วารสารแก่นเกษตร THAIJO

Content List Available at ThaiJo

Khon Kaen Agriculture Journal

Journal Home Page : https://li01.tci-thaijo.org/index.php/agkasetkaj

ความหลากหลายของรูปแบบยีน *ADRB3*, *FABP3*, *IGF2* และยีน *SCD* ในสุกรพันธุ์กระโดน

Polymorphisms of *ADRB3*, *FABP3*, *IGF2*, and *SCD* genes in Kradon Pig

ทองสา บัวสุข[1]*, เกศรา อำพาภรณ์[2] และ รัตติกาล สุวรรณสิงห์[2]

Thongsa Buasook[1]*, Kessara Ampaporn[2] and Rattikan Suwannasing[2]

[1] *ศูนย์ศึกษาค้นคว้า วิจัยและห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002*
[1] *Research Center and Central Laboratory Faculty of Agriculture, khon kean university, Khon Kaen 40002*
[2] *คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร จ.สกลนคร 47160*
[2] *Faculty of Natural Resources, Rajamangala University of Technology Isan Sakon Nakon Campus, Sakon Nakon 47160*

บทคัดย่อ: เนื้อสุกรพื้นเมืองมีรสชาติดีกว่าเนื้อสุกรพันธุ์การค้า จึงได้รับความนิยมและเป็นที่ต้องการของผู้บริโภคในท้องถิ่นต่างๆ แต่สุกรพื้นเมืองมีอัตราการเจริญเติบโตช้าและซากมีไขมันมาก ซึ่งองค์ประกอบไขมันและปริมาณไขมันแทรกในกล้ามเนื้อมีความสัมพันธ์กับคุณภาพเนื้อและเปอร์เซ็นต์ซากในสุกร การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบจีโนไทป์ของยีน *ADRB3*, *FABP3*, *IGF2* และยีน *SCD* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP และวิเคราะห์หาค่าความถี่จีโนไทป์ ความถี่อัลลีล และทดสอบ Hardy–Weinberg Equilibrium (HWE) ด้วย Chi-square test (χ^2-test) ในสุกรพันธุ์กระโดน ผลการศึกษาพบความหลากหลายของรูปแบบจีโนไทป์ 3 รูปแบบในยีน *ADRB3*, *FABP3* และยีน *IGF2* ส่วนยีน *SCD* พบจีโนไทป์เพียงรูปแบบเดียว (CT) เมื่อวิเคราะห์ค่าความถี่จีโนไทป์ของยีน *ADRB3* พบมีค่าความถี่จีโนไทป์ AG เท่ากับ 0.481 สูงกว่าจีโนไทป์ GG และ AA มีค่าเท่ากับ 0.319 และ 0.198 ตามลำดับ สำหรับยีน *FABP3* พบค่าความถี่จีโนไทป์ HH, Hh และ hh มีค่าเท่ากับ 0.380, 0.391 และ 0.228 ตามลำดับ ส่วนยีน *IGF2* พบความถี่จีโนไทป์ GG และ CG สูงกว่าจีโนไทป์ CC และสุกรพันธุ์กระโดนมีอัลลีล G ของยีน *IGF2* เป็นอัลลีลพื้นฐาน เมื่อทดสอบภาวะสมดุล HWE ของยีน พบว่ายีน *ADRB3*, *FABP3* และยีน *IGF2* อยู่ในภาวะสมดุลตามกฎ Hardy–Weinberg Equilibrium ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *ADRB3*, *FABP3* และยีน *IGF2* ที่พบนี้ไปหาความสัมพันธ์กับลักษณะคุณภาพซากและคุณภาพเนื้อในสุกร เพื่อพัฒนาเครื่องหมายพันธุกรรมในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์สุกรพันธุ์กระโดนในอนาคตต่อไปได้

คำสำคัญ: ยีน *ADRB3*; ยีน *FABP3*; ยีน *IGF2*; ยีน *SCD*; สุกรพันธุ์กระโดน

ABSTRACT: Meat of native pig offers better taste than the commercial ones. Thus, raising native pig has become popular and desired by consumers. However, the pigs have a low growth rate and fatty carcass. Intramuscular fat of the pigs and its compositions plays an important role in meat quality and carcass percentage. The objective of this research was to study the genotypes of *ADRB3*, *FABP3*, *IGF2*, and *SCD* genes using PCR-RFLP. The analysis of genotypes frequency, allele frequency, and Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was tested with the Chi-square test (χ^2-test) in Kradon pigs. The results showed polymorphic had three genotypes in the *ADRB3*, *FABP3*, *IGF2* genes except the *SCD* gene was found only one genotype (CT). Analysis for the genotype frequency of the *ADRB3* gene indicated that the genotype frequency of the AG was 0.481, which was higher than the GG and AA (0.319 and 0.198, respectively). For the *FABP3* gene, the frequency of genotypes of HH, Hh, and hh were 0.380, 0.391, and 0.228, respectively. For the *IGF2* gene the GG and CG genotypes were higher than the CC genotypes, and Kradon pigs have G

* Corresponding author: thonbu@kku.ac.th

Received: date; May 17, 2020 Accepted: date; October 12, 2021 Published: date April 15, 2021

allele of *IGF2* as a basal allele. The HWE test showed that the genes of *ADRB3*, *FABP3*, and *IGF2* were in equilibrium according to the rules of Hardy- Weinberg equilibrium. Therefore, it is possible to use genotypes of the *ADRB3*, *FABP3*, and *IGF2* genes in this study to find relationships with the carcass quality and meat quality in pigs to develop the genetic markers for the selection and genetic improvement of Kradon pigs in the future.
Keywords: *ADRB3* gene; *FABP3* gene; *IGF2* gene*; SCD* gene; Kradon Pig

บทนำ

เนื้อสุกรพื้นเมืองเป็นที่ต้องการและได้รับความนิยมซื้อจากผู้บริโภคในท้องถิ่นเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากเนื้อมีรสชาติดีกว่าเนื้อสุกรพันธุ์การค้า (Vasupen, 2007) อย่างไรก็ตามสุกรพื้นเมืองไม่เหมาะสมในการผลิตเพื่อการค้าเนื่องจากมีข้อด้อยด้านการเจริญเติบโตช้า และซากมีไขมันมาก (จรัญ, 2526) จากการศึกษาของ จรัญ (2524) เปรียบเทียบลักษณะซากสุกรสายพันธุ์ยุโรปและพันธุ์พื้นเมือง พบว่าสุกรพันธุ์ไหหลำ สุกรพันธุ์ควาย สุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ และสุกรพันธุ์ดูร็อค มีเปอร์เซ็นต์เนื้อเท่ากับ 40.60%, 41.30%, 45.70% และ 44.80% ตามลำดับ สูงกว่าในสุกรพันธุ์ราดหรือสุกรพันธุ์กระโดน ที่มีเปอร์เซ็นต์เนื้อเท่ากับ 32.40% และมีเปอร์เซ็นต์ไขมันเท่ากับ 50% ซึ่งเปอร์เซ็นต์ไขมันของสุกรพันธุ์กระโดนสูงกว่าในสุกรพันธุ์ไหหลำ สุกรพันธุ์ควาย สุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ และสุกรพันธุ์ดูร็อค ที่มีเปอร์เซ็นต์ไขมันเท่ากับ 39.40%, 36.50%, 37.80% และ 37.80% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามความแตกต่างด้านสายพันธุ์ของสุกรพื้นเมืองมีอิทธิต่อความหนาของไขมันสันหลัง วินัย และผกาพรรณ (2543) รายงานว่าสุกรพันธุ์กระโดนมีความหนาของไขมันสันหลัง 6.1 เซนติเมตร ซึ่งมากกว่าสุกรพันธุ์ไหหนานและสุกรพันธุ์ควายที่มีความหนาของไขมันสันหลังเท่ากับ 4.9 และ 4.7 เซนติเมตร และจตุพร (2551) พบว่าสุกรพื้นเมืองมีไขมันสันหลังและความหนาหนังมากกว่าสุกรขุน ส่วนไขมันแทรกไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติในสุกรพื้นเมืองและสุกรขุน ไขมันแทรกในกล้ามเนื้อและองค์ประกอบของกรดไขมันมีผลเชิงบวกต่อลักษณะคุณภาพเนื้อสุกร เช่น สีเนื้อ รสชาติ กลิ่น ความนุ่ม และระดับเนื้อสัมผัสของเนื้อสุกร ซึ่งองค์ประกอบของกรดไขมันในเนื้อสุกรมีผลต่อสุขภาพของผู้บริโภค (Fortin et al., 2005; Zhang et al., 2009; Reardon et al., 2010) องค์ประกอบของกรดไขมันได้รับอิทธิพลจากสิ่งแวดล้อม เช่น อาหาร เพศ อายุ และจากพันธุกรรม ปัจจุบันเทคโนโลยีด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลสามารถตรวจสอบความแตกต่างของรูปแบบพันธุกรรมที่ส่งผลกระทบต่อลักษณะคุณภาพเนื้อและซากในสุกร และสามารถพัฒนาเป็นเครื่องหมายพันธุกรรมในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์สุกรด้วย Marker or Gene-Assisted Selection (MAS or GAS) ซึ่งเป็นวิธีที่ได้ความนิยมและมีประสิทธิภาพสูง (Dekkers, 2004; Ranjbari et al., 2012) จากการตรวจเอกสารพบเครื่องหมายพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจโดยเฉพาะคุณภาพเนื้อและซากในสุกรสายพันธุ์การค้าและสุกรลูกผสมในต่างประเทศ เช่น ยีน Beta-3-adrenergic receptor gene (*ADRB3*) (Xue et al., 2015) ยีน Heart fatty acid binding protein (*H-FABP* หรือ *FABP3*) (Urban et al., 2016) ยีน Insulin-like growth factors-II (*IGF2*) (Vykoukalova et al., 2006) และยีน Stearoyl-CoA desaturase (*SCD*) (Lim et al., 2015) เป็นต้น

ยีน *ADRB3* เป็นตัวรับจับคู่กับ G-protein เป็นหนึ่งในกลุ่ม R7G (Cieslak et al., 2009) มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการเมตาโบลิซึมของพลังงานในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ในสุกรพบอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 15q13-14 (Nowacka-Woszuk et al., 2008) ยีน *ADRB3* ประกอบด้วย 5’UTR ขนาด 0.4 kb, Exon 1 ขนาด 1.2 kb, Exon 2 ขนาด 22-28 bp, Intron ขนาด 0.7 kb และ 3’ UTR ขนาด 0.3 kb จากการศึกษาจุดกลายพันธุ์ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *ADRB3* ในสุกรพื้นเมือง สุกรสายพันธุ์การค้าและสุกรป่า พบตำแหน่งกลายพันธุ์ 47 ตำแหน่งบนยีน *ADRB3* โดยพบการกลายพันธุ์บริเวณที่เป็นส่วนของยีน (coding regions) โดยเกิดการแทนที่กันของลำดับนิวคลีโอไทด์ 13 ตำแหน่งบริเวณ Exon 1 ส่วนบริเวณ Exon 2 พบมีการเพิ่มเข้ามาของนิวคลีโอไทด์ 1 ตำแหน่ง สำหรับบริเวณที่ไม่ใช่ส่วนของยีน (non-coding regions) มีการแทนที่กันของนิวคลีโอไทด์ 17 ตำแหน่ง และการเพิ่มขึ้นหรือการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์บริเวณ 5’UTR มี 2 ตำแหน่ง ส่วนบริเวณ Intron มี 8 ตำแหน่ง และอีก 6 ตำแหน่ง ในบริเวณ 3’UTR ของยีน *ADRB3* (Tanaka et al., 2007; Chikun et al., 2008) ซึ่งความผันแปรของเบส G/A ตำแหน่ง c.1192 ในยีน *ADRB3* มีความเกี่ยวข้องกับกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ 1 คู่ และกรดไขมัน

ไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 คู่ ในกล้ามเนื้อส่วน *Longissimus dorsi* ของสุกร (Xue et al., 2015) ไขมันแทรกในกล้ามเนื้อและค่าสี b* (meat yellowness) (Wang et al., 2013)

ยีน *FABP*3 เป็นกลุ่มโปรตีนขนาด 15 kDa มีบทบาทสำคัญในการขนส่งกรดไขมันในระหว่างขบวนการสังเคราะห์กรดไขมัน (adipogenesis) และการสะสมไขมันในสัตว์ (Samulin et al., 2008; Tramontana et al., 2008) ในสุกร ยีน *FABP*3 ตั้งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 จากการศึกษาจุดกลายพันธุ์ตำแหน่ง g.1321G>C บริเวณ 5' UTR ของยีน *FABP*3/*Hinf*I พบสุกรที่มีรูปแบบจีโนไทป์ HH มีค่าไขมันแทรกในกล้ามเนื้อสูงกว่ารูปแบบจีโนไทป์ Hh และ hh ในสุกรพันธุ์แท้เบิร์กเชีย (Lee et al., 2010) เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Urban et al. (2016) ศึกษารูปแบบจีโนไทป์ของยีน *FABP*3 บริเวณ 5' UTR ซึ่งเกิดการเปลี่ยนแปลงระหว่างเบส G กับเบส C ที่ตำแหน่ง g.1321G>C พบรูปแบบจีโนไทป์ 2 รูปแบบ (HH และ Hh) และรูปแบบของยีน *FABP*3 มีความสัมพันธ์กับกรดไขมัน โดยรูปแบบจีโนไทป์ Hh จะมีเปอร์เซ็นต์กรดไขมัน Palmitic, Stearic และ Linoleic ที่สูงกว่ารูปแบบจีโนไทป์ HH ในสุกรพันธุ์ Czech Large White

ยีน *IGF*2 ตั้งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 2 (SSC2) การกลายพันธุ์ตำแหน่ง g.G3072A บริเวณ Intron 3 ของยีน *IGF*2 มีความสัมพันธ์กับการพัฒนาของกล้ามเนื้อและการสะสมไขมันในสุกร (Van Laere et al., 2003) เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Vykoukalova et al. (2006) พบการกลายพันธุ์ของยีน *IGF*2 บริเวณ Intron 3 ตำแหน่ง g.307A>G และบริเวณ Intron 7 ตำแหน่ง g.162C>G มีผลต่อความหนาไขมันสันหลังและเนื้อแดงในสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์และสุกรพันธุ์แลนด์เลซ ในสุกรลูกผสมและสุกรพื้นเมืองก็ให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน โดยความผันแปรของยีน *IGF*2 บริเวณ Intron 7 ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 162 (*IGF*2-Intron7-162G>C) ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงระหว่างเบส G กับ C ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและขนาดร่างกายของสุกร (แพรว และคณะ, 2552) อัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน อัตราแลกเนื้อ ความหนาของไขมันสันหลัง และพื้นที่หน้าตัดเนื้อสัน (ธวัชชัย และประภาส, 2560) ความหนาไขมันสันหลังที่ตำแหน่งซี่โครงซี่ที่ 10 และซี่สุดท้าย (เกศรา และคณะ, 2561) นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของเบส G/C ในตำแหน่ง Intron 8 ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนส่งผลต่อลักษณะไขมันและซากในสุกร (Liu et al., 2003)

ยีน *SCD* อยู่บนโครโมโซมที่ 14 (SSC14q27) ประกอบด้วย 3'UTR, 5'UTR และ 6 Exon (Ren et al., 2003) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ใน endoplasmic reticulum และเยื่อหุ้มเซลล์ มีความสำคัญต่อการรักษาภาวะสมดุลโดยการเติม cis-พันธะคู่ ในตำแหน่ง Delta9 ของซับสเตรทกรดไขมันในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว (Enoch et al., 1976) ซึ่งการเกิดจุดกลายพันธุ์ในตำแหน่งโปรโมเตอร์มีความเกี่ยวข้องกับกรดไขมันในสัตว์ จากการศึกษาของ Uemoto et al. (2012) รายงานว่าการผันแปรของเบส T/C ตำแหน่ง g.353T/C และตำแหน่ง g.233T/C ในยีน *SCD* มีความสัมพันธ์กับกรดไขมัน palmitic acid (C16:0), palmitoleic acid (C16:1), stearic acid (C18:0), และ oleic acid (C18:1) ของไขมันแทรกในกล้ามเนื้อ แต่ไม่พบความสัมพันธ์ของจุดกลายพันธุ์กับกรดไขมันอิ่มตัว กรดไขมันไม่อิ่มตัว กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ 1 คู่ และกรดไขมัน arachidic acid (C20:0) ของไขมันใต้ผิวหนังชั้นนอกและชั้นในของสุกรพันธุ์ดูร็อค (Uemoto et al., 2012) อย่างไรก็ตามในสุกรลูกผสมดูร็อค การผันแปรของเบสบริเวณโปรโมเตอร์ของยีน *SCD* ส่งผลต่อองค์ประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่ 1 คู่ ของไขมันแทรกในกล้ามเนื้อและไขมันใต้ผิวหนังของสุกรลูกผสมดูร็อค (Estany et al., 2014; Henriquez-Rodriguez et al., 2015) จากการตรวจเอกสารจะเห็นว่ายีนที่กล่าวมามีอิทธิพลต่อลักษณะคุณภาพเนื้อ ซากและไขมันในสุกร ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้จึงเพื่อตรวจหารูปแบบจีโนไทป์ของยีน *ADRB*3, *FABP*3, *IGF*2 และยีน *SCD* วิเคราะห์หาความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีล และทดสอบ Hardy–Weinberg Equilibrium ด้วยค่า Chi-square (χ^2-test) ในสุกรพันธุ์กระโดน เพื่อตรวจสอบโครงสร้างทางพันธุกรรมของกลุ่มยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับลักษณะคุณภาพเนื้อ คุณภาพซากและไขมันในสุกรพันธุ์กระโดน ซึ่งจะใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์สุกรต่อไป

วิธีการศึกษา

เก็บตัวอย่างเลือดและสกัดดีเอ็นเอสุกรพันธุ์กระโดน

เก็บตัวอย่างเลือดสุกรพันธุ์กระโดนจำนวน 94 ตัวอย่าง เพื่อตรวจสอบรูปแบบยีน *ADRB*3, *FABP*3, *IGF*2 และยีน *SCD* โดยใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 18G x 1 นิ้ว เจาะเก็บเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณลำคอ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร ที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด 0.5M EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic acid) นำหลอดตัวอย่างเลือดไปปั่นเหวี่ยง 4,200 rpm นาน 5 นาที เพื่อตกตะกอนเม็ดเลือดขาว (buffy coat) ล้างเม็ดเลือดขาวโดยดูดตัวอย่างเม็ดเลือดขาว 50 ไมโครลิตร ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มี 0.9% NaCl ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร ทำการกลับหลอดเบาๆให้สารละลายเข้ากันดี นำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วเทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำอีกครั้ง) สกัดดีเอ็นเอจากเม็ดเลือดขาวโดยใช้วิธี Guanidine hydrochloride ดัดแปลงจาก Goodwin et al. (2007) รายละเอียดดังนี้ เติม 5M Guanidine HCl ปริมาตร 625 ไมโครลิตร, 20% SDS ปริมาตร 70 ไมโครลิตร, 7.5M Na-acetate ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และ 1% proteinase K (1mg/ml) ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ผสมให้สารเข้ากันดี นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสใส่หลอดใหม่ เติม Absolute isopropanol ปริมาตร 600 ไมโครลิตร กลับหลอดเบาๆจนเห็นตะกอนดีเอ็นเอ นำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm นาน 5 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย 75% Ethanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 10,000 rpm นาน 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง (ทำซ้ำอีกครั้ง) ผึ่งตะกอนให้แห้งนาน 30 นาที เติม TE buffer ปริมาตร 20 µl นำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน ตรวจสอบคุณภาพและความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่องสเปคโตโฟโตมิเตอร์ (Nano-Drop2000,Wilmington, Delaware USA) ปรับความเข้มข้นของจีโนมิกส์ดีเอ็นเอให้เป็น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส

การตรวจรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *ADRB*3, *FABP*3, *IGF*2 และยีน *SCD* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP

นำจีโนมิกซ์ดีเอ็นเอของสุกรพันธุ์กระโดนไปเพิ่มชิ้นส่วนยีน *ADRB*3, *FABP*3, *IGF*2 และยีน *SCD* ด้วยเทคนิค PCR ในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วย sterile water ปริมาตร 4.1 ไมโครลิตร,10X PCR-buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, $MgCl_2$ ปริมาตร 0.8 ไมโครลิตร, dNTPs (1.0 mM/each) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, Primer forward และ Primer reverse **(Table 1)** ปริมาตรอย่างละ 1 ไมโครลิตร, 5 U/µl Taq DNA Polymerase (Thermo scientific) ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร เติมสารละลายทั้งหมดลงในหลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร จากนั้นเติมดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่มีความเข้มข้น 50 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร (ปริมาตรสุดท้ายรวม 10 ไมโครลิตร) ตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง Thermal cycle (Biometra, English Inc.) โดยเริ่ม initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 30 รอบ ตั้งค่าการทำงานของโปรแกรมโดย denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที Primer annealing **(Table 1)** เป็นเวลา 30 วินาที Primer extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 วินาที และ Final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที หลังจากสิ้นสุดปฏิกิริยาตรวจสอบชิ้นส่วนยีนด้วย 2% agarose gel electrophoresis เมื่อได้ชิ้นส่วนยีนตามต้องการแล้วทำการย่อยชิ้นส่วนยีน *ADRB*3, *FABP*3, *IGF*2 และยีน *SCD* ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ **(Table 1)** ตรวจรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *IGF*2 ด้วย 2% agarose gel electrophoresis และตรวจรูปแบบยีน *ADRB*3, *FABP*3 และยีน *SCD* ด้วย 12 % Polyacrylamide gel electrophoresis บันทึกภาพแถบ DNA ที่เกิดขึ้นภายใต้แสง UV กำหนดรูปแบบจีโนไทป์ตามการศึกษาที่ผ่านมา

Table 1 Sequence primers and PCR-RFLP conditions to detect genetic variation of *ADRB3*, *FABP3*, *IGF2* and *SCD* genes in Kradon pigs

Genes[1]	Genbank Accession no. /SNPs	Forward / Reverse primer 5'-sequence-3'	Tm[2]	PCR sizes (bp)	Restriction enzymes	PCR-RFLP pattern (bp)
ADRB3	ENSSSCT00000017229 / c.1192G>A (Exon1)	CGTTCAACCCGCTCATCTACTGC / GGTTCCCTACTCTGTGCCCGTCTT	66	315	*Hinf*I	G = 172, 143 A = 315
FABP3	X98558 / g.1321 G>C (5'UTR region)	GGACCCAAGATGCCTACGCCG / CTGCAGCTTTGACCAAGAGG	62	693	*Taq*I	H = 339, 172, 98, 59 h = 339, 231, 98, 25
IGF2	X56094 /G162C (Intron 7)	CACAGCAGGTGCTCCATCGG / GACAGGCTGTCATCCTGTGGG	62	336	*Bcn*I	G = 308, 28 C = 208, 100, 28
SCD	AY487830.1/ c.2041T>C (3'UTR on Exon 6)	AGCTTCCTCTCCCACAGTCA / GTCTTGGCCTCTTGTGCTTC	62	425	*Msp*I	T = 253, 172 C = 220, 172, 33

[1] *ADRB3* (Xue et al., 2015), *FABP3* (Urban et al., 2016), *IGF2* (Vykoukalova et al., 2006) and *SCD* (Lim et al., 2015) [2] Annealing temperatures

การวิเคราะห์ข้อมูลสถิติ

วิเคราะห์หาความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีล ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้ที่ได้จากการสังเกต (Observed Heterozygosity : H_O) ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้คาดหมาย (Expected Heterozygosity : H_E) ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้คาดหมายที่ไม่มีอคติ (Unbiased Expected Heterozygosity : H_U) ตามวิธีการของ Nei (1978) ทดสอบ Hardy–Weinberg Equilibrium ด้วย Chi-square test (χ^2-test) (Falconer and Mackay,1996) และวิเคราะห์ค่า Polymorphic information content (PIC) ตามวิธีการของ Botstein et al. (1980) ของยีน *ADRB3*, *FABP3*, *IGF2* และ *SCD* ในสุกรพันธุ์กระโดน

ผลการศึกษาและวิจารณ์

รูปแบบจีโนไทป์ของยีน *ADRB3*, *FABP3*, *IGF2* และยีน *SCD*

จากการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนและย่อยชิ้นส่วนยีนด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ และตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ของยีนที่นำมาศึกษา พบว่าชิ้นส่วนยีนของทุกยีนมีขนาดตรงตามรายงานที่อ้างอิง และพบความหลากหลายของรูปแบบยีน *ADRB3*, *FABP3* และยีน *IGF2* ในสุกรพันธุ์กระโดนจำนวน 3 รูปแบบ โดยยีน *ADRB3* พบรูปแบบจีโนไทป์ AA, AG และ GG ยีน *FABP3* พบรูปแบบจีโนไทป์ HH, Hh และ hh และยีน *IGF2* พบรูปแบบจีโนไทป์ CC, CG และ GG ส่วนยีน *SCD* พบเพียงรูปแบบเดียว คือ จีโนไทป์ CT แสดงดัง **Figure 1**

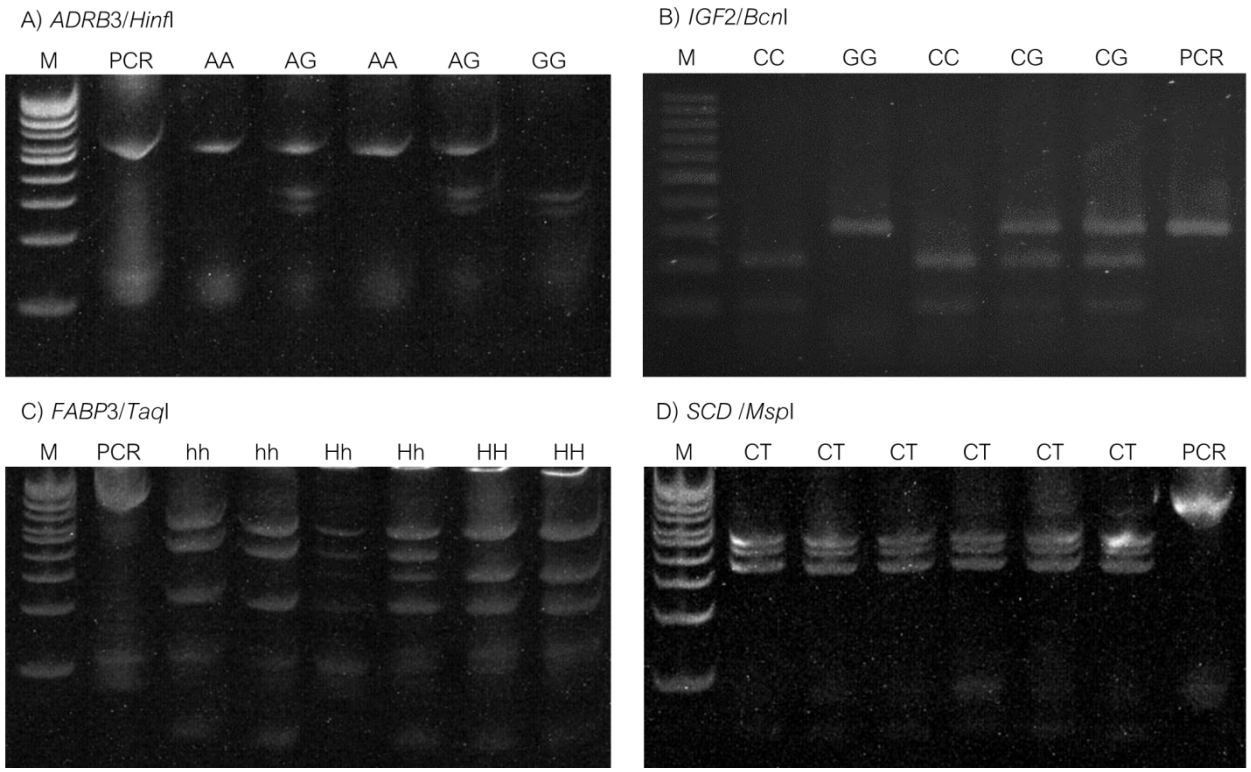

Figure 1 Pattern of A) *ADRB3*/*Hinf*I, B) *IGF2*/*Bcn*I, C) *FABP3*/*Taq*I, and D) *SCD*/*Msp*I genes in pig Kradon. (M = 50 bp DNA Ladder for A), C) and D), M = 100 bp DNA Ladder for B), and PCR = PCR Product of gene.)

ความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของยีน *ADRB3*, *FABP3*, *IGF2* และยีน *SCD*

เมื่อนำรูปแบบจีโนไทป์ในแต่ละยีนมาหาค่าความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีล ผลวิเคราะห์ค่าความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีลของยีน *ADRB3*, *FABP3*, *IGF2* และยีน *SCD* ที่นำมาศึกษาแสดงดัง **Table 2** เมื่อพิจารณาค่าความถี่จีโนไทป์ของยีน *ADRB3* ในสุกรพันธุ์กระโดน พบค่าความถี่จีโนไทป์ AG เท่ากับ 0.484 สูงกว่ารูปแบบจีโนไทป์ GG (0.319) และ AA (0.198) โครงสร้างพันธุกรรมของยีน *ADRB3* ในสุกรพันธุ์กระโดนมีความคล้ายคลึงกันกับสุกรลูกผสม Shanzhu x Duroc ดังรายงานของ Xue et al. (2015) ทำการศึกษารูปแบบยีน *ADRB3* ในสุกรลูกผสม (Shanzhu x Duroc commercial crossbreds) พบความหลากหลายของรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *ADRB3* และมีค่าความถี่จีโนไทป์ AG เท่ากับ 0.543 สูงกว่ารูปแบบจีโนไทป์ GG และ AA ที่มีค่าความถี่เท่ากับ 0.093 และ 0.364 ตามลำดับ และการศึกษาในครั้งนี้มีค่าความถี่อัลลีล G เท่ากับ 0.560 สูงกว่าอัลลีล A (0.440) แตกต่างกับการศึกษาของ Xue et al. (2015) ที่พบค่าความถี่อัลลีล A สูงกว่าอัลลีล G ที่มีค่าความถี่อัลลีล 0.635 และ 0.365 ตามลำดับ

Table 2 Genotype and allele frequencies, H_O, H_E, H_U, PIC and chi-square test (x^2) of *ADRB3*, *FABP3*, *IGF2* and *SCD* genes in Kradon pigs

Genes	N	Frequency		H_O	H_E	H_U	PIC	x^2(HWE)	P-value
		genotype	allele						
	18	0.198 (AA)	0.440 (A)	0.484	0.493	0.495	0.371	0.032	0.984
ADRB3	44	0.484 (AG)	0.560 (G)						
	29	0.319 (GG)							
	35	0.380 (HH)	0.576 (H)	0.391	0.488	0.491	0.369	3.637	0.162
FABP3	36	0.391 (Hh)	0.424 (h)						
	21	0.228 (hh)							
	10	0.106 (CC)	0.293 (C)	0.372	0.414	0.416	0.328	0.949	0.622
IGF2	35	0.372 (CG)	0.707 (G)						
	49	0.521 (GG)							
	0	0.000 (CC)	0.500 (C)	1.000	0.500	0.503	0.375	94.000	0.001*
SCD	94	1.000 (CT)	0.500 (T)						
	0	0.000 (TT)							

N = Number of samples, H_O = Observed Heterozygosity, H_E = Expected Heterozygosity, H_U = Unbiased Expected Heterozygosity, PIC = Polymorphic information content, x^2(HWE) = Hardy-Weinberg equilibrium by the x^2-test (degree of freedom = 1, critical value = 3.841, α=0.05), * P<0.001

สำหรับยีน *FABP3* ในสุกรพันธุ์กระโดนมีค่าความถี่จีโนไทป์ HH และ Hh เท่ากับ 0.380 และ 0.391 สูงกว่าจีโนไทป์ hh (0.228) และมีความถี่อัลลีล H เท่ากับ 0.576 สูงกว่าอัลลีล h (0.424) เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Lee et al. (2010) รายงานว่ายีน *FABP3* ในสุกรพันธุ์เบิร์กเชีย (Berkshire) พบรูปแบบจีโนไทป์ hh มีค่าความถี่จีโนไทป์เท่ากับ 0.18 ต่ำกว่ารูปแบบจีโนไทป์ HH (0.45) และ Hh (0.37) ตรงข้ามกับการศึกษาของ Urban et al. (2016) ศึกษารูปแบบจีโนไทป์ของยีน *FABP3* ในสุกรพันธุ์ Czech Large White พบรูปแบบจีโนไทป์ของยีนเพียง 2 รูปแบบ (HH และ Hh) ไม่พบรูปแบบจีโนไทป์ hh ในประชากรสุกรที่นำมาศึกษา โดยมีค่าความถี่จีโนไทป์ HH เท่ากับ 0.87 สูงกว่าจีโนไทป์ Hh (0.13) และมีค่าความถี่อัลลีล H (0.93) สูงกว่าอัลลีล h (0.07) จากรายงานและผลการศึกษารูปแบบอัลลีลของยีน *FABP3* ในตัวอย่างสุกรสายพันธุ์การค้าและสุกรพันธุ์กระโดน ชี้ให้เห็นว่าอัลลีล H เป็นอัลลีลพื้นฐานที่พบในสุกร

เมื่อหาความถี่จีโนไทป์ของยีน *IGF2* ในสุกรพันธุ์กระโดน พบว่ามีค่าความถี่จีโนไทป์ GG เท่ากับ 0.521 สูงกว่าจีโนไทป์ CG (0.372) และจีโนไทป์ CC (0.106) และพบค่าความถี่อัลลีล G เท่ากับ 0.707 สูงกว่าอัลลีล C (0.293) สอดคล้องกับการศึกษาของ เกศรา และคณะ (2561) รายงานว่าสุกรพันธุ์กระโดนมีค่าความถี่จีโนไทป์ GG เท่ากับ 0.63 สูงกว่าจีโนไทป์ CG (0.21) และจีโนไทป์ CC (0.17) และมีค่าความถี่อัลลีล G เท่ากับ 0.73 สูงกว่าอัลลีล C (0.27) เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Klomtong et al. (2015) พบมีค่าความถี่ยีน *IGF2* รูปแบบจีโนไทป์ GG, CG และ CC มีค่าเท่ากับ 0.57, 0.27 และ 0.16 ตามลำดับ ในสุกรพันธุ์พื้นเมืองขนสีดำ ส่วนสุกรพันธุ์พื้นเมืองขนสีดำ-ขาว มีค่าความถี่รูปแบบจีโนไทป์ GG, CG และ CC เท่ากับ 0.47, 0.31 และ 0.21 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาผลการศึกษาในครั้งนี้พบความถี่อัลลีล G สูงกว่าอัลลีล C ในสุกรพันธุ์กระโดนให้ผลแตกต่างกันกับสุกรสายพันธุ์การค้า เช่น สุกรพันธุ์ลาจไวท์ (Large White) สุกรพันธุ์แลนด์เลจ (Landrace) สุกรพันธุ์ดูร็อค (Duroc) สุกรพันธุ์เพียเทรน (Pientrain) สุกรพันธุ์ยอร์คเชีย (Yorkshire) พบมีความถี่อัลลีล C

สูงกว่าอัลลีล G (แพรว และคณะ, 2552; Knoll et al., 2000; Vykoukalova et al., 2006; Klomtong et al., 2015) อย่างไรก็ตาม ค่าความถี่ของรูปแบบจีโนไทป์และอัลลีลของยีน *IGF*2 มีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับสุกรแต่ละสายพันธุ์

การศึกษายีน *SCD* ในสุกรพันธุ์กระโดน พบรูปแบบจีโนไทป์ CT เพียงรูปแบบเดียว และมีค่าความถี่จีโนไทป์ CT เท่ากับ 1.00 และมีค่าความถี่อัลลีล T เท่ากับ 0.50 และ C เท่ากับ 0.50 แตกต่างกับการศึกษาของ Lim et al. (2015) พบความหลากหลายของรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *SCD* ในสุกรพันธุ์เบิร์กเชีย และพบรูปแบบจีโนไทป์ CC และ CT มีความถี่ 0.41 และ 0.44 สูงกว่ารูปแบบจีโนไทป์ TT (0.15) และมีความถี่อัลลีล C เท่ากับ 0.63 สูงกว่าอัลลีล T (0.37) เช่นเดียวกันกับรายงานของ Maharani et al. (2013) พบยีน *SCD* รูปแบบจีโนไทป์ CC และ CT มีค่าความถี่ 0.40 และ 0.45 สูงกว่ารูปแบบจีโนไทป์ TT (0.15) และมีความถี่อัลลีล C เท่ากับ 0.62 สูงกว่าอัลลีล T (0.38) ในสุกรลูกผสมรุ่นที่ 2 (Landrace x Korean native pig)

ทดสอบภาวะสมดุลของยีน *ADRB*3, *FABP*3, *IGF*2 และยีน *SCD*

เมื่อพิจารณาผลวิเคราะห์ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้ที่ได้จากการสังเกต (H_O) ค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้คาดหมาย (H_E) และค่าเฮทเทอโรไซโกซิตี้คาดหมายที่ไม่มีอคติ (H_U) ของแต่ละยีนจะเห็นได้ว่าค่า H_E และ H_U สูงกว่าค่า H_O และเมื่อพิจารณาค่า PIC ของยีน *ADRB*3, *FABP*3, *IGF*2 และยีน *SCD* มีค่าเท่ากับ 0.371, 0.369, 0.328 และ 0.375 ตามลำดับ ชี้ให้เห็นว่าในสุกพันธุ์กระโดนที่นำมาศึกษามีความหลากหลายด้านพันธุกรรมในระดับปานกลาง ($0.25 \leq PIC \leq 0.5$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสุกรพันธุ์กระโดนมีจำนวนน้อยลงและการเลี้ยงเป็นกลุ่มขนาดเล็ก 10-15 ตัวต่อฝูง และปล่อยหากินตามธรรมชาติ จึงอาจเกิดการผสมพันธุ์กันแบบเลือดชิดขึ้นได้ และทดสอบภาวะสมดุลความถี่ของยีนที่นำมาศึกษาตามกฎของ Hardy-Weinberg ด้วย Chi-square test (χ^2-test) พบยีน *ADRB*3, *FABP*3 และยีน *IGF*2 ในตัวอย่างสุกรพันธุ์กระโดนยังอยู่ในภาวะสมดุล ยกเว้นยีน SCD ที่ไม่เป็นไปตามกฎของ Hardy-Weinberg แต่อย่างไรก็ตามการสร้างความหลากหลายของรูปแบบยีน *SCD* ในสุกรพันธุ์กระโดนที่พบเฉพาะจีโนไทป์ที่เป็นเฮทเทอโรไซกัส (CT) นั้น สามารถนำคู่ผสมพันธุ์มาผสมพันธุ์กันเพื่อให้เกิดสุกรมีจีโนไทป์รูปแบบอื่นๆ ได้

สรุป

ผลตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *ADRB*3, *FABP*3, *IGF*2 และยีน *SCD* พบรูปแบบจีโนไทป์ 3 รูปแบบในยีน *ADRB*3, *FABP*3 และยีน *IGF2* ยกเว้นยีน *SCD* พบรูปแบบจีโนไทป์เพียงรูปแบบเดียวในสุกรพันธุ์กระโดน และเมื่อทดสอบความสมดุลของยีน *ADRB*3, *FABP*3 และยีน *IGF2* พบว่ายีนทั้งสามยังอยู่ในสภาวะสมดุลตามกฎของ Hardy-Weinberg จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำรูปแบบจีโนไทป์ของยีน *ADRB*3, *FABP*3 และยีน *IGF*2 ไปหาความสัมพันธ์กับลักษณะการเจริญเติบโต คุณภาพเนื้อและคุณภาพซากในสุกรพันธุ์กระโดน เพื่อพัฒนาศักยภาพด้านการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตเนื้อของสุกรพื้นเมืองไทยได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณฟาร์มสุกร สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร ที่สนับสนุนสัตว์ทดลอง และห้องปฏิบัติการปรับปรุงพันธุ์และโอมิกส์ทางสัตว์ อาคารอำนวยการอุทยานวิทยาศาสตร์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (ขอนแก่น)

เอกสารอ้างอิง

เกศรา อำพาภรณ์, พิลาสลักษณ์ ปานประเสริฐ, ชเวง สารคล่อง และมนต์ชัย ดวงจินดา. 2561. ผลของยีน *IGF-II* ต่อลักษณะการเจริญเติบโตและคุณภาพซากในสุกรพันธุ์กระโดน**.** แก่นเกษตร. 46: 533-542.

จตุพร คูณแก้ว. 2551. การศึกษาลักษณะซากและคุณภาพเนื้อของสุกรพื้นเมืองไทย. วิทยานิพนธ์ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา.

จรัญ จันทลักขณา. 2524. การปรับปรุงพันธุ์หมูเมืองไทยในอนาคต. สุกรสาส์น. 7: 27-45.

จรัญ จันทลักขณา. 2526. ปศุสัตว์สำหรับท้องถิ่น. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

ธวัชชัย แถวถาทำ และประภาส มหินชัย. 2560. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีน IGF2 ต่อสมรรถนะการผลิตของสุกร. วารสารวิชาการสำนักพัฒนาพันธุ์สัตว์, กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ..

แพรว เที่ยงพิมล, ธนาทิพย์ สุวรรณโสภี, ศุภมิตร เมฆฉาย และศกร คุณวุฒิฤทธิรณ. 2552. ความสัมพันธ์ของความแตกต่างทางพันธุกรรมของยีน Insulin-like growth factor II (*IGF-II*) ต่อลักษณะการเจริญเติบโตและขนาดร่างกายในประชากรสุกรเชิงการค้าแห่งหนึ่ง. แก่นเกษตร. 37: 319-330.

วินัย ประลมพ์กาญจน์ และผกาพรรณ สกุลมั่น. 2543. เอกสารการสอนชุดวิชาการปรับปรุงพันธุ์ และการสืบพันธุ์สัตว์ หน่วยที่ 1-7. มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช, นนทบุรี.

Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick, and R. W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics. 32:314-331.

Chikun, K., A. Horiuchi, H. Ide, M. Shibata, T. Hayashi, I. Nakajima, M. Oe, and S. Muroya. 2008. Nucleotide sequence polymorphisms of beta1, beta2, and beta3-adrenergic receptor genes on Jinhua, Meishan, Duroc and Landrace pigs. Animal Science Journal. 79: 665-672.

Cieslak, J., J. Nowacka-Woszuk, M. Bartz, H. Fijak-Nowak, M. Grzes, M. Szydlowski, and M. Switonski. 2009. Association studies on the porcine *RETN*, *UCP1*, *UCP3* and *ADRB3* genes polymorphism with fatness traits. Meat Science. 83: 551-554.

Dekkers, J. C. M. 2004. Commercial Application of Marker- and Gene-assisted Selection in Livestock: Strategies and Lessons. Journal of Animal Science. 82: 313-328.

Enoch, H.G., A. Catala, and P. Strittmatter. 1976. Mechanism of rat liver microsomal stearyl-CoA desaturase. Studies of the substrate specificity, enzyme-substrate interactions, and the function of lipid. Journal of Biological Chemistry. 251: 5095-5103.

Estany, J., R. Ros-Freixedes, M. Tor, and R. N. Pena. 2014. A functional variant in the stearoyl-CoA desaturase gene promoter enhances fatty acid desaturation in pork. PloS One. 9: e86177.

Falcorner, D. S. and T. F. C. Mackey. 1996. Introduction to Quantitative Genetics. 4th Edition. Pearson Education, New York.

Fortin, A., W. M. Robertson, and A. K. W. Tong. 2005. The eating quality of Canadian pork and its relationship with intramuscular fat. Meat Science. 69: 297-305.

Goodwin, W., A. Linacre, and S. Hadi. 2007. An Introduction to Forensic Genetics. John Wiley & Sons Ltd., Chicheste.

Henriquez-Rodriguez, E., M. Tor, R. N. Pena, and J. Estany. 2015. A polymorphism in the stearoyl-CoA desaturase gene promoter increases monounsaturated fatty acid content in dry-cured ham. Meat Science. 106: 38-43.

Klomtong, P., K. Chaweewan, Y. Phasuk, and M. Duangjinda. 2015. *MC1R*, *KIT*, *IGF2*, and *NR6A1* as markers for genetic differentiation in Thai native, wild boars, and Duroc and Chinese Meishan pigs. Genetics and molecular research. 14: 12723-12732.

Knoll, A., L. Putnova, J. Dvorak, and S. Cepica. 2000. A *NciI* PCR-RFLP within intron 2 of the porcine insulin-like growth factor 2 (*IGF2*) gene. Animal Genetics. 31: 150-151.

Lee, S. H., Y. M. Choi, J. H. Choe, J. M. Kim, K. C. Hong, H. C. Park, and B. C. Kim. 2010. Association between polymorphisms of the heart fatty acid binding protein gene and intramuscular fat content, fatty acid composition, and meat quality in Berkshire breed. Meat Science. 86: 794-800.

Lim, K. S., J. M., Kim, E. A. Lee, J. H. Choe, and K. C. Hong. 2015. A Candidate Single Nucleotide Polymorphism in the 3' Untranslated Region of Stearoyl-CoA Desaturase Gene for Fatness Quality and the Gene Expression in Berkshire Pigs. Asian Australasian Journal of Animal Sciences. 28: 151-157.

Liu, G. L., S. W. Jiang, Y. Z. Xiong, R. Zheng, and Y. C. Qu. 2003. Association of PCR-RFLP polymorphisms of *IGF2* gene with fat deposition related traits in pig resource family. Acta Genetica Sinica. 30: 1107-1112.

Maharani, D., H. B. Park, J. B. Lee, C. K. Yoo, H. T. Lim, S. H. Han, S. S. Lee, M. S. Ko, I. C. Cho, and J. H. Lee. 2013. Association of the gene encoding stearoyl-CoA desaturase (SCD) with fatty acid composition in an intercross population between Landrace and Korean native pigs. Molecular Biology Reports. 40:73-80.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics. 89: 583-590.

Nowacka-Woszuk, J., I. Szczerbal, H. Fijak-Nowak, and M. Switonski. 2008. Chromosomal localization of 13 candidate genes for human obesity in the pig genome. Journal of Applied Genetics. 49: 373-377.

Ranjbari, M., A. Hashemi, K. Mardani, and R. Darvishzadeh. 2012. Allelic polymorphism of Makoei sheep calpastatin gene identified by polymerase chain reeaction and single strand conformation polymorphism. Journal of Agricultural Science and Technology. 14: 533-538.

Reardon, W., A. M. Mullen, T. Sweeney, and R. M. Hamill. 2010. Association of polymorphisms in candidate genes with colour, water-holding capacity, and composition traits in bovine *M. longissimus* and *M. semimembranosus*. Meat Science. 86: 270-275.

Ren, J., C. Knorr, F. Habermann, R. Fries, L. S. Huang, and B. Brenig. 2003. Assignment of the porcine stearoyl-CoA desaturase (*SCD*) gene to SSC14q27 by fluorescence *in situ* hybridization and by hybrid panel mapping. Animal Genetics. 34: 471-473.

Samulin, J., I. Berget, S. Lien, and H. Sundvold. 2008. Differential gene expression of fatty acid binding proteins during porcine adipogenesis. Comparative Biochemistry and Physiology Part B Biochemistry and Molecular Biology. 151: 147-152.

Tanaka, K., Y. Iwaki, T. Takizawa, M. Murakami, H. Mannen, Y. Maeda, Y. Kurosawa, V. B. Dand, L. Chhum Phith, B. Bouahom, Y. Yamamoto, T. Daing, and T. Namikawa. 2007. The novel polymorphism of the beta 3-adrenergic receptor gene and its distribution in domestic pigs and wild boars in Asia. Animal Science Journal. 78: 243-250.

Tramontana, S., M. Bionaz, A. Sharma, D. E. Graugnard, E. A. Cutler, and P. Ajmone-Marsan. 2008. Internal controls for quantitative polymerase chain reaction of swine mammary glands during pregnancy and lactation. Journal of Dairy Science. 91: 3057-3066.

Uemoto, Y., H. Nakano, T. Kikuchi, S. Sato, M. Ishida, T. Shibata, H. Kadowaki, E. Kobayashi, and K. Suzuki. 2012. Fine mapping of porcine SSC14 QTL and SCD gene effects on fatty acid composition and melting point of fat in a Duroc purebred population. Animal Genetics. 43: 225-228.

Urban, T., A. Knoll, S. Boleslavova, A. Schmidtova, H. Sulcerova, V. Rozikova, and M. Juzl. 2016. Polymorphism in the gene *FABP*3 and its association with indicators of meat quality in pigs. Acta fytotechn zootechn. 19 : 171-173.

Van Laere, A. S., M. Nguyen, M. Braunschweig, C. Nezer, C. Collette, L. Moreau, A. L. Archibald, C. S. Haley, N. Buys, M. Tally, G. Andersson, M. Georges, and L. Andersson. 2003. A regulatory mutation in *IGF2* causes a major QTL effect on muscle growth in the pig. Nature. 425: 832-836.

Vasupen, K. 2007. Nutritional studies in native, Thai Kadon pigs. Ph.D. Thesis. Department of Nutrition Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University. Utrecht, The Netherlands.

Vykoukalova, Z., A. Knoll, J. Dvorak, and S. Cepica. 2006. New SNPs in the IGF2 gene and association between this gene and back fat thickness and lean meat content in Large White pigs. Journal of Animal Breeding and Genetics. 123: 204-207.

Wang, W., W. Xue, X. Zhou, L. Zhang, J. Wu, L. Qu, B. Jin, X. Zhang, F. Ma, and X. Xu. 2013. Effects of candidate genes' polymorphisms on meat quality traits in pigs. Acta Agriculturae Scandinavica, Section A – Animal Science. 62: 120-126.

Xue, W., W. Wang, B. Jin, X. Zhang, and X. Xu. 2015. Association of the *ADRB3*, *FABP3*, *LIPE*, and *LPL* gene polymorphisms with pig intramuscular fat content and fatty acid composition. Czech Journal of Animal Science. 60: 60-66.

Zhang, S., T. J. Knight, K. J. Stalder, R. N. Goodwin, S. M. Lonergan, and D. C. Beitz. 2009. Effects of breed, sex and halothane genotype on fatty acid composition of triacylglycerols and phospholipids in pork *longissimus* muscle. Journal of Animal Breeding and Genetics. 126: 259-268.