การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมือง ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b

นางสาวนิชนันท์ ชูเกิด

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2549

A STUDY ON GENETIC DIVERSITY OF INDIGENOUS PIGS IN NORTHEAST THAILAND BY ANALYSING CYTOCHROME B BASE SEQUENCES

Nitchanan Chukerd

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the

Degree of Master of Science in Animal Production Technology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2006

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยการเปรียบเทียบลำดับเบสในส่วนยีน cytochrome b

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

_____

(ผศ. ดร.ปราโมทย์ แพงคำ)
ประธานกรรมการ

_____

(รศ. ดร.พงษ์ชาญ ณ ลำปาง)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

_____

(อ. ดร.สุรินทร บุญอนันธนสาร)
กรรมการ

_____

(อ. น.สพ. ดร.ภคนิจ คุปพิทยานันท์)
กรรมการ

_____

(รศ. ดร.เสาวณีย์ รัตนพานี)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

_____

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

นิชนันท์ ชูเกิด : การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสในส่วนยีน cytochrome b (A STUDY ON GENETIC DIVERSITY OF INDIGENOUS PIGS IN NORTHEAST THAILAND BY ANALYSING CYTOCHROME B BASE SEQUENCES) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. พงษ์ชาญ ณ ลำปาง, 85 หน้า.

วัตถุประสงค์หลักของการศึกษาในครั้งนี้ คือ เพื่อหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยใช้ความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b ของสุกรพื้นเมือง จากจังหวัดเลย สกลนคร นครพนม มุกดาหาร ศรีษะเกษ และสุรินทร์ และนำข้อมูลมาศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยการสร้าง phylogenetic tree ของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเปรียบเทียบกับสุกรพันธุ์ลาร์ไวท์ ดูรอค เหมยซาน และ แลนด์เรซ และศึกษาตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ในส่วนของยีน cytochrome b ที่จะสามารถนำไปเป็นข้อมูลในการใช้เทคนิค PCR-RFLP ได้

ผลการวิจัยพบว่าตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น สามารถนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b ได้ไม่แตกต่างจากตัวอย่างปมรากขนจำนวน 200 เส้น และตัวอย่างเลือดจากใบหู ทั้งยังเป็นตัวอย่างที่สามารถเก็บได้ง่ายกว่าการเจาะเลือดจากใบหู การเก็บตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 96 ชั่วโมง นำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b ได้ ลักษณะภายนอกของสุกรพื้นเมืองไม่สามรถจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้ แต่การใช้ความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b สามารถแบ่งสุกรพื้นเมืองออกเป็น 9 haplotype จากความแตกต่างของลำดับเบส 43 ตำแหน่ง สุกรพื้นเมืองทั้ง 9 haplotype มีความสัมพันธ์กันกับสุกรพันธุ์ลาร์ไวท์ ดูรอค เหมยซาน และแลนด์เรซ และพบตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ในส่วนของยีน cytochrome b สามารถแยก haplotype H1, H5, H6, H7, H8 และ H9 แต่ไม่พบเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถแยก H2, H3 และ H4 ออกจากกันได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2549 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

CHUKERD NITCHANAN : A STUDY ON GENETIC DIVERSITY OF INDIGENOUS PIGS IN NORTHEAST THAILAND BY ANALYSING CYTOCHROME B BASE SEQUENCES. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. PONGCHAN NA LAMPANG, Ph.D. 85 PP.

GENETIC DIVERSITY/INDIGENOUS PIGS/CYTOCHROME B

The aim of this study was to find genetic diversity of indigenous pigs in northeast Thailand, i.e. Loei, Sakon Nakhon, Nakhon Phanom, Mukdahan, Si Saket and Surin provinces, by analyzing cytochrome b base sequences and used the data to construct a phylogenetic tree of indigenous and Large White, Duroc, Meishan and Landrace pigs. In addition, recognition sites of restriction enzyme on cytochrome b base sequences for PCR-RFLP method were also studied.

This study found that 100 hair root samples were suitable for DNA extraction and polymerase chain reaction analysis of cytochrome b gene in mtDNA, same as 200 hair root samples and blood samples. One-hundred hair root samples kept for 96 hr at room temperature were still suitable for DNA extraction and polymerase chain reaction analysis of cytochrome b gene in mtDNA. The morphology alone was unable to identify genetic diversity of indigenous pigs in the northeast. However, nucleotide sequences of mtDNA cytochrome b gene were able to be used for determining the genetic diversity into 9 haplotypes from 43 variable positions. It was found that Large White, Duroc, Meishan and Landrace pigs had genetic relationship with indigenous pigs in northeast Thailand. Recognition site of restriction enzyme on cytochrome b

was found to be able to be used for separating H1, H5, H6, H7, H8 and H9 haplotypes, but not H2, H3 and H4 haplotypes.

School of Animal Production Technology Student's Signature_____

Academic Year 2006 Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ชาญ ณ ลำปาง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ทั้งในด้านวิชาการ และด้านการดำเนินการทดลองที่มีค่ายิ่งต่อวิทยานิพนธ์และการทำงานของข้าพเจ้า

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.สุรินทร บุญอนันธนสาร อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์และมีค่าต่อวิทยานิพนธ์และการทำงานของข้าพเจ้า ตลอดจนกรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการเขียนและตรวจแก้วิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ภคนิจ คุปพิยานันท์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปราโมทย์ แพงคำ และอาจารย์ ดร.สมร พรชื่นชูวงศ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการเขียนและตรวจแก้วิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณพี่บุคลากรประจำอาคารศูนย์เครื่องมือ 3 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความช่วยเหลือในการใช้อุปกรณ์ และเครื่องมือต่างๆ ในการทำวิจัย ขอขอบคุณ เพื่อนๆ และน้องๆ สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัย โดยเฉพาะนางสาวคีญาภัทร์ กองร้อย นางสาวณัฐนิตย์ ป่วนปาน นางสาว กาญจนา ปัญญาไว นางสาวจีราพร บัวชู นายจักรพันธ์ ชาสมบัติ นายไพบูลย์ แดงท่าขาม นายภาคภูมิ เสาวภาคย์ และ เพื่อนและน้องที่คอยรับฟังปัญหา และเป็นกำลังที่ดีเสมอมา

ท้ายสุดนี้ใคร่ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และน้องชาย ที่ให้ความรักความปรารถนาดี คอยห่วงใย เป็นกำลังใจ อีกทั้งยังเป็นที่ปรึกษาและเป็นแรงผลักดันที่สำคัญให้มีความตั้งใจและความอดทนในการทำงาน จนสำเร็จลุล่วงมาด้วยดี

นิชนันท์ ชูเกิด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....ก

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....ข

กิตติกรรมประกาศ.....ง

สารบัญ.....จ

สารบัญตาราง.....ญ

สารบัญภาพ.....ฏ

บทที่

1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย.....2

1.3 สมมุติฐานงานวิจัย.....2

1.4 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย.....2

1.5 ขอบเขตการวิจัย.....3

1.6 ประโยชน์ที่ได้รับจากงานวิจัย.....3

1.7 สถานที่ทำการทดลอง.....3

1.8 ระยะเวลาทำการทดลอง.....3

2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 บทนำ.....4

2.2 พันธุ์สุกรพื้นเมือง.....4

2.2.1 สุกรพันธุ์ไหหลำ.....4

2.2.2 สุกรพันธุ์ควาย.....4

2.2.3 สุกรพันธุ์ราด หรือ พันธุ์พวง.....4

2.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ผ่านมา.....6

2.4 ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย.....7

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมและจำแนกสายพันธุ์สุกร
โดยการวิเคราะห์ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย....12
3 วิธีดำเนินงานวิจัย....18
3.1 การศึกษาตัวอย่างที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ PCR
โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b....18
3.1.1 การศึกษา....18
3.1.2 การเก็บตัวอย่าง....18
3.1.3 การสกัดดีเอ็นเอ....19
3.1.4 การตรวจวัดปริมาณของดีเอ็นเอ....21
3.1.5 การเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอ....21
3.1.6 การออกแบบไพรเมอร์ (Primer)....22
3.1.7 การทำ PCR....22
3.1.8 การตรวจชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ....23
3.1.9 การวิเคราะห์ผลการตรวจชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ....24
3.2 การศึกษาระยะเวลาที่นานที่สุดในการเก็บตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น
ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) นำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ PCR
โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b....24
3.2.1 การศึกษา....24
3.2.2 การเก็บตัวอย่าง....25
3.2.3 การสกัดดีเอ็นเอ....25
3.2.4 การตรวจวัดปริมาณของดีเอ็นเอ....26
3.2.5 การเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอ....26
3.2.6 การทำ PCR....26
3.2.7 การตรวจชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ....27
3.2.8 การวิเคราะห์ผลการตรวจชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ....28
3.3 การศึกษาลักษณะภายนอกของสุกรพื้นเมือง และความหลากหลายทางพันธุกรรม
ของสุกรพื้นเมือง โดยใช้ความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของยีนcytochrome b..28
3.3.1 การศึกษา....28

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.2 การเก็บตัวอย่าง....28
3.3.3 การสกัดดีเอ็นเอ....29
3.3.4 การตรวจวัดปริมาณของดีเอ็นเอ....30
3.3.5 การเจือจางความเข้มข้นของดีเอ็นเอ....30
3.3.6 การทำ PCR....30
3.3.7 การตรวจชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ....32
3.3.8 การวิเคราะห์ลำดับเบสส่วนของยีน cytochrome b ในแต่ละตัวอย่าง....32
3.3.9 วิเคราะห์ข้อมูล....32
3.4 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยการสร้าง Phylogenetic tree ของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเปรียบเทียบกับสุกรพันธุ์ลาร์ไวท์ ดูรอค เหมยซาน และ แลนด์เรซ....33
3.4.1 การศึกษา....33
3.5 การศึกษาตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) จากลำดับเบสส่วนของยีน cytochrome bในแต่ละ haplotype....33
3.5.1 การศึกษา....33
3.5.2 การหาตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)....33
3.5.3 วิเคราะห์ข้อมูล....33
4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล....34
4.1 ตัวอย่างที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีนcytochrome b....34
4.1.1 ดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่าง....34
4.1.2 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ (PCR product)....35
4.2 การศึกษาระยะเวลาที่นานที่สุดในการเก็บตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) นำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b....38
4.2.1 ดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่าง....37
4.2.2 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ....39

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3 การศึกษาลักษณะภายนอกของสุกรพื้นเมือง และความหลากหลายทางพันธุกรรม ของสุกรพื้นเมือง โดยใช้ความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของยีนcytochrome b..42
4.3.1 เปรียบเทียบลักษณะภายนอกของสุกรพื้นเมือง.....45
4.3.2 ดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่าง.....49
4.3.3 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ.....51
4.3.4 ลำดับเบสส่วนของยีน cytochrome b ในแต่ละตัวอย่าง.....52
4.3.5 จัดกลุ่ม haplotype จากความแตกต่างของลำดับเบสยีน cytochrome b.....59
4.4 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยการสร้าง Phylogenetic tree ของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเปรียบเทียบกับสุกรพันธุ์ลาร์ไวท์ ดูรอค เหมยซาน และ แลนด์เรซ.....63
4.5 การศึกษาตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) จากลำดับเบสส่วนของยีน cytochrome bในแต่ละ haplotype.....67
5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....69
5.1 สรุปผลการทดลอง.....69
5.1.1 ตัวอย่างที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b.....69
5.1.2 การศึกษาระยะเวลาที่นานที่สุดในการเก็บตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียย) นำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b.....69
5.1.3 การศึกษาลักษณะภายนอกของสุกรพื้นเมือง และความหลากหลายทาง พันธุกรรมของสุกรพื้นเมือง โดยใช้ความแตกต่างของลำดับเบสใน ส่วนของยีน cytochrome b.....69
5.1.4 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยการสร้าง Phylogenetic tree ของสุกร พื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเปรียบเทียบกับสุกรพันธุ์ ลาร์ไวท์ ดูรอค เหมยซาน และแลนด์เรซ.....70
5.1.5 การศึกษาตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) จากลำดับเบสส่วนของยีน cytochrome b ในแต่ละ haplotype.....70

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.2 ข้อเสนอแนะ....70
5.3 การประยุกต์ใช้จากผลการวิจัย....70
รายการอ้างอิง....71
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก....74
ภาคผนวก ข....81
ประวัติผู้เขียน....85

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ลักษะณะบางประการเปรียบเทียบระหว่างสุกรพันธุ์ยุโรป และพันธุ์พื้นเมือง.....6

2.2 ขนาดของดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิด.....10

2.3 ส่วนประกอบของดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียสุกร.....10

2.4 Haplotype ที่ต่างกัน 19 haplotype (I-XIX) ที่แบ่งได้จากลำดับเบสในส่วนยีน cytochrome b ของ East Asian domestic pig, Japanese wild boar, Ryukyu wild boar, European wild boar และ European domestic.....14

2.5 Haplotype ที่ต่างกัน 29 haplotype ที่แบ่งได้จากลำดับเบสในส่วนยีน cytochrome b และ D-loop ของ Iberian pigs, Spanish wild boars และ domestic pigs.....17

4.1 ความเข้มขนของดีเอ็นเอจากตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอ และตัวอย่างเลือด จากใบหู ของสุกรพื้นเมือง.....36

4.2 ความเข้มขนของดีเอ็นเอจากตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอจำนวน 100 เส้นของสุกร พื้นเมืองที่นำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ที่ระยะเวลาต่างๆ.....40

4.3 ข้อมูลการเก็บตัวอย่างสุกรพื้นเมืองในแต่ละพื้นที่.....43

4.4 ตัวอย่างที่ถูกเลือกมาทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ความแตกต่างของ ลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b.....44

4.5 ความเข้มขนของดีเอ็นเอจากตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอจำนวน 100 เส้นของสุกร พื้นเมืองที่ถูกเลือกมาทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม.....51

4.6 การจัดกลุ่ม Haplotype ของตัวอย่างสุกรพื้นเมือง.....59

4.7 ตำแหน่งลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b ที่แตกต่างกัน 43 ตำแหน่งในแต่ละ Haplotype….....60

4.8 ข้อมูลการเรียงลำดับเบสจาก GenBank.....63

4.9 ตำแหน่งลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b ที่แตกต่างกัน 65 ตำแหน่ง.....64

4.10 ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถแยกแต่ละ Haplotype….....68

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่ **หน้า**

ภาคผนวก ข.....81
1 ข. ลักษณะภายนอกของสุกรพื้นเมืองแยกตามจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง.....82

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 Phylogenetic tree ของสุกรพื้นเมือง 3 แหล่ง.....7

2.2 ไมโตคอนเดรีย (mitocondria) (ปรียานันท์, 2549).....8

2.3 ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย (mitochondria DNA) (ปรียานันท์, 2549).....9

2.4 แผนผังไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Arnason และ Janke , 2002)....9

2.5 Phylogenetic tree ของ combined mtDNA sequences 27 แบบ (ตัวเลขอาบิค) และความหลากหลายของดีเอ็นเอในส่วนของยีน cytochrome b ของไมโตคอนเดรีย (ตัวเลขโรมัน).....13

2.6 Phylogenetic tree ของ 29 Haplotypes ของความหลากหลายของดีเอ็นเอในส่วนของยีน cytochrome b และ D-loop (Alves และคณะ, 2003).....16

4.1 ลักษณะดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอ และตัวอย่างเลือดจากใบหูของสุกรพื้นเมือง.....35

4.2 ลักษณะชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b.....37

4.3 ลักษณะดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอจำนวน 100 เส้น ของสุกรพื้นเมืองที่ นำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ที่ระยะเวลาต่างๆ.....39

4.4 ลักษณะชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b.....41

4.5 สุกรพื้นเมืองรูปแบบที่ 1 มีลักษณะสีดำทั้งตัว ใบหูใหญ่ตั้ง หน้ายาว.....46

4.6 สุกรพื้นเมืองรูปแบบที่ 2 มีลักษณะสีดำทั้งตัว ใบหูใหญ่ตั้ง หน้ายาว.....46

4.7 สุกรพื้นเมืองรูปแบบที่ 3 มีลักษณะสีดำทั้งตัว ใบหูใหญ่ตก หน้ายาว.....46

4.8 สุกรพื้นเมืองรูปแบบที่ 4 มีลักษณะสีดำทั้งตัว ใบหูเล็กตั้ง หน้าสั้น.....47

4.9 สุกรพื้นเมืองรูปแบบที่ 5 มีลักษณะสีดำ แต่ที่ปลายเท้าทั้งสี่มีสีขาว บางตัวมีสีขาวถึงบริเวณเลยข้อเข่า บางตัวมีสีขาวทั้งขา ใบหูเล็กตั้ง หน้ายาว.....47

4.10 สุกรพื้นเมืองรูปแบบที่ 6 มีลักษณะสีดำ แต่ส่วนตอนล่างของลำตัวจะมีสีขาว หน้ามีแถบขาว ใบหูเล็กตั้ง หน้ายาว.....47

4.11 สุกรพื้นเมืองรูปแบบที่ 7 มีลักษณะสีดำบริเวณส่วนหัว และส่วนท้าย แต่ช่วงกลางลำตัว. หน้ามีแถบขาว ใบหูเล็กตั้ง หน้ายาว.....48

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.12 สุกรพื้นเมืองมีลักษณะสีขาวทั้งตัว แต่มีลอยด่างสีดำเป็นจุดทั้งตัว ใบหูเล็กตั้ง หน้ายาว....48
4.13 สุกรพื้นเมืองรูปแบบที่ 9 มีลักษณะสีขาวทั้งตัว แต่มีลอยด่างสีดำบริเวณตอนบน ของช่วงท้ายของลำตัว ใบหูเล็กตั้ง หน้ายาว....48
4.14 ลักษณะดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอจำนวน 100 เส้นของสุกร พื้นเมืองที่ถูกเลือกมาทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ความแตก ต่างของลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b....50
4.15 ลักษณะชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b....52
4.16 Phylogenetic tree ความสัมพันธ์ของแต่ละ Haplotype….....61
4.17 Phylogenetic tree ความสัมพันธ์ของตัวอย่างแต่ละ Haplotype กับสุกรพันธุ์ ลาร์ไวท์ ดูรอค เหมยซาน และแลนด์เรซ....66

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

หลังจากการนำสุกรพันธุ์ต่างประเทศเข้ามาทดลองเลี้ยงในประเทศไทยในปี พ.ศ. 2492 ปรากฏว่าสุกรหลายพันธุ์จากต่างประเทศได้รับความนิยมจากผู้เลี้ยงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากให้ผลผลิตดี โตเร็ว คุณภาพซากดี เป็นที่ต้องการของตลาด แม้จะต้องลงทุนด้านโรงเรือน และอาหารสูงกว่าสุกรพื้นเมืองก็ตาม ขณะเดียวกันความนิยมเลี้ยงสุกรพื้นเมืองลดลง จำนวนสุกรพื้นเมืองจึงลดลงเรื่อยๆ (จรัญ, 2524; ถวัลย์, 2526) จนแทบหมดความสำคัญในการเลี้ยงสุกรเป็นการค้าของประเทศไทย จึงทำให้จำนวนสุกรพื้นเมืองในปัจจุบันเหลืออยู่น้อยมากทั้งในประเทศไทยและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จนอาจจะสูญพันธุ์ไปได้ไม่ยากนัก เพราะมีปัจจัยด้านลบที่มีผลกระทบต่อการคงอยู่ของสุกรพื้นเมืองหลายด้าน (พงษ์ชาญ , 2545) โดยจะพบเห็นสุกรพื้นเมืองได้ก็แต่ในชนบทที่ห่างไกลความเจริญเป็นกลุ่มเล็กๆ อยู่ห่างกันเท่านั้น (Loftus and Scherf, 1993) จึงเป็นที่น่าเสียดายหากต้องสูญเสียพันธุ์กรรมดีๆ ที่ใช้เวลาวิวัฒนาการผ่านการทดสอบความทนทานมานานว่ามีความเหมาะสมกับสภาพแวดล้อมของประเทศไทยมาจนสามารถดำรงเผ่าพันธุ์ได้จนถึงปัจจุบัน

การอนุรักษ์พันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองเหล่านี้จำเป็นต้องทราบว่าสุกรพื้นเมืองในแต่ละแหล่งที่เลี้ยงมีความคล้ายคลึงกัน หรือแตกต่างกันมากน้อยเพียงใด เพื่อใช้เป็นแนวทางในการกำหนดวิธีการอนุรักษ์พันธุกรรมของสุกรพื้นเมือง (วิสุทธิ์, 2538; อลงกลด และเรืองวิทย์, 2543) แต่โดยที่ผ่านมาการพยายามจำแนกสุกรพื้นเมืองในแหล่งต่างๆ จากการสังเกตลักษณะรูปร่างภายนอกยังไม่ได้ผล เพราะมีความคล้ายคลึงกันมากในแหล่งต่างๆ ดังนั้นจึงเห็นว่าน่าจะนำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยเทคนิคนี้สามารถบอกลักษณะของ heterozygosity ระยะห่างของพันธุกรรม (genetic distance) และวิวัฒนาการ (evolution) ของสุกรในแหล่งต่างๆ ได้ ลำดับเบสของดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย (mitochondrial DNA) ได้ถูกนำมาใช้ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์หลายชนิด (Kocher et al., 1989) โดยเฉพาะบริเวณ displacement loop และ cytochrome b (Alves et al., 2003; Kim et al., 2002) ในสุกรได้มีการนำลำดับเบสของยีน cytochrome b มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมกันมาก เนื่องจากการเปรียบเทียบลำดับเบสทำได้สะดวกเพราะยีนในส่วนนี้จะแปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะ และพบว่ามีความหลากหลายสูง

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาตัวอย่างที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อทำ PCR ของยีน cytochrome b

1.2.2 การศึกษาระยะเวลาที่นานที่สุดในการเก็บตัวอย่างปมรากขนที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เพื่อนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอสำหรับ การทำ PCR

1.2.3 เพื่อศึกษาลักษณะภายนอกของสุกรพื้นเมือง และความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยใช้ความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b

1.2.4 เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยการสร้าง Phylogenetic tree ของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเปรียบเทียบกับสุกรพันธุ์ลาร์ไวท์ ดูรอค เหมยซาน และ แลนด์เรซ

1.2.5 เพื่อศึกษาตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ในส่วนของยีน cytochrome b ที่จะสามารถนำไปเป็นข้อมูลในการใช้เทคนิค PCR-RFLP ได้

1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

1.3.1 ตัวอย่างปมรากขนจากสุกรพื้นเมืองสามารถนำมาสกัดดีเอ็นเอและนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome bได้ไม่ต่างจากตัวอย่างเลือด

1.3.2 ตัวอย่างปมรากขนที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซีย) ที่ระยะเวลาต่างๆ สามารถนำมาสกัดดีเอ็นเอ และนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome bได้ไม่ต่างกัน

1.3.3 ความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b สามารถใช้บ่งบอกถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยได้

1.3.4 ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีความสัมพันธ์กับกับสุกรพันธุ์ลาร์ไวท์ ดูรอค เหมยซาน และแลนด์เรซ

1.3.5 มีตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ในส่วนของยีน cytochrome b ซึ่งสามารถนำไปใช้จำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองได้

1.4 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

1.5 ขอบเขตของงานวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้ได้มุ่งเน้นที่การศึกษาในสุกรพื้นเมืองในจังหวัดที่มีการเลี้ยงกันมาก ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ทราบถึงตัวอย่างที่เหมาะสมนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอแล้วสามารถนำดีเอ็นเอที่ได้มาทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b

1.6.2 ทราบถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยมีความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b

1.6.3 ทราบตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) นำไปเป็นข้อมูลในการใช้เทคนิค PCR-RFLP ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วกว่า

1.6.4 สามารถนำผลการวิจัยที่ได้มาใช้ประโยชน์ในการกำหนดแนวทางการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุ์สุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย

1.7 สถานที่ทำการทดลอง

ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และอาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.8 ระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง

1 มิถุนายน 2549 ถึง 31 มกราคม 2550

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรม และ งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 บทนำ

ความหลากหลายทางพันธุกรรม (Genetic diversity) ของสัตว์เลี้ยงช่วยให้เกษตรกรสามารถคัดเลือกสัตว์ไว้ทำพันธุ์ได้ จากการที่สัตว์มีลักษณะที่แตกต่างกัน หรือสามารถพัฒนาพันธุ์สัตว์ใหม่ๆ ขึ้นมาเพื่อตอบสนองกับการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม การคุกคามของเชื้อโรค การเปลี่ยนแปลงของสภาพตลาด การรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมให้สามารถหลีกเลี่ยงการสูญหายของคุณลักษณะดีเด่นบางประการของสัตว์ไป เช่น สัตว์พื้นเมืองที่มีคุณลักษณะพิเศษ ได้แก่ สืบพันธุ์เร็ว มีผลผลิตที่มีความพิเศษเฉพาะ ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม และกินอาหารคุณภาพต่ำได้ดี (แสนศักดิ์, 2543) เช่นเดียวกับสุกรพื้นเมือง ดังนั้นการอนุรักษ์พันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองเหล่านี้จำเป็นต้องทราบว่าสุกรพื้นเมืองในแต่ละแหล่งที่เลี้ยงมีความคล้ายคลึงกัน หรือแตกต่างกันมากน้อยเพียงใด เพื่อใช้เป็นแนวทางในการกำหนดวิธีการอนุรักษ์พันธุกรรมของสุกรพื้นเมือง (วิสุทธิ์, 2538; อลงกลด และเรืองวิทย์, 2543) แต่โดยที่ผ่านมาการพยายามจำแนกสุกรพื้นเมืองในแหล่งต่างๆ จากการสังเกตลักษณะรูปร่างภายนอกยังไม่ได้ผล เพราะมีความคล้ายคลึงกันมากในแหล่งต่างๆ ดังนั้นจึงเห็นว่าน่าจะนำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยเทคนิคนี้สามารถบอกลักษณะของ heterozygosity ระยะห่างของพันธุกรรม (genetic distance) และวิวัฒนาการ (evolution) ของสุกรในแหล่งต่างๆ ได้ ลำดับเบสของดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย (mitochondrial DNA) ได้ถูกนำมาใช้ใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์หลายชนิด (Kocher et al., 1989) โดยเฉพาะบริเวณ displacement loop และ cytochrome b (Alves et al., 2003; Kim et al., 2002) ในสุกรได้มีการนำลำดับเบสของยีน cytochrome b มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมกันมาก เนื่องจากการเปรียบเทียบลำดับเบสทำได้สะดวกเพราะยีนในส่วนนี้จะแปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะ และพบว่ามีความหลากหลายสูง

2.2 พันธุ์สุกรพื้นเมือง

ประสบ (2531) และจรัญ (2524) ได้แบ่งสุกรพื้นเมืองที่เลี้ยงตามท้องถิ่นต่างๆ ในประเทศตามลักษณะรูปร่างและสีไว้ดังนี้

2.2.1 สุกรพันธุ์ไหหลำ

พบในภาคกลางและภาคใต้ของประเทศไทย และตามอำเภอเมืองของจังหวัดต่างๆ ที่มีคนจีนอาศัยอยู่ สุกรพันธุ์นี้มีสีขาวกับดำปนกัน ส่วนดำมีมากตอนไหล่ ที่หลังและตอนท้าย ส่วนตอนล่างของลำตัวจะมีสีขาว จมูกยาวและแอ่นเล็กน้อย คางย้อยและไหลใหญ่ ลำตัวยาวปานกลาง สะโพกเล็ก ขาและข้อเหนือกีบไม่ค่อยแข็งแรง สุกรพันธุ์นี้มีอัตราการเจริญเติบโต และการสืบพันธุ์ดีกว่าสุกรพื้นเมืองพันธุ์อื่น พ่อสุกรโตเต็มที่หนัก 125-150 กิโลกรัม ส่วนแม่สุกรโตเต็มที่หนัก 100-125 กิโลกรัม น้ำหนักที่เหมาะส่งตลาด คือ 80 กิโลกรัม ลูกดก หาอาหารในที่สกปรก กินเก่ง และทนต่อสภาพเช่นนั้น

2.2.2 สุกรพันธุ์ควาย

พบมากทางภาคเหนือของประเทศไทย สีคล้ายกับสุกรพันธุ์ไหหลำ แต่ต่างกันที่ส่วนใหญ่สุกรพันธุ์ควายมีลำตัวสีดำ มีขาสีขาว มีลำตัวใหญ่ จมูกตรงและสั้นกว่า มีรอยย่นบริเวณลำตัวมากกว่า ใบหูใหญ่ปรกเล็กน้อย พ่อสุกรโตเต็มที่หนัก 125-150 กิโลกรัม ส่วนแม่สุกรโตเต็มที่หนัก 100-125 กิโลกรัม น้ำหนักที่เหมาะส่งตลาด คือ 80 กิโลกรัม

2.2.3 สุกรพันธุ์ราด หรือ พันธุ์พวง

ทางภาคเหนือเรียกว่า หมูราด ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่า หมูพวง มีสีดำตลอดทั้งลำตัว หน้าและจมูก ยาวตรง ลำตัวสั้นเตี้ยเป็นรูปสี่เหลี่ยม กระดูกเล็กเจริญเติบโตช้า หลังแอ่น หูตั้ง สุกรที่มีขนาดโตเต็มที่มีขนาดเพียง 60-80 กิโลกรัม

สุกรพื้นเมืองจัดเป็นพวกสุกรพันธุ์มัน มีอัตราการเจริญเติบโตช้า แต่สามารถปรับตัวได้ดีต่อสภาพภูมิอากาศที่ร้อนและความชื้นสูง ทนต่ออาหารคุณภาพต่ำ และอาจมีภูมิต้านทานต่อโรคปากและเท้าเปื่อย และพยาธิภายในด้วย (Rattanaronchart, 1994) นอกจากนี้สุกรพื้นเมืองมีความเหมาะสมต่อระบบการเลี้ยงสุกรแบบดั้งเดิมในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมากกว่าสุกรพันธุ์ผสม เพราะมีความสามารถในการดำรงชีวิตและสืบพันธุ์ในสภาพการเลี้ยงดูที่แล้งแคนได้ดีกว่า ระบบการเลี้ยงแบบดังเดิมยังคงดำรงอยู่ได้ตราบเท่าที่เกษตรกรยังมีฐานะยากจนไม่สามารถเปลี่ยนไปเลี้ยงสุกรในระบบใหม่ได้ (พงษ์ชาญ, 2545) การเปรียบเทียบลักษณะของสุกรพันธุ์ยุโรป และพันธุ์พื้นเมืองที่ได้รับการเลี้ยงดูแบบเดียวกันแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ลักษะณะบางประการเปรียบเทียบระหว่างสุกรพันธุ์ยุโรป และพันธุ์พื้นเมือง

ลักษณะ	พันธุ์				
	ลาร์จไวท์	ดูรอค	ราด	ไหหลำ	ควาย
ลูกต่อครอก (ตัว)	6.40	7.60	5.50	7.60	5.60
น้ำหนักแรกเกิดเฉลี่ย/ตัว (กก.)	1.33	1.34	0.59	0.69	0.57
อัตราการรอด (%)	84.00	80.00	74.00	80.00	69.00
น้ำหนักหย่านมเฉลี่ย/ตัว (กก.)	11.47	11.25	5.89	7.67	6.68
เนื้อ (%)	45.70	44.80	32.40	40.60	41.30
ไขมัน (%)	37.80	37.80	50.00	39.40	36.50

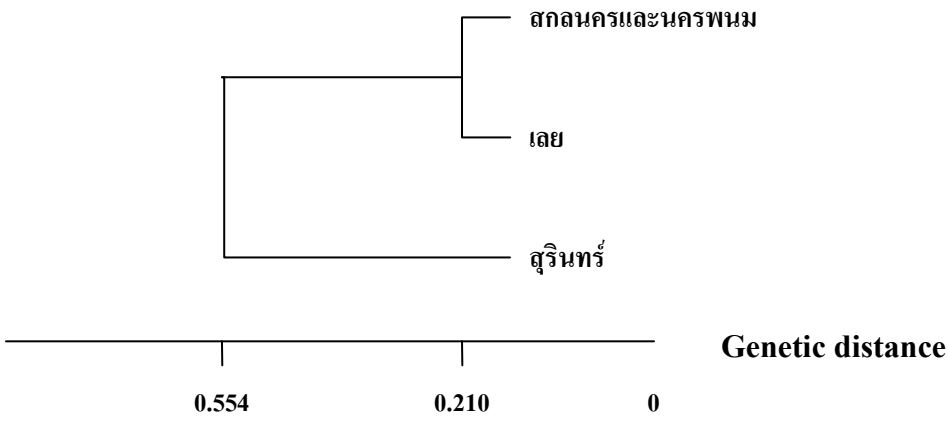
ที่มา : จรัญ (2524)

2.3 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือที่ผ่านมา

อมรรัตน์ (2537) ศึกษาเปรียบเทียบรูปร่างโครโมโซม และคาริโอไทป์ของสุกรพื้นเมืองจากบ้านหนองแสง จังหวัดขอนแก่น, บ้านกวนบุ่น จังหวัดสกลนคร และบ้านเหมืองแพร่ จังหวัดเลย กับสุกรพันธุ์ยุโรป พบว่าคาริโอไทป์ของสุกรพื้นเมืองในแต่ละแหล่งกับของสุกรพันธุ์ยุโรปมีรูปร่างและจำนวนไม่แตกต่างกัน โดยมีโครโมโซมร่างกายทั้งหมด 36 แท่ง และ โครโมโซมเพศ 2 แท่ง อาจกล่าวได้ว่าโดยจำนวน และรูปร่างของโครโมโซมนั้นยังไม่สามารถบอกถึงความแตกต่างของสุกรในแต่ละแหล่ง หรือกับสุกรพันธุ์ยุโรปได้

พนิช (2545) ทำการศึกษาและเปรียบเทียบสายพันธุ์สุกรพื้นเมืองโดยการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือดจาก 3 แหล่ง ได้แก่ จังหวัดสุรินทร์ จังหวัดเลย และจังหวัดสกลนครกับนครพนม จำนวน 28 ตัว และเปรียบเทียบกับสุกรพันธุ์ต่างประเทศลูกผสมแลนด์เรซ และลาร์จไวท์จำนวน 2 ตัว ใช้ไพรเมอร์ 17 แบบ ได้แก่ DAGK, OPN, IgF1, PgHAS, PIGS0085X, S0227, S0097, S0010, SW957, SW2429, SSC133243, S0001, SSU24283,SSS0313, SSMDNAX7, SS13NO5R และ PIGREPD พบรูปแบบพันธุกรรมแตกต่างกันทั้งหมดจำนวน 78 แบบ และพบว่าประชากรของสุกรพื้นเมืองจากจังหวัดสกลนครกับนครพนมมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีสูงที่สุด คือ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.446 ± 0.203 สุกรพื้นเมืองจากจังหวัดสุรินทร์มีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีอันดับสองมีค่าเฉลี่ย 0.397 ± 0.386 ส่วนสุกรพื้นเมืองจากจังหวัดเลยมีค่าเฮตเทอโรไซโกซิตีต่ำสุดเท่ากับ 0.370 ± 0.290 และค่าความห่างระหว่างประชากรของสุกรพื้นเมืองเปรียบเทียบทีละสองแหล่งระหว่างจังหวัดสุรินทร์กับจังหวัดเลย

จังหวัดสุรินทร์กับจังหวัดสกลนครและนครพนม และจังหวัดเลยกับจังหวัดสกลนครและนครพนมมีค่าเท่ากับ 0.544 ± 0.207, 0.564 ± 0.192, และ 0.419 ± 0.227 ตามลำดับ ดังแสดงในแผนภาพที่ 1



แผนภาพที่ 2.1 Phylogenetic tree ของสุกรพื้นเมือง 3 แหล่ง

2.4 ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย (mitochondrial DNA)

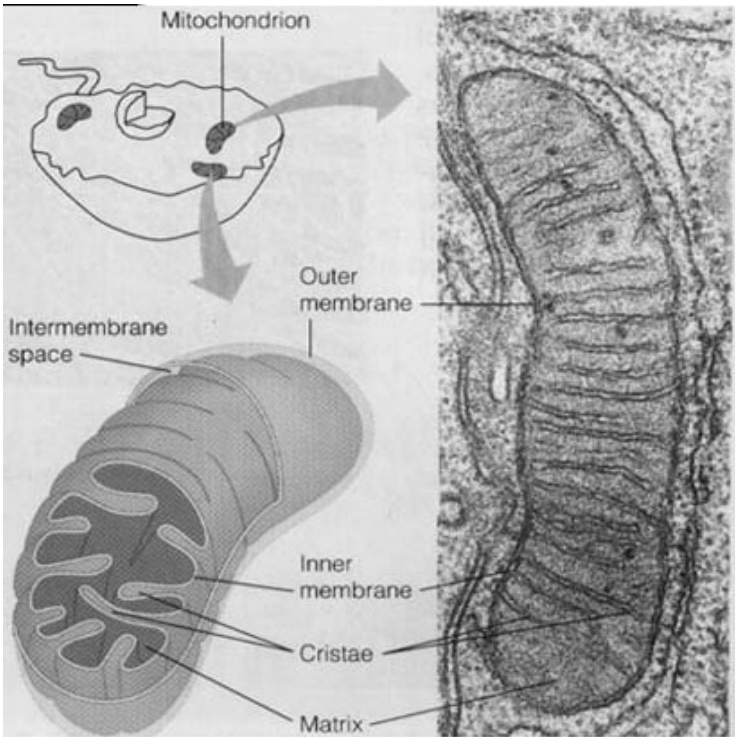
ประเภทของดีเอ็นเอสามารถแบ่งตามแหล่งที่มาได้เป็น nuclear DNA และ organelle DNA (mitochondria DNA; mtDNA) การศึกษา nuclear DNA ทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาระบบวิทยาเชิงโมเลกุล (molecular systematics) และวิวัฒนาการ (evolution) ส่วนข้อมูลการเรียงลำดับเบสของ mtDNA ซึ่งมีอัตราการ diverse มากกว่า nuclear DNA มีความเหมาะสมในการนำมาใช้หาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตที่มีสายเลือดใกล้ชิดกัน (closely related species) และยังเหมาะที่จะนำไปใช้ในการศึกษาโครงสร้างประชากร (population structure) ด้วย นักวิจัยส่วนใหญ่กำหนดยีนเป้าหมายที่ mtDNA เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดและสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตจำนวนมาก จึงทำให้มีฐานข้อมูลที่หลากหลายและสมบูรณ์ สามารถนำมาเปรียบเทียบได้ง่าย (Arnason และ Janke , 2002)

ไมโตคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์ที่พบเฉพาะในเซลล์ของยูคารีโอตที่ใช้ออกซิเจนในการหายใจเท่านั้น ในระยะแรกที่พบออร์แกเนลล์นี้มีหลายชื่อ เช่น คอนดริโอโซม (chondriosome) ไบโอบลาสต์ (bioblast) เป็นต้น จนกระทั่ง พ.ศ. 2440 เบนดา (Benda) ได้เรียกว่า ไมโตคอนเดรีย (Darley-Usmar และคณะ, 1987) รูปร่างของไมโตคอนเดรียเป็นก้อนกลม หรือก้อนรีๆ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 0.5-1.0 ไมครอน ความยาวประมาณ 5-10 ไมครอน หรือมากกว่า มีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น ซึ่งเป็นชนิดยูนิตเมมเบรน เยื่อชั้นในมีลักษณะเป็นท่อ หรือเยื่อที่พับทบกันอยู่เรียกว่า ครีสตี (cristae) ท่อนี้ยื่นเข้าไปในส่วนของเมทริกซ์ (matrix) ที่เป็นของเหลวของสารประกอบหลายชนิด

ไมโตคอนเดรียพบในยูคารีโอตเกือบทุกชนิด ยกเว้นเซลล์บางชนิด เซลล์แต่ละเซลล์มีจำนวนไมโตคอนเดรียไม่เท่ากัน โดยทั่วไปพบไมโตคอนเดรียมากในเซลล์ที่มีอัตราเมตาโบลิซึมสูง เช่น เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เซลล์ต่อม เซลล์ที่กำลังเจริญเติบโต เป็นต้น (ปรียานันท์, 2549) ภาพไมโตคอนเดรียแสดงในแผนภาพที่ 2.2

หน้าที่ของไมโตคอนเดรียจำแนกตามส่วนประกอบต่างๆ ดังนี้ คือ

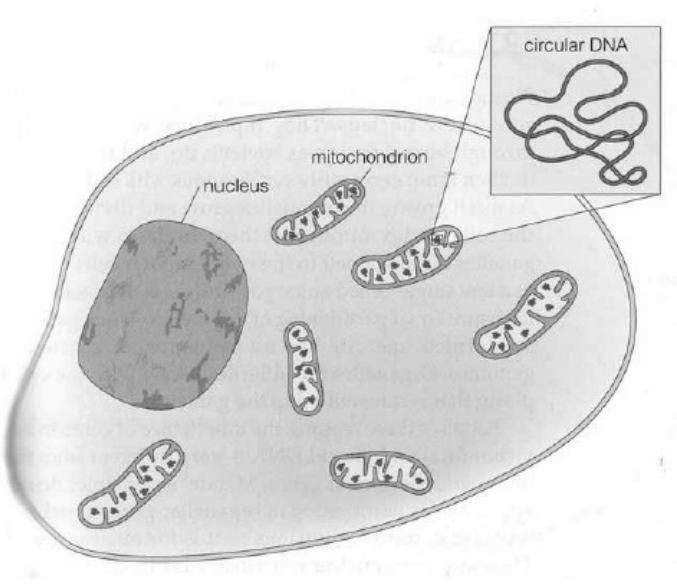
1. เยื่อหุ้มด้านใน มีเอนไซม์เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ ATP (Adenosine triphosphate)
2. ภายในเมทริกซ์มีของเหลว ที่ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาเคมีต่างๆ ในวัฏจักรเครปส์ (Kreb 's cycle)
3. DNA (Deoxyribonucleic acid) RNA (Ribonucleic acid) เอนไซม์ และไรโบโซมที่อยู่ภายในออร์แกเนลล์ ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนขึ้น ภายในออร์แกเนลล์



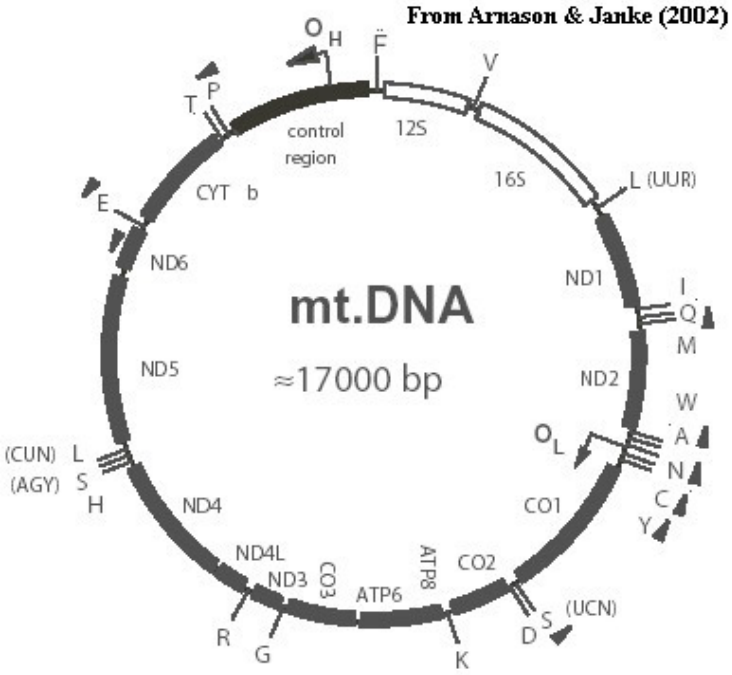
แผนภาพที่ 2.2 ไมโตคอนเดรีย (mitocondria) (ปรียานันท์, 2549)

ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียมีรูปร่างเป็นวงแหวนเกลียวคู่เช่นเดียวกับดีเอ็นเอในคลอโรพลาสต์ แต่ขนาดมีความผันแปรมากในสิ่งมีชีวิตต่างกัน ตั้งแต่ 16 กิโลเบสในไมโตคอนเดรีย

ของคนจนถึง 200-2,000 กิโลเบสในพืช แต่จำนวนยีนที่พบในไมโตคอนเดรียพืชและสัตว์ไม่ต่างกัน (Arnason และ Janke , 2002)



แผนภาพที่ 2.3 ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย (mitochondria DNA) (ปรียานันท์, 2549)



แผนภาพที่ 2.4 แผนผังไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Arnason และ Janke, 2002)

ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมโดยทั่วไปมีขนาด ประมาณ 16-17 กิโลเบส ขนาดจะแตกต่างกันไปตามแต่ละสปีชีส์ ประกอบด้วย อาร์เอ็นเอถ่ายโอน (transfer RNA, tRNA) 22 ชนิด (A-W) อาร์เอ็นเอไรโบโซม (ribosomal RNA) 2 ชนิด (12S และ 16S) และยีน

ควบคุมการสร้างโปรตีน 13 ชนิด (ATP6, ATP8, CO1, CO2, CO3, Cyt b [CYB], ND1, ND2, ND3, ND4L, ND4, ND5 และ ND6) (Arnason และ Janke,2002; Arnason และคณะ 2002) ขนาดของดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิดแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ขนาดของดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมบางชนิด

Species	**Total length (bp)**	**A (%)**	**T (%)**	**C (%)**	**G (%)**
Pig	16613	34.7	25.8	26.2	13.3
Cow	16338	33.4	27.2	25.9	13.5
Fin whale	16398	32.7	26.7	27.3	13.3
Horse	16660	32.2	25	28.5	13.4
Harbor seal	16826	33	253	27.4	14.3
Human	16570	30.9	24.7	31.3	13.1

ที่มา: Lin et al. (1999)

พบว่าดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียของสุกรมีขนาด 16613 bp ประกอบด้วย อาร์เอ็นเอถ่ายโอน (transfer RNA, tRNA) 22 ชนิด อาร์เอ็นเอไรโบโซม (ribosomal RNA) 2 ชนิด และยีนควบคุมการสร้างโปรตีน 13 ชนิด (Lin et al., 1999) ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ส่วนประกอบของดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียสุกร

Name of gene	**Location**	**Size (bp)**
D-loop	1-1175	1176
tRNA-Phe	1176-1245	70
12S rRNA	1246-2205	960
tRNA-Val	2206-2273	68
16S rRNA	2274-3844	1571
tRNA-Leu (UUR)	3845-3919	75
NADH dehydrogenase subunit 1 (*ND1*)	3922-4878	957
tRNA-Ile	4877-4945	69

Name of gene	Location	Size (bp)
tRNA-Gln	4943-5015	73
tRNA-Met	5017-5086	70
NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2)	5087-6130	1044
tRNA-Trp	6129-6196	68
tRNA-Ala	6203-6270	68
tRNA-Asn	6272-6346	75
O_L	6346-6382	37
tRNA-Cys	6379-6444	66
tRNA-Tyr	6444-6509	66
Cytochrome c oxidase subunit I (*COI*)	6511-8055	1545
tRNA-Ser (UCN)	8059-8129	71
tRNA-Asp	8135-8202	68
Cytochrome c oxidase subunit II (*COII*)	8203-8889	687
tRNA-Lys	8891-8957	67
ATPase subunit 8 (*ATPase8*)	8959-9162	204
ATPase subunit 6 (*ATPase6*)	9120-9800	681
Cytochrome c oxidase subunit III (COIII)	9800-10582	783
tRNA-Gly	10584-10652	69
NADH dehydrogenase subunit 3 (*ND3*)	10653-10997	345
tRNA-Arg	11000-11068	69
NADH dehydrogenase subunit 4L (ND4L)	11069-11365	297
NADH dehydrogenase subunit 4 (*ND4*)	11359-12735	1377
tRNA-His	12737-12805	69
tRNA-Ser (AGY)	12806-12864	59
tRNA-Leu (CUN)	12865-12934	70
NADH dehydrogenase subunit 5 (*ND5*)	12935-14755	1821
NADH dehydrogenase subunit 6 (*ND6*)	14739-15266	528
tRNA-Glu	15267-15335	69

Name of gene	Location	Size (bp)
Cytochrome b (*Ctyb*)	15342-16481	1140
tRNA-Thr	16482-16549	68
tRNA-Pro	16550-16613	64

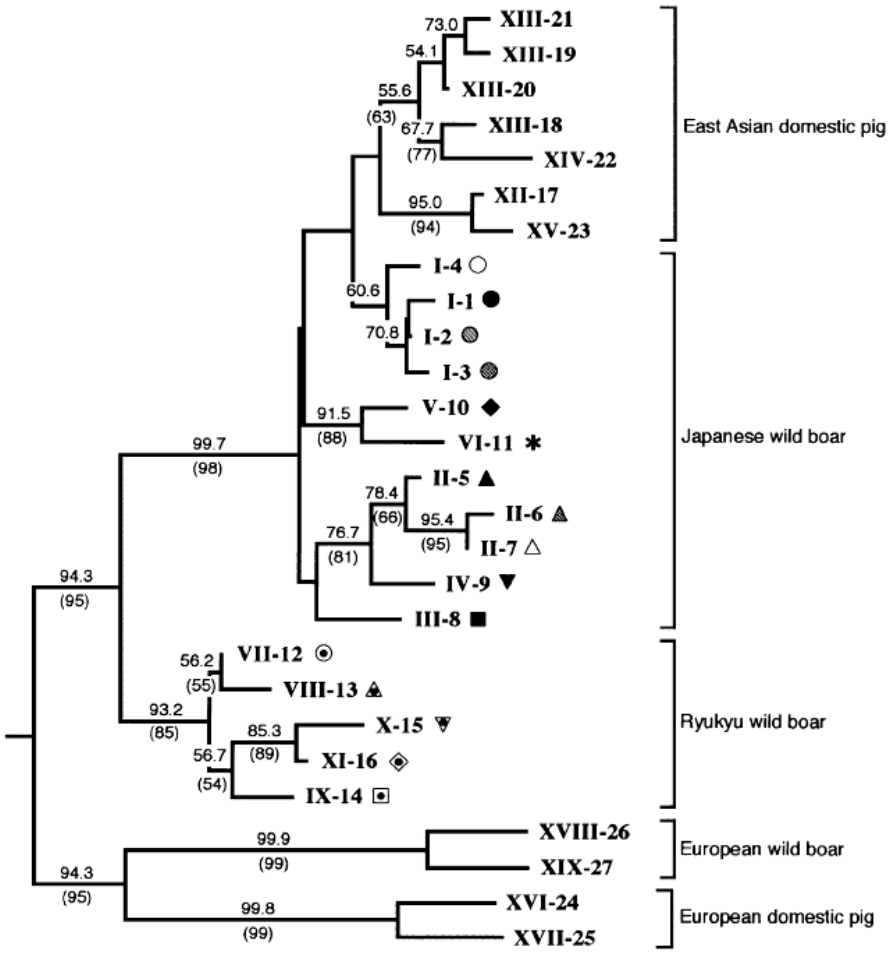
ที่มา: Lin et al. (1999)

2.5 การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม และจำแนกสายพันธุ์สุกร โดยการวิเคราะห์ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย

จากความรู้ทางด้านชีวโมเลกุล และพันธุวิศวกรรม ทำให้เกิดการพัฒนาเทคนิคใหม่มาใช้ในการตรวจสอบความหลากหลาย และวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ได้มีการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะในการศึกษาถึงวิวัฒนาการของสัตว์ โดยใช้ดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียในการศึกษา เนื่องจากดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียมีจำนวนมากกว่าในดีเอ็นเอจากนิวเคลียส และมีอัตราการเกิดวิวัฒนาการสูงกว่าดีเอ็นเอจากนิวเคลียส (Bibb, 1981) ดีเอ็นเอจากไมโตคอนเดรียมีการถ่ายทอดจากแม่เท่านั้นทำให้สามารถย้อนกลับไปที่ต้นกำเนิดสายแม่ได้ การศึกษาวิวัฒนาการด้วยการใช้เอ็นไซม์ตัดจำเพาะยังมีความยุ่งยากในการปฏิบัติ ใช้เวลานาน และไม่สามารถให้ความแตกต่างในบางตัวอย่าง จึงนำเทคนิค PCR และการหาลำดับเบส มาใช้ในการศึกษาถึงความหลากหลายทางพันธุกรรมในสัตว์หลายชนิด เช่น ปลา นก สัตว์เลี้อยคลาน สุนัข ช้าง (Fernando และ Landu, 2000; Kocher et al., 1989) โดยเฉพาะบริเวณ displacement loop (D-loop) และ cytochrome b (Alves et al., 2003; Kim et al., 2002) การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมในสุกรได้มีการนำลำดับเบส cytochrome b มาใช้เนื่องจากการเปรียบเทียบลำดับเบสทำได้สะดวกเพราะยีนในส่วนนี้จะแปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะและพบว่ามีความหลากหลายสูง

Watanobe et al. (1999) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง Japanese wild boar (*Sus scrofa leucomystax*) และ Ryukyu wild boar (*Sus scrofa riukiuanus*) โดยใช้ดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียของสุกร 94 ตัว (Japanese wild boar 59 ตัว Ryukyu wild boar 13 ตัว และ สุกรพันธุ์อื่นๆ 22 ตัว) สามารถแสดง combined mtDNA sequences 27 แบบ และความหลากหลายของดีเอ็นเอในส่วนของยีน cytochrome b ของไมโตคอนเดรีย 19 haplotypes ได้แก่ East Asian domestic pigs 4 haplotypes (XII-XV) Japanese wild boar 6 haplotypes (I-VI) Ryukyu wild boar 5 haplotypes (VII-XI) European wild boar 2 haplotypes (XVIII-XIX) และ European domestic pig 2 haplotypes (XVI-XVII) จากความแตกต่างของลำดับเบส 38

ตำแหน่งซึ่งสามารถแยก Japanese wild boar และ Ryukyu wild boar ออกเป็นคนละสายพันธุ์ได้ (ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.5 และตารางที่ 2.4)



แผนภาพที่ 2.5 Phylogenetic tree ของ combined mtDNA sequences 27 แบบ (ตัวเลขอาบิค) และความหลากหลายของดีเอ็นเอในส่วนของยีน cytochrome b ของไมโตคอนเดรีย (ตัวเลขโรมัน) (Watanobe et al., 1999)

ตารางที่ 2.4 Haplotype ที่ต่างกัน 19 haplotype (I-XIX) ที่แบ่งได้จากลำดับเบสในส่วนยีน cytochrome b ของ East Asian domestic pig, Japanese wild boar, Ryukyu wild boar, European wild boar และ European domestic

Breed	Haplotype	ตำแหน่งเบสที่เปลี่ยนแปลง																		
		5	**38**	**82**	**147**	**196**	**207**	**216**	**243**	**267**	**303**	**367**	**373**	**394**	**426**	**432**	**543**	**551**	**618**	**645**
		C	**T**	**T**	**G**	**G**	**C**	**C**	**C**	**G**	**T**	**G**	**G**	**G**	**A**	**G**	**T**	**T**	**C**	**A**
East Asian domestic pig	XII	.	.	.	.	.	.	T	.	.	C	.	.	.	.	A	.	.	.	.
	XV	.	.	.	.	.	.	T	.	.	C	.	.	.	.	A	C	.	.	.
	XIII	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	XIV	.	.	.	.	A	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.
Japanese wild boar	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	V	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	VI	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.
	IV	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	T
	III	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
Ryukyu wild boar	X	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	A	.	.	.	.	.	C	.	.
	XI	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	C	T	.
	VII	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.
	IX	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.
	VIII	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.
European wild boar	XVIII	T	.	C	A	.	.	.	.	A	.	.	A	A	.	.	.	.	T	.
	XIX	T	.	C	A	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.
European domestic	XVI	.	.	.	.	.	T	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.
	XVII	.	.	.	.	.	T	.	T	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

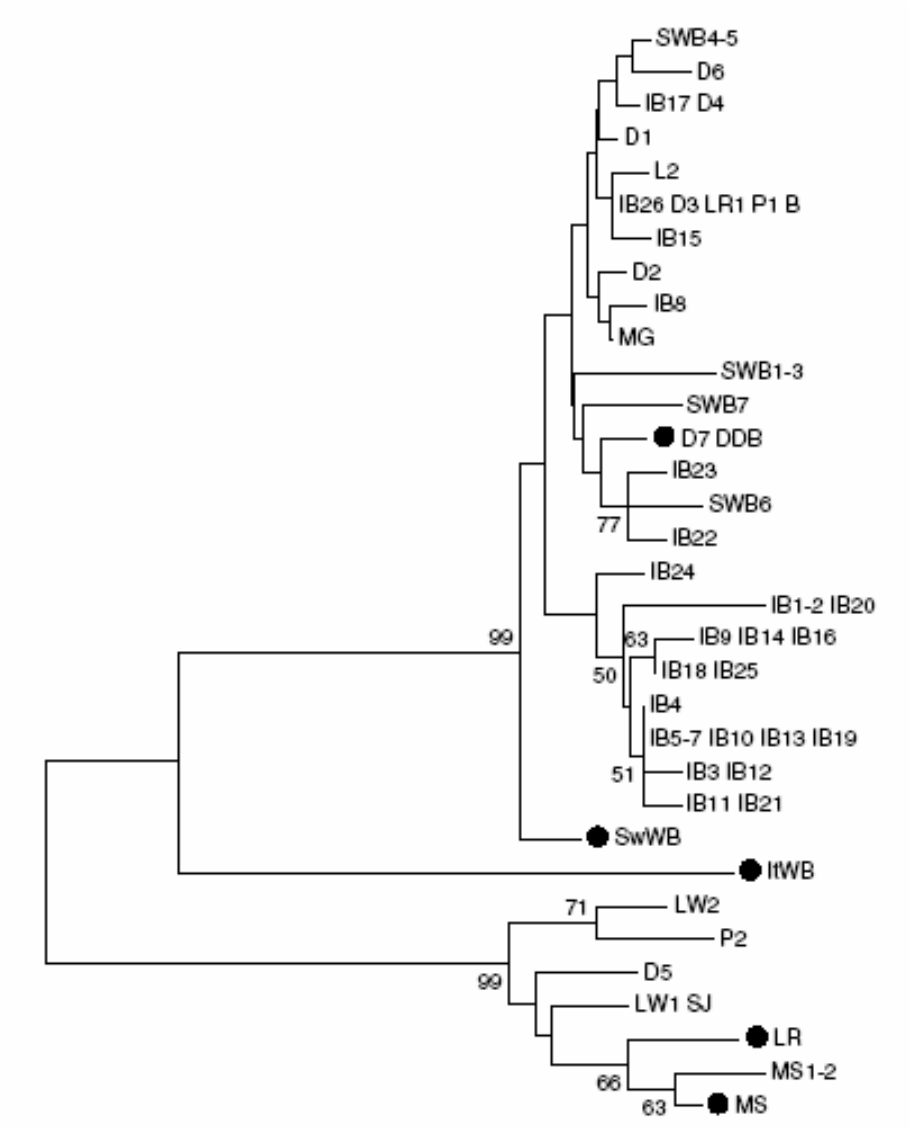
ที่มา: Watanobe et al. (1999)

ตารางที่ 2.4 Haplotype ที่ต่างกัน 19 haplotype (I-XIX) ที่แบ่งได้จากลำดับเบสในส่วนยีน cytochrome b ของ East Asian domestic pig, Japanese wild boar, Ryukyu wild boar, European wild boar และ European domestic (ต่อ)

Breed	Haplotype	ตำแหน่งเบสที่เปลี่ยนแปลง																		
		693	**694**	**726**	**753**	**768**	**837**	**840**	**858**	**874**	**876**	**879**	**883**	**912**	**940**	**951**	**1038**	**1050**	**1074**	**1134**
		G	**G**	**T**	**A**	**C**	**T**	**C**	**T**	**T**	**A**	**T**	**G**	**G**	**A**	**T**	**A**	**C**	**T**	**G**
East Asian domestic pig	XII	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.
	XV	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.
	XIII	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
	XIV	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.
Japanese wild boar	I	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	VI	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	II	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.
	IV	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.
	III	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.
Ryukyu wild boar	X	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.
	XI	A	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	VII	A	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
	IX	A	.	C	.	.	.	T	C	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.
	VIII	A	.	C	.	.	.	T	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.
European wild boar	XVIII	A	A	.	.	T	.	T	.	.	G	.	.	.	.	C	G	.	C	.
	XIX	A	.	.	G	T	.	T	.	.	G	.	.	.	.	.	G	.	C	.
European domestic	XVI	A	.	.	.	.	.	T	.	.	G	C	.	.	G	.	G	.	C	A
	XVII	A	.	.	.	.	.	T	.	.	G	C	.	.	G	.	G	.	C	A

ที่มา: Watanobe et al. (1999)

Alves et al. (2003) ทำการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสุกร 3 กลุ่ม คือ Iberian pigs, Spanish wild boars และ domestic pigs โดยใช้การศึกษาจากดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรียของสุกร 51 ตัว (Iberian pigs 26 ตัว Spanish wild boars 7 ตัว และ domestic pigs 18 ตัว) สามารถแบ่งกลุ่มพันธุกรรมของสุกรเหล่านี้ได้ 29 Haplotypes โดยดูจากลำดับเบสที่ต่างกันในส่วนยีน cytochrome b (ลำดับเบสต่างกัน 28 ตำแหน่ง) และ D-loop (ลำดับเบสต่างกัน 34 ตำแหน่ง) ดังแสดงในแผนภาพที่ 2.6 และตารางที่ 2.5



แผนภาพที่ 2.6 Phylogenetic tree ของ 29 Haplotypes ของความหลากหลายของดีเอ็นเอในส่วนของยีน cytochrome b และ D-loop (Alves et al., 2003)

ตารางที่ 2.5 Haplotype ที่ต่างกัน 29 haplotype ที่แบ่งได้จากลำดับเบสในส่วนยีน cytochrome b และ D-loop ของ Iberian pigs, Spanish wild boars และ domestic pigs

Haplotypes	Animals	Nucleotide positions: Cytochrome B gene (14264, 14309, 14369, 14378, 14405, 14429, 14465, 14594, 14705, 14711, 14717, 14740, 14855, 15002, 15017, 15036, 15038, 15041, 15045, 15074, 15081, 15102, 15200, 15212, 15236, 15257, 15264, 15296)	Nucleotide positions: D-Loop (15450, 15543, 15544, 15558, 15565, 15571, 15578, 15579, 15587, 15592, 15615, 15616, 15675, 15694, 15714, 15715, 15717, 15723, 15729, 15736, 15741, 15758, 15794, 15822, 15825, 15840, 15848, 15887, 15936, 15995, 16010, 16127, 16139, 16141)
	AJJ002189	TGTCTATGCTGCATTTGCGGCGGCCGAA	TTGAGC_CCATTTCTTCAACCTGACTCCATAAAA
H1	IB 1-2, 20	.A........A.................	..A............C.....C.........GGG
H2	IB 3, 12	..........AT................	..............C......C.........GGG
H3	IB 4	..........A.................	..............C......C.........GGG
H4	IB 5-7, 10, 13, 19	..........A.................	......A.......C......C.........GGG
H5	IB 8	....	...T..........C.....TC............
H6	IB 9, 14, 16	..........A...............G.	..............C......C..........GG
H7	IB 11, 21	..........A.................	.............TC......C.........GGG
H8	IB 15	C...........................	...T..........C......C.........G..
H9	IB 17, D4	....	...T......C...C......C.........G..
H10	IB 18, 25	..........A.................	..............C......C..........GG
H11	IB 22	....	..............C.T..............G..
H12	IB 23	..............C.............	..............C................G..
H13	IB 24	..........A.................	..............C.....TC.........G.G
H14	IB 26, D3, B, LR1; P1	....	...T..........C......C.........G..
H15	D1	....	...T.................C.........G..
H16	D2	....	...T.................C............
H17	D5	..C.CGC.T...GC.CATA..AA.T..G	.C..A_.TTGC.C.....G.T.A.T.....GGGG
H18	D6	....	...T......C......G...C............
H19	D7	....	....
H20	SJ, LW 1	..C.CGC.T...GC.CATA..AA.T...	.C..A_.TTGC.C.C...G.T...TC.T..GGGG
H21	LR 2	....	...T..........C......C.......C.G..
H22	LW 2	..CTCGCAT...GC.CATA..AA.T...	.C..A_.TTGC.......G.T...T...GCGGGG
H23	P 2	..CTCGCAT...GC.CAT...AATT..G	.C..A_.TTGC.......G.T...T.T.G.GGGG
H24	MS 1,2	..C.CGC.T...GC.CATA..AA.TA.G	.C..A_.TTGCCC.C...GTT...T..T.CGGGG
H25	MG	....	...T..........C......C............
H26	SWB 1-3	...................A........	..............C..G...C......G.....
H27	SWB 4,5	....	...T......C..........C.........G..
H28	SWB 6	.........C..................	C.............C................G..
H29	SWB 7	....................T.......	.....................C.G.......G..

ที่มา: Alves et al. (2003)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การศึกษาตัวอย่างที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b

3.1.1 การศึกษา

การศึกษาเป็นการเก็บตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอ และตัวอย่างเลือดจากใบหูของสุกรพื้นเมือง จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ทำการเก็บตัวอย่างดังนี้

1. ตัวอย่างเลือดจากใบหู	350	ไมโครลิตร	จำนวน 3 ตัวอย่าง
2. ตัวอย่างปมรากขนจำนวน	100	เส้น	จำนวน 3 ตัวอย่าง
3. ตัวอย่างปมรากขนจำนวน	200	เส้น	จำนวน 3 ตัวอย่าง

นำตัวอย่างมาศึกษาเปรียบเทียบตัวอย่างที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b ในห้องปฏิบัติการอาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.1.2 การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างเลือดจากใบหู

1. ทำความสะอาดบริเวณใบหูที่จะทำการเจาะเลือดด้วยน้ำสะอาด และเช็ดด้วยผ้าสะอาด

2. ใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์เช็ดทำความสะอาดอีกรอบ รอจนแอลกอฮอล์แห้ง

3. ใช้มือกดเส้นเลือดบริเวณใบหูให้เส้นเลือดโป่งขึ้น จากนั้นใช้เข็มเบอร์ 21 ความยาว 1 นิ้ว และไซลิ้งขนาด 3 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อ เจาะดูดเลือดจากใบหูประมาณ 1.5 มิลลิลิตร เก็บเลือดลงในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 2.0 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อ และมี 0.5M EDTA อยู่

4. เก็บหลอดไมโครฟิวจ์ที่มีตัวอย่างเลือดจากใบหูในถังน้ำแข็ง (กรณีที่เก็บตัวอย่างเลือดไว้เกิน 24 ชั่วโมง จะเก็บหลอดไมโครฟิวจ์ไว้ในถังไนโตรเจนเหลว หรือ ตู้อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส)

การเก็บตัวอย่างปมรากขน

1. ทำความสะอาดบริเวณที่จะทำการถอนปมรากขนด้วยน้ำสะอาด และเช็ดด้วยผ้าสะอาด

2. ใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์เช็ดทำความสะอาดอีกรอบ รอจนแอลกอฮอล์แห้ง

3. ถอนขนบริเวณดังกล่าว จากนั้นตัดขนด้วยกรรไกรปลอดเชื้อให้มีขนาดความยาวจากปมรากขนขึ้นมาประมาณ 0.5 เซนติเมตร ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 2.0 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อ

4. เก็บหลอดไมโครฟิวจ์ที่มีตัวอย่างปมรากขนในถังน้ำแข็ง (กรณีที่เก็บตัวอย่างปมรากขนไว้เกิน 24 ชั่วโมง จะเก็บหลอดไมโครฟิวจ์ไว้ในถังไนโตรเจนเหลว หรือ ตู้อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส)

3.1.3 การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด (โดยใช้ Genomic DNA Purification Kit (Wizard®)

1. นำเลือดที่แช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ออกมาละลาย จากนั้นนำเลือดจำนวน 350 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2. เติม cell lysis solution 1,050 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดคว่ำและหงาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) 10 นาที ระหว่างที่ตั้งทิ้งไว้ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดคว่ำและหงาย 2-3 ครั้ง

3. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ทิ้ง ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-3 จนได้ตะกอนค่อนข้างขาวจึงทำขั้นตอนที่ 4 ต่อ

4. เติม nuclei lysis solution 350 ไมโครลิตร 0.5M EDTA 84 ไมโครลิตร proteinase K (ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร) จำนวน 17.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสข้ามคืน โดยวางหลอดไมโครฟิวจ์บนเครื่องเขย่าสารให้ค่อยๆ ละลาย

5. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เพื่อให้เย็นลงเป็นเวลา 5 นาที เติม RNase A 1.5 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดคว่ำและหงาย 2-5 ครั้ง นำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

6. เติม protein precipitation solution 118 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 20 วินาที แช่เย็นในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

7. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ย้ายของเหลว (supernatant) ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

8. เติม Isopropanol (0.8 V/V) 500 ไมโครลิตร ค่อยๆ ผสมให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดคว่ำและหงาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที

9. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 80% เอธานอล โดยระวังไม่ให้ตะกอนฟุ้งขึ้นมา 200 ไมโครลิตร

10. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ทิ้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10-15 นาที ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 30 ไมโครลิตร

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น (โดยใช้ Genomic DNA Purification Kit (Wizard®)

1. เติม nuclei lysis solution 200 ไมโครลิตร 0.5M EDTA 48 ไมโครลิตร proteinase K (ความเข้มข้น15 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร) จำนวน 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสข้ามคืน โดยวางหลอดไมโครฟิวจ์บนเครื่องเขย่าสารให้ค่อยๆ ละลาย

2. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เพื่อให้เย็นลงเป็นเวลา 5 นาที เติม RNase A 1 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดคว่ำและหงาย 2-5 ครั้ง นำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3. เติม protein precipitation solution 67 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 20 วินาที แช่เย็นในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

4. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ย้ายของเหลว (supernatant) ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

5. เติม Isopropanol (0.8 V/V) 200 ไมโครลิตร ค่อยๆ ผสมให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดคว่ำและหงาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที

6. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 80% เอธานอล โดยระวังไม่ให้ตะกอนฟุ้งขึ้นมา 200 ไมโครลิตร

7. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ทิ้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10-15 นาที ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 30 ไมโครลิตร

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างปมรากขนจำนวน 200 เส้น (โดยใช้ Genomic DNA Purification Kit (Wizard®)

1. เติม nuclei Lysis solution 400 ไมโครลิตร 0.5M EDTA 96 ไมโครลิตร proteinase K (ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร) 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสข้ามคืน โดยวางหลอดไมโครฟิวจ์บนเครื่องเขย่าสารให้ค่อยๆ ละลาย

2. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เพื่อให้เย็นลงเป็นเวลา 5 นาที เติม RNase A จำนวน 2 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดคว่ำและหงาย 2-5 ครั้ง นำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3. เติม protein precipitation solution 135 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 20 วินาที แช่เย็นในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

4. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ย้ายของเหลว (supernatant) ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

5. เติม Isopropanol (0.8 V/V) จำนวน 400 ไมโครลิตร ค่อยๆ ผสมให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดคว่ำและหงาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที

6. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 80% เอธานอล โดยระวังไม่ให้ตะกอนฟุ้งขึ้นมา 200 ไมโครลิตร

7. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ทิ้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10-15 นาที ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 30 ไมโครลิตร

3.1.4 การตรวจวัดปริมาณของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical density, O.D.) ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร (nm) ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็น blank โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวน 1.5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จำนวน 300 ไมโครลิตร

คำนวณหาความเข้นของดีเอ็นเอจากตัวอย่างโดยใช้สูตร:

ความเข้นของดีเอ็นเอ (ng/µl) = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm*50*200 (dilution factor)

3.1.5 การเจือจางความเข็มข้นของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอ และตัวอย่างเลือดจากใบหูมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีความเข้มข้นดังนี้

1. ตัวอย่างเลือดจากใบหูให้มีความเข้มข้น

- 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร
- 2.5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร
- 5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

2. ตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น

- 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร
- 2.5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร
- 5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

3.1.6 การออกแบบไพรเมอร์ (Primer)

การเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายใช้ Primer MitL1 และ MitH2 (Watanobe et al., 1999)

MitL1 5'-ATCGTTGTCATTCAACTACA-3'

MitH2 5'-CTCCTTCTCTGGTTTACAAG-3'

ทำการติดสลาก Primer ด้วย M13 ดังนั้นลำดับของ Primer จึงมีลำดับดังนี้

Cytochrome b – Forward

5'-CACGACGTTGTAAAACGACGAATTCATCGTTGTCATTCAACTACA-3'

Cytochrome b – Reverse

5'-GGATAACAATTTCACACAGGGAATTCCTCCTTCTCTGGTTTACAAG-3'

3.1.7 การทำ PCR

นำดีเอ็นเอที่เจือจางความเข้มข้นมาทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b

การเตรียมสารเพื่อทำปฏิกิริยาในกระบวนการ PCR

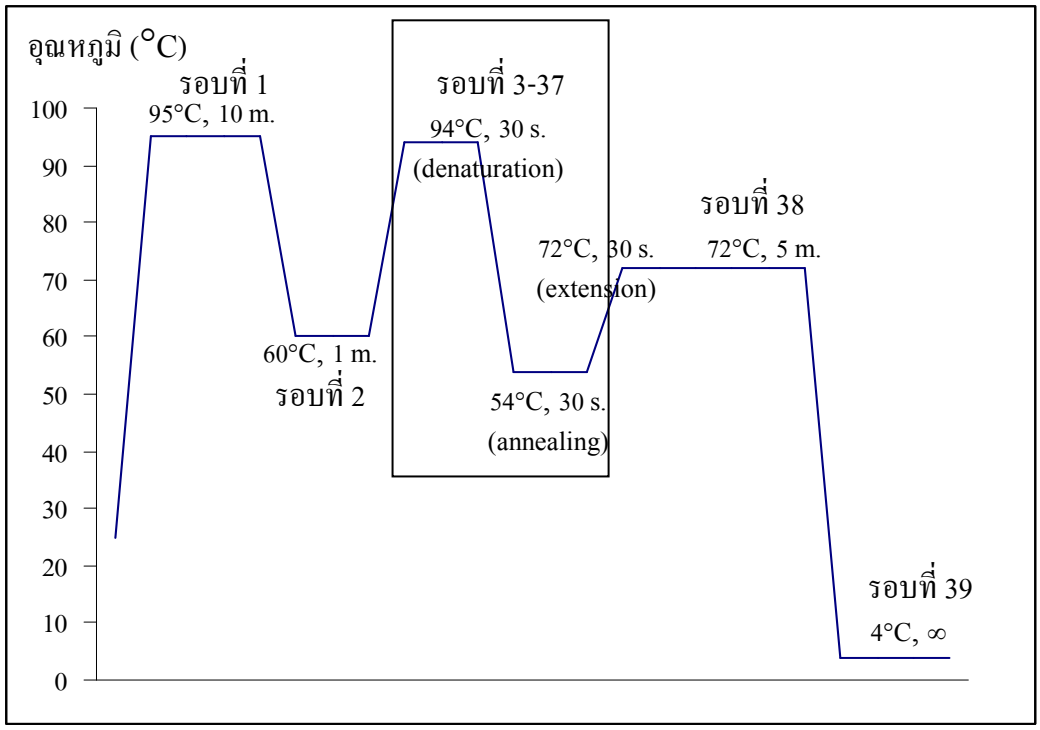
สาร	ปริมาตร	
Template	10.00	ไมโครลิตร
10Xbuffer	5.00	ไมโครลิตร
dNTP	4.00	ไมโครลิตร
10 pmol Primer F	5.00	ไมโครลิตร
10 pmol Primer R	5.00	ไมโครลิตร
Taq polymerase	0.25	ไมโครลิตร
Water	20.75	ไมโครลิตร
Total volume	50.00	ไมโครลิตร

ในการทำ PCR ครั้งนี้จะใช้วิธีการ hot start PCR โดยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อจำนวน 12.5 ไมโครลิตร ที่ผสม Taq polymerase จำนวน 0.25 ไมโครลิตร ในช่วงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วเข้าสู่กระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต่อไป

การดำเนินกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermo-cycle)

โดยใช้อุณหภูมิต่างๆ ตามลำดับดังนี้

รอบที่ 1	95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
รอบที่ 2	60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อเติม Taq polymerase และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ
รอบที่ 3-37	94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (denaturation)
	54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (annealing)
	72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที (extension)
รอบที่ 38	72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาสมบูรณ์ยิ่งขึ้น
รอบที่ 39	4 องศาเซลเซียส



3.1.8 การตรวจชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ (PCR product)

ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ (PCR product) ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอรีซีส (agarose gel electrophoresis) เตรียม 0.7% อะกาโรสเจล โดยใช้ผงอะกาโรส

เจล 0.7 กรัม ละลายใน 0.5X TBE 100 มิลลิลิตร (ที่มี ethidium bromide ละลายอยู่ในอัตราส่วน ethidium bromide 60 ไมโครลิตร ต่อ 0.5X TBE 2 ลิตร) เทลงในแบบพิมพ์ วางหวีแล้วปล่อยให้แข็งตัวดึงหวีออก เตรียม PCR product ที่ได้ โดยผสม loading dye จำนวน 1 ไมโครลิตร กับ PCR product จำนวน 2 ไมโครลิตร หยอดลงในช่องของแผ่นวุ้น (well) ต่อวงจรไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟฟ้าประมาณ 100 โวลต์ (volts) เป็นเวลา 30 นาที นำแผ่นวุ้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

3.1.9 การวิเคราะห์ผลการตรวจชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ (PCR product)

เปรียบเทียบผลของการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b ของตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอ และตัวอย่างเลือดจากใบหูหาตัวอย่างที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b

3.2 การศึกษาระยะเวลาที่นานที่สุดในการเก็บตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) นำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b

3.2.1 การศึกษา

การศึกษาเป็นการเก็บตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอ จำนวน 100 เส้น ของสุกรพื้นเมือง จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี มาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ที่ระยะเวลาต่างๆ แล้วจึงนำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b

ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา มีดังนี้

1. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) 0 ชั่วโมง จำนวน 2 ตัวอย่าง
2. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) 24 ชั่วโมง จำนวน 2 ตัวอย่าง
3. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) 48 ชั่วโมง จำนวน 2 ตัวอย่าง
4. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) 72 ชั่วโมง จำนวน 2 ตัวอย่าง
5. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) 96 ชั่วโมง จำนวน 2 ตัวอย่าง

นำตัวอย่างมาศึกษาเปรียบเทียบระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) นำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b ในห้องปฏิบัติการอาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2.2 การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างปมรากขน

1. ทำความสะอาดบริเวณที่จะทำการถอนปมรากขนด้วยน้ำสะอาด และเช็ดด้วยผ้าสะอาด

2. ใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์เช็ดทำความสะอาดอีกรอบ รอจนแอลกอฮอล์แห้ง

3. ถอนขนบริเวณดังกล่าว จากนั้นตัดขนด้วยกรรไกรปลอดเชื้อให้มีขนาดความยาวจากปมรากขนขึ้นมาประมาณ 0.5 เซนติเมตร ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 2.0 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อ

4. เก็บหลอดไมโครฟิวจ์ที่มีตัวอย่างปมรากขนในถังน้ำแข็ง (กรณีที่เก็บตัวอย่างปมรากขนไว้เกิน 24 ชั่วโมง จะเก็บหลอดไมโครฟิวจ์ไว้ในถังไนโตรเจนเหลว หรือ ตู้อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส)

3.2.3 การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น (โดยใช้ Genomic DNA Purification Kit (Wizard®)

1. เติม nuclei lysis solution 200 ไมโครลิตร 0.5M EDTA 48 ไมโครลิตร proteinase K (ความเข้มข้น15 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร) จำนวน 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสข้ามคืน โดยวางหลอดไมโครฟิวจ์บนเครื่องเขย่าสารให้ค่อยๆ ละลาย

2. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เพื่อให้เย็นลงเป็นเวลา 5 นาที เติม RNase A 1 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดคว่ำและหงาย 2-5 ครั้ง นำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3. เติม protein precipitation solution 67 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 20 วินาที แช่เย็นในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

4. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ย้ายของเหลว (supernatant) ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

5. เติม Isopropanol (0.8 V/V) 200 ไมโครลิตร ค่อยๆ ผสมให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดคว่ำและหงาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที

6. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 80% เอธานอล โดยระวังไม่ให้ตะกอนฟุ้งขึ้นมา 200 ไมโครลิตร

7. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ทิ้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10-15 นาที ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 30 ไมโครลิตร

3.2.4 การตรวจวัดปริมาณของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical density, O.D.) ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร (nm) ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ เป็น blank โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวน 1.5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จำนวน 300 ไมโครลิตร

คำนวณหาความเข้นของดีเอ็นเอจากตัวอย่างโดยใช้สูตร:

ความเข้นของดีเอ็นเอ (ng/μl) = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm*50*200 (dilution factor)

3.2.5 การเจือจางความเข็มข้นของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างปมรากขนมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีความเข้มข้น 2.5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

3.2.6 การทำ PCR

นำดีเอ็นเอที่เจือจางความเข้มข้นมาทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b

การเตรียมสารเพื่อทำปฏิกิริยาในกระบวนการ PCR

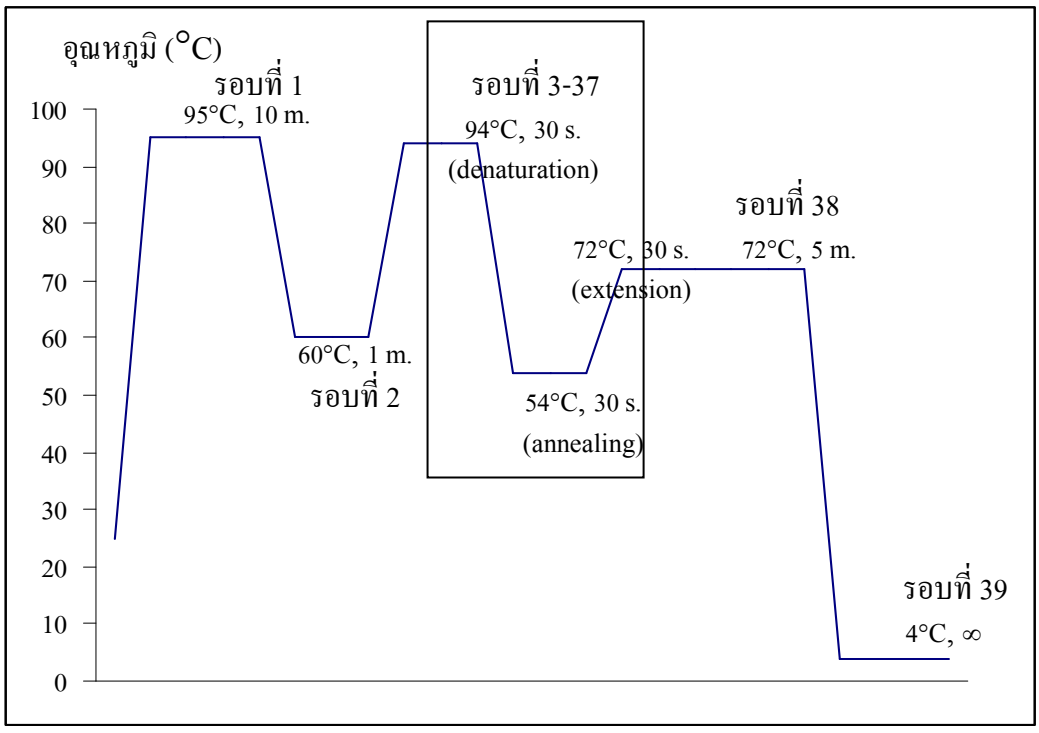
สาร	ปริมาตร	
Template (2.5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	10.00	ไมโครลิตร
10Xbuffer	5.00	ไมโครลิตร
dNTP	4.00	ไมโครลิตร
10 pmol Primer F	5.00	ไมโครลิตร
10 pmol Primer R	5.00	ไมโครลิตร
Taq polymerase	0.25	ไมโครลิตร
Water	20.75	ไมโครลิตร
Total volume	50.00	ไมโครลิตร

ในการทำ PCR ครั้งนี้จะใช้วิธีการ hot start PCR โดยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อจำนวน 12.5 ไมโครลิตร ที่ผสม Taq polymerase จำนวน 0.25 ไมโครลิตร ในช่วงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วเข้าสู่กระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต่อไป

การดำเนินกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermo-cycle)

โดยใช้อุณหภูมิต่างๆ ตามลำดับดังนี้

รอบที่ 1	95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
รอบที่ 2	60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อเติม Taq polymerase และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ
รอบที่ 3-37	94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (denaturation)
	54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (annealing)
	72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที (extension)
รอบที่ 38	72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาสมบูรณ์ยิ่งขึ้น
รอบที่ 39	4 องศาเซลเซียส



3.2.7 การตรวจชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ

ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยอะกาโรสเจล อิเล็กโตรฟอรีซีส เตรียม 0.7% อะกาโรสเจล โดยใช้ผงอะกาโรสเจล 0.7 กรัม ละลายใน 0.5X TBE 100 มิลลิลิตร (ที่มี ethidium bromide ละลายอยู่ในอัตราส่วน ethidium bromide 60 ไมโครลิตร ต่อ 0.5X TBE 2 ลิตร) เทลงในแบบพิมพ์ วางหวีแล้วปล่อยให้แข็งตัวดึงหวีออก เตรียม PCR product ที่ได้ โดยผสม

loading dye จำนวน 1 ไมโครลิตร กับ PCR product จำนวน 2 ไมโครลิตร หยอดลงในช่องของแผ่นวุ้น (well) ต่อวงจรไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟฟ้าประมาณ 100 โวลต์ (volts) เป็นเวลา 30 นาที นำแผ่นวุ้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

3.2.8 การวิเคราะห์ผลการตรวจชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ

เปรียบเทียบผลของการเพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b ของตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอ หาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) นำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b

3.3 การศึกษาลักษณะภายนอกของสุกรพื้นเมือง และความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมือง โดยใช้ความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b

3.3.1 การศึกษา

การศึกษาครั้งนี้ใช้ข้อมูลพื้นฐานจากพ่อแม่พันธุ์สุกรพื้นเมืองเพื่อนำมาเปรียบเทียบลักษณะภายนอก และตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอ จำนวน 100 เส้น จากพ่อแม่พันธุ์สุกรพื้นเมืองที่พบเห็นจากแหล่งต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย แล้วสุ่มตัวอย่างออกมาวิเคราะห์จากแหล่งต่างๆ แหล่งละ 10 เปอร์เซ็นของตัวอย่างที่เก็บได้ทั้งหมดในแต่ละแหล่ง

พื้นที่ที่จะเก็บตัวอย่างปมรากขนจากพ่อแม่พันธุ์สุกรพื้นเมือง

1. จังหวัดเลย
2. จังหวัดสกลนคร
3. จังหวัดนครพนม
4. จังหวัดมุกดาหาร
5. จังหวัดศรีษะเกษ
6. จังหวัดสุรินทร์

3.3.2 การเก็บตัวอย่าง

การเก็บข้อมูลพื้นฐานจากพ่อแม่พันธุ์สุกรพื้นเมืองที่เก็บตัวอย่างปมรากขน ดังนี้

1. ลักษณะหน้า
2. ลักษณะใบหู
3. ความยาวหน้า
4. ความ กว้างหน้า
5. ความยาวสันกะโหลกถึงโคนหาง

6. ความยาวซอกขาหน้าถึงซอกขาหลัง

7. ขนาดรอบอก

8. ความสูงจากพื้นถึงหัวไหล่

9. ลักษณะลายขาว (White marking)

10.รูปร่างลักษณะภายนอก

การเก็บตัวอย่างปมรากขน

1. ทำความสะอาดบริเวณที่จะทำการถอนปมรากขนด้วยน้ำสะอาด และเช็ดด้วยผ้าสะอาด

2. ใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์เช็ดทำความสะอาดอีกรอบ รอจนแอลกอฮอล์แห้ง

3. ถอนขนบริเวณดังกล่าว จากนั้นตัดขนด้วยกรรไกรปลอดเชื้อให้มีขนาดความยาวจากปมรากขนขึ้นมาประมาณ 0.5 เซนติเมตร ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 2.0 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อ

4. เก็บหลอดไมโครฟิวจ์ที่มีตัวอย่างปมรากขนในถังน้ำแข็ง (กรณีที่เก็บตัวอย่างปมรากขนไว้เกิน 24 ชั่วโมง จะเก็บหลอดไมโครฟิวจ์ไว้ในถังไนโตรเจนเหลว หรือ ตู้อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส)

นำตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b ในห้องปฏิบัติการอาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี แล้วส่งหาลำดับเบสส่วนของยีน cytochrome b ในแต่ละตัวอย่างเพื่อนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมือง โดยใช้ความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b

3.3.3 การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น (โดยใช้ Genomic DNA Purification Kit (Wizard®)

1. เติม nuclei lysis solution 200 ไมโครลิตร 0.5M EDTA 48 ไมโครลิตร proteinase K (ความเข้มข้น15 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร) จำนวน 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสข้ามคืน โดยวางหลอดไมโครฟิวจ์บนเครื่องเขย่าสารให้ค่อยๆ ละลาย

2. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เพื่อให้เย็นลงเป็นเวลา 5 นาที เติม RNase A 1 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดคว่ำและหงาย 2-5 ครั้ง นำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3. เติม protein precipitation solution 67 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 20 วินาที แช่เย็นในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

4. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ย้ายของเหลว (supernatant) ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

5. เติม Isopropanol (0.8 V/V) 200 ไมโครลิตร ค่อยๆ ผสมให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดคว่ำและหงาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที

6. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 80% เอธานอล โดยระวังไม่ให้ตะกอนฟุ้งขึ้นมา 200 ไมโครลิตร

7. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ทิ้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10-15 นาที ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 30 ไมโครลิตร

3.3.4 การตรวจวัดปริมาณของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร (nm) ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็น blank โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวน 1.5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปลอดเชื้อจำนวน 300 ไมโครลิตร

คำนวณหาความเข้นของดีเอ็นเอจากตัวอย่างโดยใช้สูตร:

ความเข้นของดีเอ็นเอ (ng/μl) = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm*50*200 (dilution factor)

3.3.5 การเจือจางความเข็มข้นของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างปมรากขนมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีความเข้มข้น 2.5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

3.3.6 การทำ PCR

นำดีเอ็นเอที่เจือจางความเข้มข้นมาทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b

การเตรียมสารเพื่อทำปฏิกิริยาในกระบวนการ PCR

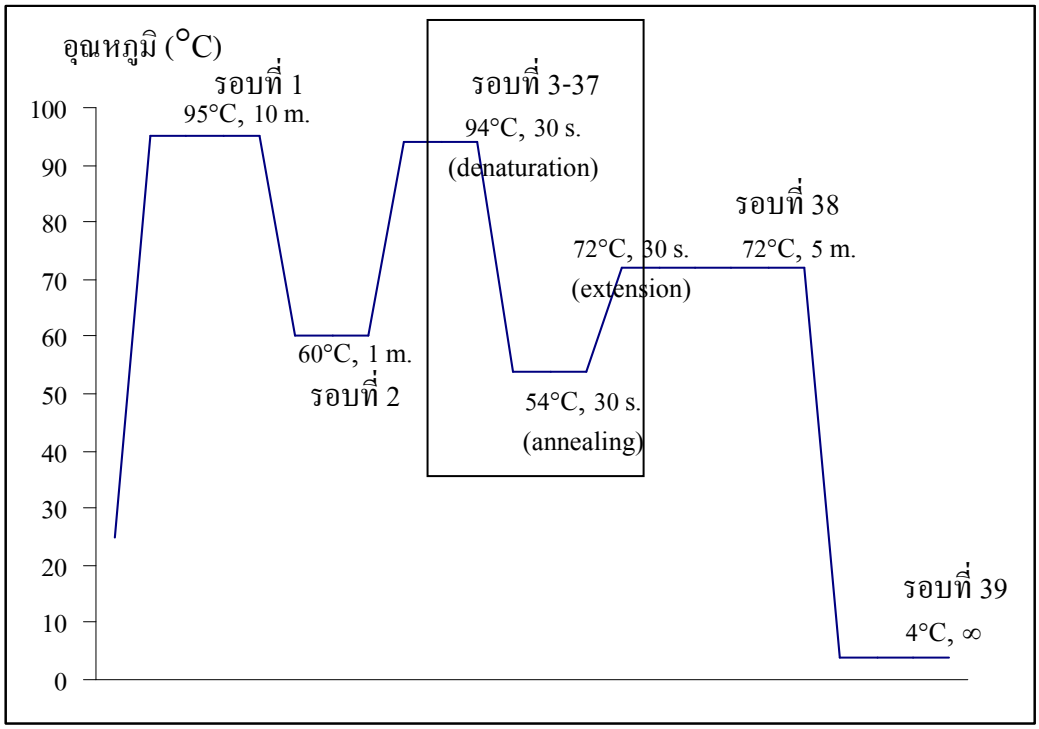
สาร	ปริมาตร	
Template (2.5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร)	10.00	ไมโครลิตร
10Xbuffer	5.00	ไมโครลิตร
dNTP	4.00	ไมโครลิตร
10 pmol Primer F	5.00	ไมโครลิตร
10 pmol Primer R	5.00	ไมโครลิตร
Taq polymerase	0.25	ไมโครลิตร
Water	20.75	ไมโครลิตร
Total volume	50.00	ไมโครลิตร

ในการทำ PCR ครั้งนี้จะใช้วิธีการ hot start PCR โดยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อจำนวน 12.5 ไมโครลิตร ที่ผสม Taq polymerase จำนวน 0.25 ไมโครลิตร ในช่วงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วเข้าสู่กระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต่อไป

การดำเนินกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermo-cycle)

โดยใช้อุณหภูมิต่างๆ ตามลำดับดังนี้

รอบที่ 1	95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
รอบที่ 2	60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อเติม Taq polymerase และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ
รอบที่ 3-37	94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (denaturation)
	54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (annealing)
	72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที (extension)
รอบที่ 38	72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาสมบูรณ์ยิ่งขึ้น
รอบที่ 39	4 องศาเซลเซียส



3.3.7 การตรวจชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ

ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณด้วยอะกาโรสเจล อิเล็กโตรฟอรีซีส เตรียม 0.7% อะกาโรสเจล โดยใช้ผงอะกาโรสเจล 0.7 กรัม ละลายใน 0.5X TBE 100 มิลลิลิตร (ที่มี ethidium bromide ละลายอยู่ในอัตราส่วน ethidium bromide 60 ไมโครลิตร ต่อ 0.5X TBE 2 ลิตร) เทลงในแบบพิมพ์ วางหวีแล้วปล่อยให้แข็งตัวดึงหวีออก เตรียม PCR product ที่ได้ โดยผสม loading dye จำนวน 1 ไมโครลิตร กับ PCR product จำนวน 2 ไมโครลิตร หยอดลงในช่องของแผ่นวุ้น (well) ต่อวงจรไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟฟ้าประมาณ 100 โวลต์ (volts) เป็นเวลา 30 นาที นำแผ่นวุ้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

3.3.8 การวิเคราะห์ลำดับเบสส่วนของยีน cytochrome b ในแต่ละตัวอย่าง

ทำการส่งตัวอย่างหาลำดับเบส

3.3.9 วิเคราะห์ข้อมูล

เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b โดยใช้โปรแกรม clustalX 1.81 เพื่อนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมือง

3.4 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยการสร้าง Phylogenetic tree ของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเปรียบเทียบกับสุกรพันธุ์ลาร์ไวท์ ดูรอค เหมยซาน และ แลนด์เรซ

3.4.1 การศึกษา

ทำการศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b โดยใช้โปรแกรม Genetyx ของตัวอย่างแต่ละ haplotype กับสุกรพันธุ์ลาร์ไวท์ ดูรอค เหมยซาน และแลนด์เรซ ที่หาข้อมูลการเรียงลำดับเบสจาก GenBank

3.5 การศึกษาตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) จากลำดับเบสส่วนของยีน cytochrome b ในแต่ละ haplotype

3.5.1 การศึกษา

การศึกษาเป็นการนำลำดับเบสของยีน cytochrome b ในแต่ละ Haplotype มาศึกษาตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) เพื่อนำไปเป็นข้อมูลในการใช้เทคนิค PCR-RFLP ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วกว่า

3.5.2 การหาตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme)

ใช้โปรแกรม clustalX 1.81 หาตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) บนลำดับเบสของยีน cytochrome b ในแต่ละ haplotype

3.5.3 วิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์หาตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) บนลำดับเบสของยีน cytochrome b ที่สามารถใช้แยกแต่ละ haplotype ออกจากกันเป็นกลุ่ม

บทที่ 4
ผลการทดลองและการอภิปรายผล

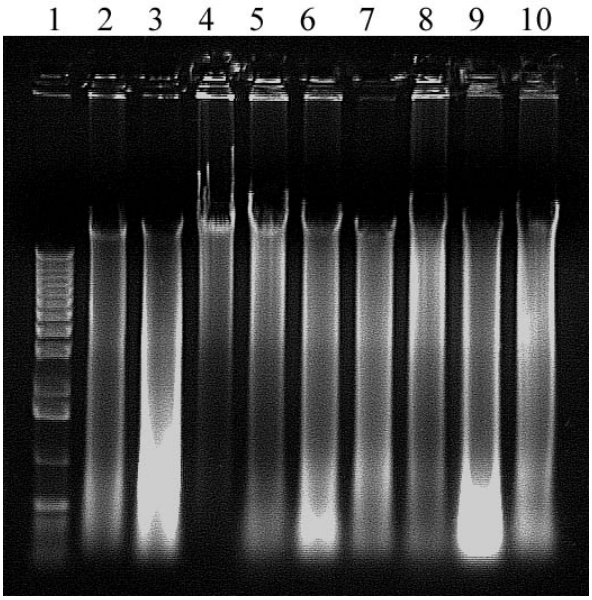
4.1 ตัวอย่างที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b

4.1.1 ดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่าง

เมื่อนำตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอ และตัวอย่างเลือดจากใบหูของสุกรพื้นเมือง ดังนี้

1. ตัวอย่างเลือดจากใบหู	350	ไมโครลิตร	จำนวน 3 ตัวอย่าง
2. ตัวอย่างปมรากขนจำนวน	100	เส้น	จำนวน 3 ตัวอย่าง
3. ตัวอย่างปมรากขนจำนวน	200	เส้น	จำนวน 3 ตัวอย่าง

นำมาทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วตรวจสอบดีเอ็นเอด้วย 0.7% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอรีซีสจะปรากฏลักษณะดีเอ็นดังแผนภาพที่ 4.1



แผนภาพที่ 4.1 ลักษณะดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอ และตัวอย่างเลือดจากใบหูของสุกรพื้นเมือง (ช่องที่ 1 เป็น DNA maker ช่องที่ 2-4 เป็นตัวอย่างเลือด ช่องที่ 5-7 เป็นตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น และช่องที่ 8-10 เป็นตัวอย่างปมรากขนจำนวน 200 เส้น)

จากแผนภาพที่ 4.1 แสดงให้เห็นว่าเมื่อนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบด้วย 0.7% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอรีซีสสามารถสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดจากใบหู 350

ไมโครลิตร ตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น และตัวอย่างปมรากขนจำนวน 200 เส้น ได้ ทำให้ในการเก็บตัวอย่างที่จะนำมาใช้ในการสกัดดีเอ็นเอของสุกรพื้นเมืองนั้นไม่จำเป็นต้องใช้เฉพาะตัวอย่างเลือดเท่านั้น โดยสามารถใช้วิธีการเก็บปมรากขนมาเพื่อสกัดดีเอ็นเอแทนการเก็บตัวอย่างเลือดที่ยุ่งยากและลำบากกว่าการเก็บตัวอย่างปมรากขน

ปริมาณของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical density, O.D.) ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร (nm) และคำนวณหาความเข้นของดีเอ็นเอจากตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอ และตัวอย่างเลือดจากใบหูของสุกรพื้นเมือง

ตัวอย่าง	ความเข้มขนของดีเอ็นเอ
ตัวอย่างเลือดซ้ำที่ 1	90 ng/μl
ตัวอย่างเลือดซ้ำที่ 2	160 ng/μl
ตัวอย่างเลือดซ้ำที่ 3	60 ng/μl
ตัวอย่างปมรากขน 100 เส้น ซ้ำที่ 1	480 ng/μl
ตัวอย่างปมรากขน 100 เส้น ซ้ำที่ 2	380 ng/μl
ตัวอย่างปมรากขน 100 เส้น ซ้ำที่ 3	330 ng/μl
ตัวอย่างปมรากขน 200 เส้น ซ้ำที่ 1	1570 ng/μl
ตัวอย่างปมรากขน 200 เส้น ซ้ำที่ 2	810 ng/μl
ตัวอย่างปมรากขน 200 เส้น ซ้ำที่ 3	1580 ng/μl

จากตารางที่ 4.1 จะพบว่าเมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical density, O.D.) ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร (nm) และคำนวณหาความเข้นข้นของดีเอ็นเอจากตัวอย่างปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้มากที่สุดจะได้จากตัวอย่างปมรากขน 200 เส้น และรองลงมา คือ ตัวอย่างปมรากขน 100 เส้น และตัวอย่างเลือดจากใบหูตามลำดับ จึงทำให้เห็นว่าถึงแม้จะเก็บตัวอย่างจากปมรากขนก็สามารถสกัดดีเอ็นเอจากสุกรพื้นเมืองได้ในปริมาณที่มากเช่นกัน

4.1.2 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ (PCR product)

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอ และตัวอย่างเลือดจากใบหูมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีความเข้มข้นดังนี้

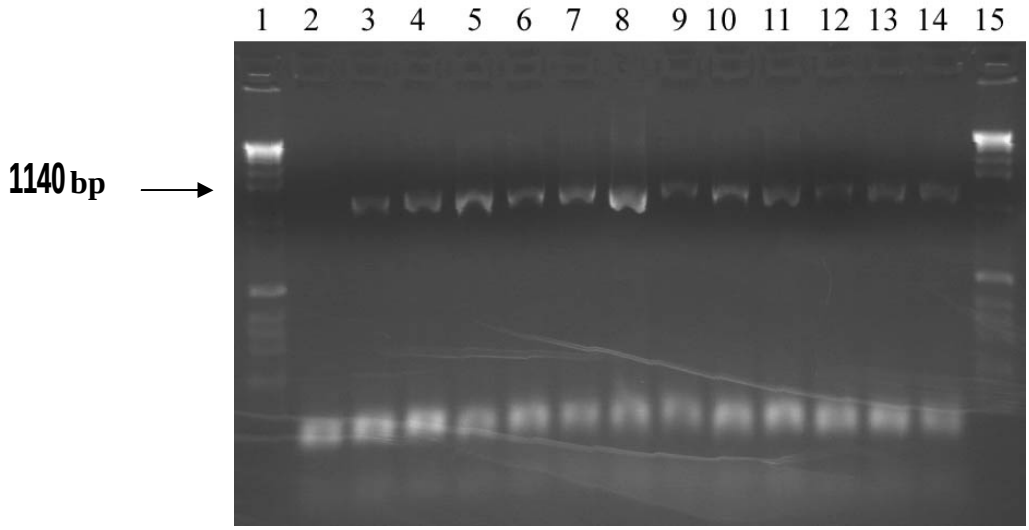
1. ตัวอย่างเลือดจากใบหูซ้ำที่ 1 และ 2 ให้มีความเข้มข้น

- 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร
- 2.5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร
- 5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

2. ตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น ซ้ำที่ 1 และ 2 ให้มีความเข้มข้น

- 1 นาโนกรัม/ไมโครลิตร
- 2.5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร
- 5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร

นำมาทำ Polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วย 0.7% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอรีสีส (agarose gel electrophoresis) ปรากฏลักษณะชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังแผนภาพที่ 4.2



แผนภาพที่ 4.2 ลักษณะชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b (ช่องที่ 1 และ 15 เป็น DNA maker ช่องที่ 2 เป็น Negative control ช่องที่ 3-5 เป็นตัวอย่างเลือดซ้ำที่ 1 ความเข้มข้น template 1, 2.5 และ 5 ng/µl ตามลำดับ ช่องที่ 6-8 เป็นตัวอย่างเลือดซ้ำที่ 2 ความเข้มข้น template 1, 2.5 และ 5 ng/µl ตามลำดับ ช่องที่ 9-11 เป็นตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น ซ้ำที่ 1 ความเข้มข้น template 1, 2.5 และ 5 ng/µl ตามลำดับ และช่องที่ 12-14 เป็นตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น ซ้ำที่ 2 ความเข้มข้น template 1, 2.5 และ 5 ng/µl ตามลำดับ

จากแผนภาพที่ 4.2 แสดงให้เห็นว่าเมื่อนำตัวอย่างดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดจากใบหู 350 ไมโครลิตร และตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น ที่มีความเข็มข้น template 1, 2.5 และ 5 ng/µl มาทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดี

เอ็นเอด้วย 0.7% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอรีซีสสามารถเพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b ได้ไม่แตกต่างกัน จากการที่เลือกนำเฉพาะตัวอย่างเลือดจากใบหู 350 ไมโครลิตร และตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น ที่มีความเข้มข้น template 1, 2.5 และ 5 ng/μl นั้นเพื่อที่จะดูว่าคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือด และตัวอย่างปมรากขนสามารถนำมาทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b ได้แตกต่างกันหรือไม่ ซึ่งพบว่าไม่แตกต่างกัน และที่เลือกเฉพาะตัวอย่างปมรากขน จำนวน 100 เส้น นั้น เพราะการเก็บตัวอย่างปมรากขน จำนวน 100 เส้น ยุ่งยากและลำบากน้อยกว่าการเก็บตัวอย่างปมรากขน จำนวน 200 เส้น

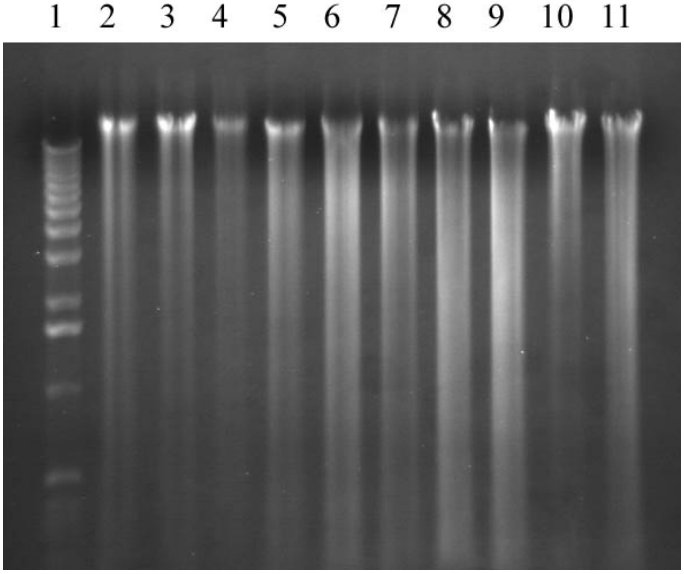
4.2 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) นำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b

4.2.1 ดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่าง

เมื่อตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอ จำนวน 100 เส้น ของสุกรพื้นเมืองมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ที่ระยะเวลาต่างๆ ดังนี้

1. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) 0 ชั่วโมง จำนวน 2 ตัวอย่าง
2. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) 24 ชั่วโมง จำนวน 2 ตัวอย่าง
3. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) 48 ชั่วโมง จำนวน 2 ตัวอย่าง
4. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) 72 ชั่วโมง จำนวน 2 ตัวอย่าง
5. เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) 96 ชั่วโมง จำนวน 2 ตัวอย่าง

นำมาทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วตรวจสอบดีเอ็นเอด้วย 0.7% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอรีซีสจะปรากฏลักษณะดีเอ็นดังแผนภาพที่ 4.3



แผนภาพที่ 4.3 ลักษณะดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอจำนวน 100 เส้น ของสุกรพื้นเมืองที่นำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ที่ระยะเวลาต่างๆ (ช่องที่ 1 เป็น DNA maker ช่องที่ 2-3 เป็นตัวอย่างที่ 0 ชั่วโมง ช่องที่ 4-5 เป็นตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมง ช่องที่ 6-7 เป็นตัวอย่างที่ 48 ชั่วโมง ช่องที่ 8-9 เป็นตัวอย่างที่ 72 ชั่วโมง และช่องที่ 10-11 เป็นตัวอย่างที่ 96 ชั่วโมง)

จากแผนภาพที่ 4.3 แสดงให้เห็นว่าเมื่อนำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตรวจสอบด้วย 0.7% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอรีซีสสามารถสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอจำนวน 100 เส้น ของสุกรพื้นเมืองมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ได้ จากการศึกษานี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในกรณีที่ไม่สามารถเก็บตัวอย่างไว้ในถังน้ำแข็งหรือไนโตรเจนเหลวได้ เนื่องจากบางครั้งในกรณีที่ผู้เก็บตัวอย่างไม่สามารถออกไปเก็บตัวอย่างได้ด้วยตัวเองหรืออุปกรณ์ในการเก็บรักษาตัวอย่างไม่เพียงพอหรือนำติดตัวไปได้ยาก การเก็บตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น ไว้เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง ก็ยังสามารถนำตัวอย่างนั้นมาสกัดดีเอ็นเอได้เช่นกัน

ปริมาณของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical density, O.D.) ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร (nm) และคำนวณหาความเข้นของดีเอ็นเอจากตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 4.2

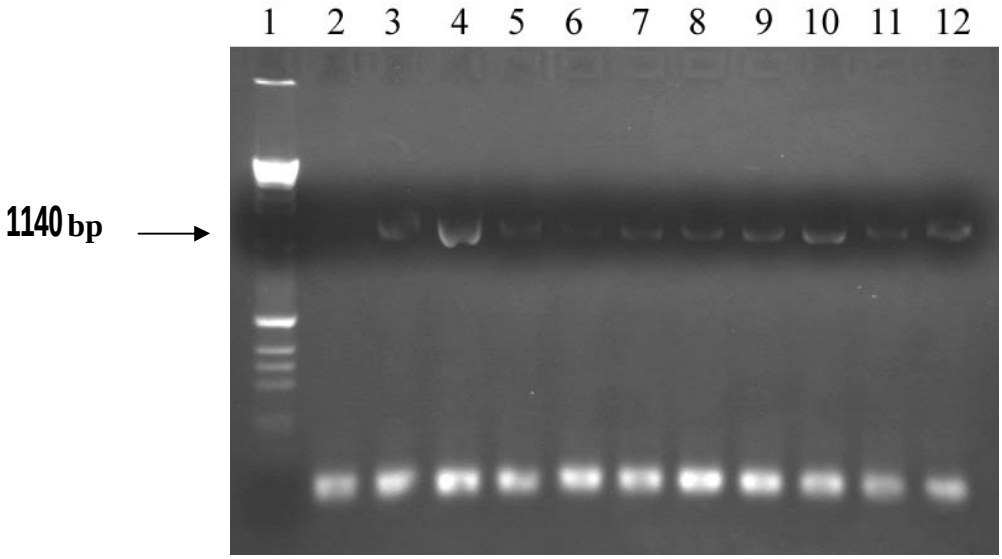
ตารางที่ 4.2 ความเข้มขนของดีเอ็นเอจากตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอจำนวน 100 เส้น ของสุกรพื้นเมืองที่นำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ที่ระยะเวลาต่างๆ

ตัวอย่าง	ความเข้มขนของดีเอ็นเอ
เก็บที่ 0 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1	430 ng/μl
เก็บที่ 0 ชั่วโมง ซ้ำที่ 2	100 ng/μl
เก็บที่ 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1	480 ng/μl
เก็บที่ 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 2	110 ng/μl
เก็บที่ 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1	600 ng/μl
เก็บที่ 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 2	270 ng/μl
เก็บที่ 72 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1	470 ng/μl
เก็บที่ 72 ชั่วโมง ซ้ำที่ 2	160 ng/μl
เก็บที่ 96 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1	1280 ng/μl
เก็บที่ 96 ชั่วโมง ซ้ำที่ 2	380 ng/μl

จากตารางที่ 4.2 จะพบว่าเมื่อนำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical density, O.D.) ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร (nm) และคำนวณหาความเข้นของดีเอ็นเอจากตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอ จำนวน 100 เส้น ของสุกรพื้นเมืองมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ความเข็มข้นของดีเอ็นเอจะมีความแปรปรวนแตกต่างกันไป ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อทิ้งตัวอย่างปมรากขนไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างมีการถูกย่อยตัวเอ็นไซม์หรือจุลลินทรีย์ที่แตกต่างกันไปในแต่ละตัวอย่าง

4.2.2 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีความเข้มข้น 2.5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร แล้วทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วย 0.7% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอรีซีสจะปรากฏลักษณะชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังแผนภาพที่ 4.4



แผนภาพที่ 4.4 ลักษณะชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b (ช่องที่ 1 เป็น DNA maker ช่องที่ 2 เป็น negative control ช่องที่ 3-4 เป็นตัวอย่างเก็บที่ 0 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1 และ 2 ช่องที่ 5-6 เป็นตัวอย่างเก็บที่ 24 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1 และ 2 ช่องที่ 7-8 เป็นตัวอย่างเก็บที่ 48 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1 และ 2 ช่องที่ 9-10 เป็นตัวอย่างเก็บที่ 72 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1 และ 2 และ ช่องที่ 11-12 เป็นตัวอย่างเก็บที่ 96 ชั่วโมง ซ้ำที่ 1 และ 2)

จากแผนภาพที่ 4.4 แสดงให้เห็นว่าเมื่อนำตัวอย่างดีเอ็นเอจากปมรากขนจากแผงคอจำนวน 100 เส้น ของสุกรพื้นเมืองมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ที่มีความเข้มข้น template 2.5 ng/µl มาทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วย 0.7% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอรีซีสสามารถเพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b ได้ไม่แตกต่างกัน จากการที่นำตัวอย่างดีเอ็นเอจากปมรากขนจากแผงคอ จำนวน 100 เส้น ของสุกรพื้นเมืองมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เพื่อที่จะดูว่าคุณภาพของดีเอ็นเอที่สกัดได้สามารถนำมาทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b ได้แตกต่างกันหรือไม่ ซึ่งพบว่าไม่แตกต่างกัน

4.3 การศึกษาลักษณะภายนอกของสุกรพื้นเมือง และความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมือง โดยใช้ความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b

ทำการเก็บข้อมูลพื้นฐานจากพ่อแม่พันธุ์สุกรพื้นเมืองเพื่อนำมาเปรียบเทียบลักษณะภายนอก และตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอ จำนวน 100 เส้น จากพ่อแม่พันธุ์สุกรพื้นเมืองที่พบเห็นจากแหล่งต่างๆ ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยในแหล่งต่างๆ ดังนี้

1. จังหวัดเลย
2. จังหวัดสกลนคร
3. จังหวัดนครพนม
4. จังหวัดมุกดาหาร
5. จังหวัดศรีษะเกษ
6. จังหวัดสุรินทร์

จำนวนตัวอย่างที่ออกเก็บในแต่ละพื้นที่แสดงในตารางที่ 4.3 ตำแหน่งที่ออกเก็บตัวอย่างนั้นจะใช้วิธีการบอกสอบถามจากชาวบ้าน และเกษตรกรผู้เลี้ยงว่าบริเวณใดมีการเลี้ยงสุกรพื้นเมืองบ้าง ส่วนตัวอย่างที่ถูกเลือกมาทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b แสดงในตารางที่ 4.4 โดยหลักการในการเลือกตัวอย่างขึ้นมาทดสอบนั้นจะใช้วิธีเลือกตัวอย่างให้กระจายไปตามบริเวณที่เก็บตัวอย่างทั้งหมดเพื่อให้ได้ตัวอย่างที่จะนำมาศึกษาครอบคลุมพื้นที่ที่ออกเก็บตัวอย่าง

ตารางที่ 4.3 ข้อมูลการเก็บตัวอย่างสุกรพื้นเมืองในแต่ละพื้นที่

สถานที่	สุกรพื้นเมือง*		สุกรป่า	สุกรพื้นเมือง ผสมเหมยซาน	สุกรพื้นเมือง ผสมสุกรป่า	เหมยซาน แท้	รวม
	ไทย	ลาว					
จ.เลย							
อ.เชียงคาน[1]	5**(2)**	2**(1)**	-	-	1	-	8
อ.ท่าลี่	4**(3)**	-	-	-	-	-	4
อ.วังสะพุง	1	-	-	-	-	-	1
รวม	10	2	-	-	1	-	13
จ.สกลนคร							
อ.กุดบาก	10**(1)**	-	2	-	-	-	12
อ.เมือง	1**(1)**	-	-	-	-	-	1
อ.เต่างอย	1**(1)**	-	2	1	-	-	4
รวม	12	-	4	1	-	-	17
จ.นครพนม							
อ.นาหว้า[2]	3**(1)**	1**(1)**	1	1	-	1	7
อ.เมือง	1**(1)**	-	1	-	1	-	3
รวม	4	1	2	1	1	1	10
จ.มุกดาหาร							
อ.หว่านใหญ่[3]	7**(2)**	4**(1)**	-	-	-	-	11
รวม	7	4	-	-	-	-	11
จ.ศรีสะเกษ							
อ.เมือง	2**(2)**	-	-	-	-	-	2
รวม	2	-	-	-	-	-	2
จ.สุรินทร์							
อ.พนมดงรัก	8**(3)**	-	-	-	-	-	8
รวม	8	-	-	-	-	-	8
					รวมทั้งหมด		**61**

หมายเหตุ:* ตัวเลขในวงเล็บ คือ จำนวนตัวอย่างที่เลือกมาศึกษาความหลากหลาย

[1] สุกรพื้นเมือง 1 ตัว มาจากตัว จ.เลย และอีก 1 ตัวเป็นหมูควาย

[2] สุกรพื้นเมือง 2 ตัว มาจาก อ.เต่างอย จ.สกลนคร

[3] สุกรพื้นเมืองมาจาก อ.ธาตุพนม 1 ตัว และอ.ภูพาน 1 ตัว

ตารางที่ 4.4 ตัวอย่างที่ถูกเลือกมาทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b

ตัวอย่าง	สุกรพื้นเมือง		จังหวัด	อำเภอ	รายละเอียดเพิ่มเติม
	ไทย	ลาว			
1 mtDNA-L	√		เลย	เชียงคาน	123 ม.5 บ.อุมุง ต.บุฮุม
2 mtDNA-L	√		เลย	เชียงคาน	6 ม.5 บ.อุมุง ต.บุฮุม
3 mtDNA-L	√		เลย	ท่าลี่	234 ม.4 บ.นากระเซ็ง ต.อาฮี
4 mtDNA-L	√		เลย	ท่าลี่	234 ม.4 บ.นากระเซ็ง ต.อาฮี
5 mtDNA-L	√		เลย	ท่าลี่	297 ม.1 บ.อาฮี ต.อาฮี
6 mtDNA-SK	√		สกลนคร	กุดบาก	44 ม.6 บ.ทรายแก้ว ต.กุดบาก
7 mtDNA-SK	√		สกลนคร	เมือง	ร.ร.กุดบากพัฒนาศึกษา ต.กุดบาก
8 mtDNA-SK	√		สกลนคร	เต่างอย	56 ม.1 บ.นาอ่าง ต.นาตาล
9 mtDNA-NP	√		นครพนม	นาหว้า	239/14 ม.7 บ.นางัว ต.นางัว
10 mtDNA-NP	√		นครพนม	เมือง	98 ม.9 บ.กุรุคุ ต.กุรุด
11 mtDNA-MD	√		มุกดาหาร	หว่านใหญ่	6 ม.1 บ.นิคมทหารผ่านศึก ต.ดงหมู
12 mtDNA-MD	√		มุกดาหาร	หว่านใหญ่	29 ม.1 บ.นิคมทหารผ่านศึก ต.ดงหมู
13 mtDNA-SS	√		ศรีสะเกษ	เมือง	35 ม.8 บ.ชุมชนหนองโพธิ์ ต.หนองครก
14 mtDNA-SS	√		ศรีสะเกษ	เมือง	36 ม.8 บ.ชุมชนหนองโพธิ์ ต.หนองครก
15 mtDNA-SR	√		สุรินทร์	พนมดงรัก	22 ม.11 บ.อู่โลก ต.กิ่งพนมดงรัก
16 mtDNA-SR	√		สุรินทร์	พนมดงรัก	29/1 ม.12 บ.สะกอ ต.พนมดงรัก
17 mtDNA-SR	√		สุรินทร์	พนมดงรัก	28 ม.15 ซอย 15 บ.หนองแวง ต.พนมดงรัก
18 mtDNA-LAO-L		√	เลย	เชียงคาน	117 ม.7 บ.นาจาน ต.ปากตม (นำมาจากประเทศลาว)
19 mtDNA-LAO-NP		√	นครพนม	นาหว้า	8 ม.13 บ.อุ่นยางคำ ต.นาหว้า (นำมาจากประเทศลาว)
20 mtDNA-LAO-MD		√	มุกดาหาร	หว่านใหญ่	29 ม.10 บ.นาแกน้อย ต.โป่งขาม (นำมาจากประเทศลาว)

4.3.1 เปรียบเทียบลักษณะภายนอกของสุกรพื้นเมือง

ลักษณะภายนอกบางประการที่ประเมิน ได้แก่ ลักษณะสี ลายขาว (White maker) หู และลักษณะใบหน้า ในสุกร 6 กลุ่ม ในจังหวัดเลย สกลนคร นครพนม มุกดาหาร ศรีษะเกษ และสุรินทร์ สามารถแยกลักษณะภายนอกของสุกรพื้นเมืองได้ 9 รูปแบบ ดังนี้ คือ

รูปแบบที่ 1 มีลักษณะสีดำทั้งตัว ใบหูเล็กตั้ง หน้ายาว (แผนภาพที่ 4.5) พบในจังหวัดเลย สกลนคร นครพนม มุกดาหาร ศรีษะเกษ และสุรินทร์ กล่าวคือ จะพบลักษณะภายนอกรูปแบบนี้ในทุกจังหวัดที่ออกเก็บตัวอย่าง

รูปแบบที่ 2 มีลักษณะสีดำทั้งตัว ใบหูใหญ่ตั้ง หน้ายาว (แผนภาพที่ 4.6) พบในจังหวัดสกลนคร และนครพนม

รูปแบบที่ 3 มีลักษณะสีดำทั้งตัว ใบหูใหญ่ตก หน้ายาว (แผนภาพที่ 4.7) พบในจังหวัดสกลนคร มุกดาหาร ศรีษะเกษ และสุรินทร์

รูปแบบที่ 4 มีลักษณะสีดำทั้งตัว ใบหูเล็กตั้ง หน้าสั้น (แผนภาพที่ 4.8) พบในจังหวัดเลย

รูปแบบที่ 5 มีลักษณะสีดำ แต่ที่ปลายเท้าทั้งสี่มีสีขาว บางตัวมีสีขาวถึงบริเวณเลยข้อเข่า บางตัวมีสีขาวทั้งขา ใบหูเล็กตั้ง หน้ายาว (แผนภาพที่ 4.9) พบในจังหวัดเลย นครพนม และสุรินทร์

รูปแบบที่ 6 มีลักษณะสีดำ แต่ส่วนตอนล่างของลำตัวจะมีสีขาว หน้ามีแถบขาว ใบหูเล็กตั้ง หน้ายาว (แผนภาพที่ 4.10) พบในจังหวัดเลย และสุรินทร์

รูปแบบที่ 7 มีลักษณะสีดำบริเวณส่วนหัว และส่วนท้าย แต่ช่วงกลางลำตัว หน้ามีแถบขาว ใบหูเล็กตั้ง หน้ายาว (แผนภาพที่ 4.11) พบในจังหวัดเลย

รูปแบบที่ 8 มีลักษณะสีขาวทั้งตัว แต่มีลอยด่างสีดำเป็นจุดทั้งตัว ใบหูเล็กตั้ง หน้ายาว (แผนภาพที่ 4.12) พบในจังหวัดสุรินทร์

รูปแบบที่ 9 มีลักษณะสีขาวทั้งตัว แต่มีลอยด่างสีดำบริเวณตอนบนของช่วงท้ายของลำตัว ใบหูเล็กตั้ง หน้ายาว (แผนภาพที่ 4.13) พบในจังหวัดมุกดาหาร

แผนภาพที่ 4.5 สุกรพื้นเมืองรูปแบบที่ 1 มีลักษณะสีดำทั้งตัว ใบหูใหญ่ตั้ง หน้ายาว

แผนภาพที่ 4.6 สุกรพื้นเมืองรูปแบบที่ 2 มีลักษณะสีดำทั้งตัว ใบหูใหญ่ตั้ง หน้ายาว

แผนภาพที่ 4.7 สุกรพื้นเมืองรูปแบบที่ 3 มีลักษณะสีดำทั้งตัว ใบหูใหญ่ตก หน้ายาว

แผนภาพที่ 4.8 สุกรพื้นเมืองรูปแบบที่ 4 มีลักษณะสีดำทั้งตัว ใบหูเล็กตั้ง หน้าสั้น

แผนภาพที่ 4.9 สุกรพื้นเมืองรูปแบบที่ 5 มีลักษณะสีดำ แต่ที่ปลายเท้าทั้งสี่มีสีขาว บางตัวมีสีขาวถึงบริเวณเลยข้อเข่า บางตัวมีสีขาวทั้งขา ใบหูเล็กตั้ง หน้ายาว

แผนภาพที่ 4.10 สุกรพื้นเมืองรูปแบบที่ 6 มีลักษณะสีดำ แต่ส่วนตอนล่างของลำตัวจะมีสี ขาว หน้ามีแถบขาว ใบหูเล็กตั้ง หน้ายาว

แผนภาพที่ 4.11 สุกรพื้นเมืองรูปแบบที่ 7 มีลักษณะสีดำบริเวณส่วนหัว และส่วนท้าย แต่ช่วงกลางลำตัว หน้ามีแถบขาว ใบหูเล็กตั้ง หน้ายาว

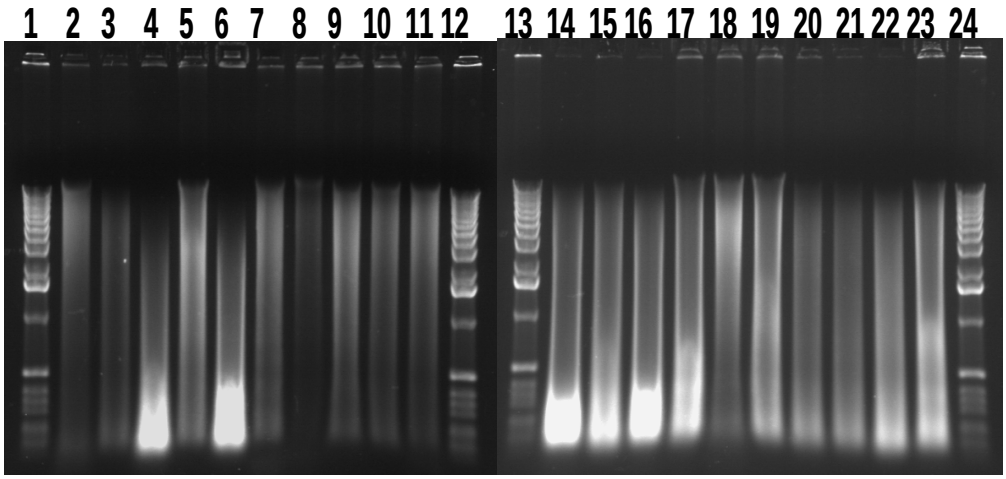
แผนภาพที่ 4.12 สุกรพื้นเมืองมีลักษณะสีขาวทั้งตัว แต่มีลอยด่างสีดำเป็นจุดทั้งตัว ใบหูเล็กตั้ง หน้ายาว

แผนภาพที่ 4.13 สุกรพื้นเมืองรูปแบบที่ 9 มีลักษณะสีขาวทั้งตัว แต่มีลอยด่างสีดำบริเวณตอนบนของช่วงท้ายของลำตัว ใบหูเล็กตั้ง หน้ายาว

เมื่อพิจารณาลักษณะภายนอกของสุกรพื้นเมืองในแต่ละจังหวัดจะพบว่าในจังหวัดเลยลักษณะของสุกรพื้นเมืองพบเป็นดังรูปแบบที่ 5 และ 6 เด่นชัดเจนกว่าจังหวัดอื่น คือ มีลักษณะลายขาว (White maker) เป็นจำนวนมากกว่าจังหวัดอื่น ส่วนในจังหวัดมุกดาหารลักษณะของสุกรพื้นเมืองพบเป็นดังรูปแบบที่ 3 เด่นชัดเจนกว่าจังหวัดอื่น คือ มีลักษณะสีดำทั้งตัว ใบหูใหญ่ตก หน้ายาว และจังหวัดสกลนคร นครพนม และสรินทร์ลักษณะของสุกรพื้นเมืองพบเป็นดังรูปแบบที่ 1 เด่นชัดเจนกว่าจังหวัดอื่น คือ สุกรพื้นเมืองรูปแบบที่ 1 มีลักษณะสีดำทั้งตัว ใบหูใหญ่ตั้ง หน้ายาว แต่อย่างไรก็ตามลักษณะภายนอกของสุกรพื้นเมืองในแต่ละจังหวัดไม่สามารถกำหนดได้อย่างชัดเจน เพราะมีความแปรปรวนไปทั้งในกลุ่มสุกรพื้นเมืองภายในจังหวัด และระหว่างกลุ่มสุกรพื้นเมืองในแต่ละจังหวัด ดังนั้นความพยายามที่จะจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือด้วยลักษณะภายนอกไม่สามารถแยกได้อย่างชัดเจน

4.3.2 ดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่าง

เมื่อนำตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอ จำนวน 100 เส้น ของสุกรพื้นเมืองที่ถูกเลือกมาทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b มาทำการสกัดดีเอ็นเอแล้วตรวจสอบดีเอ็นเอด้วย 0.7% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอรีซีสจะปรากฏลักษณะดีเอ็นดังแผนภาพที่ 4.5



แผนภาพที่ 4.14 ลักษณะดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอจำนวน 100 เส้น ของสุกรพื้นเมืองที่ถูกเลือกมาทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมโดยใช้ความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b (ช่องที่ 1, 12, 13 และ 24 เป็น DNA maker ช่องที่ 2-11 เป็นตัวอย่างที่ 1 mtDNA - 10 mtDNA ช่องที่ 14-23 เป็นตัวอย่างที่ 11 mtDNA - 20 mtDNA)

ปริมาณของดีเอ็นเอ

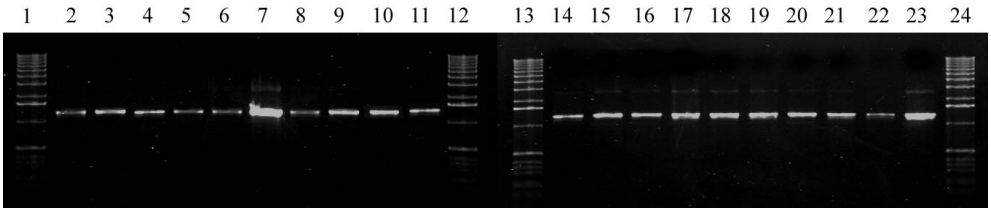
นำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical density, O.D.) ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร (nm) และคำนวณหาความเข้นของดีเอ็นเอจากตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.5 ความเข้มข้นของดีเอ็นเอจากตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอจำนวน 100 เส้น ของสุกร พื้นเมืองที่ถูกเลือกมาทำการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

ตัวอย่าง	ความเข้มข้นของดีเอ็นเอ
1 mtDNA	10400 ng/μl
2 mtDNA	9300 ng/μl
3 mtDNA	2770 ng/μl
4 mtDNA	1290 ng/μl
5 mtDNA	1090 ng/μl
6 mtDNA	270 ng/μl
7 mtDNA	1010 ng/μl
8 mtDNA	1980 ng/μl
9 mtDNA	1380 ng/μl
10 mtDNA	1280 ng/μl
11 mtDNA	920 ng/μl
12 mtDNA	1210 ng/μl
13 mtDNA	890 ng/μl
14 mtDNA	1540 ng/μl
15 mtDNA	1000 ng/μl
16 mtDNA	540 ng/μl
17 mtDNA	490 ng/μl
18 mtDNA	1100 ng/μl
19 mtDNA	1030 ng/μl
20 mtDNA	590 ng/μl

4.3.3 ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ

นำดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีความเข้มข้น 2.5 นาโนกรัม/ไมโครลิตร แล้วทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b แล้วตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วย 0.7% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอรีซีสจะปรากฏลักษณะชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังแผนภาพที่ 4.6



แผนภาพที่ 4.15 ลักษณะชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b (ช่องที่ 1, 12, 13 และ 24 เป็น DNA maker ช่องที่ 2-11 เป็นตัวอย่างที่ 1 mtDNA - 10 mtDNA ช่องที่ 14-23 เป็นตัวอย่างที่ 11 mtDNA - 20 mtDNA)

4.3.4 ลำดับเบสส่วนของยีน cytochrome b ในแต่ละตัวอย่าง

นำ PCR product ของแต่ละตัวอย่างส่งหาลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b ได้ดังนี้

```
01mtDNA     1:GACCTCCCAGCCCCCTCAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGTTCCCTCTTAGGCATC  60
02mtDNA     1:GACCTCCCAGCCCCCTCAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGTTCCCTCTTAGGCATC  60
03mtDNA     1:GACCTCCCAGCCCCCTCAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGTTCCCTCTTAGGCATC  60
04mtDNA     1:GACCTCCCAGCCCCCTCAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGTTCCCTCTTAGGCATC  60
05mtDNA     1:GACCTCCCAGCCCCCTCAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGTTCCCTCTTAGGCATC  60
06mtDNA     1:GACCTCCCAGCCCCCTCAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGTTCCCTCTTAGGCATC  60
07mtDNA     1:GACCTCCCAGCCCCCTCAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGTTCCCTCTTAGGCATC  60
08mtDNA     1:GACCTCCCAGCCCCCTCAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGTTCCCTCTTAGGCATC  60
09mtDNA     1:GACCTCCCAGCCCCCTCAAACATCTCATCATGATGAAACTTCCGTTCCCTCCTAGGCATC  60
10mtDNA     1:GACCTCCCAGCCCCCTCAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGTTCCCTCTTAGGCATC  60
11mtDNA     1:GACCTCCCAGCCCCCTCAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGTTCCCTCTTAGGCATC  60
12mtDNA     1:GACCTCCCAGCCCCCTCAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGTTCCCTCTTAGGCATC  60
13mtDNA     1:GACCTCCCAGCCCCCTCAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGTTCCCTCTTAGGCATC  60
14mtDNA     1:GACCTCCCAGCCCCCTCAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGTTCCCTCTTAGGCATC  60
15mtDNA     1:GACCTCCCAGCCCCCTCAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGTTCCCTCTTAGGCATC  60
16mtDNA     1:GACCTCCCAGCCCCCTCAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGTTCCCTCTTAGGCATC  60
17mtDNA     1:GACCTCCCAGCCCCCTCAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGTTCCCTCTTAGGCATC  60
18mtDNA     1:GACCTCCCAGCCCCCTCAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGTTCCCTCTTAGGCATC  60
20mtDNA     1:GACCTCCCAGCCCCCTCAAACATCTCATCATGATGAAACTTCGGTTCCCTCTTAGGCATC  60

01mtDNA    61:TGCCTAATCTTGCAAATCCTAACAGGCCTGTTCTTAGCAATACATTACACATCAGACACA  120
02mtDNA    61:TGCCTAATCTTGCAAATCCTAACAGGCCTGTTCTTAGCAATACATTACACATCAGACACA  120
03mtDNA    61:TGCCTAATCTTGCAAATCCTAACAGGCCTGTTCTTAGCAATACATTACACATCAGACACA  120
04mtDNA    61:TGCCTAATCTTGCAAATCCTAACAGGCCTGTTCTTAGCAATACATTACACATCAGACACA  120
05mtDNA    61:TGCCTAATCTTGCAAATCCTAACAGGCCTGTTCTTAGCAATACATTACACATCAGACACA  120
06mtDNA    61:TGCCTAATCTTGCAAATCCTAACAGGCCTGTTCTTAGCAATACATTACACATCAGACACA  120
07mtDNA    61:TGCCTAATCTTGCAAATCCTAACAGGCCTGTTCTTAGCAATACATTACACATCAGACACA  120
08mtDNA    61:TGCCTAATCTTGCAAATCCTAACAGGCCTGTTCTTAGCAATACATTACACATCAGACACA  120
09mtDNA    61:TGCCTAATCCTGCAAATCCTAACAGGCCTGTTCTTAGCAATACATTACACATCAGACACA  120
10mtDNA    61:TGCCTAATCTTGCAAATCCTAACAGGCCTGTTCTTAGCAATACATTACACATCAGACACA  120
11mtDNA    61:TGCCTAATCTTGCAAATCCTAACAGGCCTGTTCTTAGCAATACATTACACATCAGACACA  120
12mtDNA    61:TGCCTAATCTTGCAAATCCTAACAGGCCTGTTCTTAGCAATACATTACACATCAGACACA  120
```

```
13mtDNA     61:TGCCTAATCTTGCAAATCCTAACAGGCCTGTTCTTAGCAATACATTACACATCAGACACA 120
14mtDNA     61:TGCCTAATCTTGCAAATCCTAACAGGCCTGTTCTTAGCAATACATTACACATCAGACACA 120
15mtDNA     61:TGCCTAATCTTGCAAATCCTAACAGGCCTGTTCTTAGCAATACATTACACATCAGACACA 120
16mtDNA     61:TGCCTAATCTTGCAAATCCTAACAGGCCTGTTCTTAGCAATACATTACACATCAGACACA 120
17mtDNA     61:TGCCTAATCTTGCAAATCCTAACAGGCCTGTTCTTAGCAATACATTACACATCAGACACA 120
18mtDNA     61:TGCCTAATCTTGCAAATCCTAACAGGCCTGTTCTTAGCAATACATTACACATCAGACACA 120
20mtDNA     61:TGCCTAATCTTGCAAATCCTAACAGGCCTGTTCTTAGCAATACATTACACATCAGACACA 120

01mtDNA    121:ACAACAGCTTTCTCATCAGTTACACACATCTGTCGAGACGTAAATTACGGATGAGTTATT 180
02mtDNA    121:ACAACAGCTTTCTCATCAGTTACACACATCTGTCGAGACGTAAATTACGGATGAGTTATT 180
03mtDNA    121:ACAACAGCTTTCTCATCAGTTACACACATCTGTCGAGACGTAAATTACGGATGAGTTATT 180
04mtDNA    121:ACAACAGCTTTCTCATCAGTTACACACATCTGTCGAGACGCAAATTACGGATGAGTTATT 180
05mtDNA    121:ACAACAGCTTTCTCATCAGTTACACACATCTGTCGAGACGTAAATTACGGATGAGTTATT 180
06mtDNA    121:ACAACAGCTTTCTCATCAGTTACACACATCTGTCGAGACGTAAATTACGGATGAGTTATT 180
07mtDNA    121:ACAACAGCTTTCTCATCAGTTACACACATCTGTCGAGACGTAAATTACGGATGAGTTATT 180
08mtDNA    121:ACAACAGCTTTCTCATCAGTTACACACATCTGTCGAGACGTAAATTACGGATGAGTTATT 180
09mtDNA    121:ACAACCGCTTTCTCCTCAGTTACCCCCATCTGTCCAGACCTAAATTACGGATGAGTTATT 180
10mtDNA    121:ACAACAGCTTTCTCATCAGTTACACACATCTGTCGAGACGTAAATTACGGATGAGTTATT 180
11mtDNA    121:ACAACAGCTTTCTCATCAGTTACACACATCTGTCGAGACGTAAATTACGGATGAGTTATT 180
12mtDNA    121:ACAACAGCTTTCTCATCAGTTACACACATCTGTCGAGACGTAAATTACGGATGAGTTATT 180
13mtDNA    121:ACAACAGCTTTCTCATCAGTTACACACATCTGTCGAGACGTAAATTACGGATGAGTTATT 180
14mtDNA    121:ACAACAGCTTTCTCATCAGTTACACACATCTGTCGAGACGTAAATTACGGATGAGTTATT 180
15mtDNA    121:ACAACAGCTTTCTCATCAGTTACACACATCTGTCGAGACGTAAATTACGGATGAGTTATT 180
16mtDNA    121:ACAACAGCTTTCTCATCAGTTACACACATCTGTCGAGACGTAAATTACGGATGAGTTATT 180
17mtDNA    121:ACAACCGCTTTCTCATCAGTTACACACATCTGTCGAGACGTAAATTACGGATGAGTTATT 180
18mtDNA    121:ACAACAGCTTTCTCATCAGTTACACACATCTGTCGAGACGTAAATTACGGATGAGTTATT 180
20mtDNA    121:ACAACAGCTTTCTCATCAGTTACACACATCTGTCGAGACGTAAATTACGGATGAGTTATT 180

01mtDNA    181:CGCTACCTACATGCAAACGGAGCATCCATGTTCTTTATTTGCCTATTCATCCACGTAGGC 240
02mtDNA    181:CGCTACCTACATGCAAACGGAGCATCCATGTTCTTTATTTGCCTATTCATCCACGTAGGC 240
03mtDNA    181:CGCTACCTACATGCAAACGGAGCATCCATGTTCTTTATTTGCCTATTCATCCACGTAGGC 240
04mtDNA    181:CGCTACCTACATGCAAACGGAGCATCCATGTTCTTTATTTGCCTATTCATCCACGTAGGC 240
05mtDNA    181:CGCTACCTACATGCAAACGGAGCATCCATGTTCTTTATTTGCCTATTCATCCACGTAGGC 240
06mtDNA    181:CGCTACCTACATGCAAACGGAGCATCCATGTTCTTTATTTGCCTATTCATCCACGTAGGC 240
07mtDNA    181:CGCTACCTACATGCAAACGGAGCATCCATGTTCTTTATTTGCCTATTCATCCACGTAGGC 240
08mtDNA    181:CGCTACCTACATGCAAACGGAGCATCCATGTTCTTTATTTGCCTATTCATCCACGTAGGC 240
09mtDNA    181:CGCTACCTACCTGCAAACGGAGCATCCCTGTTCTTTATTTGCCTATTCCTCCACGTAGGC 240
10mtDNA    181:CGCTACCTACATGCAAACGGAGCATCCATGTTCTTTATTTGCCTATTCATCCACGTAGGC 240
11mtDNA    181:CGCTACCTACATGCAAACGGAGCATCCATGTTCTTTATTTGCCTATTCATCCACGTAGGC 240
12mtDNA    181:CGCTACCTACATGCAAACGGAGCATCCATGTTCTTTATTTGCCTATTCATCCACGTAGGC 240
13mtDNA    181:CGCTACCTACATGCAAACGGAGCATCCATGTTCTTTATTTGCCTATTCATCCACGTAGGC 240
14mtDNA    181:CGCTACCTACATGCAAACGGAGCATCCATGTTCTTTATTTGCCTATTCATCCACGTAGGC 240
15mtDNA    181:CGCTACCTACATGCAAACGGAGCATCCATGTTCTTTATTTGCCTATTCATCCACGTAGGC 240
16mtDNA    181:CGCTACCTACATGCAAACGGAGCATCCATGTTCTTTATTTGCCTATTCATCCACGTAGGC 240
17mtDNA    181:CGCTACCTACATGCAAACGGAGCATCCATGTTCTTTATTTGCCTATTCATCCACGTAGGC 240
18mtDNA    181:CGCTACCTACATGCAAACGGAGCATCCATGTTCTTTATTTGCCTATTCATCCACGTAGGC 240
20mtDNA    181:CGCTACCTACATGCAAACGGAGCATCCATGTTCTTTATTTGCCTATTCATCCACGTAGGC 240

01mtDNA    241:CGAGGCCTATACTACGGATCCTATATATTCCTAGAAACATGAAACATTGGAGTAGTCCTA 300
02mtDNA    241:CGAGGCCTATACTACGGATCCTATATATTCCTAGAAACATGAAACATTGGAGTAGTCCTA 300
03mtDNA    241:CGAGGCCTATACTACGGATCCTATATATTCCTAGAAACATGAAACATTGGAGTAGTCCTA 300
04mtDNA    241:CGAGGCCTATACTACGGATCCTATATATTCCTAGAAACATGAAACATTGGAGTAGTCCTA 300
05mtDNA    241:CGAGGCCTATACTACGGATCCTATATATTCCTAGAAACATGAAACATTGGAGTAGTCCTA 300
```

```
06mtDNA  241:CGAGGCCTATACTACGGATCCTATATATTCCTAGAAACATGAAACATTGGAGTAGTCCTA 300
07mtDNA  241:CGAGGCCTATACTACGGATCCTATATATTCCTAGAAACATGAAACATTGGAGTAGTCCTA 300
08mtDNA  241:CGAGGCCTATACTACGGATCCTATATATTCCTAGAAACATGAAACATTGGAGTAGTCCTA 300
09mtDNA  241:CGAGGCCTATACTACGGATCCTATATATTCCTAGAAACATGAAACATTGGAGTAGTCCTA 300
10mtDNA  241:CGAGGCCTATACTACGGATCCTATATATTCCTAGAAACATGAAACATTGGAGTAGTCCTA 300
11mtDNA  241:CGAGGCCTATACTACGGATCCTATATATTCCTAGAAACATGAAACATTGGAGTAGTCCTA 300
12mtDNA  241:CGAGGCCTATACTACGGATCCTATATATTCCTAGAAACATGAAACATTGGAGTAGTCCTA 300
13mtDNA  241:CGAGGCCTATACTACGGATCCTATATATTCCTAGAAACATGAAACATTGGAGTAGTCCTA 300
14mtDNA  241:CGAGGCCTATACTACGGATCCTATATATTCCTAGAAACATGAAACATTGGAGTAGTCCTA 300
15mtDNA  241:CGAGGCCTATACTACGGATCCTATATATTCCTAGAAACATGAAACATTGGAGTAGTCCTA 300
16mtDNA  241:CGAGGCCTATACTACGGATCCTATATATTCCTAGAAACATGAAACATTGGAGTAGTCCTA 300
17mtDNA  241:CGAGGCCTATACTACGGATCCTATATATTCCTAGAAACATGAAACATTGGAGTAGTCCTA 300
18mtDNA  241:CGAGGCCTATACTACGGATCCTATATATTCCTAGAAACATGAAACATTGGAGTAGTCCTA 300
20mtDNA  241:CGAGGCCTATACTACGGATCCTATATATTCCTAGAAACATGAAACATTGGAGTAGTCCTA 300

01mtDNA  301:CTATTTACCGTTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTACGTCCTGCCCTGAGGACAAATATCA 360
02mtDNA  301:CTATTTACCGTTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTACGTCCTGCCCTGAGGACAAATATCA 360
03mtDNA  301:CTATTTACCGTCATAGCAACAGCCTTCATAGGCTACGTCCTGCCCTGAGGACAAATATCA 360
04mtDNA  301:CTATTTACCGTCATAGCAACAGCCTTCATAGGCTACGTCCTGCCCTGAGGACAAATATCA 360
05mtDNA  301:CTATTTACCGTTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTACGTCCTGCCCTGAGGACAAATATCA 360
06mtDNA  301:CTATTTACCGTTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTACGTCCTGCCCTGAGGACAAATATCA 360
07mtDNA  301:CTATTTACCGTTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTACGTCCTGCCCTGAGGACAAATATCA 360
08mtDNA  301:CTATTTACCGTTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTACGTCCTGCCCTGAGGACAAATATCA 360
09mtDNA  301:CTATTTACCGTTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTACGTCCTGCCCTGAGGACAAATATCA 360
10mtDNA  301:CTATTTACCGTTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTACGTCCTGCCCTGAGGACAAATATCA 360
11mtDNA  301:CTATTTACCGTTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTACGTCCTGCCCTGAGGACAAATATCA 360
12mtDNA  301:CTATTTACCGTTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTACGTCCTGCCCTGAGGACAAATATCA 360
13mtDNA  301:CTATTTACCGTTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTACGTCCTGCCCTGAGGACAAATATCA 360
14mtDNA  301:CTATTTACCGTTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTACGTCCTGCCCTGAGGACAAATATCA 360
15mtDNA  301:CTATTTACCGTTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTACGTCCTGCCCTGAGGACAAATATCA 360
16mtDNA  301:CTATTTACCGTTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTACGTCCTGCCCTGAGGACAAATATCA 360
17mtDNA  301:CTATTTACCGTTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTACGTCCTGCCCTGAGGACAAATATCA 360
18mtDNA  301:CTATTTACCGTTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTACGTCCTGCCCTGAGGACAAATATCA 360
20mtDNA  301:CTATTTACCGTTATAGCAACAGCCTTCATAGGCTACGTCCTGCCCTGAGGACAAATATCA 360

01mtDNA  361:TTCTGAGGAGCTACGGTCATCACAAATCTACTATCAGCTATCCCTTATATCGGAACAGAC 420
02mtDNA  361:TTCTGAGGAGCTACGGTCATCACAAATCTACTATCAGCTATCCCTTATATCGGAACAGAC 420
03mtDNA  361:TTCTGAGGAGCTACGGTCATCACAAATCTACTATCAGCTATCCCTTATATCGGAACAGAC 420
04mtDNA  361:TTCTGAGGAGCTACGGTCATCACAAATCTACTATCAGCTATCCCTTATATCGGAACAGAC 420
05mtDNA  361:TTCTGAGGAGCTACGGTCATCACAAATCTACTATCAGCTATCCCTTATATCGGAACAGAC 420
06mtDNA  361:TTCTGAGGAGCTACGGTCATCACAAATCTACTATCAGCTATCCCTTATATCGGAACAGAC 420
07mtDNA  361:TTCTGAGGAGCTACGGTCATCACAAATCTACTATCAGCTATCCCTTATATCGGAACAGAC 420
08mtDNA  361:TTCTGAGGAGCTACGGTCATCACAAATCTACTATCAGCTATCCCTTATATCGGAACAGAC 420
09mtDNA  361:TTTTGAGGAGCTACGGTCATCACAAATCTACTATCAGCTATCCCTTATATCGGAACAGAC 420
10mtDNA  361:TTCTGAGGAGCTACGGTCATCACAAATCTACTATCAGCTATCCCTTATATCGGAACAGAC 420
11mtDNA  361:TTCTGAGGAGCTACGGTCATCACAAATCTACTATCAGCTATCCCTTATATCGGAACAGAC 420
12mtDNA  361:TTCTGAGGAGCTACGGTCATCACAAATCTACTATCAGCTATCCCTTATATCGGAACAGAC 420
13mtDNA  361:TTCTGAGGAGCTACGGTCATCACAAATCTACTATCAGCTATCCCTTATATCGGAACAGAC 420
14mtDNA  361:TTCTGAGGAGCTACGGTCATCACAAATCTACTATCAGCTATCCCTTATATCGGAACAGAC 420
15mtDNA  361:TTCTGAGGAGCTACGGTCATCACAAATCTACTATCAGCTATCCCTTATATCGGAACAGAC 420
16mtDNA  361:TTCTGAGGAGCTACGGTCATCACAAATCTACTATCAGCTATCCCTTATATCGGAACAGAC 420
17mtDNA  361:TTCTGAGGAGCTACGGTCATCACAAATCTACTATCAGCTATCCCTTATATCGGAACAGAC 420
18mtDNA  361:TTCTGAGGAGCTACGGTCATCACAAATCTACTATCAGCTATCCCTTATATCGGAACAGAC 420
20mtDNA  361:TTCTGAGGAGCTACGGTCATCACAAATCTACTATCAGCTATCCCTTATATCGGAACAGAC 420
```

```
01mtDNA  421:CTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTTTCCGTCGACAAAGCAACCCTCACACGATTCTTC 480
02mtDNA  421:CTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTTTCCGTCGACAAAGCAACCCTCACACGATTCTTC 480
03mtDNA  421:CTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTTTCCGTCGACAAAGCAACCCTCACACGATTCTTC 480
04mtDNA  421:CTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTTTCCGTCGACAAAGCAACCCTCACACGATTCTTC 480
05mtDNA  421:CTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTTTCCGTCGACAAAGCAACCCTCACACGATTCTTC 480
06mtDNA  421:CTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTTTCCGTCGACAAAGCAACCCTCACACGATTCTTC 480
07mtDNA  421:CTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTTTCCGTCGACAAAGCAACCCTCACACGATTCTTC 480
08mtDNA  421:CTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTTTCCGTCGACAAAGCAACCCTCACACGATTCTTC 480
09mtDNA  421:CTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTTTCCGTCGACAAAGCAACCCTCACACGATTCTTC 480
10mtDNA  421:CTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTTTCCGTCGACAAAGCAACCCTCACACGATTCTTC 480
11mtDNA  421:CTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTTTCCGTCGACAAAGCAACCCTCACACGATTCTTC 480
12mtDNA  421:CTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTTTCCGTCGACAAAGCAACCCTCACACGATTCTTC 480
13mtDNA  421:CTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTTTCCGTCGACAAAGCAACCCTCACACGATTCTTC 480
14mtDNA  421:CTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTTTCCGTCGACAAAGCAACCCTCACACGATTCTTC 480
15mtDNA  421:CTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTTTCCGTCGACAAAGCAACCCTCACACGATTCTTC 480
16mtDNA  421:CTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTTTCCGTCGACAAAGCAACCCTCACACGATTCTTC 480
17mtDNA  421:CTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTTTCCGTCGACAAAGCAACCCTCACACGATTCTTC 480
18mtDNA  421:CTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTTTCCGTCGACAAAGCAACCCTCACACGATTCTTC 480
20mtDNA  421:CTCGTAGAATGAATCTGAGGGGGCTTTTCCGTCGACAAAGCAACCCTCACACGATTCTTC 480

01mtDNA  481:GCCTTTCACTTTATCCTGCCATTCATCATTACCGCCCTCGCAGCCGTACATCTCCTATTC 540
02mtDNA  481:GCCTTTCACTTTATCCTGCCATTCATCATTACCGCCCTCGCAGCCGTACATCTCCTATTC 540
03mtDNA  481:GCCTTTCACTTTATCCTGCCATTCATCATTACCGCCCTCGCAGCCGTACATCTCCTATTC 540
04mtDNA  481:GCCTTTCACTTTATCCTGCCATTCATCATTACCGCCCTCGCAGCGGTACATCTCCTATTC 540
05mtDNA  481:GCCTTTCACTTTATCCTGCCATTCATCATTACCGCCCTCGCAGCCGTACATCTCCTATTC 540
06mtDNA  481:GCCTTTCACTTTATCCTGCCATTCATCATTACCGCCCTCGCAGCCGTACATCTCCTATTC 540
07mtDNA  481:GCCTTTCACTTTATCCTGCCATTCATCATTACCGCCCTCGCAGCCGTACATCTCCTATTC 540
08mtDNA  481:GCCTTTCACTTTATCCTGCCATTCATCATTACCGCCCTCGCAGCCGTACATCTCCTATTC 540
09mtDNA  481:GCCTTTCACTTTATCCTGCCATTCATCATTACCGCCCTCGCAGCCGTACATCTCCTATTC 540
10mtDNA  481:GCCTTTCACTTTATCCTGCCATTCATCATTACCGCCCTCGCAGCCGTACATCTCCTATTC 540
11mtDNA  481:GCCTTTCACTTTATCCTGCCATTCATCATTACCGCCCTCGCAGCCGTACATCTCCTATTC 540
12mtDNA  481:GCCTTTCACTTTATCCTGCCATTCATCATTACCGCCCTCGCAGCCGTACATCTCCTATTC 540
13mtDNA  481:GCCTTTCACTTTATCCTGCCATTCATCATTACCGCCCTCGCAGCCGTACATCTCCTATTC 540
14mtDNA  481:GCCTTTCACTTTATCCTGCCATTCATCATTACCGCCCTCGCAGCCGTACATCTCCTATTC 540
15mtDNA  481:GCCTTTCACTTTATCCTGCCATTCATCATTACCGCCCTCGCAGCCGTACATCTCCTATTC 540
16mtDNA  481:GCCTTTCACTTTATCCTGCCATTCATCATTACCGCCCTCGCAGCCGTACATCTCCTATTC 540
17mtDNA  481:GCCTTTCACTTTATCCTGCCATTCATCATTACCGCCCTCGCAGCCGTACATCTCCTATTC 540
18mtDNA  481:GCCTTTCACTTTATCCTGCCATTCATCATTACCGCCCTCGCAGCCGTACATCTCCTATTC 540
20mtDNA  481:GCCTTTCACTTTATCCTGCCATTCATCATTACCGCCCTCGCAGCCGTACATCTCCTATTC 540

01mtDNA  541:CTGCACGAAACCGGATCCAACAACCCTACCGGAATCTCATCAGACATAGACAAAATTCCA 600
02mtDNA  541:CTGCACGAAACCGGATCCAACAACCCTACCGGAATCTCATCAGACATAGACAAAATTCCA 600
03mtDNA  541:CTGCACGAAACCGGATCCAACAACCCTACCGGAATCTCATCAGACATAGACAAAATTCCA 600
04mtDNA  541:CTGCACGAAACGGGATCCAACAACCCTACGGGAATCTCATCAGACATAGACAAAATTCCA 600
05mtDNA  541:CTGCACGAAACCGGATCCAACAACCCTACCGGAATCTCATCAGACATAGACAAAATTCCA 600
06mtDNA  541:CTGCACGAAACCGGATCCAACAACCCTACCGGAATCTCATCAGACATAGACAAAATTCCA 600
07mtDNA  541:CTGCACGAAACCGGATCCAACAACCCTACCGGAATCTCATCAGACATAGACAAAATTCCA 600
08mtDNA  541:CTGCACGAAACCGGATCCAACAACCCTACCGGAATCTCATCAGACATAGACAAAATTCCA 600
09mtDNA  541:CTGCACGAAACCGGATCCAACAACCCTACCGGAATCTCATCAGACATAGACAAAATTCCA 600
10mtDNA  541:CTGCAGGAAACCGGATCCAACAACCCTACCGGAATCTCATCAGACATAGACAAAATTCCA 600
11mtDNA  541:CTGCACGAAACCGGATCCAACAACCCTACCGGAATCTCATCAGACATAGACAAAATTCCA 600
12mtDNA  541:CTGCACGAAACCGGATCCAACAACCCTACCGGAATCTCATCAGACATAGACAAAATTCCA 600
13mtDNA  541:CTGCACGAAACCGGATCCAACAACCCTACCGGAATCTCATCAGACATAGACAAAATTCCA 600
14mtDNA  541:CTGCACGAAACCGGATCCAACAACCCTACCGGAATCTCATCAGACATAGACAAAATTCCA 600
```

```
15mtDNA  541:CTGCACGAAACCGGATCCAACAACCCTACCGGAATCTCATCAGACATAGACAAAATTCCA 600
16mtDNA  541:CTGCACGAAACCGGATCCAACAACCCTACCGGAATCTCATCAGACATAGACAAAATTCCA 600
17mtDNA  541:CTGCACGAAACCGGATCCAACAACCCTACCGGAATCTCATCAGACATAGACAAAATTCCA 600
18mtDNA  541:CTGCACGAAACCGGATCCAACAACCCTACCGGAATCTCATCAGACATAGACAAAATTCCA 600
20mtDNA  541:CTGCACGAAACCGGATCCAACAACCCTACCGGAATCTCATCAGACATAGACAAAATTCCA 600

01mtDNA  601:TTTCACCCATACTACACTATTAAAGACATTCTAGGGGCCTTATTTATAATACTAATCCTA 660
02mtDNA  601:TTTCACCCATACTACACTATTAAAGACATTCTAGGGGCCTTATTTATAATACTAATCCTA 660
03mtDNA  601:TTTCACCCATACTACACTATTAAAGACATTCTAGGGGCCTTATTTATAATACTAATCCTA 660
04mtDNA  601:TTTCACCCATACTACACTATTAAAGACATTTTAGGGGCCTTATTTATAATACTAATCCTA 660
05mtDNA  601:TTTCACCCATACTACACTATTAAAGACATTCTAGGGGCCTTATTTATAATACTAATCCTA 660
06mtDNA  601:TTTCACCCATACTACACTATTAAAGACATTCTAGGGGCCTTATTTATAATACTAATCCTA 660
07mtDNA  601:TTTCACCCATACTACACTATTAAAGACATTCTAGGGGCCTTATTTATAATACTAATCCTA 660
08mtDNA  601:TTTCACCCATACTACACTATTAAAGACATTCTAGGGGCCTTATTTATAATACTAATCCTA 660
09mtDNA  601:TTTCACCCATACTACACTATTAAAGACATTCTAGGGGCCTTATTTATAATACTAATCCTA 660
10mtDNA  601:TTTCACCCATACTACACTATTAAAGACATTCTAGGGGCCTTATTTATAATACTAATCCTA 660
11mtDNA  601:TTTCACCCATACTACACTATTAAAGACATTCTAGGGGCCTTATTTATAATACTAATCCTA 660
12mtDNA  601:TTTCACCCATACTACACTATTAAAGACATTCTAGGGGCCTTATTTATAATACTAATCCTA 660
13mtDNA  601:TTTCACCCATACTACACTATTAAAGACATTCTAGGGGCCTTATTTATAATACTAATCCTA 660
14mtDNA  601:TTTCACCCATACTACACTATTAAAGACATTCTAGGGGCCTTATTTATAATACTAATCCTA 660
15mtDNA  601:TTTCACCCATACTACACTATTAAAGACATTCTAGGGGCCTTATTTATAATACTAATCCTA 660
16mtDNA  601:TTTCACCCATACTACACTATTAAAGACATTCTAGGGGCCTTATTTATAATACTAATCCTA 660
17mtDNA  601:TTTCACCCATACTACACTATTAAAGACATTCTAGGGGCCTTATTTATAATACTAATCCTA 660
18mtDNA  601:TTTCACCCATACTACACTATTAAAGACATTCTAGGGGCCTTATTTATAATACTAATCCTA 660
20mtDNA  601:TTTCACCCATACTACACTATTAAAGACATTCTAGGGGCCTTATTTATAATACTAATCCTA 660

01mtDNA  661:CTAATCCTTGTACTATTCTCACCAGACCTACTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCAGCA 720
02mtDNA  661:CTAATCCTTGTACTATTCTCACCAGACCTACTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCAGCA 720
03mtDNA  661:CTAATCCTTGTACTATTCTCACCAGACCTACTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCAGCA 720
04mtDNA  661:CTAATCCTTGTACTATTCTCACCAGACCTATTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCAGCA 720
05mtDNA  661:CTAATCCTTGTACTATTCTCACCAGACCTACTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCAGCA 720
06mtDNA  661:CTAATCCTTGTACTATTCTCACCAGACCTACTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCAGCA 720
07mtDNA  661:CTAATCCTTGTACTATTCTCACCAGACCTACTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCAGCA 720
08mtDNA  661:CTAATCCTTGTACTATTCTCACCAGACCTACTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCAGCA 720
09mtDNA  661:CTAATCCTTGTACTATTCTCACCAGACCTACTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCAGCA 720
10mtDNA  661:CTAATCCTTGTACTATTCTCACCAGACCTACTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCAGCA 720
11mtDNA  661:CTAATCCTTGTACTATTCTCACCAGACCTACTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCAGCA 720
12mtDNA  661:CTAATCCTTGTACTATTCTCACCAGACCTACTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCAGCA 720
13mtDNA  661:CTAATCCTTGTACTATTCTCACCAGACCTACTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCAGCA 720
14mtDNA  661:CTAATCCTTGTACTATTCTCACCAGACCTACTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCAGCA 720
15mtDNA  661:CTAATCCTTGTACTATTCTCACCAGACCTACTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCAGCA 720
16mtDNA  661:CTAATCCTTGTACTATTCTCACCAGACCTACTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCAGCA 720
17mtDNA  661:CTAATCCTTGTACTATTCTCACCAGACCTACTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCAGCA 720
18mtDNA  661:CTAATCCTTGTACTATTCTCACCAGACCTACTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCAGCA 720
20mtDNA  661:CTAATCCTTGTACTATTCTCACCAGACCTACTAGGAGACCCAGACAACTACACCCCAGCA 720

01mtDNA  721:AACCCACTAAACACCCCACCCCATATTAAACCAGAATGATATTTCTTATTCGCCTACGCT 780
02mtDNA  721:AACCCACTAAACACCCCACCCCATATTAAACCAGAATGATATTTCTTATTCGCCTACGCT 780
03mtDNA  721:AACCCACTAAACACCCCCCCCCATATTAAACCAGAATGATATTTCTTATTCGCCTACGCT 780
04mtDNA  721:AACCCACTAAACACCCCACCCCATATTAAACCAGAAGGATATTTTTTATTCGCTTACGCT 780
05mtDNA  721:AACCCACTAAACACCCCACCCCATATTAAACCAGAATGATATTTCTTATTCGCCTACGCT 780
06mtDNA  721:AACCCACTAAACACCCCACCCCATATTAAACCAGAATGATATTTCTTATTCGCCTACGCT 780
07mtDNA  721:AACCCACTAAACACCCCACCCCATATTAAACCAGAATGATATTTCTTATTCGCCTACGCT 780
```

```
08mtDNA  721:AACCCACTAAACACCCCACCCCATATTAAACCAGAATGATATTTCTTATTCGCCTACGCT 780
09mtDNA  721:AACCCACTAAACACCCCACCCCATATTAAACCAGAATGATATTTCTTATTCGCCTACGCT 780
10mtDNA  721:AACCCACTAAACACCCCACCCCATATTAAACCAGAATGATATTTCTTATTCGCCTACGCT 780
11mtDNA  721:AACCCACTAAACACCCCACCCCATATTAAACCAGAATGATATTTCTTATTCGCCTACGCT 780
12mtDNA  721:AACCCACTAAACACCCCACCCCATATTAAACCAGAATGATATTTCTTATTCGCCTACGCT 780
13mtDNA  721:AACCCACTAAACACCCCACCCCATATTAAACCAGAATGATATTTCTTATTCGCCTACGCT 780
14mtDNA  721:AACCCACTAAACACCCCACCCCATATTAAACCAGAATGATATTTCTTATTCGCCTACGCT 780
15mtDNA  721:AACCCACTAAACACCCCACCCCATATTAAACCAGAATGATATTTCTTATTCGCCTACGCT 780
16mtDNA  721:AACCCACTAAACACCCCACCCCATATTAAACCAGAATGATATTTCTTATTCGCCTACGCT 780
17mtDNA  721:AACCCACTAAACACCCCACCCCATATTAAACCAGAATGATATTTCTTATTCGCCTACGCT 780
18mtDNA  721:AACCCACTAAACACCCCACCCCATATTAAACCAGAATGATATTTCTTATTCGCCTACGCT 780
20mtDNA  721:AACCCACTAAACACCCCACCCCATATTAAACCAGAATGATATTTCTTATTCGCCTACGCT 780

01mtDNA  781:ATCCTACGTTCAATTCCTAATAAACTAGGTGGAGTGCTAGCTCTAATAGCCTCCATCCTA 840
02mtDNA  781:ATCCTACGTTCAATTCCTAATAAACTAGGTGGAGTGCTAGCTCTAGTAGCCTCCATCCTA 840
03mtDNA  781:ATCGTGCGTTCAATTCATAATAAACTGGGGGGAGTGCTAGCTCTAGTAGCCTCCATCTTA 840
04mtDNA  781:ATCTTACGTTCAATTCTTAATAAACTAGGGGGAGTGCTAGCTCTAGTAGCCTCCATCCTA 840
05mtDNA  781:ATCCTACGTTCAATTCCTAATAAACTAGGTGGAGTGCTAGCTCTAATAGCCTCCATCCTA 840
06mtDNA  781:ATCCTACGTTCAATTCCTAATAAACTAGGTGGAGTGCTAGCTCTAATAGCCTCCATCCTA 840
07mtDNA  781:ATCCTACGTTCAATTCCTAATAAACTAGGTGGAGTGCTAGCTCTAATAGCCTCCATCCTA 840
08mtDNA  781:ATCCTACGTTCAATTCCTAATAAACTAGGTGGAGTGCTAGCTCTAATAGCCTCCATCCTA 840
09mtDNA  781:ATCCTACGTTCAATTCCTAATAAACTAGGTGGAGTGCTAGCTCTAGTAGCCTCCATCCTA 840
10mtDNA  781:ATCCTACGTTCAATTCCTAATAAACTAGGTGGAGTGCTAGCTCTAATAGCCTCCATCCTA 840
11mtDNA  781:ATCCTACGTTCAATTCCTAATAAACTAGGTGGAGTGCTAGCTCTAATAGCCTCCATCCTA 840
12mtDNA  781:ATCCTACGTTCAATTCCTAATAAACTAGGTGGAGTGCTAGCTCTAATAGCCTCCATCCTA 840
13mtDNA  781:ATCCTACGTTCAATTCCTAATAAACTAGGTGGAGTGCTAGCTCTAGTAGCCTCCATCCTA 840
14mtDNA  781:ATCCTACGTTCAATTCCTAATAAACTAGGTGGAGTGCTAGCTCTAGTAGCCTCCATCCTA 840
15mtDNA  781:ATCCTACGTTCAATTCCTAATAAACTAGGTGGAGTGCTAGCTCTAGTAGCCTCCATCCTA 840
16mtDNA  781:ATCCTACGTTCAATTCCTAATAAACTAGGTGGAGTGCTAGCTCTAGTAGCCTCCATCCTA 840
17mtDNA  781:ATCCTACGTTCAATTCCTAATAAACTAGGTGGAGTGCTAGCTCTAGTAGCCTCCATCCTA 840
18mtDNA  781:ATCCTACGTTCAATTCCTAATAAACTAGGTGGAGTGCTAGCTCTAGTAGCCTCCATCCTA 840
20mtDNA  781:ATCCTACGTTCAATTCCTAATAAACTAGGTGGAGTGCTAGCTCTAATAGCCTCCATCCTA 840

01mtDNA  841:ATCCTAATTTTAATGCCCATACTACACACATCCAAACAACGAAGCATAATATTTCGACCA 900
02mtDNA  841:ATCCTAATTTTAATGCCCATACTACACACATCCAAACAACGAAGCATAATATTTCGACCA 900
03mtDNA  841:ATCCTAATTTTAATGCCCATAATACACACATCCAAACAAGGAAGCATAATATTTCGACCA 900
04mtDNA  841:ATCCTAATTTTAATGCCCATACTACACACATCCAAACAACGAAGCATAATATTTCGACCA 900
05mtDNA  841:ATCCTAATTTTAATGCCCATACTACACACATCCAAACAACGAAGCATAATATTTCGACCA 900
06mtDNA  841:ATCCTAATTTTAATGCCCATACTACACACATCCAAACAACGAAGCATAATATTTCGACCA 900
07mtDNA  841:ATCCTAATTTTAATGCCCATACTACACACATCCAAACAACGAAGCATAATATTTCGACCA 900
08mtDNA  841:ATCCTAATTTTAATGCCCATACTACACACATCCAAACAACGAAGCATAATATTTCGACCA 900
09mtDNA  841:ATCCTAATTTTAATGCCCATACTACACACATCCAAACAACGAAGCATAATATTTCGACCA 900
10mtDNA  841:ATCCTAATTTTAATGCCCATACTACACACATCCAAACAACGAAGCATAATATTTCGACCA 900
11mtDNA  841:ATCCTAATTTTAATGCCCATACTACACACATCCAAACAACGAAGCATAATATTTCGACCA 900
12mtDNA  841:ATCCTAATTTTAATGCCCATACTACACACATCCAAACAACGAAGCATAATATTTCGACCA 900
13mtDNA  841:ATCCTAATTTTAATGCCCATACTACACACATCCAAACAACGAAGCATAATATTTCGACCA 900
14mtDNA  841:ATCCTAATTTTAATGCCCATACTACACACATCCAAACAACGAAGCATAATATTTCGACCA 900
15mtDNA  841:ATCCTAATTTTAATGCCCATACTACACACATCCAAACAACGAAGCATAATATTTCGACCA 900
16mtDNA  841:ATCCTAATTTTAATGCCCATACTACACACATCCAAACAACGAAGCATAATATTTCGACCA 900
17mtDNA  841:ATCCTAATTTTAATGCCCATACTACACACATCCAAACAACGAAGCATAATATTTCGACCA 900
18mtDNA  841:ATCCTAATTTTAATGCCCATACTACACACATCCAAACAACGAAGCATAATATTTCGACCA 900
20mtDNA  841:ATCCTAATTTTAATGCCCATACTACACACATCCAAACAACGAAGCATAATATTTCGACCA 900
```

```
01mtDNA   901:CTAAGTCAATACCTATTTTGAATACTAGTAGCAGACCTCATTACACTAACATGAATTGGA 960
02mtDNA   901:CTAAGTCAATGCCTATTCTGAATACTAGTAGCAGACCTCATTACACTAACATGAATTGGA 960
03mtDNA   901:CTAAGTCAATGCTTATTCTGAATAGTAGTAGCAGACCTCATTCCACTAACATGAATGGGA 960
04mtDNA   901:CTAAGTCAATGCCTATTCTGAATACTAGTAGCAGACCTCATTACACTAACATGAATTGGA 960
05mtDNA   901:CTAAGTCAATGCCTATTCTGAATACTAGTAGCAGACCTCATTACACTAACATGAATTGGA 960
06mtDNA   901:CTAAGTCAATGCCTATTCTGAATACTAGTAGCAGACCTCATTACACTAACATGAATTGGA 960
07mtDNA   901:CTAAGTCAATGCCTATTCTGAATACTAGTAGCAGACCTCATTACACTAACATGAATTGGA 960
08mtDNA   901:CTAAGTCAATGCCTATTCTGAATACTAGTAGCAGACCTCATTACACTAACATGAATTGGA 960
09mtDNA   901:CTAAGTCAATGCCTATTCTGAATACTAGTAGCAGACCTCATTACACTAACATGAATTGGA 960
10mtDNA   901:CTAAGTCAATGCCTATTCTGAATACTAGTAGCAGACCTCATTACACTAACATGAATTGGA 960
11mtDNA   901:CTAAGTCAATGCCTATTCTGAATACTAGTAGCAGACCTCATTACACTAACATGAATTGGA 960
12mtDNA   901:CTAAGTCAATGCCTATTCTGAATACTAGTAGCAGACCTCATTACACTAACATGAATTGGA 960
13mtDNA   901:CTAAGTCAATGCCTATTCTGAATACTAGTAGCAGACCTCATTACACTAACATGAATTGGA 960
14mtDNA   901:CTAAGTCAATGCCTATTGTGAATACTAGTAGCAGACCTCATTACACTAACATGAATTGGA 960
15mtDNA   901:CTAAGTCAATGCCTATTCTGAATACTAGTAGCAGACCTCATTACACTAACATGAATTGGA 960
16mtDNA   901:CTAAGTCAATGCCTATTCTGAATACTAGTAGCAGACCTCATTACACTAACATGAATTGGA 960
17mtDNA   901:CTAAGTCAATGCCTATTCTGAATACTAGTAGCAGACCTCATTACACTAACATGAATTGGA 960
18mtDNA   901:CTAAGTCAATGCCTATTCTGAATACTAGTAGCAGACCTCATTACACTAACATGAATTGGA 960
20mtDNA   901:CTAAGTCAATGCCTATTCTGAATACTAGTAGCAGACCTCATTACACTAACATGAATTGGA 960

01mtDNA   961:GGACAACCCGTAGAACACCCATTCATCATCATCGGCCAACTAGCCTCCATCTTAAATTTC 1020
02mtDNA   961:GGACAACCCGTAGAACACCCATTCATCATCATCGGCCAACTAGCCTCCATCTTATATTTC 1020
03mtDNA   961:GGACAACCCGTAGAACACCCATTCATCATCATCGGCCAAGTAGCCTCCATCTAATATTTC 1020
04mtDNA   961:GGACAACCCGTAGAACACCCATTCATCATCATCGGCCAACTAGCCTCCATCTTATATTTC 1020
05mtDNA   961:GGACAACCCGTAGAACACCCATTCATCATCATCGGCCAACTAGCCTCCATCTTATATTTC 1020
06mtDNA   961:GGACAACCCGTAGAACACCCATTCATCATCATCGGCCAACTAGCCTCCATCTTATATTTC 1020
07mtDNA   961:GGACAACCCGTAGAACACCCATTCATCATCATCGGCCAACTAGCCTCCATCTTATATTTC 1020
08mtDNA   961:GGACAACCCGTAGAACACCCATTCATCATCATCGGCCAACTAGCCTCCATCTTATATTTC 1020
09mtDNA   961:GGACAACCCGTAGAACACCCATTCATCATCATCGGCCAACTAGCCTCCATCTTATATTTC 1020
10mtDNA   961:GGACAACCCGTAGAACACCCATTCATCATCATCGGCCAACTAGCCTCCATCTTATATTTC 1020
11mtDNA   961:GGACAACCCGTAGAACACCCATTCATCATCATCGGCCAACTAGCCTCCATCTTATATTTC 1020
12mtDNA   961:GGACAACCCGTAGAACACCCATTCATCATCATCGGCCAACTAGCCTCCATCTTATATTTC 1020
13mtDNA   961:GGACAACCCGTAGAACACCCATTCATCATCATCGGCCAACTAGCCTCCATCTTATATTTC 1020
14mtDNA   961:GGACAACCCGTAGAACACCCATTCATCATCATCGGCCAACTAGCCTCCATCTTATATTTC 1020
15mtDNA   961:GGACAACCCGTAGAACACCCATTCATCATCATCGGCCAACTAGCCTCCATCTTATATTTC 1020
16mtDNA   961:GGACAACCCGTAGAACACCCATTCATCATCATCGGCCAACTAGCCTCCATCTTATATTTC 1020
17mtDNA   961:GGACAACCCGTAGAACACCCATTCATCATCATCGGCCAACTAGCCTCCATCTTATATTTC 1020
18mtDNA   961:GGACAACCCGTAGAACACCCATTCATCATCATCGGCCAACTAGCCTCCATCTTATATTTC 1020
20mtDNA   961:GGACAACCCGTAGAACACCCATTCATCATCATCGGCCAACTAGCCTCCATCTTATATTTC 1020

01mtDNA  1021:CTAATCATTCTAGTATTGATACCAAT                                  1046
02mtDNA  1021:CTAATCATTCTAGTATTGATACCAAT                                  1046
03mtDNA  1021:CTAATCATTCTAGTATTGATACCAAT                                  1046
04mtDNA  1021:CTAATCATTCTAGTATTGATACCAAT                                  1046
05mtDNA  1021:CTAATCATTCTAGTATTGATACCAAT                                  1046
06mtDNA  1021:CTAATCATTCTAGTATTGATACCAAT                                  1046
07mtDNA  1021:CTAATCATTCTAGTATTGATACCAAT                                  1046
08mtDNA  1021:CTAATCATTCTAGTATTGATACCAAT                                  1046
09mtDNA  1021:CTAATCATTCTAGTATTGATACCAAT                                  1046
10mtDNA  1021:CTAATCATTCTAGTATTGATACCAAT                                  1046
11mtDNA  1021:CTAATCATTCTAGTATTGATACCAAT                                  1046
12mtDNA  1021:CTAATCATTCTAGTATTGATACCAAT                                  1046
13mtDNA  1021:CTAATCATTCTAGTATTGATACCAAT                                  1046
14mtDNA  1021:CTAATCATTCTAGTATTGATACCAAT                                  1046
```

```
15mtDNA 1021:CTAATCATTCTAGTATTGATACCAAT 1046
16mtDNA 1021:CTAATCATTCTAGTATTGATACCAAT 1046
17mtDNA 1021:CTAATCATTCTAGTATTGATACCAAT 1046
18mtDNA 1021:CTAATCATTCTAGTATTGATACCAAT 1046
20mtDNA 1021:CTAATCATTCTAGTATTGATACCAAT 1046
```

หมายเหตุ: cytochrome b มีขนาด 1140 bp แต่เนื่องจากลำดับเบสลำดับที่ 1-57 และ 1104-1140 มีความแปรปรวนจึงตัดลำดับดังกล่าวออกทำให้เหลือลำดับเบสในส่วนยีน cytochrome b 1046 bp (ตำแหน่งที่ 58-1103)

ตัวอย่างที่ 19 mtDNA ไม่สามารถหาลำดับเบสได้จึงตัดออกจากการวิเคราะห์

4.3.5 จัดกลุ่ม haplotype จากความแตกต่างของลำดับเบสยีน cytochrome b

เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b โดยใช้โปรแกรม clustalX 1.81 ร่วมกับโปรแกรม PHYLIP เพื่อแบ่งกลุ่ม haplotype ของตัวอย่างสุกรพื้นเมือง ซึ่งแสดงในตารางที่ 4.7 ส่วนตำแหน่งที่แตกต่างกันแสดงในตารางที่ 4.8

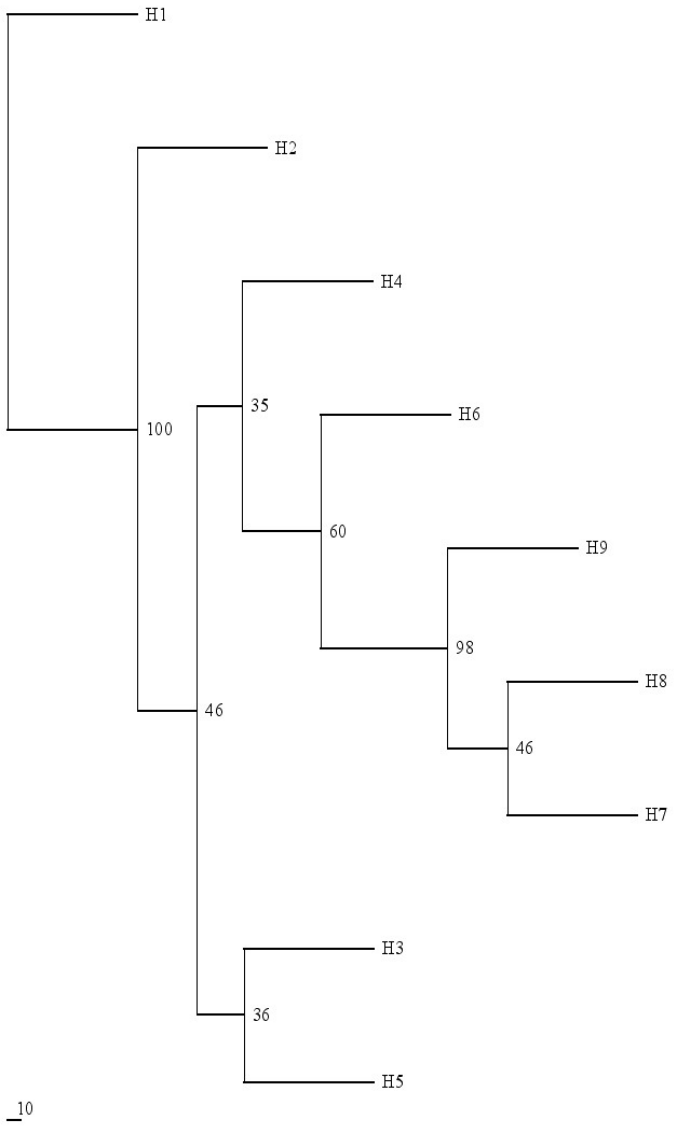
ตารางที่ 4.6 การจัดกลุ่ม haplotype ของตัวอย่างสุกรพื้นเมือง

haplotype	จำนวนตัวอย่าง (ตัว)	ตัวอย่างที่อยู่ในแต่ละ haplotype
H1	1	10 mtDNA-NP
H2	7	5 mtDNA-L, 6 mtDNA-SK, 7 mtDNA-SK, 8 mtDNA-SK, 11 mtDNA-MD, 12 mtDNA-MD, 20 mtDNA-LAO-MD
H3	5	2 mtDNA-L, 13 mtDNA-SS, 15 mtDNA-SR, 16 mtDNA-SR, 18 mtDNA-LAO-L
H4	1	14 mtDNA-SS
H5	1	17 mtDNA-SR
H6	1	1 mtDNA-L
H7	1	3 mtDNA-L
H8	1	4 mtDNA-L
H9	1	9 mtDNA-NP

ตารางที่ 4.7 ตำแหน่งลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b ที่แตกต่างกัน 43 ตำแหน่งในแต่ละ Haplotype

Haplotype	ตำแหน่งเบสที่เปลี่ยนแปลง																																											จำนวน (ตัว)
	43	52	70	126	135	144	146	155	160	161	191	208	219	312	363	525	546	552	570	631	691	738	757	765	774	784	796	797	807	810	826	838	862	880	911	913	918	925	943	957	1000	1013	1015	
H1	G	T	T	A	A	A	A	G	G	T	A	A	A	T	C	C	G	C	C	C	C	A	T	C	C	C	A	C	A	T	A	C	C	C	G	C	C	C	A	T	C	T	T	1
H2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	7
H3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	5
H4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	1
H5	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
H6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	T	.	.	.	.	.	A	1
H7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	.	G	G	A	G	G	G	T	A	G	.	T	.	G	C	G	G	A	.	1
H8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	C	.	G	C	G	G	T	T	.	G	T	T	T	.	T	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
H9	C	C	C	C	C	C	C	C	C	.	C	C	C	.	T	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1

หาความสัมพันธ์ของแต่ละ Haplotype ทั้งหมดจากลำดับเบสโดยการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธีการหาระยะห่างทางพันธุกรรมตามวิธี neighbor-joining ด้วยโปรแกรม PHYLIP package (Felsenstein, 1993) สามารถสร้างเป็น Phylogenetic tree ดังแสดงในแผนภาพที่ 4.7



แผนภาพที่ 4.7 Phylogenetic tree ความสัมพันธ์ของแต่ละ Haplotype

จากการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b โดยใช้โปรแกรม clustalX 1.81 ร่วมกับโปรแกรม PHYLIP เพื่อนำมาศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองพบว่าสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่โดยสามารถแบ่งได้เป็น 9 Haplotype

จากแผนภาพที่ 4.7 สามารถแบ่งกลุ่มของ Haplotype ใหญ่ๆ ได้ 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มี H1 กลุ่มที่ 2 มี H2 กลุ่มที่ 3 มี H4 H6 H7 H8 และ H9 กลุ่มที่ 4 มี H3 และ H5 โดยกลุ่มที่ไกลออกมาจากกลุ่มอื่นที่สุด คือ

กลุ่มที่ 1 ซึ่งมีตัวอย่างเดียวที่เก็บจากจังหวัดนครพนม (อ.เมือง) จะเป็นกลุ่มที่ไกลออกมาจากกลุ่มอื่นที่สุด

กลุ่มที่ 2 ถึงแม้จะมี H2 แค่ Haplotype เดียวแต่มีจำนวนตัวอย่างถึง 7 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 19 ตัวอย่าง อีกทั้งตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดมุกดาหาร 3 ตัวอย่าง (อ.หว่านใหญ่ ทั้งหมด แต่ต่างพื้นที่กัน) และ จังหวัดสกลนคร 3 ตัวอย่าง (อ.กุดบาก อ.เมือง และ อ.เต่างอย อย่างละ 1 ตัวอย่าง) จึงสรุปได้ว่า สุกรพื้นเมืองในจังหวัดสกลนครและจังหวัดมุกดาหารไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรมใน 2 จังหวัดนี้จากการใช้ลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b ทำการศึกษา แต่ในกลุ่มนี้กลับมีตัวอย่างจากจังหวัดเลย (อ.ทาลี่) อาจเป็นไปได้ว่าเกษตรกรผู้เลี้ยงได้นำสุกรพื้นเมืองจากบริเวณจังหวัดสกลนครและจังหวัดมุกดาหารขึ้นไปเลี้ยงในจังหวัดเลย (อ.ทาลี่)

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่มีหลาย Haplotype ที่สุด แต่ H6 (1 ตัวอย่าง จากจังหวัดเลย (อ.เชียงคาน)) H7 (1 ตัวอย่าง จากจังหวัดเลย (อ.ท่าลี)) และ H8 (1 ตัวอย่าง จากจังหวัดเลย (อ.ท่าลี)) ล้วนแต่เป็นตัวอย่างจากจังหวัดเลย แต่พบว่ามีตัวอย่างที่อยู่นอกกลุ่ม คือ H4 (1 ตัวอย่าง จากจังหวัดศรีสะเกษ (อ.เมือง)) และ H9 (1 ตัวอย่าง จากจังหวัดนครพนม (อ.นาหว้า))

กลุ่มที่ 4 มี H3 และ H5 โดยในกลุ่ม H3 มี 5 ตัวอย่าง จากจังหวัดเลย (อ.เชียงคาน แต่ต่างพื้นที่กัน) 2 ตัวอย่าง จังหวัดศรีสะเกษ (อ.เมือง) 1 ตัวอย่าง และจังหวัดสุรินทร์ (อ.พนมดงรัก แต่ต่างพื้นที่กัน) 2 ตัวอย่าง ส่วน H5 มี 1 ตัวอย่างจากจังหวัดจังหวัดสุรินทร์ (อ.พนมดงรัก) จากกลุ่มนี้จะเห็นว่าตัวอย่างจากจังหวัดสุรินทร์ทั้งหมด 3 ตัวอย่างอยู่ในกลุ่มนี้หมด แต่อยู่ใน H3 2 ตัวอย่าง ใน H5 1 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าในจังหวัดสุรินทร์สุกรพื้นเมืองยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมจากการใช้ลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b ทำการศึกษา

4.4 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยการสร้าง Phylogenetic tree ของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเปรียบเทียบกับสุกรพันธุ์ลาร์ไวท์ ดูรอค เหมยซาน และ แลนด์เรซ

เปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b โดยใช้โปรแกรม Genetyx ของตัวอย่างแต่ละ Haplotype กับสุกรพันธุ์ลาร์ไวท์ ดูรอค เหมยซาน และแลนด์เรซ ที่หาข้อมูลการเรียงลำดับเบสจาก GenBank ดังแสดงในตารางที่ 4.9 ส่วนตำแหน่งที่แตกต่างกันแสดงในตารางที่ 4.10

ตารางที่ 4.8 ข้อมูลการเรียงลำดับเบสจาก GenBank

พันธุ์	ตัวอย่าง	หมายเลขใน GenBank
ลาร์จไวท์	LW1	AB015079
	LW2	AF136548
	LW3	AF136552
	LW4	AF486874
	LW5	AY237524
	LW6	AY237525
ดูรอค	D1	AB015080
	D2	AF136554
	D3	AF486858
	D4	AY237521
เหมยซาน	M1	AB015077
	M2	AF136553
	M3	AY237530
แลนด์เรซ	LR1	AF034253
	LR2	AF136546
	LR3	AF136547
	LR4	AF304202
	LR5	AF486866

ตารางที่ 4.9 ตำแหน่งลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b ที่แตกต่างกัน 65 ตำแหน่ง

	ตำแหน่งเบสที่เปลี่ยนแปลง																																							
	43	52	70	126	129	135	144	146	150	155	159	160	161	165	183	186	191	208	210	229	246	247	291	312	363	375	411	486	525	546	552	570	631
H1	G	T	T	A	T	A	A	A	C	G	C	G	T	T	C	C	A	A	G	A	C	C	T	C	G	C	T	C	G	C	C	C	
H2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	
H3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	
H4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	
H5	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	
H6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	
H7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	
H8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	G	C	G	G	T	
H9	C	C	C	C		C	C	C	.	C	.	C	.	.	.	.	C	C	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	C	.	.	.	
LW1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	C	.	.	.	
LW2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	C	.	C	.	.	.	
LW3	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	C	.	T	.	.	A	.	T	.	.	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.	
LW4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	C	.	.	.	
LW5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	
LW6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	
D1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	
D2	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	
D3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	
D4	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	T	.	.	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.	
M1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	
M2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	
M3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
LR1	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	A		T	.	.	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.	
LR2	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	A		T	.	.	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.	
LR3	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	A		T	.	.	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.	
LR4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	T	.	.	C	.	.	.	
LR5	.	.	.	.	C	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	.	.	A	.	T	.	.	.	.	.	.	C	.	C	.	.	.	

ตารางที่ 4.9 ตำแหน่งลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b ที่แตกต่างกัน 65 ตำแหน่ง (ต่อ)

	ตำแหน่งเบสที่เปลี่ยนแปลง																																
	636	691	738	757	765	774	783	784	786	797	807	810	817	819	822	826	838	862	880	883	911	913	918	925	943	957	981	993	1000	1003	1015	1017	1038
H1	G	C	A	T	C	C	C	C	A	C	A	T	C	A	T	A	C	C	C	A	G	C	C	C	A	T	A	C	C	T	T	T	G
H2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	T	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.
H7	.	.	C	.	.	.	.	G	G	A	G	G	.	.	.	G	T	A	G	.	.	T	.	G	C	G	.	.	G	A	.	.	.
H8	.	T	.	G	T	T	.	T	.	T	.	G	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
H9	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
LW1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.		.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
LW2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.
LW3	A	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	G	C	G	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	C	A
LW4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.
LW5	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
LW6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
D1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
D2	A	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	G	C	G	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	C	.
D3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
D4	A	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	G	C	G	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	C	.
M1	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
M2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
M3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A
LR1	A	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	G	C	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	C	.
LR2	A	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	T	G	C	G	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	C	.
LR3	A	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	C	T	G	C	G	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	C	.
LR4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.
LR5	A	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.		T	G	C	G	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	C	.

หาความสัมพันธ์ของตัวอย่างแต่ละ Haplotype กับสุกรพันธุ์ลาร์ไวท์ ดูรอค เหมยซาน และแลนด์เรซ ที่หาข้อมูลการเรียงลำดับเบสจาก GenBank ทั้งหมดจากลำดับเบสโดยการสร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธีการหาระยะห่างทางพันธุกรรมตามวิธี neighbor-joining ด้วยโปรแกรม PHYLIP package (Felsenstein, 1993) สามารถสร้างเป็น Phylogenetic tree ดังแสดงในแผนภาพที่ 4.8

แผนภาพที่ 4.8 Phylogenetic tree ความสัมพันธ์ของตัวอย่างแต่ละ Haplotype กับสุกรพันธุ์ลาร์ไวท์ ดูรอค เหมยซาน และแลนด์เรซ

จากแผนภาพที่ 4.8 จะเห็นว่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยทั้ง 9 Haplotype มีความสัมพันธ์กับกับสุกรพันธุ์ลาร์ไวท์ ดูรอค เหมยซาน และแลนด์เรซ จากการศึกษาเอกสารพบในช่วงที่มีการปรับปรุงพันธุ์สุกรพันธุ์ลาร์ไวท์ ดูรอค และแลนด์เรซ ปี ค.ศ. 1770-1860 ในประเทศอังกฤษได้มีการนำเข้าสุกรของประเทศจีนเข้าไปเพื่อช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ทำให้มีลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b ของกลุ่ม Haplotype ที่เป็น Haplotype ของสุกรเอเชียอยู่ด้วย (Clop และคณะ, 2004) ดังนั้นจึงทำให้มีความสัมพันธ์กับกับสุกรพันธุ์ลาร์ไวท์ ดูรอค เหมยซาน และแลนด์เรซ

จาก Phylogenetic tree ความสัมพันธ์ของตัวอย่างแต่ละ Haplotype กับ สุกรพันธุ์ลาร์ไวท์ ดูรอค เหมยซาน และแลนด์เรซ H1 ซึ่งมีตัวอย่างเดียวที่เก็บจากจังหวัดนครพนม (อ. เมือง) เป็นกลุ่มที่ไกลออกมาจากกลุ่มอื่นที่สุดมีความสัมพันธ์กับ M3 จึงบ่งบอกได้ว่าเหตุที่ H1 ไกลจากความสัมพันธ์จาก Haplotype อื่นๆ เพราะมีสายแม่ของเหมยซานเข้ามาผสม ส่วน H2 มีความสัมพันธ์กับ D3 และกลุ่ม Haplotype ที่ไกลออกมาที่สุดและน่าจะเป็นสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยแท้ก็ คือ H5 มี 1 ตัวอย่างจากจังหวัดจังหวัดสุรินทร์ (อ.พนมดงรัก) ดังนั้นจึงควรอนุรักษ์สุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยในจังหวัดสุรินทร์ให้ดี

4.5 การศึกษาตำแหน่งจดจำ (Recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (Restriction enzyme) จากลำดับเบสส่วนของยีน cytochrome b ในแต่ละ Haplotype

นำลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b ในแต่ละ Haplotype มาศึกษา โดยใช้โปรแกรม Gentyx ที่สามารถแยกแต่ละ Haplotypeได้ ดังแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.10 ตำแหน่งจดจำของเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถแยกแต่ละ Haplotype

Haplotype	เอนไซม์ตัดจำเพาะ	ตำแหน่งจดจำ	ตำแหน่งที่ตัด
H1	*Pst*I	CTGCAG	541
H2	ไม่พบเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถแยกจาก H3 และ H4		
H3	ไม่พบเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถแยกจาก H2 และ H4		
H4	ไม่พบเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถแยกจาก H2 และ H3		
H5	*Alu*I	AGCT	369, 396 และ 819
H6	*Tru*9I	TTAA	620, 746, 850 และ 1012
H7	*BsrS*I	ACTGG/CCAGT	804
H8	*BstO*I	CCWGG	540
H9	*Sty*I	CCWWGG	51

จากตารางที่ 4.11 สามารถใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Pst*I ในการแยก H1 ออกจาก Haplotype อื่นได้ ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu*I ในการแยก H5 ออกจาก Haplotype อื่นได้ ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tru*9I ในการแยก H6 ออกจาก Haplotype อื่นได้ ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Tru*9I ในการแยก H6 ออกจาก Haplotype อื่นได้ ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BsrS*I ในการแยก H7 ออกจาก Haplotype อื่นได้ ใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BstO*I ในการแยก H8 ออกจาก Haplotype อื่นได้ และใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Sty*I ในการแยก H9 ออกจาก Haplotype อื่นได้ แต่ไม่พบเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถแยก H2, H3 และ H4 ออกจากกันได้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 ตัวอย่างที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b

ตัวอย่างที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b คือ ปมรากขนจำนวน 100 เส้น เพราะจากผลการทดลองตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น ก็สามารถนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b ได้ไม่แตกต่างจากตัวอย่างปมรากขนจำนวน 200 เส้น และตัวอย่างเลือดจากใบหูทั้งยังเป็นตัวอย่างที่สามารถเก็บได้ง่ายกว่าการเจาะเลือดจากใบหู

5.1.2 การศึกษาระยะเวลาที่นานที่สุดในการเก็บตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) นำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b

ตัวอย่างปมรากขนจากแผงคอ จำนวน 100 เส้น ของสุกรพื้นเมืองที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ที่ระยะเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง สามารถนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b ได้ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นในการเก็บตัวอย่างสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ได้เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

5.1.3 การศึกษาลักษณะภายนอกของสุกรพื้นเมือง และความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมือง โดยใช้ความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b

จากการศึกษาลักษณะภายนอกของสุกรพื้นเมืองในแต่ละจังหวัดไม่สามารถกำหนดได้อย่างชัดเจน เพราะมีความแปรปรวนไปทั้งในกลุ่มสุกรพื้นเมืองภายในจังหวัด และระหว่างกลุ่มสุกรพื้นเมืองในแต่ละจังหวัด ดังนั้นความพยายามที่จะจำแนกความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือด้วยลักษณะภายนอกไม่สามารถแยกได้อย่างชัดเจน ส่วน

การศึกษาเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b จากตัวอย่างที่เก็บในจังหวัดนครพนม มุกดาหาร เลย ศรีสะเกษ สกลนคร และจังหวัดสุรินทร์ พบว่าสามารถแบ่งสุกรพื้นเมืองออกเป็น 9 haplotype โดยพบความแตกต่างของลำดับเบส 43 ตำแหน่ง

5.1.4 การศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม โดยการสร้าง Phylogenetic tree ของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเปรียบเทียบกับสุกรพันธุ์ลาร์ไวท์ ดูรอค เหมยซาน และ แลนด์เรซ

ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยทั้ง 9 haplotype มีความสัมพันธ์กับกับสุกรพันธุ์ลาร์ไวท์ ดูรอค เหมยซาน และแลนด์เรซ จากการศึกษาเอกสารพบในช่วงที่มีการปรับปรุงพันธุ์สุกรพันธุ์ลาร์ไวท์ ดูรอค และแลนด์เรซ ปี ค.ศ. 1770-1860 ในประเทศอังกฤษได้มีการนำเข้าสุกรของประเทศจีนเข้าไปเพื่อช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ทำให้มีลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b ของกลุ่ม haplotype ที่เป็น haplotype ของสุกรเอเชียอยู่ด้วย (Clop และคณะ, 2004) ดังนั้นจึงทำให้มีความสัมพันธ์กับกับสุกรพันธุ์ลาร์ไวท์ ดูรอค เหมยซาน และแลนด์เรซ

5.1.5 การศึกษาตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) จากลำดับเบสส่วนของยีน cytochrome bในแต่ละ haplotype

จากการนำลำดับเบสในส่วนของยีน cytochrome b ในแต่ละ haplotype มาศึกษาโดยใช้โปรแกรม Gentyx สามารถแยก Haplotype H1, H5, H6, H7, H8 และ H9 แต่ไม่พบเอนไซม์ตัดจำเพาะที่สามารถแยก H2, H3 และ H4 ออกจากกันได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นเท่านั้น จึงมีการศึกษาที่กว้างเพื่อกระจายทั่วทั้งพื้นที่ เนื่องจากมีการลดลงของจำนวนสุกรพื้นเมืองอย่างรวดเร็ว บางครั้งได้รับข้อมูลว่ามีการพบการเลี้ยง แต่เมื่อไปสำรวจจริงกับพบว่าเลิกเลี้ยงแล้ว จากข้อจำกัดดังกล่าวผลสรุปจากการวิจัยนี้จึงเป็นบทสรุปตามวันเวลาที่จัดทำวิจัย แต่การเคลื่อนที่ของสุกรพื้นเมืองหรือการเคลื่อนไหวของพันธุกรรมเกิดขึ้นลอด

5.2.2 จำนวนตัวอย่างในแต่ละแหล่งมีจำนวนน้อย เพราะชาวบ้านมักปล่อยสุกรพื้นเมืองจึงยากที่จะเก็บตัวอย่าง และสุกรพื้นเมืองในแต่ละแหล่งมักสืบเชื้อสายมาจากแม่เดียวกัน

52.3 เนื่องจากมีข้อจำกัดด้านงบประมาณการวิเคราะห์ผลในห้องทดลองจึงสามารถส่งตัวอย่างเพื่อหาลำดับเบสเพียง 20 ตัวอย่าง หากเพิ่มจำนวนตัวอย่างให้มากขึ้นผลการทดลองอาจใกล้เคียงความจริงมากขึ้น

5.3 การประยุกต์ใช้จากผลการวิจัย

5.3.1 ตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น สามารถนำมาใช้สกัดดีเอ็นเอเพื่อใช้ในการทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b

5.3.2 จากการศึกษาพบว่าสุกรพื้นเมืองในแต่ละแหล่งมีความหลากหลายทางพันธุกรรม ดังนั้นหากต้องการอนุรักษ์สายพันธุ์จำเป็นต้องเก็บพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองในแต่ละแหล่ง

5.3.3 ตำแหน่งจดจำ (recognition site) ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) ที่ทำการศึกษาสามารถนำไปเป็นข้อมูลในการใช้เทคนิค PCR-RFLP ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็วกว่า

รายการอ้างอิง

จรัญ จันทลักขณา. (2524). การปรับปรุงพันธุ์หมูเมืองไทยในอนาคต. **สุกรสาสน์.** 7 (28): 27-45.

ถวัลย์ วรรณกุล. (2526). **การจัดการฟาร์มเพื่อประสิทธิภาพการผลิตสุกรพันธุ์.** กรุงเทพมหานคร : สามเจริญพานิช.

ประสบ บูรณมานัส. (2531). **สุกรและการรักษาโรค.** พิมพ์ครั้งที่ 4 กรุงเทพมหานคร : ไทยวัฒนาพานิช.

ปรียานันท์ แสนโภชน์. (2549). **เซลล์และองค์ประกอบของเซลล์** [ออนไลน์]. ได้จาก: http://student.nu.ac.th/nokcy/lesson1.htm.

พนิช คำรบธนสาร. (2545). **ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย.** วิทยานิพนธ์ดุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

พงษ์ชาญ ณ ลำปาง. (2545). **การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมของสุกรไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.** รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

วิสุทธิ์ ใบไม้. (2538). **พันธุศาสตร์.** เอ็นพีซีพพลายพริ้นติ้ง. กรุงเทพมหานคร.

แสนศักดิ์ นาควิสุทธิ์. (2543). ความหลากหลายทางชีวภาพด้วยการเกษตร: การอนุรักษ์พันธุ์สัตว์เลี้ยง. **ว.สัตวบาล.** 10 (11): 1-4.

อมรรัตน์ ขุนทองเอก. (2537). **การศึกษาระบบการเลี้ยงและคาริโอไทป์ของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.** วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาสัตวศาสตร์บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อลงกลด แทนออมทอง และ เรืองวิทย์ บรรจงรัตน์. (2543). แนวทางการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของสุกรพื้นเมืองไทย. **ว.สัตวบาล.** 10 (3): 18-22.

Alves, E., ´Ovilo, C., Rodr´ıguez, C. and Sili´o, L. (2003). Mitochondrial DNA sequence variation and phylogenetic relationships among Iberian pigs and other domestic and wild pig populations. **Anim. Genet.** 34: 319–324.

Arnason, U. and Janke A. (2002). Mitogenomic analyses of eutherian relationships. Cytogenet. **Genome Res.** 96: 20-32.

Arnason, U., Adegoke J.A., Bodin K., Born E.W., Esa Y.B., Gullberg A., Nilsson M., Short R.V., Xu X.F. and Janke A. (2002). Mammalian mitogenomic relationships and the root of the eutherian tree. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 99: 8151-8156.

Bibb, M.J. (1981). Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. **Cell.** 26:167-180.

Darley-Usmar, V.M., Rickwood, D. and Wilson, M.T. (1987). **Mitochondria a practical approach. Information Printing Ltd.** Oxford. England.

Fernando, P. and Landu, R. (2000). Molecular genetic and behavioral analysis of social organization in the Asian elephant (*Elephas maximus*). **Behav. Ecol. Sociobiol.** 48 : 84-91

Kim, K.I., Lee, J.H., Li, K., Zhang, Y.P., S, S., Gongora, J. and Moran, C. (2002). Phylogenetic relationships of Asian and European pig breeds determined by mitochondrial D-loop sequence polymorphism. **Animal. Genetics.** 33:19–25.

Kocher, T.D. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA.** 86 : 6196-6200.

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.

Loftus, R. and Scherf, B. (1993). **World watch list for domestic animal diversit.** Food and Agriculture organization of the united nation. Rome.

Rattanaranchart, S. (1994). **Present situation of Thai native pigs.** Chiang mai : Chiang mai University.

Watanobe, T.N., Okumura, N., Ishiguro, M., Nakano, A., Matsui, M. Sahara. and M. Komatsu. 1999. Genetic relationship and distribution of the Japanese wild boar (*Sus scrofa leucomystax*) and Ryukyu wild boar (*Sus scrofa riukiuanus*) analaysed by mitochondrial DNA. **Molecular Ecology.** 8 : 1509-1512.

ภาคผนวก ก

1. การเก็บตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างเลือดจากใบหู

1. ทำความสะอาดบริเวณใบหูที่จะทำการเจาะเลือดด้วยน้ำสะอาด และเช็ดด้วยผ้าสะอาด

2. ใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์เช็ดทำความสะอาดอีกรอบ รอจนแอลกอฮอล์แห้ง

3. ใช้มือกดเส้นเลือดบริเวณใบหูให้เส้นเลือดโป่งขึ้น จากนั้นใช้เข็มเบอร์ 21 ความยาว 1 นิ้ว และไซลิ้งขนาด 3 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อ เจาะดูดเลือดจากใบหูประมาณ 1.5 มิลลิลิตร เก็บเลือดลงในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 2.0 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อ และมี 0.5M EDTA อยู่

4. เก็บหลอดไมโครฟิวจ์ที่มีตัวอย่างเลือดจากใบหูในถังน้ำแข็ง (กรณีที่เก็บตัวอย่างเลือดไว้เกิน 24 ชั่วโมง จะเก็บหลอดไมโครฟิวจ์ไว้ในถังไนโตรเจนเหลว หรือ ตู้อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส)

การเก็บตัวอย่างปมรากขน

1. ทำความสะอาดบริเวณที่จะทำการถอนปมรากขนด้วยน้ำสะอาด และเช็ดด้วยผ้าสะอาด

2. ใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์เช็ดทำความสะอาดอีกรอบ รอจนแอลกอฮอล์แห้ง

3. ถอนขนบริเวณดังกล่าว จากนั้นตัดขนด้วยกรรไกรปลอดเชื้อให้มีขนาดความยาวจากปมรากขนขึ้นมาประมาณ 0.5 เซนติเมตร ลงในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 2.0 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อ

4. เก็บหลอดไมโครฟิวจ์ที่มีตัวอย่างปมรากขนในถังน้ำแข็ง (กรณีที่เก็บตัวอย่างปมรากขนไว้เกิน 24 ชั่วโมง จะเก็บหลอดไมโครฟิวจ์ไว้ในถังไนโตรเจนเหลว หรือ ตู้อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส)

2. การสกัดดีเอ็นเอ

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือด (โดยใช้ Genomic DNA Purification Kit (Wizard®)

1. นำเลือดที่แช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ออกมาละลาย จากนั้นนำเลือดจำนวน 350 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2. เติม cell lysis solution 1,050 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดคว่ำและหงาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) 10 นาที ระหว่างที่ตั้งทิ้งไว้ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดคว่ำและหงาย 2-3 ครั้ง

3. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ทิ้ง ทำซ้ำขั้นตอนที่ 2-3 จนได้ตะกอนค่อนข้างขาวจึงทำขั้นตอนที่ 4 ต่อ

4. เติม nuclei lysis solution 350 ไมโครลิตร 0.5M EDTA 84 ไมโครลิตร proteinase K (ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร) จำนวน 17.5 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสข้ามคืน โดยวางหลอดไมโครฟิวจ์บนเครื่องเขย่าสารให้ค่อยๆ ละลาย

5. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เพื่อให้เย็นลงเป็นเวลา 5 นาที เติม RNase A 1.5 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดคว่ำและหงาย 2-5 ครั้ง นำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

6. เติม protein precipitation solution 118 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 20 วินาที แช่เย็นในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

7. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ย้ายของเหลว (supernatant) ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

8. เติม Isopropanol (0.8 V/V) 500 ไมโครลิตร ค่อยๆ ผสมให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดคว่ำและหงาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที

9. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 80% เอธานอล โดยระวังไม่ให้ตะกอนฟุ้งขึ้นมา 200 ไมโครลิตร

10. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ทิ้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10-15 นาที ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 30 ไมโครลิตร

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างปมรากขนจำนวน 100 เส้น (โดยใช้ Genomic DNA Purification Kit (Wizard®)

1. เติม nuclei lysis solution 200 ไมโครลิตร 0.5M EDTA 48 ไมโครลิตร proteinase K (ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร) จำนวน 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสข้ามคืน โดยวางหลอดไมโครฟิวจ์บนเครื่องเขย่าสารให้ค่อยๆ ละลาย

2. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เพื่อให้เย็นลงเป็นเวลา 5 นาที เติม RNase A 1 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดคว่ำและหงาย 2-5 ครั้ง นำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3. เติม protein precipitation solution 67 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 20 วินาที แช่เย็นในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

4. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ย้ายของเหลว (supernatant) ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

5. เติม Isopropanol (0.8 V/V) 200 ไมโครลิตร ค่อยๆ ผสมให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดคว่ำและหงาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที

6. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 80% เอธานอล โดยระวังไม่ให้ตะกอนฟุ้งขึ้นมา 200 ไมโครลิตร

7. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ทิ้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10-15 นาที ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ30 ไมโครลิตร

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างปมรากขนจำนวน 200 เส้น (โดยใช้ Genomic DNA Purification Kit (Wizard®)

1. เติม nuclei Lysis solution 400 ไมโครลิตร 0.5M EDTA 96 ไมโครลิตร proteinase K (ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร) 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ข้ามคืน โดยวางหลอดไมโครฟิวจ์บนเครื่องเขย่าสารให้ค่อยๆ ละลาย

2. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เพื่อให้เย็นลงเป็นเวลา 5 นาที เติม RNase A จำนวน 2 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดคว่ำและหงาย 2-5 ครั้ง นำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3. เติม protein precipitation solution 135 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 20 วินาที แช่เย็นในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

4. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ย้ายของเหลว (supernatant) ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร หลอดใหม่

5. เติม Isopropanol (0.8 V/V) จำนวน 400 ไมโครลิตร ค่อยๆ ผสมให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดคว่ำและหงาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที

6. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 80% เอธานอล โดยระวังไม่ให้ตะกอนฟุ้งขึ้นมา 200 ไมโครลิตร

7. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ทิ้ง ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10-15 นาที ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ30 ไมโครลิตร

3. การหาปริมาณของดีเอ็นเอ

นำดีเอ็นเอที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical density, O.D.) ที่ความยาวคลื่นแสง 260 นาโนเมตร (nm) ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็น blank โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวน 1.5 ไมโครลิตร และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ จำนวน 300 ไมโครลิตร

คำนวณหาความเข้นของดีเอ็นเอจากตัวอย่างโดยใช้สูตร:

ความเข้นของดีเอ็นเอ (ng/μl) = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 260 nm*50*200 (dilution factor)

4. การทำ PCR

นำดีเอ็นเอที่เจือจางความเข้มข้นมาทำ PCR โดยใช้ Primer เพิ่มปริมาณส่วนของยีน cytochrome b

การเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายใช้ Primer MitL1 และ MitH2 (Watanobe และคณะ, 1999)

MitL1 5'-ATCGTTGTCATTCAACTACA-3'

MitH2 5'-CTCCTTCTCTGGTTTACAAG-3'

ทำการติดสลาก Primer ด้วย M13 ดังนั้นลำดับของ Primer จึงมีลำดับดังนี้

Cytochrome b – Forward

5'-CACGACGTTGTAAAACGACGAATTCATCGTTGTCATTCAACTACA-3'

Cytochrome b – Reverse

5'-GGATAACAATTTCACACAGGGAATTCCTCCTTCTCTGGTTTACAAG-3'

การเตรียมสารเพื่อทำปฏิกิริยาในกระบวนการ PCR

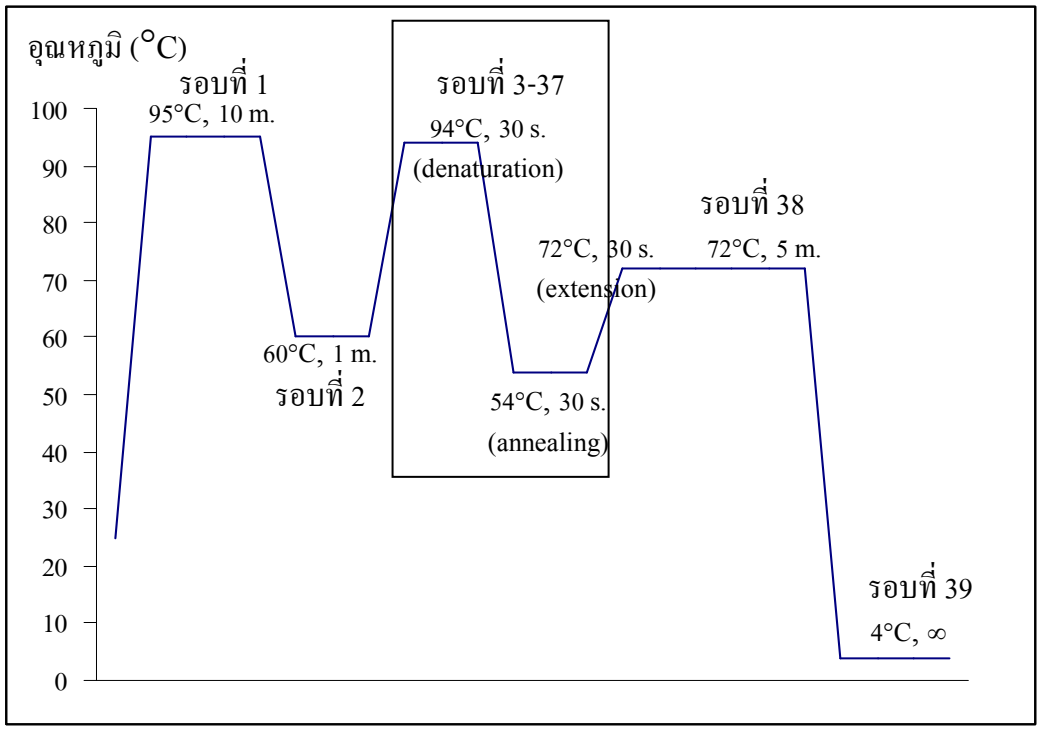
สาร	ปริมาตร	
Template	10.00	ไมโครลิตร
10Xbuffer	5.00	ไมโครลิตร
dNTP	4.00	ไมโครลิตร
10 pmol Primer F	5.00	ไมโครลิตร
10 pmol Primer R	5.00	ไมโครลิตร
Taq polymerase	0.25	ไมโครลิตร
SDW	20.75	ไมโครลิตร
Total volume	50.00	ไมโครลิตร

ในการทำ PCR ครั้งนี้จะใช้วิธีการ hot start PCR โดยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อจำนวน 12.5 ไมโครลิตร ที่ผสม Taq polymerase จำนวน 0.25 ไมโครลิตร ในช่วงที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วเข้าสู่กระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต่อไป

การดำเนินกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermocycle)

โดยใช้อุณหภูมิต่างๆ ตามลำดับดังนี้

รอบที่ 1	95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
รอบที่ 2	60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เพื่อเติม Taq polymerase และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ
รอบที่ 3-37	94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (denaturation)
	54 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (annealing)
	72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที (extension)
รอบที่ 38	72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาสมบูรณ์ยิ่งขึ้น
รอบที่ 39	4 องศาเซลเซียส



5. การตรวจชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ (PCR product)

ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ (PCR product) ด้วยอะกาโรสเจล อิเล็กโตรฟอรีซีส (agarose gel electrophoresis) เตรียม 0.7% อะกาโรสเจล โดยใช้ผงอะกาโรสเจล 0.7 กรัม

ละลายใน 0.5X TBE 100 มิลลิลิตร (ที่มี ethidium bromide ละลายอยู่ในอัตราส่วน ethidium bromide 60 ไมโครลิตร ต่อ 0.5X TBE 2 ลิตร) เทลงในแบบพิมพ์ วางหวีแล้วปล่อยให้แข็งตัวดึงหวีออก เตรียม PCR product ที่ได้ โดยผสม loading dye จำนวน 1 ไมโครลิตร กับ PCR product จำนวน 2 ไมโครลิตร หยอดลงในช่องของแผ่นวุ้น (well) ต่อวงจรไฟฟ้า โดยใช้กระแสไฟฟ้าประมาณ 100 โวลต์ (volts) เป็นเวลา 30 นาที นำแผ่นวุ้นตรวจดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

ภาคผนวก ข

ลักษณะภายนอกของสุกรพื้นเมืองที่ออกเก็บตัวอย่าง

ตารางที่ 1 ข. ลักษณะภายนอกของสุกรพื้นเมืองแยกตามจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง

สถานที่	ตัวที่	สุกรพื้นเมือง	ลักษณะ	1	2	3	4	5	6	7
จ.เลย										
อ.เชียงคาน	1	ไทย	รูปแบบที่ 5	94	45	80	50	5	27	8
อ.เชียงคาน	2	ไทย	รูปแบบที่ 1	95	48	-	55	7	28	-
อ.เชียงคาน	3	ไทย	รูปแบบที่ 1	106	53	100	59	5	31	-
อ.เชียงคาน	4	ไทย	รูปแบบที่ 4	123	67	100	63	-	19	11
อ.เชียงคาน	5	ไทย	รูปแบบที่ 5	122	64	140	66	5	34	12
อ.เชียงคาน	6	ลาว	รูปแบบที่ 6	107	45	144	62	5	21	11
อ.เชียงคาน	7	ลาว	รูปแบบที่ 5	85	37	90	50	-	21	11
อ.ท่าลี่	8	ไทย	รูปแบบที่ 5	114	58	102	62	6	30	10
อ.ท่าลี่	9	ไทย	รูปแบบที่ 5	126	52	109	62	6	25	10
อ.ท่าลี่	10	ไทย	รูปแบบที่ 7	143	60	124	65	5	27	5
อ.ท่าลี่	11	ไทย	รูปแบบที่ 5	106	52	90	53	-	24	11
อ.วังสะพุง	12	ไทย	รูปแบบที่ 1	116	49	104	60	-	28	12

ตารางที่ 1 ข. ลักษณะภายนอกของสุกรพื้นเมืองแยกตามจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง (ต่อ)

สถานที่	ตัวที่	สุกรพื้นเมือง	ลักษณะ	1	2	3	4	5	6	7
จ. สกลนคร										
อ.กุดบาก	1	ไทย	รูปแบบที่ 1	96	45	80	50	5	-	-
อ.กุดบาก	2	ไทย	รูปแบบที่ 1	95	43	92	59	5	-	-
อ.กุดบาก	3	ไทย	รูปแบบที่ 1	97	38	100	54	5	28	10
อ.กุดบาก	4	ไทย	รูปแบบที่ 1	100	-	-	50	5	30	12
อ.กุดบาก	5	ไทย	รูปแบบที่ 1	104	55	-	60	6	-	-
อ.กุดบาก	6	ไทย	รูปแบบที่ 1	95	42	88	59	5	27	9
อ.กุดบาก	7	ไทย	รูปแบบที่ 1	124	50	100	57	6	30	10
อ.กุดบาก	8	ไทย	รูปแบบที่ 3	150	70	136	69	6	25	15
อ.กุดบาก	9	ไทย	รูปแบบที่ 1	150	60	142	67	6	27	13
อ.กุดบาก	10	ไทย	รูปแบบที่ 1	129	-	-	60	5	-	-
อ.เมือง	11	ไทย	รูปแบบที่ 1	85	40	100	54	4	20	13
อ.เต่างอย	12	ไทย	รูปแบบที่ 1	115	65	122	80	6	30	10
จ.นครพนม										
อ.นาหว้า	1	ไทย	รูปแบบที่ 1	70	38	80	51	4	25	4
อ.นาหว้า	2	ไทย	รูปแบบที่ 1	65	24	90	44	5	25	10
อ.นาหว้า	3	ไทย	รูปแบบที่ 1	87	34	82	52	7	25	8
อ.นาหว้า	4	ลาว	รูปแบบที่ 1	105	64	105	63	7	31	16
อ.เมือง	5	ไทย	รูปแบบที่ 2	115	60	94	70	6	26	17

ตารางที่ 1 ข. ลักษณะภายนอกของสุกรพื้นเมืองแยกตามจังหวัดที่เก็บตัวอย่าง (ต่อ)

สถานที่	ตัวที่	สุกรพื้นเมือง	ลักษณะ	1	2	3	4	5	6	7
จ.มุกดาหาร										
อ.หว่านใหญ่	1	ไทย	รูปแบบที่ 3	102	50	84	60	6	25	11
อ.หว่านใหญ่	2	ไทย	รูปแบบที่ 1	97	37	91	63	6	26	12
อ.หว่านใหญ่	3	ไทย	รูปแบบที่ 2	115	51	110	63	7	29	13
อ.หว่านใหญ่	4	ไทย	รูปแบบที่ 3	130	42	168	77	7	27	10
อ.หว่านใหญ่	5	ไทย	รูปแบบที่ 1	117	34	100	64	6	27	10
อ.หว่านใหญ่	6	ไทย	รูปแบบที่ 3	116	47	108	67	7	30	12
อ.หว่านใหญ่	7	ไทย	รูปแบบที่ 3	121	45	128	64	6	32	14
อ.หว่านใหญ่	8	ลาว	รูปแบบที่ 9	106	42	84	54	6	24	12
อ.หว่านใหญ่	9	ลาว	รูปแบบที่ 3	131	65	132	76	-	26	14
อ.หว่านใหญ่	10	ลาว	รูปแบบที่ 1	121	47	122	65	6	34	13
อ.หว่านใหญ่	11	ลาว	รูปแบบที่ 2	120	45	110	59	5	28	10
จ.ศีรสะเกษ										
อ.เมือง	1	ไทย	รูปแบบที่ 1	120	43	132	69	6	32	11
อ.เมือง	2	ไทย	รูปแบบที่ 3	134	71	108	77	6	32	13
จ.สุรินทร์										
อ.พนมดงรัก	1	ไทย	รูปแบบที่ 8	90	40	74	54	-	26	10
อ.พนมดงรัก	2	ไทย	รูปแบบที่ 1	117	44	116	63	5	33	13
อ.พนมดงรัก	3	ไทย	รูปแบบที่ 2	119	50	132	60	7	35	10
อ.พนมดงรัก	4	ไทย	รูปแบบที่ 1	110	50	90	55	5	30	10
อ.พนมดงรัก	5	ไทย	รูปแบบที่ 6	118	50	108	64	7	29	12
อ.พนมดงรัก	6	ไทย	รูปแบบที่ 1	85	37	84	49	6	27	10
อ.พนมดงรัก	7	ไทย	รูปแบบที่ 5	137	55	108	65	7	34	12
อ.พนมดงรัก	8	ไทย	รูปแบบที่ 3	105	45	102	72	7	28	11

หมายเหตุ: รูปแบบที่ 1 มีลักษณะสีดำทั้งตัว ใบหูเล็กตั้ง หน้ายาว

รูปแบบที่ 2 มีลักษณะสีดำทั้งตัว ใบหูใหญ่ตั้ง หน้ายาว

รูปแบบที่ 3 มีลักษณะสีดำทั้งตัว ใบหูใหญ่ตก หน้ายาว

รูปแบบที่ 4 มีลักษณะสีดำทั้งตัว ใบหูเล็กตั้ง หน้าสั้น

รูปแบบที่ 5 มีลักษณะสีดำ แต่ที่ปลายเท้าทั้งสี่มีสีขาว บางตัวมีสีขาวถึงบริเวณเลยข้อเข่า บางตัวมีสีขาวทั้งขา ใบหูเล็กตั้ง หน้ายาว

รูปแบบที่ 6 มีลักษณะสีดำ แต่ส่วนตอนล่างของลำตัวจะมีสีขาว หน้ามีแถบขาว ใบหูเล็กตั้ง หน้ายาว

รูปแบบที่ 7 มีลักษณะสีดำบริเวณส่วนหัว และส่วนท้าย แต่ช่วงกลางลำตัว หน้ามีแถบขาว ใบหูเล็กตั้ง หน้ายาว

รูปแบบที่ 8 มีลักษณะสีขาวทั้งตัว แต่มีลอยด่างสีดำเป็นจุดทั้งตัว ใบหูเล็กตั้ง หน้ายาว

รูปแบบที่ 9 มีลักษณะสีขาวทั้งตัว แต่มีลอยด่างสีดำบริเวณตอนบนของช่วงท้ายของลำตัว ใบหูเล็กตั้ง หน้ายาว

1 คือ ความยาวสันกะโหลกถึงโคนหาง (เซนติเมตร)

2 คือ ความยาวซอกขาหน้าถึงซอกขาหลัง (เซนติเมตร)

3 คือ ขนาดรอบอก (เซนติเมตร)

4 คือความสูงจากพื้นถึงหัวไหล่ (เซนติเมตร)

5 คือ จำนวนเต้านม (คู่) (มีจำนวนเต้านมเป็นแม่พันธุ์สุกรพื้นเมือง ถ้าไม่มีเป็นพ่อพันธุ์สุกรพื้นเมือง)

6 คือ ความยาวหน้า (เซนติเมตร)

7 คือ ความกว้างหน้า (เซนติเมตร)

ประวัติผู้เขียน

นางสาวนิชนันท์ ชูเกิด เกิดเมื่อวันที่ 24 กรกฎาคม พ.ศ. 2526 ที่จังหวัดกาญจนบุรี เริ่มการศึกษาระดับประถมศึกษาที่โรงเรียนถาวรวิทยา อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี ศึกษาระดับมัธยมศึกษาที่โรงเรียนกาญจนานุเคราะห์ อำเภอเมือง จังหวัดกาญจนบุรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา เมื่อปี พ.ศ. 2547 จากนั้นศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุนารี จังหวัดนครราชสีมา ปีการศึกษา 2547 และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2549