# การศึกษาเบื้องต้นลักษณะทางชีววิทยาและดีเอ็นเอบาร์โค้ดของสุกรพื้นเมือง ในมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

# Preliminary Study on Important Biological and DNA barcoding of Native Pig in Songkhla Rajabhat University

**อภิชาติ พันชูกลาง[1*], จิรพงศ์ สุขจันทร์[2], โอปอล์ พิทักษ์สกุลรัตน์[3]**
Apichart Punchukrang[1*], Jirapong Sukchan[2], Opal Pitaksakulrat[3]

## บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อต้องการศึกษาลักษณะทางชีววิทยาและรูปแบบของดีเอ็นเอบาร์โค้ด (COI gene) ของสุกรพื้นเมืองที่เลี้ยงในมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ผลที่ได้จากการศึกษาพบว่าลักษณะทางชีววิทยาสุกรพื้นเมืองแบ่งออกเป็น สุกรพันธุ์ควาย 2 ตัวอย่าง สุกรพันธุ์ราด 1 ตัวอย่าง และสุกรพันธุ์ไหหลำ 1 ตัวอย่าง ซึ่งผลของลักษณะทางชีววิทยาดังกล่าวไม่สอดคล้องกับผลของดีเอ็นเอบาร์โค้ดที่ได้ อย่างไรก็ตามรูปแบบของดีเอ็นเอบาร์โค้ดควรทำการวิเคราะห์ใหม่และเปรียบเทียบผลกับฐานข้อมูล GenBank และ BOLD ใหม่อีกครั้ง

**คำสำคัญ:** สุกรพื้นเมือง, ลักษณะทางชีววิทยา, ดีเอ็นเอบาร์โค้ด

## Abstract

The objectives of this research were to study the morphology and to study the patterns of DNA barcodes (COI gene) of native pigs at Songkhla Rajabhat University. It was found that all of the studied native pigs were included in 2 Kwai pigs , Raad pig and Hailum pig. The result of morphology is not related to a result any of DNA barcodes. However, the patterns of DNA barcodes was sequenced again, and the results confirmed direct sequencing of the GenBank and BOLD database.

**Keyword:** Native pig, Morphology, DNA barcodes

[1]อาจารย์ โปรแกรมวิชาเกษตรศาสตร์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
[2]อาจารย์ โปรแกรมวิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
[3]อาจารย์ คณะสัตวแพทย์ศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
[*]**Corresponding author, E-mail:** punchukrang@gmail.com

## บทนำ

สุกรพื้นเมืองเป็นสุกรที่นิยมเลี้ยงในประเทศไทยตามภูมิภาคต่างๆ เป็นระยะเวลานาน การจำแนกสุกรพื้นเมืองสามารถจำแนกตามรูปร่างลักษณะประจำพันธุ์ได้ 4 สายพันธุ์ คือ พันธุ์ราด พันธุ์พวง พันธุ์ไหหลำ และพันธุ์ควาย (Charoensook et al., 2013) ในการจำแนกสายพันธุ์โดยอาศัยลักษณะรูปพรรณสัณฐานภายนอกเป็นเกณฑ์ พบว่ายังเป็นประเด็นปัญหาที่สำคัญ ในบางครั้งไม่สามารถจำแนกกลุ่มของสุกรไทยพื้นเมืองได้อย่างชัดเจน (Rattanaronchart, 1994) ปัจจุบันมีการนำความรู้ทางอณูพันธุศาสตร์ในระดับดีเอ็นเอมาใช้ในการศึกษาความความแตกต่างทางพันธุกรรมของสัตว์พื้นเมือง เช่น ดีเอ็นเอบาร์โค้ดหรือยีน cytochrome c oxidase I (COI) ซึ่งเป็นยีนที่อยู่บนไมโตคอนเดรียของเซลล์ ได้ถูกพัฒนาขึ้นมาใช้ในการจำแนกชนิดของสัตว์กลุ่มต่างๆ โดย Hebert et al., (2003) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome c oxidase I (COI) มีความแปรผันมากเพียงพอที่จะใช้แยกและระบุชนิดของสัตว์การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีนนี้ด้วยเทคนิค PCR ทำได้ค่อนข้างง่ายเนื่องจากเป็นยีนที่มีขนาดไม่ใหญ่มาก (โดยเฉลี่ย 600-700 คู่เบส) และมีไพรเมอร์ที่เป็น universal primers ซึ่งใช้ได้กับสัตว์หลากหลายกลุ่ม (Thomas, 2009) ในสุกรมีรายงานการใช้ยีน COI ระบุชนิดของสุกรป่าและสุกรลูกผสมของประเทศฟิลิปินส์ โดยพบว่ายีน COI สามารถใช้ในการระบุชนิดและแยกความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของสุกรได้ (Bondoc et al , 2013)

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการตรวจสอบเบื้องต้นของดีเอ็นเอบาร์โค้ดหรือยีน cytochrome c oxidase I (COI) มาใช้รายงานร่วมกับลักษณะทางชีววิทยาของสุกรพื้นเมืองที่เลี้ยงในมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

## วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาการใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดในการระบุสายพันธุ์ของสุกรพื้นเมืองที่เลี้ยงในมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลาร่วมกับลักษณะทางชีววิทยา

## วิธีดำเนินการวิจัย

**1. สัตว์ทดลอง**

สุกรพื้นเมืองในสถานีปฏิบัติการสัตวบาล คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา 2 ตัวอย่าง และศูนย์เกษตรผสมผสาน มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา 2 ตัวอย่าง

**2. การศึกษาพันธุกรรมจากลักษณะรูปพรรณสัณฐานภายนอก**

ศึกษารูปร่างลักษณะภายนอก ได้แก่ สีผิว สีขน ขนาดใบหู ความยาวหน้า ความกว้างหน้า ความยาวลำตัว ความยาวรอบอก ความสูงที่หัวไหล่ และน้ำหนัก เป็นต้น

**3. การศึกษาด้านอณูพันธุศาสตร์ระดับดีเอ็นเอ**

3.1 วิธีการเก็บตัวอย่างเลือด

เจาะเลือดจาก Jugular vein บริเวณลำคอของสุกรจำนวนตัวละ 5 ml ใส่ในหลอดแก้วที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด EDTA แล้วเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20$^{\circ}$C จนกว่าจะนำออกมาสกัดดีเอ็นเอ

3.2 การสกัดดีเอ็นเอจากเลือด

นำเลือดของสุกรที่ได้ไปสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ MasterPure™ DNA Purification Kit ของ epicentre®

3.3 การเพิ่มชิ้นส่วนของ DNA ด้วยเทคนิค PCR

นำดีเอ็นที่สกัดได้มาทำการเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) ส่วนของตำแหน่งยีน COI ในไมโทคอนเดรียโดยใช้คู่ไพรเมอร์ซึ่งเป็น universal primers ตามรายงานของ Hebert et al. (2004) โดยได้ทำการเพิ่มลำดับดีเอ็นเอของไพรเมอร์ M13 เพื่อความสะดวกในการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ จึงทำให้ไพรเมอร์มีลำดับดังนี้

LCO1490 5’-CACGACGTTGTAAAACGACGAATTCGGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3’

HCO2198 5’-GGATAACAATTTCACACAGGGAATTCTAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3’

ส่วนประกอบของการทำปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย 100 ng/µL DNA template จำนวน 1 ไมโครลิตร, 10 µM dNTP mix จำนวน 400 ไมโครโมล, 25 mM MgCl2 จำนวน 2 มิลลิโมล, ไพรเมอร์ Forward และ Reverse อย่างละ 0.4 ไมโครโมลและ 5 U/µL Taq DNA polymerase จำนวน 0.1 ยูนิตในปริมาตรรวมสุทธิ 25 ไมโครลิตรโดยตั้งอุณหภูมิและเวลาตามรายงานของ Hebert et al. (2004) 4 ขั้นตอนดังนี้ (1) Initial denaturation 94 ℃ เวลา 1 นาที (2) Denaturation 94 ℃ เวลา 1 นาที, Annealing 45 ℃ เวลา 1.5 นาทีและ Extention 72 ℃ เวลา 1.5 นาทีจำนวน 5 รอบ (3) Denaturation 94 ℃ เวลา 1 นาที, Annealing 50 ℃ เวลา 1.5 นาทีและ Extention 72 ℃ เวลา 1 นาทีจำนวน 5 รอบและสุดท้าย (4) Final extention 72 ℃ เวลา 5 นาที ทำการแยกขนาดดีเอ็นเอที่ได้จากปฏิกิริยา PCR บนเจลอะกาโรส 1% ย้อมด้วย ethidium bromide แล้วตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอภายใต้แสงยูวีจากนั้นนำผลผลิต PCR ที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย HiYield™ Gel/PCR DNA Fragments Extractionkit (RBC Bioscience Corp., Taiwan) และตรวจสอบคุณภาพบนเจลอะกาโรส 1%

3.4 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing)

นำผลผลิต PCR ที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วไปวิเคราะห์ตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ด้วยไพรเมอร์ M13 โดยส่งบริษัท 1st BASE ประเทศมาเลเซีย

3.5 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล

นำผลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencing) มาเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) โดยใช้โปรแกรม BLASTn และฐานข้อมูล BOLD (http://www.boldsystems.org)

## ผลและอภิปรายผลการวิจัย

**ลักษณะสัณฐานภายนอกของสุกรพันธุ์พื้นเมือง**

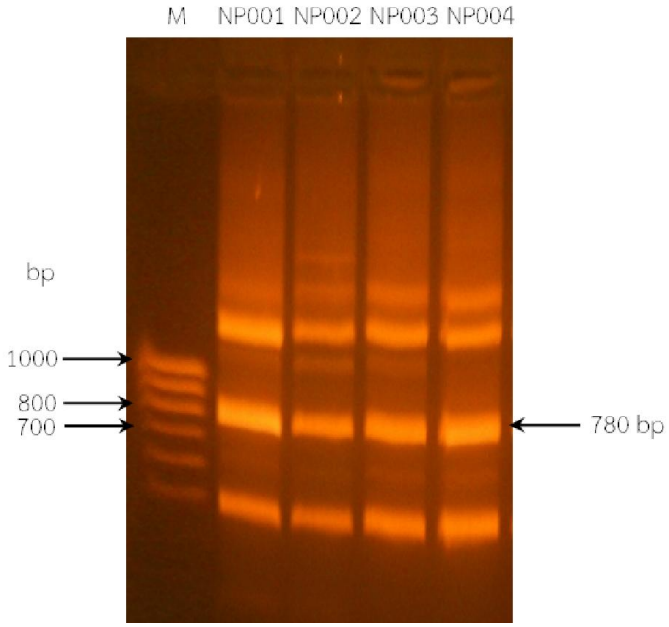
ตัวอย่างของสุกรพื้นเมืองจำนวน 4 ตัวอย่าง ที่เลี้ยงภายในมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา จากสถานีปฏิบัติการสัตวบาล 2 ตัวอย่าง จากศูนย์เกษตรผสมผสาน 2 ตัวอย่าง พบว่าจากลักษณะภายนอกที่ปรากฏสามารถแบ่งออกได้เป็นสามสายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์ควาย พันธุ์ราด และพันธุ์ไหหลำ (ตารางที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของสุกรพื้นเมืองที่ได้มีการแจกแจงรายละเอียดไว้ตามรายงานของ Charoensook et al. (2013)

**ตารางที่ 1** แสดงพันธุกรรมจากลักษณะรูปพรรณสัณฐานภายนอก

| หมายเลข | น้ำหนัก (Kg) | ลักษณะภายนอก | สายพันธุ์ |
|---|---|---|---|
| NP001 | 131 | สีขนและผิวหนังมีสีดำ ข้อขาหน้าทั้งสองข้างมีสีขาว หลังแอ่นเล็กน้อย หูใหญ่ ใบหูปรก หน้ายาว | พันธุ์ควาย |
| NP002 | 175 | สีขนและผิวหนังมีสีดำ ลำตัวยาว หลังแอ่นเล็กน้อย หูใหญ่ ใบหูปรก หน้ายาว | พันธุ์ควาย |
| NP003 | 87 | สีขนและผิวหนังมีสีดำ พู่หางสีน้ำตาล ตัวขนาดเล็ก หน้าสั้น หูเล็ก ใบหูตั้ง หลังแอ่น | พันธุ์ราด |
| NP004 | 141 | สีขนสีดำและสีขาว ผิวหนังสีน้ำตาล ข้อเท้าและใต้ท้องขนสีขาว ใบหูตั้ง หลังแอ่น | พันธุ์ไหหลำ |

**การเพิ่มชิ้นส่วนของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ส่วนของตำแหน่งยีน COI**

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดของสุกรพื้นเมืองที่เลี้ยงบริเวณมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ในตำแหน่งจำเพาะบริเวณยีน COI โดยใช้คู่ไพรเมอร์ LCO1490F และ HCO2198 (Hebert et al. 2004) ซึ่งเป็น universal primers ที่ได้รับการเติมลำดับดีเอ็นเอของไพรเมอร์ M13 พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนของดีเอ็นเอได้โดยมีความยาวประมาณ 780 คู่เบส (ภาพที่ 1) ซึ่งสอดคล้องกับ Bondoc et al. (2013) ที่ได้ศึกษาการนำยีน COI มาใช้เพื่อระบุชนิดของสุกรสายพันธุ์แท้ทางการค้าและสุกรพันธุ์พื้นเมือง โดยพบว่าขนาดของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ใช้เทียบกับฐานข้อมูลที่ขนาด 617 คู่เบส โดยชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้การการทำเทคนิค PCR มีความยาวประมาณ 700 คู่เบส




**ภาพที่ 1** ผลการตรวจสอบขนาดดีเอ็นเอปริมาณของส่วน COI gene โดยวิธีอิเล็กโทรโฟรีซีส : Lane M- ดีเอ็นเอมาตรฐาน (100 bp ladder), Lane NP001 สุกรพื้นเมืองตัวอย่างที่ 1, Lane NP002 สุกรพื้นเมืองตัวอย่างที่ 2 , Lane NP003 สุกรพื้นเมืองตัวอย่างที่ 3, Lane NP004 สุกรพื้นเมืองตัวอย่างที่ 4

**การเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล**

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ COI gene ของสุกรพันธุ์พื้นเมืองจำนวน 4 ตัวโดยการส่งวิเคราะห์ที่บริษัท 1st BASE ประเทศมาเลเซียนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม BLAST จากฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) และจากฐานข้อมูล BOLD (http://www.boldsystems.org)

การเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล GenBank พบว่าเป็นลักษณะของสุกรพื้นเมือง (Susscrofa) ทั้งหมด 4 ตัว โดยมีจำนวน 3 ตัว หมายเลข NP001- NP003 มีความคล้ายคลึงกับสุกรพันธุ์ Jeuma pig (97%) ส่วนหมายเลข NP004 มีความคล้ายคลึงกับสุกรพันธุ์ Guanling (99%)

การเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่มีในฐานข้อมูล BOLD พบว่าเป็นลักษณะของสุกรพื้นเมือง (Susscrofa) ทั้งหมด 4 ตัว โดยผลการเปรียบเทียบจากฐานข้อมูลดังกล่าวสามารถทราบถึงเพียงแค่ระดับจีนัสหรือสกุล (Genus) และระดับสปีชีส์หรือชนิด (species) เท่านั้นโดยทางฐานข้อมูลไม่บอกถึงระดับสายพันธุ์เช่นเดียวกับฐานข้อมูล GenBank

**ตารางที่ 2** ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูล GenBank และฐานข้อมูล BOLD

| หมายเลข | แหล่งที่พบ | สายพันธุ์สุกร | |
|---|---|---|---|
| | | GenBank (BLAST) | BOLD |
| NP001 | สถานีปฏิบัติการสัตวบาล | *Susscrofa* (97%) Jeuma pig | *Susscrofa* (98.37%) |
| NP002 | สถานีปฏิบัติการสัตวบาล | *Susscrofa* (97%) Jeuma pig | *Susscrofa* (97%) |
| NP003 | ศูนย์เกษตรผสมผสาน | *Susscrofa* (97%) Jeuma pig | *Susscrofa* (97.25%) |
| NP004 | ศูนย์เกษตรผสมผสาน | Susscrofa (99%) Guanling | *Susscrofa* (99.25%) |

## สรุปผลการวิจัย

การใช้ดีเอ็นเอบาร์โค้ดหรือยีน COI สามารถนำมาในการจำแนกสุกรพันธุ์พื้นเมืองจากฐานข้อมูล GenBank ได้ออกเป็น 2 สายพันธุ์ได้แก่สายพันธุ์ Jeuma และ Guanling ซึ่งพบว่าไม่สอดคล้องกับลักษณะรูปพรรณสัณฐานภายนอกที่จำแนกสุกรพันธุ์พื้นเมืองได้ออกเป็น 3 สายพันธุ์ได้แก่พันธุ์ควาย พันธุ์ราด และพันธุ์ไหหลำ

## ข้อเสนอแนะและการนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ความไม่สอดคล้องกันของลักษณะทางชีววิทยาและดีเอ็นเอบาร์โค้ดดังกล่าวอาจเกิดจากผลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ซึ่งมีความยาวเพียง 450 ถึง 490 คู่เบสเท่านั้น จึงอาจทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนขึ้นได้ และเกิดจากการที่ไม่มีผู้นำข้อมูลของดีเอ็นเอบาร์โค้ดสุกรพื้นเมืองในประเทศไทยเข้าสู่ฐานข้อมูล GenBank และฐานข้อมูล BOLD อย่างไรก็ตามควรมีการนำผลที่ได้จากการทำ PCR ส่งวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อให้มีความยาวที่มากขึ้นจะสามารถช่วยให้ผลที่ได้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

## กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากกองทุนวิจัยคณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ปีการศึกษา 2558

## เอกสารอ้างอิง

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

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

Herbert, P.D.N., Ratnasingham, S. and deWaard, J.R. (2003). Barcoding animal life: cytochrome coxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society**. B270: S96-S99.

Hebert PDN, Stoeckle MY, Zemlak TS and Francis CM. (2004). Identification of birds through DNA barcodes. **PLoSBiol**. 2 (10): 1657-1663

Rattanaronchart, S. (1994). **Present situation of Thai native pigs**. Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Chaing Mai University, Chiang Mai, Thailand. 23p.

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