

อิทธิพลของยีนหลัก *DGATI* ต่อผลผลิตและคุณภาพน้ำมัน ในโคนมลูกผสมไทย – โฮลสไตน์

จุริรัตน์ แสนโกชนัน^{1*} สายัณห์ บัวบาน¹ และ กนกพร ไตรวิทยากร²

¹ กลุ่มวิจัยและประเมินพันธุกรรมสัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

² สถาบันวิจัยอนุชีววิทยาและพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

บท คัดย่อ

ปัจจุบันพบว่ายีน *DGATI* เป็นหนึ่งในยีนหลัก ที่มีตำแหน่งอยู่ที่บริเวณกลางโครโมโซมที่ 14 ซึ่งการกลายพันธุ์โดยการแทนที่ 2 เบส จาก AA เป็น GC มีผลให้การสร้างอะมิโนแอซิดที่เป็นองค์ประกอบของเอ็นไซม์ในการสร้างไขมันเปลี่ยนไป และการเปลี่ยนแปลงของ *DGATI* มีผลต่อการแสดงออกของลักษณะการให้น้ำมันและคุณภาพน้ำมันในโคนมโฮลสไตน์ฟรีเชียนพันธุ์แท้ในประเทศต่างๆ ที่เป็นผู้นำเข้าเลี้ยงโคนม แต่การศึกษาอิทธิพลของยีนนี้พบน้อยมากในโคนมลูกผสม ดังนั้นการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบของยีน *DGATI* ความถี่ของรูปแบบของยีน และผลต่อลักษณะการให้น้ำมัน ซึ่งผลจากการศึกษาพบว่า รูปแบบของยีน *DGATI* เบี่ยงเบนไปจากความสมดุลยตามธรรมชาติ ทั้งนี้อาจเนื่องจากการนำแหล่งพันธุกรรมจากต่างถิ่นมาใช้ในการปรับปรุง ผสมข้ามพันธุ์ ตลอดจนการคัดเลือกพันธุ์โคนมโดยเน้นด้านผลผลิตน้ำมันเพื่อตอบสนองตลาดผลิตภัณฑ์ โดยรูปแบบยีนที่เป็น KK มีผลบวกต่อเปอร์เซ็นต์ไขมันและโปรตีนในน้ำมัน ส่วนรูปแบบของยีน AA มีผลบวกต่อลักษณะปริมาณ ได้แก่ ปริมาณน้ำมัน ปริมาณไขมัน และปริมาณโปรตีนในน้ำมัน ความสัมพันธ์ดังกล่าวเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับผลจากการศึกษาในโคโฮลสไตน์ ฟรีเชียนพันธุ์แท้ ยกเว้นลักษณะปริมาณไขมันนม ผลการศึกษานี้ช่วยเพิ่มความมั่นใจในการใช้เทคโนโลยีด้านชีวโมเลกุลร่วมกับวิธีการดั้งเดิมในการประเมินพันธุกรรมเพื่อการคัดเลือกโคนม ซึ่งจะช่วยให้มีความแม่นยำและความก้าวหน้าทางพันธุกรรมของลักษณะที่ต้องการปรับปรุงพันธุ์สูงขึ้น

คำสำคัญ: *DGATI* ผลผลิต น้ำมัน โคนมลูกผสม ไทยโฮลสไตน์

เลขทะเบียนผลงานวิจัย 52(1)-0208-077

*ผู้รับผิดชอบบทความ

Effect of DGAT1 Major Gene on Milk Production and Quality Traits in Thai- Holstein Dairy Crossbred

Jureeratn Sanpote^{1*} Sayan Buaban¹ and Kanokporn Triwitayakorn²

¹ Animal Genetic Evaluation and Research Section, Bureau of Biotechnology in
Livestock Production, Dept. of Livestock Dev.

² Institute of Molecular Biology and Genetics, Mahidol Univesity

Abstract

The gene, acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase1(DGAT1), has recently been identified as the one underlying a major gene for milk production traits. This gene is located in the centromeric region of the bovine chromosome 14 in purebred Holstein Friesian with different origins. Two alleles, the lysine variant and the alanine variant were postulated at the *DGAT1*. This study aims to investigate the effects of a nonconservative lysine to alanine (K232A) substitution in the *DGAT1*, which very likely represents the causal mutation, on milk production traits. The polymorphisms of the *DGAT1* as well as their effects on milk traits in Thai Holstein dairy crossbred were identified. The genotypic and allelic frequencies were found to be deviated from equilibrium according to Hardy-Weinberg law. The KK genotype showed association with high fat and protein content of milk. While AA genotype associated with all yield traits, including milk, fat and protein yield. The substitution effects of $A \rightarrow K$ are significant for most of all milk traits except for fat yield. The results encourage the use of gene assisted selection incorporated with traditional genetic evaluation of dairy cattle in Thai Holstein dairy crossbred population in Thailand in the future.

Key words: *DGAT1*, milk production, Thai-Holstein, dairy crossbred

Research project no. 52(1)-0208-077

*corresponding author

Introduction

Genetic improvement of milk production traits in dairy cattle in Thailand is based on phenotype selection. For more than 40 yr, superior dairy sires and dam were identified using quantitative genetic evaluations by BLUP method. Selective use of these animals improved phenotypic measures for milk production and milk components in Thai Holstein dairy crossbred (TH) population of Thailand. However, there are some limitations on predicting breeding values of the individual using quantitative analysis. Low heritability of milk traits, limited data of offspring in progeny testing scheme, less distribution of the offspring over the varieties of management level resulted in very slow genetic progress (DLD dairy sire summary, 2009). However, advance knowledge of the molecular architecture of complex quantitative traits could indeed lead to new insights in the genetic evaluation system. Introduction of gene assisted selection (GAS) has been implementing in many countries like USA, Canada and New Zealand.

Candidate gene approaches provide tools for identifying and mapping genes affecting quantitative traits. A candidate gene can be defined as a major gene with biological effects on the physiology of a trait of interest (functional) or as a gene closely linked to a functional gene (positional). Polymorphisms within selected genes can be tested for their association with quantitative traits to better understanding of their effects and can be used in GAS. In addition, GAS together with traditional selection methods can be most effective for complex traits, improving accuracy, reducing generation interval and accelerating genetic progress.

In recent years, *DGAT1*, diacylglycerol O – transferase has been found to be of great interest. It is considered to be a key enzyme in controlling the synthesis rate of triglycerides in adipocytes. The knock-out of mouse *DGAT1* gene indicated its crucial role for lactation. Females deficient in this enzyme are characterized by a complete lack of milk production, most probably because of impaired triglycerides synthesis in the mammary gland (Smith *et al.* 2000).

In cattle, *DGAT1* is considered to be a very strong positional candidate gene for milk yield and composition (Coppieters *et al.* 1998, Heyen *et al.* 1999, Riquet *et al.* 1999, Farnir *et al.* 2002). A polymorphism in exon 8 of the *DGAT1* gene in *Bos taurus*, AA → GC exchange resulted in a non conservative substitution of amino acid 232 Lysine (K) → Alanine (A). The result of lysine for alanine substitution (K232A) has shown to be associated with milk production traits. In particular, the lysine encoding allele (allele K) is associated with increased fat content of milk compare to the alanine encoding allele (allele A) (Winter *et al.* 2002, Grisart *et al.* 2002, Thaller *et al.* 2003).

The aims of the current study were to determine the polymorphisms of *DGAT1* gene and their effects on breeding value and yield deviation for milk production traits of Thai Holstein dairy crossbred cows.

Materials and Methods

Animals

Blood samples, 5 ml were collected from 387 Thai-Holstein dairy crossbreds maintained at a dairy farm in Amphur Paktongchai, Nachornratchasima province, Thailand. Of each cow, blood was taken from the tail vein with vacuum tube contained EDTA and stored at 4°C until used in DNA extraction.

Genotype data

Genomic DNA of individual sample was extracted from peripheral blood using the phenol-chloroform method according to the standard protocol. Spectrophotometer was used for checking the quality and quantity of each DNA sample based on an optical density (OD) ratio of 260/280 nm between 1.6 and 1.8

PCR reactions were performed using *DGAT1* gene specific primers, DGAT1-F: 5'-GCACCATCCTCTTCCTCAAG-3' and DGAT1-R: 5'-GGAAGCGCTTTCGGATG-3' (Kaupe, 2004). The reactions composed of 60 ng of genomic DNA, 1X PCR buffer with 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.8 U *Taq* DNA polymerase and 0.5 μM of each primer. Amplifications were carried out using a Touch-down PCR profiles as follows: 94°C for 4 min; 10 cycles of 94°C 1 min, 66°C 1 min (with 1°C decrease for next cycle), 72°C for 1 min, then 25 cycles of 94°C, 1 min, 56°C 2 min and 72°C 1 min; followed by final extension at 72°C for 10 min. PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis and visualized by Ethidium bromide staining as shown in figure 1.

The amplified products (10μl of PCR products) were digested with 2 units of *CfrI* restriction endonuclease at 37°C for at least 12 h, and terminated the reaction at 65°C for 20 min. The reactions were then analyzed on 5% denaturing polyacrylamide gel electrophoresis and stained with silver staining. The genotype of *DGAT1* gene was scored as KK, KA and AA as shown in figure 2.

Phenotype Data

The individual estimated breeding value (BV) and yield deviation (YD) of milk production traits: 305 day adjusted production traits of milk yield, fat yield, protein yield, fat content and protein content of 387 Thai Holstein crossbred dairy cows (TH) born between 2000-2007 were used in the study.

BV for milk production traits was taken directly from the national genetic evaluation for the Thai Holstein dairy crossbreds in 2009. The estimated breeding values for all traits of the individuals in the DLD dairy cattle database system were calculated using the BLUPF90 and AIREMLF90 programs in BLUPF90-DairyPAK 3.0 (Duangjinda, M.; Misztal, I. and S. Tsuruta, University of Georgia, available at <http://agserver.kku.ac.th/monchai>). Model was described in the following equation

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}\boldsymbol{\beta} + \mathbf{Z}\mathbf{a} + \boldsymbol{\varepsilon},$$

$$\text{Var} \begin{bmatrix} \mathbf{a} \\ \mathbf{e} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{A}\sigma_a^2 & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{I}\sigma_e^2 \end{bmatrix}$$

Where $\mathbf{y}$ is a vector of lactation milk yield ; $\boldsymbol{\beta}$ is a vector of fixed effect of breed fraction, herd-year-season, age at calving and age at calving²; $\mathbf{a}$ is a vector of random additive genetic effects; $\mathbf{X}, \mathbf{Z}$ are known incidence matrices relating the observations to the respective fixed and random effects; $\mathbf{A}$ is an additive numerator relationship matrix; σ_a^2, σ_e^2 are additive genetic and residual variances.

The advantage of using EBV as trait data in this study is the allele regressed on additive gene effect, which benefits selection on transmitting ability.

Yield deviation (YD) which is a cow's production corrected for all fixed effect was calculated using model modified from Israel and Weller (1998). The advantage of using YD is that if the allele is associated with YD but not with EBV, indicated the non-additive gene effect to be occurred on that position.

$$YD_i = y - \hat{\beta}_i$$

Where YD_i is a yield deviation of cow i ; y = milk yield of the cow in lactation; $\hat{\beta}_i$ = all fixed effect solutions including breed fraction, herd-year-season age at calving and age at calving².

Heterozygosity was also estimated to identify the genetic variability in the Thai HF dairy crossbred in this study. The observed heterozygosity was obtained as follows:

$$H(\text{observe}) = \sum_i \sum_{j=i} \frac{N_{ij}}{N} \quad \text{Halden (1954)}$$

Where N_{lij} is the number of heterozygous individuals in the l locus; N is the number of individuals analyzed.

The Hardy-Weinberg expected heterozygosity was obtained from the estimated allele frequencies:

$$H(HW) = 1 - \sum_{i=1}^n p_{li}^2$$

Where p_{li} is the frequency of the i allele at the l locus; n is the number of alleles at the l locus.

High heterozygosity (or) means lots of genetic variability. Low heterozygosity means little genetic variability.

Statistic analysis

Genotype frequencies, allele frequency and heterozygosity were calculated. Hardy-Weinberg heterozygosity and equilibrium were evaluated by the exact probability test (Haldane, 1954) under the assumption of a chi-square (χ^2) distribution. The allele substitution and genotype effect of *DGAT1* polymorphism on breeding value and yield deviation of 305 days milk yield, fat yield, protein yield, and fat and protein content were estimated and tested using regression analysis and one-way ANOVA. The analyzed locus was shown as genotype classes and regression on the number of alternative allele.

Results and Discussion

The PCR reactions resulted in 411 bp fragments as shown in figure 1. The restriction digestion analysis of 411 bp PCR product of *DGAT 1* indicates the presence of three restriction patterns. In the first pattern, one fragment (uncut) of 411 bp was observed while in the second pattern showed two fragments of 208 and 203 bp. The third pattern produced three fragments of 411, 208, 203 bp, which was the coupling of first and second patterns, in other words it is a heterozygote (figure 2). The first pattern was assigned as genotype KK (lysine variant); second pattern was genotype AA (alanine variant) and the third was genotype KA (heterozygous). The results are in accordance with the data reported by Khun *et al.* (2004), Pareek *et al.* (2005) and Lacorte *et al.* (2006).

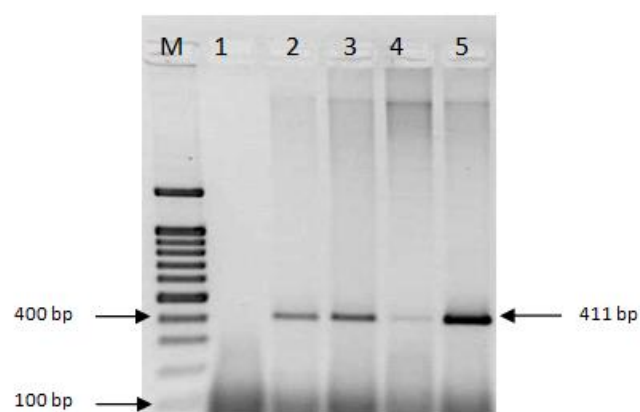


Figure. 1 *DGAT1* undigested PCR product on 1.5% agarose gel (Lane M 100 bp. + 1.5 kb DNA marker, Lane 1 Negative control, Lane 2 - 5 undigested *DGAT1*)

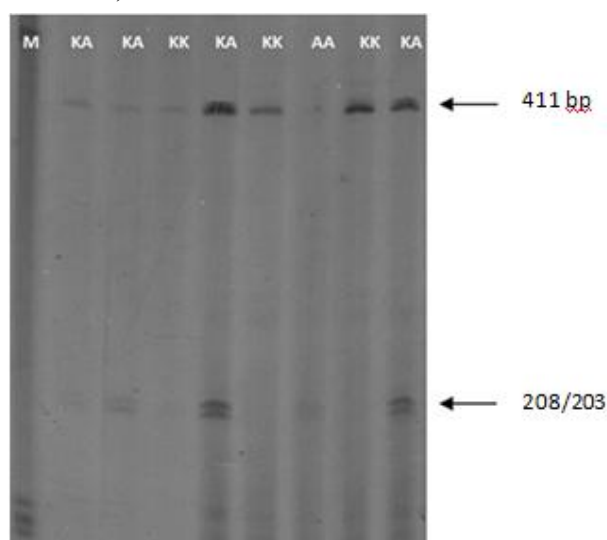


Figure2. *DGAT1* genotyping by PCR-RFLP method (using *Cfr*I (EaeI) restriction enzyme). L3-L5: *DGAT1* genotype KK (411 bp fragments); *DGAT1* genotype AA (208 and 203 bp fragments); *DGAT1* genotype KA (411, 208, and 203 bp fragments)

Table1. *DGAT1* genotype, allele frequency and heterozygosity (%) in TH dairy crossbreds

	Genotype frequency			Allele frequency		Heterozygosity	
	AA	KA	KK	A	K	Observed	Expected
N	3	222	162				
	0.77	57.36	41.86	29.46	70.54	57.36	41.56

Genotypic and allelic frequencies were calculated and the results are shown in Table 1. Thai Holstein dairy crossbreds (TH) showed a frequency of 29.45 % for the A allele. The result is in consistent with the report of Larcorte (2006) which found 39% of allele A in Gir-HF crosses. The A allele in the TH population may derived from the HF breed since there were many studies confirmed fixed *DGAT1* K allele or very low frequency of A allele (0-5%) in *Bos indicus* eg: Gir, Guzerat, Nellore and Red Sindhi (Kaupe *et al.*, 2004; Madhu *et al.*, 2006 and Larcorte *et al.*, 2006). In contrast with Holstein Friesian breed (*Bos Taurus*), the high percentage of A allele was found. Ripoli *et al.* (2006) reported that European *Bos taurus* breeds, with the exception of Jersey breed, showed the lowest frequency of the K allele, while highest K allele frequencies were harbored by *Bos indicus* type cattle.

The reviews in Scotti *et al.* (2010) study confirmed the higher A allele than K allele in Holstein population in various countries. It seems that influences of North American Holstein genetics or selection programs oriented to maximize milk yield, tended to increase p.232A allele frequency.

Since the TH population in Thailand is started from Thai native cows (*Bos indicus*) which expected to have low or none of A allele in the population, and the purebred Holstein Friesian sires, mostly from the US origin was used for genetic improvement in Thailand for long time, thus this may be the source of the A allele in the TH population.

Deviation from Hardy-Weinberg equilibrium of the *DGAT1* K232A genotypic frequencies for the TH dairy crossbreds in this study ($p < 0.01$) was observed in which there was an excess of heterozygous animals (57.36%) and almost absence of animals with the p.232AA genotype (0.77%). This disequilibrium could be a result of selection program of HF crossbred sires using in the routine AI in dairy cattle genetic improvement under Master Bull project of Thailand since 1992. The selection is emphasized on milk production, since the main dairy product (more than 90%) in Thailand is ready to drink milk, and may cause the rise of A allele frequency in the crossbred population. This result was explained by the report of Weller *et al.* (2003) which demonstrated that allele frequencies of this quantitative trait nucleotide (QTN) could be relatively easily modified by means of variation in selection directions.

The observed heterozygosity (57.36%) as well as expected (HW) heterozygosity (41.56%) are shown in Table 1. The numerous heterozygous animals provide chances of A allele selection in TH population.

Table2. Breeding value (BV) and Yield deviation (YD) of milk traits according to genotype on the DGAT1 locus and substitution effect of $A \rightarrow K$ allele.

Genotype	n	Milk yield(Kg.)		Fat yield (Kg.)		Protein yield (Kg.)		Fat content (%)		Protein (%)	
		BV*	YD**	BV	YD	BV	YD*	BV**	YD**	BV	YD*
Mean		36.26	90.52	2.83	6.14	1.90	4.71	.02	.06	.01	.01
AA	3	156.11	352.75	3.41	8.91	6.33	16.51	-.04	-.23	-.03	-.13
KA	222	70.84	190.07	3.09	7.21	2.47	6.83	.01	-.02	.01	-.01
KK	162	-13.35	-50.76	2.46	4.64	1.04	1.58	.03	.17	.01	.05
$A \rightarrow K$		-84.23**	-237.51**	-.62	-2.53	-1.53*	-5.44**	0.02**	0.19**	0.01	0.02*

*P<0.05

** P<.01

The present study shows a relationship between the BV and YD for selected milk production traits and *DGAT1* genotype in Table 2. The KK genotype associated with highest content traits (fat and protein percentage) and lowest for all yield traits (milk, fat and protein yield).

The KK genotype was associated with highest BV ($p<0.01$) and YD ($p<0.05$) for fat content of milk. The results are in accordance with the results of Winter *et al.* (2002), Grisart *et al.* (2002) and Thaller *et al.* (2003). On the other hand, KK animals in this study presented the lowest BV and YD for all yield traits: milk, fat and protein yield. However, the intergenotype differences on fat yield showed not significant. The highest protein content seemed to be related with the lowest milk yield, causing the lowest BV and YD for protein yield. A similar observation concerning lower milk and protein yields was presented by Spelman *et al.* (2002), studied on milk production traits in Holstein-Friesian, Jersey and Ayrshire cattle in New Zealand. However, the different result was found for the effect of KK genotype on fat yield. Spelman *et al.* (2002) found that the KK genotype was associated with higher fat yield. Such a tendency was contradict to the result presented in the current report which found lowest fat yield in KK genotype.

The allele substitution effects on milk traits are statistically significant except for fat yield. The direction of substitution also found similar to the results reported by Winter *et al.* (2002), Grisart *et al.* (2002) and Thaller *et al.* (2003). Only substitution effect on fat yield is contradicted to those studied in purebred dairy

cattle. The finding different effects might be influenced by different genetic background, population level, or selection criteria. This supported by the results found by Grisart *et al.* (2002) in the New Zealand population.

Conclusion

Although the magnitude of the K232A mutation effects on milk traits differed between populations, most of the direction was the same in this study, except for fat yield. The lysine variant was consistently associated with high fat and protein contents, whereas the alanine variant increased milk and fat and protein yields. The significant of YD on most traits indicates non additive genetic effect of the *DGATI* gene as the additional source of variation, either within the acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase or in another locus. These results can be the basis for future studies on testing the *DGATI* neighboring loci as candidate genes for milk traits in dairy cattle. In conclusion, polymorphism of *DGATI* is likely to be useful for GAS together with traditional selection methods for selection of superior dairy cattle. Using this technology for complex traits will not only improve accuracy and reducing generation interval but also accelerating genetic progress which is the indicator of success in dairy cattle genetic improvement program.

References

- Coppieters, W., Riquet, J., Arranz, J., Berzi, P., Cambisano, N., Grisart, B., Karim, L., Marcq, F., Moreau, L., Nezer, C., Simon, P., Vanmanshoven, P., Wagenaar, D. and Georges, M. 1998. A QTL with major effect on milk yield and composition maps to bovine chromosome 14. *Mamm. Genome*. 9:540-544.
- Duangjinda, M.; Misztal, I. and Tsuruta, S. 2010. University of Georgia, available at <http://agserver.kku.ac.th/monchai>. Accessed March 2010. Available.
- Farnir, F., Grisart, B., Coppieters, W., Riquet, J., Berzi, P., Cambisano, N., Karim, L., Mni, M., Simon, P. and Wagenaar, D. 2002. Simultaneous mining of linkage and LD to fine map QTL in outbred half-sib pedigrees: Revisiting the location of a QTL with major effect on milk production on bovine chromosome 14. *Genetics*. 161:275-287.
- Grisart, B., Coppieters, W., Farnir, F., Karim, L., Ford, C., Berzi, P., Cambisano, N., Mni, M., Reid, S., Simon, P., Spelman, R., Georges, M. and Snell, R. 2002. Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: Identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. *Genome Res*. 12:222-231.
- Haldane, J.B.S. 1954. An exact test for randomness of mating. *J. Genet*. 52: 631-635.
- Heyen, D. W., Weller, J. L., Ron, M., Band, M., Beever, J. E., Feldmesser, E., Da, Y., Wiggans, G. R., VanRaden, P. M. and Lewin, H. A. 1999. A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. *Physiol. Genomics*. 1:165-175.
- Israel, C. and Weller, J.I. 1998. Estimation of candidate gene effects in dairy cattle populations. *J. Dairy Sci*. 81:1653-1662.
- Kaupe, B., Winter, A., Fries, R. and Erhardt, G. 2004. *DGAT1* polymorphism in *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle breeds. *J. Dairy Res*. 71: 182-187.
- Kühn, C., Thaller, G., Winter, A. and Bininda-Emonds O.R.P. 2004. Evidence for multiple alleles at the *DGAT1* locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in Cattle. *Genetics*. 167: 1873-1881.
- Lacorte, G.A., Machado, M.A., Martinez, M.L., Campos, A.L., Maciel, R.P., Verneque, R.S., Teodoro, R.L. M.G., Peixoto, C.D., Carvalho, M.R.S. and Fonseca, C.G. 2006. DGAT1 K232A polymorphism in Brazilian cattle breeds. *Genetics and Molecular Research*. 5 (3): 475-482.

- Madhu S. Tantia, Ramesh K. Vijh, Bishnu P. Mishra, Bina Mishra, ST Bharani Kumar and Monika, S. 2006. DGAT1 and ABCG2 polymorphism in Indian cattle (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) breeds. *BMC Veterinary Research* 2006, 2:32doi:10.1186/1746-6148-2-32
- Pareek, C.S., Czarnik, U., Zabolewicz, T., Pareek, R.S. and Walawski, K. 2005. DGAT1 K232A quantitative traits nucleotide polymorphism in Polish Black-and-White cattle. *J. Appl. Genet.* 46: 85-87.
- Ripoli, M.V., Corva, P. and Giovambattista, G. 2006. Analysis of a polymorphism in the DGAT1 gene in 14 cattle breeds through PCR-SSCP methods . *Research in Veterinary Science.* 80(3): 287-290
- Riquet, J., Coppieters, W., Cambisano, N., Arranz, J.J., Berzi, P., Davis, S.K., Grisart, B., Farnir, F., Karim, L., Mni, M., Simon, P., Taylor, J.F., Vanmanshoven, P., Wagenaar, D., Womack, J.E. and Georges, M. 1999. Fine-mapping of quantitative trait loci by identity by descent in outbred populations: application to milk production in dairy cattle. *Proc. Nat.l Acad. Sci.* 96:9252-9257.
- Scotti, E., Fontanesi, L., Schiavini, F., La Mattina, V., Bagnato, A. and Russo, V. 2010. DGAT1 p.K232A polymorphism in dairy and dual purpose Italian cattle breeds. *Italian Journal of Animal Science*, Vol 9, No 1 (2010).
<http://www.aspajournal.it/index.php/ijas/article/viewArticle/ijas.2010.e16/1288>. Accessed March 2010. Available.
- Smith, S.J., Cases S., Jensen D.R., Chen, H.C., Sande, E., Tow, B., Sanan, D.A., Raber, J., Eckel, R.H. and Farese, JR. R.V. 2000. Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking Dgat. *Nature Genetics* 25: 87-90.
- Spelman, R. J., Ford, C. A., McElhinney, P., Gregory, G.C. and Snell, R.G. 2002. Characterization of the *DGAT1* gene in the New Zealand dairy population. *J. Dairy Sci.* 85: 3514–3517.
- Thaller, G., Krämer, W., Winter, A., Kaupe, B., Erhardt, G. and Fries, R. 2003. Effects of DGAT1 variants on milk production traits in German cattle breeds. *J. Anim. Sci.* 81:1911-1918.
- Weller, J.I., Golik, M., Seroussi, E., Ezra, E. and Ron, M. 2003. Population-wide analysis of a QTL affecting milk-fat production in the Israeli Holstein population. *J. Dairy Sci.* 86:2219-2227.
- Winter, A., Kramer, W., Werner, F.A.O., Kollers, S., Kata, S., Durstewitz, G., Buitkamp, J., Womack, J.E., Thaller, G. and Fries, R. 2002. Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase (DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99:9300-9305.

การศึกษาการแสดงออกของยีน Butyrophillin ต่อปริมาณไขมันในน้ำนมโคนม

ลูกผสมไทย-โฮลสไตน์

สายใจ ชื่นสุข^{1*} ณชัย สรรพพันธุ์¹ และ กัลยา เก่งวิชัยกรรม¹

¹กลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

กรมปศุสัตว์

บทคัดย่อ

Butyrophillin (BTN) เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งพบได้ใน milk fat globule membrane ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และมีส่วนสำคัญในการช่วยจับหลังไขมันในน้ำนมของเต้านม ซึ่งปริมาณไขมันในน้ำนมนี้มีความสำคัญในแง่คุณค่าทางเศรษฐกิจ การศึกษาความแตกต่างของรูปแบบยีนในระดับโมเลกุลของโคนมพันธุ์ Thai-Holstein ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการเลี้ยงอย่างแพร่หลายในประเทศไทยจะมีส่วนช่วยในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์เป็นอย่างมาก จากการศึกษาจำนวนโค 237 ตัวโดยใช้วิธี PCR-RFLP และการหาลำดับเบสเพื่อตรวจสอบลักษณะของ exon 8 ของ BTN ยีน พบว่ามีลักษณะแตกต่างกันของอัลลีล 2 ลักษณะได้แก่ อัลลีลแบบ A และ แบบ B ทำให้เกิดลักษณะทางพันธุกรรม 2 แบบ คือ AA และ AB โดยมีความถี่ของอัลลีล A และ B ในประชากรกลุ่มนี้เป็น 0.91 และ 0.19 และความถี่ของลักษณะพันธุกรรมแบบ AA และ AB เป็น 0.82 และ 0.18 ตามลำดับ ลักษณะที่แตกต่างนี้ พบว่ามีผลต่อปริมาณส่วนประกอบในน้ำนมโค โดยโคที่มีรูปแบบยีน BTN แบบ AA มีค่าทางพันธุกรรม เปอร์เซ็นต์ไขมันและโปรตีนในน้ำนม สูงกว่ารูปแบบ AB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

คำสำคัญ โคนม ไขมันในน้ำนม โคไทย-โฮลสไตน์ butyrophilin gene PCR-RFLP

เลขทะเบียนผลงานวิจัย 52(1)-0208-078

*ผู้รับผิดชอบบทความ

Genotypic Effect of Butyrophilin Gene on Milk Fat in Thai-Holstein Dairy Cow

Saijai Cheunsuk^{1*} Nachai Sarataphan¹ and Kalaya Kengwikum¹

¹Livestock Biotechnology Research and Development Section, Bureau of Biotechnology in
Livestock Production, Department of Livestock Development, Thailand.

Abstract

Butyrophillin (BTN) is an integral protein associated with milk fat-globule membrane in most mammal species. It plays a significant role in secretion of milk lipid which affects an economically important trait in dairy animals. A genetic polymorphism study on this gene had been carried out to estimate the effects of variability on milk traits in Thai-Holstein dairy cow in Thailand. BTN polymorphisms were identified using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) and DNA sequencing in 237 cattle. In all cattle, 501 bp of PCR product consisting of part of exon 8 was amplified and digested with *HaeIII* restriction enzyme. Two alleles namely A and B were observed. Two *HaeIII* restriction sites were found in the allele A as 316 and 162 bp fragments. In the allele B, 316 bp was replaced with 283 bp fragment. Two genotypes, AA and AB, were found and the frequencies of these genotypes were 0.82 and 0.18. This gives frequencies of 0.91 and 0.19 for A and B alleles. The genotypes had significant effects on breeding value, fat% and protein% in which AA genotype showed higher average yield for these traits than AB genotype. ($p < 0.05$)

Keywords: butyrophilin gene, dairy cow, milk fat, PCR-RFLP, Thai-Holstein cattle

Research project no. 52(1)-0208-078

* corresponding author

Introduction

Milk is a heterogeneous mixture of a colloidal suspension of proteins and milk fat, in an aqueous medium containing lactose, minerals, and other minor components. Despite of some minor differences, the qualitative make-up of milk is very similar among mammals. However, the proportion of each constituent differs from one species to another, reflective of the needs of their respective offspring. Variation at DNA level contributes to the genetic characterization of livestock population and may help to identify possible milk production traits. In order to meet the growing demand for milk, improvements in dairy cattle has focused on selection to improve quantity and quality of milk production. To find out which DNA markers influenced these important traits will provide potential tools to customize the composition of milk by selecting for a desirable character that suitable for the marketing.

Butyrophilin (BTN) is the major integral protein associated with milk fat-globule membrane in the most of mammal species. The bovine butyrophilin gene has been mapped to chromosome 23 (Ashwell et al., 1996; Taylor et al., 1996). In the same region, several quantitative trait loci (QTLs) for health and production traits have been identified. Many of them were found to influence the somatic-cell content of milk (Ashwel et al., 1996; Heyen et al., 1999). Because of its especially expression on the apical surface of the mammary epithelial cells in the final stage of pregnancy and during lactation, butyrophilin may function either in the secretion of milk fat droplets or in the maternal/neonatal immunity (Franke et al., 1981; Mather IH. and Jack LJW., 1993). Furthermore, the BTN-knockout mice showed an accumulation of lipid in the cytoplasm of milk-secreting cells and lipid droplets escaped from the cells without an intact membrane suggesting that the butyrophilin is required for proper milk-fat secretion (Ogg et al., 2004). Bhattacharya et al (2004) studied the variability at nucleotide level in cattle and revealed polymorphism of this gene. Restriction enzyme *Hae III* PCR-RFLP reaction of exon 8 of BTN gene showed three genotypes; AA, AB, and BB. The further research was conducted to detect whether these genotypes effected on milk quality traits (Bhattacharya et al., 2006). Interestingly, in cross breed Holstein and Haryana cattle, milk-fat% trait was found to be significantly associated with genotypes while total protein% was not significantly affected by butyrophilin genotypes. Komisarek et al. (2006) reported the same result in Jersey cattle. The aims of this study were to detect polymorphism of the butyrophilin exon 8 and to estimate the effect of BTN polymorphisms on milk-fat

quality traits in Thai- Holstein cattle which are the most dairy cattle raised in Thailand. The ability to select a desirable allele of BTN will provide potential tools to be used as a marker assisted selection (MAS) for Thai- Holstein dairy cow breeding plan in Thailand.

Materials and methods

Sample and DNA preparation

Blood samples were collected from 237 Thai-Holstein cattle maintained at a dairy farm in Amphur Paktongchai, Nachornratchasima province, Thailand. From each animal, about 5 ml. of blood was taken from the tail vein with vacuum tube contained EDTA and stored at 4⁰C until DNA extraction. Genomic DNA was isolated by using DNA extraction kit (Axygen, USA). Spectrophotometer was used for checking the quality and quantity of each DNA sample based on an optical density (OD) ratio of 260/280 nm between 1.6 and 1.8.

PCR-RFLP reaction

A 501 bp butyrophilin gene fragment covering part of exon 8 was amplified by using primer sequences which were established on the basis of gene sequence available in the GenBank database (accession number Z93323) (Taylor et al., 1996) (Table 1). The PCR amplification was performed in a total of 20 µl with 20 ng of genomic DNA, 0.2 µM of each primer, 0.2 mM of each dNTP, 1.5 mM of MgCl₂, 1x PCR reaction buffer, and 1U of Taq DNA polymerase. Amplification conditions included an initial denaturation at 95⁰C for 5 min, followed by 35 cycles at 95⁰C for 30 sec, 65⁰C for 60 sec, and 72⁰C for 60 sec, then followed by a final extension at 72⁰C for 5 min. The PCR products were separated by 2% (w/v) agarose gel electrophoresis.

The amplified fragments of butyrophilin gene were digested with 1 unit of *Hae III* restriction enzyme at 37⁰C 90 min in water bath and at 80⁰C 15 min. to inactivate enzyme activity. The digested PCR products were subjected to 3% (w/v) agarose gel electrophoresis for 1.5 hr. and stained with ethidium bromide. The gel was visualized and documented on Gel-Doc system (Alpha image 3400, USA).

Name primers	Sequence (5'-3')	PCR-product size (bp)	RFLP endonuclease	RFLP site sequences
Btn-forward	TGGAGCTCTATGGAAATGGG	501	<i>HaeIII</i>	CC-GG
Btn-reverse	TACCCAACAGGAAGAAACAG			

Table1. Primers used to amplify fragment of the butyrophilin gene, size of PCR product, and restriction enzyme site.

Sequencing

The PCR products belonging to different genotypes were purified using PCR purification kit (Macherey-Nagel) and sequenced the purified products using the automated dye-terminator cycle sequencing method with Ampli *Taq* DNA polymerase in ABI 3130 DNA Analysis Sequencer (ABI, USA).

Statistic analysis

Allele and genotype frequencies were calculated and a chi-square analysis was performed to test whether the genotype distributions obtained complied with the Hardy-Weinberg law. The effect of genotypes on milk fat, protein, and yield traits was tested using the GLM procedure of the Least Square Means and an F-test conducted to evaluate the significance of differences between the least square means. The design QTL marker model used was

The statistical model included the effects of BTN genotypes, breed fraction, herd-year-season age at calving and age at calving² of an individual deviated from adjusted population mean. The breeding value of the individual animal using animal model was evaluated by Best Linear Unbiased Prediction (BLUP). The analysis was carried out of 237 cows with 305-day completely lactation. Data for 305-day lactations included overall milk, fat, and protein yields as well as fat and protein contents, originated from the routine control of milk performance and were obtained from the farm documentation.

Results

Polymorphism

The PCR reactions resulted in 501 bp (long gene) fragments. *Hae III* restriction enzyme revealed two restriction patterns of which first pattern showed two bands of 316 and 162 bp and the second pattern showed 316, 283, and 162 bp in the agarose gel (Figure 1). However, the first pattern was assigned as genotype AA whereas the second pattern as genotype AB as described in Bhattacharya et al. (2004; 2006).

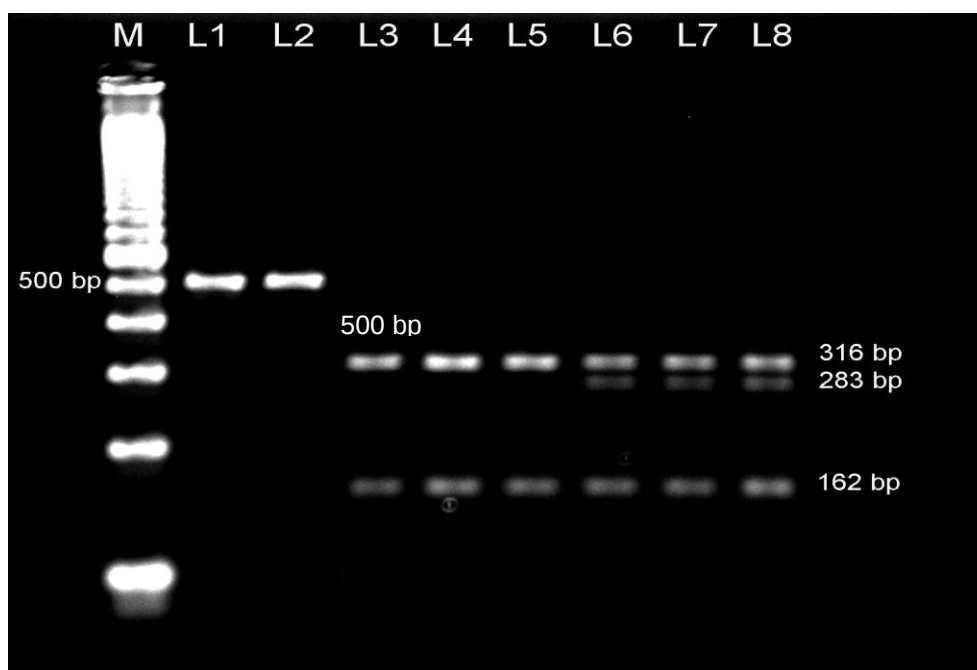


Figure1. *BTN* genotyping by PCR-RFLP method. Lane M: 100 bp DNA marker; L1-L2: 501 bp undigested PCR products; L3-L5: *BTN* genotype AA (316 and 162 bp fragments); L6-L8: *BTN* genotype AB (316, 283, and 162 bp fragments)

In allele A, the *HaeIII* restriction sites were presented in 163rd, 176th, and 186th position on the gene while in allele B, an addition of restriction site was presented in 217th position (Figure2.)

Allele A	TCCAA <u>GGCC</u> TCTTTCTCT <u>GGCC</u> CCCTCC <u>GGCC</u> CTTCTTCTGCTTGTGGTCCTGTGGTAAAAAGCCCTGACT	225
Allele B	TCCAA <u>GGCC</u> TCTTTCTCT <u>GGCC</u> CCCTCC <u>GGCC</u> CTTCTTCTGCTTGTGGTCCTGTGGTAAAA <u>GGCC</u> CCTGACT	225

Figure2. Underline letters indicated the *HaeIII* restriction sites (GG-CC) in PCR fragments. Allele A presented 3 positions (163rd, 176th, and 186th) and allele B showed an extra restriction site in 217th position.

Frequencies

Among the 237 cows examined, the BTN-AA genotype was identified in 195 animals and AB genotype in 42 animals. The frequencies of two genotypes, AA and AB, in Tropical Holstein cattle were found to be 0.82 and 0.18, respectively. The frequencies of A and B alleles were estimated as 0.91 and 0.09, respectively (Table 2). All genotypes were distributed according to the Hardy-Weinberg equilibrium.

Genotypes	n	Genotypic	Allele Frequency	
		Frequency	A	B
AA	195	0.82	0.91	0.09
AB	42	0.18		
BB	0	0		

Table2. Genotype and gene frequencies of the *HaeIII*-RFLP of exon 8 of *BTN* gene in 237 Thai- Holstein cattle.

Sequence variability

Two genotype patterns, AA and AB, were sequenced and the sequences were aligned to the NCBI gene bank (Accession number: AY491470 and AF037402) (Figure 2). Six nucleotide substitutions from allele A to B were observed as cytosine to guanine at 71st position of the fragment, cytosine to thymine at 86th position, adenine to thymine at 217th position, guanine to adenine at 258th position, adenine to cytosine at 371st position and cytosine to thymine at 377th position (Figure 3). The nucleotide substitutions at 217th, 258th, and 317th positions from allele A to B effected amino acid changes from Lysine to Arginine, Valine to Isoleucine, and Threonine to Proline at the respective position. Meanwhile, the nucleotide substitutions at 71st, 86th, and 377th positions from allele A to B showed silent mutation where there was no change of amino acids at the corresponding locations.

Positions	7	8	2	2	3	3
	1	6	1	5	7	7
			7	8	1	7
BTN:Taurus	---CCCGCCGGGTGGGGTCTTC---AAAGCC---GAGTCA---CTACAGCCAGC---					
BTN:exon8	---CCCGCCGGGTGGGGTCTTC---AAAGCC---GAGTCA---CTACAGCCAGC---					
allele A	---CCCGCCGGGTGGGGTCTTC---AAAGCC---GAGTCA---CTACAGCCAGC---					
:amino acid	K V T					
allele B	---CGCGCCGGGTGGGGTTTC---AAGGCC---GAATCA---CTCCAGCCAGC---					
:amino acid	R I P					

Figure3. Nucleotide sequence of butyrophilin gene allele A and B in Tropical Holstein cattle, aligned to BTN-*Bos taurus* (accession number: AF037402) and BTN-exon 8 (accession number: AY491470)

- Numbers in the box indicated the positions of the substituted nucleotides
- Underline letters indicated substituted nucleotides from allele A to allele B
- Bold letters indicated amino acid change from allele A to allele B

Association

The *BTN* genotypes were found to have significant effect on milk fat % and milk protein% ($p < 0.05$) (Table3.). AA genotype showed breeding value for milk fat as 0.047 which was higher than AB genotype as 0.015. As well as milk protein, the AA genotype produced higher breeding value than AB genotype as 0.027 and 0.007, respectively. However, the genotype was not found to be significantly associated with total milk yield ($p > 0.05$).

Trait	Genotype frequencies		
	AA	AB	BB
	0.82	0.18	0
No. of cows	195	42	0
Milk yield*	4054.53 ± 682.04	3837.15 ± 515.46	-

BV_M305 (milk yield)	-29.76 ^a	73.95 ^a	-
Fat yield*	162.15 ± 30.79	156.97 ± 21.15	-
% Fat	4.01 ± 0.44	4.11 ± 0.41	-
BV_AVG Fat	0.0469 ^b	0.0146 ^b	-
Protein yield*	130.39 ± 22.25	125.71 ± 15.88	-
% Protein	3.22 ± 0.25	3.29 ± 0.24	-
BV_AVG Pro	0.0271 ^c	0.0072 ^c	-

Table3. * Overall means and their standard deviations for milk production traits in AA and AB genotypes.

a, b, and c – rows with the same superscript differ at $P < 0.05$.

Discussion

BTN gene has been described in most mammal species and is likely to affect economically traits in dairy animals because of its specifically expression in the lactating mammary epithelial tissue. Moreover, *BTN* gene product functions in the secretion of fat globules at the apical surface of these cells during lactation (Jack and Mather, 1990). Several polymorphisms of *BTN* have been identified (Husaini et al., 1999; Taylor et al., 1996; Zegeye et al., 1999) as well as their impact on production traits (Komisarek and Dorynek, 2003; Komisarek et al., 2006). In this paper, the exon 8 of butyrophilin gene was examined for polymorphisms in 237 Thai-Holstein cattle. The PCR reaction resulted in 501 bp long gene fragment. In allele A, the restriction sites were presented in 163rd, 176th, and 186th position on the gene while in allele B, an addition of restriction site was presented in 217th position which were similar to the previous reports (Taylor et al., 1996; Bhattacharya et al., 2006). This addition restriction site resulted in the different of visible bands in gel electrophoresis. The allele A presented 316 and 162 bp while in the allele B, the 316 band was replaced with 283 bp. To explore what kind of nucleotide changes being present in this gene other than RFLP variability, gene sequencing was performed. Both alleles from all herd RFLP detection were examined on small number of screened animals. Only three animals from each group were used for sequencing. All the animals which were the same RFLP pattern had the same DNA sequence. From this result, PCR-RFLP method can be used to categorize animals for butyrophilin gene for it does not only reduce the workload but also reduce the cost.

In this study, only 2 genotypes were observed which were AA and AB with frequency of 0.82 and 0.18, respectively. This result was different from previous work (Bhattacharya et al., 2006) for their report of 3 genotypes (AA, AB, and BB). However, Sadr et al. (2008) studied in 3 different region cattle. Only 1 group (Shadegan region) had 3 genotypes whereas other groups (Shoshtar and Mahshar regions) had 2 genotypes (AA and AB). The allele frequencies estimated for this population; 0.91 for allele A and 0.19 for allele B, differ from those previously reported from Bhattacharya et al. (2006) in Holstein-Friesians X Haryana crossbred cattle; 0.87 for allele A and 0.13 for allele B. However, no BB genotypic animal was identified in this Thai-Holstein cattle group so it is characterized by the preponderance of the A variant. Moreover, this farm was selected because of its excellent management including record system. Dairy cows raised in this farm have been selected from generation to generation for the best productivity suggesting that allele A might be favored by selection for milk performance.

Sequencing results indicated the nucleotide changes between allele A and B and consequently 3 amino acid substitutions had been found. These substitutions might affect in the post-translational level causing changes in biological activity of the protein. Changes in structure and function of BTN gene may play a role in causing different secretion level of compositions in milk. Considering of milk quality; fat% and protein%

In Table 3. The overall means and their standard deviations for milk production, fat and protein yield in AA and AB genotypes are likely different. It seems that allele AA has higher performance than allele AB in the same feed and management. (However, this is actual means, calculated from the phenotype which is not adjusted for sire, lactation and the age of cows.) According to negative correlation, higher milk yield in allele AA resulted in lower %fat and %protein than allele AB. In allele AA has BV_M305 (milk yield), BV_AVG Fat and BV_AVG Pro lower than allele AB. It indicated that allele AA has less ability than the average of the herd and less than AB.

In conclusion, polymorphism of *BTN* exon 8 is likely to be used as a genetic marker for selection of superior dairy cattle. Using of this technology not only reduce the generation interval but also enhance the genetic gain with the desired traits over the period of time. However, the further investigation

should be conducted over a large size of samples, both in different areas and breeds, as well as other allelic difference in other part of *BTN* gene, taking into consideration all possible genotype at difference loci.

References:

- Ashwell, M.S., Ogg, S.L. and Mather, I.H. (1996). The bovine butyrophilin gene maps to chromosome 23. *Anim. Genet.* 27: 171-173.
- Bhattacharya, T.K., Misra, S.S., Sheikh, F.D., Dayal, S., Vohra, V., Kumar, P., and Sharma, A. (2004). Variability of milk fat globule membrane protein gene between cattle and riverine buffalo. *DNA Seq.* 15(5-6): 326- 331.
- Bhattacharya, T.K., Misra, S.S., Sheikh, F.D., Sukla, S., Kumar, P., and Sharma, A. (2006). Effect of Butyrophilin Gene Polymorphism on Milk Quality Traits in Crossbred Cattle. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol.19, No.7: 922-926.
- Franke, I.H., Heid, H.W., Grund, C., Winter, S., Freudenstein, C., Schmid, E., Jarasch, E.D., and Keenan, T.W. (1981). Antibodies to the major insoluble milk fat globule membrane-associated protein: specific location in apical regions of lactating epithelial cells. *J. Cell Biol.* 89: 485-494.
- Heyen, D.W., Weller, J.I., Ron, M., Band, M., Beever, J.E., Feldmesser, E., Da, y., Wiggans, G.R., VanRaden, PM. and Lewin, HA. (1999). A genome scan for QTL influencing milk production and health traits in dairy cattle. *Physiol. Genom.* 1: 165-175.
- Husaini, Y., Wilkins, R.J., and Davey, H.W., (1999). Identification of five point mutations, including an Alu I RFLP, in the bovine butyrophilin gene. *Anim. Genet.* 30: 400-401.
- Jack, L.J.W., and Mather, J.H. (1990). Cloning and analysis of cDNA encoding bovine butyrophilin , an apical glycoproteins expressed in mammary tissue and secreted in association with the milk-fat globule membrane during lactation. *J.Biol.Chem.* 265:14481-14486.
- Komisarek, J., and Dorynek, Z. (2003). Polymorphism of *BTN* and *GHR* genes and its impact on bull breeding value for milk production traits. *J. Anim. Feed Sci.* 12: 681-688.
- Komisarek, J. Waskowicz, K. and Dorynek, Z. (2006). Analysis of the relationship between two single nucleotide polymorphisms of the butyrophilin (*BTN1A1*) gene and milk production traits in Jersey cattle. *Ann. Anim. Sci.*, Vol. 6, No.1:45-52.

- Mather, I.H. and Jack, L.J.W. (1993). A review of the molecular and cellular biology of butyrophilin, the major protein of bovine milk-fat globule membrane. *J. Dairy Sci.* 76: 3832-3850.
- Ogg, S.I., Weldon, A.K., Dobbie L., Smith, A.J. and Mather, I.H. (2004). Expression of Butyrophilin (Btn1a1) in lactating mammary gland is essential for the regulated secretion of milk-lipid droplets. *PANS.* 27: 10084-10089.
- Sadr, A.S., Beigi, Nasiri, M.T., Alami-Saeid., Fayazi, J., Roshanfekar, H., and Mohammadi, M. (2008). DNA polymorphism of butyrophilin gene by PCR-RFLP technique. *Afri. J. Biotech.* 7: 2527-2529.
- Taylor, M., Everest and M., Smith, C. (1996). Restriction fragment length polymorphism in amplification products of the bovine butyrophilin gene: assignment of bovine butyrophilin to bovine chromosome 23. *Anim. Genet.* 27: 183-185.
- Zegeye, A., Peterson, J.A., Ogg, S., Rexroad, C., and Mather, L.H. (1999). RFLP markers in the bovine butyrophilin gene. *Anim. Genet.* 30: 385-386.

เปรียบเทียบค่าการผสมพันธุ์ที่ทำนายด้วยโมเดลรอบการให้นมและโมเดลวันทดสอบ ในโคนมลูกผสม

สาธิต บัวบาน^{1*} และ จุริรัตน์ แส่นโกชน¹

¹ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ปทุมธานี 12000

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ 1) เพื่อประมาณค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรม และคุณค่าการผสมพันธุ์ของลักษณะปริมาณน้ำนมในวันทดสอบ และปริมาณน้ำนมที่ 305 วัน และ 2) เพื่อเปรียบเทียบค่าการผสมพันธุ์ของลักษณะปริมาณน้ำนมที่ประเมินด้วยโมเดลวันทดสอบ(test day model, TDMs) โดยใช้บันทึกผลผลิตน้ำนมในวันทดสอบ กับโมเดลรอบการให้นม (lactation model, LCM) โดยใช้บันทึกผลผลิตน้ำนมในรอบการให้นมที่ 305 วันเพื่อที่จะหาโมเดลวันทดสอบที่เหมาะสมสำหรับประเมินค่าทางพันธุกรรมของโคนมลูกผสมในประเทศไทย โมเดลวันทดสอบที่ใช้ในการวิเคราะห์ประกอบด้วย repeatability TDMs (RP-TDMs) และ random regression TDMs (RR-TDMs) ที่มีฟังก์ชันวันให้นมแบบ Wilmlink, Ali&Shaeffer, Shaeffer&Dekker และ Legendre polynomial ข้อมูลที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นข้อมูลปริมาณน้ำนมที่ 305 วัน และ ข้อมูลปริมาณน้ำนมวันทดสอบในรอบการให้นมแรกของแม่โคนมลูกผสมที่ได้รวบรวมไว้ในระบบฐานข้อมูลของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ที่คลอดลูกในช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2535 -2550 จำนวน 10,111 ข้อมูล และ 86,519 ข้อมูล ตามลำดับ ประมาณค่าองค์ประกอบความแปรปรวน และความแปรปรวนร่วมด้วยวิธี Restricted Maximum Likelihood (REML) และประเมินคุณค่าการผสมพันธุ์ด้วยเทคนิค BLUP (Best Linear Unbiased Prediction) ผลการศึกษาพบว่าความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนจาก TDMs น้อยกว่า LCM ค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะปริมาณน้ำนมในวันทดสอบใกล้เคียงกับลักษณะปริมาณน้ำนมที่ 305 วัน (0.21) ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของคุณค่าการผสมพันธุ์จาก TDMs สูงกว่า LCM คุณค่าการผสมพันธุ์ของปริมาณน้ำนมภายใต้ TDMs และ LCM มีความสัมพันธ์อย่างสูง (0.80 - 0.84 สำหรับพ่อพันธุ์ และ 0.78 สำหรับแม่พันธุ์) การจัดลำดับตามคุณค่าการผสมพันธุ์ของพ่อพันธุ์เปลี่ยนไปน้อยกว่าแม่พันธุ์ การใช้ TDMs ทำให้การปรับปรุงทางพันธุกรรมดีขึ้นมากกว่าการใช้ LCM ผลที่ได้จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า TDMs สามารถเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งในการประเมินค่าทางพันธุกรรมของโคนมลูกผสมในประเทศไทยแทน LCM โมเดลที่เหมาะสมที่สุดคือ RR-TDMs ซึ่งอธิบายค่าเฉลี่ยของกราฟการให้นม และอิทธิพลสู่ทางพันธุกรรมด้วยฟังก์ชันการให้นมแบบ Legendre polynomial ลำดับที่ 4 และอธิบายอิทธิพลสู่ของสภาพแวดล้อมถาวรด้วยฟังก์ชันการให้นมแบบ Legendre polynomial ลำดับที่ 3 เนื่องจากให้ค่า PSB, MSE, RV ต่ำสุด และค่า RHO สูงสุด

คำสำคัญ: การประเมินค่าทางพันธุกรรม โมเดลวันทดสอบ โมเดลรอบการให้นม โคนมลูกผสม

เลขทะเบียนผลงานวิจัย 51(1)-0208-038

*ผู้รับผิดชอบบทความ

Comparison of Breeding Values Predicted with Lactation Model and Test-Day Model in Crossbred Dairy Cattle

Sayan Buaban^{1*} and Jureeratn Sanpote¹

¹The Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Department of Livestock Development,
Prathumtani 12000, Thailand

ABSTRACT

This study was designed 1) to estimate genetic parameters and breeding values for test-day (TD) and 305-day milk yields, and 2) to compare estimates of genetic values with the test-day models (TDMs) with those from a model using 305-day lactation records (LCM) to investigate the suitability of TDMs for genetic evaluation of crossbred dairy cattle in Thailand. TDMs were analyzed using repeatability models and a set of random regression models with lactation functions (Wilmink, Ali&Shaeffer and Shaeffer&Dekker) and Legendre polynomial of varying order (up to four coefficients) on additive genetic (AG) and permanent environmental (PE) effects. The data included 86,519 TD records of 10,111 first lactation of crossbred dairy cows obtained from the dairy database of the Bureau of Biotechnology for Livestock Production, Department of Livestock Development, Thailand calving from 1992 to 2007. Variance and covariance component estimates of LCM (additive and residual) and TDMs (Variance and covariance of additive and permanent environment random regression coefficients and residual) were estimated by Restricted Maximum Likelihood (REML) method and the breeding values were predicted by Best Linear Unbiased Prediction (BLUP). The results showed that residual variance (RV) from TDMs were smaller than LCM. Heritability estimates of TD milk yields from all TDMs were close to the corresponding estimates for 305-day milk yields (0.21). TDMs resulted in higher means and S.D. of EBVs than LCM. Estimated breeding values with TDMs were highly correlated with those with LCM (0.80 to 0.84 for sires and 0.78 for cows). Largest rank shift measured showed that ranking of sire was affected less than that of cows. More genetic improvement can be achieved by using TDMs to select animals for higher milk than by using models with 305-d lactation records. This finding indicates that TDMs using TD milk yields could be alternative to replace LCM for genetic evaluation of milk yield in crossbred dairy cattle in Thailand. The best models to fit TD milk yields are RR-TDMs which have the fourth order of Legendre polynomial for describing the average lactation curve and AG and the third order for describing the PE curves according to lowest PSB, MSE, RV and highest RHO values.

Keywords: model comparison, genetic evaluation, test-day model, lactation model, crossbred dairy cattle

Research project no. 51(1)-0208-038

*corresponding author

Introduction

The current genetic evaluation system of dairy cattle for production traits in Thailand has been based on the analyses of 305-day lactation records (Lactation Model, **LCM**). The basis of 305-day yield is a set of TD yields generally recorded at monthly intervals. Incomplete lactation records are usually extended with adjusted factors to 305-day records. The accuracy of 305-day measures varies depending on the number of TD that have been combined, the number of days between tests and the procedures of estimating 305-day yields (Ptak and Schaeffer, 1993). The factors such as herd management and management group within a herd, days in milk, age at calving and test, pregnancy status and milking times per day (Swalve, 1995) that could affect the TD yield were thus averaged over the lactation period. These factors seem to be arbitrary.

Recently, attempts have been made to use TD yields (Test-Day Models, **TDM**) instead of 305-day yields for the genetic evaluation of dairy cattle and, therefore, are increasingly being used. These models consider all genetic and environmental effects directly on a test-day basis (Ptak and Schaeffer, 1993; Jamrozik *et al.*, 1997a; Reents *et al.*, 1995) and therefore, improve the accuracy of genetic evaluation, provide better modeling and extending of part lactation is no more needed. It maximizes the amount of information gathering each animal. Cost of milk recording may also be reduced by having longer intervals between milk recording and less frequent collection of milk samples. However, a TDM cannot overcome the loss in accuracy from fewer TD or inaccuracies of recording (Wiggans and Goddard, 1997).

Swalve (1998, 2000) and Jensen (2001) have been investigated the approaches to modeling of TD data in the following classes: 1) direct use by fitting a model to TD data; and 2) indirect use, two-step TDM, based on correction for environmental influences on TD yields and aggregation of TD data into a lactation measure for later processing with traditional model for lactation yields. Such models have been presented by Jones and Goddard (1990) and are routinely used in Australia and New Zealand. Analysis for direct inclusion of TD records in a model involves a range of assumptions about the structure of the (co)variances among records which are different among various models. These are: (i) repeatability test-day models, **RP-TDM** or fixed regression TDM, **FR-TDM** (Ptak and Schaeffer, 1993; Reents *et al.*, 1995a, 1995b; Reents *et al.*, 1998; Vargas *et al.*, 1998; Kaya *et al.*, 2003), (ii) random regression TDM, **RR-TDM** (Schaeffer and Dekker, 1994; Jamrozik *et al.*, 1997; Meyer, 1997; Schaeffer *et al.*, 2000; Kettunen *et al.*, 2000; Schaeffer, 2004), (iii) multiple-trait TDM, **MT-TDM** (Meyer, 1991; Jensen *et al.*, 1997; Wiggan and Goddard, 1997; Kettunen *et al.*, 2000; Pool, 2000; Lidaur *et al.*, 2003; Muir *et al.*, 2007), (iv) covariance function models (Kirkpatrick *et al.*, 1994; Meyer, 1997, 1998; Meyer and Hill, 1997; Van der Werf *et al.*, 1998; Lidauer and Mantysaari, 1999), (v) character process models (Pletcher and Geyer, 1999; Jaffrezic and Pletcher, 2000; Jensen, 2001;

Meuwissen and Pool, 2001) and (vi) spline models (White et al., 1999; Druet et al., 2003). At present, there is not universal agreement on which model to be used in routine prediction of breeding values and better methods to compare models are desirable. In principle the model that maximizes genetic progress in the population is recommended the most for genetic evaluation.

Two types of TDMs are used for national dairy cattle evaluations worldwide, **RP-TDM** and **RR-TDM**. The RP-TDM considers observations within lactation as repeated observations. The stage of lactation is considered only in the fixed effect part of the model. The random animal genetic effect is modeled as a constant for each day in milk (DIM). The RR-TDM is an extension of the RP-TDM, where the random animal genetic effect can vary for each DIM and is modeled by a RR function on DIM. This requires modeling the genetic and non-genetic variance covariance (VCV) structure between any pair of TD observations along the course of lactation (Jamrozik et al., 1997b; Kettunen et al., 2000). The chosen RR function determines the number of equations per animal and, thus, the computational capacity requirement (Jamrozik et al., 1997c). Estimates of genetic parameters are most often estimated using restricted maximum likelihood (REML) procedures (Patterson and Thompson, 1971), but Bayesian methods (Schaeffer and Dekkers, 1994) utilizing Gibbs sampling as a technique for obtaining marginal posterior distributions have been advocated.

Parameters obtained in various models and with various data sets show great variability in both average values and shape. Large variability of estimates including shapes could be due to several factors, including too simplified models, small amount of data and resulting large sampling errors, unrepresentative data samples, and artifacts of random regressions where extremes greatly influence the estimates (Misztal et al., 2000). The general pattern of heritability estimates from multivariate analyses shows an increase of magnitude towards mid-lactation and again a slight decrease at the end of lactation (Meyer et al., 1989; Pander et al., 1992; Swalve., 1995; Machado *et al.*, 1998; Rekaya et al., 1999; Druet *et al.*, 2003; Kaya *et al.*, 2003; Gengler *et al.*, 2005; Silvestre *et al.*, 2006; Bilal *et al.*, 2008) contrary to the trend from random regression model (Jamrozik and Schaeffer, 1997; Kettunen et al, 1998; Strabel and Misztal, 1999; Van Der Werf et al., 1998) which were higher than expected, especially for yields at the beginning and the end of lactation. The magnitude of heritability estimates of individual test days never reach those for the corresponding ones for 305-day records but close to them in mid-lactation (Swalve, 1995). In studies that estimated the genetic and phenotypic correlations among TD records, it has been shown to be positive and high between adjacent TD records and to decrease as the TD intervals increased (Meyer et al., 1989; Pander et al., 1992; Swalve, 1995; Kettunen et al., 1998; Machado et al., 1998; Vargas et al., 1998; Olori et al., 1999; Eslamil *et al.*, 2004; Bilal *et al.*, 2008) as well as turned negative between yields at the extremes of the

lactation trajectory by RR-TDM (Jamrozik and Schaeffer, 1997; Kettunen et al., 1998; Rekaya et al., 1999; Strabel and Misztal, 1999; Brotherstone et al., 2000). Estimated breeding values (EBVs) have been estimated using TD milk yield and these values were compared to the EBVs obtained from 305-day lactation milk yields in many studies. Swalve (1995) estimated breeding values for 305-day and test-day yields and comparison of both sets of breeding values indicated only minor changes in sire rank. Schaeffer *et al.* (2000) observed a strong positive correlation of yield EBVs with previous 305-day lactation model EBVs for Holstein bulls (0.97) and cows (0.93). Similarly, there was a strong positive rank correlation observed between ranking of sire and cows on the basis of TD and 305-day yield (Kaya et al., 2003; Sawalha *et al.*, 2005).

The objectives of this study were to estimate genetic parameters and breeding values for TD and 305-day milk yields, and to compare the results from TD and 305-day analyses to investigate the suitability of TDMs for genetic evaluation of crossbred dairy cattle in Thailand.

Materials and Methods

Data

Test-day and 305-d lactation records for first lactations of crossbred dairy cows were obtained from the dairy database of the Bureau of Biotechnology for Livestock Production, Department of Livestock Development calving from 1992 to 2007. Test-day intervals were approximately 30 d from 5 to 305 DIM.

To obtain data sets of a consistent size, the following records were included: data from daughters of sires that have at least four daughters per class of herd-year- month test day, age at calving 18 to 52 months old, an interval of between 5 and 35 days from parturition to the first TD, daily milk yield between 1 and 45 kg, at least 5 TD records per lactation, a minimum of 150 DIM. After applying these criteria, a total of 86,519 TD milk records measured on 5,417 different calendar months within herds from 10,111 lactations of crossbred dairy cows, daughters of 936 sires belonging to 251 herds, were left to be analyzed.

Breed groups were classified by considering Holstein Friesian (HF) fractions and calving season was divided into 3 seasons as follow: summer (March to June), rainy (July to October) and winter (November to February). Herd-year-season subclasses with at least two observations were used in the analysis. The structure of the final data file is given in Table 1.

Table1. The structure of the final data

Item	Test-day yield data	305-d lactation yield data
Cows with observation	86,519	10,111
Herd-year-seasons classes	-	2,451
Herd –year-month TD classes	5,417	-
Sires	710	710
Mean (kg)	12.39	3,759.89
Standard deviation (kg)	4.34	983.63

Model and Methodology

Model

Lactation model (LCM)

LCM was applied on 305-d yield observations and was used as the reference model in this work. The equation analyzed can be written in scalar notation as:

$$Y_{ijk} = HYS_i + \sum_{n=1}^3 b_n X_{ijk} + \alpha + e_{ijk},$$

where Y_{ijk} is the yield of 305-d milk yield of animal j within herd-year season of calving effect i , b_n are fixed regression coefficients specific to breed fraction, linear and quadratic of age respectively, α is the additive genetic animal effect and e_{ijk} is the random measurement error.

The linear mixed model equation was:

$$y = X\beta + Za + e,$$

where y is the vector of 305-d records for a trait, β is the vector of fixed effects, a is the vector of random animal additive genetic effects, e is the vector of random residual effects, and X and Z are incidence matrices relating observations to fixed and random animal additive genetic effects, respectively. The assumption regarding the first moment for the 305-d model was that $E[y] = X\beta$. The random additive genetic and residual effects were assumed to be independent with respect to each other and to have a covariance matrix of:

$$Var \begin{bmatrix} a \\ e \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A\sigma_a^2 & 0 \\ 0 & I\sigma_e^2 \end{bmatrix},$$

where A is the numerator relationship matrix (the number of animals in the pedigree), I is an identity matrix (the number of cows with records), and σ_a^2 and σ_e^2 are the variances of additive genetic and random residual effects, respectively.

TD models (TDM)Repeatability test day model (RP-TDM)

In RP-TDM, observations along the course of lactation were considered as repeated observations. Hence, the additive genetic animal effect (**AG**), the animal environment effect (**PE**) and temporary measurements errors were modeled constant along the lactation. The equation for all the models analyzed can be written in scalar notation as:

$$Y_{ijkl} = HTM_i + \sum_{n=1}^3 b_n X_{ijkl} + \sum_{m=1}^r \beta_{jm} X_m(t) + \alpha_k + \omega_k + e_{ijkl} ,$$

where Y_{ijkl} is the yield of milk on test-day l th of animal k within herd- year month TD effect i , HTM_i is the fixed effect of herd-year month test day, b_n are fixed regression coefficients specific to breed fraction, linear and quadratic of age respectively, β_{jm} are fixed regression coefficients of test-day milk yield as a function of t , which describes the shape of the lactation curve, nested within season of calving j , $X_m(t)$ is the m th covariate from different functions evaluated at DIM t , α_k and ω_k are the additive genetic animal effect and the permanent environmental effect of animal k respectively; and e_{ijkl} is the random measurement error.

The linear mixed model equation was:

$$y = X\beta + Za + Wp + e ,$$

Defining a as the vector for the AG effects for all animals in the pedigree, p as the vector of the PE effects for all animals with records, and e as the vector of the temporary measurement errors, the following (co)variance structure was assumed:

$$\text{var} \begin{bmatrix} a \\ p \\ e \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A\sigma_a^2 & 0 & 0 \\ 0 & I\sigma_p^2 & 0 \\ 0 & 0 & I\sigma_e^2 \end{bmatrix} ,$$

where A is the numerator relationship matrix (the number of animals in the pedigree), I is an identity matrix (the number of cows with records), and σ_a^2 , σ_p^2 and σ_e^2 are the variances of additive genetic, permanent environment and residual effects (residual variance, **RV**), respectively.

Random Regression test day model (RR-TDM)

In RR-TDM, the AG and PE were modeled by random regression coefficients. All models included in their equation the same systematic effects and temporary measurements errors were taken to be independently

distributed and with constant variance along days in milk (DIM). The equation for all the models analyzed can be written in scalar notation as:

$$Y_{ijkl} = HTM_i + \sum_{n=1}^3 b_n X_{ijkl} + \sum_{m=1}^r \beta_{jm} X_m(t) + \sum_{m=1}^r \alpha_{jm} Z_{a,m}(t) + \sum_{m=1}^r \omega_{jm} Z_{p,m}(t) + e_{ijkl} ,$$

where Y_{ijk} is the yield of milk on test-day k of animal j within herd- year month TD effect i , HTM_i is the fixed effect of herd-year month test day, b_n are fixed regression coefficients specific to breed fraction, linear and quadratic of age respectively, β_{jm} are fixed regression coefficients of test-day milk yield as a function of t , which describes the shape of the lactation curve, nested within season of calving, $X_m(t)$ is the m th covariate from different functions evaluated at DIM t . The terms α_{jm} and ω_{jm} are the m th random regression coefficients (RRC) associated with the AG and PE effects of animal l , respectively, and $Z_{a,m}(t)$ and $Z_{p,m}(t)$ are the m th covariates depending on DIM t , based on the function fitted to the AG and PE effects, respectively. Finally, e_{ijk} is the residual effect for each observation.

The linear mixed model equation was:

$$y = X\beta + Za + Wp + e ,$$

Defining $\mathbf{a}$ as the vector that contains the random regression coefficient for the AG effects for all animals in the pedigree, $\mathbf{p}$ as the vector which includes the random regression coefficient fitted to the PE effects for all animals with records, and $\mathbf{e}$ as the vector containing the temporary measurement errors, the following (co)variance structure was assumed:

$$\text{var} \begin{bmatrix} \mathbf{a} \\ \mathbf{p} \\ \mathbf{e} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{G} \otimes \mathbf{A} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{P} \otimes \mathbf{I} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{I} \sigma_e^2 \end{bmatrix}$$

where $\mathbf{A}$ is the numerator relationship matrix (the number of animals in the pedigree), $\otimes$ is a Kronecker product function, $\mathbf{G}$ and $\mathbf{P}$ are covariance matrices of random regression coefficients for AG and PE effects, $\mathbf{I}$ is an identity matrix (the number of cows with records), and σ_e^2 is a variance of residual effects (residual variance, RV).

The submodel were considered to define for describing the shape of lactation curve of fixed and random regression in this study are such as the Ali and Schaeffer (1987), Shaeffer and Dekker function (1994), Wilmink (1987), and orthogonal Legendre polynomials of different orders (Kirkpatrick et al., 1990) function. The same type of function was applied to both fixed and random regressions.

Methodology

Variance covariance parameters applied

For LCM and RP-TDM, the (co)variance components (additive genetic, permanent environmental and residual variances), were estimated with the restricted maximum likelihood method, employing an accelerated expectation algorithm, using the REMLF90 program (Duangjinda et al., 2004). Convergence criteria were the squared relative difference between consecutive estimates $< 10^{-10}$. Residual variance for lactation assumed to be constant throughout the lactation due to program limitations.

For RR-TDM, estimation of the (co)variance matrices for the AG effects in all models were used obtain the daily AG (co)variances along the lactation from the covariance function $g(t_i, t_j) = z(t_i) \widehat{G} z(t_j)$, where $\widehat{G}$ is matrix of genetic variance between random regression coefficients, $z(t_i)$ and $z(t_j)$, are the vectors of covariates evaluated at times t_i and t_j from the submodel fitted to the AG effect as suggested by Jamrozik and Schaeffer (1997). The same procedure was applied to the PE effect.

Breeding value estimation

Mixed model equations were solved by the preconditioned conjugate gradient (PCG) method using BLUPF90 (Duangjinda et al., 2004). Solutions for additive genetic effects were used to form EBVs corresponding to 305-d yields. Thus, the EBV for animal i was calculated as follow:

Under RP-TDM, it provides a single estimate of the additive genetic effect of a cow that is constant for a whole lactation. Consequently, the breeding value for 305-day lactation (U_{RP-TDM}) is equal to the additive effect obtained on a daily basis multiplied by 305:

$$U_{RP-TDM} = 305\hat{a}_i,$$

Under RR-TDM, function of solutions is the EBV for the random regression coefficients, which are not very useful for ranking or selecting animals. Therefore it should be calculate EBV for each animal by method of Jamrozik et al., (1997b). An EBV for a 305-day lactation from TD yields, U_{RR-TDM} , is obtained by summing the EBV for each DIM. That is

$$U_{RR-TDM} = \sum_{t=1}^{305} D_t,$$

$$D_t = \widehat{G} z_t$$

Under LCM,

$$U_{LCM} = \hat{a}_i$$

Model Comparison

The models were compared by using 2 criteria: 1) measure goodness of fit (**GOF**) and 2) test of predictive ability (**PA**) for random set of observations.

The GOF for different models were compared in terms of the residual variance of the model (**RV**), the percentage of squared bias (**PSB-F**); Ali and Schaeffer, 1987), the empirical correlation between the observed value and predicted records (**RHO-F**) and mean square error (**MSE-F**) and also their ability to predict observed records in excluded data set were compared on percentage of squared bias (**PSB-P**), correlation between the observed value and predicted records (**RHO-P**) and mean square error (**MSE-P**).

The PSB was computed as:

$$PSB = \frac{\sum_{l=1}^n (y_{ijkl} - \hat{y}_{ijkl})^2}{\sum_{l=1}^n (y_{ijkl})^2} \times 100$$

where n is the number of records within the FIT subset, y_{ijkl} is the observed l^{th} TD record on animal k , and $\hat{y}_{ijkl}$ is the fitted one by the model, calculated through the estimates of the systematic, AG and PE effects associated to this observation.

The MSE was calculated as:

$$MSE_i = \sum_{j=1}^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_{ij})^2 / n_i$$

where y_{ij} is TD observation j belonging to subset i ; $\hat{y}_{ij}$ is the predicted value of TD observation j in subset i ; and n_i is the number of observations in subset i . The model with the lowest MSE was assumed to give the best fit.

The models were also contrasted according to EBVs, Standard deviations (S.D.) of the EBVs, correlations between EBVs of sires and cows from LCM and other models. In addition, genetic trends for milk yield from the LCM and TDM were plotted for visual examination by averaging the breeding values of animals per birth year.

Results and Discussion

Mean and standard deviation

Table 2. Means and standard deviations of day in milk and milk yield, as well as the number of TD records.

Test day	Day in milk		Milk yield (kg)	Number of records
	Mean $\pm$ SD	Min-Max	Mean $\pm$ SD	
1	20.84 $\pm$ 8.74	5-35	14.76 $\pm$ 4.10	10,111
2	51.67$\pm$8.31	36-65	14.99$\pm$4.25	9,405
3	81.59 $\pm$ 8.47	66-95	14.27 $\pm$ 4.25	9,498
4	111.51 $\pm$ 8.49	96-125	13.40 $\pm$ 4.11	9,487
5	141.47 $\pm$ 8.55	126-155	12.45 $\pm$ 3.93	9,454
6	171.21 $\pm$ 8.59	156-185	11.67 $\pm$ 3.63	9,219
7	201.04 $\pm$ 8.68	187-215	10.88 $\pm$ 3.56	8,679
8	230.95 $\pm$ 8.72	216-245	10.15 $\pm$ 3.41	8,046
9	260.83 $\pm$ 8.68	246-275	9.55 $\pm$ 3.27	7,043
10	290.37 $\pm$ 8.81	276-305	9.09 $\pm$ 3.09	5,577
Mean	144.53 $\pm$ 83.17	5-305	12.39$\pm$4.34	86,519

Mean and standard deviation of day in milk and milk yield, as well as the number of records for the first lactation data set are shown in Table 2. Small variations were observed in the standard deviation of milk yield of 10 test-day records obtained during the lactation period. The peak of milk yields in lactation curve is around TD2 (day 36-65 after calving) and then decline as the lactation progresses that close to the pattern of Pander et al. (1992), Swalve (1995), Jamrozik and Schaeffer (1997) and Buaban et al. (2000).

Estimation of the Genetic Parameters

Genetic and permanent environmental variances were calculated for each day along the lactation trajectory from the estimated covariance function coefficients.

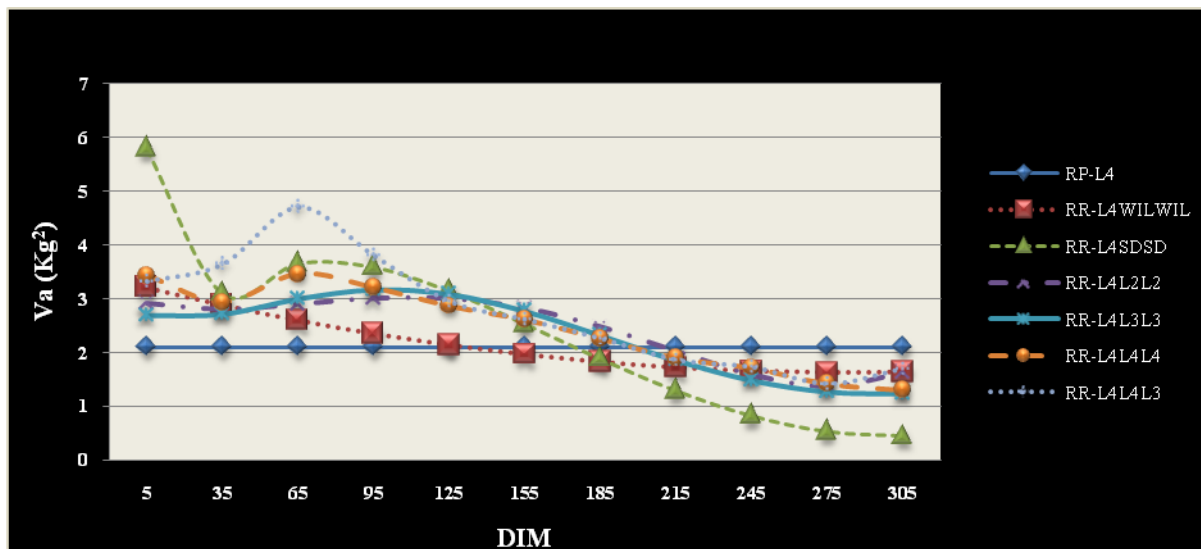


Figure 1. Estimated daily additive genetic variances of milk yield over DIM predicted with RP-TDM (RP-L4), and RR-TDM (RR-L4WLWL, RR-L4SDSD, RR-L4L2L2, RR-L4L3L3, RR-L4L4L4 and RR-L4L4L3).

Estimated daily additive variances for RP-TDM (RP_L4) and RR-TDM (RR-L4WLWL, RR-L4SDSD, RR-L4L2L2, RR-L4L3L3, RR-L4L4L4 and RR-L4L4L3) are shown in Fig. 1. RP-L4 has a constant value throughout the lactation period which similar to other RP-TDM (not present) about 2.08 kg^2 . The two lactational models (RR-L4WLWL and RR-L4SDSD) predicted much larger additive variances at the onset of lactation than RRL with the same order (RR-L4L3L3). In general, RRL-TDMs showed a similar pattern with a marked decrease in the first 35 days of lactation, then increases up to around day 65-95, and steady decline afterwards except RR-L4WLWL which steady decline genetic variance from the beginning to the end of lactation. This results are different from reported by Jamrozik et al. (1997a), who described a reduction in genetic variance from the beginning to the 25th day of lactation and then stability in values through to the end of lactation and those from Melo et al. (2007), who obtained increasing genetic variance from the beginning to the end of lactation.

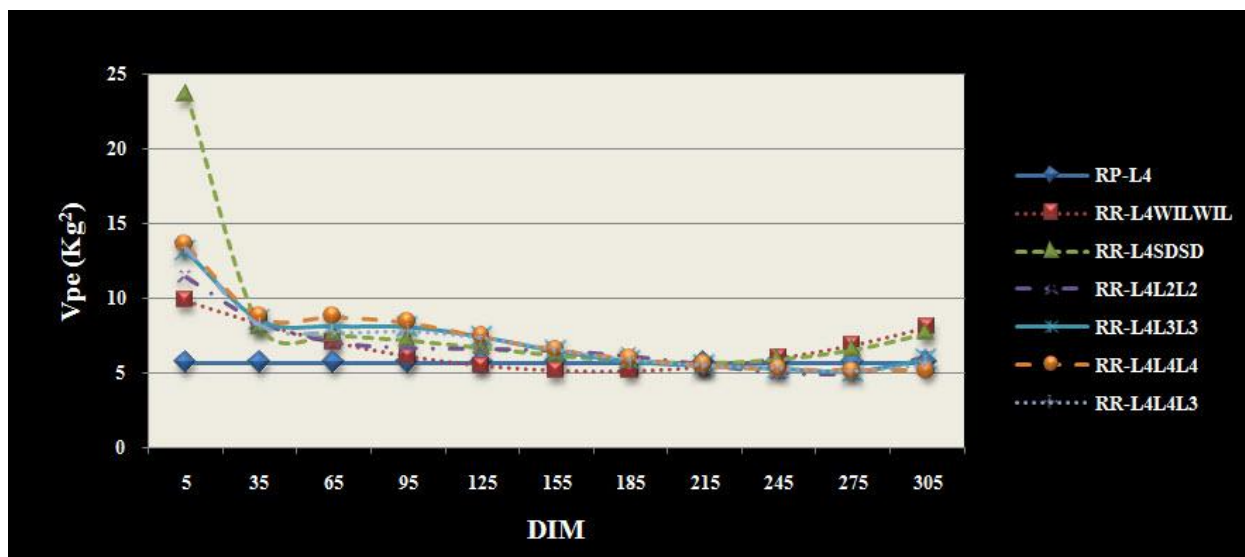


Figure 2. Estimated daily permanent environment variances of milk yield over DIM predicted with RP-TDM (RP-L4), and RR-TDM (RR-L4WLWL, RR-L4SDSD, RR-L4L2L2, RR-L4L3L3, RR-L4L4L4 and RR-L4L4L3).

Estimated daily permanent environment variances for RP-TDM (RP_L4) and RR-TDM (RR-L4WLWL, RR-L4SDSD, RR-L4L2L2, RR-L4L3L3, RR-L4L4L4 and RR-L4L4L3) are shown in Fig. 2. RP-L4 has a constant value throughout the lactation period which similar to other RP-TDM (not present) about 5.68 kg^2 . The lactation submodels, only RR-L4SDSD showed much larger PE variances at the onset of lactation than others. In general, the estimates for daily PE variances were high at the beginning and end of lactation and lower in between which similar to the study of Pool et al. (1999) and Lopez-Romero and Carabano (2003). Similar to the AG variances, there is a marked decrease in the first around 35-65 days of lactation. The fact that a constant residual variance was assumed might somehow influence the estimation of PE variance. Olori et al. (1999) found that keeping a constant residual variance produced a bias on the residual term in early lactation, without significantly affecting the estimates of the other variance components.

Dairy heritability estimates for test-day milk yield along the lactation trajectory are illustrated in Fig. 3. The heritabilities that were obtained from estimated daily variance components showed similar pattern as for the genetic variation but were less extreme values at the onset of the trajectory because of higher permanent environmental variances in this parts of lactation. The heritability of all repeatability models was 0.18 and was close to the value used in the LCM (0.21), but the estimates of RR-TDM were high at the middle of lactation range from 0.20 to 0.33. The RR-TDM patterns are the same as the general pattern estimates from multivariate analyses that shows an increase of magnitude towards mid-lactation and again a slight decrease at

the end of lactation (Meyer et al., 1989; Pander et al., 1992; Swalve., 1995; Mechado *et al.*, 1998; Rekaya et al., 1999; Druet *et al.*, 2003; Kaya *et al.*, 2003; Gengler *et al.*, 2005; 2005; Silvestre *et al.*, 2006; Bilal *et al.*, 2008) contrary to the trend from random regression model (Jamrozik and Schaeffer, 1997; Kettunen et al., 1998; Strabel and Misztal, 1999; Van Der Werf et al., 1998) where were higher than expected, especially for yields at the beginning and the end of lactation.

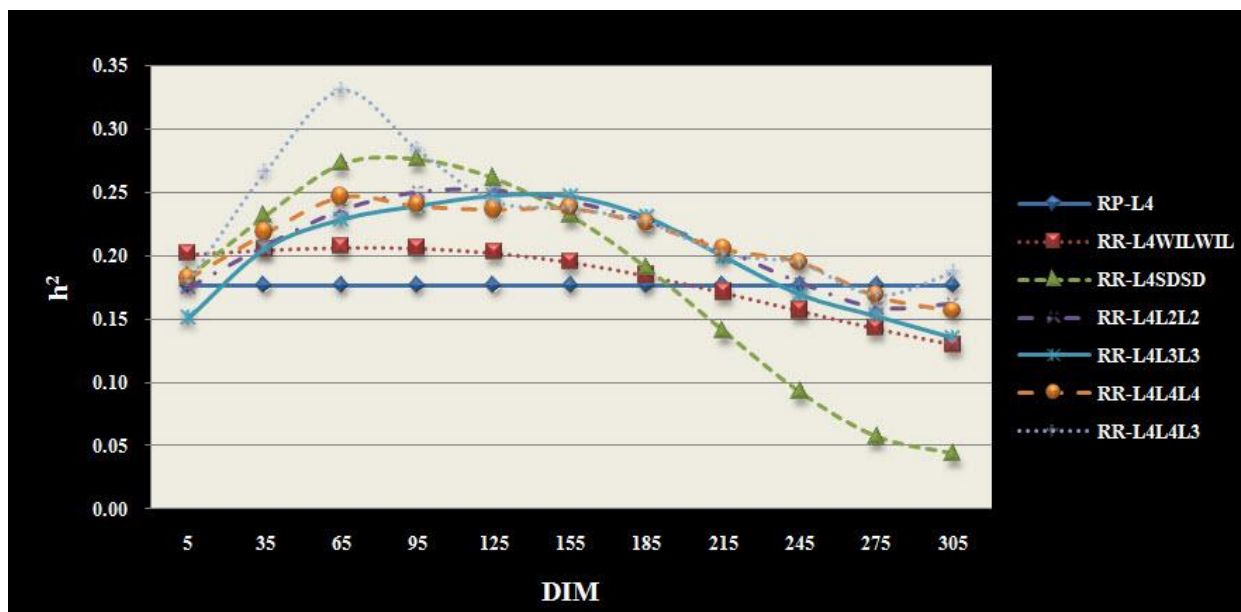


Figure 3. Daily heritability of milk yield over DIM predicted with RP-TDM (RP-L4), and RR-TDM (RR-L4WLWL, RR-L4SDSD, RR-L4L2L2, RR-L4L3L3, RR-L4L4L4 and RR-L4L4L3).

Estimates of heritabilities of 305-d yield in the first lactations computed from estimates of variance components obtained with the TDMs are shown in Table 3. Estimates of 305-d heritabilities were closely or greater than lactation-based estimates (LCM, 0.21). The estimates of 305-d heritability were larger when the estimates of TD variance components were obtained with RR_TDMs than when they were obtained with the RP_TDMs. This result may be due to the larger estimate of permanent environmental variance and the associated 305-d estimate of phenotypic variance with RP_TDMs compared with the RR_TDMs. The 305-d heritability estimates from the RR_TDMs with Legendre polynomials were slightly larger than those estimated by the RR_TDMs with lactational submodels.

Table 3. Estimates of heritability for 305-d milk yields calculated from test day models

Model ¹	Heritability ²	V _A	V _{PE}	V _E	V _P
LCM	0.21	129,000	-	492,000	621,000
RP_WL	0.18	193,492	530,243	384,193	1,107,928
RP_SD	0.18	193,492	528,382	386,054	1,107,928
RP_L2	0.18	195,353	527,452	389,775	1,112,580
RP_L3	0.18	195,353	528,382	385,124	1,108,859
RP_L4	0.18	195,353	528,382	383,263	1,106,998
RP_AS	0.18	195,353	528,382	383,263	1,106,998
RR_L4WLWL	0.21	182877	481,040	213,027	876,944
RR_L4SDSD	0.19	162746	4756,25	205,585	843,956
RR_L4L2L2	0.22	191,162	453,931	216,748	861,841
RR_L4L3L2	0.26	219,879	438,420	200,934	859,233
RR_L4L4L2	0.25	204,078	449,226	179,538	832,842
RR_L4L2L3	0.21	173,868	475,030	186,050	834,948
RR_L4L3L3	0.23	190,705	461,741	186,050	838,496
RR_L4L4L3	0.24	194,348	458,939	170,236	823,523
RR_L4L2L4	0.22	177,526	472,645	174,887	825,058
RR_L4L3L4	0.23	188,498	464,284	174,887	827,669
RR_L4L4L4	0.23	190,962	461,542	171,166	823,670

¹ LCM is lactation model; RP-WL, RP-SD, RP-L2, RP-L3, RP-L4 and RP-AS are the simple repeatability TDMs; RP-TDM; RR-L4WLWL, RR-L4SDSD, and RR-ASAS are the random regression TDMs with Wilmink, Schaeffer and Dekker, and Ali and Schaeffer for additive genetic and permanent environment effects respectively; RR-L4(*i,j*) are random regression TDMs with Legendre polynomials of order *i* and *j* for additive genetic and permanent environment effects, respectively. ² Using estimates with TD models except for LCM.

It seems clear from results in this and other studies (Rekaya et al., 1999; Brotherstone et al., 2000; and Lopez-Romero and Carabano, 2003) that lactational submodels tend to overestimate the genetic variances and underestimate the heritabilities in the extreme of lactation especially RR-L4SDSD. Lactational submodels, which have been obtained by optimizing the GOF to the observed phenotypic trajectory of daily production, do not necessarily yield an optimum associated covariance function in an RR-TDMs context. On the other hand, models fitting large order polynomials seem to result in moderately oscillatory patterns and sudden changes in the trajectory of the variances, unlikely in biological processes. These problems are likely to be more severe for higher orders of fit. Statistical criteria that allow quantifying how the observed variance

patterns translate into GOF and PA of the competing models were also investigated in order to add more objective information in the comparison of models.

Model comparison

Tables 4 show goodness of fit and predictive ability statistic used for the model comparison. Among simple repeatability TDMs (RP-WL, RP-SD, RP-L2, RP-L3, RP-L4 and RP-AS), RP-L4 model performed better than the others in terms of GOF and PA criteria. It resulted in the smallest estimates of PSB, MSE and RV, and the largest estimates of RHO. Therefore it could be selected for the fixed regressions of all the random regression TDM in this study.

Table 4. Percentage of squared bias (PSB), empirical correlation (RHO) between observed and predicted data, mean square error (MSE), and residual variance (RV) for the competing models; best and worst values for each criterion are in boldface and italics, respectively

Model ¹	Goodness of fit				Predictive ability		
	PSB-F	RHO-F	MSE-F	RV	PSB-P	RHO-P	MSE-P
RP-WL	2.028	0.903	3.498	4.20	3.651	0.822	6.295
RP-SD	2.000	0.904	3.449	4.15	3.823	0.814	6.592
RP-L2	2.023	0.903	3.488	4.19	3.216	0.842	5.545
RP-L3	1.994	0.904	3.439	4.14	3.164	0.844	5.456
RP-L4	1.984	0.905	3.422	4.12	3.145	0.845	5.423
RP-AS	1.985	0.905	3.423	4.12	5.592	0.748	9.643
RR-L4WLWL	1.260	0.940	2.180	2.29	2.662	0.871	4.590
RR-L4SDSD	0.867	0.960	1.494	2.21	2.430	0.883	4.191
RR-L4L2L2	0.925	0.957	1.595	2.33	2.434	0.883	4.196
RR-L4L3L2	0.840	0.961	1.449	2.16	2.343	0.888	4.040
RR-L4L4L2	0.704	0.967	1.215	1.93	2.314	0.889	3.991
RR-L4L2L3	0.742	0.966	1.280	2.00	2.305	0.889	3.975
RR-L4L3L3	0.742	0.966	1.280	2.00	2.303	0.890	3.971
RR-L4L4L3	0.642	0.970	1.107	1.83	2.269	0.892	3.913
RR-L4L2L4	0.676	0.969	1.166	1.88	2.274	0.891	3.922
RR-L4L3L4	0.677	0.969	1.167	1.88	2.272	0.891	3.918
RR-L4L4L4	0.651	0.970	1.123	1.84	2.291	0.890	3.951
RR-L4ASAS	-	-	-	-	-	-	-

¹ LCM is lactation model; RP-WL, RP-SD, RP-L2, RP-L3, RP-L4 and RP-AS are the simple repeatability TDMs; RP-TDM; RR-L4WLWL, RR-L4SDSD, and RR-ASAS are the random regression TDMs with Wilmink, Schaeffer and Dekker, and Ali and Schaeffer for additive genetic and permanent environment effects respectively; RR-L4(i,j) are random regression TDMs with Legendre polynomials of order i and j for additive genetic and permanent environment effects, respectively. RR-L4ASAS are not present due to problem in reaching convergence criteria.

Differences among the 12 competing random regression TDMs were rather small when compared with the statistics obtained for the simple repeatability model, particularly when looking at the PA criteria. The performance of lactational models, RR-L4WLWL and RR-L4SDSD, was worse than that of RR-L4(i,j) models of the same order of fit, RR-L4L3L3. On the other hand, considering only sublactational models, RR-L4SDSD showed a better performance than RR-L4WLWL for all the criteria, agreeing with the results presented by Jamrozik et al. (1997), Brotherstone et al. (2000) and Lopez-Romero and Carabano (2003).

For the RRL-TDMs fitting the same order of fit on both AG and PE effects, the greater the order of fit, the better the results observed for all the statistics considered. Nevertheless, the improvements became smaller with increasing order of fit. As an example, the reduction in RV was 14.16 and 8.00 % when comparing successive models RR-L4L2L2, RR-L4L3L3, RR-L4L4L4. Similar reductions in RV were observed by Pool et al. (2000) and Lopez-Romero and Carabano (2003).

For the series of RR-L4(i,j) model with different orders of fit for AG and PE effect, the GOF criteria (PSB-F, RHO-F, MSE-F and RV) and PA (PSB-P, RHO-P and MSE-P) showed that increasing the order of the PE effects produced larger improvements than increasing the order of AG effects within a given order of the PE effects which similar to the study of Lopez-Romero and Carabano (2003).

In general, the lowest value of PSB, MSE and RV and highest value of RHO were obtained for the group of models with L4 for the AG effect. The differences between models within this group were small. Legendre polynomials of order 3 for PE were preferred over other orders of polynomials for this effect.

Based on these results, RR-L4L4L3 models with Legendre polynomials of order four for fixed regression, Legendre polynomials of order four for AG and Legendre polynomials of order three for PE were selected for further comparisons.

Analysis of breeding values**Means and standard deviations**

Average and standard deviations of estimated breeding values with all models for milk yield are presented in Table 5. Compared to LCM, TDMs (RP-TDM and RR-TDMM) resulted in higher means and S.D. of EBVs. Among TDMs, the RR-TDM gave higher S.D. of EBVs than RP-TDM. These results indicated that TDMs would model somewhat more variability between the animals. Consequently, the use of TDMs for genetic evaluation may increase the rate of genetic gain by reducing the chance of selecting genetically poor sires and cows. As expected, cows had more S.D. of EBVs than did sires for all models. Also, other studies (Schaeffer et al., 2000; Lidauer et al., 2000; Lidauer et al., 2003) have shown that moving from a 305-d yield animal model to a TDM has a large impact on EBVs of cows but less impact on EBVs of bulls. This is because the TDMs allow a better modeling of the herd environment, which improves the accuracy of cows' EBVs. Bulls with a large number of daughters receive accurate EBVs also with 305-d yield models. Hence, for the bulls, the advantage of TDMs is more visible in EBVs of bulls with a small number of daughters. In most studies the model comparisons are not accurate because the genetic parameters in the different models are not comparable. However, as in our study, Jamrozik et al. (1997c) also reported up to a 5% higher S.D. in EBVs for sires with at least 12 daughters when using RR-TDM instead of a 305-d yield repeatability animal model. Reents et al. (1998) observed a larger increase (14%) in the S.D. of sires EBVs when using RP-TDM rather than a 305-d yield animal model. Lidauer et al. (2003) showed the S.D. of EBVs of active bulls with RP-TDM was in agreement with those estimated with RR-TDM. However, the S.D. of EBVs for young bulls and young cows was 3 to 11% larger when using RP-TDM compared to using RR-TDM.

Table 5. Means and standard deviation (kg) of estimated breeding values for milk yield with test-day model (Random regression (RR-TDM), Repeatability (RP-TDM), and with 305-d lactation yield model (LCM)

	No.	LCM	RP-TDM	RR-TDM
Sires	926	45.66 ±144.47	73.13±194.60	82.58±199.02
Cows	1,0111	-4.60±152.30	4.54± 218.87	21.09± 232.26
All	1,1037	-0.38 ± 152.30	10.30±217.76	26.25±230.29

Correlations

Correlations between 305-d EBVs for milk yield from the LCM and TDMs (RP-TDM and RR-TDM) and between different TDMs are given in Table 6. Correlations were in general high for both sires and cows in the range of 0.78 to 0.93 but lower than reported in the literature (0.87-0.99) (Reents and Dopp, 1996;

Jamrozik et al., 1997b,c; Reents et al., 1998; Lidauer et al., 2000; Schaeffer et al., 2000; Emmerling et al., 2002; Lidauer et al., 2003; Sawalha et al., 2005). Correlations of EBVs from RP-TDM with those from RR-TDM were high for sires (0.93) but lower for cows (0.92). Consequently, there was a smaller difference in the ranking of cows between RP-TDM and RR-TDM. This result may be partially due to TDMs sharing identical fixed effects and only differing in random component. Correlations of EBVs from LCM with those of TDMs were very high for sires (0.80 to 0.84) and were moderately for cows (0.78). The high correlations suggest almost equal ability of the LCM and the TDMs in modeling EBVs of bulls. However, for cows, the corresponding correlations show a possibility of substantial change in the rank when the LCM is substituted with a TDM. Comparison of EBVs from different models does not indicate which model is better (more accurate) for ranking purpose. It only shows that there are real differences between LCM and TDMs. The parameters that showed which model was more accurate were the smaller residual variances.

Table 6. Correlations among estimated breeding values for milk yield with TDMs (RR-TDM and RP-TDM) and with LCM for sires (above diagonal) and cows (below diagonal).

	RR-TDM	RP-TDM	LCM
RR-TDM		0.93	0.84
RP-TDM	0.92		0.80
LCM	0.78	0.78	

Tables 7 present changes in ranks of top sires and cows for milk yield from the LCM and TDMs. There are 73% of the 100 sires with the highest EBV for milk yield would have been selected with TDMs. These results are consistent with the large correlations found among EBVs with different TDMs for sires. Fewer top cows were ranked the same with different TDMs (66%) than sires.

The ranking of top 100 sires and cows was different between TDMs and LCM. Fewer cows than sires were in common among the top 100 animals from evaluations with the LCM and one of the TDMs. This is similar to the findings of Swalve (1995); Kaya *et al.* (2003) and Sawalha *et al.* (2005). Swalve (1995) reported that the largest rank shift in cows seemed to be associated with lactation curves that deviated greatly from standard lactation curve but Sawalha et al. (2005) reported that the reduced number of similarly ranked top cows with the different models is due to differences in accuracy of EBVs for sires and cows. The larger number of available cows than sires to select from may have also contributed to the differences in numbers ranked the same for sires and cows.

Table 7. Numbers of top sires (above diagonal) and cows (below diagonal) with the largest 100 estimated breeding values in common between TDMs and LCM for milk yield.

	RR-TDM	RP-TDM	LCM
RR-TDM		73	72
RP-TDM	66		60
LCM	40	39	

Table 8 show the averages of EBVs with TDMs and LCM calculated from the 100 top sires and cows for milk yield. The averages of EBVs of the selected 100 elite sires and cows with RP-TDM were close to the averages of EBVs of those selected with the RR-TDM. The largest differences were between the averages of EBVs of sires and cows selected with LCM and any TDMs. This result agrees with the proportions of the 100 top sires and cows in common among different models as shown in Tables 8. Averages of EBVs of the 100 top cows were always greater than those of the 100 top sires, which is due to the differences in the proportion of animals chosen when selecting the top 100 cows compared with the top 100 sires (i.e., the pool of cows from which to select was much larger) that the same as Sawalha et al. (2005). This indicated that the estimates of genetic trends for milk yields were likely to be different between each model that used LCM and TDMs.

Table 8. Average of estimated breeding values for milk yield (Kg/lactation) predicted with TDMs and LCM for the top 100 sires and cows.

Model	SIRES	COWS
RR-TDM	453	736
RP-TDM	423	689
LCM	312	473

Genetic trends

Trends in 305-d EBVs of different model (RP-TDM; RPL4, RR-TDM; RRL4L4L3 and LCM) for crossbred dairy cattle during 1991-2004 were shown in Figure 4. Because heritabilities on a 305-d yield basis were different for all three models, it was expected that all the models would estimate the different genetic trend. The trends in averages of EBVs by year of birth for milk yields obtained from the LCM, RP-TDM, and RR-TDM with wide fluctuation were -0.38, 2.45 and 4.49 kg of milk per year respectively. Sanpote, J. and Buaban S. (2003) reported 23 kg of annual realized genetic gain in milk yield using a multivariate analysis

lactation model. Genetic trend from TDMs (RP-TDM and RR-TDM) are higher than LCM. This is similar to the findings of Reents *et al.* (1998) that the genetic trend is significantly higher from TDMs in comparison to LCM. The slightly lower trend in level of 305-d EBV from the LCM compared to the TDMs could be affected by differences in fixed effect corrections. Differences between the estimated trends would indicate that some of the models gave biased EBVs. The RP-TDM and RR-TDM gave nearly similar pattern of genetic trend but genetic trend based on RR-TDM were higher.

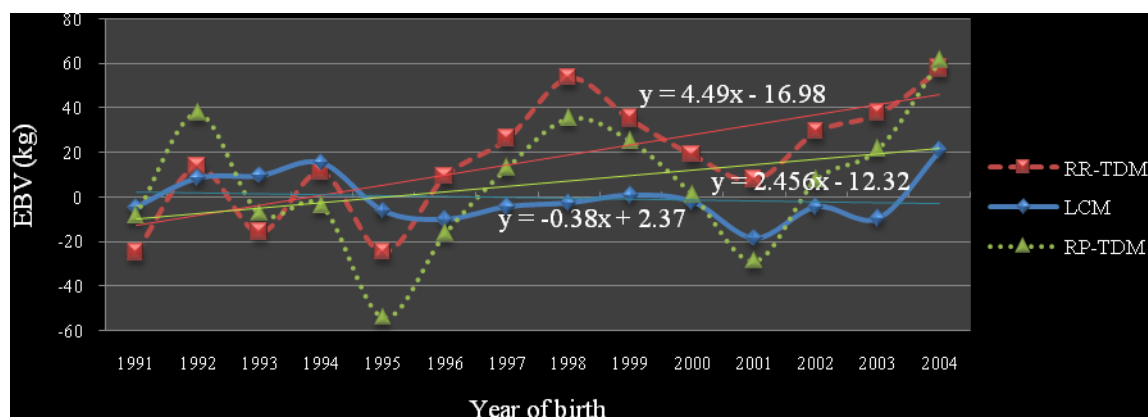


Figure 4. Trend in 305-d EBVs for crossbred dairy cattle from TDMs (RP-TDM and RR-TDM) and LCM.

Conclusion

Based on the shape of the variance curves for different DIM, analysis of fixed curves, measurement of GOF, test of PA for random set of observations, contrast each models with S.D. and correlation of EBVs, and plotting of genetic trends made it possible to select the most plausible model for routine genetic evaluation. Comparison of models based on the GOF and PA confirmed the better fit of models that the average lactation curve should be described by Legendre polynomial of order four. Other curves included in the RR-TDM should be defined with the fourth-order Legendre polynomial for AG and the third order for PE curves is recommended because it had lowest PSB, MSE, RV and highest RHO values. Addition to model comparison, TDMs resulted in higher means and S.D. of EBVs than LCM. These results indicated that TDMs would model somewhat more variability between the animals. Consequently, the use of TDMs for genetic evaluation may increase the rate of genetic gain by reducing the chance of selecting genetically poor sires and cows. Correlations between EBVs for 305-day and TD milk yields for cows and sires from LCM and from TDMs respectively are high, showed that TD milk yields were highly correlated with 305-day milk yield.

Moreover genetic trends were larger for TDMs than for LCM. These results suggested that TD milk yields could be used instead of 305-day milk yield for genetic evaluation of milk yield in crossbred dairy cattle in Thailand providing suitable TDMs. The RR-TDM rather than RP-TDM are well suited to the analysis. However, estimating breeding values by a RR-TDM is often limited by the extensive use of computer memory. It should be investigated whether or not the dimensionality of the random regression TDM can be reduced even more without substantial loss in accuracy.

Acknowledgement

The authors gratefully acknowledge the financial support for this study from the budgets of the government of Thailand.

References

- Ali, T. E., and L. R. Schaeffer. 1987. Accounting for covariances among TD milk yields in dairy cows. Canadian Journal of Animal Science 67: 637-644.
- Bilal, G., M. S. Khan, I. R. Bajwa and M. Shafiq, 2008. Genetic control of test-day milk yield in Sahiwal cattle. Pakistan Vet. J., 28(1): 21-24.
- Brotherstone, S., White, I.M.S. and Meyer, K., 2000. Genetic modeling of daily milk yield using orthogonal polynomials and parametric curves. Anim. Sci. 70, 407-414.
- Buaban, S., C. Reodecha and S. Topanurak. 2002. Test day models for genetic evaluation of milk yields in crossbred dairy cattle. Proceedings of the livestock seminar 18, DLD. Held at BITEC, Bangkok, 2-4 May 2002.
- Druet, T., F. Jaffrezik, D. Boichard and V. Ducrocq. 2003. Modeling lactation curves and estimation of genetic parameters for first lactation test-day records of French Holstein cows. J. Dairy Sci., 86: 2480-2490.
- Duangjinda M, Misztal I, Tsuruta S, 2004. BLUPF90. Dairy Pack. Manual version 2.2. The University of Georgia, USA and KhonKaen University, Thailand.
- Emmerling, R., Lidauer, M., Mantysaari, E.A., 2002. Multiple lactation random regression test-day model for Simmental and Brown Swiss in Germany and Austria. In: INTERBULL Open Meeting, Interlaken, 26-27 May/Bull. 29th Int. Bull Eval. Serv., Uppsala, pp. 111-117.

- Eslamil, J., H. Farhangfar and H. Naeemipour. 2004. Estimation of genetic parameters of TD milk yields for Holsteins in Khorasan province of Iran. *J. Dairy Sci.*, 89(Suppl. 1): 138.
- Gengler, N., G. R. Wiggans and A. Gillon, 2005. Adjustment for heterogeneous covariance due to herd milk yield by transformation of test-day random regressions. *J. Dairy Sci.*, 88: 2981-2990.
- Jaffrezic, F., and S. Pletcher. 2000. Statistical models for estimating the genetic basis of repeated measures and other function-valued traits. *Genetics* 156:913–922.
- Jamrozik J, Kistemaker GJ, Dekkers JCM and Schaeffer LR 1997a. Comparison of possible covariates for use in a random regression model for analyses of TD yields. *Journal of Dairy Science* 80, 2550-2556.
- Jamrozik, J, and L. R. Schaeffer. 1997. Estimation of genetic parameters for a TD model with random regressions for yield traits of first lactation holsteins. *Journal of Dairy Science* 80: 762-770.
- Jamrozik, J., L. R. Schaeffer, Z. Liu, and G. Jansen. 1997b. Multiple trait random regression TD model for production traits. *Interbull Bull.*, 16: 43–47.
- Jamrozik, J., L. R. Schaeffer, Z. Liu, and G. Jansen. 1997c. Multiple trait random regression TD model for production traits. *INTERBULL Open Meeting, Vienna, Austria, August 28-29. Pages 43-47 in Bulletin 16. International Bull Evaluation Service, Uppsala, Sweden.*
- Jensen, J. 2001. Genetic evaluation of dairy cattle using test-day models. *J. Dairy Sci.* 84:2803–2812.
- Jensen, J., E. A. Mantysaari, P. Madsen, and R. Thompson. 1997. Residual maximum likelihood estimation of (co)variance components in multivariate mixed linear models using average information. *J. Ind. Soc. Agric. Stat. (Golden Jub. No.)*, 1997:215–236.
- Jones, L. P., and M. E. Goddard. 1990. Five years of experience with the animal model for dairy evaluations in Australia. *Proc. 4th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod.*, Edinburgh, Scotland XIII:382–385
- Kaya, I., Y. Akbas and C. Uzmay. 2003. Estimation of breeding values for dairy cattle using test-day milk yields. *Turkish J. Vet. Anim. Sci.*, 27: 459-464.
- Kettunen, A., E. A. Mantysaari and J. Poso. 2000. Estimation of genetic parameters for daily milk yield of primi-parous Ayrshire cows by random regression test-day models. *Livest. Prod. Sci.*, 66: 251-261.
- Kettunen, A., E. A. Mantysaari, I. Strandén, J. Poso, and M. Lidauer. 1998. Estimation of genetic parameters for first lactation TD milk production using random regression models. *Proceedings of the 6th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production. Armidale, New South Wales, Australia* 23: 307-310.
- Kirkpatrick, M., D. Lofsvold, and M. Bulmer. 1990. Analysis of the inheritance, selection and evolution of growth trajectories. *Genetics* 124: 979-993.

- Kirkpatrick, M., W. G. Hill, and R Thompson. 1994. Estimating the covariance structure of traits during growth and ageing, illustrated with lactation in dairy cattle. *Genetical Research Cambridge*. 64: 57-69.
- Lidauer M., E. A. Mantysaari and I. Strandén. 2003. Comparison of test-day models for genetic evaluation of production traits in dairy cattle. *Livest. Prod. Sci.*, 79: 73-86.
- Lidauer, M., and E. A. Mantysaari. 1999. Multiple trait reduced rank random regression test-day model for production traits. *Proc. Ann. Interbull Meeting, Zurich, Switzerland, 1999. Interbull Bull.* 22:74–80.
- Lidauer, M., E. A. Mäntysaari, I. Strandén, and J. Pösö. 2000. Multiple-trait random regression test-day model for all lactations. *INTERBULL Open Meeting., Bled, Slovenia, May 14-15. Pages 81-86 in Bulletin 25. International Bull Evaluation Service, Uppsala, Sweden.*
- Lopez-Romero, and P., M.J. Carabano. 2003. Comparing alternative random regression models to analyze first lactation daily milk yield data in Holstein–Friesian cattle. *Livest. Prod. Sci.*, 82: 81–96.
- Mechado, S. G., M. A. R. De freits and C. H. Gadini. 1998. Genetic parameters of TD milk yield of Holstein cows. *Proc. 6th World Congress on Genet. Appl. Livest. Prod., Armidale, Australia*, 23: 427.
- Melo, C. M. R.de, I. U. Packer, C. N. Costa³ and P. F. Machado. 2007. Genetic parameters for TD milk yields of first lactation Holstein cows by random regression models. *Animal.*, 1: 325–334.
- Meuwissen, T. H. E., and M. H. Pool. 2001. Auto-regressive versus random regression test-day models for the prediction of milk yields. *Proc. 2001 Interbull Meeting, Budapest, Hungary. Interbull Bull.* 27:172–178.
- Meyer K. 1998. Estimating covariance functions for longitudinal data using a random regression model. *Genetics, Selection and Evolution* 30: 221-240.
- Meyer K., and W. G. Hill. 1997. Estimation of genetic and phenotypic covariance functions for longitudinal or ‘repeated’ records by restricted maximum likelihood. *Livestock Production Science* 47: 85-200.
- Meyer, K. 1991. Estimating variances and covariances for multivariate animal models by restricted maximum likelihood. *Genet. Sel. Evol.* 23:67–83.
- Meyer, K. 1997. An ‘average information’ restricted maximum likelihood algorithm for estimating reduced rank genetic covariance matrices or covariance functions for animal models with equal design matrices. *Genet. Sel. Evol.* 29:97–116.
- Meyer, K., H. U. Graser and K. Hammond. 1989. Estimates of genetic parameters for first lactation TD production of Australian Black and White cows. *Livest. Prod. Sci.*, 21: 177–199.

- Misztal, I., T. Strabel, J. Jamrozik, E. A. Mantysaari and T. H. E. Meuwissen. 2000. Strategies for estimating the parameters needed for different TD models. *J Dairy Sci.*, 83: 1125–1134.
- Muir, B. L., G. Kistemaker, J. Jamrozik and F. Canavesi. 2007. Genetic parameters for a multiple trait multiple lactation random regression test-day model in Italian Holsteins. *J. Dairy Sci.*, 90: 1564–1574.
- Olori V. E., W. G. Hill, B. J. McGuirk, and S. Brotherstone. 1999. Estimating variance components for test-day milk records by restricted maximum likelihood with a random regression animal model. *Livestock Production Science* 61: 53-63.
- Pander, B. L., W. G. Hill, and R. Thompson. 1992. Genetic parameters for TD records of British Holstein-Friesian heifers. *Animal Production* 55: 11-21.
- Patterson, H. D., and R. Thompson. 1971. Recovery of inter-block information when block sizes are unequal. *Biometrika* 58: 545-554.
- Pletcher, S. D., and C. J. Geyer. 1999. The genetic analysis of age dependent traits: Modeling a character process. *Genetics* 153:825–833.
- Pool, M. H. 2000. Test-day models: breeding value estimation based on individual test-day records. PhD Diss., Wageningen Institute of Animal Sciences, Wageningen, The Netherlands.
- Pool, M. H., and T.H.E. Meuwissen. 1999. Prediction of daily milk yields from a limited number of test days using test-day models. *Journal of Dairy Science* 82: 1555-1564.
- Pool, M. H., L.L.G. Janss, and T.H.E. Meuwissen. 2000. Genetic parameters of Legendre polynomials for first parity lactation curves. *Journal of Dairy Science* 83: 2640-2649
- Ptak, E. and L. R. Schaeffer. 1993. Use of testday yields for genetic evaluation of dairy sires and cows. *Livest. Prod. Sci.*, 34: 23-34.
- Reents, R., Dopp, L., 1996. Genetic evaluation for dairy production traits with a TD model for multiple lactations. INTERBULL Open Meeting, Veldhoven, 23–24 June/ Bull. United 14th Int. Bull Eval. Serv., Uppsala, pp. 113–117.
- Reents, R., Dopp, L., Schmutz, M., Reinhardt, F., 1998. Impact of application of a TD model to dairy production traits on genetic evaluations of cows. In: INTERBULL Open Meeting, Rotorua, 18–19 January / Bull. 17th Int. Bull Eval. Serv., Uppsala, pp. 49–54.
- Reents, R., J. C. M. Dekkers, and L. R. Schaeffer. 1995a. Genetic evaluation for somatic cell score with a multiple lactation TD model. *J. Dairy Sci.* 78:2858–2870.
- Reents, R., J. Jamrozik, L. R. Schaeffer, and J. C. M. Dekkers. 1995b. Estimation of genetic parameters for TD somatic cell score. *J. Dairy Sci.* 78:2847–2857.

- Rekaya, R., M. J. Carabaño, and M. A. Toro. 1999. Use of test-day yields for the genetic evaluation of production traits in Holstein-Friesian cattle. *Livestock Production Science* 57: 203-217.
- Sanpote, J., S. Buaban. 2003. A genetic evaluation of production traits for dairy cattle in Thailand. *Thai J.Vet. Med.* 33: 79-90.
- Sawalha, R. M., J. F. Keown, S. D. Kachman and L. D. VanVleck. 2005. Genetic evaluation of dairy cattle with test-day models with autoregressive covariance structures and with a 305-day model. *J. Dairy Sci.*, 88: 3346–3353.
- Schaeffer, L. R. 2004. Application of random regression models in animal breeding. *Livest. Prod. Sci.*, 86: 35–45.
- Schaeffer, L. R. and J. C. M. Dekkers. 1994. Random regressions in test-day production in dairy cattle. *Proc. 5th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod.*, Guelph, Ontario, Canada, 18: 443.
- Schaeffer, L. R. J. Jamrozik, G. J. Kistemaker and J. V. Doormaal. 2000. Experience with a test-day model. *J. Dairy Sci.*, 83: 1135–1144.
- Silvestre, A. M., F. Petim-Batista and J. Colaço. 2006. The accuracy of seven mathematical functions in modeling dairy cattle lactation curves based on TD records from varying sample schemes. *J. Dairy Sci.*, 89: 1813-1821.
- Strabel, T. and I. Misztal. 1999. Genetic parameters for first and second lactation milk yields of Polish Black and White cattle with random regression test-day models. *J. Dairy Sci.*, 82: 2805–2810.
- Swalve, H. H. 1995. The effect of TD models on the estimation of genetic parameters and breeding values for dairy yield traits. *J. Dairy Sci.* 78:929–938.
- Swalve, H. H. 2000. Theoretical basis and computational methods for different test-day genetic evaluation methods. *J. Dairy Sci.*, 83: 1115–1124.
- Swalve, H. H. and N. Gengler. 1998. Genetics of lactation persistency. *Proc. Workshop on Genetic Improvement of Functional Traits in Cattle—Metabolic Stress*, Edinburgh, United Kingdom. *British Soc. Anim. Sci.*, Occasional Publication No. 24: 75–81.
- Van der Werf, J.H.J., M. E. Goddard, and K. Meyer. 1998. The use of covariance functions and random regressions for genetic evaluation of milk production based on TD records. *Journal of Dairy Science* 81: 3300-3308.
- Vargas, B., E. Perez and J. A. M. Van Arendonk. 1998. Analysis of TD yield data of Costa Rican dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 81: 255–263.

- White, I. M. S., R. Thompson, and S. Brotherstone. 1999. Genetic and environmental smoothing of lactation curves with cubic splines. *J. Dairy Sci.* 82:632–638.
- Wiggans, G. R. and M. E. Goddard. 1997. A computationally feasible test-day model for genetic evaluation of yield traits in the United States. *J. Dairy Sci.*, 80: 1795–1800.
- Wilmink, J.B.M. 1987b. Comparison of different methods of predicting 305-day milk yield using means calculated from within-herd lactation curves. *Livestock Production Science* 17: 1-17.

เปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งและอัตราการผสมติดของพ่อโคนมพันธุ์ขาวดำที่ใช้ กลุ่มยาปฏิชีวนะ GTLS และ GTLS_{S₄}.

มุขดา รัตนภาสกร^{1*} กิตติศักดิ์ แสงสกุล² สันชัย วิโรจน์วุฒิกุล³ รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล¹

กฤษกร ศายขุน⁴ และ กรชัย กรแก้วรัตน์⁵

¹ กลุ่มวิจัยและผลิตน้ำเชื้อ สทป. กรมปศุสัตว์ ต. บางกะดี อ. เมือง จ. ปทุมธานี 12000

² ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพ สทป. ต. หอนงซาก อ.บ้านบึง จ. ชลบุรี 20170

³ ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อโคพันธุ์ลำพญากลาง ต. ลำสนธิ อ. ชัยบาดาล จ.ลพบุรี 15190

⁴ โครงการวิจัยชีววิทยาระบบสืบพันธุ์ของสัตว์บกเศรษฐกิจ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา อ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม 73170

⁵ ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์เลี้ยง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140

บทคัดย่อ

การเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งและอัตราการผสมติดของพ่อโคนมพันธุ์ขาวดำที่ใช้กลุ่มยาปฏิชีวนะ GTLS และ GTLS_{S₄}. จากน้ำเชื้อพ่อโคจำนวน 6 ตัว ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งโดยใช้น้ำยาเจือจาง egg yolk tris ผสมกับยาปฏิชีวนะ 2 กลุ่ม กลุ่มยาปฏิชีวนะ cell culture grade (GTLS : gentomycin 250 µg/ml, Tylosin50 µg/ml, Lincomycin/Spectinomycin) 150/300 µg/ml) และกลุ่มยาปฏิชีวนะชนิดฉีด (GTLS_{S₄} : gentamycin 250 µg/ml, Tylosin50 µg/ml, 1 Lincomycin/Spectinomycin 150/300 µg/m and streptomycin. 400 µg/ml) นำน้ำเชื้อแช่แข็งมาตรวจคุณภาพของน้ำเชื้อ รวมทั้งนำไปผสมเทียมเพื่อเปรียบเทียบอัตราการผสมติด ผลการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อพบว่า Progressive motility and curvilinear velocity (VCL) ของน้ำเชื้อกลุ่ม GTLS มีค่าสูงกว่า ($P<0.05$) กลุ่ม GTLS_{S₄} ไม่พบความแตกต่างของ % motility และลักษณะการเคลื่อนที่แบบอื่น รวมทั้งความสมบูรณ์ของเชื้อหุ้มตัวสุจิและอะโครโซมระหว่างกลุ่มยาปฏิชีวนะทั้งสอง เมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปผสมเทียมกับแม่โคของเกษตรกรพบว่า อัตราการผสมติดของน้ำเชื้อไม่แตกต่างกัน GTLS (51.6 ± 6.3) หรือ GTLS_{S₄} (49.8 ± 3.9) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ยาปฏิชีวนะชนิดฉีดในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง ซึ่งมีผลดีเช่นเดียวกับชนิด cell culture grade โดยสามารถลดต้นทุนการผลิตได้อย่างมาก

คำสำคัญ : น้ำเชื้อแช่แข็ง ยาปฏิชีวนะ อัตราการผสมติด โคนม

*ผู้รับผิดชอบบทความ

Effects of Cell Culture and Injectable Grades of Antibiotics on the Quality and Fertility of Frozen-Thawed Bull Semen

Mukda Rattanappaskorn^{1*} Kiattisak Sangsakul² Sinchai Wiroachwuthikul³ Rapiphan Uavechnichkul¹
Kornkaewrat Kornchai⁴ and Saikhun Kunasan⁵

¹Semen Research and Production sub-Division, Bureau of Biotechnology for Animal Production,
Pathumthani 12000, Thailand

²Chonburi Biotechnology and AI Research, Bureau of Biotechnology for Animal Production, Chonburi 20170, Thailand

³Lamphayaklang Livestock Semen Production Center, Lopburi 15190, Thailand

⁴Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Nakhonpathom 73140, Thailand

⁵Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya, Nakhonpathom 73170, Thailand

Abstract

Antibiotics added in extender during production of frozen semen play an important role for decreasing microbial contamination. The objective of the present study was to examine the effects of different grade of antibiotics (cell culture grade vs injectable grade) supplemented in the semen extender on the quality and fertility of frozen-thawed bull sperm. Semen samples collected from six bulls were frozen in Tris egg yolk extender containing either cell culture grade antibiotics (GTLS: 250 µg/ml gentomycin, 50 µg/ml Tylosin, 150/300 µg/ml Lincomycin/Spectinomycin) or injectable grade antibiotics (GTLSsS₄: 250 µg/ml gentamycin, 50 µg/ml Tylosin, 150/300 µg/ml Lincomycin/Spectinomycin and 400 µg/ml streptomycin. The thawed samples were evaluated for bacteriological contamination, semen quality and fertility.

Progressive motility and curvilinear velocity (VCL) of sperm in GTLS group were significantly ($P < 0.05$) higher than that in GTLSsS₄ group. There were no significant differences in percentages of total motility and other motility characteristics, membrane and acrosomal status of sperm among antibiotic grades. There were no significant differences in the calving rates following artificial insemination (AI) with frozen semen derived from GTLS (51.6 ± 6.3) or GTLSsS₄ (49.8 ± 3.9) groups. The results indicated that injectable antibiotics which cheaper than cell culture grade can be effectively used for producing frozen semen without affect the semen quality and fertility of bull sperm.

Keywords: cell culture, antibiotics, quality, fertility, bull semen

*corresponding author

Introduction

The two major goals for artificial insemination (AI) are genetic improvement of livestock breeds for increasing milk and meat production and elimination of venereal diseases. However, it is well accepted that bacterial and viral agents can be transmitted in semen by AI. It has been shown that microorganisms can be found in ejaculates even during hygienic semen collection in the perfectly and healthy bulls. Semen was contaminated at the time of collection from atmosphere, teaser animals and semen extenders. So, additional of antibiotics into semen diluents is necessary to prevent proliferation of the bacteria present in the ejaculated semen.

In Thailand, 87% of fresh semen samples were contaminated with ureaplasma whereas 52% were contaminated with mycoplasma (REF). The semen samples were also contaminated with *Pseudomonas* (41%), which 6% of them were *Pseudomonas aeruginosa* and 6% were *Corynebacterium pyogenes* but free from *Campylobacter spp.* and *Hemophilus somnus* (Ratanapaskorn et al., 1996). Shin et al (1988) reported that the combination of gentamicin (250 µg/ml), tylosin (50 µg/ml) and Linco-Spectin (150/300 µg/ml) (GTLS) was more effective for the control of mycoplasmas and ureaplasmas and equally effective for the control of *C. fetus subsp. venerealis* and *Haemophilus somnus* than the standard combination of penicillin, dihydrostreptomycin and polymyxin B sulfate. The combination of GTLS was partially controlled ureaplasma and mycoplasma by decreasing the contamination from 87 to 27% and from 51 to 14%, respectively (Ratanapaskorn et al., 1996). Most of laboratory worldwide including in Thailand used cell culture grade antibiotics which typically are pure and have been proven for the quality in producing the frozen semen. Although they are effectiveness for the control of microorganism, however, it is more expensive, while injectable antibiotics available for animals are more cheaper. Therefore, the objective of this study was to investigate the effects of cell culture and injectable grades antibiotics supplemented in the semen extender on the quality and fertility of frozen-thawed bull sperm.

Materials and Methods

Chemicals

All chemicals in this study were purchased from Sigma Chemical Company (Sigma, St. Louis, MO, USA), unless stated otherwise.

Animals and semen collections

Six Thai Holstein dairy bulls housed at the bull stud, Loburi province, Thailand were included in this study. Semen samples from each bull were collected by artificial vagina. Immediately after the collection, each ejaculate was visually assessed for sperm motility under a phase contrast microscope (400x) equipped with a warm stage (37°C). Sperm concentration was assessed using a calibrated spectrophotometer (model REF.Z160, IMV, France). Samples containing $\geq 70\%$ motile sperm, and $\geq 500 \times 10^6$ cells/ml were used in this study.

Semen freezing and thawing

Two consecutive ejaculates were pooled and diluted to a concentration of 80×10^6 cells/ml with a cryodiluent (20% egg yolk-Tris) containing either GTLS (250 µg/ml gentomycin, 50 µg/ml Tylosin, 150/300 µg/ml Lincomycin/Spectinomycin) or GTLSsS₄ (250 µg/ml gentamycin (Gentalvet), 50 µg/ml Tylosin (Tylovet), 150/300 µg/ml Lincomycin/Spectinomycin (Phamacia) and 400 µg/ml gentomycin (Merk). The diluted samples were frozen in the 0.25 ml labeled plastic straw using a Digitcool 5300 cotrolled rate freezer (IMV, France). The frozen straws were stored in liquid nitrogen until examine. For thawing, the frozen samples were rapidly thawed by placing the straws in a 37 °C water bath for 30 s. The semen samples were expelled into a 50 ml tube and kept in a 37 °C water. Ten microlitres of the thawed semen were then taken and placed on a pre-warmed microscopic slide and the post-thaw sperm motility was assessed under a phase contrast microscopy (400x). The frozen-thawed samples with a $\geq 40\%$ motility were accepted for AI.

Bacteriological examination of fresh and frozen-thawed semen

Fresh and frozen-thawed semen samples were evaluated for *ureaplasma diversum* (Ud), *mycoplasma spp.*, *campylobacter fetus* and *leptospira spp.* contaminations. For detection Ud, semen samples were serially diluted until 10^{-7} with Taylor–Robinson (TR) broth (PPLO broth w/o cv 10 % (w/v), 0.04 % phenol-red solution, 20 % (v/v) horse serum (inactivated), 2.5 % (v/v) fresh yeast extract, 0.1 % (w/v) urea, 5,000 iu/ml Penicillin G, 0.1 % thallium acetate and the pH was adjusted to 5.7 - 5.8) and were incubated at 37 °C for 4 days. To detect mycoplasma, semen was serially diluted until 10^{-5} with modified Hayflick (mH) broth (mH broth has the same fomular with PPLO broth except 0.2% DNA calf thymus were added in stead of urea and adjust pH to 7.8) and incubated for 4 days. Each diluted mH broth was inoculated onto mH agar plate and incubated for 5 days at 37°C under 5% CO₂ atmosphere to observe growth of mycoplasma colony. To detect campylobacter fetus, semen was cultured in blood agar plate No.2 and Butzler (campylobacter selective supplement, Oxoid) using Campygen (Oxoid) to control atmosphere in the dessicator, incubated at 37°C for 3 days. To detect Leptospira spp., semen was cultivated in EMJH medium supplemented with inactivated rabbit serum, incubated at 28°C and observed for 8 weeks (Heinemann et al., 2000).

Semen quality evaluation***Motility and movement characteristics Assessment by CASA***

In order to assess for motility and movement characteristics, 5 µl of the thawed semen was placed on a prewarmed (37°C) 2X-CELL slide chamber (20 µm depth) and analyzed by CASA (IVOS, Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA). At least 800 sperm were analyzed for total and progressive motility (PM) and movement characteristics including average path velocity (VAP), progressive velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), beat cross frequency (BCF), straightness of track (STR), amplitude of lateral head displacement (ALH), and linearity of track (LIN).

Membrane and acrosome integrity assessment by flow cytometry

The fluorescent probes used for membrane and acrosome integrity assessment were PI and FITC-PNA, respectively. The thawed semen was washed immediately by dilution with 10-fold volume of Hepes-

buffered modified Tyrode medium (SP-TALP; 2.0 mM CaCl₂, 3.1 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂, 100.0 mM NaCl, 25.0 mM NaHCO₃, 0.3 mM NaH₂PO₄, 1.0 mM sodium pyruvate, 21.6 mM sodium lactate, 10.0 mM Hepes, and 6 mg/ml BSA) at 37°C and filtered through 41 mm nylon mesh (Spectrum, Los Angeles, CA) and centrifuged at 500g for 10 min at room temperature to remove cell debris and extenders. The washing procedure was repeated twice. The sperm pellet was resuspended in 1 ml of SP-TALP and the concentration was adjusted to 50×10^6 cells/ml. For staining, a 440-ml aliquot of sperm suspension was mixed with 10 µl of PI (marker for membrane damage) and 50 µl of FITC-PNA (marker for acrosome damage) to obtain final concentrations of 25 and 10 µg/ml, respectively. Each sample was incubated at 37°C for 30 min in the absence of light. The stained samples were filtered through 41 mm nylon mesh and subjected to flow cytometric analysis.

Assessment of in vivo fertility by AI

Artificial insemination series using frozen semen from six bulls were conducted at Chantaburi and Srakaew provinces. The cows, body condition score ranged from 3 to 4 (REF) were inseminated on the second heat after calving with semen frozen in either GTLS (n= 1260) or GTLSsS₄ (n=1,445). The calving rates were recorded.

Results

Bacteriological examination in fresh and frozen-thawed semen

Fifteen fresh and frozen samples were examined for bacteriological contamination. There was no contamination of mycoplasma, campylobacter, leptospire in either fresh or frozen-thawed semen. By contrast, 14 out of 15 (93%) fresh semen samples were contaminated with ureaplasma at 10^2 to 10^5 CCU/ml, whereas only 1 out of 15 (7%) of frozen-thawed sample was contaminated at 10^2 to 10^4 CCU/ml.

Assessment of motility and movement characteristics by CASA

Effect of different sources of antibiotics on motility and movement characteristics of frozen-thawed sperm analyzed by CASA is summarized in Table 1. There were no significant differences in percentages of total motility of frozen-thawed sperm among antibiotic sources. By contrast, progressive motility of sperm

diluted in extender containing GTLS was significantly ($P < 0.05$) higher than that in GTLSsS₄ group. No significantly difference in the sperm movement characteristics between groups was observed, except for VCL in GTLS group was significantly higher ($P < 0.05$) than that in GTLSsS₄ group (147.9 ± 17.9 vs 138.8 ± 14.3).

Table 1. Mean $\pm$ SD of motility, progressive motility and movement characteristics of bull sperm following freezing and thawing in egg yolk Tris containing either GTLS or GTLSsS₄.

Parameters	No. of bull	GTLS ¹	GTLSsS ₄ ²
Motility (%)	20	56.0 ± 15.3^a	53.9 ± 13.1^a
PM (%)	20	32.2 ± 10.0^a	27.2 ± 8.2^b
VAP	20	85.2 ± 6.8^a	82.5 ± 7.2^a
VSL	20	65.9 ± 5.1^a	64.0 ± 5.8^a
ALH	20	7.8 ± 1.3^a	7.3 ± 0.9^a
VCL	20	147.9 ± 17.9^a	138.8 ± 14.3^b
BCF	20	25.8 ± 4.0^a	25.5 ± 4.3^a
STR	20	76.4 ± 5.5^a	77.4 ± 5.5^a
LIN	20	46.8 ± 5.5^a	47.4 ± 4.8^a

GTLS: cell culture grade antibiotics; GTLSsS₄: injectable grade antibiotics

Different superscripts in the same rows differ significantly ($P < 0.05$).

Assessment of membrane and acrosome integrity by flow cytometry

Percentage of membrane and acrosome integrity of frozen-thawed sperm analyzed by flow cytometry is summarized in Table 2. There were no significant differences among antibiotic sources (GTLS vs GTLSsS₄) in percentages of sperm with membrane-acrosome intact, membrane damage -acrosome intact and membrane-acrosome damage.

Table 2. Percentages (mean $\pm$ SD) of membrane and acrosomal status of bull sperm following freezing and thawing in egg yolk Tris containing either GTLS or GTLSsS₄.

Parameters	No. of bull	GTLS	GTLSsS ₄
Membrane-acrosome intact	20	53.0 ± 10.0	54.2 ± 9.7
Membrane damage - acrosome intact	20	23.4 ± 7.9	21.8 ± 5.5

Membrane-acrosome damage	20	23.7 ± 10.0	24.0 ± 7.7
-----------------------------	----	-------------	------------

GTLS: cell culture grade antibiotics; GTLSsS₄: injectable grade antibiotics

No significant differences in percentages of membrane and acrosomal status of bull sperm among antibiotic groups ($P > 0.05$).

Artificial insemination and calving rate

Number of cow inseminated with sperm from each six bulls frozen in extender containing either GTLS or GTLSsS₄ and calving rate are summarized in Table 3. A total of 2,705 cows were inseminated, 1260 and 1,445 cows were inseminated with sperm treated with GTLS and GTLSsS₄, respectively. There were no significant differences in calving rates following AI with sperm derived from Bulls 1 to 5 (B1 to B5) frozen in extender containing either GTLS or GTLSsS₄. By contrast, calving rate produced by Bull 6 (B6) showed significantly higher ($P < 0.05$) in GTLS group than that in GTLSsS₄ group (62.6 vs 54.5).

Table 3. Calving rates following AI with bull sperm cryopreserved in egg yolk Tris containing either GTLS or GTLSsS₄.

Bulls	GTLS		GTLSsS ₄	
	No. of cow	Calving rate (%)	No. of cow	Calving rate (%)
B1	226	48.7 ^a	238	46.6 ^a
B2	167	52.1 ^a	263	49.8 ^a
B3	224	48.7 ^a	228	50.4 ^a
B4	229	53.3 ^a	241	54.4 ^a
B5	243	44.0 ^a	240	46.6 ^a
B6	171	62.6 ^a	235	54.5 ^b
Total	1260	51.6 ± 6.3	1,445	49.8 ± 3.9

TLS: cell culture grade antibiotics; GTLSsS₄: injectable grade antibiotics

Different superscripts in the same rows differ significantly ($P < 0.05$).

Discussion

A number of microorganisms can be found either in fresh ejaculated semen or frozen semen that contaminated during the procedures of semen freezing. Moreover, bacterial contamination is also present in the yolks of

fresh eggs (Bousseau et al., 1998). Therefore, there is a need to add antibiotics in semen extender to prevent microbial contamination. The present study showed that injectable grade antibiotics (GTLSS₄) can be successfully used to prevent bacterial contamination without decreasing semen quality and fertilizing ability of frozen semen comparable to cell culture grade ones (GTLS). These findings have a benefit for reducing the cost of frozen semen production due to injectable grade antibiotics were cheaper than cell culture grade ones.

To reduce the risk of semen donors from microbial contamination, all semen donors in the Semen Production Centre have to carefully checked and free from IBR and BVD. Furthermore, prepuce washing before semen collection decreased bacterial contamination such as *Campylobacter fetus*, *Trichomonas* or ureaplasma (Chanarthinat et al., 1997; Rattanapaskorn et al., 1996). The antibiotic combination (gentamicin, tylosin and Linco-Spectin: GTLS) used in this study was effective in controlling microorganisms and was not detrimental to seminal quality (progressive motility and acrosomal integrity), which agrees with previous study (Lorton et al., 1988a). Field fertility (nonreturn rate) studies were performed to evaluate bovine semen processed for freezing using the antibiotics (GTLS). The results indicated no significant effect on seminal quality as measured by field fertility under the conditions of these experiments using heated whole milk or egg yolk-sodium citrate seminal extenders (Lorton et al., 1988b). The combination of gentamicin, tylosin, and Linco-Spectin® can be safely used in bull semen to control specific contaminating organisms and is being adopted by the artificial breeding industry (Ahmad et al., 1987). It has been reported that gentamicin was harmless to motility and acrosomal status of frozen-thawed bull sperm, by contrast, it appeared to reduce fertility of bull semen in a field trial (Ahmad et al., 1987; Ahmad and Foote, 1986). Tylosin is effective against mycoplasma and ureaplasma in bovine semen (Truscott and Abreo, 1978), addition of this antibiotic to processed bull semen may be useful to inhibit these potential semen contaminants. Moreover, motility and fertility of tylosin-treated bull sperm was comparable with fertility of control semen (Ahmad et al., 1987; Foote and Berndtn, 1976). Linco-Spectin® has been reported successfully used in bull semen as an antimycoplasma agent without affecting sperm motility or fertility (Ahmad et al., 1987).

Injectable grade antibiotics did not affect percentages of motility, plasma and acrosomal membranes of frozen-thawed sperm as compared to cell culture grade ones. Furthermore, differences grade of antibiotics did not affect calving rates following AI. Sperm is complex cell, which need to possess many attributes

(motility, an intact acrosome, ability to bind to the zona pellucida, ability to bind to the oolemma, etc.) in order to fertilize an oocyte. A number of motile sperm cells are required for enhancing the fertilizing ability of frozen-thawed semen, sperm may be infertile due to a lack of motility. High fertility sperm after freezing and thawing must have an intact and competent plasma membrane which easily ruptures during the freeze/thaw cycle causes intracellular ice formation (Steponkus et al., 1983), a major cause of cell death during cryopreservation (Mazur, 1977). High fertilizing sperm must maintain an intact acrosome up to the time it binds to the zona pellucida of the oocyte and undergoes the acrosome reaction, which releases the acrosomal enzymes permitting the sperm to digest a hole through the zona pellucida, thereby allowing the spermatozoa access to the oolemma (Yanagimachi, 1981). In conclusion, injectable grade antibiotics which are cheaper than cell culture grade can be successfully used to produce frozen semen without affecting the semen quality and fertility of bull sperm. These succeed can be used in AI industry.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Monchai Duangjinda, Faculty of Agriculture, Khonkaen University, and Khun Puttana Roongrawee, Information Technology Center, Department of Agriculture, for expert assistance in the statistical analysis.

References

- Ahmad, K. and Foote, R.H. 1986. Postthaw survival and fertility of frozen bull spermatozoa treated with antibiotics and detergent. *J Dairy Sci.* 69:535.
- Ahmad, K. Foote R.H. and Kaproth, M. 1987. Antibiotics for bull semen frozen in milk and egg yolk extenders. *J Dairy Sci.* 70:2439-43.
- Bousseau, S., Brillard, J.P., Marguant-Le, Guienne, B., Guérin, B., Camus, A. and Lechat, M. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology.* 50:699-706.
- Chanatinart, V., Uavechanichkul, R. And Ratanapaskorn, M. 1997. Enhancing quality of deep frozen bull semen by reducing bacterial contamination. *Artificial Insemination Bulletin.* 8: 2-10.

- Foote, R.H. and Berndtn, W.E. 1976. Antibacterial agents for bull semen; do they help so? In Proc. 6th Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod. Natl. Assoc. Anlm. Breeders, Columbia, MO. p23.
- Lorton, S.P., Sullivan, J.J., Bean, B., Kaproth, M., Kellgren, H. and Marshall, C. 1988a. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. 2. Evaluation of seminal quality. *Theriogenology*. 29:593-607.
- Lorton, S.P., Sullivan, J.J., Bean, B., Kaproth, M., Kellgren, H. and Marshall, C. 1988b. A new antibiotic combination for frozen bovine semen, 3. Evaluation of fertility. *Theriogenology*. 29:609-14.
- Mazur P. 1977. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*. 14:251-72.
- Ratanapaskorn, M., Ua-Vechnichkul, R., Suvimonteerabutr, J. And Virakul, P. 1996. Bacteria in Bull's Ejaculate and the use of antibacterial agents in deep frozen Semen. *Thai J Vet Med*. 26:369-378.
- Shin, S.J., Lein, D.H., Patten, V.H. and Ruhnke, L.H. 1988. A new antibiotic combination for frozen bovine semen 1. Control of . *Mycoplasmas*, *Ureaplasmas*, *Campylobacter fetus subsp. Venerealis* and *Haemophilus somnus* *Theriogenology*. 29:577-591.
- Steponkus, P.L., Dowgert, M.F. and Gordon-Kamm, W.J. 1983. Destabilization of the plasma membrane of isolated plant protoplasts during a freeze-thaw cycle: the influence of cold acclimation. *Cryobiology*. 20:448-65.
- Truscott, R.B. and Abreo, C. 1978. Antibiotics for elimination of mycoplasma and ureaplasma from bovine semen. *J Dairy Sci*. 60:954.
- Yanagimachi, R., Okada, A. and Tung, K.S. 1981. Sperm autoantigens and fertilization: II. Effects of anti-guinea pig sperm autoantibodies on sperm-ovum interactions. *Biol Reprod*. 24:512-8.

การเพิ่มประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อพ่อโคโดยวิธีการกรองผ่าน Sephadex

มุขดา รัตนภาสกร^{1*} จตุพร พงษ์เพ็ง² รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล¹ และ กุณสรศักดิ์ สายขุน³

¹กลุ่มวิจัยและผลิตน้ำเชื้อ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ถนนติวานนท์ ปทุมธานี 12000

²ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อโคพันธุ์ลำพูนกลาง ต. ลำสนธิ อ. ชัยบาดาล จ.ลพบุรี 15190

³โครงการวิจัยชีววิทยาระบบสืบพันธุ์ของสัตว์บกเศรษฐกิจ สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา อ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม 73170

บทคัดย่อ

เปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการกรองด้วย Sephadex G15 (FS) (T1); Sephadex G15 ร่วมกับ DEAE-52 (diethyl amino ethne-52;) cellulose และ CM-52 (caboxy methyl-52) cellulose (FS+IE) (T2) กับกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการกรอง โดยการใช้เชื้อโคนมพันธุ์ขาวดำจำนวน 5 ตัว เจือจางน้ำเชื้อด้วย Tris -citric acid (n=20, initial motility 50-60%) แบ่งน้ำเชื้อเป็น 3 ส่วน เพื่อทำการกรองที่อุณหภูมิ 25-28°C. ผลการศึกษาพบว่า การกรองทำให้สูญเสียจำนวนตัวอสุจิริยละ 22 – 33 แต่ อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (motility และ progressive motility) ก่อนการแช่แข็งของน้ำเชื้อ มีคุณภาพดีขึ้น (p<.05) สำหรับ อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ของน้ำเชื้อแช่แข็งเมื่อตรวจทันทีหลังการอุ่นละลาย พบว่าไม่ มีความแตกต่างระหว่างน้ำเชื้อที่ไม่ผ่านการกรองกับน้ำเชื้อที่กรองด้วยวิธีต่าง ๆ (p>.05) อย่างไรก็ตาม พบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการกรองทั้ง 2 วิธีมีค่าการเคลื่อนที่แบบ VAP(path velocity), VSL (progressive velocity) และ VCL (curvilinear velocity) ดีกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่ไม่ผ่านการกรอง (p<.05) สำหรับ plasma membrane และ acrosome integrity ของตัวอสุจิหลังการแช่แข็งมีค่าสูงขึ้นเมื่อผ่านการกรอง โดยสรุปการกรอง สามารถแยกตัวอสุจิที่ไม่แข็งแรงจากน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งได้แต่ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการแช่แข็งได้

คำสำคัญ: Sephadex น้ำเชื้อพ่อโค

เลขทะเบียนผลงานวิจัย 51(1)-0208-011

*ผู้รับผิดชอบบทความ

Improving the Freezability of Bull Semen Ejaculates by Sephadex Filtration

Mukda Rattanapaskorn^{1*}, Jatuporn Pongpeng², Rapihan Uavechanichkul¹ and Kunasun Saikhun³

¹Semen Quality control section, The Bureau of Biotechnology in Livestock Production,

Department of Livestock Development, Tiwanon Rd, Pathumthani, 12000

² Lamphayaklang Livestock Semen Production Center, Lamsonthi, Lopburi, 15190

³Department of Anatomy, Faculty of Science, Institute of Science and Technology for Research and

Development, Mahidol University, Nakhon Pathom 73170

Abstract

The effect of sephadex or sephadex-ionexchange filtration on the improvement in quality and freezability of low-grade bull semen was assessed. Two types of filtration columns were used: one containing sephadex G-15 (FS) and the other sephadex G-15 along with ion exchanger (diethyl amino ethane-52, DEAE-52) cellulose and carboxy methyl-52, CM-52) cellulose (FS+IE). Unfiltered samples served as controls. Semen ejaculates extended in Tris -citric acid (n=20, initial motility 50-60%) were filtered at 25-28°C. Semen from five AI bulls was split-filter through the above two columns. Filtration significantly reduced the concentration of recovered spermatozoa (22- 33%, FS, FS+IE) but improved sperm motility and progressive motility of extended semen (P<.05). Filtration did not improve sperm motility after freezing/thawing. Sperm motion characteristics of extended semen, was not significantly affected by filtration, while affected to frozen/thawed semen. Frozen/thawed semen motion, VAP (path velocity), VSL (progressive velocity) และ VCL (curvilinear velocity) were better in the filtered semen (p<.05). Sperm plasma membrane and acrosome integrity of frozen-thawed semen were also improved by filtration (p<.05). It can be concluded that filtration effectively separate weaken or abnormal spermatozoa in pre-freezing semen but could not improve post-thaw sperm viability of semen.

Key words: Sephadex, bull semen

Research project no. 51(1)-0208-011

* corresponding Author

คำนำ

คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบว่ามีความสมบูรณ์พันธุ์นับเป็นปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งในการผสมเทียมให้ได้ผลสำเร็จ ในขบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งนั้นต้องผลิตจากน้ำเชื้อสดพ่อโคที่มีคุณภาพผ่านเกณฑ์มาตรฐาน เช่นมีเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิมีชีวิตไม่ต่ำกว่า 70 % มีความผิดปกติของส่วนหัวและหางรวมกันไม่เกิน 20 % เนื่องจากตัวอสุจิที่ตายหรือผิดปกติจะปล่อยสารที่เป็นพิษลงในน้ำ เชื้อเกิดผลเสียต่อตัวอสุจิอื่น เป็นเหตุให้อัตราการผสมติดลดลง (Anzar and Graham, 1993) แต่ในบางช่วงเวลาพ่อโคบางตัวหรือบางสายพันธุ์ให้ผลผลิตน้ำเชื้อคุณภาพต่ำกว่ามาตรฐานแต่มีความจำเป็นต้องเร่งผลิต ให้เพียงพอต่อความต้องการ จึงมีความจำเป็นต้องหาวิธีผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งให้ได้มาตรฐานจากน้ำเชื้อดังกล่าว โดยใช้หลักการแยกตัวอสุจิที่ตายหรือมีความผิดปกติออกก่อนแล้วจึงนำไปผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง ปัจจุบันมีผู้คิดวิธีแยกตัว อสุจิเหล่านี้ออกจากน้ำเชื้อหลายวิธีเช่น ใช้การปั่นแยก (centrifugation gradients, White, *et al.*, 1984) วิธี swim up ของ Parrish and Foote (1987) รวมทั้งวิธีการกรองด้วย Sephadex ของ Anzar and Graham (1993) ที่รายงานว่าสามารถแยกตัวอสุจิไม่มีชีวิตและตัวอสุจิที่ผิดปกติออกจากน้ำเชื้อได้ผลดี

Sephadex ทำมาจากอนุพันธ์ของ inert polysaccharide (dextran) มีลักษณะเป็นเม็ดเล็กเหมือนลูกปัด มีผิวหยาบ สามารถพองตัวในน้ำได้ 2-3 เท่า ความสามารถในการจับตัวอสุจิไม่มีชีวิตและตัวอสุจิที่ผิดปกติของ Sephadex ยังไม่ทราบเหตุผลแน่ชัด อาจเกิดจากลักษณะผิวหยาบของ Sephadex เป็นตัวจับตัวอสุจิที่มีลักษณะดังกล่าว (Zavos, *et al.*, 1998) โดย Carbo และคณะ (1992) คิดว่าความสามารถในการจับตัวอสุจิของ Sephadex น่าจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงเชื้อหุ้มเซลล์มากกว่าการไม่เคลื่อนไหวของตัวอสุจิ ซึ่งตัวอสุจิที่ตายแล้วหรือตัวอสุจิที่ผิดปกติจะหลั่งสาร Clusterin ออกมา (Ibrahim, *et al.*, 2001) รวมทั้งยังเปลี่ยนประจุของผิวเชื้อหุ้มเซลล์จากประจุ ลบ เป็นประจุ บวก เป็นผลให้ตัวอสุจิจับกับ Sephadex ได้ (Ahmad, *et al.* ; 2003) การกรองน้ำเชื้อผ่าน Sephadex column นอกจากสามารถกรองตัวอสุจิไม่มีชีวิตออกจากน้ำเชื้อได้แล้วยังสามารถกรองตัวอสุจิที่ผิดปกติได้ด้วย (Anzar and Graham, 1993 ; Ahmad, *et al.* ; 2003) Januskauskas และคณะ (2005) พบว่า น้ำเชื้อที่กรองผ่าน Sephadex สามารถเพิ่มอัตราตัวอสุจิมีชีวิตหลังการอุ่นละลายของน้ำเชื้อแช่แข็งโค ดังนั้นการใช้ Sephadex อย่างเดียว หรือใช้ร่วมกับ DEAE-52 (diethyl amino ethne-52;) cellulose และ CM-52 (caboxy methyl-52) cellulose (ที่เป็นประจุ บวกและลบตามลำดับ) กรองน้ำเชื้อ น่าจะเป็นทางเลือกในการเพิ่มประสิทธิภาพในการแช่แข็งน้ำเชื้อที่มีคุณภาพต่ำของพ่อโคได้ การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบ

คุณภาพน้ำเชื้อที่กรอง ผ่าน Sephadex กับน้ำเชื้อที่รีดเก็บปกติ และผลจากการกรองน้ำเชื้อ ผ่าน Sephadex ต่อคุณภาพน้ำเชื้อเมื่อนำไปผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง

อุปกรณ์วิธีการ

วางแผนการทดลองโดยใช้ RCBD ใช้น้ำเชื้อพ่อโคของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อโคพันธุ์ลำพูนกลาง จำนวน 5 ตัว ทำ 4 ซ้ำ ให้พ่อโคเป็น block แบ่งเป็น 3 treatments ดังตาราง ดังนี้ กลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการกรอง , T1 กรองผ่าน sephadex , T2 กรองผ่าน sephadex ร่วมกับ DEAE-52 และ CM-52

ตารางแสดงส่วนประกอบของสารในแต่ละ column

ส่วนประกอบ	ประจุ	Control (ไม่กรอง)	T1 (FS)	T2 (FS+IE)
Sephadex (g)	ไม่มี	-	0.6	0.6
DEAE-52 (g)	บวก	-	-	0.25
CM-52 (g)	ลบ	-	-	0.25

วิธีการเตรียม sephadex column

1. แช่ Sephadex G-15 ใน น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Tris-citric acid ที่ไม่ใส่ไข่แดง 20 % (v/v) และ Glycerol 7 % (v/v) ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อให้ Sephadex G-15 พองตัวเป็นเวลา 1 คืน
2. การเตรียมส่วนของ Sephadex column ใช้ syringe ขนาด 10 มล. ยึดติดกับขาตั้ง โดยที่ปลาย tip ของ syringe จะต่อกับท่อยาง ความยาวประมาณ 6 นิ้ว มีคลิปหนีบสายยาง โดยที่ปลายด้านล่างของ syringe จะมี glass wool เล็กน้อยอุดอยู่เพื่อป้องกันการไหลออกของ Sephadex นำส่วนผสมในข้อ 1 มาบรรจุลง syringe รอเวลาประมาณ 5 นาทีเพื่อให้ Sephadex มีการเรียงตัวให้เรียบร้อย สำหรับ DEAE-52 (Diethylaminoethyl – 52 cellulose , positive charge) และ CM-52 (Carboxymethyl – 52 cellulose, negative charge) ให้เตรียมในวันที่ทำการทดลอง โดยมีปริมาณดังแสดงในตาราง

การกรองและแช่แข็งน้ำเชื้อ

1. ริดเก็บน้ำเชื้อ พ่อโคพันธุ์ไทยโฮลสไตน์ของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อโคพันธุ์ลำพูนกลาง จำนวน 5 ตัว โดยใช้ artificial vagina โดยทำซ้ำสัปดาห์ละ 1 ครั้ง รวม 4 สัปดาห์

2. ตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อสดหลังริดเก็บได้แก่ ตรวจอัตราตัวอสุจิมีชีวิต (% motility) เบื้องต้น ด้วยกล้องจุลทรรศน์ compound ชนิด phase contrast น้ำเชื้อพ่อโคที่มีอัตราตัวอสุจิมีชีวิตต่ำกว่า 70% นำมาผสมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Tris-citric acid แล้วแบ่งน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม, T1 และ T2 แล้วกรองน้ำเชื้อผ่านคอลัมน์ที่มีรายละเอียดดังตารางแสดงส่วนประกอบ

3. บ่มน้ำเชื้อที่ผ่านการกรองในข้อ 3 รวมทั้งกลุ่มควบคุม ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 4 ชั่วโมง แล้วจึงวิเคราะห์คุณภาพด้วยเครื่องตรวจคุณภาพน้ำเชื้ออัตโนมัติ (Computerized automatic semen analyzer) โปรแกรม IVOS Motility Analyzer version 12.3 (Hamilton-Thorne Biosciences, USA) ใช้ตัวชี้วัดต่าง ๆ มีนิยามและสูตรการคำนวณในรายงานของ Agarwal et al. (2003) และ Tardif et al. (1997) ได้แก่

3.1 การเคลื่อนที่ (motility) และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility)

3.2 ความเร็วของรูปแบบการเคลื่อนที่ วัดด้วยค่า

- Average path velocity ; VAP($\mu\text{m/s}$) แสดงค่าเฉลี่ยวิธีการเคลื่อนที่ของอสุจิในหนึ่งหน่วยเวลาที่ได้จากสัดส่วนการเคลื่อนที่แบบวิถีโค้ง (VCL) กับ วิถีตรง (VSL)

- Curvilinear velocity ; VCL ($\mu\text{m/s}$) แสดงค่าเฉลี่ยวิธีการเคลื่อนที่ในแนวโค้งจากจุดหนึ่งไปยังอีกจุดหนึ่ง ในหนึ่งหน่วยเวลา

- Straight-line velocity ; VSL($\mu\text{m/s}$) แสดงค่าเฉลี่ยวิธีการเคลื่อนที่ในแนวเส้นตรงของอสุจิระหว่างจุดเริ่มต้นและจุดสิ้นสุดการเคลื่อนที่ในหนึ่งหน่วยเวลา

3.3 ลักษณะการเคลื่อนที่ วัดด้วยค่า

- Amplitude of lateral head displacement ; ALH($\mu\text{m/s}$) แสดงค่าความกว้างของช่วงการเคลื่อนที่ของอสุจิในหนึ่งหน่วยเวลา

- Beat cross frequency ; BCF (Hz) แสดงค่าความถี่ในการส่ายหัวของอสุจิในการเคลื่อนที่

- Straightness ; STR (%) เป็นค่าอัตราส่วนของ VSL/VAP

- Linearity ; LIN (%) เป็นค่าอัตราส่วนของ VSL/VCL

4. ทำการบรรจุหลอดน้ำเชื้อขนาด 0.25 มล และแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (รุ่น Digitcool 5300 ZH 350 & UE 350 with 900 HP programmer) เก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง ในไนโตรเจนเหลว

5. การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง

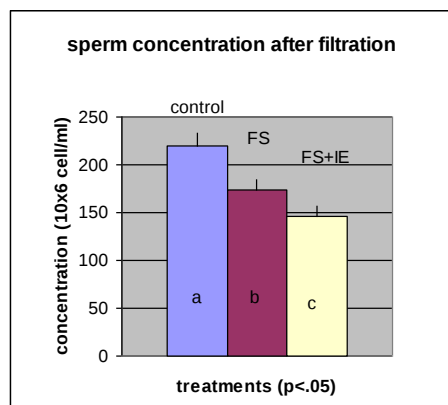
5.1 ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อหลังจากแช่แข็งอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่องตรวจคุณภาพน้ำเชื้ออัตโนมัติ เช่นเดียวกับข้อ 3 โดยตรวจทันทีหลังการอุ่นละลายที่ระดับอุณหภูมิ 37 °c นาน 30 วินาที

5.2 ตรวจความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มตัวอสุจิ (plasma membrane integrity) และอะโครโซม (acrosome integrity) โดยย้อมตัวอสุจิด้วยสี FITC-PNA/PI (fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin/propidium iodide) และตรวจด้วยเครื่อง Flow Cytometer รุ่น FACS caliber จากบริษัท BECTON DECKINSON

6. วิเคราะห์ข้อมูล โดยใช้ Analysis of Variances วิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test

ผลการทดลอง

ความเข้มข้นของน้ำเชื้อหลังเจือจางด้วย Tris-citric acid มีค่าเฉลี่ย $219.45 \pm 14.9 \times 10^6$ ตัว/มล เมื่อนำมากรองผ่าน FS หรือ FS+IE แล้วความเข้มข้นของตัวอสุจิลดลง ($p < .05$) โดยพบว่า เมื่อกรองผ่าน FS อย่างเดียว ความเข้มข้นของตัวอสุจิลดลงร้อยละ 22 (174.04 ± 11.77) แต่ถ้ากรองผ่าน FS + IE ความเข้มข้นของตัวอสุจิลดลงร้อยละ 33 (146.59 ± 11.22) (รูปที่ 2)



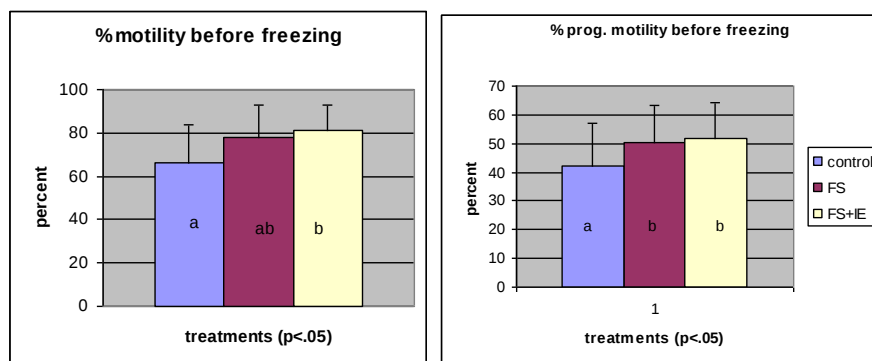
Control = ไม่ผ่านการกรอง FS = กรองผ่าน sephadex , FS + IE = กรองผ่าน sephadex + ประจุ

ตัวอักษรต่างกันในแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

รูปที่ 1 ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของตัวอสุจิ เมื่อผ่านการกรอง

คุณภาพน้ำเชื้อสดที่เจือจางด้วย Tris-citric acid มีอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเฉลี่ย 66.14 ± 17.56 และ 42.4 ± 14.22 ตามลำดับ หลังจากผ่านการกรองด้วย FS อย่างเดียวหรือ FS+IE นั้น ทำให้อัตราการ

เคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเพิ่มขึ้น ($p < .05$) (รูปที่ 1)



Control = ไม่ผ่านการกรอง FS = กรองผ่าน sephadex , FS + IE = กรองผ่าน sephadex + ประจุ

ตัวอักษรต่างกันที่อยู่ในแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

รูปที่ 2 อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็ง

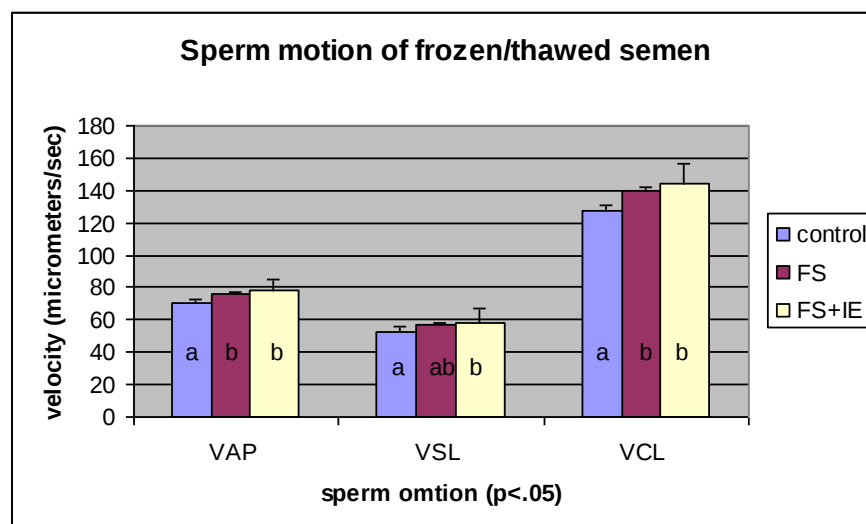
ตารางที่ 2 คุณภาพน้ำเชื้อและค่าการเคลื่อนที่ลักษณะต่าง ๆ ของตัวอสุจีก่อนแช่แข็ง

คุณภาพน้ำเชื้อ	จำนวน (ตัว/ตัวอย่าง)	ค่าเฉลี่ย ^{2/}		
		control	FS	FS+IE
การเคลื่อนที่ (% motility)	20	$66.14^a \pm 17.56$	$77.71^{ab} \pm 15.21$	$81.31^b \pm 11.77$
การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%Prog.motility)	20	$42.4^a \pm 14.22$	$50.13^b \pm 13.25$	$51.87^b \pm 12.53$
ความเร็วของรูปแบบการเคลื่อนที่				
average path velocity : VAP ($\mu\text{m/s}$)	20	129.33 ± 19.36	127.40 ± 19.01	133.87 ± 18.23
straight-line velocity : VSL ($\mu\text{m/s}$)	20	96.70 ± 11.29	97.41 ± 11.90	99.76 ± 13.18
curvilinear velocity : VCL ($\mu\text{m/s}$)	20	227.82 ± 59.29	226.42 ± 55.21	240.86 ± 57.30
ลักษณะการเคลื่อนที่				
amplitude of lateral head displacement : ALH ($\mu\text{m/s}$)	20	7.82 ± 0.05	7.59 ± 0.05	7.84 ± 0.07
beat cross frequency : BCF (Hz)	20	36.05 ± 1.11	36.88 ± 1.08	37.20 ± 0.81
straightness : STR (%)	20	76.94 ± 1.77	78.00 ± 1.77	76.29 ± 1.80
Linearity : LIN (%)	20	45.77 ± 1.30	46.83 ± 1.44	45.29 ± 1.42

^{2/} ตัวอักษรต่างกันที่อยู่ในแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการอุ่นละลาย พบว่าน้ำเชื้อที่ผ่านการกรองด้วย FS เพียงอย่างเดียวและที่ผ่านการกรองด้วย FS+IE มีอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเฉลี่ยร้อยละ 26.14 ± 22.09 , 11.4 ± 15.81 , 25.57 ± 11.90 และ 11.53 ± 5.52 ตามลำดับ ในขณะที่น้ำเชื้อแช่แข็งที่ไม่ผ่านการกรองมีอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเฉลี่ยร้อยละ 24.79 ± 6.10 และ 9.67 ± 3.88 ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ซึ่งถือว่าต่ำกว่ามาตรฐานคือต้องมีอัตราการเคลื่อนที่ไม่ต่ำกว่า ร้อยละ 40 จึงไม่สามารถนำไปใช้ในการผสมเทียมได้ แต่เมื่อพิจารณารูปแบบการเคลื่อนที่ของอสุจิในส่วนของค่าเฉลี่ยอัตราการเคลื่อนที่ได้ของอสุจิในหนึ่งวินาที (VAP) วิธีการเคลื่อนที่ในแนวตรง (VSL) และวิธีการเคลื่อนที่ในแนวโค้ง (VCL) พบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการกรองด้วย FS และ FS+IE มีค่าสูงกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่ไม่ผ่านการกรองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังตารางที่ 3

ความสมบูรณ์ของเชื้อหุ้มเซลล์ของอสุจิและอะโครโซม พบว่า น้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการกรองด้วย FS+IE มีความสมบูรณ์เชื้อหุ้มเซลล์ของอสุจิและอะโครโซมที่สมบูรณ์ สูงกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการกรองด้วย FS ($P < 0.05$) และน้ำเชื้อที่ไม่ผ่านการกรองมีความสมบูรณ์เชื้อหุ้มเซลล์ของอสุจิและอะโครโซมที่สมบูรณ์ต่ำที่สุด ($p < 0.05$) (ภาพที่ 4)



Control = ไม่ผ่านการกรอง FS = กรองผ่าน sephadex , FS + IE = กรองผ่าน sephadex + ประจุ

ตัวอักษรต่างกันที่อยู่ในแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

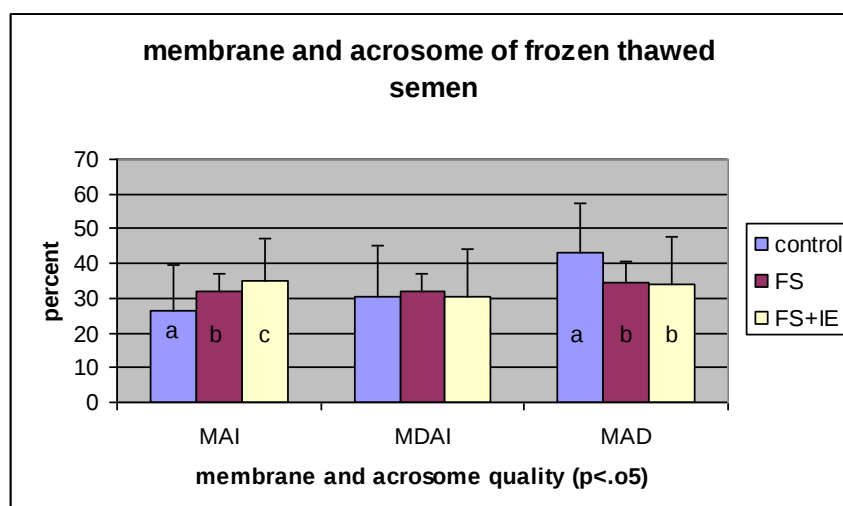
รูปที่ 3 การเคลื่อนที่แบบ VAP, VSL และ VCL ของน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการอุ่นละลาย

ตารางที่ 3 คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งและค่าการเคลื่อนที่ลักษณะต่าง ๆ ของตัวอสุจิ หลังการอุ่นละลาย

คุณภาพน้ำเชื้อ	จำนวน (ตัว/ตัวอย่าง)	ค่าเฉลี่ย ^{2/}		
		control	FS	FS+IE
การเคลื่อนที่ (% motility)	20	24.79 ± 6.10	26.14 ± 22.09	25.57 ± 11.90
การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%Prog.motility)	20	9.67 ± 3.88	11.4 ± 15.81	11.53 ± 5.52
ความเร็วของรูปแบบการเคลื่อนที่				
average path velocity : VAP (μm/s)	20	70.78 ^a ± 2.16	75.73 ^b ± 2.34	77.97 ^b ± 4.33
straight-line velocity : VSL (μm/s)	20	53.07 ^a ± 1.15	56.59 ^{ab} ± 2.02	58.53 ^b ± 2.47
curvilinear velocity : VCL (μm/s)	20	127.04 ^a ± 7.34	139.98 ^b ± 8.59	144.17 ^b ± 12.53
ลักษณะการเคลื่อนที่				
amplitude of lateral head displacement : ALH (μm/s)	20	6.78 ± 0.01	6.90 ± 0.02	10.52 ± 0.13
beat cross frequency : BCF (Hz)	20	24.47 ± 0.38	26.12 ± 0.53	25.24 ± 0.62
straightness : STR (%)	20	74.38 ± 0.74	74.44 ± 0.69	74.88 ± 0.61
Linearity : LIN (%)	20	43.94 ± 0.48	42.50 ± 0.55	42.38 ± 0.44

Control = ไม่ผ่านการกรอง FS = กรองผ่าน sephadex , FS + IE = กรองผ่าน sephadex + ประจุ

^{2/} ตัวอักษรต่างกันที่อยู่ในแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %



MAI = membrane –acrosome intact, MD-AI = membrane damage- acrosome intact,

MAD = membrane –acrosome damage

ตัวอักษรต่างกันที่อยู่ในแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

รูปที่ 4 ผลของการกรองน้ำเชื้อต่อเชื้อหุ้มตัวอสุจิและอะโครโซมของน้ำเชื้อหลังการอุ่นละลาย

ผลการศึกษาความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มตัวอสุจิและอะโครโซมในน้ำเชื้อแช่แข็งพบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการกรองด้วย FS+IE มีร้อยละเฉลี่ยของเยื่อหุ้มตัวอสุจิและอะโครโซมที่สมบูรณ์ สูงกว่าน้ำเชื้อที่ผ่านการกรองด้วย FS ($P<.05$) และน้ำเชื้อที่ไม่ผ่านการกรองมีค่าความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มตัวอสุจิและอะโครโซมต่ำที่สุด ($p<.05$) (รูปที่ 4)

สรุปผลและวิจารณ์

น้ำเชื้อที่เจือจางด้วย Tris-citric acid พบว่าเมื่อผ่านการกรองด้วย FS และ FS+IE มีอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าก่อนการแช่แข็งเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับน้ำเชื้อที่ไม่ได้กรอง แต่มีความเข้มข้นลดลงประมาณร้อยละ 22 ถึง 33 ดังนั้นหากต้องการกรองน้ำเชื้อด้วย FS และ FS+IE จำเป็นต้องคำนวณอัตราการเจือจางให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น เพื่อให้ความเข้มข้นภายหลังการกรองมีค่าตามต้องการ

สำหรับคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการอุ่นละลายทันทีพบว่ามีอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ระหว่างน้ำเชื้อที่ไม่ผ่านการกรองกับน้ำเชื้อที่กรองทั้งสองวิธี แต่พบว่ามีแตกต่างของลักษณะการเคลื่อนที่แบบ VAP, VSL และ VCL โดยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการกรองทั้ง 2 วิธี มีลักษณะการเคลื่อนที่แบบ VAP, VSL และ VCL สูงกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่ไม่ผ่านการกรอง แสดงว่าอสุจิที่ผ่านการกรองด้วย FS และ FS+IE ในหนึ่งวินาทีสามารถเคลื่อนที่ได้ไกลกว่าจึงมีส่วนระหว่างระยะของการเคลื่อนที่ได้จริงกับระยะทางที่เคลื่อนที่ได้จากจุดเริ่มต้นถึงจุดสุดท้ายมากกว่า ซึ่งอาจแสดงถึงความแข็งแรงของอสุจิที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้ดีกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ กิตติศักดิ์และคณะ (2551) พบว่า ค่า VAP, VSL และ VCL มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับอัตราการตกูก ($r = 0.928, 0.746$ และ 0.809 ตามลำดับ) แสดงว่าการกรอง สามารถลดจำนวนตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ผิดปกติได้

เมื่อพิจารณาลักษณะความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิและอะโครโซม พบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการกรองด้วย FS+IE มีความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิและอะโครโซมที่สมบูรณ์ สูงกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการกรองด้วย FS และน้ำเชื้อที่ไม่ผ่านการกรองมีความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิและอะโครโซมที่สมบูรณ์ต่ำที่สุด ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอสุจิที่ผ่านการกรองเป็นอสุจิที่สมบูรณ์และแข็งแรงจึงจะสามารถเคลื่อนที่ผ่านชั้นกรองลงมาได้ ซึ่งเป็นผลดีต่อน้ำเชื้อแช่แข็ง เนื่องจากตัวอสุจิที่ตายหรือตัวอสุจิที่อะโครโซมเกิดปฏิกิริยา capacitation หรือไม่สมบูรณ์ แล้วนั้นไม่สามารถปฏิสนธิกับเซลล์ไข่ได้ถึงแม้ว่าจะยังมีชีวิตอยู่ก็ตาม ซึ่งการกรองอาศัยหลักการที่ผิวของเยื่อหุ้มตัวอสุจิและอะโครโซมจะเปลี่ยนเป็นประจุบวก ไปจับกับประจุลบของ CM-52 cellulose ในคอลัมน์

(Anzar and Graham (1993) ซึ่งตัวอสุจิที่ประกอบด้วยเยื่อหุ้มอสุจิและอะโครโซมสมบูรณ์เท่านั้นที่สามารถเจาะผ่านผนังเซลล์ไข่ ได้เนื่องจากที่อะโครโซมมีเอ็นไซม์ที่จำเป็นสำหรับเจาะผ่านผนังเซลล์ไข่บรรจุอยู่ภายใน (Schneider and Mazur, 1984)

จากผลการทดลองในครั้งนี้ การกรองน้ำเชื้อด้วย Sephadex สามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของน้ำเชื้อสด แต่ไม่สามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง ทั้งนี้ยังไม่ทราบสาเหตุแน่ชัด จึงอาจจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลกระทบของ sephadex ที่อาจมีต่อความสามารถในการทนต่อการลดอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง และปรับเปลี่ยนองค์ประกอบของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ เพื่อให้เหมาะสม หรืออาจเนื่องจากคุณสมบัติของน้ำเชื้อเริ่มต้นจากพ่อพันธุ์ที่มีการเคลื่อนที่ต่ำอยู่แล้ว จึงมีความสามารถในการทนต่อการลดอุณหภูมิต่ำด้วยเช่นกัน ซึ่งหากเกิดจากคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ที่มีคุณภาพต่ำ อาจต้องศึกษาด้านการดูแลสุขภาพพ่อพันธุ์ เพื่อให้พ่อพันธุ์ผลิตน้ำเชื้อที่แข็งแรงต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กิตติศักดิ์ แสงสกุล สราวุธ ฉายประสาท เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล มุขดา รัตนภาสกร (2551) ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตกูกและลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิของน้ำเชื้อแช่แข็งโค วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ปีที่ 3 ฉบับที่ 1 มิถุนายน 2551

Agarwal, A., Sharma, R.K. and Nelson, D.R. 2003. New semen quality scores developed by principal component analysis of semen characteristics. J. Androl. 24:343-352.

Ahmad,Z., Anzar,M., Shahab,M., Ahmad,N. and Andrabi,S.M.H. 2003. Sephadex and Sephadex ion-exchange filtration improves the quality and freezability of low-grade buffalo semen ejaculates. Theriogeneology, 59:1189-1202

Anzar, M and Graham, E.F. 1993. Filtration of Bovine Semen. I Development of a Sephadex ion-exchange filter. Anim Reprod Sci. 31:187-195

Carbo,B.G., Loseth,K.J. and Weidel,L. 1992. Trapping of morphological types of bull spermatozoa by sephadex / glass wool filters. In: Proceedings of the 12 th International Congress on Animal Reproduction. The Hague, The Netherlands: 1:423-425

Ibrahim,N.M., Foster,D.N. and Carbo,B.G. 2001. Localization of Clusterin of Freeze-Preserved Bull Spermatozoa Before and After Glass Wool-Sephadex Filtration. J. Androl. 22: 891-902

- Januskauskas, A., Lukoseviciute, K., Nagy, S., Johannisson, A. and Rodriguez-Martinez, H. 2005. Assessment of the efficacy of Sephadex G-15 filtration of bovine spermatozoa for cryopreservation. *Theriogenology*, 63:160-178
- Parrish, J.J. and Foote, R.H. 1987. Quantification of bovine sperm separation by swim-up method: Relationship of sperm motility, integrity of acrosome, sperm migration in polyacrylamide gel and fertility. *J Androl*, 8:259-266
- Schneider, U. and Mazur, M. (1984). Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 21: 68-79.
- Tardif, A.L., Farrell, P.B., Trouern-Trend, V. and Foote, R.H. 1997. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. *J. Dairy Sci.* 80:1606-1612.
- White, L.M., Beal, W.E., Bame, J.H., Saacke, R.G. and Marshall, C.E. 1984. Characterization of bovine spermatozoa after migration through serum albumin gradient. *J. Anim. Sci.* 59:454-459.
- Zavos, P.M., Correa, J.R. and Zarmakupis-Zavos, P.N. 1998. Antisperm antibody treatment mode: Level of antisperm antibodies after incubation with TEST-yolk buffer and filtration using SpermPrepTM II method. *Fertil and Steril*. 69 (3) :517-521

การเปรียบเทียบน้ำยาเจือจาง EGG YOLK TRIS ที่มีไข่แดงของ นกกระทา ไก่ และเป็ด เป็นองค์ประกอบต่อ คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโค

จตุพร พงษ์เพ็ง^{1*} และ อภิชัย พูนชัย²

¹ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ผสมเทียมล้าพญากลาง ลำสนธิ ลพบุรี

²ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพนครราชสีมา เมือง นครราชสีมา

บทคัดย่อ

การเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด Egg Yolk Tris (EYT) ที่มีไข่แดงของนกกระทา ไก่ และเป็ด เป็นองค์ประกอบ โดยใช้น้ำเชื้อโคโฮลสไตน์-ฟรีเชียน อายุประมาณ 5-7 ปี จำนวน 6 ตัว ริดเก็บน้ำเชื้อสัปดาห์ละครั้ง ต่อเนื่องกัน 5 สัปดาห์ พบว่าน้ำเชื้อโคที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ EYT ที่มีไข่แดงของเป็ดและนกกระทาเป็นองค์ประกอบมี การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิสูงกว่าน้ำเชื้อโคที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ EYT ที่มีไข่แดงของไก่เป็นองค์ประกอบ (45.14 ± 3.25 , 43.72 ± 3.08 , 34.18 ± 3.12) แต่การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าพบว่า น้ำเชื้อโคที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ EYT ที่มีไข่แดงของเป็ดเป็นองค์ประกอบมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิสูงสุด เมื่อเทียบกับน้ำเชื้อโคที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ EYT ที่มีไข่แดงของนกกระทา และไก่เป็นองค์ประกอบ (24.23 ± 1.95 , 21.00 ± 1.51 , 17.90 ± 1.72) ลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการละลายในลักษณะ Beat cross frequency (BCF) พบว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงของไก่ เป็นองค์ประกอบ(25.20 ± 0.70) มีค่าสูงกว่าน้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงของเป็ด (22.89 ± 0.42) และนกกระทาเป็นองค์ประกอบ(23.00 ± 0.46) ความสมบูรณ์ของอะโครโซม ภายหลังการละลาย พบว่าตัวอสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของเป็ดกับนกกระทาเป็นองค์ประกอบมีความสมบูรณ์ของอะโครโซม สูงกว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงของไก่เป็นองค์ประกอบ คือ 70.14 ± 3.25 , 68.72 ± 3.08 และ 59.18 ± 3.12 ตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างของลักษณะรูปร่างของอสุจิที่ผิดปกติ จากผลการทดลองสรุปว่าการใช้ไข่แดงของเป็ดเหมาะสมที่สุดในการใช้เป็นองค์ประกอบในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อเพื่อเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการละลาย

คำสำคัญ : น้ำเชื้อแช่แข็งโค น้ำยาเจือจาง ไข่แดง

Comparison of Quail, Chicken, and Duck Egg Yolk Tris Extender on Bull Frozen Semen Quality

Jatuporn Pongpeng^{1*} Apichai Poonchai²

¹Lamphayaklang Livestock Semen Production Center, Lamsonthi, Lopburi

²NaKonratchasima Artificial Insemination and Biotechnology Centre. Muang, Nakhonratchasima

Abstract

Comparison the effective of egg yolk form chicken duck and quail in egg yolk tris extender on bull frozen semen quality. Semen of 6 Holstein-Friesian bulls aged 5-7 years were collected once a week for 5 weeks. The result showed the post-thaw motility of sperm in duck and quail egg yolk extender were higher than chicken. (45.14 ± 3.25 , 43.72 ± 3.08 , 34.18 ± 3.12). Progressive motility of sperm in duck egg yolk extender were higher compared with quail and chicken. (24.23 ± 1.95 , 21.00 ± 1.51 , 17.90 ± 1.72) But Beat Cross Frequency (BCF) of sperm in chicken egg yolk extender (25.20 ± 0.70) higher than duck (22.89 ± 0.42) and quail (23.00 ± 0.46). Percentage of acrosomal integrity sperm in duck and quail egg yolk extender were higher than chicken 70.14 ± 3.25 , 68.72 ± 3.08 และ 59.18 ± 3.12 . But morphologically abnormal sperm were not significantly different ($P > 0.05$). Conclusion egg yolk tris extender contained duck egg yolk were a highest semen quality after thawing.

Key words: Bull frozen semen, extender, egg yolk

Technical document no. 53(2)-0208-105

* corresponding author

บทนำ

น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่นิยมใช้ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งโค คือ น้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris ซึ่งมีองค์ประกอบหลักๆ คือสารที่เป็นแหล่งพลังงานให้แก่อสุจิ นั่นคือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และอีกอย่างที่สำคัญคือสารที่ทำหน้าที่เป็น cryoprotectants ซึ่งได้แก่ glycerol และไข่แดง ซึ่งทำหน้าที่ช่วยป้องกันความเสียหายที่จะเกิดกับอสุจิในกระบวนการแช่แข็ง (Foote, 1970)

ไข่แดงเป็นองค์ประกอบพื้นฐานในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่ทำหน้าที่ป้องกันความเสียหายของอสุจิจากการเกิด cold shock และป้องกันความเสียหายจากขบวนการแช่แข็ง และการละลายน้ำเชื้อก่อนการนำไปใช้ (Salamon and Maxwell, 2000) ซึ่งเชื่อว่าการทำหน้าที่ของไข่แดงสามารถปกป้องอสุจิในระดับ cell membrane ซึ่งสารในไข่แดงที่เป็นตัวทำปฏิกิริยาดังกล่าวคือ สารในกลุ่ม lipoprotein หรือ กลุ่ม phospholipid (Bathgate et al., 2006)

สารกลุ่ม lipoprotein ในไข่แดงของสัตว์ปีกต่างชนิดกันจะมีสัดส่วนแตกต่างกัน ซึ่งองค์ประกอบที่ซับซ้อนในไข่แดงประกอบด้วยส่วนของแ่งร้อยละ 50 และมีสัดส่วนระหว่างไขมันและโปรตีน 2:1 และไขมันทั้งหมดในไข่แดงจะอยู่ในรูปของ lipoprotein ซึ่งองค์ประกอบต่างๆ ในไข่แดง เป็นตัวกำหนดพฤติกรรมการทำงานที่ต่างๆ ของไข่แดง โดยเฉพาะการเกิดเจล และการเกิดอิมัลชัน โดยมี Low Density Lipoproteins หรือ LDL เป็นตัวสำคัญในการเกิดปฏิกิริยา (ณฐมด 2550) ซึ่ง LDL ส่วนใหญ่อยู่ในรูปสารประกอบโคเลสเตอรอล และมีปริมาณต่างกันในไข่แดงของสัตว์ปีกต่างชนิดกัน เช่น ปริมาณ คอลเลสเตอรอลในไข่แดงของไก่ มีคอลเลสเตอรอล 1480 มิลลิกรัม/100 กรัม ในไข่แดงของเป็ดมี 1120 มิลลิกรัม/100 กรัม ซึ่งต่างจากไข่นกกระทามีคอลเลสเตอรอล 3640 มิลลิกรัม/100 กรัม (ภัทรราวุธ, 2542) ดังนั้นเมื่อนำมาใช้เป็นองค์ประกอบในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อจึงน่าจะให้ผลการป้องกันความเสียหายที่เกิดกับอสุจิต่างกัน จากการทดลองของ Briand-amirat และคณะ (2006) พบว่าเมื่อเติม LDL ลงในน้ำยาเจือจางสามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ และจำนวนอสุจิที่มีชีวิตภายหลังการแช่แข็งได้ ส่วน Su และคณะ (2008) รายงานว่าการใช้ไข่แดงของนกพิราบเป็นองค์ประกอบในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด EYT ซึ่งมีปริมาณของโคเลสเตอรอลสูงกว่าไข่แดงจากสัตว์ปีกชนิดอื่น ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งดีกว่าการใช้ไข่แดงของ ไก่ เป็ด นกกระทา และห่าน

การศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งที่ใช้ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris ที่ใช้ไข่แดงของนกกระทา ไก่ และเป็ด เป็นองค์ประกอบ จะช่วยให้สามารถทราบว่าไข่แดงของสัตว์ปีกชนิดใดที่

เหมาะสมในการทำหน้าที่ป้องกันความเสียหายของอสุจิจากการลดอุณหภูมิของขบวนการแช่แข็งได้ ทำให้น้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งมีคุณภาพสูง

วิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

พ่อพันธุ์โคนมลูกผสมโฮลสไตน์-ฟรีเชียน อายุประมาณ 5-7 ปี จำนวน 6 ตัว ซึ่งมีน้ำเชื้อสดที่มีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไม่ต่ำกว่า 70 % ริดเก็บน้ำเชื้อสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ตลอด 5 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD โดยนำน้ำเชื้อที่ริดเก็บได้แบ่งออกเป็น 3 ส่วนเท่าๆ กัน และเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อให้มีความเข้มข้นโดยมีความเข้มข้นของตัวอสุจิเป็น 96 ล้านตัว/มล. ตามชนิดของไข่แดงเป็นปัจจัยที่ต้องศึกษา ดังนี้

1. น้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris ที่มีไข่แดงของนกกะทาเป็นองค์ประกอบ 20%
2. น้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris ที่มีไข่แดงของไก่เป็นองค์ประกอบ 20%
3. น้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris ที่มีไข่แดงของเป็ดเป็นองค์ประกอบ 20%

นำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วไปบรรจุด้วยหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.25 มล. และนำไปลดอุณหภูมิที่ 4 องศาเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ (Digitcool 5300, ZH350&UE350 with 900 HP program 3T Software, IMV, France) โดยทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อก่อนและหลังการแช่แข็ง ดังนี้

1. การเคลื่อนที่ของอสุจิ ด้วยเครื่อง CASA โปรแกรม IVOS motility analyzer version 12.0 (Hamilton-Thorne, Biosciences, MA, USA) ตรวจตัวชี้วัดต่างๆ ที่มีรายละเอียดของนิยามและสูตรการคำนวณที่ได้กล่าวไว้ในรายงานของ Agarwal et al. (2003) ได้แก่

- การเคลื่อนที่ (% motility) และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (% progressive motility)
 - ความเร็วในการเคลื่อนที่วัดด้วยค่า path velocity (VAP), straight-line velocity (VSL) และ curvilinear velocity (VCL) มีหน่วยเป็น $\mu\text{m/s}$
 - ลักษณะการเคลื่อนที่วัดด้วยค่า amplitude of lateral head displacement; ALH(μm), beat cross frequency ;BCF(HZ), straightness ;STR(%) และ linearity; LIN(%)
 - ความยาว (elongation) และพื้นที่ส่วนหัวของตัวอสุจิ (area) มีหน่วยเป็น μm
2. รูปร่างอสุจิที่ผิดปกติ และความผิดปกติของอะโครโซม ด้วย phase contrast microscope

ผลและวิจารณ์

จากการศึกษาพบว่าเมื่อเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของไก่ เป็ด นกกระทา เป็นองค์ประกอบ ก่อนการแช่แข็ง พบว่ายังไม่พบความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของอสุจิ (ตารางที่ 1) แต่เมื่อผ่านขั้นตอนการแช่แข็งแล้ว นำนํ้าเชื้อที่ได้มาทำการละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที พบว่าการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการละลาย ในน้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงของไก่และนกกระทาเป็นองค์ประกอบ พบว่าอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงของไก่เป็นองค์ประกอบ (45.14 ± 3.25 , 43.72 ± 3.08 , 34.18 ± 3.12) ส่วนการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าพบว่อสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของไก่เป็นองค์ประกอบ มีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูงกว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงของไก่และนกกระทาเป็นองค์ประกอบ (24.23 ± 1.95 , 17.90 ± 1.72 , 21.00 ± 1.51) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และทำนองเดียวกันกับค่า recovery rate (ค่าความแตกต่างระหว่างอัตราการเคลื่อนที่เริ่มต้นกับอัตราการเคลื่อนที่ภายหลังละลาย) ที่อสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของไก่เป็นองค์ประกอบมีค่าต่ำที่สุด รองลงมาคืออสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของไก่เป็นองค์ประกอบ และค่ามากที่สุดคืออสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของไก่เป็นองค์ประกอบ คือ 35.33 ± 2.78 , 39.38 ± 2.78 และ 45.81 ± 3.28 ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงของไก่เป็นองค์ประกอบ มีการสูญเสียอสุจิในระหว่างขั้นตอนการแช่แข็งต่ำที่สุด (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยลักษณะของน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งที่ใช้น้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงของไก่ เป็ด และนกกระทาเป็นองค์ประกอบ

ค่าชี้วัดตัวอสุจิ	น้ำเชื้อแช่แข็งก่อนการแช่แข็ง		
	น้ำยาเจือจาง EGG YOLK TRIS ที่มีไข่แดง 20 %		
	ไก่	เป็ด	นกกระทา
การเคลื่อนที่ (%)	80.00 ± 1.64	79.45 ± 2.36	80.95 ± 2.32
การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	38.45 ± 3.14	37.59 ± 3.86	41.36 ± 3.81
ความเร็วในการเคลื่อนที่			
Average path velocity: VAP ($\mu\text{m/s}$)	129.38 ± 5.60	127.97 ± 4.88	126.05 ± 4.70
Straight-line velocity: VSL ($\mu\text{m/s}$)	84.11 ± 4.07	83.25 ± 4.35	84.06 ± 4.01
Curvilinear velocity: VCL ($\mu\text{m/s}$)	230.50 ± 11.70	233.95 ± 8.65	243.04 ± 14.21
ลักษณะการเคลื่อนที่			
Amplitude of lateral head displacement: ALH	7.75 ± 0.36	7.94 ± 0.28	7.80 ± 0.29

(μm)			
Beat cross frequency: BCF (HZ)	32.62 ± 1.11	32.55 ± 1.25	33.70 ± 1.15
Straightness: STR (%)	67.68 ± 2.07	66.95 ± 2.20	68.95 ± 2.20
Linearity: LIN (%)	40.22 ± 1.95	38.81 ± 1.75	40.72 ± 1.81
ความยาวและพื้นที่ส่วนหัว			
Elongation(μm)	58.50 ± 0.45	57.95 ± 0.42	57.38 ± 2.35
Area(μm)	8.23 ± 0.23	8.28 ± 0.22	7.98 ± 0.23

^{ab} ตัวอักษรที่ต่างกันแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

ส่วนลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิพบว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงของไก่เป็นองค์ประกอบมีค่าลักษณะ Beat cross frequency (BCF) มีหน่วยเป็น HZ (ลักษณะความเร็วที่หัวตัวอสุจิส่ายไปมาในขณะที่เคลื่อนที่) สูงกว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงของเป็ดและนกกะทาเป็นองค์ประกอบ คือ 25.20 ± 0.70 , 22.89 ± 0.42 และ 23.00 ± 0.46 ตามลำดับ แต่ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ความยาวของอสุจิ (Elongation) ภายหลังละลายของอสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของนกกะทายาวกว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงของไก่และเป็ดเป็นองค์ประกอบ คือ 46.40 ± 0.59 , 44.36 ± 0.45 และ 44.52 ± 0.42 ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ลักษณะของรูปร่างอสุจิผิดปกติทั้งก่อนการแช่แข็งและภายหลังการละลายไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ความสมบูรณ์ของอะโครโซม ภายหลังการละลาย พบว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของเป็ดกับนกกะทาที่มีความสมบูรณ์ สูงกว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่ไก่เป็นองค์ประกอบ 70.14 ± 3.25 , 68.72 ± 3.08 และ 59.18 ± 3.12 ตามลำดับ ในทำนองเดียวกับจำนวนอะโครโซมที่เสียหาย พบว่าภายหลังการละลายอสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของไก่อะโครโซมได้รับความเสียหาย สูงกว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่เป็ดและนกกะทาเป็นองค์ประกอบ คือ 40.81 ± 3.12 , 29.85 ± 3.25 และ 31.27 ± 3.08 ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยลักษณะของน้ำเชื้อภายหลังการละลายที่ใช้ไข่เยี่ยวจากที่มีไข่แดงของไก่ เป็ด และนกกะทาเป็นองค์ประกอบ

ค่าชี้วัดตัวอสุจิ	น้ำเชื้อแช่แข็งโคภายหลังการละลาย		
	น้ำเยี่ยวจาก EGG YOLK TRIS ที่มีไข่แดง 20 %		
	ไก่	เป็ด	นกกะทา
การเคลื่อนที่ (%)	34.18 ^a ± 3.12	45.14 ^b ± 3.25	43.72 ^b ± 3.08
การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	17.90 ^a ± 1.72	24.23 ^b ± 1.95	21.00 ^{ab} ± 1.51
ความเร็วในการเคลื่อนที่			
Average path velocity: VAP (μm/s)	82.43 ± 2.65	87.94 ± 2.88	84.72 ± 2.95
Straight-line velocity: VSL (μm/s)	62.44 ± 1.91	65.37 ± 1.84	62.22 ± 1.77
Curvilinear velocity: VCL (μm/s)	144.96 ± 5.09	154.88 ± 5.63	148.50 ± 5.52
ลักษณะการเคลื่อนที่			
Amplitude of lateral head displacement: ALH (μm)	6.81 ± 0.16	7.14 ± 0.19	7.00 ± 0.15
Beat cross frequency: BCF (HZ)	25.20 ^a ± 0.70	22.89 ^b ± 0.42	23.00 ^b ± 0.46
Straightness: STR (%)	76.04 ± 0.81	74.57 ± 0.85	74.13 ± 0.87
Linearity: LIN (%)	45.45 ± 0.81	44.00 ± 0.68	44.04 ± 0.72
ความยาวและพื้นที่ส่วนหัว			
Elongation (μm)	44.36 ^a ± 0.45	44.52 ^a ± 0.42	46.40 ^b ± 0.59
Area (μm)	7.85 ± 0.17	7.50 ± 0.08	7.57 ± 0.43

^{ab} ตัวอักษรที่ต่างกันแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละของลักษณะรูปร่างและอะโครโซมของอสุจิภายหลังละลายที่ใช้ไข่แดงที่
มีไข่แดงของไก่ เป็ด และนกกะทาเป็นองค์ประกอบ

ลักษณะของอสุจิ	น้ำเชื้อแช่แข็งโคก่อนการแช่แข็ง			น้ำเชื้อแช่แข็งโคภายหลังการละลาย		
	น้ำยาเจือจาง EGG YOLK TRIS ที่มีไข่แดง 20 %			น้ำยาเจือจาง EGG YOLK TRIS ที่มีไข่แดง 20 %		
	ไก่	เป็ด	นกกะทา	ไก่	เป็ด	นกกะทา
รูปร่างผิดปกติ (%)	11.87 ± 0.47	11.66 ± 0.36	11.87 ± 0.41	18.87 ± 0.47	18.66 ± 0.36	18.87 ± 0.41
อะโครโซมสมบูรณ์ (%)	75.00 ± 1.64	74.45 ± 2.36	75.95 ± 2.32	59.18 ^a ± 3.12	70.14 ^b ± 3.25	68.72 ^b ± 3.08
อะโครโซมเสียหาย (%)	25.00 ± 1.64	25.54 ± 2.36	24.04 ± 2.32	40.81 ^a ± 3.12	29.85 ^b ± 3.25	31.27 ^b ± 3.08

^{ab} ตัวอักษรที่ต่างกันแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

สรุป

ผลการทดลองพบว่าคุณภาพน้ำเชื้อโคที่ใช้ไข่แดงที่มีไข่แดงของไก่และไข่แดงของนกกะทาเป็นองค์ประกอบภายหลังการละลายมีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าน้ำเชื้อโคที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางที่มีไข่ไก่เป็นองค์ประกอบ ส่วนการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าพบว่าน้ำเชื้อโคที่ใช้ไข่แดงของไก่เป็นองค์ประกอบภายหลังการละลายมีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าน้ำเชื้อโคที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงของไก่และนกกะทาเป็นองค์ประกอบ ซึ่งสาเหตุที่ทำให้ผลแตกต่างกันออกไปอาจเนื่องจากสัดส่วนของสารประกอบ phospholipids ที่เป็นตัวทำปฏิกิริยาในการป้องกันความเสียหายของอสุจิในขบวนการแช่แข็ง ซึ่งมีรายงานว่าในไข่เป็ดมี monounsaturates fatty acid (MUFA) มากกว่าในไข่ไก่และนกกะทา และยังมีสารในกลุ่ม phosphatidylinositol (PI) มากกว่าในไข่ไก่และนกก (Bathgate et al., 2006) ทั้งนี้ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าสารตัวใดแน่ที่เป็นตัวที่ป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งที่แท้จริง ซึ่งมีผู้ทดลองใช้ไข่แดงของสัตว์ปีกต่างชนิดกันเป็นส่วนผสมในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ เพื่อช่วยป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งในหลายๆ สัตว์ ซึ่งให้ผลที่แตกต่างกันออกไป เช่นงานทดลองของ Andrabi และคณะ (2008) พบว่าการใช้ไข่แดงของไก่เป็นองค์ประกอบในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อกระบือ Tris-citric acid glycerol มีผลทำให้การเคลื่อนที่อสุจิ, plasma membrane integrity มีค่าสูง

กว่าการใช้ไข่แดงจากสัตว์ปีกชนิดอื่น ซึ่งในทำนองเดียวกับในน้ำเชื้อแช่แข็งม้าที่ใช้ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของเป็ดเป็นองค์ประกอบมีคุณภาพน้ำเชื้อดีกว่าการใช้ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของไก่เป็นองค์ประกอบ (Clulow et al., 2007) แต่น้ำเชื้อแช่แข็งจากการใช้ไข่แดงของนกกกระทาทำให้คุณภาพน้ำเชื้อสูงกว่าการใช้ไข่แดงของไก่ (Trimeche et al. 1997) ในขณะที่ Su และคณะ (2007) พบว่าการใช้ไข่แดงของนกกกระทาในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อสูงกว่าการใช้ไข่แดงของ ไก่ เป็ด ห่าน และนกกกระทา แต่ในทางตรงข้ามกับสูตรที่พบว่าการใช้ไข่แดงของไก่ให้คุณภาพน้ำเชื้อสูงกว่าการใช้ไข่แดงของเป็ดและนกกกระทา (Bathgate et al., 2006)

ลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการละลายพบว่าความกว้างในการส่ายของส่วนหัวอสุจิ (ALH) มีค่าไม่แตกต่างกัน แต่พบว่าความเร็วในการส่ายของหัวอสุจิที่เรียกว่า BCF พบว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่ไก่เป็นองค์ประกอบมีค่าสูงกว่าที่มีไข่เป็ดและไข่นกกกระทา ซึ่งอาจแสดงให้เห็นถึงลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งพบรายงานว่าลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิโคมีความแตกต่างและเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะแวดล้อม เช่น ส่วนประกอบของของเหลวรอบตัวอสุจิ หรือความหนาของหยดน้ำเชื้อที่หยดลงบนแผ่นกระจกสไลด์ (Amann, 1988) หรืออาจเป็นลักษณะการเคลื่อนที่แบบ erratic movement ของตัวอสุจิ (Abaigar et al., 1999) ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับลักษณะความยาวของอสุจิที่เปลี่ยนไป จากการทดลองพบว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของนกกกระทายาวกว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงของไก่และเป็ดเป็นองค์ประกอบ คือ 46.40 ± 0.59 , 44.36 ± 0.45 และ 44.52 ± 0.42 ตามลำดับ แต่ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของรูปร่างอสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงเป็นองค์ประกอบต่างกัน

ความสมบูรณ์ของอะโครโซมภายหลังละลายของอสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของเป็ดกับนกกกระทาเป็นองค์ประกอบมีค่าสูงกว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของไก่เป็นองค์ประกอบ คือ 70.14 ± 3.25 , 68.72 ± 3.08 และ 59.18 ± 3.12 ตามลำดับ ในทำนองเดียวกับจำนวนอะโครโซมที่เสียหาย พบว่าภายหลังการละลายอสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของไก่อะโครโซมได้รับความเสียหาย สูงกว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่เป็ดและนกกกระทาเป็นองค์ประกอบ คือ 40.81 ± 3.12 , 29.85 ± 3.25 และ 31.27 ± 3.08 ตามลำดับ ทั้งนี้จากหลายๆ การทดลองให้เหตุผลคล้ายกัน คือ การทำงานของไข่แดงสามารถทำปฏิกิริยาถึงระดับเซลล์เมมเบรน จึงส่งผลกระทบต่ออะโครโซมแตกต่างกัน เนื่องจากมีองค์ประกอบของไข่แดงแตกต่างกัน (Bathgate et al., 2006)

จากการศึกษาในครั้งนี้ สรุปได้ว่าน้ำเชื้อแช่แข็งโคที่ใช้ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด Egg Yolk Tris ที่มีไข่แดงของเป็ดเป็นองค์ประกอบ 20 % มีคุณภาพน้ำเชื้อสูงที่สุด และเหมาะสมสำหรับการใช้เป็นองค์ประกอบของ

น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคเพื่อเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง รองลงมาคือน้ำเชื้อแช่แข็งโคที่ใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด Egg Yolk Tris ที่มีไข่แดงของนกกระทา และน้ำเชื้อแช่แข็งโคที่ใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด Egg Yolk Tris ที่มีไข่แดงของไก่เป็นองค์ประกอบ

เอกสารอ้างอิง

ณัฐมล จินดาพรรณ 2550 วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม ปีที่ 3 ฉบับที่ 1 มิถุนายน 2549-พฤษภาคม 2550. หน้า 14-20

ภัทรราวุธ อินทรกำแหง. 2542. ความสม่ำเสมอของการออกก้างกายเป็นหัวใจสู่ความสำเร็จ. กรุงเทพฯ : โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า.

Abaigar, T., Holt, W.V., Harrison, R.A.P. and del Barrio, G. 1999. Sperm subpopulations in Boar (*Sus scrofa*) and Gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biology of Reproduction* 60: 32-41.

Agarwal, A., Sharma, R.K. and Nelson, D.R. 2003. New semen quality scores developed by principal component analysis of semen characteristics. *Journal of Andrology* 24: 343-352.

Amann, R.P. 1988. Computerized evaluation of stallion sperm. In: *Proceedings of the 32th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*. Lexington, Ky. p. 453-473.

Andrabi, S.M.H., Ansar, M.S., Ullah, N., Anwar, M., Mehmood A. and Akhter, S. 2007. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. *Animal Reproduction Science* 104 : 427-433.

Bathgate, R., Maxwell, W.M. and Evans, G. 2006. Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reproduction Domestic Animal* 41(1): 68-73.

Briand-Amirat, L., Anton, M., Gerard ET, O., and Tainturier, D. 2006. In vitro bull semen fertility after freezing-thawing with egg yold LDL : a comparison with Optidyl a commercial egg yold extend. *Revue Med Vet.* 157 : 205-212.

Clulow, J.R., Maxwell, W.M.C., Evans, G. and Morris, L.H.A. 2007. A comparison of duck and chicken egg yolk for cryopreservation of stallion sperm. *Australian Veterinary Journal* Volume 85 (6) : 232-235.

Foot, R.H. 1970. Fertility of bull semen at high extension rates in tris - buffered extenders. *Journal of Dairy Science* 53: 1475-1477.

Salamon, S. and Maxwell, W.M.C. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 62:77-111.

Su, L., Li, X., Quan, J., Yang, S., Li, Y., He, X. and Tang, X. 2008. A comparison of the protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. *Anim Reprod Sci.* 3: 212-219.

Trimeche, A., Anton, M., Renard, P., Gandemer, G. and Tainturier, D. 1997. Quail Egg Yolk: A Novel Cryoprotectant for the Freeze Preservation of Poitou Jackass Sperm. *Cryobiology* 34 :385-393.

ผลการใช้สารละลายน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris, Biociphos Plus[®] และ Bioexcel[®]

ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อโคพันธุ์บราห์มัน

ศักดิ์ชัย พงษ์วิวัฒนกุล^{1*} ภกอร ศิริสมภาร¹ และ อภิรักษ์ อุทธา²

¹ ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพขอนแก่น ต.ท่าพระ อ.เมืองฯ จ.ขอนแก่น 40260

² ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ต.ท่าพระ อ.เมืองฯ จ.ขอนแก่น 40260

บทคัดย่อ

พ่อโคเนื้อจำนวน 8 ตัว ริดเก็บ น้ำเชื้อสัปดาห์ละครั้ง ติดต่อกัน 4 สัปดาห์ โดยใช้กระบอกรีดเก็บน้ำเชื้อ (artificial vagina) แต่ละตัวอย่างถูกนำมาแบ่งเป็นสามส่วนเพื่อศึกษาผลของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยกลุ่มที่ 1 ใช้สารละลาย egg-yolk tris กลุ่มที่ 2 ใช้ Biociphos plus[®] กลุ่มที่ 3 ใช้ Bioexcel[®] ที่มีสารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบแทนไข่แดง และประเมินคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม โดยใช้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังการอุ่นละลาย และเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิมีชีวิต พบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งกลุ่มที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังการอุ่นละลายทันที สูงกว่า กลุ่มที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ $41.90 \pm 15.24\%$ เทียบกับ 34.60 ± 17.19 ($p < 0.05$) ตามลำดับ แต่เมื่อตรวจเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังการอุ่นละลาย 3 ชั่วโมงพบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งของกลุ่มที่ใช้ส่วนผสมของสารสกัดจากถั่วเหลือง ได้แก่ กลุ่มที่ 3 มีค่าสูงกว่า กลุ่มที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 17.10 ± 13.16 เทียบกับ 11.56 ± 9.44 ($p < 0.05$) ตามลำดับ

คำสำคัญ: สารละลาย egg-yolk tris Biociphos plus[®], Bioexcel[®], น้ำเชื้อโคเนื้อ

เลขทะเบียนผลงานวิชาการ: 53(2)-0208-107

*ผู้รับผิดชอบบทความ

Effects of Egg-Yolk and Soybean Extract Based Diluents

on Beef Bull Frozen Semen

Sakchai Payungwiwattanagoon^{1*} Pakaon Sirisompon¹ and Apirak Utha²

^{1/}Khonkaen Artificial Insemination and Biotechnology Research Center

^{2/}Northeast Bull Semen Center

Abstract

Semen of eight beef bulls were collected once a week for four consecutive weeks using artificial vaginal method. Each ejaculate was divided into three parts for the study on effect of extenders on beef bulls frozen semen. Group 1 was diluted with egg-yolk tris based extender. Group 2 was diluted with Biociphos plus[®]. Group 3 was diluted with Bioexcel[®]. Semen evaluation in terms of percent post-thaw progressive motility and living sperm were compared between the three groups. The results showed group 1 has significantly higher post-thaw progressive motility than group 3 as $41.90 \pm 15.24\%$ vs 34.60 ± 17.19 ($p < 0.05$) respectively. However, post-thaw progressive motility at 3 hours of group 3 using Bioexcel[®] had significantly higher post-thaw progressive motility as 17.10 ± 13.16 compared with 11.56 ± 9.44 ($p < 0.05$) respectively.

Keywords: egg-yolk tris, Biociphos plus[®], Bioexcel[®], beef bull semen

Technical document no. 53(2)-0208-107

* corresponding author

บทนำ

ความสำเร็จของงานผสมเทียมขึ้นกับปัจจัยสำคัญหลายประการ ปัจจัยหนึ่งที่ถือว่าเป็นหัวใจสำคัญของงานผสมเทียมคือความสามารถของตัวอสุจิในการปฏิสนธิกับไข่ ในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อนอกจากขั้นตอนการควบคุมอุณหภูมิแล้ว ส่วนประกอบของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก็เป็นปัจจัยสำคัญต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็ง น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อประกอบด้วยอาหารเลี้ยงตัวอสุจิ สารควบคุมการเป็นกรดต่ำ และสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งในตัวอสุจิ (cryoprotectants) เป็นหลัก สารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งเป็นตัวช่วยป้องกันไม่ให้ acrosome, sperm membrane, cytoskeleton, motile apparatus และ nucleus ถูกทำลายจากการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ดังนั้นกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อรวมทั้งวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งต้องทำอย่างถูกต้องเพื่อให้เกิดความสำเร็จของการผสมเทียม (สุณิรัตน์, 2542)

น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคมีหลายชนิดที่ผลิตออกมาในรูปแบบน้ำยาเจือจางสำเร็จรูปซึ่งมีส่วนประกอบแตกต่างกันโดยเฉพาะสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง เพื่อลดความเสียหายของอสุจิเมื่ออุณหภูมิลดลงถึงจุดเยือกแข็ง ในปี 1949 Polge และคณะใช้ glycerol เป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งในตัวอสุจิ ในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อ ปัจจุบันมีการใช้ glycerol ร่วมกับไข่แดงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ เนื่องจากไข่แดงมีสาร lipoprotein ทำหน้าที่ป้องกันการเสียหายของ phospholipids membrane หรือ plasma membrane (Kolossa and Seibert, 1990) ส่งผลให้เซลล์เพิ่มความทนทานต่อกระบวนการแช่แข็งได้ดีขึ้น (Parks and Graham, 1992) สามารถช่วยลดความเสียหายหรือตายในขณะที่ลดอุณหภูมิไปยังจุดเยือกแข็ง (Gil et al., 2003) โดยใช้ไข่แดงสด 25 % และ glycerol 7% ร่วมกับ Egg Yolk Tris (Ahmad and Foote, 1984) แต่การใช้ไข่แดงในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้ออาจมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจุลชีพหลายชนิดรวมทั้ง mycoplasma (Bousseau et al., 1998) และไข่หัวคอกที่ระบาดสู่คนได้ สืบเนื่องด้วยเปลือกไข่มีช่องว่างที่เชื้อจุลชีพสามารถผ่านเข้าไปภายในไข่ได้ Aires, et al., (2003) จึงเริ่มใช้สารป้องกันการเสียหายของผนังตัวอสุจิที่สกัดจากพืช ได้แก่ lecithin จากถั่วเหลืองมาเป็นส่วนผสมในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแทนไข่แดง เนื่องจาก lecithin จัดอยู่ในกลุ่ม lipoprotein เช่นเดียวกับไข่แดงแต่สามารถแตกตัวเป็นไอออนได้ง่ายกว่าไข่แดง น่าจะมีผลปกป้องตัวอสุจิขณะแช่แข็งได้ดีกว่าไข่แดงสด

การทดลองนี้มีจุดประสงค์เพื่อเปรียบเทียบน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ 3 ชนิดที่มีสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งแตกต่างกัน ได้แก่ Egg Yolk Tris ที่ใช้ไข่แดงสด, Bioexcel[®] (IMV, France) และ Biociphus plus[®] (IMV, France) ใช้สารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแทนไข่แดง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้สารละลายที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากถั่วเหลืองในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อโคพันธุ์บราห์มัน

อุปกรณ์และวิธีการศึกษาทดลอง

สัตว์ทดลอง

ใช้พ่อโคพันธุ์บราห์มันจำนวน 8 ตัว ที่น้ำเชื้อมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไม่น้อยกว่า 70% ความเข้มข้นของตัวอสุจิไม่น้อยกว่า 500 ล้านตัว/มล. ความผิดปกติของตัวอสุจิไม่เกิน 25%

การทดลอง

1. ริดเก็บน้ำเชื้อโคพันธุ์บราห์มันจำนวน 8 ตัว สัปดาห์ละ 1 ครั้ง นาน 4 สัปดาห์ โดยใช้กระบอกรีดเก็บน้ำเชื้อ (Artificial vagina)

2. ตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น ดังนี้ ปริมาตร สี ความหนืด การเคลื่อนที่ไวกว้าง ตัวอสุจิมีชีวิต และความเข้มข้นของน้ำเชื้อ

3. แบ่งน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์โคแต่ละตัวออกเป็น 3 ส่วนเท่ากันแล้วผสมกับน้ำยาเจือจาง กลุ่มที่ 1 ผสมกับ Egg Yolk Tris , กลุ่มที่ 2 ผสมกับ Biociphos plus[®] และ กลุ่มที่ 3 ผสมกับ Bioexcel[®] ที่อุณหภูมิ 28°C โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำเชื้อเป็น 120 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร

4. นำน้ำเชื้อจาก ข้อ 3 ไปทำการลดอุณหภูมิที่ 4°C นาน 4 ชั่วโมง แล้วตรวจเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิมีชีวิตก่อนแช่แข็งโดยหยคน้ำเชื้อบนแผ่นกระจกสไลด์ ปิดทับด้วย cover glass แล้ววางบนแผ่นอุ่นสไลด์ที่มีอุณหภูมิ 37°C ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง กำลังขยาย 200 เท่า บันทึกผลการทดลอง

5. บรรจุน้ำเชื้อในหลอดน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตร และแช่แข็งด้วยวิธี Paillete technique (Van Dieten, 1976) โดยเรียงน้ำเชื้อบนแท่นเรียงน้ำเชื้อแล้วนำไปวางเรียงในเครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ อุณหภูมิ -140°C นาน 6 นาที จากนั้นนำหลอดน้ำเชื้อแช่ในไนโตรเจนเหลว เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำมาตรวจเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังการอุ่นละลายทันที (post-thaw progressive motility) จากนั้นเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 37°C แล้วนำมาตรวจซ้ำอีกครั้งหลังอุ่นละลาย 3 ชั่วโมง ด้วยวิธีเดียวกับการตรวจเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิมีชีวิตก่อนแช่แข็ง

6. ตรวจเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิมีชีวิตหลังการอุ่นละลาย ด้วยการตรวจ membrane integrity วิธี Hypo-osmotic swelling test (HOS) (Revell and Mrode, 1994)

วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติด้วยโปรแกรม SAS วิเคราะห์ข้อมูลความแปรปรวน (ANOVA) แบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range Test (DMRT) มีตัวแบบดังต่อไปนี้

$$Y_{ij} = \mu + trt_i + block_j + (trte*block)_{ij} + e_{ij}$$

Y_{ij} = ลักษณะของผลผลิตน้ำเชื้อ สารละลายน้ำเชื้อที่ I block ที่ j

μ = ค่าเฉลี่ย

trt_i = ปัจจัยของสารละลายน้ำเชื้อ i (i = 1,2,3)

$block_j$ = ปัจจัยของฟอพันธุ์ที่ j (j = 1,2,3...8)

$(trte*block)_{ij}$ = ปัจจัยของการปฏิสัมพันธ์ระหว่างสารละลายน้ำเชื้อและฟอพันธุ์

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการวิเคราะห์ ไม่พบปฏิกริยาร่วมของฟอพันธุ์กับสารละลายน้ำเชื้อ ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจีก่อนแช่แข็ง พบว่าให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่กลุ่ม 1 ที่ใช้ egg-yolk tris มีแนวโน้มให้ค่าที่สูงกว่ากลุ่ม Biociphos plus[®] และ Bioexcel[®] ที่ใช้สารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ การศึกษาพบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังการอุ่นละลายทันที (Post-thaw progressive motility) กลุ่มที่ใช้ egg-yolk tris มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังการอุ่นละลาย สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ กลุ่มที่ใช้ Bioexcel[®] แต่ให้ผลไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ใช้ Biociphos plus[®] (ตารางที่ 1) และเมื่อพิจารณาที่เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังการอุ่นละลาย 3 ชั่วโมง กลุ่มที่ใช้ Bioexcel[®] มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิสูงกว่ากลุ่มที่ใช้ egg-yolk tris อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ให้ผลไม่ต่างกับกลุ่มที่ใช้ Biociphos plus[®] (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1: เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจีก่อนแช่แข็ง หลังการอุ่นละลายทันที หลังการอุ่นละลาย 3 ชั่วโมง และเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิมีชีวิตหลังการอุ่นละลาย

กลุ่มการทดลอง	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (n=32)			
	ก่อนแช่แข็ง ($\bar{x} \pm SD$)	หลังการอุ่นละลายทันที ($\bar{x} \pm SD$)	หลังการอุ่นละลาย 3 ชั่วโมง ($\bar{x} \pm SD$)	มีชีวิตหลังการอุ่นละลาย ($\bar{x} \pm SD$)
Egg-yolk tris	70.00 $\pm$ 11.27	41.90 $\pm$ 15.24 ⁿ	11.56 $\pm$ 9.44 ^u	42.10 $\pm$ 15.66
Biociphos plus [®]	65.90 $\pm$ 10.92	36.10 $\pm$ 13.13 ^{nu}	16.30 $\pm$ 13.55 ^{nu}	37.36 $\pm$ 13.65
Bioexcel [®]	64.43 $\pm$ 11.50	34.60 $\pm$ 17.19 ^u	17.10 $\pm$ 13.16 ⁿ	37.16 $\pm$ 16.51

^u ตัวอักษรที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

น้ำเชื้อแช่แข็งในกลุ่มที่ใช้ egg-yolk tris เป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ หลังการอุ่นละลายทันที สูงกว่ากลุ่มที่ใช้สารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ (ตารางที่ 1) สอดคล้องกับ Thun และคณะ (2002) ที่พบว่าคุณภาพน้ำเชื้อโคแช่แข็งที่ใช้ egg-yolk tris เป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อดีกว่าใช้สารสกัดจากถั่วเหลืองและ Van Wagtendonk และคณะ (2000) พบว่าการใช้สารละลายที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากถั่วเหลืองในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งโค ให้ผลต่ออัตราการผสมติดต่ำกว่าน้ำเชื้อที่ผลิตโดยใช้ egg-yolk tris เป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ แต่การศึกษาของ สุดา และ จตุพร (2549) ทดลองในโคนม รวมทั้งรีพรีมและคณะ (2548) ศึกษาในแพะพบว่าสารละลายทั้งสองชนิดให้ผลไม่แตกต่างกัน Bousseau et al., (1998) รายงานว่าการใช้ egg-yolk tris และสารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อให้ผลต่ออัตราการผสมติดในโคไม่แตกต่างกัน และการศึกษาของ Gil และคณะ (2003) ที่พบว่าการใช้สารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแคะให้ผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อไม่แตกต่างจากการใช้ milk-egg yolk เป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ การศึกษาของ ศักดิ์ชัย และ อภิรักษ์ (2548) ซึ่งทดลองในกระบือพบว่าคุณภาพน้ำเชื้อกระบือแช่แข็งที่ใช้ egg-yolk tris เป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อดีกว่าใช้สารสกัดจากถั่วเหลือง

เมื่อตรวจเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังการอุ่นละลาย 3 ชั่วโมง กลับพบว่า กลุ่มที่ใช้สารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Bioexcel[®] มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และ Biociphos plus[®] ที่มีแวนโนัม ที่ให้ค่าสูงกว่าใช้กันแต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 1) แสดงว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ Bioexcel[®] เป็นน้ำยาเจือจางมีความคงทนอยู่ได้นานกว่า Egg-yolk tris น่าจะทำให้มีโอกาสผสมกับไข่ได้มากกว่า Swanson and Herman, (1944) รายงานผลการผสมเทียมพบว่าน้ำเชื้อที่มีตัวอสุจิมีชีวิตอยู่ได้นานกว่าจะให้อัตราการติดตั้งท้องสูงกว่า

สรุปผล

น้ำเชื้อแช่แข็งของกลุ่มที่ใช้สารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อมีค่าคุณภาพดีกว่า กลุ่มที่ใช้ Egg-yolk tris เป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ถึงแม้ว่าคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ Egg-yolk tris หลังอุ่นละลายทันทีจะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิสูงกว่าน้ำเชื้อที่ผลิตจากการใช้สารสกัดจากถั่วเหลือง แต่เมื่อตรวจหลังจากอุ่นละลายแล้ว 3 ชั่วโมง กลับพบว่า กลุ่มที่ใช้สารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อมีค่าสูงกว่า ซึ่งเป็นการเพิ่มโอกาสในการผสมติดได้รวมทั้งเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังการอุ่นละลายทันทีของน้ำเชื้อ กลุ่มที่ใช้สารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ก็ยังอยู่ในเกณฑ์ที่สามารถนำไปใช้ในการผสมเทียมได้

ซึ่งเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพน้ำเชื้อที่กรมปศุสัตว์กำหนด ต้องมีตัวอสุจิมิมีชีวิตไม่ต่ำกว่า 8 ล้านตัว (กรมปศุสัตว์, 2548)

กิตติกรรมประกาศ

คณะวิจัยขอขอบพระคุณ สพ.ญ.รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล และ สพ.ญ. มุขดา รัตนภาสกร ที่กรุณาให้คำแนะนำในการศึกษาวิจัย คุณธีรวิโรจน์ อัญชันภาติ คุณพุทธิพงษ์ พรหมบุญ และเจ้าหน้าที่ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งภาคตะวันออกเฉียงเหนือทุกท่านที่ช่วยอำนวยความสะดวกในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์, 2548. ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่องการรัดเก็บและผลิตน้ำเชื้อของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สัตว์
ลงวันที่ 15 กุมภาพันธ์ 2548.จำนวน 2 หน้า.
- รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล, ณรงค์ เลียงเจริญ และ อนันต์ เรื่องสันเทียะ. (2548). คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งแพะที่
เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Biociphos Plus Bioexcel และ Egg Yolk Tris. การประชุมสัมมนา
วิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่ 20 กรมปศุสัตว์ กรุงเทพฯ.
- ศักดิ์ชัย พงษ์วิวัฒนกุล , และอภิรักษ์ อุทธา , 2548. ผลการใช้สารละลายน้ำเชื้อที่มีส่วนผสมของไข่แดงกับ
สารละลายน้ำเชื้อที่มีส่วนผสมของสารสกัดตัวเหลืองต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์กระบือปลัด.
วารสารปศุสัตว์เขต4. 20:26-30
- สุดา จันทาสี , และจตุพร พงษ์เพ็ง , 2549. คุณภาพน้ำเชื้อโคนมที่ใช้ยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris
Optidyl และ Bioexcel. วารสาร 50 ปี ผสมเทียม. 113-122
- สุณิรัตน์ เอี่ยมละมัย. 2542. การผสมเทียมและการปรับปรุงพันธุ์ในโคนม.22-23.
- Ahmad, K., and Foote, R.H. 1984. Motility and fertility of froze bull spermatozoa in tris-yolk and
milk extenders containing amikacin sulfate. J. Dairy Sci. 68: 2083-2086.
- Aires, V. A., Klaus-Dieter,H., Mueller-Schloesser, F. , Bogner, K., Mueller-Schloesser, S. and Hinsch, E.
2003. In vitro and in vivo comparison of egg yolk – based and soybean lecithin-based extenders for
cryopreservation of bovine semen. Theriogenology 60(2):269-279.
- Bousseau, S., Brillard, J.P., Marquant-Le, G.B., Guerin, B., Camus, A. and Lechat, M.1998. Comparison of
bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of
bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents.Theriogenology.50:699-706.

- Gil, J., Rodriguez-Iraozqui, M., Lundeheim, N., Soderquist, L. and Rodriguez-Martinez, H. 2003. Fertility of ram semen frozen in Bioexcell[®] and used for cervical artificial insemination. *Theriogenology*. 59:1157-1170.
- Kolossa, M. and Seibert, H. 1990. A chemical defined extender for cryopreservation of bovine spermatozoa. *Andrologia*. 22:445-454.
- Parks, J.E. and Graham, J.K. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. *Theriogenology*. 38:209-222.
- Polge, C., Smith, A.U. and Parkes, A.S. 1949. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. *Nature*. 164:666.
- Revell, S.G. and Mrode, R.A. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Anim.Reprod.Sci*. 36:77-86.
- Swanson, E.W. and Herman, H.A. 1944. The Correlation Between Some Characteristics of Dairy Bull Semen and conception Rate. Department of Dairy Husbandry, University of Missouri, Columbia, Missouri. p. 296-301.
- Thun, R., Hurtado, M. and Janett, F. 2002. Comparison of Biociphos-Plus[®] and Tris-egg yolk extender for cryopreservation of bull semen. *Theriogenology*. 57:1087-1094.
- Van Dielen. 1976. In: *Livestock improvement by means of artificial insemination*. N.J. Phillips Gloeiampenfabriek, Eindhoven, The Netherlands.
- Van Wagendonk – de Leeuw, A.M., Haring, R.M., Kaal – Lansbergen L.M. and den Daas, J.H. 2000. Fertility results using bovine semen cryopreserved with extenders based on egg yolk and soybean extract. *Theriogenology*. 54:57 – 67.

อิทธิพลของอายุ ฤดูกาล ต่อคุณภาพน้ำเชื้อพ่อโคพันธุ์บราห์มัน

ศักดิ์ชัย พงษ์วิวัฒนกุล^{1*} ธวีโรจน์ อัญชันภาติ² และ พุทธิพงษ์ พรหมบุญ²

¹ ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพขอนแก่น ต.ท่าพระ อ.เมืองฯ จ.ขอนแก่น 40260

² ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ต.ท่าพระ อ.เมืองฯ จ.ขอนแก่น 40260

บทคัดย่อ

การศึกษาเพื่อประเมินปัจจัยของอายุพ่อโคพันธุ์บราห์มันและฤดูกาลต่อคุณภาพน้ำเชื้อจากข้อมูลการรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อโคจำนวน 32 ตัว รวม 2,613 ข้อมูล ของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งภาคตะวันออกเฉียงเหนือ พบว่า อายุของพ่อโคที่รีดเก็บน้ำเชื้อมีผลต่อปริมาณของน้ำเชื้อ ความเข้มข้น และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โคอายุ 7–8 ปี น้ำเชื้อมีปริมาตร (6.94 ± 0.12 มล.) และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ($71.87 \pm 0.92\%$) มากกว่าโคกลุ่มอายุอื่น ในขณะที่น้ำเชื้อของโคอายุ 9 – 11 ปี มีความเข้มข้น (1570 ± 29.58 ล้านตัว/มล.) มากกว่ากลุ่มอายุอื่น ฤดูกาลที่แตกต่างกันมีผลกระทบต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ หลังเจือจางด้วยน้ำยาละลายน้ำเชื้อ และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังผ่านขบวนการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยในฤดูหนาวน้ำเชื้อโคมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังเจือจางด้วยน้ำยาละลายน้ำเชื้อ ($67.23 \pm 0.42\%$) สูงกว่าฤดูร้อนและฤดูฝน ($65.21 \pm 0.53\%$ และ $64.74 \pm 1.66\%$) และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังผ่านขบวนการแช่แข็งในฤดูร้อนสูงกว่าฤดูหนาว ($44.67 \pm 0.50\%$) เทียบกับ ($42.88 \pm 0.37\%$) ($p < 0.05$)

คำสำคัญ: พ่อโคบราห์มัน คุณภาพน้ำเชื้อ อายุ ฤดูกาล

เลขทะเบียนผลงานวิชาการ 53(2) - 0208 - 106

*ผู้เขียนผู้รับผิดชอบบทความ

Age Seasonal Effect on Semen Quality in Brahman Bulls

Sakchai Payungwiwattanagoon^{1*} Taweeroj Unchanpati² and Puttipong Prambu²

¹ Khonkaen Artificial Insemination and Biotechnology Research Center

² Northeast Bull Semen Center

Abstract

The 32 Brahman bulls with 2,613 ejaculate data recorded from the Northeast Bull Semen Center to were evaluated the effect of the age of bulls and seasons on semen quality. The results revealed that the volume of ejaculates, sperm concentration and sperm motility were significantly affected by the age of the bulls ($p < 0.05$). The volume of ejaculates and sperm motility were highest in bulls aged 7-8 years (6.94 ± 0.12 ml, $71.87 \pm 0.92\%$) which were higher than bulls aged 4-6 years and 9-11 years. However, Sperm concentration was the highest in bulls aged 9-11 years ($1570 \pm 29.58 \times 10^6$ spermatozoa/ml) and was higher than the 4-6 and the 7-8 year old bulls. In winter, sperm motility ($67.23 \pm 0.42\%$) was higher than in summer and the rainy season ($65.21 \pm 0.53\%$ and $64.74 \pm 1.66\%$). The post-thaw motility was higher in summer ($44.67 \pm 0.50\%$) compared with winter ($42.88 \pm 0.37\%$) ($p < 0.05$).

Keywords: Brahman bull, semen quality, Age, Seasonal

Technical document no. 53(2) – 0208 - 106

* corresponding Author

บทนำ

การผสมเทียมเป็นวิธีการสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์สัตว์เพื่อให้ได้สัตว์พันธุ์ดีจำนวนมากขึ้นในเวลาอันรวดเร็วกว่าการผสมแบบธรรมชาติ ปัจจุบันงานผสมเทียมมีการให้บริการแก่เกษตรกรแทบทุกพื้นที่ของประเทศ กรมปศุสัตว์ยังคงเน้นโคเนื้อพันธุ์บราห์มันเป็นพันธุ์หลักเพื่อบริการเกษตรกร เพื่อการขยายและปรับปรุงพันธุ์โคเนื้อ แต่อย่างไรก็ตามการผสมเทียมโคเนื้อในปัจจุบันยังมีอัตราการผสมติดไม่สูงนัก ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องมาจากเจ้าหน้าที่ผสมเทียมมีประสบการณ์และความชำนาญไม่เพียงพอ การจัดการแม่โคไม่ดี วิธีการเก็บรักษาและการใช้น้ำเชื้อไม่ถูกต้อง เป็นต้น การเพิ่มจำนวนโคเนื้อด้วยการผสมเทียมเป็นวิธีที่รวดเร็วและประหยัด แต่ต้องมีการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งให้เพียงพอเพื่อใช้ในการผสมเทียมควบคู่กันไป การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งโคให้มีความเพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกร ต้องมีการวางแผนการผลิตเพื่อให้ได้ตามเป้าหมาย ต้องมีพ่อโคในจำนวนเพียงพอที่น้ำเชื้อมีคุณภาพดี สามารถผลิตเป็นน้ำเชื้อแช่แข็งได้ แต่เนื่องจากคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อโคแต่ละตัวมีความแตกต่างกัน หรือแม้แต่น้ำเชื้อพ่อโคตัวเดียวกันก็อาจมีคุณภาพไม่เหมือนกันในแต่ละครั้งที่รีดเก็บ เช่น ปริมาตร ความเข้มข้น จำนวนตัวอสุจิที่มีชีวิต (คลอนาส์และคณะ, 2548) การรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อโคแต่ละครั้ง ปริมาตรและความเข้มข้นอาจมีความแตกต่างกันอยู่ในช่วง 1-15 มล. และ 300-2,000 ล้านตัว/มล. ตามลำดับ ซึ่งอาจเป็นผลมาจากอายุ (Almquist and Amann, 1976) นอกจากนี้ฤดูกาลก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อโค โดยมีรายงานว่าคุณภาพน้ำเชื้อพ่อโครุ่นพันธุ์ ขาว-ดำ จะมีผลกระทบเนื่องจากฤดูกาลที่เปลี่ยนไป (Matheven et al., 1998a)

การศึกษานี้มีความมุ่งหวังที่จะศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อดังที่กล่าวข้างต้น โดยรวบรวมข้อมูลการผลิตน้ำเชื้อโคบราห์มัน เพื่อศึกษาผลกระทบจากปัจจัย คือ อายุ และฤดูกาล เพื่อนำผลการศึกษามาใช้ประโยชน์ในการวางแผนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งโคเนื้อต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ข้อมูลการรีดเก็บน้ำเชื้อโคเนื้อพันธุ์บราห์มัน ได้จากการรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อโคจำนวน 32 ตัว ในช่วงเดือนตุลาคม 2551 ถึง พฤษภาคม 2553 ณ ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รวม 2,613 ข้อมูล โดยมีขบวนการรีดเก็บดังนี้ หลังจากนำพ่อโคเข้ามาถึงบริเวณลานรีดเก็บน้ำเชื้อ พ่อโคจะถูกกระตุ้นให้มีความต้องการทางเพศด้วยสัตว์ตัวล่อ (teaser animal) จำนวน 2-3 ครั้ง แล้วจึงทำการรีดจริงโดยใช้โยนีเทียม (artificial vagina) ที่ได้เตรียมไว้เรียบร้อยแล้ว การรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อโคทำโดยผู้ทำการรีดเก็บชุดเดียวกัน น้ำเชื้อที่รีดเก็บได้จะถูกประเมินคุณภาพโดยเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการทันที ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง (phase contrast) ตัวชี้วัดคุณภาพน้ำเชื้อที่ศึกษานี้ประกอบด้วย ปริมาตร ความเข้มข้นของน้ำเชื้อ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (motility) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (post-thaw

motility) ทำการจำแนกปัจจัยที่เป็นกลุ่ม คือ พ่อโคออกตามอายุโค จำนวน 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 อายุ 4-6 ปี กลุ่มที่ 2 อายุ 7-8 ปี และกลุ่มที่ 3 อายุ 9-11 ปี ฤดูกาลรีดเก็บ แบ่งออกเป็น 3 ช่วงคือ ฤดูร้อน (มีนาคม-พฤษภาคม) ฤดูฝน (มิถุนายน-ตุลาคม) และฤดูหนาว (พฤศจิกายน-กุมภาพันธ์)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลมาวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ ด้วย คำสั่ง General Linear Model (Proc GLM) ของโปรแกรม SAS ที่มีตัวแบบดังต่อไปนี้

$$Y_{ij} = \mu + Age_i + Seasons_j + (Age*Seasons)_{ij} + e_i$$

Y_{ij} = คุณภาพน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้จากการหลังแต่ละครั้งของพ่อโคที่มีอายุขณะรีดเก็บน้ำเชื้อ i ในฤดูกาล j

μ = ค่าเฉลี่ย

Age_i = ปัจจัยของอายุโคที่ใช้ในการรีดเก็บน้ำเชื้อ i (i = 1,2,3)

$Seasons_j$ = ปัจจัยของฤดูกาลในการรีดเก็บน้ำเชื้อ j (j = 1,2,3)

$(Age*Seasons)_{ij}$ = ปัจจัยของการปฏิสัมพันธ์ระหว่างอายุโคที่ใช้ในการรีดเก็บน้ำเชื้อ i กับ ฤดูกาลในการรีดเก็บน้ำเชื้อ j

e_{ij} = ความคลาดเคลื่อนจากการสุ่ม

ผลการทดลอง

ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

จากผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสำหรับตัวชี้วัดคุณภาพน้ำเชื้อ ได้แก่ ปริมาตร ความเข้มข้น เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1: ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

คุณภาพน้ำเชื้อ	ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
Ejaculate Volume (CC)	5.98 ± 2.31
Sperm Concentration (10 ⁶ /CC)	1,356 ± 401
Sperm Motility (%)	66.79 ± 16.60
Post-thaw Motility (%)	43.76 ± 11.10

ปัจจัยทางด้านอายุและฤดูกาล

จากการวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลกระทบกับคุณภาพน้ำเชื้อ พบว่าอายุของกลุ่มโคที่แตกต่างกันมีผลกับปริมาณน้ำเชื้อ ความเข้มข้น เพอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวสperm หลังเจือจางด้วยน้ำยาละลาย แต่ไม่มีผลกระทบกับเพอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวสperm หลังละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ($p>0.05$) ในส่วนของปัจจัยเรื่องของฤดูกาล เมื่อฤดูกาลเปลี่ยนไปจะมีผลต่อเพอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวสperm หลังเจือจางด้วยน้ำยาละลาย และเพอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวสperm หลังละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ($p<0.05$) แต่ไม่มีผลกระทบกับปริมาณน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้ ความเข้มข้นของน้ำเชื้อ ปฏิกริยาร่วมระหว่างอายุและฤดูกาลมีผลกระทบต่อความเข้มข้นของน้ำเชื้อเพียงลักษณะเดียว

ตารางที่ 2: ค่าเฉลี่ยกำลังสองน้อยที่สุดและความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของอายุของพ่อโคและฤดูกาลกับคุณภาพน้ำเชื้อ

ค่าเฉลี่ยกำลังสองน้อยที่สุดและความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน				
ปัจจัย	Volume (CC)	Sperm Concentration (10^6 /CC)	Sperm Motility (%)	Post-thaw Motility (%)
อายุ				
4 – 6 ปี	5.19 ± 0.12^a	1181 ± 21.43^a	63.06 ± 0.91^a	42.77 ± 0.91
7 – 8 ปี	6.94 ± 0.12^a	1280 ± 21.72^a	71.87 ± 0.92^a	44.44 ± 0.85
9 – 11 ปี	5.71 ± 0.17^b	1570 ± 29.58^a	62.33 ± 1.25^b	44.89 ± 2.62
ฤดูกาล				
หนาว	5.91 ± 0.05	1364 ± 10.07	67.23 ± 0.42^a	42.88 ± 0.37^a
ร้อน	5.98 ± 0.07	1374 ± 12.63	65.21 ± 0.53^a	44.67 ± 0.50^a
ฝน	5.96 ± 0.22	1294 ± 39.31	64.74 ± 1.66^a	44.54 ± 2.84^{ab}

กข ตัวอักษรที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยกำลังสองน้อยที่สุดของอายุและฤดูกาล (ตารางที่ 2) พบว่ากลุ่มโคอายุ 7-8 ปี มีปริมาณน้ำเชื้อ 6.94 ± 0.12 มล. และมีเพอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวสperm หลังเจือจางด้วยน้ำยาละลายน้ำเชื้อ $71.87 \pm 0.92\%$ สูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในขณะที่น้ำเชื้อพ่อโคกลุ่มอายุ 9-11 ปี มีความเข้มข้นสูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) คือมีตัวสperm 1570 ± 29.58 ล้านตัว/มล. เมื่อพิจารณาในส่วนของฤดูกาล

พบว่าในช่วงฤดูหนาวเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังเจือจางด้วยน้ำยาละลายสูงกว่าฤดูกาลอื่นอย่างมีนัยสำคัญคือ $67.23 \pm 0.42\%$ ($p < 0.05$) และฤดูร้อนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังละลายสูงกว่าฤดูหนาวอย่างมีนัยสำคัญคือ $44.67 \pm 0.50\%$ ($p < 0.05$)

จากผลของปฏิภณาร่วมระหว่างอายุและฤดูกาล ซึ่งมีผลกับความเข้มข้นของน้ำเชื้อ ตามตารางที่ 3 พบว่าในฤดูฝน โคอายุ 4-6 ปี และ อายุ 7-8 ปี มีความเข้มข้นของน้ำเชื้อต่ำที่สุด ($p < 0.05$) โดยที่ฤดูหนาวและร้อนให้ผลไม่ต่างกัน ขณะที่ในกลุ่มโคอายุ 9-11 ปี ซึ่งเป็นกลุ่มอายุมากที่สุด มีความเข้มข้นของน้ำเชื้อสูงกว่ากลุ่มอายุอื่น แต่กลับให้ความเข้มข้นของน้ำเชื้อในฤดูฝนสูงกว่าฤดูหนาว

ตารางที่ 3: ค่าเฉลี่ยกำลังสองน้อยที่สุด และความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ผลของปฏิภณาร่วมระหว่างอายุและฤดูกาล ซึ่งมีผลกับความเข้มข้นของน้ำเชื้อ

ค่าเฉลี่ยกำลังสองน้อยที่สุดและความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของความเข้มข้นของน้ำเชื้อ			
ปัจจัย	หนาว	ร้อน	ฝน
อายุ			
4 – 6 ปี	$1,243 \pm 17.24^{\text{a}}$	$1,215 \pm 22.35^{\text{a}}$	$1,086 \pm 57.77^{\text{b}}$
7 – 8 ปี	$1,343 \pm 16.77^{\text{a}}$	$1,333 \pm 19.63^{\text{a}}$	$1,165 \pm 59.85^{\text{b}}$
9 – 11 ปี	$1,506 \pm 18.29^{\text{b}}$	$1,573 \pm 23.49^{\text{a}}$	$1,632 \pm 83.62^{\text{a}}$

^{a,b} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

วิจารณ์

อายุของพ่อโค มีผลกับปริมาณน้ำเชื้อ ความเข้มข้นของน้ำเชื้อและการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังเจือจางด้วยน้ำยาละลาย โคอายุ 7-8 ปี น้ำเชื้อมีปริมาณ สูงกว่ากลุ่มอื่น และพ่อโคกลุ่มอายุ 9-11 ปี น้ำเชื้อมีความเข้มข้นสูงกว่ากลุ่มอื่น สอดคล้องกับภาณุพันธ์และคณะ (2547) ที่รายงานว่ปริมาณและความเข้มข้น ได้รับผลกระทบจากอายุของพ่อโค

Garner et al. (1996) รายงานว่าปริมาณของน้ำเชื้อพ่อโคที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้วจะมากกว่าโครุ่น แต่จำนวนตัวอสุจิทั้งหมดต่อการหลังไม่ได้มากตามไปด้วย สอดคล้องกับการทดลองนี้ที่น้ำเชื้อพ่อโคอายุ 7-8 ปี มีปริมาณมากกว่าน้ำเชื้อพ่อโคอายุ 4-6 ปี แต่ขัดแย้งกันที่ในการศึกษานี้จำนวนตัวอสุจิทั้งหมดต่อการหลังเพิ่มขึ้นตามไปด้วย จะเห็นว่าอายุพ่อโคที่รีดเก็บน้ำเชื้อมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ ซึ่งอาจเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลงทาง

สรีระวิทยาของพ่อกิจจากโครุ่นสู่วัยสมบูรณ์พันธุ์ Everett and Bean (1982) และ Amann และคณะ (1974) รายงานว่าความเข้มข้นของน้ำเชื้อ และจำนวนตัวสุมิทั้งหมดจะเพิ่มขึ้นเมื่อโคอายุเพิ่มขึ้นจนถึงอายุ 4-5 ปี

ฤดูกาลที่รีดเก็บ การศึกษาครั้งนี้พบว่าฤดูกาลมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อโคในฤดูหนาว เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวสุมิหลังเจือจางด้วยน้ำยาละลายสูงกว่าฤดูกาลอื่นอย่างมีนัยสำคัญคือ $67.23 \pm 0.42\%$ ($p < 0.05$) และฤดูร้อนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวสุมิหลังละลายสูงกว่าฤดูหนาวอย่างมีนัยสำคัญคือ $44.67 \pm 0.50\%$ ($p < 0.05$)

Mathevon et al. (1998) รายงานว่าฤดูกาลของการรีดเก็บน้ำเชื้อมีผลกระทบต่อตัวชี้วัดของคุณภาพน้ำเชื้อทั้งหมดในพ่อโคที่อายุน้อย และมีผลต่อตัวชี้วัดของคุณภาพน้ำเชื้อหลายตัวในพ่อโคที่เจริญเติบโตเต็มที่แล้ว ได้แก่ ความเข้มข้นของน้ำเชื้อและจำนวนตัวสุมิทั้งหมด ซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นสูงที่สุดในช่วงฤดูหนาว สอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าผลของปฏิภริยาร่วมระหว่างอายุและฤดูกาลมีผลต่อความเข้มข้นของน้ำเชื้อ โคอายุ 4-6 ปี และ อายุ 7-8 ปี มีความเข้มข้นของน้ำเชื้อสูงที่สุดในช่วงฤดูหนาว ปาริณต และคณะ (2531) ได้ศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อของกระบือ พบว่าความเข้มข้นของน้ำเชื้อต่อการรีด 1 ครั้ง และเปอร์เซ็นต์ตัวสุมิที่มีชีวิตหลังแช่แข็ง ในฤดูฝนมีค่าสูงสุด จำนวนตัวสุมิที่มีชีวิตก่อนทำการแช่แข็ง ในฤดูหนาวมีค่าสูงสุด ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ ภาณุพันธ์และคณะ (2547) รายงานพ่อพันธุ์โฮลสไตน์ ฟรีเซียน ที่รีดเก็บน้ำเชื้อในฤดูกาลต่างๆพบว่าให้ปริมาณน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้ไม่แตกต่างกันในทุกฤดูกาล สอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้

สรุปผล

จากผลการทดลองนี้พบว่าพ่อโคโบราณอายุ 7-8 ปี น้ำเชื้อมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวสุมิดีที่สุด เมื่อพิจารณาจากฤดูกาลพบว่า ฤดูหนาวน้ำเชื้อพ่อโคโบราณมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวสุมิสูงที่สุด เมื่อพิจารณาการเคลื่อนที่ของตัวสุมิหลังเจือจางซึ่งใช้เป็นเกณฑ์ในการตัดสินคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งที่จะนำไปใช้ในการผสมเทียมนั้น พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างโคพันธุ์โบราณทั้ง 3 กลุ่มอายุ ดังนั้นจึงสามารถใช้โคอายุตั้งแต่ 4-11 ปี ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะวิจัยขอขอบพระคุณ คุณจตุรรัตน์ แสนโกษณ์ สพ.ญ.รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล สพ.ญ. มุขดา รัตนภาสกร และคุณสายันท์ บัวบาน น.สพ.อภิรักษ์ อุทธา ที่กรุณาให้คำแนะนำในการศึกษาวิจัย และเจ้าหน้าที่ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ได้แก่ คุณกรรณิกา แก้วอ่อน ในการจัดเก็บข้อมูล คุณสมศักดิ์ พิมพ์แสนศรี, คุณโรมรัน ฝั่ล้อมท่าเล, ว่าที่ร้อยตรี วรจักรย์ วงชาติ และคุณยศพนธ์ ธัญวัฒน์ชุติคุณ ซึ่งปฏิบัติงานในขบวนการผลิตน้ำเชื้อ และช่วยอำนวยความสะดวกในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- คณางค์ บุรณะอำนวย จินดา สิงห์ถ่อ สุดสรร ศิริไวยพวงศ์ เพล้ง ธรรมรักษ์ และมงคล เตชะกำพุ 2548. ผลของความถี่ในการรีดเก็บน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำ เชื้อพ่อโคพันธุ์ผสมโฮลสไตน์ฟรีเชียน. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43 กรุงเทพฯ หน้า 119-127
- ปาริฉัตร สุขโต มุขดา อมรรุจิ รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล วิชัย ชนาธินาถ และ บุญญวัฒน์ สนิวงส์. 2531. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อกระบือปลักในฤดูต่างๆ: ศึกษารูปร่าง ของตัวอสุจิ รายงานผลงานวิจัยสาขาผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 194-203
- ภาณุพันธ์ พงษ์เพ็ง สายัณห์ บัวบาน และจิรุจม์ รัตนเทพ. 2547. ปัจจัยทางสภาวะแวดล้อมและการจัดการที่มีผลกระทบต่อผลผลิตน้ำเชื้อในพ่อโคนมสำหรับใช้ผสมเทียม. การประชุมสัมมนาวิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่ 19 กรมปศุสัตว์ หน้า 49 – 50
- Almquist, J.O., and Amann, R.P. 1976. Reproductive capacity of dairy bulls. XI. Pubertal characteristics and postpuberal changes in production of semen and xual activity of Holstein bulls ejaculated frequency. J. Dairy. Sci.59:986-991.
- Amann, R.P.,J.F. Kavanaugh, L.D. Grill, Jr., and J.R. Voglmayr.1974. Sperm production of Holstein bulls determined form testicular spermatid reserves after cannulation of the testes or vasdefrens and by dairy ejaculation. J.Dairy Sci. 57:93.
- Everett, R.w. and Bean, B. 1982. Environmental influences on semen output. Journal of Dairy Science 65 (7): 1303-1310.
- Garner, D.L., Johnson, L.A., Ailen, C.H., Paleneia, D.D., and Chambers, C.S. 1996. Comparison of seminal quality in Holstein bulls as yearlings and as mature sires. Theriogenology. 45 : 923-934.
- Mathevon, M., Buhr, M.M. and Dekker, J.C. 1998a, Environmental, management and genetic factors affecting semen production in Holstein bulls. Journal of Dairy Science 81 (12): 3321-3330.
- Mathevon, M., Dekkers, J.C.M., and Buhr, M.M. 1998b. Environmental, management and genetic factors affecting semen production in French Montbeliard bulls. Lives. Pro.Sci.55: 65-77.

การเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมแพะด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง

อภิชัย พูนชัย^{1*} อนนท์ เทืองสันเทียะ² ณรงค์ เลี้ยงเจริญ² บันลือ กล้าพลู² และ มาลี อภิเมธีธารง³

¹ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพนครราชสีมา สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาการขยายผลสัตว์อ่อน สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

³กลุ่มพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะด้วยฮอร์โมน PMSG โดยใช้ขนาดของฮอร์โมนที่ต่างกัน และเปรียบเทียบผลของจำนวนครั้งการผสมเทียมต่ออัตราการติดตั้งท้องในแพะที่เหนี่ยวนำการเป็นสัด ใช้แพะเพศเมียพันธุ์ลูกผสมจำนวน 60 ตัว น้ำหนักระหว่าง 25-30 kg อายุระหว่าง 1-2 ปี แบ่งเป็น 2 การทดลองดำเนินการต่อเนื่องกัน การทดลองที่ 1 เปรียบเทียบผลของการใช้ฮอร์โมน PMSG ในขนาด 150 IU และ 250 IU ในแพะพันธุ์ลูกผสมที่เหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยวิธีสอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด (CIDR-G) ต่อการแสดงการเป็นสัด แบ่งแพะออกเป็นสองกลุ่มๆละ 30 ตัวทำการสอดฮอร์โมน CIDR-G เป็นเวลา 16 วัน ฉีด PMSG (Folligon®) เข้ากล้ามเนื้อในวันที่ 14 โดยกลุ่มที่ 1 ฉีด PMSG ขนาด 150 IU พร้อมกับฉีด PGF_{2α} (Estromate®) ขนาด 125 µg กลุ่มที่ 2 ทำการฉีด PMSG เข้ากล้ามเนื้อในวันที่ 14 โดยฉีด PMSG ขนาด 250 IU พร้อมกับฉีด PGF_{2α} ขนาด 125 µg สังเกตและบันทึกเวลาที่แพะเป็นสัดขึ้นนึ่งหลังถอด CIDR-G พบว่าแพะทั้งสองกลุ่มแสดงอาการเป็นสัดทุกตัว (100%) โดยกลุ่มที่ 1 ระยะเวลาจากถอด CIDR-G จนถึงเป็นสัดขึ้นนึ่ง (29.05 ± 7.64 ชั่วโมง, mean $\pm$ SD) ช้ากว่ากลุ่มที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (23.46 ± 4.71 ชั่วโมง, $P < 0.05$) การทดลองที่ 2 ใช้โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้ฮอร์โมนเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 แต่ฉีด PMSG ขนาด 150 IU แบ่งแพะออกเป็นสองกลุ่มๆละ 30 ตัว กลุ่มที่ 1 ผสมเทียมแพะด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง จำนวน 1 ครั้ง ในชั่วโมงที่ 36 หลังจากถอดฮอร์โมน CIDR-G กลุ่มที่ 2 ผสมเทียมแพะด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง หลังจากถอดฮอร์โมน จำนวน 2 ครั้ง ในชั่วโมงที่ 36 และชั่วโมงที่ 48 ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งพ่อเดียวและชุดการเดียวกัน การตรวจท้องที่ 45 วัน หลังผสมเทียม พบว่า กลุ่มที่ 1 มีอัตราการผสมติด 13.33%(4/30) กลุ่มที่ 2 มีอัตราการผสมติด 30%(9/30) อัตราการผสมติดทั้งสองกลุ่มแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

คำสำคัญ: การเหนี่ยวนำการเป็นสัด การผสมเทียม น้ำเชื้อแช่แข็ง แพะ

เลขทะเบียนผลงานวิจัย 50(1)-0208-040

*ผู้รับผิดชอบบทความ

Estrous Synchronization and Artificial Insemination with Frozen Semen in Goats

Apichai Poonchai^{1*} Anone Thungsanthia² Narong Leingcharoen² Bunlue Klampool²
and Malee Apimateetumrong³

¹Nakornrattchasi insemmination and biotechnology research center,
Bureau of biotechnology in livestock production

²Embryo Transfer Research Center, Nakornrattchasi Province.

³Bureau of biotechnology in livestock production, Department of Live Development.

Abstract

The objectives of this study were to compare the effect of two different doses of pregnant mare serum gonadotropins (PMSG) with progesterone (CIDR-G) and Prostaglandin-F2 α (PGF_{2 α}) for synchronizing estrous in cross bred does and to investigate the pregnancy rates after single or double artificial insemination (AI) in estrous synchronized does. Sixty cross bred, weighed 25-30 kg, aged 1-2 years, does were used. This study was divided into 2 experiments. In Experiment 1, all does were inserted with CIDR-G for 16 days and injected with 125 μ g PGF_{2 α} , and 150 IU PMSG (Group 1) or 250 IU PMSG (Group 1) on day 14. The time to onset of induced estrous was recorded in both groups. Experiment 2, cervical AI with frozen semen was done at 36 h (single AI, Group 1) or at 36 and 48 h (double AI, Group 2) following CIDR-G withdrawal in does synchronized with PGF_{2 α} and 150 IU PMSG. In Experiment 1, the mean interval to the onset of estrous, in Group 1, was significantly later than that of Group 2 (29.05 ± 7.64 h, mean $\pm$ SD and 23.46 ± 4.71 h, respectively, $P < 0.05$). All synchronized does showed the sign of estrous. In Experiment 2, there was no significant difference on pregnancy rates between single and double (AI) in synchronized does (13.33%, 4/30 and 30%, 9/30).

Key word: artificial insemination, estrous synchronization, frozen semen, goats

Research project no. 50(1)-0208-040

* corresponding author

บทนำ

การเลี้ยงแพะนั้น ส่วนใหญ่จะเป็นการเลี้ยงในกลุ่มของชาวไทยมุสลิม ที่เลี้ยงไว้เพื่อบริโภคในครัวเรือน ใช้ประกอบพิธีกรรมทางศาสนา หรือเลี้ยงเป็นอาชีพเสริม เป็นต้น แต่ในปัจจุบันการเลี้ยงแพะได้รับความนิยม มีการเลี้ยงเชิงพาณิชย์มากขึ้น และยังพบการเลี้ยงได้ในทุกเขตพื้นที่ของประเทศไทย พันธุ์แพะที่เลี้ยงส่วนใหญ่จะเป็นพันธุ์พื้นเมือง และพันธุ์ผสม จากความต้องการแพะในปริมาณที่เพิ่มขึ้น จึงมีการนำเทคโนโลยีการผลิตด้วยวิธีผสมเทียมมาเป็นแนวทางหนึ่งในการปรับปรุงและขยายพันธุ์แพะขึ้น เราสามารถผสมเทียมแพะได้ทั้งจากแพะที่เป็นสัดเองโดยธรรมชาติและที่เป็นสัดโดยวิธีการเหนี่ยวนำ ซึ่งการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะนี้ทำให้สะดวกในการจัดการฟาร์ม สะดวกในการกำหนดเวลาผสมเทียม เกษตรกรสามารถกำหนดระยะเวลาของการคลอดของลูกแพะได้ วิธีการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะมีหลายวิธี เช่น การให้แม่แพะได้พบกับพ่อพันธุ์เพื่อกระตุ้นให้แม่แพะแสดงการเป็นสัด หรือการใช้ฮอร์โมนเพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัด เป็นต้น (Whitley and Jackson, 2004) ซึ่งการใช้ฮอร์โมนเหนี่ยวนำการเป็นสัดนี้มีความสะดวกและได้รับความนิยมเป็นอย่างมาก โดย Wildeus (2000) กล่าวถึงการใช้ฮอร์โมนในรูปแบบต่างๆ เพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะ ซึ่งมีทั้งการเสริมฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากภายนอก การใช้ฮอร์โมนเพื่อสลายคอร์ปัสลูเตียม การใช้ฮอร์โมนดังกล่าวพัฒนารูปแบบมาจากฮอร์โมนที่ใช้โคและสุกร ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ใช้มีรูปแบบแตกต่างกัน เช่น ชนิดสอดช่องคลอดในรูปแบบฟองน้ำ(Sponge)ที่ประกอบด้วยฮอร์โมน Fluorgestone acetate (FGA) หรือ Methyl acetoeypogreterone (MAP) ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอดที่เป็นแท่งซิลิโคนรูปตัววาย (CIDR-G) เป็นต้น โดยเมื่อใช้ร่วมกับฮอร์โมน Pregnant Mare Serum Gonadotrophin (PMSG) หรือฮอร์โมน Prostaglandin-F2 α (PGF $_{2\alpha}$) จะทำให้การเหนี่ยวนำการเป็นสัดมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด ส่วนใหญ่จะสอดไว้ในช่องคลอดเป็นเวลา 9-19 วัน และฉีดฮอร์โมน PMSG ในช่วงสองวันก่อนถอดหรือในวันที่ถอดฮอร์โมน โดยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนนี้จะยับยั้งต่อมไฮโปธาลามัสให้หลั่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (GnRH) ลดลง มีผลให้การเจริญของฟอลลิเคิลลดลงด้วย และเมื่อถอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนออก จะทำให้ต่อมไฮโปธาลามัสหลังของฮอร์โมน GnRH เพิ่มขึ้น กระตุ้นให้ต่อมได้ส่งส่วนหน้าหลั่งฮอร์โมน Follicle Stimulating Hormone (FSH) และฮอร์โมน Luteinizing Hormone (LH) ทำให้ฟอลลิเคิลมีการเจริญและแพะก็จะแสดงอาการเป็นสัดในเวลาต่อมา ส่วนฮอร์โมน PGF $_{2\alpha}$ มีฤทธิ์ทำให้คอร์ปัสลูเตียมเกิดการสลายตัว สำหรับฮอร์โมน PMSG นั้น มีฤทธิ์เหมือนฮอร์โมน FSH และ LH ที่ช่วยให้ฟอลลิเคิลมีการเจริญและเกิดการตกไข่ขึ้น (Monika, 2002) มีรายงานการใช้ฮอร์โมน PMSG ร่วมกับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะ ตั้งแต่ขนาด 150 IU – 500 IU (นิวัฒน์ และคณะ, 2550 ; Bongso and Dass, 1982; Bretzlaff and Madrid, 1989; Waldrona et al., 1999; Dogan et al., 2005;) Bongso and Dass (1982) เหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนร่วมกับ PMSG (300 IU) พบว่าอัตราการผสมติดเมื่อผสมด้วยพ่อพันธุ์เฉลี่ย 71% และมีอัตราการผสมติดเมื่อผสมเทียมแบบกำหนดเวลาเฉลี่ย 81% นิวัฒน์ และคณะ

(2550) ได้ทดลองเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะพันธุ์ชาแนน ด้วย CIDR-G (นาน 17 วัน) และ PGF_{2α} (125 µg) ร่วมกับ PMSG (150 IU) ผสมเทียมแบบกำหนดเวลาด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง ในชม.ที่ 48 และชม. 72 พบว่าสามารถเหนี่ยวนำการเป็นสัดได้เป็นอย่างดี และมีอัตราการผสมติด 52% (21/40) ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่เป็นสัดโดยธรรมชาติ Dogan et al.(2005) เหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมแบบกำหนดเวลาในชั่วโมงที่ 36 และที่ 48 หลังถอดด้วยน้ำเชื้อสดพบว่าอัตราการตั้งท้องเฉลี่ยสูงถึง 70%

จากรายงานการศึกษาดังกล่าวข้างต้น จะพบว่าการใช้ฮอร์โมน PMSG ในขนาดที่ต่ำร่วมกับการผสมเทียมแบบกำหนดเวลานั้น สามารถให้ผลการเหนี่ยวนำการเป็นสัดได้เป็นอย่างดี ทำให้ประหยัด และลดปริมาณการใช้ PMSG ลง อย่างไรก็ตาม รายงานเกี่ยวกับการใช้ฮอร์โมน PMSG เหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะพันธุ์ลูกผสมในประเทศไทยยังมีไม่มากนัก ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาการใช้ฮอร์โมน PMSG ในขนาดที่แตกต่างกันร่วมกับการผสมเทียมแบบกำหนดเวลาขึ้น เพื่อเป็นองค์ความรู้ในการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์แพะด้วยวิธีผสมเทียมต่อไป

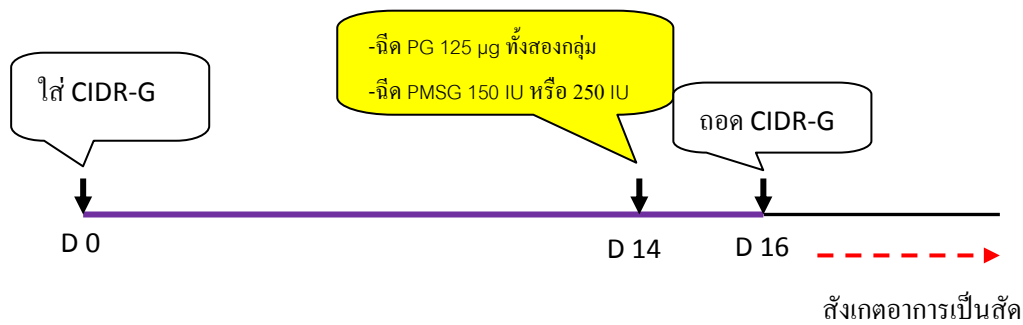
การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดเมื่อใช้ ฮอร์โมน PMSG ในขนาดต่างกันคือ ขนาด 125 IU และขนาด 250 IU ร่วมกับการใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด (CIDR-G) และเปรียบเทียบผลของจำนวนครั้งการผสมเทียมต่ออัตราการติดตั้งท้องในแพะที่เหนี่ยวนำการเป็นสัด โดยใช้การผสมเทียมแบบกำหนดเวลา 1 ครั้ง ชั่วโมงที่ 36 หรือผสมเทียม 2 ครั้ง ชั่วโมงที่ 36 และ 48 หลังจากถอดฮอร์โมน CIDR-G

อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษานี้ ใช้แพะพันธุ์ลูกผสม จำนวน 60 ตัว อายุระหว่าง 1-2 ปี น้ำหนักระหว่าง 25-30 kg มีสภาพร่างกายแข็งแรงสมบูรณ์ ผ่านการตรวจโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์ เลี้ยงอยู่ในโรงเรือนเดียวกัน มีการเลี้ยงดูและจัดการแบบเดียวกัน ณ ฟาร์มแห่งหนึ่งในจังหวัดนครราชสีมา ดำเนินการทดลองเดือน เม.ย.-ส.ค. 2551 ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด CIDR-G ที่ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ EAZI-BREEDTM CIDR[®] มีฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 0.3 กรัม ฮอร์โมน PMSG ที่ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ FOLLIGON[®] ประกอบด้วย Serum gonadotrophin (PMSG) 1,000 IU/ml ซิซี ฮอร์โมน PGF_{2α} ที่ใช้เป็นผลิตภัณฑ์ Estromate[®] ประกอบด้วย Cloprostenol ความเข้มข้น 250 µg/ml การศึกษาแบ่งเป็น 2 การทดลอง หลังจากทำการทดลองที่ 1 แล้วเสร็จจึงทำการทดลองที่ 2 ใช้แพะชุดเดียวกัน มีรายละเอียดดังนี้

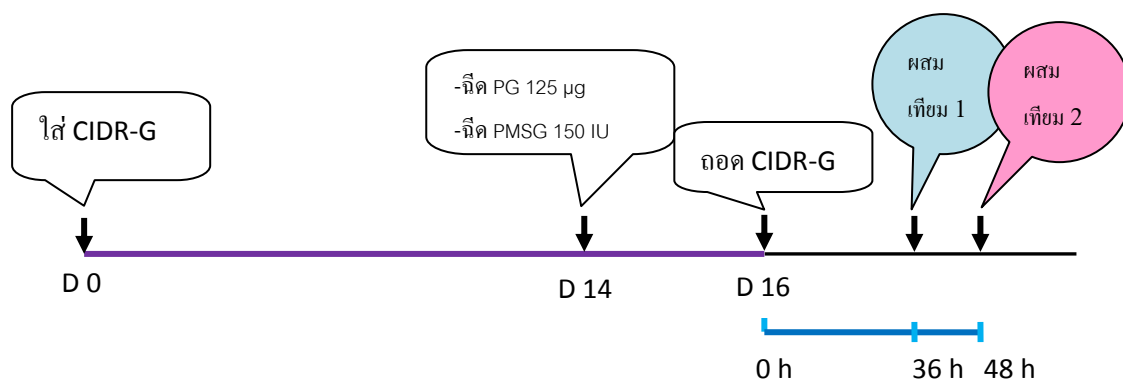
การทดลองที่ 1 แบ่งแพะออกเป็น 2 กลุ่มๆละ 30 ตัว ทั้งสองกลุ่มเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน CIDR-G เป็นเวลา 16 วัน กลุ่มที่ 1 ทำการฉีดฮอร์โมน PMSG ขนาด 150 IU (0.75 ml) พร้อมกับฉีดฮอร์โมน

พรอสตาแกลนดิน $\text{PGF}_{2\alpha}$ ขนาด 125 μg (0.5 ml) เข้ากล้ามเนื้อในวันที่ 14 กลุ่มที่ 2 ฉีดฮอร์โมน PMSG ขนาด 250 IU (1.25 ml) พร้อมกับฉีดฮอร์โมน $\text{PGF}_{2\alpha}$ ขนาด 125 μg (0.5 ml) เข้ากล้ามเนื้อในวันที่ 14 (รูปที่ 1) สังเกตการเป็นสัดหลังจากถอดฮอร์โมน โดยใช้ฟอแพะที่เบี่ยงเบนลิงค์แล้วตรวจสัด บันทึกเวลาที่แม่แพะขึ้นนั่งยอมให้ฟอแพะขึ้นจี



รูปที่ 1 โปรแกรมเหนี่ยวนำการเป็นสัด

การทดลองที่ 2 แบ่งแพะออกเป็น 2 กลุ่มๆละ 30 ตัว ทั้งสองกลุ่มเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน CIDR-G เป็นเวลา 16 วัน ทำการฉีดฮอร์โมน PMSG ขนาด 150 IU (0.75 ml) พร้อมกับฉีดฮอร์โมน $\text{PGF}_{2\alpha}$ ขนาด 125 μg (0.5 ml) เข้ากล้ามเนื้อในวันที่ 14 ทำการผสมเทียมแพะด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งขนาดหลอด 0.25 ml ความเข้มข้นของตัวอสุจิ 200 ล้านตัวต่อหลอด ปล่อยน้ำเชื้อที่บริเวณคอมดลูก กลุ่มที่ 1 ผสมเทียมแพะแบบกำหนดเวลาจำนวน 1 ครั้ง ในชั่วโมงที่ 36 หลังจากถอดฮอร์โมน CIDR-G กลุ่มที่ 2 ผสมเทียมแบบกำหนดเวลาจำนวน 2 ครั้ง ในชั่วโมงที่ 36 และ ชั่วโมงที่ 48 หลังจากถอดฮอร์โมน (รูปที่ 2) ทำการตรวจท้องด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ในวันที่ 45 หลังจากผสมเทียม บันทึกข้อมูลผลการตรวจท้อง นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติ เปรียบเทียบเวลาเฉลี่ยที่แพะแสดงอาการสัดขึ้นนั่งหลังจากถอดฮอร์โมน โดยใช้ Student's t-test และอัตราการผสมติด โดยใช้ chi – square test



รูปที่ 2 โปรแกรมเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมแบบกำหนดเวลา

การทดลองที่ 1 เปรียบเทียบผลการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย CIDR-G ร่วมกับ PMSG ในขนาดที่แตกต่างกัน คือใช้ PMSG ขนาด 150 IU และขนาด 250 IU พบว่าแพะทั้งสองกลุ่มแสดงอาการเป็นสัดทุกตัว (100%) โดยกลุ่มที่ 1 ระยะเวลาจากถอด CIDR-G จนถึงเป็นสัดขึ้นนิ่ง 29.05 ± 7.64 ชั่วโมง (mean $\pm$ SD) กลุ่มที่ 2 ระยะเวลา 23.46 ± 4.71 ชั่วโมง หลังจากถอด CIDR-G ซึ่งเร็วกว่ากลุ่มที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 1) การทดลองที่ 2 เปรียบเทียบผลการผสมเทียมแบบกำหนดเวลาระหว่างกลุ่มที่ 1 ผสมเทียมแพะจำนวน 1 ครั้ง หลังจากถอดสอดโมน CIDR-G แล้ว 36 ชั่วโมง และกลุ่มที่ 2 ผสมเทียมแพะจำนวน 2 ครั้ง หลังจากถอดสอดโมน CIDR-G แล้ว 36 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง พบว่า กลุ่มที่ 1 มีอัตราการผสมติด 13.33% กลุ่มที่ 2 มีอัตราการผสมติด 30.00% แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 แสดงการตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำการเป็นสัด และเวลาที่แสดงการเป็นสัดขึ้นนิ่งหลังถอด CIDR-G

กลุ่มทดลอง	จำนวนแพะที่เหนี่ยวนำ(ตัว)	จำนวนแพะที่แสดงอาการสัด (%)	ระยะเวลาจากถอด CIDR-G จนถึงแสดงอาการสัดขึ้นนิ่ง (ชั่วโมง)
PMSG 150 IU	30	30 (100)	29.05 ± 7.64^a (พิสัย 21.15 – 46.33)
PMSG 250 IU	30	30 (100)	23.46 ± 4.71^b (พิสัย 21.08 - 35.33)

^{a, b} ตัวอักษรที่ต่างกันในกลุ่มเดียวกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ค่าเฉลี่ยของระยะเวลา(ชั่วโมง) แสดงค่า mean $\pm$ SD

ตารางที่ 2 แสดงอัตราการผสมติดจากการผสมเทียม

กลุ่มทดลอง	จำนวน (ตัว)	อัตราการตั้งท้อง (%)	
ผสมเทียม 1 ครั้ง	30	13.33 (4/30)	
ผสมเทียม 2 ครั้ง	30	30.00 (9/30)	ผสมเทียม 1
ครั้ง หลังจากถอด CIDR-G แล้ว 36 ชั่วโมง			
ผสมเทียม 2 ครั้ง หลังจากถอด CIDR-G แล้ว 36 และ 48 ชั่วโมง			

วิจารณ์

จากผลการทดลองที่ 1 พบว่าการใช้ฮอร์โมน CIDR-G ร่วมกับฮอร์โมนPMSG ในขนาด 150 IU และขนาด 250 IU สามารถเหนี่ยวนำการเป็นสัดได้ผลเป็นอย่างดี โดยจะมีการตอบสนองต่อฮอร์โมนที่เหนี่ยวนำการเป็นสัดทุกตัว (100%) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของพีระพงษ์ และคณะ (ข) และ Romano (2004) ที่แพะเป็นสัดทุกตัวเช่นกัน ผลจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ระยะเวลาที่แสดงอาการเป็นสัดยืนนิ่งของแพะทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยกลุ่มที่ใช้ฮอร์โมน PMSG ขนาด 250 IU จะแสดงการเป็นสัดยืนนิ่งที่ 23.46 ± 4.71 ชั่วโมงหลังถอด CIDR-G เร็วกว่ากลุ่มที่ใช้ฮอร์โมน PMSG ขนาด 150 IU ซึ่งแสดงการเป็นสัดยืนนิ่งที่ 29.05 ± 7.64 ชั่วโมงหลังถอด CIDR-G ดังนั้นปริมาณของฮอร์โมน PMSG ที่ใช้น่าจะมีผลต่อเวลาที่แพะจะแสดงอาการสัดยืนนิ่งหลังจากสิ้นสุดโปรแกรมการเหนี่ยวนำ ซึ่งฮอร์โมน PMSG มีฤทธิ์เหมือนฮอร์โมน FSH และ LH ที่ช่วยให้ฟอลลิเคิลมีการเจริญและเกิดการตกไข่ขึ้น (Monika, 2002) การที่มีปริมาณ ฮอร์โมน PMSG ที่มากขึ้นจากการศึกษานี้ (250 IU เทียบกับ 150 IU) น่าจะไปเร่งการเจริญของฟอลลิเคิลให้มากขึ้น ส่งผลทำให้การเป็นสัดของแพะในกลุ่มที่ได้รับ PMSG 250 IU เกิดขึ้นเร็วกว่ากลุ่มที่ได้รับ PMSG 150 IU (29 ชั่วโมงเทียบกับ 23 ชั่วโมง, $P < 0.05$) การใช้ขนาด PMSG มากขึ้นอาจยังทำให้เวลาที่แพะแสดงอาการสัดเร็วขึ้น โดยมีรายงานที่สนับสนุนข้อสังเกตนี้ คือ เมื่อใช้ PMSG ขนาด 500 IU ร่วมกับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และ $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Dogan et al., 2005) ในโปรแกรมเหนี่ยวนำการเป็นสัดที่คล้ายกับการศึกษานี้ พบว่า แพะแสดงอาการสัดยืนนิ่ง เมื่อ 18-20 ชั่วโมงหลังจากสิ้นสุดโปรแกรมการเหนี่ยวนำ ขณะที่เมื่อใช้ PMSG ขนาด 200 IU ร่วมกับ CIDR-G (พีระพงษ์ และสาโรช, ติดต่อบุคคล) แพะจะแสดงอาการสัดยืนนิ่ง หลังถอด CIDR-G 32.5 ชั่วโมง และอัตราการเป็นสัด 92.9% แม้ว่าการใช้ PMSG จะสามารถช่วยเพิ่มการเจริญของฟอลลิเคิล และสามารถทำให้ระดับของ LH เพิ่มขึ้นมาก่อนการตกไข่ มีผลให้อัตราการตั้งท้องสูงขึ้นก็ตาม (Rahman et al., 2008; Robin et al., 1994) แต่การใช้ PMSG ซ้ำเพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะที่ผ่านการเหนี่ยวนำมาแล้วในรอบหนึ่งปี ก็มิได้ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของรังไข่ลดลงซึ่งเป็นข้อจำกัดของการใช้ PMSG (Baril et al., 2007)

จากผลการทดลองที่ 1 ที่พบว่ากลุ่มที่ใช้ฮอร์โมน PMSG ขนาด 150 IU และ 250 IU สามารถเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะได้ทุกตัวที่ใช้ในการศึกษานี้ จึงใช้ฮอร์โมน PMSG ขนาด 150 IU มาเป็นโปรแกรมในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในการทดลองที่ 2 เพื่อเป็นการประหยัดงบประมาณค่าฮอร์โมน ในการทดลองที่ 2 เปรียบเทียบอัตราการผสมติด จากการผสมเทียมแบบกำหนดเวลาโดยการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งจำนวน 2 ครั้งในชั่วโมงที่ 36 และชั่วโมงที่ 48 มีอัตราการผสมติด 30.00% ซึ่งมีแนวโน้มสูงกว่าการผสมเทียมแบบกำหนดเวลาโดยการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งจำนวน 1 ครั้งในชั่วโมงที่ 36 ที่มีอัตราการผสมติดเพียง 13.33% (ตารางที่ 2) แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะผสมในเวลาที่เหมาะสมเกินไป สำหรับการผสมเทียม 1 ครั้ง เพราะเมื่อพิจารณาพร้อมกับผลการทดลองที่ 1 แพะจะแสดงอาการสัดเมื่อ 29 ชั่วโมงหลังจาก

ถอด CIDR-G/ฉีด PMSG การที่ผสมเทียมที่ 36 ชั่วโมง หมายความว่า ผสมหลังเป็นสัดเพียง 7 ชั่วโมงดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่น้ำเชื้อจะมีโอกาสพบกับไข่ที่ตกน้อยลง สำหรับเวลาที่เหมาะสมในการผสมเทียมแพะ Rahman et al. (2008) แนะนำว่าควรผสมที่ 12 และ 24 ชั่วโมงหลังเป็นสัดขึ้นหนึ่ง ในกรณีการผสมเทียมแบบกำหนดเวลา และผสมครั้งเดียว ให้ผสมในช่วง 43-47 ชั่วโมง หลังถอดฮอร์โมนและถ้าผสมแบบ 2 ครั้งอาจผสมที่เวลา 48 และ 72 หลังถอดฮอร์โมน อย่างไรก็ตาม ผลการผสมเทียมของการศึกษาครั้งนี้ ใกล้เคียงกับรายงานของ Gacitua and Arav (2005) ที่ทดลองผสมเทียมแพะด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งในชั่วโมงที่ 32 และ 40 ในแม่แพะที่เหนียวนาการเป็นสัดด้วยฮอร์โมน CIDR-G ร่วมกับ PMSG และ $\text{PGF}_{2\alpha}$ โดยใช้น้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์สามตัว มีอัตราการตั้งท้อง 33, 37 และ 53% Dogan et al.(2008) รายงานการผสมเทียมแพะด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง จำนวน 1 ครั้ง โดยผสมชั่วโมงที่ 16 หลังจากเป็นสัดขึ้นหนึ่ง มีอัตราการผสมติดเฉลี่ย 33.33% (ทดลองในแพะพันธุ์ Turkish saanen) นิวตัน และคณะ 2550 รายงานการผสมเทียม ชั่วโมงที่ 48 และ 72 พบว่ามีอัตราการผสมติด 52% ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่เป็นสัดโดยธรรมชาติแล้วผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งหลังจากแสดงอาการเป็นสัดในชั่วโมงที่ 24 และชั่วโมงที่ 48 มีอัตราการผสมติด 35% พิระพงษ์ และคณะ (ติดต่อด่วนตัว) รายงานผลการผสมเทียมในชั่วโมงที่ 48 และ 60 พบว่ากลุ่มที่ใช้ PMSG 150 IU มีอัตราผสมติด 47% กลุ่มที่ใช้ PMSG 250 IU มีอัตราผสมติด 50% แตกต่างจากรายงานของ Romano (2004) ที่พบว่าเมื่อผสมเทียมแพะด้วยน้ำเชื้อสด ในชม.ที่ 12 และชม.ที่ 24 หลังเป็นสัดขึ้นหนึ่ง พบว่ากลุ่มที่ใช้ CIDR-G มีอัตราลูกเกิด 63%

จากข้อมูลข้างต้น จะเห็นว่ามีความแปรปรวนของการตอบสนองการเหนียวนาการเป็นสัดและการผสมเทียม ทั้งนี้ยังมีปัจจัย อีกมากที่มีผลต่อการเหนียวนาการเป็นสัด ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น น้ำหนัก สุขภาพ สายพันธุ์ (Whitley and Jackson, 2004; Estrada-Cortés et al., 2009) ซึ่งควรมีการศึกษาต่อไป เพื่อหาโปรแกรมการเหนียวนาการเป็นสัดที่เหมาะสมกับสภาพในพื้นที่ของประเทศไทย พร้อมทั้งให้ผลการผสมเทียมที่อยู่ในระดับที่ยอมรับได้

สรุป

ผลการศึกษาครั้งนี้ สรุปได้ว่า การใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน CIDR-G และ $\text{PGF}_{2\alpha}$ ร่วมกับ PMSG ขนาด 150 IU และขนาด 250 IU สามารถเหนียวนาการเป็นสัดได้ผลเป็นอย่างดี และการผสมเทียมแบบกำหนดเวลาจำนวน 2 ครั้งในชั่วโมงที่ 36 และชั่วโมงที่ 48 มีแนวโน้มอัตราการผสมติดสูงกว่าการผสมเทียมจำนวน 1 ครั้งในชั่วโมงที่ 36 หลังจากถอด CIDR-G/ฉีด PMSG อย่างไรก็ตาม อัตราการผสมเทียมจากการผสม 2 ครั้ง (30%) ยังไม่น่าพอใจนัก ดังนั้นต้องดำเนินการศึกษาเพิ่มเติม เพื่อเพิ่มอัตราการผสมติดในแพะ

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ นายสัตวแพทย์วรวิทย์ วราอัสวปดิ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและเทคโนโลยีชีวภาพนครราชสีมา ที่ให้การสนับสนุนด้านอุปกรณ์ วัสดุผสมเทียมแพะที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ขอขอบคุณ นายจักรกฤษณ์ จักรสัมฤทธิ์ สัตวแพทย์ ชำนาญงาน ที่ให้ความช่วยเหลือด้านการใส่ฮอร์โมน การผสมเทียมแพะและการติดตามผล และขอบคุณเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนและศูนย์วิจัยและเทคโนโลยีชีวภาพนครราชสีมา ที่อำนวยความสะดวกด้านประสานงาน จนทำให้การศึกษาครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- นิวัฒน์ ถาวระ อนนท์ เทื่องสันเทียะ และ บันลือ กล้าพูล. 2550. การเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย CIDR-G และ PGF_{2α} ร่วมกับ PMSG ต่ออัตราการผสมติดของแพะพันธุ์ซาแนน. ว.เทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ 2(1):1-7.
- พิระพงษ์ ตำราญทรัพย์ สาโรช งามจำ, อนนท์ เทื่องสันเทียะ และ ณรงค์ เลี้ยงเจริญ. ประสิทธิภาพการลดฮอร์โมน PMSG ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งในแพะ. (ติดต่อบทสนทนา)
- Baril, G., Remy, B., Vallet, J.C. and Beckers, J.F. 2007. Effect of Repeated Use of Progestagen-PMSG Treatment for Estrus Control in Dairy Goats out of Breeding Season. *Reproduction in Domestic Animals*. 27(3):161-168.
- Bongso, T.A., Fatimah, I. and Dass, S. 1982. Synchronisation of oestrus of goats treated with progestagen-impregnated intravaginal sponges and PMSG, and reproductive performance following natural mating or A.I. with frozen semen. 5(2):111-116.
- Bretzlaff, K.N. and Madrid, N. 1989. Clinical use of Norgestomet ear implants or intravaginal pessaries for synchronization of estrus in anestrus dairy goats. *Theriogenology*. 24(2):419-423.
- Dogan, I., Nur, Z., Gunay, U., Sagirkay, H., Soylu M.K. and Sonmez, C. 2005. Estrous synchronization during the natural breeding season in Anatolian black does. *Vet. Med. – Czech (1)*: 33–38.
- Dogan, I., Konyali, A., Gunay, U. and Yurdabak, S. 2008. Comparison of the effect of cronolone sponges and PMSG or cloprostenol on estrous induction in Turkish Saanen goats. *Pol j vet sci*. 11(1): 29-34.

- Estrada-Cortés, E., Vera-Avila, H.R., Urrutia-Morales, J., Villagómez-Amezcu, E., Jiménez-Severiano, H., Mejía-Guadarrama, C.A., Rivera-Lozano, M.T. and Gámez-Vázquez, H.G. 2009. Nutritional status influences reproductive seasonality in Creole goats: 1. Ovarian activity during seasonal reproductive transitions. *Anim Reprod Sci.* 116(3-4): 282-290.
- Gacitua, H. and Arav, A. 2005. Successful pregnancies with directional freezing of large volume buck semen. *Theriogenology.* 63(3):931-938.
- Monika, P. 2002. *Caprine Reproduction, Compendium of Animal Reproduction* .7th edition. Intervet international. 322 pp.
- Rahman, A.N.M.A., Abdullah, R.B. and Wan-Khadijah, W.E. 2008. Estrus Synchronization and superovulation in Goats:A review.*J.Biological Sciences.* 8(7):1129-1137.
- Robin, N., Laforest, J., Lussier, J. and Guilbault, L.1994. Induction of estrus with intramuscular injections of GnRH or PMSG in lactating goats (*Capra hircus*) primed with a progestagen during seasonal anestrus. *Theriogenology.* 42(1):107-116.
- Romano, J.E. 2004. Synchronization of estrus using CIDR, FGA or MAP intravaginal pessaries during the breeding season in Nubian goats.2004. *Small Rumin Res.* 55(1):15-19.
- Waldrona, D.F., Willingham, T.D., Thompson and Bretzlaff K.N.1999. Effect of concomitant injection of prostaglandin and PMSG on pregnancy rate and prolificacy of artificially inseminated Spanish goats synchronized with controlled internal drug release devices. *Small Rumin Res.*31(2):177-179.
- Whitley, N.C. and Jackson, D.J. 2004. .An update on estrus synchronization in goats: a minor species.*J .Anim Sci* .82:E270-E276.
- Wildeus, S. 2000.Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats. *Proceedings of the American Society of Animal Science* .p:1-14.

ขนาดและวิธีการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมนพรอสตาแกลนดินเอฟทูแอลฟา ในแพะพื้นเมืองไทย

ชาญยุทธ กาพล^{1*} ณรงค์ เบญจกุล² และ จิตศักดิ์ เมืองเขียว¹

¹ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสุราษฎร์ธานี อ.พุนพิน จ.สุราษฎร์ธานี 84130

²สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดกระบี่ อ.เมือง จ.กระบี่ 81000

บทคัดย่อ

ผลของขนาดและวิธีการเพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมนพรอสตาแกลนดินเอฟทูแอลฟา ($\text{PGF}_{2\alpha}$) ในแม่แพะพื้นเมืองไทยของเกษตรกรรายย่อยใน จังหวัดสุราษฎร์ธานี จำนวน 5 ฟาร์มโดยแม่แพะผ่านการคลอดลูกมาแล้วอย่างน้อย 1 ครอก มีสุขภาพสมบูรณ์ ผ่านการตรวจโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์ - การเลี้ยงดูและการให้อาหารใกล้เคียงกัน จำนวน 56 ตัว-ในแต่ละฟาร์มสุ่มแม่แพะเป็น 3 กลุ่ม โดยทั้ง 3 กลุ่มได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมน $\text{PGF}_{2\alpha}$ 2 ครั้งห่างกัน 11 วัน โดยแม่แพะกลุ่มที่ 1 จำนวน 18 ตัว กลุ่มที่ 2 จำนวน 19 ตัว ฉีด $\text{PGF}_{2\alpha}$ ขนาด 125 และ 62.5 ไมโครกรัม ตามลำดับ เข้ากล้ามเนื้อและแม่แพะกลุ่มที่ 3 ฉีด $\text{PGF}_{2\alpha}$ ขนาด 62.5 ไมโครกรัม เข้าใต้เยื่อเมือกปากช่องคลอด ตรวจการเป็นสัดด้วยแพะพ่อพันธุ์ที่ตัดท่อนำน้ำเชื้อ ในช่วงวันที่ 36 และ 48 หลังฉีด $\text{PGF}_{2\alpha}$ ครั้งที่ 2 และผสมเทียม 2 ครั้งในช่วงวันที่ 36 และ 48 ตรวจการตั้งท้องหลังการผสมเทียม 45 วัน ด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ ผลการศึกษาพบว่าแม่แพะทั้ง 3 กลุ่มมีการเป็นสัดในช่วงวันที่ 36 ไม่แตกต่างกันคือ 83.33 %, 73.68 % และ 78.95 % ตามลำดับ และในช่วงวันที่ 48 ไม่แตกต่างกันคือ 94.44 %, 78.95 % และ 84.21 % ตามลำดับ เปอร์เซ็นต์การเป็นสัดในช่วงวันที่ 36 กับช่วงวันที่ 48 ของแพะพื้นเมืองทั้ง 3 กลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) และของแม่แพะทั้งหมดมีอัตราการเป็นสัดโดยเฉลี่ยเท่ากับ 85.87 % และผลการตรวจท้องหลังผสมเทียม 45 วัน แม่แพะพื้นเมืองทั้ง 3 กลุ่มไม่ตั้งท้อง

คำสำคัญ : การเหนี่ยวนำการเป็นสัด แพะพื้นเมืองไทย Estrous synchronization, Thai native goats

เลขทะเบียนผลงานวิจัย. 52(1)-0208-086

*ผู้รับผิดชอบบทความ

Methods of Induction and Dosages of PGF_{2α} on Estrous Synchronization in Thai Native goats

Chanyuth Kapol^{1*} Narong Benjakul² and Jitsak Muangkaew¹

¹ Surattani Artificial Insemination and Biotechnology Research Center

² Nakhonratchasima Provincial Livestock Office

Abstract

The objective of this study was to determine the methods of induction and dosages of PGF_{2α} on estrous synchronization in Thai native goats. Fifty six does from 5 different farms in Surattani province were subjected for the study. These 5 farms maintained similar farm management and all 56 does were fertile with kidding history. Does were randomly divided into 3 groups. Group 1: 18 does were treated with PGF_{2α} 125μg.,I/M, twice, first injection was on day 0 and the second was on day 11. Group 2: 19 does were treated with PGF_{2α} 62.5μg.,I/M, twice, similarly to group 1. Group 3: 19 does were treated with PGF_{2α} 62.5μg.,svmc, twice, similarly to group 1. All does were estrous checked by a vasectomized buck at 36 and 48 hours after the last PGF_{2α} injection. They were all artificially inseminated(AI) at 36 and 48 hours after the last PGF_{2α} injection. Ultrasonographic pregnant check were performed on all does at 45 days after AI. The results showed no significant difference on estrous of all does (in 3 groups) at 36 hours, 83.33 %, 73.68 % and 78.95 %, respectively. There was also no significant difference on estrous of all does (in 3 groups) at 48 hours, 94.44 %, 78.95 % and 84.21 %, respectively. Estrous between group 3 and 4 was non-significant (P>0.05). The average of estrous of all does was 85.87 %. Ultrasonographic scanning did not show any pregnancies of all does.

Keywords: Estrous synchronization, Thai native goats

Research project no. 52(1)-0208-086

*corresponding author

บทนำ

แพะเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่กำลังนิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายเพราะเลี้ยงง่าย กินอาหารได้หลายชนิดต้นทุนการเลี้ยงต่ำ สามารถให้ลูกได้เร็ว และให้ลูกได้หลายครอกในชั่วชีวิต และยังทนทานต่อสภาพแวดล้อมของประเทศไทยและประเทศเขตร้อนได้เป็นอย่างดี จากสถิติจำนวนแพะในประเทศไทยของกรมปศุสัตว์ปี 2551 (ประมวลสถิติประจำปี 2551, กรมปศุสัตว์) มีจำนวนแพะทั้งประเทศประมาณ 374,029 ตัว จากเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะประมาณ 33,183 ราย โดยเฉพาะในพื้นที่ภาคใต้นิยมเลี้ยงแพะพันธุ์พื้นเมืองซึ่งมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ เกษตรกรส่วนใหญ่นิยมเลี้ยงแบบปล่อยให้หากินเองตามธรรมชาติ (สมเกียรติ, 2528) ปัจจุบันยังมีจำนวนแพะไม่เพียงพอ จึงมีแนวโน้มที่เกษตรกรจะเลี้ยงแพะเพิ่มขึ้นและมีการพัฒนาการเลี้ยงการจัดการรวมทั้งการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้แพะพันธุ์ที่มีผลผลิตสูง ปัญหาและข้อจำกัดของการปรับปรุงพันธุ์แพะของเกษตรกรคือจำนวนพ่อพันธุ์แพะที่มีคุณภาพดีมีจำนวนจำกัด และไม่เพียงพอกับความต้องการของเกษตรกรและปัญหาโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์ เช่น โรคแท้งติดต่อ โรคข้อและสมองอักเสบ เป็นต้น รวมทั้งการใช้พ่อพันธุ์ตัวเดิมคุมฝูงเป็นเวลานาน มักจะพบปัญหาการผสมเลือดชิด ดังนั้น ถ้านำเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์อันได้แก่การเหนี่ยวนำการเป็นสัด และการผสมเทียม มาใช้ในการปรับปรุงและขยายพันธุ์แพะ จะช่วยให้การปรับปรุงพันธุ์แพะในภูมิภาคเป็นไปได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและเป็นการลดต้นทุนของเกษตรกรด้วย

การผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งเป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายมากที่สุดในปศุสัตว์ ซึ่งสามารถเร่งกระจายพันธุ์สัตว์ที่มีพันธุกรรมดีข้างพ่อได้อย่างรวดเร็วที่สุดและราคาถูกที่สุด (Baldassarre and Karatzas, 2004) สำหรับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดเพื่อการผสมเทียมในแพะนั้นมีหลายวิธีและใช้ฮอร์โมนหลายชนิดอาจจะใช้ฮอร์โมนชนิดเดียว หรือใช้ฮอร์โมนร่วมกันหลายชนิด และมีหลายรูปแบบทั้งให้โดยการฉีด, แบบสอดช่องคลอด, แบบฝังใบหู และแบบผสมอาหาร เช่น การใช้ฮอร์โมน Flurogestone acetate intravaginal sponges (FGA) สอดช่องคลอดนาน 11 วัน ก่อนถอด FGA 48 ชั่วโมง ฉีดฮอร์โมน Pregnant Mare Serum Gonadotrophin (PMSG) 400 iu. และ ProstaglandinF_{2α} (PGF_{2α}) 50 มก. ทำให้แพะแสดงอาการเป็นสัด 93.8% และ อัตราการผสมติดเท่ากับ 87.5% (Freitas et al., 1996) Umberger et al. (1994) รายงานการใช้ Melengestrol acetate (MGA) ขนาด 0.3 มก.ต่อวัน ผสมอาหารให้แพะกินติดต่อกัน 10 วัน สามารถเหนี่ยวนำให้แพะแสดงอาการเป็นสัด 57.0% มีอัตราผสมติด 64.0% และ Jabbar et al. (1994) ฉีดฮอร์โมน PMSG 400 iu. และ Human Chorionic Gonadotrophin (hCG) 200 iu. ในวันที่หยุดให้ MGA พบว่าแพะแสดงการเป็นสัด 13-20% และมีอัตราผสมติด

26-50% Ritar et al.(1989) ศึกษาการใช้ Controlled Internal Drug Releasing Device (CIDR-G) สอดช่องคลอดนาน 16-20 วัน ก่อนถอด CIDR-G 48 ชั่วโมงและในวันที่ถอด CIDR-G ฉีด PMSG 200 iu พบว่าแพะแสดงการเป็นสัด 95% และ 55% ตามลำดับ หรือฉีด PMSG 200-400 iu. ในวันที่ถอด CIDR-G แพะแสดงการเป็นสัด 92% (Ritar et al.,1994)

สำหรับฮอร์โมน $\text{PGF}_{2\alpha}$ อาจจะใช้ร่วมกับฮอร์โมนชนิดอื่น เช่นการศึกษาของ Greyling and van Niekerk (1986) ฉีด $\text{PGF}_{2\alpha}$ ขนาด 62.5, 125 และ 250 μg . 2 ครั้งห่างกัน 14 วัน แพะแสดงการเป็นสัด 93.8%, 87.5% และ 100% ตามลำดับ หรือการใช้ $\text{PGF}_{2\alpha}$ ร่วมกับ Methyl acetoxo progesterone intravaginal sponge (MAP) โดยสอด MAP ในช่องคลอดนาน 5 วันและฉีด $\text{PGF}_{2\alpha}$ ขนาด 125 μg . ในวันที่ถอด MAP แพะแสดงการเป็นสัด 52.9% (Beck et al.,1993) Mgongo.(1987) รายงานเปรียบเทียบการใช้ $\text{PGF}_{2\alpha}$ ขนาด 125 μg . ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ ขนาด 62.5 μg . ฉีดเข้าได้เยื่อเมือกปากช่องคลอด (Intravulvosubmucosal :ivsm) และขนาด 62.5 μg . ฉีด ivsm ร่วมกับการสัมผัสกับพ่อแพะ พบว่าแพะแสดงการเป็นสัดภายใน 68 ชั่วโมงหลังฉีดไม่แตกต่างกันทั้งสามกลุ่ม

แต่ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการใช้ฮอร์โมน $\text{PGF}_{2\alpha}$ ในขนาดที่น้อยกว่าขนาดแนะนำฉีดเข้าได้เยื่อเมือกปากช่องคลอด (Intravulvosubmucosal :ivsm) ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดเพื่อการผสมเทียม ดังนั้น การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาขนาดและวิธีการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะที่เหมาะสม เพื่อให้การผสมเทียมประสบความสำเร็จ

อุปกรณ์และวิธีการ

โดยใช้วิธีการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมน $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Estrumate[®]; Cloprostenal ,Schering-Plough Animal Health) ในขนาดที่แตกต่างกันคือ 125 μg . และ 62.5 μg . ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ และฉีดเข้าชั้นได้เยื่อเมือกของปากช่องคลอด

แพะทดลอง เป็นแม่แพะพันธุ์พื้นเมืองไทย ผ่านการคลอดลูกมาแล้วอย่างน้อย 1 ครอก มีสุขภาพสมบูรณ์ ผ่านการตรวจโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์ แม่แพะทั้งหมดได้รับการเลี้ยงดูและการให้อาหารที่ใกล้เคียงกันในฟาร์มของเกษตรกรรายย่อยในพื้นที่ จังหวัดสุราษฎร์ธานี จำนวน 5 ฟาร์ม ๆ ละ 12 ตัว รวมจำนวน 60 ตัว ระหว่างเดือน มกราคม – สิงหาคม 2552

วิธีการ แบ่งแม่แพะในแต่ละฟาร์มแบบสุ่ม (random sampling) ออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 4 ตัว รวมกลุ่มทดลองละ 20 ตัว

แม่แพะกลุ่มที่ 1. ได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นสัด โดยการฉีดฮอร์โมน $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Estrumate® ; Cloprostenal ,Schering-Plough Animal Health) ขนาด 125 μg . เข้ากล้ามเนื้อ (im) 2 ครั้งห่างกัน 11 วัน และผสมเทียม 2 ครั้ง ในชั่วโมงที่ 36 และ 48 หลังการฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 2

แม่แพะกลุ่มที่ 2. ได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นสัด โดยการฉีดฮอร์โมน $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Estrumate® ; Cloprostenal ,Schering-Plough Animal Health) ขนาด 62.5 μg . เข้ากล้ามเนื้อ (im) 2 ครั้งห่างกัน 11 วัน และผสมเทียม 2 ครั้ง ในชั่วโมงที่ 36 และ 48 หลังการฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 2

แม่แพะกลุ่มที่ 3. ได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นสัด โดยการฉีดฮอร์โมน $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Estrumate® ; Cloprostenal ,Schering-Plough Animal Health) ขนาด 62.5 μg . เข้าได้เยื่อเมือกปากช่องคลอด 2 ครั้งห่างกัน 11 วัน และผสมเทียม 2 ครั้งในชั่วโมงที่ 36 และ 48 หลังการฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 2

แม่แพะทุกตัวได้รับการตรวจการเป็นสัดโดยใช้แพะพ่อพันธุ์ที่ตัดท่อน้ำเชื้อและสังเกตจากอาการกระดิกหาง และยืนนิ่งเมื่อแพะพ่อพันธุ์ขึ้นทับ ในชั่วโมงที่ 36 และ 48 หลังฉีด $\text{PGF}_{2\alpha}$ ครั้งที่ 2 โดยใช้แพะพ่อพันธุ์ที่ตัดท่อน้ำเชื้อหนึ่งตัวต่อหนึ่งฟาร์มตลอดระยะเวลาการวิจัย ทำการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่เป็นน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ตัวเดียวกัน โดยเจ้าหน้าที่ผสมเทียมคนเดียวกัน ตรวจการตั้งท้องหลังผสมเทียม 45 วันด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ Shenzhen Well.D Electronics รุ่น WED-3000 เก็บรวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับการตอบสนองการเป็นสัดและการผสมติด และวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ Chi – square test

ผลและวิจารณ์

ตารางที่ 1 การเป็นสัดของแม่แพะพื้นเมืองในชั่วโมงที่ 36 และ 48

กลุ่มแพะ	จำนวนแพะที่เป็นสัด/จำนวนแพะทั้งหมด	
	ชั่วโมงที่ 36	ชั่วโมงที่ 48
กลุ่มที่1 (n = 18)	15/18	17/18
กลุ่มที่2 (n = 19)	14/19	15/19
กลุ่มที่3 (n = 19)	15/19	16/19
รวม 3 กลุ่ม n = 56	44/56	48/56

หมายเหตุ : แม่แพะพื้นเมืองจำนวน 4 ตัว มีปัญหาทางด้านสุขภาพ จึงไม่นำข้อมูลมาใช้ในการวิเคราะห์นี้

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า เปอร์เซ็นต์ของการเป็นสัดจากการเหนี่ยวนำด้วยฮอร์โมนโปรสตา-แกลนดิน เอฟทูแอลฟา ($\text{PGF}_{2\alpha}$) ทั้ง 3 กลุ่ม ในช่วงเวลาที่ 36 มีค่าเท่ากับ 83.33 , 73.68 และ 78.65 % ตามลำดับ และช่วงเวลาที่ 48 มีค่าเท่ากับ 94.44 , 78.95 และ 84.21 % ตามลำดับ (ตารางที่1) ผลการทดสอบค่าทางสถิติด้วยไค-สแควร์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเป็นสัดของแพะพื้นเมืองทั้ง 3 กลุ่มในช่วงเวลาที่ 36 กับช่วงเวลาที่ 48 พบว่าไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) และเมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การเป็นสัดของแม่แพะทั้งหมดเมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่ามีความเฉลี่ยเป็น 85.87 % โดยเปอร์เซ็นต์การเป็นสัดจากการเหนี่ยวนำด้วยฮอร์โมน $\text{PGF}_{2\alpha}$ ครั้งนี้มีค่าใกล้เคียงกับรายงานของทองเจือ (2545) เท่ากับ 85.71 % และ Ogunbiyi et al.(1980) เท่ากับ 84 % แต่ต่ำกว่างานทดลองของ Karikari et al.(2009) เท่ากับ 88.20 % , Ott et al.(1980a) มีค่าเท่ากับ 94.00 % , Ishwar and Pendey (1990) เท่ากับ 100 % ตามลำดับ ทั้งนี้สาเหตุที่แตกต่างน่าจะมาจากขนาดการใช้ฮอร์โมนที่แตกต่างกันที่มีตั้งแต่ 2.5 – 8.0 มิลลิกรัม รวมทั้งอาจมีสาเหตุอื่นบางประการที่ทำให้ค่านี้มีความแตกต่างกันออกไป เช่น พันธุ์แพะ การจัดการด้านโภชนาการ อายุ ฤดูกาล และสถานที่ทำการทดลอง เป็นต้น (Whitley and Jackson, 2004)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่าเฉลี่ยของการเป็นสัดต่อขนาดและวิธีการเหนี่ยวนำด้วยฮอร์โมนทั้ง 3 กลุ่มในแม่แพะพื้นเมือง พบว่าในช่วงเวลาที่ 48 (85.87 %) สูงกว่าในช่วงเวลาที่ 36 (78.65 %) เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับ Karikari et al. (2009) ที่เหนี่ยวนำด้วยฮอร์โมน $\text{PGF}_{2\alpha}$ 62.5 μg . 2 ครั้ง (ห่างกัน 11 วัน) พบว่าเปอร์เซ็นต์การเป็นสัดของแพะพันธุ์ African Dwarf ในช่วงเวลาที่ 36 (2.5 %) และในช่วงเวลาที่ 48 (25%) มีทิศทางแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น แม้ว่าเปอร์เซ็นต์การเป็นสัดเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองนี้จะมีความแตกต่างค่อนข้างมากก็ตาม นอกจากนี้แม่แพะพื้นเมืองที่ไม่ตอบสนองต่อฮอร์โมนโปรสตา-แกลนดินเอฟทูแอลฟา ($\text{PGF}_{2\alpha}$) ทั้ง 3 กลุ่มในครั้งนี้ เป็น 1,4 และ 3 ตัว ตามลำดับ หรือ 7 ตัวจาก 56 ตัว คิดเป็น 12.50 % ใกล้เคียงกับของ Karikari et al. (2009) ที่ 11.80 % ทั้งนี้ Freitas et al.,(1997) อธิบายว่าการเป็นสัดที่แตกต่างจากการเหนี่ยวนำนี้นั้นสืบเนื่องมาจากความสามารถเฉพาะรายตัวของแต่ละตัวในธรรมชาติที่ตอบสนองระดับของเอสโตรเจน ณ จุดสูงสุด (oestradiol peak) ที่แตกต่างกัน

สำหรับอัตราการผสมติดในการศึกษาครั้งนี้เท่ากับ 0 % เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับรายงานของ อุดมและคณะ (2534) ที่ชักนำการเป็นสัดในแพะด้วย $\text{PGF}_{2\alpha}$ 2 ครั้งห่างกัน 10 วัน ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง และแยกพ่อพันธุ์ไม่ให้อยู่ร่วมในกลุ่มแม่พันธุ์โดยกลุ่มที่ 1 ผสมเทียมในช่วงเวลาที่ 10 - 14 และกลุ่มที่ 2 ผสมเทียมในช่วงเวลาที่ 22 – 26 หลังเป็นสัด พบว่าไม่มีแม่แพะผสมติดเลย ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ก็ไม่มีพ่อพันธุ์อยู่ร่วมในกลุ่มแม่พันธุ์ทั้ง 3 กลุ่ม นับเป็นที่น่าสนใจเกี่ยวกับการผสมเทียมแพะที่เหนี่ยวนำด้วย $\text{PGF}_{2\alpha}$ เพียงอย่างเดียวโดยไม่มีพ่อพันธุ์เป็นตัวกระตุ้นอาจเป็นสาเหตุสำคัญประการหนึ่งซึ่งอาจส่งผลให้การผสมเทียมไม่ติดได้ ต่างกับที่

ทองเจือ (2545) ที่ใช้พื้พันธุ์คุมฝูง และผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ ได้รายงานว่าการเหนี่ยวนำด้วย $\text{PGF}_{2\alpha}$ 2 ครั้ง ห่างกัน 12 วัน พบว่า มีอัตราการผสมติดในแพะสาวและแพะนางเป็น 70 และ 58.33 % ตามลำดับ ซึ่ง Wildeus (1999) อธิบายถึงอิทธิพลของแพะเพศผู้ (male effect) สามารถชักนำการเป็นสัดในแม่แพะที่ไม่มีวงรอบการเป็นสัดและยังส่งผลกระทบต่ออัตราการตกไข่ของแพะเพศเมียได้ นอกจากนี้สาเหตุที่ผสมเทียมไม่ติดในครั้งนี้อาจเกิดจากอิทธิพลของฮอร์โมน $\text{PGF}_{2\alpha}$ ตามที่ อุดม และคณะ (2534) อ้างถึง Fairmie et al.(1997) ที่กล่าวว่า การใช้พรอสตาแกลนดินเอฟทูแอลฟา มีผลกระทบต่อระดับโปรเจสเตอโรนในร่างกายสัตว์ ทำให้การผสมติดไม่ดี เนื่องมาจากการฝังตัวของตัวอ่อนไม่ดี และเกิดความล้มเหลวในการเดินทางของอสุจิ สอดคล้องกับ ฟิรศักดิ์ (2528) ที่กล่าวว่า การผสมติดในแพะที่ใช้พรอสตาแกลนดินเอฟทูแอลฟาเพียงชนิดเดียวไม่ค่อยได้ผลดี

ตารางที่ 2 ลักษณะภายในช่องคลอดขณะทำการผสมเทียมในชั่วโมงที่ 36 และ 48

ข้อมูล	เปอร์เซ็นต์ของลักษณะภายในช่องคลอด (ตัว)	
	ชั่วโมงที่ 36	ชั่วโมงที่ 48
เมือกใส	75 (27/36)	80.55 (29/36)
เมือกใสปนขุ่นข้น	19.44 (7/36)	16.66 (6/36)
ไม่มีเมือก	5.55 (2/36)	2.77 (1/36)
ปากคอมดลูกเปิด	88.88 (32/36)	97.22 (35/36)
ปากคอมดลูกปิด	11.11 (4/36)	2.77 (1/36)

จากตารางที่ 2 เป็นการศึกษาเพิ่มเติมโดยทำการบันทึกขณะทำการผสมเทียมทั้ง 2 ครั้ง ซึ่งพิจารณาเฉพาะแม่แพะที่เป็นสัดและทำการผสมเทียม โดยได้บันทึกข้อมูลที่ครบถ้วนเท่านั้น จากข้อมูลทั้ง 3 กลุ่มการทดลอง กลุ่มละ 12 ตัว รวมทั้งหมดเป็น 36 ตัว ที่บันทึกโดยเจ้าหน้าที่ผสมเทียม พบว่า ในชั่วโมงที่ 36 และ 48 ลักษณะเมือกที่ปรากฏแบ่งได้ 3 ลักษณะ ดังนี้ คือ 1) เมือกใส 2) เมือกใสปนขุ่นข้น (สีขาวแกมเหลือง) และ 3) ไม่มีเมือก โดยมีจำนวนแม่แพะพื้นเมืองเป็น 27, 7, 2 และ 29, 6, 1 ตัว ตามลำดับ ขณะที่ลักษณะของปากคอมดลูกที่พบของแม่แพะที่ผสมเทียมมี 2 ลักษณะ คือ 1) ปากคอมดลูกเปิด และ 2) ปากคอมดลูกปิด โดยในชั่วโมงที่ 36 และ 48 มีปากคอมดลูกเปิดและปิดเป็น 32, 4 และ 35, 1 ตัว ตามลำดับ

สรุป

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงว่าการใช้ $\text{PGF}_{2\alpha}$ ขนาด 62.5 μg . เข้าได้เมื่อเปิดปากช่องคลอด สามารถเหนี่ยวนำให้แม่แพะพื้นเมืองไทยแสดงอาการเป็นสัดได้ไม่ต่างจากขนาดที่แนะนำ (125 μg . เข้ากลัมน้ำ เมื่อพิจารณาถึงอัตราการผสมติดโดยการกำหนดเวลาการผสมเทียม พบว่าแม่แพะทั้ง 3 กลุ่มผสมไม่ติด ดังนั้นการใช้ $\text{PGF}_{2\alpha}$ เหนี่ยวนำการเป็นสัดเพื่อการผสมเทียมในแม่แพะพื้นเมืองไทยควรพิจารณาใช้ฮอร์โมนชนิดอื่นร่วมด้วยเพื่อให้อัตราการผสมติดดีขึ้น ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้ดำเนินการวิจัยขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์วิบูลย์ เยี่ยงวิศวกร คุณจรีรัตน์ แสนโกชน นักวิชาการสัตวบาลชำนาญการพิเศษ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ที่ให้คำปรึกษาและตรวจแก้ไขต้นฉบับในการศึกษาวิจัยนี้ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสุราษฎร์ธานี ที่ช่วยในการปฏิบัติงานและรวบรวมติดตามข้อมูล ทำให้การศึกษานี้สำเร็จด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- ทองเจือ แดงชื่น.2545.สมรรถภาพทางการสืบพันธุ์ในแพะที่ชักนำการเป็นสัดด้วย prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$).วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์.81 หน้า.
- ประมวลสถิติประจำปี 2551, กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- พิรศักดิ์ สุทธิโยธิน.2528.การผสมเทียม : ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- สมเกียรติ สายธนู.2528. การเลี้ยงแพะ.สงขลา : ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อุดม ช่างสุพรรณ ประสิทธิ์ ถนอมคุณ บุญเสริม ชีวะอิสระกุล บุญญวัฒน์ สนิทวงศ์ 2534 ผลของช่วงระยะเวลาผสมและการชักนำการเป็นสัดต่ออัตราการผสมติดในแพะที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง.ในการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 29: รายงานผลการวิจัยสาขาสัตว สัตวแพทยศาสตร์ ประมง 4-7 กุมภาพันธ์ 2534. กรุงเทพฯ, 2534, หน้า 437-442 (574 หน้า)

- Baldassarre, H. and Karatzas, C.N. 2004. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. Anim. Reprod. Sci. [on-line] doi: 10.1016/j.anireprosci.2004.04.027
- Beck,N.FG., Davies, B. and S.P. Williams.1993. Oestrous synchronization in ewes-the effect of combining a prostaglandin analogue with a 5-days progestagen treatment. Anim. Prod. 56:207-210
- Freitas,V.J.F., Baril, G. and Saumande, J. 1996. Induction and synchronization of estrus in goats:The ime relative efficiency of one versus two fluorogestone acetate-impregnated vaginal sponges.Theriogenology. 46:1251-1256
- Freitas,V.J.F., Freitas, G.B., martin, G.B. and Saumande, J. 1997. Physiological limits to further improvement in the efficalcy of oestrus synchronization in goats.Reproduction Fertility and Development.9(5) : 551 - 556
- Greyling,J.P.C. and van Niekerk. 1986. Synchronized of estrus in the Boer goat doe: Does effect of prostaglandin in the double injection regime. S.Afr. J. Anim. 16:146-150
- Ishwar, A.K.and Pandey, J.N.1990.Estrous synchronization and fertility in Black Bengal goats following adminration of progesterone prostaglandin and gonadotropins. Res. Vet. Sci.52:141-146
- Jabbar, G. , Umberger, S.H. and G.S.Lewis.1994. Melengestrol acetate and norgestomet for the induction of synchronized estrus in seasonally anovular ewes. J.Anim. Sci.72:3049-3054
- Karikari, P.K., Blasu, E.Y. and Osafo, E.L.K. 2009. Reproductive response of West African Dwarf does to prostaglandin administration.World Applied Science Journal. 6(4):542 – 545
- Mgongo, F.O.K.1987.Does of prostaglandin analogue cloprosterol by intravulva submucosal (IVSM) injections effective for the induction of estrus in goats. Anim. Repro.Sci.14:139-146
- Ogunbiyi,P.O., Molokwu, E.C.T. and Sooriyamorty, T.1980. Estrous synchronization and controlled breeding in goats using prostaglandin $F_{2\alpha}$. Theriogenology.13:257 – 261
- Ott,R.S.M, Nelson, D.R. and Hixon, J.E.1980a. Fertility of goats following synchronization of estrus with prostaglandin $F_{2\alpha}$. Theriogenology.13:341-345
- Ritar, AJ , Ball, P.D. and O'May,P.J. 1989. Artificial insemination of Cashmere goats: effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, semen freezing process, number of motile spermatozoa and age of females. Reproduction, Fertility and Development 2(4) 377 - 384
- Ritar, A..J., Robertson, J.A. and Evans, G.1994. Ovulatory activity, hormonal induction of ovulation and fertility of young Cashmere and Angora female goats in a temperate environment. Reproduction, Fertility and Development, Vol. 6: 737-747

- Umberger ,S.H., Jabber, G. and Lewis, G.S.1994.Seasonally anovulatory ewes fail to respon to progestogen treatment in the absence of gonadotropin stimulation. *Theriogenology*.42:1329-1336
- Whitley,N.C. and Jackson, D.J.2004. An update on estrus synchronization in goats: A minor spicies. *J.Anim. Sci.* 82:E270-E276
- Wildeus ,S. 1999.Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats.Proceedings of America society of Animal Science. [on-line]

การศึกษาภาวะสุขภาพและอัตราการเจริญเติบโตของลูกแพะที่เกิดจาก

วิธีการย้ายฝากตัวอ่อนและวิธีธรรมชาติ

สายใจ ชื่นสุข^{1*} มาลี อภิเมธีธำรง¹ อนนท์ เทื่องสันเทียะ² บันลือ กล่ำพลู² และ ณรงค์ เลียงเจริญ²

¹กลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีย้ายฝากตัวอ่อน ปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

บทคัดย่อ

เทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อน (Embryo transfer; ET) ได้มีการพัฒนาให้ทันสมัยขึ้น เมื่อนำมาใช้ร่วมกับการผสมเทียมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการที่จะช่วยในการปรับปรุงพันธุ์กรรมสัตว์ให้มีคุณภาพดี การวิเคราะห์ด้านสุขภาพสัตว์โดยการตรวจค่าทางโลหิตวิทยา ชีวเคมีและเอ็นไซม์ในเลือด ประสิทธิภาพ ตลอดจนอัตราการเจริญเติบโตในแพะที่เกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อนจะสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานและวิเคราะห์ถึงผลที่อาจเกิดขึ้นกับและมีผลต่อคุณภาพสุขภาพของสัตว์เมื่อเปรียบเทียบกับแพะที่เกิดโดยวิธีทางธรรมชาติ จากการศึกษาลูกแพะที่เกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อนจำนวน 32 ตัว และลูกแพะที่เกิดโดยวิธีทางธรรมชาติเมื่ออายุ 26 และ 10 สัปดาห์ พบว่า ลูกแพะที่เกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อนมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยขณะสิ้นสุดโครงการมากกว่าลูกแพะที่เกิดโดยวิธีทางธรรมชาติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ปริมาณโปแตสเซียมในเลือดของลูกแพะที่เกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อนมีค่าสูงกว่าลูกแพะที่เกิดโดยวิธีทางธรรมชาติ ($P < 0.05$) ตลอดระยะการทดลอง เช่นเดียวกับปริมาณของ Creatinine (CA) ของลูกแพะที่เกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อนมีค่าสูงกว่าลูกแพะที่เกิดโดยวิธีทางธรรมชาติ ($P < 0.05$) ในขณะที่เมื่ออายุ 6 และ 10 สัปดาห์ และปริมาณของ Total protein และ albumin ของลูกแพะที่เกิดจากการย้ายฝากตัวอ่อนมีค่าสูงกว่าลูกแพะที่เกิดโดยวิธีทางธรรมชาติ ($P < 0.05$) เมื่ออายุ 10 สัปดาห์ ในขณะที่ปริมาณสารอื่นๆ ได้แก่ Alanine aminotransferase (SGPT), Aspartate aminotransferase (SGOT), Alkaline phosphatase (ALK), Blood urea nitrogen (BUN), Calcium (Ca), Sodium (Na), Phosphorus (P), Chlorine (Cl), และ Thyroxine hormone (T4) ไม่พบว่ามีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) สำหรับการตรวจสอบทางปรสิตวิทยา พบว่าสามารถตรวจพบพยาธิ 4 ชนิดในลูกแพะทั้ง 2 กลุ่มในช่วงอายุใกล้เคียงกันคือมากกว่า 2 สัปดาห์

คำสำคัญ การย้ายฝากตัวอ่อน ค่าทางโลหิตวิทยา ชีวเคมีและเอ็นไซม์ในเลือด ปรสิตวิทยา แพะ อัตราการเจริญเติบโต

เลขทะเบียนผลงานวิจัย 52(1)-0208-085

*ผู้รับผิดชอบบทความ

Health Status and Growth Rate Study of Embryo-Transfer Origin and Natural Origin Goats

Saijai Cheunsuk^{1*} Malee Apimeteetumrong¹ Anone Thuangsanthia² Klumpool Banlue²
and Narong Leingcharoen²

¹ Livestock Biotechnology Research and Development Section.

² Embryo Transfer Technology Research Center, Pakchong Nakhornratchasima.

Bureau of Biotechnology in Livestock Production. Department of Livestock Development, Thailand.

Abstract

Embryo Transfer (ET) technology is now an important tool in animal breeding. Combination of ET technology and artificial insemination (AI) helps accelerating of genetic improvement of livestock production. The aims of the study was to investigate some hematological and biochemical parameters and intestinal parasitic infestation in embryo-transfer (ET) origin and natural origin goats. Thirty two ET goats and thirty one natural goats were used to study. Blood, serum, and feces samples were collected from each animal at the age of 2, 6, and 10 weeks as well as the body weights were measured. Concentrations of serum biochemical parameters were analyzed by a clinical analyzer whereas red blood cell and white blood cell counts were determined using an automatic blood counter. By the end of the experiment, body weight of ET group was higher than natural group ($P<0.05$). No difference of blood cell counts, red blood cells and white blood cells, was found in both groups ($P>0.05$). ET group had significant higher concentration of potassium (K) at all age, Creatinine (CA) at the age of 6 and 10 weeks, Total protein and albumin at the age of 10 weeks, than natural group ($P<0.05$). While Biochemical concentrations of Alanine aminotransferase (SGPT), Aspartate aminotransferase (SGOT), Alkaline phosphatase (ALK), Blood urea nitrogen (BUN), Calcium (Ca), Sodium (Na), Phosphorus (P), Chlorine (Cl), and Thyroxine hormone (T4) were not significantly different ($P>0.05$). Four species of intestinal parasites were also found in fecal samples of both groups after 2 weeks of age.

Keywords Embryo transfer, hematological values, blood biochemistry and enzyme, parasitology, goat, growth rate

Research project no. 52(1)-0208-085

* corresponding author

Introduction

Goats are one of the domestic animals in tropical countries including Thailand (Jainudeen and Hafez, 1993). They provide meat, milk, and skin. Most of the breeding plans and improvements depend on natural breeding using bucks within the flock which inbreeding is likely to occur. Artificial insemination (AI) technique is introduced to solve this problem. In animal agriculture, embryo transfer (ET) technology has gained commercial prominence in the livestock genetics since 1970's. Techniques have been adapted to most mammalian species including sheep and goats. Super-ovulation and ET technique has advantages for breeding programs because embryos can be gained from superior female combining artificial inseminated with frozen semen from many well-selected male. Moreover, more embryos from super-ovulation technique can be obtained per time more than with AI technique alone (Leeuw VW et al., 2000). In addition, these techniques allow us an opportunity to prevent several infection diseases such as Caprine arthritis-encephalitis virus (CAEV) which transmits from mothers to kids (Wolfe et al, 1987). Nowadays ET is an advanced, but well established, animal breeding technology which arises through the use of artificial insemination. When ET is coupled with AI, genetic progress may be accelerated even more. In goat, ET technique has been established since 1932 in USA (Warwick and Berry). Then, in 1949, this research group had successfully performed surgical ET (reviewed by Gordon, 1994). ET in goat has been developed couple with several advance technique such as in vitro fertilization (Rao et al, 1984) and laparoscopy (Vallet et al, 1989). Rerat et al (2005) compared health status between IVF (in-vitro fertilization) and AI calves which IVF calves had higher feed intake and growth rate during the entire growth period than AI calves but there was no difference of hematological, metabolic, or endocrine traits between these calves. However, there is no report indicated the health status in ET goat.

In Thailand, ET in goat has been developed to help promote animal agriculture. Most researches focus on improving breeding, distribution, disease control to enhance higher animal performance. In the present study, the hypothesis was tested if apparently ET and natural origin goats differ with respects of growth performance, hematological and biochemical profiles under field condition. The knowledge will be useful for improvement of livestock production in Thailand.

Materials and Methods

The goats used in this study were Saanen breed obtained from a dairy goat farm in Lopburi province. All the kids were reared together with their mothers until at least 10 weeks of age. Sixty three animals were used in which thirty two were embryo transfer birth-origin with seven paired twins and thirty one were naturally birth-origin with two paired twins. All types of samples were collected from each animal at 2, 6, and 10 month of age which weight of each animal was measured at the same time. Fecal samples from each animal were collected and examined for the presence of helminthes ova using direct microscopy, flotation, and sedimentation techniques (Garcia and Ash., 1979). Five ml of blood from jugular vein was collected from each animal following proper restraining by the owner or attendants with minimal excitement. One ml of the blood was collected in ethylene diamine tetracetate (EDTA) vacuum tubes for hematology profile examination and four ml of the blood were collected in simple vacuum tubes for serum enzymatic and biochemical test. The samples were kept in 4°C until laboratory analyses. The blood samples were tested for the red blood cell (RBC) total count, white blood cell (WBC) total cell count using automatic blood counter (Hematology Analyzer MEK-6450J/K, USA). The serum was separated from each blood sample for testing Alanine aminotransferase (SGPT), Aspartate aminotransferase (SGOT), Alkaline phosphatase (ALK), Creatinine (CA), Blood urea nitrogen (BUN), Calcium (Ca), Sodium (Na), Potassium (K), Phosphorus (P), Chlorine (Cl), Total Protein, Albumin (Bio-systems, Spain), and Thyroxine hormone (T4) using clinical analyzer (Immulite 1000, USA).

Statistic analysis

Differences between ET birth-origin group and natural birth-origin group for perinatal blood parameters were determined using SPSS Ms Windows Release 10.0 programme. One way ANOVA was used for evaluating data between groups. The data were expressed as means $\pm$ standard error of the mean (mean $\pm$ SE) to test significant differences at each point of the time. Differences of mean with p values < 0.05 were regarded as statistically significance.

Results and Discussion

Health status and growth performance

All animals were generally healthy, with few exceptions. Since they were raised in the same area and at the same period of time, few animals from both groups suffered cold with purulent nasal discharge. After treatment of antibiotics they all recovered to normal. In both groups, body weight increased with ET group gained more weight than natural group by the end of 10 weeks (13.04 ± 0.5 and 11.24 ± 0.49 , $p=0.01$, respectively) (Table1.)

Hematological status

The RBCs and WBCs counts of both groups from 2 to 10 weeks were not significantly difference (Table1). These included mean corpuscular hemoglobin concentration, lymphocyte, neutrophil, and monocyte numbers (data not shown).

Table1. Weight and Hematological values of ET- and natural- birth origin goat¹

Parameters	Age (weeks)	Animal groups				ref. values ³
		ET (means±SE)	Range ²	Natural (means±SE)	Range ²	
Weight (Kgs)	2	6.91±0.36	6.18-7.64	7.69±0.29	7.11-8.28	NA
	6	9.25±0.56	8.10-10.40	9.89±0.38	9.12-10.66	
	10	13.04±0.50 ^a	12.01-14.07	11.24±0.49 ^a	10.25-12.24	
Hematology						
RBCs x 10 ⁶ /μl	2	11.38±0.32	10.72-12.04	10.55±0.34	9.86-11.25	8-18
	6	11.17±0.37	10.42-11.91	11.03±0.30	10.41-11.65	
	10	10.87±0.35	10.17-11.58	10.04±0.29	9.44-10.64	
WBCs x 10 ³ /μl	2	12.16±0.62	10.88-13.43	10.28±0.68	8.90-11.66	4-13
	6	12.40±0.65	11.08-13.73	11.66±0.68	10.28±13.05	
	10	13.03±0.61	11.79-14.28	13.65±0.80	12.03-15.28	

1: n = 32 per ET group, n =31 per natural group.

2: range = 95% Confidence Interval for Mean.

3: Delano ML., et al (2002)

a – row with the same superscript differ at $P < 0.05$.

Serum metabolite concentrations

Creatinine concentrations in ET group were higher than natural group at the age of 6 weeks (0.75 ± 0.02 vs. 0.61 ± 0.02 , $p < 0.05$) and at the age of 10 weeks (0.72 ± 0.02 vs. 0.63 ± 0.03 , $p < 0.05$). The same as total protein and serum albumin concentration in which ET group were higher than natural group at 10 weeks of age (6.33 ± 0.18 and 5.78 ± 0.10 , $p < 0.01$ vs. 2.78 ± 0.06 and 2.56 ± 0.07 , $p < 0.02$, respectively). However, the blood urea nitrogen (BUN) concentrations were not significantly different in 2 groups at all age (Table2.).

Table2. Serum metabolite values of ET- and natural- birth origin goat¹

Parameters	Age (weeks)	Animal groups				ref. values ³
		ET (means $\pm$ SE)	Range ²	Natural (means $\pm$ SE)	Range ²	
BUN (mg/dl)	2	11.25 $\pm$ 0.83	9.56-12.94	11.97 $\pm$ 0.88	10.17-13.76	10 -20
	6	11.50 $\pm$ 0.88	9.70-13.30	13.45 $\pm$ 1.16	11.09-15.81	
	10	15.68 $\pm$ 0.86	13.93-17.43	13.74 $\pm$ 1.10	11.49-15.99	
Creatinine (mg/dl)	2	0.69 $\pm$ 0.03	0.63-0.74	0.65 $\pm$ 0.03	0.60-0.70	1 - 8
	6	0.75 $\pm$ 0.92 ^a	0.70-0.79	0.61 $\pm$ 0.02 ^a	0.57-0.66	
	10	0.72 $\pm$ 0.02 ^b	0.67-0.77	0.63 $\pm$ 0.03 ^b	0.57-0.68	
Total Protein (g/dl)	2	5.45 $\pm$ 0.13	5.32-5.87	5.38 $\pm$ 0.12	4.96-5.46	6.4-7.0
	6	6.14 $\pm$ 0.18	5.78-6.50	5.81 $\pm$ 0.27	5.25-6.36	
	10	6.33 $\pm$ 0.18 ^c	5.98-6.69	5.78 $\pm$ 0.10 ^c	5.57-6.00	
Albumin (g/dl)	2	2.54 $\pm$ 0.08	2.37-2.71	2.66 $\pm$ 0.07	2.63-3.10	2.7-3.9
	6	2.84 $\pm$ 0.07	2.70-2.98	2.71 $\pm$ 0.07	2.58-2.85	
	10	2.78 $\pm$ 0.06 ^d	2.65-2.91	2.56 $\pm$ 0.07 ^d	2.43-2.70	

1: n = 32 per ET group, n =31 per natural group.

2: range = 95% Confidence Interval for Mean.

3: Delano ML., et al (2002)

a, b, c, d – rows with the same superscript differ at $P < 0.05$.

Serum electrolytes and minerals concentrations

No differences were observed between ET and natural groups in concentrations of serum electrolytes (Ca, P, Na, and Cl) over 10 weeks of age, except for elevated serum potassium in ET group than natural group at all 3 periods (2, 6, and 10 weeks of age) (5.97 ± 0.16 , 5.96 ± 0.12 , and 7.76 ± 0.88 vs. 5.48 ± 0.09 , 5.47 ± 0.09 , and 5.40 ± 0.07 , $p < 0.01$, respectively.) (Table3.).

Table3. Serum electrolytes and minerals values of ET- and natural- birth origin goat¹

Parameters	Age (weeks)	Animal groups				ref. values ³
		ET (means $\pm$ SE)	Range ²	Natural (means $\pm$ SE)	Range ²	
Calcium (mg/dl)	2	10.40 $\pm$ 0.33	10.03-11.57	9.99 $\pm$ 0.24	9.34-10.32	
	6	10.09 $\pm$ 0.15	9.78-10.40	9.86 $\pm$ 0.19	9.47-10.25	8.9-11.7
	10	9.96 $\pm$ 0.15	9.65-10.27	9.53 $\pm$ 0.19	9.14-9.93	
Phosphorus (mg/dl)	2	8.50 $\pm$ 0.32	7.59-9.55	9.01 $\pm$ 0.30	8.66-10.39	
	6	8.94 $\pm$ 0.26	8.41-9.46	8.63 $\pm$ 0.28	8.07-9.19	4.2-9.1
	10	8.61 $\pm$ 0.24	8.11-9.10	8.31 $\pm$ 0.29	7.72-8.90	
Sodium (mEq/l)	2	145.97 $\pm$ 0.69	144.57-147.37	145.00 $\pm$ 0.50	143.98-146.02	
	6	148.34 $\pm$ 0.90	146.51-150.18	145.13 $\pm$ 0.52	144.08-146.18	142-155
	10	145.00 $\pm$ 0.60	143.77-146.23	143.97 $\pm$ 0.51	142.93-145.00	
Potassium (mEq/l)	2	5.97 $\pm$ 0.16 ^a	5.63-6.30	5.48 $\pm$ 0.09 ^a	5.30-5.66	
	6	5.96 $\pm$ 0.12 ^b	5.71-6.21	5.47 $\pm$ 0.09 ^b	5.29-5.64	3.5-6.7
	10	7.76 $\pm$ 0.88 ^c	5.96-9.55	5.40 $\pm$ 0.07 ^c	5.25-5.55	
Chloride (mEq/l)	2	109.63 $\pm$ 0.71	108.18-113.07	108.06 $\pm$ 0.60	106.84-109.29	
	6	108.72 $\pm$ 0.30	102.00-115.44	108.03 $\pm$ 0.55	106.92-109.15	99-110.3
	10	109.06 $\pm$ 0.71	107.61-110.51	109.03 $\pm$ 0.50	108.01-110.06	

1: n = 32 per ET group, n =31 per natural group.

2: range = 95% Confidence Interval for Mean.

3: Delano ML., et al (2002)

a, b, c – rows with the same superscript differ at $P < 0.05$.

Serum enzymes and hormone concentrations

No differences were observed between ET and natural groups in concentrations of serum enzymes and hormone concentrations (SGPT, SGOT, ALK, and T4), except at the age of 2 weeks T4 level in natural group was higher than ET group (6.34 ± 0.36 vs. 5.07 ± 0.24 , $p < 0.01$). However, T4 concentrations in both groups were not different at the age of 6 and 10 weeks (Table4.).

Table4. Serum enzymes and hormone values of ET- and natural- birth origin goat¹

Parameters	Age (weeks)	Animal groups				ref. values ³
		ET (means $\pm$ SE)	Range ²	Natural (means $\pm$ SE)	Range ²	
SGPT (U/l)	2	15.59 $\pm$ 0.82	13.93-17.26	14.03 $\pm$ 0.69	12.63-15.44	
	6	15.59 $\pm$ 0.64	14.29-16.90	14.39 $\pm$ 0.72	12.92-15.86	6.0-19.0
	10	14.09 $\pm$ 0.70	12.66-15.53	13.71 $\pm$ 0.91	11.86-15.56	
SGOT (U/l)	2	75.88 $\pm$ 3.05	69.64-82.11	84.55 $\pm$ 2.54	79.36-89.74	
	6	83.41 $\pm$ 1.78	79.78-87.03	80.23 $\pm$ 3.30	73.48-86.97	167-513
	10	77.28 $\pm$ 2.59	71.99-82.57	77.45 $\pm$ 3.45	70.40-84.51	
ALK (U/l)	2	567.75 $\pm$ 54.80	455.98-679.52	497.48 $\pm$ 54.31	386.57-608.40	
	6	317.13 $\pm$ 36.62	242.44-391.81	356.35 $\pm$ 49.60	255.06-457.65	93-387
	10	310.78 $\pm$ 44.83	219.36-402.21	307.13 $\pm$ 56.33	192.08-422.18	
T4 (g/l)	2	5.07 $\pm$ 0.24 ^a	4.57-5.57	6.34 $\pm$ 0.36 ^a	5.61-7.06	
	6	5.35 $\pm$ 0.25	4.84-5.86	5.81 $\pm$ 0.30	5.19-6.42	6.4-7.0
	10	5.00 $\pm$ 0.19	4.62-5.38	4.94 $\pm$ 0.29	4.36-5.52	

1: n = 32 per ET group, n = 31 per natural group.

2: range = 95% Confidence Interval for Mean.

3: Delano ML., et al (2002)

a – row with the same superscript differ at $P < 0.05$.

Parasitic status

Fecal examination revealed parasite infestation in both group at 6 and 10 weeks of age. At 6 weeks, ET group, ten out of thirty two kids were found *Eimeria* ova (Figure1a.) while natural group was found nineteen out of thirty one kids. At 10 weeks, twenty five out of thirty two in ET group were infested with *Eimeria* ova also two with *Strongyloides* spp.(nematode) (Figure1b.), one with *Moniezia* spp. (Tapeworm) (Figure1c.), and one with *Trichuris* spp. (whipworm) (Figure1d.) whereas in natural group, twenty three were positive for *Eimeria* ova, four for *Strongyloides*, one for *Trichuris*, and three for *Moniezia* spp. (data not shown)



Figure1. Four types of intestinal parasites found in ET- and natural- birth origin goat

a) *Eimeria* ova; b) *Strongyloides* spp.; c) *Moniezia* spp.; d) *Trichuris* spp.

Reference intervals for hematological and biochemical parameters are necessary for assessment of the physiologic status of animals. There were few reports about the growth rate and blood component values of young goats especially there was no report of those of ET origin goats. Since there were some concerns about the growth rate of ET goats that they were smaller than the natural birth goat (personnel interviews). From this study, at the age of 2 week, both group gained the same weight (6.91 ± 0.6 and 7.69 ± 0.29 , $p > 0.05$) as well as at 6 weeks (9.25 ± 0.56 and 9.89 ± 0.38 , $p > 0.05$). At the age of 10 weeks, ET group gained more weight than natural group, 13.04 ± 0.5 and 11.24 ± 0.49 ($p < 0.05$) respectively although there were more twin pairs in ET group than natural group. This indicated that ET kids should be able to grow at the same rate (or even better in this study) as natural birth kids. The amount of RBCs and WBCs in 2 groups were not significant different and the total count of these cells were similar to report from Addass et al (2010) and Egbe-Nwiyi et al (2000) although they were different breeds from this study. Both groups studied on the hematological values of goats influenced by age and sex in different areas. For blood biochemical examination, there were significant higher

in total protein and albumin in ET group than natural group on 10 weeks old suggested a higher hepatic albumin synthesis (Rauprich et al., 2000) in ET group. Higher Creatinine concentration in ET group than natural group at the age of 6 and 10 weeks might explained by the higher growth (body weight) in ET goats than in natural goats (Van Nieherk et al., 1963). Considering these values in both groups compared to the reference values, renal dysfunction could be excluded. No difference of serum metabolite and electrolyte concentrations was found in two groups except potassium concentration. Potassium is the major positive ion found inside of cells and essential for normal cell function such as regulation of the heart beat and the function of the muscles. The abnormal of potassium level results in many clinical signs such as kidney diseases, vomiting, diarrhea, eating disorder, etc. (Duncan and Prasse., 1986). Although ET group had higher amount of potassium than natural group in all periods of study, there was no clinical sign indicating abnormality resulted from potassium concentration. There was no difference of serum enzymes and hormone concentrations between two groups except T4 level at the age of 2 week of natural group with unknown reason since all concentration were similar in both groups when they were older.

Four types of intestinal parasites were found in both groups after age of two weeks. *Eimeria* spp. was the most parasites found in this report. Coccidia are intracellular protozoa which at least 9 species have been recognized in goat (Foreyl, 1990). In young animals, it is characterized primarily by hemorrhagic diarrhea while the adult animals may carry and shade the protozoa but rarely show clinical signs (Speer, 1996). The second type of parasites found in these animal was *Strongyloides* species which are small intestinal. Clinical signs include weight loss, diarrhea, unthriftiness, and, sometimes, skin dermatitis. *Trichuris* spp. is mildly pathogenic nematode and can cause a minor cecitis and will feed from blood. Clinical infestation is rare and results in diarrhea with mucus and blood. The last parasite found in this report was *Moniezia* species. These tape worms are rarely of clinical signs or economic important. In young animals with heavy infestation, they may develop potbellies, constipation or mild diarrhea, poor growth, and anemia (Delano et al, 2002). However, all the young goats in this study did not any severe clinical signs indicating parasitic infestation except some mild diarrhea in a few kids especially after rain fall and recovered shortly without treatment.

In conclusion, ET birth origin goats, compared with natural birth origin goats were characterized by higher growth performance. However, this was not mirrored by consistent hematological, metabolic, or parasitic change. Only serum metabolic (Creatinine, Total protein, and albumin) and mineral (potassium) concentrations were higher in ET than natural goats but they were comparable to the normal values recorded elsewhere. Both groups were generally healthy and survived through the study. Since goats are domestic animal which increasing in economic values, more studies should be conducted to gain more knowledges for helping improving of animal health.

References

- Addass, P.A., Midau, A., and Babale, D.M. 2010. Haemato-biochemical findings of indigenous goats in Mubi Adamawa State, Nigeria. *J. Agri. Soc. Sci.* 6: 14-16.
- Delano, M.L., Mischler, S.A., and Underwood, W.J. 2002. Biology and Diseases of Ruminants: Sheep, Goats, and Cattle. In "Laboratory Animal Medicine 2nd ed." (J.G. Fox, ed.). Elsevier Sci., USA.
- Duncan, J.R. and Prasse, K.W. 1986. Veterinary Laboratory Medicine. Iowa State Univ. Press, Ames.
- Egbe-Nwiyi, T.N., Nwaosu, S.C., and Salami, H.A. 2000. Haematological values of apparently healthy sheep and goats as influenced by age and sex in arid zone of Nigeria. *Afr. J. Biomed. Res.* 3: 109-115.
- Foreyt, W. 1990. Coccidiosis and cryptosporidiosis in sheep and goats. *Vet Clin. North Am. Food Anim. Pract.* 6(3): 655-670.
- Garcia, L. S., and Ash, L. R. 1979. Diagnostic parasitology: clinical laboratory manual, 2nd ed. The C. V. Mosby Co., St. Louis, Mo.
- Gordon I. 1994. Transferring embryo and establishing pregnancies in LABORATORY PRODUCTION OF CATTLE EMBRYOS. Cambridge, University Press, 625p.
- Jainudeen, M.R. and Hafez, E.S.E. 1993. Sheep and goats. In: Reproduction In farm animals. 6th Edition ESE. Hafez ed. LEA & PEBIGER, Philadelphia.: 330-342.t
- Leeuw VW., Mullaart E., Roos AP, Merton JS., Daas JHG., and Ruigh LD. 2000. Effect of different reproduction techniques: AI, MOET, or IVP, on health and welfare of bovine offspring. *Theriogenology.* 53: 575-597.

- Rao, V.H., Sarmah, B.C., and Bhattacharyya, N.K. 1984. Xenogenous fertilization of goat ova in the rabbit oviduct. *J. Reprod. Fert.* 71: 377-379.
- Rauprich, A.B.E., Hammon, H., and Blum, J.W. 2000. Effects of feeding colostrums and a formula with nutrient contents as colostrums on metabolic and endocrine traits in neonatal calves. *Biol. Neonate.* 78: 53-64.
- Rerat, M., Zbinden, Y., Saner, R., Hammon, H., and Blum, J.W. 2005. In Vitro Embryo Production: Growth Performance, Feed Efficiency, and Hematological, Metabolic, and Endocrine Status in Calves. *J.Dairy Sci.* 88:2579-2593.
- Speer, C.A. 1996. Coccidiosis. In "Large Animal Medicine" (B.L. Smith, ed.). Saunder, Philadelphia.
- Vallet, J.C., Baril, G., and Ioysel, C. 1989. Efficiency of laparoscopic embryo transfer in goat. Cited by Gordon I. 1994. Transferring embryos and establishing pregnancies. *LABORATORY PRODUCTION OF CATTLE EMBRYOS*. Cambridge, University Press, 625 p.
- Van Niekerk, B.D.H., Reid, J.T., Bensadoun, and Paladines, D.L. 1963. Urinary Creatinine as an index of body composition. *J. Nutr.* 79:463-473.
- Warwick, B.L. and Berry, R.O. 1949. Inter-genetic specific embryo transfers. Cited by Gordon I. 1994. Transferring embryos and establishing pregnancies. *LABORATORY PRODUCTION OF CATTLE EMBRYOS*. Cambridge, University Press, 625 p.
- Wolfe, D.F., Nusbaum, K.E., Lauerman, L.H., Mysinger, P.W., Riddell, M.G., Putnam, M.R., Shumway, L.S., and Powe, T.A. 1987. Embryo transfer from goats. Seropositives for caprine arthritis-encephalitis virus. *Theriogenology.* 28(3): 307-316.