บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ปัจจุบันสุกรที่เลี้ยงกันอยู่ในระดับอุตสาหกรรมของประเทศไทย ล้วนแล้วแต่เป็นการนำเข้าปู่ย่าพันธุ์ (Great grand parent stock; GGP) มาจากต่างประเทศแถบทั้งสิ้น เพื่อนำมาใช้ปรับปรุงพันธุ์สุกรภายในประเทศ ซึ่งลักษณะการสูญเสียน้ำของเนื้อเป็นลักษณะที่ภาคอุตสาหกรรมการผลิตสุกรให้ ความสำคัญเป็นอย่างมาก และต้องการเพิ่มประสิทธิภาพให้ได้มากที่สุด เพราะเป็นลักษณะที่มีผลต่อคุณภาพเนื้อสุกรที่วางขายในท้องตลาด แต่ด้วยข้อจำกัดของการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีมาตรฐานใช้ระยะเวลานาน สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และลักษณะดังกล่าวถูกควบคุมด้วยยีนจำนวนหลายคู่ ทำให้การปรับปรุงพันธุ์ลักษณะการสูญเสียน้ำของเนื้อก้าวหน้าไประดับหนึ่ง แต่ศักยภาพทางพันธุกรรมด้านความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อยังคงมีอยู่ แต่มิได้ถูกนำมาใช้อย่างเหมาะสม ทำให้อุตสาหกรรมการผลิตสุกรสูญเสียรายได้ ที่จะเพิ่มขึ้นประมาณ 500-1,000 ล้านบาท/ปี เพียงเพื่อต้องการข้อมูลพันธุกรรมในระดับโมเลกุลสำหรับการตัดสินใจคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์

ในปัจจุบันองค์ความรู้ทางด้านอณูพันธุศาสตร์ หรือพันธุศาสตร์ในระดับโมเลกุล (molecular genetics) ของสุกรเจริญก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว มีการค้นพบเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอเป็นจำนวนมาก ที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะการสูญเสียน้ำของเนื้ออาทิเช่น ยีน *Leptin (LEP)*, *Insulin-like growth factor 2 (IGF2)*, *Protein kinase, AMP-activated, gamma 3 non-catalytic subunit (PRKAG3)* และ *Ryanodine receptor (RYR)* เป็นต้น

ยีน *Leptin (LEP)* ถูกพบความผันแปรทางพันธุกรรมโดย *Kennes et al.* (2001) ที่ตำแหน่ง $2845^{A/T}$, $3996^{T/C}$, $2728^{G/A}$, $3469^{T/C}$ และ $LEP3496^{T/T}$ ในสุกรสายพันธุ์ Duroc (n=40), Landrace (n=102) และ Yorkshire (n=40) อย่างไรก็ตาม ระดับของฮอร์โมน leptin มีผลต่อความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ ($r=0.15$, $P<0.05$) (Berg *et al.*, 2003)

ยีน *Insulin-like growth factor 2 (IGF2)* เกี่ยวข้องกับ myogenesis และปริมาณกล้ามเนื้อแดง มีการกลายพันธุ์โดยเปลี่ยนจาก adenine (A) เป็น guanine (G) ที่ตำแหน่ง 3072 ใน intron 3 ซึ่งเป็นผลอย่างมากต่อการเจริญเติบโตของกล้ามเนื้อ และการสร้างไขมันในสุกร (Van Laere *et al.*, 2003) ครั้งแรกยีน *IGF2* ถูกพบว่าอยู่บนโครโมโซม 2 ซึ่งสามารถอธิบายลักษณะผันแปรของมวลกล้ามเนื้อได้ 15-30% และความผันแปรของความหนาของไขมันสันหลังได้ 10-20% (Jeon *et al.*, 1999; Nezer *et al.*, 1999) แต่จากการเกิด haplotype ร่วมด้วยทำให้พบว่าที่ 250 kb บนโครโมโซมมียีน *IGF2* ในสุกร (Nezer *et al.*, 2003) ต่อมา Carrodeguas *et al.* (2005) ได้ใช้ real time PCR (RT-PCR) ในการตรวจวัดการกลายพันธุ์ของประชากรสุกร 3 กลุ่มได้แก่ ลูกผสม Iberian พันธุ์แท้

× Duroc, สายพันธุ์ทางการค้า และพ่อพันธุ์พื้นเมือง พบการกลายพันธุ์ประมาณ 80 % ในกลุ่มประชากรสายพันธุ์ทางการค้า ส่วน Iberian พันธุ์แท้เป็น homozygous G/G ทั้งหมด ขณะที่ลูกผสม Iberian เป็น heterozygous (90%) หรือ homozygous A/A (10%) ส่วน Vykoualova *et al.*, (2006) พบความผันแปรทางพันธุกรรมของยีน *IGF2* ว่ามีผลต่อการสะสมกล้ามเนื้อของสุกร โดยพบว่าอัลลีล AA ใน *IGF2*- in3-G3072A มีผลต่อความผันแปรของลักษณะการสะสมกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้น 15-30 % และมีผลต่อความหนาของให้ไขมันสันหลัง 10-20 % เมื่อเปรียบเทียบกับอัลลีล GG นอกจากนี้ Ponsuksili *et al.* (2008) พบว่าการแสดงออกของยีน *IGF2* มีความสัมพันธ์กับลักษณะการอุ้มน้ำของเนื้อสุกร (P<.009) ทั้งนี้ Yu Gao *et al.* (2007) ได้กล่าวว่าในอนาคตจีโนไทป์ของยีน *IGF2* ในสุกรจะเป็นส่วนสำคัญของโปรแกรมการผสมพันธุ์เพราะการกลายพันธุ์ของยีน *IGF2* อาจมีแนวโน้มที่จะส่งผลต่อทั้งคุณภาพและปริมาณของเนื้อ

ยีน *Protein kinase, AMP-activated, gamma 3 non-catalytic subunit (PRKAG3)* หรือ *Rendement Napole (RN)* ถูกค้นพบครั้งแรกในสุกรพันธุ์ Hampshire โดยอัลลีล RN^- มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มการสะสมปริมาณไกลโคเจนในกล้ามเนื้อสูง ซึ่งมีผลทำให้ค่าความเป็นกรดด่างและค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อต่ำลง (Lundstrom *et al.*, 1996) โดย Milan *et al.* (1996b) พบว่ายีน *Rendement Napole* อยู่บนโครโมโซมที่ 15 และพบว่าอยู่บน SSC 15q2.4-2.5 ระหว่าง flank markers SW2053 และ SW936 (Milan *et al.*, 1996a) ต่อมา Milan *et al.* (1998) ได้พบเพิ่มเติมว่ามีตำแหน่งที่แน่นอนอยู่ที่ SSC 15q2.5 โดยจุดกลายพันธุ์ของยีน *RN* หรือ *PRKAG3* ที่ตำแหน่ง (R200Q) มีความสัมพันธ์กับการสะสมปริมาณไกลโคเจนในกล้ามเนื้อของสุกร (Milan *et al.*, 2000) ลักษณะ RN^- เกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของไกลโคเจนใน sarcoplasma เช่นเดียวกับ lysosomal compartment ของ glycolytic muscle cells โดยที่ ยีน *RN* ไม่มีผลต่อค่า pH ในซากหลังการฆ่าในช่วงแรก แต่ทำให้ค่า pH ต่ำลงที่ 24 ชั่วโมงหลังการฆ่า ซึ่งมีความสัมพันธ์กับสีที่ซีดลงของเนื้อและ inferior WHC (Le Roy *et al.*, 1990) มักพบในสุกรพันธุ์แฮมเชียร์โดยมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณไกลโคเจนในกล้ามเนื้อประมาณ 70 % (Milan *et al.*, 2000) (Hedegaard *et al.*, 2004) พบว่าเอนไซม์หลายชนิดใน glycogen storage pathways มีรูปแบบของกลไกแตกต่างกัน และพบว่ากลไกของการขนส่งกลูโคสมีผลอย่างมากต่อสัตว์ที่กลายพันธุ์ ส่วน Carr *et al.* (2006) พบว่าสุกรที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous *RN+/-* มีค่าความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อต่ำกว่าสุกรที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous *RN+/+* นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการกลายพันธุ์เหล่านี้โดยมุ่งความสนใจไปที่การอธิบาย molecular mechanisms ที่มีอิทธิพลต่อ drip loss ในเนื้อสุกร (Otto *et al.*, 2007)

ยีน *Ryanodine receptor* (*RYR*) หรือ stress porcine syndrome หรือ malignant hypothermia syndrome อยู่บนโครโมโซมที่ 6 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการควบคุมการนำแคลเซียมเข้าและออกเซลล์ (calcium-releasing channel) เมื่อมีการกลายพันธุ์ของเบสในตำแหน่งที่ 1,843 จาก cytosine (C) เป็น thiamine (T) จะมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจากกรดอะมิโน arginine เป็น cysteine ทำให้สุกรไวต่อความเครียดและทำให้เกิดลักษณะคุณภาพเนื้อที่เป็น PSE ซึ่งจะทำให้เนื้อมีคุณภาพต่ำ คือมีลักษณะเนื้อซีด เหลว และไม่คงรูป แต่ในทางตรงกันข้ามจะทำให้สุกรมีสัดส่วนของเนื้อแดงเพิ่มมากขึ้นและมีไขมันสันหลังลดลง (Urban *et al.*, 2002) โดย Fujii *et al.* (1991) พบจุดกลายพันธุ์ (Single nucleotide polymorphism; SNP) ที่ตำแหน่ง 1,843 C>T เป็นสาเหตุของการสะสมแคลเซียมในกล้ามเนื้อสูง ส่งผลต่อการเร่งกระบวนการ glycolysis และทำให้ความเป็นกรดด่างในกล้ามเนื้อลดต่ำลงอย่างรวดเร็ว เป็นผลทำให้เนื้อเกิดลักษณะสูญเสียความสามารถในการอุ้มน้ำหรือเรียกลักษณะเนื้อดังกล่าวว่า เนื้อซีด เละ และฉ่ำน้ำ (Pale soft exudative; PSE) จึงทำให้เทคนิค PCR ถูกนำมาใช้ในการขยายชิ้นส่วนของ DNA ซึ่งครอบคลุมบริเวณที่กลายพันธุ์ของยีน (Otsu *et al.* 1992 ; O'Brien *et al.* 1993) ยีน *RYR* มีบทบาทต่อการควบคุมลักษณะความไวต่อความเครียดของสุกร (stress susceptible pig) ซึ่งก่อให้สุกรเกิดอาการตื่นเต้นสุดขีด (extreme excite) ต่อสิ่งกระตุ้นต่างๆ โรคนี้เป็นโรคทางพันธุกรรมสามารถถ่ายทอดจากแม่สู่ลูกได้ สุกรที่เป็นโรคนี้มียีนด้อย (recessive gene) ที่เรียกว่า halothane พบว่าสุกรที่มีกล้ามเนื้อหนามักมียีนดังกล่าวมากกว่าสุกรที่มีกล้ามเนื้อเรียวเล็ก สุกรพันธุ์ Pietrian และBelgium Landrace มีอุบัติการณ์ของโรคนี้สูงที่สุด ส่วนพันธุ์ Duroc และ Large white มีอุบัติการณ์ของโรคน้อยที่สุด ลักษณะอาการของโรค คือ กล้ามเนื้อและหางสั่น หายใจขัดสังเกตได้ชัดเจนอุณหภูมิร่างกายเพิ่มอย่างรวดเร็ว ผิวหนังแดงคล้ำ (cyanosis) ร่างกายมีสภาพเป็นกรด (acidosis) สลบ (collapse) และตายโดยกล้ามเนื้อแข็งทื่อ (rigor mortis) ภายใน 5 นาที ไม่มีรอยโรคเฉพาะ พบอวัยวะภายในมีเลือดคั่งมีน้ำในปอด กล้ามเนื้อแข็งทื่อ (rigor mortis) ต่อมาภายใน 15 – 30 นาที กล้ามเนื้อมีสีซีด นุ่มเหลวเป็นน้ำ (โชคชัย และคณะ 2549) ซึ่งเกิดจาก malignant hyperthermia (MH) เป็นพันธุกรรมลักษณะด้อยของโรคกล้ามเนื้อ (recessive myopathy หรือ pharmacogenic disorder) ที่สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งในมนุษย์และสุกร (Fujii *et al.* 1991 ; Otsu *et al.* 1992;MacLennan and Phillips , 1992 ; O'Brien *et al.* 1993; Bjurstrom *et al.* 1995) หรือในม้า สุนัขและแมว (Roberge *et al.* 1997) โดยการเหนี่ยวนำด้วยแก๊ซฮาโลเธน หรือ anesthetic depolarizing agents ในสุกรเรามักเรียก MH ว่าเป็น porcine stress syndrome (PSS) ซึ่งส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากความเครียดทั้งจากสภาพอากาศร้อน การจับบังคับและการขนส่ง (Carlsten *et al.* 1994; Moon and Smith. 1996) สุกรอาจตายทันทีและเกิดการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อลายอย่างรวดเร็ว นำผลไปสู่การเกิดเนื้อ PSE (pale, soft, exudative) ในเวลาต่อมา (Klont . Lambooy , 1995 ; Roberge *et al.* 1997) ดังนั้นในการคัดเลือก

พันธุ์เพื่อเน้นคุณภาพซากมีแนวโน้มว่าเป็นสาเหตุของการเกิด MH หรือ Hal gene (ryanodine receptor gene) (Fujii *et al.* 1991 ; MacLennan and Phillips. 1992 ; Geers *et al.* 1996) MH และ PSS คือ สาเหตุสำคัญของการสูญเสียทางเศรษฐกิจในอุตสาหกรรมการผลิตสุกร (MacLennan and Phillips. 1992 ; Lockley *et al.* 1996) ซึ่งวิธีการหลายอย่างที่ถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบสุกรที่อ่อนแอต่อสภาพเครียด เช่น การทดสอบฮาโลเธน, in-vitro contractive tests และ blood marker technology แต่วิธีการเหล่านี้ดูเหมือนว่าไม่อาจแยกสุกรพาหะ (N/n) ได้ จากรายงานของ Van Laack *et al.* (1993) ที่ได้ทำการศึกษาสุกรที่มีจีโนไทป์ NN (สุกรที่ปกติ) Nn (สุกรที่เป็นพาหะ) และ nn (สุกรที่มีความไวต่อความเครียด) พบว่าค่าความสามารถใน การอุ้มน้ำของเนื้อ (Water holding capacity; WHC) และค่าการสูญเสียน้ำขณะเก็บ (drip loss) ในสุกรที่มีจีโนไทป์ nn มีค่าสูงกว่าจีโนไทป์ NN และ Nn ตามลำดับ (WHC : 74, 44, 36 ตามลำดับ และ drip loss : 3.8, 2.3, 1.8 ตามลำดับ) แต่ค่าความเป็นกรดเป็นด่างหลังการตายของสุกรทั้ง 3 จีโนไทป์ มีค่าไม่แตกต่างกัน (5.38, 5.47 และ 5.40 ตามลำดับ) ต่อมา Leach *et al.* (1996) ได้ทำการศึกษาสุกรที่มีจีโนไทป์แบบ NN พบว่าภายหลังการตายของสุกรนาน 45 นาที และ 24 ชั่วโมง มีค่าความเป็นกรดเป็นด่างสูงกว่าจีโนไทป์แบบ Nn อย่างมีนัยสำคัญ แต่มีเปอร์เซ็นต์ของค่า drip loss ต่ำกว่า (3.4 และ 5.2 ตามลำดับ)โดย Allison *et al.* (2005) พบว่าเนื้อสุกรที่มีความไวต่อความเครียด (halothane test) มีลักษณะ drip loss สูงกว่ากลุ่มที่มีความต้านทานต่อความเครียด ($P < 0.05$; n = 71) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hamilton *et al.* (2000) ที่พบว่าสุกรที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous (Nn) มีอัตราการสูญเสียน้ำในเนื้อสูงกว่าสุกรที่มีจีโนไทป์แบบ homozygous NN (wild type) ส่วน Pommier and Houde (1993), van Laack *et al.* (1993) และ Allison *et al.* (2005) รายงานสอดคล้องกันว่า ยีน *RYR* สามารถจำแนกจีโนไทป์ของสุกรได้ 3 รูปแบบ คือ CC (NN), CT (Nn) และ TT (nn) ต่อคุณภาพของเนื้อจากการวัดที่กล้ามเนื้อสันนอก (*Longissimus dorsi*) และกล้ามเนื้อสะโพก (*Semimembranosus*) โดยพบว่าหลังจากการฆ่าสุกรที่มีจีโนไทป์แบบ TT มีค่า pH ที่ 45 นาที ต่ำและมีค่าความสว่างของสีเนื้อ (L* value) ที่ 48 ชั่วโมง หลังจากฆ่าสูงกว่าสุกรที่มีจีโนไทป์แบบ CC (NN) และ CT(Nn) แต่มีค่าการสูญเสียน้ำขณะเก็บรักษาที่ 24 ชั่วโมง หลังจากการฆ่าของสุกรที่มีจีโนไทป์เป็น TT ในกล้ามเนื้อทั้ง 2 ชนิดมีค่าต่ำกว่าสุกรที่มีจีโนไทป์เป็น CC (NN) และ CT (Nn) จากการรายงานของ Fisher *et al.* (2000) ที่ทำการศึกษาสุกรลูกพันธุ์ผสม แลนด์เรซ × ลาร์จไวท์ พบว่าในสุกรที่มีจีโนไทป์แบบ nn มีค่าการสูญเสียน้ำขณะเก็บรักษาสูงกว่าสุกรที่ที่มี จีโนไทป์ Nn และ NN (3.67%, 2.30% และ 1.53% ตามลำดับ) และจากการรายงานของ Fàbrega *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาในสุกรลูกผสมพ่อพันธุ์จากสุกรเพียเทรน และลูกผสมลาร์จไวท์ × เพียเทรน ซึ่งมีจีโนไทป์เป็น heterozygous แบบ Nn ผสมกับแม่พันธุ์ลูกผสมแลนด์เรซ × ลาร์จไวท์ ที่มีจีโนไทป์เป็น homozygous แบบ NN พบว่าสุกรที่เป็นพาหะ (Nn) มีค่าความสว่างของสีเนื้อ ค่าการนำไฟฟ้า และ

ค่าการสูญเสียน้ำขณะเก็บรักษามากกว่าสุกรที่ปกติ (NN) (L* 49.5 และ 47.8, drip loss 15.5 และ 11.0 g/kg ตามลำดับ) แต่ไม่พบความแตกต่างของค่า ความเป็นกรดเป็นด่างในสุกรทั้ง 2 กลุ่ม

นอกจากนี้ Dick *et al.* (2007) ค้นหายีนที่มีศักยภาพต่อการควบคุมลักษณะความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อของสุกรสายพันธุ์ทางการค้า โดยใช้เทคนิค 2-dimensional electrophoresis (2-DE) พบเครื่องหมายโมเลกุลโปรตีนที่แสดงความสัมพันธ์กับลักษณะความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อ คือ creatine kinase, Desmin และ transcription activator (SWI/SNF related matrix-associated actin dependent regulator of chromatin subfamily A member1, SNF2L1) ต่อมา Ponsuksili *et al.* (2008) ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อสุกร โดยใช้ เทคนิค microarray และquantitative real-time RT-PCR พบยีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน ได้แก่ vitronectin (*VTN*), AMBP protein (*AMBP*), serpin peptidase inhibitor, clade A (α-1-antiproteinase, antitrypsin): member 1 (*SERPINA1*), Cytochrome P450, family 2, subfamily C (*CYP2C*), Cytochrome P450, family 3, subfamily A (*CYP3A*), tyrosine kinase-binding protein (*TYROBP*), AHNAK nucleoprotein (*AHNAK*), insulin-like growth factor 2 (*IGF2*) และ Zyxin (*ZYX*)

อย่างไรก็ตามในการวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาจำเพาะเจาะจงที่ยีน *Ryanodine receptor (RYR), Rendement Napole (RN), Insulin-like growth factor 2 (IGF2)* และ *Leptin (LEP)* เนื่องจากเป็นยีนสำคัญที่ส่งผลต่อ drip loss อย่างมาก เพื่อให้ได้ข้อมูลสำหรับการค้นหา และพัฒนาเครื่องหมายโมเลกุลดีเอ็นเอที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะการสูญเสียน้ำของเนื้อในสุกรสายพันธุ์ทางการค้าต่อไป