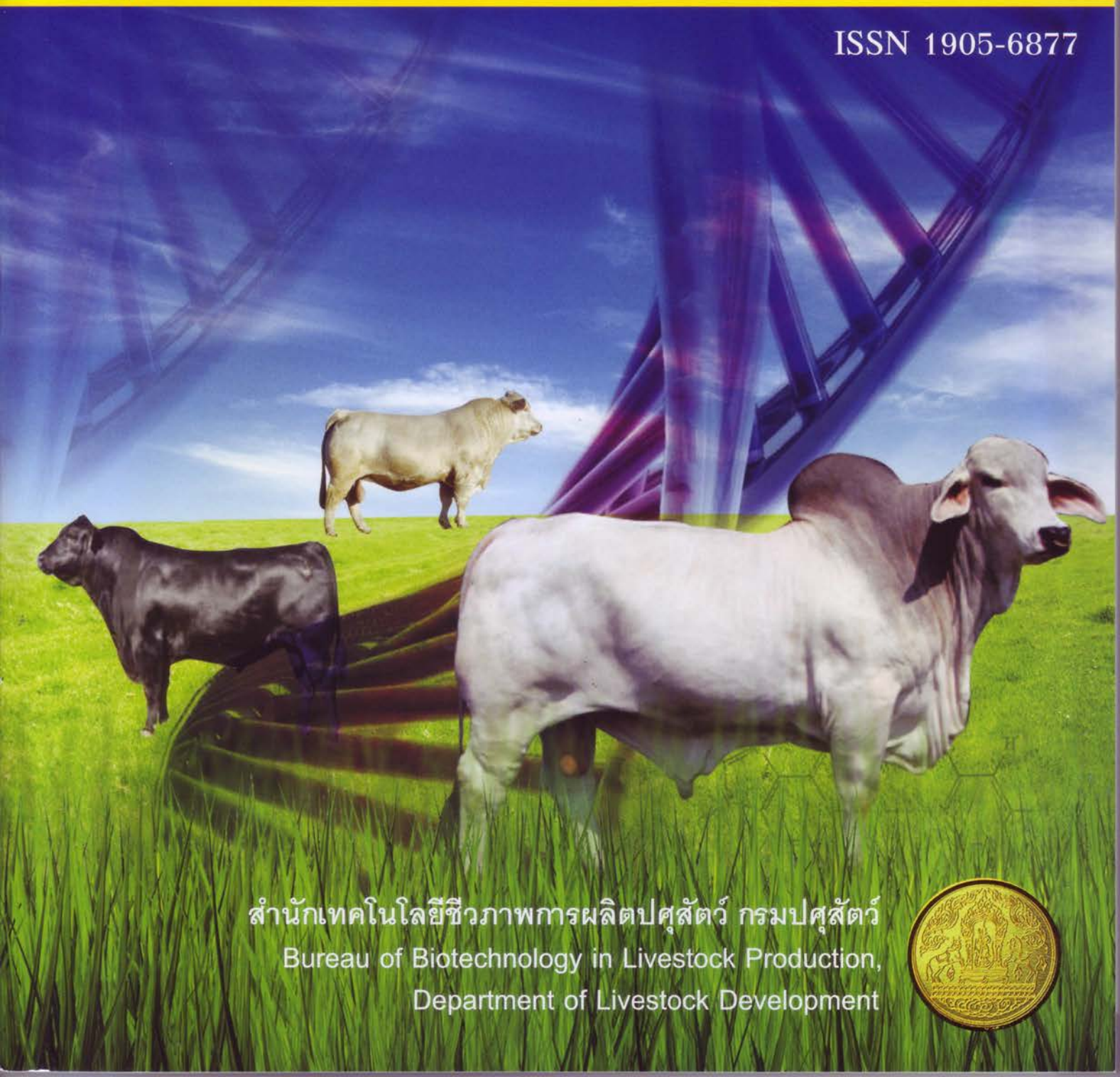
วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

Journal of Biotechnology in Livestock Production

ปีที่ 7 ฉบับที่ 1 เดือนมิถุนายน 2555
Vol.7 : June 2012
www.dld.go.th/biotech

ISSN 1905-6877



สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์
Bureau of Biotechnology in Livestock Production,
Department of Livestock Development

สาสน์จากบรรณาธิการบริหาร

ในปี 2558 อาเซียนจะรวมตัวเป็นประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน มีเป้าหมายเพื่อส่งเสริมให้อาเซียนเป็นตลาดและฐานการผลิตร่วมกัน (Single market and single production base) มีการเคลื่อนย้ายสินค้า บริการ การลงทุน แรงงานมีฝีมืออย่างเสรี และเงินทุนอย่างเสรีมากขึ้น (free flows of goods, services, investment, and skilled labors, and freer flow of capital) ผลที่จะเกิดขึ้นหลังจากเป็น AEC ประกอบด้วย การยกเลิกภาษีศุลกากรสำหรับสินค้า การลดขั้นตอนพิธีการศุลกากร อนุญาตให้ผู้ส่งออกรับรองถิ่นกำเนิดสินค้าด้วยตนเอง (Self Certification) ตลอดจนลดเลิกข้อจำกัด / อุปสรรคในการให้บริการทุกรูปแบบ มีการเปิดเสรีการลงทุน คุ้มครองการลงทุน ส่งเสริมและอำนวยความสะดวกการลงทุนครอบคลุมธุรกิจ 5 ภาคได้แก่ เกษตร ประมง ป่าไม้ เหมืองแร่ และภาคการผลิตรวมถึงบริการที่เกี่ยวเนื่อง นำไปสู่การเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันของอาเซียน มีการพัฒนาเศรษฐกิจระหว่างประเทศสมาชิกที่เสมอภาคยิ่งขึ้น ทำให้กำลังซื้อของประเทศเพื่อนบ้านดีขึ้น ขยายโอกาสการส่งออกและการลงทุนของไทย และมีการเชื่อมโยงกับประเทศภายนอก โดยเฉพาะประเทศคู่เจรจาของอาเซียน (+6) เป็นการเพิ่มโอกาสการค้าและการลงทุน

ในด้านปศุสัตว์ ประเทศไทยมีข้อได้เปรียบประเทศในเขตอาเซียนทั้งด้านพันธุกรรมโคเนื้อคุณภาพ และ เทคโนโลยีการผสมเทียม ซึ่งเป็นสองปัจจัยหลักในการผลิต สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ จึงได้พัฒนาโครงการเพื่อเตรียมความพร้อมขยายการผลิตโคเนื้อคุณภาพ เพื่อรองรับการเปิดตลาดเนื้อโคคุณภาพในอาเซียน ประกอบด้วย **“โครงการสร้างพันธุ์โคเนื้อคุณภาพไทย-แบล็ค”** และ **“โครงการเร่งรัดการผลิตโคเนื้อคุณภาพสูง โดยวิธีการผสมเทียม”** ซึ่งทำให้สามารถจัดระเบียบฟาร์มในประเทศไทยโดยจำแนกเป็น Breeding และ Fattening Farm ด้วยการสร้างระบบการผสมพันธุ์ที่ชัดเจนมีรูปแบบ เพื่อให้เกษตรกรสามารถบริหารจัดการฟาร์มได้อย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ นำไปสู่การเป็นศูนย์กลางผลิตพันธุ์โคเนื้อ และผลิตภัณฑ์เนื้อโคคุณภาพในอาเซียน ในอนาคตอันใกล้

ทั้งนี้สำนักฯ ยังมุ่งมั่นพัฒนางานเพื่อให้ไทยสามารถคงความเป็นผู้นำด้านปศุสัตว์ในอาเซียนด้วยการส่งเสริม สร้างสรรงานวิจัย และเผยแพร่ในวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตสัตว์อย่างต่อเนื่องเป็นประจำทุกปี เพื่อให้เกิดการแลกเปลี่ยน เรียนรู้ นำไปสู่การพัฒนาต่อไป

(นายสัตวแพทย์ จีระศักดิ์ พิพัฒนพงษ์โสภณ)
ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

วัตถุประสงค์

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

เจ้าของ

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

สำนักงาน

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์
ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง
จ.ปทุมธานี 12000
โทร/โทรสาร 0-2501-2116

กำหนดออก

ปีละ 1 ฉบับ

คณะที่ปรึกษา

พชช. พรรณพิไล เสกสิทธิ์
ดร. ณชัย ศราธพันธุ์
ดร. มาลี อภิเมธีธำรง

บรรณาธิการบริหาร

น.สพ. จีระศักดิ์ พิพัฒนพงศ์โสภณ

บรรณาธิการ

สพญ. กัลยา เก่งวิกย์กรรม

ผู้ช่วยบรรณาธิการ

นสพ. วิษณุ ไพศาลรุ่งพนา

กองบรรณาธิการ

นสพ. ไกรวรรณ หงษ์ยันตรชัย
นสพ. สาโรช งามขำ
สพญ. รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล
นสพ. รัตน์ ฉายารัตนศิลป์
สพญ. นุสสรา วัฒนกุล
นสพ. วิบูลย์ เยี่ยงวิศวกูร
นางจุรีรัตน์ แสนโภชน์
นายสายัณห์ บัวบาน

ผู้จัดการวารสาร

นางจุรีรัตน์ แสนโภชน์
นายวิบูลย์ เยี่ยงวิศวกูร
นางสาวทัศนีย์ พูนขำ

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ เป็นวารสารทางวิชาการของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ กำหนดออกปีละ 1 ฉบับ คือ เดือนกรกฎาคม วารสารนำลงบทความ ผลงานค้นคว้าวิจัยด้านการผลิตปศุสัตว์ ทั้งด้านการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ การจัดการอาหาร สุขภาพ และระบบสืบพันธุ์ ตลอดจนการขยายพันธุ์ และการใช้เทคโนโลยีชีวภาพที่ก้าวหน้าในการปรับปรุงและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตปศุสัตว์ด้านต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น คณะผู้จัดทำวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ยินดีรับเรื่องจากทุกท่านที่ส่งมาเพื่อเผยแพร่ และเพื่อความสะดวกในการพิจารณา ขอเสนอแนะดังนี้

1. เรื่องที่จะนำลง

1.1 งานทดลอง วิจัย ทางวิชาการ (Technical/ Research papers) หรือวิทยานิพนธ์ เป็นการเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้ทำขึ้นเอง

1.2 บทความ (Articles) และย่อเอกสาร (Literature reviewed) ทางวิชาการ ที่รวบรวมข้อมูล ความคิดเห็นและประสบการณ์ของผู้เขียน

1.3 เรื่องอื่นๆ ที่คณะผู้จัดทำพิจารณาเห็นสมควร

2. ต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่ส่งมาพิมพ์ในวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ไม่ควรเป็นเรื่องที่เคยพิมพ์หรือ กำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อลงพิมพ์วารสารอื่น

2.2 ต้นฉบับเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ พิมพ์บนกระดาษ เอ 4 จำนวนไม่เกิน 12 หน้า โดยจัดพิมพ์ด้วย Microsoft Word for Windows หรือใช้ชนิดและขนาดตัวอักษรตามที่กำหนด

2.3 ไม่มีการส่งคืนต้นฉบับ

3. การลำดับเรื่องในต้นฉบับ

เพื่อให้ขบวนการการพิจารณาผลงานวิชาการและการดำเนินการจัดพิมพ์วารสารเป็นไปอย่างเรียบร้อย รวดเร็ว และถูกต้อง จึงจำเป็นต้องให้ผู้เขียนผลงานวิชาการปฏิบัติตามข้อกำหนดอย่างเคร่งครัด ดังนี้

3.1 ให้ส่งต้นฉบับผลงานวิชาการจำนวน 1 ชุด และยังไม่ต้องส่งแผ่นบันทึกข้อมูล (Diskette)

3.2 ต้นฉบับผลงานวิชาการที่ส่งมา ให้ตรวจความถูกต้องของตัวสะกด รูปแบบการจัดพิมพ์ผลงานวิชาการให้ถูกต้องตามที่กำหนด

3.3 ส่งแผ่นบันทึกข้อมูลมาให้ เมื่อผลงานวิชาการนั้นได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการวิจัยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ แล้วเท่านั้น โดยเลขาคณะกรรมการวิจัยฯ จะแจ้งกลับไปยังเจ้าของผลงานวิชาการพร้อมส่งต้นฉบับเพื่อให้แก้ไขตามที่คณะกรรมการวิจัยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ให้ข้อเสนอแนะ

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

ชื่อผลงานวิชาการ.....

ชื่อเจ้าของผลงาน.....

ชื่อไฟล์.....

ที่อยู่ เบอร์โทรศัพท์/E-Mail.....

หรือส่งทาง Internet

มายัง jureeratn@gmail.com

3.4 ต้นฉบับผลงานวิชาการที่ส่งให้คณะกรรมการวิจัย สทป. พิจารณา จะเป็นบทความที่จัดรูปแบบได้ถูกต้องตามที่กำหนดเท่านั้น หากผลงานวิชาการที่ส่งมาให้ไม่ถูกต้องตามข้อกำหนด จะจัดส่งคืนให้เจ้าของผลงานวิชาการกลับไปแก้ไขให้ถูกต้อง

3.5 ต้นฉบับที่จัดส่งมาต้องชัดเจน ทั้งเนื้อหาและรูปภาพประกอบผลงานวิชาการ โดยส่งมาที่

3.6 หรือติดต่อสอบถามได้ที่

นางจุรีรัตน์ แสนโภชน์

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง

จ. ปทุมธานี 12000

โทรศัพท์ 02-967-9791 หรือ 02-967-9792

โทรสาร. 02-5011386

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

4. การลำดับเรื่อง

4.1 ชื่อเรื่อง (Title) ควรต้องชื่อให้สั้นและสื่อความหมายให้ดี และพิมพ์โดยใช้ขนาดตัวอักษร 18 และตัวหนา

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

4.3 บทคัดย่อ (Abstract) เขียนสั้นๆได้เนื้อความคลุมวัตถุประสงค์ วิธีการ และผลการทดลอง ความยาวไม่ควรเกิน 3% ของตัวเรื่อง บทคัดย่อต้องมีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ แยกหน้าต่างหากจากกันส่ง บรรณาธิการวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000

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

4.5 เนื้อหา (Text) สำหรับงานวิจัยประกอบด้วย

4.5.1 บทนำ(Introduction) อธิบายถึงปัญหาและวัตถุประสงค์และควรมีการตรวจเอกสาร (literature review)

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

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

- ตาราง (Tables) ควรพิมพ์ให้ชัดเจนเหมาะกับหน้า ต้องมีความหมายในตัวเอง และมีคำอธิบายตารางอยู่เหนือตารางนั้นๆ

- รูปภาพ (Figures) ควรเป็นภาพขาว – ดำ ภาพสีหากจำเป็นผู้เขียนต้องเสียค่าใช้จ่ายเองอธิบายรายละเอียดไว้ใต้รูปนั้นๆ

4.5.4 วิจารณ์ (Discussion) เป็นการวิจารณ์ผลการทดลอง โดยมีจุดมุ่งหมาย เพื่อให้ผู้อื่นเห็นคล้อยถึงหลักการที่แสดงออกมาจากผลการทดลอง หรือเพื่อสนับสนุน หรือคัดค้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน หรือเพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น ผู้เขียนควรพยายามเน้นถึงปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยในอนาคตและลู่ทางที่จะนำผลไปใช้เป็นประโยชน์

4.5.5 สรุป (Conclusion) เขียนใจความที่สำคัญและคุณค่าของงานเพื่อให้ผู้อ่านเข้าใจง่ายขึ้น

4.5.6 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) ควรมีในกรณีที่ได้รับความช่วยเหลือ หรือความร่วมมือที่สนับสนุนงานค้นคว้าวิจัยนั้นๆ

4.5.7 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. กรณีที่อ้างอิงในเนื้อเรื่อง ควรอ้างอิงดังนี้คือ

1. กรณีที่อ้างจากการตรวจเอกสาร โดยผู้อื่นๆ ให้ใช้คำว่าอ้างถึงโดย (cited by)

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

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

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

ข. การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง ควรขึ้นต้นเอกสารอ้างอิงภาษาไทยก่อน เขียนเรียงตามลำดับพยัญชนะของผู้เขียน ถ้าเป็นภาษาอังกฤษใช้ชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง แล้วตามด้วยปี ชื่อเรื่องชื่อหนังสือ หรือชื่อย่อวารสาร ปีที่ ฉบับที่ และหน้าที่อ้างอิง ดังตัวอย่าง

วิบูรณ์ ตุลารักษา และ จุรีรัตน์ แสนโภชน์ 2549 การสกัด ดีเอ็นเอ เซลล์รากขนในโคนมไทยโฮลสไตน์ การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 2 “ก้าวทันสมัยกับปศุสัตว์ไทย” วันที่ 24 มกราคม 2549 โรงแรมโซฟิเทล ขอนแก่น. หน้า 452-463

เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล และกัลยา เก่งวิกย์กรรม 2549 การประเมินวิธีสกัดแยกดีเอ็นเอจากเลือด น้ำเชื้อ และเซลล์รากขนของพ่อพันธุ์โค. สัตวแพทย์สาร56 (3):68-79

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

กรณีอ้างอิงจากตำรา ให้ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่ตีพิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อตำรา (พิมพ์ครั้งที่เท่าใดและบรรณาธิการหากมี) สำนักพิมพ์ เมืองที่พิมพ์ หน้าแรกและหน้าสุดท้ายที่อ้างถึง ดังตัวอย่าง

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

Van Oirschot, J. T. 1986. Hog Cholera. In : Disease of Swine, 6 th ed. Leman, A. D. ed. Lowa state university Press. Iowa. p. 293-297.

กรณีอ้างอิงจากเวบไซต์ (Online references) ดังตัวอย่าง

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

จันทรา แป้นตุ้ม จุฑาพร ศรีวิพัฒน์ วรวิทย์ แสงสิงแก้ว และ พึ่งพิศ ดุลยพัชร์. 2541. อาหารจากข้าวโพด.คู่มือการส่งเสริมการเกษตรที่ 43. แหล่งที่มา: http://www.ku.ac.th/agri/cornn/corn.htm. 27 มีนาคม 2541.

5. การพิมพ์ผลงานทางวิชาการ

ตัวพิมพ์ ให้พิมพ์ดีด หรือใช้เครื่องพิมพ์ (Printer) หมึกพิมพ์ต้องเป็นสีดำ คมชัด สะดวกแก่การอ่าน และใช้ตัวพิมพ์แบบเดียวกันทั้งฉบับ กรณีใช้เครื่องคอมพิวเตอร์พิมพ์เนื้อความให้ใช้ตัวอักษร Angsana UPC 16 ตัวปกติ เท่านั้น ยกเว้นหัวข้อใหญ่ เช่น ชื่อเรื่อง บทคัดย่อ บทนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผล วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 18 ส่วนหัวข้อย่อย เช่น ชื่อผู้วิจัยและคณะ คำสำคัญ ตาราง รูปภาพ เป็นต้น พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 16กระดาษที่ใช้พิมพ์ ให้ใช้กระดาษขาว ไม่มีบรรทัด ขนาดมาตรฐาน A4 (210 X297 มม.) ใช้เพียงหน้าเดียว

การเว้นที่ว่างขอบกระดาษ

- ตั้งกั้นหน้าบนและซ้ายไว้ที่ 2.5 เซนติเมตร

- ด้านขวาและด้านล่างไว้ที่ 2.0 เซนติเมตร

การเว้นระยะในการพิมพ์

- การเว้นระยะระหว่างบรรทัดและการย่อหน้าควรจัดตามความสวยงาม

- กรณีคำสุดท้ายไม่จบบรรทัดนั้นๆ ให้ยกคำนั้นทั้งคำไปพิมพ์ในบรรทัดต่อไป ไม่ควรตัดส่วยท้ายของคำไปพิมพ์ในบรรทัดใหม่ เช่น กระบือปลัก ไม่ให้แยกเป็น กระบือ-ปลัก เป็นต้น จุลชีพ เช่น Escherichia coli หรือพิมพ์ตัวเอน Escherichia coli

- หลังเครื่องหมาย . และ , หรือ; เคาะ 1 เคาะ พืช เช่น Oryza sativa หรือพิมพ์ตัวเอน Oryza sativa

- ระหว่างคำสุดท้าย กับเครื่องหมาย . และ , ไม่เว้นช่องว่าง

สัตว์ เช่น Bos taurus หรือ พิมพ์ด้วยตัวเอน Bos taurus

- ไม่ต้องเว้นช่องว่าง ระหว่างวงเล็บ และคำข้างในวงเล็บ เช่น (รพีพรรณ และคณะ)

การลำดับหน้า

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

ตาราง รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ

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

- กรณีตารางมีความยาวมาก ไม่สามารถสิ้นสุดในหน้าเดียวได้ ให้พิมพ์ส่วนที่เหลือในหน้าถัดไปโดยพิมพ์เลขที่ตารางและตามด้วยคำว่า (ต่อ)

- กรณีรูปภาพ แผนที่ แผนภูมิ กราฟ ควรเป็นภาพขาวดำ และใช้แนวทางข้างต้น

การพิมพ์ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิต ให้ใช้ตามประมวลนามศาสตร์สากล (International code of nomenclature) คือ ขีดเส้นใต้ หรือ พิมพ์ด้วยตัวเอน ชื่อวิทยาศาสตร์เป็นไปตามการตั้งชื่อ

สารบัญ

	หน้า
• โครงการเร่งรัดผลิตโคเนื้อคุณภาพสูง โดยวิธีการผสมเทียม	8
• การศึกษารูปแบบของยีน CD18 ที่ก่อโรค Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) ในโคไทยโฮลสไตน์ด้วยเทคนิค PCR	10
• ระดับแอนติบอดีของเชื้อโบวายน์ไวรัลไดอะเรียและอุบัติการณ์เกิดโรคในโค ในพื้นที่ปศุสัตว์ เขต 1 2 3 และ 7 ของประเทศไทย	18
• ผลของระดับฮอร์โมน เอฟเอสเอช ต่อการเพิ่มการตกไข่ในโคพื้นเมืองสายอีสาน	29
• ผลความเข้มข้นของ Cysteine ในน้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris ต่อคุณภาพน้ำเชื้อโคนม	37
• ผลการเสริมกลูตามีนและไกลซีนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อโคนม ภายหลังการละลาย	44
• สมรรถนะทางการสืบพันธุ์ของโคเนื้อลูกผสมบราห์มันในภาคใต้ของประเทศไทย	52
• อิทธิพลของพลังงานเชิงลบช่วงหลังคลอดต่อความสมบูรณ์พันธุ์ในแม่โคนม ลูกผสมไทยโฮลสไตน์	65
• การพัฒนาชุดตรวจสอบความเป็นพ่อแม่ลูกโค ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอ ชนิดไมโครแซทเทิลไลท์ เพื่อเพิ่มความเชื่อมั่น	75
• ความสัมพันธ์ระหว่างสนิปของยีนเลปตินกับคุณภาพซากในโคเนื้อ ลูกผสมแองกัส x พื้นเมือง 50%	85
• อิทธิพลสนิปจีโนไทป์ของยีนคาลเปน และคาลปาสตาตินต่อลักษณะความนุ่ม ของเนื้อในโคลูกผสมแองกัส 50 % (Thai-Black)	94

โครงการเร่งรัดการผลิตโคเนื้อคุณภาพ โดยวิธีการผสมเทียม

นายรัตน์ ฉายารัตนศิลป์

การเลี้ยงโคเนื้อเป็นอาชีพทางการเกษตรที่สำคัญ และเกี่ยวข้องกับเกษตรกรไม่น้อยกว่าล้านครอบครัว การเลี้ยงโคเนื้อของเกษตรกรไทย ที่เคยใช้ประโยชน์เป็นแรงงานทำการเกษตรเป็นหลักนั้น ปัจจุบันความเจริญเติบโตของประชากรในประเทศที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว การใช้ประโยชน์ในที่ดินทำกินมีจำกัด ต้องใช้เกิดประโยชน์คุ้มค่า พื้นที่สาธารณะประโยชน์ที่เคยมีพืชอาหารสัตว์กระจายอยู่ทั่วไป ก็ลดลงอย่างเห็นได้ชัด เกษตรกรจำนวนมากต้องเลิกเลี้ยงโคเนื้อแบบเลี้ยงปล่อย มีการสูญเสียแม่พันธุ์โคไปเป็นจำนวนมาก แนวโน้มการเลี้ยงโคเนื้อต้องเปลี่ยนเป็นการเลี้ยงเพื่อจำหน่าย และเพื่อผลิตเนื้อโค ทั้งนี้เพราะความต้องการบริโภคเนื้อสัตว์เพิ่มขึ้น ทั้งจากความต้องการของประชากรในประเทศเอง และนักท่องเที่ยวจากต่างประเทศ ตลอดจนความต้องการของตลาดต่างประเทศ ยิ่งไปกว่านั้น การรวมตัวของประเทศในอาเซียน เกิดเป็นประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน ซึ่งจะเริ่มทำการค้าเสรี ตั้งแต่ปี พ.ศ.2558 เป็นต้นไปนั้น การเลี้ยงโคเนื้อจำเป็นต้องเปลี่ยนรูปแบบเป็นฟาร์มที่มีมาตรฐานการเลี้ยงที่สากลยอมรับ การผลิตเนื้อโคคุณภาพสูง (Premium Grade) ซึ่งประเทศไทยมีโอกาสและศักยภาพสูง เมื่อเปรียบเทียบกับประเทศต่างๆ ในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (ASAEN) มีความสามารถที่จะผลิตโคเนื้อคุณภาพสูง เพื่อการบริโภคภายในประเทศและส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศได้ ซึ่งผลจากข้อตกลงเขตการค้าเสรีอาเซียน (AFTA) ซึ่งมีผลตั้งแต่วันที่ 1 มกราคม 2553 ประเทศไทยเริ่มส่งออกโคเนื้อไปต่างประเทศเพิ่มมากขึ้น

กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ได้จัดทำแผนยุทธศาสตร์โคเนื้อ ดำเนินการระหว่างปี พ.ศ. 2555 – 2559 เพื่อเป็นแผนแม่บท และใช้เป็นแนวทางในการกำหนดนโยบายของรัฐบาล ในการผลิตโคเนื้อในประเทศ โดยรัฐบาลได้บรรจุ **"โครงการเร่งรัดการผลิตโคเนื้อคุณภาพ"** ไว้ในแผนบริหารราชการแผ่นดิน (4ปี) แล้ว โดยหวังว่าจะให้การเลี้ยงโคเนื้อเป็นอาชีพที่ทำรายได้ให้เกษตรกรอย่างสม่ำเสมอ

โครงการเร่งรัดการผลิตโคเนื้อคุณภาพสูงโดยวิธีการผสมเทียม ได้รับการจัดสรรงบประมาณดำเนินการ ระยะ 4 ปี ระหว่างปีงบประมาณ พ.ศ.2555-2558 โดยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ เป็นผู้รับผิดชอบดำเนินการผสมเทียมแม่โคเนื้อพื้นฐานในประเทศ คือพันธุ์พื้นเมือง พันธุ์ลูกผสมบราห์มัน ให้ได้ลูกเกิดโคเนื้อคุณภาพสูงสายเลือด 50 % ของพันธุ์ชาร์โรเลย์ หรือ พันธุ์แองกัส ในเบื้องต้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อยกระดับคุณภาพการผลิตโคเนื้อคุณภาพและเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรรายย่อยผู้เลี้ยงโคเนื้อ เพื่อสนองตอบความต้องการของตลาดโคเนื้อคุณภาพที่ขยายตัวอย่างรวดเร็ว และเพื่อปรับเปลี่ยนทัศนคติผู้บริโภค ให้นิยมบริโภคเนื้อคุณภาพเพิ่มขึ้น เป้าหมาย ผสมเทียมแม่โคเนื้อในประเทศ จำนวน 600,000 ตัว ผลิตลูกเกิดโคเนื้อคุณภาพดี จำนวน 180,000 ตัว

ปีงบประมาณ	ผสมเทียมแม่โค	ตรวจท้อง	ลูกเกิด	ลูกโคผู้	ลูกโคเมีย
2555	50,000	45,000	-	-	-
2556	100,000	90,000	30,000	15,000	15,000
2557	200,000	180,000	60,000	30,000	30,000
2558	250,000	225,000	120,000	60,000	60,000
2559	0	0	150,000	75,000	75,000
รวม	600,000	540,000	360,000	180,000	180,000

เกษตรกรเป้าหมาย คือ เกษตรกรต้นน้ำ ผลิตโคเนื้อคุณภาพ ป้อนสู่ตลาดเกษตรกรกลางน้ำ คือ กลุ่มโคเตรียมขุน และหรือ เกษตรกรปลายน้ำกลุ่มโคขุน และเชื่อมโยงกับผู้ประกอบการเนื้อโคคุณภาพ ต่อไป โดยคาดว่า เกษตรกรต้นน้ำจะสามารถผลิตลูกเกิดโคเนื้อคุณภาพ ตอบสนองความต้องการของตลาดในประเทศได้จำนวน 180,000 ตัว ในช่วงเวลา 4 ปี (ปี 2556-59) และมีกำไรตอบแทนจากการผลิตลูกโคเนื้อคุณภาพตัวละ 5,500 บาท ตั้งแต่ปีที่2 ของโครงการฯ จากผลผลิต จำนวน 60,000 ตัว เป็นเงิน 564 ล้านบาท

กลไกการขับเคลื่อนโครงการ มีการจัดตั้งและขึ้นทะเบียนกลุ่มผสมเทียมโคเนื้อคุณภาพผ่านศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพทั้ง 10 ศูนย์ การให้ผสมเทียมแม่โคของกลุ่มเกษตรกรฯ การติดตามตรวจท้อง ติดตามลูกเกิด การบันทึกข้อมูลประวัติการผสมเทียม และการรับรองพันธุ์เพื่อการจำหน่ายโคหย่านมของกลุ่มเกษตรกรฯ การปรับปรุงพันธุ์โคเนื้อคุณภาพสูง ใช้หลักการปรับพันธุ์แบบ Terminal Cross Breed ซึ่งช่วยให้เกิด Hybrid Vigor ที่ได้ประโยชน์สูง โดยการผสมข้ามสายเลือดระหว่างโคสายเลือด Bos Indicus ได้แก่โคพันธุ์ลูกผสมพื้นเมือง โคพันธุ์ลูกผสมบราห์มัน กับโคสายเลือด Bos Taurus ได้แก่ โคพันธุ์ชาร์โรเลย์ หรือ แองกัส เป็นต้น

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กำหนดแผนภูมิภาพการปรับปรุงพันธุโดยวิธีการผสมเทียมเพื่อมุ่งเน้นการผลิตลูกโคขุนคุณภาพในฟาร์มเกษตรกรรายย่อย (รุ่น F1) ที่เกิดจากแม่พันธุ์โคพื้นเมืองผสมเทียมกับน้ำเชื้อโคพ่อพันธุ์ ชาร์โรเลย์ หรือแองกัส ซึ่งตรงตามความต้องการของกลุ่มผู้ประกอบการโคขุน โดยเกษตรกรสามารขายลูกโค รุ่น F1 นี้ได้ทั้งตัวผู้และตัวเมีย ในราคาที่ใกล้เคียงกัน สำหรับลูกโค รุ่น F1 เพศเมีย ที่เกษตรกรต้องการเลี้ยงไว้ทำพันธุ์ต่อไปนั้น สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ไม่แนะนำให้ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อโคพ่อพันธุ์ชาร์โรเลย์อีก แต่สามารถผสมพันธุ์กับน้ำเชื้อพ่อโคพันธุ์ตากหรือพันธุ์กำแพงแสน จะได้ลูกเกิด รุ่น F2 และรุ่น F3 ที่สามารถขายให้กับผู้ประกอบการโคขุนได้ แต่การเลี้ยงการจัดการอาจยุ่งยากขึ้น ไม่เหมาะสำหรับเกษตรกรรายย่อยทั่วไป

จากผลการดำเนินโครงการในปีแรกของปีงบประมาณ 2555 เกษตรกรทั่วไป ได้รับโอกาสในการเชิญชวนเข้าร่วมโครงการ และผสมเทียมแม่โคไปแล้วจำนวน 41,713 ตัว คิดเป็นร้อยละ 84 ของเป้าหมาย แม่โคและลูกโคที่เกิดจะได้รับการติดหมายเลขประจำตัว (NID= National livestock Identification and Registration system) และการรับรองพันธุ์ เพื่อการซื้อขายที่ได้มูลค่าที่สูงขึ้น

การศึกษารูปแบบของยีน CD18 ที่ก่อโรค Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) ในโคไทยโฮลสไตน์ด้วยเทคนิค PCR

กัลยา เก่งวิกย์กรรม[1], ณชัย ศราธพันธุ์[1], ณัฐนันท์ ศิริรัตนธัญญะกุล[1] และ สายใจ ชื่นสุข[1]

[1]สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

บทคัดย่อ

โรค Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) เป็นโรคทางพันธุกรรม ที่เกิดจากยีนด้อย CD18 ชนิดโฮโมไซกัส (homozygous) ทำให้เป็นโรคบกพร่องภูมิคุ้มกัน และขาดความสมบูรณ์พันธุ์ พบในโคนมสายพันธุ์โฮลสไตน์ และมักจะตายตั้งแต่อายุน้อย 1-2 เดือน แต่โคนมที่มียีนด้อย แบบเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) จะมีอาการปกติ และเป็นตัวที่แพร่ยีนด้อยนี้ไปในฝูงโคนมที่มีสายเลือดโฮลสไตน์ มีการค้นพบครั้งแรกในสหรัฐอเมริกา ว่าโคนมพ่อพันธุ์โฮลสไตน์ เป็นพาหะของ โรคนี้ (BLAD carrier) และต่อมาพบพาหะโรค BLAD เพิ่มขึ้นในประเทศบราซิล และประเทศญี่ปุ่น จากรายงานที่พบมากขึ้น ผู้วิจัยจึงเริ่มทำการศึกษาเรื่องนี้ ในปี พ.ศ. 2554 ขึ้นเป็นครั้งแรกในประเทศไทยและได้นำเทคนิค PCR -RFLP ซึ่งให้ผลการตรวจที่รวดเร็วมาใช้ เพราะมีความเที่ยงตรง มากกว่าการตรวจนับเม็ดเลือดขาว ซึ่งเป็นการตรวจแบบดั้งเดิม การศึกษารูปแบบยีนCD18ครั้งนี้ ได้นำตัวอย่างดีเอ็นเอ ซึ่งสกัดจากเลือดของฝูงโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ จำนวน 220 ตัวของเกษตรกร ที่เกิดมาจากน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์โคนมโฮลสไตน์ของอเมริกา และตรวจเช็คความแม่นยำของชิ้นดีเอ็นเอที่ถูกตัดด้วยเอ็นไซมด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบส (DNA sequencing) ด้วยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ พบว่าในจำนวนโคทั้งหมด (220 ตัวอย่าง) มีโคที่เป็นพาหะโรคนี้ จำนวน 1 ตัว และมีรูปแบบยีน CD18 คือ156 bp, 201 bp และ357 bp แต่ตัวอย่างของยีน CD18 ในโคนมอีกจำนวน 199 ตัวที่ไม่เป็นพาหะโรคนี้ มีรูปแบบของยีน CD18 คือ 156 bp และ201 bp จากการศึกษาพบว่า prevalence rate ของการพบพาหะโรคนี้ มีค่าเท่ากับ 0.045% และมีความถี่ของยีนCD 18 เท่ากับ 0.094 แสดงว่าพาหะของโรคนี้ยังมีจำนวนน้อยอยู่

คำสำคัญ : รูปแบบของยีน CD18, Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) โคไทยโฮลสไตน์ เทคนิค PCR

Genotyping of Gene CD18 Causing Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) in Thai Holstein Cattle using Polymerase Chain Reaction (PCR).

Kalaya Kengvikkum[1], Nachai Sarataphan[1], Nattanant Sirivattanatanyakul[1] and Saijai Cheunsuk[1]

[1]Bureau of Biotechnology in Livestock Production Department of Livestock Development

Abstract

BLAD is a specific Holstein autosomal recessive genetic disorder characterized by immuno-deficiency, recurrent infections and infertility resulting in death of homozygous animals at the early age (1-2 months). Heterozygous cows and bulls are clinically normal but they have a chance of producing homozygous calves affected by the disease. It was firstly identified in Holstein sires of North American, then Brazil and Japan. According to those reports of finding BLAD carriers from many countries using deep frozen semen of American BLAD carrier sires, in 2011 PCR-RFLP was chosen to identify genotypes of gene CD18 for the first time in Thailand. Blood samples of Thai Holstein cattle population (n=220) to find out BLAD carriers. The PCR –RFLP procedure and DNA sequencing were adjusted for optimum conditions. The results showed that the genotype of BLAD carrier has three fragments of 156 bp, 201 bp and 357 bp whereas unaffected cattle have only two fragments of 156 bp and 201 bp. All genotypes were confirmed by DNA sequencing method. The prevalence rate of the BLAD-carrier were 0.045% and allelic frequency of CD 18, was only 0.094. It was concluded that the prevalent of CD18 gene mutation in Thai Holstein cattle was still very low.

Keywords : Genotyping, Gene CD18, Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency, BLAD, Thai Holstein cattle, Polymerase Chain Reaction, PCR

Introduction

BLAD is a specific Holstein autosomal recessive genetic disorder and results in death of homozygous animals at the early age (1-2 months). It was firstly identified in North American Holstein (Shuster et al 1992). BLAD carriers were among the most popular top bulls of the Holstein breed such as Osborrndale Ivanhoe, Penstate Ivanhoe Star, and Carlin-M Ivanhoe Bell (Shuster et al 1992, Powell et al 1996). Widespread use of Artificial insemination (AI) and multiple ovulation embryo transfer (MOET) techniques caused demanding semen from those elite Holstein bulls. Affected cattle with BLAD were linked to common the ancestor sires that were proved to be carriers (Shuster et al 1992, Jørgensen et al 1993). Thai Holstein cattle inherited disorder by autosomal recessive gene and expressed as a diseased phenotype if both alleles are present (Homozygous). Homozygous individuals can be identified by different methods such as clinical examination, analysis of enzyme activity in blood and genomic analysis. With the molecular basis, the screening of carriers (Heterozygous) is possible at the direct genetic detection. This study aims to develop the PCR-RFLP conditions and estimate the BLAD allele in 220 Thai Holstein cattle.

Material and Methods

Blood samples were collected from 220 cattle of Thai Holstein cattle's jugular vein into EDTA containing tubes. DNA was isolated using Axyprep Blood Genomic DNA Miniprep Kit and stored at 4°C until analysis.

Genotyping for BLAD was carried out using PCR-RFLP methods. PCR was made in 20µl reaction mixture containing 1µl Genomic DNA, 1U Taq polymerase, 0.2mM dNTP, 5 µM of each primer (F: 5' GAA TAG GCA TCC TGC ATC ATA TCC ACC A 3' R: 5' CTT GGG GTT TCA GGG GAA GAT GGA GTAG 3') The primers were designed to amplify a DNA fragment of 357 bp. (Meydan, et al. 2010) The cycling reaction were performed in a Personal Thermal Cycler (MJ Mini™) with an initial denaturation for 3 min at 96oC followed by the thermal cycles as follows : denaturation step at 94oC for 30s, annealing step at 66oC for 30s, and an elongation step at 72oC for 30s. The reaction was completed with a final elongation step at 72oC for 5 min PCR products were analyzed with 2% agarose gel. The 357 bp DNA fragment was amplified by PCR. Aliquots of 2 µl of PCR product were subjected to restriction digestion with TaqI in a 10 µl reaction volume. Using 0.2 µl TaqI restriction endonuclease with BSA per one sample, the mixture was incubated at 65oC for 3 hr. The digested amplified PCR product on 2% agarose gel yielded two bands of 201 and 156 bp for normal animals and three bands of 201, 156 and 357 bp for carriers. The amplified PCR product of 357 bp was for the BLAD locus.

One DNA of known carrier of BLAD as a control was obtained from Dr. Istvan Anton, Research Institute for Animal Breeding and Nutrition (ATK) Herceghalom, Hungary. All genotypes were confirmed by DNA sequencing technique. After gel electrophoresis, the amplicons were purified using NucleoSpin® Extract II and sequenced by Big Dye Terminator chemistry on an ABI 3130 Automated DNA Sequencing.

Allelic Frequency estimate

The gene frequency estimate of the CD18 was calculated based on the Hardy-Weinberg law as follow: $p = \frac{2(AA) + (Aa)}{2N}$ $q = 1-p$ (Crow, J F. 1999).

Where p = normal allele frequency, q=mutant allele frequency, N= total number of animal tested, AA = number of BLAD-free cattle, and Aa = number of BLAD carriers.

Results

The primer mentioned above successfully amplified the DNA fragments of 357 bp for BLAD. In figure 1, there were five BLAD carriers: an example from Hungary as a control and four samples in Thai Holstein have three fragments of 156 bp, 201 bp and 357 bp whereas unaffected cattle have only two fragments of 156 bp and 201 bp. The BLAD positive and negative samples were sequenced by Big Dye Terminator chemistry on an ABI 3130 Automated DNA sequencing (Applied Biosystems, USA). The DNA sequences were analyzed using the Sequencing Analysis Software Version 3.3 (Applied Biosystems). Among five carriers' allele, there were only two mutant alleles: a control sample DNA from Hungary and one sample from Thai Holstein bull. The other three alleles (Figure 1: in the column 5, 6, 7) were found to be false positive when confirmed by DNA sequencing method. To improve that PCR-RFLP analysis should be a strong and reliable method for identification of BLAD. Many trials have been done in both PCR and of TaqI enzyme conditions in order to find the optimum procedure. Finally, a proper condition of TaqI enzyme was found by adding BSA 1 µl (0.1%) and reducing DDW (deionized distil water) from 6.8 µl to 5.8 µl in total solution 10 µl. DNA samples from Thai Holstein cattle in column 5, 6, and 7 in Figure 1 were truly false positive when checking sequences. (Figure 2)

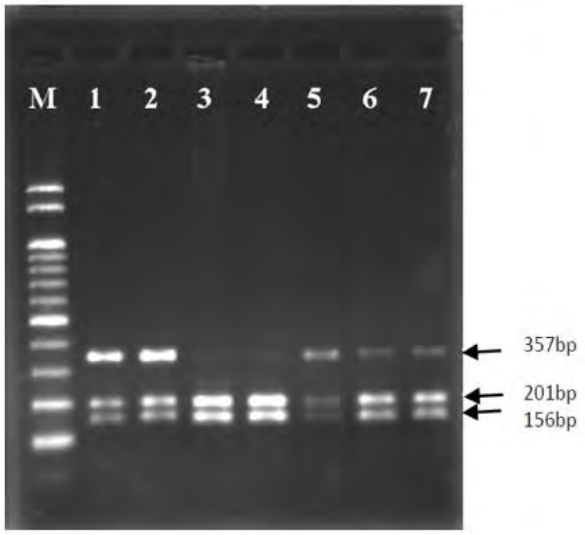


Figure1: Visualization of restriction fragments produced by TaqI enzyme on the PCR products. Column M: 100 bp ladder.

Column 1-2: Positive control DNA from Hungary cow and positive sample of Thai Holstein cattle respectively.

Column 3-4: Negative DNA samples of Thai Holstein cattle

Column 5, 6, 7: (false) positive DNA samples of Thai Holstein cattle

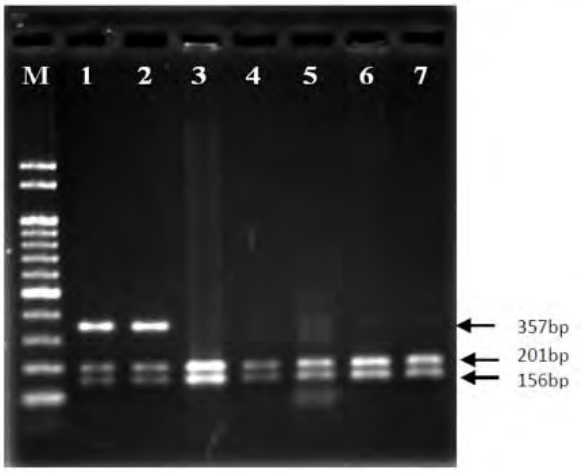


Figure 2: Visualization of restriction fragments produced by TaqI enzyme on the PCR products.

Column M: 100 bp ladder.

Column 1-2: Positive control DNA from Hungary cow and positive sample of Thai Holstein cattle

Column 3, 4, 5, 6, 7: Negative DNA samples of Thai Holstein cattle

The results from 220 DNA samples showed that there were only two genotypes. One type was of known carrier (heterozygous; Aa) and the other was of normal cow (homozygous; AA). The homozygous of recessive gene of CD18 cannot be found. All genotypes were confirmed by sequencing method. The nucleotide sequence was in the GenBank with accession number FJ853493 for BLAD. The result of sequencing for the mutant BLAD allele was confirmed a single point mutation at the nucleotide 383 in the CD18 gene as the other reports (Figure 3) (Kriegesmann, et al 1997, Meydan, et al. 2010). In this paper: the prevalence of BLAD carriers in Thai Holstein cattle was found 0.045% and the gene frequency of CD 18, calculated according to the Hardy-Weinberg Law was only 0.01in the 220 samples. The other incidence of BLAD carriers among Top sires was also found to be 23% in U.S.A. (Shuster et al 1992), 10% in France (Tainturier et al 1995), 16% in Japan (Nagahara et al 1995), 3.33% in Iran (Norouzy et al 2005) and 4.76%(Patel et al 2011)

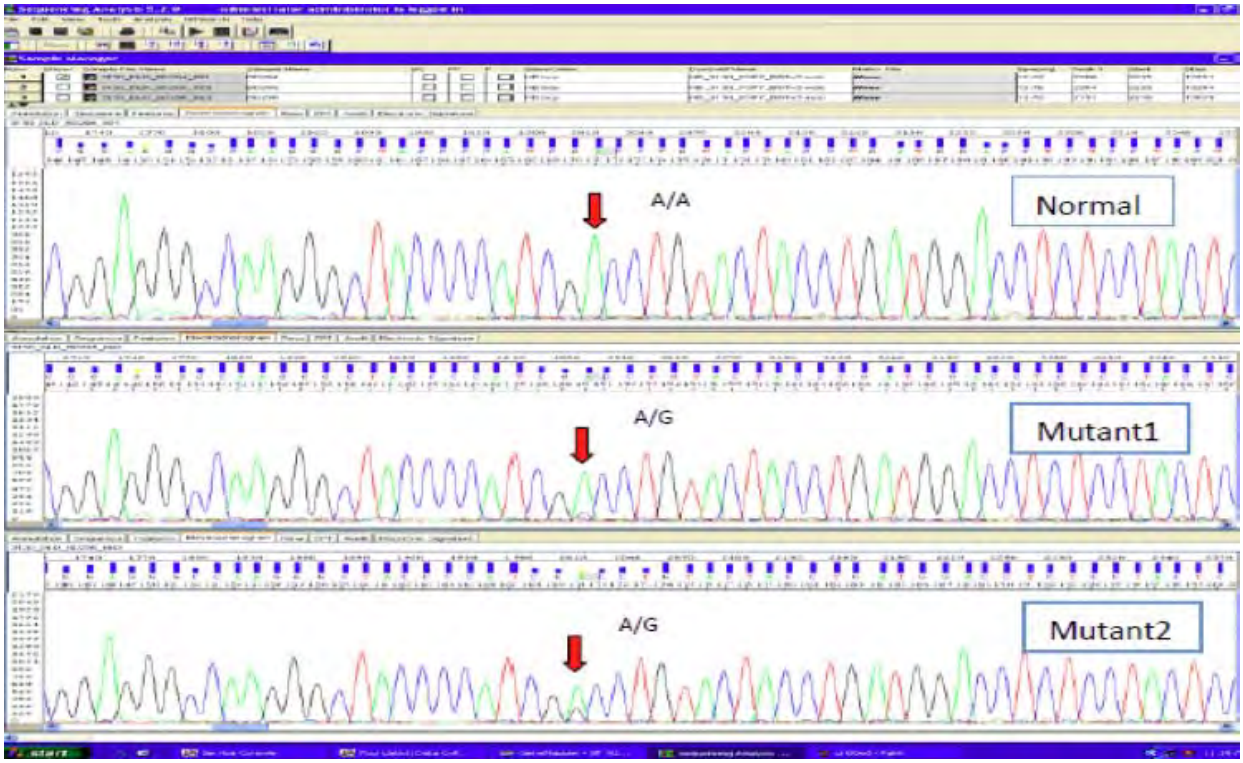


Figure 3 Alignment of BLAD sequences from normal Thai Holstein cow (green peak pointed by the arrow represented the A/A bp), mutant1 (positive control DNA from Hungary; two peaks pointed by the arrow represented the A/G bp) and mutant 2 from normal Thai Holstein (positive BLAD-DNA from a Thai sample; two peaks pointed by the arrow represented the A/G bp) on the second and third rows respectively. The mutation consists of a single point mutation of nucleotide 383 in the CD18 gene. The box indicates the single point mutation site (A to G)

Discussion

The PCR-RFLP procedure was adjusted by our team to eliminate the false positive. Finally, the restriction enzyme TaqI digested the PCR product into two fragments of 156 bp and 201 bp (Figure 2, lane 3, 4, 5, 6 and 7) in normal homozygote. Heterozygote animals gave three fragments of 156 bp, 201 bp and 357 bp (Figure 2, lane 1 and 2). It was the same as other experiments that normal unaffected BLAD cattle have two fragments of alleles and the carriers had three fragments in PCR-RFLP method. Ribeiro, et al (2000) surveyed BLAD in Holstein and Gir cattle in Brazil and used the enzyme TaqI to digest the PCR product. In normal homozygote there were two fragments of 26 and 32 bp and in BLAD carrier had three fragments of 58, 26 and 32 bp. Meyden, et al (2010) used PCR-RFLP method and DNA sequencing for screening genotyping BLAD of 350 Holstein cows in South East Anatolia in Turkey between the years 2007-2009. The normal unaffected BLAD cattle alleles produced two fragments of 156 bp and 201 bp. BLAD carriers exhibited three fragments of 156, 201 and 357 bp.

The prevalence of BLAD in this paper is still low at 0.045% and allelic frequency of CD 18, was only 0. 094. It was because of small investigated number of samples and could be higher in the coming years. As the selection within Holstein breed, its' crosses and AI programs are of major factors to spread of undesirable genetic disorder of BLAD. Routine checking of bulls and dams by the Real time PCR is required to reduce the recessive lethal gene in Thai Holstein cattle population.

Acknowledgements

The author wish to thank Dr. Istvan Anton, Research Institute for Animal Breeding and Nutrition (ATK) Herceghalom, Hungary for giving DNA of known carries of BLAD.

References

Crow, James F. (1999). "Hardy, Weinberg and language impediments". Genetics 152 (3): 821–825. PMC 1460671. PMID 10388804. [Online]

http://www.genetics.org/cgi/pmidlookup?view=long&pmid=10388804. Access 10/1/2011.

Jørgensen, C.B., Agerholm J.S., Pedersen J. and Thomsen, P.D. 1993. Bovine leukocyte adhesion deficiency in Danish Holstein-Friesian cattle. I. PCR screening and allele frequency estimation. Acta. Vet. Scand. 1993; 34(3):231-6.

Meydan, H., Yildiz, A.M. and Agerholm, J. 2010. Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophos synthase, complex vertebral malformation, bovine citrullinaemia, and factor XI deficiency in Holstein cows reared in Turkey. Acta. Veterinaria Scandinavica. 52:56

Kriegesmann, B., Jansen, s., Baumgartner B.G. and Brening, B. 1997. Partial genomic structure of the bovine CD18 gene and the refinement of test for bovine leukocyte adhesion deficiency. J. Dairy Sci. 80: 2547-2549

Nagahara, H., Tamoto K., Noda, H. and Kociba, G.J. 1995. Expression and role of adhesion molecule CD18 on bovine neutrophils. Can.J.Vet. Res. 59:1-7

Norouzy A., Nassiry, M.R., Eftekharishahrody, F., Javadmanesh, A., Mohammad Abadi, M.R. and Sulimova, G.E. 2005. Identification of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) carriers in Holstein Brown Swiss AI bulls in Iran. Russ.J.Gen. 41(12):1679-1701

Patel, M., Patel, R.K, Sing, K.M., Rank, D.N., Thakur, M.C. and Khan, A. 2011. Detection of genetic polymorphism in CD18 gene in cattle by PCR-RFLP. Wayamba Journal of Animal Science. http://www. Wayambajournal.com

Powell, R.L., Norman, H.D. and Cowan, C.M. 1996. Relationship of bovine leukocyte adhesion deficiency with genetic merit for performance traits. J. Dairy Sci. 79:895-899.

Ribeiro, L.A., Baron, E.E., Martinez, M.L, and Coutinho, L.L. 2000. PCR screening and allele frequency of bovine leukocyte in Holstein and Gir cattle in Brazil. Genetics and Molecular Biology, 23 4, 831-834

Shuster, D.E., Kehrli, M.E. JR, Ackermann, M.R. and Gilbert, R.O. 1992. Identification and prevalence of a genetic defect that causes leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. Proc.Natl. Acad.Sci. USA 89:9225-9229

Tainturier, D., Grobet, L., Brouwers, B., Bruyas, J.F., Fieni, F., Battut, I., Lecoanet, J., Douart, A., Breton, I. and Duclos, P. 1995. Observations on three cases of bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD) Revue-de Medecine Veterinaire 146(3): 189-195

ระดับแอนติบอดีของเชื้อโบวายน์ไวรัลไดอะเรีย และอุบัติการณ์เกิดโรคในโคในพื้นที่ปศุสัตว์ เขต 1 2 3 และ 7 ของประเทศไทย

ไกรวรรณ หงษ์ยันตรชัย[1] อรุณ จันทร์กระจ่าง[1] พรรณพิไล เสกสิทธิ์[2]

[1]ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี จ. สระบุรี

[2]สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ จ. ปทุมธานี 12000

บทคัดย่อ

การศึกษาความชุกของโรคไวรัสโบวายน์ไวรัลไดอะเรีย (Bovine Viral Diarrhea: BVD) ในเขตพื้นที่ปศุสัตว์เขต 1, 2, 3 และ 7 ของประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากฟาร์มโคนมลูกผสมโฮลสไตน์-ฟรีเชี่ยน 108 ฟาร์ม จำนวน 3,380 ตัวอย่างและเจาะเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อหูจาก 89 ฟาร์ม จำนวน 2,679 ตัวอย่าง ตรวจแอนติบอดี โดยใช้ PrioCHECK®BVDV Ab และตรวจแอนติเจนจากเนื้อเยื่อหนังหูโดยใช้ PrioCHECK® BVDV AgPl^{focus} ซึ่งเป็นชุดตรวจอีไลซ่าสำเร็จรูป ของประเทศเนเธอร์แลนด์ ผลการตรวจแอนติบอดี พบว่าพื้นที่ปศุสัตว์เขต 7 มีจำนวนฟาร์มที่ตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสบีวีดีสูงสุดเป็นร้อยละ 83.9 ขณะที่พื้นที่เขต 3, 1 และ 2 พบร้อยละ 72.0, 62.5 และ 53.6 ตามลำดับ และพบว่าโคในพื้นที่ ปศุสัตว์เขต 7 มีจำนวนโคนมที่ตรวจพบแอนติบอดีต่อเชื้อไวรัสบีวีดีสูงสุดเช่นกัน คิดเป็นร้อยละ 30.21 ขณะที่พื้นที่ปศุสัตว์เขต 3, 1,และ 2 พบ ร้อยละ 20.05, 14.97 และ 2.86 ตามลำดับ พบระดับแอนติบอดีในฟาร์มที่มี และไม่มีประวัติแท้งลูกหรือลูกตาย ทั้ง 4 เขต เป็นร้อยละ 71.43 และ 64.44 ตามลำดับ และพบระดับแอนติบอดีในกลุ่มแม่โค โคสาวและลูกโคเป็นร้อยละ 20.79, 10.88 และ 10.36 ตามลำดับ สำหรับผลการตรวจแอนติเจนเนื้อเยื่อหนังหู ในระดับฟาร์มพบในฟาร์มของพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2, 3 และ 7 คิดเป็นร้อยละ 4.5, 5.6 และ 6.9 ตามลำดับ แต่ไม่พบในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 1 อัตราการพบในโคเพศเมียของพื้นที่ปศุสัตว์เขต 2, 3, และ 7 เป็นร้อยละ 0.2, 0.2,และ 0.2 ตามลำดับ ไม่พบในโคของพื้นที่ปศุสัตว์เขต 1 และตรวจพบแอนติเจนเฉพาะในฟาร์มที่มีประวัติแท้งลูกหรือลูกตาย เป็นร้อยละ 6.45 โดยพบแอนติเจนในกลุ่มแม่โค โคสาวเป็นร้อยละ 0.11, 0.52 ตามลำดับ ไม่พบในลูกโค ผลจากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ในการวางมาตรการควบคุมและกำจัดโรคบีวีดีไม่ให้แพร่กระจายต่อไป

คำสำคัญ : โบวายน์ไวรัลไดอะเรีย ไวรัสบีวีดี โคนม แอนติบอดี แอนติเจน

Seroprevalence against Bovine Viral Diarrhea in Cattle in 4 Livestock Regions of Thailand

Kriwon Hongyuntarachai[1] Arun Chungrachang[1] Panpilai Sekasiddhi[2]

[1]Saraburi Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Saraburi 18260

[2]The Bureau of Biotechnology in Livestock Production,

Department of Livestock Development, Pathumthani.

Abstract

A prevalence study of Bovine Viral Diarrhea (BVD) by detecting BVDV antibodies and antigens in cattle was conducted. A total of 3,380 blood and 2,679 ear notch tissue samples were collected from female crossbred Holstein-Friesian of 108 farms in the areas of Livestock Region (LR) 1, 2, 3 and 7 of Thailand. The blood samples were screened for antibodies against BVDV using ELISA test kit :PrioCHECK®BVDV Ab, while ear notch tissue samples were tested for BVDV antigens using PrioCHECK®BVDV Ag Pl^{focus} . Results of BVDV antibody prevalence showed that the farms in LR7 had highest seroprevalence of 83.9% followed by LR3, 1, 2, (72%, 62.5% and 53.6%, respectively). The number of cattle with seroprevalence was also highest in LR7 (30.21%) followed by the same sequence of LR3, 1, 2, (20.05%, 14.97% and 2.86%, respectively). In addition, the farms with history of abortion had higher seroprevalence than those without history ones (71.43% and 64.44%, respectively). While cows had higher seroprevalence than heifers and calves (20.70%, 10.88% and 10.36%, respectively). Results of BVDV antigens detection from 89 farms, there were positive in LR2, 3 and 7 (4.5%, 5.6% and 6.9%, respectively) but not in LR1. While the number of positive antigen detected from 2,679 cattle in LR1, 2, 3 and 7 were 0%, 0.2%, 0.2%, and 0.2%, respectively. The positive antigen was detected only in the farms with abortion history (6.45%) but not in the farms without abortion. The positive antigens prevalence in cows, heifers and calves were 0.11%, 0.52% and 0%, respectively. This study provides beneficial information for dairy cattle reproductive herd health management planning and BVD prevention program.

Keywords : Bovine viral diarrhea, BVDV, cattle, antibody, antigen

Introduction

In Thailand, artificial insemination activity mainly supported by the Bureau of Biotechnology in Livestock Production (BBLP) has taken a major role in livestock improvement especially in dairy cattle. Normally, dairy farmers prefer to get high production by gaining a calf/year and minimizing day-open period. Some cows aborted at the first 3 months or the 3 months of midterm or at the late 3 months of gestation period. The abortions included early embryonic death and mummification. Any cow that had an early embryonic death could be on heat as usual. As a result, the owner might think about infertility problem or an accident in case of abortion. Some newborn calves died of weakness with unknown cause. Therefore, infectious diseases those result in abortion, for example, bovine viral diarrhea (BVD) should not be excluded.

The BVDV, distributed worldwide, is a heterogeneous group of viruses belonging to genus pestivirus, family flaviviridae (Becher et al., 2002). It exists as a cytopathogenic (CP) and noncytopathogenic (NCP) biotype, based on the presence or absence of visible cytopathic effects in the cell culture (Dubovi, 1990). Fetuses infected with non-cytopathogenic biotype of BVDV in the period of between 30 to 120 days of gestation develop immune tolerance and will be persistently infected (PI). These PI calves are highly susceptible to other diseases. As the PI animals have very high and persistent viremia, consequently, they were primary reservoir of BVDV and can disseminate infection by shedding the virus through nasal discharge, saliva, semen, urine, feces, tear and milk (Brock, 1995).

There is no adequate information about prevalence of BVDV persistency in Thailand. Therefore, the present study was aimed to survey the prevalence of PI animals among Holstein dairy cattle herds in the Livestock Region 1st, 2nd, 3rd and 7th of Thailand. The design of effective control and eradication strategy depends on the knowledge of epidemiological parameters, including the prevalence of PI animals which reflected from the antibody and antigen detection.

Material and Methods

The study comprised of 22 months period from October 2009 – July 2011. A total of 3,380 animals from 108 farms in the Livestock Region 1st, 2nd, 3rd and 7th non – vaccinated with any BVD virus vaccines, were randomly purposive sampling. Both serum and ear notch biopsy samples were taken from each animal that has history record such as abortion, bearing weak calf and in addition with complete history: age, breed of the animals, total number of animals on a farm, pregnancy status, and previous diseases. The blood samples were analyzed for the presence of BVDV antibodies using an ELISA test kit, PrioCHECK®BVDV Ab, while ear notch tissue samples were tested for BVDV antigens using PrioCHECK®BVDV Ag PIfocusat the BBLP central lab, Pathumthani province. The kit detected the highly stable virus protein,

which was secreted extracellularly during virus replication. The sensitivity (Se) and specificity (Sp) of the tests were 98% and 99% for BVDV antibodies, 100% and 99.4% for BVDV antigens, respectively, as indicated by the manufacturer.

Statistic analysis. All data were calculated into 4 aspects as follows;

1. The prevalence = $\frac{\text{number of infected cattle}}{\text{number of cattle examined}}$
2. Percentage of farms with positive to BVDV antibodies
3. Percentage of heads of cattle with positive antibodies
4. Percentage of farms and heads of cattle with positive to BVDV antigen

Results

Table 1 showed that a total of 3,380 cows within 108 dairy cattle herds in the Livestock Region 1st, 2nd, 3rd and 7th there were 108 farms (68.5%) positive to antibody against BVDV. Among those farms in the regions, it was found that farms in LR7th had the highest antibody prevalence of 83.9%, followed by the, farms in the LR3rd, 1st and 2nd (72%, 62.5% and 53.6%, respectively). Also the prevalence of cattle (heads) in LR7th having the antibody was higher (30.21%) than that of cattle in LR1st (14.97%), 2nd (2.86%) and 3rd (20.05%).

Table 2 showed that the cows had the higher prevalence of serum antibody (20.79%) than heifers (10.88%) and young calves (10.36%)

Table 3 showed the detection of BVDV antigen from ear notch biopsy samples of 4 Livestock Regions, by PrioCHECK® BVDV AgPIfocus ELISA test kit. It was found that there were 4 infected farms located in LR 2nd (1 farms), LR 3rd (1 farms), and LR 7th (2 farms). The farms having prevalence of abortion were found BVDV antigen positive test at 6.45%. While there were no prevalence BVDV antigen positive in the farms without prevalence of abortion.

Table 4 showed that out of 1,849 cows and 389 heifers, BVDV antigen detection was lower in cows than heifers (0.11% and 0.52%, respectively). Whereas there was no BVDV antigen positive in 441 samples from calves.

Table 5 showed status of farms and cattle with positive antibody detected by PrioCHECK®BVDV Ab and positive antigen by PrioCHECK®BVDV Ag PI^{focus}. There are 4 farms and 4 cattle with antigen positive, 2 farms in LR7, one farm LR3 and LR2. Farm 1-3 had high antibody prevalence (83.9%, 97.6% and 97.1%, respectively) in all cattle and 6-12 months cattle (100%, 75% and 100%, respectively), except for farm 4 that had low antibody and antigen prevalence (8.3% and 0%, respectively). Most of the cattle that positive antigen detection (3/4), had negative antibody.

Discussion and Conclusion

The detection of BVDV antigen and antibody had been done in farm level and cattle in 4 important Livestock Regions. The results showed that the farms in the Livestock Region 7th (LR7) had highest prevalence of both BVDV antibody and antigen. Physically the LR7 occupied large area with the most congested farms and population of dairy cattle (DLD, 2012). Aiumlamai et al. (1992) reported 4.4% prevalence of BVDV antibody from bulk milk tanks of dairy farms in the Muaglek area, while Virakul et al. (1997) reported at 15.8%, 39.6% 32.9% and 11.2% in LR 1,2,3, and 7, compared with this report (Table 1) at 62.5%, 53.6%, 72.0% and 83.9% respectively, in the same regions. The 2 reports showed that BVDV spreaded rapidly in all studied regions. Every cattle in this study were non-vaccinated herd. Therefore, the antibody, found in every cattle was active immunity. However the antibody of calves might be the passive immune derived from their dams or be the immunity producing by themselves when they were 125 days embryo facing the BVDV (Kampa, 2008). It is difficult to prevent and control BVD disease effectively. Therefore the outbreak of BVD disease can happen rapidly and widely.

The antibody prevalence was not so different between farms with and without abortions (71.43% vs. 64.44%). So, BVDV antibody might not influence on abortion. It is generally considered that serologically positive; nonviremic cattle are 'safe', providing that they are not pregnant (Drew, 2008).

From Table 2, according to positive antibody prevalence of cows, heifers and young calves (20.79%, 10.88% and 10.36%) compared to the study of Ajariyakhajorn et al. (2000) in milking cows, dry cows, heifers and calves (66.1%, 82.4%, 54.2% and 43.3%, respectively). The positive antibody prevalence was the same sequence by adult cattle had highest antibody prevalence, then heifers and calves. Transmission is most efficient by direct contact. However, as infections have been observed in closed, non-pasturing herds, other transmission routes seem likely to have some practical importance, Differences in BVDV prevalence among regions or introduction of virus in herds previously free of BVDV are often associated with particular epidemiological determinants such as cattle population density, animal trade and pasturing practices (Houe,2003).

In this study, the total prevalence of antigen detection figures from farms and cattle were 4.5% and 0.1% respectively (Table 3). The status of antigen positive cattle was acute infectious or PI cattle. PI cattle are the main source for transmission of the virus. However, acutely infected cattle as well as other ruminants, either acutely or persistently infected, may transmit the virus (Houe, 2003). In generally, there were 1-2% PI cattle within the cattle population and such animals had no or low antibodies to BVDV (Drew, 2008). Groom (2005) reported that high BVDV titer in non-vaccinated calves 6-12 month of age had been showed to be a reliable

indicator that cattle persistently infected with BVDV were present in the herd. Since BVDV antigen was found in only farms that had abortion (6.45%) but not in the farms without abortion. It might be concluded that BVDV is one of the causes of abortions on those farms.

From table 4, there was no positive antigen detection in young calves, inconsistent with positive antibody in table 2. It might be due to the last longing of maternal antibody in colostrums which could be lasted for 13 months for BVD (Virakul et al., 1997). Coria and McClurkin (1978) studied the duration of active and colostrum-derived passive antibodies to bovine viral diarrhea virus in 14 calves. Five calves born with actively induced antibodies to BVDV retained high titers during the year of observation. Colostrum-derived antibodies to BVDV in nine calves declined at an expected rate for the first four to six months of age. However, titers of six of these calves increased at five to eight months of age and either remained constant or increased through one year of age.

From table 5, most of the farms (3 out of 4) had high prevalence of BVDV antibodies (83.9%, 97.6% and 97.1%), but only farm 4 that located in LR2nd had low prevalence (8.3%). It might be due to the first infection in the farm, the immunity in the cow could develop at the third week after infection, stable in 10th-13th week then a little decline and still in longlife (Kampa, 2008). The 12-year old cow with positive antibody and antigen and history of repeat breed was still pregnancy at 3.5 months (Farm 1), according to Drew (2008) reported that the dam would often have high antibody titres (>1/2000) to BVDV, which was suggestion of fetal infection and was probably due to the fetus providing the dam an extended challenge of virus. The problem might occur when the antigen positive pregnant cow in farm 1 might serve as reservoir animal that had a potential to transferring BVDV to her fetus or other cattle on farm (Moenning and Liess, 1995). Most of the 6-12 month cattle (farm 1, 2 and 3) had high prevalence of antibody against BVDV (100%, 75% and 100%, respective). The high antibody in non vaccinated young calves aged at 6-12 months indicated virus persistency in herds (Groom, 2005).

Based on the results obtained from this study, antibodies prevalence can be found in cattle, ether in farms with or without abortions. However, antigen prevalence was neither found in farms without abortion nor in calves. According to the reports of Aiumlamai et al.(1992), Virakul et al. (1997), Kampa et al. (2004) antibodies prevalence can be found in generally and should be tested for PI cattle. When BVDV still circulates in those areas, it may cause losses in Thai dairy production in the future (Kampa et al., 2011).

To get rid of PI by a proper country-control plan, Department of Livestock Development should educate the dairy farmers, dairy cooperatives and the government officers in order to corporate and investigate the infected farms and cattle.

References

Aiumlamai, S., Alenius, S. and Nithichai, K. 1992. Prevalence of antibodies to various bovine viruses in bulk tank samples from dairy herds in the Muaglek area. Thai J Vet Med. 22:113-120.

Ajariyakhajorn, K., Boonserm, T., Inchaisri, C., Oraveerakul, K. and Maneechaiwongse, K. 2000. Epidemiology of bovine viral diarrhea virus (BVDV) infection in bulk tank milk antibody positive dairy herds. pp. 75-82l. Proceedings of the 26th Veterinary Medicine and Livestock Development Annual Conference; Miracle Grand Convention, Bangkok, Thailand.

Becher, P., Thiel, H.J., Collins, M., Browlie, J. and Orlich, M. 2002. Cellular sequences pestivirus genomes encoding gamma-aminobutyric acid (A) receptor-associated protein and Golgi-assosiated ATPase enhancer of 16 kilodaltons. J. Virol. 76:13069-13076.

Brock, K.V. 1995. Diagnosis of bovine viral diarrhea infections. Vet. Clin. North Am. 11:549-561.

Coria, M.F. and McClurkin, A. W. 1978. Duration of active and colostrum-derived passive antibodies to bovine viral diarrhea virus in calves. Can J Comp Med. 42(2): 239–243.

Department of Livestock Development (DLD), 2012. Available source: http:// dld.go.th/ict/th/images/stories/stat_web/yearly/2554/gis54/dairy_den54.pdf. Access: September 17, 2012.

Drew, T. 2008. Bovine viral diarrhea. Available source : http://www.oie.int. Access: September 17, 2012.

Dubovi, E.J. 1990. The Diagnosis of bovine viral diarrhea infection. Vet. Med. 85:1133-1139.

Grooms, D.L. 2005. Diagnosis of Bovine Viral Diarrhea Virus: A key component of a comprehensive BVDV control program. Available source:http://ars.usda.gov/SP2UserFiles/Place /36253000 /BVD2005/ Produce 2_Grooms_Hout.pdf. Access: September 11, 2012.

Houe, H. 2003. Epidemiological features and economical importance of bovine virus diarrhea virus (BVDV) infections. Vet. Microbiol. 93: 275-276.

Kampa, J. 2004. BVDV and BHV-1 Infections in Dairy Herds in Northern and North Eastern Thailand. Acta vet. Scand. 45: 181-192.

Kampa, J. 2008. Bovine Viral Diarrhoea. KKU. Vet. J. 18(1):54-67.

Kampa, J., Sigh-na, U., Kanistanon, K. and Aiumlamai, S. 2011. Reproductive loss due to Pestivirus infection in dairy cattle herds in Thailand. Thai J. Vet. Med. 41(4): 409-415

Moennig, V. and Liess, B. 1995. Pathogenesis of intrauterine infection with bovine viral diarrhea virus. Veterinary Clinics of North America: food animal practice. 11: 477-487.

Virakul, P., Suadsong, S., Suwimonteerabutr, J. and Singlor, J. 1997. Prevalence of infectious bovine rhinotracheitis (IBR), bovine viral diarrhea (BVD), parainfluenza – 3 (PI3) and bovine respiratory syncytial (BRS) viruses in Thai dairy farms. Thai J. Vet. Med. 27(3):295- 313.

Table 1 The prevalence of BVDV antibody detected by and PrioCHECK®Ab in 3,380 cattle from 108 farms selected out of the Livestock Region (LR) 1st, 2nd, 3rd and 7th

	the Livestock Region (LR)				
	LR 1st	LR 2nd	LR 3rd	LR 7th	Total
No. farms	24	28	25	31	108
BVD positive (farms)	15	15	18	26	74
Prevalence (%)	62.5	53.6	72.0	83.9	68.5
No. cattle (heads)	695	874	798	1,013	3,380
BVD positive (heads)	104	25	160	306	595
Prevalence (%)	14.97	2.86	20.05	30.21	17.60
No. farms prevalence of abortion	10	15	13	25	63
BVD positive in farms (prevalence of abortion).	6	8	10	21	45
Prevalence (%) in farms (prevalence of abortion).	60.0	53.33	76.92	84.00	71.43
No.farms no prevalence of abortion	14	13	12	6	45
BVD positive in farms (no prevalence of abortion).	9	7	8	5	29
Prevalence (%) in farm (no prevalence of abortion).	64.29	53.85	66.67	83.33	64.44

Table 2 The prevalence of Antibody against BVDV in serum of cows, heifers and young calves selected out of the Livestock Region 1st, 2nd, 3rd and 7th detected by ELISA PrioCHECK®BVDV Ab

LR	cows			heifers			Young calves		
	No. (head)	positive (head)	prevalence (%)	No. (head)	positive (head)	prevalence (%)	No. (head)	positive (head)	prevalence (%)
LR 1st	453	88	19.4	110	10	9.1	132	6	4.5
LR 2nd	652	19	1.4	113	4	3.5	109	2	1.8
LR 3rd	495	121	24.4	140	13	9.3	163	26	16.0
LR 7th	724	255	35.2	152	29	19.1	137	22	16.1
Total	2,324	483	20.79	515	56	10.88	541	56	10.36

Table 3 The prevalence of BVDV antigen detected by PrioCHECK®AgPl^{focus} from ear notch samples selected out of the Livestock Region (LR) 1st, 2nd, 3rd and 7th

	the Livestock Region (LR)				
	LR 1st	LR 2nd	LR 3rd	LR 7th	Total
No. farms	20	22	18	29	89
BVD positive (farms)	0	1	1	2	4
Prevalence (%)	0	4.5	5.6	6.9	4.5
No. cattle (heads)	581	597	589	912	2,679
BVD positive (heads)	0	1	1	2	4
Prevalence (%)	0	0.2	0.2	0.2	0.1
No. farms prevalence of abortion	10	15	13	25	6326
BVD positive in farms (prevalence of abortion).	0	1	1	0	
Prevalence (%) in farms (prevalence of abortion).	0	6.67	8.33	8.00	6.45
No.farms no prevalence of abortion	10	7	5	4	26
Prevalence in farms (no prevalence of abortion).	0	0	0	0	0
BVD positive (%) in farm (no prevalence of abortion).	0	0	0	0	0

Table 4 The prelalence of BVDV antigen from ear notch samples of cows, heifers and young calves selected out of the Livestock Region 1st, 2nd, 3rd and 7th detected by ELISA PrioCHECK®AgPl^{focus}

LR	cows			heifers			Young calves		
	No. (head)	positive (head)	prevalence (%)	No. (head)	positive (head)	prevalence (%)	No. (head)	positive (head)	prevalence (%)
LR 1st	379	0	0	82	0	0	120	0	0
LR 2nd	429	1	0.2	82	0	0	86	0	0
LR 3rd	378	0	0	96	1	1	115	0	0
LR 7th	663	1		129	1	0.8	120	0	0
Total	1,849	2	0.11	389	2	0.52	441	0	0

Table 5 Status of farms and cattle with positive antibody detected by PrioCHECK®BVDV Ab and positive antigen by PrioCHECK®BVDV Ag PI[focus]

Farm	Positive antibody prevalence in adult cattle	Positive antibody prevalence in 6-12 mo. cattle	No positive antigen cattle
Farm 1 in LR 7	47/56 (83.9%)*	1/1 (100%)*	1[1] [1]12 years old cow with 3.5 month pregnancy, repeat breeder and positive antibody detection
Farm 2 in LR 7	40/41 (97.6%)*	3/4 (75%)*	1[2] [2]2.5 years, positive antigen but negative antibody heifer.
Farm 3 in LR 3	34/35 (97.1%)*	5/5 (100%)*	1[3] [3]3 years, positive antigen but negative antibody heifer.
Farm 4 in LR 2	3/36 (8.3%)*	0/0 (0%)	1[4] [4]8 years olds cow, repeat breeder, post antigen but negative antibody.

*No. of positive/Total no. in the farm (%)

ผลของระดับฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ต่อการเพิ่มการตกไข่ในโคพื้นเมืองสายอีสาน

ณรงค์กร เกษมสุข[1] อนนท์ เทืองสันเทียะ[2] ณรงค์ เลี้ยงเจริญ[2] บรรลือ กล่ำพูล[2] และมาลี อภิเมธีธำรง[3]

[1] ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพอุบลราชธานี

[2] ศูนย์พัฒนาเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อน จ.นครราชสีมา

[3] สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์กรมปศุสัตว์

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อเปรียบเทียบขนาดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช (FSH; Follicle stimulating hormone) 2 ระดับ คือ 150 และ 200 มิลลิกรัม ในการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ในโคพื้นเมืองอีสาน โคให้ตัวอ่อนเป็นโคพื้นเมืองอีสานที่มีสุขภาพแข็งแรง สมบูรณ์และมีวงจรการเป็นสัดปกติ อายุประมาณ 3-5 ปี น้ำหนักระหว่าง 250-350 กิโลกรัม ทำการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรนชนิดสอดในช่องคลอด (CIDR-B®) และกระตุ้นเพิ่มการตกไข่โดยใช้ฮอร์โมน FSH (Folltropin-V®, Australia) แบ่งกลุ่มแม่โคแบบสุ่มเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว วางแผนการทดลองแบบ crossover design ทำซ้ำ 4 ครั้ง โคกลุ่มที่หนึ่ง ใช้ฮอร์โมน FSH ขนาด 150 มิลลิกรัม ต่อตัว และกลุ่มที่สอง ใช้ฮอร์โมน FSH ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อตัว โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อ เช้า-เย็น ห่างกัน 12 ชั่วโมง และฉีดติดต่อกันแบบลดขนาดลงทุกวันเป็นเวลา 3 วัน ร่วมกับการฉีด พรอสต้าแกรนดิน (Estrumate, New Zealand) ขนาด 500 ไมโครกรัม เข้ากล้ามเนื้อ บันทึกเวลาและอาการเป็นสัด หลังจากนั้นผสมเทียมในแม่โคตัวให้พร้อมกับฉีดฮอร์โมน gonadotrophic releasing hormone (Receptal®, Germany) ขนาด 100 ไมโครกรัม เข้ากล้ามเนื้อ ผลการทดลองในกลุ่มที่ 1 ได้อัตราการเก็บตัวอ่อนได้ 80% (76/95) เป็นตัวอ่อนที่มีคุณภาพย้ายฝากได้ (เกรดA, B, C) จำนวน 35 ตัวอ่อน เฉลี่ย (mean ± SE) 2.00 ± 1.6 ตัวอ่อน/ตัว แม่โคในกลุ่มที่ 2 ได้ตัวอ่อนที่มีคุณภาพย้ายฝากได้ (เกรดA, B, C) จำนวน 26 ตัวอ่อน เฉลี่ย 1.53±1.48 ตัวอ่อน/ตัว อัตราการเก็บตัวอ่อนได้ 66.31% (63/95) ขนาดฮอร์โมน FSH 150 และ 200 มิลลิกรัม ให้จำนวน CL เฉลี่ย (mean ± SE) ต่อตัว (5.94±2.14 และ 5.6±1.00) และจำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) จำนวนตัวอ่อนเกรด A, B, C และ D+UFO ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ 1 และ 2 คือ เกรด A = 1.29±1.08 และ 1.0±0.47, เกรด B = 0.53±0.44 และ 0.13±0.07, เกรด C = 0.24±0.22 และ 0.18±0.16, D+UFO = 1.88±1.25 และ 1.76±1.57 ตามลำดับ (P >0.05) ผลการศึกษานี้แสดงว่าขนาดฮอร์โมน FSH 150 มิลลิกรัม หรือ 200 มิลลิกรัม ให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญต่อการตอบสนองต่อฮอร์โมนสำหรับกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ในโคพื้นเมืองสายอีสาน

คำสำคัญ : โคพื้นเมืองอีสาน ฮอร์โมน เอฟ เอส เอช การกระตุ้นเพิ่มการตกไข่

Effect of FSH Dosages on Superovulatory Response in North-Eastern Thai Native Cows

Narongkorn Kasemsuk[1] Anone Thuangsanthia[2] Narong Liengchareon[2] Bunleu Glamphu[2] and Malee Apimeteetumrong[3]

[1]Ubonratchathani Artificial Insemination and Biotechnology Research Center

[2]Embryo Transfer Technology Research Center

[3]Bureau of biotechnology in Livestock Production

Abstract

The objective of this study was to compare the efficacy of different follicle stimulating hormone (FSH) doses; 150 and 200 mg. on superovulatory response in north-eastern Thai native cattle (Bos indicus). Cyclic donor cows (n = 10) were assigned randomly into 2 treatment groups (n = 5 in each group) with a crossover design, 4 replications. They were 3-5 years of age and live weight 250-350 kg. Estrous synchronization was done in all donors with CIDR-B® and Prostaglandin F2α. Then they were injected with Folltropin®-V (FSH) twice daily for 3 days in decreasing doses according to its dose assignment, 150 (Group 1) or 200 mg. (Group 2). On the last day of FSH injection, PGF2α was given and CIDR-B® was removed. On standing heat, cows were artificial inseminated (AI) with same frozen semen batch of a north-eastern Thai native bull and injected i.m. with 100 µg gonadotrophic releasing hormone (Receptal®, Germany). Numbers of corpora lutea were determined by rectal palpation and embryos were collected on day 7 after AI. Data were analyzed by Student, s t test. In Group 1, a total of 35 transferable embryos (A, B, C grades = 2.00 ± 1.6, mean ± SE) were collected, for a recovery rate of 80% (76/95). In Group 2, a total of 26 transferable embryos (1.53±1.48, mean ± SE) were collected, for a recovery rate of 66.31% (63/95). No significant difference in the numbers of CL and transferable embryos (mean ± SE) were found between Group 1 and Group 2 (5.94±2.14 and 5.6±1.0; 2.00 ± 1.6 and 1.53±1.48, respectively, P>0.05). There were also no significant differences in the numbers of embryo grade A, B, C, and D+UFO between two treatment groups (A grade= 1.29±1.08 and 1.0±0.47, B grade = 0.53±0.44 and 0.13±0.07, C grade = 0.24±0.22 and 0.18±0.16, and D+UFO = 1.88±1.25 and 1.76±1.57, for Group 1 and 2, respectively, P>0.05). This study demonstrated that 150 or 200 mg of FSH did not give different results on superovulatory response in north-eastern Thai native cattle.

Keywords : north-eastern Thai native cows, FSH, superovulation

บทนำ

โคพื้นเมืองของเมืองไทย จัดเป็นโคกลุ่ม Bos indicus เป็นโคที่เลี้ยงง่าย ใช้งานได้ดี ทนต่อโรคแมลง อากาศร้อน มีความสมบูรณ์พันธุ์สูง เป็นสัดเร็ว ผสมติดง่าย และให้ลูกอย่างสม่ำเสมอตลอดทั้งปี ทั้งที่ไม่ได้รับอาหารที่สมบูรณ์นัก ปัญหาและอุปสรรคในการเลี้ยงโคพื้นเมือง ได้แก่ มีพื้นที่เลี้ยงน้อยลง ขาดการปรับปรุงพันธุ์ จำนวนประชากรโคลดลง มีการเลี้ยงตัวผู้และตัวเมียรวมกัน ความหลากหลายสายพันธุ์ลดลง ทำให้เกิดสายเลือดชิด ลูกเกิดมาแคระแกรนไม่แข็งแรง อีกทั้งผู้เลี้ยงไม่ค่อยเลี้ยงดูและเอาใจใส่เกี่ยวกับสุขภาพเท่าที่ควร นอกจากนี้โคพื้นเมืองมักถูกนำไปผสมกับโคสายพันธุ์ต่างประเทศอื่นๆ ทั้งพันธุ์เนื้อและนม เพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ โดยอาศัยข้อดีของโคพื้นเมือง ทำให้โคพื้นเมืองสายพันธุ์ไทยแท้ๆ กลายเป็นโคลูกผสมไปเป็นจำนวนมาก และเมื่อผสมกับโคสายพันธุ์อื่นไปหลายๆรุ่นผลที่ตามมา คือ ระดับสายเลือดของโคพื้นเมืองไทยจะลดน้อยลงเรื่อยๆ และในอนาคตอาจหาโคพื้นเมืองพันธุ์แท้ของไทยไม่ได้ หากไม่มีการดำเนินงานด้านการอนุรักษ์สายพันธุ์อย่างจริงจัง การพัฒนาโคพันธุ์ใหม่ที่ต้องอาศัยพันธุ์พื้นฐานจากพันธุ์พื้นเมือง ก็จะกระทำได้อย่างลำบาก

การอนุรักษ์พันธุกรรมสัตว์ สามารถดำเนินการได้สองแนวทางคือ การอนุรักษ์ในสภาพธรรมชาติและนอกสภาพธรรมชาติ การอนุรักษ์ในสภาพธรรมชาติ หมายถึง การเลี้ยงดู ที่มีการจัดการฝูง การจัดแผนผสมพันธุ์เพื่อให้ดำรงสายพันธุ์และรักษาระยะห่างทางพันธุกรรม ซึ่งมีหน่วยงานของกรมปศุสัตว์ดำเนินการอยู่ ส่วนการอนุรักษ์นอกสภาพธรรมชาติ หมายถึง การเลี้ยงดูในสวนสัตว์ การเก็บรักษาพันธุกรรมในรูปของเซลล์สืบพันธุ์และตัวอ่อนโดยเก็บในสภาพแช่แข็ง สามารถนำไปผสมเทียม หรือฝากตัวอ่อนเพื่อให้มีลูกเกิดได้ในอนาคต ทั้งนี้พบว่าอัตราการตั้งท้องจากการผสมเทียมและย้ายฝากตัวอ่อนไม่แตกต่างกันเมื่อตรวจ ณ วันที่ 28 หลังการเป็นสัด (Demetrio, 2007) ปกติโคพื้นเมืองของไทยจะถูกเลี้ยงอยู่กระจายทั่วประเทศ มีหลายชื่อเรียก มักเรียกชื่อตามถิ่นที่อยู่ เช่นโคขาวลำพูน โคพื้นเมืองสายอีสาน โคพื้นเมืองภาคใต้ โดยจะมีลักษณะปรากฏต่างกัน กรมปศุสัตว์โดยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ได้เริ่มศึกษาการอนุรักษ์โคพื้นเมืองภาคใต้ และโคขาวลำพูน โดยเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อน (อนนท์ และคณะ, 2547; ณรงค์ และคณะ, 2550) พบว่าโคทั้งสองสายพันธุ์มีการตอบสนองต่อฮอร์โมนกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ไม่เท่ากันแม้ว่าจะใช้ขนาดฮอร์โมนเท่ากัน (150-200 มิลลิกรัม Folltropin-V®, Bioniche Animal Health (A/Asia) Pty. Ltd., Australia) การใช้ขนาดฮอร์โมนสูงเกินไป (260 มิลลิกรัม) ทำให้เกิดการตอบสนองมากเกินไป (overstimulation) มีไข่ไม่ได้รับการผสมจำนวนมาก และได้ตัวอ่อนน้อย มีรายงานว่า Bos indicus มีการตอบสนองต่อฮอร์โมน FSH มากกว่า Bos Taurus และสามารถใช้ฮอร์โมนในขนาดที่น้อยกว่าที่ใช้ใน Bos Taurus 25-30% (Lewis, 1992) วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อเปรียบเทียบขนาดของฮอร์โมน FSH 2 ระดับ คือ 200 และ 150 มิลลิกรัม ในการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ในโคพื้นเมืองอีสาน

อุปกรณ์และวิธีการ

1. คัดเลือกแม่โคพื้นเมืองอีสานที่เป็นตัวให้ตัวอ่อน (Donor) จำนวน 10 ตัว มีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์และมีวงจรการเป็นสัดปกติ อายุประมาณ 3–5 ปี มีน้ำหนักระหว่าง 250 –350 กิโลกรัม

2. แม่โคพื้นเมืองสายอีสานทุกตัว จะได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรนชนิดสอดในช่องคลอด (CIDR-B®, InterAg, New Zealand) และกระตุ้นเพิ่มการตกไข่โดยใช้ฮอร์โมน FSH (Folltropin-V®, Bioniche Animal Health (A/Asia) Pty. Ltd., Australia) โดยแบ่งกลุ่มแม่โคพื้นเมืองภาคตะวันออกเฉียงเหนือแบบสุ่มเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 5 ตัว วางแผนการทดลองแบบ crossover design ทำซ้ำ 4 ครั้ง กลุ่มที่หนึ่ง ใช้ฮอร์โมน FSH ขนาด 150 มิลลิกรัมต่อตัว และอีกกลุ่มหนึ่ง ใช้ฮอร์โมน FSH ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อตัว ซึ่งจะเริ่มฉีดในวันที่ 9 หลังใส่ฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรนชนิดสอดในช่องคลอด โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อ เช้า-เย็น ห่างกัน 12 ชั่วโมง และฉีดติดต่อกันแบบลดขนาดลงทุกวันเป็นเวลา 3 วัน

3. ในวันที่ 3 ของการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ ฉีดสารพรอสต้าแกรนดิน (Estrumate®, Cloprostenol, Schering-Plough Animal Health, NSW, Australia) ขนาด 2 ml. (500 ไมโครกรัม) เข้ากล้ามเนื้อเช้า-เย็น ร่วมกับการถอดฮอร์โมนโปรเจสเตอร์โรน

4. บันทึกเวลาและอาการเป็นสัด หลังจากนั้นผสมเทียมในแม่โคตัวให้ จำนวน 4 ครั้ง ห่างกัน 12 ชั่วโมง โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อพันธุ์โคพื้นเมืองที่ผ่านการทดสอบคุณภาพหลังการละลายแล้ว พร้อมกับฉีดฮอร์โมน gonadotrophic releasing hormone (Receptal®, Intervet International B.V., Holland) ขนาด 100 ไมโครกรัม เข้ากล้ามเนื้อ ให้กับแม่โคตัวให้หลังจากผสมเทียมครั้งแรก

5. ในวันที่ 7 หลังอาการสัด ล้วงตรวจและบันทึกการตอบสนองต่อการกระตุ้นการตกไข่ โดยการนับจำนวนคอร์ปัสลูเทียม (Corpus lutium : CL) บนรังไข่ทั้ง 2 ข้าง จากนั้นทำการเก็บตัวอ่อนจากแม่โคตัวให้ โดยใช้น้ำยาชะล้างตัวอ่อน (Emcare®, Har-vet, New Zealand) ชะล้างตัวอ่อนออกจากปีกมดลูกทั้ง 2 ข้าง ด้วยน้ำยาข้างละ 500 ml. โดยใช้ชุดสายยางสำหรับชะล้างตัวอ่อน (flushing set) ต่อกับท่อสวนตามวิธีของ Saito (1994) และปล่อยน้ำยาไหลผ่านถ้วยกรองตัวอ่อน

6. นำถ้วยกรองตัวอ่อนไปตรวจหาตัวอ่อน และประเมินคุณภาพตัวอ่อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ บันทึกจำนวน และคุณภาพตัวอ่อนที่เก็บได้ โดยการประเมินคุณภาพตัวอ่อนที่เก็บได้ ตามวิธีของ Linder และ Wright (1983) ตามรายละเอียด ดังนี้

เกรด A ตัวอ่อนคุณภาพดีมาก มีพัฒนาการปกติ ลักษณะของเซลล์ตัวอ่อนหรือบลาสโตเมียร์ต้องเป็นทรงกลมเกาะกันแน่น ไม่มีเซลล์แตก

เกรด B ตัวอ่อนคุณภาพดี มีพัฒนาการปกติ ลักษณะของตัวอ่อนเป็นทรงกลม มีบางเซลล์แยกออกจากเซลล์กลุ่มใหญ่ 10-20% ของเซลล์ทั้งหมด

เกรด C เป็นตัวอ่อนคุณภาพพอใช้ตัวอ่อนอาจมีรูปร่างเป็นทรงกลม มีการเสื่อมของเซลล์ประมาณ 30 - 40 %

เกรด D เป็นตัวอ่อนที่มีการเสื่อมสลายของเซลล์มาก มีเซลล์ที่ยังเกาะแน่นต่ำกว่า 40 % หรือเป็นตัวอ่อนที่มีพัฒนาการช้ากว่าปกติและหยุดเจริญ หรือไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสม (UFO; unfertilized ova)

ตัวอ่อนเกรด A, B และ C เป็นตัวอ่อนคุณภาพที่สามารถนำไปฝากให้ตัวรับได้ (Transferable embryo) และตัวอ่อนเกรด A และ B เป็นตัวอ่อนที่นำไปแช่แข็งได้

7. รวบรวมผลการดำเนินการ และนำข้อมูลไปวิเคราะห์ผลโดยใช้ Student's t test

ผลการทดลอง

ตารางที่ 1 (Table 1) แสดงจำนวน CL ที่ตรวจพบบนรังไข่ จำนวนตัวอ่อนคุณภาพดีย้ายฝากได้ จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้ทั้งหมด ตารางที่ 2 เปรียบเทียบจำนวน CL ที่ตรวจพบ จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้เกรดต่างๆ กัน จำนวนตัวอ่อนคุณภาพดีที่ย้ายฝากได้ต่อตัว/ครั้ง

Table 1 Effects of FSH on CL and embryo numbers

FSH Level	No. session	No. (range)	No. recovered ova/embryo (range)	% Recovery rate
150 mg	16	95 (3-17)	76 (0-11)	80.0% (76/95)
200 mg	17	95 (3-17)	63 (0-13)	66.3% (63/95)

Table 2 Effects of FSH on CL number and embryo quality

FSH mg (n)	CL	A	B	C	D + UFO	transferable embryos
150 (n=16)	5.94±2.14a	1.29±1.08a	0.53±0.44a	0.24±0.22a	1.88±1.25a	2.00±1.6a
200 (n=17)	5.6±1.00a	1.0±0.74a	0.13±0.07a	0.18±0.16a	1.76±1.57a	1.53±1.48a

a = ตัวเลขที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันคือไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

Data are shown as mean ± SE.

UFO : unfertilized ova

Transferable embryos : ตัวอ่อนเกรด A, B และ C

ผลการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) ของ จำนวน CL ที่ตรวจพบ จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้ จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้เกรด A, B, C, D-UFO และตัวอ่อนที่คุณภาพที่ย้ายฝากได้ (Transferable embryos, A+B+C grades)

วิจารณ์

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าจำนวน CL ที่ตรวจพบไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ในโคพื้นเมืองอีสานที่ได้รับฮอร์โมน FSH ขนาด 150 หรือ 200 มิลลิกรัม ตัวอ่อนคุณภาพที่ย้ายฝากได้ (Transferable embryos, จำนวนรวมตัวอ่อนเกรด A, B และ C) จากทั้ง 2 กลุ่ม (Table 2) ก็ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ (เฉลี่ย 2.00±1.60 และ 1.53±1.48 ตัวอ่อน) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P < 0.05) อย่างไรก็ตามมีแนวโน้มที่การใช้ FSH ขนาด 150 มิลลิกรัม จะได้จำนวนตัวอ่อนคุณภาพที่ย้ายฝากได้มากกว่าการใช้ FSH 200 มิลลิกรัม ซึ่งอาจเกิดจากการที่โคพื้นเมืองอีสานมีน้ำหนักตัวน้อยการใช้ FSH ปริมาณเท่ากับโคสายพันธุ์อื่นอาจจะกระตุ้นรังไข่มากเกินไป เช่นเดียวกับรายงานของ Barati et al. (2006) รายงานว่า FSH ขนาด 250 มิลลิกรัม ทำให้รังไข่ได้รับการกระตุ้นมากเกินไปและมีจำนวนฟอลลิเคิล ที่ไม่มีการตกไข่จำนวนมาก และรายงานของ Barros et al.(2003) ที่พบว่าขนาดฮอร์โมน FSH 200 มิลลิกรัม มีแนวโน้มให้ผลจำนวนตัวอ่อนคุณภาพดีมากกว่าขนาด 120 มิลลิกรัม แต่เมื่อทดลองใช้ขนาด 250 มิลลิกรัม พบว่าทำให้มีการตอบสนองมากเกินไป (overstimulation) จากจำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้ซึ่งแยกตามคุณภาพของตัวอ่อนคือ เกรด A, B, C, D+UFO และ Transferable แสดงในตารางที่ 2 ซึ่งจะเห็นว่า จำนวนตัวอ่อนในกลุ่มคุณภาพ A, B, C และ D+UFO ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง กลุ่มที่ 1 และ 2 คือ เกรด A = 1.29±1.08 และ 1.0±0.47, เกรด B = 0.53±0.44 และ 0.13±0.07, เกรด C = 0.24±0.22 และ 0.18±0.16, D+UFO = 1.88±1.25 และ1.76±1.57 ตามลำดับ (P>0.05)

พบว่าจำนวน CL ที่ตรวจพบทั้งจากการใช้ FSH ขนาด 150 และ 200 มิลลิกรัม (5.94±2.14 และ 5.6±1.00) ต่ำกว่าในรายงานของโคขาวลำพูน (ณรงค์ และคณะ, 2549) และแตกต่างกันกับรายงานการใช้ในโคพื้นเมืองภาคใต้ (ชาญยุทธ และคณะ, 2551) โดยใช้ขนาดฮอร์โมนเท่ากัน จึงเป็นไปได้ว่า รังไข่ของโคพื้นเมืองอีสานอาจจะมีการตอบสนองต่อฮอร์โมน FSH ต่างจากโคขาวลำพูนและโคพื้นเมืองภาคใต้หรืออาจมาจากปัจจัยด้านอื่นเช่นน้ำหนักตัวหรือสภาพแวดล้อม และเมื่อเปรียบเทียบกับโคสายพันธุ์ยุโรปตามรายงานของ Hasler (1992) ที่ว่าโคในกลุ่ม Bos indicus ให้การตอบสนองมากกว่า Bos taurus เมื่อเหนี่ยวนำการตกไข่โดยใช้ FSH ในปริมาณเท่ากันทั้งได้ด้านปริมาณตัวอ่อน และคุณภาพตัวอ่อน

พิจารณาจากอัตราการเก็บตัวอ่อนได้ (Recovery rate, Table 1) ทั้งสองกลุ่ม คือ FSH 150 และ 200 มิลลิกรัม คือ 80% (76/95) และ 66.3% (63/95) ใกล้เคียงกับรายงานในโคพื้นเมือง Sistani cattle (Bos indicus) ของอิหร่าน (Barati et al., 2006) ที่ได้อัตราการเก็บเฉลี่ย 61-84% เมื่อให้ฮอร์โมน FSH ขนาด 160-200 มิลลิกรัม ในขณะที่มีตัวอ่อนคุณภาพที่นำไปย้ายฝากได้ (รวมเกรด A, B, C) จำนวน 35 และ 26 ตัวอ่อน (Table 1) นับว่าได้น้อยกว่า 50 % เมื่อเทียบกับจำนวนไข่และตัวอ่อนที่เก็บได้ทั้งหมดคือ 76 และ 63 ใบ/ตัวอ่อน (FSH 150 มิลลิกรัมได้ 46.1%, 35/76 และ FSH 200 มิลลิกรัมได้ 41.3%, 26/63) ทั้งนี้อาจมีสาเหตุจากคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งมีความแปรปรวนมาก การทดลองครั้งนี้ใช้น้ำเชื้อโคพื้นเมืองอีสาน 100% ซึ่งรีดเก็บมาแล้วนานกว่าสิบปีและมีประวัติการเปลี่ยนสถานที่จัดเก็บบ่อยครั้ง จากการสุ่มตรวจพบอัตราการเคลื่อนที่ (motility) 15 - 35% ในชุดการผลิตเดียวกัน เพื่อป้องกันความผิดพลาดจากคุณภาพ

น้ำเชื้อจึงได้ทำการผสมเทียมให้กับแม่โค 4 ครั้งๆ ละ 2 โด๊ส พร้อมกับสุ่มตรวจคุณภาพน้ำเชื้อก่อนการผสมเทียมด้วย ในปัจจุบันมีน้ำเชื้อโคพื้นเมืองอีสานเหลืออยู่น้อยแล้ว ดังนั้น หากจะมีการดำเนินงานย้ายฝากตัวอ่อนในโคพื้นเมืองอีสานต่อไปในอนาคต ควรมีการรีดเก็บน้ำเชื้อจากโคพื้นเมืองอีสานเพิ่มเติม เพื่อให้การใช้ประโยชน์เทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนมีประสิทธิภาพสูงสุด

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ขนาดฮอร์โมน FSH 150 มิลลิกรัม ให้ผลเทียบเท่าและมีแนวโน้มให้ผลสูงกว่าขนาด 200 มิลลิกรัม แสดงให้เห็นว่า ปริมาณฮอร์โมนมาก ก็ไม่ได้ส่งผลดีเสมอไป ซึ่งนับว่ามีข้อดีเนื่องจากสามารถใช้ฮอร์โมนในขนาดที่น้อยลงแต่ได้ผลเท่าเทียมกันหรือดีกว่าทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายจากการใช้ฮอร์โมนเหนี่ยวนำการตกไข่ เป็นผลดีต่องานอนุรักษ์โคพื้นเมืองอีสานต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์อยุทธ์ หรินทรานนท์ ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ที่สนับสนุนการดำเนินงาน นายสัตวแพทย์ กมลชนก สร้อยเพชร นายสัตวแพทย์ ระดับชำนาญการที่ช่วยวิเคราะห์ข้อมูล ข้าราชการและพนักงานราชการของศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพอุบลราชธานี และศูนย์วิจัยเทคโนโลยีย้ายฝากตัวอ่อน ที่ช่วยให้การศึกษาครั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

เอกสารอ้างอิง

ณรงค์ เลี้ยงเจริญ อนนท์ เทืองสันเทียะ วิบูลย์ เยี่ยงวิศวกูร และมาลี อภิเมธีธำรง 2549 ผลของขนาดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ต่อการเพิ่มการตกไข่และจำนวนตัวอ่อนในโคขาวลำพูน การประชุมสัมมนา Enhancement Of Reproductive Efficiency and Production of Livestock in Thailand ในโอกาสครบรอบ 50 ปีงานผสมเทียมในประเทศไทย วันที่ 14-16 ธันวาคม 2549 โรงแรมเชียงใหม่ฮิลล์ จ.เชียงใหม่

ชาญยุทธ กาพล อนนท์ เทืองสันเทียะ ณรงค์ เลี้ยงเจริญ และมาลี อภิเมธีธำรง 2551 ผลของขนาดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ต่อการเพิ่มการตกไข่และจำนวนตัวอ่อนในโคพื้นเมืองภาคใต้

อนนท์ เทืองสันเทียะ วิบูลย์ เยี่ยงวิศวกูร ณรงค์ เลี้ยงเจริญ กีรติ ธิแจ้ บุญชู ศรีสุข และจุรีย์รัตน์ สำเร็จประสงค์ 2547 การตอบสนองของโคพันธุ์ขาวลำพูนต่อการกระตุ้นการตกไข่ การประชุมวิชาการสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 30 วันที่ 10-12 พฤศจิกายน 2547 กรุงเทพมหานคร

Barros, C.M., Porto, L.P.C., and Noguera, M.F.G. 2003. Dose-response trial in Bos taurus vs Bos indicus cows superovulated with FSH, assiated with controlled LH surge and fixed time artificial insemination. Theriogenology 59: 524 (abstr.).

Barati, F., Niasari_Naslaji, A., Bolourchi, M., Sarhaddi, F., Razavi, K., Naghzali, E. and Thatcher, W.W. 2006. Superovulatory response of Sistani cattle to three different doses of FSH during winter and summer. Theriogenology. 66:1149-1155.

Demetrio, D.G.B., Santos, R.M. Santos, R.M., Santos, R.M., Demetrio, C.G.B. and Vasconcelos, J.L. M. 2007. Factors affecting conception rates following artificial insemination or embryo transfer in lactating Holstein cows. J. Dairy Sci. 90 (11): 5073-5082.

Hasler, J.F. 1992. Current status and potential of embryo transfer and reproductive technology in dairy cattle. J. Dairy Sci. 75 (10): 2857-2879.

Lewis, I. 1992. Programming donors and recipients. In: Embryo transfer and pregnancy diagnosis. NSW: Post Graduate Committee in Veterinary Science, University of Sydney. pp. 69-88.

Linder, G.M. and Wright, R.W. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. Theriogenology. 20: 407-416.

Saito, N. 1994. Manual of embryo transfer and in vitro fertilization in cattle. National Livestock Breeding Center, MAFF, Japan, September. pp. 132.

ผลความเข้มข้นของ Cysteine ในน้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris ต่อคุณภาพน้ำเชื้อโคนม

สุดา จันทาสี[1] และ จตุพร พงษ์เพ็ง[1]

[1] ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ผสมเทียมลำพญากลาง

บทคัดย่อ

การเปรียบเทียบผลของการเสริมกรดอะมิโนซิสเตอีนที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ15 มิลลิโมล ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคนม Egg Yolk Tris ต่อคุณภาพของอะโครโซม เยื่อหุ้มตัวอสุจิ และอัตราการมีชีวิตของตัวอสุจิภายหลังการแช่แข็งด้วยเครื่อง flow cytometer และ CASA (computerized automatic semen analyzer) วางแผนการทดลองแบบ RCBD โดยรีดเก็บน้ำเชื้อจากโคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์ จำนวน 5 ตัวด้วย Artificial vagina สัปดาห์ละครั้งต่อเนื่องกัน 5 สัปดาห์ ในแต่ละสัปดาห์น้ำเชื้อของพ่อพันธุ์โคนมถูกแบ่งออกเป็น 4 ส่วนตามทรีตเมนต์ที่วางแผนทดลอง ได้แก่ กลุ่มควบคุม เสริมซิสเตอีนที่ระดับ 5, 10 และ15 มิลลิโมล ผลการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยเครื่อง CASA พบว่าน้ำเชื้อที่เสริมกรดอะมิโนซิสเตอีนทั้ง สามระดับมีอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิร้อยละ 51.62±2.03, 49.12±1.83 และ 47.52±2.43 ตามลำดับ สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เสริมซิสเตอีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งมีอัตราการเคลื่อนที่ร้อยละ 40.03±1.78 ลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิพบว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่ไม่เสริมกรดอะมิโนซิสเตอีนคือลักษณะ Beat frequency (BCF), Linearity (LIN) และStraightness (STR) สูงกว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่เสริมกรดอะมิโนซิสเตอีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$) ลักษณะความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และโครโซมของอสุจิภายหลังการแช่แข็งพบว่าแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ผลจากการศึกษาแสดงว่าการเสริมกรดอะมิโนซิสเตอีนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris สามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคนม ซึ่งการเสริมกรดอะมิโนซิสเตอีน 5 มิลลิโมล มีอัตราการเคลื่อนที่สูงที่สุด ส่วนการเสริมกรดอะมิโนซิสเตอีน 10 มิลลิโมลมีลักษณะความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และโครโซมสูงที่สุด

คำสำคัญ : พ่อโคนม, Egg Yolk Tris, ซิสเตอีน

Effect of Cysteine Concentrations in Egg Yolk Tris on Dairy Cattle Semen Quality

Suda Chuntasee[1] and Jatuporn Pongpeng[1]

[1] Lamphayaklang Livestock Semen Production Center, Lamsonthi, Lopburi, 15190, Thailand

Abstract

This study was performed to evaluate the effect of cysteine concentration in Egg Yolk Tris on dairy cattle semen quality. Semen from five Tropical–Holstein bulls were collected and frozen once a week for five consecutive weeks. Each Bull's semen sample was accessed weekly for 4 treated groups: non-cysteine treated (control) and supplement treated with 5, 10 and 15 mM of cysteine. Percentage of motility of frozen-thawed semen extender with cysteine treated groups showed highly significant ($P<0.05$) compared to control group (51.62±2.03, 49.12±1.83, 47.52±2.43 and 40.03±1.78 respectively). For Kinetic movement of spermatozoa: BCF LIN and STR, all cysteine treated groups showed highly significant ($P<0.01$). However percent of spem membrane and acrosome integrity was not significant different ($P>0.05$). The results from this study indicated that cysteine treated in Egg Yolk Tris improved after thaw motility of bull spermatozoa which 5 mM of cysteine showed the highest response whereas 10mM of cysteine showed the highest live acrosome intact (LAI).

Keywords : dairy bull, DFS, Egg Yolk, Cysteine

บทนำ

การผสมเทียมให้เกิดความสำเร็จนั้น ต้องอาศัยปัจจัยหลายประการ เช่น การจับสัด การ ผสมเทียมในช่วงเวลาที่เหมาะสม และคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ผสมเทียม เป็นต้น คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งมีความสำคัญเนื่องจากมีกระบวนการและขั้นตอนในการผลิตที่ต้องอาศัยเทคนิค วิชาการและความชำนาญในการผลิตและควบคุมคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง ตั้งแต่ขั้นตอนการรีดเก็บน้ำเชื้อสดจากพ่อโค การตรวจประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น การควบคุมอุณหภูมิและลดอุณหภูมิน้ำเชื้อ การเจือจางน้ำเชื้อ การบรรจุในหลอดน้ำเชื้อ การแช่แข็งน้ำเชื้อและการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง (ปริฉัตร,2544) เพื่อให้ได้น้ำเชื้อแช่แข็งที่มีคุณภาพดี มีศักยภาพในการผสมติดดีที่สุด

ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งต้องใช้สาร cryoprotectant ซึ่งทำหน้าที่ช่วยป้องกันและลดความเสียหายที่เกิดกับอสุจิจากการลดอุณหภูมิในขณะทำการแช่แข็ง (Foote, 1970) สารที่กล่าวถึงนี้ ได้แก่ กลีเซลรอล เป็นต้น ปัจจุบันมีการศึกษาผลของการใช้กรดอะมิโนเพื่อช่วยลดความเสียหายจากกระบวน การแช่แข็งน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ในสัตว์หลายชนิด เช่น น้ำเชื้อกระบือ El-Sheshtawy at el. (2008) ได้ทำการศึกษาพบว่าการเติม glutamine glycine alanine และ cystein ในน้ำยาเจือจางทำให้คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งดีขึ้น โดยการเติม cysteine ความเข้มข้น 5 mM สามารถรักษาความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ (Membrane Integrity) ได้ดีที่สุดคือ 53.90% น้ำยาเจือจางปกติที่ไม่ได้เติมคือ 41.10% ส่วนในแกะ Uysal et al. (2007) รายงานว่า การเติม cysteine ความเข้มข้น 10 mM ช่วยเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตสูงสุดของตัวอสุจิ ในขณะที่อัตราความผิดปกติของตัวอสุจิต่ำกว่าการไม่เสริม cysteine คือ 9.8% เปรียบเทียบกับ 30.1%

ดังนั้น การศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโค โดยใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ egg yolk tris ที่เติม cysteie ปริมาณ 0 mM, 5 mM, 10 mM และ 15 mM เพื่อทำหน้าที่เป็นสารเสริมจะช่วยให้คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังขบวนการแช่แข็งมีชีวิตรอดมากขึ้นและมีประสิทธิภาพมากขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลอง

1. รีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์ อายุประมาณ 5 - 6 ปี จำนวน 5 ตัว ที่น้ำเชื้อมีความเข้มข้นของตัวอสุจิไม่น้อย กว่า 500 ล้านตัว/มล. ตัวอสุจิมีชีวิตไม่น้อยกว่า 70% ตัวอสุจิมีความผิดปกติส่วนหัว และส่วนหางไม่เกิน 10% และ 5% ตามลำดับ สัปดาห์ละ 1 ครั้ง 5 สัปดาห์ติดต่อกัน โดยใช้โยนีเทียม (Artificial Vagina: AV)

2. ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นดังนี้ ปริมาตร สี ความหนืด การเคลื่อนไหวหมู่ และตรวจนับความเข้มข้นของน้ำเชื้อโดยใช้ spectrophotometer (Model: REF Z160, Minitube, Germany)

3. นำน้ำเชื้อมาแบ่งเป็น 4 ส่วนเท่าๆ กัน เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจาง ให้มีจำนวนตัวอสุจิ 96 ล้านตัว/มล. ด้วยน้ำยาเจือจางดังนี้

1. น้ำยาเจือจาง egg yolk tris
2. น้ำยาเจือจาง egg yolk tris เสริม cysteine 5 mM
3. น้ำยาเจือจาง egg yolk tris เสริม cysteine 10 mM
4. น้ำยาเจือจาง egg yolk tris เสริม cysteine 15 mM

4. นำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วไปทำการบรรจุและพิมพ์หลอด ที่อุณหภูมิ 25oC แล้วนำไปลดอุณหภูมิที่ 4° C นาน 4 ชั่วโมง

5. แช่แข็งน้ำเชื้อด้วยเครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (Digitcool 5300 ZH 350 & UE 350 with 900 HP programmer French) โดยเรียงน้ำเชื้อบนแท่นเรียงน้ำเชื้อแล้วนำไปวางเรียงในเครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ อุณหภูมิ -140° C นาน 6 นาที จากนั้นนำหลอดน้ำเชื้อแช่ในไนโตรเจนเหลวทันที เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำมาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ ดังนี้

ตรวจร้อยละตัวอสุจิมีชีวิต (% living sperm) อัตราการเคลื่อนที่ (% motilityและอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (% progressive motility) ในน้ำเชื้อแช่แข็งโดยใช้เครื่อง CASA (computer assisted semen analyzer) (Hamilton Thorn Motility Analyzer, IVOS12.3) โดย ตั้งค่าเพื่อการตรวจดังนี้ Frames Per Sec.50Hz, No. of Frames 30, minimum contrast 60, minimum cell size 5 pix, Path velocity, VAP 55ul/s, STR50%, cell Intensity 55, VAP cut off 21.9 u/s, VSL cut off 6 u/s

ตรวจร้อยละความสมบูรณ์ของผนังเซลล์และอะโครโซมของตัวอสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็ง ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อหลังจากแช่แข็งอย่างน้อย 24 ชั่วโมง โดยตรวจร้อยละของความผิดปกติของเยื่อหุ้มตัวอสุจิและอะโครโซมในน้ำเชื้อแช่แข็งโดยใช้เครื่อง Flow Cytometer

การวิเคราะห์และประมวลผล วางแผนการทดลองแบบ RCBD เปรียบเทียบร้อยละความผิดปกติของอะโครโซมและเยื่อหุ้มตัวอสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็ง และเปรียบเทียบร้อยละอสุจิมีชีวิตในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อทั้ง 4 ชนิด วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยวิธี ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของ treatments โดย DMRT (Duncan's Multiple Range test)

ผลการทดลอง

ผลการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์โคนมที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris ที่เสริมด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีน 5 15 และ 15 มิลลิโมล ภายหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อ และนำน้ำเชื้อที่แช่แข็งมาละลายด้วยน้ำอุณที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 30 วินาที พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิที่เสริมน้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris ด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีน มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิที่ไม่เสริมน้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris ด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีน (51.62±2.03, 49.12±1.83, 47.52±2.43, 40.03±1.78) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิพบว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่ไม่เสริมกรดอะมิโนซิสเตอีนมีลักษณะ Beat frequency(BCF) Linearity;(LIN) และStraightness(STR) สูงกว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่เสริมกรดอะมิโนซิสเตอีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P<0.01$) แต่ความเร็วในการเคลื่อนที่เป็นเส้นตรง Straight-line velocity (VSL) พบว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่ไม่เสริมกรดอะมิโนซิสเตอีนสูงกว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่เสริมกรดอะมิโนซิสเตอีนคือ 71.10±1.63 µm/s, 66.34±1.02 µm/s, 66.34±1.02 µm/s และ66.96±1.08 µm/s ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ย ± SE ของร้อยละของตัวอสุจิมีชีวิต และการเคลื่อนที่ทาง kinetic ของตัวอสุจิภายหลังการแช่แข็งในน้ำเชื้อโคนมที่มีน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris

ลักษณะการเคลื่อนที่	น้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris ที่มีความเข้มข้น Cysteine			
	0 mM	5 mM	10 mM	15 mM
Motility (%)	40.03b±1.78	51.62a±2.03	49.12a±1.83	47.52a±2.43
Progressive motility (%)	26.58±1.24	26.05±1.19	26.20±1.20	24.82±1.31
ความเร็วในการเคลื่อนที่ (μm/s)				
Curvilinear velocity ;VCL (μm/s)	151.06b±3.65	163.22a±3.55	166.53a±4.19	164.57a±2.65
Straight-line velocity ;VSL(μm/s)	71.10a±1.63	66.34b±1.02	67.83b±1.14	66.96b±1.08
Average path velocity ;VAP(μm/s)	88.43±1.94	90.82±1.69	92.10±1.99	89.42±1.25
Amplitude of lateral head displacement; ALH(μm/s)	6.89b±0.16	7.81a±0.09	8.13a±0.15	8.01a±0.13
ลักษณะการเคลื่อนที่				
Beat frequency; BCF (Hz)	26.58a±0.62	22.98b±0.43	21.80b±0.41	22.42b±0.41
Linearity; LIN (%)	48.12a±0.80	42.22b±0.64	43.17b±1.00	41.58b±0.64
Straightness; STR (%)	79.18a±0.89	72.54b±0.79	73.20b±0.64	73.05b±0.78

1/: a ,b : อักษรที่เหมือนกันในแถวเดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

เมื่อศึกษาความสมบูรณ์ของอะโครโซมและเยื่อหุ้มตัวอสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็งโคนมที่ผลิตโดยใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris เสริมด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีน 5 15 และ 15 มิลลิโมล ด้วยเครื่อง flow cytometer แสดงในตารางที่ 2 โดยพบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) แต่น้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris เสริมด้วยกรดอะมิโนซิสเตอีน 10 มิลลิโมลมีเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมสมบูรณ์สูงที่สุดคือร้อยละ 44.65±6.39 เมื่อเทียบกับไม่เสริมกรดอะมิโน และการเสริมcysteine 5 และ 15 มิลลิโมล (40.07±2.25, 42.00±3.57 และ 38.66±4.30 ตามลำดับ)

ตารางที่ 2 ร้อยละของความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มตัวอสุจิและอะโครโซมภายหลังการแช่แข็งของอสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็งโคนมในน้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris เสริมด้วยกรดอะมิโน cysteine 5 10 และ 15 มิลลิโมล เมื่อตรวจด้วยเครื่อง Flow Cytometer (ค่าเฉลี่ย±SE)

ลักษณะของอะโครโซมของอสุจิ	น้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris ที่มีความเข้มข้น Cysteine			
	0 mM	5 mM	10 mM	15 mM
Dead- acrosome intact (%)	32.39±2.82	31.72±3.09	30.67±2.94	34.70±3.17
Dead- acrosome damage (%)	28.39±2.34	25.20±2.41	25.13±2.14	26.25±2.49
Live- acrosome intact (%)	40.07±2.25	42.00±3.57	44.65±6.39	38.66±4.30
Live- acrosome damage (%)	0.03±0.01	0.007±0007	0.03±0.01	0.02±0.01

1/: a ,b : อักษรที่เหมือนกันในแถวเดียวกันไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

วิจารณ์

ผลการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคนมที่ใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris เสริมด้วยกรดอะมิโน cysteine 5 10 และ 15 มิลลิโมล พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของกลุ่มที่เสริมด้วยกรดอะมิโน cysteine สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เสริมโดยน้ำยาเจือจางที่เสริมกรดอะมิโน cysteine 5 มิลลิโมล สูงที่สุด แต่ความสมบูรณ์ของอะโครโซมและเยื่อหุ้มตัวอสุจิพบว่าทั้งสองกลุ่มไม่พบความแตกต่าง เนื่องจาก cysteine เป็นกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของ glutatthione และ glutathione สามารถป้องกัน reduction of fertility potential หลังการแช่แข็ง (Kaeoket at al.,2008) นอกจากนี้ cysteine ยังป้องกันสารออกซิเจนที่เป็นพิษต่อตัวอสุจิจากขบวนการเมตาบอลิซึม (toxic oxygen metabolites) ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ plasma membranes ของตัวอสุจุเสียหาย (Meister and tate, 1976)ซึ่งแตกต่างกับการทดลอง Tuncer และคณะ (2010) พบว่าการเสริม cysteine 5 มิลลโมลในน้ำยาเจือจาง Laiciphose®ไม่ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิโคนมเพิ่มขึ้นแต่สามารถลดความเสียหายของ DNA ได้นอกจากนี้ยังมีรายงานการทดลองในสัตว์หลายชนิดที่ให้ผลใกล้เคียงกัน เช่น Andreea และคณะ (2010) พบว่า การเสริม cysteine ที่ระดับ 10 มิลลิโมล ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแพะเพิ่มอัตราการการเคลื่อนที่ อสุจิมีชีวิต และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ดีที่สุด รายงานในหมูพบว่าการเสริม cysteine ที่ระดับ 5 มิลลิโมลสามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ดีที่สุด (Chanapiwat P. at al,2008)

จากผลการศึกษาแสดงว่าการเสริมซิสเตอีนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิโมลให้อัตราการเคลื่อนที่ดีที่สุด ทำให้มีประโยชน์ที่จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อดียิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนายสัตวแพทย์ภาณุพันธ์ พงษ์เพ็ง ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัย ดร.จำเนียร สายขุน และอาจารย์กรชัย กรแก้วรัตน์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและช่วยเหลือการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ นายนรินทร์ จารี นางสายแก้ว แก้วเกิด และเจ้าหน้าที่ของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ผสมเทียม ที่ให้ความช่วยเหลือการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ปริฉัตร สุขโต. 2544. เทคโนโลยีชีวภาพทางวิทยาการสืบพันธ์เพื่อการผลิตปศุสัตว์. 71-77.

Andreea, A., Stela Z., Coprean, D. and Dorina, M. 2010. The effects of antioxidants on the cytological parameters of cryopeserved buck semen. Romanian Biotechnological Letters. 15:26-32.

Chanapiwat, P., Kaeoket, K. and Tummaruk, P. 2008. L-cysteine supplementation improved qualities of cryopreserved boar semen.Proceedings the 15th of FAVA. p.165-167.

El-Sheshtawy, R.I., El-Sisy, G.A. and El-Nattat, W.S. 2008. Use of selected amino acids to improve buffalo bull semen cryopreservation. Global Veterinaria. 2(4): 146-150.

Foot, R.H. 1970. Fertility of bull semen at high extension rates in tris – buffered extender. J. Dairy Sci. 53:1475-1477.

Kaeoket, K., Tantiparinyakul, K., Kladkaew, W., Chanapiwat, P. and Techakumphu. M. 2008. Effect of different antioxidants on quality of cryopreserved boar semen in breeds. Thai Journal of Agricultural Sci. 41:1-9.

Meister, S., and Tate, S.S. 1976. Glutathione and related gamma-glutamyl compounds, Biosyntehesis and utilization. Annu. Rev. Biochem. 45:559-604.

Usal Bucak, M.N. 2007, Effect of oxidixed glutathione, bovine serum albumin, cysteine and lycopene on the quality of frozen thawed ram semen, Acta Vet. Brno. 76: 383-390.

ผลการเสริมกลูตามีนและไกลซีนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อโคนมภายหลังการละลาย

ภาณุพันธ์ พงษ์เพ็ง[1] สุดา จันทาสี[1] กุลณสรรค์ สายขุน[2] จตุพร พงษ์เพ็ง[1]
[1]ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ผสมเทียมลำพญากลาง อ.ลำสนธิ จ.ลพบุรี 15190
[2]สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล อ.ศาลายา จ.นครปฐม 73170

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการเสริมกรดอะมิโนสองชนิดคือ กลูตามีนและไกลซีนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris (EYT) ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคนม วางแผนการทดลองแบบบล็อกสมบูรณ์ (randomized complete block design: RCBD) ใช้พ่อโคนมทรอปิคอลโฮลไสตน์จำนวน 5 ตัว (บล็อก) ทำการรีดน้ำเชื้อสัปดาห์ละ 1 วันเป็นเวลา 5 สัปดาห์ (ซ้ำ) ในแต่ละสัปดาห์น้ำเชื้อถูกแบ่งออกเป็น 4 ส่วนสำหรับการทดลอง 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง EYT ที่ไม่เสริมกรดอะมิโน, กลุ่มที่ 2 เสริมกลูตามีน 50 mM, กลุ่มที่ 3 เสริมไกลซีน 50 mM และ กลุ่มที่ 4 เสริมกลูตามีน 25 mM ร่วมกับไกลซีน 25 mM ผลการศึกษาพบว่า อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิในกลุ่มที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ EYT ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่เสริมกลูตามีน หรือไกลซีน และกลุ่มที่เสริมกลูตามีนร่วมกับไกลซีน (P>0.05) แต่ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิพบว่าอสุจิในน้ำยาเจือจาง EYT ที่เสริม กลูตามีนร่วมกับไกลซีนมีความเร็วที่ใช้ในการเคลื่อนที่วิถีตรง (straight-line velocity: VSL) ต่ำที่สุดคือ 64.07±2.19 µm/s (P<0.05) ในขณะที่ลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่ไม่เสริมกรดอะมิโนมีความกว้างในการส่ายหัวมากที่สุด (amplitude of latereal head displacement: ALH) คือ 6.80±0.11 µm เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เสริมกรดอะมิโน กลูตามีน หรือไกลซีน และกลูตามีนร่วมกับไกลซีน โดยมีค่า 6.56±0.11, 6.66±0.08 และ 6.40±0.12 µm ตามลำดับ (P<0.05) ส่วนลักษณะความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิและอะโครโซมภายหลังการแช่แข็ง พบว่าเมื่อเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ EYT ที่เสริมกลูตามีนอสุจิมีเยื่อหุ้มเซลล์และชอะโครโซมสมบูรณ์สูงกว่ากลุ่มไม่เสริมกรดอะมิโน (P<0.05) แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับอสุจิในน้ำยาเจือจางที่เสริมไกลซีน หรือเสริมกลูตามีนร่วมกับไกลซีน คือมีค่าร้อยละ 52.90±2.45, 42.72±3.30, 48.66±3.53 และ 44.17±2.80 ตามลำดับ จากการศึกษาแสดงว่าการเสริมกลูตามีนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ EYT สามารถช่วยเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อโคนมภายหลังการแช่แข็ง โดยทำให้อสุจิมีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิและอะโครโซมสูงสุด

คำสำคัญ : กลูตามีน ไกลซีน น้ำเชื้อโคนมม

เลขทะเบียนผลงานวิจัย : 54(1)-0408-032

Effect of Glutamine and Glycine Supplements in Extenders on Post-Thaw Semen Quality of Dairy Bulls.

Panupan Pongpeng[1] Suda Janthasi[1] Kunasan Saykhun[2] Jatuporn Pongpeng[1]

[1]Lamphayaklang Livestock Semen Production Center, Lamsonthi, Lopburi 15190

[2]Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Salaya, Nakhornpathom 73170.

Abstract

This study was performed to evaluate the effects of glutamine, glycine and glutamine+glycine added in Egg Yolk Tris (EYT) extender on cryopreservation of dairy bull semen. Semen was collected at five weekly intervals from five mature crossbreed Holstein-Friesian bulls. Each bull semen sample (n=4) was accessed weekly for treated groups: non-amino acid treated (control) and supplemented with 50 mM of glutamine, glycine and 25 mM glutamine+25 mM glycine.

Amino acid treated groups showed no significant different (P>0.05) post-thawing sperm motility compared to the control group. However, for the sperm velocity, the glutamine+glycine added group had the lowest straight-line velocity (VSL) (P<0.05). For the kinetic movement, the control group had the highest amplitude of lateral head displacement (ALH) compared with the amino acid treated groups (P<0.05). Additionally, the statistically significant (P<0.05) sperm membrane and acrosome integrity as live-acrosome intact (LAI) was observed only in the glutamine added group as 52.90±2.45% vs 42.72±3.30, 48.66±3.53 and 44.17±2.80% for the control, the glutamine and the glutamine+glycine added group respectively.

The results from this study indicated that addition of glutamine in EYT extender enhanced post-thawed semen quality, interms of improved membrane and acrosome integrity of dairy bull frozen semen.

Keywords : Glutamine, Glycine, Semen quality, Dairy bulls

Research project no. : 54(1)-0408-032

บทนำ

ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งอาจมีความเสียหายเกิดขึ้นกับตัวอสุจิจากปัจจัยหลายอย่าง เนื่องจากอสุจิมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของสารเคมี การลดอุณหภูมิขณะทำการแช่แข็ง ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อมีสารที่สำคัญคือสาร cryoprotectants ที่ช่วยป้องกันอสุจิเสียหายหรือตายระหว่างการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็ง (McLaughlin et al., 1992) โดยช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในเซลล์ (Curry, 2000) ลดความเสียหายของผนังอสุจิ (Peters and Ball, 1995) ซึ่งถ้าผนังเซลล์อสุจิเสียหายจะส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อหุ้มอสุจิและอะโครโซมซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่อสุจิใช้เจาะผ่านผนังเซลล์ไข่ ถ้าหากอะโครโซมเสียหายหรือไม่สมบูรณ์ถึงแม้ว่าอสุจิไม่ตายแต่ก็ไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ (Januskauskas et al., 2003)

เมื่ออุณหภูมิเย็นจัด สัตว์และพืชหลายชนิดจะมีการสะสมกรดอะมิโนไว้ในเซลล์รวมทั้งในน้ำเชื้อด้วย เชื่อว่าสามารถช่วยป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ได้ (El-Sheshtawy et al., 2008) และกรดอะมิโนกลูตามีนก็เป็นกรดอะมิโนที่พบมากที่สุดประมาณร้อยละ 90 ของกรดอะมิโนทั้งหมด รองลงมาได้แก่ ไกลซีนและอะลานีน ในน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคยังพบกรดอะมิโนในรูปแบบของสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆด้วย ซึ่งสารประกอบเหล่านี้ทำหน้าที่เป็นสารเสริมช่วยป้องกันความเสียหายให้แก่ตัวอสุจิในกระบวนการแช่แข็ง (Brown and White, 1974) และยังมีส่วนเกี่ยวข้องในกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวให้เป็นพลังงานเพื่อใช้ในกิจกรรมของเซลล์และการเคลื่อนที่ของอสุจิอีกด้วย (Bhargava et al., 1959) อย่างไรก็ตามกลไกทางสรีรวิทยาของกรดอะมิโนเหล่านี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (El-Sheshtawy et al., 2008) แต่มีการศึกษาชนิดของกรดอะมิโนที่นิยมใช้เสริมในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งของสัตว์ชนิดต่างๆ ได้แก่ การเสริมกลูตามีนไกลซีนและโปรลีน 100-150 mM สามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อ หรือการเสริมกลูตามีน 80 mM สามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิมนุษย์และอสุจิม้าภายหลังการแช่แข็ง (Renard et al, 1996; Scanchez-Partidata et al, 1992) ส่วน El-Sheshtawy et al. (2008) ทำการศึกษาในน้ำเชื้อกระบือพบว่าการเสริมกลูตามีน ไกลซีน อะลานีนและซีสเตอีนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อมีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งแตกต่างกัน และอธิบายว่าการเสริมไกลซีนที่ความเข้มข้น 25 mM สามารถรักษาความสมบูรณ์ของอะโครโซมได้ดีที่สุดคือ 61.30% เปรียบเทียบกับน้ำยาเจือจางปกติที่ไม่ได้เสริมซึ่งมีความสมบูรณ์ของอะโครโซม 50.30% ในขณะที่การเสริม กลูตามีนที่ระดับ 25 mM สามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิเป็น 42.50% เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาเจือจางที่ไม่เสริม มีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ 32.50% และ Amirat-Briand et al. (2009) ก็ทำการศึกษาเสริมกลูตามีน ขนาด 10 mM ในน้ำยาเจือจาง EYT ที่ใช้ low density lipoproteins (LDL) แทนไข่แดงพบว่าสามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิโคให้สูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบน้ำยาเจือจางที่ไม่เสริม กลูตามีน

ดังนั้นจึงทำการศึกษาการเสริมกรดอะมิโน 2 ชนิด คือกลูตามีนไกลซีนและกลูตามีนร่วมกับไกลซีนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคนมเพื่อเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง

อุปกรณ์ และวิธีการ

วางแผนการทดลองแบบบล็อกสมบูรณ์(randomized complete block design: RCBD) กำหนดให้น้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคทรอปิคอลโฮลสไตน์ อายุประมาณ 3-5 ปีจำนวน 5 ตัวเป็นบล็อก รีดเก็บน้ำเชื้อด้วย artificial vagina สัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยกำหนดให้น้ำเชื้อต้องมีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่ต่ำกว่า 70% รีดเก็บติดต่อกัน 5 สัปดาห์โดยแบ่งน้ำเชื้อออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆ กัน ทำการเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางในแต่ละกลุ่มทดลองดังนี้ กลุ่มที่ 1 เจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง EYT (tris 30.28 g, citricacid 17 g, fructose 12.5 g, deminralised water 920.0 ml., glycerol 80 ml., egg yolk 250 ml., penicillin G sodium 1,000,000 IU และstreptomycinsulfate 1 g) ที่ไม่เสริมกรดอะมิโน กลุ่มที่2 น้ำยาเจือจาง EYT เสริมกลูตามีน 50 mM กลุ่มที่3 น้ำยาเจือจาง EYT เสริมไกลซีน 50 mM และกลุ่มที่ 4 น้ำยาเจือจาง EYT เสริมกลูตามีน 25 mM ร่วมกับไกลซีน 25 mM โดยคำนวณให้มีจำนวนอสุจิ 96 ล้านตัว/ml

การบรรจุและการแช่แข็งบรรจุน้ำเชื้อใน French ministraw 0.25ml ด้วยเครื่องบรรจุน้ำเชื้อ (Typemachine MRS3, Code YC250, IMV, France) นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยเครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (Digitcool 5300, ZH 350 & UE 350 with 900 HP program 3T Software, IMV, France) และเก็บไว้ใต้ระดับไนโตรเจนเหลวในถังเก็บน้ำเชื้อ

การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง ทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยน้ำอุ่น 37°C เป็นเวลา 30 วินาที เช็ดให้แห้ง ตัดปลายหลอดให้น้ำเชื้อหยดลงในหลอดแก้วเล็ก ทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อทันที

การตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CASA (computer assisted semen analysis) โปรแกรม IVOS motility analyzer version 12.0 (Hamilton-Thorne, Biosciences, MA, USA.) ทำการตรวจวิเคราะห์ดังนี้

- การเคลื่อนที่ (motility) และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility)
- ความเร็วในการเคลื่อนที่ ได้แก่ pathvelocity (VAP), straight-line velocity (VSL) และ curvilinear velocity (VCL)
- ลักษณะการเคลื่อนที่ ได้แก่ amplitude of lateral headdis placement (ALH), beatcros frequency (BCF), straightness (STR) และ linearity (LIN)

การตรวจความผิดปกติของอะโครโซม (acrosome integrity) โดยย้อมสี FITC-PNA (fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin) และตรวจความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane integrity) โดยย้อมด้วยสี PI (propridium iodide) วิธีการคือทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่ 37°C นาน 30 วินาที เจือจางด้วย Hepes-buffered modified Tyrode medium (CaCl2 2.0 mM, KCl 3.1 mM, MgCl2 0.4 mM, NaCl 100 mM, NaHCO3 25 mM, NaH2PO4 0.3 mM, sodium pyruvate 1.0 mM, sodium lactate 21.6 mM, Hepes 10.0 mM และ BSA 6.0 mg/ml) ปริมาตร 10 เท่าของน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C กรองผ่าน nylon mesh ขนาด 41 µm (Spectrum, Los Angeles, CA, USA) จากนั้นย้อมด้วยสี FITC-PNA โดยใช้น้ำเชื้อ 440 µl ผสมกับสี FITC-PNA 50 µl (10 mg/ml)

นำไปไว้ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที จากนั้นย้อมด้วยสี PI ก่อนนำไปตรวจด้วยเครื่อง flow cytometer รุ่น FACS caliber (Becton Dickinson, NJ, USA.)

การวิเคราะห์และแปลผล วิเคราะห์ค่าตัวชี้วัดต่างๆ ด้วย Analysis of Variance และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์โคนมที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris ที่เสริมกรดอะมิโนต่างๆ ได้แก่ กลูตามีน ไกลซีน และกลูตามีนร่วมกับไกลซีน พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ (motility) และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility) ของอสุจิในกลุ่มที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ EYT ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่เสริมกลูตามีน ไกลซีน และกลูตามีนร่วมกับไกลซีน ($P>0.05$) ซึ่งแตกต่างกับน้ำเชื้อกระบือที่การเสริมกลูตามีนในน้ำยาเจือจาง สามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิให้สูงขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาเจือจางที่ไม่เสริมกรดอะมิโน แต่เมื่อเพิ่มถึงระดับ 100 mM กลับทำให้อัตราการเคลื่อนที่ลดลง (El-Sheshtawy et al., 2008) แสดงว่าการเสริมกรดอะมิโนสามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อสัตว์หลังการแช่แข็งได้หลายชนิดแต่การเสริมอาจมีระดับที่จำกัดแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด

ส่วนความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ (velocity) ซึ่งเป็นตัวชี้วัดที่ให้ทราบถึงความสามารถในการเคลื่อนที่ของอสุจิในช่วงเวลาหนึ่ง ได้แก่ VAP เป็นความเร็วในการเคลื่อนที่จริงในหนึ่งวินาที ส่วน VCL (การเคลื่อนที่วิถีโค้ง) เป็นการคำนวณแนวโน้มของการเคลื่อนที่เฉลี่ยใน 1 วินาที และ VSL (การเคลื่อนที่วิถีตรง) เป็นการคำนวณจากจุดหนึ่งไปยังอีกจุดหนึ่งในแนวเส้นตรงในช่วงระยะเวลา 1 วินาที ซึ่งความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิที่มีค่ามากแสดงว่าอสุจิน่าจะมีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้ดี ซึ่งมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการผสมติด (กิตติศักดิ์ และคณะ 2551) จากการทดลองพบว่าอสุจิในน้ำยาเจือจาง EYT ที่เสริมกลูตามีนร่วมกับไกลซีนมีความเร็วที่ใช้ในการเคลื่อนที่วิถีตรง (VSL) ต่ำที่สุดคือ 64.07±2.19 μm/s เทียบกับกลุ่มที่ไม่เสริม กลุ่มที่เสริมกลูตามีน และกลุ่มที่เสริมไกลซีนเพียงอย่างเดียว ($P<0.05$) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 72.15±1.23, 69.55±1.13 และ 68.82±1.39 μm/s ตามลำดับ ในทำนองเดียวกับความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีโค้ง (VCL) อสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่เสริมกลูตามีนร่วมกับไกลซีนให้ค่าต่ำที่สุด เมื่อเทียบกับไม่เสริมอะมิโน หรือเสริมกลูตามีน หรือเสริมไกลซีนเพียงอย่างเดียว ($P<0.05$) ซึ่งมีค่า VCL เท่ากับ 139.45±2.45, 150.42±2.51, 145.57±2.57 และ 142.46±2.84 μm/s ตามลำดับ

ส่วนลักษณะการเคลื่อนที่ (kinetic movement) เป็นตัวชี้วัดที่บอกให้ทราบว่าในการเคลื่อนที่ของอสุจิมีลักษณะการส่ายของหัวมากน้อย ซึ่งลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิควรมีการส่ายน้อยๆ หรือมีการเคลื่อนที่ได้ตรงที่สุดซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของผนังเซลล์ และการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารและองค์ประกอบของผนังเซลล์ (Shannon and Vishwanath, 1995) และผลกระทบจากการเปลี่ยนสถานะของสารละลายอันเนื่องมาจากการแช่แข็ง (Holt and North, 1994) เมื่อเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่ไม่เสริมกรดอะมิโน พบว่าอสุจิมีช่วงกว้างขณะส่ายหัว (ALH) มากที่สุด คือ 6.80±0.11 μm เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เสริมกรดอะมิโนกลูตามีน ไกลซีน และกลูตามีนร่วมกับไกลซีน ($P<0.05$)โดยมีค่า 6.56±0.11, 6.66±0.08 และ 6.40±0.12 μm ตามลำดับ (Table 1) แสดงว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่เสริมกรดอะมิโนมีส่วนช่วยลดผลกระทบจากการแช่แข็งได้ดีกว่า

Table 1 Post-thawing sperm quality parameterswere examined by CASA

Sperm quality parameters	Post-thawing semen in EYT supplements			
	Control	Glutamine	Glycine	Glutamine+Glycine
Motility (%)	50.85±1.17	52.58±2.41	51.00±2.17	49.59±2.14
Progressivemotility (%)	32.45±0.95	32.67±1.55	30.68±1.46	30.69±1.45
Velocity				
Averagepathvelocity:VAP (µm/s)	113.56±24.58	86.36±1.36	85.07±1.55	82.46±1.48
Straight-linevelocity:VSL (µm/s)	72.15^{a}±1.23	69.55^{a}±1.13	68.82^{a}±1.39	64.07^{b}±2.19
Curvilinearvelocity:VCL (µm/s)	150.42^{a}±2.51	145.57^{ab}±2.57	142.46^{b}±2.84	139.45^{b}±2.45
Kineticmovement				
Amplitudeoflateralhead:ALH (µm)	6.80^{a}±0.11	6.56^{ab}±0.11	6.66^{ab}±0.08	6.40^{b}±0.12
Beatcross frequency:BCF (HZ)	27.07±0.53	27.18±0.56	26.61±0.45	26.77±0.61
Straightness: STR (%)	79.29±0.62	79.40±0.72	79.77±0.65	78.77±0.74
Linearity: LIN (%)	48.49±0.59	49.14±0.68	49.69±0.72	48.46±0.72

^{ab} ตัวอักษรที่แตกต่างกันอยู่ในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05)

ลักษณะความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมภายหลังการแช่แข็ง พบว่าเมื่อเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ EYT ที่เสริมกลูตามีน มีผลทำให้อสุจิที่มีชีวิตมีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิและอะโครโซมสูงกว่า อสุจิในน้ำยาเจือจางที่ไม่เสริมกรดอะมิโน (P<0.05) แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับอสุจิในน้ำยาเจือจางที่เสริมไกลซีน หรือที่เสริมกลูตามีนร่วมกับไกลซีน คือมีค่าร้อยละ 52.90±2.45, 42.72±3.30, 48.66±3.53 และ 44.17±2.80 ตามลำดับ (Table 2) ซึ่งมีผลการทดลองเป็นไปในทำนองเดียวกับ El-Sheshtawy et al. (2008) พบว่าการเสริมไกลซีนในน้ำยาเจือจางสามารถรักษาความสมบูรณ์ของอะโครโซมได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาเจือจางที่ไม่ได้เสริมกรดอะมิโน

Table 2 Post-thawing sperm quality parametersexamined by Flow Cytometer

Sperm quality parameters (%)	Post-thawing semen in EYT supplements			
	Control	Glutamine	Glycine	Glutamine+Glycine
Dead-acrosome intact (DAI)	29.13^{bc}±1.86	24.70^{a}±1.50	26.16^{ab}±1.19	31.00^{c}±1.77
Dead-acrosome damage (DAD)	28.12±2.97	23.14±2.72	25.18±3.46	24.76±2.99
Live-acrosome intact(LAI)	42.72^{a}±3.30	52.90^{b}±2.45	48.66^{ab}±3.53	44.17^{ab}±2.80
Live-acrosome damage (LAD)	0.05±0.01	0.06±0.02	0.03±0.01	0.04±0.01

^{ab} ตัวอักษรที่แตกต่างกันอยู่ในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05)

สรุปผลการทดลอง

ผลจากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่าการเสริมกรดอะมิโนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ สามารถช่วยเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งได้ โดยสามารถช่วยลดผลกระทบจากการแช่แข็ง และช่วยเพิ่มความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมให้สูงขึ้น แต่ไม่ทำให้อัตราการเคลื่อนที่และความเร็วในการเคลื่อนที่แตกต่างกับการเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ EYT ที่ไม่เสริมกรดอะมิโน และจากผลการทดลองการเสริมกลูตามีน 50 mMในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ EYT สามารถช่วยเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งได้ อสุจิมีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิและอะโครโซมสูงขึ้น

เอกสารอ้างอิง

กิตติศักดิ์ แสงสกุล สราวุธ ฉายประสาท เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล และ มุขดา รัตนภาสกร. 2551. ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตกลูกและลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิของน้ำเชื้อแช่แข็งโค. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. ปีที่ 3 ฉบับที่ 1 มิถุนายน 2551.

Amirat-Briand, L., Bencharif, D., Vera-Munoz, O., Bel Hadj Ali, H., Destrumelle, S., Desherces, S., Schmidt, E., Anton, M., and Tainturier, D. 2009. Effect of glutamine on post-thaw motility of bull spermatozoa after association with LDL (low density lipoproteins) extender: Preliminary results. Theriogenology. 71(8): 1209-1214.

Bhargava, P.M., Bishop, W.H. and Work, T.S. 1959 . The chemical composition of bull semen with special reference to nucleic acids, free nucleotides and free amino acids. Biochemical Journal. 73(2): 242-247.

Brown-Woodman, P.D. and White, I.G. 1974. Amino acids composition of semen and the secretions of the male reproductive tract. Australian Journal of Biological Sciences. 27(4): 415-422.

Curry, M.R. 2000. Cryopreservation of sperm from domestic livestock. Reviews of Reproduction. 5:46-52.

El-Sheahtawy, R.I., El-Sisy, G.A. and El-Nattat, W.S. 2008. Use of Selected amino acids to improve buffalo bull semen cryopreservation. Global Veterinaria. 2(4): 146-150.

Holt, W.V. and Nort, R.D. 1994. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. Biological Reproduction. 51:414-424.

Januskauskas, A., Johannisson, A. and Rodriguez-Martinez, H. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatinstructure, and field fertility. Theriogenology. 60: 743-758.

Khlifaoui, M., Battut, I., Bruyas, J. F., Chatagnon, G., Trimeche, A. and Tainturier, D. 2005. Effect of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa: an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. Theriogenology. 63(1): 138-149.

McLaughlin, E.A., Ford, W.C. and Hull, M.G. 1992. The contribution of the toxicity of a glycerol-egg yolk-citrate cryopreservative to the decline in human sperm motility during cryopreservation. Journal of Reproduction and Fertility. 95:749-754.

Peters, A.R. and Ball, P.J.H. 1995. Reproduction in Cattle. 2nd Ed. Blackwell Science Ltd. P. 82-84.

Phetudomsinsuk, K., Sirinarumitr, K., Choothesa, A., Suthanmapinunt, P., Kornkaewrat, K., Laikul, A., Amornsak, S. and Pinyopummin, A. 2009. Thai Journal Veterinarian Medicine. 39(2): 105-114.

Renard, P., Grizard, G., Griveau, J.F., Sion, B., Boucher, D. and Le Lannou, D. 1996. Improvement of motility and fertility potential of post-thaw human sperm using amino acids. Cryobiology. 33: 311-319.

Scanchez-Partidata, L.G., Maxwell, W.M.C., Paleg, L.G. and Setchell, B.P. 1992. Proline and glycine brtaine in cryoprotective diluent for ram spermatozoa. Reproduction and fertility Development. 4: 113-118.

Shannon, P. and Vishwanath, R. 1995. The effect of optimal and suboptimal concentration of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. Animal Reproductive Science. 39: 1-10.

สมรรถนะทางการสืบพันธุ์ของโคเนื้อลูกผสมบราห์มันในภาคใต้ของประเทศไทย

จิตศักดิ์ เมืองเขียว[1] และ ธวัชชัย โพธิ์คำ[1]

[1] ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสุราษฎร์ธานี อ.พุนพิน จ.สุราษฎร์ธานี

บทคัดย่อ

ศึกษาสมรรถนะทางการสืบพันธุ์โคเนื้อลูกผสมภายใต้สภาพการจัดการของเกษตรกรรายย่อยทางภาคใต้ของประเทศไทย ใช้ข้อมูลผสมเทียมรายตัวของโคที่รวบรวมไว้ในระบบฐานข้อมูลของศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสุราษฎร์ธานี กรมปศุสัตว์ ในช่วงปี พ.ศ. 2548-2553 จำนวน 8,095 บันทึก มีการตรวจสอบความถูกต้องจากบัตรบันทึกผสมเทียม (ผท.2) ประจำหน่วยผสมเทียม แบ่งกลุ่มพันธุ์โคออกเป็น 5 กลุ่ม คือ AB75%xNA25%, AB50%xNA50%, AB50% xCHA50%, AB25% xCHA50%xNA25% และ NA 100 % และแม่โคแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ โคสาว (Heifer) และแม่โค (Primiparous และ Multiparous) สมรรถภาพการสืบพันธุ์ที่วิเคราะห์ได้ ดังนี้ อายุเมื่อให้ลูกตัวแรก (AFC) จำนวนครั้งที่ผสมต่อการผสมติด (SPC) และระยะอุ้มท้อง (GL) ในโคสาว มีค่าเท่ากับ 38.84+0.29 เดือน 1.56+0.08 ครั้งและ 282.02+0.02 วัน ตามลำดับ ส่วนระยะเวลาจากคลอดถึงผสมครั้งแรก (PTF) จำนวนครั้งที่ผสมต่อการผสมติด (SPC) ระยะเวลาตั้งแต่คลอดถึงผสมติด (DO) ระยะอุ้มท้อง (GL) และช่วงห่างการคลอดลูก (CI) ของในกลุ่มแม่โค มีค่าเท่ากับ 148.59+4.02 วัน 1.43+0.03 ครั้ง 174.82+5.76 วัน 282.25+0.10 วัน และ 465.56+4.43 วัน ตามลำดับ กลุ่มโคที่มีระดับสายเลือดบราห์มันจะให้ผลการวิเคราะห์ตัวชี้วัดของ AFC, PTF, SPC, DO และ CI สูงกว่ากลุ่มแม่โคพื้นเมือง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) โดยเฉพาะกลุ่ม AB75%xNA25% จะให้ค่าเฉลี่ยของตัวชี้วัดเหล่านี้สูงสุด แม่โคในกลุ่ม Primiparous ทุกระดับสายเลือดมีประสิทธิภาพการสืบพันธุ์โดยเฉลี่ยต่ำกว่ากลุ่ม Multiparous มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) ยกเว้น SPC และ GL เมื่อมีการเลี้ยงดูภายใต้สภาพการจัดการของเกษตรกรรายย่อยทางภาคใต้ของประเทศไทย

คำสำคัญ : โคเนื้อ ลูกผสม บราห์มัน สมรรถภาพทางการสืบพันธุ์

Reproductive Performances of Brahman Crossbreds in Southern Thailand

Jitthasak Maungkhiow[1] and Tawutchai Pothkom[1]

[1] Suratthani Artificial Insemination and Biotechnology research Centre, Punpin District, Suratthani

Abstract

The main objective of this study was to determine reproductive performances of mixed breed beef cattle under small farm holder management in Southern Thailand. Between 2005 to 2010, 8,095 AI records (AI 2 form) from AI units of Surathani Artificial Insemination and Research Center, Department of Livestock Development. were checked and analyzed. The beef cattle on the AI records were divided according to their breed percentage into 5 groups as follows; AB75% x NA25%, AB50% x NA50%, AB50% x CHA50%, AB25% x CHA50% x NA25% and NA100%. These female beef cattle were also divided into heifer and cow groups. The cow group was then subdivided into Primiparous and Multiparous. Reproductive performances studied in heifer group were Age at First Calving (AFC), Service per Conception (SPC) and Gestation Length (GL) which the results showed 38.84±0.29 months, 1.56±0.08 services and 282.02±0.02 days, respectively. Whereas results of Day from parturition to first service (PTF), Service per Conception (SPC), Days Open (DO), Gestation Length (GL) and Calving Interval (CI) in the cow group were 148.59±4.02 days, 1.43±0.03 services, 174.82±5.76 days, 282.25±0.10 days and 465.56±4.43 days, respectively. Study in mixed Brahman cattle group revealed significant superior performances in term of AFC, PTF, SPD, DO and CI to Native cattle ($p<0.01$) which the best performance index was from AB75% x NA25% group. Cows in primiparous group of any breed percentage showed significantly inferior in term of all reproductive performance indexes to the multiparous group except SPC and GL ($p<0.01$).

Keywords : Brahman crossbred, reproductive performance

บทนำ

การเลี้ยงโคเนื้อในพื้นที่ภาคใต้ส่วนใหญ่เป็นเกษตรกรรายย่อย ใช้หญ้าตามธรรมชาติและผลพลอยได้ทางการเกษตรเป็นแหล่งอาหารหยาบ อาจมีการสร้างแปลงพืชอาหารสัตว์ขนาดเล็กและมีการเสริมวัตถุดิบอาหารสัตว์บ้างในบางราย โดยมีวัตถุประสงค์ของการเลี้ยงเพื่อขายลูกโคและนำเนื้อมาบริโภค นอกจากนี้มูลโคยังเป็นผลพลอยได้ที่สำคัญใช้เป็นปุ๋ยบำรุงดินให้กับพืชเศรษฐกิจหลัก ทั้งยางพาราและปาล์มน้ำมัน ทั้งนี้ยังรวมถึงโคพื้นเมืองภาคใต้ที่ผ่านการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์โดยภูมิปัญญาในท้องถิ่นมายาวนานจนเกิด **"กีพาชนโค"** ซึ่งแสดงความเป็นเอกลักษณ์ของโคทางภาคใต้ สิ่งเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยงโคเนื้อมีบทบาทต่อวิถีชีวิต สังคม และวัฒนธรรมของคนทางภาคใต้เป็นอย่างมาก

จากรายงานของกรมปศุสัตว์ระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมาปริมาณโคเนื้อในพื้นที่ภาคใต้มีทิศทางที่เพิ่มขึ้น โดยในปี 2542 มีจำนวนโคเนื้อเท่ากับ 685,669 ตัว (กองแผนงาน, 2542) และในปี พ.ศ. 2552 มีจำนวนโคเนื้อเท่ากับ 776,019 ตัว (ศูนย์สารสนเทศ, 2553) ส่วนใหญ่เป็นโคลูกผสมที่เกิดจากการใช้โคพื้นเมืองเป็นแม่โคพื้นฐานผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อโคพันธุ์แท้จากต่างประเทศ โดยเฉพาะน้ำเชื้อจากโคพันธุ์บราห์มันและโคพันธุ์ชาร์โรเลส์สำหรับผลิตโคเนื้อคุณภาพ โคเพศผู้จะนำไปเลี้ยงเป็นโคขุนหรือเลี้ยงเป็นโคเนื้อส่งโรงฆ่า ส่วนโคเพศเมียจะเลี้ยงไว้เป็นแม่โคเพื่อผลิตลูกในรุ่นต่อๆ ไป

สมรรถนะทางการสืบพันธุ์ เช่น อายุเมื่อให้ลูกตัวแรก (Age at first calving) ระยะเวลาอุ้มท้อง (Gestation length) ช่วงห่างของการคลอดลูก (Calving interval) ระยะเวลาตั้งแต่คลอดถึงผสมครั้งแรก (Calving to first service interval) ระยะเวลาตั้งแต่คลอดถึงผสมติด (Days open) อัตราการผสมติดครั้งแรก (First service conception rate) จำนวนครั้งที่ผสมต่อการผสมติด (Service per conception) เป็นต้น เป็นตัวชี้วัดประสิทธิภาพการผลิตโคที่สำคัญ โดยทั่วไปแม่โคที่มีประสิทธิภาพการผลิตที่ดีควรจะให้ลูกปีละตัว คือแม่โคต้องได้รับการผสมพันธุ์และผสมติดภายใน 60 - 90 วัน (สุณีรัตน์, 2550) แต่ข้อมูลทางด้านสมรรถนะทางการสืบพันธุ์ ของแม่โคเนื้อลูกผสมภายใต้สภาพการเลี้ยงของเกษตรกรรายย่อยและสภาพแวดล้อมทางภาคใต้ของประเทศไทย มีผู้ศึกษาน้อยและไม่ครอบคลุมทั่วทุกจังหวัดในพื้นที่ จึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาทางด้านนี้เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการจัดการเลี้ยงดู วางแผนปรับปรุงพันธุ์และวางแผนส่งเสริมในการผลิตต่อไป

ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสมรรถนะทางการสืบพันธุ์ของโคเนื้อลูกผสมบราห์มันในภาคใต้ของประเทศไทย ภายใต้สภาพการจัดการของเกษตรกรรายย่อย

อุปกรณ์ และวิธีการ

1. ข้อมูลและการจัดการข้อมูล

เป็นการศึกษาข้อมูลสมรรถนะการสืบพันธุ์จากฐานข้อมูลผสมเทียมรายตัวโคเนื้อของศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสุราษฎร์ธานี กรมปศุสัตว์ ในช่วงปี พ.ศ. 2548-2553 โดยมีการตรวจสอบความถูกต้องจากบัตรผสมเทียม (ผท.2) ประจำหน่วยผสมเทียม จำนวน 8,095 บันทึก

โคเนื้อในฟาร์มของเกษตรกรรายย่อยทางภาคใต้ของประเทศไทย ที่มีการเลี้ยงดูโดยใช้พืชอาหารสัตว์จากแปลงขนาดเล็กที่ปลูกเองและหญ้าตามธรรมชาติรวมทั้งผลพลอยได้จากพืชผลทางการเกษตรเป็นแหล่งอาหารหยาบ

สมรรถนะภาพทางการสืบพันธุ์ที่ใช้เป็นตัวชี้วัดในโคสาวประกอบด้วย อายุเมื่อให้ลูกตัวแรก (Age at first calving, AFC) จำนวนครั้งที่ผสมต่อการผสมติด (Service per conception, SPC) และระยะอุ้มท้อง (Gestation length, GL)

ในแม่โคประกอบด้วยระยะเวลาตั้งแต่คลอดถึงผสมติด (Days open, DO) ระยะอุ้มท้อง (Gestation length, GL) และช่วงห่างการคลอดลูก (Calving interval, CI) ระยะเวลาจากคลอดถึงผสมครั้งแรก (Day from parturition to first service, PTF) และจำนวนครั้งที่ผสมต่อการผสมติด (Service per conception, SPC)

การจัดการข้อมูลการผสมเทียมเบื้องต้นจะประยุกต์ตามวิธีการของ Kadarmideen and Coffey (2001) ที่กำหนดให้ระยะเวลาการตั้งท้องอยู่ในช่วง 268 - 296 วัน ส่วนข้อจำกัดและเกณฑ์ในการตรวจสอบความถูกต้องและความน่าเชื่อถือของข้อมูลการผสมเทียมเพิ่มเติมได้มีข้อกำหนดดังนี้

- อายุเมื่อคลอดลูกตัวแรกอยู่ในช่วง 18 - 52 เดือน
- ช่วงห่างจากคลอดถึงการผสมเทียมครั้งแรกจะต้องอยู่ในช่วง 20 - 240 วัน
- จำนวนครั้งการผสมเทียมต่อการผสมติดจะต้องบันทึกอยู่ในช่วง 20 - 340 วันหลังคลอด
- ค่าเฉลี่ยจำนวนครั้งการผสมเทียมต่อการผสมติดของฝูงจะต้องอยู่ในช่วง 1.5 - 3.5 ครั้ง
- ช่วงห่างการคลอดลูกจะต้องอยู่ในช่วง 290 - 630 วัน

จำแนกปัจจัยหลักที่เป็นกลุ่มได้คือ

กลุ่มพันธุ์จำแนกออกเป็น 5 กลุ่มคือ AB75%xNA25%, AB50%xNA50%, AB50%xCHA50%, AB25%xCHA50%xNA25% และ NA 100 %

กลุ่มแม่โคแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ โคสาว (Heifer) และแม่โค แบ่งเป็น 2 กลุ่มย่อยคือ แม่โคมีลูกแล้ว 1 ตัว (Primiparous) และ แม่โคมีลูกมากกว่า 1 ตัว (Multiparous)

เดือนที่ผสมเทียม และเดือนที่คลอดในแต่ละปีแบ่งเป็น 2 ฤดู คือ ฤดูร้อน ตั้งแต่ ธันวาคมถึงพฤษภาคม และฤดูฝน ตั้งแต่ มิถุนายนถึงพฤศจิกายน (จิตศักดิ์, 2550)

ปีของการผสมเทียม และการคลอดจำนวน 5 ปี คือ ปีพ.ศ. 2548 - 2553

2. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูล ด้วย GLM procedure ที่มีตัวแบบดังต่อไปนี้

$Y = \mu + bAgeB_i + Hr_j + Yb_k + Db_1 + BG_m + e$ (โคสาว)

$Y = \mu + bAgeC_i + Hr_j + Yc_k + Dc_1 + BG_m + CG_n + (BG \times CG)\ o + e$ (แม่โค)

เมื่อ : Y = ค่าสังเกตจากโคสาว หรือแม่โคสำหรับลักษณะข้อมูลต่อเนื่อง

μ = ค่าเฉลี่ย

$bAgeB_i$ = สัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นตรงของอายุของโคสาวเมื่อผสมเทียมครั้งแรก

$bAgeC_i$ = สัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นตรงของอายุของแม่โคเมื่อคลอดลูก

Hr_j = ปัจจัยคงที่ของฝูง

Yb_k = ปัจจัยคงที่ของปีเกิด

Db_1 = ปัจจัยคงที่ของฤดูกาลที่เกิด

Yc_k = ปัจจัยคงที่ของปีที่คลอดลูก

Dc_1 = ปัจจัยคงที่ของฤดูกาลที่คลอดลูก

BG_m = ปัจจัยคงที่ของระดับสายเลือดโค

CG_n = ปัจจัยคงที่ของกลุ่มแม่โค

$(BG \times CG)_o$ = ปัจจัยคงที่ของการปฏิสัมพันธ์ระหว่างระดับสายเลือดกับกลุ่มแม่โค

e = ค่าความคลาดเคลื่อน

ผลการศึกษา

ค่าสมรรถนะทางการสืบพันธุ์ของโคเนื้อ

จากผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย สมรรถนะทางการสืบพันธุ์ของโคเนื้อลูกผสมภายใต้สภาพการจัดการของเกษตรกรรายย่อยทางภาคใต้ของประเทศไทย อายุเมื่อให้ลูกตัวแรก (AFC) จำนวนครั้งที่ผสมต่อการผสมติด (SPC) และระยะอุ้มท้อง (GL) ในโคสาว 5 กลุ่ม มีค่าเท่ากับ 38.84+0.29 เดือน 1.56+0.08 ครั้ง และ 282.02+0.02 วัน ตามลำดับ ส่วนระยะเวลาจากคลอดถึงผสมครั้งแรก (PTF) จำนวนครั้งที่ผสมต่อการผสมติด (SPC) ระยะเวลาตั้งแต่คลอดถึงผสมติด (DO) ระยะอุ้มท้อง (GL) และช่วงห่างการคลอดลูก (CI) ของในแม่โค 5 กลุ่มมีค่าเท่ากับ 148.59+4.02 วัน 1.43+0.03 ครั้ง 174.82+5.76 วัน 282.25+ 0.10 วัน และ 465.56+4.43 วัน ตามลำดับ (ตารางที่ 1 - 6)

อิทธิพลของระดับสายเลือดในโคสาว

จากการวิเคราะห์อิทธิพลของระดับสายเลือดในโคสาวต่อสมรรถนะทางการสืบพันธุ์ พบว่าค่า AFC มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) ส่วนค่า SPC และ GL ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ดังที่แสดงไว้ในตารางที่ 1

Table 1 Least square means and standard error for AFC SPC and GL of heifer in different breed groups.

Breed groups	Least square means + SE		
	AFC (month)	SPC (service)	GL (day)
AB75% x NA25%	41.88±0.83[a]	1.54±0.11	282.97±0.58
AB50% x NA50%	40.82±0.41[a]	1.52±0.05	282.01±0.29
AB50% x CHA50%	40.88±0.93[a]	1.51±0.12	282.71±0.64
AB25% x CHA50%x NA25%	39.20±0.41[b]	143±0.07	282.55±0.37
NA100%	38.21±0.54[b]	1.41±0.54	281.93±0.29
Overall means	38.84±0.29	1.56±0.83	282.02±0.11

[a b] Least square means with different letters within the column are high significantly difference. ($P < 0.01$)

อิทธิพลของระดับสายเลือด กลุ่มแม่โค และปฏิสัมพันธ์ระหว่างระดับสายเลือดกับกลุ่มแม่โค

จากการวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อสมรรถภาพทางการสืบพันธุ์ในกลุ่มแม่โค และการปฏิสัมพันธ์ระหว่างระดับสายเลือดกับกลุ่มแม่โค พบว่าทุกปัจจัยมีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ต่อ PTF, SPC, DO, GL และ CI ($P<0.01$) (ตารางที่ 2 - 6)

Table 2 Least square means and standard error for PTF in different breed groups and cow groups.

Breed groups	Cow groups		Breed group means
	Primiparous	Multiparous	
AB75% x NA25%	186.02±15.15[aA]	166.80±9.89[aA]	176.41±9.07[a]
AB50% x NA50%	182.55±4.53[aA]	156.38±2.40[aB]	169.47±2.61[a]
AB50% x CHA50%	171.68±12.17[abA]	151.95±8.43[aA]	161.81±7.47[b]
AB25% x CHA50% x NA25%	184.40±8.90[aA]	154.30±6.19[aB]	169.34±5.50[a]
NA100%	142.96±3.37[bA]	128.25±1.40[bB]	135.60±1.85[c]
Cow group means	173.52±4.60[A]	151.53±3.00[B]	148.59±4.02*

[a b c] Least square means with different letters within the column are high significantly different. ($P<0.01$)

[a b] Least square means with different letters within the row are high significantly different. ($P<0.01$)

* Overall means

Table 3 Least square means and standard error for SPC in different breed groups and cow groups.

Breed groups	Cow groups		Breed group means
	Primiparous	Multiparous	
AB75% x NA25%	1.42±0.15	1.66±0.10^{ab}	1.54±0.09
AB50% x NA50%	1.38±0.05	1.41±0.02^{ab}	1.40±0.03
AB50% x CHA50%	1.61±0.12	1.42±0.08^{ab}	1.52±0.08
AB25% x CHA50% x NA25%	1.50±0.08	1.45±0.06^{ab}	1.48±0.05
NA100%	1.39±0.03	1.36±0.14^{b}	1.37±0.01
Cow group means	1.46±0.04	1.46±0.03	1.43±0.03*

$^{a\ b}$ Least square means with different letters within the column are high significantly different. (P<0.01)

* Overall means

Table 4 Least square means and standard error for DO in different breed groups and cow groups

Breed groups	Cow groups		Breed group means
	Primiparous	Multiparous	
AB75% x NA25%	242.31±17.62^{aA}	205.20±11.50^{aA}	223.75±10.54^{a}
AB50% x NA50%	204.82±5.27^{aA}	181.09±2.80^{aB}	192.95±3.03^{b}
AB50% x CHA50%	212.06±14.16^{aA}	171.39±9.81^{abB}	191.72±8.68^{b}
AB25% x CHA50% x NA25%	218.90±10.35^{aA}	184.08±7.20^{aB}	201.49±6.39^{b}
NA100%	162.73±3.91^{bA}	148.33±1.63^{bB}	155.53±2.15^{c}
Cow group means	208.16±5.34^{A}	178.02±3.48^{B}	174.82±5.76*

$^{a\ b\ c}$ Least square means with different letters within the column are high significantly different. (P<0.01)

$^{A\ B}$ Least square means with different letters within the row are high significantly different. (P<0.01)

* Overall means

Table 5 Least square means and standard error for GL in different breed groups and cow groups.

Breed groups	Cow groups		Breed group means
	Primiparous	Multiparous	
AB75% x NA25%	280.54±0.86^{abA}	282.53±0.57^{abA}	281.59±0.52^{b}
AB50%xNA50%	282.37±0.25^{abA}	282.46±0.13^{aA}	282.42±0.14^{a}
AB50% x CHA50%	283.15±0.69^{abA}	282.25±0.48^{abA}	282.70±0.43^{ab}
AB25% x CHA50% x NA25%	283.77±0.52^{aA}	281.97±0.35^{abB}	282.87±0.32^{a}
NA100%	281.61±0.19^{bA}	281.85±0.08^{bA}	281.74±0.10^{b}
Cow group means	282.29±0.86^{A}	282.23±0.57^{A}	282.25±0.10*

$^{a\ b\ c}$ Least square means with different letters within the column are significantly different (P<0.01)

$^{A\ B}$ Least square means with different letters within the row are significantly different (P<0.01)

* Overall means

Table 6 Least square means and standard error for CI in different breed groups and cow groups

Breed groups	Cow groups		Breed group means
	Primiparous	Multiparous	
AB75% x NA25%	522.84±17.65^{aA}	487.83±11.52^{aA}	505.34±10.54^{a}
AB50% x NA50%	487.83±5.28^{aA}	463.56±2.80^{aB}	475.38±3.04^{a}
AB50% x CHA50%	495.21±14.18^{aA}	453.64±9.83^{aA}	474.42±8.70^{a}
AB25% x CHA50% x NA25%	502.67±10.36^{aA}	466.05±7.21^{aB}	484.36±6.41^{a}
NA100%	444.34±3.92^{bA}	430.19±1.63^{aB}	437.27±2.15^{b}
Cow group means	490.45±5.36^{A}	460.25±3.50^{B}	465.56±4.43*

$^{a\ b\ c}$ Least square means with different letters within the column are high significantly different (P<0.01)

$^{A\ B}$ Least square means with different letters within the row are high significantly different (P<0.01)

* Overall means

วิจารณ์

ผลการวิเคราะห์สมรรถนะทางการสืบพันธุ์ของโคเนื้อลูกผสมภายใต้สภาพการจัดการของเกษตรกรรายย่อยในภาคใต้ของประเทศไทย พบว่าโคลูกผสมบราห์มันมีค่าเฉลี่ยของตัวชี้วัดสูงกว่าโคพื้นเมือง โดยเฉพาะโค AB75%xNA25% จะมีค่าเฉลี่ยของตัวชี้วัดสูงสุดแสดงว่ามีประสิทธิภาพทางการสืบพันธุ์ต่ำกว่า สอดคล้องกับ Tamwasorn et al. (1982) ที่ศึกษาในฟาร์มทดลองโคเนื้อกำแพงแสนพบว่าโคพื้นเมืองมีประสิทธิภาพทางการสืบพันธุ์ดีกว่า โคลูกผสมบราห์มันxพื้นเมือง และโคลูกผสม ชาโรเลส์xพื้นเมือง นอกจากนี้ผลการวิเคราะห์พบว่าแม่โคกลุ่ม Primiparous มีค่าเฉลี่ยของตัวชี้วัดสูงกว่าแม่โคกลุ่ม Multiparous สอดคล้องกับการศึกษาในโคนมของ ชาลีและคณะ (2549) และรายงานในต่างประเทศก็พบว่าแม่โคกลุ่ม Primiparous มีประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแม่โคกลุ่ม Multiparous (Kinsel and Etherington ,1998) เนื่องจาก สารอาหารที่แม่โคกลุ่ม Primiparous ได้รับเข้าไปร่างกายจำเป็นต้องมีการแบ่งส่วนสารอาหาร (partition) ไปเพื่อการเจริญเติบโตในสัดส่วนที่สูงเมื่อเทียบกับแม่โคกลุ่ม Multiparous (Bellows and Short,1978) ดังนั้นแม่โคกลุ่ม Multiparous แบ่งส่วนสารอาหารเพื่อการสืบพันธุ์จึงมีสัดส่วนสูงกว่าแม่โคกลุ่ม Primiparous นอกจากนี้อาจเป็นไปได้ที่ว่าเกษตรกรได้ทยอยขายแม่โคที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำออกไป ทำให้เหลือแม่โคกลุ่มที่มีความสมบูรณ์พันธุ์สูงในฝูง

เมื่อพิจารณาแยกตามตัวชี้วัดที่ทำการศึกษาปรากฏ ดังนี้

อายุเมื่อให้ลูกตัวแรก (AFC) พบว่าโคลูกผสมที่มีระดับสายเลือดอเมริกันบราห์มันตั้งแต่ 50% ขึ้นไปมีอายุเมื่อให้ลูกตัวแรกสูงกว่าโคที่มีระดับสายเลือดอเมริกันบราห์มันต่ำกว่า 50% และโคพื้นเมือง สอดคล้องกับ Tamwasorn et al. (1982) และรายงานในเม็กซิโก(Magana and Segura ,1997) แต่ต่ำกว่าโคบราห์มันพันธุ์แท้ (AB100%) ที่เลี้ยงในศูนย์ฯ / สถานี ซึ่งมีค่าเท่ากับ 3.91 ปี หรือประมาณ 46.92 เดือน (กองบำรุงพันธุ์สัตว์, 2545) ทั้งนี้เป็นผลมาจากโคพันธุ์บราห์มันมีอายุการเป็นหนุ่มสาวช้าประกอบกับอายุการเป็นหนุ่มสาวของโคพันธุ์บราห์มันมีค่าอัตราพันธุกรรมสูง ทำให้โคลูกผสมที่มีระดับสายเลือดบราห์มันสูงมีอายุเมื่อให้ลูกตัวแรกช้าตามไปด้วย (Nogueira,2004)

ระยะเวลาจากคลอดถึงผสมครั้งแรก (PTF) พบว่าแม่โคที่มีสายเลือดอเมริกันบราห์มันจะมีค่า PTF ยาวนานกว่าแม่โคพื้นเมืองเนื่องจากลูกผสมบราห์มันมีโครงสร้างของรูปร่างใหญ่กว่าโคพื้นเมืองจึงมีความต้องการอาหารเพื่อการดำรงชีพและสืบพันธุ์สูงกว่า Hentges and Howes (1963) รายงานว่าในสภาพการเลี้ยงของเกษตรกรรายย่อย ใช้หญ้าตามธรรมชาติและผลพลอยได้ทางการเกษตรเป็นแหล่งอาหารหยาบจึงมีแนวโน้มให้โคลูกผสมบราห์มันได้รับอาหารไม่เพียงพอทำให้กลับมาเป็นสัดช้ากว่าโคพื้นเมือง

แม่โคกลุ่ม Primiparous มีค่า PTF ยาวนานกว่ากลุ่ม Multiparous วัน สอดคล้องกับ Nahar et al.(1992) ที่ทำการศึกษาสมรรถนะแม่โคสายพันธุ์ซีบู (Zebu type) พบว่า ช่วงระยะเวลาจากคลอดถึงผสมครั้งแรกของกลุ่มแม่โคลำดับท้องที่ 2 (151.97 + 14.44 วัน) ยาวนานกว่ากลุ่มแม่โคลำดับท้องที่ 3 (127 + 10.22 วัน) อย่างไรก็ดีจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าช่วงระยะเวลาจากคลอดถึงผสมครั้งแรกของโคลูกผสมบราห์มันและโคพื้นเมือง สูงกว่าค่าทางอุดมคติที่ว่าแม่โคต้องได้รับการผสมพันธุ์และผสมติดภาย 90 - 100 วันหลังคลอดทั้งนี้เนื่องมาจากการเลี้ยงโคเนื้อในภาคใต้เป็นเกษตรกรรายย่อยและเลี้ยงโคเป็นอาชีพเสริมทั้งขาดแคลนอาหารหยาบคุณภาพดีและขาดการจัดการฟาร์มที่ดี โดยเฉพาะไม่มีการจัดการหย่านมลูกโค

มีผลทำให้แม่โคไม่กลับสัดหลังคลอดนานประมาณ 7- 8 เดือน (Morrow et al, 1969) ซึ่ง Spicer and Echternkamp (1986) รายงานว่าแม่โคที่ลูกดูดนมต่อเนื่องและยาวนาน จะมีผลไปยับยั้งการเจริญของกระเปาะไข่และกระบวนการตกไข่ น่าจะเป็นเหตุผลสำคัญประการหนึ่งที่ทำให้การกลับสัดในแม่โคหลังคลอดยาวนานออกไป

จำนวนครั้งที่ผสมต่อการผสมติด (SPC) พบว่าระดับสายเลือดลูกผสมอเมริกันบราห์มัน รวมทั้งลำดับการให้ลูกไม่มีผลต่อ SPC แต่ในกลุ่ม Multiparous พบว่าแม่โคพื้นเมืองมีค่า SPC เท่ากับ 1.36 ต่ำที่สุดสอดคล้องกับการศึกษาของ Tamwasorn et al. (1982) และ ณัฐพรและคณะ (2549) ซึ่งค่า SPC ที่วัดได้จากการศึกษาในครั้งนี้อยู่ในเกณฑ์ดีมาก ซึ่งกรมปศุสัตว์ (2545) แนะนำไว้คือ 1.5 ครั้ง

ระยะเวลาตั้งแต่คลอดถึงผสมติด (DO) พบว่าค่า DO จะผันแปรโดยตรงกับระดับสายเลือดอเมริกันบราห์มันของแม่โค แสดงว่าแม่โคที่มีระดับสายเลือดอเมริกันบราห์มันสูงจะมีค่า DO มากกว่า สอดคล้องกับที่ Roberts (1986) สำหรับลำดับการตั้งท้องพบว่า แม่โคกลุ่ม Primiparous มีค่า DO มากกว่าแม่โคกลุ่ม Multiparous สอดคล้องกับพิพัฒน์และคณะ (2541) ที่ศึกษาในโคออสเตรเลี่ยนบราห์มันรายงานว่าค่าเฉลี่ยระยะเวลาท้องว่างของแม่โคให้ลูกระหว่างตัวที่ 1 - 2 (247.89+8.71วัน) นานกว่าระยะเวลาท้องว่างของแม่โคให้ลูกระหว่างตัวที่ 2 – 3 (148.91+13.98 วัน)

เป็นที่น่าสังเกตว่า จากค่าดัชนีชี้วัด PTF และ SPC ที่ปรากฏ จะเห็นว่าการที่แม่โคมีระยะเวลาท้องว่างหรือระยะเวลาตั้งแต่คลอดถึงผสมติดยาวมิได้มีสาเหตุมาจากการที่แม่โคผสมติดยาก หากเป็นผลจากค่า PTF ที่นานมากกว่า นั้นคือการที่แม่โคมีระยะการกลับสัดหลังคลอดหรือการกลับมามีวงรอบการทำงานของรังไข่อีกครั้งหลังคลอดยาวนาน

ระยะอุ้มท้อง (GL) พบว่าโคสาว มีระยะอุ้มท้องเฉลี่ย 282.02+0.11 วันและระดับสายเลือดของแม่โคลูกผสมมีผลต่อระยะเวลาการตั้งท้องโดยพบว่าโคทีมีสายเลือดชาร์โรเลย์มีแนวโน้มมีค่า GL นานกว่าสายเลือดลูกผสมอเมริกันบราห์มันและพันธุ์พื้นเมือง โดยลำดับการตั้งท้องมีค่า GLไม่แตกต่างกัน

ช่วงห่างการคลอดลูก (CI) พบว่าระดับสายเลือดลูกผสมอเมริกันบราห์มันไม่มีผลต่อระยะห่างการคลอดลูกแต่มีค่ามากกว่าของแม่โคพันธุ์พื้นเมืองซึ่งสอดคล้องกับ Tamwasorn et al. (1982) และจิตศักดิ์และคณะ (2550)

อย่างไรก็ตาม ช่วงห่างการคลอดลูกของแม่โคเป็นตัวชี้วัดประสิทธิภาพทางการสืบพันธุ์ที่ดีที่สุดที่บ่งชี้ถึงประสิทธิภาพการผลิตของสัตว์ทั้งหมดของฝูง (Mukasa - Mugerwa, 1989) จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสูงกว่าค่าที่ยอมรับได้ในโคเนื้อเขตร้อนที่ 410 - 440 วัน ทั้งนี้เพราะมีหลายปัจจัยมากระทบทั้ง สภาพแวดล้อม การจัดการและพันธุกรรม (Lôbo et al., 1988)

สรุปผล

สมรรถนะทางการสืบพันธุ์ของโคลูกผสมบราห์มันและชาร์โรเล่ย์ มีประสิทธิภาพทางการสืบพันธุ์ต่ำกว่าโคพื้นเมือง และแม่โคกลุ่ม Primiparous มีประสิทธิภาพทางการสืบพันธุ์ต่ำกว่ากลุ่มแม่โค Multiparous นอกจากนี้ยังพบว่า ช่วงระยะเวลาจากคลอดถึงผสมครั้งแรกของโคลูกผสมบราห์มันและโคพื้นเมือง สูงกว่าค่าทางอุดมคติที่ว่าแม่โคต้องได้รับการผสมพันธุ์และผสมติดภาย 90 - 100 วันหลังคลอด มีผลทำให้แม่โคในภาคใต้มีช่วงห่างการคลอดลูกของแม่โคยาว ส่งผลถึงประสิทธิภาพการผลิตโคเนื้อโดยรวมของเกษตรกรรายย่อย

ข้อเสนอแนะ

ระยะเวลาจากคลอดถึงผสมครั้งแรกเป็นช่วงสำคัญที่สุด แม่โคต้องการอาหารคุณภาพดี โดยเฉพาะโคลูกผสมบราห์มันที่มีโครงสร้างใหญ่ และการหย่านมลูกโคจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งกับแม่โคในช่วงที่อาหารสัตว์ไม่สมบูรณ์ โดยสามารถหย่านมได้ตั้งแต่ลูกโคอายุ 6 – 7 เดือน หรือใช้การหย่านมแบบชั่วคราว คือ การแยกแม่โคกับลูกเป็นชั่วเวลาสั้นๆ เพื่อไม่ให้ลูกโคดูดนมต่อเนื่องนานเกินไป จะช่วยแม่โคกลับมาเป็นสัดหลังคลอดเร็วขึ้น ทั้งนี้ควรพิจารณาสุขภาพของลูกโคประกอบการหย่านม

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์ชาญยุทธ กาพล ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีสุราษฎร์ธานี เจ้าหน้าที่ผสมเทียมประจำหน่วย เจ้าหน้าที่ของศูนย์ฯ ผสมเทียมสุราษฎร์ธานีทุกท่านที่ช่วยตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล คุณจุรีรัตน์ แสนโภชน์ และคุณสายัณห์ บัวบาน นักวิชาการสัตวบาลชำนาญการพิเศษ สำนักเทคโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ที่ให้คำแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูลและตรวจแก้ไขต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์ 2545 คู่มือสำหรับเจ้าหน้าที่ผสมเทียม เล่ม 5 กรุงเทพ : กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

กองบำรุงพันธุ์สัตว์ 2545 คู่มือการปฏิบัติงานผลิตและวิจัยโคเนื้อในศูนย์วิจัยฯ/สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ กรุงเทพฯ 290 หน้า

กองแผนงาน ข้อมูลจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทย ปี 2542 กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ - กรุงเทพฯ 376 หน้า

จิตศักดิ์ เมืองเขียว และ ชาญยุทธ กาพล 2550 ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อช่วงห่างการให้ลูกของโคพื้นเมืองและลูกผสมชาร์โรเลส์ วารสารเทคโนโลยีชีวภาพสุราษฎร์ธานี ปีที่ 2 ฉบับที่ 1 สิงหาคม 2550

ชาลี ลีละสิริ สายัณห์ บัวบาน และ จุรีรัตน์ แสนโภชน์ 2549 สมรรถภาพการสืบพันธุ์โคนมลูกผสมระดับสายเลือดต่างๆ ของเกษตรกรรายย่อยในประเทศไทย วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ปีที่ 1 ฉบับที่ 1 สิงหาคม 2549

ณัฐพร จุ้ยจุลเจิม สมพงษ์ เทศประสิทธ์ และศิริชัย ศรีพงศ์พันธุ์ 2549 สมรรถภาพทางการสืบพันธุ์บางประการของโคพื้นเมืองเพศเมียในจังหวัดชุมพรและระนอง รายงานการประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ภาคใต้ ครั้งที่ 4 ณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ระหว่าง 15 – 16 สิงหาคม 2549 หน้า 354 -363

ณัฐพร จุ้ยจุลเจิม 2550 สมรรถภาพทางการสืบพันธุ์บางประการของโคพื้นเมืองเพศเมียทางภาคใต้ตอนบนของไทยจากฐานข้อมูลซึ่งบันทึกโดยเจ้าหน้าที่ผสมเทียมของรัฐ วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 95 หน้า

พิชิต ชูเสน สมมาตร สุวรรณมาโจ และสุวิช บุญโปร่ง 2548 ความสมบูรณ์พันธุ์บางประการของโคพันธุ์ บราห์มันที่เลี้ยงในศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ทับกวาง. [online] http://www.dld.go.th/research-AHD/research/Webpage/Research_2548_1.html

พิพัฒน์ สมภาร กัญจนะ มากวิจิตร์ ศรเทพ ธัมวาสร บัณฑิต ธานินทร์ธราธาร และนันทา วาณิชยเศรษฐกุล 2541 การปรับปรุงความสมบูรณ์พันธุ์ภายหลังคลอดของแม่โคพันธุ์ออสเตรเลียนบราห์มันในสภาพการเลี้ยงระดับหมู่บ้านในจังหวัดอ่างทองและอุทัยธานี ประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 36: บทคัดย่อ 3-5 กุมภาพันธ์ 2541 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 297 หน้า

ศูนย์สารสนเทศ 2553 ข้อมูลสถิติปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ [Online] http://www.dld.go.th/ict/stat_web/yearly/yearly52/stock52/region/table2.pdf

สุณีรัตน์ เอี่ยมละมัย 2550 การจัดการและการดูแลสุขภาพโคเนื้อเบื้องต้น วารสารศูนย์บริการวิชาการมหาวิทยาลัยขอนแก่น 15(3): 41-45

สมบัติ ศรีจันทร์ 2542 อิทธิพลของฤดูกาลต่อการผลิตของลูกโคพันธุ์ออสเตรเลียนบราห์มันและโคพันธุ์ลูกผสม บราห์มัน เอกสารการประชุมสัมมนาทางวิชาการ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล ครั้งที่ 16: เล่ม 2 สาขาเกษตรศาสตร์ หน้า 251-285

Bellows, R.A. and Short, R.E. 1978. Effects of precalving feed level on birth weight, calving difficulty and subsequent fertility. J. Anim. Sci. 46: 1522-1528.

Hentges, J. F. Jr. and Howes, J. R., 1963. Milk production.In: T. J. Cunha, M. Koger and A. C.Warnick (Ed.) Crossbreeding Beef Cattle. Univ. of Florida Press, Gainesville. p. 93-97.

Kadarmideen, H. N. and Coffey, M. 2001. Quality and validation of insemination data for national genetic evaluations for dairy cow fertility in the United Kingdom. Interbull Bulletin 27. Proceedings of the 2001 Interbull Meeting in Budapest, Hungary, August 30-31, 2001.

Kinsel, M.L. and Etherington, W.G. 1998. Factors affecting reproductive performance in Ontario dairy herds. Theriogenology. 50: 1221-1238.

Lôbo, R.B., Reis, J.C., Duarte, F.A.M. and Wilcox, C.J. 1988. Reproductive performance of Pitangueiras cattle in Brazil. Brazil Journal Genetics. 11: 51-61.

Magaña, J. G. and Segura, J. 1997. Heritability and factors affecting growth traits and age at first calving of zebu heifers in south-eastern Mexico. Tropical Animal Health and Production. 29:185-192.

Morrow, D. A., Roberts, S. J. and McEntee, K. 1969. Postpartum ovarian activity and involution of the uterus and cervix in dairy cattle ovarian activity. Cornell Veterinarian. 59:173-199.

Mukasa-Mugerwa, E. 1989. A review of reproductive performance of female Bos indicus

(zebu) cattle. ILCA monograph no. 6. International Livestock Centre for Africa (ILCA). Addis Ababa, ET. 134 p.

Nahar, T.N., Islam,M. and Hasnath, M.A. 1992. A comparative study on the performance of F1 crossbred cows, under rural conditions in and around the BAU campus, Asian-Australasian Journal of Animal Science. 5: 35-438.

Nebel, R.L. and Jobst, S.M. 1998. Evaluation of systematic breeding programs for lactating dairy cows. J. Dairy Sci. 81:1169–1174.

Nogueira, G.P. 2004. Puberty in South American Bos indicus (Zebu) cattle. Animal Reproduction Science. 82–83: 361–372.

Plasse, D., Warnick, A.C., Reese, R.E. and Koger, M. 1968. Reproductive behavior of Bos indicus females in subtropical environment. II. Gestation length in Brahman cattle. J. Anim. Sci. 27: 101-104.

Roberts, S. J. 1986. Veterinary Obstetrics and Genital Diseases, 2nd ed. CBS Publishers, New Delhi, Lucknow. p.230-232

Sacco, R.E., Baker, J.F., Cartwright, T.C., Long, C.R. and Sanders, J.O. 1990. Measurements at calving for straightbred and crossbred cows of diverse types. Journal of Animal Science. 68: 3103-3108.

Spicer, L. J. and Echternkamp, S.E. 1986. Ovarian follicular growth, function and turnover in cattle: A review. Journal of Animal Science. 62: 428-451

Tamwasorn, S., Prucsasri , P., Markvichitr, B., Rengsirikul, P. and Chantalakhana, C. 1982. Comparative performance of Thai indigenous native, Brahman halfbred and Charolais halfbred cattle at Kamphaengsaen animal research station. Proceeding of the animal science research. The 20th annual conference. Kasetsart University 1 – 5 February 1982. p.363 -376.

อิทธิพลของพลังงานเชิงลบช่วงหลังคลอดต่อความสมบูรณ์พันธุ์ในแม่โคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์

อรุณ จันทร์กระจ่าง[1] ไกรวรรณ หงษ์ยันตรชัย[1]

[1]ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี จ. สระบุรี 18260

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินค่าพลังงานเชิงลบคือระดับความเข้มข้นของค่า non – esterified fatty acid (NEFAs) และกลูโคสในซีรั่ม ที่มีผลต่อค่าสมรรถนะการสืบพันธุ์ คือ ระยะคลอดถึงผสมครั้งแรก (days to first service) ระยะคลอดถึงผสมติด (days open) จำนวนครั้งที่ผสมเทียมต่อการผสมติด (service per conception) อัตราการผสมติดจากการผสมเทียมครั้งแรก (first service conception rate) รวมถึงความสัมพันธ์ระหว่างค่า NEFAs และกลูโคสกับค่าสมรรถนะการสืบพันธุ์ ในโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ช่วงก่อนและหลังคลอดจำนวน 69 ตัว ในอำเภอ ชัยบาดาล และท่าหลวง จังหวัดลพบุรี โดยเก็บตัวอย่างเลือดที่ 2 สัปดาห์ก่อนคลอดและ หลังคลอด ผลปรากฏว่า ระดับกลูโคสก่อนคลอดมีค่าเท่ากับ 34.90±1.65 mg/dL และหลังคลอดมีค่าเท่ากับ 26.17±1.47 mg/dL ส่วนระดับ NEFAs ก่อนคลอดมีค่าเท่ากับ 0.398±0.035 mEq/L และหลังคลอด 0.475±0.049 mEq/L และค่าสมรรถนะระบบสืบพันธุ์ได้แก่ จำนวนวันผสมครั้งแรกหลังคลอด (Days to first service) มีค่าเท่ากับ 83.86±4.11 วัน จำนวนวันคลอดจนถึงผสมติด (Days open) มีค่าเท่ากับ 106.76±5.66 วัน จำนวนครั้งที่ผสมติด (Service per conception) มีค่าเท่ากับ 1.65±0.14 ครั้ง และอัตราการผสมติดครั้งแรก (First service conception rate) ร้อยละ 47.62 ซึ่งจะพบว่าแม่โคในฟาร์มดังกล่าวมีระดับของการเกิดพลังงานเชิงลบโดยสังเกตจากระดับของกลูโคสที่ลดต่ำลงและระดับ NEFAs มีค่าสูงขึ้นในช่วงหลังคลอด ซึ่งการเกิดสภาวะพลังงานเชิงลบดังกล่าวส่งผลกระทบต่อความสมบูรณ์พันธุ์ทำให้จำนวนวันผสมครั้งแรกหลังคลอดยาวนานขึ้น

คำสำคัญ : กรดไขมันอิสระ กลูโคส ความสมบูรณ์พันธุ์ พลังงานเชิงลบ แม่โคนม

เลขทะเบียนผลงานวิจัย 54 (1) - 0108 – 031

Influence of Negative Energy Balance during Postpartum on Fertility in Thai-Holstien Cows

Arun Chankrachang[1] *Kriwan Hongyantrachai*[1]

[1]*Saraburi Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Saraburi 18260*

Abstract

The aim of this study was to evaluate the effects of the negative energy balance such as the concentration of non – esterified fatty acid (NEFAs) and serum glucose on reproductive performance including days to first service, days open, services per conception, first service conception rate as well as the relationship between NEFAs and serum glucose and reproductive performance. The study was performed in 69 Thai Holstein Crossbred dairy cows at Chaibadarn and Thaluang district in Lopburi province. Blood samples were collected two times at two weeks prepartum and two weeks postpartum. Means and standard deviations of glucose pre and postpartum were 34.90±1.65 mg/dL and 26.17±1.47 mg/dL whereas NEFAs pre and postpartum were 0.398±0.035 mEq/L and 0.475±0.049 mEq/L. Means and standard deviations of days to first service, days open, services per conception, first service conception rate were 83.86±4.11 days, 106.76±5.66 days, 1.65±0.14 times and 47.62% respectively. The results showed that at postpartum NEFAs increased significantly ($p< 0.05$) while glucose decreased significantly ($p< 0.05$) compared to those of prepartum. It was concluded that negative energy balance had effect on prolonging days to first service.

Keywords : Non – esterified fatty acid, Glucose, Fertility, Negative Energy Balance, Cows

Research project no. 54 (1) - 0108 - 031

บทนำ

ความไม่สมบูรณ์พันธุ์ในแม่โคนม เกิดจากปัจจัยหลายสาเหตุซึ่งเป็นปัญหาที่ก่อให้เกิดความสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจอย่างมากต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม สาเหตุที่สำคัญประการหนึ่งคือ พลังงานเชิงลบ (Negative energy balance, NEB) ในช่วงหลังคลอด พลังงานเชิงลบ หมายถึง ภาวะที่ร่างกายได้รับสารให้พลังงานไม่เพียงพอกับที่ร่างกายต้องการใช้ ซึ่งเกิดจากความต้องการพลังงานเพิ่มขึ้น รวมถึงการเปลี่ยนแปลงทางสรีระและระดับฮอร์โมนช่วงก่อนและหลังคลอดเป็นสาเหตุให้ร่างกายแม่โคนำไปสู่สภาวะที่มีพลังงานเชิงลบ (Harrison et al., 1990) ระยะนี้แม่โคมีความอยากอาหารลดลง ทำให้กินได้น้อย จึงสูญเสียน้ำหนักตัว และแสดงอาการตอบสนองต่อพลังงานเชิงลบโดยดึงพลังงานที่ร่างกายเก็บสำรองไว้มาใช้ ได้แก่ ไกลโคเจน ไขมัน และโปรตีน เพื่อชดเชยพลังงานที่ต้องการ (Rakkwamsuk et al., 2006) การสลายไขมันที่สะสมในเนื้อเยื่อของไขมันทำให้ระดับ non – esterified fatty acid (NEFAs) ในเลือดสูงขึ้น ส่งผลให้แม่โคมีปัญหาการสะสมของไขมันในตับและรบกวนการทำงานของตับ นำไปสู่ภาวะ ketosis และfatty liver รวมทั้งเป็นพิษต่อรังไข่และฟอลลิเคิล และพลังงานเชิงลบจะทำให้ลดการหลั่ง GnRH และLH ส่งผลต่อวงรอบการเป็นสัด (Butler and Canfield, 1989) ทำให้การตกไข่ครั้งแรกหลังคลอดล่าช้าออกไป (Staples et al., 1990) และอัตราการผสมติดลดลง (Wathes et al. 2003 and 2007)

ค่าที่บ่งชี้ถึงสภาวะพลังงานเชิงลบมี 2 ชนิด ได้แก่ กลูโคส ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานหลักสำหรับรังไข่ และ NEFAs ในกระแสเลือด (Rabiee et al., 1999) ที่สะท้อนถึงสภาพการจัดการด้านโภชนาการในแม่โคนมทั้งก่อนและหลังคลอดของเกษตรกร ซึ่งสภาวะพลังงานเชิงลบในช่วงหลังคลอด จะเกิดขึ้นโดยปกติอยู่แล้ว (Butler, 2006) ถ้าแม่โคที่มีร่างกายแข็งแรงและมีความสมบูรณ์ดีจะแก้ไขสภาพพลังงานเชิงลบและสามารถฟื้นตัวได้เร็ว โดยแม่โคส่วนใหญ่จะปรับตัวจนเข้าสู่สภาวะสมดุลของพลังงานที่ประมาณ 6-8 สัปดาห์หลังคลอด (Block et al., 2001; Heuer et al., 2001) โดยแม่โคที่ร่างกายไม่สมบูรณ์ต้องใช้ระยะเวลานานในการปรับตัวเข้าสู่สภาวะสมดุลของพลังงาน การทดลองครั้งนี้เพื่อศึกษาข้อมูลของระดับกลูโคส และ NEFAs ในกระแสเลือด ที่ทำให้เกิดปัญหาพลังงานเชิงลบในแม่โคนมที่เลี้ยงในฟาร์มเกษตรกรรายย่อย จังหวัด ลพบุรี และใช้เป็นแนวทางในการเฝ้าระวังป้องกันไม่ให้แม่โคเกิดปัญหาพลังงานเชิงลบภายหลังคลอด อันจะส่งผลให้แม่โคไม่กลับเป็นสัดตามปกติ มีปัญหาผสมติดล่าช้า มีจำนวนวันท้องว่างยาวนาน และลดผลกระทบต่อประสิทธิภาพการผลิต จนเกษตรกรเกิดความสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจ

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

โคลูกผสมไทยโฮลสไตน์ มีระดับสายเลือด ตั้งแต่ 87.5 – 93.75 เปอร์เซ็นต์ แม่โคทั้งหมดมีสุขภาพสมบูรณ์ อายุในช่วง 3-7 ปี เลี้ยงในฟาร์มโคนมของเกษตรกรรายย่อยในจังหวัด ลพบุรี โดย แม่โคทั้งหมดได้รับการเลี้ยงดูและการจัดการที่คล้ายคลึงกัน คือ อยู่ในโรงเรือนแบบปล่อยตลอดเวลา รีดนมวันละ 2 ครั้ง พร้อมสังเกตการเป็นสัด คือ ช่วงเช้า 06.00 – 07.00 น. ในช่วงบ่าย 14.00 – 15.00 น. การให้อาหารข้นโปรตีน 16 % วันละ 2 ครั้ง โดยให้เป็นสัดส่วนคือ ให้อาหารข้น 1 กิโลกรัม ต่อปริมาณน้ำนม 2 กิโลกรัม ที่แม่โคผลิตได้ สำหรับอาหารหยาบช่วงเดือน มิถุนายน – ธันวาคมให้หญ้าสดเช่น หญ้าขน หญ้ารูซี่ หญ้าเนเปียร์ กินเต็มที่ สลับกับฟางวันละ 2 มื้อ ส่วนช่วงเดือนมกราคม-พฤษภาคมให้ฟางหรือฟางหมักวันละ 2 มื้อ

การเก็บตัวอย่าง

สุ่มตัวอย่างโคนมตั้งท้องจำนวน 69 ตัว จดบันทึกประวัติ และเก็บตัวอย่างเลือดตัวละจำนวน 10 ซีซี. ก่อนและหลังคลอด 2 สัปดาห์ ปั่นแยกซีรั่ม แช่แข็งไว้ส่งห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจระดับ กลูโคส และ NEFAs สังเกตอาการเป็นสัดของแม่โคนมหลังคลอดและผสมเทียมโดยน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์และชุดการผลิตเดียวกันของกรมปศุสัตว์ โดยเจ้าหน้าที่ผสมเทียมที่มีความชำนาญเพียงคนเดียว จนกว่าจะผสมติด ถ้าแม่โคไม่กลับแสดงอาการเป็นสัดหลังการผสมเทียม 60 วัน จะตรวจการตั้งท้อง ติดตามและบันทึกข้อมูลสมรรถนะทางการสืบพันธุ์ได้แก่ ระยะคลอดถึงผสมครั้งแรก (days to first service) ระยะคลอดถึงผสมติด (days open) จำนวนครั้งที่ผสมเทียมต่อการผสมติด (service per conception) และอัตราการผสมติดจากการผสมเทียมครั้งแรก (first service conception rate)

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์สถิติโดยใช้ Regression analysis โดยมี Independent variable คือ ระดับกลูโคส กับ NEFAs และ Dependent variable คือ 1. ระยะคลอดถึงผสมครั้งแรก 2. ระยะคลอดถึงผสมติด 3. จำนวนครั้งที่ผสมเทียมต่อการผสมติด 4. อัตราการผสมติดจากการผสมเทียมครั้งแรก โดยแยกวิเคราะห์เฉพาะผลของกลูโคส กับ NEFAs ที่มีต่อค่าสมรรถนะทางการสืบพันธุ์ทั้ง 4 ค่า และวิเคราะห์ Multiple regression ของผลร่วมของกลูโคส กับ NEFAs กับทั้ง 4 ตัว เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างกลูโคส กับ NEFAs ว่าจะมี Interaction กันหรือไม่

ผลการทดลองและวิจารณ์

ระดับกลูโคสในซีรั่มของแม่โคนมก่อนและหลังคลอดมีค่าดังนี้ คือก่อนคลอด 2 สัปดาห์ มีค่าเท่ากับ 34.90±1.65 mg/dL และหลังคลอด 2 สัปดาห์มีค่าเท่ากับ 26.17±1.47 mg/dL ซึ่งลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนระดับ NEFAs ในช่วงก่อนคลอด 2 สัปดาห์ มีค่าเท่ากับ 0.398±0.035 mEq/L และหลังคลอด 2 สัปดาห์ มีค่าเท่ากับ 0.475±0.049 mEq/L ซึ่งเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ดังตารางที่ 1

และข้อมูลสมรรถนะระบบสืบพันธุ์ของแม่โคนมได้แก่ จำนวนวันผสมครั้งแรกหลังคลอด (Days to first service) มีค่าเท่ากับ 83.86±4.11 วัน จำนวนวันคลอดจนถึงผสมติด (Days open) มีค่าเท่ากับ 106.76±5.66 วัน จำนวนครั้งที่ผสมติด (Service per conception) มีค่าเท่ากับ 1.65±0.14 ครั้ง อัตราการผสมติดครั้งแรก (First service conception rate) มีค่าเท่ากับร้อยละ 47.62 ดังตารางที่ 2 และจากผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของค่ากลูโคสและ NEFAs พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ในทางสถิติกับค่าสมรรถนะระบบสืบพันธุ์ (P>0.05)

ตารางที่ 1 แสดงระดับ NEFAs (mEq/L) และGlucose (mg/dL) ในซีรั่มของแม่โคนมจำนวน 69 ตัว ตรวจวัดระดับที่ก่อนคลอด 2 สัปดาห์ (prepartum) และหลังคลอด 2 สัปดาห์ (postpartum)

	ก่อนคลอด		หลังคลอด	
	means±SD	range	means±SD	range
NEFAs (mEq/L)	0.398^{a}±0.035	0.122-1.588	0.475^{b}±0.049	0.096-2.371
Glucose (mg/dL)	34.90^{a}±1.65	13.40-61.28	26.17^{b}±1.47	7.505-51.812

$^{a\ b\ c}$ แสดงค่าเฉลี่ยของระดับ NEFAs และ Glucose ระหว่างก่อนและหลังคลอดที่ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

ตารางที่ 2 แสดงค่าสมรรถนะระบบสืบพันธุ์ของแม่โคนมที่ศึกษา

ค่าสมรรถนะระบบสืบพันธุ์	means±SD	range	ค่าที่เหมาะสม*
จำนวนโค (ตัว)	69		
จำนวนวันผสมครั้งแรกหลังคลอด (วัน)	83.86±4.11	52-142	60
จำนวนวันคลอดจนถึงผสมติด (วัน)	106±5.66	56-215	<100
จำนวนครั้งที่ผสมติด (ครั้ง)	1.65±0.14	1-4	<2.0
อัตราการผสมติดครั้งแรก (ร้อยละ)	47.62		70

* ค่าที่เหมาะสมของค่าสมรรถนะระบบสืบพันธุ์โคนม (Herman et al.,1994 และ Dahl et al.,1991)

ช่วงระหว่างการคลอด ค่าชีวเคมีของเลือดที่บ่งชี้ถึงสภาวะพลังงานเชิงลบถูกประเมินโดยระดับกลูโคสและ NEFAs ในกระแสเลือด (Jim spain, 2005) การศึกษานี้ระดับกลูโคสในซีรั่มของแม่โคนมที่ 2 สัปดาห์หลังคลอด ลดลงจากที่ 2 สัปดาห์ก่อนคลอด อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) สอดคล้องกับ Rukkwamsuk (2010) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าแม่โคนมเข้าสู่ช่วงพลังงานเชิงลบหลังคลอดโดยเฉพาะช่วง 2 สัปดาห์ของการให้นม

การลดลงของระดับกลูโคสในกระแสเลือดจากผลของการเกิดพลังงานเชิงลบในช่วงหลังคลอดนี้จะทำให้แม่โคนมมีการเพิ่มการเคลื่อนย้ายของพลังงานสำรองโดยการเพิ่มขบวนการสลายไขมันจากเนื้อเยื่อไขมัน (MacNamara, 1986 ; Rukkwamsuk et al., 1999) ส่งผลให้มีระดับ NEFAsในกระแสเลือดมากขึ้น ซึ่ง NEFAs เป็นตัวบ่งชี้ถึงระดับของการเคลื่อนย้ายไขมันและสภาวะพลังงานเชิงลบ

ในช่วงการเจริญเติบโตของโอโอไซต์ (oocyte) ระยะแรก กลูโคส และNEFAs สามารถผ่านเข้าไปในของเหลวในฟอลลิเคิล(follicular fluid) ได้ง่าย และมีผลต่อโอโอไซต์ โดยตรง (Fernandez et at., 2006) โดยระดับความเข้มข้นของกลูโคสในกระแสเลือดในช่วงสภาวะ NEB จะมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญและมีผลโดยตรงต่อระดับความเข้มข้นของกลูโคสในของเหลวในฟอลลิเคิล (Lopez et al., 2003 ; Martin et al., 2008) มีผลทำให้ยับยั้งการเจริญเติบโตของ โอโอไซต์ เนื่องจากขาดกลูโคสซึ่งใช้เป็นแหล่งพลังงาน ส่วน NEFAs ในกระแสเลือดจะเป็นพิษโดยตรงต่อฟอลลิเคิล ซึ่งจะชักนำให้ Cumulus cells ตาย และฟอลลิเคิลหยุดการเจริญเติบโต (Jorritsma et al., 2004; Friggens, 2003; Bossaert et al., 2008)

การขาดพลังงานหลังคลอดทำให้ไม่เกิดการตกไข่ซึ่งต่อมาจะพัฒนา กลายเป็นถุงน้ำในรังไข่ (Boland et al., 2001; Vanholder et al., 2006) และมีผลกระทบต่อการทำงานของคลอปัสลูเทียมและส่งผลถึงการผลิตโปรเจสเตอโรน (Van Knegsel et at., 2007; Vanholder et al., 2006) ซึ่งสภาวะเหล่านี้ทำให้เยื่อบุมดลูกไม่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งรูปร่างและการทำงานในช่วงการผสมครั้งแรกหลังคลอด และมีผลที่ไม่ดีต่อสภาพแวดล้อมภายในมดลูกซึ่งจำเป็นต่อการฝังตัวของตัวอ่อน ทำให้การเข้าอู่ของมดลูกล่าช้าหลังคลอด (30-40 วัน) และเป็นสาเหตุหลักของการเกิดมดลูกอักเสบในฝูง (Rossi et al., 2008; Huzzey et al., 2007) เช่นเดียวกับ Jackson et al. (2011) และ LeBlanc et al. (2010) รายงานว่า NEB ก่อนคลอดมีความสัมพันธ์กับการเกิด endometritis และ NEB หลังคลอดสัมพันธ์กับการเกิดถุงน้ำในรังไข่และการทำงานของคลอปัสลูเทียมที่ล่าช้า

ในช่วงก่อนและหลังคลอดเป็นจุดวิกฤติที่สำคัญต่อสุขภาพและความสมบูรณ์พันธุ์ แม่โคส่วนใหญ่จะเกิดพลังงานเชิงลบ ส่งผลถึงวงรอบการเป็นสัดปกติและอัตราการผสมติด (Wathes et al., 2009) ภาวะพลังงานเชิงลบ จะเริ่มเกิดประมาณ 1 สัปดาห์ก่อนคลอด เนื่องจากการกินได้ลดลงและยังคงดำเนินต่อไปมากกว่า 2-3 สัปดาห์ และถึงจุดสูงสุดที่ประมาณ 2 สัปดาห์หลังคลอด (Butler, 2006) โคส่วนใหญ่จะปรับตัวจนเข้าสู่ภาวะสมดุลของพลังงานที่ประมาณ 6-8 สัปดาห์หลังคลอด (Block et al., 2001; Heuer et al., 2001) หรือ อาจเป็นระยะเวลานานหลายสัปดาห์ก่อนที่จะกลับเข้าสู่สภาวะปกติ (Wathes, 2008) ซึ่งระยะนี้อาจยาวนาน ถ้าโคไม่ได้รับพลังงานจากสารอาหารเพียงพอ (Grummer et al., 2004) ความรุนแรงและระยะเวลาของการขาดพลังงาน มีผลต่อระบบสืบพันธุ์และความสมบูรณ์พันธุ์ (Pryce et at., 2001;Wathes, 2008) โดยปกติแล้วแม่โคควรได้รับการผสมครั้งแรกไม่เกิน 60 วันหลังคลอด (Dahl et al., 1991) แต่จากการศึกษาครั้งนี้จำนวนวันผสมครั้งแรกหลังคลอดมีค่าเท่ากับ 83.86±4.11 วันซึ่งมีค่ามากกว่าปกติ แสดงให้เห็นว่าภาวะดังกล่าวส่งผลกระทบต่อจำนวนวันผสมครั้งแรกหลังคลอด ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ Rukkwamsuk (2010) รายงานว่า จำนวนวันคลอดถึงเป็นสัดครั้งแรกมีค่าเท่ากับ 72±65 วันซึ่งมีค่ามากกว่าปกติ และสอดคล้องกับGeorge ที่รายงานว่าการเพิ่มภาวะพลังงานเชิงลบ อาจทำให้การตกไข่ครั้งแรกล่าช้าที่ 60-75 วัน หรือยาวนานกว่านั้น

จำนวนวันคลอดจนถึงผสมติดมีค่าเท่ากับ 106.76±5.66 วันซึ่งมีค่ามากกว่าปกติ ส่วนจำนวนครั้งที่ผสมติดมีค่าเท่ากับ 1.65±0.14 ครั้งอาจเนื่องจากแม่โคสามรถกลับเข้าสู่สภาวะสมดุลของพลังงานและสภาพแวดล้อมภายในมดลูกพร้อมรับการผสมทำให้จำนวนครั้งที่ผสมติดมีค่าน้อย และอัตราการผสมติดครั้งแรกมีค่าเท่ากับร้อยละ 47.62 ซึ่งมีค่าน้อยกว่าปกติ ในขณะที่ Rukkwamsuk (2010) รายงานอัตราการ

ตั้งท้องจากการผสมเทียมครั้งแรก เท่ากับร้อยละ 28.6 ซึ่งการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าแม่โคนมในฟาร์มที่ศึกษามีระดับการเกิดพลังงานเชิงลบแต่ไม่รุนแรงและเป็นระยะเวลานานในการกลับสู่สภาวะพลังงานสมดุลซึ่งภาวะดังกล่าวทำให้ส่งผลกระทบต่อจำนวนวันผสมครั้งแรกหลังคลอดยาวนานขึ้น

แม่โคใกล้คลอดการกินได้จะลดลง 25-40 เปอร์เซ็นต์ (Grummer et al., 2004) ซึ่งการลดการกินได้ส่งผลกับการเกิดสภาวะNEB (Huzzey et al., 2007) ทำให้แม่โคสูญเสียคะแนนร่างกาย โดยสภาวะ NEB สามารถสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงคะแนนร่างกายของแม่โคซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้มากที่สุดเพื่อใช้ประเมินค่าสมดุลของพลังงาน (Pryce et al., 2001) และสามารถใช้ในการประเมินสภาวะการสลายไขมันที่สะสมในเนื้อเยื่อไขมันได้ (Rukkwamsuk et al., 2006) ถ้าคะแนนร่างกายลดลง 0.5 หน่วยระหว่างช่วงแห้งนมและสัปดาห์แรกของการให้นมอัตราการผสมติดจะลดลง 10 เปอร์เซ็นต์ (Butler, 2003)และอัตราการผสมติดลดลงน้อยกว่าร้อยละ 30 เมื่อคะแนนร่างกายลดน้อยลงกว่า 1 หน่วย (Formigoni et al., 2003) ดังนั้นแม่โคควรจะสูญเสียคะแนนร่างกายประมาณ 1 หน่วยในช่วง 4 สัปดาห์หลังคลอด ถ้าสูญเสียมากกว่านั้นจะส่งผลต่ออัตราการผสมติดครั้งแรกลดต่ำลง

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าแม่โคนมในฟาร์มเกษตรกรมีการเกิดสภาวะพลังงานเชิงลบที่ส่งผลกระทบต่อความสมบูรณ์พันธุ์ทำให้จำนวนวันผสมครั้งแรกหลังคลอดยาวนานขึ้น ทำให้เราต้องใส่ใจในการป้องกันโดยเฉพาะการจัดการด้านโภชนาการและการกินได้ในช่วงก่อนและหลังคลอด โดยการเพิ่มเข้มข้นของโภชนะในสูตรอาหารและความถี่ของการให้อาหารต่อวันให้มากขึ้น ให้อาหารสดใหม่และเพียงพอกับระดับของพลังงานที่โคต้องการ ทั้งนี้เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมควรหมั่นสังเกตคะแนนร่างกายของแม่โคนมอย่างสม่ำเสมอ เพื่อใช้เป็นการเฝ้าระวังการเกิดปัญหาภาวะพลังงานเชิงลบที่จะส่งผลกระทบต่อความสมบูรณ์พันธุ์ นอกจากนี้ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการกลับเข้าสู่ภาวะพลังงานสมดุลของแม่โคนมหลังคลอดเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการวางแผนการจัดการเพิ่มประสิทธิภาพระบบสืบพันธุ์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ.ดร.น.สพ.ธีระ รักความสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจวิเคราะห์ค่ากลูโคสและNEFAs พร้อมทั้ง สพ,ญ.กัลยา เก่งวิกย์กรรม และคุณสายัณห์ บัวบาน สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ที่ให้คำแนะนำตลอดการทดลองนี้จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Block, S.S., Butler, W.R., Ehrhardt, R.A., Bell, A.W., Van Amburgh, M.E. and Boisclair, Y.R. 2001. Decreased concentration of plasma leptin in periparturient dairy cows is caused by negative energy balance. J. Endocrinol. 171(2):339-48.

Boland, M.P., Lonegan, P. and O'Callaghan, D. 2001. Effect of nutrition and andocrine parameters, ovarian physiology and oocyte and embryo development. Theriogenology 55: 1323-1340.

Bossaert, P., Leroy, J., De Vliegher, S. and Opsomer, G. 2008. Interrelations between glucose induced insulin response, metabolic indicators and time of first ovulation in high-yielding dairy cows. Journal of Dairy Science 91: 3363-3371.

Butler, W.R. and Canfield R.W. 1989. Interrelationships between energy balance and postpartum reproduction .In Proc. Cornell Nutrition Conference for Feed Manufacturers, October 24-26, 1989,Cornell University, Ithaca.

Butler, W.R. 2003. Energy balance relationships with follicular development, ovulation and fertility in postpartum dairy cows. Livestock Production Science 83: 211-218.

Butler, W.R. 2006. Relationships of Negative Energy Balance with Fertility. (Online) http://WWW.altagenetics.com/English/Whatsnew/20060110NegativeEnergy.htm.5/1/2012

Dahl, J.C., Ryder, J.K., Holmes, B.J. and Wollenzien, A.C.1991. An integrated and multidisciplinary approach to improving a dairy's production.Vet Med.86 (2)

Fernandez, R., Martini, A.C, Navarro, V.M., Castellano, J.M., Dieguez, C., Aguilar, E., Pinilla, L. and Tena – Sempere, M. 2006 . Novel signals for the integration of energy balance and reproduction. Molecular and Cellular Endocrinology 254 – 255: 127-132.

Formigoni, A. and Trevisi, E. 2003. Transition Cow : Interaction with Fertility. Veterinary Research Communications .Volume 27: 143-152.

Friggens, N.C.2003. Body lipid reserves and the reproductive cycle : towards a better understanding. Livestock Production Science 83: 219-236.

George, J. Negative Energy Balance and Conception Rates. (Online) http://www.uky.edu/Ag/AnimalSciences/dairy/dairyrepro /rep024.pdf 5/1/2012

Grummer, R.R., Mashek, D.G. and Hayirli, A. 2004. Dry matter intake and energy balance in the transition period. Veterinary Clinics: Food Animal Practice 20 : 447-470.

Harrison, R.O., Ford, S.P., Young, J.W., Conley, A.J. and Freeman, A.E. 1990. Increased milk production versus reproductive and energy status of high producing dairy cows. J. Dairy Sci. 73: 2749 – 2758.

Herman, H.A., Mitchell, J.R. and Doak, G.A. 1994.The Artificail Insemination and Embryo transfer. A handbook of laboratory manual, Interstate Publishers, INC. p.198.

Heuer, C., Van Straalen, W.M., Schukken, Y.H., Dirkzwager, A. and Noordhuizen, T.M. 2001. Prediction of energy balance in high yielding dairy cows with test-day information. Journal of Dairy Science 84(2): 471-81.

Huzzey, J.M., Veira, D.M., Weary, D.M. and Von Keyserlingk, M.A. 2007. Prepartum behavior and dry matter intake identify dairy cows at risk for metritis. Journal of Dairy Science 90: 3220-3233.

Jackson, R.A., Wills, J.R., Kendall, N.R., Green, M.J., Murray, R.D. and Dobson, H. 2011. Energy metabolites in pre – and postpartum dairy cattle as predictors of reproductive disorders. Veterinary Record 2011:168, 562.

Jim Spain. 2005. Implementing a Nutritional Management Strategy to Enhance Fertility. Advance in Dairy Technology 17: 171.

Jorritsma, R., Cesar, M.L., Hermans, J.T., Kruitwagen, C. L.J.J., Vos , P.L.A.M. and Kruip, T.A.M. 2004. Effects of non–esterified fatty acids on bovine granulose cells and developmental potential of oocytes in vitro. Animal Reproduction Science 81: 225 –235.

LeBlanc, S.J., Dubuc, I., Duffield, T.F., Leslie, K.E. and Walton, J.S. 2010. Risk factors, impact and treatment of postpartum uterine diseases in dairy cows. Proceeding of the 26th World Buiatrics Congress. Santiago,Chile November 14 to 18, 2010.

Lopez Gautius, F., Yaniz , J. and Madriles–Helm, D. 2003. Effect of body condition score and score change on the reproductive performance of dairy cows: a meta–analysis. Theriogenology 59: 801–812.

Martin, B., Golden, E., Carlson, O.D., Egan, J.M., Mattson, M.P. and Maudsley, S. 2008. Caloric restriction: Impact upon pituitary function and reproduction. Ageing Research Reviews 7: 209 –224.

MacNamara, I.P. and Hillers, J.K. 1986. Adaptations in Lipid metabolism of bovine adipose tissue in lactogenesis and lactation. Journal of Lipid Research 27: 150-157.

Patton, J., Kenny, D.A., McNamara, S., Mee, J.F., O'Mara, F.P., Diskin, M.G. and Murphy, J.J. 2007. Relationships Among Milk Production, Energy Balance, Plasma Analyses, and Reproduction in Holstein–Friesian Cows. Journal of Dairy Science 90: 649-658.

Pryce, J.E., Coffey, M.P. and Sim, G. 2001. The relationship between body condition score and reproduction performance. Journal of Dairy Science 84: 1508-1515.

Rabiee, A.R., Lean, I.J., Gooden, J.M. and Miller, B.G. 1999. Relationships among metabolites influencing ovarian function in the dairy cow. Journal of Dairy Science 82:39-44.

Rossi, F., Righi, F., Romanelli, S. and Quarantelli, A. 2008. Reproductive efficiency of dairy cows under negative energy balance conditions. Ann. Fac. Medic Vet. Di Parma 28: 173-180

Rukkwamsuk, T., Kruip, T.A.M. and Wensing, T. 1999. Relationship between overfeeding and overconditioning in the dry period and the problems of high producing dairy cow during the periparturient period. Veterinary. Quart 21: 71-77.

Rukkwamsuk, T.,Homwong, N.,Bunkhuntod, W., Rohitakanee, P. and Sukcharoen, R. 2006. Negative Balance in Periparturient Dairy Cows Raised in Small-Holder Farms in Kamphaengsaen District , Nakhon Pathom Province. Kasetsart J. Nat.Sci. 40: 1000 – 1004.

Rukkwamsuk. 2010. A field study on negative energy balance in periparturient dairy cows kept in small-holder Farms: Effect on milk production and reproduction. African Journal of Agricultural Research 5(23): 3157–3163.

Spicer, L.J., Francisci, C.C., Jones, D. and Waldner, D.N. 2002. Changes in Insulin and Glucose Concentrations During Early Lactation in Holstein. http://wwwansi.okstate.edu/research/2002rr/33/index.htm 5/1/2012

Staples, C.R., Tucker, W.B. and Adams, G.D. 1990. Relationship between ovarian activity and energy status during the early postpartum period of the high producing dairy cow. Journal of Dairy Science 73:938.

Vanholder, T., Opsomer, G., and De Kruie, A. 2006. Aetiology and pathogenesis of cystic ovarian follicles in dairy cattle: a review. Reproduction Nutrition, Development 46: 105-119.

Van Knegsel, A.T.M., Van Den Bramd, H., Dijkstra, J. and Kemp, B. 2007. Effects of dietary energy source on energy balance, metabolites and reproduction variables in dairy cows in early lactation. Theriogenology 685: 274-280.

Wathes, D.C., Taylor, V.J., Cheng, Z. and Mann, G.E. 2003. Follicle growth, corpus luteum function and their effects on embryo development in the postpartum cow. Reproduction Supplement 61: 219–237.

Wathes, D.C., Fenwick, M., Cheng, Z., Bourne, N., Llewellyn, S., Morris, D.G., Kenny, D., Murphy, J. and Fitzpatrick, R. 2007. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in the high producing dairy cow. Theriogenology 68: S232–S241.

Wathes, D.C. 2008. Metabolic effects on the reproductive tract environment and conception rates in the dairy cow. Havemeyer Found Monogr Ser 21: 15-19.

Wathes, D.C., Fenwick, M., Cheng, Z. Bourne, N., Llewellyn, S., Morris, D.G., Kenny, D., Murphy, J. and Fitzpatrick, R. 2009. Influence of negative energy balance on cyclicity and fertility in high producing dairy cow. Theriogenology 68: 232-241.

การพัฒนาชุดตรวจสอบความเป็นพ่อแม่ลูกโค ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทิลไลท์เพื่อเพิ่มความเชื่อมั่น

กัลยา เก่งวิกย์กรรม[1] ณัฐนันท์ ศิริรัตนธัญญะกุล[1] และ บุหงา จินดาวานิชสกุล[1]

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เพื่อพัฒนาชุดเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทิลไลท์ (ไพรเมอร์ 11 คู่) สำหรับตรวจสอบความเป็นพ่อแม่ลูก (parentage test) และเอกลักษณ์ (identification) ในโค เพื่อเพิ่มความเชื่อมั่น จำนวน 11 ตำแหน่งในโครโมโซมคือ HEL1, HEL5, ILSTS005, INRA063, INRA005, HEL13, BM1818, MM12, CSRM60, HEL9 และ ETH185 โดยเก็บตัวอย่างเลือดโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ จำนวนทั้งสิ้น 234 ตัว นำไปทดสอบด้วยชุดตรวจสอบที่พัฒนาขึ้นใหม่ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ สำหรับการตรวจสอบเอกลักษณ์ได้ในตัวอย่างทั้งหมด 234 ตัว และสามารถตรวจสอบพ่อแม่ลูกได้ เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทิลไลท์ ทุกตำแหน่งแสดงรูปแบบความหลากหลายของอัลลีล อยู่ระหว่าง 6 - 23 อัลลีล โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 12.09 อัลลีล ค่าเฮเทอโรไซโกซิตี้ (Heterozygosity) มีค่าเฉลี่ยของ Ho = 0.6788 (พิสัย 0.444-0.902), ค่าเฉลี่ยของ He เท่ากับ 0.7508 (พิสัย0.610 - 0.924) และค่าเฉลี่ยของโพลีมอร์ฟิก อินฟอร์เมชั่นคอนเทน (Polymorphic Information Content; PIC) คือ 0.7122 (พิสัย 0.535-0.924) และตำแหน่งที่ใช้ตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ให้ผลแม่นยำสูง คือ HEL9 (23 alleles, Ho= 0.902, He = 0.924, PIC = 0.917), BM1818 (15 alleles, Ho = 0.762, He = 0.805, PIC = 0.781) และETH185 (14 alleles, Ho = 0.816, He=0.836, PIC = 0.815) และ CSRM60 (13 alleles, Ho = 0.833, He = 0.801, PIC = 0.776) ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์พบว่าข้อมูลทางพันธุกรรมหลายตำแหน่งร่วมกัน (Combined Exclusion Probability; CEP) ของ 11 marker kit ที่พัฒนาเป็น 2 ชุด multiplex PCR ใหม่ มีค่าความถูกต้องในการตรวจสอบสูงสุดที่ 0.999999 ให้ค่าความเชื่อมั่นสูงถึง 99.99% และพบค่า exclusion probability (PE) มีค่าอยู่ระหว่าง 8.86x10-12 จะเพิ่มความแม่นยำและความเชื่อมั่นสูงขึ้น ในการตรวจพิสูจน์พ่อแม่ลูกโค และน้ำเชื้อปลอม

คำสำคัญ : ชุดตรวจสอบความเป็นพ่อแม่ลูก โค เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทิลไลท์

Development of Bovine Parentage Test Kit using Microsatellite DNA Markers

Kalaya Kengvikkum[1] Nattanant Sirivattanatanyakul[1] and Buh-nga Chindawanichsakul[1]

[1] Bureau of Biotechnology in Livestock Production Department of Livestock Development

Abstract

The objective of this study is to develop new sets of bovine eleven microsatellite markers; HEL1, HEL5, ILSTS005, INRA063, INRA005, HEL13, BM1818, MM12, CSRM60, HEL9 and ETH185 for evaluating parentage verification and identity test. The blood samples from 234 Holstein crossbred cattle (Holstein –Thai native cattle) population in Thailand were extracted for genotyping by four capillary electrophoresis injections. All markers were highly polymorphic with a mean number of 12.09 alleles per locus with range of 6-23 alleles. At the 11 tested loci, a total of 133 alleles were detected. An average observed and expected heterozygosity was 0.6788 (with range 0.444-0.9020) and 0.7508 (with range 0.610-0.924) respectively. An average Polymorphic Information Content (PIC) was 0.7122 and values ranged 0.535 – 0.917. The high polymorphic markers were HEL9 (23 alleles, Ho= 0.902, He = 0.924, PIC = 0.917), BM1818 (15 alleles, Ho = 0.762, He = 0.805, PIC = 0.781) ETH185 (14 alleles, Ho= 0.816, He=0.836, PIC = 0.815) and CSRM60 (13 alleles, Ho= 0.833, He = 0.801, PIC = 0.776) respectively. The results of Combined Exclusion Probability; CEP for parentage testing was high at 0.999999 (99.99%) and the range of exclusion probability (PE) was 8.86x10-12. The present study confirms that the new two sets of multiplex for 11 microsatellite markers are suitable for parentage testing and identification in Thai Holstein Crossbred cattle.

Keywords : Bovine, Parentage test kit, Microsatellite DNA markers

Introduction

Correct pedigree information and identification are essential for successful improvement of productivity and cattle breeding program. Misidentification can lead to inaccurate genetic evaluation and the structure of selection indexes (Rehout et al., 2006). Cattle parentage analysis, using blood type showed a high frequency of incorrect paternity in Germany (4-23%) (Geldermann et al., 1986) Advance molecular technology such as Polymerase Chain Reaction (PCR) development and the discovery of many new DNA markers for example Microsatellite have been used to solve this limitation. Many microsatellites markers are useful in parentage analysis because it is due to their highly polymorphisms, simple nucleotide repeats known as Short Tandem Repeat (STR) (Divine et al., 2010, Lewis Jr., 2010) and distributed throughout genome. In 2008, The International Society for Animal Genetics (ISAG) recommended 11 microsatellite loci (TGLA227, Bm2113, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA023, ETH225, BM1824, ETH3, and TGLA53) as the International Panel of Microsatellites for Cattle Parentage Testing (ISAG Panel). Other countries developed more microsatellite markers for their cattle populations. (Carolino et al., 2009, Ozkan et al., 2009) To increase efficacy in parentage testing and identification, additional 11 markers (HEL1, HEL5, ILSTS005, INRA063, INRA005, HEL13, BM1818, MM12, CSRM60, HEL9 และ ETH185) from ISAG panel using two multiplex PCR were evaluated.

Materials and Methods

Sample collection and DNA extraction

Genomic DNA from blood samples of 234 Thai Holstein cattle from private farms located in various regions of Thailand were isolated with AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep Kit and kept at 4oC. DNA yield was checked with Agarose Gel Electrophoresis.

Multiplex PCR and Genotype determination.

Eleven microsatellites used in this study as recommended by the International Society for Animal Genetics (ISAG Conference, 2008) for cattle paternity testing were divided into 2 sets. The first multiplex set has 6 primers and another has 5 primers. All primers were labeled with fluorescence dye (Table 1). DNA samples were amplified using 1X PCR buffer, 3 mM MgCl, 200 µM dNTP, 0.1 µM primers and 1U Platinum Taq (InvitrogenTM) The cycling reactions were performed in a programmable MJ Mini Personal Thermalcycler with an initial denaturation for 10 min at 950C followed by the thermal cycles as follows: denaturation step at 950C for 45 s, annealing step: the first multiplex group at 570C and the second multiplex group at 620C

for 45s, and an elongation step at 720C for 1 min. The reaction was completed with a final elongation step at 720C for 60 min. PCR products were checked with Gel Electrophoresis (2% agarose gel), and stained with ethidium bromide and took a picture with UV light of Gel Documentation. The fluorescent labeled PCR products were submitted to fragments analysis by four capillary electrophoresis, with an automated sequencer (3130 Genetic Analyzer: Applied Biosystem) using the GeneScanTM-500 ROXTM Size Standard (Applied Biosystem), according to the manufacturer specifications. Results were read and interpreted using GeneScan® and GeneMapper software respectively.

Table 1 Composition of two multiplexes for the new bovine microsatellite loci examined

Multiplex	Locus (Dye)	Allelic range (bp)	Primer Sequence (5' - 3')	Reference (chromosome)
1	HEL1	98–118	F- CAACAGCTATTTAACAAGGA	Kaukinen and Varvio 1993
	(FAM)		R- AGGCTACAGTCCATGGGATT	(15)
	HEL13	177–197	F- TAAGGACTTGAGATAAGGAG	Kaukinen and Varvio 1993
	(FAM)		R- CCATCTACCTCCATCTTAAC	(11)
	HEL5	151–181	F- GCAGGATCACTTGTTAGGGA	Kaukinen and Varvio 1993
	(VIC)		R- AGACGTTAGTGTACATTAAC	(21)
	MM12	107–133	F- CAAGAGAGGTGTTTCAATCT	Mommens and Coppieters 1994 (9)
	(VIC)		R- ATCGACTCTGGGGATGATGT	
	INRA063	175–188	F- ATTTGCACAAGCTAAATCTAACC	Vaiman *et al.* 1994
	(PET)		R- AAACCACAGAAATGCTTGGAAG	(18)
	INRA005	137–143	F- CAATCTGCATGAAGTATAAATAT	Vaiman *et al.* 1992
	(FAM)		R- CTTCGAGCATACCCTACACC	(12)
2	CSRM60	93–111	F- AAGATGTGATCCAAGAGAGAGGCA	Moore *et al.* 1994
	(PET)		R- AGGACCAGATCGTGAAAGGCATAG	(10)
	HEL9	143–171	F- CCCATTCAGTCTTCAGAGGT	Kaukinen and Varvio 1993
	(NED)		R- CACATCCATGTTCTCACCAC	(8)
	ILSTS005	181–193	F- GGAAGCAATGAAATCTATAGCC	Brezinsky *et al.* 1993
	(NED)		R- TGTTCTGTGAGTTTCTAAGC	(10)
	BM1818	252–272	F- AGCTGGGAATATAACCAAAGG	Bishop *et al.* 1994
	(FAM)		R- AGTGCTTTCAAGGTCCATGC	(23)
	ETH 185	220-238	F- TGCATGGACAGAGCAGCCTGGC	Steffen, P. *et al.* 1993 (17)
	(FAM)		R- GCACCCCAACGAAAGCTCCCAG	

Data analysis

Standard statistical procedures were used to assess the informativeness of selected microsatellite markers. The number of alleles (N), Heterozygosity (Ho, He), Polymorphism Information Content (PIC) according to Hardy Weinberg equilibrium, (Bostein et al., 1980). The Combined Exclusion Probability (CEP) and the Probability of Exclusion (PE) was defined for two cases (Jamison and Taylor, 1997) and the probability of Identity (PI) was calculated for each microsatellite marker. All were determined by the CERVUS 3.0 software (Kalinowski et al., 2007)

Results

From Table 1, according to ABI PRISM Genetic Analyzer 3130 (Applied Biosystems), genotyping data were analyzed with GeneMapper® version 3.0 software (Applied Biosystems), and were sized due to GeneScan™ 500 ROX™ Size Standard, an internal lane size standard developed for the use with the Applied Biosystems fluorescence-based DNA. Eleven new 11 microsatellite markers were evaluated for their use in parentage analysis.

The results are presented in Table 2. Among the 11 microsatellite sequences, an amplification product was obtained for 11 loci. All are effective in parentage testing and pedigree verification depending on polymorphism (number of alleles), and their relative population frequencies (Taylor, 1997). In the studied group of 234 cattle (N), the alleles per locus (K) ranged from 6 to 23. The mean K per locus was 12.09 and the total number of alleles was 133. The allele frequency per locus was shown. Ho had an average value at 0.6788 with range from 0.444 to 0.902 and He had values an average value at 0.7508 with range from 0.610 to 0.924. PIC values ranged from 0.535 to 0.917 with the mean value of 0.712 (Table 2).

Table 1 Composition of two multiplexes for the new bovine microsatellite loci examined

Marker / (Locus) / HWE	K	N	Allele Freq	Ho	He	PIC
HEL1 (D15S10)**	12	234	(0.006 - 0.386)	0.662	0.742	0.704
INRA005 (D9S1)***	6	234	(0.002 - 0.352)	0.641	0.737	0.689
HEL13 (D11S15)	8	234	(0.004 - 0.376)	0.637	0.610	0.535
ETH185 (D17S1)	14	234	(0.002 - 0.284)	0.816	0.836	0.815
BM1818 (D23S21)	15	231	(0.002 - 0.342)	0.762	0.805	0.781
MM12 (D9S20)*	11	234	(0.002 - 0.342)	0.564	0.653	0.594
HEL5 (D21S15)	13	234	(0.002 - 0.451)	0.611	0.693	0.645
HEL9 (D8S4)	23	234	(0.002 - 0.147)	0.902	0.924	0.917
ILSTS005 (D10S25)***	9	124	(0.009 - 0.459)	0.444	0.711	0.670
CSRM60 (D10S5)	13	233	(0.004 - 0.347)	0.833	0.801	0.776
INRA063 (D18S5)***	9	232	(0.002 - 0.375)	0.595	0.748	0.707
Mean	12.09			0.6788	0.7508	0.712

K Alleles per locus, N-number of individuals, Allele Freq – Allele frequency,
Ho - observed Heterozygosity,

H_e Expected Heterozygosity PIC – Polymorphism Information Content.

*, **,* ** were results of chi square test.

High number of alleles, Heterozygosity and PIC values were observed for HEL9, ETH185, CSRM60, BM1818 and HEL1. In addition, those are the most informative markers among tested loci in this study. The results of the chi square test of goodness-of-fit revealed that the population was in Hardy- Weinberg Equilibrium (HWE) proportions for six microsatellite loci (HEL13, ETH185, BM1818, HEL5, HEL9 and CSRM60). The remaining five Loci (HEL1, INRA005, MM12, ILSTS005 and INRA063) showed significant from HWE. It might be attributed to selection, mutation, genetic drift and null allele (not amplifying alleles).

Table 3 The combined exclusion probability and multi locus probability of identity estimation of two marker sets (commercial and developed marker set)

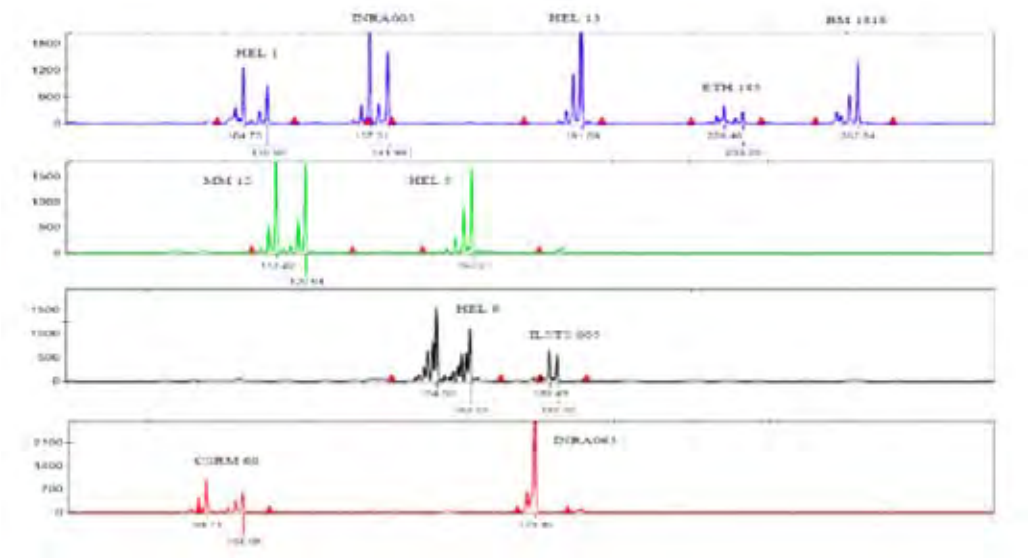
	Combined exclusion probability PE_1	PE_2	probability PI	PI-Sib
11 marker (StockMarks® kit)	0.9999999	0.999821	2.14×10^{-11}	7.72×10^{-6}
11 new marker kit	0.999999	0.97900	8.86×10^{-12}	5.418×10^{-5}

PE1 Probability of exclusion (both parents known), PE2- Probability of exclusion (only one parent known),

PI Average probability of two individuals have identical genotype, PI-Sib = Average probability of two full siblings has identical genotypes.

The two sets of 11 markers in this study had similar exclusion probabilities and probability of Identity (PI) to the commercially available StockMarks® kit. (Applied Biosystems) (Showed in Table 3) By comparing with the results using other 11 microsatellite loci: TGLA227, Bm2113, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA023, ETH225, BM1824, ETH3, and TGLA53 (the "StockMarks for Cattle ® Bovine Genotyping Kit" (Applied Biosystems Inc., Foster City, CA) (in Figure 1)

Figure 1 Parentage testing using fragments analysis by 4 capillary electrophoresis, with an automated sequencer (3130 Genetic Analyzer: Applied Biosystems) using the GeneScan™-500 ROX™ Size Standard (Applied Biosystem)



Discussion

The commercial "StockMarks for Cattle ® Bovine Genotyping Kit" has 11 microsatellite loci: *TGLA227, Bm2113, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA023, ETH225, BM1824, ETH3,* and *TGLA53* that has been already approved for their accuracy. This study tried to develop more marker sets of microsatellite loci and had spent time finding optimal conditions in multiplex PCR using the other 11 new microsatellites markers also recommended by ISAG. Two sets of multiplex PCR have the optimal conditions as mention above. Every 11 microsatellites *HEL1, HEL5, ILSTS005, INRA063, INRA005, HEL13, BM1818, MM12, CSRM60, HEL9* and *ETH185* can amplify DNA fragment at 11 loci and showed similar PE and PI in parentage testing as using the "StockMarks for Cattle ® Bovine Genotyping Kit" (Figure3 and Table3). Theoretically, the PIC values should be higher than 0.5. In this study, the mean PIC value for all loci was found to be 0.712 and ranged from 0.535 (HEL13) to 0.917 (HEL9) similar to Zhang, et al., (2010), Rehout, et al., (2006) and Ozken, et al., (2009).

The high genetic variability of markers indicated their high effectiveness for parentage testing. The combined exclusion probability (CEP) is a measure of ability of markers to identify genetic paternity and exclude all suspected candidates. The probability of exclusions is shown in Table3. PE_1 estimated the probability of exclusion of a parent when genotypes of the offspring and two parents are known. PE_2 estimated the probability of exclusion of parentage test when genotypes of offspring and only one parent was known, PI – Average probability of two individuals have identical genotype, PI-Sib = Average probability of two full siblings has identical genotypes. In this study PE_1 were 0.999999 for both the commercial kit and new two sets of 11 microsatellite kits. PE_2 of the commercial kit valued 0.999821 and was 0.97900 for new two sets of 11 microsatellite kits. PI and PI-sib estimations were high ($2.14x10^{-11}$, $7.72x10^{-6}$ and $8.86x10^{-12}$, $5.48x10^{-5}$ respectively) in both commercial StockMarks and new 11 marker kits. PI indicated high effectiveness in parentage analysis. All PE_1 PE_2, PI and PI-sib were similar to Zhang, et. Al., (2010).

In conclusion, this study developed a new convenient and efficient two set multiplex PCR (6 and 5 microsatellite markers) for routine identification and parentage testing in cattle population. By using both commercial StockMarks and new set kit of 11 microsatellite markers can be useful and increase the accuracy in pedigree and parentage analysis.

Acknowledgement

The author would like to convey thanks to the Department of Livestock Development for providing financial means.

References

Bishop, M.D. and Kappes, S.M. 1994. A genetic linkage map for cattle. Genetic. 136 (5):619 – 639.

Botstein, D., White, R. L., Skolnick, M. and Davis, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. Am. J. Hum. Genet. 32(3): 314-331.

Brezinsky L.S., Kemp, J. and Teale, A.J. 1993. ILSTS005: a polymorphic bovine microsatellite. Animal Genetics 24: 73.(2)

Carolino I., Sousa C.O., Ferreira S., Carolino N., Silva F. S., Gama L.T. 2009. Implementation of a parentage control system in Portuguese beef-cattle with a panel of microsatellite markers. Genetics and Molecular Biology. 32: 306–311.

Divine, A.M, Edlund, H. and Allen, M. 2010. Forensic analysis of autosomal STR markers using pyrosequencing. Forensic Sci. Int-Gen. 4: 122-129.

Geldermann, H., Pieper, U. and Weber, W. E. 1986. Effect of misidentification on the estimation of breeding value and heritability in cattle. Journal of Animal Science. 63(6):1759- 1768.

ISAG Conference. 2008. Amsterdam, the Netherlands. Cattle Molecular Markers and Parentage Testing Workshop. [Online] http://www.isag.org.uk/ISAG/all/ISAG2008_CattleParentage.pdf

Jakabova, D., Trandzik, J., Chrastina, J., Hudecova, L., Zetochova, E., Bulla, J., Bugarsky, A., Jakab, F. and Kozlik, P. 2002. Effectiveness of six highly polymorphic microsatellite markers in resolving paternity cases in Thoroughbred horses in Slovakia. Czech J. Anim. Sci. 47: 497-501.

Jamieson, A. and Taylor, S. C. S. 1997. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. Anim. Genet. 28(6):397-400.

Kalinowski, S. T., Taper, M. L. and Marshall, T. C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. Mol. Ecol. 16(5):1099-1006.

Kaukinen, J. and Varvio ,S.L. 1993. Eight polymorphic bovine microsatellites. Animal Genetic. 24(1): 148.

Lewis, C,M, Jr. 2010. Hierarchical modeling of genome-wide short tandem repeat (STR) markers infers native American prehistory. Am. J. Phys. Anthropol. 141: 281-289.

Mommens, G. W. and Coppieters, A. 1994. Dinucleotide repeats polymorphism at the bovine MM12E6 and MM8D3 loci. Animal Genetics 25(6): 368.

Moore. S.S., Byrne. K. 1994. Characterization of 65 bovine microsatellites. Mammalian Genome 5(7): 84 – 90.

Ozkan, E., Soysal, M.I., Ozder, M., Koban, E., Sahi,n O. and Togan, I. 2009. Evaluation of parentage testing in the Turkish Holstein population based on 12 microsatellite loci. Livestock Science.124: 101–106.

Rehout, V., Hradecká, E. and Cítek, J. 2006. Evaluation of parentage testing in the Czech population of Holstein cattle. Czech. J. Anim. Sci. 51(12):503-509.

Steffen, P., Eggen, A., Stranzinger, G., Fries, R., Dietz, A. B. and Womack, J.E. 1993. Isolation and mapping of polymorphic microsatellites in cattle. Animal Genetics. 24(2): 121–124.

Taylor, G.R. 1997. Laboratory methods for the detection of mutations and polymorphisms in DNA. CRC Press Inc., Boca Raton, USA, 333p.

Vaiman, D., Merier, D. 1994. A set of 99 cattle microsatellites: characterization, synteny mapping, and polymorphism. Mammalian Genome. 5(3): 288 – 297.

Vaiman, D. and Osta, D. 1992. Characterization of five new bovine microsatellite repeats. Animal Genetics 23(4):537.

Zhang, Y., Wang, Y., Sun, D., Yu, Y. and Zhang, Y. 2010. Validation of 17 Microsatellite Markers for Parentage Verification and Identity Test in Chinese Holstein Cattle. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 23(4): 425 – 429.

ความสัมพันธ์ระหว่างสนิปของยีนเลปติน กับคุณภาพซากในโคเนื้อลูกผสมแองกัส x พื้นเมือง 50%

ณชัย ศราธพันธุ์[1] ณัฐนันท์ ศิริรัตนธัญญะกุล[1] สายใจชื่นสุข[1] และ กัลยา เก่งวิกย์กรรม[1]

[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อตรวจหาความถี่ของการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์หนึ่งตำแหน่ง (สนิป) ในส่วนโปรโมเตอร์ของยีนเลปติน (*leptin5*) และเพื่อหาหาความสัมพันธ์กับคุณภาพของซาก รวมทั้งผลจากอัลตราซาวน์ ตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวน 66 ตัวอย่างของโคลูกผสมแองกัส x พื้นเมืองไทย 50% ถูกนำมาเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมด้วยวิธี TaqMan probe real-time PCR และนำผลมาวิเคราะห์หาความถี่ของอัลลิลและสนิปจีโนไทป์ของยีนเลปตินส่วนโปรโมเตอร์ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 528 หมายเลขธนาคารยีน AB070368 ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงจากเบส C เป็น T ผลการวิเคราะห์พบว่า ความถี่ของอัลลิล C ในโคเพศผู้และเมีย เท่ากับ 0.79 และ0.69 ส่วนอัลลิล T เท่ากับ 0.21 และ 0.31 ตามลำดับ สนิปจีโนไทป์ CC, CT และ TT ในโคเพศผู้เท่ากับ 0.63, 0.33 และ 0.04 ส่วนในเพศเมียเท่ากับ 0.47, 0.43 และ 0.10 ตามลำดับ ซึ่งพบว่าความถี่สนิปจีโนไทป์ของโคเพศผู้มีการกระจายอยู่ในสัดส่วนของ Hardy-Weinberg equilibrium คุณภาพซากจากผลอัลตราซาวน์พบว่าโคเพศเมียมีความหนาไขมันที่สะโพก (RF) เท่ากับ 7.54±1.16 มม มากกว่าในเพศผู้ (3.91±1.53 มม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในทางตรงกันข้าม ในโคเพศผู้มีเปอร์เซ็นต์ไขมันแทรกเนื้อ (IMF) เท่ากับ 3.56±0.24% มากกว่าในโคเพศเมีย (2.29±0.01%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ค่าเฉลี่ย (LS mean) ของคุณภาพซากของโคเพศผู้และเพศเมีย ได้แก่ พื้นที่หน้าตัดกล้ามเนื้อสันนอกส่วนริบอาย (REA) คะแนนไขมันแทรกเนื้อ (BMS) และค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (WBSF) เท่ากับ 62.24 ซม^2, 7.28 มม และ 14.63 กก ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์พบว่า เพศไม่มีอิทธิพลต่อ REA (R^2 = 0.25, p = 0.827) และ WBSF (R^2 = 0.675, p = 0.145) แต่มีอิทธิพลต่อ BF (R^2 = 0.92, p = 0.021) และ BMS (R^2 = 0.92, p = 0.012) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) นอกจากนี้พบว่า BMS ได้รับอิทธิพลจากระยะเวลาการขุน ($p<0.05$) น้ำหนักสุดท้าย ($p<0.05$) และยีน *leptin5* ($p<0.01$) การศึกษานี้ได้ผลที่น่าสนใจคือ ค่า BMS และ WBSF มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญ (p = 0.035) กับสนิปจีโนไทป์ของยีน *leptin5* โคที่มีสนิปจีโนไทป์ CT มีค่าเฉลี่ยของ BMS สูงกว่า (3.42±0.47; 1.14±0.43) และมีค่าเฉลี่ยของ WBSF ต่ำกว่า (2.97±4.42; 14.86±1.91) โคที่มีสนิปจีโนไทป์ CC อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ผลการศึกษานี้สรุปได้ว่า สนิปจีโนไทป์ของยีน *leptin5* มีความสัมพันธ์กับคะแนนไขมันแทรกเนื้อ และความนุ่มของเนื้อ

คำสำคัญ : โคลูกผสมแองกัส x พื้นเมืองไทย50% คุณภาพซาก สนิป จิโนไทป์ เลปติน

Association of SNP in the Bovine Leptin Gene with Carcass Quality Trait of 50% Angus x Thai – Native Crossbred Beef Cattle

Nachai Sarataphan[1] Saijai Cheunsuk[1] Nattanant Sirivattanatanyakul[1] and Kalaya Kengvikkum[1]

[1] Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Tiwanon Rd., Bangkadee, Muang, Pathumthani

Abstract

The objective of this study was to determine frequency of a single nucleotide polymorphism (SNP) in the leptin promoter region (*leptin5*) and examine associations of ultrasound and carcass quality traits. Sixty-six DNA samples from 50% Angus x Thai-native crossbred beef were analyzed allele and genotype frequency of a SNP of leptin gene at the promoter region (g528C>T, AB070368) by TaqMan probe real-time PCR. Frequency of allele C was 0.79 and 0.69 as well as allele T was 0.21 and 0.31 in the male and female animals, respectively. The genotype frequency of CC, CT and TT was 0.63, 0.33 and 0.04, as well as 0.47, 0.43 and 0.10 in male and female animals, respectively. The genotype frequency of the *leptin5* SNP were distributed according to Hardy-Weinberg equilibrium proportions in the male animals. The carcass quality traits of rump fat (RF) from ultrasound measurement was significantly higher in female (7.54±1.16 mm) than male (3.91±1.53 mm) animals ($p<0.05$). In contrast, intramuscular fat (IMF) in male animals (3.56±0.24 %) was significantly higher than female (2.29±0.01 %) animals ($p<0.01$). The least square mean of dependent variable of carcass quality traits included rib eye area (REA), back fat (BF), beef marbling standard score (BMS; 0-9) and Warner-Bratzler Shear Force (WBSF) was 62.24 cm2, 7.08 (mm), 2.28 and 14.63 kg respectively. The result showed that no effect of sex on REA (R^2=0.25, p=0.827) and WBSF (R^2=0.675, p=0.145) but it had significantly effect on BF (R^2=0.92, p=0.021) and BMS (R^2=0.92, p=0.012). The BMS of the carcasses was significantly effected on duration of fattening ($p<0.05$), final weight ($p<0.05$) and leptin5 genotype ($p<0.01$). Interestingly, the WBSF of rib eye steak muscle was significantly effected on *leptin5* genotype (p=0.035). The effects of leptin5 genotype were only found significantly on BMS and WBSF. The animals carried CT genotype had significantly higher BMS (3.42±0.47; 1.14±0.43) and lower WBSF (2.97±4.42; 14.86±1.91) than animals carried CC *leptin5* genotype, respectively ($p<0.05$). The results concluded that the SNP in bovine *leptin5* gene had highly significant association with beef marbling standard score and also association with meat tenderness.

Keywords : Angus x Thai-native 50%, Beef, Carcass quality traits, Genotype, *Leptin*, SNP

Introduction

Leptin is a 16-kDa protein that is synthesized by adipose tissue and is involved in regulation of feed intake, energy balance, fertility, and immune functions (Fruhbeck et al., 1998). Leptin binds to a receptor mainly localized on neuropeptide Y-neurons, which results in a reduction of feed intake and an increase of energy expenditure. Neuropeptide Y is also involved in the control of reproductive function (Magni et al., 2000). Although poly-morphisms in the bovine *leptin* gene have been described (Pomp et al., 1997; Haegeman et al., 2000) and an association with fat deposition in beef cattle was reported (Fitzsimmons et al., 1998). These physiological properties support *leptin* as a strong candidate gene for evaluation of genetic polymorphisms that could affect carcass fat content in cattle.

Polymorphisms in the bovine *leptin* promoter had been reported by Nkrumah et al. (2005). The study indicated that *Bos taurus x Bos taurus* crossbred cattle with the TT genotype at nucleotide position 528 according to GenBank accession No. AB070368 show 48 and 39% increases highly significant in serum leptin concentration, 39 and 31% increases in backfat thickness and 13 and 9% increase significant in marbling score, compared with CC or CT genotypes, respectively. Association studies of SNP in the bovine leptin promoter with carcass quality traits have not been reported yet in Angus x Thai – native 50% crossbred beef cattle. The objective of this study was to determine frequency of a single nucleotide polymorphism (SNP) in the leptin promoter region (*leptin5*) and examine associations of ultrasound and carcass quality traits in Angus x Thai – native 50% crossbred beef cattle.

Material and Methods

Experimental animals

Sixty-six 50% Angus x Thai native crossbred beef from the project of a high quality Thai-Black beef production under the Bureau of Biotechnology in Livestock Production (BBLP), Department of Livestock Development (DLD) were used in this study. Eleven castrated male at average 1.71±0.08 yr of age with 294.36±11.32 kg and 10 female at average 1.66±0.07 yr of age with 295.10±15.37 kg were used in experiment of carcass quality traits. The male were fed with stems and sweet corn pulps by-product of sweet corn can. Fourteen percent protein of commercial concentrated feed were added daily at 4 kg per animal. The female animals were fed with 14 % protein of total mix ration (TMR) including concentrated and dry Pangola hays.

DNA samples

Blood samples of each animal were collected from the jugular vein into 6 ml of EDTA tube. The blood samples were kept in ice box and submitted to our laboratory. Two hundred ml of each blood sample was extracted genomic DNA by commercial kit (AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep kit : Axygen Bio science; USA). Frozen semen samples of Angus bull were extracted DNA by the standard phenol: chloroform method (Sambrook et al. 1989). Twenty nanogram of the DNA samples were prepared for detecting a single nucleotide polymorphism (SNP) in the promoter region of bovine leptin (*leptin5*) gene.

SNP detection and genotyping

A SNP of leptin5 gene at the bovine leptin promoter according to GenBank accession AB070368 (g528 C>T) was amplified by primer and specific probes. The forward primer: 5'-aggtgcccagggactca-3', the reverse primer: 5'-caacaaaggccgtgtgaca-3' and two ABI TaqMan fluorogenic probes: Probe 1, 5'-caagctctagagcctGtgt-3'and Probe 2, 5'-aagctctagagcctAtgt-3' were designed according to Nkrumah et al. (2005). The probe 1 and 2 were tagged with VIC and FAM fluorescent dyes which showed green and blue color of amplification curve in a result of analysis by StepOnePlus software (StepOnePlus, ABI, USA). A specific match of the probe sequence to the target sequence will result in amplification, during which cleavage and release of the reporter dye occurs. Fluorescent signal for one or two dyes indicated homozygosity or heterozygosity for a particular allele of the SNP.

Ultrasound for carcass quality traits

At termination of the experiment, the animal's weight were recorded. Mean±SE (n) values of male and female animals were average 2.5±0.1 and 2.1±1.3 yr of age with live weight of 425.4±17.7 and 400.9±22.1 kg. Economic important traits for carcass quality including, rib eye area (REA) of Longissimus dorsi muscle (cm^2), back fat (BF) thickness (mm), lump fat (LF) thickness (mm) and percentage of intramuscular fat (%IMF) were measured at the 12^{th} and 13^{th} rib interface. The ultrasound measurement was done before submitting to slaughter by real-time ultrasound (Aloka, Japan) with a 17 cm, 3.5 MHz linear array transducer. The data were analyzed by Image Analysis Software (Designer Genes Technologies, Inc., USA).

Carcass examination

In each carcass, rib eye area muscle between the 10^{th} to 13^{th} rib were cut and submitted to our laboratory for 14 d of ageing. One half of the REA muscle samples were cut into 250-300 g of rib eye steak for REA, back fat thickness and beef marbling score (BMS) measurement (0-9) using Australian' score card. The other half of the carcasses were deboned and cut 3 x 2 x 5 cm of longitudinal Longissimus dorsi muscle for submitting to measure Warner-Bratzler

Shear Force (WBSF) using the machine of Instron Model 1011 (Instron Corporation, USA) at the Chiang Mai's meat laboratory under the DLD.

Statistical analyses

The genotype and allele frequencies of each polymorphism were examined for deviations from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) within both Angus x Thai native 50% crossbred and Angus bull by X^2 test with statistic on 1 df. The carcass quality traits between the experimental male and female animals as well as genotypes of *leptin5* gene were compared by PROC MEANS (least squares means ± standard error). Co-variable data eg. final weight, duration of fattening were also calculated using the GLM procedure of SAS manual.

Results and Discussion

SNP genotype and allele frequencies

Expected genotype and allele frequencies of *leptin5* gene in male and female Angus x Thai-native50% crossbred beef was shown in Table 1. The results of the X2 test of goodness-of-fit revealed that the male animals was in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) proportions (p=0.784). But the female animals showed significant departure from HWE proportions (p=0.048) which might be to systemic selection force in the population. However, inbreeding coefficient (*F*) were negative *F* values (*F*<0) in both male and female animals indicating the absence of inbreeding at this gene. In contrast, the result of X^2 test of goodness-of fit in Angus 100% bull was in HWE proportions (p=0.166) and F value was below zero indicating outbreeding in these bulls. The frequency of the T allele of leptin5 gene was 0.21 and 0.31 in male and female Angus x Thai native 50% crossbred beef, respectively. The frequency of the T allele was 0.40 in Angus 100% bull which was higher than the Angus x Thai native 50% crossbred cattle. The frequency of the T allele of *leptin5* gene of the animals in this study was nearly similar to experimental animals in a study of Nkrumah et al. (2005). The T allele frequency (0.11-0.26) was significant different among crossbred lines using Angus, Herford and Charolais sires.

The overall average and standard errors for the traits tested are in Table 2. Ultrasound rump fat showed significant different (p=0.028) among the male and female animals. Ultrasound intramuscular fat (IMF,%) was highly significant different (p=0.001) among the male (3.56±0.24) and female (2.29±0.01) animals. Carcass back fat thickness was significant (p=0.021) different among the male (3.83±2.01) and the female (13.58±2.06) animals. Carcass beef marbling score (BMS 0-9) was also significant (p=0.012) different among the male (2.74±0.18) and the female (0.84±0.21) animals. In addition, duration of fattening and final weight of the animals was significantly (p=0.010 and p=0.023) associated with BMS as shown in table 3.

SNP genotype effects

The leptin5 genotype was highly significant (p=0.005) associated with BMS and was significantly (p=0.035) associated with WBSF as presented in Table 3. The effects of *leptin5* genotype on the carcass quality traits analyzed are shown in Table 4. The *leptin5* genotype was not associated with ultrasound and carcass REA, BF, RF and IMF. The BMS differed ($p<0.05$) among genotypes and was higher for animals with genotype CT (3.42±0.47) than for animals with genotype CC (1.14±0.43). The sample size of animal with genotype TT was too small for statistic comparison in this study. However, animals inheriting with genotype TT had highly significantly higher ultrasound BF and BMS (p=0.01) compared with genotype CT or CC (Nkrumah et al., 2005). Interestingly, animals with CT genotype (2.97±4.42 kg) had significant ($p<0.05$) lower WBSF compared with genotype CC (14.86±1.91 kg). The sample size of animal with genotype TT was too small for statistic comparison in this study. In present study indicated that SNP genotypic effect of *leptin5* gene was indirectly influenced on WBSF due to effect of *leptin5* genotype on BMS. In addition, the mean value of BMS was slightly associated ($r = -0.32$) with WBSF value, those were similarly to the study of (Bertrand et al., 2001). It indicated that greater marbling is slightly associated with greater meat tenderness. The results represent the initial associations of leptin5 genotypes with carcass quality traits and further efforts are required to validate these findings in other animal populations before their application in marker-assisted selection.

References

Bertrand, J. K., Green, R. D., Herring, W. O. and Moser, D. W. 2001. Genetic evaluation of beef carcass traits. J. Anim. Sci. 79 (Suppl E):190–200.

Buchanan, F. C., Fitzsimmons, C. J., Van Kessel, A. G., Thue, T. D., Winkelman –Sim, C. and Schmutz, S. M. 2002. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. Genet. Sel. Evol. 34: 105-116.

Fitzsimmons, C. J., Schmutz, S. M., Bergen, R. D. and McKinnon, J. J. 1998. A potential association between the BM1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. Mamm. Genome 9:432–434.

Fruhbeck, G., Jebb, S. A. and Prentice, A. M. 1998. Leptin: Physiology and pathophysiology. Clin. Physiol. 18:399–419.

Haegeman, A., Van Zeveren, A. and Peelman, L. J. 2000. New mutation in exon 2 of the bovine leptin gene. Anim. Genet. 31:79.

Magni, P., Motta, M. and Martini, L. 2000. Leptin: A possible link between food intake, energy expenditure, and reproductive function. Regul. Pept. 92:51–56.

Nkrumah, J.D., Li, C., Yu, J., Hansen, C., Keisler, D.H. and Moore, S.S. 2005. Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior, and measures of carcass merit. J. Anim. Sci. 83: 20-28.

Pomp, D., Zou, T., Clutter, A. C. and Barendse, W. 1997. Rapid communication: mapping of leptin to chromosome 4 by linkage analysis of a PCR-based polymorphism. J. Anim. Sci. 75:1427.

Table 1 Expected genotype and allele frequency of the SNP leptin5 gene derived from Hardy-Weinberg equilibrium calculation in 50% Angus x Thai native (TN) crossbred beef and Black Angus bull

Breed	Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium								
		Frequency of							
		Exp. Genotype			Allele				
	n	CC	CT	TT	C	T	x^2	P	F
Angus x TN50%									
-Male	29	0.63	0.33	0.04	0.79	0.21	0.07	0.784	-0.050
-Female	37	0.47	0.43	0.10	0.69	0.31	3.90*	0.048*	-0.324
Angus 100%	10	0.36	0.48	0.16	0.60	0.40	0.28	0.166	0.166

X^2 chi-square, P = Pearson's goodness of fit chi-square, F = Inbreeding coefficient, *p<0.05

Table 2 Least squares means±SE showing the effect of sex on muscle quality traits of male and female 50% Angus x Thai native crossbred beef

Carcass quality traits	Mean±SE		P
	Male	Female	
Ultrasound (n=30)	8	22	
Rib eye are (cm2)	79.15±6.4	73.59±4.87	0.388
Rib eye area (cm2/100 kg BW)	19.09±1.81	18.36±1.37	0.682
Back fat (mm)	3.17±1.21	5.35±1.21	0.085
Rump fat (mm)	3.91±1.53	7.54±1.16	0.028*
Intramuscular fat (IMF, %)	3.56±0.24	2.29±0.01	0.001**
Carcass (n=26)	8	18	
Rib eye area (cm2)	67.28±12.81	70.54±9.83	0.818
Rib eye area (cm2/100 kg BW)	16.40±3.27	17.32±2.51	0.767
Back fat (mm)	3.83±2.01	13.58±2.06	0.021*
Beef marbling standard score (0-9)	2.74±0.18	0.84±0.21	0.012*

*p<0.05, **p<0.01

Table 3 Probability of dependent variable of carcass quality traits associated with co-variable data in 50% Angus x native crossbred beef

	Dependent variable of carcass quality traits				
	REA	REA/100	Back fat	BMS	WBSF
Mean	62.24	15.26	7.08	2.28	14.63
R^2	0.254	0.287	0.922	0.732	0.675
	Probability (P)				
Sex	0.827	0.767	0.021*	0.012*	0.145
Duration of fattening	0.287	0.322	0.062	0.010*	0.453
Final weight	0.927	0.214	0.817	0.023*	0.089
Leptin5 genotype	0.904	0.904	0.859	0.005**	0.035*

*p<0.05, **p<0.01

Table 4 Mean±SE values of carcass quality traits of the animals carried CC, CT and TT genotype of the *leptin5* gene

Carcass quality traits	*Leptin5* genotype		
	CC	CT	TT
Ultrasound (n=30)	14	15	1
Rib eye area (cm^2)	71.57±4.29	75.85±5.01	81.69±9.88
Rib eye area (cm^2/100 kg BW)	18.74±2.73	18.42±1.01	19.02±2.07
Back fat thickness (mm)	5.20±0.85	4.59±0.94	2.97±1.86
Rump fat (mm)	5.66±1.08	6.72±1.19	4.80±2.35
Intramuscular fat (%)	2.93±0.23	2.94±0.26	2.91±0.49
Carcass (n)	10	15	1
Rib eye area (cm^2)	69.59±9.91	64.92±10.85	72.23±17.62
Rib eye area (cm^2/100 kg BW)	16.99±2.53	15.68±2.77	17.58±4.49
Back fat thickness (mm)	8.22±1.34	9.44±2.15	8.54±2.64
Beef marbling score (0-9)	$1.14±0.43^a$	$3.42±0.47^b$	$0.81±0.77^a$
Warner-Bratzler Shear Force (kg)	14.86±1.91*	2.97±4.42*	nd

[a, b] Within the carcass quality traits in a column, genotypes without a common superscript letter differ ($p<0.05$), *$p < 0.05$, nd = not done

อิทธิพลสนิปจีโนไทป์ของยีนคาลเปนและคาลปาสตาติน ต่อลักษณะความนุ่มของเนื้อในโคลูกผสมแองกัส 50% (Thai-Black)

ณชัย ศราธพันธุ์[1] สายใจ ชื่นสุข[1] ณัฐนันท์ ศิริรัตนธัญญะกุล[1]
เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล[2] และ กัลยา เก่งวิกย์กรรม[1]
[1] สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์
[2] สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อหาความถี่อัลลิลและสนิปจีโนไทป์ในยีนคาลเปนและยีนคาปาส ตาติน และหาความสัมพันธ์กับความนุ่มของเนื้อของโคลูกผสมแองกัสxพื้นเมือง 50% ตัวอย่างดีเอ็นเอจำนวน 66 ตัวอย่าง ได้นำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่องหมายสนิป CAPN1 4751 และ CAST-T1 โดยเทคนิค TaqMan Probe real-time PCR ผลการศึกษาพบว่าตัวอย่างโคมีความถี่อัลลิล C และ T ของยีนคาลเปนเท่ากับ 0.55 และ 0.45 ในโคเพศผู้ ส่วนในโคเพศเมียมีความถี่อัลลิลเท่ากับ 0.42 และ 0.58 ตามลำดับ ความถี่สนิปจีโนไทป์ CC, CT และ TT เท่ากับ 0.30, 0.49 และ 0.21 ในโคเพศผู้ และเท่ากับ 0.17, 0.49 และ 0.34 ในเพศเมียตามลำดับ ส่วนยีนคาลปาสตาตินมีความถี่อัลลิล G และ A เท่ากับ 0.28 และ 0.72 ในโคเพศผู้ และเท่ากับ 0.20 และ 0.80 ในโคเพศเมีย ตามลำดับ ความถี่สนิปจีโนไทป์ GG, AG และ AA เท่ากับ 0.07, 0.36 และ 0.56 ในโคเพศผู้ และเท่ากับ 0.04, 0.30 and 0.66 ในโคเพศเมีย ตามลำดับ การกระจายของความถี่สนิปจีโนไทป์ของยีนคาลเปนและคาลปาสตาติน พบว่าอยู่ในภาวะไม่สมดุลย์และสมดุลย์ของ Hardy-Weinberg equilibrium ตามลำดับ ความนุ่มของเนื้อสันนอกส่วนริบอายของโคลูกผสมแองกัสxพื้นเมือง 50% จำนวน 20 ตัว ได้จากการวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ หลังจากบ่มซาก 14 วัน โคตัวผู้มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อเท่ากับ 5.96±3.36 กก. ส่วนในตัวเมียมีค่าเท่ากับ 11.87±2.83 กก. แสดงว่าโคตัวผู้มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อต่ำกว่าในตัวเมียอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ในโคที่มีสนิปจีโนไทป์ของยีนคาล เปนเป็น CT และ TT มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อเท่ากับ 11.53±1.95 และ 6.31±4.17 กก. ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p=0.241) ส่วนในโคที่มีสนิปจีโนไทป์ของยีนคาลปาสตาตินเป็น AA, AG และ GG มีค่าแรงตัดผ่านเนื้อเท่ากับ 9.5±3.41, 8.15±3.97 และ 9.05±3.51 กก. ตามลำดับ ซึ่งมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p=0.751-0.922) การทดลองในครั้งนี้สรุปได้ว่า สนิปจีโนไทป์ของยีนคาลเปนและคาลปาสตาตินมีอิทธิพลต่อความนุ่มของเนื้ออย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05)

คำสำคัญ : โคลูกผสมแองกัสxพื้นเมืองไทย50% คาลเปน คาลปาสตาติน ความนุ่มของเนื้อ สนิปจีโนไทป์

SNP Genotypic Effect of μ–*Calpain* and *Calpastatin* Genes on Tenderness Trait in 50% Angus Crossbred (Thai – Black)

Nachai Sarataphan[1] Saijai Cheunsuk[1] Nattanant Sirivattanatanyakul[1]
Lerdchai Chintapitasakul[2] and Kalaya Kengvikkum[1]
[1] Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Pathumthani
[1] National Institute of Animal Health, Bangkok, 10900

Abstract

The objective of this study was to determine frequency and association of SNP genotype in *calpain (CAPN1)* and *calpastatin (CAST)* gene with meat tenderness. Sixty-six DNA samples from 50% Angus x Thai-Native crossbred beef were analyzed two single nucleotide polymorphisms (SNPs) and SNP genotype frequency of *CAPN1* and *CAST* gene by CAPN1 4751 and CAST-T1 markers via TaqMan probe real-time PCR. Frequency of allele C and T in *CAPN1* gene was 0.55 and 0.45 as well as 0.42 and 0.58 in male (n=29) and female (n=37) animals, respectively. The SNP genotype frequencies of CC, CT and TT in *CAPN1* gene was 0.30, 0.49 and 0.21, as well as 0.17, 0.49 and 0.34 in male and in female animals, respectively. Allele frequency of G and A in *CAST* gene was 0.28 and 0.72 as well as 0.20 and 0.80 in male and female animals, respectively. The SNP genotype frequency of *CAST* gene, including GG, AG and AA was 0.07, 0.37 and 0.56 in male, as well as 0.04, 0.30 and 0.66 in female animals, respectively. The SNP genotype frequency of the *CAPN1* and *CAST* genes were not and were distributed according to Hardy-Weinberg equilibrium proportions, respectively. Meat tenderness of rib-eye steak muscles was measured by Warner-Bratzler Shear Force (WBSF) at 14 d postmortem ageing from 11 male and 9 female of 50% Angus x Thai-Native crossbred beef. The WBSF values were 5.96±3.36 and 11.87 ± 2.83 kg in male and female animals, respectively. It revealed that the rib eye steak muscle of male animal had no significantly ($p > 0.05$) more tender than those of female animals. Moreover, the WBSF values were 11.53±1.95 and 6.31±4.17 in animals carried CT and TT genotype of CAPN1 gene ($p=0.241$). In addition, the WBSF values were 9.5±3.41, 8.15±3.97 and 9.05±3.51 in animals carried AA, AG and GG genotype of *CAST* gene ($p=0.751$-0.922). It was concluded that there was no significant effect of the SNP genotype of *CAPN1* and *CAST* genes on meat tenderness in this study.

Keywords : Angus x Thai-native 50%, Beef, μ-Calpain, Calpastatin, Gene, Meat tenderness

Introduction

Meat tenderness is a critical trait in determining consumer satisfaction, and there has been significant interest in genetic selection to decrease problems with meat tenderness variation. However, the problem of variability in meat tenderness has not diminished, in part because of an inability to accurately select for increased tenderness. Identification of genetic markers for meat tenderness variation would provide some selection criteria to facilitate genetic improvement in this trait. Previous study identified a QTL influencing meat tenderness on chromosome 29 (Casas et al., 2000). Subsequently, the bovine calcium-activated neutral protease (CAPN1) gene, encoding the protease-calpain, was mapped to the QTL interval (Smith et al., 2000). This protease seems to be the primary enzyme in postmortem tenderization (Koohmaraie, 1996), suggesting from both positional and functional standpoints that variation in the gene sequence might be associated with meat tenderness in cattle. Sequencing the bovine CAPN1 gene in a multibreed panel of cattle identified >150 sequence variations spread along >11,000 bp. Two single-nucleotide polymorphisms (SNP) predict variation in the protein sequence of the protease (Page et al., 2002).

The physiological change in muscle structure during the postmortem period is complex (Koohmaraie, 1994). The calpain/calpastatin system is an endogenous, calcium-dependent proteinase system, theorized to mediate the proteolysis of key myofibrillar proteins during postmortem storage of carcass and cuts of meat at refrigerated temperatures (Koohmaraie et al., 1995b). Calpain is responsible for the breakdown of myofibrillar proteins, which are closely related to meat tenderness (Wheeler and Koohmaraie, 1994). Calpastatin (CAST) inhibits calpain activity and, therefore, regulates postmortem proteolysis. Increased postmortem CAST activity has been correlated with reduced meat tenderness (e.g., Koohmaraie et al., 1995a; Pringle et al., 1997). The CAST gene, mapped to BTA 7 (Bishop et al., 1993), is considered a candidate gene for beef tenderness. More recently, genetic tests for meat tenderness in beef, which utilize genetic polymorphisms in the CAPN1 and/or CAST genes, have been made available by private companies. Examples are the IGENITY TenderGENE test (Merial Ltd., Atlanta, GA) and the Gene- STAR Tenderness 2 test (Genetic Solutions Pty. Ltd., Albion, Australia). The objective of this study was to assess the association of two SNPs in the CAPN1 and CAST gene with meat tenderness in Angus x Thai-native 50% crossbred beef cattle.

Materials and Methods

Experimental animals

Sixty-six 50% Angus x Thai native crossbred beef from the project of a high quality Thai-Black beef production under the Bureau of Biotechnology in Livestock Production (BBLP), Department of Livestock Development (DLD) were used in this study. Eleven castrated male at average 1.71±0.08 yr of age with 294.36±11.32 kg and 10 female at average 1.66±0.07 yr of age with 295.10±15.37 kg were used in experiment of carcass quality traits. The male were fed with stems and sweet corn pulps by-product of sweet corn can. Fourteen percent protein of commercial concentrated feed were added daily at 4 kg per animal. The female animals were fed with 14 % protein of total mix ration (TMR) including concentrated and dry Pangola hays.

DNA samples

Blood samples of each animal were collected from the jugular vein into 6 ml of EDTA tube. The blood samples were kept in ice box and submitted to our laboratory. Two hundred ml of each blood sample was extracted genomic DNA by commercial kit (AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep kit : Axygen Bio science; USA). Frozen semen samples of Angus bull were extracted DNA by phenol: chloroform method (Sambrook et al. 1989). Twenty nanogram of the DNA samples were prepared for detecting two SNPs in the CAPN1 and CAST gene.

SNP detection and genotyping

A SNP of CAPN1 gene, namely CAPN1 4751, at the nucleotide 6545 according to GenBank accession AF248054 (g6545 C>T) was amplified by primer and specific probes. The forward primer: 5'-tggcatcctccccttgact-3', the reverse primer: 5'-cccccgtcacttgacaca-3' and two ABI TaqMan fluorogenic probes: Probe 1, 5'-cgcctcGgttttc-3'and Probe 2, 5'-cgcctcAgttttc-3' were designed according to White et al. (2005). A SNP of CAST gene, namely CAST-T1, at the nucleotide 2959 according to GenBank accession AF159246 (g2959 A>G) was also amplified by primer and specific probes. The forward primer: 5'-ctcacgtgttcttcagtgttctg-3', the reverse primer: 5'-caaccaaagaaaca tcaaacacagt-3' and two ABI TaqMan fluorogenic probes: Probe 1, 5'-cctttcctcttAgacttgt-3', Probe 2: 5'-ctttcctcttGgacttgt-3 were design according to Barendse (2002).

Real-time polymerase chain reaction (PCR) mixture contained 20 ng (1 µl) of DNA sample template, 5 µl of *Taq*Man Genotyping Master Mix (2x), 0.5 µl of *Taq*Man genotyping assay mix (20x) and 3.5 µl of DNase-free, RNAse free water. Real-time PCR was performed in the thermal cycler machine (StepOnePlus, ABI, USA). PCR reaction was activated AmpliTaq Gold enzyme at 95 °C for 10 min, then thermal cycle of 40 cycles included denaturation at 95 °C for 15 s and annealing at 60 °C for 1 min. The probe 1 and 2 were tagged with VIC and

FAM fluorescent dyes which showed green and blue color of amplification curve in a result of analysis by StepOnePlus software (StepOnePlus, ABI, USA). A specific match of the probe sequence to the target sequence will result in amplification, during which cleavage and release of the reporter dye occurs. Fluorescent signal for one or two dyes indicated homozygosity or heterozygosity for a particular allele of the SNP.

Carcass examination

In each carcass, rib eye area (REA) muscle between the 10^{th} to 13^{th} rib were cut and submitted to our laboratory for 14 d of ageing. One half of the REA muscle samples were cut into 250-300 g of rib eye steak for REA, back fat thickness and beef marbling score (BMS) measurement (0-9) using Australian' score card. The other half of the carcasses were deboned and cut into 3 x 2 x 5 cm of longitudinal Longissimus dorsi muscle for submitting to measure Warner-Bratzler Shear Force (WBSF) using the machine of Instron Model 1011 (Instron Corporation, USA) at the Chiang Mai's meat laboratory under the DLD.

Statistical analyses

Gene-marker frequencies for Angus x Thai native 50% crossbred beef with *CAPN1* and *CAST* gene marker were estimated using the genotype data. Test of deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was performed and tested against their expectations using the chi-squared test with statistic on 1 df. All analyses of carcass quality traits were performed using the GLM procedure of SAS manual. The carcass quality traits between the experimental male and female animals as well as genotypes of *CAPN1* and *CAST* genes were compared by PROC MEANS.

Results and Discussion

Expected genotype and allele frequencies of *CAPN1* gene in male and female Angus x Thai-native crossbred beef was shown in Table 1. The results of the X^2 test of goodness-of-fit revealed that the male and female showed significant departure from HWE which might be to systemic selection force in the population. However, inbreeding coefficient (*F*) were negative *F* values (*F*<0) indicating the absence of inbreeding at this gene. In contrast, this study the result of *X2* test of goodness-of fit in Angus 100% bull was in HWE and F value was below zero indicating outbreeding in these bulls. Favorable allele C frequency of *CAPN1* gene (0.47) had been reported in red Angus (Van Eenennaam et al. 2007) which similarly value (0.42-0.55) in the male and female animals and lower value (0.60) than Black Angus in this study.

Expected genotype and allele frequencies of *CAST* gene in male and female Angus x Thai-native crossbred beef was shown in Table 1. The results of the X^2 test of goodness-of-fit revealed that the male and female was in HWE and *F* values were negative (*F*<0) indicating the absence of inbreeding at this gene similar to Angus 100% bull. Favorable allele A frequency of *CAST* gene (0.89) had been reported in Angus (Van Eenennaam et al. 2007) which was higher value (0.72-0.80) than in the male and female animals and lower value (0.95) than Black Angus in this study.

The WBSF values were 5.96±3.36 and 11.87±2.83 kg (*p*=0.145) in male and female animals, respectively as shown in Table 2. It revealed that the rib eye steak muscle of male animal had no significantly (*p* >0.05) more tender than those of female animals. Moreover, the WBSF was also not associated with period of fattening (p=0.453) and final live weight (*p*=0.089) of the animals in this study (Table 3). The result indicated that there was no significant effect of sex, period of fattening and final live weight on tenderness trait. Interestingly, *leptin5* gene showed a significant effect (*p* = 0.035) on tenderness in Angus x Thai-native 50% crossbred beef. In addition, *leptin5* gene showed a highly significant effect (p = 0.005) on beef marbling score. It was possible that phenotypic and genetic relationships between marbling and tenderness are not especially high but show a favorable direction. It indicated that greater marbling is slightly associated with greater tenderness (Bertrand et al., 2001).

In table 3, the study was not detect significant association of *CAPN1* (p=0.241) and *CAST* (p=0.940) polymorphisms with meat tenderness. In table 4, the WBSF values were 11.53±1.95 and 6.31±4.17 in animals carried CT and TT genotype of *CAPN1* gene (p=0.241). In addition, the WBSF values were 9.5±3.41, 8.15±3.97 and 9.05±3.51 in animals carried AA, AG and GG genotype of *CAST* gene (p=0.751-0.922). It was concluded that there was no significant effect of the SNP genotype of *CAPN1* and *CAST* genes on meat tenderness in this study. In this study was similar to both studies of Lonergan et al. (1995) and Chung et al. (1999) that association of CAST polymorphism were not detected significantly with meat tenderness. It was possible that the sample sizes were small, which may have contributed to the failure to identify significant association between the *CAST* gene polymorphisms and meat tenderness. However, the study of Casas et al. (2006) using a large sample sizes of crossbred European beef (n>500) and pure breed Brahman (n=444) was performed to detect the *CAPN1* and *CAST* polymorphisms by the same our markers. The results showed that animals inheriting the CC genotype of *CAPN1* gene had meat that was more tender than those inheriting the TT genotype. In addition, animals inheriting the AA genotype of *CAST* gene had more meat tenderness than those inheriting the GG genotype. It concluded that the CAPN1 4751 and CAST-T1 markers are suitable for use in identifying *Bos taurus x Bos taurus, Bos taurus x Bos indicus* crossbred and pure breed Brahman beef with the genetic potential to produce meat that is more tender.

References

Barendse, W.G. 2002. DNA markers for meat tenderness. International patent application No. PCT/AU02/00122. World Intellectual Property Org. Int. Publication No. WO 02/064820 A1.

Bertrand, J.K., Green, R.D., Herring, W.O. and Moser, D.W. 2001. Genetic evaluation of beef carcass traits. J. Anim. Sci. 79(Suppl E):190–200.

Bishop, M.D., Koohmaraie, M., Killefer, J. and Kappes, S. 1993. Rapid communication: Restriction fragment length polymorphisms in the bovine calpastatin gene. J. Anim. Sci. 71:2277.

Casas, E., Shackelford, S.D., Keele, J.W., Stone, R.T., Kappes, S.M. and Koohmaraie, M. 2000. Quantitative trait loci affecting growth and carcass composition of cattle segregating alternate forms of myostatin. J. Anim. Sci. 78:560–569.

Casas, E., White, S. N., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Koohmaraie, M., Riley, D. G., Chase, C. C., Johnson, Jr., D. D. and Smith, T. P. L. 2006. Effects of calpastatin and {micro}-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. J. Anim. Sci. 84:520–525.

Chung, H. Y., Davis, M. E., Hines, H. C. and Wulf, D. M. 1999. Relationship of a PCR-SSCP at the bovine calpastatin locus with calpastatin activity and meat tenderness. J. Anim. Sci. 77(Suppl 1):31. (Abstr.)

Koohmaraie, M. 1994. Muscle proteinases and meat aging. Meat Sci. 36:93–104. Koohmaraie, M. 1996. Biochemical factors regulating the toughening and tenderization process of meat. Meat Sci. 43:S193–S201.

Koohmaraie, M., Killefer, J., Bishop, M. D., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L. and Arbona, J. R. 1995a. Calpastatin-based methods for predicting meat tenderness. Pages 395–412 in Expression of Muscle Proteinases and Regulation of Protein Degradation as Related to Meat Quality. A. Ouali, D. Demeyer, and F. Smulders, ed. Audet Tijdschrifren b.v., Nijmegen, The Netherlands.

Koohmaraie, M., Wheeler, T. L. and Shackelford, S. D. 1995b. Beef tenderness: Regulation and prediction. Pages 1–10 in Proc. Meat '95: CSIRO Meat Industry Res. Conf., Session 4A. CSIRO Australia, Brisbane, Australia.

Page, B. T., Casas, E., Heaton, M. P., Cullen, N. G., Hyndman, D. L., Morris, C. A., Crawford, A. M., Wheeler, T. L., Koohmaraie, M., Keele, J. W. and Smith, T. P. L. 2002. Evaluation of single nucleotide polymorphisms in CAPN1 for association with meat tenderness in cattle. J. Anim. Sci. 80:3077–3085.

Pringle, T. D., Williams, S. E., Lamb, B. S., Johnson, D. D. and West, R. L. 1997. Carcass characteristics, the Calpain proteinase system, and aged tenderness of Angus and Brahman crossbred steers. J. Anim. Sci. 75:2955–2961.

Lonergan, S. M., Ernst, C. W., Bishop, M. D., Calkins, C. R. and Koohmaraie, M. 1995. Relationship of restriction fragment length polymorphisms (RFLP) at the bovine calpastatin locus to calpastatin activity and meat tenderness. J. Anim. Sci. 73:3608–3612.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Lab. Press, New York, NY.

Wheeler, T. L., and Koohmaraie, M. 1994. Prerigor and postrigor changes in tenderness of ovine longissimus muscle. J. Anim. Sci. 72:1232–1238.

White, S. N., Casas, E., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Koohmaraie, M., Riley, D. G., Chase C. C. Jr., Johnson, D. D., Keele, J. W. and Smith, T. P. L. 2005. A new single nucleotide polymorphism in CAPN1 extends the current tenderness marker test to include cattle of Bos indicus, Bos taurus, and crossbred descent. J. Anim. Sci. 83:2001–2008.

Van Eenennaam, A. L., Li, J., Thallman, R. M., Quaas, R. L., Dikeman, M. E., Gill, C. A., Franke, D. E. and Thomas. M. G. 2007. Validation of commercial DNA tests for quantitative beef quality traits. J. Anim. Sci. 85:891–900.

Table 1 Allele and genotype frequency of CAPN1 and CAST gene derived from Hardy-Weinberg Equilibrium calculation in Angus 100% and Angus x Thai native (Angus x TN) 50% crossbred beef

Breed/ *CAPN1* gene:	n	Tests for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium Frequency of Exp. Genotype			Allele				
		CC	CT	TT	C	T	x^2	P	F
Angus x TN50%									
-Male	29	0.30	0.49	0.21	0.55	0.45	13.14	2.8e-4**	-0.673
-Female	37	0.17	0.49	0.34	0.42	0.58	13.76	2.07e-4**	-0.609
Angus 100%	10	0.36	0.48	0.16	0.60	0.40	3.40	0.065	0.583
Breed/ *CAST* gene:	n	Frequency of Exp. Genotype			Allele				
		CC	CT	TT	C	T	x^2	P	F
Angus x TN50%									
-Male	29	0.07	0.37	0.56	0.28	0.72	1.26	0.261	-0.208
-Female	37	0.04	0.30	0.66	0.20	0.80	2.39	0.121	-0.254
Angus 100%	10	0.01	0.09	0.90	0.05	0.95	0.03	0.867	-0.053

X^2 chi-square, P = Pearson's goodness of fit chi-square, F = Inbreeding coefficient,

** $p<0.05$

Table 2 Mean±SE values of age at slaughter, live weight and Warner-Bratzler Shear Force (WBSF) of male and female 50% Angus x native crossbred beef

Sex	Cow groups		
	Age (yr)	Live Weight (kg)	WBSF (kg)
Male (n=11)	2.50±0.15	425.36±17.75	5.96±3.36
Female (n=10)	2.10±0.13	400.90±22.14	11.87±2.83

$^{a\,b\,c}$ Least square means with different letters within the column are significantly different ($P < 0.01$)

$^{A\,B}$ Least square means with different letters within the row are significantly different ($P < 0.01$)

* Overall means

Table 3 Probability of dependent variable of carcass quality traits in 50% Angus x native crossbred beef

	Dependent variable of carcass quality traits				
	REA	REA/100	Back fat	BMS	WBSF
Mean	62.24	15.26	7.08	2.28	14.63
R^2	0.254	0.287	0.922	0.732	0.675
	Probability (P)				
Sex	0.827	0.767	0.021*	0.012*	0.145
Duration of fattening	0.287	0.322	0.062	0.010*	0.453
Final weight	0.927	0.214	0.817	0.023*	0.089
Leptin5 genotype	0.904	0.904-	0.859	0.005**	0.035*
CAPN1 genotype	0.696	0.745	0.965	0.162	0.162
CAST genotype	0.999	0.993	0.213	0.369	0.369

* p<0.05

Table 4 Independent genotypic effect of calpain (*CAPN1*) and calpastatin (*CAST*) gene on Warner-Bratzler Shear Force of 22 rib eye steak muscles

Gene	Warner-Bratzler Shear Force (kg) Mean±SE Genotype		
CAPN1	CC	CT	TT
	nd	11.53±1.95^{ns}	6.31±4.17^{ns}
CAST	AA	AG	GG
	9.56±3.41^{ns}	8.15±3.97^{ns}	9.05±3.51^{ns}

nd no data,

^{ns} non significance (p>0.05)