



# วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

Journal of Biotechnology in Livestock Production

ปีที่ 3 ฉบับที่ 2 เดือนธันวาคม 2551 Vol.3 ; No. 2 ; December 2008

[www.dld.go.th/biotech](http://www.dld.go.th/biotech)



## ตรวจสอบพ่อแม่-ลูกโค ได้ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

Parentage Analysis in Cattle using DNA Fingerprint



# ตรวจพิสูจน์ พ่อ-แม่-ลูกโค ได้ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

Parentage Analysis in Cattle using DNA Fingerprint



สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์  
กรมปศุสัตว์

## สารจากบรรณาธิการบริหาร

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์มีความยินดีที่มีผู้นำเสนอผลงานวิจัย และผลงานวิชาการ ทางด้านเทคโนโลยีการผลิตปศุสัตว์มากขึ้นในปี 2551 นี้ จนทำให้สำนักฯ ตัดสินใจที่จะได้นำเสนอวารสาร สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์เป็นเล่มที่ 2 ในรอบปี 2551

วารสารมีเนื้อหาสาระในทุกด้านของเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ เช่น การปรับปรุงพัฒนา พันธุ์ปศุสัตว์ให้เกิดโคนมพันธุ์ใหม่ที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม พร้อมทั้งให้ผลผลิตน้ำนมสูง โคนี้อ พันธุ์ใหม่พร้อมด้วยคุณภาพเนื้อสูงชัน มีความนุ่มและมีไขมันแทรก งานวิจัยด้านการย้ายฝากตัวอ่อน และการโคลนนิ่งปศุสัตว์ที่ได้รับการพัฒนาคัดสรรพันธุ์มาแล้วให้ผลผลิตดี รวมทั้งการอนุรักษ์สัตว์ที่ใกล้สูญพันธุ์ ด้านชีวโมเลกุล มีการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เพื่อพิสูจน์พ่อ-แม่-ลูก และการพิสูจน์จำแนกพ่อพันธุ์จากน้ำเชื้อ แข่งขัน การตรวจค้นหาโรคที่ควบคุมการให้น้ำนม การให้คุณภาพเนื้อสูง หรือการต้านทานโรค งานวิจัยด้านการผสมเทียมเพื่อเพิ่มอัตราการผสมติด ค้นหาสาเหตุการผสมซ้ำในโคนม โคนี้อ กระบือ งานวิจัยด้านการผลิตน้ำเชื้อเพื่อเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อให้ปลอดจากการปนเปื้อนจากเชื้อโรค และการแก้ไขปัญหา ความสมบูรณ์พันธุ์ที่มีสาเหตุมาจากปัจจัยต่างๆ เช่น ความไม่สมดุลของฮอร์โมน ความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ ฯลฯ

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์หวังว่าประเทศไทยโดยเฉพาะในวงการปศุสัตว์จะมีนักวิจัยที่มีผลงานทางวิชาการในแนวทางที่กล่าวมาแล้วข้างต้นเพิ่มมากขึ้น อันจะช่วยให้อุตสาหกรรมความรู้ด้านการผลิตปศุสัตว์ของไทยได้รับการนำเสนอ และถ่ายทอดเพื่อการนำไปประยุกต์ใช้ หรือพัฒนาต่อยอดให้เกิดประโยชน์ต่อวงการปศุสัตว์ และ เป็นประโยชน์ถึงเกษตรกรให้สามารถพัฒนาการเลี้ยงปศุสัตว์ของไทยให้ก้าวหน้ายิ่งขึ้นต่อไป



(นายยุทธ หรินทรานนท์)

ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

## วัตถุประสงค์

1. ส่งเสริมการศึกษา ค้นคว้าและวิจัยด้านการผลิตและขยายพันธุ์สัตว์
2. รวบรวม เผยแพร่ความรู้ด้านการผลิตและขยายพันธุ์สัตว์โดยเทคโนโลยีชีวภาพ
3. ส่งเสริมความสัมพันธ์ และความร่วมมือระหว่างนักวิชาการและสถาบันต่างๆ

## เจ้าของ

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

## สำนักงาน

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง

จ.ปทุมธานี 12000

โทร/โทรสาร 0-2501-2116

## กำหนดออก

ปีละ 1 ฉบับ

## คณะที่ปรึกษา

ผชช. พรรณพีไล เสกสิทธิ์

ดร. ณชัย ศราธพันธุ์

ดร. มาลี อภิเมธีธารง

## บรรณาธิการบริหาร

น.สพ.อยุทธิ์ หรินทรานนท์

## บรรณาธิการ

สพญ. กัลยา เก่งวิทย์กรรม

## ผู้ช่วยบรรณาธิการ

นสพ. วิษณุ ไพศาลรุ่งพนา

## กองบรรณาธิการ

นสพ. ไกรวรรณ หงษ์ยันตรชัย

นสพ. สาโรช งามท่า

สพญ. รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล

นสพ. รัตน์ ฉายรัตน์ศิลป์

สพญ. นุสสรุา วัฒนกุล

นสพ. วิบูลย์ เชียงวิสากร

นางจุรีรัตน์ แสนโกชน์

นายสายัณห์ บัวบาน

## ผู้จัดการวารสาร

นางจุรีรัตน์ แสนโกชน์

นายวิบูลย์ เชียงวิสากร

นางสาวทัศนีย์ พูนจำ



## ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ เป็นวารสารทางวิชาการของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ กำหนดออกปีละ 1 ฉบับ คือ เดือนกรกฎาคม วารสารนำลงบทความ ผลงาน ค้นคว้าวิจัยด้านการผลิตปศุสัตว์ ทั้งด้านการพัฒนา และปรับปรุงพันธุ์ การจัดการอาหาร สุขภาพ และระบบ สืบพันธุ์ ตลอดจนการขยายพันธุ์ และการใช้เทคโนโลยีชีวภาพที่ก้าวหน้าในการปรับปรุงและเพิ่มประสิทธิภาพ การผลิตปศุสัตว์ด้านต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น คณะผู้จัดทำวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ยินดีรับ เรื่องจากทุกท่านที่ส่งมาเพื่อเผยแพร่ และเพื่อความ สะดวกในการพิจารณา ขอเสนอแนะดังนี้

### 1. เรื่องที่จะนำลง

1.1 งานทดลอง วิจัย ทางวิชาการ (Technical/ Research papers) หรือวิทยานิพนธ์ เป็นการเสนอ ผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้ทำขึ้นเอง

1.2 บทความ (Articles) และย่อเอกสาร (Literature reviewed) ทางวิชาการ ที่รวบรวมข้อมูล ความ คิดเห็นและประสบการณ์ของผู้เขียน

1.3 เรื่องอื่นๆ ที่คณะผู้จัดทำพิจารณาเห็น สมควร

### 2. ต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่ส่งมาพิมพ์ในวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ไม่ควรเป็นเรื่องที่เคยพิมพ์ หรือ กำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อลงพิมพ์วารสารอื่น

2.2 ต้นฉบับเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ พิมพ์บนกระดาษเอ 4 จำนวนไม่เกิน 12 หน้า โดยจัดพิมพ์ ด้วย Microsoft Word for Windows หรือใช้ชนิดและ ขนาดตัวอักษรตามที่กำหนด

2.3 ไม่มีการส่งคืนต้นฉบับ

### 3. การลำดับเรื่องในต้นฉบับ

เพื่อให้ขบวนการการพิจารณาผลงานวิชาการ และการดำเนินการจัดพิมพ์วารสารเป็นไปอย่างเรียบร้อย รวดเร็ว และถูกต้อง จึงจำเป็นต้องให้ผู้เขียนผลงาน วิชาการปฏิบัติตามข้อกำหนดอย่างเคร่งครัด ดังนี้

3.1 ให้ส่งต้นฉบับผลงานวิชาการจำนวน 1 ชุด และยังไม่ต้องส่งแผ่นบันทึกข้อมูล (Diskette)

3.2 ต้นฉบับผลงานวิชาการที่ส่งมาให้ตรวจสอบ ถูกต้องของตัวสะกด รูปแบบการจัดพิมพ์ผลงานวิชาการ ให้ถูกต้องตามที่กำหนด

3.3 ส่งแผ่นบันทึกข้อมูลมาให้ เมื่อผลงาน วิชาการนั้นได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการวิจัย สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ แล้วเท่านั้น โดยเลขคณะกรรมการวิจัยฯ จะแจ้งกลับไปยังเจ้าของ ผลงานวิชาการพร้อมส่งต้นฉบับเพื่อให้แก้ไขตามที่ คณะกรรมการวิจัยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิต ปศุสัตว์ให้ข้อเสนอแนะ

บันทึกผลงานวิชาการที่แก้ไข ถูกต้องแล้วตาม ข้อแนะนำของคณะกรรมการวิจัยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพ การผลิตปศุสัตว์ ลงใน Diskette ขนาด 3.5 นิ้ว หรือ CD-ROM ใช้โปรแกรม Microsoft Word for Windows โดยมีรายละเอียดบนสติกเกอร์ติดหน้า Diskette หรือ CD-ROM ดังนี้

ชื่อผลงานวิชาการ .....  
ชื่อเจ้าของผลงาน .....  
ชื่อไฟล์ .....  
ที่อยู่ เบอร์โทรศัพท์ / E-Mail .....

หรือส่งตรงทาง Internet มายัง jureeratn@gmail.com

3.4 ต้นฉบับผลงานวิชาการที่ส่งให้คณะกรรมการวิจัย สทป. พิจารณาจะเป็นบทความที่จัดรูปแบบได้ถูกต้องตามที่กำหนดเท่านั้น หากผลงานวิชาการที่ส่งมาให้ไม่ถูกต้องตามข้อกำหนด จะจัดส่งคืนให้เจ้าของผลงานวิชาการกลับไปแก้ไขให้ถูกต้อง

3.5 ต้นฉบับที่จัดส่งมาต้องชัดเจน ทั้งเนื้อหาและรูปภาพประกอบผลงานวิชาการ โดยส่งมาที่

ส่ง  
บรรณาธิการวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์  
สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์  
ถ. ติวานนท์ ต. บางกะดี อ. เมือง  
จ. ปทุมธานี 12000

3.6 หรือติดต่อสอบถามได้ที่

นางจุรีรัตน์ แสนโภชน์

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

ถ. ติวานนท์ ต. บางกะดี อ. เมืองจ. ปทุมธานี 12000

โทรศัพท์ 02-967-9791 หรือ 02-967-9792

โทรสาร. 02-5011386

ดูข้อมูลรายละเอียดเกี่ยวกับข้อแนะนำสำหรับผู้เขียนผลงานที่ได้ <http://www.dld.go.th/biotech>

## 4. การลำดับเรื่อง

4.1 ชื่อเรื่อง (Title) ควรตั้งชื่อให้สั้นและสื่อความหมายให้ดี และพิมพ์โดยใช้ขนาดตัวอักษร 18 และตัวหนา

4.2 ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน (Author and co - workers) เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ วางกึ่งกลางใต้ชื่อเรื่อง พร้อมทั้งสถานที่ทำงานที่ติดต่อได้สะดวกพิมพ์ไว้ใต้ชื่อคณะผู้วิจัย โดยใช้ขนาดตัวอักษร 16 และตัวปกติ

4.3 บทคัดย่อ (Abstract) เขียนสั้นๆ ได้เนื้อความคลุมวัตถุประสงค์ วิธีการ และผลการทดลอง ความยาวไม่ควรเกิน 3% ของตัวเรื่อง บทคัดย่อต้องมีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ แยกหน้าต่างหากจากกัน

4.4 คำสำคัญ (Key words) เป็นคำหรือข้อความสั้นๆ ที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้นๆ รวมกันแล้วไม่เกิน 5 คำ หากไม่สามารถแปลเป็นภาษาไทยได้ให้ใช้ภาษาอังกฤษแทน โดยการพิมพ์อยู่ใต้บทคัดย่อ (ขึ้นบรรทัดใหม่)

4.5 เนื้อหา (Text) สำหรับงานวิจัยประกอบด้วย  
4.5.1 บทนำ (Introduction) อธิบายถึงปัญหาและวัตถุประสงค์และควรมีการตรวจเอกสาร (literature review)

4.5.2 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) อธิบายเครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองวิธีการที่ใช้ ถ้าคิดค้นขึ้นควรอธิบายอย่างละเอียด แต่ถ้าเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปให้เขียนในลักษณะอ้างอิงถึง ถ้าเป็นเครื่องหมายตราหรือชื่อการค้า ควรทำเป็น foot note ไว้ที่ด้านล่างของหน้านั้น

4.5.3 ผล (Results) รายงานผลการทดลองเป็นคำบรรยาย ให้ละเอียดและเข้าใจง่าย โดยแบ่งเป็นหลายๆ ย่อหน้า และจัดข้อความที่มีเนื้อหาเดียวกันไว้ด้วยกัน หากเป็นไปได้ควรเสนอในรูปของตารางหรือรูปภาพ หรือกราฟพร้อมทั้งบรรยายประกอบ ทั้งนี้ตาราง รูป หรือกราฟไม่ควรแสดงผลที่เหมือนกัน

- ตาราง (Tables) ควรพิมพ์ให้ชัดเจนเหมาะกับหน้า ต้องมีความหมายในตัวเอง และมีคำอธิบายตารางอยู่เหนือตารางนั้นๆ

- รูปภาพ (Figures) ควรเป็นภาพขาว-ดำ ภาพสีหากจำเป็นผู้เขียนต้องเสียค่าใช้จ่ายเองอธิบายรายละเอียดไว้ใต้รูปนั้นๆ

4.5.4 วิจาร์ณ (Discussion) เป็นการวิจารณ์ผลการทดลอง โดยมีจุดมุ่งหมาย เพื่อให้ผู้อื่นเห็นคล้อยถึงหลักการที่แสดงออกมาจากผลการทดลอง หรือเพื่อสนับสนุน หรือคัดค้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน หรือเพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น ผู้เขียนควรพยายามเน้นถึงปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยในอนาคตและดูทางที่จะนำไปใช้เป็นประโยชน์

**4.5.5 สรุป (Conclusion)** เขียนใจความที่สำคัญและคุณค่าของงานเพื่อให้ผู้อ่านเข้าใจง่ายขึ้น

**4.5.6 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)** ควรมีในกรณีที่ได้รับความช่วยเหลือ หรือความร่วมมือที่สนับสนุนงานค้นคว้าวิจัยนั้นๆ

#### 4.5.7 เอกสารอ้างอิง (References)

**ก. กรณีที่อ้างอิงในเนื้อเรื่อง** ควรอ้างอิงดังนี้ คือ

1. กรณีที่อ้างจากการตรวจเอกสาร โดยผู้อื่นๆ ให้ใช้คำว่าอ้างถึงโดย (cited by)

2. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นคนไทย เมื่อเป็นประธานของประโยค ใช้ “วิบูรณ์ และจรัสรัตน์ (2549), เลิศชัย และคณะ (2549) กล่าวว่า.....” หรือเมื่อรายงานอยู่กลาง หรือท้ายประโยค ใช้ (วิบูรณ์, 2549) หรือมีเอกสารอ้างอิงในเรื่องเดียวกันมากกว่า 1 ฉบับ ให้ใช้ (ถาวรและคณะ, 2547; นริศ และสินสมุทร, 2543 .....)

3. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นชาวต่างประเทศเมื่อเป็นประธานของประโยค ใช้ “Rudbeck and Dissing (1998), Kashi et al. (1990) กล่าวว่า.....” หรือเมื่อผู้รายงานอยู่ระหว่างกลางหรือท้ายประโยค ใช้ (Rudbeck and Dissing, 1998; Kashi et al., 1990 .....)

4. กรณีอ้างถึงบุคคลหรือเรื่องที่ไม่เคยลงพิมพ์มาก่อน (personal communication) ให้อ้างเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปลงในรายชื่อเอกสารอ้างอิง เช่น ... similar results (Walker, J.M., unpublished data), ...for other protocols (Walker, J.M., personal communication)

**ข. การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง** ควรขึ้นต้นเอกสารอ้างอิงภาษาไทยก่อน เขียนเรียงตามลำดับพยัญชนะของผู้เขียน ถ้าเป็นภาษาอังกฤษใช้ชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง แล้วตามด้วยปี ชื่อเรื่อง ชื่อหนังสือหรือชื่อวารสารปีที่ฉบับที่และหน้าที่อ้างอิง ดังตัวอย่าง

วิบูรณ์ ตูลารักษาและ จรัสรัตน์ แสนโภชน. 2549. การสกัดดีเอ็นเอ เซลล์รากขนในโคนมไทยโฮลสไตน์. การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 2 “ก้าวทันสมัยกับปศุสัตว์ไทย” วันที่ 24 มกราคม 2549. โรงแรมโซฟิเทล ขอนแก่น. หน้า 452-463.

เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล และกัลยา เก่งวิทย์กรรม. 2549. การประเมินวิธีสกัดแยกดีเอ็นเอจากเลือด น้ำเชื้อ และเซลล์รากขนของพ่อพันธุ์โค. สัตวแพทย์สาร. 56 (3):68-79.

Jason, R. H. and Callings, D.F. 1971. Transplacental infection of piglets with a porcine parvovirus. Res. Vet. Sci. 12: 570-572.

**กรณีอ้างอิงจากตำรา** ให้ระบุชื่อผู้เขียนปีที่ตีพิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อตำรา (พิมพ์ครั้งที่เท่าใด และบรรณาธิการหากมี) สำนักพิมพ์ เมืองที่พิมพ์ หน้าแรกและหน้าสุดท้ายที่อ้างอิง ดังตัวอย่าง

Allison, P.D. 2005. Survival analysis using SAS: A practical guide 8 th edition. SAS institute Inc., Cary, NC, USA. 292 pp.

Van Oirschot, J. T. 1986. Hog Cholera. In : Disease of Swine, 6th ed. Leman, A. D. ed.

Lowa state university Press. Iowa. p. 293-297.

**กรณีอ้างอิงจากเว็บไซต์ (Online references)** ดังตัวอย่าง

Weeden, N.F. 1993. Comparison of DNA extraction protocols. [Online] <http://home.twony.rr.com/protocol.htm> Access 29/10/2005.

จันทร์หา เป็นดุ่ม จุฑาพร ศรีวิพัฒน์ วรวิทย์ แสงสิงแก้ว และพิงพิศ ดุลยพัชร. 2541. อาหารจากข้าวโพด. คู่มือการส่งเสริมการเกษตรที่ 43. แหล่งที่มา : <http://www.ku.ac.th/agri/cornn/corn.htm>. 27 มีนาคม 2541.

## 5. การพิมพ์ผลงานทางวิชาการ

**ตัวพิมพ์** ให้พิมพ์ดีด หรือใช้เครื่องพิมพ์ (Printer) หมึกพิมพ์ต้องเป็นสีดำ คมชัด สะดวกแก่การอ่านและใช้ตัวพิมพ์แบบเดียวกันทั้งฉบับ กรณีใช้เครื่องคอมพิวเตอร์พิมพ์ เนื้อความให้ใช้ตัวอักษร Angsana UPC 16 ตัวปกติเท่านั้น ยกเว้นหัวข้อใหญ่ เช่น ชื่อเรื่อง บทคัดย่อ บทนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผล วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 18 ส่วนหัวข้อย่อย เช่น ชื่อผู้วิจัยและคณะ คำสำคัญ ตาราง รูปภาพ เป็นต้นพิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 16

**กระดาษที่ใช้พิมพ์** ให้ใช้กระดาษขาวไม่มีบรรทัด ขนาดมาตรฐาน A4 (210 x 297 มม.) ใช้เพียงหน้าเดียว

### การเว้นที่ว่างขอบกระดาษ

- ตั้งกั้นหน้าบนและซ้ายไว้ที่ 2.5 เซนติเมตร
- ด้านขวาและด้านล่างไว้ที่ 2.0 เซนติเมตร

### การเว้นระยะในการพิมพ์

- การเว้นระยะระหว่างบรรทัดและการย่อหน้า ควรจัดตามความสวยงาม

- กรณีคำสุดท้ายไม่จบบรรทัดนั้นๆ ให้ยกคำนั้นทั้งคำไปพิมพ์ในบรรทัดต่อไป ไม่ควรตัดส่วยท้ายของคำไปพิมพ์ในบรรทัดใหม่ เช่น กระบือปลักไม่ให้แยกเป็น กระบือ-ปลัก เป็นต้น

- หลังเครื่องหมาย . และ , หรือ ; เกาะ 1 เกาะ
- ระหว่างคำสุดท้ายกับเครื่องหมาย. และ , ไม่เว้น

ช่องว่าง

- ไม่ต้องเว้นช่องว่าง ระหว่างวงเล็บ และคำข้างในวงเล็บ เช่น (รพีพรรณ และคณะ)

## การลำดับหน้า

- ลำดับหน้าโดยใช้หมายเลข 1, 2, 3..... ที่กึ่งกลางหน้ากระดาษ

## ตาราง รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ

- ตารางประกอบด้วย เลขที่ของตาราง (table number) ชื่อของตาราง (table title) หัวตาราง (table heading) และที่มาของตาราง (ถ้ามี) โดยให้ทำเป็นภาษาอังกฤษหรือภาษาไทยทั้งตาราง พิมพ์อยู่ในหน้าเดียวกันทั้งหมด

- กรณีตารางมีความยาวมาก ไม่สามารถสิ้นสุดในหน้าเดียวได้ ให้พิมพ์ส่วนที่เหลือในหน้าถัดไปโดยพิมพ์เลขที่ตารางและตามด้วยคำว่า (ต่อ)

- กรณีรูปภาพ แผนที่ แผนภูมิ กราฟ ควรเป็นภาพขาวดำ และใช้แนวทางข้างต้น

**การพิมพ์ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิต** ให้ใช้ตามประมวลนามศาสตร์สากล (International code of nomenclature) คือ ขีดเส้นใต้ หรือ พิมพ์ด้วยตัวเอน ชื่อวิทยาศาสตร์เป็นไปตามการตั้งชื่อระบบทวินาม (Binomial nomenclature) คือประกอบด้วยคำ 2 คำ คำแรกเป็นชื่อ Genus ขึ้นต้นด้วยอักษรตัวใหญ่ คำหลังเป็น specific epithet พิมพ์เว้นวรรคห่างจากคำแรก และขึ้นต้นด้วยอักษรตัวเล็ก ดังตัวอย่าง

จุลินทรีย์ เช่น Escherichia coli หรือพิมพ์ด้วยตัวเอน *Escherichia coli*

พืช เช่น Oryza sativa หรือพิมพ์ด้วยตัวเอน *Oryza sativa*

สัตว์ เช่น Bos taurus หรือพิมพ์ด้วยตัวเอน *Bos taurus*



## สารบัญ

### หน้า

|                                                                                                                                                           |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| การใช้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์พ่อแม่-ลูกในโค                                                                                                          | 11 |
| สนธิปจโนไทป์ในยีนโรคโลหิตจางของโคลูกผสมพื้นเมืองไทย x แองกัส                                                                                              | 23 |
| รูปแบบของโครโมโซมของโคลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามสายพันธุ์<br>ระหว่างโคป่าและโคชีบู กับความสมบูรณ์พันธุ์และการเจริญเติบโต                                  | 33 |
| คาร์โบไฮเดรตของพ่อกระทิงไทยของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว                                                                                                        | 48 |
| ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและการผสมติดในโคนมที่ได้รับฮอร์โมน<br>โกนาโดโทรปินรีลีสซิงในระยะลูเตียลหลังการผสมเทียม                                            | 57 |
| การศึกษาความสมบูรณ์ของอโครโซมของอสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็งแพะที่เจือจางด้วย<br>น้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris ที่มีปริมาณไข่แดงแตกต่างกันด้วยเครื่องฟรีซโตมิเตอร์ | 68 |
| การประเมินพันธุกรรมของค่าโซมาติกเซลล์ในน้ำนมของโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์                                                                                      | 76 |

## DNA Fingerprint for Parentage analysis in Cattle

Kalaya Kengvikkum, Wiboon Tularaksa

### Abstract

Blood samples of 57 Thai Holstein dairy crossbred cattle were extracted for genomic DNA by using AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit. Then the eleven PCR primers; TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA023, ETH3, ETH225 and BM1824 were used for examine 11 microsatellite loci. Each locus was compared between the suspect sire-dam-calf for parentage analysis. If they were similar for all 11 loci, there will probability be family. (The combined exclusion probability was 0.9998) Thirty six samples were the true families but fifteen samples were not.

**Keywords :** DNA fingerprint, parentage analysis, cattle.

### การใช้อยาลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อพิสูจน์พ่อ-แม่-ลูกในโค

กัลยา เก่งวิทย์กรรม, วิบูรณ์ ตุลาธิรักษา

### บทคัดย่อ

เจาะตัวอย่างเลือดของโคลูกผสมไทยโฮลสไตน์จำนวน 57 ตัวอย่าง นำไปสกัดดีเอ็นเอ และเพิ่มปริมาณด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ไพรเมอร์จำนวน 11 ชุด คือ TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA023, ETH3, ETH225 และ BM1824 สำหรับตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอนิคมโครแซทเทลไลต์จำนวน 11 ตำแหน่ง (Loci) เพื่อตรวจสอบความเป็นพ่อ-แม่-ลูก พบว่าจำนวนโค 36 ตัว มีความน่าจะเป็น (CEP = 0.9998.) เป็นพ่อ-แม่-ลูก 12 ครอบครัว เพราะมีขนาดของดีเอ็นเอคล้ายคลึงกันระหว่างพ่อ-แม่-ลูก ทั้ง 11 ตำแหน่ง และมี 7 ครอบครัว ที่ไม่เป็นครอบครัวเดียวกัน

**คำสำคัญ** ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ พิสูจน์พ่อ-แม่-ลูก โค

## บทนำ

ในปี ค.ศ. 1953 เจมส์ ดี วัตสัน และฟรานซิส คริก ค้นพบโมเลกุลของดีเอ็นเอ ที่มีโครงสร้างประกอบด้วย น้ำตาลไรโบส หมู่ฟอสเฟต และเบส 4 ชนิด คือ อะดีนีน (A-Adenine) ไทมีน (T-Thymine) ไซโตซีน (C-Cytosine) และกวานีน (G-Guanine) ดีเอ็นเอ คือ สารพันธุกรรมที่อยู่ในนิวเคลียสของทุกเซลล์ เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์ผิวหนัง ปลายรากขน เชื้ออสุจิ สามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกหลาน ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของร่างกายและลักษณะรูปร่าง ทำให้สิ่งมีชีวิตแต่ละหน่วยมีความแตกต่างกัน จำนวนดีเอ็นเอทั้งหมดบนเส้นโครโมโซมมีส่วนที่เป็นยีน (coding DNA) เพียง 5% ของดีเอ็นเอทั้งหมด และมีส่วนที่ไม่ใช่ยีน (non-coding DNA) มากถึง 95%

ในปี ค.ศ. 1985 ศาสตราจารย์ ดร.อเล็ก เจฟฟรีย์ พบว่าดีเอ็นเอในส่วนที่ไม่ใช่ยีน มีลักษณะเป็นลายพิมพ์เหมือนบาร์โค้ด เรียกว่าลายพิมพ์ดีเอ็นเอ หรือ DNA fingerprint หรือ DNA profile มีความแตกต่างกันหลากหลายมาก (Polymorphism) จนสามารถใช้จำแนกความแตกต่างได้เฉพาะตัว หรือใช้พิสูจน์ความเป็นพ่อ-แม่-ลูกได้ เพราะดีเอ็นเอหรือสารพันธุกรรมของลูกได้รับจากพ่อครั้งหนึ่งและจากแม่ครั้งหนึ่ง เมื่อนำมาดีเอ็นเอของพ่อ-แม่-ลูก มาเปรียบเทียบกันเฉพาะในส่วนที่ไม่ใช่ยีน จำนวนหลายตำแหน่ง (Loci) จะต้องพบความเหมือนกันของลายพิมพ์ดีเอ็นเอของลูก กับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของพ่อ-แม่ ในทุกตำแหน่งที่เปรียบเทียบกัน

ในบางส่วนที่ไม่ใช่ยีน หรือ Non-coding gene เป็นส่วนที่เบสเรียงตัวซ้ำๆ กัน เรียกว่าเบสซ้ำ อยู่ภายในจีโนม (Genome) หรือดีเอ็นเอทั้งหมด มีส่วนที่เป็นเบสซ้ำประมาณ 30% ของจีโนม ลำดับเบสซ้ำมีความแตกต่างกันทั้งขนาดและจำนวนซ้ำ โดยลักษณะการเรียงตัวซ้ำกันมีอยู่ 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ เบสซ้ำต่อเนื่อง (tandem repeats) คือการเรียงตัวซ้ำต่อเนื่องเป็นช่วงๆ ยาว กระจายอยู่ภายในเส้นดีเอ็นเอ และเบสซ้ำกระจาย (interspersed repeats) เป็นกลุ่มของเบสซ้ำที่มีลักษณะไม่ต่อเนื่องและพบกระจายอยู่บริเวณต่างๆ ในจีโนม แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มย่อยตามความยาวของเบสซ้ำได้แก่ ชนิดที่ 1 เบสซ้ำกระจายแบบสั้น (short interspersed elements หรือ SINES) มีขนาด 130-300 เบส พบในจีโนมในลักษณะเดี่ยวหลายพันชุด และชนิดที่ 2 เบสซ้ำที่กระจายแบบยาว (long interspersed elements หรือ LINES) มีขนาดตั้งแต่ 500 เบสขึ้นไป

การเรียงตัวของเบสซ้ำแบบต่อเนื่อง (Tandem repeats) เป็นช่วงยาว พบอยู่หลายแห่งทั่วไปภายในดีเอ็นเอทั้งหมด จึงถูกนำมาใช้ในการตรวจสอบความแตกต่างเฉพาะตัว และใช้พิสูจน์พ่อ-แม่-ลูก โดยการเปรียบเทียบความเหมือนของจำนวนซ้ำของเบสในตัวอย่างของดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการตรวจสอบกับตัวอย่างดีเอ็นเอของสิ่งมีชีวิตที่ทราบข้อมูลที่แน่นอน

จำนวนซ้ำของเบสแบบ Tandem repeats แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดตามจำนวนซ้ำและความยาวของหน่วยซ้ำ ชนิดที่ 1 คือ แซเทลไลท์ (Satellite) เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่มีการเรียงตัวของเบสซ้ำขนาด 1-6 เบส เรียงยาวต่อเนื่องถึงหลายร้อยเบส โดยมีจำนวนซ้ำถึง 103-107 ครั้ง แต่มีการซ้ำชนิดนี้เพียง 1 หรือ 2 ตำแหน่งต่อโครโมโซม และมักพบที่บริเวณเซนโทรเมียร์ ชนิดที่ 2 คือมินิแซเทลไลท์ (Minisatellite) เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำขนาด 9-100 เบส เรียงยาวต่อเนื่อง พบได้ประมาณ 10-1,000 ครั้ง การเรียงตัวซ้ำชนิดนี้มีจำนวนมาก และมีความหลากหลายสูง จึงมีอีกชื่อว่า วาเอ็นทีอาร์ (VNTR-Variable number of tandem repeats) ชนิดที่ 3 คือ ไมโครแซเทลไลท์ (Microsatellite) เป็นส่วนของดีเอ็นเอที่มีเบสซ้ำขนาด 1-6 เบส เรียงยาวไม่เกิน 100 ครั้ง เช่น มีเบส C ซ้ำ 10 จะมีลักษณะการซ้ำคือ CCCCCCCCCC ถ้าเป็นชนิดเบสซ้ำ เช่น (CA) 8 จะมีลักษณะการซ้ำคือ CA CA CA CA CA CA CA CA เบสซ้ำชนิดนี้มีเป็นจำนวนมากกระจายอยู่ในจีโนม ประมาณ 104-105 ตำแหน่ง และมีความหลากหลายสูง

จนนำมาพัฒนาใช้เป็นเครื่องมือตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ เรียกว่า ไมโครแซทเทลไลท์ มาร์คเกอร์ (Microsatellite marker - MM) (วิชัย และคณะ 2547)

ในการศึกษาพันธุ์ประวัติ (Pedigree) โค และการพิสูจน์พ่อ-แม่-ลูก นิยมใช้ MM (Visscher et al., 2002, Ibeagha-Awemu and Erhard, 2005) เพราะ Taut and Renz (1984) พบว่า MM มีความหลากหลายสูง (Large polymorphism information) และพบในหลายตำแหน่งกระจายทั่วในดีเอ็นเอ เหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นในการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

ในประเทศไทยประชากรโคนมส่วนมากเป็นลูกผสมระหว่างโคเนื้อพื้นเมืองกับโคนมพันธุ์แท้โฮลสไตน์ จากประเทศสหรัฐอเมริกา โดยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ หรือเดิมคือกองผสมเทียม ได้พัฒนาขึ้นเป็นพันธุ์โคนมไทยโฮลสไตน์ ในระหว่างการพัฒนาพันธุ์ ได้กำหนดโปรแกรมการผสมพันธุ์ระหว่างพ่อพันธุ์โคนมผ่านการคัดเลือกมาแล้วด้วยวิธีทางสถิติ ว่ามียืนที่ควบคุมลักษณะการให้น้ำนมสูง และมียืนที่ควบคุมให้มีรูปร่างถูกต้องสมสัดส่วนโคนมกับแม่โคลูกผสมพื้นเมือง - โฮลสไตน์ของเกษตรกร เพื่อให้ส่งผ่านยีนเหล่านี้ไปยังโคนมรุ่นลูกหลาน

ลูกโคนมที่เกิดจากการวางแผนผสมพันธุ์อย่างมีจุดมุ่งหมายเพื่อปรับปรุงพันธุกรรมให้ดียิ่งขึ้น สำหรับนำมาเลี้ยงเพื่อคัดเลือกไว้เป็นพ่อพันธุ์ขึ้นทะเบียนไว้ผลิตน้ำเชื้อ เนื่องจากลูกโคเกิดในฟาร์มเกษตรกร บางครั้งการจำแนกให้ถูกต้องแน่นอนว่าเป็นลูกที่เกิดจากน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคนมของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ โดยตัดสินจากข้อมูลพันธุ์ประวัติเท่านั้นไม่เพียงพอหรือการตรวจสอบว่าน้ำเชื้อที่ซื้อขายกันนั้นเป็นน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์โคที่มีชื่อเสียง และมีราคาแพงแน่นอน ผลิตในศูนย์ผลิตน้ำเชื้อของเอกชน ไม่ได้ปลอมแปลงโดยเอาน้ำเชื้อพ่อโคตัวอื่นมาขายแทน ทั้ง 2 กรณีจำเป็นต้องพิสูจน์ และตัดสินปัญหาด้วยการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

การตรวจพิสูจน์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยใช้ MM เป็นการตรวจเบสซ้ำแบบไมโครแซทเทลไลท์ และจำเป็นต้องตรวจเป็นจำนวนหลายตำแหน่ง (Loci) เพื่อเพิ่มความน่าจะเป็นไปได้ให้มากขึ้น (exclusion probability-E.P.) ในการศึกษาของ Cervini et al. (2006) พบว่าถ้าใช้ไพรเมอร์ จำนวนมากถึง 10 คู่ เพื่อตรวจตำแหน่งที่มีเบสซ้ำชนิดไมโครแซทเทลไลท์ในโคลูกผสมบราซิลเลียนเนลเลอร์ จำนวน 10 ตำแหน่ง มีความน่าจะเป็น (E.P.) ได้สูงถึง 0.9989

## วิธีดำเนินงานวิจัย

ขั้นตอนการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ที่สงสัยว่าเป็นพ่อ-แม่-ลูก จำนวน 12 ครอบครัว (พ่อโค 12 ตัวอย่าง แม่โค 12 ตัวอย่าง และลูกโค 12 ตัวอย่าง) ด้วยชุด AxyPrep Blood Genomic

### DNA Miniprep Kit

1. ขั้นตอนการทำให้เซลล์แตก โดยเติม AP1 บัฟเฟอร์ (cell lysis buffer) ปริมาณ 500  $\mu$ l ลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 ml.
2. เติมตัวอย่างเลือด ซึ่งมีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) ปริมาณ 200-250  $\mu$ l ปิดฝาหลอดปิดฝาหลอด นำไปปั่นด้วย vortex โดยใช้ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 10 วินาที
3. ขั้นตอนการแยกส่วนประกอบของเซลล์ที่เป็นโปรตีนออกจากดีเอ็นเอ โดยเติม AP2 บัฟเฟอร์ (Protein depleting buffer) ปริมาณ 100  $\mu$ l ปั่นด้วย vortex โดยใช้ความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 10 วินาที นำไปใส่ในเครื่องเซนติฟิวส์ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิปกติ สารละลายแยกเป็น 2 ชั้นคือตะกอนสีน้ำตาลที่เป็นส่วนประกอบชนิดโปรตีนของเซลล์และของเหลวใส ซึ่งมีจีโนมิกดีเอ็นเออยู่



4. หลังจากนั้นดูของเหลวที่ได้จากการปั่นใส่ลงในหลอดมินิเพบคอลัมน์ ที่สวมอยู่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 2 ml. นำไปใส่ในเครื่องเซนติฟิวส์ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวที่กรองได้หลังจากการปั่น จะได้ตะกอนดีเอ็นเอเหลืออยู่บนผิวเตอร์ของหลอดมินิเพบ

5. การชะล้างดีเอ็นเอโดยการเติม W1A บัฟเฟอร์ (wash buffer) ปริมาณ 700  $\mu$ l ลงในตะกอนดีเอ็นเออยู่บนแผ่นผิวเตอร์ของหลอดมินิเพบคอลัมน์ ที่สวมอยู่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 2 ml. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที หลังจากนั้นนำไปใส่ในเครื่องเซนติฟิวส์ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที

6. การชะล้างครั้งที่ 1 โดยเติม W2 บัฟเฟอร์ (Desalting buffer) ปริมาณ 800  $\mu$ l ลงในแผ่นกรองของหลอดมินิเพบคอลัมน์ ที่สวมอยู่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 2 ml. นำไปใส่ในเครื่องเซนติฟิวส์ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวไป

7. การชะล้างครั้งที่ 2 โดยเติม W2 บัฟเฟอร์ (Desalting buffer) ปริมาณ 500  $\mu$ l ลงบนแผ่นกรองในหลอดมินิเพบคอลัมน์ ที่สวมอยู่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 2 ml. นำไปใส่ในเครื่องเซนติฟิวส์ ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งของเหลวไป (การล้างเก็บดีเอ็นเอ 2 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าเกลือหรือสารต่างๆ ที่อาจมีปฏิกิริยาของเอนไซม์ต่างๆ ออกไปกับของเหลวจนหมด)

8. ขั้นตอนการเก็บดีเอ็นเอจากแผ่นกรอง โดยเติม TE บัฟเฟอร์ (TE buffer) ปริมาณ 80-200  $\mu$ l ลงในแผ่นกรองที่มีตะกอนดีเอ็นเอของหลอดมินิเพบคอลัมน์ ที่สวมอยู่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 1.5 ml. เพื่อให้สารละลาย TE บัฟเฟอร์ละลายตะกอนดีเอ็นเอที่ติดอยู่ที่แผ่นกรอง สารละลายบัฟเฟอร์จะละลายดีเอ็นเอจากแผ่นกรองลงมาอยู่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบ/นาที จะได้ดีเอ็นเอที่ละลายอยู่ในบัฟเฟอร์

### **ขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีพีซีอาร์** (Polymerase chain reaction –PCR protocol)

เติมดีเอ็นเอ ปริมาณ 20 ng / $\mu$ l ลงในสารละลาย PCR-reaction ปริมาณ 14  $\mu$ l ซึ่งประกอบด้วย 5.5  $\mu$ l ของพีซีอาร์ไพรเมอร์มิกซ์ (Stockmarks for cattle Bovine genotyping Kits) และ dNTP มิกซ์ ปริมาณ 4.0  $\mu$ l เติม PCR buffer 3.0  $\mu$ l และ ใส่ Taq polymerase ปริมาณ 0.5  $\mu$ l (Ampli Taq Gold™, PE Applied) เติมน้ำกลั่นชนิดดีไอออนไนซ์ ปริมาณ 1.0  $\mu$ l. เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องพีซีอาร์ด้วยการเริ่มแยกสายดีเอ็นเอ (Denaturation) ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 15 นาที ทำพีซีอาร์ 31 รอบโดยเริ่มขั้นแรกทำการแยกดีเอ็นเอที่อุณหภูมิ 95°C นาน 35 วินาที ขั้นที่สอง annealing ที่ 61°C นาน 45 วินาที ขั้นที่ 3 extension ที่ 72°C นาน 60 นาที ตรวจสอบคุณภาพผลผลิตพีซีอาร์ด้วย 2% ethidium bromide stained agarose gels.

ตารางที่ 1 ข้อมูลไพรเมอร์ฟิชอาร์ (StockMarks for Cattle®) เป็น Bovine genotyping kit ของบริษัท ABI

| Locus              | Size range (bp) | Primer sequence                                                         | Reference                         |
|--------------------|-----------------|-------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| TGLA227<br>(D18S1) | 64-115          | F:5'-CGAATTCCAAATCTGTAAATTTGCT-3'<br>R:5'-ACAGACAGAACTCAATGAAAGCA-3'    | Barendse et al., 1992             |
| BM2113<br>(D2S26)  | 116-146         | F:5'-GCTGCCTTCTACCAAATACCC-3'<br>CTTCCTGAGAGAAGCAACACC-3'               | Bishop et al., 1994               |
| TGLA53<br>(D16S3)  | 147-197         | F:5'-GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA-3'<br>R:5'-ATCTTCACATGATATTACAGCAGA-3'    | Barendse et al., 1992             |
| ETH10<br>(D5S3)    | 198-234         | F:5'-G TTCAGGACTGGCCCTGCTAACA -3'<br>R:5'-CCTCCAGCCCACTTTCTCTTCTC -3'   | Toldo et al., 1993                |
| TGLA126<br>(D20S1) | 104-133         | F:5'-CTAATTTAGAATGAGAGAGGCTTCT-3'<br>R:5'- TTGGTCTCTATTCTCTGAATATTCC-3' | Barendse et al., 1992             |
| TGLA122<br>(D21S6) | 130-193         | F:5'-CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC-3'<br>R:5'-AATCACATGGCAAATAAGTACATAC-3'      | Barendse et al., 1992             |
| INRA023<br>(D3S10) | 193-235         | F:5'-GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC-3'<br>R:5'-TAACTACAGGGTGTTAGATGAACTC-3'   | Vaiman, et al., 1992              |
| ETH3<br>(D19S2)    | 90-135          | F:5'-GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG-3'<br>R:5'-ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG-3'        | Toldo et al., 1993                |
| ETH225<br>(D9S1)   | 135-165         | F:5'-GATCACCTTGCCACTATTTCTCCT-3'<br>R:5'-ACATGACAGCCAGCTGCTACT-3'       | Steffen et al., 1993              |
| BM1824<br>(D1S34)  | 170-218         | F:5'-GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC-3'<br>R:5'-CATTCTCCAACCTGCTTCCTTG-3'         | Bishop et al., 1994               |
| SPS115<br>(D15)    | 230-250         | F:5'-AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG-3'<br>R:5'-AACGAGTGTCTAGTTTGGCTGTG-3'     | Moore, S.S. and Byrne, K. (1993). |

วิเคราะห์ปริมาณผลผลิตฟิชอาร์ด้วยเครื่อง Automated genetic analyzer รุ่น ABI 3130 และวิเคราะห์เปรียบเทียบพ่อ-แม่-ลูก ด้วยโปรแกรม Gene Map per version 3.7

### ผลและวิจารณ์

ตามมาตรฐานของ International Society of Animal Genetics. (ISAG) การใช้ไมโครแซเทลไลท์มาร์คเกอร์จำนวน 10 คู่ สามารถใช้ในการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างตัวโค และนำไปสู่การใช้ตรวจพิสูจน์พ่อ-แม่-ลูก จากการตรวจสอบโคจำนวน 19 ครอบครัว เพื่อความแน่นอนในการคัดเลือกพ่อพันธุ์ เพื่อพิสูจน์ความสามารถในการถ่ายทอดยีนที่ควบคุมลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจ ในแผนการพัฒนาพันธุ์โคนม หรือโคเนื้อ ถ้าข้อมูลพันธุ์ประวัติไม่แน่นอน การคัดเลือกเกิดความผิดพลาดได้ ทำให้ได้พ่อโคที่ไม่เหมาะสม จะใช้เป็นพ่อพันธุ์ Geldermann et al., (1986) ประเมินความผิดพลาดที่เกิดจากการพิสูจน์พันธุ์ประวัติด้วยการตรวจรูปแบบแถบสูงถึง 13% ในขณะที่ Rosa et al (1996) พบความผิดพลาดเพียง 5% จากการใส่ลายพิมพ์ดีเอ็นเอชนิดไมโครแซเทลไลท์ในฝูงโคของอิสราเอล แต่ Ron et al., (1996) พบความผิดพลาดสูงถึง 15% เมื่อใช้การตรวจแบบอาร์เอฟแอลพี (RFLP : Restriction fragment length polymorphism) ฝูงโคบราซิล ดังนั้น ไมโครแซเทลไลท์จึงเป็นที่นิยมใช้ในการพิสูจน์ประวัติพ่อ-แม่-ลูก

จากตารางที่ 2 เป็นรายละเอียดของการเปรียบเทียบของอัลลีลลูก (ตัวย่อ C) กับอัลลีลของพ่อ (ตัวย่อ S) และแม่ (ตัวย่อ D) ในแต่ละตำแหน่ง (Loci) โดยอัลลีลของลูกจะต้องมีส่วนที่เหมือนของพ่อและแม่ ทั้งสองอัลลีล แต่ถ้าลูกมีเพียงอัลลีลเดียว หมายความว่าอัลลีลนั้นเป็นอัลลีลที่เหมือนทั้งพ่อและแม่ เป็นไปตามกฎนี้ทั้ง 11 ตำแหน่ง และตารางที่ 3 เป็นรายละเอียดของการเปรียบเทียบอัลลีลของลูกโคที่เจ้าของให้ข้อมูลว่าเป็นลูกของพ่อโคทดสอบ จำเป็นต้องพิสูจน์ให้แน่ชัดในประวัติก่อนทำการเก็บข้อมูลน้ำนมเพื่อทดสอบพ่อพันธุ์ (Progeny Test) ใน 7 ครอบครัวพบว่าลูกโคมีอัลลีลเหมือนแม่โค แต่ไม่เหมือนพ่อโค ทำให้สามารถตัดสินใจไม่ใช้ลูกโคในแผนการพัฒนาพันธุ์ เป็นการลดค่าใช้จ่ายในการเก็บฐานข้อมูลน้ำนม ซึ่งกินเวลายาวนานถึง 10 เดือน

นอกจากนี้การตรวจอัลลีลทั้ง 11 ตำแหน่ง ด้วยไมโครแซเทลไลท์มาร์คเกอร์ 11 ชุด ยังสามารถใช้ประโยชน์ ในการตรวจน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ปลอมปนได้ โดยเปรียบเทียบอัลลีลของน้ำเชื้อกับตัวอย่างเลือด หรือเซลล์รากขนของพ่อพันธุ์ตัวที่ระบุว่าเป็นเจ้าของน้ำเชื้อ

### กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ 2 ท่าน คือ คุณเจนจิรา ตูลารักษา และ คุณบุหงา จินดาวานิชกุล ที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานในห้องปฏิบัติการให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

### เอกสารอ้างอิง

- วิชัย บุญแสง อัญชลี ทศนาขจร ชัยณรงค์ วงศ์ธีรทรัพย์ นุสรา สิทธิดิถีรัตน์ สกลพันธุ์ยิ้ม 2547. ภายหลังพิมพ์  
ดีเอ็นเอ จากสารพันธุกรรมสู่เทคโนโลยีพิสูจน์บุคคล ฉบับปรับปรุงใหม่ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์  
และเทคโนโลยีแห่งชาติ
- Barendse W., Armitage S.M. et al. (1994). A genetic linkage map of the bovine genome. *Nature Genetics* 6  
227-235.
- Bishop M.D. and Kappes S.M. et al. (1994). A genetic linkage map for cattle. *Genetics* 136 619-639. Cervini,  
M., Henrique-Silva, F., Mortari, N. and Matheucci, E. 2006. Genetic Variability of 10  
microsatellite markers in the characterization of Brazilian Nellore cattle (*Bos indicus*)
- Geldermann H., Pieper U and Weber WE. 1986. Effect of misidentification on the estimation of breeding  
value and heritability in cattle. *J Animal Sci* 63: 1759-1768.
- Georges, M. and Massey, J.M.. (1992). Polymorphic DNA markers in Bovidae. Patent WO 92/13102 (1992).
- Ibeagha-Awemu EM and Erhard G 2005. Genetic structure and differentiation of 12 African *Bos indicus* and  
*Bos Taurus* cattle breeds, inferred from protein and microsatellite polymorphisms. *J. Anim Breed Genet*  
122:12-20
- Moore, S.S. and Byrne, K.. (1993). Dinucleotide polymorphism at the bovine calmodulin independent  
Adenylcyclase locus. *Animal Genetics* 24 150.
- Steffen P., Eggen A. et al. (1993). Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. *Animal  
Genetics* 24 121-124.
- Ron M., Blanc Y., Band M., Ezra E and Weller JI. 1996. Misidentification rate in the Israeli Dairy cattle  
population and its implications for genetic improvement. *J Animal Sci* 79: 676-681.
- Rosa AJM. 1997. Characterization of the Nellore cattle test for paternity using Molecular markers.  
Master thesis. University of South Paulo.
- Taut D and Renz M. 1984. Simple sequences are ubiquitous components of eukaryotic genomes. *Nucleic  
Acids Res* 12:4127-4138.
- Solinas Toldo S., Fries R. et al. (1993). Physically mapped, cosmid-derived microsatellite markers as anchor  
loci on bovine chromosomes. *Mammalian Genome* 4 720-727.
- Vaiman D., Osta D. et al. (1992). Characterisation of five new bovine microsatellite repeats. *Animal Genetics*  
23 537.
- Visser, P.M, Woolliams J.A., Smith D and Williams J.L. 2002. Estimation of Pedigree errors in the UK  
dairy population using microsatellite markers and the impact on selection. *J Dairy Sci* 85:2368-2375



**ตัวอย่างที่ 1** แสดงค่าของขนาดดีเอ็นเอส่วนที่เป็นเบสคู่ต่อเนื่องแบบไมโครแซทเทิลไลท์ 11 ตำแหน่ง โดยใช้ไพรเมอร์ฟิชอาร์ 11 คู่ และพบว่า พ่อ-แม่-ลูก 7 ครอบครัว มีความเป็นไปตั้งแต่ 1 เป็นพ่อแม่ลูกที่แท้จริง

|    | TGLA227 |        | BM2113 |        | TGLA53 |        | ETH10  |        | SPS115 |        | TGLA126 |        | TGLA122 |        | INRA23 |        | ETH3   |        | ETH225 |        | BM1824 |        |
|----|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---------|--------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| S1 | 89.52   | 98.26  | 123.91 | 133.47 | 158.83 | 164.97 | 213.85 | 215.59 | 242.13 | 246.06 | 118.28  | 122.44 | 147.73  | 171.86 | 211.34 | -      | 113.56 | -      | 133.26 | 141.34 | 178.68 | 180.72 |
| D1 | 92.06   | 104.57 | 122.45 | 132.04 | 165.11 | -      | 219.98 | 211.96 | 246.37 | 250.20 | 116.05  | 124.41 | 161.22  | 163.29 | 208.65 | 212.45 | 99.43  | 124.30 | 142.79 | 149.21 | 180.47 | 188.52 |
| C1 | 89.87   | 104.69 | 122.46 | 124.43 | 159.00 | 165.11 | 216.13 | 219.96 | 242.52 | 250.29 | 116.17  | 118.22 | 148.03  | 163.41 | 212.56 | -      | 113.91 | 124.31 | 134.31 | 149.21 | 178.43 | 188.64 |

|    |       |       |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |   |        |        |        |        |        |        |
|----|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| S2 | 89.52 | 98.26 | 123.91 | 133.47 | 158.83 | 164.97 | 213.85 | 215.59 | 242.13 | 246.06 | 118.28 | 122.44 | 147.73 | 171.86 | 211.34 | - | 113.56 | -      | 133.26 | 141.34 | 178.68 | 180.72 |
| D2 | 81.13 | 87.71 | 122.35 | 134.07 | 178.88 | 180.94 | 206.71 | 218.16 | 242.50 | 248.37 | 116.17 | 118.22 | 140.70 | 171.59 | 212.60 | - | 113.91 | 126.52 | 142.52 | 154.97 | 180.46 | 188.68 |
| C2 | 81.12 | 98.40 | 124.39 | 134.06 | 159.00 | 180.89 | 214.19 | 218.02 | 242.47 | 248.30 | 118.16 | -      | 171.69 | -      | 212.46 | - | 113.96 | 126.49 | 134.42 | 142.52 | 178.35 | 188.60 |

|    |       |       |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |   |        |        |        |        |
|----|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|---|--------|--------|--------|--------|
| S3 | 89.52 | 98.26 | 123.91 | 133.47 | 158.83 | 164.97 | 213.85 | 215.59 | 242.13 | 246.06 | 118.28 | 122.44 | 147.73 | 171.86 | 211.34 | -      | 113.56 | - | 133.26 | 141.34 | 178.68 | 180.72 |
| D3 | 81.06 | 98.42 | 122.41 | 136.00 | 156.73 | 159.00 | 216.17 | 240.51 | 242.50 | 254.08 | 118.18 | 122.44 | 140.80 | 147.92 | 205.68 | 211.52 | 114.00 | - | 144.67 | 149.09 | 180.43 | 182.47 |
| C3 | 89.96 | 98.42 | 134.00 | 136.02 | 156.73 | 159.00 | 216.15 | 242.35 | 242.47 | 254.01 | 118.18 | -      | 140.80 | 147.92 | 211.63 | -      | 114.14 | - | 142.48 | 149.09 | 178.34 | 182.53 |

|    |       |       |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|----|-------|-------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| S4 | 89.61 | 91.74 | 129.55 | 131.51 | 156.65 | 158.93 | 210.03 | 215.69 | 247.9  | 249.97 | 116.14 | 122.36 | 140.43 | 142.59 | 199.89 | -      | 113.54 | 123.96 | 143.56 | -      | 178.72 | 188.85 |
| D4 | 76.69 | 98.41 | 124.41 | 134.07 | 156.86 | 165.23 | 216.14 | -      | 242.55 | 250.33 | 118.21 | 120.26 | 150.13 | 171.78 | 96.42  | 211.59 | 118.21 | 124.41 | 142.65 | -      | 180.47 | 182.52 |
| C4 | 92.71 | 98.52 | 124.57 | 132.19 | 156.86 | 165.11 | 210.46 | 216.46 | 242.46 | 248.31 | 120.31 | 122.38 | 143.12 | 171.78 | 196.42 | 200.12 | 118.25 | 124.46 | 142.68 | 144.68 | 178.43 | 180.48 |

**ตัวอย่างที่ 1 (ต่อ)** แสดงค่าของขนาดดีเอ็นเอส่วนที่เป็นเบสคู่ต่อเนื่องแบบไมโครแซทเทลไลต์ 11 ตำแหน่ง โดยใช้พรอมเมอร์ที่ชื่อว่า  
พ่อ-แม่-ลูก 7 ครอบครัว มีความเป็นไปได้ที่เป็นพ่อแม่ลูกที่แท้จริง

|    | TGLA227     | BM2113        | TGLA53        | ETH10         | SPS115        | TGLA126       | TGLA122       | INRA23        | ETH3          | ETH225        | BM1824        |
|----|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| S5 | 89.61 91.74 | 129.55 131.51 | 156.65 158.93 | 210.03 215.69 | 247.9 249.97  | 116.14 122.36 | 140.43 142.59 | 199.89 -      | 113.54 123.96 | 143.56 -      | 178.72 188.85 |
| D5 | 76.69 98.41 | 124.41 134.07 | 156.86 165.23 | 216.14 -      | 242.55 250.33 | 118.21 120.26 | 150.13 171.78 | 196.42 211.59 | 118.21 124.41 | 142.65 -      | 180.47 182.52 |
| C5 | 91.74 98.41 | 124.57 132.19 | 156.65 165.21 | 210.46 216.23 | 242.46 248.31 | 120.31 122.38 | 143.12 171.78 | 196.42 199.89 | 118.25 124.46 | 142.61 144.68 | 178.43 180.48 |

|    |             |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |
|----|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| S6 | 89.61 91.74 | 129.55 131.51 | 156.65 158.93 | 210.03 215.69 | 247.9 249.97  | 116.14 122.36 | 140.43 142.59 | 199.89 -      | 113.54 123.96 | 144.68 -      | 178.72 188.85 |
| D6 | 83.23 92.28 | 132.05 134.08 | 150.64 159.00 | 216.08 219.92 | 242.43 -      | 116.14 118.19 | 140.92 -      | 204.76 208.68 | 99.43 113.54  | 144.68 149.09 | 178.35 188.85 |
| C6 | 92.06 94.12 | 130.07 134.09 | 150.51 159.40 | 210.36 216.14 | 242.40 250.16 | 118.25 122.38 | 140.92 -      | 200.00 203.77 | 113.54 -      | 144.68 149.09 | 188.85 -      |

|    |             |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |
|----|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| S7 | 89.61 91.74 | 129.55 131.51 | 156.65 158.93 | 210.03 215.69 | 247.9 279.97  | 116.14 122.36 | 140.43 142.59 | 199.89 -      | 113.54 123.96 | 144.68 -      | 178.72 188.85 |
| D7 | 81.12 92.28 | 128.07 -      | 150.76 -      | 216.15 -      | 242.41 -      | 116.14 120.39 | 140.80 147.92 | 194.46 205.75 | 111.81 124.27 | 134.25 154.91 | 180.47 182.49 |
| C7 | 81.12 90.04 | 128.10 132.05 | 150.63 159.01 | 210.35 216.05 | 242.34 248.25 | 116.18 120.34 | 140.78 142.95 | 194.48 200.00 | 111.85 124.43 | 144.61 154.90 | 180.42 188.58 |

|    |             |               |               |               |               |               |               |               |               |               |               |
|----|-------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| S8 | 87.27 89.60 | 121.91 131.44 | 158.80 173.05 | 213.82 215.70 | 242.14 247.94 | 116.24 122.44 | 140.30 -      | 199.90 203.60 | 113.54 121.54 | 133.29 141.25 | 178.65 180.72 |
| D8 | 83.28 96.36 | 124.43 132.05 | 156.99 163.05 | 216.13 218.10 | 242.39 250.17 | 116.17 118.22 | 138.40 171.66 | 204.74 -      | 113.91 122.35 | 142.65 -      | 178.43 -      |
| C8 | 87.76 96.25 | 132.04 -      | 156.99 159.00 | 216.27 -      | 242.56 248.31 | 116.05 118.21 | 138.40 140.83 | 204.86 -      | 122.22 -      | 134.31 142.52 | 180.47 180.47 |

**ตัวอย่างที่ 1 (ต่อ) แสดงค่าของขนาดดีเอ็นเอส่วนที่เป็นเบสซ้ำต่อเนื่องแบบไมโครแซทเทิลไลท์ 11 ตำแหน่ง โดยใช้โปรแกรมพีซีอาร์ 11 คู่ และพบว่า พ่อ-แม่-ลูก 7 ครอบครัว มีความเป็นไปได้ที่เป็นพ่อแม่ลูกที่แท้จริง**

|     | TGLA227 | BM2113 | TGLA53 | ETH10  | SPS115 | TGLA126 | TGLA122 | INRA23 | ETH3   | ETH225 | BM1824 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|-----|---------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| S9  | 87.27   | 89.60  | 121.91 | 131.44 | 158.80 | 173.05  | 213.82  | 215.70 | 242.14 | 247.94 | 116.24 | 122.44 | 140.30 | -      | 199.90 | 203.60 | 113.54 | 121.54 | 133.29 | 141.25 | 178.65 | 180.72 |
|     | 83.43   | 90.06  | 125.55 | 136.11 | 156.81 | 158.98  | 206.63  | 210.45 | 242.42 | -      | 116.22 | 124.41 | 140.93 | 163.32 | 196.39 | 211.57 | 114.06 | 116.11 | 155.02 | -      | 182.50 | -      |
| C9  | 87.70   | 89.97  | 122.49 | 132.13 | 156.74 | 172.96  | 206.62  | 214.28 | 242.49 | -      | 116.16 | 124.35 | 141.09 | -      | 201.10 | 212.54 | 113.89 | 116.05 | 134.41 | 154.97 | 180.38 | 182.45 |
|     |         |        |        |        |        |         |         |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| S10 | 87.27   | 89.60  | 121.91 | 131.44 | 158.80 | 173.05  | 213.82  | 215.70 | 242.14 | 249.94 | 116.24 | 122.44 | 140.30 | -      | 199.90 | 203.60 | 113.54 | 121.54 | 133.29 | 141.25 | 178.65 | 180.72 |
| D10 | 87.76   | 98.43  | 132.04 | 134.03 | 156.77 | 158.89  | 216.07  | -      | 242.39 | 248.18 | 116.13 | 118.27 | 140.78 | 149.87 | 200.96 | 212.42 | 114.01 | -      | 134.38 | 148.82 | 182.49 | 188.54 |
| C10 | 87.77   | -      | 122.46 | 132.03 | 156.90 | 173.08  | 214.24  | 216.07 | 242.39 | 248.30 | 116.15 | 122.35 | 140.80 | 150.00 | 200.96 | 204.68 | 113.92 | -      | 134.49 | -      | 180.47 | 182.49 |
|     |         |        |        |        |        |         |         |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| S11 | 98.84   | 92.10  | 122.41 | 133.85 | 154.79 | 158.89  | 216.08  | -      | 242.36 | -      | 116.05 | 118.08 | 147.77 | 163.15 | 200.00 | 207.64 | 122.06 | 124.25 | 134.33 | 146.85 | 178.71 | 188.53 |
| D11 | 76.56   | 87.63  | 124.28 | 133.87 | 154.66 | 164.95  | 210.39  | 216.12 | 242.40 | 246.30 | 120.15 | 122.33 | 140.68 | -      | 200.12 | 212.46 | 113.83 | 122.21 | 136.24 | 142.36 | 180.33 | 182.49 |
| C11 | 89.85   | 89.85  | 122.38 | 124.33 | 159.00 | 165.08  | 210.29  | 216.03 | 242.26 | -      | 118.18 | 120.22 | 140.67 | 163.27 | 200.00 | -      | 122.27 | 124.33 | 134.12 | 136.14 | 178.41 | 180.44 |
|     |         |        |        |        |        |         |         |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| S12 | 92.01   | 104.4  | 131.86 | 140.68 | 154.66 | 164.95  | 210.16  | 216.02 | 242.33 | 250.03 | 118.11 | -      | 140.68 | -      | 207.61 | 211.50 | 113.83 | 126.36 | 134.22 | 144.55 | 178.17 | 182.36 |
| D12 | 90.39   | 94.75  | 134.94 | -      | 156.78 | 158.89  | 216.02  | 217.98 | 242.33 | 250.29 | 118.52 | 124.70 | 140.80 | 149.87 | 200.12 | 207.73 | 133.21 | 114.31 | 144.55 | 154.91 | 178.29 | 180.33 |
| C12 | 94.24   | 104.69 | 132.13 | 138.05 | 158.87 | 165.09  | 216.05  | 218.01 | 242.41 | 250.13 | 118.28 | 124.57 | 140.78 | 149.87 | 200.00 | 211.52 | 114.00 | 126.53 | 134.60 | 154.83 | 180.38 | 182.53 |

**ตัวอย่างที่ 2 (ต่อ)** แสดงค่าของขนาดดีเอ็นเอส่วนที่เป็นเบสซ้ำต่อเนื่องแบบไมโครเซทไมโครไลต์ 11 ตำแหน่ง โดยใช้ไพรเมอร์ซีอาร์ 11 คู่ และพบว่า พ่อ-แม่-ลูก 7 ครอบครัว มีความเป็นปกติที่ไม่พอม่งลูกที่แท้จริง

|     | TGLA227 | BM2113 | TGLA53 | ETH10  | SPS115 | TGLA126 | TGLA122 | INRA23 | ETH3   | ETH225 | BM1824 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|-----|---------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| S13 | 80.50   | 87.16  | 121.76 | -      | 156.64 | 180.76  | 206.14  | 215.64 | 245.96 | 247.91 | 116.91 | 122.51 | 140.54 | 149.64 | 203.72 | 211.32 | 111.41 | 113.58 | 133.17 | 154.48 | 178.86 | 180.73 |
|     | D13     | 76.45  | 92.01  | 122.37 | 134.01 | 150.51  | -       | 210.26 | 215.90 | -      | 116.12 | -      | 145.50 | 163.27 | 200.96 | 212.33 | 122.26 | 126.52 | 134.36 | 144.60 | 182.48 | 188.54 |
|     |         | C13    | 87.64  | 92.02  | 122.30 | -       | 150.51  | -      | 206.50 | 210.25 | -      | 116.18 | -      | 140.78 | 145.51 | 211.46 | -      | 111.82 | 126.44 | 144.61 | 154.78 | 178.25 |
|     |         |        |        |        |        |         |         |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| S14 | 80.50   | 87.16  | 121.76 | -      | 156.64 | 180.76  | 206.14  | 215.64 | 245.96 | 247.91 | 116.91 | 122.51 | 140.54 | 149.64 | 203.72 | 211.32 | 111.41 | 113.58 | 133.17 | 154.48 | 178.86 | 180.73 |
| D14 | 81.12   | 83.28  | 130.17 | 132.18 | 163.05 | -       | 206.56  | 216.13 | 242.39 | -      | 116.16 | 118.32 | 140.93 | 181.92 | 204.86 | 212.56 | 114.00 | 122.35 | 144.68 | 146.88 | 188.52 | -      |
| C14 | 83.35   | 98.41  | 132.19 | 134.09 | 154.77 | 163.18  | 216.12  | -      | 242.49 | -      | 118.25 | -      | 182.09 | -      | 204.86 | -      | 113.94 | -      | 144.67 | -      | 188.69 | -      |
|     |         |        |        |        |        |         |         |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| S15 | 87.27   | 89.60  | 121.91 | 131.44 | 158.80 | 173.05  | 213.82  | 215.70 | 242.14 | 247.94 | 116.24 | 122.44 | 140.30 | -      | 199.90 | 203.60 | 113.54 | 121.54 | 133.29 | 141.25 | 178.65 | 180.72 |
| D15 | 81.09   | 92.17  | 124.41 | 132.04 | 159.00 | 165.12  | -       | -      | 242.45 | 254.07 | 116.05 | 124.30 | 140.83 | 147.77 | 201.09 | 206.70 | 113.90 | 126.51 | 144.75 | 146.85 | 178.47 | 180.53 |
| C15 | 92.15   | 98.41  | 124.43 | 135.99 | 159.00 | 163.05  | 216.30  | 222.13 | 242.61 | -      | 116.06 | 124.31 | 147.77 | -      | 201.10 | 205.00 | 113.91 | 126.41 | 144.75 | -      | 180.53 | 188.60 |
|     |         |        |        |        |        |         |         |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
| S16 | 87.27   | 89.60  | 121.91 | 131.44 | 158.80 | 173.05  | 213.82  | 215.70 | 242.14 | 247.94 | 116.24 | 122.44 | 140.30 | -      | 199.90 | 203.60 | 113.54 | 121.54 | 133.29 | 141.25 | 178.65 | 180.72 |
| D16 | 76.57   | 81.05  | 122.50 | 136.04 | 156.77 | 180.89  | 214.09  | 221.77 | 246.20 | 248.09 | 118.32 | 124.56 | 140.91 | 145.63 | 196.24 | 211.55 | 111.86 | 126.50 | 142.82 | 154.90 | 178.40 | 180.42 |
| C16 | 76.56   | 87.70  | 122.33 | -      | 156.78 | -       | 206.06  | 214.22 | -      | -      | 116.03 | 124.39 | 145.59 | 150.00 | 197.29 | 211.55 | 111.92 | -      | 155.03 | -      | 180.47 | -      |



**ตัวอย่างที่ 2 (ต่อ) แสดงค่าของขนาดดีเอ็นเอส่วนที่เป็นเบสซ้ำต่อเนื่องแบบไมโครแซทเทิลไลท์ 11 ตำแหน่ง โดยใช้โปรแกรมพีซีอาร์ 11 คู่ และพบว่า พ่อ-แม่-ลูก 7 ครอบครัว มีความเป็นไปดีที่ไม่ใช่พ่อแม่ลูกที่แท้จริง**

|     | TGLA227 | BM2113 | TGLA53 | ETH10  | SPS115 | TGLA126 | TGLA122 | INRA23 | ETH3   | ETH225 | BM1824 |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |        |
|-----|---------|--------|--------|--------|--------|---------|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| S17 | 89.52   | 98.26  | 123.91 | 133.47 | 158.83 | 164.97  | 213.85  | 215.59 | 242.13 | 246.06 | 118.28 | 122.44 | 147.73 | 171.86 | 211.34 | -      | 113.56 | -      | 133.26 | 141.34 | 178.68 | 180.72 |
| D17 | 100.53  | 104.73 | 136.27 | 137.93 | 156.90 | 172.96  | 210.33  | 216.03 | 242.41 | -      | 118.17 | 120.31 | 136.50 | 171.64 | 200.00 | 211.54 | 113.81 | -      | 142.74 | 146.75 | 180.35 | -      |
| C17 | 92.13   | 100.54 | 124.48 | 136.03 | 156.77 | 158.89  | 210.40  | 216.13 | 242.53 | 246.13 | 118.32 | 120.36 | 147.69 | 171.55 | 211.16 | -      | 113.94 | 124.48 | 138.40 | 142.82 | 178.25 | 180.40 |
| S18 | 89.52   | 98.26  | 123.91 | 133.47 | 158.83 | 164.97  | 213.85  | 215.59 | 242.13 | 246.06 | 118.28 | 122.44 | 147.73 | 171.86 | 211.34 | -      | 113.56 | -      | 133.26 | 141.34 | 178.68 | 180.72 |
| D18 | 98.40   | -      | 122.53 | 134.19 | 158.98 | 165.11  | 206.72  | 216.22 | 242.61 | 246.44 | 118.27 | 124.51 | 136.47 | 140.93 | 200.24 | 211.64 | 114.04 | 124.51 | 142.86 | 146.87 | 180.51 | 182.56 |
| C18 | 83.39   | 98.52  | 118.28 | 134.06 | 159.25 | -       | 216.17  | -      | 242.50 | 248.24 | 118.16 | -      | 141.22 | 142.66 | 198.32 | 200.12 | 111.92 | 124.39 | 142.39 | 146.98 | 180.52 | 188.60 |
| S19 | 98.43   | -      | 131.89 | -      | 156.78 | 163.01  | 215.99  | 221.87 | 242.25 | 246.02 | 118.22 | -      | 163.26 | -      | 203.85 | 211.48 | 113.86 | 124.36 | 142.61 | -      | 182.43 | 190.52 |
| D19 | 76.46   | 83.20  | 124.34 | -      | 156.85 | -       | 206.39  | 214.04 | 248.08 | 249.98 | 116.13 | -      | 140.78 | 145.50 | 212.33 | -      | 111.87 | 113.89 | 142.69 | 154.83 | 180.63 | -      |
| C19 | 76.45   | 98.31  | 122.26 | 124.21 | 156.66 | 163.01  | 214.11  | 215.93 | 246.16 | 250.07 | 116.03 | 118.17 | 145.01 | 163.25 | 211.44 | -      | 113.79 | 124.32 | 142.48 | 154.91 | 180.35 | 182.49 |

## **Genotyping of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) in the Thyroglobulin (TG) Gene of Angus x Thai Native Crossbred Cattle**

Nachai Sarataphan\* Kalaya Kengvikkum

### **Abstract**

The objective of this study was to identify the single nucleotide polymorphism (SNP) in the thyroglobulin (TG) gene of Angus x Thai native crossbred cattle. The SNP reported in TG gene which encodes the glycoprotein precursor to the thyroid hormones lies in 5' untranslated region (5'UTR) of the TG 5 gene, and has been associated with differences in marbling score in beef cattle. Genomic DNA samples from 73 Angus x Thai native crossbred cattle were amplified the TG 5 gene prior to make directly nucleotide sequence of the PCR products. The result indicated that two point mutations in the TG 5 gene at position 422 and 552 of the TG 5 gene (GenBank accession number X05380) was a C/T polymorphism. Three genotypes of the TG 5 gene were classified according to homozygous CC or TT and heterozygous CT of the nucleotide C or T at the two SNP markers. The genotypic frequencies of the SNP1 marker were 58.9, 39.7 and 1.4 % with genotypes CC, CT and TT respectively, whereas the genotypic frequencies of the SNP2 marker were 0, 68.5 and 31.5 %. The SNP1 marker of TG 5 gene had been evaluated for association with marbling, one of carcass composition traits in various beef cattle. A higher percentage of those with more favourable genotype for marbling, known as the 'TT' genotype, achieve a higher marbling grade. Thus, we analyzed TG 5 marker of 41 heifers obtained from Thai native cows which were artificially inseminated with 3 Angus semen. High frequency (63.6 – 80.0%) of the genotype CT in 26 heifers obtained from 2 sires with the genotype CT, as well as low frequency (6.7%) of the genotype TT in one of 15 heifers obtained from the sire with the genotype CT. Moreover, low frequency (6.7%) of 15 heifers with the genotype CT obtained from one sire with the genotype CC. The result indicated that the TG 5 marker would be a candidate molecular marker for assisting selection of Angus sire to enhance possibility of marbling in Angus x Thai native crossbred cattle. Further study on evaluation of the association of this marker with marbling score need to be taken in Angus x Thai native crossbred cattle. The TG 5 marker will be one of several SNP markers for marbling and be used for marker-assisted selection (MAS) in the crossbred beef breeding program.

**Keywords :** Angus x Thai native, crossbred cattle, genotype, SNP, thyroglobulin

\* Corresponding author:

Nachai Sarataphan

Livestock Biotechnology Research and Development Section,

Bureau of Biotechnology in Livestock Production,

Tiwanon road, Bang Kadee, Muang, Pathumthai 12000

Tel. 0-2967-9700 ext. 3211, 08-1170-2107 Fax. 0-2967-9719 E-mail: nsarataphan@gmail.com

## สไนป์โนไทป์ในยีนไรโรกลอบิวลินของโคลูกผสมพื้นเมืองไทย x แองกัส

ณชัย สราชนันท์\* กัลยา เก่งวิทยกรรม

### บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้เพื่อจำแนกจีโนไทป์ของนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนแปลง (SNP) ของยีนไรโรกลอบิวลิน (TG) ในโคลูกผสมพื้นเมืองไทย x แองกัส SNP ในยีนไรโรกลอบิวลินเกิดขึ้นที่บริเวณ 5' ไพรม์ของยีนนี้ ซึ่งเป็นยีนที่ควบคุมการสร้างไกลโคโปรตีนสำหรับสร้างไครอยซอร์โมน มีความสัมพันธ์กับคะแนนไขมันแทรกเนื้อในโคเนื้อ คณะผู้วิจัยได้นำตัวอย่างดีเอ็นเอของโคลูกผสมพื้นเมืองไทย x แองกัสจำนวน 73 ตัวมาขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอของยีนส่วนนี้ด้วย ปฏิกริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสก่อนนำไปหาการเรียงลำดับนิวคลีโอไทด์ ผลจากการวิเคราะห์พบว่าการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์อยู่ 2 ตำแหน่งซึ่งตรงกับตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 422 และ 552 ของยีนนี้ (GenBank accession number X05380) เป็นไซโตซีน / ไรอะมีน (C/T) ที่สองตำแหน่งนี้ การจำแนกจีโนไทป์ของยีน TG 5 เป็น 3 จีโนไทป์คือ CC, CT และ TT ที่ 2 ตำแหน่ง (SNP markers) ผลจากการวิเคราะห์ตัวอย่างทั้ง 73 ตัวอย่างพบว่า ความถี่ของจีโนไทป์ CC, CT และ TT ที่ SNP1 เท่ากับ 58.9, 39.7 และ 1.4 เปอร์เซ็นต์ ที่ SNP2 เท่ากับ 0, 68.5 และ 31.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีรายงานการประเมินผลการใช้ SNP1 marker ของยีน TG 5 ว่าสัมพันธ์กับไขมันแทรกเนื้อในโคเนื้อสายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งรูปแบบ (allele) ยีน TG 5 “T” สัมพันธ์กับคะแนนไขมันแทรกเนื้อในโคเนื้อพันธุ์แองกัส ดังนั้นคณะผู้วิจัยได้วิเคราะห์ตัวอย่างโคลูกผสมพื้นเมือง x แองกัส เพศเมียจำนวน 41 ตัว ที่เกิดจากการนำน้ำเชื้อโคพ่อพันธุ์แองกัส 3 ตัวผสมกับแม่โคพื้นเมือง ปรากฏว่าลูกโคจำนวน 26 ตัวที่เกิดจากพ่อที่มีจีโนไทป์ CT ทั้ง 2 ตัว มีความถี่ของจีโนไทป์ CT สูง (63.6 – 80.0 %) และมีความถี่ของจีโนไทป์ TT ต่ำ (6.7%) ของลูกโคหนึ่งตัวใน 15 ตัวที่เกิดจากพ่อโคที่มีจีโนไทป์ CT นอกจากนี้ลูกโคจำนวน 15 ตัวที่เกิดจากพ่ออีกหนึ่งตัวที่มีจีโนไทป์ CC มีความถี่ของจีโนไทป์ CT ต่ำ (6.7 %) จากผลการวิเคราะห์ครั้งนี้บ่งชี้ได้ว่า เครื่องหมายยีน TG 5 จะเป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมหนึ่งที่จะช่วยในการคัดเลือกโคพ่อพันธุ์แองกัสเพื่อเพิ่มความเป็นไปได้ของการเพิ่มไขมันแทรกเนื้อของโคลูกผสมพื้นเมืองไทย x แองกัส

การประเมินผลความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายยีนนี้กับคะแนนไขมันแทรกเนื้อในโคลูกผสมพื้นเมืองไทย x แองกัส จำเป็นต้องทำการศึกษาต่อไป เพื่อยืนยันว่าเครื่องหมายยีน TG 5 จะเป็นหนึ่งในหลายๆ เครื่องหมาย SNP ของยีนอื่นๆ ที่สัมพันธ์กับไขมันแทรกเนื้อ และนำไปใช้เป็นเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่ช่วยในโปรแกรมการคัดเลือกผสมพันธุ์ในโคเนื้อลูกผสมต่อไป

**คำสำคัญ :** แองกัส โคลูกผสม โคพื้นเมืองไทย จีโนไทป์ สไนป์ ไรโรกลอบิวลิน

\* กลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

## Introduction

In mammals, an adequate supply of thyroid hormones is not only essential for normal growth and neurological development but also play an important role in regulating metabolism and can affect homeostasis of fat depots. The biosynthesis of thyroid hormones involves an iodinated precursor protein, thyroglobulin, which may be considered an extreme example of a pro-hormone. Thyroglobulin is a dimeric glycoprotein of relative molecular mass (Mr) 660,000 (660K), which is secreted by the thyrocyte and stored in the lumen of the thyroid follicle. The hormonogenic reaction is extracellular, and involves iodination of tyrosyl residues of thyroglobulin and the intramolecular coupling of a subset of these into thyroxine (T<sub>4</sub>) and triiodothyronine (T<sub>3</sub>), which remain part of the polypeptide chain.

The complete primary structure of bovine thyroglobulin, derived from the sequence of its 8,431-base-pair complementary DNA. The 2,769-amino-acid sequence is characterized by a pattern of imperfect repeats derived from three cysteine-rich motifs. Four hormonogenic tyrosines have been precisely localized near the amino and carboxyl ends of the protein (Mercken et al., 1985). The bovine thyroglobulin (TG) gene had been investigated by a combination of Southern genomic blotting and direct analysis of cloned gene fragments isolated from a chromosomal DNA library. The entire locus is spread over more than 200,000 base pairs which makes it one of the largest eukaryotic genes studied to date. The coding information is scattered into at least 42 exons, 34 of which have been precisely identified. The bovine TG gene and of its 5' flanking region or 5' untranslated region (5' UTR) showed a significant homology exists between bovine and human thyroglobulin sequences, except for the presence within the ruminant promoter region of a 220-base-pair sequence belonging to the bovine monomer repeated family (de Martynoff et al., 1987). The TG 5' flanking region is a consensus sequence for the RNA polymerase III binding site. Thus, variation in this segment had been proposed to account for some of the genetic variation in producing the precursor for thyroid hormones. The variation in the 5'-flanking segment of the TG gene (TG 5) is single nucleotide polymorphism (SNP). The SNPs located at the position 422 and 552 of the TG 5 gene (GenBank accession number X05380) were investigated and had been associated with marbling. Three types of alleles were classified according to single nucleotide mutation (C/T) at these positions (Barendse, 1997). The TG 5 gene test for a marbling quantitative trait loci had been evaluated in long-fed (>250 days on feed) and short-fed (<250 days on feed) in beef cattle. Cattle having allele '3' or TT genotype which the SNPs located at the position 422 and 552 is T and T, are prone to have higher marbling scores than cattle with the allele '2' or CT genotype (Barendse, 1997; Barendse et al., 2004).

The objective of this study was to identify SNPs in 5' UTR of the TG 5 gene of Angus x Thai native crossbred cattle.



## Materials and methods

### Animals

Seventy-three of Angus x Thai native crossbred cattle including 23 steers and 50 heifers obtained from Thai native cows artificially inseminated to 3 Angus sires with frozen semen under the Thai-Black, high quality beef production project. The project was implemented by Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Department of Livestock Development since 2006.

### DNA samples

A 10 ml sample of blood were collected from the jugular vein and transferred into EDTA tubes, then submitted to the laboratory within 24 hr. Two hundred ml of the blood samples were extracted DNA by using FlexiGene DNA Kit (QAIGEN, USA) according to the manufacturer's protocol. The DNA samples were kept at  $-30^{\circ}\text{C}$  until used.

### Amplification of TG 5 gene

The DNA fragment of TG 5 gene was amplified, using the primers TG5U2: 5'- ggg gat gac tac gag tat gac tg-3' and TG5D1: 5'-gtg aaa atc ttg tgg agg ctg ta-3' designed according to the TG5 gene of GenBank accession number X05380 (Barendse et al., 2004) as shown in Fig 1. In 50  $\mu\text{l}$  of polymerase chain reaction mixture containing 200  $\mu\text{M}$  of each dNTPs, 1.5 mM of  $\text{Mg}^{2+}$ , 10  $\mu\text{M}$  of each primers, 0.25 U of Taq DNA polymerase (Platinum Taq DNA polymerase, Invitrogen, USA). Two  $\mu\text{l}$  of DNA templates from each sample were used to amplified TG 5 gene using thermal cycler ( GeneAmp® PCR System 9700, AB, USA) with denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 5 min, followed by 30 cycles of denaturation at  $95^{\circ}\text{C}$  for 1 min, an annealing temperature of  $58^{\circ}\text{C}$  for 30 sec and extension of  $72^{\circ}\text{C}$  for 1 min, then final extension at  $72^{\circ}\text{C}$  for 8 min. The DNA fragment (537 bp) of TG 5 gene were detected on 1.5% agarose gel after staining with ethidium bromide through UV transillumination as shown in Figure 2.

### DNA sequencing

The specific DNA fragment (537 bp) of the TG 5 gene of each sample on agarose gel were excised and purified with PCR Clean-Up Gel Extraction Kit (NucleoSpin® Extract II, MN, USA) according to the manufacturer's protocol. Ten ng of purified PCR products were used as a template for DNA sequencing using 3130 Genetic Analyzer (AB, USA) according to the manufacturer's protocol.

### Allelic type and Genotyping

A SNP occurs when corresponding sequences of DNA from different individuals differ at one DNA base, for example where the sequence of TG 5 gene GATCCCC changes to GATTCCCC. This contains two alleles of C and T. SNPs typically have three genotypes, would be CC, CT and TT. Two SNPs occurred in the TG 5 gene at the position 422 and 552 of the TG 5 gene (GenBank accession number X05380) as shown in Figure 1. Allelic,

genotyping and haplotyping were designated by several authors. For example, three haplotypes were classified according to single nucleotide mutation (C/T) at these positions. Allele '1' (CC) of the TG 5 gene had both nucleotide C at SNP1 and SNP2. Allele '2' (CT) had a nucleotide C and T, whereas allele '3' (TT) had both nucleotide T at SNP1 and SNP2. Then, genotyping were designated as g11, g12, g13, g22, g23, g33 (Barendse et al., 2004). The commercially available GeneSTAR for marbling test measures the specific thyroglobulin gene polymorphism and identifies cattle as having 0, 1, or 2 copies of the T allele; these are identified as 0-STAR, 1-STAR, or 2-STAR, which corresponded to genotype of g22, g23, or g33, respectively. On the other hand, the 0-STAR, 1-STAR, or 2-STAR corresponded to homozygous or heterozygous of the nucleotide CC, CT and TT at the SNP1 position.

## Results

### The PCR products of the TG 5 gene

DNA fragments (537 bp) of the TG 5 gene of Angus x native crossbred cattle were amplified by PCR prior to DNA sequencing as shown in Figure 1.

### Nucleotide sequence of the TG 5 gene

Nucleotide sequence at 5'-flanking region or 5'-untranslated region (5' UTR) of the TG 5 gene (GeneBank accession number X05380) was identified two mutations in 73 DNA samples from Angus x Thai native crossbred cattle. The point mutations was designed to SNP1 and SNP2 at position 422 and 552 as shown in Figure 2.

In Figure 3, single nucleotide polymorphism T/C were detected by DNA sequencing machine at the two SNPs of the TG 5 gene with heterozygous T/C or homozygous C or T. It was noticed that the peaks of heterozygous T/C was lower than the homozygous C or T.

### SNP Genotype frequencies

In Table 1, SNP genotype frequencies of two SNP markers of the TG 5 gene in 73 Angus x Thai native crossbred cattle were demonstrated. The genotypic frequencies of the SNP1 marker were 58.9, 39.7 and 1.4 % with genotypes CC, CT and TT respectively, whereas the genotypic frequencies of the SNP2 marker were 0, 68.5 and 31.5 %.

The SNP1 marker of the TG 5 gene had been evaluated for association with marbling, one of carcass composition traits in various beef cattle. The favorable T allele of TG 5 gene has been associated with increases in marbling score in Angus cattle. Thus, we analyzed the SNP1 marker in the TG 5 gene of 41 heifers obtained from Thai native cows which were artificially inseminated with 3 Angus semen.

In Table 2, high frequency (63.6 – 80.0%) of the genotype CT in 26 heifers obtained from 2 sires with the genotype CT, as well as low frequency (6.7%) of the genotype TT in one of 15 heifers obtained from a sire with the genotype CT. Moreover, low frequency (6.7%) of 15 heifers with the genotype CT obtained from one sire with the genotype CC.

Genotypic frequencies for the SNP1 marker of the TG 5 gene in different breed beef cattle was shown in Table 3. Frequencies of favorable allele T of the SNP1 marker of the TG 5 gene in 73 Angus x Thai native crossbred cattle was 40 and 1 % with SNP1 genotype of CT and TT, respectively.

### Discussion

An example to illustrate genotype is the single nucleotide polymorphism or SNP. A SNP occurs when corresponding sequences of DNA from different individuals differ at one DNA base, for example where the sequence AAGCCTA changes to AAGCTTA. This contains two alleles : C and T. SNPs typically have three genotypes. In the example above, the three genotypes would be CC, CT and TT. Genotypic and allele frequencies reported for each of the SNP examined in this study are summarized in Tables 1 and 2. These frequencies were derived from crossbred cattle and were therefore not necessarily reflective of any purebred population. They do give some indication as to the general prevalence of the favorable marker in Angus x Thai native crossbred cattle. These frequencies at least provide some indication as to the value of crossbreeding in Angus x Thai native crossbred cattle. The frequency of the favorable SNP1 genotype of TG 5 gene (TT) is greatest in the Wagyu breed, intermediate in other *Bos taurus* breeds, and lowest in *Bos indicus* breeds (Table 3). The wagyu breed was well known in meat having highest marbling in the world. SNP1 genotypic frequencies of the TG 5 gene (TT) examined in Angus x Thai native crossbred cattle was closed to Hereford and Brahman breeds. Interestingly, SNP1 genotypic frequencies (CT) of Angus x Thai native crossbred cattle was higher than in other *Bos taurus* and in Brahman breeds. This is important because the potential impact of selecting for a genetic marker depends on both the magnitude of its effect and its frequency in the population.

In this study, two of 3 Angus sires (AGQRFX101, AGQRFX015) containing one copy of allele T (SNP1 genotype CT) increased the occurrence of 'CT' genotype (63.6–80.0%) in the Angus x Thai native crossbred cattle than a Angus sire (AGQRFX167) containing no copy of allele T (SNP1 genotype 'CC'). In order to breed steers with the favourable 'TT' SNP1 genotype, a bull and a cow which both have the 'TT' SNP1 genotype should be crossed. But if breeders are starting with stock in a minority of animals with 'CT' or 'TT' genotypes, it may take up to two generations of structured matings before large numbers of 'TT' genotype animals are on the herd. For breeding purposes, selecting animals which contain at least one copy (allele T) of the TG5 DNA fragment will increase the occurrence of the more favourable 'TT' genotype for marbling in beef cattle.

The favorable T allele of TG5 has been associated with increases in marbling score in both long-fed (>250 days on feed; Barendse, 1999), and short fed (<250 days on feed) Angus and Shorthorn animals where the genotype at this locus accounted for 6.5% of the residual variance for the marbling phenotype (Barendse et al., 2004). Three other peer-reviewed studies have examined associations of beef quality traits with the TG5 polymorphism. There was no association found between this marker and backfat in *Bos taurus* cattle (Moore et al., 2003), marbling score in *Bos indicus* cattle (Casas et al., 2005). 3.8% of animals with the 'TT' SNP1 genotype reached a marbling score five compared with 1.3% of those with the 'CC'.

Therefore, the TG 5 marker would be a candidate molecular marker for assisting selection of Angus sire to enhance possibility of marbling in Angus x Thai native crossbred cattle. Further study on evaluation of the association of this marker with marbling score need to be taken in Angus x Thai native crossbred cattle. The TG 5 marker will be one of several SNP markers for marbling and be used for marker-assisted selection (MAS) in the crossbred beef breeding program.

### Acknowledgements

The present study was partially supported by AusAids in training course on collaborated research project for high quality meat improvement and selecting breeding cattle with CSIRO Livestock Industries, Australia. The authors would like to thank Dr. Ayuth Harintharanon, the Director of Bureau of Biotechnology in Livestock Production, for contribution of several facilities, Dr. Wiboon Tularaksa and Miss Bugna Jindawanichakul for the technical support on DNA sequencing.

### References

- Barendse, W. 1997. Assessing lipid metabolism. Patents W09923248, US6383751 (PCT/AU98/00882).
- Barendse, W., Bunch, R., Thomas, M., Armitage, S., Baud, S. and Donaldson, N. 2004. The TG 5 thyroglobulin gene test for a marbling quantitative trait loci evaluated in feedlot cattle. *Aust. J. Exp. Agric.* 44:669–674.
- Casas, E., White, S. N., Riley, D. G., Smith, T. P. L., Brennen, R. A., Olson, T. A., Johnson, D. D., Coleman, S. W., Bennett, G. L. and Chase, Jr. C. C. 2005. Assessment of single nucleotide polymorphisms in genes residing on chromosomes 14 and 29 for association with carcass composition traits in *Bos indicus* cattle. *J. Anim. Sci.* 83:13–19.
- De Martynoff, G., Pohl, V., Mercken, L., van Ommen, G. L. and Vassart, G. 1987. Structural organization of the bovine thyroglobulin gene and its 5'-flanking region. *Eur. J. Biochem.* 164(3): 591-599.
- Mercken, L., Simons, M. J., Swillens, S., Massaer, M. and Vassart, G. 1985. Primary structure of bovine thyroglobulin deduced from the sequence of its 8,431 base complementary DNA. *Nature* 316(6029): 647-651.
- Nicol, D. C., Armitage, S. M., Hetzel, D. J. S. and Davis, G. P. 2001. Genotype frequencies for GeneSTAR\_Marbling—A DNA-based Diagnostic Test for Beef Cattle. *Proc. Assoc. Advancement of Anim. Breeding and Genetics.* 537–539.
- Van Eenennaam, A. L., J. Li, Thallman, R. M., Quaas, R. L., Dikeman, M. E., Gill, C. A., Franke, D. E. and Thomas, M. G. 2007. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. *J Anim Sci.* 85:891-900.



**Table 1** Genotypic frequencies for the two SNP markers of TG 5 gene in Angus x Thai native crossbred cattle

| SNP markers | No. of animals | SNP genotypes of TG 5 |               |               |
|-------------|----------------|-----------------------|---------------|---------------|
|             |                | CC                    | CT            | TT            |
| SNP1        | 73             | 43<br>(58.9% )        | 29<br>(39.7%) | 1<br>(1.4%)   |
| SNP2        | 73             | 0<br>(0%)             | 50<br>(68.5%) | 23<br>(31.5%) |

**Table 2** Genotype for the SNP1 marker of TG 5 gene in 41 Angus x Thai native crossbred heifers derived from 3 Angus sires.

| Sires (Angus) | SNP1 genotypes of sires | SNP1 genotypes of heifer (Angus x Native) |               |             |       |
|---------------|-------------------------|-------------------------------------------|---------------|-------------|-------|
|               |                         | CC                                        | CT            | TT          | Total |
| AGQRFX 101    | CT                      | 2<br>(13.3%)                              | 12<br>(80.0%) | 1<br>(6.7%) | 15    |
| AGQRFX 015    | CT                      | 4<br>(36.4%)                              | 7<br>(63.6%)  | 0<br>(0%)   | 11    |
| AGQRFX167     | CC                      | 14<br>(93.3%)                             | 1<br>(6.7%)   | 0<br>(0%)   | 15    |
| Total         |                         | 20                                        | 20            | 1           | 41    |

**Table 3** Genotypic frequencies for SNP1 marker of the TG 5 gene in different breed beef cattle

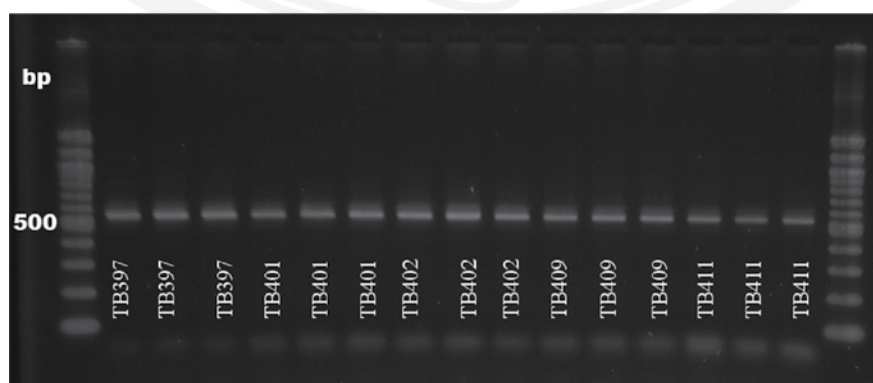
| Breed               | SNP1 genotype, % |    |    | Reference                  |
|---------------------|------------------|----|----|----------------------------|
|                     | CC               | CT | TT |                            |
| Wagyu               | 12               | 50 | 38 | Nicol et al., 2001         |
| Red Angus           | 42               | 42 | 16 | Nicol et al., 2001         |
| Black Angus         | 53               | 38 | 9  | Nicol et al., 2001         |
| Charolais x Angus   | 62               | 34 | 5  | Van Eenennaam et al., 2007 |
| Angus               | 64               | 32 | 3  | Berendse et al., 2004      |
| Hereford            | 81               | 18 | 1  | Van Eenennaam et al., 2007 |
| Brahman             | 95               | 4  | 1  | Casas et al., 2005         |
| Angus x Thai Native | 59               | 40 | 1  | This study                 |

### Figures legends

**Figure 1.** Nucleotide sequence at 5'- flanking region or 5'- untranslated region (5' UTR) of the TG 5 gene (GeneBank accession number X05380) indicated SNP1 and SNP2 at position 422 and 552. Primer sets were designed corresponding to the sequence in underlined letters.

**Figure 2.** DNA fragments (537 bp) of the TG 5 gene of Angus x native crossbred cattle were amplified by PCR prior to DNA sequencing.

**Figure 3.** Single nucleotide polymorphism (SNP) of the TG 5 gene showing heterozygous (T/C) and homozygous (C or T) in the SNP1 and SNP2 positions



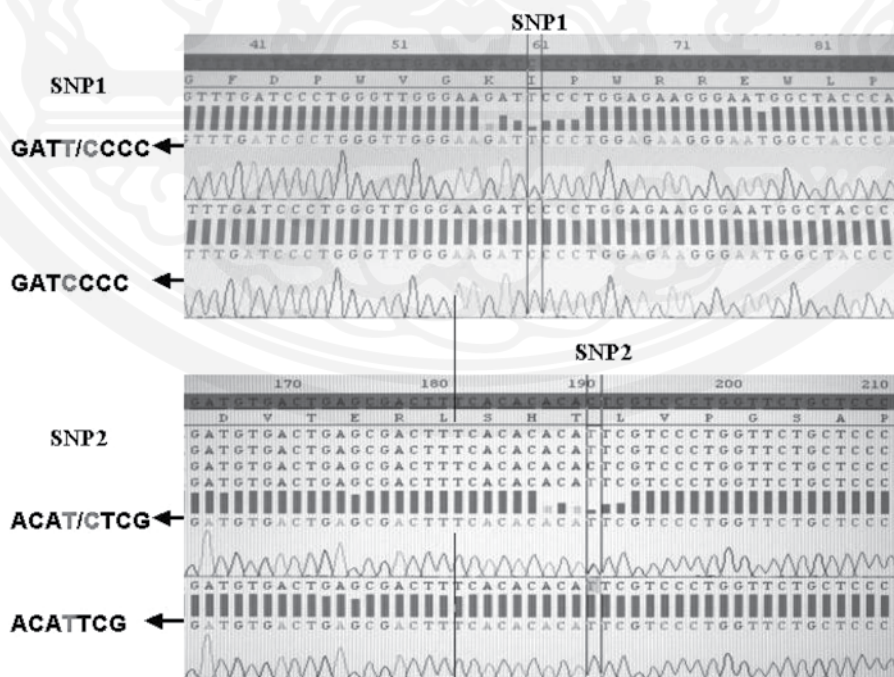
**Figure 1.** DNA fragments (537 bp) of the TG 5 gene of Angus x native crossbred cattle were amplified by PCR prior to DNA sequencing.

```

AAGCT TCCTGCTGCCT TT TGGT TGTCTGACGTCCTGGGACAGAGGGGAAAAG GGGGATGAC      60
TACGAGTATGACTG   TGGCTGTGT T TGGCT TATCTCATCAAAATCTCTACAT TCTGTGT TA      120
ATGGATCT GCCT GT T T T GT TCCCT GCCATATCCTCAT GGCCTAGAATAG TG TCT GCT TCT      180
CTATCAGAC TCTAAAGAAACAT TGCTAGGAGGGAAGGAAGGAGCATGGAT GAGGAGGGAG      240
GGAGCAT TG TGT T TCTCTACGGTGGGCTGAACGTGTGGCCACCAAG T T G T TAACT T T      300
GGCCT T TACCC C TGAAGATGAATTATGAAGCCACACCCCCAGT T CT TCCTTGGTGGCTCA      360
GATGGTCAAGAATCCACCTGCAATGCGGGAGACCTGGGT T TGATCCCT GGGT TGGAAGA      420
SNP1
T C CCCT GGAGAAGGGAATGGCTACCCACTCCAGTAT TCTGGCCTGGAGAATCCCATGGAC      480
AGAGGAGCCT GCGGGGAT GCAGTCCATGGGG TCTCAGAGAGTCAGATGTGACTGAGCGAC      540
SNP2
T T TCACACACA T TCGTCCCT GGT TCTGCTCCCC TACAGCCTCCACAAGATTTTCAC CCA      600

```

**Figure 2.** Nucleotide sequence at 5'-flanking region or 5'-untranslated region (5' UTR) of the TG 5 gene (GeneBank accession number X05380) indicated SNP1 and SNP2 at position 422 and 552. Primer sets were designed corresponding to the sequence in underlined letters.



**Figure 3.** Single nucleotide polymorphism (SNP) of the TG 5 gene showing heterozygous (T/C) and homozygous (C or T) in the SNP1 and SNP2 positions.

## รูปแบบของโครโมโซมของโคลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่าง โคป่าและโคชีบูกับความสมบูรณ์พันธุ์และการเจริญเติบโต

นุสสรา วัฒนกุล<sup>1</sup> วันชัย ตันวัฒนะ<sup>2</sup> พรรณพิไล เสกสิทธิ์<sup>1</sup>

มนตกานต์ ตันสถิตย์<sup>3</sup> วิวัฒน์ ชวนะนิกุล<sup>4</sup>

### บทคัดย่อ

ศึกษาการโอโทปีของโคลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างโคป่าและโคชีบู โดยใช้ น้ำเชื้อ  
แช่แข็งของพ่อกระทิง และพ่อโคแดงของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ผสมเทียมให้กับแม่โคชีบูในท้องที่ พบว่า โคลูกผสม  
(F1) ทุกตัว ที่เกิดจากพ่อกระทิงและแม่ชีบู มีจำนวนโครโมโซมเป็น  $2n=58$  โดยมีโครโมโซมร่างกายเป็นแบบ  
อะโครเซนตริก จำนวน 54 ตัว และเป็นแบบ ซับเมตาเซนตริก จำนวน 2 ตัว ในขณะที่โครโมโซมเพศจะเป็นแบบ  
ซับเมตาเซนตริก ตัวใหญ่ 1 ตัว และ เมตาเซนตริก ตัวเล็ก 1 ตัว สำหรับเพศผู้ และเป็นแบบ ซับเมตาเซนตริก  
ตัวใหญ่ 2 ตัวในเพศเมีย ในขณะที่การโอโทปีของโคลูกผสม (F1) ที่เกิดจากน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อโคแดง และแม่ชีบู  
จะมีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกันเป็น 2 แบบ คือ  $2n=59$  และ  $2n=58$  โดยพบ 1/29 Robertsonian translocation  
ในโคที่มี  $2n=59$  และพบ 1/29 และ 2/27 Robertsonian translocation ในโคที่มี  $2n=58$  โดยทั้ง 2 กลุ่มมีโครโมโซม  
เพศเป็นแบบเดียวกับโคลูกผสม (F1) ที่เกิดจากพ่อกระทิง เมื่อพิจารณาถึงความสมบูรณ์พันธุ์ พบว่าโคลูกผสมเพศเมีย  
(F1) ทั้งที่เกิดจากพ่อกระทิง และพ่อโคแดงสามารถให้ลูกได้จากการผสมธรรมชาติ ในขณะที่โคลูกผสมเพศผู้ (F1)  
ทั้งหมด ไม่สามารถผลิตน้ำเชื้อได้ จากลักษณะการเจริญเติบโตของโคลูกผสม (F1) ทั้งที่เกิดจากพ่อกระทิง และ  
พ่อโคแดง พบว่ามีน้ำหนักในระยะต่างๆ และอัตราการเจริญเติบโตที่น่าพอใจ ดังนั้น โคลูกผสมเพศผู้ (F1) แม้จะเป็น  
หมัน แต่จะมีประโยชน์ทางเศรษฐกิจคือ สามารถนำไปขุนเพื่อผลิตเนื้อสำหรับการบริโภคได้ ในขณะที่โคลูกผสมเพศ  
เมียสามารถนำไปใช้ในการผสมพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้ เพื่อให้ได้โคลูกผสมที่มีผลผลิต และสมรรถภาพการ  
สืบพันธุ์ที่ดีที่สุดในการเลี้ยงดูในประเทศไทย

**คำสำคัญ :** การโอโทปี ลูกผสมโคป่าและโคชีบู ความสมบูรณ์พันธุ์ การเจริญเติบโต

- 1 สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ จ.ปทุมธานี
- 2 สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จ.ชลบุรี
- 3 คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ
- 4 คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ



## KARYOTYPE OF CROSSBRED PROGENY BORN FROM INTERSPECIES HYBRIDIZATION OF WILD AND ZEBU CATTLE IN RELATION TO FERTILITY AND GROWTH PERFORMANCE

Nussara Vadhanakul<sup>1</sup> Wanchai Tunwattana<sup>2</sup> Panpilai Sekkasiddhi<sup>1</sup>  
Montakarn Tansatit<sup>3</sup> Vivat Chavananikul<sup>4</sup>

### Abstract

Karyotype of crossbred progeny of wild and zebu cattle born from insemination of zebu dams with deep frozen semen of gaur (*Bos gaurus*) and banteng (*Bos javanicus*) sires were studied. Crossbred progeny (F1) born from the gaur sire and zebu dams revealed a diploid chromosome number of  $2n=58$ . Fifty-four acrocentric and 2 submetacentric autosomes were found whereas sex chromosomes were submetacentric and metacentric in male and 2 submetacentric in female. Two types of chromosome complement of  $2n=59$  and  $2n=58$  were found in crossbred progeny (F1) of the banteng sire and zebu dams. Robertsonian translocation of 1,29 was found in crossbred progeny with  $2n=59$  whereas 1/29 and 2/27 Robertsonian translocation was found in those with  $2n=58$ . Sex chromosomes of both groups were the same as those of crossbred progeny (F1) of the gaur sire and zebu dams. Concerning fertility, female crossbred progeny (F1) born from both gaur and banteng sires can be conceived from natural breeding whereas males could not produce sperm. Growth performances of these crossbred progeny revealed satisfactory results in terms of weight at different ages and growth rate. Therefore, male hybrids, even sterile, are of economical benefit for meat production whereas female hybrids can be used for breeding purpose in order to achieve crossbred progeny with maximal heterosis of interspecies hybridization in terms of production and reproductive fitness.

**Key words :** karyotype wild and zebu cattle hybrids fertility growth performance

- 1 Bureau of Biotechnology for Animal Production, Department of Livestock Development, Patumthani.
- 2 Khao Kheow Open Zoo , Choburi.
- 3 Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok.
- 4 Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok

## บทนำ

การศึกษานี้เป็นการศึกษาต่อเนื่องจากโครงการอนุรักษ์พันธุ์โคป่า ซึ่งถือกำเนิดขึ้นในปี พ.ศ. 2533 โดยความร่วมมือของกรมปศุสัตว์ องค์การสวนสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสถาบันสมิธโซเนียน ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยในโครงการดังกล่าวในระยะแรก ได้ทำการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อกระทิง (Bos gaurus) และพ่อโคแดง (Bos javanicus) ของสวนสัตว์เปิดเขาเขียวเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์ (conservation program) และได้้นำน้ำเชื้อส่วนหนึ่งมาใช้ในการผสมข้ามพันธุ์โดยการผสมเทียมให้กับแม่โคชีบูที่เลี้ยงในพื้นที่ด้วยวัตถุประสงค์เพื่อสร้างโคเนื้อสายพันธุ์ใหม่ระหว่างโคป่า (wild cattle) และโคชีบู ที่มีรูปร่างลักษณะและโครงร่างที่ใหญ่ขึ้น และมีความทนทานต่อสิ่งแวดล้อม โดยอาศัยคุณสมบัติทางพันธุกรรมที่ดีของโคป่า คือ มีขนาดใหญ่ และมีความทนทานในสถานะต่างๆ และสภาพอาหารที่ไม่สมบูรณ์ มาช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ (ฮันต์และคณะ, 2542) แต่เนื่องจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างสปีชีส์ที่ต่างกัน (interspecies hybridization) ไม่ว่าจะมีจำนวนโครโมโซมเท่ากันหรือต่างกันก็อาจมีความผิดปกติบางประการเกิดขึ้นได้ เช่น อาจเกิดการจับคู่กันของโครโมโซมที่ผิดปกติไป หรืออาจเกิดการเชื่อมกัน (fusion) แบบต่างๆ ของโครโมโซมที่มาจากคนละคู่กัน ที่พบมากได้แก่การเกิด Robertsonian translocation, tandem fusion ฯลฯ ซึ่งจะทำให้จำนวนโครโมโซมทั้งหมด (diploid number) และรูปร่างของโครโมโซม เปลี่ยนแปลงไปจากจำนวนปกติ และอาจส่งผลทำให้เกิดความผิดปกติของระบบต่างๆ ตามมา โดยเฉพาะระบบสืบพันธุ์ และยังถ่ายทอดโครโมโซมที่ผิดปกติเหล่านี้ไปยังลูกหลานด้วย จากการศึกษาของ Gustavsson (1980) รายงานไว้ว่า การเกิด 1/29 Robertsonian translocation ในโค จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพความสมบูรณ์พันธุ์ลดลง นอกจากนี้ Forsdyke (2000) และ Zhang (2000) ยังได้รายงานการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างโคแดง กับโคชีบู และใน yak กับโคชีบู หรือ กับโค Bos taurus ซึ่งพบว่าโคลูกผสม (F1) เพศเมียเท่านั้นที่มีสมรรถภาพการสืบพันธุ์ที่ปกติ แต่ในโคลูกผสม (F1) เพศผู้จะเป็นหมัน แม้จะมีลักษณะภายนอกปกติก็ตาม

การศึกษานี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาคาริโอไทป์ (Karyotype) ของโคลูกผสมที่เกิดจากโครงการในระยะแรก ซึ่งเป็นการผสมข้ามพันธุ์ระหว่าง พ่อโคป่า (พ่อกระทิง, พ่อโคแดง) กับแม่โคชีบู ว่ามีลักษณะของโครโมโซมเป็นเช่นไร มีความผิดปกติอย่างไร และมีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์อย่างไร ตลอดจนศึกษาถึงลักษณะการเจริญเติบโตในแต่ละระยะ เพื่อให้ทราบถึงความเป็นไปได้ในการใช้พันธุกรรมของโคป่ามาปรับปรุงพันธุ์โคชีบูที่เลี้ยงในท้องถิ่นว่าสามารถได้โคลูกผสมที่มีโครงร่างใหญ่ขึ้น และมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้หรือไม่ เพื่อประโยชน์ในการนำไปใช้บริโภค และใช้แรงงานต่อไป

## วัสดุและวิธีการ

เก็บตัวอย่างเลือดของโคลูกผสมจำนวน 20 ตัว ที่เกิดจากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อกระทิง และพ่อโคแดง ของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว กับแม่โคชีบู (พันธุ์บราห์มัน, พันธุ์เรด ชินดี และพันธุ์พื้นเมือง) ในท้องที่ โดยเป็นโคลูกผสมที่เกิดจากน้ำเชื้อพ่อกระทิงจำนวน 12 ตัว และเกิดจากน้ำเชื้อพ่อโคแดงจำนวน 8 ตัว และเก็บตัวอย่างเลือดของแม่โคชีบูที่นำมาใช้ผสมเทียมด้วย จำนวน 10 ตัว ในขณะที่ตัวอย่างเลือดของพ่อกระทิงที่ใช้ทำน้ำเชื้อแช่แข็งได้ถูกเจาะเก็บไว้แล้วโดยการวางยาสลบ และได้ทำการศึกษาคาริโอไทป์ไว้เรียบร้อยแล้วโดย นุสสุราและคณะ (กำลังอยู่ในระหว่างตีพิมพ์) แต่พ่อโคแดงที่ใช้ทำน้ำเชื้อแช่แข็ง ไม่สามารถเก็บตัวอย่างเลือดได้ เนื่องจากระหว่างนั้นยังไม่มีโปรแกรมที่จะวางยาสลบเพื่อปฏิบัติงานของสวนสัตว์ และการวางยาสลบจะทำเมื่อจำเป็นเท่านั้น เนื่องจากอาจมีความเสี่ยงจากการแพ้ยาได้

ตัวอย่างเลือดถูกเก็บในหลอดที่มี heparin เป็นสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด แล้วทำการเพาะเลี้ยง เซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocyte) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Minimum essential media ซึ่งมี 10% calf serum และ phytohaemagglutinin แล้วบ่ม (incubate) ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเมื่อถึงชั่วโมง ที่ 70 จะเติมสารละลาย colcemid ลงไปเพื่อหยุดการแบ่งตัวของเซลล์ให้อยู่ในระยะเมตาเฟส และบ่มในตู้เพาะเลี้ยง ต่อไปจนครบกำหนดเวลา หลังจากนั้นนำแต่ละตัวอย่างออกมาจากตู้เพาะเลี้ยง และทำให้เซลล์บวมด้วยสารละลาย hypotonic solution (0.075 M.KCl) แล้วปั่นเอาส่วนใสทิ้ง แล้ว fix เซลล์ด้วยสารละลาย fixative (methanol : glacial acetic acid = 3 : 1) สลับกับการปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง เพื่อแยกเอาส่วนใสออก และทำซ้ำ 3-5 ครั้ง แล้วเก็บตะกอน ที่ได้ครั้งสุดท้ายในสารละลาย fixative และเก็บค้างคืนไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C วันรุ่งขึ้นจึงนำเซลล์ไปหยดให้ กระจายบนสไลด์ ย้อมด้วยสีจิมซ่าแล้วนำมาตรวจดูการโอโตไทป์ของแต่ละตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยตรวจจาก กลุ่มเมตาเฟสที่สมบูรณ์ตัวอย่างน้อย 30 กลุ่ม ถ่ายรูปเก็บไว้ แล้วเรียงลำดับโครโมโซมคู่ต่างๆด้วยมือโดยจัดตามขนาด ของโครโมโซมจากยาวไปหาสั้น และเปรียบเทียบอีกครั้งโดยใช้การเรียงลำดับของโครโมโซมด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ และซอฟต์แวร์ที่ใช้เรียงลำดับโครโมโซมของโค (Ikaros ของ บริษัท Metasystem)

ติดตามประวัติเกี่ยวกับความสมบูรณ์พันธุ์ของโคลูกผสมเหล่านี้ และลักษณะการเจริญเติบโต โดยชั่ง น้ำหนักแรกเกิด น้ำหนักหย่านม และน้ำหนักเมื่ออายุ 18 เดือน ของโคลูกผสมจำนวน 15 ตัว ที่เลี้ยงอยู่ในที่เดียวกัน และคำนวณอัตราการเจริญเติบโตในแต่ละระยะเพื่อให้ทราบถึงความสมบูรณ์พันธุ์ และการเจริญเติบโต

### ผลการทดลอง

การโอโตไทป์ของแม่โคชีบู (พันธุ์บราห์มัน , เรดซินดี้ และ พันธุ์พื้นเมือง) ที่นำมาใช้ผสมเทียม มีจำนวน โครโมโซมเป็น  $2n=60$  โดยมี โครโมโซมร่างกาย (autosome) เป็นแบบ อะโครเซนตริก (acrocentric) ทั้งหมด และ โครโมโซมเพศ (sex chromosome) เป็นแบบ ซับเมตาเซนตริก ตัวใหญ่ (X) 2 ตัว (รูป 1) (ตาราง 1)

สำหรับคาริโอไทป์ของโคลูกผสม (F1) ทุกตัวที่เกิดจากน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อกระทิง และ แม่โคชีบู ไม่ว่า จะเป็นแม่พันธุ์ใดก็ตามระหว่าง บราห์มัน, เรดซินดี้ และพันธุ์พื้นเมือง จะมีจำนวนโครโมโซมเป็น  $2n=58$  โดยมี โครโมโซมร่างกาย เป็นแบบ อะโครเซนตริก จำนวน 54 ตัว และเป็นแบบ ซับเมตาเซนตริก จำนวน 2 ตัว ส่วน โครโมโซมเพศ จะมีลักษณะเช่นเดียวกับใน Bos taurus และกระทิง (Bos gaurus) คือเป็นแบบ ซับเมตาเซนตริก ตัวใหญ่ (X) 1 ตัว และ เมตาเซนตริก ตัวเล็ก (Y) 1 ตัว ในเพศผู้ และเป็นแบบ ซับเมตาเซนตริก ตัวใหญ่ (X) 2 ตัว ในเพศเมีย (รูป 2, รูป 3) (ตาราง 1)

ในขณะที่ในโคลูกผสม (F1) ที่เกิดจากน้ำเชื้อของพ่อโคแดง และแม่โคชีบู แม้ว่าพ่อจะเป็นน้ำเชื้อของ พ่อโคแดงตัวเดียวกัน แต่พบว่าโคลูกผสม จะมีจำนวนโครโมโซมที่ต่างกันเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 (จำนวน 6 ตัวเป็น เพศผู้ 4 ตัวและเพศเมีย 2 ตัว) จะมีจำนวนโครโมโซมเป็น  $2n=59$  โดยมี โครโมโซมร่างกายเป็นแบบ อะโครเซนตริก จำนวน 56 ตัว และเป็นแบบ ซับเมตาเซนตริก จำนวน 1 ตัว ส่วน โครโมโซมเพศ จะมีลักษณะเช่นเดียวกับใน Bos taurus และ Bos gaurus คือเป็นแบบ ซับเมตาเซนตริก ตัวใหญ่ (X) 1 ตัว และเมตาเซนตริก ตัวเล็ก (Y) 1 ตัว ในเพศผู้ และเป็นแบบ ซับเมตาเซนตริก ตัวใหญ่ (X) 2 ตัว ในเพศเมีย ในขณะที่โคลูกผสมในกลุ่มที่ 2 (จำนวน 2 ตัว ซึ่งเป็นเพศเมียทั้งหมด) มีจำนวนโครโมโซมเป็น  $2n=58$  โดยมีโครโมโซมร่างกายเป็นแบบ อะโครเซนตริก จำนวน 54 ตัว และเป็นแบบ ซับเมตาเซนตริก จำนวน 2 ตัว โดยที่โครโมโซมเพศจะเป็นเหมือนในกลุ่มที่ 1 และ

เช่นเดียวกับใน *Bos taurus* และ *Bos gaurus* ซึ่งเมื่อศึกษาโดยละเอียดต่อไปจากคาริโอไทป์ของโคลูกผสมเหล่านี้ โดยนำโครโมโซมแต่ละคู่มาจัดเรียงกันตามขนาด ทั้งการจัดด้วยมือและการใช้ซอฟต์แวร์ พบว่า ในโคลูกผสมที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น  $2n=59$  นั้น โครโมโซมร่างกายที่เป็น ซับเมตาเซนตริก จะเกิดจากการเชื่อมกัน (centric fusion) ของอะโครโซม ตัวที่ 1 และ 29 (1/29 Robertsonian translocation) ทำให้จำนวนโครโมโซมทั้งหมด (diploid number) ลดลง 1 ตัว ในขณะที่ในโคลูกผสมที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น  $2n=58$  จะเกิดจากการเชื่อมกันของอะโครโซม ตัวที่ 1 กับ 29 (1/29 Robertsonian translocation) และ อะโครโซม ตัวที่ 2 กับ 27 (2/27 Robertsonian translocation) ทำให้จำนวนโครโมโซมทั้งหมดลดลง 2 ตัว (รูป 4, รูป 5) (ตาราง 1) อย่างไรก็ตาม การพิสูจน์ให้แน่ชัดว่าเป็นการเชื่อมกันของโครโมโซมคู่ใดจะทำได้โดยเทคนิคการทำ banding ของโครโมโซม แต่ในรายงานนี้ไม่ได้ทำการศึกษาไว้ แต่ใช้เพียงการเรียงลำดับและการจับคู่ตามขนาดของโครโมโซมเท่านั้น

เมื่อศึกษาถึงความสมบูรณ์พันธุ์ (fertility) ของโคลูกผสม (F1) ที่เกิดจากทั้งพ่อกระทิง และพ่อโคแดง พบว่า ในโคลูกผสมเพศเมียทั้งหมด ไม่ได้มีการผสมเทียมต่อ เนื่องจากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว มีวัตถุประสงค์จะเลี้ยงไว้เพื่อเป็นตัวรับในการย้ายฝากตัวอ่อนในโครงการระยะต่อไป แต่พบว่าการผสมธรรมชาติจากพ่อโคแดงที่อยู่ในคอกข้างเคียง และสามารถตกลูกได้แล้ว 3 ตัว โดยเกิดจากแม่โคลูกผสมที่เกิดจากน้ำเชื้อพ่อโคแดง และแม่ชีนุ ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเป็น  $2n=59$  จำนวน 2 ตัว และเป็นแม่โคลูกผสมที่เกิดจากพ่อกระทิง และแม่ชีนุ ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเป็น  $2n=58$  จำนวน 1 ตัว ซึ่งแสดงว่าโคลูกผสมเพศเมียที่เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างโคป่า และโคชีนุ ไม่มีผลกระทบต่อความสมบูรณ์พันธุ์ แม้จะมีการเกิด Robertsonian translocation ก็ตาม ในขณะที่ในโคลูกผสมเพศผู้ทั้งหมด ได้มีการทดลองรีดเก็บน้ำเชื้อโดยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านทางทวารหนัก (electroejaculator) ตั้งแต่อายุ 2-4 ปี (วิบูลย์ เยี่ยงวิศากร และ วันชัย ตันวัฒนะ, ติดต่อบุคคล) และพบว่าไม่สามารถรีดเก็บน้ำเชื้อเพื่อนำไปทำน้ำเชื้อแช่แข็งได้ เนื่องจาก ejaculate ที่ได้แต่ละครั้ง มีลักษณะใส และมีแต่ seminal fluid

เมื่อศึกษาถึงลักษณะของการเจริญเติบโตของโคลูกผสม (F1) ที่เกิดจากน้ำเชื้อของพ่อกระทิง และพ่อโคแดง กับแม่โคชีนุ พบว่ามีน้ำหนักในแต่ละระยะ และอัตราการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างดี แม้จะเลี้ยงในสภาวะแวดล้อมที่ไม่สมบูรณ์ (ตาราง 2)

## วิจารณ์

คาริโอไทป์ของโคลูกผสมทุกตัวในการศึกษานี้ที่เกิดจากน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อกระทิง และ แม่ชีนุ พบว่าจำนวนโครโมโซมเป็น  $2n=58$  เนื่องจากพ่อกระทิงของเขาเขียวมีจำนวนโครโมโซมเป็น  $2n=56$  (นุสสรุ และคณะ, กำลังอยู่ในระหว่างตีพิมพ์) และแม่ชีนุมีจำนวนโครโมโซมเป็น  $2n=60$  ดังนั้น ลูกจึงได้โครโมโซมมาจากพ่อและแม่อย่างละครึ่ง โดยลูกผสมเหล่านี้จะมี โครโมโซมร่างกาย เป็นแบบ ซับเมตาเซนตริก 2 ตัว ที่มีขนาดไม่เท่ากัน ซึ่งได้รับถ่ายทอดมาจากพ่อกระทิง และจะไม่มีคู่ที่เหมือนกันด้วย (homologous partner) เนื่องจากในแม่ชีนุมีโครโมโซมร่างกายเป็นแบบ อะโครเซนตริก เท่านั้น ซึ่งตรงกับการศึกษาของ Bongso และคณะ (1988) ซึ่งศึกษาในลูกผสมระหว่างพ่อกระทิงของมาเลเซีย (*Bos gaurus hubbacki*) กับแม่โค *Bos indicus* ซึ่งพบคาริโอไทป์เป็นแบบเดียวกัน

แม้จะไม่สามารถเก็บตัวอย่างเลือดจากพ่อโคแดงเพื่อตรวจรูปแบบของโครโมโซมได้ แต่ Gallagher และคณะ (1999), Potter และ Upton (1979) และ Potter และคณะ (1979) รายงานไว้ว่า ในโคแดง จะมีจำนวนโครโมโซมทั้งหมดเท่ากับ *Bos taurus* และ *Bos indicus* คือ  $2n=60$  โดยมีจำนวน โครโมโซมร่างกาย เป็น 58 และ



เป็นแบบ อะโครเซนตริก ทั้งหมด ขณะที่ โครโมโซมเพศเป็นแบบเดียวกับ *Bos taurus* และ *Bos gaurus* คือเป็นแบบ ซับเมตาเซนตริกตัวใหญ่ 1 ตัว และเมตาเซนตริกตัวเล็ก 1 ตัว ในเพศผู้ และเป็นแบบซับเมตาเซนตริกตัวใหญ่ 2 ตัว ในเพศเมีย ซึ่งพ้อยโคแดงของสวณสัตว์เปิดเขาเขียวที่นำมาใช้ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งก็น่าจะมีจำนวนโครโมโซมเป็น  $2n=60$  เช่นเดียวกัน ดังนั้นโคลูกผสม (F1) ที่เกิดจากน้ำเชื้อพ้อยโคแดง และแม่ชีบูในการศึกษานี้ จึงควรมีจำนวนโครโมโซมเป็น  $2n=60$  เช่นเดียวกับในพ่อและแม่ แต่จากการศึกษานี้พบว่า จำนวนโครโมโซมของโคลูกผสมเหล่านี้มี 2 แบบ คือ  $2n=59$  และ  $2n=58$  และเมื่อนำโครโมโซมมาจัดเรียงลำดับตามขนาดจากใหญ่ไปหาเล็ก พบการเกิด 1/29 Robertsonian translocation ในกลุ่มที่มี  $2n=59$  ในขณะที่ในกลุ่มที่มี  $2n=58$  จะพบการเกิด 1/29 และ 2/27 Robertsonian translocation ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Khumnirdpetch และคณะ (1998) ซึ่งศึกษาการโอไทป์ของโคลูกผสมระหว่างโคป่า (*Bos javanicus* และ *Bos banteng*) กับโคชีบูที่มีเปอร์เซ็นต์สายเลือดต่างๆ กัน และเลี้ยงอยู่ที่สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ของกรมปศุสัตว์ โดยพบว่า โคลูกผสมเหล่านี้มีจำนวนโครโมโซมเป็น 3 แบบ คือ  $2n=60$ ,  $2n=58$  และ  $2n=59$  และยังรายงานไว้ว่า โคลูกผสมที่มีจำนวนโครโมโซมทั้งหมดน้อยกว่า 60 จะเนื่องจากการเกิด Robertsonian translocation ของโครโมโซมคู่ที่ 1/29 และ 2/27 โดยตรวจจากการเรียงลำดับของโครโมโซมตามขนาดเช่นเดียวกัน แต่ในการตรวจวินิจฉัยที่แน่นอนว่าเป็นการเชื่อมกันของโครโมโซมร่างกายตัวใด สามารถทำได้โดยวิธี chromosome banding ซึ่งโครโมโซมแต่ละตัวจะถูกย้อมด้วยเอนไซม์เป็นช่วงๆ และเมื่อย้อมสีจะเห็นเป็นแถบ (band) ซึ่งมีลักษณะเฉพาะตัวในแต่ละคู่ของโครโมโซมซึ่งจะทำให้สามารถตรวจวินิจฉัยได้แน่นอนยิ่งขึ้น โดยภาวะการเกิด Robertsonian translocation ที่พบมากที่สุดเป็นแบบ 1/29 Robertsonian translocation (Gustavsson, 1966 ; Amrud, 1969) ซึ่งมักมีผลทำให้ประสิทธิภาพความสมบูรณ์พันธุ์ลดลง (Gustavsson, 1980) เนื่องจากการตายของตัวอ่อน ซึ่งเป็นผลมาจากเซลล์สืบพันธุ์ที่ไม่สมดุล (unbalanced gametes) ซึ่งเป็นความผิดปกติที่พบมาก (Popescu and Pech, 1991; Plachot and Popescu, 1991) ในขณะที่ Iannuzzi และคณะ (2001) ก็ได้รายงานการเกิด Robertsonian translocation ระหว่างโครโมโซมร่างกาย ตัวที่ 9 และโครโมโซม Y (#9/Y) ในพ้อยโคซึ่งมีลักษณะภายนอกปกติ แต่พบว่าพ้อยโคเป็นหมันเนื่องจากไม่สามารถผลิตสเปิร์มได้ (azoospermia) นอกจากนี้ Popescu (1977 a,b) ยังได้พบการเกิด fusion ของโครโมโซมตัวที่ 3 และ 9 (3/9) ในโคด้วย

จากการโอไทป์ของโคลูกผสมระหว่างโคป่าและโคชีบู ที่เกิดจากน้ำเชื้อพ้อยกระทิงและพ้อยโคแดง ในการศึกษานี้ เมื่อนำไปพิจารณาต่อถึงความสัมพันธ์กับความสมบูรณ์พันธุ์ พบว่าในโคลูกผสมเพศเมีย ทั้งที่เกิดจากพ้อยกระทิง และพ้อยโคแดง สามารถให้ลูกได้จากการผสมธรรมชาติ แม้จะมีรูปแบบและจำนวนของโครโมโซมที่ต่างกัน หรือมีการเกิด Robertsonian translocation ก็ตาม ในขณะที่ในโคลูกผสมเพศผู้ทั้งหมดทั้งที่เกิดจากพ้อยกระทิง และพ้อยโคแดง ซึ่ง วิบูลย์ เยี่ยงวิศวกร และ วันชัย ต้นวัณณะ (ติดต่อส่วนตัว) ได้ทดลองรีดเก็บน้ำเชื้อโดยใช้กระแสไฟฟ้ากระตุ้นผ่านทางทวารหนัก (electroejaculator) ตั้งแต่อายุ 2-4 ปี และพบว่าไม่มี seminal fluid โดยไม่มีตัวสเปิร์ม ดังนั้น โคลูกผสมเพศผู้จึงอาจเป็นหมัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Bongso และคณะ (1988) ซึ่งศึกษาในโคลูกผสมระหว่างพ้อยกระทิงของมาเลเซียกับโคชีบู ซึ่งมีรูปแบบและจำนวนโครโมโซมที่ต่างกัน และพบว่าจะมีประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ที่ต่ำลง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากรูปแบบของการแยกตัว (segregation pattern) และการแบ่งตัวในระยะ meiosis ของโครโมโซมร่างกายชนิด ซับเมตาเซนตริก ซึ่งมีขนาดไม่เท่ากัน 2 ตัว ที่ได้มาจากพ้อยกระทิงและเมื่อส่งผ่านมายังลูกผสมก็จะไม่มีการจับคู่ของโครโมโซมที่เหมือนกัน โดยพบว่าโคลูกผสมเพศเมียจะมีประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ที่ปกติแต่โคเพศผู้จะเป็นหมันแม้ในโคลูกผสมระหว่างโคแดงและโคชีบู ที่มีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน ก็พบว่าเป็นเช่นเดียวกัน (Nijman และคณะ, 2003) ในขณะที่ Zhang (2000) ซึ่งศึกษาการผสมข้ามพันธุ์ระหว่าง yak

กับโคชีบูก็พบว่าโคลูกผสมเพศผู้จะเป็นหมัน ในขณะที่โคเพศเมียจะปกติเช่นเดียวกัน ซึ่งตรงกับการศึกษาของ Winter และคณะ (1988) ซึ่งศึกษาการผสมข้ามพันธุ์ระหว่าง โคป่าของภูฐาน (Mithun, *Bos frontalis*) กับโคชีบู (Siri, *Bos indicus*) และรายงานไว้ว่า ปัญหาของประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ที่ลดลง จะเป็นผลเนื่องมาจากโครโมโซมร่างกาย ไม่ใช่โครโมโซมเพศ และยังได้ทำการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่ออัณฑะของโคลูกผสม (F1) และพบว่า ขบวนการสร้างสเปิร์ม (spermatogenesis) จะหยุดที่ระยะ pachytene และจะไม่พบ spermatid ใน seminiferous tubule และใน epididymis เลย จะพบแต่เพียง spermatogenic cell ที่ไม่เจริญ และ sertoli chamber ที่ว่างเท่านั้น แต่จะไม่มีผลกระทบใดๆ ต่อ sertoli cell นอกจากนี้อาจพบการฝ่อของลูกอัณฑะ (testicular hypoplasia) ได้ด้วย ซึ่งตรงกับ การศึกษาของ Forsdyke (2000) และ Zhang (2000) ที่พบว่า ความสมบูรณ์พันธุ์ในลูกผสมที่เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ ระหว่างสปีชีส์ที่ต่างกัน จะเกิดใน homogametic sex ซึ่งก็คือเพศเมียเท่านั้น โดยเพศผู้จะเป็นหมัน โดย Pathak และ Keiffer, 1979 และ Steklenev และ Elistratova, 1992 ก็รายงานไว้ว่าขบวนการสร้างสเปิร์มในลูกผสมเพศผู้ จะหยุด ที่ระยะ pachytene เช่นเดียวกัน ดังนั้นจึงไม่อาจใช้ลูกผสมเพศผู้ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้ แต่จะใช้ประโยชน์เพื่อ การบริโภค หรือเพื่อการใช้งานเท่านั้น ในขณะที่ในโคลูกผสมเพศเมียสามารถใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้โดยการ backcross หลายๆ ครั้งกับพ่อโคป่า หรือพ่อโคเลี้ยง (domestic cattle) พันธุ์แท้ จนกว่าจะได้ลูกผสมที่มี คาร์ิโอไทป์ที่ปกติและสมดุล ซึ่งสามารถมีชีวิตอยู่ได้โดยมีอัตราการเจริญเติบโต และ สมรรถภาพการสืบพันธุ์ ที่ใช้ได้ (Nijman และคณะ, 2003 ; Riggs และคณะ, 1997) โดย Winter และคณะ (1988) พบว่าลูกรุ่นต่อไปที่เกิดจากการ backcross จะมีการสร้างสเปิร์มที่ดีขึ้น และประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ ก็จะค่อยๆ กลับมาดีขึ้นในรุ่นต่อไป ซึ่งอาจ เนื่องมาจากเกิดการเจือจาง และมีการแยกกันเพิ่มขึ้น (progressive segregation) ของยีนที่มีผลต่อประสิทธิภาพของ ระบบสืบพันธุ์ ในลูกแต่ละรุ่นที่ถัดไป

เมื่อพิจารณาถึงลักษณะการเจริญเติบโตของโคลูกผสม ที่เกิดจากน้ำเชื้อพ่อกระทิง และพ่อโคแดงกับ แม่ชีบูแล้ว พบว่า น้ำหนักในระยะเวลาต่างๆ และอัตราการเจริญเติบโตจะค่อนข้างสูง แม้จะเลี้ยงในสภาวะแวดล้อมที่ไม่ สมบูรณ์นัก และพบว่าสูงกว่ามากเมื่อเทียบกับโคขาวลำพูน ซึ่งเป็นโคพื้นเมืองของไทยที่มีขนาดใหญ่ และมีอัตราการเจริญเติบโตสูง และมีความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ซึ่งพบว่ามีน้ำหนักแรกเกิดของเพศผู้ และเพศเมียเป็น 18.70 และ 17.57 กก. เท่านั้น ในขณะที่น้ำหนักเมื่อหย่านมก็เป็นเพียง 124.26 และ 115.32 กก. และมีอัตราการเจริญเติบโตเป็น 505.83 และ 465.69 กรัม/วัน ในเพศผู้ และเพศเมีย ตามลำดับ (ฐิริ และ ปรัชญา , 2545) ในขณะที่เมื่อเทียบกับการเจริญเติบโตของโคเนื้อพันธุ์แท้เช่น บราห์มัน หรือลูกผสมของบราห์มัน ซึ่งเป็นโคเนื้อพันธุ์ หลักของประเทศไทย (สมมาตร และคณะ, 2541) พบว่า น้ำหนักแรกเกิด น้ำหนักหย่านม และอัตราการเจริญเติบโต ใกล้เคียงกับโคลูกผสมที่เกิดจากพ่อกระทิงและแม่ชีบู ในขณะที่ในโคลูกผสมพันธุ์บุนทรบุรี ซึ่งเป็นโคลูกผสมพันธุ์ ใหม่ของกรมปศุสัตว์ ที่สร้างขึ้นจากพ่อพันธุ์ซิมเมนทอล และแม่บราห์มัน ด้วยจุดประสงค์เพื่อให้ได้โคพันธุ์ใหม่ ที่ให้ผลผลิตดีทั้งเนื้อ และนม ซึ่งพบว่ามีน้ำหนักแรกเกิดสูงกว่าทั้งในโคลูกผสมที่เกิดจากพ่อกระทิง และพ่อโคแดง ในขณะที่น้ำหนักเมื่อหย่านมจะสูงกว่าโคลูกผสมที่เกิดจากพ่อโคแดงเล็กน้อย แต่ต่ำกว่าโคลูกผสมที่เกิดจากพ่อกระทิง ส่วนน้ำหนักที่อายุ 18 เดือน จะต่ำกว่าทั้งในโคลูกผสมที่เกิดจากพ่อกระทิง และ พ่อโคแดง (รติศักดิ์ และ ชีรชัย, 2545) แสดงว่าโคลูกผสมระหว่างพ่อกระทิง และพ่อโคแดง กับแม่ชีบู สามารถปรับตัวให้เหมาะกับสภาพแวดล้อมใน ประเทศไทย และการเลี้ยงดูให้อาหารที่ไม่สมบูรณ์นักได้ดีกว่า ทำให้มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่า แม้น้ำหนักในช่วงแรก จะต่ำกว่าก็ตาม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการเจริญเติบโตของโคลูกผสมระหว่างพ่อกระทิงของมาเลเซีย กับโคชีบู ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตที่น้ำพอกใจเช่นเดียวกัน (Bongso และคณะ, 1988) ดังนั้น การผสมข้ามพันธุ์โดยใช้น้ำเชื้อ

ของพ่อกระทิง และพ่อโคแดง ด้วยวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงพันธุ์โคเนื้อ เพื่อให้มีโครงร่างใหญ่ขึ้น อัตราการเจริญเติบโตสูง และมีความทนทานต่อโรคและสภาวะแวดล้อมได้มากขึ้น จึงอาจเป็นทางเลือกอย่างหนึ่งในการสร้างโคเนื้อสายพันธุ์ใหม่เพื่อให้ได้ลูกผสมที่มีคุณสมบัติเด่นของพ่อและแม่มารวมกัน (heterosis) โดยโคลูกผสมที่ได้มีน้ำหนักในระยะเวลาต่างๆ และอัตราการเจริญเติบโตเป็นที่น่าพอใจ และยังมีคุณสมบัติเด่นของความทนทานต่อโรคและสิ่งแวดล้อมที่ได้จากพันธุกรรมของพ่อโคป่าด้วย

เนื่องจากโคลูกผสมเพศผู้ (F1) อาจเป็นหมัน เนื่องจากไม่สามารถผลิตสเปิร์มได้ จึงสามารถใช้ประโยชน์เพื่อการบริโภค และการใช้แรงงานเท่านั้น ดังนั้นถ้าลูก F1 มีขนาดโครงร่างที่ใหญ่ก็จะเป็นประโยชน์ทางเศรษฐกิจอย่างมาก และในแง่ของการใช้แรงงาน F1 จะมีสายเลือดของโคป่าลดลง จึงมีความแข็งแรงมากขึ้นและควบคุมได้ง่ายขึ้นเนื่องจากพันธุกรรมที่ได้รับจากโคเลี้ยง ทั้งยังมีรูปร่างใหญ่เหมาะกับการใช้แรงงานด้วย

สำหรับในโคลูกผสมเพศเมีย ก็สามารถใช้ประโยชน์ในการผสมพันธุ์ และปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้ โดยวิธี backcross กับพันธุ์หลักเพื่อสร้างลูกในรุ่นต่อไป และเพื่อให้ได้คุณสมบัติของ heterosis ที่สูงสุด (maximal heterosis)

## สรุป

การผสมข้ามพันธุ์ระหว่างโคป่า (พ่อกระทิง และพ่อโคแดง) กับโคชีบู ให้ลูกผสมที่มีจำนวนโครโมโซม (2n) เท่ากับที่ได้รับถ่ายทอดจากพ่อและแม่ตามปกติสำหรับลูกผสมที่เกิดจากพ่อกระทิง โดยมีจำนวนโครโมโซมเป็น  $2n=58$  แต่ในลูกผสมที่เกิดจากพ่อโคแดง แม่พ่อและแม่จะมีจำนวนโครโมโซมเท่ากัน แต่ลูกผสมที่เกิดขึ้นมีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกันเป็น 2 แบบ คือ  $2n=59$  และ  $2n=58$  เนื่องจากการเกิด Robertsonian translocation ของโครโมโซม 1 คู่ และ 2 คู่ ทำให้จำนวนโครโมโซม (2n) ลดลง 1 ตัว และ 2 ตัวตามลำดับ โดยโคลูกผสมเพศเมียทั้งหมดทั้งที่เกิดจากพ่อกระทิง และพ่อโคแดง สามารถให้ลูกได้จากการผสมธรรมชาติ ในขณะที่ลูกผสมเพศผู้ อาจเป็นหมัน อย่างไรก็ตามโคทั้งหมดมีลักษณะการเจริญเติบโตที่น่าพอใจ แม้จะเลี้ยงในภาวะที่ไม่สมบูรณ์

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ น.สพ. วิบูรณ์ ตูลารักษา ที่ช่วยในการเก็บตัวอย่างเลือด และ คุณสุรพงษ์ จันทา และ คุณอัจฉราวรรณ น้อยกล้า ที่ช่วยปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการตลอดระยะเวลาของการศึกษา



## เอกสารอ้างอิง

- ภู่รี วีระสมิทธิ์ และ ปรัชญา สัตวราญจน์ 2002 (2545). การเจริญเติบโตในระยะก่อนหย่านมของลูกโคขาวลำพูน. ผลงานวิจัยการปศุสัตว์ สาขาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ และการจัดการฟาร์ม ประจำปี พ.ศ. 2545 กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 11-18.
- ยันต์ สุขวงศ์ สุเมธ กมลนรรณธ ชัยณรงค์ โลหจิต มาลี อภิเมธารัง วิบูลย์ เขียววิศวรร และ Barbara Wolfe 1999 (2542). เสนอเป็นโปสเตอร์ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สาขาสัตวแพทยศาสตร์) ครั้งที่ 37 3-5 กุมภาพันธ์ 2542.
- รติศักดิ์ แซ่ลี้ และ ชีรชัย ช่อไม้ 2002 (2545). สมการทำนายน้ำหนักตัวโลกบินทร์บุรี ชั่วโมงที่ 1 ระยะแรกเกิดถึง 1 ปี. ผลงานวิจัยการปศุสัตว์ สาขาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ และการจัดการฟาร์ม ประจำปี พ.ศ. 2545 กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 1-10
- สมมาตร สุวรรณมาโจ จรรยา ลีรัตนชัย และสุวิษ บุญโปร่ง 1998 (2541). การปรับปรุงพันธุ์โคบราห์มันในหน่วยงานของกรมปศุสัตว์. รายงานผลงานวิจัย งานค้นคว้าและวิจัยการผลิตปศุสัตว์ประจำปี 2541 สาขาปรับปรุงพันธุ์สัตว์ และการจัดการฟาร์ม กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
- Amrud J. 1969. Centric fusion of chromosomes in Norwegian red cattle (NRF). *Hereditas* 62: 293 - 302.
- Bongso T.A., Hilmi M., Sopian M. and Zulkili S. 1988. Chromosomes of Gaur cross domestic cattle hybrids. *Res. Vet. Sci.* 44: 251-254.
- Forsdyke DR. 2000. Haldane's rule: hybrid sterility affects the heterogametic sex first because sexual differentiation is on the path to species differentiation. *J. Theor. Biol.* 204: 443-452.
- Gallagher D.S., Davis S.K., DeDonato M., Burzlaff J.D., Womack J.E., Taylor J.F. and Kumamoto A.T. 1999. A molecular cytogenetic analysis of the tribe Bovini (Artiodactyla: Bovidae: Bovinae) with an emphasis on autosome morphology and Nor distribution. *Chromosome Res.* 7:481-492.
- Gustavsson, I. 1966. Chromosome abnormality in cattle. *Nature* 211: 865-866.
- Gustavsson, I. 1980. Chromosome aberrations and their influence on the reproductive performance of domestic animals. A review. *Z. Tierz. Zuchtbiol.* 97: 176-195.
- Iannuzzi L., Molteni L., Di Meo G.P., De Giovanni A., Perucatti A., Succi G., Incarnato D., Eggen A. and Cribiu E.P. 2001. A case of azoospermia in a bull carrying a y-autosome reciprocal translocation. *Cytogen. Cell Genet.* 95: 225-227.
- Khumnirdpetch V., Chavananikul V., Intaramongkol J. and Wattanadorn S. 1998. Karyotype of crossbred between *Bos javanicus* and *Bos banteng* sires and domestic dams. *Proceedings of the sixth world congress on genetics applied to livestock production.*



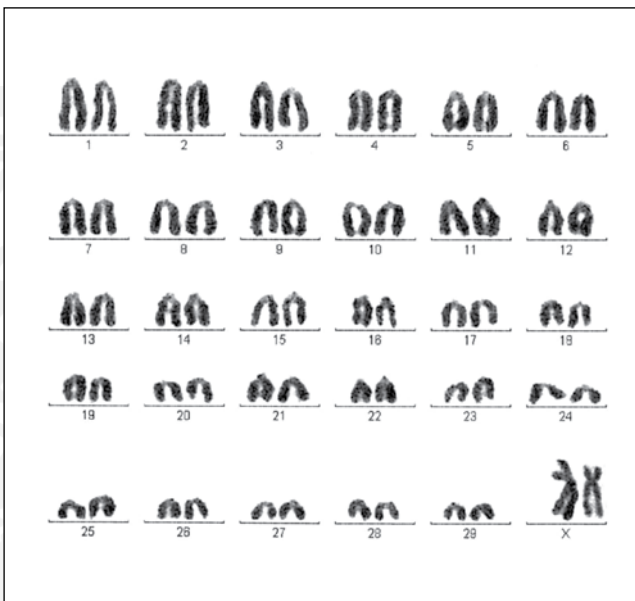
- Arnidale, New South Wales, Australia. January, 11-16. Vol. 25: 311-314.
- Nijman I.J., Otsen M., Verkaar E.L.C., Ruijter C., Hanekamp E., Ochieng J.W., Shamshad S., Rege J.E.O., Hanotte O., Barwegen M.W., Sulawati T. and Lenstra J.A. 2003. Hybridization of banteng (*Bos javanicus*) and Zebu (*Bos indicus*) revealed by mitochondrial DNA, AFLP and microsatellites. *Heredity* 90: 10-16.
- Pathak S. and Kieffer N.M. 1979. Sterility in hybrid cattle. I. Distribution of constitutive heterochromatic and nucleolus organizer regions in somatic and meiotic chromosomes. *Cytogenet. Cell Genet.* 24: 42-52.
- Plachot M. and Popescu C.P. 1991. Les anomalies chromosomiques et geniques. Leurs consequences sur le developpement et la reproduction. In: Thibault, E.C. and Levasseur, M.C. (eds) *Reproduction chez les Mammiferes*. Ellipses, Paris, pp. 687-712.
- Popescu C.P. 1977a. Les anomalies chromosomiques des bovines (*Bos Taurus* L. ). Etat actuel des Connaissances. *Ann. Genet. Sel. Anim.* 9: 463-470.
- Popescu C.P. 1977b. A new type of Robertsonian translocation in cattle. *J. Hered.* 68: 139-142.
- Popescu C.P. and Pech A. 1991. Une bibliographie sur la translocation 1/29 de bovins dans le monde (1964-1990). *Annales de Zootechnie* 40: 271-305.
- Potter W.L. and Upton P.C. 1979. Y chromosome morphology of cattle. *Australian Vet. J.* 55: 539 - 541.
- Potter W.L., Upton P.C., Cooper J. and Blackshaw A.W. 1979. C- and G- band patterns and chromosomal morphology of some breed of Australian cattle. *Australian Vet. J.* 55: 560 - 567.
- Riggs P.K., Owens K.E., Rexroad C.E., Amaral M.E.J. and Womack J.E. 1997. Development and Initial characterization of a *Bos taurus* X *B. gaurus* interspecific hybrid backcross panel. *The Journal of Heredity* 88: 373-379.
- Steklenev E.P. and Elistratova T.M. 1992. The characteristics of reproductive capacity of hybrids of banteng (*Bos (Bibos) javanicus* d' Alton) with the domestic cow (*Bos (Bibos) primigenius taurus*). *Tsitol. Genet.* 26: 45-57. (in Russian).
- Winter H., Kalat M., Mayr B., Dworak E. and Schleger W. 1988. Mithun cross siri hybrids: cyto and immunogenetic examinations and characterization of abnormal spermatogenesis. *Res. Vet. Sci.* 45: 86-100.
- Zhang R.C. 2000. Interspecies hybridization between yak, *Bos taurus* and *Bos indicus* reproduction of the hybrids. In: *Recent advance in yak production*, Zhao, X.X. and Zhang, R.C. (Eds.). International Veterinary Information Service, Ithaca NY. 1-4.

**ตาราง 1** คาริโอไทป์ของ แม่โคชีนุ และ โคลูกผสมที่เกิดจากน้ำเชื้อของพ่อกระทิง และพ่อโคแดง กับ แม่โคชีนุ

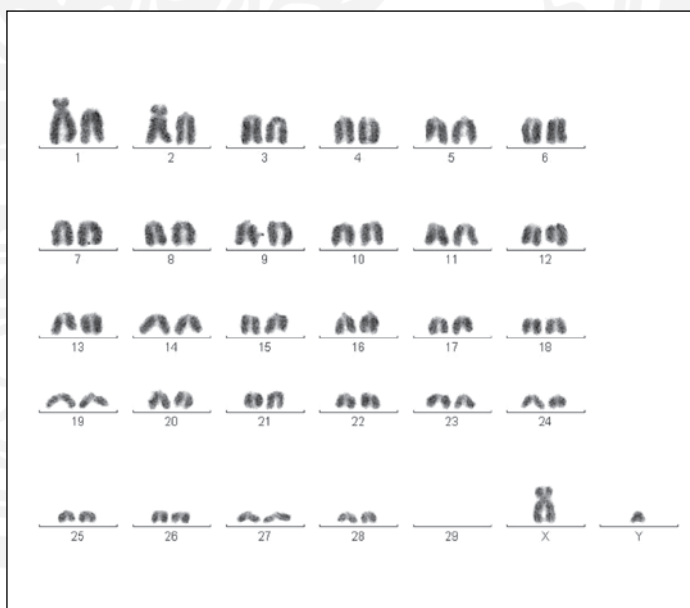
|                                                                     | จำนวนโครโมโซม<br>(2n) | จำนวนและรูปแบบของโครโมโซมร่างกาย |              | รูปแบบของโครโมโซมเพศ                                           |                                    |
|---------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------------------|--------------|----------------------------------------------------------------|------------------------------------|
|                                                                     |                       | ซั่มเมตาเซนตริก                  | อะโครเซนตริก | เพศผู้                                                         | เพศเมีย                            |
| - แม่โคชีนุ                                                         | 60                    | -                                | 58           | -                                                              | - ซั่มเมตาเซนตริก<br>ตัวใหญ่ 2 ตัว |
| - โคลูกผสมที่เกิด<br>จากน้ำเชื้อพ่อ<br>กระทิงและแม่ชีนุ<br>(12 ตัว) | 58                    | 2                                | 54           | - ซั่มเมตาเซนตริก ตัวใหญ่ 1 ตัว<br>- เมตาเซนตริก ตัวเล็ก 1 ตัว | - ซั่มเมตาเซนตริก<br>ตัวใหญ่ 2 ตัว |
| - โคลูกผสมที่เกิด<br>จากน้ำเชื้อพ่อโค<br>แดงและแม่ชีนุ              |                       |                                  |              |                                                                |                                    |
| - กลุ่มที่ 1<br>(6 ตัว)                                             | 59                    | 1                                | 56           | - ซั่มเมตาเซนตริก ตัวใหญ่ 1 ตัว<br>- เมตาเซนตริก ตัวเล็ก 1 ตัว | - ซั่มเมตาเซนตริก<br>ตัวใหญ่ 2 ตัว |
| - กลุ่มที่ 2<br>(2 ตัว)                                             | 58                    | 2                                | 54           | - ซั่มเมตาเซนตริก ตัวใหญ่ 1 ตัว<br>- เมตาเซนตริก ตัวเล็ก 1 ตัว | - ซั่มเมตาเซนตริก<br>ตัวใหญ่ 2 ตัว |

ตาราง 2 การเจริญเติบโตของโคลูกผสมที่เกิดจากน้ำเชื้อของพ่อกระทิง และพ่อโคแดง กับแม่จีนู

| ชนิดน้ำเชื้อ                                           | จำนวน<br>(ตัว) | นน.แรกเกิด (กก.)<br>(X±SD) | นน.หย่านม (กก.)<br>(X±SD) | นน.เมื่ออายุ 18 เดือน<br>(กก.) (X±SD) | อัตราการเจริญเติบโต<br>ต่อวันตั้งแต่แรกเกิด<br>ถึงหย่านม (กรัม/วัน)<br>(X±SD) | อัตราการเจริญเติบโต<br>ต่อวันตั้งแต่หลังหย่านม<br>ถึงอายุ 18 เดือน<br>(กรัม/วัน) (X±SD) |
|--------------------------------------------------------|----------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| น้ำเชื้อพ่อกระทิง<br>- ลูกผสมตัวผู้<br>- ลูกผสมตัวเมีย | 6              | 28.67±4.52                 | 172.50±11.88              | 320.50±24.95                          | 719.17±42.12                                                                  | 435±52.68                                                                               |
|                                                        | 3              | 25.33±6.11                 | 178.77±16.39              | 329.33±37.21                          | 767.00±85.54                                                                  | 442.33±85.92                                                                            |
| น้ำเชื้อพ่อโคแดง<br>- ลูกผสมตัวผู้<br>- ลูกผสมตัวเมีย  | 3              | 20.33±0.58                 | 144.33±29.77              | 283.33±17.04                          | 620.00±147.56                                                                 | 408.33±55.72                                                                            |
|                                                        | 3              | 22.33±4.16                 | 148.87±12.99              | 284.00±17.78                          | 632.67±65.16                                                                  | 397.00±14.53                                                                            |

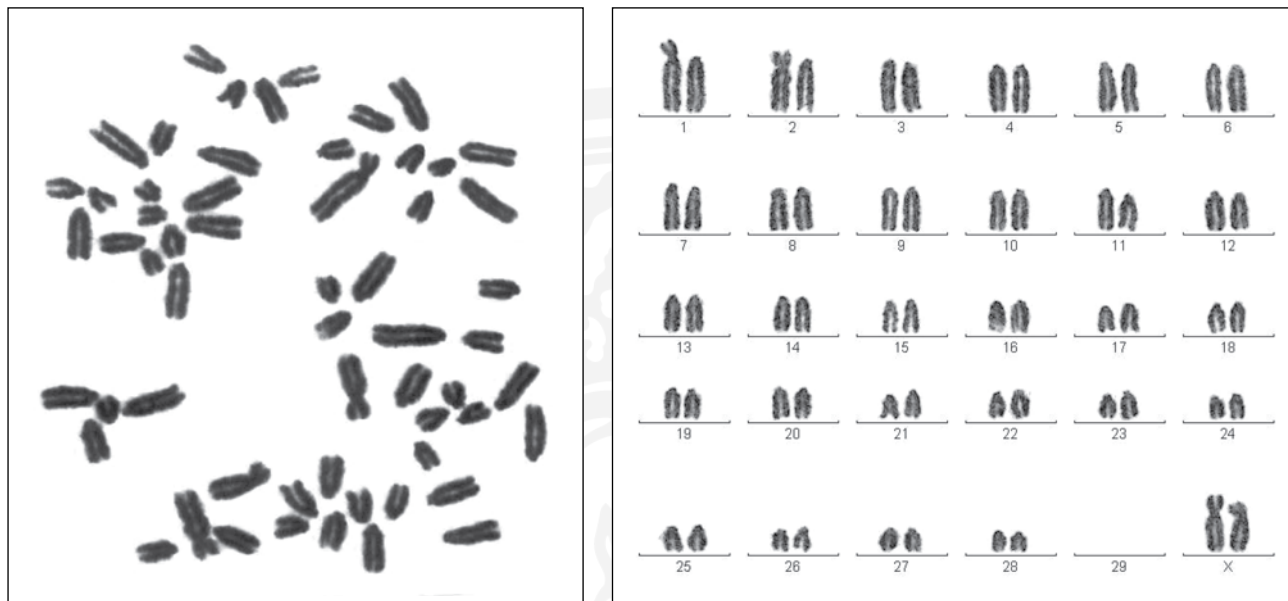


**รูป 1** คาริโอไทป์ของแม่โคชีนุ

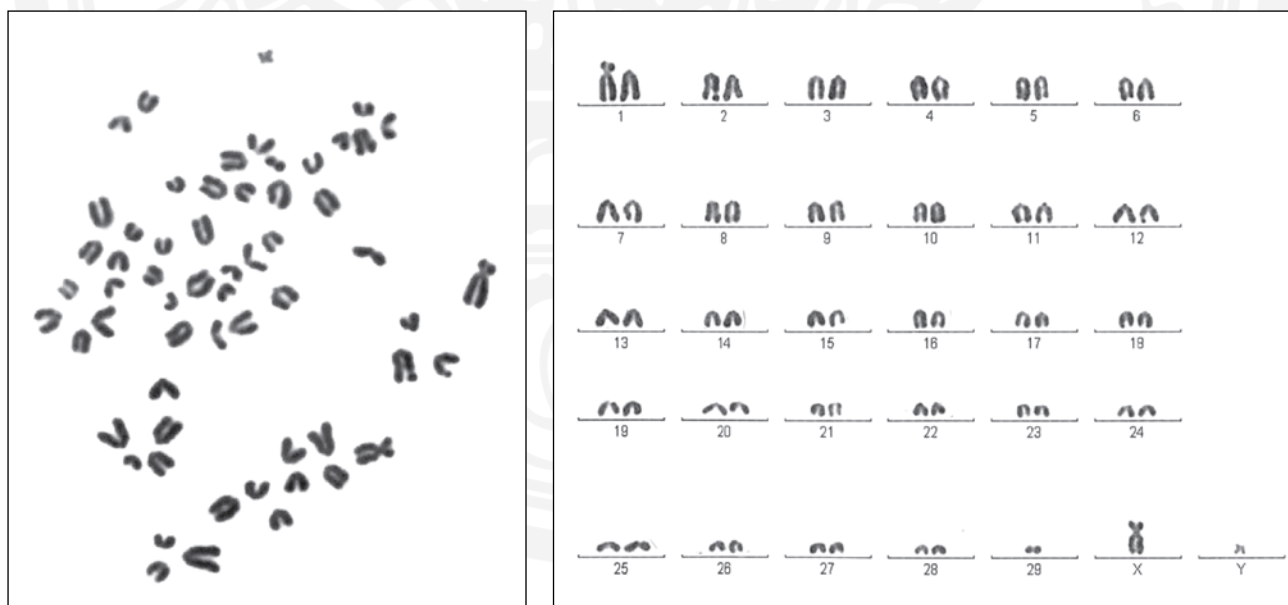


**รูป 2** คาริโอไทป์ของโคลูกผสมเพศผู้ที่เกิดจากพ่อกระทิง และแม่ชีนุ

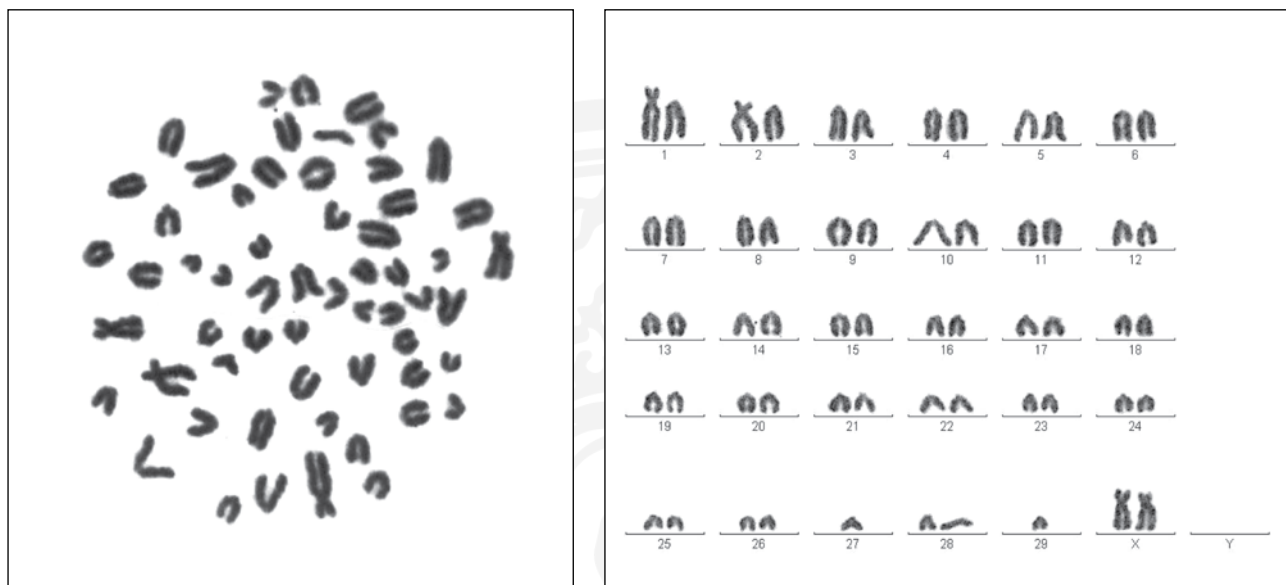




รูป 3 คาร์ิโอไทป์ของโคลูกผสมเพศเมียที่เกิดจากพ่อกระทิง และแม่ชีนุ



รูป 4 คาร์ิโอไทป์ของโคลูกผสมที่เกิดจากพ่อโคแดง และแม่ชีนุ :- กลุ่มที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น  $2n=59$



รูป 5 คาร์ิโอไทป์ของโคลูกผสมที่เกิดจากพ่อโคแดง และแม่ชีบู :- กลุ่มที่มีจำนวนโครโมโซมเป็น  $2n=58$

## Karyotype of a Thai Gaur Sire of Khao Kheow Open Zoo

Nussara Vadhanakul<sup>1\*</sup> Montakarn Tansatit<sup>2</sup> Wanchai Tunwattana<sup>3</sup>

### Abstract

Cytogenetic study of a Thai gaur sire of Khao Kheow Open Zoo was performed in order to identify the karyotype of Thai gaur. Chromosomal aberration of the sire was also examined to ensure that the semen collected for genetic conservation program possessed normal chromosomes. The results revealed that the diploid chromosome number (2n) of the Thai gaur sire was 56. Two pairs of submetacentric autosomes of different size and 25 pairs of acrocentric autosomes were found whereas sex chromosomes were submetacentric (X) and metacentric (Y). A comparison between GTG-banded karyotype of Thai gaur with domestic cattle standard showed that the 2 pairs of submetacentric autosomes of Thai gaur occurred from centric fusion of 1;29 and 2;28 acrocentric autosomes, respectively. No other chromosomal aberration was found. It is shown that the Thai gaur sire of Khao Kheow Open Zoo possesses normal karyotype which can be genetically conserved for future use in increasing the population of Thai gaur in the country as well as breeding improvement of domestic cattle.

**Key words:** Thai gaur *Bos gaurus* karyotype GTG-banding

<sup>1</sup> Bureau of Biotechnology for Animal Production, Department of Livestock Development, Patumthani.

<sup>2</sup> Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok.

<sup>3</sup> Khao Kheow Open Zoo, Choburi.

\* Corresponding person Tel. 02-5012115 Fax 02-5012115 E-mail: vnussara@hotmail.com

## การไอโทปีของพ่อกะทิ้งไทยของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว

นุสสรา วัฒนกุล<sup>1\*</sup> มนต์กานต์ ตันสถิตย์<sup>2</sup> วันชัย ตันวัฒนะ<sup>3</sup>

### บทคัดย่อ

ศึกษาการไอโทปีของพ่อกะทิ้งไทยของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จำนวน 1 ตัว เพื่อให้ทราบถึงรูปแบบของโครโมโซมของพ่อกะทิ้งไทย และเพื่อตรวจความผิดปกติของโครโมโซมของพ่อกะทิ้งด้วย เพื่อให้มั่นใจว่าน้ำเชื้อของพ่อกะทิ้งไทยดังกล่าวที่ทำการผลิตไว้ในการศึกษาครั้งก่อนของโครงการอนุรักษ์พันธุ์โคป่า ไม่มีความผิดปกติของโครโมโซมที่จะถ่ายทอดไปทางพันธุกรรมได้ ผลการศึกษาพบว่าพ่อกะทิ้งไทยมีจำนวนโครโมโซม (2n) เป็น 56 โดยมีโครโมโซมร่างกายชนิดซับเมตาเซนตริก จำนวน 2 คู่ ซึ่งมีขนาดแตกต่างกัน และเป็นชนิดอะโครเซนตริก จำนวน 25 คู่ ในขณะที่โครโมโซมเพศเป็นชนิดซับเมตาเซนตริก (X) และ เมตาเซนตริก (Y) จากการศึกษาการไอโทปีของพ่อกะทิ้งไทยโดยการย้อมด้วยเอนไซม์ และย้อมให้เกิดแถบสีโดยวิธี GTG-banding เปรียบเทียบกับรูปแบบมาตรฐานของโคเลี้ยงที่ย้อมด้วยวิธีเดียวกันพบว่า โครโมโซมร่างกายชนิดซับเมตาเซนตริก จำนวน 2 คู่ ของกะทิ้งไทย เกิดจากการเชื่อมกันบริเวณเซนโตรเมียร์ของโครโมโซมร่างกายชนิดอะโครเซนตริก คู่ที่ 1;29 และ 2;28 ตามลำดับ และไม่พบความผิดปกติอื่นของโครโมโซม พ่อกะทิ้งไทยของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว พบว่ามีการไอโทปีที่ปกติจึงสามารถจะส่งและเก็บรักษาพันธุกรรมไว้เพื่อใช้ประโยชน์ในการเพิ่มจำนวนของกะทิ้งไทยให้สูงขึ้นและใช้ในการปรับปรุงพันธุ์โคเลี้ยงด้วย

คำสำคัญ: กะทิ้งไทย *Bos gaurus* การไอโทปี GTG-banding

<sup>1</sup> สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ จังหวัดปทุมธานี

<sup>2</sup> คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ

<sup>3</sup> สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี

\* ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 02-5012115, โทรสาร 02-5012115, E-mail: vnussara@hotmail.com



## Introduction

Wild cattle are larger members of the Bovidae family which are descendant to domestic cattle (such as *Bos taurus* and *Bos indicus*). Gaur is one of the highly endangered wild cattle which is native to Southeast Asia and India. Three wild subspecies of gaur are generally recognized:- the Indian gaur (*Bos gaurus gaurus*) found in India, Nepal, Bhutan and Bangladesh; the Indochinese gaur (*Bos gaurus readei* or *Bos gaurus laotiensis*) found in southern China, Vietnam, Laos, Cambodia, Burma and Thailand; the Malayan gaur (*Bos gaurus hubbacki*) found in southern Thailand and Malaysia (Conry, 1981, 1989 ; National Research Council, 1983). The global population of gaur are in decline. Only a few thousand head still exist in tropical forests and woodlands in India, Indochina and the Malay Peninsula which corresponds to the remaining large forested areas.

In Thailand, the number of Thai gaur in the wild has not been clarified yet but it is believed to be limited. This leads to the problem of inbreeding and lowering heterozygosity as well as genetic diversity which may affect the adaptation of gaur to environment and diseases. Khao Kheow Open Zoo, located in Choburi province, is the only place where Thai gaur are conserved with very limited number ( 3 males and 1 female ). Due to the difficulty in reproducing, the number of gaur in the zoo has not been increased. Therefore, the genetic conservation program of wild cattle has been established in cooperation with the Department of Livestock Development, Chulalongkorn University and Smithsonian Institute since 1990. Deep frozen semen of a Thai gaur sire of Khao Kheow Open Zoo was produced for the purposes of genetic conservation and increasing population by means of artificial breeding as well as breeding improvement of domestic cattle with superior characters of gaur sire (Sukwong et al., 1999). However, chromosome pattern of that Thai gaur sire has not been identified yet. This is very important as part of the prior selection process which should be the rule rather than the exception because the chromosome pattern of the sire should be identified before the process of genetic conservation and further breeding in order to determine any chromosomal aberrations which can be inherited to later generation. Moreover, the karyotype of gaur subspecies which inhabit Thailand (*Bos gaurus readei*) has not been studied. Karyotype of the other 2 subspecies of Indian and Malayan gaur are already reported as  $2n=58$  with 2 submetacentric and 54 acrocentric autosomes (Wurster and Benirschke, 1968; Gallagher and Womack, 1992) and  $2n=56$  with 4 submetacentric and 50 acrocentric autosomes (Bongso et al., 1988), respectively.

The objective of this study was to identify the karyotype of a Thai gaur sire conserved in Khao Kheow Open Zoo which is representative of Thai gaur subspecies (*Bos gaurus readei*). Chromosomal abnormalities of the sire were also identified to ensure that the produced semen possessed normal karyotype of gametes suitable for genetic conservation. GTG-band patterns was also studied for more accurate arranging and pairing chromosomes as well as identifying the type of chromosomal aberrations. Cytogenetic comparison with domestic cattle was also performed basing upon banded karyotype in order to know the relationship with domestic cattle.

## Materials and methods

Phenotypic features of a Thai gaur sire of Khao Kheow Open Zoo was observed and photographed. Blood sample was taken by firstly immobilizing the gaur by remote (tele) injection of 3-6 mg. carfentanyl citrate (WildnilR, Wildlife Laboratories Inc., U.S.A.) and 40-100 mg. xylazine hydrochloride (Ilium xylacil-100R, Troy Laboratories Pty. Ltd., Australia), intramuscularly, by using the projector (rifle) and darting equipment. Blood sample was collected aseptically into a heparinized tube and delivered to the cytogenetic laboratory. The sample was cultured in Minimum Essential Media (MEM) (Nissui, Japan) supplemented with 10% calf serum (Gibco, U.S.A.) and phytohaemagglutinin (Gibco, U.S.A.). Incubation in the 37°C incubator was then performed for 72 h. Colcemid solution (Gibco, U.S.A.) was added 1.5 h. prior to harvesting in order to arrest cells in metaphase stage. The medium was then transferred to centrifuge tubes and centrifuged at 1200 rpm. for 5-7 minutes. The sedimented cells were resuspended in hypotonic solution (0.075 M. KCl) for about 20 minutes followed by centrifugation at the same speed. The sedimented cells were then resuspended in 3 changes of fixative solution (methanol: glacial acetic acid = 3:1). The final cell suspension was kept overnight at 4°C. The next day, a few drops of the final concentrated cell suspension were then dropped on the glass slides and air-dried. The cells were stained with 2% Giemsa (stock solution) (Gibco, U.S.A.) for conventional chromosome preparation. GTG (G)-banding technique was also applied using Trypsin 1:250 (Difco, U.S.A.) in order to identify members of each pair with similar gross morphology for the purpose of accurate arrangement of chromosome pairs and identification of chromosomal aberration. The homology between the Thai gaur from Khao Kheow Open Zoo and domestic cattle chromosomes was also studied basing upon banded karyotype. Karyotype of Thai gaur sire was firstly investigated, under the light microscope, from good quality complete metaphases of Giemsa-staining. The arrangement of karyotype and numbering of the chromosome pairs were performed primarily basing upon relative total length of the chromosomes by using manual arrangement and Ikaros automatic karyotyping software (Metasystem), respectively. The arrangement was then confirmed on reference to GTG-banding pattern of the chromosomes and numbering according to the Reading Conference cattle standard (Ford et al., 1980). Submetacentric autosomes were arranged first, followed by acrocentric autosomes in decreasing order of size. Chromosomal aberration was identified from both conventional and GTG-banded preparation. Cytogenetic comparison between the Thai gaur and domestic cattle (*Bos taurus*) chromosomes was studied basing on banded karyotype of the gaur and cattle GTG-band standard (Di Berardino et al., 1990).

## Results

Phenotypic features of Thai gaur sire of Khao Kheow Open Zoo were similar to those of Indian and Malayan gaur. The dark brown coat was short, dense and shiny with large shoulder hump and white stockings. The head was high with a bulging forehead ridge between the horns (Figure 1).

Karyotype of the Thai gaur sire (*Bos gaurus readei*) revealed diploid chromosome number of  $2n=56$ . Two pairs of submetacentric autosomes (each pair distinctly different in size) and 25 pairs of acrocentric autosomes were found. The X chromosome was submetacentric which was smaller in size than the submetacentric autosome. The Y chromosome was the smallest metacentric (Figure 2).

GTG (G)-banded karyotype of the Thai gaur sire is shown in Figure 3. Chromosome arms were numbered according to the Reading Conference cattle standard. A comparison of Thai gaur GTG-banded chromosomes with domestic cattle GTG-band standard revealed that the 2 submetacentric autosomal pairs of Thai gaur were the results of centric fusions (Robertsonian translocation) of 2 sets of acrocentric autosomal pairs. The arms of the first submetacentric autosomal pair was orthologous with cattle 1 and 29 autosomes whereas the second pair corresponded to cattle 2 and 28. Other 25 pairs of acrocentric autosomes and sex chromosomes of the Thai gaur and domestic cattle showed similar banding pattern in each pair.

## Discussion

Thai gaur (*Bos gaurus readei*) had a diploid chromosome number of  $2n=56$  which was the same as that of Malayan gaur (*Bos gaurus hubbacki*) (Bongso et al., 1988) but different from that of Indian gaur (*Bos gaurus gaurus*) which possessed chromosome number of  $2n=58$  (Wurster and Benirschke, 1968; Gallagher and Womack, 1992). Two pairs of submetacentric autosomes of different size were found in Thai and Malayan gaur whereas only a pair of submetacentric autosome was found in Indian gaur. Sex chromosomes were similar in all 3 subspecies and also similar to those of *Bos taurus*. This may indicate that Thai and Malayan gaur are closely related. However, ascertaining generic affinities or phylogenetic relationship of Thai gaur with Malayan and Indian gaur or with other bovids can be performed by means of DNA analysis (Wall et al., 1992; Buntjer, 1997).

The GTG(G)-banding technique, using trypsin treatment, is the most popular method to induce banding pattern along metaphase chromosomes for Giemsa staining (Seabright, 1971). Dark G-bands represent chromosome segments containing DNA rich in adenine-thymine base pairs whereas light G-bands represent those rich in guanine-cytosine pairs. The DNA in centromeric area of all bovid species is GC rich, thus it is unstained with Giemsa banding (Pathak, 1979). The G-band patterns are equivalent to the fluorescent Q-bands which is the first banding technique (Caspersson et al., 1970). However, some exceptions do exist (Pathak, 1979). The G-banding technique facilitates the recognition of chromosomes which helps in more accurate pairing and numbering chromosomes than considering only from the length. Other abnormalities such as fusion and translocation of chromosomes of different pairs can also be identified accurately from the unique band of each pair of chromosomes. Thus, G-band patterns have become the common basis of cytogenetic study. Riggs et al.(1997) reported that the gaur ( $2n=58$ ) was characterized karyotypically by 2;28 Robertsonian translocation with respect to the cattle

karyotype ( $2n=60$ ). This was consistent with an earlier report of Gallagher and Womack (1992) which examined chromosome comparisons between gaur ( $2n=58$ ) and domestic cattle basing upon QFH(Q)-banded karyotype. G-banded karyotype of Thai gaur in this study which had different chromosome diploid number ( $2n=56$ ) from those two reports revealed that the first pair of submetacentric autosomes were from centric fusion of 1 and 29 whereas the second pair were from centric fusion of 2 and 28 compared to G-band standard of domestic cattle. Bongso et al. (1988) reported the same diploid number ( $2n=56$ ) of Malayan gaur as in Thai gaur that also possessed 2 pairs of submetacentric autosomes but the G-banded karyotype was not studied. Therefore, Thai and Malayan gaur possess less chromosome diploid number than that of Indian gaur due to an extra pair of submetacentric autosomes which are from centric fusion of 1;29. The diploid chromosome number ( $2n$ ) of the Bovidae ranges from 30 to 60 based on band similarity but the autosomal arm number is relatively constant at 56-58 for most karyotyped bovids. The constancy in autosomal arm number is indicative of centric fusions (Wurster and Benirschke, 1968). This corresponds to the study of Long (1985) and Berland et al. (1988) which speculated that chromosomal variation in the Bovidae was primarily the result of centric fusion of acrocentric autosomes. Buckland and Evans (1978) suggested that bovid chromosomal evolution had proceeded from a primitive karyotype of 58 acrocentric autosomes ( $2n=60$ ) as seen in domestic cattle, domestic goat and many other bovids. They also agreed that centric fusion played an important role in reducing the ancestral diploid number to the range of values currently seen. Robertsonian fusion is better tolerated among the Bovidae than structural rearrangements such as inversions or alterations in sequence (Toll and Halnan, 1976). Most types of centric fusion reported for dairy cattle involve 1;29 Robertsonian translocation (Berland et al., 1988) which has the main effect on impairing fertility in all studied breeds (Kovac, 1989; Popescu, 1989). The mechanism for fertility reduction is due to the early death of the embryos that results from fertilization with imbalanced gametes, which originate from meiotic nondisjunction of bulls and cows with the 1;29 translocation (Gustavsson, 1969; Popescu, 1980; King et al., 1981). This chromosomal aberration can be transferred to the progeny through breeding. However, in wild bovids such as gaur, centric fusions of acrocentric autosomes is considered normal because the Robertsonian mechanism is indeed the principal karyotype evolutionary mechanism as was suggested by the work of Wurster and Benirschke (1968) and Buckland and Evans (1978).

This study is the first report of the karyotype of Thai gaur. Conventional Giemsa staining and GTG-banding show normal karyotype with no chromosomal aberration. Since Thai gaur is endangered species which are conserved only in Khao Kheow Open Zoo with very limited number, this karyotype study ensures that genetic conservation of that Thai gaur sire can be performed in order to be used for increasing the population of Thai gaur in the country by means of natural breeding, artificial breeding and other advanced technology such as embryo transfer, IVF, cloning, etc. (Johnston and Loskutoff, 1993; Hammer et al., 2001). Superior characters of gaur in having hugh size, hardiness and high resistance to diseases and harsh environment (National Research Council, 1983) can be very much of use for breeding improvement of domestic cattle by means of crossbreeding in order to exploit the advantages of heterosis. The heterosis in terms of growth rates and body weight in hybrids is



tremendous (Bongso et al., 1988; Riggs et al., 1997). Therefore, crossbred progeny obtained can be potentially of use for draught and meat production. However, fertility of F1 offspring born from interspecies hybridization is often restricted to the homogametic sex (Forsdyke, 2000). Male F1 hybrids are sterile and can be used only for draught and meat purposes whereas female F1 can be further used for breeding purpose (Vadhanakul et al., personal comm.).

### Acknowledgements

The authors would like to thank Mr. Surapong Junta and Ms. Acharawan Noiklum for their helpful technical work in the laboratory.

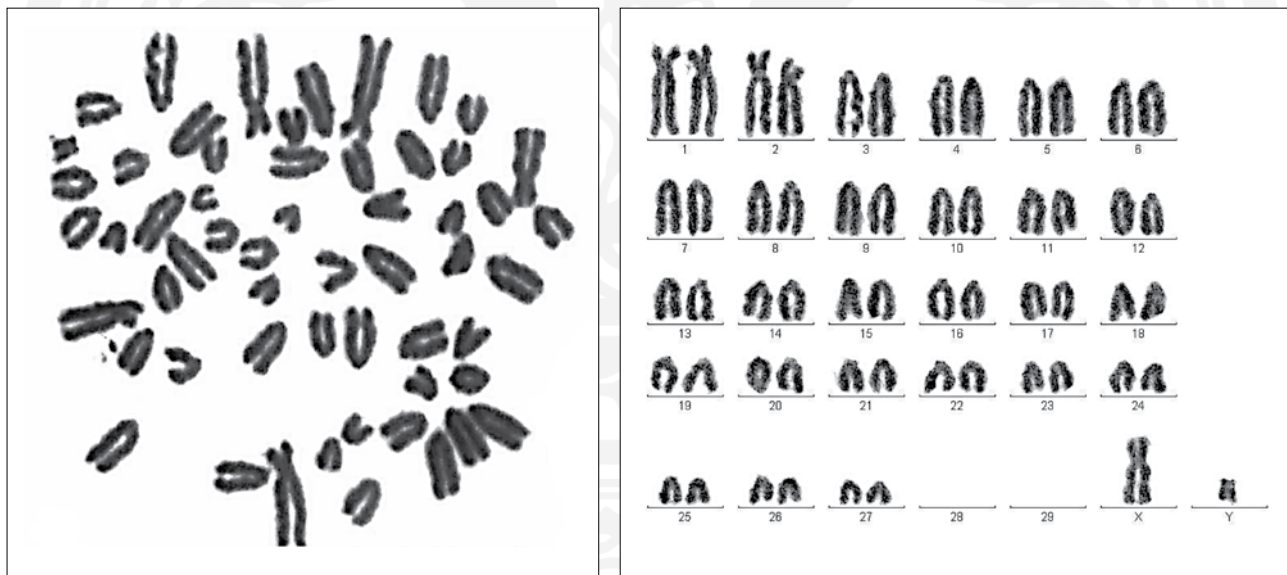
### References

- Berland, M., Sharma, A., Crihiu, E.P., Darre, R., Boscher, J. and Popescu, C.P. 1988. A new case of Robertsonian translocation in cattle. *J. Hered.* 79: 33-36.
- Bongso, T.A., Hilmi, M., Sopian, M. and Zulkili, S. 1988. Chromosomes of Gaur cross domestic cattle hybrids. *Res. Vet. Sci.* 44: 251-254.
- Buckland, R.A. and Evans, A.J. 1978. Cytogenetic aspects of phylogeny in the Bovidae, G-banding. *Cytogenet. and Cell Genet.* 32: 64-71.
- Buntjer, J.B. 1997. DNA repeats in the vertebrate genome as probes in phylogeny and species identification. Academic thesis, Utrecht University. 110 p.
- Casperson, T., Zech, L., Johansson, C. and Modest, E.J. 1970. Identification of human chromosomes by DNA-binding fluorescing agents. *Chromosoma (Berl.)* 30: 215-218.
- Conry, P.J. 1981. Habitat selection and use, movements, and home range of Malaysian gaur (*Bos gaurus hubbacki*) in Central Pahang, Malaysia. MS Thesis, University of Montana, Missoula. 120p.
- Conry, P.J. 1989. Gaur (*Bos gaurus*) and development in Malaysia. *Biological Conservation* 49: 47-65.
- Di Berardino, D., Hayes, H., Fries, R. and Long, S. 1990. International system for Cytogenetic nomenclature of domestis animals. *Cytogenet. and Cell Genet.* 53: 65-79.
- Ford, C.E., Pollock, D.L. and Gustavsson, I. 1980. Proceedings of the first international conference for the standardization of banded karyotypes of domestic animals, University of Reading, Reading, England, 2-6 August 1976. *Hereditas* 92: 145-162.
- Forsdyke, D.R. 2000. Haldane's rule: hybrid sterility affects the heterogametic sex first because sexual differentiation is on the path to species differentiation. *J. Theor. Biol.* 204: 443-452.
- Gallagher, D.S., Jr. and Womack, J.E. 1992. Chromosome conservation in the Bovidae. *J. Hered.* 83: 287-298.

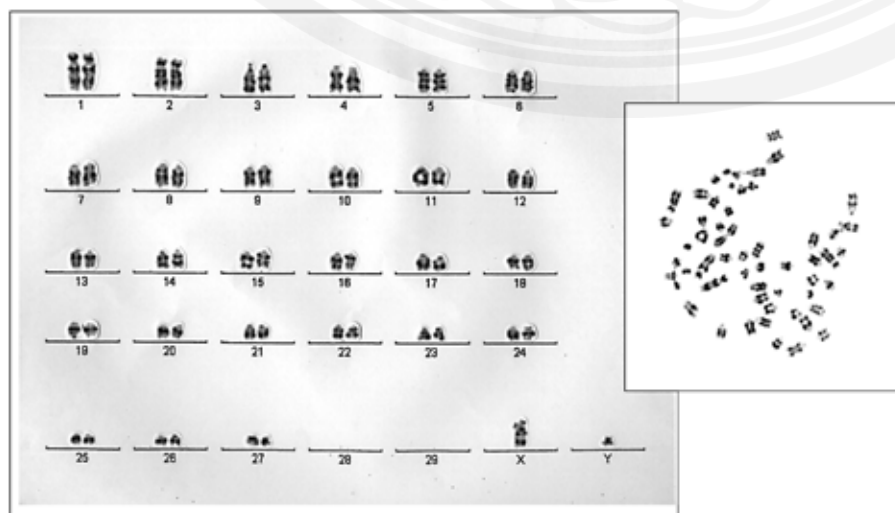
- Gustavsson, I. 1969. Cytogenetics, distribution and phenotypic effects of a translocation in Swedish cattle. *Hereditas* 63: 168-169.
- Hammer, C.J., Tyler, H.D., Loskutoff, N.M., Armstrong, D.L., Funk, D.J., Lindsey, B.R. and Simmons, L.G. 2001. Compromised development of calves (*Bos gaurus*) derived from in vitro-generated embryos and transferred interspecifically into domestic cattle (*Bos taurus*). *Theriogenology* 55: 1447-1455.
- Johnston, L.A. and Loskutoff, N.M. 1993. Embryo technology in domestic cattle and its applications to endangered species conservation. *Annu. Proc. Am. Assoc. Zoo Vet.* p. 270-272.
- King, W.A., Linares, T. and Gustavsson, I. 1981. Cytogenetics of preimplantation embryos sired by bulls heterozygous for the 1/29 translocation. *Hereditas* 94: 219-224.
- Kovacs, A. 1989. Application of cytogenetics to cattle breeding improvement. In: *Cytogenetics of Animals* (Halnan CRE., ed.). Wallingford, UK: CAB International; 221-223.
- Long, S.E. 1985. Centric fusion translocation in cattle. A review. *Vet. Record* 116: 516-518.
- National Research Council (1983). *Little-Known Asian Animals with a Promising Economic Future*. National Academy Press, Washington D.C. 165 p.
- Pathak, M.S. 1979. Cytogenetic research techniques in humans and laboratory animals that can be applied most profitably to livestock. *J. Dairy Science* 62: 836-843.
- Popescu, C.P. 1980. Cytogenetics study on embryos sired by a bull carrier of 1/29 translocation. In: *Proceedings of the 4th European Colloquium on the Cytogenetics of Domestic Animals*, Uppsala, Sweden. 182-186.
- Popescu, C.P. 1989. Le caryotype normal et anormal des principales especes d' animaux de ferme: le boeuf domestique (*Bos taurus*). In: *Cytogenetique des Mammiferes d' Elevage*. Paris: INRA 25-52.
- Riggs, P.K., Owens, K.E., Rexroad, C.E., Amaral, M.E.J. and Womack, J.E. 1997. Development and initial characterization of a *Bos taurus* X *B. gaurus* interspecific hybrid backcross panel. *J. Hered.* 88: 373-379.
- Seabright, M.A. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* II: 971-974.
- Sukwongs, Y., Kamolnorranath, S., Lohachit, C., Apimeteetumrong, M., Yiengvisavakul, V. and Wolfe, B. 1999. Successful cryopreservation of gaur (*Bibos gaurus*) and Banteng (*Bibos javanicus*) spermatozoa and pregnancies after artificial insemination with frozen semen. Poster presentation in 37th Kasetsart University Animal Conference (Veterinary Medicine) 3-5 February 1999.
- Toll, G.L. and Halnan, C.R.E. 1976. The karyotype of the Australian Swamp buffalo (*Bubalus bubalis*). *Can. J. Genet. Cytol.* 18: 101-104.
- Wall, D.A., Davis, S.K. and Read, B.M. 1992. Phylogenetic relationships in the subfamily Bovinae (Mammalia: Artiodactyla) based on ribosomal DNA. *J. Mammal.* 73: 262-275.
- Wurster, D.H. and Benirschke, K. 1968. Chromosome studies in the superfamily Bovidae. *Chromosoma* 25: 152-171.



**Figure 1** Phenotypic features of Thai gaur sire



**Figure 2** Karyotype of Thai gaur sire from conventional Giemsa staining



**Figure 3**  
GTG-banded karyotype  
of Thai gaur sire

**PROGESTERONE PROFILES AND CONCEPTION OF DAIRY CATTLE  
ADMINISTERED WITH GONADOTROPIN RELEASING HORMONE IN LUTEAL  
PHASE POST INSEMINATIONS**

Nussara Vadhanakul <sup>1\*</sup> Arun Chankrachang <sup>1</sup> Wanvipa Suthikrai <sup>2</sup> Kriwon Hongyuntarachai <sup>1</sup>

**ABSTRACT**

Administration of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in luteal phase post insemination was studied in fertile crossbred dairy cattle for the purpose of assessing the effect of gonadotropin releasing hormone on endogenous concentration of progesterone and the potential impact on conception. Ninety-two crossbred dairy cattle were randomly divided into two groups (control and treatment groups) and inseminated when they were in estrus. Only the treatment group was administered with 10 µg. of GnRH on day 12 post insemination. Serum of both groups were collected and analyzed for progesterone concentration by means of radioimmunoassay on day 0, 12, 18 and 25 post inseminations. All hormonal data and conception rate of both groups were statistically analyzed. The results showed that GnRH administered 12 days post insemination significantly increased serum progesterone on D18 post insemination ( $P<0.05$ ). However, the conception rates obtained were not significantly different between control and treatment groups.

**Key words :** gonadotropin releasing hormone, luteal phase, post insemination,  
progesterone, conception, dairy cattle

---

1. Bureau of Biotechnology for Animal Production, Department of Livestock Development

2. Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University

\* Corresponding author / E-mail address: vnussara@gmail.com



## ระดับสอร์โมนโปรเจสเทอโรนและการผสมติดในโคนมที่ได้รับสอร์โมน โกนาโดโทรปินรีลีซซิงในระยะลูเตียลหลังการผสมเทียม

นุสสร วัฒนกุล<sup>1\*</sup> อรุณ จันทรกระจ่าง<sup>1</sup> วรรณวิภา สุทธิไกร<sup>2</sup> ไกรวรรณ หงษ์ยันตรชัย<sup>1</sup>

### บทคัดย่อ

ศึกษาการให้สอร์โมนโกนาโดโทรปินรีลีซซิง ในระยะลูเตียล หลังการผสมเทียมในโคนมที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ปกติ เพื่อให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงของระดับสอร์โมนโปรเจสเทอโรนในระยะต่างๆ หลังการผสมเทียม และผลต่อการผสมติด โดยศึกษาในโคนมลูกผสมจำนวน 92 ตัวที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ปกติ สุ่มตัวอย่างเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง โคทั้งหมดได้รับการผสมเทียมเมื่อแสดงอาการเป็นสัด ในขณะที่โคกลุ่มทดลองได้รับการฉีดสอร์โมนโกนาโดโทรปินรีลีซซิงจำนวน 10 ไมโครกรัม เข้ากล้ามเนื้อ ในวันที่ 12 หลังการผสมเทียม เก็บซีรัมจากโคทั้ง 2 กลุ่ม ในวันที่ 0, 12, 18 และ 25 หลังผสมเทียมเพื่อตรวจวิเคราะห์หาระดับของสอร์โมนโปรเจสเทอโรนในซีรัมโดยเทคนิคเรดิโออิมมูโนแอสเสย์ ตรวจการตั้งท้องโดยการล้วงคลำผ่านทางทวารหนักในวันที่ 60 หลังการผสมเทียม เปรียบเทียบระดับของสอร์โมนโปรเจสเทอโรนในวันต่างๆ และอัตราการผสมติดระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยวิธีการทางสถิติ ผลการศึกษาพบว่า การให้สอร์โมนโกนาโดโทรปินรีลีซซิง ในวันที่ 12 หลังการผสมเทียม จะเพิ่มระดับของสอร์โมนโปรเจสเทอโรนในวันที่ 18 หลังการผสมเทียมอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) ในขณะที่อัตราการผสมติดระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

**คำสำคัญ :** สอร์โมนโกนาโดโทรปินรีลีซซิง, ระยะลูเตียล, หลังการผสมเทียม, โปรเจสเทอโรน, การผสมติด, โคนม

1. สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์
2. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

\*ผู้เขียนผู้รับผิดชอบ/ อีเมล: vnussara@gmail.com

## INTRODUCTION

Early embryonic mortality is one of a major economic loss to dairy producers. Approximately 25% of bovine embryos are lost in the first 3 weeks of life (Peters, 1996) of which the greatest proportion seems to occur between 14 & 17 days after ovulation (Sreenan et al., 2000). A major contributing factor of early embryonic death in cattle is believed to be due to low progesterone production by the corpus luteum. Embryo development is related to concentrations of progesterone and the ability of the conceptus to secrete the antiluteolytic hormone, interferon- $\tau$  (Mann et al., 1999). More exposure to progesterone by the embryo may increase its chance of secreting interferon- $\tau$  and thus survive (Thatcher et al., 2001). By manipulating post-insemination concentrations of progesterone, conception rates may ultimately improve.

One avenue being pursued to increase progesterone concentration after insemination is the application of luteotropic hormones such as GnRH at various time after insemination in order to provide additional luteotropic stimuli to the corpus luteum or to interfere indirectly with luteolytic mechanisms. The mechanism involved derives from the physiological effect of GnRH in stimulating the release of LH and FSH from the anterior pituitary gland which results in inducing ovulation of dominant follicle at mid cycle, thereby possibly reducing estradiol secretion of ovarian follicles (Thatcher et al., 1989 ; Rettmer et al., 1992) as well as obtaining accessory corpus luteum formation. Lack of estradiol late in the estrous cycle probably prevents the changes in uterine receptor concentrations of oxytocin that are prerequisite for luteolysis (Hughes et al., 1987) which increases the chances for embryo to establish maternal recognition of pregnancy before a new wave of estrogen - secreting follicles develops and initiates luteolysis.

The stage at which GnRH is given in luteal phase has been varied between days 1 and 3, 4 and 6, 7 and 10, 11 and 13 after insemination with variable results. The remarkable improvement in pregnancy rate was found mostly in the treatment between days 11 and 13 after insemination (Macmillan et al., 1986 ; Sheldon and Dobson, 1993 ; Drew and Peters, 1994 ; Peters et al., 2000). This might be due to the reason that it coincides approximately with maternal recognition of pregnancy as characterized by the embryonic secretion of the antiluteolytic factor interferon- $\tau$  (Thatcher et al., 1996). However, the action of GnRH also depends on follicular status at the time of treatment. Cows with 3- wave cycles, the GnRH treatment between days 11 and 14 coincides with the rise or peak of the second follicular wave (Webb et al., 1992) and therefore high estradiol concentrations whereas estradiol concentrations are likely to be lower in two-wave animals at this time. This could be one possible reason for differences in study results.

In Thailand, most studies were performed in limited number of dairy cattle of different status by using different days of GnRH administration and variable results were obtained (Pilachai et al., 2004; Sumransap et al., 2006). In this study, higher number of fertile dairy cattle raised under field condition of small-scale farms in

Thailand were studied in order to obtain more accurate results in assessing the effectiveness of gonadotropin releasing hormone (GnRH) administrating during luteal phase on endogenous concentration of progesterone and the potential impact on conception of fertile dairy cattle in the field condition of Thailand in order to understand progesterone profiles in different stages after GnRH treatment in fertile dairy cattle which will be very much useful for further application in improving reproductive performance of dairy cattle in Thailand.

## MATERIALS & METHODS

Ninety-two fertile crossbred dairy cattle (>87.5% Holstein-Fresian crossbred), 3-6 years of age, good body condition score with regular estrous cycle and normal reproductive organs from rectal examination, were randomly selected for the study. They were all raised under similar condition of small scale farms in Saraburi Province with fair nutrition and management. They were then randomly allocated in two groups (control and treatment group). Both groups were inseminated when they were in estrus. Ten µg. of gonadotropin releasing hormone (Buserelin/ ReceptalR; Intervet Company) was then intramuscularly injected on day 12 post insemination only in treatment group. Blood samples were collected via coccygeal venipuncture in both groups on day 0 (day of estrus), day 12, day 18 and day 25 post insemination. Serum was separated and stored at -20oC until assayed for progesterone. Concentrations of progesterone in serum were determined by radioimmunoassay (RIA). Sensitivity of the assay was 0.05 ng./ml. Percentages of coefficient of variation (%CV) of intra-assay from three levels of control pools were 5.5, 6.7 and 10.9% whereas those of inter-assay were 16.0, 10.2 and 15.5 %. Pregnancy was verified by rectal palpation of uterus on day 60 after the insemination. All hormonal data were analyzed by means of general linear model whereas conception rates were compared by chi-square analysis and the categorical data procedures in order to determine the significant treatment effect. Ages of experimented animals in both groups were also adjusted using GLM procedures in order to reduce the error effect from different ages. The accuracy of pregnancy and non-pregnancy diagnosis by means of progesterone determination on day 25 post insemination were also studied by comparing with the results obtained from uterine palpation on day 60.

## RESULTS

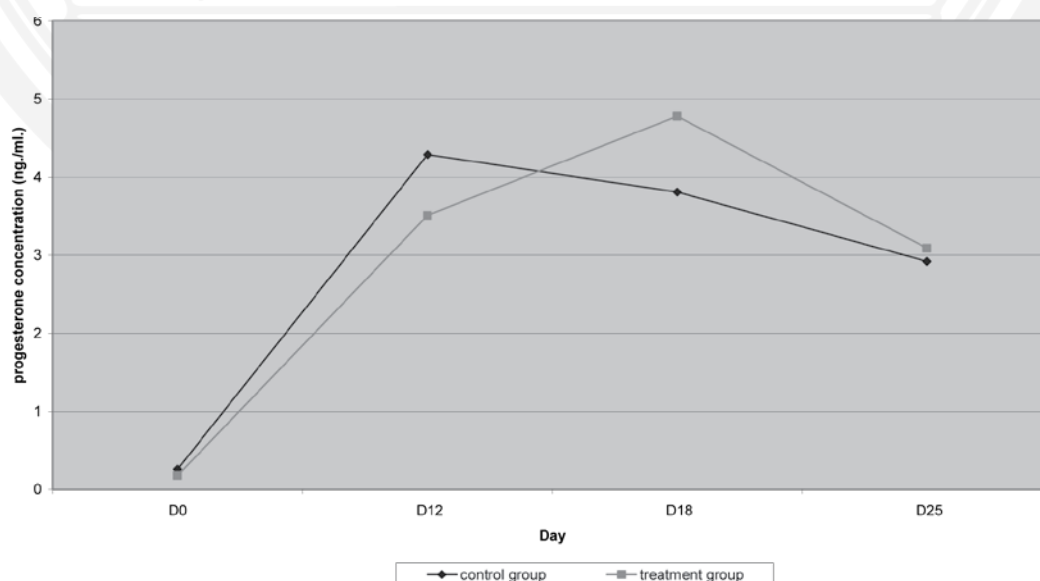
**Table 1** Serum concentration of progesterone on day 0, day12, day18 and day 25 post insemination in control and treatment groups

| Day | Progesterone concentration<br>(mean $\pm$ SE) ng./ml |                          |
|-----|------------------------------------------------------|--------------------------|
|     | Control group                                        | Treatment group          |
| 0   | 0.26 + 0.05                                          | 0.18 + 0.05              |
| 12  | 4.29 + 0.34                                          | 3.51 + 0.35 <sup>a</sup> |
| 18  | 3.81 + 0.66                                          | 4.78 + 0.69 <sup>b</sup> |
| 25  | 2.92 + 0.41                                          | 3.09 + 0.40              |

a,b Figures within the same column with different superscripts differ significantly ( $P < 0.05$ ).

Comparison of serum progesterone concentration on each day between control and treatment group showed no significant difference ( $P > 0.05$ ) whereas progesterone concentration on day 18 of treatment group was significantly higher than that of day 12 ( $P < 0.05$ ).

**Figure 1** Progesterone profile in various days of control and treatment groups



When conception of the animals was considered, regardless of the treatment methods, serum concentration of progesterone between conceived and non-conceived groups were compared (Table 2).



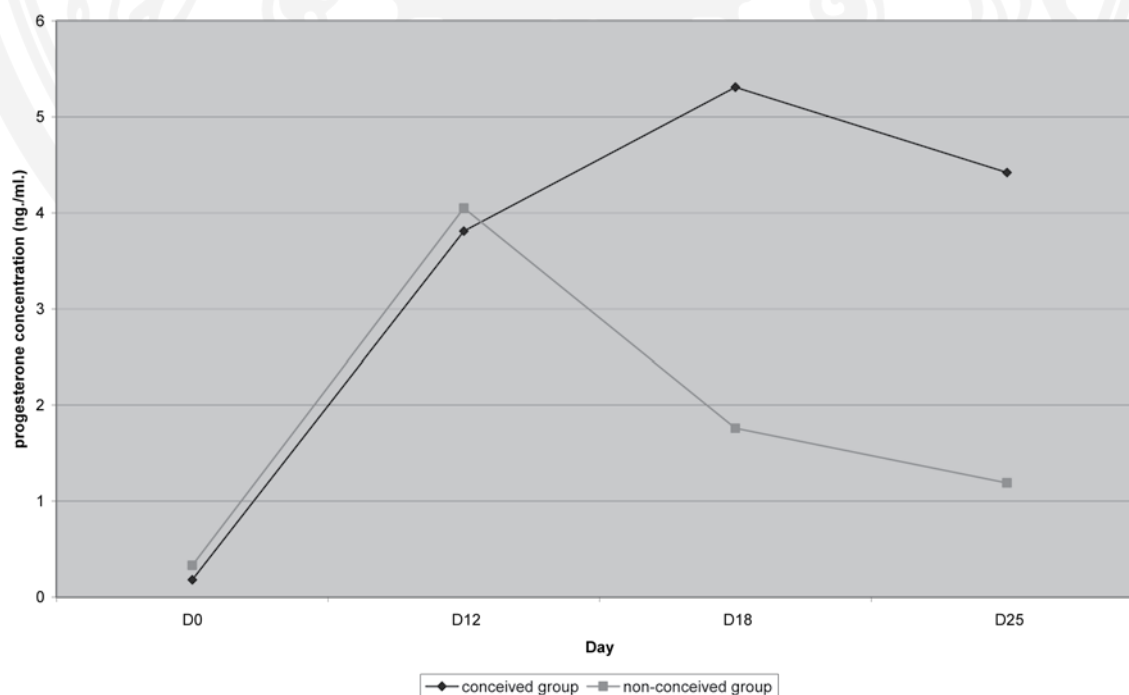
**Table 2** Serum concentration of progesterone on day 0, day12, day18 and day 25 post insemination in conceived and non-conceived groups

| Day | Progesterone concentration<br>( mean $\pm$ SE) ng./ml |                          |
|-----|-------------------------------------------------------|--------------------------|
|     | Conceived group                                       | Non-conceived group      |
| 0   | 0.18 + 0.04                                           | 0.33 + 0.06              |
| 12  | 3.81 + 0.33                                           | 4.05 + 0.38              |
| 18  | 5.31 + 0.43 <sup>a</sup>                              | 1.76 + 0.67 <sup>b</sup> |
| 25  | 4.42 + 0.30 <sup>a</sup>                              | 1.19 + 0.34 <sup>b</sup> |

<sup>a,b</sup> Figures within the same row with different superscripts differ highly significantly ( $P < 0.0001$ ).

It was found that progesterone concentration on day 18 of conceived group was significantly higher than that of non-conceived group ( $P < 0.0001$ ).

**Figure 2** Progesterone profile in various days of conceived and non-conceived groups



Conception rates between control and treatment groups were also compared (Table3). The results showed no significant difference between groups ( $P > 0.05$ ).

**Table 3** Conception rate of control and treatment groups

| Group           | No. of pregnant cows /<br>no. of inseminated cows | Conception rate (%) |
|-----------------|---------------------------------------------------|---------------------|
| Control group   | 26 / 47                                           | 55.32               |
| Treatment group | 25 / 45                                           | 55.56               |

The accuracy of early pregnancy diagnosis by means of progesterone determination on day 25 post inseminations compared to the results obtained from uterine palpation on day 60 post inseminations was 83.93 % whereas that of non-pregnancy diagnosis was 90.91 %.

## DISCUSSION

From Table 1, it was found that progesterone level in each day were not significantly different between control and treatment groups ( $P>0.05$ ). But progesterone level on day 18 of the treatment group seemed to be higher than that of control group which might be due to the effect of GnRH treatment that cause ovulation of dominant follicle of the second follicular wave and later formation of accessory corpus luteum. Thus progesterone level was higher on day 18 in treatment group. This was concurrent to the comparison of progesterone level between day 12 and day 18 in each group which showed that progesterone level on day 18 of treatment group was significantly higher than that of day 12 ( $P<0.05$ ) whereas the progesterone level on day 12 and day 18 of the control group were not different significantly ( $P>0.05$ ). This might indicate that in the treatment group of which GnRH was given enabled the increase of progesterone level in the luteal phase. This is concurrent to the study of Pilachai et al. (2004), Howard et al. (2006) and Peters (2005) which found higher progesterone concentration and accessory corpus luteum in cows after GnRH administration.

When conception of the animals was considered, regardless of treatment method (Table2), it was found that progesterone level on day 12 of conceived and non-conceived groups were not significantly different because they were all in luteal phase whereas progesterone level on day 18 of the conceived group was significantly higher than that of non-conceived group ( $P<0.0001$ ). This indicated that increasing progesterone level in luteal phase post insemination might increase conception. The results were concurrent to the hypothesis that increasing progesterone concentration after artificial insemination would increase fertility (Stevenson et al., 2007) due to

increase the chance of embryo development and its ability to secrete antiluteolytic hormone (Mann et al., 1999; Thatcher et al., 2001). Thatcher et al. (1994) also reported that manipulation of post-insemination concentration of progesterone by giving exogenous progesterone could stimulate embryo development and ultimately improved conception rates.

The conception rate obtained from GnRH administration post inseminations in this study (Table 3) was not significantly different from that of control group which is consistent with the findings of Howard et al. (2006) and Peter et al. (1992) who observed no effect on conception rate in dairy cows, despite elevation of progesterone concentration. This contrasts with the study of Willard et al. (2003); Peters et al. (2000) and Kalaimani et al. (2007) who indicated the improvement of pregnancy rates in dairy cattle after GnRH administration in luteal phase post insemination. Lopez-Gatius et al. (2002) also reported that cows with an additional corpus luteum were eight times less likely to experience fetal loss than those with a single corpus luteum. Thatcher et al. (2006) found the similar results that induction of accessory corpus luteum and increased progesterone concentration reduced early embryonic mortality in cattle.

The conception rate after GnRH treatment post inseminations is varied depending on the injection time after AI and follicular status when treatment is initiated (Peters, 2005). Peter (2005) also reported that only treatment between day 11 and 13 resulted in improvement in pregnancy rate which was concurrent to some studies (Drew and Peters, 1994; Sheldon and Dobson, 1993) but contrasted to some studies (Schmitt et al., 1996; Willard et al., 2003; Kalaimani et al., 2007) which reported that GnRH administration on day 5-7 post insemination also gave good results. Considering follicular status at the treatment time, cows with 2 and 3 wave cycles showed different fertility responses to GnRH treatment post inseminations (Peter, 2005).

However, post insemination GnRH treatments have been reported to be particularly effective in conditions of heat stress, poorer body condition (Kaim et al., 2003; Willard et al., 2003; Pilachai et al., 2004) and in repeat breeding cows (Sumransup et al., 2006). Wolfenson et al. (1993) also suggested that progesterone concentration might be less in heat-stressed cows.

The accuracy of determining non-pregnancy was greater (90.91%) than that for determining pregnancy (83.93%) which is consistent with other studies which reported accuracies of 67 to 88% for pregnant and 87 to 100% for non-pregnant diagnoses (Gowan et al., 1982; Reimers et al., 1985; Wimpy et al., 1986). This could indicate the main advantage of the progesterone test in picking out the non-pregnant animals (Dobson and Kamonpatana, 1986).

## CONCLUSION

This study indicates that the administration of exogenous GnRH in luteal phase post inseminations in fertile dairy cattle resulted in increased serum progesterone concentration. This might be beneficial in reducing early embryonic mortality especially in infertile or heat-stressed or repeat breeding cows which might have less progesterone concentration after insemination. However, the conception rate obtained from this study in treatment group was not significantly higher than that of control group which might be due to the variability of follicular status when treatment is initiated.

## ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to express their sincere thanks to Ms. Ratree Jintana for her cooperation in the laboratory throughout the study.

## REFERENCES

- Dobson, H. and Kamonpatana, M. 1986. A review of female cattle reproduction with special reference to a comparison between buffaloes, cows and zebu. *J. Reprod. Fert.* 77, 1-36.
- Drew, S.B. and Peters, A.R. 1994. Effect of buserelin on pregnancy rates in dairy cows. *Vet. Rec.* 134, 267-269.
- Gowan, E.W., Etches, R.J., Bryden, C. and King, G.J. 1982. Factors affecting accuracy of pregnancy diagnosis in cattle. *J. Dairy Sci.* 65, 1294-1298.
- Howard, J.M., Manzo, R., Dalton, J.C., Frago, F. and Ahmadzadeh, A. 2006. Conception rates and serum progesterone concentration in dairy cattle administered gonadotropin releasing hormone 5 days after artificial insemination. *Animal Reproduction Science* 95, 224-233.
- Hughes, T.L., Villa-Godoy, A., Kesner, J.S. and Fogwell, R.L. 1987. Destruction of bovine follicles: Effects on pulsatile release of luteinizing hormone and prostaglandin F<sub>2</sub>α –induced luteal regression. *Biol. Reprod.* 36, 523-529.
- Kaim, M., Bloch, A., Wolfenson, D., Braw-Tal, R., Rosenberg, M., Voet, H. and Folman, Y. 2003. Effects of GnRH administered to cows at the onset of estrus on timing of ovulation, endocrine responses, and conception. *J. Dairy Sci.* 86, 2012-2021.
- Kalaimani, S., Devanathan, T.G., Sridevi, P. and Thangavel, A. 2007. HCG and GnRH administration on 7<sup>th</sup> day post breeding in augmenting fertility in crossbred cows. *Tamilnadu J. Veterinary and Animal Sciences* 3, 95-97.



- Lopez-Gatius, F., Santolaria, P., Yaniz, J.L., Rutllant, J. and Lopez-Bejar, M. 2002. Factors affecting pregnancy loss from gestation day 38 to 90 in lactating dairy cows from a single herd. *Theriogenology* 57, 1251-1261.
- MacMillan, K.L., Taufa, V.K. and Day, A.M. 1986. Effects of an agonist of GnRH (buserelin) in cattle. III. Pregnancy rates after a post-insemination injection during metoestrus or dioestrus. *Anim. Reprod. Sci.* 11, 1-10.
- Mann, G.E., Lamming, G.E., Robinson, R.S. and Wathes, D.C. 1999. The regulation of interferon-tau production and uterine hormone receptors during early pregnancy. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 54, 317-328.
- Peters, A.R., Drew, S.B., Mann, G.E., Lamming, G.E. and Beck, N.F. 1992. Experimental and practical approaches to the establishment and maintenance of pregnancy. *J. Physiol. Pharmacol.* 43 (Suppl. 1), 143-152.
- Peters, A.R. 1996. Embryo mortality in the cow. *Animal Breedings Abstracts* 64, 587-598.
- Peters, A.R. 2005. Veterinary clinical application of GnRH-questions of efficacy. *Animal Reproduction ] Sciences* 88, 155-167.
- Peters, A.R., Martinez, T.A. and Cook, A.J.C. 2000. A meta-analysis of studies of the effect of GnRH 11-14 days after insemination on pregnancy rates in cattle. *Theriogenology* 54, 1317-1326.
- Pilachai, R., Aiumlamai, S., Wongsrikaew, W. and Sirisatien, S. 2004. A study on day 5 post insemination administration of GnRH or HCG on serum progesterone concentrations and conception rates in dairy heifers during hot season. *Abstracts of the 30<sup>th</sup> Veterinary Medicine and Livestock Development Annual Conference. The Thai Veterinary Medical Association Under the Royal Patronage*, p. 61-62.
- Reimers, T.J., Smith, R.D. and Newman, S.K. 1985. Management factors affecting reproductive performance of dairy cows in the northeastern United States. *J. Dairy Sci.* 68, 963-974.
- Rettmer, I., Stevenson, J.S. and Corah, L.R. 1992. Pregnancy rates in beef cattle after administering a GnRH agonist 11 to 14 days after insemination. *J. Anim. Sci.* 70, 7-12.
- Schmitt, E.J., Diaz, T., Barros, T.M., de la Sota, R.L., Drost, M., Fredriksson, E.W., Staples, C.R., Thorner, R. and Thatcher, W.W. 1996. Differential response of the luteal phase and fertility in cattle following ovulation of the first-wave follicle with human chorionic gonadotropin or an agonist of gonadotropin-releasing hormone. *J. Anim. Sci.* 74, 1074-1083.
- Sheldon, I.M. and Dobson, H. 1993. Effects of GnRH administered 11 days after insemination on the pregnancy rates of cattle to the first and later services. *Vet. Rec.* 133, 160-163.
- Sreenan, J.M., Diskin, M.G. and Morris, D.G. 2000. Embryo survival rate in cattle: a major limitation to the achievement of high fertility. *Occup. Publ. Br. Soc. Anim. Sci.* 26, 93-104.

- Stevenson, J.S., Portaluppi, M.A., Tenhouse, D.E., Lloyd, A., Eborn, D.R., Kacuba, S. and DeJarnette, J.M. 2007. Interventions after artificial insemination: conception rates, pregnancy survival, and ovarian responses to Gonadotropin Releasing Hormone, Human Chorionic Gonadotropin, and progesterone. *J. Dairy Sci.* 90, 331-340.
- Sumransup, P., Ngamkhum, S. and Vadhanakul, N. 2006. GnRH application for improving pregnancy rate in repeat breeding dairy cows. *J. Biotec. Liv. Prod.* 1, 29-39.
- Thatcher, W.W., MacMillan, K.L., Hansen, P.J., and Drost, M. 1989. Concepts for regulation of corpus luteum function by the conceptus and ovarian follicles to improve fertility. *Theriogenology* 31, 149-164.
- Thatcher, W.W., Staples, C.R., Danet-Desnoyers, G., Oldick, B. and Schmitt, E.-P. 1994. Embryo health and mortality in sheep and cattle. *J. Anim. Sci.* 72 (Suppl. 3), 16.
- Thatcher, W.W., De La Sota, R.L., Schmitt, E.J., Diaz, T., Badinga, L. and Simmen, F.A. 1996. Control and management of ovarian follicles in cattle to optimize fertility. *Reprod. Fertil. Dev.* 8, 203-217.
- Thatcher, W.W., Guzeglu, A., Mattos, R., Binelli, M., Hansen, T.R. and Pru, J.K. 2001. Uterine conception interactions and reproductive failure in cattle. *Theriogenology* 56, 1435-1450.
- Thatcher, W.W., Bilby, T.R., Bartolome, J.A., Silvestre, F., Staples, C.R. and Santos, J.E.P. 2006. Strategies for improving fertility in the modern dairy cow. *Theriogenology* 65, 30-44.
- Webb, R., Gong, J.G., Law, A.S. and Rusbridge, S.M. 1992. Control of ovarian function in cattle. *J. Reprod. Fert. Supplement* 45, 141-156.
- Willard, S., Gandy, S., Bowers, S., Graves, K., Elias, A. and Whisnant, C. 2003. The effects of GnRH administration post insemination on serum concentrations of progesterone and pregnancy rates in dairy cattle exposed to mild summer heat stress. *Theriogenology* 59, 1799-1810.
- Wimpy, T.H., Chang, C.F., Estergreen, V.L. and Hillers, J.K. 1986. Milk progesterone enzyme immunoassay: modifications and a field trial for pregnancy detection in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 69, 1115-1121.
- Wolfenson, D., Luft, O., Berman, A. and Meidan, R. 1993. Effect of season, incubation temperature and cell age on progesterone and prostaglandinF2 $\alpha$  production in bovine luteal cells. *Anim. Reprod. Sci.* 32, 27-34.

## การศึกษาความสมบูรณ์ของโครโซมของอสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็งแพะที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris ที่มีปริมาณไข่แดงแตกต่างกันด้วยเครื่องโฟรีไซโตมิเตอร์

จตุพร พงษ์เพ็ง<sup>1</sup>, ณรงค์ เลี้ยงเจริญ<sup>1</sup>, มุขดา รัตนภาสกร<sup>1</sup>,  
ปิยวรรณ สุธรรมภินันท์<sup>2</sup>, ธวัชชัย แก้วมาก<sup>3</sup>, มาลี อภิเมธีธารัง<sup>1</sup>

### บทคัดย่อ

การศึกษาความสมบูรณ์ของโครโซมของตัวอสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็งแพะที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris (EYT) ที่มีปริมาณไข่แดงแตกต่างกันเครื่องโฟรีไซโตมิเตอร์ โดยใช้น้ำเชื้อของแพะพันธุ์ผสมชาแนนพื้นเมืองที่เจือจางด้วย EYT ที่มีปริมาณไข่แดง 2.5%, 5% และ 10% ตามลำดับ ทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C นาน 30 วินาที จากนั้นย้อมสีอสุจิด้วย fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) และ propidium iodide (PI) นำไปตรวจความผิดปกติของโครโซมและเยื่อหุ้มอสุจิด้วยเครื่องโฟรีไซโตมิเตอร์ อสุจิที่มีความผิดปกติของเยื่อหุ้มและโครโซมจะติดสีแดงของ PI และสีเขียวของ FITC-PNA ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่เจือจางด้วย EYT ที่มีปริมาณไข่แดง 5% และ 10% ทำให้จำนวนอสุจิที่มีเยื่อหุ้มและโครโซมสมบูรณ์สูงกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่เจือจางด้วย EYT ที่มีปริมาณไข่แดง 2.5% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < .05$ ) โดยมีร้อยละของอสุจิที่มีชีวิตและโครโซมสมบูรณ์เท่ากับ  $15.13 \pm 2.00$ ,  $23.67 \pm 2.09$  และ  $23.15 \pm 3.37$  ที่ปริมาณไข่แดง 2.5%, 5% และ 10% ตามลำดับ ส่วนอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าและลักษณะการเคลื่อนที่ทาง kinetic ที่ตรวจด้วยเครื่อง Computerized Assister Semen Analysis (CASA) พบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P > .05$ ) ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ EYT ที่มีปริมาณไข่แดงเป็นองค์ประกอบ 5% และ 10% ทำให้จำนวนอสุจิที่มีชีวิตและมีโครโซมสมบูรณ์สูงกว่าที่มีปริมาณไข่แดงเป็นองค์ประกอบอยู่ 2.5%

**คำสำคัญ :** โครโซม น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ โฟรีไซโตมิเตอร์

เลขทะเบียนผลงานวิจัย ที่ 51(2)-0108-056

<sup>1</sup> สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตภัณฑ์ กรมปศุสัตว์ ถนนติวานนท์ ปทุมธานี 12000

<sup>2</sup> คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม

<sup>3</sup> สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อการวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา อำเภอเมือง นครปฐม

**Study on acrosome integrity of goat spermatozoa frozen in Tris-based extender at different egg yolk percentages by flow cytometry.**

Jatuporn Pongpeng<sup>1</sup>, Narong Leingcharoen<sup>1</sup>, Mukda Ratanapaskorn<sup>1</sup>, Piyawan Suthunmapinata<sup>2</sup>  
Thawatchai Kaewmarg<sup>3</sup>, Malee Apimeteetumrong<sup>1</sup>

**Abstract**

Acrosome integrity of goat spermatozoa frozen in Tris-based extender at different percentages of egg yolk was studied using flow cytometry. Samples were Saanen-Thai native crossbred semen frozen in Tris-based extenders containing 2.5, 5 and 10% (v/v) egg yolk. Frozen semen samples were thawed at 37°C for 30 seconds then stained with fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) and propidium iodide (PI). The acrosome status of stained spermatozoa was then assessed using flow cytometer. The 5% and 10% egg yolk in extenders yielded a significant increase in the percentage of spermatozoa with intact acrosome as compared to 2.5% egg yolk ( $23.67 \pm 2.09$  and  $23.15 \pm 3.37\%$  vs  $15.13 \pm 2.00\%$ ,  $P < 0.05$ ). Percentage of progression motility and kinetic movement of 2.5, 5 and 10% egg yolk in Tris-based extenders showed no significant difference. This study indicated that 5% and 10% egg yolk in EYT gave percentage of live spermatozoa with intact acrosome membrane treated the superior effect compared to 2.5%.

**Keywords :** acrosome, extender, Flow cytometry

**Research paper registration no.** 51(2)-0108-056

<sup>1</sup> The Bureau of Biotechnology in Animal Production, Department of Livestock Development.

<sup>2</sup> Faculty of Veterinary, Kaseatsat University Kampeangsean Nakornpathom

<sup>3</sup> Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom



## บทนำ

การเลี้ยงแพะส่วนใหญ่ในประเทศไทยเป็นการเลี้ยงแบบปล่อยโดยมีพ่อพันธุ์คุมฝูง ซึ่งมีประสบการณ์ปัญหาการผสมเลือดชิด และการแพร่ระบาดของโรคทางระบบสืบพันธุ์ แต่การปรับปรุงพันธุ์แพะทั้งด้านเนื้อและนมให้มีผลผลิตสูงจำเป็นต้องใช้พ่อพันธุ์ที่ดี ซึ่งมีราคาแพง ซึ่งเกษตรกรไม่สามารถจัดหาได้เอง จึงนำการผสมเทียมมาใช้เพื่อช่วยแก้ปัญหาอันเนื่องมาจากการขาดแคลนพ่อพันธุ์การจัดการขยายพันธุ์ และการควบคุมโรค ปัจจุบันนิยมใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในการผสมเทียม

กระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งมีหลายขั้นตอนที่เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การแช่แข็งน้ำเชื้อประสบความสำเร็จ เช่น อัตราการการลดอุณหภูมิ วิธีการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง เป็นต้น ขณะลดอุณหภูมิจาก 25 °C ถึง 5 °C ตัวอสุจิจะมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงจนทำให้เกิด cold shock ขึ้นได้ เป็นผลให้เกิดความเสียหายต่อองค์ประกอบต่างๆ ของอสุจิ เช่น ผนังเยื่อหุ้มเซลล์ (Rodriguez and Martin, 1994) ไมโทคอนเดรีย (Watson, 1995) อะโครโซม (Jones and Martin, 1973) การใช้สาร cryoprotectants เป็นสิ่งสำคัญยิ่งที่ช่วยป้องกันความเสียหายจากการลดอุณหภูมิ ความเสียหายของเยื่อหุ้มอสุจิและโครโมโซมเนื่องจากการแช่แข็งมีผลทำให้อสุจิตสูญเสียความสมบูรณ์ทางกายภาพไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ เนื่องจากเมื่อเยื่อหุ้มอสุจิและโครโมโซมเสียหายเอ็นไซม์ที่บรรจุอยู่ภายในจะสูญเสียคุณสมบัติทางชีวเคมี ทำให้ไม่สามารถเจาะผ่านผนังเซลล์ไข่ได้ (Schneider and Mazur, 1984) Ritar and Solamon (1982) รายงานว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่นิยมใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อแพะมากที่สุดคือ Tris-glucose-citric acid-yolk และพบว่าปริมาณไข่แดงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris มีผลต่อการอยู่รอดของตัวอสุจิหลังการแช่แข็ง เนื่องจากในน้ำเชื้อแพะมี egg yolk coagulating enzyme หรือ phospholipase A ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับไข่แดงในน้ำยาเจือจางจะก่อให้เกิดสารที่เป็นพิษต่ออสุจิ

ปัจจุบันการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อสามารถทำได้อย่างละเอียดถึงระดับเซลล์ โดยการย้อมสี fluorescent ร่วมกับเครื่องโฟรีไซโตมิเตอร์ สามารถบอกความแตกต่างในระดับเซลล์ที่ละเอียดภายในเวลาอันสั้น เช่น ความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) ความสมบูรณ์ของโครโมโซม (acrosome integrity) สถานะของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial function) สถานะของเหลวภายในเซลล์ (membrane fluidity) เป็นต้น (Gillan et al., 2005) ดังนั้นการวิเคราะห์ความสมบูรณ์ของโครโมโซมของตัวอสุจิได้ละเอียดมากเท่าใด ความสามารถบ่งบอกถึงคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีตัวอสุจิที่พร้อมเข้าปฏิสนธิกับไข่ได้สูงตามไปด้วย ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการผสมติดด้วย (Kuisma et al., 2006) ดังนั้นการศึกษาศาสนะของโครโมโซมของอสุจิในน้ำเชื้อแพะที่แช่แข็งในน้ำยาเจือจาง EYT ที่มีปริมาณไข่แดงแตกต่างกันด้วยเครื่องโฟรีไซโตมิเตอร์ สามารถทราบปริมาณไข่แดงที่ทำให้มีจำนวนอสุจิมีชีวิตและโครโมโซมสมบูรณ์สูงสุดในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งแพะลูกผสมชาแนล-พื้นเมือง

## อุปกรณ์และวิธีการ

น้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้มาจากการศึกษาของณรงค์และคณะ (2550) ซึ่งมีวิธีการโดยสรุปดังนี้ รีดเก็บน้ำเชื้อจากแพะพ่อพันธุ์ลูกผสมชาแนล-พื้นเมือง จำนวน 3 ตัว รีดเก็บน้ำเชื้อสัปดาห์ละ 1 ครั้งติดต่อกัน 10 สัปดาห์ ซึ่งมีคุณภาพน้ำเชื้อสดได้มาตรฐานโดยมีอัตราการเคลื่อนที่ร้อยละ 70 ขึ้นไป ในการรีดเก็บน้ำเชื้อแต่ละครั้งเทรวมน้ำเชื้อสดของพ่อพันธุ์ทั้ง 3 ตัว เข้าด้วยกันในปริมาณเท่ากัน ตรวจนับความเข้มข้นด้วยเครื่องตรวจนับเม็ดเลือดแดง (Haemocytometer) แล้วแบ่งน้ำเชื้อออกเป็น 3 ส่วนเท่าๆ กัน เจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง EYT ที่มีไข่แดงเป็นส่วนผสมอยู่ 2.5%, 5% และ 10% โดยกำหนดให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของตัวอสุจิ 480 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร

ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อโดยการนำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วทั้ง 3 ส่วนไปลดอุณหภูมิที่ 4°C นาน 4 ชั่วโมง แล้วบรรจุใส่หลอดน้ำเชื้อขนาด 0.25 ml. และแช่แข็งด้วยกลองโฟม ที่บรรจุไนโตรเจนเหลว โดยวางบนแท่นเรียงเหนือระดับไนโตรเจนเหลว ประมาณ 5 ซม. อุณหภูมิประมาณ -120°C นาน 10 นาที จากนั้นแช่หลอดน้ำเชื้อในไนโตรเจนเหลวเมื่อครบ 24 ชั่วโมง ทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อโดยการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C นาน 30 วินาที

#### การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อหลังแช่แข็ง

ทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 วินาที แล้วเจือจางทันทีด้วย Hepes-buffered modified Tyrode medium (SP-TALP; 2.0 mM CaCl<sub>2</sub>, 3.1 mM KCl, 0.4 mM MgCl<sub>2</sub>, 100.0 mM NaCl, 25.0 mM NaHCO<sub>3</sub>, 0.3 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.0 mM sodium pyruvate, 21.6 mM sodium lactate, 10.0 mM Hepes, and 6 mg/ml BSA) ปริมาตร 10 เท่าของน้ำเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 °C และกรองผ่าน 41 µm nylon mesh (Spectrum, Los Angeles, CA) หรือคำนวณให้มีความเข้มข้นของตัวอสุจิ 50×10<sup>6</sup> cells/ml. จากนั้นย้อมด้วยสี FITC-PNA ใช้น้ำเชื้อปริมาตร 440-µl aliquot ผสมกับสี FITC-PNA ปริมาตร 50 µl (10 µg/ml.) ปั่นตัวอย่างที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 30 นาที จากนั้นย้อมด้วยสี PI ก่อนนำไปตรวจด้วยเครื่อง Flow Cytometer รุ่น FACS calibur จากบริษัท BECTON DECKINSON การตรวจอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (% progressive motility) และลักษณะทาง kinetic ในน้ำเชื้อแช่แข็งใช้เครื่องตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ CASA (computerized Assister semen analysis) Hamilton Thorn Motility Analyzer, IVOS 12.3 โดยตั้งค่าเพื่อการตรวจดังนี้ Frames Per Sec. 50Hz, No. of Frames 30, minimum contrast 60, minimum cell size 5 pix, Path velocity, VAP 55ul/s, STR 50%, cell Intensity 55, VAP cut off 21.9 u/s, VSL cut off 6 u/s ซึ่งเป็นค่าทางสถิติที่ใช้คำนวณค่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าและกำหนดรูปแบบการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิที่วัดได้จากเครื่อง CASA ที่ต้องแสดงไว้พิจารณาพร้อมกับค่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าที่วัดจากเครื่อง CASA ทุกครั้ง ได้แก่

- Curvilinear velocity ; VCL (µm/s) แสดงค่าเฉลี่ยของอสุจิที่เคลื่อนที่ในแนวโค้งจากจุดหนึ่งไปยังอีกจุดหนึ่งในขณะที่เครื่องใช้ประมวลผล
- Straight-line velocity ; VSL(µm/s) แสดงค่าการเคลื่อนที่ของอสุจิระหว่างจุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดการเคลื่อนที่เป็นเส้นตรงขณะที่เครื่องใช้ประมวลผล
- Average path velocity ; VAP(µm/s) แสดงค่าเฉลี่ยของอสุจิที่เคลื่อนที่ปกติที่ได้จากการคำนวณของเครื่อง CASA
- Amplitude of Lateral Head Displacement ; ALH (µm/s) แสดงค่าการแทนที่ของเซลล์ในตำแหน่งที่เครื่องกำลังประมวลผล
- Beat frequency ; BCF มีหน่วยเป็น เฮิรตซ์
- Linearity ; LIN เป็นค่าอัตราส่วนของ VSL/VCL
- Straightness ; STR เป็นค่าอัตราส่วนของ VSL/VAP

#### การวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองในครั้งนี้ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) กำหนดให้ปริมาณไข่แดงเป็นทริทเมนต์และเปรียบเทียบร้อยละของความผิดปกติโครโมโซมและเยื่อหุ้มตัวอสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็งและเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ ด้วยตาราง ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range Test.

### ผลการทดลอง

ผลการศึกษาความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มตัวอสุจิและโครโมโซมในน้ำเชื้อแช่แข็งแพะที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง EYT ที่มีส่วนผสมไข่แดง 2.5%, 5% และ 10% เมื่อตรวจด้วยเครื่อง flow cytometer ด้วยการย้อมด้วย FITC-PNA ร่วมกับการย้อมด้วย PI พบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้น้ำยาเจือจาง EYT ที่มีไข่แดงเป็นส่วนผสม 5% และ 10 % มีอสุจิที่มีชีวิตและโครโมโซมสมบูรณ์ (Membrane acrosome intact ;MAI) มีจำนวนมากกว่า น้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงเป็นส่วนผสม 2.5% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P<0.05$ ) ส่วนอสุจิที่ตายแต่ยังมีโครโมโซมสมบูรณ์ (Membrane damage acrosome intact; MDAI) และอสุจิที่ตายและโครโมโซมถูกทำลาย (Membrane acrosome damage; MAD) ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P>0.05$ ) ดังตารางที่ 1

**Table 1.** Means  $\pm$  SE of acrosome integrity of goat semen frozen with 2.5%, 5% and 10% egg yolk in Egg Yolk Tris extender, assessed by flow cytometer.

| Acrosome Integrity                       | Egg Yolk in Egg Yolk Tris Extende |                               |                               |
|------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
|                                          | 2.5 %<br>(n=10)                   | 5 %<br>(n=10)                 | 10 %<br>(n=10)                |
| Membrane acrosome intact; MAI(%)         |                                   |                               |                               |
| Membrane damage acrosome intact; MDAI(%) | 15.13 $\pm$ 2.00 <sup>a</sup>     | 23.67 $\pm$ 2.09 <sup>b</sup> | 23.15 $\pm$ 3.37 <sup>b</sup> |
| Membrane acrosome damage; MAD(%)         | 22.88 $\pm$ 2.19 <sup>a</sup>     | 21.11 $\pm$ 3.17 <sup>a</sup> | 20.48 $\pm$ 2.02 <sup>a</sup> |
|                                          | 61.93 $\pm$ 3.13 <sup>a</sup>     | 54.85 $\pm$ 4.01 <sup>a</sup> | 56.24 $\pm$ 4.17 <sup>a</sup> |

<sup>a, b</sup> : Mean in a row with a different superscript are significantly different ( $P<0.05$ )

เมื่อตรวจการเคลื่อนที่ด้วยเครื่อง CASA พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า รวมทั้งลักษณะการเคลื่อนที่ทาง kinetic ของตัวอสุจิ ทั้งสามกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ( $P>0.05$ ) ดังตารางที่ 2

**Table 2.** Mean  $\pm$  SE of motility, progressive motility of goat frozen semen with 2.5%, 5% and 10% egg yolk in Egg Yolk Tris extender. (P<0.05)

| Spermatozoa Movement                                       | Egg Yolk in Egg Yolk Tris Extende |                   |                   |
|------------------------------------------------------------|-----------------------------------|-------------------|-------------------|
|                                                            | 2.5 %<br>(n=10)                   | 5 %<br>(n=10)     | 10 %<br>(n=10)    |
| Progressive motility (%)                                   | 11.20 $\pm$ 2.35                  | 11.81 $\pm$ 1.90  | 16.63 $\pm$ 2.53  |
| Curvilinear velocity ;VCL ( $\mu$ m/s)                     | 68.53 $\pm$ 3.10                  | 68.64 $\pm$ 4.78  | 70.13 $\pm$ 3.02  |
| Straight-line velocity; VSL( $\mu$ m/s)                    | 142.85 $\pm$ 6.78                 | 148.48 $\pm$ 7.92 | 151.70 $\pm$ 6.45 |
| Average path velocity; VAP( $\mu$ m/s)                     | 83.80 $\pm$ 3.77                  | 86.82 $\pm$ 5.15  | 88.51 $\pm$ 3.81  |
| Amplitude of lateral head displacement;<br>ALH( $\mu$ m/s) | 7.02 $\pm$ 0.25                   | 7.40 $\pm$ 0.09   | 7.40 $\pm$ 0.18   |
| Beat frequency; BCF                                        | 36.17 $\pm$ 0.65                  | 35.27 $\pm$ 0.56  | 35.48 $\pm$ 0.69  |
| Linearity; LIN                                             | 48.22 $\pm$ 0.66                  | 47.30 $\pm$ 0.68  | 47.00 $\pm$ 0.66  |
| Straightness; STR                                          | 70.20 $\pm$ 7.83                  | 76.10 $\pm$ 0.69  | 76.09 $\pm$ 0.65  |

### วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การศึกษาคุณสมบัติของโครโมโซมในน้ำเชื้อแช่แข็งที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง YET ที่มีปริมาณไข่แดงแตกต่างกัน 3 ระดับ ด้วยเครื่อง Flow cytometer พบว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีปริมาณไข่แดง 5% และ 10% มีจำนวนอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มตัวอสุจิและโครโมโซมสูงกว่า น้ำยาเจือจาง EYT ที่มีปริมาณที่มีไข่แดงปริมาณ 2.5% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) แสดงให้เห็นว่าหากน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อมีส่วนประกอบของไข่แดงน้อยเกินไปอาจส่งผลให้เกิดความเสียหายกับเยื่อหุ้มตัวอสุจิและโครโมโซมได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากการรักษาสภาพความสมดุลภายในและภายนอกเซลล์ในขณะที่ลดอุณหภูมิไปยังจุดเยือกแข็งไม่ดีเท่าที่ควร ทำให้ของเหลวเมื่อกลายสภาพเป็นของแข็งเกิดเป็นเกร็ดน้ำแข็งซึ่งมีความแหลมคมทำให้เซลล์ได้รับความเสียหายขณะลดอุณหภูมิ (Aboagla and Terada, 2004; Jones and Martin; 1973) จึงทำให้ส่วนของโครโมโซมได้รับความเสียหาย และยังมีผลทำให้อสุจิตายภายหลังการแช่แข็ง แต่ร้อยละของ โครโมโซมที่สมบูรณ์ของน้ำเชื้อแช่แข็งทั้ง 3 กลุ่มก็ยังอยู่ในระดับต่ำมาก ซึ่งอาจมีสาเหตุจากการได้รับผลกระทบการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง egg yolk coagulating enzyme หรือ phospholipase A กับไข่แดง ซึ่งมีผู้ทดลองปั่นล้างเพื่อแยกน้ำเลี้ยงอสุจิที่มีสาร egg yolk coagulating enzyme หรือ phospholipase A ออกเป็นการลดสารพิษให้น้อยลงแต่วิธีดังกล่าวทำให้สูญเสียจำนวนอสุจิและเพิ่มขั้นตอนการผลิตที่ค่อนข้างยุ่งยาก(Ritar,



1993) ซึ่งเมื่อพิจารณาร่วมกับอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าซึ่งตรวจด้วยเครื่อง CASA มีค่าไม่แตกต่างกันทั้ง 3 กลุ่ม ( $P < 0.05$ ) และมีปริมาณค่อนข้างต่ำกว่าค่ามาตรฐาน ซึ่งต้องการอัตราการเคลื่อนที่ภายหลังการแช่แข็งประมาณ 40% ถึงแม้ว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนผสมของไข่แดงน้อย แต่การเกิดปฏิกริยาดังกล่าวยังมีอยู่และสารที่เกิดขึ้นอยู่ในระดับที่ทำให้ตัวอสุจิเสียหายหรือตายได้ ซึ่งสอดคล้องกับ Ritar and Salamon (1982) กล่าวว่าถ้าปริมาณไข่แดงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ EYT มีมากกว่า 1.5% (v/v) จะมีผลทำให้ปริมาณตัวอสุจิมีชีวิตหลังการแช่แข็งในน้ำเชื้อเพศลดลง นอกจากนี้ยังมีการทดลองใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิดที่ใช้ถั่วเหลืองแทนไข่แดงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสำเร็จรูปเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้ไข่แดงก็ยังให้ค่าการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่แตกต่างกัน (รพีพรรณ และคณะ 2548)

เครื่อง Flow cytometer สามารถวิเคราะห์คุณสมบัติการทำงานของอโครโซมอสุจิได้ละเอียดและรวดเร็ว และยังสามารถวิเคราะห์ลักษณะความมีชีวิตของเซลล์การทำงานของไมโตรคอนเดรีย ความสมบูรณ์ของ อโครโซม และการเกิดโครโซม reaction ได้ด้วย ได้อย่างแม่นยำ ภายในเวลาอันรวดเร็ว Gillan et al. (2005) รายงานว่าเครื่อง Flow cytometer ใช้เวลาเพียง 8000-20,000 s<sup>-1</sup> สามารถวิเคราะห์เซลล์อสุจิ 10,000 เซลล์ ดังนั้นการนำเครื่อง Flow cytometer มาใช้ในการศึกษานี้จึงนับได้ว่าเป็นเครื่องมือที่ช่วยในการศึกษาได้อย่างดีในเรื่องความละเอียดและแม่นยำ แต่เครื่องมีราคาค่อนข้างสูง ไม่สามารถนำมาใช้ทุกครั้งในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ จึงน่าจะเหมาะสำหรับการศึกษาวิจัยที่ต้องการความละเอียดสูงมากกว่า ในทำนองเดียวกับการใช้เครื่อง CASA ในการวิเคราะห์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิที่ช่วยเพิ่มความสะดวกและรวดเร็วแต่ต้องมีความเข้าใจในเรื่องของค่าทาง kinetic ที่ต้องพิจารณาควบคู่ไปทุกครั้ง เนื่องจากมีผลทำให้ค่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเปลี่ยนไปตามการตั้งค่าดังกล่าว

การศึกษาคูณสมบัติของอโครโซมอสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็งที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง YET ที่มีปริมาณไข่แดงแตกต่างกัน 3 ระดับ ด้วยเครื่อง Flow cytometer พบว่าการใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris ที่มีปริมาณไข่แดงเป็นองค์ประกอบอยู่ 5% และ 10% มีผลทำให้จำนวนอสุจิที่มีชีวิตและมีอโครโซมสมบูรณ์สูงกว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris ที่มีปริมาณไข่แดงเป็นองค์ประกอบอยู่ 2.5%

### กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนายสัตวแพทย์ยุทธ หรินทรานนท์ ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัย ขอขอบคุณ ดร.จำเนียร สายขุน และ อาจารย์กรชัย กรแก้วรัตน์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและคำแนะนำในการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ และเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยการย้ายฝากตัวอ่อน ที่ให้ความอนุเคราะห์สัตว์ทดลองและให้ความช่วยเหลือและร่วมมืออย่างดีในการทำการศึกษาครั้งนี้จนสำเร็จด้วยดี

## เอกสารอ้างอิง

- ณรงค์ เลี้ยงเจริญ อนนท์ เทื่องสันเทียะ จตุพร พงษ์เพ็ง และมาลี อภิเมธีธำรง. 2550. การเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งแพะจากการผลิตโดยใช้สารละลายน้ำเชื้อที่มีปริมาณไข่แดง 2.5, 5 และ 10 เปอร์เซนต์. สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (ติดต่อส่วนบุคคล)
- รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล ณรงค์ เลี้ยงเจริญ และอนนท์ เทื่องสันเทียะ. 2548. คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งแพะที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Biociphos Plus® Bioexcel® และ Egg Yolk Tris. การประชุมวิชาการปศุสัตว์ครั้งที่ 20 ประจำปี 2548 “ปศุสัตว์ก้าวไกล เกษตรกรไทยก้าวหน้า พัฒนาเศรษฐกิจชาติ”. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
- Aboagla, E.M. and Terada, T. 2004. Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa. *Theriogenology*. 62(6): 1160-1172.
- Gillan, L., Evans, G. and Maxwell, W.M.C. 2005. Flow cytometric evaluation of sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology* 63: 445-457
- Jones, R.C. and Martin, I.C.A. 1973 The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5oC in the ultrastructure to ram spermatozoa. *J.Reprod. Fertil.* 35:311-320.
- Kuisma, P., Andersson, M., Koskinen, E. and Katila, T. 2006. Fertility of frozen-thawed stallion semen cannot be predicted by the currently used laboratory methods. *Acta Veterinaria Scandinavica* 48: 14 ([http://www. Actavetscand.com/content/48/1/14](http://www.Actavetscand.com/content/48/1/14))
- Ritar, A. J. 1993. Control of ovulation, storage semen and Cowper' glands of the goat. *Nature*; 179: 318-319.
- Ritar, A. J., and Salamon, S. 1982. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Australia Jour Bio Sci.* 35: 305-312.
- Rodriguez,K.O. and Martin,H. 1994. Membrane damage during dilution,cooling and freezing-thawing of boar spermatozoa packed in plastic bags. *Vet Med. A-Zbl Vet A – Physiol.* 41:37-47.
- Schneider,U. and Mazur,P. 1984. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to survival of frozen-thawed embryos. *Therigenology*, 21:68-79.
- Watson,P.F. 1995. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod. Fertil. Dev.* 7:871-891

## การประเมินพันธุกรรมของค่าโซมาติกเซลล์ในน้ำนม ของโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์

นางกัลยา เก่งวิทย์กรรม<sup>1</sup> นายณรงค์กร เกษมสุข<sup>2</sup> นายวิบูรณ์ ตุลารักษา<sup>1</sup>

### บทคัดย่อ

การประเมินพันธุกรรมของค่าโซมาติกเซลล์ในน้ำนมของโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ จำนวน 9,538 บันทึก จากแม่โคนม 975 ตัว ในฟาร์มเกษตรกรอำเภอวังเห็ก จังหวัดสระบุรีในระหว่างปี 2547 – 2549 (หรือ ค.ศ 2001 – 2006 ) โดยเก็บตัวอย่างน้ำนมเดือนละครั้ง ทุกเดือนจนครบระยะการให้นม (Lactation) จากข้อมูลค่าโซมาติกเซลล์ของแม่โคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ ซึ่งแบ่งตามระดับเลือดโฮลสไตน์ได้ 5 ระดับ กลุ่มที่ 1 มีระดับเลือดโฮลสไตน์ <75% กลุ่มที่ 2 75% กลุ่มที่ 3 >75<87.5% กลุ่มที่ 4 87.5<93.75% กลุ่มที่ 5 >93.75 แม่โคทั้ง 5 กลุ่ม มีการให้น้ำนมตั้งแต่ครั้งที่ 1 – ครั้งที่ 12 จากข้อมูลพบว่า เมื่อแปลงค่าโซมาติกเซลล์เคานท์ (Somatic cell count; SCC) ซึ่งเป็นตัวแปรที่มีค่าไม่ต่อเนื่อง ให้เป็นค่าโซมาติกเซลล์สกอร์ (Somatic Cell Score; SCS) ซึ่งเป็นตัวแปรที่มีค่าต่อเนื่อง ให้เป็นค่าโซมาติกเซลล์สกอร์ (Somatic Cell Score; SCS) เพื่อให้เป็นตัวแปรที่มีค่าไม่ต่อเนื่อง และนำมาคำนวณเพื่อประเมินพันธุกรรม พบว่าค่าอัตราพันธุกรรม (heritability;  $h^2$ ) ของค่าโซมาติกเซลล์เท่ากับ 0.179 (SD=0.0141) และค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่า SCS ของแม่โคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ กลุ่มที่ 1 เท่ากับ  $8.71 \pm 0.53$  (n=226) กลุ่มที่ 2 เท่ากับ  $10.93 \pm 2.72$  (n=242) กลุ่มที่ 3 เท่ากับ  $9.67 \pm 1.77$  (n=242) กลุ่มที่ 4 เท่ากับ  $9.49 \pm 1.39$  (n=5549) และกลุ่มที่ 5 เท่ากับ  $10.51 \pm 0.73$  (n=1962)

**คำสำคัญ :** การประเมินพันธุกรรม ค่าโซมาติกเซลล์ โคนมไทยโฮลสไตน์

<sup>1</sup> กลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตภัณฑ์

<sup>2</sup> ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี

## **Test – Day Heritability Estimates of Somatic Cell Score For Thai Holstein Dairy Crossbreds.**

Kalaya Kengvitkum<sup>1</sup>, Narongkorn Kasemsuk<sup>2</sup> and Viboon Tularuksa<sup>1</sup>

### **Abstract**

The aim of the paper was to estimate variance components for somatic cell scores for Thai Holstein Dairy crossbreds using data from Muaklek, one area of Saraburi province. A total of 9,538 twelve parity test-day records, collected from 2004-2006 were available for study. A pedigree file was extracted from the data base of Saraburi Artificial Insemination and Biotechnology Centre. Milk samples from each cow were collected every month for detecting Somatic Cell Count. Those cows were divided into 5 groups. They were <75%, 75%, >75-<87.5%, 87.5-<93.75% and >93.75% respectively. Somatic Cell Count was transform to Somatic Cell Score in order to estimate heritability which was 0.179 (SD=0.0141). Means and standard deviation in five groups were  $8.71 \pm 0.53$  (n=226),  $10.93 \pm 2.72$  (n=1559),  $9.67 \pm 1.77$  (n=242),  $9.49 \pm 1.39$  (n=5549) and  $10.51 \pm 0.73$  (n=1962) respectively.

**Key word :** Test – day Heritability Estimates, Somatic Cell Score, Thai Holstein Dairy Crossbreds

<sup>1</sup> Livestock Biotechnology Research and Development Section.

<sup>2</sup> Saraburi Artificial Insemination and Biotechnology Centre.



## บทนำ

การเลี้ยงโคนมในประเทศไทย เป็นอาชีพที่ทำรายได้มาสู่เกษตรกรไม่น้อยกว่าการเพาะปลูกข้าว จากรายงานกรมปศุสัตว์ ในปี 2548 มีประชากรโคนมในประเทศไทยจำนวน 478,836 ตัว จาก 23,374 ฟาร์มส่วนใหญ่เป็นเกษตรกรรายย่อย และรวมตัวกันเป็นสหกรณ์โคนม แต่การเลี้ยงโคนมของเกษตรกรได้ประสบปัญหา ที่ก่อให้เกิดความสูญเสียทางเศรษฐกิจ คือ การสูญเสียรายได้จากการขายน้ำนม และต้องเสียเงินค่ายา ค่ารักษา (Dekkers, 1995) แม่โคนมที่เป็นโรคนี้ชนิดเฉียบพลันรุนแรงหรือเรื้อรัง ต้องถูกคัดทิ้งออกจากฝูงก่อนเวลาอันสมควร เพราะการเลี้ยงโคนจนถึงอายุการให้ผลผลิต เป็นระยะของการลงทุน เมื่อแม่โคเริ่มให้น้ำนมไป จนกระทั่งถึงอายุโคเต็มวัย ซึ่งเป็นช่วงที่แม่โคให้ผลผลิตน้ำนมสูงสุด (Roger, 2001) ถ้าแม่โคในฝูงเป็นโรคเต้านมอักเสบหลายตัวต้องละเว้นการรีดนม ทำให้ปริมาณน้ำนมรวม (Milk yield) ของฟาร์มลดลงและการอักเสบของเต้านมยังมีผลกระทบต่อกำไรประกอบของน้ำนม (Bartlett, 1991)

การวัดค่า Somatic cell count (SCC คือ จำนวนเซลล์ ที่ร่างกายสร้าง / 1 ซีซีของน้ำนม) เป็นทั้งเครื่องชี้วัดสุขภาพของเต้านมของแม่โค และเป็นการเฝ้าระวังการเกิดโรคเต้านมอักเสบในแต่ละฟาร์ม การตรวจพบแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบแบบไม่แสดงอาการ (sub-clinical mastitis) มีค่า SCC สูงกว่าค่าปกติ มีปริมาณน้ำนมต่ำ (Fetrow, 1991) มีรายงานวิจัยศึกษาความสัมพันธ์ของค่าโซมาติกเซลล์เคาร์ท (SCC) ซึ่งแปลงเป็นค่ามาติกเซลล์สกอร์ (Somatic cell score =  $\log_2[(SCC/100)+3]$  เป็นสมการของ Ali และ Shook, 1980 โดยแปลงค่า SCC ให้เป็น SCS พบว่า ค่าอัตราพันธุกรรมของค่า SCS อยู่ระหว่าง 0.02 - 0.16 โดยค่าต่ำสุดในระยะการให้นมครั้งแรก (first lactation) และเพิ่มขึ้นในระยะการให้นมครั้งต่อไป (Mrode and Swanson 1996) และค่าสหสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic correlation) ระหว่างค่า SCS กับ การเกิดเต้านมอักเสบมีค่าสูงถึง 0.6 - 0.8 (Emanuelson et al. 1988 Cranford and Pearson, 2001)

การประเมินค่าอัตราพันธุกรรมของค่า SCC นำไปสู่การพัฒนาโคนมให้มีความต้านทานต่อโรคเต้านมอักเสบ โดยคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ ให้มีพันธุกรรมที่มีความต้านทานโรคเต้านมอักเสบ (mastitis resistance) ไว้ในแผนการผสมพันธุ์หรือแผนการคัดเลือก เพราะถึงแม้ว่ามีค่าอัตราพันธุกรรมของค่า SCS ต่ำ พ่อพันธุ์ยังถ่ายทอดความสามารถในการต้านทานโรคเต้านมอักเสบไปยังลูกโคสาวได้ (Caraviello, 2004)

## อุปกรณ์และวิธีการ

1. เก็บตัวอย่างน้ำนมของแม่โคลูกผสมไทยโฮลสไตน์ ในฟาร์มเกษตรกรอำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี ที่มีระดับเลือดโฮลสไตน์ต่างกัน โดยแบ่งเป็น 5 กลุ่ม คือกลุ่มที่ 1 มีระดับเลือด <75% กลุ่มที่ 2 75% กลุ่มที่ 3 >75-<87.5% กลุ่มที่ 4 87.5 - <93.75% และกลุ่มที่ 5 >93.75 แม่โคทั้ง 5 กลุ่ม มีระยะการให้น้ำนมตั้งแต่ครั้งที่ 1 - ครั้งที่ 12 ในฟาร์มเกษตรกรเป็นประจำทุกเดือน เดือนละ 1 ครั้ง จนครบระยะหนึ่งระยะการให้น้ำนม เพื่อนำมาตรวจค่าโซมาติกเซลล์ด้วยเครื่อง Fossomatic 5000 basic

2. บันทึกข้อมูลค่าโซมาติกเซลล์ในน้ำนมของโคนมไทยโฮลสไตน์เป็นรายเดือน และเป็นรายตัว จนครบหนึ่งระยะให้นม (1 Lactation) จำนวน 9,538 บันทึก ระหว่างปี 2547 – 2549 จากข้อมูลพบว่าแม่โคที่เป็นโรคเต้านมอักเสบมีค่า SCS มีตั้งแต่ 500.000 – 995.450 เซลล์ / มล.

3. วิจัยทางสถิติ แปลงข้อมูลค่าโซมาติกเซลล์เคาท์ เป็นค่า Logarithmic form คือค่าโซมาติกเซลล์สกอร์ SCS Somatic cell score =  $\log_2[(SCC/100)+3]$  (Ali and Shook, 1980)

4. นำข้อมูล SCS มาวิเคราะห์ใช้สมการแบบ single – trait repeatability animal model : (Henderson, 1984) ด้วยโปรแกรม Dairy Pak (Duangjinda et al, 2004)

$$Y_{ijkl} = A + G_i + P_j + bSTG_k + PE_l + C_l + e_{ijkln}$$

$Y_{ijkl}$  = ค่า test day Somatic Cell Score {  $SCS = \log_2[(SCC/100)+3]$  }  
 $A$  = ค่า population mean  
 $G_i$  = fixed effect of ith genetic group  
 $P_j$  = fixed effect of j parity  
 $bSTG_k$  = effect of DM (Day in Milk) on SCS  
 $PE_l$  = permanent environment effect  
 $C_l$  = random effect l th cow  
 $e_{ijkln}$  = random residual effect.

5. คำนวณค่า covariance โดย AI-REML algorithm (Johnson and Thompson, 1995) ในโปรแกรมชุด DairyPak (Duangjinda และคณะ, 2004) ค่า Additive genetic ( $\sigma_G^2$ ) ค่า PE ( $\sigma_{PE}^2$ ) และค่าอัตราพันธุกรรมของ SCS ที่วันทดสอบ (DIM) โดยสมการ

$$H^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \sigma_{PE}^2 + \sigma_e^2}$$

### ผลการทดลอง

ค่า SCC ของแม่ลูกผสมไทยโฮลสไตน์ เป็นข้อมูลรายตัว และเป็นค่าที่ตรวจทุก 30 วัน แม่โคนมลูกผสม 5 กลุ่มแบ่งตามระดับเลือดโฮลสไตน์ พบว่าในแต่ละระยะการให้นมมีการอักเสบของเต้านมเป็นบางเดือน มีค่า SCC ต่ำสุดประมาณ 1,000 – 900,000 เซลล์/มล. เมื่อแปลงเป็นค่า SCS ซึ่งเป็นตัวแปรต่อเนื่อง และหาค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (ตารางที่ 1) พบว่าแม่โคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ที่มีระดับเลือดโฮลสไตน์ต่ำ ในกลุ่มที่ 1 มีค่าต่ำสุด และ SCS เริ่มมีค่าสูงขึ้นเมื่อระดับเลือดโฮลสไตน์สูง ในกลุ่มที่ 2, 3, 4 และ 5

**ตารางที่ 1** แสดงค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าโซมาติกเซลล์สกอร์ (Somatic Cell Score; SCS) ของแม่โคนมูลูกผสมไทยโฮลสไตน์จำนวน 5 กลุ่ม แบ่งตามระดับเลือดโฮลสไตน์

| กลุ่ม | ระดับเลือดโฮลสไตน์ | จำนวนตัวอย่าง<br>(บันทึก) | ค่าเฉลี่ยของค่า SCS $\pm$<br>ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน |
|-------|--------------------|---------------------------|--------------------------------------------------|
| 1     | <75                | 226                       | 8.71 $\pm$ 0.53                                  |
| 2     | 75                 | 1559                      | 10.92 $\pm$ 2.71                                 |
| 3     | >75 - <87.5        | 242                       | 9.67 $\pm$ 1.77                                  |
| 4     | 87.5 - <93.75      | 5549                      | 9.49 $\pm$ 1.39                                  |
| 5     | >93.75             | 1962                      | 10.51 $\pm$ 0.73                                 |

การประเมินค่าอัตราพันธุกรรม ( $h^2$ ) ของค่า SCS จากค่า variances ในตารางที่ 2 ให้ค่าอัตราพันธุกรรมที่ต่ำ คือ 0.1792 ซึ่งอยู่ในช่วงของค่าอัตราพันธุกรรม 0.05 – 0.19 (Boettcher et al., 1998; Mrode et al., 1996; Rupp and Biochard, 1999)

**ตารางที่ 2** การประเมินค่าอัตราพันธุกรรม ( $h^2$ ) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานในวงเล็บจากค่า SCS จำนวน 9,538 ข้อมูลของแม่โคลูกผสมไทยโฮลสไตน์ทั้ง 5 กลุ่ม โดยมีค่า Genetic variance for permanent effect ( $\delta^2_{PE\ G}$ ) ค่า Genetic variance ( $\delta^2_G$ ) และค่า Residual variance ( $\delta^2_e$ )

| ระดับเลือดแม่โค<br>(กลุ่ม) | Somatic Cell Score (SCS) |                    |              |               |
|----------------------------|--------------------------|--------------------|--------------|---------------|
|                            | $\delta^2_G$             | $\delta^2_{PE\ G}$ | $\delta^2_e$ | $H^2$         |
| 5                          | 0.83419                  | 2.5226             | 1.2993       | 0.179(0.0141) |

## วิจารณ์

แผนการปรับปรุงพันธุ์โคนมโดยมาก มีวัตถุประสงค์ในการสร้างพ่อแม่พันธุ์ ที่ให้ผลผลิตน้ำนมสูง เพราะลักษณะการให้นม มีค่าอัตราพันธุกรรม ( $h^2$ ) ปานกลาง อยู่ระหว่าง 0.2 – 0.4 การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ด้วยลักษณะนี้ ทำให้โคนมรุ่นต่อไปให้ผลผลิตน้ำนมสูงขึ้น แต่การคัดเลือกโดยเน้นลักษณะการให้นมเพียงอย่างเดียว ทำให้สุขภาพของแม่โคอ่อนแอลง พบการเกิดโรคเต้านมอักเสบในแม่โคที่ให้นมสูงมากกว่าแม่โคที่ให้นมน้อย เพราะการให้นมสูงมีสหสัมพันธ์ (correlate) เชิงบวกกับการเกิดโรคเต้านมอักเสบ (Wilson, et al., 1972)

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณจूरรัตน์ แสนโกชน์ และคุณสายัณห์ บัวบาน ได้ให้คำแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูลงานวิจัยครั้งนี้บรรลุผลสำเร็จ

## เอกสารอ้างอิง

- Ali, A.K. and G.E. Shook. 1980. An optimum transformation for somatic cell concentration in milk. J. Dairy Sci. 63:487-490
- Bartlett, P.C. Van Wijk, D.J Wilson, C.D. Green, G. Miller, G.A. Majewski, and L.E. Heiderl 1991. Temporal patterns of lost milk production following clinical mastitis in a large Michigan Holstein herd . J. Dairy Sci. 74:1561-1572
- Boettcher, P. J., J.C.M. Dekkers and B.W. Kolstad. 1998. Development of an udder health index for sire selection based on somatic cell score, udder conformation and milking speed. J. Dairy Sci 86: 2984-2989
- Boldman, K.G., L.A. Kriese, L.D. Van Vleck, C.P. Van Tassell and S.D. Kachman, 1997 A manual for use of MTDFREML A set of programs to obtain estimates of variance and covariances., US Department of Agric Res. Service.
- Caraviello D.Z., K.A. Weigel and D. Gianola. 2004 Analysis of the relationship between type traits and functional survival in US Holstein cattle using a Weibull proportional hazards model J. Dairy Sci. J. Dairy Sci. 87:2677-2686.



- Cranford, J.L. and Pearson, R.E. 2001. Relationship of sire predicted transmitting ability for somatic cell score with measure of daughter performance. *J. Dairy Sci.* 84:p: 1504-1507.
- Dekkers, J.C.M. 1995. Genetic improvement of dairy cattle for profitability. In: *Animal Science Research and Development: Moving Toward a New Century*. Agri. Agri-Food Canad, Ottawa, pp. 307-327.
- Duangjinda, M., Misztal, I and Tsuruta S. 2004. BLUP 20 Dary Pak. Manual version 2.2 The University of Georgia, U.S.A. and Khon Kaen University, Thailand.
- Emanuelson, U., B. Danell and J. Philipsson. 1988. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell counts and milk production estimated by multiple-trait restricted maximum likelihood. *J. Dairy Sci.* 85:1325-1330.
- Fetrow, J., D. Mann, K. Butche, and B. McDaniel. 1991. Production loss from mastitis: carry over from the previous lactation. *J. Dairy Sci.* 74:833-839.
- Johnson, D. L., and R. Thompson. 1995 Restricted maximum likelihood estimation of variance components for univariate animal models using sparse matrix techniques and average information. *J. Dairy Sci.* 78:449-456.
- Henderson, CR 1984. Applications of linear models in animal breeding. University of Guelph, Guelph, Canana.
- McDaniel B.T. 1993. Regression of incidence of clinical mastitis on sire evaluations for somatic cell score. *J. Dairy Sci.* 77 p: 238
- Mrode R.A., and Swanson, G. J. T. 1996. Genetic and Statistical properties of somatic cell count and its suitability as an indirect means of reducing the incidence of mastitis in dairy cattle, *Anim. Breed. Abstr.* 64 p. 847-857.
- Phillipson J. Ral G. and Berglund B. 1995. Somatic cell count as a selection criterion for mastitis resistance in dairy cattle. *Livest. Prod. Sci.* 41. p:195-200.
- Roger, G.W. 2001. Importance of genetic evaluation for longevity in Dairy cattle. Agricultural Extension service. The University of Tennessee.
- Rupp, R. and D. Biochard. 1999 Genetic parameters for Clinical mastitis, somatic cell score, production, udder type trait, and milking ease in first lactation Holsteins. *J. Dairy Sci* 82:2189-2204
- Schukken, V.H., Mallard B.A., Dekkers. J.C.M., Leslie M.J 1994 Genetic impact on the risk of intra mammary infection following *Staphylococcus aureus* challenge, *J. Dairy Sci.* 77 p: 27-33
- Wilton, J.W., Van Vleck, L.D., Everett, R.W., Guthrie, R.S., Roberts, S.J.: Genetic and environmental aspects of udder infection. *J. Dairy Sci.* 1972; 55:183-193



สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์  
ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000