บทที่ 4

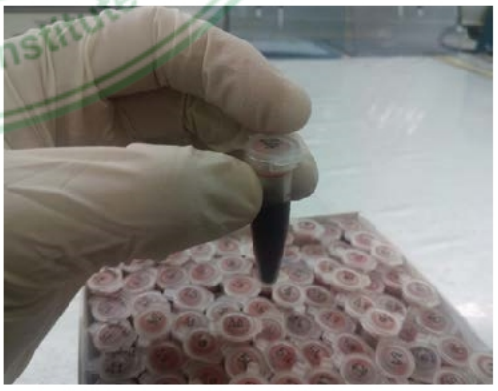
ผลการวิจัย

4.1 การเก็บรวบรวมตัวอย่างเลือดสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง

ตัวอย่างเลือดสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง (พื้นเมืองไทย x เหมยซาน x ดูร็อค) ภายใต้ชุดโครงการวิจัยเพื่อเสริมสร้างประสิทธิภาพการเลี้ยงสุกรบนพื้นที่สูง ถูกเก็บจากเส้นเลือดดำที่บริเวณระหว่างคอ (Anterior vena cava) ปริมาณ 1 ml. ใส่หลอดทดลอง ขนาด 1.5 ml. ที่บรรจุสารกันเลือดแข็ง EDTA จำนวน 50 µl แสดงดังภาพที่ 1 จำนวน 100 ตัว โดยรวบรวมจากศูนย์วิจัยสาธิตและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ ตำบลแม่เหียะ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 25 ตัว ดังภาพที่ 2 จากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองหอย ตำบลแม่แรม อำเภอแม่ริม จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 45 ตัว จากสถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด ตำบลสบเปิง อำเภอแม่แตง จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 10 ตัว และจากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองเขียว ตำบลเมืองนะ อำเภอเชียงดาว จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 20 ตัว แสดงดังภาพที่ 3 สุกรทั้งหมดมีอายุประมาณ 1-2 เดือน สุกรส่วนใหญ่มีลักษณะสีผิวลำตัวเป็นสีดำ แต่สุกรบางตัวมีลักษณะสีผิวลำตัวเป็นสีดำปนน้ำตาล และสีขาวปนดำ แสดงดังภาพที่ 4 ซึ่งโดยรวมแล้ว ได้ทำการเก็บตัวอย่างสุกรที่มีลักษณะสีผิวของลำตัวดำตรงตามลักษณะสายพันธุ์จำนวน 60 ตัวอย่าง และสุกรที่มีลักษณะไม่ตรงตามสายพันธุ์จำนวน 40 ตัวอย่าง แสดงรายละเอียดในตารางที่ 2

ก

ข



ภาพที่ 1: (ก) การเก็บตัวอย่างเลือดสุกรสายพันธุ์โครงการหลวงจากเส้นเลือดดำบริเวณระหว่างคอ (Anterior vena cava) และ (ข) หลอดตัวอย่างเลือดสุกรที่ทำการเก็บ

ก

ข

ภาพที่ 2: (ก และ ข) ตัวอย่างสุกรสายพันธุ์โครงการหลวงจากศูนย์วิจัยสาธิตและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ

ก

ข

ค

ง

ภาพที่ 3: ตัวอย่างสุกรสายพันธุ์โครงการหลวงจาก (ก และ ข) ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองหอย (ค) ศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองเขียว และ (ง) สถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด

ก

ข

ภาพที่ 4: ตัวอย่างสุกรที่มีลักษณะสีผิวของลำตัวเป็น (ก) สีน้ำตาลปนดำ และ(ข) สีขาวปนดำ

ตารางที่ 2 รายละเอียดการเก็บตัวอย่างเลือดสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง

ลำดับ	ลักษณะ	เพศ	พันธุ์	อายุ	สถานที่
1	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
2	สีน้ำตาล	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
3	สีน้ำตาล	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
4	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
5	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
6	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
7	สีดำ	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
8	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
9	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
10	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
11	สีดำเท้าขาว	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
12	สีดำเท้าขาว	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
13	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
14	สีดำ	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
15	สีดำ	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
16	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
17	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
18	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
19	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
20	สีน้ำตาลลายจุดดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
21	สีดำเท้าขาว	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
22	สีดำ	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
23	สีดำ	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
24	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
25	สีน้ำตาลลายจุดดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	ศูนย์วิจัยแม่เหียะ
26	น้ำตาล	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
27	น้ำตาล	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
28	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
29	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
30	สีน้ำตาลลายจุดดำ	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย

ตารางที่ 2 รายละเอียดการเก็บตัวอย่างเลือดสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง (ต่อ)

ลำดับ	ลักษณะ	เพศ	พันธุ์	อายุ	สถานที่
31	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
32	สีน้ำตาล	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
33	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
34	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
35	สีน้ำตาล	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
36	สีน้ำตาล	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
37	สีน้ำตาลลายจุดดำ	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
38	สีน้ำตาลลายจุดดำ	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
39	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
40	สีน้ำตาล	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
41	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
42	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
43	สีน้ำตาล	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
44	สีน้ำตาลลายจุดดำ	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
45	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
46	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
47	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
48	สีขาวลายจุดดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
49	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
50	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
51	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
52	สีดำ	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
53	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
54	สีขาวจุดดำ	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
55	สีน้ำตาล	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
56	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
57	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
58	สีน้ำตาล	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
59	สีขาวลายจุดดำ	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
60	สีน้ำตาลลายจุดดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย

ตารางที่ 2 รายละเอียดการเก็บตัวอย่างเลือดสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง (ต่อ)

ลำดับ	ลักษณะ	เพศ	พันธุ์	อายุ	สถานที่
61	สีน้ำตาล	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
62	สีขาวลายจุดดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
63	สีดำ	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
64	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
65	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
66	สีน้ำตาลลายจุดดำ	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
67	สีน้ำตาล	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
68	สีน้ำตาล	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
69	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
70	สีดำ	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x เปียแตรง	~ 2 เดือน	โครงการหลวงหนองหอย
71	สีน้ำตาลลายดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงแม่หลอด
72	สีน้ำตาลลายดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงแม่หลอด
73	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงแม่หลอด
74	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงแม่หลอด
75	สีดำ	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงแม่หลอด
76	สีน้ำตาล	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงแม่หลอด
77	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงแม่หลอด
78	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงแม่หลอด
79	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงแม่หลอด
80	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงแม่หลอด
81	สีขาวลายจุดดำ	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองเขียว
82	สีขาวลายจุดดำ	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองเขียว
83	สีน้ำตาลลายดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองเขียว
84	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองเขียว
85	สีดำ	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองเขียว
86	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองเขียว
87	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองเขียว
88	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองเขียว
89	สีน้ำตาล	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองเขียว
90	สีน้ำตาลลายจุดดำ	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองเขียว

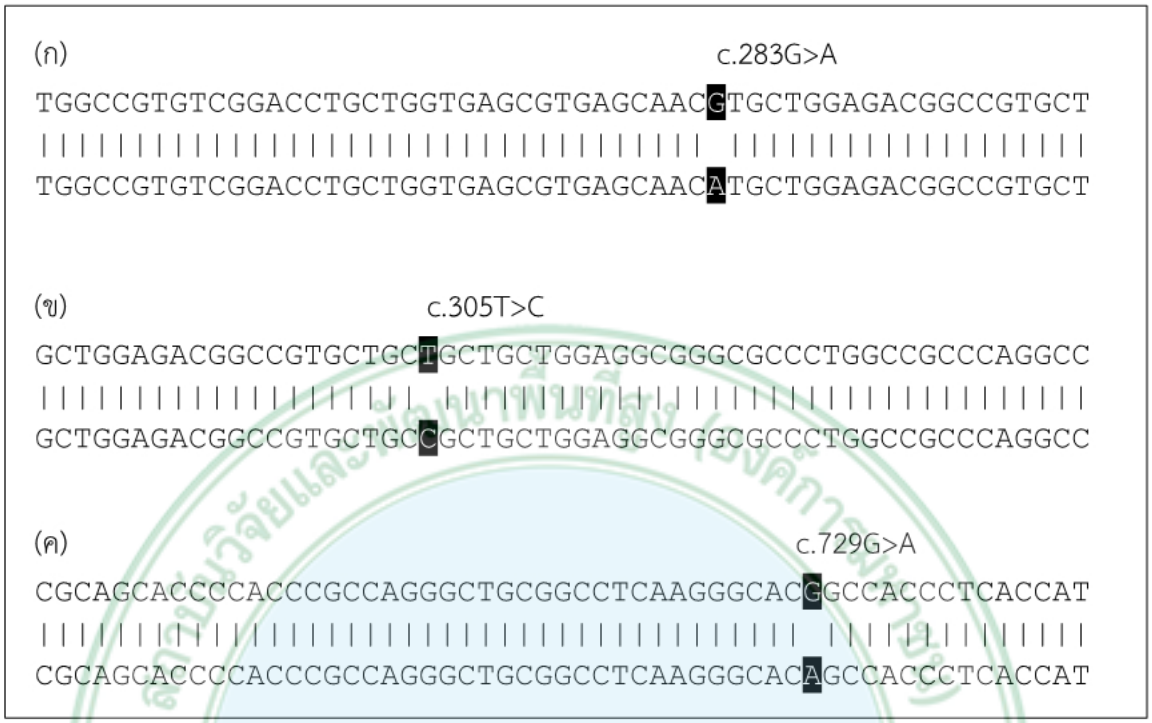
ตารางที่ 2 รายละเอียดการเก็บตัวอย่างเลือดสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง (ต่อ)

ลำดับ	ลักษณะ	เพศ	พันธุ์	อายุ	สถานที่
91	สีน้ำตาลลายจุด	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองเขียว
92	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองเขียว
93	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองเขียว
94	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองเขียว
95	สีดำ	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองเขียว
96	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองเขียว
97	สีน้ำตาล	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองเขียว
98	สีน้ำตาล	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองเขียว
99	สีดำ	เมีย	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองเขียว
100	สีดำ	ผู้	พื้นเมือง x เหมยซาน x ดูร็อค	~ 1 เดือน	โครงการหลวงหนองเขียว

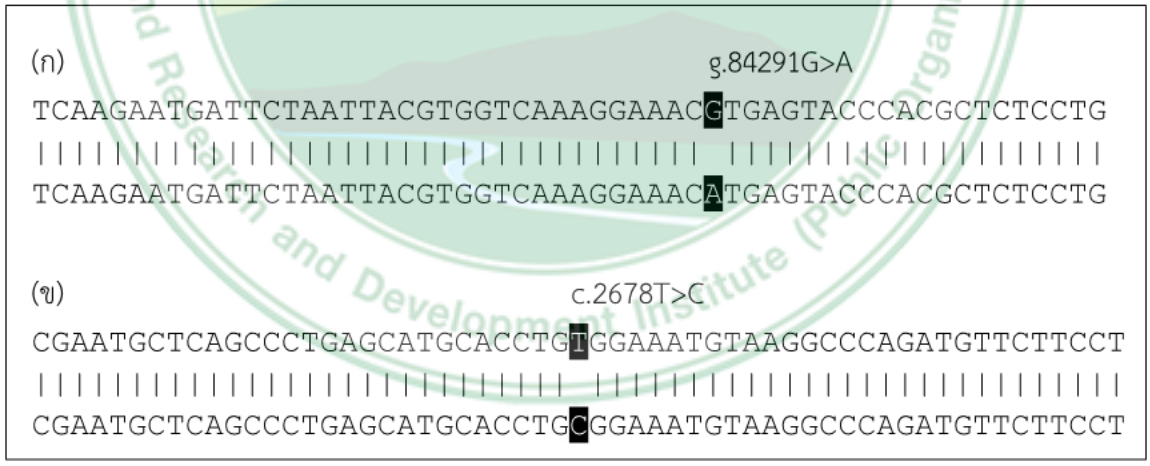
4.2 การสืบค้นข้อมูลทางพันธุกรรมของสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง

ผลการค้นหาความผันแปรทางพันธุกรรมของยีนเป้าหมาย ยีน *MC1R* และ *KIT* โดยใช้วิธี *In silico* analysis พบความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *MC1R* ที่ตำแหน่ง c.283G>A ตำแหน่ง c.305T>C และตำแหน่ง c.729G>A ดังภาพที่ 5 และยีน *KIT* พบความผันแปรทางพันธุกรรมที่ตำแหน่ง g.84291G>A และ c.2678T>C ดังภาพที่ 6

นอกจากนี้ได้ออกแบบไพรเมอร์ของยีน *MC1R* และ *KIT* แสดงดังตารางที่ 3 ให้ครอบคลุมตำแหน่งความผันแปรทางพันธุกรรม ดังภาพที่ 7 เพื่อใช้สำหรับค้นหาหาความผันแปรทางพันธุกรรมของยีนดังกล่าวในประชากรสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง



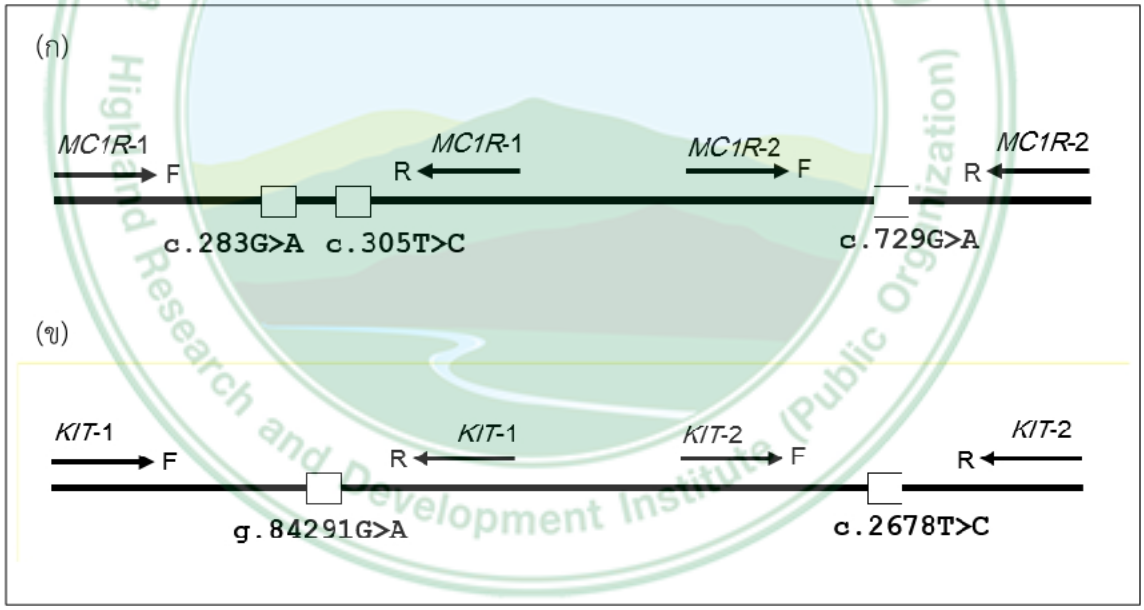
ภาพที่ 5: ผลการค้นหาความผันแปรทางพันธุกรรมของยีนเป้าหมาย ยีน *MC1R* ตำแหน่ง (ก) c.283G>A, (ข) c.305T>C และ (ค) c.729G>A



ภาพที่ 6: ผลการค้นหาความผันแปรทางพันธุกรรมของยีนเป้าหมาย ยีน *KIT* ตำแหน่ง (ก) g.84291G>A และ (ข) c.2678T>C

ตารางที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของไพรเมอร์ยีน *MC1R* และ *KIT*

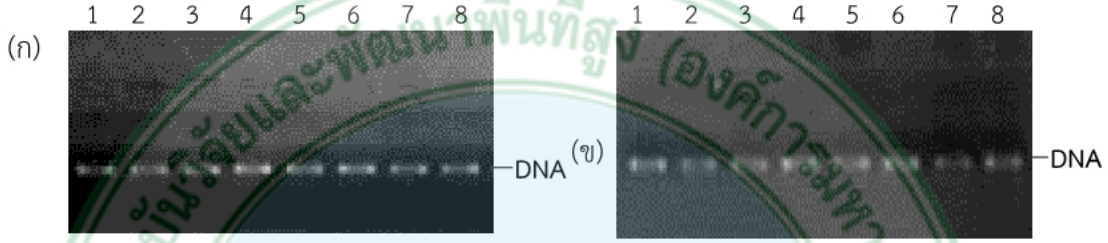
ยีน	ไพรเมอร์ (5'→ 3')	ขนาดแถบดีเอ็นเอ (bp)
MC1R-1	F: CTGCACTCGCCCATGTACT	196
	R: AGCAGAGGCTGGACACCAT	
MC1R-2	F: GCGGTACTGTACGTCCACA	153
	R: CCAGCAGAGGAGGAAGAC	
KIT-1	F: GTATTCACAGAGACTTGGCG	170
	R: TGCAAGGAAAATCCTTCACG	
KIT-2	F: AGATGATCAAGGAGGGTTTC	196
	R: ACATCTGACCAGGATGTCCT	



ภาพที่ 7: การออกแบบไพรเมอร์โดยครอบคลุมตำแหน่งความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน (ก) *MC1R* และ (ข) *KIT*

4.3 การสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอของสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง

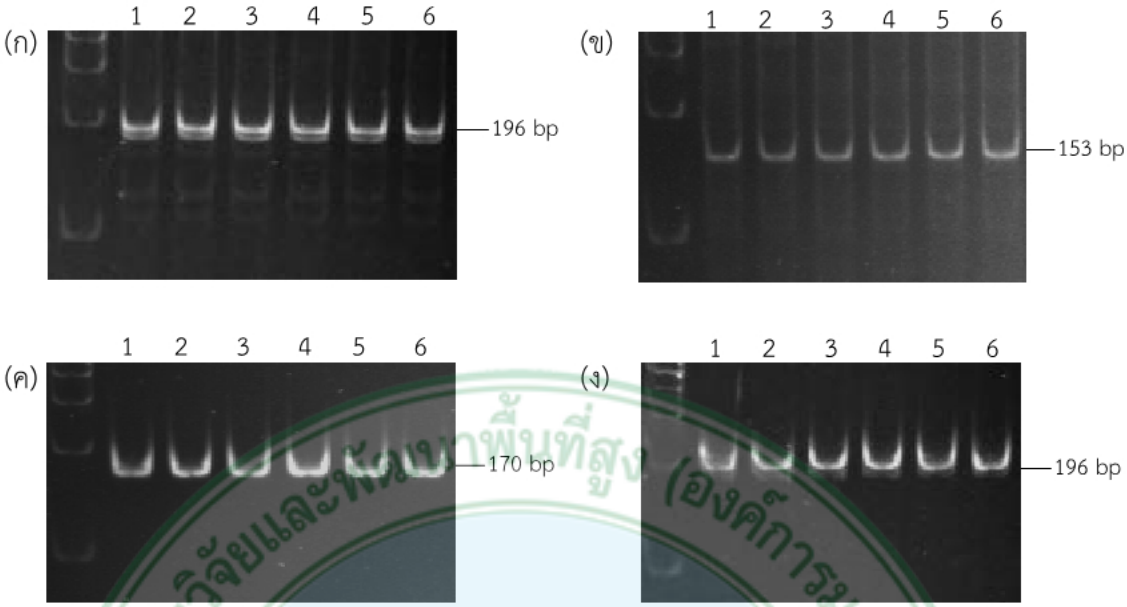
นำตัวอย่างเลือดของสุกรสายพันธุ์โครงการหลวงที่เก็บรวบรวม จำนวน 100 ตัวอย่าง มาทำการสกัดตัวอย่างดีเอ็นเอ ด้วยวิธี phenol-chloroform รวมทั้งตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอ บน agarose gel electrophoresis แสดงดังภาพที่ 8 และวัดความเข้มข้นของตัวอย่างดีเอ็นเอด้วยเครื่อง nanodrop โดยดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 100-200 ng/µl



ภาพที่ 8: ตัวอย่างการตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอ บน agarose gel electrophoresis (ก) ตัวอย่างดีเอ็นเอของสุกรจากศูนย์วิจัยสาธิตและฝึกอบรมการเกษตรแม่เหียะ และศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองหอย และ (ข) ตัวอย่างดีเอ็นเอของสุกรจากศูนย์พัฒนาโครงการหลวงหนองเขียว และสถานีวิจัยโครงการหลวงแม่หลอด โดยหมายเลข 1-4 แสดงแถบดีเอ็นเอตัวอย่างสุกรที่มีลักษณะสีดำล้วน และหมายเลข 5-8 แสดงแถบดีเอ็นเอตัวอย่างสุกรที่มีลักษณะสีไม่ดำล้วน

4.4 การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนเป้าหมาย

ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีน *MC1R* และ *KIT* โดยใช้ปฏิกิริยาพีซีอาร์และตรวจสอบการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอบน polyacrylamide gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 6.0% โดยผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน *MC1R* และ *KIT* ทั้ง 4 คู่ไพรเมอร์พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแต่ละไพรเมอร์ได้สำเร็จ ซึ่งเมื่อได้นำมาตรวจสอบด้วย polyacrylamide gel electrophoresis พบแถบดีเอ็นเอของไพรเมอร์ *MC1R*-1, *MC1R*-2, *KIT*-1 และ *KIT*-2 ปรากฏตรงกับขนาดแถบดีเอ็นเอของยีนเป้าหมายที่ได้ออกแบบไว้ โดยมีขนาด 196 bp, 153 bp, 170 bp และ 196 bp ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 9



ภาพที่ 9: การตรวจสอบผลการเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอยีน (ก) *MC1R*-1, (ข) *MC1R*-2, (ค) *KIT*-1 และ (ง) *KIT*-2 โดยหมายเลข 1-3 แสดงแถบดีเอ็นเอตัวอย่างสุกรที่มีลักษณะสีดำล้วน และหมายเลข 4-6 แสดงแถบดีเอ็นเอตัวอย่างสุกรที่มีลักษณะสีไม่ดำล้วน

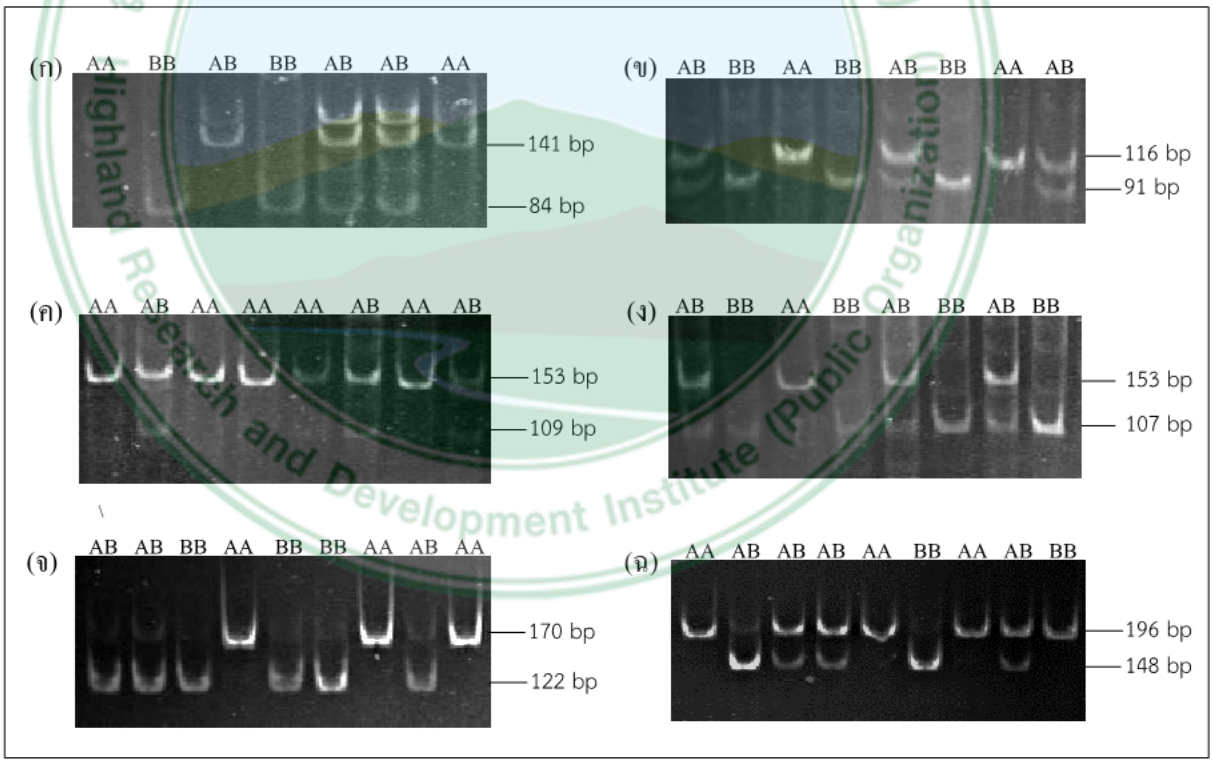
4.5 การค้นหาความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์บนยีนเป้าหมาย *MC1R* และ *KIT*

ทำการค้นหาความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ยีน *MC1R* และ *KIT* ที่ได้จากค้นหาด้วยวิธี *In silico* analysis ในประชากรสุกรสายพันธุ์โครงการหลวงเบื้องต้น โดยนำสุกรสายพันธุ์โครงการหลวงที่มีสีดำและสีไม่ดำ มาทำการทดสอบด้วยเทคนิค polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP)

โดยตำแหน่งความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *MC1R* ที่ตำแหน่ง c.283G>A ถูกตรวจด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nla*III ที่มีตำแหน่งจุดตัดจำเพาะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ CATG^ โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถตัดแถบ PCR ของยีน *MC1R*283 ได้ออกเป็น 2 แถบ ซึ่งมีขนาด 141 และ 84 bp แสดงดังภาพที่ 10 (ก) สำหรับยีน *MC1R* ที่ตำแหน่ง c.305T>C ถูกตรวจด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Aci*I ที่มีตำแหน่งจุดตัดจำเพาะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ C^CGC โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถตัดแถบ PCR ของยีน *MC1R*305 ได้ออกเป็น 2 แถบ ซึ่งมีขนาด 116 และ 91 bp แสดงดังภาพที่ 10 (ข) และยีน *MC1R* ที่ตำแหน่ง c.729G>A ถูกตรวจด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Bst*UI ที่มีตำแหน่งจุดตัดจำเพาะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ CG^CG โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถตัดแถบ PCR ของยีน *MC1R*305 ได้ออกเป็น 2 แถบ ซึ่งมีขนาด 153 และ 109 bp แสดงดังภาพที่ 10 (ค)

นอกจากนี้ ยังทำการตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *MC1R* ที่ตำแหน่ง c.727G>A โดยตำแหน่งดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับลักษณะสีดำของสุกรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและสามารถทำนายลักษณะดังกล่าวได้ถูกต้องสูงสุดในการวิจัยปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 ซึ่งตรวจด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin6*I ที่มีตำแหน่งจุดตัดจำเพาะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ G^CGC โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถตัดแถบ PCR ของยีน *MC1R727* ได้ออกเป็น 2 แถบ ซึ่งมีขนาด 153 และ 107 bp แสดงดังภาพที่ 10 (ง)

สำหรับความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *KIT* ที่ตำแหน่ง g.84291G>A ถูกตรวจด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Nla*III มีตำแหน่งจุดตัดจำเพาะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ CATG^ โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถตัดแถบ PCR ของยีนได้ออกเป็น 2 แถบ ซึ่งมีขนาด 170 และ 122 bp แสดงดังภาพที่ 10 (จ) และความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *KIT* ที่ตำแหน่ง c.2678T>C ถูกตรวจด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Aci*I มีตำแหน่งจุดตัดจำเพาะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ C^CGC โดยเอนไซม์ตัดจำเพาะสามารถตัดแถบ PCR ของยีนได้ ออกเป็น 2 แถบ ซึ่งมีขนาด 196 และ 148 bp แสดงดังภาพที่ 10 (ฉ)



ภาพที่ 10: การค้นหาความผันแปรของลำดับนิวคลีโอไทด์ในประชากรสุกรสายพันธุ์โครงการหลวงบนยีน *MC1R* ตำแหน่ง (ก) c.283G>A, (ข) c.305T>C, (ค) c.729G>A และ (ง) c.727G>A และยีน *KIT* ตำแหน่ง (จ) g.84291G>A และ (ฉ) c.2678T>C โดย AA = homozygous dominant, AB = heterozygous, BB = homozygous recessive

4.6 ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของยีนเป้าหมาย

ความถี่จีโนไทป์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *MC1R283*, *MC1R305*, *MC1R727*, *MC1R729*, *KIT2678* และ *KIT84291* ในประชากรสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง แสดงดังตารางที่ 4 โดยเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *MC1R283*, *MC1R305*, *MC1R727*, *KIT2678* และ *KIT84291* พบรูปจีโนไทป์ทั้ง 3 รูปแบบ (AA, AB และ AB) แต่สำหรับเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ *MC1R729* พบรูปแบบจีโนไทป์เพียง 2 รูปแบบ (AA และ AB)

ตารางที่ 4: ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของเครื่องหมายโมเลกุล *MC1R283*, *MC1R305*, *MC1R727*, *MC1R729*, *KIT2678* และ *KIT84291*

เครื่องหมายโมเลกุล	ประชากร	จีโนไทป์			อัลลีล	
		AA	AB	BB	A	B
MC1R283	Black	0.36	0.49	0.15	0.61	0.39
	Non-black	0.73	0.20	0.07	0.83	0.17
MC1R305	Black	0.05	0.30	0.65	0.20	0.80
	Non-black	0.36	0.46	0.18	0.59	0.41
MC1R727	Black	0.08	0.45	0.47	0.30	0.70
	Non-black	0.09	0.46	0.45	0.32	0.68
MC1R729	Black	0.86	0.14	0.00	0.93	0.07
	Non-black	0.68	0.32	0.00	0.84	0.16
KIT2678	Black	0.44	0.23	0.33	0.55	0.45
	Non-black	0.80	0.15	0.05	0.88	0.13
KIT84291	Black	0.24	0.40	0.36	0.44	0.56
	Non-black	0.70	0.25	0.05	0.83	0.17

4.7 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายกับลักษณะสีดำในสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน *MC1R283*, *MC1R305*, *MC1R727*, *MC1R729*, *KIT2678* และ *KIT84291* กับลักษณะสีดำในสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง พบว่าเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 5 เครื่องหมาย ประกอบด้วย *MC1R283*, *MC1R305*, *MC1R727*, *MC1R729* และ *KIT2678* มีความสัมพันธ์กับลักษณะสีดำของสุกรสายพันธุ์โครงการหลวงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยเครื่องหมายโมเลกุล *MC1R305* มีค่าไคสแควร์สูงสุด เท่ากับ 31.5516 ($P < 0.0001$) ในขณะที่เครื่องหมายโมเลกุล *MC1R283*, *MC1R727*, *MC1R729* และ *KIT2678* มีค่าไคสแควร์ เท่ากับ 17.0511 ($P < 0.0001$), 29.9608 ($P < 0.0001$), 6.5165 ($P = 0.0170$) และ 9.5233 ($P = 0.0020$) ตามลำดับ สำหรับเครื่องหมายโมเลกุล *KIT84291* ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะสีดำของสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง โดยมีค่าไคสแควร์ เท่ากับ 0.0219 ($P = 0.8836$) แสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5: ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายโมเลกุลกับลักษณะสีดำในสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง

เครื่องหมายโมเลกุล	ค่าไคสแควร์	P-value
MC1R283	17.0511	<0.0001
MC1R305	31.5516	<0.0001
MC1R727	29.9608	<0.0001
MC1R729	6.5165	0.0170
KIT2678	9.5233	0.0020
KIT84291	0.0219	0.8836

นอกจากนี้ความแม่นยำของเครื่องหมายโมเลกุลยีน *MC1R283*, *MC1R305*, *MC1R727*, *MC1R729* และ *KIT2678* ในการทำนายลักษณะสีดำในสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง และค่าความแม่นยำแบบรวมเครื่องหมายโมเลกุล แสดงดังตารางที่ 6 โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบจีโนไทป์ของยีนเป้าหมายกับลักษณะสีดำของสุกรด้วยวิธีโลจิสติกส์รีเกรสชั่น ซึ่งพิจารณาจากความน่าจะเป็นในการทำนายลักษณะสีดำของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ และความแม่นยำของการทำนายลักษณะสีดำของสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง พิจารณาจากความสามารถของเครื่องหมายโมเลกุลใน

การทำนายลักษณะสีดำและสีไม่ดำได้ถูกต้อง พบว่าการใช้เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอแบบรวมกันจำนวน 2, 3, 4 และ 5 เครื่องหมาย มีค่าความแม่นยำในการทำนายลักษณะสีดำในสุกรสายพันธุ์โครงการหลวงได้ถูกต้องแม่นยำ 68.8, 81.8, 87.0 และ 88.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าค่าการทำนายของแต่ละเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ โดยมีความแม่นยำอยู่ระหว่าง 30.2 ถึง 65.1 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 6: สมการของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอและความแม่นยำในการทำนายลักษณะสีดำในสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง

เครื่องหมายโมเลกุล (X)	**สมการ** [1]	**ความแม่นยำ (%)** [2]
MC1R283 (X1)	y = 0.1184 – 1.1807 (X1)	49.8
MC1R305 (X2)	y = 0.6080 – 1.7252 (X2)	65.1
MC1R727 (X3)	y = 1.5055 - 1.6277 (X3)	64.2
MC1R729 (X4)	y = 0.8294 – 0.0560 (X4)	30.2
KIT2678 (X5)	y = –0.7849 + 1.2266 (X5)	48.0
X1 + X2	y = 0.6197 - 0.0490 (X1) – 1.6914 (X2)	68.8
X1 + X2 + X3	y = 1.8182 + 0.1125 (X1) – 1.4669 (X2) – 1.1924 (X3)	81.8
X1 + X2 + X3 + X4	y = 1.7606 + 0.1968 (X1) – 1.3341 (X2) – 1.7150 (X3) + 2.0238 (X4)	87.0
X1 + X2 + X3 + X4 + X5	y = 1.9772 + 0.1568 (X1) – 1.3491 (X2) – 1.5923 (X3) + 1.8467 (X4) – 0.5029 (X5)	88.4

[1]y คือ ค่าความน่าจะเป็นของการทำนายลักษณะสีดำของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ โดย X1, X2, X3, X4 และ X5 คือ รูปแบบจีโนไทป์ AA, AB และ BB ของเครื่องหมายโมเลกุล *MC1R283*, *MC1R305*, *MC1R727*, *MC1R729* และ *KIT2678* ตามลำดับ เมื่อ AA, AB และ BB แทนค่าด้วย 0, 1 และ 2 ตามลำดับ

เมื่อค่า $y \geq 0.5$ ทำนายว่าเป็นสุกรสีดำ และค่า $y < 0.5$ ทำนายว่าเป็นสุกรสีไม่ดำ

[2]เปอร์เซ็นต์ความแม่นยำ = จำนวนสุกรลักษณะสีดำและไม่ดำที่เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอทำนายได้ถูกต้อง x 100

บทที่ 5

วิจารณ์ผลการวิจัย

ลักษณะสีของสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ลักษณะสุกรที่มีสีดำทั้งลำตัว และสุกรที่มีสีดำไม่ทั่วทั้งลำตัว โดยลักษณะสีดำมีความผันแปรในสุกรแต่ละตัว ไม่สามารถกำหนดหรือทราบได้จากลักษณะของพ่อแม่พันธุ์ จากข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าลักษณะสีดำของสุกรสายพันธุ์โครงการหลวงยังคงมีการกระจายตัวอยู่ ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้ทำศึกษาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีน melanocortin 1 receptor (*MC1R*) และ v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog (*KIT*) จำนวน 6 เครื่องหมาย ได้แก่ *MC1R283*, *MC1R305*, *MC1R727*, *MC1R729*, *KIT2678* และ *KIT84291*

5.1 ความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *MC1R* และ *KIT*

จากการค้นหาความผันแปรทางพันธุกรรมของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายยีน *MC1R* และ *KIT* โดยใช้ข้อมูลจากฐานพันธุกรรมในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในตำแหน่งต่างๆ ของยีน (*In silico* analysis) พบความผันแปรทางพันธุกรรมที่มีศักยภาพสำหรับการศึกษา และอาจมีความสัมพันธ์กับลักษณะสีดำของสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง จำนวน 5 ตำแหน่ง (*MC1R283*, *MC1R305*, *MC1R729*, *KIT2678* และ *KIT84291*) นำไปสู่การออกแบบไพรเมอร์ให้ครอบคลุมตำแหน่งความผันแปรทางพันธุกรรมดังกล่าว นอกจากนี้ยังได้ใช้ไพรเมอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการศึกษาวิจัยปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 อีก 1 ไพรเมอร์ คือ *MC1R727* รวมทั้งหมดเป็น 6 เครื่องหมายโมเลกุล เพื่อใช้ในการค้นหาความผันแปรทางพันธุกรรมในสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง โดยตรวจสอบความผันแปรทางพันธุกรรมด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ หรือ เทคนิค polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ซึ่งพบเครื่องหมายโมเลกุลทั้งหมด (*MC1R283*, *MC1R305*, *MC1R727*, *MC1R729*, *KIT2678* และ *KIT84291*) แสดงความผันแปรในประชากรสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง สอดคล้องกับการค้นหาความผันแปรทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค *In silico* analysis และการรายงานของ Kijas et al., 2001, Andersson, 2003, 2011 และ Fang et al., 2009 ซึ่งได้รายงานว่าพบความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *MC1R* ในตำแหน่งดังกล่าวในสุกรสายพันธุ์ต่างๆ

5.2 ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอเป้าหมายกับลักษณะสีดำของสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง

เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอยีน *MC1R* และ *KIT* จำนวน 6 เครื่องหมาย ได้แก่ *MC1R283*, *MC1R305*, *MC1R727*, *MC1R729*, *KIT2678* และ *KIT84291* แสดงความผันแปรในประชากรสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง โดยเครื่องหมายโมเลกุลจำนวน 5 เครื่องหมาย ได้แก่ *MC1R283*, *MC1R305*, *MC1R727*, *MC1R729* และ *KIT2678* มีความสัมพันธ์กับลักษณะสีดำของสุกรสายพันธุ์โครงการหลวงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และสามารถทำนายลักษณะสีดำของสุกรได้ถูกต้องเท่ากับ 49.8, 65.1, 64.2, 30.2 และ 48.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาอิทธิพลของเครื่องหมายโมเลกุลร่วมกันจำนวน 5 เครื่องหมาย (*MC1R283*, *MC1R305*, *MC1R727*, *MC1R729* และ *KIT2678*) พบว่าสามารถทำนายลักษณะสีดำของสุกรได้ถูกต้องเท่ากับ 88.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าความแม่นยำสูงกว่าค่าการทำนายของแต่ละเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอ ซึ่งมีความแม่นยำอยู่ระหว่าง 30.2 ถึง 65.1 เปอร์เซ็นต์ จากผลการวิจัยซึ่งพบว่ายีน *MC1R* มีความสัมพันธ์กับลักษณะสีดำของสุกรสายพันธุ์โครงการหลวงนั้น อาจเป็นผลมาจากความผิดปกติของกระบวนการสร้างเม็ดสีในขั้นตอนการกระตุ้นการทำงานเซลล์เมลาโนไซต์ (melanocyte) ซึ่งจะผ่านทางตัวรับ คือ melanocortin 1 receptor หรือยีน *MC1R* ที่อยู่บนผิวเซลล์เมลาโนไซต์ที่เนื้อเยื่อใต้ผิวหนัง ซึ่งความผันแปรทางพันธุกรรมที่พบในการศึกษาครั้งนี้อาจไปมีผลต่อกระบวนการดังกล่าว มีผลทำให้สัตว์มีผิวหนังสีดำและไม่ดำเกิดขึ้นได้ (Mao et al., 2010) และสำหรับยีน *KIT* ซึ่งจากการวิจัยในครั้งนี้พบว่ามีความสัมพันธ์กับลักษณะสีดำของสุกรสายพันธุ์โครงการหลวงเช่นกัน โดยยีน *KIT* มีส่วนในกระบวนการสร้างเม็ดสีและจำเป็นต่อกระบวนการทำงานของเซลล์เมลาโนไซต์ (Okumura et al., 2008) การค้นพบความผันแปรทางพันธุกรรมในการวิจัยครั้งนี้ ที่ตำแหน่ง c.2678T>C ซึ่งทำให้กรดอะมิโนเปลี่ยนไปนั้น อาจมีผลต่อกระทบต่อการสร้างเม็ดสี ซึ่งทำให้สุกรมีลักษณะสีดำล้วนและสีไม่ดำล้วนได้

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอของยีนเป้าหมาย melanocortin 1 receptor (*MC1R*) และ v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog (*KIT*) สำหรับบ่งชี้ลักษณะสีดำของสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง โดยใช้ไพรเมอร์ จำนวน 6 เครื่องหมาย ประกอบด้วย *MC1R283*, *MC1R305*, *MC1R727*, *MC1R729*, *KIT2678* และ *KIT84291* พบว่า

1) เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่แสดงความผันแปรในประชากรสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง มีจำนวน 6 เครื่องหมาย คือ *MC1R283*, *MC1R305*, *MC1R727*, *MC1R729*, *KIT2678* และ *KIT84291*

2) เครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะสีดำของสุกรสายพันธุ์โครงการหลวง มีจำนวน 5 เครื่องหมาย คือ *MC1R283*, *MC1R305*, *MC1R727*, *MC1R729* และ *KIT2678*

3) อิทธิพลของเครื่องหมายโมเลกุลร่วมกันจำนวน 5 เครื่องหมาย (*MC1R283*, *MC1R305*, *MC1R727*, *MC1R729* และ *KIT2678*) มีค่าความแม่นยำในการทำนายลักษณะสีดำในสุกรสายพันธุ์โครงการหลวงได้ถูกต้องสูงที่สุด โดยมีค่าความแม่นยำ เท่ากับ 88.4 เปอร์เซ็นต์