthase (*FASN*) เป็นเอนไซม์ที่สังเคราะห์ไขมันซึ่งมีบทบาทสำคัญในขบวนการเมตาบอลิซึมของไขมัน ทำหน้าที่ควบคุมการสังเคราะห์ของกรดไขมันสายยาว (Oztabak et al., 2014) ตั้งอยู่บนโครโมโซมที่ 19 จากการศึกษาที่ผ่านมาพบการเกิดมิวเตชันของยีน *FASN* มีความสัมพันธ์กับลักษณะการสะสมกรดไขมันในส่วน of longissimus dorsi muscle ในโคพันธุ์แองกัส (Zhang et al., 2008) มีความสัมพันธ์กับองค์ประกอบกรดไขมันในเนื้อ เช่น C14:0, C14:1, C14:1 n-5, C16:0, C16:1, C18:1, C18:3 และ SFA (Kaplanova et al., 2013; Yeon et al., 2013; Barton et al., 2016) และยังพบว่ามีความสัมพันธ์กับลักษณะไขมันแทรกด้วย (Oh et al., 2012b)

ในการค้นหาเครื่องหมายพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะการเจริญเติบโต คุณภาพเนื้อ และองค์ประกอบกรดไขมัน เพื่อพัฒนาไปเป็น Marker-assisted selection (MAS) จำเป็นต้องศึกษาความหลากหลายของรูปแบบจีโนไทป์ ความถี่จีโนไทป์ และความถี่อัลลีลของยีน *IGF-I*, *SCD*, *FABP4* และยีน *FASN* เพื่อให้ทราบความหลากหลายของรูปแบบจีโนไทป์ของยีน ซึ่งเป็นการศึกษาโครงสร้างของยีนในประชากรนั้นๆ และนำข้อมูลรูปแบบจีโนไทป์ไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาสายพันธุ์ หรือวางแผนการปรับปรุงพันธุ์กรรมของโคเนื้อต่อไปในอนาคต การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหารูปแบบจีโนไทป์ของยีน *IGF-I*, *SCD*, *FABP4* และยีน *FASN* ในโคพื้นเมืองไทยและโคบราห์มัน

วิธีการศึกษา

จรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง

การดำเนินการวิจัยในครั้งนี้ได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับดูแลการดำเนินการต่อสัตว์ เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของสถานที่ดำเนินการ (คกส.) และได้ผ่านการรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์เลขที่ 11/2563 วันที่อนุมัติ 1 ตุลาคม 2563 จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน

การเก็บตัวอย่างเลือดและสกัดดีเอ็นเอ

สุ่มเก็บตัวอย่างเลือดโคพื้นเมืองไทย จากกลุ่มเกษตรกรผู้เลี้ยงโคพื้นเมืองอีสานในเขตจังหวัดสกลนคร ที่เลี้ยงรูปแบบปล่อยแปลงให้หากินเองตามธรรมชาติ และใช้พ่อพันธุ์คุมฝูง จำนวน 110 ตัวอย่าง และโคบราห์มัน จำนวน 50 ตัวอย่าง โดยใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 18 ความยาว 1 นิ้ว เจาะเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณลำคอ ปริมาตร 10 มิลลิลิตรต่อตัวอย่าง ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรที่บรรจุสารละลายป้องกันการแข็งตัวของเลือด 0.5M EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic acid) และทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด GF-1 Blood DNA Extraction Kit (Vivantis, Malaysia) ตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (BioSpectrometer® basic, Germany) และปรับความเข้มข้นของดีเอ็นเอให้เป็น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน *IGF-I*, *SCD*, *FABP4* และยีน *FASN* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน *IGF-I*, *SCD*, *FABP4* และยีน *FASN* ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction: PCR) ในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ (Hypure™ WFI Quality water, HyClone) ปริมาตร 3.4 ไมโครลิตร, 10X PCR-buffer

ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร, dNTPs (1.0 mM/each) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, Primer forward ปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ Primer reverse ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (Table 1) , 5 U/ μ l Taq DNA Polymerase (Thermo scientific) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร แบ่งสารละลายปริมาตร 9 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร เติมน้ำดีเอ็นเอปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมสารให้เข้ากันดี (ปริมาตรสุดท้าย 10 ไมโครลิตร) ตั้งโปรแกรมการเพิ่มปริมาณขึ้นส่วนยีนดังนี้ Initial Denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 3 นาที denature ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที (ยีน *IGF-I*), 45 วินาที (ยีน *FABP4*, *SCD* และยีน *FASN*) annealing ที่อุณหภูมิ 62 องศาเซลเซียส (ยีน *IGF-I* และยีน *FABP4*) และที่อุณหภูมิ 64 องศาเซลเซียส (ยีน *SCD* และยีน *FASN*) เป็นเวลา 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที (ยีน *IGF-I*), 45 วินาที (ยีน *SCD* และยีน *FABP4*) และ 1 นาที 30 วินาที (ยีน *FASN*) โดยทำปฏิกิริยาจำนวน 35 รอบ และ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีอาร์ (PCR-Product) ด้วย 2% agarose gel electrophoresis โดยใช้ PCR-Product ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับ 1X loading dye ปริมาตร 4 ไมโครลิตร ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ นาน 45 นาที ครอบก้นเวลาแน่นแผ่นเจลไปย้อมด้วย Visafe Red Gel stain (Vivantis, USA) บันทึกภาพแถบ DNA ที่เกิดขึ้นภายใต้แสง UV ด้วย Gel Documentation System และทำการวิเคราะห์ขนาดของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเทียบกับ GeneRuler™ 100 bp DNA ladder (Thermo scientific)

Table 1 Primer sequence, PCR-product, and allele size of the *IGF-I/SnaBI*, *SCD/AclI*, *FABP4/NlaIII* and *FASN/HhaI* genes

Genes ¹ / Enzymes	SNPs Position	Primer Sequence (forward and reverse)	PCR product (bp)	Allele size (bp)
<i>IGF-I/SnaBI</i>	Exon1T>C	F: ATTACAAAGCTGCCTGCCCC R: ACCTTACCCGTATGAAAGGAATATACGT	249	T: 226, 23 bp C: 249, 23 bp
<i>SCD/AclI</i>	Exon5C>T	F: GTGTCCTGTTGTTGTGCTTCAT R: ACTACCACCCAGATCAGAGA	520	T: 362, 158 bp C: 304, 158, 58 bp
<i>FABP4/NlaIII</i>	g.3691G>A	F: ACCCCTATGATGCTATTCCACA R: ATACGGTTCACATTGAGAGGGA	565	A: 233, 230, 71, 31 bp G: 463, 71, 31 bp
<i>FASN/HhaI</i>	g.16024A>G	F: ATCGGCAAAGTGGTCATTACAGGT R: CATTGTACTTGGGCTTGTGACG	768	A: 768 bp G: 508, 260 bp

¹ *IGF-I* (Curi et al., 2005), *SCD* (Kaneda et al., 2011), *FABP4* (Ardicli et al., 2017) and *FASN* (Kaneda et al., 2011)

ตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *IGF-I*, *SCD*, *FABP4* และยีน *FASN* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP

ตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *IGF-I*, *SCD*, *FABP4* และยีน *FASN* โดยนำ PCR-Product ของยีน *IGF-I*, *SCD*, *FABP4* และยีน *FASN* ไปย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ ในหนึ่งปฏิกิริยาประกอบด้วยน้ำกลั่นบริสุทธิ์ (Hypure™ WFI Quality water, HyClone) ปริมาตร 6.5 ไมโครลิตร, Buffer for enzymes ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, PCR-Product ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และเอนไซม์ตัดจำเพาะ *SnaBI*, *NlaIII*, *AclI* และ *HhaI* (Thermo Scientific, Lithuania) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร (Table 1) นำไปป้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 6-8 ชั่วโมง ตรวจสอบผลผลิตหลังย่อยด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Enzymes-Product) ของแต่ละยีนด้วยเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้ 2% agarose gel (ยีน *FASN*) 3% agarose gel (ยีน *FABP4*) 8% Polyacrylamide gel (ยีน *SCD*) และ 10% Polyacrylamide gel (ยีน *IGF-I*) นำแผ่นเจลไปย้อมด้วย Visafe Red Gel stain (Vivantis, USA) บันทึกภาพแถบ DNA ที่เกิดขึ้นภายใต้แสง UV กำหนดรูปแบบจีโนไทป์ตามการศึกษาที่ผ่านมา (Table 1)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

คำนวณค่าความถี่จีโนไทป์และอัลลีล ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกต (Observed Heterozygosity: H_o) ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่คาดหวัง (Expected Heterozygosity: H_E) ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่คาดหวังที่ไม่มีอคติ (Unbiased Expected Heterozygosity: uH_E) ตามวิธีการของ Nei (1978) วิเคราะห์ค่า Polymorphic information content (PIC) ตามวิธีการของ Botstein et al. (1980) และดูการเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนในประชากรว่าเปลี่ยนแปลงหรือไม่โดยทดสอบ Hardy-Weinberg Equilibrium ด้วย Chi-square test (χ^2 -test) ตามวิธีของ Falconer and Mackay (1996) ดังสมการ

$$1) H_o = \frac{H}{N} \quad 2) H_E = 1 - \sum_{i=1}^k P_i^2 \quad 3) uH_E = \frac{2N}{2N-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k P_i^2 \right)$$

$$4) PIC = 1 - \sum_{i=1}^k P_i^2 - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k 2P_i^2 P_j^2 \quad 5) Chi-square = \sum_{i=1}^n \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

เมื่อ H = จำนวนตัวอย่างที่มีจีโนไทป์แบบเฮเทอโรไซโกต, N = จำนวนตัวอย่างที่ให้ข้อมูลทั้งหมด P_i = ความถี่ของอัลลีล i , P_j = ความถี่ของอัลลีล j , k = จำนวนอัลลีล, O_i = จำนวนสัตว์แต่ละจีโนไทป์ที่พบในประชากร, และ E_i = จำนวนสัตว์ที่คาดว่าจะพบตามกฎของ Hardy-Weinberg ซึ่งคำนวณได้จาก p^2N , $2pqN$ และ q^2N ในแต่ละยีน

ผลการศึกษาและวิจารณ์

รูปแบบจีโนไทป์ ความถี่จีโนไทป์ และความถี่อัลลีลของยีน *IGF-I*, *SCD*, *FABP4* และยีน *FASN*

ผลการตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ (Figure 1) และผลวิเคราะห์ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของ *IGF-I/SnaBI*, *SCD/AclI*, *FABP4/NlaIII* และยีน *FASN/HhaI* (Table 2) จากผลวิเคราะห์ยีน *IGF-I/SnaBI* ในโคพื้นเมืองอีสาน พบเฉพาะรูปแบบจีโนไทป์ CC มีค่าความถี่จีโนไทป์ CC และความถี่อัลลีล C เท่ากับ 1.00 สอดคล้องกับหลายงานวิจัยที่ศึกษายีน *IGF-I/SnaBI* ในโคพันธุ์ Nellore (Curi et al., 2005) โคพันธุ์ Ongole grade (Anggraeni et al., 2017) และโคพันธุ์ Pasundan (Putra et al., 2018) ซึ่งเป็นโคเขตร้อน (*Bos indicus*) และพบเพียงรูปแบบจีโนไทป์ CC เพียงรูปแบบเดียว แสดงให้เห็นว่าบริเวณตำแหน่งดังกล่าวไม่มีความหลากหลายด้านพันธุกรรม ขณะที่โคเขตหนาว (*Bos taurus*) พบจีโนไทป์ทั้ง 3 รูปแบบ (TT, CT และ CC) ในโคพันธุ์ชาร์โรเลส์ (Islam et al., 2009) โคพันธุ์ Montbeliarde (Szewczuk, 2016) และโคพันธุ์โฮสไตร์ฟรียัน (Ardicli et al., 2018) ที่มีความถี่จีโนไทป์ TT, CT และ CC อยู่ในช่วง 0.29-0.44, 0.47-0.52 และ 0.09-0.24 ตามลำดับ และมีความถี่อัลลีล T และ C อยู่ในช่วง 0.52-0.67 และ 0.33-0.48 ตามลำดับ ส่วนในโคบราห์มันพบจีโนไทป์ 2 รูปแบบ คือ CT และ CC มีค่าความถี่จีโนไทป์เท่ากับ 0.14 และ 0.86 ตามลำดับ มีค่าความถี่อัลลีล T เท่ากับ 0.07 และความถี่อัลลีล C เท่ากับ 0.93 ให้ผลสอดคล้องกับในโคพันธุ์ Beefmaster ที่พบรูปแบบจีโนไทป์ 2 รูปแบบ (CT และ CC) และมีความถี่จีโนไทป์ CT เท่ากับ 0.07 และ CC เท่ากับ 0.93 และความถี่อัลลีล T เท่ากับ 0.03 และอัลลีล C เท่ากับ 0.97 (Reyna et al., 2010) จะเห็นได้ว่าอัลลีล C เป็นอัลลีลพื้นฐานที่พบเป็นส่วนมากในโคเขตร้อน ซึ่งแตกต่างจากในโคเขตหนาวที่มักพบความถี่อัลลีล T สูงกว่าอัลลีล C ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของสายพันธุ์ ตำแหน่งการกลายพันธุ์ และเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้จำแนกจุดกลายพันธุ์ โดย Gui et al. (2018) ได้ศึกษาดำแหน่งสนิปของยีน *IGF-1* และใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่แตกต่างกัน ได้แก่ *IGF1/MaeIII*, *IGF-1/TagI* และ *IGF-1/MboI* ในโคพันธุ์ Qinchuan พบรูปแบบจีโนไทป์และความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลแตกต่างกันไป เช่นเดียวกับการศึกษาของ Yumalis et al. (2017) ที่ทำการศึกษา ยีน *IGF-1/SnaBI*, *IGF-1/TasI* และ *IGF-1/RsaI* ในโคพันธุ์ Pesisir ก็พบรูปแบบจีโนไทป์และความถี่จีโนไทป์แตกต่างกันไปในแต่ละเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ย่อยจุดกลายพันธุ์เช่นกัน

ยีน *SCD* พบจีโนไทป์ 3 รูปแบบ คือจีโนไทป์ TT, CT และ CC ทั้งในโคพื้นเมืองอีสานและโคบราห์มัน โดยในโคพื้นเมืองอีสานมีค่าความถี่จีโนไทป์เท่ากับ 0.606, 0.339 และ 0.055 ตามลำดับ มีค่าความถี่อัลลีล T เท่ากับ 0.775 และอัลลีล C เท่ากับ 0.225 ส่วน

โคบราห์มันมีค่าความถี่จีโนไทป์ TT, CT และ CC เท่ากับ 0.520, 0.400 และ 0.080 ตามลำดับ มีค่าความถี่อัลลีล T เท่ากับ 0.720 และอัลลีล C เท่ากับ 0.280 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่น *SCD* ในโคพันธุ์ Japanese Black (Taniguchi et al., 2004) และโคพันธุ์ Hanwoo (Oh et al., 2011) ที่พบจีโนไทป์ทั้ง 3 รูปแบบ การศึกษาของ Kaneda et al. (2011) รายงานว่ายีน *SCD* บริเวณ Exon5 มีค่าความถี่อัลลีล T อยู่ในช่วง 0.167-0.417 ในโค Korean cattle, Japanese Black, Mongolian cattle, Holstein, Hereford, Japanese Brown และโคพันธุ์แอ่งกึ่ง ยกเว้นโคกลุ่ม Bos indicus (แถบกัมพูชา พม่า และลาว) มีค่าความถี่อัลลีล T เท่ากับ 0.733 นอกจากนี้มีการค้นพบความหลากหลายของตำแหน่งกลายพันธุ์ของยีน *SCD* บริเวณ Exon 5 เพิ่มหลายตำแหน่ง จากการศึกษาของ Oh et al. (2011) พบการผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *SCD* บริเวณ Exon5 ที่ตำแหน่ง g.10153A>G, g.10213 T>C, และตำแหน่ง g.10329 C>T โดยที่ตำแหน่ง g.10153A>G มีค่าความถี่อัลลีล A เท่ากับ 0.462 และอัลลีล G เท่ากับ 0.538 สำหรับตำแหน่ง g.10213 T>C มีค่าความถี่อัลลีล C เท่ากับ 0.507 และความถี่อัลลีล T เท่ากับ 0.493 และตำแหน่ง g.10329 C>T มีค่าความถี่อัลลีล C เท่ากับ 0.443 และอัลลีล T เท่ากับ 0.557 ในโคพันธุ์ Hanwoo นอกจากจะพบความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริเวณ Exon แล้ว ยังพบการผันแปรของเบสในส่วนของ Intron ด้วยจากการศึกษาของ Alwiyah et al. (2016) ได้ศึกษาจุดกลายพันธุ์ของยีน *SCD* บริเวณ Exon 5 ที่ตำแหน่ง c.10153A>G, c.10318C>A และตำแหน่ง c.10329C>T และบริเวณ Intron 5 ที่ตำแหน่ง g.10360G>A, g.10394G>A, g.10428C>T, g.10486A>C และตำแหน่ง g.10487G>A ผลการศึกษาพบว่าตำแหน่ง g.10360G>A มีค่าความถี่อัลลีล A เท่ากับ 0.520 และอัลลีล G เท่ากับ 0.480 ตำแหน่ง g.10428C>T มีค่าความถี่อัลลีล T เท่ากับ 0.805 และอัลลีล C เท่ากับ 0.195 และที่ตำแหน่ง g.10487G>A มีค่าความถี่อัลลีล A เท่ากับ 0.27 และอัลลีล G เท่ากับ 0.73 แต่ไม่พบความหลากหลายของรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *SCD* บริเวณ Exon 5 ที่ตำแหน่ง c.10153A>G, c.10318C>A, c.10329C>T และบริเวณ Intron 5 ที่ตำแหน่ง g.10394G>A และ g.10486A>C ในโค Bali

ยีน *FABP4* ที่ทำการศึกษายีนบริเวณ Exon 3 ตำแหน่ง g.3691G>A พบรูปแบบจีโนไทป์ GG เพียงรูปแบบเดียว ทั้งในโคพื้นเมืองอีสานและโคบราห์มัน จึงมีค่าความถี่จีโนไทป์ GG และความถี่อัลลีล G เท่ากับ 1.00 แสดงให้เห็นว่าบริเวณตำแหน่งดังกล่าวไม่มีความหลากหลายด้านพันธุกรรมในโคทั้งสองพันธุ์ ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในโคพันธุ์ Yanbian Yellow (Yin et al., 2020) โคพ่อพันธุ์ไฮสไตล์ (Ardicli et al., 2017) และโคพันธุ์ Hanwoo (Shin et al., 2012) ที่พบจีโนไทป์ 3 รูปแบบ (GG, GA และ AA) โดยการศึกษาของ Yin et al. (2020) พบว่าการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์จากเบส G ไปเป็นเบส A ที่ตำแหน่ง g.3691G>A ในยีน *FABP4* ทำให้เกิดรูปแบบจีโนไทป์ 3 รูปแบบ และมีค่าความถี่จีโนไทป์ GG, GA และ AA เท่ากับ 0.686, 0.186 และ 0.128 ตามลำดับ มีค่าความถี่อัลลีล G เท่ากับ 0.778 และอัลลีล A เท่ากับ 0.222 ในโคพันธุ์ Yanbian Yellow เช่นเดียวกันกับงานของ Ardicli et al. (2017) ที่ทำการศึกษาจุดกลายพันธุ์ของยีน *FABP4* บริเวณ Exon 3 ตำแหน่ง g.3691G>A และบริเวณ Intron 1 ตำแหน่ง g.2834C>G พบรูปแบบจีโนไทป์ 3 รูปแบบ ในทั้งสองตำแหน่งที่ทำการศึกษา โดยตำแหน่ง g.3691G>A มีค่าความถี่จีโนไทป์ GG, GA และ AA เท่ากับ 0.502, 0.458 และ 0.040 ตามลำดับ มีค่าความถี่อัลลีล G เท่ากับ 0.731 และอัลลีล A เท่ากับ 0.269 ส่วนตำแหน่ง g.2834C>G มีค่าความถี่จีโนไทป์ GG, GC และ CC เท่ากับ 0.303, 0.607 และ 0.09 ตามลำดับ มีค่าความถี่อัลลีล G เท่ากับ 0.606 และอัลลีล C เท่ากับ 0.394 ในโคพ่อพันธุ์ไฮสไตล์ ซึ่งสอดคล้องกันกับการศึกษาของ Shin et al. (2012) ได้ศึกษารูปแบบจีโนไทป์ของยีน *FABP4* ที่ตำแหน่ง g. 2834C>G, g.3533T>A และตำแหน่ง g.3691G>A โดยพบตำแหน่ง g. 2834C>G มีค่าความถี่อัลลีล C เท่ากับ 0.592 และอัลลีล G เท่ากับ 0.408 ส่วนตำแหน่ง g.3533T>A มีค่าความถี่อัลลีล T เท่ากับ 0.421 และอัลลีล A เท่ากับ 0.579 และตำแหน่ง g.3691G>A มีค่าความถี่อัลลีล G เท่ากับ 0.789 และความถี่อัลลีล A เท่ากับ 0.211 ในโคพันธุ์ Hanwoo

และยีน *FASN* ได้ทำการศึกษาจุดกลายพันธุ์บริเวณ Exon 34 ตำแหน่ง g.16024A>G พบจีโนไทป์ 2 รูปแบบ คือ AG และ GG ทั้งในโคพื้นเมืองอีสานและโคบราห์มัน ซึ่งสอดคล้องกับ Kaneda et al. (2011) ที่ได้ศึกษาจุดกลายพันธุ์ของยีน *FASN* บริเวณ Exon 34 ตำแหน่ง g.16024A>G ที่มีการแทนที่ของเบส A ไปเป็นเบส G ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจาก Threonine ไปเป็น Alanine ผลการศึกษาพบยีน *FASN* มีค่าความถี่อัลลีล G อยู่ในช่วง 0.583-0.983 ในโคพันธุ์ Japanese Brown, Korean cattle, Mongolian, Angus, Hereford, Holstein และโคกลุ่ม Bos indicus ยกเว้นในโคพันธุ์ Japanese Black มีค่าความถี่อัลลีล A เท่ากับ 0.633 สูงกว่าอัลลีล G (0.367) จะเห็นได้ว่ายีน *FASN* มีอัลลีล G เป็นอัลลีลพื้นฐานในโคเกือบทุกสายพันธุ์

จึงมีความเป็นไปได้ที่การศึกษาจุดกลายพันธุ์บริเวณ Exon 34 ตำแหน่ง g.16024A>G ในโคพื้นเมืองอีสานและโคบราห์มัน นี้ทำให้พบความถี่ของอัลลีล G สูงเช่นเดียวกับโคสายพันธุ์อื่นๆ แต่แตกต่างจากการศึกษาของ Oztabak et al. (2014) ที่พบจีโนไทป์ 3 รูปแบบ (AA, AG และ GG) ในโคพันธุ์ South Anatolian Red (SER) และโคพันธุ์ East Anatolian Red (EAR) โดยได้ศึกษาการผันแปรของยีน *FASN* ในส่วน thioesterase (TE) ตำแหน่ง g.18663T>C, g.17924A>G และตำแหน่ง g.18440G>A ผลการศึกษาพบตำแหน่ง g.18663T>C มีค่าความถี่อัลลีล C อยู่ในช่วง 0.72-0.87, ตำแหน่ง g.17924A>G มีค่าความถี่อัลลีล A อยู่ในช่วง 0.19-0.32 และตำแหน่ง g.18440G>A มีค่าความถี่อัลลีล A อยู่ในช่วง 0.49-0.68 และในส่วน β -Ketoacyl reductase (KR) ตำแหน่ง g.16024A>G มีค่าความถี่อัลลีล A อยู่ในช่วง 0.34-0.38 และตำแหน่ง g.16039T>C มีค่าความถี่อัลลีล C อยู่ในช่วง 0.36-0.58

ผลการศึกษาแบบจีโนไทป์ ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของยีน *IGF-I*, *SCD*, *FABP4* และยีน *FASN* ในตำแหน่งสลิปที่ทำการศึกษาในโคพื้นเมืองอีสานและโคบราห์มันของประชากรนี้ พบยีน *SCD* มีรูปแบบจีโนไทป์มากที่สุด รองลงมาคือยีน *FASN* ในโคพื้นเมืองอีสานและโคบราห์มัน และไม่พบความหลากหลายของรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *IGF-I* และยีน *FABP4* ในโคพื้นเมืองอีสาน ส่วนในโคบราห์มันพบว่ายังคงมีความหลากหลายของรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *IGF-I* อยู่ ทั้งนี้การที่กลุ่มประชากรโคเนื้อที่ได้นำมาศึกษานั้น ไม่พบรูปแบบของยีนที่หลากหลาย อาจเกิดจากความแตกต่างของสายพันธุ์ ตำแหน่งการกลายพันธุ์ของยีน ประชากรที่นำมาศึกษามีขนาดเล็กเกินไป ทำให้มีโอกาสที่จะไม่พบอัลลีลอื่นๆ หรือรูปแบบการเรียงโคของเกษตรกรที่เป็นระบบปล่อยหากินเองตามธรรมชาติ และให้พ่อพันธุ์คุมฝูง อาจทำให้เกิดการผสมพันธุ์แบบเลือดชิด ทำให้บางอัลลีลเกิดการสูญหายไปได้

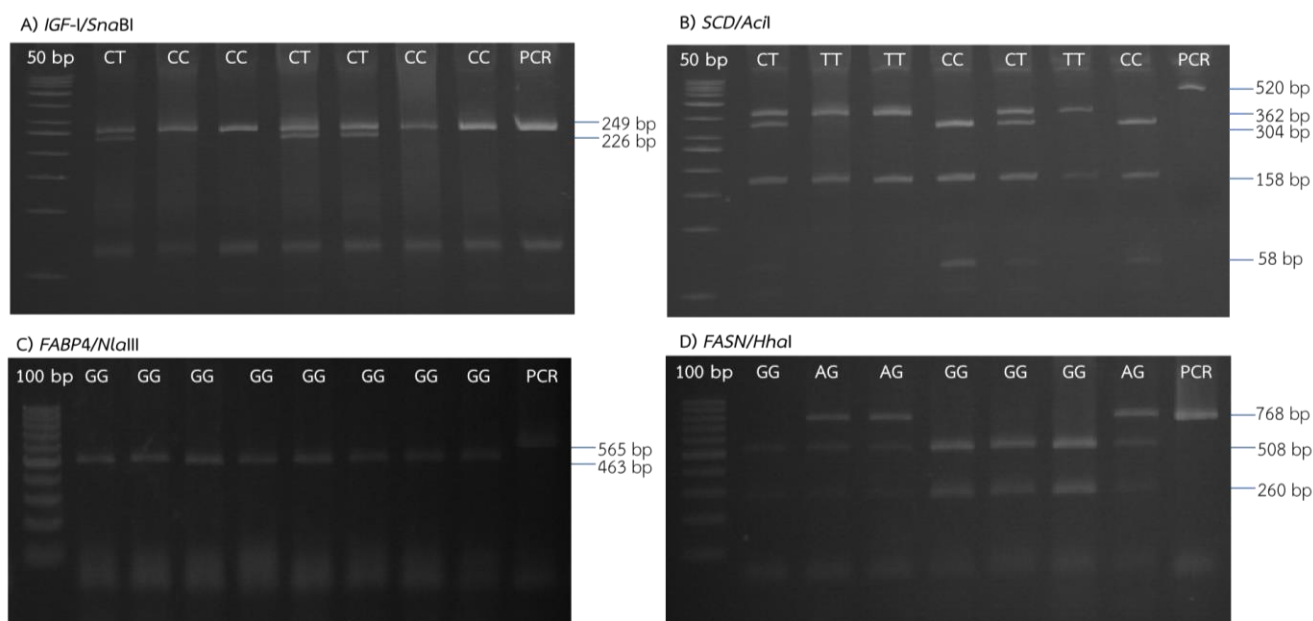


Figure 1 Agarose gel and Polyacrylamide gel electrophoresis patterns of A) *IGF-I/SnaBI*, B) *SCD/AclI*, C) *FABP4/NlaIII* and D) *FASN/HhaI* genes in Thai native and Brahman cattle. (M = 50 bp DNA Ladder for A) and B), M = 100 bp DNA Ladder for C) and D), and PCR = PCR Product of gene)

ความหลากหลายด้านพันธุกรรมและภาวะสมดุลของยีน

การวิเคราะห์ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีที่ได้จากการสังเกต (H_o) ค่าเฮเทอโรไซโกซิตีคาดหวัง (H_e) และค่าเฮเทอโรไซโกซิตีคาดหวังที่ไม่มีอคติ (uH_e) และวิเคราะห์ค่า Polymorphic information content (PIC) เพื่อใช้บ่งชี้ความหลากหลายทางพันธุกรรมของประชากรโคพื้นเมืองอีสานและโคบราห์มัน ผลวิเคราะห์ค่า H_o , H_e , uH_e และ PIC ของยีน *IGF-I* ในโคบราห์มันมีค่าเท่ากับ 0.140, 0.130, 0.132 และ 0.122 ตามลำดับ จากผลวิเคราะห์ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี และค่า PIC ชี้ให้เห็นว่ายีน *IGF-I* มีความหลากหลายด้านพันธุกรรมอยู่ระดับต่ำ ($PIC < 0.25$) ส่วนในโคพื้นเมืองไม่สามารถคำนวณค่าได้ เนื่องจากพบรูปแบบจีโนไทป์เพียงรูปแบบเดียว สำหรับยีน *SCD* ในโคพื้นเมืองอีสานและ โคบราห์มัน มีค่า H_o อยู่ในช่วง 0.339-0.400, ค่า H_e อยู่ในช่วง 0.348-0.403, ค่า uH_e อยู่ในช่วง 0.350-0.407 และค่า PIC อยู่ในช่วง 0.288-0.322 แสดงให้เห็นว่ายีน *SCD* มีค่าความหลากหลายด้านพันธุกรรมระดับปานกลาง ($0.25 \leq PIC \leq 0.5$) ส่วนในยีน *FABP4* ไม่สามารถวิเคราะห์หาความหลากหลายด้านพันธุกรรมได้ เนื่องจากพบรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *FABP4* เพียงรูปแบบเดียวในโคทั้งสองพันธุ์ และยีน *FASN* พบความหลากหลายด้านพันธุกรรมต่ำ ($PIC < 0.25$) เมื่อพิจารณาจากค่า H_o , H_e , uH_e และ PIC โดยมีค่า H_o อยู่ในช่วง 0.009-0.060, ค่า H_e อยู่ในช่วง 0.009-0.058, ค่า uH_e อยู่ในช่วง 0.009-0.059 และค่า PIC อยู่ในช่วง 0.009-0.057 ในโคพื้นเมืองอีสานและโคบราห์มัน (Table 2)

ทดสอบภาวะสมดุลของยีน *IGF-I*, *SCD*, *FABP4* และยีน *FASN* ตามกฎของ Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) ด้วย Chi-square test (χ^2 -test) เพื่อการเปลี่ยนแปลงความถี่ยีนในประชากรโคพื้นเมืองอีสานและโคบราห์มันที่นำมาศึกษา ซึ่งกฎของ HWE ความถี่ของยีนในประชากรจะอยู่ภาวะสมดุลต้องเป็นประชากรที่มีขนาดใหญ่ มีการผสมพันธุ์กันอย่างสุ่ม ไม่มีการคัดเลือก ไม่มีการอพยพ และไม่มีการกลายยีน ผลการศึกษาพบยีน *SCD* และ *FASN* ยังอยู่ในภาวะสมดุลตามกฎของ Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) ทั้งในโคพื้นเมืองอีสานและโคบราห์มัน สำหรับยีน *IGF-I* ผลทดสอบภาวะสมดุลของยีน พบว่ายังอยู่ในภาวะสมดุลในประชากรโคบราห์มัน แต่ไม่สามารถทดสอบภาวะสมดุลของยีนดังกล่าวในประชากรโคพื้นเมืองอีสานได้ และยีน *FABP4* ไม่สามารถทดสอบภาวะของยีนทั้งได้ในโคพื้นเมืองอีสานและโคบราห์มัน เนื่องจากพบรูปแบบจีโนไทป์เดียวในโคทั้งสองกลุ่ม ซึ่งโคพื้นเมืองอีสานที่นำมาใช้ศึกษาในครั้งนี้เป็นโคที่เลี้ยงปล่อยให้หากินเองตามธรรมชาติ ตามเทือกภูเขาพาน และริมเขื่อนแม่น้ำมูล ปล่อยให้พ่อพันธุ์คุมฝูง และมีการผสมพันธุ์กันอย่างสุ่ม ไม่ได้มีการคัดเลือก ทำให้ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงภาวะสมดุลของยีนในประชากรโคพื้นเมืองอีสานและโคบราห์มันได้

สรุป

จากผลการศึกษาจีโนไทป์ของยีน *IGF-I*, *SCD*, *FABP4* และยีน *FASN* ในโคพื้นเมืองอีสานและโคบราห์มัน เมื่อพิจารณาจากความถี่จีโนไทป์ ความถี่อัลลีล และความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยเฉพาะค่า PIC พบว่ายีน *SCD/Act1* เป็นยีนที่พบความหลากหลายด้านพันธุกรรมระดับปานกลาง สามารถนำไปศึกษาหาความสัมพันธ์กับลักษณะคุณภาพเนื้อและองค์ประกอบกรดไขมันต่อไปในอนาคตได้ ส่วนยีน *IGF-I/SnaBI*, *FABP4/NlaIII* และยีน *FASN/HhaI* ในการศึกษาของประชากรนี้พบว่ายังไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ศึกษาหาความสัมพันธ์กับลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากไม่พบความหลากหลายทางพันธุกรรม หรือพบเพียงเล็กน้อย จึงควรมีการพิจารณาตำแหน่งสปีหรือเอนไซม์ตัดจำเพาะอื่น ๆ เพื่อใช้ศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณสาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร ที่สนับสนุนสถานที่ทำงานวิจัย และขอขอบคุณโครงการวิจัยการพัฒนาและยกระดับโคพื้นเมืองภูพาน กองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (กสว.) : งบประมาณด้าน ววน. Full Proposal ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2564 ที่สนับสนุนงบประมาณการวิจัย

Table 2 Numbers and genotype frequencies, allele frequencies, H_O , H_E , uH_E , PIC and chi-square test χ^2 (HWE) of the *IGF-I*, *SCD*, *FABP4* and *FASN* genes in Thai Native Cattle and Brahman

Genes	Breeds ¹	Genotype Frequencies (N)			Allele Frequencies		H_O	H_E	uH_E	PIC	χ^2 (HWE)
		CC	CT	TT	C	T					
<i>IGF-I</i>	TNC	1.000 (109)	0.000 (0)	0.000 (0)	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-
	BR	0.860 (43)	0.140 (7)	0.000 (0)	0.930	0.070	0.140	0.130	0.132	0.122	0.283
<i>SCD</i>	TNC	0.055 (6)	0.339 (37)	0.606 (66)	0.225	0.775	0.339	0.348	0.350	0.288	0.073
	BR	0.080 (4)	0.400 (20)	0.520 (26)	0.280	0.720	0.400	0.403	0.407	0.322	0.003
<i>FABP4</i>	TNC	0.000 (0)	0.000 (0)	1.000 (108)	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-
	BR	0.000 (0)	0.000 (0)	1.000 (50)	0.000	1.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-
<i>FASN</i>	TNC	0.000 (0)	0.009 (1)	0.991 (109)	0.005	0.995	0.009	0.009	0.009	0.009	0.002
	BR	0.000 (0)	0.060 (3)	0.940 (47)	0.030	0.970	0.060	0.058	0.059	0.057	0.048

¹ TNC = Thai native cattle, BR = Brahman cattle N = Number of samples, H_O = Observed Heterozygosity, H_E = Expected Heterozygosity, uH_E = Unbiased Expected Heterozygosity, PIC = Polymorphic information content, χ^2 (HWE) = Hardy-Weinberg equilibrium by the χ^2 -test ($\chi^2_{1;0.05} = 3.841$, $P < 0.05$)

เอกสารอ้างอิง

- สุทธิพงศ์ อริยะพงศ์สรณ์. 2555. การสร้างมูลค่าเพิ่มแก่วัตถุดิบและเนื้อโคพื้นเมืองของไทย. แก่นเกษตร. 40: 60-63.
- Alwiyah, A., H. Naraini, P.P. Agung, and J. Jakaria. 2016. Polymorphism stearoyl-CoA desaturase (SCD) gene and association with characteristics meat in Bali cattle. *Journal of the Indonesian Tropical Animal Agriculture*. 41: 188-195.
- Anggraeni, A., C. Talib, S.A. Asmarasari, T. Herawati, and E. Andreas. 2017. Genetic polymorphisms of IGF1, GH, and OPN genes in crosses Peranakan Ongole cattle based on birth type in Central Java. *Indonesian Journal of Animal and Veterinary Sciences*. 22: 165-172.
- Ardicli, S., H. Samli, D. Dincel, B. Ekiz, H. Yalcintan, B. Vatansever, and F. Balci. 2018. Relationship of the bovine IGF1, TG, DGAT and MYF5 genes to meat colour, tenderness and cooking loss. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*. 69: 1077-1087.
- Ardicli, S., S. Hale, D. Deniz, S. Bahadir, and B. Faruk. 2017. Association of single nucleotide polymorphisms in the FABP4 gene with carcass characteristics and meat quality in Holstein bulls. *Annals of Animal Science*. 17: 117-130.
- Barton, L., D. Bures, T. Kott, and D. Rehak. 2016. Associations of polymorphisms in bovine DGAT1, FABP4, FASN, and PPARGC1A genes with intramuscular fat content and the fatty acid composition of muscle and subcutaneous fat in Fleckvieh bulls. *Meat Science*. 114: 18-23.
- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick, and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*. 32: 314-331.
- Casas, E., S.D. Shackelford, J.W. Keele, M. Koohmaraie, T.P.L. Smith, and R.T. Stone. 2003. Detection of quantitative trait loci for growth and carcass composition in cattle. *Journal of Animal Science*. 81: 2976-2983.
- Curi, R.A., H.N. de Oliveira, A.C. Silveira, and C.R. Lopes. 2005. Association between IGF1, IGF-IR and GHRH gene polymorphisms and growth and carcass traits in beef cattle. *Livestock Production Science*. 94: 159-167.
- Dawood, M., L.M. Kramer, M.I. Shabbir, and J.M. Reecy. 2021. Genome-wide association study for fatty acid composition in American Angus cattle. *Animals*. 11: 2424.
- Duan, X., B. An, L. Du, T. Chang, M. Liang, B.G. Yang, L. Xu, L. Zhang, J. Li, G. E, and H. Gao. 2021. Genome-wide association analysis of growth curve parameters in Chinese Simmental beef cattle. *Animals*. 11: 192.
- Falconer, D.S., and T.F.C. Mackey. 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. 4 th Edition. Pearson Education, New York.
- Fortes, M.R., R.A. Curi, L.A. Chardulo, A.C. Silveira, M.E. Assumpcao, J.A. Visintin, and H.N. de Oliveira. 2009. Bovine gene polymorphisms related to fat deposition and meat tenderness. *Genetic and Molecular Biology*. 32: 75-82.
- Frezarim, G.B., L.F.S. Fonseca, B.M. Salatta, D.B.S. Silva, T. Bresolin, L. Oliveira Seno, A. Barufatti, J.A. Ferro, and L.G. Albuquerque. 2021. Genes and proteins associated with ribeye area and meat tenderness in a commercial Nelore cattle population. *Genome*. 3: 1-12.

- Gui, L.S., Z.Y. Wang, J.L. Jia, C.T. Zhang, Y.Z. Chen, and S.Z. Hou. 2018. IGF-1 gene polymorphisms influence bovine growth traits in Chinese Qinchuan cattle. *Kafkas Universitesi Veteriner Fakultesi Dergisi Journal*. 24: 387-392.
- Hennebry, A., J. Oldham, T. Shavlakadze, M.D. Grounds, P. Sheard, M.L. Fiorotto, S. Falconer, H.K. Smith, C. Berry, F. Jeanplong, J. Bracegirdle, K. Matthews, G. Nicholas, M. Senna-Salerno, T. Watson, and C.D. McMahon. 2017. IGF1 stimulates greater muscle hypertrophy in the absence of myostatin in male mice. *Journal of Endocrinology*. 232: 187-200.
- Islam, K.K., M. Vinsky, R.E. Crews, E. Okine, S.S. Moore, D.H. Jr Crews, and C. Li. 2009. Association analyses of a SNP in the promoter of IGF1 with fat deposition and carcass merit traits in hybrid, Angus and Charolais beef cattle. *Animal genetics*. 40: 766-769.
- Kaneda, M., B.Z. Lin, S. Sasazaki, K. Oyama, and H. Mannen. 2011. Allele Frequencies of gene polymorphisms related to economic trait in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle breeds. *Animal Science Journal*. 82: 717-721.
- Kaplanova, K., A. Dufek, E. Drackova, J. Simeonovova, J. Subrt, I. Vrtkova, and J. Dvorak. 2013. The association of CAPN1, CAST, SCD, and FASN polymorphisms with beef quality traits in commercial crossbred cattle in the Czech Republic. *Czech Journal of Animal Science*. 11: 489-496.
- Li, C., N. Aldai, M. Vinsky, M.E.R. Dugan, and T.A. McAllister. 2011. Association analyses of single nucleotide polymorphisms in bovine stearoyl-CoA desaturase and fatty acid synthase genes with fatty acid composition in commercial cross-bred beef steers. *Animal Genetics*. 43: 93-97.
- Maskur, C. Arman, C. Sumantri, E. Gurnadi, and Muladno. 2012. A Novel Single Nucleotide Polymorphism in Exon 4 of Insulin-Like Growth Factor-1 Associated with Production Traits in Bali Cattle. *Media Peternakan*. 35: 96-101.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*. 89: 583-590.
- Oh, D.Y., Y.S. Lee, and J.S. Yeo. 2011. Identification of the SNP (single nucleotide polymorphism) of the stearoyl-CoA desaturase (SCD) associated with unsaturated fatty acid in Hanwoo. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 24: 757-765.
- Oh, D., Y. Lee, B. La, and J. Yeo. 2012a. Identification of the SNP (single nucleotide polymorphism) for fatty acid composition associated with beef flavor-related FABP4 (fatty acid binding protein 4) in Korean cattle. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 25: 913-20.
- Oh, D., Y. Lee, B. La, J. Yeo, E. Chung, Y. Kim, and C. Lee. 2012 b. Fatty acid composition of beef is associated with exonic nucleotide variants of the gene encoding FASN. *Molecular Biology Reports*. 39: 4083-4090.
- Oh, D.Y., M.H. Jin, Y.S. Lee, J.J. Ha, B.K. Kim, J.S. Yeo, and J.Y. Lee. 2013. Identification of stearoyl-CoA desaturase (SCD) gene interactions in Korean native cattle based on the multifactor-dimensionality reduction method. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*. 26: 1218-1228.
- Oztabak, K., F.E. Gursel, I. Akis, A. Ates, H. Yardibi, and G. Turkey. 2014. FASN Gene Polymorphism in Indigenous Cattle Breeds of Turkey. *Folia Biologica (Krakow)*. 62: 29-35.

- Pecina, M., and A. Ivankovic. 2021. Candidate genes and fatty acids in beef meat, a review. *Italian journal of animal science*. 20: 1716-1729.
- Putra, W.P.B., S.T. Nugraheni, Y. Irnidayanti, and S. Said. 2018. Genotyping in the Insulin-like Growth Factor 1 (IGF1/SnaBI) gene of Pasundan cattle with PCR-RFLP method. *Indonesian Journal of Animal and Veterinary Sciences*. 23: 174-179.
- Reyna, X.F.D.R., H.M., Montoya, V.V. Castrellon, A.M.S. Rincon, M.P. Bracamonte, and W.A. Vera. 2010. Polymorphisms in the IGF1 gene and their effect on growth traits in Mexican beef cattle. *Genetics and Molecular Research*. 9: 875-883.
- Shin, S.C., J.P. Heo, and E.R. Chung. 2012. Genetic variants of the FABP4 gene are associated with marbling scores and meat quality grades in Hanwoo (Korean cattle). *Molecular Biology Reports*. 39: 5323-5330.
- Szewczuk, M. 2016. Association of single nucleotide polymorphisms in genes coding insulin-like growth factor 1 system and milk production traits in Montbeliarde cows. *South African Journal of Animal Science*. 46: 191-195.
- Taniguchi, M., T. Utsugi, K. Oyama, H. Mannen, M. Kobayashi. Y. Tanabe. A. Ogino, and S. Tsuji. 2004. Genotype of stearoyl-CoA desaturase is associated with fatty acid composition in Japanese Black cattle. *Mammalian Genome*. 15: 142-148.
- Tansy, J.T., A.M. Huml, R. Vogt, K.E. Davis, J.M. Jones, K.A. Fraser, D.L. Brasaemle, A.R. Kimmel, and C. Londres. 2003. Functional studies on native and mutated forms of Perilipins. A role in protein kinase A-mediated lipolysis of triacylglycerols in Chinese hamster ovary cells. *Journal of Biological Chemistry*. 278: 8401-8406.
- Wang, Z., B. Zhu, H. Niu, W. Zhang, L. Xu, L. Xu, Y. Chen, L. Zhang, X. Gao, H. Gao, S. Zhang, L. Xu, and J. Li. 2019. Genome wide association study identifies SNPs associated with fatty acid composition in Chinese Wagyu cattle. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 10: 27.
- Wu, X.X., Z.P. Yang, X.K. Shi, J.Y. Li, D.J. Ji, Y.J. Mao, L.L. Chang, and H.J. Gao. 2012. Association of SCD1 and DGAT1 SNPs with the intramuscular fat traits in Chinese Simmental cattle and their distribution in eight Chinese cattle breeds. *Molecular Biology Reports*. 39: 1065–1071.
- Yang, C., Y. Zhu, Y. Ding, Z. Huang, X. Dan, Y. Shi, and X. Kang. 2022. Identifying the key genes and functional enrichment pathways associated with feed efficiency in cattle. *Gene*. 807: 145934.
- Yeon, S.H., S.H. Lee, B.H. Choi, H.J. Lee, G.W. Jang, K.T. Lee, K.H. Kim, J.H. Lee, and H.Y. Chung. 2013. Genetic variation of FASN is associated with fatty acid composition of Hanwoo. *Meat Science*. 94: 133-138.
- Yin, B.Z., J.C. Fang, J.S. Zhang, L.M. Zhang, C. Xu, H.Y. Xu, J. Shao, and G.J. Xia. 2020. Correlations between single nucleotide polymorphisms in FABP4 and meat quality and lipid metabolism gene expression in Yanbian yellow cattle. *PLOS ONE*. 15: e0234328.
- Yoshida, T., and P. Delafontaine. 2020. Mechanisms of IGF-1 Mediated regulation of skeletal muscle hypertrophy and atrophy. *Cells*. 9: 1970.
- Yu, H.W. 2017. SNP detection of FABP3 and FABP4 genes and their correlation analysis with meat quality traits of Qinchuan beef cattle. Shaanxi, Northwest Agricultural and Forestry University.

- Yu, H.W., L.S. Gui, Y. Hu, and L.S. Zan. 2018. Correlation between SNP of FABP3 and FABP4 genes and meat quality traits in Qinchuan beef cattle. *Journal of Northwest Agricultural and Forestry University of Science and Technology (NATURAL SCIENCE EDITION)*. 46: 1-7.
- Yurnalis, Arnim, and E.P. Dino. 2017. Polymorphism of insulin-like growth factor 1 gene (IGF1/TasI, IGF1/SnaBI, IGF1/RsaI) and the association with daily gain of Pesisir cattle local breed from West Sumatera, Indonesia. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 20: 210-216.
- Zalewaska, M., K. Puppel, and T. Sakowski. 2021. Associations between gene polymorphisms and selected meat traits in cattle – A review. *Animal Bioscience*. 34: 1425-1438.
- Zhang, S., T.J. Knight, J.M. Reecy, and D.C. Beitz. 2008. DNA polymorphisms in bovine fatty acid synthase are associated with beef fatty acid composition. *Animal genetics*. 39: 62-70.