



การตรวจติดตามแบบที่เรียในกระเพาะรูเมนของโค
ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล

พฤษพร กันยา

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของความสมบูรณ์ของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้
มหาวิทยาลัยแม่โจ้
พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยแม่โจ้



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ชื่อเรื่อง

การตรวจติดตามแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค

ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล

โดย

พฤษพร กันยา

พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์)

วันที่ 16 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2555

กรรมการที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.แสงทอง พงษ์เจริญกิจ)

วันที่ 18 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2555

กรรมการที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ ดร.ปราโมช ศีตะโกเศศ)

วันที่ 18 เดือน ต.ค. พ.ศ. 55

ประธานกรรมการประจำหลักสูตร

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มงคล ถิรบุญยานนท์)

วันที่ 16 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2555

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จตุพงศ์ วาฤทธิ์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 19 เดือน ต.ค. พ.ศ. 2555

ชื่อเรื่อง	การตรวจติดตามแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล
ชื่อผู้เขียน	นางสาวพญพร กันยา
ชื่อปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
ประธานกรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปิยะนุช เนียมทรัพย์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคโดยตรง โดยปราศจากการเพาะเลี้ยง ด้วยการโคลนยีน 16S ribosomal RNA (16S rDNA) จากนั้นนำลำดับเบส 16S rDNA มาทำการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับเบสกับข้อมูลในฐานข้อมูล GenBank และการจัดกลุ่ม ซึ่งใช้โคพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียน (Holstein Friesian) เป็นตัวแทนในการศึกษา เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานสำหรับการออกแบบ 16S rDNA oligonucleotide primer และ TaqMan probe ที่ใช้ในการตรวจติดตามแบคทีเรียกลุ่มเป้าหมาย รวมทั้งหาความสัมพันธ์ระหว่างชนิดและปริมาณของแบคทีเรีย จากจำนวนโคลนทั้งสิ้น 69 โคลน พบว่ามีความเหมือนกับยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ จำนวน 27 โคลน และยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงไม่ได้ จำนวน 42 โคลน เมื่อนำทั้งหมดมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) พร้อมกับแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ 74 ชนิดจากฐานข้อมูล GenBank พบว่าในกระเพาะรูเมนของโค ประกอบไปด้วยแบคทีเรียจำนวน 7 กลุ่ม โดยประกอบด้วยกลุ่มใหญ่ 2 กลุ่ม คือ Low G+C Gram-positive bacteria (LGCGPB) เป็นจำนวน 43.5% ของโคลนทั้งหมด และกลุ่ม *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (CFB) เป็นจำนวน 37.7% ของโคลนทั้งหมด และแบคทีเรียกลุ่มย่อย 5 กลุ่ม คือ *Proteobacteria* เป็นจำนวน 7.3% ของโคลนทั้งหมด, *Rhodopirellula* เป็นจำนวน 5.8% ของโคลนทั้งหมด, *Victivellaceae bacterium/ Planctomycete* เป็นจำนวน 2.9% ของโคลนทั้งหมด, *Spirochaetes* เป็นจำนวน 1.4% ของโคลนทั้งหมด และ *Fibrobacteria* เป็นจำนวน 1.4% ของโคลนทั้งหมด

เมื่อทำการศึกษาบทบาทและหน้าที่ของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนแต่ละกลุ่ม พบว่ากลุ่ม LGCGPB และ CFB เป็นแบคทีเรียที่พบมากที่สุดในการเพาะรูเมนซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการย่อยสลายเยื่อใยและสร้างกรดไขมันระเหยง่าย (volatile fatty acid; VFA) ส่วนกลุ่ม *Proteobacteria* เป็นแบคทีเรียกลุ่ม fumarate reducing bacteria ที่ส่งเสริมในการสร้างก๊าซมีเทนและเป็นแบคทีเรียผลิตก๊าซมีเทนซึ่งเป็นผลเสียต่อสิ่งแวดล้อม ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกแบคทีเรีย 3 กลุ่ม

นี้ มาทำการออกแบบ 16S rDNA primer และ TaqMan probe ที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียกลุ่มเป้าหมายดังกล่าวเท่านั้น เพื่อศึกษาการตรวจติดตามแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคโดยวิธี real-time PCR ในการให้อาหารโคที่มีอัตราส่วนอาหารข้นต่ออาหารหยาบแตกต่างกัน 4 สูตร คือ 0:100, 20:80, 40:60 และ 60:40 เป็นระยะเวลา 10 วัน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนมาวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันระเหยง่าย และสกัดดีเอ็นเอเพื่อหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด และแบคทีเรีย 3 กลุ่มคือ กลุ่ม LGCGPB, CFB และ *Proteobacteria* ในกระเพาะรูเมนของโค ด้วยเทคนิค real-time PCR ในอาหาร 4 สูตรแตกต่างกันนี้ พบว่าอาหารสูตรที่ 1 ที่ประกอบด้วยฟางข้าว 100% มีปริมาณ VFA มากที่สุด และมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* น้อยที่สุด และเมื่อปริมาณอาหารข้นเพิ่มมากขึ้น ปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* ก็จะเพิ่มขึ้นเช่นกัน ส่วนปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB และ CFB ไม่มีความแตกต่างกันมากในอาหารทั้ง 4 สูตร ดังนั้นอาหารสูตรที่ 1 มีความเป็นไปได้ว่าเป็นอาหารสูตรที่มีการผลิตก๊าซมีเทนน้อยที่สุด เนื่องจากมีกลุ่ม *Proteobacteria* ที่สามารถผลิตก๊าซมีเทน ซึ่งพบน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับอาหารสูตรอื่นๆ ที่ผสมอาหารข้น เพราะการผลิตก๊าซมีเทนมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นในกระเพาะรูเมนเมื่อโคกินอาหารที่มีพวกเชื้อใยต่ำ ดังนั้นจากผลงานวิจัยการศึกษานิสเวศวิทยาของแบคทีเรียในรูเมนโดยวิธีทางด้านชีววิทยาโมเลกุล ในการหาลำดับเบสของยีนส่วน 16S rRNA และการตรวจติดตามแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนด้วยเทคนิค real-time PCR ครั้งนี้สามารถนำข้อมูลแบคทีเรียที่ได้เป็นความรู้พื้นฐานเพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาอาหารของโค และเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตโคเพิ่มมากขึ้นต่อไป

Title	Bacterial Monitoring by Molecular Biology Techniques in Cow Rumen
Author	Ms. Phuksaphorn Kanya
Degree of	Master of Science in Biotechnology
Advisory Committee Chairperson	Assistant Professor Dr. Piyanuch Niamsup

ABSTRACT

This research was conducted to study bacterial diversity in the rumen of ruminal fistulated Holstein Friesian cow directly in a culture-independent manner by cloned 16S ribosomal RNA (16S rDNA) followed by the analysis of 16S rDNA sequence to test the homogeneity analysis of DNA sequence with GenBank database and their groupings. The Holstein Friesian cows were used to attain database to design 16S rDNA oligonucleotide primer and TaqMan probe used to monitor target bacteria and to identify relationship between bacterial types and population in the rumen from a total of 69 clones. Results showed homogeneity with 16S rRNA clones was observed among 27 clones in cultured rumen bacteria and 42 clones in uncultured group. Analysis using a phylogenetic tree of all the clones together with 74 16S rDNA from GenBank, indicated that cow rumen contained seven groups consisting of two major groups: 43.5% of Low G + C Gram positive bacteria (LGCGPB); and 37.7% of *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (CFB). The remainder of the total clones were identified as *Proteobacteria* (7.3%), *Rhodopirellula* (5.8%), *Victivallaceae bacterium/ Planctomycete* (2.9%), *Fibrobacteria* (1.4%) and *Spirochaetes* (1.4%).

On the results of the study on the role and function of each group of the cow rumen bacteria, it was found that the LGCGPB and CFB which were mostly found, had an important function on diet fiber degradation in ruminants and production of volatile fatty acid (VFA). On the other hand, *Proteobacteria* was a fumarate reducing bacteria that promoted production of methane gas, a bad influence to the environment. This work was conducted to design a specific primer (16S rDNA) and TaqMan probe sets for the detection of LGCGPB, CFB and *Proteobacteria* group using a real-time PCR with a TaqMan system. Four dietary treatment ratios were mixed to concentrate diets to hay, 0:100, 20:80, 40:60 and 60:40. Rumen fluid

samples were taken to analyze VFA and extract DNA to measure total bacterial count including 3 major bacterial groups of LGCGPB, CFB and *Proteobacteria* in the cow rumen. It was found that Treatment 1 containing 100% hay had the highest amount of VFA but lowest amount of *Proteobacteria*. Increasing amount of concentrate diet tended to increase the amount of *Proteobacteria* group as well. However, LGCGPB and CFB group showed no difference among all other treatments. Therefore, Treatment 1 showed greatest feasibility of reducing methane in the rumen because the presence of *Proteobacteria* group was able to produce lowest amount of methane gas as compared to other treatments. Generally, methane is increased when cows are fed low fiber diet. Therefore, from this research study on bacterial monitoring of the diversity of rumen bacteria using 16S rRNA gene and real-time PCR technique, overall understanding will serve as basic knowledge in developing cow rumen feed and increasing production efficiency.

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษางานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยความกรุณาของประธานกรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะนุช เนียมทรัพย์ กรรมการที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. แสงทอง พงษ์เจริญกิต และ รองศาสตราจารย์ ดร.ปราโมช ศีตะโกเศศ ที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน พร้อมทั้งให้คำปรึกษา และคำแนะนำในการแก้ไขปัญหา ตลอดจนดำเนินงานวิจัย อีกทั้งยังสละเวลาอันมีค่าในการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ตลอดจนคอยให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด ทั้งนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการศึกษาวิจัย และวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ถือเป็นส่วนหนึ่งของแผนงานวิจัย “การศึกษาแบบที่เรียในกระเพาะรูเมนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารโค” ในปีงบประมาณ 2552 และ 2553

ขอกราบขอบพระคุณฟาร์มโคนมไร้แม่เหิยะ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อสถานที่และโคนมพันธุ์ Holstein Friesian จำนวน 2 ตัว รวมทั้งเจ้าหน้าที่ในฟาร์มและพี่ ณรณมล เลาห์รอดพันธ์ นักศึกษาปริญญาเอก คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ช่วยเหลือในการเลี้ยง โคและให้อาหารโคตลอดจนเสร็จสิ้นการทดลอง

ขอกราบขอบพระคุณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ลำปาง กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตร อาหารสัตว์กลาง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์เอื้ออาหารหยาบและอาหารข้นใช้ในการทดลองจนเสร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี รวมทั้งคุณเรือนแก้ว ประพศิต นักวิทยาศาสตร์ สถาบัน IQS มหาวิทยาลัยแม่โจ้

นอกจากนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อสมบุญ และคุณแม่วันนา และครอบครัวของข้าพเจ้า ที่ได้มอบโอกาสที่ดีในการศึกษาครั้งนี้ รวมถึงพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอด

ประ โยชน์ และความดี อันเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้จะพึงมีเพียงใด ขอมอบแต่คุณพ่อคุณแม่ผู้อบรมเลี้ยงดู และให้การศึกษา ตลอดจนครูอาจารย์ที่ประสิทธิ์ประสาทความรู้ และอบรมสั่งสอนตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ผู้เขียนมีความซาบซึ้งอย่างยิ่งในความเมตตากรุณาจากทุกท่านที่ได้กล่าวนามมา และขอกราบขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

พฤษพร กันยา

ตุลาคม 2555

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
ABSTRACT	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญเรื่อง	(8)
สารบัญตาราง	(11)
สารบัญภาพ	(13)
สารบัญตารางภาคผนวก	(17)
สารบัญภาพภาคผนวก	(18)
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	4
ระบบการย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง	4
จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน	6
กรดไขมันระเหยง่าย (Volatile fatty acid; VFA) ในกระเพาะรูเมน	14
ชนิดและบทบาทของอาหารโค	26
การศึกษาแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนโดยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล	29
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	39
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	43
อุปกรณ์เครื่องมือ	43
สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	44
เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน	46
ลำดับเบสดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย	46
โปรแกรมคอมพิวเตอร์	48
ขนาดของจีโนมที่ใช้ในการคำนวณกราฟมาตรฐานของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน	48
Primer และ Probe ที่ใช้ในการวิจัย	49

โคนมที่ใช้ในการศึกษา	50
อาหารเลี้ยงโค	50
แนวทางในการดำเนินงานวิจัย	51
ขั้นตอนในการวิจัย	52
บทที่ 4 ผลและการอภิปรายผลการวิจัย	70
ผลการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลของชิ้นส่วน 16S rRNA และ ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)	70
ผลการออกแบบ 16S rDNA primer และ TaqMan probes สำหรับการทำ real-time PCR	84
ผลการทดสอบความจำเพาะของ primer และ probe ด้วยเทคนิค conventional PCR และ real-time PCR	91
ผลการศึกษาชนิดและปริมาณของกลุ่มแบคทีเรียที่มีอยู่จริงโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล	101
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	116
บรรณานุกรม	118
ภาคผนวก	125
ภาคผนวก ก ปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานและเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างกระเพาะรูเมนที่ให้อาหารสูตรแตกต่างกันที่วัดได้จากเครื่องปริมาณดีเอ็นเอรุ่น Nano Drop 2000c Spectrophotometer	126
ภาคผนวก ข ผลการทำ gel electrophoresis ในการทดสอบ probe ด้วย real-time PCR	131
ภาคผนวก ค ข้อมูลดิบในการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในตัวอย่างของเหลวกระเพาะรูเมนในการเลี้ยงด้วยอัตราส่วนอาหารข้นต่ออาหารหยาบต่างกัน 4 สูตร ด้วยเครื่อง real-time PCR	135

ภาคผนวก ง ลำดับเบสของยีนส่วน 16S rRNA ที่ได้จากการโคลนยีนส่วน 16S rRNA ของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian จำนวน 3 ตัว ทั้งหมด 69 โคลน (ได้มาจากการทดลองในโครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาแบคทีเรีย ในกระเพาะรูเมนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารโค มหาวิทยาลัยแม่โจ้)	144
ภาคผนวก จ ประวัติผู้วิจัย	167

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 กลุ่มของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในรูเมนแบ่งตามชนิดของสารประกอบที่ใช้	10
2 Accession number ของแบคทีเรีย 163 ชนิดที่นำมาจากฐานข้อมูลใน GenBank	47
3 ขนาดจีโนมของเชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณกราฟมาตรฐาน	48
4 Primer และ Probe ที่ใช้ในการวิจัย	49
5 ส่วนประกอบอาหารขึ้น	50
6 ความจำเพาะของ probe และ primer ต่อเชื้อมาตรฐานทั้ง 3 กลุ่ม	55
7 ผลที่คาดว่าจะเกิดขึ้นในการทดสอบความจำเพาะต่อแบคทีเรียมาตรฐานทั้ง 3 กลุ่ม	56
8 ส่วนประกอบของ PCR reaction และ PCR program ในการทดสอบ primer ทั้ง 4 กลุ่ม ด้วยเทคนิค conventional PCR	56
9 ส่วนประกอบของ PCR reaction และ PCR program ในการทดสอบ TaqMan probe ทั้ง 4 กลุ่ม ด้วยเทคนิค real-time PCR	57
10 การเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนของโคในการเลี้ยงด้วยอาหารสูตรแตกต่างกัน	61
11 ปริมาณมวลดีเอ็นเอต่อจีโนมของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานแต่ละกลุ่ม	64
12 การ dilution ความเข้มข้นจำนวน copy number ของแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB	67
13 การ dilution ความเข้มข้นจำนวน copy number ของแบคทีเรียกลุ่ม <i>Proteobacteria</i>	67
14 การ dilution ความเข้มข้นจำนวน copy number ของแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacteria)	68
15 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (BLAST) ของลำดับเบสยีนส่วน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการโคลนยีนส่วน 16S rRNA ของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian จำนวน 3 ตัว กับดีเอ็นเอจากฐานข้อมูล NCBI	71
16 การกระจายตัวของยีนส่วน 16S rRNA ที่ได้จากการโคลนนิ่งของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian	76
17 ตำแหน่งลำดับเบส primer และ probe ของแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB ที่คัดเลือกจากการ alignment	86
18 ตำแหน่งลำดับเบส primer และ probe ของแบคทีเรียกลุ่ม CFB ที่คัดเลือกจากการ alignment	87

ตาราง

หน้า

19	ตำแหน่งลำดับเบส primer และ probe ของแบคทีเรียกลุ่ม <i>Proteobacteria</i> ที่คัดเลือกจากการ alignment	88
20	คุณสมบัติของ primer และ probe ของแบคทีเรียแต่ละกลุ่ม	89
21	Primer และ probe ที่ออกแบบได้	90
22	ผลการวิเคราะห์อาหารขึ้นและอาหารหยาบ	101
23	ผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่าย (volatile fatty acid; VFA) ในตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian ที่มีการเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่แตกต่างกัน	102
24	ปริมาณ VFA ที่ได้จากระบวนการหมักในกระเพาะรูเมนจากการให้อาหารที่แตกต่างกัน	103
25	ผลการวิเคราะห์ปริมาณของแบคทีเรียต่อปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ 50 ng ในการทำปฏิกิริยา PCR ใน real-time PCR ทั้ง 3 กลุ่มจากตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian ที่มีการให้อัตราส่วนอาหารขึ้นและอาหารหยาบที่แตกต่างกัน	109
26	ผลการศึกษาปริมาณของแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มที่มีอยู่จริงในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian ในการให้อัตราส่วนอาหารขึ้นต่ออาหารหยาบที่แตกต่างกัน 4 สูตร	110
27	ปริมาณ VFA และปริมาณแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนเฉลี่ยที่พบในอาหารที่มีสัดส่วนอาหารขึ้นและอาหารหยาบต่างกัน 4 สูตร	112

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
1 กระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง	4
2 ขบวนการเมแทบอลิซึมคาร์โบไฮเดรตในกระเพาะรูเมน	15
3 ขั้นตอนเริ่มต้นของขบวนการเมแทบอลิซึมของ propionate	17
4 ขบวนการหมักในกระเพาะรูเมนของคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญในพืช	19
5 การสังเคราะห์ VFA ในกระเพาะรูเมน	20
6 การนำ VFA ไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน	23
7 องค์ประกอบของไรโบโซมในโปรคาริโอต (แบคทีเรีย)	31
8 องค์ประกอบที่สำคัญของไฟโลจีนติกทรี ทรีในรูปแบบ ก และ ข เป็นแบบชนิดมีราก โดยรูป ข หรืออยู่ในลักษณะเส้นนอน และเส้นตั้ง ส่วนรูป ก เป็นแบบไม่มีราก ทั้งสามทรีนี้มีโทโพโลยี เหมือนกัน A-E คือ แทกซา โดย A, B แยกมาจากโนดหนึ่ง และ D, E จากอีกโนดหนึ่ง และแทกซา A, B, C อยู่ในคลด หนึ่งส่วนแทกซา D, E อยู่อีกคลดหนึ่งต่างคลดกัน	34
9 ระบบการเรืองแสงของ TaqMan probe ที่ประกอบด้วย fluorophore และ quencher ติดที่ปลาย 5' และปลาย 3' (A) ลำดับเบส probe ที่จะจับกับ DNA template ระหว่างการ annealing ของการทำ PCR (B) 5'-3' exonuclease activity ของ Taq DNA polymerase เข้ามาตัดลำดับเบสของ probe ออก และทำให้ fluorophore และ quencher หลุดแยกออกจากกันเป็นอิสระ (C) ทำให้เกิดการคายพลังงานในรูปแบบของแสงเกิดเรืองแสงของ fluorescent เกิดขึ้น	37
10 ขั้นตอนในการศึกษาวิจัย	51
11 การทดสอบความจำเพาะของ probe แต่ละกลุ่มด้วยเทคนิค real-time PCR	59
12 ตัวอย่างการศึกษาปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม CFB ในกระเพาะรูเมนที่ให้อาหาร สูตรต่างกัน	63
13 Phylogenetic tree ของลำดับเบส 16S rRNA ยีนที่ได้จากการโคลนนิ่งของแบคทีเรีย ในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian โดยใช้ <i>Aquifex pyrophilus</i> เป็น out-group ในการตรึงรากและตัวเลขที่จุดร่วม (nodes) ของ tree แสดง เปอร์เซ็นต์ความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้าง tree ด้วย bootstrap test จำนวน 1000 ครั้ง	75

ภาพ

หน้า

- 14 Phylogenetic tree ชนิดของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian ที่อยู่ในกลุ่มของ CFB group จากการทำ phylogenetic tree ของลำดับเบส 16S rRNA ขึ้น (ภาพ 13) 79
- 15 ชนิดของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของ โคนมพันธุ์ Holstein Friesian ที่อยู่ในกลุ่มของ LGCGPB group และ *Proteobacteria* group จากการทำ phylogenetic tree ของลำดับเบส 16S rRNA ขึ้น (ภาพ 13) 80
- 16 ผลการทดสอบ primer 4 คู่ ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน *Clostridium amylolyticum* (JCM14823), *Bacteroides vulgatus* (JCM5826), *Prevotella albensis* (JCM12258), *Salmonella enteritidis* (DMST15676) และ *Escherichia coli* (DMST12743) 93
- 17 การทดสอบความจำเพาะของ probe CFBProbe แบคทีเรียกลุ่ม CFB ด้วยเทคนิค real-time PCR 94
- 18 Gel electrophoresis ของการทดสอบ CFBProbe แบคทีเรียกลุ่ม CFB ด้วยเทคนิค real-time PCR 95
- 19 การทดสอบความจำเพาะของ probe BACProbe ของแบคทีเรียทั้งหมดด้วยเทคนิค real-time PCR 95
- 20 การทดสอบความจำเพาะของ probe ด้วยเทคนิค real-time PCR ในสภาวะที่ 1; ภาพ A คือ probe LGCProbe และ ภาพ B คือ probe PROProbe 96
- 21 การทดสอบความจำเพาะของ probe ด้วยเทคนิค real-time PCR ในสภาวะที่ 2; ภาพ A คือ probe LGCProbe และ ภาพ B คือ probe PROProbe 97
- 22 การทดสอบความจำเพาะของ probe ด้วยเทคนิค real-time PCR ในสภาวะที่ 3; ภาพ A คือ probe LGCProbe และ ภาพ B คือ probe PROProbe 98
- 23 การทดสอบความจำเพาะของ probe ด้วยเทคนิค real-time PCR ในสภาวะที่ 4; ภาพ A คือ probe LGCProbe และ ภาพ B คือ probe PROProbe 99

- 24 การศึกษาปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB โดยใช้ *Clostridium amylolyticum* (JCM14823) เป็นตัวแทนในการทำ standard curve ด้วยเทคนิค real-time PCR; A คือ standard curve ระหว่าง log fluorescence กับ cycle, B คือ standard curve ระหว่าง log quantity กับ C(T) cycle, C คือ กราฟแสดงการตรวจจับแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB ในตัวอย่างของเหลวกระเพาะรูเมน เป็นกราฟระหว่าง log fluorescence กับ cycle 105
- 25 การศึกษาปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม CFB โดยใช้ *Bacteroides vulgatus* (JCM5826) เป็นตัวแทนในการทำ standard curve ด้วยเทคนิค real-time PCR; A คือ standard curve ระหว่าง log fluorescence กับ cycle, B คือ standard curve ระหว่าง log quantity กับ C(T) cycle, C คือ กราฟแสดงการตรวจจับแบคทีเรียกลุ่ม CFB ในตัวอย่างของเหลวกระเพาะรูเมน เป็นกราฟระหว่าง log fluorescence กับ cycle 106
- 26 การศึกษาปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* โดยใช้ *Salmonella enteritidis* (DMST15676) เป็นตัวแทนในการทำ standard curve ด้วยเทคนิค real-time PCR; A คือ standard curve ระหว่าง log fluorescence กับ cycle, B คือ standard curve ระหว่าง log quantity กับ C(T) cycle, C คือ กราฟแสดงการตรวจจับแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* ในตัวอย่างของเหลวกระเพาะรูเมน เป็นกราฟระหว่าง log fluorescence กับ cycle 107
- 27 การศึกษาปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดโดยใช้ *Escherichia coli* (DMST12743) เป็นตัวแทนในการทำ standard curve ด้วยเทคนิค real-time PCR; A คือ standard curve ระหว่าง log fluorescence กับ cycle, B คือ standard curve ระหว่าง log quantity กับ C(T) cycle, C คือ กราฟแสดงการตรวจจับแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างของเหลวกระเพาะรูเมน เป็นกราฟระหว่าง log fluorescence กับ cycle 108
- 28 การเปรียบเทียบปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม CFB, LGCGPB และ *Proteobacteria* ในการเลี้ยงโคด้วยอัตราส่วนอาหารข้นและหยาบ 4 สูตร; 1 = 0:100, 2 = 20:80, 3 = 40:60 และ 4 = 60:40 111

ภาพ

หน้า

- 29 การเปรียบเทียบปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacteria) ในการเลี้ยงโค
ด้วยอัตราส่วนอาหารข้นและหยาบ 4 สูตร; 1 = 0:100, 2 = 20:80, 3 = 40:60 และ
4 = 60:40

111



สารบัญตารางภาคผนวก

ตารางผนวก

หน้า

1	ผลการวัดปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานและเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนที่ให้อาหารสูตรแตกต่างกันที่วัดได้จากเครื่องปริมาณดีเอ็นเอรุ่น Nano Drop 2000c spectrophotometer	127
2	ผลการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม CFB group ด้วยเครื่อง real-time PCR	136
3	ผลการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB group ด้วยเครื่อง real-time PCR	138
4	ผลการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม <i>Proteobacteria</i> group ด้วยเครื่อง real-time PCR	140
5	ผลการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (Total Bacteria) ด้วยเครื่อง real-time PCR	142

สารบัญภาพภาคผนวก

ภาพผนวก	หน้า
1 ผลการทำ gel-electrophoresis ในการทดสอบ probe Total Bacteria (BACProbe) ด้วย real-time PCR	132
2 ผลการทำ gel-electrophoresis ในการทดสอบสถานะที่ 1 (LGCProbe และ PROProbe) ด้วย real-time PCR	132
3 ผลการทำ gel-electrophoresis ในการทดสอบสถานะที่ 2 (LGCProbe และ PROProbe) ด้วย real-time PCR	133
4 ผลการทำ gel-electrophoresis ในการทดสอบสถานะที่ 3 (LGCProbe และ PROProbe) ด้วย real-time PCR	133
5 ผลการทำ gel-electrophoresis ในการทดสอบสถานะที่ 4 (LGCProbe และ PROProbe) ด้วย real-time PCR	134

บทที่ 1

บทนำ

จากแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 4-ฉบับปัจจุบัน ได้มีการส่งเสริมให้เกษตรกรได้เพิ่มการเลี้ยงโคให้มากขึ้นเพื่อลดพื้นที่การเพาะปลูกพืชไร่บางชนิดที่มีปัญหาเรื่องผลผลิตและราคาคงต่ำ จากการส่งเสริมอาชีพโคดังกล่าวได้มีการณรงค์และสนับสนุนให้ประชาชนบริโภคเนื้อมันเพิ่มมากขึ้นด้วย ดังนั้นเนื้อมันดิบที่จะผลิตเป็นเนื้อมันพร้อมดื่มจึงต้องมีคุณภาพดี ซึ่งมีปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องคือสุขภาพแม่โคและการจัดการฟาร์ม โดยปัจจุบันมีรายงานว่าได้มีการเลี้ยงโคเพิ่มสูงขึ้น แต่ความสามารถในการผลิตเนื้อมันของแม่โคยังไม่มีประสิทธิภาพสาเหตุสำคัญส่วนใหญ่ นอกจากปัญหาด้านพันธุ์โคแล้ว การจัดการอาหารโคในระยะต่างๆ นับยังเป็นปัญหาสำคัญอย่างยิ่ง ซึ่งพื้นฐานสำคัญของการศึกษาสรีรวิทยาระบบทางเดินอาหารและโภชนาการของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง จะใช้จุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารในการศึกษา เนื่องจากโคทั่วไปแล้วในสัตว์เคี้ยวเอื้องจะไม่มีเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารใดๆ ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลสและ polymer ของพืชได้ จึงต้องอาศัยกระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจที่จะศึกษาแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในกระเพาะรูเมนโดยใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล เพื่อนำข้อมูลพื้นฐานที่ได้ไปใช้ในการปรับใช้เทคโนโลยีชีวภาพทางอาหารของโคให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นต่อไป ซึ่งในอดีตการศึกษาชนิดของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนนั้นทำได้ยาก เนื่องจากต้องอาศัยกระบวนการเพาะเลี้ยง ซึ่งมีข้อจำกัดในการตรวจสอบ เพราะแบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ หากเพาะเลี้ยงได้ก็ใช้เวลานานและเกิดความผิดพลาดในการตรวจสอบได้ง่ายเนื่องจากเชื้อบางชนิดมีคุณลักษณะใกล้เคียงกัน งานวิจัยนี้ได้ใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล คือ ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคโดยการหาลำดับเบสของยีน 16S ribosomal RNA (rDNA) ร่วมกับเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลมาใช้ในการแก้ไขปัญหาที่เกิดจากข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยงดังกล่าว โดยเทคนิคนี้ไม่ต้องอาศัยการเพาะเลี้ยง อีกทั้งยังใช้เวลารวดเร็วในการทดสอบ

นอกจากนี้ถึงแม้ว่าจะมีงานวิจัยในต่างประเทศ ได้รายงานผลของการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคนมโดยการหาลำดับเบสส่วน 16S rDNA มาบ้างแล้ว แต่ในประเทศไทยเองยังไม่มีรายงานมาก่อน ซึ่งโครงการวิจัยนี้จะทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในกระเพาะรูเมนของโคที่มีการเลี้ยงในประเทศไทย ซึ่งมีสภาพแวดล้อมและการใช้อาหารที่แตกต่างจากต่างประเทศ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง และประโยชน์ที่ได้จากงานวิจัยนี้ คือ เพื่อนำข้อมูลพื้นฐานที่ได้ไปใช้ในการปรับใช้เทคโนโลยีชีวภาพทางอาหาร

ของโคให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น และนอกจากนี้จากการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนโดยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล ยังอาจทำให้มีการค้นพบยีนบางชนิดที่มีประโยชน์ในการนำมาประยุกต์ใช้ในระดับเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมได้ เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งเอนไซม์เซลลูเลส สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์และการผลิตพลังงานทดแทนเอธานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร หรือยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแบคทีเรียโอซิน ซึ่งสารแบคทีเรียโอซินสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหารและป้องกันการเกิดโรคด้านมออักเสบได้อีกด้วย เป็นต้น



วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค โดยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานสำหรับการออกแบบ 16S rDNA oligonucleotide primer และprobe รวมทั้งความสัมพันธ์ระหว่างชนิดและปริมาณของแบคทีเรีย
2. เพื่อศึกษาการตรวจติดตามแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคโดยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล
3. เพื่อศึกษาการพัฒนาอาหาร โค และหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดไขมันระเหยง่ายกับปริมาณแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคในอาหารสูตรแตกต่างกัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระเพาะรูเมนของโคไปหาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในแต่ละกลุ่มกับประสิทธิภาพการย่อยอาหารของโค รวมถึงได้วิธีการที่มีความแม่นยำในการตรวจจับ เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของจำนวนประชากรแบคทีเรียที่สำคัญในกระเพาะรูเมน และได้องค์ความรู้ใหม่ในด้านอาหารของโค ได้สูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพที่สามารถแนะนำให้เกษตรกรและบริษัทผู้ผลิตอาหารสัตว์ได้

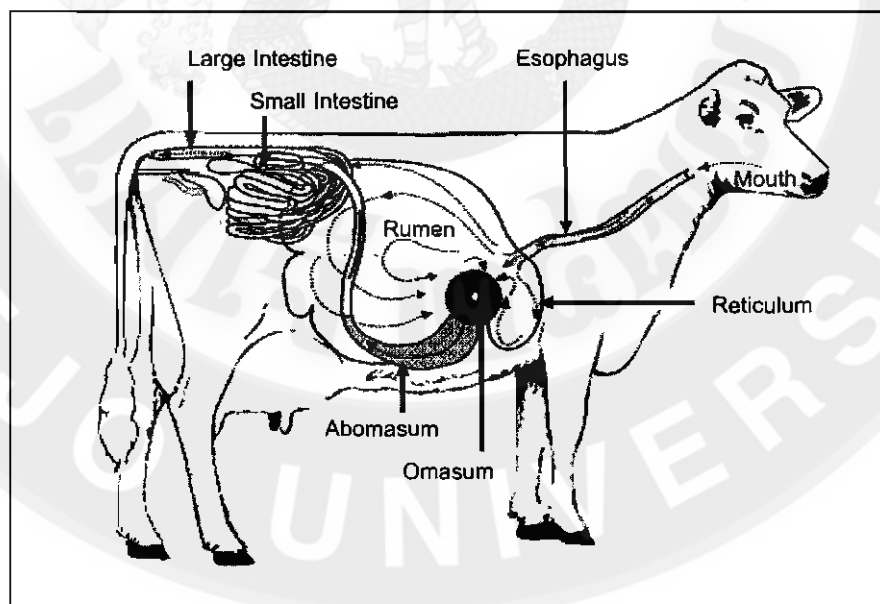
บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

ระบบการย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง

กระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง (บุญล้อม, 2527; วิบุลย์ศักดิ์ และ ญาณิน, 2534; ปราโมช, 2543)

กระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้องแบ่งได้เป็น 4 ส่วนด้วยกัน โดยมีสัดส่วนขนาดต่างๆ ในขณะที่สัตว์โตเต็มที่ แต่ละกระเพาะมีขนาดดังต่อไปนี้คือ ส่วนที่ 1 รูเมน (Rumen) หรือที่เรียกว่า ผ้าขี้ริ้ว มีขนาดประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ของเนื้อที่กระเพาะรวมทั้งหมด ส่วนที่ 2 เรติคูลัม (Reticulum) หรือที่เรียกว่า รังผึ้ง มีขนาดประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์ของเนื้อเยื่อกระเพาะรวมกันทั้งหมด ส่วนที่ 3 โอมาซั่ม (Omasum) หรือที่เรียกว่า สามสิบกลีบ มีขนาดประมาณ 7-8 เปอร์เซ็นต์ของเนื้อที่กระเพาะทั้งหมด ส่วนที่ 4 อะโบมาซั่ม (Abomasum) หรือที่เรียกว่ากระเพาะแท้ มีขนาดประมาณ 8-7 เปอร์เซ็นต์ของเนื้อที่กระเพาะทั้งหมด แสดงดังภาพที่ 1



ภาพ 1 กระเพาะสัตว์เคี้ยวเอื้อง

ที่มา: เทิดชัย (2548)

ส่วนที่ 1 รูเมน (Rumen) หรือที่เรียกว่า ผ้าชีว์ มีความจุถึง 80% ของปริมาตรทั้งหมด มีหน้าที่หลัก 3 ประการคือ

1. เก็บอาหารในส่วนที่กินเข้ามาใหม่ และส่วนที่มีขนาดใหญ่รอการเคี้ยวเอื้อง
2. มีการบีบตัวเพื่อเกิดการเคลื่อนที่ของอาหารส่วนที่ละเอียดเดินทางต่อไป
3. เป็นดังหมักโภชนา โดยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในกระเพาะรูเมน

กระเพาะรูเมนจะอยู่ติดกับผนังด้านซ้ายของช่องท้อง ผนังด้านในมีลักษณะคล้ายผ้าขนหนู เรียกว่า papillae ทำหน้าที่คลุกเคล้าอาหาร การเคลื่อนบีบตัวของกระเพาะรูเมนและการดูดซึมผ่านของกรดไขมันระเหยง่าย เป็นดังหมักโภชนา โดยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในกระเพาะรูเมน จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์แก่โค คือ แบคทีเรีย ที่มีความสำคัญได้แก่ จุลินทรีย์ที่ย่อยคาร์โบไฮเดรต ซึ่งผลจากการย่อยของแบคทีเรียที่สำคัญได้แก่ กรดไขมันระเหยง่าย และแอมโมเนีย ซึ่งจะถูดูดซึมผ่าน papillae ของรูเมน แก๊สที่เป็นผลจากการย่อยที่สำคัญได้แก่ มีเทนและคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งโคจะขจัดออกโดยการเรอ โดยการบีบตัวของรูเมน ซึ่งหากแก๊สเหล่านี้ระบายออกไม่ได้เพราะหลอดถูกปิดกั้น หรือแก๊สเกิดมากเกินไปจะทำให้เกิดท้องอืด (bloat) ที่มีผลทำให้โคตายได้ นอกจากแบคทีเรียจะย่อยโภชนาในอาหารแล้ว ยังมีชนิดอื่น ๆ ที่สามารถสังเคราะห์วิตามินได้ เช่น บีคอมเพลกซ์ และ เค

ส่วนที่ 2 เรติคูลัม (Reticulum) หรือที่เรียกว่า รังผึ้ง เป็นกระเพาะที่รับอาหารจากหลอดอาหาร มีลักษณะเป็นถุงขนาดเล็ก ความจุประมาณ 5 % ของปริมาตรทั้งหมดของกระเพาะ อยู่ติดกับส่วนหน้าของกระเพาะรูเมนผนังด้านในมีลักษณะเป็นแอ่งหกเหลี่ยมคล้ายรังผึ้ง นอกจากนี้ยังมี esophageal groove ซึ่งมีลักษณะเป็นท่อที่เกิดขึ้นจากการรวมตัวกันของกล้ามเนื้อสองกลุ่มที่มีการพัฒนาเป็นอย่างดีทำหน้าที่เชื่อมระหว่าง reticulum และ omasum ทำให้อาหารไหลผ่านโดยไม่ถูกย่อยในกระเพาะรูเมน ท่อนี้จะถูกกระตุ้นโดยการดูดนม กลืนของโซเดียมและคอปเปอร์ ส่วนอาหารหยาบจะส่งคืนมายังรูเมน เพื่อเคี้ยวเอื้อง

ส่วนที่ 3 โอม่าซัม (Omasum) หรือที่เรียกว่า สามสิบกลีบ มีความจุ 7-8% ของปริมาตรทั้งหมด อยู่ติดส่วนหน้ากระเพาะรูเมน มีลักษณะรูปกลม เป็นทางผ่านของอาหารโดยทางเปิดเข้าและเปิดออก อยู่ห่างกันเพียง 3 นิ้ว ผนังด้านในมีลักษณะเป็นแถบเรียกว่า laminae บนผิวของแถบมีปุ่มจำนวนมาก มีหน้าที่ในการบดขยี้และกรองอาหารให้มีขนาดเล็ก (ดูดซับน้ำ)

ส่วนที่ 4 อะโบมาซัม (Abomasum) หรือที่เรียกว่า กระเพาะแท้ เป็นส่วนที่มีการผลิตเอนไซม์ในการย่อยโภชนาต่างๆ ที่ผ่านเข้ามา โดยมีกรดเกลือเป็นตัวทำให้เกิดสภาพความเป็นกรด 2.1-4.4 เพื่อให้โภชนาตกตะกอนมีเวลาในการย่อยนานขึ้น และยังมีสารเมือกป้องกันไม่ให้เอนไซม์ย่อยเซลล์เยื่อทางเดินอาหารเองด้วย ในส่วนนี้จะมีโปรเอนไซม์ เปปไซม์โนเจน

(pepsinogen) ที่ต้องอาศัยกรดเกลือในการเปลี่ยนเป็นเปปซิน (pepsin) ที่จะย่อยโปรตีนได้ผลผลิตส่วนใหญ่เป็นโพลีเปปไทด์ (polypeptide) และส่วนน้อยเป็นกรดอะมิโน เอนไซม์ที่พบในอะโบมาซันนี้คือ เรนิน (rennin) ซึ่งมีความสำคัญในลูกโคระยะกินนม เพราะทำให้เคซีนในน้ำนมจับตัวเป็นก้อน ไหลผ่านระบบทางเดินอาหารช้าลง นอกจากนี้ยังมีเอนไซม์ไลเปส (lipase) มีหน้าที่ย่อยไขมัน แต่จะทำงานได้น้อยเพราะในอะโบมาซันนี้สภาพความเป็นกรดสูงเกินไป

แบบของการย่อยอาหารในสัตว์เคี้ยวเอื้อง มี 3 แบบ ดังนี้ (พานิช, 2512)

1. การย่อยโดยวิธีกล ได้แก่การบดเคี้ยวอาหารในปากโดยใช้ฟัน เหงือก กล้ามเนื้อ และน้ำลายช่วย
2. การย่อยโดยวิธีทางเคมี คือ การย่อยอาหารโดยน้ำย่อยชนิดต่างๆในกระเพาะที่ 4 และลำไส้เล็ก
3. การย่อยโดยแบคทีเรีย ได้แก่การหมักอาหารในกระเพาะรูเมนและลำไส้ใหญ่

จุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน

กฤษ (2547) และ เทิดชัย (2548) กล่าวว่าภายในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้องมีจุลินทรีย์อาศัยอยู่มากมายหลายชนิด ในแต่ละชนิดก็มีลักษณะที่แตกต่างกันแต่จุลินทรีย์บางชนิดก็จะมี ความคล้ายคลึงกันบ้างในบางส่วน แต่จำนวนประชากรและชนิดของจุลินทรีย์จะมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารที่สัตว์เคี้ยวเอื้องได้รับ โดยปกติแล้วจะมีจุลินทรีย์อาศัยอยู่ภายหลังจากเกิดทันที มีจุลินทรีย์หลายๆ ชนิดที่เข้าไปอาศัยอยู่ในลำไส้ส่วนต่างๆ ขึ้นอยู่กับความสามารถของจุลินทรีย์นั้นๆ ในการจะอยู่รอด ในสภาวะต่างๆ ซึ่งจะแตกต่างกันในแต่ละส่วนของทางเดินอาหาร ที่อยู่ของจุลินทรีย์ดังกล่าวจะเปลี่ยนแปลง เมื่อสัตว์เจริญวัยขึ้นและอาจจะมีการเปลี่ยนแปลงของทางเดินอาหารทั้งทางยาวคือ จากปากไปทวารหนัก หรือทางกว้างคือ จากกึ่งกลางของช่องในทางเดินอาหารไปยังส่วนลึกของ crypts ที่อยู่ในชั้นของ mucosa ดังนั้นที่อยู่ต่างๆ จึงค่อนข้างจะมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา (dynamic) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนั้นอาจเกิดขึ้นต่อเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของอาหาร การเปลี่ยนแปลงโดย host หรือการเปลี่ยนแปลงของเมแทบอลิซึมซึ่งเกิดจากจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในทางเดินอาหารมักจะมีการควบคุมสมดุลของจุลินทรีย์ให้อยู่ในสภาวะที่คงที่ (homeostasis) เพื่อที่สภาพแวดล้อมในทางเดินอาหารจะค่อนข้างคงที่เมื่อเทียบกับบนดินหรือในน้ำ ความสัมพันธ์ระหว่างสัตว์ที่เป็น host กับจุลินทรีย์ที่อยู่ในทางเดินอาหารจะค่อนข้างซับซ้อนและมีผู้เข้าใจค่อนข้างน้อย แม่นอนว่าจุลินทรีย์ดังกล่าว เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับตัว host และเป็นพื้นฐานสำคัญของการศึกษาระบบทางเดินอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง โดยทั่วไป

แล้วในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะไม่มีเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารใด ๆ ที่สามารถย่อยสลาย เซลลูโลส และ polymer ของพืชชนิดอื่นๆ ดังนั้นการนำเอาพืชที่มีใยอาหารไปใช้จึงต้องอาศัย กระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารที่อาศัยหรือมีอยู่แล้ว การย่อย เซลลูโลสโดยจุลินทรีย์เป็นกระบวนการค่อนข้างช้า ดังนั้นอาหารจำพวกใยอาหารจึงต้องมีการอยู่ หรือค้างอยู่ในกระเพาะและลำไส้เป็นเวลานาน ซึ่งกลไกดังกล่าวมีอยู่แล้วในสัตว์ที่กินพืชเป็น อาหาร โดยมีการพัฒนาการของการเก็บกักอาหารที่มีขนาดใหญ่ในส่วนที่เป็นถุง ดังเช่น รูเมน และเรติคูลัม

ภายในกระเพาะรูเมน มีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมที่สุดกับการเจริญเติบโตของ จุลินทรีย์ เช่น ระดับ pH 5.5-7.0 และอุณหภูมิ 39-40 °C ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เอนไซม์ส่วนใหญ่ทำงาน ได้ดี นอกจากนี้ การที่มีอาหารเข้ามาอย่างสม่ำเสมอประกอบกับการบีบตัวเป็นจังหวะของกระเพาะ รูเมน ทำให้อาหารเคลื่อนที่หมุนเวียนอยู่ภายในและกระจายตัวเองได้ดี ผลผลิตที่เกิดขึ้น ก็มีการดูด ซึมเอาไปใช้ประโยชน์ มีการหมุนเวียนหรือระบายวัตถุที่อยู่ภายในให้ออกไปอย่างมีประสิทธิภาพ จากสภาพแวดล้อมที่ดีดังกล่าว ทำให้ประชากรของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนมีจำนวนมาก ประมาณได้ว่า มีจุลินทรีย์ที่อยู่ในรูปแบบของ microbial protoplasm สูงถึง 10 เปอร์เซ็นต์ของ ของเหลวทั้งหมดภายในกระเพาะรูเมน แต่ถึงแม้ว่าสภาพในกระเพาะรูเมนจะเหมาะสมกับการ ดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ก็ตาม แต่ก็ยังปรากฏว่า มีการเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากรของจุลินทรีย์อยู่ ตลอดเวลา ซึ่งสาเหตุของการเปลี่ยนแปลงจำนวนประชากรของจุลินทรีย์ มีดังต่อไปนี้

1. การแข่งขันในด้านการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่มีการเจริญเติบโตดี มี biochemical work สูง ก็จะมีชีวิตรอดได้ดี จำนวนประชากรก็จะเพิ่มมากขึ้น
2. การปรับตัวของจุลินทรีย์ให้เหมาะสมกับอาหารที่สัตว์เคี้ยวเอื้องกินเข้าไป จุลินทรีย์ชนิดที่ปรับตัวหรือใช้ประโยชน์จากอาหารบางชนิดไม่ได้ ก็จะลดจำนวนน้อยลง แต่ จุลินทรีย์ที่สามารถปรับตัวหรือใช้ประโยชน์จากอาหารได้หลายชนิด ก็จะมีชีวิตอยู่ต่อไปและ เจริญเติบโตได้ดี

จุลินทรีย์ที่มีมากในกระเพาะรูเมนมีอยู่ด้วยกัน 2 ชนิด คือ แบคทีเรียและโปรโตซัว ประเภท ciliated protozoa ในบางครั้งอาจจะพบเชื้อรา หรือจุลินทรีย์ที่คล้ายยีสต์ปะปนอยู่บ้าง หรือ โปรโตซัวประเภท flagellated protozoa ที่พบในสัตว์เคี้ยวเอื้องที่อายุน้อยในบางครั้ง และเนื่องจาก สภาพภายในกระเพาะรูเมนเป็นสภาพ anaerobic จึงทำให้จุลินทรีย์เกือบทั้งหมดเป็นพวก anaerobes ด้วยเหตุนี้ จึงอาจกำหนดลักษณะเฉพาะของจุลินทรีย์ที่อยู่ในกระเพาะรูเมน ได้ดังนี้ 1) เป็นจุลินทรีย์ ที่อาศัยอยู่ในที่ที่ไม่มีออกซิเจนได้ 2) ให้ผลผลิตชนิดเดียวกับผลผลิตที่พบในกระเพาะรูเมน 3) ถ้า เป็นแบคทีเรียจะต้องมีอย่างน้อย 1 ล้านเซลล์/น.ม. 1 กรัม

การกระจายตัวของจุลินทรีย์ในรูเมน (เมธา, 2529)

1. พวกที่คลุกเคล้าในของเหลวในรูเมน พวกนี้จะอยู่ในของเหลวในรูเมนมีอัตรา การแบ่งตัวสูง เพราะในรูเมนนั้นจะมีการไหลออกของของเหลวในระยะ liquid phase เพราะฉะนั้น อัตราการแบ่งตัวของจุลินทรีย์เหล่านี้จะต้องสูงกว่า rumen fluid dilution rate

2. พวกที่เกาะติดอยู่กับอนุภาคของอาหาร (adherent to feed particles) พวกนี้มีอยู่มากที่สุดในจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยเฉพาะแบคทีเรียที่ย่อยสลายพวกอาหารหยาบ การเข้า เกาะติดของจุลินทรีย์บนผิวของอนุภาคอาหารนั้นเป็นลักษณะที่พิเศษมาก

3. พวกที่เกาะบนผนังของรูเมน (adherent to rumen epithelium) พวกนี้พียงจะพบเมื่อไม่นานมานี้ เป็นพวกที่เกาะติดอยู่กับเยื่อผนังของรูเมน เป็นพวก facultative bacteria พบว่า แบคทีเรียกลุ่มนี้ทำหน้าที่สำคัญหลายประการในรูเมน กล่าวคือ

- สามารถผลิตน้ำย่อยพวก protease ในรูเมนมากกว่า 10%
- สามารถใช้โปรตีนจากเซลล์ผนังรูเมนที่ตายแล้ว โดยอาศัยขบวนการ deamination
- สามารถผลิตน้ำย่อยยูเรีย ซึ่งจะไฮโดรไลซ์ยูเรียให้ได้แอมโมเนีย และอาจมีส่วน ช่วยในการขนถ่ายยูเรียผ่านผนังรูเมนให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น
- จุลินทรีย์กลุ่มนี้อาจช่วยป้องกันให้พวก obligate anaerobes จากการทำลายของ ออกซิเจน
- จุลินทรีย์กลุ่มนี้อาจใช้ออกซิเจนที่ซึมผ่านผนังรูเมนในการผลิตพลังงาน โดยผ่าน ขบวนการ oxidative phosphorylation

ระบบนิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน

นิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ภายในกระเพาะรูเมน มีความซับซ้อนและมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา การเปลี่ยนแปลงนี้ส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับอาหารที่สัตว์กินเข้าไป โคส่วนใหญ่กินอาหารประเภทที่มีคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลส (cellulose) และ เฮมิเซลลูโลส (hemicelluloses) เป็นอาหารหลัก แต่ในบางโอกาสสัตว์อาจได้รับอาหารที่ ประกอบด้วย soluble carbohydrates จำพวกเมล็ดธัญพืช หรือ กากน้ำตาล พืชที่โคกินเป็นอาหาร โดยทั่วไป จะมีการสร้างโครงสร้างโมเลกุลของผนังเซลล์ที่มีคุณสมบัติป้องกันการเข้าย่อยสลายของจุลินทรีย์ แต่ในรูเมนจะมีจุลินทรีย์หลายชนิดที่มีความสามารถเข้าย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต ใน

พืชนี้ได้ จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเป็นพวก anaerobic bacteria, protozoa และ fungi โดย anaerobic bacteria เป็นจุลินทรีย์หลักสำคัญในการทำให้เกิดการหมักของคาร์โบไฮเดรตที่อยู่ในผนังเซลล์ของพืช (Preston and Leng, 1987)

แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีอยู่เป็นปริมาณมากที่สุดในกระเพาะรูเมน การจำแนกชนิดของแบคทีเรียสามารถจำแนกได้หลายแบบ เช่น จำแนกตามส่วนต่างๆ ในกระเพาะรูเมน ที่แบคทีเรียยึดเกาะอยู่ หรือจำแนกตามการใช้ประโยชน์อาหารหรือผลผลิตที่สังเคราะห์ได้ โดยการจำแนกแบบหลังนี้สามารถแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียได้หลายกลุ่ม เช่น cellulolytic bacteria, amylolytic bacteria, proteolytic bacteria, ammonia-producing bacteria และ methanogenic bacteria เป็นต้น (Krause et al., 2003)

ระบบการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียในรูเมน

ความพยายามของนักจุลชีววิทยาและนักโภชนาศาสตร์ในการจัดการเกี่ยวกับกระบวนการหมักในกระเพาะรูเมนช่วยเพิ่มผลผลิตในปศุสัตว์อย่างมาก และเป็นการชี้ให้เห็นถึงความต้องการในการหาวิธีการที่เหมาะสมในการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงประชากรของจุลินทรีย์ต่างๆ ในกระเพาะรูเมน วิธีการที่มีพื้นฐานมาจากชีววิทยาโมเลกุล (molecular biology) ทำให้ทราบว่าแบคทีเรียในรูเมนเป็นจำนวนมากมายังซึ่งยังไม่ถูกค้นพบ แบคทีเรียในกระเพาะรูเมนสามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มต่างๆ ได้หลายรูปแบบ ในรูปแบบแรกเป็นการแบ่งตามส่วนของกระเพาะรูเมนที่มันอาศัยอยู่ เช่น แบคทีเรียที่ยึดเกาะกับพืชอาหารสัตว์ที่ลอยอยู่ในน้ำรูเมน แบคทีเรียที่ยึดกับผนังโปรโตซัว แบคทีเรียที่ยึดเกาะกับโปรโตซัว แบคทีเรียที่ยึดเกาะกับกับผนังด้านในของรูเมน และแบคทีเรียที่ลอยอยู่ในน้ำในรูเมน การเกาะยึดของแบคทีเรียกับพืชอาหารสัตว์ในรูเมนเป็นตัวอย่างให้มีการย่อยพืชอาหารต่างๆ เหล่านั้นอย่างดี การแบ่งจำแนกชนิดแบคทีเรียในรูเมนคือ แบ่งตาม substrate หรืออาหารที่แบคทีเรียเหล่านั้นใช้ เช่น แบคทีเรียบางชนิดสามารถทนต่อออกซิเจนได้โดยเฉพาะออกซิเจนที่แพร่ผ่านเนื้อเยื่อต่างๆ มาเป็นแบคทีเรียกลุ่ม facultative anaerobes หน้าที่หลักของแบคทีเรียกลุ่มนี้คือ กำจัดแบคทีเรียออกจากน้ำในรูเมนเพื่อป้องกันจุลินทรีย์อื่นๆ ซึ่งไวต่อออกซิเจนและชอบสถานะแวดล้อมซึ่งไม่มีออกซิเจน

กฤษ (2547) ได้อธิบายระบบการจำแนกเชื้อแบคทีเรียในรูเมน ดังนี้คือ

1. การจำแนกตามรูปร่างแบคทีเรียในรูเมน มี 3 รูปแบบ คือ เป็นทรงกลม (cocci) เป็นท่อน (bacilli) อาจเป็นตัวเดี่ยวๆ เป็นคู่หรือเกาะกันเป็นสายยาว

2. การจำแนกตามโครงสร้างที่ต่างกัน เช่น มีเปลือกหุ้ม (envelope) โครงสร้างของไซโตพลาสซึม หรือผิวที่มีรยางค์สำหรับการเกาะยึด

3. การจำแนกแบคทีเรียตามชนิดของ substrate มีข้อจำกัดตรงที่แบคทีเรียบางชนิดใช้ substrate มากกว่า 1 ชนิด และ substrate ชนิดเดียวกันอาจเกิดจากแบคทีเรียมากกว่า 1 ได้

นอกจากนี้ Kamra (2005) ได้จำแนกกลุ่มของแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ต่าง ๆ ตามชนิดของสารประกอบที่ใช้ในกระเพาะรูเมน ดังตาราง 1

ตาราง 1 กลุ่มของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในรูเมนแบ่งตามชนิดของสารประกอบที่ใช้

Substrate	Bacteria
Bacteria active in carbohydrate utilization	
Cellulose	<i>Fibrobacter succinogenes</i> (<i>Bacteroides succinogenes</i>) <i>Ruminococcus flavefaciens</i> , <i>Ruminococcus albus</i> <i>Clostridium cellobioparum</i> , <i>Clostridium longisporum</i> , <i>Clostridium lochheadii</i> <i>Eubacterium cellulosolvens</i> (<i>Cillobacterium cellulosolvens</i>)
Hemicellulose	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i> <i>Prevotella ruminicola</i> (<i>Bacteroides ruminicola</i>) <i>Eubacterium xylanophilum</i> , <i>E. uniformis</i>
Starch	<i>Streptococcus bovis</i> <i>Ruminobacter amylophilus</i> (<i>Bacteroides amylophilu</i>) <i>Prevotella ruminicola</i> (<i>Bacteroides ruminicola</i>)
Sugars/dextrins	<i>Succinivibrio dextrinosolvens</i> , <i>Succinivibrio amylolytica</i> <i>Selenomonas ruminantium</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. helveticus</i> <i>Bifidobacterium globosum</i> , <i>B. longum</i> , <i>B. thermophilum</i> , <i>B. ruminale</i> , <i>B. ruminantium</i>
Pectin	<i>Treponema saccharophilum</i> <i>Lachnospira multiparus</i>

ตาราง 1 (ต่อ)

Substrate	Bacteria
Bacteria active in nitrogen utilization	
Protein degraders	<i>Prevotella ruminicola</i> <i>Ruminobacter amylophilus</i> <i>Clostridium bifermentans</i>
Urea hydrolyzers	<i>Megasphaera elsdenii</i>
Other bacteria	
Acid utilizers	<i>Megasphaera elsdenii</i> (<i>Peptostreptococcus elsdenii</i>) <i>Wollinella succinogenes</i> (<i>Vibrio succinogenes</i>) <i>Veillonella gazogenes</i> (<i>Veillonella alcalescens</i> , <i>Micrococcus lactolytica</i>) <i>Oxalobacter formigenes</i> <i>Desulphovibrio desulphuricans</i> , <i>Desulphatmaculum ruminis</i> <i>Succiniclasticum ruminis</i>
Lipolytic bacteria	<i>Anaerovibrio lipolytica</i>
Acetogenic bacteria	<i>Eubacterium limosum</i> <i>Acetitomaculum ruminis</i>
Tannin degraders	<i>Streptococcus caprinus</i> <i>Eubacterium oxidoreducens</i>
Mimosine degraders	<i>Synergistes jonesii</i>
Methanogenic archaea	<i>Methanobrevibacter ruminantium</i> <i>Methanobacterium formicicum</i> <i>Methanosarcina barkeri</i> <i>Methanomicrobium mobile</i>
Mycoplasma	<i>Anaeroplasma bactoclasticum</i> <i>Anaeroplasma abactoclasticum</i>

จากหลักเกณฑ์ที่กล่าวมาข้างต้น สามารถนำมาใช้คัดแปลงการแบ่งแยกประเภทของแบคทีเรียได้ตามชนิดของอาหารและผลผลิตของแบคทีเรียเป็นหลัก และได้แบ่งแบคทีเรียออกเป็นประเภทต่างๆ ดังต่อไปนี้ (เมธา, 2529; กฤษ, 2547; เทอดชัย, 2548)

1. แบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลส (Cellulolytic bacteria)

เป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสที่ใช้ย่อยเซลลูโลสได้ นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้อาจจะย่อยเซลโลไบโอสได้อีกด้วย การย่อยเซลลูโลสโดยแบคทีเรียประเภทนี้ชนิดใดชนิดหนึ่งตามลำพังจะกระทำไม่ได้ซ้ำ แต่ถ้ามีแบคทีเรียประเภทอื่นหลายประเภทนี้หลายชนิดร่วมกัน จะสามารถย่อยเซลลูโลสได้ดีกว่า ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากว่า โครงสร้างของพืชประกอบด้วยการรวมตัวของคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อน เอนไซม์จากแบคทีเรียชนิดใดชนิดหนึ่งโดยเฉพาะ อาจมีผลโดยเฉพาะจุดใดจุดหนึ่งเท่านั้น การมีเอนไซม์จากแบคทีเรียต่างชนิดกันแต่อยู่ในประเภทเดียวกัน อาจจะมีผลในการเข้าย่อยในจุดต่างๆ ร่วมกัน ทำให้การย่อยเซลลูโลสได้ผลเร็วขึ้นได้ โดยปกติแล้วจะพบแบคทีเรียประเภทนี้ในสัตว์เคี้ยวเอื้องที่กินอาหารหยาบเป็นจำนวนมาก ชนิดที่สำคัญได้แก่ *Bacteroides succinogenes*, *Ruminococcus flavefaciens*, *Ruminococcus albus* และ *Cillobacterium cellulosolvens*

2. แบคทีเรียย่อยเฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose digesting bacteria)

เฮมิเซลลูโลสนี้แตกต่างจากเซลลูโลสตรงที่มี pentose และ uronic acid เป็นส่วนประกอบของโครงสร้างนอกเหนือไปจากการมี hexose เป็นส่วนประกอบ ในพืชทั่วไปจะมีเฮมิเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบที่สำคัญชนิดหนึ่ง แบคทีเรียประเภทที่ย่อยเซลลูโลสได้จะสามารถย่อยเฮมิเซลลูโลสได้อีกด้วย แต่มีแบคทีเรียบางชนิดที่ย่อยเฮมิเซลลูโลสได้แต่ไม่สามารถย่อยเซลลูโลสได้ ชนิดที่สำคัญของแบคทีเรียกลุ่มนี้คือ *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Lachnospيريا multiparens* และ *Bacteroides ruminicola*

3. แบคทีเรียย่อยแป้ง (Amylolytic bacteria; starch digesting bacteria)

แบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลสบางชนิดสามารถย่อยแป้งได้ แต่แบคทีเรียที่ย่อยแป้งได้จะไม่สามารถย่อยเซลลูโลสได้ ในสัตว์ที่กินแป้งเป็นอาหารในปริมาณที่มาก จะพบแบคทีเรียชนิดนี้เป็นจำนวนมาก ชนิดที่สำคัญของแบคทีเรียกลุ่มนี้คือ *Bacteroides amylophilus*, *Succinimonas amylophilus*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Selenomonas ruminantium*, *Streptococcus bovis* และ *Bacteroides ruminicola*

4. แบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลเป็นอาหาร (Sugar utilizing bacteria)

แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่สามารถย่อย polysaccharides ได้ จะสามารถย่อย disaccharides และ monosaccharides ได้อีกด้วยเช่นกัน อาหารของแบคทีเรียประเภทนี้ได้แก่

คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ ซึ่งจะมีมากในพืชที่อายุน้อย และน้ำตาลจากเซลล์แบคทีเรียบางชนิดที่ตายแล้ว แต่หากว่า น้ำตาลมีอยู่น้อย และการหมักของคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ในกระเพาะรูเมนเกิดขึ้นเร็วและต่อเนื่องกันไปแล้ว จะทำให้เกิดการขาดน้ำตาลซึ่งเป็นอาหารของแบคทีเรียประเภทนี้ จะมีผลทำให้แบคทีเรียประเภทนี้ลดจำนวนลงได้ เซลโลไบโอสอาจจะเป็นแหล่งพลังงานชนิดหนึ่งของแบคทีเรียประเภทนี้ เนื่องจากปรากฏว่ามีแบคทีเรียบางชนิดย่อยเซลโลไบโอสไม่ได้ แต่สามารถผลิตเอนไซม์ β -glucosidase ที่ใช้ย่อยเซลโลไบโอสได้ ในลูกสัตว์เคี้ยวเอื้องที่อายุน้อยจะพบแบคทีเรียที่ย่อย lactose ได้เป็นจำนวนมากในกระเพาะรูเมน

5. แบคทีเรียที่ใช้กรด (Acid utilizing bacteria)

ตามปกติจะมีแบคทีเรียประเภทนี้ เช่นแบคทีเรียที่ใช้กรดแลคติกอยู่น้อยในกระเพาะรูเมน แต่ในบางครั้งที่เกิดความผิดปกติภายในกระเพาะรูเมน พบว่ามีแบคทีเรียที่ใช้แลคติกอยู่เป็นจำนวนมากพอสมควร นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียที่ใช้กรดชนิดอื่นๆ เป็นอาหารหลักได้อีก เช่น succinic acid, malic acid, fumaric acid และ oxalic acid มีแบคทีเรียบางชนิดที่ย่อย formic acid และ acetic acid ได้ แต่อาจไม่นำกรดเหล่านี้ไปใช้เป็นแหล่งพลังงานโดยตรง ชนิดที่สำคัญของแบคทีเรียกลุ่มนี้คือ *Veillonella gazogenes*, *Veillonella alcalescens*, *Propionibacteria* sp., *Selenomonas ruminantium*, *Peptostreptococcus elsdenii* และ *Selenomonas lactilytica*

6. แบคทีเรียที่ใช้โปรตีนเป็นอาหาร (Proteolytic bacteria)

แบคทีเรียประเภทนี้จะใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งพลังงานโดยตรง ชนิดที่สำคัญของแบคทีเรียกลุ่มนี้คือ *Bacteriodes amylophilus*, *Clostridium sporogenes* และ *Bacillus licheniformis*

7. แบคทีเรียที่ผลิตแอมโมเนีย (Ammonia producing bacteria)

พวกนี้คล้ายคลึงกับพวกที่ใช้โปรตีนเป็นอาหาร แต่มีแบคทีเรียอีกจำนวนหนึ่งที่สามารถผลิตแอมโมเนียได้จากอาหารแหล่งอื่นๆ ทำให้พบแอมโมเนียอยู่อย่างสม่ำเสมอในกระเพาะรูเมน ชนิดที่สำคัญของแบคทีเรียกลุ่มนี้คือ *Bacteroides ruminicola*, *Selenomonas ruminantium* และ *Peptostreptococcus elsdenii*

8. แบคทีเรียที่สังเคราะห์มีเทน (Methane producing bacteria)

มีการศึกษาแบคทีเรียประเภทนี้น้อยมาก เนื่องจากสามารถนำมาเลี้ยงในห้องทดลองได้ยาก แต่จากการที่มีก๊าซมีเทนอยู่ 25-30 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณก๊าซทั้งหมด ชี้ให้เห็นว่าต้องมีแบคทีเรียประเภทนี้อยู่เป็นจำนวนมากพอสมควรในกระเพาะรูเมน ชนิดที่สำคัญของแบคทีเรียกลุ่มนี้คือ *Methanobacterium ruminantium* และ *Methanobacterium formicicum*

9. แบคทีเรียที่ใช้ไขมันเป็นอาหาร (Lipolytic bacteria)

มีแบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถใช้ glycerol และสามารถ hydrolyze glycerol จากโมเลกุลของไขมันได้ และยังมีแบคทีเรียบางชนิดที่ทำให้เกิด hydrogenation กับกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) และแบคทีเรียบางชนิดเปลี่ยน long-chain fatty acid ให้เป็น ketone

10. แบคทีเรียที่สังเคราะห์วิตามิน (Vitamin-synthesizing organism)

แบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์วิตามินได้ เช่น วิตามินบี ต่างๆ วิตามินเหล่านี้เป็นแหล่งวิตามินของสัตว์เคี้ยวเอื้องที่จุลินทรีย์อาศัยอยู่ และบางส่วนจะถูกจุลินทรีย์ตัวอื่นไปใช้ประโยชน์

11. กลุ่มย่อยเพคติน Pectinolytic species ได้แก่แบคทีเรีย *Streptococcus bovis*

12. กลุ่มที่ย่อยยูเรีย Ureolytic species ได้แก่แบคทีเรีย *Ruminococcus bromii*

กรดไขมันระเหยง่าย (Volatile fatty acid; VFA) ในกระเพาะรูเมน

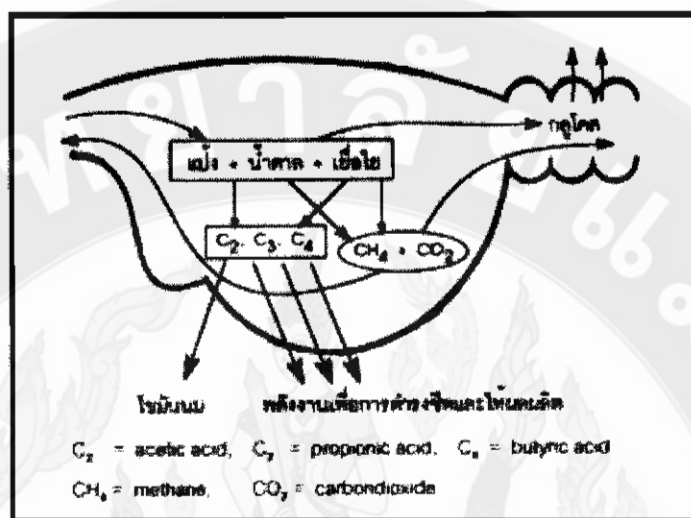
การสังเคราะห์เมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตและกรดไขมันระเหยง่าย (บุญล้อม, 2527; เมธา, 2529)

เนื่องจากสัตว์เคี้ยวเอื้องเป็นสัตว์กินพืช และองค์ประกอบส่วนใหญ่ของพืชอยู่ในรูปคาร์โบไฮเดรต ดังนั้นจึงนับว่าคาร์โบไฮเดรตเป็นโภชนาที่สำคัญต่อสัตว์เคี้ยวเอื้องมาก หน้าที่หลักของมันคือ เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของตัวสัตว์เองและจุลินทรีย์ในรูเมนด้วย

ในพืชจะมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบประมาณ 75% ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ polysaccharides เช่น เซลลูโลส (cellulose), เฮมิเซลลูโลส (hemi-cellulose), เพคติน (pectins), ฟรุคโตแซน (fructosans) และแป้ง มีส่วนน้อยเท่านั้นที่อยู่ในรูปของ disaccharides เช่น ซูโครส (sucrose) หรือ monosaccharides เช่น กลูโคส (glucose)

เมื่อสัตว์กินอาหารเข้าไป คาร์โบไฮเดรตจะถูกย่อยด้วยจุลินทรีย์ในรูเมน โดยแบคทีเรียจะย่อย polysaccharides ภายนอกเซลล์ (extracellular degradation) ให้ได้เป็น oligosaccharides สายสั้นๆ เสียก่อน แล้วจึงส่งเข้าไปในเซลล์เพื่อ hydrolysed หรือ phosphorylative cleavage ให้ได้เป็น monosaccharide จากนั้นจุลินทรีย์จะเกิดการหมักเกิดขึ้นภายในเซลล์ โดยขบวนการเมแทบอลิซึม การเปลี่ยนแปลงจาก Pyruvate ไปเป็นผลสุดท้ายจากการย่อย ผลผลิตสุดท้าย ส่วนใหญ่จะเป็นกรดไขมันที่ระเหยได้ (Volatile Fatty Acid; VFA) ที่พบในปริมาณมาก ได้แก่ กรดอะซิติก (acetic acid, C_2) กรดโพรพิโอนิก (propionic acid, C_3) กรดบิวทิริก (butyric

acid, C_4) แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และแก๊สมีเทน (methane, CH_4) เพื่อให้สัตว์สามารถดูดซึมไปใช้ประโยชน์ต่อไปดังแสดงใน ภาพ 2



ภาพ 2 ขบวนการเมแทบอลิซึมคาร์โบไฮเดรตในกระเพาะรูเมน
 ที่มา: บุญล้อม (2541)

ขั้นตอนการย่อย polysaccharide แต่ละชนิดมีดังต่อไปนี้

1. เซลลูโลส เป็น polysaccharides ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวด้วย β -1,4-linkage โดยไม่มีการแตกแขนง ในรูเมนมักจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ เซลลูเลส ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียในกลุ่ม cellulolytic bacteria ย่อยให้เป็น oligosaccharide $\rightarrow$ cellulose $\rightarrow$ glucose หรือ glucose-1-phosphate

กลูโคสที่เกิดในรูเมนจะสลายตัวอย่างรวดเร็ว จึงไม่สามารถตรวจพบได้ หรือตรวจพบได้น้อยมากในรูเมน มันจะเปลี่ยนเป็น pyruvate โดยวิถี glycolysis เช่นเดียวกับการสลายตัวของกลูโคสในสัตว์กระเพาะเคี้ยว

2. เฮมิเซลลูโลส คล้ายกับเซลลูโลส ต่างกันตรงมีเพนโตสอยู่ด้วย ซึ่งมักจะถูกย่อยให้เป็น xylobiose และ xylose ตามลำดับ ซึ่ง xylose จะถูกเปลี่ยนโดยเอนไซม์ transketolase และ transaldolase ในวิถี pentose phosphate ให้เป็น C_7 และ C_3 ซึ่งจะได้เป็น C_6 และ C_4 แล้ว C_4 จะทำปฏิกิริยากับ C_5 ได้เป็น C_6 (fructose-6-phosphate) และ C_3 (triose phosphate) ตามลำดับ สารทั้ง 2 ตัวหลังนี้จะเข้าสู่ glycolytic pathway เพื่อเปลี่ยนให้เป็น pyruvate เช่นเดียวกับกลูโคส

3. เพคติน จะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ pectinesterase ได้เป็น methanol และ pectic acid สารตัวหลังนี้จะถูกย่อยต่อไปด้วยเอนไซม์ polygalacturonidase ซึ่งสร้างโดยโปรโตซัวให้เป็น galacturonic acid แล้วจึงถูกเปลี่ยนเป็น xylose เข้าสู่วิถี pentose phosphate ได้เป็น fructose phosphate และ triose phosphate ซึ่งจะถูกเปลี่ยนให้เป็น pyruvate โดยวิถี glycolysis

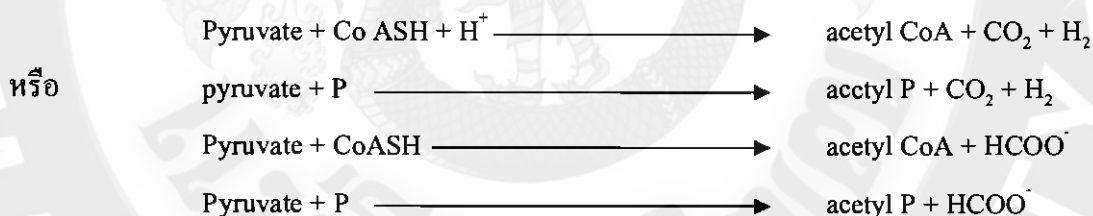
4. น้ำตาล สำหรับแป้งและคาร์โบไฮเดรตที่ละลายได้ง่ายอื่นๆ ก็จะถูกย่อยให้เป็น โมเลกุลที่เล็กลงเช่นกัน โดยแป้งจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ maltase ให้เป็น maltose แล้วจึงถูกเปลี่ยนด้วยเอนไซม์ maltose phosphorylase ให้เป็นกลูโคส และ glucose-1-phosphate พวกคาร์โบไฮเดรตที่ละลายได้ง่ายเช่นพวก mono หรือ disaccharide ซึ่งอาจจะมีมากในพืชบางอย่าง ก็ถูกสลายให้เป็น กลูโคสหรือเพนโตสเช่นเดียวกัน แล้วกลูโคสและเพนโตสก็จะถูกเปลี่ยนเป็น pyruvate

การเปลี่ยน Pyruvate เป็นกรดไขมันที่ระเหยได้ (Volatile fatty acid; VFA)

กรดไขมันที่ระเหยได้ที่ได้จากการเมแทบอลิซึมของ pyruvate ในกระเพาะรูเมน ได้แก่ acetate, butyrate และ propionate นอกจากนี้ ยังให้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) เป็นผลผลิตร่วมอีกด้วย ซึ่งจะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ Methane (CH₄) ในขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. การผลิต acetate (C₂) และ formate

การสังเคราะห์ acetate และ formate อาจเกิดขึ้นได้ดังนี้



ปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นได้ในทั้งสองระบบนี้ จำเป็นจะต้องมี thiamine pyrophosphate (TPP), coenzyme-A และ phosphate ความแตกต่างของ 2 ระบบนี้คือการที่จุลินทรีย์ต่างชนิดกันนำอิเล็กตรอนที่เกิดขึ้นไปใช้ต่างกัน ส่วนขั้นตอนของการขนส่งอิเล็กตรอนยังไม่ทราบแน่นอน แต่ตัวนำขั้นต้นอาจจะเป็น Fe-protein ferredoxin ซึ่งเป็นตัวให้อิเล็กตรอนเพื่อผลิต H₂

กรด formate จะถูกออกซิไดส์อย่างรวดเร็วในกระเพาะรูเมน เพราะการทำงานของ น้ำย่อย ferredoxin - dependent formic dehydrogenase ซึ่งจะทำให้เกิด H₂ และ CO₂

2. การผลิต propionate (C₃)

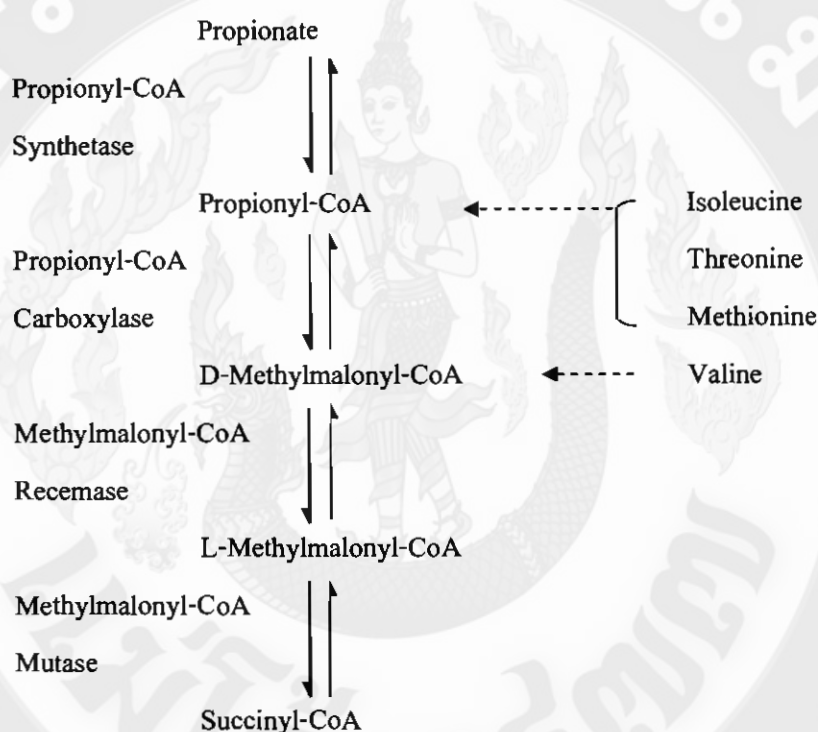
การเปลี่ยน lactate หรือ pyruvate ให้เป็น propionate นั้นเกิดขึ้นได้ 2 ทาง คือ

2.1 ขบวนการที่ผ่านการผลิต xaloacetate และ succinate

2.2 ขบวนการที่ 2 ผ่านการผลิต acrylate

ขบวนการหลักที่สำคัญจะเป็นขบวนการที่ 2.1 แต่ถ้าขาดซัลเฟอร์จะทำให้ประชากรจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงไป อาจทำให้ขบวนการ 2.2 มีความสำคัญมากขึ้น โดยเฉพาะในสัตว์ที่ได้รับอาหารชั้นพลังงานสูง น่าย่อยที่มีความสำคัญมากคือ methylmalonyl CoA transcarboxylase ซึ่งจะทำหน้าที่ย้าย COOH ของ methylmalonyl-CoA ไปยัง oxaloacetate

นอกจากนั้นแล้วขบวนการสังเคราะห์ C_3 ยังต้องอาศัยวิตามินบี 12 เป็น co-enzyme ในขบวนการ ดังแสดงในภาพ 3



ภาพ 3 ขั้นตอนเริ่มต้นของขบวนการเมแทบอลิซึมของ propionate
ที่มา: เมธา (2529)

3. การผลิต butyrate (C_4)

Butyrate อาจจะถูกผลิตในกระเพาะรูเมนจาก acetate หรือจากสารประกอบที่สามารถผลิต acetyl-CoA เช่น pyruvate หรือ glutamate แต่ขบวนการที่ผลิต butyrate จาก acetate เกิดขึ้นได้ 2 ทาง ขบวนการที่น่าจะเป็นไปได้มากที่สุดคือ การสังเคราะห์ butyrate จาก acetate ซึ่งจะใช้ ATP 1 mole โดย reversal of p-oxidation ขบวนการที่ 2 โดยผ่านการผลิต malonyl ซึ่งขบวนการนี้จำเป็นต้องใช้ ATP 2 moles ในการผลิต butyrate 1 mole จาก acetate 2 moles

4. การผลิตร่วมระหว่าง acetate และ butyrate

จากการผลิต butyrate และ acetate ในจุลินทรีย์บางชนิด พบว่าได้ net ATP เพิ่มขึ้น 1 ตัว แต่ในจุลินทรีย์บางชนิดปรากฏว่ามีการสูญเสีย net ATP ตัว การสังเคราะห์ butyrate เกิดขึ้นโดยผ่านขบวนการผลิต malonyl-CoA และการสังเคราะห์ acetate จาก butyrate โดยผ่านขบวนการ oxidation

การสังเคราะห์ butyrate จาก acetate อาจเป็นการช่วยในการ oxidize พวก co-factors ที่มีอยู่ในรูป reduced เพื่อทำให้ขบวนการหมักเกิดขึ้นได้ จากจุดนี้สามารถแก้ปัญหาในการใช้ acetate 2 mole เพื่อสังเคราะห์ butyrate 1 mole เพราะทุกๆ 1 mole ของ butyrate ที่ได้สามารถ oxidize พวก co-factors ได้ 2 ตัว ถ้าขบวนการนี้เกี่ยวข้องกับ glycolysis จะทำให้สามารถใช้ hexose ได้อีก 1 ตัว ทำให้เกิด net ATP เพิ่ม 1 ตัว ดังสมการข้างล่าง



สรุปปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในการผลิต VFA

1. การผลิต C_2



2. การผลิต C_3



3. การผลิต C_4

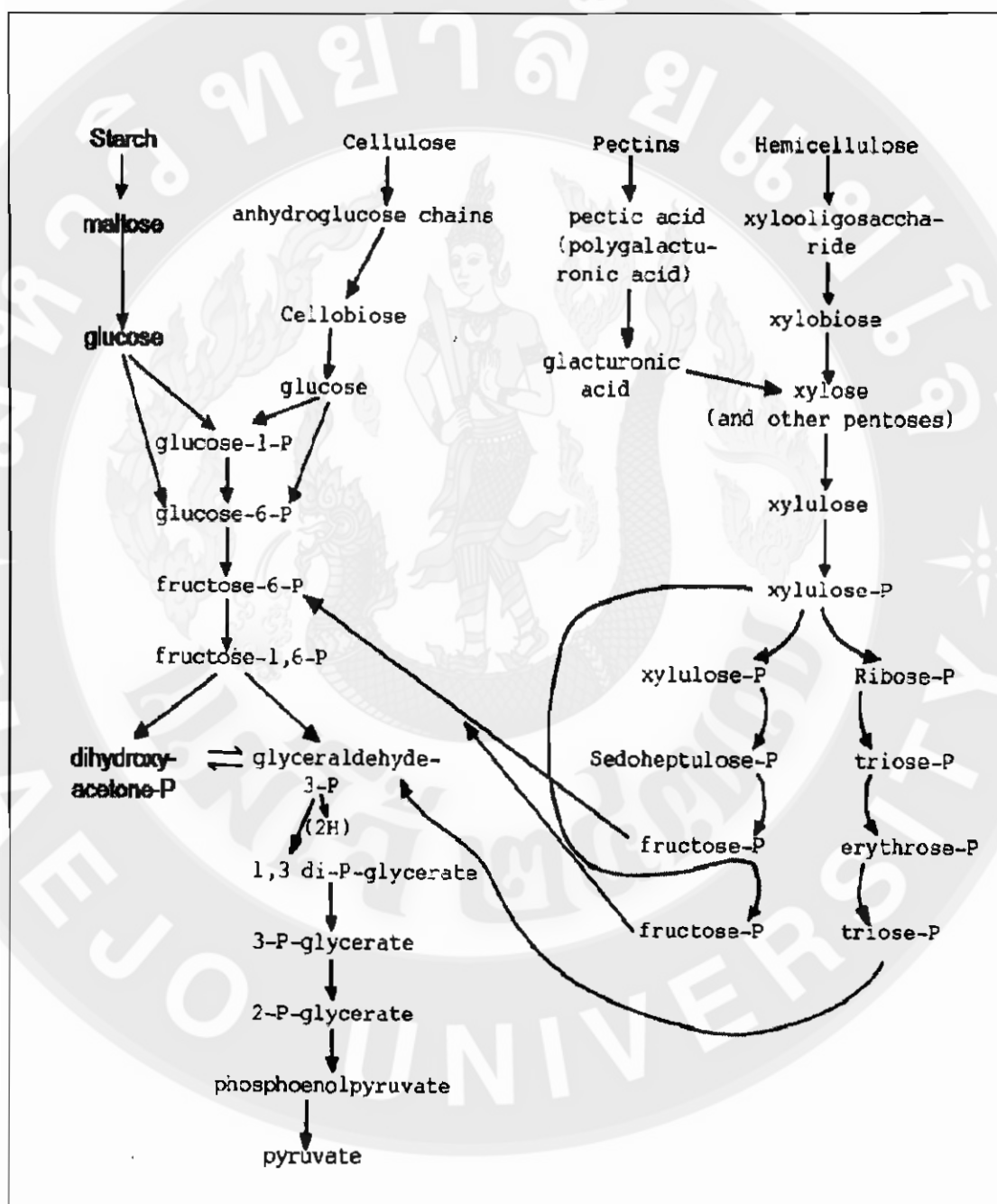


4. การผลิต CO_2 CH_4

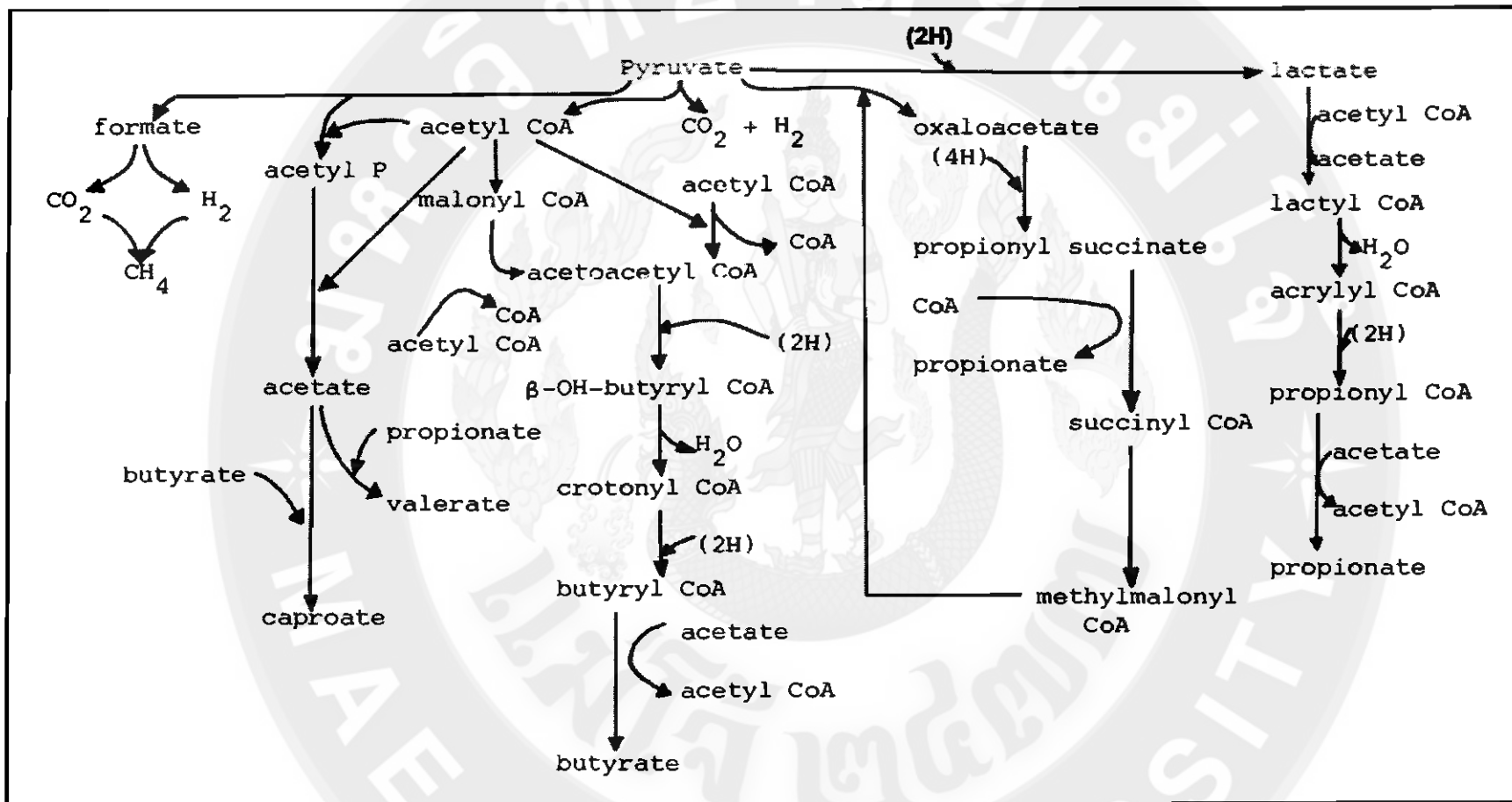


จากสมการข้างต้นจะเห็นได้ว่าการผลิต acetate จะก่อให้เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และไฮโดรเจน ส่วนการผลิต propionate ไม่ทำให้เกิดก๊าซเลย เพราะฉะนั้นพลังงานที่สูญเสียไปในบางส่วนจะอยู่ในรูป CO_2 , CH_4 และ heat of fermentation ในช่วงของการหมัก ในสภาวะที่มีก๊าซไฮโดรเจนอยู่น้อยจะทำให้การผลิตก๊าซมีเทนลดน้อยลง ถ้ามีการผลิต acetate มากก็จะทำให้โอกาสการผลิตก๊าซมีเทนมากตามไปด้วย ส่วนการผลิต butyrate จะอาศัยก๊าซไฮโดรเจนเพื่อไป reduce acetate (acetoacetate) จึงเป็นการช่วยกำจัดการผลิตก๊าซมีเทน การผลิต propionic acid นั้นจำเป็นต้องใช้ก๊าซไฮโดรเจนเช่นกัน

ซึ่งกระบวนการหมักในกระเพาะรูเมนของคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญในพืช ทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นและเมแทบอลิซึมในการสังเคราะห์ VFA พอสรุปได้เป็นแผนภาพดังแสดงในภาพ 4 และ 5 ต่อไปนี้



ภาพ 4 ขบวนการหมักในกระเพาะรูเมนของคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญในพืช
ที่มา: เมธา (2529)



ภาพ 5 การสังเคราะห์ VFA ในกระเพาะรูเมน

ที่มา: เมธา (2529)

การดูดซึมกรดไขมันระเหยง่าย (Volatile fatty acid; VFA) ในกระเพาะรูเมน (กฤษ, 2547)

กรดไขมันระเหยง่ายโดยเฉพาะ propionic acid เป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้องทั้ง acetate, butyrate และ propionate จะเป็นไขมันสายสั้นหลัก ซึ่งสร้างขึ้นจากระบวนการหมักโดยแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนประมาณ 80% ของกรดไขมันที่สร้างขึ้นในกระเพาะรูเมนจะถูกดูดซึมผ่านผนังเรติคูโลรูเมน คือส่วนที่กระเพาะส่วนเรติคูลัมและรูเมนเชื่อมต่อกัน กรดไขมันระเหยง่ายนี้จะแตกตัวก่อนที่ผนังรูเมน ก่อนถูกดูดซึมเข้าหลอดเลือดดำที่มาเลี้ยงระบบทางเดินอาหาร acetate และ butyrate จะถูกเมแทบอลิซึมผ่านวัฏจักรเครปส์ (tricarboxylic acid (TCA) or Kreb's cycle) ในสภาวะปกติ ซึ่งจะไม่มีการสร้าง glycogen สะสมในตัว acetate จะใช้เป็นแหล่งพลังงานของสัตว์ และมีความสำคัญในการสร้างไขมันในน้ำนม butyrate ยังถูกเมแทบอลิซึมไปเป็น β -hydroxy butyrate หรือ acetate โดยเยื่อกระเพาะรูเมน หลังจากนั้น β -hydroxy butyrate จะเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญสำหรับเยื่อผนังเซลล์ของรูเมน ทั้ง β -hydroxy butyrate และ acetate จะมีความสัมพันธ์อย่างใกล้ชิดกับกระบวนการเมแทบอลิซึม โดยทั่วไปของสัตว์ propionate เป็นแหล่งสำคัญของการสร้างกลูโคส ประมาณ 50-60% ในกระเพาะรูเมน เนื่องจากว่า propionate จะไม่ถูกเมแทบอลิซึมโดยวัฏจักรเครปส์ มีการประมาณว่าความสามารถในการใช้กลูโคสโดยเนื้อเยื่อของสัตว์เคี้ยวเอื้องจะมีปริมาณที่ใกล้เคียงกับในสัตว์กระเพาะเดียว แต่ว่าเนื่องจากระดับของกลูโคสในเลือดจะมีค่าต่ำในสัตว์เคี้ยวเอื้องเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ชนิดอื่น ดังนั้นกรดไขมันจะมีบทบาทสำคัญในการเป็นแหล่งพลังงานแก่สัตว์เคี้ยวเอื้องพวกนี้ ในลูกสัตว์เกิดใหม่ระดับของกลูโคสในพลาสมาจะสูงกว่าในสัตว์โตเต็มวัยแล้ว แต่เมื่อภายหลังจากที่สัตว์ตัวนั้นเริ่มกินอาหารพวกใบอาหารก็จะมีการสร้างกรดไขมันระเหยง่าย ความสำคัญของกลูโคสในเลือดจึงลดน้อยลงในสัตว์โตเต็มวัย ในกรณีที่กลูโคสไม่เพียงพอหมายถึง กลูโคสจากการเปลี่ยนแปลงของ propionate ไม่เพียงพอ สัตว์จะได้กลูโคสจากกระบวนการ gluconeogenesis โดยผ่าน deamination ของโปรตีน จากกระบวนการ protein deamination นี้ทำให้การขับไนโตรเจนทั้งในปัสสาวะของสัตว์เคี้ยวเอื้องจะมีปริมาณมากกว่าในสัตว์กระเพาะเดียวเนื่องจากว่า pH ของน้ำในรูเมนปกติจะมีสภาพเป็นกรดแต่จะไม่ต่ำไปกว่า pH 5.5 ในสภาพการกินอาหารที่ปกติ อัตราการดูดซึมกรดไขมันจากรูเมนจะเป็นไปได้มากในสภาพน้ำในรูเมนที่เป็นกรดมากกว่าจะเป็นด่างหรือเป็นกลาง แต่การดูดซึมอาจจะเกิดขึ้นในสภาพเป็นกลางหรือเป็นด่างได้ในอัตราที่ช้าลง การดูดซึมกรดไขมันโดยกระเพาะรูเมนจะเกิดขึ้นพร้อมๆ กับการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ในรูเมนด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในการดูดซึมในสภาพที่น้ำในรูเมนเป็นด่าง โดยส่วนใหญ่แล้วการดูดซึมคาร์บอนไดออกไซด์จะถูกเก็บสะสมอยู่ในรูปของไบคาร์บอเนต ระดับของคาร์บอนไดออกไซด์ใน

กระเพาะรูเมนจะมีประมาณ 30% ของที่พบในพลาสมา อัตราการดูดซึมกรดไขมันระเหยง่ายในกระเพาะรูเมนจะขึ้นกับปัจจัยหลายอย่างคือ

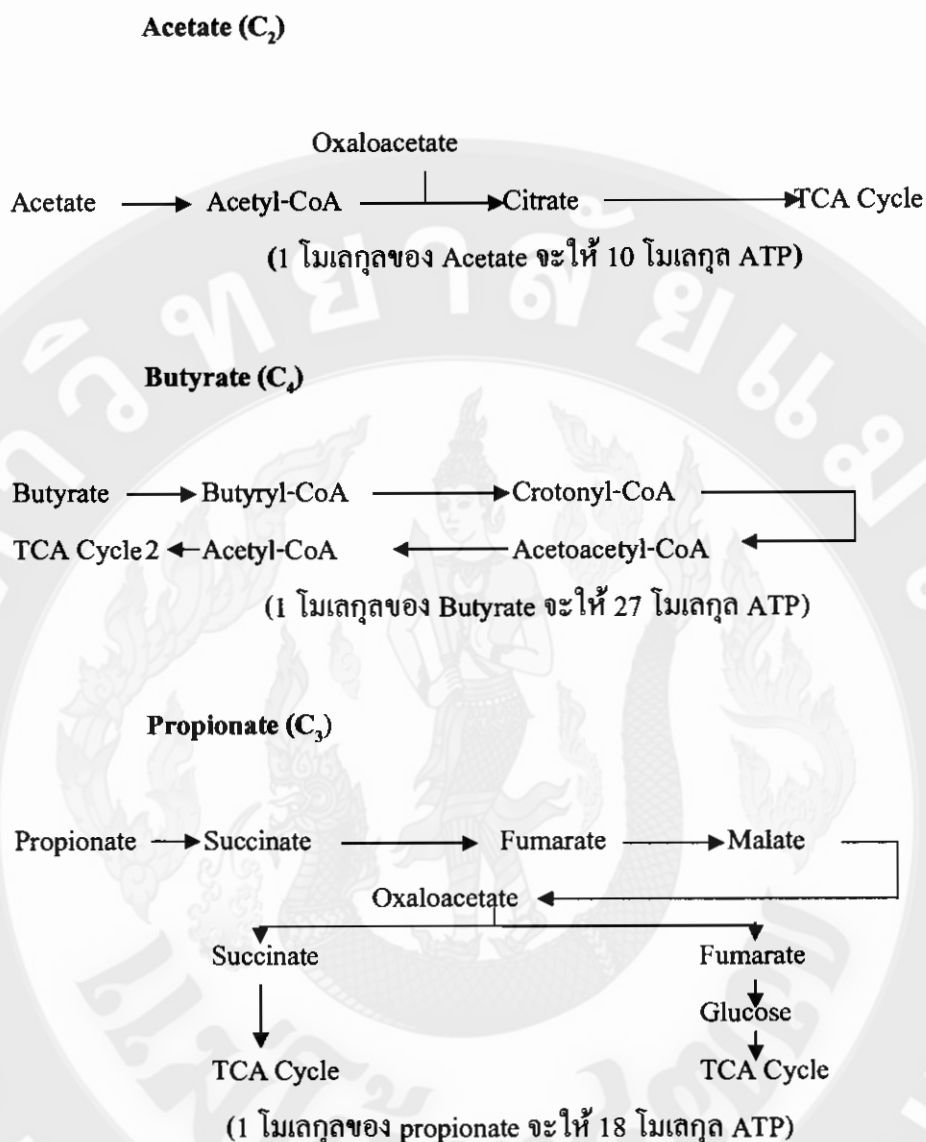
1. ความยาวของจำนวนคาร์บอนอะตอมของกรดไขมันระเหยง่าย (chain length)
2. pH ถ้า pH ในรูเมนมีค่า 4.5-5.0 พบว่าจะมีการดูดซึม butyrate > propionate > acetate แต่ถ้า pH มากกว่า 6.5 อัตราการดูดซึมกรดไขมันระเหยง่าย 3 ชนิดจะใกล้เคียงกัน แต่ acetate จะดูดซึมได้ดีที่สุดรองลงมาคือ propionate และ butyrate กรดแลคติกจะดูดซึมได้ดีที่ pH ต่ำกว่า 5.0
3. ความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยง่าย
4. Osmolarity ของสารละลายหรือน้ำในรูเมน

เมแทบอลิซึมของกรดไขมันระเหยง่าย

เป็นที่ทราบกันตั้งแต่ศตวรรษที่ 19 แล้วว่าใน rumen contents มีกรดไขมันระเหยง่ายคือ acetate, propionate และ butyrate อยู่และได้มีการศึกษาถึงประโยชน์ทางโภชนาการของกรดไขมันระเหยง่ายเหล่านี้ในภายหลัง ปัจจุบันการตรวจหา VFA ทำได้ง่ายขึ้นโดยใช้ gas chromatography (GC) วิเคราะห์หาและต่อมายังพบกรดไขมันระเหยง่ายอื่นๆ เช่น isobutyric isovaleric 2-methylbutyric acid ซึ่งเปลี่ยนมาจากกรดอะมิโน valine leucine และ isoleucine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิดที่เป็นแขนง (branched-chain amino acid) กรดไขมันระเหยง่ายที่เป็น branched-chain เหล่านี้มีความจำเป็นในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ย่อยเซลลูโลส (cellulolytic bacteria)

Acetate ถือเป็นสารตั้งต้นสำคัญในกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันระเหยง่ายในเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วนในสัตว์เคี้ยวเอื้อง acetate เป็นแหล่งพลังงานสำคัญซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียที่อยู่ในรูเมน ค่อม้านมเป็นอวัยวะหนึ่งที่มีการดูดซึม acetate ไปใช้ในโคนม ซึ่งพบว่ามี propionate butyrate และ formate ในกระแสเลือดของโคนมด้วย แม้ว่าโคนมจะไม่ได้รับอาหารมาเป็นเวลานานหรือมีการเอา content ในกระเพาะรูเมนออก ยังพบระดับ acetate ในเลือดโคเท่ากับ 0.3 มิลลิโมล/ลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับระดับ acetate ในเลือดของสัตว์ที่ไม่ได้กินพืช แสดงให้เห็นว่ามีการสร้าง acetate ภายในร่างกายโดยไม่ต้องรับจากอาหาร

เทอดชัย (2548) กล่าวว่า การนำเอา VFA ไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน จะต้องผ่านขบวนการ oxidation เข้าไปสู่วงจร tricarboxylic acid (TCA Cycle) ดังแผนภูมิของ VFA แต่ละชนิด ดังภาพ 6



ภาพ 6 การนำ VFA ไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน

ที่มา: เทิดชัย (2548)

ในทุกประเภทของ VFA พบว่า acetate และ butyrate จะเป็นแหล่งที่สำคัญในการให้พลังงานผ่านขบวนการ oxidation นอกเหนือไปจากการที่ acetate เป็นวัตถุดิบสำคัญในการสังเคราะห์ไขมัน โดยขบวนการ lipogenesis ในขณะที่ propionate เป็นแหล่งวัตถุดิบที่สำคัญในการสังเคราะห์ glucose โดยขบวนการ gluconeogenesis

VFA เหล่านี้ จะถูกดูดซึมจาก reticulo-rumen ผ่านผนังกระเพาะรูเมนเข้าไปใน portal blood ที่นำเลือดไปยังตับทางเส้นเลือดดำที่เข้าไปยังตับ (portal vein) ในรูปของ VFA อิสระ

โดยมี acetate เป็นจำนวนมากที่สุด แต่ในขณะที่ VFA ผ่านผนังกระเพาะส่วนนี้ ก็จะมีการเมแทบอลิซึมเกิดขึ้นในบริเวณนั้น โดยมีการเมแทบอลิซึมของ butyrate เกิดขึ้นมาก เมื่อเปรียบเทียบกับ acetate ที่มีการเมแทบอลิซึมน้อยที่สุด ส่วน propionate พบว่า ผนังกระเพาะ reticulo-rumen ของแกะ จะมีการเมแทบอลิซึมมากกว่าของวัวที่มีอยู่เพียง 3-5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

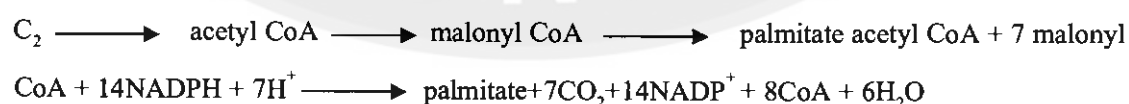
Propionate และ butyrate ส่วนใหญ่จะถูกเมแทบอลิซึมต่อไปที่ตับ ในขณะที่ acetate จะเข้าสู่ peripheral circulation ซึ่งเป็นระบบเลือดที่ส่งไปยังส่วนต่างๆของร่างกายเป็นจำนวนมากถึง 40 เปอร์เซ็นต์ของ VFA ทั้งหมดที่มีอยู่และถูกนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงาน โดยขบวนการ oxidation และการสังเคราะห์ไขมัน โดยเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของร่างกาย

Butyrate ส่วนที่ผ่านการเมแทบอลิซึมที่ผนังกระเพาะรูเมน จะถูกเปลี่ยนเป็น ketone body ได้แก่ acetoacetate และ (D)- β -hydroxybutyrate ซึ่งจะถูกนำไปใช้ต่อไปที่ตับ แต่ในสภาพที่สัตว์ได้รับอาหารไม่เพียงพอในขณะที่ร่างกายต้องการโภชนะเป็นจำนวนมาก พลังงานที่เก็บสะสมไว้ในรูปของไขมันจะถูกสับเปลี่ยนให้เป็น (L) β -hydroxybutyrate แล้วส่งเข้าไปใน peripheral circulation เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานต่อไป แต่ปรากฏว่า เมื่อสัตว์มีอาการเครียดในระยะนี้ หรือเมแทบอลิซึมของ ketone body ชนิดนี้ผิดปกติจะมีผลทำให้น้ำ ketone body ไปใช้ประโยชน์ไม่ได้ และจะถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะและน้ำนม บางส่วนจะหมุนเวียนกลับเข้าไปในกระเพาะรูเมน เป็นผลทำให้สัตว์ป่วย และเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า ketosis การให้สัตว์ได้รับ butyrate เพิ่มเติมนอกเหนือไปจากปกติ อาจจะทำให้เกิด ketone body สูงขึ้นเกินไปได้ แต่การให้ acetate เพิ่มเติม จะไม่ทำให้เกิดอาการดังกล่าวเนื่องจากขั้นตอนการเมแทบอลิซึมแตกต่างกัน

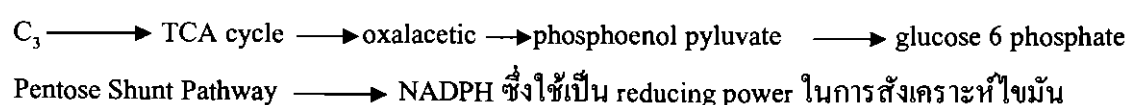
การเมแทบอลิซึมของ propionate ที่ตับพบว่าสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวน propionate ทั้งหมดที่มีอยู่ในกระแสโลหิต และพบว่า มีวิธีการเมแทบอลิซึมที่แตกต่างกันไป ได้แก่ การนำส่วนหนึ่งไปสังเคราะห์ glucose โดยขบวนการ gluconeogenesis การรวมตัวกับ acetyl-CoA เพื่อนำไปสร้างเป็น citrate และนำไปสังเคราะห์กรดอะมิโน aspartate, glutamate และ alanine

นอกจากนี้ยังมีการนำ volatile fatty acid ไปใช้เพื่อสังเคราะห์ไขมัน เช่นการใช้ C_2 , C_3 และ C_4 สังเคราะห์ไขมันดังกระบวนการต่อไปนี้ (เมธา, 2529)

การใช้ C_2 ในการสังเคราะห์ไขมัน



การใช้ C_3 ในการสังเคราะห์ไขมัน



การใช้ C₄ ในการสังเคราะห์ไขมัน

C₄ —————> acetyl CoA —————> เหมือนกับ pathway ของ C₂

การสังเคราะห์ Glucose ในร่างกาย (Glucogenesis) (เทอดชัย, 2548)

เนื่องจาก คาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่ที่สัตว์เคี้ยวเอื้องได้รับในอาหาร จะถูกย่อยและเมแทบอลิซึมภายในกระเพาะรูเมนเปลี่ยนเป็น volatile fatty acid (VFA) ทำให้การดูดซึม glucose น้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์กระเพาะเดี่ยว และจากการที่สัตว์เคี้ยวเอื้องเองก็มีความต้องการใช้ glucose ในปริมาณที่ค่อนข้างจะมากพอสมควร ทำให้การสังเคราะห์ glucose มีความสำคัญค่อนข้างสูง และกล่าวได้ว่าเป็นแหล่งใหญ่ของ glucose ที่สัตว์เคี้ยวเอื้องจะได้รับภายใต้สภาพของการได้รับอาหารตามปกติ

แหล่งของคาร์บอนที่นำมาใช้สังเคราะห์ glucose ที่สำคัญที่สุด ได้แก่ propionate โดยประมาณได้ว่า propionate จำนวน 2 โมเลกุลสามารถนำไปสังเคราะห์ glucose ได้ 1 โมเลกุล หรืออาจกล่าวได้ว่ามีประสิทธิภาพ 50 เปอร์เซ็นต์ และจากจำนวนของ glucose ทั้งหมดที่อยู่ในกระแสโลหิต พบว่า 30-60 เปอร์เซ็นต์ เป็น glucose ที่สังเคราะห์มาจาก propionate

วัตถุดิบที่มีความสำคัญรองลงมาจาก propionate ได้แก่ กรดอะมิโน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในขณะที่ยังมีการได้รับ propionate หรือ glucose ที่ดูดซึมเข้าทางลำไส้เล็กโดยตรงไม่เพียงพอ เช่น ในระยะที่สัตว์ขาดแคลนอาหาร จะมีการนำเอากรดอะมิโนมาใช้ในการสังเคราะห์ glucose หรือในขณะที่ยังอยู่ในช่วงระยะที่ให้ผลผลิตสูง เช่น แม่วัวให้น้ำนมประมาณ 30-40 ลิตรต่อวัน ความต้องการ glucose ก็จะมีเพิ่มมากขึ้น ทำให้จำเป็นต้องใช้กรดอะมิโนบางส่วนมาสังเคราะห์ glucose ในกรณีนี้ อาจจะนำเอาโปรตีนที่ย่อยได้ของจำนวนที่ร่างกายต้องการทั้งหมด มาใช้ในการสังเคราะห์ glucose ได้ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ของจำนวนทั้งหมดที่แม่วัวตัวนี้ต้องการ

นอกจากนี้ glucose ยังสามารถสังเคราะห์ได้จาก lactate, iso acids, valerate, glycerol ที่มาจากไขมันพวก non-specific glucogenic amino acid และสารประกอบที่มีคาร์บอนจำนวนเลขคี่ (odd-carbon compound) ได้เหมือนกัน

วัวนมทั่วไปมีความต้องการ glucose สูงมากในช่วงที่กำลังผลิตน้ำนม ในขณะที่แกะมีความต้องการสูงในช่วงท้ายของการตั้งท้อง การขาด glucose ในระยะนี้จะทำให้ ketosis ได้ glucose ส่วนใหญ่จะถูกนำไปใช้สร้างน้ำตาล lactose ในน้ำนม ในการสังเคราะห์ lactose 1 หน่วย ต้องการใช้ glucose 1.5 หน่วย แม่วัวที่ผลิตน้ำนมได้จำนวนมากจะมีความต้องการ glucose สูงถึง 2.8-3 กก. ต่อวัน

การศึกษากรดไขมันระเหยง่าย (Volatile fatty acid) ในกระเพาะรูเมน

Spinhirne และคณะ (2003) ได้ศึกษาผลผลิตสุดท้ายของกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนของโคเนื้อคือ กรดไขมันระเหยง่ายและแก๊ส โดยวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS พบว่ากรดไขมันระเหยง่ายและแก๊สในกระเพาะรูเมนประกอบด้วย toluene, dimethyl disulfide, pentadecane, acetic acid, propionic acid, isobutyric acid, butyric acid, isovaleric acid, valeric acid, hexanoic acid

Wanapat และคณะ (2009) ได้ศึกษานิเวศวิทยาของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนของ swamp buffalo ที่ให้อาหารที่แตกต่างกัน โดยศึกษาทั้งชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ รวมถึงแก๊สและกรดไขมันระเหยง่ายโดยใช้ HPLC พบว่ามีกรดไขมันระเหยง่าย 3 ชนิดที่สำคัญคือ acetic acid (C_2), propionic acid (C_3) และ butyric acid (C_4)

ชนิดและบทบาทของอาหารโค

โคนมเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องที่มีความสามารถในการเปลี่ยนอาหารคุณภาพต่ำจำพวกหญ้า เศษเหลือใช้ทางการเกษตร ให้เป็นอาหารที่มีคุณภาพสูง เช่น น้านมและเนื้อ ซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับมนุษย์เรา สำหรับเรื่องอาหารของโคนมว่าเป็นหัวใจสำคัญของการทำฟาร์มโคนมเพาะโคจะกินอาหารได้มากและให้ผลผลิตมากขึ้นกับชนิดและคุณภาพของอาหารของโค ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ อาหารหยาบ (roughages) และอาหารข้น (concentrates) (วิโรจน์, 2546 และ เทอดชัย, 2548)

อาหารหยาบ (Roughages)

อาหารหยาบคือ อาหารที่เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตชนิดเยื่อใยและความหนาแน่นน้อย เป็นส่วนประกอบมากกว่า 18% ของวัตถุดิบ มีความสำคัญทำให้ขบวนการย่อยอาหารของโคดำเนินไปตามปกติ และเป็นแหล่งพลังงานหลัก ได้แก่ พืชอาหารสัตว์ (forages) ได้แก่ หญ้าอาหารสัตว์ชนิดต่างๆ พืชตระกูลถั่วบางชนิด หรือเศษเหลือใช้ทางการเกษตร เช่น ด่านข้าวโพด ฟางข้าว หรือเศษผักต่างๆ และอาจจะเป็นพืชบางชนิดที่ใช้เป็นอาหารหยาบได้ เช่น ไมยราบยักษ์ พืชอาหารสัตว์ (forages) สำหรับโคนมอาจอยู่ในรูปพืชสด พืชแห้ง หรือหญ้าหมัก และบ่อยครั้งที่ผู้เลี้ยงใช้คำว่าอาหารหยาบ “roughage” ในความหมายว่าเป็นพืชอาหารสัตว์ ทั้งที่ความหมายของ

roughage จะมีความหมายกว้างกว่า พืชอาหารสัตว์จัดเป็นอาหารที่มีต้นทุนการผลิตต่ำที่สุดในบรรดาอาหารด้วยกัน แต่การปรับปรุงคุณค่าทางอาหารของพืชอาหารสัตว์มีผลมากต่อปริมาณโภชนาที่โคได้รับ และผลผลิตที่ได้จากโค นอกจากพืชอาหารสัตว์แล้ว โคยังสามารถใช้วัสดุเศษเหลือจากการปลูกพืช และวัสดุเหลือจากอุตสาหกรรมมาเป็นอาหารหยาบได้ แต่ต้องมีการปรับปรุงคุณภาพให้เหมาะสมแก่การใช้เป็นประโยชน์และระบะการให้ผลผลิตของโค

โดยปกติแล้ว อาหารหยาบจะเป็นอาหารหลักที่สำคัญของสัตว์เคี้ยวเอื้อง เนื่องจากมีราคาถูกหาได้ง่าย จึงทำให้มีการให้อาหารหยาบกับสัตว์เคี้ยวเอื้องในปริมาณที่มากกว่าอาหารชนิดอื่นๆ หรือในบางขณะจะให้สัตว์เคี้ยวเอื้องได้รับเฉพาะแต่อาหารหยาบเพียงอย่างเดียว สัตว์เคี้ยวเอื้องก็จะได้รับโภชนาครบถ้วนและอยู่ในระดับเพียงพอกับความต้องการของร่างกาย ถ้าอาหารหยาบนั้นมีคุณค่าทางอาหารสูงพอสมควร ด้วยเหตุนี้อาหารหยาบจึงมีความสำคัญต่อสัตว์เคี้ยวเอื้องค่อนข้างมากกว่าอาหารชนิดอื่นๆ

คุณค่าทางอาหารของอาหารหยาบ

อาหารหยาบโดยทั่วไปที่มีคุณภาพดีจะเป็นแหล่งโภชนาต่างๆ ที่สำคัญให้กับสัตว์เคี้ยวเอื้อง โภชนาเหล่านั้นได้แก่ โปรตีน แร่ธาตุ และพลังงาน ซึ่งสามารถใช้จำนวนหรือปริมาณของโภชนาเหล่านี้ที่มีอยู่ในอาหารหยาบเป็นตัวบ่งชี้ถึงคุณภาพหรือคุณค่าทางอาหารของอาหารหยาบนั้นๆ ได้

ส่วนประกอบทางเคมีของอาหารหยาบสามารถแบ่งได้ออกเป็นประเภทต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. ส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ (cell contents) ได้แก่ โปรตีน แร่ธาตุ และคาร์โบไฮเดรตชนิดที่ไม่ใช่โครงสร้างของพืช (non-structural carbohydrates)
2. ส่วนประกอบที่เป็นผนังเซลล์ (cell wall) ได้แก่ cellulose, hemicelluloses, lignin, pectin, polyuronides, silica และส่วนประกอบอื่นๆ อีกเล็กน้อย เช่น โปรตีน แร่ธาตุ ฟอสฟอรัส แคลเซียม แมกนีเซียมและ โซเดียม

อาหารข้น (concentrates)

อาหารข้น เป็นอาหารที่มีลักษณะตรงกันข้ามกับอาหารหยาบโดยสิ้นเชิง ดังได้กล่าวมาแล้วตอนต้น อาหารข้นเองก็มี 2 ประเภท คือ กลุ่มอาหารพลังงานและกลุ่มอาหารโปรตีน ส่วนเศษเหลือใช้ทางการเกษตร (by products) ต่างๆ จะกระจายเข้าอยู่ใน 2 กลุ่มนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณโภชนาที่มีอยู่

อาหารที่เข้าข่ายเป็นอาหารชั้นจะมีคุณสมบัติคือ 1) มีความเข้มข้นของสารอาหารพลังงาน/โปรตีน อยู่สูง 2) มีปริมาณเยื่อใยต่ำ 3) มีน้ำหนักมากเมื่อคิดต่อหน่วยน้ำหนัก 4) มีขนาดเล็กจนถึงเม็ดละเอียด

ประเภทของอาหารชั้น

1. กลุ่มอาหารพลังงาน ในประเทศอเมริกา อาหารโคที่ได้จากเมล็ดธัญพืช (grains) หลัก คือ ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอต ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี ซึ่งกลุ่มของข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี จะมีพลังงานสูงและเยื่อใยต่ำกว่ากลุ่มข้าวบาร์เลย์ ข้าวโอต

สำหรับประเทศไทยแหล่งอาหารโคนม จะเป็นข้าวโพด ข้าวฟ่าง มันสำปะหลัง (เป็นส่วนของรากที่เก็บสะสมอาหารพวกแป้งอยู่สูง) ปลายข้าว ด้วยการที่ระดับพลังงานที่สะสมอยู่ในเมล็ดพืชที่แตกต่าง รวมทั้งราคาต่อหน่วย จึงมีผลต่อการเลือกนำมาใช้ในการประกอบสูตรอาหารโค อาหารชั้นพวกเมล็ดธัญพืชนี้ปกติจะมีความน่ากินอยู่สูง โคนมชอบกิน ฉะนั้นในสูตรอาหารหนึ่งๆ ถ้าไม่ใส่เมล็ดธัญพืชอย่างหนึ่งอย่างใดเกิน 80% ของอาหารชั้น อาหารนั้นจะยังคงมีความน่ากินอยู่สูง คุณสมบัติอีกประการของเมล็ดธัญพืชทั้งหลายคือจะอุดมด้วยพลังงานและฟอสฟอรัส แต่มีโปรตีนกับแคลเซียมต่ำ ดังนั้นเราจึงต้องผสมสูตรอาหารให้มีส่วนของ grain ระดับหนึ่งและผสมจากแหล่งอาหารโปรตีนเสริมเข้ามาอีก จึงจะทำให้สูตรอาหารมีความเหมาะสมกับโคนม

2. กลุ่มอาหารโปรตีน กลุ่มอาหารโปรตีนของต่างประเทศกับของประเทศไทยจะมีความคล้ายคลึงกัน คือ 1) แหล่งที่ได้จากสัตว์ ได้แก่ ปลาป่น ขนไก่ป่น เครื่องในสัตว์ป่น กระดูกป่น และเลือดป่น 2) แหล่งที่ได้จากพืช ได้แก่ เมล็ดกากถั่วเหลือง เมล็ดกากฝ้าย กากทานตะวัน กากเรปซิด กากมะพร้าว กากปาล์ม ฯลฯ

ยูเรียเป็นสารเคมี ที่ผลิตขึ้นมาโดยมีองค์ประกอบของไนโตรเจน 42-46% (feed-grade) ซึ่งเทียบเท่ากับ โปรตีน 262-288% ยูเรียและ NPN (non-protein nitrogen) ในรูปอื่นๆ จึงเป็นอีกแหล่งหนึ่งของโปรตีนเสริม ที่ให้เฉพาะ โปรตีนไม่มีพลังงานหรือแร่ธาตุอื่นเจือปน

เศษเหลือใช้ทางการเกษตร เศษเหลือหรือผลพลอยได้ทางการเกษตร หรือที่ออกมาจากโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ ก็ดี มีมากมายที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ดี เช่น รำ กากเบียร์ กากน้ำตาล กากสับปะรด กากมะเขือเทศ ฯลฯ ผลพลอยได้เหล่านี้ โดยปกติเราจะไม่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบหลักในการผสมสูตรอาหาร แต่เราจะใช้เป็นวัตถุดิบรองเสริม ซึ่งขึ้นกับราคาและรูปแบบของเศษเหลือนั้นๆ เพื่อให้ลดต้นทุนในการผลิตสูตรอาหาร หรือค่าอาหารของโคนมต่อไป

จากประเภทอาหารของโคที่กล่าวมาข้างต้นทั้งสองประเภท มีลักษณะและค่าทางโภชนาที่ต่างกัน ดังนั้นการให้อาหารชั้นกับสัตว์เคี้ยวเอื้อง จะต้องพิจารณาถึงความต้องการของร่างกายของสัตว์ในขณะนั้นเป็นสำคัญ โดยจัดสัดส่วนระหว่างอาหารชั้นกับอาหารหยาบให้

สอดคล้องกับสภาพการผลิตในขณะนั้น วิธีการนี้จะเป็นการให้อาหารที่ถูกต้องที่สุด และใช้ประโยชน์จากอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ สัดส่วนระหว่างอาหารขึ้นกับอาหารหยাবนี้จะต้องไม่อยู่ในระดับที่ทำให้เกิดผลเสียต่อคุณภาพของผลผลิต เช่น การให้อาหารขึ้นมากเกินไปจนทำให้ไขมันน้ำนมลดต่ำลง (Low milk fat syndrome) หรือทำให้สุขภาพของสัตว์เสียไป เช่น ทำให้เกิดโรคหรืออาการผิดปกติต่างๆที่เกิดขึ้นจากเมแทบอลิซึมของอาหาร หรือการทำงานของทางเดินอาหารบางส่วนผิดปกติไป (เทอดชัย, 2548) นอกจากนี้แล้วอัตราส่วนระหว่างอาหารขึ้นและอาหารหยาบยังมีผลต่อชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน แม้แต่อาหารขึ้นอย่างเดียว อาหารหยาบอย่างเดียว ก็มีผลต่อชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน (Kamra, 2005) และปริมาณ VFA ที่ได้จากการย่อยสลายของจุลินทรีย์ก็จะแตกต่างกันไปตามชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน ซึ่งก่อนหน้านี้ Sadet-Bourgeteau และคณะ (2010) ก็ได้ทำการศึกษการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค ต่อการให้อาหารอัตราส่วนอาหารขึ้นและอาหารหยาบที่แตกต่างกัน ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล ซึ่งก็พบว่าชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่เขาทำการศึกษามีความแตกต่างกันในแต่ละอัตราส่วนของอาหารขึ้นและอาหารหยาบที่แตกต่างกันในแต่ละสูตร นอกจากนี้แล้ว wanapat และคณะ (2009) ก็ได้ศึกษาทั้งการเปลี่ยนแปลงของกลุ่มจุลินทรีย์และ VFA ในการให้อาหารกระบือปลักในสูตรอาหารที่แตกต่างกัน คือเศษมันสำปะหลังและซังข้าวโพด ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล และหา VFA ด้วยเทคนิค HPLC ซึ่งเขาก็พบว่าเมื่อให้อาหารที่แตกต่างกันปริมาณจุลินทรีย์ในแต่ละกลุ่มก็แตกต่างกันทำให้ผลผลิต VFA ที่ได้แตกต่างกันตามไปด้วย

การศึกษาแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนโดยวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล

การจำแนกแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน

โดยปกติการศึกษาชนิดของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนนั้นทำได้ยาก เนื่องจากต้องอาศัยกระบวนการเพาะเลี้ยงซึ่งมีข้อจำกัดในการตรวจสอบ เพราะแบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ หากเพาะเลี้ยงได้ก็ใช้เวลานานและเกิดความผิดพลาดในการตรวจสอบได้ง่าย เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียบางชนิดมีคุณสมบัติเกาะติดกัน (Amann et al., 1995) โดยในปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลขึ้นเพื่อใช้ในการตรวจนับแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน โดยไม่ทำการเพาะเลี้ยง (unculturable technique) ซึ่งจะทำได้ผลที่ถูกต้องแม่นยำมากขึ้น ทำให้นักวิจัยสามารถนำไปปรับใช้เทคโนโลยีชีวภาพทางอาหารของโคให้มีประสิทธิภาพดีที่สุด (Whitford et

al., 1998) เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาชิ้นส่วนของ 16S ribosomal RNA (16S rDNA) ร่วมด้วยการออกแบบ DNA probe หรือ primer เพื่อใช้ในการตรวจจับจุลินทรีย์กลุ่มต่าง ๆ จากตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมน ด้วยเทคนิค Fluorescent *in situ* hybridization (FISH) หรือ real time-PCR ซึ่งเป็นวิธีที่มีความถูกต้องแม่นยำและใช้เวลาในการวิเคราะห์สั้น เนื่องจากไม่ต้องมีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (Amann et al., 1995; Koike et al., 2010) โดยนักวิจัยจากต่างประเทศได้มีการศึกษาแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนมาบ้างแล้ว (Whitford et al., 1998; Tajima et al., 1999; Shinkai and Kobayashi, 2007) แต่ในประเทศไทยเองยังไม่พบการรายงานการศึกษาแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนด้วยวิธีนี้มาก่อนซึ่งแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ในกระเพาะรูเมนของโคที่มีการเลี้ยงในประเทศไทย มีสภาพแวดล้อมและการใช้อาหารที่แตกต่างจากต่างประเทศ ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อนชื้น ด้วยความร้อนที่ผลิตในร่างกายโคนมจากการได้รับโภชนาที่ไม่สมดุล จัดเป็นปัญหาที่สำคัญที่สุดซึ่งทำให้ศักยภาพการผลิตไม่มีประสิทธิภาพ กลุ่มของแบคทีเรียที่พบอาจมีความแตกต่างจากงานวิจัยของต่างประเทศ

Ribosomal RNA

อาร์เอ็นเอไรโบโซมเป็นองค์ประกอบสำคัญของไรโบโซม ซึ่งเป็นอนุภาคที่ให้อาร์เอ็นเอนำรหัสอาร์เอ็นเอถ่ายทอดและองค์ประกอบอื่นๆ ที่จำเป็น มาเกาะเพื่อร่วมกันสังเคราะห์โปรตีน ไรโบโซมของ *E. coli* มีมวลประมาณ 2.7×10^6 ดาลตัน และมีสัมประสิทธิ์การนอนก้น (sedimentation coefficient) 70S ซึ่งสามารถแยกออกจากกันเป็น 2 หน่วยย่อยได้แก่ หน่วยย่อย 30S ซึ่งประกอบด้วยอาร์เอ็นเอขนาด 16S กับพอลิเพปไทด์ 21 ชนิด และหน่วยย่อย 50S ซึ่งประกอบด้วยอาร์เอ็นเอขนาด 5S และ 23S กับพอลิเพปไทด์ 34 ชนิด อาร์เอ็นเอไรโบโซม 16S ช่วยให้หน่วยย่อยไรโบโซม 30S ไปเกาะบนสายอาร์เอ็นเอนำรหัส ณ จุดเริ่มต้นได้อย่างจำเพาะ การที่อาร์เอ็นเอไรโบโซม 16S ทำเช่นนี้ได้เพราะลำดับเบสที่ปลาย 3' สามารถคู่สมกับลำดับเบสจำเพาะบนอาร์เอ็นเอนำรหัส เรียกว่า ลำดับเบส Shine-Dalgarno หรือตำแหน่งยึดเกาะของไรโบโซม (ribosome binding site) หลังจากนั้น อาร์เอ็นเอถ่ายทอดพร้อมกรดอะมิโน โปรตีนองค์ประกอบที่เกี่ยวข้อง และหน่วยย่อยไรโบโซม 50S จะเข้ามาประกอบกันเป็นไรโบโซม 70S ที่สมบูรณ์ พร้อมทั้งจะสร้างโปรตีนต่อไปโดยแปลรหัสไปตามสายอาร์เอ็นเอนำรหัสแบคทีเรีย *E. coli* มีชิ้นสำหรับสร้างสายรหัสอาร์เอ็นเอไรโบโซมขึ้นต้นอยู่ทั้งหมด 7 ชุด ที่อยู่บนโครโมโซม ณ ตำแหน่งต่างๆ กันขึ้นทั้ง 7 ชุด มีส่วนของอาร์เอ็นเอไรโบโซมเหมือนกันแต่มีความแตกต่างกันที่ตำแหน่ง ชนิด และจำนวนของอาร์เอ็นเอถ่ายทอดที่แทรกอยู่ (สุกัญญา และ วิเชียร, 2547)

Ribosomal RNA (rRNA) โดยทั่วไปโมเลกุลของ rRNA ประกอบรวมอยู่กับโปรตีนแล้วเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน ที่เรียกว่า ไรโบโซม (ribosome) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการแปลรหัส (ภาพ 7)

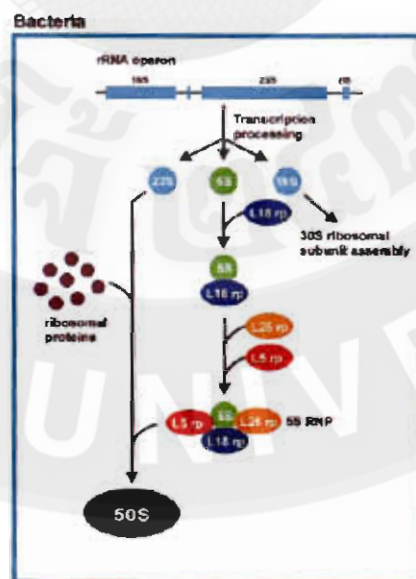
โปรคาริโอต สามารถแบ่งโมเลกุลของ rRNA ได้เป็น 3 ชนิด คือ

1. 23S rRNA มีขนาดประมาณ 2,904 นิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ซึ่งเป็นองค์ประกอบของ หน่วยใหญ่ของไรโบโซม ขนาด 50S
2. 16S rRNA มีขนาดประมาณ 1,541 นิวคลีโอไทด์ เป็นองค์ประกอบของ หน่วยใหญ่ของไรโบโซม ขนาด 30S
3. 5S rRNA มีขนาดประมาณ 120 นิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของหน่วยใหญ่ของไรโบโซม ขนาด 50S

ไรโบโซมของโปรคาริโอตมีขนาด 70S ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อย 2 หน่วย คือ 50S และ 30S โดย

1. Large subunit (50S) ประกอบด้วย 23S rRNA + 5S rRNA + protein 34 ชนิด
2. Small subunit (30S) ประกอบด้วย 16S rRNA + protein 21 ชนิด

(S = Sevedberg unit คือ A value used to express the velocity with a molecule or structure sediments when centrifuged in a dense solution)



ภาพ 7 องค์ประกอบของไรโบโซมในโปรคาริโอต (แบคทีเรีย)

ที่มา: Szymanski et al. (2003)

จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าในโปรคาริโอตทุกชนิดจะต้องมียีนในการสังเคราะห์ไรโบโซม และมีหน้าที่ที่แน่นอนคือการสังเคราะห์โปรตีน โดยจะผลิตโปรตีนชนิดเดิมเสมอเพื่อความอยู่รอด และพบว่าการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในแต่ละช่วงวิวัฒนาการ ซึ่งมีบริเวณอนุรักษ์ในระดับที่เหมาะสม และยังมีบริเวณที่มีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดแต่ละกลุ่มของจุลินทรีย์จึงสามารถที่จะนำลำดับเบสของยีน ribosomal RNA มาใช้ในการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตได้

โดยส่วนใหญ่จะนิยมใช้ยีนส่วน 16S rRNA ในการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ เพื่อแสดงถึงความแตกต่างและความหลากหลายทางพันธุกรรม เนื่องจากความเหมาะสมของโมเลกุลของยีน 16S rRNA มีขนาดประมาณ 1500 คู่เบส ซึ่งยีนส่วน 5S rRNA มีลำดับเบสเพียงประมาณ 120 คู่เบส ซึ่งมีข้อมูลลำดับเบสที่น้อย ส่วนยีน 23S rRNA มีลำดับเบสประมาณ 2,900 คู่เบส ซึ่งมีข้อมูลลำดับเบสที่มากและเป็นส่วนที่ดี แต่ในทางปฏิบัติ และการวิเคราะห์ทำได้ยากกว่า และนอกจากนี้ ยีนส่วน 16S rRNA ยังมีความแม่นยำ นิยมนำมาใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย เพราะยีน 16S rRNA มีลำดับเบสอนุรักษ์ปานกลางและมีความแตกต่างมากพอที่จะนำมาใช้ในการระบุชนิดของเชื้อแบคทีเรียในระดับสปีชีส์ได้ ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียจะขึ้นอยู่กับความคล้ายกัน (similarity) ของลำดับเบสของยีน 16S rRNA และยังมี primer ที่เป็น universal ของยีน 16S rRNA ที่สามารถนำมาใช้ในการเริ่มต้นการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพื่อเพิ่มปริมาณของดีเอ็นเอของแบคทีเรียทุกชนิดได้ (Weisburg et al., 1991; Petti et al., 2005) และสามารถนำมาใช้ประโยชน์อย่างมากในการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยใช้ 16S rRNA ยีนซึ่งเป็นที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางในการนำมาใช้ในการหาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการอย่างง่ายสะดวกและรวดเร็วด้วยการใช้ phylogenetic analysis รวมถึงใช้ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียและการจัดกลุ่มของแบคทีเรียได้ (Lane et al., 1985) นอกจากนี้ยังมีการเก็บรวบรวมข้อมูลของ 16S rRNA ยีนเป็นจำนวนมากซึ่งเราสามารถค้นหาได้ในระบบออนไลน์ของเว็บไซต์ฐานข้อมูลที่จัดเก็บ ซึ่งง่ายและสะดวกต่อการค้นหาและการทำงานในการศึกษา (Robin et al., 1994)

การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมของเชื้อแบคทีเรีย

การศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต ปัจจุบันนิยมใช้การวิเคราะห์แผนภูมิต้นไม้ เนื่องจากมีความสำคัญในการจัดกลุ่ม และศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด โดยพิจารณาถึงความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต และการมีบรรพบุรุษร่วมกัน และการทำแผนภูมิต้นไม้ได้มีการนำความรู้แผนใหม่ทางชีววิทยาและวิทยาศาสตร์สาขาอื่นๆ เข้ามาประกอบด้วย ซึ่ง

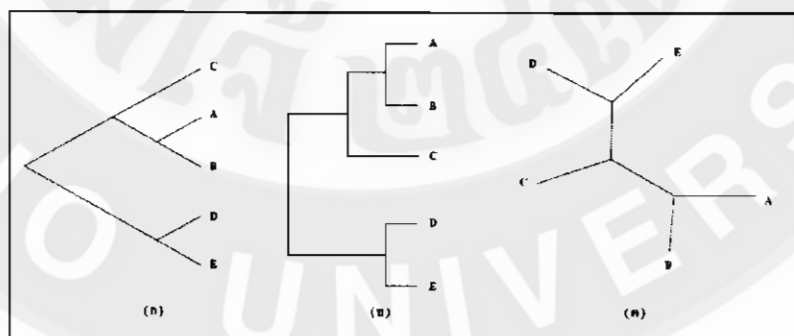
เป็นระบบที่ได้รับความนิยมในปัจจุบัน ซึ่งในปัจจุบันนักระบบวิทยาเชิงวิวัฒนาการส่วนใหญ่นิยมใช้วิธีเปรียบเทียบด้วยการอ่านลำดับดีเอ็นเอมากที่สุด เนื่องจากเป็นวิธีที่ให้ข้อมูลความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการได้ตรงที่สุด คือ เป็นวิธีที่ตรงที่สุดในการวัดการสืบทอดทางพันธุกรรมร่วมกัน จากบรรพบุรุษร่วมของสิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิดนั้น ข้อสำคัญในการศึกษาโดยใช้ลักษณะระดับอนุเช่นนี้คือ เราจะต้องเลือกขึ้นที่จะใช้ให้มีอัตราการวิวัฒนาการเหมาะสมกับกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่เราสนใจจะศึกษา กล่าวคือ ใช้ขึ้นที่วิวัฒนาการช้ากับกลุ่มที่วิวัฒนาการแยกจากกัน ตั้งแต่ครั้งโบราณกาล (ancient groups) ตัวอย่างเช่น ribosomal subunit DNA ซึ่งมีอยู่ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและวิวัฒนาการช้ามาก ได้ถูกนำมาใช้เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตทั้ง 3 โดเมนหลัก (domains) คือ bacteria, archaea และ eukaryota ขณะที่เลือกใช้ขึ้นที่วิวัฒนาการเร็วกับกลุ่มที่วิวัฒนาการแยกจากกันเมื่อไม่นานมาแล้ว (recent groups) ตัวอย่างเช่น mitochondrial genes ซึ่งมีอัตราการแทนที่ของลำดับเบสดีเอ็นเอ (base substitution rate) เร็วกว่าใน nuclear genes ถึง 10 เท่า และถูกใช้อย่างแพร่หลายในระบบวิทยาของสัตว์ (เจษฎา, 2545)

ไฟโลจีนetikทรี (Phylogenetic tree)

ไฟโลจีนetikทรีสามารถสร้างโดยอาศัยข้อมูลลักษณะสัณฐานวิทยา ซากดึกดำบรรพ์หรือข้อมูลระดับโมเลกุล โดยเฉพาะลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับโปรตีนของยีนต่างๆ ที่เป็นออร์โธล็อก (orthologue)

ไฟโลจีนetikทรี มีองค์ประกอบคล้ายต้นไม้ คือ ประกอบด้วยกิ่งก้านหรือแขนง (branch) ก้านอาจแตกเป็นกิ่งย่อยแบบสองทาง (bifurcation) หรือหลายทาง (multifurcation) ซึ่งแบบหลังนี้พบน้อยมาก ตำแหน่งที่ก้านแตกเป็นกิ่งย่อยเป็นจุดต่อ เรียกว่า โหนด (node) ที่ปลายสุดของกิ่งจะเป็นลำดับเบส หรือโปรตีนสายพันธุ์หรือสปีชีส์ของสิ่งมีชีวิต เรียกว่า ใบ (leaf) หรือ แทกซอน (taxon) หรือหน่วยอนุกรมวิธานเชิงปฏิบัติการ (OTU; operational taxonomic unit) อาจจะพิจารณาทรีเป็นกราฟชนิดหนึ่งซึ่งมีส่วนยอด (vertex) เป็น โหนด และแขนงที่ต่อโหนดเป็นเส้นขอบ (edge) แต่ทรีอาจมีจุดกำเนิดร่วมหรือราก (rooted tree) ซึ่งเป็นส่วนยอดทรีเป็นตำแหน่งของบรรพบุรุษร่วมของแทกซา (taxa) ทั้งหมดหรือไม่มีราก (unrooted tree) ก็ได้ ทรีที่มีรากจะทำให้ทราบทิศทาง เวลา และบรรพบุรุษในการวิวัฒนาการความยาวของก้านที่แตกต่างกัน แสดงระยะห่างของวิวัฒนาการ ซึ่งแต่ละก้านอาจมีอัตราเร็วของวิวัฒนาการแตกต่างกัน ระยะห่างอาจแสดงเป็นตัวเลขบนแต่ละก้านหรืออาจเขียนเป็นสเกลความยาวบอกขนาดในภาพทรีอาจเขียนในลักษณะเส้นตรงที่แยกออกจากกัน (ภาพ 8 ก) หรืออาจเขียนด้วยเส้นแนวตั้งและแนวนอน (ภาพ 8 ข) เพื่อให้เปรียบเทียบความยาวของก้านได้ง่าย ในกรณีเส้นในแนวตั้งเป็นเส้นเชื่อมต่อไม่มีความหมายอื่นใด ทรีอาจจะเขียนในลักษณะที่ส่วนของใบเสมอกัน และโดยความยาวของก้านไม่มีความหมาย ทรีใน

ลักษณะนี้ เรียกว่า เคลดโคแกรม (cladogram) ถ้าพิจารณาตรีโคโดยสนใจเพียงโครงสร้างการแตกกิ่งก้าน ไม่สนใจความยาวของขอบสามารถจะกล่าวว่า ทรินั้นมีโทโพโลยี (topology) เดียวกันหรือเรียก topological trees เมื่อสามารถบิหรือขีดขอบต่างๆ แล้วทำให้ตรี ที่มีลักษณะ โครงสร้างของกิ่งก้านแบบเดียวกัน หรืออาจเรียกว่าเป็น additive tree ถ้าระยะห่างของวิวัฒนาการของสองแทกซาที่แยกมาจากโนดเดียวกันเท่ากับผลบวกของระยะห่างทั้งสองจากโนดนั้น ถ้าตั้งสมมุติฐานให้ตรีมีอัตราการกลายพันธุ์ (mutation rate) คงที่สำหรับทุกสายทาง (lineages) สำหรับการวิวัฒนาการของลำดับเบสหรือโปรตีน จะเรียกสมมุติฐานนี้ว่า สมมุติฐานนาฬิกาของโมเลกุล (molecular clock assumption) เนื่องจากอัตราการกลายพันธุ์คงที่ ดังนั้น ปริมาณการกลายพันธุ์ของแต่ละเส้นขอบจะเป็นสัดส่วนกับเวลาที่ผ่านไป ดังนั้น ไม่ว่าจะใช้ความยาวของเส้นแทนปริมาณการกลายพันธุ์หรือเวลาที่ผ่านไปจะได้ตัวเลขเดียวกันแต่ถ้าไม่ใช่สมมุติฐานนาฬิกาของโมเลกุลที่ขอบที่มีระยะเวลาเท่ากัน แต่มีอัตราเร็วของการกลายพันธุ์แตกต่างกัน ขอบที่มีอัตราเร็วการกลายพันธุ์มากกว่าจะมีปริมาณการกลายพันธุ์มากกว่าในช่วงเวลาที่ผ่านไปเท่ากันนั้น กลุ่มของแทกซาที่กำเนิดมาจากบรรพบุรุษร่วมกันเรียกว่า เคลด (clad) หรืออาจมีเพียงเคลดเดียว เรียกว่า monophyletic tree หรือ มีหลายเคลดเรียกว่า polyphyletic tree และแต่ละคู่ของสปีชีส์ หรือแทกซาที่แยกจากกันและกันหนึ่งช่วงโนดที่อยู่ภายในตรี (internal node) หรือ กล่าวอีกอย่างก็คือ แทกซาใดๆ ที่เส้นขอบวิ่งไปบรรจบกัน เรียกว่า เป็นเพื่อนบ้านกัน (neighbors) สำหรับสปีชีส์หรือแทกซาที่แยกออกจากสปีชีส์อื่นที่กำลังศึกษาในระยะแรกๆ ของการวิวัฒนาการ เรียกว่า พวคนอกกลุ่ม (outgroup) ซึ่งสปีชีส์เหล่านี้สามารถนำมาใช้เพื่อสร้างตรีแบบมีรากได้ องค์ประกอบที่สำคัญของไฟโลเจเนติกตรี (สมชาย, 2008) ดังแสดงในภาพ 8



ภาพ 8 องค์ประกอบที่สำคัญของไฟโลเจเนติกตรี ตรีในรูป ก และ ข เป็นแบบชนิดมีราก โดยรูป ข ตรีอยู่ในลักษณะเส้นนอน และเส้นตั้ง ส่วนรูป ค เป็นแบบไม่มีราก ทั้งสามทรินี้มีโทโพโลยีเหมือนกัน A-E คือ แทกซา โดย A, B แยกมาจากโนดหนึ่ง และ D, E จากอีกโนดหนึ่ง และแทกซา A, B, C อยู่ในเคลด หนึ่งส่วนแทกซา D, E อยู่อีกเคลดหนึ่งต่างเคลดกัน

ที่มา: สมชาย (2008)

จำนวนของทรินท์ชนิดมีรากและไม่มีราก สามารถคำนวณหาได้เมื่อทราบจำนวนของแทกซา ซึ่งจะมีจำนวนมากมาย ดังนั้นโปรแกรมสำหรับสร้างไฟโลจีนetikทรินท์จึงมุ่งไปสู่การสร้างหรือค้นหาทรินท์ที่เหมาะสมหรือดีที่สุด ซึ่งบางวิธีจะใช้เวลาและกำลังคอมพิวเตอร์ในการวิเคราะห์มาก การสร้างไฟโลจีนetikทรินท์ 5 ขั้นตอน คือ การรวบรวมชุดข้อมูล การจัดเรียงลำดับ การพิจารณาเลือกวิธีวิเคราะห์ เลือกโมเดลวิวัฒนาการ และโปรแกรมการทดสอบและการนำเสนอ

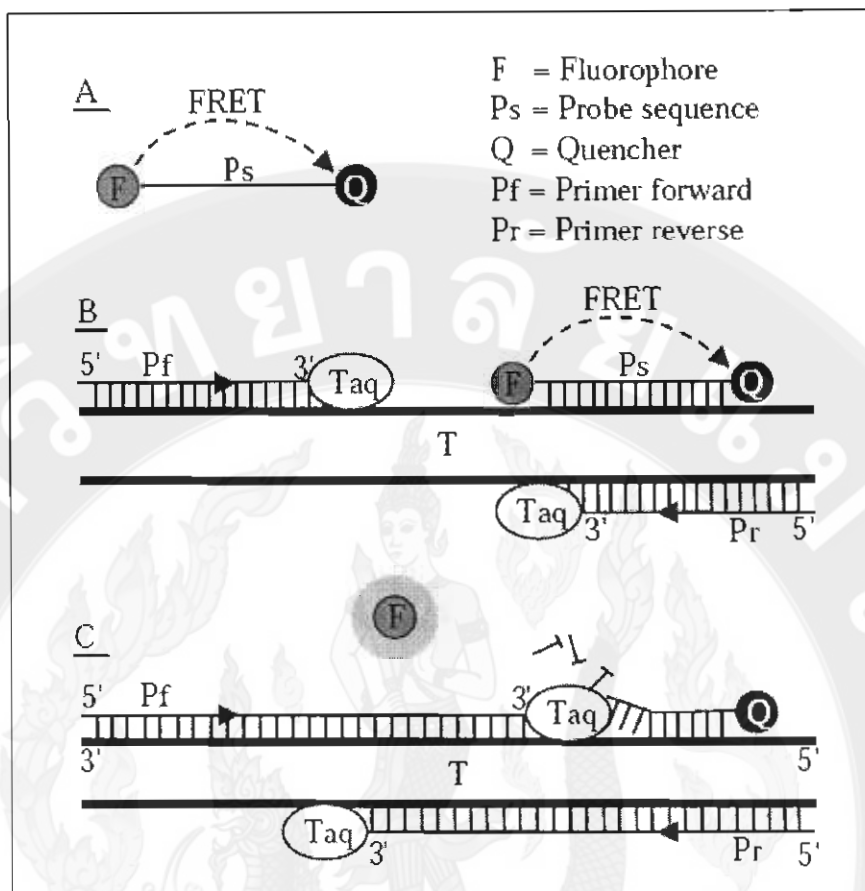
จากที่กล่าวมาเราสามารถนำความรู้ที่วิเคราะห์ได้จากการศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลายทาง ดังเช่น สามารถเปลี่ยนรูปร่างวิวัฒนาการให้เป็นแผนผังการจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตตามลำดับชั้น (hierarchical classification) และเป็นกุญแจตรวจสอบรายชื่อสิ่งมีชีวิต (identification key) ได้ สามารถใช้วิวัฒนาการในการบอกลำดับของการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสิ่งมีชีวิตนั้น ไปตามแนวทางของแผนภูมิต้นไม้ สามารถใช้วิวัฒนาการในการทำนายว่า สิ่งมีชีวิตชนิดที่เราสนใจ น่าจะมีลักษณะคล้ายคลึงกับชนิดที่เป็นพี่น้องกับชนิดนั้น (sister taxon) เราอาจจะนำวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดที่พึงพอาศัยกัน มาศึกษาเปรียบเทียบกัน เพื่อดูรูปแบบการเกิดวิวัฒนาการร่วม (co-evolution) ของสิ่งมีชีวิตเหล่านั้นได้ นำวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตหลายชนิดที่อาศัยอยู่ในพื้นที่ทางนิเวศวิทยาเดียวกัน มาศึกษาเปรียบเทียบกัน เพื่อประโยชน์ในเชิงอนุรักษ์ เช่น กำหนดว่าพื้นที่ใดมีความเป็นสิ่งมีชีวิตเฉพาะถิ่นมากกว่า (high endemism) หรือ มีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูงกว่า (high genetic diversity) (เจษฎา, 2545) ซึ่งปัจจุบันก็มีนักวิจัยจำนวนมากได้นำ phylogenetic tree หรือการศึกษาวิวัฒนาการมาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรีย การจัดกลุ่มของแบคทีเรีย โดยการใช้ชิ้นส่วน 16S rRNA ในการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย และจัดกลุ่มของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมที่น่าสนใจ ยกตัวอย่างเช่นก่อนหน้านี้ก็มีรายงานการวิจัยหลายงานวิจัย ในการศึกษา ชนิดและกลุ่มของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน โดยการใช้ 16S rRNA ขึ้นในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียและทำการจัดกลุ่มของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนด้วยการใช้ phylogenetic tree analysis ทำให้ทราบว่าในกระเพาะรูเมนของโคประกอบไปด้วยแบคทีเรียหลากหลายกลุ่ม คือ Low G+C Gram positive bacteria, *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*, *Proteobacteria* และ *Spirochaetes bacteria* ตามลำดับ (Tajima et al., 1999) นอกจากนี้การทำ phylogenetic tree ด้วยชิ้น 16S rRNA ที่ได้จากการ clone ขึ้นของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนก็ทำให้ได้กลุ่มของแบคทีเรียที่ไม่ทราบชนิด (uncultured bacteria) เกิดขึ้นเป็นจำนวนมากอย่างเช่นก่อนหน้านี้มีการศึกษาแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายเยื่อใยในกระเพาะรูเมนของแกะพบว่าพบกลุ่มของแบคทีเรียไม่ทราบชนิดจำนวน 3 กลุ่ม คือ unknown group 1, 2 และ 3 ในกระเพาะรูเมนของแกะ ซึ่งสามารถนำกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่ทราบชนิดนี้ไปใช้ในการศึกษาต่อไป (Koike et al., 2003)

การตรวจติดตามแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนด้วย เทคนิค real-time PCR (อโณทัย, 2549)

Real-time PCR คือ PCR ในขณะที่กำลังเกิดขึ้นจริงๆ ทำให้สามารถติดตาม PCR ในช่วง exponential phase ได้อย่างแม่นยำ ซึ่งนำไปสู่การวัดปริมาณได้ ซึ่งใน PCR แบบธรรมดา (conventional PCR) เราจะไม่สามารถรู้ได้ว่าเกิดอะไรขึ้นระหว่างทาง ซึ่งต้องกะประมาณว่าต้องปรับเปลี่ยนอุณหภูมิที่รอบจึงจะได้ product ที่เพียงพอต่อการตรวจวัด และต้องมีการ run gel electrophoresis เพื่อตรวจสอบดูทั้งปริมาณและขนาดของ product เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา ในขณะที่ในระบบ real-time PCR สามารถติดตามดูปฏิกิริยาได้ทุกระยะระหว่างที่กำลังดำเนินอยู่และสามารถกำหนดจุดที่จะเก็บข้อมูลเพื่อนำมาวิเคราะห์ในภายหลังได้ นอกจากนั้นยังมีวิธีพิสูจน์ตรวจสอบ product ได้โดยใช้วิธีดู melting curve หลังปฏิกิริยา โดยไม่ต้องนำมา run gel อีก

หลักการทั่วไปของ real-time PCR คือการตรวจหา PCR products ในสารละลาย โดยการใช้สารเรืองแสง (fluorescence reporters) ต่าง ๆ และการพัฒนาเครื่อง thermocycler ซึ่งแต่เดิมเป็นแค่เครื่องควบคุมอุณหภูมิขึ้นลงตามระยะเวลาที่กำหนด มาเป็นเครื่อง real time thermocycler โดยเพิ่มส่วนที่เป็นแหล่งกำเนิดแสงเพื่อไปก่อให้เกิดการเรืองแสงของ PCR products และส่วนตรวจวัดการเรืองแสงที่เกิดจาก PCR product ในหลอดปฏิกิริยา ดังนั้นการทำ real time PCR จึงเป็นการทำการเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอ โดยที่เราสามารถตรวจวัดปริมาณ PCR products ที่เกิดขึ้นจริง ณ เวลานั้น ๆ ซึ่งต่างจาก conventional PCR และการตรวจ PCR products จะกระทำหลังจากปฏิกิริยาการเพิ่มขยายสิ้นสุดแล้ว การที่เราสามารถตรวจวัด PCR products ได้ เกิดจากการทำให้ PCR products สามารถเกิดสัญญาณการเรืองแสงได้ซึ่งเราสามารถทำได้โดยการใช้สารสี (dye) ที่สามารถจับกับ DNA ทั่วไปได้ ที่นิยมใช้กันก็คือ SYBR Green I หรือใช้ probe ซึ่ง probe ก็จะมี 2 ลักษณะคือ Hydrolysis probes (ตัวอย่างเช่น Taqman, Beacons, Scorpions) และ Hybridization probes (ตัวอย่างเช่น Light Cycler)

ซึ่ง Hydrolysis probes เป็น probe ที่มีลักษณะเป็น dual-labelled probe คือ มีทั้งตัวรับสัญญาณ (quencher fluorophore) และ reporter fluorophore อยู่บน probe เส้นเดียวกัน ซึ่งขณะที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง (intact) ตัว quencher จะดูดแสง fluorescence ของ reporter fluorophore ไว้ แต่เมื่อมีการ amplify target sequence เกิดขึ้น polymerase ซึ่งมีคุณสมบัติของ 5'-exonuclease activity จะ hydrolyze probe ทำให้เกิดการแยกตัวของ reporter และ quencher fluorophore ดังนั้น fluorescence ของ reporter fluorophore จะถูกวัดได้ ในระหว่างแต่ละรอบของ PCR cycle แสง fluorescence จะเพิ่มขึ้นเพราะมีจำนวน reporter fluorophore ที่เป็นอิสระสะสมมากขึ้นเรื่อยๆ ดังภาพ 9



ภาพ 9 ระบบการเรืองแสงของ TaqMan probe ที่ประกอบด้วย fluorophore และ quencher ติดที่ปลาย 5' และปลาย 3' (A) ลำดับเบส probe ที่จะจับกับ DNA template ระหว่างการ annealing ของการทำ PCR (B) 5'-3' exonuclease activity ของ Taq DNA polymerase เข้ามาตัดลำดับเบสของ probe ออก และทำให้ fluorophore และ quencher หลุดแยกออกจากกันเป็นอิสระ (C) ทำให้เกิดการคายพลังงานในรูปของแสงเกิดเรืองแสงของ fluorescent เกิดขึ้น

ที่มา: Schena et al. (2004)

ส่วน Hybridization probes เป็น oligonucleotide probe สายสั้นสองสาย ซึ่ง PCR ลักษณะนี้ probe เส้นหนึ่งจะติดไว้ด้วย donor fluorophore ที่ 3' end และ probe อีกเส้นที่ติดกันจะมี acceptor fluorophore ติดอยู่ เมื่อทั้งสอง fluorophore อยู่ใกล้กัน (ภายใน 1-5 nucleotide) แสงที่เปล่งออกมาของ donor fluorophore จะไปกระตุ้น (excite) acceptor fluorophore ทำให้เกิดสัญญาณ fluorescence (FRET-fluorescent Resonance Energy Transfer) ที่สามารถวัดได้ในช่วง annealing phase และช่วงแรกของ extension phase ของ PCR reaction ในแต่ละรอบของ PCR cycle จะมีการ anneal โดย hybridization probe เพิ่มมากขึ้น ทำให้สัญญาณ fluorescence เพิ่มขึ้น

หลังจากการทำ real-time PCR เสร็จสิ้น ข้อมูลจะถูกนำไปประมวลผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ของเครื่องและแสดงผลออกมา โดยทั่วไปจะมีการแสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาที่ใช้ในแต่ละรอบ (cycle) รวมถึงกราฟแสดงระดับความเข้มแสงที่เปลี่ยนแปลงใน PCR แต่ละรอบแบบ real-time การคำนวณหาปริมาณตั้งต้นของดีเอ็นเอเป้าหมายจากตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ สามารถทำได้โดยใช้ดีเอ็นเอมาตรฐานที่ทราบปริมาณ มาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมควบคู่กับดีเอ็นเอเป้าหมายที่ต้องการทราบปริมาณจากตัวอย่าง ข้อมูลที่ได้จากกลุ่มของดีเอ็นเอมาตรฐานจะถูกนำไปสร้างเป็น calibration graph เพื่อให้กลุ่มตัวอย่างตรวจวิเคราะห์ใช้เทียบเพื่อคำนวณหาปริมาณของดีเอ็นเอตั้งต้น ซึ่ง dynamic range และความไว (sensitivity) ของ real-time PCR จะสูงกว่าเทคโนโลยีอื่นในปัจจุบันที่ใช้ตรวจหาปริมาณตั้งต้นของดีเอ็นเอเป้าหมาย ในสิ่งส่งตรวจ dynamic range ของ real-time PCR จะกว้างมาก โดยสามารถตรวจวัดดีเอ็นเอเป้าหมายปริมาณไม่กี่โมเลกุลไปจนถึงระดับล้านโมเลกุลได้โดยไม่ต้องเพิ่มความเข้มข้นหรือเจือจางดีเอ็นเอตั้งต้น ทำให้มีความสะดวกและประหยัดเวลาในการทำการวิเคราะห์

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่าวิธี real-time PCR เป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูงที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจสอบและวัดปริมาณของแบคทีเรียโดยปราศจากการเพาะเลี้ยง โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียที่เป็น anaerobic processes และแบคทีเรียในตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อม ซึ่งเนื่องจากแบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถที่จะเพาะเลี้ยงได้ โดยการศึกษาส่วนใหญ่จะทำการออกแบบ primer และ probe เพื่อใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียและ archaea โดยการใช้ลำดับเบสของยีนส่วน 16S rRNA (Yu, 2005) ซึ่ง probe ที่ใช้เป็นตัว detect ย่อมมีความสำคัญในการใช้เป็นตัว detect ในปฏิกิริยา real-time PCR โดยในปัจจุบันส่วนใหญ่จะนิยมใช้การย้อมสีเป็นตัว detect เช่น SYBR Green I ซึ่งมีนักวิจัยจำนวนมากใช้ในการวิจัย นอกจากนี้ probe ก็เป็นอีกชนิดหนึ่งที่คนนิยมใช้ในการ detect DNA ของเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย เช่น TaqMan probe ซึ่ง TaqMan probe เป็น sequence-specific oligonucleotide probes สายสั้นๆ ที่มีการติดฉลากด้วย fluorescent มีทั้งตัวระงับสัญญาณ (quencher fluorophore) และ reporter fluorophore อยู่บน probe เส้นเดียวกันที่ปลาย 5' และ 3' โดย probe จะมีความ specific ต่อลำดับเบสของดีเอ็นเอเป้าหมาย และยังมีความถูกต้องและแม่นยำในการหาแบคทีเรียในตัวอย่างสิ่งแวดล้อมได้เป็นอย่างดี (Harms et al., 2003) ซึ่งในปัจจุบันก็มีการนำเทคนิค real-time PCR แบบใช้ TaqMan probe มาใช้ในงานวิจัยทางด้านการหาแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนโดยไม่มีการเพาะเลี้ยง ซึ่งใช้การศึกษาลำดับเบสของยีนส่วน 16S rRNA แล้วทำการออกแบบ primer และ probe เพื่อนำมาใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียด้วยเทคนิค real-time PCR (TaqMan) กันอย่างแพร่หลาย (Koike et al., 2010)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีรายงานหลายเรื่องที่ศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล โดยไม่ต้องทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารอย่างวิธีการดั้งเดิม เนื่องจากมีข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบางชนิดสิ่งแวดล้อม และแบคทีเรียในกระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน เช่น ในกระเพาะรูเมน ลำไส้สัตว์เคี้ยวเอื้องหรือสัตว์กระเพาะเดี่ยว

Whifford และคณะ (1998) ได้ศึกษาเปรียบเทียบลำดับเบส DNA ของส่วน 16S rRNA ซึ่งเป็นวิธีที่มีการศึกษามากแล้ว มาใช้ในการศึกษาแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค โดยทำการสกัด DNA จากของเหลวในกระเพาะรูเมนของโคจำนวน 10 ตัว ที่กินอาหารต่างกัน คือ หญ้าแห้ง ข้าวโพดหมัก ในความเข้มข้นที่แตกต่างกัน จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างของเหลวในรูเมนทั้ง 2 แบบจากโคจำนวน 5 ตัว ทำการสกัด DNA และเพิ่มจำนวนโดยใช้เทคนิค PCR ที่แตกต่างกัน 2 แบบ คือ 12 cycle และ 30 cycle จากนั้นนำลำดับเบสในส่วน 16S rRNA ที่ได้ไปทำการเปรียบเทียบความเหมือนใน Ribosomal Database Project จากนั้นนำมาทำการวิเคราะห์โดย phylogenetic tree พบว่า 55% ลำดับเบสจะอยู่ใน phylum ของแบคทีเรีย Low-G+C Gram positive bacteria ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกลุ่มของแบคทีเรีย *Clostridia* และ 30% จะเป็น *Prevotella-Bacteroides*

Tajima และคณะ (1999) ได้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน ซึ่งทำการวิเคราะห์โดยการเพิ่ม DNA ด้วยเทคนิค PCR จากนั้นทำการโคลนยีนส่วน 16S rRNA ซึ่งได้จากตัวอย่างของเหลวและของแข็งในกระเพาะรูเมนของโคพันธุ์ Holstein Friesian หลังจากที่ยืนกินอาหารผ่านไป 16 ชั่วโมง จากการทดลองได้จำนวนโคลนทั้งหมด 84 โคลน จากนั้นนำไปทำการหาความเหมือนในหิ้งสมุดออนไลน์ พบว่า มีจำนวน 4 โคลนที่เหมือนกับ *Butyrivibrio fibrisolvens* และมีจำนวน 1 โคลน ที่เหมือนกับ *Treponema bryantii* และเมื่อนำโคลนทั้งหมดมาทำการวิเคราะห์ phylogenetic tree พบว่า ลำดับเบสของแบคทีเรียทั้งที่ได้จากของเหลวและของแข็งในกระเพาะรูเมน ส่วนใหญ่อยู่ใน phylum ของ Low G+C Gram positive bacteria , *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides*, *Proteobacteria* และ *Spirochaetes bacteria* ตามลำดับ

Koike และคณะ (2003) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียกับเส้นใย โดยใช้ phylogenetic tree ของลำดับเบส 16S rRNA ยีน ที่ได้จากการเก็บตัวอย่างจากกระเพาะรูเมนของแกะ หลังจากที่ยืนกิน orchardgrass และ alfalfa ผ่านไป 6 ชั่วโมงและ 20 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอ ทั้งหมดและทำการโคลนส่วน 16S rRNAs โดยใช้เทคนิค PCR ซึ่งได้ตัวอย่างโคลนทั้งหมด 91 โคลน และเมื่อนำมาทำ phylogenetic tree พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่อยู่ใน phylum

Cytophaga-Flavobacter-Bacteroides และ Low G+C Gram positive bacteria และสามารถแบ่งกลุ่มออกเป็นกลุ่มคือ ส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มของแบคทีเรีย *Prevotella* sp. และ *Butyrivibrio Flbrisolvens*

An Dengdi และคณะ (2005) ได้ศึกษาความหลากหลายของโปรคาริโอตในกระเพาะรูเมนของโคพันธุ์ yak (*Bos grunniens*) และ Jinnan cattle (*Bos taurus*) ที่ประเมินความเหมือนโดยใช้ 16S rDNA ในการวิเคราะห์พบว่าในรูเมนของ Yak ประกอบด้วยแบคทีเรียกลุ่ม Low G+C Gram-positive bacteria (LGCGPB) 54.12% และ *Bacteroidetes* 30.93% ส่วนในรูเมนของ Jinnan cattle ประกอบด้วยแบคทีเรียกลุ่ม *Bacteroidetes* 39.59% *Proteobacteria* 26.9% และ LGCGPB 22.34% และยังพบว่า 10.8% sequences ในรูเมนของ Yak เป็นแบคทีเรียชนิด fibrolytic bacterial species ส่วนในกระเพาะรูเมนของ Jinnan cattle 4% และ 17.8% sequences เป็นแบคทีเรียชนิด fibrolytic และ amylolysis species และนอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกลุ่ม methanogenic archaea ในกระเพาะรูเมนทั้งสองด้วยแต่พบในปริมาณที่น้อยมาก

Shinkai และ Kobayashi (2007) ได้ศึกษาภาพและตำแหน่งของแบคทีเรียเฉพาะที่มีความสัมพันธ์กับพืชที่เป็นวัตถุดิบคือ orchard grass hay ในกระเพาะรูเมนของแกะ โดยใช้เทคนิคของ FISH และใช้ real time PCR ในการดูปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม fibrolytic species คือ *Fibrobacter succinogenes* และ *Ruminococcus flavefaciens* และแบคทีเรียทั้งหมด ซึ่งพบว่า จำนวนแบคทีเรียที่เกาะอยู่บน leaf sheaths มีปริมาณมากกว่าที่เกาะอยู่ใน stems และยังพบว่าจะมีแนวโน้มมากที่ *R. flavefaciens* มีปริมาณมากกว่า *Fibrobacter succinogenes* ที่เกาะอยู่ leaf sheaths จากข้อมูลพบว่า *Fibrobacter succinogenes* มีความสำคัญในการย่อยสลาย fiber เพราะเราสามารถตรวจสอบได้โดยใช้ FISH และเป็นแบคทีเรียที่มีปริมาณเยอะมากจึงทำให้สามารถย่อย stem ได้ง่าย

Wanapat และ Rowlinson (2007) ได้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของ swamp buffalo ที่มีบทบาทในกระบวนการหมักโดยใช้วิธีการ PCR – DGGE/real-time PCR เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการทำการศึกษาวิจัยในอนาคต ซึ่งเขาได้ตระหนักถึงความสำคัญของแหล่งอาหารที่ให้กับ swamp buffalo ที่สนับสนุนการเจริญเติบโตของ swamp buffalo ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และจุลินทรีย์ก็มีส่วนสำคัญในกระบวนการหมักและการดูดซึมสารผ่านผนังกระเพาะของ swamp buffalo หลังจากกระบวนการหมัก ดังนั้นเขาจึงทำการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนตามการให้อาหารชนิดต่างๆ เช่น urea-treated rice straw, cassava hay เป็นต้น

Wanapat และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษานิเวศวิทยาในกระเพาะรูเมนของ swamp buffalo จำนวน 4 ตัว ในการให้อาหารต่างชนิดกัน ซึ่งจะประกอบด้วยอาหารทั้งหมด 4 สูตร

ครั้งนี้ factor A=2 อาหารหยาบ (cassava chip และ corn cobs), factor B=2 อาหารชั้นที่มียูเรียผสม (15 และ 30 g/kg) ในแต่ละสูตรจะทำการเลี้ยงเป็นเวลา 21 วัน หลังจากนั้นทำการเก็บน้ำในกระเพาะรูเมนมาทำการทดสอบ pH, อุณหภูมิ และความเข้มข้นของ $\text{NH}_3\text{-N}$ และจำนวนของจุลินทรีย์โดยใช้วิธีการนับโดยตรงคือ roll-tube technique และวิธีทางชีววิทยาโมเลกุล ซึ่งรวมถึงวิธี PCR-DGGE และ real-time PCR technique ซึ่งจากการศึกษาจุลินทรีย์โดยใช้วิธีทางชีววิทยาโมเลกุล เขาได้พบว่าแหล่งพลังงานที่เป็น cassava chip จะมีจำนวนประชากรของโปรโตซัวมากกว่า corn cobs ส่วนจำนวนประชากรของแบคทีเรียและ fungal zoospore พบว่าทั้ง 2 factor มีปริมาณเท่าๆ กัน

Yang และคณะ (2009) ได้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของ Gayals, Swamp buffaloes และ Holstein cow โดยใช้เทคนิคการโคลน 16S rRNA gene sequence พบว่า 70% และ 26.2% เป็นแบคทีเรียกลุ่ม Low G+C subdivision และ *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (CFB) และนอกจากนี้ยังมีกลุ่ม *Proteobacter*, High G +C Gram positive bacteria (HGCGPB) และ *Spirochaetes*

Vinh และคณะ (2011) ได้ศึกษาปริมาณและความหลากหลายของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนของ swamp buffalo จำนวน 4 ตัว โดยใช้เทคนิค libraries 4 ชนิดคือ microscopic, roll-tube, real-time PCR และ PCR DGGE และทำการให้อาหารเลี้ยง 4 สูตร คือ factor A=2 เป็นอาหารหยาบ (rice straw; RS และ 2 urea 2% lime treated rice straw; TRS) factor B=2 อาหารชั้นที่มียูเรียผสม (0 และ 4% ยูเรีย) จากนั้นทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์กับกระบวนการหมัก ซึ่งจากผลการทดลองได้พบว่าปริมาณของ *F. succinogenes* และ *R. albus* cellulolytic bacteria และ fungal มีปริมาณมากที่สุด ใน TRS และ 4% ยูเรียในอาหารชั้น ในขณะที่ *R. flavefaciens* และ โปรโตซัวลดลง และ amylolytic bacteria, proteolytic bacteria และ total bacteria ไม่มีการเปลี่ยนแปลงระหว่างการเปลี่ยนสูตรอาหารแต่ละสูตร

จากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่ามีนักวิจัยสนใจศึกษาแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนเพิ่มมากขึ้นตั้งแต่อดีตที่ใช้วิธีการเพาะเลี้ยงจนถึงปัจจุบันที่ใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลเข้ามาช่วยในการศึกษาแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน เนื่องจากวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารมีข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยงมาก เพราะจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนนั้นเพาะเลี้ยงยาก ดังนั้นเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลจึงถูกนำมาใช้ในงานวิจัยการศึกษาแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน ร่วมกับการศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยแบคทีเรียทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานชนิดและกลุ่มของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนเป็นจำนวนมาก จึงสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการศึกษาอาหารของสัตว์ได้โดยทำการตรวจติดตามจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในกระเพาะรูเมนโดยไม่ต้องทำการเพาะเลี้ยง ซึ่งเทคนิค real-time PCR ก็เป็นที่นิยมนำมาใช้ในการตรวจติดตามแบคทีเรียใน

กระเพาะรูเมนและสิ่งแวดล้อม ซึ่งนอกจากการออกแบบ primer ที่ specific ต่อแบคทีเรียเป้าหมาย โดย detect ด้วยการติดสี SYBR Green I ที่เป็นที่ยอมรับแล้ว แต่การ detect โดยใช้ TaqMan probe ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีความ specific สูงกว่าและเป็นที่ยอมรับเช่นเดียวกัน โดยมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

Yu และคณะ (2004) ได้ใช้เทคนิค real-time polymerase chain reaction (PCR) ที่เป็นวิธีที่มีความแม่นยำและสามารถใช้ในการตรวจสอบและหาปริมาณจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ไม่ชอบอากาศและตัวอย่างจากสิ่งแวดล้อมโดยไม่ต้องทำการเพาะเลี้ยง ซึ่งเขาได้ทำการออกแบบ primer และ probe (TaqMan) เพื่อตรวจสอบหาจุลินทรีย์ methanogens ด้วยเทคนิค real-time PCR แบบ TaqMan ซึ่ง primer กับ probe ที่ออกแบบในการศึกษารั้งนี้เขาได้ออกแบบ methanogenic 6 ชนิด คือ 4 orders (*Methanococcales*, *Methanobacteriales*, *Methanomicrobiales*, และ *Methanosarcinales*), 2 families (*Methanosarcinaceae* และ *Methanosaetaceae*), universal bacteria และ archaea ซึ่งเขาพบว่า primer และ probe ที่ออกแบบในการศึกษารั้งนี้สามารถตรวจสอบและหาปริมาณของกลุ่ม methanogenic groups ในกระบวนการหมักทางชีวภาพที่ไม่ใช้อากาศและสิ่งแวดล้อมได้

และในปี 2007 Hastie และคณะได้ศึกษาแบคทีเรีย *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes* และ *Streptococcus bovis* ในลำไส้ใหญ่ของม้า โดยใช้เทคนิค real-time polymerase chain reaction แบบ TaqMan เพื่อหาปริมาณและแยกเชื้อแบคทีเรีย cclulolytic (*Ruminococcus flavefaciens*; *Fibrobacter succinogenes*) และ non-cellulolytic (*Streptococcus bovis*) bacteria ใน rumen contents จาก caecum, ventral, dorsal, colon และ rectum ของม้า ซึ่งก็สามารถหาปริมาณของแบคทีเรียทั้ง 3 ชนิดใน rumen content ของม้าได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน และข้อมูลที่ได้ก็ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาระบบนิเวศของลำไส้ใหญ่ของม้าได้

ต่อมา Koike และคณะ (2010) ได้ศึกษาปริมาณของกลุ่มแบคทีเรีย uncultured rumen bacteria (U2, U3) ในกระเพาะรูเมนของแกะ ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ย่อยสลาย fiber โดย U2 อยู่ในกลุ่มของ fiber-associated groups และ U3 อยู่ในกลุ่มของ Low-G+C Gram-positive bacteria group ซึ่งได้ทำการออกแบบ target probe 16S rDNA หรือ rRNA สำหรับสองกลุ่มนี้เพื่อนำไปใช้หาแบคทีเรียที่มีอยู่จริงโดยใช้เทคนิคของ FISH พบว่า fiber ในกระเพาะรูเมนของแกะมีประชากรของแบคทีเรีย U2 สูงถึง 1.83% ในขณะที่ U3 มีเพียง 0.03% เท่านั้น และนอกจากนี้ยังทำการออกแบบ PCR primer sequence เพื่อศึกษาปริมาณแบคทีเรีย U2 และ U3 ที่มีอยู่จริงโดยใช้เทคนิค real-time PCR (TaqMan)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

อุปกรณ์เครื่องมือ

1. ตู้ลามีเนียร์รุ่น ABS1200 (Microflow, USA)
2. ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Sanyo Gall encamp PCL, UK)
3. เครื่องฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Astell, England)
4. ตู้อบลมร้อน (Binder, Germany)
5. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo, Switzerland)
6. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Mettler-Toledo, Switzerland)
7. เครื่องปั่นเหวี่ยงรุ่น Wise Spin® (Daihan Scientific, Korea)
8. PCR Mastercycler Personal (Eppendorf, Germany)
9. Electrophoresis Gel XL Mini Gel Migration Tank (National Labnet, USA)
10. Dark Reader® Transluminator (Clare Chemical Research, USA)
11. เครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอรุ่น Nano Drop 2000c spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
12. Real-time PCR chromo 4™ system (Bio Rad, USA)
13. Anaerobic Jar
14. pH meter (Metrohm, Switzerland)
15. กล้องจุลทรรศน์ (Olympus optical, Japan)
16. ตู้เก็บเชื้อแบคทีเรียและดีเอ็นเอ -20 °C
17. Microwave (Sharp, Thailand)
18. ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell) ยี่ห้อ Geneaid (Geneaid Biotech Ltd., Taiwan)
19. อุปกรณ์อื่นๆ
 - Low Tube Strip, WHT (Bio Rad, GB)
 - Flat Cap Strips (Bio Rad, China)
 - Microcentrifuge tube
 - PCR reaction tube

- Micropipette
- Micro Tips
- Micro centrifuge tube rack
- PCR tube rack
- หลอดทดลอง (test tube)
- บีกเกอร์ (beaker)
- จานเพาะเชื้อ (petri dish)
- กระบอกควง (cylinder)
- ขวดปรับปริมาตร
- ปิเปต (pipette)
- Centrifuge tube
- ผ้าขาวบาง
- ถุงมือยาง

สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สารละลาย/สารเคมี ที่ใช้ในการสกัดดีเอ็นเอ (Geneaid, Taiwan)

- สารละลายเอนไซม์ lysozyme (Biobasic, Canada)/TEN ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ RNase 2 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร (Fermentas, USA)

- สารละลาย W1 buffer
- สารละลาย Wash buffer
- สารละลาย Elution buffer
- เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์

2. สารละลาย/สารเคมี ที่ใช้ในการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง PCR

- PCR Master Mix (Fermentas, USA)
- สารละลาย 16S rDNA primer ตาราง 3 (1st BASE CUSTOM OLIGOS,

Malaysia)

- DNA Template
- deionized water (RNase free water) (Fermentas, USA)

3. สารละลาย/สารเคมี ที่ใช้ในการสังเคราะห์เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Real-time PCR

- Express qPCR supermix universal (Invitrogen, USA)
- สารละลาย 16S rDNA primer ตาราง 3 (1st BASE CUSTOM OLIGOS, Malaysia)

- Fluorescent probe ตาราง 3 (SIGMA-ALDRICH, USA)
- DNA Template
- deionized water (RNase free water) (Fermentas, USA)

4. สารละลาย/ สารเคมีที่ใช้ในการทำ electrophoresis

- สารละลาย PCR product
- Loading dye (Fermentas, USA)
- GeneRuler™100 bp Plus DNA Ladder (Fermentas, USA)
- GeneRuler™100 bp DNA Ladder (Fermentas, USA)
- สารละลาย Gel star (Lonza, Switzerland)
- UltraClean™ Agarose gel 3.0 เปอร์เซ็นต์
- สารละลาย TAE buffer

5. อาหารเหลวสูตร EG medium ประกอบด้วย

- Lab-Lemco' powder (Oxoid, England)
- Tryptone (Scharlau Chemie S.A., European Union)
- Meat peptone (Rcilabscan limited, Thailand)
- Yeast extract (Hardy Diagnostic, USA)
- Na₂HPO₄ (Fisher Scientific, UK)
- Glucose (Fisher Scientific, UK)
- Soluble starch (QReC, NewZealand)
- L-Cystine (Merck, Germany)
- L-Cysteine.HCL.H₂O (Fluka Biochemika, Switzerland)
- Distilled water

6. อาหารเหลวสูตร Brain Heart Infusion Broth (BHI) (Hardy Diagnostics, USA) ประกอบด้วย BHI 37 กรัมต่อลิตร

7. GasPak EZ Anaerobic Container System Sachets 260678 (บริษัท Becton, Dickinson and Company, USA)

เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน

1. *Bacteroides vulgates* (JCM5826)
2. *Prevotella albensis* (JCM12258)
3. *Clostridium amylolyticum* (JCM14823)
4. *Escherichia coli* (DMST12743)
5. *Salmonella enteritidis* (DMST15676)
6. *Vibrio parahaemolyticus* (DMST5665)

(หมายเหตุ: JCM= Japan Collection of Microorganisms จาก RIKEN Bioresource Center Japan Collection of Microorganisms, ประเทศญี่ปุ่น และ DMST= Department of Medical Sciences Thailand จากศูนย์เก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์แห่งชาติ กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, ประเทศไทย)

ลำดับเบสดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ใช้ในการวิจัย

ข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณส่วน 16S rRNA ที่นำมาใช้ในการวิจัยได้จากการโคลนนิ่งแบคทีเรียจากกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์โฮลสไตน์เฟรเซียน (Holstein Friesian) จำนวน 3 ตัว ทั้งสิ้นจำนวน 69 โคลนคือ RB1-RB69 ดังภาคผนวก ง (ได้มาจากผลการทดลองในโครงการวิจัยเรื่องการศึกษาแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารโคมหาวิทยาลัยแม่โจ้) และลำดับเบสของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในกระเพาะรูเมนจากงานวิจัยอื่นๆ ที่นำมาจากฐานข้อมูล GenBank ทั้งสิ้นจำนวน 165 ชนิด ดังตาราง 2 โดยใช้ในการทำ phylogenetic tree 73 ชนิดและ out group 1 ชนิด ใน 165 ชนิด และใช้ในการออกแบบ primer และ probe ทั้งสิ้น 164 ชนิดโดยไม่ใช้ out group

ตาราง 2 Accession number ของแบคทีเรีย 165 ชนิดที่นำมาจากฐานข้อมูลใน GenBank

Accession number	Used For	Reference
NR-029172	Out group	
AJ009959, AY196659, FJ394915, GQ356142, M58768, AB501177, AB501174, NR_025300, GQ131410, L16465, AY689230, AY689226, GU470898, GQ131418, AY323525, NR_028866, L16478, L16480, L16476, EU794297, M11656, AB510712, M86695, EF184292, AM420070, M71238, M57737, L35548, M62696, AB192280, AB198471, AB231071, DQ167245, HM856391, FM242319, HM798899, HM799085, AY047219, FM882232, AF192154, AB602505, FJ415749, HQ200412, AF078757, AB547153, AB607331, TF779842, HQ407286, EU118107, HQ407301, HQ433472, FJ624353, NR_026205, M62701, M62702, AY349407, Y09434, AF432140, NR_028689, DS483461, L34683, EU266549, AF104833, AY445603, M59083, NR_029185, L04165, DQ479411, AY169422, EU794231, AB595134, HM004598, AB627077	Phylogenetic analysis	Whitford et al., 1998, Tajima et al., 1999,
NR_028689, NR_044647, L34683, M62701, NR_026450, EU794076, EU266549, AY445603, EU139255, AY169424, AB196512, L76604, M25049, AY349407, NR_029325, AF373022, NR_026205, NR_025300, NR_028866, L16478, NR_044630, NR_044627, CP002589, CP002123, AY689230, L16480, GQ131410, AB501174, M86695, EU722741, AB547704, AB547703, AB547670, AB547671, AB547674, AB547681, AB547682, AB547684, AB429506, AB547685, AB547687, AB547689, AB547690, AB547691, AB547692, NR_041285, AB547695, AB547702, AF183406, NR_026242, X83942, X83952, AB021162, L16485, L16496, L16489, L16486, AB554415, FM865643, GQ127151, X87274, HQ200412, HQ407286, NR_026381, FJ866784, AF416663, AB607032, AB547153, HM357129, HM452945, AB607331, HQ433472, Y15992, Y17599, Y17600, HQ433441, AM397063, JN590717, JN049636, U03717, HQ433465, AB607332, JN590704, AB198471, AB231071, FM242319, FM882232, HM798899, HM799085, HM856391, EU037903	Multiple Alignment for desing primer and probe	Kocherginskaya et al., 2001, An et al., 2005, Yang, L. Y. et al., 2010, Yang, S. et al., 2010
Total 165 ชนิด		

โปรแกรมคอมพิวเตอร์

1. BIOEDIT
2. BLASTN (The National Center for Biotechnology Information (NCBI), USA)
3. CLUSTAL X1.83
4. PHYLIP Package เช่น dnadist, neighbor, seqboot และ consense
5. Tree view6. OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies (IDT), <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>)
7. Probe Match (Ribosomal Database Project (RDP), <http://rdp.emc.msu.edu/>)
8. GeneDoc
9. Adobe photoshop CS2

ขนาดของจีโนมที่ใช้ในการคำนวณกราฟมาตรฐานของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน

ตาราง 3 ขนาดจีโนมของเชื้อมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณกราฟมาตรฐาน

เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน	เชื้ออ้างอิงที่ใช้ในการคำนวณ	ขนาด Genome (bp)	Reference
<i>Bacteroides vulgatus</i> (JCM5826)	<i>Bacteroides vulgatus</i> (ATCC8482)	5,163,189	Genome Atlas Database
<i>Clostridium amylolyticum</i> (JCM14823)	<i>Clostridium phytofermentans</i> ISDg	4,847,594	Genome Atlas Database
<i>Salmonella enteritidis</i> (DMST15676)	<i>Salmonella enteritidis</i> str. P125109	4,685,848	Genome Atlas Database
<i>Escherichia coli</i> (DMST12743)	<i>Escherichia coli</i> K-12 substr. MG1655	4,639,221	Okano et al., 2003

Primer และ Probe ที่ใช้ในการวิจัย

ตาราง 4 Primer และ Probe ที่ใช้ในการวิจัย

Name	Target group	Sequence (5' → 3')	Target position ^a	Tm (°C)	GC (%)	Productsize (bp)	Reference
LGC907F	Most	AAACTCAAAGGAATTGACGGGR	907-928	55.6	45.5	196	This study
LGCProbe	LGCGPB	ACAGGTGGTGCATGGYTGTCGTCAGCTC	1044-1071	65.8	57.1		
LGC1102R		TTGCRGGACTTAACCYAACAT	1082-1102	57.1	47.6		
CFB287F	Most CFB	TAGGGGTCTGAGAGGAAGGY	287-307	56.8	52.4	420	This study
CFBProbe		CTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGT	342-371	64.3	53.3		
CFB705R		ATCTAWGCATTTACCGCTACAY	683-705	55.2	43.5		
PRO937F	Most	AAGCRGTGGAKBATGTKGTTTAAT	937-960	59.4	45.8	166	This study
PROProbe	<i>Proteoba-</i>	CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTYG	1051-1077	66.4	63		
PRO1102R	<i>cterium</i>	TTRCRGGACTTAACCYAACAT	1082-1102	57.1	47.6		
BAC338F	Bacteria	ACTCCTACGGGAGGCAG	338-354	63.4	64.7	468	Yu et al., 2005
BACProbe		TGCCAGCAGCCGCGTAATAC	516-536	70.8	61.9		
BAC805R		GACTACCAGGGTATCTAATCC	785-805	60.7	47.6		

^a The positions are based on the nucleotide position in *Escherichia coli*. (Robin, 1993)

โคนมที่ใช้ในการศึกษา

1. โคนมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชียน (Holstein Friesian) ตัวที่ 1
 2. โคนมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชียน (Holstein Friesian) ตัวที่ 2
- (ฟาร์มโคนมไร่มะเหิระ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)

อาหารเลี้ยงโค

1. อาหารหยาบ คือ ฟางข้าว (ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ลำปาง กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์)
2. อาหารข้นประกอบด้วย

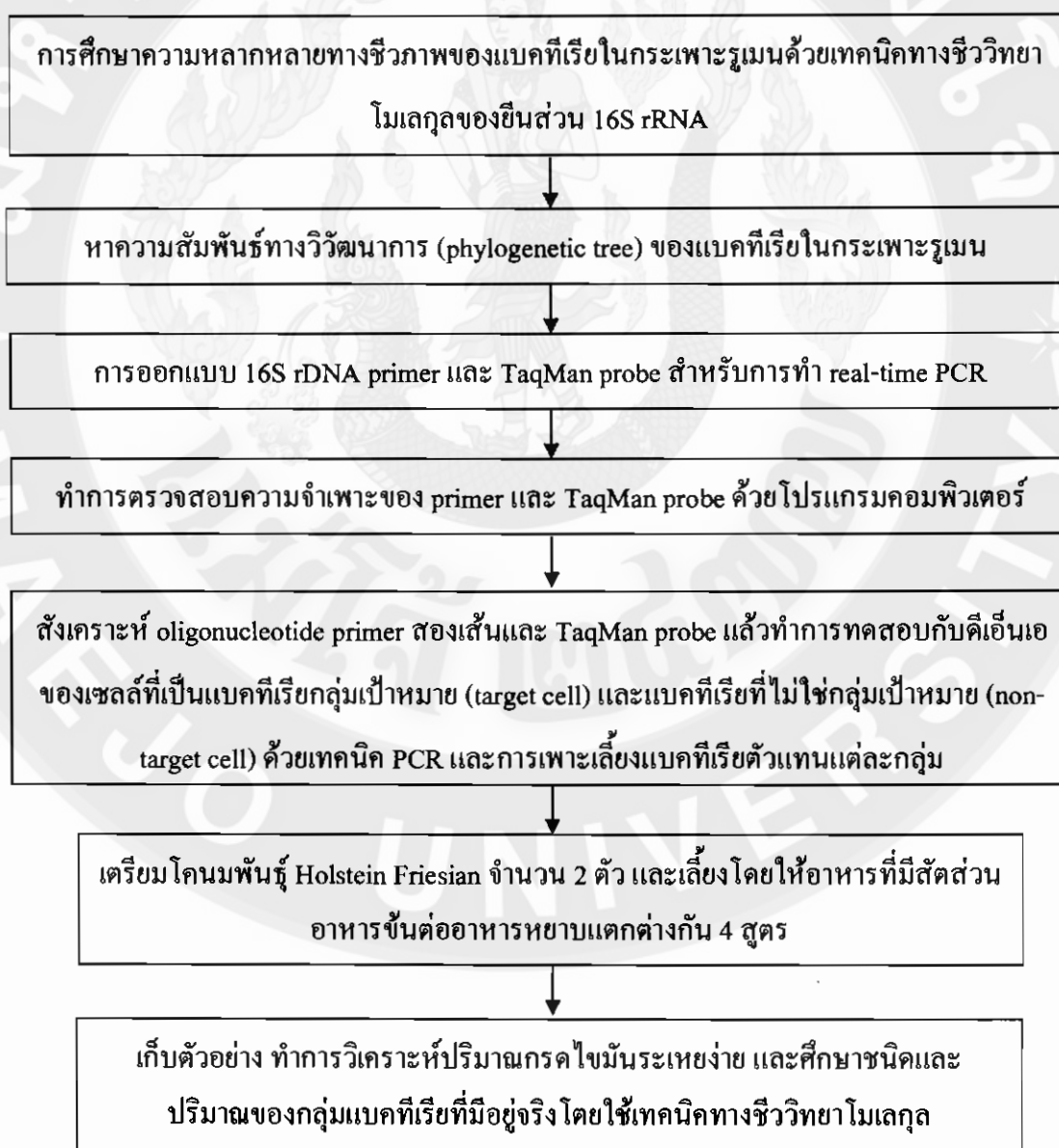
ตาราง 5 ส่วนประกอบอาหารข้น

ลำดับ	วัตถุดิบ	อาหาร
		จำนวน (กก.)
1	ปลายข้าว	210
2	ข้าวโพด	210
3	รำละเอียด	400
4	กากถั่วเหลือง	100
5	ไคแคลเซียม พี14	30
6	เกลือ	10
7	พรีมิกซ์โคนม	3.5
8	ไบกะลิน	40
รวม		1003.5

(โรงอาหารสัตว์กลาง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่)

แนวทางในการดำเนินงานวิจัย

ในการทดลองเป็นการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคด้วยการใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานในการออกแบบ 16S rDNA oligonucleotide primer และ probe เพื่อนำไปใช้ในการตรวจติดตามแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน รวมทั้งศึกษาการพัฒนาอาหารโคและหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกรดไขมันระเหยง่ายกับปริมาณแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคในอาหารสูตรแตกต่างกัน โดยมีขั้นตอนการศึกษาวิจัยแสดงดังภาพที่ 10 ต่อไปนี้



ภาพ 10 ขั้นตอนในการศึกษาวิจัย

จากแผนภาพขั้นตอนในการศึกษาวิจัยสามารถอธิบายขั้นตอน ในการวิจัยโดยละเอียดได้ดังนี้

1. การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนด้วย เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลของยีนส่วน 16S rRNA และ ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

1.1 นำข้อมูลลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณส่วนยีน 16S rRNA ที่ได้จากการโคลนนิ่งแบคทีเรียจากกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian จำนวน 3 ตัว ทั้งหมด 69 โคลน (ได้มาจากผลการทดลองในโครงการวิจัยเรื่องการศึกษาแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหารโค มหาวิทยาลัยแม่โจ้) (ภาคผนวก ง) โดยทำการปรับและคัดเลือกลำดับเบส sequence โดยใช้โปรแกรม BIOEDIT จากนั้นนำไปทำการวิเคราะห์หาชนิดของแบคทีเรียใน GenBank (Tajima et al., 1999) โดยการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (homology) ด้วยโปรแกรม BLASTN ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA) (Yang et al., 2009)

1.2 หลังจากนั้นนำลำดับเบสดีเอ็นเอของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนที่ได้ทำการเปรียบเทียบความเหมือนเพื่อหาชนิดของแบคทีเรียแล้ว พร้อมกับลำดับเบสที่ได้จากฐานข้อมูล GenBank จำนวน 74 ชนิดที่พบในกระเพาะรูเมนจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ มาทำการหาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ ในกระเพาะรูเมนโดยนำลำดับเบสมาสร้าง phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรมทาง bioinformatics หลายโปรแกรมร่วมกัน คือ นำลำดับดีเอ็นเอที่ได้มาทำการ alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTAL X1.83 (Chenna, 2003) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้าง phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม PHYLIP Package ซึ่งประกอบด้วย dnadist โดยเลือกความสัมพันธ์ของ Neighbour - Joining tree ด้วยรูปแบบของ Kimura2-parameter (Kimura et al., 1908), neighbor, seqboot และ consense (Felsenstein, 1985) ตามลำดับ และทำ Bootstrap Neighbour - Joining tree (Edwards et al., 2004) แสดงผลในรูปสายวิวัฒนาการด้วยโปรแกรม Tree view การสร้าง tree จะทำการวิเคราะห์หาค่า bootstrap ซึ่งค่า bootstrap มีความสัมพันธ์กับความเชื่อมั่นในผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ โดยการสร้าง tree จะเลือกใช้ bootstrap data resampled 1000 ครั้ง เพื่อสร้างเมทริกความคล้ายคลึงในการเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับเบส โดยกลุ่มไหนแสดงค่า bootstrap 95 เปอร์เซ็นต์หรือสูงกว่า แสดงถึงความเชื่อมั่นระดับสูงของสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

ที่ได้ (Felsenstein, 1985) และ phylogenetic tree ที่ได้จะใช้ out group คือลำดับเบสของเชื้อแบคทีเรีย *Aquifex pyrophilus* ในการทำ rooting tree หรือ tree แบบครีงราก (Tajima et al., 1999)

2. การออกแบบ 16S rDNA primer และ TaqMan probe สำหรับการทำ real-time PCR

2.1 การ alignment ลำดับเบสดีเอ็นเอ และการออกแบบ primer และ probe

นำข้อมูลที่ได้จากข้อ 1.2 เกี่ยวกับกลุ่มของแบคทีเรียที่สำคัญในกระเพาะรูเมน โดยทำการศึกษาแบคทีเรียกลุ่มที่สำคัญในกระเพาะรูเมนที่ได้จากการทำ phylogenetic tree จากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีหน้าที่สำคัญในกระเพาะรูเมนที่น่าสนใจมาใช้ในการศึกษา ตรวจสอบแบคทีเรียที่มีอยู่จริงในกระเพาะรูเมนซึ่งกลุ่มแบคทีเรียที่น่าสนใจมีจำนวน 3 กลุ่ม คือ Low G+C Gram positive bacteria (LGCGPB), *Cytophaga-Flixibacter-Bacteriodes* (CFB), *Proteobacteria* group และ Total bacteria แต่ Total bacteria จะใช้ universal primer และ TaqMan probe โดยนำลำดับดีเอ็นเอทั้งหมดที่ได้มาจากการโคลนนิ่งจำนวน 69 โคลน และจาก GenBank จำนวน 164 ชนิด มาทำการ alignment ด้วยโปรแกรม CLUSTAL X1.83 และทำการคัดลอกข้อมูล ลำดับเบสที่ได้จากการ alignment ทั้งหมดด้วยโปรแกรม GeneDoc (Sadet-Bourgeteau et al., 2010) เพื่อนำลำดับเบสทั้งหมดที่ถูก alignment มาหาตำแหน่งของลำดับเบสเพื่อทำการออกแบบ 16S rDNA primer และ TaqMan probe โดยทำการออกแบบ forward และ reverse 16S rDNA primer และ TaqMan probe ด้วยการหาลำดับเบสของ DNA ส่วนที่มีความเหมือนกันของแบคทีเรียในกลุ่มเดียวกันและมีความแตกต่างกับลำดับเบสของ DNA ของแบคทีเรียในกลุ่มอื่น และการออกแบบจะต้องพิจารณาหลักเกณฑ์ดังนี้คือ primer ควรมีความยาว 20-24 bp และ probe ควรมีความยาว 20-30 bp

2.2 การทดสอบคุณสมบัติของ primer และ probe ที่ออกแบบได้

เมื่อได้ตำแหน่ง primer และ probe ในข้อ 2.1 แล้ว ทำการตรวจสอบ ลักษณะและคุณสมบัติของ oligonucleotide primer ทั้งสองเส้น และ probe ที่ออกแบบได้โดยใช้โปรแกรม OligoAnalyzer 3.1 (Integrated DNA Technologies (IDT), <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) ซึ่งทำการเลือกใน program เป็น target type DNA, oligo concentration 0.25 μ M และ Na^+ concentration 50 mM จากนั้นเมื่อทำการนำลำดับเบสที่ออกแบบได้ใส่เข้าไปในโปรแกรมก็จะขึ้นค่าคุณสมบัติของ primer หรือ probe ที่ออกแบบดังนี้คือ % GC content, melt temp (T_m), hairpin, self dimer และ hetero dimer ซึ่งค่าที่ได้นี้จะต้องนำมาพิจารณา

ตามเงื่อนไขต่อไปนี้คือ % GC content ต้องมีค่าระหว่าง 40-70%, melt temp (T_m) ของ primer ควรอยู่ระหว่าง 55-60 °C ส่วน probe ควรอยู่ระหว่าง 65-67 °C ซึ่ง T_m ของ probe ควรสูงกว่า primer 5-10 °C (Kocherginskaya, 2001 และ ABgene®), hairpin loop, self dimer และ hetero dimer ควรมีค่าพลังงาน ΔG มากกว่า -7.0 kcal.mole⁻¹ และทำการตรวจสอบความจำเพาะของแต่ละ primer และ probe ด้วยโปรแกรม Probe match ของ Ribosomal Database Project (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/>) (Owczarzy, 2008) ซึ่ง oligonucleotide primer สองเส้นและ probe ที่ออกแบบได้นี้จะต้องมีความจำเพาะและเพิ่มจำนวนได้ในเฉพาะแบคทีเรียกลุ่มเป้าหมายทั้งหมด (Koike et al., 2010) จากนั้นทำการสังเคราะห์ oligonucleotide primer สองเส้นและ probe ที่ติดฉลากปลาย 5' ด้วย fluorescent reporter dye 6-carboxyfluorescein และปลาย 3' ด้วย fluorescent quencher dye 6-carboxytetramethylrhodamine แล้วทำการทดสอบความจำเพาะกับ DNA ของเซลล์ที่เป็นแบคทีเรียกลุ่มเป้าหมาย (target cell) และแบคทีเรียที่ไม่ใช่กลุ่มเป้าหมาย (non-target cell) และทำการเทียบตำแหน่ง primer และ probe ที่ออกแบบได้กับตำแหน่งของ 16S rRNA ยีนบนโครโมโซมของเชื้อ *Escherichia coli* เพื่อใช้เป็นตำแหน่งอ้างอิง (Robin, 1993)

3. การทดสอบความจำเพาะของ primer และ probe ด้วยเทคนิค conventional PCR และ real-time PCR

3.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียมาตรฐานและการสกัดดีเอ็นเอ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจำนวน 3 กลุ่ม ดังนี้คือ กลุ่ม LGCGPB group ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium amylolyticum* (JCM14823) และกลุ่ม CFB group ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacteroides vulgatus* (JCM5826) และ *Prevotella albensis* (JCM12258) โดยสองกลุ่มนี้เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร EG medium ในสภาวะไม่มีอากาศโดยเลี้ยงใน anaerobic jar ที่มี gaspack บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง และกลุ่ม *Proteobacteria* group ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* (DMST12743), *Salmonella enteritidis* (DMST15676) และ *Vibrio parahaemolyticus* (DMST5665) เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร BHI บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่ม จำนวน 6 ชนิด ด้วย Genomic DNA Mini Kit และวัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอรุ่น Nano Drop 2000c spectrophotometer ได้หน่วยเป็น ng จากนั้นทำการ dilution DNA ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเพื่อนำไปใช้ในการทำปฏิกิริยา PCR ใน conventional PCR และ real-time PCR 20 ng และ 10 ng ตามลำดับ

3.2 การทดสอบความจำเพาะของ primer และ probe

เมื่อได้คีเอ็นเอแล้วนำคีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียที่สกัดได้ไปใช้ในการทดสอบความจำเพาะของ primer ด้วยเทคนิค conventional PCR ซึ่ง primer จะต้องติดแบคทีเรียกลุ่มเป้าหมายที่เราสนใจได้ เมื่อทดสอบ primer ที่เราออกแบบได้แล้วก็นำ primer ที่เราออกแบบได้ไปใช้ในการทดสอบความจำเพาะของ probe ด้วยเทคนิค real-time PCR ซึ่ง probe ที่เราออกแบบได้จะต้องติดแบคทีเรียกลุ่มเป้าหมายเท่านั้น ซึ่งความจำเพาะของแบคทีเรียมาตรฐานกับ primer และ probe ดังตาราง 6 และผลที่คาดว่าจะเกิดขึ้นในการทดสอบความจำเพาะของ primer และ probe คือแบคทีเรียมาตรฐานทั้ง 3 กลุ่ม ดังตาราง 7 โดยองค์ประกอบของปฏิกิริยา PCR และโปรแกรม PCR ที่ใช้ในการทำ conventional PCR และ real-time PCR ดังแสดงในตาราง 8 และ 9 ตามลำดับ ซึ่งวิธีการทดสอบความจำเพาะของ probe สรุปได้ดังแสดงในภาพ 11 ต่อไปนี้และในแต่ละการทดสอบจะทำการทดสอบ 2 ขั้ว โดยในการทดสอบความจำเพาะของ primer และ probe แต่ละกลุ่มจะต้องมีคีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่เป็น non target เปรียบเทียบกับตัวอย่างซึ่ง probe จะไม่เกิดการเรืองแสงในคีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียที่เป็น non target

ตาราง 6 ความจำเพาะของ probe และ primer ต่อเชื้อมาตรฐานทั้ง 3 กลุ่ม

Group	Bacteria	Primer specific/ Probe	PCR product
LGCGBB Group	JCM14823 <i>Clostridium amylolyticum</i>	LGC907F, LGC1102R LGCProbe	~166 bp.
CFB Group	JCM5826 <i>Bacteroides vulgatus</i> JCM12258 <i>Prevotella albensis</i>	CFB287F, CFB705R CFBProbe	~420 bp.
Proteobacteria Group	DMST15676 <i>Salmonella enteritidis</i> DMST5665 <i>Vibrio parahaemolyticus</i> DMST12743 <i>Escherichia coli</i>	PRO937F, PRO1102R PROProbe	~196 bp.
Total bacteria	Total bacteria	BAC338F, BAC805R BACProbe	~468 bp.

ตาราง 7 ผลที่คาดว่าจะเกิดขึ้นในการทดสอบความจำเพาะของ primer และ probe คอแบคทีเรีย
มาตรฐานทั้ง 3 กลุ่ม

Primer	LGC907F,	CFB287,	PRO937F,	BAC338F,
Probe	LGC1102R	CFB705R	PRO1102R	BAC805R
Bacteria	LGCProbe	CFBProbe	PROProbe	BACProbe
JCM5826	-	+	-	+
JCM12258	-	+	-	+
JCM14823	+	-	-	+
DMST15676	-	-	+	+
DMST5665	-	-	+	+
DMST12743	-	-	+	+

ตาราง 8 ส่วนประกอบของ PCR reaction และ PCR program ในการทดสอบ primer ทั้ง 4 กลุ่ม
ด้วยเทคนิค conventional PCR

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ความเข้มข้นสุดท้าย	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
PCR MasterMix	-	25
Primer I	800 nM	4
Primer II	800 nM	4
DNA	20 ng	5
dH ₂ O	-	12
Total	-	50
สภาวะ PCR		
Initial denaturation	95 องศาเซลเซียส	5 นาที
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	1 นาที
Annealing	55 องศาเซลเซียส	1 นาที
Extension	72 องศาเซลเซียส	1 นาที
Final Extension	72 องศาเซลเซียส	5 นาที

44 รอบ

ตาราง 9 ส่วนประกอบของ PCR reaction และ PCR program ในการทดสอบ TaqMan probe ทั้ง 4 กลุ่ม ด้วยเทคนิค real-time PCR

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา	ความเข้มข้น สุดท้าย	ปริมาตรต่อปฏิกิริยา (ไมโครลิตร)
EXPRESS qPCR SuperMix Universal	-	10
Primer I	500 nM	1
Primer II	500 nM	1
Fluorescent TaqMan Probe	200 nM	0.4
DNA	10 ng	2.5
dH ₂ O	-	5.1
Total	-	20
สถานะ PCR ของ		
กลุ่ม CFB primer คือ CFB287, CFB705R และ TaqMan probe CFBProbe		
Two Step PCR		
UDG incubation	50 องศาเซลเซียส	2 นาที
Initial denaturation	95 องศาเซลเซียส	2 นาที
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	15 วินาที
Annealing และ Extension	60 องศาเซลเซียส	1 นาที
(Invitrogen™ User Manual, 2009)		44 รอบ
กลุ่ม Total bacteria primer คือ BAC338F, BAC805R และ TaqMan probe BACProbe		
UDG incubation	50 องศาเซลเซียส	2 นาที
Initial denaturation	95 องศาเซลเซียส	2 นาที
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	15 วินาที
Annealing และ Extension	60 องศาเซลเซียส	30 วินาที
(Yu et al., 2005)		44 รอบ

ส่วนสภาวะ PCR ของกลุ่ม LGCGPB group primer คือ LGC907F, LGC1102R และ TaqMan probe LGCPProbe และกลุ่ม *Proteobacteria* group primer คือ PRO937F, PRO1102R และ TaqMan probe PROProbe จะทำการหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานของ primer และ probe จากนั้นทำการ run gel electrophoresis เพื่อดูการเพิ่มจำนวนของ DNA ที่เกิดขึ้น ดังต่อไปนี้ โดยจะมีการหาสภาวะที่เหมาะสมทั้งหมด 4 สภาวะ เพื่อให้การทำงานของ probe มีความจำเพาะต่อกลุ่มแบคทีเรียเป้าหมาย ดังนี้คือ

สภาวะที่ 1

UDG incubation	50 องศาเซลเซียส	2 นาที	
Initial denaturation	95 องศาเซลเซียส	2 นาที	
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	15 วินาที	} 44 รอบ
Annealing และ Extension	60 องศาเซลเซียส	1 นาที	

สภาวะที่ 2

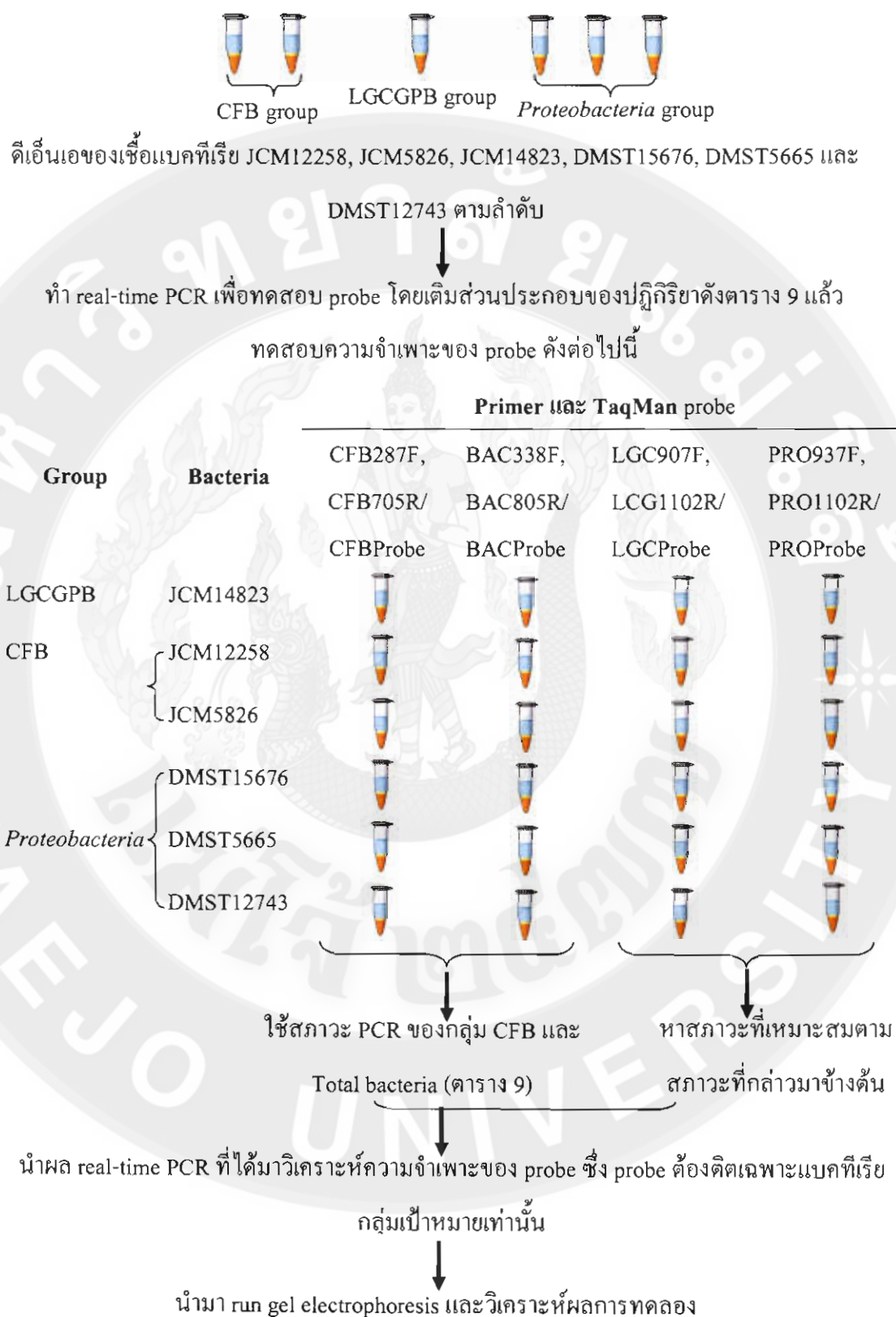
UDG incubation	50 องศาเซลเซียส	2 นาที	
Initial denaturation	95 องศาเซลเซียส	2 นาที	
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	15 วินาที	} 44 รอบ
Annealing และ Extension	65 องศาเซลเซียส	30 วินาที	

สภาวะที่ 3

UDG incubation	50 องศาเซลเซียส	2 นาที	
Initial denaturation	95 องศาเซลเซียส	2 นาที	
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	15 วินาที	} 44 รอบ
Annealing และ Extension	68 องศาเซลเซียส	30 วินาที	

สภาวะที่ 4

UDG incubation	50 องศาเซลเซียส	2 นาที	
Initial denaturation	95 องศาเซลเซียส	2 นาที	
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	15 วินาที	} 44 รอบ
Annealing และ Extension	70 องศาเซลเซียส	30 วินาที	



ภาพ 11 การทดสอบความจำเพาะของ probe แต่ละกลุ่มด้วยเทคนิค real-time PCR

4. การศึกษาชนิดและปริมาณของกลุ่มแบคทีเรียที่มีอยู่จริงโดยใช้เทคนิคทาง

ชีววิทยาโมเลกุล

4.1 การเตรียมโคที่ใช้ในการศึกษา

เตรียมโคนมพันธุ์ Holstein Friesian จำนวน 2 ตัว และเลี้ยงโคให้อาหารที่มีสัดส่วนอาหารข้นต่ออาหารหยาบแตกต่างกัน ตั้งแต่ 0:100 20:80 40:60 และ 60:40 โดยการให้อาหารสัดส่วนหนึ่งจะใช้เวลา 10 วัน เมื่อครบเวลา 10 วัน จากนั้นจะทำการเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนในการให้อาหารแต่ละสูตรตามขั้นตอนที่ 4.3 ในวันที่ 10 และเมื่อจะทำการเริ่มให้อาหารสูตรใหม่จะพักโคเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ก่อนเริ่มเลี้ยงด้วยอาหารสูตรใหม่

4.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในอาหารเลี้ยงโค

ทำการเก็บตัวอย่างอาหารเลี้ยงโคโดยมีอาหารหยาบและอาหารข้นจากนั้นทำการส่งวิเคราะห์ค่าต่างๆ ณ ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ดังต่อไปนี้

1. การวิเคราะห์ค่า dry matter (DM)
2. การวิเคราะห์หาโปรตีน
3. การวิเคราะห์หา neutral detergent fibre (NDF)

4.3 การเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมน

ทำการเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนมาศึกษา โดยเก็บในวันที่ 10 ของการให้อาหารสูตรนั้นๆ ซึ่งในแต่ละสูตรอาหารให้ทำการเก็บตัวอย่างดังตาราง 10 โดยการเก็บตัวอย่างในแต่ละเช้าจะเก็บตัวอย่างโดยนำตัวอย่างในกระเพาะรูเมนมากรองผ่านผ้าขาวบางเพื่อกรองเอาเศษอาหารหรือส่วนประกอบอื่น ๆ ที่ไม่ใช่แบคทีเรียทิ้งไป เพื่อเก็บเฉพาะของเหลวในกระเพาะรูเมนมาทำการวิเคราะห์เท่านั้น โดยเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนใส่ไว้ในหลอด centrifuge tube ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

หลังจากทำการเก็บตัวอย่างแล้วให้เก็บรักษาดตัวอย่างทันทีใน ice pack และทำการส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่าย ณ ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยตัวอย่างที่ส่งคือ ขวด ที่ 1, 3, 5, 7, 9, 11 ส่วนขวดที่ 2, 4, 6, 8, 10, 12 จะนำไปทำการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียด้วยชุดสกัด Genomic DNA Mini Kit ตัวอย่างละ 1 ml และวัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอรุ่น Nano Drop 2000c spectrophotometer เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาชนิดและปริมาณของแบคทีเรียที่มีอยู่จริงในกระเพาะรูเมนด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลคือ real-time PCR ในขั้นตอนที่ 4.4

ตาราง 10 การเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนของโคในการเลี้ยงด้วยอาหารสูตรแตกต่างกัน

สูตรอาหาร	จำนวนวันที่เลี้ยง	การเก็บตัวอย่างโคนม	จำนวนตัวอย่างที่เก็บ
อาหารชั้น : อาหารหยาบ 0 : 100	10 วัน	โค 1 เก็บซ้ำ 1	ขวด 1, 2 (W1-1)
		โค 1 เก็บซ้ำ 2	ขวด 3, 4 (W1-2)
		โค 1 เก็บซ้ำ 3	ขวด 5, 6 (W1-3)
		โค 2 เก็บซ้ำ 1	ขวด 7, 8 (B1-1)
		โค 2 เก็บซ้ำ 2	ขวด 9, 10 (B1-2)
		โค 2 เก็บซ้ำ 3	ขวด 11,12 (B1-3)
		โค 1 เก็บซ้ำ 1	ขวด 1, 2 (W2-1)
		โค 1 เก็บซ้ำ 2	ขวด 3, 4 (W2-2)
		โค 1 เก็บซ้ำ 3	ขวด 5, 6 (W2-3)
อาหารชั้น : อาหารหยาบ 20 : 80	10 วัน	โค 2 เก็บซ้ำ 1	ขวด 7, 8 (B2-1)
		โค 2 เก็บซ้ำ 2	ขวด 9, 10 (B2-2)
		โค 2 เก็บซ้ำ 3	ขวด 11,12 (B2-3)
		โค 1 เก็บซ้ำ 1	ขวด 1, 2 (W3-1)
		โค 1 เก็บซ้ำ 2	ขวด 3, 4 (W3-2)
		โค 1 เก็บซ้ำ 3	ขวด 5, 6 (W3-3)
		โค 2 เก็บซ้ำ 1	ขวด 7, 8 (B3-1)
		โค 2 เก็บซ้ำ 2	ขวด 9, 10 (B3-2)
		โค 2 เก็บซ้ำ 3	ขวด 11,12 (B3-3)
อาหารชั้น : อาหารหยาบ 40 : 60	10 วัน	โค 1 เก็บซ้ำ 1	ขวด 1, 2 (W4-1)
		โค 1 เก็บซ้ำ 2	ขวด 3, 4 (W4-2)
		โค 1 เก็บซ้ำ 3	ขวด 5, 6 (W4-3)
		โค 2 เก็บซ้ำ 1	ขวด 7, 8 (B4-1)
		โค 2 เก็บซ้ำ 2	ขวด 9, 10 (B4-2)
		โค 2 เก็บซ้ำ 3	ขวด 11,12 (B4-3)
		โค 1 เก็บซ้ำ 1	ขวด 1, 2 (W4-1)
		โค 1 เก็บซ้ำ 2	ขวด 3, 4 (W4-2)
		โค 1 เก็บซ้ำ 3	ขวด 5, 6 (W4-3)
อาหารชั้น : อาหารหยาบ 60 : 40	10 วัน	โค 2 เก็บซ้ำ 1	ขวด 7, 8 (B4-1)
		โค 2 เก็บซ้ำ 2	ขวด 9, 10 (B4-2)
		โค 2 เก็บซ้ำ 3	ขวด 11,12 (B4-3)

4.4 Real-time PCR

นำตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมนมาศึกษาชนิด และปริมาณของกลุ่มแบคทีเรียโดยใช้ primer และ probe ที่ออกแบบได้จากข้อ 2 โดยใช้ real-time PCR (Koike et al., 2010) โดยนำตัวอย่างของเหลวจากรูเมนจำนวน 1 ml มาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบสูงเพื่อเก็บเกี่ยวเซลล์แบคทีเรีย หลังจากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั้งหมดด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ Genomic DNA Mini Kit จากนั้นนำดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สกัดได้จากของเหลวในกระเพาะรูเมนมาทำการศึกษากลุ่มของแบคทีเรียที่เราสนใจและปริมาณของแต่ละกลุ่มที่มีอยู่จริงในกระเพาะรูเมนด้วยการใช้เทคนิค real-time PCR โดยส่วนประกอบของปฏิกิริยา real-time PCR ทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย EXPRESS qPCR SuperMix Universal 10 ไมโครลิตร, primer ทั้ง forward และ reverse 1 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 500 nM), fluorescent TaqMan Probe 0.4 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 nM) (Yu et al., 2004), DNA (50 ng) 1 ไมโครลิตร ที่เหลือเป็น dH₂O 6.6 ไมโครลิตร โดยบรรจุใน low tube strip และปิดฝาด้วย flat cap strips ซึ่งเป็น tube สีขาว จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง real-time PCR chromo 4™ system โดยสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ตามตาราง 9 ที่ใช้ในการตรวจสอบความจำเพาะของ probe โดยกลุ่ม CFB group primer คือ CFB287, CFB705R และ TaqMan probe CFBProbe และกลุ่ม Total bacteria group primer คือ BAC338F, BAC805R และ TaqMan probe BACProbe ใช้ two step PCR คือ

UDG incubation	50 องศาเซลเซียส	2 นาที	} 44 รอบ
Initial denaturation	95 องศาเซลเซียส	2 นาที	
Denaturation	95 องศาเซลเซียส	15 วินาที	
Annealing และ Extension (CFB)	60 องศาเซลเซียส	1 นาที	
Annealing และ Extension (Total bacteria)	60 องศาเซลเซียส	30 วินาที	

ส่วนสภาวะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของกลุ่ม LGCGPB group primer คือ LGC907F, LGC1102R และ TaqMan LGCPProbe และ กลุ่ม *Proteobacteria* group primer คือ PRO937F, PRO1102R และ TaqMan PROProbe ให้ใช้ตามสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของ primer และ probe ของทั้งสองกลุ่มในการทดลอง 3.2 จากนั้นให้ run real-time PCR ไปเรื่อยๆ โดยแต่ละตัวอย่างการ amplification จะต้องทำ 2 ซ้ำ ทำการหาชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในแต่ละกลุ่ม ซึ่งจะหาเป็นจำนวนจีโนม โดยนำค่า C_T ที่ได้ของแต่ละตัวอย่างที่ได้จากการ detect โดย probe มาเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของ standard curve genomic ที่ plot กราฟระหว่างค่า log quantity กับค่า C_T ของดีเอ็นเอของเชื้อมาตรฐาน

โดยการทำให้ real-time PCR เพื่อหาปริมาณแบคทีเรียที่มีอยู่จริงในกระเพาะรูเมนในแต่ละตัวอย่างที่มีการเลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่แตกต่างกันจะทำการทดสอบที่ละ primer ที่ละ probe เปรียบเทียบกับ standard curve ของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานกลุ่มนั้นๆ ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม CFB ในของเหลวกระเพาะรูเมน ของการเลี้ยงอาหารทั้ง 4 สูตรที่แตกต่างกัน จะทำการทดสอบดังภาพ 12 ส่วนการศึกษากลุ่มอื่นก็ทำเช่นเดียวกัน

ทำการเติมส่วนประกอบของ PCR มาข้างต้นเพื่อศึกษาแบคทีเรียกลุ่ม CFB โดยใช้ primer CFB287, CFB705R, TaqMan probe CFBProbe และดีเอ็นเอของตัวอย่างที่เก็บจากกระเพาะรูเมนต่อไปนี้

สูตรอาหาร	โคตัว 1	โคตัว 2	Standard JCM5826
อาหารชั้น : อาหารหยาบ 0 : 100	โค 1 เก็บซ้ำ 1 โค 1 เก็บซ้ำ 2 โค 1 เก็บซ้ำ 3	โค 2 เก็บซ้ำ 1 โค 2 เก็บซ้ำ 2 โค 2 เก็บซ้ำ 3	10^8 10^7 10^6
อาหารชั้น : อาหารหยาบ 20 : 80	โค 1 เก็บซ้ำ 1 โค 1 เก็บซ้ำ 2 โค 1 เก็บซ้ำ 3	โค 2 เก็บซ้ำ 1 โค 2 เก็บซ้ำ 2 โค 2 เก็บซ้ำ 3	10^5 10^4 10^3
อาหารชั้น : อาหารหยาบ 40 : 60	โค 1 เก็บซ้ำ 1 โค 1 เก็บซ้ำ 2 โค 1 เก็บซ้ำ 3	โค 2 เก็บซ้ำ 1 โค 2 เก็บซ้ำ 2 โค 2 เก็บซ้ำ 3	
อาหารชั้น : อาหารหยาบ 60 : 40	โค 1 เก็บซ้ำ 1 โค 1 เก็บซ้ำ 2 โค 1 เก็บซ้ำ 3	โค 2 เก็บซ้ำ 1 โค 2 เก็บซ้ำ 2 โค 2 เก็บซ้ำ 3	

จากนั้นนำเข้าเครื่อง real-time PCR พร้อมกับ tube ที่ทำ standard curve หลังจากเสร็จปฏิบัติการแล้ววิเคราะห์ผลที่เกิดขึ้น ซึ่งเครื่องจะคำนวณปริมาณแบคทีเรียโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

ภาพ 12 ตัวอย่างการศึกษาปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม CFB ในกระเพาะรูเมนที่ให้อาหารสูตรต่างกัน

4.5 การสร้างกราฟมาตรฐาน (Standard curve)

การสร้างกราฟมาตรฐานในการทดลองครั้งนี้ได้ศึกษาแบคทีเรียทั้งหมด 4 กลุ่มคือ CFB, LGCGPB, *Proteobacteria* และ Total bacteria ดังนั้นจะสร้างกราฟมาตรฐานของแต่ละกลุ่มโดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนั้นเป็นตัวแทนของกลุ่ม จากนั้นนำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียที่ใช้เป็นตัวแทนกลุ่มมาทำการคำนวณจำนวนจีโนม โดยใช้ขนาดของจีโนมของเชื้อแบคทีเรียชนิดนั้นๆ คำนวณ จากนั้นทำการการเจือจางเป็นลำดับที่ละ 10 เท่า ของจีโนมดีเอ็นเอที่คำนวณตามความเข้มข้นเริ่มต้นของดีเอ็นเอ โดยมีขั้นตอนการคำนวณ 5 ขั้นตอนต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 หาขนาดของจีโนมของเชื้อแบคทีเรียที่เราต้องการคำนวณหา standard curve โดยจีโนมของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่ใช้ในการคำนวณดังแสดงในตาราง 3 ที่กล่าวมาข้างต้น

ขั้นตอนที่ 2 คำนวณมวล (mass) ของดีเอ็นเอต่อจีโนม โดยใช้สูตร

$$m = (n)(1.096 \times 10^{-21} \text{ g/bp})$$

โดย m = mass, n = genome size (bp) และ $e^{-21} = 10^{-21}$

ซึ่งผลการคำนวณมวลดีเอ็นเอต่อจีโนมของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานแต่ละกลุ่มดังแสดงในตารางที่ 11

ตาราง 11 ปริมาณมวลดีเอ็นเอต่อจีโนมของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานแต่ละกลุ่ม

เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน	กลุ่มแบคทีเรีย	ขนาด จีโนม (bp)	การคำนวณ	มวลดีเอ็นเอ ต่อจีโนม (pg)
<i>Bacteroides vulgatus</i> (JCM5826)	CFB	5,163,189	5,163,189 bp* (1.096e-21 g/bp)	0.0056588551
<i>Clostridium amylolyticum</i> (JCM14823)	LGCGPB	4,847,594	4,847,594 bp* (1.096e-21 g/bp)	0.0053129630
<i>Salmonella enteritidis</i> (DMST15676)	<i>Proteobacteria</i>	4,685,848	4,685,848 bp* (1.096e-21 g/bp)	0.0051356894
<i>Escherichia coli</i> (DMST12743)	Total bacteria	4,639,221	4,639,221 bp* (1.096e-21 g/bp)	0.0050845862

จากนั้นนำมวลจีโนมที่คำนวณได้มาทำการคำนวณมวลของ genomic DNA (gDNA) ตามจำนวน gDNA ที่เราต้องการในขั้นตอนต่อไป โดยขอยกตัวอย่างการคำนวณ standard curve ของเชื้อแบคทีเรีย JCM5826 ที่เป็นตัวแทนของกลุ่ม CFB ในขั้นตอนที่ 3 ต่อไปดังนี้

ขั้นตอนที่ 3 คำนวณมวลของ gDNA ตามจำนวนจีโนมที่เราต้องการตามสูตรต่อไปนี้คือ $\text{Genome of interest} \times \text{mass of genome} = \text{mass of DNA}$ ที่เราต้องการได้ผลดังนี้

ขั้นตอนที่ 3		
Genome (cell)	pg	Mass of gDNA needed (pg)
100,000,000		565885.5144
10,000,000		56588.5514
1,000,000		5658.8551
100,000	$\times 0.0056588551$	565.8855
10,000		56.5886
1,000		5.6589
100		0.5659
10		0.0566

ขั้นตอนที่ 4 คำนวณความเข้มข้นของ gDNA ที่เราต้องการกับจำนวนจีโนมที่เราสนใจ โดยใช้ mass gDNA ที่เราต้องการหารด้วยปริมาตรที่เราต้องการใช้ในปฏิกิริยา real-time PCR ได้ผลดังนี้

ขั้นตอนที่ 4			
Genome (cell)	Mass of gDNA needed (pg)	μl ที่ใช้ใน reaction PCR	Final concentration (pg/ μl) of gDNA
100,000,000	565885.5144		226354.205760
10,000,000	56588.5514		22635.420576
1,000,000	5658.8551		2263.542058
100,000	565.8855	2.5	226.354206
10,000	56.5886		22.635421
1,000	5.6589		2.263542
100	0.5659		0.226354
10	0.0566		0.022635

ขั้นตอนที่ 5 จากนั้นทำการเตรียมการเจือจางของ gDNA โดยใช้สูตร

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

ได้ผลดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 6							
Dilution	Source of gDNA for dilution	Initial concentration (pg/μl) (C1)	Volume of gDNA (μL) (V1)	Volume of diluent (μl)	Final volume (μL) (V2)	Final concentration of dilution (pg/μl) (C2)	Resulting gDNA/2.5μl
1	10 ⁸	679,000	7	13	20	226354.206	100,000,000
2	10 ⁷	226,354.206	5	45	50	22635.421	10,000,000
3	10 ⁶	22,635.421	5	45	50	2263.542	1,000,000
4	10 ⁵	2,263.542	5	45	50	226.354	100,000
5	10 ⁴	226.354	5	45	50	22.635	10,000
6	10 ³	22.635	5	45	50	2.264	1,000
7	10 ²	2.264	5	45	50	0.226	100
8	10	0.226	5	45	50	0.023	10

ในส่วนของแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB, *Proteobacteria* และ Total bacteria จะนำมวลต่อจีโนมที่คำนวณได้ในตารางที่ 11 มาแทนค่าในขั้นตอนที่ 3, 4 และ 5 เช่นเดียวกันเพื่อทำการความเข้มข้นของ gDNA ที่ต้องทำการเจือจาง ดังตาราง 12, 13 และ 14 ตามลำดับต่อไปนี้

ตาราง 12 การเจือจางความเข้มข้นจีโนมของแบคทีเรียกลุ่ม LGCGBP

Standard curve ของกลุ่ม LGCGBP							
Dilution	Source of gDNA for dilution	Initial concentration (pg/μl) (C1)	Volume of gDNA (μL) (V1)	Volume of diluent (μl)	Final volume (μL) (V2)	Final concentration of dilution (pg/μl) (C2)	Resulting gDNA/2.5μl
1	10 ⁷	136,400	8	42	50	21251.852	10,000,000
2	10 ⁶	21,251.852	5	45	50	2125.185	1,000,000
3	10 ⁵	2,125.185	5	45	50	212.519	100,000
4	10 ⁴	212.519	5	45	50	21.252	10,000
5	10 ³	21.252	5	45	50	2.125	1,000
6	10 ²	2.125	5	45	50	0.213	100
7	10	0.213	5	45	50	0.021	10

ตาราง 13 การเจือจางความเข้มข้นจีโนมของแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria*

Standard curve ของกลุ่ม <i>Proteobacteria</i>							
Dilution	Source of gDNA for dilution	Initial concentration (pg/μl) (C1)	Volume of gDNA (μL) (V1)	Volume of diluent (μl)	Final volume (μL) (V2)	Final concentration of dilution (pg/μl) (C2)	Resulting gDNA/2.5 μl
1	10 ⁸	363,550	17	13	30	205427.576	100,000,000
2	10 ⁷	205,427.576	5	45	50	20542.758	10,000,000
3	10 ⁶	20,542.758	5	45	50	2054.276	1,000,000
4	10 ⁵	2,054.276	5	45	50	205.428	100,000
5	10 ⁴	205.428	5	45	50	20.543	10,000
6	10 ³	20.543	5	45	50	2.054	1,000
7	10 ²	2.054	5	45	50	0.205	100
8	10	0.205	5	45	50	0.021	10

ตาราง 14 การเจือจางความเข้มข้นจีโนมของแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacteria)

Standard curve ของ Total bacteria							
Dilution	Source of gDNA for dilution	Initial concentration (pg/μl) (C1)	Volume of gDNA (μL) (V1)	Volume of diluents (μl) (V2)	Final volume (μL) (V2)	Final concentration of dilution (pg/μl) (C2)	Resulting gDNA/2.5μl
1	10 ⁷	71,350.000	14	36	50	20338.345	10,000,000
2	10 ⁶	20,338.345	5	45	50	2033.834	1,000,000
3	10 ⁵	2,033.834	5	45	50	203.383	100,000
4	10 ⁴	203.383	5	45	50	20.338	10,000
5	10 ³	20.338	5	45	50	2.034	1,000
6	10 ²	2.034	5	45	50	0.203	100
7	10	0.203	5	45	50	0.020	10

จากนั้นทำการเจือจางตามความเข้มข้นของจำนวนจีโนมที่คำนวณได้แล้วนำมาทำ real-time PCR กลุ่มละ 3 ซ้ำพร้อมกับตัวอย่างของดีเอ็นเอจากกระเพาะรูเมนที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารสูตรที่แตกต่างกันตัวอย่างละ 2 ซ้ำ เพื่อหาปริมาณของเชื้อแบคทีเรียกลุ่มนั้นๆ ที่มีอยู่จริงในกระเพาะรูเมนในอาหารสูตรต่างๆ ส่วนประกอบของปฏิกิริยา real-time PCR ของการทำ standard curve ทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย EXPRESS qPCR SuperMix Universal 10 ไมโครลิตร, primer ทั้ง forward และ reverse 1 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 500 nM), fluorescent TaqMan probe 0.4 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้าย 200 nM) (Yu et al., 2004), DNA 2.5 ไมโครลิตร ที่เหลือเป็น dH₂O 5.1 ไมโครลิตร โดยบรรจุใน low tube strip และปิดฝาด้วย flat cap strips ซึ่งเป็น tube สีขาว จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง Real-time PCR Chromo 4TM System โดยสถานะการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ตามให้ใช้ตามสถานะที่เหมาะสมต่อการทำงานของ primer และ probe ของกลุ่ม CFB group, LGCGPB group, *Proteobacteria* group และ Total bacteria โดยการตั้งโปรแกรมการวิเคราะห์ปริมาณจะทำการตั้งโปรแกรมการคำนวณเป็น set เพื่อหาค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำของตัวอย่างนั้นๆ หลังจากที่ทำ real-time PCR เสร็จแล้วการวิเคราะห์ผลในเครื่อง Real-time PCR Chromo 4TM System ต้องเลือก quantification เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณ จากนั้นเลือกวิเคราะห์ผลโดยใช้ค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำในการวิเคราะห์ standard และตัวอย่าง ทำการลากเส้น base line โดยพยายามให้เส้น base line อยู่ตรงกลางช่วง exponential phase ในกราฟ log ของกราฟ

standard curve เมื่อทำการคัดเลือกกราฟ standard curve ที่มีค่า R^2 ที่ยอมรับได้แล้ว จากนั้นเครื่องจะทำการคำนวณปริมาณจีโนมของตัวอย่างอัตโนมัติโดยเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ plot ระหว่าง log quantity กับค่า C_T cycle

เมื่อได้ปริมาณจีโนมของตัวอย่างที่เครื่องคำนวณอัตโนมัติแล้ว จะนำมาคำนวณกลับเป็นปริมาณของเซลล์แบคทีเรียใน 1 ml ของตัวอย่างที่นำมาสกัด โดยปริมาณที่ได้จากเครื่องจะหมายถึง ปริมาณจีโนม/50 ng DNA ในปฏิกิริยาที่ใช้ในการทำ real-time PCR ซึ่งในแต่ละตัวอย่าง 1 ml ที่นำมาสกัดดีเอ็นเอมีปริมาณดีเอ็นเอไม่เท่ากัน และค่าปริมาณดีเอ็นเอที่วัดได้จะเป็น ng/ μ l แต่ใน 1 ml ตัวอย่างที่นำมาสกัดดีเอ็นเอจะได้ปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด 50 μ l จึงต้องนำปริมาณดีเอ็นเอ ng/ μ l ที่วัดได้มาเทียบกลับให้เป็นปริมาณดีเอ็นเอ ng/50 μ l จากนั้นนำค่าปริมาณดีเอ็นเอ ng/50 μ l ที่ได้ไปเทียบกลับจาก ปริมาณจีโนม/50 ng เพื่อหาปริมาณ cell/ml ยกตัวอย่างเช่น

ตัวอย่าง W2 (ผลรวมเฉลี่ย W2-1, W2-2 และ W2-3) มีปริมาณดีเอ็นเอเฉลี่ย เท่ากับ 100.15 ng/ μ l ดังนั้นใน 50 μ l จะมีปริมาณดีเอ็นเอเท่ากับ $(100.15 \text{ ng}/\mu\text{l} \times 50 \mu\text{l}) = 5007.50 \text{ ng}$ เมื่อค่าที่ได้จากการคำนวณปริมาณเทียบกับกราฟมาตรฐานโดยอัตโนมัติในเครื่อง เท่ากับ $8.93\text{E}+06 \text{ gDNA}/50 \text{ ng}$ ดังนั้นใน 1 ml ของตัวอย่างที่นำมาสกัดโดยมีดีเอ็นเอเริ่มต้น 50 μ l จะมีจำนวนเซลล์เท่ากับ

$$\begin{aligned} &= (8.93\text{E}+06 \text{ gDNA} \times 5007.50 \text{ ng})/50 \text{ ng} \\ &= 8.95\text{E}+08 \text{ gDNA (cell)}/\text{ml} \end{aligned}$$

เมื่อคำนวณจำนวน cell/ml ในแต่ละตัวอย่างแล้ว ทำการหาค่าเฉลี่ยปริมาณของแบคทีเรียแต่ละชนิดในอาหารแต่ละสูตร เพื่อทำการวิเคราะห์ผลต่อไป

4.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำผลการทดลองที่ได้จากการหาปริมาณของแบคทีเรียที่มีอยู่จริงในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian ที่ถูกเลี้ยงด้วยอัตราส่วนของอาหารข้นและอาหารหยาบในระดับที่แตกต่างกัน 4 สูตร ด้วยวิธี real-time PCR และผลการวิเคราะห์ปริมาณของกรดไขมันระเหยง่าย (VFA) ที่ได้ มาหาความสัมพันธ์ของปริมาณแบคทีเรียต่อปริมาณกรดไขมันระเหยง่ายที่ได้ในอาหาร 4 สูตร เพื่อทำวิเคราะห์และคัดเลือกอาหารที่มีประสิทธิภาพต่อการย่อยอาหารของโค

บทที่ 4

ผลและการอภิปรายผลการวิจัย

ผลการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน
ด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลของยีนส่วน 16S rRNA และ
ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree)

ผลการวิเคราะห์ชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียที่ได้จากการโคลนนิ่งแบคทีเรียจาก
กระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian จำนวน 3 ตัว ทั้งหมด 69 โคลน

จากการนำลำดับเบสของยีนส่วน 16S rRNA ที่ได้จากการโคลนนิ่งของแบคทีเรีย
ในของเหลวในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian จำนวน 3 ตัว ที่ใช้เป็นตัวแทนใน
การศึกษาครั้งนี้ โดยมีจำนวนลำดับเบสที่ได้จากการโคลนทั้งหมด 69 โคลน (ได้มาจากการ
ทดลองในโครงการวิจัยเรื่องการศึกษาแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้
อาหารโค มหาวิทยาลัยแม่โจ้) มาทำการหาชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียโดยนำลำดับ
เบสส่วน 16S rRNA ที่มีขนาดของลำดับเบสประมาณ 800-1,500 เบสมาทำการเปรียบเทียบ
ความเหมือนด้วยโปรแกรม BLASTN ของ The National Center for Biotechnology Information
(NCBI, USA) (Yang et al., 2009) ผลที่ได้จากการเปรียบเทียบความเหมือนดังแสดงในตาราง 15
โดยให้ลำดับโคลนทั้ง 69 โคลนแทนด้วยรหัส RB1-RB69 และผลการเปรียบเทียบความเหมือนซึ่ง
จะใช้ค่าความเหมือนในการเปรียบเทียบเพื่อศึกษา cultured bacteria หรือแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้
คือมากกว่าหรือเท่ากับ 97%, 90-97% และ น้อยกว่า 90% (Yang et al., 2010) พบว่าผลการวิเคราะห์
เป็นแบคทีเรีย uncultured หรือแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงไม่ได้ จำนวน 42 โคลน และแบคทีเรีย cultured
หรือแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้ จำนวน 27 โคลน โดยพบว่าในจำนวน cultured bacteria 27 โคลน
ประกอบด้วย 6 โคลน ที่มีค่าความเหมือนมากกว่าหรือเท่ากับ 97% คือ *Butyrivibrio fibrisolvens*
(RB65), *Fibrobacter succinogenes* (RB10), *Treponema bryantii* (RB34), *Succinoclasticum*
ruminis (RB30) and *Prevotella ruminicola* (RB9, RB18) ส่วน 20 โคลน ที่มีค่าความเหมือน
ระหว่าง 90-97% คือ *Paraprevotella clara* (RB51), *Prevotella ruminicola* (RB5, RB7, RB23,
RB20, RB39, RB60, RB63), *Prevotella brevis* (RB67), *Desulfotomaculum* sp. (RB66), *B.*
fibrisolvens (RB58), *Eubacterium ruminantium* (RB12, RB55), *Succinoclasticum ruminis* (RB2,
RB56), *Pseudobutyrvibrio ruminis* (RB46), *Firmicutes* sp. (RB41), *Victivallaceae bacterium*
(RB25), *Eubacterium oxidoreducens* (RB16, RB17) และอีก 1 โคลน ที่มีค่าความเหมือนน้อยกว่า

90% คือ *Ruminococcus flavefaciens* (RB3) ในแบคทีเรีย uncultured จำนวน 42 โคลน พบว่ามีค่าความเหมือนมากกว่าหรือเท่ากับ 97% จำนวน 20 โคลน (RB1, RB6, RB8, RB14, RB19, RB24, RB28, RB32, RB33, RB36, RB37, RB38, RB43, RB44, RB45, RB47, RB57, RB59, RB61 และ RB64) ส่วนที่มีค่าความเหมือนระหว่าง 90-97% จำนวน 21 โคลน (RB4, RB11, RB13, RB15, RB21, RB22, RB26, RB27, RB29, RB31, RB35, RB40, RB42, RB48, RB49, RB50, RB52, RB54, RB62, RB68 และ RB69) และที่มีค่าน้อยกว่า 90% จำนวน 1 โคลน (RB53) (ดังสรุปในตาราง 16)

ตาราง 15 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ (BLAST) ของลำดับเบสชิ้นส่วน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการโคลนชิ้นส่วน 16S rRNA ของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian จำนวน 3 ตัว กับดีเอ็นเอจากฐานข้อมูล NCBI

No.	Clone	Length (bp)	Nearest relative	GenBank Accession no.	Similarity (%)
1.	RB1	1526	Uncultured rumen bacterium	AB034074	97
2.	RB2	1538	<i>Succinilasticum ruminis</i>	NR_026205	91
3.	RB3	1513	<i>Ruminococcus flavefaciens</i>	AY445599	86
4.	RB4	1496	Uncultured <i>Ruminococcaceae</i> bacterium	EU794231	91
5.	RB5	1522	<i>Prevotella aff. ruminicola</i>	AJ009933	95
6.	RB6	1508	Uncultured bacterium	EU842258	97
7.	RB7	1620	<i>Prevotella ruminicola</i>	AB501168	94
8.	RB8	1517	Uncultured <i>Porphyromonadaceae</i> bacterium	EU794182	98
9.	RB9	1522	<i>Prevotella ruminicola</i>	AB501152	99
10.	RB10	1492	<i>Fibrobacter succinogenes</i>	AJ505938	99
11.	RB11	1496	Uncultured <i>alpha proteobacterium</i>	AB198471	93
12.	RB12	1519	<i>Eubacterium ruminantium</i>	NR_024661	91
13.	RB13	1493	Uncultured <i>alpha proteobacterium</i>	AB198460	92
14.	RB14	1517	Uncultured rumen bacterium	EU259473	99
15.	RB15	1494	Uncultured <i>alpha proteobacterium</i>	AB198471	93
16.	RB16	1513	<i>Eubacterium oxidoreducens</i>	AF202259	93

ตาราง 15 (ต่อ)

No.	Clone	Length (bp)	Nearest relative	GenBank Accession no.	Similarity (%)
17.	RB17	1513	<i>Eubacterium oxidoreducens</i>	AF202259	93
18.	RB18	1522	<i>Prevotella ruminicola</i>	AB501173	97
19.	RB19	1530	Uncultured rumen bacterium	AB270056	98
20.	RB20	1522	<i>Prevotella ruminicola</i>	AB501167	95
21.	RB21	1514	Uncultured bacterium	EF445218	95
22.	RB22	1502	Uncultured bacterium	DQ807549	93
23.	RB23	1521	<i>Prevotella ruminicola</i>	AF218620	93
24.	RB24	1546	Uncultured rumen bacterium	AB270140	99
25.	RB25	1498	<i>Victivallaceae bacterium</i>	FJ394915	93
26.	RB26	1516	Uncultured rumen bacterium	AB185555	90
27.	RB27	1520	Uncultured <i>planctomycete</i>	GQ356146	94
28.	RB28	1534	Uncultured rumen bacterium	EU850478	97
29.	RB29	1513	Uncultured rumen bacterium	AB034016	96
30.	RB30	1546	<i>Succiniclasicum ruminis</i>	NR_026205	97
31.	RB31	1521	Uncultured <i>Bacteroidales bacterium</i>	EU794309	95
32.	RB32	1516	Uncultured rumen bacterium	EF436314	97
33.	RB33	1524	Uncultured rumen bacterium	AB185621	98
34.	RB34	1533	<i>Treponema bryantii</i>	M57737	98
35.	RB35	1494	Uncultured <i>alpha proteobacterium</i>	AB198471	93
36.	RB36	1195	Uncultured rumen bacterium	GU303561	98
37.	RB37	1297	Uncultured rumen bacterium	EU259395	99
38.	RB38	1524	Uncultured rumen bacterium	AB270026	97
39.	RB39	1533	<i>Prevotella ruminicola</i>	AB501159	96
40.	RB40	1533	Uncultured rumen bacterium	EU871420	91
41.	RB41	1535	<i>Firmicutes</i> sp.	AF432140	90
42.	RB42	1517	Uncultured bacterium	AY854341	95
43.	RB43	1518	Uncultured rumen bacterium	EU259446	97

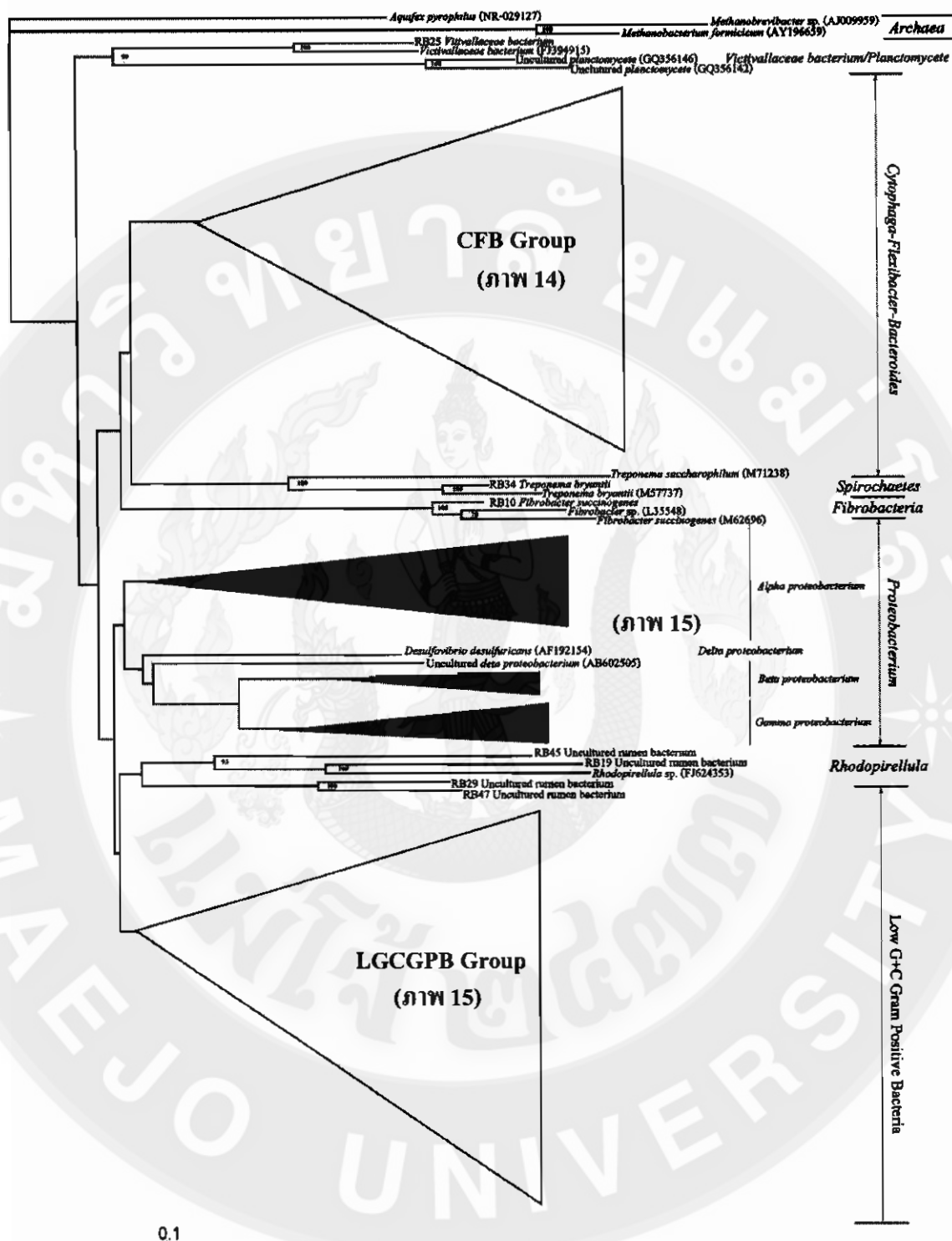
ตาราง 15 (ต่อ)

No.	Clone	Length (bp)	Nearest relative	GenBank Accession no.	Similarity (%)
44.	RB44	1537	Uncultured bacterium	EU842738	99
45.	RB45	982	Uncultured rumen bacterium	AB034017	99
46.	RB46	1531	<i>Pseudobutyrvibrio ruminis</i>	AY178841	91
47.	RB47	1513	Uncultured rumen bacterium	EU871361	99
48.	RB48	1520	Uncultured <i>Porphyromonadaceae</i> bacterium	EU794182	93
49.	RB49	1498	Uncultured <i>alpha</i> proteobacterium	AB299554	92
50.	RB50	1544	Uncultured rumen bacterium	GU302828	96
51.	RB51	1503	<i>Paraprevotella clara</i>	AB331896	90
52.	RB52	1521	Uncultured rumen bacterium	EU381474	95
53.	RB53	1526	Uncultured bacterium	FJ172829	89
54.	RB54	1504	Uncultured <i>Ruminococcaceae</i> bacterium	EU794087	94
55.	RB55	988	<i>Eubacterium ruminantium</i>	NR_024661	93
56.	RB56	1540	<i>Succiniclasicum ruminis</i>	NR_026205	92
57.	RB57	1522	Uncultured rumen bacterium	EF436315	99
58.	RB58	1522	<i>B.fibrisolvens</i>	X89979	90
59.	RB59	1528	Uncultured rumen bacterium	AB270065	99
60.	RB60	1523	<i>Prevotella aff. ruminicola</i>	AJ009933	90
61.	RB61	1519	Uncultured rumen bacterium	AY244965	97
62.	RB62	1521	Uncultured <i>Bacteroidales</i> bacterium	EU794309	91
63.	RB63	1524	<i>Prevotella ruminicola</i>	AB501167	92
64.	RB64	1517	Uncultured rumen bacterium	EU259402	99
65.	RB65	1537	<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>	AY699273	99
66.	RB66	1527	<i>Desulfotomaculum</i> sp.	DQ479419	92
67.	RB67	1522	<i>Prevotella brevis</i>	AB501176	93
68.	RB68	1506	Uncultured <i>Ruminococcaceae</i> bacterium	EU794299	93
69.	RB69	1517	Uncultured <i>Porphyromonadaceae</i> bacterium	EU794304	96

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโค

จากผลการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับเบสส่วน 16S rRNA ขึ้นจำนวน 69 โคลน กับฐานข้อมูลใน GenBank พบว่าพบเชื้อแบคทีเรีย uncultured จำนวน 42 โคลนซึ่งมีจำนวนมากกว่าแบคทีเรีย cultured ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการศึกษาแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนโดยตรงโดยปราศจากการเพาะเลี้ยงและการใช้การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนเป้าหมายหรือยีน 16S ribosomal RNA gene (16S rRNA) ทำให้ได้แบคทีเรีย uncultured หรือแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงไม่ได้เกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก และการใช้ phylogenetic tree ในการศึกษาวิวัฒนาการความสัมพันธ์ของแบคทีเรียจึงเป็นสิ่งสำคัญในการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน (Tajima et al., 1999) ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงทำการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนโดยสร้าง phylogenetic tree เพื่อทำการจัดกลุ่มของแบคทีเรีย โดยใช้ลำดับเบสที่นำมาจาก GenBank จำนวน 74 ชนิด ที่ทราบชนิดแล้วโดยแบคทีเรียเหล่านี้เป็นแบคทีเรียที่ส่วนใหญ่พบในกระเพาะรูเมน พร้อมกับ 69 โคลนที่ได้ การทำ phylogenetic tree ทำให้เราทราบวิวัฒนาการความสัมพันธ์ของแบคทีเรียที่มีความคล้ายคลึงกันหรือมีวิวัฒนาการร่วมกัน จึงทำให้ทราบแบคทีเรีย uncultured ในกระเพาะรูเมนได้ว่าแบคทีเรีย uncultured ที่ได้มีความใกล้เคียงกันกับแบคทีเรียชนิดไหน มีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียชนิดไหน และจัดอยู่กับแบคทีเรียในกลุ่มอะไร ซึ่งผลการทำ phylogenetic tree แสดงในภาพ 13

จากผลการทำ phylogenetic tree ดังภาพ 13 พบว่าเมื่อใช้เชื้อแบคทีเรีย *Aquifex pyrophilus* เป็น out-group ในการสร้าง tree และหาเปอร์เซ็นต์บน branch จากการทำ 1,000 bootstrap trees สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคได้เป็น 7 กลุ่ม โดยพบว่าแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian ประกอบด้วยกลุ่มใหญ่ 2 กลุ่มคือ Low G+C Gram-positive bacteria (LGCGPB) เป็นจำนวน 43.5% ของโคลนทั้งหมด และกลุ่ม *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (CFB) เป็นจำนวน 37.7% ของโคลนทั้งหมด และแบคทีเรียกลุ่มย่อย 5 กลุ่มคือ *Proteobacteria* เป็นจำนวน 7.3% ของโคลนทั้งหมด, *Rhodopirellula* เป็นจำนวน 5.8% ของโคลนทั้งหมด, *Victivellaceae bacterium/ Planctomycete* เป็นจำนวน 2.9% ของโคลนทั้งหมด, *Spirochaetes* เป็นจำนวน 1.4% ของโคลนทั้งหมด และ *Fibrobacteria* เป็นจำนวน 1.4% ของโคลนทั้งหมด ดังสรุปในตาราง 16



ภาพ 13 Phylogenetic tree ของลำดับเบส 16S rRNA ยีนที่ได้จากการโคลนนิ่งของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian โดยใช้ *Aquifex pyrophilus* เป็น out-group ในการตรึงรากและตัวเลขที่จุดร่วม (nodes) ของ tree แสดงเปอร์เซ็นต์ความน่าเชื่อถือทางสถิติของการสร้าง tree ด้วย bootstrap test จำนวน 1000 ครั้ง

ตาราง 16 การกระจายตัวของชิ้นส่วน 16S rRNA ที่ได้จากการโคลนนิ่งของแบคทีเรียในกระเพาะ
รูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian

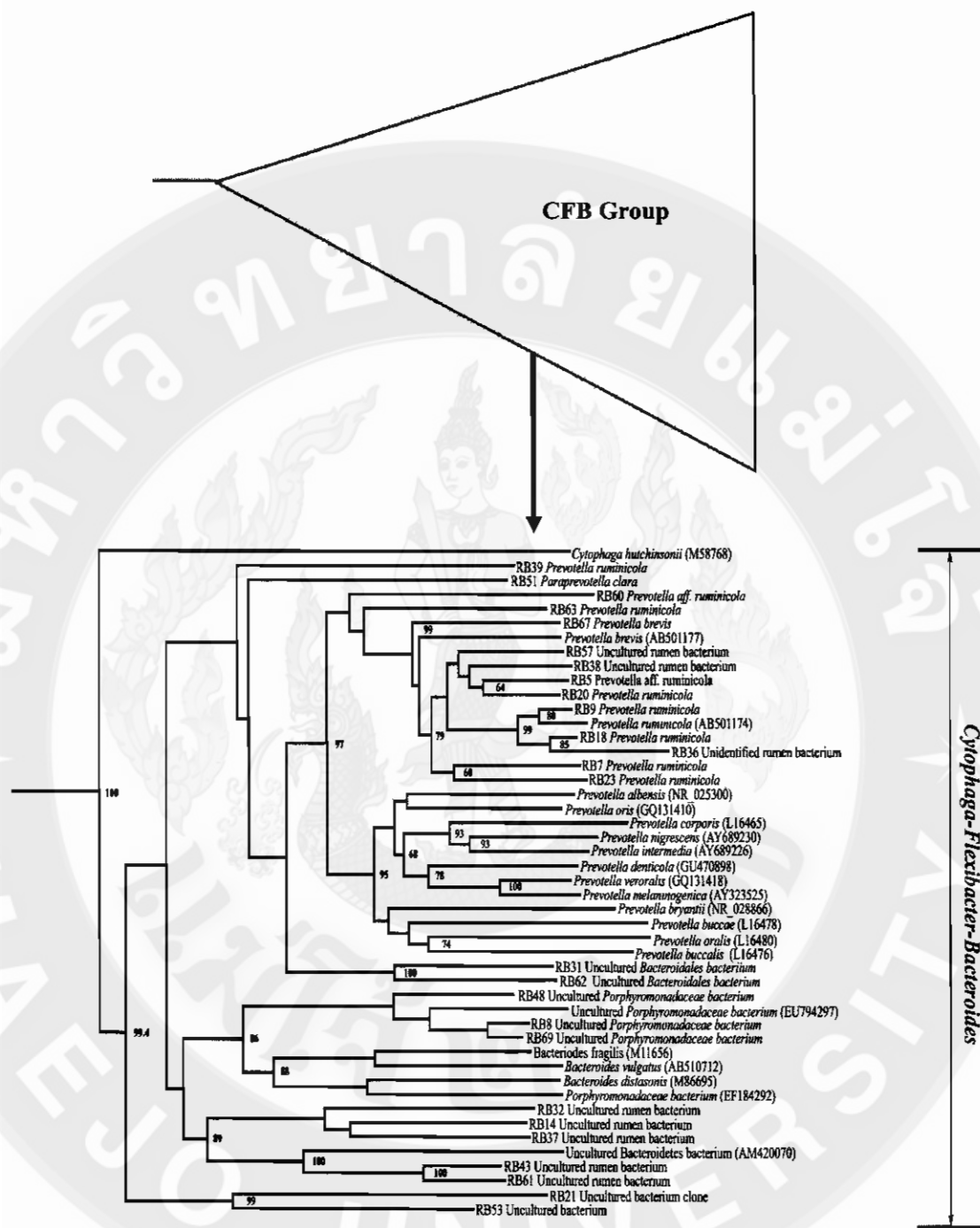
Items	Clone	
	No. of clone	% Total clone
Similarity		
≥ 97%	26	37.7
(cultured bacteria 6 clone, uncultured bacteria 20 clone)		
90–97%	41	59.4
(cultured bacteria 20 clone, uncultured bacteria 21 clone)		
< 90%	2	2.9
(cultured bacteria 1 clone, uncultured bacteria 1 clone)		
Low G+C Gram-positive Bacteria (LGCGBP)	30	43.5
≥ 97%	2	2.9
(RB30, RB65)		
90–97%	10	13.0
(RB2, RB12, RB16, RB17, RB30, RB41, RB46, RB55, RB46, RB58, RB66)		
< 90%	1	1.5
(RB3)		
Uncultured groups	17	26.1
(RB1, RB4, RB6, RB22, RB24, RB26, RB28, RB33, RB40, RB42, RB44, RB50, RB52, RB54, RB59, RB64, RB68)		
Cytophage-Flexibacteria-Bacteroides (CFB)	26	37.7
≥ 97%	2	2.9
(RB9, RB18)		
90–97%	9	16.0
(RB5, RB7, RB20, RB23, RB39, RB51, RB60, RB63, RB67)		
Uncultured groups	15	18.8
(RB8, RB14, RB21, RB31, RB32, RB36, RB37, RB38, RB43, RB48, RB53, RB57, RB61, RB62, RB69)		
Proteobacteria	5	7.3
Uncultured groups	5	7.3
(RB3, RB11, RB13, RB15, RB49)		

ตาราง 16 (ต่อ)

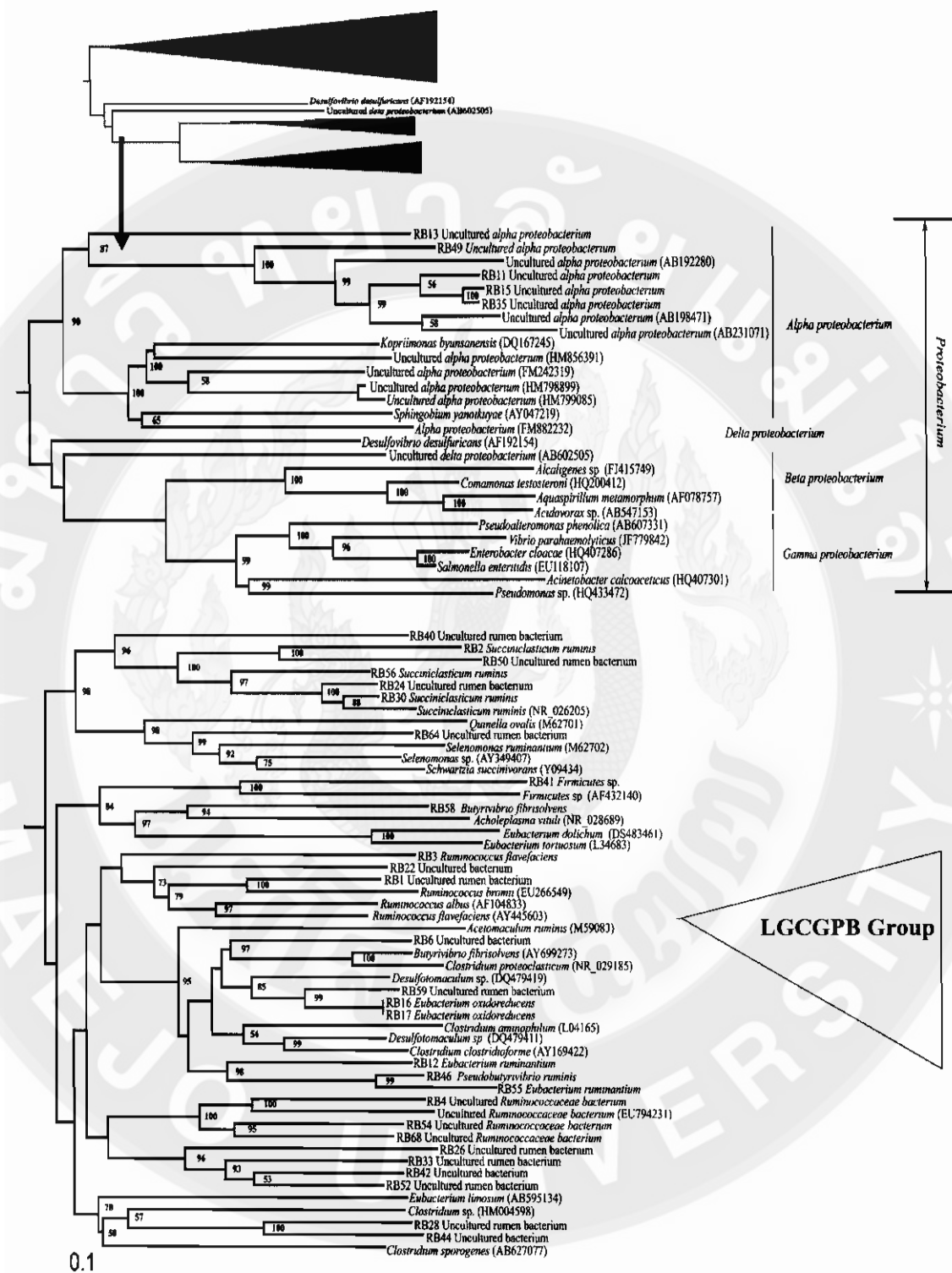
Items	Clone	
	No. of clone	% Total clone
<i>Rhodospirillum rubrum</i>	4	5.8
Uncultured groups (RB19, RB29, RB45, RB47)	4	5.8
<i>Vibrionaceae bacterium/ Planctomycete</i>	2	2.9
<90% (RB25)	1	1.45
Uncultured groups (RB27)	1	1.45
<i>Spirochaetes</i>	1	1.4
≥ 97% (RB34)	1	1.4
<i>Fibrobacteria</i>	1	1.4
≥ 97% (RB10)	1	1.4
Total	69	100

และจากตาราง 16 พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม Low G + C Gram-positive bacteria ประกอบ uncultured bacteria 18 โคลน และ cultured bacteria 12 โคลน (RB2, RB3, RB12, RB16, RB17, RB30, RB41, RB46, RB55, RB56, RB58 and RB66) ที่ประกอบไปด้วยแบคทีเรียชนิด *Succinilasticum ruminis*, *Butyrivibrio fibrilvolvens*, *Eubacterium ruminantium*, *Eubacterium oxidoreducens*, *Firmicutes* sp., *Desulfotomaculum* sp., *Succinilasticum ruminis*, *Butyrivibrio fibrilvolvens*, *Pseudobutyrovibrio ruminis* และ *Ruminococcus flavefaciens* (ภาพ 15) ในแบคทีเรียกลุ่ม CFB พบ uncultured bacteria 15 โคลน และ cultured bacteria 11 โคลน (RB5, RB7, RB9, RB18, RB20, RB23, RB39, RB51, RB60, RB63 และ RB67) ที่ประกอบด้วยแบคทีเรียชนิด *Prevotella* spp. และนอกจากนี้ในกลุ่ม CFB ยังประกอบ uncultured *Bacteroidetes bacterium* (RB31, RB62), uncultured *Prophyromonadaceae bacterium* (RB8, RB48, RB69) (ภาพ 14) ในกลุ่มของ proteobacteria แบคทีเรียพบไว้ในกระเพาะรูเมนของโคพบเพียงแบคทีเรียชนิด *alpha Proteobacterium* (RB5, RB11, RB13, RB15, RB49) (ภาพ 15) และในส่วนของกลุ่ม *Spirochaetes* และ *Fibrobacteria* พบเพียง 1 โคลนคือ RB34 (*Treponema bryantii*) และ RB10 (*Fibrobacter succinogenes*) ตามลำดับ และนอกจากนี้ในงานวิจัยครั้งนี้ยังพบแบคทีเรียกลุ่มใหม่ในกระเพาะ

รูเมนของโคเมื่อทำการเปรียบเทียบกับงานวิจัยในต่างประเทศหลายงานวิจัยก่อนหน้านี้ คือ แบคทีเรียกลุ่ม *Victivellaceae bacterium/ Planctomycete* ที่ประกอบด้วยแบคทีเรียชนิด *Victivellaceae bacterium* (RB25), uncultured *Planctomycete* (RB27) และแบคทีเรียกลุ่ม *Rhodopirellula* (RB19, RB45) ซึ่งพบว่าเป็นแบคทีเรียที่ยังไม่พบในกระเพาะรูเมนมาก่อนเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานการวิจัยในต่างประเทศก่อนหน้านี้ อาจจะเป็นเพราะว่าเนื่องจากสภาพแวดล้อมและอาหารที่โคกินเข้าไปแตกต่างกันทำให้ได้กลุ่มของแบคทีเรียที่ต่างกัน ซึ่งจากการศึกษาพบว่าจุลินทรีย์สามารถเข้าสู่กระเพาะรูเมนได้เป็นล้านๆ เซลล์ในแต่ละวันจากการกินอาหาร น้ำ และอากาศ จึงทำให้ระบบนิเวศของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลาตามอาหารที่กินเข้าไป หรือเมื่อมีการปรับเปลี่ยนโภชนาการใหม่ การเกิดขึ้นนี้ก็เพราะเนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้ต้องปรับตัวเพื่อความอยู่รอดในกระเพาะรูเมนได้ โดยจุลินทรีย์ที่มีการปรับตัวให้เข้ากับอาหารที่โคกินเข้าไปหรือสภาพแวดล้อม ก็จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีในกระเพาะรูเมน ส่วนจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถปรับตัวได้เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงของอาหารและสิ่งแวดล้อม ก็จะไม่สามารถเจริญเติบโตในกระเพาะรูเมนได้ ซึ่งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่พบในกระเพาะรูเมนจะเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มของ anaerobiosis (Kamra, 2005)



ภาพ 14 Phylogenetic tree ชนิดของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian ที่อยู่ในกลุ่มของ CFB group จากการทำ phylogenetic tree ของลำดับเบส 16S rRNA ขึ้น (ภาพ 13)



ภาพ 15 ชนิดของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian ที่อยู่ในกลุ่มของ LCGGPB group และ Proteobacteria group จากการทำ phylogenetic tree ของลำดับเบส 16S rRNA ขึ้น (ภาพ 13)

จากการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนด้วยเทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล 16S rRNA และการศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วย phylogenetic tree หรือแผนภูมิต้นไม้ สามารถจำแนกชนิดและจัดกลุ่มของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนได้ ซึ่งปัจจุบันวิธีทางชีววิทยาโมเลกุลเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมหรือตัวอย่างที่ต้องการศึกษา โดยใช้การศึกษาลำดับเบสของยีนโดยตรงโดยปราศจากการเพาะเลี้ยงบนอาหาร (Kocherginskaya et al., 2001) เนื่องจากมีข้อจำกัดในการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ยกตัวอย่างเช่นการศึกษาแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงพบว่าพบแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนเพียง 22 ชนิด ซึ่งเป็นที่ไม่แน่ชัดเพราะอาจจะเป็นแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนเพียงบางส่วนเท่านั้น (Krause and Russell, 1996) ดังนั้นปัจจุบันจึงนิยมใช้ยีนส่วน 16S rRNA ในการศึกษาทั้งชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน (Koike et al., 2003 and Shin et al., 2004) และจากผลการศึกษาความหลากหลายและกลุ่มของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian พบว่าประกอบด้วยกลุ่มใหญ่ 2 กลุ่มคือ Low G+C Gram-positive bacteria (LGCGPB) (43.5% ของโคลนทั้งหมด) และกลุ่ม *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (37.7% ของโคลนทั้งหมด) และแบคทีเรียกลุ่มย่อย 6 กลุ่มคือ *Proteobacteria* (7.3% ของโคลนทั้งหมด), *Rhodopirellula* (5.8% ของโคลนทั้งหมด), *Victivellaceae bacterium/Planctomycete* (2.9% ของโคลนทั้งหมด), *Spirochaetes* (1.4% ของโคลนทั้งหมด) และ *Fibrobacteria* (1.4% ของโคลนทั้งหมด) ตามลำดับ ซึ่งก็มีรายงานก่อนหน้านี้ในการศึกษาแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนโดยพบว่าแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนประกอบด้วยแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ 2 กลุ่ม คือ Low G+C Gram-positive bacteria (LGCGPB) และ *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* (Tajima et al., 1999; Koike et al., 2003; Edwards et al., 2004; An et al., 2005 and Yang, L.Y. et al., 2010) ยกตัวอย่างเช่นในปี 2010 Shuli Yang และคณะได้ทำการศึกษาแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของ Gayals (*Bos frontalis*), Swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*) และ Holstein cow โดยการโคลนยีนส่วน 16S rDNA ของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน ซึ่งพบว่าเมื่อทำการจำแนกแบคทีเรียและศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วย phylogenetic tree ในกระเพาะรูเมนของสัตว์ดังกล่าวประกอบด้วยแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ 2 กลุ่มคือ Low G+C Gram-positive bacteria (LGCGPB) และ *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* 70 และ 26.2% ตามลำดับ และพบแบคทีเรียกลุ่มย่อยคือ *proteobacteria*, High G+C Gram positive bacteria (HGCGPB) และ *Spirochaetes* ซึ่งก็สอดคล้องกับผลงานวิจัยครั้งนี้ และนอกจากนี้ Koike, 2003 ยังพบแบคทีเรียกลุ่ม *Fibrobacter* ในกระเพาะรูเมนของแกะ ซึ่งในผลงานวิจัยครั้งนี้ก็พบแบคทีเรียกลุ่มนี้เช่นเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้ก็ทำให้ได้แบคทีเรียกลุ่มใหม่ที่พบในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein

Friesian 2 กลุ่ม คือ *Victivellaceae bacterium/ Planctomycete* ที่ประกอบด้วยแบคทีเรียชนิด *Victivellaceae bacterium* (RB25), uncultured *Planctomycete* (RB27) และแบคทีเรียกลุ่ม *Rhodopirellula* (RB19, RB45) เมื่อเทียบกับรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ซึ่งที่กล่าวมาข้างต้นยังไม่มี การค้นพบแบคทีเรีย 2 กลุ่มในกระเพาะรูเมน แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียทั้งสองกลุ่มนี้ก็ยังไม่มีการศึกษาหน้าที่ที่แน่นอน ซึ่งอาจจะต้องมีการศึกษาต่อไปว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้มีความสัมพันธ์ อย่างไรในระบบการย่อยอาหารของโค เพราะเนื่องจากสภาพแวดล้อมและอาหารที่โคกินเข้าไป แตกต่างกันทำให้ได้กลุ่มของแบคทีเรียที่ต่างกัน

แบคทีเรียในกลุ่ม Low G + C Gram-positive bacteria ในกระเพาะรูเมนของโค ประกอบด้วยแบคทีเรียหลายชนิดเช่น *Succinoclasticum ruminis*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Eubacterium ruminantium*, *Eubacterium oxidoreducens*, *Firmicutes* sp., *Desulfotomaculum* sp., *Succinoclasticum ruminis*, *Butyrivibrio fibrisolvens*, *Pseudobutyrvibrio ruminis* และ *Ruminococcus flavefaciens* (ภาพ 15) และในแบคทีเรียกลุ่ม CFB ในกระเพาะรูเมนของโค ประกอบด้วยแบคทีเรียชนิด *Prevotella* spp. และ *Bacteroidetes* spp. (ภาพ 14) ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ 2 กลุ่มนี้บทบาทและหน้าที่สำคัญในระบบการย่อยอาหารของโคในกระเพาะรูเมน เนื่องจาก โดยทั่วไปแล้วในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะไม่มีเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารใด ๆ ที่สามารถย่อยสลายเซลลูโลส และ polymer ของพืชชนิดอื่นๆ ดังนั้นการนำเอาพืชที่มีใยอาหารไปใช้จึงต้องอาศัย กระบวนการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารที่อาศัยหรือมีอยู่แล้ว ดังนั้น การศึกษาจุลินทรีย์หรือแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนจึงเป็นพื้นฐานสำคัญของการศึกษาสรีรวิทยา ระบบทางเดินอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง ซึ่งจากรายงานก่อนหน้านี้กล่าวว่าแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนที่ ทำหน้าที่ในการย่อยสลายเส้นใยหรือแบคทีเรียกลุ่ม fibrolytic bacteria ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มของ Low G+C Gram-positive bacteria ประกอบด้วยแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ย่อยสลาย cellulose ยกตัวอย่างเช่นแบคทีเรียชนิดหลัก 2 ชนิดคือ *Ruminococcus albus* ผลิตเอนไซม์ endoglucanases, cellobiosidase และ L-glucosidases และ *Ruminococcus flavefaciens* ผลิตเอนไซม์ exoglucanase, cellodextrinase และ glucanases ส่วนแบคทีเรียที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลาย xylan ได้ดีที่สุดหรือ highly xylanolytic Gram positive bacteria ยกตัวอย่างเช่น แบคทีเรียชนิด *Butyrivibrio fibrisolvens* และ *Pseudobutyrvibrio* sp. (Krause et al., 2003) ส่วนในกลุ่มของแบคทีเรีย CFB ที่ประกอบด้วย *Prevotella* spp. และ *Bacteroidetes* spp. พบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่ถือว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่มที่ทำ หน้าที่ในการย่อยสลาย cellulose ได้ดีเนื่องจากสามารถย่อยสลาย cellulose ได้ แต่เป็นแบคทีเรียที่ สามารถผลิตเอนไซม์ xylanases ได้ดี ทำให้มีหน้าที่สำคัญในการย่อยสลาย xylan ในกระเพาะรูเมน ยกตัวอย่างเช่น *Prevotella ruminicola*, *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides uniformis* และ

Prevotella ruminicola ซึ่งเมื่อทำทดสอบการแสดงออกของยีนในแบคทีเรียกลุ่มนี้ระหว่างยีน cellulase และ xylanase พบว่าพบการแสดงออกของยีน xylanase มากกว่าในแบคทีเรียกลุ่มนี้ (Krause et al., 2003 and Daniel et al., 1995)

นอกจากแบคทีเรีย 2 กลุ่มใหญ่ที่มีหน้าที่สำคัญในการย่อยสลายอาหารในกระเพาะรูเมนดังกล่าวข้างต้นแล้ว ในกระเพาะรูเมนยังพบแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ และชนิดอื่นๆ ที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายอาหารที่โคกินเข้าไปหลายชนิด เช่นจากผลงานวิจัยยังพบแบคทีเรียกลุ่มย่อยหลายๆ กลุ่ม เช่น *Fibrobacteria* โดยแบคทีเรีย *Fibrobacter succinogenes* เป็นแบคทีเรียที่ทำหน้าที่หลักในการย่อยสลาย cellulose และในกลุ่มของ *Spirochaetes* จะทำหน้าที่ในการย่อยสลาย Pectin ในกระเพาะรูเมน (Kamra, 2005) ในส่วนของแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* ถ้าพบมากในกระเพาะรูเมนจะทำให้เกิดการผลิตก๊าซมีเทนเพิ่มมากขึ้นในกระเพาะรูเมน เพราะจากรายงานก่อนหน้านี้มีการศึกษาแบคทีเรีย *Proteobacteria* ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ methanotroph-specific primers ในการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอ ทำให้พบว่า *Proteobacteria* มีความเป็นไปได้มากกว่าสามารถ oxidizes แอมโมเนียและผลิตมีเทนได้ (Mitsumori et al., 2002) และนอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยการศึกษา fumarate reducing bacteria โดยการออกแบบยีนส่วน fumarate reductase gene (frdA) จากแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* ซึ่งทำให้ทราบว่ากลุ่ม *Proteobacteria* เป็น fumarate reducing bacteria หรือแบคทีเรียที่ย่อยสลาย fumarate (Hattori and Matsui, 2008) เนื่องจากกระบวนการเกิด methanogenesis เป็นขั้นตอนสุดท้ายของการเผาผลาญคาร์โบไฮเดรตในกระเพาะรูเมนของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ดังนั้นการลด methanogenesis ในกระเพาะรูเมนเป็นเรื่องที่สำคัญสำหรับระบบนิเวศทั่วโลกและการใช้อาหารสัตว์ที่มีการเสริม fumarate เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถลดการผลิตก๊าซมีเทนได้ เพราะ fumarate เป็นสารตัวกลางในการเปลี่ยน succinate เป็น propionate และใช้ก๊าซไฮโดรเจนในการผลิต propionate ในกระเพาะรูเมน ถ้า fumarate ลดลงด้วย fumarate reductase ก็จะทำให้ปริมาณของ succinate ลดลงทำให้การผลิต propionate ลดลงด้วย และเมื่อในกระเพาะรูเมนมีแบคทีเรียที่ใช้ fumarate ทำให้ fumarate ลดลงใน path way และแบคทีเรีย methanogenic ก็จะทำให้เกิดการแข่งขันกันใช้ไฮโดรเจนทำให้แบคทีเรียเหล่านี้ผลิตก๊าซมีเทนเพิ่มขึ้น (Lopez et al., 1999; Asanuma et al., 1999; Moss et al., 2000 and Newbold et al., 2005) ดังนั้นการมีกลุ่มของแบคทีเรีย *Proteobacteria* ในกระเพาะรูเมนในปริมาณมากก็จะทำให้มีการผลิตมีเทนมากในสัตว์เคี้ยวเอื้อง เพราะการผลิต propionate เป็นกระบวนการที่ไม่ทำให้เกิดก๊าซไฮโดรเจน เมื่อไม่เกิดก๊าซไฮโดรเจนการผลิตมีเทนก็จะลดลง (บุญล้อม, 2527, และ เมธา, 2529)

เห็นได้จากบทบาทและความสำคัญของแบคทีเรียที่พบในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein friesian ดังที่กล่าวข้างต้น ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สนใจที่จะศึกษาประสิทธิภาพการ

ย่อยอาหารของโคโดยแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนเพื่อให้ได้กรดไขมันระเหยง่ายที่มีประโยชน์ต่อโค โดยเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียที่มีอยู่จริงและกรดไขมันระเหยง่ายในอาหารแต่ละสูตรจำนวน 4 สูตร ดังนั้นจึงทำการออกแบบ primer และ probe เพื่อทำการตรวจติดตามแบคทีเรียที่มีอยู่จริงในกระเพาะรูเมนด้วยเทคนิค real-time PCR โดยกลุ่มแบคทีเรียที่สนใจในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวน 3 กลุ่มคือ LGCGPB, CFB และ *Proteobacteria* ซึ่งผลการออกแบบดังแสดงในผลการทดลองต่อไปนี้

ผลการออกแบบ 16S rDNA primer และ TaqMan probes

สำหรับการทำ real-time PCR

ผลการหาคำแหน่งลำดับเบสจากการจากการ alignment ลำดับเบสดีเอ็นเอทั้งหมด เพื่อออกแบบ 16S rDNA primer และ TaqMan probes

จากการศึกษาเกี่ยวกับกลุ่มของแบคทีเรียที่สำคัญในกระเพาะรูเมนในผลการทดลองข้างต้น สามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่มีหน้าที่สำคัญในกระเพาะรูเมนมาใช้ในการศึกษาตรวจติดตามแบคทีเรียที่มีอยู่จริงในกระเพาะรูเมนซึ่งกลุ่มแบคทีเรียที่สนใจมีจำนวน 3 กลุ่ม คือ CFB, LGCGPB, *Proteobacteria* group และ Total bacteria แต่ Total bacteria จะใช้ universal primer และ probe (Yu et al., 2005) เมื่อนำลำดับเบสดีเอ็นเอทั้งหมดที่ได้มาจากการโคลนนิ่งจำนวน 69 โคลน และจาก GenBank จำนวน 163 ชนิด มาทำการ alignment และหาคำแหน่งของลำดับเบสเพื่อทำการออกแบบ primer และ TaqMan probe พบว่าสามารถคัดเลือกตำแหน่ง Primer และ probe ของแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB, CFB, *Proteobacteria* group ดังแสดงในตาราง 17, 18 และ 19 ตามลำดับ โดยขอแสดงผลการคัดเลือกตำแหน่งที่ได้จากการ alignment ในการเปรียบเทียบความเหมือนและความแตกต่างของลำดับเบสที่คัดเลือกเป็นตัวแทนแบคทีเรียในแต่ละกลุ่มของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนเพียง 3 กลุ่มแบคทีเรีนี้นี้เท่านั้น ซึ่งการอ้างอิงตำแหน่งจะใช้จีโนมของ *Escherichia coli* ในส่วน 16S rRNA ขึ้นในการเปรียบเทียบ (Robin, 1993)

จากผลการเปรียบเทียบในตำแหน่งที่คัดเลือก เมื่อให้ตัวเลขด้านหลัง sequence ที่แสดงในตาราง 17, 18 และ 19 เป็นจำนวนของลำดับเบสที่ mismatch กับแบคทีเรียกลุ่มอื่น พบว่า primer forward (LGC907F) และ reverse (LGC1102R) ของกลุ่มแบคทีเรีย LGCGPB มีความแตกต่างจากแบคทีเรียกลุ่มอื่นน้อยมากยกเว้นในส่วนของ reverse (LGC1102R) ที่มีลำดับเบสแตกต่างจากกลุ่มแบคทีเรีย CFB จำนวน 6 เบส ดังนั้นในกลุ่มของ LGCGPB จึงใช้ probe LGCProbe มาใช้ในการ detect เพื่อตรวจหาแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB ในรูเมน โดยพบว่า LGCProbe มีลำดับเบสต่างจากแบคทีเรียกลุ่ม CFB 3 เบส และกลุ่ม *Proteobacteria* 1-2 เบส

ตามลำดับ ส่วน primer forward (CFB287F) และ reverse (CFB705R) ของกลุ่มแบคทีเรีย CFB พบว่ามีความจำเพาะต่อแบคทีเรียกลุ่มเป้าหมาย CFB เนื่องจากมีลำดับเบสแตกต่างจากแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB และ *Proteobacteria* จำนวน 1-9 เบส และ 2-6 เบส ตามลำดับ และ probe CFBProbe มีลำดับเบสที่แตกต่างจำนวน 2-5 เบส และ 1-4 เบส ในแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB และ *Proteobacteria* ตามลำดับ และ primer forward (PRO937F) และ reverse (PRO1102R) ของกลุ่มแบคทีเรีย *Proteobacteria* พบว่ามีความแตกต่างจากแบคทีเรียกลุ่ม CFB เนื่องจากมีลำดับเบสที่แตกต่างจำนวน 2-6 เบส แต่ไม่มีความแตกต่างกับแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB เนื่องจากไม่มีลำดับเบสที่แตกต่าง ดังนั้นจึงใช้ probe PROProbe มาช่วยในการ detect โดย probe PROProbe จะมีลำดับเบสที่แตกต่างจากแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB และ CFB จำนวน 1-2 เบส ซึ่งจากการรายงานก่อนหน้านี้ พบว่าการเกิดผลลบหรือการไม่ detect แบคทีเรียที่ไม่ใช่กลุ่มเป้าหมายได้ขึ้นก็ต่อเมื่อมีระดับความแตกต่างของแบคทีเรียกลุ่มเป้าหมายต่อแบคทีเรียที่ไม่ใช่กลุ่มเป้าหมายเพิ่มมากขึ้น ซึ่งถ้าหากแบคทีเรียในกลุ่มเป้าหมายมีลำดับเบสที่แตกต่างกับแบคทีเรียที่ไม่ใช่กลุ่มเป้าหมาย 1 เบสหรือมากกว่าก็จะทำให้เกิดผลลบในแบคทีเรียไม่ใช่กลุ่มเป้าหมายได้ แต่อย่างไรก็ตามความแตกต่างของลำดับเบสเพียง 1 เบสต่อแบคทีเรียไม่ใช่กลุ่มเป้าหมาย มักจะเป็นกรณีที่ไม่ยอมรับซึ่งมีระดับการเกิดผลบวกสูง ดังนั้นที่ระดับความแตกต่างของลำดับเบส 2 หรือมากกว่า จะให้ผลลบดีกว่าความแตกต่างของลำดับเบสเพียง 1 เบส (Yu et al., 2005)

ตาราง 17 ตำแหน่งลำดับเบส primer และ probe ของแบคทีเรียกลุ่ม LGCGBP ที่คัดเลือกจากการ alignment

Clone/Accession No.	Group	Forward sequence designed LGC907F	Reverse sequence designed LGC1102R	Probe designed LGCprobe
Primer/Probe		5'-AAACTCAAAGGAATTGACGGGR-3'	5'-TTGCRGGACTTAACCYAACAT-3'	5'-ACAGGTGGTGCATGGYTGTCTCAGCTC-3'
<i>E. coli</i> (J01695)		5'-AAACTCAAATGAATTGACGGGG-3'	5'-TTGCGGGACTTAACCCAACAT-3'	5'-ACAGGTGCTGCATGGCTGTCTCAGCTC-3'
Target		5'-TTTGAGTTTCCTTAAGTCCCY-3'	5'-AACGYCCTGAATTGGRTTGA-3'	3'-TGTCCACCACGTACCRACAGCAGTCGAG-5'
<i>R. flavefaciens</i> (RB3)	LGCGBP	-----	-----	-----
<i>E. ruminantium</i> (RB12)		-----	-----	-----
<i>P. ruminis</i> (RB46)		-----	-----	-----
<i>B. fibrisolven</i> (RB65)		-----	-----	-----
<i>Desulfotomaculum</i> sp. (RB66)		-----	-----	-----
<i>C. amylolyticum</i> (EU037903)		-----	-----	-----
<i>S. ruminantium</i> (M62702)		-----	-----	-----
<i>R. bromii</i> (EU266549)		-----	-----	-----
<i>R. albus</i> (AF104833)	CFB	-----	-----	-----
<i>C. proteoclasticum</i> (NR_029185)		-----	-----	-----
<i>P. ruminicola</i> (RB7)		-----	--AT--C-----G--G--C 6	GG-----C----- 3
Uncultured <i>B. bacterium</i> (RB31)		-----	--AT--C-----G--G--C 6	GG-----C----- 3
Uncultured <i>P. bacterium</i> (RB48)		-----	--AT--C-----G--G--C 6	CT-----C----- 3
<i>P. clara</i> (RB51)		-----	--AT--C-----G--G--C 6	GG-----C----- 3
<i>P. brevis</i> (RB67)		-----	--AT--C-----G--G--C 6	GG-----C----- 3
<i>P. albensis</i> (NR_025300)		-----	--AT--C-----G--G--C 6	GA-----C----- 3
<i>P. nigrescens</i> (AY689230)	Protobacteria	-----	--AT--C-----G--G--C 6	GA-----C----- 3
<i>B. vulgatus</i> (AB510712)		-----	--AT--C-----G--G--C 6	GA-----C----- 3
<i>B. distasonis</i> (RB31)		-----	--AT--C-----G--G--C 6	CG-----C----- 3
<i>P. bacterium</i> (EF184292)		-----	--AT--C-----G--G--C 6	CG-----C----- 3
Uncultured alpha <i>Pro.</i> (RB11)		-----T----- 1	-----	---A-C----- 2
Uncultured alpha <i>Pro.</i> (RB13)		-----	-----	---A-C----- 2
Uncultured alpha <i>Pro.</i> (RB15)		-----T----- 1	-----	---A-C----- 2
Uncultured alpha <i>Pro.</i> (RB35)		-----T----- 1	-----	---A-C----- 2
Uncultured alpha <i>Pro.</i> (RB49)		-----T----- 1	-----	---A-C----- 2
<i>K. byunsanensis</i> (DQ167245)		-----	-----	---A-C----- 2
<i>A. metamorphum</i> (AF078757)		-----	-----	---C----- 1
<i>S. enteritidis</i> (EU18107)		-----T----- 1	-----	---C----- 1
<i>V. parahaemolyticus</i> (JF779842)		-----	-----	---C----- 1
<i>E. bcloacae</i> (HQ407286)		-----	-----	---C----- 1
				---C----- 1

ตาราง 18 ตำแหน่งลำดับเบส primer และ probe ของแบคทีเรียกลุ่ม CFB ที่คัดเลือกจากการ alignmety

Clone/Accession No.	Group	Forward sequence designed CFB287F	Reverse sequence designed CFB705R	Probe designed CFBprobe
Primer/Probe		5'-TAGGGGTTCTGAGAGGAAGGY-3'	5'-ATCTAWGCATTTACCGCTACAY-3'	5'-CTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGT-3'
<i>E. coli</i> (J01695)		5'-TAGCTGGTCTGAGAGGATGAC-3'	5'-CTCTACGCATTTACCGCTACAC-3'	5'-CTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA-3'
Target		5'-ATCCCCAAGACTCTCCTTCCR-3'	5'-TAGATWCGTAAAGTGGCGATGTR-3'	3'-GATGCCCTCCGTCGTCACCTTATAACCA-5'
<i>R. flavefaciens</i> (RB3)	LGCCPB	---CC--C-----GT-AA 7	----C-----1	-----G-----CA 3
<i>E. ruminantium</i> (RB12)		---CC-GC-----GTAA 9	----C-----1	-----G-----CA 3
<i>P. ruminis</i> (RB46)		---CC-GC-----GT-TA 8	----C-----1	-----G-----CA 3
<i>B. fibrisolven</i> (RB65)		---CC-GC-----GC-A 7	----C-----1	-----G--G-----CA 4
<i>Desulfotomaculum</i> sp. (RB66)		---CC-GC-----GT-AA 8	----C-----1	-----G-----A 2
<i>C. amylolyticum</i> (EU037903)		---CC-AC-----GT-A- 7	C---C-----2	-----G-----CA 3
<i>S. ruminantium</i> (M62702)		---CC-G-----T-AA 6	---C-----1	-----G---C---CCG 5
<i>R. bromii</i> (EU266549)		---CC-GA-----TT-AA 8	C---C-----2	-----G--G---CG 4
<i>R. albus</i> (AF104833)		---CC-GA-----TT-AA 8	---C-----1	-----G-----CA 3
<i>C. proteoclasticum</i> (NR_029185)		---CC-GA-----TC-A 7	---C-----1	-----G--G---CA 4
<i>P. ruminicola</i> (RB7)	CFB	-----	-----	-----
Uncultured <i>B. bacterium</i> (RB31)		-----	-----	-----
Uncultured <i>P. bacterium</i> (RB48)		-----	-----	-----
<i>P. clara</i> (RB51)		-----	-----	-----
<i>P. brevis</i> (RB67)		-----	-----	-----
<i>P. albensis</i> (NR_025300)		-----	-----	-----
<i>P. nigrescens</i> (AY689230)		-----	-----	-----
<i>B. vulgatus</i> (AB510712)		-----	-----	-----
<i>B. distasonis</i> (RB31)		-----	-----	-----
<i>P. bacterium</i> (EF184292)		-----	-----	-----
Uncultured <i>alpha Pro.</i> (RB11)	Proteobacteria	---CT-G-----C-AT 6	----C-G-----C----- 3	-----CT-A-----G 4
Uncultured <i>alpha Pro.</i> (RB13)		---CT-G-----C-AA 6	----C-A-----T----- 3	-----CT-A-----G 1
Uncultured <i>alpha Pro.</i> (RB15)		---CT-G-----C-AT 6	----C-G-----C----- 3	-----CT-A-----G 4
Uncultured <i>alpha Pro.</i> (RB35)		---CT-G-----C-AT 6	----C-G-----C----- 3	-----CT-A-----G 4
Uncultured <i>alpha Pro.</i> (RB49)		---CT-G-----C-AT 6	----C-A-----T----- 3	-----CT-A-----G 4
<i>K. byunsanensis</i> (DQ167245)		---CT-G-----C-AT 6	----C-A-----T----- 3	-----CT-A-----G 4
<i>A. metamorphum</i> (AF078757)		---CT-G-----C-AC 6	---C-----T----- 2	-----G-----A 2
<i>S. enteritidis</i> (EU18107)		---CT-G-----C-AC 6	C---C-----2	-----G-----CA 3
<i>V. parahaemolyticus</i> (JF779842)		---CT-G-----C-AT 6	C---C-----2	-----G-----CA 3
<i>E. bcloacae</i> (HQ407286)		---CT-G-----C-AC 6	C---C-----2	-----G-----CA 3

ตาราง 19 ตำแหน่งลำดับเบส primer และ probe ของแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* ที่คัดเลือกจากการ alignment

Clone/Acession No.	Group	Forward sequence designed PRO937F	Reverse sequence designed PRO1102R	Probe designed PROprobe
Primer/Probe		5'-AAGCRGTGGAKBATGKTGTTTAAT-3'	5'-TTRCRGGACTTAACCYAACAT-3'	5'-CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTG-3'
<i>E. coli</i> (J01695)		5'-AAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT-3'	5'-TTGCGGGACTTAACCCAACAT-3'	5'-CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTG-3'
Target		5'-TTCGYCACCTMBTACTMGAAATTA-3'	5'-AAYGYCCTGAATTGGRTTGTA-3'	3'-GACGTACCGACAGCAGTCGAGCACARC-5'
<i>R. flavefaciens</i> (RB3)	LGCCPB	-----	-----	G-----T----- 2
<i>E. ruminantium</i> (RB12)		-----	-----	G----- 1
<i>P. ruminis</i> (RB46)		-----	-----	G-----T----- 2
<i>B. fibrisolven</i> (RB65)		-----	-----	G-----T----- 2
<i>Desulfotomaculum</i> sp. (RB66)		-----	-----	G-----T----- 2
<i>C. amylolyticum</i> (EU037903)		-----	-----	G-----T----- 2
<i>S. ruminantium</i> (M62702)		-----	-----	G-----T----- 2
<i>R. bromii</i> (EU266549)		-----	-----	G-----T----- 2
<i>R. albus</i> (AF104833)		-----	-----	G-----T----- 2
<i>C. proteoclasticum</i> (NR_029185)		-----	-----	G-----T----- 2
<i>P. ruminicola</i> (RB7)	CFB	-----A--A----- 2	--AT--C-----G--G--C 6	-----T-----C-- 2
Uncultured <i>B. bacterium</i> (RB31)		-----A--A----- 2	--AT--C-----G--G--C 6	-----T-----C-- 2
Uncultured <i>P. bacterium</i> (RB48)		-----A--A----- 2	--AT--C-----G--G--C 6	-----T-----C-- 2
<i>P. clara</i> (RB51)		-----A--A----- 2	--AT--C-----G--G--C 6	-----T-----C-- 2
<i>P. brevis</i> (RB67)		-----A--A----- 2	--AT--C-----G--G--C 6	-----T-----C-- 2
<i>P. albensis</i> (NR_025300)		-----A--A----- 2	--AT--C-----G--G--C 6	-----T-----C-- 2
<i>P. nigrescens</i> (AY689230)		-----A--A----- 2	--AT--C-----G--G--C 6	-----T-----C-- 2
<i>B. vulgatus</i> (AB510712)		-----A--A----- 2	--AT--C-----G--G--C 6	-----T-----C-- 2
<i>B. distasonis</i> (RB31)		-----A--A----- 2	--AT--C-----G--G--C 6	-----T-----C-- 2
<i>P. bacterium</i> (EF184292)		-----A--A----- 2	--AT--C-----G--G--C 6	-----T-----C--2
Uncultured alpha Pro. (RB11)	Proteobacteria	-----	-----	-----
Uncultured alpha Pro. (RB13)		-----	-----	-----
Uncultured alpha Pro. (RB15)		-----	-----	-----
Uncultured alpha Pro. (RB35)		-----	-----	-----
Uncultured alpha Pro. (RB49)		-----	-----	-----
<i>K. byunsanensis</i> (DQ167245)		-----	-----	-----
<i>A. metamorphum</i> (AF078757)		-----	-----	-----
<i>S. enteritidis</i> (EU18107)		-----	-----	-----
<i>V. parahaemolyticus</i> (JF779842)		-----	-----	-----
<i>E. bcloacae</i> (HQ407286)		-----	-----	-----

ผลการทดสอบคุณสมบัติของ primer และ probe ที่ออกแบบได้

จากตำแหน่งลำดับเบส 16S rDNA ที่ถูก alignment ด้วยเบสที่เรียบทั้งหมด 163 ชนิดและเบสที่เรียบที่ได้จากการโคลน 69 ชนิด ที่ถูกคัดเลือกส่วนที่มีความเหมือนกันของเบสที่เรียบในกลุ่มเดียวกันที่สนใจและมีความแตกต่างกับลำดับเบสของ DNA ของเบสที่เรียบในกลุ่มอื่นจากผลที่ได้ดังกล่าว เมื่อนำลำดับเบสที่คัดเลือกได้เพื่อใช้เป็น primer และ probe มาทำการวิเคราะห์คุณสมบัติของ primer และ probe โดยใช้โปรแกรม OligoAnalyzer 3.1 ได้ผลดังตาราง 20 จากนั้นทำการสังเคราะห์ primer และ probe สรุปดังตาราง 21 จากบริษัท 1st BASE CUSTOM OLIGOS, Malaysia และ SIGMA-ALDRICH, USA ตามลำดับ

ตาราง 20 คุณสมบัติของ primer และ probe ของเบสที่เรียบแต่ละกลุ่ม

คุณสมบัติ	LGCGPB Group			CFB Group			Proteobacteria Group		
Designation	LGC907F	LGC1102R	LGCprobe	CFB287F	CFB705R	CFBProbe	PRO937F	PRO1102R	PROProbe
Length	22	21	28	21	23	30	24	21	27
%GC	43.2	42.9	58.9	54.8	41.3	53.3	38.2	40.5	61.1
Tm (°C)	54.6-	51.6-	65.8-	56.8-	54.3-	64.3	51.2-	48.3-	65.1-
	55.6	57.1	67.4	58.1	55.3		59.4	57.1	66.4
Hairpinloop ^a	-1.37	0.43	-0.19	-0.25	0.55	0.01	2.1	0.9	-3.6
Selfdimer ^a	-5.47	-7.88	-7.05	-3.52	-10.05	-7.8	-6.68	-6.48	-7.05
Heterodimer ^a									
F-R ^b	-6.14	-	-	-5.31	-	-	-9.23	-	-
F-P ^c	-8.48	-	-	-3.55	-	-	-8.26	-	-
RDP result ^d									
Total bac.	2212243	2212243	2212243	2212243	2212243	2212243	2212243	2212243	2212243
Firmicutes	405252	384056	386566	171	361	102	369955	389413	876
Bacteroidetes	134658	2091	499	110340	162707	154330	46215	2122	1682
Proteobacteria	243502	326652	1812	27	1567	64	341657	388883	383284

a = หน่วยของพลังงาน คือ kcal.mole⁻¹, b = การทดสอบการเกิด hetero-dimer ระหว่าง primer forward และ reverse, c = การทดสอบการเกิด hetero-dimer ระหว่าง primer forward และ probe, d = การนำลำดับเบสที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน RDP เพื่อดูความจำเพาะของ primer และ probe

ตาราง 21 Primer และ probe ที่ออกแบบได้

Name	Target group	Sequence (5' → 3')	Target position ^a	Tm (°C)	GC (%)	Productsize (bp)	Reference
LGC907F	Most	AAACTCAAAGGAATTGACGGGR	907-928	55.6	45.5	~196	This study
LGCProbe	LGCGPB	ACAGGTGGTGCATGGYTGTCGTCAGCTC	1044-1071	65.8	57.1		
LGC1102R		TTGCRGGACTTAACCYAACAT	1082-1102	57.1	47.6		
CFB287F	Most CFB	TAGGGGTTCTGAGAGGAAGGY	287-307	56.8	52.4	~420	This study
CFBProbe		CTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGT	342-371	64.3	53.3		
CFB705R		ATCTAWGCATTTCAACCGCTACAY	683-705	55.2	43.5		
PRO937F	Most	AAGCRGTGGAKBATGTKGTTTAAT	937-960	59.4	45.8	~166	This study
PROProbe	<i>Proteoba-</i>	CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTYG	1051-1077	66.4	63		
PRO1102R	<i>cterium</i>	TTRCRGGACTTAACCYAACAT	1082-1102	57.1	47.6		
BAC338F	Bacteria	ACTCCTACGGGAGGCAG	338-354	63.4	64.7	~468	Yu et al., 2005
BACProbe		TGCCAGCAGCCGCGTAATAC	516-536	70.8	61.9		
BAC805R		GACTACCAGGGTATCTAATCC	785-805	60.7	47.6		

^a The positions are based on the nucleotide position in *Escherichia coli* accession number J01695 (Robin, 1993)

ผลการทดสอบความจำเพาะของ primer และ probe ด้วยเทคนิค conventional PCR และ real-time PCR

ผลการสกัดดีเอ็นเอ

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจำนวน 3 กลุ่ม คือ กลุ่ม LGCGPB group ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Clostridium amylolyticum* (JCM14823) กลุ่ม CFB group ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacteroides vulgatus* (JCM5826) และ *Prevotella albensis* (JCM12258) ในอาหารเหลวสูตร EG medium ในสภาวะไม่มีอากาศโดยเลี้ยงใน anaerobic jar ที่มี gaspack บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง และกลุ่ม *Proteobacteria* group ประกอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* (DMST12743), *Salmonella enteritidis* (DMST15676) และ *Vibrio parahaemolyticus* (DMST5665) ในอาหารเหลวสูตร BHI บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ Genomic DNA Mini Kit และวัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเครื่องวัดปริมาณดีเอ็นเอรุ่น Nano Drop 2000c spectrophotometer พบว่าได้ปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรีย JCM5826, JCM12258, JCM14823, DMST12743, DMST15676 และ DMST5665 เท่ากับ 678.55, 8.5, 136.4, 71.35, 363.55 และ 1930.45 ตามลำดับ (ภาคผนวก ก)

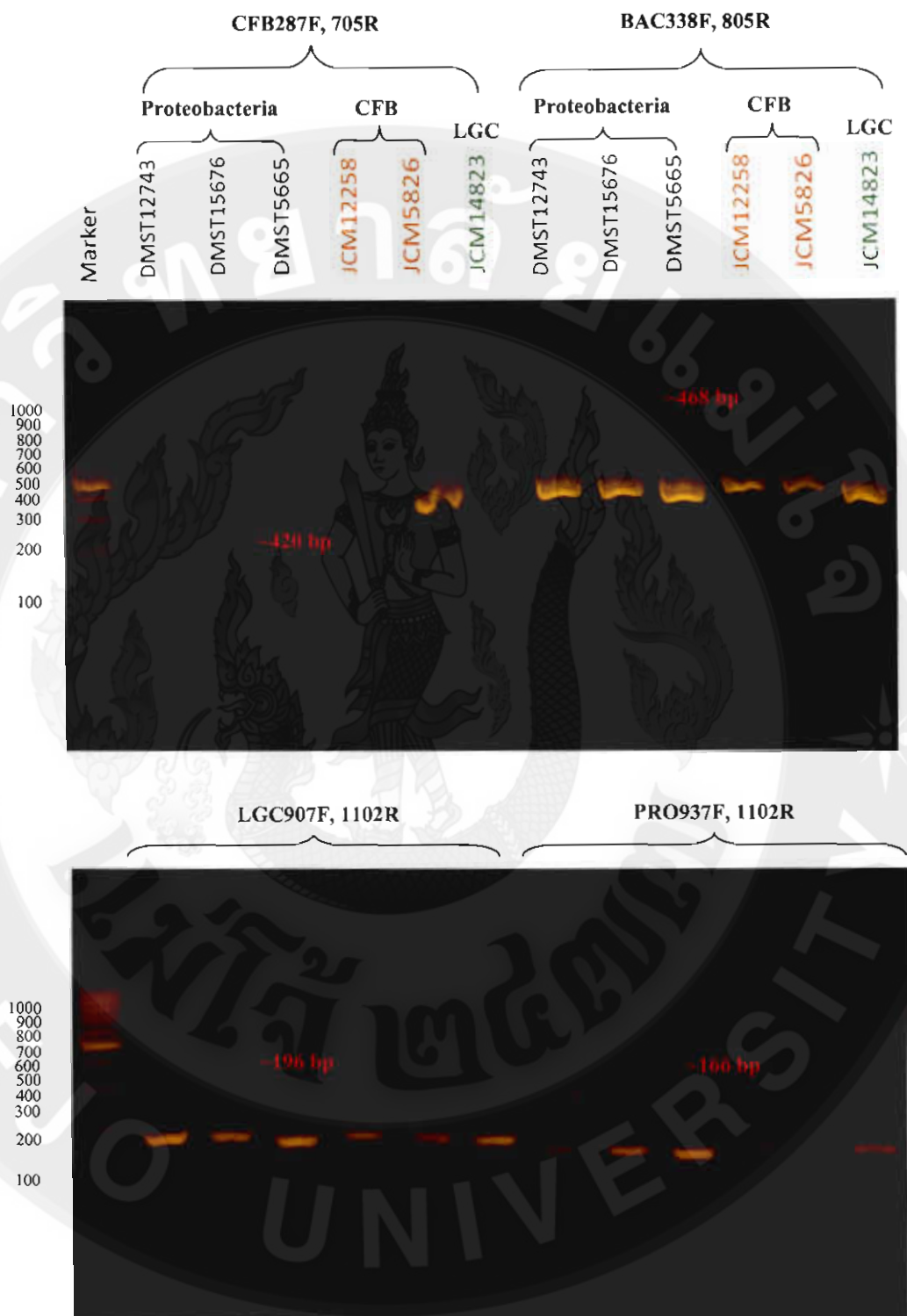
ผลการทดสอบความจำเพาะของ primer และ probe

1. การทดสอบ primer ด้วยเทคนิค conventional PCR

เมื่อนำดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานที่สกัดได้ไปใช้ในการทดสอบความจำเพาะของ primer ที่ออกแบบได้ด้วยเทคนิค conventional PCR โดย primer CFB287F และ CFB705R จะจำเพาะต่อแบคทีเรียกลุ่ม CFB โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacteroides vulgatus* (JCM5826) และ *Prevotella albensis* (JCM12258) เป็นแบคทีเรียมาตรฐานซึ่งจะมี PCR product ขนาดประมาณ 166 bp ส่วน primer LGC907F และ LGC1102R จะจำเพาะต่อแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Clostridium amylolyticum* (JCM14823) เป็นแบคทีเรียมาตรฐานซึ่งจะมี PCR product ขนาดประมาณ 420 bp และ primer PRO937F และ PRO1102R จะจำเพาะต่อแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Salmonella enteritidis* (DMST15676), *Vibrio parahaemolyticus* (DMST5665) และ *Escherichia coli* (DMST12743) เป็นแบคทีเรียมาตรฐานซึ่งจะมี PCR product ขนาดประมาณ 196 bp นอกจากนี้ยังมี primer BAC338F และ BAC805R มีขนาด PCR product ประมาณ 468 bp ใช้ในการศึกษาแบคทีเรียทั้งหมดในกระเพาะรูเมน ซึ่งจะต้อง

ติดแบคทีเรียมาตรฐานทั้งหมด จากผลการทำ PCR เพื่อทดสอบ primer ทั้ง 4 คู่ เมื่อนำ PCR product มาทำการรันเจลได้ผลดังภาพ 16 ปรากฏว่า primer CFB287F และ CFB705R มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียกลุ่ม CFB โดยเกิดแถบดีเอ็นเอขึ้นที่เชื้อแบคทีเรีย JCM5826 และ JCM12258 ที่เป็นแบคทีเรียมาตรฐานในกลุ่มนี้ ส่วนแบคทีเรียในกลุ่มอื่นๆ ไม่มีแถบดีเอ็นเอเกิดขึ้น ในส่วนของ primer LGC907F และ LGC1102R สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้กับแบคทีเรียทุกกลุ่มเนื่องจากเกิดแถบดีเอ็นเอขึ้นกับแบคทีเรียทุกกลุ่ม และ primer PRO937F และ PRO1102R สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกกลุ่มเช่นเดียวกัน ยกเว้นเชื้อแบคทีเรีย JCM5826 ในกลุ่มของ CFB ซึ่งไม่มีแถบดีเอ็นเอปรากฏ ส่วน primer BAC338F และ BAC805R ที่ใช้ในการศึกษาแบคทีเรียทั้งหมดพบว่าเกิดแถบดีเอ็นเอขึ้นกับแบคทีเรียทุกกลุ่มดังนั้นจึงสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ทุกกลุ่มแบคทีเรีย

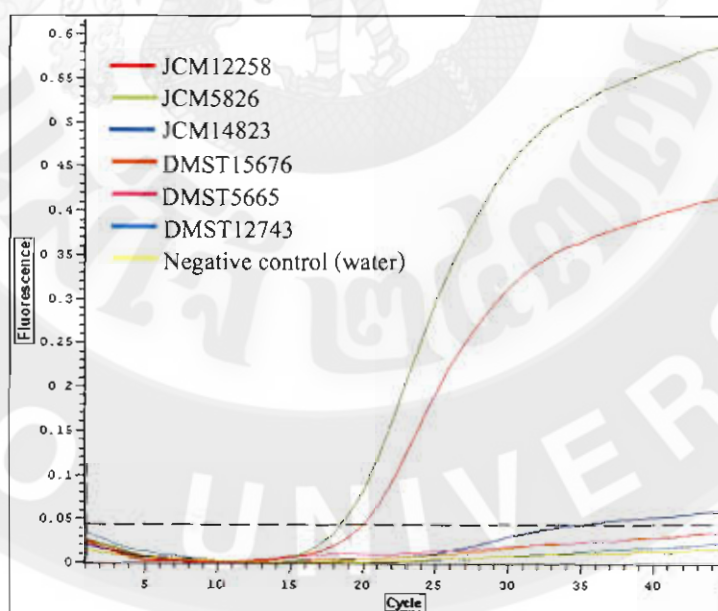
ดังนั้นจากผลการทดสอบความจำเพาะของ primer ด้วยเทคนิค PCR จะเห็นได้ว่า primer LGC907F, LGC1102R และ primer PRO937F, PRO1102R ยังไม่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียกลุ่มเป้าหมาย จึงต้องใช้ probe มาช่วยในการตรวจจับแบคทีเรียกลุ่มเป้าหมายเช่นเดียวกับอีกสองกลุ่ม เพื่อเพิ่มความจำเพาะในการตรวจจับแบคทีเรียกลุ่มเป้าหมาย เนื่องจาก probe ชนิดแบบ TaqMan probe เป็น hydrolysis probe ซึ่งการ detect จะตรวจวัดด้วยการเรืองแสงของ fluorescent เมื่อ probe ถูก 5'-3' exonuclease ทำให้ fluorophore และ quencher หลุดแยกออกจากกันเป็นอิสระ จึงทำให้เกิดการเรืองแสงได้ ดังนั้น TaqMan probe จึงถูกพัฒนาขึ้นเพื่อให้มีความจำเพาะมากกว่า conventional probes (Kutyavin et al., 2000) ซึ่งปัจจุบันมีการนำ TaqMan probe ในเทคนิค real-time PCR มาใช้ในการศึกษาปริมาณของแบคทีเรียโดยปราศจากการเพาะเลี้ยงในกระเพาะรูเมนของโคเป็นจำนวนมากแล้ว การนำ TaqMan มาใช้ในการตรวจจับแบคทีเรียในรูเมนของคนและสัตว์อื่นๆ ก็มีเป็นจำนวนมากด้วยเนื่องจากสามารถหาปริมาณของแบคทีเรียได้แม่นยำด้วยความจำเพาะของ TaqMan probe เช่นการนำ TaqMan probe ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อก่อโรคมานำมาใช้ในการตรวจหาปริมาณของแบคทีเรียที่ก่อโรค (Nonnenmacher, 2004) การนำ TaqMan probe มาใช้ในการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่มีอยู่ในอุจจาระของคน (Rousselon, 2004) เป็นต้น



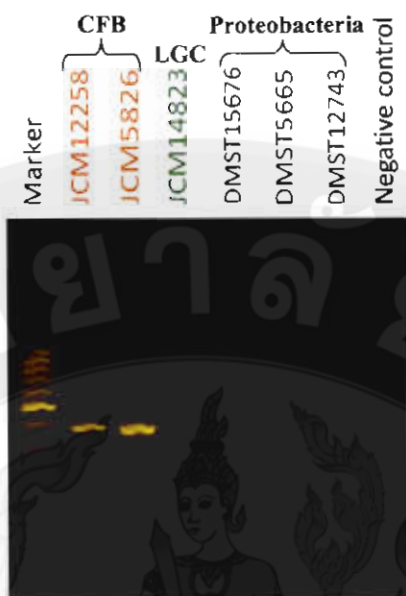
ภาพ 16 ผลการทดสอบ primer 4 คู่ ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้เชื้อแบคทีเรียมาตรฐาน *Clostridium amylolyticum* (JCM14823), *Bacteroides vulgatus* (JCM5826), *Prevotella albensis* (JCM12258), *Salmonella enteritidis* (DMST15676) และ *Escherichia coli* (DMST12743)

2. การทดสอบ primer และ probe ด้วยเทคนิค real-time PCR

เมื่อทำการทดสอบความจำเพาะของ primer ที่ออกแบบได้ด้วยเทคนิค conventional PCR แล้ว จากนั้นทำการทดสอบความจำเพาะของ probe แต่ละกลุ่มด้วยเทคนิค real-time PCR โดย probe CFBProbe จะจำเพาะต่อแบคทีเรียกลุ่ม CFB ส่วน probe LGCPProbe จะจำเพาะต่อแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB และ probe PROProbe จะจำเพาะต่อแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* ซึ่ง ส่วนประกอบของ PCR reaction ใน real-time PCR คือ EXPRESS qPCR SuperMix Universal 10 ไมโครลิตร, primer (500 nM) 1 ไมโครลิตร, fluorescent TaqMan probe (200 nM) 0.4 ไมโครลิตร, dH₂O 5.1 ไมโครลิตร และ DNA (10 ng) 2.5 ไมโครลิตร โดยสำหรับ กลุ่ม CFB ที่มี primer CFB287F, CFB705R และ probe CFBProbe จะใช้สภาวะ real-time PCR ที่ UDG incubation 50 องศาเซลเซียส 2 นาที, initial denaturation 95 องศาเซลเซียส 2 นาที, 45 cycle ของ denaturation 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที annealing และ extension 60 องศาเซลเซียส 1 นาที พบว่าผลการทดสอบความจำเพาะของ probe CFBProbe มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียกลุ่ม CFB เพราะสามารถ detect ได้เพียงแบคทีเรีย JCM12258 และ JCM5826 ส่วนแบคทีเรียกลุ่มอื่นไม่เกิดการ detect ดังภาพ 17 และเมื่อนำมาทำ gel electrophoresis ได้ผลดังภาพ 18

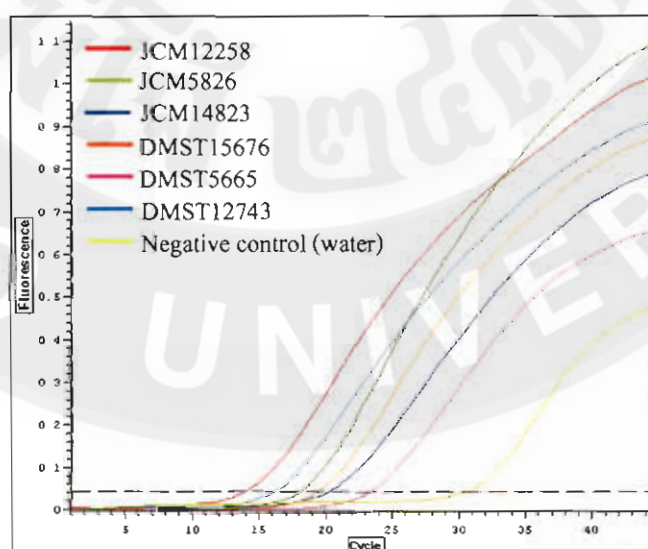


ภาพ 17 การทดสอบความจำเพาะของ probe CFBProbe ต่อแบคทีเรียกลุ่ม CFB ด้วยเทคนิค real-time PCR



ภาพ 18 Gel electrophoresis ของการทดสอบ CFBProbe ต่อแบคทีเรียที่เรียกลุ่ม CFB ด้วยเทคนิค real-time PCR

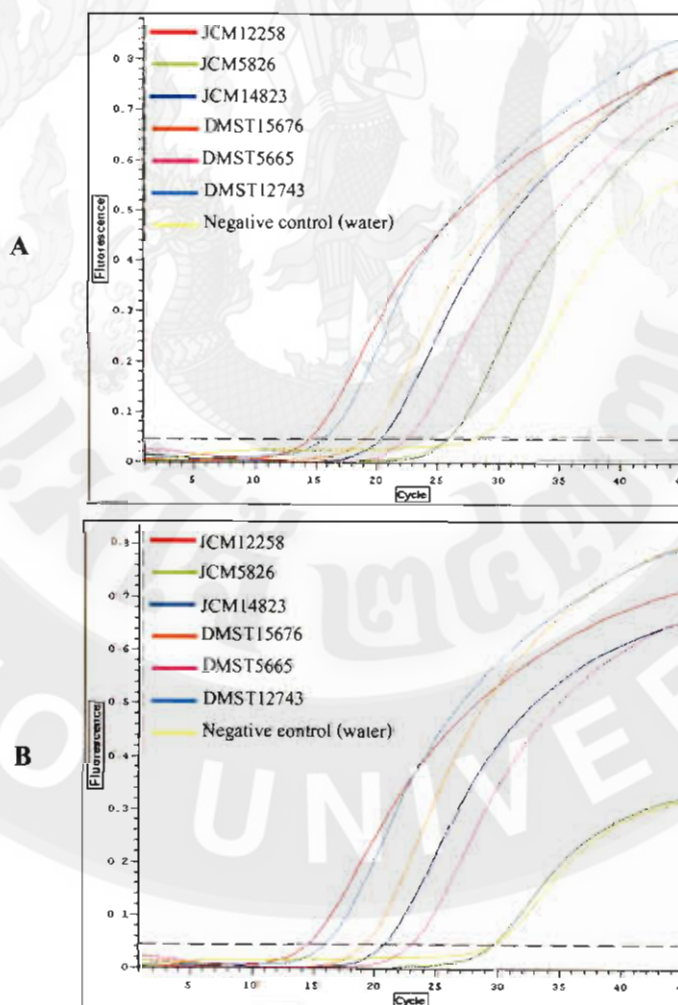
ส่วนผลการทดสอบความจำเพาะของ probe BACProbe ที่มีความจำเพาะต่อ ที่สภาวะ UDG incubation 50 องศาเซลเซียส 2 นาที, initial denaturation 95 องศาเซลเซียส 2 นาที, 45 cycle ของ denaturation 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที annealing และ extension 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที พบว่าสามารถ detect แบคทีเรียได้ทุกกลุ่ม ดังภาพ 19



ภาพ 19 การทดสอบความจำเพาะของ probe BACProbe ต่อแบคทีเรียทั้งหมดด้วยเทคนิค real-time PCR

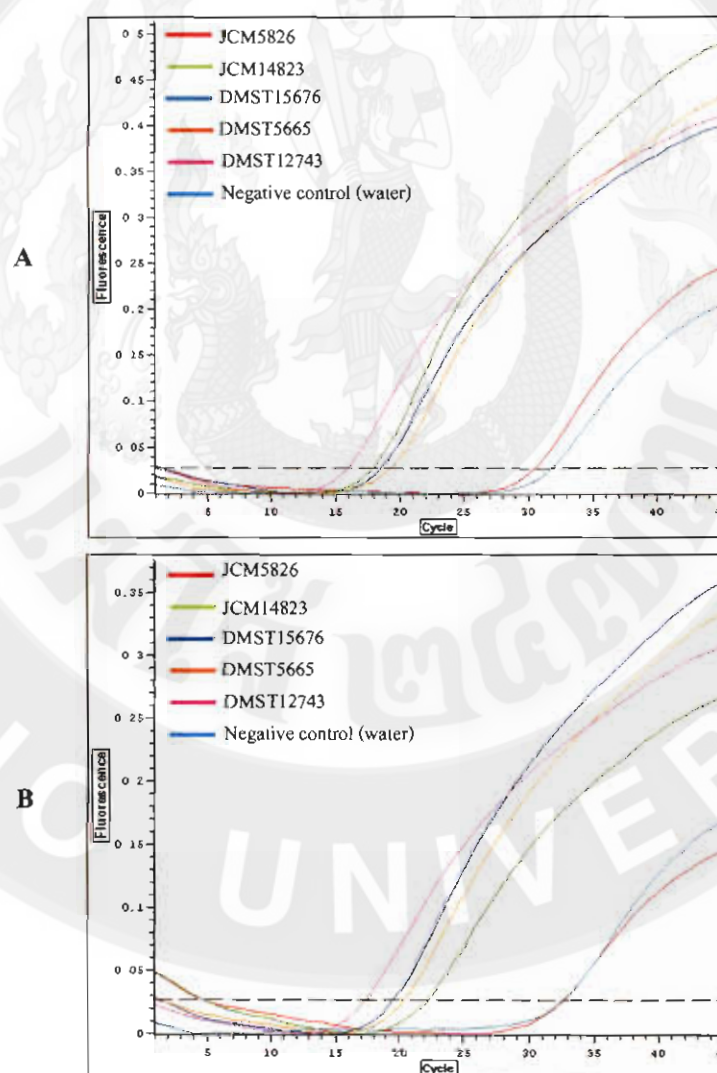
ผลการทดสอบความจำเพาะของ probe LGCProbe และ PROProbe โดยทำการหาสถานะที่เหมาะสมต่อการทำงานของ probe ซึ่งผลการทดสอบแสดงดังนี้

ผลการทดสอบสภาวะที่ 1 สภาวะที่ใช้คือ UDG incubation 50 องศาเซลเซียส 2 นาที, initial denaturation 95 องศาเซลเซียส 2 นาที, 45 cycle ของ denaturation 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที annealing และ extension 60 องศาเซลเซียส 1 นาที ผลการทดสอบพบว่าในสภาวะนี้ primer สามารถ amplification ได้ แต่การทำงานของ probe LGCProbe และ PROProbe ไม่มีความจำเพาะคือแบคทีเรียกลุ่มเป้าหมาย เนื่องจาก probe ทั้งสองกลุ่มสามารถ detect แบคทีเรียได้ทุกกลุ่ม คือ JCM12258, JCM5826, JCM14823, DMST15676, DMST5665 และ DMST12743 ที่ cycle 15-25 ดังภาพ 20A และ 20B ดังนั้นจึงทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในสภาวะที่ 2 ต่อไป



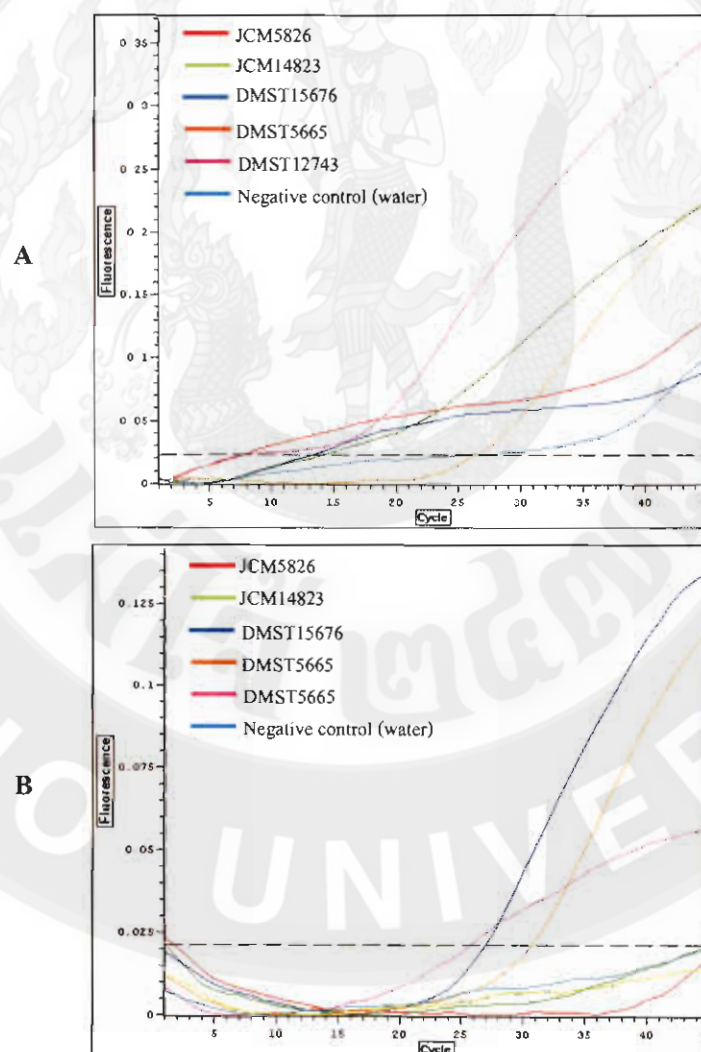
ภาพ 20 การทดสอบความจำเพาะของ probe ด้วยเทคนิค real-time PCR ในสภาวะที่ 1; ภาพ A คือ probe LGCProbe และ ภาพ B คือ probe PROProbe

ผลการทดสอบสถานะที่ 2 ทำการเพิ่มอุณหภูมิ annealing และ extension จาก 60 องศาเซลเซียส เป็น 65 องศาเซลเซียส และเปลี่ยนเวลาจาก 1 นาทีเป็น 30 วินาที ซึ่งสถานะที่ใช้คือ UDG incubation 50 องศาเซลเซียส 2 นาที, initial denaturation 95 องศาเซลเซียส 2 นาที, 45 cycle ของ denaturation 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที annealing และ extension 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที พบว่าทั้ง probe LGCPProbe และ PROProbe สามารถ detect แบคทีเรียได้ 2 กลุ่มคือ LGCGPB (JCM14823) และ *Proteobacteria* (DMST15676, DMST5665 และ DMST12743) ที่ cycle 15-20 แต่สามารถ detect กลุ่ม CFB (JCM5826) ได้ลดลง ดังภาพ 21A และ 21B ดังนั้นจึงทำการทดลองเพิ่มอุณหภูมิ annealing และ extension 68 องศาเซลเซียส ในสถานะที่ 3 อีกครั้ง



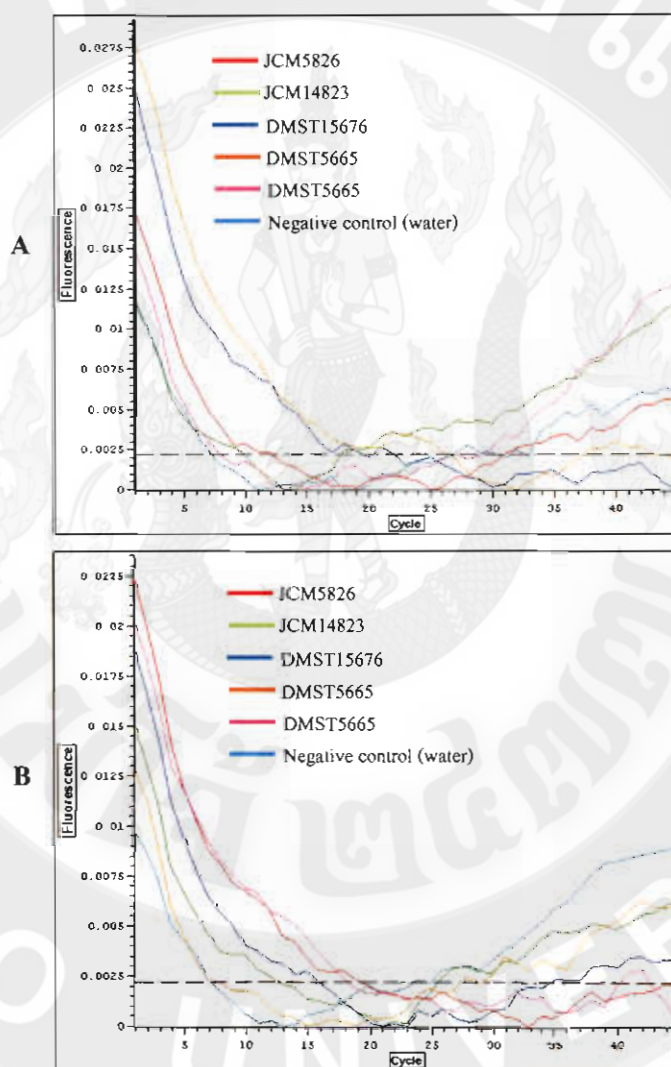
ภาพ 21 การทดสอบความจำเพาะของ probe ด้วยเทคนิค real-time PCR ในสถานะที่ 2; ภาพ A คือ probe LGCPProbe และ ภาพ B คือ probe PROProbe

ผลการทดสอบสถานะที่ 3 สภาวะที่ใช้คือ UDG incubation 50 องศาเซลเซียส 2 นาที, initial denaturation 95 องศาเซลเซียส 2 นาที, 45 cycle ของ denaturation 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที annealing และ extension 68 องศาเซลเซียส 30 วินาที ผลการทดสอบพบว่า probe LGCPProbe สามารถ detect แบคทีเรียกลุ่มเป้าหมายกลุ่ม LGCGPB คือ JCM14823 น้อยลงเมื่อเทียบกับสภาวะที่ 2 และยังสามารถ detect แบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* คือ DMST5665 และ DMAT12743 ดังภาพ 22A แต่ในส่วน probe PROProbe พบว่าสามารถ detect แบคทีเรียกลุ่มเป้าหมาย *Proteobacteria* คือ DMST15676, DMST5665 และ DMST12743 เท่านั้น ที่ cycle 20-25 ดังภาพ 22B



ภาพ 22 การทดสอบความจำเพาะของ probe ด้วยเทคนิค real-time PCR ในสภาวะที่ 3; ภาพ A คือ probe LGCPProbe และ ภาพ B คือ probe PROProbe

ผลการทดสอบสภาวะที่ 4 ทำการเพิ่มอุณหภูมิ annealing และ extension จาก 68 องศาเซลเซียส เป็น 70 องศาเซลเซียส ซึ่งสภาวะที่ใช้คือ UDG incubation 50 องศาเซลเซียส 2 นาที, initial denaturation 95 องศาเซลเซียส 2 นาที, 45 cycle ของ denaturation 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที annealing และ extension 70 องศาเซลเซียส 30 วินาที ผลการทดสอบ probe LGCPROBE ของ และ PROProbe แสดงดังภาพ 23A และ 23B ต่อไปนี้



ภาพ 23 การทดสอบความจำเพาะของ probe ด้วยเทคนิค real-time PCR ในสภาวะที่ 4; ภาพ A คือ probe LGCPROBE และ ภาพ B คือ probe PROProbe

จากภาพ 23 เห็นได้ว่าที่อุณหภูมิ annealing และ extension 70 องศาเซลเซียส primer และ probe LGCProbe และ PROProbe ไม่สามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอได้ถึงจะเพิ่มได้ก็เพิ่มในปริมาณที่น้อยมาก ดังนั้นสถานะที่เลือกใช้สำหรับ probe LGCProbe จะใช้สถานะที่ 2 คือ UDG incubation 50 องศาเซลเซียส 2 นาที, initial denaturation 95 องศาเซลเซียส 2 นาที, 45 cycle ของ denaturation 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที annealing และ extension 65 องศาเซลเซียส 30 วินาที ซึ่ง ณ สถานะนี้ probe LGCProbe สามารถ detect แบคทีเรีย 2 กลุ่มคือ LGCGPB และ *Proteobacteria* ได้ดีกว่าสถานะอื่นๆ และ detect แบคทีเรียกลุ่ม CFB ได้น้อยมาก ซึ่งการใช้ probe LGCProbe ในการ detect แบคทีเรียที่มีอยู่จริงในตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนต่อการเลี้ยงโคด้วยสูตรอาหาร 4 สูตรที่แตกต่างกัน จะเป็นการ detect จำนวนของแบคทีเรีย 2 กลุ่มแทนคือ LGCGPB และ *Proteobacteria* เพราะไม่สามารถที่จะหาสถานะที่เหมาะสมได้เนื่องจากหาสถานะจนถึงสถานะที่ 4 ที่ใช้อุณหภูมิในการ annealing และ extension ที่ 70 องศาเซลเซียส ทำให้ probe และ primer ไม่สามารถที่จะทำงานได้ ดังนั้นเมื่อต้องการทราบปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB ที่มีอยู่จริงในกระเพาะรูเมนจะใช้วิธีการหักลบปริมาณของแบคทีเรียในกลุ่มของ *Proteobacteria* ที่ได้ โดยการใช้ Probe PROProbe ที่สถานะที่เลือกคือ สถานะที่ 4 UDG incubation 50 องศาเซลเซียส 2 นาที, initial denaturation 95 องศาเซลเซียส 2 นาที, 45 cycle ของ denaturation 95 องศาเซลเซียส 15 วินาที annealing และ extension 68 องศาเซลเซียส 30 วินาที เนื่องจากสถานะที่ 4 สามารถ detect ได้เฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* ได้ดีกว่าสถานะอื่นๆ ซึ่งสามารถแยกแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* ออกจากแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB และ CFB ได้ ดังนั้นเมื่อได้ปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* ที่มีอยู่จริงในตัวอย่างของเหลวกระเพาะรูเมนแล้วจะนำมาใช้ในการหักลบกับปริมาณแบคทีเรียที่ได้จากการ detect ของ probe LGCProbe ก็จะได้ปริมาณอย่างคร่าวๆของแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB ที่มีอยู่จริงในตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนจากการเลี้ยงด้วยอาหาร 4 สูตรที่แตกต่างกัน (ผลการทำ gel-electrophoresis ในการทดสอบ probe ด้วย real-time PCR แสดงในภาคผนวก ข)

**ผลการศึกษานิสิตและปริมาณของกลุ่มแบคทีเรียที่มีอยู่จริงโดยใช้
เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุล**

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีในอาหารเลี้ยงโค

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงโคประกอบด้วยอาหาร 2 ชนิดคือ อาหารข้นและอาหารหยาบ เมื่อทำการส่งวิเคราะห์ค่า dry matter (DM), โปรตีน และ neutral detergent fibre (NDF) ได้ผลดังตาราง 22

ตาราง 22 ผลการวิเคราะห์อาหารข้นและอาหารหยาบ

ตัวอย่าง	Dry matter (%)	ปริมาณโปรตีน (%)	NDF (%)
อาหารข้น ซ้ำ 1	89.10	16.73	21.40
อาหารข้น ซ้ำ 2	89.19	16.23	21.68
เฉลี่ย	89.14	16.48	21.54
อาหารหยาบ ซ้ำ 1	89.84	1.96	73.98
อาหารหยาบ ซ้ำ 2	89.80	1.95	72.39
เฉลี่ย	89.82	1.96	73.18

**ผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่ายที่ได้จากตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์
Holstein Friesian**

จากการเก็บตัวอย่างในการเลี้ยงโคด้วยอัตราส่วนอาหารข้นและอาหารหยาบในอัตราที่แตกต่างกันจำนวน 4 สูตรคือ 0:100, 20:80, 40:60 และ 60:40 ตามลำดับ จากนั้นนำไปวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่าย ณ ห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ซึ่งได้ผลการวิเคราะห์ปริมาณของกรดไขมันระเหยง่ายดังแสดงในตาราง 23 ต่อไปนี้และอีกที่นำไปทำการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียและวัดปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้ผลดังภาคผนวก ก

ตาราง 23 ผลการวิเคราะห์กรดไขมันระเหยง่าย (volatile fatty acid; VFA) ในตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian ที่มีการเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารที่แตกต่างกัน

สูตรอาหาร	การเก็บตัวอย่าง โคนม	จำนวนตัวอย่าง ที่เก็บ	Acetic acid (mg/L)	Propionic acid (mg/L)	Butyric acid (mg/L)
อาหารชั้น : อาหารหยาบ 0 : 100	โค 1 เก็บซ้ำ 1	ขวด 1 (W1-1)	7.35	1.73	2.09
	โค 1 เก็บซ้ำ 2	ขวด 3 (W1-2)	16.22	2.75	7.12
	โค 1 เก็บซ้ำ 3	ขวด 5 (W1-3)	4.91	0.83	2.18
	โค 2 เก็บซ้ำ 1	ขวด 7 (B1-1)	7.72	0.85	2.18
	โค 2 เก็บซ้ำ 2	ขวด 9 (B1-2)	4.86	0.65	1.22
	โค 2 เก็บซ้ำ 3	ขวด 11 (B1-3)	2.73	Nd.	0.75
อาหารชั้น : อาหารหยาบ 20 : 80	โค 1 เก็บซ้ำ 1	ขวด 1 (W2-1)	0.49	2.51	0.31
	โค 1 เก็บซ้ำ 2	ขวด 3 (W2-2)	1.18	2.47	0.31
	โค 1 เก็บซ้ำ 3	ขวด 5 (W2-3)	0.81	Nd.	0.28
	โค 2 เก็บซ้ำ 1	ขวด 7 (B2-1)	1.12	Nd.	0.40
	โค 2 เก็บซ้ำ 2	ขวด 9 (B2-2)	1.30	Nd.	0.34
	โค 2 เก็บซ้ำ 3	ขวด 11 (B2-3)	1.17	Nd.	0.36
อาหารชั้น : อาหารหยาบ 40 : 60	โค 1 เก็บซ้ำ 1	ขวด 1 (W3-1)	2.58	Nd.	0.66
	โค 1 เก็บซ้ำ 2	ขวด 3 (W3-2)	0.87	Nd.	0.20
	โค 1 เก็บซ้ำ 3	ขวด 5 (W3-3)	1.31	Nd.	0.64
	โค 2 เก็บซ้ำ 1	ขวด 7 (B3-1)	1.45	Nd.	0.27
	โค 2 เก็บซ้ำ 2	ขวด 9 (B3-2)	1.77	Nd.	0.37
	โค 2 เก็บซ้ำ 3	ขวด 11 (B3-3)	2.78	0.53	0.66
อาหารชั้น : อาหารหยาบ 60 : 40	โค 1 เก็บซ้ำ 1	ขวด 1 (W4-1)	1.21	0.23	0.31
	โค 1 เก็บซ้ำ 2	ขวด 3 (W4-2)	1.17	Nd.	0.43
	โค 1 เก็บซ้ำ 3	ขวด 5 (W4-3)	0.53	Nd.	0.18
	โค 2 เก็บซ้ำ 1	ขวด 7 (B4-1)	1.88	0.57	0.69
	โค 2 เก็บซ้ำ 2	ขวด 9 (B4-2)	0.78	Nd.	0.24
	โค 2 เก็บซ้ำ 3	ขวด 11 (B4-3)	0.92	Nd.	0.16

และเมื่อนำผลการวิเคราะห์ VFA มาทำการเฉลี่ยและหาสัดส่วนของ acetic acid (mg/L), propionic acid (mg/L) และ butyric acid (mg/L) ที่พบในอาหารแต่ละสูตร 4 สูตร ได้ผลดังแสดงในตาราง 24 ต่อไปนี้

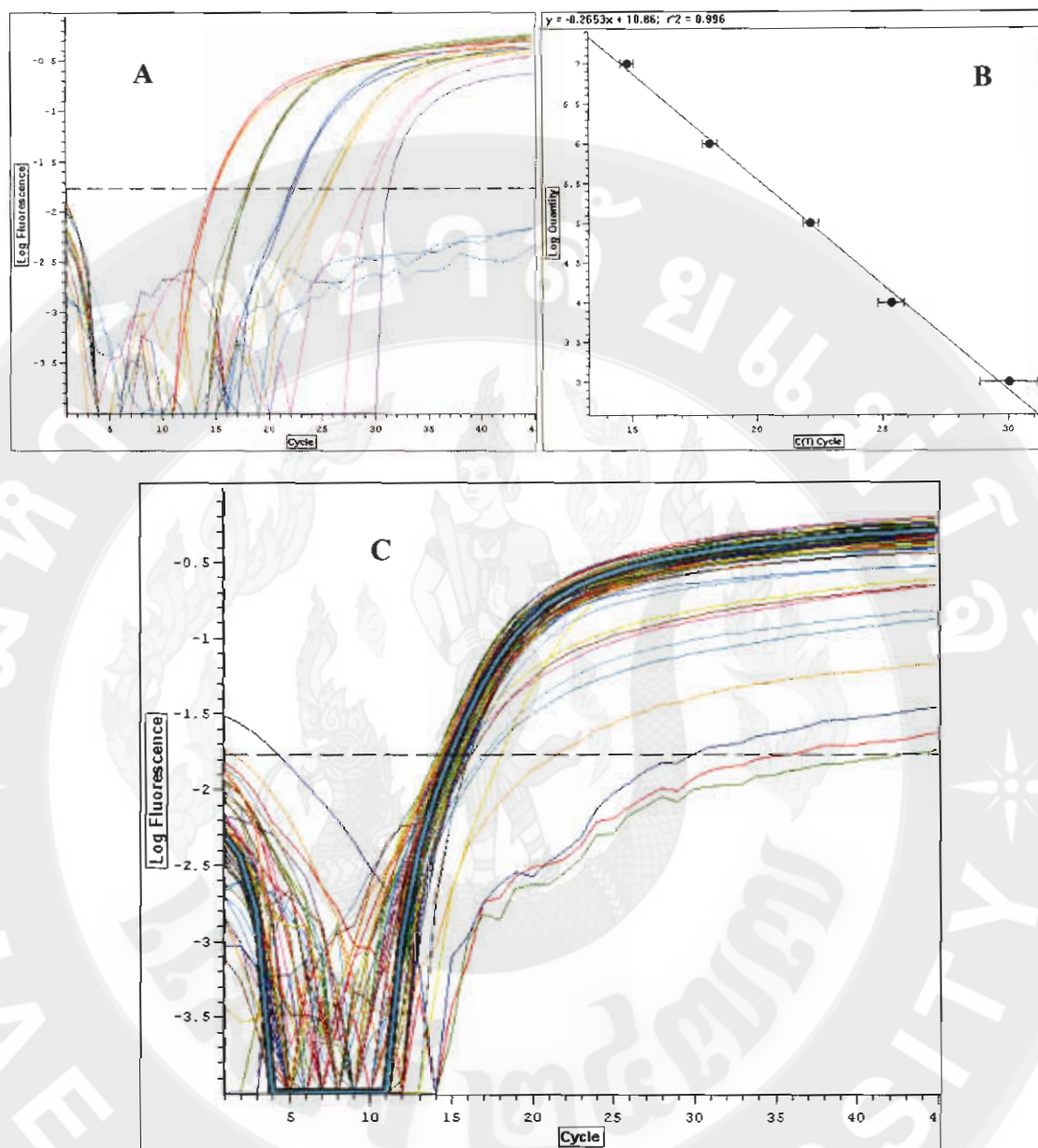
ตาราง 24 ปริมาณ VFA ที่ได้จากการบวกรวมการหมักในกระเพาะรูเมนจากการให้อาหารแตกต่างกัน

อาหาร	VFA				สัดส่วน VFA (C ₂ : C ₃ : C ₄)		
	Acetic acid (C ₂)	Propionic acid (C ₃)	Butyric acid (C ₄)	Total VFA	Acetic acid (C ₂)	Propionic acid (C ₃)	Butyric acid (C ₄)
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(%)	(%)	(%)
สูตร 1 (0 : 100)	7.30	1.26	2.59	11.15	65	11	23
สูตร 2 (20 : 80)	1.01	1.25	0.33	2.59	39	48	13
สูตร 3 (40 : 60)	1.79	0.27	0.47	2.53	71	10	18
สูตร 4 (60 : 40)	1.08	0.40	0.34	1.82	60	22	18

จากตาราง 24 พบว่าปริมาณ VFA ที่ได้จากการเลี้ยงโคด้วยการให้อาหารข้นและอาหารหยาบในอัตราส่วนที่ต่างกัน 4 สูตร คือ 0 : 100, 20 : 80, 40 : 60 และ 60 : 40 ปริมาณ acetic acid มีปริมาณอยู่ในช่วง 39-71% ส่วน propionic acid มีปริมาณอยู่ในช่วง 10-48% และ butyric acid มีปริมาณอยู่ในช่วง 13-23% ตามลำดับ และจากปริมาณ VFA รวมทั้งหมดจะเห็นได้ว่าปริมาณ VFA ทั้งหมด พบมากที่สุดในการให้อาหารสูตรที่ 1 ต่อโค เมื่อเทียบกับอาหารสูตรอื่นๆ และปริมาณ VFA ทั้งหมด จะมีปริมาณลดลงเรื่อยๆ เมื่อมีการให้อาหารข้นในปริมาณที่เพิ่มขึ้นในอาหารสูตร 2, 3 และ 4 ตามลำดับ และจากผลการวิเคราะห์ VFA ในอาหารแต่ละสูตรก็พบว่าปริมาณ VFA มีความแปรปรวนมาก ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องจากการเก็บตัวอย่างในแต่ละซ้ำเป็นการสุ่มเก็บภายในจุดกระเพาะรูเมนที่นำตัวอย่างของเหลวออกมาวิเคราะห์ต่างกัน ทำให้ปริมาณ VFA ในแต่ละซ้ำมีความแตกต่างกันมาก

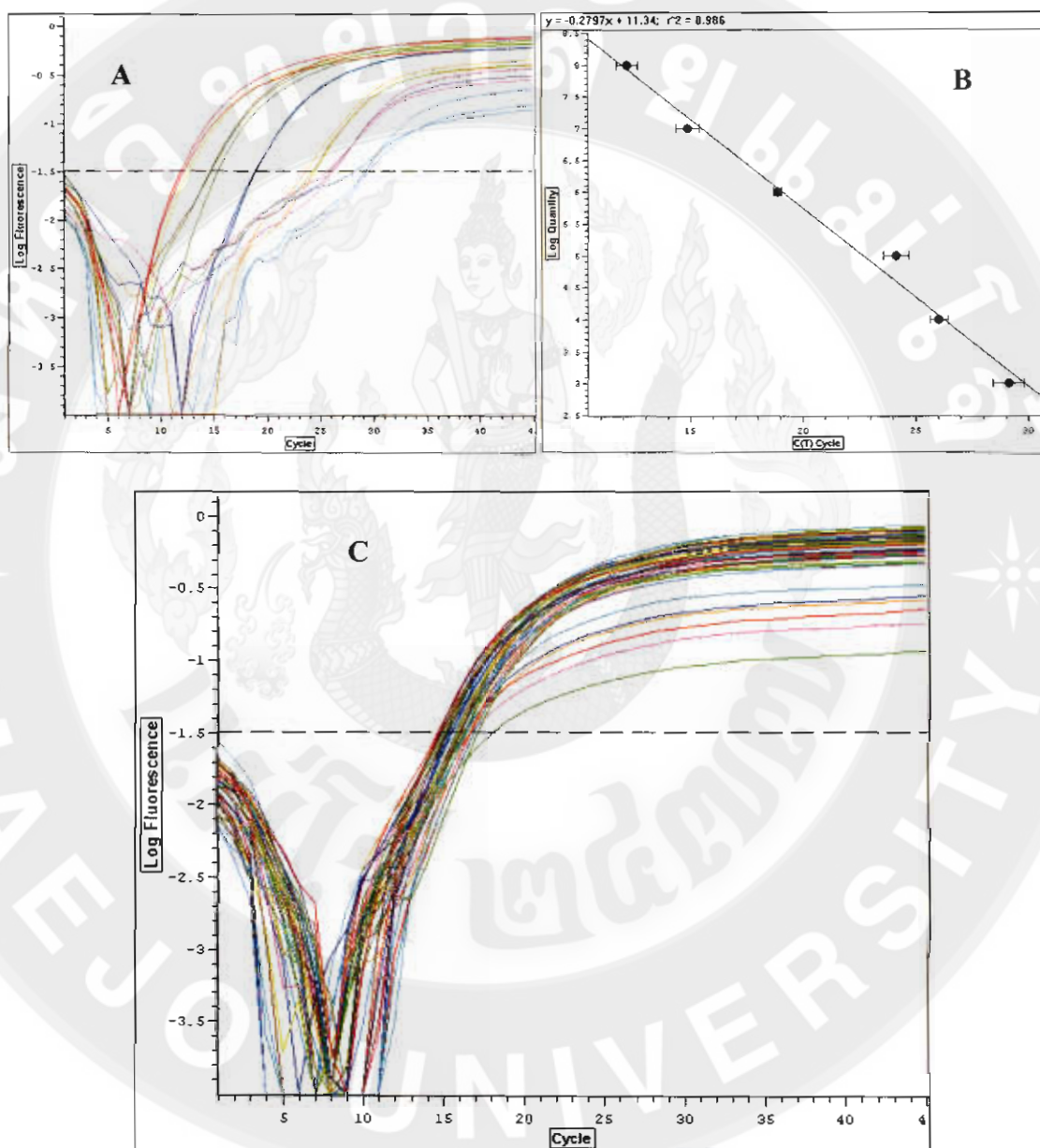
ผลการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของแบคทีเรียจากตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian ที่เลี้ยงด้วยอัตราส่วนอาหารข้นต่ออาหารหยาบที่แตกต่างกัน 4 สูตร ด้วยเทคนิค real-time PCR

จากตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมน ที่ได้จากการเลี้ยงโคด้วยอาหารข้นต่ออาหารหยาบในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน 4 สูตร ส่วนหนึ่งนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ VFA ผลที่ได้ดังผลการทดลองข้างต้น และตัวอย่างอีกส่วนนำมาทำการศึกษาชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในกลุ่มที่เราสนใจจำนวน 3 กลุ่ม คือ LGCGPB, CFB และ *Proteobacteria* group รวมถึง Total bacteria ด้วยเทคนิค real-time PCR โดยทำการวิเคราะห์ตัวอย่างทั้งหมดที่เก็บ ตัวอย่างละ 2 ซ้ำ พร้อมกับกราฟมาตรฐานจำนวน 3 ซ้ำ หลังจากที่ทำ real-time PCR เสร็จแล้วการวิเคราะห์ผลในเครื่อง Real-time PCR Chromo 4™ System โดยเลือก quantification เพื่อวิเคราะห์ปริมาณ จากนั้นเลือกวิเคราะห์ผลโดยใช้ค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำมาใช้ในการวิเคราะห์ standard และตัวอย่าง ทำการลากเส้น base line โดยพยายามให้เส้น base line อยู่ตรงกลางช่วง exponential phase ในกราฟ log ของกราฟ standard curve เมื่อทำการคัดเลือกกราฟ standard curve ที่มีค่า R^2 ที่ยอมรับได้แล้ว จากนั้นเครื่องจะทำการคำนวณปริมาณจีโนมของตัวอย่างอัตโนมัติโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งได้ผลการศึกษาดังต่อไปนี้ โดยกราฟมาตรฐานจะ plot กราฟระหว่าง log quantity กับ C_T และในการแสดงผลการ detect ของแบคทีเรียในแต่ละกลุ่มจะขอแสดงเป็นกราฟระหว่าง log fluorescence กับ cycle เมื่อทำการลากเส้น base line ของกราฟมาตรฐานเพื่อให้ได้ค่า R^2 ที่ยอมรับได้เพื่อให้ได้สมการเส้นตรงที่น่าเชื่อถือเพื่อนำไปใช้ในการคำนวณปริมาณของแบคทีเรียในกลุ่มเป้าหมายนั้นๆ โดยผลการศึกษาปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB เทียบกับกราฟมาตรฐานโดยใช้ *Clostridium amylolyticum* (JCM14823) เป็นตัวแทนในการทำกราฟมาตรฐาน ด้วยวิธี real-time PCR ดังแสดงในภาพ 24 ต่อไปนี้



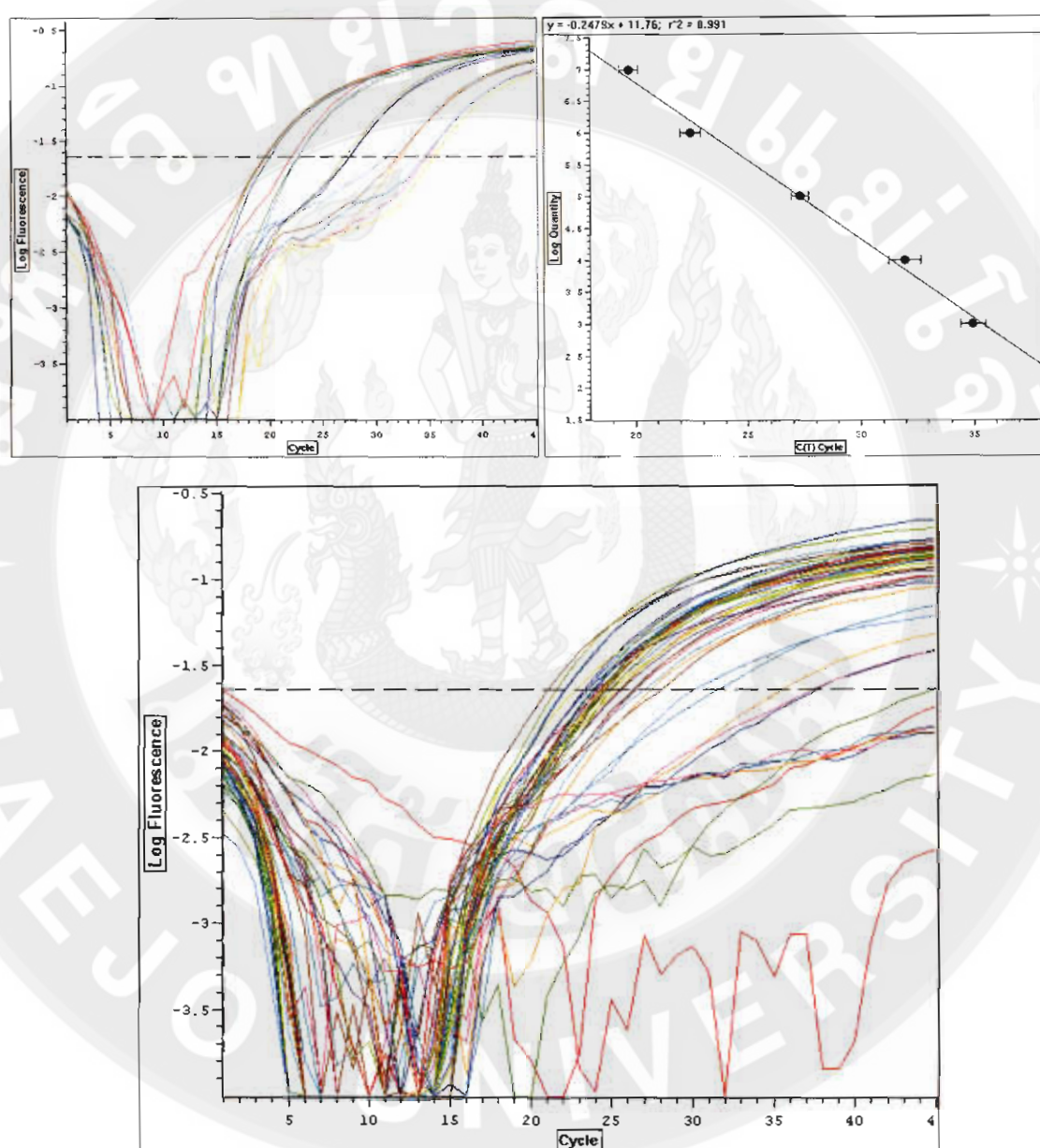
ภาพ 24 การศึกษาปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB โดยใช้ *Clostridium amylolyticum* (JCM14823) เป็นตัวแทนในการทำ standard curve ด้วยเทคนิค real-time PCR; A คือ standard curve ระหว่าง log fluorescence กับ cycle, B คือ standard curve ระหว่าง log quantity กับ C(T) cycle, C คือ กราฟแสดงการตรวจจับแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB ในตัวอย่างของเหลวกระเพาะรูเมน เป็นกราฟระหว่าง log fluorescence กับ cycle

การศึกษาปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม CFB เทียบกับกราฟมาตรฐานโดยใช้ *Bacteroides vulgatus* (JCM5826) เป็นตัวแทนในการทำกราฟมาตรฐาน ด้วยวิธี real-time PCR ดังแสดงในภาพ 25 ต่อไปนี้



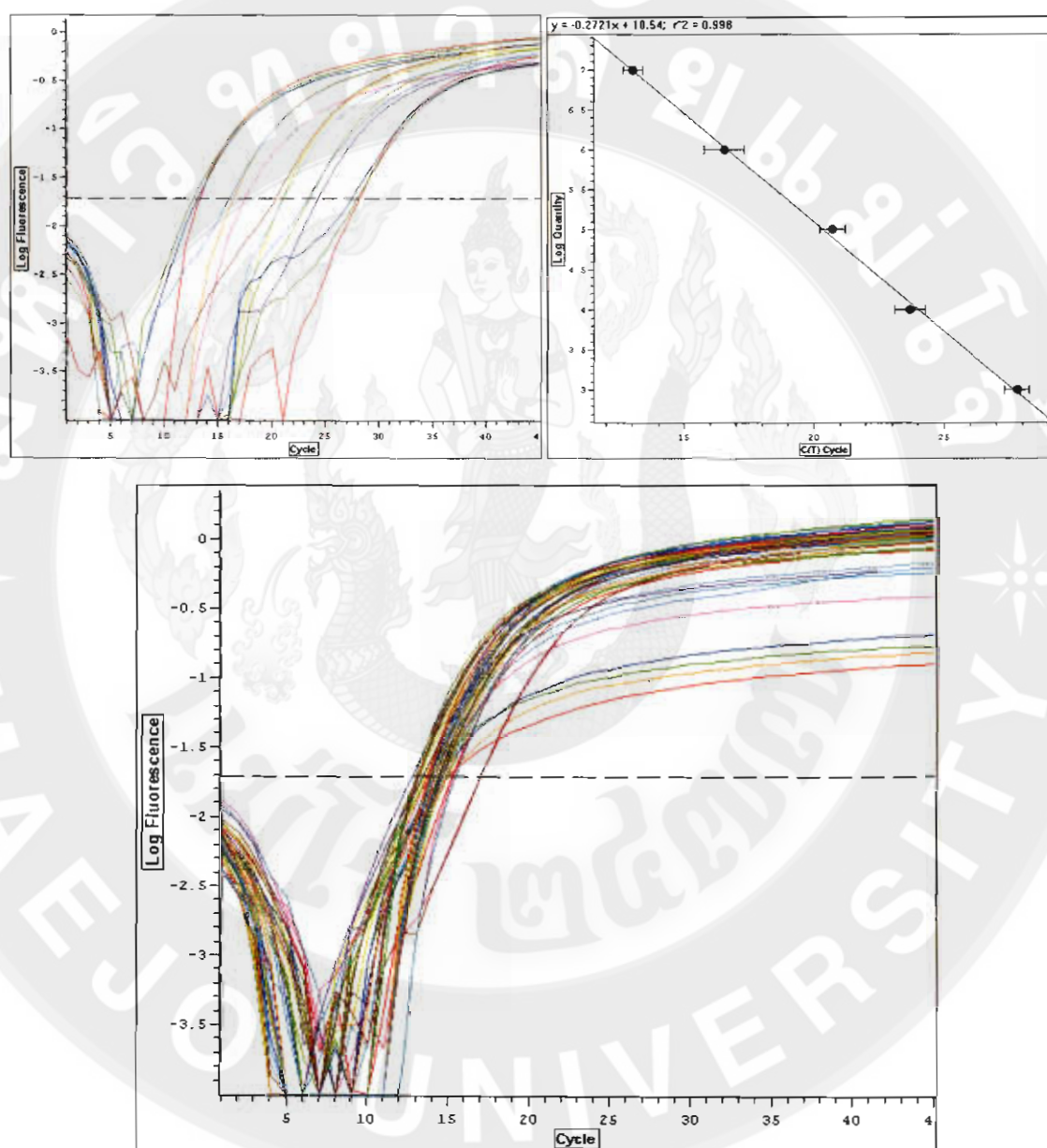
ภาพ 25 การศึกษาปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม CFB โดยใช้ *Bacteroides vulgatus* (JCM5826) เป็นตัวแทนในการทำ standard curve ด้วยเทคนิค real-time PCR; A คือ standard curve ระหว่าง log fluorescence กับ cycle, B คือ standard curve ระหว่าง log quantity กับ C(T) cycle, C คือ กราฟแสดงการตรวจจับแบคทีเรียกลุ่ม CFB ในตัวอย่างของเหลวกระเพาะรูเมน เป็นกราฟระหว่าง log fluorescence กับ cycle

ในส่วนการศึกษาปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* เทียบกับกราฟมาตรฐานโดยใช้ *Salmonella enteritidis* (DMST15676) เป็นตัวแทนในการทำกราฟมาตรฐาน ด้วยวิธี real-time PCR ดังแสดงในภาพ 26 ต่อไปนี้



ภาพ 26 การศึกษาปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* โดยใช้ *Salmonella enteritidis* (DMST15676) เป็นตัวแทนในการทำ standard curve ด้วยเทคนิค real-time PCR; A คือ standard curve ระหว่าง log fluorescence กับ cycle, B คือ standard curve ระหว่าง log quantity กับ C(T) cycle, C คือ กราฟแสดงการตรวจจับแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* ในตัวอย่างของเหลวกระเพาะรูเมน เป็นกราฟระหว่าง log fluorescence กับ cycle

และการศึกษาปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดเทียบกับกราฟมาตรฐานโดยใช้ *Escherichia coli* (DMST12743) เป็นตัวแทนในการทำกราฟมาตรฐาน ด้วยวิธี real-time PCR ดังแสดงในภาพ 27 ต่อไปนี้



ภาพ 27 การศึกษาปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดโดยใช้ *Escherichia coli* (DMST12743) เป็นตัวแทนในการทำ standard curve ด้วยเทคนิค real-time PCR; A คือ standard curve ระหว่าง log fluorescence กับ cycle, B คือ standard curve ระหว่าง log quantity กับ C(T) cycle, C คือ กราฟแสดงการตรวจจับแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างของเหลวกระเพาะรูเมน เป็นกราฟระหว่าง log fluorescence กับ cycle

จากกราฟมาตรฐานที่ plot กราฟระหว่าง log Quantity (ปริมาณจีโนม) ที่คำนวณได้ของดีเอ็นเอแต่ละ dilution กับ threshold cycle (C_T) โดยค่า logarithms ของดีเอ็นเอที่คำนวณได้จะหมายถึงความเข้มข้นของดีเอ็นเอในหน่วย จีโนม (cell)/ 50 ng โดยปริมาณจีโนม(เซลล์) ในตัวอย่างจะถูกคำนวณได้จากสมการเส้นตรงที่ได้ในการหาปริมาณของแต่ละกลุ่มพร้อมกับกราฟมาตรฐาน โดยพบว่าจากภาพ 24, 25, 26 และ 27 ได้สมการเส้นตรงของแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB Group โดยใช้ *Clostridium amylolyticum* (JCM14823) เป็นตัวแทนในการศึกษา CFB Group โดยใช้ *Bacteroides vulgates* (JCM5826) เป็นตัวแทนในการศึกษา *Proteobacteria* Group โดยใช้ *Salmonella enteritidis* (DMST15676) เป็นตัวแทนในการศึกษา และ Total bacteria โดยใช้ *Escherichia coli* (DMST12743) เป็นตัวแทนในการศึกษาเท่ากับ $y = -0.2653x + 10.86$, $y = -0.2797x + 11.34$, $y = -0.2479x + 11.76$, $y = -0.2721x + 10.54$ และค่า coefficient (R^2) เท่ากับ 0.996, 0.986, 0.991, 0.998 ตามลำดับ เมื่อได้สมการเส้นตรงและค่า R^2 ที่ยอมรับได้แล้ว เครื่องจะทำการคำนวณปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มเป้าหมายนั้นๆ ออกมาอัตโนมัติ โดยจะทำการคำนวณเป็นค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำในแต่ละตัวอย่าง ซึ่งผลการศึกษารายปริมาณของแบคทีเรียจากของเหลวกระเพาะรูเมนในการให้อัตราส่วนอาหารข้นต่ออาหารหยาบที่แตกต่างกัน 4 สูตร (ภาคผนวก ก) สามารถสรุปปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มเป้าหมายทั้ง 3 กลุ่มต่อปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ 50 ng ในการทำปฏิกิริยา PCR ใน real-time PCR ดังตาราง 25 ต่อไปนี้

ตาราง 25 ผลการวิเคราะห์ปริมาณของแบคทีเรียต่อปริมาณดีเอ็นเอที่ใช้ 50 ng ในการทำปฏิกิริยา PCR ใน real-time PCR ทั้ง 3 กลุ่มจากตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian ที่มีการให้อัตราส่วนอาหารข้นและอาหารหยาบที่แตกต่างกัน

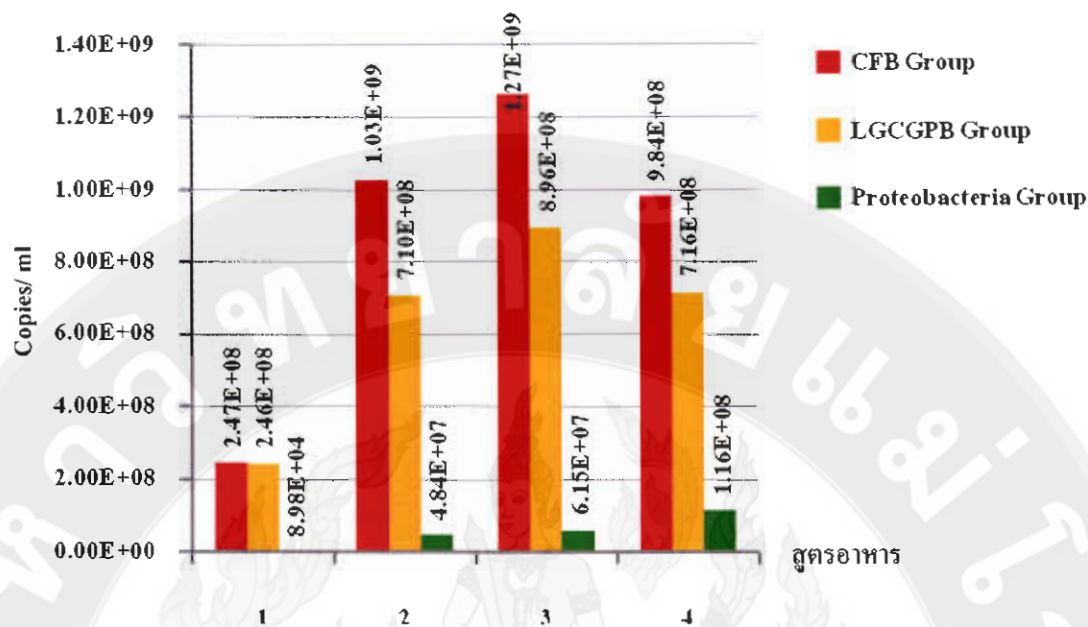
สูตรอาหาร(อาหาร ข้น:อาหารหยาบ)	โค	Bacteria			
		CFB	LGCGPB	<i>Proteobacteria</i>	Total Bacteria
		(genome/50 ng)	(genome/50 ng)	(genome/50 ng)	(genome/50 ng)
สูตร 1 (0:100)	ตัวที่ 1	5.16E+06	3.13E+06	0	4.25E+06
สูตร 2 (20:80)		8.93E+06	6.05E+06	4.60E+05	5.34E+06
สูตร 3 (40:60)		1.28E+07	7.33E+06	6.83E+05	7.63E+06
สูตร 4 (60:40)		8.42E+06	8.94E+06	2.96E+05	6.15E+06
สูตร 1 (0:100)	ตัวที่ 2	4.50E+06	5.30E+06	2.41E+03	2.96E+06
สูตร 2 (20:80)		1.12E+07	7.81E+06	4.88E+05	7.20E+06
สูตร 3 (40:60)		1.06E+07	9.29E+06	4.47E+05	5.75E+06
สูตร 4 (60:40)		1.03E+07	5.18E+06	1.80E+06	5.00E+06

เมื่อได้ปริมาณจีโนมของตัวอย่างที่เครื่องคำนวณอัตโนมัติดังสรุปในตารางที่ 25 ข้างต้นแล้ว จะนำมาคำนวณกลับเป็นปริมาณของเซลล์แบคทีเรียใน 1 ml ของตัวอย่างที่นำมาสกัด โดยปริมาณที่ได้ในตารางที่ 25 เป็น ปริมาณจีโนม/50 ng DNA ในปฏิกิริยาที่ใช้ในการทำ real-time PCR ซึ่งในแต่ละตัวอย่าง 1 ml ที่นำมาสกัดมีปริมาณดีเอ็นเอไม่เท่ากัน และค่าปริมาณดีเอ็นเอที่วัดได้จะเป็น ng/ μ l แต่ใน 1 ml ตัวอย่างที่นำมาสกัดดีเอ็นเอจะได้ปริมาณดีเอ็นเอทั้งหมด 50 μ l จึงต้องนำปริมาณดีเอ็นเอ ng/ μ l ที่วัดได้มาเทียบกลับให้เป็นปริมาณดีเอ็นเอ ng/50 μ l จากนั้นนำค่าปริมาณดีเอ็นเอ ng/50 μ l ที่ได้ไปเทียบกลับจาก ปริมาณจีโนม/50 ng ก็จะได้ปริมาณเซลล์ต่อ 1 ml (ปริมาณ DNA ที่สกัดได้ 50 μ l/1 ml ของเหลวในกระเพาะรูเมน) ซึ่งผลการคำนวณปริมาณแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มเป็น cell/ml โดยนำปริมาณที่ได้ในตารางที่ 25 ใช้ในการคำนวณ และทำการนำโคทั้ง 2 ตัวมาหาค่าเฉลี่ย ได้ผลการศึกษาปริมาณของแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มที่มีอยู่จริงในกระเพาะรูเมนของโคในการให้อัตราส่วนอาหารข้นต่ออาหารหยาบที่แตกต่างกัน ดังสรุปในตาราง 26 ต่อไปนี้

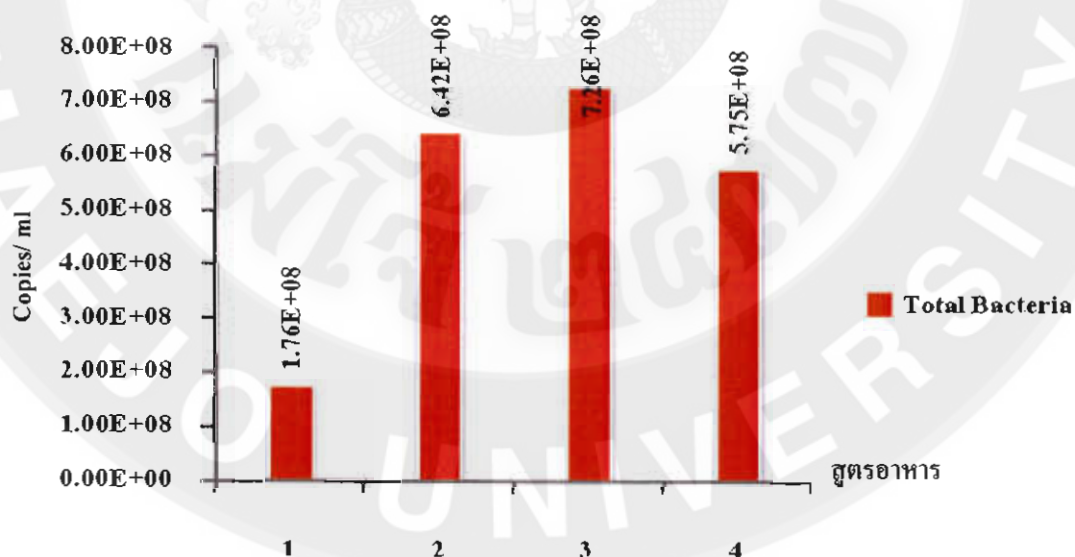
ตาราง 26 ผลการศึกษาปริมาณของแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มที่มีอยู่จริงในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian ในการให้อัตราส่วนอาหารข้นต่ออาหารหยาบที่แตกต่างกัน 4 สูตร

สูตรอาหาร (อาหารข้น:อาหารหยาบ)	Bacteria			
	CFB	LGCGPB	<i>Proteobacteria</i>	Total Bacteria
	(cell/ml)	(cell/ml)	(cell/ml)	(cell/ml)
สูตร 1 (0:100)	3.67E+08	3.19E+08	8.98E+04	2.74E+08
สูตร 2 (20:80)	1.03E+09	7.10E+08	4.84E+07	6.42E+08
สูตร 3 (40:60)	1.27E+09	8.96E+08	6.15E+07	7.26E+08
สูตร 4 (60:40)	9.84E+08	7.16E+08	1.16E+08	5.75E+08

และจากผลการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มนี้ จากตัวอย่างในกระเพาะรูเมนของโคโดยเลี้ยงในอาหารที่มีอัตราส่วนอาหารข้นต่ออาหารหยาบต่างกัน 4 สูตร ดังสรุปในตารางที่ 26 ข้างต้น เมื่อนำมาทำการเปรียบเทียบปริมาณของแบคทีเรียของแต่ละกลุ่มในอาหารแต่ละสูตร สามารถเปรียบเทียบปริมาณของแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มที่มีอยู่จริงในกระเพาะรูเมนของโคในการให้อาหาร 4 สูตรดังแสดงในภาพ 28 ต่อไปนี้ และภาพ 29 เป็นการเปรียบเทียบปริมาณ Total bacteria ในอาหารแต่ละสูตร และสามารถสรุปได้ดังแสดงในตาราง 27 พร้อมกับเปรียบเทียบกับ VFA ที่พบในอาหาร 4 สูตร ดังนี้



ภาพ 28 การเปรียบเทียบปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม CFB, LGCGPB และ *Proteobacteria* ในการเลี้ยงโคด้วยอัตราส่วนอาหารข้นและหยาง 4 สูตร; 1 = 0:100, 2 = 20:80, 3 = 40:60 และ 4 = 60:40



ภาพ 29 การเปรียบเทียบปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมด (Total bacteria) ในการเลี้ยงโคด้วยอัตราส่วนอาหารข้นและหยาง 4 สูตร; 1 = 0:100, 2 = 20:80, 3 = 40:60 และ 4 = 60:40

ตาราง 27 ปริมาณ VFA และปริมาณแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนเฉลี่ยที่พบในอาหารที่มีสัดส่วนอาหารข้นและอาหารหยาบต่างกัน 4 สูตร

อาหาร	VFA			Bacteria			Total Bacteria
	Acetic acid (C2)	Propionic acid (C3)	Butyric acid (C4)	LGCGPB	CFB	Proteobacteria	
	(mg/L)	(mg/L)	(mg/L)	(cell/ml)	(cell/ml)	(cell/ml)	
สูตร 1	7.30	1.26	2.59	2.46E+08	2.47E+08	8.98E+04	1.76E+08
สูตร 2	1.01	1.25	0.33	7.10E+08	1.03E+09	4.84E+07	6.42E+08
สูตร 3	1.79	0.27	0.47	8.96E+08	1.27E+09	6.15E+07	7.26E+08
สูตร 4	1.08	0.40	0.34	7.16E+08	9.84E+08	1.16E+08	5.75E+08
สัดส่วน	C ₂ : C ₃ : C ₄			CFB: LGCGPB: <i>Proteobacteria</i>			-
สูตร 1	65	11	23	49.8	50.1	0.02	-
สูตร 2	39	48	13	39.7	57.6	2.7	-
สูตร 3	71	10	18	40.3	56.9	2.8	-
สูตร 4	60	22	18	39.4	54.2	6.4	-

จากภาพและตารางข้างต้นแสดงให้เห็นว่าจากการเลี้ยงโคด้วยอาหาร 4 สูตรที่มีอัตราส่วนอาหารข้นและอาหารหยาบที่แตกต่างกัน พบว่ามีประชากรของแบคทีเรียในกลุ่มของแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB อยู่ในช่วง 2.46×10^8 - 8.96×10^8 , CFB อยู่ในช่วง 2.47×10^8 - 12.7×10^8 และแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* อยู่ในช่วง 8.98×10^4 - 1.16×10^8 และเมื่อคิดเป็นสัดส่วนทั้งหมดของแบคทีเรีย 3 กลุ่มในอาหารแต่ละสูตร พบว่า แบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB, CFB และ *Proteobacteria* มีสัดส่วนอยู่ในช่วง 39.4-49.8%, 50.1-57.6% และ 0.02-6.4% ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าแบคทีเรียกลุ่ม CFB จะมีปริมาณมากที่สุด ปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB มีปริมาณมากเป็นอันดับสอง และแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* มีปริมาณน้อยที่สุดตามลำดับ แต่จากผลการวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีการโคลนยีนพบว่า มีชนิดของแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB มากที่สุดดังนั้นผลการทำ real-time PCR จึงเป็นผลที่บอกปริมาณของแบคทีเรียที่มีอยู่จริงในกระเพาะรูเมน และจากรายงานก่อนหน้านี้พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม CFB ประกอบด้วยแบคทีเรียส่วนใหญ่ยกตัวอย่างเช่น *Prevotella* sp. และ *Bacteroides* sp. ที่ทำหน้าที่หลักในการย่อยสลายเชื้อใย cellulose ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักคือ formate, acetate และ succinate ส่วนแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ประกอบด้วย *Ruminococcus* sp., *Butyrivibrio* sp. และ *Selenomonas* sp. ที่ทำหน้าที่

หลักในกระเพาะรูเมนคือ ย่อยสลาย cellulose, xylan, starch และ lactate ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก คือ formate, acetate, ethanol, CO₂, butyrate, lactate, propionate และ succinate (Joblin, 1997; Daniel et al., 1995 and Krause et al., 2003)

จากการทดลองพบว่าสัดส่วนของแบคทีเรียตามการศึกษา แบคทีเรียที่มีการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสัดส่วนอาหารข้นและอาหารหยาบที่แตกต่างกันได้คือแบคทีเรียในกลุ่มของ *Proteobacteria* ที่มีสัดส่วนเป็น 0.00, 2.70, 2.80 และ 6.4% ในสูตรอาหารที่มีอัตราส่วนอาหารข้นต่ออาหารหยาบ 4 สูตรเป็น 0:100, 20:80, 40:60 และ 60:40 ตามลำดับ เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรีย fumarate reducing bacteria หรือแบคทีเรียที่ย่อยสลาย fumarate (Hattori and Matsui, 2008) และเป็นแบคทีเรียกลุ่มผลิตมีเทนด้วยซึ่งมีรายงานก่อนหน้านี้ยืนยันกลุ่มแบคทีเรีย methanotrophs ด้วยลำดับ rDNA พบว่า methanotrophs ชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 คือ gamma-*Proteobacteria* และ alpha-*Proteobacteria* ตามลำดับ (Murrell and Radajewski, 2000) ซึ่งเราจะเห็นได้ว่าวัวที่กินอาหารสูตรที่ 1 คือฟางข้าวแห้ง 100% พบว่ามีแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* น้อยมากเมื่อเทียบกับอาหารสูตรอื่นที่มีอาหารข้นผสมเข้ากับอาหารหยาบ ทำให้ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นตามลำดับความเข้มข้นของอาหารข้นที่เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* เป็นแบคทีเรียที่ใช้ fumarate และเป็นแบคทีเรียผลิตก๊าซมีเทน (Hattori and Matsui, 2008; Mitsumori et al., 2002) จึงต้องใช้ substrate เริ่มต้นจากกระบวนการหมักของแบคทีเรียในกลุ่มที่ย่อยเยื่อใย และจากรายงานก่อนหน้านี้ก็พบว่าโดยทั่วไปการผลิตก๊าซมีเทนจะมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นในกระเพาะรูเมนเมื่อสัตว์กินอาหารที่มีพวกที่มีเยื่อใยต่ำ (Kirchgeßner et al., 1995) ซึ่งส่วนใหญ่ในกระเพาะรูเมนจะใช้ประโยชน์ในการย่อยสลายเยื่อใย การลดการผลิตก๊าซมีเทนได้นั้นทำได้โดยลดการกินอาหารพวกเยื่อใยต่ำหรืออาหารข้นลง ดังนั้นเมื่ออาหารสูตร 1 ที่มีอัตราส่วนอาหารข้นต่ออาหารหยาบ 0:100 มีปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* เท่ากับ 8.98×10^4 cell/ml ซึ่งมีปริมาณน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับอาหารสูตรอื่นที่มีการผสมอาหารข้น ทำให้เป็นไปได้ว่าในอาหารสูตรนี้มีการผลิตก๊าซมีเทนลดลงเพราะ โคกินแต่อาหารพวกเยื่อใยสูงไม่มีอาหารข้นผสมอยู่ และเมื่อไม่มีแบคทีเรียกลุ่มนี้ fumarate ก็จะไม่ถูกย่อยสลายทำให้มีการผลิต propionate เพิ่มมากขึ้นทำให้แบคทีเรียกลุ่มนี้ผลิตมีเทนน้อยลงและแบคทีเรียกลุ่ม methanogenic ชนิดอื่นผลิตก๊าซมีเทนลดลงด้วย เนื่องจากการผลิต propionic ไม่มีการผลิตก๊าซไฮโดรเจนจึงทำให้แบคทีเรีย methanogenic ที่ใช้ไฮโดรเจนผลิตก๊าซมีเทนลดลง (Lopez et al., 1999; Asanuma et al., 1999; Moss et al., 2000 and Newbold et al., 2005) แต่ทั้งนี้ทั้งนั้นจากการศึกษาที่ได้ในครั้งนี้ก็ยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่าอาหารสูตรที่ 1 ที่เป็นฟางข้าว 100% จะเป็นสูตรที่มีการผลิตก๊าซมีเทนน้อยที่สุดได้ ดังนั้นจึงสามารถนำไปพัฒนาศึกษาต่อไปได้ โดยเพิ่มวิธีการ

วิเคราะห์ปริมาณก๊าซมีเทนด้วยวิธีต่างๆ ต่อไปในการศึกษาการพัฒนาอาหารของโค เพื่อนำมาใช้ในการขึ้นสูตรอาหารที่มีการผลิตก๊าซมีเทนน้อยที่สุด

นอกจากนี้จากผลการศึกษาปริมาณของ VFA ยังพบว่าการตอบสนองของสัดส่วน VFA มีความแปรปรวนสูงซึ่งปกติแล้วปริมาณของ VFA ในกระเพาะรูเมนจะมีปริมาณของ acetate สูงสุด ปริมาณมากรองลงมาคือ propionate และ butyrate ตามลำดับ ซึ่งจากการรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ที่มีการศึกษา VFA ในการให้อาหารที่แตกต่างกันก็พบว่าปริมาณ acetate > propionate > butyrate ตามลำดับ (Wanapat and Rowlinson, 2007; Wanapat et al., 2009 and Vinh et al., 2011) และการตอบสนองของสัดส่วนแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่ม มีความแปรปรวนต่ำกว่าการตอบสนองของสัดส่วน VFA ซึ่งเป็นที่น่าสนใจที่จะใช้เป็นตัวชี้วัดประสิทธิภาพการให้อาหารโคต่อไป

และจากผลการศึกษาจะเห็นว่าการเลี้ยงโคด้วยอาหารสูตรที่ 1 ที่เป็นฟางข้าว 100% ให้ปริมาณกรดไขมันระเหยง่าย (VFA) มากที่สุดเมื่อเทียบกับการเลี้ยงโคด้วยอาหารสูตรอื่นๆ และปริมาณของแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มก็พบว่าแบคทีเรียกลุ่ม CFB และกลุ่ม LGCPB มีปริมาณที่ไม่แตกต่างกันในแต่ละสูตร แต่แบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* มีปริมาณน้อยที่สุดในอาหารสูตรที่ 1 เมื่อเทียบกับอาหารสูตรอื่น การที่อาหารสูตรที่ 1 มีปริมาณ VFA และแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มดีที่สุดเมื่อเทียบกับอาหารสูตรอื่นๆ อาจเป็นเพราะเนื่องจากการให้อาหารโคทดลองที่ปกติเป็นฟางข้าวเป็นส่วนใหญ่จึงทำให้กระเพาะรูเมนของโคในอาหารสูตร 1 มีปริมาณ VFA ที่มากกว่าอาหารสูตรอื่น และการตอบสนองของแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* น้อยกว่าสูตรอื่นและนอกจากนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากระยะเวลาในการเลี้ยงโคแต่ละสูตรใช้เวลาเพียง 10 วันเท่านั้นซึ่งอาจจะเป็นระยะเวลาที่สั้นในการปรับตัวของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนต่อการปรับเปลี่ยนสูตรอาหารที่โคกินเข้าไป ปกติการศึกษการเปลี่ยนแปลงชนิด กลุ่มของแบคทีเรีย และ VFA ในการให้อาหารที่มีสูตรแตกต่างกันเพื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงโค มักจะใช้ระยะเวลาในการศึกษาอาหารแต่ละสูตร 21-28 วัน ในการตอบสนองของแบคทีเรียและการผลิต VFA ในการให้อาหารสูตรต่างๆ (Tajima, 2001 and Vinh, 2011)

Total bacteria หรือแบคทีเรียทั้งหมด ที่ใช้ universal bacteria primer และ probe BAC338F; 5'-ACTCCTACGGGAGGCAG-3', BAC805R; 5'-GACTACCAGGGTATCTAATC-C-3' และ BACProbe; 5'-TGCCAGCAGCCGCGGTAATAC-3' (Yu et al., 2005) โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* K-12 substr. MG1655 ที่มีจำนวนจีโนมขนาด 4,639,221 (Okano et al., 2003) มาคำนวณจำนวนปริมาณจีโนมของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Escherichia coli* (DMST12743) เป็นเชื้อมาตรฐาน จากผลการทดลองดังแสดงในตาราง 27 และภาพ 29 พบว่าปริมาณของ Total bacteria มีปริมาณที่น้อยกว่าผลรวมของแบคทีเรียทั้ง 3 กลุ่มที่ศึกษา ซึ่งเป็นไปไม่ได้ที่ Total

bacteria จะมีปริมาณน้อยกว่ากลุ่มแบคทีเรียที่ศึกษา ดังนั้นจากผลการศึกษา Total bacteria ทำให้ทราบว่าในการศึกษาค้างนี้ไม่สามารถนำเชื้อแบคทีเรีย *Escherichia coli* (DMST12743) มาใช้เป็นตัวแทนในการศึกษา Total bacteria ได้ แม้ก่อนหน้านี้จะมีรายงานการวิจัยการนำ *Escherichia coli* มาใช้เป็นเชื้อมาตรฐานในการศึกษา Total bacteria (Okano et al., 2003 and Castillo et al., 2006) ก็ตาม แต่ในการศึกษาค้างนี้ก็ไม่สามารถนำมาใช้เป็นตัวแทนได้ ซึ่งการศึกษาค้างนี้มีข้อผิดพลาดในการศึกษา Total bacteria เนื่องจากไม่ได้มีการนับเซลล์แบคทีเรียทั้งหมดไว้ โดยปกติการศึกษา Total bacteria ส่วนใหญ่จะใช้วิธีการนับ viable count ซึ่งจากรายงานวิจัยก่อนหน้านี้ก็มีการใช้ DAPI staining method ในการนับ Total bacteria ร่วมกับการวิเคราะห์แบคทีเรียที่เราสนใจ (Matsuki et al., 2004) หรืออาจจะใช้วิธี roll-tube technique ในการหาวิเคราะห์หาปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมด (Wanapat et al., 2009 and Vinh et al., 2011) ดังนั้นข้อผิดพลาดดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการพัฒนาการศึกษาแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนของโคในส่วน of total bacteria ต่อไป

ดังนั้นจากผลงานวิจัยการศึกษานิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในรูเมนโดยวิธีทางด้านชีววิทยาโมเลกุล ในการหาลำดับเบสของยีนส่วน 16S rDNA และการตรวจติดตามแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนด้วยเทคนิค real-time PCR ค้างนี้สามารถนำข้อมูลแบคทีเรียที่ได้เป็นความรู้พื้นฐานเพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาอาหารของโค และเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตโคเพิ่มมากขึ้นต่อไป และนอกจากนี้ยังสามารถนำข้อมูลที่ได้จากการศึกษาไปใช้ในการพัฒนาการศึกษาวิจัยต่อไป ยกตัวอย่างเช่น primer และ probe ที่ออกแบบได้สามารถนำไปพัฒนาต่อให้มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียกลุ่มเป้าหมายดังกล่าวเพิ่มมากขึ้น และข้อมูลในส่วน of แบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* สามารถนำไปใช้ในการศึกษาแบคทีเรียผลิตก๊าซมีเทนร่วมกับการวิเคราะห์ก๊าซมีเทนด้วยวิธีทางเคมีและการคำนวณ ในการศึกษาการให้อาหารโคต่อไปได้ เป็นต้น

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

ลำดับเบสของยีนส่วน 16S rRNA ที่แยกได้จากของเหลวในกระเพาะรูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian ทั้งสิ้น 69 โคลน เมื่อนำมาทำการหาชนิดและความหลากหลายของแบคทีเรียโดยเปรียบเทียบความเหมือนด้วยโปรแกรม BLASTN ของ The National Center for Biotechnology Information (NCBI, USA) พบว่าผลการวิเคราะห์เป็นแบคทีเรีย uncultured หรือแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงไม่ได้ จำนวน 42 โคลน และแบคทีเรีย cultured หรือแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จำนวน 27 โคลน โดยพบว่าในจำนวน cultured bacteria 27 โคลนประกอบด้วยแบคทีเรีย *Butyrivibrio fibrisolvens* (RB65), *Fibrobacter succinogenes* (RB10), *Treponema bryantii* (RB34), *Succinoclasticum ruminis* (RB30) and *Prevotella ruminicola* (RB9, RB18), *Paraprevotella clara* (RB51), *Prevotella ruminicola* (RB5, RB7, RB23, RB20, RB39, RB60, RB63), *Prevotella brevis* (RB67), *Desulfotomaculum* sp. (RB66), *B. fibrisolvens* (RB58), *Eubacterium ruminantium* (RB12, RB55), *Succinoclasticum ruminis* (RB2, RB56), *Pseudobutyrvibrio ruminis* (RB46), *Firmicutes* sp. (RB41), *Victivallaceae bacterium* (RB25), *Eubacterium oxidoreducens* (RB16, RB17) และ *Ruminococcus flavefaciens* (RB3) จากนั้นเมื่อนำลำดับเบสจากฐานข้อมูล GenBank จำนวน 74 ชนิด ที่ทราบชนิดแล้วโดยแบคทีเรียเหล่านี้เป็นแบคทีเรียที่ส่วนใหญ่พบในกระเพาะรูเมน พร้อมกับ 69 โคลนที่ได้ มาทำ phylogenetic tree เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน พบว่าในกระเพาะรูเมนสามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียได้ทั้งสิ้น 7 กลุ่ม ประกอบด้วยกลุ่มใหญ่ 2 กลุ่มคือ Low G+C Gram-positive bacteria (LGCGPB) เป็นจำนวน 43.5% ของโคลนทั้งหมด และกลุ่ม *Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides* เป็นจำนวน 37.7% ของโคลนทั้งหมด และแบคทีเรียกลุ่มย่อย 5 กลุ่มคือ *Proteobacteria* เป็นจำนวน 7.3% ของโคลนทั้งหมด, *Rhodopirellula* เป็นจำนวน 5.8% ของโคลนทั้งหมด, *Victivellaceae bacterium/ Plantomycete* เป็นจำนวน 2.9% ของโคลนทั้งหมด, *Spirochaetes* เป็นจำนวน 1.4% ของโคลนทั้งหมด และ *Fibrobacteria* เป็นจำนวน 1.4% ของโคลนทั้งหมด

ทำการออกแบบ primer และ Taqman probe ที่มีความจำเพาะต่อกลุ่มแบคทีเรียที่สนใจ 3 กลุ่มคือ LGCGPB, CFB และ *Proteobacteria* เนื่องจาก LGCGPB และ CFB เป็นแบคทีเรียกลุ่มหลักที่ทำหน้าที่ในการย่อยสลายเชื้อในกระเพาะรูเมน และแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตมีเทนและย่อยสลาย fumarate ทำให้การผลิตมีเทนเพิ่มมากขึ้นซึ่งก๊าซมีเทนเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่ง primer และ TaqMan probe ที่ออกแบบได้มีลำดับเบสดังนี้กลุ่ม

LGCGBP ประกอบด้วย LGC907F; 5'-AAACTCAAAGGAATTGACGGGR-3', LGC1102R; 5'-TTGCRGGACTTAACCYAACAT-3' และ LGCProbe; 5'-ACAGGTGGTGCATGGYTGTCTGTCAGCTC-3' กลุ่ม CFB ประกอบด้วย CFB287F; 5'-TAGGGGTTCTGAGAGGAAGGY-3', CFB705R; 5'-ATCTAWGCATTTTCACCGCTACAY-3' และ CFBProbe; 5'-CTACGGGAGGC-AGCAGTGAGGAATATTGGT-3' และกลุ่ม *Proteobacteria* ประกอบด้วย PRO937F; 5'-AAGCRGTGGAKBATGKGTTTAAT-3', PRO1102R; 5'-TTRCRGGACTTAACCYAACAT-3' และ PROProbe; 5'-CTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGTG-3' เมื่อทำการทดสอบคุณสมบัติและความจำเพาะของ primer และ TaqMan probe ด้วยวิธีทางโปรแกรมคอมพิวเตอร์คือโปรแกรม Probe match ของ Ribosomal Database Project (RDP) (<http://rdp.cme.msu.edu/>) และด้วยการทดสอบโดยใช้เทคนิค conventional PCR และ real-time PCR แล้ว primer และ TaqMan probe สามารถ detect กลุ่มเป้าหมายได้แค่ primer และ TaqMan probe ของแบคทีเรียกลุ่ม LGCGBP สามารถ detect ได้สองกลุ่มคือ LGCGBP และ *Proteobacteria* ดังนั้น เมื่อได้ปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* แล้วสามารถนำมาหักลบเพื่อให้ได้ทราบปริมาณคร่าวๆ ของแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* ได้ เมื่อทำการเลี้ยงโคด้วยอัตราส่วนอาหารข้นและอาหารหยาบต่างกัน 4 สูตร คือ 0:100, 20:80, 40:60 และ 60:40 ตามลำดับ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหารของโค โดยทำการเพาะเลี้ยงแต่ละสูตรเป็นระยะเวลา 10 วัน เก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนมาทำการวิเคราะห์ VFA และ ปริมาณของแบคทีเรีย 3 กลุ่มเป้าหมายที่สนใจ พบว่าอาหารสูตรที่ 1 ที่ประกอบด้วยฟางข้าว 100% มีปริมาณ VFA มากที่สุด และปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม LGCGBP และ CFB ไม่มีความแตกต่างกันมากในอาหารทั้ง 4 สูตร แต่แบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* พบว่าในอาหารสูตรที่ 1 มีปริมาณน้อยที่สุด เพราะเนื่องจาก *Proteobacteria* เป็นแบคทีเรียกลุ่ม ย่อยสลาย fumarate และผลิตก๊าซมีเทน ปกติทั่วไปแบคทีเรียกลุ่มก๊าซมีเทนจะมีเพิ่มมากขึ้นและการผลิตก๊าซมีเทนมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นในกระเพาะรูเมนเมื่อโคกินอาหารที่มีพวกเชื้อยีสต์ ดังนั้นในอาหารสูตรที่ 1 จึงมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* ที่ผลิตก๊าซมีเทนน้อยเพราะอาหารสูตรที่ 1 เป็นอาหารที่เป็นเชื้อยีสต์ 100% และเมื่อเราทำการเพิ่มปริมาณอาหารข้นเพิ่มมากขึ้นตั้งแต่ สูตร 2-4 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* ก็มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นตามลำดับการเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนอาหารข้น จากผลการศึกษารั้วนี้สามารถนำ ข้อมูลพื้นฐานทางด้านแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนไปใช้เป็นพื้นฐานในการศึกษาเพื่อประโยชน์การย่อยอาหารของโค นอกจากนี้ primer และ TaqMan probe ที่ออกแบบได้สามารถนำไปใช้ในการพัฒนาความจำเพาะให้เพิ่มมากขึ้น และสามารถนำไปใช้ในการตรวจติดตามแบคทีเรียที่มีอยู่จริงในกระเพาะรูเมนได้ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการย่อยอาหารของโค โดยเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* ที่เป็นแบคทีเรียที่ผลิตก๊าซมีเทน

บรรณานุกรม

- กฤษ อังคนาพร. 2547. สรีรวิทยาของกระเพาะอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง. กรุงเทพฯ: ภาควิชา
สรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. น. 39, 40, 61-76.
- เจษฎา เต็มดวงบริพันธ์. 2545. ระบบวิทยาและวงศ์วานวิวัฒนาการ (systematics and phylogeny)
เปิดโลกทัศน์ใหม่ทางชีววิทยา. วารสารวิทยาศาสตร์ 56, 3: 168-175.
- เทอดชัย เวียรศิลป์. 2548. โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง. พิมพ์ครั้งที่ 5. เชียงใหม่:
ภาควิชาสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. น. 74.
- บุญล้อม ชีวอิสระกุล. 2527. โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง (RUMINANT NUTRITION).
เชียงใหม่: ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
น. 106-137.
- บุญล้อม ชีวอิสระกุล. 2541. โภชนศาสตร์สัตว์. เชียงใหม่: ภาควิชาสัตวศาสตร์
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 170 น.
- ปราโมช ศีตะโกเศศ. 2543. การผลิตโคนมและโคเนื้อ. เชียงใหม่: ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว์
คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้. น. 101-134.
- พานิช ทินนิมิตร. 2512. อาหารและการให้อาหารสัตว์. นครศรีธรรมราช: วิทยาลัยเกษตรกรรม
นครศรีธรรมราช. น. 98-106.
- เมธา วรรณพัฒน์. 2529. โภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง. ขอนแก่น: ภาควิชาสัตวศาสตร์
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. น. 11-12, 93.
- วิบูลย์ศักดิ์ กาวิละ และณณณิน โอภาสพัฒนกิจ. 2534. การผลิตโคนม. กรุงเทพฯ: ภาควิชาผลิตโคนม
ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง. น. 48.
- วิโรจน์ ภัทรจินดา. 2546. โคนม (Dairy Cattle). พิมพ์ครั้งที่ 2. ขอนแก่น: ภาควิชาสัตวศาสตร์
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. น. 195-231.
- สุกัญญา สุนทรส และวิเชียร ริมพนิชขกิจ. 2547. ชีวโมเลกุล. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 98-100 น.
- สมชาย แสงอำนาจเดช. 2008. ขั้นตอนง่ายๆ ในการสร้างไฟโลจีนีติกทรี Sample step in
reconstruction of phylogenetic tree. Naresuan University Journal 16: 181-
188.

อโนทัย โกศาภิรักษ์. 2549. **Introduction to Real time-PCR and Its Applications**. สงขลา: ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ABgene® Nucleic Acid Amplification. 2011. **Designing Dual Labelled Probes**. [Online].

Available <http://www.abgene.com> (14/11/2011).

An, Dengdi., Dong, X. and Dong, Z. 2005. Prokaryote diversity in the rumen of yak (*Bos grunniens*) and Jinnan cattle (*Bos taurus*) estimated by 16S rDNA homology analyses. **Anaerobe** 11: 207–215.

Amann, R.L., Ludwig, W. and Bryant, M.P. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. **Microbiological Reviews** 59: 143-149.

Asanuma, N., Iwamoto, M. and Hino, T. 1999. Effect of the addition of fumarate on methane production by ruminal microorganisms in vitro. **Journal of Dairy Science** 82:780–787.

Chenna, R., Sugawara, H., Koike, T., Lopez, R., Gibson, T.J., Higgins, D.J., and Thompson, J.D. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. **Nucleic Acids Research** 31: 3497–3500.

Castillo, M., Martín-Orue, S.M., Manzanilla, E.G., Badiola, I., Martín, M. and Gasa, J. 2006. Quantification of total bacteria, enterobacteria and lactobacilli populations in pig digesta by real-time PCR. **Veterinary Microbiology** 114: 165–170.

Daniel, A.S., Martin, J., Vanat, I., Whitehead, T.R. and Flint, H.J. 1995. Expression of a cloned cellulose/xylanase gene from *Prevotella ruminicola* in *Bacteroides vulgatus*, *Bacteroides uniformis* and *Prevotella ruminicola*. **Applied Bacteriology** 79: 417-424.

Edwards, J.E., Neil, R., McEwan, Anthony, J. Travis and Wallace, R.J. 2004. 16S rDNA library-based analysis of ruminal bacterial diversity. **Antonie van Leeuwenhoek** 86: 263–281.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution** 39: 783–791.

Genome Atlas Database (GBS). 2012. **5 most recently added genomes**. [Online]. Available <http://www.cbs.dtu.dk/services/GenomeAtlas/> (20/07/2012).

- Harms, G., Layton, A.C., Dionisid, H.M., Gregory, I.R., Garrett, V.M., Hawkins, S.A., Robinson, K.G. and Sayler, G.S. 2003. Real-time PCR quantification of nitrifying bacteria in a municipal wastewater treatment plant. **Environmental Science and Technology** 37: 343-351.
- Hastie1, P.M., Mitchell, K. and Murray, Jo-Anne M.D. 2008. Semi-quantitative analysis of *Ruminococcus flavefaciens*, *Fibrobacter succinogenes* and *Streptococcus bovis* in the equine large intestine using real-time polymerase chain reaction. **British Journal of Nutrition** 100: 561–568.
- Hattori, K. and Matsui, H. 2008. Diversity of fumarate reducing bacteria in the bovine rumen revealed by culture dependent and independent approaches. **Anaerobe** 14: 87–93.
- Invitrogen™. 2009. **Express qPCR SuperMixes and Two-Step qPT-PCR Kits**, User Manual. Munual part no. A10329.
- Joblin KN. 1997. **Interactions between ruminal fibrolytic bacteria and fungi**. In: Onodera R, Itabashi H, Ushida K, Yano H, Sasaki Y (eds) *Rumen microbes and digestive physiology in ruminants*. Basel: S. Karger, pp 152-177.
- Kamra, D. N. 2005. **Rumen microbial ecosystem**. Microbiology Section. Centre of Advanced Studies in Animal Nutrition. Indian Veterinary Research Institute, India. 124-135.
- Kimura, M. 1980. A simple model for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of molecular Evolution** 16: 111–120.
- Kirchgeßner, M., W. Windisch, and H. L. Muller. 1995. **Nutritional factors for the quantification of methane production**. pp. 333–348. In: *Ruminant Physiology: Digestion, Metabolism, Growth and Reproduction*. W. A. Engelhardt, S. Leonhard-Marek, mG. Breves, and D. Giesecke. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, Germany.
- Koike, S., Yoshitani, S., Kobayashi, Y. and Tanaka, K. 2003. Phylogenetic analysis of fiber-associated rumen bacterial community and PCR detection of uncultured bacteria. **FEMS Microbiology** 229: 23-30.

- Koike, S., Handa, Y., Goto, H., Sakai, K., Miyagawa, E., Matsui, H., Ito, S. and Kobayashi, Y. 2010. Molecular monitoring and isolation of previously uncultured bacterial strains from sheep rumen. **Applied and Environmental Microbiology** 1887-1894.
- Kocherginskaya, S.A., Aminov, R.I., and White. 2001. Analysis of the rumen bacterial diversity under two different diet conditions using denaturing gradient gel electrophoresis, random sequencing, and statistical ecology approaches. **Anaerobe** 7: 119-134.
- Krause, D.O. and Russell, J.B. 1996. How many ruminal bacteria are there? **Journal of Dairy Science** 79:1467-1475.
- Krause, D.O., Denman, S.E., Mackie, R.I., Morrison, M., Rae, A.L., Attwood, G.T. and McSweeney, C.S. 2003. Opportunities to improve fiber degradation in the rumen: microbiology, ecology, and genomics. **FEMS Microbiology Reviews** 27: 663-693.
- Kutyavin, I.V., Afonina, I.A., Mills, A., Gorn, V.V., Lukhtanov, E.A., Belousov, E.S., Singer, M.J., Walburger, D.K., Lokhov, S.G., Gall, A.A., Dempcy, R., Reed, M.W., Meyer, R.B., Hedgpeth, J. 2000. 3V-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. **Nucleic Acids Res** 28: 655- 661.
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L. and Pace, N.R. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America** 82: 6955-6959.
- Lopez, S., Valdes, C., Newbold, C.J. and Wallace, R.J. 1999. Influence of sodium fumarate addition on rumen fermentation in vitro. **British Journal of Nutrition** 81:59-64.
- Mitsumori, M., Ajisaka, N., Tajima, K., Kajikawa, H. and Kurihara, M. 2002. Detection of *Proteobacteria* from the rumen by PCR using methanotroph-specific primers. **Letters in Applied Microbiology** 35: 251-255.

- Moss, A.R., Jouany, J.P. and Newbold, J. 2000. Methane production by ruminants: its contribution to global warming. **Annales De Zootechnie** 49: 231–253.
- Murrell, J.C. and Radajewski, S. 2000. Mini-review: Cultivation-independent techniques for studying methanotroph ecology. **Research in Microbiology** 151: 807–814.
- Matsuki, T., Watanabe, K., Fujimoto, J., Takada, T. and Tanaka, R. 2004. Use of 16S rRNA gene-targeted group-specific primers for real-time PCR analysis of predominant bacteria in human feces. **Applied and Environmental Microbiology** 70: 7220–7228.
- Newbold, C.J., Lopez, S., Nelson, N., Ouda, J.O., Wallace, R.J. and Moss, A.R. 2005. Propionate precursors and other metabolic intermediates as possible alternative electron acceptors to methanogenesis in ruminal fermentation in vitro. **British Journal of Nutrition** 94: 27–35.
- Nonnenmachera, C., Dalpkea, A., Muttersa, R. and Heegb K. 2004. Quantitative detection of periodontopathogens by real-time PCR. **Journal of Microbiological Methods** 59: 117–125.
- Okano, Y., Hristova, K.R., Leutenegger, C.M., Jackson, L.E., Denison, R.F., Gebreyesus, B., Lebauer, D. and Scow, K.M. 2003. Application of real-time PCR to study effects of ammonium on population size of ammonia-oxidizing bacteria in soil. **Applied and Environmental Microbiology** 70: 1008–1016.
- Owczarzy, R., Tataurov, A.V., Wu, Y., Manthey, J.A., McQuisten, K.A., Almabrazi, H.G., Pedersen, K.F., Lin, Y., Garretson, J., McEntaggart, N.O., Sailor, C.A., Dawson R.B. and Peek, A.S. 2008. IDT SciTools: a suite for analysis and design of nucleic acid oligomers. **Nucleic Acids Research** 36: W163–W169.
- Petti, C.A., Polage, C.R. and Schreckenberger, P. 2005. The role of 16S rRNA gene sequencing in identification of microorganisms misidentified by conventional methods. **Journal of Clinical Microbiology** 43: 6123–6125.
- Preston, T.R. and R.A. Leng. 1987. **Matching ruminant production system with available resources in the tropics and sub-tropics**. Armidale NSW: Renambul Books. 245 p.

- Robin, R.G. 1993. Collection of small subunit (16S- and 16S-like) ribosomal RNA structures. **Nucleic Acids Research** 21: 3051-3054.
- Rousselon, N., Delgenes, J.P. and Godon, J.J. 2004. A new real time PCR (TaqManR PCR) system for detection of the 16S rDNA gene associated with fecal bacteria. **Journal of Microbiological Methods** 59: 15– 22.
- Sadet-Bourgeteau, S., Martin, C. and Morgavi, D.P. 2010. Bacterial diversity dynamics in rumen epithelium of wethers fed forage and mixed concentrate forage diets. **Veterinary Microbiology** 146: 98–104.
- Schena, L., Nigro, F., Ippolito, A. and Gallitelli, D. 2004. Real-time quantitative PCR: a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. **European Journal of Plant Pathology** 110: 893–908.
- Shinkai, T. and Kobayashi, Y. 2007. Localization of ruminal cellulolytic bacteria on plant fibrous materials as determined by fluorescence *in situ* hybridization and real-time PCR. **Applied and Environmental Microbiology** 73(5): 1646-1652.
- Shin, E.C., Choi, B.R., Lim, W.J., Hong, S.Y., An, C.L., Cho, K.M., Kim, Y.K., An, J.M., Kang, J.M., Lee, S.S., Kim, H., Yun, H.D. 2004. Phylogenetic analysis of archaea in three fractions of cow rumen based on the 16S rDNA sequence. **Anaerobe** 10: 313–319.
- Spinhime, J.P., Koziel, J. A., Chirase, N. K. 2003. Characterizing volatile fatty acid and other gases in a rumen closed in vitro fermentation system using solid phase microextraction. **Agricultural Engineers** 46: 585–588.
- Szymanski, M., Barciszewska, M.Z., Erdmann, V.A. and Barciszewski, J. 2003. 5S rRNA: structure and interactions. **Biochemical Journal** 371: 641-651.
- Tajima, K., Aminov, R.I., Nagamine, T., Ogata, K., Nakamura, M., Matsui, H. And Benno, Y. 1999. Rumen bacterial diversity as determined by sequence analysis of 16S rDNA libraries. **FEMS Microbiology Ecology** 29: 159-169.
- Vinh, N.T., Wanapat, M., Khejomsart, P. and Kongmun, P. 2011. Studies of diversity of rumen microorganisms and fermentation in swamp buffalo fed different diets. **Animal and Veterinary Advances** 10: 406-414.

- Wanapat, M. and Rowlinson, P. 2007. Nutrition and feeding of swamp buffalo: feed resources and rumen approach. **Italian Journal of Animal Science** 6: 67-73.
- Wanapat, M., Pilajun, R. and Kongmun, P. 2009. Ruminal ecology of swamp buffalo as influenced by dietary sources. **Animal Feed Science and Technology** 151: 205–214.
- Whitford, M.F., Forster, R.J., Beard, C.E., Gong, J. and Teather, R.M. 1998. Phylogenetic analysis of rumen bacteria by comparative sequence analysis of cloned 16S rRNA genes. **Anaerobe** 4: 153-163.
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., and Lane, D.J. 1991. 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. **Journal of Bacteriology** 173: 697-703.
- Yang, S., M, Songcheng., Chen, J., M, Huaming., H, Yiduo., X, Dongmei., Yang, L., H, Tianbao. and Deng W. 2010. Bacterial diversity in the rumen of Gayals (*Bos frontalis*), Swamp buffaloes (*Bubalus bubalis*) and Holstein cow as revealed by cloned 16S rRNA gene sequences. **Springer Science+Business Media B.V.** 37: 2063–2073.
- Yang, L. Y., Chen, J., Cheng, X. L., Xi, D. M., Yang, S. L., Deng, W. D., Mao, H. M. 2010. Phylogenetic analysis of 16S rRNA gene sequences reveals rumen bacterial diversity in Yaks (*Bos grunniens*). **Springer Science+Business Media B.V.** 37: 553–562.
- Yu, Y., Lee C., Kim, J. and Hwang, S. 2005. Group-specific primer and probe sets to detect methanogenic communities using quantitative real-time polymerase chain reaction. **Biotechnology and Bioengineering** 89: 670-679.



ภาคผนวก ก

ปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานและเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างกระเพาะ
รูเมนที่ให้อาหารสูตรแตกต่างกัน ที่วัดได้จากเครื่องปริมาณดีเอ็นเอรุ่น Nano Drop 2000c
spectrophotometer

ตารางภาคผนวก 1 ผลการวัดปริมาณความเข้มข้นดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียมาตรฐานและเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนที่ให้อาหารสูตรแตกต่างกัน ที่วัดได้จากเครื่องปริมาณดีเอ็นเอรุ่น Nano Drop 2000c spectrophotometer

ลำดับ	Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Average	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
1	W1-1 (1)	27	26.3	ng/μl	0.54	0.324	1.66	0.82	DNA	50
2	W1-1 (2)	25.6		ng/μl	0.512	0.301	1.7	0.83	DNA	50
3	W1-2 (1)	38.5	37.85	ng/μl	0.771	0.456	1.69	0.82	DNA	50
4	W1-2 (2)	37.2		ng/μl	0.745	0.439	1.7	0.85	DNA	50
5	W1-3 (1)	28.7	28.7	ng/μl	0.573	0.318	1.8	0.98	DNA	50
6	W1-3 (2)	28.7		ng/μl	0.574	0.319	1.8	0.95	DNA	50
7	B1-1 (1)	61.6	61.7	ng/μl	1.232	0.701	1.76	1.14	DNA	50
8	B1-1 (2)	61.8		ng/μl	1.236	0.695	1.78	1.14	DNA	50
9	B1-2 (1)	57.7	58.45	ng/μl	1.154	0.635	1.82	1.13	DNA	50
10	B1-2 (2)	59.2		ng/μl	1.183	0.659	1.79	1.09	DNA	50
11	B1-3 (1)	102.1	103.3	ng/μl	2.041	1.143	1.79	1.06	DNA	50
12	B1-3 (2)	104.5		ng/μl	2.091	1.19	1.76	1.05	DNA	50
13	W2-1 (1)	78.2	78.7	ng/μl	1.563	0.794	1.97	1.55	DNA	50
14	W2-1 (2)	79.2		ng/μl	1.584	0.806	1.97	1.59	DNA	50

ตารางภาคผนวก 1 (ต่อ)

ลำดับ	Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Average	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
15	W2-2 (1)	108	105.45	ng/μl	2.16	1.082	2	1.78	DNA	50
16	W2-2 (2)	102.9		ng/μl	2.058	1.037	1.98	1.75	DNA	50
17	W2-3 (1)	115.4	116.3	ng/μl	2.308	1.184	1.95	1.62	DNA	50
18	W2-3 (2)	117.2		ng/μl	2.345	1.21	1.94	1.59	DNA	50
19	B2-1 (1)	100.6	100.35	ng/μl	2.013	1.025	1.96	1.67	DNA	50
20	B2-1 (2)	100.1		ng/μl	2.003	1.023	1.96	1.65	DNA	50
21	B2-2 (1)	124.7	124.95	ng/μl	2.493	1.295	1.92	1.6	DNA	50
22	B2-2 (2)	125.2		ng/μl	2.504	1.299	1.93	1.61	DNA	50
23	B2-3 (1)	87.8	87.2	ng/μl	1.755	0.986	1.78	1.33	DNA	50
24	B2-3 (2)	86.6		ng/μl	1.731	0.967	1.79	1.35	DNA	50
25	W3-1 (1)	64.2	63.65	ng/μl	1.285	0.678	1.89	1.4	DNA	50
26	W3-1 (2)	63.1		ng/μl	1.263	0.67	1.88	1.42	DNA	50
27	W3-2 (1)	143	142.15	ng/μl	2.861	1.449	1.97	1.65	DNA	50
28	W3-2 (2)	141.3		ng/μl	2.825	1.437	1.97	1.7	DNA	50
29	W3-3 (1)	127	127.1	ng/μl	2.54	1.287	1.99	1.74	DNA	50
30	W3-3 (2)	127.2		ng/μl	2.554	1.274	2	1.74	DNA	50

ตารางภาคผนวก 1 (ต่อ)

ลำดับ	Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Average	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
31	B3-1 (1)	80.5	79.5	ng/μl	1.61	0.825	1.95	1.55	DNA	50
32	B3-1 (2)	78.5		ng/μl	1.57	0.806	1.95	1.56	DNA	50
33	B3-2 (1)	131.8	131.7	ng/μl	2.636	1.326	1.99	1.68	DNA	50
34	B3-2 (2)	131.6		ng/μl	2.633	1.323	1.99	1.67	DNA	50
35	B3-3 (1)	105.9	105.15	ng/μl	2.117	1.12	1.89	1.23	DNA	50
36	B3-3 (2)	104.4		ng/μl	2.088	1.108	1.89	1.22	DNA	50
37	W4-1 (1)	86.4	86.45	ng/μl	1.728	0.879	1.96	1.51	DNA	50
38	W4-1 (2)	86.5		ng/μl	1.73	0.886	1.95	1.5	DNA	50
39	W4-2 (1)	117.6	117.75	ng/μl	2.352	1.212	1.94	1.37	DNA	50
40	W4-2 (2)	117.9		ng/μl	2.357	1.214	1.94	1.38	DNA	50
41	W4-3 (1)	76.5	77.95	ng/μl	1.53	0.849	1.8	1.17	DNA	50
42	W4-3 (2)	79.4		ng/μl	1.587	0.874	1.82	1.17	DNA	50
43	B4-1 (1)	98.5	98.3	ng/μl	1.971	1.001	1.97	1.57	DNA	50
44	B4-1 (2)	98.1		ng/μl	1.961	1.006	1.95	1.55	DNA	50
45	B4-2 (1)	150.8	150.4	ng/μl	3.016	1.501	2.01	1.56	DNA	50
46	B4-2 (2)	150		ng/μl	3	1.49	2.01	1.56	DNA	50

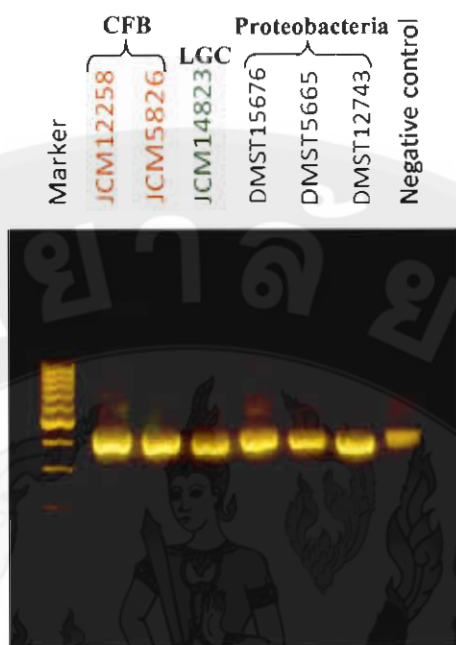
ตารางภาคผนวก 1 (ต่อ)

ลำดับ	Sample ID	Nucleic Acid Conc.	Average	Unit	A260	A280	260/280	260/230	Sample Type	Factor
47	B4-3 (1)	97.3	93.35	ng/μl	1.946	1.012	1.92	1.42	DNA	50
48	B4-3 (2)	97.4		ng/μl	1.948	1.015	1.92	1.41	DNA	50
49	DMST12743 (1)	70.9	71.35	ng/μl	1.419	0.702	2.02	1.63	DNA	50
50	DMST12743 (2)	71.8		ng/μl	1.435	0.709	2.02	1.69	DNA	50
51	DMST15676 (1)	365	363.55	ng/μl	7.3	3.37	2.17	2.26	DNA	50
52	DMST15676 (2)	362.1		ng/μl	7.243	3.34	2.17	2.26	DNA	50
53	DMST5665 (1)	1990	1930.45	ng/μl	39.8	18.269	2.18	2.35	DNA	50
54	DMST5665 (2)	1870		ng/μl	37.418	17.108	2.19	2.38	DNA	50
55	JCM12258 (1)	10.3	8.5	ng/μl	0.206	0.103	2	0.69	DNA	50
56	JCM12258 (2)	6.7		ng/μl	0.133	0.061	2.2	0.54	DNA	50
57	JCM5826 (1)	672.4	678.55	ng/μl	13.447	6.252	2.15	2.42	DNA	50
58	JCM5826 (2)	684.7		ng/μl	13.695	6.305	2.17	2.42	DNA	50
59	JCM14823 (1)	136.3	136.4	ng/μl	2.727	1.246	2.19	2.24	DNA	50
60	JCM14823 (2)	136.4		ng/μl	2.729	1.241	2.2	2.25	DNA	50

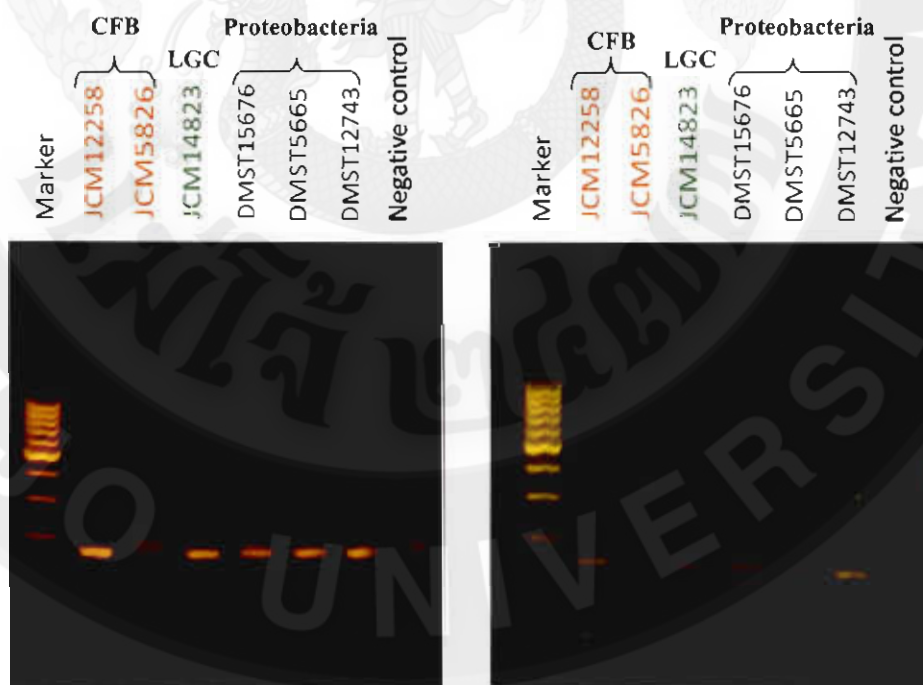


ภาคผนวก ข

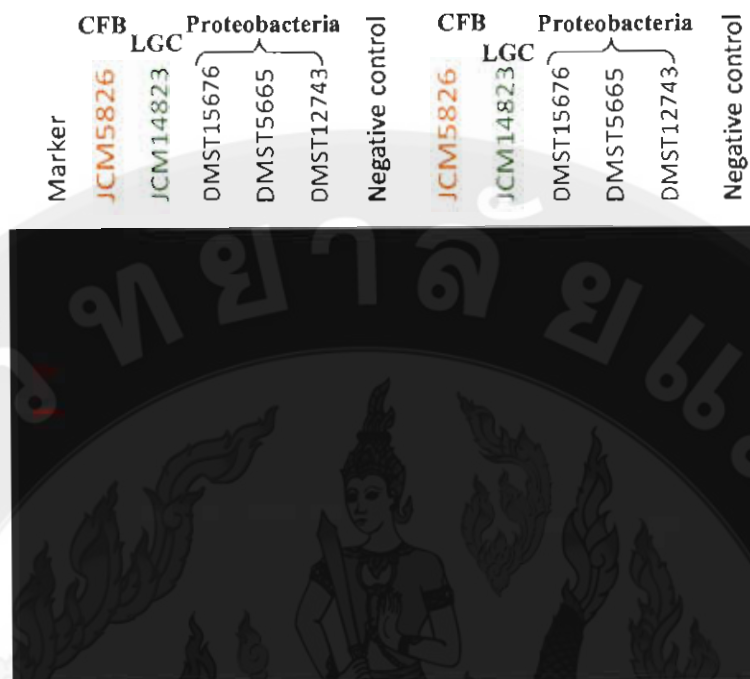
ผลการทำ gel electrophoresis ในการทดสอบ probe ด้วย real-time PCR



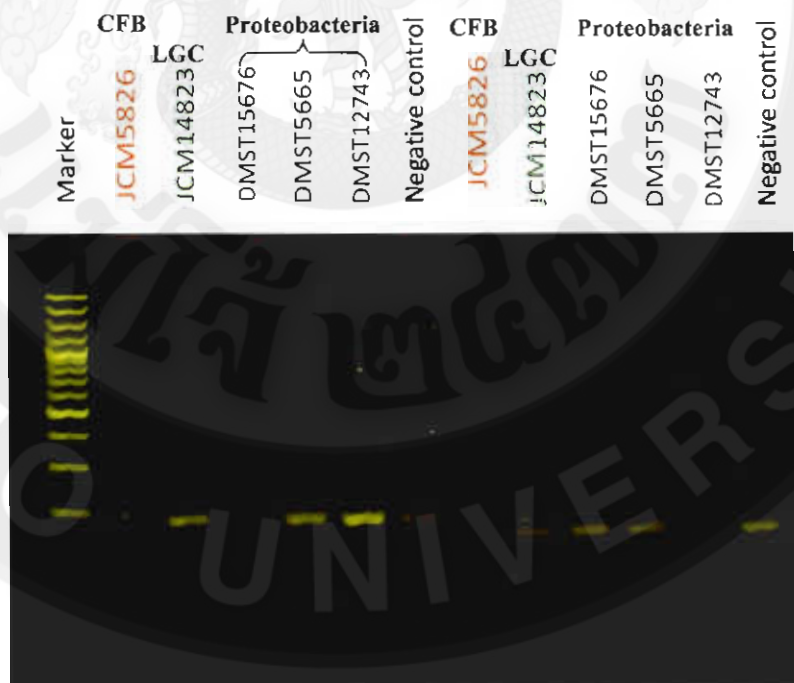
ภาพภาคผนวก 1 ผลการทำ gel-electrophoresis ในการทดสอบ probe Total Bacteria คือ BACProbe ด้วย real-time PCR



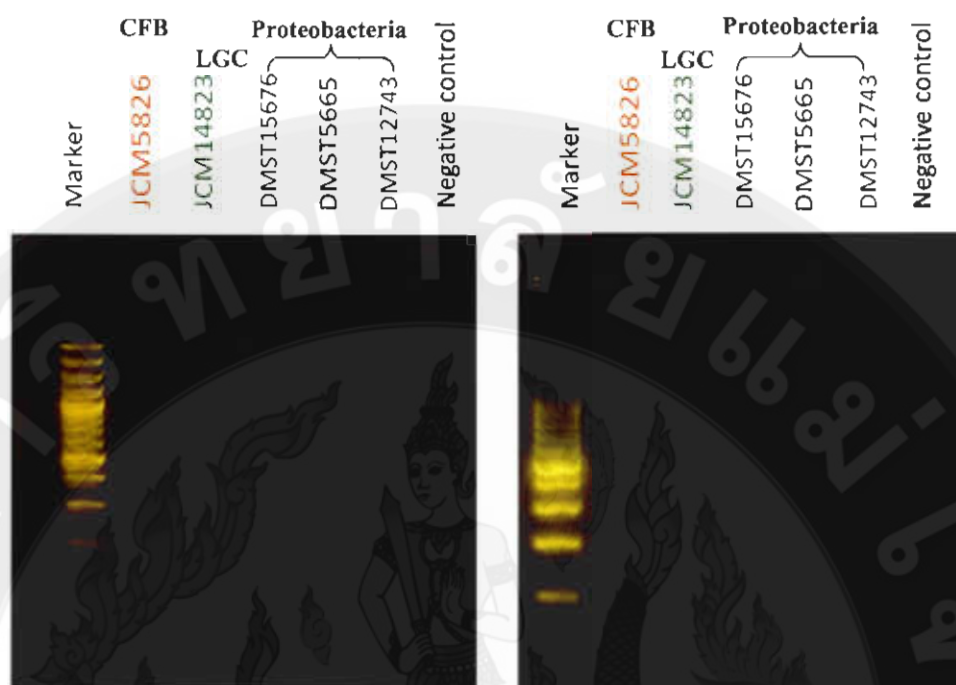
ภาพภาคผนวก 2 ผลการทำ gel-electrophoresis ในการทดสอบสถานะที่ 1 ของ LGCProbe และ PROProbe ด้วย real-time PCR



ภาพภาคผนวก 3 ผลการทำ gel-electrophoresis ในการทดสอบสถานะที่ 2 ของ LGCPProbe และ PROProbe ด้วย real-time PCR



ภาพภาคผนวก 4 ผลการทำ gel-electrophoresis ในการทดสอบสถานะที่ 3 ของ LGCPProbe และ PROProbe ด้วย real-time PCR



ภาพภาคผนวก 5 ผลการทำ gel-electrophoresis ในการทดสอบสถานะที่ 4 ของ LGCPProbe และ PROProbe ด้วย real-time PCR

ภาคผนวก ค

ข้อมูลดิบในการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียในตัวอย่างของเหลวกระเพาะรูเมนในการเลี้ยงด้วย
อัตราส่วนอาหารข้นต่ออาหารหยาบต่างกัน 4 สูตร ด้วยเครื่อง real-time PCR

ตารางภาคผนวก 2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม CFB group ด้วยเครื่อง real-time PCR

Well / Set	Dye	Content	Description	Efficiency	C(t)	copies	Avg C(t)	Max C(t)	Min C(t)	C(t) SD	Avg copies	Max copies	Min copies	copies SD	Wellset Type
New Set	FAM	Standard	e7	76.63%	13.04	1.00E+07	13	13.21	12.71	0.21	1.00E+07	1.00E+07	1.00E+07	0	Replicate
New Set 2	FAM	Standard	e6	71.84%	16.55	1.00E+06	16.64	17.48	16.08	0.61	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	0	Replicate
New Set 3	FAM	Standard	e5	70.01%	20.72	1.00E+05	20.74	21.03	20.27	0.34	1.00E+05	1.00E+05	1.00E+05	0	Replicate
New Set 4	FAM	Standard	e4	58.36%	23.7	1.00E+04	23.71	24.31	23.34	0.43	1.00E+04	1.00E+04	1.00E+04	0	Replicate
New Set 5	FAM	Standard	e3	58.48%	27.81	1000	27.8	28.1	27.38	0.31	1000	1000	1000	0	Replicate
New Set 6	FAM	Sample	w1-1	38.98%	14.29	4.50E+06	14.39	14.92	13.87	0.53	4.44E+06	5.86E+06	3.03E+06	1.42E+06	Replicate
New Set 7	FAM	Sample	w1-2	51.80%	14.71	3.46E+06	14.74	15.01	14.48	0.27	3.43E+06	4.00E+06	2.86E+06	5.66E+05	Replicate
New Set 8	FAM	Sample	w1-3	70.84%	14.15	4.89E+06	14.17	14.31	14.03	0.14	4.86E+06	5.28E+06	4.45E+06	4.14E+05	Replicate
New Set 9	FAM	Sample	w2-1	105.61%	14.05	5.23E+06	14.05	14.1	13.99	0.06	5.24E+06	5.43E+06	5.05E+06	1.93E+05	Replicate
New Set 10	FAM	Sample	w2-2	97.75%	14.12	4.98E+06	14.11	14.3	13.93	0.19	5.05E+06	5.64E+06	4.46E+06	5.87E+05	Replicate
New Set 11	FAM	Sample	w2-3	121.04%	13.91	5.69E+06	13.91	14.01	13.8	0.1	5.73E+06	6.09E+06	5.36E+06	3.65E+05	Replicate
New Set 12	FAM	Sample	w3-1	127.84%	13.33	8.21E+06	13.35	13.6	13.1	0.25	8.18E+06	9.46E+06	6.91E+06	1.28E+06	Replicate
New Set 13	FAM	Sample	w3-2	161.26%	13.77	6.22E+06	13.77	13.83	13.72	0.06	6.22E+06	6.44E+06	6.01E+06	2.15E+05	Replicate
New Set 14	FAM	Sample	w3-3	90.95%	13.26	8.56E+06	13.29	13.53	13.06	0.23	8.47E+06	9.71E+06	7.24E+06	1.24E+06	Replicate
New Set 15	FAM	Sample	w4-1	87.84%	13.22	8.80E+06	13.25	13.47	13.03	0.22	8.70E+06	9.88E+06	7.53E+06	1.18E+06	Replicate
New Set 16	FAM	Sample	w4-2	114.00%	14.3	4.48E+06	14.3	14.36	14.24	0.06	4.47E+06	4.64E+06	4.30E+06	1.70E+05	Replicate
New Set 17	FAM	Sample	w4-3	106.01%	14.03	5.29E+06	14.03	14.03	14.03	0	5.29E+06	5.29E+06	5.29E+06	1753	Replicate
New Set 18	FAM	Sample	b1-1	85.98%	15.05	2.80E+06	15.03	15.15	14.91	0.12	2.84E+06	3.05E+06	2.62E+06	2.12E+05	Replicate
New Set 19	FAM	Sample	b1-2	92.99%	14.62	3.65E+06	14.63	14.78	14.47	0.15	3.66E+06	4.01E+06	3.31E+06	3.50E+05	Replicate
New Set 20	FAM	Sample	b1-3	105.91%	15.3	2.39E+06	15.3	15.36	15.25	0.06	2.39E+06	2.47E+06	2.30E+06	8.36E+04	Replicate

ตารางภาคผนวก 2 (ต่อ)

Well / Set	Dye	Content	Description	Efficiency	C(t)	copies	Avg C(t)	Max C(t)	Min C(t)	C(t) SD	copies				Wellset Type
											Avg copies	Max copies	Min copies	SD	
New Set 21	FAM	Sample	b2-1	112.08%	14.55	3.83E+06	14.55	14.61	14.49	0.06	3.82E+06	3.97E+06	3.68E+06	1.48E+05	Replicate
New Set 22	FAM	Sample	b2-2	88.36%	13.63	6.81E+06	13.66	13.98	13.34	0.32	6.80E+06	8.14E+06	5.46E+06	1.34E+06	Replicate
New Set 23	FAM	Sample	b2-3	104.11%	12.92	1.06E+07	12.88	13.09	12.67	0.21	1.10E+07	1.24E+07	9.55E+06	1.43E+06	Replicate
New Set 24	FAM	Sample	b3-1	165.29%	12.98	1.02E+07	12.98	13.03	12.92	0.06	1.02E+07	1.06E+07	9.88E+06	3.63E+05	Replicate
New Set 25	FAM	Sample	b3-2	101.89%	14.26	4.57E+06	14.26	14.32	14.21	0.05	4.57E+06	4.72E+06	4.42E+06	1.50E+05	Replicate
New Set 26	FAM	Sample	b3-3	81.01%	15.26	2.45E+06	15.72	17	14.45	1.28	2.45E+06	4.08E+06	8.21E+05	1.63E+06	Replicate
New Set 27	FAM	Sample	b4-1	77.27%	14.15	4.91E+06	15.07	17	13.14	1.93	5.02E+06	9.21E+06	8.23E+05	4.20E+06	Replicate
New Set 28	FAM	Sample	b4-2	89.45%	14.46	4.05E+06	14.46	14.63	14.28	0.18	4.07E+06	4.52E+06	3.62E+06	4.50E+05	Replicate
New Set 29	FAM	Sample	b4-3	85.86%	13.99	5.41E+06	13.98	14.65	13.32	0.67	5.93E+06	8.27E+06	3.58E+06	2.34E+06	Replicate

ตารางภาคผนวก 3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม LGCGPB group ด้วยเครื่อง real-time PCR

Well / Set	Dye	Content	Description	Efficiency	C(t)	copies	Avg C(t)	Max C(t)	Min C(t)	C(t) SD	Avg copies	Max copies	Min copies	copies SD	Wellset
															Type
New Set 1	FAM	Standard	c7	101.90%	14.81	1.00E+07	14.81	14.93	14.64	0.12	1.00E+07	1.00E+07	1.00E+07	0	Replicate
New Set 2	FAM	Standard	c6	86.31%	18.1	1.00E+06	18.1	18.23	17.97	0.11	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	0	Replicate
New Set 3	FAM	Standard	c5	71.10%	22.12	1.00E+05	22.12	22.31	21.97	0.14	1.00E+05	1.00E+05	1.00E+05	0	Replicate
New Set 4	FAM	Standard	c4	64.44%	25.29	1.00E+04	25.3	25.59	24.83	0.33	1.00E+04	1.00E+04	1.00E+04	0	Replicate
New Set 5	FAM	Standard	c3	95.61%	30.01	1000	29.95	31.21	28.9	0.96	1000	1000	1000	0	Replicate
New Set 6	FAM	Standard	w1-1	N/A	N/A		N/A	N/A	N/A	N/A					Replicate
New Set 7	FAM	Sample	w1-2	30.44%	17.24	1.90E+06	18.15	21.53	15.55	2.5	2.40E+06	5.32E+06	1.39E+05	2.16E+06	Replicate
New Set 8	FAM	Sample	w1-3	42.01%	16.13	3.74E+06	16.22	17.06	15.36	0.69	3.86E+06	5.96E+06	2.12E+06	1.59E+06	Replicate
New Set 9	FAM	Sample	w2-1	71.25%	15.03	7.31E+06	15.01	15.23	14.77	0.19	7.46E+06	8.56E+06	6.46E+06	8.61E+05	Replicate
New Set 10	FAM	Sample	w2-2	81.84%	15.45	5.65E+06	15.47	15.73	15.18	0.22	5.64E+06	6.65E+06	4.75E+06	7.77E+05	Replicate
New Set 11	FAM	Sample	w2-3	80.99%	15.23	6.45E+06	15.26	15.63	15.06	0.27	6.43E+06	7.19E+06	5.05E+06	9.78E+05	Replicate
New Set 12	FAM	Sample	w3-1	84.40%	14.45	1.04E+07	14.46	14.55	14.39	0.07	1.04E+07	1.08E+07	9.78E+06	4.28E+05	Replicate
New Set 13	FAM	Sample	w3-2	81.08%	15.32	6.14E+06	15.32	15.39	15.23	0.06	6.14E+06	6.45E+06	5.88E+06	2.34E+05	Replicate
New Set 14	FAM	Sample	w3-3	72.04%	15.02	7.34E+06	14.99	15.18	14.67	0.23	7.54E+06	9.09E+06	6.67E+06	1.10E+06	Replicate
New Set 15	FAM	Sample	w4-1	75.49%	14.46	1.03E+07	14.48	14.87	14.26	0.28	1.03E+07	1.17E+07	8.04E+06	1.64E+06	Replicate
New Set 16	FAM	Sample	w4-2	76.21%	15.51	5.45E+06	16.01	18.1	14.94	1.48	5.45E+06	7.72E+06	1.12E+06	3.06E+06	Replicate
New Set 17	FAM	Sample	w4-3	80.81%	14.22	1.19E+07	14.23	14.31	14.08	0.11	1.19E+07	1.30E+07	1.13E+07	7.89E+05	Replicate
New Set 18	FAM	Sample	B1-1	79.91%	15.77	4.65E+06	15.78	15.94	15.61	0.13	4.63E+06	5.11E+06	4.18E+06	3.81E+05	Replicate
New Set 19	FAM	Sample	B1-2	64.41%	15.08	7.08E+06	15.08	15.12	15.02	0.04	7.09E+06	7.37E+06	6.93E+06	1.95E+05	Replicate

ตารางภาคผนวก 3 (ต่อ)

Well / Set	Dye	Content	Description	Efficiency	C(t)	copies	Avg C(t)	Max C(t)	Min C(t)	C(t) SD	Avg copies	Max copies	Min copies	copies SD	Wellset Type
New Set 20	FAM	Sample	B1-3	83.81%	15.94	4.18E+06	15.94	16.09	15.79	0.12	4.20E+06	4.58E+06	3.83E+06	3.08E+05	Replicate
New Set 21	FAM	Sample	B2-1	89.62%	15.73	4.78E+06	15.73	15.88	15.46	0.19	4.79E+06	5.61E+06	4.36E+06	5.86E+05	Replicate
New Set 22	FAM	Sample	B2-2	73.28%	14.68	9.06E+06	14.68	14.81	14.49	0.14	9.08E+06	1.02E+07	8.33E+06	7.74E+05	Replicate
New Set 23	FAM	Sample	B2-3	82.07%	14.36	1.10E+07	14.37	14.65	14.08	0.23	1.10E+07	1.30E+07	9.22E+06	1.55E+06	Replicate
New Set 24	FAM	Sample	B3-1	76.04%	14.41	1.07E+07	14.46	14.91	14.2	0.32	1.05E+07	1.21E+07	7.87E+06	1.88E+06	Replicate
New Set 25	FAM	Sample	B3-2	83.35%	14.56	9.72E+06	14.57	14.75	14.44	0.13	9.72E+06	1.05E+07	8.68E+06	7.59E+05	Replicate
New Set 26	FAM	Sample	B3-3	101.47%	14.66	9.17E+06	14.73	15.19	14.26	0.38	8.98E+06	1.17E+07	6.62E+06	2.06E+06	Replicate
New Set 27	FAM	Sample	B4-1	107.34%	14.65	9.21E+06	14.67	14.85	14.32	0.25	9.22E+06	1.13E+07	8.15E+06	1.45E+06	Replicate
New Set 28	FAM	Sample	B4-2	122.42%	15.94	4.20E+06	15.92	16.14	15.54	0.27	4.30E+06	5.35E+06	3.70E+06	7.44E+05	Replicate
New Set 29	FAM	Sample	B4-3	78.86%	15	7.42E+06	15	15.01	15	0.01	7.42E+06	7.45E+06	7.38E+06	2.64E+04	Replicate

ตารางภาคผนวก 4 ผลการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม *Proteobacteria* group ด้วยเครื่อง real-time PCR

Well / Set	Dye	Content	Description	Efficiency	C(t)	copies	Avg C(t)	Max C(t)	Min C(t)	C(t) SD	Avg copies	Max copies	Min copies	copies SD	Wellset Type
New Set	FAM	Standard	e7	40.74%	19.72	1.00E+07	19.73	20.04	19.51	0.23	1.00E+07	1.00E+07	1.00E+07	0	Replicate
New Set 2	FAM	Standard	e6	41.71%	22.45	1.00E+06	22.47	22.67	22.09	0.27	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	0	Replicate
New Set 3	FAM	Standard	e5	33.68%	27.31	1.00E+05	27.32	27.49	27.05	0.2	1.00E+05	1.00E+05	1.00E+05	0	Replicate
New Set 4	FAM	Standard	e4	27.94%	31.95	1.00E+04	31.86	32.35	31.13	0.53	1.00E+04	1.00E+04	1.00E+04	0	Replicate
New Set 5	FAM	Standard	e3	34.81%	34.95	1000	34.93	35.44	34.57	0.37	1000	1000	1000	0	Replicate
New Set 6	FAM	Sample	w1-1	N/A	N/A		N/A	N/A	N/A	N/A					Replicate
New Set 7	FAM	Sample	w1-2	N/A	N/A		N/A	N/A	N/A	N/A					Replicate
New Set 8	FAM	Sample	w1-3	N/A	N/A		N/A	N/A	N/A	N/A					Replicate
New Set 9	FAM	Sample	w2-1	21.18%	25.97	2.11E+05	25.93	26.39	25.47	0.46	2.23E+05	2.80E+05	1.66E+05	5.70E+04	Replicate
New Set 10	FAM	Sample	w2-2	26.73%	25.65	2.54E+05	25.73	26.44	25.02	0.71	2.63E+05	3.63E+05	1.62E+05	1.01E+05	Replicate
New Set 11	FAM	Sample	w2-3	29.77%	23.44	8.94E+05	23.44	23.56	23.32	0.12	8.95E+05	9.56E+05	8.34E+05	6.07E+04	Replicate
New Set 12	FAM	Sample	w3-1	28.92%	24.45	5.02E+05	24.44	24.58	24.31	0.14	5.06E+05	5.45E+05	4.67E+05	3.92E+04	Replicate
New Set 13	FAM	Sample	w3-2	29.69%	23.1	1.09E+06	23.33	24.45	22.2	1.13	1.16E+06	1.82E+06	5.01E+05	6.58E+05	Replicate
New Set 14	FAM	Sample	w3-3	27.44%	24.96	3.75E+05	25.01	25.59	24.43	0.58	3.85E+05	5.08E+05	2.62E+05	1.23E+05	Replicate
New Set 15	FAM	Sample	w4-1	28.36%	24.68	4.40E+05	24.68	24.69	24.68	0	4.40E+05	4.40E+05	4.39E+05	761.3	Replicate
New Set 16	FAM	Sample	w4-2	25.20%	25.33	3.04E+05	25.73	27.06	24.4	1.33	3.14E+05	5.15E+05	1.13E+05	2.01E+05	Replicate
New Set 17	FAM	Sample	w4-3	18.59%	27.36	9.53E+04	27.96	30.24	25.67	2.29	1.34E+05	2.50E+05	1.84E+04	1.16E+05	Replicate
New Set 18	FAM	Sample	b1-1	N/A	N/A		N/A	N/A	N/A	N/A					Replicate
New Set 19	FAM	Sample	b1-2	11.56%	36.6	488.5	36.64	37.71	35.57	1.07	567.6	876.2	259	308.6	Replicate

ตารางภาคผนวก 4 (ต่อ)

Well / Set	Dye	Content	Description	Efficiency	C(t)	copies	Avg C(t)	Max C(t)	Min C(t)	C(t) SD	Avg copies	Max copies	Min copies	copies SD	Wellset Type
New Set 20	FAM	Sample	b1-3	11.74%	33.97	2184	34.6	37.55	31.65	2.95	4255	8227	283.4	3972	Replicate
New Set 21	FAM	Sample	b2-1	18.81%	26.31	1.74E+05	26.59	28.09	25.09	1.5	2.06E+05	3.49E+05	6.27E+04	1.43E+05	Replicate
New Set 22	FAM	Sample	b2-2	28.34%	24.34	5.36E+05	24.43	24.89	23.97	0.46	5.27E+05	6.62E+05	3.91E+05	1.36E+05	Replicate
New Set 23	FAM	Sample	b2-3	31.49%	23.81	7.23E+05	23.83	24.2	23.46	0.37	7.31E+05	8.84E+05	5.78E+05	1.53E+05	Replicate
New Set 24	FAM	Sample	b3-1	29.26%	23.96	6.65E+05	23.96	24.03	23.89	0.07	6.66E+05	6.92E+05	6.39E+05	2.64E+04	Replicate
New Set 25	FAM	Sample	b3-2	25.27%	25.4	2.92E+05	25.71	27.42	23.99	1.71	3.71E+05	6.51E+05	9.19E+04	2.80E+05	Replicate
New Set 26	FAM	Sample	b3-3	28.41%	25.37	2.96E+05	25.58	26.53	24.63	0.95	3.03E+05	4.54E+05	1.53E+05	1.50E+05	Replicate
New Set 27	FAM	Sample	b4-1	31.20%	21.75	2.34E+06	21.95	22.84	21.06	0.89	2.37E+06	3.47E+06	1.26E+06	1.11E+06	Replicate
New Set 28	FAM	Sample	b4-2	38.96%	21.81	2.27E+06	21.82	22.06	21.58	0.24	2.27E+06	2.58E+06	1.97E+06	3.07E+05	Replicate
New Set 29	FAM	Sample	b4-3	27.93%	23.76	7.44E+05	23.74	23.94	23.53	0.2	7.59E+05	8.46E+05	6.72E+05	8.74E+04	Replicate

ตารางภาคผนวก 5 ผลการวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (Total Bacteria) ด้วยเครื่อง real-time PCR

Well / Set	Dye	Content	Description	Efficiency	C(t)	copies	Avg C(t)	Max C(t)	Min C(t)	C(t) SD	Avg copies	Max copies	Min copies	copies SD	Wellset Type
New Set	FAM	Standard	e7	76.63%	13.04	1.00E+07	13	13.21	12.71	0.21	1.00E+07	1.00E+07	1.00E+07	0	Replicate
New Set 2	FAM	Standard	e6	71.84%	16.55	1.00E+06	16.64	17.48	16.08	0.61	1.00E+06	1.00E+06	1.00E+06	0	Replicate
New Set 3	FAM	Standard	e5	70.01%	20.72	1.00E+05	20.74	21.03	20.27	0.34	1.00E+05	1.00E+05	1.00E+05	0	Replicate
New Set 4	FAM	Standard	e4	58.36%	23.7	1.00E+04	23.71	24.31	23.34	0.43	1.00E+04	1.00E+04	1.00E+04	0	Replicate
New Set 5	FAM	Standard	e3	58.48%	27.81	1000	27.8	28.1	27.38	0.31	1000	1000	1000	0	Replicate
New Set 6	FAM	Sample	w1-1	38.98%	14.29	4.50E+06	14.39	14.92	13.87	0.53	4.44E+06	5.86E+06	3.03E+06	1.42E+06	Replicate
New Set 7	FAM	Sample	w1-2	51.80%	14.71	3.46E+06	14.74	15.01	14.48	0.27	3.43E+06	4.00E+06	2.86E+06	5.66E+05	Replicate
New Set 8	FAM	Sample	w1-3	70.84%	14.15	4.89E+06	14.17	14.31	14.03	0.14	4.86E+06	5.28E+06	4.45E+06	4.14E+05	Replicate
New Set 9	FAM	Sample	w2-1	105.61%	14.05	5.23E+06	14.05	14.1	13.99	0.06	5.24E+06	5.43E+06	5.05E+06	1.93E+05	Replicate
New Set 12	FAM	Sample	w3-1	127.84%	13.33	8.21E+06	13.35	13.6	13.1	0.25	8.18E+06	9.46E+06	6.91E+06	1.28E+06	Replicate
New Set 10	FAM	Sample	w2-2	97.75%	14.12	4.98E+06	14.11	14.3	13.93	0.19	5.05E+06	5.64E+06	4.46E+06	5.87E+05	Replicate
New Set 11	FAM	Sample	w2-3	121.04%	13.91	5.69E+06	13.91	14.01	13.8	0.1	5.73E+06	6.09E+06	5.36E+06	3.65E+05	Replicate
New Set 13	FAM	Sample	w3-2	161.26%	13.77	6.22E+06	13.77	13.83	13.72	0.06	6.22E+06	6.44E+06	6.01E+06	2.15E+05	Replicate
New Set 14	FAM	Sample	w3-3	90.95%	13.26	8.56E+06	13.29	13.53	13.06	0.23	8.47E+06	9.71E+06	7.24E+06	1.24E+06	Replicate
New Set 15	FAM	Sample	w4-1	87.84%	13.22	8.80E+06	13.25	13.47	13.03	0.22	8.70E+06	9.88E+06	7.53E+06	1.18E+06	Replicate
New Set 16	FAM	Sample	w4-2	114.00%	14.3	4.48E+06	14.3	14.36	14.24	0.06	4.47E+06	4.64E+06	4.30E+06	1.70E+05	Replicate
New Set 17	FAM	Sample	w4-3	106.01%	14.03	5.29E+06	14.03	14.03	14.03	0	5.29E+06	5.29E+06	5.29E+06	1753	Replicate
New Set 18	FAM	Sample	b1-1	85.98%	15.05	2.80E+06	15.03	15.15	14.91	0.12	2.84E+06	3.05E+06	2.62E+06	2.12E+05	Replicate
New Set 19	FAM	Sample	b1-2	92.99%	14.62	3.65E+06	14.63	14.78	14.47	0.15	3.66E+06	4.01E+06	3.31E+06	3.50E+05	Replicate

ตารางภาคผนวก 5 (ต่อ)

Well / Set	Dye	Content	Description	Efficiency	C(t)	copies	Avg C(t)	Max C(t)	Min C(t)	C(t) SD	Avg copies	Max copies	Min copies	copies SD	Wellset Type
New Set 20	FAM	Sample	b1-3	105.91%	15.3	2.39E+06	15.3	15.36	15.25	0.06	2.39E+06	2.47E+06	2.30E+06	8.36E+04	Replicate
New Set 21	FAM	Sample	b2-1	112.08%	14.55	3.83E+06	14.55	14.61	14.49	0.06	3.82E+06	3.97E+06	3.68E+06	1.48E+05	Replicate
New Set 22	FAM	Sample	b2-2	88.36%	13.63	6.81E+06	13.66	13.98	13.34	0.32	6.80E+06	8.14E+06	5.46E+06	1.34E+06	Replicate
New Set 23	FAM	Sample	b2-3	104.11%	12.92	1.06E+07	12.88	13.09	12.67	0.21	1.10E+07	1.24E+07	9.55E+06	1.43E+06	Replicate
New Set 24	FAM	Sample	b3-1	165.29%	12.98	1.02E+07	12.98	13.03	12.92	0.06	1.02E+07	1.06E+07	9.88E+06	3.63E+05	Replicate
New Set 25	FAM	Sample	b3-2	101.89%	14.26	4.57E+06	14.26	14.32	14.21	0.05	4.57E+06	4.72E+06	4.42E+06	1.50E+05	Replicate
New Set 26	FAM	Sample	b3-3	81.01%	15.26	2.45E+06	15.72	17	14.45	1.28	2.45E+06	4.08E+06	8.21E+05	1.63E+06	Replicate
New Set 27	FAM	Sample	b4-1	77.27%	14.15	4.91E+06	15.07	17	13.14	1.93	5.02E+06	9.21E+06	8.23E+05	4.20E+06	Replicate
New Set 28	FAM	Sample	b4-2	89.45%	14.46	4.05E+06	14.46	14.63	14.28	0.18	4.07E+06	4.52E+06	3.62E+06	4.50E+05	Replicate
New Set 29	FAM	Sample	b4-3	85.86%	13.99	5.41E+06	13.98	14.65	13.32	0.67	5.93E+06	8.27E+06	3.58E+06	2.34E+06	Replicate

ภาคผนวก ง

ลำดับเบสของยีนส่วน 16S rRNA ที่ได้จากการโคลนยีนส่วน 16S rRNA ของแบคทีเรียในกระเพาะ

รูเมนของโคนมพันธุ์ Holstein Friesian จำนวน 3 ตัว ทั้งหมด 69 โคลน

(ได้มาจากการทดลองในโครงการวิจัยเรื่อง การศึกษาแบคทีเรียในกระเพาะรูเมนเพื่อเพิ่ม

ประสิทธิภาพการใช้อาหาร โค มหาวิทยาลัยแม่โจ้)

>RB1

AGAGTTTGATCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACA
CATGCAAGTCGAACGGAGTAAGACGCTGGATTGATGGTAGCTTGCT
ACTCGATTTCCTTGCTTACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGT
GAGTAACCTGCCCTCGAGTGGGGAATAACGTTCTGAAAAGAAGCT
AATACCGCATAATGTACATTGACCGCATGATCGATGTACCAAGAT
TTAATTGCTCGAGGATGGACTCGCTCCGATTAGCTAGTTGGTGAGGT
AACGGCCACCAAGGCGACGATCGGTAGCCGGA CTGAGAGGTTGA
ACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGC
AGCAGTGGGGGATAATTGCGCATGGGGAAACCTGACGACGCAAC
GCCGCGTGGAGGATGACGGCTTTCGGATTGTAACCTCTNTATAA
GGGACGAATAAGACGGTACCTTATGAATAAGCTCCGGCTAACTAC
GTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGGAGCAAGCGTTGTCCGGAT
TTACTGGGTGTAAGGGTGCGTAGGCGCTTGCGAAGTCAGGTGTG
AAATCCA TGGGCTCAACCATGAACTGCACTTGAACTGTCAGGCT
TGAGTGAAGTAGAGGCAGCGGAATTCCTGTGTAGCGGTGAAATG
CGTAGAGATAGGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGCGCGCTGCTGGG
CTTTAACTGACGCTCAGGCACGAAAGCGTGGGTAGCAACAGGATT
AGATACCTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGATTACTAGGTGTG
GTGGACTGACCCATCCGTGCGCGAGTTAACACAATAAGTAATCCA
CTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GGCCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCG
AAGAACCTTGCCAGGTCTTGACATCGAGTGACGATCCAGAGATGG
ATGTTTCTTCGGGACACGAAGACAGGTGGTGCATGGTGTGCTCA
GCTCGTGTGCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CTTGCTATTAGTTGCTACGCAAGACACTCTAATAGGACTGCCGTTG
ACAAAACGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAATATCATATGCCCTT
ATGACCTGGGTACACACGTAATAAAGCCGTAAACAGAGGGAA
GCGAAACAGCGATGTGGAGCAACCCCTAAAGCGGTCCAGTTCA
GATTGCAAGTGCAACCCGCTGATGAAGTCGGAATTGCTAGTAA
TCGCGGATCAGCATGCCCGGTGAATACGTTCCGGGCTCTGTACA
CACC GCCGTACACCATGGGAGCGGTAAATACCGAAGTCAGTAG
TTCAACCGCAAGGAGAGCGCTGCCGAAGGTAGGATTGGCGACTGGG
GTGAAGTCGTAACAAGGTAGCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCA
CTCTCTT

>RB2

AGAGTTTGATCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACA
CATGCAAGTCGAACGGGATTTTGTTCGGCAGAATCCTAGTGGCG
AACGGGTGAGTAACGCGTAGGCAACCTGCCCGCGGGGACAA
CACGCCGAAAGGTGTGCTAATACCGGATACGAAGGATGACCGCAT
GGTATATTTTGAAGAGCGGCTCTGAATGTAAGCTGTGCCGGGG
GATGGGCTGCTCCGATTAGCTGTTGGCGGGGTAACGGCCACC
AAGGCGACGATCGGTAGCCGGTCTGAGAGGATGGACGGCCACATTG
GGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATCTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCGCGTGGGT
GAGGAAGTTTTTCGAACGTAAGCCCTGTTGTTATGACGAACGG
CCCTTCTGTGAACAATGGAGGGGAATGACGGTAATAGACGAGGAAG
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCA
AGCGTTGTCCGGAATTAATTGGCGTAAAGCGCATGTAGCGGTAAAT
GTAAGTCTGTGTAAGTGCAGGGGCTCAGCCCCGTATGGCGATGG
AACTGGATTACTTGAAGTGCAGGAGAGGAAAGGGGAACCTCCAGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAG
GCGCTTTCTGGAGTGTGTCTGACGCTGAGATGCGAAAGCCAGGGT
AGCGAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCTGGCGTAAACGATGG

GTACTAGGTGTGGGAGGTATCGACCCCTTCCGTGCGGAGTTAACG
CAATAAGTACCCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTTAAACTCA
AAGGAATTGACGGGGGCCGCAACAAGCGGTGAGTATGTGGTTAA
TTCGACGCAACGCGAAGAACTTACCAGGTCTTGACATCGAGTGCA
AGGTGTAGAGATACACCCCTCTCTTCGGAGACATGAAGACAGGTGG
TGATGGGTGTGCTGAGCTCGTGGCGTGGAGGTGTGGCTTAAGTGCC
ATAACGAGCGCAACCCCTTCTCCAGTTGCCATCAGGTTAAGCTGGG
CACTCTGGAGACACTGCCACCGTAAGGTGTGAGGAAAGTGGGGATG
ACGTCAAATCAGCAGGGCCCTTACGTCCGGGGCTACACACGTGTTA
CAATGGGGAGTACAGAGAGTCAACCGCCGGCAACGTGGTTTAATC
AATAAAGCTCTCTCAGTTCGGATTGGGTCTGCAACCCGACCCCAT
GAAGCTGGATTGCTAGTAA TCGCGCATCAGCATGCGCGGTGAA
TACGTTCCCGGGCTTTGTACACCGCCGCTCAAGCCATGAAAGCC
GGGGGCGCTGAAGTCCGTGACCGGAGGGTGGCGCTAGGGTGAAA
CCGGTGATTGGGGCTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGT
GCGGCTGGATCCTCTCT

>RB3

AGAGTTTGATCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCGGTCTTAAG
CATGCAAGTCGAATGGCAAGATCGGTGCTTGCACTGATCTAGAAAT
GGCGGACTGGTGAGTAACGCGTGGGTGACGTACCTCTTGGATGGGG
ATAGCTCTTGGAACAGGAGATAATACCGAATACGCTGCATGGATT
TAGAGGCCATGCAAGAAAGTATCTTTTGATACCGAGAGAGCGGC
CCGCGGCTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGCCACCAAGCGGA
CGATCAGTAGCCGGCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGA
GACACGGCCCAACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCA
CAATGGGGGAAACCTGATGCAAGCAGCCGCGTGAAGTGAAGAAAG
TATTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAATGACGGTA
CCTGACTAAGAAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAA
TACGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGTGTAAGGGGTG
CGTAGGCGGGGCTGCAAGTCAGATGTGAAATGTATGGGCTCAACCC
ATGAACTGCATTGTAAGCTGTGGCTCTTGAGTGAGATAGAGGTAAG
CGGAAATCTCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAAC
ATCGGTGGCGAAGCGCGCTTACTGGGCTTTACTGACGCTGAGGCA
CGAAAGCTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACG
CTGTAAACGATGATGACTAGGTGTGGGGGACTGAACCTTCCGTG
CCGCAAGTAACACAATAAGTCATCCACCTGGGGAGTACGGCCGCAA
GGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCAGTGGGA
GTATGTGGTTTAATTCGACGCAACGCGAAGAACTTACCAGGGCTT
GACATGTATGGGAATACTTTAGAGATAGAAGTAGCTCTTCGGAGC
TCATACACAGGTGGTGCATGGTGTGCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATG
TTAGGTTAAGTCTGCAACGAGCGCAACCCCTATTCTAGTTGCCAG
CACATCATGTTGGGAACCTAGAAAGACTGCCGCTAATAAATCGGA
GGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTTATGTCTTGGG
CTACACACGTACTACATGGCCGTACAAAGAGCAGCAACATAGTG
ATATGAAGCAAACTCAAAGCGGTCTCAGTTCGGAGTGCAGGCT
GAAATTCGCTGCAAGGTCGGAATTGCTAGTAATGCGAGGTGAG
CATACTGCCGTGAATACGTTCCCGGGCTTTGTACACCCCGGCTCA
CACCATGAGAGTTGAAATACCGAAGGCTGTGAGCTAACTTTAG
AGGAGCAGTCAAGGTAGAGCAATGATTGGGTGAAAGTCGTAAC
AAGGTAGCCGTAGGAGAACTGCGGTGGATCACTCTCTT

>RB4

AGAGTTTGATCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACA
CATTAAGTCGAACGAGCCGTAGAAATACGGCGAGTGGCGGACGG
GTGAGTAACGCGTAAGCAATCTGCTTTGTGTGGAATAACAACCT

GGAAACGGTTGCTAATACCGCATGACGCAGAGGGATCGCATGGTCT
 TTCTGCCAAAGATTATCGCACGAAGATGAGCTTGGCTCCGATTAGA
 TAGTTGGCGGGCAACCGCCACCAAGTCTACGATCGGTAGCCGGA
 CTGAGAGGCTGAACGGCCACATTGGAACTGAGATACGGTCCAGACT
 CCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGCAATGGACGGAAGT
 CTGACCCAGCGACGCCGCTGAGGGAAGAAGGTCTTCGGATTGTAA
 ACCTTAGTCAACAGGGACGAAGCAAGTGACGGTACCTGTGGAGGAA
 GCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGTAGGTGGC
 GAGCGTTATCCGGAACTACTGGGTGTAAAGGGTGTGTAGCGGGAA
 GGCAAGTCGGATGTGAAAAATTATGGGCTTAAACCCATAAAGTGCAG
 CGAAACTGTCTTCTTGAGGATCGGAGAGGTAATGAGAATCCCGG
 TGTAGCGGTGAAATGCGCAGAGATCGGAGGAATACCGGTGGCGA
 AGGCGAATTACTGGACGATAACTGACGCTGAGACGAAAGCGTGG
 GGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGAT
 GAAATGCTAGGTGTAGGGAGTCACTCTGTGCCGAGCTAACGCA
 ATAAGCATTCCACCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTGAAACTCAA
 GGAATTGACGGGAGCCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGTTAATT
 CGACGCAACCGGAAAAACCTTACCGGGACTTGACATCTCGGGAAGG
 ACCGATAACGAGGTCCGTGCCCTTCGGGGAGCCGCAAGACAGGT
 GGTGCATGGTGTGTCGTCAGTCTGTGTCGTGAGATGTTGGTTAAGTC
 CCGCAACGAGCGCAACCTTACCGTCAGTTGCTACGCAAGAGCACT
 CTGGCAGGACTGCCGTTGACAAAACGGAGGAAGGTGGGGATGACG
 TCAAAATCATATGCCCTTTATGTTCCGGGCCACACGTAATAA
 GGCGCAAAACAAAGGAAGCGAACCCGCGAGGGGGAGCGAATCCCA
 TAAAAGGCGTCCCAAGTTCGGATTGACAGGTGCAACTCGCTGCATG
 AAGTTGGAATTGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGTGCGGTGAATA
 CGTTCCCGGGCTTTGTACACCCGCCGTCAAACCATGAAAGTCGG
 AAACACCCGAAGCCTGTGAGCTGACCGCAAGGGGGCAGCAGTCGA
 AGGTGGGTCTGATGATTGGGGTTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAT
 CGGAAGGTGCGGTTGGATCACCTCCTT

>RB5

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAACA
 CATGCAAGTCGAGGGGCAGCATGAAGTTTGGTTGCAAACTTTGATG
 GCGACCGGCGCACGGGTGAGTAACCGGTATCCAACCTTCCCTTAG
 TAGGGCATAGCCCGCGCAAAAGTCGGATTAATACCTATGTTTCCA
 ATGAGGACATCTGAGCTGGAACAAAGATTGATCGCTAAGGGATGGG
 GATGCGTCTGATTAGGCAGTAGGCGGGTAACGGCCCACTAGCCT
 ACGATCAGTAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACATTGAACTG
 AGACACGGTCCAACTCTACGGGAGGCGAGTGAAGGAATATTGG
 TCAATGGGCGCGAGCTGAACCAAGTAAGTGCAGGATGACG
 GCCCTATGGGTTGTAACCTGCTTTATACAGGGATAAAGTGCACCAC
 GTGTGGTGTGTTGTAGGTACTGTATGAATAAGGACCGGCTAATCCG
 TGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAAGGTCCGGGCTTATCCGATT
 TATTGGGTTTAAAGGGAGCGCAGGCTGATTGTTAAGCGTGACGTGA
 AATGTAGCCGCTAACCGGTGCACTGCGTCGCAACTGGCAGTCTT
 GAGTGAGTACGACGTGACGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGC
 TTAGATATCACGAAGAACCCGATTGCGAAGGCAGCTGACGAGTCC
 TTTACTGACGCTAAAGCTCGAAGGTGCGGTATCGAACAGGATTAG
 ATACCTGTGATGTCGACCGTAACGATGGATGCCGCTGTTGGC
 GATATAGTGTACGCGCAAGCGAAAGCGTTAAGCATCCACCTGG
 GGAGTACGCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
 CGCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTAATTCGATGATACGCGAGGA
 ACCTTACCGGGCTTGAATGCGCAGCAGGAGGATACAGAGATGTTGA
 CGCCCTTCGGGGCTGCTGTGAGGTGCTGATGGTTGCTGTCAGCTC

GTGCCGTGAGGTGTCGGCTTAAGTGCCATAACGAGCGCAACCCCTG
 TCCGTAGTTGCCATCAGGTAGTCTGGGCACTCTCGGGATACTGCCA
 CCGTAAGGTGTGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAGCAGCGCC
 CTTACGTCCGGGGCTACACAGTGTTACAATGGGTGGTACAGAGAG
 TGGGTGCTGGCAATAGCAATCAAAATCAAAAAAGCATCTCAGTT
 CGGATTGGGGTCTGCAACCCGACCCCATGAAGCTGGATTCTAGT
 AATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGT
 ACACACCGCCCGTCAAGCCATGAAAGCTGGGGCGCCTGAAGTCCG
 TGACCGGAGGGTGGGCTAGGGTGAAACAGGTGATTGGGGCTAAG
 TCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCT

>RB6

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGTAAACA
 CATGCAAGTCGAACGGAACCTTAATGAAACCTAGTGAATTAAGTTTA
 GTGGCGGACGGGTGAGTAACCGGTGGTAACTGCCGATGACAGGG
 GGACAACAGAGGGAACTCTCTGCTAATACCGCATGAAGCGCAGGGG
 CCGCATGGCCTTGTGTGAAAAGATTATCGGCATGCGATGGACCCG
 CGTCTGATTAGCAGTTGGTGAAGTAACGGCCCAACCAACCTACGA
 TCAGTAGCCGGCTGAGAGGGCAACCGGCCACATTGGGACTGAGAC
 ACGGCCCAAACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAA
 TGGAGGAACTCTGATGACGCGACGCGCGTGAGTGAAGAAAGTATT
 TCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGAAGAAAATGACGGTACCTG
 ACTAAGAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAAATACG
 TAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGTGTAAAGGGAGCGTA
 GACGGTCTGCAAGTCTGAAGTGAAGCTCGGGGCTCAACCCCGGA
 ACTGCTTTGGAACTGTAGAACTGGAGTGCAGGAGAGGTGAAGCGGA
 ATTCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCA
 GAGGCGAAGGGCGCTTACTGGACTGTAACGTGACGTTGAGGCTCGAA
 GCGGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTGTAGTCCACGCGGT
 AAACGATGATCACTAGGTGTTGGCAGGCATAGCCTGTGCGGTCCGC
 AGCAACCGCAATAAGTATCCACCTGGGGAGTACGTTCCGCAAGAA
 GAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCAAGCGGTGGAGCAT
 GTGGTTTAATTCGAAGCAACCGCAAGAACCTTACCTGGTCTTGAGA
 TCCAGTTGAATAATGGGTAATGCCATTAGTCTTCGGACAACCTGAGA
 CAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGT
 AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTAGTAGCCAGCAAGTA
 AAGTTGGGCACTTAAGGAGACTGCCCGGGATAACCGGGAGGAAG
 GTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCAAGGCTACA
 CAGTGTCTACAATGTCGTAACAAAGGGAAAGCAATGGAGCGATCCG
 GAGCAAAATCCAGAAATAACGACTCAGTTGCGGATTGACAGGTGCAA
 CTCGCTGCATGAAGCTGGAATCGTAGTAATCGCAGATCAGCATG
 CTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTGTACACACCGCCCGTCAACC
 ATGGGAGTCTGATAATGCCGAAGCTCGTGACCTAACCTCGTGAAGG
 AGCGATCGAAGGCAGGATTGATAACTGGGGTGAAGTCGTAACAAG
 GTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT

>RB7

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAACA
 CATGCAAGTCGAGGGGCAGCATGATCGAAGCTTGTGTTGATTGATG
 GCGACCGGCGCACGGGTGAGTAACCGGTATCCAACCTTCCCTATAG
 TAGAGGATAGCCCGGCAAGTCGGATTAATACTCTATGTTTCCA
 ATGCAACATCTAAGATGGAACAAAGGTTTACCGCTATAGGATGGG
 GATGCGTCTGATTAGATGGTAGGCGGGTAACGGCCCACTAGTGC
 ACGATCAGTAGGGTCTGAGAGGAAGGTCCCCACATTGGAAGTGC
 AGACAAGGTCCAACTCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGAAATTGG

TCAATGGGCGAGAGCTGAACAGCCAAGTAGCGTGACGGATGACG
GCCCTATGGGTGTAACTGCTTTATATGGGGATAAAGTTACCCAC
GTGTGGTGTTTTGTAGGTACCATATGAATAAGGACCGGCTAATCCG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAAGGTCCGGCGTTATCCGGATT
TATTGGGTTTAAAGGAGCGCAGGCGGTGCTTAAGCGTGACGTGA
AATGCCGCGGCTCAACCGTGGAAGTGCGTCGCGAACTGGGTGCCTT
GAGTGAGTTCGACGCGCGGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGC
TTAGATATCACGAAGAACCCGATTGCGAAGGCAGCCGGCGAGGCC
TTTACTGACGCTAAAGCTCGAAGGTGCGGGTATCGAACAGGATTAG
ATACCTGGTAGTCCGCAACGGTAAACGATGGATGCCGCTGTATGC
GATATAATTGTATGCGGCCAAGCGAAAGCGTTAAGCATCCCACTGG
GGAGTACGCCGCAACGGTGAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAAGCGGAGGAACATGTGGTTAATTCGATGATACGCGAGGA
ACCTTACCCGGGCTTGAACCTGACGAGAACGATTACAGAGATGATGA
GGTCTTCGGGACTGCTGTGGAGGTGCTGCATGGTTGCTGTCAGCTC
GTGCCGTGAGGTGTCGGCTTAAGTGCCATAACGAGCGCAACCCCTT
TCGTGAGTTGCCATCAGGTGCGAGCTGGGCACTCTGGCGACACTGCC
ACCGTAAGGTGCGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAGCACGG
CCCTTACGTCCGGGGCTACACACGTGTTACAATGGGTGGTACAGAG
AGTCGGGTGTACGCAAGTACGCTCAATCATGAAAGCCATCCTCAG
TTCGGACTGGGGTCTGCAACCCGACCCACGAAGCTGGATTGCTA
GTAATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTT
GTACACACCGCCGCTAAGCCATGAAAGCCTGGGGCGCCTGAAGTC
CGTGACCCGAGGGTTCGGCTAGGGTGAAACAGGTGATTGGGGCTA
AGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTC
CTTAATCACTAGTGAATTCGCGGCCGCTGCAAGTGCAGCATATGG
GAGAGCTCCCAACCGCTTGGATGCATAGCTTGAGTATCTATAGTTCA
CTAAAGCN

>RB8

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGACAGGCCTAACA
CATGCAAGTCGAGGGGACGCGGGGAGAAGCTTGCTTTCTGGCG
GCGACCGGCGCAGGGTGCGTAACAGGTGTGAATCTGTCTATAC
CGGGGATAGCCAGCGAAAGTTGGATTAAATCTCCATGTGAGACG
AAGCCGATGGTTTGTGTTGAAACGTAAAGGTATAGGGTGAGCAC
GCTTCTGATTAGATAGTTGGTGGGGTAACGGCTACCAAGTCGACG
ATCAGTAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACATTTGGAAGTGA
CACGGTCCAACTCTACGGGAGGACGAGTGAGGAATATTGGTCA
ATGGGCGAGAGCCTGAACAGCAAGTCGCGTGAAGGATGAAGGTT
CTATGGATTGTAAACTCTTTTGTCCGAGGGTAAAAAGGCCACGTG
TGGCTTCTTGCAAGTATCGGACGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGC
CAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCGAGCGTTATCCGGATTAT
TGGGTTTAAAGGGTGCGTAGGTGGTTTGTAAAGTTTGGTGAAAGC
GTGCGGCTCAACCGTACCAAGCCATGAAACCTGGCGAACTTGAGTG
CAAAAGAGGTAGGCGGAATGTGATGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGA
TATGTACAGAAACCCGATTGCGAAGGCAGCTTACCAGCATGCAAC
TGACACTGAGGCAGAAAGCGTGGGTATCAAAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCACGCAAGTAACGATGAATACTAGCTGTGGCGATAT
ATGGTCAGCGGTACAGCGAAAGTGTAAAGTATTCACCTGGGGAGT
ACGCCGGCAACGGTGAAACTCAAGGAATTGACGGGGGCCGAC
AAGCGGAGGAACATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGAGGAACCTT
ACCCGGGCTTGAAAGTTAGTGACGGAAGTGAAAGCGGTCTTCCT
TCGGGGCAGGAACTAGGTGCTGCATGGTTGCTCAGCTCGTGCC
GTGAGGTGTCCGCTTAAAGTGCCATAACGAGCGCAACCTTGCCGTT
AGTTGCCAGCGGTAATGCCGGGAACCTAGCGGACTGTACTGT

AAGGTAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAGCACGGCCCTTAC
GTCCGGGGGACACACGTGTTACAATGGTGAGTACAGAGGGTTGCT
ACCTGGTGACAGGATGCTAATCTCCTAAAACTCATCTCAGTTCGGAT
CGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGCTGGATTGCTAGTAATCG
CGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACA
CCGCCCGTCAAGCCATGGAAGCTGGGGGTACCTAAAGTCTGCAACC
GCAAGGAGCGGCCAGGGTAAAACTGGTAACCTGGGGCTAAGTCGTA
ACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT

>RB9

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAAACA
CATGCAAGTCGAGGGGACGAGATCGAAAGCTTGCTTTTGTATGCTG
GCGACCGGCGCAGGGTGAGTAACGCGTATCCAACTTCCCTGTAG
TAGAGAATAGCCCGCGAAAGTCGGATTAACTGCTCTATGTTGTATTT
CGATGACATCTGAAGAATACCAAGGTTTACCGCTATAGGATGGGG
ATGCGTCTGATTAGTTTGGCGGGTAAACGGCCACCAAGCCCA
CGATCAGTAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACATTGGAAGTGA
GACACGGTCCAACTCTACGGGAGGACGAGTGAGGAATATTGGT
CAATGGACGGAAGTCTGAACAGCCAAGTAGCGTGACGAGTGAACG
GCCCTATGGGTTGTAACTGCTTTTATATGGGGATAAAGTGAGGGA
CGTGTCCTTTTGTAGGTACCATGAAATAAGGACCGGCTAATTC
GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAAGGTGCGGGCTTATCCGGAT
TTATTGGGTTTAAAGGAGCGCAGGCTGATGATTAAAGCTGACGTG
AAATGTAGCCGCTCAACGGCTGAAGTGCCTGCGGAACTGGTTATCTT
GAGTGAGTTCGATGTGGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGC
TTAGATATCAGAAAGACTCCGATTGCGAAGGCAGCCAAACAGGCC
TTTACTGACGCTAAAGCTCGAAGGTGCGGGTATCGAACAGGATTAG
ATACCTGGTAGTCCGACGGTAAACGATGGATGCCCGCTGTTTGC
GATATACTGTGAGCGGCAAGAGAAATCGTTAAGCATCCCACTGG
GGAGTACGCCGCAACGGTGAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGAGGA
ACCTTACCCGGGCTTGAACCTGCCAGTGAACGATACAGAGATGTTGA
GGCCCTTCGGGGCACTGGTGAGGTGCTGATGGTTGCTGTCAGCTC
GTGCCGTGAGGTGTCGGCTTAAAGTGCATAACGAGCGCAACCCCTT
CATTAGTTGCCATCAGGTGATGCTGGGCACTCTGGTGATACTGCCAC
CGTAAGGTGTGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAGCAGCGGCC
TTACGTCCGGGGCTACACACGTGTTACAAATGGGAGGTACAGAGAGT
CGGTGCATGGCAATATGCATCTAATCTTAAAGGCTTCCCTCAGTTG
GATTGGGGTCTGCAACCCGACCCCATGAAGCTGGATTGCTAGTAA
TCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGATC
ACACCGCCCGTCAAGCCATGAAGCGGGGGCGCTTGAAGTCCGTG
ACCGCAAGGATCGGCTAGAGCGAAACTGGTAATTGGGGCTAAGTC
GTAAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT

>RB10

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAAACA
CATGCAAGTCGAGCAAGGCAGCAATGCCGAGCGGCAACGGGTGA
GTAACGCGTAAGCAATCTCCCCGTATCAGGAATACCCGTGCCAA
CGCGCGTTAATGTCCAGGAGAGTGCTCCCTGCATGGGGAGTTGA
CTAGAGATTATCGGTACGGGATGAGCTTGGCTCCGATTAGCTAGTT
GGCGGGGCAACGGCCCAAGGCGACGATCGGTAGCGGGCTTGA
GAGGGTATCGGCCACATTGGGACTGAGATACGGCCACAGCTCCTA
CGGGAGGACGAGTAGGGAATATTGCAATGGGGGAAACCTTGA
TGCAGCAACGCCACGTGTGGGAAGAAGCATTTGCTGTGTAAACCA
CTGTCTGAGGGAAATAAGGCCCGCTTCGACGGGATTTGAATGTAC
CTCGAAAGGAAGCACCGGCAAACTCTGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT

ACGAGGGGTGCAAGCGTTGTTCCGAATCACTGGGCGTAAAGGGAGC
GTAGGCGGAGATTCAAGCGGATTGTACAATCCCGGGGCCCAACCCC
GGACCTGCAGTCCGAACTGGATCTCTTGGATAGTTCAGGGGCAGGC
GGAAATTCCTGGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGAGATCAGGAAGAACA
CCGATGGCGAAGGCAGCCTGCTGGGGACTTAATCGACGCTGAGGCT
CGAAAGTGCGGGTAGCAACAGGATTAGATACCTGTGTAGTCCGCA
CCGTAAACGATGCATACTGGGTGTCCGGGGTATCCCGGGTACCG
TAGCCAACGCGTTAAGTATGCCCGCTGGGGAGTACGTACGCAAGTA
TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAAGCGGTGGAGCA
TGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGCAGAACCTTACCAGGTTTGAC
ATGGGAACCGCGCGCGAGAGATCGCCGTCTTGACGCAATGCAACG
TTCCGCACAGGTGCTGATGGCTGTCTGACGCTGTGTGTGAGATG
TTGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCACGTTTCCAGTTGCCAC
CCGCGAGGGGGCCCTCTGAGAGACTGCCGGGACAAACCGGAGG
AAGGTGTGGATGACGTCAAGTCTCATGGCCCTTACATCTGGGCTA
CACACGTGCTACAATGGTGGTACAATGGTGGCAACATCGCGAGA
TGGAGCCAATCCCAAAGCGTCTCAGTTGGATCGGAGTCTGCA
ACTCGACTCCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGTGGTCAACAC
ACCACGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCGCTCAAG
CCATGGGAGAAGGGAGTGTCTAAGTGTGCAAGCGCTAAAGCAA
GACCTTTGACTGGGGCTAAGTCTGAACAAGGTAGCCGTACCGGAAG
GTGCGGCTGGATCACCTCCTT

>RB11

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGTCTTAGG
CATGCAAGTCGAACGGACGAAGCGAAAGCTTGCTTTCCGCTAGTTA
GTGGCGCACGAGTGAGTAAACGCGTGGGAACTGCCATTACTGGGG
AATAACGTTTGGAAACGAACGCTAATACCGCATACGCGGAAACGG
GAAAAGTTTATCGGTGATGGATGTGCCCGCGTTGGATTAGCTTGTG
GTGGGTAATGGCCTACCAAGGCAATGATCCATAGCTGGTCTGAGA
GGACGATCAGCCAGCTTGGAACTGAGACAGGTCCAACTCCTACG
GGAGGACGACGTAAGAATATTGGGCAATGGAGGAACTCTGACCC
AGCCATGCGCGTGAAATGAAGAAGGCCTTCGGGTGTAAAGTTCTT
TTAGTCGTGAAGATGATGACAGTAGCGACAGAAAAGCACCGGCTA
ACTTCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTGTT
CGGATTTACTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGTTTGTAAAGTCAG
AGGTGAAATCCCAAGGCCAACCTTGAACCTGCCTTTGATACTGGC
AAGCTGGAGCGGATAGAGGAAGATGGAACATCTGGTGTAGGGT
GAAATCCGTAGATATCAGATAGAACAACCAATGGCGAAGGCAGTCTT
CTGGATCGTCGTGACACTGAGGGACGAAGCGTGGGTAGCAAACA
GAATTAGATACTCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCATGCTTGT
GTTGGTTTCTTCGGGGATCAGTGACGAAGCTAACCGCTTAAGCA
TGCCCGCTGGGGAGTACGATCGCAAGATTAAACTTAAAGGAATTG
ACGGGGACCCGCAACAAGCGGTGAGTATGTTGTTAATTCGATGCT
ACGCGAGAAACCTTACCGACCCCTTGACATCCCGCACGCGATTCCA
GAGATGGATTCTCAATTTCGGTTGGTGGGAGACAGATGCTGCAT
GGCTGTCTGACGTCTGTGCTGTGAGATGTTAGGTTAAGTCTGCAAC
GAGCGCAACCCACGCCCTATGTTGCCAGCGGTAATGCCGGAACT
CTTAGGGGACTGCCCGCTCAAGCGGGAGGAAGGTGTGGATGACGT
CAAGTCATCATGGTTCTACGGGTGGGCTACAAACGTAATACTAAT
GGCGTTAAACAATGGGTGCAATGTGCGAAGGCAAGCCAATCCTTA
AAAAACGCCCTCAGTTGAGATTGCCCTCTGCAACTCGAGGACATGAA
GCTGGAATCGTAGTAATCGTGTGATGCAATGACGCGGTGAATACG
TTCCCGGGTCTGTACACACCGCTGTCAAACCATGAGAGTCGATTT
CACCCAAAGTCGGTAGTCTAACGCAAGGGGACGCGCCTACGGTGG

GATTTGGTATTGGGGTTAAGTCATAACAAGGTAGCAGTACCGGAAG
GTGCGGCTGGATCACCTCCTT

>RB12

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGTAAACA
CATGCAAGTCGAACGGAGATTTACCACCTGCTTGCAGGAGGTAAAT
CTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGTAACTGCCTCACAC
AGGGGGATAACAGTTGGAACGACTGTTAATACCGCATAAGCGCAC
GGTATCGCATGATACAGTGTGAAAACTCCGGTGGTGTGAGATGGA
CCCGCGTCTGATTAGCTAGTTGGCGAGGTAAACGGCCACCAAGGCG
ACGATCAGTAGCGGCTGAGAGGGTAAACGGCCACATTTGGGACTG
AGACACGGCCAACTCCTACGGGAGGCAAGCAGTGGGGAATATTGC
ACAAATGGGGGAAACCTGTAGTACGAGCAGCGCGTGTGATGAA
GTATTTGCTACGTAAACTCTATCAGCAGGGAAGAAAATGACGGT
ACCTGACTAAGAAGCAGCGCTAAATACGTGCAGCAGCCGCGGTA
ATACGTATGGTGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGTGTAAAGGT
CGGTAGGTGGCATGGCAAGTCAGATGTGAAATGCCGGGCTCAACC
CCGGAATGCAATTGAACTGTCAAGCTAGAGTACAGGAGAGGAAA
CGGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAA
CACCAGTGGCGAAGGCGGCTTCTGGACTGACACTGACACTGAGGC
ACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTCGGTATGCCAC
GCCGTAACGATGAATACTAGGTGTTGGGAGCAAGCTCTCGGT
GCCGACGTAACGCAATAAGTATTCACCTGGGAGTACGTTCCGA
AGAATAAACTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCAACAAGCGGTGG
AGCATGTGGTTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTAGGTTT
GACATCCGGAGAACTCCTGTGAAAGCAGGAGGTGCCCGCAAGGGA
GCTCCGAGACAGGTGCTGATGGCTGTCTGACGCTGTGCTGTAAG
ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATGACAGTTG
CCAGCAGGCAAGGCTGGGCACTCTGTGACAGTGCCTGGGTCACCT
GGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTATCATGCGCCCTTACACCT
AGGGCTACACAGTACTACAATGGCGCATACAGAGGGCGGGGAAG
CCGCGAGGCCAAGCGAATCCCAAACTCGCTCCAGTCCGGATAG
GAGTCTGCAACTCGACTCCTTGAAGTTGGAATCGCTAGTAAATCCGG
ATCAGCATGCCGGGTGAATGCGTTCCTGGGCTTGTACACACCGC
CCGTACACCCAGAAAGTCGGTTTACCCGAAGCGGTGAGTCAAC
TAGCAATAGAGGACCGCTACGCTAGGACCGATGATTGGGGGA
AGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATCACCTC
CTT

>RB13

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCGAGGCTTAACA
CATGCAAGTTGAACGGGATTGGTGGTAGCTTGTATCATTAAATGAG
AGTAGCGCACTGGTGTAGTAACAGCTGGGAACATACCTTTTGGTGGG
GGACAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCGCATAAGCCCTAAGGG
GGAAAAGTTTATTGCCGAAGATTGGCCCGGGAAGATTAGGTAGT
TGGTGGGGTAACGGCTACCAAGCCGACGATCTATAGCTGGTCTGA
GAGGACGAACAGCCATTGGAACCTGAGACAGGTCAGACTCCTA
CGGGAGGACAGTGTAGGAATAATGGCAATGGAGGAACTCTGA
CCCAGCCATGCCCGTGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGAATTGTAAGCT
CTTTCGGATGTGACGATGATGACGCTAGCATCTAAAGAAGCCCCGG
CAAACCTTCGTGCGCAGCAGCGCGTAAATACGAAGGGGGCAGCGTT
GTTCCGAATTACTGGGCGTAAAGGGTGTGTAGGTGGATAAGTAAGA
TAGCGGTGAAATACCTGGGCTTAACCTAGGAATTGCCGTTAATACTA
TTTATCTAGAGTGACAGAGAGGATATTGGAATACCCAGTGTAGAGG
TGAAATTCGTAGATATTGGGTAGAACCCGGAGGCGAAGGCGAGTA
TCTGGCTGTCAACTGACACTGAGGCACGAAGCATGGGGATCAAAC

AGGATTAGATACCTGGTAGTCCATGCTGTAAACGATGAATGCTAG
TTGTCGGCGATAAGTCGGTGACGAAGTTAACGCGATAAGCAATTCGG
CCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAACTCAAAGGAATTGACGGG
GACCCGACACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCAACGCG
AAGAACCCTTACCAACTCTTGATCATCCTTATCGGGGAGATCAGAGAT
GATTTCCTTTCAGTTAGGCTGGATAAGTGACAGATGCTGCATGGCTGT
CGTCAGCTCGTGTCTGTAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCG
CAACCCCTTGCTACCAAGTTGCCATCAAGTAAAGTTGGGCACTCTGGTG
GGACTGCCGTGACAAGCCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAGT
CATCATGCCCCCTTATGTCTGGGCTACACGTAATACAATGGCAAC
GACAGAGGGCAGCAAAACCCGCGAGGGCAAGCAAAATCCCAACGT
TGTCTCAGTTCGGACTGCGAGGCTGCAACCCGCTGCACGAAGTCGG
AATTGCTAGTAATGGCAGGTGACATACTGCCGTGAATACGCTCCC
GGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGAGAGTCTGCAATACC
CGAAGTCAGTAGCTAACCGCAAGGAGGGCGCTGCCGAAGGTAGG
GCGGATAATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGG
TGCGGCTGGATCACTCCTT

>RB14

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAACA
CATGCAAGTCGAGGGCAGCGCGGGTAGCAATACCTGGCGGGC
ACCGCGCAAGGGTGCGTAACGCGTGAGCAACTTGCCCGTATCTGG
GACATAAGCGGTGGAACCGCCGTCTAATTTCCATAACAACAGAGG
CCGCATGACCTTTGTTTGAAGATCCGTCGGATACCGATGGGCTCGC
GAGACATTAGCTAGTCGGCTGGTAACGGCACACCGAGGCTACGAT
GTCTAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCCACTGGAAGCTGAGACA
CGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAAT
GGGCGCAAGCCTGAACAGCCATGCCGCGTGCAAGGAATAAGGCCCT
ATGGGTCGTAACATGCTTTTGTGGTGAGCAATAAGGTGTACGTGT
ACACCGATGAGAGTACATCACGAATAAGCATCGGCTAATCCGTGC
CAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGATTTAT
TGGGTTTAAAGGGTGCGTAGGCTGTGGGAAAGTCAGGGGTGAAG
CCCGGCGCTTAACGCGGAACTGCCCTTGATACTTCTCCGTGGAAAT
ACGGATGCCGTGGGAGGAATGAGTAGTGTAGCGGTGAATGCATAG
ATACTACTCAGAACACCGATTGCGAAGGCATCTCACGAATCCGTCA
TTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGATCAACACGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGAGTAACGATGATAACTAACCGTCGGCGATA
CACAGTCGGTGGCCAAGCGAAAGCGATAAGTTATCCACCTGGGGAG
TACGTTTCGCAAGAAATGAACTCAAAGGAATTGACGGGGCCCGCAC
AAGCGGAGGAACATGTGGTTTAAATTCGATGATACCGGAGGAACCTT
ACCCGGGCTCGAACGCGCAAGTGAAGGATCAAGAGATTGTGACGCC
TTCGGGGCACTTGTGCGAGGTGCTGATGGTTGTCTGCTGAGCTCGTGT
GTGAGATGTTGGCTTAAGTGCCATAACGAGCGCAACCTTGTCTGCC
AGTTACCAGCAAGTAAAGTTGGGGACTCTGGCGAGACTGCCACCGC
AAGGTGTGAGGAAGCGGGGATGACGTCAATCAGCACGGCCCTTA
CGTCCGGGGCGACACACGTGTTACAATGGCGACTACAGAGGGAAGC
CACCTGGCGACAGGGAGCAGATCTGAAAAGTGTCTCAGTTGGA
TCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGCTGGATTGCTAGTAATCG
CGCATCAGCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACA
CCGCCGTCAAGCCATGAAAGCCGGGGGTGCTGAAGTCCGTGACC
GAAAGGAGCGGCTAGGGCAAACTGGTAATTGGGGCTAAGTCGTA
ACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT

>RB15

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAGG
CATGCAAGTCGAACGGATGACAGAGAGCTTGTCTCTGAAGTCAGT

GGCGCACGAGTGAGTAACGCGTGGGAACTGCCCTTCACTGGGGAA
TAACGTTTGGAACGAACGCTAATACCGCATACGCCCGCAAGGGGA
AAGATTTATCGGTGATGGATGTGCCCGCGTTGGATTAGCTTGTGGT
GGGGTAATGGCCTACCAAGGCAATGATCCATAGCTGGTCTGAGAGG
ACGATCAGCCACGCTGGAAGTGAACACGCTCCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGCTAAGAAATATTGGGCAATGGAGGAACTCTGACCCAG
CCATGCCGCGTGAATGAAGAAGGCCCTCGGGTTGTAAGTTCTTTTA
GTCATGAAGATGATGACAGTAGTGACAGAAAAAGCACCAGCTAAGT
TCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGAACGCTTGTTCGG
ATTACTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGTTGTTAAGTCAGGGGT
GAAATCCAGGGGCCAACCTGGAAGTGCCTTTGATCTGCGCAAGC
TGGAGCGGATAGAGGAAGTGGAAATCTGTTGTAGGGGTGAAAT
CCGTAGATATCAGATAGAACACCAATGGCGAAGGCAGCTTCTGGA
TCGTTGCTGACACTGAGGGACGAAGGCGTGGTAGCAAAACAGAATT
AGATACTCTGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCATGCTTGTGTTGG
TTTCTTCCGGGGATCAGTGACGGAGTTAAACAGTTAAGCATGCCG
CCTGGGGACTACGATCGCAAGATTAAACTTAAAGGAATTGACGGG
GACCCGACAAAGCAGTGGAGTATGTTGTTTAAATTCGATGCTACGCG
AGAAACCTTACCGACCTTGACATCTGGTCGCGACTTCCAGAGATG
GTTGCTTCAATTCCGTTGGACCAAGACAGATGCTGCATGGCTGTCT
GTCAGCTCTGTCTGTGAGATGTTAGGTTAAGTCTGCAACGAGCGC
AACCCACGCCCTATGTTGCCAGCGGGTAAAGCGGGAACCTTATAGG
GGACTGCCCGCGTCAAGCGGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTC
ATCATGGTTCTTACGGGTCGGGCTACAAACGTAACAATGGCGGT
AACAAATGGGTGCAATGTGCGAAGGCAAGCAATCCTTAAAAACC
GTCTCAGTTGAGATTGCCCTGCAACTCGAGGACATGAAGTTGGA
ATTGCTAGTAATCGTTGATCAGAAATGCAACGGTGAATACGTTCCCG
GGTCTTGTACACACCGCTGTCAACCATGAGAGTCGATTTCACCCA
AAGTCGGTAGTTTAAACGCAAGAGGGCGCGCTACCGTGGGATTGG
TGATTGGGGTTAAGTCATAACAAGGTAGCAGTACCGGAAGGTGCGG
CTGGATCACTCCTT

>RB16

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGTAAACA
CATGCAAGTCGAACGGAGTTTACATGAACCTAGTGATTGTAAACT
TAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACTGCCCTTATCCAG
GGGGATAACAGTGAGAAATTAAGTCAATACCGCATAAGCGCACAG
AATCGCATGATTCAAGTGTGAAAGATTATCGGGATAAGATGGACC
CGGCTCTGATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGCCACCAAGGGCAG
GATCAATGACCGGCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAG
ACACGGCCCAAACCTTACGGGAGGCAAGTGGGGAATATTGACAC
AATGGGGGAAACCTTATGACGAGCAGCCGCGTGAGTGATGAAGTA
TTTCGGTATGTAAAGCTTATCAGCAGGGAAGAAATGACGGTACC
TGACTAAGAAGCCCGGCTAAGTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATA
CGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGTGTAAAGGGAGCG
TAGACGGCATGGCAAGTCTGAAGTGAATGCGGGGGCTCAACCCCT
GAAGTGTCTTGGAACTGTAAAGCTAGAGTGTGAGAGAGGTAAAGT
GAATTCCTAGTGTAGCGGTGAATGCGTATGATATTAGGAGGAACAC
CGGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGATGACTGACGTTGAGGCTCG
AAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTATGTCACGCC
GTAAACGATGATTACTAGGTGTGGGGGACTATAGTCTTCCGTGCC
GTCGCAACGCAATTAAGTAATCCACTGGGGAGTACGTTCCGAAGA
ATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCGCACAGCGGTGGAGC
ATGTTGTTTAAATCGAAGCAACGCAAAAAACCTTACCAATCTTGA
CATCTGGATGACCATAATGTAATGATATTCTCTCGGAGCATCCA

AGACAGGTGGTGCATGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTG
GGTTAAgTCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGCCTTTAGTAGCCAGCG
GTTCGGCCGGGCACTCTAGAGGGACTGCCAGGGATAACCTGGAGGA
AGGTGGGGATGACGCAAAATCATCATGCCCTTATGATTGGGGTAC
ACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAAGCGACCTGTGAAG
GTGAGCAAATCTAAAAATAACGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGC
AACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCA
TGTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACCCGCCGTACACA
CCATGGGAGTCGGAATGCCCCGAAGTCAGTGACCTAACCGCAAGGA
AGGAGCCGCCGAAGGCAGGTCTGATACTGGGGTGAAGTCGTAACA
AGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT

>RB17

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGCTTAACA
CATGCAAGTCGAACGGAGTTTACATGAAACCTAGTGAATTGTAACCT
TAGTGGCGGACGGGTGAGTAACCGTGGGTAACTGCCCTTATCCAG
GGGGATAACAGTGAGAAATTAAGTCTAATACCGCATAAGCGCACAG
AATCGCATGATTACGTGTGAAAAGATTATCGGGATAAGATGGACC
CGCGTCTGATTAGTAGTTGGTGAAGTAACGGCCACCAAGCGGAC
GATCAGTAGCCGGCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAG
ACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCGAGTGGGGAAATATTGCAC
AATGGGGGAAACCTGATGACGCGACCGCGGTGAGTGATGAAGTA
TTTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAGAAAATGACCGTACC
TGACTAAGAACCCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCGCGGTAATA
CGTAGGGGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGGTGTAAAGGGAGCG
TAGACGGCATGGCAAGCTGAAGTGAATGCGGGGGCTCAACCCCT
GAACTGCTTTGAAAGCTGTTAAGCTAGAGTGTGCGAGAGGTAAAGTG
GAATTCCTAGTGTAGCGGTGAATGCGTAGATATTAGGAGGAACAC
CGGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGATGACTGACGTTGAGGCTCG
AAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCC
GTAAACGATGATTACTAGGTGTTGGGGGACTATAGTCTTCGGTGCC
GTCGCAACCGCATTAAGTAATCCACCTGGGGAGTACGTTTCGAAGA
ATGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGC
ATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAAAACCTTACCAAACTTTGA
CATCTGGATGACCATAATGTAATGTATATCTCTTCGGAGCATCCA
AGACAGGTGGTGCAATGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTG
GGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGCTTTAGTAGCCAGCG
GTTCCGCCGGGCACTCTAGAGGGACTGCCAGGGATAACCTGGAGGA
AGGTGGGGATGACGCTCAAATCATATGCCCTTATGATTGGGGCTAC
ACACGTGCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAAGCGACCTGTGAAG
GTGAGCAAATCTAAAAATAACGTCTCAGTTCGGATTGTAGTCTGC
AACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCA
TGTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACCCGCCGTACACA
CCATGGGAGTCGGAATGCCCCGAAGTCAGTGACCTAACCGCAAGGA
AGGAGCCGCCGAAGGCAGGTCTGATACTGGGGTGAAGTCGTAACA
AGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT

>RB18

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAACA
CATGCAAGTCGAAGGGCAGCATATTGGTAGCTTGCTACTAATGATG
GCGACCGGCGCAGGGTGAGTAACGCGTATCCAACCTTCCCTATAC
TAGAGGATAGCCCGCGGAAAGTCGGATTAACTCTATGTIATICA
ATGCGGACATCTAAGTTGAATCAAAGATTATCGGTATAGGATGGG
GATGCGTCTGATTAGGTGTTGGCGGGTAACGGCCACCAAGCCC
ACGATCAGTAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACATTGGAAGCTG
AGACACGGTCCAACTCCTACGGGAGGCGAGTGAAGGAATATTGG

TCAATGGACGAGAGTCTGAACCAGCCAAGTAGCGTGACGGATGACG
GCCCTATGGGTGTGAAAGCTCTTTTATACAGGGATAAAGTGATCTAC
GTGTAGATTTTTGTAGGTACTGTATGAATAAGGACCGGCTAATCCCG
TGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAAGGTCCGGGCGTTATCCGGATT
TATTGGGTTTAAAGGGAGCGCAGGCTGATGATTAAGCGTGACGTGA
AATGTAGCCGCTCAAAGGCTGAAGTGCCTGCGCAACTGGTTATCTTG
AGTGAGTTCGATGTTGGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCT
TAGATATCACGAAAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCACAAGGCCCT
TTACTGACGCTAAAGCTCGAAGGTGCGGGTATCGAACAGGATTAGA
TACCCCTGGTAGTCCGCAAGGTAAACGATGGATGCCCGCTGTTTCG
ATATACTGTGAGCGGCCAAGAGAAATCGTTAAGCATCCACCTGGG
GAGTACGCCGGCAACGGTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTAATTCGATGATACGCGAGGAA
CCTTACCCGGGCTTGAAGTCCAGCGCAACGATACAGAGATGTTGAG
GCCCTTCGGGGCGCTGGTAGAGGTGCTGATGTTGTCTCAGCTCG
TGCCGTGAGGTGTGCGCTTAAGTGCCATAACGAGCGCAACCCCTTTC
ATTAGTTGCCATCAGGTAATGCTGGGCACTCTGGTGA TACTGCCACC
GTAAGGTGTGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAGCAGCGCCCT
TACGTCCGGGCTACACACGTTTACAATGGGAGGTACAGAGAGTC
GGATGTACGTAAGTACATTTCTAATCTTAAAGCTTCCCTCAGTTCGG
ATTGGGGTCTGCAACCCGACCCATGAAGCTGGAATTCGCTAGTAAT
CGCGCATCAGCCATGGCGGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACA
TACCGCCCGTCAAGCCATGAAAGCCGGGGCGCTTGAAATCCGTGA
CCGCAAGGATCGGCTAGAGCGAACTGGTAAATGGGGCTAAGTCG
TAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT

>RB19

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAAATGAACGTTGGCGGCTGGATTAGG
CATGCAAGTCGAACGGTAAGGTACTTAGCTTGTGTAACCCCTAG
AGTGCGGAAAGGGATAGTACAATGTAGATCATATACCTCAGGTTG
GGGATAGCGTCTGGAACCGGGCGGTAATACCCGATAATATCTCCGG
ATCAAAGGTGAGATTCCGCTGAGGATTAGTTTACACACTATTAGCT
TGTGCGGGGTAAATGGCCCAAGGCGACGATGGTTACCGGGCG
TGAGAGCGTGACCCGGATCACTGGGACTGAGACACTGCCAGACAC
CTACGGGTGGCTGCAATCGAGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCT
GATCGAGCGACGCCCGGTGATGATGAAGGCCCTTCGGGTGTAAAA
TACTGTGATTAGCGGGAATGTGTAGGGGTATCTTTACATTTGA
CCTATCAATTGGAGGAAGGACGGGCTAAGTTCTGCCAGCAGCGCG
GTAAGACGAACTGTCCAAACGTTATTCGGAATCACTGGGCTTAAAG
GGTGCCTAGGCGGACTTGCAAGTGGGATCTGAAATCCCTCGGCTCA
ACCGAGGAACTGGGTCCCAACTGCGAGACTAGAGTGAGGCGAGGG
GTAAGTGGAATCTGCGGTGGAGCGGTGAAATGCTTTGATATCGCAA
GGAAACCGGGGGCGAAGGCGACTTACTGGGCTTAACTGACGCTC
AAGCACGAAAGCTAGGGTAGCGAACGGGATTAGATACCCCGGTAGT
CCTAGCCGTAAACGCTGGGTACTTGGTGGAGGAGCCTCCATACTTT
TCCGGCCGTAGCGAAAGTTTAAAGTACTCCGCTGGGGAGTATGGT
CGCAAGGCTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGCTCACACAAGCG
GTGGAGGATGTGGCTTAATTCGAGGCTACGCGAAAAACCTTATCCT
AGGCTTGACATGATGATACCTCCCTGAAAGGGGAGTAAAGTTGC
CTTCGGGTGAAACTTGACAGGTGCTGATGGCTGTCTGACGTCGT
GTCTGAGATGTGCGGTAAAGTCCCTTAACGAGCGGAAACCCCTGTC
ACCAGTTCCATCGAGTAATGTCTGGGACTCTGTGTAGACTGCCGA
AGTTAATGAGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAGTCTCATGGCCT
TTATGTCTAGGGCTGCACAGTCTTACAATGGCATCCCAAAAGGGA
AGCGAGACTGTGAAGTGGAGCTAATCCCAAAAAGGTGTCTCAGTT

CGGATTGCAAGGCTGCAACTCGCCTGCATGAAGCGGAATCGCTAGT
AATCGCGGGTCATCATACCGCGGTGAATATGTTCTGAGCCTTGATC
ACACCGCCGTCGAAGCCAGAAAGCAGGGGGCATCCGAAGTCGCCG
AAGCAACTTTATAGAGCTAAGCGCGAAGATGAACCTTTGTGATTGG
GACTAAGTCGTAAACAAGGTAGCCGTAGGGGAACCTGCGGCTGGATC
ACCTCCTT

>RB20

AGAGTTTGATCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAACA
CATGCAAGTCGAGGGGAGCATGATCAAAAGCTTCTTTGATTGATG
GCGACCGGCGCAGGGTGAGTAACGCGTATCCAACCTTCCCTTAG
TAGGGCATAGCCCGCGAAAGTCGGATTAATACCTATGTTTCCA
ATGAGGACATCTGAGCTGGAATAAAGATTTATCGCTAAGGGATGGG
GATGCGTCTGATTAGTTGTTGGCGGGTAACGGCCCAAGGCCG
ACGATCAGTAGGGTCTGAGAGGAAGTCCCCACATTGGAAGCTG
AGACACGGTCCAACTCTACGGGAGGAGCAGTGAGGAATATTGG
TCAATGGTCGAGAGACTGAACAGCCAAGTAGCGTGCAAGGATGACG
GCCCTATGGGTGTAACCTGCTTTATACGGGGATAAAGTGAGCCA
CGTGTGGTTTTTTCAGGTACCGTATGAATAAGGACCGCTAATTC
GTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAAGTCCGGGCTTATCCGGAT
TTATTGGGTTTAAAGGAGCGCAGCGGGTTGTTAAGCGTGACGTG
AAATGTAGCCGCTCAACGGCTGAACTCGCTCGGAACCTGGCAGTCT
TGAGTGAGTACGAGCTCAGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAATG
CTTAGATATCAGGAAGAACCCCGATTGCGAAGGAGCTGACGAGTC
CTTACTGACGCTAAAGCTCGAAGGTGCGGGTATCGAACAGGATTA
GATACCTTGGTAGTCCGCAAGGTAAACGATGGATGCCCGTGICTG
CGATATAGTGTAGGCGGCCAAGAGAAATCGTTAAGCATCCCACTG
GGGAGTACCGCCGCAACGGTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGG
CCGCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTAATTCGATGATACGCGAGG
AACCTTACC CGGCTTGAACTGCCAGAGAACGATTCAGAGATGATG
AGGCCCTTCGGGGCTCTGGTGGAGGTGCTGCATGGTTGCTGCAGCT
CGTGCCGTGAGGTGTCGGCTTAAGTGCCATAACGAGCGCAACCTT
GTCGTAGTGTCCATCAGGTGATGCTGGGCACTCTCGGATACCTGCC
ACCGTAAGGTGTGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAGCACGG
CCCTTACGTCCGGGGTACACACGTTTACAATGGGTGGTACAGAG
AGTCGGTGATGCAATGTGATCCAATCCTTAAAGCCATCCTCAGT
TCGGATTGGGGTCTGCAACCCGACCCCATGAAGCTGGATTGCTAG
TAATCGGCGCATCAGCCAAGGCGCGTGAATACGTTCCCGGCCCTGT
ACACACCGCCCGTCAAGCCATGAAGCGGGGGCGCTGAAGTCCG
TGACCGCGAGGGTCCGGCTAGGGTGAAACCGGTGATTGGGGCTAAG
TCGTAAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCT
T

>RB21

AGAGTTTGATCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGAGGCTTAATA
CATGCAAGTCGAACGGGATGGGGTCTTCGGGACCCCGAGAGTGG
CGCAGGGTGCGCAAACGCGTATGCAACCAACCCCGACAGGCGGAT
AGCCGGTGGAACCGCCGATAATACGCCATGTTCCGAGGAGGCG
ATCTCCAAGCGGATAAAGCTGAGGCGGTGCGGGACGGGATCGCTC
CCATTAGATAGTCGGCGGGGTGACGGCCACCGAGTCCACGATGGG
TAGGGGATCTGAGAGGACGGTCCCCACACTGGTACTGAGACACGG
ACCAGACTCTGCGGGAGGACGAGTAAGGGATATTGGTCAATGGT
CGGAAGACTGAACAGGCAATGCCGCGTGAGGGGAATGAGGCCCTAG
GGTCTGTAACCTCTTTTATTCGGGGACAAAGGACGCGCACGAGATGC
GTGTTTGAGGGTACCGAAGGAATAAGCATCGCTAACTCCGTGCCA
GCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCGAGCGTTATCCGGATTCAATTG

GGTTTAAAGGGTGCAGGCGGCGGTGCAAGTCAGCGGTGAAGGCC
CGGGGCCCAACCCCGGAAGTGCCGTGTGATACTGTGCGGCTGGAATG
CGGTGAGGGCGGGCGGAACGTGGCGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG
ATATGCCACAGAACCGCGATAGCGAAGGCGAGCTCGCCAGGCTGCA
TTGACGCTCGGGCACGAAAGCGTGGGGATCGAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGGACGCTCGTCTGCGGCGACA
GATGGTCGGCGGCCAAGCGAAAGCGATAAGCGTCCACCTGGGGA
GTACGGTCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCA
CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCT
TACCCGGGCTTGAACTGGAGGGGAACGACCGGGAGACCGGAAGGC
CAGCAATGGCCCCCTCAGAGGTGCTGCATGGTTGCTGCTAGCTCGTG
CCGTGAGGTGTCGGGTCAAGTCCCATACGAGCGCAACCCCTGCGT
CCAGTTGCCAGCGGTTTGCCGGGCACTCTGGACGGACTGCCACG
CAAGTGGAGAGGAAGCGGGGATGACGTCAAATCAGCACGCGCCT
TACGTCCGGGCGACACAGTGTCTACAATGGCCGCGACAGAGGAA
GCCACGCGCAACGCGGAGCGGATCCCGAAGTCCGGTACAGTCCG
GATCGGGGGCTGCAACCCGCCCCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAA
TCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGATC
ACACCGCCCGTCAAGCCATGGGAGCGCGGGGCGCTGAAGTCCGTG
ACCGCGAGGGTCCGGCTAGGGTGAAACCGGTGATTGGGGCTAAGTC
GTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT

>RB22

AGAGTTTGATCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGCTTAACA
CATGCAAGTCGAACGAGAGAGAGAGGTGCTTGCATTTTCAATCGA
GTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACTGCTCATAACAGGG
GGAATAACAACCTGGAACCGTTGATAATACCGCATAAGCGCACAGCA
TCGCAATGATGAGTGTGAAAACTCCGGTGGTATGAGATGGACCCG
CGTCTGATTAGCTAGTTGGCAGGGTACGGCCTACCAAGCGACGGA
TCAGTAGCCGCTGAGAGGGTGAAACGGCCCATTTGGGACTGAGAC
ACGGCCCAACTCTACGGGAGGAGCAGTGGGGGATATTGCACAA
TGGGGGAACCCGTGATGACGACGCGCGGTGAGCGAAGAAATATC
TCGGTATGTAAAGCTCTATCGGAGGGAAGAAATGACGGTACCTG
ACTAAGAAAGTCCGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TATGGAGCAAGCGTTATCCGATTACTGGGTGTAAGGGAGCGTA
GACCGTGGCGCAAGTCTGATGTGAAAGGCGGGGGCTCAACCCCGCA
ACTGCAATTGGAACCTGCGGTGCTGGAGTGTGCGGAGGGGTAAAGCGGA
ATTCTAGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCG
GCGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGATCACTGACGTTGAGGGCTCGAA
AGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCACGCGGT
AAACGATGAATACTAGGTGTGGGTGAGTACCCCATCCGTGCCG
AGTTAAACAATAAGTAATCCACCTGGGGAGTACGGCCGAAGGTT
GAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAACGAGTGGAGTAT
GTGGTTTAAATCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACAGGTCTTGACA
TCGAGTGACGTACCCAGAGGTGGGTATTTCTTCGGGACACGAAGA
CAGGTGGTGATGGTTGCTGCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTT
AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGTCTATTAGTGTACGCAAGA
GCACTCTAATAGGACTGCCCTTGACAAAACGGAAGGAGTGGGGAC
GACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGTACACACGTAATA
CAATGGCCGTCAACAGAGGGAAGCAATATGGTGAATGGAGCAAA
CCCCAAAAGCGGTCTAGTTAGATTGACAGGCTGCAACCCGCGCTG
CATGAAGTCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTG
AATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCGTCACCATGGGAG
CCGGTAATACCGAAGTCAGTAGTTCAACCGCAAGGAGAGCGCTAC

CGAAGGTAGGATTGGCGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCG
TATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT

>RB23

AGAGTTTGATCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAACA
CATGCAAGTCGAGGGGAGCATGGTCTTAGCTTGAAGACCGATG
GCGACCGGCGCACGGGTGAGTAAACGCTATCCAACCTGGCCCTTAG
TAGGGGATAGCCCGGCGAAAGTCGGATTAATACCTATGTTTTCCC
ATGAGAGCATTTGAAGGGGAACAAAGATTATCGTAAGGGATGGG
GATGCGTCCGATTAGCTTGACGGCGGGGTAACGGCCACCGTGGCA
ACGATCGGTAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACATTGGTACTG
AGACACGGTCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGG
TCAATGGCCGCGAGGCTGAACCAAGTAGCGTGAGGGATGACG
GCCCTATGGGTTGTAAACCTCTTTGACGGGGAATAAAGTGCCCA
CGCGTGGTGTGTTGTATGTACCTGAGAAATAAGGACCGGCTAATCC
GTGCGACGACCGCGGTAATACGGAAGGTCTGGCGTTATCCGGAT
TTATTGGGTTAAAGGAGCGCAGGCGGAGATTAAGCGTGACGTG
AAATGCGCGGCTCAACCGTGAAGTGCGTCGCGAACTGGTTCTCT
TGAGTGAGTACGACGCTGGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATG
CTTAGATATCAGGAAGAACCCGATTGCGAAGGCAGCCAGCGAGGC
CTTAAGTACGCTAAAGCTCGAAGGTGCGGATTCGAACAGGATTA
GATACCTTGGTAGTCCGACCGGTAAACGATGGAATGCCGCTGTCCG
CGACAGACTGCCGCGGCCAAGGGAAACCGTTAAGCATCCACCTG
GGGAGTACGCGGCCAAGGTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGCC
CGCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTAATTCGATGATACGCGAGGA
ACCTTACCCGGGCTTGAATGCGAGGAGAACGATACAGAGATGTTGA
GGCCCTTCCGGGCTCTGTGGAGGTGCTGCATGGTTGTCGTCAGCTC
GTGCGGTGAGGTGTCGGCTTAAGTGCCATAACGAGCGCAACCCCTG
TCCCGGTTGCCATCAGGTGATGCTGGGCACTCCGTGGATACTGCCA
CCGTAAGGTGCGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCAGCACGGC
CCTTACGTCCGGGGTACACACGTGTTACAATGGGTGGTACAGAGA
GTGCGCGGTACGCAATTGCGGTCCATCAATAAGGCCATCTCAGTT
CGGATTGGGCTCTGCAACCCGACCCCATGAAGCTGGATTGCTAGT
AATCGCGCAACAGCATGCGCGGTGAATACGTTCCCGGCGCTTGT
ACACACCGCCGTCAGCCATGAAGCCTGGGGCGCTGAAGTCCG
TGACCGCGAGGGTCCGCTAGGGTGAACAGGTGATTGGGGCTAAG
TCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCT
T

>RB24

AGAGTTTGATCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTAACA
CATGCAAGTCGAACGGGATTTGTTTCGGCAGAATCTAGTGGCG
AACGGGTGAGTAACGCGTAGGCAACCTGCCCTCCGGCCGGGACAA
CACTCCGGAAGGGGTGCTAATACCGGATACGAAGTCTGTCCGCGAT
GGTACGGATTGAAAGATGGCCTCTATTATAAGCTATCGCCGGGG
GATGGGCTCGCTCCGATTAGCTGGTGGTGGGGTAACGGCCTACC
AAGGCGACGATCGGTAGCCGCTGTGAGAGGATGAACGGCCACATTG
GGACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGA
ATCTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGT
GAGGAAGTTCTTCGGAACGTAAGCTCTGTGTTCTGACGAACCTC
CCCTCTATCAACAACGGAGGGGACTGACGGTAGGGAAACGAGGAAG
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCGCGGTAATACGTAGGTGGCA
AGCGTGTCCGGAATTAATGGGCGTAAAGCGCATGATAGGCGGTAAT
TTAAGTCTGTGTAAGTCTGCGGGCTCAGCCCGTATGGCGATGG
AAACTGGGTACTTGTAGTGACGAGGAGGAAGGGGAACCTCCAGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGATAATGGGAAGAACACCGGTGGCGAAG

GCGCCTTTCTGGACTGTGTCTGACGCTGAGATGCGAAAGCCAGGGT
AGCGAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCTGGCCGTAACGATGG
GTACTAGGTGTTGGGAGGTATCGACCCCTTCGTGCCGGAGTTAACG
CAATAAGTACCCCGCTGGGGAGTACGGCCGAAGGCTTAACTCA
AAGGAATTGACGGGGGCCCCACAAGCGGTGGAGTATGTGGTTTAA
TTCGACGCAACGCGAAGAACCTTACAGGGCTTGACATCGACTGAA
AGATGCGAGAGATGTATCCCTCTCTTCGGAGACAGGAAGACAGGTGG
TGCAATGGCTGTCTGACGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCC
GCAACGAGCGCAACCCCTATCTATGTTACCATCAATTAAGTTGGGG
ACTCATAGGAGACTGCCAGGGACAACCTGGAGGAAGCGGGGATG
ACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTGGGTACACACGTAATAC
AATGGCCGGCAACAGAGGGAAGCGAAGCGCGAGGGCGGAGCGAAG
CCCCAAAACCCGGTCCAGTTCGGATCGCAGGCTGCAACCCGCTG
CGTGAAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTCGCGTG
AATACGTTCCCGGCTTGTACACACCCGCCGTACACACGAAAG
TTGGTAACACCCGGAGCGGTGGGGTAACTTAGGGAGCCAGCCGT
CTAAGGTGGGCGCATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCG
TATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT

>RB25

AGAGTTTGATCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCTAGGATTAGG
CATGCAAGTCGAACGAGGTAGCAATACCGAGTGGCGGAAGGGTGA
GGAAACAGTGAGTAATCTGCCCAAGTTGGGAATAACAGTTGGAA
ACGATTGCTAATACCGAATGTGGCTTTTTTCCGCTGGAAGAACAG
TTAAAGATTATCGCTTGGGGATGAGCTCGCTCCCATAGTTAGTT
GGTGAGGTAAACGGCCACCAAGACAATGATGGGTAGCTGGTCTGAG
AGGATGGTACGCCACACTGGGACTGAGACACTGCCAGACTCTTAC
GGGAGGCTGCAGTCGAGAACTTGGGCAATGCGCGAAGCGTGAC
CAGCAATGCCGCTGTATGATGAAGGTCTTCGGATTGTAATAACT
GTCTCCCGGACGAAAGATGACGGTACCGGGGAAGGAAGCCACGG
CTAACTACGTGCCAGCGCGCGGTAAATACGTAGGTGGCGAGCGTT
GTTCCGATTATTGGGCGTAAGGGTCTGTAGGAGGTTTGTAAATA
CGAGGTGAAATCCGGGAGCTCAACTCCCGAATTCCTTGTAGACTG
GCAGACTGGAGTACTGGAGAGGTAAAGCGGAATACAGGTGTAGCG
GTGGAATGCGTAGATATCTGGTAGAACCAAGAGCGAAGGCAGCT
TGCTGGACAGTTACTGACTCTCAAAGACGAAAGCGTGGGGAGCAAA
CAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACCGCGTAACCGGTGTCAACTT
GATGTAAGGCGGTTTCAGTCCGTTCTGTATCGAAGCTAACCGGTTAA
GTTGACCGCTGGGGACTACGGCCGCAAGGCTAAACTCAAAGGAA
TTGACGGGGGCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGCTTAATTCGAG
GCAACGCGAAGAACCTTACCTGGGCTGAAATATAAGTCCAGTCT
GTGAAAGCAGATCTCTTTCGGAGCGCTTATACAGGTGCTGCATGG
CTGTCTGACGTCTGTCTGTGAGGTGTTGCGTTAAGTCCGGCAACGA
GCGCAACCCGTGTCATTAGTTACAGCGGTCAAAGCCGGGACTCT
AATGAGACTGCCCGTGTAAAGCGGGAGGAAGGCGCGGATGACGTCA
AGTCAGTATGGCCCTTACGCCAGGGCTGCAACGTGTCTAATAGG
TCGGTACAATGAGACGCAAGCCGCGAGGTGGAGCAATCTACAA
AACCGATCTTAGTTCGGAATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGT
TGGAATCGCTAGTAAAGCGGTATCAGTACGACGCGCTTGAATACGT
TTCCGGGCTTGTACACACCCGCCGTACATCATGGGAGTTGATTGC
ACCCGAAATCGCTGATCTGACCTGCAAGGAGGAAGGCGCCTAAGG
TGTGGTCTGATGACTGGGATGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGGG
AACCTGCGGCTGGATCACCTCCTT

>RB26

AGAGTTTGATCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACA

CATGCAAGTCGAACGGGGTTTAAGAAAGGAAGCTTGCTTTCATTTTA
 AACCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGGAACCTGCCCTTC
 AGTGGGGAACAACAACCTAGAAATGGTTGCTAATACCGCATAATGTC
 GGAGAGCCGCATGACATTCGACCAAAAGGATTTATTCGCTGAAGGA
 TGGCCTCGCTCCGATTAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCCACCAA
 GTCTACGATCGGTAGCCGAACCTAGAGAGTTGATCGGCCACATTGGG
 ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGAGCAGTGGGGAAT
 ATTGGGCAATGGGCGAAAGCCTGACCCAGCAACGCCGCTGAAGG
 ATGACGGTCTTCGGATTGTAACCTTCTTTAATGGGGAAGAACA
 ATGACCTACCCAAAGAAATAGCCCGGCTAACTTCGTCCAGCAGC
 CGCGGTAATACGAAGGGGCTAGCGTTGCTCGGAATCACTGGGCGT
 AAAGGGCGCGTAGCGCGGCTTTAAGTCGGGGGTGAAAGCCTGTGG
 CTCAACCACAGAATGGCCTTCGATACTGGGACGCTTGAGTATGGTA
 GAGGTGGTGAACTGCGAGGTAGAGGTGAAATTCGTAGATATTTC
 GCAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCCAACTGGACCAATTACTGACG
 CTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTCGGT
 AGTCCACGCGTAAACGATGAATGCCAGCTGTTGGGGTCTTGAC
 CGCAGTAGCGCAGCTAACGCTTTGAGCATTCGCGCTGGGAGTACG
 GTCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACACAAGC
 AGTGGATTATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA
 GGGCTTGACATCCTCTGACAGCTGATAGATACAGTTTCCCTTCGGG
 GCAGAGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTACGCTCGTGTCTGAG
 ATGTTTGGTTAAGTCCAATAACGAGCGCAACCCCTATTCTAGTTGC
 CAGCAGTAATGGTGGGAACTCTAGAAAGACTGCCGGTAATAAATC
 GGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTTATGTCTT
 GGGCTACACAGTACTACAAATGGCCGTTACAAAGAGCAGCAACATA
 GTGATATGAAGCAAACTCAAAAGCGGTCTCAGTTCCGACTGCAG
 GCTGAAATTCGCTGCACGAAGTCGGAATTGCTAGTAATGGCAGGT
 CAGCATACTGCCGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTACACACCGCCCG
 TCACACCATGAGAGTTGGAATAACCCGAAGCCTGTGAGCTAACTTT
 TAGAGGCAGCAGTCGAAGGTAGAGCCAAATGATTGGGGTGAAGTCGT
 AACAAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGTTGGATCACCTCCTT
 >RB27
 AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGCGCGGATTAGG
 CATGCAAGTCGAGCGAGAACTCTGGGAGTTCAAGTTTCGGACAAGA
 ACTTCGGAGGAAAGCGCGGGAAGGGTGAGTACAACATGGGCAAT
 CCATCTCCAAGTTGGGTATACTTCGGAAGGGGAGATAATCCCG
 AATGTGGTGAGCCAAGGCATCTTGGCGAACTAAAGCGGGGACCG
 CAAGGCCCTGCCGTTGGAGCCGAGCCCGTGCACTATCAGCTAGTTG
 GTGAGGTAAACGGCCACCAAGGCGATGACGGTTAGCTGGTCTGAGA
 GGATGGTCAGCCACACTGGGACTGAGATACTGCCAGACTCCTACG
 GGAGGCTGCAGTCGAGAAATCATTCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGG
 TCGCAGCCCGCGTGGAGGACGAAGGCTTCTCGGATTGTAACTCCTG
 TCATGTGGGATAAACGGTCTTGGCGCAACAACGCCGAGAAAGTGAT
 AGTACCACAGGAGGAAGAGACGGCTAACTCTGTGCCAGCAGCCGCG
 GTAATACAGAGGTTCTGAGCGTTGTTGGATTACTGGGCGTAAAG
 GGAGCGTAGGCGGTGCGGTGTTGAATGTGAAAGCCCAAACTCA
 ACGATGGAATTGCATTCAAACCTGCCCGGCTGGAGTACTGGAGAGG
 AGAGCGGAATTCTCGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCGAGAA
 GAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGCCAGATACTGACGCTGA
 GGCTCTAAAGTTAGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTCGGTAGTC
 CTAACTTAAACCGGTGTACACTTGGTGTGCGAGGAATTGTCCCTTGT
 CGCGCGTAGCCAACCGGTAAAGTGTACCGCTGGGAGTACGGTC
 GCAAGATTAAACTCAAAGGAATTGACGGGACCCGCAACAAGCGG

TGGAGCATGTGGCTTAATTCGATGCAACGCGAAGAACCTTACCTGG
 ACTTGACATGCAGGTGGTAGGATCCCGAAAAGGAGACGACCGTAGC
 AATACGGAGCCTGCACAGGTGCTGCATGGCTGCTCAGCTCGTGC
 TGTGAGGTGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTGGT
 TAGTTGCCCTTATTCAGTTAGGCACTCTAGCCAGACTGCCGGTGATA
 AGCCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAGTCAGTATGGTCCTTATG
 TCCAGGGCTGCACACGTGTACAATGACCGGTACAGAAGGAAGCAA
 TGCCCGGAGGCGGAGCAATCCCGAAAGCGGCCCGAGTTCGGATT
 GGAGTCTGCAACCGCACTCCATGAAGCCGGAATCCTAGTAACCGC
 GTATCAGCTACGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGTACACACC
 GCCCGTCACTCATGGGAGCCGATTGCACCCAAAGCCGTTGATTG
 ACCCGCAAGGGGATAGACGTCCAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCT
 T
 >RB28
 AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCCTAACA
 CACGCAAGTCGAGCGGGGACATGCGACGACCAAGAAATTCGGTT
 GGAAGGAAGATGTATTGTTCTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACCGG
 TGAGCAACCTGTCCCTTACAGGGGGAATAACACAGCGAAAGTTGTAC
 TAATACCGCATGAGACCAGGTGAGACATCTCACAGGGGTCAAAGG
 AGCAATCCGGTAAGGGGTGGGCTCGCGTCCGATTAGATAGTTGGTG
 AGGTAACGGCCACCAAGTCGACGATCGGTAGCCGACCTGAGAGGG
 TGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGA
 GGCAGCAGTGGGGAATATTGGGCAATGGGGGAACCCCTGACCCAG
 CAACGCCCGGTGAGGGAAGAGGTTTTCGGAATGTAACCTCTGTCT
 CTTGGTGAAGAGGAAGAGACGCTAGCCAAGGAGGAAGCCCGGCT
 AACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAATACGTAGGGGCGAGCGTTGT
 CCGGAATGATTGGGCGTAAAGGGCGGTAGGCGGCCCGGTAAAGTCT
 GGAGTGAAAGTCTGCTTTTAAAGGTGGGAATTGCTTTGGTACTGTCT
 GGGCTTGAGTGACGAGAGGTAAGTGGAATTCAGTGTAGCGGTG
 AAATGCGTAGAGATTGGGAGGAACCAAGTGGCGAAGGCGACTTA
 CTGGACGCAAACTGACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAAAAC
 AGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGAATACTAG
 GTGTGGGGGACTGACCCCTCGGTGCGGAGTTAAACAATAAGT
 ATTCCACCTGGGAGTACGCCCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATT
 GACGGGGGCCCGCAACGAGTGGATTAATGTGGTTTAAATTCGACGC
 AACCGGAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCCAATAACGAGGCGAG
 AGATGCATTAGGTGCCCTTCGGGGAAGTTGAGACAGGTGGTGCAI
 GGTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC
 GAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAGCGA
 GACTGCCGTTGACAAAACGGAGGAAGGCGGGGACGACGTCAAATC
 ATCATGCCCTTATGTCTGGGCTACACACGTAATAACAATGGCGATC
 AACAAAGGGAAGCAAAATCCGTAAGGAGGAGCAAAATCCCAAAAGT
 CGTCTCAGTTCCGATCGTGGGCTGCAACCCGCCACGTGAAGTCGG
 AATTGCTAGTAATCGCGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCC
 GGGCTTGTACACACCGCCGCTACACCATGAGAGTCGGGAACACC
 CGAAGTCCGTAGTCTAACCGCAAGGAGGCGCGGCCGGAAGGTGGG
 CTTGATAATTGGGGTGAAGTCTGAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGG
 TGCGGCTGGATCACCTCCTT

>RB29

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGCATGCTTCATA
 CATGCAAGTCGAACGAGAAGCTGACTTCGGTCACTGGAAGTGGCG
 GACGGGTGAGTAATATGTAGGAAATCTGCCCTAGAGAGGGGGACA
 ACAGAGGGAACCTCTGCTAATACCCCATATGAGCTTGGCTGCAAT
 GCCAATCTGAAAATCCGGTGTCTAGGATGAGCCTGCATCTGATT

AGCTTGTGGTGGTGAATGGACTACCAAGCGACGATCAGTAGCT
GGTTTGAGAGGATGATCAGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCCAT
ACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAAATTTGCGCAATGGCGAAA
GCCTGACGCAGCAATGCCGCGTGAATGATGAAGCCCTTCGGGGTGT
AAAGTCTGTCACTGGGGACGAAACTTGACGGTACCCACAGAGGAA
GCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGC
AAGCGTTGTTCCGAATCATTGGCGTAAAGAGTTCGTAGGCGGTAT
GTAAAGTCCGGTGTAAATCCCGAAGCTCAACTTCGGCATGGCACT
GGATACTTGCAAACTAGAAATGCGGTAGAGGTAAAGGAAATCCTGG
TGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAGGAACATCGGTGGCGAA
AGCGCTTACCGGGCCGTTATTGACGCTGAGGAACGAAAGCCGGGG
TAGCAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCCGCCGTAACGATG
GATACTAGGTGTTGCGGTATCGACCCCTGCAGTCCGTAGCTAAC
GCGATAAGTATCCGCTGGGGAGTACGCACGCAAGTGTGAACTC
AGAGGAATTGACGGGACCCGCAACGCGGTGGAACATGTGGTTTA
ATTCGAAGCAACGCAAGAACCTTACCAGGGCTTGACATCTGAGGA
ACTTTTGTGAAAGCAGAAGGTGCTCTTCGGAGAGCCTCAAGACAGG
TGGTGCACGGTTGTCTGACGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGT
CCCGCAACGAGCGCAACCTCGTCTGTTAGTTGCACATATCGGTATAC
TGATAATGATGCTCTAGCGAGACTGCCGGTGATAAACCAGGAGAA
GGTGGGACGACGCTAAATCATCATGCCCTTATGCTCTGGGTAC
ACACGTGTTACAATGGCTATGACAACGAGCAGCAACCCCGAGGG
TGAGCAAAATCTTAAACATAGTCTCAAGTTCGGATTGCACTCTGCAA
CTCGAGTGCATGAAGTCGGAATCGCTAGTAACCGCAGATCAGCACG
CTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTTGACACCCGCGGTACACACC
ATGGAAGTCGACACCGCCGAAGTACGTGAGCTAACCATTTGGAGG
CAGCGTCTTAAGGCAGGGTTGGTGAAGTGGGGTGAAGTCGTAACAAG
GTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACTCTCT

>RB30

AGAGTTTGATCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGCGTGCCTAACA
CATGCAAGTCGAACGGGGAATTTGTTTCGGCAGAATCCTAGTGGCG
AACGGGTGAGTAACGCGTAGGCAACCTGCCCGCGGATTGGGACAA
CACCCCGAAAGGGGTGCTAATACCGGATACGAAGACAGCACCGCAT
GGCGCTGTTTGAAGATGGCTCTATTATAAGCTATCGCCGGGG
ATGGGCTGCGTCCGATTAGCTGGTGGGGGGTAACGGCCACCA
AGGCGACGATCGGTAGCGGTCTGAGAGGATGAACGGCCACATTGG
GACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAAGTGGGGAA
TCTTCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCGTGGGTG
AGGAAGTCTTCGGGACGTAAAGCCCTGTGTTTATGACGAACGGT
CCCTCTATCAACACGGAGGGGAATGACGGTAATAGACGAGGAAG
CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGTGGCA
AGCGTTGTCCGAATATTGGGCGTAAAGCGCATGTAGGCGGCGGT
TAAAGTCTGCTGAAACTGCGGGGCTCAGCCCGTATGGCGATGG
AAACTGGGTGCTTTGAGTGCAGGAGAGGAAGGGGAACCTCCAGTG
TAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAG
GCGCCTTCTGGAGTGTCTGACGCTGAGATGCGAAAGCCAGGGTA
GCGAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCTGCGCGTAACGATGGG
TACTAGGTGTGGGAGGTATCGACCCCTTCCGTGCGGAGTTAACGC
AATAAGTACCCCGCTGGGGAGTACGCGCGCAAGGCTTAACTCAA
AGGAATTGACGGGGTCCGCAACGCGGTGGAGTATGTGGTTAAT
TCGACGCAACGCGAAGAACTTACAGGGCTTGACATCGACTGAAA
GGAGCAGAGATGTTCCCTCTCTTCGGAGACAGGAAGACAGGTGGT
GCATGGCTGTCTGACGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCG
CAACGAGCGCAACCCCTATCCCATGTTACCATCTTGAAGTTGGGGA

CTCATGGGAGACTGCCAGGGACAACCTGGAGGAAGCGGGGATGA
CGTCAAGTCATCATGCCCTTATGTCTGGGCTACACAGTACTACA
ATGGCCGGCAACAGAGGGGAAGCGAAGCCGAGGCGGAGCGAACC
CCAGAAAACCGGTCCAGTTCCGATCGCAGGCTGCAACCCGCTGC
GTGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCAGGTACGATACTGCGGTGA
ATACGTTCCCGGCTTGACACACCGCCGTCACACACGAAAGTT
GGTAACACCCGAAGCCGGTGGGTAACCGTAAGGAGCCAGCCGTCT
AAGGTGGGGCGATGATTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTA
TCGGAAGGTGCGGTGGATCACCTCTT

>RB31

AGAGTTTGATCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAAACA
CATGCAAGTCGAGGGGAGCATTGAGATAGCTTGTCTATTTCAGATG
GCGACCGGCGCACGGGTGCGTAACACGTATCCAATCAACCATGGC
TCAGGGATAGCTTTTGAAGAAAGATTAACTGATGGTCTCAA
GTTAAGACATCTTTCTGAGTAAAGATTGTCGCGGATGGATGAGG
ATGCGTCCGATTAGGTAGTAGGGGGTAACGGCCCACTAGCCGA
CGATCGGTAGGGGTTCTGAGAGGAAGTCCCGCAATTGGAAGTGA
GACACGGTCCAACTCTACGGGAGGAGCAGTGAGGAATATTGGT
CAACGGGCGAGAGCCTGAACAGCAAGTACGCTGAGGGATGACG
GCCCTACGGGTGTAAACCTCTTTTGGTGGGAATAAAGTGTCCAC
GTGTTGGGATTTGTATGTACCTTACGAATAAGCATCGGCTAATTC
GTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAAGATGCGAGCGTTATCCGGAT
TTATTGGGTTTAAAGGAGCGTAAGCGGGCTTTAAGCAGCGGTCT
AAATGTCATGGCCCAACCTTGCGATGCCGTTGGAAGTGGGGTCTT
GAATACACACAAGGACGGTGAATCTGTTGTGTAGCGGTGAATGC
TTAGATATGACGAAGAACTGATTGCGAAGGAGCCGCTCTGGGT
GCGATTGACGCTGAGGCTCGAAAGTGGGGGATCAACAGGATTAG
ATACCTGGTAGTCCGCACAGTAACGATGAATGCTGTTCTGGGC
GATATAATGTCCGGGACCTAGGGAACCATTAAGCATTCCACCTGG
GGAGTACCGCGCAACGGTGAACCTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAAATCGATGATACCGGAGGA
ACCTTACCGGGCTTGAAGTGCAGCAGCCAGGAGAGATGCCTG
TTCCCTTCGGGGCTGGTGTGGAGGTGCTGCATGGTGTCTGACGCTC
GTGCGGTGAGGTGTCGGCTTAAGTGCCTAACGAGCGCAACCTTG
CCGTCAAGTGCATCACTTAGGGTGGGCACTCTGATGGGATGCCAT
CGCAAGATGTGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAATCAACACGGCC
CTTAGCTCCGGGGTACACACGCTGTTAATGGGGGGCACAGCGCG
CCGCTACCCGGCGACGGGATGCGAATCGTGAAATCCCTCTCAGTT
CGGACTGGAGTCTGCAACCCGACTCCACGAAGCTGGATTGCTAGT
AATCGCGCATCAGCCATGGCGCGTGAATACGTTCCCGGGCTTGT
ACACACCGCCGTCAGCCATGAAGGCGGGGGTGCCTGAAGTCCG
TCAACCGGAGGATCGGCCTAAGGCAAACTGGTGAATTGGGGCTAAG
TCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACTCTCT
T

>RB32

AGAGTTTGATCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAAACA
CATGCAAGTCGAGGGGAGCGCGGTAGCAATATCTGGCGGCGACC
GGCGAAAGGTGAGTAACGCGTGAGCAACGTGCCCGTATTGGGG
GATAGTCATTGGAACGATGCGTAATACCCATAACACGAGGATC
GCATGGTCCATGTTGAAAGATTCAATGATACCGGATCGGCTCGGT
ACCATTAGCTAGATGGCGGGTAACGGCCCACTAGGCGACGATGG
TTAGGGGTTCTGAGAGGAAGTCCCGCAATTGGAAGTGAAGACG
GTCCAGACTCTACGGGAGGAGCAGTGAAGGAATATTGGTCAATGG
CCGAGAGGCTGAACAGGATGCCGCTGCGGGAGGACGGCCCTAT

GGGTTGTAACCCGCTTTTGTAGGGGAGCAATAAGTATTACGTGTAA
TACGATGAGAGTACCTCGCAATAAGCATCGGCTAATCCGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTATTG
GGTTTAAAGGGTGCAGCGCGCTTGTAAAGCGTGAGGTGAAATGT
CCGGGCTCAACCTGGGAACCTCGCTCGGAACCTGGCTGGCTGAATG
CCCTGCCGTGGGAGGAATGTGTGGTGTAGCGGTGAAATGCATAGA
GATCACACAGAACCCGATTGCGAAGGCATCTCACGAAGGGGTGAT
TGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGATCAAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCACGCAGTAAACGATGATGGCTAACCGCTGGTTTATA
CGGATCAGTGGCCAAAGCGAAGCGATAAGCCATCCACCTGGGGAGT
ACGACCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAC
AAGCGGAGGAACATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGAGGAACCTT
ACCCGGGCTCGAACGGCAGGTGAAGAGATCCAGAGATGGTGACGTC
CTTCGGGACACCTGTGCGAGGTGCTGATGGTGTGTCGTCAGCTCGTG
CGTGAGGTGTCGGCTCAAGTGCCATAACGAGCGCAACCTTTCGGT
CAGTTACACGCAGCTGCTGGTGGGACTCTGGCGGGACTGCCACCG
CAAGGTGAGAGGAGGGGGGGGA TGACGTCAAATCAGCACGGCCCT
TACGTCCGGGGCAGACACGTGTTACAAATGGCGGTTACAAAGGGAA
ACTACCTGGTGACAGGATGTGAATCTCAAAAAGCCGCTCAGTTTCG
GATCGGAGTCTCAACCCGACTCCGTGAAGCTGGATTTCGTAGTAA
TCGCGCATCAGCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAC
ACACCGCCGCTCAAGCCATGAAAGTCTGGGGCGCCTGAAGTTCGTG
ACCGCAAGGAGCGACCTAGGGCGAAACAGGTAATTGGGGCTAAGT
CGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT
>RB33

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGCGTGCATAACA
CATTCAAGTCGAACGAAGCGTGCGGAACGAGACCTTCGGGTCAAGA
GAAGTACGACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGGAACCT
GCCCTTCAGTGGGGAACAACAATAAGAAATGGTTGCTAATACCGCA
TAATGTGCGGATTGCCGATGACAGACCGACCGAAGGATTTATTCGC
TGAAGGATGGCTCGCGTCCGATTAGATAGTTGGTGAGGTAACGGC
CCACCAAGTCTACGATCGGTAGCCGAACGTAGAGGTTGATCGGCCA
CATTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGGGCAATGGGCGAAAGCCTGACCCAGCAACGCCGCGT
GAAGGATGACGGTCTTCGGAATTGTAAATCTTTAATTGGGGAAGA
ACAAATGACCTACCCAAAGAAATAAGTACGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGACAAGCGTTATCCGGATTACTG
GGCGTAAAGGGCGTGTAGGCGGCTTGCAAGTCAGAAGTGAAATTC
CTGAGCTCAACTCGGGCGCTGCTTCTGAAATCGCAGGACTTGAGTG
CTGGAGGGGATAGCGGAATTCCTAGTGGAGCGGTAAATGCGCAGA
TATTAGGAAGAACCCGGGGGCGAAGGCGGCTATCTGGACAGTAAT
GACGCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACC
CTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAGGTGTAGGGGGTAT
CGACTCCCTCTGTGCGCGAGTAAACACAATAAGTATTCGCCCTGGGG
AGTACGGCCGCAAGGTTGAAATCAAGGAATTGACGGGGGCCCCG
ACAAGCAGTGGAATTATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACC
TTACAGGGCTTGACATCTCTGACCGCTCTAGAGATAGAGITTCCT
TTCGGGCGAGAGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTAGCTCGTGT
CGTGAGATGTTTGGTTAAGTCCAATAACGAGCGCAACCCCTATGGT
CAGTTGCCATCATTAAGTGGGCACTCTGGCAAGACTGCCGCGGAC
AACCGGAGGAAGGAGGGGACGACGTCAAATCATATGCCCTTAT
GTCTGGGTACACAGTAATACAATGGCAACGACAGAGGGCAGCA
AACCCGCGAGGGCAAGCAATCCCAAACGTTGTCTCAGTTCCGAC
TGCAGGCTCAACCCGCTGCACGAAGTCGGAATTGCTAGTAATGG

CAGGTCAGCATACTGCGGTGAATACGTTCCTCCGGGCTTGTACACACC
GCCCGTCACACCATGAGAGTCTGCAATACCCGAAGTCAGTAGCCTA
ACCGCAAGGAGGGCGCTGCCGAAAGGTAGGGCCGATAATTGGGGTG
AAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACT
CCTT

>RB34

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCGCTCTTAAG
CATGCAAGTCGAGCGGTAAGATGGAAGCTTGCTTCTACTCTAGAGC
GGCGGACTGGTGAGTAACGCGTGGTGACGTACCTTTGTGACGGGG
ACAGCTCTAGAAATAGGAGATAATACCGGATACGCTGCATGTTGT
CAGAGGACATGCAGGAAAGGATCTTTGATTTCGCACAGAGAGCGGC
CCGCTACTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAACGGCCCAACAGCGA
CGATAGTTACCCGGCCTAAGAGGGTGAACGGGCACATTGGGACTGA
GATACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGAGCTAAGAATATTCGG
CAATGGACGAAAGTCTGACGGAGCGACGCCGCGTGGATGATGAAG
GCCGGAAGGTGTAAAACTCTTTTATGACTGAGGAATAAGCAGAGT
GAGAGAGACGCTTTGTGGTGACTGTAGGTATGAATAAGCAACGGC
TAATTACGTGCCAGCAGCCGCGTAAACAGTAAGTTGCGAGCGTTG
TTCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCATGTAGGCGGTTCTGCAAGTC
TGGTGTGAAATGCCGGGGCTCAACCCCGAAGTGGTGTGAAACGT
CAGAACTTGAATCGCTGAGGGGCGCCAGAAATCCAGGTGTAGGGG
TGAAATCTGTAGATATCTGGAAGAAATACCAATGGCGAAGGCAGGCT
GCCAGCAGATGATTGACGCTGAGGTGCGAAGGTGCGAGGAGCAAA
CAGGATTAGATACCTGGTAGTCCGACAGTCAACTATGTACACTG
GGTGTCCGCTCATGAGAGTGGGTGCCGAAGCAACCGCATAAAGTGT
ACCGCTGGGGAGTATGCCCGCAAGGGTGAACTCAAAGGAATTGA
CGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGGTA
CGCGAGGAACCTTACCTGGGTTTGACATACACAGGAATTATTTAGA
GATAAGTAAGCGCAGCAATGCGCTGTGAACAGGTGCTGCATGGCT
GTCGTACGCTCGTGGCGTGAGGTGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG
CGCAACCCCTACTGCCAGTTACTAGCAGGTAATGCTGAGGACTCTG
GCGGAACCTGCCGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCA
AGTCATCATGGCCCTTATGTCCAGGGCTACACAGCTGCTACAATGGC
AGGTACAGAGTGATGCGAAGGGGTGACCTGGAGCGAAACGAGAA
AGCCTGCCTCAGTCCGATAGGAGTCTGAAACCCGACTCCTTGAAG
TTGGAATCGCTAGTAATCGCACATCAGCAGCGTGGGTGAATACGT
TCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCTGACACCATCCGAGTGGGGGG
TACCCGAAGTCGTGAGTCTAACCGCAAGGAGGACATGCCGAAGGT
ACGTTCCGTGAGGGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGTCGTACCGGA
AGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT

>RB35

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCGAGTCTTAGG
CATGCAAGTCGAACGGATGACAGAGACTTGCTCTCTGAAGTCAGT
GGCGCAGAGTGAGTAACGCGTGGGAACTGCCCTTCACTGGGGAA
TAACGTTTGAAACGAACGCTAATACCGCATACGCCCGCAAGGGGA
AAGATTTATCGGTGATGGATGTGCCCGGCTTGATTAGCCAGTTGGT
GGGGTAATGGCTACCAAAGCAATGATCCATAGCTGGTCTGAGAGG
ACGATCAGCCACGCTGGAAGTACGACAGGTCAGACTCCTACGGG
AGGCAGCAGCTAAGAATATTGGGCAATGGAGGAACTCTGACCCAG
CCATGCCGCGTGAATGAAGAAGGCTTCGGGTTGTAAGATCTTTTA
GTCATGAAGATGATGACAGTAGTGACAGAAAAAGCACGGCTAACT
TCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGTGCAAGCGTTGTTCCG
ATTTACTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGTTTGTAAAGTCAGGGGT
GAAATCCAGGGGCCAACCCCTGGAAGTGCCTTTGATACTGGCAAA

TGGAGCGCGATAGAGGAAGATGGAATATCTGGTGTAGGGGTGAAAT
CCGTAGATATCAGATAGAACACCAATGGCGAAGGCAGCTTCTGGA
TCGTCGCTGACACTGAGGGACGAAAGCGTGGGTAGCAACAGAAATT
AGATACTCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGCTGCTGTGTGG
TTTCCTTCGGGGGATCAGTGACGTAGCTAACCGCTTAAGCATGCCGC
CTGGGGACTACGATCGCAAGATTAAACTTAAAGGAATTGACGGGG
ACCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTTGTTAATTCGATGCTACGGA
GAAACCTTACCGACCTTGACATCTTGGTCGCGACTTCAGAGATGG
TTGTCTTCAATTGGTTGGACCAAGACAGATGCTGATGGCTGTG
TCAGCTCGTGTGATGATGTTAGTTAAGTCTGCAACGAGCGCA
ACCCACGCCCTATGTTGCCAGCGGGTAATGCCGGGAACCTTAGGG
GACTGCCCGCTCAAGCGGGAGGAAGGTGTGGATGACGTCAAGTCA
TCATGGTTCTTACGGGTCGGGTACAAACGTACTACAATGGCGGT
ACAATGGGTGCAATGTGCGAAGGCAAGCCAACTCTAAAAACCG
TCTCAGTTCGGATTGTCTCTGCAACTCGAGGCGATGAAGCTGGAAT
TGCTAGTAATCGCTGATCAGAATGCAGCGGTGAATACGTTCCCGGG
TCTTGTACACACCGCTGTGTAACCATGAGAGTGCATTTACCCAAA
GTGCGTAGTTTAAACGAAGAGGGCGCCGCTACGGTGGGATTGGTG
ATTGGGGTTAAGTCATAACAAGGTAGCAGTACCGGAAGGTGCGGCT
GGATCACCTCCTT

>RB36

AGTAACGCGTATCCAACCTTCCCTATACTAGAGGATAGCCCGGGA
AAGTCGGAATTAATACTCTATGTTGTAATTCGAGGACATCTGAATAAT
ACCAAGGTTTACCGGTATAGGATGGGGATGCGTCTGATTAGGTTG
TTGGCGGGTAACGGCCCAAGCCTACGATCAGTAGGGGTTCTG
AGAGGAAGGTCCCCACATTGGAACTGAGACACGGTCCAACTCCT
ACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGACGAGAGTCTG
AACCAGCCAAGTAGCTGTCAGGATGACGGCCCTATGGGTGTAAAC
TGCTTTIATACAGGATAAAGTGCCTACGTGTAGTGTGTTTGTAGGT
ACTGTATGAATAAGGACCGGCTAAATCCGTGCCAGCAGCCGGGTA
ATACGGAAGGTCCGGCGGTTATCCGGATTATTGGGTTTAAAGGGA
GCGCAGGCTGATGATTAAGCGTGACGTGAAATGTAGCCGCTCAACG
GCTGAATGCGTCGCGAATCGTTATCTTGAGTGAGTTCGATGTTGG
CGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATACGAAGAAC
TCCGATTGCGAAGGCAGCCAAAGGCGCTTACTGACGCTAAAGCT
CGAAGGTGCGGGTATCGAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCGCA
CGGTAAACGATGGATGCCCGCTGTTTGGCATATACTGTGAGCGGCC
AAGAGAAATCGTTAAGCATCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGG
TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCAAGCGGAGGAACA
TGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCGGGCTTGAAC
TGCAGCGGAAGGATACAGAGATGTTGACGCCCTTCGGGGCGCTGT
GGAGGTGCTGATGTTGTCGTGAGTCTGTCGCGGTGAGGTGTCGGCT
TAAGTGCCATAACGAGCGCAACCTTTTCATAGTIGCCATCAGGTA
ATGCTGGGCACTCTGTTGATACTGCCACCGTAAGGTGTGAGGAAGG
TGGGGATGACGTCAAATCAGCACGGCCTTACGTCCGGGGTACAC
ACGTGTTACAATGGCGGTACAGAGAGTGGGGCTACGCGAGTGCG
CTCCAATCTTGAAGCGGTTCTCAGTTCGGAATGGGGTCTG

>RB37

GATGAGCTCGCGAGACATTAGTTAGTGGCGGGTAACGGCCACC
AAGACCGGATGTCTAGGGGAACCTGAGAGGTTGGTCCCCACACTG
GAACTGAGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGTGAAGGA
ATAATTGACAATGGCCGAAGGCTGATCCAGCCATGCCCGTGAAG
GATAAGTCTCTATGGATTGTAACCTCTTTTGTAGTGGGAGCAATAA
GGATGTCGTGACATCCGATGAGAGTACCATTCGAATAAGCATCGGC

TAACCTCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCGAGCGTTA
TCCGGATTATTGGGTTTAAAGGGTGCCTAGGCGGTTTGTCAAGTCA
GCGGTGAAACGCAAGGGCTCAACCTTGACCTGCCGTTGAAACTGA
TTGACTAGAATGCGGATGCTGTGGGAGGAATGTGTGGTGTAGCGGT
GAAATGCATAGATATCACACAGAACCCGATTGCGAAGGCACCTCA
CAAATCCGTGATTGACGCTGAGGCACGAAAGTGTGGGGATCAAACA
GGATTAGATACCTGGTAGTCCACTCTAAACGATGATGACTCGC
TGTCGGCGATATACAGTCGGTGCCAAAGCGAAAGCGATAAGTCATC
CACCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACG
GGGGCCCCACAAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAAATTCGATGATACG
CGAGGAACCTTACCGGGCTGCAACGGCAAGTGAAGGATCTAGAGA
TAGTGACGTCTTCGGGACACTTGCCGAGGTGCTGCAATGGTTGCT
CAGCTCGTGCCTGAGGTGTCGGCTTAAGTGCCATAACGAGCGCAA
CCCTTGCCATTAGTTACCGACGCTAAAGGTGGGGACTCTAGTGGG
ACTGCCACCGTAAGGTGAGAGGAGGGGGGGATGACGTCAAATCA
GCACGGCCCTTACGTCCGGGGCGACACGCTTACAATGGTGGGT
ACAGAGGGCAGTACCTGGCGCAGGATGCAAACTCTGAAAAACCA
TCTCAGTTCGGATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTTGGATT
CGCTAGTAATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGG
GCCTTGACACACCGCCGCTAAGCCATGAAGGTGGGGGTGCTTG
AAGTCGCGACCGAAAGGAGCGGCTAGGGCAAACTGGTAATTG
GGGCTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGAT
CACCTCCTT

>RB38

AGAGTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAACA
CATGCAAGTTCGAGGGGACGATGAAGATGTGCTTGCAAACTTTGA
TGGCGACCGGCGCACGGGTGAGTAACCGGTATCCAACCTTCCCTAT
AGTAGAGAATAGCCGGCGAAAGTCGGATTAATGCTCTATGTTCTT
CTTTGATGGCATCTGACGAGAAGCAAGGTTACCGCTATAGGATG
GGGATGCGTCTGATTAGGTAGTGGCGGGGTAACGGCCCAACCGAGC
CAACGATCAGTAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCCACTGGTAC
TGAGACACGGACCACTCTACGGGAGGCAGAGTGAGGAATAATT
GGTCAATGGGCGGAGCTGAACCGCAAGTAGCGTGCAGGATGA
CGGCCCTATGGGTTGTAACTGCTTTTATGCGGGGATAAAGTGAGG
GACGTGTCCCTTTTGTAGGTACCGATGAATAAGGACCGGCTAATT
CCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAAGGTCCGGCGGTTATCCGG
ATTATTTGGGTTTAAAGGGAGCGCAGGCTGATTGTTAAGCGTGACG
TGAAATGTAGCCGCTCAACGGCTGAAGTGCCTGCGCAACTGCGAGT
CTTGAGTGAGTACGACGTACGCGGAATTCTGGTGTAGCGGTGAAA
TGCTTAGATATCAGGAAGAACCCGATTGCGAAGGCAGCTGACGAG
TCCTTTACTGACGCTAAAGCTCGAAGGTGCGGGTATCGAACAGGAT
TAGATACCTGGTAGTCCGACCGGTAACGATGGATGCCCGCTGTT
GGCGATACAATGTACGGGCAAGCGAAAGCGTTAAGCATCCCAAC
TGGGGAGTACGCGGCAACGGTGAACCTCAAAGGAATTGACGGGG
GCCCCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGA
GGAACCTTACCGGGCTTGAAGTCCAGCGAACGATACAGAGATGT
TGAGGCCCTTCGGGGCGCTGGTGGAGGTGCTGATGTTGTGCTCA
GCTCGTGGCGTGAAGTGTGGCTTAAAGTGCCATAACGAGCGCAACC
CCTGTCCGTAGTTGCCATCAGGTAGTGTGGGCACTCTGCGGATACT
GCCACCGTAAGGTGTGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCAGCAC
GGCCCTTACGTCCGGGGCTACACAGGTGTACATGTTGGGAGTACAG
AGAGTCGGTGTGAGCAATTGCGATCCAATCTTAAAGCTCTCTCA
GTTGCGGATTGGGGTCTGCAACCGGACCCCATGAAGCTGGAATCGCT
AGTAATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCT

TGTACACACCGCCGTCAGCCATGAAAGCCGGGGCGCCTGAAGT
CCGTGACCGCGAGGGTCGGCTAGGGTGAACCGGTGATTGGGGCT
AAGTCGTAAACAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCT
CCTT

>RB39

AGAGTTTGATCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGCCTAAC
CATGCAAGTCGAACGAGATTTAACGCTGATGAAGCTTCGGCAGAA
TCTGTGTAATCTTAGTGCGGACGGGTGAGTAACGCTGGGCAAC
CTGCCTCATACTGGGGATAACAGCTGGAACGACTGTAAATACCG
CATAAGCGCACGGTATCGCATGATACAGTGTGAAAACTCCGGTGG
TATGAGATGGGCCCGCTCAGATTAGCCAGTTGGCAGGGTAACGGC
CTACCAAAGCGACGATCTGTAGCCGGCTGAGAGGGCGGACGGCCA
CAITGGGACTGAGACACGGCCAACTCTACGGGAGGCAGCAGTG
AGGAATATTGGTCAATGGGCTGAGCTGAACACGCCAAGTAGCT
GCAGGATGACGGCCCTATGGGTTGAACTGCTTTATGCGGGGAT
AAAGTGAGGGACGTGCCCTTTTGTAGGTACCGCATGAATAAGGA
CCGGCTAAATTCGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGGAAGGTCCGGG
CGTTATCCGGATTTATTGGGTTAAAGGGAGCGCAGCGGGTTATTA
AGCGTGACGTGAAATGTAGCCGCTCAACGGCTGAAGTGGCTCGCGA
ACTGGTTATCTTGAGTGAGTTCGATGTTGGCGGAATTCGTGGTGTAG
CGGTGAAATGCTTAGATATACGAAGAACTCCGATTGCGAAGGCAG
CCAAACAGGCCCTTACTGACGCTAAAGCTCGAAGGTGCGGGTATCG
AACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCGCACGGTAAACGATGGATGC
CCGCTGTTTGGCATATACTGTGAGCGGCAAGAGAAATCGTTAAGC
ATCCACCTGGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAACCTCAAAGGAATT
GACGGGGGCCCGCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAAATTCGATGA
TACGCGAGGAACCTTACCGGGCTTGAAGTGCAGGTGAACGATACA
GAGATGTTGAGGTCTTCGGGACACCTGTGGAGGTGCTGCATGGTT
GTCGTACGTCGTGCCGTGAGGTGTCGGCTTAAGTGCCATAACGAG
CGCAACCTTTTTCATTAGTTGCCATCAGGTAAAGCTGGGCACCTCTGG
TGATACTGCCACCGTAAGGTGTGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAA
TCAGCACGGCCCTTACGTCCGAGGTACACAGTGTACAATGGGA
GGTACAGAGAGTCGGTCGTACGCAAGTACGATCTAATCTAAAAGC
CTTCCTCAGTTCCGATTGGGGTCTGCAACCCGACCCCATGAAGCTGG
ATTCGCTAGTAATCGCGCATCAACCATGCGCGGTGAATACGTTCCC
GGGCTTGATACACACCGCCGTCAGGCATGAAGCCGGGGGCGCT
TGAAGTCCGTGACCGCAAGGATCGGCTAGAGCGAACTGGTAATT
GGGGCTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGTGGA
TCACCTCCTT

>RB40

AGAGTTTGATCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCTGCCTAACA
CATGCAAGTCGAACGAGGTTTGTGTTTCGGCAGAACCTTAGTGGCG
AACGGGTGAGTAACGCGTAGGCAACCTGCCCCCGCGGGGACAA
CACGCCGAAAGGTGTGCTAATACCGGATACGAAGGCGGCATCGCAT
GGTGCTGTTTGAAGATGGCTCTATGTATAAGCTATCGCCGGGGG
ATGGGCTCGCTCCGATTAGCTGGTTGGTGGGGTAACGGCCACCA
AGGCGACGATCGGTAGCCGGTCTGAGAGGATGAACGCCACATTGG
GACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
TCTTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGGAGCAACGCCGCTGAGTG
AGGAAGTTTTCGGAACGTAAAGCTCTGTTGTACCCGACGAACGTG
CCCTCTATGAACAAACGAGGGTAATGACGGTAGGGTACGAGGAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTGTCCGGAATTATTGGGCTAAAGAGTGAGCAGGCGCATGG
TAAGTTTGAAGTGAAGCGTGGGGCTTAACCCCATACAGCTTCGAA

AACTGCCAGGCTAGAGTACGGGAGAGGTAAACGGAACCTCATGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGG
CGGTTTACTAGCCCGATACTGACGCTCAGTCACGAAAGCGTGGGGA
GCAAAATAGGATTAGATACCTAGTAGTCCACGCCGTAAACGATGTC
TACTAAATATTGCAGTGATGCAGTGTGAAGCTAACGCATTAAAGTA
GACCGCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTTAAAGGAATTG
ACGGGGACCCGCACAAGCAGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGCT
ACGCGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATGGATACAAATGTTTCAG
AGATGAAAAGATAGTTATGGATCACACAGGTGGTGCATGGTTGTGCG
TCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCA
ACCCTTGTCTTAGTTACCATCATTTAGTTGGGGACTCTAAGGAGAC
TGCCGATGTAAAGTCGAGGAAGGTGGGGATGACGCTAAATCATCAT
GCCCTTTATGTCTGGGCGACACAGTGCTACAATGGCCGGTACAA
AGGGATGCCAAGCCGCGAGGCGGAGCAAAACTCACAAGCCGGTCT
TCAGTTTCAGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATTG
CTAGTAATCGCAGAACCCATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGGT
CTTGACACACCGCCGTCAAACCATGAGAGCTGGTAATACTCGAA
GTCGTTATCCTAACCGAAGGGGGAGACGCTAAGGTAGGACTGG
TGATTGGGGTTAAGTCGTAACAAGGTATCCCTACGGGAACGTGCGG
CTGGATCACCTCCTT

>RB41

AGAGTTTGATCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAACA
CATGCAAGTCGAGGGGCGAGGAGGTTAGCTTGCTAACCTTGTGCG
GCGACCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTATCCAACTGGCCCTTAG
TAGGGGATAGCCCGCGAAAGTCCGATTAAATACCTATGTTTTCCTA
ATGAGGACATCTGAGCTGGAATAAAGGTTTACCGCTAAGGGATGGG
GATGCGTCTGATTAGGTTGTTGGCGGGTAACGGCCACCAAGCCA
TCGATCAGTAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACATTGGAACCTG
AGACACGGCCGAGACTCTACGGGAGACAGCAGTTAGGAATATTCCG
TCAATGGGGGAAACCTGAACGAGCAATGCCCGGTGAAGGATGAC
GGTCTCTGGATTGTAAACTTCTGTTGTTAGGGAAGAACGACCATAT
TAGGAAATGAGTATGGAGTGACGGTACCTTTCAAGAAAGCATCGGC
TAACTACGTGCCAGCAGCCCGGTAAATACGTAGGATGCGAGCGTTA
TCCGGAATTATTGGGTGTAAAGCGTGTGTAGGCGGGAATAAAGTC
TAAGGTCTAAGCTGGAGCTCAACTCCAGTTCGCTTAGAAACTGTAT
TTCTTGAGTATGGTAGAGGCAATGGAATTTCTAGTGTAGCGGTAA
AATGCGTAGATATTAGAAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGATTGTCT
GGGCCAAAACCTGACGCTGAGACAGGAAAGCGTGGGGAGCAAAATAG
GATTAGATACCTAGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAATACTAAGT
GTCGGATTATTCCGGTGTGAAGTTAACACATIAAGTATCCACCTG
AGTAGTACGGTCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGCACC
CGCACAAGCGGTGGAGCATGCTGTTAATTCGAAGATACGCGAAGA
ACCTTACCTGGGCTTGACATCCCAATGAAAGTTTGTGGAAACACGA
ACCCCTCCTTTCCGGGACATTGGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGCT
AGCTCGTGTGAGATGTTTGGTTAAGTCCAATAACGAGCGCAAC
CCCTATCTTTAATTGCTAATIAAGTTGAGAACCTTAAAGATACTG
CCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATG
CCCCTIACGTCCAGGGCAACAGCGTGTCTATAATGGCTGGTATAAA
AAGACGCAAAATGGTGACATGGAGCAAACTCAAAGGCCAGTCTC
AGTCCGGATTGAAGTCTGCAACTCGACTTCATGAAGTTAGAATCGCT
AGTAATCCCAATCAGAAATGTTGGGGTGAATACGTTCCCGGGTGT
GTACACACCGCCGTCACGCCATGGGAGTTAATAATACCGGAAGCT
GGTAGCCTAACCTTTTAGGAGGGGGCCATCGAAGGTAGGATTAGCG

ACTGGGGTGAAAGTCGTAACAAGGTATCCCTACGGGAACGTGCGGCT
GGATCACCTCCTT

>RB42

AGAGTTTGATCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGCTTAACA
CATGCAAGTCGAACGGGGTTAAGAAGGAAGCTTGCTTTCAITTTA
AACCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGGAACCTGCCCTTC
AGTGGGGAACAACAACAGAAATGGTGTCTAATACCGCATAATGTC
GGAGAGCCGATGACATTCCGACCAAAGGATTTATTCGCTGAAGGA
TGGCCTCGCTCCGATTAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCCACCAA
GTCTACGATCGGTAGCCGAACCTGAGAGTTGATCGGCCACATTGGG
ACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGAGGCAGCAGTGGGAAT
ATTGGGCAATGGGCGAAAGCCTGACCCAGCAACGCCGCTGAAGG
ATGACGGTCTTCGATTGTAACTTTTAAATGGGGAAGAACAAA
ATGACCTACCCAAAGATAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGC
CGCGTAATACGTAGGTGACAAGCGTTATCCGATTACTGGGCGT
AAAGGGCGTGTAGGCGGCTTTCGAAGTCAGAAATGAAATTCCTGAG
CTCAACTCGGGCGCTGCTTCTGAAATGACAGGACTTGAGTGTGGA
GGGATAGCGGAATTCCTAGTGGAGCGGTAAATGCGCAGATATTA
GGAAGAACACCGGTGGCGAAGCGGCTATCTGGACAGTAACCTGAC
GCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTTG
GTAGTCCACATGTAAACGATGATTACTAGGTGTGGGGGCTGAC
CCCTTCCGTGCCGACGAAACGCAATAAGTAATCCACCTGGGGAGT
ACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGACCCGAC
AAGCAGTGGATTATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGGAAGAACCTT
ACCAGCACITGACATCCAATAACGAAATAGAGATATATTAGGTGC
CCTTCGGGGAAGTTCGAGACAGGTGGTGCAATGGTTGTCGTCAGCTC
GTGTCGTGAGATGTTGGTTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTG
CCATTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTAATGGGACCGCTACCGACA
AGGTGGAGGAAGGTGGGAGCAGCTCAATCATCATGCCCTTATG
TGCTGGGTACACAGTAATAAATGGCCGTAAACAAAGGAAGCA
ATCTCGCGAGAAGGAGCAAAACCCCAAAACGGTCCAGTTCGGAC
TGCAGGTGCAACCCGCCGTCACGAAGTTGGAATTGCTAGTAATCG
TGGATCAGCATGCCACGGTGAATACGTTCCCGGGTCTGTACACACC
GCCCCTCACACCATGGGAGTCCGTTAATCCCGAAGTCAGTAGTCTA
ACCGCAAGGAGGACGCTGCCGAAGGTAGGATTGACGACTGGGGTG
AAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCACCT
CCTT

>RB43

AGAGTTTGATCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAACA
CATGCAAGTCGAGGGGTAACAGGAGTAGCAATACTCTGTGACGA
CCGGCGCACGGGTGCGTAACCGGTATGCAACCTACCTGTAAACGGG
GGATAACGGAGAGAAATTCCTACTAATACCCCATATTGTTATCTTT
CGCATGTTAGGATAACGAAGCTTCGGTGGTACGGATGGGCATGC
GTGACATTAGCTAGTTGGCGGGGCAACGGCCACCAAGGCGACGAT
GTCTAGGGGAGCTGAGAGGCTTATCCCCACACTGGTACTGAGACA
CGGACCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGAAATTTGGTCAAT
GGACGGAAGTCTGAACCAGCATGCCGCGTGGAGGAAGAAGGTCTT
ATGGGTTGTAACCTCTTTTGTCCGAGAGTAATAAGGTCTATGCGTA
GACCGATGAGAGTATCGGGCAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGCC
AGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGAAGCGTTATCCGATTATTT
GGGTTTAAAGGGTGCGCAGGCGGCGGTTAAGTCAGTGGTGAAATC
TCCCGGCTCAACCGGGAACTGCCATTGATACTGGCGTCTAGAGT
ACGGACGGCGCCGCGGGAATGTGTATGTAGCGGTGAATGCTTAG
ATATGCCACAGAACCGATCGGAAGGCAGCTGGCGAGGCCGGG

ACTGACGCTCAGGCACGAAAGCGTGGGGATCAACAGGATTAGATA
CCCTGGTAGTCCACGAGTAAACGATGATAACTTTGTGTCGGCGAT
AGACAGTCGGTGACAAAGCGAAAGCGATAAGTTATCCACCTGGGGA
GTACGATCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCA
CAAGCGGAGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGAGGAACCT
TACCTGGACTCAAATGTTGAGCGACCGATTGAGAAATGAATCTTCCC
TTCGGGCGCTTAGCAAGGTGCTGATGTTGTCTGCTGAGCTGCTGCC
GTGAGGTGTCAGGTTAAGTCTTATAACGAGCGCAACCCCTACGTCC
AGTTGCCAGCGGTAAGCGCGGACTCTGGAGGACTGCCGGCGC
AAGCCGAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAGCAGGCCCTT
ACGTCCAGGCGACACACGTGCTACAATGGCCGCTACAGAGGCGAG
CCACCTGCTGACAGGAGCGAATCTCGAAAGCGGCTCTCAGTTCCG
ATCGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTTGGATTCTGCTAGTAATC
GCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTGTACAC
ACCGCCGCTCAAGCCATGAAAGTCTGGGTACTGAAAGTCCGTGAC
CGAGAGGAGCGGCTAGGGTAAACAGGTGATTGGGGCTAAGTCGT
AACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT

>RB44

AGAGTTTGATCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCTGCTTAACA
CATGCAAGTCGAGCGGAGACATGCGACGGACCGGAAGTTTTCGGAT
GGAAGGGAAGACGATGTTTACGGCGGACGGGTGAGTAACCGCT
GAGCAACCTGCTCTTACAGGGGGATAACACAGCGAAAGTTGTACT
AATACCGCATAAGACCAAGGTCACATGATCGAGGGGTCAAAGG
AGCAATCCGGTGAAGGGTGGGCTCGCGTCCGATTAGGTAAGTTGGTG
AGGTAACGGCCACCAAGTCGACGATCGGTAGCCGACCTGAGAGGG
TGATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGA
GGCAGCAGTGGGGAATATTGGGCAATGGGGGAACCCCTGACCCAG
CAACGCCGCGTGAGGGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAACCTCTGTC
CTTGGTGAAGAGAAAGAGACGCTAGCCAAGGAGGAAGCCCGGCT
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAACTAGTGGGGGCGAGCGTTGT
CCGGAATGATTGGGCGTAAGGGCGCGTAGGCGGCCCGGTAAAGTCT
GGAGTGAAAGTCTGCTTTTAAAGGTGGGAATTGCTTTGGATACTGTC
GGGCTTGAGTGCAGGAGAGGTAAGTGAATTCCTAGTGTAGCGGTG
AAATGCGTAGAGATTGGGAGGAACCAAGTGGCGAAGGCGACTTA
CTGGAATGTAACCTGACGCTGAGGCGCGAAAGTGTGGGAGCAACA
GGATTAGATACCTGTTAGTCCACTGTAAACGATGAATGCTAGG
TGTAGGGGGTATCGACCCCTTCTGTGCCGAGTCAACACAATAAGC
ATTCGCCCTGGGAGTACGCCCGCAAGGTTGAACTCAAAGGAATT
GACGGGGGCCCGCAAGCAGCGGAGCATGTGGTTTAAATTCGACGC
AACCGGAAGAACCTTACAGGTTGATCCAGGTAAAGCCGTAG
AGATACGTTGTGCTTGCACAACTGAGACAGGTGGTGTATGTT
GTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTAAGTCCCGCAACGAG
CGCAACCTTATTTTCACTTAAACGATAGAGGTGAGGACTCTGA
AGAGACTGCCGGGCAACTCGGAGGAAGGTGGGAGCAGCGTCAA
ATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTCTAATGGCC
ACCACAGAGAGGAGCGAACTGCAAGGGGAGCGGATCTCAAAAA
AGTGGTCCAGTTCGGAATTGTGGGCTGCAACCCGCCACATGAAGT
CGGAGTTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTT
CCCGGGCTTGTACACCCGCCGTCACACCATGGGAGTTGGGAGT
GCCAAAGTCGGTGAGGTAACCGCAAGGAGCCAGCCGCTAAAGGC
AAGACCAATGACTGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGA
AGGTGCGGTTGGATCACCTCCTT

>RB45

AGCGTTACTCGGAATTACTAGGCGTAAAGCGCGCTAGGCGGAATG

TTAAGTCTGTTGTGTAATCTCTGGGCTCAACCCAGAACTGCAACAG
 AAACTGGCGTTCTTGAGTGAGGAGAGGAAATCGGAATCTCTAGTG
 TAGCAGTGAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACCGTGGCGAAA
 GCGGATTTCTGGGCTTTACTGACGCTCAAGTGCGAAAGCTAGGGG
 AGCAAAACGGGATTAGATACCCCGGTAGCTAGCCGTAACGATGA
 TAACTAGTTGTGGGAGGTATCGACCCCTCCGTGACGCGCTAACGC
 ATTAAGTTATCCGCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGTAAAACTCAA
 AGGAATTGACGGGACCCGACAAAGAGTGGAGTATGTGGTTAAT
 TCGACGCTACGCGAAAACTTACCTGGGCTCGAAGCACTGGTGGT
 AGTCTTTATGAAAGTAGAGGCGACCCGCAAGGGAGCCAGCGAGGT
 GCTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTC
 CCGCAACGAGCGCAACCCCTATCTGTGTTGCTAGCAATAGGAICT
 CTCAGGAGACCCCGCGGATAACGTGGAGGAAGGTGGGATGACG
 TCAAATCATCATGGCCCTTATGTCCAGGGCTACACAGTACTACAA
 GGTATAGACAGAGGGCAGCAATACCGTAAGGTGGAGCCAATCCCTA
 AACTATGCCCCAGTTCAGATTGTGGGCTGCAATTCGCCACATGAA
 GCCGGAATCTCTAGTAATCGCAGATAGCACGCTGCGGTGAATACG
 TTCCCGGGICTGTACACACCGCCGTCACACCAGAAAGTCAATG
 GCAACAGAAATATCCAGGTGCTGTGGGCTCAAGTTGTGATTGGTG
 ATTGGGTGAAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCT
 GGATCACCTCCTT

>RB46

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATAAACGCTGGCGGCGTGCTTAACA
 CATGCAAGTCGAACGGAGTGGTCTCCCGAAGACCTGACGAGCTTG
 CTCTGATGGAATTCAATTGGATCACTTAGTGGCGGACGGGTAGTA
 ACGCGTGGGTAACCTGCCCTATACTGGGGGATAGCAGTTGGAACG
 ACTGATAATACCGCATAAGCGCACAGCATCGCATGATGCACTGTGA
 AAAACTCCCGTGGTATAGGATGGACCCCGCTCTGATTAGCTAGTTG
 GTGAGGTAACGGCCCAACGAAGCGACGATCAGTAGCCGCGCTGAGA
 GGGTGTACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACG
 GGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGACAATGGGGGAAACCTGATC
 CAGCGACGCCGCGTGAGTGAAGAAGTATCTCGGTATGTAAGCTCT
 ATCAGCAGGGAAGATAATGACGGTACTGACTAAGAAGCACCGGCT
 AAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTATGGTGCAAGCGTTAT
 CCGGATTTACTGGGTGTAAGGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT
 GATGTGAAAACCTATGGGCTCAACCCATTAGACTGCATTGAACTA
 CCGAGCTAGAGTGACGAGAGGAAAGTGGAAATCTAGTGTAGCGG
 TGAATGCGTAGATATTAGGAGGAACACGATGGCGAAGGCGGCTT
 ACTGGACGATTACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAC
 AGGATTAGATACCTGGTATGTCACGCGTAAACGATGAATACTAG
 GTGTGGCTTCCACAGGAGTCCGTGCGCAGCTAACGCAATAAGT
 ATTCCACCTGGGAGTACGTTCCGAAGAATGAACTCAAAGGAATT
 GACGGGACCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGC
 AACGCGAAGAACCTTACCAAACTTGACATCTCTTGACAAAGTAT
 GTAATGTACTCTTCCTCGGACAAAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTT
 GTCGTACGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGAACGAG
 CGCAACCTTGTCTTATGACGAGCAAGTCAAGTTGGGCACTCTAG
 GGAGACTGCCGGGATAACCGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAA
 ATCATGTCGCCCTTATGACCGAGGTACACAGTGTCTACAATGTCG
 TAAACAAAGGGAAGCAATGGAGCGATCCGAGCAATCCAGAAA
 TAACGACTCAGTTCGGAATGCAAGGTGCAACTCGCTGCATGAAGC
 TGGAAATCGTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTT
 CCCGGGCTTGTACACACCGCCGTCAGGCAATGAAAGTCTGGGGC
 GCCTGAAGTCCGTGACCGAGAGGAGCGGCTAGGGCGAAACAGGT

AATTGGGGCTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGC
 TGGATCACCTCCTT

>RB47

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGTGTGCCTATA
 CATGCAAGTCGAACGATAAGGTTCCTTCGGGAATACATAAGTGCGG
 GACGGGTGAGTACAACATAGGAAATCTGCCCTAACTGGGGGACAA
 CAGAGGGAACTTCTGCTAATACCCATACGAGCTTAGTTGAAATA
 CTAATCTTGAAAGCTCCGGCGGTTTAGGATGAGCTGTGCTGATTA
 GCTAGTTGGTGGTGAATGGACTACCAAGGCGACGATCAGTAGCTG
 GTTTGAGAGGATGATCAGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATA
 CTCCTACGGGAGGACAGCAGTAGGGAATTTTGGCGAATGGGGGAAAC
 CCTGACGACGAACACCGCGTGAATGTTAAGCCCTTCGGGTGTAA
 AGTTCTGTGAGTAGGGAAGAACAATGACTGTACTACAAAGGAAG
 CACCGGCTAATCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGGGGTGCA
 AGCGTTGTCCGGAATCATGGGCGTAAGCGTTTCTAGGCGGTAAAG
 ATAAGTCAGATGTTAAAGCCCGGGCTCAACTCCGGTCCGGCATTT
 GATACTATCTAAGTGAATGTGGTAGAGTTAAGGGAATTCCTGGT
 GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAGGAACATCGGTGGCGAA
 AGCGCTTAAGTGGCCATTATTGACGCTGAGGAACGAAGCCGGGG
 GAGCAAAATGGGATTAGATACCCAGTAGTCCCGGCCGTAACGATG
 AACACTAGGTGTTGCGGGTATCGACCCCTGCAAGTGCAGCTAAC
 GCGATAAGTGTTCGCGCTGGGGAGTACGACGCAAGTGTGAAACTT
 AAAGGAATTGACGGGACCCGCAACAGCGGTGGAACATGTGGTTTA
 ATTCGAAGCAACCGCAAGAACCTTACCAGGACTTGACATTGATAGA
 ATCCTGATGAAAGTCCGGAGTGCCTTCGGGGAACCTTGAAACAGG
 TGGTGACCGGTGTGTCGTCAGCTCATGTCTGAGATGTTGGGTTAAGT
 CCCGCAACGAGCGCAACCTCTGCTGTAGTTGGTGCTATCGGTATAC
 TTATAGTAACCTCTCTAGCGAGACTGCCGGTGAATAACCGGAGGAA
 GGTGAGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTACGTTCTGGGCTAC
 ACACGTGTTACAATGGCTGGTACAACGAGCAGCAAACTCGCGAGAG
 CAAGCAAAATCTTTAAACCCAGTCTCAGTTCGGATTGGACTCTGCAA
 CTCGAGTCCATGAAGTCGGAATCGTAGTAAACGAGATCAGCAGC
 CTGCGTTGAATACGTTCCCGGGTCTGTACACACCGCCGTCACACC
 ATGGGAGTCTGCCACGCCGAAGTACGTGAGCTAACCGTAAGGAGG
 CAGCGTCTTAAGGAGGGGTGGTAACTGGGGTGAAGTCGTAACAAG
 GTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT

>RB48

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAACA
 CATGCAAGTCGAGGGGACGATGAGATTAGCTTGTCTAATCTTGATG
 GCGACCGGCGACGGGTGAGTAACGCGTATCCAACTTCCCTTAG
 TAGGGCATAGCCCGGTGAAATCGGATTAATACCTATGTTGTCAA
 TAGAGGACATCTGAAGCTGACCAAGATTATCGCTAAGGGATGGG
 GATGCGTCTGATTAGATAGTAGGCGGGTAACGGCCACCTAGTCCG
 ACGATCAGTAGGGTCTGAGAGGAAGGTCCCCACATTGGAAGTGA
 AGACACGGTCCAACTCTACGGGAGGACAGTGAAGGAATATTGG
 CCAATGGGCGAGAGCCTGAACGACCAAGTCCGCTGAAGGATGAA
 GGTTCATGGAATTGTAACCTCTTTTTCGAGGGTAAAGAAGGTCA
 CGTGTGACTTCTTGAAGTATCGGACGAATAAGCATCGGCTAATCC
 GTGCCAGCAGCGCGGTAATACGGAGGATGCGAGCGTTATCCGGAT
 TTATTGGGTTTAAAGGTGCGTAGGTGGTTTGAAGTTTGGTGA
 AAGCGTGGGCTCAACCGTACCAAGCATGAAACTGGCGAAGCTTG
 AGTGCAACGAGGTAGGCGGAATGTGATGTGTAGCGGTGAAATGCT
 TAGATATGTACAGAACCCGATTGCGAAGGAGCTTACAGCATG
 CAACTGACACTGAGGCAGAAAGCGTGGGTATCAACAGGATTAGA

TACCCGTGGTAGTCCACGAGTAAACGATGAATACTAGCTGTTGGCG
 ATATATGGTCAGCGGTACAGCGAAAGTGTAAAGTATTCACCTGGG
 GAGTACGCCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
 GCACAAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGAGGAA
 CCTACCCGGGCTTGAAAGTTAGTGACGGCGGATGAAAAGTCTGCTT
 CCCTTCGGGGCACGAACTAGGTGCTGCATGGTTGCTCAGCTCGT
 GCCGTGAGGTGTCGGCTTAAGTGCCATAACGAGCGCAACCCTTGCC
 GTTAGTTGCCAGCGGTAATGCCGGGAACCTAGCGGGACTGCTAC
 TGTAAGGTAGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAGCAGCGCCCT
 TACGTCCGGGGCAGACACGTGTACAAATGGTGAGTACAGAGGGTT
 GCTACCTGGTGACAGGATGCTAATCTCTAAACTCATCTCAGTTG
 GATCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGTGGATTCTAGTAA
 TCGCGCATCAGCATGGCGCGGTGAATACGTTCGGGGCTTGTAC
 ACACCGCCCGTCAAGCCATGGAAGCTGGGGGTACCTAAAGTCTGCA
 ACCGCAAGGAGCGGCCCTAGGTAAACTGGTAACTGGGGCTAAGTC
 GTAAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGTGGATCACCTCCTT
 >RB49

AGAGTTTGATCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAAGTCTTAGG
 CATGCAAGTCGAACGGGTGAAGCAGGGCTTGCCCTGTGAATCTAGT
 GCGCGCAGAGTAGTAACGCGTGGGAACTGCCACCACTGGGGA
 ATAACGTTTGGAAACGAACGCTAATACCGCATACCGCGGAACGGG
 AAAGATTTATCGGTGGTGAATGTGCCCGCGTTGGAATAGCTTGTGG
 TGGGGTAATGGCTACCAAGCGATGATCCATAGCTGGTCTGAGAG
 GACGATCAGCCAGTGTGGAACGTAGACACGGTCCAACTCTACGG
 GAGGCAGCAGCTAAGAATAATGGGCAATGGAGGAACTCTGACCCA
 GCCATGCCCGTGAAATGAAGAAGGCCCTTCGGGTTGTAAGTTCTTT
 AATCGTGAAGATGATGACAGTAGCGATAGAAAAAGCACCGGCTAA
 CTTCTGTCAGCAGCGCGGTAAATACGAAGGGTGCAAGCGTTGTT
 GGATTTACTGGGCGTAAAGCGTCCGTAGGTGGTTTGTAAAGTCAGG
 GGTGAATCCCGGGGCCAACCTCGGAACCTGCCCTTGATAGTGGCA
 AGCTGGAGCGCGATAGAGGAAGATGGAATATCTGGTGTAGGGGTG
 AAATCCGTAGATATCAGATAGAACCAATGGCGAAGGCAGTCTTC
 TGGATCGTTGCTGACATGAGGGACGAAGCGTGGGTAGCAAAACAG
 AATTAGATACTCTGGTAGTCCAGCCCTAAACGATGCCTGCTGTGTG
 TTGGTTTCTTCGGGGAATCAGTGACGAAGCTAACCGGTTAAGCAG
 GTCGCTGGGGACTACGATCGCAAGATTAAACTTAAAGGAATTGA
 CGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGTATGTGTTTAAATTCGATGCTA
 CGCGAGAAACCTTACCGACCTTGACATCTTGGTTCGCTATTCAGA
 GATGGATTCTTCAATTCGGTTGGACCAAGACAGATGCTGCATGG
 CTGTCTGACGTCTGTCTGTGAGATGTTAGGTAAAGTCTGCAACGA
 GCGCAACCCCTATCTATGTTACAGCACGTAATGGTGGGACTCAT
 AGGAGACTGCGGGGACAACTGGAGGAAGGCGGGGATGACGTCA
 AGTCATCATGCCCTTATGTCTGGGTACACACGTACTACAATGGC
 CGGCAACAGAGGGAAGCGAAGCCGCGAGGCGGAGCGAAACCCAAA
 AACCCGGTCCAGTTCGGATCGCAGGCTGCAACCCGCTGCGTGAA
 GTCGGAATCGCTAGTAATCGCAGGTGAGCATACTGCGGTGAATACG
 TTCCCGGGCTTGTACACACGCGCGTCACACCAGAAAGTTGGTA
 ACACCCGAAGCCGGTGGGTAAACCGCAAGGAGCCAGCCGTCTAAG
 GTGGGGCCGATGATTGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCG
 GAAGGTGCGGTTGGATCACCTCCTT

>RB50

AGAGTTTGATCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTCTTAACA
 CATGCAAGTCGAACGGAGCAGAGACGCTGACGAGTGGAGGGCTTG
 CTCAAAGCAAATCTGTGCGTGTCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAAC

GCGTGAGCAACCTGCCCTAGAGTGGGGAATAACACCGAGAAATCGG
 TGCTAATACCGCATAATGTCAGAGGACCGCATGATCCACTGACCAA
 AGGATTTTATTCGCTTAGGATGGGCTCGCGTCCGATTAGGCAGTTGG
 CGGGGTAAACGCCCAACCAACCGACGATCGGTAGCCGAACTGAGA
 GGTGATCGGCCACATIGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACG
 GGAGGCAGCAGTGGGGAATCTCCGCAATGGGCGCAAGCCTGACGG
 AGCAACGCCGCGTGAGTGAGGAAGTTCTTCGGAACGTAAAGCTCTG
 TTGTTCTGACGAACCTCCCTTCTATCAACAACGGAGGGGACTGACG
 GTAGGGAACGAGGAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCG
 GTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAG
 CGCATGTAGGCGGTAATTTAAGTCTGTCTGTGAAACTCGCGGGCTCA
 GCCCGTATGGCGATGGAAACTGGGTTACTTGAGTGACAGGAGAGGA
 AAGGGGAACCTCCAGGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAG
 AACACCGGTGGCGAAGGCGCTTCTTGGATCTGTCTGACGCTGAG
 ATGCGAAAGCCAGGATGCGAAGCGGATAGATACCCCGGTAGTCC
 TGGCCGTAAACGATGGGTACTAGGTGTGGGAGGTATCGACCCCTTC
 CGTGCCGGAGTTAAACGAATAAGTACCCCGCTGGGAGTACGGCC
 GCAAGGCTTAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGACAAAGCGG
 AGGAACATGTGGTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCCGG
 GCTTGAACGTGACGACAGCGATCTAGAGATAGTACTCCTTCGGG
 GCTGCTGTGGAGGTGCTGCAATGGTTGCTGACGCTGTCGCTGAGG
 TGTCCGGTTAAGTGCCATAACGAGCGCAACCTTTTCAATTAGTTGCC
 ATCAGGTAATGTGGGCACTCTGGTGATACTGCCACCGTAAGGTGT
 GAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAGCACGGCCCTTACGTCCGG
 GGCTACACACGTGTTACAATGGTGGTACAGAGAGTCGGGTGTATG
 CAAATACATTTCTAATCAAGAAAGCCAATCTCAGTTCGGATTGGGT
 CTGCAACCCGACCCCATGAAGCTGGATTCTGCTAGTAATCGCGCATC
 AGCCAATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACCCGCC
 GTCAGCCATGAAGGCGGGGGCGCTTGAAGTCCGTGACCGCAAGG
 ATCGGCCTAGAGCGAACTGGTAATTTGGGGCTAAGTCGTAACAAGG
 TAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT

>RB51

AGAGTTTGATCTGGCTCAGAACGAACGCTGGCGGCAAGCTTAACA
 CATGCAAGTTGAACGGGATTTGTATGGTGCTGCACTAGACAAATGA
 GAGTAGCGCACTGGTGAGTAACACGTGGGAACGTGCCCTTTAGTGG
 GGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCCGATACGCCCTAAAG
 GGGAAAGATTTATCGCTAAAGATCGGCCCGCGGAAGATTAGATAG
 TAGGCGGGGTAAACGGCCCACTAGTCGACGATCGGTAGGGGTCTG
 AGAGGAAGGTCCCGACACTGGAACGTGAGACACGGTCCAGACTCCT
 ACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGGTCAATGGTCCGAGACTGA
 ACCAGCCAAGTAGCTGTCAGGATGACTGCCCTATGGGTGTAAACT
 GCTTTGTACGGGAATAAAGTACCCACGTGTGGGTGTTGTCATGTA
 CCGTACGAATAAGCACCGGCTAATCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAA
 TACGGAAGGTGCGAGCGTTATCCGGAATTTATGGGTTTAAAGGGAG
 CGTAGGCGGAACCTCAAGTCAGCTGTGAAATCTCGGGCTCAACCG
 TAGGCTGCGAGTTGAAACTGTGGTTCTTGTAGTGACATGAGGATGG
 TGGAAATTTGTGGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGATATCAAGAAAC
 TCCGATTGCGAAGGCAGCTGTCTGGGGTGCAACTGACGCTGAGGCT
 CGAAAGTGGGGTATCAACAGGAATTAGATACCTCGGTAGTCCGCA
 CAGTAAACGATGGATCTCGTGGTTGGCGATACACTGTCAGTCACC
 CAGCGAAAGCGTTAAGTATCCACCTGGGGAGTACCGCGCAACGG
 TGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGAGGAACA
 TGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCCGGGCTTGAAC
 TGCAGTGGACCGGTGACAGATGCACTTCTTTCGGAGCCGCTGTG

GAGGTGCTGCATGGTGTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGAGGTGTCGGCTT
AAGTGCCATAACGAGCGCAACCCCTGTCTTCGGTTGCCATCGGGTA
ATGCCGGGCACTCCGCAGATACTGCCATCGCAAGATGTAGGAAGG
TGGGGATGACGTCAAATCAGCAGGCCCTTACGTCCGGGGCTACAC
ACGTGTACAAATGGGAGGTACAGAAGGCAGCTACCCGCGAGGGG
ATGCGAAATCCCAAATCCTCTCCAGTTCGGACCGGAGTCTGCAACC
CGACTCCGCGAAGCTGGATTCGTAGTAATCGGCATCAGCCATGG
CGCGGTGAATACGTTCCCGGGCTTGTACACACCGCCGTCAGCC
ATGAAAGCCGGGGCGCTGAAGTCCGTGACCGTAAGGAGCGGCCCT
AGGGTGAAACTGGTGATTGGGGCTAAGTCTGAACAAGGTAGCCGTA
CCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT

>RB52

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGGTGCTTAACA
CATGCAAGTCGAACGGGGTTAAGAAGGAAGCTTGCTTTTCAATTTA
AACCTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGGAACCTGCCCTTC
AGTGGGGAACAACAATAGAAATGGTTGCTAATACCGCATAATGTC
GGAGAGCCGATGACATTCCGACCAAGGATTTATTCGCTGAAGGA
TGGCTCTCGCTCCGATTAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCCACCAA
GTCTACGATCGGTAGCCGAACCTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGG
ACTGAGACACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCATGGGGAAAT
ATTGGGCAATGGGCGAAAGCGCTGACCCAGCAACGCCGCGTAAGG
ATGACGGTCTTCGGATTGTAACTTCTTTAATTGGGGAAGAACAAA
ATGACCTACCCAAAGAATAAGTCACGGTAACCTAGTGCCAGCAGC
CGCGGTAATACGTAGGTGACAAAGCGTATCCGGATTACTGGGCGT
AAAGGGCGTGTAGGCGGTCTTGCAAGTCAGAAGTGAATTCCTGAG
CTCAACTCGGGCGCTGCTTCTGAACTGCAGGACTTGAGTGCTGGA
GGGGATAGCGGAATTCTAGTGGAGCGGTAAATGCGCAGATATTA
GGAAGAACACCGGTGGCGAAAGCGGCTATCTGGACAGTAACGTGAC
GCTGAGGCGCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTG
GTAGTCCACGCGCTAAACGATGATTACTAGGTGTGGGGGACTATA
GTCTTCGGTGCCGTCGCAAAACGCATTAAGTAATCCACCTGGGGAG
TACGTTTCGCAAGAATGAAACTCAAGGAATTGACGGGACCCGCAC
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCGAAAAACCTT
ACCAAACTCTTGACATCTGATGACCATATATGTAAATGATATTCCT
TCGGAGCATCAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGT
CGTGAGATGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGCTCTT
AGTAGCCAGCGGTTCCGCCGGGCACTTAGAGGGACTGCCAGGGAT
AACCTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTAT
GATTGGGCTACACAGTGTCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAAGCG
ACCTGTGAAAGGTGAGCAATCTCAAAAATAACGTCTCAGTTCGGA
TTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCG
CGAATCAGCATGTGCGGGTGAATACGTTCCCGGGTCTGTACACACC
GCCCCTCACACCATGGGAGTGGGAAATGCCCAAGTCGGTGACCTA
ACCGCAAGGAAGGAGCCGCCGAAGGCGAGGTCTGATACTGGGGTG
AAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCT
CCTT

>RB53

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGCAGGCTTAACA
CATGCAAGTCGAGGGGACGCGGGGTAGCAATACTCTGGCGGCA
CCGGCGAAAGGGTGAGTAACGCGTGAGCAACATGCCGCTAGAGA
GGGATAGTCGATGGAACGTCGCGTAATACCTCGTAATACAAGGGG
TCGCAATGGTCTTTGTGAAAGATTATCGCTACCGGATTGGCTCGC
GTTCCATTAGCTAGTTGGCGGGTAACGGCCACCAAGGCGACGAT
GGATAGGGGTTCTGAGAGGAAGTCCCCACATTGGAACGTAGACA

CGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATIGGTCAAT
GGCCGAGAGGCTGAACCAGCCATGCCGCGTGGGGAGGACGGCCCT
ATGGGTTGTAAACCGCTTTTGTACGGGGGCAATAAGTATTACGAGT
AATACGATGAGAGTACCTGGCGAATAAGCGTCGGCTAAGTCCGTGC
CAGCAGCCGCGTAATACGGAGGACGCGAGCGTTATCCGGATTICAT
TGGGTTTAAAGGTTGCGCAGGCGGCCGTGCAAGTCAGCGGTGAAA
TCCCGGGGCCAACCCCGGAAGTGGCGTTGATCTGGCGGGCTGGA
ATGCGGTGGGGCGGGCGGAACGTTGGCGTGTAGCGGTGAAATGCGT
AGATATGCCACAGAAGCGCGTAGCGGAGGCACTGCCAGGCGCTG
CATTGACGCTCGGGCACGAAGCGTGGGATCGAACAGGATTAGAT
ACCTGGTAGTCCACCGCTAACGATGGGCGCTGCTGCTGGCGG
CAGACGGTGGGGCGCAAGCGAAAGCGTAAGCGCCCACTGGG
GAGTACGGTCGAAAGGCTGAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGATACGCGAGGAA
CCTTACCGGGCTTGAACTGTGGGGGAACGACGGGGAGACCCGGAG
GTCCGCAAGGACTCCACAGAGGTGCTGCATGGTTGCTGTCAGCTC
GTGCGGTGAGGTGTGGGTCAAGTCCCATACGAGCGCAACCCCTG
CGTCCAGTTGCCAGCGGTGAGGCGGGCACTCTGGAACGGAATGCC
GCGCAAGCGGAGAGGAAGGCGGGGATGACGCTCAAATCATCATGCC
CCTTATGACCGGGGTACACAGCTGCTACAATGGCGTAACAAAGG
GAAGCGAGGGAGCGATCCGAGCGAATCCCAAAAATAAGTCCCA
GTTTCGATCGAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCT
AGTAATCGCAGATCGGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCGGGTCTTG
TACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGAAATGCCGAAGCGG
GTGGCCGAATCGCAAGATAGGAGCGCTCGAAGGCGAGCGCGTGA
CTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTG
GATCACCTCCTT

>RB54

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCAGGCTTAACA
CATGCAAGTCGAACGGGAAATTTTGGTTTACTGGAAATCTTATGTC
GCGGACGGGTGAGTAACAGTGAACCACTGCTCTGAGAGGGGG
ATAGCTTCTGGAACCGATGGTAATACCTTATAACATATCGAAACC
GCATGATTTTGATATCAAGAATTAATCACTCAGAGATGGGCTCGCGT
CTGATTAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTACCAAGTCGAGATCA
GTAGCCGACTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGAATGAGATACG
GTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGGGCAATGG
GCGAAAGCCTGACCCAGCGACGCGCGTGAATGAAGAAGATCTTCG
GGTTGTAAGTTCTTTTATATGGGACGAAACAAATGACGGTACCAT
ATGAATAAGCCACGGCTAATACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACG
TAGGTGGCGAGCGTTATCCGGATTACTGGGTGTAAGGGGTGTGTA
GGCGGGGAAGCAAGTCAGATGTGAAATTAATGGGCTCAACTATAA
CTTGCAATTGAACTGTTTTCTTGAGGATCGGAGGGGTAAGTGAA
TTCCCGGTGTAGCAGTGAATGCGTATATCGGAGGAACACCGG
TGGCGAAGCGAGTTACTGGACGATTACTGACGCTGAGACAGGAA
GTGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTGTAGTCCACACCGTA
AACGATGAATGCTAGGTGTGGGGCGCAAGCTTCCGTGCGCAGTT
AACACAATAAGCATTCACCTGGGGAGTACGGCGCAAGGTTGAAA
CTCAAAGGAATGACGGGAGCCCGCACAAGCAGTGGAGTATGTGGT
TTAATTCGACGCAACGGAAGAACCTTACCAGGACTTGACATCCCG
GGAACCGGCGTAATGGCGGGGTGCCCTTCGGGGAATCCGGAGAC
AGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTA
AGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTACGGTTAGTGTCTACGCAAGAG
CACTCTAGCCGACTGCCGTGACAAACGAGGAAGGTGGGGATG
ACGTCAAATCATCATGCCCTTACGTTCTGGGCCACACAGTACTAC

AATGGCGAAAACAAAGGGAAGCAACACCGCGAGGTAGAGCAAAAC
CCATAAAAAATCGTCCAGTTCGGACTGCAGGCTGCAACTCGCTGTC
ACGAAGTTGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGA
ATACGTTCGGGGCTTTGTACACACCGCCCGTCAACCATGAAAGTC
GGAAACACCCGAAGTCAGTGAGCTAACCGCAAGGAGGCAGCTGCC
GAAGGTGGGTCCGATGATTGGGGTTAAGTCGTAACAAGGTAGCCGT
ATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCTCCTT

>RB55

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCATGCTTAACA
CATGCAAGTCGAACGGAGTGGTTCTCCGAAGACCTGACGAGCTTG
CTCTGATGGAATTCATTTGAATCACTTAGTGGCGGACGGGTAGTA
ACCGTGGGTAACTGCCCTATCTGGGGGATAGCAGTTGGAACCG
ACTGATAATACCGCATAAGCGCACAGTACCGCATGGTACGGTGTGA
AAAATCCGGTGGTATAGGATGGACCCCGCTCTGATTAGCTAGTTG
GTGAGGTAACGGCCACCAAGCGGACGATCAGTACCGGCTGAGA
GGGTGTACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAACTCCTACG
GGAGGCAGCAGTGGGGAATTTGGACAATGGGGGAAACCTGATC
CAGCGACGCGCGTGAGCGATGAAGTATCTCGGTATGTAAAGTTCT
ATCAGCAGGAAGATAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCACCGGCT
AAATACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTATGGTGCAAGCGTTAT
CCGGATTTACTGGGTGTAAGGGTGGTATGGTGGCATGGCAAGTCA
GATGTGAAAACATATGGGCTCAACCCATAGACTGCATTTGAACTGC
CGAGCTAGAGTGCAGGAGAGGAAAGTGGAATTCCTAGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGATATTAGGAAGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCCT
GCTGGACTGAGACTGACCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAA
CAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACGCGTAAACGATGAACACCA
GGTGCTGGGGACGGACAGTCTCGGTGGCGAAGCAACGCATTAAG
TGTTCCACCTGGGGAGTACGTTCCGAAGAAATGAACTCAAAGGAAT
TGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGTTTAAATTCGACG
CAACGCGAAGAACCTTACCAGGCCT

>RB56

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCTAACA
CATGCAAGTCGAACGGGGATTGTTTTCGGCAGAACTCTAGTGGCG
AACGGGTGAGTAACCGGTAGGCAACCTGCCCGCGCGGGGACAA
CACGCCGAAAGGTGTGCTAATACCGGATACGAAGGCGGCATCGCAT
GGTGCTGTTTGAAGAATGGCTCTGTTTACAAGCTATCGCCGGGGG
ATGGGCTGCGTCCGATTAGTGGTGGTGGGTAAACGGCCACCA
AGGCGCAGCATCGGTAGCCGGTCTGAGAGGATGAACGGCCACATTGG
GACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAA
TCTTCGCAATGGGCGCAAGCTGACGGAGCAACGCCGCTGGGTG
AGGAAGTTTTTCGGAACGTAAAGCCCTGTTGTCTATGACGAACGGA
CTTTCGTGAAGAATGGGAAGTAGTGACGGTAATAGACGAGGAAGC
CACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTGTCGGAAATATTGGGCGTAAAGCGCATGTAGGCGGTGCCT
TAAAGTGTGCTGAAACTGCGGGGCTTACCCCGTATGGCGATGGA
AACTGTGGCACTTGAGTGACGAGAGGAAAGGGGAACCTCCAGTGT
AGCGGTGAAATGCGTAGATATTGGGAAGAACACCGGTGGCGAAGG
CGCCTTCTCGGACTGTGCTGACGCTGAGATGCGAAGGCAGGGTA
GCGAACGGGATTAGATACCCCGGTAGTCTTGGCGTAAACGATGGG
TACTAGGTGTGGGAGGTATCGACCCCTTCCGTGCCGAGTTAACGC
AATAAGTACCCCGCTGGGGAGTACGGCGCAAGGCTTAAACTCAA
AGGAAATTGACGGGGGCCCCACAAAGCGGTGGAGTATGTGTTTAAT
TCGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCGACTGTAA
GGGACAGAGATGTCCCTCTCTTCGGAGACAGGAAGACAGGTGGT

GCATGGCTGTCTGCTAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCG
CAACGAGCGCAACCCCTTGCTATTAGTTGCTACGCAAGAGCACTCTA
ATAGGACTGCCGTTGACAAAACGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCA
AATCATCATGCCCTTATGACCTGGGTACACAGTACTACAATGGC
CGTAAACAGAGGGAAGCGAAACGGCGATGTGGAGCAAAACCCCTAA
AAGCGGTCCAGTTCAGATTGCAGGCTGCAACCCGCTGCTGAAG
TCGGAATTGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGT
TCCCGGGCTTGTACACACCGCCCGTCAACCATGGGAGCGGTAA
TACCCGAAGTCAGTAGTTCAACCGCAAGGAGAGCGCTGCCGAAGGT
AGGATTGGCGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGA
AGGTGCGGTTGGATCACCTCCTT

>RB57

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAACA
CATGCAAGTCGAGGGGCATCATTTGAGATAGCTTGTCTATTTCAGATG
CGACCCGGCGACGGGTGAGTAACCGGTATCCAACCTTCCCTTAG
TAGGGCATAGCCCGGCGAAAGTCGGATTAAATCCCTATGTTATCCG
AAGAGGACATCTGAATTGATCAAGATTCATCGCTAAGGGATGGG
GATGCGTCTGATTAGGTAGTAGGGGGGTAAACGGCCACCTAGCCG
ACGATCAGTAGGGTCTGAGAGGAAGTCCCCACACTGGTACTG
AGACACGGACCACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATATTG
GTCAATGGGCGTGAGCTGAAACGCAAGTAGCGTGACAGGATGAC
GGCCCTATGGGTGTAAACTGCTTTTATGCGGGGATAAAGTAGGGG
ACGTGTCCTTTTGTAGGTACCGCATGAATAAGGACCGGCTAATTC
CGTGCCAGCAGCCGCGTAAACGGAAGGTCCGGCGTTATCCGGA
TTTATTGGGTTTAAAGGGAGCGCAGCGGGTTATTAAGCGTGACGT
GAAATGTAGCCGCTCAACGGCTGAAGTGCCTGCGGAACGTGTAGTC
TTGAGTGAGTACGACGGGACGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAT
GCTTAGATATACGAAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGTCCCGGAGT
CCTTTACTGACGCTAAAGCTCGAAGGTGCGGGTATCGAACAGGATT
AGATACCTGGTAGTCCGACCGTAAACGATGGATGCCCGCTGTTG
GCGATACATTGTACGCGGCAAGCGAAGCGTTAAGCATCCCACT
GGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAACCTCAAAGGAATTGACGGGGG
CCCGCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAAATTCGATGATACCGGAG
GAACCTTACCCGGGCTTGAATGCAGCCGAACGATAGAGAGATCTT
GAGGTCTCTCGGACCGGCTGTGGAGGTGCTGCATGGTGTGCTCAG
CTCGTGCCGTGAGGTGTGGCTTAAAGTGCCTAACGAGCGCAACCC
TTTCTCTAGTTGCCATCAGGTAAAGCTGGGCACTCTGGGGACACTG
CCACCGTAAGGTGTGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAGCACG
GCCCTTACGTCCGGGCTACACACGTGTTACAATGGGGGGTACAGA
GAGTCGAGTGCCGGTAACGTCACTCCAATCAAGAAAGCTCTCTCA
GTTCCGATTGGGGTCTGCAACCCGACCCCATGAAGCTGGATTTCGCT
AGTAATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCT
TGTACACACCGCCGTAAGCCATGAAGCGGGGGCGCTGAAGT
CCGTGACCGCGAGGGTGGCGCTAGGGTGAACCGGTGATTGGGGCT
AAGTCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCT
CCTT

>RB58

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTAATA
CATGCAAGTCGAACGCTAATCTTCGGTTTAGTGTGGCAACGGGTG
AGTAACACGTAGGTAACCTGCCATAAGACGAGGATAACTACTGGA
AACGGTAGCTAATACTGGATAGTATAGAAAGTCGATGACTTTATAT
TTAAAGGTGCTCTAAGCATCACTTATGGATGGACCTGGCGGCATT
AGCTAGTTGGTGAAGTAACGGCCACCAAGGCGCAGATGCGTAGCC
GGACTGAGAGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCAG

ACTCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATTTTCGGCAATGGACGCAA
 GTCTGACCGAGCAACGCCGCTGAGTGATGAAGTCTTCGGAACGT
 AAAATTCCTTTTATTTGGAAAAACGTATAGTGTAGGAAATGACATT
 ATAGTGATGGTACCAATGAATAAGCCCGGCTAACTATGTGCCAG
 CAGCCCGGTAAATACATAGGGGGGAGCGTTATCCGGATTIATTGG
 GCGTAAAGGGTGCCTAGGCGGTAGATTAAAGTCTAAGGTTAAAGTGC
 AAGGCTCAACCTTGTGATGCCCTTAGAAACTGGTTTACTTGAGTTTGG
 TAGAGGTAAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTAAAAATGCGTAAAAAT
 ATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGCGGCTTACTGGGCCACAAT
 GACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACC
 CTGGTAGTCCACGCTGTAAACGATGAGTACTAAGTGTGGAAAAAT
 CCAGTGCTGAAGTTAACGCATTAAGTACTCCGCTGAGTAGTACGT
 ACACAAGTATGAACTCAAGGAATTGACGGGGACCCGACAAAGC
 GGTGGAGCATGTGGTTTAAATCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA
 AATCTTGACATCTCTTGACAAAGTATGTAATGTACTTTCCTTCGG
 GACAAGATGACAGGTGGTGCATGGTTGTCTCAGCTCGTGTCTGTG
 AGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGCTTAGTA
 GCCAGCAATTCTGGTTGGGCACTTAGGGAGACTGCCCGGTGAACC
 GGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGATT
 TGGGCTACACAGTGTCTACAATGGCGTAAACAAAGGGAAGCAATTG
 GGTGACCATGAGCAAACTCAAAAAATAACGTCTCAGTTCGGATTGT
 AGTCTGCAACTCGACTACATGAAGTGGAAATCGCTAGTAATCGCGA
 ATCAGAAATGTCCGGTGAATACGTTCCGGGTCTTGTACACACCGCC
 CGTCACACCATGGGAGTTGGGAATGCCGGAAGTCTGTGACCCAACC
 GTAAGGAGGGAGCAGCCGAAGGAGGCTCGATAACTGGGGTGAAG
 TCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACTCCT
 T

>RB59

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGCTTAAACA
 CATGCAAGTCGAACGGAGTATAGACGCTGCAGAGATTTCGGTCGAA
 GCTTGTTTATACTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAAAC
 CTGCCGTATGCAGGGGGACAACAGTTGGAAACGACTGCTAATACCG
 CATATGCGCACAGTACCGCATGGTACAGTGTGGAAAGATTIATCGG
 CATACGATGGACCCCGCTTTGATTAGATAGTTGGTGAGGTAAACGGC
 TCACCAAGTCGACGATCAATAGCCGGCTGAGAGGGCAATCGGCCA
 CATTTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTG
 GGGAAATTGCACAATGGGGGAAACCTGATGCAGCGACGCCGCGT
 GAGTGAAGAAGTATTTCTGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAGA
 AAATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCGGCTAACTACGTGCCAGC
 AGCCGCGGTAAATCGTAGGGGGCAAGCGTTATCCGGATTIATGCGG
 TGTAAAGGGAGCGTAGACGGTTTTTAAAGTCTGATGTGAAGCTGG
 GGGCTCAACCCCAAACTGCATTGGAACTGGGGAAGTAGAGTGTG
 GGAGAGGTAAGTGAATTCTAGTGTAGCGGTGAATGCGTAGATA
 TTAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACGATGACTG
 ACGTTTGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAAACAGGATTAGATACCTT
 GGTAGTCCACCGCTAAACGATGATTACTAGGTGTGGAGGACTAT
 AGTCTTTCGGTCCGTCGCAAAACGATTAAAGTAATCCACCTGGGGA
 GTACGTTTCGAAGAAATGAAACTCAAGGAATTGACGGGGACCCGCA
 CAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCAACGCGAAAACTT
 TACCAAACTTTGACATCTGAGTGACCATTCGGGTAAATGCGAACTCT
 CTTCCGAGCACTCAAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGT
 GTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTGGC
 TTTAGTAGCCAGCGGTCAAAGCCGGCACTCTAGAGGAGTCCAG
 GGATAACCTGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCATATGCCCC

TTATGATTGGGCTACACACGTGTACAATGGCGTAAACAAAGGGA
 AGCGACCTGTGAAGGTGAGCGAATCTCAAAAATAACGCTCAGTT
 CGGATTGTAGTCTGCAACTCGACTACATGAAGCTGGAATCGTAGT
 AATCGCGAATCAGCATGTGCGGTGAATACGTTCCCGGGTCTGTAC
 ACACCGCCGTCACCATGGGAGTGGGAAATGCCCGAAGTCCGTG
 ACCTAACCGTAAGGAAGGAGCGGCCGAAGGCAAGTCTGATAACTG
 GGGTGAAGTCGTAAACAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGAT
 CACCTCCTT

>RB60

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAAACA
 CATGCAAGTCGCGGGGCTCGCATGGGGCGGCAACGCTCCCTGGCGG
 CGACCGCGGATGGGTGAGTAACCGGTATCCAACTGGCCCCCTCT
 CCGGGACAGCCCTCGAAAGAGGGATTAATACCGGATGTTCCTTT
 ATGCCGATGGCGTATGGGCAAGGCGTGAGTCGGAAGGGGATG
 GGGATGCGTTCATTAGGCAGCGCGGGGTAAACGGCCACCGGGC
 CTTGATGGATAGGGGTTCTGAGAGGAAGTCCCCACACTGGTAC
 TGAGACACGGACCACTCCTACGGGAGGCAGCATGAGGAATAATT
 GGTCAATGGGCGAGAGCTGAACCAAGTACGCTGCAGGATG
 ACGGCCCTATGGGTGTAACTGCTTTTATATAGGATAAAGTGCAC
 CACGTGTGGTGTGGTAGGTACTATATGAATAAGGACCGGCTAATT
 CCGTGCCAGCAGCCGCGTAAACGGAAGGTCCGGCGTTATCCGG
 ATTTATTTGGGTTTAAAGGAGCGCAGGCTGATTGTTAAGCGTGACG
 TGAATGTAGCCGCTCAACGGCTGAACGCTGCGTCCGAACTGGCAGT
 CTTGAGTGAGTACGAGTGCAGCGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAA
 TGCTTAGATATCAGGAAGACCCCGATTGCGAAGGCAGCTGACGAG
 TCTTTACTGACGCTAAAGCTCGAAGGTGCGGGTATCGAACAGGAT
 TAGATACCTGGTAGTCCGACGGTAAACGATGGATGCCCGCTGTT
 GGGCATATAGTGTACGCGGCAAGCGAAAGCGTTAAGCATCCCAAC
 TGGGGAGTACGCGGCAACGGTGAACTCAAGGAATTGACGGGG
 GCCCGCACAAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAAATTCGATGATACGGA
 GGAACCTTACCCGGGCTCGAACGGCAAGTGAAGGAACAAGAGATT
 GTGACGCCCTTCGGGGCACTTGTGAGGTGTGTCATGGTTGTGCTCA
 GCTCGTGTGAGATGTTGGCTTAAAGTGCATAACAGGCGCAACC
 CTTGTGCCAGTTACCAGCAAGTCAAGTTGGGGACTCTGGCGAGAC
 TGCCACCGCAAGATGTGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCAGCA
 CGGCCCTTACGTCGGGGCTACACAGCTGTTACAATGGGGGTACA
 GAATGCTGTGGGTGGCGACACCCGGCAATCATAAAAACCTTCT
 CAGTTCGGAAGTGGAGTGTCAACCCGACTCCACGAAGCTGGATTCTG
 CTAGTAATCGCGCATCAGCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGC
 CTTGTACACACCGCCGTCAGGCAATGAAGCGGGGGTGCCTAAA
 GTACGTACCGCAAGGAGCGTCTAGGGGAAAACTGGTAATTGGGG
 CTAAGTCGTAAACAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCAC
 CTCCTT

>RB61

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGGAGGCTTAAACA
 CATGCAAGTCGAGGGGAGCGCGGAGTAGCAATACTTGGCGGCGA
 CCGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATGCAACCTACCCGTAACAGGG
 GTATAACGGAGTGAATAATCCACTAATCCCCATAATTGCTATTGATC
 CGCATGTTTCGATGACGAAAGTTTTCTGGTTACGGATGGGCATGC
 GTGACATTAGCTAGTTGGCGGGGCAACGGCCCAAGGCGACGAT
 GTCTAGGGGAGCTGAGAGGCTTATCCCCCACTGGTACTGAGACA
 CGGACCAAGTCTACGGGAGGCAGCAGTGAAGGAATAATTGGTCAAT
 GGGAGGAATCCTGAACAGCATGCCGCTGGGGGAAGAGGTCTCT
 ATGGGTGTAAACCCCTTTTGTCCGGAGTAATAAGTCTTTGCGAA

CGACGATGAGAGTACGGGGCGAATAAGCATCGGCTAATCCGTGCC
AGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATGCAAGCGTTATCCGGATTATT
GGGTTTAAAGGGTGCGAGGCGGCGTTAAGTCAGCGGTGAAATG
TCCCGGCTCAACCGGGGCCCTGCCGTTGATACTGGCGTGCTGGAGT
ACGGACGGCGCCGGCGGAATGTGTATGTAGCGGTGAAATGCTTAG
ATATGCCACAGAACACCGATCGCGAAGGCAGCTGGCGAGGCGGTA
CTGACGCTCAGGCACGAAAGCGTGGGGATCAAAACAGGATTAGATAC
CCTGGTAGTCCACGCAGTAAACGATGATAACTTGTTCGGCGATA
GAATGTCCGTGACAAAGCGAAAGCGATAAGTTATCCACCTGGGGAG
TACGATCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGAC
AAGCGGAGGAGCATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGAGGAACCTT
ACCTGGACTCAAATGTTGACTGACCGATTACAGAAATGGATCTCCCT
TCGGGGCAGTCAGCAAGGTGCTGCATGTTGTCGTCAGCTCGTGCC
GTGAGGTGTCAAGTTAAGTCTATAACGAGCGCAACCCCTACGTCC
AGTTGCCAGCGGTAAAGCCGGGACTCTGGAGGGAAGTGGCGGCGC
AAGCCGAGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCAGCAGGCGCCTT
ACGTCCAGGGGACACACGTGCTACAATGGCCGGTACAGAGGGCAG
CCACCTGGCGACAGGAGCGAATCTCGAAAGCCGGCCTCAGTTCCG
ATCGGAGTCTGCAACCCGACTCCGTGAAGTTGGATTTCGTAGTAATC
GCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTGTATAC
ACCGCCCGTCAAGCCATGAAAGTCCGGGGTACCTGAAGTCCGTGAC
CGAGAGGAGCGGCTAGGGTAAACCGGGTGAATGGGGTAAAGTCGT
AACAAAGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACTCCCT

>RB62

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAACA
CATGCAAGTCGAGGGGACAGGGATCTAGCTTGCTAGATTGCTG
GCGACCGGCGACGGGTGCGTAACAGTATCAACCTACCATGGC
CCGGGATAGCCTTCCGAAAGGAAGATTAATACCGATGGTCTCAT
TTCAGGACATCCTGTTATGAGTAAAGATTATCGCGGTGGATGGG
GATGCGTCCGATTAGCTTGTGGCGGGGCAACGGCCCAACAGGCT
TCGATCGGTAGGGGCTCTGAGAGGAGGGTCCCCACACTGGAAGT
AGACACGGTCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGG
TCAATGGCGGAGAGCCTGAACAGCAAGTAGCGTGAGGGACGAC
GGCCCTACGGGTTGTAAACCTCTTTGTTGGGAATAAGTGCCGCA
CGCGTGCGGTTTGTATGTACCTTACGAATAAGCATCGGCTAATTC
GTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAAGATGCGAGCGTTATCCGGAT
TTATTGGGTTTAAAGGAGCGTAGGCGGCCGTTAAGCCAGCGGTC
AAATGTATGCGCCAACTTGGCATGCCGTTGGAATGTCGGGCTTG
AATACACACAAGGAAGATGGAATTCGTCGTGTAGCGGTGAAATGCT
TAGATATGACGAAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCCTTCTGGGGTG
CGATTGACGCTGAGGCTCGAAAGTGCAGGATCGAACAGGATTAGA
TACCCTGGTAGTCCGACAGTAAACGATGGATGCTCGTTCTGGGCG
ATATATTGTCCGGGACCTAGGGAAACCATTAAGCATCCACCTGGG
GAGTACGCCGGCAACGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
GCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTAATTCGATGATACGCGAGGAA
CCTTACCCGGGCTTGAAGTGCAGAGAGCGGATCCAGAGATGGTGAC
TCCCTTCGGGGTCTGTGGAGGTGCTGCATGTTGTCGTAGCTCG
TGCGGTGAGGTGTGCGCTTAAGTGCCATAACGAGCGCAACCCCTTCT
GGTAGTTGCCATCAGTGATGGTGGGCACTCTGCCAGTACTGCCACC
GTAAGGTGTGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAGCAGGCGCCT
TACGTCCGGGGTACACAGTGTACAATGGGGATACAGAGTGTG
AGCGGCCGGCAACGTCCGTTCAATCATGAAAGTGTCTTCAATTG
GATTGGGGTCTGCAACCCGACCCATGAAAGTGTGATTCGCTAGTAA
TCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCGGGCTTGTAC

ACACCGCCCGTCAAGCCATGAAAGTCTGGGGCGCCTGAAGTCCGTG
ACCGAAAGGAGCGGCTAGGGCGAAACAGGTAATTGGGGCTAAGT
CGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACTCCTT
>RB63

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAACA
CATGCAAGTCGAGGGGACGAGAGGAAAGCTTGTCTTCTGTGCG
GCGACCGGCGCACGGGTGAGTAACCGGTATCCAACTGGCCCTTAG
TAGGGGATAGCCCGGCGAAAGTCGGATTAATACCTATGTTTCCA
ATGCAGACATCTAAATGGAATAAAGGTTTACCGCTAAGAGATGGG
GATGCGTCTGATTAGGTTGTTGGCGGGTAACGGCCACCAAGCCT
TCGATCAGTAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACATTGGAAGT
AGACACGGTCCAACTCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTGG
TCAATGGACGAGAGTCTGAACCGCAAGTAGCGTGACAGGATGACG
GCCCTATGGGTTGTAACTGCTTTTATGCGGGGATAAAGTGAGGGA
CGTGTCCTTTTGTAGGTACCGCATGAATAAGGACCGGCTAATTC
GTGCCAGCAGCGCGGTAATACGGAAGGTCCGGGCGTTATCCGGAT
TTATTGGGTTTAAAGGAGCGCAGGCTGAAGGTTAAGCGTGACGTG
AAATGTAGCCGCTCAACGGCTGAAGTTCGCTCGCGAACTGCGTTCTT
GAGTGAGTACGACGTCAGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAATGC
TTAGATATGACGAAGAACTCCGATCGCGAAGGCAGCTTCCCGGGC
GCAACTGACGCTGAAGTTCGAAGGTGCGGGTATCGAACAGGATTAG
ATACCTGGTAGTCCGACAGTAAACGATGGATCTCGCTGTGCGC
GATATACGCTCGGTGGCCAAAGCGAAAGCGTTAAGTATCCACCTGG
GGAGTACGCGGCAACGGTGAAGTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTTAAATTCGATGATACGCGAGGA
ACCTTACCCGGGCTTGAATTGCTGGTGACGGTTACTGGAGACAGTTT
CCTTCTTCGGGACGCCAGTGAAGGTGCTGCATGGTTGTCGTAGCT
CGTGCCGTAAGGTGTGCGCTCAAGTGCCATAACGAGCGCAACCCCT
GCCGTTAGTTGCCATCAGGTCAGCTGGGCACTCTATCGGAGTGGC
ATCGTAAGATGTGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCAGCAGCGC
CCTTATGTCCGGGGTACACAGTGTACAATGGGGGTACAGAGG
GAAGCCACCTGGCGACAGGGCGCGGATCCCGAAATCCCTTCTCAGT
TCGGATTGGAGTCTGGAACCCGACTCCATGAAGCTGGATTGCTAG
TAATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGT
ACACACCGCCCGTCAAGCCATGAAGCGGGGGCGCTGAAGTCCG
TAACCGCGAGGATCGGCTAGGGCGAACCTGGTAATTGGGGCTAAG
TCGTAACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGCGGCTGGATCACTCCT
T

>RB64

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGTAAACA
CATGCAAGTCGAACGGGCTCTATTAGCTTGTAAGACGACCTAGTG
GCAACCGGTTAGTAACGCGTGGGCAACCTGCCGGAAGATGGGG
ACAACATCCCGAAAGGGTGCTAATACCGAATGTTGTACGAGGGAC
GCATGTTCCATGTACTAAAGGATTTATCCGCTTTCGATGGGCCCG
CGTCCGATTAGCTGGTTGGTGAGATAACGGCCACCAAGGCGACGA
TCGGTAGCCGGCTGAGAGGGTGAACGGCCACATTGGGACTGAGAC
ACGGCCAGACTCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATCTTCGCAA
TGGGCGAAAGCCTGACGAGCAACGCGCGTGAGTGAAGAAGGCC
TTCGGGCGTAAAGCTCTGTTGCCGGGAAGAGTGCTATGGGGGAA
CCTGTAGAGGGACGGTACCGGCGAGGAAGCCGCGCTAACTACGT
GCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGCGGCAAGCGTTGTCGGAATC
ATTGGGCGTAAAGGGGGCGAGGCGGGAACAATAGTCTTCTGAA
AGTTCGGGGCTCAGCCCGTATGGGAAGGAACGTGTTTCTTGA
GCGCGGAGAGGGAAGCGGAATCTCGGTGTAGCGGTGAATGCGT

AGATATCAGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTTCTGGACCGC
GGCTGACGCTGAGGCCGAAAGCCAGGGGAGCGAACGGGATTAGA
TACCCCGGTAGTCTGGCCGTAAACGATGGATGCTAGGTGTTGGGAG
GTATCGACCCCTTCCGTGCCGAGTCAACGCAATAAGCATCCCGCT
GGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAACTCAAAGGAATTGACGGGG
CCCGCACAAAGCGGTGGAGTATGTGGTTAATTCGACGCAACGCGAA
GAACCTTACCAGGGCTTGACATTGAGTGAAAGGCATGGAAACATGT
CCCCCTTTCGGAGGCACGAAAAAGGTGGTGATGGCTGTCGTCA
GCTCGTGCCGTGAGGTGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACC
CCTGCCCCGTGTTGCCAGCAGTAAAGCTGGGACTCGCGGGGAC
TGCCGCGGAGAACGCGGAGGAAGGCGGGATGACGTCAAGTCATC
ATGCCCTTATGTCTGGGTACACACGTACTACAATGGATGGAC
AGAGGGAAAGCGAAACCGCGAGGTAGAGCGGAACCTAAAAGCATC
CCCCAGTTCCGATTGACAGGTGCAACCCGCTGCATGAAGTCGGAA
TCGCTAGTAATCGCAGGTACAGATACTGCGGTGAATACGTTCCCG
GCCTGTACACACCCCGCTCACACCAGGAAGCCGTTACGCCCCG
AAGCCGGGTCAAACCTGTGCAAGGCGGGCGGTGACTGGGGTG
AAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGCGGCTGGATCACCT
CCTT

>RB65

AGAGTTTGATCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACA
CATGCAAGTCGAACGGAGAATTACGCTGACGAGACTTCGGTCAAA
TCTTGTAATCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGCAAC
CTGCCCTACTAGGGGTTAACAGCTGGAAACGACTGTTAATACCG
CATAAGCGCACGGTATCGCATGATACAGTGTGAAAACTCCGGTGG
TATGAGATGGGCCCCGCTCAGATTAGCCAGTTGGCAGGGTAACGGC
CTACCAAGCGCAGATCTGTAGCCGGCTGAGAGGGCGGACGGCCA
CATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGGATATTGCAATGGAGGAAACTCTGATGCAGCGACGCCGCGT
GAGTGAAGAAGTATTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAGGGAAGA
AAGACTCGTAAGTGAGATGACGGTACCTGACTAAGAAGCCCCGGCT
AACTACGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGTAGGGGGCAAGCGTTAT
CCGGATTACTGGGTGTAAAGGGAGCGCAGACGGCTTAGCAAGTCT
GAAGTGAACCCACGGCTCAACCGTGGGCTTGCTTTGGAACGTGT
TAAGCTAGAGTACTGGAGAGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGATATTAGGAGGAACATCGGTGGCGAAGGCGGCTTA
CTGGACAGCAACTGACGTTGAGGCGCAAGGCGTGGGGAGCAAACA
GGATTAGATACCTCGTAGTCCAGCGGTAAACGATGAATACTAGG
TGTTGGGTGTCATAGACATTAGTCCGCTCGCTAACGCAATAAGTAT
TCCACCTGGGGAGTACGTTCCGAAGAATGAAACTCAAAGGAATTGA
CGGGGACCCGCAACGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAA
CGGAAGAACCTTACCAGATCTTGAGATCCGGATGAATACATGGTA
ATGCATGTAGCTTTCGGAGCATCCGAGACAGGTGGTGATGGTTG
TCGTACAGCTCGTGTGAGATGTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGC
GCAACCTTGTCCATAGTAGCCAGCAGTAAGATGGGAACTCTATGG
AGACTGCCAGGGATAACCTGGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAAT
CATCATGCCCTTATGATCTGGGCCACACACGTGCTACAATGTCGTA
ACAAAGGGACGCGACCCCGGAGGGTGAGCAATCTCAAAAATAA
CGACCAAGTTCCGACTGTAGGCTGCAACCCGCTGCACGAAGCTGG
AATCGCTAGTAATCGCAGATCAGCATGCTGCGGTGAATACGTTCCC
GGGTCTTGACACACCCCGCTCACACCATGGGAGTCGGAATGCC
CGAAGCCGGTGACTTAACCGTAAGGAGAGAGCGGTGCAAGGCAGG
TCTGATAACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACC
TGCGGCTGGATCACCTCCTT

>RB66

AGAGTTTGATCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCGTGCTTAACA
CATGCAAGTCGAACGGAGTGTAAACGCTGAAGCGATTTCGGTCAAT
TCTTGTTTATCTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGGGTAACC
TGCCGTATGCAGGGGGACAACAGTTGGAACGACTGCTAATACCGC
ATAAGCGCACAGTATCGCATGGTACAGTGTGAAAAGATTTATCGGC
ATACGATGGACCCGCGTCTGATTAGCTTGTTGGTGAGGTAAACGCC
CACCAGGCGACGATCAGTAGCCGGCTGAGAGGGTGAACGGCCA
CATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCTACGGGAGGCAGCAGTG
GGGAATATTGGACAATGGGGGAAACCTGATCCAGCGACGCCGCT
GAGTGAAGAAGTATTCGGTATGTAAAGCTCTATCAGCAAGGAAGA
AAATGACGGTACTTGACTAAGAAGCTCCGGCTAAATACGTGCCAGC
AGCCGCGGTAATACGTATGGAGCAAGCGTTATCCGGATTACTGGG
TGTAAGGGGAGCGTAGACGGCATAGCAAGTCTGAAGTGAATCCCA
TGGCTTAACCATGGAACGTCTTGGAACCTGCCAGGCTAGAGTGCA
GGAGAGGTAAGCGGAATTCCTAGTGTAGCGGTGAATGCGTAGATA
TTAGGAGGAACACCAAGTGGCGAAGGCGGCTTACTGGACTGTAACG
ACGTTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAACAGGATTAGATACCCCT
GGTAGTCCACGCTGTAACGATGATTACTAGGTGTTGGGGACCAAA
GGTCTCGGTGCCCGCGCAACGCAATTAAGTAATCCACCTGGGGAG
TACGTTCCGAAGAATGAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCAC
AAGCGGTGGAGCATGTGGTTAATTCGAAGCAACGCAAGAACCTT
ACCAGATCTTGACATCCAACCTGACCTATAGGGTAACGCTATATCTC
TTCGGAGCAGTTGAGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTACGTCGTGT
CGTGAGATGTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGCTTT
AGTAGCCAGCAGCTCAAGGTGGGCACTCTAGAGGGACTGCCAGGGA
TAACCTGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAAATCATCATGCCCTTA
TGATCTGGGCTACACACGTGTACAAATGGCGTAACAAAGGGAAGC
AGAGTCGTGAGGCCGAGCAATCCCAAAAATAACGCTCAGTTCGG
ACTGTAGTCTGCAACTCGACTACAGGAAGCTGGAATCGCTAGTAAT
CGCAGATCAGAAATGCTGCGGTGAATACGTTCCCGGCTCTGTACAC
ACCGCCGCTCACACCATGGGAGTAGGTAATACCCGAAGTCCGTGAC
TTAACCGTAAGGAGAGAGCGGCCGAAGGTAGGACTTATAACTGGGG
TGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCTGCGGCTGGATCAC
CTCCTT

>RB67

AGAGTTTGATCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCTACAGGCTTAACA
CATGCAAGTCGAGGGGACGATGAACCTAGCTTGCTAAGTTTATG
GCGACCGGCGCACGGGTGAGTAACGCGTATCCAACCTTCCCTTAG
TAGGGCATAGCCCGGCAAGGTGCGATTAAATCCCTATGTTCTTCGT
AGAAGACATCTGAAATGAAGCAAAGGTTTACCCTAAGGGATGGG
GATGCGTCCGATTAGGTAGTTCGGCGGGTAACGGCCACCGAGCCT
TCGATCGTAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACACTGTTACTG
AGACACGGACCGAGCTCTACGGGAGGCAGCAGTGAGGAATATTG
GTCAATGGGCGCGAGCCTGAACCAAGTACGCTGACGAGTATGAC
GGCCCTATGGGTGTAAACTGCTTTTATGCGGGGATAAAGTGAGCC
ACGTGTGGTTTTTTCAGGTACCGTATGAATAAGGACCGGCTAATTC
CGTGCCAGCAGCCGGTAATACGGAAGGTCCGGCGTTATCCGGA
TTTATTGGGTTTAAAGGGAGCGCAGGCTGCCTGTTAAGCGTGACGT
GAAATGCCGCGGCTCAACCGTGAAGTGCTGCGAACTGGCGGGC
TTGAGTGTGCACGAGGAAGGCGGAATTCGTGGTGTAGCGGTGAAT
GCTTAGATATCACGAAGAACTCCGATTGCGAAGGCAGCCTTCCAGG
GCATTACTGACGCTAAGGCTCGAAGGTGCGGGTATCGAACAGGATT
AGATACCTGGTAGTCCGCAGGTAAACGATGGATGCCCGCTGTTG

GCGATATACAGTCAGCGGCCAAGCGAAAGCGTTAAGCATCCACCT
 GGGGAGTACGCCGGCAACGGTGAACTCAAAGGAATTGACGGGG
 CCCGCACAAGCGGAGGAACATGTGGTTAATTGATGATACGCGAG
 GAACCTTACCCGGGCTGAACTGCAGCAGAAGGATACAGAGATGTT
 GACGCCCTTCGGGGCTGCTGTGGAGGTGCTGATGGTGTGTCGTCAGC
 TCGTGCCGTGAGGTGTGGGCTTAAGTGCCATAACGAGCGCAACCCC
 TGCCTTTAGTTGCCATCAGGTAGAGCTGGGCACTCTGGAGGGACTG
 CCACCGCAAGGTGTGAGGAAGGTTGGGATGACGTCAAATCAGCAG
 GCCCTTACGTCCGGGGCTACACAGCTGTTAATGAGGGCATACAGC
 GAGTCGGTGTGGGCAACGCGCATCTAATCATGAAATGTCTCGTA
 GTTCGGATTGGGGCTGCAACCCGACCCCATGAAGCTGGATTGCGT
 AGTAATCGCGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCGGGCT
 TGTACACACCGCCCGTCAAGCCATGAAAGCTGGGGCGCGCTGAAGT
 CCGTAGCCGCGAGGGTGGGCTAGGGCGAAACCGGTGATTGGGGCT
 AAGTCGTAAACAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGGGCTGGATCACCT
 CCTT

>RB68

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTGGCGGCTGCATAACA
 CATTCAAGTCGAACGGACTGATTTCGTAGCTTGTACGGATGAAAG
 TTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACGCGTGAGCAACCTGCCCTATGT
 GCGGGATAACGTTTGGAAACGGACGCTAATACCGCATAAATCCAATT
 GGATCGCATGGTCCGATTGGCAAGATTATTGTCATAGGGATGGGC
 TCGCGTCCGATTAGATAGTTGGCGGGCAACGGCCACCAAGTCTG
 CGATCGGTAGCCGGACTGAGAGGTTGAACGGCCACATTGGAACCTGA
 GAAACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGGG
 CAATGGGCGAAAGCCTGACCCAGCGACGCGCGTGAAGGAAGACG
 GTCTTCGATTGTAACTTCTTTTATGTAGGACGAAAAATGACGGT
 ACTACATGAATAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGTA
 ATACGTAGGTGGCGAGCGTTATCCGGATTTACTGGGTGTAAAGGGT
 GTGTAGGCGGGATTGCAAGTCAGATGTGAAAAATTATGGGCTCAACT
 CATAACCTGCATTTGAACTGTGATTCTTGAGGGTCGGAGAGTAA
 CCGGAATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCAGGAGGAA
 CACCGGTGGCGAAGCGGGTACTGGACGATTACTGACGCTGAGAC
 ACGAAAGCGTGGGAGCAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCAC
 GCTGTAAACGATGAATGCTAGGTGTGGGGCGATAGCTTCCGTGCC
 GCAGTTAACACAATAAGCATTCACCTGGGAGTACGGCGCAAGG
 TTGAACTCAAAGGAATTGACGGGAGCCCGCACAAAGCAGTGGAGTA
 TGTGGTTAATTGACGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGATTGAC
 ATCCCGAGAAGTCTGCGTAATGGCGGATGTGCCCTTCGGGAATT
 GGAGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGTCGATGT
 TGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCTTACGTTCAAGTTGCTACG
 CAAGGACACTCTGGACGACTGCCGTTGACAAAACGGAGGAAGGC
 GGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTACATTCGGGCTACACAC
 GTACTACAATGGCGAAAACAAAGGAAGCAATACCGCGAGGTGGA
 GCAATCCCAATAAAGTCCGTCAGTTCGGATTGTAGTCTGCAACTC
 GACTGCATGAAGTGGAAATCGCTAGTAATCGCAAAATCAGAATGTTG
 CCGTGAATACGTTCCCGGTCTTGTACACCCGCCGTCACACCATG
 GGAGTTGGATATGCCGAAGTCAGTGACCTAACGCAAGGAGGAGCT
 GCCGAAGGTGGAGCCAATGACTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTAG
 CCGTATCGGAAGGTGGGCTGGATCACCTCCTT

>RB69

AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGATGAACGCTAGCGACAGGCCTAACA
 CATGCAAGTCGAGGGGACGACGAAGGAAGCTTGCTTTCTTGGTG
 GCGACCGGCGACGGGTGCGTAACAGGTGTGCAATCTGTCTATAC

CGGGGCATAGCCAGCGAAAGTTGGATTAAATTCCTCATGTGAGTGA
 ACGCCGCATGACGATCACTTGAGACGTAAGGGTATAGGGTGAGCAC
 GCTTCTGATTAGATAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGTCGACG
 ATCAGTAGGGGTTCTGAGAGGAAGGTCCCCACATTGGAATGAGA
 CACGGTCCAACTCTACGGGAGGACGAGTGAGGAATATTGGTCA
 ATGGGCGAGAGCCTGAACAGCAAGTCGCGTGAAGGATGAAGGTT
 CTATGGATTGTAACTTCTTTGTCCGAGGGTAAAAAGGCCACGTG
 TGGCTTCTTGCAAGTATCGGACGAATAAGCATCGGCTAACTCCGTGC
 CAGCAGCCGCGTAATACGGAGGATGCGAGCGTTATCCGGATTAT
 TGGGTTTAAAGGGTGTGAGGTGGTTTGTAAAGTTGTGGTGAAGC
 GTGCGGCTCAACCGTACCAAGCCATGAAACTGGCGAACTTGAGTG
 CAAACGAGGTAGCGGAATGTGATGTGTAGCGGTGAAATGCTTAGA
 TATGTACAGAACCCGATTGCGAAGGCAGCTTACCAGCATGCAAC
 TGACACTGAGGCACGAAAGCGTGGGTATCAACAGGATTAGATACC
 CTGGTAGTCCACGCAGTAAACGATGAATACTAGCTGTTGGCGATAT
 ATGGTCAGCGGTACAGCGAAAGTGTAAAGTATTCACCTTGGGGAGT
 ACGCGGCAACGGTGAACTCAAAGGAATGACGGGGGCCCGCAC
 AAGCGGAGGAACATGTGGTTAATTCGATGATACGCGAGGAACCTT
 ACCCGGGCTTGAAAGTTAGTGACGGACTGTGAAAGCGGTCTTCCT
 TCGGGGACGAAACTAGGTGCTGATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCC
 GTGAGGTGTGGCTTAAGTGCCATAACGAGCGCAACCTTGGCGTT
 AGTTGCCAGCGGTCATGCGGGAACTCTAGCGGACTGCTACTGT
 AAGGTAGAGGAAGGTGGGATGACGTCAAATCAGCAGCGCCCTTAC
 GTCCGGGGGACACACGTGTTAATGTTGGGTACAGAGGGTTGCT
 ACCACGCGAGTGGATGCTAAICTCATAAACCCATCTCAGTTCGGA
 TCGGAGTCTGCAACTCGACTCCGTGAAGCTGGATTGCTAGTAATCG
 CGCATCAGCCATGGCGCGGTGAATACGTTCCCGGCGCTTGTACACA
 CCGCCCGTCAAGCCATGGAAGCTGGGGGTACCTAAAGTCTGCAACC
 GCAAGGAGCGGCTAGGGTAAACTGGTAACCTGGGCTAAGTCGTA
 ACAAGGTAGCCGTACCGGAAGGTGGGCTGGATCACCTCCTT



ภาคผนวก จ
ประวัติผู้วิจัย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล

นางสาวพฤษพร กันยา

เกิดเมื่อ

01 มิถุนายน 2528

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2546 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลายจาก
โรงเรียนมัธยมวิทยา อำเภอเมือง จังหวัดลำปาง
พ.ศ. 2550 สำเร็จการศึกษาระดับวิทยาศาสตร์บัณฑิต
สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่

ประวัติการทำงาน

พ.ศ. 2551-2552 R&D supervisor บริษัท มาเจสติกอุตสาหกรรมอาหาร
จำกัด จังหวัดลำปาง

การเข้าร่วมงานประชุมวิชาการ

พ.ศ. 2554 การนำเสนองานวิจัยในงานการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์
และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 37 เรื่อง
“Determination of Bacterial Community in the Ruminant
Fluid of Holstein Cow Based on Sequence Comparison of
Bacteria 16S rRNA” วันที่ 10-12 ตุลาคม 2554 ณ โรงแรม
เซ็นทาราแกรนด์ และ บางกอกคอนเวนชันเซ็นเตอร์ เซ็นทรัล
เวิลด์ กรุงเทพฯ

พ.ศ. 2555 การนำเสนองานวิจัยในงาน The First Asean Plus Three
Graduate Research Congress เรื่อง “Design and evaluation of
16S rRNA gene group specific primers and probes to
investigate bacteria in rumen fluid” วันที่ 1 - 2 มีนาคม 2555
ณ 239 Huai Kaeo Road, Tambon Suthep, Amphoe Mueang
Chiang Mai 50200 Thailand

งานวิจัยเผยแพร่

- พ.ศ. 2554 Kanya, P., Pongjaroenkit, S., Seetakoses, P. and Niamsup, P. 2011. Determination of Bacterial Community in the Ruminal Fluid of Holstein Cow Based on Sequence Comparison of Bacteria 16S rRNA. pp. 1-6. In The 37th Congress on Science and Technology of Thailand. กรุงเทพฯ: สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์.
- พ.ศ. 2555 Kanya, P., Pongjaroenkit, S., Seetakoses, P. and Niamsup, P. 2012. Design and evaluation of 16S rRNA gene- group specific primers and probes to investigate bacteria in rumen fluid. In Proceeding 1st Asean Plus Three Graduate Research Congress.