การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมือง ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ ในส่วนยีน cytochrome b

A study on genetic diversity of native pigs in the Northeast by comparing nucleotide sequences of cytochrome b gene

นิชนันท์ ชูเกิด, พงษ์ชาญ ณ ลำปาง*, และ สุรินทร บุญอนันธนสาร[1]

Nitchanan Chukerd, Pongchan Na-Lampang*, and Surintorn Boonanuntanasarn[1]

บทคัดย่อ: ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จากตัวอย่างจำนวน 19 ตัวอย่าง ที่เก็บจากจังหวัดเลย สกลนคร นครพนม มุกดาหาร ศรีสะเกษ และสุรินทร์ โดยการใช้เทคนิค PCR และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนยีน cytochrome b และสร้าง Phylogenetic tree โดยวิธีการหาระยะห่างทางพันธุกรรมตามวิธี neighbor-joining ด้วยโปรแกรม PHYLIP package พบว่า สุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือสามารถแบ่งได้เป็น 9 haplotype จากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ 43 ตำแหน่ง (**คำสำคัญ:** ความหลากหลายทางพันธุกรรม, สุกรพื้นเมือง, ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ, cytochrome b)

ABSTRACT: Genetic diversity of native pigs in the Northeast was studied from 19 native pig hair samples collected from Loei, Sakon Nakhon, Nakhon Phanom, Mukdahan,oSi Saket and Surin provinces by using PCR technique and nucleotide sequencing of cytochrome b gene. A phylogenetic tree was constructed from genetic distance determination according to neighbor-joining method using PHYLIP package program. It was able to divide native pigs in the Northeast into 9 haplotypes according to 43 site nucleotide sequences difference. (**Key words:** genetic diversity, native pigs, the Northeast, cytochrome b)

[1] สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Animal Production Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology

* Corresponding author: pongchan@sut.ac.th

บทนำ

จำนวนสุกรพื้นเมืองในปัจจุบันเหลืออยู่น้อยมากในประเทศไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งจะพบเห็นได้ก็แต่ในชนบทที่ห่างไกลความเจริญ และพบเป็นเพียงกลุ่มเล็กๆ ที่อยู่อย่างกระจัดกระจายกันเท่านั้น (Loftus and Scherf, 1993) จนเชื่อว่าอาจจะสูญพันธุ์ไปได้โดยง่าย เพราะมีปัจจัยด้านลบที่มีผลกระทบต่อการคงอยู่ของสุกรพื้นเมืองหลายประการ (พงษ์ชาญ, 2545) จึงเป็นที่น่าเสียดายหากต้องสูญเสียสัตว์ที่ผ่านการทดสอบมาอย่างยาวนานว่า มีความเหมาะสมกับสภาพแวดล้อมของประเทศไทย จึงจำเป็นต้องหาทางอนุรักษ์ไว้ให้อนุชนรุ่นหลังได้ใช้ประโยชน์ต่อไป

การที่จะอนุรักษ์สุกรพื้นเมืองเหล่านี้ให้ได้ผลจำเป็นต้องทราบว่าสุกรพื้นเมืองในแต่ละแหล่งที่เลี้ยงมีความคล้ายคลึงกันหรือแตกต่างกันมากน้อยเพียงใด เพื่อใช้เป็นแนวทางในการกำหนดวิธีการอนุรักษ์พันธุกรรมของสุกรพื้นเมือง (วิสุทธิ์, 2538; อลงกลด และเรืองวิทย์, 2543) โดยที่ผ่านมา การพยายามจำแนกสุกรพื้นเมืองในแหล่งต่างๆ จากการสังเกตลักษณะรูปร่างภายนอกยังไม่ได้ผล เพราะมีความคล้ายคลึงกันมากในแหล่งต่างๆ ดังนั้นจึงเห็นว่าน่าจะนำเทคนิคทางด้านชีวโมเลกุลมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยเทคนิคนี้สามารถบอกระดับของ heterozygosity ระยะห่างของพันธุกรรม (genetic distance) และวิวัฒนาการ (evolution) ได้

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอในไมโตคอนเดรีย (mitochondrial DNA) ได้ถูกนำมาใช้ศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์หลายชนิด (Kocher et al., 1989) โดยเฉพาะบริเวณ displacement loop และ cytochrome b (Alves et al., 2003; Kim et al., 2002) ในสุกรได้มีการนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน cytochrome b มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมกันมาก เนื่องจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ทำได้สะดวกเพราะยีนในส่วนนี้จะแปลรหัสเป็นโปรตีนที่มีความจำเพาะ และพบว่ามีความหลากหลายสูง

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยใช้ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน cytochrome b ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอที่สกัดจากตัวอย่างปมรากขน

วิธีการศึกษา

แหล่งเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างปมรากขนจากสุกรพื้นเมืองจำนวน 19 ตัวอย่าง จากจังหวัดเลย สกลนคร นครพนม มุกดาหาร ศรีสะเกษ และสุรินทร์ ดังแสดงใน Table 1

Table 1 Locations and number of native pig used in this study.

Province	District	Number of Animals
Loei	Chiang Khan	3
Loei	Tha Li	3
Sakon Nakhon	Kud Bak	1
Sakon Nakhon	Muang	1
Sakon Nakhon	Tao Ngoi	1
Nakhon Phanom	Na Wa	1
Nakhon Phanom	Muang	1
Mukdahan	Wan Yai	3
Si Sa Ket	Muang	2
Surin	Phanom Dong Rak	3

การเก็บตัวอย่างปมรากขน

การเก็บตัวอย่างปมรากขนมีขั้นตอนดังนี้

1. ทำความสะอาดบริเวณที่ทำการถอนปมรากขนด้วยน้ำสะอาด และเช็ดด้วยผ้าสะอาด

2. ใช้สำลีชุบแอลกอฮอล์เช็ดทำความสะอาดอีกรอบ รอจนแอลกอฮอล์แห้ง

3. ถอนขนบริเวณดังกล่าว จากนั้นตัดขนด้วยกรรไกรปลอดเชื้อให้มีขนาดความยาวจากปมรากขนขึ้นมาประมาณ 0.5 ซม. ลงในหลอดไมโครทิวบ์ (microtube) ขนาด 2.0 มล. ที่ปลอดเชื้อ

4. เก็บหลอดไมโครทิวบ์ที่มีตัวอย่างปมรากขนในถังน้ำแข็ง (กรณีที่เก็บตัวอย่างปมรากขนไว้เกิน 24 ชั่วโมง จะเก็บหลอดไมโครทิวบ์ไว้ในถังไนโตรเจนเหลว หรือตู้อุณหภูมิ -80 °ซ)

วิธีการสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอตามวิธีของ Genomic DNA Purification Kit (Wizard®) โดยใช้ปมรากขน 100 เส้น มีขั้นตอนดังนี้

1. เติม Nuclei lysis solution 200 ไมโครลิตร 0.5M EDTA 48 ไมโครลิตร proteinase K (ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร) จำนวน 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 55 °ซ ข้ามคืน โดยวางหลอดไมโครทิวบ์บนเครื่องเขย่าสารให้ค่อยๆ ละลาย

2. ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เพื่อให้เย็นลงเป็นเวลา 5 นาที เติม RNase A 1 มล. ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดคว่ำและหงาย 2-5 ครั้ง นำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 30 นาที

3. เติม Protein precipitation solution 67 ไมโครลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันด้วย vortex เป็นเวลา 20 วินาที แช่เย็นในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที

4. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 5 นาที ย้ายของเหลว (supernatant) ใส่ในหลอดใสไมโครทิวบ์ขนาด 1.5 มล. หลอดใหม่

5. เติม Isopropanol (0.8 V/V) 200 ไมโครลิตร ค่อยๆ ผสมให้เข้ากันด้วยวิธีกลับหลอดคว่ำและหงาย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 °ซ) เป็นเวลา 30 นาที

6. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ทิ้ง ล้างตะกอนด้วย 80% เอธานอล โดยระวังไม่ให้ตะกอนฟุ้งขึ้นมา 200 ไมโครลิตร

7. ปั่นที่ 12,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 1 นาที ดูดส่วนที่เป็นของเหลวใส (supernatant) ทิ้ง ทิ้งส่วนที่เหลือให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง (25 °ซ) เป็นเวลา 10-15 นาที ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 30 ไมโครลิตร

วิธีการทำ Polymerase Chain Reaction (PCR)

การออกแบบไพรเมอร์ (Primer design)

การเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายใช้ Primer MitL1 และ MitH2 (Watanobe et al., 1999) มีลำดับนิวคลีโอไทด์ดังนี้

MitL1 5'-ATCGTTGTCATTCAACTACA-3'

MitH2 5'-CTCCTTCTCTGGTTTACAAG-3'

ทำการติดสลาก Primer ด้วย M13 ดังนั้นลำดับของ Primer จึงมีลำดับดังนี้

Cytochrome b - Forward

5'-CACGACGTTGTAAAACGACGAATTCATCGTTGTCATTCAACTACA-3'

Cytochrome b - Reverse

5'-GGATAACAATTTCACACAGGGAATTCCTCCTTCTCTGGTTTACAAG-3'

การดำเนินกระบวนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (thermocycle)

ใช้อุณหภูมิ และเวลาในการทำ PCR ตามลำดับดังนี้

รอบที่ 1 95 °ซ เป็นเวลา 10 นาที

รอบที่ 2 60 °ซ เป็นเวลา 1 นาที เพื่อเติม Taq polymerase และน้ำกลั่นปลอดเชื้อ

รอบที่ 3-37 94 °ซ เป็นเวลา 30 วินาที (denaturation)
54 °ซ เป็นเวลา 30 วินาที (annealing)
72 °ซ เป็นเวลา 45 วินาที (extension)

รอบที่ 38 72 °ซ เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ปฏิกิริยาสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

รอบที่ 39 4 °ซ

การทำ PCR ใช้วิธีการ hot start PCR และนำตัวอย่างไปตรวจดูโดยวิธี 0.7% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอรีซัส (agarose gel electrophoresis)

ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ (PCR product)

ตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วย 0.7% อะกาโรสเจลอิเล็กโตรฟอรีซีสจะปรากฏลักษณะชิ้นส่วนดีเอ็นเอมีขนาด 1140 bp ดัง **Figure 1**

การหาลำดับนิวคลีโอไทด์

ส่งตัวอย่างชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณ (PCR product) ไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี

วิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ของสุกรพื้นเมืองทั้ง 19 ตัวอย่าง มาเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน cytochrome b โดยใช้โปรแกรม clustal X 1.81 (Jeanmougin et al., 1998) ร่วมกับโปรแกรม PHYLIP package (Felsenstein, 2007) เพื่อแบ่งกลุ่ม haplotype ของตัวอย่างสุกรพื้นเมือง

การสร้าง Phylogenetic tree

สร้าง Phylogenetic tree ด้วยวิธีการหาระยะห่างทางพันธุกรรมตามวิธี neighbor-joining ด้วยโปรแกรม PHYLIP package (Felsenstein, 2007)

ผลการศึกษา

กลุ่ม haplotype ของสุกรพื้นเมือง

จากการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของสุกรพื้นเมืองทั้ง 19 ตัวอย่าง สามารถแบ่งกลุ่มสุกรพื้นเมืองเป็น 9 haplotype (**Table 2**) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ต่างกัน 43 ตำแหน่ง (**Table 3**)

Phylogenetic tree

Phylogenetic tree ความสัมพันธ์ของแต่ละ haplotype แสดงใน **Figure 2**

วิจารณ์

การศึกษาความหลากหลายทางพันธุกรรมของสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือโดยใช้เทคนิค PCR และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของยีน cytochrome b ของไมโตคอนเดรียดีเอ็นเอ จากตัวอย่างปมรากขนที่เก็บจากจังหวัดเลย สกลนคร นครพนม มุกดาหาร ศรีสะเกษ และสุรินทร์ พบว่าสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรม โดยสามารถแบ่งได้เป็น 9 haplotype จากความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ 43 ตำแหน่ง

จาก Phylogenetic tree สามารถแบ่งกลุ่มของ haplotype ออกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มี H1 กลุ่มที่ 2 มี H2 กลุ่มที่ 3 มี H4 H6 H7 H8 และ H9 กลุ่มที่ 4

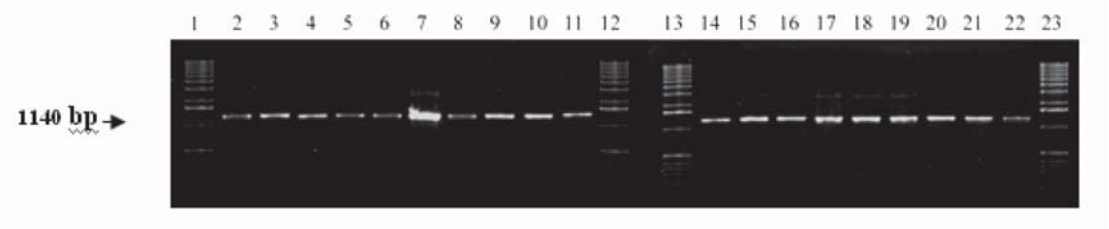

Figure 1 DNA pattern of the amplified cytochrome b region product. (Number 1, 12, 13 and 23 are DNA makers and the rest are samples).

Table 2 Haplotypes of native pigs.

Haplotype	Collection location		Number of Animals
	Province	District	
H1	Nakhon Phanom	Muang	1
H2	Loei	Tha Li	1
	Sakon Nakhon	Kud Bak	1
	Sakon Nakhon	Muang	1
	Sakon Nakhon	Tao Ngoi	1
	Mukdahan	Wan Yai	3
H3	Loei	Chiang Khan	2
	Si Sa Ket	Muang	1
	Surin	Phanom Dong Rak	2
H4	Si Sa Ket	Muang	1
H5	Surin	Phanom Dong Rak	1
H6	Loei	Chiang Khan	1
H7	Loei	Tha Li	1
H8	Loei	Tha Li	1
H9	Nakhon Phanom	Na Wa	1

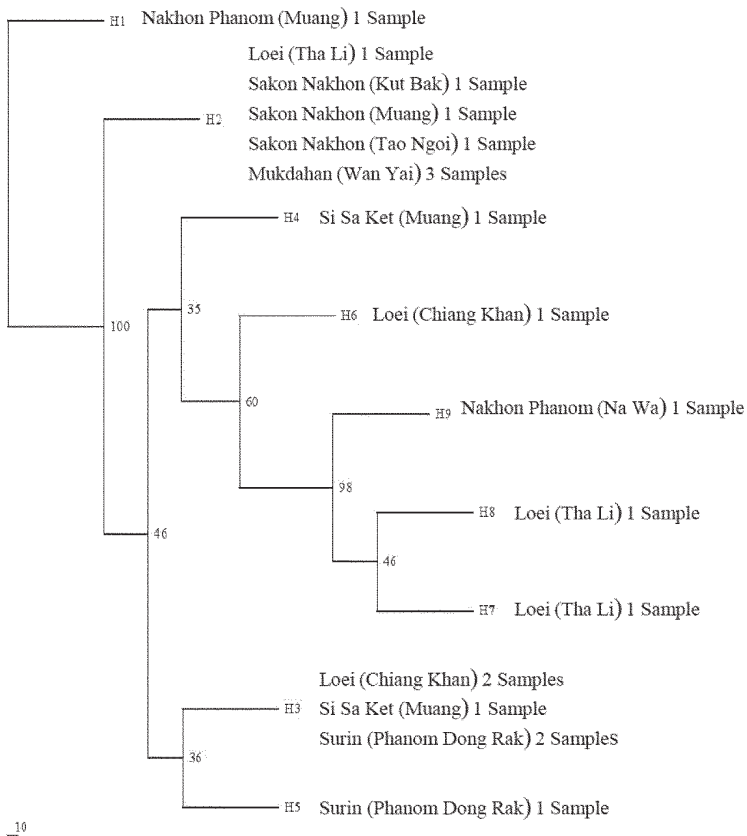

Figure 2 Phylogenetic tree based on Cyt B sequences using the neighbour-joining method.

Table 3 Forty-three variable positions in mtDNA reginons of each haplotypes.

Haplotype	Nucleotide positions[1]																																										Number of Animals[3]
	4 3	5 2	7 0	1 2 6	1 3 5	1 4 4	1 4 6	1 5 5	1 6 0	1 6 1	1 9 1	2 0 8	2 2 9	3 1 2	3 6 3	5 2 5	5 4 6	5 5 2	5 7 0	6 3 1	6 9 1	7 3 8	7 5 7	7 6 5	7 7 4	7 8 4	7 8 6	8 9 7	8 0 7	8 1 0	8 2 6	8 3 8	8 6 2	8 8 0	9 1 1	9 1 3	9 1 8	9 2 5	9 4 3	9 5 7	1 0 0	1 0 3	1 0 5	
H1	G	T	T	A	A	A	A	G	G	T	A	A	A	T	C	C	G	C	C	C	C	A	T	C	C	C	A	C	A	T	A	C	C	C	G	C	C	C	A	T	C	T	T	1
H2	.[2]	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	7
H3	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	5
H4	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	1
H5	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
H6	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	T	.	.	.	.	.	A	.	1
H7	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	C	.	.	.	.	C	.	.	.	G	G	A	G	G	G	T	A	G	.	T	.	G	C	G	G	A	.	1
H8	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	C	.	G	C	G	G	T	T	.	G	T	T	T	.	T	.	G	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1
H9	C	C	C	C	C	C	C	C	C	.	C	C	C	.	T	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	1

[1] Nucleotide positions read from top to bottom in each column

[2] The same nucleotide with H1 in the same column.

[3] Number of samples of the same haplotype in each row.

มี H3 และ H5 โดยกลุ่มที่ไกลออกมาจากกลุ่มอื่นที่สุด คือ กลุ่มที่ 1 มีตัวอย่างเดียวที่เก็บจาก อ.เมือง จังหวัดนครพนม กลุ่มที่ 2 ถึงแม้จะมี H2 แต่เพียง haplotype เดียว แต่มีจำนวนตัวอย่างถึง 7 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 19 ตัวอย่าง การที่ตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดมุกดาหาร 3 ตัวอย่าง และที่เก็บจากจังหวัดสกลนคร 3 ตัวอย่าง อยู่ในกลุ่มเดียวกัน แสดงว่าสุกรพื้นเมืองในจังหวัดสกลนครและจังหวัดมุกดาหารมีพันธุกรรมที่ใกล้เคียงกัน แต่การที่ตัวอย่างจาก อ.ทาลี่ จังหวัดเลย อยู่ในกลุ่มนี้ด้วย อาจเป็นไปได้ว่าเกษตรกรผู้เลี้ยงได้นำสุกรพื้นเมืองจากบริเวณจังหวัดสกลนครและจังหวัดมุกดาหารขึ้นไปเลี้ยง กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่มีหลาย haplotype ที่สุด แต่ H6, H7 และ H8 ล้วนแต่เป็นตัวอย่างจากจังหวัดเลย แสดงให้เห็นว่าสุกรพื้นเมืองในจังหวัดเลยยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่มาก แต่พบว่ามีตัวอย่างที่อยู่นอกกลุ่ม คือ H4 ซึ่งเป็นตัวอย่างจาก อ.เมือง จังหวัดศรีสะเกษ และ H9 ตัวอย่างจาก อ.นาหว้า จังหวัดนครพนม กลุ่มที่ 4 มี H3 และ H5 โดยในกลุ่ม H3 มี 5 ตัวอย่าง จาก อ.เชียงคาน จังหวัดเลย 2 ตัวอย่าง จาก อ.เมือง จังหวัดศรีสะเกษ 1 ตัวอย่าง และจาก อ.พนมดงรัก จังหวัดสุรินทร์ 2 ตัวอย่าง ส่วน H5 มี 1 ตัวอย่างจาก อ.พนมดงรัก จังหวัดจังหวัดสุรินทร์ จะเห็นว่าตัวอย่างจากจังหวัดสุรินทร์ทั้งหมด 3 ตัวอย่าง อยู่ในกลุ่มนี้หมด แต่อยู่ใน H3 2 ตัวอย่าง ใน H5 1 ตัวอย่าง แสดงให้เห็นว่าสุกรพื้นเมืองในจังหวัดสุรินทร์ยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่มาก

กล่าวโดยสรุป คือ สุกรพื้นเมืองในจังหวัดสกลนครและมุกดาหารไม่มีความหลากหลายทางพันธุกรรม ส่วนสุกรพื้นเมืองในจังหวัดเลย นครพนม ศรีสะเกษ และสุรินทร์ยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมอยู่มาก ซึ่งในจังหวัดเลยพบว่ามีความหลากหลายทางพันธุกรรมมากกว่าจังหวัดอื่นๆ และจาก Phylogenetic tree คาดว่าสุกรพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีการเคลื่อนย้ายออกจากแหล่งพันธุ์ดั้งเดิมไปยังแหล่งอื่นๆ ในช่วงเวลาที่ผ่านมา

เอกสารอ้างอิง

พงษ์ชาญ ณ ลำปาง. 2545. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมของสุกรไทยภาคตะวันออกเฉียงเหนือ. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา.

วิสุทธิ์ ใบไม้. 2538. พันธุศาสตร์. เอ็นพีซีพพลายพริ้นติ้ง, กรุงเทพฯ.

แสนศักดิ์ นาควิสุทธิ์. 2543. ความหลากหลายทางชีวภาพด้วยการเกษตร: การอนุรักษ์พันธุ์สัตว์เลี้ยง. ว.สัตวบาล 10: 1-4.

อลงกลด แทนออมทอง และ เรืองวิทย์ บรรจงรัตน์. 2543. แนวทางการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของสุกรพื้นเมืองไทย. วารสารสัตวบาล 10: 18-22.

Alves, E., C. 'Ovilo, C. Rodr'iguez, and L. Sili'o. 2003. Mitochondrial DNA sequence variation and phylogenetic relationships among Iberian pigs and other domestic and wild pig populations. Animal. Genetics. 34: 319-324.

Felsenstein, J. 2007. PHYLIP. Available: http://evolution. genetics. washington.edu/phylip.html.

Jeanmougin, F., J.D. Thompson, M. Gouy, D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1998.Multiple sequence alignment with Clustal X. Trends. Biochem. Sci. 23: 403-405.

Kim, K.I., J.H. Lee, K. Li, Y.P. Zhang, S.S. Lee, J. Gongora, and C. Moran. 2002. Phylogenetic relationships of Asian and European pig breeds determined by mitochondrial D-loop sequence polymorphism. Anim. Genet. 33:19-25.

Kocher, T.D. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 86: 6196-6200.

Loftus, R. and B. Scherf. 1993. World watch list for domestic animal diversit. Food and Agriculture Organization of the United Nation, Rome.

Watanobe, T., N. Okumura, N. Ishiguro, O. Nakano, A. Matsui, M. Sahara. and M. Komatsu. 1999. Genetic relationship and distribution of the Japanese wild boar (*Sus scrofa leucomystax*) and Ryukyu wild boar (*Sus scrofa riukiuanus*) analaysed by mitochondrial DNA. Mol. Ecol. 8: 1509-1512.