บทที่ 4

ผลการทดลอง

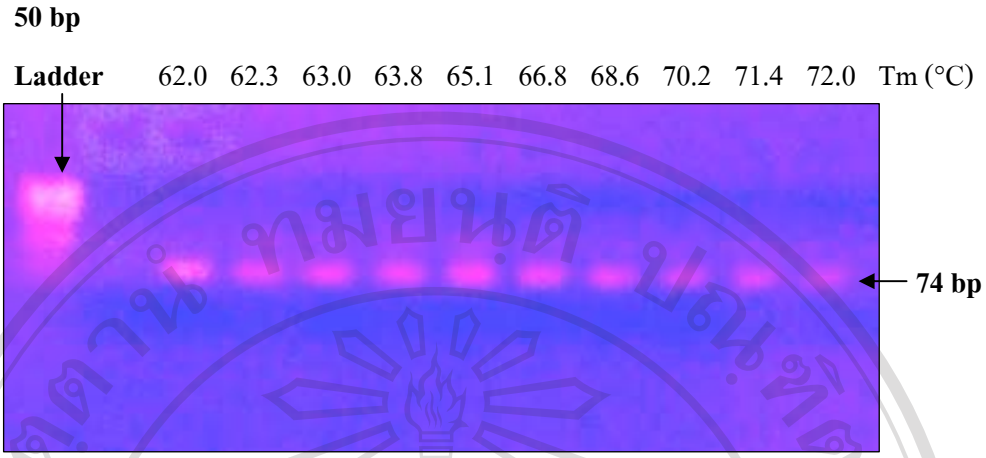
4.1 การสกัดดีเอ็นเอและความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

ในการวิจัยครั้งนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอจากสุกรสายพันธุ์แท้ (พันธุ์ดูรอค เพียเทรน ลาร์จไวท์ แลนด์เรซ) สุกรลูกผสม 2 สาย (ลาร์จไวท์ × แลนด์เรซ) และสุกรลูกผสม 3 สาย (แลนด์เรซ × ลาร์จไวท์ × ดูรอค และสายพันธุ์ทางการค้า) ในเขตจังหวัดเชียงใหม่โดยใช้ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ (ใบหูและกล้ามเนื้อ) เลือด และน้ำเชื้อ ส่วนสุกรไทยพื้นเมืองจากจังหวัดอุตรดิตถ์ แม่ฮ่องสอนและเชียงใหม่ เก็บตัวอย่างจากเนื้อเยื่อใบหูเพียงอย่างเดียว เนื่องจากมีความสะดวกในการเก็บตัวอย่างในท้องที่และการเก็บรักษาเนื้อเยื่อ จากการตรวจสอบปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเนื้อเยื่อใบหู เลือด และน้ำเชื้อ โดยตรวจสอบใน 1% Agarose gel และวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอในสารละลายโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 260 nm พบว่า ดีเอ็นเอที่สกัดจากชิ้นส่วนใบหู เลือด และน้ำเชื้อมีค่าความเข้มข้นของดีเอ็นเอเฉลี่ย 701.07, 510 และ 82.35 ng/µl ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้จากชิ้นส่วนใบหูมีค่ามากที่สุด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณของเนื้อเยื่อที่ใช้ด้วย (ภาคผนวก)

4.2 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยพีซีอาร์

จากการทดสอบหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเข้าจับของไพรเมอร์ (Annealing temperature; Tm) และสภาวะที่เหมาะสมของการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยวิธีพีซีอาร์ของยีน *RYR1* โดยใช้ไพรเมอร์ RYR1-F,R (ตาราง 9) ทดสอบโดยใช้ช่วงอุณหภูมิระหว่าง 62°C ถึง 72°C แล้วนำผลผลิตจาก PCR มาตรวจสอบใน agarose gel 3% พบว่า ช่วงอุณหภูมิ 62°C ถึง 72°C สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทั้งหมด จึงเลือกใช้อุณหภูมิ 65.1°C และได้ผลผลิตพีซีอาร์ที่มีความยาว 74 bp (ภาพ 4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

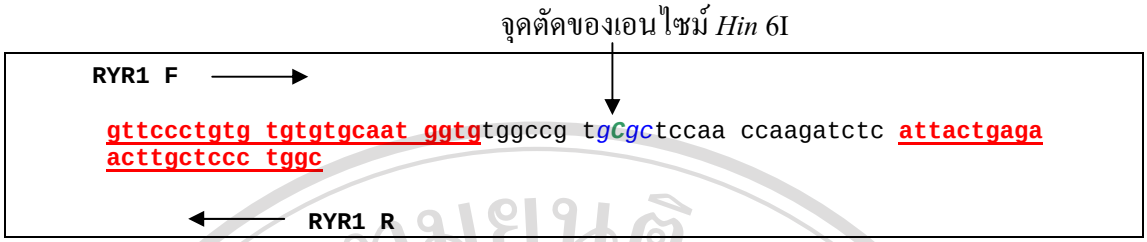


ภาพ 4 ผลผลิตจาก PCR ของยีน *RYR1* บน 3% Agarose gel ในการหา Annealing temperature (Tm)

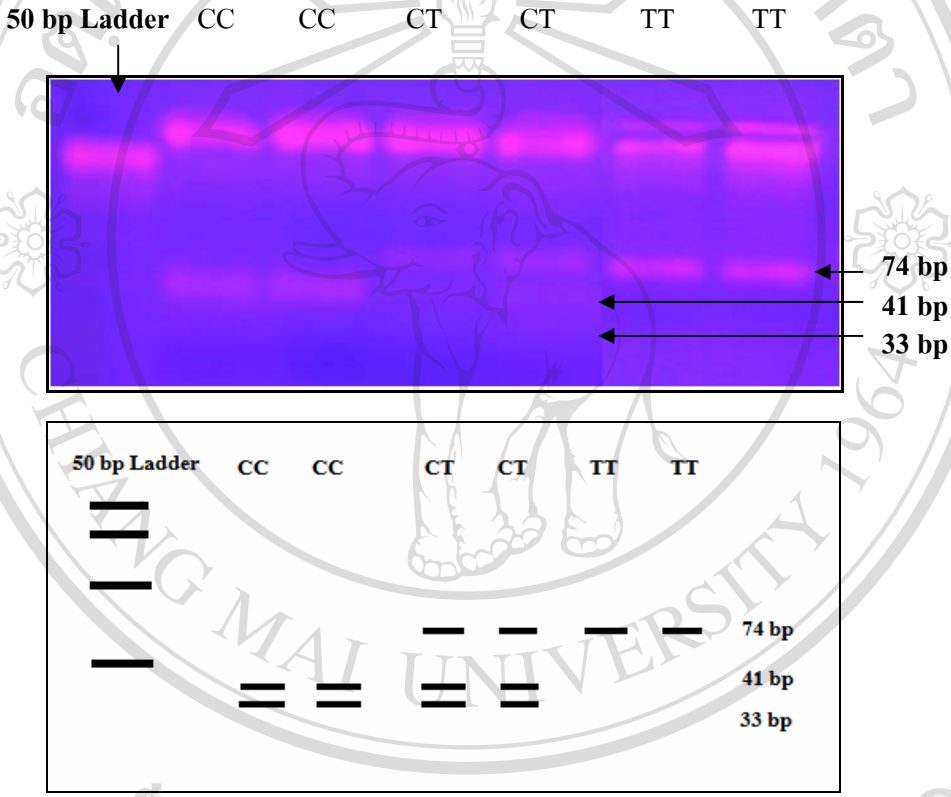
4.3 การจำแนกจุดกลายพันธุ์โดยใช้เทคนิค PCR-RFLP

การศึกษาการกลายพันธุ์ของยีน *RYR1* ในสุกรแต่ละตัวทำโดยการตรวจจีโนไทป์ด้วยเทคนิค PCR-RFLP จากสุกรทั้งหมด 363 ตัว ซึ่งเป็นสุกรสายพันธุ์ทางการค้าจำนวน 325 ตัว แบ่งเป็นสุกรเพศผู้พันธุ์แท้ จำนวน 80 ตัว (ดูรอค 22 ตัว เพียเทรน 19 ตัว ลาร์จไวท์ 24 ตัว แลนด์เรซ 15 ตัว) สุกรเพศเมียพันธุ์แท้ จำนวน 41 ตัว (ดูรอค 3 ตัว เพียเทรน 7 ตัว ลาร์จไวท์ 23 ตัว แลนด์เรซ 8 ตัว) สุกรลูกผสม 2 สาย (ลาร์จไวท์ × แลนด์เรซ) สุกรลูกผสม 3 สาย (แลนด์เรซ × ลาร์จไวท์ × ดูรอค และสายพันธุ์ทางการค้า) ที่เกิดในครอกเดียวกันรวมจำนวน 204 ตัว และ สุกรไทยพื้นเมืองจากจังหวัดอุตรดิตถ์ แม่ฮ่องสอน และเชียงใหม่ จำนวน 21, 6 และ 11 ตัว ตามลำดับ เมื่อนำผลผลิตจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอที่มีขนาดความยาว 74 bp มาตัดด้วยเอนไซม์ *Hin* 6I ที่มีจุดตัดจำเพาะ คือ cgtGCGCtcc (ภาพ 5) ทำให้ได้ความยาวของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเป็น 41 และ 33 bp ในกรณีที่เป็นเบส Cytosine (C) ส่วนเบส Thymine (T) จะไม่ถูกตัดโดยเอนไซม์ *Hin* 6I ซึ่งจะทำให้มีความยาวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอเป็น 74 bp (ภาพ 6) พบว่าสุกรที่มีจีโนไทป์ CT ซึ่งเป็นพาหะของโรค (Nn) มีจำนวน 73 ตัว (20.1%) และสุกรที่มีจีโนไทป์ TT ซึ่งเป็นสุกรที่ไวต่อความเครียด (nn) มีจำนวน 2 ตัว (0.6%) ส่วนสุกรที่เหลือจำนวน 288 ตัว (79.3%) เป็นสุกรปกติ (NN) ที่มีจีโนไทป์ CC ดังแสดงในตาราง 10

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 5 ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน *RYR1* ตำแหน่งของการแทนที่ของลำดับเบส (Single nucleotide polymorphism; SNP) และจุดตัดของเอนไซม์ *Hin* 6I



ภาพ 6 รูปแบบของจีโนไทป์ที่ตัดด้วยเอนไซม์ *Hin* 6I บน 3% Agarose gel

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.4 การวิเคราะห์ความถี่ของจีโนไทป์และความถี่อัลลีล

การเปรียบเทียบความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของจุดกลายพันธุ์ในยีน *RYR1* โดยทำการตรวจจีโนไทป์สุกรทั้งหมด 363 ตัว พบว่าสุกรที่ศึกษามีจีโนไทป์ 3 รูปแบบ คือ CC, TT และ CT (ตาราง 10) จากการวิเคราะห์ความถี่ของจีโนไทป์ระหว่างพันธุ์ต่างๆโดยใช้วิธีไคสแควร์และวิเคราะห์ความถี่อัลลีลโดยวิธี Z- test ไม่พบความแตกต่างของความถี่ของจีโนไทป์ระหว่างสุกรสายพันธุ์ทางการค้า คือ ดูรอค ลาร์จไวท์ แลนด์เรซ เพียเทรน สุกรลูกผสม 2 สาย (ลาร์จไวท์ × แลนด์เรซ) และ สุกรลูกผสม 3 สาย (แลนด์เรซ × ลาร์จไวท์ × ดูรอค และสายพันธุ์ทางการค้า) ($P > 0.05$) แต่เมื่อ

เปรียบเทียบกับความถี่จีโนไทป์ของสุกรไทยพื้นเมือง พบความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) จากการเปรียบเทียบความถี่อัลลีล C และ T ไม่พบความแตกต่างระหว่างสุกรสายพันธุ์ทางการค้า คือ ดูรอค ลาร์จไวท์ แลนด์เรซ เพียเทรน สุกรลูกผสม 2 สาย (ลาร์จไวท์ × แลนด์เรซ) และ สุกรลูกผสม 3 สาย (แลนด์เรซ × ลาร์จไวท์ × ดูรอค และสายพันธุ์ทางการค้า) (C:T = 0.94 : 0.06, 0.93 : 0.07, 0.85 : 0.15, 0.85 : 0.15, 0.86 : 0.14 และ 0.92 : 0.08 ตามลำดับ) ($P > 0.05$) แต่เมื่อวิเคราะห์ความถี่อัลลีลของสุกรไทยพื้นเมืองจำนวน 34 ตัว พบว่า สุกรไทยพื้นเมืองมีจีโนไทป์ CC ทั้งหมดทำให้มีอัตราส่วนอัลลีล C:T = 1 : 0 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับสุกรสายพันธุ์แลนด์เรซ เพียเทรน สุกรลูกผสม 2 สาย (ลาร์จไวท์ × แลนด์เรซ) และ 3 สาย (แลนด์เรซ × ลาร์จไวท์ × ดูรอค) (C:T = 0.85 : 0.15, 0.87 : 0.13, 0.85 : 0.15 และ 0.86 :0.14 ตามลำดับ) แต่มีอัตราส่วนอัลลีล C:T ไม่แตกต่างจากสุกรพันธุ์ดูรอค ลาร์จไวท์ และสุกรลูกผสม 3 สาย (สายพันธุ์ทางการค้า) ($P > 0.05$) (C:T = 0.94 : 0.06, 0.93 : 0.07 และ 0.92 : 0.08 ตามลำดับ) (ตาราง 10)

ตาราง 10 แสดงความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของยีน *RYR1* ในสุกรสายพันธุ์ทางการค้าและสุกรไทยพื้นเมือง

สายพันธุ์	N	ความถี่จีโนไทป์			ความถี่อัลลีล	
		CC	CT	TT	C	T
แลนด์เรซ	23	$0.70^{ข}$ (16)	0.30 (7)	0 (0)	$0.85^{ข}$	0.15
ลาร์จไวท์	47	$0.85^{ข}$ (40)	0.15 (7)	0 (0)	$0.93^{กข}$	0.07
ดูรอค	25	$0.88^{ข}$ (22)	0.12 (3)	0 (0)	$0.94^{กข}$	0.06
เพียเทรน	26	$0.73^{ข}$ (19)	0.26 (7)	0 (0)	$0.87^{ข}$	0.13
สุกรไทยพื้นเมือง	38	$1^{ก}$ (38)	0 (0)	0 (0)	$1^{ก}$	0
สุกรลูกผสม 2 สาย (ลาร์จไวท์ × แลนด์เรซ)	49	$0.69^{ข}$ (34)	0.31 (15)	0 (0)	$0.85^{ข}$	0.15
สุกรลูกผสม 3 สาย (แลนด์เรซ × ลาร์จไวท์ × ดูรอค)	100	$0.73^{ข}$ (73)	0.25 (25)	0.02 (2)	$0.86^{ข}$	0.14
สุกรลูกผสม 3 สาย (สายพันธุ์ทางการค้า)	55	$0.84^{ข}$ (46)	0.16 (9)	0 (0)	$0.92^{กข}$	0.08
ประชากรรวม	363	0.79 (288)	0.20 (73)	0.01 (2)	0.90	0.10

^{ก,ข}ตัวอักษรต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแตกต่างกันในทางสถิติ ($P < 0.05$).

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.5 ความสัมพันธ์ของการกลายพันธุ์ในยีน *RYR1* ต่อคุณภาพเนื้อ

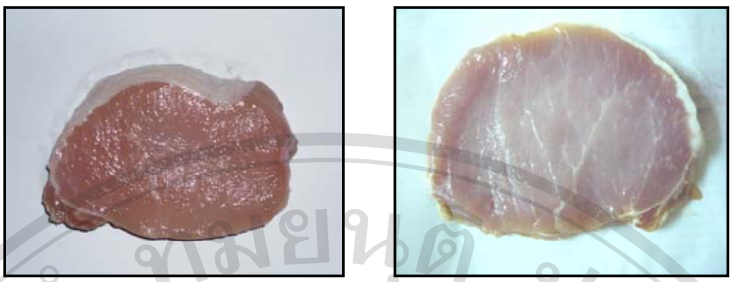
4.5.1 ความเป็นกรดด่างของเนื้อ

การศึกษาคุณภาพเนื้อของสุกรลูกผสม 3 สาย (แลนด์เรซ × ลาร์จไวท์ × ดูรอค) จำนวน 100 ตัว พบว่าค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ของกล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*) และกล้ามเนื้อสะโพก (*Semimembranosus*) ภายหลังการฆ่าที่เวลา 45 นาที (pH_1) และ 24 ชั่วโมง (pH_u) พบว่า กลุ่มสุกรที่มีจีโนไทป์ CC และ CT มีค่าสูงกว่าในกลุ่มสุกรที่มีจีโนไทป์ TT ($P < 0.05$) ซึ่งกล้ามเนื้อทั้งสองชนิดของกลุ่มสุกรที่มีจีโนไทป์ CC มีค่า pH ลดลง คือ ภายหลังการฆ่าที่เวลา 45 นาที มีค่า pH ประมาณ 6.34-6.55 และที่ 24 ชั่วโมง มีค่า pH ลดลงเป็น 5.76-5.86 และสุกรที่มีจีโนไทป์ CT ภายหลังการฆ่าที่เวลา 45 นาที มีค่า pH ประมาณ 6.27-6.48 และที่ 24 ชั่วโมง มีค่า pH ลดลงเป็น 5.75-5.86 ส่วนสุกรที่มีจีโนไทป์ TT มีค่า pH ภายหลังการฆ่าที่เวลา 45 นาที ประมาณ 5.60-5.74 และที่ 24 ชั่วโมง มีค่า pH ลดลงเป็น 5.43-5.58 (ตาราง 11)

4.6.2 สีของเนื้อ

ค่าสีของเนื้อ (meat color) วัดจากกล้ามเนื้อสันนอกของกลุ่มสุกรที่มีจีโนไทป์ TT พบว่า มีค่าความสว่าง (lightness, L*) สูงที่สุด รองมาคือกลุ่มสุกรที่มีจีโนไทป์ CC และ CT (56.96, 50.59 และ 49.79 ตามลำดับ) และค่าสีแดง (redness, a*) พบว่า กลุ่มสุกรที่มีจีโนไทป์ TT มีค่าสูงกว่ากลุ่มสุกรที่มีจีโนไทป์ CC และ CT อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยที่ค่าความเป็นสีแดง (a*) ของกลุ่มสุกรที่มีจีโนไทป์ CC และ CT ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) (10.54, 8.90 และ 8.33 ตามลำดับ) ส่วนค่าสีเหลือง (yellowness, b*) พบว่า กลุ่มสุกรที่มีจีโนไทป์ TT มีค่าสูงสุด รองมาคือกลุ่มสุกรที่มีจีโนไทป์ CC และ CT ตามลำดับ (8.68, 5.42 และ 5.14 ตามลำดับ) (ภาพ 7) จากผลการวัดค่าต่างๆแสดงว่ากลุ่มสุกรที่มีจีโนไทป์ TT มีค่าความสว่างของสีเนื้อ และค่าสีเหลือง แตกต่างจากกลุ่มสุกรที่มีจีโนไทป์ CC และ CT อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และมีค่าสีแดงแตกต่างจากกลุ่มสุกรที่มีจีโนไทป์ CC อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มสุกรที่มีจีโนไทป์ CT ($P > 0.05$) (ตาราง 11)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 7 เนื้อสุกรที่มีลักษณะปกติ (CC) (ซ้าย) และเนื้อสุกรที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *RYR1* (CT) ซึ่งแสดงลักษณะ PSE (ขวา) หลังจากการเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.6.3 ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ

ค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ (water holding capacity; WHC) วัดจากการสูญเสียน้ำขณะเก็บ (drip loss) ของกล้ามเนื้อสันนอก พบว่า กลุ่มสุกรที่มีจีโนไทป์ TT มีการสูญเสียน้ำของเนื้อขณะเก็บสูงที่สุด คือ 22.5 เปอร์เซ็นต์ รองมาคือกลุ่มสุกรที่มีจีโนไทป์ CC มีค่า 4.66 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มสุกรที่มีจีโนไทป์ CT มีค่า 4.01 เปอร์เซ็นต์ (ตาราง 11)

ตาราง 11 แสดงความสัมพันธ์ของยีน *RYR1* กับลักษณะคุณภาพเนื้อในสุกรลูกผสม 3 สาย

ลักษณะคุณภาพเนื้อ	จีโนไทป์			R^2
	CC	CT	TT	
pH_{45}				
SM	6.55±0.26^{ก}	6.48±0.24^{ก}	5.74±0.08^{ข}	0.176
LD	6.34±0.23^{ก}	6.27±0.22^{ก}	5.60±0.31^{ข}	0.179
pH_{24}				
SM	5.86±0.12^{ก}	5.86±0.09^{ก}	5.58±0.04^{ข}	0.106
LD	5.76±0.15^{ก}	5.75±0.11^{ก}	5.43±0.19^{ข}	0.101
Drip loss (%)	4.66±2.34^{ข}	4.01±2.58^{ข}	22.5±0.40^{ก}	0.537
L^*	50.59±4.08^{ข}	49.79±4.77^{ข}	56.96±0.05^{ก}	0.052
a^*	8.33±1.58^{ข}	8.90±1.39^{กข}	10.54±0.14^{ก}	0.060
b^*	5.42±1.75^{ข}	5.14±1.94^{ข}	8.68±0.57^{ก}	0.070
จำนวน (N)	73	25	2	

^{ก,ข}ตัวอักษรต่างกันในแถวเดียวกันแตกต่างกันในทางสถิติ ($P < 0.05$)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved