

แนวทางการใช้วิธีอณูพันธุศาสตร์เพื่อตรวจสอบย้อนกลับในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

Molecular genetic -based approaches for traceability of meat and meat products

พิชญานิภา กล่อมทอง มนต์ชัย ดวงจินดา*

Pitchayanipa Klomtong, Monchai Duangjinda*

ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

*Corresponding author: monchai@kku.ac.th

บทคัดย่อ

การตรวจสอบย้อนกลับมีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมผลิตเนื้อสัตว์ ทำให้สามารถติดตามและตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ในทุกขั้นตอนการผลิต ตลอดจนเป็นการประกันคุณภาพผลิตภัณฑ์ อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจสอบย้อนกลับที่ใช้อยู่ในปัจจุบันยังมีข้อจำกัด บทความครั้งนี้ได้นำเสนอแนวทางการใช้อณูพันธุศาสตร์ในการตรวจสอบย้อนกลับ ซึ่งเป็นการวิเคราะห์ความผันแปรของดีเอ็นเอมาใช้จำแนกสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ ดีเอ็นเอมีข้อดี คือ มีความจำเพาะ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงพบได้ในทุกเซลล์ ทนต่อความร้อน และมีความผันแปรระหว่างตัวสัตว์ สายพันธุ์และชนิดของสัตว์ สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบย้อนกลับด้วยกันสามแนวทางคือ 1) จำแนกชนิดสัตว์ที่มีการแทนที่หรือปลอมปนลงในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ โดยใช้ข้อมูลความผันแปรของดีเอ็นเอไมโทคอนเดรีย เช่น ยีน *cytochrome b*, *cytochrome oxidase I* และ D-loop และออกแบบ universal primer ร่วมกับการใช้เทคนิค real time PCR การตรวจสอบมีความรวดเร็วและไวต่อการตรวจพบดีเอ็นเอที่ปลอมปนในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ 2) จำแนกพันธุ์สัตว์เพื่อเป็นการประกันคุณภาพผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ โดยใช้ยีนควบคุมสีผิวและไมโครแซทเทลไลต์มาใช้ในการตรวจสอบ เนื่องจากสามารถแยกแยะระหว่างสัตว์พันธุ์แท้ ลูกผสม และสายพันธุ์สังเคราะห์ได้ 3) จำแนกสัตว์เป็นรายตัว โดยใช้ไมโครแซทเทลไลต์หรือ Single Nucleotide Polymorphisms (SNPs) ในการตรวจสอบ ดังนั้นวิธีอณูพันธุศาสตร์เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการ

ตรวจสอบย้อนกลับในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต และทำให้ผู้บริโภคเกิดความมั่นใจในผลิตภัณฑ์

ABSTRACT

Traceability is an important issue in the meat industry, since it can be used to track and trace back to the product during all stages of production, as a quality assurance in products. However, current traceability methods are limited. This article presents the approach of using genetic traceability to identify animals and meat products through DNA analysis. The advantages of using DNA analysis include: the specificity and, inalterability of DNA, the present of DNA in every cell, high-temperature resistance of DNA, and the variations among animal species. DNA analysis can be used to trace in three approaches: 1) Identify animal species substitution and adulteration in meat and meat product. By using mitochondrial DNA such as *cytochrome b*, *cytochrome oxidase I* gene and D-loop and designing the universal primer with the use of real time PCR technique to be a rapid and sensitive method to detect meat substitution and adulteration. 2) Identify animal breed in order to certify animals and animal products. Coat color gene and Microsatellite DNA are often used, since they

can help discriminate between purebred and crossbred or synthesis breed. 3) Identify individual animal. Microsatellite DNA and Single Nucleotide Polymorphisms are used. Therefore, molecular genetic is an efficient method for the traceability of meat and meat products, in order to enhance the monitoring of production and giving consumers confidence in products.

คำสำคัญ: ดีเอ็นเอ; การตรวจสอบย้อนกลับ; ชนิดสัตว์; พันธุ์สัตว์; สัตว์รายตัว

Keyword: DNA; traceability; species; breed; individual

บทนำ

ผู้ผลิตและผู้บริโภคมีความตื่นตัวและตระหนักถึงความปลอดภัยของอาหาร และคุณภาพของสินค้าโดยผู้บริโภคมีความต้องการที่จะทราบถึงข้อมูลของผลิตภัณฑ์มากขึ้น เช่น วันที่ผลิต วันหมดอายุ วัตถุดิบ และแหล่งผลิต ขณะที่ผู้ผลิตมีการพัฒนาการผลิตอาหารภายใต้มาตรฐานต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยของอาหาร ที่ถูกใช้ในการจัดการด้านความปลอดภัยในการผลิตอาหารของอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ เช่น Good Manufacturing Practice (GMP), Hazard Analysis and Critical Control Point (HACCP) และ Food Safety Management System (ISO 22000) แต่ระบบดังกล่าวยังไม่มีเพียงพอ เนื่องจากไม่สามารถตรวจสอบย้อนกลับได้ หรือเรียกคืนสินค้าที่มีปัญหา กลับได้อย่างมีประสิทธิภาพ จะต้องอาศัยวิธีการอื่นเข้ามาช่วย (Meuwissen *et al.*, 2003; Van der Vorst, 2006) ซึ่งการตรวจสอบย้อนกลับ (traceability) เป็นวิธีหนึ่งที่ผู้ผลิตนำมาใช้ในการเพิ่มศักยภาพด้านความปลอดภัยทางอาหารในอุตสาหกรรมการผลิตเนื้อสัตว์ European Commission (2002) ให้นิยามของการตรวจสอบย้อนกลับ คือ ความสามารถในการตรวจสอบและติดตามอาหาร อาหารสัตว์ ผลิตภัณฑ์สัตว์ หรือส่วนที่เกี่ยวข้องมีจุดประสงค์สำหรับการบริโภค ตรวจสอบได้ในทุกขั้นตอน ไม่ว่าจะเป็นกระบวนการผลิตและการกระจายของสินค้า ในปัจจุบันกลุ่มสหภาพยุโรปมีการออก

กฎหมายการนำเข้าสินค้า (EC (178/2002) ซึ่งสินค้าทุกชนิดต้องสามารถตรวจสอบย้อนกลับไปยังแหล่งที่มาของวัตถุดิบ อย่างไรก็ตามบางประเทศยังไม่ออกกฎหมายบังคับใช้ แต่มีการนำระบบการตรวจสอบย้อนกลับมาใช้ เช่น ประเทศอเมริกา ญี่ปุ่น และแคนาดา ในขณะที่ประเทศไทยมีการบังคับใช้พระราชบัญญัติความรับผิดชอบต่อความเสียหายที่เกิดขึ้นจากสินค้าที่ไม่ปลอดภัย พ.ศ. 2551 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อการคุ้มครองที่เป็นธรรมกับผู้บริโภค โดยสามารถเรียกค่าเสียหายที่เกิดขึ้นจากสินค้าที่ไม่ปลอดภัยจากผู้ผลิตได้ (พระราชบัญญัติความรับผิดชอบต่อความเสียหายที่เกิดขึ้นจากสินค้าที่ไม่ปลอดภัย พ.ศ. 2551, 2551)

การตรวจสอบย้อนกลับมีบทบาทสำคัญมากในอุตสาหกรรมผลิตเนื้อสัตว์ ซึ่งระบบตรวจสอบย้อนกลับเป็นตัวช่วยในการจัดการข้อมูลภายในระบบการผลิตสัตว์และผลิตอาหาร จากการรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับวิธีการตรวจสอบย้อนกลับที่ใช้อยู่ในวงการปศุสัตว์และอุตสาหกรรมอาหารมี 3 วิธีหลัก คือ 1) วิธีการดั้งเดิมและไม่ใช้ข้อมูลชีวภาพ เช่น การติดเบอร์หู การสัก การบันทึกข้อมูลสัตว์รายตัวด้วยคอมพิวเตอร์ การใช้ electronic transponders (EID), radio frequency identification (RFID) และบาร์โค้ด 2) วิธีทางชีวเคมี ทำได้โดยตรวจหาองค์ประกอบทางเคมีของสารประกอบอินทรีย์ เช่น สารประกอบอะโรมาติกที่ทำให้เกิดกลิ่นโดยใช้ spectroscopy techniques (Alamprese *et al.*, 2013) และวิธีการตรวจหาโปรตีนหรือเปปไทด์ที่มีความจำเพาะในเนื้อสัตว์ด้วยเทคนิคต่างๆ เช่น enzyme linked immune sorbent assay (ELISA) อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวยังมีข้อจำกัดหลายประการ ทั้งการใช้วิธีการดั้งเดิมและไม่ใช้ข้อมูลชีวภาพ ซึ่งมีความเสี่ยงต่อการหลุดสูญเสียระหว่างห่วงโซ่การผลิต และไม่สามารถติดตามตัวสัตว์จากโรงฆ่าไปยังกระบวนการกระจายสินค้าได้ (Capoferri *et al.*, 2005) ส่วนการตรวจหาโปรตีนด้วยวิธี EILSA สามารถตรวจโปรตีนได้จากเนื้อเยื่อบางส่วนเท่านั้น (Ayaz *et al.*, 2006) 3) วิธีอณูพันธุศาสตร์เป็นการตรวจสอบความผันแปรของดีเอ็นเอของตัวสัตว์ โดยอาศัยเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล เช่น specific-PCR, multiplex PCR, polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-

RFLP), random amplified polymorphic DNA (RAPD) และไมโครแซเทลไลต์ นำมาใช้ในการจำแนกชนิดสัตว์ พันธุ์สัตว์ และสัตว์รายตัว (Pereira *et al.*, 2008) ซึ่งวิธีทางอณูพันธุศาสตร์มีข้อดีกว่า 2 วิธีที่กล่าวมาข้างต้น คือสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอได้ในทุกเซลล์ มีรูปแบบดีเอ็นเอที่จำเพาะในสัตว์แต่ละตัว ทนต่อความร้อนได้สูง ตรวจสอบได้ง่ายด้วยวิธีทางห้องปฏิบัติการ และสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบย้อนกลับด้วยวิธีดั้งเดิม (Dalvit *et al.*, 2007) ดังนั้นบทความครั้งนี้จึงได้นำเสนอแนวทางการใช้วิธีอณูพันธุศาสตร์เพื่อตรวจสอบย้อนกลับในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์

เทคโนโลยีอณูพันธุศาสตร์กับการตรวจสอบย้อนกลับในอุตสาหกรรมผลิตเนื้อสัตว์

อณูพันธุศาสตร์เป็นการศึกษาข้อมูลพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ที่ในปัจจุบันมีการนำไปใช้ในงานด้านต่างๆ กันอย่างแพร่หลาย เช่น การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างดีเอ็นเอ หรืออาร์เอ็นเอ กับโรคผิดปกติทางพันธุกรรม และการตรวจสอบความเป็นพ่อแม่ลูกในคน ซึ่งมีความแม่นยำและน่าเชื่อถือ รวมถึงการนำไปประยุกต์ใช้ในงานทางปศุสัตว์ในการตรวจยืนยันที่ทำให้เกิดโรคทางพันธุกรรมในสัตว์ การคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์สัตว์ นอกจากนี้ยังได้นำมาใช้ตรวจสอบความผันแปรของดีเอ็นเอ เพื่อใช้จำแนกชนิดสัตว์ พันธุ์สัตว์ หรือแม้กระทั่งสามารถแยกสัตว์แต่ละตัวได้ ดังนั้นจึงได้มีการนำเอาเทคโนโลยีอณูพันธุศาสตร์มาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือในการตรวจสอบย้อนกลับในอุตสาหกรรมผลิตเนื้อสัตว์ในปัจจุบัน โดยสามารถแบ่งได้เป็น 3 วิธีการหลักดังนี้

การตรวจสอบการแทนที่และปลอมปนเนื้อสัตว์อื่นลงในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์

การปลอมแปลงเนื้อสัตว์ชนิดอื่นในผลิตภัณฑ์อาหาร เป็นการนำเนื้อสัตว์ชนิดอื่นที่มีราคาถูกมาแทนที่หรือผสมลงในผลิตภัณฑ์ เพื่อลดต้นทุนการผลิต เช่น การนำเนื้อม้ามาแทนที่เนื้อโค หรือการปลอมปนเนื้อสุกรลงในไส้กรอกโค ปัญหาเหล่านี้ล้วนก่อให้เกิดผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค ผิดหลักความเชื่อทางศาสนา ก่อให้สร้างความเสียหายทางเศรษฐกิจ และยังเป็นการกระทำที่ผิดกฎหมาย (Cawthorn *et al.*, 2013) ดังนั้นหากสามารถ

ตรวจสอบย้อนกลับเพื่อยืนยันความถูกต้องของชนิดสัตว์ในผลิตภัณฑ์ได้ จะช่วยเพิ่มความเชื่อมั่นให้กับผู้บริโภค จึงได้มีการนำเอาวิธีอณูพันธุศาสตร์ที่มีความแม่นยำสูงมาใช้ โดยนิยมใช้ข้อมูลความผันแปรของดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียมาเป็น DNA barcode เพื่อใช้ในการตรวจสอบย้อนกลับมากกว่าการใช้ข้อมูลความผันแปรของดีเอ็นเอในนิวเคลียส ทั้งนี้เนื่องจากดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียมีข้อดี คือ 1) ในหนึ่งเซลล์ของสิ่งมีชีวิตจะมีจำนวนดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียหลายชุด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์นั้นๆ โดยทั่วไปมีประมาณ 100-100,000 ชุด ทำให้ง่ายต่อการเก็บดีเอ็นเอในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่มีอยู่น้อย เนื่องจากผ่านการถูกทำลายด้วยความร้อน 2) ดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียมีลำดับเบสแบบอนุรักษ์ (conserved region) จึงมีความใกล้เคียงกันทางพันธุกรรมของสัตว์ในแต่ละชนิดสัตว์สูง (Galimberti *et al.*, 2013) ทำให้ง่ายต่อการออกแบบ universal primer เพื่อจำแนกสัตว์ได้พร้อมกันหลายชนิด เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ที่นำมาใช้จำแนกชนิดสัตว์ และการปลอมปนเนื้อสัตว์ในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ มีด้วยกันมีหลายเทคนิค เช่น เทคนิค PCR, PCR-RFLP และ real time PCR จาก Table 1 จะเห็นได้ว่าตำแหน่งยีนบนไมโทคอนเดรียมีความสามารถและประสิทธิภาพในการตรวจสอบย้อนกลับ เพื่อระบุชนิดของสัตว์ โดยสามารถตรวจสอบได้ทั้งเนื้อสดและผลิตภัณฑ์เนื้อแปรรูป เทคนิค multiple PCR, PCR-RFLP และ real time PCR เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพ สามารถตรวจสอบสัตว์ได้พร้อมกันหลายชนิด และสามารถตรวจสอบดีเอ็นเอผสม อีกทั้งราคาไม่แพง อย่างไรก็ตามเทคนิค multiplex PCR ใช้เวลาในการตรวจสอบนาน เนื่องจากต้องตรวจสอบดีเอ็นเอด้วยการทำ gel electrophoresis ส่วน PCR-RFLP ผลการตรวจสอบในรูปของดีเอ็นเอผสมยังไม่แม่นยำ ในกรณีที่มียีนดีเอ็นเอผสมปริมาณต่ำ (Girish *et al.*, 2005) ขณะที่เทคนิค real time PCR สามารถตรวจสอบและทราบผลได้ทันที แม้มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ปลอมปนน้อยกว่า 1 พิโคกรัม/ไมโครลิตร ซึ่งในปัจจุบันเทคนิค melting curve analysis และ high resolution melt (HRM) real time PCR มีราคาไม่แพงเมื่อเทียบกับเทคนิค Taq Man Real Time PCR ดังนั้นการใช้เทคนิค melting curve analysis และ HRM real time PCR จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำไปใช้ในการตรวจสอบการปลอมปนเนื้อสัตว์ลงในผลิตภัณฑ์

Table 1 Mitochondrial DNA for use genetic traceability in animal and animal product.

Genes	Techniques	Species	Samples	LOD ^{1/}	References
12S rRNA	multiplex-PCR	yak and cattle	meat	0.1 ng (0.1%)	Yin <i>et al.</i> , 2009
Cyt b	SNP	cattle and water buffalo	meat	0.01pg (0.1%)	Gupta <i>et al.</i> , 2011
mtDNA	specific real-time PCR (Taqman)	cattle, pig, lamb, chicken, turkey, and ostrich	meat	0.03–0.80 pg	Lopez-Andreo <i>et al.</i> , 2005
mtDNA	specific- PCR	pig, horse, cat, or dog cattle, sheep, and goat meat	meat	0.25ng (0.1%)	Lhak and Arslan, 2007
Cyt b	multiplex-PCR	cattle, pig, chicken, sheep, goat and horse	meat	0.1%.	Matasunaga <i>et al.</i> , 1999
Cyt b	melting curve analysis	cattle, pig, horse, and wallaroo	meat	0.4–0.04 pg	Lopez-Andreo <i>et al.</i> , 2006
COI	PCR-RFLP (HpaII)	cow, chicken, turkey, sheep, pig, buffalo, camel and donkey	meat	-	Haider <i>et al.</i> , 2012
mtDNA	specific PCR	horse, donkey and pig	product	(0.1%) ng	Kesmen <i>et al.</i> , 2007
D-loop	PCR-RFLP	cattle, buffalo, sheep, goat, pig, duck, guinea fowl, turkey and quail	product	1%	Mane <i>et al.</i> , 2012
Cytb	PCR-RFLP	chicken, pig, cattle	product	0.25 mg	Ong <i>et al.</i> , 2007
D-loop	species-specific PCR	cattle	product	1%	Mane <i>et al.</i> , 2009
12S and 18SrRNA	high resolution melting (HRM)	buffalo and mammals	product	0.1%.	Sakaridis <i>et al.</i> , 2013

^{1/}LOD= Limit of detection**การจำแนกพันธุ์สัตว์ด้วยวิธีอณูพันธุศาสตร์**

นอกจากการปลอมปนสัตว์ชนิดอื่นลงในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์แล้ว ยังพบปัญหาการแทนที่เนื้อสัตว์สายพันธุ์ลูกผสมลงในผลิตภัณฑ์ที่มาจากสัตว์สายพันธุ์แท้หรือสายพันธุ์พื้นเมือง เช่น การนำเนื้อสุกรลูกผสมมาแอบอ้างเป็นเนื้อสุกรป่าพันธุ์แท้ หรือการนำเนื้อไก่ลูกผสมมาแอบอ้างขายเป็นเนื้อไก่พื้นเมือง ซึ่งวิธีอณูพันธุศาสตร์มีความสามารถในการจำแนกสัตว์พันธุ์แท้และสัตว์สายพันธุ์ลูกผสมได้ โดยสามารถใช้ข้อมูลดีเอ็นเอ

ไมโทคอนเดรีย ดีเอ็นเอในนิวเคลียส และดีเอ็นเอไมโครแซลเทลไลต์ในการจำแนกพันธุ์สัตว์ได้

Asch *et al.* (2011) ได้ศึกษาความผันแปรของดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียในสุกรเอเชียและสุกรสายพันธุ์ยุโรปด้วยเทคนิค multiplex single base extension และตรวจหารูปแบบแอลลีลที่จำเพาะในสัตว์แต่ละชนิดด้วยวิธี deterministic approach ซึ่งพบตำแหน่ง SNP จำนวน 15 จุด ที่มีความจำเพาะกับสุกรสายพันธุ์เอเชียและสุกรสายพันธุ์ยุโรป สามารถใช้จำแนกสายพันธุ์สุกรได้

นอกจากนี้ Alves *et al.* (2009) ได้ศึกษาความผันแปรของดีเอ็นเอไมโทคอนเดรีย เพื่อใช้ในการจำแนกสุกรป่าสุกรดุก และสุกรไอร์เบอเรียน เมื่อวิเคราะห์จีโนมไมโทคอนเดรีย พบว่ารูปแบบแอลลีลจำเพาะกับสุกรพันธุ์ไอร์เบอเรียน จำนวน 3 ตำแหน่ง (m.7998C>T, m.9111T>C, m.14719A>G) แต่ไม่พบในสุกรดุก และแอลลีลนี้มีความถี่สูงถึง 0.72 ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นตัวบ่งชี้และตรวจสอบผลิตภัณฑ์จากสุกรไอร์เบอเรียนแท้ได้ อย่างไรก็ตามการศึกษาความผันแปรของดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียเพื่อจำแนกพันธุ์สัตว์นั้น ส่วนใหญ่จะพบความถี่ของแอลลีลในดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียค่อนข้างต่ำ มีความจำเพาะกับแหล่งกำเนิดของสัตว์เท่านั้น และไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างสัตว์พันธุ์แท้ และสัตว์ลูกผสมได้ (Fajardo *et al.*, 2008; Scandura *et al.*, 2008; Alves *et al.*, 2009; Mutalib *et al.*, 2012) เนื่องจากไมโทคอนเดรียมีการถ่ายทอดพันธุกรรมผ่านทางแม่เท่านั้น จึงมักนำไปใช้ในการตรวจสอบหาบรรพบุรุษ หรือพันธุ์สัตว์ต้นกำเนิด (Wu *et al.*, 2007; Alves *et al.*, 2010) อย่างไรก็ตามดีเอ็นเอไมโทคอนเดรียยังเหมาะสมในการนำมาใช้สำหรับตรวจสอบย้อนกลับไปยังพันธุ์สัตว์ในบางกรณี เช่น สุกรสายพันธุ์ไอร์เบอเรียนของประเทศสเปนยอมให้มีการจำหน่ายสุกรลูกผสมที่มีแม่เป็นสุกรพันธุ์ไอร์เบอเรียนและติดฉลากผลิตภัณฑ์ดังกล่าวว่าเป็นสุกรพันธุ์ไอร์เบอเรียนได้ (Alves *et al.*, 2009)

จากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับยีนควบคุมสีผิวในสุกร พบว่ายีนที่มีหน้าที่หลักในการควบคุมสีผิวคือ ยีน *MC1R* (melanocortin receptor 1) และยีน *KIT* (v-kit Hardy Zuckerman4 feline sarcoma viral oncogene homology) ส่วนยีนอื่นมีอิทธิพลเพียงเล็กน้อย โดยยีน *MC1R* เป็นยีนควบคุมการสังเคราะห์ eumelanin (สีดำและสีน้ำตาล) และ pheomelanin (สีแดงและสีเหลือง) ที่เกิดขึ้นภายใน melanocyte ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อยู่ในกำหนดของ Extension (E) locus ซึ่งมีด้วยกัน 5 แอลลีล (E^+ , E^{D1} , E^{D2} , E^p และ e) โดยแอลลีลที่แตกต่างกันเป็นผลมาจากการเกิดกลาย ซึ่งส่งผลให้สุกรมีสีผิวแตกต่างกัน โดยสามารถใช้จำแนกสุกรป่า สุกรดุก และสุกรผสมสุกรป่าออกจากกันได้ (Kijas *et al.*, 1998) ส่วนยีน *KIT* มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนา

melanocyte การกลายของยีน *KIT* เช่น การเกิด duplication และ deletion ร่วมกับการกลายบริเวณ splice ที่ตำแหน่ง intron 17, การเกิด duplication เพียงอย่างเดียว, การเกิด 4-bp deletion ที่ intron 18 สามารถนำไปใช้จำแนกความแตกต่างระหว่างสุกรผิวสีขาวและสุกรผิวสีขาวจุดดำได้ (Okumura *et al.*, 2008) ในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์หากต้องการใช้ยีนควบคุมสีผิวในการบ่งชี้สายพันธุ์สัตว์เพื่อยืนยันและรับรองพันธุ์สัตว์ สามารถทำได้โดยการคัดเลือกสัตว์ และตรวจสอบว่ามีแอลลีลที่จำเพาะต่อสายพันธุ์นั้น และทำการเก็บแอลลีลนั้นลงไปให้มีการถ่ายทอดไปทุกชั่วรุ่น ซึ่งทำให้สามารถนำแอลลีลนั้นไปใช้ในการตรวจสอบย้อนกลับได้ (Fontanesi *et al.*, 2010)

สำหรับเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ ส่วนใหญ่นำมาศึกษาเกี่ยวกับความใกล้ชิดทางพันธุกรรม และความหลากหลายทางพันธุกรรมในสัตว์ ใช้เปรียบเทียบความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่มประชากรสัตว์หรือพันธุ์สัตว์ เนื่องจากเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ มีความหลากหลายสูง จึงนำมาใช้ในการจำแนกพันธุ์สัตว์ได้ โดยการบันทึกชุดข้อมูลของแอลลีลที่พบในสัตว์แต่ละพันธุ์นำมาคำนวณในรูปแบบของความน่าจะเป็นที่จะพบแอลลีลนั้นที่มีความสัมพันธ์กับพันธุ์สัตว์ โดยใช้สถิติเข้ามาช่วยในการวิเคราะห์ เช่น Dalvit *et al.* (2006) สามารถใช้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ จำนวน 6 ตำแหน่ง ในการจำแนกโคพันธุ์พื้นเมืองในประเทศอิตาลีจำนวน 4 สายพันธุ์ (Chianina, Marchigiana, Romagnola และ Piemontese) ได้ นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาเพื่อใช้ในการตรวจสอบย้อนกลับ ไปยังสัตว์สายพันธุ์สังเคราะห์หรือสัตว์ลูกผสม โดย Rodriguez-Ramirez *et al.* (2011) รายงานว่าสามารถใช้เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์จำนวน 7 ตำแหน่งในการจำแนกโคสายพันธุ์แมกซิกัน ซึ่งเป็นสายพันธุ์สังเคราะห์ที่มีต้นกำเนิดมาจากโคพันธุ์ Brangus and Charolais/Brahman ได้

การจำแนกสัตว์ด้วยวิธีอณูพันธุศาสตร์

การตรวจสอบย้อนกลับนอกจากสามารถตรวจติดตามสินค้าจากผู้ผลิตไปยังผู้บริโภค ยังต้องสามารถตรวจสอบย้อนกลับจากผู้บริโภคไปยังแหล่งผลิตได้อีกด้วย โดยต้องรวบรวมข้อมูลตัวสัตว์แต่ละตัวในแต่ละชั้นตอนภายใต้ห่วงโซ่การผลิตเนื้อสัตว์ เพื่อใช้ในการตรวจสอบ

ย้อนกลับถึงที่มาของผลิตภัณฑ์ ซึ่งวิธีอณูพันธุศาสตร์สามารถนำมาใช้จำแนกสัตว์รายตัวได้ โดยอาศัยข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ (A, T, C และ G) หรือยีนที่แตกต่างกัน (DNA profile) ภายในจีโนมสัตว์ ซึ่งมีความจำเพาะในสัตว์แต่ละตัวและไม่ซ้ำกัน หรือใช้เป็น DNA profiling เพื่อจำแนกสัตว์และผลิตภัณฑ์จากตัวสัตว์ในระดับรายตัวได้ การใช้ข้อมูล DNA profile มีข้อดีกว่าการใช้เลขบาร์โค้ดคือ ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ไม่มีการหลุดสูญหาย และไม่ซ้ำกัน การตรวจสอบ DNA profile จะต้องเก็บข้อมูลตัวอย่างดีเอ็นเอจากตัวสัตว์แต่ละตัว (สามารถเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อหรือเลือด ในตัวสัตว์มีชีวิต หรือเก็บตัวอย่างจากซากในระหว่างขั้นตอนการแปรรูป) นำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ หรือดีเอ็นเอเครื่องหมาย เช่น RFLP, ไมโครแซเทลไลต์ หรือ SNPs รวบรวมไว้ในฐานข้อมูลร่วมกับข้อมูลพันธุประวัติและแหล่งที่มาของตัวสัตว์ ใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในการตรวจสอบย้อนกลับ ซึ่งหากต้องการตรวจสอบย้อนกลับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ในกรณีเกิดความไม่มั่นใจในผลิตภัณฑ์ หรือเพื่อยืนยันผลิตภัณฑ์ สามารถทำได้โดยเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อมาทำการสกัดดีเอ็นเอและตรวจสอบ DNA profile จากนั้นนำมาเปรียบเทียบข้อมูลที่ต้องการตรวจสอบกับข้อมูลดีเอ็นเออ้างอิง ว่าตรงหรือไม่ตรงกับข้อมูลในฐานข้อมูล หากพบว่าตรงกับข้อมูลใดๆ ในฐานข้อมูลก็จะสามารถทราบถึงแหล่งที่มาของผลิตภัณฑ์นั้นได้

อย่างไรก็ตาม การตรวจสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายดีเอ็นเอต่อการจำแนกสัตว์รายตัวนั้น ทำโดยวิเคราะห์ค่าความน่าจะเป็นที่สัตว์สองตัวจะมีแอลลีลเดียวกันในเครื่องหมายตำแหน่งเดียวกัน หรือที่เรียกว่า matching probability (MP) เป็นสถิติในการทดสอบ ซึ่งค่าดังกล่าวควรมีค่าน้อย โดยหากตรวจสอบจากจำนวนสัตว์สุ่มพันตัว ค่า MP ควรมีค่าในระดับ 10^{-6} (Dalvit *et al.*, 2007) จากรายงานการศึกษาการจำแนกสัตว์รายตัวด้วยวิธีอณูพันธุศาสตร์ ใน Table 2 จะเห็นได้ว่าการใช้

เครื่องหมายดีเอ็นเอ SNPs และ ไมโครแซเทลไลต์ มีประสิทธิภาพในการจำแนกสัตว์รายตัว เนื่องจากมีค่า MP ต่ำอย่างไรก็ตามทั้ง 2 วิธีมีข้อจำกัด เช่น เครื่องหมาย SNP มีค่าใช้จ่ายสูงกว่าเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ (Herraeza *et al.*, 2005) และ เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์มีผลการศึกษาที่แตกต่างกันในแต่ละห้องปฏิบัติการ มีความไม่สม่ำเสมอเพราะมีความแตกต่างในการกำหนดขนาดของแอลลีล และอาจเกิดข้อผิดพลาดในการกำหนดขนาด ยิ่งไปกว่านั้นแม้จะมีโปรแกรมสำเร็จรูปในการวิเคราะห์เครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ แต่ใช้เวลานานในการฝึกบุคลากร และเนื่องจากเครื่องหมายไมโครแซเทลไลต์ ใช้ข้อมูลจำนวนหลายตำแหน่งในการตรวจสอบ (Fernandez *et al.*, 2013)

ในปัจจุบันมีการนำวิธีอณูพันธุศาสตร์มาใช้ในการตรวจสอบย้อนกลับ เพื่อจำแนกสัตว์รายตัวในอุตสาหกรรมผลิตเนื้อสัตว์แล้ว ดังเช่น ในประเทศแคนาดา บริษัทผู้จำหน่ายเนื้อสัตว์ยี่ห้อ Maple Leaf นำการตรวจสอบย้อนกลับมาใช้ในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสุกร โดยเก็บข้อมูลดีเอ็นเอของแม่สุกรทุกตัวไว้เป็นฐานข้อมูลสำหรับใช้เป็นตัวอ้างอิง หากนำชิ้นเนื้อมาตรวจสอบ DNA profile และผลการตรวจสอบตรงกับแม่สุกรตัวใด จะทำให้สามารถตรวจสอบย้อนกลับไปยังฟาร์มที่ผลิตได้ (Webb, 2004) ประเทศนิวซีแลนด์ มีการนำตรวจสอบย้อนกลับด้วยข้อมูลดีเอ็นเอที่เรียกว่า easiTrace™ มาใช้ในการตรวจสอบย้อนกลับในเนื้อแกะ โดยเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อแกะในระหว่างกระบวนการชำแหละซาก นำชิ้นเนื้อแกะแต่ละซากมาสกัดดีเอ็นเอ และวิเคราะห์ข้อมูล DNA profile เก็บไว้เป็นฐานข้อมูล หลังจากนั้นนำชิ้นเนื้อแกะที่ส่งไปตามตลาดกลับมาตรวจสอบย้อนกลับ พบว่ามีความถูกต้องและแม่นยำ (Shackell *et al.*, 2001) นอกจากนี้มีการพัฒนาโปรแกรม IdentiGEN ซึ่งเป็นการจัดเก็บข้อมูลดีเอ็นเอของพ่อแม่พันธุ์ มาใช้ในการตรวจสอบย้อนกลับ และประกันคุณภาพของเนื้อสุกร (Loftus, 2005) เป็นต้น

Table 2 Markers for individual identification and parentage test in animal species.

DNA markers	Number of marker	Match probability	Species	References
SNP	44	2.73×10^{-12}	cattle	Hara <i>et al.</i> , 2010
SNP	21	7×10^{-9}	pig	Goffaux <i>et al.</i> , 2005
SNPlex™	46	5.12×10^{-9}	pig	Ballester <i>et al.</i> , 2007
Microsatellites	10	3.51×10^{-19}	pig	Kaul <i>et al.</i> , 2001

การนำวิธีอนุพันธุศาสตร์ไปใช้ในการตรวจสอบย้อนกลับในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ของประเทศไทย

ปัจจุบันประเทศไทยมีการนำระบบการตรวจสอบย้อนกลับมาใช้ในสินค้าเกษตรและอาหาร โดยเฉพาะสินค้าในเกรดพรีเมียม เพื่อสร้างมาตรฐานสินค้าและรองรับการส่งสินค้าไปยังต่างประเทศ เช่น บริษัทในเครือเบทาโกรได้พัฒนาซอฟต์แวร์มาใช้ในการตรวจสอบย้อนกลับที่เรียกว่า e-Traceability ใช้เพื่อประกันความปลอดภัยและคุณภาพอาหาร (Food Safety & Quality Assurance: FSQA) ทำให้กระบวนการผลิตอาหารมีความปลอดภัยทั้งระบบ และมีขั้นตอนที่เป็นมาตรฐานเดียวกัน สามารถตรวจสอบย้อนกลับได้ บริษัท ซีพีเอฟ จำกัด มหาชน ได้นำระบบ RFID มาใช้งานในโรงงานชำแหละสุกร และติดตั้งตามสายการผลิตต่างๆ (RFID Institute of Thailand, 2557) นอกจากนี้ยังมีการนำเทคโนโลยีบาร์โค้ดมือถือสมาร์ทโฟน คือ QR code โดยอาศัยรหัสมาตรฐานสากล มาช่วยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการจัดการบริหารในสินค้าเกษตรและอาหาร ตลอดจนเพิ่มความสามารถในการตรวจสอบย้อนกลับ และติดตามแหล่งกระจายสินค้าได้ตั้งแต่ผู้ผลิตถึงผู้ส่งออก (จิรพร, 2556) เป็นต้น อย่างไรก็ตามหากอุปกรณ์ที่ใช้ตรวจติดตามดังกล่าวเกิดการหลุดสูญหายจะทำให้ไม่สามารถติดตามและตรวจสอบสินค้ากลับได้ ขณะที่วิธีอนุพันธุศาสตร์สามารถตรวจสอบย้อนกลับได้แม้ว่าเกิดการหลุดสูญหายของอุปกรณ์ที่ใช้ตรวจติดตาม โดยใช้ข้อมูลดีเอ็นเอจากตัวสัตว์หรือผลิตภัณฑ์ และสามารถตรวจสอบการปลอมปนเนื้อสัตว์อื่นในผลิตภัณฑ์ จำแนกสายพันธุ์สัตว์และสัตว์รายตัวได้ ในปัจจุบันสามารถส่งตัวอย่างไปตรวจสอบได้ ตามห้องปฏิบัติการด้านพันธุศาสตร์ของหน่วยงานรัฐและภาคเอกชน อย่างไรก็ตามการจำแนกสัตว์รายตัว มีความยุ่งยากในการจัดเก็บข้อมูล มีต้นทุนสูงอาจเหมาะสมกับบริษัทขนาดใหญ่ที่มีระบบการจัดการที่ดี เพื่อให้ระบบตรวจสอบย้อนกลับมีประสิทธิภาพสูงสุด จึงใช้วิธีอนุพันธุศาสตร์ร่วมกับวิธีการตรวจสอบย้อนกลับแบบดั้งเดิม เช่น การบันทึกข้อมูลลงคอมพิวเตอร์ และการใช้ RFID

บทสรุป

การใช้วิธีอนุพันธุศาสตร์เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจสอบย้อนกลับ สามารถตรวจติดตามได้ตลอดห่วงโซ่การผลิตจากผู้บริโภคไปยังแหล่งผลิต ซึ่งวิธีอนุพันธุศาสตร์สามารถนำไปใช้ในการตรวจสอบการแทนที่และการปลอมปนเนื้อสัตว์อื่นลงในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยใช้ข้อมูลความผันแปรของดีเอ็นเอไมโทคอนเดรีย ที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค real time PCR ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงสุด ใช้ในการตรวจสอบจำแนกสายพันธุ์สัตว์ โดยใช้ข้อมูลความผันแปรของยีนควบคุมสีผิวไมโครแซเทลไลต์ และดีเอ็นเอไมโทคอนเดรีย ตลอดจนนำไปใช้ในการจำแนกสัตว์รายตัวโดยใช้ข้อมูลความผันแปรของ ไมโครแซเทลไลต์ หรือ SNPs การใช้ระบบตรวจสอบย้อนกลับจำเป็นต้องมีการติดอุปกรณ์ตรวจติดตาม เพื่อเก็บข้อมูลของสินค้าทั้งหมดตั้งแต่แหล่งผลิตไปยังผู้บริโภค ทำให้มีต้นทุนการผลิตสูง การนำไปใช้กับผลิตภัณฑ์หรือสินค้าทั่วไปที่ไม่ใช่ที่สินค้าระดับพรีเมียม จะเป็นการเพิ่มภาระให้แก่ผู้บริโภค จึงสามารถนำไปใช้ได้กับสินค้าที่มีมูลค่าสูง อย่างไรก็ตามการพัฒนาทางด้านเทคโนโลยีทำให้อุปกรณ์การตรวจติดตาม หรือการตรวจด้วยวิธีอนุพันธุศาสตร์มีราคาลดลง จึงมีความเป็นไปได้ในอนาคตที่จะมีการใช้วิธีอนุพันธุศาสตร์มาใช้ในการตรวจสอบย้อนกลับมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัย นี้ได้รับการสนับสนุนจาก โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษาและการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

เอกสารอ้างอิง

- พระราชบัญญัติความรับผิดชอบต่อความเสียหายที่เกิดขึ้นจากสินค้าที่ไม่ปลอดภัย พ.ศ. 2551 (2551) ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 125, ตอนที่ 36 ก: 17-22.
- Alamprese C, Casale M, Sinelli N, Lanteri S, Casiraghan E (2013) Detection of minced beef adulteration with turkey meat by UVevis, NIR and MIR spectroscopy. J Food Sci Tech 53: 225-232.
- Alves E, Fernandez AI, Fernandez-Rodriguez A,

- Perez-Montarelo D, Benitez R, Ovilo C, Rodriguez C, Sillio L (2009) Identification of mitochondrial markers for genetic traceability of European wild boars and Iberian and Duroc pigs. *Animal* 3: 1216–1223.
- Alves PC, Pinheiro I, Godinho R, Vicente J, Gortázar C, Scandura M (2010) Genetic diversity of wild boar populations and domestic pig breeds (*Sus scrofa*) in South-western Europe. *Biol J Linnean Soc* 101: 7978–7922.
- Asch BV, Santos LS, Carneiro J, Pereira F, Amorim A (2011) Identification of mtDNA lineages of *Sus scrofa* by multiplex single base extension for the authentication of processed food products. *Abstract J Agr Food Chem* 59: 6920–6926.
- Ayaz Y, Ayaz ND, Erol I (2006) Detection of species in meat and meat products using enzyme-linked immune sorbent assay. *J Muscle Foods* 17: 214–220.
- Ballester M, Mercade A, Haandel BV, Santamartina J, Sanchez A (2007) Individual identification and genetic traceability in the pig using the SNPlex™ genotyping system. *Anim Genet* 37: 1–3.
- Cawthorn DM, Steinmanb HA, Hoffman LC (2013) A high incidence of species substitution and mislabelling detected in meat products sold in South Africa. *Food Control* 32: 440–449.
- Capoferri R, Galli A, Bongioni G (2005) Molecular traceability in meat producing animals by SNPs. *Proceedings of the 4th World Italian Beef Cattle Congress, Gubbio Italy*.
- Dalvit C, Targhetta C, Gervaso M, Marchi MD, Mantovani R, Cassand M (2006) Application of a panel of microsatellite markers for the genetic traceability of bovine origin products. In: *Book of Abstracts of the 57th Annual Meeting of the European Association for Animal Production*. Wageningen Academic Publishers, the Netherlands, pp 26.
- Dalvit C, Marchi MD, Cassandro M (2007) Genetic traceability of livestock products: A review. *Meat Sci* 77: 437–449.
- European Commission (2002) Council Regulation (EC) No 178/2002 of 28 January 2002 laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety. *OJEU* 31:1–24.
- Fajardo V, Gonzalez I, Martin I, Rojas M, Hernandez PE, Garcia T, Martin R (2008) Differentiation of European wild boar (*Sus scrofa scrofa*) and domestic swine (*Sus scrofa domestica*) meats by PCR analysis targeting the mitochondrial D-loop and the nuclear melanocortin receptor 1 (*MC1R*) genes. *Meat sci* 78 : 314–332.
- Fernandez ME, Goszczynski DE, Liron JP, Villegas-Castagnasso EE, Carino MH, Ripoli MV, Rogberg-Munoz A, Posik DM, Peral-Garcia P, Giovambattista G (2013) Comparison of the effectiveness of microsatellites and SNP panels for genetic identification, traceability and assessment of parentage in an inbred Angus herd. *Genet Mol Biol* 36: 185–191.
- Fontanesi L, D'Alessandro E, Scotti E, Liotta L, Crovetto A, Chiofalo V, Russo V (2010) Genetic heterogeneity and selection signature at the *KIT* gene in pigs showing different coat colours and patterns. *Anim Genet* 41: 478–492.
- Galimberti A, Mattia F De, Losa A, Bruni I, Federici S, Casiraghi M, Martellos S, Labra M (2013) DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food res Int* 50: 55–63.
- Girish PS, Anjaneyulu ASR, Viswas KN, Shivakumar BMMA, Patel M, Sharma B (2005) Meat species identification by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) of mitochondrial 12S rRNA gene. *Meat Sci* 70: 107–112.

- Goffaux F, China B, Dams L, Clinquart A, Daube G (2005) Development of a genetic traceability test in pig based on single nucleotide polymorphism detection. *Forensic Sci Int* 151: 239–247.
- Gupta R, Rankb DN, Joshib CG (2011) Single-nucleotide primer extension assay of mtDNA to authenticate cattle and buffalo meat. *Science Asia* 37: 170–173.
- Haider N, Nabulsil, Al-Safadi B (2012) Identification of meat species by PCR-RFLP of the Halal authentication by SYBR green I real-time PCR. *J Food Sci Tech* 46: 951–955.
- Hara K, Watanabe H, Sasazaki S, Mukai F, Mannen H (2010) Development of SNP markers for individual identification and parentage test in a Japanese Black cattle population. *Anim Sci J* 81: 152–157.
- Herraeza DL, Schafer H, Mosner J, Fries HR, Wink M (2005) Comparison of microsatellite and single nucleotide polymorphism markers for the genetic analysis of a Galloway cattle population. *Z Naturforsch C* 60: 637–643.
- Kaul R, Singh A, Vijh RK, Tania MS, Behl R (2001) Evaluation of the genetic variability of 13 microsatellite markers in native Indian pigs. *J Genet* 80: 149–53.
- Kesmen Z, Sahin F, Yetim H (2007) PCR assay for the identification of animal 476 species in cooked sausages. *Meat Sci* 77: 649–653.
- Kijas JM, Wales R, Törnsten A, Chardon P, Moller M, Andersson L (1998) Melanocortin receptor 1 (*MC1R*) mutations and coat color in pigs. *Genetics* 150: 1177–1185.
- Lhak O, Arslan A (2007) Identification of meat species by polymerase chain reaction (PCR) Technique. *Turk J Vet Anim Sci* 31: 159–163.
- Loftus R (2005) Farm to Fork Traceability through DNA Technology IdentiGEN Ltd, Dublin, Ireland Paul Laronde, Ontario Ministry of Agriculture and Food Ontario. Canada.
- Lopez-Andreo M, Lugo L, Garrido-Pertierra A, Prieto I, Puyet A (2005) Identification and quantitation of species in complex DNA mixtures by real-time polymerase chain reaction. *Anal Biochem* 339: 73–82.
- Lopez-Andreo M, Garrido-Pertierra A, Puyet A (2006) Evaluation of post polymerase chain reaction melting temperature analysis for meat species identification in mixed DNA samples. *J Agr Food Chem* 54: 7973–7978.
- Mane BG, SM endiratta K, Tiwari AK (2009) Beef specific polymerase chain reaction assay for authentication of meat and meat products. *Food Control* 28: 246–249.
- Mane BG, Mendiratta KS, Tiwari AK, Bhilegaokar KN (2012) Detection of adulteration of meat and meat products with buffalo meat employing polymerase chain reaction assay. *Food Anal Methods* 5: 296–300.
- Matasunaga T, Chikuni K, Tanabe R, Muroya S, Shaibata K, Yamaa J, Shinmura Y (1999) A quick and simple method for the identification of meat species and meat products by PCR assay. *Meat Sci* 51: 143–148.
- Meuwissen MPM, Velthuis AGJ, Hogeveen H, Huirne RBM (2003) Traceability and Certification in Meat Supply Chains. *JAB* 21: 167–181.
- Mutalib SA, Nazri WS, Shahimi WS, Yaakob N, Sani NA, Abdullah A, Babji AS, Ghan MA (2012) Comparison between pork and wild boar meat (*Sus scrofa*) by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *Sains Malays* 41: 199–204.
- Okumura N, Matsumoto T, Awata T (2008) Single nucleotide polymorphisms of the *KIT* and *KITL* genes in pigs. *Anim Sci J* 79: 303–313.

- Ong SB, Zuraini MI, Jurin WG, Cheah YK, Tunung R, Chai LC (2007) Meat molecular detection: sensitivity of polymerase chain reaction restriction fragment length polymorphism in species differentiation of meat from animal origin. *ASEAN Food J* 14: 51–59.
- Pereira F, Carneiro J, Amorim A (2008) Identification of species with DNA-based technology: current progress and challenges. *Recent Pat DNA Gene Seq* 2: 187–200.
- Rodríguez-Ramírez R, Arana A, Alfonso L, González-Córdova AF, Torrescano G, Guerrero-Legarreta I, Vallejo-Cordoba B (2011) Molecular traceability of beef from synthetic Mexican bovine breeds. *Genet Mol Res* 10: 2358–2365.
- Sakaridis I, Ganopoulos I, Argiriou A, Tsaftaris AS (2013) A fast and accurate method for controlling the correct labeling of products containing buffalo meat using high resolution melting (HRM) analysis. *Meat Sci* 94: 84–88.
- Scandura M, Iacolina L, Crestanello B, Pecchioli E, Di Benedetto MF, Russo V, Davoli R, Apollonio M, Bertorelle G (2008) Ancient vs. recent processes as factors shaping the genetic variation of the European wild boar: are the effects of the last glaciation still detectable. *Mol Ecol* 17: 1745–1762.
- Shackell GH, Tate ML, Anderson RM (2001) Installing DNA-based traceability system in the meat industry. *J Anim Breed Genet* 1: 533.
- Van der Vorst J (2006) Product traceability in food-supply chains. *AQA* 11: 33–37.
- Webb J (2004) Tracking pork from pen to plate. *Advances in Pork Production* 15: 33.
- Wu GS, Yao YG, Qu KX, Ding ZL, Li H, Palanichamy MG, Duan ZY, Li N, Chen YS, Zhang YP (2007) Population phylogenomic analysis of mitochondrial DNA in wild boars and domestic pigs revealed multiple domestication events in East Asia. *Genome Biol* 8: R245.
- Yin RH, Bai WL, Wang JM, Wu CD, Dou QL, Yin RL, He JB, Luo GB (2009) Development of an assay for rapid identification of meat from yak and cattle using polymerase chain reaction technique. *Meat Sci* 83: 38–44.
- จิรพร ชื่อจริง. ระบบการตรวจสอบย้อนกลับในการส่งออกผักสดโดยเทคโนโลยี QR code แหล่งข้อมูล: www.mlog.mut.ac.th/IS/2555/5417510018.pdf. (ธันวาคม 2556)
- RFID institute of Thailand. Case Study: การตรวจสอบย้อนกลับในเนื้อสัตว์ http://www.rfid.or.th/webdatas/download/dl_27.pdf (กันยายน 2557)