รายงานการวิจัย

การประยุกต์ใช้ยีนในไมโตคอนเดรีย (COI และ 12S rRNA) เพื่อการจำแนกสายพันธุ์ของสุกรพื้นเมือง

Application of two mitochondrial genes (COI, 12S rRNA) for identification of native pig breeds

นายอภิชาติ พันชูกลาง

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณกองทุนวิจัย
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558

ชื่องานวิจัย การประยุกต์ใช้ยีนในไมโตคอนเดรีย (COI และ 12S rRNA) เพื่อการจำแนกสายพันธุ์ของสุกรพื้นเมือง
ผู้วิจัย นายอภิชาติ พันชูกลาง
คณะ เทคโนโลยีการเกษตร
ปี 2561

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อเพื่อการจำแนกสายพันธุ์ของสุกรพื้นเมืองในจังหวัดสงขลา โดยใช้ยีนในไมโตคอนเดรีย (COI และ 12S rRNA) ผลที่ได้จากการศึกษาพบว่าลักษณะภายนอกและรูปแบบของดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย (COI และ 12S rRNA) ไม่สามารถแยกสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตามรูปแบบของดีเอ็นเอบาร์โค้ดควรทำการวิเคราะห์ใหม่และเปรียบเทียบผลกับฐานข้อมูล GenBank และ BOLD ใหม่อีกครั้ง

MA2301
6 มี.ค. 2561
636.A22

Research Title Application of two mitochondrial genes (COI, 12S rRNA) for identification of native pig breeds

Researcher Apichart Punchukrang

Faculty Agricultural Technology

Year 2018

Abstract

The objectives of this research were to study the patterns of DNA barcodes (COI gene and 12S rRNA) for identification of native pigs at Songkhla Province. For strain identification, physical appearance and patterns of COI gene and 12S rRNA were found unsuitable. However, the patterns of COI gene and 12S rRNA were sequenced again, and the results confirmed direct sequencing of the GenBank and BOLD database.

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก ดร. ศรัณยา สถิตย์มั่นวิวัฒน์ สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ปรึกษางานวิจัยที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาในการวิจัย

ขอขอบพระคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย ขอขอบคุณบุคลากรและนักศึกษาคณะเทคโนโลยีการเกษตร ที่ให้ความช่วยเหลือในการทดลองทั้งเครื่องมืออุปกรณ์ และวัสดุ รวมทั้งให้การช่วยเหลือในการวิจัย ตลอดจนบุคลากรหน่วยงานสถาบันวิจัยและพัฒนาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการให้คำแนะนำด้านการบริหารจัดการด้านทุนและเอกสารงานวิจัยจนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

นายอภิชาติ พันชูกลาง

มีนาคม 2561

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ก

Abstrac ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญ ..... ค

สารบัญตาราง ..... จ

สารบัญภาพ ..... ฉ

บทที่ 1 บทนำ 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหา 2
วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย 2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2
ขอบเขตการวิจัย 2

บทที่ 2 ทฤษฎี 3

บทที่ 3 การทดลอง 6

บทที่ 4 ผลการทดลอง 9

บทที่ 5 สรุปและวิจารณ์ผล 16

เอกสารอ้างอิง 17

ภาคผนวก 19

ประวัติผู้วิจัย 22

สารบัญตาราง

ตาราง หน้า

1 จำนวนสุกรพื้นเมืองในจังหวัดสงขลา ที่ใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา แยกเป็นรายอำเภอ.....6

2 ลักษณะสี ขนาดใบหน้า ขนาดใบหู ของสุกรพื้นเมืองในจังหวัดสงขลา.....10

3 ลักษณะความยาวลำตัว รอบอก ความสูง และน้ำหนักของสุกรพื้นเมืองในจังหวัดสงขลา..11

4 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank และฐานข้อมูล BOLD...12

5 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank.....13

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1 ไมโตคอนเดรีย (mitochondria).....4
2 สุกรลำตัวส่วนใหญ่สีดำมีสีขาวแซม.....9
3 สุกรลำตัวสีน้ำตาล แผงคอสีดำ.....9
4 สุกรลำตัวส่วนใหญ่สีน้ำตาลมีสีขาวแซม.....9
5 สุกรลำตัวสีดำล้วน.....9

ภาพผนวกที่ 1 แสดงแถบดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณของส่วน COI gene.....19
ภาพผนวกที่ 2 แสดงแถบดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณของส่วน 12S rRNA.....20
ภาพผนวกที่ 3 แสดง Sequencing electropherogram ของสุกรพื้นเมืองตัวอย่างที่ NP.....21

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สุกรพื้นเมืองเป็นสุกรที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทยตามภูมิภาคต่างๆ มาเป็นระยะเวลานาน สุกรพื้นเมืองที่พบในประเทศไทยสามารถจำแนกตามรูปร่างลักษณะประจำพันธุ์ได้ 4 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ราด พันธุ์พวง พันธุ์ไหหลำ และพันธุ์ควาย (Charoensook et al., 2013) ในการจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยลักษณะรูปพรรณสัณฐานภายนอกเป็นเกณฑ์ พบว่ายังเป็นปัญหาที่สำคัญ ในบางครั้งไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ของสุกรไทยพื้นเมืองจากรูปพรรณสัณฐานภายนอกได้อย่างชัดเจน (Rattanaronchart, 1994) ในจังหวัดสงขลามีการเลี้ยงสุกรพื้นเมืองกระจายอยู่ทั่วไปในพื้นที่ 6 อำเภอ ได้แก่ อำเภอเมือง อำเภอคลองหอยโข่ง อำเภอระโนด อำเภอสทิงพระ อำเภอสะบ้าย้อย และอำเภอจะนะ โดยเกษตกรจะเรียกสุกรพื้นเมืองที่เลี้ยงว่า หมูขี้พร้า หรือหมูขี้ไก่ (ควรญ และ มงคล 2547) และจากการสำรวจเบื้องต้นพบว่าสุกรพื้นเมืองที่เลี้ยงในจังหวัดสงขลา ไม่สามารถจำแนกตามลักษณะรูปพรรณสัณฐานภายนอกประจำสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด หรือยีน cytochrome c oxidase I (COI) ที่อยู่บนไมโตคอนเดรีย ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาใช้ในการจำแนกชนิดของสัตว์กลุ่มต่างๆ โดย Hebert et al., (2003) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI มีความแปรผันมากเพียงพอที่จะใช้แยกและระบุชนิดของสัตว์ ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนนี้ด้วยเทคนิค PCR ทำได้ค่อนข้างง่าย เนื่องจากเป็นยีนที่มีขนาดไม่ใหญ่มาก และมีไพรเมอร์ที่เป็น universal primers ซึ่งใช้ได้กับสัตว์หลากหลายกลุ่ม และการทำดีเอ็นเอบาร์โค้ดด้วยยีน COI ในสัตว์ให้ความถูกต้องในการระบุชนิดสูงกว่า 95% (Thomas, 2009) ในสุกรมีรายงานการใช้ยีน COI ระบุชนิดของสุกรป่าและสุกรลูกผสมของประเทศฟิลิปินส์ โดยพบว่ายีน COI สามารถใช้ในการระบุชนิดและแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของสุกรได้ (Bondoc et al , 2013) ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA : rRNA) สามารถพบได้ในไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอในสัตว์ โดยหน่วยย่อยขนาดเล็กมีตำแหน่งอยู่ที่ยีน 12S rRNA ได้มีรายงานว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 12S rRNA สามารถนำมาใช้การจำแนกชนิดของสุกรป่าของอินเดียได้ (Jadav et al , 2014) นอกจากนี้ยังพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI และ 12S rRNA สามารถใช้ในการจำแนกชนิดปลาในแม่น้ำอะเมซอนที่มีชื่อท้องถิ่นเรียกต่างๆ กัน พบว่า ยีนทั้งสองนี้มีประสิทธิภาพสูงในการจำแนกชนิดและทำให้ทราบชื่อวิทยาศาสตร์ของปลาได้ (ดุจฤดี, 2556)

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีความสนใจนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI และ 12S rRNA มาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์ของสุกรพื้นเมืองที่เลี้ยงในจังหวัดสงขลา โดยข้อมูลของยีน COI ที่ได้จะรวบรวมไว้ในฐานข้อมูล BOLD (Barcode of Life Data System; http://www.boldsystems.org) ของสิ่งมีชีวิตทั้งหมดทั่วโลกต่อไป

วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดหรือยีน COI และยีน 12S rRNA ในการระบุสายพันธุ์ของสุกรพื้นเมืองที่เลี้ยงในจังหวัดสงขลา ร่วมกับลักษณะภายนอก

2. เพื่อเป็นข้อมูลในการอนุรักษ์สายพันธุ์ของสุกรพื้นเมือง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

11.1 ได้ข้อมูลของดีเอ็นเอบาร์โค้ดรายงานเข้าสู่ฐานข้อมูล GenBank และฐานข้อมูล BOLD

11.2 ได้ข้อมูลพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองในจังหวัดสงขลา เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการอนุรักษ์สายพันธุ์สัตว์พื้นเมือง

ขอบเขตการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้จำกัดเฉพาะสุกรพื้นเมืองที่เลี้ยงในจังหวัดสงขลา

บทที่ 2
ทฤษฎี

1 พันธุ์สุกรพื้นเมือง

สุกรพื้นเมืองเป็นสุกรที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทยมาเป็นระยะเวลานาน โดยส่วนมากเลี้ยงอยู่ตามหมู่บ้านในชนบท และพวกชาวไทยภูเขาโดย Rattanaronchart (1994) และ Charoensook et al. (2013) ได้แบ่งสุกรพื้นเมืองที่เลี้ยงตามท้องถิ่นต่างๆ ในประเทศตามลักษณะ รูปพรรณสัณฐานภายนอกออกเป็น 4 สายพันธุ์คือ

พันธุ์ไหหลำ พบในภาคกลางและภาคใต้ของประเทศไทยตามลำตัวมีสีดำปน ส่วนท้องจะมีสีขาว ท้องยาน จมูกยาว และแอ่นเล็กน้อย คางย้อย ไหล่กว้าง หลังแอ่น ตะโพกเล็ก มีอัตราการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ดีกว่าสุกรพันธุ์พื้นเมืองทั้งหมด ให้ลูกดก กินเก่ง และทนทานต่อสภาพอากาศ น้ำหนักโตเต็มที่ประมาณ 110-120 กิโลกรัม

พันธุ์ควาย พบมากทางภาคเหนือของประเทศไทยสีคล้ายกับสุกรพันธุ์ไหหลำแต่พันธุ์ควายลำตัวมีสีดำ หูใหญ่ปรกเล็กน้อย หลังแอ่น ท้องยาน เมื่ออายุมากหนังจะหยาบย่นตามอายุ เป็นสุกรที่มีขนาดใหญ่ น้ำหนักโตเต็มที่ประมาณ 125-150 กิโลกรัม

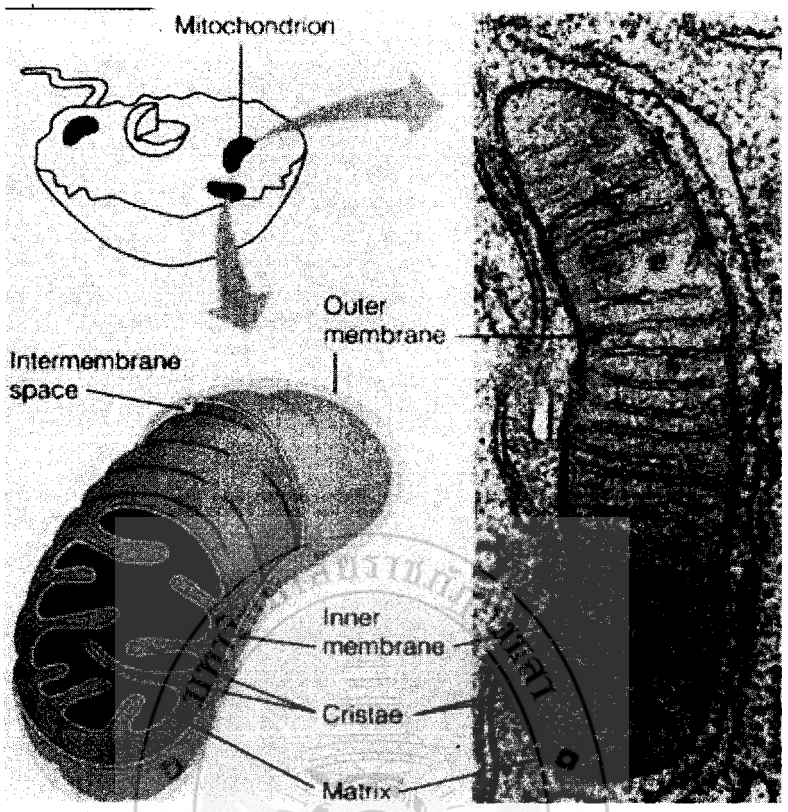
พันธุ์พวง เลี้ยงกันมากตามภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน มีขนสีดำทั้งตัว มีสีขาวปนแซมบ้างเล็กน้อย จมูกยาว ลำตัวขนาดเกือบเท่าพันธุ์ไหหลำ หลังแอ่น ใบหูใหญ่หนา ผิวหนังหยาบ แม่สุกรโตเต็มที่ขนาดประมาณ 80 – 100 กิโลกรัม

พันธุ์ราด เลี้ยงตามภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง โดยจัดเป็นสุกรขนาดเล็ก ลำตัวสั้น มีซี่โครง 8-9 ซี่ หูเล็กตั้ง หน้าเล็กแหลมคล้ายหนู ว่องไว ปราดเปรียว ขุดคุ้ยหากินตามป่าเก่ง น้ำหนักโตเต็มที่ประมาณ 60-80 กิโลกรัม

สุกรพื้นเมืองจัดเป็นพวกสุกรมัน (Lard type) มีอัตราการเจริญเติบโตช้า แต่สามารถปรับตัวได้ดีต่อสภาพภูมิอากาศร้อนชื้น สามารถใช้อาหารคุณภาพต่ำในการเจริญเติบโตได้ดี และมีภูมิต้านทานต่อโรคปากเท้าเปื่อยและพยาธิภายใน (Rattanaronchart, 1994)

2 ดีเอ็นเอไมโตคอนเดรีย (mitochondrial DNA)

ไมโตคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์ที่พบเฉพาะในเซลล์ของยูคาริโอตที่ใช้ออกซิเจนในการหายใจ โดยรูปร่างของไมโตคอนเดรียมีลักษณะเป็นก้อนกลม หรือก้อนรี มีเส้นผ่าศูนย์กลางระหว่าง 0.1-1.0 ไมครอน ความยาวประมาณ 5-10 ไมครอน หรือมากกว่า มีเยื่อหุ้มสองชั้น ซึ่งเป็นชนิดยูนิตเมนเบรน เยื่อชั้นในมีลักษณะเป็นท่อ หรือเยื่อที่ทบพับกันอยู่เรียกว่า cristea ท่อนี้จะยื่นเข้าไปในส่วนของ metrix ซึ่งเป็นของเหลวของสารประกอบหลายชนิด โดยไมโตครอนเดรียพบในยูคารีโอตเกือบทุกชนิด เซลล์แต่ละเซลล์มีไมโตคอนเดรียไม่เท่ากัน โดยทั่วไปพบไมโตรคอนเดรียมากในเซลล์ที่มีอัตราเมตาบอลิซึมสูง เช่น เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เซลล์ต่อม เซลล์ที่กำลังเจริญเติบโต เป็นต้น (ลัดดา, 2547) โดยแสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ไมโตคอนเดรีย (mitochondria) (ปรียานันท์, 2549)

ดีเอ็นเอไมโตคอนเดรียมีรูปร่างเป็นวงแหวนเกลียวคู่เช่นเดียวกับดีเอ็นเอในคอร์โรพลาส แต่ขนาดมีความแปรผันมากในสิ่งมีชีวิตต่างกัน ตั้งแต่ 16 กิโลเบสในไมโตคอนเดรียของมนุษย์ ส่วนในพืชมีมากถึง 200-2,000 กิโลเบสในพืช แต่จำนวนยีนที่พบในไมโตคอนเดรียของพืชและสัตว์ไม่ต่างกัน โดยดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยทั่วไปมีขนาด ประมาณ 16-17 กิโลเบส ขนาดจะแตกต่างกันไปตามแต่ละสปีชีส์ ประกอบด้วย อาร์เอ็นเอถ่ายโอน (transfer RNA, tRNA) 22 ชนิด อาร์เอ็นเอไรโบโซม (ribosomal RNA) 2 ชนิด (12S และ 16S) และยีนควบคุมการสร้างโปรตีน 13 ชนิด (Arnason and Janke, 2002 ; Arnason et al., 2002)

ในสุกรพบว่ามีดีเอ็นเอไมโตคอนเดรียที่มีขนาด 16,613 bp ประกอบด้วย อาร์เอ็นเอถ่ายโอน 22 ชนิด ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ 2 ชนิด (12S และ 16S) และยีนควบคุมการสร้างโปรตีน 13 ชนิด (Lin et al., 1999)

3 ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

ดีเอ็นเอบาร์โค้ด หรือยีน COI ที่อยู่บนไมโตคอนเดรีย ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาใช้ในการจำแนกชนิดของสัตว์กลุ่มต่างๆ โดย Hebert et al. (2003a) เป็นผู้ริเริ่มใช้ยีน COI เพื่อการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต ซึ่งลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI มีความแตกต่างมากพอที่จะแยกสิ่งมีชีวิตต่างชนิดออกจากกันได้อย่างชัดเจน ในขณะที่สิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะมีความแตกต่างกันน้อยมากหรือไม่มีเลย ทำให้มีความนิยมใช้ยีนนี้ในการจำแนกชนิดในสัตว์ ซึ่งดีเอ็นเอบาร์โค้ด คือเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาระบบอนุกรมวิธาน เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์สาย

สั้นๆ ที่อยู่บนไมโตคอนเดรียของเซลล์ ซึ่งเป็นการถ่ายทอดลักษณะภายในชนิดจากแม่สู่รุ่นลูก ทำให้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีเอกลักษณ์เฉพาะของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ และแตกต่างจากสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นๆ การใช้ยีนบนไมโตคอนเดรียมีข้อดีกว่ายีนในนิวเคลียส คือไมโตคอนเดรียมีอัตราการสะสมการกลายพันธุ์ของยีนสูงกว่า และไม่มีอินทรอน (ดุจฤดี, 2556)

Bondoc et al. (2013) ได้ทำการศึกษาดีเอ็นเอบาร์โค้ดหรือยีน COI โดยใช้สุกรในประเทศ ฟิลิปินส์จำนวน 8 ตัว ประกอบด้วย สุกรสายพันธุ์แท้จำนวน 4 ตัว (Duroc, Landrace, Large White, Pietrain) สุกรสายพันธุ์พื้นเมืองของประเทศฟิลิปินส์จำนวน 2 ตัว (Kalinga, Quezon) สุกรลูกผสมสองสายพันธุ์จำนวน 1 ตัว (Landrace x Large White) และสุกรลูกผสมสี่สายพันธุ์จำนวน 1 ตัว (Duroc x Pietrain x Landrace x Large White) โดยพบว่ายีน COI มีประสิทธิภาพในการแยกสายพันธุ์ของสุกรในประเทศฟิลิปินส์จำนวน 8 ตัว ออกจากกันได้

4 ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ

ไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA : rRNA) สามารถพบได้ในจีโนมของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอในสัตว์ โดยหน่วยย่อยขนาดเล็กมีตำแหน่งอยู่ที่ยีน 12S rRNA ในสุกรพบว่ามีขนาด 956 คู่เบส และนอกจากนี้ยังมีหน่วยย่อยขนาดใหญ่อยู่ที่ยีน 16S rRNA ในสุกรพบว่ามีขนาด 1563 คู่เบส (Chen et al., 2011)

การศึกษาแยกชนิดสุกรของประเทศอินเดียด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 12S rRNA โดยใช้ชิ้นเนื้อของสุกรป่าของอินเดียจำนวน 21 ตัวอย่าง และสุกรพื้นเมืองของอินเดียจำนวน 15 ตัวอย่าง จากการตรวจสอบด้วยการใช้เครื่องหมายสนิปส์ (SNPs) ที่อยู่บนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 12S rRNA พบว่าสามารถใช้แยกความแตกต่างของสุกรป่าของอินเดียออกจากสุกรพื้นเมืองได้ (Jadav et al., 2014)

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI และ 12S rRNA สามารถใช้ในการจำแนกชนิดปลาในแม่น้ำอะเมซอนที่มีชื่อท้องถิ่นเรียกต่างๆ กัน พบว่ายีนทั้งสองนี้มีประสิทธิภาพสูงในการจำแนกชนิดและทำให้ทราบชื่อวิทยาศาสตร์ของปลาได้ (ดุจฤดี, 2556)

บทที่ 3

การทดลอง

ตัวอย่างสัตว์ทดลองทำการสำรวจและเก็บข้อมูลของสุกรพื้นเมืองในจังหวัดสงขลาพื้นที่ 5 อำเภอ ได้แก่ อำเภอเมือง จะนะ คลองหอยโข่ง รัตภูมิ และกระแสสินธุ์ จากนั้นทำการศึกษาเทคนิคอณูพันธุศาสตร์ระดับดีเอ็นเอ ณ. ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร ชั้น 6 อาคาร 62 คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

3.1 การศึกษาพันธุกรรมจากลักษณะรูปพรรณสัณฐานภายนอก

ศึกษารูปร่างลักษณะภายนอก ได้แก่ สีผิว สีขน ขนาดใบหู ความยาวหน้า ความกว้างของหน้าความยาวลำตัว ความยาวรอบอก ความสูงที่หัวไหล่ และจำนวนเต้านม พร้อมถ่ายภาพประกอบลักษณะของสุกรพื้นเมือง

3.2 จำนวนตัวอย่างในการศึกษาด้านอณูพันธุศาสตร์ระดับดีเอ็นเอ

เก็บตัวอย่างเลือดสุกรพื้นเมืองจากพื้นที่ 5 อำเภอ ได้แก่ อำเภอเมือง จะนะ คลองหอยโข่ง รัตภูมิ และกระแสสินธุ์ จำนวนตัวอย่างสุกรในแต่ละอำเภอแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนสุกรพื้นเมืองในจังหวัดสงขลา ที่ใช้เป็นตัวอย่างในการศึกษาลักษณะ ทางสัณฐานวิทยา แยกเป็นรายอำเภอ

อำเภอ	จำนวน (ตัว)
เมือง	4
จะนะ	6
คลองหอยโข่ง	3
รัตภูมิ	4
กระแสสินธุ์	3
รวม	**21**

13.3 วิธีการเก็บตัวอย่าง

ถอนขนสุกรพื้นเมืองโดยต้องมีปมรากขนติดมาด้วยอย่างน้อย ตัวอย่างละ 10 เส้น

13.4 การสกัดดีเอ็นเอจากปมรากขน

นำปมรากขนของสุกรที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัด Tissue and Hair Extraction Kit (for use with DNA IQ™) ตามขั้นตอนและกระบวนการในคู่มือการสกัดดีเอ็นเอของชุดสกัด

13.5 การเพิ่มชิ้นส่วนของ DNA ด้วยเทคนิค PCR

นำดีเอ็นที่สกัดได้จากปมรากขนของสุกรพื้นเมือง มาทำการเพิ่มชิ้นส่วนของ DNA ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) ในส่วนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในไมโทคอนเดรีย

บนตำแหน่งยีน COI โดยใช้คู่ Primer และวิธีการตามรายงานของ Hebert et al. (2003b) โดยได้ทำการเพิ่มลำดับดีเอ็นเอของไพรเมอร์ M13 เพื่อความสะดวกในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงทำให้ไพรเมอร์มีลำดับดังนี้

LCO1490 5'-CACGACGTTGTAAAACGACGAATTCGGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'

HCO2198 5'-GGATAACAATTTCACACAGGGAATTCTAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'

ส่วนประกอบของการทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 100 ng/µL DNA template จำนวน 1 ไมโครลิตร, 10 µM dNTP mix จำนวน 400 µM, 25 mM $MgCl_2$ จำนวน 2 mM, ไพรเมอร์ Forward และ Reverse อย่างละ 0.4 ไมโครโมล และ 5 U/µL Taq DNA polymerase จำนวน 0.1 ยูนิต ในปริมาตรรวมสุทธิ 25 ไมโครลิตร โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาตามรายงานของ Hebert et al. (2004) 4 ขั้นตอน ดังนี้ (1) initial denaturation 94 °C เวลา 1 นาที (2) denaturation 94 °C เวลา 1 นาที, annealing 45 °C เวลา 1.5 นาที และ Extention 72 °C เวลา 1.5 นาที จำนวน 5 รอบ (3) denaturation 94 °C เวลา 1 นาที, annealing 50 °C เวลา 1.5 นาที และ extention 72 °C เวลา 1 นาที จำนวน 5 รอบและสุดท้าย (4) final extention 72 °C เวลา 5 นาที ทำการแยกขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR บนเจลอะกาโรส 1% ย้อมด้วย ethidium bromide แล้วตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี จากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit (RBC Bioscience Corp., Taiwan) และตรวจสอบคุณภาพบนเจลอะกาโรส 1%

การเพิ่มชิ้นส่วนของ DNA ในส่วนของยีน 12S rRNA ใช้คู่ Primer และวิธีการตามรายงานของ (Jadav et al., 2014) โดยไพรเมอร์มีลำดับดังนี้

Forward: 5'-CAAACTGGGATTAGATACCCCACTAT-3'

Reverse: 5'- GAGGGTGACGGGCGGTGTGT3'

ส่วนประกอบของการทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 100 ng/µL DNA template จำนวน 1 ไมโครลิตร, 10 µM dNTP mix จำนวน 400 µM, 25 mM $MgCl_2$ จำนวน 2 mM, ไพรเมอร์ Forward และ Reverse อย่างละ 0.4 ไมโครโมล และ 5 U/µL Taq DNA polymerase จำนวน 0.1 ยูนิต ในปริมาตรรวมสุทธิ 25 ไมโครลิตร โดยตั้งอุณหภูมิและเวลาตามรายงานของ Jadav et al. (2014) มีขั้นตอนดังนี้ (1) initial denaturation 95 °C เวลา 20 นาที (2) denaturation 95 °C เวลา 1 นาที, annealing 55 °C เวลา 1 นาที และ extention 72 °C เวลา 1 นาที จำนวน 35 รอบ final extention 72 °C เวลา 10 นาที ทำการแยกขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR บนเจลอะกาโรส 1.5% ย้อมด้วย ethidium bromide แล้วตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวี จากนั้นนาผลผลิต PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extraction kit (RBC Bioscience Corp., Taiwan) และตรวจสอบคุณภาพบนเจลอะกาโรส 1%

13.6 การแยกดีเอ็นเอเป้าหมาย

ดีเอ็นเอเป้าหมายที่ได้จากข้อ 13.5 นำมาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้วิธีการและขั้นตอนของชุดสกัด PCR DNA Fragment Extraction kit

13.7 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing)

นำดีเอ็นเอเป้าหมายที่ถูกทำให้บริสุทธิ์แล้วจากข้อ 13.6 ส่งวิเคราะห์ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing)

13.8 เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

นำผลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing) มาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูลของสุกรที่เก็บรวบรวมไว้จาก Genbank (http://www.ncbi.nlm.hin.gov) ด้วยวิธีการ BLAST (The *Basic Local Alignment Search Tool)*

13.9 วิเคราะห์วิวัฒนาการและสร้างแผนภูมิทางวิวัฒนาการ

ใช้โปรแกรมทางชีวสารสนเทศ MEGA เวอร์ชั่น 6 ทำการวิเคราะห์วิวัฒนาการเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลด้วยวิธีการ Clustal W จากนั้นวิเคราะห์ความหลากหลายโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วย Kimura 2-parameter หรือ K2P model (Kimura, 1980) และวิเคราะห์แผนภูมิทางวิวัฒนาการด้วยวิธีการ Neighbour-Joining (NJ) ที่มีค่า bootstrap 1000

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

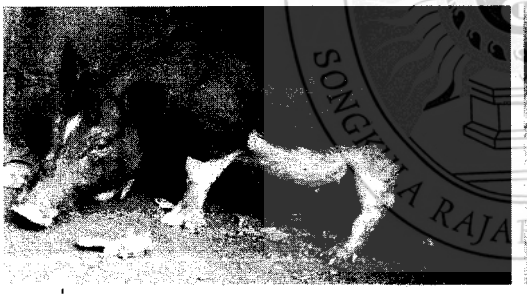
บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การศึกษาพันธุกรรมจากลักษณะรูปพรรณสัณฐานภายนอก

จากตัวอย่างสุกรพื้นเมืองที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา จำนวน 21 ตัว พบว่าสุกรพื้นเมืองในจังหวัดสงขลาส่วนใหญ่จำนวน 9 ตัว คิดเป็น 42.86 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะสีลำตัวส่วนใหญ่สีดำมีสีขาวแซมบริเวณเท้าหรือขา ใต้ท้อง หน้าผาก และพู่หาง จุดขาวแซมนี้อาจมีครบทุกประการดังกล่าวหรือมีเป็นบางประการก็ได้ (ภาพที่1) ลักษณะที่รองลงมาสุกรขนสีน้ำตาล แผงคอสีดำ จำนวน 4 ตัว คิดเป็น 19.04 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่2) สุกรที่มีสีน้ำตาลมีสีขาวแซมบริเวณเท้าหรือขา ใต้ท้อง หน้าผากจำนวน 3 ตัว คิดเป็น 14.28 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่3) สุกรที่ลักษณะสีดำล้วนจำนวน 3 ตัว คิดเป็น 14.29 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่4) และตัวอย่างที่เหลือเป็นส่วนน้อยที่มีลักษณะสีลำตัวน้ำตาลแดงจำนวน 2 ตัว คิดเป็น9.52 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 2)

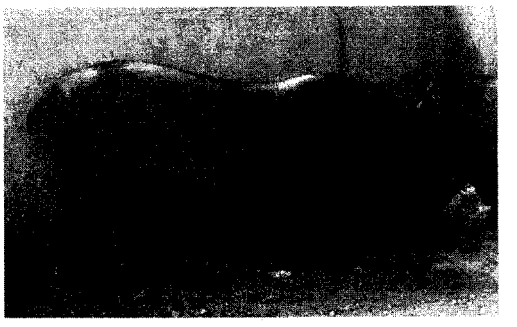
ตัวอย่างสุกรที่พบมีความยาวใบหูอยู่ในช่วง 8 – 22 เซนติเมตร สุกรมีความกว้างใบหูอยู่ในช่วง 8 - 17 เซนติเมตร ความยาวหน้าที่วัดจากปลายจมูกถึงสันกะโหลกอยู่ในช่วง 18 – 35 เซนติเมตร (ตาราง 2) ความยาวลำตัวที่วัดจากสันกะโหลกถึงโคนหางอยู่ในช่วง 55 – 170 เซนติเมตร ความยาวรอบอกอยู่ในช่วง 55 – 137 เซนติเมตร ความสูงที่หัวไหล่อยู่ในช่วง 35 – 68 เซนติเมตร จำนวนเต้านมอยู่ในช่วง10 – 14 เต้า น้ำหนักโดยประมาณอยู่ในช่วง 32 - 175 กิโลกรัม (ตาราง 3)



ภาพที่ 2 สุกรลำตัวส่วนใหญ่สีดำมีสีขาวแซม

ภาพที่ 3 สุกรลำตัวสีน้ำตาล แผงคอสีดำ

ภาพที่ 4 สุกรลำตัวส่วนใหญ่สีน้ำตาลมีสีขาวแซม



ภาพที่ 5 สุกรลำตัวสีดำล้วน

ตารางที่ 2 ลักษณะสี ขนาดใบหน้า ขนาดใบหู ของสุกรพื้นเมืองในจังหวัดสงขลา

อำเภอ	สีลำตัว	ลักษณะท้อง	หน้ายาว (ซม.)	หูยาว (ซม.)	หูกว้าง (ซม.)
เมือง	ดำล้วน (ราดหรือพวง)	ย้อย	28	17	14
	ดำเท้าขาหน้าขาว	ธรรมดา	35	22	17
	ดำ ขนหางสีน้ำตาล	ธรรมดา	18	9	9
	น้ำตาล ขาวข้อเท้า4	ธรรมดา	27	15	16
จะนะ	ดำ ท้องขาวเท้าขาว4ข้าง	ย้อย	19	10	10
	ดำ ท้องขาวเท้าขาว4ข้าง	ย้อย	19	10	8
	ดำ หน้าขาว	ย้อย	21	9	10
	น้ำตาลแดง	ย้อย	24	11	12
	น้ำตาลแดง หน้าดำ	ธรรมดา	24	8	9
	ดำ ล้วน	ธรรมดา	21	8	10
คลองหอยโข่ง	ดำ ขนสีน้ำตาลแดง	ย้อย	25	10	9
	ดำ ขนสีน้ำตาลแดง	ธรรมดา	22	9	8
	ดำ ล้วน	ธรรมดา	27	11	10
	ดำ ล้วน	ธรรมดา	25	9	9
รัตภูมิ	ดำ เท้าขาว 4ข้าง	ธรรมดา	26	12	10
	ดำ ขนน้ำตาล	ธรรมดา	26	13	12
	น้ำตาล ท้องขาว เท้าขาว 4ข้าง	ธรรมดา	23	9	8
	น้ำตาลแดง ท้องขาว เท้าขาว 4ข้าง	ธรรมดา	21	11	9
กระแสสินธุ์	ดำ ท้องขาว	ธรรมดา	22	13	12
	ดำ ท้องขาว	ธรรมดา	22	9	8
	ดำ ท้องขาว เท้าขาว 4ข้าง	ธรรมดา	24	12	11
เฉลี่ยรวม	-	-	23.7	11.4	10.6

ตารางที่ 3 ลักษณะความยาวลำตัว รอบอก ความสูง และน้ำหนักของสุกรพื้นเมืองในจังหวัดสงขลา

อำเภอ	ลำดับที่	ลำตัวยาว (ซม.)	รอบอก (ซม.)	ความสูงหัวไหล่ (ซม.)	จำนวนเต้านม	น้ำหนัก (กก.)
เมือง	NP001	135	121	65	10	131
	NP002	170	137	71	10	175
	NP003	98	101	46	10	87
	NP004	156	125	68	10	141
จะนะ	NP005	55	55	23	12	32
	NP006	62	57	26	10	35
	NP007	69	62	27	12	39
	NP008	90	82	36	12	82
	NP009	66	65	34	12	42
	NP010	63	58	32	12	35
คลองหอยโข่ง	NP011	86	49	44	12	72
	NP012	75	55	38	14	77
	NP013	82	61	41	12	83
	NP014	84	51	40	12	75
รัตภูมิ	NP015	77	70	35	12	48
	NP016	106	90	35	12	70
	NP017	56	56	32	12	36
	NP018	67	59	34	12	36
กระแสสินธุ์	NP019	94	77	40	12	55
	NP020	61	56	35	12	32
	NP021	85	82	39	12	60
เฉลี่ยรวม		87.65	75.90	40.05	10.40	68.40

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

2. การเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ COI gene กับฐานข้อมูล

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ COI gene ผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST จากฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) และจากฐานข้อมูล BOLD (http://www.boldsystems.org)

การเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็นลักษณะของสุกรพื้นเมือง (*Sus scrofa*) ทั้งหมด 21 ตัว โดยมีจำนวน 17 ตัว มีความคล้ายคลึงกับสุกรพันธุ์ Jeuma pig (97%) ส่วนอีกจำนวน 4 ตัว มีความคล้ายคลึงกับสุกรพันธุ์ Guanling (99%)

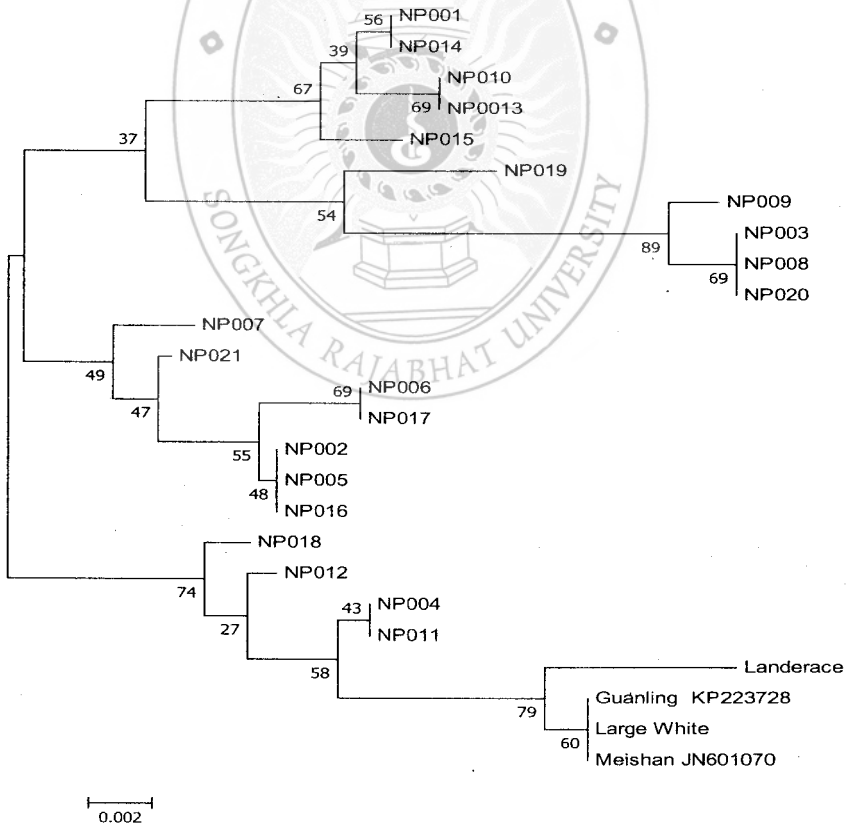
การเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล BOLD พบว่าเป็นลักษณะของสุกรพื้นเมือง (*Sus scrofa*) ทั้งหมด 21 ตัว โดยผลการเปรียบเทียบจากฐานข้อมูลดังกล่าวสามารถทราบถึงเพียงแค่ระดับจีนัสหรือสกุล (Genus) และระดับสปีชีส์หรือชนิด (species) เท่านั้นโดยทางฐานข้อมูลไม่บอกถึงระดับสายพันธุ์เช่นเดียวกับฐานข้อมูล GenBank

ตารางที่ 4 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank และฐานข้อมูล BOLD

หมายเลข	แหล่งที่พบ	สายพันธุ์สุกร	
		GenBank (BLAST)	BOLD
NP001	เมือง	*Sus scrofa* (97%) Jeuma pig	*Sus scrofa* (98.37%)
NP002	เมือง	*Sus scrofa* (97%) Jeuma pig	*Sus scrofa* (97%)
NP003	เมือง	*Sus scrofa* (97%) Jeuma pig	*Sus scrofa* (97.25%)
NP004	เมือง	Sus scrofa (99%) Guanling	*Sus scrofa* (99.25%)
NP005	จะนะ	*Sus scrofa* (97%) Jeuma pig	*Sus scrofa* (97%)
NP006	จะนะ	*Sus scrofa* (97%) Jeuma pig	*Sus scrofa* (97.03%)
NP007	จะนะ	*Sus scrofa* (97%) Jeuma pig	*Sus scrofa* (97.03%)
NP008	จะนะ	*Sus scrofa* (97%) Jeuma pig	*Sus scrofa* (97.23%)
NP009	จะนะ	*Sus scrofa* (97%) Jeuma pig	*Sus scrofa* (97.20%)
NP010	จะนะ	*Sus scrofa* (97%) Jeuma pig	*Sus scrofa* (98.25%)
NP011	คลองหอยโข่ง	Sus scrofa (99%) Guanling	*Sus scrofa* (99.24%)
NP012	คลองหอยโข่ง	Sus scrofa (99%) Guanling	*Sus scrofa* (99.15%)
NP013	คลองหอยโข่ง	*Sus scrofa* (97%) Jeuma pig	*Sus scrofa* (98.20%)
NP014	คลองหอยโข่ง	*Sus scrofa* (97%) Jeuma pig	*Sus scrofa* (98.35%)
NP015	รัตภูมิ	*Sus scrofa* (97%) Jeuma pig	*Sus scrofa* (98%)
NP016	รัตภูมิ	*Sus scrofa* (97%) Jeuma pig	*Sus scrofa* (97%)
NP017	รัตภูมิ	*Sus scrofa* (97%) Jeuma pig	*Sus scrofa* (97.05%)
NP018	รัตภูมิ	Sus scrofa (99%) Guanling	*Sus scrofa* (99.10%)
NP019	กระแสสินธุ์	*Sus scrofa* (97%) Jeuma pig	*Sus scrofa* (97.20%)
NP020	กระแสสินธุ์	*Sus scrofa* (97%) Jeuma pig	*Sus scrofa* (97.24%)
NP021	กระแสสินธุ์	*Sus scrofa* (97%) Jeuma pig	*Sus scrofa* (97.04%)

3. ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของสุกรพันธุ์พื้นเมืองด้วย COI gene

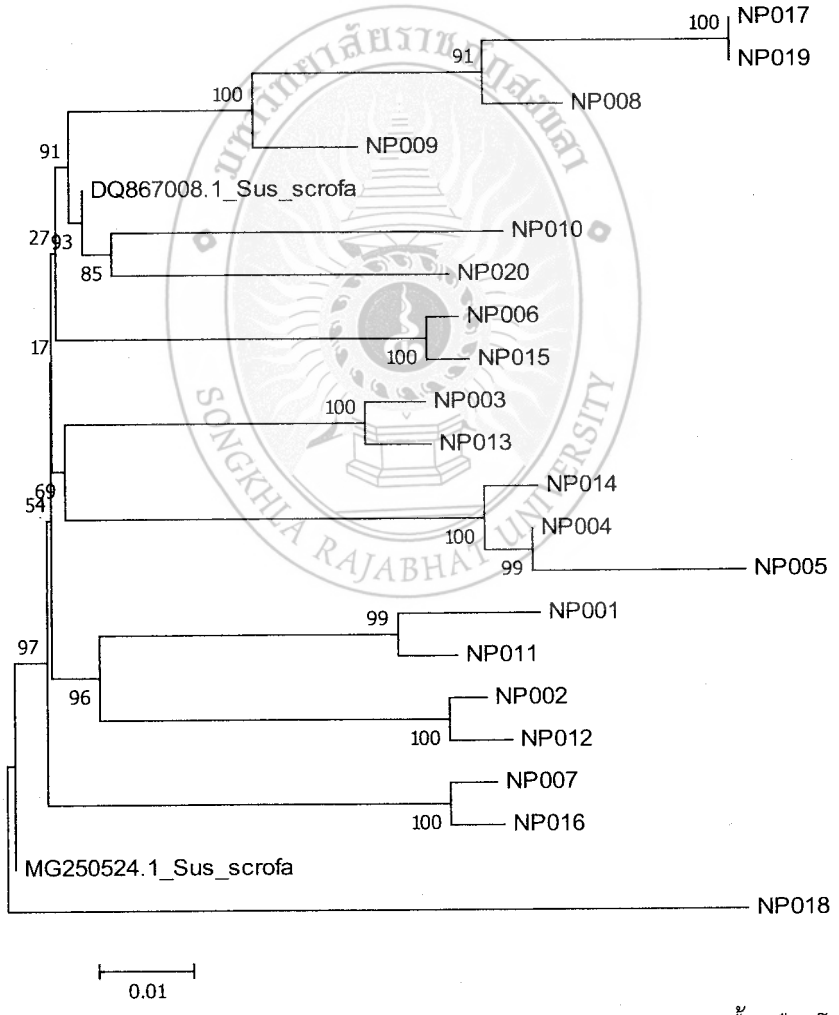
วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสุกรพื้นเมืองกับฐานข้อมูลด้วยโปรแกรม Clustal W วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA 6.0 ใช้วิธีการ Neighbour-Joining (NJ) ที่มีค่า bootstrap จำนวน 1000 รอบ วิเคราะห์ความหลากหลายโดยใช้วิธี Kimura 2-parameter หรือ K2P model (Kimura, 1980) พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของสุกรพื้นเมืองจำนวน 21 ตัวอย่างได้ออกเป็น 4 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 สุกรพื้นเมืองหมายเลข NP001, NP014, NP010, NP013 และ NP015 กลุ่มที่ 2 มีความสัมพันธ์อยู่ในกลุ่มเดียวกันได้แก่สุกรพื้นเมืองหมายเลข NP019, NP009, NP003, NP008 และ NP020 กลุ่มที่ 3 มีความสัมพันธ์อยู่ในกลุ่มเดียวกันได้แก่สุกรพื้นเมืองหมายเลข NP007, NP021, NP006, NP017, NP002, NP05 และ NP016 ในขณะที่สุกรพื้นเมืองหมายเลข NP018, NP012, NP04 และ NP011 จัดอยู่ในสุกรกลุ่มที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมใกล้ชิดกันอยู่ในกลุ่มที่ 4 โดยใช้ข้อมูลเปรียบเทียบเป็นสุกรสายพันธุ์แลนด์เรซที่เลี้ยงในจังหวัดสงขลา (Landerace) สุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ที่เลี้ยงในจังหวัดสงขลา (Large White) และสุกรอ้างอิงจากฐานข้อมูล GenBank ที่ accession number KP223720 (Guanling) และ accession number JN601070 (Meishan) (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองโดยใช้วิธีการ Neighbour-Joining (NJ) ที่มีค่า bootstrap จำนวน 1000 รอบ วิเคราะห์ความ หลากหลายโดยใช้วิธี Kimura 2-parameter หรือ K2P model (Kimura, 1980)

3. ศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของสุกรพันธุ์พื้นเมืองด้วย 12S rRNA

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสุกรพื้นเมืองด้วย 12S rRNA พบว่าสามารถแบ่งกลุ่มของสุกรพื้นเมืองจำนวน 20 ตัวอย่างได้ออกเป็น 5 กลุ่ม โดยกลุ่มที่ 1 สุกรพื้นเมืองหมายเลข NP017, NP019, NP008, NP009, NP010, NP020, NP006 และ NP015 กลุ่มที่ 2 มีความสัมพันธ์อยู่ในกลุ่มเดียวกันได้แก่สุกรพื้นเมืองหมายเลข NP003, NP013, NP014, NP004 และ NP005 กลุ่มที่ 3 มีความสัมพันธ์อยู่ในกลุ่มเดียวกันได้แก่สุกรพื้นเมืองหมายเลข NP001, NP011, NP002 และ NP012 ในขณะที่สุกรพื้นเมืองหมายเลข NP007 และ NP016 และกลุ่มสุดท้ายหมายเลข NP008 โดยใช้ข้อมูลเปรียบเทียบเป็นสุกรอ้างอิงจากฐานข้อมูล GenBank ที่ accession number DQ867001.1 (*Sus scrofa*) และ accession number MG250524.1 (*Sus scrofa*)



ภาพที่ 7 แผนภูมิต้นไม้พันธุกรรมแสดงความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองโดยใช้วิธีการ Neighbour-Joining (NJ) ที่มีค่า bootstrap จำนวน 1000 รอบ วิเคราะห์ความ หลากหลายโดยใช้วิธี Kimura 2-parameter หรือ K2P model (Kimura, 1980)

2. การเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ 12S rRNA กับฐานข้อมูล

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วย 12S rRNA ผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST จากฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) พบว่าเป็นลักษณะของสุกรพื้นเมือง (*Sus scrofa*) ทั้งหมด 20 ตัว โดยมี จำนวน 9 ตัว มีความคล้ายคลึงกับสุกรจากฐานข้อมูล DQ867008.1 จำนวน 6 ตัว มีความคล้ายคลึงกับสุกรจากฐานข้อมูล KJ651274.1 จำนวน 3 ตัว มีความคล้ายคลึงกับสุกรจากฐานข้อมูล MG250524.1 และจำนวน 1 ตัว มีความคล้ายคลึงกับสุกรจากฐานข้อมูล MG009445.1 ในขณะที่หมายเลข NP021 ข้อมูลไม่สมบูรณ์

ตารางที่ 5 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank

หมายเลข	แหล่งที่พบ	ความคล้ายคลึง	
		GenBank (BLAST)	Accession Number
NP001	เมือง	*Sus scrofa* (98%)	MG250524.1
NP002	เมือง	*Sus scrofa* (98%)	MG250524.1
NP003	เมือง	*Sus scrofa* (96%)	DQ867008.1
NP004	เมือง	Sus scrofa (96%)	DQ867008.1
NP005	จะนะ	*Sus scrofa* (96%)	DQ867008.1
NP006	จะนะ	*Sus scrofa* (97%)	DQ867008.1
NP007	จะนะ	*Sus scrofa* (96%)	DQ867008.1
NP008	จะนะ	*Sus scrofa* (95%)	DQ867008.1
NP009	จะนะ	*Sus scrofa* (96%)	DQ867008.1
NP010	จะนะ	*Sus scrofa* (95%)	DQ867008.1
NP011	คลองหอยโข่ง	Sus scrofa (100%)	MG009445.1
NP012	คลองหอยโข่ง	Sus scrofa (96%)	KJ651274.1
NP013	คลองหอยโข่ง	*Sus scrofa* (97%)	KJ651274.1
NP014	คลองหอยโข่ง	*Sus scrofa* (95%)	KJ651274.1
NP015	รัตภูมิ	*Sus scrofa* (97%)	KJ651274.1
NP016	รัตภูมิ	*Sus scrofa* (96%)	KJ651274.1
NP017	รัตภูมิ	*Sus scrofa* (92%)	KJ651274.1
NP018	รัตภูมิ	Sus scrofa (93%)	MG250524.1
NP019	กระแสสินธุ์	*Sus scrofa* (92%)	KJ651274.1
NP020	กระแสสินธุ์	*Sus scrofa* (96%)	DQ867008.1
NP021	กระแสสินธุ์	incomplete	incomplete

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากตัวอย่างสุกรที่ศึกษาจำนวน 21 ตัว พบว่าสุกรทุกตัวมีสีดำเป็นพื้นและอาจมีสีขาวแซมบริเวณพื้นท้อง หน้าผาก ขาเท้า และ ปลายหาง เป็นบางตำแหน่งของร่างกายพบมากที่สุด ลักษณะที่รองลงมาสีลำตัวดำ ขนน้ำตาล ส่วนลักษณะสีน้ำตาลแซมบริเวณพื้นท้อง หน้าผาก เท้า และ ปลายหาง มีจำนวนเท่ากับลักษณะที่มีสีดำล้วน และมีนำตาลแดงพบน้อยมาก ตัวอย่างสุกรที่ศึกษาส่วนมากมีลักษณะหูตั้ง ใบหูกว้างอยู่ใน ช่วง 8 – 17 เซนติเมตร และใบหูยาวอยู่ในช่วง 8 – 22 เซนติเมตร โดยส่วนใหญ่มีความยาวหน้าอยู่ในช่วง 18 – 35 เซนติเมตร มีความสูงที่หัวไหล่อยู่ในช่วง 42 – 68 เซนติเมตร มีความยาวลำตัวอยู่ในช่วง 55 – 170 เซนติเมตร และความยาวรอบอกอยู่ในช่วง 44 – 137 เซนติเมตร สุกรที่ศึกษามีจำนวนเต้านมอยู่ในช่วง 10 – 14 เต้า มีน้ำหนักโดยประมาณอยู่ในช่วง 32 – 175 เซนติเมตร และมีเพศผู้ 1 ตัว เพศเมีย 20 ตัว

การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดหรือยีน COI สามารถนำมาในการจำแนกสุกรพันธุ์พื้นเมืองได้ออกเป็น 4 กลุ่ม ซึ่งพบว่าไม่สอดคล้องกับลักษณะทางภายนอกของสุกรพันธุ์พื้นเมืองที่พบในจังหวัดสงขลา ผลดังกล่าวอาจเกิดจากผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ซึ่งมีความยาวเพียง 450 ถึง 490 คู่เบสเท่านั้น (ภาพผนวกที่ 3) จึงอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนขึ้นได้ อย่างไรก็ตามควรมีการนำผลที่ได้จากการทำ PCR ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อให้มีความยาวที่มากขึ้น จะสามารถช่วยให้ผลที่ได้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ในขณะที่ Bondoc et al. (2013) ได้ใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดหรือยีน COI แยกสายพันธุ์ของสุกรในประเทศฟิลิปินส์จำนวน 8 ตัว ออกจากกันได้

การใช้ 12S rRNA สามารถนำมาในการจำแนกสุกรพันธุ์พื้นเมืองได้ออกเป็น 5 กลุ่ม ซึ่งพบว่าไม่สอดคล้องกับลักษณะทางภายนอกของสุกรพันธุ์พื้นเมือง ซึ่งผลดังกล่าวอาจเกิดจากผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ซึ่งมีความยาวประมาณ 450 คู่เบสเท่านั้น ซึ่งอาจมีความยาวไม่เพียงพอต่อการจำแนกกลุ่มสายพันธุ์ ในขณะที่ยีน 12S rRNA มีความยาวถึงประมาณ 960 คู่เบส จึงอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนขึ้นได้ อย่างไรก็ตามควรมีการนำผลที่ได้จากการใช้ไพรเมอร์ที่ได้ชิ้นส่วนของ PCR เต็มเส้นของยีนดังกล่าวจะสามารถช่วยให้ผลที่ได้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ในขณะที่มีรายงานของ Jadav et al. (2014) ใช้เครื่องหมายสนิปส์ (SNPs) ที่อยู่บนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 12S rRNA พบว่าสามารถใช้แยกความแตกต่างของสุกรป่าของอินเดียออกจากสุกรพื้นเมืองได้

จากการสัมภาษณ์ผู้เลี้ยงสุกรพื้นเมืองพบว่า สุกรพื้นเมืองในจังหวัดสงขลาพบปัญหาการผสมข้ามพันธุ์กันมากขึ้น เช่นผู้เลี้ยงมักนำไปผสมพันธุ์กับสุกรป่าซึ่งพบเป็นจำนวนค่อนข้างมาก และรวมถึงปัญหาการไม่ทราบแหล่งที่มาที่ชัดเจนหรือจำไม่ได้ของสุกรพื้นเมืองที่นำมาเลี้ยง จึงเป็นปัญหาต่อการอนุรักษ์สุกรพันธุ์พื้นเมืองในจังหวัดสงขลาต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

ครวญ บัวคีรี และ มงคล เทพรัตน์, (2547) "การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสุกรพื้นเมืองที่เป็นอาชีพเสริมของเกษตรกรในอำเภอสะบ้าย้อย จังหวัดสงขลา" รายงานการวิจัยและถ่ายทอดเทคโนโลยี: 52 น.

ดุจฤดี ปานพรหมมินทร์, (2556) "ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในปลาและการประยุกต์ใช้". วารสารนเรศวรพะเยา, 6(3), 174-184.

ปรียานันท์ แสนโภชน์, (2549) "เซลล์และองค์ประกอบของเซลล์" http://student.nu.ac.th/nokcy/lesson1.htm.

ลัดดา เอกสมทราเมษฐ์ (2547) "ชีววิทยาของเซลล์" สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ : 225 น.

Arnason, U. and Jank A. (2002). Mitogenomic analyses of eutherian relationship Cytogenet. Genome Research. 96: 20-32.

Arnason, U., Adegoke J.A., Bodin K., Born E.W., Esa Y.B., Gullberg A., Nilson M., Short R.V., Xu X.F. and Jank A. (2002). Mammalian mitogenomic relationship and the Root of the eutherian tree. Proceedind of the National Academy of Science of the United Stage of America. 99: 8151-8156.

Bondoc, O.L., Michael, J., Dominguez, D. and Peñalba, F.F. (2013). DNA barcoeing of dometic swine breeds and crossbreeds (*Sus scrofa*) in the Philippines. Philipp J Vet Anim Sci. 39 (1): 31-42.

Charoensook, R., Knorr, C., Brenig, B. and Gatphayak, K. (2013). Thai pigs and cattle production, genetic diversity of livestock and strategies for preserving animal genetic resources. Maejo Internationalof Science and Technology.7(01): 113-132.

Chen, C.H., Huang, H.L., Yang, H.Y., Lai, S.H., Yen, N.T., Wu, M.C. and Huang, M.C. (2013). Mitochondrial genome of Taiwan pig *(Sus Scrofa).* African Journal of Biotechnology. 10(13): 2556-2561.

Herbert, P.D.N., Ratnasingham, S. and deWaard, J.R. (2003a). Barcoding animal life: cytochrome coxidase subunit 1 divergences among closely related species. Proceedings of the Royal Society B 270: 96-99.

Hebert, P.D.N., Cywinska, A., Ball, S.L. and DeWaard, J.R. (2003b). Biological identifications through DNA barcodes. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 270: 313-321.

Jadav, K., Rajput, N., Shrivastav, A.B., Mandal, S. and Shrivastav, G. (2014) Application of 12S rRNA gene sequence for identification of Indian wild pig *(Sus scrofa cristatus).* Journal of Meat Science and Technology. 2(4): 79-84.

Kimura, M. (1980). A simple method for estimating evolutionary rate of base substitution through comparative studies of nucleotide sequence. Journal of Molecular Evolution. 16: 111-120.

Lin, C.S., Sun, Y.L., Liu, C.Y. Yang, P.C., Chang, L.C., Cheng, I.C. Mao, S.J. and Huang, M.C. (1999). Complete nucleotide sequence of pig (Sus scrofa) mitochondrial genome and dating evolutionary divergence within Artiodactyla. Gene. 236: 107-114.

Rattanaronchart, S. 1994. Present situation of Thai native pigs. Department of Animal Science, Chaing Mai University, Thailand. 23p.

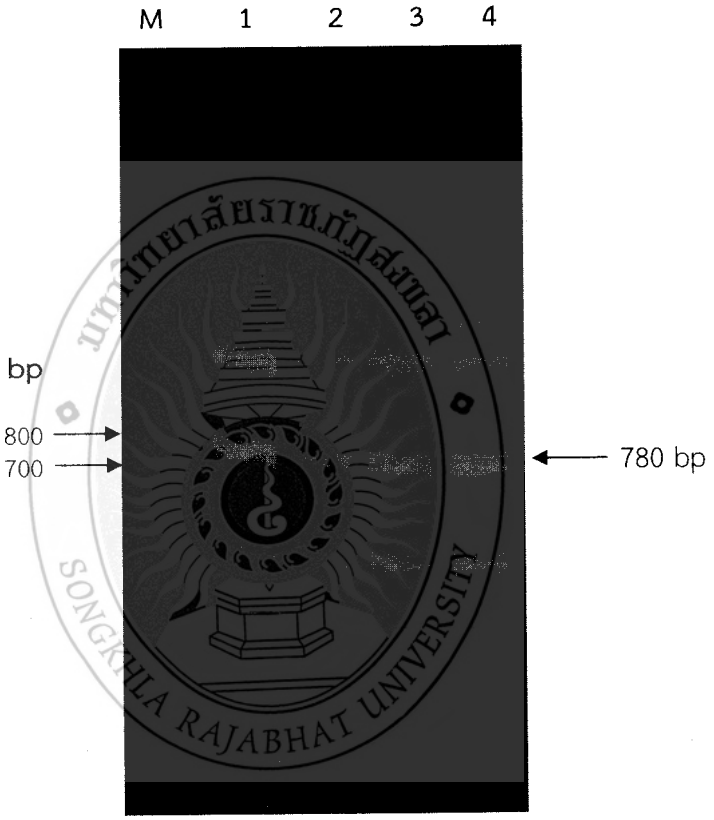
Thomas, C. (2009). Plant barcode soon to become reality. Science. 325: 526.

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ภาคผนวก

1. การเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ส่วนของตำแหน่งยีน COI

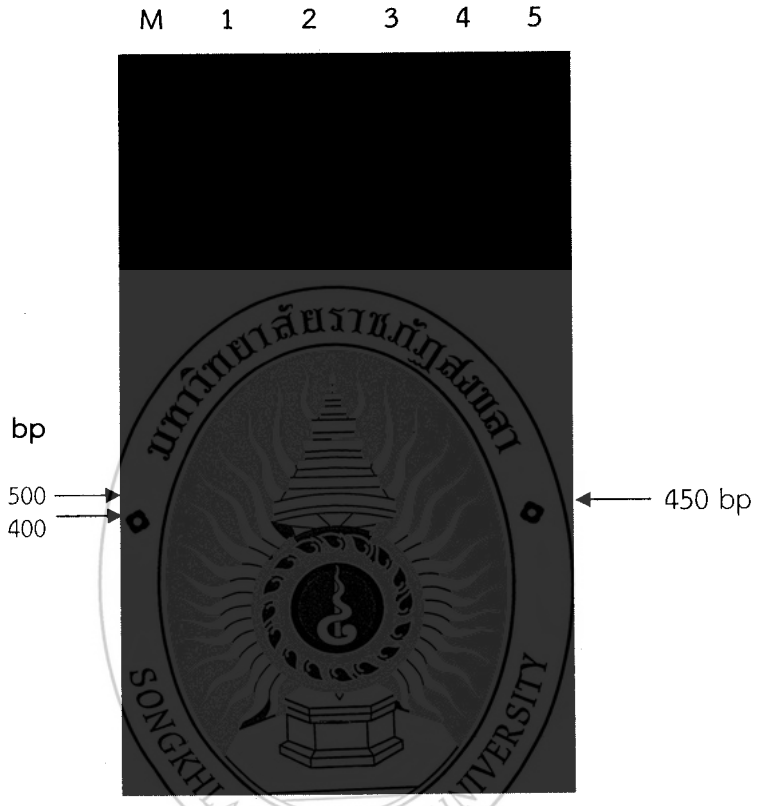
การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ในตำแหน่งจำเพาะบริเวณยีน COI โดยใช้คู่ไพรเมอร์ LCO1490F และ HCO2198 (Hebert et al. 2004) สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้โดยมีความยาวประมาณ 780 คู่เบส (ภาพผนวกที่ 1)



ภาพผนวกที่ 1 แสดงแถบดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณของส่วน COI gene แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟริซิส บน 1% agarose ใน TBE buffer เป็นเวลา 60 นาที ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ โดยที่ M เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด100bp หมายเลขที่ และหมายเลข 1-4 ดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากการทำเทคนิคพีซีอาร์จากสุกรพื้นเมืองตัวที่ 1-4 ตามลำดับ

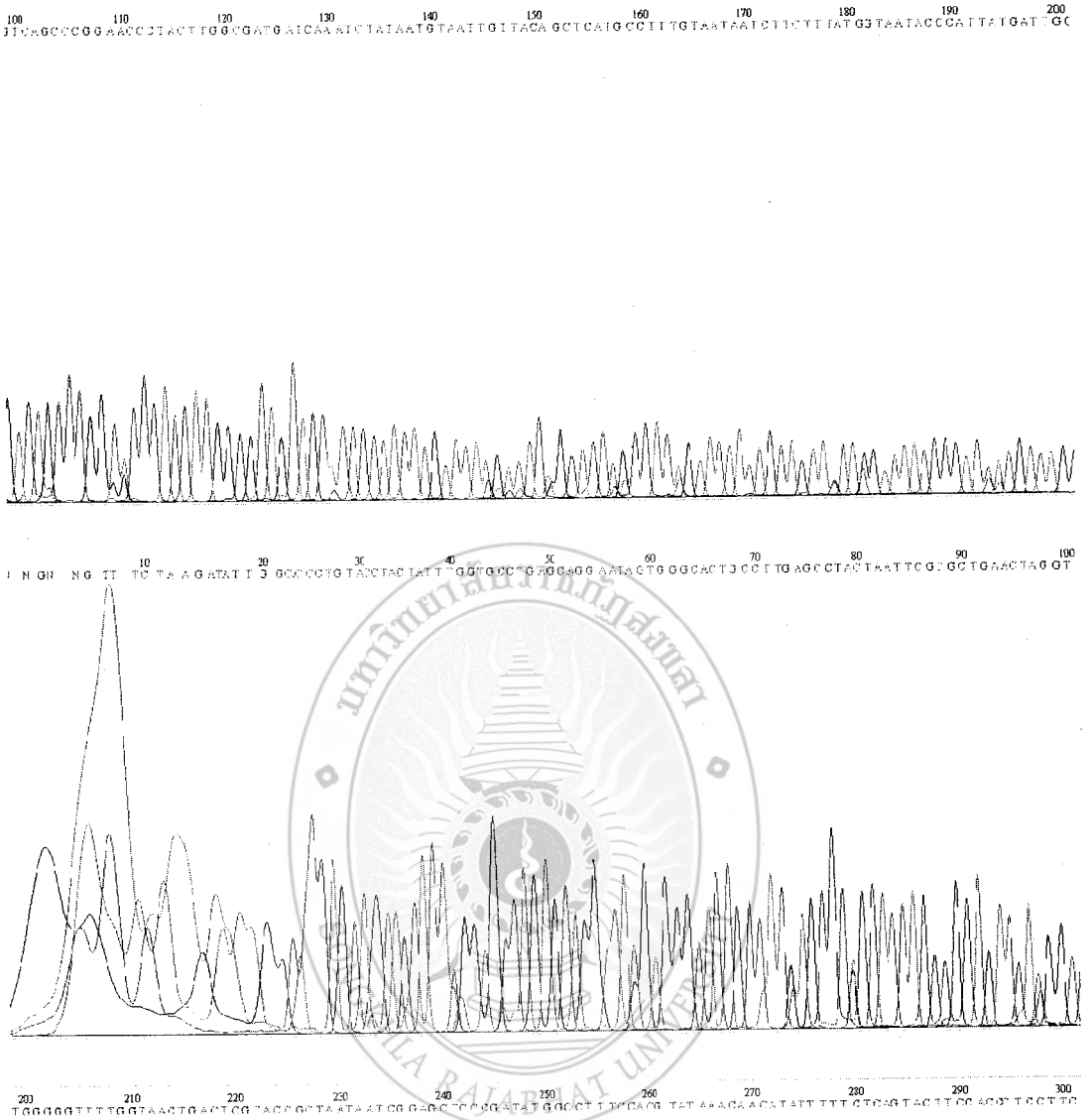
2. ผลการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ส่วนของตำแหน่งยีน 12S rRNA

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ในตำแหน่งจำเพาะบริเวณยีน 12S rRNA โดยใช้คู่ Primer และวิธีการตามรายงานของ Jadav et al. (2014) สามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้ โดยมีความยาวประมาณ 450 คู่เบส (ภาพผนวกที่ 2)



ภาพผนวกที่ 2 แสดงแถบดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากการเพิ่มปริมาณของส่วน 12S rRNA แล้วนำมาตรวจสอบด้วยวิธีเจลอิเล็คโตรโฟริซิส บน 1% agarose ใน TBE buffer เป็นเวลา 60 นาที ที่ความต่างศักย์ 100 โวลต์ โดยที่ M เป็นแถบดีเอ็นเอมาตรฐานขนาด 100 bp plus และหมายเลข 1-5 ดีเอ็นเอผลผลิตที่ได้จากการทำเทคนิคพีซีอาร์

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY



ภาพผนวกที่ 3 แสดง Sequencing electropherogram ของสุกรพื้นเมืองตัวอย่างที่ NP001

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

1. **ชื่อ-สกุล** : นายอภิชาติ พันชูกลาง
   : Mr.Apichart Punchukrang
2. **เลขบัตรประจำตัวประชาชน** : 3 7001 00186 41 4
3. **ตำแหน่งปัจจุบัน** : อาจารย์ (พนักงานมหาวิทยาลัย)
4. **หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก**
   : โปรแกรมวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ตำบลเขารูปช้าง อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา 90000
   E-mail; punchukrang@gmail.com

5. **ประวัติการศึกษา**

ปีที่สำเร็จการศึกษา	คุณวุฒิ	มหาวิทยาลัย
2551	วท.ม. เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหาร ลาดกระบัง
2547	วท.บ. สัตวศาสตร์ (เกียรตินิยมอันดับ 2)	สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตพระนครศรีอยุธยา หันตรา

6. **สาขาวิชาการที่เชี่ยวชาญ** : Molecular genetics, Bioinformatic
7. **ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัย**

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย

-

7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย

- การศึกษาเบื้องต้นของดีเอ็นเอบาร์โค้ดจากสุกรพื้นเมืองในจังหวัดสงขลา

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

Punchukrang, A. and C. Leelayuwat. (2552) Database analysis of MIC-E (PERB11.5), a ligand to NKG2D: Indication of a nucleotide deletion leading to a frame shift mutation and pseudogene. งานประชุมเนื่องในโอกาสการสถาปนาครบรอบ 30 ปี คณะเทคนิคการแพทย์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

Punchukrang, A., T. Thongaram, L. Eurwilaichitr and K. Srikijkasemwat. (2008). Genetic Diversity of Bacterial Population in Bovine Rumen. The 13th Animal Science Congress of the Asian - Australasian Association of Animal Production Societies. Hanoi-Vietnam September 22- 26, 2008.

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

Chanathip Thammakarn, Apichart Punchukrang, Kanya Jirajaroenrat and Kanokrat Srikijkasemwat. Sex Identification of Some Psittacine Birds by Polymerase Chain Reaction. Journal of Mahanakorn Veterinary Medicine . Vol 2. No 2. July – December 2007 (p. 30-34)

ปรีชา รอดอิ่ม, วาสนา มานิช, สุนันท์ กลิ่นประทุม, อภิชาติ พันชูกลาง และพรรณปพร กองแก้ว. คุณภาพของ ต้นข้าวโพดฝักอ่อนหมักและการยอมรับของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมชุมชนหุบมะกล่ำ. “รวมบทความวิจัย” การประชุมเสนอผลงานวิจัยของเครือข่ายบริหารการวิจัยภาคกลางตอนล่างประจำปี พ.ศ. 2551. หน้า 139-144.

7.4 งานวิจัยที่กำลังทำ

636.A22
ป16ก

5 ม.ค. 2561