บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

สุกร (*Sus scrofa*) เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีกีบเท้า เช่นเดียวกันกับ โค แพะ แกะ และกวาง ซึ่งถูกจัดอยู่ในออเดอร์ (Order) อาร์ทิโอแดคทีลา (Artiodactyla) แต่สุกรเป็นสัตว์ที่มีกระเพาะเดี่ยวจึงแยกอยู่ในสับออเดอร์ ซูฟอร์ม (Suiformes)และอยู่ในจีนัส (Genus) ซัส (Sus) ซึ่งรายละเอียดของอนุกรมวิธานสุกร มีดังข้อ 2.1

2.1 อนุกรมวิธานของสุกร (Taxonomy of pigs)

Rothschild and Ruvinsky (1998) ได้จัดลำดับชั้นของสุกร ไว้ดังนี้

Order *Artiodactyla* -- artiodactyls, even-toed ungulates

Suborder *Suiformes* -- Ancondonta (Hippopotamuses, pigs, peccearies)

Infraorder *Suina* -- Tayassuidae (peccearies)

Family *Suidae* -- hogs, pigs

Subfamily *Suinae*

Genus *Sus* -- pigs

Species *Sus barbatus* -- bearded pig (Malaya, Sumatra, Borneo)

Species *Sus bucculentus* -- Viet Nam warty pig

Species *Sus cebifrons* -- Visayan warty pig

Species *Sus celebensis* -- Celebes wild boar (Sulawasi warty pig)

Species *Sus crytatus* -- Indian crested pig or Asiatic wild pig (India)

Species *Sus heureni* -- Flores warty pig

Species *Sus philippensis* -- Philippine warty pig

Species *Sus salvanius* -- pygmy hog (Southeast Nepal, Assum)

Species *Sus scrofa* -- pig, wild boar (Europe, Asia); Domestic pig

Species *Sus timoriensis* -- Timor wild boar

Species *Sus verrucosus* -- Javanese warty hog (Java, Sulawasi, Philippines)

Species *Sus vittatus* -- banded pig (Malay Archipelago)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 สุกรที่เลี้ยงอยู่ในประเทศไทย

สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ สุกรสายพันธุ์ต่างประเทศ สุกรพื้นเมือง และสุกรป่า

2.2.1 สุกรสายพันธุ์ต่างประเทศ

สุกรพันธุ์ต่างประเทศที่นำเข้ามาเลี้ยงในประเทศไทย ได้แก่ พันธุ์เบริ์กเชียร์ (Berkshire) แฮมเชียร์ (Hampshire) เพียแทรน (Pietrain) แลนด์เรซ (Landrace) ดูรอค (Duroc) และลาร์จไวท์ หรือยอร์คเชียร์ (Largewhite or Yorkshire) (บุญลือ, 2545)

เบิร์กเชียร์

เป็นพันธุ์สีดำของอังกฤษ ที่เกิดจากการผสมข้ามระหว่างสุกรยุโรปกับสุกรพื้นเมืองเอเชีย มีความทนต่อสภาพแวดล้อมที่แร้นแค้นได้ดี ลำตัวมีสีดำ และจุดขาว 6 แห่ง คือ ปลายขาทั้งสี่ข้าง ปลายจมูก และปลายหาง ลักษณะส่วนของจมูก และปากสั้นมาก ใบหูตั้งและกางออก ลำตัวยาว ลึก และหนาได้สัดส่วนกัน แต่การเติบโตไม่ค่อยดี ใช้อาหารเปลือง ลูกไม่ค่อยดก ปัจจุบันมีเลี้ยงอยู่ในประเทศเป็นจำนวนน้อย (ภาพ 1ก)

แฮมเชียร์

มีถิ่นกำเนิดในอังกฤษ ลักษณะเด่นของแฮมเชียร์ คือ ลำตัวสีดำ และมีสีขาวคาดรอบอก รวมถึงขาหน้าด้วย ลักษณะทั่วไปของแฮมเชียร์มีขายาว ลำตัวค่อนข้างยาว การเติบโตโดยเฉลี่ยต่ำกว่าพันธุ์อื่นๆ เป็นเหตุให้แฮมเชียร์ไม่ได้รับความนิยมเท่าที่ควร ถึงแม้ว่าจะให้เปอร์เซ็นต์ลูกหย่านมสูง และทนต่อสภาพแวดล้อมที่แร้นแค้นได้ดีมาก (ภาพ 1ข)

เพียแทรน

เป็นสุกรของเบลเยี่ยม ลำตัวมีจุดดำ–ขาว เป็นพันธุ์ให้เนื้อมาก โดยเฉพาะบริเวณไหล่ อัตราส่วนเนื้อต่อไขมันสูงกว่าพันธุ์อื่น แต่เป็นพันธุ์ที่โตช้า และไม่ทนต่อสภาพอากาศร้อนชื้น เนื่องจากมีลักษณะทางพันธุกรรมพบยีนที่ไวต่อความเครียด ที่เรียกว่า PSS (Porcine Stress Syndrome) ซึ่งเป็นสาเหตุของการตายอย่างกะทันหัน ในสภาพอากาศเขตร้อนชื้น และยังมีปัญหาเรื่อง เนื้อสุกรมีลักษณะซีด ไม่คงตัว เละ หรือฉ่ำน้ำ เรียก PSE (Pale Soft Exudative) ปัจจุบันได้รับการปรับปรุงให้ต้านทานต่อความเครียด และมีการนำเข้ามาเลี้ยงในประเทศมากขึ้น (ภาพ 1ค)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

แลนด์เรซ

เป็นพันธุ์พื้นเมืองของสแกนดิเนเวีย ที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์ให้มีสีขาว ลำตัวยาว โดยมีซี่โครงมากถึง 16-17 คู่ (สุกรปกติมีกระดูกซี่โครง 15-16 คู่) สะโพกใหญ่ หูยาวปรก หน้ายาว โตเต็มที่ 200-250 กิโลกรัม แม่พันธุ์ให้ลูกดกเฉลี่ย 9-10 ตัว เลี้ยงลูกเก่ง หย่านมเฉลี่ย 8-9 ตัว ให้นมมาก โตเร็ว เป็นพันธุ์ที่นิยมเลี้ยงกันมากในปัจจุบัน โดยมีการนำเข้ามาเลี้ยงในประเทศตั้งแต่ปี พ.ศ. 2506 (ภาพ 1ง)

ดูรอค

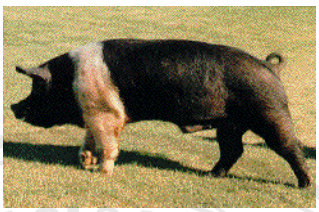
มีถิ่นกำเนิดอยู่ทางตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นสุกรพื้นเมืองสีแดง เรียกว่า ดูรอค (Duroc) หรือ ดูรอคเจอร์ซี่ ปัจจุบันเรียกสั้นๆ ว่า ดูรอค เป็นสุกรพันธุ์เนื้อมีลำตัวขนาดกลาง ลำตัวมีสีแดงล้วน อาจแดงเข้มจนถึงน้ำตาลดำ หูปรกเป็นส่วนใหญ่ ลำตัวสั้นกว่าลาร์จไวท์ และแลนด์เรซ ลำตัวหนา หลังโค้ง โตเต็มที่ 200-250 กิโลกรัม เป็นพันธุ์ที่มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว และถึงวัยเจริญพันธุ์เร็วกว่าพันธุ์อื่นๆ มีอัตราการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อสูง แม่พันธุ์มีความสามารถในการเลี้ยงลูกพอใช้ได้ เป็นสุกรที่มีโครงสร้างแข็งแรง บึกบึน มีความต้านทานโรคต่างๆ ได้ดี ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ปัจจุบันนิยมเลี้ยงกัน โดยใช้เป็นพ่อพันธุ์สำหรับผลิตลูกสุกรขุน และลูกผสม (ภาพ 1จ)

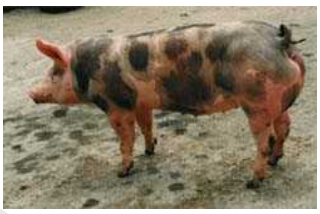
ลาร์จไวท์ หรือยอร์คเชียร์

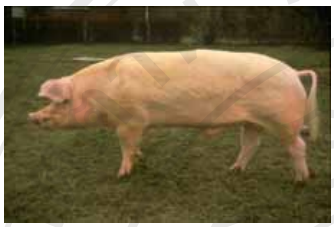
เป็นพันธุ์ที่ได้รับความนิยมมาก มีต้นกำเนิดจากเมืองยอร์คเชียร์ ประเทศอังกฤษ นำเข้ามาในประเทศไทยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2482 มีลักษณะประจำพันธุ์ คือ ลำตัวสีขาวล้วน ผิวออกสีชมพู หูตั้ง ลำตัวขนาดใหญ่ กระดูกใหญ่ โครงใหญ่ หน้าสั้น หัวใหญ่ มีอัตราการเจริญเติบโตดีมาก ให้ลูกดกเฉลี่ย 9-10 ตัว เลี้ยงลูกเก่ง หย่านมเฉลี่ย 8-9 ตัว มีลักษณะการเป็นแม่พันธุ์ที่ดี มีเปอร์เซ็นต์ซากสูง เพศเมียเมื่อโตเต็มวัย น้ำหนักมากถึง 300 กิโลกรัม อัตราการเจริญเติบโตมากกว่า 750 กรัมต่อวัน เฉลี่ยตั้งแต่แรกเกิดจนถึง 100 กิโลกรัม ซากให้เนื้อแดงถึง 55 – 60 เปอร์เซ็นต์ (ภาพ 1ฉ)

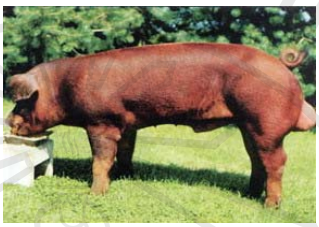
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ก.


ข.


ค.


ง.


จ.

ฉ.

ภาพ 1 สุกรสายพันธุ์ต่างประเทศ ที่นำเข้ามาเลี้ยงในประเทศไทย (ก.) พันธุ์เบริ์กเชียร์ (ข.) พันธุ์แฮมเชียร์ (ค.) พันธุ์เพียเทรน (ง.) พันธุ์แลนด์เรซ (จ.) พันธุ์ดูรอค และ(ฉ.) พันธุ์ลาร์จไวท์หรือยอร์คเชียร์ (ที่มา : Clulow, 2005; PSA, 2005; Distl, 2002; GSEI, 2005)

2.2.2 สุกรพื้นเมือง

สุกรไทยพื้นเมืองเป็นสุกรที่เลี้ยงในประเทศมานานแล้ว อาจสืบทอดมาจากสุกรป่า และบางชนิดอาจสืบทอดสายพันธุ์มาจากประเทศจีนนำเข้ามาโดยชาวจีนอพยพ (จรัญ, 2524) เลี้ยงอยู่ตามหมู่บ้านในชนบท และพวกชาวไทยภูเขา ลักษณะโดยทั่วไป มีขนสีดำ ท้องยาน หลังแอ่น การเจริญเติบโตช้า แต่เลี้ยงลูกเก่ง สุกรไทยพื้นเมืองสามารถได้เป็น 4 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ไหหลำ ควาย พวง และราด (จรัญ, 2524; บุญลือ, 2545; Rattanaronchart, 1994) ซึ่งมีขนาดลำตัว ความสูง ความยาวรอบอก ที่แตกต่างกัน ดังตาราง 1

พันธุ์ไหหลำ เลี้ยงมากตามภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันตก และภาคใต้ของประเทศไทย มีสีดำปนขาว ตามลำตัวจะมีสีดำ ท้องมักมีสีขาว ท้องยาน จมูกยาวและแอ่นเล็กน้อย คางย้อย ไหล่กว้าง หลังแอ่น สะโพกเล็ก มีอัตราการเจริญเติบโต และการสืบพันธุ์ได้ดีกว่าสุกรพื้นเมืองอื่นๆ น้ำหนักโตเต็มวัยประมาณ 110-120 กิโลกรัม (ภาพ 2ก)

พันธุ์ควาย สุกรพันธุ์ควาย หรือหมูควาย เลี้ยงตามภาคเหนือ มีลักษณะคล้ายสุกรไหหลำ แตกต่างกันที่พันธุ์ควายจะมีสีดำ สุกรพันธุ์ควายมีหูใหญ่ ปรกเล็กน้อย หลังแอ่น ท้องยาน เมื่อมีอายุมากขึ้นหนังจะหยาบย่นตามอายุ เป็นสุกรที่มีขนาดใหญ่ น้ำหนักขนาดโตเต็มวัย 125 - 150 กิโลกรัม (ภาพ 2ข)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

พันธุ์พวง สุกรพันธุ์พวง เลี้ยงตามภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน มีขนสีดำตลอดตัว มีสีขาวปนแซมบ้างเล็กน้อย จมูกยาว ลำตัวขนาดเกือบเท่าพันธุ์ไหหลำ หลังแอ่น ใบหูใหญ่หนา ผิวหนังหยาบ แม่สุกรโตเต็มที่ หนักประมาณ 80-100 กิโลกรัม (ภาพ 2ค)

พันธุ์ราดหรือกระโดน เลี้ยงตามภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง สุกรพันธุ์ราดหรือกระโดน จัดเป็นสุกรขนาดเล็ก ลำตัวสั้น มีซี่โครง 8-9 ซี่ หนักประมาณ 60-80 กิโลกรัม หูเล็กตั้งหน้าเล็กแหลม คล้ายหนู ว่องไว ปราดเปรียว ขุดคุ้ยหากินตามป่าเก่ง กระดูกเล็ก เนื้อแน่น (ภาพ 2ง)

ก. ข. ค. ง.

ภาพ 2 สุกรไทยพื้นเมือง (ก.) พันธุ์ไหหลำ (ข.) พันธุ์ควาย (ค.) พันธุ์พวง และ (ง.) พันธุ์ราดหรือกระโดน (DAD-IS Stage 2, 2004)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1 ข้อมูลลักษณะภายนอกปรากฏ (Phenotype) ของสุกรไทยพื้นเมืองพันธุ์ต่างๆ

พันธุ์	เพศ	จำนวน	ขนาดตัว (ซม.)			น้ำหนักโตเต็มวัย (กก.)
			ความสูง	ความยาว	รอบอก	
ไหหลำ	ผู้	6	58.1 ±2.30	101.4 ±3.78	97.6 ±4.54	110 - 120
	เมีย	20	57.2 ±2.30	101.4 ±3.78	98.6 ±3.81	-
ควาย	ผู้	10	70.3 ±2.51	127.4 ±3.40	130.1 ±2.62	125 - 150
	เมีย	8	71.2 ± 1.88	127.5 ± 6.88	136.8 (3.66	-
ราด	ผู้	8	52.7 (1.43	86.6 (2.43	85.3 (2.12	60 - 80
	เมีย	14	51.9 (2.97	84.0 (2.77	85.7 (2.99	-
*พวง	ผู้	-	58	-	-	115
	เมีย	-	57	-	-	115

ที่มา : Rattanaronchart (1994), * ข้อมูลจาก (‼ HYPERLINK "DAD-IS Stage 2, " ⌜¶ DAD-IS Stage 2, ⊥ 2004)

2.2.3 สุกรป่า

สุกรป่าเลี้ยงตามภาคต่าง ๆ ทั่วไป มีขนหยาบแข็ง สีน้ำตาลเข้มหรือสีดำเข้ม หรือสีดอกเลา หนังหนา หน้ายาว จมูกยาวและแหลมกว่าสุกรพื้นเมือง ขาเล็กและเรียว ดูปราดเปรียว ที่พบมีอยู่ 2 พันธุ์ คือ พันธุ์หน้ายาว และพันธุ์หน้าสั้น แม่สุกรโตเต็มที่หนักประมาณ 80 กิโลกรัม (ภาพ 3)

ก.

ข.

ภาพ 3 สุกรป่า (ก.) พันธุ์หน้าสั้น (ข.) พันธุ์หน้ายาว (ไชยา, 2541)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

2.3 เครื่องหมายที่ใช้บ่งบอกความแตกต่าง

เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ใช้บ่งชี้ความแตกต่าง ของสิ่งมีชีวิต สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา (Morphological marker) และเครื่องหมายทางโมเลกุล (Molecular marker) (สุรินทร์, 2545)

2.3.1 เครื่องหมายทางสัณฐานวิทยา

การบอกความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตใช้วิธีเปรียบเทียบลักษณะภายนอกทางสัณฐานวิทยา หรือทางสรีรวิทยา ซึ่งลักษณะที่ตรวจสอบนี้มักจะขึ้นกับสภาพแวดล้อม ทำให้ตรวจสอบผลผิดพลาดได้ บางครั้งต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ

2.3.2 เครื่องหมายทางโมเลกุล

เครื่องหมายทางโมเลกุล มี 2 ระดับ คือ ระดับโปรตีน และระดับโมเลกุล

2.3.2.1 ระดับโปรตีน เป็นการตรวจสอบความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่ระดับโมเลกุลของโปรตีน โดยตรวจสอบรูปแบบของเอนไซม์หรือไอโซไซม์ต่างๆ จำนวนเอนไซม์ที่ตรวจสอบได้ยังมีไม่มากนัก ไม่กระจายครอบคลุมทั้งจีโนม และต้องมีการแสดงออกของยีนที่ศึกษา จึงต้องเลือกเนื้อเยื่อ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ผลที่ได้ยังขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อ ระยะของการเจริญเติบโต และสิ่งแวดล้อม นอกจากนี้โปรตีน และไอโซไซม์ยังสูญเสียสภาพธรรมชาติได้ง่าย จึงต้องวิเคราะห์ผลในเวลาจำกัด ไม่สามารถเก็บตัวอย่างไว้นานได้

2.3.2.2 ระดับดีเอ็นเอ ตรวจสอบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในระดับโมเลกุลของดีเอ็นเอสามารถวิเคราะห์จากตัวอย่างที่ถูกเก็บไว้เป็นเวลายาวนานได้ เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในเซลล์เกือบทุกเซลล์ในปริมาณเท่ากัน จึงสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอจากเนื้อเยื่อใดๆ ได้ ระยะการเจริญเติบโตหรือสภาพทางสรีรวิทยาใดก็ได้โดยไม่ขึ้นกับสภาพแวดล้อม การตรวจสอบดีเอ็นเอจากส่วนที่เป็นยีนหรือไม่ใช่ยีนก็ได้ จะมีการแสดงออกหรือไม่ก็ได้ จึงตรวจสอบได้โดยไม่จำกัด และครอบคลุมทั้งจีโนม ประกอบกับวิธีตรวจสอบเครื่องหมายดีเอ็นเอแบบต่างๆ มีให้เลือกมากมาย ทำให้การใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอเป็นเครื่องมือตรวจสอบ ความแตกต่างทางพันธุกรรมได้อย่างกว้างขวาง และสามารถประยุกต์ใช้กับงานต่างๆ ได้ดีกว่าการตรวจสอบที่ระดับโปรตีน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.4 เทคนิคเอเอฟแอลพี (AFLP; Amplified fragment length polymorphism)

เอเอฟแอลพี เป็นเทคนิคค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ (DNA marker) แบบหนึ่ง ถูกพัฒนาขึ้นโดย Zabeau and Vos (1993) เรียกว่า Selective Restriction Fragment Amplification; SRFA ได้จดสิทธิบัตรในปี ค.ศ. 1993 และใช้ชื่อว่า เทคนิคเอเอฟแอลพี หลักการพื้นฐานของเทคนิคเอเอฟแอลพี คือ การตรวจสอบความยาวของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน ซึ่งเกิดจากการตัดดีเอ็นเอด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ และการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาพีซีอาร์ หรืออาจกล่าวอีกนัยหนึ่งว่า เทคนิค AFLP เป็นการรวมเอาเทคนิคอาร์เอฟแอลพี (RFLP; Restriction Fragment Length Polymorphism) และเทคนิคพีซีอาร์เข้าด้วยกัน (Zebaeu and Vos, 1993)

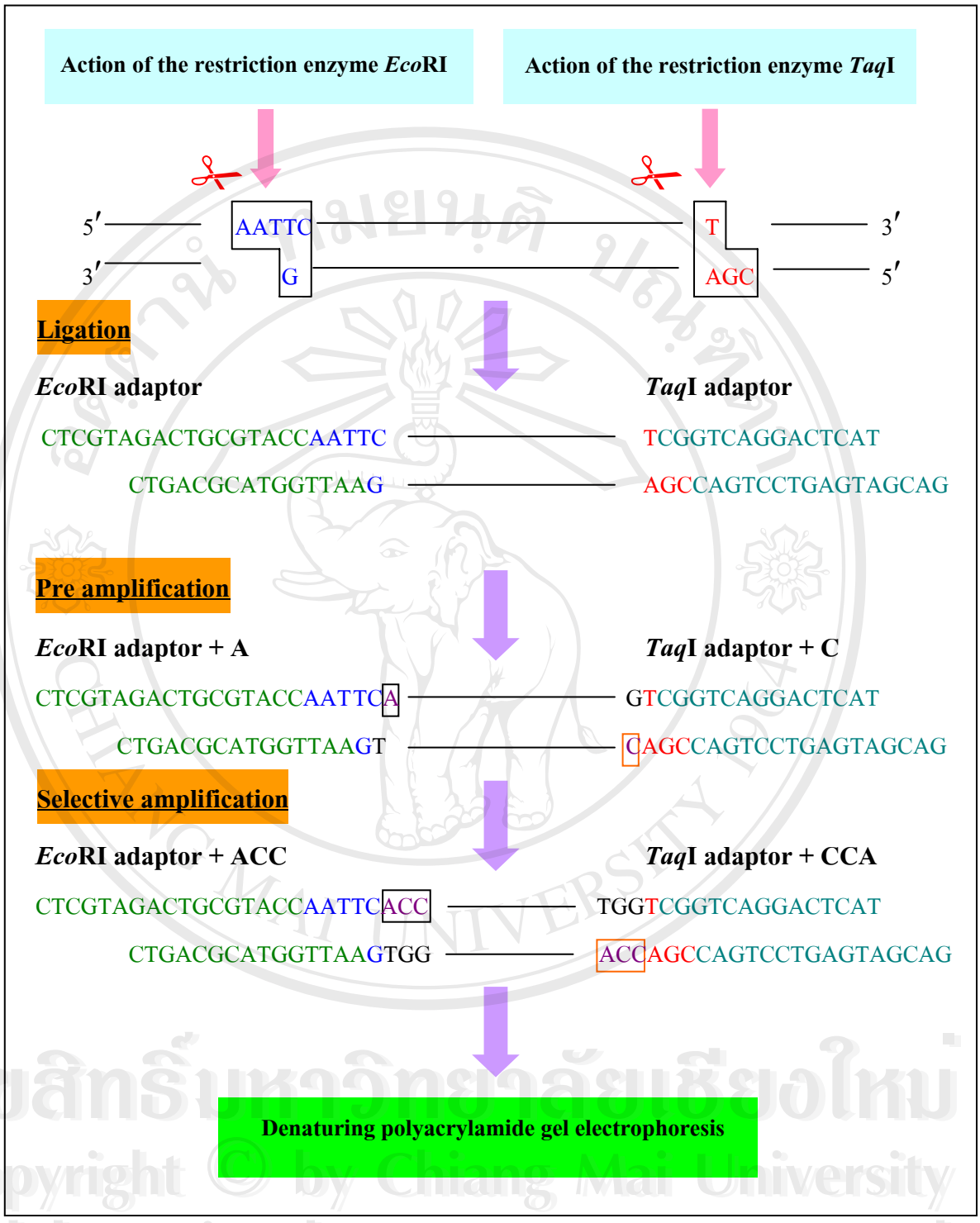
2.4.1 หลักการทำเอเอฟแอลพี

การทำเอเอฟแอลพี ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ การตัด-ต่อดีเอ็นเอด้วย adaptor การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลองด้วยปฏิกิริยา PCR และการแยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วย polyacrylamide gel electrophoresis รายละเอียดดัง ภาพ 4

2.4.1.1 Restriction / Ligation คือ การนำดีเอ็นเอมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ 2 ชนิด นิยมใช้เอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 6 คู่เบส (rare cutter) ตำแหน่ง คือ *Eco*RI, *Hin*dIII, *Pst*I, *Bgl*II, *Xbl*I จึงช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณจากการทำพีซีอาร์ลง ซึ่งจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งห่างกันประมาณ 4^6 (= 4,096) คู่เบส ร่วมกับเอนไซม์ที่มีตำแหน่งจดจำ 4 คู่เบส (frequent culter) คือ *Mse*I และ *Taq*I เป็นต้น จะตัดดีเอ็นเอได้ชิ้นขนาดเล็ก ซึ่งจะตัดดีเอ็นเอที่ตำแหน่งห่างกันประมาณ 4^4(= 256) คู่เบส เมื่อใช้เอนไซม์ 2 ชนิดตัดชิ้นดีเอ็นเอ จะได้ชิ้นดีเอ็นเอที่มีปลายด้านหนึ่งเป็นตำแหน่งตัดของเอนไซม์ที่เป็น rare cutter และอีกด้านหนึ่งเป็น frequent cutter แล้วเชื่อมต่อชิ้นดีเอ็นเอกับ adaptor ของเอนไซม์ทั้งสองชนิด เพื่อให้เป็นที่จับของไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณโดยวิธีพีซีอาร์ในขั้นต่อไป (ภาพ 4) (สุรินทร์, 2545)

2.4.1.2 Amplification คือ การเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอบางส่วนโดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะไพรเมอร์ที่ใช้มีลำดับเบสทางปลาย 5′ เหมือนกับลำดับเบสของ adaptor ต่อด้วยลำดับเบสบริเวณจดจำหรือบริเวณตัดจำเพาะของเอนไซม์ และเพิ่มเบสเข้าไปที่ปลาย 3′ อีกส่วนหนึ่ง เพื่อให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบางชิ้นส่วน ส่วนของไพรเมอร์ที่เหมือนกับ adaptor และบริเวณจดจำของเอนไซม์เรียกว่า common part ส่วนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3′ เรียกว่า selective part จำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปที่ปลาย 3′ จะช่วยลดจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นที่เพิ่มปริมาณลดลง โดยชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ต้องมีลำดับเบสที่อยู่ต่อตำแหน่งตัดจำเพาะของเอนไซม์สอดคล้องกับเบสที่เพิ่มเข้าไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 4 แสดงลำดับขั้นตอน ของเทคนิค AFLP (Gaikwad, 2004)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

ซึ่งดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตหรือจีโนมที่ศึกษาส่วนประกอบของเบสทั้ง 4 ชนิด คือ G, C, A, T มีในสัดส่วนเท่ากัน การเพิ่มเบสเข้าที่ปลาย 3′ ของไพรเมอร์เพื่อคัดเลือก 1 เบสจะช่วยลดจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่จะเพิ่มปริมาณเหลือเพียง 1 ใน 4 ของทั้งหมด ถ้าเพิ่มเบสเพื่อคัดเลือก 2 เบส จำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ตรวจสอบได้ก็จะลดลงเหลือ $(1/4)^2$ หรือ 1 ใน 16 ของชิ้นดีเอ็นเอที่ตัดได้ทั้งหมด ดังนั้นจึงสามารถควบคุมให้เกิดการเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอในจำนวนที่เหมาะสมได้ โดยจำนวนเบสที่เพิ่มเข้าไปแต่ละเบสจะลดปริมาณชิ้นดีเอ็นเอลงเหลือ $(1/4)^n$ ของทั้งหมด (n คือ จำนวนเบสสำหรับคัดเลือกที่เพิ่มขึ้น) ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสเพื่อคัดเลือกที่ปลาย 3′ จะเรียกว่าเป็นไพรเมอร์ +1, +2, +3 เช่น ไพรเมอร์ทางปลาย *Eco*RI adaptor จะเรียกว่า *Eco*RI+1, *Eco*RI+2, *Eco*RI+3 เป็นต้น (สุรินทร์, 2545; อุไรวรรณ, 2545)

การทำพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสที่ปลาย 3′ มากกว่า 2 เบส จะทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณ 2 ครั้ง ครั้งแรกเรียกว่า preselective amplification และการทำพีซีอาร์ครั้งที่ 2 เรียกว่า selective amplification โดยมีขั้นตอนดังนี้

(1) preseletive amplification เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอต้นแบบให้มากขึ้น และช่วยให้เกิดการคัดเลือกเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกต้อง ใช้ไพรเมอร์โดยเพิ่มเบสคัดเลือก +1 เพื่อคัดเลือกปริมาณดีเอ็นเอพบว่าจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณได้ลดลง

(2) selective amplification การทำปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอครั้งที่ 2 โดยใช้ไพรเมอร์ที่เพิ่มเบสที่ปลาย 3′ มากกว่า 2 เบสขึ้นไป นอกจากเป็นการประกันว่าการคัดเลือกเพิ่มปริมาณชิ้นดีเอ็นเอของไพรเมอร์ที่ใช้อย่างถูกต้อง และมีประสิทธิภาพสูงสุดแล้ว ยังช่วยลดพื้นหลังไม่ให้ดำในลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

2.4.1.3 Electrophoresis คือ การวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้โดยทำอิเลคโตรโฟ-รีซิสใน denaturing polyacrylamide gel แถบดีเอ็นเอที่เหมาะสมในการแยกโดยวิธีนี้ อยู่ในช่วง 50-100 แถบ การตรวจสอบแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้นใช้วิธีติดฉลากไพรเมอร์ชนิดใดชนิดหนึ่งด้วยสารกัมมันตรังสี (ภาพ4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

หลังจากทำอิเลคโตรโฟรีซิสเสร็จแล้ว ตรวจผลโดยวิธีย้อมเจลด้วย silver staining หรือการทำออโตเรดิโอกราฟ อาจใช้วิธีติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (fluorescent dye) (Vos *et al*., 1995; Blears *et al*., 1998; Gaikwad, 2004; Newton and Graham, 1997; Savelkoul *et al*., 1999; Mueller and Wolfenbarger, 1999)

2.5 การประยุกต์ใช้เทคนิค AFLP เพื่อศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม

เทคนิค AFLP ถูกใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ กันอย่างกว้างขวาง อาทิเช่น ในพืช (อจลี, 2546) และในสัตว์เศรษฐกิจ เช่น สุกร (Sookmanee and Alcantara, 1999; Kim *et al*., 2002; Plastow *et al*., 2003) โค (Ajmone-Marsan *et al*., 1997) แพะ (Ajmone-Marsan *et al*., 2001) นอกจากนี้วิธี AFLP ยังสามารถตรวจสอบเพศของสัตว์บางชนิด เช่น นกกระจอกเทศ (Griffiths and Orr, 1999) และสามารถนำไปใช้สร้างแผนที่บนโครโมโซมของปลา (สุภาวดี และอุทัยรัตน์, 2544) และไก่ (Knorr *et al*., 1999) เป็นต้น

เทคนิค AFLP ถูกใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมสุกรในประเทศต่างๆ อาทิเช่น สุกรพื้นเมืองของไทย ฟิลิปปินส์ เกาหลี จีน ญี่ปุ่น มาเลเซีย และบราซิล (Sookmanee and Alcantara, 1999; Rothschild, 2003; Kim *et al*., 2002; Lucchini, 2003; Mariante *et al*., 2003) นอกจากนี้ AFLP ยังถูกใช้เปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสุกรพันธุ์พื้นเมือง กับสุกรสายพันธุ์ทางการค้า (ดูรอค ลาร์จไวท์ แลนด์เรซ และยอร์กเชียร์) และเปรียบเทียบระหว่างสุกรพันธุ์ยุโรปกับสุกรพันธุ์เอเชีย (เนรมิต และ พาซิโด, 2538; Plastow *et al*., 2003; Ollivier *et al*., 2003; Ren *et al*., 2004)

จากการทดลองของ Sookmanee and Alcantara (1999) นำสุกรพันธุ์พื้นเมืองของประเทศฟิลิปปินส์ จำนวน 9 ตัว จากฟาร์ม UPLB-UA และสุกรพันธุ์พื้นเมืองของประเทศไทย จำนวน 16 ตัว จากแหล่งต่างๆ (จังหวัดนครปฐม นครราชสีมา อุบลราชธานี และขอนแก่น) มาศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมด้วยวิธี AFLP โดยใช้ primers จำนวน 12 คู่ ซึ่งปรากฏ AFLP band จำนวนทั้งหมด 209 bands พบว่ามี polymorphic bands จำนวน 72 bands (34.2%) จากข้อมูลดังกล่าวถูกนำมาจำแนกกลุ่มด้วยวิธี Unweight Pair-Group mean arithmatic Method Analysis (UPGMA) สามารถจำแนกสุกรพื้นเมืองของประเทศฟิลิปปินส์ได้ 2 กลุ่ม ส่วนในสุกรพื้นเมืองของประเทศไทยแบ่งได้ 2 กลุ่มเช่นกัน กลุ่มแรกพบความสัมพันธ์ระหว่างสุกรพื้นเมืองทั้ง 4 จังหวัด ส่วนกลุ่มที่สองพบความสัมพันธ์สุกรพื้นเมืองจากจังหวัดขอนแก่นเพียงจังหวัดเดียว แสดงว่าสุกรพื้นเมืองจากจังหวัดขอนแก่นมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่าสุกรพันธุ์พื้นเมืองจากจังหวัดอื่นๆ ส่วนค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันภายในพันธุกรรมของประเทศฟิลิปปินส์ และประเทศไทย มีค่า 0.69-0.96 และ 0.8-1.0 ตามลำดับ และได้ค่าสัมประสิทธิ์ความคล้ายคลึงกันในพันธุกรรมระหว่างพันธุ์ของสุกรพันธุ์พื้นเมืองของทั้ง 2 ประเทศมีค่า 0.78

Kim *et al.* (2002) ใช้ AFLP ศึกษาความแตกต่างทางพันธุกรรมของสุกรพันธุ์พื้นเมืองของประเทศเกาหลี (black pig) ประเทศจีน และประเทศญี่ปุ่น กลุ่มละ 10 ตัว เปรียบเทียบกับสุกรสาย-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

พันธุ์ทางการค้า (สุกรพันธุ์ดูรอค แลนด์เรซ และยอร์กเชียร์) ชนิดละ 8 ตัว รวมทั้งหมด 54 ตัว จากการใช้ primer (*Eco*RI/*Taq*I) จำนวน 3 คู่ วัดความแตกต่างระหว่างพันธุกรรมปรากฏ AFLP band จำนวน 186 bands ได้ polymorphic bands 67 bands (36%) สำหรับการจัดกลุ่มของสุกรพันธุ์พื้นเมืองของเกาหลีด้วยวิธี UPGMA สามารถจัดกลุ่มแยกออกจากสุกรสายพันธุ์ทางการค้า

Lucchini (2003) ได้ศึกษาสุกรพื้นเมืองของประเทศมาเลเซีย คือ พันธุ์ bearded pig (*Sus barvatus*) จาก 3 แหล่ง ที่อาศัยอยู่ในเกาะเพนนินซูล่า เกาะสุมาตรา เกาะบอร์เนียว ของประเทศมาเลเซีย ใช้ไพรเมอร์ 5 คู่ และจำแนกจัดกลุ่มด้วยวิธี Neigbour - joining tree สามารถแยกได้ว่าแต่ละแหล่งมีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม โดยที่สุกร bearded จากเกาะสุมาตราแยกออกจากอีก 2 แหล่งได้อย่างชัดเจน

ในงานทดลองของ เนรมิต และพาซิโด (2538) หาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพันธุ์แลนด์เรซในประเทศฟิลิปปินส์ และไทย โดยวิธีการ AFLP ได้ไพรเมอร์ที่ให้ความหลากหลายมากจำนวน 5 คู่ ตรวจพบว่ามีค่า polymorphism เท่ากับ 44.90 เปอร์เซ็นต์ และได้ค่าความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพันธุ์แลนด์เรซสายพันธุ์อเมริกา เบลเยี่ยม และแคนาดา ในประเทศฟิลิปปินส์มีค่าสูงกว่าในประเทศไทย เท่ากับ 7.8, 4.4, 1.40 และ 5.4, 2.6, 3.6 loci ต่อไพร-เมอร์ ตามลำดับ

Plastow *et al.* (2003) ใช้เทคนิค AFLP มาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรมสุกรในโครงการความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรในกลุ่มประเทศยุโรป (EC Pig Biodiversity project) จำนวน 3 สายพันธุ์ ประกอบด้วย สายพันธุ์ลาร์จไวท์ แลนด์เรซ และดูรอค เปรียบเทียบกับสุกรพื้นเมืองเหมยซาน จำนวนทั้งหมด 2,435 ตัว จากการวิเคราะห์โดยใช้ primer (*Eco*RI/*Taq*I) จำนวน 4 combination ผลที่ได้สามารถแยกกลุ่มของสุกรสายพันธุ์เหมยซาน และสุกรสายพันธุ์ทางการค้าได้อย่างชัดเจน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved