



วารสารเทคโนโลยีชีวภาพ การผลิตปศุสัตว์



JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY
IN ANIMAL PRODUCTION

ISSN : 1905-6877

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

BUREAU OF BIOTECHNOLOGY IN LIVESTOCK PRODUCTION
DEPARTMENT OF LIVESTOCK DEVELOPMENT

ปีที่ 10 : พ.ศ. 2561 - 2562

Vol 10 : 2018 - 2019

สารจากบรรณาธิการบริหาร

๑

การศึกษาวิจัยของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ หลายคนอาจมองว่าเป็นเรื่องเก่าๆ เดิมๆ แต่เรากล้าพูดได้ว่า เรื่องที่เราศึกษามาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุง พัฒนางานและขยายผลสู่เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ได้อย่างกว้างขวาง และเป็นส่วนหนึ่งในการนำพาวงการปศุสัตว์ไทย ให้พัฒนาทัดเทียมอารยประเทศ จากปีที่ผ่านมาภาครัฐได้มีการสนับสนุน ส่งเสริมอาชีพการเลี้ยงปศุสัตว์เพิ่มมากขึ้น ในพื้นที่ต่างๆ ทั่วประเทศ ภายใต้โครงการสร้างทักษะและส่งเสริมอาชีพด้านการเกษตร โดยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ได้รับโอกาสให้เป็นเจ้าภาพในการดำเนินงานกิจกรรมอาสาปศุสัตว์เพื่อการพัฒนาอาชีพแก่เกษตรกรรายย่อย ซึ่งถือเป็นการประยุกต์ใช้ประโยชน์จากงานวิจัยต่างๆ เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตปศุสัตว์ และได้มีโอกาสถ่ายทอดองค์ความรู้ในด้านการผสมเทียมผ่านอาสาปศุสัตว์ เพื่อให้สามารถปฏิบัติงานด้านการให้บริการผสมเทียมได้อย่างกว้างขวางและครอบคลุมทั่วทุกพื้นที่ และสามารถตอบสนอง ต่อความต้องการของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคเนื้อและแพะ ทั้งนี้ยังมีอีกหลายโครงการ ที่เราได้มีส่วนสนับสนุนและผลักดัน ในการทำให้เกษตรกรมีโอกาสเข้าถึงสัตว์พันธุ์ดี และที่สำคัญเป็นการพัฒนาสายพันธุ์ปศุสัตว์ของไทย สู่การพัฒนาอาชีพการเลี้ยงปศุสัตว์อย่างยั่งยืน

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ขอเป็นส่วนหนึ่งในการผลักดันให้นักวิจัย ที่มีผลงานทางวิชาการ เพื่อพัฒนาวงการปศุสัตว์ไทยให้ก้าวไกลสู่สากล โดยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวารสารฉบับนี้ จะเป็นอีกช่องทางหนึ่ง ในการถ่ายทอดองค์ความรู้ต่างๆ จากนักวิชาการออกสู่สาธารณชน เพื่อนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อเกษตรกร และวงการปศุสัตว์ไทย ต่อไป

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

น.สพ. ไกรวรรณ หงส์ยंत्रชัย

น.สพ. จิรุตม์ รัตนเทพ

บรรณาธิการบริหาร

น.สพ. ณรงค์ เลี้ยงเจริญ

บรรณาธิการ

น.สพ. ศาโรช งามจำ

ผู้ช่วยบรรณาธิการ

นางจุฑพร พงษ์เพ็ง

กองบรรณาธิการ

สพ.ญ. สายใจ ชื่นสุข

น.สพ. อรุณ จันทร์กระจำ

น.สพ. ณัฐนันท์ ศิริรัตนัญญกุล

น.สพ. พีระพงษ์ สำราญทรัพย์

ดร. สายัณห์ บัวบาน

ดร. มาลี อภิเมธีธำรง

นายสมศักดิ์ เปรมปรีดี

ผู้จัดการวารสาร

สพ.ญ. จรรยาพร รุ่งเรืองศักดิ์

สพ.ญ. มุขสุดา เรืองศรี

สพ.ญ. วิษญุณี ภูมิพิทักษ์กุล

น.สพ. สุรวีทย์ จินสุข

ข้อเสนอแนะสำหรับผู้เขียน

วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ เป็นวารสารทางวิชาการของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ กำหนดออก ปีละ 1 ฉบับ คือ เดือนกรกฎาคม วารสารนำลงบทความ ผลงานค้นคว้าวิจัยด้านการผลิตปศุสัตว์ ทั้งด้านการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ การจัดการอาหาร สุขภาพ และระบบสืบพันธุ์ ตลอดจนการขยายพันธุ์ และการใช้เทคโนโลยีชีวภาพที่ก้าวหน้า ในการปรับปรุงและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตปศุสัตว์ด้านต่างๆ 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 ที่รวบรวมข้อมูลความคิดเห็นและประสบการณ์ของผู้เขียน

1.3 เรื่องอื่นๆ ที่คณะผู้จัดทำพิจารณาเห็นสมควร

2. ต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่ส่งมาพิมพ์ในวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ไม่ควรเป็นเรื่องที่เคยพิมพ์ หรือ กำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อลงพิมพ์วารสารอื่น

2.2 ต้นฉบับเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ พิมพ์บนกระดาษ เอ 4 จำนวนไม่เกิน 12 หน้า โดย

จัดพิมพ์ด้วย Microsoft Word for Windows หรือใช้ชนิดและขนาดตัวอักษรตามที่กำหนด

2.3 ไม่มีการส่งคืนต้นฉบับ

3. การลำดับเรื่องในต้นฉบับ

เพื่อให้ขั้นตอนการพิจารณาผลงานวิชาการ และการดำเนินการจัดพิมพ์วารสารเป็นไปอย่างเรียบร้อยรวดเร็ว และถูกต้อง จึงจำเป็นต้องให้ผู้เขียนผลงานวิชาการปฏิบัติตามข้อกำหนดอย่างเคร่งครัด ดังนี้

3.1 ให้ส่งต้นฉบับผลงานวิชาการจำนวน 1 ชุด และยังไม่ต้องส่งแผ่นบันทึกข้อมูล (Diskette)

3.2 ต้นฉบับผลงานวิชาการที่ส่งมา ให้ตรวจความถูกต้องของตัวสะกด รูปแบบการจัดพิมพ์ ผลงานวิชาการให้ถูกต้องตามที่กำหนด

3.3 ส่งแผ่นบันทึกข้อมูลมาให้ เมื่อผลงานวิชาการนั้นได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการวิจัยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ แล้วเท่านั้น โดยเลขคณะกรรมการวิจัยฯ จะแจ้งกลับไปยังเจ้าของผลงานวิชาการพร้อมส่งต้นฉบับเพื่อให้แก้ไขตามที่คณะกรรมการวิจัยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ให้ข้อเสนอแนะ

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

ชื่อผลงานวิชาการ.....
 ชื่อเจ้าของผลงาน.....
 ชื่อไฟล์.....
 ที่อยู่ เบอร์โทรศัพท์/E-Mail.....
 หรือส่งทาง Internet มายัง jureeratn@gmail.com

3.4 ต้นฉบับผลงานวิชาการที่ส่งให้คณะกรรมการวิจัย สทป. พิจารณา จะเป็นบทความที่จัดรูปแบบได้ถูกต้องตามที่กำหนดเท่านั้น หากผลงานวิชาการที่ส่งมาให้ไม่ถูกต้องตามข้อกำหนดจะจัดส่งคืนให้เจ้าของผลงานวิชาการกลับไปแก้ไขให้ถูกต้อง

3.5 ต้นฉบับที่จัดส่งมาต้องชัดเจน ทั้งเนื้อหาและรูปภาพประกอบผลงานวิชาการ โดยส่งมาที่

3.6 หรือติดต่อสอบถามได้ที่
 นางจตุพร พงษ์เพ็ง
 สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์
 ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง
 จ. ปทุมธานี 12000
 โทรศัพท์ 02-967-9791 หรือ 02-967-9792
 โทรสาร. 02-5011386
 ข้อมูลรายละเอียดเกี่ยวกับข้อแนะนำสำหรับ
 ผู้เขียนผลงานที่ได้ <http://www.dld.go.th/biotech>

4. การลำดับเรื่อง

4.1 ชื่อเรื่อง (Title) ควรตั้งชื่อให้สั้นและสื่อความหมายให้ดี และพิมพ์โดยใช้ขนาดตัวอักษร 18 และตัวหนา

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

4.3 บทคัดย่อ (Abstract) เขียนสั้นๆ ได้ เนื้อความคลุมวัตถุประสงค์ วิธีการ และผลการทดลอง ความยาวไม่ควรเกิน 3% ของตัวเรื่อง บทคัดย่อต้องมีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ แยกหน้าต่างหากจากกันส่ง บรรณาธิการวารสาร เทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ 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 หากเป็นไปได้ควรเสนอในรูปแบบของตารางหรือรูปภาพ หรือกราฟพร้อมทั้งบรรยายประกอบ ทั้งนี้ตาราง รูป หรือกราฟ ไม่ควรแสดงผลที่เหมือนกัน

- ตาราง (Tables) ควรพิมพ์ให้ชัดเจน
เหมาะกับหน้า ต้องมีความหมายในตัวเอง และมี
คำอธิบายตารางอยู่เหนือตารางนั้นๆ

- รูปภาพ (Figures) ควรเป็นภาพขาว –
ดำ ภาพสีหากจำเป็นผู้เขียนต้องเสียค่าใช้จ่ายเอง
อธิบายรายละเอียดไว้ใต้รูปนั้นๆ

4.5.4 วิจารณ์ (Discussion) เป็นการ
วิจารณ์ผลการทดลอง โดยมีจุดมุ่งหมาย เพื่อให้ผู้อื่น
เห็นคล้อยถึงหลักการที่แสดงออกมาจากผลการ
ทดลอง หรือเพื่อสนับสนุน หรือคัดค้านทฤษฎีที่มีผู้
เสนอมาก่อน หรือเพื่อเปรียบเทียบกับผลการ
ทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น ผู้เขียนควร
พยายามเน้นถึงปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของ
เรื่องที่กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อ
การวิจัยในอนาคตและสู่ทางที่จะนำไปใช้เป็น
ประโยชน์

4.5.5 สรุป (Conclusion) เขียนใจความที่
สำคัญและคุณค่าของงานเพื่อให้ผู้อ่านเข้าใจง่ายขึ้น

4.5.6 กิตติกรรมประกาศ
(Acknowledgement) ควรมีในกรณีที่ได้รับความ
ช่วยเหลือ หรือความร่วมมือที่สนับสนุนงาน
ค้นคว้าวิจัยนั้นๆ

4.5.7 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. กรณีที่อ้างอิงในเนื้อเรื่อง ควรอ้างอิง
ดังนี้คือ

1. กรณีที่อ้างจากการตรวจเอกสาร โดย
ผู้อื่นๆ ให้ใช้คำว่าอ้างถึงโดย (cited by)
2. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นคนไทย เมื่อ
เป็นประธานของประโยค ใช้ “วิบูรณ์ และ จุริรัตน์
(2549), เลิศชัย และคณะ(2549) กล่าวว่า.....” หรือ
เมื่อรายงานอยู่กลาง หรือท้ายประโยค ใช้ (วิบูรณ์,
2549) หรือมีเอกสารอ้างอิงในเรื่องเดียวกันมากกว่า

1 ฉบับ ให้ใช้ (ถาวรและคณะ, 2547; นริศ และสิน
สมุทร, 2543)

3. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นชาว
ต่างประเทศ เมื่อเป็นประธานของประโยค
ใช้ “Rudbeck and Dissing (1998), Kashi *et al.*
(1990) กล่าวว่า..... “ หรือเมื่อผู้รายงานอยู่ระหว่าง
กลางหรือท้ายประโยค ใช้ (Rudbeck and Dissing,
1998; Kashi *et al.*,1990)

4. กรณีอ้างถึงบุคคลหรือเรื่องที่ไม่เคยลง
พิมพ์มาก่อน (personal communication) ให้อ้าง
เฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปลงในรายชื่อ
เอกสารอ้างอิง เช่นsimilar results (Walker,J.M.,
unpublished data),for other protocols
(Walker,J.M., personal communication)

ข. การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง ควร
ขึ้นต้นเอกสารอ้างอิงภาษาไทยก่อน เขียนเรียง
ตามลำดับพยางค์ของชื่อผู้เขียน ถ้าเป็นภาษาอังกฤษ
ใช้ชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง แล้วตามด้วยปี
ชื่อเรื่องชื่อหนังสือ หรือชื่อย่อวารสาร ปีที่ ฉบับที่
และหน้าที่อ้างอิง ดังตัวอย่าง

วิบูรณ์ ตูลารักษา และ จุริรัตน์ แสนโกษณ์. 2549.
การสกัด ดีเอ็นเอ เซลล์รากขนในโคนมไทย
โสดสไต้น. การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์
ครั้งที่ 2 “ก้าวทันสมัยกับปศุสัตว์ไทย” วันที่ 24
มกราคม 2549. โรงแรมโซฟิเทล ขอนแก่น.
หน้า 452-463.

เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล
และกัลยา เก่งวิทย์กรรม. 2549. การประเมินวิธี
สกัดแยกดีเอ็นเอจากเลือด น้ำเชื้อ และเซลล์
รากขนของพ่อพันธุ์โค. สัตวแพทย์สาร. 56 (3)
:68-79. Jason, R. H. and Callings, D.F. 1971.

Transplacental infection of piglets with a porcine parvovirus. Res. Vet. Sci. 12: 570-572.

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

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

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

กรณีอ้างอิงจากเว็บไซต์ (Online references) ดังตัวอย่าง

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

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

5. การพิมพ์ผลงานทางวิชาการ

ตัวพิมพ์ ให้พิมพ์ดีด หรือใช้เครื่องพิมพ์ (Printer) หมึกพิมพ์ต้องเป็นสีดำ คมชัด สะดวกแก่การอ่านและใช้ตัวพิมพ์แบบเดียวกันทั้งฉบับ กรณีใช้เครื่องคอมพิวเตอร์พิมพ์เนื้อความให้ใช้ตัวอักษร

Angsana UPC 16 ตัวปกติเท่านั้น ยกเว้นหัวข้อใหญ่ เช่น ชื่อเรื่อง บทคัดย่อ บทนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผล วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 18 ส่วนหัวข้อย่อย เช่น ชื่อผู้วิจัยและคณะ คำสำคัญ ตาราง รูปภาพ เป็นต้น พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 16กระดาษที่ใช้พิมพ์ ให้ใช้กระดาษขาวไม่มีบรรทัด ขนาดมาตรฐาน A4 (210 X297 มม.) ใช้เพียงหน้าเดียว

การเว้นที่ว่างขอบกระดาษ

- ตั้งกั้นหน้าบนและซ้ายไว้ที่ 2.5 เซนติเมตร
- ด้านขวาและด้านล่างไว้ที่ 2.0 เซนติเมตร

การเว้นระยะในการพิมพ์

- การเว้นระยะระหว่างบรรทัดและการย่อ

หน้า ควรจัดตามความสวยงาม

- กรณีคำสุดท้ายไม่จบบรรทัดนั้นๆ ให้ยกคำนั้นทั้งคำไปพิมพ์ในบรรทัดต่อไป ไม่ควรตัดส่วท้ายของ คำไปพิมพ์ในบรรทัดใหม่ เช่น กระบือปลัก ไม่ให้แยกเป็น กระบือ-ปลัก เป็นต้น

จุลชีพ เช่น *Escherichia coli* หรือพิมพ์ตัวเอน

Escherichia coli

- หลังเครื่องหมาย . และ , หรือ; เคาะ 1 เคาะพืช 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.....ที่
กึ่งกลางหน้ากระดาษ

ตาราง รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ

- ตารางประกอบด้วย เลขที่ของตาราง (table
number) ชื่อของตาราง (table title) หัวตาราง (table
heading) และที่มาของตาราง (ถ้ามี) โดยให้ทำเป็น
ภาษาอังกฤษหรือภาษาไทยทั้งตาราง พิมพ์อยู่ใน
หน้าเดียวกันทั้งหมด

- กรณีตารางมีความยาวมาก ไม่สามารถ
สิ้นสุดในหน้าเดียวได้ ให้พิมพ์ส่วนที่เหลือในหน้า
ถัดไปโดยพิมพ์เลขที่ตารางและตามด้วยคำว่า (ต่อ)

- กรณีรูปภาพ แผนที่ แผนภูมิ กราฟ ควรเป็น
ภาพขาวดำ และใช้แนวทางข้างต้น

การพิมพ์ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิต ให้ใช้
ตามประมวลนามศาสตร์สากล (International code
of nomenclature) คือ **ขีดเส้นใต้** หรือ **พิมพ์ด้วยตัว
เอน** ชื่อวิทยาศาสตร์เป็นไปตามการตั้งชื่อ

สารบัญ

	หน้า
การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบยีน Butyrophilin และ DGAT1 ที่มีผลต่อองค์ประกอบและปริมาณน้ำมันในโคพันธุ์ทรอปิคอลไฮสไตน์ด้วยวิธี Real-time PCR (สาโรช งามขำ สายใจ ชื่นสุข)	1
การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบยีน Inhibin ที่มีผลต่ออัตราการตกไข่ในโคลูกผสมแองกัสด้วยวิธี Real-Time PCR (สายใจ ชื่นสุข วิษณุ ไพศาลรุ่งพนา อนนท์ เพื่องสันเทียะ)	14
ผลของ GnRH ต่ออัตราการผสมติดในแพะเนื้อลูกผสมที่เหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย CIDR-G® (ชาญยุทธ ภาพล จิตศักดิ์ เมืองเขียว อุบลรัตน์ วิชัยดิษฐ์ ณัฐพร จั๋ยจุลเจิม)	29
ประสิทธิภาพของฮอร์โมนเอฟเอสเอชและพีเอ็มเอสจี เมื่อใช้ร่วมกับ CIDR-G® ต่อการแสดงการเป็นสัดและอัตราการผสมติดในแพะ (สาโรช งามขำ พิระพงษ์ สำราญทรัพย์)	40
ระยะเวลาผสมเทียมหลังเหนี่ยวนำการเป็นสัดต่ออัตราการผสมติดในแพะเนื้อลูกผสม (กิตติศักดิ์ แสงสกุล สิ้นชัย วิโรจน์วุฒิกุล)	49
ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน PDC-109 ใน seminal plasma ของพ่อพันธุ์โคนมทรอปิคอลไฮสไตน์ ต่อความสามารถในการแช่แข็งน้ำเชื้อ (จรรยาพร รุ่งเรืองศักดิ์ วรพงษ์ พงษ์ศิริ)	58
ผลของวิธีการปั่นแยก seminal plasma ด้วยสารละลายเพอร์คอลลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรภายหลังการละลาย (วรพงษ์ พงษ์ศิริ จรรยาพร รุ่งเรืองศักดิ์)	75

การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบยีน Butyrophilin และ DGAT1 ที่มีผลต่อองค์ประกอบและปริมาณน้ำมันในโคพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ด้วยวิธี Real-time PCR

สาโรช งามขำ สายใจ ชื่นสุข

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบความถี่ของยีน Butyrophilin (BTN) และ Acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase1 (DGAT1) โดยใช้เทคนิค Real-Time PCR และความสัมพันธ์รูปแบบของยีนที่มีผลต่อปริมาณน้ำมันที่ 305 วัน เพอร์เซ็นต์ไขมันและเปอร์เซ็นต์โปรตีนของโคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์เพศเมียในเขตพื้นที่จังหวัดราชบุรีและสระบุรี จำนวน 170 ตัว ระหว่างเดือนมีนาคม 2558 ถึงกันยายน 2560 โดยเก็บตัวอย่างเลือดโคตัวละ 6 ซีซี ในหลอดเก็บเลือดที่มีสารกันเลือดแข็ง (EDTA) นำมาสกัดดีเอ็นเอ เพื่อศึกษารูปแบบและความถี่ของยีน BTN และ DGAT1 ด้วยวิธี Real-time PCR ระบุ genotype ของยีน allele และเก็บตัวอย่างน้ำมันเพื่อวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ไขมันและเปอร์เซ็นต์โปรตีนเดือนละ 1 ครั้งติดต่อกัน 10 เดือน ผลการศึกษาพบว่ารูปแบบของยีน BTN ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางพันธุกรรมของทุกลักษณะที่ศึกษา ในขณะที่รูปแบบของยีน DGAT1 มีความสัมพันธ์กับลักษณะทางพันธุกรรมของเปอร์เซ็นต์โปรตีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และอิทธิพลร่วมกันระหว่างรูปแบบของยีน BTN และ DGAT1 ไม่มีผลต่อลักษณะทางพันธุกรรมของทุกลักษณะที่ศึกษา อย่างไรก็ตามรูปแบบของยีน BTN และ DGAT1 สามารถตรวจสอบได้โดยวิธี Real-time PCR ซึ่งให้ผลที่แม่นยำและรวดเร็ว

คำสำคัญ: โคทรอปิคอลโฮลสไตน์ ปริมาณน้ำมัน วิธี Real-time PCR ยีน Butyrophilin ยีน DGAT องค์ประกอบน้ำมัน

เลขทะเบียนวิจัย: 57(1)-0208-013

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ อ. เมือง จ. ปทุมธานี

Genotypic Study of Butyrophilin and DGAT1 Gene Related to Milk Composition and Yield in Tropical Holsteins Using Real-Time PCR

Saroch Ngamkhum Saijai Cheunsuk

Abstract

The objective of this study was to analyze association between Butyrophilin gene (BTN), Acyl-CoA:diacylglycerolacyltransferase1 gene (DGAT1) by Real-Time PCR technic and 305-day milk yield, milk composition (%Fat and %Protein) from Dairy Farm in Saraburi and Ratchaburi province. One hundred and seventy crossbred Holstein primiparous cows were used and their blood samples were taken for the study during March 2016 to September 2017. Real-time PCR was used to identify the allele and genotype of genes. A general linear model and t-test significant differences were used to compare the mean of each trait between genotypes. The results found indicated that DGAT1 to associate with %FAT ($p=0.03$). Simultaneously, the association between genotype patterns of two genes on estimated breeding value shown that DGAT was associated with %Protein EBV ($p=0.01$) whereas another combined gene were not associated with estimated breeding value.

Key word: Tropical Holstein cow, milk yield, Real-time PCR, Butyrophilin gene, DGAT1 gene, milk composition

Registered No.: 57(1)-0208-013

Bureau of biotechnology in livestock production

คำนำ

อุตสาหกรรมโคนมและผลิตภัณฑ์นมในประเทศไทยมีการรับซื้อน้ำนมตามคุณภาพน้ำนม ดังนั้นการที่แม่โคนมสามารถผลิตน้ำนมที่มีคุณภาพและปริมาณที่สูง จะทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมมีรายได้สูงตามมาด้วย การปรับปรุงพันธุ์โคนมถือว่าเป็นเครื่องมือในการพัฒนาพันธุ์โคนมในประเทศ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ มีหน้าที่และความรับผิดชอบในการใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อปรับปรุงพันธุ์โคนมของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม เพื่อให้บรรลุถึงเป้าหมายของการเลี้ยงโคนมของเกษตรกรให้มีรายได้ดี ดังนั้น โปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์โคนมจะมุ่งเน้นให้ความสำคัญการปรับปรุงพันธุ์กรรมด้านผลผลิตและองค์ประกอบน้ำนมเป็นหลัก (Rychtarova *et al.*, 2014) การที่สามารถระบุยีนที่เป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรม (genetic marker) ของลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจได้แก่ปริมาณและองค์ประกอบน้ำนมแล้วนำมาคัดเลือกโคนมเพื่อใช้ในการปรับปรุงพันธุ์เป็นวิธีหนึ่งที่ได้รับคามนิยมและมีประสิทธิภาพมากในปัจจุบัน (Zhu and Zhao, 2007)

Butyrophilin (BTN) เป็น acidic glycoprotein ชนิดหนึ่งซึ่งพบได้ในปริมาณมากกว่า 40% ของ total milk fat globule membrane protein ในโค (Mather *et al.*, 1980) และมีส่วนสำคัญในการช่วยขับหลังไขมันในน้ำนมของเต้านมระหว่างช่วงการให้นม (Jack and Mather, 1990) การแสดงออกของยีน BTN จะพบจำเพาะในเต้านมและเฉพาะในช่วงการให้น้ำนมเท่านั้น (Franke *et al.*, 1981) มีการศึกษาโดย Bhattacharya *et al.* (2006) พบว่าลักษณะที่แตกต่างกันภายในยีน BTN (genotypic difference) ทั้งสิ้น 3 แบบ (AA, AB, และ BB) มีผลต่อการสร้างไขมันในน้ำนมโคสายพันธุ์ผสมระหว่าง Holstein Friesian และ Hariana ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานผลการทดสอบความสัมพันธ์ของยีนนี้กับการสร้างไขมันในน้ำนมโคสายพันธุ์ Jersey โดย Komisarek *et al.* (2006) ทั้งนี้การทดสอบของทั้ง 2 คณะใช้เทคนิค PCR-RFLP ในการตรวจสอบ เช่นเดียวกับ ยีน Acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase1 (DGAT1) ที่จัดอยู่ในกลุ่มยีนที่ควบคุมขบวนการสร้างไตรกลีเซอไรด์ซึ่งเป็นแหล่งเก็บพลังงานที่สำคัญของร่างกายและสามารถพบได้ในปริมาณสูงถึง 95% ในไขมันนม (Jensen, 2002; Farese *et al.*, 2000) การศึกษายีนนี้โดยวิธี PCR-RFLP ในโคหลายสายพันธุ์พบว่าโคพันธุ์เจอร์ซี (Komisarek *et al.*, 2004) พันธุ์ Holstein-Friesian (Winter *et al.*, 2002; Pareek *et al.*, 2005) พันธุ์ Brazilian (Lacorte *et al.*, 2006) พบว่ายีน BTN มีความสัมพันธ์ในการควบคุมลักษณะองค์ประกอบโปรตีนนมและไขมันนมในโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ (Saijai *et al.*, 2553) และมีส่วนสำคัญในการช่วยขับหลังไขมันในน้ำนมของเต้านมระหว่างช่วงการให้นม (Jack and Mather, 1990)

ในขณะที่ยีน DGAT1 พบว่าเป็นยีนหลักยีนหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาเต้านมของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพศเมียขณะกำลังเจริญเติบโต (Smith *et al.*, 2000) และ ยังมีบทบาทสำคัญในการสร้างเอ็นไซม์ Acyl-CoA diacylglycerol acyltransferase ซึ่งมีความสำคัญในขบวนการเมตาบอริซึมของ triglyceride ในร่างกาย เช่น การดูดซึม triglyceride ในลำไส้ การสร้าง adipose tissue และการสร้างน้ำนมเมื่อสัตว์คลอดลูก (Cases *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2000) พบว่าหนูเพศเมียที่ถูกสกัดกั้นการแสดงออกของยีน DGAT1 ไม่สามารถหลั่งน้ำนมได้เมื่อคลอดลูก ในโคนมยีน DGAT1 มีตำแหน่งอยู่ที่ส่วนปลาย (3 cM) ของโครโมโซมคู่ที่ 14 (Farnir *et al.*, 2002) ซึ่งต่อมาพบว่าบน exon xiii ของ DGAT gene มีการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสที่ทำให้การถอดรหัสอะมิโนแอซิด เปลี่ยนจาก Lysine เป็น Alanine (Spelman *et al.*, 2002; Thaller *et al.*, 2003; Weller *et al.*, 2003) การเปลี่ยนแปลงนี้มีผลต่อลักษณะการให้น้ำนมในโคนมที่พบได้ในพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชียน ทั้งสายพันธุ์ เยอรมัน โปแลนด์ นิวซีแลนด์ อิสราเอล และในโคบราซิล (Thaller *et al.*, 2003; Spelman *et al.*, 2002; Lacorte *et al.*, 2006; Szyda and Komisarek, 2007) ทั้งนี้ผลของการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสต่อปริมาณน้ำนม ไขมัน โปรตีน และเปอร์เซ็นต์ ไขมัน โปรตีน แตกต่างกันไปในแต่ละประชากร

ปัจจุบันใช้เทคนิค PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) เป็นวิธีเพื่อตรวจหาลักษณะที่แตกต่างในระดับเบสของสายดีเอ็นเอของยีน แต่การตรวจด้วยวิธีนี้จะใช้เวลา 2-3 วันและมีหลายขั้นตอนในการตรวจไม่เหมาะสมในการปฏิบัติงาน เพราะอาจเกิดการปนเปื้อนของตัวอย่างและความผิดพลาดระหว่างขั้นตอนได้มาก เทคนิค Real-time PCR ซึ่งได้ถูกพัฒนาขึ้นเป็นวิธีเพื่อลดปัญหาดังกล่าว โดยอาศัยหลักการใช้ probe ติดตามเรืองแสง ที่ได้รับการออกแบบจำเพาะเพื่อค้นหาการเปลี่ยนลำดับเบสที่ต้องการตรวจ ทำให้การตรวจให้ผลแม่นยำและรวดเร็ว ลดขั้นตอนการปฏิบัติงาน

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษารูปแบบและความถี่ของยีน BTN และ DGAT1 ในโคนมทรอปิคอลไฮลอสไนด์เพศเมีย โดยใช้เทคนิค Real-Time PCR และความสัมพันธ์ของแต่ละรูปแบบของยีนที่มีต่อปริมาณเปอร์เซ็นต์ไขมันและเปอร์เซ็นต์โปรตีนของน้ำนม ซึ่งจะทำให้ทราบรูปแบบของยีนที่มีผลต่อการผลิตน้ำนมทั้งปริมาณและคุณภาพในโคนมส่วนใหญ่ของประเทศที่กรมปศุสัตว์ให้บริการ แนะนำและส่งเสริมการเลี้ยงโคเกษตรกรให้สามารถผลิตน้ำนมได้มีประสิทธิภาพทั้งปริมาณและคุณภาพเพราะการปรับปรุงพันธุ์ที่กรมปศุสัตว์จะพัฒนาขึ้นโดยลำดับ

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

โคนมเพศเมียที่มีการให้ผลผลิตครั้งแรก มีอายุเฉลี่ยในช่วง 2-3 ปี จากฟาร์มเกษตรกรที่เข้าร่วมโครงการผลิตฟอสโคนมทรอปิคอลไฮลอสไนด์ในเขตจังหวัดราชบุรีและสระบุรี จำนวน 170 ตัว ที่มีข้อมูลการเก็บตัวอย่างน้ำนมตลอดระยะเวลาการให้นมได้รับการถ่ายพยาธิ ฉีดวัคซีนตามโปรแกรม และได้รับอาหาร แร่ธาตุตามสภาพการเลี้ยงในแต่ละฟาร์ม เก็บตัวอย่างเลือดเพื่อศึกษารูปแบบและความถี่ของยีน BTN และ DGAT1 จากเส้นเลือดดำที่บริเวณโคนหางจำนวน 6 ซีซี ในหลอดเก็บเลือดที่มีสารกันเลือดแข็ง (EDTA) เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ และเก็บตัวอย่างน้ำนมเพื่อวิเคราะห์คุณภาพน้ำนมเดือนละ 1 ครั้งติดต่อกัน 10 เดือน ซึ่งดำเนินการตั้งแต่เดือนมีนาคม 2558 ถึงเดือนกันยายน 2560

การสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างเลือดทั้งหมดถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C ก่อนนำมาสกัด genomic DNA ด้วยชุดสกัด DNA สำเร็จรูป (QIAGEN Genomics DNA Extraction Kit, QIAGEN. USA) ตัวอย่างทั้งหมดถูกเก็บไว้ในสารละลาย TE buffer และทำการวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA ให้มีค่า OD ที่ 260/280 ระหว่าง 1.6-1.8 ด้วย Microvolume Spectrophotometer (Nanodrop, DeNovix.USA)

การทดสอบรูปแบบยีน BTN และ DGAT1 ด้วยปฏิกิริยา PCR-RFLP

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือดของโคมาเพิ่มขยายชิ้นส่วน DNA (PCR) ตามวิธีของ Saijai *et al.*, 2553 และ Jureeratn *et al.*, 2553 ดังนี้

การวิเคราะห์ยีน BTN ใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 5 µl (20 ng), 10xPCR buffer 2 µl, Forward primer: btnF(TGGAGCTCTATGGAAATGGG) และ Reverse primer: btnR(TACCCAACAGGAAGAAACAG) อย่างละ 2 µl (0.2 µM) Platinum Taq DNA polymerase 0.5 µl (1 unit) dNTPs 5 µl (0.2 mM) MgCl₂ 1.5 µl (1.5 mM) distilled water 7 µl ปริมาตรรวม 20 µl และ PCR condition คือ pre-denaturation 95°C นาน 5 นาที denaturation 95°C นาน 30 วินาที annealing 65°C นาน 60 วินาที และ extension 72°C นาน 60 วินาที จำนวน 35 รอบ ตามด้วย 72°C นาน 5 นาที จากนั้นนำผลผลิต PCR (PCR product) ที่ได้จากขั้นตอนการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาทำ purification โดยใช้ NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel. Germany) จากนั้นนำมาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ Hae III โดยมีปริมาณดีเอ็นเอ 20 µl (10ng/µl), reaction buffer 2.5 µl, enzyme 2 µl, distilled water 0.5 µl ปริมาตรสุดท้าย 25 µl หลังจากนั้น incubate

ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 ชั่วโมงแล้วนำมาย้อมสีด้วย GelRed Loading Buffer (Biotium, USA) ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 2% (w/v) agarose gel ที่ 100 V นาน 30 นาที ตรวจขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel-Doc system (Alpha image 3400, USA)

การวิเคราะห์ยีน DGAT1 ใช้ปริมาณดีเอ็นเอ 5 µl(20 ng), 10xPCR buffer 2µl, Forward primer: DGAT1-F(GCACCATCCTCTTCTCAAG) และ Reverse primer: DGAT1-R (GGAAGCGCTTTCGGATG) อย่างละ 2 µl(0.5 µM) Platinum Taq DNA polymerase 0.5 µl(0.8 unit)dNTPs 5 µl(0.2 mM) MgCl₂ 1.5 µl(1.5 mM) distilled water 7 µl ปริมาตรรวม 20 µl และ PCR condition คือ pre-denaturation 94°C นาน 4 นาที, denaturation 94°C นาน 60 วินาที, annealing 66°C นาน 60 วินาที (ลดอุณหภูมิลงรอบละ 1°C) และ extension 72°C นาน 60 วินาที ตามด้วย pre-denaturation 94°C นาน 4 นาที, denaturation 94°C นาน 60 วินาที, annealing 60°C นาน 60 วินาที และ extension 72°C นาน 60 วินาที จำนวน 25 รอบ และ 72°C นาน 10 นาที นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นตอนการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอมาทำ purification เช่นเดียวกับยีน BTN จากนั้นนำมาตัดโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ *Cfr*I โดยมีปริมาณดีเอ็นเอ 20 µl (10ng/µl), reaction buffer 2.5 µl, enzyme 2 µl, distilled water 0.5 µl ปริมาตรสุดท้าย 25 µl หลังจากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 ชั่วโมงแล้วนำมาย้อมสีด้วย GelRed Loading Buffer (Biotium, USA) ทำอิเล็กโตรโฟรีซิสใน 5% (w/v) denaturing polyacrylamide gel ตรวจขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วย silver staining K232A

การตรวจสอบลำดับเบสของยีน BTN และ DGAT1 เพื่อออกแบบไพรเมอร์และโพรบ (primers and probes) สำหรับปฏิกิริยา Real-time PCR

นำตัวอย่างดีเอ็นเอโคที่ได้ออกทดสอบ genotype จากปฏิกิริยา PCR-RFLP มาทำการหาลำดับเบสด้วยวิธี automated dye-terminator cycle sequencing method with AmpliTaq DNA polymerase โดยใช้เครื่อง ABI 3130 DNA Analysis Sequencer (ABI, USA) และวิเคราะห์ตำแหน่ง SNP ด้วยโปรแกรม the BLAST Sequence Analysis program (National Center for Biotechnology Information, NCBI, USA) เพื่อใช้ออกแบบ TaqMan MGB-probes (minor groove binding probes) fluorescence real-time PCR ด้วย Primer 5 software โดยใช้สีฟลูออเรสเซนต์ชนิด VIC และ FAM (GENEPLUS, USA) (Table 1)

Table 1 Real time PCR-Probes for BTN and DGAT1 gene underline/italic letter represented SNP polymorphisms

Gene	Primers	Sequence (5' → 3')
BTN	F-Rt	CGGCCCTTCTTCTGCTTGT
	R-Rt	CATCAGTGACTGGGCAGATAGT
	Report-1	(VIC) - CTGTGGTAAAA <u>A</u> GCCCCT
	Report-2	(FAM) – TGTGGTAAAA <u>G</u> GCCCCT
DGAT1	F-Rt	CGCTTGCTCGTAGCTTTGG
	R-Rt	CGCGGTAGGTCAGGTTGTC
	Report-1	(VIC) - CGTTGGCC <u>II</u> CTTACC
	Report-2	(FAM) – TTGGCC <u>GC</u> CTTACC

การทดสอบรูปแบบยีน BTN และ DGAT1 ด้วยปฏิกิริยา Real-time PCR

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดจากเลือดโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ทั้งหมด 170 ตัวอย่าง มาทดสอบ genotype ของทั้ง 2 ยีน ด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้ชุดตรวจ CustomTaqMan SNP Genotyping Assay

(GENEPLUS, USA.) และเครื่อง Step One Plus Real-time PCR System (GENEPLUS, USA.) ดังนี้ ปริมาณดีเอ็นเอ 20 ng 2X TaqMan Genotyping MasterMix 5 µl, 40X Assay Mix cDNA 0.25 µl ปริมาตรสุดท้าย 10 µl และ PCR condition คือ pre-denaturation 95°C นาน 10 นาที, denaturation 95°C นาน 15 วินาที, annealing และ extension 60°C นาน 60 วินาที จำนวน 50 รอบ

การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำนม

การเก็บตัวอย่างน้ำนมสำหรับการตรวจวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ไขมัน และเปอร์เซ็นต์โปรตีนเดือนละครั้ง ตั้งแต่หลังคลอดจนถึงแห้งนม และตรวจวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ไขมัน และเปอร์เซ็นต์โปรตีนของน้ำนมด้วยเครื่อง combifossft+ (Foss, Denmark)

การวิเคราะห์ทางสถิติ:

การวิเคราะห์ข้อมูลพันธุกรรมของลักษณะที่ศึกษาประเมินค่าทางพันธุกรรม (Breeding value, BV) และค่า Yield deviation (YD) ของลักษณะปริมาณน้ำนม เปอร์เซ็นต์ไขมัน และเปอร์เซ็นต์โปรตีน ด้วยโปรแกรม BLUPF90 and AIREMLF90 programs โดยใช้ BLUPF90-DairyPAK3.0 (Misztal *et al.*, 2002). ด้วยโมเดลวิเคราะห์หา Heterozygosity ของ allele frequency โดยใช้หลัก Hardy-Weinberg Law

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

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ศึกษาอิทธิพลของ Allele substitution ของยีนส์ BTN และ DGAT1 ต่อปริมาณน้ำนม เปอร์เซ็นต์ไขมัน และเปอร์เซ็นต์โปรตีน โดยวิธี Generalized Linear Model (Henderson, 1984) ที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษารูปแบบยีน BTN ใช้วิธี Real-time PCR ตรวจการเพิ่มขึ้นของ PCR product โดยการออกแบบ Probe และ Primer ที่มีความจำเพาะต่อ SNPs ของยีนและการวัดปริมาณสี fluorescence 2 ชนิด ได้แก่ allele A ด้วย VIC-fluorescence dye (กราฟสีเขียว) และ allele B ด้วย FAM-fluorescence dye (กราฟสีน้ำเงิน) (Figure 1) เช่นเดียวกับยีน DGAT1 ปฏิบัติ Real-time PCR สามารถตรวจ SNP ของยีน (Figure 2)

Genotype ของยีน BTN ในประชากรโคทรอปิคอลโฮลสไตน์ในการทดลองนี้สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ AA และ AG โดยมีจำนวน 136 และ 34 ตัว คิดเป็นความถี่ 0.80 และ 0.20 ตามลำดับ โดยมีความถี่ของ allele A และ G คือ 0.90 และ 0.3 ซึ่งไม่พบลักษณะ Genotype แบบ GG เลย (Table 2) ในขณะที่ genotype ของยีน DGAT1 สามารถพบได้ 3 กลุ่ม คือ AA AG และ GG ซึ่งมีจำนวน 1888 และ 64 ตามลำดับ คิดเป็นความถี่ 0.110.51 และ 0.38 ตามลำดับ โดยมีความถี่ของ allele A และ G คือ 0.36 และ 0.64 (Table 3) เมื่อพิจารณาสภาพความสมดุลของยีน (Equilibrium of genes) พบว่าการกระจายตัวของทั้งยีน BTN และ DGAT1 ไม่มีความสมดุลตามหลักสมการ Hardy-Weinberg ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการปรับปรุงพันธุ์โดยโคเหล่านี้เป็นโคที่เกิดจากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์โคจากโครงการผลิตพ่อพันธุ์โคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์ของกรมปศุสัตว์ ทำให้การผสมพันธุ์ไม่เป็นไปอย่างสุ่ม (non-random mating) นอกจากนี้การคัดเลือก (selection) ตามลักษณะปรากฏของตัวสัตว์ (phenotype) ที่ต้องการเพื่อนำมาเป็นพ่อแม่พันธุ์ที่จะใช้สร้างพันธุ์ต่อไป เช่น ลักษณะการให้น้ำนม ปริมาณน้ำนม เป็นต้น ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนหรือเกิดการสูญหายของยีน (สุรินทร์, 2552)

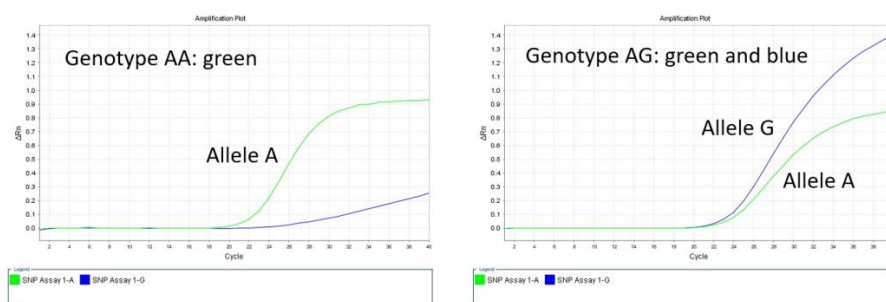


Figure 1 Real-time PCR genotyping for BTNgene of Tropical Holstein cows. VIC-fluorescence dye (green) and FAM-fluorescence dye (blue) indicated allele A and G, respectively. Graph presented 2 genotypes as AA and AG.

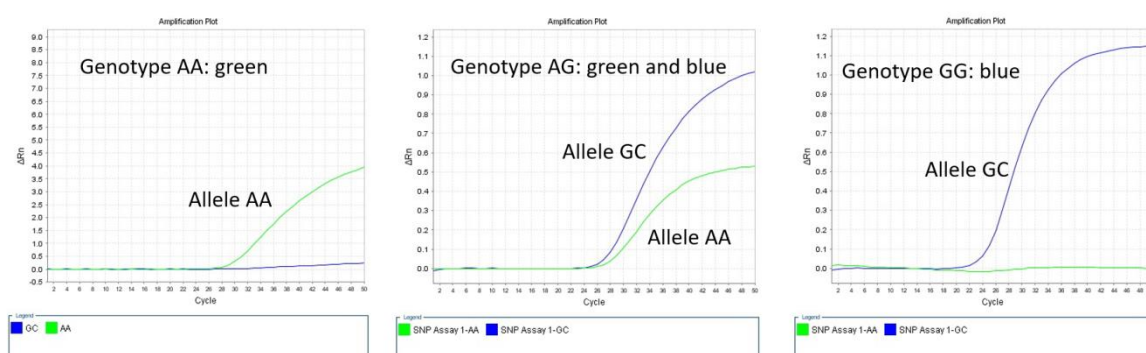


Figure 2 Real-time PCR genotyping for DGAT1gene of Tropical Holstein cows. VIC- fluorescence dye (green) and FAM- fluorescence dye (blue) indicated allele AA and GC, respectively. Graph presented 3 genotypes as AA, AGand GG.

Table 2 Genotype and gene frequencies of the BTN gene in 170Tropical Holsteincows.

Genotypes	n	genotypic frequency
AA	136	0.80
AG	34	0.20
GG	0	0.0
Allele	allele frequency	
A	0.90	
G	0.10	

Table 3 Genotype and gene frequencies of the DGAT1 gene in 170 Tropical Holsteincows.

Genotypes	n	genotypic frequency
AA	18	0.11
AG	88	0.51
GG	64	0.38
Allele	allele frequency	
A	0.36	
G	0.64	

Table 4 Descriptive statistics of the data of 170 dairy cows.

Traits	Mean	SD	Min	Max
Milk 305 day (kg)	4,384.12	1,423.05	1,460.94	8,526.70
Fat (%)	3.56	1.12	1.11	6.65
Protein (%)	3.04	0.20	2.45	3.62

ค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำนมที่ 305 วันเปอร์เซ็นต์ไขมันและเปอร์เซ็นต์โปรตีนมีค่าเท่ากับ 4,384.12 กก. 3.56% และ 3.04% ตามลำดับ (Table 4) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของวันทนาและคณะ (2558) และสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ (2560)

Table 5 Effect of genotype gene markers on 305-day Milk yield, Fat and Protein (Least square means $\pm$ Standard error)

Gene	Genotype	Milk yield	Fat(%)	Protein(%)
DGAT	AA	4,711.23 $\pm$ 390.56	3.89 $\pm$ 0.33 ^a	3.05 $\pm$ 0.06
	AG	4,265.24 $\pm$ 232.32	3.68 $\pm$ 0.20 ^a	3.08 $\pm$ 0.03
	GG	4,085.40 $\pm$ 272.55	3.24 $\pm$ 0.23 ^b	3.04 $\pm$ 0.04
	P-value	0.23	0.03	0.44
BTN	AA	4,239.44 $\pm$ 231.96	3.54 $\pm$ 0.20	3.05 $\pm$ 0.03
	AG	4,468.48 $\pm$ 313.50	3.67 $\pm$ 0.27	3.06 $\pm$ 0.05

P-value	0.39	0.57	0.90
---------	------	------	------

^{a,b}within a column in each gene with no common superscript are significant difference (P<0.05)

ผลการศึกษาในครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของยีน BTN กับค่าปริมาณน้ำนมที่ 305 วัน เพอร์เซ็นต์ไขมัน และเปอร์เซ็นต์โปรตีน ดังแสดงใน Table 5 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Saijai *et al.* (2553) วันทนาและคณะ (2558) และ Rychtarova *et al.* (2014) ที่ไม่พบความสัมพันธ์เช่นกันแสดงว่ารูปแบบของยีน BTN ไม่สามารถใช้เป็นตัวบ่งบอกความสามารถในการให้ผลผลิตน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมได้ ในขณะที่รูปแบบของยีน DGAT1 พบว่ามีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์ไขมัน โดยลักษณะ genotype GC/GC มีเปอร์เซ็นต์ไขมันต่ำสุด แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำนมที่ 305 วัน และเปอร์เซ็นต์โปรตีน อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Molee *et al.* (2012) พบว่ารูปแบบของ GC/GC มีผลต่อลักษณะขององค์ประกอบของนมทั้งหมดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งเป็นประชากรแม่โคนมลูกผสมโฮลสไตน์เช่นกันซึ่งแตกต่างจากศึกษาครั้งนี้เพราะประชากรโคนมเป็นของเกษตรกรที่มีการจัดการที่แตกต่างกันในแต่ละฟาร์มผลการศึกษาความสัมพันธ์รูปแบบยีน BTN และ DGAT1 กับค่าการผสมพันธุ์ พบว่าไม่มีความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของยีน BTN กับค่าการผสมพันธุ์ลักษณะปริมาณน้ำนมที่ 305 วัน เพอร์เซ็นต์ไขมัน และเปอร์เซ็นต์โปรตีน แต่รูปแบบของยีน DGAT1 มีความสัมพันธ์กับค่าการผสมพันธุ์ลักษณะเปอร์เซ็นต์โปรตีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05)

ความสัมพันธ์ของรูปแบบ genotype โดยการรวมยีนเครื่องหมายเข้าด้วยกัน (combined genes) กับค่าการผสมพันธุ์ในลักษณะที่ศึกษาต่างๆ (Table 6) พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน ดังนั้นอิทธิพลของรูปแบบยีน DGAT1 ในการศึกษานี้ไม่สูงจนสามารถใช้ในการคัดเลือกเพื่อเพิ่มองค์ประกอบที่สำคัญในน้ำนมได้ เนื่องจากลักษณะการให้ผลผลิตและค่าองค์ประกอบน้ำนมมียีนที่ควบคุมลักษณะการแสดงออกหลายยีน และภายใต้การจัดการจัดการของฟาร์มที่ศึกษาครั้งนี้อาจจะทำให้การแสดงออกของยีนทั้งคู่ไม่ส่งผลต่อความแปรปรวนขององค์ประกอบและปริมาณน้ำนม (สมศักดิ์และเริงวุฒิ, 2561) อย่างไรก็ตามอิทธิพลของรูปแบบ GC/GC ในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์อาจไม่สูงจนสามารถใช้ในการคัดเลือกเพื่อเพิ่มองค์ประกอบที่สำคัญในน้ำนมได้ ซึ่งอาจมีสาเหตุจากอิทธิพลระหว่างยีนที่อยู่ต่างตำแหน่งกันมีผลต่อการแสดงออกของยีน ทั้งนี้เนื่องจากโครงสร้างพันธุกรรมของโคลูกผสมโฮลสไตน์ส่วนหนึ่งประกอบด้วยสายเลือดโคพื้นเมือง อาจมีพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบน้ำนมต่ำ และพันธุกรรมดังกล่าวอาจมีผลต่อการแสดงออกของยีนนี้ (ณัฐญา, 2555; Lillehammer *et al.*, 2009) ยังพบผลกระทบที่สำคัญของปฏิสัมพันธ์ระหว่างสภาพแวดล้อมและการแสดงออกของยีน ดังนั้นก่อนที่ genotype GC/GC จะสามารถนำมาใช้ในโปรแกรมปรับปรุงพันธุ์ได้ควรศึกษาผลกระทบนอกจากนี้การแสดงออกของยีนนี้ขึ้นกับการจัดการอาหารสัตว์และสภาพแวดล้อมอื่น ๆ (Hayes *et al.*, 2003; Lillehammer *et al.*, 2009; Hammami *et al.*, 2009)

Table 6 Effect of genotype gene markers on estimated breeding value 305-day Milk yield, %Fat and %Protein (Least square means $\pm$ Standard error)

Gene	Genotype	Milk yield	%Fat	%Protein
DGAT	AA	62.57 $\pm$ 164.60	-0.04 $\pm$ 0.05	0.00 $\pm$ 0.02 ^{ab}
	AG	90.38 $\pm$ 57.32	-0.02 $\pm$ 0.02	0.01 $\pm$ 0.01 ^a

	GG	77.55±75.69	-0.06±0.03	-0.03±0.01 ^b
	P-value	0.98	0.46	0.01
BTN	AA	145.33±47.91	-0.01±0.02	-0.02±0.01
	AG	8.33±117.27	-0.07±0.04	0.00±0.02
	P-value	0.28	0.15	0.25
Combine	AA/AA	232.59±116.39	0.02±0.04	-0.01±0.02
DGAT- BTN	AA/AG	-107.46±307.93	-0.09±0.10	0.01±0.04
	GC/AA	101.03±56.22	0.00±0.02	-0.02±0.01
	GC/AG	79.72±99.91	-0.05±0.03	0.03±0.01
	GC/AG	102.38±62.86	-0.05±0.02	-0.03±0.01
	GC/AG	52.71±137.71	-0.07±0.05	-0.04±0.02
	P-value	0.66	0.76	0.12

a,b/within a column in each gene with no common superscript are significant difference (P<0.05)

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษพบว่ารูปแบบของยีน BTN ไม่มีความสัมพันธ์กับค่าการผสมพันธุ์กับทุกลักษณะที่ศึกษา ในขณะที่รูปแบบของยีน DGAT1 มีความสัมพันธ์กับค่าการผสมพันธุ์ของลักษณะเปอร์เซ็นต์โปรตีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) และอิทธิพลร่วมระหว่างรูปแบบของยีน DGAT1 และ BTN ไม่มีผลต่อค่าการผสมพันธุ์ของปริมาณน้ำมัน เปอร์เซ็นต์ไขมันและเปอร์เซ็นต์โปรตีน อย่างไรก็ตามรูปแบบของยีนBTN และ DGAT1 สามารถตรวจสอบได้โดยวิธี Real-time PCR ซึ่งให้ผลที่แม่นยำและรวดเร็ว

เอกสารอ้างอิง

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์. 2560 สมุดพ่อดัชนี 2560 ISSN : 974-682-193-8
 ณัฐญา, ดวงหะคลัง . 2555. อิทธิพลของยีน Acyl-CoA : diacylglycerol acyl transferase1 (DGAT1) ต่อ
 ลักษณะผลผลิตน้ำมันและยีน Gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR) ต่อ
 ลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ในประชากรโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชียน. วิทยานิพนธ์.
 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.นครราชสีมา. 83 หน้า
 วันทนา เจริญโอสธ ก้องเกียรติ ศรีสุวรรณ มนต์ชัย ดวงจินดา ทองสา บัวสุข ศรีนวล คณานิตย์ และ วุฒิไกร บุญ
 คุ่ม. 2558. การศึกษาความสัมพันธ์ของยีนเครื่องหมายต่อการให้ผลผลิตน้ำมันมอดค์ประกอบ
 น้ำมัน และสมดุลพลังงานในโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์. ว. แก่นเกษตร. 43: 245-254.

- สมศักดิ์ เปรมปรีดิ์ และเริงวุฒิ วรวุฒิ. 2561. ผลกระทบของอิทธิพลร่วมระหว่างพันธุกรรมกับสิ่งแวดล้อมต่อการให้ผลผลิตน้ำนมของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชียนในพื้นที่ภาคตะวันตกของประเทศไทย. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ปีที่ 9 ฉบับพิเศษ พ.ศ. 2557-2561
- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- Bhattacharya, T.K., S.S. Misra, Sheikh, D. Feroz, S. Sukla, P. Kumar, and A Sharma. 2006. Effect of Butyrophilin Gene Polymorphism on Milk Quality Traits in Crossbred Cattle. Asian-Aust. J. Anim. Sci. Vol.19, No.7: 922-926.
- Cases, S., S.J. Smith, Y. Zheng, H.M. Myers, S.R. Lear, and E. Snnde. 1998. Identification of a gene encoding an acyl CoA: diacylglycerolacyltransferase, a key enzyme in triglycerol synthesis. Proc Natl Acad Sci USA: 95: 13018-13023.
- Franke, W.W., H.W. Heid, C. Grand, S. Winter, C. Freudenstein, E. Schmid, E.D. Jarasch, and K.W. Keenan. 1981. Antibodies to the major insoluble milk fat globule membranes-associated protein: specific location in apical regions of lactating epithelial cells. J. Cell Biol. 89: 485-494.
- Farese JR, RV., Cases, and S.J Smith. 2000. Triglyceride synthesis: insights from the cloning of diacylglycerolacyltransferase. Current Opinion in Lipidology. 11: 229-234.
- Farnir, F., B. Grisart, W. Coppieters, J. Riquet, P. Berzi, N. Cambisano, L. Karim, M. Mni, P. Simon, D. Waggenaar, J. Vikki, and M. George. 2002. Simultaneous mining of linkage and LD to fine map QTL in outbred half-sib pedigrees: Revisiting the location of a QTL with major effect on milk production on bovine. Genetics. 161: 275-287.
- Hayes, B. J., Carrick, M., Bowman, P., Goddard, M.E., 2003. Genotype x environment interaction for milk production of daughters of Australian dairy sires from test-day records. J. Dairy Sci., 86, 3736-3744.
- Hammami, H., B. Rekik, C. Bastin, H. Soyeurt, J. Bormann, J. Stoll, N. Gengler, 2009. Environmental sensitivity for milk yield in Luxembourg and Tunisian Holsteins by herd management level. Journal Dairy Science, 92, 4604-4612.
- Henderson, C. R. 1984. Applications of linear models in animal breeding. University of Guelph, Ontario, Canada
- Jack, L. J.W. and I.H. Mather. 1990. Cloning and analysis of cDNA encoding bovine butyrophilin, an apical glycoprotein expressed in mammary tissue and secreted in association with the milk-fat globule membrane during lactation. J. Bio. Chem. 265: 14481-14486.
- Jensen, R.G. 2002. The composition of bovine milk lipids: January 1995 to December 2000. J. of Dairy Science. 85: 295-350.
- Jureeratn, S., B. Sayan, and T. Kanokporn. 2553. Effect of DGAT1 Major Gene on Milk Production and Quality Traits in Thai- Holstein Dairy Crossbred. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ปีที่ 5 ฉบับที่ 1 มิถุนายน 2553 หน้า 9-20.

- Komisarek, J., K. Waskowicz, A. Michalak, and Z. Dorynek. 2004. Effects of DGAT1 variants on milk production traits in Jersey cattle. *Ani.Sci.Paper and Report*. Vol. 22 (3): 307-313.
- Komisarek, J., K. Waskowicz, and Z. Dorynek. 2006. Analysis of the relationship between two single nucleotide polymorphisms of the butyrophilin (*BTN1A1*) gene and milk production traits in Jersey cattle. *Ann. Anim. Sci.*, Vol. 6, No.1:45-52.
- Lacorte, G.A., M.A. Machado, M.L. Martinez, A.L. Campos, R.P. Maciel, R.S. Verneque, R.L. Teodoro, M.G.C.D. Peixoto, M.R.S. Carlvalho, and C.G. Fonseca. 2006. DGAT1 K232A polymorphism in Brazilian cattle breeds. *Genetics and Molecular Research*. Online. <http://www.funpecrp.com.br> [access date: 24/7/2007].
- Lillehammer, M., B.J. Hayes, T. H. E. Meuwissen, and M. E. Goddard. 2009. Gene by environment interactions for production traits in Australian dairy cattle *Journal Dairy Science*, 92,4008–4017.
- Mather, I.H., C.B. Tamplin, and M.G. Irving. 1980. Separation of the proteins of bovine milk-fat globule membrane by electrofocusing with retention of enzymatic and immunological activity. *Eur. J. Biochem.* 110: 327-336.
- Misztal I., S. Tsuruta, T. Strabel, B. Auvray, T. Druet, and D. Lee. 2002. BLUPF90 and related programs (BGF90), in *Proceedings of the 7th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production*, Communication Montpellier: 28–27.
- Molee A., N. Duanghaklang, and P. Na-Lampang. 2012. Effects of Acyl-CoA: diacylglycerol acyl transferase 1 (DGAT1) gene on milk production traits in crossbred Holstein dairy cattle. *Tropical Animal Health and Production* 44: 751-755.
- Pareek, C.S., U. Czarnik, T. Zabolewicz, R.S. Pareek, and Walawski. 2005. DGAT1 K232A Quantitative Trait Nucleotide Polymorphism in Polish Black-and-White Cattle. *J. Appl. Genet.* Vol. 46 (1): 85-87.
- Rychtarova J., Z. Sztankoova, J. Kyselova, V. Zink, M. Stipkova, M. Vacek, and L. Stolc. 2014. Effect of DGAT1, BTN1A1, OLR1 and STAT1 genes on milk production and reproduction traits in the Czech Fleckvieh breed. *Czech J. Anim. Sci.* 59: 45-53.
- Saijai C., S. Nachai, and K. Kalaya. 2553. Genotypic Effect of Butyrophilin Gene on Milk Fat in Thai-Holstein Dairy Cow. *วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ปีที่ 5 ฉบับที่ 1 มิถุนายน 2553* หน้า 21- 32.
- Smith, S. J., S. Cases, D.R. Jensen, H. C. Chen, E. Sande, B. Tow, D.A. Sanan, J. Raber, R.H. Eckel, and R.V. Jr. Farese. 2000. Obesity resistance and multiple mechanisms of triglyceride synthesis in mice lacking DGAT. *Nat. Genet.* 25 :87-90.
- Spelman, R.J., C.A. Ford, P. McElhinney, G.C. George, and R.G. Snell. 2002. Characterization of the DGAT1 gene in the New Zealand dairy population. *J. Dairy Sci.* 85: 3514-3517.
- Szyda, J. and J. Komisarek. 2007. Statistical modeling of candidate gene effects on milk production traits in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 90: 2971-2979.

- Thaller, G., W. Kramer, A. Winter, B. Kaupe, G. Erhardt, and R. Fries. 2003. Effects of DGAT1 variants on milk production traits in German cattle breeds. *J. Anim. Sci.* 81: 1911-1918.
- Winter, A., W. Kramer, F. Werner, S. Kollers, S. Kata, G. Durstewitz, J. Buitkamp, J. Womack, G. Thaller, and R. Fries. 2002. Association of a lysine-232/alanine polymorphism in bovine gene encoding acyl-Co A: diacylglycerolacyltransferase(DGAT1) with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. *Proc.Of the Nat. Acad.Of Science of the USA*.99: 9300-9305.
- Weller , J.I., M. Golik, E. Seroussi, E. Ezra, and M. Ron. 2003. Population –wide analysis of a QTL affecting milk-fat production in the Israel Holstein population. *J. Dairy Sci.* 86:2219-2227.
- Zhu, M., and S. Zhao. 2007. Candidate gene identification approach: progress and challenges. *Int. J. Biol. Sci.* 3: 420-427.

การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบยีน Inhibin ที่มีผลต่ออัตราการตกไข่

ในโคลูกผสมแองกัสด้วยวิธี Real-Time PCR

สายใจ ชื่นสุข^{1/} วิษณุ ไพศาลรุ่งพนา^{2/} อนนท์ เทืองสันเทียะ^{3/}

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์รูปแบบของ exon 1 ของยีนInhibin (*INHAgene*)ในโคลูกผสมแองกัสจำนวน 200 ตัวโดยใช้เทคนิค Real-Time PCR และหาความสัมพันธ์ของแต่ละรูปแบบของยีนInhibinต่ออัตราการตกไข่ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำการตกไข่หลายใบ (superovulation) ในโคลูกผสมแองกัสเพศเมียจำนวน 38 ตัวผลการทดลองพบว่าเมื่อทำการตรวจ exon 1 ของยีนInhibinด้วยวิธีReal-Time PCR โดยการออกแบบฟลูออเรสเซนต์โพรบให้จำเพาะต่อสปีท์ตำแหน่ง A192Gสามารถแบ่งลักษณะที่แตกต่างกันของอัลลีล 2 ลักษณะคือ อัลลีลแบบ A และแบบ G ทำให้เกิดลักษณะทางพันธุกรรม 3 แบบได้แก่ AA AGและ GG โดยมีความถี่อัลลีล A และ G คือ0.65 และ 0.35 และความถี่ของลักษณะทางพันธุกรรมแบบ AA AG และ GG คือ 0.36 0.59และ 0.05 ตามลำดับ ลักษณะที่แตกต่างกันนี้พบว่ามีผลต่อจำนวนไข่และตัวอ่อนที่ได้จากการทำ superovulation โดยโคที่มีรูปแบบของexon 1 ของยีนInhibinชนิด GG จะให้ปริมาณตัวอ่อนทั้งหมดและตัวอ่อนที่ย้ายฝากได้สูงกว่าชนิดรูปแบบ AG และ AA อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทั้ง 3 ครั้งของการทดลอง แต่ไม่พบความแตกต่างของจำนวนไข่ที่ไม่ถูกผสมและจำนวนตัวอ่อนตายหรือเสื่อมสภาพ สรุปว่าวิธี Real-time PCR สามารถใช้ตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ที่แตกต่างกันของexon 1 ของยีนInhibin และรูปแบบที่แตกต่างของยีนนี้มีความสัมพันธ์กับอัตราการตกไข่จากกระบวนการ superovulationในโคลูกผสมแองกัส

คำสำคัญ: การตกไข่หลายใบโคลูกผสมแองกัส วิธี Real-time PCR ยีนInhibin

เลขทะเบียนวิจัย: 59(1)-0208-006

^{1/}สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์กรมปศุสัตว์ อำเภอมะนัง จังหวัดปทุมธานี ประเทศไทย

^{2/}ศูนย์ฝึกอบรมและถ่ายทอดเทคโนโลยีชีวภาพการปศุสัตว์ อำเภอลำลูกเกด จังหวัดลพบุรีประเทศไทย

^{3/}ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ อำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมา ประเทศไทย

Genotypic Study of InhibinGeneRelated to Ovulation Rate in Cross-bred Angus Cattle Using Real-Time PCR

Saijai Cheunsuk^{1/}Witsanu Paisalrunghana^{2/}Anone Thuangsanthia^{3/}

Abstract

The aims of this study was to develop a molecular method, Real-time PCR, to identify the genotypes of the exon 1of Inhibingene(*INH1*) in 200 Cross-bred Angus Cattleas well as the association between the superovulation performance among gene polymorphisms in 38 genotyping cows. The study showed that, by using the fluorescence probe specific to the SNP A192G, the exon 1ofInhibingene was contained with 2 alleles, A and G allele with allelic frequencies of 0.65 and 0.35 respectively and divided into 3 genotypes as AA, AG and GG with genotypic frequencies of 0.36, 0.59, and 0.05, respectively. Moreover, the genotypes had significant effects on the oocytes and embryos under the superovulation procedure. The results showed that the cows with GG genotype resulted in significant different higher increasing in the total number of embryo and the number of transferable embryothan AG and AA genotype in all 3 experiments. However, among 3 genotypes, there was no significant different in the number of unfertilized ova and the number of degenerate embryo in all 3 experiments. These results indicated that Real-time PCR method could be used to identify the polymorphisms of Inhibingeneand these polymorphisms had correlation to the ovulation rate in superovulation practice.

Keywords: Superovulation, Cross-bred Angus cattle, Real-time PCR, Inhibin gene

Registered No.: 59(1)-0208-006

^{1/}Bureau of Biotechnology in Livestock Production. Department of Livestock Development, Amphoe Mueng, Pathumthani. Thailand

^{2/}Livestock Biotechnology Training and Transfer Center. Amphoe Tha Luang, Lopburi Province. Thailand

^{3/}Embryo Transfer Technology and Animal Germplasm Research Center. Amphoe Pakchong, Nakhon Ratchasima. Thailand

คำนำ

การทำให้สัตว์เพศเมียเกิดการตกไข่จำนวนมาก(Superovulation) เพื่อใช้ในการย้ายฝากตัวอ่อน (Multiple ovulation and embryo transfer, MOET)มีจุดมุ่งหมายให้ได้จำนวนตัวอ่อนจำนวนมากที่สามารถใช้ในกระบวนการย้ายฝากตัวอ่อน เพิ่มโอกาสเกิดลูกโคที่มีลักษณะพันธุกรรมที่ถ่ายทอดจากพ่อแม่ที่ดีเยี่ยมได้คราวละหลายๆตัว ลดโอกาสการนำโรคเข้าสู่ฟาร์มและเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือกสัตว์ (Armstrong, 1993)ทั้งยังสามารถจัดเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งเพื่อนำไปใช้ภายหลังดังนั้นกระบวนการSuperovulationจึงเป็นเทคนิคที่สำคัญมากในขั้นตอนการย้ายฝากตัวอ่อนโดยเฉพาะอย่างยิ่งในการเลี้ยงโค เนื่องจากเป็นสัตว์ที่มีลูกคราวละตัวเดียวและใช้เวลาในการตั้งท้องนาน แต่ปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งที่พบคือการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นจากฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องซึ่งจะแตกต่างกันในแต่ละตัวสัตว์ (Mapletoft and Hasler, 2005) แม้ว่าจะได้มีการพยายามปรับปรุงสภาพแวดล้อมและการเลี้ยงดู หรือการใช้ฮอร์โมนชนิดต่างๆเข้าช่วยแต่ก็ไม่ทำให้เกิดการตอบสนองเท่าที่ควร(Thatcher *et al.*, 2001; Malhiet *al.*, 2008)ส่งผลต่อประสิทธิภาพและผลประโยชน์ที่ได้รับ

Follicle-Stimulating Hormone (FSH) เป็นฮอร์โมนที่หลั่งจากต่อมใต้สมอง(pituitary gland) สามารถพบในกระแสเลือดของรอบการเป็นสัด (estrous cycle) (Kaneko, 1995) และหลังคลอด (postpartum period) (Sunderland, 1994) หรือในโคที่มี Follicular cysts (Hamilton *et al.*, 1995; Todorokiet *al.*, 2001) มีหน้าที่หลักในการควบคุมและกระตุ้นการเจริญของไข่ในรังไข่การยับยั้งการทำงานของ FSH จะทำให้ไข่ไม่เจริญเติบโตส่งผลให้ไม่มีการตกไข่ในปัจจุบันมักนิยมใช้ FSH เป็นตัวหลักในการเหนี่ยวนำซึ่งอาจจะให้ผลแตกต่างกันในด้านการตอบสนองของสัตว์แต่ละตัว (Hasler, 2003) ทั้งนี้ขึ้นกับขนาดและระยะเวลาที่ใช้ (Picton *et al.*, 1990; McNeilly *et al.*, 1991) Takedomi *et al.* (2005) รายงานว่าการหลั่ง FSH จาก pituitary glandถูกควบคุมโดยการทำงานร่วมกันของฮอร์โมน 2 ชนิด คือ Inhibin และ Estradiol สำหรับฮอร์โมน Inhibin เป็นฮอร์โมนที่ถูกควบคุมการสร้างโดยอิน Inhibin โดยพบการสร้างและขับออกมาสู่กระแสเลือดจากอวัยวะและรังไข่ ซึ่งมี 2 ชนิดคือ Inhibin A (INHA)และ Inhibin B (INHB) โดยทั้ง 2 ชนิดทำหน้าที่ในการกดการหลั่งของ FSH จาก pituitary cell แต่ไม่มีผลต่อการสร้าง LHในเซลล์เพาะเลี้ยง (Robertson *et al.*, 1985; Lu *et al.*, 2009) ดังนั้นปริมาณของฮอร์โมนinhibin ในกระแสเลือดน่าจะมีผลต่อการทำงานของ FSH หรือปริมาณของฟอลลิเคิล (Sasaki *et al.*, 2006)

การศึกษาโครงสร้างของยีน Inhibin ในส่วนที่สร้างฮอร์โมนINHAในคน พบว่ามีการกลายพันธุ์ในตำแหน่ง A257T จะทำให้เกิดภาวะ premature ovarian failure (POF) ซึ่งเป็นลักษณะที่รังไข่หยุดทำงานก่อนวัยอันควร (Woad *et al.*, 2009) เป็นต้น สำหรับการศึกษาในสัตว์นั้นHua (2007) พบว่าตำแหน่ง G284A ของยีน Inhibin ในส่วนที่สร้างฮอร์โมน INHAในแพะที่มีความแตกต่างของรูปแบบสลับ (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) จะมีผลต่อจำนวนลูกต่อครอกโดยลักษณะ G ให้ลูกต่อครอกมากกว่าลักษณะ Aนอกจากนี้มีการศึกษาความสำคัญของ Inhibin gene ในโคที่เคยมีการฉีด anti- α subunit inhibinของยีน Inhibin ในส่วนที่สร้างฮอร์โมน INHAพบว่าสามารถเพิ่มการหลั่ง FSH จากต่อมใต้สมองทำให้มีระดับ FSH ในกระแสเลือดเพิ่มขึ้น (Ishigame *et al.*, 2004) และอัตราการตกไข่รวมถึงจำนวนตัวอ่อนที่สามารถย้ายฝากได้มีปริมาณเพิ่มขึ้น (Takedomi *et al.*, 2005; Mei *et al.*, 2009) แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของยีน Inhibin ในส่วนที่สร้างฮอร์โมน INHAที่มีผลต่อการทำ superovulation นอกจากนี้Tanget *al.* (2011)ใช้วิธีการตรวจแบบ PCR-RFLP เพื่อหาลักษณะการกลายพันธุ์ใน exon I ของยีน Inhibin ในส่วนที่สร้างฮอร์โมน INHAในโคสายพันธุ์ Chinese Holstein ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 3 จีโนไทป์ ได้แก่ AA AGและ GG พบว่าแต่ละจีโนไทป์มีความสัมพันธ์กับการตอบสนองต่อ

การเหนี่ยวนำให้เกิดการตกไข่แตกต่างกันแม้ว่าYang *et al.* (2014) ศึกษาลักษณะของ β -A subunit Inhibin gene ในโคสายพันธุ์ Chinese Holstein โดยใช้วิธีเดียวกัน พบว่าที่ตำแหน่ง 7639 ของยีน Inhibin มีการเปลี่ยนลำดับเบสจาก C เป็น T ซึ่งสามารถแยกเป็น 3 จีโนไทป์ (CT, TT, CC) เช่นกัน แต่ไม่มีความแตกต่างของการตอบสนองต่อการทำ superovulation ในแต่ละจีโนไทป์ในทั้ง 2 รายงานแสดงให้เห็นวิธี PCR-RFLP สามารถใช้ในการตรวจหา SNP ของยีนนี้ได้แม้ในตำแหน่งที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามวิธีการตรวจแบบ PCR-RFLP เป็นวิธีที่มีขั้นตอนในการตรวจยุ่งยากหลายขั้นตอน ใช้เวลานานทั้งยังต้องเลือกเอนไซม์ตัดเฉพาะที่สามารถแยกความแตกต่างของตำแหน่งของ SNP ได้ซึ่งเป็นข้อจำกัดของวิธีนี้

วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อพัฒนาวิธีวิเคราะห์รูปแบบจีโนไทป์ของ exon 1 ของยีน Inhibin ในส่วนที่สร้างฮอร์โมน *INHA* ในโคลูกผสมแองกัสโดยใช้เทคนิค Real-Time PCR แทนการใช้วิธีเดิมคือ วิธี PCR-RFLP และความสัมพันธ์ของแต่ละรูปแบบจีโนไทป์ของยีน Inhibin ในส่วนที่สร้างฮอร์โมน *INHA* ที่มีต่ออัตราการตกไข่ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยฮอร์โมนในโคลูกผสมแองกัสเพศเมีย

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลองและการเก็บตัวอย่าง

โคลูกผสมแองกัสเพศเมียอายุ 3-5 ปีที่เคยมีลูกอย่างน้อย 1 ตัวจำนวน 200 ตัว เลี้ยงที่ศูนย์ฝึกอบรมและถ่ายทอดเทคโนโลยีชีวภาพการปศุสัตว์ อำเภอลำทะเมนชัย จังหวัดลพบุรี ได้รับการถ่ายพยาธิ ฉีดวัคซีนตามโปรแกรม และได้รับอาหาร แร่ธาตุตามข้อกำหนดของศูนย์ฯ ทำการเก็บตัวอย่างเลือดโคจาก jugular vein จำนวนตัวละ 6 ซีซี ในหลอดเก็บเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA นำมาสกัดดีเอ็นเอเพื่อศึกษารูปแบบและความถี่จีโนไทป์ของ exon 1 ของยีน Inhibin ในส่วนที่สร้างฮอร์โมน *INHA* จากนั้นจัดการสุ่มตัวอย่างโคแบบไม่เฉพาะเจาะจงตามกลุ่มจีโนไทป์ดังนี้ AA AG และ GG จำนวนจีโนไทป์ละ 15 ตัวสำหรับการทดลองตามขั้นตอน superovulation การผสมเทียมและการเก็บตัวอ่อน โดยแต่ละตัวจะทำการเก็บตัวอย่าง 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 3 เดือนเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของแต่ละรูปแบบจีโนไทป์ของยีน Inhibin ที่มีผลต่ออัตราการตกไข่ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยฮอร์โมน

การสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างเลือดทั้งหมดถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสก่อนนำมาสกัด genomic DNA ด้วยชุดสกัด DNA สำเร็จรูป (QIAGEN Genomics DNA Extraction Kit, QIAGEN, USA) ทำการวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA ให้มีค่า OD ที่ 260/280 ระหว่าง 1.6-1.8 ด้วย Microvolume Spectrophotometer (Nanodrop, DeNovix, USA) ตัวอย่างทั้งหมดถูกเก็บไว้ในสารละลาย TE buffer ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะทำการทดสอบ

การออกแบบไพรเมอร์สำหรับปฏิกิริยา PCR-RFLP และเอนไซม์ตัดเฉพาะ

การออกแบบไพรเมอร์จำเพาะต่อ bovine Inhibin gene ที่มีชิ้นส่วนของ SNP-A192G (GenBank number: rs41257116) (Tang *et al.*, 2011) ใช้โปรแกรม Primer 3 plus (Untergasser and Nijveen, 2007) (Table 1) และ โปรแกรม NEB cutter V2.0 (New England BioLabs, USA) ใช้หาตำแหน่งตัดจำเพาะและทำนายขนาดของนิวคลีโอไทด์ของเอนไซม์ตัดจำเพาะ

การทดสอบรูปแบบ *INHA* gene ด้วยปฏิกิริยา PCR-RFLP

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือดของโคลูกผสมแองกัส ปริมาณตัวอย่างละ 5 μ l (20 ng/ μ l) มาเพิ่มขยายชิ้นส่วน DNA (PCR) ดังนี้ 10xPCR buffer 5 μ l primer InhF และ InhR (Forward และ Reverse primers) (Table 1) อย่างละ 2 μ l (0.2 μ M) Platinum Taq DNA polymerase 0.5 μ l (1 unit) dNTPs 5 μ l (0.2 mM) MgCl₂ 1.5 μ l (1.5 mM) distilled water 29 μ l ปริมาตรรวม 50 μ l และ PCR condition คือ pre-denaturation 95°C นาน 2 นาที denaturation 95°C นาน 45 วินาที annealing 62°C นาน 45 วินาที และ extension 72°C นาน 45 วินาที จำนวน 40 รอบ ตามด้วย 72°C นาน 10 นาที นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR (PCR product) มาคัดแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธี purification โดยใช้ NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Germany) และนำมาตัดโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ MspI โดยมีปริมาณดีเอ็นเอ 20 μ l (10 ng/ μ l) reaction buffer 2.5 μ l MspI restriction enzyme 2 μ l distilled water 0.5 μ l ปริมาตรสุดท้าย 25 μ l เป่าที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 ชั่วโมง จากนั้นย้อมสีด้วย GelRed Loading Buffer (Biotium, USA) แยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอใน 5% (w/v) Nusieve agarose gel electrophoresis ที่ 100 V นาน 1.5 ชั่วโมง ตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Gel-Doc system (Alpha image 3400, USA)

การตรวจสอบลำดับเบสของ *INHA* gene เพื่อออกแบบ primers และ probes สำหรับปฏิกิริยา Real-time PCR

ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ทราบจีโนไทป์ (AA, AG, GG) จากปฏิกิริยา PCR-RFLP มาวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี automated dye-terminator cycle sequencing method with Ampli Taq DNA polymerase โดยใช้เครื่อง ABI 3130 DNA Analysis Sequencer (ABI, USA) และตำแหน่งจุดตัดเฉพาะของเอนไซม์ตัดจำเพาะ MspI ด้วยโปรแกรม the BLAST Sequence Analysis program (National Center for Biotechnology Information, NCBI, USA) และโปรแกรม NEBcutter V2.0 สำหรับการตรวจสอบรูปแบบของสปีท์ตำแหน่ง A192G ของ *INHA* gene ในปฏิกิริยา Real-time PCR ใช้ TaqMan MGB-probes (minor groove binding probes) fluorescence real-time PCR ที่ได้รับการออกแบบ primers และ probes ด้วยโปรแกรม Primer 3 Plus ซึ่งจะใช้ทดสอบ A และ G alleles ในเวลาเดียวกัน (Table 1)

Table 1. PCR-RFLP Primers and Real-time PCR Primers and Probes with the expecting amplicon sizes, underline and italic letter in Real-time PCR reactions represented SNP polymorphisms

Reactions	Primers	Sequence (5' $\longrightarrow$ 3')	amplicon sizes
PCR-RFLP	Inh-F1	GCCCTGTTTCTGGATGCC	249 bp
	Inh-R1	ATTCAACCCAACCTGCCTA	
Real-time PCR	F-Rt	AAGGTGGAGATCCTGGAGTCA	161 bp
	R-Rt	GCCCCTGCGCATGAAG	
	Report-1	(VIC)-CTGCACCGAAGGCA	

การทดสอบรูปแบบ *INHA* gene ด้วยปฏิกิริยา Real-time PCR

ตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือดโคทั้ง 200 ตัวอย่างที่ได้ทำการทดสอบจีโนไทป์ด้วยวิธี PCR-RFLP แล้วนำมาทดสอบจีโนไทป์อีกครั้งด้วยวิธี Real-time PCR โดยใช้ชุดตรวจ Custom TaqMan SNP Genotyping Assay (GENEPLUS, USA.) ซึ่งใช้สีฟลูออเรสเซนต์ชนิด VIC และ FAM (GENEPLUS, USA) ด้วยเครื่อง Step-One Plus Real-time PCR System (GENEPLUS, USA) ดังนี้ ปริมาณดีเอ็นเอ 20 ng 2X TaqMan Genotyping MasterMix 5 μ l 40X Assay Mix cDNA 0.25 μ l ปริมาตรสุดท้าย 10 μ l และ PCR condition คือ pre-denaturation 95°C นาน 10 นาที denaturation 95°C นาน 15 วินาที annealing และ extension 60°C นาน 60 วินาที จำนวน 50 รอบ

การกระตุ้นการตกไข่และการเก็บตัวอ่อน

โคที่ถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตาม genotype ได้แก่ AA AG และ GG จะถูกเลือกแบบสุ่มไม่เฉพาะเจาะจงภายในกลุ่มที่มีจีโนไทป์เดียวกัน จำนวนจีโนไทป์ละ 15 ตัว ให้ฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นการตกไข่หลายใบ ผสมเทียมและเก็บตัวอ่อนตามขั้นตอนของศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา (Figure 1) ทำการเก็บตัวอย่างโดยมีการกระตุ้นการตกไข่หลายใบ ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งจากพ่อพันธุ์ตัวเดียวกันที่ผลิตในครั้งเดียวกันและเก็บตัวอ่อนโดยจะทำการเก็บตัวอย่างจากโคแต่ละตัว 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 3 เดือน

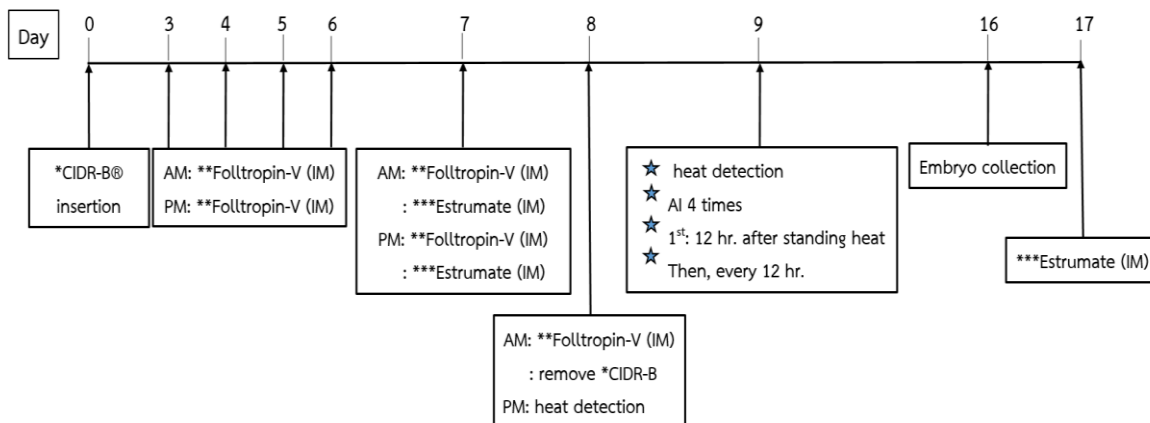


Figure 1. Superovulation procedures and embryo harvest program followed Embryo Transfer Technology and Animal Germplasm Research Center protocol.

Note: *CIDR-B®: intravaginal progesterone releasing device (Ceva Sante Animale, France)

**Folltropin-V®: FSH (Bioniche Animal Health Canada Inc.)

***Estrumate: prostaglandin F2 α (Intervet Canada Inc.)

บันทึกข้อมูลการตกไข่เป็น 4 ชนิด ได้แก่ อัตราการตกไข่ซึ่งหมายถึงจำนวนรวมของตัวอ่อนที่ย้ายฝากได้ ไข่ที่ไม่ได้รับการผสม และตัวอ่อนที่เสื่อมสภาพทั้งหมด (the total number of ovulation; TNO = the total number of transferable embryo/unfertilized ova/degenerate embryo) จำนวนตัวอ่อนที่ย้ายฝากได้

(the number of transferable embryo; NTE)จำนวนไข่ที่ไม่ถูกผสม (the number of unfertilized ova; NUO) และจำนวนตัวอ่อนตายหรือเสื่อมสภาพ (the number of degenerate embryo; NDE)

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาความถี่ของยีนและจีโนไทป์โดยใช้สมการ

$$(pA+qa)^2 = p^2AA+2pqAa+q^2aa$$

โดยที่ A หมายถึง A allele
a หมายถึง G allele
P หมายถึงความถี่ของ A allele
q หมายถึงความถี่ของ G allele
 $p+q = 1$

การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบยีน Inhibin ที่มีผลต่ออัตราการตกไข่โดยวิเคราะห์อิทธิพลของจีโนไทป์ของยีนกับปริมาณและชนิดตัวอ่อน/ไข่ที่เก็บได้ด้วยวิธี Generalized Linear Model (GLM)ตามสมการ

$$Y_{ijk} = u+G_i+N_k+T_j+e_{ijk}$$

โดยที่ Y_{ijk} หมายถึง phenotypic value of traits
U หมายถึง population mean
 G_i หมายถึง fixed effect of genotype
 N_k หมายถึง fixed effect of age
 T_j หมายถึง fixed effect of contemporary group และ
 e_{ijk} หมายถึง random residue error

ผลและวิจารณ์การทดลอง

การศึกษารูปแบบจีโนไทป์ของยีน Inhibin ในส่วนที่สร้างฮอร์โมน *INHA* สามารถทำได้โดยการใช้วิธีทางชีวโมเลกุลซึ่งเดิมใช้วิธี PCR-RFLP ดังนั้นในการตรวจสอบโดยใช้วิธีใหม่คือ Real-time PCR ต้องแน่ใจว่าการออกแบบprimers และprobes ของขั้นตอน Real-time PCR นั้นมีความถูกต้องและแม่นยำตามจีโนไทป์จริง จึงต้องมีการจัดกลุ่มจีโนไทป์ที่ถูกต้องในกลุ่มสัตว์ทดลองก่อนสำหรับการทดลองครั้งนี้มีการออกแบบไพรเมอร์ที่ใช้ในวิธี PCR-RFLPให้ครอบคลุมบริเวณ A192G ใน exon 1 ของยีน Inhibin ส่วนที่สร้างฮอร์โมน *INHA*โดยการทดสอบในขั้นตอนนี้พบว่ามีความซับซ้อนของดีเอ็นเอจากปฏิกิริยา PCR เท่ากับ 249 bp การกลายพันธุ์จาก A allele (ACCGAAGGCA) เป็น G allele (ACCGGAGGCA)ที่ตำแหน่ง 192 (A192G) ทำให้เพิ่มจุดตัดของเอนไซม์ตัดจำเพาะ MspI(CCGG) ขึ้นอีก 1 ตำแหน่ง(Figure 2)เมื่อตรวจสอบขนาดชิ้นส่วนDNA หลังการตัดด้วย MspIพบว่าในกลุ่มจีโนไทป์AA มีขนาด 123 95และ31 bp และในกลุ่มจีโนไทป์GG มีขนาด 95 79 44 และ31 bp ส่วนกลุ่มจีโนไทป์ AG พบทั้ง 5 ขนาด (123 95 79 44 และ 31) (Figure 3)

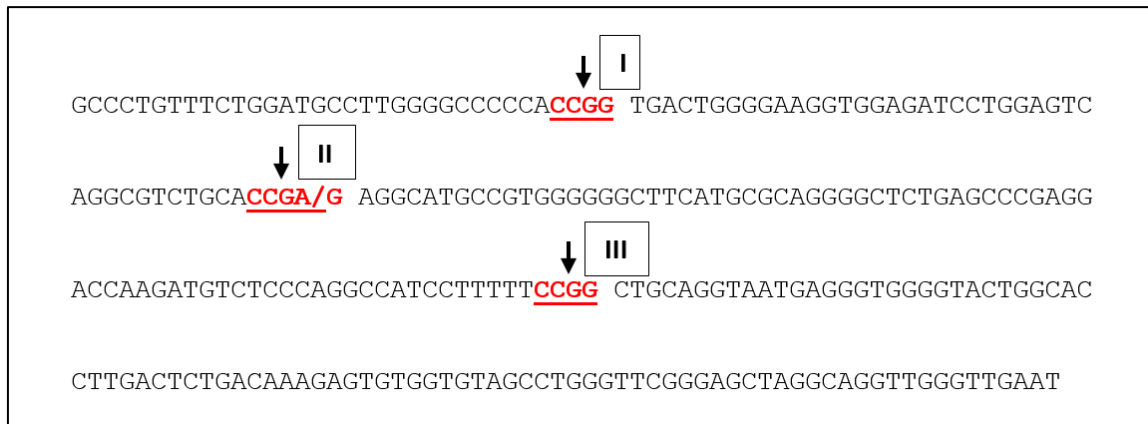


Figure 2. The cleavage point (arrow) of MspI endonuclease (CC-GG) on the 249 bp PCR product of *INHAgene*. Number in the box indicated number of the cutting side (Aallele: box I and III; G allele: box I, II, and III).

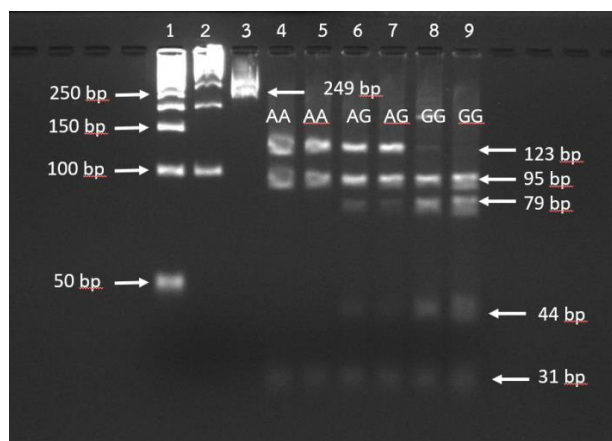


Figure 3. A representative gel showing exon 1 *INHAgene* genotyping by PCR-RFLP technique. 50 and 100 bp molecular markers were presented on lane 1 and 2, respectively. The 249 bp of uncut PCR product was shown on lane 3, then, Lane 4 and 5: AA genotype (123, 95 and 31bp); lane 6 and 7: AG genotype (123, 95, 79, 44 and 31bp); lane 8 and 9: GG genotype (95, 79, 44 and 31bp)

เมื่อนำตัวอย่างดีเอ็นเอชุดเดียวกันมาทดสอบด้วยวิธี Real-time PCR ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นโดยการออกแบบ primers และ probes ที่จำเพาะต่อ SNP ของยีนที่ตำแหน่ง A192G และตรวจการเพิ่มขึ้นของ PCR product โดยการวัดปริมาณสี fluorescence 2 ชนิด ได้แก่ A allele ด้วย VIC-fluorescence dye (กราฟสีเขียว) และ G allele ด้วย FAM-fluorescence dye (กราฟสีน้ำเงิน) (Figure 4) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับวิธี PCR-RFLP แล้วพบว่าทั้ง 2 วิธีสามารถตรวจสอบ genotype ของยีน Inhibin ส่วนที่สร้างฮอร์โมน *INH*A ได้และให้ผลเหมือนกันทั้ง 200 ตัวอย่าง

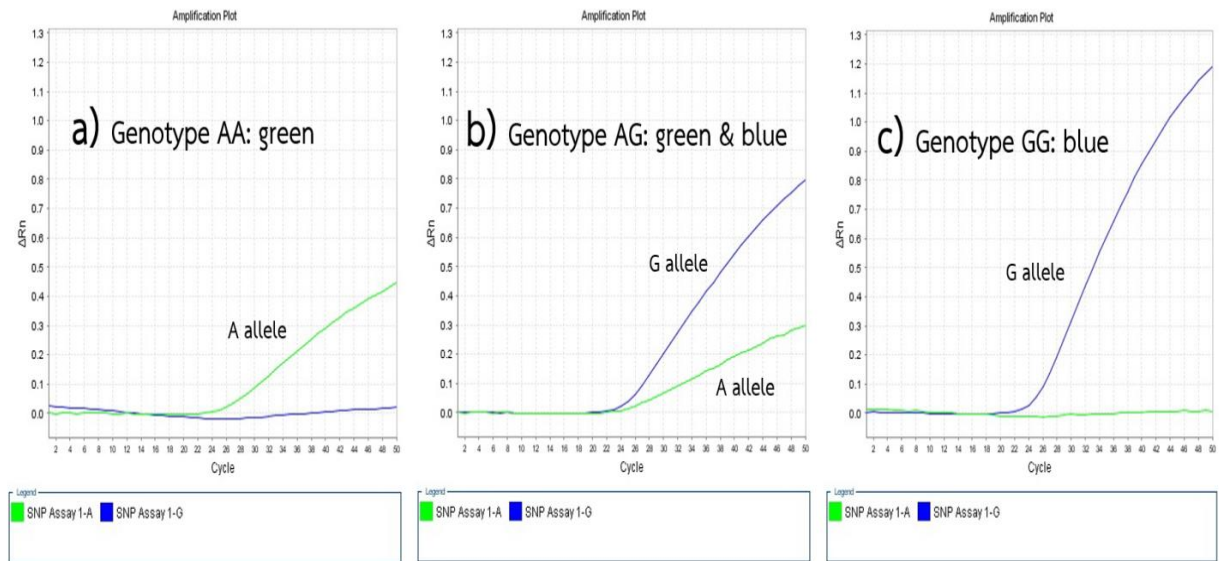


Figure 4. Real-time PCR genotyping for exon I of *INHA* gene in Angus crossbred cows. VIC-fluorescence dye (green) and FAM-fluorescence dye (blue) indicated A and G alleles, respectively. a), b) and c) represented AA, AG and GG genotype, respectively.

การตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ของยีน Inhibin ส่วนที่สร้างฮอร์โมน *INHA* เดิมใช้วิธี PCR-RFLP (Tang et al., 2011) ซึ่งต้องผ่านกระบวนการหลายขั้นตอนที่ยังยากรวมถึงขั้นตอนในการเลือกใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ ทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายสูง จากการทดสอบครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการตรวจโดยวิธี Real-time PCR จะให้ผลตรวจเหมือนกันในทุกตัวอย่างเลือดโคลูกผสมแองกัส (200 ตัวอย่าง) ที่ทำการแยกจีโนไทป์ด้วยวิธี PCR-RFLP ร่วมกับการตัดด้วยเอนไซม์ตัดเฉพาะ *MspI* แสดงว่าเทคนิค Real-time PCR เป็นวิธีที่มีความถูกต้องและแม่นยำสามารถใช้ในการตรวจหาจีโนไทป์ของ exon I ในยีน Inhibin ส่วนที่สร้างฮอร์โมน *INHA* ทำให้มีความสะดวกประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการทดสอบเมื่อเทียบกับวิธี PCR-RFLP

จีโนไทป์ของยีน Inhibin ส่วนที่สร้างฮอร์โมน *INHA* ในประชากรโคลูกผสมแองกัสสำหรับการทดลองนี้สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มคือ AA AG และ GG ซึ่งมีจำนวน 72 118 และ 10 ตัว โดยมีความถี่จีโนไทป์เป็น 0.36 0.59 และ 0.05 ตามลำดับและมีความถี่ของ A และ G allele คือ 0.65 และ 0.35 ตามลำดับ (Table 2) เมื่อพิจารณาสภาพความสมดุลของยีน (Equilibrium of genes) พบว่าการกระจายตัวของยีน Inhibin ส่วนที่สร้างฮอร์โมน *INHA* ไม่มีความสมดุลตามหลักสมการ Hardy-Weinberg ($p < 0.01$) โดยเฉพาะจีโนไทป์ GG พบเพียง 10 ตัว ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการปรับปรุงพันธุ์ ซึ่งโคเหล่านี้เป็นโคที่เกิดจากการผสมเทียมโคพื้นเมืองด้วยน้ำเชื้อพ่อพันธุ์แองกัสที่ได้รับการคัดเลือกและมีจำนวนพ่อพันธุ์จำกัดโดยมีจุดประสงค์เพื่อพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์กรรมในประชากรเดิมทำให้การผสมพันธุ์ไม่เป็นไปอย่างสุ่ม (non-random mating) นอกจากนี้การคัดเลือก (selection) ตามลักษณะปรากฏของตัวสัตว์ (phenotype) เพื่อนำมาเป็นแม่พันธุ์ที่จะใช้สร้างพันธุ์โคต่อไป ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงความถี่ของยีนหรือเกิดการสูญหายของยีน (สุรินทร์, 2552)

Table2. Genotypic and allelic frequencies of the Inhibin gene exon 1 in 200 Angus crossbred cows.

Genotypes	n	Genotypic frequency
AA	72	0.36
AG	118	0.59
GG	10	0.05
Alleles	n	Allelic frequency
A	200	0.65
G		0.35

การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบจีโนไทป์ยีน Inhibin ส่วนที่สร้างฮอร์โมน *INH*A กับอัตราการตกไข่ที่เกิดจากการทำ superovulation พบว่ามีแม่โคในกลุ่มจีโนไทป์ GG ที่มีเพียงจำนวน 10 ตัวในประชากรโค 200 ตัว นั้นมีจำนวน 2 ตัวที่มีความผิดปกติของรังไข่ในขณะทำการทดสอบ จึงเหลือเพียง 8 ตัวที่สามารถใช้ในการทดลองทั้งนี้จำนวนตัวอ่อนและไข่ที่เกิดจากการทำ superovulation ตามรูปแบบจีโนไทป์ของกลุ่มโคทดลองแต่ละครั้งของการทดลอง จำนวน 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 3 เดือน แสดงใน Table 3

Table 3. Association analysis of *INH*A genotypes with the superovulation traits of the number of total ovulation (TNO), the number of transferable embryo (NTE), the number of unfertilized ova (NUO) and the number of degenerate embryo (NDE) in Angus crossbred cows

3a) the first superovulation testing:

Types	AA (15)	AG (15)	GG (8)	P value
TNO	4.20 ^a ±0.45	5.27 ^a ±0.45	8.00 ^b ±0.62	<0.0001
NTE	2.27 ^a ±0.51	3.20 ^{ab} ±0.51	4.75 ^b ±0.70	0.0259
NUO	1.20±0.29	1.33±0.29	1.88±0.40	0.3893
NDE	0.73±0.20	0.73±0.20	1.38±0.28	0.1385

3b) the second superovulation testing:

Types	AA (15)	AG (15)	GG (8)	P value
TNO	4.87 ^a ±0.59	6.47 ^a ±0.59	9.75 ^b ±0.80	<0.0001
NTE	3.13 ^a ±0.61	3.33 ^a ±0.61	7.25 ^b ±0.83	0.0006
NUO	0.60±0.40	1.93±0.40	1.00±0.55	0.0711
NDE	1.13±0.34	1.20±0.34	1.50±0.47	0.8140

3c) the third superovulation testing:

Types	AA (15)	AG (15)	GG (8)	P value
TNO	5.00 ^a ±0.67	6.47 ^a ±0.67	9.87 ^b ±0.92	0.0006
NTE	2.33 ^a ±0.47	3.00 ^a ±0.47	5.87 ^b ±0.65	0.0003
NUO	1.33±0.42	1.80±0.42	1.87±0.58	0.6647
NDE	1.33±0.33	1.67±0.33	2.13±0.45	0.3768

Note: number in parenthesis indicated number of cows in each genotype group. Least square means values (±SE) with different letters in the same row were significant different at P value as shown.

ความสัมพันธ์ของรูปแบบจีโนไทป์ของยีน Inhibin ส่วนที่สร้างฮอร์โมน *INHA* ต่ออัตราการตกไข่พบว่า โคที่มีจีโนไทป์แบบ GG มีค่าจำนวนการตกไข่ทั้งหมด (ค่ารวมของจำนวนตัวอ่อนที่ย้ายฝากได้ ไข่ที่ไม่ได้รับการผสม และตัวอ่อนที่เสื่อมสภาพ) หรือ TNO สูงกว่า กลุ่ม AA และ AG ในการเก็บตัวอ่อนจากการทำ superovulation อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการทดลองทั้ง 3 ครั้ง ($P = <0.0001$ ในครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 และ $P = 0.0006$ ในครั้งที่ 3) ในขณะที่กลุ่ม AA และ AG ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของ TNO ในการทดลองทั้ง 3 ครั้ง (Table 3a, 3b และ 3c) เช่นเดียวกับค่าของจำนวนตัวอ่อนที่ย้ายฝากได้หรือ NTE โดยกลุ่ม GG มีค่าสูงกว่ากลุ่ม AA และ AG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการทดลองทั้ง 3 ครั้ง ($P = 0.0259$ 0.0006 และ 0.0003 ตามลำดับ) (Table 3) ยกเว้นครั้งที่ 1 ที่ค่า NTE ของกลุ่ม GG ไม่แตกต่างจากกลุ่ม AG (Table 3a) สำหรับจำนวนไข่ที่ไม่ถูกผสมหรือ NUO และจำนวนตัวอ่อนตาย/เสื่อมสภาพหรือ NDE พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในการทดลองทั้ง 3 ครั้งของทุกกลุ่มจีโนไทป์ (Table 3) จากผลการทดลองเห็นได้ว่ารูปแบบจีโนไทป์ของยีน Inhibin ส่วนที่สร้างฮอร์โมน *INHA* ที่มีความแตกต่างกันของ exon I ในโคลูกผสมแองกัสซึ่งเป็นโคเนื้อที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีผลต่ออัตราการตกไข่เมื่อทำ superovulation โดยกลุ่ม GG จะให้จำนวนตัวอ่อนและไข่ทั้งหมด (TNO) และจำนวนตัวอ่อนที่สามารถทำการย้ายฝากได้ (NTE) สูงกว่าลักษณะ AA และ AG ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Tang *et al.* (2011) ที่พบว่าลักษณะ GG ของ *INHA* gene ในโคนมพันธุ์ Chinese Holstein ให้ปริมาณตัวอ่อนและไข่ทั้งหมด และจำนวนตัวอ่อนที่สามารถทำการย้ายฝากได้มากกว่าลักษณะ AA ทั้งนี้การ

เปลี่ยนแปลงลำดับเบสของยีนในตำแหน่ง A192G อาจมีผลทำให้การทำงานของ *INHA* gene ลดลงหรือเกิดความไม่เสถียรของ RNA ในขั้นตอน RNA transcription ทำให้บทบาทในการกระตุ้นการทำงานของ FSH ที่ต่อมใต้สมองลดลง (Sangetal., 2011) ปริมาณ FSH จึงเพิ่มขึ้นส่งผลให้รังไข่ถูกกระตุ้นให้สร้างฟอลลิเคิลได้มากขึ้น ซึ่งลักษณะของ A allele จะมีผลทางลบต่อการกระตุ้นการตกไข่หลายใบ ในขณะที่ G allele จะให้ผลทางบวก

นอกจากนี้การทดลองนี้ยังศึกษาผลของการเหนี่ยวนำเพื่อให้เกิดการตกไข่จำนวนมากซ้ำๆหลายครั้งติดต่อกันว่าจะมีต่อการตอบสนองต่อฮอร์โมนในแม่โคทดลองหรือไม่ โดยไม่ได้คำนึงถึงรูปแบบของยีน (Table 4) พบว่าการเหนี่ยวนำเพื่อให้เกิดการตกไข่จำนวนมากซ้ำๆหลายครั้งติดต่อกันไม่มีผลต่อค่าเฉลี่ยจำนวนตัวอ่อนและไข่ทั้ง 4 ชนิดในแต่ละครั้งของการทดลอง ยกเว้นพบจำนวนตัวอ่อนตาย/เสื่อมสภาพหรือ NDE ในครั้งที่ 3 มากกว่าครั้งที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากสภาพอากาศและอาหารเนื่องจากช่วงระยะเวลาที่ทำการเก็บตัวอ่อนในครั้งแรกอยู่ในเดือนธันวาคมซึ่งสัตว์อยู่ในสภาพอุณหภูมิเย็นกว่าและอาหารมีคุณภาพดีกว่าก่อนทำการทดลอง ส่วนในการทดลองครั้งที่ 3 ที่มีการเก็บตัวอ่อนในราวเดือนมิถุนายนนั้นสัตว์อาจมีภาวะเครียดสะสมเนื่องจากผ่านสภาพอากาศร้อนจัด (ช่วงเดือนเมษายน-มิถุนายน) และอาหารไม่สมบูรณ์นักก่อนทำการเก็บตัวอ่อนส่งผลให้เกิดตัวอ่อนจำนวนหนึ่งไม่สมบูรณ์ ตายหรือเสื่อมสภาพมากขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาในภาพรวมของจำนวน TNO และ NTE พบว่าไม่มีความแตกต่างโดยเฉพาะค่า NTE ซึ่งบ่งบอกถึงตัวอ่อนที่ย้ายฝากได้อันเป็นส่วนสำคัญที่สุดของจุดประสงค์ในการทำ superovulation ดังนั้นการเหนี่ยวนำด้วยฮอร์โมนให้เกิดการตกไข่หลายใบสามารถกระทำซ้ำๆอย่างน้อย 3 ครั้งติดต่อกันโดยไม่มีผลกระทบต่อปริมาณตัวอ่อนที่ย้ายฝากได้

Table 4. Effect of repeated superovulation treatments of the number of TNO, NTE, NUO and NDE in Angus crossbred cows (n= 38)

Types	1 st superovulation	2 nd superovulation	3 rd superovulation	P value
TNO	5.42±0.45	6.53±0.45	6.61±0.45	0.1178
NTE	3.16±0.39	4.08±0.39	3.34±0.39	0.2198
NUO	1.39±0.24	1.21±0.19	1.63±0.24	0.4628
NDE	0.87 ^a ±0.19	1.24 ^{ab} ±0.19	1.63 ^b ±0.19	0.0183

Note: Least square means values (±SE) with different letters were significant different at *P* value as shown.

นอกจากนี้ผลการวิจัยยังพบว่าในแต่ละครั้งของการทดลองการกระตุ้นการตกไข่ของโคกลุ่มนี้ จะได้ตัวอ่อนและไข่ทั้งหมด (TNO) (โดยไม่คำนึงถึงชนิดจีโนไทป์) ต่อแม่โคตัวให้ (Donor) เฉลี่ยทั้ง 3 ครั้งของการทดลองที่จำนวน 5.42±0.45 6.53±0.45 และ 6.61±0.45 ตามลำดับ (Table 4) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานจำนวนตัวอ่อนในการทำ superovulation ทั่วไปจะได้ประมาณ 6 ตัวอ่อนต่อแม่โคตัวให้ (Bo and Mapletoft, 2014) โดยปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณและคุณภาพตัวอ่อนในกระบวนการ superovulation และ embryo recovery คือ ปัจจัยจากตัวสัตว์ได้แก่ พันธุกรรม ประวัติการสืบพันธุ์ อายุ สายพันธุ์ และสภาวะของระบบสืบพันธุ์และรังไข่ของ donor ในขณะที่ทำการกระตุ้น เป็นต้น นอกจากนี้สภาวะแวดล้อม ได้แก่ ปัจจัยที่ก่อให้เกิดความเครียด เช่น อุณหภูมิ การ

จัดการ อาหาร รวมถึง โปรแกรมการให้ฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่ น้ำเชื้อที่ใช้ในการผสมเทียม และผู้ที่ทำการผสมเทียมหรือเก็บตัวอ่อน (Butler, 2000; Benyei *et al.*, 2003; Hooper *et al.*, 2015; Biancucci *et al.*, 2016) อย่างไรก็ตามจำนวนโคที่ใช้ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบจีโนไทป์ของยีนและจำนวนตัวอ่อนนั้นอาจจะมีความไม่มากนัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่ม GG นั้นมีเพียง 8 ตัว ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาต่อในประชากรที่มากขึ้น และในโคสายพันธุ์อื่นๆว่ามีความสัมพันธ์ในแนวทางเดียวกันหรือไม่

สรุปผลการทดลอง

รูปแบบจีโนไทป์ของยีน *Inhibin* สามารถตรวจสอบได้โดยวิธี Real-time PCR โดยให้ผลที่แม่นยำและรวดเร็วกว่าการตรวจสอบด้วยวิธี PCR-RFLP ซึ่งเป็นวิธีเดิมที่มีความยุ่งยากและใช้เวลามาก ทั้งนี้รูปแบบจีโนไทป์ที่แตกต่างกันของ exon 1 ในยีน *Inhibin* ส่วนที่สร้างฮอร์โมน *INHA* มีผลต่ออัตราการตกไข่จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการตกไข่คราวละมากๆ (superovulation) โดยรูปแบบ GG จะให้ตัวอ่อนที่สามารถนำไปใช้ในการย้ายฝากได้มากที่สุดตามวัตถุประสงค์ของการทำ superovulation สามารถใช้เป็นแนวทางคัดเลือกแม่โคตัวให้ (donor) ที่มีลักษณะดีตรงตามจุดประสงค์การสร้างและพัฒนาสายพันธุ์เพื่อการผลิตตัวอ่อนสำหรับการย้ายฝากเช่นการสร้างโคเนื้อคุณภาพสูงไทยเบ็ดสีของกรมปศุสัตว์ ช่วยลดระยะเวลา ค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงดูและการเหนี่ยวนำการตกไข่ และอาจนำไปศึกษาต่อเนื่องในโคพันธุ์อื่นๆต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. 2552. เครื่องหมายดีเอ็นเอ: จากพื้นฐานสู่การประยุกต์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- Armstrong, D.T. 1993. Recent advances in superovulation of cattle. *Theriogenology* 39: 7–24.
- Benyei, B., A. Gaspard and S. Cseh. 2003. Effect of the El Nino phenomenon on the ovarian responsiveness and embryo production of donor cows. *Acta Vet Hung.* 51: 209–218.
- Biancucci A., T. Sbaragli, A. Comin, L. Sylla, M. Monaci, T. Peric and G. Stradaoli. 2016. Reducing treatments in cattle superovulation protocols by combining a pituitary extract with a 5% hyaluronan solution: Is it able to diminish activation of the hypothalamic pituitary adrenal axis compared to the traditional protocol? *Theriogenology*. 85: 914–921.
- Bo G.A and R.J. Mapletoft. 2014. Historical perspectives and recent research on superovulation in cattle. *Theriogenology*. 81: 38–48.
- Butler W.R. 2000. Nutritional interactions with reproductive performance in dairy cattle. *Anim Reprod Sci.* 60–61: 449–457.
- Hamilton S.A., H.A. Garverick, D.H. Keisler, Z.Z. Xu, K. Loos, R.S. Youngquist and B.E. Salfen. 1995. Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows. *Biol Reprod.* 53:890–898.
- Hasler, J.F. 2003. The current status and future of commercial embryo transfer in cattle. *Anim Reprod Sci.* 79:245–264.

- Hooper, L.M., R.R. Payton, L.A. Rispoli, A.M. Saxton and J.L. Edwards. 2015. Impact of heat stress on germinal vesicle breakdown and lipolytic changes during in vitro maturation of bovine oocytes. *J Reprod Dev.* 61: 459-464.
- Hua, G.H., S.L. Chen, H.W. Yao, W.S. W.u, Z. Shen, Q.K. Chen, L. Chen, Q.Y. Wen and LG. Yang. 2007. Hae RFLP of INHA and its relationship to goat litter size. *Yi Chuan.* 29:972-976.
- Ishigame, H., M.S. Medan, G. Watanabe and Z. Shi. 2004. A new alternative method for superovulation using passive immunization against inhibin in adult rats. *Biol. Reprod.* 71: 236-243.
- Kaneko, H., H. Kishi, G.Watanabe, K. Taya, S. Sasamoto, and Y. Hasegawa. 1995. Changes in plasma concentrations of immunoreactive inhibin, estradiol and FSH associated with follicular waves during the estrous cycle of the cow. *J Reprod Dev.* 41:311-320.
- Lu, C., W. Yang, M. Chen, T. Liu, J. Yang, P. Tan, L. Li, X. Hu, C. Fan, Z. Hu, and Y. Liu. 2009. Inhibin A inhibits follicle-stimulating hormone (FSH) action by suppressing its receptor expression in cultured rat granulosa cells. *Mol Cel Endocrinol.* 298:48-56.
- Malhi, P.S., G.P. Adams, R.J. Mapletoft, and J. Singh. 2008. Superovulatory response in a bovine model of reproductive aging. *Anim. Reprod. Sci.* 109: 100-109.
- Mapletoft, R.J. and J.F. Hasler. 2005. Assisted reproductive technologies in cattle: a review. *Rev. Sci. Tech* 24: 393-403.
- McNeilly, A.S., W. Crow, and B.K. Campbell. 1991. Effect of follicular fluid and inhibin immunoneutralization on FSH-induced preovulatory follicle growth in the ewe. *J Endocrinol* 131:401-409.
- Mei, C., M.Y. Li, S.Q. Zhong, Y. Lei, and ZD. Shi. 2009. Enhancing embryo yield in superovulated holstein heifers by immunization against inhibin. *Rep Domest Anim* 44:735-739.
- National Center for Biotechnology Information, NCBI. The BLAST Sequence Analysis program. https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch#
- New England BioLabs. NEBcutter V2.0. <http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php>
- Picton, H.M., C.G. Tsonis, and A.S. McNeilly. 1990. FSH causes a time dependent stimulation of preovulatory follicle growth in the absence of pulsatile LH secretion in ewes chronically treated with gonadotrophin-releasing hormone agonist. *J Endocrinol* 126:297-307.
- Robertson, D.M., L.M. Foulds, L. Leversha, F.J. Morgan, M.T.W. Hearn, H.G. Burger, R.E.H. Wettenhall, and D.M. de Kretser. 1985. Isolation of inhibin from bovine follicular fluid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 126, 220-226.
- Sang, L., Q.Z. Du, W.C. Yang, K.Q. Tang, J.N. Yu, G.H. Hua, X.X. Zhang, and L.G. Yang. 2011. Polymorphisms in follicle stimulation hormone receptor, inhibin alpha, inhibin beta A, and prolactin genes, and their association with sperm quality in Chinese Holstein bulls. *Anim. Reprod Sci.* 126: 151-156.

- Sasaki, K., MS. Medan, G. Watanabe, S. Sharawy, and K. Taya. 2006. Immunization of goats against inhibin increased follicular development and ovulation rate. *J Reprod Dev* 52:543–550.
- Sunderland, SJ., MA. Crowe, MP. Boland, JF. Roche, and JJ. Ireland. 1994. Selection, dominance and atresia of follicles during the oestrous cycle of heifers. *J Reprod Fertil*. 101:547–555.
- Takedomi, T., H. Kishi, MS. Medan, Y. Aoyagi, M. Konishi, T. Itoh, S. Yazawa, G. Watanabe, and K. Taya. 2005. Active immunization against inhibin improves superovulatory response to exogenous FSH in cattle. *J Reprod Dev* 51:341–346.
- Tang, KQ., SJ. Li, WC. Yang, JN. Yu, L. Han, X. Li, and LG. Yang. 2011. An Mspl polymorphism in the inhibin alpha gene and its associations with superovulation traits in Chinese Holstein cows. *Mol Biol Rep* (2011) 38:17–21.
- Thatcher, WW., F. Moreira, JE. Santos, and RC. Mattos. 2001. Effects of hormonal treatments on reproductive performance and embryo production. *Theriogenology* 55: 75-89.
- Todoroki, J., H. Yamakuchi, K. Mizoshita, N. Kubota, N. Tabara, J. Noguchi, K. Kikuchi, G. Watanabe, K. Taya, and H. Kaneko. 2001. Restoring ovulation in beef donor cows with ovarian cysts by progesterone-releasing intravaginal Silastic devices. *Theriogenology*. 55:1919–1932.
- Untergasser, A. and H. Nijveen. 2007. Primer3Plus. <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plusAbout.cgi>
- Woad, KJ., SM. Pearson, SE. Harris, K. Gersak, and AN. Shelling. 2009. Investigating the association between inhibin alpha gene promoter polymorphisms and premature ovarian failure *Fertil Steril*. 91:62–66.
- Yang, WC, SJ. Li, Y. Chen, and LG. Yang. 2014. Polymorphism of the inhibin β A gene and its relationship with superovulation traits in Chinese Holstein cows. *Genet. Mol. Res.* 13(1): 269-275 .

ผลของ GnRH ต่ออัตราการผสมติดในแพะเนื้อลูกผสมที่เหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย CIDR-G®

ชาญยุทธ กากล^{1/} จิตศักดิ์ เมืองเขียว^{1/} อุบลรัตน์ วิชัยดิษฐ์^{1/} ณัฐพร จัวยจุลเจิม^{2/}

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวงรอบการเป็นสัดรวมทั้งระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ระยะเวลาการเป็นสัดและผลของฮอร์โมน GnRH ต่ออัตราการผสมติดในแม่แพะเนื้อลูกผสมบอร์-แอ่งโกลนุเป็น การทดลองที่ 1 ใช้แม่แพะจำนวน 15 ตัว เก็บตัวอย่างเลือด (10 ml.) ทุก 3 วันตลอดวงรอบการเป็นสัดติดต่อกัน 3 วงรอบตรวจวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วยเทคนิค Radioimmunoassay (RIA) ผลการศึกษา พบว่า วงรอบการเป็นสัด ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในระยะ follicular phase ระยะ Luteal phase และ ระยะเวลาเป็นสัดมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 21.16 ± 4.51 วัน 0.31 ± 0.25 ng/ml 3.65 ± 1.96 ng/ml และ 41.13 ± 1.17 ชั่วโมงตามลำดับการทดลองที่ 2 ใช้แม่แพะ จำนวน 52 ตัว แบ่งเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 26 ตัว กลุ่มควบคุม และกลุ่ม ศึกษา ทำการเหนี่ยวนำการเป็นสัดแม่แพะทุกตัว ด้วย CIDR- G®(day 0) 14 วัน ฉีด PMSG 150 IU และ PGF_{2α} 125 µg. ก่อนถอด CIDR- G® 2 วัน (day 12) ผสมเทียมที่ 24 ชั่วโมงหลังเป็นสัดยืนนิ่งทั้ง 2 กลุ่ม แต่กลุ่มศึกษา (Experimental group) ได้รับ GnRH 10 µg. เข้ากล้ามเนื้อพร้อมผสมเทียม ผลการศึกษาพบว่าอัตราการผสมติด ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มศึกษามีค่าเฉลี่ย 38.46 ± 0.49 และ 42.31 ± 0.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ไม่แตกต่างอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

คำสำคัญ: GnRH อัตราการผสมติด วงรอบการเป็นสัด แพะ

เลขทะเบียนวิจัย: 57(1)-0208-003

^{1/}ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสุราษฎร์ธานีสุราษฎร์ธานี อำเภอบ้านนา จังหวัดสุราษฎร์ธานี

^{2/}มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานีอำเภอมะหะสรี จังหวัดสุราษฎร์ธานี

**Effect of GnRH on conception rate in crossbred meat goats
synchronized for estrus with CIDR-G[®]**

Chanyut kaphol^{1/}Jitthasak Maungkhiow^{1/}Ubonrat Wichaidit¹ Nattaporn Juijuljerm^{2/}

Abstract

The objectives of this study were to determine estrous cycle and its progesterone hormonal profile, duration of estrous and effect of GnRH on conception rate in Boer-Anglo Nubian crossbred does. Experiment 1 were conducted in 15 does, blood samples(10 ml.) were collected every 3 days during the estrous cycle, 3 cycles consecutively. Progesterone profile analysis was determined by Radioimmunoassay (RIA). The results showed estrous cycle and its progesterone profile (follicular phase as well as luteal phase) and duration of estrous as 21.16 ± 4.51 days, 0.31 ± 0.25 ng/ml (follicular phase), 3.65 ± 1.96 ng/ml (luteal phase) and 41.13 ± 1.17 hrs, respectively. Experiment 2: Fifty two does were divided into control group (n=26) and experimental group (n=26). All does were estrous synchronized with CIDR-G[®] (first day of insertion, d. 0) 14 days, PMSG 150 IU. and PGF_{2α} 125 µg. i/m on d.12 (2 days before CIDR-G[®] removal) and artificial inseminated (AI) 24 hrs after standing heat. Only does in experimental group were i/m with GnRH 10 µg. at the time of AI. The result revealed the conception rates of the control and experimental groups were $38.46 \pm 0.49\%$ and $42.31 \pm 0.50\%$, respectively, ($P > 0.05$).

Keywords: GnRH, Progesterone, Conception rate, Estrous cycle, Boer-Anglo Nubian crossbred

Registered No. 57(1) – 0208 – 003

^{1/}Suratthani Biotechnology and Artificial Insemination Research Center Phunphin District
Suratthani

^{2/}Suratthani Rajabhat University Mueang Suratthani

คำนำ

แพะจัดเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก มีระยะการอุ้มท้องประมาณ 150 วัน และมีโอกาสเกิดลูกแฝดสูง สามารถกินได้ทั้งใบไม้ พืชใบพุ่มตลอดจนหญ้า และพืชตระกูลถั่วต่างๆ ได้ดี ในพื้นที่ภาคใต้เกษตรกรให้ความสนใจเลี้ยงแพะเนื้อและนิยมเลี้ยงมากที่สุดคือแพะเนื้อลูกผสมบอร์-แองโกลนูเบียน เพราะเป็นที่ต้องการของตลาดเนื้อแพะ การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแพะจึงเป็นสิ่งจำเป็นต้องดำเนินการอย่างเร่งด่วน เพื่อเพิ่มปริมาณและกระจายแพะพันธุ์ดีให้เพียงพอความต้องการของตลาดและผู้บริโภค จำเป็นต้องใช้เทคโนโลยีชีวภาพทางการสืบพันธุ์ช่วยพัฒนาการผลิตแพะโดยเฉพาะการผสมเทียมซึ่งเป็นวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสัตว์และกระจายพันธุ์กรรมของสัตว์พันธุ์ดี ได้อย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการผสมเทียมแพะมีอัตราการผสมติดค่อนข้างผันแปรเช่น อัตราการผสมติด 32.00-52.00 เปอร์เซ็นต์ (นิวัฒน์ และคณะ, 2550) 13.33-30.00 เปอร์เซ็นต์ (อภิชัย และคณะ, 2553) 15.4-75.0 เปอร์เซ็นต์ (มาลีและคณะ, 2556) 41.5-50.0 เปอร์เซ็นต์ (วิศิษฐ์ และคณะ, 2557) อัตราการผสมติดจากการผสมเทียมที่มีความผันแปรอาจมีผลจากแพะที่เลี้ยงในเขตร้อนชื้นสามารถเป็นสัดได้ตลอดทั้งปี มีวงจรการเป็นสัด 3 รูปแบบ คือ วงรอบสั้น (11.50 ± 3.02 วัน) วงรอบปกติ (21.83 ± 2.03 วัน) และวงรอบยาว (23.81 ± 3.14 วัน) (จรรยา และศิริชัย, 2541) ระยะเวลาเป็นสัดยืนนิ่งไม่แน่นอน 34.06 ± 8.91 ชั่วโมง (ทองยศ และคณะ, 2527) 23.64 ± 12.86 ชั่วโมง (จรรยา, 2540) แพะแสดงอาการเป็นสัดไม่ชัดเจนสังเกตอาการเป็นสัดได้ยาก (Cheminear *et al.*, 1992) และเวลาการตกไข่ของแพะก็มีความหลากหลายไม่แน่นอน เช่น 20-48 ชั่วโมง (Akusu *et al.*, 1986) 30-36 ชั่วโมง (Gordon, 1997) และ 38 ชั่วโมง (Greyling and Van Niekerk, 1990) หลังเริ่มเป็นสัดยืนนิ่งหรือไข่จะตกในช่วงปลายของการเป็นสัดยืนนิ่ง (Goel and Angawel, 2003) จึงยากที่จะกำหนดเวลาที่เหมาะสมในการทำผสมเทียมให้สอดคล้องกับเวลาการตกไข่ของแพะ การใช้ฮอร์โมนเหนี่ยวนำการเป็นสัดร่วมกับฮอร์โมนที่กระตุ้นการตกไข่สำหรับควบคุมวงจรการเป็นสัดและเวลาการตกไข่เพื่อกำหนดเวลาที่เหมาะสมในการผสมเทียมเป็นวิธีการหนึ่งที่จะทำให้อัตราการผสมติดเพิ่มขึ้น เช่นใช้ฮอร์โมน Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) ร่วมกับฮอร์โมนอื่นในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดเพื่อกระตุ้นให้ระดับฮอร์โมน Luteinizing hormone (LH) สูงขึ้น (Beck *et al.*, 1996) ซึ่ง LH จะไปกระตุ้นให้เกิดการตกไข่ และอัตราการผสมติดจะเพิ่มขึ้น (Pierson *et al.*, 2003)

ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องศึกษาให้ทราบถึงวงจรการเป็นสัดระยะเวลาการเป็นสัด ที่แน่นอนของแพะ โดยการตรวจวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในระหว่างวงจรการเป็นสัดซึ่งจะบ่งชี้ได้อย่างชัดเจนว่าแพะนั้นกำลังเป็นสัดอย่างแท้จริงหรือไม่ หรือมีการเจริญและเปลี่ยนแปลงของ follicle หรือ corpus luteum (CL) หรืออยู่ในระยะใดของวงจรการเป็นสัด ซึ่งจะทำให้สามารถกำหนดเวลาที่เหมาะสมในการผสมเทียมแพะจากการเป็นสัดตามธรรมชาติได้ถูกต้องเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและสร้างองค์ความรู้เพิ่มเติมเพื่อพัฒนางานผสมเทียมแพะต่อไป

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาวงจรการเป็นสัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ระยะเวลาการเป็นสัด ของแพะเนื้อลูกผสมบอร์-แองโกลนูเบียนและเพื่อเปรียบเทียบผลของฮอร์โมน GnRH ร่วมกับโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย CIDR-G® ต่ออัตราการผสมติด (conception rate) ในแม่แพะเนื้อลูกผสมบอร์-แองโกลนูเบียน ระยะเวลาหลังถอด CIDR-G® ถึงเป็นสัดยืนนิ่ง

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1**สัตว์ทดลอง**

แม่แพะเนื้อลูกผสมบอร์-แองโกลนูเบียนหลังคลอดลูกไม่น้อยกว่า 30-45 วัน จำนวน 15 ตัว สุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง ไม่มีความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ให้ลูก(parity)มาแล้ว 1 ครอก น้ำหนักตัวระหว่าง 25-45 กิโลกรัมแพะทุกตัวได้รับอาหารหยาบและน้ำสะอาดแบบเต็มที่ เสริมอาหารข้นโปรตีนไม่น้อยกว่า 14 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 300 กรัม/ตัว/วัน มีแร่ธาตุก้อนให้ตลอดการทดลอง ปรับสภาพแม่แพะโดยการถ่ายพยาธิและฉีดวิตามินบำรุง ให้มีคะแนนร่างกายระหว่าง 3-3.5 (BCS 1-5) ก่อนเริ่มดำเนินการทดลอง แพะทุกตัวมีระบบการเลี้ยงและการจัดการเหมือนกันโดยทำการทดลอง ณ ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสุราษฎร์ธานี

วิธีการทดลอง

เก็บตัวอย่างเลือด 10 มิลลิลิตรต่อตัว บริเวณเส้นเลือดดำที่คอ (jugular vein) ติดต่อกัน 3 วงรอบการเป็นสัดปั่นแยกซีรัม (Serum) ภายใน 2 ชั่วโมง เก็บซีรัมที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตรวจวิเคราะห์ปริมาณของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ด้วยเทคนิค Radioimmunoassay (RIA) และตรวจการเป็นสัดวันละ 4 ครั้ง โดยใช้แพะพ้อพันธุ์ที่เปียงเบนลิงค์ร่วมกับสังเกตอาการเป็นสัดของแม่แพะ การบันทึกข้อมูล

1) วงรอบการเป็นสัด (Estrous cycle: day) หมายถึง ระยะเวลาที่แพะเป็นสัดยืนนิ่งยอมรับการขึ้นทับจากพ้อแพะครั้งแรกในรอบการเป็นสัดครั้งที่ 1 ถึงเวลาที่แพะเป็นสัดยืนนิ่งยอมรับการขึ้นทับจากพ้อแพะครั้งแรกในรอบการเป็นสัดครั้งถัดไป

2) ระยะเวลาการเป็นสัด (Duration of estrus: hr.) หมายถึง ระยะเวลาที่แพะเริ่มเป็นสัดยืนนิ่งยอมรับการขึ้นทับของพ้อแพะครั้งแรกถึงครั้งสุดท้ายในรอบการเป็นสัดเดียวกัน

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นของวงรอบการเป็นสัดและระยะเวลาการเป็นสัด โดยนำมาหาพิสัย ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนแต่ละระยะโดยนำมาหา พิสัย ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การทดลองที่ 2**สัตว์ทดลอง**

แม่แพะเนื้อลูกผสมบอร์-แองโกลนูเบียนจำนวน 52 ตัว มีสุขภาพแข็งแรงไม่มีความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ น้ำหนักตัวระหว่าง 25-45 กิโลกรัมมีคะแนนร่างกายระหว่าง 2.0-4.0 (BCS 1-5) มีสภาพการเลี้ยงและสภาพแวดล้อมคล้ายคลึงกันจำนวน 2 ฟาร์มๆ ละ 26 ตัว ในพื้นที่ใกล้เคียงกัน ของจังหวัดสุราษฎร์ธานี ในแต่ละฟาร์มแบ่งแพะออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 13 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (Control group) สอด CIDR- G[®]14 วัน(day 0) ฉีด PMSG 150 IU และ PGF_{2α} 125 µg. ก่อนถอด CIDR- G[®]2 วัน (day 12) ผสมเทียมที่ 24 ชั่วโมงหลังแพะเป็นสัดยืนนิ่ง

กลุ่มที่ 2 กลุ่มศึกษา (Experimental group) สอด CIDR- G[®]14 วัน(day 0) ฉีด PMSG 150 IU และ PGF_{2α} 125 µg. ก่อนถอด CIDR- G[®]2 วัน (day 12) ฉีด GnRH 10 µg. (GnRH: Receptal[®], 1 ml. ประกอบด้วย Buserslin acetate 4.00 µg.) เข้ากล้ามเนื้อพร้อมผสมเทียมที่ 24 ชั่วโมงหลังแพะเป็นสัดยืนนิ่ง

วิธีการทดลอง

แม่แพะทั้งสองกลุ่มได้รับการผสมเทียมเพียงครั้งเดียวในชั่วโมงที่ 24 หลังเริ่มเป็นสัดยืนนิ่ง ด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง (Frozen semen) ขนาด 0.25 มิลลิลิตรที่มีจำนวนอสุจิไม่น้อยกว่า 150 ล้านตัว และอัตราการเคลื่อนไหว

(motility) ไม่น้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์จากน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ตัวเดียวกัน ทำการผสมเทียมด้วยเจ้าหน้าที่คนเดียวกัน ตลอดการทดลอง ตรวจการตั้งท้องที่ 45 วัน หลังผสมเทียมด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ บันทึกข้อมูลระยะเวลาล้างถอด CIDR- G[®] ถึงเวลาเริ่มเป็นสัดขึ้นนิ่ง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นของอัตราการผสมติด และระยะเวลาล้างถอด CIDR- G[®] ถึงเวลาเริ่มเป็นสัดขึ้นนิ่ง โดยนำมาหา พิสัย ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน เปรียบเทียบอัตราการผสมติดด้วยวิธี Chi-square test

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลองที่ 1

วงจรการเป็นสัด (estrus cycle)

แพะเนื้อลูกผสมบอร์-แองโกลนูเปียน มีจำนวนวงจรการเป็นสัดทั้งหมด 47 วงรอบ มีความยาววงจรการเป็นสัดระหว่าง 9-27 วัน ค่าเฉลี่ยวงจรการเป็นสัดเท่ากับ 19.96 ± 5.36 วัน (Table 1) แบ่งเป็น 3 กลุ่มตามวิธีของ สุริย์และคณะ (2535) ดังนี้แบบวงรอบสั้น (ความยาววงรอบน้อยกว่า 17 วัน) แบบวงรอบปกติ (ความยาววงรอบ 17-25 วัน) และ แบบวงรอบยาว (ความยาววงรอบมากกว่า 25 วัน) ค่าเฉลี่ยวงจรการเป็นสัดของแต่ละแบบเท่ากับ 10.33 ± 2.65 , 21.26 ± 2.00 และ 27.00 ± 0.89 วัน ตามลำดับ ใกล้เคียงกับรายงานของ ทองเจือ (2545) ทำการศึกษาในแพะพื้นเมืองและลูกผสมพื้นเมืองค่าเฉลี่ยวงจรการเป็นสัดแต่ละแบบเท่ากับ 12.83 ± 5.41 , 20.91 ± 1.17 และ 36.77 ± 10.49 วัน ตามลำดับ ขณะที่รายงานของ จรวยและศิริชัย (2541) มีค่าเฉลี่ยวงจรการเป็นสัดแต่ละแบบเท่ากับ 6.77 ± 3.92 , 21.70 ± 1.98 และ 50.45 ± 29.71 วัน ตามลำดับ เช่นเดียวกับรายงานของ สุริย์และคณะ (2535) เท่ากับ 7.15 ± 0.86 , 21.25 ± 0.52 และ 50.89 ± 6.73 วันตามลำดับ จึงสรุปได้ว่าวงจรการเป็นสัดตามธรรมชาติของแพะสามารถเกิดได้ถึง 3 รูปแบบดังกล่าว แต่ส่วนใหญ่ที่พบมากที่สุด คือ วงจรการเป็นสัดแบบปกติ คือ ระหว่าง 17- 25 วัน ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้มีถึง 73.33 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับการศึกษาของ Farshad *et al.* (2008) ที่ศึกษาในแพะพันธุ์ Markhoz ไว้ที่ 73.00 เปอร์เซ็นต์ และค่าเฉลี่ยวงจรการเป็นสัดแบบปกติสอดคล้องกับรายงานของ จรวยและ ศิริชัย (2541) (21.70 ± 1.98 วัน) ส่วนทองเจือ (2545) ศึกษาในแพะสาวและแพะนางมีวงจรการเป็นสัดเฉลี่ย 20.62 ± 2.58 และ 20.91 ± 1.17 วัน ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับหลายการทดลองที่มีวงจรการเป็นสัดเท่ากับ 21.7 ± 0.7 วัน (Thompson *et al.*, 1983) 20.7 ± 0.7 วัน (Greyling, 2000) 21.2 ± 1.5 วัน (Zarkawi and Soukouti, 2001) แต่สูงกว่าในแพะพื้นเมืองในการศึกษาของทองยศและคณะ (2527) และ ฉวีวรรณ และคณะ (2526) มีวงจรการเป็นสัด 18.23 ± 4.40 วัน และ 17.94 ± 5.02 วัน ตามลำดับ ทั้งนี้ น่าจะเนื่องมาจากแพะพื้นเมืองมีความสมบูรณ์พันธุ์สูงกว่าแพะเนื้อลูกผสมบอร์-แองโกลนูเปียน และขึ้นกับพันธุ์ อายุ ฤดูกาล (Romano and Abella, 1997)

Table 1 Mean $\pm$ SD and percentage of estrous cycle in crossbred goats.

Estrous cycle (days)	Mean $\pm$ SD	Percentage
<17	10.33 $\pm$ 2.65	6.67
17-25	21.26 $\pm$ 2.00	73.33
>25	27.00 $\pm$ 0.89	20.00
Overall	19.96 $\pm$ 5.36	100.00

ระยะเวลาการเป็นสัด (duration of estrus)

แพะเนื้อลูกผสมบอร์-แองโกลนูเบียนมีระยะเวลาการเป็นสัด แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ระยะเวลาการเป็นสัดน้อยกว่า 36 ชั่วโมง (26.67%) กลุ่มที่ 2 ระยะเวลาการเป็นสัด 36-48 ชั่วโมง (20.00 %) และกลุ่มที่ 3 ระยะเวลาการเป็นสัดมากกว่า 48 ชั่วโมง (53.33 %) มีค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 29.36 $\pm$ 3.35, 43.33 $\pm$ 3.39 และ 50.70 $\pm$ 3.07 ชั่วโมง ตามลำดับ มีค่าเฉลี่ยทั้งหมดเท่ากับ 41.13 $\pm$ 1.17 ชั่วโมง (Table 2) สูงกว่า รายงานของ ทองยศ และคณะ (2527) จรวัย (2540) และทองเจือ (2545) ทำการศึกษาในแพะพื้นเมืองและแพะลูกผสมพื้นเมืองเท่ากับ 34.06 $\pm$ 8.91 ชั่วโมง, 23.64 $\pm$ 12.86 ชั่วโมง และ 21.80 $\pm$ 2.98 ชั่วโมง ตามลำดับ สาเหตุที่ระยะเวลาการเป็นสัดมีความผันแปรอาจเนื่องมาจากปัจจัยของพันธุ์ และปัจจัยอื่นๆ เช่นอายุ โภชนะ ฤดูกาล และอิทธิพลจากแพะตัวผู้ เป็นต้น (Gordon.I,1997) หากพิจารณาในกลุ่มที่ 2 และ 3 ที่มีระยะเวลาการเป็นสัดตั้งแต่ 36 ชั่วโมง คิดเป็น 73.33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงได้ว่าแพะส่วนมากจะมีระยะเวลาการเป็นสัดยืนนึ่งนานกว่า 36 ชั่วโมงและ Goel and Angawel (2003) รายงานว่าแพะที่เป็นสัดไขจะตกในช่วงปลายของการเป็นสัดยืนนึ่ง ดังนั้น จึงมีข้อเสนอแนะให้ทำการผสมเทียมแพะ 2 ครั้ง ในชั่วโมงที่ 36 และ 48 หลังเริ่มเป็นสัดยืนนึ่งจากการเป็นสัดตามธรรมชาติ

Table 2 Mean $\pm$ SD and percentage duration of estrus in crossbred goats.

Duration of estrus (hrs.)	Mean $\pm$ SD	Percentage
<36	29.36 $\pm$ 3.35	26.67
36-48	43.33 $\pm$ 3.39	20.00
>48	50.70 $\pm$ 3.07	53.33
Overall	41.13 $\pm$ 1.17	100.00

ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (plasma progesterone profile)

แม่แพะเนื้อลูกผสมบอร์-แอ็งโกลนูเบียนที่มีวงรอบการเป็นสัดแบบปกติ จำนวน 22 วงรอบในวันที่ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 หลังเป็นสัดยืนนิ่ง ปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเฉลี่ยเท่ากับ 0.17 ± 0.08 , 0.87 ± 0.35 , 2.70 ± 1.37 , 4.26 ± 1.94 , 4.80 ± 1.99 , 4.15 ± 2.26 , 1.66 ± 1.94 , 0.17 ± 0.07 ng/ml และ 0.20 ± 0.06 ng/ml ตามลำดับ โดยในวันที่ 0 เริ่มเป็นสัดยืนนิ่ง มีปริมาณฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนต่ำสุด มีค่าเฉลี่ย 0.17 ± 0.08 ng/ml จนถึงในวันที่ 3 หลังเป็นสัดยืนนิ่ง ซึ่งระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีค่าเฉลี่ย 0.87 ± 0.35 ng/ml (Figure 1) ทั้งนี้เนื่องจากอิทธิพลของฮอร์โมน FSH จากต่อมใต้สมองส่วนหน้ากระตุ้นให้เกิดการเจริญของ follicle พร้อมกับผลิต estrogen ออกมา ทำให้แพะแสดงอาการเป็นสัดในช่วง 1-3 วันแรก ไข่จะตกในช่วงนี้หลังการตกไข่จะมีการเจริญของ luteal cell พัฒนาเป็น CL ทำหน้าที่ผลิตและสร้างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจึงเริ่มเพิ่มขึ้นมากกว่า 1.00 ng/ml ตั้งแต่วันที่ 6 หลังเป็นสัดยืนนิ่งวันที่ 12 ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน มีค่าเฉลี่ยสูงสุด 4.80 ± 1.99 ng/ml และยังคงรักษาระดับไปจนถึง วันที่ 15 จึงเริ่มลดลงอีกครั้ง และลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 18 และต่ำกว่า 1.00 ng/ml ในวันที่ 21 (0.17 ± 0.07 ng/ml) จนถึงวันที่ 24 (0.20 ± 0.06 ng/ml) ซึ่งเป็นช่วงที่แม่แพะจะกลับมาแสดงอาการเป็นสัดอีกครั้งจากการเปลี่ยนแปลงระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน สามารถแบ่งวงรอบการเป็นสัดได้ 2 ระยะ คือ ระยะ Luteal phase หรือช่วงที่มี CL ระยะเวลาประมาณ 15 วัน ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีค่าเฉลี่ย 3.65 ± 1.96 ng/ml (1.00 - 11.57 ng/ml) และระยะ follicular phase หรือช่วงที่มี follicle และเกิดการตกไข่ ระยะเวลาประมาณ 6 วัน ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีค่าเฉลี่ย 0.31 ± 0.25 ng/ml (0.01 - 0.98 ng/ml) (Table 3) ซึ่งระดับโปรเจสเตอโรนในช่วงที่แพะเป็นสัดครั้งนี้มีค่าสูงกว่าที่มีรายงานในแพะพื้นเมืองไทยในช่วงเป็นสัดระหว่าง 0.10 - 0.20 ng/ml (กิตติยาและคณะ, 2528) และ 0.04 ± 0.30 ng/ml (ฉวีวรรณและคณะ, 2526) นอกจากนี้พบว่า การแสดงพฤติกรรมการเป็นสัดและการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของแพะจากการสังเกตในแบบวงรอบสั้น แบบวงรอบปกติ และแบบวงรอบยาวในครั้งนี้เป็นไปในทำนองเดียวกัน

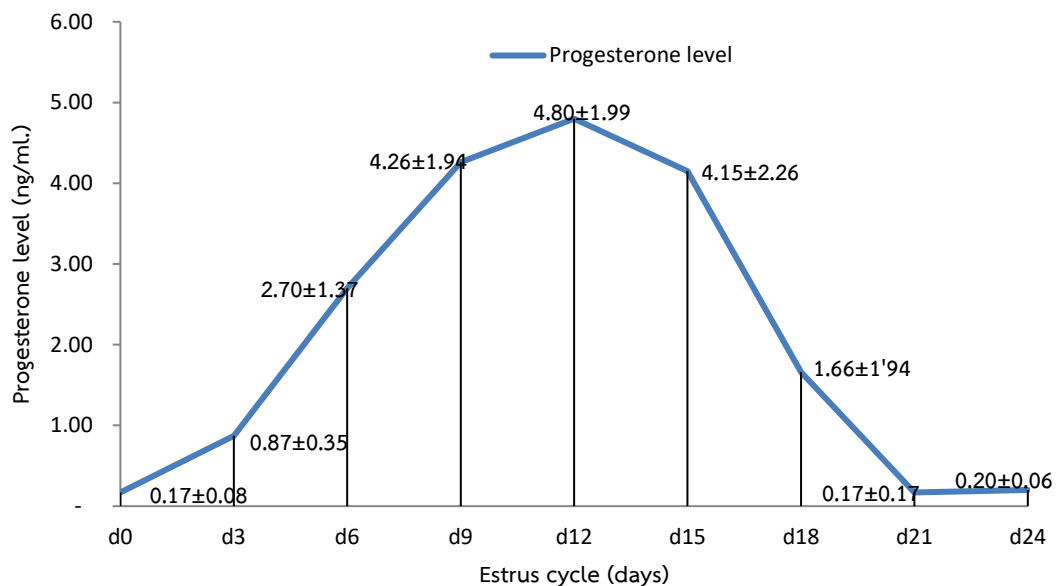


Figure.1 Plasma progesterone level (ng/ml) during the normal estrus cycle of crossbred goats.

Table 3 Plasma progesterone level (ng/ml) during the estrous cycle of crossbred goats.

Estrous cycle	Plasma progesterone level (ng/ml)			
	Luteal phase		Follicular phase	
	Range	Mean±SD	Range	Mean±SD
Short cycle (<18)	1.07-5.14	2.37±1.47	0.07-0.38	0.22±0.06
Normal cycle (18-24)	1.02-11.57	3.88±1.99	0.04-0.98	0.32±0.25
Long cycle (>24)	1.00-5.76	3.12±1.27	0.01-0.92	0.29±0.27
Total	1.00-11.57	3.65±1.96	0.01-0.98	0.31±0.25

Table 4 Effect of GnRH on conception rate in crossbred does synchronized for estrus with CIDR-G

Group	No. crossbred does.(heads)	No.pregnancy.(heads)	Conception rate.(%)	Standard error mean
Control	26	10	38.46	0.097
Experimental	26	11	42.31	0.099

ผลการทดลองที่ 2

อัตราการผสมติดในกลุ่มควบคุมและกลุ่มศึกษาเฉลี่ยเท่ากับ 38.46 และ 42.31 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่กลุ่มศึกษามีแนวโน้มสูงกว่า (Table 4) อย่างไรก็ตามยังมีค่าต่ำกว่าการศึกษาของ Pierson *et al.*, (2003) ที่ศึกษาในแกะโดยใช้ MAP-sponge และ PGF_{2α} ร่วมกับการฉีด GnRH หลังถอด MAP-sponge 24 ชั่วโมง อัตราการผสมติดในกลุ่มที่ฉีดและในกลุ่มที่ไม่ฉีด เท่ากับ 83.00 และ 50.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Riaz *et al.*, (2012) รายงานการฉีด GnRH ร่วมกับการฉีด PG ในแพะและใช้ฟอพันธุ์ผสมพบว่าอัตราการผสมติด 60.00 และ 78.00 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ระยะเวลาหลังถอด CIDR-G ถึงเริ่มเป็นสัดยืนนิ่ง (Time of CIDR-G removal to Onset of estrus) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 23.82±4.64 ชั่วโมง (12.35-47.05 ชั่วโมง) ใกล้เคียงกับ อภิชัยและคณะ (2553) รายงานค่านี้ไว้ที่ 29.05±7.64 ชั่วโมง (CIDR-G-Day16) แต่น้อยกว่ารายงานของ Romano (2004) (40.2 ±10.5 h.)

สรุปผลการทดลอง

1. วงรอบการเป็นสัดในแม่แพะเนื้อลูกผสมบอร์-แองโกลนูเบียนมี 3 รูปแบบ คือ แบบวงรอบสั้น (10.33 ± 2.65 วัน) แบบวงรอบปกติ (21.26 ± 2.00 วัน) และแบบวงรอบยาว (27.00 ± 0.89 วัน) เฉลี่ยเท่ากับ 19.96 ± 5.36 วัน
2. ระยะเวลาการเป็นสัดในแม่แพะเนื้อลูกผสมบอร์-แองโกลนูเบียนแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ น้อยกว่า 36 ชั่วโมง 36-48 ชั่วโมง และมากกว่า 48 ชั่วโมงเฉลี่ยเท่ากับ 41.13 ± 1.17 ชั่วโมง
3. ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในระยะ follicular phase มีค่าเฉลี่ย 0.31 ± 0.25 ng/ml และระยะ Luteal phase มีค่าเฉลี่ย 3.65 ± 1.96 ng/ml
4. ระยะเวลาหลังคลอด CIDR-G ถึงเป็นสัดขึ้นนิ่งมีค่าเฉลี่ย 23.82 ± 4.64 ชั่วโมง
5. อัตราการผสมติดในแพะลูกผสมบอร์-แองโกลนูเบียนจากการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย CIDR-G® 14 วัน ระหว่างกลุ่มไม่ฉีด GnRH และกลุ่มที่ฉีด GnRH พร้อมกับการผสมเทียมไม่แตกต่างกัน (38.46 ± 0.49 และ 42.31 ± 0.50 เปอร์เซ็นต์)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่สนับสนุนทุนวิจัย กรมปศุสัตว์ที่ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยและผู้มีส่วนร่วมในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ เจ้าของฟาร์มผู้เลี้ยงแพะและเจ้าหน้าที่ทุกท่านของศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสุราษฎร์ธานี ที่ให้ความช่วยเหลือในการปฏิบัติการ การเก็บข้อมูล และการอำนวยความสะดวกต่างๆ ตลอดจนผู้ทรงคุณวุฒิที่ให้คำปรึกษา ตรวจสอบ แก้ไข งานวิจัยฉบับนี้จนทำให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กิตติยา ศรีศักดิ์วัฒนะ ฉวีวรรณ จันสกุล, จันท์เพ็ญ พันธุ์สิน และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2528. ปลาสม่าโปรเจสเตอโรนและเอสโตรเจนซัลเฟตระหว่างการจัดท้องคลอดและหลังคลอดในแพะพื้นเมืองไทย โดยเทคนิคทางไมโครโตเอกซเพลทเอนไซม์อิมมูโนเอสเซ, น 73-75. ในบทคัดย่อการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 23 (สาขาสัตวแพทย์). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- จรรยา บุญชู. 2540. วงรอบการเป็นสัดของแพะและการชักนำให้เกิดการตกไข่มากกว่าปกติโดยใช้ Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- จรรยา บุญชู และศิริชัยศรีพงศ์พันธุ์. 2541. วงรอบการเป็นสัดและการเป็นสัดแบบมีพักยกในแพะ. เอกสารการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36 (สาขาสัตวศาสตร์). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ฉวีวรรณ จันสกุล จันท์เพ็ญ พันธุ์สิน และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2526. การศึกษาวงจรสัดของแพะพื้นเมืองไทยและระดับโปรเจสเตอโรนระหว่างวงจรสัดโดยเทคนิคทางเรดิโออิมมูโนเอสเซ, น51. ใน เรื่องย่อการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 20 (สาขาสัตวศาสตร์). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ทองเจือ แดงชื่น. 2545. สมรรถภาพทางสืบพันธุ์ในแพะที่ชักนำด้วยการเป็นสัดด้วย Prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ทองยศ อนเนกเวียง สุรัชย์ ชาศิริรัตน์ และชวนิศนดากร วรวรรณ. 2527. การตรวจการเป็นสัดและการตกไข่ของแพะพื้นเมือง, น24. ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 20 (สาขาสัตวศาสตร์). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

- นิวัฒน์ ถาวระ อนนท์ เทืองสันเทียะ และบันลือ กล้าพลู. 2550. การเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย CIDR-G และ $\text{PGF}_{2\alpha}$ ร่วมกับ PMSG ต่ออัตราการผสมติดในแพะพันธุ์ชานน. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ 2(1):1-7.
- มาลี อภิเมธีธำรง จักรภพ จันทร์สะอาด บรรจง จงรักษ์วัฒนา วิทยา ขจีรัมย์ อรุณ ชุมแก้ว และณรงค์ เลี้ยงเจริญ. 2556. อัตราการตั้งท้องหลังผสมเทียมแบบกำหนดเวลาในแพะที่เหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบโปรแกรมระยะสั้น. ว. วิทย. กษ. 44:1 (พิเศษ): 207-210
- วิศิษฐ์ ทองเที่ยง กฤษณ์ วีระวงศ์ วิทยา ขจีรัมย์ และอรุณ ชุมแก้ว. 2557. เปรียบเทียบอัตราผสมติดระหว่างการผสมเทียมครั้งเดียวและสองครั้งแบบกำหนดเวลาหลังการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะพื้นเมืองลูกผสมในภาคใต้ของประเทศไทย. <http://req.dld.go.th:28080/research/index.jsp>, 4 กรกฎาคม 2559.
- สุรีย์ ขาติวงงาม มณีวรรณ กมลพัฒนะ พรพิมล ศิริรัตน์ พัทธา ศุภธิสกุล มุกดา ปลุกผล และศิริชัย ศรีพงศ์พันธุ์. 2535. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนภายในวงจรการเป็นสัดของแพะพื้นเมืองไทยโดยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเซ. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ของโครงการวิจัยที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมด้วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติประจำปี 2533-2535. ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- อภิชัย พูลชัย อนนท์ เทืองสันเทียะ ณรงค์ เลี้ยงเจริญ บันลือ กล้าพลู และมาลี อภิเมธีธำรง. 2553. การเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมแพะด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ 5(1):110-119.
- Akusu, M. O., A. I. A. Osuagwuh, J. U. Akpokodje and G. N. Egbunike. 1986. Ovarian activities of the West Africa Dwarf goat (*Capra hircus*) during oestrus. *Journal of Reproduction and Fertility*. 78: 459-462.
- Beck, N. F. G., M. Jones, G. E. Mann and A. R. Peter. 1996. The effect of GnRH analogue (buserelin) on day 12 post-mating on ovarian structure and plasma oestradiol and progesterone concentration in ewes. *Anim Sci*. 63: 407-412.
- Chemineau, P., A. Deveau, F. Maurice and J. A. Delgadillo. 1992. Seasonality of oestrus and ovulation is not modified by subjecting female Alping goat to a tropical photoperiod. *Small Rum. Research*. 8: 299-312.
- Farshad, A., S. Akhondzadeh, M. J. Zamiri and G. H. Sadeghi. 2008. The estrus cycle of the markhoz goat in Iran. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* Vol. 21(10) : 1411 – 1415.
- Goel, A.K. and K.P. Agrawal, 2003. Ovulation jakhrana goat native to tropical climates. *Small Ruminant Research*. 3(5): 457-464.
- Gordon, I. 1997. *Controlled Reproduction in sheep and goats* CABI publishing, New city 450 pp.
- Greyling, J.P.C. and Van Niekerk, C.H. 1990. Ovulation in the boer goat doe. *Small Ruminant Research*. 3(5): 457-464.
- Greyling, J.P.C. 2000. Reproduction traits in Boer goat doe. *Small Rumin. Res.* 36:171-177.
- Pierson, J.T.H., Baldassarre, C.L. keefer and B.R. Downey. 2003. Influence of GnRH administration on timing of the LH surge and ovulation in dwarf goat. *Theriogenology* 60:397-406.

- Riaz, H., A. Sattar, M.A. Arshad and N. Ahmad. 2012. Effect of synchronization protocols and GnRH treatment on the reproductive performance in goats. *Small Ruminant Research*. 104 : 151-155.
- Romano, J. E. and D. F. Abella. 1997. Effect of service on duration of oestrus and ovulation in dairy goats. *Anim. Reprod. Sci.* 47:107-112.
- Romano, J. E. 2004. Synchronization of estrus using CIDR, FGA or MAP intravaginal pessaries during the season in Nubian goats. *Small Ruminant Research*. 55:15-19.
- Thompson, F. N., E. Abrams and D. M. Miller. 1983. Reproductive traits in Nubian dairy goats. *Anim. Reprod. Sci.* 6:59-65.
- Zarkawi, M. and A. Soukouti. 2001. Serum progesterone levels using radioimmunoassay during oestrous cycle of indigenous Damascus does. *New Zealand J. Agric. Res.* 44:165-169.

ประสิทธิภาพของฮอร์โมนเอสโตรเจนและพีเอ็มเอสจี เมื่อใช้ร่วมกับ CIDR-G

ต่อการแสดงการเป็นสัดและอัตราการผสมติดในแพะ

สาโรช งามคำ^{1/} พีระพงษ์ สำราญทรัพย์^{2/}

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลของการเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้ฮอร์โมนเอฟเอสเอช และพีเอ็มเอสจี ร่วมกับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอดต่อการแสดงอาการเป็นสัดและ อัตราการผสมติดในแพะโดยใช้แม่แพะนมพันธุ์ซาเนนจำนวน 20 ตัวแบ่งแพะออกเป็น 2 กลุ่มๆละ 10 ตัวทำการสอดฮอร์โมน CIDR-G เป็นเวลา 13 วันและในวันที่ถอดฮอร์โมนออก กลุ่มที่ 1 ฉีดฮอร์โมนพีเอ็มเอสจี 200 IU.และกลุ่มที่ 2 ฉีดฮอร์โมนเอฟเอสเอช 55 mg. ตรวจอาการเป็นสัดแพะทุกตัว และทำการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีจำนวนตัวอสุจิไม่ต่ำกว่า 200 ล้านตัว/โดสโดยปล่อยน้ำเชื้อที่บริเวณคอมดลูกในช่วงเวลาที่ 48 และ 72 หลังถอด CIDR-G ตรวจการตั้งท้องโดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์หลังจากการผสมเทียมไปแล้ว 35 วันและติดตามลูกเกิด ทำการทดลองซ้ำในแพะทั้งสองกลุ่ม จนถึงการให้ลูกในท้องที่ 3 ผลการทดลองพบว่า แพะแสดงอาการเป็นสัดอัตราการผลิตและจำนวนลูกเกิดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยแพะในกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 มีระยะเวลาแสดงอาการเป็นสัดเท่ากับ 39.6 ± 10.8 ชั่วโมง และ 35.2 ± 10.7 ชั่วโมง และอัตราการผสมมีค่าเท่ากับ 47% และ 50% สรุปผลการทดลองได้ว่าการใช้ฮอร์โมน CIDR-G ร่วมกับฮอร์โมนพีเอ็มเอสจีหรือฮอร์โมนเอฟเอสเอชเพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัดและทำการผสมเทียมสามารถทำให้แพะแสดงอาการเป็นสัดและมีอัตราการผสมติดไม่แตกต่างกัน

คำสำคัญ พีเอ็มเอสจี เอฟเอสเอช อัตราการผลิตแพะ

เลขทะเบียนวิจัย: 54(1)-0108-041

^{1/}สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

^{2/} ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพราชบุรีสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

Comparative Efficiency of FSH and PMSG with CIDR-G

on Estrus response and Pregnancy rate in Goats

Saroeh Ngamkhum^{1/} Peerapong Sumransap^{2/}

Abstract

The objectives of this study were to compare the results of repeated used of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) and follicle stimulating hormone (FSH) with progesterone intra vaginal device (CIDR-G) for estrus induction and conception rate in goats. Twenty saanen goats were divided into 2 groups. Each group included 10 does that was inserted with CIDR-G for 13 days. At the day of removed hormone, Does in the first groups was injected with PMSG 200 IU while the second group was injected with FSH 55 mg intramuscular. Estrus detection was done and all does that showed estrus sign were intra cervical inseminated with frozen semen which have total sperms 200 million per dose at the 48th and 72th h after hormone removal. Pregnancy diagnosis was done by ultrasound at 35th days after insemination then observe the kids. Then do the repeated experiment until the does gave the third kids. The results showed that there was no statistical difference between the group in estrus response and conception rate ($p > 0.05$). Goats showed estrus by duration of estrus for both groups were 39.6 ± 10.8 h and 35.2 ± 10.7 h and conception rate of group I was 47% and group II was 50%. It can indicated that synchronized estrus using CIDR-G with PMSG or FSH mg be the same effective in estrus response and conception rate although repeated use of PMSG or FSH

Key word: PMSG, FSH, pregnancy rate, goat

Registered No. 54(1)-0108-041

¹Bureau of biotechnology in livestock production

²Ratchaburi artificial insemination and biotechnology research center Bureau of biotechnology in livestock production

คำนำ

ปัจจุบันเกษตรกรมีการเลี้ยงแพะเพิ่มขึ้น รูปแบบการเลี้ยงส่วนใหญ่ยังเป็นการเลี้ยงแบบปล่อยและใช้พ่อพันธุ์แพะคุมฝูง ซึ่งหากไม่มีการจัดการฝูงที่ดีและปล่อยให้คุมฝูงเป็นเวลานาน ปัญหาที่เกิดขึ้นคือการผสมเลือดชิดเป็นผลให้ลูกมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ สุขภาพไม่แข็งแรง ติดโรคได้ง่าย และอาจทำให้เกิดการแพร่โรคทางระบบสืบพันธุ์ เนื่องจากการใช้พ่อพันธุ์ที่ไม่ได้ผ่านการตรวจคัดกรองโรคก่อนนำเข้าฝูง นอกจากนี้ยังทำให้การปรับปรุงพันธุ์เป็นไปอย่างค่อนข้างช้า หากพ่อพันธุ์หรือแม่พันธุ์มีจำนวนไม่เพียงพอ การเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งเป็นวิธีที่สามารถช่วยแก้ปัญหานี้ได้

ปัจจุบันการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะเพื่อทำการผสมเทียม นิยมใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในรูปแบบที่สอดไว้ในช่องคลอด (intravaginal device) เช่น Controlled internal drug release – Goat (CIDR-G) (Mottomelo *et al.*, 2002; Romano, 2004) ร่วมกับการฉีดฮอร์โมนพีเอ็มเอสจี (Pregnant mare serum gonadotropins) พบว่าแพะจะแสดงอาการเป็นสัดชัดเจนทำให้กำหนดระยะเวลาการตกไข่และผสมเทียมได้ในระยะเวลาที่เหมาะสม ฮอร์โมนพีเอ็มเอสจีมีระยะเวลาการออกฤทธิ์ยาวนานและราคาสูง (Drion *et al.*, 2001) ซึ่งฮอร์โมนพีเอ็มเอสจีเป็นโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ มีผลกระตุ้นการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลและการตกไข่ เมื่อใช้ซ้ำบ่อยๆ ร่างกายจะมีการสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมาต่อต้านฮอร์โมนนี้ได้ ทำให้การเหนี่ยวนำการเป็นสัดในครั้งต่อไปอาจไม่ได้ผลหรือไม่มีการตอบสนองต่อฮอร์โมนดังกล่าว (Beckers *et al.*, 1990; Remy *et al.*, 1991; Bodin *et al.*, 1995; Baril *et al.*, 1992) ในขณะที่ฮอร์โมนเอฟเอสเอช (Follicle stimulating hormone) ซึ่งเป็น สเตียรอยด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก และมีผลกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิล (Pendelton *et al.*, 1992) เช่นเดียวกับพีเอ็มเอสจี แต่ไม่มีผลทำให้ร่างกายสร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมาต่อต้านฮอร์โมน

ดังนั้นจึงทำการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบผลของการเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้ฮอร์โมนเอฟเอสเอช และพีเอ็มเอสจี ร่วมกับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอดต่อการแสดงอาการเป็นสัดและ อัตราการผสมติดในแพะ

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

ทำการศึกษาในแม่แพะนมพันธุ์ชานาอายุ 2–5 ปีจำนวน 20 ตัว ที่มีสุขภาพร่างกายสมบูรณ์ ไม่เคยได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมน และผ่านการตรวจโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์ ที่ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพราชบุรี ระหว่างเดือนมีนาคม พ.ศ. 2555 ถึงเดือนกันยายน 2558 แบ่งแม่แพะออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 10 ตัวโดยวิธีการสุ่มทำการเหนี่ยวนำการเป็นสัดแม่แพะทั้ง 2 กลุ่ม โดยการสอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด (Eazi-Breed™ CIDR® Sheep and Goat Device, Pharmacia & Upjohn, NSW) เป็นเวลา 13 วัน และในวันที่ถอดฮอร์โมนแพะในกลุ่มที่ 1 ฉีดพีเอ็มเอสจีเข้ากล้ามเนื้อขนาด 200 IU. (Folligon®, Intervet International BV, Holland) กลุ่มที่ 2 ฉีดเอฟเอสเอชเข้ากล้ามเนื้อขนาด 55 mg. (Follltropin®, Vetoquinol, Canada) ตรวจการแสดงอาการเป็นสัดหลังถอด CIDR-G ทุก 3 ชั่วโมง

วิธีการทดลอง

แพะทั้งสองกลุ่มทำการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีจำนวนตัวอสุจิ 200 ล้านตัว/โดส จำนวน 2 ครั้ง ที่ 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมงภายหลังถอด CIDR-G โดยปล่อยน้ำเชื้อบริเวณคอมดลูก ตรวจการตั้งท้องด้วยเครื่องอัลตราซาวด์หลังจากผสมเทียม 35 วัน และติดตามลูกเกิดโดยแพะที่ไม่ตั้งท้องจะเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมจนกว่าจะติดตั้งท้อง ซึ่งแพะที่ให้ลูกในท้องแรกแล้ว จะทำการพักท้อง 3 เดือนและเริ่มเข้าสู่การทดลองซ้ำจนกว่าจะให้ลูกครบ 3 ท้องติดต่อกัน

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ทางสถิติ เปรียบเทียบการแสดงอาการเป็นสัดและอัตราผสมติดด้วยใช้ chi-square test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

ผลการทดลองและวิจารณ์

แพะในกลุ่มที่เหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย CIDR-G ร่วมกับ พีเอ็มเอสจีมีอัตราการเป็นสัดสูงสุดในครั้งแรกของการเหนี่ยวนำและจะค่อยๆ ลดลง ในรอบการการเหนี่ยวนำการเป็นสัดถัดมา แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ และมีระยะเวลาการแสดงการเป็นสัดที่ไม่แตกต่างกัน โดยมีระยะเวลาการแสดงการเป็นสัดเฉลี่ย 39.6 ± 10.8 ชม. อัตราการผสมติดและจำนวนลูกเกิดในแต่ละรอบการให้ลูกไม่มีความแตกต่างกัน โดยมีอัตราการผสมติดร้อยละ 47 และจำนวนลูกเกิดเฉลี่ยเท่ากับ 1.2 ตัว จำนวนครั้งของการผสมเทียมที่ทำให้เกิดการติดตั้งท้องในแต่ละรอบของการให้ลูก พบว่าผสมเทียมครั้งเดียวแล้วติดตั้งท้องจะมีจำนวนสูงสุด รองลงมาเป็นการผสมเทียมสองครั้ง และใช้การผสมเทียมสามครั้งตามลำดับ (Figure 1)

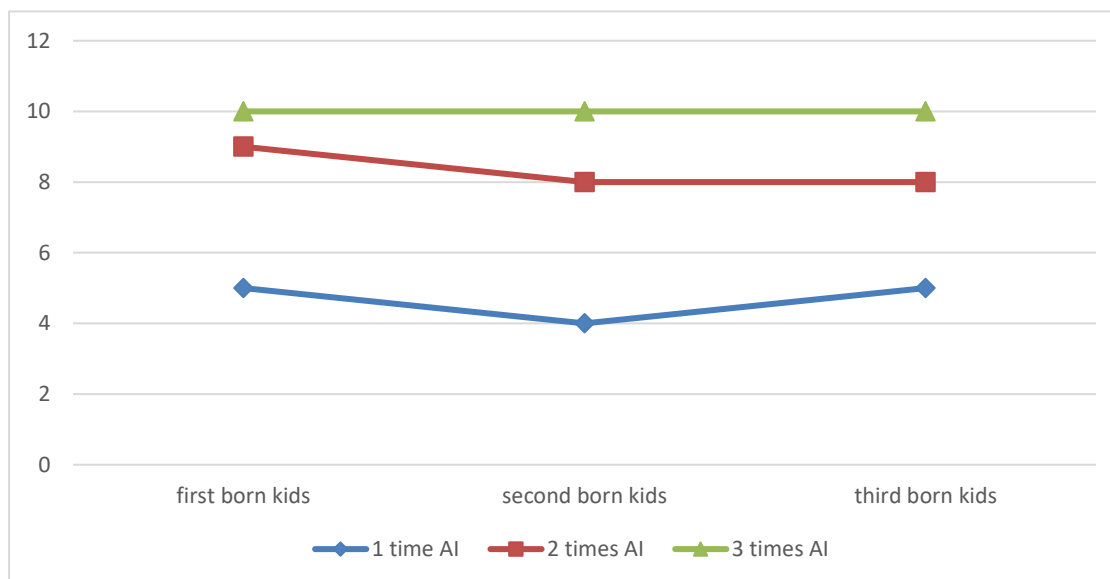


Figure 1 Services per conception in each born kids of goats induced estrus with CIDR-G and PMSG

แพะกลุ่มที่เหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย CIDR-G ร่วมกับฮอร์โมนเอฟเอสเอชในขนาด 55 mg พบว่าในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดครั้งแรกนั้น มีอัตราการตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำเป็นสัดที่สูงสุดและจะลดลง เมื่อจำนวนครั้งของการเหนี่ยวนำเป็นสัดเพิ่มขึ้น แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติและมีระยะเวลาการแสดงการเป็นสัดที่ไม่แตกต่างกัน โดยมีระยะเวลาการแสดงการเป็นสัดเฉลี่ย 35.2 ± 10.7 ชม. อัตราการผสมติดและจำนวนลูกเกิดในแต่ละรอบการให้ลูกไม่มีความแตกต่างกัน โดยมีอัตราการผสมติดร้อยละ 50 และจำนวนลูกเกิดเฉลี่ยเท่ากับ 1.3 ตัว จำนวนครั้งของการผสมเทียมที่ทำให้เกิดการติดตั้งท้องในแต่ละรอบของการให้ลูก พบว่าทำการผสมเทียมครั้งเดียวแล้วติดตั้งท้องจะมีจำนวนสูงสุด รองลงมาเป็นการผสมเทียมสองครั้ง และใช้การผสมเทียมสามครั้งตามลำดับ (Figure 2)

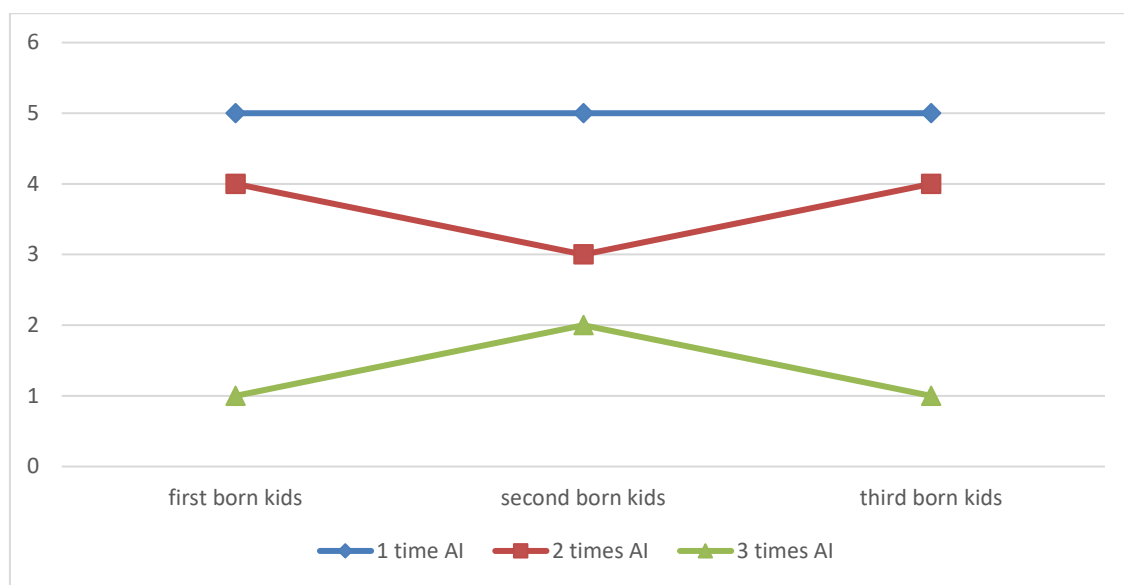


Figure 2 Services per conception in each born kids of goats induced estrus with CIDR-G and FSH

แพะในกลุ่มที่เหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย CIDR-G ร่วมกับพีเอ็มเอสจี กับกลุ่มที่เหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย CIDR-G ร่วมกับเอฟเอสเอชนั้น กลุ่มที่ใช้พีเอ็มเอสจีมีอัตราการตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำเป็นสัดที่ต่ำกว่า แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ระยะเวลาที่เริ่มแสดงการเป็นสัดในกลุ่มที่ใช้พีเอ็มเอสจีคือ 33.2 ± 9.6 ชม. ซึ่งช้ากว่ากลุ่มที่ใช้เอฟเอสเอชที่ใช้ระยะเวลา 28.0 ± 7.8 ชม. และมีระยะเวลาการแสดงการเป็นสัดที่ไม่แตกต่างกัน กลุ่มที่ใช้พีเอ็มเอสจีมีระยะเวลาการแสดงการเป็นสัดเฉลี่ย 39.6 ± 10.8 ชม. กลุ่มที่ใช้เอฟเอสเอชมีระยะเวลาการแสดงการเป็นสัดเฉลี่ย 35.2 ± 10.7 ชม. อัตราการผสมติดและจำนวนลูกเกิดในทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน โดยมีอัตราการผสมติดร้อยละ 47 และ 50 ส่วนจำนวนลูกเกิดเฉลี่ยเท่ากับ 1.2 และ 1.3 ตัว ตามลำดับ (Table 1)

Table 1 Comparison the Pregnancy rate, estrus response and number of kids in goats induced estrus used CIDR-G withPMSGand CIDR-Gwith FSH

Treatment groups	Estrus response (%)	Onset of estrus (h)	Estrus duration (h)	Pregnancy rate (%)
PMSG	94.4	33.2±9.6	39.6±10.8	47
FSH	96	28.0±7.8	35.2±10.7	50

ฮอร์โมนพีเอ็มเอสจี นิยมใช้ร่วมกับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมในแพะ ขนาดที่ใช้มีความแตกต่างกันค่อนข้างมาก ตั้งแต่ 200-600 IU (Amarantidis *et al.*, 2004; Leboeuf *et al.*, 1998) ฮอร์โมนพีเอ็มเอสจีมีระยะเวลาในการในการออกฤทธิ์ยาวนาน (Drion *et al.*, 2001; Fonseca *et al.*, 2005) พบว่าการใช้ฮอร์โมนพีเอ็มเอสจีร่วมในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะ นอกจากจะทำให้ประสิทธิภาพการสืบพันธุ์สูงขึ้นแล้วยังส่งผลทำให้จำนวนลูกต่อครอกเพิ่มสูงขึ้นด้วย แต่ก็มีการศึกษาต่อมาที่พบว่าการใช้ฮอร์โมนพีเอ็มเอสจี ซ้ำจำนวน 5 ครั้ง อาจกระตุ้นการสร้างแอนติบอดี ซึ่งจะส่งผลต่อประสิทธิภาพของฮอร์โมน (Becker *et al.*, 1990; Bodin *et al.*, 1995; Remy *et al.*, 1991) อาจพบการเป็นสัดหรือตกไข่ล่าช้าหรืออาจทำให้ไม่แสดงการเป็นสัด จากการเพิ่มขึ้นแอนติบอดีต่อฮอร์โมน (Baril *et al.*, 1996) แต่ในการศึกษารั้งนี้ซึ่งใช้ฮอร์โมนพีเอ็มเอสจีในขนาด 200 IU ไม่พบการลดลงของประสิทธิภาพระบบสืบพันธุ์ แม้จะมีการลดลงในการตอบสนองการเป็นสัด และอัตราการผสมติด เมื่อจำนวนครั้งในการใช้ฮอร์โมนเพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัดเพิ่มขึ้น ส่วนระยะเวลาการแสดงการเป็นสัดและจำนวนลูกเกิดมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น แต่ไม่มีความแตกต่างกันซึ่งแตกต่างกับการศึกษาของ Baril *et al.* (1992) ที่พบว่าการใช้ฮอร์โมนพีเอ็มเอสจีซ้ำในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดจะส่งผลให้ประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดลดลงอย่างมีนัยสำคัญโดยการใช้ฮอร์โมน PMSG ครั้งแรกจะมีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดที่ดีที่สุด

ส่วนฮอร์โมนเอฟเอสเอชที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการเจริญของกระเปาะไข่ได้เหมือนฮอร์โมนพีเอ็มเอสจี แต่จะมีผลทำให้ระยะเวลาการแสดงการเป็นสัดที่ยาวนานกว่า รวมทั้งอาจทำให้จำนวนกระเปาะไข่ที่เจริญเต็มที่มากขึ้น (Drion *et al.*, 2001; Amoah and Gelaye, 1990) มักถูกใช้ในแพะเพื่อกระตุ้นการเป็นสัดและทำให้เกิดการตกไข่หลายใบ โดยพบว่ามีประสิทธิภาพในการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ที่ดีกว่า PMSG ทั้งในแง่ปริมาณและคุณภาพ (Pendelton *et al.*, 1992; Rosnina, *et al.*, 1992; Tsunada and Sugies, 1989) Knight *et al.* (2001) ใช้ฮอร์โมนเอฟเอสเอชขนาด 55 มก. ร่วมกับโปรเจสเตอโรนในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแกะ ได้ผลอัตราการผสมติดครั้งแรกร้อยละ 49 เปอร์เซนต์ และพบว่าการตอบสนองการเป็นสัด จำนวนกระเปาะที่มากขึ้นและขนาดของกระเปาะไข่ที่ใหญ่กว่า รวมทั้งอัตราการตกไข่ที่มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเพียงอย่างเดียว Pendleton *et al.* (1992) ใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ร่วมกับฮอร์โมนเอฟเอสเอช ขนาด 24 มก. โดยแบ่งฉีดเป็น 4 ช่วงเวลา พบอัตราการเป็นสัด 88 เปอร์เซนต์ ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาในครั้งนี้ โดยเมื่อใช้ฮอร์โมน

เอฟเอสเอสซ่า เพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมในวงรอบการให้ลูกถัดมา ไม่พบการลดลงของประสิทธิภาพระบบสืบพันธุ์ การตอบสนองการเป็นสัด ระยะเวลาการแสดงการเป็นสัดรวมทั้งอัตราการผลิตมีแนวโน้มลดลง แต่ไม่มีความแตกต่างตามจำนวนครั้งในการใช้ฮอร์โมนเพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัดที่เพิ่มขึ้น ส่วนค่าเฉลี่ยจำนวนลูกเกิดแม้มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้น แต่ก็ไม่มีความแตกต่างกันและเมื่อเปรียบเทียบการใช้ฮอร์โมน CIDR-G ร่วมกับฮอร์โมนพีเอ็มเอสจีหรือใช้ฮอร์โมน CIDR-G ร่วมกับฮอร์โมนเอฟเอสเอสซ่าเพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัดซ้ำหลายครั้งพบว่าประสิทธิภาพไม่แตกต่างกัน โดยแพะทั้งสองกลุ่มมีอัตราตอบสนองต่อการเป็นสัด ระยะเวลาแสดงการเป็นสัดอัตราการผลิตและจำนวนลูกเกิดไม่แตกต่างกันแตกต่างจากการศึกษาของ Becker *et al.* (1990) Bodinet *et al.* (1995) รวมทั้ง Remy *et al.* (1991) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากขนาดของฮอร์โมนพีเอ็มเอสจี 200 IU ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นขนาดที่ค่อนข้างต่ำ ถึงแม้จะมีการใช้ซ้ำหลายครั้ง โอกาสที่จะเกิดแอนติบอดีก็จะน้อย ส่วนขนาดของฮอร์โมนเอฟเอสเอสซ่า 55 mg ที่ใช้ถึงแม้จะมีขนาดในเกณฑ์สูง แต่เมื่อเทียบกับโอกาสที่จะเกิดแอนติบอดีที่น้อยกว่า จึงทำให้ผลการทดลองในครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างกัน

สรุปผลการทดลอง

การเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอดร่วมกับฮอร์โมนพีเอ็มเอสจีหรือร่วมกับฮอร์โมนเอฟเอสเอสซ่าเพื่อผสมเทียมสามารถทำให้แพะแสดงอาการเป็นสัดและมีอัตราการผลิตไม่แตกต่างกันและการเหนี่ยวนำการเป็นสัดร่วมกับฮอร์โมนพีเอ็มเอสจีซ้ำ พบว่าสามารถกระตุ้นให้แพะแสดงอาการเป็นสัด และตั้งท้องได้ตามปกติ

ข้อเสนอแนะ

การเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะโดยใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอดร่วมกับฮอร์โมนพีเอ็มเอสจี หรือฮอร์โมนเอฟเอสเอสซ่า ต้องพิจารณาถึงต้นทุนของฮอร์โมนที่มีต้นทุนต่ำกว่า ในการทดลองนี้พบว่าต้นทุนของฮอร์โมนกลุ่มที่ 1 ฉีดฮอร์โมนพีเอ็มเอสจี 200 IU. เท่ากับ 350 บาท และกลุ่มที่ 2 ฉีดฮอร์โมนเอฟเอสเอสซ่า 55 mg เท่ากับ 500 บาท

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้มีส่วนร่วมในการศึกษาวิจัย เจ้าหน้าที่ผู้เลี้ยงดูแพะ และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการของศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพราชบุรี ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านปฏิบัติการ การเก็บข้อมูล และการอำนวยความสะดวกต่างๆ ที่ทำให้การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Amarantidis, I., A. Karagiannidis, P.H. Saratsi and P. Brikas, 2004. Efficiency of methods used for estrous synchronization in indigenous Greek goats. *Small Ruminant Research* 52: 247–252.
- Amoah, E.A. and S. Gelaye, 1990. Superovulation, synchronization and breeding of does. *Small Rum. Res.* 3:63-72.
- Baril, G., B. Remy, J.C. Vallet and J.F. Beckers, 1992. Effect of repeated use of progestagen- PMSG treatment for estrus control in dairy goats out of the breeding season. *Reprod.Dom. Anim.*, 27:161-168.
- Baril, G., B. Remy, B. Leboeuf, J.F. Beckers and J. Saumane, 1996. Synchronisation of estrus in goats: the relationship between CG binding in plasma, time occurrence of estrus and fertility following insemination. *Theriogenology*, 45:1553-1559.
- Beckers, J.F., G.Baril, J.C. Vallet, D. Chupin, B. Remy and J. Saumane, 1990. Are porcine follicle stimulating hormone antibodies associated with decreased superovulatory response in the goats. *Theriogenology*, 33:192-196.
- Bodin, L., P.V. Drion, B. Remy, M.C. Maurel and J.F. Beckers, 1995. Effect of repeated PMSG treatment on sheep reproduction. 46th Annual meeting of the European Association for animal production. Prague, Czech Republic.
- Drion, P.V., V. Furtoss, G. Baril, E. Manfredi, F. Bouvier, J.L. Pougard, D. Bernelas, P. Caugnon, E.M. McNamara, B. Remy, J. Sulon, J.F. Beckers, L. Bodin and B. Leboeuf, 2001. Four years of induction/synchronization of estrus in dairy goats. *Reprod. Nutr. Dev.* pp 401-412.
- Fonseca, J.F., J.H. Bruschi, Zambrini, F.N. Demczuk, J.H.M. Viana and M.P. Palhao, 2005. Induction of synchronized estrus in dairy goats with different gonadotrophins. *Anim. Reprod.* 2: 50-53.
- Knights, M., T. Hoehn, P.E. Lewis and E.K. Inskeep, 2001. Effectiveness of intravaginal progesterone inserts and FSH for inducing synchronized estrus and increasing lambing rate in anestrus ewes. *J. Anim Sci.* 79:1120-1131.
- Leboeuf, B., E. Manfredi, P. Boue, A. Piacère, G. Brice, G. Baril, C. Broqua, P. Humblot, and M. Terqui, 1998. Artificial insemination of dairy goats in France. *Livest. Prod. Sci.* 55, 193-203.

Motlomelo, K.C., J.P.C. Greyling and L.M.J. Schwalbach. 2002. Synchronisation of oestrus in goats: the use of different progestagen treatments. *Small Rumin. Res.* 45, 45-49.

Pendleton, R.J., C.R. Youngs, R.W. Rorie, S.H. Pool, M.A. Memon and R.A. Godke, 1992. Comparison of fluorogestone acetate sponges with norgestomet implants for induction of estrus and ovulation in anestrous dairy goats. *Small Rumin. Res.* 8, 269-273.

Remy, B., G. Baril, J.C. Vallet, R. Dufour, C. Chouvet, J. Saumande, D. Chupin and J.F. Beckers, 1991. Are antibodies responsible for a superovulatory response in goats which have been treated repeatedly with porcine follicle stimulating hormone. *Theriogenology.* 36, 389-399.

Romano, J.E., 2004. Synchronization of estrus using CIDR, FGA or MAP intravaginal pessaries during the breeding season in Nubian goats. *Small Rumin. Res.* 55:15-19.

Tsunada, Y. and T. Sugies, 1989. Superovulation in nonseasonable Japanese native goats with special reference to the developmental progression of embryos. *Theriogenology.* 31: 991-996.

ระยะเวลาผสมเทียมหลังเหนี่ยวนำการเป็นสัดต่ออัตราการผสมติด ในแพะเนื้อลูกผสม

กิตติศักดิ์ แสงสกุล^{1/}สินชัย วิโรจน์วุฒิกุล^{1/}

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระยะเวลาผสมเทียมหลังเหนี่ยวนำการเป็นสัดต่ออัตราการผสมติดในแพะเนื้อลูกผสม โดยทำการศึกษาระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ.2557 – ธันวาคม พ.ศ. 2558 ในแพะเนื้อลูกผสมในฟาร์มเกษตรกรเขตจังหวัดชลบุรี จำนวน 40 ตัว การทดลองที่ 1 ศึกษาเวลาที่แพะแสดงอาการเป็นสัดหลังจากเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมน progesterone ชนิดสอดช่องคลอดร่วมกับ PG และ PMSG ทำการตรวจการเป็นสัดด้วยฟอปันธุ์ทุกๆ 3 ชั่วโมง การทดลองที่ 2 ศึกษาระยะเวลาผสมเทียมต่ออัตราการผสมติด โดยแบ่งแพะออกเป็น 2 กลุ่มเท่าๆ กัน เพื่อผสมเทียมตามระยะเวลาที่กำหนดจากการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมน โดยกลุ่มที่ 1 ผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในชั่วโมงที่ 48 และ 72 หลังจากถอดฮอร์โมน progesterone และกลุ่มที่ 2 ผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในชั่วโมงที่ 12 และ 36 หลังจากแสดงอาการเป็นสัดขึ้นนิ่ง ผลการทดลองพบว่าแพะเนื้อลูกผสมแสดงอาการเป็นสัดขึ้นนิ่งเฉลี่ยที่ 25.96 ± 5.11 ชั่วโมงหลังถอดฮอร์โมน และมีระยะเวลาเป็นสัดนาน เฉลี่ย 18.60 ± 3.73 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม กลุ่มทดลองมีอัตราการผสมติดไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม คือมีอัตราการผสมติดที่ร้อยละ 50 และ 55 ตามลำดับ

คำสำคัญ: ระยะเวลาผสมเทียม โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัด แพะ อัตราการผสมติด

เลขทะเบียนวิจัย: 58(1)-0208-004

^{1/}ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพชลบุรี อ. บ้านบึง จ. ชลบุรี

Effect of insemination time on conception rate after estrus synchronization in crossbred meat goats

Kittisak Sangsakul^{1/} Sinchai Wirojwutthikul^{1/}

Abstract

The objective of this study was to determine the effect of insemination time on conception rate after estrus synchronization in crossbred meat goats. This was performed in 40 crossbred meat goats in local farms located at Chonburi province, during January 2014–December 2015. The experiments of this study consisted of 2 parts. The first part was conducted to study the appropriate time of estrus after applying an estrus synchronization program with intra-vaginal progesterone, prostaglandin and PMSG injection. Heat detection was administered every 3 hours in order to evaluate the estrus period. Then, the second experiment was approached to assess the effect of insemination time on conception rate. All experimental goats were divided equally into 2 groups. In control group, the goats were inseminated twice using frozen semen at 48 and 72 hours after progesterone withdrawal while the experimental group were inseminated at 12 and 36 hours after onset of standing heat detection. The result of this study showed that the average onset of estrus could be detected at 25.96 ± 5.11 hours after progesterone withdrawal. The average of estrus period was 18.60 ± 3.73 hours. However, the conception rate between control and experimental groups was not significantly different which was 50% and 55%, respectively.

KEYWORDS: ARTIFICIAL INSEMINATION TIME, SYNCHRONIZATION PROGRAM, GOATS, CONCEPTION RATE

Registered No: 58(1)-0208-004

^{1/} Chonburi Artificial Insemination and Biotechnology Research Center Banbueng Chonburi.

คำนำ

เทคโนโลยีการผสมเทียมเป็นแนวทางหนึ่งในการปรับปรุงและขยายพันธุ์แพะด้วยการเหนี่ยวนำให้เกิดการเป็นสัดพร้อมกันและผสมเทียมในระยะเวลาที่กำหนดไว้ สามารถช่วยให้การจัดการผสมพันธุ์ได้สะดวก ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการออกปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่โดยการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะ คือการควบคุมระยะ luteal phase ในวงจรของการเป็นสัด (estrous cycle) โดยใช้ฮอร์โมน progesterone การกระตุ้นให้เกิดการเป็นสัดและตกไข่ในระยะเวลาที่ต้องการ (premature luteolysis) (Amoah and Gelaye, 1990; Wildeus, 1999) โดยฮอร์โมน progesterone ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำมีหลายรูปแบบ นิยมใช้กันมากในแพะ คือ controlled internal drug-releasing device (CIDR-G) ซึ่งเป็นแท่งซิลิโคน มีตัวยาเป็น progesterone ฅบอยู่ สำหรับสอดเข้าไว้ในช่องคลอด (Knights et al., 2001)

จากผลการศึกษาที่ผ่านมาพบรายงานการศึกษาโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดเพื่อการผสมเทียม โดยใช้ฮอร์โมน progesterone ร่วมกับ PMSG และ PGF_{2α} ขนาดตั้งแต่ 150 IU – 500 IU และกำหนดเวลาในการผสมเทียมแพะด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งในชั่วโมงที่ 48 และ 72 พบว่าสามารถเหนี่ยวนำการเป็นสัดได้เป็นอย่างดีและอัตราการผสมติด 52% (นิวัฒน์ และคณะ, 2550; Bongso et al., 1982) ในขณะที่ Dogan et al. (2005) รายงานว่าการผสมเทียมแพะภายหลังการเหนี่ยวนำการเป็นสัดชั่วโมงที่ 36 และ 48 หลังถอดฮอร์โมน progesterone ด้วยน้ำเชื้อสดมีอัตราการตั้งท้องเฉลี่ยสูงถึง 70% ซึ่งไม่แตกต่างกับการผสมเทียมในแพะที่เป็นสัดโดยธรรมชาติ ส่วน Motlomelo et al. (2002) เหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะพันธุ์บอร์ ด้วย CIDR พบว่าแพะยีนนิ่ง ชั่วโมงที่ 27 หลังจากถอด CIDR ทำการผสมเทียมแบบกำหนดเวลาด้วยน้ำเชื้อสด ในชั่วโมงที่ 48 และ 60 พบว่ามีอัตราการตั้งท้อง 47% ทั้งนี้แต่ละโปรแกรมขึ้นอยู่กับช่วงที่แพะแสดงอาการเป็นสัดซึ่งแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ (Bretzlaff and Madrid, 1989; Waldrona et al., 1999) ตั้งแต่ 22–30 ชั่วโมงหลังถอดฮอร์โมน (Greyling and van Niekerk, 1986; Akusu and Egbunike, 1984)

วัตถุประสงค์เพื่อศึกษาช่วงเวลาการเป็นสัดของแพะเนื้อลูกผสมที่ได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมนและกำหนดเวลาผสมเทียมที่เหมาะสมที่อาจส่งผลให้มีอัตราการผสมติดที่สูงขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

แพะทดลอง

แพะเนื้อลูกผสมที่เคยให้ลูกมาแล้วอย่างน้อย 1 ตัว อายุประมาณ 2-4 ปี มีร่างกายสมบูรณ์แข็งแรงในฟาร์มเกษตรกรเขตจังหวัดชลบุรีจำนวน 40 ตัว ก่อนเข้าสู่งานทดลองได้รับการถ่ายพยาธิด้วยยาฉีด IVERMEC-F และฉีดวิตามิน AD3E ทำการศึกษาระหว่างเดือนมกราคม 2557– ธันวาคม 2558

วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การศึกษาระยะเวลาที่แพะแสดงอาการเป็นสัดหลังจากเหนี่ยวนำการเป็นสัด

แพะทั้งหมดได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยโปรแกรมการเหนี่ยวนำ (Figure 1) ดังนี้

Day 0 สอดฮอร์โมน Progesterone ชนิดสอดเข้าช่องคลอด (CIDR-G; EAZI-BREED, CIDR®, Pharmacia & Upjohn)

Day 14 ฉีดฮอร์โมน PMSG (Folligon®, Intervet International B.V., Holland) ปริมาณ 150 IU (0.75 mL) และฉีดฮอร์โมน PGF_{2α} (Estrumate®, Essex Animal Health, Germany) ปริมาณ 125 µg. เข้ากล้ามเนื้อ

Day 16 ถอดฮอร์โมน CIDR-G

Day 17 สังเกตอาการเป็นสัด หลังถอดฮอร์โมน CIDR-G โดยใช้พ่อพันธุ์ตรวจการเป็นสัดทุกๆ 3 ชั่วโมง บันทึกอาการและเวลาเป็นสัดตั้งแต่แพะเริ่มแสดงอาการเป็นสัด (onset) จนกระทั่งเป็นสัดเย็นนิ่งยอมให้พ่อแพะขึ้นขี่ (standing heat) จนถึงไม่แสดงอาการแล้ว

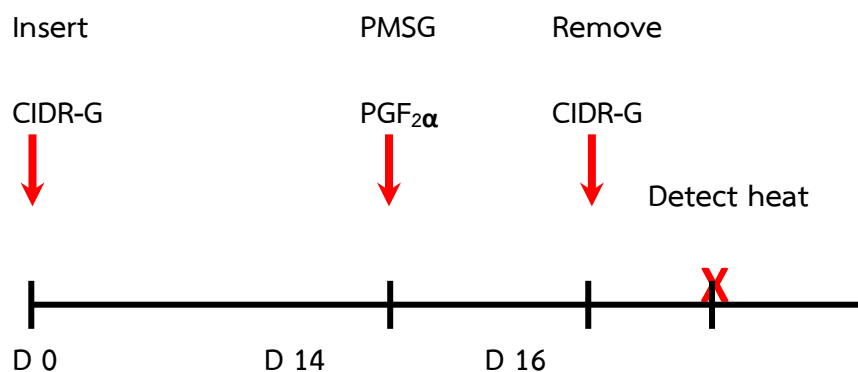


Figure 1 Estrous synchronization program

วิเคราะห์ข้อมูลชั่วโมงที่แพะเป็นสัดเย็นนิ่งภายหลังถอดฮอร์โมน progesterone และระยะเวลาที่แสดงอาการเป็นสัดด้วยด้วยสถิติพรรณนา

การทดลองที่ 2 ศึกษาระยะเวลาผสมเทียมต่ออัตราการตั้งท้องโดยแบ่งแพะออกเป็น 2 กลุ่มเท่าๆ กัน ด้วยวิธีการสุ่ม เพื่อผสมเทียมตามระยะเวลาดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมโดยเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมนตามโปรแกรมในการทดลองที่ 1 และผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งที่มีอสุจิอยู่ 200 ล้านตัว และมีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ 40% ในชั่วโมงที่ 48 และ 72 หลังจากถอดฮอร์โมน progesterone (นิวตัน และคณะ, 2550) บันทึกข้อมูลการผสมเทียม (Figure 2)

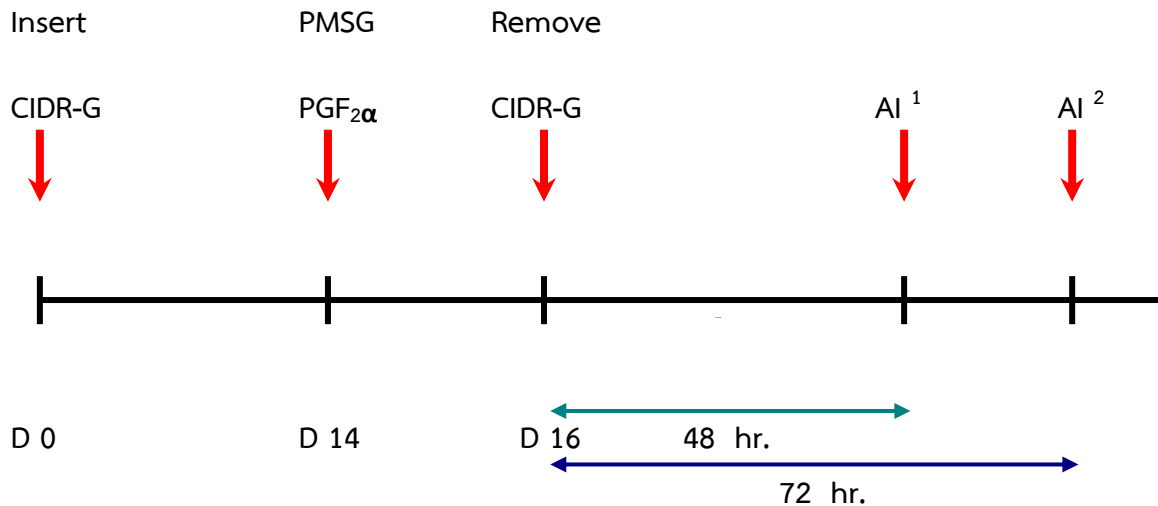


Figure 2 Estrous synchronization program and fixed-time AI (Group 1)

กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดลอง เหนียวนาการเป็นสัดด้วยฮอร์โมนตามโปรแกรมในการทดลองที่ 1 และผสมเทียม โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งที่มีอสุจิอยู่ 200 ล้านตัว และมีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ 40% ในชั่วโมงที่ 12 และ 36 ภายหลังแพะแสดงอาการเป็นสัดขึ้นนี้ และบันทึกข้อมูลการผสมเทียม (Figure 3)

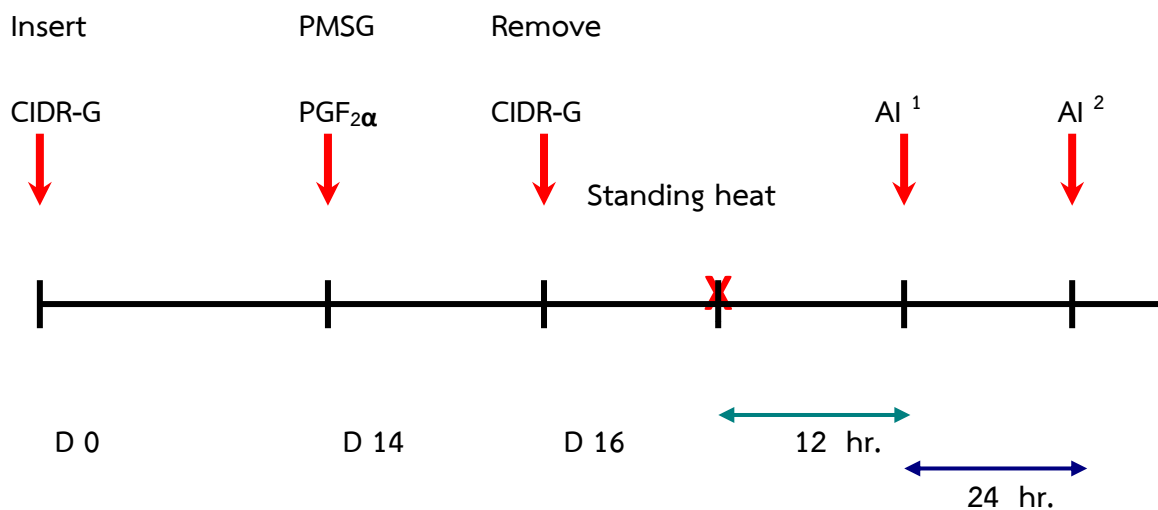


Figure 3 Estrous synchronization program and Fixed-time AI (Group 2)

ตรวจการตั้งท้องแม่แพะทั้ง 2 กลุ่ม ภายหลังการผสมเทียมอย่างน้อย 45 วันด้วยเครื่องอัลตราซาวด์และวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างของอัตราการผสมติดด้วยวิธี Chi-Square

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาระยะเวลาที่แพะแสดงอาการเป็นสัดหลังการเหนียวนำด้วยฮอร์โมนพบว่าแพะแสดงอาการเป็นสัดขึ้นนี้ตั้งแต่ 18 ชั่วโมง จนถึง 39 ชั่วโมงหลังถอดฮอร์โมน โดยมีจำนวนแพะที่แสดงอาการเป็นสัดสูงสุด คือ 12 ตัว จาก 40 ตัว ที่ 24 ชั่วโมง (Figure 4)

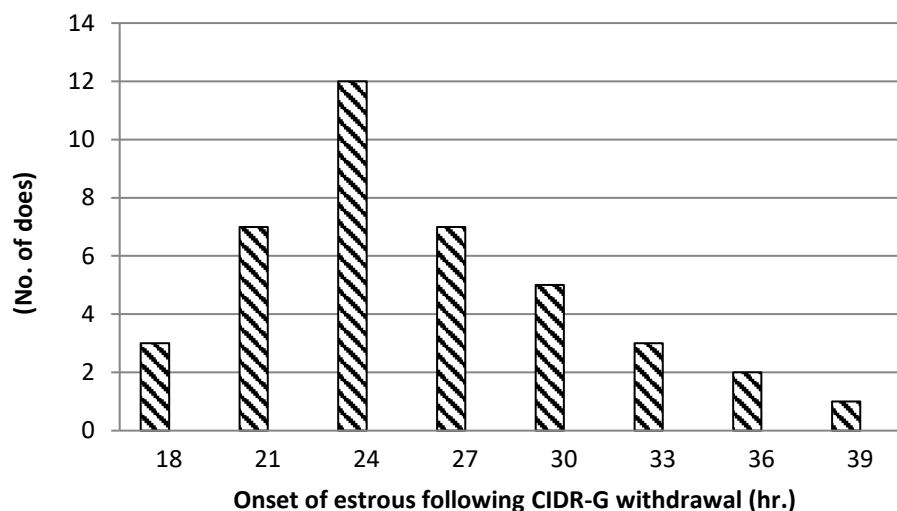


Figure 4 Frequency distribution of onset of estrous following CIDR-G withdrawal in does

เมื่อวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ยที่สัตว์แสดงอาการเป็นสัด พบว่าแพะเนื้อลูกผสม จะแสดงอาการเป็นสัดเฉลี่ย ที่ 25.96 ± 5.11 ชั่วโมงหลังถอดฮอร์โมน (Table 1) ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับ Akusu and Egbunike (1984) ที่ ทำการศึกษาในแพะพื้นเมืองแอฟริกันตะวันตก โดยการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย Prostaglandin $F_{2\alpha}$ พบว่า แพะแสดงอาการเป็นสัดยืนนิ่งเฉลี่ย 22.4 ± 8.6 ชั่วโมง และ Bretzlaff and Madrid (1989) ทำการศึกษาการ เหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะนม โดยใช้ฮอร์โมน progesterone ชนิดสอดช่องคลอด ร่วมกับ PG และ PMSG พบว่าแพะแสดงอาการเป็นสัดยืนนิ่งที่ 22 ± 6.3 ชั่วโมงหลังถอดฮอร์โมน

Table1 Mean and SD of onset of estrous after CIDR-G withdrawal and estrous periods in does

Parameters	Mean	SD	Min	Max
Onset of estrous after CIDR-G withdrawal (hr.)	25.96	5.11	18	39
Estrous periods (hr.)	18.60	3.73	12	27

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นแพะเนื้อลูกผสมที่มีสายเลือดของแพะพันธุ์บอร์ ซึ่งแสดงอาการเป็นสัดยืนนิ่งที่ 25.96 ± 5.11 ชั่วโมง และมีระยะเวลาเป็นสัดสั้นเพียง 18.6 ± 3.73 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับ Motlomelo *et al.* (2002) ซึ่งศึกษาในแพะบอร์พันธุ์แท้ พบว่าแพะแสดงอาการเป็นสัดยืนนิ่งที่ 27.2 ± 0.4 ชั่วโมงหลังถอดฮอร์โมน progesterone และมีช่วงระยะเวลาเป็นสัดที่ค่อนข้างนาน 35.2 ± 0.7 ชั่วโมง ในขณะที่พีระพงษ์ และคณะ (2552) ทำการศึกษาการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะนมลูกผสม โดยใช้ฮอร์โมน progesterone ชนิดสอดช่องคลอด ร่วมกับ PG และ PMSG พบว่าแพะมีระยะเวลาแสดงอาการเป็นสัดที่ 48.2 ± 7.4 ชั่วโมง นับจากเริ่มแสดงอาการ เป็นสัด

ในวงจรการเป็นสัดของแพะ เมื่อแพะเริ่มแสดงอาการเป็นสัด อีกประมาณ 30-36 ชั่วโมง จะเกิดกระบวนการตกไข่ (เทวินทร์, 2542) ดังนั้นจำเป็นต้องทำการผสมเทียมก่อนการตกไข่ เนื่องจากอสุจิต้องใช้เวลาดำเนินทางในท่อนำไข่และเกิดขบวนการเตรียมพร้อมเพื่อเข้าปฏิสนธิกับไข่ได้ ดังนั้นจากผลการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าแพะแสดงอาการเป็นสัดเฉลี่ยที่ 25.96 ± 5.11 ชั่วโมงหลังถอดฮอร์โมน ดังนั้นจึงทำการผสมเทียมครั้งที่ 1 ที่ 44 ชั่วโมง และผสมเทียมครั้งที่ 2 ที่ 68 ชั่วโมงหลังถอดฮอร์โมน

การศึกษาระยะเวลาผสมเทียมต่ออัตราการผสมติด พบว่า แพะกลุ่มควบคุมที่ผสมเทียมที่ชั่วโมง 48 กับ 72 ชั่วโมงหลังถอดฮอร์โมน มีอัตราการผสมติดไม่แตกต่างกันทางสถิติกับแพะที่ผสมเทียมภายหลังการเป็นสัดยืนนิ่งที่ 12 ชั่วโมงและ 36 ชั่วโมง คือมี 50% และ 55% ตามลำดับ (Table 2)

Table 2 Conception rate in does.

	Control Group	Treatment Group	P value
No. of does	20	20	
Conception rate (%)	50	55	0.78

จากผลการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าแพะทั้ง 2 กลุ่มมีอัตราการผสมติดไม่แตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากการผสมเทียมอยู่ในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกันมากนัก และเป็นช่วงเวลาที่ก่อนจะมีการตกไข่และให้ผลใกล้เคียงกับการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าในปี พ.ศ. 2550 มีการศึกษาเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะพันธุ์ชานเนน ด้วยฮอร์โมน progesterone ร่วมกับ PGF_{2α} และ PMSG ในการผสมเทียมแบบกำหนดเวลาด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งในชั่วโมงที่ 48 และชั่วโมงที่ 72 พบว่ามีอัตราการผสมติดที่ร้อยละ 52 (นิวตันและคณะ 2550) และพีระพงษ์และคณะ (2552) ได้ทดลองเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย ฮอร์โมน PMSG และผสมเทียมแพะพันธุ์ชานเนน พบว่าอัตราการผสมติดเท่ากับร้อยละ 47-50 ต่อมาในปี พ.ศ. 2553 พีระพงษ์และสาโรช ศึกษาผลของใช้ CIDR® และ Chornogest ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมในแพะชานเนน พบว่าอัตราการผสมติดเท่ากับร้อยละ 39.9-43.1 ในขณะที่ Holtz *et al.* (2008) ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งผสมเทียมแพะที่ได้รับการเหนี่ยวนำพบว่ามีอัตราการผสมติดใกล้เคียงกัน คือร้อยละ 58 โดยผสมเทียมครั้งเดียวที่ 46 ชั่วโมงภายหลังถอดฮอร์โมน progesterone ชนิดฟองน้ำสอดช่องคลอดมีอัตราการผสมติดที่ร้อยละ 48.7 (Arrebola *et al.*, 2012) และ Dogan *et al.* (2004) ศึกษาเปรียบเทียบฮอร์โมนฟรูโอโรเจสโตนและเมดรอกซีโปรเจสเตอโรนแบบฟองน้ำชนิดสอดช่องคลอดเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียม ครั้งเดียวชั่วโมงที่ 48 หลังถอดฮอร์โมน progesterone พบว่าอัตราการผสมติดร้อยละ 52.6 และ 50 ตามลำดับ

สรุปผลการทดลอง

แพะเนื้อลูกผสมที่เหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมน progesterone ชนิดสอดช่องคลอด ร่วมกับ PG และ PMSG จะแสดงอาการเป็นสัดยืนนิ่งเฉลี่ยที่ 25.96 ± 5.11 ชั่วโมงหลังถอดฮอร์โมน มีระยะเวลาเป็นสัดนานเฉลี่ย 18.60 ± 3.73 ชั่วโมง และการผสมเทียมที่ 12 และ 36 ชั่วโมงภายหลังแพะแสดงอาการเป็นสัดยืนนิ่ง มีผลต่ออัตราการผสมติดไม่แตกต่างกับการผสมเทียมแบบกำหนดเวลาที่ 48 และ 72 ชั่วโมงภายหลังถอดฮอร์โมน progesterone

ข้อเสนอแนะ

ปัจจุบันการผสมเทียมแพะเข้ามามีบทบาทสำคัญในการปรับปรุงและขยายพันธุ์แพะ ซึ่งส่วนใหญ่ยังเป็นการให้บริการโดยเจ้าหน้าที่ จากผลการทดลองพบว่าทั้ง 2 โปรแกรมมีผลต่ออัตราการผสมติดไม่แตกต่างกัน การผสมเทียมแบบกำหนดเวลาที่ 48 และ 72 ชั่วโมงภายหลังถอดฮอร์โมน progesterone สามารถช่วยให้การจัดการแผนการดำเนินงานได้สะดวก ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการออกปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่ ส่วนในกรณีที่ฟาร์มเกษตรกรสามารถจับสัตว์ได้แม่นยำ อาจพิจารณาใช้การผสมเทียมที่ 12 และ 36 ชั่วโมง ภายหลังการแสดงอาการเป็นสัด ซึ่งมีแนวโน้มทำให้อัตราการผสมติดดีกว่า

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) คณะผู้วิจัย ขอขอบคุณคุณ จตุพร พงษ์เพ็ง นักวิชาการสัตวบาลชำนาญการพิเศษ น.สพ.อรุณ จันทร์กระจ่าง ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี และเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสงขลา ที่ให้การช่วยเหลือและสนับสนุนให้สามารถดำเนินการวิจัยเป็นไปตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

- เทวินทร์ วงษ์พระลับ. 2542. การสืบพันธุ์ในสัตว์เลี้ยง. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- นิวัฒน์ ถาวระ อนนท์เทืองสันเทียะ และบรรลือ กล้าพูล. 2550. การเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย CIDR® และ PGF_{2α} ร่วมกับ PMSG ต่อการผสมติดของแพะพันธุ์ซาเนน. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. ปีที่ 2 ฉบับที่ 1 สิงหาคม 2550. หน้า 1-7.
- พีระพงษ์ สำราญทรัพย์ สาโรช งามขำ อนนท์ เทืองสันเทียะ และณรงค์ เลี้ยงเจริญ. 2552. ประสิทธิภาพการลดฮอร์โมน PMSG ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง ในแพะ. ว.เทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ 4(1):16-23.
- Akusu, M. O., and G.N. Egbunike. 1984. Fertility of West African Dwarf goat in its native environment following prostaglandin F_{2α} induced estrus. Vet. Q. 6:173-176.
- Amoah, E. A., and S. Gelaye. 1990. Superovulation, synchronization and breeding of does. Small Rumin. Res. 3:63-72.
- Arrebola, F.A., B. Pardo, M.Sanches, M.D. Lopez and C.C. Perez-Marin, 2012. Factor influencing the success of an artificial insemination program in Florida goats. Spanish Journal of Agricultural Research. 10(2): 338- 344.

- Bongso, T.A., I. Fatimah and S. Dass. 1982. Synchronisation of oestrus of goat treated with progestagen-impregnated intravaginal sponges and PMSG, and reproductive performance following natural mating or A.I. with frozen semen. 5(2): 111-116.
- Bretzlaff, K.N. and N. Madrid. 1989. Clinical use of Norgestomet ear implants or intravaginal pessaries for synchronization of estrus in anestrus dairy goats. Theriogenology. 24(2): 419-423.
- Dogan, I., Z. Nur, U. Gunay, M.K. Soylu and C. Sonmez. 2004. Comparison of fluorgestone and medroxyprogesterone intravaginal sponges for oestrus synchronization in Saanen does during the transition period. South African Journal of Animal Science. 34(1): 18-22.
- Dogan, I., Z. Nur, U. Gunay, H. Sagirkay, M.K. Soylu and C. Sonmez. 2005. Estrous synchronization during the natural breeding season in Anatolian black does. Vet. Med. – Czech (1): 33-38.
- Greyling, J. P. C., and C. H. van Niekerk. 1986. Synchronization of oestrus in the Boer goat doe: Does effect of prostaglandin in the double injection regime. S. Afr. J. Anim. Sci. 16: 146-150.
- Holtz, W. H., H. Sohnrey, M. Gerland and M. A. Driancourt. 2008. Ovsynch synchronization and fixed-time insemination in goats. Theriogenology. 69(7): 785-792.
- Knights, M., T. Hoehn, P.E. Lewis, and E.K. Inskeep. 2001. Effectiveness of intravaginal progesterone inserts and FSH for inducing synchronized estrus and increasing lambing rate in anestrus ewes. J. Anim. Sci. 79: 1120-1131.
- Motlomelo, K.C., J.P.C. Greyling, and L.M.L. Schwalbach. 2002. Synchronisation of oestrus in goats; the use of different progestagen treatments. Small Rumin. Res. 45: 45-49.
- Waldrona, D.F., T.D. Willingham, P.V. Thompson, and K.N. Bretzlaff. 1999. Effect of concomitant injection of prostaglandin and PMSG on pregnancy rate and prolificacy of artificially inseminated Spanish goats synchronized with controlled internal drug release devices. Small Rumin. Res. 31(2): 177-179.
- Wildeus, S. 1999. Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats. Proc. Am. Soc. Anim. Sci. Available: <http://www.asas.org/JAS/symposia/proceedings/0016.pdf>. July 10, 2003.

ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน PDC-109 ใน seminal plasma
ของพ่อพันธุ์โคนมทรอปิคอล โฮลสไตน์ ต่อความสามารถในการแข่งขันน้ำเชื้อ

จรรยาพร รุ่งเรืองศักดิ์ วรพงษ์ พงษ์ศิริ

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน PDC-109 ในเซมินอลพลาสมาของพ่อพันธุ์โคนมทรอปิคอล โฮลสไตน์ ต่อความสามารถในการแข่งขันน้ำเชื้อ ทำการศึกษาในน้ำเชื้อ 60 ตัวอย่างจากพ่อพันธุ์จำนวน 12 ตัว อายุ 3-4 ปี ของศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ลำพูนกลาง ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อด้วยช่องคลอดเทียม สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ติดต่อกัน 5 สัปดาห์ โดยแบ่งน้ำเชื้อเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งและประเมินความสามารถในการแข่งขัน ส่วนที่สองทำการปั่นแยกเฉพาะเซมินอลพลาสมาและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำไปสกัดและตรวจหาโปรตีน ผลการทดลองพบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งในกลุ่มที่มีความสามารถในการแข่งขันสูงมีอัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ย $53.79 \pm 9.49\%$ และกลุ่มที่มีความสามารถในการแข่งขันต่ำมีอัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ย $23.61 \pm 9.31\%$ ส่วนการศึกษาปริมาณโปรตีน PDC-109 ในเซมินอลพลาสมาที่นำไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) และตรวจสอบปริมาณโปรตีน PDC-109 ด้วยเทคนิค western blot พบว่าปริมาณโปรตีน PDC-109 ในเซมินอลพลาสมาของน้ำเชื้อที่มีความสามารถในการแข่งขันสูงและต่ำมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ย 0.13 ± 0.05 และ 0.14 ± 0.06 ตามลำดับ โดยขนาดโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเซมินอลพลาสมาของพ่อพันธุ์โคนมทรอปิคอล โฮลสไตน์ อยู่ในช่วงตั้งแต่ 14-97 kDa และกลุ่มโปรตีนที่มีขนาดต่ำกว่า 14 kDa โดยพบแถบโปรตีนที่มีปริมาณมากที่สุด (major protein) ที่ขนาดโมเลกุลประมาณ 16 kDa และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ อสุจิมิชีวิต และความสมบูรณ์ของอะโครโซม ต่อปริมาณโปรตีน PDC-109 ($P>0.05$) สรุปว่าปริมาณโปรตีน PDC-109 ในเซมินอลพลาสมาของพ่อพันธุ์โคนมทรอปิคอล โฮลสไตน์ ไม่มีความสัมพันธ์ต่อความสามารถในการแข่งขันซึ่งมีผลต่อเนื่องไปถึงคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลาย

คำสำคัญ: ความสามารถในการแข่งขันน้ำเชื้อ น้ำเชื้อแช่แข็งโค โปรตีนในเซมินอลพลาสมา

เลขทะเบียนวิจัย: 61(1)-0208-011

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ อ.เมือง จ.ปทุมธานี

Relationship between PDC-109 in seminal plasma of Tropical Holstein sire and freezability of spermatozoa

Janyaporn Rungruangsak Worapong Pongsiri

Abstract

The aim of the study was to investigate the relationship between the amount of PDC-109 protein in seminal plasma proteins in 60 ejaculates from 12 Tropical Holstein sires, ranging of age between 3-4 years, and its freezability. All sires were raised and fed under the same environment at Lumphayaklang Livestock Semen Production Center, Lopburi province. Semen samples were collected once a week for 5 weeks and each sample was separated into 2 parts. The first part, semen samples were used for frozen semen production following conventional method and determination of semen freezability. Another part, semen samples were centrifuged for seminal plasma collection and kept at -80 degree Celsius for protein extraction. The results showed that the average motility of high and low freezability groups were $53.79 \pm 9.49\%$ and $23.61 \pm 9.31\%$, respectively. Consideration on the protein study in seminal plasma using Sodium Dodecyl Sulfate–Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) and western blot methods, it represented that the amounts of PDC-109 protein between high and low freezability groups did not show significantly different ($P>0.05$) which were 0.13 ± 0.05 and 0.14 ± 0.06 , respectively. In addition, the sizes of seminal plasma proteins found in this study were varied from 14 to 97 kDa which a major 16 kDa protein band was shown. In addition, a group of lower molecular weight protein under 14 kDa was also detected. However, the amount of PDC-109 seminal plasma protein did not correlate to the sperm motility, kinematic movement, sperm viability and acrosomal integrity ($P>0.05$). In conclusion, the amount of PDC-109 in seminal plasma of Tropical Holstein sires did not associate to the semen freezability which indicated the frozen semen quality of Tropical Holstein bull.

Keywords: freezability, bull frozen semen, seminal plasma protein

Registered No: 61(1)-0208-011

Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Muang district, Pathum Thani province

คำนำ

การผสมเทียมเป็นเครื่องมือที่มีประสิทธิภาพในการผลิตและปรับปรุงพันธุ์โคนม โดย 80% ของโคนมทั่วโลกมีการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง (Morrell et al., 2018) คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งในโคนมจึงเป็นปัจจัยหนึ่งที่บ่งชี้ถึงความสำเร็จพันธุ์ได้ ซึ่งปัจจุบันแนวโน้มในการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนในเซมินอลพลาสมา (seminal plasma) และอสุจิ (spermatozoa) ที่ส่งผลต่อความสามารถในการแช่แข็งและความสมบูรณ์พันธุ์ พบในสัตว์เศรษฐกิจหลายชนิดรวมถึง โคนมด้วย ซึ่งโปรตีนในระบบสืบพันธุ์เพศผู้มีความสำคัญต่อการทำหน้าที่และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของอสุจิเพื่อให้พร้อมต่อการปฏิสนธิ (Belleannée et al., 2011; Dacheux et al., 2003) รวมถึงคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการหลั่งออกมา (ejaculation) ด้วย ทั้งนี้ ผลของโปรตีนยังมีบทบาทในกระบวนการเกิด capacitation และปฏิกริยาระหว่างอสุจิกับเซลล์บุท่อไข่ (Gwathmey et al., 2006; Therien et al., 1998, 1999) รวมทั้งส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของอะโครโซม (acrosomal reaction) และการพัฒนาของตัวอ่อนอีกด้วย การศึกษาเชิงโปรตีโอมิกส์ ซึ่งเป็นการศึกษาวิจัยโปรตีน ทั้งการระบุชนิดและปริมาณโปรตีนในเซมินอลพลาสมาและอสุจิ เพื่อนำไปหา biomarker ต่างๆ จึงมีบทบาทและเป็นที่แพร่หลายในสัตว์หลายชนิด ทั้งในมนุษย์ (Martínez-Heredia et al., 2006) หนู (Baker et al., 2008) โค กระบือ (Peddinti et al., 2008) และสุกร (González-Cadavid et al., 2014) โปรตีนในเซมินอลพลาสมาและอสุจิถูกพบว่ามีความสัมพันธ์ต่อความสามารถในการแช่แข็งในโค (Jobim et al., 2004) และสัตว์ชนิดอื่น เช่น ม้า (Jobim et al., 2011) เป็นต้น องค์ประกอบของโปรตีนในเซมินอลพลาสมา และอสุจียังมีหลายองค์ประกอบที่ยังไม่รู้หน้าที่แน่ชัด ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้สามารถบ่งชี้แนวโน้มว่าโปรตีนหลายชนิดมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการแช่แข็งและความสมบูรณ์พันธุ์ (Gaviraghi et al., 2010)

โปรตีน PDC-109 เป็นกลุ่มโปรตีน binding sperm protein ที่เป็นองค์ประกอบหลักในเซมินอลพลาสมาของโค (Jobim et al., 2004) ซึ่งส่งผลต่อความสามารถในการแช่แข็ง (freezability) ของอสุจิโคและกระบือ (Singh et al., 2014) เมื่อหลังน้ำเชื้อออกมา โปรตีน PDC-109 ในเซมินอลพลาสมาจะเข้าจับส่วนผิวของอสุจิ (Manjunath et al., 1994) ส่งผลให้โคลีนฟอสโฟลิปิด (choline phospholipid) และโคเลสเตอรอล (cholesterol) ไหลออก (efflux) จากส่วนหัวของอสุจิ กระตุ้นการเกิด capacitation และเกิดการเปลี่ยนแปลงของอะโครโซม ทำให้อสุจิสามารถเจาะผ่าน zona pellucida ของไข่เพื่อเข้าปฏิสนธิได้ (Therien et al., 1998; Therien et al., 2001) อย่างไรก็ตาม หากมีโปรตีน PDC-109 ความเข้มข้นที่สูงเกินไปและสัมผัสกับอสุจิเป็นเวลานานจะส่งผลเสียให้กับอสุจิด้วยเช่นกัน เนื่องจากกระตุ้นให้เกิดการไหลออกของฟอสโฟลิปิดและโคเลสเตอรอลที่ก่อให้เกิดความไม่คงตัวของเยื่อหุ้มอสุจิ (plasma membrane) ทำให้อสุจิมีความไวต่ออนุมูลอิสระออกซิเจน (Reactive Oxygen Species; ROS) และเกิดความไวต่อการเปลี่ยนแปลงในขั้นตอนของการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง (Srivastava et al., 2012)

การศึกษานี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน PDC-109 ในเซมินอลพลาสมาของพ่อพันธุ์โคนมทรอปิคอล โฮลสไตน์ (Tropical Holstein) ต่อความสามารถในการแช่แข็งน้ำเชื้อ เพื่อมาใช้ร่วมเป็นเกณฑ์การคัดเลือกพ่อพันธุ์นอกเหนือไปจากการคัดเลือกลักษณะอื่นๆ ตลอดจนวางแผนการผลิตและพัฒนาเทคนิคการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งในโคนมให้มีคุณภาพสูงขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

พ่อพันธุ์โคนมทรอปิคอล โฮลสไตน์ ระดับสายเลือด 93.75-96.87% HF ที่มีอายุระหว่าง 3-4 ปี จำนวน 12 ตัว ของศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ลำพญากลาง จังหวัดลพบุรี เก็บตัวอย่างน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ทั้งหมด 12 ตัว สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ติดต่อกันเป็นเวลา 5 สัปดาห์ ด้วยช่องคลอดเทียม (artificial vagina) โดยกำหนดให้น้ำเชื้อสดมีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่ต่ำกว่า 70% และมีความผิดปกติของอสุจิส่วนหัวและส่วนหางไม่เกิน 12% และ 25% ตามลำดับ (รพีพรรณ, 2551)

การวางแผนการทดลอง *ภาคผนวก

แบ่งน้ำเชื้อออกเป็นสองส่วนเท่ากัน

ส่วนที่ 1 นำไปผลิตเป็นน้ำเชื้อแช่แข็ง ตามวิธีการของศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ลำพญากลาง ตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลาย ด้วยเครื่อง CASA (The IVOS II, Hamilton Thorne Inc. Beverly, USA.) เพื่อประเมินความสามารถในการแช่แข็ง (รพีพรรณ, 2551) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 น้ำเชื้อที่มีความสามารถในการแช่แข็งสูง (good freezability) หมายถึงน้ำเชื้อที่มีอัตราการเคลื่อนที่เท่ากับหรือมากกว่า 40%

กลุ่มที่ 2 น้ำเชื้อที่มีความสามารถในการแช่แข็งต่ำ (poor freezability) หมายถึงน้ำเชื้อที่มีอัตราการเคลื่อนที่ต่ำกว่า 40%

ส่วนที่ 2 ปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยเครื่องปั่นแยก ความเร็ว 10,000 x g ที่ 4 °C นาน 15 นาที และทำการเก็บส่วนใส ใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เก็บที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์โปรตีนต่อไป

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยสุ่มน้ำเชื้อแช่แข็งชุดการผลิตละ 3 หลอด ทำการละลายโดยแช่ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 °C นาน 30 วินาที จากนั้นตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่อง CASA

1) อัตราการเคลื่อนที่ (motility; %) และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility; %)

2) ความเร็วในการเคลื่อนที่ (velocity) ได้แก่

- Average Path Velocity (VAP; $\mu\text{m/s}$) หมายถึง ความเร็วในการเคลื่อนที่เฉลี่ยจากระยะทางจริงใน 1 วินาที

- Straight Line Velocity (VSL; $\mu\text{m/s}$) หมายถึง ความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีตรง เป็นการคำนวณจากจุดหนึ่งไปยังอีกจุดหนึ่งในแนวเส้นตรงในช่วงระยะเวลา 1 วินาที

- Curvilinear Velocity (VCL; $\mu\text{m/s}$) หมายถึงความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีโค้ง เป็นการคำนวณแนวโน้มของการเคลื่อนที่เฉลี่ยใน 1 วินาที

3) ลักษณะการเคลื่อนที่ (kinematic movement) ได้แก่

- Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH; μm) หมายถึง ความกว้างของส่วนหัวของอสุจิที่ส่ายไปมา

- Beat Cross Frequency (BCF; Hz) หมายถึง ความถี่ของการส่ายส่วนหัวของอสุจิ

- Straightness (STR; %) หมายถึง ความตรงในการเคลื่อนที่ ซึ่งคำนวณจากอัตราส่วนความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีตรง (VSL) ต่อความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (VAP) คูณด้วยร้อย
 - Linearity (LIN; %) หมายถึง อัตราส่วนความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีตรงต่อความเร็วเฉลี่ยของการเคลื่อนที่วิถีโค้ง (VCL) คูณด้วยร้อย
 - Wobble (WOB; %) หมายถึง อัตราส่วนความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (VAP) ต่อความเร็วเฉลี่ยของการเคลื่อนที่วิถีโค้ง (VCL) คูณด้วยร้อย
- 4) ความผิดปกติในส่วนหางของสุจิโดยใช้โปรแกรมตรวจความผิดปกติของสุจิตัวด้วยเครื่อง CASA
 - 5) อสุจิมีชีวิตร (sperm viability; %) ก่อนการแช่แข็งโดยใช้วิธีย้อมสี eosin และ nigrosin ตามวิธีการของ Dott and Foster (1972) และภายหลังการแช่แข็งด้วยสีย้อมชนิด SYBR-14 และ Propidium iodide (Molecular Probes Inc., USA) ตามวิธีการของ Garner and Johnson (1995)
 - 6) ความผิดปกติของเซลล์อสุจิ (morphology) ก่อนการแช่แข็ง โดยใช้วิธีย้อมสี William's staining (Blom and Birch-Andersen, 1970)
 - 7) ความสมบูรณ์ของอะโครโซม (acrosome integrity) โดยใช้วิธีย้อมสี FITC-PNA (fluorescein Isothiocyanate - conjugated peanut agglutinin) ตามวิธีการของ Axner et al. (2004)
 - 8) ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มตัวอสุจิ (membrane integrity) ด้วยวิธี Hypo-osmotic swelling test (HOS test) ตามวิธีการของ Revell and Mrode (1994)

การวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค SDS-PAGE และ Western blot

เลือกตัวอย่างเซมินอลพลาสมาของน้ำเชื้อกลุ่มที่มีความสามารถในการแช่แข็งสูงและต่ำ กลุ่มละ 30 ตัวอย่าง นำมาตรวจวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE และ Western blot เพื่อหาปริมาณโปรตีน PDC-109 จากแถบโปรตีนที่วัดได้เทียบกับปริมาณโปรตีนรวม

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนรวมในเซมินอลพลาสมา ด้วยชุดทดสอบโปรตีน (Quick Start Bradford Protein Assay; Bio-Rad®, USA) ตามวิธี Bradford's assay (Bradford., 1976) โดยยืนยันชนิดโปรตีน PDC-109 โดยเทคนิค Western blot ตามวิธีของ Thepparat et al., (2012) โดยสังเขปดังนี้ เตรียม 15% separating gel จำนวน 2 แผ่น โดยใช้ตัวอย่างเซมินอลพลาสมา ตัวอย่างละ 10 µg อิเล็กโตรโฟรีซิสด้วยกระแสไฟฟ้า 150 V นาน 90 นาที จากนั้นนำเจล 1 แผ่นไปย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue R-250 เพื่อแยกแถบโปรตีนในตัวอย่าง เจลแผ่นที่ 2 จะถูกนำไปถ่ายแถบโปรตีนลงสู่แผ่น nitrocellulose โดยบ่มใน blocking solution (5% skim milk ในสารละลาย TBST buffer) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นนำแผ่น nitrocellulose บ่มร่วมกับ primary antibody (seminal plasma protein PDC-109 monoclonal antibodies; AbX™) ในอัตราส่วน 1:500 ที่เจือจางด้วย blocking solution ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่น nitrocellulose ด้วยสารละลาย TBST buffer 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที นำแผ่น nitrocellulose มาบ่มต่อด้วย secondary antibody conjugated anti-mouse IgG ในอัตราส่วน 1:2000 ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างแผ่น nitrocellulose ด้วยบัฟเฟอร์ TBST buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วนำแผ่น nitrocellulose มาแช่ในสารละลายซับสเตรตบัฟเฟอร์ (substrate buffer) 2 ครั้ง ครั้งละ 30 วินาที ตรวจสอบผลการเกิดปฏิกิริยาด้วยการเติมสารละลายซับสเตรต (substrate solution) เขย่าในที่มืดที่ 25°C นาน 5-10 นาที จนมองเห็นแถบสีม่วงปรากฏชัดบนแผ่น nitrocellulose จึงหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น

การวัดโปรตีนจากเทคนิค western blot ด้วยโปรแกรม ImageJ

วิเคราะห์ความแตกต่างของปริมาณโปรตีนของตัวอย่างเซมินอลพลาสมา โดยแผ่น nitrocellulose จะถูกนำมาย้อมสี Coomassie Brilliant Blue R-250 ตามวิธีการของ Welinder and Ekblad (2011) เพื่อนำมา normalized กับแถบโปรตีนที่วัดได้ และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม ImageJ (Version 1.6; NIH)

ปริมาณโปรตีน PDC-109 = ความเข้มของแถบโปรตีน PDC-109/ปริมาณโปรตีนรวม

โดยหน่วยที่ได้ของ ความเข้มของแถบโปรตีน PDC-109 และปริมาณโปรตีนรวมเป็น pixel/mm²

การศึกษาแบบแผนโปรตีนด้วยเทคนิค Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE)

นำเซมินอลพลาสมาจากกลุ่มตัวอย่างน้ำเชื้อที่มีความสามารถในการแข่งขันสูงและต่ำ จำนวน 5 สัปดาห์ โดยนำแต่ละกลุ่มมาทำการรวมกัน (pool) และศึกษาแบบแผนของโปรตีนด้วยเทคนิค 2D-PAGE เพื่อดูความแตกต่างของชนิดและรูปแบบโปรตีนจากเซมินอลพลาสมาของทั้งสองกลุ่ม

การแยกโปรตีนในทิศทางแรก โดยโปรตีนจะถูกแยกโดยอาศัยสมบัติที่แตกต่างกันของประจุ pi โดยใส่ (load) โปรตีนลงบน dry strip ในช่วง pH 3-10 ขนาด 7 เซนติเมตร จากนั้นทำการแยกโปรตีนด้วยเครื่อง Ettan® IPGphor (Amersham Biosciences, USA) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ วาง strip holder ลงบนเครื่อง Ettan® IPGphor จากนั้นใส่สารละลายโปรตีน 100 µg/strip ที่ทำการผสมกับ rehydration buffer (7 M urea, 2 M thiourea, 2% (w/v) CHAPS, 2 mM DTT, 0.8% (w/v) IPG buffer and 0.2% bromophenol blue) เรียบร้อยแล้วลงใน strip holder โดยปริมาตรสุดท้ายคือ 250 µL แล้วจึงทำการวาง IPG strip pH 3-10 ลงใน strip holder จากนั้น overlay IPG strip ด้วยน้ำยาเคมีชนิดแห้ง (dry strip cover fluid) ประมาณ 700 µL แล้วตั้งค่าโปรแกรม IEF สำหรับการบ่ม IPG strip โดยทำการบ่ม IPG strip (pH 3-10) กับ equilibration solution ปริมาตร 2.5 mL ที่มี dithiothreitol (DTT) 0.025 g นาน 30 นาที จากนั้นทำการบ่ม IPG strip ต่อด้วย equilibration solution ปริมาตร 2.5 mL ที่มี iodoacetamide (IAA) 0.0625 g นาน 30 นาที หลังจากแยกโปรตีนในทิศทางแรกแล้ว โปรตีนจะถูกแยกอีกครั้งในทิศทางที่สองโดยอาศัยสมบัติของขนาดของโมเลกุลที่แตกต่างกัน โดยในการทดลองนี้จะใช้ 13.5% separating gel (SDS-PAGE) จากนั้นวาง strip และกระดาษกรองที่ใส่ protein marker ปริมาตร 2 µL ลงด้านบนของเจล โดยตั้งโปรแกรมที่ 10 mA นาน 15 นาที จากนั้นเพิ่มเป็น 20 mA นาน 20 นาที แล้วนำเจลที่ได้มาทำการย้อมโดยใช้ Coomassie Brilliant blue R-250

การวิเคราะห์ข้อมูลจากเจลด้วยโปรแกรม ImageMaster™ 2D Platinum

สแกนแผ่นเจลและวิเคราะห์ความแตกต่างของจุด (spot) โปรตีนของตัวอย่างแต่ละกลุ่มด้วยโปรแกรม ImageMaster™ 2D platinum version 7.0 เพื่อให้ได้จุดโปรตีนที่สนใจ คือโปรตีนที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหรือลดลง หรือมีการแสดงออกเฉพาะในบางกลุ่มทดลอง ทำการเปรียบเทียบแบบแผนของโปรตีนจากเซมินอลพลาสมาของพ่อโคในกลุ่มที่มีความสามารถในการแข่งขันที่สูงและต่ำ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ผลของคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์โคนมภายหลังการละลาย ได้แก่ อัตราการเคลื่อนที่ ความเร็วในการเคลื่อนที่ และลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ อสุจิมีชีวิต ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ และความผิดปกติของอสุจิ โดยเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลายระหว่างกลุ่มที่มีความสามารถในการแช่แข็งน้ำเชื้อที่สูงและต่ำ และเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน PDC-109 ระหว่างกลุ่มที่มีความสามารถในการแช่แข็งน้ำเชื้อที่สูงและต่ำ ด้วย t-test for independent samples และวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r) ระหว่างพารามิเตอร์ของคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลายและปริมาณโปรตีน PDC-109 ทั้งนี้ การวิเคราะห์ทางสถิติของการทดลองดังกล่าวนี้ กำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ ร้อยละ 95 ($P < 0.05$) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ R commander version 3.5.2 (R Core Team, 2018)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง

ผลการเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งระหว่างกลุ่มที่มีความสามารถในการแช่แข็งน้ำเชื้อที่สูงและต่ำ (Table 1) พบว่า พารามิเตอร์ของคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง ได้แก่ อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ และลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิแบบ ALH ในกลุ่มที่มีความสามารถในการแช่แข็งสูง มากกว่ากลุ่มที่มีความสามารถในการแช่แข็งต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ความผิดปกติในส่วนหางของอสุจิในกลุ่มที่มีความสามารถในการแช่แข็งต่ำ สูงกว่า กลุ่มที่มีความสามารถในการแช่แข็งสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้พบว่า อสุจิมีชีวิตและความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ ในกลุ่มที่มีความสามารถในการแช่แข็งสูง มากกว่า กลุ่มที่มีความสามารถในการแช่แข็งต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งนี้ ผลของคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อนำไปใช้ในการแบ่งกลุ่มคุณภาพน้ำเชื้อดังกล่าวฯ นี้ สอดคล้องกับการแบ่งกลุ่มตัวอย่างเพื่อหาความสัมพันธ์ของโปรตีนในเซมินอลพลาสมาต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์โคของ Sarsaifi et al. (2015) ที่แบ่งกลุ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ คุณภาพสูง กลาง และต่ำ โดยพบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลายที่มีคุณภาพสูง มีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ความเร็วในการเคลื่อนที่ ลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ อสุจิมีชีวิต และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ สูงกว่ากลุ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งคุณภาพต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่าพารามิเตอร์ของคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้จากการตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง CASA นี้ มีรายงานว่าพบความสัมพันธ์ในเชิงบวกต่อความสมบูรณ์พันธุ์ โดยค่าพารามิเตอร์ต่างๆ มีผลต่อการปฏิสนธิด้วย (Budworth et al. 1987; Farrell et al. 1998) และยังพบว่าความเร็วในการเคลื่อนที่แบบ VSL และ VCL และลักษณะการเคลื่อนที่แบบ ALH และ LIN นั้น มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกต่อความสมบูรณ์พันธุ์อีกด้วย (Farrell et al. 1996; Perumal et al. 2011)

Table 1. Semen quality parameters of frozen-thawed bull semen (mean $\pm$ SD)

Sperm quality parameters	Semen quality performance groups	
	Good (n=30)	Poor (n=30)
sperm motility		
Total motility (%)	53.79 ^a $\pm$ 9.49	23.61 ^b $\pm$ 9.31
Progressive motility (%)	29.80 ^a $\pm$ 6.90	11.98 ^b $\pm$ 5.37
Velocity		
Straight Line Velocity (VSL; $\mu\text{m/s}$)	66.45 ^a $\pm$ 5.79	58.29 ^b $\pm$ 7.12
Curvilinear Velocity (VCL; $\mu\text{m/s}$)	146.50 ^a $\pm$ 20.77	127.50 ^b $\pm$ 18.83
Average Path Velocity (VAP; $\mu\text{m/s}$)	80.84 ^a $\pm$ 7.42	70.52 ^b $\pm$ 8.18
Kinematic movement		
Amplitude of Lateral Head	6.92 ^a $\pm$ 1.34	6.26 ^b $\pm$ 1.16
Displacement (ALH; μm)		
Beat Cross Frequency (BCF; Hz)	28.68 $\pm$ 2.76	27.99 $\pm$ 3.93
Straightness (STR; %)	80.36 $\pm$ 4.04	80.46 $\pm$ 3.92
Linearity (LIN; %)	46.96 $\pm$ 5.38	47.05 $\pm$ 5.41
Wobble (WOB; %)	56.80 $\pm$ 4.20	56.81 $\pm$ 4.25
Sperm defects		
Bent tail (%)	13.86 ^b $\pm$ 3.35	19.08 ^a $\pm$ 4.76
Coiled tail (%)	1.46 ^b $\pm$ 0.69	2.18 ^a $\pm$ 1.03
Proximal droplet (%)	3.09 ^b $\pm$ 1.09	5.31 ^a $\pm$ 3.16
Distal droplet (%)	4.94 ^b $\pm$ 1.32	7.87 ^a $\pm$ 1.48
Sperm function		
Sperm viability (%)	84.11 ^a $\pm$ 9.34	76.67 ^b $\pm$ 15.59
Acrosome integrity (%)	68.38 $\pm$ 15.73	65.38 $\pm$ 19.15
Plasma membrane integrity (%)	52.81 ^a $\pm$ 13.44	45.09 ^b $\pm$ 16.13

^{ab} Different superscripts within the same row demonstrate significant differences ($P < 0.05$)

รูปแบบโปรตีนในเซมินอลพลาสมาและปริมาณโปรตีน PDC-109

เมื่อตรวจวิเคราะห์รูปแบบของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในเซมินอลพลาสมาของทั้ง 2 กลุ่ม ใน SDS-PAGE พบว่ามีรูปแบบโปรตีนที่คล้ายกัน โดยมีขนาดโมเลกุลส่วนใหญ่ระหว่าง 14-97 kDa (Figure 1) และสามารถพบขนาดโมเลกุลเล็กกว่า 14 kDa ในปริมาณไม่มากนัก ทั้งนี้แถบโปรตีนที่มีปริมาณมากที่สุด (major

protein) มีขนาดโมเลกุลประมาณ 16 kDa (Figure 2a) ซึ่งเป็นขนาดเดียวกันกับโปรตีน PDC-109 โดย Thepparat et al. (2012) ที่รายงานการวิเคราะห์เซมินอลพลาสมาด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์โดยใช้เทคนิค 2D-PAGE ว่าโปรตีน PDC-109 เป็นโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลประมาณ 16.5 kDa สำหรับการศึกษาารูปแบบโปรตีนในสัตว์ชนิดอื่น เช่น การวิเคราะห์โปรตีนด้วย SDS-PAGE ในเซมินอล พลาสมาของกระบือ พบโปรตีน 25 ชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลระหว่าง 14.4-80.5 kDa โดยโปรตีนส่วนมากจะน้ำหนักน้อยกว่าและเท่ากับ 35.5 kDa พบเป็น 28% ของโปรตีนรวมทั้งหมด (Asadpour et al., 2007) การศึกษารูปแบบโปรตีนในพ่อพันธุ์แกะ พบโปรตีนที่มีขนาด 15–108 kDa (Jobim et al., 2005) การศึกษารูปแบบโปรตีนในในม้าพบโปรตีนขนาด 14–30 kDa (Töpfer et al., 2005) ทั้งนี้ การศึกษาของ Arangasamy et al. (2005) ในกระบือที่รายงานว่าพบโปรตีน 18 ชนิดโดยมีขนาดโปรตีนตั้งแต่ 12 -127 kDa นั้น แตกต่างจากการศึกษาของ Asadpour et al. (2007) โดยความแตกต่างของจำนวนแถบโปรตีนที่พบในการศึกษาแต่ละวิธีนั้น อาจเกิดจากความแตกต่างกันของวิธีการเตรียมโปรตีน

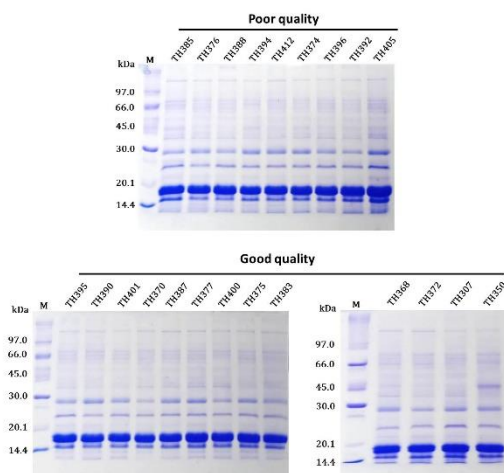


Figure 1 SDS-PAGE patterns of proteins in bovine seminal plasma. The gels were stained with Coomassie Brilliant Blue R-250. M lane indicated low molecular weight standard.

เทคนิค western blot ถูกนำมาใช้เพื่อยืนยันชนิดของโปรตีนจากเซมินอลพลาสดังกล่าวฯ โดยใช้ mouse monoclonal anti PDC-109 พบว่าโปรตีนที่มีขนาดมวลโมเลกุล 16 kDa ซึ่งพบเป็นโปรตีนหลักใน SDS-PAGE สามารถจับได้อย่างจำเพาะกับโปรตีน PDC-109 (Figure 2b)

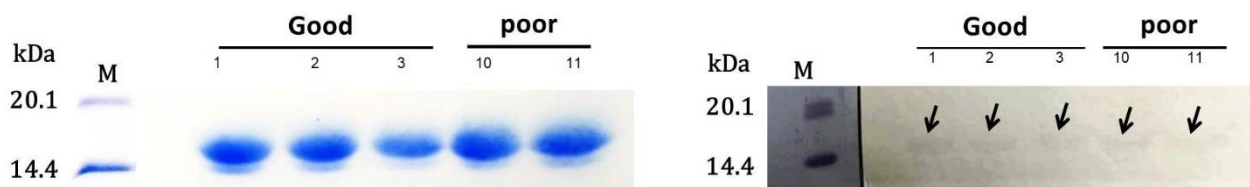


Figure 2 SDS-PAGE patterns of proteins in bovine seminal plasma in both groups (good and poor sperm freezability; 2a). Western blot images show representative protein patterns for PDC-109 in 2 groups (2b).

ความสัมพันธ์ของโปรตีน PDC-109 ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง

จากการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีน PDC-109 ในเซมินอลพลาสมาระหว่างน้ำเชื้อโคทั้งสองกลุ่ม (Table 2) พบว่า มีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน PDC-109 กับความสามารถในการแช่แข็งซึ่งมีผลต่อเนื่องไปถึงคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลายในทุกลักษณะ (Table 3)

Table 2. Amount of PDC-109 in seminal plasma of good and poor freezability groups (mean $\pm$ SD)

Group (n=30)	PDC-109
Good freezability	0.13 $\pm$ 0.05
Poor freezability	0.14 $\pm$ 0.06

Table 3 Correlation coefficients between sperm quality parameters of frozen-thawed semen and amount of PDC-109

Parameters	Correlation coefficients (r) between sperm quality parameters and amount of PDC-109 (n=60)	P-value
Sperm motility (%)		
Total motility	-0.077	0.600
Progressive motility	-0.102	0.482
Slow motility	-0.008	0.956
Static sperm	0.077	0.600
Velocity		
VSL ($\mu\text{m/s}$)	0.051	0.689
VCL ($\mu\text{m/s}$)	0.029	0.768
VAP ($\mu\text{m/s}$)	0.040	0.784
Kinematic movement		
ALH (μm)	-0.058	0.690
BCF (Hz)	0.253	0.079
STR (%)	-0.034	0.813
LIN (%)	0.09	0.560
WOB (%)	0.132	0.363
Sperm with tail defects (%)		
Bent tail	-0.067	0.963
Coiled tail	0.117	0.424
Proximal droplets	0.08	0.967
Distal droplets	-0.049	0.740
Sperm functions (%)		
Sperm viability	0.050	0.755
Acrosome integrity	0.262	0.082

สำหรับการศึกษานี้ คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลายที่มีความแตกต่างกันนั้น อาจเกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย เช่น ปริมาณโปรตีนชนิดอื่นที่มีความแตกต่างกันนอกจากโปรตีน PDC-109 ในเซมินอลพลาสมา (Sarsaifi et al., 2015) เช่น อัลบูมิน (albumin) ช่วยป้องกันความเสียหายของเยื่อหุ้มอสุจิ และเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ โปรตีนคลัสเตอร์ิน (clusterin protein) ช่วยป้องกันความเสียหายจาก oxidative stress และยับยั้งการทำลายอสุจิ (Moura et al., 2007) นอกจากนี้ Schöneck et al. (1996) ได้รายงานว่าการโปรตีน bovine acidic seminal fluid สามารถป้องกันความเสียหายบริเวณเยื่อหุ้มอสุจิได้ ทำให้อสุจิมีชีวิตและอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิสูงขึ้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Jobim et al. (2004) ที่รายงานว่าพบความสัมพันธ์ในเชิงบวกระหว่างปริมาณโปรตีน bovine acidic seminal fluid กับคุณภาพน้ำเชื้อหลังทำละลาย นอกจากนี้ สารต้านอนุมูลอิสระต่างๆ (antioxidants) เช่น วิตามินเอ วิตามินอี กรดแอสคอร์บิก (ascorbic acid) และซีลีเนียม รวมถึงเอนไซม์ที่ช่วยกำจัดอนุมูลอิสระออกซิเจน (enzymatic ROS scavengers) เช่น คตะเลส (catalase) กลูตาไทโอนเพอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) และ ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) ที่อยู่ในเซมินอลพลาสมาก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ช่วยปกป้องอสุจิจากอนุมูลอิสระ (Gürler et al., 2015) ซึ่งความแตกต่างของโปรตีนหรือองค์ประกอบอื่นในเซมินอลพลาสมา อาจเป็นปัจจัยที่อาจส่งผลกระทบต่อความสามารถในการแช่แข็งซึ่งมีผลต่อเนื่องไปถึงคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลายได้

ในขณะที่ Singh et al. (2014) ได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน HBP และ PDC-109 ในน้ำเชื้อกระปือ พบว่าน้ำเชื้อกระปือกลุ่มที่มีความสามารถในการแช่แข็งต่ำมีปริมาณโปรตีน PDC-109 สูงกว่ากลุ่มที่มีความสามารถในการแช่แข็งสูง ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาในครั้งนี้ และจากการศึกษาของ Sánchez-Luengo et al. (2004) ทำการทดลองโดยเก็บน้ำเชื้อจากส่วนต่างๆ ของอวัยวะเพศ (epididymis) เพื่อศึกษาความเข้มข้นของโปรตีน PDC-109 ต่อการเคลื่อนที่ได้ออสุจิที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการแช่แข็ง พบว่าโปรตีน PDC-109 ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันสามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิได้ เนื่องจากการเก็บตัวอย่างจากอวัยวะเพศ ยังไม่มีอิทธิพลจากน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ อีกทั้งการรีดเก็บน้ำเชื้อจนเข้าสู่กระบวนการผลิตน้ำเชื้อใช้ระยะเวลาไม่นาน ทำให้อสุจิสัมผัสกับโปรตีน PDC-109 ในเซมินอลพลาสมาในช่วงเวลาสั้นๆ รวมทั้งการเติมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิดไข่แดงทริสในขบวนการแช่แข็ง สามารถช่วยลดความเข้มข้นของโปรตีนชนิดต่างๆ เนื่องจากโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบหลักในเซมินอลพลาสมาจะเข้าจับกับ LDL ซึ่งเป็นองค์ประกอบในไข่แดงอย่างรวดเร็วและจำเพาะจึงช่วยลดปริมาณของโปรตีนในเซมินอลพลาสมาที่จะเข้าจับกับอสุจิ (Manjunath and Therien, 2002) รวมถึงโปรตีน PDC-109 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการ sperm capacitation เพื่อเตรียมความพร้อมสำหรับการเข้าปฏิสนธิกับไข่ ทำให้อสุจิไวต่อการเกิด cold shock จากกระบวนการแช่แข็ง (Purdy and Graham, 2004; Therien et al., 1998) โดยหากอสุจิสัมผัสเซมินอลพลาสมาในเวลานานจะทำให้เกิดภาวะการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและกลไกการทำงานของอสุจีก่อนที่จะเข้าสู่ระบบสืบพันธุ์เพศเมีย (pre-capacitation) ทำให้น้ำเชื้อมีคุณภาพลดลงกว่าที่ควรจะเป็น (Therien et al., 1998) และจากการศึกษาของ Vishwanath et al. (1992) และ Bergeron et al. (2007) พบว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนผสมของไข่แดงที่เป็นที่นิยมใช้ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งนั้น ช่วยลดอันตรายจากการที่อสุจิสัมผัสเซมินอลพลาสมา โดยโปรตีนในไข่แดงสามารถเคลือบที่เยื่อหุ้มอสุจิและยังสามารถจับกับโปรตีน PDC-109 ได้อย่างรวดเร็วก่อนเข้าสู่กระบวนการแช่แข็ง นอกจากนี้ การศึกษาของ

Singh et al. (2007) รายงานว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีสูตรเป็นไข่แดงทริสสามารถลดความเสียหายของอสุจิจากการแช่แข็งในน้ำเชื้อกระป๋องได้

การศึกษาของ Srivastava et al. (2012) ซึ่งได้ทำการทดลองโดยการแบ่งน้ำเชื้อจากพ่อโคพันธุ์ผสม (cross breed) ออกเป็น 3 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกจะเติมเฉพาะน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนผสมของไข่แดงทริส กลุ่มที่ 2 จะมีการเคลือบหลอดที่เก็บน้ำเชื้อด้วยสาร anti-PDC109 และใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตรที่ไม่มีไข่แดง ส่วนกลุ่มที่ 3 จะมีการเคลือบหลอดที่เก็บน้ำเชื้อด้วยสาร anti-PDC109 และเติมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนผสมของไข่แดง โดยผลการทดลองพบว่า กลุ่มที่ 3 มีคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการละลาย ได้แก่อัตราการมีชีวิตของอสุจิ ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ และความสมบูรณ์ของอะโครโซม สูงกว่ากลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแม้จะมีการเติมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ โปรตีน PDC-109 ยังคงมีอิทธิพลต่อคุณภาพน้ำเชื้อทั้งก่อนและหลังการแช่แข็ง แต่อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาในครั้งนี้อาจสรุปได้ว่าน้ำเชื้อของพ่อโคสายพันธุ์ทรอปิคอล โฮลสไตน์มีปริมาณและความเข้มข้นของโปรตีน PDC-109 ที่ต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับพ่อโคสายพันธุ์อื่น และร่วมกับภายหลังจากการรีดน้ำเชื้อได้เข้าสู่กระบวนการเติมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้ออย่างรวดเร็ว ย่อมทำให้ผลของโปรตีน PDC-109 ต่ออสุจิลดลง ทั้งนี้ผลการทดลองจาก Table 3 ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน PDC-109 ต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการละลาย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Srivastava et al. (2012) ที่พบว่าสารละลายเจือจางน้ำเชื้อสูตรที่มีไข่แดง ช่วยลดผลทางด้านลบของโปรตีน PDC-109 นอกจากนี้ ยังอาจเกิดจากปัจจัยอื่นๆ เช่น ความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ของโค และพันธุ์กรรม ซึ่งส่งผลต่อการแสดงออกของยีนได้ ซึ่งจากการศึกษาของ Intasqui et al. (2013) พบว่าทั้งความสมบูรณ์และความเสียหายของดีเอ็นเอ เกิดจากความแตกต่างในการแสดงออกของโปรตีน ซึ่งส่งผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิได้

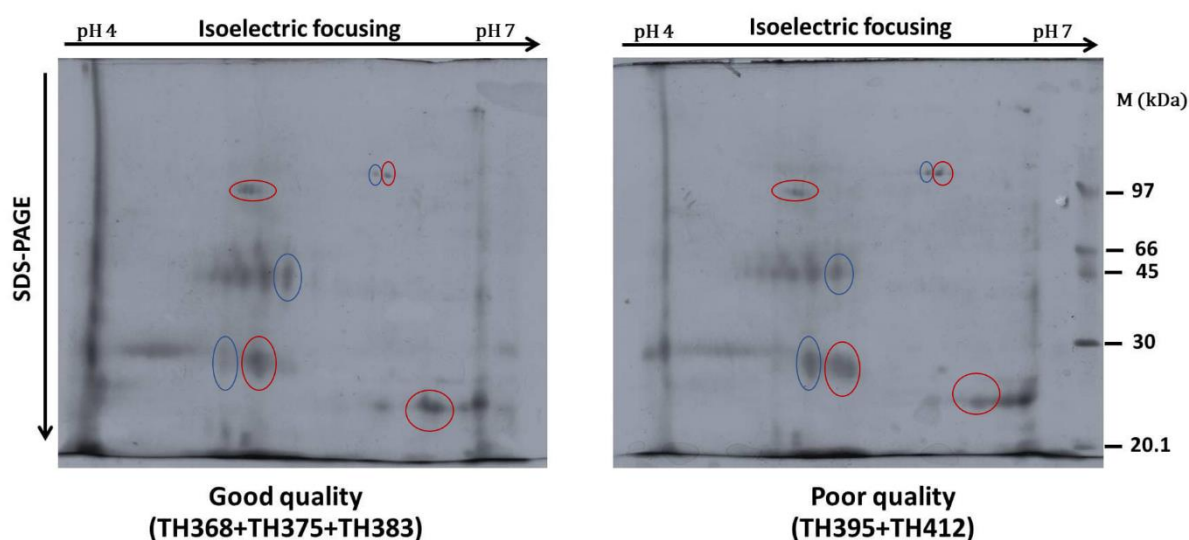


Figure 3 Two-dimensional polyacrylamide electrophoretic gel of bovine seminal plasma proteins were stained with Coomassie Brilliant blue R-250.

อย่างไรก็ตาม จากการทดสอบด้วยเทคนิค 2D-PAGE ได้มีการค้นพบความแตกต่างของรูปแบบโปรตีนอื่น นอกเหนือไปจากโปรตีนเป้าหมายหลัก PDC-109 โดยพบว่าโปรตีนในเซมินอลพลาสมาทั้งสองกลุ่มมีการแสดง

ออกของโปรตีนที่แตกต่างกันตามการกระจายตัวของโปรตีนที่แยกบนเจล (Figure 3) ในกลุ่มน้ำเชื้อที่มีความสามารถในการแช่แข็งสูงและต่ำ ซึ่งเมื่อนำเซมินอลพลาสมาจากพ่อพันธุ์โคนมทรอปิคอล โฮลสไตน์จากกลุ่มตัวอย่างน้ำเชื้อที่มีความสามารถในการแช่แข็งสูงและต่ำ จำนวน 5 สัปดาห์ มาทำการรวมกันและศึกษาแบบแผนของโปรตีนด้วยเทคนิค 2D-PAGE นั้น ผลการศึกษาพบว่า โปรตีนในเซมินอลพลาสมาทั้งสองกลุ่มมีการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกัน (Figure 3) ซึ่งการศึกษาดังกล่าวฯ อาจต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต ทั้งในส่วนของรูปแบบโปรตีนในเซมินอล พลาสมาในพ่อพันธุ์โคนมทรอปิคอล โฮลสไตน์ที่จะมีผลต่อความสามารถในการแช่แข็ง ซึ่งมีผลต่อเนื่องไปถึงคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลายและความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อโค ซึ่งอาจทำให้ค้นพบกระบวนการที่ช่วยในการเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์โคภายหลังการละลาย รวมถึงเป็นส่วนหนึ่งในการคัดพ่อโคที่ไม่เหมาะสมออกก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งได้

สรุปผลการทดลอง

น้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์โคนมทรอปิคอล โฮลสไตน์กลุ่มที่มีความสามารถในการแช่แข็งสูงและต่ำมีปริมาณโปรตีน PDC-109 ในเซมินอลพลาสมาไม่แตกต่างกัน และปริมาณโปรตีน PDC-109 ไม่มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการแช่แข็งของน้ำเชื้อซึ่งมีผลต่อเนื่องไปถึงคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลาย

ข้อเสนอแนะ

แม้ว่าในการศึกษารั้งนี้ PDC-109 ไม่มีความสัมพันธ์กับความสามารถในการแช่แข็งของน้ำเชื้อซึ่งมีผลต่อเนื่องไปถึงคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลาย แต่ถ้าพิจารณาถึงรูปแบบของโปรตีนในเซมินอลพลาสมาเมื่อตรวจด้วยเทคนิค 2D-PAGE ในน้ำเชื้อที่มีความสามารถในการแช่แข็งสูงและต่ำ จะพบว่ามีโปรตีนที่แสดงออกที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจมีโปรตีนที่ส่งผลต่อความสามารถในการแช่แข็งชนิดอื่นซึ่งมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง จึงควรทำการศึกษาโปรตีนอื่นที่เป็นองค์ประกอบในเซมินอลพลาสมาในกลุ่มพ่อโคที่มีคุณภาพน้ำเชื้อที่แตกต่างกัน รวมทั้งความสามารถในการแช่แข็งสูงและต่ำต่อไป เพื่อนำมาใช้ในการร่วมเป็นเกณฑ์การคัดเลือกพ่อพันธุ์ นอกเหนือไปจากการคัดเลือกลักษณะอื่นๆ การวางแผนการผลิตและพัฒนาเทคนิคการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งในโคนมให้มีคุณภาพสูงขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) คณะผู้วิจัย ขอขอบคุณผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ลำพญากลาง เจ้าหน้าที่ของกลุ่มวิจัยการผลิตและมาตรฐานน้ำเชื้อ และเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อฯ ลำพญากลาง ที่ให้การช่วยเหลือและสนับสนุนให้สามารถดำเนินการวิจัยเป็นไปตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

- รพีพรรณ เอื้อเวชนิขกุล. 2551. คู่มือการปฏิบัติงาน การควบคุมคุณภาพน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ผสมเทียม (Quality control of livestock semen for artificial insemination). สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์.
- Arangasamy, A., L.P. Singh, N. Ahmed, M.R. Ansari and C.G. Ram. 2005. Isolation and characterization of heparin and gelatin binding buffalo seminal plasma proteins and their effect on cauda epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 90(3):243–254.
- Asadpour, R., S.M. Alavi-Shoushtari, S.A. Rezaii and M.H.K. Ansari. 2007. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis of buffalo bull seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Animal Reproduction Science.* 102(3):308-313.
- Axnér, E., U. Hermansson and C. Linde-Forsberg. 2004. The effect of Equex STM paste and sperm morphology on post-thaw survival of cat epididymal spermatozoa. *Animal Reproduction Science.* 84(1):179-191.
- Baker, M.A., L. Hetherington, G.M. Reeves and R.J. Aitken. 2008. The mouse sperm proteome characterized via IPG strip prefractionation and LC-MS/MS identification. *Proteomics.* 8(8):1720-1730.
- Belleannée, C., V. Labas, A. Teixeira-Gomes, J.L. Gatti, J.L. Dacheux and F. Dacheux. 2011. Identification of luminal and secreted proteins in bull epididymis. *Journal of Proteomics.* 74(1):59-78.
- Bergeron, A., Y. Brindle, P. Blondin and P. Manjunath. 2007. Milk caseins decrease the binding of the major bovine seminal plasma proteins to sperm and prevent lipid loss from the sperm membrane during sperm storage. *Biol. Reprod.* 77:120–126.
- Blom, E. and A. Birch-Andersen. 1970. Ultrastructure of the decapitated sperm defects in Guernsey bulls. *Reproduction.* 23(1):67-72.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry.* 72(12):248–254.
- Budworth, P.R., R.P. Amann and R.H. Hammerstedt. 1987. A microcomputer-photographic method for evaluation of motility and velocity of bull sperm. *Journal of Dairy Science.* 70(9):1927–1936.
- Dacheux, J.L., J.L. Gatti and F. Dacheux. 2003. Contribution of epididymal secretory proteins for spermatozoa maturation. *Microsc. Res. Tech.* 61:7–17.
- Dott, H.M. and G.C. Foster. 1972. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential live/dead stain. *J. Reprod. Fert.* 29:443-445.
- Farrell P.B., R.H. Foote, M.M. McArdle, V.L. Trouerntrend and A.L. Tardif. 1996. Media and dilution procedures tested to minimize handling effects on human, rabbit, and bull

- sperm for computer-assisted sperm analysis (CASA). *Journal of Andrology*. 17(3):293–300.
- Farrell P.B., G.A. Presicce, C.C. Brockett and R.H. Foote. 1998. Quantification of bull sperm characteristics measured by computer-assisted sperm analysis (CASA) and their relationship to fertility. *Theriogenology*. 49:871–879.
- Garner, D. and L. Johnson. 1995. Viability assessment of mammalian sperm using SYBR-14 and propidium iodide. *Biol. Reprod.* 53(2):276-284.
- Gaviraghi, A., F. Deriu, A. Soggiu, A. Galli, C. Bonacina, L. Bonizzi and P. Roncada. 2010. Proteomics to investigate fertility in bulls. *Veterinary Research Communications*. 34(1):33-36.
- González-Cadavid, V., J.A.M. Martins, F.B. Moreno, T.S. Andrade, A.C.L. Santos, A.C.O. Monteiro-Moreira, R.A. Moreira and A.A. Moura. 2014. Seminal plasma proteins of adult boars and correlations with sperm parameters. *Theriogenology*. 82(5):697-707.
- Gürler, H., O. Calisici and H. Bollwein. 2015. Inter- and intra-individual variability of total antioxidant capacity of bovine seminal plasma and relationships with sperm quality before and after cryopreservation. *Animal Reproduction Science*. 155:99-105.
- Gwathmey, T.M., G.G. Igotz, J.L. Mueller, P. Manjunath and S.S. Suarez. 2006. Bovine seminal plasma proteins PDC-109, BSP-A3, and BSP-30-kDa share functional roles in storing sperm in the oviduct. *Biol. Reprod.* 75(4):501-507.
- Intasqui, P., M. Camargo, G.P.T. Del, D.M. Spaine, V.M. Carvalho, K.H.M. Cardozo, A.P. Cedenho and R.P. Bertolla. 2013. Unraveling the sperm proteome and post-genomic pathways associated with sperm nuclear DNA fragmentation. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*. 30(9):1187-1202.
- Jobim, M.I.M., E.R. Oberst, C.G. Salbego, D.O. Souza, V.B. Wald, F. Tramontina and R.C. Mattos. 2004. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of bovine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*. 61(2):255-266.
- Jobim, M.I.M., E.R. Oberst, C.G. Salbego, V.B. Wald, A.P. Horn and R.C. Mattos. 2005. BSP A1/A2 like proteins in ram seminal plasma. *Theriogenology*. 63(7):2053–2062.
- Jobim, M.I.M., C. Trein, H. Zirkler, R.M. Gregory, H. Sieme and R.C. Mattos. 2011. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of equine seminal plasma proteins and their relation with semen freezability. *Theriogenology*. 76(4):765-771.
- Manjunath, P., L. Chandonnet, E. Leblond and L. Desnoyers. 1994. Major proteins of bovine seminal vesicles bind to spermatozoa. *Biol. Reprod.* 50:27–37.
- Manjunath, P. and I. Therien. 2002. Role of seminal plasma phospholipid-binding proteins in sperm membrane lipid modification that occurs during capacitation. *Journal of Reproductive Immunology*. 53(1):109-119.
- Martínez-Heredia, J., J.M. Estanyol, J.L. Ballescà, and R. Oliva. 2006. Proteomic identification of human sperm proteins. *Proteomics*. 6(15):4356-4369.
- Morrell, J.M., A.S. Valeanu, N. Lundeheim and A. Johannisson. 2018. Sperm quality in frozen

- beef and dairy bull semen. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 60(1):41.
- Moura, A.A., D.A. Chapman, H. Koc and G.J. Killian. 2007. A comprehensive proteomic analysis of the accessory sex gland fluid from mature Holstein bulls. *Animal Reproduction Science*. 98(3): 169-188.
- Peddinti, D., B. Nanduri, A. Kaya, J.M. Feugang, S.C. Burgess and E. Memili. 2008. Comprehensive proteomic analysis of bovine spermatozoa of varying fertility rates and identification of biomarkers associated with fertility. *BMC Systems Biology*. 2:19-20.
- Perumal, P., S. Selvaraju and S. Selvakumar. 2011. Effect of pre-freeze addition of cysteine hydrochloride and reduced glutathione in semen of crossbred jersey bulls on sperm parameters and conception rates. *Reproduction in Domestic Animals*. 46(4):636–641.
- Purdy, P.H. and J.K. Graham. 2004. Effect of cholesterol-loaded cyclodextrin on the cryosurvival of bull sperm. *Cryobiology*. 48(1):36-45.
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria.
- Revell, S.G. and R.A. Mrode. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science*. 36(1):77-86.
- Sánchez-Luengo, S., G. Aumüller, M. Albrecht, P.C. Sen, K. Röhm and B. Wilhelm. 2004. Interaction of PDC-109, the major secretory protein from bull seminal vesicles, with bovine sperm membrane Ca^{2+} -ATPase. *Journal of Andrology*. 25(2):234-244.
- Sarsaifi, K., A.W. Haron, J. Vejayan, R. Yusoff, H. Hani, M.A. Omar, L.W. Hong, N. Yimer, J.T. Ying and A.M. Othman. 2015. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of Bali bull (*Bos javanicus*) seminal plasma proteins and their relationship with semen quality. *Theriogenology*. 84(6):956-968.
- Schöneck, C., J. Braun and R. Einspanier. 1996. Sperm viability is influenced in vitro by the bovine seminal protein aSFP: Effects on motility, mitochondrial activity and lipid peroxidation. *Theriogenology*. 45(3):633-642.
- Singh, L.P., H.M. Harshan and M.R. Ansari. 2007. Effect of egg yolk and seminal plasma heparin binding protein interaction on the freezability of buffalo cauda epididymal spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci*. 99:395–400.
- Singh, M., S.K. Ghosh, J.k. Prasad, A. Kumar, R.P. Tripathi, S.K. Bhure and N. Srivastava. 2014. Seminal PDC- 109 protein vis- à- vis cholesterol content and freezability of buffalo spermatozoa. *Animal Reproduction Science*. 144(1):22-29.
- Srivastava, N., S.K. Srivastava, S.K. Ghosh, L.P. Singh, J.K. Prasad, A. Kumar, P. Perumal, A. Jerome and A. Thamizharasan. 2012. Sequestration of PDC-109 protein improves freezability of crossbred bull spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci*. 131(12):54-62.
- Thepparat, T., S. Katawatin, T. Vongpralub, M. Duangjinda, S. Thammasirak and A. Utha. 2012. Separating of bovine seminal plasma proteins by using 2D-PAGE revealed the

- different profile of PDC-109. Khon Kaen Agricultural Journal. 40(2):387-391.
- Therien, I., S. Soubeyrand and P. Manjunath. 1998. Major proteins of bovine seminal plasma modulate sperm capacitation by high-density lipoprotein. Biol. Reprod. 57(5):1080-1088.
- Therien, I., R. Moreau and P. Manjunath. 1999. Bovine seminal plasma phospholipid-binding proteins stimulate phospholipid efflux from epididymal sperm. Biol. Reprod. 61:590-598.
- Therien, I., D. Bousquet and P. Manjunath. 2001. Effect of seminal phospholipid-binding proteins and follicular fluid on bovine sperm capacitation. Biol. Reprod. 65(1):41-51.
- Töpfer, P.E., M. Ekhlas-Hundrieser, C. Kirchhoff, T. Leeb and H. Sieme. 2005. The role of stallion seminal proteins in fertilization. J. Anim. Reprod. 89(1):159-170.
- Vishwanath, R., P. Shannon and B. Curson. 1992. Cationic extracts of egg yolk and their effects on motility, survival and fertilizing ability of bull sperm. Anim. Reprod. Sci. 29:185-194.
- Welinder, C. and L. Ekblad. 2011. Coomassie staining as loading control in Western blot analysis. Journal of Proteome Research. 10(3):1416-1419.

ผลของวิธีการปั่นแยก seminal plasma ด้วยสารละลายเพอร์คอลล ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรภายหลังการละลาย

วรพงษ์ พงษ์ศิริ จรรยาพร รุ่งเรืองศักดิ์

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยสารละลายเพอร์คอลลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรภายหลังการละลาย โดยใช้น้ำเชื้อจากสุกรพ่อพันธุ์จำนวน 9 ตัว อายุ 2-3 ปี จากศูนย์วิจัยและพัฒนาสุกรจังหวัดนครราชสีมา รีดเก็บน้ำเชื้อสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ติดต่อกัน 4 สัปดาห์ ภายหลังปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 15 °C นาน 120 นาที แบ่งน้ำเชื้อออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มควบคุมไม่ใช้สารละลายเพอร์คอลล กลุ่มที่ 2 ใช้สารละลาย เพอร์คอลลชั้นเดียวที่ความเข้มข้น 80% และกลุ่มที่ 3 ใช้สารละลายเพอร์คอลลสองชั้น ชั้นที่ 1 ความเข้มข้น 80% และชั้นที่ 2 ความเข้มข้น 45% ทำการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา ที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที นำส่วนที่ตกตะกอนเข้าสู่ขบวนการแช่แข็งและเก็บรักษาภายใต้ระดับไนโตรเจนเหลวอย่างน้อย 24 ชั่วโมง สุ่มตรวจอัตราการเคลื่อนที่ ความเร็วในการเคลื่อนที่ ลักษณะการเคลื่อนที่ และความผิดปกติในส่วนหางของอสุจิด้วยเครื่อง CASA ตรวจอสุจิมิชีวิตและความสมบูรณ์ของอะโครโซมด้วยเครื่อง flow cytometer ผลการทดลองพบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งในกลุ่มที่ 2 และ 3 มีคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลายที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ได้แก่ อัตราการเคลื่อนที่ (32.94 ± 11.80 , 35.72 ± 10.52 และ 25.22 ± 13.45) อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (12.99 ± 5.86 , 14.09 ± 5.51 และ 7.04 ± 5.22) ความเร็วในการเคลื่อนที่แบบ VSL (52.91 ± 11.16 , 54.04 ± 8.29 และ 46.20 ± 9.99) ลักษณะการเคลื่อนที่แบบ STR (81.33 ± 6.82 , 79.70 ± 6.89 และ 74.08 ± 8.37) แบบ LIN (51.85 ± 9.20 , 49.27 ± 9.38 และ 42.90 ± 9.31) และแบบ WOB (61.82 ± 6.58 , 59.72 ± 6.72 และ 55.64 ± 6.34) ในขณะที่อสุจิมิชีวิตในกลุ่มที่ 3 สูงกว่ากลุ่มที่ 2 และกลุ่มควบคุม (54.99 ± 11.19 , 51.36 ± 11.97 และ 48.30 ± 10.15 ตามลำดับ) แต่ลักษณะความผิดปกติส่วนหางของอสุจิทั้งกลุ่มที่ 2 และ 3 ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของทั้งสามกลุ่มไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) (58.61 ± 24.97 , 58.11 ± 25.43 และ 63.79 ± 22.08 ตามลำดับ) สรุปได้ว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้สารละลายเพอร์คอลลทั้งแบบชั้นเดียวและแบบสองชั้นมีคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรสูงกว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาแบบไม่ใช้สารละลายเพอร์คอลล โดยคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรภายหลังการละลายจากการปั่นแยกด้วยสารละลายเพอร์คอลลแบบสองชั้นสูงกว่าการปั่นแยกด้วยสารละลายเพอร์คอลลแบบชั้นเดียว

คำสำคัญ: เซมินอลพลาสมา น้ำเชื้อแช่แข็งสุกร สารละลายเพอร์คอลล

เลขทะเบียนวิจัย: 60(1)-(60:02)-0208-025

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ อ.เมือง จ.ปทุมธานี

Effect of Percoll density gradient centrifugation for boar thawing semen quality

Worapong Pongsiri Janyaporn Rungruangsak

Abstract

The present experiment aimed to evaluate the effects of different Percoll density gradient centrifugations on frozen-thawed boar semen quality. Nine mature boars aged 2 to 3 years old, were collected semen at one-week interval over a 4-week period. After incubation at 15 °C for 120 minutes, semen was divided into 3 groups; control group: separated without using Percoll, group 2: separated using one-step Percoll at 80% concentration, and group 3: separated using two-step Percoll with lower part of 80% and upper part of 45% concentrations. All semen samples were centrifuged for seminal plasma separation at 2,000 rpm for 15 minutes. The sperm pellets from each group, were used to continue the process of frozen-thawed boar semen production and stored in liquid nitrogen at least 24 hours before semen quality evaluation. The frozen semen quality was evaluated including sperm motility, velocity, kinematic movement, and sperm with tail defects using CASA as well as sperm viability and acrosomal integrity using flow cytometer. The results showed that frozen-thawed boar semen quality from group 2 and 3 were significantly better than the control group ($P < 0.05$) including motility (32.94 ± 11.80 , 35.72 ± 10.52 and 25.22 ± 13.45), progressive motility (12.99 ± 5.86 , 14.09 ± 5.51 and 7.04 ± 5.22), velocity VSL (52.91 ± 11.16 , 54.04 ± 8.29 and 46.20 ± 9.99), kinematic movement STR (81.33 ± 6.82 , 79.70 ± 6.89 and 74.08 ± 8.37), LIN (51.85 ± 9.20 , 49.27 ± 9.38 and 42.90 ± 9.31), and WOB (61.82 ± 6.58 , 59.72 ± 6.72 and 55.64 ± 6.34). Moreover, sperm viability from group 3 was higher than group 2 and control group (54.99 ± 11.19 , 51.36 ± 11.97 and 48.30 ± 10.15 respectively) with statistical significance ($P < 0.05$). The sperm with tail defects from group 2 and 3, were significantly lower than control group ($P < 0.05$), whereas the acrosomal integrity did not show a significant difference ($P > 0.05$) among the groups (58.61 ± 24.97 , 58.11 ± 25.43 and 63.79 ± 22.08 respectively). In conclusion, the process of seminal plasma separation using both one-step Percoll at 80% concentration and two-step Percoll with lower part of 80% and upper part of 45% concentrations, provided better quality of frozen-thawed boar semen than those from the centrifugation without Percoll. Furthermore, two-step Percoll provided better quality of frozen-thawed boar semen than one-step Percoll.

Keywords: seminal plasma, frozen boar semen, Percoll

Registered No: 60(1)-(60:02)-0208-025

Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Muang district, Pathum Thani province

คำนำ

ปัจจุบันการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งสุกรในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรทั่วโลกมีประมาณ 1% เท่านั้น (Yeste, 2015) เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการผสมเทียมต่ออัตราการผสมติดและจำนวนลูกสุกรต่อครอกที่ต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสดหรือแช่เย็น (Chanapiwat et al., 2014; Martinez-Alborcia et al., 2012) แต่ข้อดีของการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีการแช่แข็งคือสามารถเก็บรักษาอสุจิให้คงสภาพที่ดีได้เป็นเวลายาวนาน เพื่อนำกลับมาใช้ในการเพาะขยายพันธุ์สุกรที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจสูง ลดข้อจำกัดด้านอายุของพ่อพันธุ์สุกรผสมเทียม (Safranski et al., 2011) สามารถขนส่งระยะทางไกลและลดความเสี่ยงในการแพร่ผ่านของโรคทางระบบสืบพันธุ์ (Chanapiwat et al., 2014)

น้ำเชื้อแช่แข็งสุกรคุณภาพดีเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผสมเทียม ดังนั้นจึงมีความสำคัญที่จะพัฒนากระบวนการผลิตเพื่อเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร ซึ่งมีขั้นตอนและเทคนิคที่ซับซ้อนกว่าน้ำเชื้อปศุสัตว์ชนิดอื่น โดยเฉพาะขั้นตอนการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา (seminal plasma) ซึ่งเป็นขั้นตอนในการเพิ่มความเข้มข้นของอสุจิให้สามารถเติมสารละลายในกระบวนการแช่แข็ง อีกทั้งยังสามารถคัดแยกอสุจิคุณภาพดีออกจากอสุจิคุณภาพต่ำ รวมถึงสิ่งปนเปื้อนอื่นๆ (Matás et al., 2011; Suzuki and Nagai, 2003) โดยวิธีที่นิยมคือการใช้สารละลายเพอร์คอลลเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการปั่นแยก ซึ่งเพอร์คอลลไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (Avery and Greve, 1995)

การใช้สารละลายเพอร์คอลลในขั้นตอนการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาจากน้ำเชื้อ อาศัยหลักการของสารละลายที่มีค่าความหนาแน่นที่ไม่ต่อเนื่องกันหลายระดับ (discontinuous density gradient) โดยทำให้สารที่ต้องการคัดแยกเคลื่อนที่ไปสู่จุดที่มีค่าความหนาแน่นที่ตรงกัน ซึ่งเทคนิคการปั่นแยกนี้สามารถใช้แยกอสุจิที่เคลื่อนที่ได้ออกจากเซมินอลพลาสมา อสุจิที่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ และเซลล์ปนเปื้อนชนิดอื่นๆ (Morrell, 2006) และเป็นที่ยอมรับในสัตว์หลายชนิด (Arias et al., 2017) เช่น สุนัข (Phillips et al., 2012) สุกร (Grant et al., 1994; Jeong, B.S. and X. Yang, 2001; Matás et al., 2011; Mattioli et al., 1989) ม้า (Lindsey et al., 2002) โค (Arias et al., 2017; Cesari et al., 2006; Lee et al., 2009) โดยมีรายงานการศึกษาการใช้สารละลายเพอร์คอลลเพื่อปั่นแยกน้ำเชื้อสุกรทั้งแบบสารละลายเพอร์คอลลแบบชั้นเดียวที่ระดับความเข้มข้น 15%, 30%, 45%, 60%, 75% และ 90% พบว่าที่ความเข้มข้น 90% สามารถปั่นแยกอสุจิสุกรได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับระดับความเข้มข้นอื่น (Suzuki and Nagai, 2003) ในขณะที่การปั่นแยกแบบสองชั้น ชั้นที่ 1 ความเข้มข้น 90% และชั้นที่ 2 ความเข้มข้น 45% มีความเร็วและลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ใช้สารละลายเพอร์คอลล (Matás et al., 2011) แต่ในการศึกษานี้พบว่าการเตรียมสารละลายเพอร์คอลลที่ความเข้มข้น 90% ทำให้อสุจิผ่านลงมาได้น้อยไม่เพียงพอต่อการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร จึงได้ทำการปรับระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลลให้เหมาะสมกับการศึกษาในครั้งนี้

โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยสารละลายเพอร์คอลลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรภายหลังการละลาย ในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรเพื่อให้ได้น้ำเชื้อสุกรที่มีคุณภาพสูงขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

พ่อพันธุ์สุกรสายพันธุ์ดิวอี้ ลาร์จไวท์ และแลนด์เรซ ที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ อายุระหว่าง 2-3 ปี สายพันธุ์ละ 3 ตัว จำนวน 9 ตัว จากศูนย์วิจัยและพัฒนาสุกร จังหวัดนครราชสีมา รีดเก็บน้ำเชื้อโดยใช้เทคนิคการใช้มือบีบขนาดที่ปลายอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (gloved hand technique) สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ติดต่อกัน โดยน้ำเชื้อสดสุกรที่นำมาผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งต้องมีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่ต่ำกว่า 70% (Buranaamnuay et al. 2009; Kaeoket et al. 2010) และค่าความผิดปกติของอสุจิในส่วนหัวและส่วนหางไม่

เกิน 12% และ 25% ตามลำดับ โดยดัดแปลงจากเกณฑ์ค่าความผิดปกติของอสุจิในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรของ Kaeoket et al. (2010) โดยใช้วิธีย้อมสี William's staining (Blom and Birch-Andersen, 1970)

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) กำหนดให้สายพันธุ์พ่อสุกรเป็นบล็อก (block) โดยนำน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สุกรที่รีดเก็บได้เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด Duragen® (Magapor, Spain) อัตราส่วน 1:1 (v/v) บรรจุในหลอดทดลอง และวางในภาชนะที่หล่อด้วยน้ำให้มึนระดับเดียวกันกับของเหลวภายในขวด บ่มที่อุณหภูมิ 15 °C นาน 120 นาที จากนั้นแบ่งน้ำเชื้อออกเป็น 3 กลุ่มเท่าๆ กัน คือ กลุ่มควบคุม ปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยไม่เติมสารละลายเพอร์คอลล กลุ่มที่ 2 เติมสารละลายเพอร์คอลลชั้นเดียวที่ 80% และกลุ่มที่ 3 ใช้สารละลายเพอร์คอลลสองชั้น ชั้นที่ 1 ความเข้มข้น 80% และชั้นที่ 2 ความเข้มข้น 45% นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 15 นาที

การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง

ดำเนินการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งดัดแปลงจากวิธีของ Buranaamnuy et al. (2009) โดยแยกเอาของเหลวส่วนบนทิ้ง เจือจางด้วย lactose-egg yolk (LEY; 20% ไข่แดง ในสารละลาย 11% lactose) ให้อสุจิมีความเข้มข้น 1.5×10^9 ตัว/มิลลิลิตร และแช่เย็นที่ 4 °C นาน 120 นาที หลังจากนั้นเจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง LEY ผสมกับ 9% glycerol และ 1.5% Equex-STM ให้มีความเข้มข้น 1.0×10^9 ตัว/มิลลิลิตร

การบรรจุและการแช่แข็ง

บรรจุน้ำเชื้อด้วยหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปอังไว้เหนือไอไนโตรเจน 3-4 เซนติเมตร อุณหภูมิประมาณ -120 °C นาน 20 นาที และเก็บรักษาไว้ภายใต้ระดับไนโตรเจนเหลวเพื่อตรวจคุณภาพน้ำเชื้อต่อไป

การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ

คุณภาพน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อภายหลังการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา ด้วยการตรวจอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (motility) และความผิดปกติของอสุจิ (abnormal morphology) ด้วยเครื่อง CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer;IVOS II Motility Analyzer version, Hamilton-Thorne, Biosciences, MA., USA.) และความเข้มข้นของอสุจิด้วย hemocytometer

คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลาย สุ่มน้ำเชื้อแช่แข็งจากทุกชุดการผลิตๆ ละ 3 หลอดต่อพ่อพันธุ์สุกร ละลายน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรด้วยวิธีการอุ่นในน้ำอุณหภูมิที่ 50 °C นาน 12 วินาที และตัวอย่างบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C ตลอดการตรวจคุณภาพ ดังนี้

- 1) อัตราการเคลื่อนที่ (motility; %) อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility; %) อัตราการเคลื่อนที่แบบช้า (slow motility; %) และอสุจิที่ไม่เคลื่อนที่ (static sperm; %)
- 2) ความเร็วในการเคลื่อนที่ ได้แก่
 - Average Path Velocity (VAP; $\mu\text{m/s}$) หมายถึง ความเร็วในการเคลื่อนที่เฉลี่ยจากระยะทางจริงใน 1 วินาที
 - Straight Line Velocity (VSL; $\mu\text{m/s}$) หมายถึง ความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีตรง เป็นการคำนวณจากจุดหนึ่งไปยังอีกจุดหนึ่งในแนวเส้นตรงในช่วงระยะเวลา 1 วินาที

- Curvilinear Velocity (VCL; $\mu\text{m/s}$) หมายถึง ความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีโค้ง เป็นการคำนวณแนวโน้มของการเคลื่อนที่เฉลี่ยใน 1 วินาที

3) ลักษณะการเคลื่อนที่ ได้แก่

- Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH; μm) หมายถึง ความกว้างของส่วนหัวของอสุจิที่ส่ายไปมา

- Beat Cross Frequency (BCF; Hz) หมายถึง ความถี่ของการส่ายส่วนหัวของอสุจิ

- Straightness (STR; %) หมายถึง ความตรงในการเคลื่อนที่ ซึ่งคำนวณจากอัตราส่วนความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีตรง (VSL) ต่อความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (VAP) คูณด้วยร้อย

- Linearity (LIN; %) หมายถึง อัตราส่วนความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีตรงต่อความเร็วเฉลี่ยของการเคลื่อนที่วิถีโค้ง (VCL) คูณด้วยร้อย

- Wobble (WOB; %) หมายถึง อัตราส่วนความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (VAP) ต่อความเร็วเฉลี่ยของการเคลื่อนที่วิถีโค้ง (VCL) คูณด้วยร้อย

4) ความผิดปกติในส่วนหางของอสุจิโดยใช้โปรแกรมตรวจความผิดปกติอสุจิด้วยเครื่อง CASA

5) อสุจิมีชีวิตและความสมบูรณ์ของอะโครโซมด้วยเครื่อง flow cytometer (Attune NxT, Thermo Fisher Scientific, USA) ดังนี้

- ความสมบูรณ์ของอะโครโซมโดยย้อมด้วยสี FITC-PNA (Lectin PNA From Arachis hypogaea (peanut), Alexa Fluor™ 488, Thermo Scientific, Kalamazoo, MI, L21409.) และ PI (LIVE/DEAD Sperm Viability Kit ,Molecular Probes) ตามวิธีการของ Nagy et al., (2003) นับจำนวนอสุจิทั้งสิ้น 10,000 ตัวอสุจิ

เกณฑ์การพิจารณาคุนภาพน้ำเชื้อทั้ง 3 กลุ่ม ภายหลังการปั่นแยกด้วยสารละลายเพอร์คอลล

*ภาคผนวก

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วย one-way analysis of variance (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบผลเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's multiple comparison test กำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับร้อยละ 95 ($P < 0.05$) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ R commander version 3.5.2 (R Core Team, 2018)

ผลการทดลอง

อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ

จาก Table 1 ผลการวิเคราะห์คุนภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรภายหลังการละลายในกลุ่มที่ 2 ปั่นแยกด้วยสารละลายเพอร์คอลลชั้นเดียวที่ความเข้มข้น 80% และกลุ่มที่ 3 ปั่นแยกสารละลายเพอร์คอลลสองชั้น ชั้นที่ 1 ความเข้มข้น 80% และชั้นที่ 2 ความเข้มข้น 45% พบว่าอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ใช้สารละลายเพอร์คอลล อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 ($P > 0.05$) ส่วนอสุจิที่ไม่เคลื่อนที่ในกลุ่มควบคุม มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

Table 1 Sperm motility parameters of frozen-thawed boar semen from three different Percoll density gradient centrifugations (mean $\pm$ SD)

Parameters (%)	Treatment		
	Without Percoll (N=36)	Percoll 80% (N=36)	Percoll 80/45% (N=36)
Total motility	25.22 ^b $\pm$ 13.45	32.94 ^a $\pm$ 11.80	35.72 ^a $\pm$ 10.52
Progressive motility	7.04 ^b $\pm$ 5.22	12.99 ^a $\pm$ 5.86	14.09 ^a $\pm$ 5.51
Slow motility	9.33 $\pm$ 4.01	10.21 $\pm$ 4.13	10.46 $\pm$ 4.04
Static sperm	74.78 ^a $\pm$ 11.54	67.06 ^b $\pm$ 10.97	64.28 ^b $\pm$ 10.41

^{ab} Different superscripts within the same row demonstrate significant differences ($P < 0.05$)

ความเร็วและลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ

เมื่อพิจารณาความเร็วและลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรภายหลังการละลายพบว่าในกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 มีความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ VSL และลักษณะการเคลื่อนที่แบบ STR แบบ LIN และแบบ WOB สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) ซึ่งไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 (Table 2)

Table 2 Velocity and kinematic movement parameters of frozen-thawed boar semen from three different Percoll density gradient centrifugations (mean $\pm$ SD)

Parameters	Treatment		
	Without Percoll (n=36)	Percoll 80% (n=36)	Percoll 80%/45% (n=36)
<u>Velocity</u>			
VAP ($\mu\text{m/s}$)	64.88 $\pm$ 15.93	66.16 $\pm$ 14.63	68.78 $\pm$ 10.34
VSL ($\mu\text{m/s}$)	46.20 ^b $\pm$ 9.99	52.91 ^a $\pm$ 11.16	54.04 ^a $\pm$ 8.29
VCL ($\mu\text{m/s}$)	125.14 $\pm$ 34.96	113.87 $\pm$ 30.81	121.98 $\pm$ 24.32
<u>Kinematic movement</u>			
ALH (μm)	5.02 $\pm$ 0.67	4.56 $\pm$ 1.24	4.90 $\pm$ 1.06
BCF (Hz)	34.04 $\pm$ 5.50	32.89 $\pm$ 3.52	34.33 $\pm$ 3.64
STR (%)	74.08 ^b $\pm$ 8.37	81.33 ^a $\pm$ 6.82	79.70 ^a $\pm$ 6.89
LIN (%)	42.90 ^b $\pm$ 9.31	51.85 ^a $\pm$ 9.20	49.27 ^a $\pm$ 9.38
WOB (%)	55.64 ^b $\pm$ 6.34	61.82 ^a $\pm$ 6.58	59.72 ^a $\pm$ 6.72

^{ab} Different superscripts within the same row demonstrate significant differences ($P < 0.05$)

ความผิดปกติของอสุจิส่วนหาง

สำหรับการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรด้านรูปร่างและความผิดปกติของตัวอสุจิส่วนหาง (Table 3) พบว่ากลุ่มที่ 2 และกลุ่มที่ 3 มีความผิดปกติในส่วนหางทั้งแบบหางงอ (bent tail) และแบบมีก้านคล้ายหยดน้ำ

ที่หางตรงส่วนปลาย (distal droplet) ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม และไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม ที่ 2 และกลุ่มที่ 3 ($P>0.05$) ส่วนความผิดปกติของอสุจิแบบหางม้วน (coiled tail) ในกลุ่มที่ 3 มีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่ 2 และกลุ่มควบคุม ($P<0.05$)

Table 3 Sperm with tail defects of frozen-thawed boar semen from three different Percoll density gradient centrifugations (mean $\pm$ SD)

Parameters (%)	Treatment		
	Without Percoll (n=36)	Percoll 80% (n=36)	Percoll 80%/45% (n=36)
Bent tail	21.48 ^a $\pm$ 8.20	16.94 ^b $\pm$ 9.36	16.01 ^b $\pm$ 6.75
Coil tail	2.8 ^a $\pm$ 1.80	2.47 ^a $\pm$ 1.71	1.64 ^b $\pm$ 0.97
Proximal droplet	16.21 $\pm$ 8.40	13.03 $\pm$ 5.72	14.78 $\pm$ 5.74
Distal droplet	9.98 ^a $\pm$ 4.31	7.09 ^b $\pm$ 3.98	7.84 ^b $\pm$ 4.43

^{ab}Different superscripts within the same row demonstrate significant differences ($P<0.05$)

อสุจิมีชีวิตและความสมบูรณ์ของอะโครโซม

สำหรับการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรด้านจำนวนอสุจิมีชีวิตและความสมบูรณ์ของอะโครโซม (Table 4) พบว่าอสุจิมีชีวิตในกลุ่มที่ 3 มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ 2 และกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในขณะที่ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิสุกรจากทั้ง 3 กลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

Table 4 Sperm viability and sperm with intact acrosome of frozen-thawed boar semen from three different Percoll density gradient centrifugations (mean $\pm$ SD)

Parameters (%)	Treatment		
	Without Percoll (n=36)	Percoll 80% (n=36)	Percoll 80%/45% (n=36)
Sperm viability	48.30 ^b $\pm$ 10.15	51.36 ^b $\pm$ 11.97	54.99 ^a $\pm$ 11.19
Intact acrosome	58.61 $\pm$ 24.97	58.11 $\pm$ 25.43	63.79 $\pm$ 22.08

^{ab}Different superscripts within the same row demonstrate significant differences ($P<0.05$)

เมื่อทำการตรวจสอบอสุจิมีชีวิตและความสมบูรณ์ของอะโครโซมโดยการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ชนิด FITC ที่บ่งบอกถึงความผิดปกติของอะโครโซม และชนิด PI ที่บ่งบอกถึงความผิดปกติของผนังหุ้มเซลล์อสุจิ (plasma membrane) หรืออสุจิที่ตายด้วยเครื่อง Flow cytometer พบว่าอสุจิที่มีชีวิตและมีความสมบูรณ์ของอะโครโซมต้องไม่ติดสีทั้ง 2 ชนิด (FITC-, PI-) (Figure1 , 2)

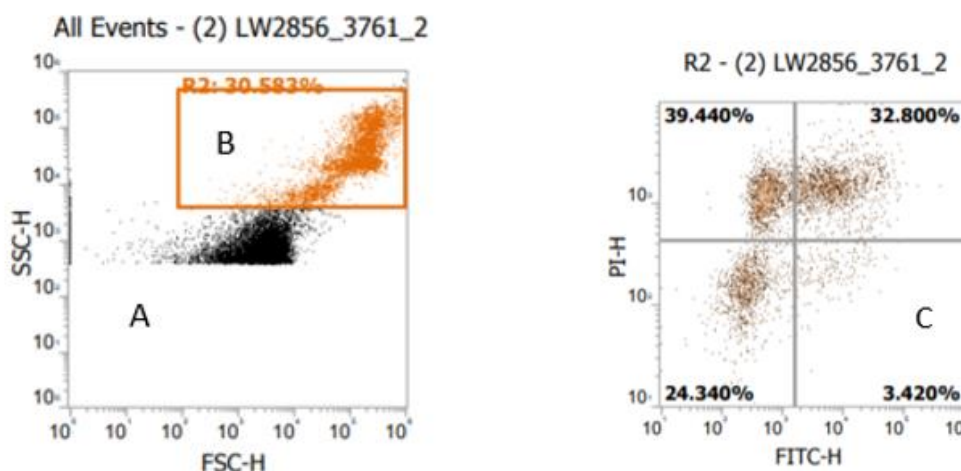


Figure 1. Flow cytometric out-gating of egg yolk particles based on scatter properties after dual-staining. (A) and (B) show small particles as judged on two-dimensional forward-scatter and sideways-scatter dot plot properties (A) were gated out for analyses to selectively analyze particles with sperm-like scatter properties (B). The two-dimensional fluorescence dot plot of PI and FITC-PNA fluorescence (C).

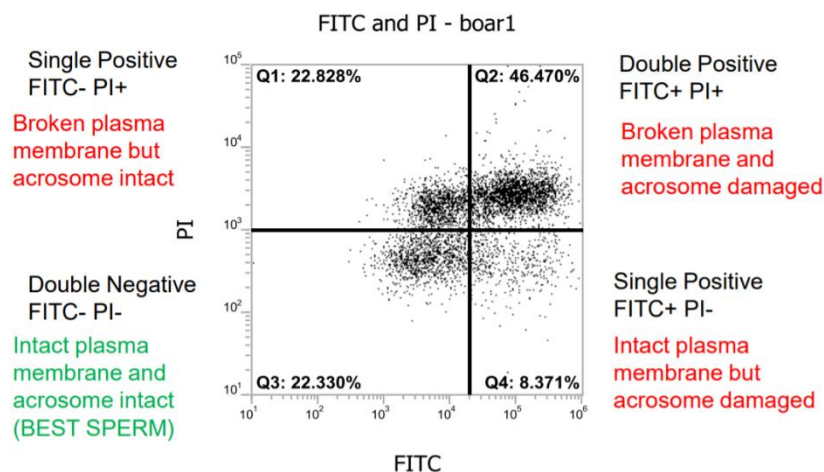


Figure 2. The lower left quadrant represents sperm cells with intact plasma membrane and acrosome, and the lower right quadrant shows sperm cells with intact plasma membranes but after the reaction of acrosome. The upper quadrants indicate the same acrosomal status of deteriorated cells, respectively.

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการศึกษาพบว่า น้ำเชื้อแช่แข็งสุกรภายหลังการละลายในกลุ่มที่ผ่านขบวนการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซมินอลพลาสมาด้วยสารละลายเพอร์คอลลทั้งแบบชั้นเดียวที่ความเข้มข้น 80% และแบบสองชั้น ชั้นที่ 1 ความเข้มข้น 80% และชั้นที่ 2 ความเข้มข้น 45% ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิมียค่าสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ใช้สารละลายเพอร์คอลลในการปั่นแยก นอกจากนี้ยังพบว่าความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิแบบ VSL และลักษณะการเคลื่อนที่แบบ STR, LIN และ WOB ของอสุจิสุกรภายหลังการละลาย ในกลุ่มที่ผ่านขบวนการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซมินอลพลาสมาด้วยสารละลายเพอร์คอลล ทั้งแบบชั้นเดียวและแบบสองชั้น มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ใช้สารละลายเพอร์คอลลในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมา ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซมินอลพลาสมาด้วยสารละลายเพอร์คอลลช่วยเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรภายหลังการละลายให้สูงขึ้น จากค่าความเร็วในการเคลื่อนที่แบบ VSL ลักษณะการเคลื่อนที่แบบ STR, LIN และ WOB ที่เพิ่มขึ้น แสดงถึงอสุจิมีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้ดีขึ้นในขณะที่ยังคงลักษณะการเคลื่อนที่ปกติของอสุจิไว้ โดยประเมินจากลักษณะการเคลื่อนที่แบบ ALH และ BCF ที่ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ไม่ได้ใช้สารละลายเพอร์คอลลในการปั่นแยก สอดคล้องกับการศึกษาของ Grant et al. (1994) และ Matás et al. (2011) ที่รายงานว่าอัตราการเคลื่อนที่ความเร็วและลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิมียค่าสูงขึ้นภายหลังการปั่นแยกด้วยสารละลายเพอร์คอลล ในทำนองเดียวกับ Suzuki and Nagai (2003) ที่รายงานว่าการปั่นแยกด้วยสารละลายเพอร์คอลลมีผลให้อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิสุกรเพิ่มขึ้น

นอกจากนี้การปั่นแยกน้ำเชื้อด้วยสารละลายเพอร์คอลลยังสามารถแยกอสุจิที่มีความผิดปกติออกได้ โดยพบว่าความผิดปกติในส่วนหางของอสุจิสุกรแช่แข็งภายหลังการละลายทั้งแบบหางงอ (bent tail) แบบหางม้วน (coiled tail) และแบบมีหยดน้ำที่บริเวณส่วนปลายของหาง (distal droplets) มีค่าต่ำกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรที่ไม่ผ่านขบวนการปั่นแยกด้วยสารละลายเพอร์คอลล สอดคล้องกับการศึกษาของ Matás et al. (2011) ที่พบว่า การคัดแยกอสุจิสุกรด้วยสารละลายเพอร์คอลลสามารถช่วยลดความผิดปกติในส่วนหางและความผิดปกติแบบมีหยดน้ำที่บริเวณส่วนปลายของหาง ส่วนความสมบูรณ์ของอะโครโซมพบว่า การปั่นแยกด้วยสารละลายเพอร์คอลลไม่มีผลต่ออะโครโซมของอสุจิสุกร โดยอะโครโซมของอสุจิสุกรแช่แข็งที่ผ่านขบวนการปั่นแยกด้วยสารละลายเพอร์คอลลมีความสมบูรณ์ของอะโครโซมไม่แตกต่างกับอะโครโซมของอสุจิสุกรแช่แข็งที่ไม่ผ่านขั้นตอนการปั่นแยกด้วยสารละลายเพอร์คอลล สอดคล้องกับการศึกษาของ Matás et al. (2011) ที่พบว่า การปั่นแยกอสุจิสุกรด้วยจำนวนชั้นและความเข้มข้นของเพอร์คอลลที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซม ซึ่งอะโครโซมเป็นส่วนที่ห่อหุ้มเอนไซม์หลายชนิดที่มีความจำเป็นต่อการปฏิสนธิในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย (Senger, 2012) แต่อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้พบว่า การปั่นแยกด้วยสารละลายเพอร์คอลลแบบสองชั้นจะมีปริมาณอสุจิมียชีวิตสูงกว่าเมื่อปั่นแยกด้วยสารละลายเพอร์คอลลแบบชั้นเดียว อาจเนื่องมาจากสารละลายเพอร์คอลลแบบสองชั้นมีค่าความหนาแน่นของสารละลายแตกต่างกัน 2 ระดับ คือค่าความเข้มข้น 80% และ 45% โดยอสุจิที่มีชีวิตและมีรูปร่างปกติจะมีค่าความหนาแน่นมากกว่าและเคลื่อนที่ได้ดีกว่า สามารถผ่านระดับชั้นความเข้มข้นที่แตกต่างกันซึ่งคล้ายกับการคัดแยกกันสองระดับได้ดีกว่า อสุจิที่ตายแล้วหรือเคลื่อนที่ไม่ได้ ทั้งนี้อสุจิเหล่านี้จะติดอยู่ในชั้นความเข้มข้นของเพอร์คอลล 80% และ 45% ดังนั้นจึงพบจำนวนอสุจิมียชีวิตจากการปั่นแยกด้วยสารละลายเพอร์คอลลแบบสองชั้นสูงกว่าจากการปั่นแยกด้วยสารละลายเพอร์คอลลแบบชั้นเดียวที่ความเข้มข้น 80% โดยสอดคล้องกับการศึกษาของ Sharma et al. (1997) ที่เปรียบเทียบระหว่างการคัดแยกอสุจิโดยใช้สารละลายเพอร์คอลลแบบชั้นเดียวและแบบสองชั้น พบว่าการคัดแยกอสุจิโดยใช้สารละลายเพอร์คอลลแบบสองชั้น มีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิและอสุจิมียชีวิตดีกว่าการคัดแยกอสุจิโดยใช้สารละลายเพอร์คอลลแบบชั้นเดียวอย่างมีนัยสำคัญ

จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มขึ้นตอนการปั่นแยกด้วยสารละลายเพอร์คอลลในขบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรสามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร โดยจำนวนอสุจิมีชีวิตเพิ่มขึ้น อสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติลดลง และไม่มีผลต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซม ซึ่งช่วยเพิ่มโอกาสในการปฏิสนธิได้มากขึ้นสำหรับการผสมเทียมสุกร รวมทั้งการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (IVF) โดยมีรายงานว่า ผลการปฏิสนธิด้วยเทคนิค IVF โดยการใช้อสุจิสุกรแช่แข็งนำมาผ่านการปั่นแยกด้วยสารละลายเพอร์คอลล ให้ผลการปฏิสนธิที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับแบบไม่ได้ปั่นแยกด้วยสารละลายเพอร์คอลลถึง 50% (Suzuki and Nagai, 2003) นอกจากนี้ การปั่นแยกน้ำเชื้อด้วยสารละลายเพอร์คอลลยังเป็นการคัดแยกอสุจิที่ตายแล้วออกจากน้ำเชื้อที่จะใช้ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง ส่งผลให้อนุมูลอิสระออกซิเจน (Reactive Oxygen Species; ROS) ลดลง โดยการศึกษาของ Roca et al. (2013) รายงานว่าอสุจิที่ตายแล้วที่มีอยู่ในน้ำเชื้อมีผลเสียต่อการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งสุกร โดยพบว่าอสุจิที่ตายจะส่งผลลบต่อการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งสุกร ซึ่งอาจเกิดจากการสร้างอนุมูลอิสระออกซิเจนที่ผลิตภายในอสุจิ (endogenous ROS) ออกมาในปริมาณมากในระหว่างขบวนการแช่แข็งอสุจิ ดังนั้นการคัดแยกอสุจิที่ตายแล้วออกก่อนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง จึงเป็นการช่วยเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการละลาย

โดยทั่วไปเมื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C จะสามารถคงคุณภาพ (quality) และหน้าที่ (function) ของอสุจิสำหรับการผสมได้ (Mazur, 1984) แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาของ Li et al. (2018) ได้รายงานว่า คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรสามารถลดลงได้หากเก็บรักษาเป็นระยะเวลาที่ยาวนานหลายปีภายใต้ระดับไนโตรเจนเหลว แม้ว่าจำนวนอสุจิสุกรมีชีวิตไม่แตกต่างกัน แต่อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิลดลงเมื่อเก็บเป็นระยะเวลายาวนานมากกว่า 4 ปี สอดคล้องกับการศึกษาของ Fraser et al. (2014) ที่พบว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรเป็นระยะเวลายาวนาน อาจส่งผลให้คุณภาพอสุจิภายหลังการละลาย เช่น อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการละลายลดลง เป็นต้น การใช้เทคนิคการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยสารละลายเพอร์คอลลจากการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นการพัฒนาวิธีเพื่อเพิ่มจำนวนอสุจิที่มีคุณภาพให้ดียิ่งขึ้น เพื่อใช้ในการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง และส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลายดีขึ้นกว่าการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรที่ไม่ได้ปั่นแยกด้วยสารละลายเพอร์คอลลทั้งในด้านอัตราการเคลื่อนที่ ความเร็วในการเคลื่อนที่ ลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ และความสมบูรณ์ของอะโครโซม อย่างไรก็ตามการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยสารละลายเพอร์คอลล 2 ชั้นจะให้อสุจิมีชีวิตในปริมาณที่สูงกว่าและมีความผิดปกติของอสุจิแบบหางม้วนต่ำกว่าแบบปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยสารละลายเพอร์คอลลชั้นเดียว

สรุปผลการทดลอง

การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยสารละลายเพอร์คอลลชั้นเดียวที่ความเข้มข้น 80% และสารละลายเพอร์คอลลสองชั้นที่ความเข้มข้น 80% และ 45% มีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร ทั้งอัตราการเคลื่อนที่ ความเร็วในการเคลื่อนที่ ลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ สูงกว่าการปั่นแยกแบบไม่ใช้สารละลายเพอร์คอลล ทั้งนี้ การปั่นแยกด้วยสารละลายเพอร์คอลลแบบ 2 ชั้นให้คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรดีกว่าแบบชั้นเดียว

ข้อเสนอแนะ

แม้ว่าการใช้สารละลายเพอร์คอลลในขั้นตอนการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาจะสามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรภายหลังการละลายได้ดีกว่าการปั่นแยกแบบไม่ใช้สารละลายเพอร์คอลล แต่ก็เป็นการพัฒนาต้นทุนในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร เนื่องจากปริมาตรน้ำเชื้อสุกรที่ค่อนข้างมากเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารละลายเพอร์คอลลในสัตว์ชนิดอื่นจึงต้องใช้สารละลายเพอร์คอลลในปริมาณที่มากกว่า ดังนั้น การเพิ่มขึ้นตอนการปั่นแยกด้วยสารละลายเพอร์คอลลนี้ จึงเหมาะสมต่อการใช้ในการด้านการอนุรักษ์สุกรสายพันธุ์ดี มีคุณค่า

ทางเศรษฐกิจสูง หรือประยุกต์ใช้น้ำเชื้อของพ่อพันธุ์สุกรที่พบปัญหาในการผลิตด้วยวิธีการแช่แข็งแบบปกติ เพื่อให้ได้อสุจิแช่แข็งสุกรภายหลังการละลายที่มีคุณภาพดีหรือประยุกต์ใช้กับเทคโนโลยีชีวภาพชนิดอื่น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาสุกร จังหวัดนครราชสีมา ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ เจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยและพัฒนาสุกรและศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ที่ให้การช่วยเหลือและสนับสนุนให้สามารถดำเนินการวิจัยเป็นไปตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

- Arias, M.E., K. Andara, E. Briones and R. Felmer. 2017. Bovine sperm separation by Swim-up and density gradients (Percoll and BoviPure): Effect on sperm quality, function and gene expression. *Reproductive Biology*. 17(2):126-132.
- Avery, B. and T. Greve. 1995. Impact of Percoll on bovine spermatozoa used for in vitro insemination. *Theriogenology*. 44(6):871-878.
- Blom, E. and A. Birch-Andersen. 1970. Ultrastructure of the decapitated sperm defects in Guernsey bulls. *Reproduction*. 23(1):67-72.
- Buranaamnuay, K., P. Tummaruk, J. Singlor, H. Rodriguez-Martinez and M. Techakumphu. 2009. Effects of straw volume and Equex-STM® on boar sperm quality after cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*. 44(1): 69-73.
- Cesari, A., G.G. Kaiser, N. Mucci, A. Mutto, A. Vincenti, M.W. Fornés and R.H. Alberio. 2006. Integrated morphophysiological assessment of two methods for sperm selection in bovine embryo production in vitro. *Theriogenology*. 66(5):1185-1193.
- Chanapiwat, P., E. Olanratmanee, K. Kaeoket and P. Tummaruk. 2014. Conception rate and litter size in multiparous sows after intrauterine insemination using frozen-thawed boar semen in a commercial swine herd in Thailand. *Journal of Veterinary Medical Science*. 76(10):1347-1351.
- Fraser, L., J. Strzeżek and W. Kordan. 2014. Post-thaw sperm characteristics following long-term storage of boar semen in liquid nitrogen. *Animal Reproduction Science*. 147(3):119-127.
- Grant, S.A., S.E. Long and T.J. Parkinson. 1994. Fertilizability and structural properties of Boar spermatozoa prepared by Percoll gradient centrifugation. 1994. *J. Reprod. Fertil*. 100:477-483
- Jeong, B.S. and X. Yang. 2001. Cysteine, glutathione, and Percoll treatments improve porcine oocyte maturation and fertilization in vitro. *Molecular Reproduction and Development*. 59(3):330-335.
- Kaeoket, K., P. Sang-urai, A. Thamniyom, P. Chanapiwat and M. Techakumphu. 2010, Effect of docosahexaenoic acid on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. *Reproduction in domestic animals*. 45:458-463.
- Lee, H.L., S.H. Kim, D.B. Ji and Y.J. Kim. 2009. A comparative study of Sephadex, glass wool and Percoll separation techniques on sperm quality and IVF results for cryopreserved bovine semen. *Journal of veterinary science*. 10(3):249-255.
- Li, J., I. Parrilla, M.D. Ortega, E.A. Martinez, M.H. Rodriguez and J. Roca. 2018. Post-thaw boar sperm motility is affected by prolonged storage of sperm in liquid nitrogen: A retrospective study. 2018. *Cryobiology*. 80:119-125.
- Lindsey, A.C., L.H.A. Morris, W.R. Allen, J.L. Schenk, E.L. Squires and J.E. Bruemmer. 2002. Hysteroscopic insemination of mares with low numbers of non-sorted or flow

- sorted spermatozoa. *Equine Veterinary Journal*. 34(2):128-132.
- Martinez-Alborcia, M.J., A. Valverde, I. Parrilla, J.M. Vazquez, E.A. Martinez and J. Roca. 2012. Detrimental effects of non-functional spermatozoa on the freezability of functional spermatozoa from boar ejaculate. *Plos one*. 7(5):36-55.
- Matás, C., L. Vieira, F.A. García-Vázquez, K. Avilés-López, R. López-Úbeda, J.A. Carvajal and J. Gadea. 2011. Effects of centrifugation through three different discontinuous Percoll gradients on boar sperm function. *Animal Reproduction Science*. 127(1):62-72.
- Mattioli, M., M.L. Bacci, G. Galeati and E. Seren. 1989. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. *Theriogenology*. 31(6):1201-1207.
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanisms and implications. *American Journal of Physiology-Cell Physiology*. 247(3):125-142.
- Missio, D., N.P. Folchini, F.G. Leivas, C.I.I.U.M. Pavin, H.F. Pinto, F.W.S. Cibin and D.S. Brum. 2018. Reduction in Percoll volume increases recovery rate of sex-sorted semen of Bulls without affecting sperm quality and early embryonic development. *Animal Reproduction Science*. 192:146-153.
- Morrell, J.M. 2006. Update on Semen Technologies for Animal Breeding. *Reproduction in Domestic Animals*. 41(1):63-67.
- Nagy, S., J. Jansen, E.K. Topper and B.M. Gadella. 2003. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biology of Reproduction*. 68(5):1828-1835.
- Phillips, T.C., G.K. Dhaliwal, K.M. Verstegen-Onclin and J.P. Verstegen. 2012. Efficacy of four density gradient separation media to remove erythrocytes and nonviable sperm from canine semen. *Theriogenology*. 77(1):39-45.
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria.
- Roca, J., M.J. Martinez-Alborcia, M.A. Gil, I. Parrilla and E.A. Martinez. 2013. Dead spermatozoa in raw semen samples impair in vitro fertilization outcomes of frozen-thawed spermatozoa. *Fertility and Sterility*. 100(3):875-881.
- Safranski, T.J., J.J. Ford, G.A. Rohrer and H.D. Guthrie. 2011. Plenary contribution to International conference on boar semen preservation 2011: genetic selection for freezability and its controversy with selection for performance. *Reproduction in Domestic Animals*. 46(2):31-34.
- Senger, P.L. 2012. Reproductive behavior, pp. 228-253. Pathways to pregnancy and parturition. Current Conceptions, Inc. Redmond.
- Sharma, R.K., K. Seifarth and A. Agarwal. 1997. Comparison of single- and two-layer Percoll separation of motile spermatozoa. *Int J Fertil Womens Med*. 42(6):412-417
- Suzuki, K. and T. Nagai. 2003. In vitro fertility and motility characteristics of frozen-thawed

boar epididymal spermatozoa separated by Percoll. Theriogenology. 60(8):1481-1494.

Yeste, M. 2015. Recent advances in boar sperm cryopreservation: state of the art and current perspectives. Reproduction in Domestic Animals. 50(2):71-79.