



วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY IN ANIMAL PRODUCTION

ISSN : 1905-6877

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

BUREAU OF BIOTECHNOLOGY IN LIVESTOCK PRODUCTION
DEPARTMENT OF LIVESTOCK DEVELOPMENT

ปีที่ 12 : พ.ศ. 2564

Vol 12 : 2021

สาส์นจากบรรณาธิการบริหาร

ในปี พ.ศ. 2564 สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ได้มีการพัฒนาระบบฐานข้อมูลสำหรับให้บริการผู้เกี่ยวข้องด้านการจัดการฟาร์มและระบบสืบพันธุ์ รวมทั้งวิทยาการด้านเทคโนโลยีชีวภาพการปศุสัตว์ทั้งหมด โดยการรวบรวม จัดเก็บและเชื่อมโยงข้อมูลจากระดับฟาร์มที่ได้จากการปฏิบัติงานในพื้นที่ และข้อมูลจากห้องปฏิบัติการของสำนักฯ ในรูปแบบของระบบฐานข้อมูลชีวสารสนเทศที่เกี่ยวข้องกับข้อมูลทางด้านพันธุกรรม จีโนม โคโมโซม ดีเอ็นเอ เซลล์ร่างกาย เซลล์สืบพันธุ์ และตัวอ่อนของปศุสัตว์ทุกชนิด ให้มีระบบการจัดเก็บตามมาตรฐานสากล โดยมุ่งหวังให้เกิดการเชื่อมโยงให้เป็นชุดฐานข้อมูลขนาดใหญ่ที่ประกอบไปด้วยข้อมูลหลากหลายรูปแบบกับระบบฐานข้อมูลจากหน่วยงานอื่นทั้งภายในประเทศ หรือแม้กระทั่งหน่วยงานระหว่างประเทศ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้สามารถสืบค้น และประมวลผลได้ในหลากหลายมิติ เอื้อประโยชน์ต่อการศึกษาค้นคว้าวิจัย และพัฒนานำไปสู่นวัตกรรมใหม่ ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการกำหนดนโยบาย การวางแผน และพัฒนาระบบการปฏิบัติงานที่มีประสิทธิภาพของเจ้าหน้าที่ทั้งภายในและภายนอกกรมปศุสัตว์ รวมทั้งการอนุรักษ์พันธุกรรมสัตว์ของประเทศ โดยที่ประชาชนทุกคนมีส่วนร่วมในการเป็นเจ้าของ และสามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ได้อย่างสูงสุด

กองบรรณาธิการวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ (Journal of Biotechnology in Livestock Production) มีความยินดีที่จะเปิดรับตีพิมพ์บทความที่มีความหลากหลาย อาทิเช่น บทความวิจัย หรือบทความวิชาการในทุกสาขา และหวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะเป็นส่วนหนึ่งของการพัฒนาทักษะทางวิจัยและวิชาการ ตลอดจนสาขาอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องเพื่อเป็นแหล่งข้อมูลในการศึกษาค้นคว้า อ้างอิง อันจะเกิดประโยชน์ต่อการพัฒนานวัตกรรมใหม่ๆ และองค์ความรู้สู่วงการปศุสัตว์และสาขาอื่นที่เกี่ยวข้องต่อไป



(นายณรงค์ เลี้ยงเจริญ)

ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

วัตถุประสงค์

1. ส่งเสริมการศึกษา ค้นคว้า วิจัยด้านการผลิตปศุสัตว์และเทคโนโลยีชีวภาพ
2. รวบรวม เผยแพร่ความรู้ด้านการผลิตปศุสัตว์และเทคโนโลยีชีวภาพ
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. สาโรช งามขำ

บรรณาธิการบริหาร

น.สพ. ณรงค์ เลี้ยงเจริญ

บรรณาธิการ

นางจตุพร พงษ์เพ็ง

ผู้ช่วยบรรณาธิการ

สพ.ญ.จรรยาพร รุ่งเรืองศักดิ์

กองบรรณาธิการ

สพ.ญ. สายใจ ชื่นสุข

น.สพ. ภาณุพันธ์ พงษ์เพ็ง

น.สพ. ณัฐนันท์ ศิริรัตนธัญญะกุล

น.สพ. อรุณ จันทร์กระจำ

น.สพ. พีระพงษ์ สำราญทรัพย์

น.สพ. ธวัชชัย โพธิ์คำ

น.สพ. วรพงษ์ พงษ์ศิริ

นายสมศักดิ์ เปรมปรีดี

น.สพ. ภัทรพล สำเร็จดี

สพ.ญ. เพชรร้อย เพชรเรียง

ผู้จัดการวารสาร

นายเริงวุฒิ วรวุฒิ

สพ.ญ. เพชรร้อย เพชรเรียง

สพ.ญ. มนัสวี ชูเชิด

นางอัมภาพันธ์ ลีละศิริ

ข้อเสนอแนะสำหรับผู้เขียน

วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ เป็นวารสารทางวิชาการของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ กำหนดออกปีละ 1 ฉบับ โดยวารสารจะตีพิมพ์บทความ ผลงาน ค้นคว้าวิจัยด้านการผลิตปศุสัตว์ ทั้งด้านการพัฒนา และปรับปรุงพันธุ์ การจัดการอาหาร สุขภาพ และระบบสืบพันธุ์ ตลอดจนการขยายพันธุ์ และการใช้ เทคโนโลยีชีวภาพที่ก้าวหน้าในการปรับปรุงและพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตปศุสัตว์ด้านต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น คณะผู้จัดทำวารสาร เทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ยินดีรับเรื่องจากทุกท่านที่ส่งมาเพื่อเผยแพร่ และเพื่อความสะดวกในการพิจารณา ขอเสนอแนะดังนี้

1. เรื่องที่จะตีพิมพ์

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

1.2 บทความ (Articles) และย่อเอกสาร (Literature reviewed) ทางวิชาการ ที่รวบรวม ข้อมูล ความคิดเห็นและประสบการณ์ของผู้เขียน

1.3 เรื่องอื่นๆ ที่กองบรรณาธิการพิจารณาเห็นสมควร

2. ต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่ส่งมาตีพิมพ์ในวารสาร เทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ไม่ควรเป็นเรื่องที่เคยเผยแพร่ หรือ กำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อเผยแพร่ในวารสารอื่น

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

2.3 ไม่มีการส่งคืนต้นฉบับ

3. การลำดับเรื่องในต้นฉบับ

เพื่อให้ขบวนการการพิจารณาผลงานวิชาการ และการดำเนินการจัดพิมพ์วารสารเป็นไปอย่างเรียบร้อยรวดเร็ว และถูกต้อง จึงจำเป็นต้องให้ผู้เขียนผลงานวิชาการปฏิบัติตามข้อกำหนดอย่างเคร่งครัด ดังนี้

3.1 ให้ส่งต้นฉบับเอกสารผลงาน จำนวน 1 ชุด พร้อมไฟล์ Microsoft word

3.2 ต้นฉบับผลงานที่ส่งมา ให้ตรวจสอบความถูกต้องของตัวสะกด รูปแบบการจัดพิมพ์ให้ถูกต้องตามที่กำหนด

3.3 เมื่อผลงานผ่านการพิจารณาจากกองบรรณาธิการแล้ว จะแจ้งกลับไปยังเจ้าของผลงาน พร้อมส่งต้นฉบับเพื่อให้แก้ไขตามที่กองบรรณาธิการเสนอแนะ

ส่งผลงานที่แก้ไข ถูกต้องแล้วตามข้อแนะนำของกองบรรณาธิการ ในรูปแบบเอกสารไฟล์ Microsoft Word และรูปแบบไฟล์ PDF มายัง

e-mail : pongpeng.pj@gmail.com

โดยมีรายละเอียด ดังนี้

ชื่อผลงาน.....
ชื่อเจ้าของผลงาน.....
ที่อยู่.....
โทรศัพท์.....
E-Mail.....

กรณีมีข้อสงสัย ติดต่อสอบถามได้ที่

นางจตุพร พงษ์เพ็ง

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง

จ. ปทุมธานี 12000

โทรศัพท์ 02-967-9791 หรือ 08-6700-3880

ดูข้อมูลรายละเอียดเกี่ยวกับข้อแนะนำ
สำหรับผู้เขียนผลงานที่ได้

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

4. การลำดับเรื่อง

4.1 ชื่อเรื่อง (Title) ควรตั้งชื่อให้สั้นและสื่อ
ความหมายให้ชัดเจน และพิมพ์ด้วยอักษร TH
SarabunPSK ขนาดตัวอักษร 16 และตัวหนา

**4.2 ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน (Author and
co - workers)** เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทย
และภาษาอังกฤษ วางกึ่งกลางใต้ชื่อเรื่อง

4.3 บทคัดย่อ (Abstract) เขียนสั้นๆได้
เนื้อหาครอบคลุมวัตถุประสงค์ วิธีการ ผลการทดลอง
และสรุปผลการทดลอง ความยาวไม่ควรเกินหนึ่ง
หน้ากระดาษ บทคัดย่อต้องมีทั้งภาษาไทยและ
ภาษาอังกฤษ แยกหน้าต่างหากจากกัน ส่ง
บรรณาธิการวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิต
ปศุสัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์
ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000

4.4 คำสำคัญ (Key words) เป็นคำหรือ
ข้อความสั้นๆ ที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไป
ของการทดลองนั้นๆ รวมกันแล้วไม่เกิน 5 คำ หากไม่
สามารถแปลเป็นภาษาไทยได้ให้ใช้ภาษาอังกฤษแทน
โดยการพิมพ์อยู่ใต้บทคัดย่อ (ขึ้นบรรทัดใหม่)

4.5 เลขทะเบียนวิจัย (Registered No.)
(ถ้ามี)

4.6 สังกัดผู้วิจัย และสถานที่ติดต่อ ให้ระบุไว้
ในเชิงอรรถ (footnote) โดยให้ใช้ระบบเลขบนชื่อ
เป็นตัวระบุในเชิงอรรถ เป็นชื่อหน่วยงานที่สังกัด
สถานที่ติดต่อได้สะดวก ให้ครบทุกคน กรณีผู้วิจัยอยู่
หน่วยงานเดียวกันให้ใช้ตัวยก (super script)
เดียวกัน

4.7 เนื้อหา (Text) สำหรับงานวิจัย
ประกอบด้วย

4.7.1 คำนำ (Introduction) อธิบายถึง
ปัญหาและวัตถุประสงค์และควรมีการตรวจเอกสาร
(literature review)

4.7.2 อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง
(Materials and Methods) อธิบายเครื่องมือ
อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง วิธีการที่ใช้ ถ้าคิดค้นขึ้น
ควรอธิบายอย่างละเอียด แต่ถ้าเป็นที่ทราบกัน
โดยทั่วไปให้เขียนในลักษณะอ้างอิงถึง ถ้าเป็น
เครื่องหมายตราหรือชื่อการค้า ควรทำเป็น foot
note ไว้ที่ด้านล่างของหน้านั้น

4.7.3 ผลการทดลอง (Results) รายงาน
ผลการทดลองเป็นคำบรรยาย ให้ละเอียดและเข้าใจ
ง่าย โดยแบ่งเป็นหลายๆ ย่อหน้า และจัดข้อความที่
มีเนื้อหาเดียวกันไว้ด้วยกัน หากเป็นไปได้ควรเสนอ
ในรูปของตารางหรือรูปภาพ หรือกราฟพร้อมทั้ง
บรรยายประกอบ ทั้งนี้ตาราง รูป หรือกราฟ ไม่ควร
แสดงผลที่เหมือนกัน

- **ตาราง (Tables)** ควรพิมพ์ให้ชัดเจน
เหมาะกับหน้า ต้องมีความหมายในตัวเอง และมี
คำอธิบายตารางอยู่เหนือตารางนั้น

- **รูปภาพ (Figures)** ควรเป็นภาพขาว -
ดำ หรือภาพสี และอธิบายรายละเอียดไว้ใต้รูปนั้น

4.7.4 วิจารณ์ (Discussion) เป็นการ
วิจารณ์ผลการทดลอง โดยมีจุดมุ่งหมาย เพื่อให้ผู้อื่น
เห็นคล้อยถึงหลักการที่แสดงออกมาจากการ
ทดลอง หรือเพื่อสนับสนุน หรือคัดค้านทฤษฎีที่มีผู้
เสนอมาก่อน หรือเพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลอง
และการตีความหมายของผู้อื่น ผู้เขียนควรพยายาม
เน้นถึงปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่
กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยใน
อนาคตและแนวทางที่จะนำไปใช้เป็นประโยชน์

4.7.5 สรุปผลการทดลอง (Conclusion)

ควรเป็นใจความที่สำคัญ กระชับเป็นไปตามวัตถุประสงค์และคุณค่าของงานเพื่อให้ผู้อ่านเข้าใจง่ายขึ้น

4.7.6 ข้อเสนอแนะ (Suggestion) เป็น

การเสนอให้นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (application) ใครหรือหน่วยงานใด ควรทำอะไร คำนึงถึงสิ่งใดบ้าง ควรปรับปรุง พัฒนาอย่างไร และควรแสดงผลกระทบจากการนำไปใช้ด้วย

4.7.7 กิตติกรรมประกาศ

(Acknowledgement) ควรมีในกรณีที่ได้รับความช่วยเหลือ หรือความร่วมมือที่สนับสนุนงาน ค้นคว้าวิจัยนั้นๆ

4.7.8 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. กรณีที่อ้างอิงในเนื้อเรื่อง ควรอ้างอิง ดังนี้คือ

1) กรณีที่อ้างอิงจากการตรวจเอกสาร โดยผู้อื่นให้ใช้คำว่า อ้างถึงโดย (cited by)

2) กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นคนไทย เมื่อเป็นประธานของประโยค ใช้ “สาโรชและสายใจ (2562), สายใจและคณะ (2562) กล่าวว่า.....” หรือ เมื่อรายงานอยู่กลาง หรือท้ายประโยค ใช้ (สาโรชและสายใจ, 2562) หรือมีเอกสารอ้างอิงในเรื่องเดียวกันมากกว่า 1 ฉบับ ให้ใช้ (สายัณห์และคณะ, 2561; จรรยาพรและวรพงษ์, 2562;)

3) กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นชาวต่างประเทศ เมื่อเป็นประธานของประโยค ใช้ “Szyda and Komisarek (2007), Rychtarova et al. (2014) กล่าวว่า.....” หรือเมื่อผู้รายงานอยู่ระหว่างกลางหรือท้ายประโยค ใช้ (Szyda and Komisarek, 2007; Rychtarova et al., 2014;)

4) กรณีอ้างอิงบุคคลหรือเรื่องที่ไม่เคยลง

พิมพ์มาก่อน (personal communication) ให้อ้างเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปลงในรายชื่อเอกสารอ้างอิง เช่นsimilar results (Walker, J.M., unpublished data),for other protocols (Walker, J.M., personal communication)

ข. การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง

ควรขึ้นต้นเอกสารอ้างอิงภาษาไทยก่อน เขียนเรียงตามลำดับพยางค์ของชื่อผู้เขียน

1) กรณีอ้างอิงจากวารสาร ให้ระบุชื่อผู้เขียน ถ้าเป็นภาษาอังกฤษคนแรกใช้ชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง ผู้เขียนในลำดับถัดมาให้ใช้ชื่อย่อขึ้นก่อน แล้วตามด้วยชื่อสกุล แล้วตามด้วยปี ชื่อเรื่องวารสารปีที่ ฉบับที่ และหน้าที่อ้างอิง ดังตัวอย่าง

สาโรช งามขำ และ สายใจ ชื่นสุข. 2562. การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบยีน Butyrophilin และ DGAT1 ที่มีผลต่อองค์ประกอบและปริมาณน้ำมันในโคพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ด้วยวิธี Real-time PCR. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 10:1-13.

จรรยาพร รุ่งเรืองศักดิ์ และ วรพงษ์ พงษ์ศิริ. 2562. ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน PDC-109 ใน seminal plasma ของพ่อพันธุ์โคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์ต่อความสามารถในการแช่แข็งน้ำเชื้อ. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 10:58-74.

Sarsaifi, K., A.W. Haron, J. Vejjayan, 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.

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

Allison, P.D. 2005. Survival analysis using

SAS: A practical guide 8 th edition. SAS institute Inc., Cary, NC, USA. 292 pp.

Van Oirschot, J. T. 1986. Hog Cholera. In :

Disease of Swine, 6 th ed. Leman, A. D. ed. Iowa state university Press. Iowa. p. 293-297.

3) กรณีอ้างอิงจากเว็บไซต์ (Online references) ดังตัวอย่าง

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.

Carlvaho, 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].

จันทร์หา ปั่นตุ้ม จุฑาพร ศรีวิวัฒน์ วรวิทย์ แสงสิงแก้ว และ พิงพิศ ดุลยพัชร. 2541. อาหารจากข้าวโพด. คู่มือการส่งเสริมการเกษตรที่ 43. แหล่งที่มา:

<http://www.ku.ac.th/agri/cornn/corn.htm>

m. 27 มีนาคม 2541.

5. การพิมพ์ผลงานทางวิชาการ

ตัวพิมพ์ ให้ใช้เครื่องพิมพ์ (Printer) หมึกพิมพ์ต้องเป็นสีดำ คมชัด สะดวกแก่การอ่านและใช้ตัวพิมพ์แบบเดียวกันทั้งฉบับ กรณีใช้เครื่องคอมพิวเตอร์พิมพ์เพื่อความให้ใช้ตัวอักษร TH Sarabun PSK 16 ตัวปกติ เท่านั้น ยกเว้นหัวข้อใหญ่ เช่น ชื่อเรื่อง บทคัดย่อ บทนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผล วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 16 ส่วนหัวข้อย่อย เช่น ชื่อผู้วิจัยและคณะ คำสำคัญ ตาราง รูปภาพ เป็นต้น พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 16 กระดาษที่ใช้พิมพ์ ให้ใช้กระดาษขาวไม่มีบรรทัด ขนาดมาตรฐาน A4 (210 X 297 มม.) ใช้เพียงหน้าเดียว

การเว้นที่ว่างขอบกระดาษ

- ตั้งกั้นหน้าบนและซ้ายไว้ที่ 2.5 เซนติเมตร

- ด้านขวาและด้านล่างไว้ที่ 2.0 เซนติเมตร

การเว้นระยะในการพิมพ์

- การเว้นระยะระหว่างบรรทัดและการย่อ

หน้า ควรจัดตามความสวยงาม

- กรณีคำสุดท้ายไม่จบบรรทัดนั้นๆ ให้ยกคำนั้นทั้งคำไปพิมพ์ในบรรทัดต่อไป ไม่ควรตัดส่วยท้ายของ คำไปพิมพ์ในบรรทัดใหม่ เช่น กระบือปลักไม่ให้แยกเป็น กระบือ-ปลัก เป็นต้น

จุลชีพ เช่น *Escherichia coli* หรือพิมพ์ตัวเอน

Escherichia coli

- หลังเครื่องหมาย . และ , หรือ; เคาะ 1

เคาะพิช เช่น *Oryza sativa* หรือพิมพ์ตัวเอน *Oryza sativa*

- ระหว่างคำสุดท้าย กับเครื่องหมาย . และ , ไม่เว้นช่องว่าง สัตว์ เช่น *Bos taurus* หรือ พิมพ์ด้วยตัวเอน *Bos taurus*

- ไม่ต้องเว้นช่องว่าง ระหว่างวงเล็บ และคำ
ข้างในวงเล็บ เช่น (รพีพรรณ และคณะ)

การลำดับหน้า

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

ตาราง รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ

- ตารางประกอบด้วย เลขที่ของตาราง (table
number) ชื่อของตาราง (table title) หัวตาราง
(table heading) และที่มาของตาราง (ถ้ามี) โดยให้
ทำเป็นภาษาอังกฤษหรือภาษาไทยทั้งตาราง พิมพ์อยู่
ในหน้าเดียวกันทั้งหมด

- กรณีตารางมีความยาวมาก ไม่สามารถ
สิ้นสุดในหน้าเดียวได้ ให้พิมพ์ส่วนที่เหลือในหน้า
ถัดไปโดยพิมพ์เลขที่ตารางและตามด้วยคำว่า (ต่อ)

- กรณีรูปภาพ แผนที่ แผนภูมิ กราฟ ควรเป็น
ภาพขาวดำ และใช้แนวทางข้างต้น

การพิมพ์ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิต ให้ใช้
ตามประมวลนามศาสตร์สากล (International
code of nomenclature) คือ **ขีดเส้นใต้** หรือ **พิมพ์
ด้วยตัวเอน** ชื่อวิทยาศาสตร์เป็นไปตามการตั้งชื่อ

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
1. การตรวจแยกเพศตัวอ่อนโคโดยวิธี Real-Time PCR ด้วย TSPY gene (ณัฐนันท์ ศิริรัตนธัญญะกุล, กัลยา เก่งวิทยกรรม, วิบูลย์ เยี่ยงวิศวรร, เจนจิราคงพันธุ์จิตร)	1
2. การทำนายค่าพันธุกรรมจีโนมของลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมสำหรับโคนมไทยโดยใช้วิธีการ แบบขั้นตอนเดียวด้วยโมเดลวันทดสอบการถดถอยแบบสุ่ม (สายัณห์ บัวบาน, สมศักดิ์ เปรมปรีดี, มนต์ชัย ดวงจินดา)	15
3. ผลของการผสมเทียมแพะแบบลาพาโรสโคปิกในแม่แพะตัวให้ต่อจำนวนและคุณภาพของตัวอ่อน (อรุณ จันทร์กระจ่าง, อนนท์ เทืองสันเทียะ, วิศิษฐ์ ทองเทียะ, พิงค์ลานนา กุญชร)	40
4. ประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของฝูงโคนมทดแทนในช่วงระหว่างปี 2551-2561 (นันทมนัส สีคง, เพชรร้อย เพชรเรียง)	52
5. อิทธิพลของพรอสตาแกรนดิน เอฟ ทู แอลฟา ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคชนในภาคใต้ของไทย (วิชญ์ ไพศาลรุ่งพนา, วิศิษฐ์ ทองเทียะ, ธวัชชัย โพธิ์คำ, จตุพร พงษ์เพ็ง)	64
6. การสำรวจปัญหาการผสมพันธุ์อันเนื่องมาจากความผิดปกติทางโครโมโซมของโคนอ และโคนมในเขต 1 (พรรณพิไล เสกสิทธิ์, ไกรวรรณ หงษ์ยंत्रชัย, อรุณ จันทร์กระจ่าง)	74
7. การสร้างโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมในแกะ (मुखसुदा रेणुगरी, चाद्री कद्वरवेष, ढनलषुऐर पणुणुडडकल)	82
8. ระดับของกรดไขมันอิสระ กลูโคส และยูเรียในกระแสเลือดที่มีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของแม่ แพะลูกผสมในประเทศไทย (เพชรร้อย เพชรเรียง, मुखसुदा रेणुगरी)	94
9. การคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคเต้านมอักเสบโดยการคัดเลือกลักษณะเต้านมในโคนมลูกผสม ไทยโฮลสไตน์ (สายัณห์ บัวบาน, จุริรัตน์ แสนโกชน, ไกรวรรณ หงษ์ยंत्रชัย, สาโรช งามขำ)	103
10. แนวโน้มทางพันธุกรรมสำหรับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนมลูกผสมในประเทศไทย (สายัณห์ บัวบาน, จุริรัตน์ แสนโกชน, วรางคณา กิจพิพิธ)	119

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
11. การศึกษาความเป็นไปได้ในการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะด้วยวิธี laparoscopic ovum pick-up (LOPU) และการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายในประเทศไทย (อรรถพล พรประไพ, อนนท์ เทืองสันเทียะ, พิงค์ลานนา กุญชร, มาลี อภิเมธีธำรง)	136
12. การใช้เทคโนโลยีอัลตราซาวด์ในการประเมินสมรรถภาพระบบสืบพันธุ์พ้อโค (วิชญ์ ไพศาลรุ่งพนา, จรรยาพร รุ่งเรืองศักดิ์, จุฬฉัตร ชำปญญา)	151
13. ปัจจัยที่ส่งผลต่อความสามารถในการรอดชีวิตและคุณภาพตัวอ่อนโคตัดแบ่งครั้งที่ได้มาจากการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายหลังเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อน (อรรถพล พรประไพ, พิงค์ลานนา กุญชร)	175
14. การเพิ่มประสิทธิภาพการย้ายฝากตัวอ่อนด้วยฮอร์โมน GnRH ในแม่โคเนื้อพันธุ์บราห์มัน ลูกผสมในระดับฟาร์มเกษตรกร (ทิวกร ดอนสิงห์, บัญชา สืบสีมา, ณรงค์กร เกษมสุข, นพรัตน์ บุญชูใส)	194
15. อนุนิติวิทยาศาสตร์ทางสัตว์: Case report 1 การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอสุนัขจากวัตถุพยาน: กรณีศึกษาด้านนิติวิทยาศาสตร์ทางสัตว์ (สายใจ ชื่นสุข)	202
16. การประเมินสมรรถภาพของโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์เพศผู้ (ภัทรพล สำเร็จดี, เรืองวุฒิ วรรณ)	211

การตรวจแยกเพศตัวอ่อนโคโดยวิธี Real-Time PCR ด้วย TSPY gene

ณัฐนันท์ ศิริรัตนัญญกุล^{1/} กัลยา เก่งวิทย์กรรม^{1/} วิบูลย์ เยี่ยงวิศวกร^{1/} เจนจิรา คงพันธุวิจิตร^{2/}

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อพัฒนาการตรวจแยกเพศตัวอ่อนโคโดยการนำเทคนิค Real-Time PCR ร่วมกับ testis-specific protein Y (TSPY) gene ให้มีความไว แม่นยำและรวดเร็ว เพื่อใช้ในการผลิตตัวอ่อนแช่แข็งแยกเพศ ทำการศึกษาโดยการเก็บตัวอย่างเลือดโคเพศผู้และเพศเมียเพศละ 5 ตัวเพื่อใช้เป็น positive control และหาปริมาณดีเอ็นเอน้อยที่สุดที่สามารถตรวจแยกเพศได้ โดยการเก็บรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์ เพื่อมาผลิตตัวอ่อนด้วยวิธี IVF (*In Vitro* Fertilization) นำเซลล์ตัวอ่อนโคที่เจริญถึงระยะ 8–16 เซลล์ (days 2-4 post insemination) จำนวน 30 ตัวอ่อน เจาะเก็บแยกเซลล์blastomere (blastomere) ในแต่ละตัวอ่อน เป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มจำนวน 1 2 4 เซลล์ และเซลล์ที่เหลือ แยกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สกัดดีเอ็นเอและตรวจแยกเพศด้วยไพรเมอร์ติดตามเรืองแสง (fluorogenic probe primers) จำนวน 2 ชุดที่ความจำเพาะต่อโครโมโซม X และโครโมโซม Y ด้วยเทคนิค Real-Time PCR ผลการศึกษาพบว่า ค่าความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำที่สุดจากเลือดโคที่สามารถตรวจแยกเพศได้มีค่าเท่ากับ 0.001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร จำนวนเซลล์ blastomere ทั้ง 4 กลุ่ม ให้ผลการตรวจเหมือนกับเซลล์ที่ได้มาจากตัวอ่อนตัวเดียวกัน โดยประสิทธิภาพในการตรวจแยกเพศของจำนวนเซลล์ blastomere 1 2 4 และเซลล์ที่เหลือ มีค่าความถูกต้องคิดเป็น 86.67 (26/30) 93.33 (28/30) 100.00 (30/30) และ 100.00 (30/30) เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สรุปว่าการตรวจแยกเพศตัวอ่อนโคโดยวิธี Real-Time PCR ด้วย TSPY gene สามารถตรวจที่ความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดที่ระดับ 0.001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และจำนวนเซลล์ blastomere ตั้งแต่ 4 เซลล์ขึ้นไป ให้ผลความถูกต้องร้อยละ 100 แต่ให้ผลไม่ต่างกับเซลล์ blastomere 1 และ 2 เซลล์

คำสำคัญ: ดีเอ็นเอ ตัวอ่อนโค เทคนิคเรียลไทม์ พีซีอาร์ ยีนทีเอสพีวาย

เลขทะเบียนวิจัย : 53(1)-0208-036

^{1/}สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ อำเภอมือง จังหวัดปทุมธานี

^{2/} คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพมหานคร

TSPY gene for sex determination of bovine embryos by one step Real-Time PCR

Nattanant Sirirattanatanyakul^{1/} Kalaya Kengvikkum^{1/} Viboon Yienvisavakul^{1/} Janejira Kongpunvijit^{2/}

Abstract

This study was performed in order to develop a novel, rapid and sensitive method for sex determination of bovine embryos using TSPY (testis-specific protein Y) gene by one step Real-Time polymerase chain reaction (PCR) technique for produced frozen sex-embryo. Blood sample were collected from 5 male and female cows for positive control and test sensitivity of Real-Time PCR at the lowest target DNA concentration. Bovine embryos were produced by IVF (In Vitro Fertilization) method. A total of 30 bovine embryos at 8–16 cells stage were removed and blastomeres were separated in 4 groups 1, 2, 4 and remaining cells then kept in 0.2 ml tube and stored at -20 C until PCR analysis. DNA was extracted from the embryonic cells and analysed in Real-Time PCR utilizing two different sets of Y-specific chromosome (TSPY gene) and X-specific chromosome (K-Casein gene) and fluorogenic probe primers. The results showed that could be detected at lowest DNA concentration of 0.001 ng/ul blood DNA template. Amount of Blastomeres in 4 groups of the same embryo were concordant in all cases and sexing efficiency was 86.67 (26/30), 93.33 (28/30), 100.00 (30/30) and 100.00 (30/30) when 1, 2, 4 and remaining cells, respectively. In conclusion, sex determination of bovine embryos with TSPY gene by Real-Time PCR technique could be detected at lowest DNA concentration at 0.001 ng/ul and up 4 blastomere cells was 100 % accurate.

Keywords: DNA, Bovine embryo, Real-Time PCR technique, TSPY gene

Registered No: 53(1)-0208-036

^{1/} Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Muang district, Pathum Thani province

^{2/} Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok

คำนำ

ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงปศุสัตว์เชิงพาณิชย์ การบริหารจัดการฟาร์มที่ดีส่งผลทำให้เกิดผลกำไรในการประกอบการ ปัญหาการจัดการฟาร์มที่มีส่วนสำคัญและมักพบมากในการเลี้ยงปศุสัตว์ของเกษตรกรได้แก่การจัดหาจำนวนโคทดแทนที่เพียงพอและตรงต่อความต้องการของเกษตรกร ซึ่งจะแตกต่างกันในฟาร์มเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมและโคเนื้อกล่าวคือ ในฟาร์มโคนมเกษตรกรมีความต้องการที่จะได้โคเพศเมีย เนื่องจากผลกำไรที่ได้มาจากปริมาณและคุณภาพผลผลิตน้ำนม ส่วนฟาร์มโคเนื้อมีความต้องการโคเพศผู้ เพราะอัตราการแลกเปลี่ยนอาหารและอัตราการเจริญเติบโตในตัวผู้สูงกว่าในตัวเมียทำให้ได้ผลผลิตเนื้อมากทำกำไรได้คุ้มค่ามากขึ้น ซึ่งในปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพมีความก้าวหน้าอย่างมาก ได้มีการนำเอาความรู้ทางด้านอนุพันธุศาสตร์และชีวโมเลกุลมาใช้ประโยชน์ช่วยในด้านการตรวจแยกเพศตัวอ่อนโคซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถใช้ในการแก้ไขปัญหาการจัดหาจำนวนโคทดแทนได้เนื่องจากเมื่อทราบเพศของตัวอ่อนสามารถนำไปผลิตเป็นโคทดแทนได้ตรงตามความต้องการให้กับเกษตรกรได้โดยเทคนิคย้ายฝากตัวอ่อน นอกจากนี้สามารถนำมาใช้สนับสนุนร่วมกับการสร้างสายพันธุ์และเพิ่มพันธุกรรมให้ดีขึ้นตามเป้าหมายที่สนใจ เป็นการเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจให้กับตัวโคได้เป็นอย่างดี

ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทุกชนิดจะมีโครโมโซม Y เป็นตัวกำหนดเพศผู้ ซึ่งยีนที่อยู่บนโครโมโซม Y เรียกว่า วายลิงค์ยีน (Y-linked gene) ซึ่งเป็นยีนที่พบเฉพาะในเพศผู้เท่านั้น ตัวอย่างเช่น SRY ZFY และ TSPY ยีนเป็นต้น ในการศึกษาของ Affara et al. (1996) พบว่า TSPY ยีน (the testis-specific protein Y-encoded gene) เป็นยีนที่มีความจำเพาะของโครโมโซมวาย ที่มีความเหมือนกันในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบได้ในมนุษย์ ม้าและโค (Jakubiczka et al., 1993; Schempp et al., 1995) เป็นยีนที่แสดงออกถึงความเป็นเพศผู้ ซึ่งควบคุมโดย male germ cell ที่จะพัฒนาและมีหน้าที่ในขบวนการผลิตสเปิร์ม (spermatogenesis) (Vogel et al., 1997) Lemos et al. (2005) พบว่า TSPY ยีนสามารถใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีความจำเพาะต่อเพศผู้ในการตรวจแยกเพศโคที่ใช้กับดีเอ็นเอที่มีปริมาณความเข้มข้นน้อยมากได้ เช่นเดียวกับ Manz et al. (1998) ที่ใช้ TSPY ยีน ในการแยกเพศตัวอ่อนม้า

การตรวจแยกเพศสัตว์ในห้องปฏิบัติการสามารถทำได้หลายวิธี เช่นวิธี cytogenetic โดยการตรวจ chromosome วิธีการตรวจทาง Biochemical assay ด้วย X-linked enzyme activity วิธีการตรวจทาง immunological ด้วย male specific antibody วิธีการตรวจทาง immunocytochemical hybridization ด้วยการใช้ Y-specific gene ร่วมกับเทคนิค fluorescence in situ hybridization แต่วิธีการคัดแยกเพศที่กล่าวมานั้น มีความถูกต้องแม่นยำต่ำใช้เวลาในการตรวจนาน ต่อมาได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจโดยนำความรู้ทางอนุพันธุศาสตร์มาใช้ในการตรวจแยกเพศด้วยการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายในหลอดทดลองอย่างต่อเนื่องด้วยการออกแบบ primers ที่มีความจำเพาะต่อยีน Y-specific gene ซึ่งอยู่บนโครโมโซมเพศผู้เรียกวิธีการตรวจนี้ว่า เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) ในปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการตรวจแยกเพศตัวอ่อนอย่างต่อเนื่องเป็นเทคนิค Real-Time PCR เป็นวิธีการที่ถูกพัฒนามาจากการทำ PCR แบบดั้งเดิม โดยเพิ่มวิธีการติดตามผลผลิตดีเอ็นเอเป้าหมายที่เพิ่มขึ้นด้วยการติดฉลากด้วยสารเรืองแสงประเภท fluorochrome ที่ติดบนสาย specific probe เป็นดีเอ็นเอเส้นเดียว ประกอบด้วย reporter dye ที่จับอยู่ปลาย 5'

ของ probe สีฟลูออเรสเซนซ์ ที่ใช้ได้แก่ FAM, TET และ HEX เป็นต้น และ quencher dye จะจับที่ปลาย 3' ของ probe เช่น TAMRA เมื่อเกิดการไฮบริไดเซชันสีฟลูออเรสเซนซ์ของ reporter จะถูกกระตุ้น (excite) และปล่อยแสง (emit) ในการทำ Real-Time PCR เมื่อปฏิกิริยา extension เกิดขึ้น Taq DNA polymerase ที่มี 5' nuclease activity จะตัด reporter dye ออกจาก probe ทำให้ reporter dye หลุดห่างออกจาก quencher dye และสามารถคายพลังงานออกมาในรูปของแสงฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งทำให้สามารถวัดปริมาณของดีเอ็นเอเป้าหมายตั้งต้นจากสิ่งต้องการตรวจวัดได้และสามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้นมาได้ทันที โดยไม่จำเป็นต้องรอให้กระบวนการเสร็จสิ้นก่อน (Gibthai) Pierce et al. (2000) รายงานว่า เทคนิค Real-Time PCR เป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูงในการตรวจแยกเพศ ตัวอ่อนในมนุษย์โดยใช้ TSPY gene เช่นเดียวกับ Carneiro et al. (2011) พบว่า TSPY gene เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่มีความจำเพาะต่อเพศผู้ ที่มีประสิทธิภาพดีและมีจำนวน copy number ที่สูงเหมาะสมที่นำมาใช้ในเทคนิค Real-Time PCR ในปี 2006 Badr et al. (2006) ทำการแยกเพศตัวอ่อนโคและกระบือโดยใช้ เซลล์ตัวอ่อนระยะ blastocyst ด้วยวิธี one step Real-Time PCR พบว่าสามารถแยกเพศได้อย่างถูกต้อง 56 ตัวจาก 57 ตัว ของตัวอ่อนโค และในตัวอ่อนกระบือแยกเพศได้ถูกต้องทั้ง 25 ตัว

วัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ เพื่อพัฒนาเทคนิคการตรวจแยกเพศตัวอ่อนโคโดยการนำเทคนิค Real-Time PCR ที่สามารถวัดปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายที่มีปริมาณน้อยๆ เช่น จำนวน 1 – 3 เซลล์ blastomere ของตัวอ่อนโคระยะ 8 – 16 เซลล์ หรือ morula หรือ trophoblast ของตัวอ่อนโคระยะ blastocyst เป็นต้น และยีน TSPY ที่มีความจำเพาะต่อโครโมโซมเพศผู้ มาใช้ในการตรวจแยกเพศตัวอ่อนโคร่วมกันซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถติดตามดูปฏิกิริยาได้ทุกระยะโดยวัดจากปริมาณของสารเรืองแสงในระหว่างที่กำลังดำเนินการอยู่ ทำให้มีความไว ถูกต้อง แม่นยำและรวดเร็วกว่าเทคนิค PCR แบบดั้งเดิม เพิ่มประสิทธิภาพมากขึ้น เพื่อนำไปผลิตตัวอ่อนแยกเพศแช่แข็งในการเพิ่มจำนวนโคในโครงการปรับปรุงพ่อพันธุ์โคนมทรอปิคอลไฮสโตนและให้บริการแก่เครือข่ายเกษตรกรที่ร่วมโครงการ

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

รังไข่จากโรงฆ่าสัตว์ในเขตจังหวัดสระบุรี ปทุมธานี ออยุธยา เก็บตัวอย่างเลือดโคเพศผู้และเพศเมียจากฟาร์มเกษตรกรในเครือข่ายของศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตสัตว์สระบุรี

สถานที่ทดลอง

ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ จังหวัดปทุมธานี

ระยะเวลาการทดลอง

เริ่มตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2552 – 30 กันยายน 2555

การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดโคเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 5 ตัว ใส่หลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 – 8 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับเป็นตัวควบคุมบวก (positive control) ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพและความไวในการตรวจแยกเพศของ primer และ probe

การผลิตตัวอ่อนโคด้วยวิธี IVF

1. เก็บรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์ นำมดลูกจากโคหลังโคเสียชีวิตและชำแหละซากมาตัดรังไข่ออกจากปีกมดลูกซ้ายและขวา นำรังไข่ที่ได้มาเก็บรักษาในน้ำยา phosphate buffered saline (PBS) ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์ fetal bovine serum (FBS) และยาปฏิชีวนะ ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส

2. นำส่งรังไข่โคเข้าห้องปฏิบัติการภายใน 2 ชั่วโมง คัดเก็บโอโอไซต์ด้วยไซริงค์จากฟอลลิเคิลที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-8 มิลลิเมตรบนรังไข่ คัดเลือกโอโอไซต์ที่มีชั้นเซลล์คิวมูลัสห่อหุ้มล้อมรอบตั้งแต่ 3 ชั้น (cumulus-oocyte complexes: COCs)

3. เพาะเลี้ยง COCs ให้เจริญถึงขั้นพร้อมปฏิสนธิโดยกระบวนการ *In vitro* maturation (IVM) โดยเพาะเลี้ยงในน้ำยา TCM 199-Hepes ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ FBS 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร FSH (folitropin) 1 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร Estradiol 17 β (sigma) 0.54 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร pyruvate 0.14 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร L-glutamine 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร epidermal growth factor และ 10 มิลลิโมล β -mercaptoethanol (ดัดแปลงจาก มาลีและคณะ 2552) เพาะเลี้ยง COCs ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส และ 5 เปอร์เซ็นต์ CO₂ ในบรรยากาศความชื้นสัมพัทธ์สูงกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ในตู้เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 22-23 ชั่วโมง

4. นำ COCs ที่ได้นำไปปฏิสนธิกับน้ำเชื้อแช่แข็งโค ที่จัดเตรียมด้วยวิธี “swim-up” ตามวิธีของ Songsasen and Apimeteetumrong (2002) ดังนี้ นำตัวอสุจิที่ได้ไปผสมกับโอโอไซต์ที่พร้อมปฏิสนธิ (matured oocytes) ในน้ำยา TALP ที่มี 2.0 มิลลิโมล penicillamine 1.0 มิลลิโมล hypotaurine 250 ไมโครโมล epinephrine และ 10 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร heparin โดยปรับความเข้มข้นของตัวอสุจิเป็น 1×10^6 ตัว ต่อ 1 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยง matured oocytes ร่วมกับตัวอสุจิ (เลี้ยง 10-15 ใบ ในน้ำยา 500 ไมโครลิตร) ในตู้เพาะเลี้ยงนาน 19-20 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส และ 5 เปอร์เซ็นต์ CO₂ ในบรรยากาศความชื้นสัมพัทธ์สูงกว่า 95 เปอร์เซ็นต์

5. จากนั้นนำเซลล์ไข่ที่เกิดปฏิสนธิไปเลี้ยงในน้ำยา SOF (synthetic oviduct fluid) ร่วมกับเซลล์เพาะเลี้ยง (vero cell) เสริมด้วย 10 เปอร์เซ็นต์ FBS ในตู้เพาะเลี้ยง ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส และ 5 เปอร์เซ็นต์ CO₂ ในบรรยากาศความชื้นสัมพัทธ์สูงกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลานาน 3-6 วัน นำตัวอ่อนที่เจริญถึงระยะ 8-16 เซลล์ (Figure 1) หรือระยะ morula มาใช้ศึกษาต่อไป

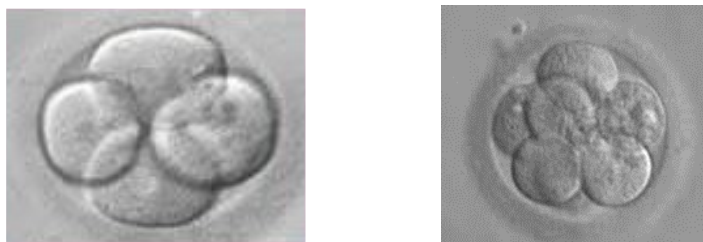


Figure 1. Embryos at the cleavage stage: A 4-cell embryo (left) and a 6-cell embryo (right)

การเตรียมเซลล์ตัวอ่อนสำหรับทำ Real-Time PCR

นำเซลล์ตัวอ่อนโคระยะ morula (8 – 16 เซลล์) ล้างด้วย สารละลาย PBS ใส่ในสารละลายที่มี 0.05 เปอร์เซ็นต์ pronase E (P5147, Sigma) เพื่อสลายชั้น zona pellucida นำออกมาล้างด้วย สารละลาย PBS 3 ครั้ง แล้วนำไปทำการเจาะดูดแยกเซลล์ blastomere ด้วยเครื่อง micromanipulator ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ stereomicroscope โดยตัวอ่อน 1 ใบ แยกเซลล์ blastomere เป็น 4 กลุ่ม คือกลุ่มจำนวน 1 2 4 เซลล์ และ เซลล์ที่เหลือ จากตัวอ่อน 30 ใบ เซลล์ blastomere ที่แยกได้เก็บในหลอดขนาด 0.2 มิลลิลิตร ที่มี 1 ไมโครลิตร ของสารละลาย TE (Tris-EDTA buffer) เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาตรวจวิเคราะห์ผล

การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดและเซลล์ตัวอ่อน

1. นำตัวอย่างเลือดมาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอ QIAmp-Blood DNA Extraction Kit (QIAGEN®, Germany) โดยนำตัวอย่าง DNA ที่ได้มาทำทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 6 ระดับ โดยการเจือจางดีเอ็นเอครั้งละ 10 เท่า (10 fold serial dilution) โดยเจือจางให้มีความเข้มข้นที่ 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 และ 0.0001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับ โดยทดสอบความเข้มข้นละ 5 ซ้ำเพื่อทดสอบความไวในการตรวจแยกเพศที่สามารถตรวจได้ของความเข้มข้นดีเอ็นเอที่ต่ำที่สุด

2. นำเซลล์ blastomere จากตัวอ่อน มาสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้วิธี water heat (ดัดแปลงมาจาก Hirayama et al. (2004)) โดยเติมน้ำ deionized 10 ไมโครลิตร ใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเครื่อง Real-Time PCR

ดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเลือดโคและจากเซลล์ตัวอ่อนนำมาตรวจสอบแยกเพศ โดยใช้ primers ที่มีความจำเพาะกับ โครโมโซม X ได้แก่ K-casein gene (Chen et al., 2003) โครโมโซม Y ได้แก่ TYP5 gene (Lemos et al., 2005) และ primers probe ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (TaqMan Probe) ตาม Table 1 โดยการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Real-Time PCR ใช้เครื่อง StepOne Plus (Applied Biosystems) มีองค์ประกอบของปฏิกิริยาดังนี้ ปริมาณปฏิกิริยาทั้งหมด 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย forward primer และ

reverse primer ของ TSPY-specific primer (Y chromosome) และ bovine specific primer (X chromosome) 10 ไมโครโมล อย่างละ 0.4 ไมโครลิตร TaqMan probe สำหรับ Y chromosome และ TaqMan probe สำหรับ X chromosome 15 ไมโครโมล อย่างละ 0.27 ไมโครลิตร และ 2X TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (P/N 4352042) 10 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 6.9 ไมโครลิตร และ DNA template 1 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ Pre-incubation 95 องศาเซลเซียส 20 วินาที amplification 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที และ 60 องศาเซลเซียส 20 วินาที จำนวน 50 รอบ ตรวจวัดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ด้วย SDS software ของเครื่อง StepOne Plus (Applied Biosystems)

Table 1 Specific primers and probes for X-Y chromosome

Specific chromosome	Primer/probe Sequences (5' → 3')	Product size (bp)
X chromosome K-Casein gene	F –CAAGCCCAGCCAACTACCAT- R –GATTTTTCTTTGGTGAATGGCCATA- Probe VIC –CCACACCCACATTTATG-	443
Y chromosome TSPY gene	F –AGGGCAAGGCCTGGTG- R –GGAAGTCCCGCCCCGATTC- Probe FAM –CCGCCACGTCTCCGTC-	260

การตรวจวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์ผลโดยการตรวจเช็คการเพิ่มขึ้นของ PCR product โดยการตรวจวัด fluorescence ด้วยโปรแกรมในเครื่อง Real-Time thermal cycle การแปลผลมีเกณฑ์ดังนี้ PCR product ที่เกิดขึ้นจาก primers ที่มีความจำเพาะต่อ TSPY gene ที่ติดด้วย probe FAM (เส้นกราฟสีน้ำเงิน) พบเฉพาะโคเพศผู้เท่านั้น และ PCR product ที่เกิดขึ้นจาก primers ที่มีความจำเพาะต่อ K-Casein gene ที่ติดด้วย probe VIC (เส้นกราฟสีเขียว) ซึ่งเป็น primer ควบคุม พบทั้งโคเพศผู้และเพศเมีย (Figure 2) ดังนั้นตัวอ่อนเพศผู้จะปรากฏเส้นกราฟ 2 เส้นดังภาพ Panel A ขณะที่ตัวอ่อนเพศเมียจะพบเส้นกราฟเพียง 1 เส้นดังภาพ Panel B โดยมีค่า C_t (cycle threshold) ซึ่งเป็นค่าจำนวนรอบของการทำงานของ Real - Time PCR ที่ให้ค่าแสงฟลูออเรสเซนซ์ตัดกับเส้น threshold เป็นค่าที่บ่งชี้ความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่ต้องการทดสอบ โดยมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับความเข้มข้นดีเอ็นเอ (ค่า C_t มากดีเอ็นเอน้อย ค่า C_t น้อยดีเอ็นเอมาก)

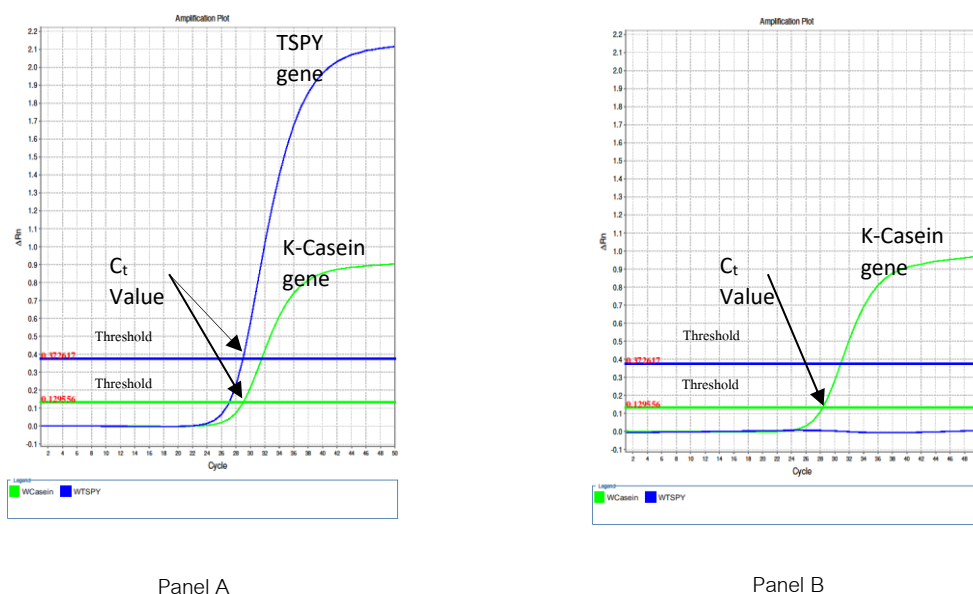


Figure 2. Graphical representation of Real-Time PCR data of male and female cows. Panel A (male): PCR product of TSPY gene primers/probes (blue, FAM) and PCR product of K-Casein gene primers/probes (green, VIC). Panel B (female): Only PCR product of K-Casein gene primers/probes (green, VIC).

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้การวิเคราะห์ข้อมูลสถิติเชิงพรรณนา และเปรียบเทียบร้อยละ

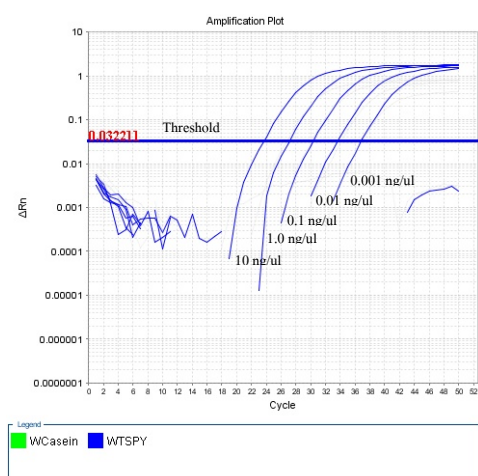
ผลการทดลองและวิจารณ์

ปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอ

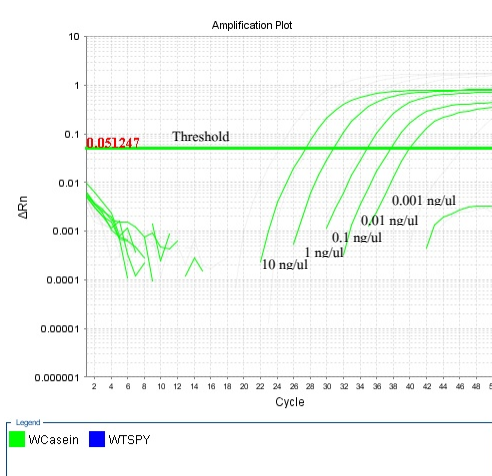
การทดสอบความไว (sensitivity) ของวิธีทดสอบแยกเพศโค โดยการหาความเข้มข้นต่ำสุดของดีเอ็นเอจากเลือดโคมาทำการทดสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน 6 ระดับ โดยการเจือจางดีเอ็นเอครั้งละ 10 เท่า (10 fold serial dilution) โดยเจือจางให้มีความเข้มข้นที่ 10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 และ 0.0001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ตามลำดับ ผลการทดสอบ พบว่าความเข้มข้นดีเอ็นเอต่ำสุดที่สามารถตรวจแยกเพศได้มีค่าเท่ากับ 0.001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร (หรือเท่ากับ 1 พิโคกรัม/ไมโครลิตร) ดัง Table 2 โดยในเพศผู้จะพบเส้นกราฟ 2 เส้น ขณะที่เพศเมียจะพบเส้นกราฟเพียง 1 เส้น (Figure 2) ในขณะที่ Jinming et al. (2007) ได้ทดสอบความไวของ primer TSPY gene ด้วยเทคนิค PCR แบบดั้งเดิม โดยทดสอบในตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือดโคที่ความเข้มข้น 10, 20, 40 และ 60 พิโคกรัม/ไมโครลิตร โดยผลการศึกษาดังกล่าวพบความไวที่ 10 พิโคกรัม/ไมโครลิตรมีความไวต่ำกว่าการทดลองในครั้งนี้ซึ่งเป็นไปได้ว่าด้วยเทคนิค Real - Time PCR มีประสิทธิภาพที่สูงกว่า เทคนิค PCR แบบดั้งเดิม

Table 2 DNA concentrations of sex determination bovine from male and female whole blood.

Gender (n)	DNA Concentration (ng/ μ l)											
	10		1		0.1		0.01		0.001		0.0001	
	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male	Female	Male
Male (5)	-	5	-	5	-	5	-	5	-	5	-	-
Female (5)	5	-	5	-	5	-	5	-	5	-	-	-



A



B

Figure 3 Amplification plot show the variation of $\log(\Delta Rn)$ with PCR cycle number. [A] TSPY gene primer (male) at 10 fold dilution concentration DNA (10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 and 0.0001 ng/ μ l). [B] K-Casein gene primer (female) at 10 fold dilution concentration DNA (10, 1, 0.1, 0.01, 0.001 and 0.0001 ng/ μ l).

จากการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรมของเครื่อง StepOne Plus (Applied Biosystems) คำนวณค่า C_t ตาม Figure 3 แสดงค่า amplification plot ของการตรวจแยกเพศด้วย TSPY gene primer (male) และ K-Casein gene primer (female) ที่ระดับความเข้มข้นดีเอ็นเอ 10 - 0.001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เส้นกราฟปรากฏชัดเจน แต่ความเข้มข้น 0.0001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ไม่ปรากฏเส้นกราฟ เนื่องจากไม่มีการเพิ่มขึ้นหรือมีเพิ่มในปริมาณที่น้อยมากของชิ้นดีเอ็นเอของยีน TSPY และ K-Casein มีผลทำให้การตรวจวัดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์เป็นศูนย์ จึงไม่สามารถแสดงเป็นเส้นกราฟได้ และได้ใช้น้ำกลั่นเป็น negative control จะไม่ปรากฏกราฟเนื่องจากไม่มี DNA จากการทดลองนี้สามารถตรวจแยกเพศโคได้ที่มีความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุด 0.001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ที่ $C_t \pm SD$ เฉลี่ย 36.82 ± 0.1321 และ 40.84 ± 0.1431 ของ TSPY gene primer (male) และ K-Casein gene primer (female) ตามลำดับ ดัง Table 3

ค่า C_t เฉลี่ยของ TSPY gene primers ในตัวอย่างดีเอ็นเอจากเลือดที่ระดับความเข้มข้น 10 fold dilution พบอยู่ในช่วง 23.70 – 36.82 และ ค่า C_t เฉลี่ยของ K-Casein gene primers พบอยู่ในช่วง 27.45 – 40.84 ดัง Table 3 ซึ่งให้ผลที่ต่างกับการศึกษาของ Badr et al. (2006) ในการทดสอบความไวของวิธีตรวจแยกเพศโค ในการทำ 10 fold serial dilution (10 – 0.001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) พบ ค่า C_t เฉลี่ยของ Y primers อยู่ในช่วง 33.83 - 41.34 และค่า C_t เฉลี่ยของ BOV primers อยู่ในช่วง 16.79 – 27.00 ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะการใช้ primers ของยีนที่ใช้ในการตรวจเพศที่ต่างกันถึงแม้ว่าจะตรวจด้วยเทคนิคเดียวกัน

Table 3. Threshold cycle (C_t) mean and SD of TSPY gene (male) and K-Casein gene (female)

Concentration of DNA (ng/μl)	C _t Value					Mean	SD
	1	2	3	4	5		
TSPY gene (male)							
10	23.79	23.68	23.63	23.76	23.66	23.70	0.0680
1	27.20	27.13	26.96	27.24	26.98	27.10	0.1269
0.1	30.64	30.36	30.31	30.45	30.51	30.45	0.1297
0.01	33.77	33.67	33.54	33.70	33.62	33.66	0.0863
0.001	36.88	36.98	36.63	36.76	36.85	36.82	0.1321
0.0001	0	0	0	0	0	0	0
K-Casein gene (female)							
10	27.57	27.40	27.34	27.56	27.38	27.45	0.1072
1	30.96	30.81	31.22	30.95	30.84	30.96	0.1616
0.1	35.12	34.83	34.99	34.76	34.84	34.91	0.1451
0.01	37.87	37.64	37.55	37.81	37.73	37.73	0.1285
0.001	41.01	40.90	40.62	40.81	40.81	40.84	0.1431
0.0001	0	0	0	0	0	0	0

การตรวจเพศตัวอ่อนโค

ผลการตรวจเพศตัวอ่อนโคจากเซลล์ตัวอ่อนโคที่เจริญถึงระยะ 8 – 16 เซลล์ จำนวน 30 ใบ โดยนำตัวอ่อน 1 ใบ มาตัดแยกเซลล์ blastomere เป็น 4 กลุ่ม คือ 1 2 4 เซลล์ และเซลล์ที่เหลือ (Table 4) พบว่า กลุ่มเซลล์ที่สามารถอ่านผลได้ 100 (30/30) เพอร์เซ็นต์ คือกลุ่มเซลล์ 4 เซลล์และเซลล์ที่เหลือ ส่วนกลุ่มเซลล์ที่สามารถอ่านผลได้ 86.67 (26/30) และ 93.34 (28/30) เพอร์เซ็นต์ คือ กลุ่ม 1 เซลล์ และกลุ่ม 2 เซลล์ สำหรับกลุ่มเซลล์ที่อ่านผลไม่ได้ อาจเกิดจากการดูดเก็บเซลล์ไม่ได้ หรือเซลล์ที่เก็บติดอยู่ในเข็มเก็บเซลล์ซึ่ง

มีขนาดเล็กมาก ทำให้ไม่มีดีเอ็นเอในการตรวจสอบ ทั้งนี้มีการศึกษาก่อนหน้านี้โดย Badr et al. (2006) ได้ทดสอบการแยกเพศตัวอ่อนจากเซลล์ blastomere 71 เซลล์ จากตัวอ่อนโครระยะ morula จำนวน 14 ใบ โดยแบ่งเซลล์ blastomere จำนวน 57 เซลล์ ตรวจสอบด้วยวิธี Real-Time PCR และจำนวน 14 เซลล์ตรวจสอบด้วยวิธี classical PCR พบว่า ให้ผลตรงกัน 13 ใบ คิดเป็น 92.86 เปอร์เซ็นต์ (13/14) ซึ่งต่างจากการศึกษาของ Martinhago et al. (2010) โดยการตรวจเพศของตัวอ่อนในคนด้วยเทคนิค Real-Time PCR และวิธี FISH ด้วย single blastomeres จำนวน 35 เซลล์เท่า ๆ กัน พบว่าให้ผลความถูกต้อง 74.3 เปอร์เซ็นต์ (26/35) และ 80.0 เปอร์เซ็นต์ (28/35) ตามลำดับ

Table 4 Gender determination of 1, 2, 4 and remaining blastomeres cell and matched embryos by Real-Time PCR, using TSPY gene specific primers (Y chromosome) and bovine specific primer (X chromosome)

Embryos	Blastomere				Remark
	1	2	4	Remaining	
1	M	M	M	M	Male
2	M	M	M	M	Male
3	M	M	M	M	Male
4	F	F	F	F	Female
5	-	M	M	M	Male
6	M	M	M	M	Male
7	F	F	F	F	Female
8	F	F	F	F	Female
9	M	M	M	M	Male
10	F	F	F	F	Female
11	-	F	F	F	Female
12	F	F	F	F	Female
13	M	M	M	M	Male
14	F	F	F	F	Female
15	M	-	M	M	Male
16	M	M	M	M	Male
17	M	M	M	M	Male
18	-	M	M	M	Male
19	M	M	M	M	Male

Embryos	Blastomere				Remark
	1	2	4	Remaining	
20	M	M	M	M	Male

Embryos	Blastomere				Remark
	1	2	4	Remaining	
21	F	F	F	F	Female
22	M	M	M	M	Male
23	F	F	F	F	Female
24	M	M	M	M	Male
25	-	M	M	M	Male
26	F	F	F	F	Female
27	M	M	M	M	Male
28	M	-	M	M	Male
29	F	F	F	F	Female
30	F	F	F	F	Female

สรุปผลการทดลอง

การตรวจแยกเพศตัวอ่อนโคด้วย TSPY gene โดยวิธีเทคนิค Real-Time PCR พบว่า สามารถตรวจแยกเพศตัวอ่อนโคโดยใช้ปริมาณความเข้มข้นของดีเอ็นเอต่ำสุดที่ระดับ 0.001 นาโนกรัม/ไมโครลิตร และจำนวนเซลล์ blastomere ตั้งแต่ 4 เซลล์ขึ้นไป ที่สามารถตรวจได้ให้ผลความถูกต้อง 100 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าการตรวจแยกเพศตัวอ่อนโคด้วย TSPY gene โดยเทคนิค Real-Time PCR มีประสิทธิภาพให้ผลการทดสอบที่ถูกต้องแม่นยำ มีความไวและความจำเพาะในการตรวจแยกเพศโค โดยสามารถตรวจดีเอ็นเอตั้งแต่ 0.001 นาโนกรัม/ไมโครลิตรหรือตั้งแต่ 4 เซลล์ขึ้นไปของเซลล์ blastomere

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.มาลี อภิเมธีธำรง ที่ช่วยเหลือให้คำแนะนำในการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนและการเจาะเก็บเซลล์ตัวอ่อน และนายมงคลฤกษ์ คุณพระ นางสาวนิตยา วาปีกา รวมทั้งเจ้าหน้าที่กลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีและความหลากหลายทางชีวภาพปศุสัตว์ทุกท่าน ที่ช่วยเหลือด้านการเตรียมอุปกรณ์ สารเคมีและตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- มาลี อภิเมธีอารัง ณรงค์ เลี้ยงเจริญ อนนท เทืองสันเทียะ วิบูลย์ เยี่ยงวิศวกูร กิรติ ธิแจ้ และ จุริย์รัตน์ สำเร็จประสงค์. 2552. การผลิตตัวอ่อนโคขาวลำพูนพันธุ์แท้โดยการเก็บเซลล์ไข่จากรังไข่ผ่านทางผนังช่องคลอดและการปฏิสนธิในอกร่างกาย. ประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ มข. ครั้งที่ 10 ประจำปี 2552 หัวข้อเรื่อง “วิกฤตเศรษฐกิจโลก : การปรับตัวของครัวไทยสู่ครัวโลก” ระหว่างวันที่ 3-4 มิถุนายน 2552 ณ ห้องประชุมใหญ่ อาคารพิเชษฐฯ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- Affara, N., C. Bishop and W. Brown. 1996. Report of the second international workshop on Y chromosome mapping. *Cytogenet. Cell Genet.* 73: 33-76.
- Badr, H., R. Puglisi and G. Bongioni. 2006. A rapid method for sex determination of bovine and buffalo embryos by one step Real-Time PCR. *Atti 41° Congr. SIPZOO “From genome to proteome in animal science”*, Lodi.
- Carneiro, M. C., P. L. Takeuchi. A. Araújo, R. B. Lôbo, F. P. Elias, R. A. Vila, C. L. Miranda-Furtado and E. S. Ramos. 2011. Sexing single bovine blastomeres using TSPY gene amplification. *Genet. Mol. Res.* 10: 3937-3941
- Chen, C.Y., L.S. Huang, J.B. Chen, N.S. Ding, L.L. Zhou and X. Hai-Xia. 2003. Establishing and optimizing the system for sex determination of bovine preimplantation embryos. *Chinese Journal of Agricultural Biotechnology.* 1: 13-16.
- Gibthai. 2015. Real-Time PCR technology. Available source: http://www.gibthai.com/services/technical_detail.php?ID=12, March 02, 2015.
- Hirayama, H., S. Kageyama, S. Moriyasu, K. Sawai, S. Onoe, Y. Takahashi, S. Katagiri, K. Toen, K. Watanabe, T. Notomi, H. Yamashina, S. Matsuzaki and A. Minamihashi. 2004. Rapidsexing of bovine preimplantation embryos using loopmediated isothermal amplification. *Theriogenology* 62: 887-896.
- Jakubiczka, S., F. Schnieders and J. Schmidtke. 1993. A bovine homologue of the human TSPY gene. *Genomics.* 17: 732-735.
- Jinming, H., Y. Wei, W. Naïke and T. Xiuwen. 2007. Use of the non-electrophoretic method to detect testis specific protein gene for sexing in preimplantation bovine embryos. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 20: 866-871.
- Lemos, D.C., A.F.L. Rios, R.B. Lobo and R.A. Vila. 2005. Use of the TSPY gene for sexing cattle. *Genet. Mol. Biol.* 28: 117-119.

- Manz, E., T. Vogel, P. Glatzel and J. Schmidtke. 1998. Identification of an equine Y chromosome specific gene locus (eTSPY) with potential in preimplantation sex diagnosis. *Theriogenol.* 49: 364-370.
- Martinhago, C., L. Vagnini, C. Petersen, A. Mauri, R. Baruffi, R. de Oliveira and J.J.R. Franco. 2010. Development of a Real-Time PCR method for rapid sexing of human preimplantation embryos. *Reprod Biomed Online.* 20: 75-82.
- Pierce, K. E., J. E. Rice and J. A. Sanchez. 2000. Real-Time PCR using molecular beacons for accurate detection of the Y chromosome in single human blastomere. *Mol. Hum. Reprod.* 6: 1155-1164.
- Schempp, W., A. Binkele, J. Arnemann, B. Glaser, K. Ma, K. Taylor, R. Toder, J. Wolfe and A. C. Chandley. 1995. Comparative mapping of YRRM- and TSPY-related cosmids in man and hominoid apes. *Chromosome Res.* 3: 227-234.
- Songsasen, N. and M. Apimeteetumrong. 2002. Effects of β -mercaptoethanol on formation of pronuclei and developmental competence of swamp buffalo oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 71: 193-202.
- Vogel, T., F. Dechend. and E. Manz. 1997. Organization and expression of bovine TSPY. *Mamm. Genome.* 8: 491-496.

การทำนายค่าพันธุกรรมจีโนมของลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมสำหรับโคนมไทย

โดยใช้วิธีการแบบขั้นตอนเดียวด้วยโมเดลวันทดสอบการถดถอยแบบสุ่ม

สายัณห์ บัวบาน^{1/} สมศักดิ์ เปรมปรีดิ์^{1/} มนต์ชัย ดวงจินดา^{2/}

บทคัดย่อ

การทำนายค่าพันธุกรรมจีโนมโดยใช้วิธีการแบบขั้นตอนเดียว (ssGBLUP) ได้แสดงให้เห็นว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธีการแบบหลายขั้นตอน และการวิเคราะห์ทางสถิติของลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมด้วยโมเดลวันทดสอบการถดถอยแบบสุ่ม (RR-TDM) มีข้อดีที่ชัดเจนกว่าโมเดลอื่น ๆ การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการทำนายค่าพันธุกรรมของลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมโดยใช้วิธีการแบบขั้นตอนเดียวด้วยโมเดลวันทดสอบการถดถอยแบบสุ่ม (SS-RR-TDM) เปรียบเทียบกับวิธีการแบบดั้งเดิมโดย RR-TDM ในประชากรโคนมไทย และศึกษาผลกระทบจากการใช้ข้อมูลจีโนไทป์ของแม่โคต่อความแม่นยำในการทำนายค่าพันธุกรรมจีโนมสำหรับพ่อโคที่อายุน้อย ชุดข้อมูลของลักษณะปริมาณน้ำนม ($n = 170,666$) และองค์ประกอบน้ำนม ($n = 160,526$) ได้มาจากแม่โคนมในรอบการให้นมครั้งแรกที่คลอดลูกระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2536 ถึงเดือนมีนาคม 2560 จำนวน 24,858 และ 23,201 ตัว ตามลำดับ ข้อมูลจีโนไทป์ที่ได้จาก Illumina Bovine SNP50 BeadChip สำหรับลักษณะปริมาณน้ำนม และองค์ประกอบน้ำนมมีจำนวน 876 และ 868 ตัว ตามลำดับ ตัดข้อมูลในช่วงหกปีสุดท้าย และสัตว์ที่ใช้ตรวจสอบความแม่นยำกำหนดให้เป็นพ่อโคที่ไม่มีลูกสาวในชุดข้อมูลที่ลดลง ค่าการผสมพันธุ์ (EBV) ทำนายด้วย RR-TDM ส่วนค่าพันธุกรรมจีโนม (GEBV) ทำนายด้วย SS-RR-TDM เปรียบเทียบวิธีการทำนายโดยใช้ความสามารถในการทำนายค่าพันธุกรรมสำหรับพ่อโคที่มีอายุน้อย ได้แก่ ความแม่นยำเชิงทฤษฎี (r_t) ความแม่นยำเชิงการตรวจสอบ (r_v) และความไม่อคติ (b) ความแม่นยำเชิงทฤษฎีได้จากการแปลงเมตริกซ์สัมประสิทธิ์ของสมการโมเดลแบบผสม ในขณะที่ความแม่นยำเชิงการตรวจสอบได้จากสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สันระหว่าง deregressed proofs (dEBV) จากชุดข้อมูลทั้งหมด และ G(EBV) จากชุดข้อมูลที่ลดลง ความไม่อคติพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยที่คำนวณตามโมเดลการถดถอยเชิงเส้น (ค่าเข้าใกล้ 1) ผลการศึกษาพบว่าการทำนายค่า GEBV ด้วย SS-RR-TDM โดยใช้จีโนไทป์พ่อโคเพียงอย่างเดียวให้ค่าความแม่นยำเชิงทฤษฎี และความแม่นยำเชิงการตรวจสอบเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ย 0.22 และ 0.06 จุด ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทำนายด้วย RR-TDM และเมื่อนำข้อมูลจีโนไทป์ของแม่โคมาร่วมในการทำนายด้วยจะให้ความแม่นยำเชิงทฤษฎี และความแม่นยำเชิงการตรวจสอบเพิ่มขึ้นอีกโดยเฉลี่ย 0.02 และ 0.07 จุด ตามลำดับ นอกจากนี้การใช้ข้อมูลจีโนไทป์ของแม่โคร่วมในการทำนายด้วย SS-RR-TDM ทำให้ค่าอคติในการทำนายมีค่าลดลง การวิจัยครั้งนี้ช่วยยืนยันความเป็นไปได้ในการใช้ SS-RR-TDM ทำนายค่า GEBV สำหรับลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม และควรใช้ข้อมูลจีโนไทป์ของทั้งพ่อและแม่โคร่วมในการทำนายค่า GEBV ในประชากรโคนมไทยในอนาคต

คำสำคัญ: โคนมไทย โมเดลในวันทดสอบการถดถอยแบบสุ่ม ลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม วิธีการแบบขั้นตอนเดียว

เลขทะเบียนวิชาการ: 64(2)-0208-003

^{1/}สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ต. บางกะดี อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000

^{2/}ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

Genomic prediction of milk production traits for Thai dairy cattle using single-step approach with random regression test-day model

Sayan Buaban^{1/} Somsak Prempre^{1/} Monchai Duangjinda^{2/}

ABSTRACT

In genomic prediction, the single-step genomic BLUP (ssGBLUP) has been demonstrated to outperform multi-step methods. For milk production traits, the random regression test-day model (RR-TDM) has clear advantages over other models. This study aimed to evaluate the feasibility of using the single-step random regression test-day model (SS-RR-TDM) in genomic prediction of milk production traits, in comparison with the pedigree-based RR-TDM, and to investigate an effect of genotyped cows on the accuracy of genomic prediction for young bulls. Data of milk yield ($n=170,666$) and milk components ($n=160,526$) were from 24,858 and 23,201 cows in first lactation, calving between November 1993 and March 2018, respectively. Additionally, 876 and 868 bulls and cows of each data set were genotyped using Illumina Bovine SNP50 BeadChip. We cut off the data in the last six years, and the validation animals were defined as genotyped bulls with no daughters in the truncated set. Estimated breeding value (EBV) were obtained with RR-TDM, and genomic estimated breeding value (GEBV) were estimated with SS-RR-TDM. The prediction methods were compared with the genetic predictive ability for young bulls, namely theoretical accuracy ($\mathbf{r}_t$), validation accuracy ($\mathbf{r}_v$) and unbiasedness ($\mathbf{b}$). The $\mathbf{r}_t$ was obtained by inverting the coefficient matrix of the mixed model equations whereas the $\mathbf{r}_v$ was measured by the Pearson correlation between deregressed EBV from the full dataset and (G)EBV predicted with the reduced dataset. The $\mathbf{b}$ was determined by the regression coefficient calculated according to the linear regression model (closed to 1). Using only bull genotypes, on average, SS-RR-TDM increased $\mathbf{r}_t$ by 0.22 and $\mathbf{r}_v$ by 0.07, compared with RR-TDM. With cow genotypes, the extra increase was 0.02 and 0.07 for $\mathbf{r}_t$ and $\mathbf{r}_v$, respectively. The bias was reduced when the prediction was based on using SS-RR-TDM and including cow genotypes. This study confirmed the feasibility of SS-RR-TDM for genomic prediction of milk production traits in Thai dairy population. The evaluation should include the genotype data of both the sires and cows.

Key words: Thai dairy cattle, random regression test-day model, milk production traits, single-step genomic BLUP

Registered No: 64(2)-0208-003

^{1/}Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Department of Livestock Development, Bangkokadee, Pathumthani, 12000

^{2/}Department of Animal Science, Khon Kaen University, Meaung, Khon Kaen 40002

คำนำ

การทำนายค่าพันธุกรรมเป็นเครื่องมือที่สำคัญสำหรับใช้ในการจัดลำดับและคัดเลือกสัตว์ตามพันธุกรรมในแผนการปรับปรุงพันธุ์ อันจะทำให้การผลิตสัตว์ในรุ่นถัดไปเป็นตามวัตถุประสงค์ของการปรับปรุงพันธุ์ โดยเฉพาะลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมซึ่งเป็นลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจที่มีผลต่อการทำกำไรของการเลี้ยงโคนม โคนมที่มีการให้ผลผลิตน้ำนมเพิ่มขึ้นทั้งปริมาณ และคุณภาพมีความสัมพันธ์โดยตรงกับรายได้ที่มากขึ้น (Seegers et al., 2003) ลักษณะนี้เป็นลักษณะที่ควบคุมด้วยยีนหลายคู่ (polygenic traits) ที่ได้รับผลกระทบจากปัจจัยหลายประการ และหลายยีน ซึ่งแต่ละยีนมีผลกระทบเล็กน้อยต่อการแสดงออกของลักษณะ (Snelling et al., 2013) การปรับปรุงด้านการจัดการและโภชนาการ พร้อมกับการคัดเลือกพันธุกรรมอย่างเข้มข้นสามารถเพิ่มการผลิตน้ำนมได้ ในครั้งแรกลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมมีการทำนายค่าพันธุกรรมบนพื้นฐานของลักษณะการแสดงออกแบบสะสมโดยใช้โมเดลรอบการให้นม (lactation model, LAM) จนถึงปัจจุบันการทำนายค่าพันธุกรรมของลักษณะดังกล่าวได้มุ่งเน้นไปที่การใช้โมเดลวันทดสอบการถดถอยแบบสุ่ม (random regression test-day model, RR-TDM) ซึ่งเป็นโมเดลที่สามารถอธิบายปัจจัยทางพันธุกรรมและทางสภาพแวดล้อมทั้งหมดที่มีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงข้อมูลฟีนไทป์ของแม่โคได้โดยตรงในแต่ละวันทดสอบตลอดระยะเวลาการให้นม (Oliveira et al., 2019a) ด้วยวิธีการทำนายค่าพันธุกรรมแบบไม่เอนเอียงเชิงเส้นตรงที่ดีที่สุด (Best Linear Unbiased Prediction, BLUP) (Henderson, 1984) โดยใช้ข้อมูลฟีนไทป์ร่วมกับข้อมูลพันธุ์ประวัติ สำหรับการทำนายค่าการผสมพันธุ์ (estimated breeding value, EBV) เพื่อใช้ในการคัดเลือกแบบดั้งเดิม (Traditional pedigree-based selection) ส่งผลให้การทำนายค่า EBV ด้วย RR-TDM มีความแม่นยำสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ LAM หรือวิธีการทางสถิติอื่นๆ (Kistemaker, 1997; Buaban and Sanpote, 2010) อย่างไรก็ตามวิธีการนี้ยังคงมีข้อจำกัดในการใช้งานอยู่บ้าง เช่น ในการคัดเลือกสัตว์ให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์มักใช้ระยะเวลานาน และได้ผลช้า ในทศวรรษที่ผ่านมาได้มีความก้าวหน้าของเทคโนโลยีจีโนม ส่งผลให้การจำแนกข้อมูลของความผันแปรทางพันธุกรรมในระดับนิวคลีโอไทด์ หรือ single nucleotide polymorphisms (SNPs) ของสัตว์รายตัวสามารถทำได้ครั้งละจำนวนมาก ครอบคลุมทั่วทั้งจีโนม และมีราคาถูกลงอย่างต่อเนื่อง (VanRaden, 2020) จึงได้นำการคัดเลือกด้วยจีโนม (genomic selection, GS) ซึ่งหมายถึงการคัดเลือกจากการทำนายค่าพันธุกรรมจีโนม (genomic estimated breeding value, GEBV) โดยใช้ข้อมูล SNPs ร่วมกับข้อมูลฟีนไทป์และข้อมูลพันธุ์ประวัติ (Legarra et al., 2009; Misztal et al., 2009) มาแทนการคัดเลือกแบบดั้งเดิม โดยเฉพาะในโคนมที่เกิดความสำเร็จในการพัฒนาในหลายประเทศ เช่น ประเทศสหรัฐอเมริกา แคนาดา สหราชอาณาจักร นิวซีแลนด์ ออสเตรเลีย ฝรั่งเศส เนเธอร์แลนด์ เยอรมนี และประเทศสแกนดิเนเวีย (Silva et al., 2014) การคัดเลือกด้วยจีโนมมีข้อดีหลายอย่างเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการคัดเลือกแบบดั้งเดิม เช่น มีศักยภาพในการเพิ่มความก้าวหน้าทางพันธุกรรมของลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจสำหรับโคนมในแต่ละปีเพิ่มขึ้น (Doublet et al., 2019) ผ่านความแม่นยำในการทำนายค่าพันธุกรรม และลดข้อจำกัดจากการที่สามารถคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์โคนมได้ในขณะที่ยังไม่มีข้อมูลของลูกสาว (Hayes et al., 2009) ที่ทำได้ในช่วงต้นของชีวิตสัตว์ หรือบางครั้งก่อนที่สัตว์จะเกิด นอกจากนี้การคัดเลือกด้วยจีโนมสามารถลดต้นทุนในการสร้างพ่อแม่พันธุ์ได้เป็นอย่างมากเมื่อ

เทียบกับโปรแกรมการทดสอบลูกสาวแบบดั้งเดิม โดยทั่วไปวิธีการทำนายค่าพันธุกรรมจีโนมสามารถแบ่งได้เป็นสองประเภทหลัก: วิธีการแบบหลายขั้นตอน (multi-step approach) และแบบขั้นตอนเดียว (single-step approach) โดยวิธีแบบขั้นตอนเดียว (single-step genomic BLUP, ssGBLUP) เป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมในปัจจุบัน และมีข้อดีกว่าวิธีการทำนายแบบหลายขั้นตอน (Misztal et al., 2020) เนื่องจากสามารถทำนายสัตว์ที่มีจีโนไทป์ และไม่มีจีโนไทป์ทั้งหมดได้ในเวลาเดียวกันได้ทั้งหมด ลดความซับซ้อนในทางปฏิบัติ และมีอคติในการทำนายน้อยลง นอกจากนี้วิธีการแบบขั้นตอนเดียวยังให้การทำนายที่มีความแม่นยำมากขึ้น และมีคุณสมบัติที่สามารถใช้ร่วมกับ RR-TDM สำหรับลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมที่มีข้อมูลต่อเนื่องได้ (Kang et al., (2017) จากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าการทำนายค่าพันธุกรรมโดยวิธีการแบบขั้นตอนเดียวด้วยโมเดลวันทดสอบการถดถอยแบบสุ่ม (single-step random regression test-day model, SS-RR-TDM) มีความเป็นไปได้ที่จะให้ความแม่นยำมากขึ้น และมีอคติของการทำนายน้อยลง (Oliveira et al., 2019b) การทำนายค่าพันธุกรรมสำหรับลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมในประเทศไทย สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ได้ดำเนินการด้วย RR-TDM โดยใช้ข้อมูลฟีโนไทป์ร่วมกับข้อมูลพันธุ์ประวัติมาตั้งแต่ปี 2556 (กรมปศุสัตว์, 2556) และในปัจจุบันได้มีการรวบรวมข้อมูลจีโนไทป์จากทั้งพ่อพันธุ์ที่ผ่านการพิสูจน์ด้วยการทดสอบลูกสาว และจากแม่โค ซึ่งหากมีการผสมผสานระหว่าง RR-TDM เข้ากับ ssGBLUP (SS-RR-TDM) ในการทำนายค่าพันธุกรรม น่าจะเพิ่มความแม่นยำ และมีอคติของการทำนายน้อยลง และส่งผลทำให้ความสำเร็จในการปรับปรุงพันธุ์โคนมของประเทศเป็นไปอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามในประเทศไทยมีพ่อพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบด้วยข้อมูลของลูกสาวไม่มากนัก การเพิ่มข้อมูลจีโนไทป์ของแม่พันธุ์ที่มีข้อมูลฟีโนไทป์ร่วมในการทำนายค่าพันธุกรรมแทนที่จะใช้จีโนไทป์ของพ่อพันธุ์เพียงอย่างเดียวจะทำให้การทำนายค่าพันธุกรรมจีโนมมีความน่าเชื่อถือมากขึ้น ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินความเป็นไปได้ในการทำนายค่าพันธุกรรมของลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมโดยใช้วิธีการแบบขั้นตอนเดียวด้วยโมเดลวันทดสอบการถดถอยแบบสุ่ม (SS-RR-TDM) เปรียบเทียบกับวิธีการแบบดั้งเดิมโดย RR-TDM ในประชากรโคนมไทย และศึกษาผลกระทบจากการใช้ข้อมูลจีโนไทป์ของแม่โคต่อความแม่นยำในการทำนายค่าพันธุกรรมจีโนมสำหรับพ่อโคที่อายุน้อย

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ข้อมูลการให้อาหาร

โคนมในประเทศไทยมักเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่เป็นฟาร์มขนาดเล็กถึงขนาดกลางเป็นส่วนใหญ่ อาหารและวิธีการให้อาหารมีความแตกต่างกันไปในแต่ละภูมิภาค เมื่อพิจารณาจากคุณภาพอาหารชั้นที่ใช้เกษตรกรจำนวนมากจะให้อาหารชั้น 1 กก. การให้ปริมาณผลิตน้ำนม 2 กก. ต่อวันเป็นบรรทัดฐานในการปฏิบัติ ส่วนอาหารหยากที่ให้ประกอบด้วย หญ้าในเขตร้อน ฟางข้าว และของเหลือจากการเกษตรบางส่วน องค์ประกอบของส่วนผสมของอาหารชั้นขึ้นอยู่กับความพร้อมในท้องถิ่นและราคา อย่างไรก็ตามการขาดแคลนอาหารหยากเป็นเรื่องวิกฤติในฤดูหนาวและฤดูร้อน และเกษตรกรต้องซื้อหญ้าแห้งหรือฟางข้าว หรือเพิ่มการ

ใช้อาหาร TMR (Total Mixed Ration) หรือ Complete Ration (CR) ซึ่งเป็นอาหารผสมสำเร็จรูปที่เกิดจากการนำอาหารหยาบ และอาหารข้นมาผสมกันในอัตราส่วนที่เหมาะสม

ข้อมูลฟีโนไทป์ และพันธุ์ประวัติ

ข้อมูลในวันทดสอบรายเดือน (monthly test-day records) ของแม่โคนมในรอบการให้นมครั้งแรกที่คลอดลูกระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2536 ถึงเดือนมีนาคม 2560 จากฐานข้อมูลโคนมของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ และเพื่อให้ได้ชุดข้อมูลที่มีความเหมาะสมในการวิเคราะห์จึงได้ตรวจสอบข้อมูลตามเงื่อนไขของ Buaban et al. (2020) ข้อมูลที่ผ่านการตรวจสอบแล้วจะเรียกว่าเป็นชุดข้อมูลทั้งหมด (full data set) ซึ่งมีข้อมูลในวันทดสอบถึงปี 2560 ข้อมูลในวันทดสอบประกอบด้วย 7 ลักษณะ: ปริมาณน้ำนม (milk yield, MY, กก.) ปริมาณไขมัน (fat yield, FY, กก.), ปริมาณโปรตีน (protein yield, PY, กก.) ปริมาณของแข็งทั้งหมด (total solid yield, TY, กก.) เปอร์เซ็นต์ไขมัน (fat percentage, FP, %) เปอร์เซ็นต์โปรตีน (protein percentage, PP, %) และเปอร์เซ็นต์ของแข็งทั้งหมด (total solid percentage, TP, %) เพื่อให้ข้อมูลมีความเหมาะสมในการวิเคราะห์ และเนื่องจากในวันทดสอบเดียวกันบางลักษณะไม่มีการบันทึก ผู้วิจัยจึงแบ่งลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมที่ศึกษาออกเป็น 2 กลุ่ม: ลักษณะปริมาณน้ำนม (MY) และลักษณะองค์ประกอบน้ำนม (FY, PY, TY, FP, PP และ TP) โดยกลุ่มลักษณะปริมาณน้ำนมมีจำนวน 170,666 ข้อมูล (24,858 ตัว) และกลุ่มลักษณะองค์ประกอบน้ำนมมีข้อมูล 160,526 ข้อมูล (23,201 ตัว) โดยชุดข้อมูลที่ได้ในแต่ละกลุ่มจะสับย้อนกลับพันธุ์ประวัติไปถึงสามชั่วอายุจากแม่โคที่มีข้อมูล สำหรับการตรวจสอบพ่อโคที่อายุน้อย ผู้วิจัยจะต้องเตรียมชุดข้อมูลเป็น 2 ชุด คือ ชุดข้อมูลทั้งหมดและชุดข้อมูลที่ลดลง (reduced data set) โดยชุดข้อมูลทั้งสองจะต้องอยู่ในฐานพันธุกรรมเดียวกัน ชุดข้อมูลที่ลดลงถูกดึงมาจากชุดข้อมูลทั้งหมดโดยตัดข้อมูลในวันทดสอบในช่วงหกปีสุดท้ายออกเพื่อต้องการให้พ่อโคที่อายุน้อยที่ใช้ตรวจ (validation of young bulls) ไม่มีข้อมูลฟีโนไทป์ของลูกสาว ดังนั้นชุดข้อมูลนี้จึงมีข้อมูลในวันทดสอบถึงปี 2554 นอกจากนี้พ่อโคที่อายุน้อยที่ใช้ตรวจสอบยังต้องมีความแม่นยำจากการทำนายค่า EBV สำหรับแต่ละลักษณะจากชุดข้อมูลทั้งหมดมากกว่า 75%

Table 1 Number of farms, animals and records used in this study.

Items	Number of animals and records	
	Milk yield traits	Milk component traits
Number of farms		
Full data set	1,905	1,764
Reduced data set	1,523	1,379
Animals in pedigree	51,128	48,834
Animals with records		
Full data set	24,858	23,201
Reduced data set	15,404	13,768
Test-day records		
Full data set	170,666	160,526
Reduced data set	97,970	88,000
Genotyped animals	876	868
Bulls	152	152
Cows	724	716
SNP information	41,977	41,975

ข้อมูลจีโนมไทป์

ข้อมูลจีโนมไทป์ที่ได้จากการจำแนกข้อมูลของความผันแปรทางพันธุกรรมในระดับนิวคลีโอไทด์ (SNPs) ด้วย Illumina BovineSNP50 BeadChip (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) ที่เป็นเวอร์ชัน 2 (มีจำนวน 54,609 SNPs) หรือ เวอร์ชัน 3 (มีจำนวน 53,218 SNPs) โดยเลือกใช้ SNPs ที่เหมือนกันทั้งสองเวอร์ชันจำนวน 50,908 SNPs ไปผ่านการควบคุมคุณภาพ ซึ่งพิจารณาด้วย call rate > 0.9 สำหรับทั้ง SNPs และ จีโนมสัตว์ MAF (minor allele frequency) > 0.05 การออกจากสมดุล Hardy-Weinberg (ความแตกต่างระหว่างความถี่ที่คาดหวัง และความถี่ที่สังเกต) < 0.15 การทดสอบความขัดแย้งระหว่างคู่พ่อแม่ลูกหลาน (parent-progeny conflict) โดยโปรแกรม PREGSF90 (Misztal, 2018) ได้นำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพ SNPs และตัวอย่าง ภายหลังจากการควบคุมคุณภาพ ยังคงเหลือข้อมูล SNPs สำหรับใช้ในการวิเคราะห์จำนวน 41,977 และ 41,975 SNPs จากสัตว์ที่มีจีโนมไทป์จำนวน 876 และ 868 ตัว สำหรับลักษณะปริมาณน้ำนม และลักษณะองค์ประกอบน้ำนม ตามลำดับ รายละเอียดของชุดข้อมูลทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษานี้แสดงไว้ใน Table 1

โมเดลทางสถิติ

ทุกลักษณะที่ศึกษาครั้งนี้จะทำนายค่าพันธุกรรมโดยใช้วิธีการแบบดั้งเดิมด้วย RR-TDM และวิธีการแบบขั้นตอนเดียวด้วย SS-RR-TDM โมเดลที่ใช้มีความคล้ายคลึงกับที่ใช้ในการทำนายค่าพันธุกรรมของกรมปศุสัตว์ (กรมปศุสัตว์, 2562; Buaban et al., 2020)

RR-TDM เป็นวิธีการแบบดั้งเดิมที่ใช้ในการทำนายค่าพันธุกรรมโดยใช้ข้อมูลฟีโนไทป์ ร่วมกับข้อมูลพันธุ์ประวัติของสัตว์แต่ละตัว ด้วยวิธี Best Linear Unbiased Prediction (BLUP) โดยได้ EBV เป็นผลลัพธ์โดยตรง และใช้เป็นโมเดลอ้างอิงในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งมีโมเดลทางสถิติดังนี้:

$$\mathbf{y} = \mathbf{X}_1\mathbf{b}_1 + \mathbf{X}_2\mathbf{b}_2 + \mathbf{V}\mathbf{h} + \mathbf{Z}\mathbf{a} + \mathbf{W}\mathbf{p} + \mathbf{e}, \quad (1)$$

โดยที่ $\mathbf{y}$ เป็นเวกเตอร์ของบันทึกข้อมูลในวันทดสอบของลักษณะที่ทำการศึกษา (MY, FY, PY, TY, FP, PP และ TP) $\mathbf{b}_1$ เป็นเวกเตอร์ของอิทธิพลคงที่ซึ่งประกอบด้วย หน่วยผสมเทียม-ปี-ฤดูกาล กลุ่มพันธุ์-กลุ่มอายุที่คลอด $\mathbf{b}_2$ เป็นเวกเตอร์ของค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยคงที่ของ Legendre polynomials (LPs) ที่ซ้อนอยู่ในกลุ่มพันธุ์-กลุ่มอายุที่คลอด $\mathbf{h}$ เป็นเวกเตอร์ของอิทธิพลสุ่มเนื่องจาก ผุ้ง-ปี-เดือนทดสอบ $\mathbf{a}$ และ $\mathbf{p}$ เป็นเวกเตอร์ของสัมประสิทธิ์การถดถอยแบบสุ่มของ LPs ที่ซ้อนกันภายในอิทธิพลเนื่องจากพันธุกรรม และสิ่งแวดล้อมตามลำดับ และ $\mathbf{e}$ เป็นเวกเตอร์ของอิทธิพลของความคลาดเคลื่อน เมตริกซ์ $\mathbf{X}_1$, $\mathbf{X}_2$, $\mathbf{V}$, $\mathbf{Z}$ และ $\mathbf{W}$ เป็น incidence matrices ที่สอดคล้องกันกับอิทธิพลที่กล่าวมาข้างต้น ลำดับของ LPs ซึ่งเป็นค่าแปรผันร่วมของปัจจัยคงที่ และปัจจัยสุ่ม ที่คำนวณจากวันให้นม (DIM) ตามที่กำหนดโดย Gengler et al. (1999) การศึกษาในครั้งนี้ใช้ LPs ลำดับที่ 3 (constant, linear, quadratic และ cubic) สำหรับลักษณะปริมาณน้ำนม และองค์ประกอบน้ำนม โดยจะใช้ LPs ลำดับเดียวกันสำหรับอิทธิพลการถดถอยแบบคงที่และแบบสุ่ม กลุ่มพันธุ์จำแนกเป็น 3 กลุ่ม ตามระดับสายเลือดโฮลสไตน์ ฟรีเชียน (HF) ประกอบด้วย $HF < 87.50\%$, $87.50 \leq HF < 93.75$ และ $HF \geq 93.75\%$ กลุ่มอายุที่คลอดถูกจำแนกเป็น 7 กลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มห่างกันทุกๆ 3 เดือน กลุ่มแรกมีอายุน้อยกว่า 25 เดือน และกลุ่มสุดท้ายมีอายุมากกว่า 39 เดือน ฤดูกาลจำแนกเป็น 3 กลุ่ม คือ ฤดูหนาว (พฤศจิกายน-กุมภาพันธ์) ฤดูร้อน (มีนาคม-มิถุนายน) และฤดูฝน (กรกฎาคม-ตุลาคม)

เพื่อลดความซับซ้อนของโมเดลจึงสมมติให้ตัวแปรของอิทธิพลของความคลาดเคลื่อนมีค่าเท่ากันตลอดการให้นม และกำหนดให้อิทธิพลแบบสุ่มมีการกระจายแบบปกติด้วยค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0 และโครงสร้างความแปรปรวนร่วมของโมเดลกำหนดให้เป็นดังนี้

$$\text{Var} \begin{bmatrix} \mathbf{h} \\ \mathbf{a} \\ \mathbf{p} \\ \mathbf{e} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \mathbf{I}\sigma_{h^2}^2 & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{A} \otimes \mathbf{G}_0 & \mathbf{0} & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{I} \otimes \mathbf{P}_0 & \mathbf{0} \\ \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{0} & \mathbf{I}\sigma_e^2 \end{bmatrix} \quad (2)$$

โดยที่ $\mathbf{G}_0$ และ $\mathbf{P}_0$ เป็นเมตริกซ์ความแปรปรวนร่วม 4×4 ของสัมประสิทธิ์การถดถอยแบบสุ่มสำหรับอิทธิพลเนื่องจากพันธุกรรมและสภาพแวดล้อมตามลำดับ $\mathbf{A}$ เป็นเมตริกซ์ความสัมพันธ์ระหว่าง

สัตว์ในพันธุ์ประวัติ (numerator relationship matrix) $\mathbf{I}$ เป็นเมตริกซ์เอกลักษณ์ (Identity matrix) $\otimes$ เป็น Kronecker product $\sigma_{h_{tm}}^2$ เป็นความแปรปรวนร่วมของฝูง-ปี-เดือนทดสอบ และ σ_e^2 เป็นความแปรปรวนร่วมของความคลาดเคลื่อน

SS-RR-TDM เป็นวิธีการที่ใช้ในการทำนายค่าพันธุกรรมโดยใช้ข้อมูลจีโนไทป์ ข้อมูลพันธุ์ประวัติของสัตว์แต่ละตัว และข้อมูลจีโนไทป์พร้อมกันในการวิเคราะห์โดยใช้ GEBV เป็นผลลัพธ์โดยตรง วิธีการนี้มีโมเดลเดียวกันกับ RR-TDM ยกเว้นการแทนที่ $\mathbf{A}$ ด้วย $\mathbf{H}$ ซึ่งเป็นการรวมเมตริกซ์ความสัมพันธ์เครือญาติทางพันธุ์ประวัติเข้ากับเมตริกซ์ความสัมพันธ์ทางจีโนม (genomic-based relationship matrices, $\mathbf{G}$) (Legarra et al., 2009) โดยสามารถเขียนในรูปผกผันดังนี้:

$$\mathbf{H}^{-1} = \mathbf{A}^{-1} + \begin{bmatrix} 0 & 0 \\ 0 & \tau \mathbf{G}^{-1} - \omega \mathbf{A}_{22}^{-1} \end{bmatrix} \quad (3)$$

เมื่อ $\mathbf{H}^{-1}$ คือเมตริกซ์ผกผันของความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่เอาเมตริกซ์ผกผันของความสัมพันธ์ทางจีโนม ($\mathbf{G}^{-1}$) รวมเข้ากับเมตริกซ์ผกผันของความสัมพันธ์เครือญาติทางพันธุ์ประวัติเฉพาะตัวสัตว์ที่มีข้อมูลจีโนไทป์ ($\mathbf{A}_{22}^{-1}$), $\mathbf{A}^{-1}$ คือเมตริกซ์ผกผันของความสัมพันธ์เครือญาติทางพันธุ์ประวัติ τ และ ω คือ ปัจจัยปรับ (weighting factors), $\mathbf{G}$ คือเมตริกซ์ของความสัมพันธ์ทางจีโนม (genomic relationship matrix) ที่สร้างตามวิธีการแรกของ VanRaden (2008) โดย $\mathbf{G} = 0.95 \frac{\mathbf{Z}\mathbf{Z}'}{2 \sum_{i=1}^m p_i(1-p_i)} + 0.05\mathbf{A}_{22}$ (เพื่อที่จะหลีกเลี่ยงปัญหา singularity) เมื่อ $\mathbf{Z}$ คือเมตริกซ์ของจีโนไทป์ที่ปรับตามความถี่ของอัลลีลแล้ว โดย $\mathbf{Z} = \mathbf{M} - \mathbf{P}$, $\mathbf{M}$ คือ centered genotypes (เช่น -1, 0, และ 1 ที่เป็นตัวแทนของ AA, Aa, และ aa, ตามลำดับ), $\mathbf{P}$ คือความถี่ของอัลลีลสำหรับ SNPs i (p_i) ในคอลัมน์ที่ i ที่แสดงตาม $2(p_i - 0.5)$, เมื่อ p_i คือความถี่ของอัลลีลที่โลกัส i และ m คือ จำนวนของ SNPs ทั้งหมด

ความแตกต่างระหว่าง $\mathbf{A}_{22}$ และ $\mathbf{G}$ อาจเกิดขึ้นหลายเหตุผลที่ควรพิจารณา เช่น ความไม่สมบูรณ์ของพันธุ์ประวัติ ความผิดพลาดของพันธุ์ประวัติ การกำหนดจีโนไทป์ที่ไม่ถูกต้อง และคุณภาพของจีโนไทป์ที่ไม่ดี อาจทำให้เกิดความแตกต่างดังกล่าว ส่งผลให้เกิดการมอดิตของค่าพันธุกรรมจีโนมสำหรับสัตว์ที่มีอายุน้อย เพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาดังกล่าว และควบคุมอคติของการ convergence จึงมีการกำหนดน้ำหนัก (ω) ให้แก่ $\mathbf{A}_{22}^{-1}$ และในการวิเคราะห์เบื้องต้นน้ำหนักของ $\omega = 0.50$ ให้ค่าอคติน้อยเนื่องจากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficients, $\mathbf{b}$) ของ de-regressed EBV เข้าใกล้ 1 ซึ่งมีความเหมาะสมกับประชากรที่ศึกษา

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. การประมาณองค์ประกอบความแปรปรวน และการทำนายค่าพันธุกรรม

องค์ประกอบความแปรปรวนของลักษณะที่ศึกษาถูกวิเคราะห์ด้วย RR-TDM แบบดั้งเดิมโดยใช้ชุดข้อมูลทั้งหมด และค่าองค์ประกอบความแปรปรวนที่ประมาณได้ในประชากรที่ศึกษานี้จะถูกใช้สำหรับทำนายค่าพันธุกรรมทั้งใน RR-TDM และ SS-RR-TDM โดยใช้โปรแกรม AIREMLF90 เพื่อประมาณองค์ประกอบความแปรปรวน และใช้โปรแกรม BLUPF90 เพื่อแก้สมการโมเดลแบบผสม (mixed model equation,

MME) (Misztal et al., 2018) ความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนจากการทำนาย (prediction error variance, PEV) ของสัมประสิทธิ์การถดถอยแบบสุ่มจะคำนวณได้ด้วยค่าผกผันของเมตริกซ์ด้านซ้ายของ MME จากโปรแกรม BLUPF90 ค่าพันธุกรรมของสัตว์แต่ละตัวจะถูกนำเสนอจากผลผลิตที่ 305 วัน โดยค่าพันธุกรรมที่ 305 วัน ได้กำหนดจากผลรวมของค่าพันธุกรรมระหว่างวันให้นมที่ 5 ถึง 305 สำหรับลักษณะปริมาณการให้ผลผลิตน้ำนมตามวิธีการของ Jamrozik et al. (1997) สำหรับลักษณะเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบน้ำนม (FP, PP และ PT) ผลรวมของค่าพันธุกรรมในรอบการให้นมจะถูกแทนที่ด้วยค่าเฉลี่ย

ค่าอัตราพันธุกรรมต่อวัน (h_d^2) สำหรับลักษณะปริมาณการให้ผลผลิตน้ำนม และลักษณะเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบน้ำนม คำนวณได้ดังนี้:

$$h_d^2 = \frac{\sigma_{a(d)}^2}{\sigma_{a(d)}^2 + \sigma_{htm}^2 + \sigma_{p(d)}^2 + \sigma_e^2} \quad (4)$$

เมื่อ $\sigma_{a(d)}^2$ และ $\sigma_{p(d)}^2$ เป็นความแปรปรวนและความแปรปรวนร่วม ((co)variances) ทางพันธุกรรม และสิ่งแวดล้อมแบบถาวรสำหรับแต่ละวัน ตามลำดับ

ค่าอัตราพันธุกรรมสำหรับลักษณะปริมาณการให้ผลผลิตน้ำนม และลักษณะเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบน้ำนม ที่ 305 วัน (h_{305d}^2) คำนวณได้ดังนี้:

$$h_{305d}^2 = \frac{\sigma_{a(305)}^2}{301\sigma_{htm}^2 + \sigma_{a(305)}^2 + \sigma_{p(305)}^2 + 301\sigma_e^2}, \quad \text{สำหรับลักษณะปริมาณการให้ผลผลิตน้ำนม} \quad (5)$$

$$h_{305d}^2 = \left(\frac{\sigma_{a(305)}^2}{\sigma_{htm}^2 + \sigma_{a(305)}^2 + \sigma_{p(305)}^2 + \sigma_e^2} \right) \quad \text{สำหรับลักษณะเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบน้ำนม} \quad (6)$$

เมื่อ $\sigma_{a(305)}^2$ และ $\sigma_{p(305)}^2$ สำหรับลักษณะปริมาณการให้ผลผลิตน้ำนม เป็นความแปรปรวนและความแปรปรวนร่วมทางพันธุกรรม และสิ่งแวดล้อมแบบถาวรที่รวมกันตั้งแต่วันให้นมที่ 5 ถึง 305 ตามลำดับ (Jamrozik and Schaeffer, 1997; Jakobsen et al., 2002) ส่วน $\sigma_{a(305)}^2$ และ $\sigma_{p(305)}^2$ สำหรับเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบน้ำนม เป็นค่าความแปรปรวนและความแปรปรวนร่วมทางพันธุกรรม และสิ่งแวดล้อมแบบถาวรเฉลี่ยตั้งแต่วันให้นมที่ 5 ถึง 305 ตามลำดับ

PEV ของค่าพันธุกรรมที่ 305 วันจะคำนวณตามฟังก์ชันของ PEV ของสัมประสิทธิ์การถดถอยแบบสุ่มและตัวแปรร่วมของ LPs (Mrode, 2014)

2. การตรวจสอบค่าพันธุกรรมจีโนมสำหรับพ่อโคที่อายุน้อย (การเปรียบเทียบวิธีการทำนายจากโมเดล RR-TDM กับ SS-RR-TDM)

การศึกษาครั้งนี้ได้ประเมินความสามารถในการทำนายค่าพันธุกรรมสำหรับพ่อโคที่มีอายุน้อย โดยใช้การตรวจสอบความแม่นยำกับข้อมูลที่ลดลง (cross-validation) ค่าการทำนายทางพันธุกรรมคือค่าเฉลี่ยของพ่อแม่ (PA) ใน RR-TDM และค่า GEBV ใน SS-RR-TDM พ่อโคที่ทำการตรวจสอบ (validation bulls) จะพิจารณาจากพ่อโคหนุ่มที่อายุน้อยในชุดข้อมูลที่ลดลงที่มีเฉพาะข้อมูลจีโนไทป์ และมีค่าความแม่นยำจากการทำนายค่า EBV สำหรับแต่ละลักษณะจากชุดข้อมูลทั้งหมดมากกว่า 75% พ่อโคที่ทำการตรวจสอบความ

แม่นยำมีจำนวนถึง 28 ตัว ดังแสดงใน Table 3 ในลำดับแรกนั้นจะคำนวณค่า EBV ที่ 305 วัน สำหรับพ่อโคที่ทำการตรวจสอบตาม RR-TDM โดยใช้ข้อมูลทั้งหมด จากนั้นจะสามารถคำนวณค่า de-regressed EBV (dEBV) สำหรับพ่อโคแต่ละตัวโดยใช้สูตรของ (VanRaden et al., 2009) ดังต่อไปนี้

$$dEBV = PA + \frac{EBV - PA}{R_{dEBV}^2} \quad (7)$$

โดยที่ R_{dEBV}^2 คือความเชื่อมั่นของค่า EBV ที่ไม่รวมการสนับสนุน (contribution) จากค่า EBV เฉลี่ยของพ่อแม่ (parent average, PA) โดยค่า dEBV จะถูกนำมาใช้เป็นเกณฑ์มาตรฐานในการตรวจสอบ จากนั้นเรากำหนดค่า GEBV (และ PA) ที่ 305 วัน สำหรับพ่อโคที่ทำการตรวจสอบแต่ละตัวจาก SS-RR-TDM (และ RR-TDM) โดยใช้ข้อมูลที่ลดลง ในการทดสอบความสามารถในการทำนายจะใช้เกณฑ์ 3 ข้อ ดังต่อไปนี้ คือ ความแม่นยำเชิงทฤษฎี (theoretical accuracy, r_t) ความแม่นยำเชิงการตรวจสอบ (validation accuracy, r_v) และความไม่อคติของการทำนาย (unbiasedness of prediction, b)

ความแม่นยำเชิงทฤษฎี (r_t) เป็นค่าความแม่นยำของสัตว์แต่ละตัวของค่า GEBV (และ PA) ที่ 305 วัน ที่คำนวณได้จาก PEV (Misztal and Wiggins, 1988):

$$r_t = \sqrt{1 - \frac{PEV}{\sigma_{a(305)}^2}} \quad (8)$$

เมื่อ $\sigma_{a(305)}^2$ เป็นค่าความแปรปรวนทางพันธุกรรมที่ประมาณได้จาก RR-TDM ตั้งแต่วันให้นมที่ 5 ถึง 305 PEV เป็นความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนจากการทำนายสำหรับสัตว์แต่ละตัว และแต่ละลักษณะ ซึ่งคำนวณได้จากค่ายกกำลังที่สองของค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SEP^2) จากโปรแกรม AIREMLF90 (Misztal et al., 2018) โดยเฉพาะอย่างยิ่งสำหรับการวิเคราะห์ด้วยโมเดลการถดถอยแบบสุ่ม ความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนจากการทำนายสำหรับสัตว์แต่ละตัวที่ i และแต่ละลักษณะตามวิธีการด้านล่าง:

$$PEV_i = \mathbf{z}_i' \mathbf{C}^{ii} \mathbf{z}_i \quad (9)$$

เมื่อ $\mathbf{z}_i$ เป็นเวกเตอร์ของ orthogonal covariates ที่เกี่ยวข้องกับฟังก์ชัน LPs และ $\mathbf{C}^{ii}$ เป็นเซตย่อยของการผกผันของ MME ที่สอดคล้องกับอิทธิพลของจีโนไทป์สำหรับสัตว์ i

ความแม่นยำเชิงการตรวจสอบ (r_v) เป็นค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของเพียร์สัน (Pearson correlation coefficient) ระหว่าง dEBV และ GEBV (หรือ PA) ที่ปรับด้วยรากที่สองของความเชื่อมั่นของ dEBV ($\sqrt{R_{dEBV}^2}$) ดังแสดงตามสมการด้านล่าง

$$r_v = \frac{\text{corr}(dEBV, GEBV \text{ or } PA)}{\sqrt{R_{dEBV}^2}} \quad (10)$$

ความไม่อคติของการทำนาย (b) เป็นค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยที่คำนวณตามโมเดลการถดถอยเชิงเส้นดังนี้:

$$dEBV = \mu + b(GEBV \text{ or } PA) + e \quad (11)$$

โดยที่ μ คือจุดตัด (intercept) และ e คือความคลาดเคลื่อน ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยที่มีค่าต่ำกว่าและสูงกว่า 1 บ่งชี้ว่า GEBV (หรือ PA) มีค่าสูงเกินจริง (inflation) และต่ำเกินจริง (deflation) ตามลำดับ ทั้งนี้การวิเคราะห์ด้วยวิธีการแบบขั้นตอนเดียว (SS-RR-TDM) นั้น จะมีการดำเนินการจำนวนสองครั้งสำหรับแต่ละชุดข้อมูลที่มีและไม่มีจีโนไทป์ของแมโค เพื่อเปรียบเทียบผลกระทบจากการมีส่วนร่วมของแมโคต่อการทำนายค่าพันธุกรรมจีโนม

ผลการทดลองและวิจารณ์

ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าอัตราพันธุกรรม

ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และค่าอัตราพันธุกรรม (ค่าเฉลี่ยรายวัน และในรอบการให้นมที่ 305 วันจากการวิเคราะห์ที่ละลักษณะด้วย RR-TDM) สำหรับลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมในรอบการให้นมแรกของประชากรโคนมไทยแสดงใน Table 2 ค่าเฉลี่ยของ TD-MY, TD-FY, TD-PY, TD-TY, TD-FP, TD-PP และ TD-TP มีค่าเท่ากับ 13.89 ± 4.53 กก. 0.49 ± 0.20 กก. 0.44 ± 0.14 กก. 1.69 ± 0.55 กก. 3.56 ± 0.96 %, 3.13 ± 0.39 % และ 12.12 ± 1.10 % ตามลำดับ โดยทั่วไปชุดข้อมูลที่ลดลงจะมีค่าเฉลี่ยของแต่ละลักษณะใกล้เคียงกับชุดข้อมูลทั้งหมด ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละลักษณะมีค่าความผันแปรเล็กน้อย ค่าอัตราพันธุกรรมโดยเฉลี่ยรายวันของทุกลักษณะอยู่ในระดับต่ำถึงปานกลาง โดยลักษณะปริมาณการให้ผลผลิตน้ำนม ($0.21 - 0.36$) ให้ค่าสูงกว่าองค์ประกอบน้ำนม ($0.10 - 0.16$) นอกจากนี้ค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะปริมาณการให้ผลผลิตน้ำนมในรอบการให้นมที่ 305 วันนั้นสูงกว่าค่าอัตราพันธุกรรมโดยเฉลี่ยต่อวันของลักษณะที่สอดคล้องกันโดยมีค่าอยู่ในช่วง $0.43 - 0.54$

ค่าอัตราพันธุกรรมโดยเฉลี่ยต่อวันที่ประเมินได้ของปริมาณน้ำนม และโปรตีนสูงกว่าไขมันซึ่งสอดคล้องกับผลของ Ben Zaabza et al. (2018) โดยเฉพาะอย่างยิ่งค่าอัตราพันธุกรรมของปริมาณน้ำนมในการศึกษา (0.35) ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.17 ถึง 0.41 (ไม่แสดง) ใกล้เคียงกับช่วงที่ได้รับจากโคนมเอธิโอเปีย ($0.32: 0.17 - 0.42$; Gebreyohannes et al., 2016) และโคนมไทย ($0.36: 0.29 - 0.44$; Buaban et al., 2020) ค่าอัตราพันธุกรรมโดยเฉลี่ยต่อวันนั้นมีค่าต่ำกว่าค่าอัตราพันธุกรรมที่ 305 วัน ซึ่งสาเหตุหนึ่งอาจเป็นผลมาจากการกำจัดความแปรปรวนของลักษณะที่แสดงออกภายในสัตว์โดยการรวบรวมข้อมูลในวันทดสอบหลายบันทึกไปเป็นข้อมูลที่ 305 วันบันทึกเดียว (Abdollahpour et al., 2013) องค์ประกอบของความผันแปรนี้สามารถเพิ่มความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนของโมเดลวันทดสอบได้อย่างมากหากอิทธิพลในโมเดลการวิเคราะห์ไม่ได้ถูกพิจารณา ด้วยเหตุผลนี้ในสถานการณ์ของภูมิอากาศที่หลากหลาย การเปลี่ยนแปลงด้านสิ่งแวดล้อม การจัดการและระบบการให้อาหาร เช่น ในประเทศไทย ลักษณะเกี่ยวกับไขมันในนมซึ่งสัตว์มีความไวสูงต่อปัจจัยเหล่านี้ โมเดลวันทดสอบจะให้ความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนมากกว่า และอัตราพันธุกรรมที่ต่ำกว่า ปัญหานี้อาจลดลงได้โดยการให้แหล่งข้อมูลใหม่ในโมเดลของการวิเคราะห์ เช่น คุณภาพอาหาร ซึ่งอาจอธิบายการเปลี่ยนแปลงภายในตัวสัตว์ หรือเกี่ยวข้องกับการจัดการกับฝูงสัตว์ที่คล้ายกันมากขึ้น (Abdollahpour et al., 2013) ความแตกต่างของค่าอัตราพันธุกรรมสำหรับลักษณะปริมาณการให้ผลผลิต

ทั้งหมดในการศึกษาต่างๆ อาจเป็นเพราะความแตกต่างของประชากร วิธีการวิเคราะห์ โมเดลที่ต่างกัน และอิทธิพลที่รวมอยู่ในโมเดล (Machado et al., 1999) นอกจากนี้ความแตกต่างอาจเกิดจากระบบการให้อาหาร และความเครียดจากความร้อนในประเทศไทยยังสามารถอธิบายค่าอัตราพันธุกรรมที่ตรงกันข้ามกันสำหรับปริมาณการให้ผลผลิต ฟาร์มโคนมของประเทศไทยมีการกระจายอยู่ทั่วทุกภูมิภาค แหล่งอาหารหายาสำหรับโคนมประกอบด้วยผลพลอยได้ทางการเกษตร ข้าวโพด หญ้า และฟางข้าว ในภาคเหนือ ภาคกลาง ตะวันตก และตะวันออก ตามลำดับ ส่วนใหญ่แล้วในประเทศไทยมีการให้อาหารแบบแยกส่วนมากที่สุด ภายใต้ระบบการให้อาหารนี้ เกษตรกรใช้อาหารชั้นสูงแตกต่างกันตามปริมาณและคุณภาพของอาหารหายาที่หาได้ง่าย นอกจากนี้ โคนมยังเลี้ยงในโรงเรือนเปิดซึ่งมีสภาพอากาศร้อนชื้นตลอดทั้งปี ดังนั้นโคนมจึงพยายามปรับตัวเพื่อให้ผลผลิตภายใต้ความหลากหลายของธรรมชาติของประเทศไทย เราอาจคาดการณ์ได้ว่าโคนมในเขตร้อนแสดงศักยภาพทางพันธุกรรมที่ต่างกัน (Buaban et al., 2020)

Table 2 Mean, standard deviation (SD), average daily heritability estimates (h_d^2), and 305-d heritability estimates (h_{305d}^2) of milk production traits in the data set used for genetic evaluation.

Traits ¹	Unit	Full data set				Reduced data set	
		Mean	SD	h_d^2	h_{305d}^2	Mean	SD
TD-MY	kg	13.89	4.53	0.35	0.49	13.35	4.44
TD-FY	kg	0.49	0.20	0.21	0.43	0.48	0.19
TD-PY	kg	0.44	0.14	0.36	0.54	0.42	0.15
TD-TY	kg	1.69	0.55	0.36	0.52	1.64	0.55
TD-FP	%	3.56	0.96	0.10	0.10	3.58	0.91
TD-PP	%	3.13	0.39	0.16	0.16	3.16	0.41
TD-TP	%	12.12	1.10	0.15	0.15	12.16	1.08

¹TD-MY =Test day-milk yield; TD-FY=Test day-fat yield; TD-PY=Test day-protein yield; TD-TY=Test day-total solid yield; TD-FP=Test day-fat percentage; TD-PP=Test day-protein percentage; TD-TP=Test day-total solid percentage.

การตรวจสอบค่าพันธุกรรมจีโนมสำหรับพ่อโคที่อายุน้อย

ความแม่นยำเชิงทฤษฎี

Table 3 แสดงค่าเฉลี่ยของความแม่นยำเชิงทฤษฎี (r_t) ของ PA จาก RR-TDM และ ค่าพันธุกรรม โดยการทำนายค่าพันธุกรรมจีโนม (GEBV) จาก SS-RR-TDM สำหรับประชากรที่ตรวจสอบความแม่นยำโดยใช้

ลักษณะปริมาณการให้ผลผลิตน้ำนม และองค์ประกอบน้ำนมที่ 305 วัน ซึ่งคำนวณจากการทำนายค่าพันธุกรรมจีโนมด้วยวิธีการถดถอยแบบสุ่มที่พิจารณาข้อมูลจีโนไทป์จากพ่อโคอย่างเดียว และจากทั้งพ่อโคและแม่โค

Table 3 Averages (SD) of theoretical accuracies of parent average (PA) from the pedigree-based RR-TDM and genomic estimated breeding value (GEBV) from SS-RR-TDM for the validation bulls using 305-d milk production and milk components, which were calculated from random regression methods considering genotype of only bulls and bulls and cows in genomic evaluation.

Traits ^{1/}	No. of validation bulls	PA	GEBV			
			Only Bulls		Bulls and Cows	
			r_t	Gain ^{3/}	r_t	Gain
305-d MY	28	0.51 (0.11)	0.71 (0.04)	0.20	0.73 (0.04)	0.22
305-d FY	23	0.48 (0.12)	0.70 (0.04)	0.22	0.72 (0.04)	0.24
305-d PY	28	0.51 (0.11)	0.71 (0.04)	0.20	0.73 (0.04)	0.22
305-d TY	28	0.50 (0.11)	0.71 (0.04)	0.20	0.73 (0.04)	0.23
average-FP	9	0.43 (0.15)	0.68 (0.05)	0.25	0.69 (0.05)	0.26
average-PP	25	0.48 (0.11)	0.70 (0.04)	0.22	0.72 (0.04)	0.24
average-TP	27	0.48 (0.11)	0.70 (0.04)	0.22	0.72 (0.04)	0.24
Mean		0.48	0.70	0.22	0.72	0.24

^{1/}305-d MY=305-d milk yield; 305-d FY=305-d fat yield; 305-d PY=305-d protein yield; 305-d TY=305-d total solid yield; average-FP=average fat percentage; average-PP=average protein percentage; average-TP=average total solid percentage.

^{2/} r_t = theoretical accuracy.

^{3/}Gain= r_t of GEBV - r_t of PA.

ความแม่นยำเชิงทฤษฎีในการทำนายค่าพันธุกรรมจีโนมทุกลักษณะที่พิจารณาจีโนไทป์ทั้งจากพ่อโคอย่างเดียวก และจากทั้งพ่อโคและแม่โคเปรียบเทียบกับ PA มีค่าเพิ่มขึ้น (gain) โดยเฉลี่ยเท่ากับ 0.22 และ 0.24 หรือประมาณร้อยละ 46 และ 50 ตามลำดับ โดยความแม่นยำเชิงทฤษฎีเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ย 0.02 จุด หรือประมาณร้อยละ 9.10 เมื่อทำนายค่าพันธุกรรมจีโนม (GEBV) โดยใช้ข้อมูลจีโนไทป์จากทั้งพ่อโคและแม่โคเปรียบเทียบกับสถานการณ์ที่มีพ่อโคเพียงอย่างเดียว

ความแม่นยำเชิงทฤษฎีแตกต่างกันไปตามค่าอัตราพันธุกรรมของแต่ละลักษณะ ลักษณะที่มีอัตราพันธุกรรมสูง (MY, PY และ TY) จะมีความแม่นยำเชิงทฤษฎีสูงขึ้นมากกว่าลักษณะที่มีค่าพันธุกรรมต่ำ (FP, PP และ TP) อย่างไรก็ตามลักษณะที่มีค่าอัตราพันธุกรรมต่ำมีแนวโน้มที่จะได้รับความแม่นยำเชิงทฤษฎีสำหรับการทำนายค่าพันธุกรรมจีโนมเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ PA ผลของการเพิ่มความแม่นยำเชิงทฤษฎีสำหรับทุกลักษณะสอดคล้องกับการศึกษาอื่น ๆ (VanRaden et al., 2009; Ding et al., 2013; Jattawa et al., 2016; Oliveira, 2019b) ซึ่งมีเหตุผลเกี่ยวข้องกับปริมาณข้อมูลที่มีอยู่ใน MME ดังนั้นการรวมเอาข้อมูลจีโนมซึ่งเป็นอีกแหล่งข้อมูลหนึ่งในการทำนายค่าพันธุกรรม GEBV ด้วย SS-RR-TDM ทำให้มีความแม่นยำเชิงทฤษฎีเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับ PA ที่ได้จาก RR-TDM โดยทั่วไปความแม่นยำเชิงทฤษฎีของ GEBV ที่ประเมินได้ในการศึกษานี้อยู่ในระดับปานกลางถึงสูง (0.68 - 0.73) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการลดลงของค่าอคติของการทำนาย (PEV) เนื่องจากการใช้วิธีการแบบขั้นตอนเดียว และเกณฑ์ที่ใช้ในการเลือกสัตว์รวมเข้าไประหว่างประชากรอ้างอิง และประชากรที่ตรวจสอบ ที่มีความแม่นยำสูง ผลของการศึกษานี้ยังแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่ตรงระหว่างความแม่นยำเชิงทฤษฎี และค่าอัตราพันธุกรรม ลักษณะที่มีค่าพันธุกรรมต่ำจะมีค่า EBV หรือ GEBV ที่มีความความแม่นยำต่ำสอดคล้องกับ Luan et al. (2009) ในโคนมสีแดงในกลุ่มประเทศนอร์ดิค สำหรับ FP ที่มีค่าความแม่นยำเชิงทฤษฎีที่ต่ำกว่านั้นเนื่องจากค่าอัตราพันธุกรรมที่ต่ำกว่า และมีสัตว์จำนวนน้อยกว่าในเมตริกซ์ **G** เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะอื่น ๆ ซึ่งสะท้อนถึงข้อมูลในการทำนายมีจำนวนน้อย และเป็นที่น่าทึ่งที่ทราบว่าหนึ่งในปัจจัยที่มีผลต่อความแม่นยำของ EBV หรือ GEBV คือจำนวนข้อมูลฟีโนไทป์ของลักษณะ (Hayes et al., 2009) ในการศึกษาครั้งนี้จำนวนข้อมูลฟีโนไทป์ที่ใช้ในการทำนายค่าพันธุกรรมสำหรับ FP นั้นน้อยกว่าลักษณะอื่น ๆ จึงทำให้ความแม่นยำของ EBV หรือ GEBV สำหรับ FP ที่ได้ต่ำกว่าลักษณะอื่น ๆ

ความแม่นยำเชิงการตรวจสอบ

Table 4 แสดงค่าเฉลี่ยของความแม่นยำเชิงการตรวจสอบของค่าเฉลี่ยพ่อแม่ (PA) จาก RR-TDM และค่าพันธุกรรมโดยการทำนายค่าพันธุกรรมจีโนม (GEBV) จาก SS-RR-TDM สำหรับประชากรที่ตรวจสอบความแม่นยำโดยใช้ลักษณะปริมาณการให้ผลผลิตน้ำนม และองค์ประกอบน้ำนมที่ 305 วัน ซึ่งคำนวณจากการทำนายค่าพันธุกรรมจีโนมด้วยวิธีการถดถอยแบบสุ่มที่พิจารณาข้อมูลจีโนไทป์จากพ่อโคอย่างเดียวก และจากทั้งพ่อโคและแม่โค โดยทั่วไปรากที่สองของความเชื่อมั่นเฉลี่ยของ $dEBV (r_{dEBV_{mean}})$ ของพ่อโคที่ตรวจสอบสำหรับแต่ละลักษณะอยู่ในช่วง 0.84 ถึง 0.88 สำหรับลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม ซึ่งมีแนวโน้มที่สอดคล้องตามค่าอัตราพันธุกรรมสำหรับแต่ละลักษณะ (ลักษณะที่มีค่าอัตราพันธุกรรมที่สูงกว่านั้นจะมีค่าความแม่นยำ

สูงกว่า) ความแม่นยำเชิงการตรวจสอบที่ประเมินได้สำหรับ GEBV โดยใช้ SS-RR-TDM มีค่าสูงกว่าที่ประเมินโดย PA โดยใช้ RR-TDM ในทุกลักษณะที่ศึกษา ความแม่นยำเชิงการตรวจสอบของ PA มีค่าอยู่ในช่วง 0.06-0.34 และ GEBV มีค่าอยู่ในช่วง 0.12-0.39 และ 0.22-0.40 สำหรับการใช้อัตราส่วนของข้อมูลจากพ่อโคอย่างเดียวก่อน และจากทั้งพ่อโคและแม่โค ตามลำดับ ความแม่นยำเชิงการตรวจสอบที่เพิ่มสูงขึ้นเมื่อวิเคราะห์ด้วย SS-RR-TDM จากการใช้อัตราส่วนของข้อมูลจากพ่อโคอย่างเดียวก่อน และจากทั้งพ่อโคและแม่โค เมื่อเปรียบเทียบกับ RR-TDM นั้นมีค่าโดยเฉลี่ยเพิ่มขึ้น 0.06 และ 0.13 จุด หรือประมาณร้อยละ 33.30 และ 72.2 ตามลำดับ (Table 4) โดยความแม่นยำเชิงการตรวจสอบเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ย 0.07 จุด เมื่อทำนายค่า GEBV โดยใช้ข้อมูลจากพ่อโคและแม่โคเปรียบเทียบกับสถานการณ์ที่มีพ่อโคเพียงอย่างเดียว

Table 4 Validation realized accuracies of parent average (PA) from the pedigree-based RR-TDM and genomic estimated breeding value (GEBV) from SS-RR-TDM for the validation bulls using 305-d milk production and milk components, which were calculated from random regression methods considering genotype of only bulls and bulls and cows in genomic evaluation.

Traits ^{1/}	No. of validation bulls	$r_{dEBV_{mean}}^{2/}$	PA	GEBV			
				Only Bulls		Bulls and Cows	
			$r_v^{3/}$	r_v	Gain ^{4/}	r_v	Gain
305-d MY	28	0.87	0.24	0.31	0.07	0.37	0.13
305-d FY	23	0.87	0.15	0.18	0.03	0.33	0.18
305-d PY	28	0.87	0.22	0.28	0.06	0.31	0.09
305-d TY	28	0.87	0.11	0.18	0.07	0.27	0.16
average-FP	9	0.88	0.06	0.12	0.06	0.22	0.16
average-PP	25	0.84	0.34	0.39	0.05	0.40	0.06
average-TP	27	0.85	0.15	0.25	0.10	0.25	0.10
Mean		0.86	0.18	0.24	0.06	0.31	0.13

^{1/}305-d MY=305-d milk yield; 305-d FY=305-d fat yield; 305-d PY=305-d protein yield; 305-d TY=305-d total solid yield; average-FP=average fat percentage; average-PP=average protein percentage; average-TP=average total solid percentage.

^{2/} $r_{dEBV_{mean}}$ = the average of the square root of the reliability of de-regressed proof for validation bulls (dEBV).

^{3/} r_v = validation accuracy.

^{4/}Gain= r_v of GEBV - r_v of PA.

การรวมเอาข้อมูลจีโนมในการทำนายค่าพันธุ์กรรมจีโนมด้วย SS-RR-TDM เพิ่มความแม่นยำเชิงการตรวจสอบของ GEBV สำหรับเกือบทุกลักษณะอาจเป็นเพราะ GEBV ยังคำนึงถึงเงื่อนไขการสืบทอดอย่าง Mendelian และเมตริกซ์ **H** เชื่อมโยงสัตว์ที่มีจีโนไทป์แต่ไม่มีฟีโนไทป์กับสัตว์ที่ไม่มีจีโนไทป์แต่มีฟีโนไทป์ ถ้ามีการเชื่อมโยงผ่านทางพันธุ์ประวัติ (Garcia et al, 2018) ดังนั้นจึงเป็นการประมาณค่าความดีเด่นทางพันธุ์กรรมของสัตว์ที่อายุน้อยซึ่งเป็นประโยชน์มากกว่าเมื่อเทียบกับ PA การค้นพบนี้สอดคล้องกับที่รายงานในการศึกษาอื่นๆ โดยใช้วิธีการแบบขั้นตอนเดียวกันเหมือนกันด้วยโมเดลในวันทดสอบการถดถอยแบบสุ่มหลายรอบการให้นมในการทำนายค่าพันธุ์กรรมจีโนมของโคนมสีแดงในกลุ่มประเทศนอร์ดิก (Koivula et al., 2015) และการทำนายค่าพันธุ์กรรมจีโนมแบบสองขั้นตอนในโคโฮลสไตน์ของแคนาดา (Oliveira et al., 2019b) แต่มีค่าความแม่นยำต่ำกว่า ปัจจัยสำคัญที่ทำให้ค่าความแม่นยำเชิงการตรวจสอบของการศึกษานี้แตกต่างจากการศึกษาอื่นนั้น ได้แก่ การมีประชากรอ้างอิงขนาดเล็ก และองค์ประกอบในแง่ของแม่โคส่วนใหญ่ที่มีความแม่นยำของข้อมูลฟีโนไทป์ต่ำกว่าพอโคทดสอบในขบวนการทดสอบลูกหลานในประเทศที่พัฒนาแล้ว

ความไม่อคติของการทำนาย

Table 5 แสดงค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยซึ่งเป็นตัวบ่งชี้วัดความไม่อคติของการทำนายค่าเฉลี่ยของพ่อแม่ (PA) โดยใช้ RR-TDM และค่าพันธุ์กรรมจีโนม (GEBV) โดยใช้ SS-RR-TDM สำหรับประชากรที่ตรวจสอบโดยใช้ลักษณะปริมาณการให้ผลผลิตน้ำนม และองค์ประกอบน้ำนมที่ 305 วัน ซึ่งคำนวณจากวิธีการถดถอยแบบสุ่มที่พิจารณาข้อมูลจีโนไทป์จากพ่อโคอย่างเดียว และจากทั้งพ่อโคและแม่โคในการทำนายค่าพันธุ์กรรมจีโนม

Table 5 Regression coefficients (b) and standard error (SE) of parent average (PA) from the pedigree-based RR-TDM and genomic estimated breeding value (GEBV) from SS-RR-TDM for the validation population using 305-d milk production and milk components, which were calculated from random regression methods considering genotype of only bulls and bulls and cows in genomic evaluation.

Traits ^{1/}	No. of validation bulls	PA		GEBV			
				Only Bulls		Bulls and Cows	
		b	SE	b	SE	b ₁	SE
305-d MY	28	0.23	0.21	0.45	0.31	0.47	0.27
305-d FY	23	0.19	0.31	0.33	0.45	0.58	0.42
305-d PY	28	0.18	0.18	0.32	0.26	0.35	0.24
305-d TY	28	0.21	0.21	0.43	0.31	0.45	0.27
average-FP	9	0.19	1.36	0.48	1.36	0.48	1.66
average-PP	25	0.54	0.38	0.67	0.39	0.75	0.43

Traits ^{1/}	No. of validation bulls	PA		GEBV			
				Only Bulls		Bulls and Cows	
average-TP	27	0.30	0.38	0.44	0.42	0.39	0.46
Mean		0.26		0.45		0.50	

^{1/}305-d MY=305-d milk yield; 305-d FY=305-d fat yield; 305-d PY=305-d protein yield; 305-d TY=305-d total solid yield; average-FP=average fat percentage; average-PP=average protein percentage; average-TP=average total solid percentage.

ตามหลักการแล้วค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยใกล้เคียง 1 จะบ่งชี้ว่าในการทำนายความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างสัตว์มีความไม่คลาดมาก ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของ PA สำหรับทุกลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม มีค่าอยู่ในช่วง 0.19 - 0.54 ในขณะที่ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของ GEBV มีค่าอยู่ในช่วง 0.32 - 0.67 และ 0.35 - 0.75 สำหรับการใช้ข้อมูลจีโนไทป์จากพ่อโคอย่างเดียวน และจากทั้งพ่อโคและแม่โคในการทำนายค่าพันธุกรรมจีโนม ตามลำดับ ในการศึกษาครั้งนี้สำหรับลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมมีค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของทั้ง GEBV และ PA ต่ำกว่า 1 ซึ่งบ่งชี้ว่าค่าทำนายที่ได้นั้นสูงเกินจริง ส่งผลให้การทำนายค่าพันธุกรรมของลูกโคนั้นได้เกินจริงเมื่อเทียบกับการแสดงออกของลูกโคเหล่านั้นในอนาคต แต่อย่างไรก็ตามค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยที่ได้จาก SS-RR-TDM ของลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมโดยเฉลี่ยมีค่าเข้าใกล้ 1 มากกว่า RR-TDM จากผลการศึกษาบ่งชี้ว่าการเปลี่ยนแปลงการทำนายแบบดั้งเดิมโดยใช้พันธุ์ประวัติ (PA) มาเป็นการทำนายค่าพันธุกรรมจีโนม (GEBV) จะช่วยเพิ่มความแม่นยำในการประมาณค่าพันธุกรรมให้ดีขึ้น เมื่อเปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของ GEBV ที่ประมาณได้ในการศึกษานี้กับการศึกษาอื่น ๆ ที่ใช้วิธีเดียวกัน (Koivula et al., 2015; Baba et al., 2017) และที่มีการปรับขนาดเพื่อรวมเมตริกซ์ความสัมพันธ์จีโนม (**G**) และเมตริกซ์ความสัมพันธ์ทางพันธุ์ประวัติ (**A**) ซึ่งทำให้ความไม่คลาดสูงขึ้นเช่นเดียวกัน (Christensen et al., 2012; Koivula et al., 2015) แต่การศึกษานี้มีจำนวนข้อมูลเนื่องจากพ่อโคที่ใช้ในการตรวจสอบความแม่นยำน้อย ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของ GEBV ที่ประมาณได้จึงไม่ใกล้เคียงกับ 1 หากประชากรอ้างอิงที่มีขนาดใหญ่ขึ้นน่าจะส่งผลให้ความแม่นยำในการทำนายเพิ่มขึ้น และสามารถเพิ่มความไม่คลาดได้ โดยรวมแล้ว SS-RR-TDM มีประสิทธิภาพเหนือกว่า RR-TDM ในแง่ความแม่นยำเชิงทฤษฎี ความแม่นยำเชิงการตรวจสอบและความไม่คลาด (สัมประสิทธิ์การถดถอย, b_1) โมเดล RR-TDM ใช้ข้อมูลพันธุ์ประวัติ ดังนั้นความแม่นยำที่ได้ นั้นมาจากเพียงความสัมพันธ์ทางพันธุ์ประวัติ (**A**) ระหว่างสัตว์แต่ละตัว โมเดล SS-RR-TDM ใช้ข้อมูลจีโนมร่วมด้วย ดังนั้นความแม่นยำที่ได้เพิ่มขึ้นมาจากทั้งความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (**G**) ที่เพิ่มขึ้นระหว่างสัตว์แต่ละตัวและจากความเชื่อมโยงแบบไม่สมดุลของเครื่องหมายทางพันธุกรรม (linkage disequilibrium, LD) นอกจากนี้การใช้เมตริกซ์ **H** ใน SS-RR-TDM เทียบเท่ากับการกำหนดจีโนไทป์ที่หายไปของสัตว์แต่ละตัวที่มีฟีโนไทป์แต่ไม่มีข้อมูลจีโนไทป์ และทำให้ชุดข้อมูลอ้างอิงมีขนาดใหญ่ขึ้น ดังนั้น SS-RR-TDM จึงให้ความแม่นยำที่สูงขึ้น แสดงให้เห็นว่าการใช้ GEBV ที่ได้จากวิธีการแบบขั้นตอนเดียวด้วยโมเดลการถดถอยแบบผสมจึงเป็นค่า

การทำนายที่เข้าใจลึกซึ้งความเป็นจริงมากกว่าและมีประสิทธิภาพในการทำนายค่าพันธุกรรมจีโนมสำหรับทุกลักษณะในโคนมไทย

ผลกระทบจากการมีส่วนร่วมของแม่โคกับการทำนายค่าพันธุกรรมจีโนม

โดยรวมแล้วค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมสำหรับการทำนายค่า GEV ที่ใช้เฉพาะจีโนไทป์พ่อโคอย่างเดียว และจีโนไทป์ของทั้งพ่อโคและแม่โคมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.45 และ 0.50 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาค่าการทำนายที่ได้รับจาก SS-RR-TDM โดยการเพิ่มข้อมูลจีโนไทป์ของแม่โคแสดงให้เห็นว่ามีความแม่นยำเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ย 0.02 และ 0.07 จุด สำหรับความแม่นยำเชิงทฤษฎี และความแม่นยำเชิงการตรวจสอบ ตามลำดับ เมื่อเทียบกับการใช้ข้อมูลจีโนไทป์ของพ่อโคอย่างเดียว ซึ่งชี้ให้เห็นว่าการใช้จีโนไทป์ของทั้งพ่อโคและแม่โคในการในการทำนายมีความไม่อคติมากกว่าการใช้จีโนไทป์พ่อโคอย่างเดียว การทำนาย GEV ที่เกินจริงมีแนวโน้มลดลงเมื่อมีการใช้ข้อมูลจีโนไทป์ของแม่โคร่วมในการทำนาย (Tables 3 และ 4) ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการเพิ่มจำนวนของข้อมูลที่มีอยู่สำหรับการวิเคราะห์ หรือเกี่ยวข้องกันกับค่า EBV ที่ได้รับจากแม่โคมีความน่าเชื่อถือ (Uemoto et al., 2017) ในประชากรอ้างอิงจำเป็นต้องมีค่า EBV ที่น่าเชื่อถือสำหรับใช้ในประมาณอิทธิพลของเครื่องหมายทางพันธุกรรม หรือการทำนายค่า GEV ได้อย่างถูกต้อง ขณะที่ในประชากรที่ตรวจสอบจำเป็นต้องมีรายละเอียดของข้อมูลที่น่าเชื่อถือสำหรับการตรวจสอบ GEV ได้อย่างถูกต้อง โดยทั่วไปแม่โค 3-10 ตัว ที่มีจีโนไทป์จะให้รายละเอียดของข้อมูลเท่ากับพ่อโคที่ผ่านการทดสอบแล้วเพียง 1 ตัว ขึ้นอยู่กับค่าอัตราพันธุกรรมของแต่ละลักษณะ (Boichard et al., 2015; Weller, 2016) การค้นพบที่ได้ในครั้งนี้น่าสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มแม่โคในประชากรอ้างอิงช่วยเพิ่มความแม่นยำเชิงทฤษฎี (Gao et al., 2015; Su et al., 2016; Oliveira et al., 2019b) และความแม่นยำเชิงตรวจสอบ (Tsuruta et al., 2013; Koivula et al., 2014; Cooper et al., 2015; Uemoto et al., 2017) อย่างมีนัยสำคัญ แต่มีงานวิจัยบางฉบับที่ให้ผลตรงกันข้าม (Baba et al., 2017; Olivera et al., 2019b) อย่างไรก็ตามค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยที่ได้ในการศึกษานี้มีค่าน้อยกว่า 1 มาก ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาอื่น ๆ ที่ใช้ SS-RR-TDM (Koivula et al., 2015; Baba et al., 2017) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการมีพ่อพันธุ์อยู่อย่างจำกัดจึงไม่สามารถเก็บตัวอย่างของพ่อพันธุ์โดยสุ่มเพื่อตรวจจีโนไทป์ (Mäntysaari et al., 2010) มีข้อมูลสัตว์ที่จีโนไทป์น้อย (Legarra and Reverter, 2018) และความเข้ากันไม่ได้ (incompatibility) ระหว่าง **G** และ **A₂₂** (ความแตกต่างโดยเฉลี่ยขององค์ประกอบระหว่างเมทริกซ์ทั้งสอง) (Misztal et al., 2017) ความเข้ากันไม่ได้ อาจเกิดจาก **A₂₂** ไม่สมบูรณ์เนื่องจากพันธุ์ประวัติที่ขาดหายไป (Misztal et al., 2017) แม้ว่าค่า GEV ที่ทำนายได้จะมีค่าสูงเกินจริง แต่เรายังคงสามารถจัดอันดับสัตว์เพื่อคัดเลือกสัตว์ที่มีจีโนไทป์และอายุยังน้อยได้โดยพิจารณาจากค่า GEV แม้ว่าเราจะไม่สามารถทำนายแนวโน้มทางพันธุกรรมในอนาคตของพ่อพันธุ์ได้อย่างแม่นยำ หรือเปรียบเทียบพ่อโคหนุ่มที่จะคัดเลือก (young candidate bulls) กับพ่อพันธุ์ที่ผ่านการพิสูจน์แล้วได้เนื่องจาก GEV ที่มีค่าสูงเกินจริง แต่หากเพิ่มจำนวนสัตว์ที่ใช้ในการทดสอบความถูกต้องมากขึ้นจะทำให้การทำนาย GEV ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับความเป็นจริงในอนาคต ปัจจุบันนี้การทำนายค่าพันธุกรรมจีโนมโดยทั่วไปสำหรับโคนมสายพันธุ์โฮลสไตน์ได้รวมเอาเฉพาะพ่อโคเพียงอย่างเดียวทั้งในประชากรอ้างอิงและ

ประชากรที่ตรวจสอบ เนื่องจากมีความซับซ้อนและกังวลเกี่ยวกับอคติในการทำนายแม่โค การเพิ่มความแม่นยำในการรวมจีโนไทป์ของแม่โคในประชากรอ้างอิงอาจขึ้นอยู่กับวิธีการวิเคราะห์ การใช้โมเดลแบบหลายลักษณะพร้อมกันช่วยเพิ่มความแม่นยำของลักษณะที่มีจำนวนข้อมูลที่จำกัด (Guo et al. 2014; Bauer et al. 2015) นอกจากนี้การวิเคราะห์โดยใช้วิธีการแบบขั้นตอนเดียวจะเพิ่มความแม่นยำของค่า GEBV และเพิ่มความไม่อคติเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการทำนายอื่น ๆ (Uemoto et al., 2017)

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าโมเดล SS-RR-TDM มีความเป็นไปได้ที่จะนำไปใช้ในการทำนายค่าพันธุ์กรรมจีโนมสำหรับลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมในประเทศไทย ซึ่งเป็นวิธีที่รวมข้อมูลฟีโนไทป์เข้ากับข้อมูลจีโนไทป์โดยตรง ทำให้ได้ค่า GEBV ที่มีความแม่นยำสูงขึ้น เนื่องจากปัจจุบันจำนวนของพ่อโคที่มีจีโนไทป์มีค่อนข้างน้อยทำให้การสร้างเมตริกซ์ **G** ผกผันทำได้ง่าย แต่ในอนาคตเมื่อมีจำนวนของพ่อโคที่มีจีโนไทป์มากขึ้น การสร้างเมตริกซ์ **G** ผกผันอาจทำได้ยากขึ้น จึงมีการเสนออัลกอริทึมเพื่อแก้ปัญหา โดย Legarra and Ducrocq (2012) และ Liu et al. (2013) ซึ่งทำให้ โมเดล SS-RR-TDM ถูกนำไปใช้อย่างกว้างขวาง

สรุปผลการทดลอง

การทำนายค่าพันธุ์กรรมจีโนมด้วยการใช้ข้อมูลจีโนมร่วมกับข้อมูลฟีโนไทป์ และข้อมูลพันธุ์ประวัติโดยใช้วิธีการแบบขั้นตอนเดียวด้วยโมเดลวันทดสอบการถดถอยแบบสุ่ม (SS-RR-TDM) ให้ทั้งความแม่นยำเชิงทฤษฎีและความแม่นยำเชิงการตรวจสอบที่สูงกว่า และมีความไม่อคติที่สูงกว่าการทำนายค่าพันธุ์กรรมด้วยการใช้ข้อมูลฟีโนไทป์ และข้อมูลพันธุ์ประวัติโดยใช้โมเดลวันทดสอบการถดถอยแบบสุ่มแบบดั้งเดิม (RR-TDM) สำหรับการทำนายพ่อโคที่อายุยังน้อยทุกลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม การใช้จีโนไทป์พ่อโคเพียงอย่างเดียวในการทำนายค่าพันธุ์กรรม SS-RR-TDM ให้ค่าความแม่นยำเชิงทฤษฎี และความแม่นยำเชิงการตรวจสอบเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ย 0.22 และ 0.06 จุด ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ RR-TDM ขณะที่การนำเอาข้อมูลจีโนไทป์ของแม่โคมาร่วมใช้ในการทำนายค่าพันธุ์กรรมจีโนมมีผลทำให้ความแม่นยำเชิงทฤษฎี และความแม่นยำเชิงการตรวจสอบเพิ่มขึ้นอีกโดยเฉลี่ย 0.02 และ 0.07 จุดตามลำดับ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยที่ได้จาก SS-RR-TDM มีค่าเข้าใกล้ 1 มากกว่า RR-TDM และการทำนาย GEBV ที่เกินจริงมีแนวโน้มลดลงเมื่อมีการใช้ข้อมูลจีโนไทป์ของแม่โคร่วมในการทำนาย ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้ช่วยยืนยันความเป็นไปได้ในการใช้ SS-RR-TDM ในการทำนายค่าพันธุ์กรรมจีโนมสำหรับลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมของโคนมไทยในอนาคต และควรใช้ข้อมูลจีโนไทป์ของทั้งพ่อโคและแม่โคในการทำนายพันธุ์กรรมจีโนมในประชากรโคนมไทยซึ่งมีพ่อโคจำนวนน้อยที่ผ่านการทดสอบด้วยข้อมูลของลูกสาวแล้ว รวมทั้งเพิ่มจำนวนแม่โคที่มีจีโนไทป์เพื่อเพิ่มความแม่นยำของค่า GEBV สำหรับใช้ในการคัดเลือก

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาครั้งนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการ “การประเมินพันธุ์กรรมจีโนมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์กรรมของโคนมพันธุ์โฮลส์ไตน์ในประเทศไทย” ซึ่งเป็นความร่วมมือระหว่างสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ และมหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยได้รับงบประมาณสนับสนุนส่วนหนึ่งจากสำนักงานพัฒนาการวิจัย

การเกษตร ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์สำหรับการจัดหาข้อมูลจีโนมไทป์และข้อมูลผลผลิตในวันทดสอบ

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. 2556. สมุดพ่อพันธุ์กรมปศุสัตว์ 2556. สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ พิมพ์ที่ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย 69 หน้า. ค้นเมื่อ 15 ธันวาคม 2020. แหล่งข้อมูล: http://biotech.dld.go.th/webnew/Data/Sire_Summary/2556/Sire_Summary2556.pdf.
- กรมปศุสัตว์. 2562. สมุดพ่อพันธุ์กรมปศุสัตว์ 2562. สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ พิมพ์ที่ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย 69 หน้า. ค้นเมื่อ 15 ธันวาคม 2020. แหล่งข้อมูล: http://biotech.dld.go.th/webnew/Data/Sire_Summary/2562/Sire_Summary2562.pdf.
- Abdullahpour, R., M. M. Shahrababak, A. Nejati-Javaremi, R. V. Torshizi, and R. Mrode. 2013. Genetic analysis of milk yield, fat and protein content in Holstein dairy cows in Iran: Legendre polynomials random regression model applied. *Arch. Tierzucht.* 56:497–508.
- Baba, T., Y. Gotoh, S. Yamaguchi, S. Nakagawa, H. Abe, Y. Masuda, and T. Kawahara. 2017. Application of single-step genomic best linear unbiased prediction with a multiple-lactation random regression test-day model for Japanese Holsteins. *Anim. Sci. J.* 88:1226–1231. (Nihon Chikusan Gakkaiho).
- Bauer, J., J. Pribyl, and L. Vostrý. 2015. Short communication: Reliability of single-step genomic BLUP breeding values by multi-trait test-day model analysis. *J. Dairy Sci.* 98:4999–5003.
- Ben Zaabza, H., A. Ben Gara, and B. Rekik. 2018. Genetic analysis of milk production traits of Tunisian Holsteins using random regression test-day model with Legendre polynomials. *Asian-Australas. J. Anim. Sci.* 31:636–642.
- Boichard, D., V. Ducrocq, and S. Fritz. 2015. Sustainable dairy cattle selection in the genomic era. Invited review. *J. Anim. Breed. Genet.* 132: 135–143.
- Buaban, S. and J. Sanpote. 2010. Comparison of breeding values predicted with lactation model and test-day model in crossbred dairy cattle. *J. Biotec. Lives. Prod.* 5:33–59.
- Buaban, S., S. Puangdee, M. Duangjinda, and W. Boonkum. 2020. Estimation of genetic parameters and trends for production traits of dairy cattle in Thailand using a multiple-trait multiple-lactation test day model. *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 33:1387-1399.
- Christensen, O. F., P. Madsen, B. Nielsen, T. Ostensen, and G. Su. 2012. Single-step methods for genomic evaluation in pigs. *Animal.* 6:1565–1571.

- Cooper, T. A., G. R. Wiggins, and P. M. VanRaden. 2015. Short communication: Analysis of genomic predictor population for Holstein dairy cattle in the United States-Effects of sex and age. *J. Dairy Sci.* 98:2785–2788.
- Ding, X., Z. Zhang, X. Li, S. Wang, X. Wu, and D. Sun. 2013. Accuracy of genomic prediction for milk production traits in the Chinese Holstein Population using reference population consisting of cows. *J. Dairy Sci.* 96:5315–5323.
- Doublet, A. C., P. Croiseau, S. Fritz, A. Michenet, C. Hozé, C. Danchin-Burge, D. Laloë, and G. Restoux. 2019. The impact of genomic selection on genetic diversity and genetic gain in three french dairy cattle breeds. *Genet. Sel. Evol.* 51:52.
- Gao, H., P. Madsen, U. Nielsen, G. Aamand, G. Su, K. Byskov, and J. Jensen. 2015. Including different groups of genotyped females for genomic prediction in a Nordic Jersey population. *J. Dairy Sci.* 98: 9051–9059.
- Garcia, A. L. S., B. Bosworth, G. Waldbieser, I. Misztal, S. Tsuruta, and D. A. L. Lourenco. 2018. Development of genomic predictions for harvest and carcass weight in channel catfish. *Genet. Sel. Evol.* 50:66.
- Gebreyohannes, G., S. Koonawootrittriron, M. A. Elzo, T. Suwanasopee. 2016. Estimation of genetic parameters using a random regression monthly test-day model in an Ethiopian dairy cattle population. *Agric. Nat. Resour.* 50:64–70.
- Gengler, N., A. Tijani, G. R. Wiggins, and I. Misztal. 1999. Estimation of (co)variances function coefficient for test-day yield with expectation-maximization restricted maximum likelihood algorithm. *J. Dairy Sci.* 82:1849.e1-1849.e23.
- Hayes, B. J., P. J. Bowman, A. Chamberlain, and M. Goddard. 2009. Invited review: Genomic
- Hayes, B. J., P. J. Bowman, A. Chamberlain, and M. Goddard. 2009. Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. *J. Dairy Sci.* 92:433–443.
- Henderson, C. R. 1984. Applications of linear models in animal breeding, University of Guelph, 462 p.
- Jakobsen, J. H., P. Madsen, J. Jensen, J. Pedersen, L. Christensen, and D. Sorensen. 2002. Genetic parameters for milk production and persistency for danish Holsteins estimated in random regression models using REML. *J. Dairy Sci.* 85:1607–1616.

- Jamrozik, J., and L. Schaeffer. 1997. Estimates of genetic parameters for a test day model with random regressions for yield traits of first lactation Holsteins. *J. Dairy Sci.* 80:762–770.
- Jamrozik, J., L. Schaeffer, and J. Dekkers. 1997. Genetic evaluation of dairy cattle using test day yields and random regression model. *J. Dairy Sci.* 80:1217–1226.
- Jattawa, D., M. A. Elzo, S. Koonawootrittriron, and T. Suwanasopee. 2016. Genomic-polygenic and polygenic evaluations for milk yield and fat percentage using random regression models with Legendre polynomials in a Thai multibreed dairy population. *Livest.. Sci.* 188: 133–141.
- Jattawa, D., M. A. Elzo, S. Koonawootrittriron, and T. Suwanasopee. 2016. Genomic-polygenic and polygenic evaluations for milk yield and fat percentage using random regression models with Legendre polynomials in a Thai multibreed dairy population. *Livest. Sci.* 188:133–141.
- Kang, H., L. Zhou, R. Mrode, Q. Zhang, and J. F. Liu. 2017. Incorporating the single-step strategy into a random regression model to enhance genomic prediction of longitudinal traits. *Heredity.* 119:459–467.
- Kistemaker, G. J. 1997. The comparison of random regression test day models and a 305-day for evaluation of milk yield in dairy cattle. PhD Thesis. University of Guelph, Guelph, ON, Canada.
- Koivula M., I. Strandén, J. Poso, G. P. Aamand, and E. A. Mantysaari. 2015. Single-step genomic evaluation using multitrait random regression model and test-day data. *J Dairy Sci.* 98:2775–2784.
- Koivula, M., I. Strandén, G. P. Aamand, and E. A. Mäntysaari. 2014. Effect of cow reference group on validation accuracy of genomic evaluation. In *Proceedings, 10th world congress of genetics applied to livestock production*. [Vancouver].
- Konstantinov, K. V., G. J. Nieuwhof and T. P. Hancock. 2015. Implementation of multiple traits multi lactation random regression test day model for production traits in Australia. *Interbull Bull.* 49:117–126.

- Legarra, A., and A. Reverter. 2018. Semi-parametric estimates of population accuracy and bias of predictions of breeding values and future phenotypes using the LR method. *Genet. Sel. Evol.* 50:53.
- Legarra, A., and V. Ducrocq. 2012. Computational strategies for national integration of phenotypic, genomic, and pedigree data in a single-step best linear unbiased prediction. *J. Dairy Sci.* 95:4629–4645.
- Legarra, A., I. Aguilar, and I. Misztal. 2009. A relationship matrix including full pedigree and genomic information. *J. Dairy Sci.* 92:4656–4663.
- Liu, R., Y. Sun, G. Zhao, F. Wang, D. Wu, M. Zheng, J. Chen, L. Zhang, Y. Hu, and J. Wen. 2013. Genome-wide association study identifies loci and candidate genes for body composition and meat quality traits in Beijing-You chickens. *PLoS ONE* 8:e61172.
- Luan, T., J. A. Woolliams, S., M. Kent, M. Svendsen, and T. H. Meuwissen. 2009. The accuracy of Genomic Selection in Norwegian red cattle assessed by cross-validation. *Genetics*, 183:1119–1126.
- Machado, S. G., M. A. R. Freitas, and C. H. Gadini. 1999. Genetic parameters of test day milk yields of Holstein cows. *Genet. Mol. Biol.* 22:383–386.
- Mäntysaari, E., Z. Liu, and P. VanRaden. 2010. Interbull validation test for genomic evaluations. *Interbull bull.* 17–22.
- Misztal, I. and G. R. Wiggans. 1988. Approximation of Prediction Error Variance in Large-Scale Animal Models. *J. Dairy Sci.* 71:27–32.
- Misztal, I., A. Legarra, and I. Aguilar. 2009. Computing procedures for genetic evaluation including phenotypic, full pedigree, and genomic information. *J. Dairy Sci.* 92:4648–4655.
- Misztal, I., D. Lourenco, and A. Legarra. 2020. Current status of genomic evaluation. *J Anim. Sci.* 98:1–14.
- Misztal, I., H. L. Bradford, D.A.L. Lourenco, S. Tsuruta, Y. Masuda, A. Legarra, and T.J. Lawlor. 2017. Studies on inflation of GEBV in single-step GBLUP for type. *Interbull bull.* 51: 38–42.
- Misztal, I., S. Tsuruta, D. Lourenco, Y. Masuda, I. Aguilar, A. Legarra, and Z. Vitezica. 2018. Manual for blupf90 family of programs. University of Georgia. [Cited 1 February 2020]. Available

- fromURL:https://www.researchgate.net/publication/331812692_Manual_for_BLUPF90family_of_programs.
- Mrode, R. A. 2014. Linear models for the prediction of animal breeding values, 3rd edition. Wallingford, United Kingdom. CAB International. 360 p.
- Oliveira, H. R., L. F. Brito, D. A. L. Lourenco, F. F. Silva, J. Jamrozik, L. R. Schaeffer, and F. S. Schenkel. 2019a. Invited review: Advances and applications of random regression models: From quantitative genetics to genomics. *J. Dairy Sci.* 102:7664–7683.
- Oliveira, H. R., L. F. Brito, F. F. Silva, D. A. L. Lourenco, J. Jamrozik, and F. S. Schenkel. 2019b. Genomic prediction of lactation curves for milk, fat, protein, and somatic cell score in Holstein cattle. *J. Dairy Sci.* 102:452–463.
- Seegers, H., C. Fourichon, and F. Beaudeau. 2003. Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds. *Vet. Res.* 34:475–491.
- Silva, M. V. B., D. J. A. dos Santos, S. A. Boison, A. T. H. Utsunomiya, A. S. Carmo, T. S. Sonstegard, J. B. Cole, and C. P. Van Tassell. 2014. The development of genomics applied to dairy breeding. *Livest. Sci.* 166:66–75.
- Snelling, W. M., R. A. Cushman, J. W. Keele, C. Maltecca, M. G. Thomas, and M. R. S Fortes, A. Reverter. 2013. Breeding and genetics symposium: networks and pathways to guide genomic selection. *J. Anim. Sci.* 91:537–552.
- Su, G. M. P., U. S. Nielsen, G. P. Aamand, G. Wiggans, and B. Guldbrandtsen. 2016. Sharing referenced data and including cows in the reference population improve genomic predictions in Danish Jersey. *Animal.* 10:1067–1075.
- Tsuruta, S., I. Misztal, and T. J. Lawlor. 2013. Short communication: Genomic evaluations of final score for US Holsteins benefit from the inclusion of genotypes on cows. *J. Dairy Sci.* 96:3332–3335.
- Uemoto, Y., T. Osawa, and J. Saburi. 2017. Effect of genotyped cows in the reference population on the genomic evaluation of Holstein cattle. *Animal.* 11:382–393.
- VanRaden, P. 2020. Symposium review: How to implement genomic selection. *J. Dairy Sci.* 103:5291–5301.

- VanRaden, P. M. 2008. Efficient methods to compute genomic predictions. *J. Dairy Sci.* 91:4414–4423.
- VanRaden, P. M., C. P. Van Tassel, G. R. Wiggans, T. S. Sonstegard, R. D. Schnabel, J. F. Taylor, and F.S. Schenkel. 2009. Invited review: Reliability of genomic predictions for North American Holstein bulls. *J. Dairy Sci.* 92:16–24.
- Weller, J. I. 2016. *Genomic Selection in Animals*. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, NJ. 192 p.

ผลของการผสมเทียมแพะแบบลาพาโรสโคปิกในแม่แพะตัวให้ต่อจำนวนและคุณภาพของตัวอ่อน

อรุณ จันทรกระจ่าง^{1/} อนนท เทืองสันเทียะ^{2/} วิศิษฐ์ ทองเที่ยง^{3/} พิงค์ลานนา ภูษธร^{4/}

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผสมเทียมแบบลาพาโรสโคปิกในแม่แพะตัวให้ต่อจำนวนและคุณภาพของตัวอ่อนในกระบวนการผลิตตัวอ่อน ในแม่แพะพันธุ์บอร์ที่เคยให้ลูกมาแล้วอย่างน้อย 1 ตัว อายุระหว่าง 2-3 ปี ร่างกายสมบูรณ์แข็งแรง มีระบบสืบพันธุ์และรอบการเป็นสัดปกติ จำนวน 50 ตัว โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 25 ตัว กลุ่มแรกเป็นกลุ่มควบคุมซึ่งผสมพันธุ์ตามธรรมชาติโดยใช้พ่อพันธุ์ กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มทดลองซึ่งผสมพันธุ์ด้วยวิธีการผสมเทียมแบบลาพาโรสโคปิก และชะล้างเก็บตัวอ่อนภายหลังการผสมพันธุ์ 7 วัน ด้วยวิธีการผ่าตัด พบว่ากลุ่มแม่แพะตัวให้ที่ผสมพันธุ์ตามธรรมชาติโดยใช้พ่อพันธุ์ มีจำนวนไข่และตัวอ่อนที่เก็บได้ และจำนวนไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ มีค่าเฉลี่ย (Means±SD) เท่ากับ 17.34 ± 5.47 และ 9.63 ± 7.23 ใบ/ตัว และอัตราการปฏิสนธิมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 56.34 ± 36.31 ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.5$) กับกลุ่มแม่แพะตัวให้ที่ผสมพันธุ์ด้วยวิธีการผสมเทียมแบบลาพาโรสโคปิก ซึ่งมีจำนวนไข่และตัวอ่อนที่เก็บได้ และจำนวนไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 14.16 ± 6.40 และ 6.50 ± 5.39 ใบ/ตัว และอัตราการปฏิสนธิมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 49.89 ± 42.79 และคุณภาพตัวอ่อนเกรด A B C D และไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิหรือเสื่อมสภาพในกลุ่มที่ผสมพันธุ์ตามธรรมชาติโดยใช้พ่อพันธุ์มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6.54 ± 3.80 3.37 ± 3.60 0.65 ± 1.13 0.23 ± 0.54 ตัวอ่อน/ตัว และ 7.32 ± 7.37 ใบ/ตัว ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.5$) กับกลุ่มที่ผสมพันธุ์ด้วยวิธีผสมเทียมแบบลาพาโรสโคปิก ซึ่งมีจำนวนตัวอ่อนคุณภาพเกรด A B C D และไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิหรือเสื่อมสภาพ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.67 ± 0.81 2.66 ± 2.65 1.34 ± 2.42 0.50 ± 1.23 ตัวอ่อน/ตัว และ 7.67 ± 8.61 ใบ/ตัว ตามลำดับ สรุปได้ว่าการผสมเทียมด้วยวิธีลาพาโรสโคปิกในแม่แพะตัวให้ในกระบวนการผลิตตัวอ่อนมีผลทำให้จำนวนและคุณภาพตัวอ่อนที่ได้ไม่แตกต่างกับการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติโดยใช้พ่อพันธุ์ ดังนั้นการผลิตตัวอ่อนเพื่อกระจายพันธุ์กรรมแพะพันธุ์ดีสู่ฟาร์มเกษตรกรสามารถเลือกใช้วิธีการผสมพันธุ์ได้ทั้ง 2 วิธีโดยมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกัน

คำสำคัญ : กระตุ้นการตกไข่หลายใบ ตัวให้ ตัวอ่อน แพะ ผสมเทียมแบบลาพาโรสโคปิก

เลขทะเบียนวิจัย : 61(1)-0208-022

^{1/}ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี อ.แก่งคอย จ. สระบุรี

^{2/}ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

^{3/}สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดตรัง อ.เมือง จ.ตรัง

^{4/}สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ อ.เมือง จ.ปทุมธานี

Result of laparoscopic AI in superovulation donor goat on amount and quality of embryo

Arun Chankrachang^{1/} Anone Thuangsanthia^{2/} Visid Tongtieng^{3/} Pinglanna Kunchorn^{4/}

Abstract

The objective of this study was to determine Laparoscopic artificial insemination in the donor Boar goat for the number and quality of embryos in the embryo production. In doe that had given 1 kid, aged between 2-3 years old, being healthy and strong. There were 50 does with normal reproductive systems and estrous cycles, divided into 2 groups of 25 individuals. The first group was a control group which natural service and the second group was an experimental group which Laparoscopic artificial insemination and flushed embryo 7 days after breeding using surgical methods. Total number of ova/embryos recovered, the number of ova fertilized and percent ova fertilized per doe flushed, in natural service, (Means $\pm$ SD) were 17.34 $\pm$ 5.47, 9.63 $\pm$ 7.23 and 56.34 $\pm$ 36.31, respectively, which was not statistically significant difference ($P>0.05$) with Laparoscopic artificial insemination group. In Laparoscopic artificial insemination, (Means $\pm$ SD) were 14.16 $\pm$ 6.40, 6.50 $\pm$ 5.39 and 49.89 $\pm$ 42.79, respectively. And embryos grade A, B, C, D and unfertilized ova /degenerated per doe flushed, in natural service, (Means $\pm$ SD) were 6.54 $\pm$ 3.80, 3.37 $\pm$ 3.60, 0.65 $\pm$ 1.13, 0.23 $\pm$ 0.54 and 7.32 $\pm$ 7.37, respectively, which were not statistically different ($P>0.05$) with Laparoscopic artificial insemination group. In Laparoscopic artificial insemination, (Means $\pm$ SD) were 5.67 $\pm$ 0.81, 2.66 $\pm$ 2.65, 1.34 $\pm$ 2.42, 0.50 $\pm$ 1.23 and 7.67 $\pm$ 8.61, respectively. It can be concluded that Laparoscopic artificial insemination in donor of embryo production process was effective. The number and quality of the embryo was not statistically different from natural service. Therefore, the production of embryo for distributing genetically produced goats to farms, farmers can choose both methods of breeding, with no difference in efficiency.

Keywords : superovulation, donor, embryo, goat, laparoscopic artificial insemination

Registered No.: 61(1)-0208-022

^{1/}Saraburi Biotechnology and Artificial Insemination Research Center, Keangkoi, Saraburi.

^{2/}Embryo Transfer Technology and Animal Germplasm Research Center, Pakchong, Nakornrachasima.

^{3/}Trang Provincial Livestock Office, Muang, Trang.

^{4/}Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Muang, Pathumthani.

คำนำ

ประเทศไทยมีการเลี้ยงแพะจำนวนเพิ่มมากขึ้นทุกปี จากปี 2561 มีแพะจำนวน 719,872 ตัว และเกษตรกรจำนวน 55,762 ราย ในปี 2563 มีจำนวนแพะเพิ่มเป็น 900,964 ตัว และมีเกษตรกรจำนวน 68,509 ราย (ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมปศุสัตว์, 2563) เพิ่มขึ้นประมาณ 180,000 ตัว ภายในระยะเวลาปีเศษ ซึ่งนับว่าเป็นอาชีพที่มีการขยายและเป็นที่สนใจของเกษตรกรทั่วไป ทั้งนี้เนื่องจากการเลี้ยงแพะเป็นปศุสัตว์ที่ราคาผันแปรค่อนข้างน้อย ให้ผลตอบแทนเร็ว และมีวงจรการสืบพันธุ์ที่สั้น ทำให้เกิดเลือดชิดได้ในเวลาอันสั้น ดังนั้นการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์และกระจายแพะพันธุ์ดีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตและย้ายฝากตัวอ่อน จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถกระจายพันธุ์กรรมที่ดีสู่ฟาร์มเกษตรกรได้กว้างขวางและรวดเร็วยิ่งขึ้น

การผลิตตัวอ่อนแพะประกอบด้วยขั้นตอน การคัดเลือกแม่แพะตัวให้ โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่หลายใบ การผสมพันธุ์ การเก็บตัวอ่อนหลังจากผสมพันธุ์แล้ว 7 วันด้วยวิธีการผ่าตัด การคัดเลือกและประเมินคุณภาพตัวอ่อน และการแช่แข็งตัวอ่อน ซึ่งแต่ละขั้นตอนนับว่ามีความสำคัญที่ส่งผลต่อความสำเร็จของการผลิตตัวอ่อนทั้งสิ้น (Chemineau et al., 1996; Morand-Fehr and Boyazoglu, 1999) โดยขั้นตอนการผสมพันธุ์ในกระบวนการผลิตตัวอ่อนนั้นมีทั้งวิธีการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติโดยใช้พ่อพันธุ์หรือการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อ กรณีการผสมพันธุ์ตามธรรมชาตินั้นพ่อพันธุ์แพะจะต้องมีสุขภาพความสมบูรณ์พันธุ์ และน้ำเชื้อคุณภาพที่ดี สามารถผสมพันธุ์กับแม่แพะตัวให้ได้หลายครั้ง แต่มีข้อจำกัดคือพ่อพันธุ์มีราคาแพงและมีการจัดการเลี้ยงดูที่ยุ่งยาก จึงนิยมเลี้ยงเฉพาะแม่พันธุ์ดีไว้ในฟาร์ม ทำให้ไม่สามารถผลิตตัวอ่อนในฟาร์มเกษตรกรที่ไม่มีพ่อพันธุ์ได้ ซึ่งเป็นปัญหาหนึ่งของการผลิตตัวอ่อนที่จำกัดอยู่เฉพาะในฟาร์มเกษตรกรที่มีพ่อพันธุ์เท่านั้น ดังนั้นการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งเพื่อลดข้อจำกัดดังกล่าว โดยการผสมเทียมมีทั้งวิธีผ่านคอมดลูก และลาพาโรสโคปิก ซึ่งการผสมเทียมแบบลาพาโรสโคปิก เป็นวิธีการผสมเทียมโดยใช้กล้องลาพาโรสโคปส่องหาดำแหน่งปีกมดลูก และผสมเทียมด้วยการฉีดน้ำเชื้อแช่แข็งเข้าโพรงมดลูกที่ตำแหน่งปีกมดลูกทั้งสองข้าง เพื่อที่จะให้มีอัตราการผสมติดที่สูงขึ้นและตัวอสุจิสามารถอยู่ที่ตำแหน่งมดลูกโดยตรง (Sohnrey and Holtz, 2005) โดยวิธีการผสมเทียมแบบนี้จะมีอัตราการผสมติดประมาณ 60-80 เปอร์เซ็นต์ (Cseh et al., 2012) และอาจสูงถึง 85 เปอร์เซ็นต์ (Dovenski et al., 2013) ซึ่งสูงกว่าการผสมเทียมด้วยวิธีผ่านคอมดลูก เนื่องจากคอมดลูกในสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็กมีความยาว คดเคี้ยว และมีลักษณะเป็นวงแหวนประมาณ 4-7 วง ซึ่งวงแหวนคอมดลูกดังกล่าวมีผลทำให้เกิดการขัดขวางทางกายภาพของน้ำเชื้อผ่านทางท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ Meinecke et al. (1986) รายงานว่าการผสมเทียมแบบลาพาโรสโคปิกจากการกระตุ้นการตกไข่หลายใบในแพะและแกะมีอัตราการผสมติดสูงกว่าการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการผสมเทียมแบบลาพาโรสโคปิกในแม่แพะตัวให้ต่อจำนวนและคุณภาพของตัวอ่อน ในกระบวนการผลิตตัวอ่อน เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการขยายเทคโนโลยีการผลิตและการย้ายฝากตัวอ่อนสำหรับการปรับปรุงพันธุ์และกระจายแพะพันธุ์ดีสู่เกษตรกรได้อย่างทั่วถึงต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

แพะเพศเมียพันธุ์บอร์ที่เคยให้ลูกมาแล้วอย่างน้อย 1 ตัว อายุระหว่าง 2-3 ปี ร่างกายสมบูรณ์แข็งแรง มีระบบสืบพันธุ์และรอบการเป็นสัดปกติ จำนวน 50 ตัว เลี้ยงดูที่ศูนย์วิจัยวิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสงขลา โดยให้อาหารหยาบเป็นหญ้าแพงโกล่าแห้งกินตลอดเวลา และอาหารข้นวันละ 200 กรัม/ตัว/วัน ฉีดวิตามินบำรุงร่างกายและถ่ายพยาธิก่อนเริ่มโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่หลายใบ โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 25 ตัว เพื่อศึกษาวิธีการผสมพันธุ์สำหรับการผลิตตัวอ่อน

วิธีการทดลอง

แพะทุกตัวจะได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่หลายใบ ดังนี้

วันที่ 0 สอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด (Cidr-G®, Pharmacia & Upjohn, NSW, Australia)

วันที่ 13 ฉีดฮอร์โมน FSH (Folttropin-V®, Bioniche Animal Health (A/Asia) Pty. Ltd., Australia) ปริมาณ 50 mg. เข้ากล้ามเนื้อ และฉีด PGF_{2α} ปริมาณ 175 µg. (Estrumate®, Cloprostenol, Schering-Plough Animal Health, NSW, Australia) เข้ากล้ามเนื้อเวลา 18.00 น.

วันที่ 14 ฉีดฮอร์โมน FSH ปริมาณ 50 mg. เข้ากล้ามเนื้อเวลา 06.00 น. และปริมาณ 30 mg. เข้ากล้ามเนื้อเวลา 18.00 น.

วันที่ 15 ฉีดฮอร์โมน FSH ปริมาณ 30 mg. เข้ากล้ามเนื้อเวลา 06.00 น. และปริมาณ 20 mg. เข้ากล้ามเนื้อเวลา 18.00 น. และถอด Cidr-G® ออก เวลา 16.00 น.

วันที่ 16 ฉีดฮอร์โมน FSH ปริมาณ 20 mg. เข้ากล้ามเนื้อเวลา 06.00 น. และสังเกตอาการเป็นสัด

วันที่ 17 ทำการผสมพันธุ์ ตามแผนการทดลองดังนี้

กลุ่มที่ 1 ผสมพันธุ์ตามธรรมชาติโดยใช้พ่อพันธุ์ ภายหลังการเป็นสัดยืนนิ่งจำนวน 3 ครั้ง ห่างกัน 12 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 2 ผสมเทียมแบบลาพาโรสโคปิก ในช่วงเวลาที่ 46 หลังจากถอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด (Cidr-G®)

วันที่ 24 ทำการชะล้างเก็บตัวอ่อน ด้วยวิธีการผ่าตัด ตรวจนับและประเมินคุณภาพตัวอ่อน ตามวิธีของ Linder and Wright (1983) ซึ่งแบ่งตัวอ่อนออกเป็น 4 เกรด คือ เกรด A B C D และกลุ่มไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (UFO: unfertilized oocytes) ตามรายละเอียดดังนี้

เกรด A เป็นตัวอ่อนคุณภาพดีมาก มีการพัฒนาการปกติ ลักษณะของเซลล์ตัวอ่อนหรือบลาสโตเมอร์ต้องเป็นทรงกลมเกาะกันแน่น ไม่มีเซลล์แตก

เกรด B เป็นตัวอ่อนคุณภาพดี มีคุณภาพปกติ ลักษณะของตัวอ่อนเป็นทรงกลม มีบางเซลล์แยกออกจากเซลล์กลุ่มใหญ่ 10-20 % ของเซลล์ทั้งหมด

เกรด C เป็นตัวอ่อนคุณภาพพอใช้ ตัวอ่อนอาจมีรูปร่างเป็นทรงกลม มีการเสื่อมของเซลล์ประมาณ 30-40 %

เกรด D เป็นตัวอ่อนที่มีการเสื่อมสลายของเซลล์มาก มีเซลล์ที่ยังเกาะแน่นต่ำกว่า 40% หรือเป็นตัวอ่อนที่มีพัฒนาการช้ากว่าปกติและหยุดเจริญ ไม่สามารถนำไปย้ายฝากตัวอ่อนได้

UFO (Unfertilized Oocytes) เป็นไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ

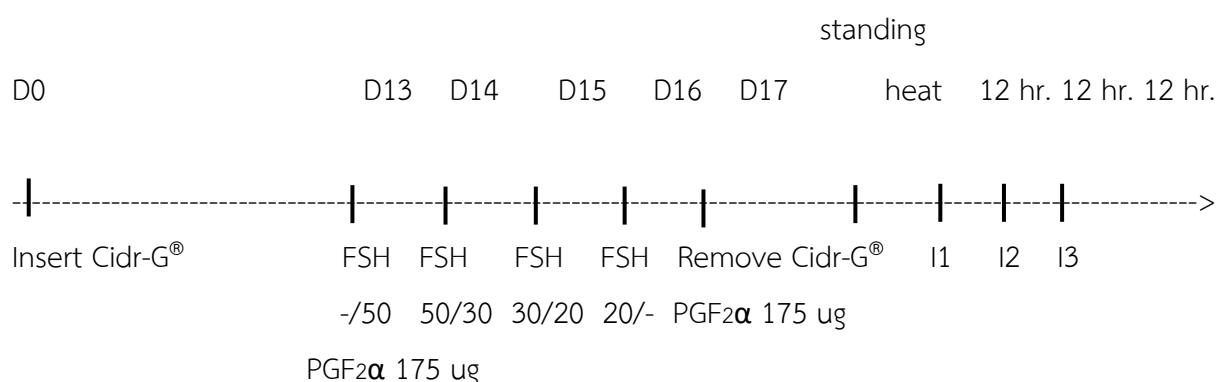


Figure 1 Estrous synchronization program and Natural service (Group 1)

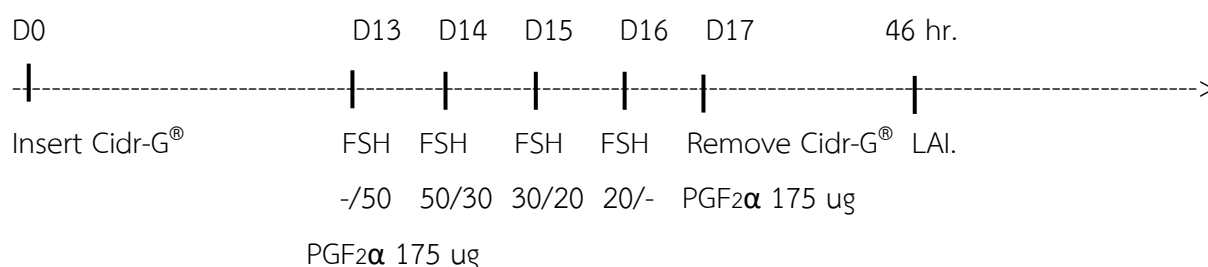


Figure 2 Estrous synchronization program and Laparoscopic A.I. (Group 2)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนไข่และตัวอ่อนที่เก็บได้ทั้งหมด จำนวนไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ ไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิหรือเสื่อมสภาพ จำนวนตัวอ่อนคุณภาพเกรด A B C และ D ทั้งสองกลุ่ม โดยใช้ Chi Square

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลองพบว่าจำนวนไข่และตัวอ่อนที่เก็บได้ทั้งหมด จำนวนไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ และเปอร์เซ็นต์ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ ที่ได้จากการผลิตตัวอ่อนที่ใช้วิธีการผสมเทียมแบบลาพาโรสโคปและการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติด้วยพ่อพันธุ์ มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) (Table 1)

Table 1. Means $\pm$ SD total number of ova/embryos recovered, total number of ova fertilized and percent ova fertilized per doe of Natural service and Laparoscopic Artificial Insemination.

Parameters	Natural service	Laparoscopic A.I.
number of does	18	12
Total number of ova/embryos recovered	17.34 $\pm$ 5.47	14.16 $\pm$ 6.40
Total number of ova fertilized	9.63 $\pm$ 7.23	6.50 $\pm$ 5.39
percent ova fertilized	56.34 $\pm$ 36.31	49.89 $\pm$ 42.79

จากการทดลองครั้งนี้พบว่าจำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้จะสูงกว่าของ Melican and Gavin (2008) และ Menchaca et al. (2010) ที่รายงานการเก็บตัวอ่อนทั้งแบบการผ่าตัดและไม่ผ่าตัด ได้จำนวนตัวอ่อนอยู่ระหว่าง 0-18 ตัวอ่อนต่อแม่ตัวให้ 1 ตัว ซึ่งจำนวนตัวอ่อนที่ได้เฉลี่ยประมาณ 4-6 ตัวอ่อนต่อแม่ตัวให้ 1 ตัว โดยจำนวนไข่และตัวอ่อนที่เก็บได้ทั้งหมดขึ้นอยู่กับความผิดปกติของการตกไข่ การปฏิสนธิ การพัฒนาของตัวอ่อน และการเคลื่อนที่ของตัวอ่อนในท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์ ซึ่งความผิดปกติของการตกไข่เกิดจากการคงอยู่ของฟอลลิเคิลที่มีฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ไม่ตกไข่ ซึ่งสัมพันธ์กับความล้มเหลวของการปฏิสนธิ (Ishwar et al., 1996) การตอบสนองที่แตกต่างต่อการกระตุ้นการตกไข่หลายใบมีความสัมพันธ์กับสภาพของฟอลลิเคิลของแม่แพะตัวให้ในขณะเริ่มการให้ฮอร์โมน FSH โดยจำนวนคอร์ปัสลูเทียมมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับจำนวนทั้งหมดของฟอลลิเคิลที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2-6 มิลลิเมตร นั้นหมายความว่าขนาดของฟอลลิเคิลดังกล่าวมีการตกไข่ นอกจากนี้ขนาดของฟอลลิเคิลไม่เพียงแต่เป็นตัวกำหนดอัตราการตกไข่ แต่ยังมีผลสำคัญต่อความสามารถในการเจริญเติบโตของไข่และการพัฒนาของตัวอ่อนในที่สุดอีกด้วย ซึ่งจำนวนไข่และตัวอ่อนที่เก็บได้ทั้งหมดและตัวอ่อนมีชีวิตจากการกระตุ้นการตกไข่หลายใบมีความสัมพันธ์กับฟอลลิเคิลขนาด 4-6 มิลลิเมตร ซึ่งชี้ให้เห็นว่าไข่จากฟอลลิเคิลขนาดเล็กกว่านี้ไม่สามารถเจริญเติบโตเต็มที่ (González-

Bulnes et al., 2003) โดยฟอลลิเคิลขนาดตั้งแต่ 4 มิลลิเมตรเป็นแหล่งผลิตฮอร์โมนอินฮิบิน และเป็นแหล่งที่มาหลักของไข่ที่มีผลต่อจำนวนตัวอ่อนมีชีวิตที่เก็บได้ (González-Bulnes et al., 2004a) และจำนวนฟอลลิเคิลที่มีขนาดมากกว่า 6 มิลลิเมตรที่จุดเริ่มต้นของการกระตุ้นการตกไข่หลายใบมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับจำนวนของไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (Nare et al., 2018) อย่างไรก็ตามแม้ว่าไม่มีผลต่ออัตราการตกไข่ แต่ทั้งจำนวนและตัวอ่อนมีชีวิตที่เก็บได้จะลดลง (González-Bulnes et al., 2002d) ซึ่งฟอลลิเคิลขนาดใหญ่มีความสัมพันธ์กับการหลังเสตียร์รอยด์และอินฮิบิน จะยับยั้งการเจริญเติบโตของกลุ่มฟอลลิเคิลขนาดเล็กจากการกระตุ้นการตกไข่หลายใบ และนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของจำนวนไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (Driancourt, 2001) นั่นคือที่จุดเริ่มต้นของการกระตุ้นการตกไข่หลายใบในกรณีที่ไม่มีฟอลลิเคิลขนาดใหญ่จะส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของกลุ่มฟอลลิเคิล อัตราการตกไข่ และ/หรือจำนวนตัวอ่อน (Menchaca et al., 2002)

คุณภาพของตัวอ่อนที่เก็บได้ พบว่าแพะในกลุ่มที่ผสมพันธุ์ตามธรรมชาติโดยใช้พ่อพันธุ์ และกลุ่มแม่แพะตัวให้ที่ผสมพันธุ์ด้วยวิธีผสมเทียมแบบลาพาโรสโคปิก มีจำนวนตัวอ่อนคุณภาพเกรด A B C D และไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิหรือเสื่อมสภาพ มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) (Table 2)

Table 2. Means±SD embryos quality in grades A B C D and unfertilized ova / degenerated per doe.

Parameters	Natural service	Laparoscopic A.I.
Total number of ova/embryos	17.34±5.47	14.16±6.40
Embryo grade A	6.54±3.80	5.67±0.81
Embryo grade B	3.37±3.60	2.66±2.65
Embryo grade C	0.65±1.13	1.34±2.42
Embryo grade D	0.23±0.54	0.50±1.23
Unfertilized Ova / degenerated	7.32±7.37	7.67±8.61

จำนวนคุณภาพตัวอ่อนขึ้นอยู่กับจำนวนและขนาดของฟอลลิเคิลที่มีอยู่ในขณะเริ่มต้นการกระตุ้นการตกไข่หลายใบด้วยการให้ฮอร์โมน FSH โดยการมีจำนวนของฟอลลิเคิลขนาดกลาง(4-5 มิลลิเมตร)ที่จุดเริ่มต้นของการกระตุ้นการตกไข่หลายใบส่งผลให้จำนวนตัวอ่อนที่ย้ายฝากได้(ตัวอ่อนเกรด A B และ C) มีจำนวนเพิ่มขึ้น (Menchaca et al., 2002) ซึ่งในแพะความสามารถในการเจริญเติบโตของไข่จนถึงระยะโตเต็มที่ที่จะอยู่ในฟอลลิเคิลที่มีขนาดมากกว่า 3 มิลลิเมตร ดังนั้นคุณภาพของตัวอ่อนจึงเพิ่มขึ้นตามจำนวนของฟอลลิเคิลขนาดดังกล่าว (De Smedt et al., 1994) ความสามารถในการเจริญเติบโตของไข่ที่พัฒนาเป็นตัวอ่อนมีปัจจัยหลักสำคัญที่เกี่ยวข้องกับความผิดปกติของทั้ง ท่อนำไข่ หรือมดลูก และ/หรือการทำงานของคอร์ปัสลูเทียม (Barnes, 2000) ในการผ่าตัดเพื่อเก็บตัวอ่อนของแพะมักจะแนะนำไม่ให้ชะล้างตัวอ่อนที่พบว่ามี การสลายของ

คอร์ปัสลูเทียมในระยะแรกหรือระยะก่อนสมบูรณ์เต็มที่ โดยในแพะที่กระตุ้นการตกไข่หลายใบด้วยฮอร์โมน FSH พบว่ามีการเสื่อมสลายของคอร์ปัสลูเทียมระยะก่อนสมบูรณ์เต็มที่ประมาณ 33 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งนำไปสู่อัตราการเก็บตัวอ่อนได้ลดลง รวมทั้งจำนวนไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิและตัวอ่อนที่เสื่อมสลายเพิ่มมากขึ้น (Armstrong et al., 1983; Baldassarre and Karatzaz, 2004) การสลายของคอร์ปัสลูเทียมระยะแรกมักเกิดขึ้นโดยทั่วไปในการกระตุ้นการตกไข่หลายใบในแพะที่มีสาเหตุจากการลดลงของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและเกิดการเสื่อมสลายของตัวอ่อน (Armstrong et al., 1982) การที่คอร์ปัสลูเทียมไม่ทำงานภายหลังการกระตุ้นการตกไข่หลายใบทำให้ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดลดลงภายใน 4 วันหลังการตกไข่ (Southee et al., 1988) เนื่องจากการขาดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในแพะที่มีการสลายของคอร์ปัสลูเทียมในระยะก่อนสมบูรณ์เต็มที่ ทำให้มีการสูญเสียตัวอ่อนจำนวนมากก่อนที่จะมีการเก็บตัวอ่อนในวันที่ 6 หรือ 7 หลังจากแพะเริ่มแสดงอาการเป็นสัด (Armstrong et al., 1987) ซึ่งการสลายของคอร์ปัสลูเทียมระยะก่อนสมบูรณ์เต็มที่อาจเกิดจากการคงอยู่ของฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ในจุดที่เริ่มต้นการกระตุ้นการตกไข่หลายใบ (Cognie et al., 2003; Nare et al., 2018)

ความสำเร็จของการกระตุ้นการตกไข่หลายใบและการผลิตตัวอ่อนขึ้นอยู่กับทั้งปัจจัยภายใน ได้แก่ อายุ สภาวะโภชนาการ และสถานะภาพระบบสืบพันธุ์ และปัจจัยภายนอก ได้แก่ แหล่งและความบริสุทธิ์ของฮอร์โมน และขั้นตอนการให้ฮอร์โมน (Baril et al., 1993) โดยอายุก่อนสมบูรณ์พันธุ์ในเพศเมียสามารถกระตุ้นการตกไข่หลายใบได้เพราะว่าฟอลลิเคิลมีการตอบสนองต่อฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (Driancourt et al., 1990b) แต่อัตราการตกไข่จะต่ำกว่าสัตว์โตเต็มวัย (Driancourt and Avdi, 1993) ซึ่งความล้มเหลวของการกระตุ้นการตกไข่หลายใบ และการปฏิสนธิต่ำ จะเป็นข้อจำกัดจำนวนของตัวอ่อนที่ได้รับจากแม่แพะและแกะตัวให้ที่มีอายุน้อยกว่า 1 ปี และแพะที่มีความสมบูรณ์พันธุ์จะมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นการตกไข่หลายใบได้ดีกว่า (Gonzalez-Bulnes et al., 2004a) ภาวะพร่องโภชนาการ ส่งผลต่อความสามารถในการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลและไข่ (O'Callaghan et al., 2000) การทำงานของคอร์ปัสลูเทียม (Jabbour et al., 1991) และการพัฒนาของตัวอ่อน (Abecia et al., 1997) ส่วนสถานะภาพระบบสืบพันธุ์ เป็นบทบาทหลักสำคัญของประสิทธิภาพการกระตุ้นการตกไข่หลายใบ ซึ่งการตอบสนองของรังไข่ต่อการกระตุ้นการตกไข่หลายใบมีผลต่อจำนวนตัวอ่อนที่ได้ ส่วนปัจจัยภายนอก ได้แก่ ขั้นตอนและวิธีการให้ฮอร์โมน FSH ซึ่งกระตุ้นการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลไปถึงระยะก่อนการตกไข่ โดยขั้นตอนและวิธีการให้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินมีทั้งการให้แบบคงที่หรือการลดขนาดลง (Hoffman et al., 1988) โดยพบว่าการให้ฮอร์โมน FSH ในขนาดสูงในช่วงระยะแรกของการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิล อาจกระตุ้นการเสื่อมสลายของฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ที่สุด (López-Sebastián et al., 1999) และเกิดอุบัติการณ์สูงของความล้มเหลวของการตกไข่จากการให้ฮอร์โมน FSH ในขนาดคงที่ (González-Bulnes et al., 2000a) ส่วนการกระตุ้นการตกไข่หลายใบซ้ำกันหลายครั้งด้วยฮอร์โมน FSH จะเป็นสาเหตุของการลดการพัฒนาของรังไข่ รวมถึงสมรรถภาพระบบสืบพันธุ์ ส่งผลต่อการตอบสนองและ

คุณภาพของไข่ลดลง (Swanson et al., 1996; Combelles et al., 2003) ซึ่งการลดลงของความสมบูรณ์พันธุ์ภายหลังการใช้ฮอร์โมนโกลนาโดโทรปินซ้ำ ๆ จะสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของภูมิคุ้มกันการต่อต้านฮอร์โมน FSH (Baril et al., 1992) นำไปสู่การลดการทำงานของรังไข่ (Bavister et al., 1986; Remy et al., 1991)

สรุปผลการทดลอง

การผสมเทียมด้วยวิธีลาพาโรสโคปิกในแม่แพะตัวให้ในกระบวนการผลิตตัวอ่อนมีผลทำให้จำนวนและคุณภาพตัวอ่อนไม่แตกต่างกับการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติโดยพ่อพันธุ์ ชี้ให้เห็นว่าการผลิตตัวอ่อนเพื่อกระจายพันธุ์กรรมแพะพันธุ์ดีสู่ฟาร์มเกษตรกรสามารถเลือกใช้วิธีการผสมพันธุ์ได้ทั้ง 2 วิธีโดยมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับศักยภาพและความพร้อมของฟาร์ม

เอกสารอ้างอิง

ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมปศุสัตว์, 2563. แหล่งที่มา:

<http://ict.dld.go.th/webnew/index.php/th/>, 21 มิถุนายน 2563.

- Abecia, J.A., J.M. Lozano, F. Forcada and L. Zarazaga. 1997. Effect of level of dietary energy and protein on embryo survival and progesterone production on day eight of pregnancy in Rasa Aragonesa ewes. Anim. Reprod. Sci. 48,209–218.
- Armstrong, D.T., A.P. Pfizner, K.J. Porter, G.M. Warnes, P.O. Janson and R.F. Seamark. 1982. Ovarian responses of anoestrous goats to stimulation with pregnant mare serum gonadotrophin. Anim. Reprod. Sci. 5,15–23.
- Armstrong, D.T., A.P. Pfizner, G.M. Warnes and R.F. Seamark. 1983. Superovulation treatments and embryo transfer in Angora goats. J Reprod Fertil. 67:403–410.
- Armstrong, D.T., D.J. Kiehm, G.M. Wames and R.F. Seamark. 1987. Corpus luteum (CL) failure and embryonic loss in superovulated goats. Theriogenology. 27:207.
- Baldassarre, H. and C.N. Karatzas. 2004. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. Anim Reprod Sci. 82–83:255–266.
- 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 breeding season. Reprod Domest Anim; 27:161–8.
- Baril, G., P. Brebion and P. Chesné. 1993. Manuel de Formation pour la Transplantation Embryonnaire Chez la Brebis et la Chevre. Vol.115.
- Barnes, F. L. 2000. The effects of early uterine environment on the subsequent development of embryo and fetus. Theriogenology 19,31–42.

- Bavister, B.D., C. Dees and R.D. Schultz. 1986. Refractoriness of rhesus monkeys to repeated ovarian stimulation by exogenous gonadotropins is caused by nonprecipitating antibodies. *Am J Reprod Immunol Microbiol*; 11:11–6.
- Chemineau, P., G. Baril, B. Leboeuf, M.C. McMaurel and Y. Cognie. 1996. Recent advances in the control of goat reproduction. In 'Proceedings of the 6th International Conference on Goats, pp. 776–784.
- Cognie, Y., G. Baril, N. Poulin and P. Mermillod. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*. 59:171–188.
- Combelles, C.M. and D.F. Albertini. 2003. Assessment of oocyte quality following repeated gonadotropin Stimulation in the mouse. *Biol Reprod*; 68:812–21.
- Cseh, S., V. Faigl and G. S. Amiridis. 2012. Semen processing and artificial insemination in health management of small ruminants. *Animal Reproduction Science* 130:187-192.
- De Smedt, V., N. Crozet and L. Gall. 1994. Morphological and functional changes accompanying the acquisition of meiotic competence in ovarian goat oocyte. *J. Exp. Zool.* 269,128–139.
- Dovenski, T., P. Trojancanec, V. Petkov, F. Popovska-Percinic, L. Kocoski and J. Grizelj. 2013. LAPAROSCOPY-PROMISING TOOL FOR IMPROVEMENT OF REPRODUCTIVE EFFICIENCY OF SMALL RUMINANTS.
- Driancourt, M.A. 2001. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. *Theriogenology*. 55:1211–1239.
- Driancourt, M.A., R.C. Fry, B.K. Campbell and A.S. McNeilly. 1990b. Granulosa cell content and production of steroids, inhibin and follicular peptides by large follicles from a range of prolific and non-prolific breeds of sheep. *J. Reprod. Fertil.* 43,230–231.
- Driancourt, M. A. and M. Avdi. 1993. Effect of the physiological stage of the ewe on the number of follicles ovulating following hCG injection. *Anim. Reprod. Sci.* 32,227–236.
- Gonzalez-Bulnes, A., J.A. Carrizosa, C. Diaz-Delfa, R.M. Garcia-Garcia, B. Rutia, J. Santiago-Moreno, M.J. Cocero and A. Lopez-Sebastian. 2003. Effect of ovarian follicular status on superovulatory response of dairy goats to FSH treatment. *Small Ruminant Res.* 48:9–14.

- González-Bulnes, A., J. Santiago-Moreno, M.J. Cocero and A. López-Sebastián. 2000a. Effects of FSH commercial preparation and follicular status on follicular growth and superovulatory response in Spanish Merino ewes. *Theriogenology* 54,1055–1064.
- González-Bulnes, A., J. Santiago-Moreno, M.J. Cocero, C.J.H. Souza, N.P. Groome, R.M. García-García, A. López-Sebastián and D.T. Baird. 2002d. Measurement of inhibin A predicts the superovulatory response to exogenous FSH in sheep. *Theriogenology* 57,1263–1272.
- González-Bulnes, A., R.M. García-García, J.A. Carrizosa, B. Urrutia, C.J.H. Souza, M.J. Cocero, A. López-Sebastián and A.S. McNeilly. 2004a. Plasma inhibin A determination at start superovulatory FSH treatments is predictive for embryo outcome in goats. *Domest. Anim. Endocrinol.* 26,259–266.
- Hoffman, K.A., S.L. Waller and C.R. Young. 1988. Once daily vs twice daily treatments with follicle stimulating hormone in ewes synchronized with different dosages of norgestomet. *Theriogenology* 29,261.
- Ishwar, A.K., and M.A. Memon. 1996. Embryo transfer in sheep and goat: a review. *Small Rumin Res*; 19:35–43.
- Jabbour, H.N., J.P. Ryan, G. Evans and W.M. Maxwell. 1991. Effects of season, GnRH administration and lupin supplementation on the ovarian and endocrine responses of merino ewes treated with PMSG and FSH-P to induce superovulation. *Reprod. Fertil. Dev.* 3,699–707.
- Linder, G.M. and R.W. Wright. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20:407-416.
- López-Sebastián, A., A. González-Bulnes, J. Santiago-Moreno, A. Gómez-Brunet, E.C. Townsend and E.K. Inskeep. 1999. Effects of follicular status at treatment on follicular development and ovulation in response to FSH in Spanish Merino ewes. *Theriogenology* 52,505–514.
- Meinecke, B. and S. Meinecke-Tillmann. 1986. Fertilization results in superovulated ewes and goats after transmural-intrauterine insemination controlled by laparoscopy. *TierarztlPrax.* 14(1):35-41.
- Melican, D., and W. Gavin. 2008. Repeat superovulation, non-surgical embryo recovery, and surgical embryo transfer in transgenic dairy goats. *Theriogenology* 69:197-203.

- Menchaca, A., A. Pinczak and E. Rubianes. 2002. Follicular recruitment and ovulatory response to FSH treatment initiated on Day 0 or Day 3 postovulation in goats. *THERIOGENOLOGY* Volume: 58 Issue: 9 Pages:1713-1721.
- Menchaca, A., M. Vilarino, M. Crispo, T. de Castro and E. Rubianes. 2010. New approaches to superovulation and embryo transfer in small ruminant. *Reprod Fertil Dev* 22: 113-118.
- Morand-Fehr, P. and J. Boyazoglu. 1999. Present state and future outlook of the small ruminant sector. *Small Ruminant Res.* 34,175–188.
- Nare, A.M., A. Gonzalez-Bulnes and C.L. Khoboso. 2018. Effect of breed and follicular status on response to superovulation in South African goats. *Journal of Applied Animal Research.* Volume 46. Issue 1. Pages 141-145.
- O’Callaghan, D., H. Yaakub, P. Hyttel, L.J. Spicer and M.P. Boland. 2000. Effect of nutrition and superovulation on oocyte morphology, follicular fluid composition and systemic hormone concentrations in ewes. *J. Reprod. Fertil.* 118,303–313.
- Remy, B., G. Baril and J.C. Vallet. 1991. Are antibodies responsible for a decreased superovulatory response in goats which have been treated repeatedly with porcine follicle-stimulating hormone. *Theriogenology*; 36:389–99.
- Sohnrey, B. and W. Holtz. 2005. Technical Note: Transcervical deep corneal insemination of goats. *J Anim Sci.* 83:1543-1548.
- Southee, J.A., M.G. Hunter, A.S. Law and W. Haresign. 1988. Effect of hysterectomy on the short life-cycle corpus luteum produced after GnRH-induced ovulation in the anoestrous ewe. *J Reprod Fert.* 84:149–155.
- Swanson, W.F., T.L. Roth, K. Graham, D.W. Horohov and R.A. Godke. 1996. Kinetics of the humoral immune response to multiple treatments with exogenous gonadotropins and relation to ovarian responsiveness in domestic cats. *Am J Vet Res*; 57:302–7.

ประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของฝูงโคนมทดแทนในช่วงระหว่างปี 2551-2561

นันทมนัส สีคง^{1/} เพชรร้อย เพชรเรียง^{1/}

บทคัดย่อ

อายุเมื่อคลอดลูกตัวแรก (Age at First Calving; AFC) เป็นดัชนีทางระบบสืบพันธุ์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยสามารถบ่งชี้ให้เกษตรกรวางแผนเพื่อการลดต้นทุนการผลิตจากการเพิ่มประสิทธิภาพโคนมสาวทดแทนในฝูงได้ การศึกษาวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อเปรียบเทียบดัชนีทางระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ ลักษณะอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรก (AFC) จำนวนครั้งต่อการผสมติด (NSC) และอัตราการผสมติดในการผสมครั้งแรก (FSC) ของฝูงโคนมทดแทนที่เกิดระหว่างปีพ.ศ. 2551-2561 ของโคนมในประเทศไทยที่มีเปอร์เซ็นต์สายเลือดพันธุ์ชาวดำมากกว่าหรือเท่ากับ 75 % ที่อยู่ในฟาร์มโครงการผลิตฟอโคนมทรอปิคอลโฮลส์ไต้หวัน และฟาร์มดำเนินกิจการทั่วไป การศึกษานี้ดำเนินการโดยใช้ข้อมูลจากระบบฐานข้อมูลโคนม กรมปศุสัตว์ จำนวน 107,214 ข้อมูล โดยเตรียมข้อมูลโดยใช้โมเดล ผลการศึกษาพบว่า การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า AFC และ FSC ระหว่างกลุ่มของโคนมที่เกิดระหว่างปี พ.ศ. 2551-2561 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่า AFC มีแนวโน้มลดลงทุกปี และค่า FSC มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี ($p < 0.0001$ และ $p < 0.0001$ ตามลำดับ) ส่วนค่า NSC พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เฉพาะในกลุ่มสายพันธุ์ 75-87.5HF และ >87.5-93.75HF ($p < 0.0001$) รวมทั้งมีแนวโน้มลดลงทุกปีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มสายพันธุ์พบว่า ค่า AFC ของกลุ่ม >87.5-93.75HF และกลุ่ม >93.75HF มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในปี 2554 และ 2558 ($p < 0.0003$) โดยในโคนมที่เกิดปี 2561 ในกลุ่มสายเลือด 75-87.5HF ให้ค่าอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรกเฉลี่ยต่ำที่สุดที่ 727.5 ± 8.795 วัน ค่า FSC ในกลุ่ม 75-87.5HF มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกับกลุ่มสายพันธุ์อื่นๆ ($p < 0.01$) ส่วนค่า NSC พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มสายพันธุ์ทั้งสามกลุ่ม การเปรียบเทียบค่า AFC ระหว่างฟาร์มมาสเตอร์บูล และฟาร์มดำเนินกิจการฯ 5 ปีย้อนหลัง พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในปี 2557 2558 และ 2560 ($p < 0.00002$) ในกลุ่ม >87.5-93.75HF ส่วนในกลุ่มสายพันธุ์อื่นๆ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สรุปการวิเคราะห์ผลพบว่าดัชนีประสิทธิภาพของโคนมสาวย้อนหลัง 10 ปี มีการพัฒนาการในทางที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น เมื่อคำนวณวันผสมจากข้อมูลของศูนย์วิจัยการผสมเทียมที่มีค่า AFC น้อยที่สุด พบว่าอายุเมื่อผสมติดที่ประมาณ 21 เดือน ซึ่งสอดคล้องกับนโยบายของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ที่สนับสนุนให้มีการผสมเทียมตั้งแต่อายุประมาณ 18 เดือนเพื่อให้ได้โคนมทดแทนที่มีประสิทธิภาพสูงสุด

คำสำคัญ : ฝูงโคนมทดแทน อายุเมื่อคลอดลูกตัวแรก จำนวนครั้งที่ผสม อัตราการผสมติดครั้งแรก

เลขทะเบียนวิจัย : 63(2)-0208-138

^{1/} สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมืองปทุมธานี จ.ปทุมธานี 12000

Reproductive Performance of the Replacement Herd During The year 2008-2018

Nanmanas Sikong^{1/}, Petchroi Petchreng^{1/}

Abstract

Age at first calving (AFC) of each cow is a key indicator of the quality of young stock management. In this study, the model calculation was used to compared 107,214 dairy cows in Thailand that were born during 2008-2018 and had a pedigree of 75% Holstein Frisian or more. Age at first calving (AFC), number of service per conception (NSC) and First service conception rate (FSC) of each breed groups were monitored. A statistically significant difference of AFC and FSC between the birth year of 2008-2018 showed the AFC tending to decline every year and FSC tended to increase. ($P < 0.0001$ and $p < 0.0001$, respectively), NSC was found to be statistically significant difference only in the 75-87.5HF and $> 87.5-93.75$ HF breed groups ($p < 0.0001$), including a yearly downward trend ($p < 0.0001$). When comparing the breed groups, AFC values for groups $> 87.5-93.75$ HF and groups > 93.75 HF were differences in 2011 and 2015 ($p < 0.0003$). The 75-87.5HF breed group gave the lowest mean of AFC at 727.5 ± 8.795 days and FSC of this group has significant difference from others ($p < 0.01$). The NSC showed no significant difference between the three breed groups. AFC comparison between Masterbull farms and the other farms in the past 5 years showed a significant difference in the years 2014, 2015 and 2017 ($p < 0.00002$) only in $> 87.5-93.75$ HF. breed group. In conclusion, the analysis showed that the performance index of the replacement herd for the past 10 years had improved in a more efficient way. The lowest AFC value was found that age at the conception was approximately 21 months, consistent with the Bureau of Biotechnology in Livestock Production's policy to support AI at approximately 18 months of age to get the most efficient replacement cow.

Keywords: Dairy cow, replacement dairy herd, age of first calving, number of service, first conception rate

Registered No.: 63(2)-0208-138

^{1/} Bureau of Biotechnology in Livestock Production. Bangkadi subdistrict, Amphoe Mueng, Pathumthani Province. 12000

คำนำ

การจัดการฟาร์มโคนมให้มีจำนวนโคนมตามฝูงมาตรฐาน (Ideal Herd) ทำให้มีการคัดแม่ออกจากฝูง และการใช้โคนมสาวทดแทน หมุนเวียนแทนกันได้อย่างสมดุล ซึ่งควรมีสัดส่วนของโคนมสาวพร้อมผสมพันธุ์อยู่ที่ 30-35 % ของจำนวนแม่โคนมทั้งหมด โดยมีดัชนีอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรก (Age at First Calving; AFC) ในโคนมเป็นลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจที่มีส่วนช่วยในการวางแผนของเกษตรกรและหน่วยส่งเสริมให้สามารถลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพของการสร้างโคนมสาวทดแทนในระบบการผลิต เป็นดัชนีที่บ่งชี้คุณภาพของการจัดการฝูงโคนมทดแทน โดยสามารถแสดงถึงอัตราการเจริญเติบโตของโคนมสาวก่อนการผสมเทียม ผสมติด และตั้งท้อง โดยมีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้อง เช่น คุณภาพและความพร้อมด้านโภชนาการ ความเสี่ยงเรื่องโรค รวมถึงพยาธิต่างๆ สายพันธุ์ และวิธีการผสมเทียม (Adamczyk et al., 2017; Bond et al., 2015; Rincker et al., 2011 and MacDonald et al., 2005) การจัดการทางระบบสืบพันธุ์ด้วยการผสมเทียมของโคนมสาวทดแทนเริ่มต้นจากช่วงเวลาที่โคนมเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์และมีวงรอบการเป็นสัดที่สมบูรณ์ ซึ่งมีช่วงเวลาตั้งแต่โคนมสาวอายุได้ 10 เดือนหรือเร็วกว่านั้น ถ้าได้รับการจัดการอาหารแบบประสิทธิภาพสูงสุด (Wathes et al., 2014) รวมทั้งการเว้นช่วงการเป็นสัดอย่างน้อย 3 วงรอบก่อนการผสมเทียมจะทำให้ได้ระบบสืบพันธุ์ที่พร้อมผสมมากที่สุด (Chester-Jones et al., 2017)

การศึกษาเกี่ยวกับอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรก ส่วนมากพบว่าจะมีความสัมพันธ์กับประสิทธิภาพของโคนมทดแทนแบ่งหลักๆ ได้ 4 ด้าน โดย Steele (2020) ได้สรุปการศึกษาจากรายงานของประเทศต่างๆ ไว้ดังนี้ ผลผลิตน้ำนม (รอบการให้นมแรก และ ผลผลิตทั้งชีวิต) ในโคนมที่มีอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรกอยู่ในช่วง 18-21 เดือน จะมีผลผลิตน้ำนมต่ำกว่าโคนมที่มีอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรกมากกว่า 26 เดือนประมาณ 170-600 กิโลกรัมในรอบการให้นมแรก ความสมบูรณ์พันธุ์ (อัตราการผสมติดครั้งแรก ช่วงห่างการคลอดลูก วันท้องว่าง จำนวนครั้งที่ผสมต่อการตั้งท้อง) โดยการศึกษาหลายฉบับพบ ว่าประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของโคนมที่มีอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรกมากกว่า 26 เดือนจะดีกว่า แต่ Ettema et al. (2004) เห็นว่าการตั้งเป้าหมายอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรกที่ต่ำกว่า นั้นไม่ได้กระทบกับเป้าหมายเรื่องอัตราการผสมติดครั้งแรก อายุใช้งาน (อัตราการรอดเมื่อคลอดลูกตัวที่สอง และอายุ) ของโคนมทดแทนอาจไม่ได้เชื่อมโยงกับอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรกโดยตรงเพราะต้องคำนึงถึงผลผลิต และการคัดทิ้งเนื่องจากปัญหาสุขภาพด้านอื่นๆ แต่มีการศึกษาของ Eastham et al. (2018) ที่แสดงให้เห็นว่าโคนมที่มีอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรกระหว่าง 22-26 เดือนมีแนวโน้มที่จะอยู่รอดในการคลอดลูกเป็นครั้งที่สองซึ่งเป็นภาพสะท้อนการจัดการโคนมทดแทนในช่วงต้นโดยรวม ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ (ลดต้นทุน และเพิ่มกำไร) เป็นตัวแปรที่ยากที่จะนำมาเปรียบเทียบเนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่างในการจัดการการเลี้ยงโคนมสาวและการให้นมที่มีผลต่อกำไรของนม ซึ่งการเชื่อมโยงอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรก กับผลกำไร มักอ้างถึงค่าใช้จ่ายด้านอาหาร และการจัดการในการเลี้ยงที่มากขึ้นหากใช้เวลานาน โดย Krpalkova et al. (2014) แนะนำว่าอายุเมื่อคลอดลูกระหว่าง 24-26 เดือน จะให้ผลตอบแทนสูงสุด

ในประเทศไทยมีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรก โดยเปรียบเทียบอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรกของกลุ่มโคนมที่มีเปอร์เซ็นต์สายเลือดที่ต่างกัน พบว่า แม่โคนมสาวที่มีเปอร์เซ็นต์สายเลือดมากกว่าร้อยละ 87.5 จะมีอายุเฉลี่ยเมื่อคลอดลูกตัวแรกน้อยกว่ากลุ่มโคนมสาวที่มีเปอร์เซ็นต์สายเลือดร้อยละ 50-75 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ขวัญชาย เครือสุคนธ์ และ ศร ธิปภูมิกร, 2547)

โดยประชากรโคนมในประเทศไทยมากกว่า 80 % เป็นพันธุ์ผสมโฮลสไตน์ (Holstein) หรือพันธุ์ขาวดำ ที่มีเปอร์เซ็นต์สายเลือดมากกว่าหรือเท่ากับ 75 % (ระบบฐานข้อมูลโคนม กรมปศุสัตว์) นอกจากอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรกแล้ว ดัชนีอื่นที่ผู้วิจัยจะนำมาศึกษาร่วมด้วย ได้แก่ อัตราการผสมติดครั้งแรก (First Service Conception; FSC) จำนวนครั้งที่ผสมต่อการตั้งท้องแรก (Number of service per conception; NSC) โดยเปรียบเทียบดัชนีต่างๆ ของแม่โคนมทดแทนที่เกิดระหว่างปี พ.ศ. 2551-2561 ในฟาร์มโครงการผลิตพ่อโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ และฟาร์มดำเนินกิจการทั่วไป โดยวิเคราะห์ข้อมูลจากระบบฐานข้อมูลโคนม กรมปศุสัตว์ เพื่อให้เกษตรกรได้เห็นความแตกต่างของการจัดการในแต่ละปี และใช้ประโยชน์ในการเพิ่มประสิทธิภาพของฝูงทดแทนในฟาร์มได้อย่างยั่งยืน

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบลักษณะอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรก จำนวนครั้งที่ผสมติด และอัตราการผสมติดในการผสมครั้งแรก ของโคนมในประเทศไทยที่มีเปอร์เซ็นต์สายเลือดพันธุ์ขาวดำมากกว่าหรือเท่ากับ 75 % ระหว่างฟาร์มในโครงการผลิตพ่อโคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์ และฟาร์มดำเนินกิจการทั่วไป ควบคู่กับตัวแปรทางภูมิศาสตร์ ในฝูงโคนมทดแทนที่เกิดระหว่างปี พ.ศ. 2551-2561

วิธีการศึกษา

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่าง (sample size) ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นแม่โคนมพันธุ์ทรอปิคอล โฮลสไตน์ที่เกิดระหว่างปี พ.ศ. 2551-2561 ในฟาร์มเกษตรกรเครือข่ายโครงการผลิตพ่อโคนมทรอปิคอล โฮลสไตน์ และฟาร์มดำเนินกิจการที่ได้รับการบริการจากสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ทั่วประเทศ ที่มีการผสมเทียม และคลอดลูกตัวแรกได้สำเร็จ และบันทึกกิจกรรมในระบบฐานข้อมูลโคนม กรมปศุสัตว์

วิธีการเตรียมข้อมูล

1. เตรียมข้อมูลแม่โคนมโดยใช้ข้อมูล เลขประจำตัวโคนม เลขทะเบียนฟาร์ม วันเกิดโคนม วันที่คลอดลูกตัวแรก ระดับสายพันธุ์โคนม จำนวนครั้งที่ผสมต่อการตั้งท้อง วันผสมที่ทำให้เกิดการท้อง จากระบบฐานข้อมูลโคนม สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ เมื่อวันที่ 30 มิถุนายน 2563 โดยตัดข้อมูลที่ไม่สมบูรณ์ออก ได้เป็นข้อมูลดิบจำนวน 107,214 ข้อมูลเป็นข้อมูลรายตัว
2. ดัชนีทางระบบสืบพันธุ์ของโคนมของ ได้แก่ อายุเมื่อคลอดลูกตัวแรก และจำนวนครั้งที่ผสมต่อการผสมติดครั้งแรกในรอบการให้นมรอบที่ 1 จะถูกวิเคราะห์โดยเทคนิคกำลังสองน้อยที่สุดโดย (Least squares technique) เป็นแบบจำลองดังนี้

$$AFC = \mu + BY + YS + BG + Farm + AiZone + e$$

$$NSC = \mu + BY + YS + BG + Farm + AiZone + e$$

$$FSC = \mu + BY + YS + BG + Farm + AiZone + e$$

เมื่อ

AFC : อายุเมื่อคลอดลูกตัวแรก (วัน)

NSC : จำนวนครั้งที่ผสมต่อการผสมติดครั้งแรก (ครั้ง)

FSC : อัตราการผสมติดในการผสมครั้งแรก

μ : ค่าเฉลี่ยของลักษณะเป็นอิทธิพลร่วมซึ่งค่าสังเกตทุกค่าได้รับ

BY : ปีเกิดของโคนม

YS : ปัจจัยคงที่ของปีและฤดูกาลที่ผสมเทียม-ปีที่ผสมเทียมและทำให้เกิดการตั้งท้อง ที่อธิบายผลของการจัดการและ สภาพแวดล้อม ที่มีผลต่ออายุเมื่อคลอดลูกตัวแรกของโคนม โดยผู้ของสัตว์จะพิจารณาจากฟาร์ม และปี

BG : กลุ่มสายพันธุ์แบ่งเป็นสามระดับสายเลือดคือ 75-87.5HF, >87.5-93.75HF, >93.75HF

Farm: ฟาร์มดำเนินการและฟาร์มมาสเตอร์บูล

AiZone : พื้นที่ฟาร์มแยกตามศูนย์วิจัยการผสมเทียมฯ

e : ความคลาดเคลื่อน

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การเปรียบเทียบข้อมูล AFC และ NSC ระหว่างปีเกิดของโคนม ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน Analysis of Variance หรือ ANOVA และ Tukey's multiple comparison test

การเปรียบเทียบข้อมูล AFC และ NSC ระหว่างกลุ่มสายพันธุ์และประเภทฟาร์มทั้งสองประเภท ใช้การวิเคราะห์ด้วย Multiple t tests

สำหรับดัชนีอัตราการผสมติดในการผสมครั้งแรกนั้นคำนวณจากโคนมทั้งหมดที่ได้รับการผสมแยกตามปีเกิดเพื่อหาอัตราการผสมติดในแต่ละปีแยกตามกลุ่มสายพันธุ์ แล้วนำมาเปรียบเทียบทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน Analysis of Variance หรือ ANOVA และ Tukey's multiple comparison test โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, USA)

ผลการทดลองและวิจารณ์

โครงสร้างข้อมูลของดัชนีระบบสืบพันธุ์ของแม่โคนมที่เกิดในปี พ.ศ. 2559 ซึ่งเป็นปีที่มีข้อมูลที่สมบูรณ์ที่สุด พบว่ามีข้อมูลดังตาราง 1

ดัชนี	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	Minimum	Maximum
อายุเมื่อคลอดลูกตัวแรก (วัน)	939.50	140.20	614.00	1475.00
จำนวนครั้งที่ผสมที่ทำให้ตั้งท้องครั้งแรก	1.41	0.77	1.00	8.00
อัตราการผสมติดครั้งแรก (%)	73.06	2.99	70.89	76.46

ตาราง 1 แสดงค่าสถิติเชิงพรรณนาของดัชนีระบบสืบพันธุ์โคนม ในปี พ.ศ. 2559

และเมื่อเปรียบเทียบค่าอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรกแยกตามศูนย์วิจัยการผสมเทียมฯ ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (ANOVA) พบว่ามีค่าอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรกของแต่ละศูนย์วิจัยแตกต่างกันอย่างมีนัยทางสถิติ ($p < 0.0001$) โดยศูนย์วิจัยการผสมเทียมที่มีค่า AFC น้อยที่สุดคือ ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพขอนแก่น (Figure 1) มีค่าเฉลี่ยอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรกเท่ากับ 914.20 ± 5.64 วัน หรือประมาณ 30 เดือน เมื่อคำนวณวันผสมจะพบว่าอายุเมื่อผสมติดที่ประมาณ 21 เดือน จากการศึกษาของ Steele (2020) พบว่า อายุเมื่อคลอดลูกตัวแรกประมาณ 26 เดือน จะให้ผลดีที่สุดทั้งด้านผลผลิตน้ำนม ความสมบูรณ์พันธุ์ อายุใช้งาน และผลตอบแทนทางเศรษฐกิจ เมื่อคำนวณเป็นวันผสมจะเท่ากับอายุเมื่อผสมติดประมาณ 16-17 เดือน ซึ่งสอดคล้องกับนโยบายของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ที่สนับสนุนให้มีการผสมเทียมตั้งแต่อายุประมาณ 18 เดือนเพื่อให้ได้โคนมทดแทนที่มีประสิทธิภาพสูงสุด

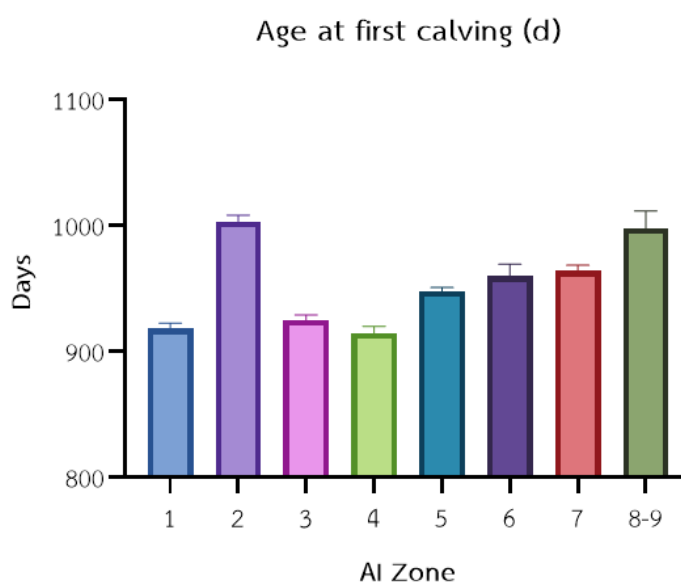


Figure 1 Least square means and standard error of AFC differentiated by AI zone

(1=Saraburi, 2=Chonburi, 3=Nakhonratchasima, 4=Khonkhan, 5=Chaingmai, 6=Pissanulok, 7= Rachaburi, 8=Surathani and 9= Songkla)

กลุ่มสายพันธุ์แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มตามสายเลือดโฮสไตน์ คือ 75-87.5HF, >87.5-93.75HF และ >93.75HF ตามงานวิจัยของขวัญชาย เครือสุคนธ์ และ ศร จีปฎิมากร, 2547 โดยในงานวิจัยฉบับนี้มีการคำนวณเป็นร้อยละจากข้อมูลดิบจะพบว่ามียุคสายเลือด 75-87.5HF ร้อยละ 36.40 กลุ่มสายเลือด >87.5-93.75HF ร้อยละ 53.82 และกลุ่มสายเลือด >93.75HF ร้อยละ 9.78 โดยไม่ได้นำกลุ่มสายเลือดโฮสไตน์ที่ต่ำกว่าร้อยละ 75 เข้ามาเปรียบเทียบในการวิเคราะห์ครั้งนี้

อายุเมื่อคลอดลูกตัวแรก

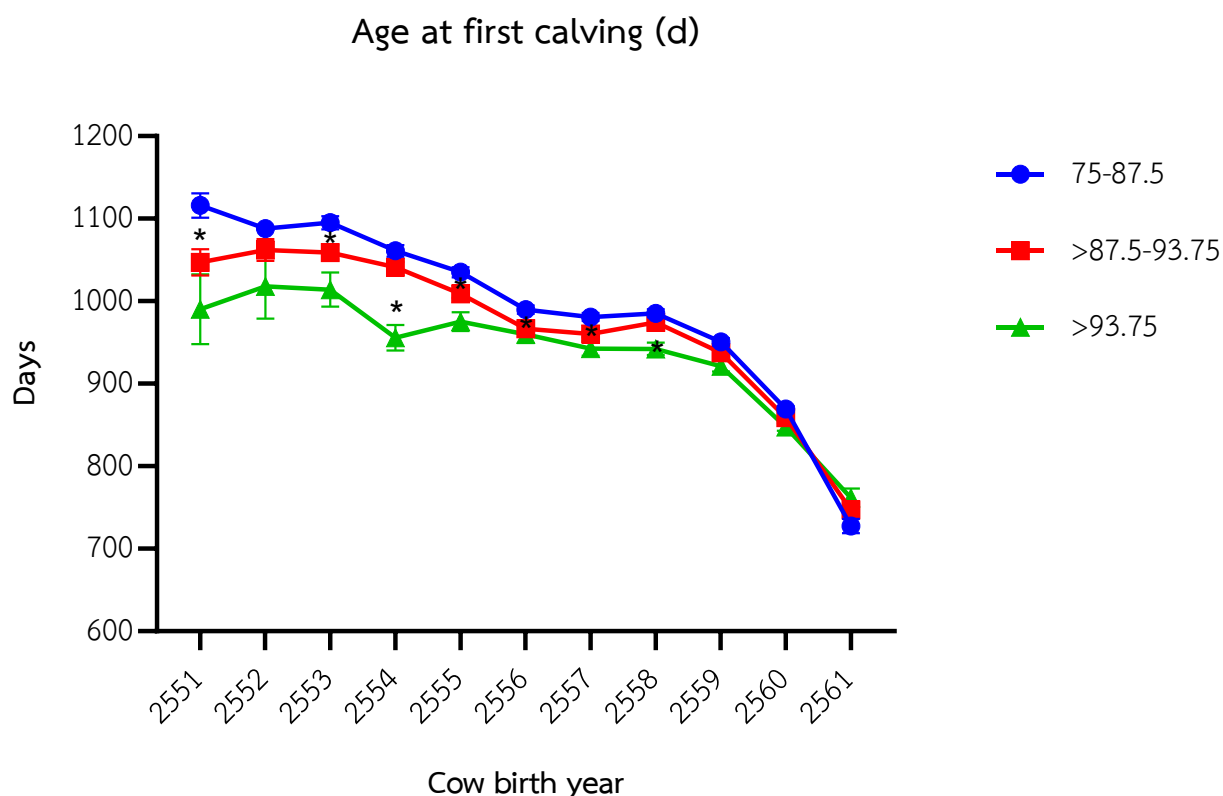


Figure 2 Least square means and standard error of AFC of three different breed groups.

(* = has significant difference between breed groups)

ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรกระหว่างกลุ่มของโคนมที่เกิดระหว่างปี พ.ศ. 2551-2561 (figure 2) ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (ANOVA) พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) ทั้ง 3 กลุ่มสายพันธุ์ รวมถึงอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรกของฝูงโคนมทดแทนมีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) และการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ AFC ระหว่างกลุ่มสายพันธุ์ด้วยวิธี Multiple t tests พบว่ากลุ่มสายพันธุ์ 75-87.5HF มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับกลุ่มสายพันธุ์ >87.5-93.75HF ในปีพ.ศ. 2551, 2553, 2555-2557 ($p < 0.0001$) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มสายพันธุ์ >93.75HF ในทุกๆ ปี ($p < 0.003$) ยกเว้นปี พ.ศ. 2552 ($p = 0.063$) และปี พ.ศ. 2561 ($p = 0.072$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มสายพันธุ์ >87.5-93.75HF และกลุ่มสายพันธุ์ >93.75HF

พบกว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในปี พ.ศ. 2554 และ 2558 ($p < 0.0003$) เท่านั้น โดยในโคนมที่เกิดเมื่อปี พ.ศ. 2561 ให้ค่าอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรกเฉลี่ยต่ำที่สุดที่ 727.50 ± 8.80 วัน ในกลุ่มสายเลือด 75-87.5HF ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับการศึกษาของ ผศ.ดร.ศกร คุณวุฒิฤทธิ์ธรรณ ระหว่างปี พ.ศ. 2531 - 2543 ว่าโคนมเพศเมียที่เกิดใหม่ในแต่ละปีมีอายุที่คลอดลูกครั้งแรกลดลงทุกปี แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มสายเลือดโฮลสไตน์ และสอดคล้องกับข้อมูลของสมุดพ่อพันธุ์โคนมปี พ.ศ. 2562 ที่แสดงประชากรโคนมในประเทศไทยระหว่างปีพ.ศ. 2537-2557 ว่ามีแนวโน้มการลดลงของอายุเมื่อคลอดลูกครั้งแรก 0.12 เดือนต่อปี และค่าความสามารถทางพันธุกรรมมีอัตราลดลง 0.01 เดือนต่อปี

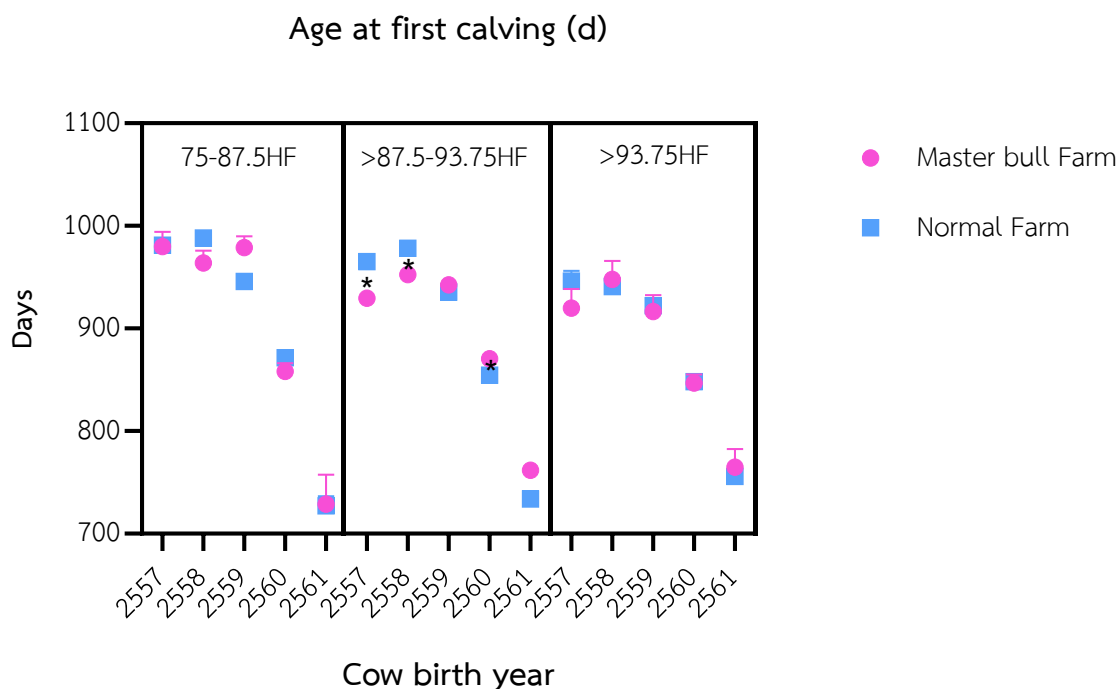


Figure 3 Least square means and standard error of AFC of three different breed groups separated by farm type. (* = has significant difference between farm's type)

การวิเคราะห์ด้วย Multiple t tests ระหว่าง AFC ของฟาร์มมาสเตอร์บูล และฟาร์มดำเนินการฯ 5 ปีซ้อนหลัง พบว่าอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรกในฟาร์มทั้ง 2 ประเภท ของกลุ่มสายพันธุ์ >87.5-93.75HF มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในปีพ.ศ. 2557-2558 และ 2560 ($p < 0.00002$) ส่วนในกลุ่มสายพันธุ์อื่นๆ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของฟาร์มทั้ง 2 ประเภท ซึ่งการที่ผู้วิจัยตั้งสมมุติฐานว่าการได้รับการของเจ้าหน้าที่ต่อการจัดการฟาร์ม ของฟาร์มโครงการมาสเตอร์บูลจะดีกว่าฟาร์มดำเนินการทั่วไปนั้น อาจตั้งจากการปฏิบัติงานตามนโยบายในปัจจุบันเท่านั้น แต่แท้จริงแล้วการบริการจากเจ้าหน้าที่อย่างสม่ำเสมอโดยติดตามงานจากระบบฐานข้อมูลโคนม ของฟาร์มทั้ง 2 ประเภทอาจมีลักษณะคล้ายคลึงกัน เกษตรกรเล็งเห็นถึงความสำคัญของการจัดการระบบสืบพันธุ์ของฝูงโคนมทดแทนได้ไม่ต่างกัน ทำให้ข้อมูลอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรกเฉลี่ยของฟาร์มทั้ง 2 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

จำนวนครั้งที่ผสมที่ทำให้เกิดการตั้งท้องครั้งแรก

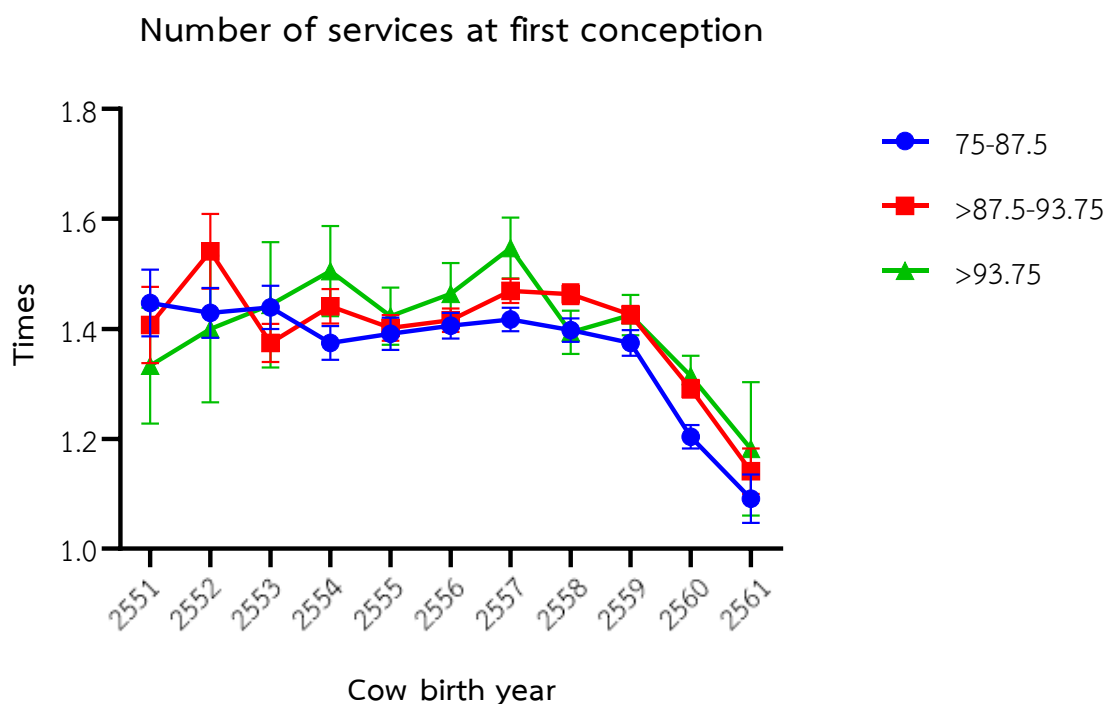


Figure 4 Least square means and standard error of NFC in three different breed groups.

ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างจำนวนครั้งที่ผสมระหว่างกลุ่มของโคนมที่เกิดระหว่างปี พ.ศ. 2551-2561 (figure 4) ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (ANOVA) พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เฉพาะในกลุ่มสายพันธุ์ 75-87.5HF และ >87.5-93.75HF ($p < 0.0001$) รวมถึงมีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) ส่วนการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ NFC ระหว่างกลุ่มสายพันธุ์ด้วยวิธี Multiple t tests พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มสายพันธุ์ ทั้ง 3 กลุ่ม ($p > 0.05$)

อัตราการผสมติดครั้งแรก

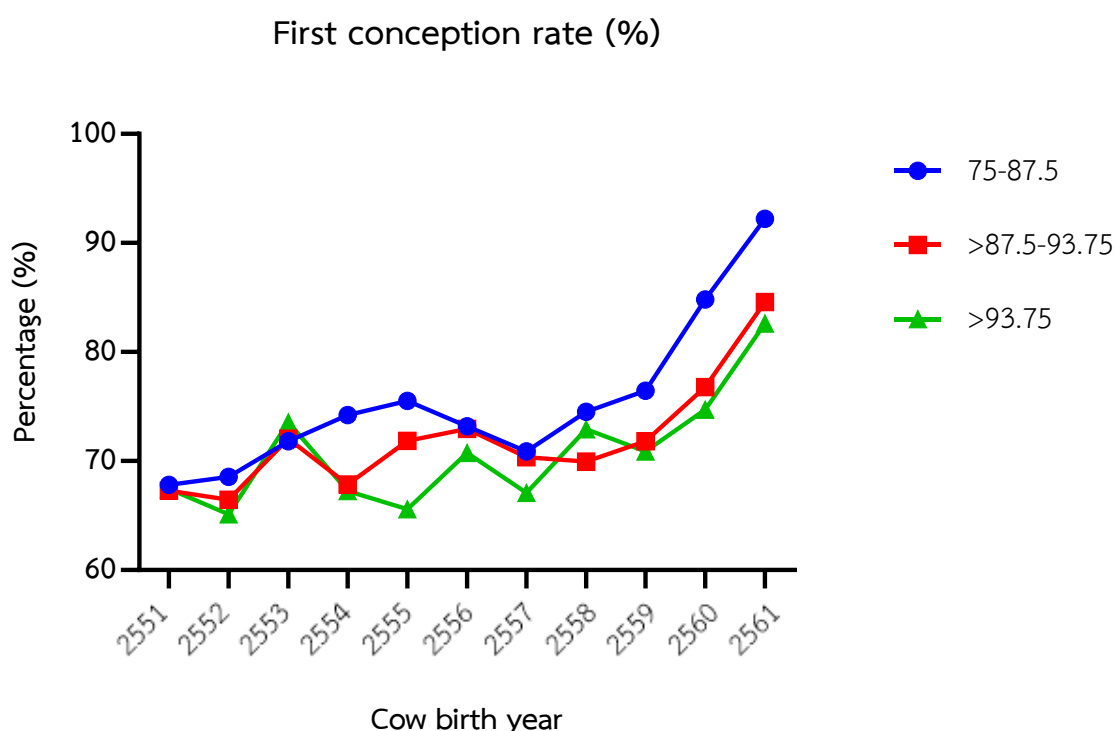


Figure 5 Least square means and standard error of FSC in three different breed group.

ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างอัตราการผสมติดครั้งแรกระหว่างกลุ่มของโคนมที่เกิดระหว่าง พ.ศ. 2551-2561 (figure 5) ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (ANOVA) พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.03$) โดยการทดสอบระหว่างกลุ่มสายพันธุ์ พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม 75-87.5HF กับกลุ่มสายพันธุ์อื่นๆ ($p < 0.01$) และเมื่อทดสอบแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของอัตราการผสมติดเฉลี่ยแต่ละปี พบว่า มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทุกปี ($p < 0.0001$)

จากการวิเคราะห์พบว่าดัชนีประสิทธิภาพของโคนมสาวย้อนหลัง 10 ปี มีการพัฒนาการในทางที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยเมื่อเปรียบเทียบค่า AFC NFC และ FSC ในแต่ละกลุ่มสายพันธุ์ สรุปได้ว่ากลุ่มพันธุ์ที่มีเปอร์เซ็นต์เลือด HF ต่ำกว่ามีประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์ที่ดีกว่าภายใต้สภาพการเลี้ยงเดียวกัน สอดคล้องกับรายงานการศึกษาของ น.สพ. ชาลี ลีละสิริ และคณะ (2006) แต่เนื่องจากโคนมที่เกิดในปี พ.ศ. 2560 และ 2561 มีอายุปัจจุบันเท่ากับ 18 ถึง 40 เดือนเท่านั้น จึงทำให้กลุ่มประชากรนี้ยังไม่ได้ผ่านการผสมหรือคลอดในครั้งแรกทั้งหมด ค่าเฉลี่ยดังกล่าวจึงยังมียังมีค่าน้อยกว่าความเป็นจริง

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาค่าดัชนีประสิทธิภาพของฝูงโคนมทดแทนของฟาร์มโครงการผลิตฟาร์มโคนมพันธุ์ทรอปิคอลไฮลสไตนกับฟาร์มที่ดำเนินกิจการทั่วไปไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลดัชนีประสิทธิภาพของฝูงโคนมทดแทน ย้อนหลังตั้งแต่ปี พ.ศ. 2551-2561 ทั้งค่าอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรก จำนวนครั้งที่ผสมที่ทำให้ท้อง และอัตราการผสมติด ของฟาร์มทั้งสองประเภทยังมีความสัมพันธ์ทางสถิติกับจำนวนปี

ที่เพิ่มขึ้น คือมีค่าที่ดีขึ้นตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) เนื่องจากฟาร์มทั้งสองประเภทมีการจัดการที่ดีขึ้น

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาค่าอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรก ซึ่งเป็นลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจในโคนมนี้ แม้จะไม่มี ความแตกต่างของการจัดการฟาร์มมาสเตอร์บูลและฟาร์มทั่วไป แต่ก็สามารถส่งเสริมให้เกษตรกรทราบข้อมูลที่จะ ช่วยวางแผนการจัดการให้เกิดประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นในฟาร์มได้ โดยการวิเคราะห์ข้อมูลค่าอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรกใน 2-3 ปีหลังจากที่ผ่านมา มีแนวโน้มที่ลดลงเป็นสัญญาณที่ดีในการจัดการฝูงทดแทน แต่ก็สามารถจะพัฒนา ให้มีค่าดัชนีที่ดีขึ้นได้อีก เพื่อเป็นการยกระดับความสัมฤทธิ์ผลทางธุรกิจการเลี้ยงโคนม และทำให้เกษตรกรมี อาชีพการเลี้ยงโคนมในประเทศไทยได้อย่างยั่งยืน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายณรินทร์ จารี และนายภาณุวัฒน์ สุขทัศน์ ที่ปรึกษาด้านการจัดการข้อมูลจากระบบ ฐานข้อมูลโคนม กรมปศุสัตว์ นายสมศักดิ์ เปรมปรี และ นายกิตติศักดิ์ เหล็งหนูดำ ที่ปรึกษาด้านสถิติ และการ นำเสนอข้อมูล ที่ทำให้งานวิจัยมีความสมบูรณ์ และสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- กลุ่มวิจัยและประเมินพันธุกรรมสัตว์. สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. กรมปศุสัตว์. 2562. “แนวโน้ม ลักษณะพันธุกรรมและลักษณะปรากฏ” สมุดพ่อพันธุ์โคนม 2562 หน้า 11-20.
- ขวัญชาย เครือสุคนธ์ และ ศร อภิภูมารกร. 2547. ประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของโคนมสาวลูกผสมโฮลสไตน์ใน เขตภาคเหนือของประเทศไทย. เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2547;2:9-15.
- ขาลี ลีละสิริ สายัณห์ บัวบาน และจวีรัตน์ แสนโกษณ์. 2548. สมรรถภาพการสืบพันธุ์โคนมลูกผสมระดับ สายเลือดต่างๆ ของเกษตรกรรายย่อย ในประเทศไทย. สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุ สัตว์.
- ศกร คุณวุฒิจูฤทธิ์. 2563. ลักษณะอายุเมื่อคลอดลูกครั้งแรกของโคนมในประเทศไทย (ออนไลน์) แหล่งที่มา www.dpogenetics.com/index.php/article-summary-menu/57-age. 6 ตุลาคม 2563.
- Adamczyk, K., Makulska, J., Jagusiak, W. & Węglarz, A. 2017. Associations between strains, herd size, age at first calving, culling reason and lifetime performance characteristics in Holstein-Friesian cows. *Animal* 11 (2): 327–334.
- Bond, G.B., von Keyserlingk, M.A., Chapinal, N., Pajor, E.A. & Weary, D.M. 2015. Among farm variation in heifer BW gains. *Animal* 9 (11): 1884–1887.
- Chester-Jones, H., Heins, B.J., Ziegler, D., Schimek, D., Schuling, S., Ziegler, B., de Ondarza, B., Sniffen, C.J. & Broadwater, N. 2017. Relationships between early-life growth, intake, and birth season with first-lactation performance of Holstein dairy cows. *Journal of Dairy Science* 100 (5): 3697–3704.

- Eastham, N.T., Coates, A., Cripps, P., Richardson, H., Smith, R. & Oikonomou, G. 2018. Associations between age at first calving and subsequent lactation performance in UK Holstein and Holstein-Friesian dairy cows. *PlosOne* 13 (6): e0197764.
- Ettema, J.F. & Santos, J.E. 2004. Impact of age at calving on lactation, reproduction, health, and income in first-parity Holsteins on commercial farms. *Journal of Dairy Science* 87 (8): 2730–2742.
- Krpalkova, L., Cabrera, V.E., Kvapilik, J., Burdych, J. & Crump, P. 2014. Associations between age at first calving, rearing average daily weight gain, herd milk yield and dairy herd production, reproduction, and profitability. *Journal of Dairy Science* 97 (10): 6573–6582.
- MacDonald, K.A., Penno, J.W., Bryant, A.M. & Roche, J.R. 2005. Effect of feeding level pre- and post-puberty and body weight at first calving on growth, milk production, and fertility in grazing dairy cows. *Journal of Dairy Science* 88 (9): 3363–3375.
- Rincker D., L.E., Vandehaar, M.J., Wolf, C.A., Liesman, J.S., Chapin, L.T. & Weber Nielsen, M.S. 2011. Effect of intensified feeding of heifer calves on growth, pubertal age, calving age, milk yield, and economics. *Journal of Dairy Science* 94 (7): 3554–3567.
- Steele, M. (2020). Age at first calving in dairy cows: which months do you aim for to maximise productivity?. *Veterinary Evidence*. 5. 10.18849/ve.v5i1.248.
- Wathes, D.C., Pollot, G.E., Johnson, K.F., Richardson, H. & Cooke, J.S. 2014. Heifer fertility and carry over consequences for life time production in dairy and beef cattle. *Animal* 8 (1): 91–104.

อิทธิพลของพรอสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคชนในภาคใต้ของไทย

วิชญ์ ไพศาลรุ่งพนา^{1/} วิศิษฐ์ ทองเที่ยง^{2/} ธวัชชัย โพธิ์คำ^{3/} จตุพร พงษ์เพ็ง^{3/}

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของฮอร์โมนพรอสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งและความกำหนดโคชนในภาคใต้ของประเทศไทย ทำการศึกษาในโคชนปลดระวางเพศผู้อายุ 10-12 ปี จำนวน 4 ตัว ที่มีสุขภาพแข็งแรง ในฟาร์มเกษตรกรพื้นที่จังหวัดพัทลุง ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อติดต่อกัน 8 ครั้ง (2 สัปดาห์/ครั้ง) โดยแบ่งการรีดเก็บน้ำเชื้อออกเป็น 3 ช่วง ดังนี้ ช่วงที่ 1 และ 3 รีดเก็บน้ำเชื้อ 3 ครั้งติดต่อกันโดยพ่อพันธุ์ทุกตัวไม่ได้รับการฉีดฮอร์โมน ส่วนช่วงที่ 2 รีดเก็บติดต่อกัน 2 ครั้งโดยพ่อพันธุ์ได้รับการฉีดฮอร์โมนพรอสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา ขนาด 2 มิลลิกรัม (Cloprostenol 500 ไมโครกรัม) เข้ากล้ามเนื้อก่อนรีดเก็บน้ำเชื้อ 1 ชั่วโมง เก็บข้อมูลระยะเวลาในการรีดเก็บ ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสด ได้แก่ ปริมาตร ความเข้มข้น จำนวนอสุจิทั้งหมด และอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ และคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง ได้แก่ อัตราการเคลื่อนที่ ความเร็วและลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้ออัตโนมัติ ผลการทดลองพบว่าในช่วงที่ 2 ซึ่งเป็นช่วงที่มีการฉีดฮอร์โมนในระยะเวลาในการรีดเก็บน้ำเชื้อ 11.63 นาที น้อยกว่าช่วงที่ 1 และช่วงที่ 3 (32.64 นาทีและ 32.87 นาที ตามลำดับ) ส่วนคุณภาพน้ำเชื้อสดของพ่อพันธุ์ในช่วงที่ 2 มีปริมาตรน้ำเชื้อ 7.25 มิลลิกรัม มากกว่าช่วงที่ 1 (3.35 มิลลิกรัม) และช่วงที่ 3 (2.83 มิลลิกรัม) และมีจำนวนอสุจิทั้งหมด 14,337.25 ล้านตัว มากกว่าช่วงที่ 1 (4,128.36 ล้านตัว) แต่ไม่แตกต่างกับช่วงที่ 3 (14,712.87 ล้านตัว) ($P < 0.05$) ในขณะที่อัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไม่แตกต่างกันทางสถิติทั้ง 3 ช่วง ($P > 0.05$) ส่วนคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง พบว่าอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ในช่วงที่ 2 มีค่าไม่แตกต่างจากช่วงที่ 1 แต่สูงกว่าช่วงที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ซึ่งมีค่าอัตราการเคลื่อนที่ 63.71, 63.92 และ 56.68 % และค่าอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า 56.92, 58.36 และ 50.53% ในช่วงที่ 2 1 และ 3 ตามลำดับ แต่ความเร็วในการเคลื่อนที่ VAP VSL และ VCL และลักษณะการเคลื่อนที่ ALH BCF STR และ LIN ของทั้ง 3 ช่วงไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) สรุปผลการทดลองฮอร์โมนพรอสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา สามารถเพิ่มความกำหนด ปริมาตรน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้ และจำนวนอสุจิทั้งหมดของน้ำเชื้อสด แต่ไม่มีอิทธิพลโดยตรงต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งของโคชนปลดระวางในภาคใต้ของไทย

คำสำคัญ : คุณภาพน้ำเชื้อ, โคชน, พรอสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอล ฟา

เลขทะเบียนวิจัย : 60(1)-0208-029

^{1/}ศูนย์ฝึกอบรมและถ่ายทอดเทคโนโลยีชีวภาพการปศุสัตว์ ต.ท่าหลวง อ.ท่าหลวง จ.ลพบุรี

^{2/}สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดตรัง ต.ทับเที่ยง อ.เมือง จ.ตรัง

^{3/}ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี อ.แก่งคอย จ.สระบุรี

Influence of PGF_{2α} on semen quality of fighting bulls in southern Thailand

Wisanu Phaisalrungrana^{1/} Visid Thongtheang^{2/} Twatchai Pocum^{3/} Jatuporn Pongpeng^{3/}

Abstract

The objective of this study was to determine the effects of PGF_{2α} on libido and frozen semen quality of fighting bulls in the southern part of Thailand. This study was conducted in 4 healthy retired fighting bulls, ranging in age from 10 to 12 years. The semen samples were collected over 8 consecutive times (two-week interval) by dividing the collection time into 3 periods. During the first and the third period, semen samples were collected from all bulls without hormone injection. However, in the second period, 2 ml of PGF_{2α} was injected intramuscularly 1 hour prior to the collecting of semen. Fresh semen quality was evaluated by using several parameters, including volume, concentration and sperm motility. The frozen semen quality was evaluated in many aspects, including motility, progressive motility, sperm velocity and kinematic movement by using Computer Assisted Semen Analysis. The results showed that in the second period, the duration of semen collection was less than the first and the third periods, which were 11.63, 32.64 and 32.87 minutes respectively. In terms of fresh semen, the volume of fresh semen collected during in the second period (7.25 milliliter) were higher than the first period (3.35 milliliter) and the third period (2.83 milliliter). Also, the total sperm count of the second period, which was 14,337.25 million, was higher than the first period (4,128.36 million), but there was no significantly difference compared to the third period (14,712.87 million) ($P < 0.05$). However, the sperm motility did not show significant difference in 3 periods. ($P > 0.05$). Concentrate on the frozen semen quality there were no significant difference of motility and progressive motility between the first and the second period whereas both parameters of second period were significantly higher than the third period (the motility of the second, the first and third period were 63.71%, 63.92% and 56.68%, respectively and the progressive motility of the second, the first and third period were 56.92%, 58.36% and 50.53%, respectively). However, in the velocity movement of VAP, VSL and VCL, and kinetic movement of ALH, BCF, STR and LIN did not show significant difference between 3 periods ($P > 0.05$). In conclusion, PGF_{2α} could increase libido, volume and total sperm count of the fresh semen but did not direct affect on the frozen semen quality of fighting bulls in the southern part of Thailand.

Keywords: Semen quality, fighting bulls, PGF_{2α}

Registered No: 60(1)-0208-029

^{1/} Livestock Technology Transfer and Training Center, Tha Luang, Tha Luang, Lopburi

^{2/} Trang Provincial Livestock Office, Tubtaeng, Muang, Trang.

^{3/} Saraburi Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Keang Koi, Saraburi.

คำนำ

การเลี้ยงโคพื้นเมืองในภาคใต้โดยทั่วไปจะใช้พ่อพันธุ์โคชนในการผสมพันธุ์เพื่อผลิตลูกโคพื้นเมือง หากได้ลูกโคเพศผู้ที่มีลักษณะดีก็จะนำมาฝึกเป็นโคชน ซึ่งโคชนมีมูลค่าทางเศรษฐกิจที่สูงกว่าโคเพศผู้และเพศเมียทั่วไปมากกว่า 3-4 เท่าตัว โดยโคชนที่จะนำมาเป็นพ่อพันธุ์ต้องมีลักษณะรูปร่างตรงตามอัตลักษณ์ของโคชนและมีประวัติการแข่งขันที่ดี แต่ปัจจุบันจำนวนพ่อพันธุ์มีจำนวนน้อยและยากต่อการเข้าถึงเพราะเกษตรกรจะใช้เป็นพ่อพันธุ์คุมฝูงก็ต่อเมื่อปลดระวางจากการชนและมีอายุมากแล้วเท่านั้น ซึ่งพ่อพันธุ์ดังกล่าวอาจมีปัญหาเรื่องสุขภาพ ความสมบูรณ์พันธุ์และความกำหนดต่ำ แต่ส่วนทางกับความต้องการของเกษตรกรในการขอรับบริการผสมพันธุ์ อีกทั้งเจ้าของไม่ยินยอมให้ผสมพันธุ์กับแม่โคของบุคคลอื่นนอกเครือข่าย และมีค่าบริการผสมพันธุ์สูงมาก ทำให้เกษตรกรรายย่อยหันมาสนใจขอรับบริการผสมเทียมจากกรมปศุสัตว์มากขึ้น แต่การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งโคชนที่มีลักษณะดีในปัจจุบันยังไม่เพียงพอกับความต้องการของเกษตรกร จากข้อจำกัดดังกล่าวจำเป็นต้องใช้ฮอร์โมนเข้ามาช่วยในการแก้ไขปัญหาเพื่อให้สามารถรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์กลุ่มดังกล่าวให้ได้ทั้งคุณภาพและปริมาณที่เพียงพอสำหรับการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งคุณภาพดี เพื่อบริการผสมเทียมให้เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกร

ฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา ($\text{PGF}_{2\alpha}$) เป็นฮอร์โมนที่มีผลต่อการทำงานของต่อมพิทูอิทารี (pituitary gland) ในการกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนลูทิไนซิง (Luteinizing Hormone) ทำให้อินเตอร์สตีเชียลเซลล์ (interstitial cell) ในอัณฑะผลิตและหลั่งฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน (Testosterone) ซึ่งส่งผลต่อการแสดงออกของพฤติกรรมทางเพศและกระบวนการสร้างอสุจิ โดยมีผลกระตุ้นการบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบรอบๆ อีพิดิไดมิส (Epididymis) หรือหลอดเก็บอสุจิ ซึ่งเป็นที่อยู่ของอสุจิที่โตเต็มที่พร้อมสำหรับการหลั่งออกมาทางอวัยวะสืบพันธุ์ (Haynes et al., 1977; Reichard et al., 1978; Hib and Oscar, 1978; Hafez and Hafez, 2000) จากรายงานการใช้ฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟาในพ่อพันธุ์สัตว์แต่ละชนิด สำหรับการผลิตน้ำเชื้อ พบว่าให้ผลต่อความกำหนดและคุณภาพน้ำเชื้อแตกต่างกันไป โดยการฉีดฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา ในพ่อพันธุ์โคเนื้อพบว่าไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในซีรัมแต่มีผลทำให้ปริมาตรอสุจิที่รีดเก็บได้ต่อครั้งเพิ่มขึ้น (เจษฎาและคณะ, 2555) ในขณะที่การฉีดฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา ให้กับพ่อพันธุ์โคนมพบว่ามีความกำหนด ปริมาตรและความเข้มข้นของน้ำเชื้อเพิ่มขึ้น (Masoumi et al., 2011) ส่วนในแพะการฉีดฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟาสามารถเพิ่มความเข้มข้นของอสุจิ จำนวนอสุจิต่อการรีด จำนวนอสุจิมิชีวิต อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ และสามารถลดจำนวนอสุจिरูปร่างผิดปกติได้ (Barwary et al., 2013) ในขณะที่การฉีดฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟาให้กับพ่อพันธุ์แกะพบว่าสามารถเพิ่มปริมาตร ความเข้มข้นและจำนวนอสุจิทั้งหมด แต่ไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ จำนวนอสุจิมิชีวิต และอสุจิที่ผิดปกติ (Olfati et al., 2013) ส่วนในพ่อพันธุ์สุกรพบว่าการฉีดฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา มีผลทำให้ทั้งความกำหนดและคุณภาพน้ำเชื้อเพิ่มขึ้น (Hashizume and Niwa, 1984)

ดังนั้นจึงทำการศึกษาผลของฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา ต่อความกำหนด คุณภาพ น้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งของโคชนปลดระวางในภาคใต้ของไทย เพื่อนำผลการทดลองมาใช้พัฒนา ประสิทธิภาพการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งคุณภาพดี สำหรับการอนุรักษ์และการใช้ประโยชน์ในการให้บริการผสม เทียมแก่เกษตรกรทั่วไปเพื่อผลิตโคพื้นเมืองภาคใต้ให้คงอยู่สืบไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

โคชนเพศผู้ปลดระวางในภาคใต้อายุ 10-12 ปี จำนวน 4 ตัว มีร่างกายสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง คะแนนรูปร่าง 3.5 คะแนน สามารถรีดเก็บน้ำเชื้อได้ด้วยวิธีโยนีเทียม โดยน้ำเชื้อสดมีอัตราการเคลื่อนที่ไม่ต่ำกว่า 70% ความผิดปกติของตัวอสุจิส่วนหัวไม่เกิน 12% และส่วนหางไม่เกิน 25% อยู่ภายใต้สภาพการเลี้ยงดู ของฟาร์มเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดพัทลุง ผ่านการตรวจโรคตามข้อกำหนดของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อมาตรฐานกรม ปศุสัตว์ ทำการถ่ายพยาธิและให้วิตามินก่อนการรีดเก็บน้ำเชื้อ โดยทำการศึกษาดังแต่เดือนมีนาคม ถึง เดือน สิงหาคม 2560

ตัวล่อเป็นแม่โคพื้นเมืองที่ทำการเหนียวนำการเป็นสัดก่อนการรีดเก็บน้ำเชื้อ 9 วัน ด้วยการสอด ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด (CIDR-B® , InterAg, New Zealand) ร่วมกับการฉีดฮอร์โมน โปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา ในวันที่ 7 พร้อมกับถอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด

วิธีการทดลอง

ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ด้วยวิธีโยนีเทียม ติดต่อกัน 8 ครั้ง แต่ละคร้งรีดเก็บน้ำเชื้อห่างกัน 2 สัปดาห์ โดยแบ่งออกเป็น 3 ช่วง ดังนี้

ช่วงที่ 1 เป็นช่วงก่อนทดลอง รีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ทุกตัวโดยไม่ได้รับการฉีดฮอร์โมนโปรสตา แกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา โดยรีดเก็บน้ำเชื้อจำนวน 3 ครั้งติดต่อกัน ห่างกัน 2 สัปดาห์

ช่วงที่ 2 เป็นช่วงทดลอง โดยพ่อพันธุ์ได้รับการฉีดฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา ขนาด 2 มิลลิลิตร (Cloprostenol 250 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร, Estrumate®, MSD Animal Health) เข้ากล้ามเนื้อ ก่อนรีดเก็บน้ำเชื้อ 1 ชั่วโมง โดยรีดเก็บน้ำเชื้อจำนวน 2 ครั้งติดต่อกัน ห่างกัน 2 สัปดาห์

ช่วงที่ 3 เป็นช่วงหลังทดลอง รีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ทุกตัวโดยไม่ได้รับการฉีดฮอร์โมนโปรสตา แกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา โดยรีดเก็บน้ำเชื้อจำนวน 3 ครั้งติดต่อกัน ห่างกัน 2 สัปดาห์

การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง

ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งจากพ่อพันธุ์ทั้ง 4 ตัว ตามวิธีของการผลิตน้ำเชื้อโคของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ผสมเทียมลำพูนกลาง กรมปศุสัตว์ โดยกำหนดให้มีความเข้มข้น 30 ล้านตัว/โดส บรรจุน้ำเชื้อในหลอดขนาด 0.25 มิลลิลิตร (French ministraws) และเก็บรักษากายไ้ระดับไนโตรเจนเหลวตลอดเวลา

การประเมินความกำหนด

ประเมินจากระยะเวลาในการรีดเก็บตั้งแต่พ่อพันธุ์เข้ามาในบริเวณรีดเก็บน้ำเชื้อ แสดงอาการสนใจ และสัมผัสแม่โคตัวล่อ ขึ้นทับและกระแทกจนถึงหลังน้ำเชื้อ (Reaction time)

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

คุณภาพน้ำเชื้อสด ประเมินด้วย ปริมาตร ความเข้มข้น และอัตราการเคลื่อนที่ และน้ำเชื้อแช่แข็ง ประเมินคุณภาพภายหลังการแช่แข็ง 24 ชั่วโมง โดยการสุมน้ำเชื้อแช่แข็งจำนวน 3 หลอด จากแต่ละพ่อในแต่ละช่วงการทดลองมาทำละลายโดยแช่ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 วินาที ตรวจประเมินค่าอัตราการเคลื่อนที่ (Motility) อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (Progressives motility) ความเร็วในการเคลื่อนที่ (Velocity movement) ได้แก่ Average path velocity (VAP) Straight-line velocity (VSL) และ Curvilinear velocity (VCL) และลักษณะการเคลื่อนที่ (Kinematic movement) ได้แก่ Amplitude of lateral head displacement (ALH) Beat cross frequency (BCF) Straightness (STR) และ Linearity (LIN) ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้ออัตโนมัติ (CASA) โปรแกรม IVOS motility analyzer version 12.0 (รุ่น Hamilton-Thorne, Biosciences, MA., USA.)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนที่มีการวัดซ้ำ ด้วยวิธี Repeated Measures ANOVA (Lund Research Ltd[©], 2018) โดยใช้ General linear model procedure และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองด้วย Duncan's new multiple range test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลองการฉีดฮอร์โมนพรอสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา ให้กับพ่อโคชนปลดระวางพบว่า ในช่วงที่ 2 ซึ่งเป็นช่วงที่มีการฉีดฮอร์โมนพ่อพันธุ์ใช้ระยะเวลาในการรีดเก็บน้ำเชื้อ 11.63 นาที น้อยกว่าช่วงที่ 1 และช่วงที่ 3 (32.64 นาทีและ 32.87 นาที ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนคุณภาพน้ำเชื้อสดของพ่อพันธุ์ในช่วงที่ 2 มีปริมาตรน้ำเชื้อ 7.25 มิลลิลิตร มากกว่าช่วงที่ 1 (3.35 มิลลิลิตร) และช่วงที่ 3 (2.83 มิลลิลิตร) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และมีจำนวนอสุจิทั้งหมด 14,337.25 ล้านตัว มากกว่าช่วงที่ 1 (4,128.36 ล้านตัว) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่ไม่แตกต่างกับช่วงที่ 3 (14,712.87 ล้านตัว) ($P>0.05$) ในขณะที่อัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไม่แตกต่างกันทางสถิติทั้ง 3 ช่วง ($P>0.05$) ดัง Table 1

Table 1 Reaction time and Characteristics of fresh semen from 3 periods in fighting bulls.

Parameter	Period			SEM	P-value
	1	2	3		
Reaction time (min.)	32.64 ^a	11.63 ^b	32.87 ^a	1.58	0.0001
Volume (ml.)	3.35 ^b	7.25 ^a	4.57 ^b	0.40	0.0005
Concentration (x10 ⁶ /ml.)	1,376.36 ^b	2,167.5 ^b	3,142 ^a	211.02	0.0003
Total sperm (x10 ⁶)	4,128.36 ^b	14,337.25 ^a	14,712.87 ^a	1532	0.001
Motility (%)	72.73	74.38	71.67	0.67	0.2987

^{a,b} Least Square means followed by different letters on the same row are significantly different (P<0.05)

คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งพบว่า อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ในช่วงที่ 2 มีค่าไม่แตกต่างจากช่วงที่ 1 แต่สูงกว่าช่วงที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ซึ่งมีความอัตราการเคลื่อนที่ 63.92, 63.71 และ 56.68 % และมีค่าอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า 58.36, 56.92 และ 50.53 % ในช่วงที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ แต่ความเร็วในการเคลื่อนที่ VAP VSL และ VCL และลักษณะการเคลื่อนที่ ALH BCF STR และ LIN ของทั้ง 3 ช่วงไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ดัง Table 2

Table 2 Characteristics of frozen semen from 3 periods in fighting bulls.

Parameter	Period			SEM	P-value
	1	2	3		
Motility (%)	63.92 ^a	63.71 ^a	56.68 ^b	5.337	0.022
Progressive motility (%)	58.36 ^a	56.92 ^a	50.53 ^b	5.134	0.017
VAP (µm/s)	55.17	51.90	55.30	3.339	0.178
VCL (µm/s)	87.37	79.45	84.32	5.352	0.097
VSL (µm/s)	45.27	44.40	46.73	3.057	0.371
ALH (µm)	4.47	4.10	4.31	0.293	0.193

Parameter	Period			SEM	P-value
	1	2	3		
BCF (Hz)	23.64	23.18	23.46	1.216	0.855
STR (%)	82.33	81.94	84.10	4.268	0.609
LIN (%)	53.83	55.95	57.00	3.739	0.385

^{a,b} Least Square means followed by the different letters on the same row are significantly different ($P < 0.05$)

จากผลการทดลองการฉีดฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา ให้กับพ่อพันธุ์โคชนปลดระหว่างพบว่าสามารถเพิ่มความกำหนด โดยประเมินจากระยะเวลาในการรีดเก็บน้ำเชื้อที่น้อยกว่าช่วงที่ไม่ได้ฉีดฮอร์โมน นอกจากนี้ยังมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อสด ในการเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้ โดยในช่วงที่ 2 ที่ฉีดฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา มีผลทำให้จำนวนอสุจิทั้งหมดเพิ่มขึ้นมากกว่าช่วงที่ 1 แต่ไม่แตกต่างกับช่วงที่ 3 สอดคล้องกับ Masoumi et al. (2011) ที่ศึกษาอิทธิพลของฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา ต่อคุณภาพน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคนมที่มีความกำหนดต่ำ โดยทำการฉีดฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา กับพ่อพันธุ์โคนมก่อนรีดเก็บน้ำเชื้อ 30 นาที ในกลุ่มทดลองโดยรีดเก็บน้ำเชื้อทุก 2 สัปดาห์ เป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่าระยะเวลาในการรีดเก็บน้ำเชื้อลดลง ในขณะที่ปริมาตรน้ำเชื้อและความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สันนิษฐานว่าฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา ไม่ใช่ฮอร์โมนที่กระตุ้นความกำหนดโดยตรงแต่เป็นฮอร์โมนในกลุ่มสเตียรอยด์ที่มีผลต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย โดยมีผลไปกระตุ้นต่อมพิทูอิทารี ให้หลั่งฮอร์โมนลูทีไนซิง ซึ่งจะมีผลต่ออินเตอร์สติเชียลเซลล์ในอัณฑะให้ผลิตและหลั่งฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน โดยไปกระตุ้นกระบวนการสร้างตัวอสุจิและกระตุ้นการบีบตัวของกล้ามเนื้อเรียบทำให้พ่อพันธุ์โคนมหลั่งอสุจิออกมาในปริมาณมาก นอกจากนี้ยังมีผลต่อการแสดงออกของพฤติกรรมทางเพศของพ่อพันธุ์ (Hafez and Hafez, 2000) และจากการศึกษาของ Haynes et al (1977) ทำการศึกษาให้ฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา ในพ่อโคอายุ 18 เดือนในปริมาณ 2,000 นาโนกรัม/นาฬิกา เข้าสู่เส้นเลือด เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมงพบว่าส่งผลให้ระดับฮอร์โมนลูทีไนซิง กลูโคคอร์ติคอยด์ (Glucocorticoids) และเทสโทสเตอโรน ในกระแสเลือดเพิ่มขึ้นและคงระดับอยู่ได้นานขึ้น นอกจากนี้การฉีดโปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา ยังส่งผลต่อการบีบตัวกล้ามเนื้อเรียบของอวัยวะสืบพันธุ์ต่างๆ ซึ่งกระตุ้นโดยนอร์อิพิเนฟริน (norepinephrine) หรือ อะซิติลโคลีน (Acetylcholine) เพิ่มขึ้น ส่งผลต่อการปล่อยน้ำเชื้อและต่อมร่วม (Accessory glands) ที่ผลิตเซมินอลพลาสมา (Seminal plasma) ที่อยู่โดยรอบบีบตัวและปล่อยน้ำเชื้อออกมา (Hib and Oscar, 1978) ดังผลการศึกษาพบว่าคุณภาพน้ำเชื้อสดในส่วนองปริมาตรที่รีดเก็บได้ในช่วงที่ 2 ที่มีค่าสูงกว่าช่วงที่ 1 และ 3 เนื่องจากมีกลไกการทำงานของฮอร์โมนที่มีผลต่อกล้ามเนื้อเรียบจึงทำให้ทั้งจำนวนอสุจิและเซมินอลพลาสมาถูกหลั่งออกมาในปริมาณมากกว่าปกติ แต่จำนวนอสุจิทั้งหมดในช่วงที่ 2 มีค่าสูงกว่าช่วงที่ 1 แต่ไม่แตกต่างกับช่วงที่ 3 นั้นอาจเนื่องจากผลของฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา ไปมีอิทธิพลต่อกระบวนการสร้างอสุจิตลอดวงจรรอบการผลิต ทั้งในขั้นตอนการพัฒนาจาก

สเปิร์มาโตไซด์ (Spermatocyte) และเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นสเปิร์มาติก (Spermatid) ที่เก็บไว้ในท่อเซมินิเฟอรัส (Seminiferous tubules) จนกระทั่งเป็นอสุจิ (Spermatozoa) ซึ่งจะใช้เวลาในการพัฒนาดังกล่าวประมาณ 2 สัปดาห์ถึง 1 เดือนกว่าจะถูกหลั่งออกนอกร่างกาย (Staub and Johnson, 2018)

นอกจากนี้ยังพบว่าการประยุกต์ใช้ในปศุสัตว์หลายชนิด เช่น การฉีดฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟาในแพะพบว่าสามารถเพิ่มความเข้มข้นของอสุจิ จำนวนอสุจิต่อการรีด อสุจิมีชีวิต อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ และลดจำนวนตัวอสุจิที่ผิดปกติ (Barwary et al., 2013) ในแกะถูกผสมพบว่าการฉีดฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟาสามารถเพิ่มปริมาตร ความเข้มข้นและจำนวนอสุจิทั้งหมดแต่ไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่อสุจिरายตัว จำนวนอสุจิมีชีวิตและอสุจิรูปร่างผิดปกติ (Olfati et al., 2013) และในสุกรทำให้จำนวนอสุจิทั้งหมดสูงขึ้นแต่ไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่และยังทำให้พ่อพันธุ์สุกรมีพฤติกรรมทางเพศดีขึ้น (Ryu et al., 2007) แต่ให้ผลแตกต่างในกระบือซึ่งพบว่าการฉีดฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา ไม่มีผลต่อระยะเวลาการรีดเก็บ ปริมาตร ความเข้มข้น จำนวนอสุจิทั้งหมดต่อการรีดและอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Capitan et al., 1990)

ผลของการฉีดฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง พบว่าอัตราการเคลื่อนที่และค่าอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิในช่วงที่ 2 มีค่าไม่แตกต่างกับช่วงที่ 1 แต่มีค่าสูงกว่าช่วงที่ 3 แต่ไม่พบความแตกต่างของลักษณะการเคลื่อนที่ ทั้งนี้อาจไม่ได้เกิดจากอิทธิพลของฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา แต่คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งขึ้นอยู่กับปัจจัยของคุณลักษณะของน้ำเชื้อสดตั้งต้นก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิตมากกว่า เช่น แรงดันออสโมติก และความแข็งแรงของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ เป็นต้น (Correa et al., 1997; Parks and Graham, 1992) โดยเฉพาะในช่วงที่ 3 ซึ่งพบว่ามีอัตราการเคลื่อนที่ต่ำสุด อาจสืบเนื่องมาจากน้ำเชื้อสดตั้งต้นมีอสุจิจากขบวนการสร้างที่ถูกกระตุ้นให้เกิดขึ้นเร็วกว่าปกติ ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าคุณภาพน้ำเชื้อสดของพ่อโคชนทั้งหมดอยู่ในเกณฑ์ดี ถึงแม้จะเป็นโคที่มีอายุน้อย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการดูแลและการจัดการโคที่มีผลต่อสมรรถภาพระบบสืบพันธุ์ (ยุทธชัย, 2557) โดยเฉพาะโคชนที่เลี้ยงไว้เพื่อจุดประสงค์ในการแข่งกีฬาโคชน ซึ่งมีการดูแลอย่างใกล้ชิด ทั้งด้านอาหารและสุขภาพรวมทั้งการออกกำลังกายเป็นประจำ จึงส่งผลให้น้ำเชื้อแช่แข็งทั้งหมดจากการศึกษาในครั้งนี้มีคุณภาพดีสูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานตามประกาศกรมปศุสัตว์ปี พ.ศ. 2548 เรื่องการรีดเก็บและผลิตน้ำเชื้อของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สัตว์ น้ำเชื้อแช่แข็งโค กระบือต้องมีอสุจิมีชีวิตไม่ต่ำกว่า 8 ล้านตัว/โดส หรือมีอัตราการเคลื่อนที่ไม่ต่ำกว่า 40%

สรุปผลการทดลอง

ผลของฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา สามารถเพิ่มความก้ำกั้น โดยทำให้ระยะเวลาในการรีดเก็บน้ำเชื้อลดลง และมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อสด ในส่วนของปริมาตรน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้ และจำนวนอสุจิทั้งหมดเพิ่มขึ้น แต่ไม่มีอิทธิพลโดยตรงต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งของโคชนปลดระวางในภาคใต้ของไทย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้ทุนวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. มงคล เทพรัตน์ ที่ช่วยวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ และขอขอบคุณนายสัตวแพทย์กิตติศักดิ์ แสงสกุล ผู้อำนวยการ ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสงขลา และพนักงานเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสงขลาที่ให้ความช่วยเหลือการวิจัยครั้งนี้จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์

เอกสารอ้างอิง

- เจษฎา ฐิติรุ่งเรือง, ปรัชญา หิรัญพัชรวงศ์, ภูมิพัฒน์ โสภณพัฒนา, จินดา สิงห์ลอ และเผด็จ ธรรมรักษ์. 2555. ผลของสารโพรสตาแกลนดินเอฟทู อัลฟาต่อปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ความกำหนด และ ปริมาณอสุจิในพ่อโค. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. ปี ที่ 22 ฉบับที่ 1 หน้า 41-50.
- ยุทธชัย นุชาญรัมย์. 2557. การศึกษาลักษณะทางเศรษฐกิจของโคพื้นเมือง. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะ เกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี แหล่งที่มา:
<http://www.agri.ubu.ac.th/~suralee/seminar-home/yutachai.pd>, 23 มิถุนายน 2557.
- Barwary, M. S. Q., A. Q. S. Barwary and H. M. H. Zebari. 2013. Influence of prostaglandin $F_{2\alpha}$ injection on semen characteristics and some enzymatic activity in meriz bucks. Journal Animal Science. 2(1):6-10.
- Capitan, S. S., G. S. Antiporda and V. G. Momongan. 1990. Reaction time semen output and semen quality of buffalo bulls after Pre-collection Injection of prostaglandin F_2 Alpha ($PGF_{2\alpha}$) Asian-Australasian Journal of Animal Sciences. 3(4)343-346.
- Correa J.R., M.M. Pace and P.M. Zavos. 1997. Relationships among frozen thawed sperm characteristics assessed via the routine sēmen analysis, sperm functional tests and the fertility of bulls in artificial insemination program. Theriogenology 48: 721-731.
- Hafez, E. S. E. and B. Hafez. 2000. Reproduction in farm animals. 7th Ed, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore.
- Hashizume, T and T. Niwa. 1984. Effect of administration of prostaglandin F_{2a} on the properties of sperm rich fraction of boar semen. Japan Journal Animal Reproduction. 30; 182-185.
- Haynes, N. B., T. E. Kiser, H. D. Hafs, T. D. Carruthers, W. D. Oxender and M. S. McCarthy. 1977. Effect of intracarotid infusion of prostaglandin $F_{2\alpha}$ on plasma luteinizing hormone, testosterone and glucocorticoid concentrations in bull. J. Anim. Sci. 45:1102-1107.

- Hib, J. and P. Oscar. 1978. Effects of prostaglandin and indomethacin on rat epididymal responses to norepinephrine and acetylcholine. Arch. Androl. J. 1(1):43-47.
- Lund Research Ltd. 2018. Repeated Measures ANOVA. Available source: <https://statistics.laerd.com/statistical-guides/repeated-measures-anova-statistical-guide.php> , 26 January 2021.
- Masoumi, R., A. Towhidi, A. N. Javaremi, N. Nablizadeh and M. Zhandi. 2011. Influence of $\text{PGF}_{2\alpha}$ on semen quality and libido in Holstien bull. Turkey Journal Veterinary Animal Science. 35:1-6.
- Olfati, A., G. H. Moghaddam, H. Daghigh Kia and H. Karami Shabankareh. 2013. Effects of prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ treatment on semen characteristics of crossbred rams in the non-breeding season. Journal of Cell and Animal Biology Vol. 7(2); 16-20.
- Parks, J.E. and J.K. Graham. 1992. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes. Theriogenology 38: 210-223.
- Reichard, L. A., H. D. Hafs and N. B. Haynes. 1978. Sperm output and serum testosterone in rabbits given prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ or E2. Prostaglandins 16 (1): 135-138
- Ryu, J. W., K. H. Cho, J. H. Lee, J. H. Son, K. H. Chung and I. C. Kim. 2007. The Effect of Prostaglandin $\text{F}_{2\alpha}$ on Semen Collection Training in Boars. Reproductive Development Biology. 31(4) : 249-252.
- Staub, C and L. Johnson, 2018. Review: Spermatogenesis in the bull. The Animal Consortium. page 1 of 9.

การสำรวจปัญหาการผสมพันธุ์อันเนื่องมาจากความผิดปกติทางโครโมโซมของโคเนื้อและโคนมในเขต ๑

พรรณพิไล เสกสิทธิ์^{๑/} ไกรวรรณ หงษ์ยันตรชัย^{๑/} อรุณ จันทร์กระจ่าง^{๒/}

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจปัญหาการผสมพันธุ์อันเนื่องมาจากความผิดปกติทางโครโมโซมของโคเนื้อและโคนม ได้แก่ freemartin Robertsonian translocation และ Trisomy โดยทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชียน และโคเนื้อ จำนวนทั้งสิ้น ๔,๘๔๕ ตัวอย่าง จากฟาร์มทั้งหมด ๒๑๐ ฟาร์ม ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต ๑ โดยเก็บตัวอย่างเลือดแบบคละพันธุ์ คละเพศและอายุ ตั้งแต่ปี พ.ศ. ๒๕๔๘-๒๕๕๒ นำตัวอย่างเลือดมาตรวจโครโมโซมด้วยการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวและจัดทำคาริโอไทป์ พบมีความผิดปกติทางโครโมโซมรวม ๙ ตัวอย่าง คิดเป็น ๐.๒๑ เปอร์เซ็นต์ โดยพบความผิดปกติแบ่งเป็น ๓ ชนิด ได้แก่ freemartin จำนวน ๖ ตัวอย่าง คิดเป็น ๐.๑๔ เปอร์เซ็นต์ ๑/๒๙ Robertsonian translocation จำนวน ๒ ตัวอย่าง คิดเป็น ๐.๐๕ เปอร์เซ็นต์ และ Trisomy จำนวน ๑ ตัวอย่าง คิดเป็น ๐.๐๒ เปอร์เซ็นต์ แนะนำให้เกษตรกรเจ้าของฟาร์มคัดทิ้งโคที่มีความผิดปกติของโครโมโซมดังกล่าว เพื่อมิให้โคที่มีความผิดปกติทางโครโมโซมถ่ายทอดความผิดปกติทางพันธุกรรมที่ส่งผลกระทบต่อความสมบูรณ์พันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ : โครโมโซม โคนม โคเนื้อ เขต 1

เลขทะเบียนวิจัย : 48(1)-0208-049

^{1/} สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ อ.เมือง จ.ปทุมธานี

^{2/} ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี อ.แก่งคอย จ.สระบุรี

Survey on Reproductive Problems Due to Abnormal Chromosome in Beef and Dairy Cattle in the 1st Region

Panpilai Sekasiddhi^{1/} Kriwon Hongyuntarachai^{1/} Arun Chankrachang^{2/}

Abstract

The survey on reproductive problems related to chromosomal abnormalities in beef and dairy cattle of the first livestock region in Thailand was performed by using 4,845 blood samples to identify the karyotype and chromosomal characteristics. The samples were collected from 210 beef and dairy farms, varying in ages and breeds, during the period of 2005-2009. The results have shown that the abnormalities in number and chromosomal appearance including freemartin, 1/29 Robertsonian translocation and Trisomy were detected in 0.14 % (6 samples), 0.05% (2 samples) and 0.02% (1 sample), respectively. Therefore, the culling of beef and dairy cattle carrying chromosomal abnormalities should be done in order to decrease the chance of abnormal genetic distribution in next generation.

Keywords: chromosome dairy cattle beef cattle 1st region

Registered No.: 48(1)-0208-049

^{1/} Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Muang district, Pathum Thani province

^{2/} Saraburi Artificial Insemination and Biotechnology Research Center. Keangkoi district, Saraburi province

คำนำ

การปรับปรุงพันธุ์โดยการคัดเลือกสัตว์ที่มีพันธุกรรมดี ไม่มีความผิดปกติทางด้านพันธุกรรม ให้ผลผลิตและมีความสมบูรณ์พันธุ์สูง เพื่อนำไปขยายและกระจายพันธุกรรมที่ดีสู่เกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ให้มีปริมาณมากขึ้น ด้วยการผสมพันธุ์ทั้งวิธีการผสมเทียมหรือผสมตามธรรมชาติโดยพ่อพันธุ์ โดยความผิดปกติของพันธุกรรมสามารถตรวจได้จากความผิดปกติของโครโมโซมจากการจัดทำคาริโอไทป์ ความผิดปกติของโครโมโซมในโคสามารถทำให้เกิดผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญต่อความสมบูรณ์พันธุ์ ทำให้เกิดความล้มเหลวของการผลิตและการมีชีวิตของเซลล์สืบพันธุ์ หรือการตายของตัวอ่อนระยะแรกซึ่งส่งผลให้เกิดการสูญเสียทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก ความผิดปกติของโครโมโซมสามารถเกิดขึ้นได้เนื่องจากข้อผิดพลาดของจำนวนหรือการจัดเรียงโครงสร้างใหม่โดยไม่ทำให้เกิดความผิดปกติของลักษณะปรากฏในสัตว์ที่เป็นพาหะ ปัจจุบันเกี่ยวกับความผิดปกติของโครโมโซมพบว่า Robertsonian translocation ที่เกี่ยวข้องกับการแทนที่ของโครโมโซม 1 และ 29 ซึ่งเป็นความผิดปกติที่พบได้บ่อยที่สุดในโคพันธุ์ต่าง ๆ ส่วนความผิดปกติอื่น ๆ ที่พบน้อยในโค ได้แก่ reciprocal translocation, freemartins, mosaic และพบน้อยมากที่เป็นความผิดปกติของโครโมโซมเพศ (Yimer and Rosnina, 2014)

โปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์และการผลิตโคที่ประสบผลสำเร็จขึ้นอยู่กับ การลดหรือการป้องกันสาเหตุที่ส่งผลต่อความล้มเหลวของระบบสืบพันธุ์ทั้งของเพศผู้และเพศเมียที่มีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของโคในฟาร์ม ความสมบูรณ์พันธุ์มีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกัน ได้แก่ โภชนาการ โรค ความผิดปกติของฮอร์โมน การทำงานของระบบสืบพันธุ์ คุณภาพน้ำเชื้อ สิ่งแวดล้อม การจัดการ และพันธุกรรม ซึ่งมีความจำเป็นที่จะต้องทราบถึงสถานะความสมบูรณ์พันธุ์และไม่สมบูรณ์พันธุ์ ปกติโคจะมีโครโมโซมจำนวน 60 โครโมโซม ประกอบด้วยโครโมโซมร่างกาย 29 คู่ และโครโมโซมเพศ 1 คู่ (XX ในตัวเมีย; XY ในตัวผู้) โดยโคโรเจอร์จะมีออโตโซมเป็นอะโครเซนตริก มีโครโมโซมเพศ X เป็นอะโครเซนตริกและ Y เป็นซับเมตาเซนตริก ส่วนโคอินเดียมีออโตโซมเป็นอะโครเซนตริก มีโครโมโซมเพศ X เป็นซับเมตาเซนตริก และโครโมโซมเพศ Y เป็นอะโครเซนตริก (Lightner, 2008) ในกรณีโคผสมซ้ำ (Repeat Breeders) ซึ่งเกิดจากปัญหาหลายสาเหตุ แต่มีสาเหตุหนึ่งที่เกิดจากความผิดปกติของโครโมโซม โดยเป็นความผิดปกติแบบการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม เช่น 1/29 Robertsonian translocation (59XY), Trisomy X (61XY) (Lafi and Kaneene, 1988; Bruyas et al., 1993) และความผิดปกติของโครโมโซมชนิด freemartin ที่ส่งผลต่อปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ การตรวจความผิดปกติของโครโมโซมสามารถลดการตายของตัวอ่อนได้มากถึง 20-30 เปอร์เซ็นต์ (Roberts, 1971) ดังนั้นจึงมีการสำรวจปัญหาการผสมพันธุ์อันเนื่องมาจากความผิดปกติทางโครโมโซมของโคเนื้อและโคนม ได้แก่ freemartin Robertsonian translocation และ Trisomy โดยการตรวจความผิดปกติของโครโมโซมจากเซลล์เม็ดเลือดขาว เพื่อป้องกันมิให้สัตว์ที่มีปัญหาดังกล่าวยังคงแฝงอยู่ในฝูงและมีการถ่ายทอดพันธุกรรมที่ไม่ดีก่อให้เกิดการสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจต่อเกษตรกรเจ้าของสัตว์ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดด้วยหลอดสุญญากาศที่มีสารเฮพาริน ในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซียน และโคเนื้อ ที่เลี้ยงดูในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 1 จำนวน 210 ฟาร์ม โคจำนวน 4,845 ตัว โดยไม่คำนึงถึงพันธุ์ เพศ และอายุ ระหว่างปี พ.ศ. 2548-2552 นำมาตรวจวิเคราะห์ความผิดปกติของโครโมโซม ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวในตู้อบอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นหยดสารโคลชิซินที่มีความเข้มข้น 0.05 ไมโครกรัม/ไมโครลิตร ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร และบ่มในตู้ควบคุมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 90 นาที เพื่อให้โครโมโซมในเซลล์เม็ดเลือดขาวหยุดการเจริญเติบโตที่ระยะเมตาเฟส และย้อมสี Giemsa ตรวจโครโมโซมที่ระยะเมตาเฟสด้วยกล้องจุลทรรศน์ จำแนกจำนวนโครโมโซมที่มีลักษณะปกติและผิดปกติ (Khatun et al., 2011) และนำมาวิเคราะห์ด้วยสถิติเชิงพรรณนา (descriptive statistics)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการเก็บตัวอย่างเลือดโคจำนวนทั้งสิ้น 4,845 ตัว จากจำนวน 210 ฟาร์ม สามารถเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวและวิเคราะห์ผลได้ 4,225 ตัวอย่าง พบมีความผิดปกติทางโครโมโซมรวม 9 ตัวอย่าง คิดเป็น 0.21 เปอร์เซ็นต์ โดยพบความผิดปกติแบ่งเป็น 3 ชนิด ได้แก่ freemartin จำนวน 6 ตัวอย่าง 1/29 Robertsonian translocation จำนวน 2 ตัวอย่าง และ Trisomy จำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 0.14, 0.05 และ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Table 1)

Table 1. Chromosome Analysis results.

year	no. of farm	no. of samples	no. of fail WBC culture	no. of normal chromosome	no. of abnormal chromosome
2548	64	1,218	151	1,064	3
2549	38	773	79	684	1
2550	42	994	207	787	2
2551	44	1,181	129	1,051	3
2552	22	679	40	639	0
total	210	4,845	606	4,225	9

Table 2. Classification of chromosome abnormalities: Freemartin, Robertsonian Translocation and Trisomy

year	abnormal chromosome	numbers of abnormal chromosome		
		Freemartin	Robertsonian Translocation	Trisomy
2548	3	2	1	0
2549	1	0	0	1
2550	2	2	0	0
2551	3	2	1	0
2552	0	0	0	0
total	9	6	2	1
%		0.14	0.05	0.02

จากผลการตรวจโครโมโซมพบความผิดปกติชนิด freemartin คิดเป็น 0.14 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาของ Esteves et al. (2012) พบว่ามีอุบัติการณ์ในโคนมโฮลสไตน์ฟรีเชียนจำนวน 1.81 เปอร์เซ็นต์ และในโคนือจำนวน 0.52 เปอร์เซ็นต์ โดยลูกโคเพศเมียจะมีปัญหาระบบสืบพันธุ์ โดยลักษณะภายนอกของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียมักพบ clitoris มีขนาดใหญ่ แต่มีปากช่องคลอดขนาดเล็ก และมีฟูลนยื่นออกมาชัดเจน นอกจากนี้พบว่าการเชื่อมต่อกันของเส้นเลือดระหว่างตัวอ่อนเพศผู้และเพศเมีย ทำให้ฮอร์โมนจากคู่แฝดเพศผู้ไปกดการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมียในระยะที่ยังเป็นตัวอ่อน ทำให้หยุดการสร้างมดลูก รังไข่ และพบว่าทำให้มีเซลล์ผสมกันทั้งเพศเมีย (XX) และเพศผู้ (XY) ในตัวอ่อนที่กำลังเจริญเติบโต จนคลอดออกมาและเติบโตตามปกติ โดยfreemartin เป็นรูปแบบความผิดปกติทั่วไปของโครโมโซมเพศในโค ซึ่งพบมีคาริโอไทป์ XX/XY ในเพศเมีย 86.4 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เหลืออีก 13.6 เปอร์เซ็นต์มีคาริโอไทป์ปกติเป็น XX (De Lorenzi et al., 2012)

จากผลการสุ่มตรวจในปี พ.ศ. 2550 ซึ่งเป็นปีที่มีการตรวจพบความผิดปกติของโครโมโซมชนิด freemartin พบโครโมโซมเพศมีทั้งแบบ XX และ XY ในกลุ่มเมตาเฟส แต่สัดส่วนของ XX:XY แตกต่างกันในแฝดแต่ละคู่ โดยพบสัดส่วน XX:XY ของแฝดเพศเมียเป็น 52:48 และของแฝดเพศผู้เป็น 38:62 ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Basrur and Kanagawa (1969) ที่พบว่าสัดส่วนของโครโมโซมเพศในแฝดเพศผู้และแฝดเพศเมียจะมีสัดส่วนเท่ากัน คือ XX:XY 15:85

ความผิดปกติของโครโมโซมชนิด 1/29 Robertsonian translocation ตรวจพบ ในปี พ.ศ. 2548 และ พ.ศ. 2551 จำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผู้วิจัยได้ติดตามจนถึงวัยเจริญพันธุ์ ซึ่ง Meleshko (1990) ทำการศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ในแม่โคพันธุ์ซิมเมนทอล ที่มีโครโมโซมผิดปกติแบบ 1/29 Robertsonian translocation พบว่าอัตราการผสมเทียมในครั้งเดียวติด ในกลุ่มแม่โคปกติเท่ากับ 35.4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในแม่โคที่มีโครโมโซมผิดปกติเท่ากับ 28.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติ และในกลุ่มโคที่เป็นลูกสาวที่มีโครโมโซมผิดปกติ จะมีอัตราการผสมติดต่ำกว่ากลุ่มลูกสาวที่มีโครโมโซมปกติถึง 13 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ Gustavsson (1971) และ Swartz and Vogt (1983) พบว่าโคสาวที่มีการผสมซ้ำหลายครั้งหรือเป็น repeat breeder มักจะพบว่าเป็น 1/29 Robertsonian translocation ในเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าที่คาดคิด ถึงแม้ว่าความสมบูรณ์พันธุ์จะไม่ลดลงอย่างเห็นได้ชัด แต่ก็พบได้บ่อยในการผสมพันธุ์ที่มีปัญหา ส่วนในโคพ่อพันธุ์ Dyrendahl and Gustavsson (1979) พบว่า โคพ่อพันธุ์ที่เป็น 1/29 Robertsonian translocation มีความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำและในตัวเมียมีไข่เป็น duplication หรือ deficiency อาจจะถูกอสุจิเข้าผสมเกิดการปฏิสนธิได้ แต่ตัวอ่อนจะตายก่อนอายุ 90 วัน โดยโคที่ตรวจพบความผิดปกติของโครโมโซมแบบ 1/29 Robertsonian translocation ทั้งโคเพศผู้และเพศเมียที่เป็นพาหะจะมีลักษณะปรากฏที่ปกติ (Rubes et al., 1996) อย่างไรก็ตามสัตว์เหล่านี้จะมีระดับของความไม่สมบูรณ์พันธุ์ต่างกันเพราะการผลิตเซลล์สืบพันธุ์ที่ผิดปกติซึ่งส่งผลต่อการรวมตัวเป็นไซโกตที่มีความผิดปกติของโครโมโซมที่ต่อมาส่งผลทำให้เกิดการตายของตัวอ่อนระยะแรก (Molteni et al., 2005) ในโคที่เป็น 1/29 Robertsonian translocation จะพบความผิดปกติของเซลล์สืบพันธุ์ในอสุจิ 2.76 เปอร์เซ็นต์ และ ในไข่ 4.06 เปอร์เซ็นต์ (Bonnet-Garnier et al., 2008) พ่อโคที่เป็น 1/29 Robertsonian translocation เป็นสาเหตุทำให้ตัวอ่อนผิดปกติ 10 % ในขณะที่แม่โคทำให้ตัวอ่อนผิดปกติ 20 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการตายของตัวอ่อน 5 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังการผสมเทียม 28 วัน และมีอัตราการตายของตัวอ่อน 7 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังการผสมเทียม 56 วัน (Schumtz, 1991)

และมีการตรวจพบความผิดปกติของโครโมโซมชนิด Trisomy ในปี พ.ศ. 2549 พบว่าในลูกโคเพศผู้ มีคาริโอไทป์ เป็น 61,XXY ซึ่งไม่สามารถติดตามความสมบูรณ์พันธุ์ได้ เนื่องจากเกษตรกรเจ้าของสัตว์ได้ขายออกจากฟาร์มในภายหลัง โดย Rieck et al. (1970) ได้รายงานการตรวจพบโครโมโซม 61,XXX ในโคสาวพันธุ์เฟลคเวีย โดยที่โคดังกล่าวมีอวัยวะเพศและการสืบพันธุ์ปกติ Norberg et al. (1976) ตรวจพบโครโมโซม 61,XXX ในโคสาวนอร์วีเจียนเรด ซึ่งโคไม่แสดงอาการเป็นสัตว์ พบแสดงอาการเป็นสัตว์ตั้งแต่อายุ 13 เดือนจนถึงอายุ 18 เดือน โคมีมดลูกขนาดเล็ก รังไข่ไม่เจริญ และ Sysa et al. (1998) รายงานการตรวจพบโครโมโซม 61,XXX ในโคส่วนใหญ่มักจะมี ความสมบูรณ์พันธุ์และให้ลูกที่มีคาริโอไทป์ปกติ และ Schmutz et al. (1994) พบว่าโคตัวผู้ที่มีโครโมโซม 61,XXY จะไม่มีอสุจิในน้ำเชื้อที่หลั่งออกมา พฤติกรรมทางเพศมีสมรรถภาพทางเพศปกติ สามารถขึ้นผสมพันธุ์ได้

สรุปผลการทดลอง

การสำรวจปัญหาการผสมพันธุ์อันเนื่องมาจากความผิดปกติทางโครโมโซมในโคเนื้อและโคนม ในพื้นที่ปศุสัตว์เขต 1 พบความผิดปกติทางโครโมโซมที่เป็น freemartin 6 ตัว 1/29 Robertsonian translocation 2 ตัว และ Trisomy 1 ตัว คิดเป็น 0.14 0.05 และ 0.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งพบน้อยมาก แนะนำให้เกษตรกรคัดทั้งโคที่ตรวจพบความผิดปกติของโครโมโซมดังกล่าว เพื่อป้องกันการถ่ายทอดความผิดปกติทางโครโมโซมสู่ลูกสัตว์รุ่นต่อไป

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากความผิดปกติของโครโมโซมทุกลักษณะส่งผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ซึ่งสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ ดังนั้นโคทั้งหมดที่ตรวจพบความผิดปกติของโครโมโซมควรแนะนำให้เกษตรกรเจ้าของสัตว์คัดทิ้งออกจากฝูง และควรมีการตรวจในกลุ่มโคพ่อพันธุ์ทุกตัว เพื่อป้องกันการกระจายความผิดปกติทางโครโมโซมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Basrur, P.K. and H. Kanagawa. 1969. Pararellism in chimeric ratios in heterosexual cattle twins. *Genetics* 63:419-425.
- Bruyas, J.F., F. Feini and D. Tainturier. 1993. Le syndrome “repeat-breeding”: analyse bibliographique 1^oPartie: Etiologie. *Revue med vet.* 144:385-398.
- Bonnet-Garnier, A., S. Lacaze, J.F. Beckers, H.M. Berland, A. Pinton, M. Yerle and A. Ducos. 2008. Meiotic segregation analysis in cows carrying the t(1;29) Robertsonian translocation. *Cytogenetics and Genome Research*, 120,91–96.
- De Lorenzi, L., P. Morando, J. Planas, M. Zannotti, L. Molteni and P. Parma. 2012. Reciprocal translocations in cattle: frequency estimation. *Journal of Animal Breeding and Genetics*, 129,409–416.
- Dyrenhal, I. and I. Gustavsson. 1979. Sexual function, semen characteristics and fertility of bull carrying the 1/29 chromosome translocation. *Hereditas* 90:281-289.
- Eldridge, F.E. 1985. *Cytogenetics of livestock*. AVI publishing company, INC., Westport, Connecticut., pp.75-92,115-188.
- Esteves, A., R. Bage and P. Rita. 2012. Freemartin in Cattle. *ResearchGate*. Chapter September 2012:99-120. Available source: <http://www.researchgate.net/publication/256293263>, November 30, 2017.
- Gustavsson, I. 1971. Distribution of the 1/29 translocation in the A.I. bull population in Swedish cattle. *Hereditas*. 63:67-169.
- Khatun, M.R., Md. Arifuzzaman and A. Ashraf. 2011. Karyotype for Identification of Genetic Abnormalities in Cattle. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*, 6: 117-125.
- Marcum, J.B. 1974. The freemartin syndrome. *Anim. Breeding Abstracts*, 42,227-241.
- Meleshko, A.A. 1991. The reproductive ability of animal carrying The Robertsonian translocation (1/29). *Animal Breeding Abstracts*, 59(4).

- Molteni, L., D. Meggiolaro and M. Giovanni. 2005. Fertility of cryopreserved sperm in three bulls with different Robertsonian translocations. *Animal Reproduction Science*, 86(1-2),27-36.
- Norberg, H.S., A.O. Refdal, O.N. Garm and N. Nes. 1976. A case report on X-trisomy in cattle. *Hereditas* 82:69-72.
- Rieck, G.W., H. Hohn and A. Herzog. 1970. X-trisomy in cattle with familial tendency toward meiotic non-dysjunction. *Cytogenetics* 9:401-419.
- Roberts, S.J. 1971. *Veterinary Obstetrics and Genital Diseases*. 2nd Edn., CBS Publication and Distributors, New Delhi, India, pp:496-506.
- Rubes, J., P. Musilova, L. Borkovec, Z. Borkovcova, D. Svecova and J. Urbanova. 1996. A new Robertsonian translocation in cattle, rob (16;20). *Hereditas*, 124(3):275-279.
- Schmutz, S.M., A.D. Barth and J.S. Moker. 1994. A Klinefelter Bull with a 1;29 translocation born to a fertile 61,XXX cow. *Can Vet. J.* 35(3):182-184.
- Schmutz, S., J. Moker, A. Barth and R. Mapletoft. 1991. Embryonic loss in superovulated cattle caused by the 1; 29 Robertsonian translocation. *Theriogenology*, 35(4),705-714.
- S.O. and J.b. Kaneene. 1988. Risk factors and associated economic effects of the repeat breeder syndrome in dairy cattle. *Vet. Bull.* 58:891-903.
- Swartz, H.A. and D.W. Vogt. 1983. Chromosome abnormalities as a cause of reproductive inefficiency In heifers. *J. Hered.* 74: 320-324.
- Sysa, P.S., J. Krolinski, Z. Gołyźniak, M. Matuszewska and E. Słota. 1998. Kolejny przypadek trisomii XXY u buhaja z wychowalni. *Mat. Konf. Naukowej pt. Aktualne zagadnienia z zakresu embriotransferu, higieny mleka i rozrodu zwierząt domowych*. Polanica Zdroj, pp:112-113.

การสร้างโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมในแกะ

मुखसुता เรืองกรี^{1/} ชาตรี คติวรเวช^{2/} ธนิษฐีธร ปัญญามงคล^{3/}

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดสำหรับการผสมเทียมด้วยวิธีสอดผ่านช่องคลอด โดยดำเนินการศึกษาในแกะลูกผสมเพศเมีย ที่ได้รับการเลี้ยงดูในฟาร์มแกะทดลอง ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อ.เมือง จ.นครปฐม จำนวน 92 ตัว ที่มีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์และมีวงรอบการเป็นสัดปกติ ทำการศึกษาระหว่างเดือนตุลาคม 2562 ถึงเดือนมีนาคม 2564 โปรแกรมการเหนี่ยวนำ 4 โปรแกรม ได้แก่ โปรแกรมที่ 1 สอด ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดแท่ง (Progesterone : Controlled Internal Drug Device (CIDR®)) 14 วันร่วมกับฮอร์โมนแพร์กแนนท์แมร์ซีรึม โภนาโดโทรปิน (Pregnant Mare Serum Gonadotropin: PMSG) ฮอร์โมนพรอสตาแกลนดิน (Prostaglandin) และฮอร์โมนโภนาโดโทรปินรีลีสซิ่ง (Gonadotropin releasing hormone: GnRH) (CPPG-14) โปรแกรมที่ 2 สอด CIDR® 14 วันร่วมกับฮอร์โมนพรอสตาแกลนดิน และฮอร์โมน GnRH (CPG-14) โปรแกรมที่ 3 สอด CIDR® 7 วันร่วมกับฮอร์โมน PMSG ฮอร์โมนพรอสตาแกลนดิน และฮอร์โมน GnRH (CPPG-7) และโปรแกรมที่ 4 สอด CIDR® 7 วันร่วมกับฮอร์โมนพรอสตาแกลนดินและฮอร์โมน GnRH (CPG-7) ผลการทดลองพบว่าแกะที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยโปรแกรมที่ 1 และโปรแกรมที่ 2 จะแสดงอาการเป็นสัดสูงกว่าโปรแกรมที่ 3 และโปรแกรมที่ 4 คิดเป็นร้อยละ 57.14, 52.17, 33.33 และ 36.84 ตามลำดับ ในขณะที่อัตราการผสมติดของแกะทั้ง 4 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าแกะที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยโปรแกรมที่ 3 และ โปรแกรมที่ 4 จะมีอัตราการสอดป็นผสมเทียมผ่านถึงคอมดลูกสูงกว่าโปรแกรมที่ 1 และโปรแกรมที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สรุปได้ว่าโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยโปรแกรมที่ 1 และ 2 แกะแสดงอาการเป็นสัดดีกว่าโปรแกรมที่ 3 และ 4 แต่มีอัตราการผสมติดไม่แตกต่างกัน

คำสำคัญ: การผสมเทียม การเหนี่ยวนำการเป็นสัด แกะ

เลขทะเบียนวิชาการ: 64(2)-0208-096

^{1/} ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพราชบุรี อ.โพธาราม จ.ราชบุรี

^{2/} ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ

^{3/} ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพเชียงใหม่ อ.เมือง จ.เชียงใหม่

Establishment of estrus synchronization and artificial insemination program in sheep

Muksuda Ruangkree^{1/} Chatree Khatiworavage^{2/} Thanittian Punyamongkol^{3/}

Abstract

The aim of this study was to establish estrus synchronization program for artificial insemination (AI) in ewes. The experiments were conducted in 92 healthy ewes with normal estrous cycle. The study was carried out in sheep experiment farm, Department of Animal Husbandry, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Muang nakornpathom, Nakornpathom and conducted from October, 2019 to March, 2021. Ninety-two ewes were randomly divided into 4 programs (1) program1 (CPPG-14) Controlled Internal Drug Device (CIDR®) (14 days) + Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) + Prostaglandin + Gonadotropin releasing hormone (GnRH); (2) program2 (CPG-14) CIDR® (14 days) + Prostaglandin + GnRH; (3) program3 (CPPG-7) CIDR® (7 days) + PMSG + Prostaglandin + GnRH; (4) program4 (CPG-7) CIDR® (7days) + Prostaglandin + GnRH. The study showed that the percentage of estrous response in program1 (CPPG-14) and program2 (CPG-14) were significantly higher than program3 (CPPG-7) and program4 (CPG-7) at 57.14%, 52.17%, 33.33% and 36.84% respectively but there are no significant differences in conception rate among the treatment ($p>0.05$). Moreover, the percentage of the AI gun passing through the cervix in program3 and program4 were higher than program1 and program2 significantly. It was concluded that estrus synchronization with CPPG-14 and CPG-14 showed better sign in estrus synchronization than CPPG-7 and CPG-7 but there was no different in conception rate.

Keywords: artificial insemination, estrus synchronization, sheep

Registered No: 64(2)-0208-096

^{1/}Ratchaburi Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Photharam, Ratchaburi

^{2/}Department of Animal Husbandry, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok

^{3/}Chiangmai Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Muang, Chiangmai

คำนำ

ปัจจุบันเกษตรกรได้มีความสนใจในการเลี้ยงแกะเพิ่มขึ้นจากเกษตรกรผู้เลี้ยงแกะจำนวนทั้งหมด 5,387 ราย (แกะจำนวน 53,228 ตัว) ในปี 2560 เป็น 8,034 ราย ในปี 2564 และมีประชากรแกะเพิ่มเป็น 114,263 ตัว ซึ่งส่วนใหญ่ใช้วิธีการขยายพันธุ์ด้วยการใช้พ่อพันธุ์คุมฝูง ส่งผลให้เกษตรกรต้องจัดหาพ่อพันธุ์ใหม่ นำเข้ามาในฝูงทุกปี เนื่องจากพ่อพันธุ์แกะมีอายุการใช้งานที่ค่อนข้างสั้นและเพื่อป้องกันการเกิดปัญหาการผสมเลือดชิดภายในฝูงซึ่งส่งผลให้สัตว์รุ่นลูกที่เกิดมาตัวเล็ก ความต้านทานโรคและความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ อีกทั้งมีความเสี่ยงสูงจากโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์ ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์ลดลงทำให้เกิดความสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจต่อผู้เลี้ยงแกะเป็นอย่างมาก เกษตรกรจึงหันมาให้ความสนใจการการผสมเทียมเพื่อพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์กรรมแกะเหมือนกับปศุสัตว์อื่น เพื่อเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงดูและการจัดการพ่อพันธุ์ สามารถวางแผนการผสมพันธุ์เพื่อป้องกันและแก้ปัญหาการผสมเลือดชิดภายในฝูง รวมทั้งป้องกันการแพร่กระจายของโรคติดต่อทางการสืบพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามการผสมเทียมแกะยังมีการส่งเสริมและให้บริการจากภาครัฐ เนื่องจากโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแกะยังไม่ได้ผลเท่าที่ควรและมีอัตราการผสมติดที่ค่อนข้างต่ำ

กรมปศุสัตว์นำโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะเข้ามาปรับใช้กับแกะ แต่ยังพบปัญหาการตอบสนองจากฮอร์โมนมีความแปรปรวนค่อนข้างสูง และส่วนใหญ่ดัดแปลงมาจากต่างประเทศ โดยใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Progesterone) สังเคราะห์ชนิดสอดช่องคลอด (ชนิดแท่งซิลิโคนหรือชนิดฟองน้ำ) ร่วมกับฮอร์โมนพรอสตาแกลนดิน (prostaglandin) ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินรีลีสซิง (Gonadotropin releasing hormone: GnRH) ฮอร์โมนแพรกแนนท์แมร์ซีรัมโกนาโดโทรปิน (Pregnant Mare Serum Gonadotropin: PMSG) และฮอร์โมนฮิวแมนคอร์ริโอนิกโกนาโดโทรปิน (Human chorionic gonadotropin: hCG) (Wildeus, 1999) ที่แตกต่างกันออกไปทั้งชนิดของฮอร์โมน ขนาดของฮอร์โมนและระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ โดยอ้างอิงวงจรการเป็นสัดตามธรรมชาติของแกะ ซึ่งฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะถูกหลั่งออกมาในระยะลูเทียลเฟสของวงจรการเป็นสัด การเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจะถูกปล่อยออกมาและซึมผ่านผนังช่องคลอดเข้าสู่กระแสเลือดที่ละน้อยอย่างต่อเนื่อง ทำให้ต่อมใต้สมองหยุดการหลั่งหรือสร้างฮอร์โมน GnRH ลดลง มีผลให้การเจริญของฟอลลิเคิลหยุดชะงักชั่วคราว และเมื่อถอดฮอร์โมน โปรเจสเตอโรนออก จะทำให้ต่อมไฮโปธาลามัสหลั่งฮอร์โมน GnRH เพิ่มขึ้นอีกครั้ง และกระตุ้นให้ต่อมใต้สมอง ส่วนหน้าหลั่งฮอร์โมนฟอลลิเคิลสติมูเลตติ้ง (Follicle Stimulating Hormone: FSH) และฮอร์โมนลูทีไนซิง (Luteinizing Hormone: LH) ทำให้ฟอลลิเคิลมีการเจริญ และสัตว์ก็จะแสดงอาการเป็นสัดในเวลาต่อมา ส่วนฮอร์โมนพรอสตาแกลนดินมีฤทธิ์ทำให้คอร์ปัสลูเตียม (Corpus luteum: CL) เกิดการสลายตัว ฮอร์โมนพรอสตาแกลนดินถูกใช้เพื่อสลายคอร์ปัสลูเตียมที่ยังคงค้างอยู่บนรังไข่ และมักจะฉีดในวันเดียวกับที่ทำการถอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด (Wildeus, 1999) สำหรับฮอร์โมน PMSG นั้น มีฤทธิ์เหมือนฮอร์โมน FSH และฮอร์โมน LH ที่ช่วยให้ฟอลลิเคิลมีการเจริญและเกิดการตกไข่ขึ้น (Monika, 2001)

สำหรับโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแกะนั้นได้มีการศึกษาไว้หลายโปรแกรม ได้แก่ การใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดซิลิโคนสอดช่องคลอด (CIDR®) เพียงอย่างเดียว นาน 12 วัน พบและแสดงอาการเป็นสัด 91% (Carlson et al., 1989) การใช้ CIDR® นาน 14-20 วัน ร่วมกับฮอร์โมน PMSG พบและแสดงอาการเป็นสัด 92% (Hamra et al., 1989) และพบว่ามียัตราการผสมติดจากการผสมเทียมด้วยการสอดป้อนผสมเทียมผ่านคอมดลูกที่ 40.7% และ 64.5% สำหรับการผสมเทียมด้วยเทคนิคการส่องกล้องลาพาโรสโคปิก (Ritar et al., 1990) การใช้ CIDR® ร่วมกับฮอร์โมนพลอสตาแกลนดิน และฮอร์โมนอีควัยคอร์ไอโอนิกโกนาโดโทรปิน (Equine chorionic gonadotropin: eCG) พบอัตราการผสมติดที่ 56.7% (Dias et al., 2015) การใช้ Intravaginal Sponges 12 วันร่วมกับฮอร์โมน eCG พบว่าอัตราการแสดงการเป็นสัดที่ 79.4% และมีอัตราการผสมติดที่ 60.42% (Kalyan et al., 2014)

นอกจากนี้ยังพบรายงานการใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนระยะสั้น 5-6 วัน โดยให้พร้อมกับการฉีดฮอร์โมนพรอสตาแกลนดินในวันแรกในแพะและแกะและให้ฮอร์โมน PMSG ขนาด 200-300 IU ในวันที่ถอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด (Menchana and Rubianes, 2004) และมีรายงานในแพะว่าวิธีนี้ให้ผลการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและการผสมติดดีกว่าการใส่ระยะยาว ทั้งการผสมเทียมหลังการแสดงอาการสัด และ ผสมเทียมแบบกำหนดเวลาที่ 54 ชั่วโมงหลังการถอดฮอร์โมน โดย Vinales et al. (2001) รายงานการใช้ฮอร์โมน โปรเจสเตอโรนระยะยาว (12 วัน) ให้ผลการตั้งท้องจากการผสมโดยใช้พ่อแกะต่ำกว่า (63% vs 87%) การใส่ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนระยะสั้น (6 วัน) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้วัตถุประสงค์เพื่อสร้างโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมในแกะโดยใช้โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดทั้งหมด 4 โปรแกรม เพื่อสร้างโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดเพื่อการผสมเทียมด้วยวิธีสอดผ่านช่องคลอดในแกะ

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

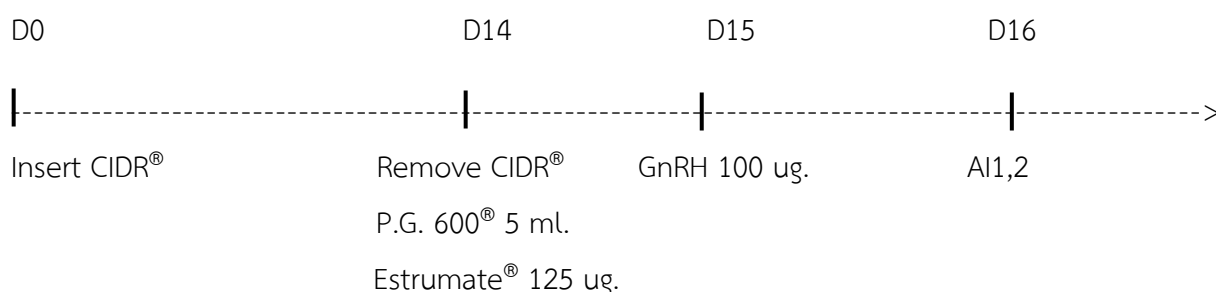
แกะลูกผสมเพศเมีย จำนวน 92 ตัว อายุระหว่าง 1.5-5 ปี มีคะแนนร่างกาย 2.5-4 (คะแนนเต็ม 5 คะแนน) สุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ มีวงรอบการเป็นสัดปกติ และไม่มี ความผิดปกติด้านระบบสืบพันธุ์ เลี้ยงดูที่ฟาร์มแกะทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อ.เมือง จ.นครปฐม ทำการศึกษาระหว่างเดือนตุลาคม 2562 ถึงเดือนมีนาคม 2564 วางแผนทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) กำหนดให้โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัด 4 โปรแกรม โปรแกรมละ 23 ตัว

วิธีการทดลอง

สุ่มแกะทั้งหมดให้ได้รับปัจจัยทดลองทั้ง 4 โปรแกรม ประกอบด้วย ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดซิลิโคนสอดช่องคลอด (Eazi-Breed® CIDR® Sheep and Goat Device; Zoetis Australia Pty Ltd, New Zealand) ร่วมกับฮอร์โมนพรอสตาแกลนดิน (Estrumate®; Vet Pharma Friesoythe GmbH, Germany)

ขนาด 125 ug. ฮอร์โมน P.G. 600[®] (Intervet International, Holland) ขนาด 1 โด๊ส ซึ่งประกอบด้วย ฮอร์โมน PMSG ขนาด 400 IU และ ฮอร์โมน hCG 200 IU และฮอร์โมน GnRH (Receptal[®]; MSD Animal Health UK Limited Walton Manor, United Kingdom) 100 ug. และทำการผสมเทียมด้วยวิธีสอดผ่านทางช่องคลอด (Transcervical Artificial Insemination) 2 ครั้งที่ 48 และ 56 ชั่วโมงภายหลังการถอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน

โปรแกรมที่ 1 เหนี่ยวนำด้วยฮอร์โมนโปรเจเนเตอร์ชนิดซิลิโคนสอดช่องคลอด (EAZI-BREED[®] CIDR[®] Sheep and Goat Device; Zoetis Australia Pty Ltd, New Zealand) ทางช่องคลอดเป็นเวลา 14 วัน ร่วมกับฮอร์โมนพรอสตาแกลนดิน (Estrumate[®]; Vet Pharma Friesoythe GmbH, Germany) และ P.G. 600[®] (Intervet International, Holland) และฮอร์โมน GnRH (Receptal[®]; MSD Animal Health UK Limited Walton Manor, United Kingdom) (CPPG-14)



วันที่ 0 สอด CIDR[®]

วันที่ 14 ถอด CIDR[®] และฉีดฮอร์โมน P.G. 600[®] ปริมาณ 5 มิลลิลิตร และฮอร์โมน Estrumate[®] ขนาด 125 ug เข้ากล้ามเนื้อ

วันที่ 15 ฉีดฮอร์โมน GnRH ขนาด 100 ug เข้ากล้ามเนื้อ (กำหนดช่วงเวลา 16-18 ชั่วโมงก่อนทำการผสมเทียม)

วันที่ 16 ผสมเทียม 2 ครั้งที่ ชั่วโมงที่ 48 และ 56 หลังถอด CIDR[®]

โปรแกรมที่ 2 เหนี่ยวนำด้วยฮอร์โมนโปรเจเนเตอร์ชนิดซิลิโคนสอดช่องคลอด (EAZI-BREED[®] CIDR[®] Sheep and Goat Device; Zoetis Australia Pty Ltd, New Zealand) ทางช่องคลอดเป็นเวลา 14 วัน ร่วมกับฮอร์โมนพรอสตาแกลนดิน (Estrumate[®]; Vet Pharma Friesoythe GmbH, Germany) และฮอร์โมน GnRH (Receptal[®]; MSD Animal Health UK Limited Walton Manor, United Kingdom) (CPG-14)



วันที่ 0 สอด CIDR®

วันที่ 14 ถอด CIDR® และฉีดฮอร์โมน Estrumate® ขนาด 125 ug เข้ากล้ามเนื้อ

วันที่ 15 ฉีดฮอร์โมน GnRH ขนาด 100 ug เข้ากล้ามเนื้อ (กำหนดช่วงเวลา 16-18 ชั่วโมงก่อนทำการผสมเทียม)

วันที่ 16 ผสมเทียม 2 ครั้งในช่วงที่ 48 และ 56 หลังถอด CIDR®

โปรแกรมที่ 3 เหนียวนำด้วยฮอร์โมนโปรเจนเตอโรนชนิดซิลิโคนสอดช่องคลอด (EAZI-BREED® CIDR® Sheep and Goat Device; Zoetis Australia Pty Ltd, New Zealand) ทางช่องคลอดเป็นเวลา 7 วัน ร่วมกับฮอร์โมนพรอสตาแกลนดิน (Estrumate®; Vet Pharma Friesoythe GmbH, Germany) และ P.G. 600® (Intervet International, Holland) และฮอร์โมน GnRH (Receptal®; MSD Animal Health UK Limited Walton Manor, United Kingdom) (CPPG-7)



วันที่ 0 สอด CIDR®

วันที่ 7 ถอด CIDR® และฉีดฮอร์โมน P.G. 600® ปริมาณ 5 มิลลิกรัม และฮอร์โมน Estrumate® ขนาด 125 ug เข้ากล้ามเนื้อ

วันที่ 8 ฉีดฮอร์โมน GnRH ขนาด 100 ug เข้ากล้ามเนื้อ (กำหนดช่วงเวลา 16-18 ชั่วโมงก่อนทำการผสมเทียม)

วันที่ 9 ผสมเทียม 2 ครั้งในช่วงที่ 48 และ 56 หลังถอด CIDR®

โปรแกรมที่ 4 การเหนียวนำด้วยฮอร์โมนโปรเจนเตอโรนชนิดซิลิโคนสอดช่องคลอด (EAZI-BREED® CIDR® Sheep and Goat Device; Zoetis Australia Pty Ltd, New Zealand) ทางช่องคลอดเป็นเวลา 7 วัน ร่วมกับฮอร์โมนพรอสตาแกลนดิน (Estrumate®; Vet Pharma Friesoythe GmbH, Germany) และฮอร์โมน GnRH (Receptal®; MSD Animal Health UK Limited Walton Manor, United Kingdom) (CPG-7)



วันที่ 0 สอด CIDR®

วันที่ 7 ถอด CIDR® และฮอร์โมน Estrumate® ขนาด 125 ug เข้ากล้ามเนื้อ

วันที่ 8 ฉีดฮอร์โมน GnRH ขนาด 100 ug เข้ากล้ามเนื้อ (กำหนดช่วงเวลา 16-18 ชั่วโมงก่อนทำการผสมเทียม)

วันที่ 9 ผสมเทียม 2 ครั้งที่ ชั่วโมงที่ 48 และ 56 หลังถอด CIDR®

บันทึกข้อมูล คะแนนร่างกาย อาการเป็นสัดจากลักษณะของอวัยวะเพศบวมแดง มีเมือกภายในช่องคลอดและส่วนนอกของคอมดลูกนูนมีสีแดง ความสามารถในการสอดป้อนผสมเทียมผ่านคอมดลูก และตรวจการตั้งท้องภายหลังการผสมเทียม 40 ด้วยเครื่องอัลตราซาวนด์

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองสำหรับข้อมูล การแสดงอาการเป็นสัด ความสามารถในการสอดป้อนผสมเทียมผ่านคอมดลูก และอัตราการตั้งท้อง ด้วย Chi-square test และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดต่อการแสดงอาการเป็นสัด ความสามารถในการสอดป้อนผสมเทียมผ่านคอมดลูก และอัตราการตั้งท้อง ด้วย สถิติของฟิชเชอร์ (The fisher exact probability test) กำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p\text{-value} < 0.05$

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้พบว่าระยะเวลาในการสอด CIDR® มีความสัมพันธ์กับการแสดงอาการเป็นสัด และความสามารถในการสอดผ่านของป้อนผสมเทียมถึงคอมดลูก ($p < 0.05$; Table 1) โดยพบว่า แกะที่ได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยโปรแกรมที่ 1 (CPPG-14) และโปรแกรมที่ 2 (CPG-14) จะแสดงอาการเป็นสัดสูงกว่าโปรแกรมที่ 3 (CPPG-7) และโปรแกรมที่ 4 (CPG-7) สำหรับความสามารถสอดป้อนผสมเทียมผ่านถึงคอมดลูกพบว่าแกะที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยโปรแกรมที่ 3 (CPPG-7) และโปรแกรมที่ 4 (CPG-7) จะมีอัตราการสอดป้อนผสมเทียมผ่านถึงคอมดลูกสูงกว่าโปรแกรมที่ 1 (CPPG-14) และโปรแกรมที่ 2 (CPG-14) ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างของอัตราการตั้งท้องในแกะที่ได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดทั้ง 4 โปรแกรมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Table 1 Estrous synchronization and fixed time AI in sheep: The relationship of CIDR® insertion duration and P.G. 600 on estrous response, AI gun passing through the cervix and conception rate.

Programs	Estrous synchronization	Number of ewes	BCS	Estrous response	p-value	AI gun passing through the cervix	p-value	Pregnancy ewes
1	CPPG-14	21	3	12 ^a (57.14%)	0.014	3 ^b (14.29%)	0.006	3 (14.28%)
2	CPG-14	23	3	12 ^a (52.17%)		6 ^b (26.09%)		1 (4.35%)
3	CPPG-7	18	3	6 ^b (33.33%)		14 ^a (77.77%)		1 (5.55%)
4	CPG-7	19	3	7 ^b (36.84%)		13 ^a (68.42%)		0 (0%)

^{a,b}: mean in the same column with different superscripts differ significantly (p<0.05)

Body Condition Score (BCS)

สำหรับจำนวนตัวอย่างแกะตามแผนการดำเนินการกำหนดไว้โปรแกรมละ 23 ตัว แต่ระหว่างการดำเนินการศึกษาพบฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด (CIDR®) หลุดก่อนเวลาที่กำหนดจากแกะทดลองในโปรแกรมที่ 1 จำนวน 2 ตัว โปรแกรมที่ 3 จำนวน 5 และ โปรแกรมที่ 4 จำนวน 4 ตัว จึงคงเหลือแกะทดลองในโปรแกรมที่ 1, 3 และ 4 จำนวน 21, 18 และ 19 ตัว ตามลำดับ

การศึกษาในครั้งนี้ใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในรูปแบบแท่งซิลิโคน (CIDR®) เพื่อการควบคุมให้วงจรการเป็นสัดอยู่ในระยะลูทีอัลเฟส เนื่องจากใช้งานง่ายและมีความสม่ำเสมอในการปลดปล่อยฮอร์โมน (Holtz, 2005) พบว่าการสอด CIDR® นาน 14 วัน (long-term protocol) ในโปรแกรมที่ 1 และ 2 แกะจะมีปริมาณเมือกภายในช่องคลอดมากกว่าและแสดงอาการเป็นสัดมากกว่าการสอด CIDR® 7 วัน (short-term protocol) ในโปรแกรมที่ 3 และ 4 แต่ในทางกลับกันโปรแกรมการสอด CIDR® 7 วัน ผู้ผสมเทียมสามารถสอดปืนผสมเทียมผ่านเข้าสู่คอมดลูกโดยไม่ใช้แรงดันได้มากกว่า แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างของอัตราการตั้งท้องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแกะที่ได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดทั้ง 4 โปรแกรม ซึ่งขัดแย้งการรายงานของ Menchana and Rubianes (2004) ที่ทำการผสมเทียมผ่านคอมดลูกและกำหนดเวลาผสมเทียมในแกะที่ได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย CIDR® ในระยะเวลาที่แตกต่างกันพบว่า โปรแกรมการสอด CIDR® 6 วันให้อัตราการตั้งท้องที่สูงกว่าโปรแกรมการสอด CIDR® 14 วัน ที่ 41.2% และ 29.1% ตามลำดับ และจากการศึกษาของ Carson และคณะ (1989) พบว่าการใช้ CIDR® 12 วัน พบว่าแกะแสดงอาการเป็นสัด 91% และมีอัตราการผสมติดจากการใช้พ่อแกะ 95% และจากการศึกษาของ Hamra และคณะ พบว่าการใช้ CIDR 14 วันร่วมกับ PMSG 750 IU แกะแสดงอาการเป็นสัดสูงถึง 92%

ฮอร์โมน P.G. 600® ประกอบด้วยฮอร์โมน PMSG (Pregnancy Mare Serum Gonadotropin) และ hCG (Human Chorionic Gonadotropin) ซึ่งช่วยลดระยะเวลาระหว่างเริ่มแสดงอาการเป็นสัดจนถึงเวลาตกไข่ (Dogan et al., 2018) และกระตุ้นการพัฒนาของฟอลลิเคิลและเพิ่มอัตราการตกไข่ของแกะ (Koyuncu and Ozis, 2010) จึงนำมาใช้เพื่อทดแทนฮอร์โมน PMSG ในการศึกษาครั้งนี้ซึ่งไม่พบความแตกต่าง

ของอัตราการเป็นสัด อัตราการสอปปันผสมเทียมผ่านถึงคอมดลูก และอัตราการตั้งท้องในแกะที่ได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยโปรแกรมที่ใช้และไม่ใช้ฮอร์โมน P.G. 600® อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งขัดแย้งกับผลการศึกษาของ Zaiem et al. (1996) ในแกะพันธุ์ Black Thibar ที่พบว่าการเสริมฮอร์โมน PMSG ในระดับที่แตกต่างกัน (300 450 และ 600 IU) จะส่งผลให้แกะแสดงอาการเป็นสัดมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้การเสริมฮอร์โมน PMSG แม้ว่าฮอร์โมน P.G. 600® จะมีหน้าที่ช่วยในการลดระยะเวลาการแสดงอาการเป็นสัดจนถึงเวลาตกไข่ (Dogan, 2018) แต่ขนาดที่นำมาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้เป็นการนำปริมาณที่ใช้ในสุกรมาปรับใช้ในแกะ (Armstrong et al., 1983) จึงส่งผลให้มีปริมาณของฮอร์โมน PMSG ที่ใช้ไม่เพียงพอที่จะกระตุ้นให้แกะแสดงอาการเป็นสัดที่ชัดเจนมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ฮอร์โมน PMSG ในระยะยาว จะก่อให้เกิดการสร้าง anti-PMSG แอนติบอดีขึ้นภายในตัวสัตว์ (Bodin et al., 1997) ส่งผลให้ตัวสัตว์มีความสมบูรณ์พันธุ์ที่ลดลง เกิดการแสดงอาการเป็นสัดช้ากว่าปกติ (delay of the onset of estrus) (Baril et al., 1993) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ฮอร์โมน P.G. 600® ในระยะยาว และขนาดที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดของแกะในประเทศไทยต่อไป

จากการศึกษาในครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของอัตราการผสมติดในแกะที่ได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดของทั้ง 4 โปรแกรม โดยมีอัตราการผสมติดของโปรแกรมที่ 1, 2, 3 และ 4 ที่ 14.28%, 4.35%, 5.55% และ 0% ตามลำดับ ซึ่งอัตราการผสมติดน้อยกว่าจากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่รายงานการผสมติด ที่ 60% ในแกะที่ได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอดนาน 12 วัน ร่วมกับฮอร์โมน eCG 200 IU และทำการผสมเทียมแบบกำหนดเวลา (Kalyan et al., 2014) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Dias et al. (2015) ที่รายงานว่า การเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอดนาน 9 วัน ร่วมกับฮอร์โมนพลอสตาแกลนดิน และฮอร์โมน eCG ขนาด 250 IU และผสมเทียมแบบกำหนดเวลามีอัตราการผสมติดที่ 56.7% อย่างไรก็ตามความแปรผันของอัตราการผสมติดที่พบในการศึกษานี้ อาจเป็นผลเนื่องมาจากระยะเวลาการสอ CIDR® ซึ่งส่งผลให้ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในร่างกายสัตว์สูงขึ้น ทำให้เกิดการคงค้างของ dominant follicle (Rubianes et al., 1996; Leyva et al., 1999) โดยพบว่าระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในระดับ subluteal levels จะทำให้เกิดความถี่ของ LH pulse ที่มากขึ้น จึงทำให้ dominant follicle กลายเป็น persistent follicle (Adams, 1999) และ persistent follicle ที่ตกในวันที่ทำการผสมเทียมนี้ จะมีความสมบูรณ์พันธุ์ที่น้อยลง (Johnson et al., 1996)

สำหรับความสามารถสอปปันผสมเทียมผ่านถึงคอมดลูกด้วยโปรแกรมที่ 3 (CPPG-7) และโปรแกรมที่ 4 (CPG-7) สูงกว่าโปรแกรมที่ 1 (CPPG-14) และโปรแกรมที่ 2 (CPG-14) คิดเป็นร้อยละ 77.77%, 68.42%, 14.29% และ 26.09% ตามลำดับ ซึ่งความสามารถในการสอปปันผสมเทียมผ่านถึงคอมดลูกนั้นไม่ส่งผลต่ออัตราการผสมติด อย่างไรก็ตามความสามารถในการสอปปันผสมเทียมผ่านคอมดลูกในแกะนั้นขึ้นกับลักษณะกายวิภาคของแกะ เช่น ความยาวของคอมดลูก วงแหวนคอมดลูก (cervical ring) ซึ่งแตกต่างกันไปตามพันธุ์ อายุ ลำดับท้องและส่งผลต่อความยากง่ายในการสอปปันผสมเทียมผ่านคอมดลูกเพื่อการผสมเทียม (Khalil et al., 2017) ความสำเร็จของการผสมเทียมในแกะนั้นมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ เช่น สายพันธุ์ของแกะ

อายุ ลักษณะทางกายวิภาคของ คอมนดลูก ระยะเวลาระหว่างการคลอดถึงการผสมเทียมเทคนิคการผสมเทียม ปี ฤดูแล้ง ฟาร์ม และผู้ทำการ ผสมเทียมรวมไปถึงคุณภาพน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ นอกจากนี้ยังได้รายงานว่าการผสมเทียมด้วยเทคนิคการส่องกล้องลาพาโรสโคปให้อัตราการผสมติดที่ดีกว่าการผสมเทียมด้วยการสอดป้อนผ่านคอมนดลูกที่ 44.89% และ 31.25% ตามลำดับ (Anel et al., 2005)

สรุปผลการทดลอง

โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดเพื่อการผสมเทียมด้วยวิธีสอดผ่านช่องคลอดด้วยการสอด CIDR® นาน 14 วัน (โปรแกรมที่ 1 และ 2) มีผลทำให้แกะแสดงอาการเป็นสัดดีกว่าการ CIDR® นาน 7 วัน (โปรแกรมที่ 3 และ 4) แต่มีอัตราการผสมติดไม่แตกต่างกันในทุกโปรแกรม

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากโปรแกรมการทดลองในแกะของประเทศนั้นส่วนใหญ่ถูกปรับการใช้งานมาจากแพะจึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในส่วนของการเก็บตัวอย่างฮอร์โมนในแกะ (hormone profile) เพื่อสร้างโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดเพื่อการผสมเทียมให้เหมาะสมกับแกะในประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

- Adam, G.P. 1999. Comparative patterns of follicle development and selection in ruminants. *Journal of reproduction and fertility*. 54:17-32.
- Anel, L., M. Kaabi, B. Abroug and M. Alvarez. 2005. Factors influencing the success of vaginal and laparoscopic artificial insemination in churra ewes: A field study. *Theriogenology*. 63(4):1235-1247.
- Armstrong, D.T.A., A.P. Pfizner, G.M. Warnes, M.M. Raph and R.F. Seamark. 1983. Endocrine response of goats after induction of superovulation with PMSG and FSH. *Journal of reproduction and fertility*, 67:395-401.
- Baril, G., B. Leboeuf and J. Saumande. 1993. Synchronization of estrus in goats-the relationship between time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. *Theriogenology*. 40:621-628.
- Bodin, L., P.V. Drion, B. Remy, G. Brice, Y. Cognie and J.F. Beckers. 1997. Anti-PMSG antibody levels in sheep subjected annually to oestrus synchronization. *Reproductive Nutrition Development*. 37:651-660.
- Carlson, K.M., H.A. Pohl, J.M. Marcek, R.K. Muser and J.E. Wheaton. 1989. Evaluation of progesterone controlled internal drug release dispensers for synchronization of estrus in sheep. *Animal Reproduction Science*. 18:205-218.

- Dias, L.M.K., M.B. de Barros, P. Value, I.N. Sales, R. Valentim, F.F. dos Santos, M.C. da Cunha Jr, C.T. Marino and C.A. de Oliveira. 2015. Effect of a new device for sustained progesterone release on the progesterone concentration, ovarian follicular diameter, time of ovulation and pregnancy rate of ewes. *Animal Reproduction Science* 155:56-63.
- Dogan, I., Z. Nur, and B. Kilnic. 2018. Different estrus induction protocols and fixed time artificial insemination during the anoestrous period in non-lactating Kivircik ewes. *Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society*, 69(1):801-808.
- .Hamra, A.H., J.W. McNally, J.M. Marcek, K.M. Carlson and J.E. Wheaton. 1989. Comparison of progesterone sponges, cronolone sponges and controlled internal drug release dispensers on fertility un anestrous ewes. *Animal Reproduction Science*. 18:219-226.
- Holtz, W.H. 2005. Recent developments in assisted reproduction in goats. *Small Ruminant Research*, 60(1):95-110.
- Johnson, S.K., R.A. Dailey, E.K. Inskeep and P.E. Lewis. 1996. Effect of peripheral concentrations of progesterone on follicular growth and fertility in ewes. *Domestic Animal Endocrinology*. 13:69-79.
- Kalyan, D., D. Kumar, D. Sethi, R. Gulyani and S.M.K. Naqvi. 2014. Estrus synchronization and fixed-time artificial insemination in sheep under field condition of a semi-arid tropical region. *Tropical Animal Health and Production*. 47(2): 469-472.
- Khalil, K.D., N. Hamidallah, A. Benmoula, A. Badi, L. Allai, A. Fatet, M. Ibbelbachyr and B.E. Amiri. 2017. Comparative study of ewe's cervix anatomy of two Moroccan breed: A necessary step before the artificial insemination. *Proceeding of the 33rd Meeting of the Association of Embryo Transfer in Europe (AETE)*.
- Koyuncu, M., S. Ozis. 2010. Effects of Progestagen and Pmsg on Estrous Synchronization and Fertility in Kivircik Ewes during Natural Breeding Season. *Animal Bioscience*, 23(3):308-311.
- Leyva, V., B.C. Buckrell, J.S. Walton. 1999. Regulation of follicular activity and ovulation in ewes by exogenous progestogen. *Theriogenology*. 50:395-416.
- Menchana, A. and E. Rubianes. 2004. New Treatments associated with Timed Artificial Insemination in small ruminants. *Reproduction, Fertility and Development*. 16:403-414.
- Monika, P. 2001. Ovine reproduction. In: *Compendium of animals reproduction*. Monika, P. (Ed), Intervet International. B.V. Holannd, pp.125-145.

- Rita, A.J., P.D. Ball and P.J. O'May. 1990. Artificial insemination of cashmere goats – effects on fertility and fecundity of intravaginal treatment, method and time of insemination, semen freezing process, number of motile spermatozoa and age of females. *Reproduction, Fertility and Development*. 2:377-384.
- Rubianes, E., T. de Castro, B. Carbajal. 1996. Effects of high progesterone level during the growing phase of the dominant follicle of wave 1 in ultrasonically monitored ewes. *Canadian Journal of Animal Science*. 76:473-475.
- Vinoles, C., M. Forsberg, G. Banchero and E. Rubianes. 2001. Effect of long-term and short-term progesterone treatment on follicular development and pregnancy rate in cyclic ewes. *Theriogenology*. 55(4):993-1004.
- Wildevus, S. 1999. Current concepts in synchronization of estrus: Sheep and goats. *Proceedings of the American Society of Animal Science*.
- Zaiem, I., D. Tainturier, J. Chemli and M. Soltini. 1996. Vaginal sponges and different PMSG doses to improve breeding performance of Black Thibar ewes. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 147: 305-310.

ระดับของกรดไขมันอิสระ กลูโคส และยูเรียในกระแสเลือดที่มีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์
ของแม่แพะลูกผสมในประเทศไทย

เพชรร้อย เพชรเรียง^{1/} มุขสุดา เรืองศรี^{2/}

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระดับกรดไขมันอิสระ กลูโคส และยูเรียในกระแสเลือดที่มีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์และอัตราการผสมติดของแม่แพะลูกผสมที่ได้รับการผสมเทียมในระยะหลังหย่านมอย่างน้อย 30 วัน จำนวน 94 ตัว จากฟาร์มเกษตรกรในเขตจังหวัดราชบุรี โดยเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจระดับกรดไขมันอิสระ กลูโคส และยูเรียในกระแสเลือด จากนั้นเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอดเป็นเวลา 17 วัน ในวันที่ 14 ฉีดฮอร์โมนพรอสตาแกลนดินและฮอร์โมนแพร์กแนนท์แอมร์ซีรั่ม โกลนาโดโทรปิน ทำการผสมเทียมในช่วงวันที่ 48 และ 72 หลังถอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด ตรวจการตั้งท้องหลังทำการผสมเทียม 40 วันด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ ผลการศึกษาพบว่าระดับกรดไขมันอิสระ กลูโคส และยูเรียในกระแสเลือดของแพะมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.39 ± 0.25 มิลลิโมลต่อลิตร, 61.80 ± 9.89 มิลลิกรัม ต่อเดซิลิตร และ 55.02 ± 35.32 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร ตามลำดับ ผลการตรวจท้องพบว่า มีแพะท้องจำนวน 27 ตัว คิดเป็นอัตราการผสมติดเท่ากับร้อยละ 28.72 เมื่อเปรียบเทียบค่าชีวเคมีทั้งสามในแม่แพะ 2 กลุ่มคือกลุ่มท้องและไม่ท้อง พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) และเมื่อพิจารณาอัตราการผสมติดของกลุ่มแม่แพะที่มีระดับกรดไขมันอิสระ กลูโคส และยูเรียในกระแสเลือดอยู่ในช่วงปกติและผิดปกติ พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) แต่เมื่อพิจารณาค่าที่บ่งชี้ถึงสภาวะพลังงานเชิงลบ ได้แก่ค่ากรดไขมันอิสระ และกลูโคสในกระแสเลือดร่วมกันพบว่า อัตราการผสมติดของ แพะในกลุ่มที่มีสภาวะสมดุลพลังงาน (ค่า NEFA และ ค่า Glu อยู่ในช่วงปกติ) มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่มีค่าใดค่าหนึ่งผิดปกติและกลุ่มที่มีค่าผิดปกติทั้งสองค่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่อัตราการผสมติด ร้อยละ 39.13, 23.68 และ 0 ตามลำดับ ซึ่งการเกิดสภาวะพลังงานเชิงลบดังกล่าวส่งผลกระทบต่อความสมบูรณ์พันธุ์ทำให้อัตราการผสมติดลดลง

คำสำคัญ: กรดไขมันอิสระ กลูโคส แพะ ยูเรียในกระแสเลือด อัตราการผสมติด

เลขทะเบียนวิจัย: 61(1)-0208-023

^{1/}สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ อ.เมือง จ.ปทุมธานี

^{2/}ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพราชบุรี อ.โพธาราม จ.ราชบุรี

The Effect of non-esterified fatty acid, blood glucose and blood urea nitrogen on conception rate in artificial insemination in goats

Petchroi Petchriang^{1/} Muksuda Ruangkree^{2/}

Abstract

The objective of this study was to determine the relationship between non-esterified fatty acid (NEFA), blood glucose (Glu) and blood urea nitrogen (BUN) on doe's fertility and conception rate at 30 days after weaning. Ninety-four healthy goats in Ratchaburi province were used in this study. Blood samples were collected for NEFA, Glu and BUN evaluation. The does were synchronized for estrus with Controlled Internal Drug Device (CIDR®: Progesterone) for 17 days with prostaglandin and Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) at 14 days after CIDR® insertion. Ninety-four does were inseminated at 48 and 72 hours after CIDR® removal. The pregnancy diagnosis was performed 40 days after artificial insemination by ultrasonography. The average of NEFA, Glu and BUN for ninety-four does were 0.39 ($\pm$ 0.25) mmol/L, 61.80 ($\pm$ 9.89) mg/dl and 55.02 ($\pm$ 35.32) mg/dl which are each within normal ranges. Twenty-seven does were pregnant. The conception rate was 28.72%. There were no significant differences in NEFA, Glu or BUN level between pregnant and non-pregnant groups ($p>0.05$). The conception rate for each of NEFA, Glu and BUN, comparisons between the in-normal-range groups and non-in-normal-range groups showed no significant difference ($p>0.05$). Given that NEFA and Glu are indices for negative energy balance, the group where both were within normal range had higher conception rate than the group where only one of them was within normal range and the group where both were not within normal range significantly ($p<0.05$) (conception rate = 39.13, 23.68 and 0, respectively). In conclusion, this study showed that negative energy balance in goats affected their fertilities with the evidence of decreased conception rate.

Keywords: non-esterified fatty acid, blood glucose, goats, blood urea nitrogen, conception rate

Registered No: 61(1)-0208-023

^{1/}Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Muang District, Pathum Thani Province

^{2/}Ratchaburi Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Photharam, Ratchaburi

คำนำ

ปัจจุบันเกษตรกรไทยมีความสนใจในด้านการเลี้ยงแพะเพิ่มมากขึ้นเนื่องจากแพะเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีอัตราการเจริญเติบโตดี ให้ผลผลิตเร็ว ให้ลูกแฝดสูง และระยะเวลาการตั้งท้องเพียง 5 เดือน เลี้ยงดูง่าย ปรับตัวเข้ากับสภาพภูมิอากาศร้อนชื้นได้ดี โดยทั่วไปเกษตรกรนิยมเลี้ยงแพะลูกผสมแบบกึ่งปล่อยหากินในทุ่งหญ้าธรรมชาติเวลากลางวันและซังคอกในเวลากลางคืน โดยมีพ่อพันธุ์คุมฝูง แต่ปัจจุบันเกษตรกรให้ความสนใจการปรับปรุงพันธุ์เพื่อเพิ่มผลผลิตด้วยการใช้วิธีการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งจากแพะพันธุ์แท้เพิ่มมากขึ้นเนื่องจากพ่อพันธุ์มีราคาแพง โดยมีเป้าหมายในการยกระดับสายเลือดและป้องกันการผสมเลือดชิดภายในฝูงรวมทั้งการควบคุมป้องกันโรคติดต่อ แต่พบว่ายังมีอัตราการผสมติดค่อนข้างต่ำ ซึ่งปัญหาดังกล่าวอาจเกิดได้จากหลายปัจจัย ได้แก่ การจัดการฟาร์ม ความสมบูรณ์ของร่างกายและระบบสืบพันธุ์ ฤดูกาล สภาพอากาศ การให้ผลผลิตน้ำนมและวันให้นม และที่สำคัญคือสภาวะโภชนาการ (Arrebola et al., 2012)

สภาวะโภชนาการเป็นตัวบ่งชี้ถึงการได้รับอาหารที่ถูกต้องตามความต้องการของร่างกาย ได้แก่ อาหารจากแหล่งโปรตีนและพลังงานเป็นหลัก โดยระดับยูเรียในกระแสเลือด (Blood Urea Nitrogen: BUN) เป็นค่าชีวเคมี ที่บ่งบอกถึงสภาวะการได้รับอาหารโปรตีน หากสัตว์ได้รับอาหารโปรตีนในปริมาณมากจะมีระดับ BUN ที่สูงและส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนในท้องนำไข่ลดลง (Bindari et al., 2013) โดยปกติระดับ BUN ของแพะ จะอยู่ที่ 25-60 mg/dl ขึ้นกับอายุ ชนิดของอาหาร ระดับโปรตีนที่สัตว์ได้รับและการย่อยได้ของโปรตีน (Mohamed et al., 2016) ในขณะที่สภาวะพลังงานเชิงลบ (Negative Energy Balance: NEB) เป็นตัวบ่งชี้การได้รับอาหารพลังงานไม่เพียงพอทำให้ร่างกายต้องสลายไขมันที่สะสมไว้นำออกมาใช้เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทน (Bindari et al., 2013) โดยพบว่าค่าชีวเคมีในกระแสเลือดที่บ่งชี้ถึงสภาวะพลังงานเชิงลบมี 2 ชนิด ได้แก่ กลูโคสในกระแสเลือด (Blood glucose: Glu) และกรดไขมันอิสระ (non-esterified fatty acid: NEFA) ในกระแสเลือด (Rabiee et al., 1999) โดยหากระดับ Glu อยู่ในระดับปกติ ร่างกายจะหลั่งฮอร์โมนอินซูลินออกมายับยั้งการสลายไขมันในร่างกาย ส่งผลให้ระดับ NEFA อยู่ในระดับต่ำ (Bowden, 1971) แต่เมื่อร่างกายสัตว์เข้าสู่สภาวะขาดพลังงานร่างกายจะมีการสลายไขมันนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานจึงทำให้พบสารในกลุ่ม NEFA ในกระแสเลือดสูงขึ้น โดยปกติระดับของ NEFA จะมีค่าน้อยกว่า 0.45 mmol/L หรือ 30-100 mg/L (Kaneko et al., 1997) ขณะที่ระดับ Glu มีค่าระหว่าง 48-76 mg/dl (Merck, 2008)

สภาวะสมดุลพลังงานมีความสัมพันธ์โดยตรงกับระบบสืบพันธุ์ของแพะ โดยพบว่าระดับ NEFA สูงขึ้นส่งผลให้ลดการหลั่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (Gonadotropin releasing hormone: GnRH) มีผลต่อการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลทำให้ฟอลลิเคิลมีขนาดเล็กลง ทำให้อัตราการผสมติดลดลง (Bindari et al., 2013) นอกจากนี้พบว่า NEFA เป็นพิษต่อไอโอไฮด์และยังยับยั้งการเจริญเติบโตของไอโอไฮด์อีกด้วย (Schilo et al., 1992) ในขณะที่ระดับ Glu ที่ลดลงมีผลต่อการทำงานของรังไข่ (Bindari et al., 2013)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระดับกรดไขมันอิสระ กลูโคส และยูเรียในกระแสเลือดที่มีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของแม่แพะที่ได้รับการผสมเทียมและอัตราการผสมติดจากการผสมเทียม

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

คัดเลือกแม่แพะลูกผสม จำนวน 94 ตัว จากฟาร์มในเขตจังหวัดราชบุรีที่เกษตรกรมีความประสงค์จะดำเนินการผสมเทียม เป็นแม่แพะที่อยู่ในช่วงลำดับท้องที่ 1-5 อยู่ในระยะหลังหย่านมอย่างน้อย 30 วัน มีคะแนนร่างกาย 2.5-3.5 (คะแนนเต็ม 5 คะแนน) และไม่มี ความผิดปกติด้านระบบสืบพันธุ์ เลี้ยงดูโดยการให้ กระถิน เสริมด้วยหญ้าสดและอาหารข้น ทำการศึกษาระหว่างเดือนตุลาคม 2560 ถึงเดือนกันยายน 2561

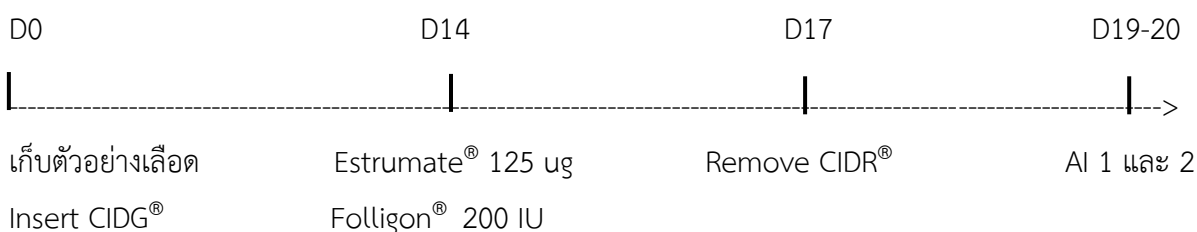
การเก็บตัวอย่างเลือด การเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียม

1. บันทึกข้อมูลทั่วไปของฟาร์ม รูปแบบการเลี้ยง จำนวนประชากรแพะในฝูง การจัดการด้านการ ป้องกันโรคและการจัดการด้านระบบสืบพันธุ์

2. เก็บบันทึกข้อมูลของแม่แพะพันธุ์ที่ต้องการรับการผสมเทียม ได้แก่ รหัสประจำตัวสัตว์ ชื่อ อายุ ลำดับท้อง คะแนนร่างกายและประวัติการคลอด

3. เจาะเก็บตัวอย่างเลือดแพะจากเส้นเลือดคอ (jugular vein) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในวันที่ทำการ เหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด โดยทำการเก็บเลือดก่อนแพะได้รับอาหาร มื้อเช้า ใส่หลอดสุญญากาศ (Mohamed et al., 2016) และตรวจวิเคราะห์ระดับ NEFA, Glu และ BUN ใน ห้องปฏิบัติการ

4. แพะได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยปฏิบัติตามคู่มือผสมเทียมแพะ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการ ผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดแท่งซิลิโคนสอดช่องคลอด (EAZI-BREED® CIDR® Sheep and Goat Device; Zoetis Australia Pty Ltd, New Zealand) เป็นเวลา 17 วัน ในวันที่ 14 ทำการ ฉีดฮอร์โมนฮอร์โมนพลอสตาแกลนดิน (Estrumate®; Vet Pharma Friesoythe GmbH, Germany) 125 ไมโครกรัม และฮอร์โมนแพร์กแนนท์แมร์ซีรัมโกนาโดโทรปิน (Pregnant Mare Serum Gonadotropin: PMSG) (Folligon®; Intervet International GmbH, Germany) 200 IU จากนั้นทำการถอด CIDR® ในวันที่ 17



5. ทำการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อชุดเดียวกันและเจ้าหน้าที่คนเดียวกัน โดยผสมเทียมที่ชั่วโมงที่ 48 และ 72 หลังจากถอด CIDR®

6. ตรวจการตั้งท้องหลังทำการผสมเทียม 40 วัน โดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์และบันทึกข้อมูลการตั้งท้อง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

รายงานข้อมูลแบบสถิติเชิงพรรณนาสำหรับค่าดัชนีที่ศึกษา ได้แก่ ระดับ NEFA, Glu และ BUN โดยการเปรียบเทียบข้อมูลความแตกต่างทางสถิติของค่าดัชนีทั้งสามระหว่างกลุ่มที่ตั้งท้องและกลุ่มที่ไม่ตั้งท้อง ด้วยวิธี Multiple t-tests และเปรียบเทียบอัตราการผสมติระหว่างกลุ่มที่มีค่าดัชนีอยู่ในช่วงค่าเลือดมาตรฐานของแพะ (in-normal-range group) และกลุ่มที่ไม่อยู่ในช่วงค่าเลือดมาตรฐาน (non-normal-range) และกลุ่มที่มีสภาวะสมดุลพลังงานและกลุ่มที่อยู่ในภาวะพลังงานเชิงลบ ด้วย Chi-square test ทั้งนี้ กำหนดค่าความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 ในทุกการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้โปรแกรม GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad Software, USA)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากแม่แพะทั้งหมด 94 ตัว มีค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าชีวเคมีทั้ง 3 ค่า คือ NEFA, Glu และ BUN ได้เท่ากับ 0.39 ± 0.25 mmol/L , 61.80 ± 9.89 mg/dl และ 55.02 ± 35.32 mg/dl ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 1 ซึ่งค่าเฉลี่ยดังกล่าวจัดอยู่ในช่วงปกติของแพะ (Kaneko et al., 1997; Merck, 2008; Mohamed et al., 2016) และจากจำนวนแพะทั้งหมด 94 ตัว พบว่ามีแพะตั้งท้องทั้งหมด 27 ตัว คำนวณ อัตราการผสมติดได้เท่ากับร้อยละ 28.72

Table 1 Mean $\pm$ SD of the three interested parameters, NEFA, Glu and BUN in 94 goats.

Parameters	mean $\pm$ SD	Normal range	References
NEFA (mmol/L)	0.39 ± 0.25	< 0.45	Kaneko et al., 1997
Glu (mg/dl)	61.80 ± 9.89	48-76	Merck, 2008
BUN (mg/dl)	55.02 ± 35.32	25-60	Mohamed et al., 2016

จากข้อมูลผลการตั้งท้องของแม่แพะ แบ่งกลุ่มแม่แพะออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มแม่แพะตั้งท้อง และกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มแม่แพะไม่ตั้งท้อง เมื่อทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของค่าชีวเคมีทั้ง 3 ค่าในแม่แพะทั้งสองกลุ่ม ได้แก่ ค่า NEFA, Glu และ BUN ตามลำดับ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันของค่าชีวเคมีในเลือดระหว่างกลุ่มที่ตั้งท้องและไม่ตั้งท้อง และทั้งสองกลุ่มมีค่าเฉลี่ยของระดับค่าชีวเคมีทั้งสามค่าอยู่ในช่วงปกติดังแสดงใน Table 2

Table 2 Mean $\pm$ SD of the three interested parameters, non-esterified fatty acid (NEFA), blood glucose (Glu) and blood urea nitrogen (BUN) in pregnant (n=27) and non-pregnant (n=67) groups.

Parameters	Pregnant group	Non-pregnant group	Normal range	p-value
NEFA (mmol/L)	0.40 $\pm$ 0.28	0.38 $\pm$ 0.24	< 0.45	0.82
Glu (mg/dl)	62.26 $\pm$ 10.18	61.60 $\pm$ 10.16	48-76	0.78
BUN (mg/dl)	61.81 $\pm$ 34.06	52.09 $\pm$ 34.71	25-60	0.11

เมื่อแบ่งกลุ่มแม่แพะด้วยผลของระดับค่าชีวเคมีในเลือด โดยแบ่งเป็นกลุ่มที่มีค่าชีวเคมีในเลือดแต่ละค่าอยู่ในช่วงปกติ (In-normal-range groups) ซึ่งมีค่าน้อยกว่า 0.45 mmol/L ระหว่าง 48-76 mg/dl และ 25-60 mg/dl สำหรับค่า NEFA, Glu และ BUN ตามลำดับ และกลุ่มที่มีค่าชีวเคมีในเลือดแต่ละค่าไม่ได้อยู่ในช่วงปกติ (Non-normal-range groups) เพื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบอัตราการผสมติดของทั้งสองกลุ่มพบว่าอัตราการผสมติดของทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ดังที่แสดงใน Table 3

Table 3 Conception rate (%) between the in-normal-range groups and non-normal-range groups for each parameter

Parameters	Conception rate (%)		p-value
	In-normal-range groups	Non-normal-range groups	
NEFA	29.03 (18/62)	28.12 (9/32)	0.94
Glu	33.33 (22/76)	20.58 (5/18)	0.27
BUN	28.94 (20/60)	27.77 (7/34)	0.93

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงค่าที่บ่งชี้ถึงสภาวะพลังงานเชิงลบ (Negative energy balance) ได้แก่ ค่า NEFA และ ค่า Glu ร่วมกัน พบว่าแพะในกลุ่มที่มีสภาวะสมดุลพลังงาน (ค่า NEFA และ ค่า Glu อยู่ในช่วงปกติทั้งสองค่า) กลุ่มที่มีค่าใดค่าหนึ่งผิดปกติ และกลุ่มที่มีค่าผิดปกติทั้ง 2 ค่า มีอัตราการผสมติดที่ร้อยละ 39.13, 23.68 และ 0 ตามลำดับ โดยพบว่าอัตราการผสมติดของทั้งสามกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.03$)

Table 4 Conception rate (%) of negative energy balance indices

Negative energy balance	Conception rate (%)	
Both were within normal range	39.13 (18/46) ^a	
Only one of them was within normal range	23.68 (9/38) ^b	p-value = 0.03
Both were not within normal range	0 (0/10) ^c	

a,b,c: mean in the same column with different superscripts differ significantly ($p < 0.05$)

สภาวะทางโภชนาการส่งผลต่อระบบสืบพันธุ์ โดยพบว่าเมื่อสัตว์อยู่ภาวะขาดสารอาหารจะส่งผลต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์ (Scramuzza and Matin, 2006) และการขาดสารอาหารเป็นระยะเวลานานมักพบว่าก่อให้เกิดการลดลงของประสิทธิภาพทางระบบสืบพันธุ์โดยมีผลต่อการระบบ Hypothalamic-gonadotropin-releasing-hormone pulse generator (Schilo, 1992) และจารึกและคณะ (2554) รายงานว่าการจัดการด้านอาหารให้เพียงพอจะส่งผลโดยตรงต่อระบบสืบพันธุ์ของสัตว์แม่พันธุ์ พบว่าการให้อาหารที่เพียงพอส่งผลต่อจำนวนฟอลลิเคิลที่เพิ่มขึ้น คุณภาพโอเอสโตรเจนที่ดีกว่าและส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในฟอลลิเคิลอีกด้วย นอกจากนี้พบว่าการเพิ่มชิ้นการกินได้ในช่วงก่อนการผสมพันธุ์ทำให้อัตราการตกไข่และอัตราการผสมติดที่เพิ่มมากขึ้น (Mani et al., 1992) ในทางกลับกันหากแพะอยู่ในภาวะการจำกัดอาหารจะทำให้มีระดับ NEFA ที่สูงขึ้น มีผลต่อการหลั่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (Gonadotropin releasing hormone: GnRH) ซึ่งมีผลต่อการเจริญของฟอลลิเคิลทำให้ฟอลลิเคิลมีขนาดเล็กลง ส่งผลต่ออัตราการผสมติด (Bindari et al., 2013) นอกจากนี้ระดับ NEFA ที่สูงขึ้นยังเป็นพิษต่อโอเอสโตรเจนและยังยับยั้งการเจริญของโอเอสโตรเจนอีกด้วย (Schilo, 1992) ระดับ Glu ที่ต่ำลงมีผลต่อการทำงานของรังไข่ แม้ว่าแพะจะมีการปรับตัวต่อสภาวะการขาดสารอาหารได้แต่ในภาวะการขาดสารอาหารแพะจะมีประสิทธิภาพทางระบบสืบพันธุ์ลดลง และอัตราการเกิดลูกแฝดก็ลดลงเช่นกัน (Sibanda et al., 1998)

ปริมาณอาหารที่กินได้ของสัตว์มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของระบบเมตาบอลิซึมของไขมันในร่างกายโดยเฉพาะอย่างยิ่งการสลายตัวของไขมันในร่างกายสัตว์ในช่วงที่มีการกินได้ลดลง โดยพบว่าหากสัตว์มีการกินได้ที่ลดลงจะมีการสลายตัวของเนื้อเยื่อไขมันในร่างกายมาเป็นพลังงานและทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นระดับ NEFA และคีโตนบอดี (Ketone bodies) (Annison, 1960) นอกจากนี้ยังมีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อระดับ NEFA เช่น สภาวะโภชนาการ การจับบังคับ พันธุ์ ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต (Growth hormone) เวลาให้อาหาร ระดับพลังงานในอาหาร ปริมาณอาหารที่กินได้ (Bowden, 1971) โดยพบว่าระดับ NEFA จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อสัตว์อยู่ในภาวะถูกจำกัดอาหารหรือเมื่อใกล้ถึงเวลาให้อาหารหรือถูกจับบังคับและพบว่าระดับ NEFA จะลดลง ที่ช่วงโมเมนต์ 4-6 หลังจากให้อาหาร นอกจากนี้ระดับ NEFA ที่สูงขึ้นจะสัมพันธ์กับระดับ Glu ที่ลดลง (Patterson, 1968) ดังนั้นจึงสามารถใช้ค่า NEFA ในการบ่งชี้สภาวะทางโภชนาการได้ดีมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งหากสัตว์อยู่ในภาวะขาดสารอาหารในช่วงแรกต่างจากระดับของคีโตนที่มักจะพบการเปลี่ยนแปลงเมื่อสัตว์อยู่ในภาวะขาดอาหารอย่างรุนแรง

ในทางกลับกันการให้อาหารบางประเภทที่มากเกินไปก็ส่งผลเสียได้เช่นกัน โดยพบว่าอาหารที่มีโปรตีนสูงทั้งในรูปโปรตีนและยูเรีย มีผลลดอัตราการตั้งท้อง (Smith and Chase, 2010) ค่า BUN ที่สูงขึ้นมักเป็นผลมาจากการให้อาหารประเภทโปรตีนอย่างไม่เหมาะสม พบว่าระดับ BUN ที่สูงขึ้นส่งผลให้เกิดความบกพร่องของโอโอไซด์ และส่งผลต่อการเกิดการปฏิสนธิและการพัฒนาของตัวอ่อน ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนในท่อนำไข่ลดลงจากสภาวะแวดล้อมในท่อนำไข่ที่ไม่เหมาะสม นอกจากนี้ยังมีผลต่อสมดุลของฮอร์โมน กล่าวคือหากพบ ระดับ BUN สูงขึ้นจะทำให้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนซึ่งเป็นฮอร์โมนสำคัญในการควบคุมการตั้งท้องที่ลดต่ำลง (Bindari et al., 2013) ซึ่งในประเทศไทยพบว่าเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะส่วนใหญ่มักจะให้กระถินเป็นอาหารใน คอกแพะตลอดเวลาอาจทำให้ค่า BUN สูงขึ้นกว่าปกติได้ อย่างไรก็ตามอัตราการผสมติดจากการผสมเทียมในแพะนั้นมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายปัจจัย เช่น ระบบการเลี้ยง ปีและฤดูกาลที่ทำการผสมเทียม พ่อพันธุ์ที่ผลิตน้ำเชื้อและตำแหน่งที่ปล่อยน้ำเชื้อ เทคนิคการผสมเทียม โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัด จำนวนวันให้นม ปริมาณน้ำนม ลำดับท้อง (Arrebola et al., 2012)

สรุปผลการทดลอง

ระดับกรดไขมันอิสระ กลูโคส และยูเรียในกระแสเลือดของแพะส่วนใหญ่มีค่าอยู่ในช่วงปกติและมีผลต่ออัตราการผสมติดไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อพิจารณาถึงค่าที่บ่งชี้ถึงสภาวะพลังงานเชิงลบ ได้แก่ กรดไขมันอิสระและกลูโคสในกระแสเลือดร่วมกัน แพะในกลุ่มที่มีสภาวะสมดุลพลังงานที่มีค่ากรดไขมันอิสระและกลูโคสอยู่ในช่วงปกติ มีอัตราการผสมติดสูงกว่ากลุ่มที่มีค่าใดค่าหนึ่งผิดปกติและกลุ่มที่มีค่าผิดปกติทั้งสองค่า ซึ่งการเกิดสภาวะพลังงานเชิงลบดังกล่าวส่งผลกระทบต่อความสมบูรณ์พันธุ์ทำให้อัตราการผสมติดลดต่ำลง

เอกสารอ้างอิง

- จารึก ญัฎฐากรกุล ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์ ภาวดี ภัคดี ฉลอง วชิราภกร. 2554. ผลของวิธีการให้อาหารแบบขั้นบันไดในระยะวงรอบการเป็นสัดต่อการพัฒนาฟอลลิเคิลและคุณภาพของโอโอไซด์ของแม่แพะพื้นเมืองไทย. วารสารแก่นเกษตร. ฉบับที่ 39 หน้า 33-42.
- Annisson, J.H. 1960. Plasma non-esterified fatty acid in sheep. Australian Journal of Agriculture Research, 11(1):58-64.
- Arrebola, F.A., B. Pardo, M. Sanchez, M.D. Lopez and C.C. Perez-Marin. 2012. Factors influencing the success of an artificial insemination program in Florida goats. Spanish Journal Agricultural Research, 10(2):338-344.
- Bindari, Y.R., S. Shrestha, N. Shrestha and T.N. Gaire. 2013. Effect of nutrition on reproduction- A review. Advances in Applied Science Research, 4(1):421-429.
- Bowden, D.M. 1971. Non-esterified fatty acids and ketone bodies in blood as indicators of nutritional status in Ruminant: A review. Canadian Journal of Animal Science, 51:1-13.
- Kaneko, J.J., J. Harvey and M. Bruss. 1997. Clinical Biochemistry of Domestic Animals, 5th Ed. Academic Press, New York, NY, USA

- Mani, A.U., W.A.C. McKelvey and E.D. Watson. 1992. The effects of low levels of feeding on response to synchronization of estrus, ovulation rate and embryo loss in goat. *Theriogenology*, 30:1016-1022.
- Merck & Co., Inc. 2008. The Merck Veterinary Manual: Reference Guides; Serum biochemical reference ranges. (Online). Available: [http://www. Merckvetmanual. Com/mvm /htm/bc/ tref7.htm](http://www.Merckvetmanual.Com/mvm/htm/bc/tref7.htm) (April 21, 2010).
- Mohamed, S. A., M. A. Razzaque, A.E. Omar, S. Albert and W.M. Al-Gallaf. 2016. Biochemical and hematological profile of different breeds of goat maintained under intensive production system. *African Journal of Biotechnology*. 15(24):1253-1257.
- Patterson, D.S.P. 1968. Some observation on the estimate of non-esterified fatty acid concentration in cow and sheep plasma. *Research in Veterinary Science*, 4:230-237.
- Rabiee, A.R., I.J. Lean, J. M. Gooden, and B. G. Miller. 1999. Relationships among metabolites influencing ovarian function in the dairy cow. *Journal of Dairy Science*, 82:39–44.
- Schilo, K.K. 1992. Effects of dietary energy on control of luteinizing hormone secretion in cattle and sheep. *Journal of Animal Science*. 70(4):1271-1282.
- Scramuzza, R.J. and G.B. Matin. 2006. The importance of the interactions among nutrition, seasonality and socio-sexual factors in development of hormone-free methods for controlling fertility. *Reproduction in Domestic Animals*. 43(2):129-136.
- Sibanda, L.M., L.R. Ndlovu and M.J. Bryant. 1998. Effects of a low plane of nutrition during pregnancy and lactation on the performance of Matebele goats and their kids. *Small Ruminant Research*. 32(3):243-250.
- Smith, R.D. and L.E. Chase. 2010. *Nutrition and Reproduction in Dairy Integrated Reproductive Management*.

การคัดเลือกลักษณะต้านทานโรคเต้านมอักเสบโดยการคัดเลือกลักษณะเต้านมในโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์

สายันท์ บัวบาน^{1/} จุรีรัตน์ แสนโกชน^{2/} ไกรวรรณ หงษ์ยันตรชัย^{1/} สาโรช งามข้า^{3/}

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาเพื่อประเมินความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และลักษณะปรากฏระหว่างค่าเฉลี่ยคะแนนเซลล์โซมาติก (SCS) และลักษณะเต้านมในโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ ข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ประกอบด้วยข้อมูลที่มีทั้งลักษณะเต้านม (ความสูงของเต้านมหลัง (UH) ความกว้างเต้านมหลัง (UW) เอ็นยึดเต้านมหลัง (UC) ความลึกของเต้านมหลัง (UD) ความยาวของเต้านมหน้า (FUL) การเกาะยึดเต้านมคู้หน้า (FUA) ความสมดุลของเต้านม (UB) และขนาดของหัวนม (TS)) และจำนวนโซมาติกเซลล์ในวันทดสอบ (TD-SCC) รายตัวของแม่โคนมในรอบการให้นมแรก คลอดลูกปี 2542-2559 ใน 119 ฟาร์ม จำนวน 3,676 ตัว แปลงข้อมูล TD-SCC ให้อยู่ในรูปคะแนนเซลล์โซมาติกในวันทดสอบ (TD-SCS) แล้วหาค่าเฉลี่ยแบบถ่วงน้ำหนักจากวันให้นมที่ 5 ถึง 150 วัน (SCS150) และ 5 ถึง 305 (SCS305) โมเดลที่ใช้ประกอบด้วยปัจจัยคงที่ของฝูง-ปี ปี-ฤดูกาลคลอด กลุ่มพันธุ์ และสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นตรงของอายุเมื่อคลอด (สำหรับ SCS150 และ SCS305) และ ฝูง-ปี ปี-ฤดูกาลประเมินลักษณะรูปร่าง กลุ่มพันธุ์ สัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นตรงและกำลังสองของอายุเมื่อคลอด และสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นตรงของวันให้นมในช่วงเวลาของการประเมินลักษณะ (สำหรับลักษณะเต้านม) ประเมินค่าองค์ประกอบความแปรปรวนโดยใช้ REML ด้วยโมเดลตัวสัตว์แบบวิเคราะห์หลายลักษณะพร้อมกัน อัตราพันธุกรรมที่ประมาณได้สำหรับ SCS150 และ SCS305 มีค่าเท่ากับ 0.111 และ 0.107 ตามลำดับ ในขณะที่ค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะเต้านมมีค่าตั้งแต่ 0.011 (UC) ถึง 0.222 (UD) ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และลักษณะปรากฏระหว่าง SCS150 และ SCS305 นั้นมีค่าสูง (ค่าเฉลี่ย $\pm$ SE; 0.961 ± 0.004 และ 0.864 ± 0.005 ตามลำดับ) ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของ SCS150 และ SCS305 กับลักษณะเต้านมมีค่าตั้งแต่ปานกลางถึงสูงสำหรับ FUL (0.658 และ 0.751), UB (0.343 และ 0.271), UD (-0.314 และ -0.372), FUA (-0.287 และ -0.224) ส่วนความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับลักษณะอื่นมีค่าต่ำผันแปรจาก UC (-0.094 และ 0.049) ถึง UW (0.120 และ 0.240) ตามลำดับ ค่าประเมินที่ได้บ่งชี้ว่า SCS150 และ SCS305 ถือได้ว่าเป็นลักษณะทางพันธุกรรมเดียวกัน การบันทึกข้อมูล SCS ในช่วงต้นของการให้นมสามารถทดแทนข้อมูล SCS ตลอดทั้งรอบการให้นม และโคนมที่มีหัวนมเต้านมหน้าอยู่หน้าเส้นสมมุติ เต้านมหน้าสูงกว่าเต้านมหลัง ความลึกของเต้านมที่อยู่เหนือข้อเข่า การเกาะยึดของเต้านมที่แน่นแนบไปกับช่องท้อง ความสูงของเนื้อเยื่อเต้านมหลังที่เหมาะสม ความกว้างของเต้านมน้อย และขนาดของหัวนมสั้น มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับค่า SCS ที่ต่ำ และมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อโรคเต้านมอักเสบน้อย ดังนั้นจึงสามารถใช้ลักษณะเต้านมบางลักษณะช่วยในการคัดเลือกเพื่อเพิ่มความต้านทานโรคเต้านมอักเสบได้ทางอ้อมด้วยการสร้างดัชนีสุขภาพเต้านม.

คำสำคัญ: ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม คะแนนเซลล์โซมาติก โคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ ลักษณะเต้านม

เลขทะเบียนวิจัย: 50(1)-0208-042

^{1/} สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.เมือง จ.ปทุมธานี

^{2/} กลุ่มพัฒนาวิชาการปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ พญาไท กรุงเทพมหานคร

^{3/} กรมปศุสัตว์ พญาไท กรุงเทพมหานคร

Selection for mastitis resistance in Thai Holstein dairy crossbred using udder traitsSayan Buaban^{1/} Jureeratn Sanpote^{2/} Kiwon Hongyantachai^{1/} Saroach Kgamkum^{3/}**ABSTRACT**

Genetic and phenotypic correlations among average somatic cell score (SCS) and udder conformation traits in Thai Holstein dairy crossbred were estimated. A total of 3,676 first parity cows in 119 herds which had information both on udder conformation traits (rear udder height (UH), udder width (UW), udder cleft (UC), udder depth, (UD), fore udder length (FUL), fore udder attachment (FUA), udder balance (UB) and teat size, TS) and test-day somatic cell s (TD-SCC) calved from 1996 to 2009 were used. TD-SCC were transformed to test-day somatic cell sore (TD-SCS) and they were calculated weighted means of SCS from 5 to 150 DIM (SCS150) and 5 to 305 DIM (SCS305). Models used included the fixed effect of herd-year, year-season of calving, breed group and the linear regression coefficients of age at calving (for SCS150 and SCS305) and herd-year, year-season of type classification, breed group the linear and quadratic regression coefficients of age at calving and the linear regression coefficients and coefficient effect of stage of lactation at the time of type classification (for udder traits). Variance components were estimated using REML based on multiple-trait animal models. The heritabilities for SCS150 and SCS305 were 0.111 and 0.107, respectively whereas the heritabilities of the udder conformation traits ranged from 0.011 (UC) to 0.222 (UD). Genetic and phenotypic correlations between SCS150 and SCS305 were very high (0.961 ± 0.004 and 0.864 ± 0.005 , respectively). Genetic correlations of SCS150 and SCS305 with udder conformation traits showed moderate to high for FUL (0.658 and 0.751), UB (0.343 and 0.271), UD (-0.314 and -0.372), FUA (-0.287 and -0.224), whereas the genetic correlations with other udder traits were low varied from UC (-0.094 and 0.049) to UW (0.120 and 0.240). These estimates indicate that SCS150 or SCS305 could be genetically regarded as the same trait. Recording of SCS for shorter periods of early lactation could be representatives of the whole lactation. In addition, the lower value of SCS, rear quarters deep, height of udder floor above hocks, extremely snug and strong fore udder attachment, intermediate rear udder height, narrow rear udder width, and shorter teat size should result in low risk to mastitis. Therefore, selection for some of udder traits might be helpful to indirectly increase mastitis resistance using udder health index.

Keywords: genetic correlations, somatic cell score, Thai Holstein crossbred, udder traits**Registered No:** 50(1)-0208-042^{1/} Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Maung, Pathumthani^{2/} Livestock Academic Development Group, Department of Livestock Development, Payathai, Bangkok^{3/} Department of Livestock Development, Payathai, Bangkok

คำนำ

การคัดเลือกลักษณะด้านทานโรคเต้านมอักเสบเพื่อสุขภาพเต้านมที่ดีขึ้นเป็นการดำเนินการอันดับต้นๆ ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงโคนม (INTERBULL, 1999) และเป็นเป้าหมายการปรับปรุงพันธุ์โคนมของหลายประเทศ ทั้งนี้เนื่องจากการเป็นโรคเต้านมอักเสบเป็นโรคที่ทำความเสียหายแก่ธุรกิจการเลี้ยงโคนม ต้องงดส่งน้ำนมตามข้อบังคับเรื่องน้ำนมปลอดสารตกค้าง ในกรณีที่เป็นเต้านมอักเสบชนิดร้ายแรง หรือชนิดเรื้อรัง อาจต้องคัดโคทิ้ง ส่งผลทำให้อายุการใช้งานของแม่โคลดลงด้วย (Nielsen, 2009) แนวทางการแก้ไขปัญหาระบาดของโรคเต้านมอักเสบสามารถทำได้โดยการปรับปรุงการจัดการเลี้ยงดูและสภาพแวดล้อม เช่น การป้องกันดูแลรักษาสุขภาพแม่โคให้ถูกสุขอนามัย (Norman et al., 2000)

การปรับปรุงและคัดเลือกลักษณะด้านทานโรคเต้านมอักเสบเป็นอีกแนวทางหนึ่งเพื่อลดอุบัติการณ์ของเต้านมอักเสบ (Wolf et al., 2010) เนื่องจากลักษณะนี้ยังคงมีความผันแปรของลักษณะ โดยใช้ข้อมูลเต้านมอักเสบทั้งที่เป็นแบบแสดงอาการโดยตรงหรือโดยผ่านลักษณะที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับการเกิดเต้านมอักเสบทางอ้อม หรือใช้รวมกันทั้งสองทาง (Luhar et al., 2006) แต่การคัดเลือกโดยตรงยังไม่สามารถดำเนินการได้เนื่องจากขาดแคลนข้อมูล (De Jong and Lansbergen, 1996; Heringstad et al., 2000) มีเพียงข้อมูลจำนวนเซลล์โซมาติกในวันทดสอบ (test-day somatic cell count, TD-SCC) ที่แปลงเป็นคะแนนเซลล์โซมาติกในวันทดสอบ (test-day somatic cell score, TD-SCS) แล้วหาค่าเฉลี่ยให้อยู่ในรูปแบบของค่าเฉลี่ย SCS ตลอดการให้นม (lactation mean somatic cell scores, LSCS) หรืออยู่ในรูปแบบของค่าเฉลี่ย SCS ในช่วงต้นของการให้นม (early lactation mean somatic cell score, ELSCS) เป็นตัวบ่งชี้วัดที่ดีสำหรับสุขภาพเต้านม และมักจะใช้เป็นเกณฑ์การคัดเลือกเพื่อลดอุบัติการณ์หรือความรุนแรงของโรคเต้านมอักเสบทางอ้อม (De Haas et al., 2008; Bloemhof et al., 2009; Windig et al., 2010; Koeck et al., 2012) ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะนี้มีค่าอัตราทางพันธุกรรมที่สูงกว่าลักษณะโรคเต้านมอักเสบที่แสดงอาการ และมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่แข็งแกร่งกับลักษณะความต้านทานต่อโรคเต้านมอักเสบ (Rupp and Boichard, 1999; Carlen et al., 2004)

นอกจากคะแนนเซลล์โซมาติกแล้วลักษณะเต้านม (udder traits) เป็นอีกแหล่งข้อมูลหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกลักษณะด้านทานโรคเต้านมอักเสบทางอ้อมเนื่องจากสามารถจัดหาได้ง่าย สะดวก และเป็นข้อมูลที่มีความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคเต้านมอักเสบ หากนำมาใช้ในการคัดเลือกลักษณะด้านทานโรคเต้านมอักเสบอาจช่วยลด SCS ในน้ำนมและความเสี่ยงต่อการเกิดโรคเต้านมอักเสบ (Nemcova et al., 2007; Bloemhof et al., 2009; Ptak et al., 2011)

ลักษณะเต้านมที่สำคัญที่นำมาพร้อมกับ SCC หรือข้อมูลโรคเต้านมอักเสบสำหรับการสร้างดัชนีสุขภาพเต้านม (udder health index, UHI) ได้แก่ ความลึกของเต้านม (udder depth, UD), ความกว้างของเต้านมหลัง (rear udder width, UW) การยึดเกาะของเต้านมหน้า (fore udder attachment, FUA) เอ็นยึดเต้านมหลัง (sensory ligament,) ความสมดุลของเต้านม (udder balance, UB) และ ความยาวหรือขนาดของหัวนม (teat size, TS) (Rupp and Boichard, 1999; Samoré and Groen, 2006; Ptak et al., 2011) Ptak et al. (2009, 2011) แนะนำว่าแม่โคนมโฮลสไตน์ของโปแลนด์ที่มีเต้านมลึกและกว้างมีค่า SCS สูงกว่าแม่โคที่มีคะแนนสำหรับลักษณะเหล่านี้ที่เหมาะสม

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและลักษณะปรากฏระหว่าง SCS และลักษณะเต้านมของโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ในรอบการให้นมแรก สำหรับใช้เป็นแนวทางในการสร้างดัชนีคัดเลือกลักษณะด้านทานโรคเต้านมอักเสบในการคัดเลือกพ่อพันธุ์โคนมต่อไป โดยใช้ข้อมูล LSCS

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ข้อมูลและการจัดการข้อมูล

ข้อมูลที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นข้อมูล TD-SCC และข้อมูลลักษณะเต้านมรายตัวของแม่โคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ในรอบการให้นมครั้งแรก คลอดลูกในช่วงปี พ.ศ. 2545-2561 ที่รวบรวมไว้ในระบบฐานข้อมูลโคนมของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ โดยแม่โคนมแต่ละตัวจะต้องมีข้อมูลพันธุ์ประวัติ และข้อมูลการคลอดที่สอดคล้องกัน มีอายุเมื่อคลอดครั้งแรกอยู่ช่วงระหว่าง 20-48 เดือน ข้อมูลในวันทดสอบจะอยู่ในช่วงวันให้นมที่ 5-305 วัน มีจำนวนวันให้นมไม่น้อยกว่า 150 วัน วันทดสอบครั้งแรกอยู่ระหว่างวันที่ 5-60 หลังจากคลอด และกลุ่มการจัดการ (ฝูง-ปีที่คลอด หรือฝูง-ปีที่ประเมินลักษณะรูปร่าง) จะต้องมีข้อมูลอย่างน้อย 2 ข้อมูล นอกจากนี้แม่โคนมแต่ละตัวที่มีข้อมูลจะต้องทราบประวัติพ่อพันธุ์ และข้อมูลพันธุ์ประวัติย้อนกลับไป 3 ชั่วอายุ ดังนั้นจึงมีชุดข้อมูล TD-SCC จำนวน 29,945 ข้อมูล และลักษณะเต้านมจำนวน 3,676 ข้อมูล จากแม่โคนม 3,676 ตัว ร่วมกับข้อมูลพันธุ์ประวัติของโคที่เกี่ยวข้องกับโคที่มีข้อมูล TD-SCS และลักษณะเต้านม จำนวน 11,029 ตัว

TD-SCC จะแปลงเป็น TD-SCS ตามสมการ $TD-SCS = \log_2 (TD-SCC/100) + 3$ (Ali and Shook, 1980) และจากนั้นหาค่าเฉลี่ยสำหรับ SCS ในช่วงต้นของวันให้นมจากวันที่ 5 ถึง 150 (SCS150) และ SCS ตลอดการให้นมจากวันที่ 5 ถึง 305 (SCS305)

เนื่องจากการเจือจางของ SCC เป็นผลมาจากปริมาณน้ำนม (Green et al., 2006) จึงได้คำนวณหาค่าเฉลี่ยแบบถ่วงน้ำหนักของ SCS โดยคำนึงถึงปริมาณน้ำนมที่สอดคล้องกันกับ SCC สำหรับแต่ละวันทดสอบ โดยคำนวณตามสูตรของ Raffrenato et al. (2003):

$$WSCS = \frac{\sum_{i=1}^n m_i SCS_i}{\sum_{i=1}^n m_i} \quad (1)$$

เมื่อ WSCS เป็นค่าเฉลี่ยแบบถ่วงน้ำหนักของ LSCS (SCS150 หรือ SCS305), SCS_i คือ SCS ในวันทดสอบ และ m_i คือปริมาณน้ำนมในวันทดสอบที่ i ค่าสังเกตที่ใช้อยู่ระหว่างวันให้นมที่ 5 ถึง 305 และในการคำนวณ SCS150 และ SCS305 จะต้องนับที่ SCS ในวันทดสอบอย่างน้อย 3 วัน

ข้อมูลของลักษณะเต้านม เป็นข้อมูลเกี่ยวข้องกับความแข็งแรงของการยึดเกาะโดยเอ็นยึดเต้านมกับร่างกายส่วนที่เป็นพื้นที่ท้องกับส่วนกระดูกเชิงกราน และเป็นข้อมูลที่ได้จากการให้คะแนนที่แสดงในระดับ 1 ถึง 50 คะแนน และการวัดโดยตรงตามคู่มือของจอร์จตัน (2552) ลักษณะที่มีการวัดโดยตรงประกอบด้วย 5 ลักษณะย่อย ได้แก่ ความสูงของเต้านมหลัง (rear udder height, UH) ความกว้างเต้านมหลัง (udder width, UW) เอ็นยึดเต้านมหลัง (udder cleft, UC) ความลึกของเต้านมหลัง (udder depth, UD) ความยาวของเต้านมหน้า (fore udder length, FUL) และลักษณะที่ได้จากการให้คะแนนประกอบด้วย 3 ลักษณะ ได้แก่ การเกาะยึดเต้านมคู่หน้า (fore udder attachment, FUA) ความสมดุลของเต้านม (udder balance, UB) และขนาดของหัวนม (teat size, TS)

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแปรปรวนและความแปรปรวนร่วม โดยใช้วิธี restricted maximum likelihood (REML) ด้วยโมเดลตัวสัตว์แบบวิเคราะห์หลายลักษณะพร้อมกัน (multiple-trait animal model) ผ่านโปรแกรมสำเร็จรูป AIREMLF90 (Misztal et al., 2020) ซึ่งมีโมเดลดังนี้

$$y_1 = X\beta + Z_a + e \quad \text{สำหรับลักษณะ SCS} \quad (2)$$

$$y_2 = X\beta + Z_a + e \quad \text{สำหรับลักษณะเต้านม} \quad (3)$$

เมื่อ y_1, y_2 คือ เวกเตอร์ของลักษณะคะแนนเซลล์โซมาติก (LSCS150 หรือ LSCS305) และเวกเตอร์ของลักษณะเต้านม (UH, UW, FUA, UC, UD, FUL, UB และ TS) ตามลำดับ; β คือ เวกเตอร์ของปัจจัยคงที่ทั้งหมดสำหรับลักษณะคะแนนเซลล์โซมาติก (ได้แก่ ฟอง-ปี ปี-ฤดูกาลของการคลอด กลุ่มพันธุ์ และสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นตรงของอายุเมื่อคลอด) และสำหรับลักษณะเต้านม (ได้แก่ ฟอง-ปี ปี-ฤดูกาลของการประเมินลักษณะรูปร่าง กลุ่มพันธุ์ สัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นตรงและการถดถอยกำลังสองของอายุเมื่อคลอด และสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นตรงของวันให้นมในช่วงเวลาของการประเมินลักษณะ); a และ e คือ เวกเตอร์ของปัจจัยสุ่มเนื่องจากพันธุกรรม และความคลาดเคลื่อนตามลำดับ โดย $a \sim N(0, A \otimes G)$ และ $e \sim N(0, I \otimes R)$; X คือ incidence matrices สำหรับปัจจัยคงที่; Z คือ incidence matrices สำหรับปัจจัยสุ่ม; A คือ เมตริกซ์ความสัมพันธ์ระหว่างสัตว์ในพันธุ์ประวัติ (numerator relationship matrix); I คือ identity matrix; G คือ เมตริกซ์ความแปรปรวนร่วมของอิทธิพลเนื่องจากพันธุกรรม; R คือ เมตริกซ์ความแปรปรวนร่วมของความคลาดเคลื่อน; σ_a^2 คือ ความแปรปรวนเนื่องจากพันธุกรรม; σ_e^2 คือ ความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อน; $\otimes$ คือ a Kronecker product function

ฤดูกาลคลอดจำแนกเป็น 3 กลุ่ม ประกอบด้วยฤดูร้อน (มีนาคม-มิถุนายน) ฤดูฝน (กรกฎาคม-ตุลาคม) และ ฤดูหนาว (พฤศจิกายน-กุมภาพันธ์) และกลุ่มพันธุกรรมจำแนกตามระดับสายเลือดโฮลส์ไตน์ฟรีเซียนเป็น 3 กลุ่มคือ $HF < 87.5\%$, $87.5\% \leq HF < 93.75\%$ และ $HF \geq 93.75\%$

ค่าองค์ประกอบความแปรปรวนและความแปรปรวนร่วมที่ได้จะนำไปใช้คำนวณหาค่าอัตราพันธุกรรม ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและลักษณะปรากฏ ดังนี้

$$\text{ค่าอัตราพันธุกรรม (Heritability, } h^2) = \frac{\sigma_a^2}{\sigma_p^2} \quad (4)$$

$$\text{ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (Genetic correlation, } r_{g(xy)}) = \frac{\sigma_{g(xy)}}{\sqrt{\sigma_{g(x)}^2 * \sigma_{g(y)}^2}} \quad (5)$$

$$\text{ความสัมพันธ์ของลักษณะปรากฏ (Phenotypic correlation, } r_{p(xy)}) = \frac{\sigma_{p(xy)}}{\sqrt{\sigma_{p(x)}^2 * \sigma_{p(y)}^2}} \quad (6)$$

เมื่อ σ_a^2 = ความแปรปรวนเนื่องจากพันธุกรรมแบบบวกสะสม

σ_p^2 = ความแปรปรวนเนื่องจากลักษณะปรากฏทั้งหมด

$\sigma_{p(xy)}$ = ความแปรปรวนร่วมของลักษณะปรากฏระหว่างลักษณะ x และ y

$\sigma_{g(xy)}$ = ความแปรปรวนร่วมทางพันธุกรรมระหว่างลักษณะ x และ y

$\sigma_{p(x)}^2$ = ความแปรปรวนทั้งหมดของลักษณะ x

$\sigma_p^2(y)$ = ความแปรปรวนทั้งหมดของลักษณะ y

$\sigma_g^2(x)$ = ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลักษณะ x

$\sigma_g^2(y)$ = ความแปรปรวนทางพันธุกรรมของลักษณะ y

ผลการทดลองและวิจารณ์

ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสำหรับ LSCS และลักษณะเต้านมของแม่โคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ในรอบแรกของการให้นมจำนวน 3,676 ตัว (Table 1) มีค่าเท่ากับ 3.488 ± 1.320 และ 3.673 ± 1.187 สำหรับ SCS150 และ SCS305 ตามลำดับ ส่วนลักษณะเต้านมที่ได้จากการวัดโดยตรงมีค่าอยู่ระหว่าง 3.272 ± 1.054 (UC) ถึง 19.787 ± 4.430 (UW) และลักษณะเต้านมที่ได้จากการให้คะแนนมีค่าอยู่ระหว่าง 26.663 ± 5.761 (UB) ถึง 28.920 ± 7.582 (FUA)

Table 1 Description of traits, phenotypic means and standard deviations (SD)

Trait ¹	Description of traits	Mean	SD
Udder measures (cm)			
UH	Measured based on the vagina endpoint to the beginning of rear udder tissue	19.787	4.430
UW	Measured based on the highest point of rear udder tissue between the niches on both sides	11.596	3.481
UC	Measured based on the depth of the groove divided between the left and right rear udder	3.272	1.054
UD	Measured based on from the floor of udder to the level of the cow hock	13.459	5.055
FUL	Measured based on from the beginning of the front udder to the relative line drawn down from the hip bone	4.174	4.068
Udder scores ²			
FUA	1=loose to 50=strong attachment	28.920	7.582
UB	1=low rear udder to 50=high rear udder	26.663	5.761
TS	1=short to 50=long teats	26.689	6.620
SCS			
LSCS150	Weight lactation means of test-day SCS during 5-150 DIM	3.488	1.320
LSCS305	Weight lactation means of test-day SCS during 5-305 DIM	3.673	1.187

¹UH = rear udder height; UW = udder width; UC = udder cleft; UD = udder depth; FUL = fore udder length; FUA = fore udder attachment; UB = udder balance; TS = teat size; LSCS150 = weight average of SCS at 5-150 DIM; LSCS305 = weight average of SCS at 5-305 DIM.

²Evaluated subjectively on a scale from 1 to 50.

ค่าเฉลี่ยของ LSCS305 ที่ได้ในช่วงเดียวกับรายงานในประชากรแม่โคนม Czech Holstein และ Czech Fleckvieh (Zavadilová et al., 2011) และ Polish Holstein-Friesian (Rzewuska et al., 2011) ที่มีค่าเท่ากับ 3.40-4.13 3.16-4.01 และ 3.59-4.42 ตามลำดับ และมีค่าสูงกว่าที่รายงานไว้ในประชากรโคนมในอิตาลี (Samoré et al., 2008) ประชากรโคนมในอิหร่าน (Dadpasand et al., 2012; Kheirabadi and Alijani, 2014) และประชากรโคนมในเกาหลี ญี่ปุ่น และบราซิล (Alam et al., 2015; Costa et al., 2015; Nishiura et al., 2015) ค่าเฉลี่ยของ LSCS305 มีค่าสูงกว่า LSCS150 สอดคล้องกับการศึกษาของ Dadpasand et al. (2012) ส่วนค่าเฉลี่ยของลักษณะเต้านมที่ได้จากการให้คะแนนจาก 1-50 สำหรับลักษณะที่ศึกษานั้น โดยทั่วไปมีค่าสูงกว่าการศึกษาในโคนมอิตาลีเลนโฮลสไตน์ฟรีเซียน ของ Samoré and Groen (2006) ที่มีเกณฑ์การให้คะแนน 1-50 เหมือนกัน

ค่าความแปรปรวนและค่าอัตราพันธุกรรม

ค่าความแปรปรวนทางพันธุกรรม ค่าความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อน ค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะเต้านม และ LSCS สำหรับวันให้นมที่ 5 ถึง 150 (SCS150) และ การให้นมที่ 5 ถึง 305 (SCS305) แสดงไว้ใน Table 2

Table 2 Additive genetic variances (σ_a^2), residual variances (σ_e^2) and estimated heritability (h^2) of udder conformation traits and LSCS (SCS150 และ SCS305)

Trait ¹	σ_a^2	σ_e^2	h^2	SE
Udder measures (cm)				
UH	1.133	8.109	0.123	0.007
UW	0.278	2.995	0.085	0.006
UC	0.006	0.520	0.011	0.001
UD	3.401	11.896	0.222	0.011
FUL	0.351	9.583	0.035	0.002
Udder scores ²				
FUA	0.995	37.265	0.026	0.002
UB	0.525	18.905	0.027	0.002
TS	2.143	21.251	0.092	0.007
SCS				
LSCS150	0.123	0.988	0.111	0.008
LSCS305	0.087	0.727	0.107	0.007

¹UH = rear udder height; UW = udder width; UC = udder cleft; UD = udder depth; FUL = fore udder length; FUA = fore udder attachment; UB = udder balance; TS = teat size; SCS150 = weight average of SCS at 5-150 DIM; SCS305 = weight average of SCS at 5-305 DIM.

²Evaluated subjectively on a scale from 1 to 50.

ความแปรปรวนทางพันธุกรรมสำหรับลักษณะ LSCS ของแม่โคนมมีค่าเท่ากับ 0.123 และ 0.087 สำหรับ LSCS150 และ LSCS305 ตามลำดับ และการเพิ่มขึ้นของความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนมีแนวโน้มไปในทางเดียวกันกับความแปรปรวนทางพันธุกรรมโดยมีค่าเท่ากับ 0.988 และ 0.727 ตามลำดับ

ส่งผลให้อัตราพันธุกรรมมีค่าไม่ต่างกันเมื่อจำนวนวันให้นมมากขึ้นซึ่งมีค่าเท่ากับเท่ากับ 0.111 และ 0.107 ส่วนลักษณะเต้านมมีค่าอัตราพันธุกรรมค่อนข้างต่ำเหมือนกับลักษณะ SCS มีค่าอยู่ในช่วง 0.011 (UC) ถึง 0.222 (UD) ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของอัตราพันธุกรรมสำหรับทุกลักษณะมีค่าอยู่ระหว่าง 0.001 ถึง 0.011

ค่าอัตราพันธุกรรมของ LSCS150 และ LSCS305 ที่ประเมินได้ครั้งนี้มีค่าเท่ากับ 0.111 และ 0.107 ตามลำดับ ใกล้เคียงกับการประเมินก่อนหน้านี้ด้วยโมเดลรอบการให้นมของ Mrode et al. (1998) (0.11-0.12), Jattawa et al. (2012) (0.12) และน้อยกว่าการศึกษาของ Boettcher et al. (1998) (0.14), Rupp and Boichard (1999) (0.17), Samoré et al. (2008) (0.18) และมากกว่า Heringstad et al. (2006) (0.070), Holtsmark et al. (2008) (0.026) เมื่อเปรียบเทียบกับโมเดลการถดถอยแบบสุ่ม ค่าอัตราพันธุกรรมที่ประมาณได้มีค่าน้อยกว่าการศึกษาของ De Roos et al. (2003) (0.237) แต่มากกว่าการศึกษาของ Koivula et al., (2005) (0.07), Rzewuska et al. (2011) (0.09), Kheirabadi and Alijani (2014) (0.03-0.07) และ สายัณห์ และคณะ (2563) (0.15)

ส่วนค่าอัตราพันธุกรรมสำหรับลักษณะเต้านมส่วนใหญ่ที่ประมาณได้มีค่าใกล้เคียงกับที่ได้ประมาณไว้ก่อนหน้านี้ในประชากรเดียวกันซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.020 (UB) ถึง 0.170 (UD) และเป็นค่าที่ใช้ในการคำนวณ EBV ในปัจจุบัน (กรมปศุสัตว์, 2561) แต่อย่างไรก็ตามบางลักษณะมีค่าแตกต่างไปจากรายงานก่อนหน้านี้ในประชากรอื่น โดยทั่วไปแล้วมีค่าน้อยกว่าที่ได้จากประมาณการจากประชากรโฮลสไตน์ฝรั่งเศส (Rupp and Boichard, 1999)

อย่างไรก็ตามค่าอัตราพันธุกรรมทั้งลักษณะ SCS และลักษณะเต้านมจากหลายการศึกษาให้ค่าที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับคำจำกัดความ และเกณฑ์ที่ใช้วัดและให้คะแนน (Muir et al., 2007; Bohmanova et al., 2009; Miglior et al., 2009)

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และลักษณะปรากฏ

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และทางลักษณะปรากฏ ระหว่าง SCS150 และ SCS305 หรือ ระหว่าง LSCS (SCS150 SCS305) กับลักษณะเต้านม ของโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ในรอบการให้นมแรกได้แสดงดัง Table 3

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและลักษณะปรากฏโดยประมาณระหว่าง SCS150 และ SCS305 มีค่าเท่ากับ 0.961 ± 0.004 และ 0.864 ± 0.005 ตามลำดับ โดยทั่วไปพบว่าความสัมพันธ์ของ LSCS กับลักษณะเต้านมหลายลักษณะมีความเกี่ยวข้องกันมีค่าตั้งแต่ปานกลางถึงสูงอยู่ในช่วงตั้งแต่ 0.120 (TS) ถึง 0.751 (FUL) FUL, UB และ UD มีค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับทั้ง LSCS150 และ LSCS305 ค่อนข้างสูง เมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะเต้านมอื่นๆ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.658, 0.343 และ -0.314 สำหรับ SCS150 และ 0.751, 0.271 และ -0.372 สำหรับ SCS305 ตามลำดับ สะท้อนให้เห็นว่าแม่โคที่มีความยาวของเต้านมหน้ามาก (หัวนมเต้านมหน้าอยู่หลังเส้นสมมุติ) ความสมดุลของเต้านมที่มีค่าสูง (เต้านมหลังสูงกว่าเต้านมหน้า) และความลึกของเต้านมที่ยาวเลยข้อเข้าไปมาก มีความสัมพันธ์กับค่าเซลล์โซมาติกที่สูง และมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อโรคเต้านมอักเสบ ลักษณะเต้านมอื่นๆ มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับ LSCS ในระดับปานกลางในเชิงบวกและ

ลบ UH และ FUA มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเชิงลบกับทั้ง LSCS มีค่าเท่ากับ -0.201 และ -0.287 สำหรับ LSCS150 และมีค่าเท่ากับ -0.224 และ -0.224 สำหรับ LSCS305 UW และ TL มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมเชิงบวกกับ LSCS มีค่าเท่ากับ 0.120 และ 0.184 สำหรับ LSCS150 และ 0.240 และ 0.047 ส่วน UC มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับ LSCS อยู่ในระดับต่ำ (0.094 สำหรับ LSCS150 และ 0.049 สำหรับ LSCS305) ความสัมพันธ์ดังกล่าวบ่งชี้ว่าเต้านมที่มีการเกาะยึดของเต้านมหน้าที่แข็งแรงแนบแน่นไปกับพื้นที่ท้องมีความสูงของเนื้อเยื่อเต้านมหลังที่พอเหมาะ ความกว้างของเต้านมที่เหมาะสม และความยาวของหัวนมสันมีความสัมพันธ์กับ SCS ที่ต่ำ โดยทั่วไปความสัมพันธ์ทางลักษณะปรากฏระหว่าง LSCS กับลักษณะเต้านมมีค่าอยู่ในระดับต่ำ ซึ่งมีค่าตั้งแต่ -0.015 (FUA) ถึง 0.037 (TS) สำหรับ LSCS150 และมีค่าตั้งแต่ -0.030 (FUA) ถึง 0.055 (TS) สำหรับ LSCS305

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ภายในระหว่างลักษณะเต้านมที่ศึกษาพบว่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างลักษณะมีค่าต่ำถึงสูงอยู่ในช่วงจาก 0.008 (ความสัมพันธ์เชิงลบ) ถึง 0.852 (ความสัมพันธ์เชิงลบ) UW มีความสัมพันธ์ปานกลางในเชิงบวกกับ UC (0.447) กับ FUL (0.411) แต่มีความสัมพันธ์เชิงลบกับ UD (-0.574) ซึ่งให้ความกว้างของเต้านมในโคลูกผสมในประเทศไทย มีความสัมพันธ์ไปทิศทางเดียวกับลักษณะเอ็นยึดเต้านมหลัง ความยาวของเต้านมหน้า และความสัมพันธ์ไปทิศทางตรงกันข้ามกับ ความลึกของเต้านม UB มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับ UH (0.420), UW (0.486), FUL (0.465) และ FUA (0.472) บ่งชี้ว่าโคที่มีค่าความสมดุลของเต้านม (มีเต้านมหลังสูงกว่าเต้านมหน้า) มีความสัมพันธ์ไปทิศทางเดียวกับความสูงและความกว้างของเต้านม ความยาวของเต้านมหน้า และเอ็นยึดเต้านมหลัง และ FUA มีความสัมพันธ์สูงเชิงลบกับ TS (-0.852) บ่งชี้ว่าเอ็นยึดเต้านมหน้าที่แนบชิดไปกับลำตัวจะมีความสัมพันธ์ขนาดของเต้านมที่เล็ก ส่วนความสัมพันธ์ทางลักษณะปรากฏระหว่างลักษณะเต้านม โดยทั่วไปส่วนใหญ่มีค่าน้อยกว่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม

Table 3 Genetic (r_g) and phenotypic (r_p) correlations (means $\pm$ SE¹) between LSCS and udder conformation traits.

Traits ²	SCS150	SCS305	UH	UW	UC	UD	FUL	FUA	TS	UB
SCS150		0.961	-0.201	0.120	-0.094	-0.314	0.658	-0.287	0.184	0.343
SCS305	0.864		-0.224	0.240	0.049	-0.372	0.751	-0.224	0.047	0.271
UH	0.026	0.007		-0.120	0.193	-0.328	0.339	0.331	-0.033	0.420
UW	-0.002	0.001	-0.051		0.447	-0.574	0.411	0.262	-0.249	0.486
UC	0.016	0.012	0.007	0.089		-0.805	0.513	-0.311	0.180	-0.008
UD	0.035	-0.045	0.008	-0.123	-0.119		-0.784	0.310	-0.344	-0.388
FUL	0.009	-0.018	-0.035	0.072	0.076	-0.150		-0.074	0.016	0.465
FUA	-0.015	-0.030	-0.031	-0.016	0.052	0.020	0.182		-0.852	0.472
TS	0.037	0.055	-0.027	0.050	0.148	-0.056	0.053	0.034		-0.275
UB	0.006	0.004	-0.001	-0.005	0.029	0.022	0.077	0.095	0.051	

¹/SE of genetic correlations ranged from 0.002 to 0.049; SE of phenotypic correlations ranged from 0.003 to 0.199.

²SCS150 = weight average of SCS at 5-150 DIM; SCS305 = weight average of SCS at 5-305 DIM; UH = rear udder height; UW = udder width; UC = udder cleft; UD = udder depth; FUL = fore udder length; FUA = fore udder attachment; UB = udder balance; TS = teat size.

โดยทั่วไปความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อมระหว่าง SCS150 และ SCS305 และความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง LSCS และลักษณะเต้านมที่ประเมินได้จากโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ในรอบการให้นมแรกครั้งนี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาอื่นที่คล้ายคลึงกัน

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและลักษณะปรากฏระหว่าง SCS150 และ SCS305 มีค่าค่อนข้างสูงมาก ซึ่งหมายความว่า SCS150 และ SCS305 อาจถือได้ว่าเป็นลักษณะทางพันธุกรรมเดียวกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการบันทึก SCS ในช่วงต้นของการให้นม (เช่น 150 DIM แรก) สามารถทดแทนข้อมูล SCS ตลอดทั้งรอบการให้นม และเป็นช่วงที่เหมาะสมที่จะทำให้สามารถรวบรวมข้อมูล SCS ได้จากโคจำนวนมากตัว และฝูงแม่โคที่มากขึ้น

ทั้งๆที่มีความคลาดเคลื่อนที่พบในการประเมินความสัมพันธ์ของ SCS กับลักษณะเต้านมต่าง ๆ แต่ UD, UW และ FUA มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่แข็งแกร่งกับ SCS เหมือนกันในแต่ละพันธุ์และประชากร (Rupp and Boichard, 1999; Samoré and Groen, 2006; Ptak et al., 2011) โดยในการศึกษารุ่นนี้ UC, UD และ FUA มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเชิงลบกับ LSCS ส่วน UW มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเชิงบวกกับ LSCS สอดคล้องกับการศึกษาของ Boettcher et al. (1998), Rupp and Boichard (1999), Samoré and Groen (2006), Nemcova et al., (2007), Bloemhof et al. (2009), Samoré et al., 2010, Ptak et al. (2009, 2011) และ Dadpasand et al. (2012) แต่ UD กับ FUA มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเชิงบวกกับ LSCS ในแม่โคนมโฮลสไตน์ของเนเธอร์แลนด์ (Bloemhof et al., 2009) และในโคนมบราวสวิสของอิตาลี (Samoré et al., 2010)

UH มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับ LSCS ในเชิงลบ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Samoré and Groen (2006) แต่ต่างจากการศึกษาของ Dadpasand et al. (2012) ที่พบความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับ LSCS ในเชิงบวก ซึ่งชี้ให้เห็นแนวโน้มสำหรับการลดลงของ SCS ในแม่โคที่มีความสูงที่เหมาะสม

UB มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับ LSCS สอดคล้องกับ Rupp and Boichard, (1999) และ Sorensen et al. (2000) โดย UB มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเชิงบวกกับ LSCS ซึ่งผลแตกต่างจากการศึกษาก่อนหน้า Samoré and Groen (2006) อาจเนื่องมาจากความแตกต่างจาก ประชากรโคสภาพแวดล้อม แหล่งของเชื้อที่ก่อให้เกิดเต้านมอักเสบ และพฤติกรรมผู้เลี้ยงก่อนรีดนมที่แตกต่างกัน โดยโคนมในประเทศไทยเป็นโคนมลูกผสมซึ่งมีขนาดและโครงสร้างของเต้านมที่แตกต่างกับโคพันธุ์แท้ในต่างประเทศ โคเหล่านี้ที่มีเซลล์โซมาติกสูงจะมีความสัมพันธ์กับลักษณะเต้านมหลังสูงกว่าเต้านมหน้า ขณะที่โคในต่างประเทศจะมีความสัมพันธ์กับลักษณะเต้านมหน้าสูงกว่าเต้านมหลัง ประกอบกับในทางปฏิบัติโดยทั่วไปเกษตรกรมีพฤติกรรมมักอาบน้ำโคก่อนรีดนม จึงทำให้มีความเสี่ยงในการติดเชื้อจากมูลที่มาจากทวารหนักมากกว่าในต่างประเทศ ในทำนองเดียวกันกับ FUL ที่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเชิงบวกกับ LSCS ต่างบ่งชี้ว่าโคนมในประเทศไทยมีการติดเชื้อจากเต้านมหลังมากกว่า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ สุภาดา และคณะ (2556) วันวิสาข์ (2559) และภักญาณี และคณะ (2562) ที่พบว่าเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคเต้านมอักเสบส่วนใหญ่มาจากสิ่งแวดล้อมและเชื้อที่อยู่ในมูลสัตว์ เช่น E.coli, Streptococcus faecalis และ Streptococcus dysgalactiae

TS มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเชิงบวกกับ LSCS ซึ่งชี้ให้เห็นว่าโคนมที่มีหัวนมสั้นมีความสัมพันธ์กับการลดลงของ SCS สอดคล้องกับการศึกษาของ Mrode et al. (1998), Rupp and Boichard (1999), Samoré and Groen (2006), Nemcova et al. (2007), Dube et al. (2008) และ Samoré et al. (2010) แต่ต่างจาก DeGroot et al. (2002), Bloemhof et al. (2009) และ Ptak et al. (2009) ที่พบว่า TS มีความสัมพันธ์เชิงลบกับ LSCS ขณะที่ Dadpasand et al. (2012) พบว่า TS ไม่มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับ LSCS150 หรือมีเพียงเล็กน้อยในเชิงลบ (-0.03) กับ LSCS305

ดังนั้นจากค่าความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง LSCS และลักษณะเต้านมที่ได้ในประชากรนี้ ชี้ให้เห็นว่าแม่โคที่มีความยาวของเต้านมหน้ามาก (หัวนมเต้านมหน้าอยู่หลังเส้นสมมุติ) ความสมดุลของเต้านมที่มีค่าสูง (เต้านมหลังสูงกว่าเต้านมหน้า) และความลึกของเต้านมที่ยาวเลยข้อเข้าไปมาก การเกาะยึดของเต้านมหน้าที่ไม่แข็งแรง และหัวนมยาว มีความสัมพันธ์กับค่าเซลล์โซมาติกที่สูง และมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อโรคเต้านมอักเสบ

ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะ SCS และลักษณะเต้านมมีค่าไม่คงที่ในแต่ละพันธุ์ และประชากร อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับโครงสร้างของข้อมูล คำจำกัดความของลักษณะ วิธีการแปลงข้อมูล และโมเดลที่ใช้วิเคราะห์ (Dadpasand et al., 2012)

สรุป

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมและลักษณะปรากฏระหว่าง SCS150 และ SCS305 ในโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ในรอบการให้นมแรกมีค่าสูง แสดงว่า SCS150 และ SCS305 ถือได้ว่าเป็นลักษณะทางพันธุกรรมเดียวกัน และการบันทึก SCS ในช่วงต้นของการให้นม (เช่น 150 DIM แรก) สามารถทดแทนข้อมูล SCS ตลอดทั้งรอบการให้นม และจากความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่าง LSCS และลักษณะเต้านมหลายลักษณะที่ประเมินได้นั้นสามารถสรุปได้ว่าโคนมที่มีหัวนมเต้านมหน้าอยู่หน้าเส้นสมมุติ เต้านมหน้าสูงกว่าเต้านมหลัง ความลึกของเต้านมที่อยู่เหนือข้อเข้า การเกาะยึดของเต้านมที่แน่นแนบไปกับช่องท้อง ความสูงของเนื้อเยื่อเต้านมหลังที่เหมาะสม ความกว้างของเต้านมน้อย และขนาดของหัวนมสั้น มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับค่า SCS ที่ต่ำ และมีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อโรคเต้านมอักเสบน้อย ส่งผลทำให้มีความต้านทานต่อโรคเต้านมอักเสบเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงสามารถใช้ลักษณะเต้านมบางลักษณะช่วยในการคัดเลือกเพื่อเพิ่มความต้านทานโรคเต้านมอักเสบได้ทางอ้อมด้วยการสร้างดัชนีสุขภาพเต้านม (UHI) อย่างไรก็ตามในการพิจารณาเลือกลักษณะเต้านมใดในดัชนีจะต้องทำการทดสอบการตอบสนองต่อการคัดเลือกที่ได้รับจากแต่ละดัชนีที่เป็นไปได้ สำหรับการคัดเลือกลักษณะเต้านมเบื้องต้นที่ควรอยู่ใน UHI ในประชากรที่ศึกษานี้ประกอบด้วย UB, UD, FUA และ UW

เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์. 2534. การประชุมสัมมนาข้าราชการกรมปศุสัตว์ที่ปฏิบัติการในโครงการพัฒนาโคนม กิจกรรมพัฒนาและผลิตน้ำเชื้อพ่อโคนมพันธุ์ดี (Master Bull Project). 5-6 สิงหาคม 2534 ณ โรงแรมแมนดาริน เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ.

- กรมปศุสัตว์ 2561 สมุดพ่อพันธุ์กรมปศุสัตว์ 2561 สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ พิมพ์ที่ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย 81 หน้า เข้าถึงได้จาก http://biotech.dld.go.th/webnew/Data/Sire_Summary/2561/Sire_Summary2561.pdf
- จूरินทร์ แสนโภชน. 2552. คู่มือการประเมินและคัดเลือกกรูปร่างโคนม กลุ่มวิจัยและประเมินพันธุ์กรรมสัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์. 84 หน้า.
- ภักญาณี สุตสาร ปนัดดา ประมาพันธ์ และ ปรางทิพย์ ตันเซ่ง. 2562. การสำรวจเชื้อก่อโรคเต้านมอักเสบในโคนมและความไวต่อยาปฏิชีวนะในจังหวัดสระแก้ว. แก่นเกษตร. 47(ฉบับพิเศษ 2):1017-1022.
- วันวิสาข์ วะชุม. 2559. การหายจากโรคเต้านมอักเสบแบบแสดงอาการในแม่โครีดนมที่รักษาด้วยยาปฏิชีวนะ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารสัตวศาสตร์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ.
- สายัณห์ บัวบาน เกียรติศักดิ์ เหล็งหนูดำ และ มนต์ชัย ดวงจินดา. 2563. การประมาณค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรม และค่าแนวโน้มทาง พันธุกรรมสำหรับลักษณะความต้านทานเต้านมอักเสบของแม่โคนมไทย โดยใช้ข้อมูลในวันทดสอบ แก่นเกษตร 48 (1): 23-34.
- สุภาดา คณานับ จิรนิจ เจริญสวัสดิ์ เมญาณี กาญจนพันธุ์ และ พิพัฒน์ อรุณวิภาส. 2556. การประชุมวิชาการแห่งชาติ ครั้งที่ 10, 6-7 ธันวาคม 2556 ณ อาคารศูนย์เรียนรวม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม.
- Alam, M., C. I. Cho, T. J. Choi, B. Park, J. G. Choi, Y. H. Choy, S. S. Lee, and K. H. Cho. 2015. Estimation of genetic parameters for somatic cell scores of Holsteins using multi-trait lactation models in Korea. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 28:303-310.
- Ali, A.K. A. and G. E. Shook. 1980. An optimum transformation for somatic cell concentration in milk. J. Dairy Sci. 63:487-490.
- Bloemhof, S., G. de Jong, and Y. de Haas. 2009. Genetic parameters for clinical mastitis in the first three lactations of Dutch Holstein cattle. Vet. Microbiol. 134:165-171.
- Boettcher, P. J., J. C. M. Dekkers, and B. W. Kolstad. 1998. Development of an udder health index for sire selection based on somatic cell score, udder conformation, and milking speed. J. Dairy Sci. 81:1157-1168.
- Bohmanova, J., F. Miglior, and J. Jamrozik. 2009. Use of test-day records beyond three hundred five days for estimation of three hundred five-day breeding values for production traits and somatic cell score of Canadian Holsteins. J. Dairy Sci. 92:5314-5325.
- Carlén, E., E. Strandberg, and A. Roth. 2004. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score and production in the first three lactations of Swedish Holstein cows. J. Dairy Sci. 87:3062-3070.
- Costa, C.N., G.G. Santos, J.A. Cobuci, G. Thompson, and J.G.V. Carvalheira. 2015. Genetic parameters for test day somatic cell score in Brazilian Holstein cattle. Genet. Mol. Res. 14:19117-19127.

- Dadpasand, M., M. J. Zamiri, H. Atashi, and A. Akhlaghi. 2012. Genetic relationship of conformation traits with average somatic cell score at 150 and 305 days in milk in Holstein cows of Iran. *J. Dairy Sci.* 95:7340–7345.
- De Haas, Y., W. Ouweltjes, J. T. Napel, J. J. Windig, and G. de Jong. 2008. Alternative somatic cell count traits as mastitis indicators for genetic selection. *J. Dairy Sci.* 91:2501–2511.
- De Jong, G. and L. Lansbergen. 1996. Udder health index: selection for mastitis resistance. *Proceedings of the International Workshop on genetic improvement of functional traits in cattle*, Gembloux, Uppsala. *Interbull bulletin.* 12:42–47.
- De Roos, A., A. Harbers, and G. De Jong. 2003. Genetic parameters of test-day somatic cell score estimated with a random regression model. *Interbull bulletin.* 31:97–97.
- DeGroot, B. J., J. F. Keown, L. D. Van Vleck, and E. L. Marotz. 2002. Genetic parameters and responses of linear type, yield traits, and somatic cell scores to divergent selection for predicted transmitting ability for type in Holsteins. *J. Dairy Sci.* 85:1578–1585.
- Dube, B., K. Dzama, and C. B. Banga. 2008. Genetic analysis of somatic cell score and udder type traits in South African Holstein cows. *S. Afr. J. Anim. Sci.* 38:1–11.
- Green, L. E., Y. H. Schukken, and M. J. Green. 2006. On distinguishing cause and consequence: Do high somatic cell counts lead to lower milk yield or does high milk yield lead to lower somatic cell count. *Prev. Vet. Med.* 76:74 – 89.
- Heringstad, B., D. Gianola, Y. M. Chang, J. Ødegård, and G. Klemetsdal. 2006. Genetic associations between clinical mastitis and somatic cell score in early first-lactation cows. *J. Dairy Sci.* 89(6):2236–2244.
- Heringstad, B., G. Klemetsdal, and J. Ruane. 2000. Selection for mastitis resistance in dairy cattle: A review with focus on the situation in Nordic countries. *Livest. Prod. Sci.* 64:95–106.
- Holtmark, M., B. Heringstad, P. Madsen, and J. Ødegård. 2008. Genetic relationship between culling, milk production, fertility, and health traits in Norwegian Red cows. *J. Dairy Sci.* 91(10):4006–4012.
- INTERBULL. 1999. *Proceedings of International Workshop on Genetic improvement of functional traits in cattle - Breeding goals and selection schemes*, Wageningen. Uppsala. *Interbull bulletin.* 23:221–223.
- Jattawa, D., S. Koonawootrittriron, M. A. Elzo and T. Suwanasopee. 2012. Somatic cells count and its genetic association with milk yield in dairy cattle raised under Thai tropical environmental conditions. 25 (9):1216 – 1222.

- Kheirabadi, K. and S. Alijani. 2014. Estimation of genetic parameters and genetic trends of somatic cell score in Iranian Holstein cows using test-day records. *Iranian J. Appl. Anim. Sci.* 4(4):707–716.
- Koeck, A., F. Miglior, D. F. Kelton, and F. S. Schenkel. 2012. Alternative somatic cell count traits to improve mastitis resistance in Canadian Holsteins. *J. Dairy Sci.* 95:432–439.
- Koivula, M., E. A. Mäntysaari, E. Negussie, and T. Serenius. 2005. Genetic and phenotypic relationships among milk yield and somatic cell count before and after clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 88(2):827–833.
- Luhar R., R. K. Patel, and K. M. Singh. 2006. Studies on the possible association of β -lactoglobulin genotype with mastitis in dairy cows. *Indian J. Dairy Sci.* 59:155–158.
- Miglior, F., W. Gong, Y. Wang, J. Kistemaker, A. Sewalem, and J. Jamrozik. 2009. Genetic parameters of production traits in Chinese Holsteins using a random regression test-day model. *J. Dairy Sci.* 92:4697–4706.
- Misztal, I., S. Tsuruta, D. Lourenco, I. Aguilar, A. Legarra, and Z. Vitezica. 2020. Manual for BLUPF90 family of programs. Animal and Dairy Science Department, Georgia; Available: http://nce.ads.uga.edu/wiki/lib/exe/fetch.php?media=blupf90_all7.pdf. Accessed May 10, 2020.
- Mrode, R. A., G.J.T. Swanson, and M. S. Winters. 1998. Genetic parameters and evaluation for somatic cell counts and its relationship with production and type traits in some dairy breeds in the United Kingdom. *Anim. Sci.* 66:569–576.
- Muir, B. L., G. Kistemaker, J. Jamrozik, and F. Canavesi. 2007. Genetic parameters for a multiple-trait multiple-lactation random regression test-day model in Italian Holsteins. *J. Dairy Sci.* 90:1564 – 1574.
- Nemcova, E., M. Štípková, L. Zavadilová, J. Bouška, and M. Vacek. 2007. The relationship between somatic cell count, milk production and six linearly scored type traits in Holstein cows. *Czech J. Anim. Sci.* 52:437–446.
- Nielsen, C. H. 2009. Economic impact of mastitis in dairy cows. PhD Thesis No. 2009:29. Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, Sweden.
- Nishiura, A., O. Sasaki, M. Aihara, H. Takeda, and M. Satoh. 2015. Genetic analysis of fat-to-protein ratio, milk yield and somatic cell score of Holstein cows in Japan in the first three lactations by using a random regression model. *Anim Sci J.* 86:961-969.
- Norman, H. D., R. H. Miller, J. R. Wright, and G. R. Wiggans. 2000. Herd and state means for somatic cell count from dairy herd improvement. *J. Dairy Sci.* 83:2782–2788.

- Ptak, E., W. Jagusiak, A. Zarnecki, and A. Otwinowska-Mindur. 2009. Relationship between somatic cell score and udder conformation traits in Polish Holstein-Friesian cows. *Anim. Sci.* 9:237–241.
- Ptak, E., W. Jagusiak, A. Zarnecki, and A. Otwinowska-Mindur. 2009. Relationship between somatic cell score and udder conformation traits in Polish Holstein-Friesian cows. *Anim. Sci.* 9:237–241.
- Ptak, E., W. Jagusiak, A. Zarnecki, and A. Otwinowska-Mindur. 2011. Heritabilities and genetic correlations of lactational and daily somatic cell score with conformation traits in Polish Holstein cattle. *Czech J. Anim. Sci.* 56:205–212.
- Raffrenato, E., R. W. Blake, P. A. Oltenacu, J. Carnevalheira, and G. Licitra. 2003. Genotype by environmental interaction for yield and somatic cell score with alternative definitions. *J. Dairy Sci.* 86:2470–2479.
- Rupp, R. and D. Boichard. 1999. Genetic parameters for clinical mastitis, somatic cell score, production, udder type traits, and milking ease in first lactation Holsteins. *J. Dairy Sci.* 82(10):2198–2204.
- Rzewuska, K., J. Jamrozik, A. Zarnecki, and T. Strabel. 2011. Genetic parameters of test-day somatic cell scores for the first three lactations of Polish Holstein-Friesian cattle. *Czech J. Anim. Sci.* 56(9):381–389.
- Samoré, A. B. and A. F. Groen. 2006. Proposal of an udder health genetic index for the Italian Holstein Friesian based on first lactation data. *Ital. J. Anim. Sci.* 5:359–370.
- Samoré, A. B., A. F. Groen, P. J. Boettcher, J. Jamrozik, F. Canavesi, and A. Bagnato. 2008. Genetic correlation patterns between somatic cell score and protein yield in the Italian Holstein-Friesian population. *J. Dairy Sci.* 91(10):4013–4021.
- Samoré, A. B., R. Rizzi, A. Rossoni, and A. Bagnato. 2010. Genetic parameters for functional longevity, type traits, somatic cell scores, milk flow and production in the Italian Brown Swiss. *Ital. J. Anim. Sci.* 9:145–151.
- Sorensen M. K., J. Jensen, and L. G. Christensen. 2000. Udder conformation and mastitis resistance in Danish first-lactation cows: heritabilities, genetic and environmental correlations. *Acta Agric. Scand.* 50:72–82.
- Windig, J. J., W. Ouweltjes, J. T. Napel, G. De Jong, R. F. Veerkamp, and Y. De Haas. 2010. Combining somatic cell count traits for optimal selection against mastitis. *J. Dairy Sci.* 93:1690–1701.
- Wolf, J., M. Wolfová, and M. Stípková. 2010. A model for the genetic evaluation of number of clinical mastitis cases per lactation in Czech Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 93:1193–1204.

Zavadilová, L., J. Wolf, M. Štípková, E. Nemcová, and J. Jamrozik. 2011. Genetic parameters for somatic cell score in the first three lactations of Czech Holstein and Fleckvieh breeds using a random regression model. *Czech J. Anim. Sci.* 56:251-260.

แนวโน้มทางพันธุกรรมสำหรับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนมลูกผสมในประเทศไทย

สายัณห์ บัวบาน^{1/} จุรีรัตน์ แสนโกชน^{2/} วรางคณา กิจพิพิ^{3/}

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อประเมินแนวโน้มลักษณะปรากฏและแนวโน้มทางพันธุกรรมของลักษณะปริมาณน้ำนมและลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ในประเทศไทย และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแนวโน้มลักษณะปรากฏและแนวโน้มทางพันธุกรรมของลักษณะปริมาณน้ำนมกับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ ลักษณะที่ศึกษาประกอบด้วยลักษณะปริมาณน้ำนมที่ 305 วัน (305MY, กิโลกรัม) อายุเมื่อคลอดลูกครั้งแรก (AFC, วัน) ช่วงห่างจากการผสมเทียมครั้งแรกถึงผสมติด (DFTC, วัน) ช่วงห่างจากคลอดถึงการผสมเทียมครั้งแรก (DTFS, วัน) ช่วงห่างจากคลอดถึงผสมติด (DO, วัน) ช่วงห่างการคลอดลูก (CI, วัน) จำนวนครั้งการผสมเทียมต่อการผสมติด (NSPC, ครั้ง) อัตราการผสมติดจากการผสมเทียมครั้งแรก (FSC, %) อัตราการตั้งท้องภายใน 56 วัน (P56, %) และอัตราการตั้งท้องภายใน 90 วัน (P90, %) โดยใช้ข้อมูลรายตัวของโคนมลูกผสมของไทย จากการให้แม่ครั้งแรกที่ได้รวบรวมไว้ในระบบฐานข้อมูลของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ในฟาร์มเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในพื้นที่ภาคกลาง ตะวันออก ตะวันออกเฉียงเหนือเหนือ และตะวันตกของประเทศไทยที่คลอดลูกในช่วงปี พ.ศ.2545-2558 ประกอบด้วยชุดข้อมูลสำหรับวิเคราะห์ลักษณะ 305MY และ AFC จำนวน 82,633 ข้อมูล และชุดข้อมูลสำหรับวิเคราะห์ลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ของแม่โคอื่นๆ จำนวน 82,633 ข้อมูล วิเคราะห์ค่าแนวโน้มทางพันธุกรรมโดยใช้วิธีการถดถอยระหว่างค่าเฉลี่ยของคุณค่าการผสมพันธุ์จากสัตว์ที่ประเมินกับปีเกิด (แยกตามแม่โค พ่อโค และภูมิภาค) ผลการศึกษาพบว่าแนวโน้มทางลักษณะปรากฏและทางพันธุกรรมต่อปีมีค่าเท่ากับ: 305 MY, 37.75 ± 7.09 และ 6.955 ± 1.93 กิโลกรัม; AFC, -0.00 ± 0.07 และ -0.01 ± 0.00 เดือน; DTFS, 0.41 ± 0.17 และ 0.03 ± 0.02 วัน; DFTC, -1.52 ± 0.56 และ 0.02 ± 0.03 วัน; DO, -1.11 ± 0.51 และ 0.07 ± 0.05 วัน; CI, -1.18 ± 0.50 และ 0.06 ± 0.06 วัน; NSPC, -0.05 ± 0.02 และ 0.00 ± 0.00 ครั้ง; FSC, 1.41 ± 0.51 และ 0.00 ± 0.00 %; P56, -0.91 ± 0.35 และ 0.00 ± 0.00 %; และ P90, 0.64 ± 0.26 และ -0.00 ± 0.00 % เมื่อแยกพิจารณาระหว่างพ่อพันธุ์ แม่พันธุ์ และภูมิภาค พบว่าเกือบทุกลักษณะที่ศึกษายกเว้น AFC พ่อพันธุ์มีค่าแนวโน้มทางพันธุกรรมสูงกว่าแม่พันธุ์ ในแต่ละภูมิภาคแนวโน้มทางพันธุกรรมสำหรับแต่ละลักษณะจะมีค่าที่เหมือนและแตกต่างกันไป แสดงให้เห็นว่าการคัดเลือกโดยพิจารณาปริมาณน้ำนมเป็นหลักในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ในช่วงเวลาที่ผ่านมา (2542-2555) นั้นมีผลกระทบเชิงบวกต่อลักษณะ 305MY และ AFC และในเชิงลบต่อลักษณะ DTFS, DFTC, DO และ CI แต่ไม่มีผลต่อลักษณะ NSPC, FSC, P56 และ P90 สำหรับโคนมลูกผสมไทย

คำสำคัญ: แนวโน้มทางพันธุกรรม ปริมาณน้ำนม ความสมบูรณ์พันธุ์ โคนมลูกผสม ประเทศไทย

เลขทะเบียนวิจัย: 54(1)-(54:06)0208-026

^{1/}สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.เมือง จ.ปทุมธานี

^{2/}กลุ่มพัฒนวิชาการปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ พญาไท ราชเทวี กรุงเทพมหานคร

^{3/}วิทยาลัยสัตวแพทยศาสตร์อัครราชกุมารี มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช

Genetic trends for fertility traits of crossbred dairy cows in Thailand

Sayan Buaban^{1/} Jureeratn Sanpote^{2/} Warangkana Kitpipit^{3/}

ABSTRACT

The objectives of this study were 1) to estimate the phenotypic and genetic trends for milk yield and fertility traits of Thai dairy cattle and 2) to study the relationship between the phenotypic and genetic trends of milk yield and fertility traits. The investigated milk yield and fertility traits were 305-d milk yield (**305MY**, kg), age at first calving (**AFC**, mo), days from calving to first service (**DTFS**, d), days from first service to conception (**DFTC**, d), days from calving to conception or day open (**DO**, d), calving interval (**CI**, d), number of service per conception (**NSPC**, no), conception at first service (**FSC**, %), pregnancy within 56 d (**P56**, %) and pregnancy within 90 d (**P90**, d). The first lactation individual records of Thai dairy crossbred cows in the central, eastern, northeastern, northern and western part of Thailand, collected in the database of the Bureau of Livestock Technology Biotechnology, Department of Livestock Development, and calved during 2002-2015 were used. Data set consisted of 82,633 lactation records for analyzing 305 MY and AFC and 82,633 fertility records for analyzing other fertility traits calving during 2002-2015. The phenotypic or genetic trends were analyzed using regression methods between the average performance or genetic merit of animals per year of birth and the year of birth (separated by sires, cows and regions). The results show that annual phenotypic and genetic trends were: 305MY, 37.75 ± 7.09 and 6.955 ± 1.93 kg; AFC, -0.00 ± 0.07 and -0.01 ± 0.00 mo; DTFS, 0.41 ± 0.17 and 0.03 ± 0.02 d; DFTC, -1.52 ± 0.56 and 0.02 ± 0.03 d; DO, -1.11 ± 0.51 and 0.07 ± 0.05 d; CI, -1.18 ± 0.50 and 0.06 ± 0.06 d; NSPC, -0.05 ± 0.02 and 0.00 ± 0.00 no; FSC, 1.41 ± 0.51 and 0.00 ± 0.00 %; P56, -0.91 ± 0.35 and 0.00 ± 0.00 %; and P90, 0.64 ± 0.26 and -0.00 ± 0.00 %. When considering among sires, cows and the regions found that almost all the studied traits except AFC had a higher genetic tendency for sires than the cows. In addition, there will be a genetic trend value for each trait that has the same and different values in each region. These showed that selection based on milk yield only in the recent breeding program (2002-2012) induced a positive impact on 305MY and AFC, and negatively on DTFS, DFTC, DO and CI but had no impact on NSPC, FSC, P56 and P90 for Thai dairy cattle.

Key Words: genetic trends milk yield fertility traits dairy crossbred Thailand

Registered No: 54(1)-(54:06)0208-026

^{1/} Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Muang, Pathumthani 12000.

^{2/} Livestock Academic Development Group, Department of Livestock Development, Phayathai, Bangkok 10400.

^{3/} Akkharatchakumari Veterinary College Walailak University, Tha Sala, Nakhon Si Thammarat 80160.

คำนำ

การพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์โคนมเพื่อให้มีความก้าวหน้าทางพันธุกรรมมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ต้องมีแผนการปรับปรุงพันธุ์ (breeding plan) ที่เหมาะสมร่วมกับการจัดการและสภาพแวดล้อม ซึ่งหมายถึง ระบบการคัดเลือก (selection system) และระบบการผสมพันธุ์ (mating system) ที่ให้ผลต่อการตอบสนอง การคัดเลือก (selection response) หรือการตอบสนองทางพันธุกรรม (genetic response) ที่แม่นยำและมี ประสิทธิภาพ เครื่องมือสำคัญตัวหนึ่งสำหรับใช้วัดความสำเร็จของโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์กรรมสัตว์ หรือ ความก้าวหน้าทางพันธุกรรม ทั้งภายในฝูงและระหว่างฝูง หรือแม้แต่ในการประเมินพันธุกรรมระดับชาติ (national genetic evaluation) คือการประเมินแนวโน้มทางพันธุกรรม (genetic trend) (Intaratham et al. 2008; Ghavi Hossein-Zadeh, 2011) ช่วยให้ทราบว่าพันธุกรรมที่ควบคุมลักษณะนั้นเป็นไปในทิศทางใด การคัดเลือกมีประสิทธิภาพหรือ พันธุกรรมมีการปรับปรุงถึงขีดจำกัดของการตอบสนองแล้วหรือไม่ สามารถ สังเกตจากอัตราการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (genetic change) (Intaratham et al., 2008) นอกจากนี้ยังสามารถประเมินค่าเฉลี่ยของลักษณะที่ปรับปรุงเป็นผลแท้จริงจากพันธุกรรมหรือเนื่องจากสภาพแวดล้อม หรือ การจัดการที่เปลี่ยนไป

การปรับปรุงพันธุ์กรรมโคนมสำหรับประเทศไทยที่ผ่านมามุ่งเน้นคัดเลือกลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม เป็นหลักและพิจารณาลักษณะอื่นๆที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจน้อยมากโดยเฉพาะลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ ซึ่งส่งผลต่อค่าใช้จ่ายในการผสมเทียม ค่าแรงงาน และค่าการรักษาพยาบาล ช่วงห่างการคลอดลูก เพิ่มอัตราโค ทดแทนเนื่องจากเกิดการคัดทิ้งโคก่อนเวลาอันควรแบบไม่ได้ตั้งใจเพิ่มขึ้น (Roche, 2006) นอกจากนี้ลักษณะ ความสมบูรณ์พันธุ์ยังมีสหสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม (Roxstrom et al., 2001; Liu et al., 2008) ซึ่งหมายถึงการมุ่งเน้นคัดเลือกให้ปริมาณน้ำนมเพิ่มสูงขึ้นแต่ทำให้ลักษณะความสมบูรณ์ พันธุ์ลดลง (Pryce and Veerkamp, 2001) แม้โคนมมีอัตราการผสมติดจากการผสมครั้งแรกลดต่ำลง และมี จำนวนครั้งต่อการผสมติดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ช่วงห่างการให้ลูกยาวขึ้น (Bagnato and Oltenacu, 1994) ประกอบกับการปรับปรุงพันธุ์แบบยกระดับสายเลือด (up grading) โคพันธุ์ยุโรปเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนทำให้ ประชากรโคนมส่วนใหญ่ของประเทศมีสัดส่วนสายเลือดพันธุ์ฮอลสไตน์ฟรีเซียนมากกว่า 87.50% ขึ้นไป หรือ เกือบเป็นพันธุ์แท้ (กรมปศุสัตว์, 2558) ส่งผลทำให้แนวโน้มของปัญหาด้านความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนมใน ประเทศไทยทวีความรุนแรงมากยิ่งขึ้น

ดังนั้นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงหรือแนวโน้มทางพันธุกรรมของลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ใน ภาพรวมของประชากรโคนมทั้งประเทศ และทราบถึงสถานภาพทางพันธุกรรมของประเทศ เพื่อใช้ในการ ตัดสินใจ กำหนดทิศทาง วางแผนการคัดเลือก และการผสมพันธุ์ ในอนาคต โดยการกำหนดเป้าหมายที่ เฉพาะเจาะจงสำหรับการผสมพันธุ์ฝูงโคนมที่ทำให้มีกำไร และความยั่งยืน การศึกษาดังนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ ประเมินแนวโน้มลักษณะปรากฏและแนวโน้มทางพันธุกรรมของลักษณะปริมาณน้ำนม และลักษณะความ สมบูรณ์พันธุ์ของแม่โคในประเทศไทย ศึกษาความสัมพันธ์แนวโน้มลักษณะปรากฏและแนวโน้มทางพันธุกรรม ของลักษณะปริมาณน้ำนมกับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ในช่วงระหว่างปีเกิด 2542-2555 โดยแยกตามแม่โค พ่อโค และภูมิภาค

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ข้อมูลและการจัดการข้อมูล

ใช้ข้อมูลรายตัวของแม่โคนมลูกผสมของไทย ซึ่งรวบรวมจากระบบฐานข้อมูลของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ จากฟาร์มเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมใน 5 ภูมิภาคของประเทศ (ภาคกลาง ตะวันออก ตะวันออกเฉียงเหนือเหนือ และตะวันตก) โดยใช้ ข้อมูลปริมาณน้ำนมที่ 305 วัน (305 d milk yield, 305 MY) ข้อมูลลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ ได้แก่ อายุเมื่อคลอดลูกครั้งแรก (age at first calving, AFC) ช่วงห่างจากการผสมเทียมครั้งแรกถึงผสมติด (days from first service to conception; DFTC) ช่วงห่างจากคลอดถึงการผสมเทียมครั้งแรก (days from calving to first service; DTFS) ช่วงห่างจากคลอดถึงผสมติด (day open; DO) ช่วงห่างการคลอดลูก (calving interval, CI) จำนวนครั้งการผสมเทียมต่อการผสมติด (number of service per conception, NSPC) และอัตราการผสมติดจากการผสมเทียมครั้งแรก (first service conception rate; FSC) อัตราการตั้งท้องภายใน 56 วัน (pregnancy within 56 d, P56) และอัตราการตั้งท้องภายใน 90 วัน (pregnancy within 90 d, P90) ที่คลอดลูกในช่วงปี พ.ศ. 2545-2558

ข้อมูลการผสมเทียมเบื้องต้นประยุกต์ตามวิธีการของ Kadarmideen and Coffey (2001) ที่กำหนดให้ระยะเวลาการตั้งท้องอยู่ในช่วง 280 ± 15 วัน เกณฑ์การตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลเพิ่มเติม กำหนดให้ อายุเมื่อคลอดครั้งแรกอยู่ในช่วง 18-48 เดือน ช่วงห่างจากคลอดถึงการผสมเทียมครั้งแรกจะต้องอยู่ในช่วง 20-240 วัน จำนวนครั้งการผสมเทียมต่อการผสมติดจะต้องบันทึกอยู่ในช่วง 20-340 วันหลังคลอด ช่วงห่างการคลอดลูกจะต้องอยู่ในช่วง 290-630 วัน การตั้งท้องแม่โคในแต่ละรอบการให้นมจะตัดสินจากวันคลอดถัดมา การผสมเทียมภายใน 10 วัน จากการผสมเทียมก่อนหน้านี้ถือว่าเป็นการผสมซ้ำและตัดทิ้ง วิเคราะห์ข้อมูลโคที่สมบูรณ์อย่างน้อย 1 ข้อมูลที่อยู่ในกลุ่มการจัดการเดียวกัน (ฝูง-ปีการคลอดสำหรับแม่โค) และต้องระบุพ่อพันธุ์ชัดเจน

ดังนั้นจึงมีชุดข้อมูลและพันธุ์ประวัติที่ใช้วิเคราะห์สำหรับลักษณะปริมาณน้ำนม จำนวน 31,973 ข้อมูล (1.81 ข้อมูลต่อแม่โค) และ 44,996 ตัว และสำหรับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ จำนวน 82,633 ข้อมูล (1.81 ข้อมูลต่อแม่โค) และ 94,817 ตัว ตามลำดับ

โมเดลสำหรับการวิเคราะห์

การวิเคราะห์ลักษณะปริมาณน้ำนม (305MY) และลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ (AFC, DFTC, DTFS, DO, CI, NSPC, FSC, P56 และ P90) ของแม่โคที่วิเคราะห์ด้วยโมเดลตัวสัตว์แบบที่ละลักษณะ มีตัวแบบผสมดังนี้

$$y = X\beta + Z_a a + Z_p p + e, \quad \text{สำหรับ 305MY} \quad (1)$$

$$y = X\beta + Z_a a + e, \quad \text{สำหรับ AFC} \quad (2)$$

$$y = X\beta + Z_{hy} hy + Z_a a + Z_p p + e, \quad \text{สำหรับ DTFS, DFTC, DO, CI} \quad (3)$$

$$y = X\beta + Z_{hy} hy + Z_a a + Z_p p + Z_{ss} ss + e, \quad \text{สำหรับ FSC, P56 และ P90} \quad (4)$$

เมื่อ y คือเวกเตอร์ค่าสังเกตของลักษณะปริมาณน้ำนมที่ 305 วัน (305MY) และลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ (AFC, ICFS, IFLS, DO, CI, NSPC, FSC, P56 และ P90); β คือเวกเตอร์ของปัจจัยคงที่; $hy \sim N(0, I\sigma_{hy}^2)$ คือเวกเตอร์ของปัจจัยสุ่มของกลุ่มการจัดการในฝูง $\times$ ปีเมื่อคลอดลูกสำหรับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ทุกลักษณะยกเว้น AFC; $a \sim N(0, A\sigma_a^2)$ คือเวกเตอร์ของปัจจัยสุ่มเนื่องจากอิทธิพลของพันธุกรรมสำหรับสัตว์ทุกตัวในพันธุ์ประวัติ; $p \sim N(0, I\sigma_p^2)$ คือเวกเตอร์ของปัจจัยสุ่มเนื่องจากอิทธิพลของสภาพแวดล้อมถาวรสำหรับทุกลักษณะยกเว้น AFC; $ss \sim N(0, I\sigma_{ss}^2)$ คือเวกเตอร์ของปัจจัยสุ่มเนื่องจากน้ำเชื้อที่ใช้ผสมเทียม (สำหรับ FSC, P56 และ P90); $e \sim N(0, I\sigma_e^2)$ และ คือเวกเตอร์ของปัจจัยสุ่มเนื่องจากความคลาดเคลื่อน; X คือเมตริกซ์ที่สัมพันธ์กับปัจจัยคงที่; Z_{hy} , Z_a , Z_p , และ Z_{ss} คือเมตริกซ์ที่สัมพันธ์กับปัจจัยสุ่ม; A คือเมตริกซ์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวสัตว์; I คือ Identity matrix และ σ_{hy}^2 , σ_a^2 , σ_p^2 , σ_{ss}^2 และ σ_e^2 คือความแปรปรวนเนื่องจาก ฝูง-ปี ที่ผสมเทียมครั้งแรก หรือฝูง-ปี ที่คลอดครั้งแรก ตัวสัตว์ สภาพแวดล้อมถาวร น้ำเชื้อที่ใช้ผสมเทียม และความคลาดเคลื่อนตามลำดับ

ปัจจัยคงที่สำหรับ 305MY ประกอบด้วยกลุ่มการจัดการในฝูง $\times$ ปีเมื่อคลอดลูก $\times$ ฤดูกาลคลอด อายุเมื่อคลอดครั้งแรก กลุ่มพันธุ์ และลำดับการคลอด สำหรับ AFC ประกอบด้วย กลุ่มการจัดการในฝูง $\times$ ปีเมื่อเกิด $\times$ ฤดูกาลเกิด และกลุ่มพันธุ์ สำหรับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์อื่นๆ ประกอบด้วย อายุเมื่อคลอดลูก ปี-เดือนของการคลอด และลำดับการคลอด ปี-เดือนของการผสมเทียมครั้งแรก (168 กลุ่ม) ปี-เดือนของการคลอด (181 กลุ่ม) กลุ่มพันธุ์ถูกจำแนกตามระดับสายเลือดโฮลสไตน์ฟรีเซียนเป็น 3 กลุ่ม ประกอบด้วย HF $\geq 93.75\%$, $87.50 \leq HF < 93.75$ และ $HF < 87.50\%$ ส่วนลำดับการคลอดลูกประกอบด้วยลำดับการคลอดที่ 1-5 (5 กลุ่ม)

การวิเคราะห์ข้อมูล

1. การประมาณค่าองค์ประกอบความแปรปรวน และการประเมินคุณค่าการผสมพันธุ์

ประมาณค่าองค์ประกอบความแปรปรวนของลักษณะปริมาณน้ำนม (305MY) และลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ ของแม่โค เพื่อนำไปประมาณคุณค่าการผสมพันธุ์ด้วยวิธี average information restricted maximum likelihood โดยใช้โปรแกรม AIREMLF90 และประเมินคุณค่าการผสมพันธุ์ด้วยวิธี Best Linear Unbiased Prediction, BLUP (Henderson, 1984) จากโปรแกรมสำเร็จรูป BLUPF90 family (Misztal et al., 2018) ในการวิเคราะห์ด้วย AIREMLF90 ใช้เกณฑ์พิจารณาสำหรับการคำนวณสิ้นสุดเมื่อค่าความแปรปรวนที่ได้แต่ละซ้ำต่างกันน้อยกว่า 10^{-12} และจะเริ่มการวิเคราะห์อีกครั้งโดยการใช้ผลครั้งที่ผ่านมาเพื่อที่จะให้ได้ความน่าจะเป็นสูงสุดที่แท้จริง

2. การประเมินแนวโน้มทางพันธุกรรม

การประเมินแนวโน้มทางพันธุกรรมจะใช้วิธีการถดถอยระหว่างค่าเฉลี่ยของคุณค่าการผสมพันธุ์จากสัตว์ที่ประเมินกับปีเกิด (แยกตามแม่โค พ่อโค และภูมิภาค) โดยวิเคราะห์แยกแต่ละลักษณะที่ทำการศึกษา และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างแนวโน้มทางพันธุกรรมของปริมาณน้ำนมกับแนวโน้มทางพันธุกรรมของลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์โดยใช้ Pearson correlation coefficient

ผลการทดลองและวิจารณ์

ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าอัตราพันธุกรรม และค่าอัตราซ้ำ

ค่าเฉลี่ย ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่าอัตราพันธุกรรม และค่าอัตราซ้ำของลักษณะปริมาณน้ำนมที่ 305 วัน (305MY) และลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ในแม่โค (AFC, DTFS, DFTC, DO, CI, NSPC, FSC, P56 และ P90) ที่คำนวณจากการวิเคราะห์แบบที่ละลักษณะด้วยโมเดลตัวสัตว์ ได้แสดงไว้ใน Table 1

ในประชากรแม่โคที่ศึกษาในครั้งนี้มีค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสำหรับ 305MY, AFC, DTFS, DFTC, DO, CI, NSPC, FSC, P56 และ P90 เท่ากับ 4,479.93±1,123.68 กิโลกรัม 31.34±5.48 เดือน 101.06±44.88 วัน 48.87±68.47 วัน 149.93±78.60 วัน 428.36±78.60 วัน 2.12±1.53 ครั้ง 47.87±49.96 % 67.77±46.74 % และ 78.35±41.18 % ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยที่ได้อาจแตกต่างจากรายงานวิจัยอื่นๆทั้งในและต่างประเทศ เนื่องจากการวัดลักษณะ การจัดการข้อมูล หรือการวางแผนปรับปรุงพันธุ์ที่แตกต่างกันในแต่ละประชากร

ค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะ 305MY (0.46) มีค่าสูงกว่าลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ในแม่โคทุกลักษณะ (0.01-0.07) และค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ที่มีข้อมูลแบบต่อเนื่อง (0.07-0.13) จะมีค่าอัตราพันธุกรรมสูงกว่าข้อมูลไม่ต่อเนื่อง (0.01-0.04) ยกเว้น DFTC มีค่าอัตราพันธุกรรมเท่ากับ 0.02

Table 1 Means±standard deviation ($X\pm SD$), minimum, maximum heritability (h^2) and repeatability (t) estimates (standard deviation in parenthesis) for milk yield and various fertility traits with continuity and discontinuity data in cows which analyzed by linear animal model (LAM) with univariate analysis.

Traits ^{1/}	Parameter				
	Mean±SD	Min	Max	h^2	t
305MY (kg)	4,479.93±1,123.68	1,017.57	11,771.20	0.46 (0.02)	0.47 (0.01)
AFC (m)	31.34±5.48	18	48	0.13 (0.02)	-
DTFS (d)	101.06±44.88	20	250	0.07 (0.01)	0.18 (0.01)
DFTC (d)	48.87±68.47	0	400	0.02 (0.00)	0.12 (0.01)
DO (d)	149.93±78.60	20	400	0.07 (0.01)	0.17 (0.01)
CI (d)	428.36±78.60	291	690	0.07 (0.01)	0.17 (0.01)
NSPC (no)	2.12±1.53	1	10	0.04 (0.01)	0.15 (0.01)
FSC (%)	47.87±49.96	0	100	0.01 (0.00)	0.07 (0.01)
P56 (%)	67.77±46.74	0	100	0.02 (0.00)	0.08 (0.01)
P90 (%)	78.35±41.18	0	100	0.02 (0.00)	0.08 (0.01)

^{1/}305MY = 305d milk yield; AFC = age at first calving; DTFS = days from calving to first service; DFTC = days from first service to conception; DO = days from calving to conception or day open; CI = calving interval;

NSPC = number of services per conception; FSC = conception at first service; P56= pregnancy within 56 days after first service; P90 = pregnancy within 90 days after first service

โดยทั่วไปค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ในแม่โคมีค่าค่อนข้างต่ำ (0.01-0.07) สอดคล้องกับที่พบในโคโฮลสไตน์ประเทศคิวบา (Buxadera and Dempfle, 1997) โคโฮลสไตน์ประเทศเคนยา (Ojango and Pollott, 2001) โคนมประเทศเอธิโอเปีย (Demeke et al., 2004) และโคโฮลสไตน์ประเทศโคลัมเบีย (Zanbrano and Echeverri, 2014) นอกจากนี้ค่าอัตราพันธุกรรมที่พบดังกล่าวนี้มีค่าต่ำกว่าในโคโฮลสไตน์ประเทศแคนาดา (Jamrozik et al., 2005) และ โคโฮลสไตน์ประเทศญี่ปุ่น (Abe et al., 2009) แต่สูงกว่าเล็กน้อยตามการศึกษาของ Veerkamp and Beerda (2007) และตามที่ได้รายงานในโคนมไทย (König et al., 2005; Buaban et al., 2015)

ค่าอัตราซ้ำของลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ค่าอยู่ในช่วง 0.072 (FSC) ถึง 0.184 (DTFS) ค่าที่ได้อยู่ในช่วงที่ได้รายงานไว้สำหรับโคนมที่อยู่ในสภาพแวดล้อมแบบร้อนชื้น (Ojango and Pollott, 2001; Demeke et al., 2004) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าอิทธิพลของสภาพแวดล้อมการที่จะกระทบต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ของแม่โคนมในประชากรที่ศึกษามีค่าน้อย การแสดงออกในรอบการให้นมครั้งต่อมาของลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ดังกล่าวอาจไม่เป็นไปเหมือนกับรอบการให้นมก่อนหน้า

ค่าอัตราทางพันธุกรรม และอัตราซ้ำของลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ที่ต่ำในการศึกษาครั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความซับซ้อนทางพันธุกรรมและชีววิทยาของลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ ความยากลำบากและความไม่ถูกต้องในการวัดลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ (Merilä and Sheldon, 1999; Falconer and Mackay, 2001) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสภาพแวดล้อมและการจัดการมีผลต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์สูง การปรับปรุงลักษณะดังกล่าวในแม่โคสามารถทำได้โดยการปรับปรุงการจัดการทางระบบสืบพันธุ์ เช่น วิธีการจับสัดที่มีประสิทธิภาพ การผสมเทียมในเวลาที่เหมาะสม เจ้าหน้าที่ผสมเทียมที่ประสบการณ์และความชำนาญในการผสมเทียม การจัดการให้อาหารที่เหมาะสมสำหรับโคที่กำลังเจริญเติบโต โคหลังคลอดและโคแห้งนม อย่างไรก็ตามความผันแปรของค่าอัตราพันธุกรรมและอัตราซ้ำระหว่างแต่ละงานวิจัยอาจเป็นความผันแปรเนื่องมาจากความแตกต่างของโครงสร้างกลุ่มประชากร โมเดล และวิธีการที่ใช้ในการศึกษาวิเคราะห์

แนวโน้มทางลักษณะปรากฏและแนวโน้มทางพันธุกรรม

การเปลี่ยนแปลงของค่าเฉลี่ยที่ปรากฏและค่าเฉลี่ยของคุณค่าการผสมพันธุ์สำหรับลักษณะปริมาณน้ำนม (305MY) และลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ (AFC, DTFS, DFTC, DO, CI, NSPC, FSC, P56 และ P90) เทียบกับปีเกิดของโคนมลูกผสมของไทยในช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2542-2555 (ค.ศ. 1999-2012) จะแสดงใน Figure 1 (a-j) และค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นที่แสดงไว้ใน Table 2 แนวโน้มทางลักษณะปรากฏและทางพันธุกรรมต่อปีสำหรับลักษณะปริมาณน้ำนม (305MY) และลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ (AFC, DTFS, DFTC, DO, CI, NSPC, FSC, P56 และ P90) ของโคนมลูกผสมของไทยที่เกิดในช่วงเวลาดังกล่าวโดยรวมพบว่ามีค่าเท่ากับ: 305MY, 37.75 ± 7.09 และ 6.955 ± 1.93 กิโลกรัม; AFC, -0.00 ± 0.07 และ -0.01 ± 0.00 เดือน; DTFS, 0.41 ± 0.17 และ 0.03 ± 0.02 วัน; DFTC, -1.52 ± 0.56 และ 0.02 ± 0.03 วัน; DO, -1.11 ± 0.51 และ

0.07 ± 0.05 วัน; CI, -1.18 ± 0.50 และ 0.06 ± 0.06 วัน; NSPC, -0.05 ± 0.02 และ 0.00 ± 0.00 ครั้ง; FSC, 1.41 ± 0.51 และ 0.00 ± 0.00 %; P56, -0.91 ± 0.35 และ 0.00 ± 0.00 %; และ P90, 0.64 ± 0.26 และ -0.00 ± 0.00 %

เมื่อพิจารณาตาม Figure 1a พบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่าเฉลี่ยคุณค่าการผสมพันธุ์ในแต่ละปีเป็นไปในทางบวกและลบ สาเหตุของความผันผวนที่เกิดขึ้นจากการศึกษานี้อาจเป็นผลมาจากการใช้พ่อพันธุ์ที่ไม่ทราบคุณค่าการผสมพันธุ์หรือในการคัดเลือกสัตว์จะพิจารณาเฉพาะลักษณะการแสดงออกภายนอกเป็นหลัก ค่าเฉลี่ยของคุณค่าการผสมพันธุ์ของ 305MY ต่ำกว่าศูนย์ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1999-2006 (พ.ศ. 2542-2549) และเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงประมาณ 88.86 กิโลกรัมในปี ค.ศ. 2012 (พ.ศ. 2555) ดังนั้นจาก Table 2 จึงได้มีการปรับปรุงเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ย 6.96 กิโลกรัม/ปี ในช่วงปีค.ศ. 1999-2012 (พ.ศ. 2542-2555) แนวโน้มที่ได้นี้แสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของการเลือกเพื่อปรับปรุงการให้ปริมาณน้ำนม ในการวิเคราะห์แนวโน้มทางพันธุกรรมของโคนมลูกผสมในประเทศไทยก่อนหน้านี้ (ในช่วงปีค.ศ. 1989-2002; พ.ศ. 2532-2545) สำหรับลักษณะ 305MY จะอยู่ที่ 3.29 กิโลกรัม/ปี (กรมปศุสัตว์, 2547) เหตุผลในการประมาณการที่สูงขึ้นในการศึกษาปัจจุบันเมื่อเทียบกับผลการศึกษาวิเคราะห์ของกรมปศุสัตว์ (2547) คือแนวโน้มทางพันธุกรรมของลักษณะ 305MY ในพ่อพันธุ์ (8.06 กิโลกรัม/ปี) มีมากกว่าแม่โค (7.03 กิโลกรัม/ปี) (Table 2 และ Figure 2a) ทั้งนี้เนื่องจากการคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่มีความเข้มข้นมากยิ่งขึ้น โดยมุ่งเน้นพ่อพันธุ์ที่ให้ผลผลิตน้ำนมสูงมาผสมพันธุ์กับแม่โคของเกษตรกร

Table 2 Estimates of annual phenotypic and genetic changes (b) and standard error (SE) for milk yield and various cow fertility traits of Thai dairy cattle between year 2002-2015

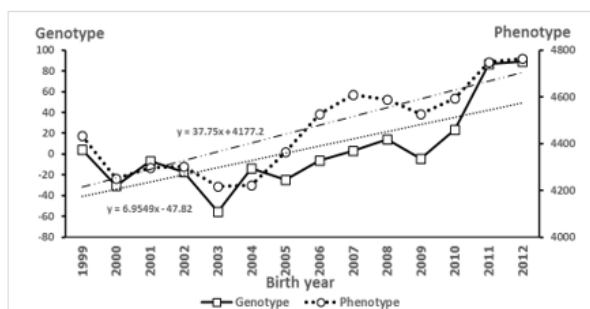
Traits ^{1/}	Phenotypic trend		Genetic trend	
	(b±SE)		(b±SE)	
	Cow	Sire	Cow	All
305MY	37.75±7.09	8.06±7.20	7.03±1.94	6.955±1.93
AFC	-0.00±0.07	-0.01±0.01	-0.01±0.00	-0.01±0.00
DTFS	0.41±0.17	0.18±0.14	0.03±0.02	0.03±0.02
DFTC	-1.52±0.56	-0.06±0.06	0.02±0.03	0.02±0.03
DO	-1.11±0.51	0.14±0.14	0.07±0.05	0.07±0.05
CI	-1.18±0.50	0.14±0.14	0.07±0.06	0.06±0.06
NSPC	-0.05±0.02	-0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
FSC	1.41±0.51	0.00±0.00	-0.00±0.00	0.00±0.00
P56	0.91±0.35	0.00±0.00	-0.00±0.00	-0.00±0.00
P90	0.64±0.26	0.00±0.00	-0.00±0.00	-0.00±0.00

^{1/}305MY = 305d milk yield; AFC = age at first calving; DTFS = days from calving to first service; DFTC = days from first service to conception; DO = days from calving to conception or day open; CI = calving interval;

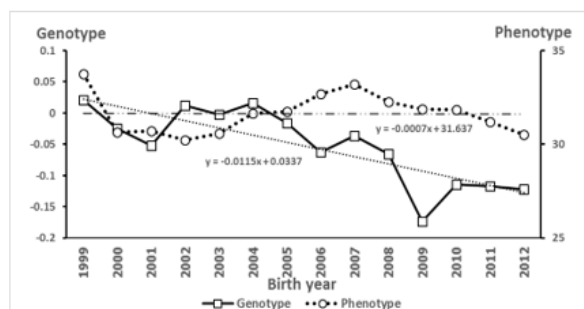
NSPC = number of services per conception; FSC = conception at first service; P56= pregnancy within 56 days after first service; P90 = pregnancy within 90 days after first service. Unit of traits as given in table 1

สำหรับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ในช่วงที่ผ่านมาในแผนการปรับปรุงพันธุ์ยังไม่ได้กำหนดเป้าหมายที่แน่นอน เมื่อคัดเลือกเพื่อเพิ่มลักษณะปริมาณน้ำนมเป็นหลักจึงเป็นเหตุทำให้ลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์เกือบทุกลักษณะโดยรวมนี้อาจมีแนวโน้มทางพันธุกรรมไปในทิศทางที่ไม่พึงประสงค์คือมีประสิทธิภาพลดลง (ได้แก่ DTFS, DFTC, DO, CI และ NSPC) ส่วนลักษณะ FSC, P56 และ P90 ไม่มีการเปลี่ยนแปลง หรือเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยไปในทิศทางที่มีประสิทธิภาพดีขึ้น (ได้แก่ AFC) (Table 2 และ Figure 2b-2j) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ghiasi and Hanarvar (2016) ที่ได้ศึกษาแนวโน้มทางพันธุกรรมและลักษณะปรากฏของโคนมในประเทศไทย พบว่าโคนมมีแนวโน้มทั้งทางพันธุกรรมและลักษณะปรากฏลดลง ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากลักษณะปริมาณน้ำนม และลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์มีสหสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในทางตรงกันข้าม (Dematawewa and Berger, 1998; Abdallah and Mcdaniel, 2000; Roxstrom et al., 2001; Liu et al., 2008) กล่าวคือการคัดเลือกโดยการเพิ่มปริมาณน้ำนมอย่างต่อเนื่องทำให้แม่โคนมมีสมรรถภาพด้านความสมบูรณ์พันธุ์ (DTFS, DO, NSPC และ FSC) ลดลง (Nebel and McGiliad, 1993; Bagnato and Oltenacu, 1994; Lucy, 2001; Sewalem et al., 2008) และสามารถพบลักษณะเช่นนี้ได้ในประเทศอื่นๆอีก เช่น ไอร์แลนด์ สหราชอาณาจักร และออสเตรเลีย อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากแนวโน้มทางลักษณะปรากฏ (Table 2 และ Figure 2b-2j) ลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์เกือบทุกลักษณะมีประสิทธิภาพดีขึ้นเมื่อแนวโน้มทางลักษณะปรากฏของลักษณะปริมาณน้ำนมเพิ่มขึ้น ยกเว้น DTFS ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากการปรับเปลี่ยนการจัดการเลี้ยงดูโคนมภายในฟาร์มให้เหมาะสมกับสภาพภูมิอากาศและสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละปี x เดือนของเกษตรกร (Chanvijit, 2006) หรือการปรับปรุงการจัดการทางระบบสืบพันธุ์ เช่น หาวิธีการจับสัดที่มีประสิทธิภาพ และการผสมเทียมในเวลาที่เหมาะสม

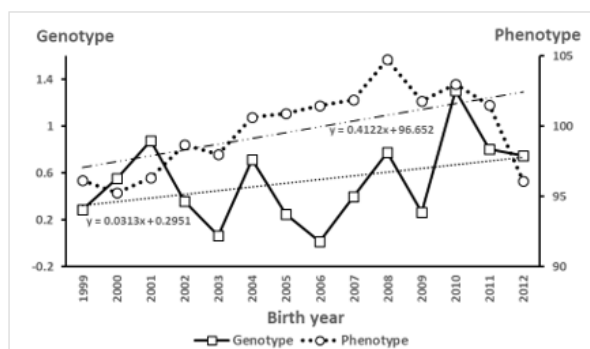
a) 305MY



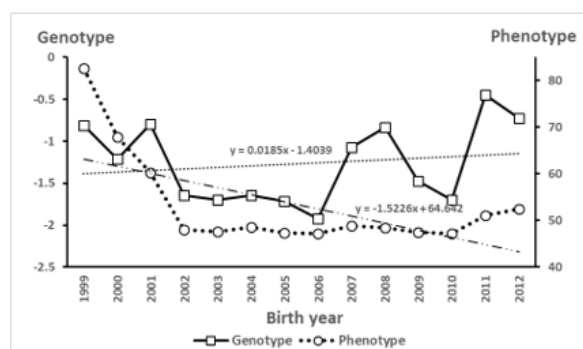
b) AFC



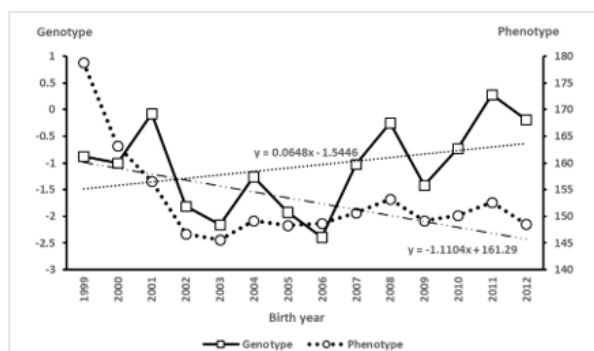
c) DTFS



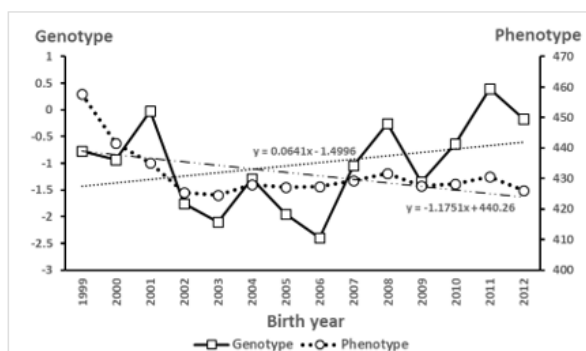
d) DFTC



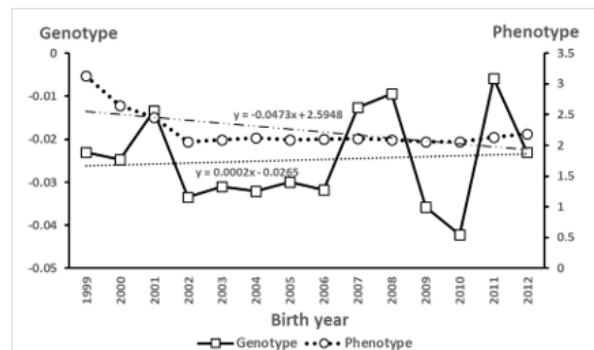
e) DO



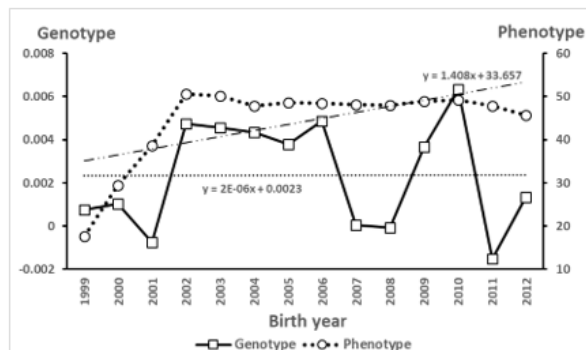
f) CI



g) NSPC



h) FSC



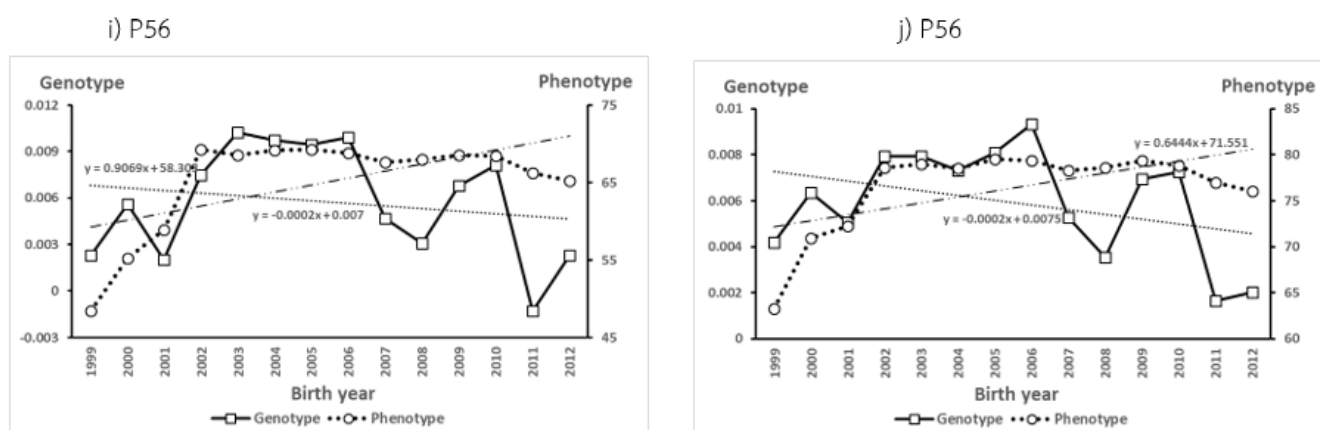


Figure 1 Genetic and phenotypic trends of milk yield (305MY, kg) and various cow fertility traits

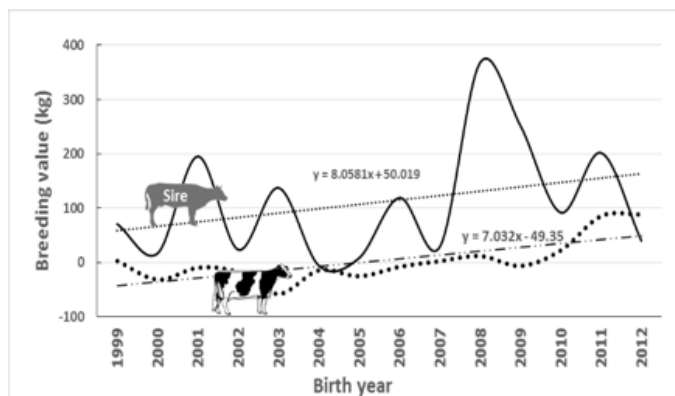
(AFC, m; DTFS, d; DFTC, d; DO, d; CI, d; NSPC, no; FSC, %; P56, % และ P90, %) in Thai dairy cattle during year 1999-2012

แนวโน้มทางพันธุกรรมแยกตามพ่อโคและแม่โค

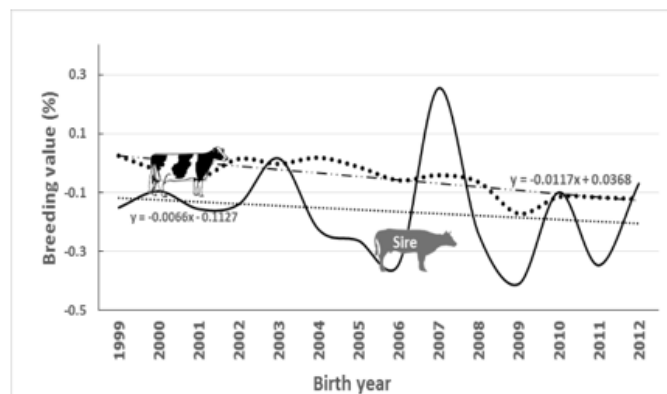
การเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยของคุณค่าการผสมพันธุ์สำหรับลักษณะปริมาณน้ำนม (305MY) และลักษณะความสำเร็จพันธุ์ (AFC, DTFS, DFTC, DO, CI, NSPC, FSC, P56 และ P90) เทียบกับปีเกิดของของพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์โคนมลูกผสมของไทยในช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2542-2555 (ค.ศ. 1999-2012) จะแสดงใน Figure 2a-2j และค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นที่สอดคล้องกันจะแสดงไว้ใน Table 2

สำหรับลักษณะ 305MY พบว่าค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นของพ่อพันธุ์ (8.06 ± 7.20 กิโลกรัมต่อปี) มีค่าสูงกว่าแม่พันธุ์ (7.03 ± 1.94 กิโลกรัมต่อปี) และมีทิศทางไปในทางเดียวกันที่ (ทางบวก) โดยค่าเฉลี่ยของคุณค่าการผสมพันธุ์ของพ่อพันธุ์ในแต่ละปีมีลักษณะขึ้นๆลงๆ ขณะที่ค่าเฉลี่ยของคุณค่าการผสมพันธุ์ของแม่พันธุ์มีลักษณะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทำนองเดียวกับลักษณะความสำเร็จพันธุ์ (เช่น DTFS, DO, และ CI) ที่มีค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นของพ่อพันธุ์มีค่าสูงกว่าแม่พันธุ์ และมีทิศทางเพิ่มขึ้นไปในทางทางบวก (เช่น DTFS, DO, และ CI) แต่ไม่เป็นที่ต้องการ ส่วนลักษณะ AFC มีทิศทางไปในทางลบและเป็นที่ต้องการ และลักษณะ DFTC มีทิศทางไปในทางตรงกันข้ามกัน นอกนั้นค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นของพ่อพันธุ์มีทิศทางไปในทางตรงกันข้ามที่พ่อพันธุ์มีค่าสูงกว่าแม่พันธุ์ (เช่น DFTC) และพ่อพันธุ์มีค่าใกล้เคียงแม่พันธุ์ (เช่น NSPC, FSC, P56 และ P90) ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นผลจากลักษณะปริมาณน้ำนมและลักษณะความสำเร็จพันธุ์มีสหสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในทางตรงกันข้าม และช่วงก่อนหน้านั้นยังไม่มี การปรับใช้บันทึกลักษณะความสำเร็จพันธุ์ของลูกสาวในการประเมินพ่อพันธุ์

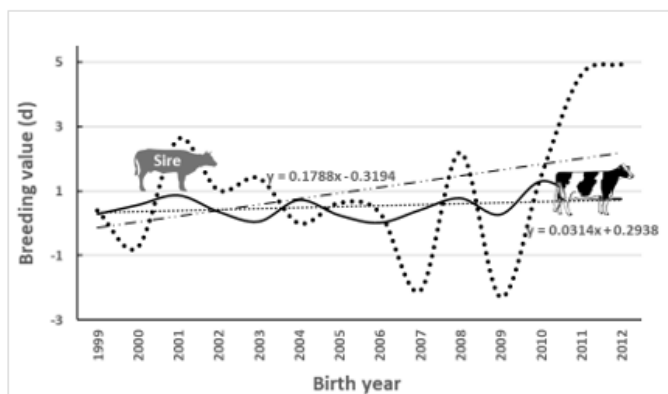
a) 305MY



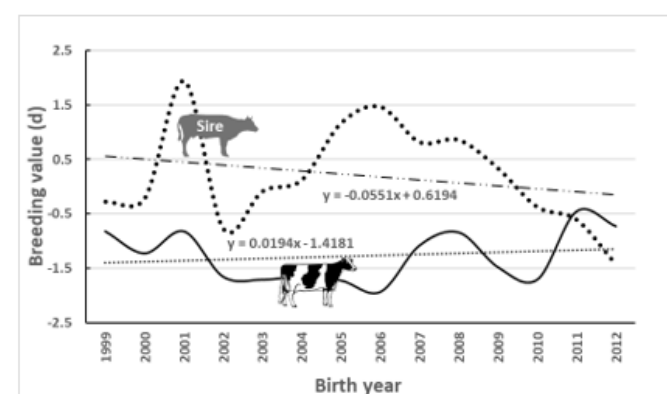
b) AFC



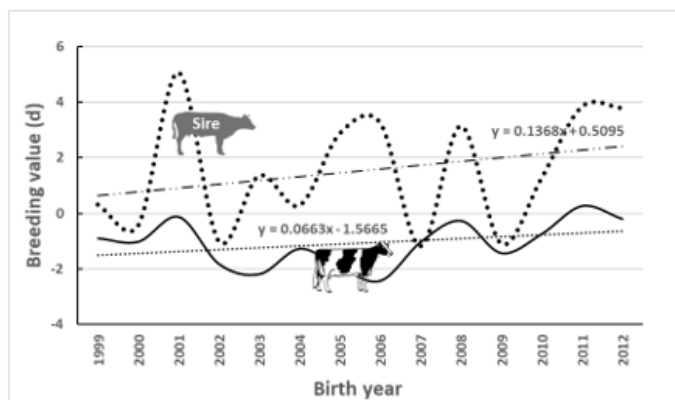
c) DTFS



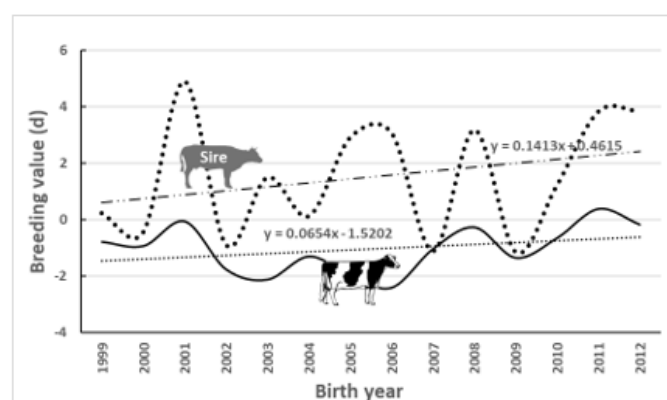
d) DFTC



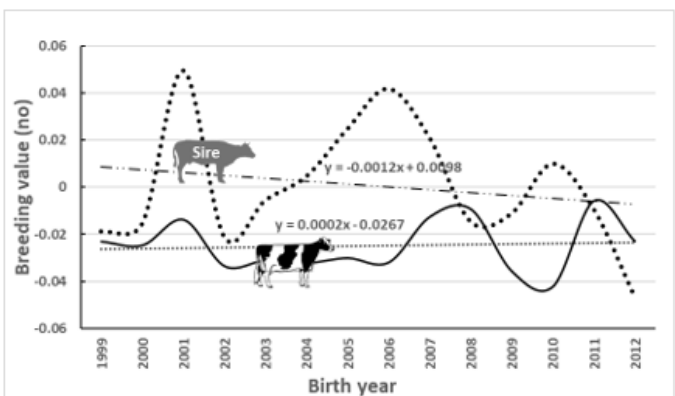
e) DO



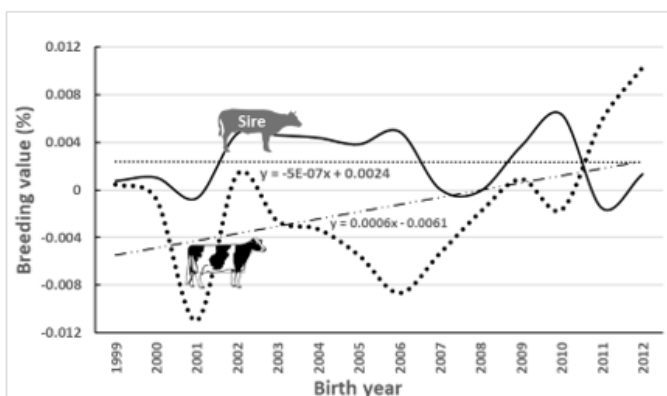
f) CI



g) NSPC



h) FSC



i) 56

j) P90

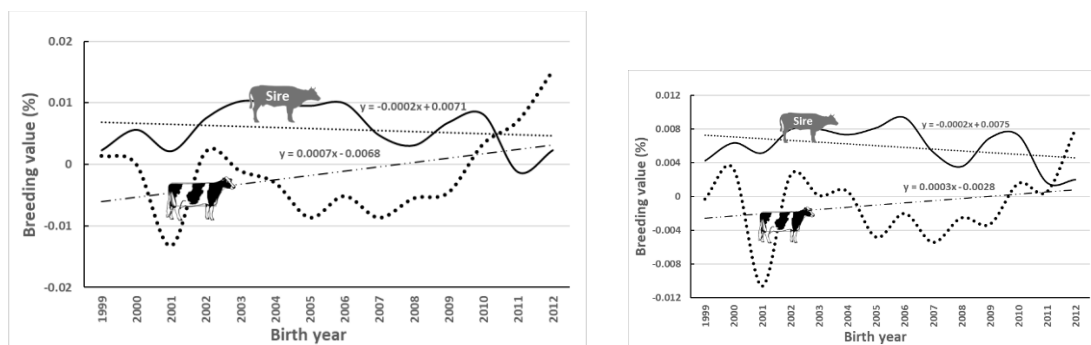


Figure 2 Genetic trends of sires and cows for milk yield and various cow fertility in Thai dairy cattle during year 1999-2012

แนวโน้มทางพันธุกรรมแยกตามภูมิภาคของประเทศ

การเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยที่ปรากฏและค่าเฉลี่ยของคุณค่าการผสมพันธุ์สำหรับลักษณะปริมาณน้ำนม (305MY) และลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ (AFC, DTFS, DFTC, DO, CI, NSPC, FSC, P56 และ P90) เทียบกับปีเกิดเฉพาะแม่พันธุ์โคนมลูกผสมของไทยในแต่ละภูมิภาคในช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2542-2555 (ค.ศ. 1999-2012) ดังแสดงใน Figure 3a-3j และค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นที่สอดคล้องกันจะแสดงไว้ใน Table 3

Table 3 Phenotypic and genetic trend for milk yield and various cow fertility traits in Thai dairy cows during year 1999-2012 considering each region of Thailand.

Traits ^{1/}	Trend ^{2/}	Region					
		Central	East	Northeast	North	West	All
305MY	p	39.97±14.30	45.99±10.77	43.87±13.47	-16.50±9.11	47.08±14.89	37.75±7.09
	g	1.47±3.72	3.22±3.31	6.57±4.05	4.85±3.83	18.47±4.31	7.03±1.94
AFC	p	-0.06±0.07	0.27±0.14	-0.05±0.09	-0.05±0.07	-0.02±0.10	-0.00±0.07
	g	-0.00±0.00	-0.01±0.01	-0.02±0.01	-0.02±0.01	-0.01±0.00	-0.01±0.00
DTFS	p	1.15±0.39	0.46±0.23	-0.17±0.27	-0.05±0.24	0.13±0.37	0.41±0.17
	g	-0.02±0.04	0.06±0.05	-0.03±0.05	-0.12±0.04	-0.05±0.04	0.03±0.02
DFTC	p	-1.47±0.68	-1.53±0.67	-0.08±0.33	-1.18±0.59	-2.05±0.55	-1.52±0.56
	g	0.00±0.05	0.09±0.05	0.07±0.04	0.04±0.06	-0.06±0.04	0.02±0.03
DO	p	-0.32±0.47	-1.06±0.59	-0.25±0.40	-1.23±0.79	-1.91±0.56	-1.11±0.51
	g	-0.00±0.10	0.20±0.10	0.08±0.09	-0.06±0.11	-0.17±0.08	0.07±0.05
CI	p	-0.41±0.51	-1.17±0.57	-0.26±0.39	-1.27±0.80	-1.94±0.55	-1.18±0.50
	g	-0.00±0.10	0.18±0.10	0.09±0.09	-0.06±0.11	-0.16±0.08	0.07±0.06
NSPC	p	-0.02±0.01	-0.04±0.02	-0.02±0.01	-0.04±0.02	-0.04±0.01	-0.05±0.02
	g	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	-0.00±0.00	0.00±0.00
FSC	p	1.80±0.69	1.22±0.61	-0.31±0.28	1.21±0.52	1.64±0.46	1.41±0.51
	g	0.00±0.00	-0.00±0.00	-0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	-0.00±0.00
P56	p	1.03±0.42	0.82±0.42	0.03±0.37	0.73±0.37	1.36±0.44	0.91±0.35
	g	-0.00±0.00	-0.00±0.00	-0.00±0.00	-0.00±0.00	0.00±0.00	-0.00±0.00
P90	p	-0.19±0.12	0.60±0.30	0.34±0.22	0.70±0.36	1.15±0.34	0.64±0.26
	g	-0.00±0.00	-0.00±0.00	-0.00±0.00	-0.00±0.00	0.00±0.00	-0.00±0.00

¹AFC = age at first calving; DTFS = days from calving to first service; DFTC = days from first service to conception; DO = days from calving to conception or day open; CI = calving interval; NSPC = number of services per conception; FSC = conception at first service; P56= pregnancy within 56 days after first service; P90 = pregnancy within 90 days after first service. Unit of traits as given in table 1

²g=genetic trend; P=phenotypic trend (unit of traits as given in table 1)

ความสัมพันธ์และการถดถอยระหว่างแนวโน้มทางพันธุกรรมของปริมาณน้ำนมกับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์

ค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ (r) และค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้น (b) ระหว่างค่าเฉลี่ยของคุณค่าการผสมพันธุ์ในแต่ละปีสำหรับลักษณะปริมาณน้ำนม (305MY) และลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ (AFC, DTFS, DFTC, DO, CI, NSPC, FSC, P56 และ P90) ของโคนมลูกผสมของไทยในช่วงระหว่างปี พ.ศ. 2542-2555 (ค.ศ. 1999-2012) แสดงใน Table 4 และ Figure 3a-3j โดยทั่วไปพบว่าค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยของคุณค่าการผสมพันธุ์ของลักษณะ 305MY กับค่าเฉลี่ยของคุณค่าการผสมพันธุ์ของลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์มีค่าปานกลาง (0.42) ถึงสูง (0.79) โดยมีทิศทางบวก (305MY-DTFS, 305MY-DFTC, 305MY-DO, 305MY-CI และ 305MY-NSPC) และทิศทางลบ (305MY-AFC, 305MY-FSC, 305MY-P56 และ 305MY-P90) กล่าวคือเมื่อโคนมมีการให้ผลผลิตน้ำนมมากขึ้นจะส่งผลทำให้ DTFS, DFTC, DO CI และ NSPC มากขึ้น แต่จะทำให้ AFC, FSC, P56 และ P90 ลดลงด้วย ซึ่งเป็นความสัมพันธ์ที่ไม่ต้องการ ยกเว้น AFC ที่ลดลงและเป็นความสัมพันธ์ที่ต้องการ สอดคล้องกับการศึกษาของ Makgahlela et al. (2007) ที่รายงานว่าแนวโน้มการให้ปริมาณน้ำนมของประเทศแอฟริกาใต้ในช่วงปี 1982 ถึง 2001 เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และพบว่าสหสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลักษณะปริมาณน้ำนมและลักษณะ CI มีความสัมพันธ์ทางเดียวกันค่อนข้างสูง ขณะที่ความสัมพันธ์กับ AFC มีทิศทางตรงกันข้าม และเมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยเชิงเส้นระหว่างค่าเฉลี่ยของคุณค่าการผสมพันธุ์ในแต่ละปีของลักษณะ 305MY และลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ต่างในช่วงปี 1999-2012 พบว่าทุกๆ 100 กิโลกรัมของปริมาณน้ำนมที่ 305 วัน ที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ DTFS, DFTC, DO, และ CI เพิ่มขึ้น 0.50, 0.80, 1.50 และ 1.50 วัน ตามลำดับ ขณะที่ AFC ลดลง 0.10 เดือน ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Melendez and Pinedo (2007) ที่พบว่าทุกๆ 100 กิโลกรัมของ 305MY ที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ DO เพิ่มขึ้น 0.6 วัน

Table 4 Correlation and regression between 305-d milk yield (305MY) and various fertility trait both using average phenotypic performance and average estimated breeding values

Fertility traits ^{1/}	Correlation (r)		Regression (b)
	Phenotypic	Genotypic	Genotypic
AFC	0.28	-0.60	-0.001±0.000
DTFS	0.40	0.52	0.005±0.002
DFTC	-0.19	0.66	0.008±0.003
DO	-0.09	0.73	0.015±0.004
CI	-0.12	0.72	0.015±0.004
NSPC	-0.22	0.42	0.000±0.000

FSC	0.20	-0.43	0.000±0.000
P56	0.17	-0.70	0.000±0.000
P90	0.15	-0.79	0.000±0.000

¹AFC = age at first calving; DTFS = days from calving to first service; DFTC = days from first service to conception; DO = days from calving to conception or day open; CI = calving interval; NSPC = number of services per conception; FSC = conception at first service; P56= pregnancy within 56 days after first service; P90 = pregnancy within 90 days after first service. Unit of traits as given in table 1

สรุป

การประมาณพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมสำหรับโคนมลูกผสมของไทยมีความสอดคล้องกับที่ได้มีรายงานไว้ในวรรณกรรม การวิเคราะห์แนวโน้มทางลักษณะปรากฏและทางพันธุกรรมในช่วงปี 2542-2555 ที่ศึกษาชี้ให้เห็นความจำเป็นในการปรับปรุงโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ โปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ที่ออกแบบมานั้นมีผลกระทบเชิงบวกต่อการให้ปริมาณน้ำนมที่ 305 วัน และอายุเมื่อคลอดลูกตัวแรก แต่มีผลกระทบเชิงลบหรือไม่มีผลกระทบต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์อื่นๆในแม่โคนมไทยลูกผสม ดังนั้นในการออกแบบโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์โคนมในอนาคตควรจะพิจารณาลักษณะลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์อื่นๆร่วมไปพร้อมกับลักษณะการให้ปริมาณน้ำนมในรูปแบบของดัชนีการคัดเลือก การคัดเลือกและการผสมพันธุ์ตามคุณค่าการผสมพันธุ์ที่มีความน่าเชื่อถือจะทำให้มีโอกาสที่ดีสำหรับการปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตของโคนมในประเทศไทย

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. 2547. สมุดพ่อพันธุ์โคนม. สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ กรุงเทพฯ. ณ วันที่ 13 เมษายน พ.ศ.2563.
- http://biotech.dld.go.th/webnew/Data/Sire_Summary/2547/Sire_Summary2547.pdf
- Abdallah, J. M. and B. T. McDaniel. 2000. Genetic parameters and trends of milk, fat, days open and body weight after calving in North Carolina experimental herds. J. Dairy Sci. 83:1364-1370.
- Abe, H., Y. Masuda, and M. Suzuki. 2009. Relationships between reproductive traits of heifers and cows and yield traits for Holsteins in Japan. J. Dairy Sci. 92:4055-4062.
- Bagnato, A., and P. A. Oltenacu. 1994. Phenotypic evaluation of fertility traits and their association with milk production of Italian Friesian cattle. J. Dairy Sci. 77: 874-882.
- Buaban, S., M. Duangjinda, M. Suzuki, Y. Masuda, J. Sanpote, and K. Kuchida. 2015. Short communication: Genetic analysis for fertility traits of heifers and cows from smallholder dairy farms in a tropical environment. J. Dairy Sci. 98:4990 - 4998.
- Buxadera, A. M. and L. Dempfle. 1997. Genetic and environmental factors affecting some reproductive traits of Holstein cows in Cuba. Genet. Sel. Evol. 29:469-482.

- Chanvijit, K. 2006. Genetic estimation of milk production by model including effects of genetic $\times$ environment interaction in purebred and crossbred Holstein Friesian. Ph.D. Thesis, Khon Kaen University.
- Dematawewa, C. M. and P. J. Berger. 1998. Genetic and phenotypic parameters for 305-day yield, fertility, and survival in Holsteins. *J. Dairy Sci.* 81:2700 - 2709. *J. Dairy Sci.* 84:1277–1293.
- Demeke, S., F. W. C. Naser, and S. J. Schoeman. 2004. Estimates of genetic parameters for Boran, Friesian and crosses of Friesian and Jersey with the Boran cattle in the tropical highlands of Ethiopia: Reproduction traits. *J. Anim. Breed. Genet.* 121:57–65.
- Ghasi, H. and M. Honarvar. 2016. Genetic and Phenotypic Trends of Fertility Traits in Iranian Holstein Cows. *Iranian J. of Appl. Anim Sci.* 1(6):55-59
- Ghavi Hossein-Zadeh, N. 2011. Genetic parameters and trends for calving interval in the first three lactations of Iranian Holsteins. *Trop Anim Health Prod.* 43:1111–1115.
- Henderson, C. R. 1984. Applications of linear models in animal breeding. University of Guelph Press., Guelph. 462 p.
- Intaratham, W., S. Koonawootrittriron, P. Sopannarath, H. U. Graser, and S. Tumwasorn. 2008. Genetic parameters and annual trends for birth and weaning weights of a northeastern Thai indigenous cattle line. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 21:478-483.
- Jamrozik, J., J. Fatehi, G. J. Kistemaker, and L. R. Schaeffer. 2005. Estimates of genetic parameters for Canadian Holstein female reproduction traits. *J. Dairy Sci.* 88:2199–2208.
- König, S., N. Chongkasikit, and H. J. Langholz. 2005. Estimation of variance components for production and fertility traits in Northern Thai dairy cattle to define optimal breeding strategies. *Arch. Tierz.* 48:233–246.
- Liu, Z., J. Jaitner, F. Reinhardt, E. Pasman, S. Rensing, and R. Reents. 2008. Genetic evaluation of fertility traits of dairy cattle using a multiple-trait animal model. *J. Dairy Sci.* 91:4333–4343.
- Lucy, M. C. 2001. Reproductive loss in high-producing dairy cattle: Where will it end? *J. Dairy Sci.* 84:1277–1293.
- Makgahlela, M. L., C. B. Banga, D. Norris, K. Dzama, and J. W. Ng'ambi. 2007. Genetic correlations between female fertility and production traits in South African Holstein cattle. *South African Journal of Anim. Sci.* 37(3):180–188.
- Falconer, D. S. and T. F. C. Mackay. 2001. Introduction to quantitative genetics (4th ed.). Zaragoza, ES: Acribia.
- Melendez P. and P. Pinedo. 2007. The Association Between Reproductive Performance and Milk Yield in Chilean Holstein Cattle. *J. Dairy Sci.* 90:184–192

- Merilä, J. E. and B. C. Sheldon. 1999. Genetic architecture of fitness and non-fitness traits—empirical patterns and development of ideas. *Heredity*. 83:103–109.
- Misztal, I., S. Tsuruta, D. A. L. Lourenco, Y. Masuda, I. Aguilar, A. Legarra, and Z. Vitezica. 2018. Manual for BLUPF90 family of programs. Vol. 2018 Animal and Dairy Science Department, Georgia; [cited 1 February 2018]. Available from URL: http://nce.ads.uga.edu/wiki/lib/exe/fetch.php?media=blupf90_all7.pdf.
- Nebel, R. L. and M. L. McGilliard. 1993. Interactions of high milk yield and reproductive performance in dairy cows. *J. Dairy Sci.* 76: 3257 - 3268.
- Ojango, J. M. and G. E. Pollott. 2001. Genetics of milk yield and fertility traits in Holstein-Friesian cattle on large-scale Kenyan farms. *J. Anim. Sci.* 79:1742–1750.
- Pryce, J. E. and R. F. Veerkamp. 2001. The incorporation of fertility indices in genetic improvement programs. Pages 223–236 in *Fertility in the High-Producing Dairy Cow*. M. G. Diskin, ed. Br. Soc. Anim. Sci. Occ. Publ. No. 26. Edinburgh, UK.
- Roche, J. F. 2006. The effect of nutritional management of the dairy cow on reproductive efficiency. *Anim. Reprod. Sci.* 96:282–296.
- Roxstrom, A., E. Strandberg, B. Berglun, U. Emanuelson, and J. Phillipsson. 2001. Genetic and environmental correlations among female fertility traits and milk production in different parities of Swedish Red and White dairy cattle. *Acta Agric. Scand.* 51:7–14.
- Sewalem, A., G. Kistemaker, F. Miglior and B. Van Doormaal. 2008. Including milk production in female fertility genetic evaluations for Canadian Holsteins. Dairy cattle open industry session, May 6, 2008.
- Veerkamp, R. F. and B. Beerda. 2007. Genetics and genomics to improve fertility in high producing dairy cows. *Theriogenology*. 68: S266–S73.
- Zambrano, J. C. and J. Echeverri. 2014. Genetic and environmental variance and covariance parameters for some reproductive traits of Holstein and Jersey cattle in Antioquia (Colombia). *Rev. Bras. Zootec.* 43:132–139.

การศึกษาความเป็นไปได้ในการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะด้วยวิธี laparoscopic ovum pick-up (LOPU) และการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายในประเทศไทย

อรรถพล พรประไพ^{1/} อนนท์ เทืองสันเทียะ^{1/} พิงค์ลานนา กุญชร^{2/} มาลี อภิเมธีธำรง^{3/}

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะด้วยวิธี laparoscopic ovum pick-up (LOPU) และการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย โดยใช้แพะทดลองที่เลี้ยงดูภายในศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ จำนวน 3 ตัว ซึ่งเป็นแพะลูกผสมพันธุ์ชาเนน จำนวน 1 ตัว และแพะลูกผสมพันธุ์แองโกลนูเบียน จำนวน 2 ตัว อายุ 1-5 ปี นำมาเจาะเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี LOPU โดยประยุกต์ใช้เข็ม injection set ที่ใช้ร่วมกับกล้องลาพาโรสโคป ซึ่งเป็นอุปกรณ์สำหรับผสมเทียมแพะ ร่วมกับชุดอุปกรณ์การเจาะเก็บโอโอไซต์และเครื่องปั๊มสุญญากาศ จากการเจาะฟอลลิเคิลเพื่อเก็บโอโอไซต์ทั้งหมดจำนวน 41 ฟอลลิเคิล พบว่าเก็บโอโอไซต์ได้จำนวน 30 ใบ คิดเป็นอัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ได้ (recovery rate) ร้อยละ 73.17 (30/41) และนำโอโอไซต์ที่เก็บได้ทั้งหมดเข้าสู่กระบวนการผลิตตัวอ่อนด้วยวิธีปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (*in vitro* embryo production, IVP) โดยใช้น้ำเชื้อผสมกับโอโอไซต์ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิด้วยการใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงสำเร็จรูป (IVF bioscience, UK) เพาะเลี้ยงโอโอไซต์และตัวอ่อนตลอดกระบวนการผลิตตัวอ่อนด้วยวิธีปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ภายหลังจากเพาะเลี้ยงตัวอ่อนในตู้เพาะเลี้ยง 6-7 วัน พบว่าได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์จำนวน 8 ตัวอ่อน คิดเป็นอัตราการเกิดบลาสโตซิสต์ (blastocyst rate) ร้อยละ 28.57 (8/28) จากผลการศึกษาพบว่าสามารถเจาะเก็บโอโอไซต์แพะได้ด้วยวิธี LOPU และผลิตตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ได้ด้วยวิธีปฏิสนธิภายนอกร่างกาย และตัวอ่อนที่ได้สามารถนำไปแช่แข็งเก็บไว้เพื่อนำไปย้ายฝากให้กับแม่แพะตัวต่อไป

คำสำคัญ : การเก็บโอโอไซต์ การปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ลาพาโรสโคปิก แพะ โอโอไซต์

เลขทะเบียนวิชาการ : 64(2)-0208-095

^{1/}ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

^{2/}สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ อ.เมือง จ.ปทุมธานี

^{3/}ข้าราชการบำนาญ

Laparoscopic ovum pick-up (LOPU) and in vitro embryo production (IVP) in goats:**A feasibility study in Thailand.**

Attapol pornprapai^{1/} Anone Thuangsanthia^{1/} Pinglanna Kunchorn^{2/} Malee Apimeteetumrong^{3/}

Abstract

The objective of this preliminary study were to establish the feasible technique for collecting the caprine oocyte by laparoscopic ovum pick-up (LOPU) and to produce embryos in vitro. Three crossbred goats (1 crossbred Saanen and 2 crossbred Anglo-Nubian) being raised at Embryo Transfer biotechnology and animal Germplasm Research Center, Department of Livestock Development. There were collected oocytes by LOPU. Injection needle set for laparoscopic artificial insemination, connected with air suction pump machine were used for aspirating the follicle on the ovary of doe. A total of 30 oocytes were collected from 41 follicles as recovery rate was 73.17% (30/41). Then all oocytes were brought into in vitro embryo production (IVP) program, using commercial media (IVF bioscience, UK) at all steps of production. Matured oocytes of each doe were fertilized with fresh semen obtained from fertility proven bucks. After 6-7 days of incubation, 8 blastocyst-stage embryos were obtained, resulting in blastocyst rate as 28.57% (8/28). The results of this study show that caprine oocytes can be collected by LOPU method and the blastocyst-stage embryos can be produced by IVP. These embryos can be frozen for further transfer to recipients.

keywords : ovum pick-up, in vitro fertilization, laparoscopic, goat, oocyte

Registered No. : 64(2)-0208-095

^{1/}Embryo Transfer Technology and Animal Germplasm Research Center, Pakchong, Nakornrachasima.

^{2/}Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Muang, Pathumthani.

^{3/}Retired government official

คำนำ

ในปัจจุบัน สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ได้ดำเนินการผลิตตัวอ่อนแพะจากแม่พันธุ์แพะพันธุ์กรรมดีด้วยวิธีการผลิตตัวอ่อนภายในร่างกาย (*in vivo* embryo production) พบว่า วิธีนี้ยังมีข้อจำกัดบางประการที่ส่งผลต่อความสำเร็จของการผลิตตัวอ่อน ได้แก่ ขั้นตอนการเก็บตัวอ่อนด้วยการชะล้างตัวอ่อนออกจากปีกมดลูก ที่มีโอกาสเก็บตัวอ่อนคุณภาพดีได้ปริมาณน้อย พบตัวอ่อนหยุดการพัฒนา (undeveloped embryo) และตัวอ่อนที่เสื่อมคุณภาพ (degenerative embryo) หรืออาจไม่สามารถเก็บตัวอ่อนได้ อันเนื่องมาจากสาเหตุของความผิดปกติภายในโพรงมดลูก หรือการตีบตันบริเวณตำแหน่งของท่อ นำไข่ส่งผลทำให้โอโอไซต์ (oocyte) ไม่เกิดการปฏิสนธิกับอสุจิ ทำให้ได้ตัวอ่อนที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (unfertilized oocyte, UFO) โดยปัญหาดังกล่าวมีโอกาสอาจเกิดขึ้นได้ทุกๆ รอบการผลิตตัวอ่อนภายในร่างกาย และยังใช้เวลาในการผ่าตัดเพื่อชะล้างเก็บตัวอ่อนที่ค่อนข้างนาน เพื่อเป็นการลดโอกาสการเกิดปัญหาดังกล่าว จำเป็นต้องศึกษาความเป็นไปได้ของการนำเทคโนโลยีการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย (*in vitro* embryo production, IVP) เพื่อนำมาแก้ไขปัญหการปฏิสนธิในแม่พันธุ์ที่มีรังไข่และฟอลลิเคิลสมบูรณ์แต่มีปัญหาท่อ นำไข่หรือปีกมดลูกผิดปกติ เป็นการเพิ่มศักยภาพการผลิตตัวอ่อนจากการที่สามารถเก็บโอโอไซต์ได้จำนวนหลายครั้ง และลดระยะเวลาในการเก็บตัวอ่อนเมื่อเทียบกับระยะเวลาในการเก็บตัวอ่อนด้วยวิธีการผลิตตัวอ่อนภายในร่างกาย และสามารถเก็บพันธุ์กรรมแม่พันธุ์ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจให้เกิดประโยชน์สูงสุด

การผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย เป็นเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพระบบสืบพันธุ์ ที่นำเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียหรือโอโอไซต์และเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้หรืออสุจิ มาผสมกันในห้องทดลองภายใต้สภาวะที่เหมาะสม ทำให้เกิดกระบวนการปฏิสนธิภายนอกร่างกายในห้องปฏิบัติการจนเกิดเป็นตัวอ่อน และสามารถนำตัวอ่อนที่ได้นั้นไปฝากในมดลูกของเพศเมียเพื่อให้ตั้งท้องต่อไป ซึ่งกระบวนการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายประกอบด้วยกระบวนการเก็บโอโอไซต์ (oocyte recovery) การเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ (*in vitro* maturation, IVM) การเตรียมน้ำเชื้อสำหรับการปฏิสนธิระหว่างน้ำเชื้อกับโอโอไซต์ในจานทดลอง (*in vitro* fertilization, IVF) และการเพาะเลี้ยงตัวอ่อน (*in vitro* embryo culture, IVC) (Mondal et al., 2008)

การเก็บโอโอไซต์ จากตัวสัตว์ทำได้หลายวิธี ได้แก่ การเก็บโดยตรงจากฟอลลิเคิลที่ได้จากรังไข่ของสัตว์จากโรงฆ่าสัตว์ ซึ่งมีข้อดีคือสามารถเก็บโอโอไซต์ได้จำนวนมากแต่ก็มีข้อเสียที่ไม่ทราบค่าทางพันธุกรรมของสัตว์ การเก็บตัวอ่อนด้วยวิธีผ่าตัดแบบเปิดช่องท้อง (laparotomy) และเจาะดูดโอโอไซต์โดยตรง ที่นิยมทำในสัตว์ขนาดเล็กในฟาร์ม เช่น แพะ แกะ พบว่ามีข้อเสีย คือ ไม่สามารถทำซ้ำได้หลายครั้ง เพราะอาจมีการยึดติดของเยื่อโอเมนตัม (omentum) กับเยื่อช่องท้อง (peritoneum) หรือมีการยึดติดของอวัยวะสืบพันธุ์กับอวัยวะภายในช่องท้อง เช่น ลำไส้ กระเพาะปัสสาวะ เป็นต้น การเก็บโอโอไซต์ด้วยเข็มเจาะดูดผ่านทางผนังช่องคลอดร่วมกับการใช้เครื่องตรวจอวัยวะภายในด้วยคลื่นความถี่สูง มีข้อดีคือ สามารถเก็บซ้ำได้หลายครั้ง และใช้เวลาในการปฏิบัติงานน้อยกว่าการผ่าตัด (เอกชาติ และคณะ, 2543)

การผ่าตัดด้วยการส่องกล้องลาพาโรสโคปี ถูกนำมาใช้ในงานด้านระบบสืบพันธุ์แพะ ทั้งในด้านการตรวจวินิจฉัยความผิดปกติ การเก็บตัวอ่อน และการย้ายฝากตัวอ่อน (Wieczorek et al., 2020) ซึ่งในประเทศไทย มีรายงานการนำกล้องลาพาโรสโคปีมาใช้ในการตรวจระบบสืบพันธุ์ การผสมเทียม และการย้ายฝากตัวอ่อนแพะ (นิธิรา และคณะ, 2556; อรุณและคณะ, 2564) แต่ยังไม่มียางานการนำมาใช้ในการเก็บโอโอไซต์

แพะ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะด้วยวิธี laparoscopic ovum pick-up (LOPU) และการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

คัดเลือกแพะแม่พันธุ์ในศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ ที่มีสุขภาพแข็งแรง สมบูรณ์ ไม่มีปัญหาในระบบสืบพันธุ์ จำนวน 3 ตัว อายุ 1-5 ปี น้ำหนัก 44-46 กิโลกรัม เป็นแพะลูกผสมพันธุ์ซาเนน จำนวน 1 ตัว และแพะลูกผสมพันธุ์แองโกลนูเบียน จำนวน 2 ตัว โดยให้อาหารหยาบเป็นหญ้าแพงโกล่าแห้งกินตลอดเวลา และอาหารข้นวันละ 300 กรัม/ตัว/วัน

วิธีการทดลอง

1. โปรแกรมเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่หลายใบ โดยดัดแปลงมาจากโปรแกรมของ Wieczorek และคณะ (2020) ดังนี้

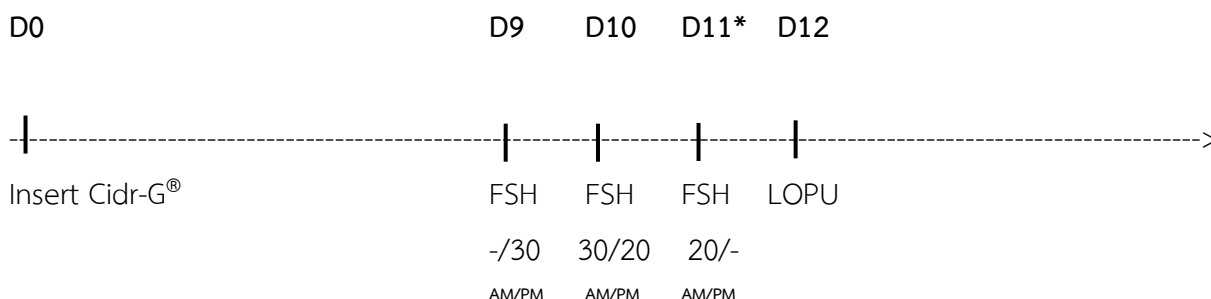
วันที่ 0 สอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด (CIDR®-G, 0.3 g progesterone, Eazi Breed, InterAg, New Zealand)

วันที่ 9 ฉีดฮอร์โมน FSH (Folltropin-V®, Ontario, Canada) ปริมาณ 30 mg. เข้ากล้ามเนื้อ เวลา 18.00 น.

วันที่ 10 ฉีดฮอร์โมน FSH ปริมาณ 30 mg. เข้ากล้ามเนื้อเวลา 06.00 น. และปริมาณ 20 mg เข้ากล้ามเนื้อ เวลา 18.00 น.

วันที่ 11 ฉีดฮอร์โมน FSH ปริมาณ 20 mg. เข้ากล้ามเนื้อเวลา 06.00 น. และถอด Cidr-G® เวลา 18.00 น. (12 ชั่วโมงหลังจากฉีดฮอร์โมน FSH เข็มสุดท้าย)

วันที่ 12 เก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี LOPU เวลา 06.00 น. (หลังจากถอด CIDR®-G 12 ชั่วโมง)



Remark : AM = 06.00 a.m., PM = 06.00 p.m., * = Remove Cidr-G®

Figure 1. estrus synchronization and superovulation for LOPU

2. การเก็บโอโอไซต์โดยวิธี LOPU

ก่อนดำเนินการเก็บโอโอไซต์ แพะถูกดื่มน้ำและอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการวางยาสงบประสาท (tranquilizer drug) กลุ่ม alpha-2 agonist ด้วย xylazine HCL 0.2 mg/kg ร่วมกับ atropine 0.04 mg/kg เข้ากล้ามเนื้อ และยาระงับปวด (analgesic drug) ด้วย phenylbutazone 4 mg/kg เข้ากล้ามเนื้อ และยาปฏิชีวนะ (prophylaxis antibiotic drug) ด้วย penicillin-streptomycin 20,000 IU/kg เข้ากล้ามเนื้อ เมื่อแพะมีอาการซึม นำแพะขึ้นบนเตียงผ่าตัดและจัดท่าแพะให้อยู่ในท่านอนหงาย (dorsal recumbency) (figure 2.) โดยให้ส่วนหัวของแพะอยู่ต่ำกว่าส่วนท้ายลำตัว จากนั้นทำการโกนขนและเตรียมบริเวณผ่าตัดด้วยเทคนิคการกีดกันเชื้อ (aseptic technique)



Figure 2. Dorsal recumbency position

กำหนดตำแหน่งที่จะทำการเจาะช่องท้องที่บริเวณเหนือเต้านมมาทางด้านหน้า 2 ตำแหน่ง ดำเนินการระงับความรู้สึกเฉพาะที่ โดยใช้ยาชา lidocaine HCL ณ ตำแหน่งที่มีการกรีดผิวหนังตำแหน่งละ 2 ซีซี โดยตำแหน่งแรกใช้ trocar อันแรก เจาะผนังช่องท้องด้านหน้าของเต้านมซ้าย และนำกล้องลาพาโรสโคปสอดเข้าช่องท้องทางช่องของ trocar ซึ่ง trocar นี้มีที่เชื่อมต่อกับสายแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นเติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เข้าช่องท้องเพื่อให้ช่องท้องขยายและเพิ่มช่องว่างในช่องท้อง จากนั้นตำแหน่งที่ 2 ใช้ trocar อันที่ 2 เจาะช่องท้องด้านหน้าเต้านมขวาในตำแหน่งตรงกันข้ามกับตำแหน่งแรกเพื่อใช้เป็นตำแหน่งสอดเข็ม injection set (AMNOTECH international medical, Germany) ที่ใช้ร่วมกับกล้องลาพาโรสโคปเพื่อใช้เป็นทางผ่านของเข็มสำหรับเจาะดูดเก็บโอโอไซต์ หลังจากนั้นดำเนินการตรวจดูรังไข่และนับจำนวนฟอลลิเคิลบนรังไข่ด้วยกล้องลาพาโรสโคป และบันทึกข้อมูล จากนั้นใช้ trocar อันที่ 3 เจาะที่ตำแหน่งกึ่งกลางลำตัวค่อนมาทางด้านหน้า และสอด grasping forceps ซึ่งใช้ในการจับเยื่อแขวนรังไข่ (mesovarium) เพื่อใช้ควบคุมบังคับตำแหน่งรังไข่ให้ง่ายในการเจาะเก็บโอโอไซต์ (figure 3.)

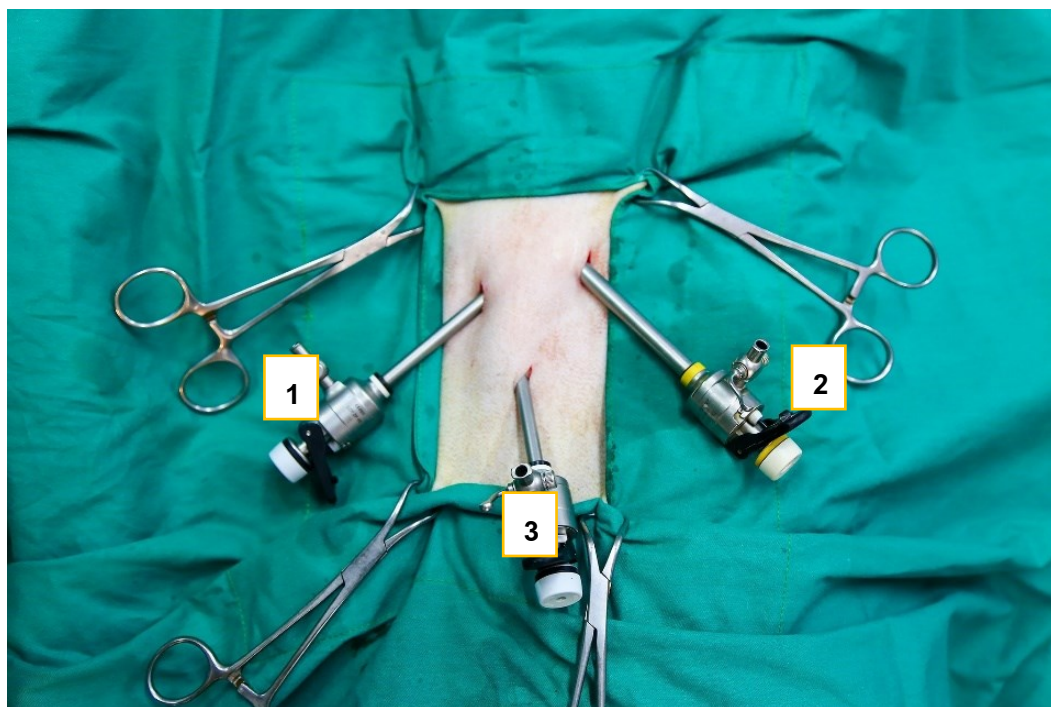


Figure 3. Trocar placement for laparoscope (1), Trocar placement for injection needle size 18G (2) and Trocar placement for grasping forceps (3)

ทำการเจาะฟอลลิเคิลที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 3 มิลลิเมตร ซึ่งสามารถมองเห็นได้จากบนผิวของรังไข่ (figure 4.) โดยใช้เข็มเจาะเก็บโอโอไซด์ที่ประยุกต์มาจากเข็ม injection set ซึ่งเป็นอุปกรณ์สำหรับผสมเทียมแพะแบบลาพาโรสโคปิก (laparoscopic artificial insemination, LAI) ที่ใช้ร่วมกับกล้องลาพาโรสโคป ลักษณะเป็นโลหะ มีปลายเข็มต่อกับท่อลำเลียง ขนาดเข็มเบอร์ 18G เส้นผ่านศูนย์กลางของเข็ม 1.2 มิลลิเมตร ความยาวของเข็ม 20 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางของท่อลำเลียง 2.8 มิลลิเมตร และความยาวของท่อลำเลียง 330 มิลลิเมตร (figure 5.)

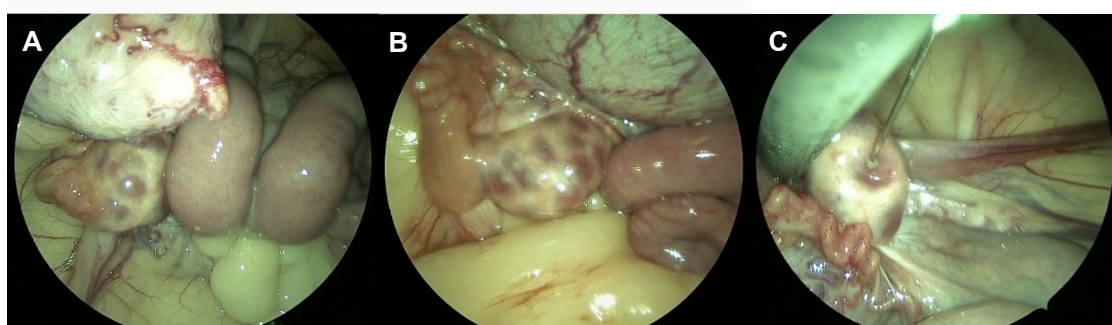


Figure 4. Reproductive tract of goat showing ovaries with high response to stimulation (A),(B) and aspirated follicles through injection needle (C)

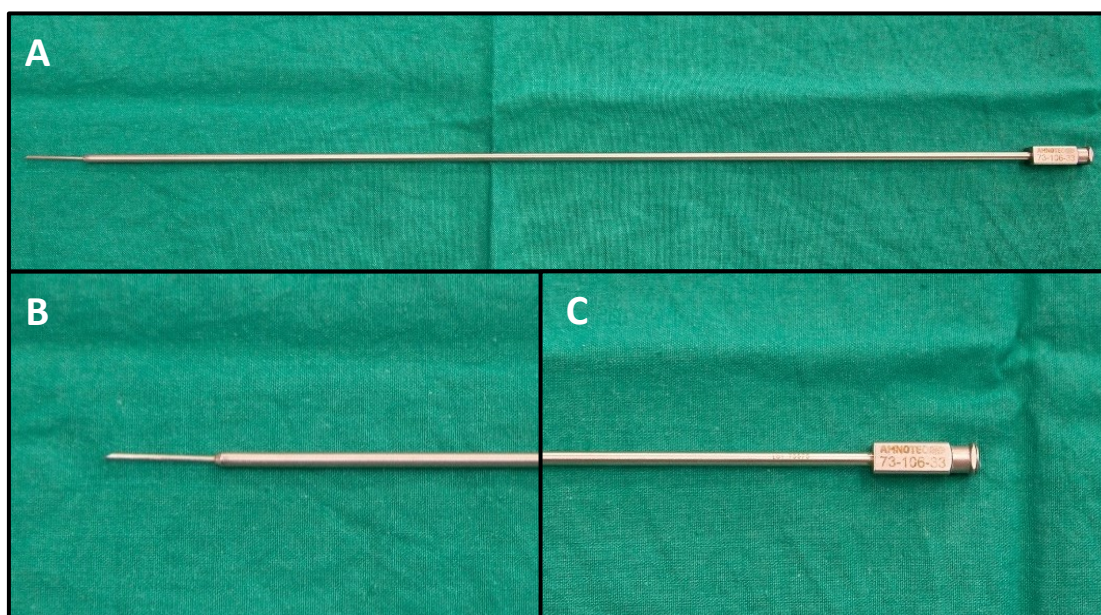


Figure 5. Injection needle size 18G for LOPU (A) and closed-up view of needle (B),(C)

เชื่อมต่อเข็ม injection set ที่ใช้เจาะเก็บโอโอไซด์เข้ากับชุดอุปกรณ์การเจาะเก็บโอโอไซด์และเครื่องปั๊มสุญญากาศ (NF100KT.18 RC (LIQUIDPORT 100), KNF, Switzerland) และ heating block (N-FTH-2012, COOK, Australia) ด้วยสายซิลิโคน (figure 6.) ทำการเก็บโอโอไซด์ด้วยเข็ม injection set ร่วมกับการใช้กล้องลาพาโรสโคป (figure 7.) โดยใช้แรงดูดที่ 30 มิลลิเมตรปรอท สังเกตเริ่มต้นดูดเก็บโอโอไซด์จากฟอลลิเคิลที่มีลักษณะบวมจนกระทั่งฟอลลิเคิลมีรอยบุ๋มลงไป จึงหยุดดูดเก็บโอโอไซด์ ระมัดระวังไม่ให้เกิดเลือดออก ใช้สารละลาย phosphate buffered saline (PBS) (Gibco, BRL, USA) เสริมด้วย 1% bovine serum (Gibco, New Zealand) เป็นน้ำยาเก็บโอโอไซด์ ซึ่งต้องคงอุณหภูมิสารละลาย PBS นี้ไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ใน heating block



Figure 6. Injection needle set for laparoscopic ovum pick-up (LOPU) which connected with air suction pump machine

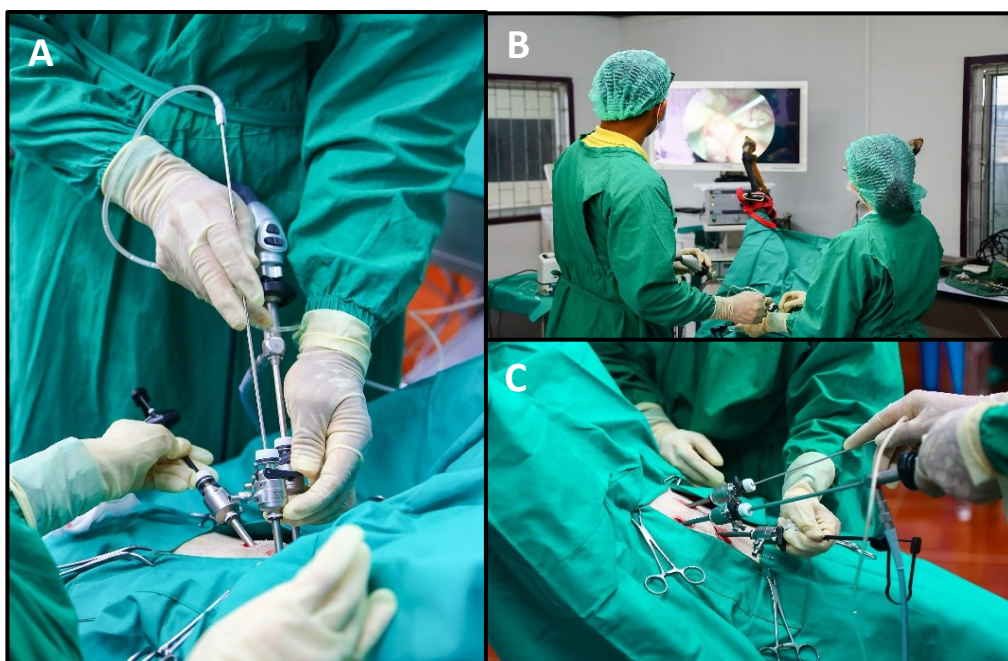


Figure 7. The grasping forceps were held by assistant for ovary stabilization at third trocar position (A), General view of LOPU (B) and view of three trocars position during LOPU (C)

หลังจากเก็บโอโอไซต์เสร็จเรียบร้อยแล้ว เติมน้ำสารละลาย normal saline 1,000 มิลลิลิตร ผสมกับ heparin 10,000 IU/ml (Gland Pharm Limited, India) 2 มิลลิลิตร ที่คงอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ลงในช่องท้องประมาณ 200 - 250 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันการเกิดแผลยึดติด (adhesion) ของอวัยวะระบบสืบพันธุ์และอวัยวะอื่นๆภายในช่องท้อง จากนั้นกดบริเวณหน้าท้องเพื่อไล่แก๊ส คาร์บอนไดออกไซด์ออกจากช่องท้องและเย็บปิดบาดแผล จากนั้นนำหลอด centrifuge tube ที่มี สารละลาย PBS และของเหลวในฟอลลิเคิลเข้าห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาโอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ บันทึกจำนวนและคุณภาพของโอโอไซต์

3. การผลิตตัวอ่อนด้วยวิธีปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (*in vitro* embryo production, IVP) ดำเนินการตามขั้นตอน ดังนี้

3.1 การเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ (*in vitro* maturation, IVM)

นำของเหลวที่เจาะได้กรองด้วยถ้วยกรองขนาด 75 ไมโครเมตร (Agtech Zona filter, Australia) จากนั้นตรวจหาโอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอและคัดเลือกโอโอไซต์ที่เสื่อมสภาพ (degenerated oocyte) ออก จากนั้นนำโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ทั้งหมด มาล้าง 3 ครั้ง ในน้ำยา TCM-199 Hepes (Gibco, USA) เสริมด้วย 5% FBS และ penicillin-streptomycin 10,000 IU/ml (Gibco, USA) อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส จากนั้นล้าง 3 ครั้ง ในน้ำยา BO-IVM Oocyte maturation medium (IVF Bioscience, UK) สำหรับเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ โดยนำโอโอไซต์ใส่น้ำยาปริมาณ 500 ไมโครลิตร ในจานเพาะเลี้ยงแบบ 4 หลุม (4-well petri dishes, Nunc, Roskilde, Denmark) และเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ มากกว่า 95% นาน 23-25 ชั่วโมง

3.2 การเตรียมน้ำเชื้อแพะและการปฏิสนธิกับโอโอไซต์ในจานทดลอง (semen preparation and *in vitro* fertilization, IVF)

ก่อนเตรียมน้ำเชื้อ ทำการปรับสมดุลน้ำยาสำหรับปฏิสนธิระหว่างโอโอไซต์กับตัวสุจิ โดยใส่น้ำยา BO-IVF fertilization medium (IVF Bioscience, UK) ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 4 หลุมๆละ 400 ไมโครลิตร นำเข้าในตู้เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนใช้งาน จากนั้นนำน้ำเชื้อสดจากแพะพ่อพันธุ์ชาเนน 1 ตัว และแองโกลนูเบียน 1 ตัว ที่มีประวัติการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งผสมเทียมและให้ลูกเกิดจากการผสมเทียม ก่อนนำมาเตรียม น้ำเชื้อเพื่อปฏิสนธิกับโอโอไซต์ของแม่แพะลูกผสมพันธุ์ชาเนนและแม่แพะลูกผสมพันธุ์แองโกลนูเบียน ตามลำดับ ทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อสดด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์คุณภาพอสุจิ (computer assisted semen analysis, CASA) รุ่น Hamiton Thorne CEROS II (Hamilton Thorne, USA) และตรวจวัดความเข้มข้นน้ำเชื้อด้วยเครื่อง photometer (Minitube, Germany) นำน้ำเชื้อสดที่คำนวณจำนวนอสุจิจากพ่อพันธุ์ ประมาณ 150 ล้านตัว ปั่นล้าง 2 ครั้ง ที่ 300g นาน 5 นาทีในน้ำยา BO-SemenPrep medium (IVF Bioscience, UK) ใช้น้ำยาปั่นครั้งละ 2 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง ในการปั่นครั้งที่ 2 ให้เหลือน้ำยาที่มีตะกอนน้ำเชื้อประมาณ 200 ไมโครลิตร และประเมิน motility ตรวจนับอสุจิด้วย hemacytometer จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของน้ำเชื้อและปริมาณน้ำเชื้อที่จะเติมในจานเพาะเลี้ยงชนิด 4 หลุม ที่มีน้ำยา BO-IVF fertilization medium (IVF Bioscience, UK) 400 ไมโครลิตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของอสุจิ 1×10^6 ตัวต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ระหว่างที่รอการปั่นน้ำเชื้อ นำโอโอไซต์ที่เพาะเลี้ยงจนครบเวลาการเจริญพร้อมปฏิสนธิแล้ว มาล้าง 3 ครั้ง ด้วยน้ำยา BO-IVF fertilization medium ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ย้ายโอโอไซต์ลงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 4 หลุม ที่มีน้ำยา BO-IVF fertilization medium 400 ไมโครลิตรที่เตรียมไว้ก่อนหน้า นำกลับเข้าตู้เพาะเลี้ยงเดิม เพื่อรอการหยอด

น้ำเชื้อในหลุมดังกล่าว หลังจากหยอดน้ำเชื้อลงในหลุมที่มีโอโอไซต์แล้ว เพาะเลี้ยงต่อในตู้เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18-19 ชั่วโมง

3.3 การเพาะเลี้ยงตัวอ่อน (*in vitro* embryo culture, IVC)

เมื่อสิ้นสุดเวลาการปฏิสนธิ ย้ายตัวอ่อนลงในน้ำยา TCM-199 เสริมด้วย 5% FBS และ penicillin-streptomycin 10,000 IU/ml อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ล้างอสุจิส่วนเกินและกำจัดเซลล์ผิวมูลออกจากไซโกต ด้วยเครื่อง vertex mixer และใช้ปิเปตต์ดูดตัวอ่อนเข้าออกหลายๆครั้ง จากนั้นล้าง 3 ครั้ง และเพาะเลี้ยงในน้ำยา BO-IVC 1 step culture medium (IVF Bioscience, UK) ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ก่อนหน้า 2 ชั่วโมง โดยเพาะเลี้ยงตัวอ่อนจากแม่แพะแต่ละตัวในน้ำยาปริมาณ 500 ไมโครลิตร เททับด้วย BO-OIL liquid paraffin (IVF Bioscience, UK) ปริมาณ 350 ไมโครลิตร เพาะเลี้ยงจนถึงวันที่ 6 (วันที่ 1 คือวันที่เริ่มเพาะเลี้ยง) จึงนำออกมาตรวจสอบ การพัฒนาของตัวอ่อน ติดตามการพัฒนาของตัวอ่อนต่อไปทุกวันจนถึงวันที่ 8 บันทึกข้อมูลจำนวนตัวอ่อนที่มีพัฒนาการตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง เมื่อได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ นำตัวอ่อนมาแช่แข็งโดยใช้น้ำยาแช่แข็งที่มีส่วนผสมของ ethylene glycol 1.4 M และ sucrose (VIGRO®, Canada) ด้วยวิธี conventional method ตามวิธีที่ปฏิบัติทางห้องปฏิบัติการ

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการเก็บโอโอไซต์ด้วยการเจาะฟอลลิเคิลทั้งหมดจำนวน 41 ฟอลลิเคิล พบว่าเก็บโอโอไซต์ได้ทั้งหมดจำนวน 30 ใบ คิดเป็นอัตราการเจาะเก็บได้ ร้อยละ 73.17 (30/41) ดังที่ปรากฏใน Table 1.

การผลิตตัวอ่อนด้วยวิธีปฏิสนธิภายนอกร่างกาย จากการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์เริ่มต้นจำนวน 28 ใบ พบว่าได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์รวมทั้งหมดจำนวน 8 ตัวอ่อน (figure 8) คิดเป็นอัตราการเกิดบลาสโตซิสต์ (blastocyst rate) ร้อยละ 28.57 (8/28) ดังที่ปรากฏใน Table 2

Table 1. Number of follicles aspirated and oocytes derived from LOPU in each doe

Doe ID	Breed	Total number of follicles aspirated	Collected oocytes in each category				Total oocytes derived	Recovery rate (%)
			COCs ¹ ≥ 2 levels	partial CCs ²	DOs ³	Deg ⁴		
SAA00367	crossbred Saanen	15	4	7	2	0	13	86.67
ANG00368	crossbred Anglo- Nubian	13	1	7	1	1	10	76.92
59031	crossbred Anglo- Nubian	13	0	5	2	0	7	53.85
Total		41	5	20	5	1	30	73.17

Table 2. Embryo development following IVF of caprine oocytes derived from LOPU in each doe.

Doe ID	Number of oocytes subjected to			Cleavage/ IVC (%)	Number of embryos developed to blastocyst stage (post insemination)		Total blastocysts/IVC (%)
	IVM ¹	IVF ²	IVC ³		Day 7	Day 8	
SAA00367	13	13	13	8 (61.54)	3	2	5 (38.46)
ANG00368	9	9	8	4 (50.00)	1	1	2 (25.00)
59031	7	7	7	5 (71.43)	0	1	1 (14.29)
Total	29	29	28	17 (60.71)	4	4	8 (28.57)

¹IVM = *in vitro* maturation²IVF = *in vitro* fertilization³IVC = *in vitro* embryo culture

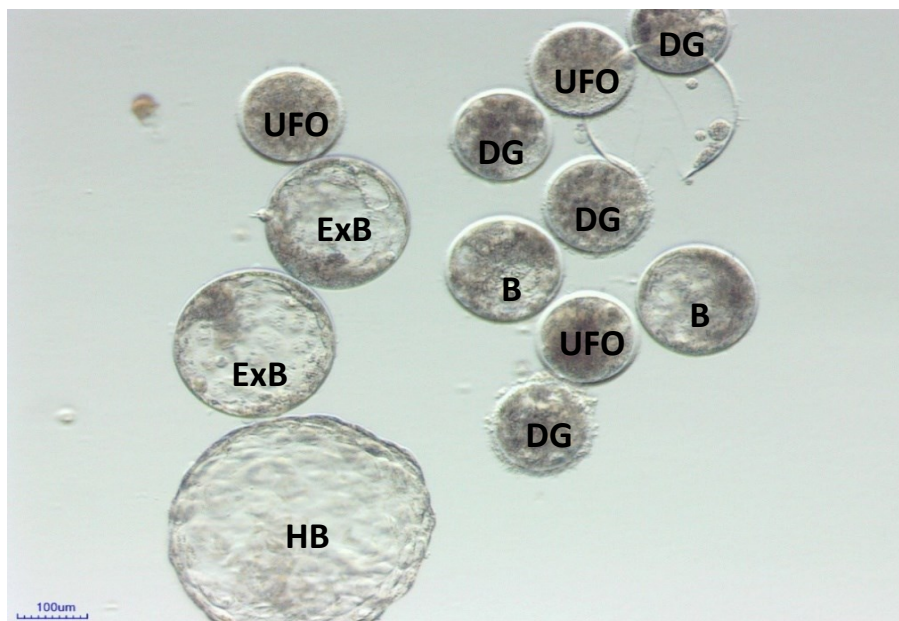


Figure 8 Blastocyst formation after 7-8 days of in vitro fertilization with fresh semen (original magnification, X80) (B: Blastocyst, ExB: Expanded blastocyst, HB: Hatched blastocyst, DG: Degenerated embryo, UFO: Unfertilized oocyte)

การศึกษารั้้งนี้ พบว่า อัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ได้ ร้อยละ 73.17 (30/41) เมื่อพิจารณาอัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ได้เปรียบเทียบกับรายงานของ Wieczorek et al.(2020) ที่ทำการศึกษเกี่ยวกับกระบวนการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะด้วยวิธี laparoscopic ovum pick-up โดยมีการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่หลายใบด้วยโปรแกรมฮอร์โมน ร่วมกับเทคนิคการใช้ grasping forceps ในการควบคุมและพลิกหาตำแหน่งบนรังไข่ที่เหมาะสมในการเจาะดูด พบว่า อัตราการเจาะเก็บได้เท่ากับ ร้อยละ 67 ซึ่งต่ำกว่าการในศึกษารั้้งนี้เล็กน้อย โดยเทคนิคที่แตกต่างกัน คือ การเลือกใช้ขนาดของเข็มในการเจาะรังไข่ โดยในการศึกษารั้้งนี้ ใช้เข็มเบอร์ 18G ที่มีขนาดใหญ่กว่า รายงานของ Wieczorek et al. (2020) ซึ่งใช้เข็มเบอร์ 23G ที่มีขนาดเล็กกว่า ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการเจาะดูดโอโอไซต์ด้วยเข็มที่มีขนาดใหญ่กว่า ส่งผลให้อัตราการเจาะเก็บได้สูงกว่า แต่ทั้งนี้ เข็มที่ใหญ่ขึ้นมีข้อเสีย คืออาจทำให้รังไข่บอบช้ำได้ ซึ่งขึ้นอยู่กับทักษะและความชำนาญของผู้ปฏิบัติงานด้วย

ปัจจัยความสำเร็จในการเก็บโอโอไซต์ประกอบด้วยหลายขั้นตอน เริ่มตั้งแต่การเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่หลายใบด้วยโปรแกรมฮอร์โมนที่เหมาะสม ซึ่งปรากฏในลักษณะของฟอลลิเคิลที่สมบูรณ์ การบังคับสัดไว้ให้อยู่หนึ่งและการควบคุมตำแหน่งของรังไข่ขณะเจาะเก็บโอโอไซต์ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่จะทำให้ อัตราการเจาะเก็บได้เพิ่มสูงขึ้น หากไม่สามารถควบคุมตำแหน่งของรังไข่ขณะเจาะดูดเก็บโอโอไซต์และมีเลือดออกในบริเวณที่เจาะเก็บจนทำให้ไม่สามารถมองเห็นตำแหน่งฟอลลิเคิลได้ชัดเจน จะส่งผลทำให้ไม่สามารถเก็บโอโอไซต์ที่เหลือได้ รวมทั้งอุปกรณ์และแรงดูดในการเจาะเก็บโอโอไซต์ ยังเป็นส่วนสำคัญที่มีผลต่ออัตราการเจาะเก็บได้ จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าแรงดูดที่จะทำให้สามารถเจาะเก็บโอโอไซต์ได้อยู่ที่ประมาณ

30 – 40 มิลลิเมตรปรอท ซึ่งสอดคล้องกับแรงดูดที่เหมาะสมของ (Souza-Fabjan et al., 2014) ที่สุดมีค่าเท่ากับ 30 มิลลิเมตรปรอท

การผลิตตัวอ่อนด้วยวิธีปฏิสนธิภายนอกร่างกาย จากการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ จำนวน 28 ใบ พบว่า ได้ตัวอ่อนที่มีการพัฒนาถึงระยะบลาสโตซิสต์สักรวมทั้งหมดจำนวน 8 ตัวอ่อน นับว่าเป็นรายงานครั้งแรกของกรมปศุสัตว์ ที่ประสบความสำเร็จในการผลิตตัวอ่อนแพะด้วยวิธีปฏิสนธิภายนอกร่างกาย คิดเป็นอัตราการเกิดบลาสโตซิสต์สักรวมทั้งหมด (total blastocyst rate) จากโอโอไซต์ที่ทำการเก็บจากแพะมีชีวิตทั้งหมด 3 ตัว ด้วยวิธี LOPU คิดเป็นร้อยละ 28.57 (8/28)

ด้านการพัฒนาของตัวอ่อนที่ได้จากแม่แพะมีชีวิตทั้งหมดจำนวน 3 ตัว พบว่า มีจำนวนตัวอ่อนที่มีการพัฒนาถึงระยะบลาสโตซิสต์ไม่เท่ากัน จะเห็นได้ว่า แม่แพะที่มีการตอบสนองต่อฮอร์โมนที่ใช้ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่หลายใบที่ดี จะส่งผลต่อการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลและพบฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่กว่า 5 มิลลิเมตร จำนวนมาก ทำให้ได้โอโอไซต์คุณภาพดี มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบโอโอไซต์หลายชั้น (cumulus-oocytes complex, COCs) ส่งผลทำให้ตัวอ่อนมีพัฒนาการที่ดี ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Crozet et al (1995) พบว่า ฟอลลิเคิลที่ใกล้เข้าสู่ระยะการตกไข่ มีอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซิสต์สูง ถึงร้อยละ 41 ส่วนฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่กว่า 5 มิลลิเมตร ฟอลลิเคิลที่มีขนาด 3.1-5 มิลลิเมตร และฟอลลิเคิลที่มีขนาด 2-3 มิลลิเมตร มีอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซิสต์ เท่ากับร้อยละ 26 12 และ 6 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการเพิ่มขึ้นของขนาดฟอลลิเคิล จะส่งผลต่อคุณภาพของโอโอไซต์และการพัฒนาของตัวอ่อนที่ดีขึ้น (Gandolfi et al., 2005) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า อัตราการเกิดบลาสโตซิสต์สักรวมทั้งหมด ร้อยละ 28.57 ซึ่งต่ำกว่ารายงานของ Souza-Fabjan et al. (2014) ที่เคยรายงานพบค่าอัตราการเกิดบลาสโตซิสต์จาก LOPU ที่ร้อยละ 38 จากการที่ได้อัตราการเกิดบลาสโตซิสต์ที่ไม่สูงมาก อาจเนื่องจากการทดลองครั้งนี้ ใช้โอโอไซต์ทั้งหมดที่เก็บได้ นำไปใช้ผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย ซึ่งโอโอไซต์เหล่านี้มีทั้งที่คุณภาพดี มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบหลายชั้น คุณภาพที่ด้อยลงมา ได้แก่ มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบบางส่วน (partial CCs) และไม่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบ (denuded oocytes) ซึ่งปกติ denuded oocytes จะไม่นำไปใช้ผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย เพราะจะได้ผล อัตราการเกิดบลาสโตซิสต์ ต่ำ เมื่อเทียบกับการใช้โอโอไซต์คุณภาพดีทั้งหมด (Souza-Fabjan et al., 2016) แต่การศึกษานี้ใช้ denuded oocytes ร่วมกับ COCs เนื่องจากมีรายงานสนับสนุนว่าพัฒนาการและคุณภาพของของตัวอ่อนจากการทำ IVF จะดีขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับ denuded oocytes โดยการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง zona pellucida ให้มีการเพิ่มจำนวนรูบนพื้นผิว zona pellucida ที่ใช้ในการแลกเปลี่ยนสารอาหารและสารต่างๆ ส่งผลทำให้เพิ่มความสามารถของนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมของโอโอไซต์ เหมาะแก่การปฏิสนธิที่ดีขึ้น ยิ่งไปกว่านั้น ยังสามารถกระตุ้นทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนเซลล์ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์เพิ่มขึ้นและสามารถลดสัดส่วนจำนวนของเซลล์ที่ตาย (apoptosis) ลงได้ (Choi et al., 2013) และรายงานของ Souza-Fabjan et al. (2014) พบว่าแหล่งที่มาและวิธีการเก็บโอโอไซต์ ไม่มีผลต่ออัตราการเกิดบลาสโตซิสต์ เนื่องจากอัตราการเกิด บลาสโตซิสต์จากโอโอไซต์ที่ทำการเก็บจากแพะมีชีวิตด้วยวิธี LOPU หรือจากโอโอไซต์จากแพะที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ มีค่าไม่แตกต่างกัน

สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาความเป็นไปได้ในการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะด้วยวิธี laparoscopic ovum pick-up (LOPU) และการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย พบว่า มีอัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ได้ ร้อยละ 73.17 (30/41) และอัตราการเกิดบลาสโตซิสต์รวมทั้งหมด ร้อยละ 28.57 (8/28) และตัวอ่อนที่ได้สามารถนำไปแช่แข็งเก็บไว้เพื่อย้ายฝากให้กับแม่แพะตัวรับต่อไป ทั้งนี้พบว่ากรมปศุสัตว์ประสบความสำเร็จในการผลิตตัวอ่อนแพะด้วยวิธีปฏิสนธิภายนอกร่างกายเป็นครั้งแรกในประเทศไทย

ข้อเสนอแนะ

สามารถนำองค์ความรู้และวิธีการเก็บโอโอไซต์แพะด้วยวิธี LOPU และการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย นำไปใช้เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและกระจายพันธุ์กรรมที่ดีของแพะ เพื่อเป็นการพัฒนาพันธุ์กรรมแพะพันธุ์ดีสู่เกษตรกรได้อย่างรวดเร็ว และสามารถใช้เป็นต้นแบบในการศึกษา ค้นคว้า วิจัย ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตตัวอ่อนแพะด้วยวิธีปฏิสนธิภายนอกร่างกายในอนาคตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ คุณนิศยา วาปีกา นักวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความรู้และตรวจหาโอโอไซต์รวมถึงปฏิบัติงานผลิตตัวอ่อนจากการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย คุณจิราภา ขาวสุข นักวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความรู้และตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อแพะ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ที่มดูแลสุขภาพและการจัดการแพะพ่อแม่พันธุ์ ที่ช่วยควบคุมดูแลแพะและรีดเก็บน้ำเชื้อแพะ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ช่วยเหลือและงานงานวิจัยครั้งนี้ประสบความสำเร็จเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- นิธิรา อนันกุล จันทรเพ็ญ สุวิมลธีระบุตร สฤณีวิชญ์ ปัญญาภิบาลย์ ศรารณิ ชันมณี ญัฐกานต์ ถนอมสุขสินชัย มงคล เตชะกำพุ. 2556. การผลิตแพะดำด้วยการผสมเทียมด้วยเทคนิคส่องกล้องลาพาโรสโคปและการย้ายตัวฝากตัวอ่อน. เวชสารสัตวแพทย์. ปีที่ 43 ฉบับที่ 2 หน้า 259-263.
- เอกชาติ พรหมดิเรก มงคลเตชะกำพุ นวเพ็ญ ภูติกนิษฐ์ อัญชลี ณ เชียงใหม่. 2543. การศึกษาเบื้องต้นของการเก็บโอโอไซต์. เวชสารสัตวแพทย์. ปีที่ 30 ฉบับที่ 1 หน้า 43-50.
- อรุณ จันทรกระจ่าง อนนท เทืองสันเทียะ วิศิษฐ์ ทองเที่ยง พิงค์ลานนา กุญชร. 2562. ผลของการผสมเทียมแพะแบบลาพาโรสโคปแม่แพะตัวให้ต่อจำนวนและคุณภาพของตัวอ่อน. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 12(1):40-51
- Choi, B.H., B. Jae-Il, J. Jong-In, K. Seong-Su, J. Hyun-Tae, D. Gautam Kumar, D. Nasser, C. Kyu-Woan and K. Il-Keun. 2013. Coculturing cumulus oocyte complexes with denuded

- oocytes alters zona pellucida ultrastructure in in vitro matured bovine oocytes. *Theriogenology*. 80: 1117–1123.
- Crozet, N., Ahmed-Ali, M. and M.P. Dubos. 1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation fertilization and culture in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 103: 293-298
- Gandolfi, F., Brevini, T.A., Cillo, F. and S. Antonini. 2005. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. *Rev. Sci. Technol.* 24: 413–423.
- Mondal A., A.M.Y. Khandoker, M.A. Mondal, A.H.M.S. Rahman, A.S. Apu and S. Pervage. 2008 In Vitro Production Of Goat Embryos In Bangladesh. *Bang. J. Anim. Sci.* 2008, 37(1):1-9
- Souza-Fabjan, J.M.G., L. Yann, D. Nicolas, C. Emilie, T. Jean-Luc, P. Christine, B. Jean Francois, F. F. Vicente Jose and M. Pascal. 2014. In vitro embryo production in goats: Slaughterhouse and laparoscopic ovum pick up- derived oocytes have different kinetics and requirements regarding maturation media. *Theriogenology*. 81:1021-1031.
- Souza-Fabjan, J.M.G., Y. Locatelli, N. Duffard, E. Corbin, R.I.T. Pereira-Batista, V.J.F. Freitas, J.F.Beckers and P. Mermillod. 2016. Intrinsic quality of goat oocytes already found denuded at collection for in vitro embryo production. *Theriogenology*. 86(8):1989-1998.
- Wieczorek, J., K. Jurij, S. Maria and C. Mirosław. 2020. L-OPU in goat and sheep—different variant of the oocyte recovery method. *Animal*. (10):658-672.

การใช้เทคโนโลยีอัลตราซาวด์ในการประเมินสมรรถภาพระบบสืบพันธุ์พ่อโค

วิชณู ไพศาลรุ่งพนา^{1/} จรรยาพร รุ่งเรืองศักดิ์^{1/} จุฬฉัตร ชาญปัญญา^{2/}

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการประเมินสมรรถภาพระบบสืบพันธุ์ในโคนมเพศผู้ด้วยการใช้เทคนิคอัลตราซาวด์อันทะและคุณลักษณะน้ำเชื้อ โดยใช้พ่อพันธุ์โคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์ อายุ 2-7 ปี จำนวน 25 ตัว ของศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ลำพญากลาง จังหวัดลพบุรี รีดเก็บน้ำเชื้อสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ติดต่อกัน 6 สัปดาห์ ทำการวัดขนาดเส้นรอบวงอันทะ ตรวจอันทะด้วยเทคนิคอัลตราซาวด์ และตรวจคุณลักษณะน้ำเชื้อสด ได้แก่ ปริมาตร ความเข้มข้นอสุจิ อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ตรวจร้อยละความผิดปกติของอสุจิ ร้อยละอสุจิมีชีวิต วิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางกายภาพของพ่อพันธุ์ ได้แก่ อายุของพ่อพันธุ์ ณ วันที่เก็บตัวอย่าง และเส้นรอบวงอันทะ กับคุณลักษณะของน้ำเชื้อสดทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ และค่าที่ได้จากเทคนิคอัลตราซาวด์ รวมทั้งสร้างสมการเพื่อทำนายคุณภาพน้ำเชื้อด้วยสมการถดถอยพหุคูณ (multiple linear regression models) ผลการศึกษาพบว่า อายุมีความสัมพันธ์ปานกลางกับเส้นรอบวงอันทะของพ่อโค ($r = 0.50$; $p < 0.05$) อายุและเส้นรอบวงอันทะมีความสัมพันธ์ต่ำกับคุณภาพน้ำเชื้อหลายลักษณะ ($r = -0.35$ ถึง 0.21 ; $p < 0.05$) คะแนนรอยโรค (focal point) ซึ่งประเมินจากการใช้เทคนิคอัลตราซาวด์อันทะ มีความสัมพันธ์เชิงลบในระดับต่ำถึงปานกลางกับคุณภาพน้ำเชื้อหลายลักษณะ ทั้งความเข้มข้นของอสุจิ อสุจิที่ผลิตได้ ร้อยละอสุจิมีชีวิต ร้อยละอสุจิผิดปกติ และอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ($r = -0.19$ ถึง -0.52 ; $p < 0.05$) และมีความสัมพันธ์เชิงบวกในระดับต่ำกับความผิดปกติของอสุจิ ($r = 0.21$; $p < 0.05$) ในขณะที่ค่าความเข้มของภาพถ่ายอัลตราซาวด์อันทะ (pixel intensity) มีความสัมพันธ์กับอายุเท่านั้น ($r = 0.18$; $p < 0.05$) จากการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณพบว่าคะแนนรอยโรคในอันทะที่เพิ่มขึ้นมีผลทำคุณภาพน้ำเชื้อต่ำลงเกือบทุกลักษณะ นอกจากนี้ พบว่า focal point อายุ และเส้นรอบวงอันทะ มีศักยภาพสำหรับใช้ในการสร้างสมการเพื่อทำนายคุณภาพน้ำเชื้อในบางลักษณะ ได้แก่ ร้อยละของอสุจิมีชีวิต อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ อย่างไรก็ตาม ความแม่นยำในการทำนายคุณภาพน้ำเชื้อดังกล่าวยังมีจำกัด (R squared, $R^2 \approx 0.28$ ถึง 0.35) ดังนั้น การใช้เทคนิคอัลตราซาวด์อันทะพ่อโคมีประโยชน์ในการประเมินรอยโรคและสามารถบ่งบอกถึงระดับความรุนแรงของรอยโรคที่เกิดขึ้นได้เบื้องต้น เพื่อเพิ่มความแม่นยำของการพยากรณ์คุณภาพน้ำเชื้อ จำเป็นต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมทั้งในส่วนของการเพิ่มขนาดตัวอย่าง รวมถึงเลือกใช้ตัวแปรทำนายอื่นๆ เพื่อสร้างสมการทำนายที่เหมาะสมมากยิ่งขึ้น ซึ่งจะทำให้สามารถนำไปใช้ในการประเมินสมรรถภาพระบบสืบพันธุ์ในโคเพศผู้ รวมถึงใช้ในการคัดโคพ่อพันธุ์ออกจากฝูงได้

คำสำคัญ: การประเมินระบบสืบพันธุ์เพศผู้, การทำนาย, พ่อโค, เทคนิคอัลตราซาวด์

เลขทะเบียนวิจัย: 63(1)-0208-099

^{1/}สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ อ.เมือง จ.ปทุมธานี

^{2/}ศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ลำพญากลาง ตำบลหนองรี อำเภอลำสนธิ จังหวัดลพบุรี

Ultrasonic technology for bull breeding soundness evaluation (BBSE)

Witsanu Paisanrungrana^{1/} Janyaporn Rungruangsak^{1/} Jullachat Chapanya^{2/}

Abstract

The aim of the study was to assess the correlation between breeding soundness using ultrasonography of the testes and semen quality in dairy bulls. Twenty-five Tropical Holstein sires at the age of 2 - 7 years from Lumphayaklang frozen semen production research center in Lopburi province, were used in this study. Semen was regularly collected weekly for six successive weeks, one-week interval. All bulls were measured for scrotal circumference, scrotal ultrasonography, and fresh semen quality such as volume, sperm concentration, sperm motility using computer-assisted sperm analysis (CASA), percentage of sperm abnormal morphology, and percentage of sperm viability. The correlation analysis was performed to analyze the correlation between scrotal circumference, age at measuring, semen quantity and quality as well as ultrasound evaluations. Moreover, multiple regression analysis was used to predict semen quality characteristics. The results showed that focal point, as a measure of fibrotic lesion in testis, had low to moderate negative correlations with semen quality including sperm concentration, percentage of sperm viability, percentage of sperm abnormal morphology, and sperm motility ($r = -0.19$ to -0.52 ; $p < 0.05$), but it had a low positive correlation with sperm abnormal morphology ($r = 0.21$; $p < 0.05$). Results from multiple regression analysis revealed significant negative impacts of focal point on most of semen quality characteristics. Focal point, combined with age of bulls and scrotal circumference were potentially useful in predicting some characteristics of semen including viability, motility, progressive motility, and integrity of plasma membrane. However, predictive ability of the regression models was limited (R squared, $R^2 \approx 0.28$ to 0.35). In conclusion, ultrasonography technology is a useful technique for bull breeding soundness evaluation (BBSE) due to its ability to detect and characterize testicular pathology, particularly testicular fibrosis. To increase prediction accuracy of models for predicting semen quality, further studies with larger sample size and other candidates for predictor variables are required, which would be eventually used for breeding soundness evaluation and culling decisions of bulls.

Keywords: Breeding soundness evaluation (BBSE), Prediction, Bull, Ultrasound technique

Registered No: 63(1)-0208-099

^{1/}Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Muang district, Pathum Thani province

^{2/}Lumphayaklang Frozen Semen Production and Research Center Lamsonthi Lopburi

คำนำ

ในแต่ละปี กรมปศุสัตว์ ต้องผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อให้บริการแก่เกษตรกรมากกว่า 500,000 โด๊ส (สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์, 2563) โดยเฉพาะโคนม ที่ได้พัฒนาปรับปรุงขึ้นมาภายใต้ชื่อพันธุ์ทรอปิคอล โฮลสไตน์ ซึ่งผ่านการทดสอบและคัดเลือกในหลายขั้นตอนกว่าจะมาเป็นพ่อพันธุ์ผสมเทียมที่ผ่านมาพ่อพันธุ์ส่วนใหญ่มีคุณภาพน้ำเชื้อดีสามารถรีดเก็บและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งได้ตามเกณฑ์ แต่ในบางครั้งมีการตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของน้ำเชื้อที่มีคุณภาพต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยหลายอย่างส่งผลกระทบต่อสมรรถภาพการสืบพันธุ์และการให้ผลผลิตน้ำเชื้อ โดยการเกิดสภาวะสูญเสียสภาพเหมาะสมต่อการสร้างอสุจิ โดยที่โคไม่แสดงอาการป่วย ดังนั้นการประเมินความรุนแรงของผลกระทบที่มีต่อระบบสืบพันธุ์ของโคได้ว่าสภาวะการณั้เกิดขึ้นเป็นการชั่วคราวหรือถาวร จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถปรับใช้ในการจัดการพ่อพันธุ์ผสมเทียมที่ดี การประเมินระบบสืบพันธุ์ในโคเพศผู้ (bull breeding soundness evaluation, BBSE) เป็นวิธีที่สามารถใช้ในการคัดเลือเบื้องต้นเพื่อบ่งชี้ประสิทธิภาพระบบสืบพันธุ์ของพ่อโคในการให้ผลผลิตน้ำเชื้อที่มีคุณภาพ เพื่อลดความสูญเสียทางเศรษฐกิจและใช้เป็นแนวทางการแก้ไขปัญหาทางระบบสืบพันธุ์ได้ ซึ่งโคที่ได้รับการประเมินระบบสืบพันธุ์เพศผู้จะพบปัญหาความไม่สมบูรณ์พันธุ์แบบไม่แสดงอาการ (subfertility) ประมาณร้อยละ 20-40 (Kastelic and Brito, 2012) ซึ่งการเก็บน้ำเชื้อด้วยวิธีการกระตุ้นการหลั่งด้วยไฟฟ้า (electro-ejaculation) เพื่อทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อเพียงอย่างเดียวไม่สามารถบ่งบอกถึงความไม่สมบูรณ์พันธุ์แบบไม่แสดงอาการได้ (Parkinson, 2004) การประเมินน้ำหนัของอัณฑะ โดยการวัดขนาดเส้นศูนย์กลางของอัณฑะ ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ BBSE (Barth et al., 2008) เป็นวิธีพื้นฐานที่ใช้ในการทำนายปริมาณอสุจิ (sperm output) (Gibson et al., 1985) แต่อย่างไรก็ตามการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางเพื่อประเมินขนาดอัณฑะนั้น ไม่สามารถใช้ทำนายรอยโรคที่เกิดขึ้นภายในอัณฑะ (pathology) หรือทำนายผลของรอยโรคภายในอัณฑะต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของโคเพศผู้ (Kastelic and Brito, 2012)

โคเพศผู้ที่มีปัญหาด้านความสมบูรณ์พันธุ์ ได้แก่ การผลิตและคุณภาพน้ำเชื้อ มักพบจากการทำ BBSE โดยสัตวแพทย์ ซึ่งหากยังพบเร็วก็สามารถทำการรักษาได้ไ้ โดยสัตวแพทย์จะดูจากประวัติการตรวจพื้นฐานทั่วไป และการตรวจประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ ซึ่งการใช้เทคนิคอัลตราซาวด์เป็นวิธีการที่ไม่เป็นอันตรายต่อตัวสัตว์ (noninvasive) และสามารถใช้ในการวิเคราะห์เนื้อเยื่อที่อัณฑะและบริเวณเอพิไดไมซิส (epididymis) รวมถึงสามารถบอกรอยโรคที่จำเพาะบริเวณเนื้อเยื่ออัณฑะของโคเพศผู้ได้ (Eilts and Pechman, 1988; Cartee et al., 1989; Yimer et al., 2001; Gloria et al., 2018) ซึ่งการพบรอยโรค (fibrosis lesion) ที่บริเวณอัณฑะมีความสัมพันธ์กับคุณภาพน้ำเชื้อโดยตรง (Arteaga et al., 2005) นอกจากนี้ Kastelic and Brito (2012) รายงานการใช้เทคนิคอัลตราซาวด์เนื้อเยื่อบริเวณอัณฑะในโคพบว่าความเข้มของภาพ (parenchymal pixel intensity, PI) มีความสัมพันธ์กับคุณภาพน้ำเชื้อ การใช้เทคนิคอัลตราซาวด์จึงเป็นเครื่องมือที่มีศักยภาพสูงในการบ่งชี้ถึงความผิดปกติที่เนื้อเยื่อบริเวณอัณฑะหรือระบบสืบพันธุ์และยังมีความปลอดภัยต่อผู้ปฏิบัติงานและตัวสัตว์ (Coulter and Bailey, 1988) ดังนั้น เทคนิคอัลตราซาวด์จึงเป็นวิธีที่มีศักยภาพสำหรับการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อบริเวณอัณฑะและการทำนายคุณภาพน้ำเชื้อ

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการประเมินสมรรถภาพระบบสืบพันธุ์ในโคเพศผู้ด้วยการใช้เทคนิคอัลตราซาวด์อันทะและคุณภาพน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคนม

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

พ่อพันธุ์โคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์ อายุ 2-7 ปี จำนวน 25 ตัว ของศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ลำพญากลาง จังหวัดลพบุรี ทำการประเมินอันทะด้วยเทคนิคอัลตราซาวด์และรีดเก็บน้ำเชื้อโดยใช้ช่องคลอดเทียม เพื่อประเมินคุณลักษณะของน้ำเชื้อสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ติดต่อกัน

การตรวจประเมินอันทะด้วยเทคนิคอัลตราซาวด์

นำพ่อพันธุ์เข้าสู่ช่องบังคับเพื่ออาบน้ำและทำความสะอาดบริเวณอันทะและเช็ดให้แห้ง ใช้เจลอัลตราซาวด์ทาบริเวณอันทะ ตั้งค่าเครื่องอัลตราซาวด์เป็นโหมด B (B-mode) ความถี่ 7.5 MHz (Honda electronic; HS1600V) วางโพรบให้แนบกับอันทะ บันทึกภาพถ่ายทั้งทิศทางแนวยาว (longitudinal plane) และทิศทางแนวนอน (horizontal plane) โดยบันทึกภาพตำแหน่งละ 3 ภาพ จากนั้นนำไปวิเคราะห์ความเข้มของภาพ (PI) ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ความเข้มของภาพ (Image J, U. S. National Institutes of Health, MD, USA) ตามวิธีการของ Tomlinson et al. (2017) โดย PI บริเวณอันทะจะถูกวัดโดยการวาดวงกลมหกลจุด เส้นผ่านศูนย์กลางจุดละ 10 มิลลิเมตร วิเคราะห์ค่าเฉลี่ย PI (PI total) ของภาพแต่ละตำแหน่ง จากภาพถ่ายทิศทางแนวยาว (PI vertical) และแนวนอน (PI horizontal)

คำนวณค่าคะแนนรอยโรค (focal point) ซึ่งเป็นค่าคะแนนรอยโรคจากการวัดขนาดของรอยโรคบริเวณอันทะจากภาพถ่ายอัลตราซาวด์ (fibrosis lesion) ที่เกิดขึ้นบริเวณรอยโรคในภาพและกำหนดเป็นคะแนนตามขนาดของรอยโรค (Table 1) ค่า focal point คำนวณได้จากผลรวมของคะแนนจากจุดรอยโรคที่ปรากฏทั้งหมดในภาพ

Table 1 Scoring of testicular fibrosis lesion (modified from Barth et al., 2008)

Point	Criteria
1	fibrosis lesion size ≤ 2 mm
2	fibrosis lesion size $>2 - 5$ mm
3	fibrosis lesion size $>5 - 10$ mm
4	fibrosis lesion size >10 mm

การบันทึกข้อมูล

1) เส้นรอบวงอณฑะ (scrotal circumference, cm.) วัดด้วยสายเทปวัดเส้นรอบวงลูกอณฑะ โดยวัดรอบอณฑะทั้งข้างซ้ายและขวาบริเวณส่วนรอบที่กว้างที่สุด ขณะที่โคยืนในท่าที่อณฑะอยู่ในแนวตั้งฉากกับพื้นราบ

2) ปริมาตร (volume, mL.) วัดปริมาณน้ำเชื้อจากระดับที่ระบุปริมาตรบนหลอดทดลอง ด้วยสายตา

3) ความเข้มข้นของอสุจิ (sperm concentration, $\times 10^6$ cell/mL.) วัดด้วยเครื่อง spectrophotometer (Accucell photometer, IMV technologies, France)

4) จำนวนอสุจิที่รีดเก็บได้ทั้งหมด (total sperm, $\times 10^6$ cell) คำนวณจากผลคูณของปริมาตรและความเข้มข้นของอสุจิ

5) อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (motility and progressive motility, %) วัดด้วยเครื่องวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ (computer-assisted sperm analysis: CASA) (The IVOS II CASA system driven by software version 14: Hamilton Thorne Inc., Beverly, USA.)

6) อสุจิมีชีวิต (sperm viability, %) ประเมินจากการย้อมสี eosin-nigrosin (Dott and Foster, 1972) โดยการนำน้ำเชื้อสดปริมาณ 50 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อม eosin-nigrosin จากนั้นนำน้ำเชื้อที่ผสมกับสีย้อมแล้ว ปริมาณ 7 μ L สเมียร์ลงบนกระจกสไลด์และทิ้งให้แห้ง อสุจิมีชีวิตจะถูกนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบไม่ตัดแสง (Nikon, Japan) นับอสุจิจำนวน 200 ตัว ที่กำลังขยาย 400 เท่า (400X) โดยอสุจิที่ไม่ติดสี นับเป็นอสุจิมีชีวิต และอสุจิที่ติดสีม่วงแดงนับเป็นอสุจิที่ตายแล้ว คำนวณร้อยละอสุจิมีชีวิตโดยนำจำนวนอสุจิที่ไม่ติดสีที่นับได้ คูณด้วย 100 แล้วหารด้วย 200

$$\text{ร้อยละอสุจิมีชีวิต} = \frac{\text{อสุจิที่ไม่ติดสี} \times 100}{200}$$

7) ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ (functional integrity of sperm plasma membrane) ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิวัดโดยใช้ Hypo-osmotic swelling test (HOS test) ตามวิธีของ Rota et al. (2000) ทำโดยการผสมน้ำเชื้อปริมาณ 0.1 mL กับน้ำยา HOS solution ปริมาณ 1 mL ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ 40 นาที จากนั้นนำส่วนผสม 0.5 mL ผสมกับ HOS solution ที่ใส่ 5% formalin เข้มข้น จากนั้นนำส่วนผสมดังกล่าวมา 7 μ L หยดลงบนกระจกสไลด์ ปิดทับด้วยแผ่นกระจกบาง และตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง กำลังขยาย 1000 เท่า (1000X) นับจำนวนอสุจิ 200 ตัว ตัวอสุจิที่ให้ผลบวกทางหางจะม้วนงอ ตัวอสุจิที่นับเป็นอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อยู่ คำนวณร้อยละความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ โดยนำจำนวนอสุจิหางจะม้วนงอที่นับได้ คูณด้วย 100 แล้วหารด้วย 200

$$\text{ร้อยละความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ} = \frac{\text{อสุจิที่ม้วนงอ} \times 100}{200}$$

8) อสุจิผิดปกติ (sperm defects) ใช้วิธีการย้อมสีแบบ William's staining ตามวิธีการของ Williams และดัดแปลงด้วยวิธีของ Lagerlof (Kavak et al., 2004). ทำโดยการหยดน้ำเชื้อปริมาณ 20 μ l. ลงบนแผ่นกระจกสไลด์แล้วเสมียร์ บางๆ ทิ้งให้แห้ง และนำไปสไลด์ด้วยเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์จากนั้นแช่สไลด์ใน absolute ethyl alcohol 3-4 นาที และแช่ใน 0.5% chloramines solution 1-2 นาที จนกว่าฝ้าหรือ mucus บนสไลด์หมดไป ล้างในน้ำสะอาดและใน 96% ethyl alcohol จากนั้นย้อมด้วยสี Carbon fuchsin-eosin 2-10 นาที ล้างในน้ำสะอาดและซับให้แห้ง จากนั้นตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ light microscope กำลังขยาย 1000 เท่า (1000X) และทำการตรวจรูปร่างของอสุจิในส่วนหัวที่มีการย้อมสี โดยนับอสุจิจำนวน 200 ตัว คำนวณร้อยละอสุจิผิดปกติ โดยนำจำนวนอสุจิที่ผิดปกติที่ส่วนหัวที่นับได้ คูณด้วย 100 แล้วหารด้วย 200

$$\text{ร้อยละอสุจิผิดปกติ} = \frac{\text{อสุจิที่ผิดปกติที่ส่วนหัว} \times 100}{200}$$

ข้อมูลที่บันทึกถูกตรวจสอบความถูกต้อง และตัดข้อมูลที่มีค่าผิดปกติ (outliers) ออกจากไฟล์ข้อมูล ก่อนการวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางกายภาพของพ่อพันธุ์ ได้แก่ อายุของพ่อพันธุ์ ณ วันที่เก็บตัวอย่าง เส้นรอบวงอวัยวะ และคุณลักษณะของน้ำเชื้อสดทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ และสร้างแบบจำลองสมการถดถอยพหุคูณ (Multiple Regression Model) เพื่อทำนายคุณภาพน้ำเชื้อโดยใช้ลักษณะทางกายภาพของพ่อพันธุ์ ได้แก่ อายุของพ่อพันธุ์ เส้นรอบวงอวัยวะ และค่าที่ประเมินได้จากเทคนิคอัลตราซาวด์ (focal point และ PI) การวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณเป็นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรอิสระหลายตัวกับตัวแปรตาม เพื่อศึกษาว่ามีตัวแปรอิสระตัวใดบ้างที่ร่วมกันทำนายหรือพยากรณ์ หรืออธิบายการผันแปรของตัวแปรตามได้ โดยเขียนความสัมพันธ์ในรูปแบบของสมการได้ดังนี้

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon,$$

เมื่อ

Y คือ ค่าของตัวแปรตาม

X_i คือ ค่าของตัวแปรอิสระที่ i ($i = 1, \dots, k$), โดย k คือ จำนวนตัวแปรอิสระ

β_0 คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient) ของจุดตัดแกน Y (intercept)

β_i คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของตัวแปรอิสระ X_i

ε คือ ค่าความคลาดเคลื่อน (error or residual)

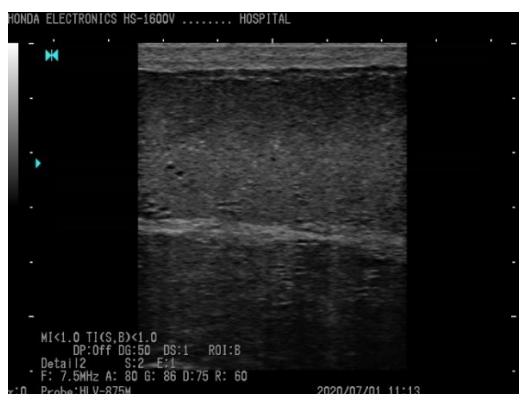
ใช้เทคนิค Stepwise ในการเลือกตัวแปรอิสระในการสร้างสมการถดถอย สำหรับลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อแต่ละลักษณะ รายงานโมเดลของสมการถดถอยที่ให้ประสิทธิภาพโมเดลสูงที่สุด (model performance) โดยพิจารณาจากค่า overall p-value, overall F statistics, R squared (R^2), adjusted R squared (adj. R^2) และ Bayesian information criteria (BIC) นอกจากนี้ ได้ใช้การประเมิน

ภาวะร่วมเส้นตรงหลายตัวแปรของแบบจำลอง (multicollinearity) โดยดูจากค่า Tolerance ($\text{Tolerance} = 1 - R^2$) ซึ่งบ่งบอกถึงระดับความสัมพันธ์กันของตัวแปรอิสระ หากค่า Tolerance มีค่าน้อยกว่า 0.1 บ่งบอกว่ามีปัญหา multicollinearity ขั้นรุนแรง หากค่า Tolerance มีค่าน้อยกว่า 0.2 แสดงว่ามีปัญหา ระดับมาก (Brace et al., 2012; Weisburd and Britt, 2014) การวิเคราะห์ทางสถิติกำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับร้อยละ 95 ($p < 0.05$) ใช้โปรแกรม R commander version 3.5.2 (R Core Team, 2018) ในการวิเคราะห์สหสัมพันธ์และการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณ

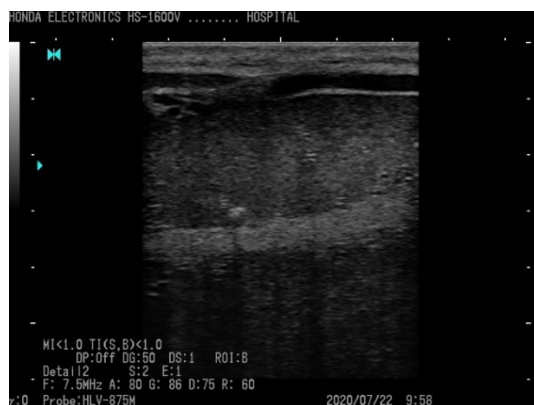
ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การตรวจประเมินอันตรายด้วยเทคนิคอัลตราซาวด์

การใช้เทคนิคอัลตราซาวด์ที่บริเวณอัณฑะ เพื่อประเมินความสมบูรณ์ของระบบสืบพันธุ์เพศผู้ ที่ส่งผลกระทบต่อคุณลักษณะของน้ำเชื้อ ด้วยอัลตราซาวด์โหมด B (B-mode) ความถี่ 7.5 MHz บันทึกภาพถ่ายทั้งทิศทางแนวนอนและขวาง ทำการวิเคราะห์ความเข้มของภาพออกมาเป็นค่า PI vertical และ PI horizontal ร่วมกับการวัดขนาดของจุดที่เกิดขึ้นบริเวณรอยโรคและแปลงค่าเป็นคะแนน focal point เพื่อจำแนกลักษณะการเกิด fibrosis lesion ตามวิธีของ Barth et al. (2008) ซึ่งแบ่งลักษณะการเกิดรอยโรค ออกเป็น 5 กลุ่ม —ผลจากการประเมินพ่อพันธุ์โคทั้งหมด 25 ตัว พบลักษณะการเกิดรอยโรค 3 แบบ คือรอยโรคเล็กน้อย (mild) จำนวน 18 ตัว ปานกลาง (moderate) จำนวน 6 ตัว และรุนแรง (severe) จำนวน 1 ตัว (Figure 1) แต่ไม่พบโคที่อัณฑะปกติไม่มีรอยโรค (normal) และรอยโรคที่มีลักษณะรุนแรงมาก (very severe) การศึกษาเกี่ยวกับการอัลตราซาวด์อัณฑะในสัตว์หลายชนิด รวมถึงสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก เช่น แกะ พบว่าค่า PI มีความสัมพันธ์กับลักษณะของเซลล์ของ seminiferous tubules (Powe et al., 1988 ; Evans et al., 1996) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการสร้างอสุจิโดยตรง (Arteaga et al., 2005)



Mild fibrotic changes (score 2)



Moderate fibrotic change (score 3)



Severe fibrotic change (score 4)

Figure 1 Fibrosis score of bulls evaluated based on Barth et al. (2008)'s method

การศึกษาในครั้งนี้ใช้การประเมินอวัยวะด้วยเทคนิคอัลตราซาวด์ต่อเนื่อง 6 สัปดาห์ติดต่อกัน เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงลักษณะการเกิด fibrosis ในอวัยวะ และแบ่งลักษณะรอยโรคตามความรุนแรงของการเกิด fibrosis ซึ่งการประเมินจาก grey scale จากภาพอัลตราซาวด์นั้นสามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ต่างๆ ในอวัยวะได้อย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว (Chandolia et al., 1997) พ่อพันธุ์โคนมที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้เป็นพ่อพันธุ์ที่ยังใช้งานผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งในปัจจุบัน (active sires) ซึ่งสามารถผลิตน้ำเชื้อได้ดีตามปกติทั้งคุณภาพและปริมาณ อย่างไรก็ตาม การตรวจพบลักษณะรอยโรคที่บริเวณอวัยวะ ในระดับน้อยถึงรุนแรง (mild to severe fibrosis) บ่งบอกว่า การประเมินอวัยวะด้วยเทคนิคอัลตราซาวด์สามารถใช้สำหรับประเมินความสมบูรณ์ของพ่อพันธุ์โคเพื่อนำไปสู่การรักษาและป้องกันปัญหาด้านความไม่สมบูรณ์พันธุ์ของพ่อพันธุ์โคที่ใช้ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งได้อย่างทันท่วงที

แม้ว่าการใช้เทคนิคอัลตราซาวด์ในการประเมินอวัยวะจะมีประโยชน์ในการตรวจหารอยโรคที่เนื้อเยื่ออวัยวะของพ่อพันธุ์โคที่ยังสามารถให้ผลผลิตน้ำเชื้อได้ตามปกติ อย่างไรก็ตาม การแบ่งคะแนนของรอยโรคไม่ได้มีการวัดหรือการแบ่งกลุ่มที่ชัดเจน เป็นการตัดสินคะแนนโดยใช้เกณฑ์จากผู้ประเมิน ซึ่งอาจทำให้ผู้ที่ไม่มีความชำนาญ ไม่สามารถแบ่งลักษณะรอยโรคได้อย่างถูกต้อง ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาวิธีการคำนวณคะแนนรอยโรคอย่างละเอียด (focal point) โดยดัดแปลงจากวิธีของ Barth et al. (2008) ซึ่งสามารถช่วยเพิ่มความแม่นยำในการวัดรอยโรคจากการใช้เทคนิคอัลตราซาวด์ และสามารถนำไปใช้ในการหาความสัมพันธ์กับคุณภาพของน้ำเชื้อต่อไป

2. ข้อมูลสถิติเชิงพรรณนา

Table 2 แสดงค่าสถิติเชิงพรรณนาของลักษณะทางกายภาพพ่อโค ปริมาณและคุณภาพน้ำเชื้อ และค่า pixel intensity และ focal point จากภาพถ่ายด้วยเทคนิคอัลตราซาวด์บริเวณอวัยวะของพ่อโคนม โดยพ่อโคที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้มีค่าเฉลี่ยของอายุ ประมาณ 4.3 ปี (2.4 – 7.6 ปี) ส่วนเส้นรอบวงอวัยวะ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 38.4 cm. (32 ถึง 48.5 cm.) โดยพบว่าพ่อพันธุ์ที่อายุน้อย จะมีเส้นรอบวงอวัยวะน้อยกว่า พ่อพันธุ์อายุมากกว่า สำหรับคุณลักษณะของน้ำเชื้อสดในด้านปริมาณ (ปริมาตร ความเข้มข้นของอสุจิ และจำนวนอสุจิที่ติดเก็บได้ทั้งหมด) และด้านคุณภาพ (ร้อยละของอสุจิมีชีวิต ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ อสุจิผิดปกติ อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า) โดยภาพรวมพบว่ามีค่าอยู่ในช่วงมาตรฐานของพ่อพันธุ์ที่สามารถนำไปผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งได้ (รพีพรรณ, 2552) ซึ่งเป็นสิ่งที่คาดการณ์ไว้แล้ว เนื่องจากพ่อพันธุ์โคที่เหล่านี้นี้เป็นพ่อพันธุ์ที่ใช้ในการรีดน้ำเชื้อเพื่อผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งในปัจจุบัน

สำหรับค่าที่ประเมินได้จากเทคนิคอัลตราซาวด์บริเวณอวัยวะ พบว่าค่าความเข้มของภาพที่ได้จาก ค่าเฉลี่ยของภาพถ่ายทิศทางแนวตั้งและแนวขวาง (PI total) มีค่าเฉลี่ยประมาณ 414.5 intensity/mm² (294.6 ถึง 537.7 intensity/mm²) ส่วนคะแนนรอยโรค (focal point) มีค่าเฉลี่ยประมาณ 97.8 (70 ถึง 132) (Table 2) ทั้งนี้ไม่พบการศึกษารอยโรคที่อวัยวะ แบบที่มีการทดแทนรอยโรคด้วยคะแนน (focal point) โดยการศึกษาส่วนมากจะเป็นการศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่าง ค่า PI และ ลักษณะเชิงกายภาพ เช่น อายุ หรือ คุณภาพน้ำเชื้อเท่านั้น

Table 2 Summary descriptions of range of bull physical characteristics, semen quality and quality, and testicular ultrasound evaluation of bulls (n = 25)

Parameter ¹	Mean ± SD	Min	Max
Physical characteristics			
Age of bull (years)	4.32 ± 1.56	2.43	7.60
Scrotal circumference (cm.)	38.41 ± 5.09	32.00	48.50
Semen quantity			
Volume (ml.)	5.13 ± 2.31	1.50	13.00
Concentrations (x10 ⁶ /ml.)	1057.23 ± 523.48	60.00	2533.00
Total sperm (cell/ml)	5030.44 ± 2914.06	496.00	14880.00
Semen quality			
Viability (%)	74.47 ± 16.76	8.00	93.50
Plasma membrane integrity (%)	75.93 ± 17.17	4.5	96.00
Sperm defects (%)	10.19 ± 9.63	2.50	57.50
Total motility (%)	69.28 ± 18.17	6.00	91.00
Progressive motility (%)	43.74 ± 13.88	3.00	68.00

Ultrasound evaluation

PI vertical (intensity/mm ²)	419.89 ± 53.49	266.67	589.33
PI horizontal (intensity/mm ²)	409.01 ± 58.98	289.75	611.75
PI total (intensity/mm ²) ²	414.45 ± 47.76	294.58	537.66
Focal point	97.81 ± 13.29	70.00	132.00

¹ Each bull was evaluated for their semen quantity and quality as well as ultrasound observations for 6 times, 6 weeks in a row

² PI total = average of pixel intensities assessed from vertical and horizontal

3. สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางกายภาพ และคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อโค

จาก Table 3 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง PI และ focal point ต่อคุณลักษณะของพ่อพันธุ์ ปริมาณน้ำเชื้อ และคุณภาพน้ำเชื้อ โดยพบว่า อายุของพ่อพันธุ์และเส้นรอบวงอณฑะมีความสัมพันธ์ในเชิงบวก แต่อยู่ในระดับปานกลาง ($r = 0.501$, $p < 0.0001$) โดยจากข้อมูลพบว่าเมื่ออายุเพิ่มมากขึ้นมีแนวโน้มที่เส้นรอบวงอณฑะจะเพิ่มขึ้นตาม (คล้ายกันกับกรณีอายุน้อยลง เส้นรอบวงอณฑะจะลดลง) และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างเส้นรอบวงอณฑะและค่าที่ประเมินได้จากเทคนิคอัลตราซาวด์ (PI และ focal point) อย่างไรก็ตาม พบว่าเส้นรอบวงอณฑะมีความสัมพันธ์ในระดับต่ำกับลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อทั้งเชิงปริมาณ (ปริมาตร $r = 0.21$, ความเข้มข้นของอสุจิ $r = -0.22$) และเชิงคุณภาพทุกลักษณะยกเว้นร้อยละอสุจิผิดปกติ ($r \approx -0.20$ ถึง -0.21 ; $p < 0.05$)

ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะทางกายภาพ และคุณภาพน้ำเชื้อในโค มีความผันแปรแตกต่างกันบ้างแล้วแต่การศึกษา โดยส่วนใหญ่แล้ว เส้นรอบวงอณฑะมีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาตรและความเข้มข้นของอสุจิ (Bhuminand et al., 2008; Ahmad et al., 2011) และอายุโค (Ahmad et al., 2011) ยกตัวอย่างเช่น Latif et al. (2011) รายงานว่าเส้นรอบวงอณฑะมีความสัมพันธ์ในระดับสูงกับปริมาตร ($r = 0.72$) และความเข้มข้นของอสุจิ ($r = 0.72$) ในโคเนื้อพันธุ์พื้นเมือง อายุ 15-20 เดือน Bhuminand et al. (2008) ศึกษาในโคนมและพบความสัมพันธ์ในเชิงบวกระหว่างเส้นรอบวงอณฑะ กับปริมาตร ความเข้มข้นของอสุจิ รวมถึงปริมาณฮอร์โมน testosterone นอกจากนี้ การศึกษาในโคพันธุ์ชาฮิวาลจำนวน 128 ตัว โดย Ahmad et al. (2011) พบว่า น้ำหนักตัว เส้นรอบวงอณฑะ ค่า PI รวมถึงปริมาตร และความเข้มข้นของอสุจิเพิ่มขึ้นตามอายุ แต่คุณภาพน้ำเชื้อ ได้แก่ อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ และความสมบูรณ์ของอะโครโซมไม่มีความสัมพันธ์กับอายุของโค สำหรับผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ซึ่งพบความสัมพันธ์ในเชิงลบในระดับต่ำระหว่างเส้นรอบวงอณฑะโคกับคุณภาพน้ำเชื้อ (ความเข้มข้นของอสุจिर้อยละอสุจิมีชีวิต ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ) (Table 3) อาจมีเหตุผลมาจากการที่พ่อโคมีอายุมากขึ้น ซึ่งมีแนวโน้มที่ความยาวเส้นรอบวงอณฑะจะมากขึ้นและอาจถูกใช้งานเพื่อผลิตน้ำเชื้อมาก่อนช้านาน ส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อลดลงได้ ส่วนพ่อพันธุ์โคที่อายุน้อย (ความยาวเส้นรอบวงอณฑะน้อยกว่า) อาจถูกใช้งานมาไม่นาน น้ำเชื้อที่ผลิตได้จึงยังคงคุณภาพดีกว่าโคที่ถูกใช้งาน

มานานกว่า (อายุมากกว่า) อย่างไรก็ตาม ข้อคิดเห็นนี้มีข้อยกเว้นในกรณีที่โคได้รับความเสียหายที่บริเวณอวัยวะจากสาเหตุทางกายภาพหรือโรคในระบบสืบพันธุ์ โดยไม่คำนึงถึงอายุของโค ซึ่งจะทำให้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างอายุและคุณภาพน้ำเชื้อ หรืออาจมีความสัมพันธ์ในระดับต่ำ ดังเช่นที่พบจากการศึกษาในครั้งนี้ ทั้งนี้ อาจทำการเก็บข้อมูลเชิงลึกเพิ่มเติมเพื่อค้นหาสาเหตุที่เกี่ยวข้องในประเด็นนี้ เช่น ปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน หรือ ข้อมูลอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการรีดน้ำเชื้อ รวมทั้งเพิ่มขนาดตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาด้วย

ในส่วน of ค่าที่ประเมินได้จากเทคนิคอัลตราซาวด์บริเวณอวัยวะ พบว่า PI มีความสัมพันธ์เชิงบวกในระดับต่ำกับอายุของพ่อพันธุ์ ($r = 0.18$; $p < 0.05$) แต่ไม่พบความสัมพันธ์กับคุณลักษณะของพ่อพันธุ์ และลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อทั้งเชิงปริมาณและคุณภาพ ซึ่งผลการศึกษาเป็นไปในทิศทางเดียวกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ โดย Arteaga et al. (2005) พบว่า PI ไม่มีความสัมพันธ์กับลักษณะภาพที่ได้จากอัลตราซาวด์ (normal testicular ultrasonogram appearance) และคุณภาพน้ำเชื้อในโคเนื้อจำนวน 16 ตัว Tomlinson et al. (2017) รายงานว่าไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่า PI กับ คุณภาพน้ำเชื้อโค อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาในครั้งนี้แตกต่างจากการศึกษาอื่นๆ ที่พบความสัมพันธ์ระหว่าง PI กับคุณภาพน้ำเชื้อ (Arteaga et al., 2005; Brito et al., 2012; Kastelic et al., 2012) การศึกษาในโคเนื้อจำนวน 152 ตัวโดย Brito et al. (2012) ได้รายงานว่าคุณค่า echogenicity (ค่า PI) มีความสัมพันธ์กับการสร้างอสุจิ (sperm production) และรูปร่างของอสุจิ (sperm morphology) ในโคเนื้อจำนวน 152 ตัว ทั้งนี้พบความสัมพันธ์ที่ไม่ค่อยสม่ำเสมอในแต่ละกลุ่มทดลอง

Brito et al. (2012) ได้อธิบายว่า การศึกษาอื่นที่ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างค่า PI กับ คุณภาพน้ำเชื้อโค อาจเนื่องมาจากใช้การเปรียบเทียบข้อมูลเพียงช่วงเวลาเดียวกันกับการเก็บน้ำเชื้อโดยไม่เก็บข้อมูลต่อเนื่อง ทั้งนี้ เนื้อเยื่อของ seminiferous มักมีการเปลี่ยนแปลงหลังจากมีการเก็บภาพอัลตราซาวด์ 4-6 สัปดาห์จึงจะส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อได้ เช่นเดียวกับการทดลองโดยใช้ฉนวนหุ้มบริเวณอวัยวะ จะพบความสัมพันธ์ระหว่างระหว่างค่า PI และคุณภาพน้ำเชื้อหลังจากนั้น 2-4 สัปดาห์ (Arteaga et al., 2005) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Brito et al. (2012) ที่หาความสัมพันธ์ระหว่างค่า PI และคุณภาพน้ำเชื้อหลังจากนั้น 4-8 สัปดาห์ แต่อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ที่ได้ค่อนข้างต่ำ แต่พบว่า PI เป็นตัวบ่งบอกระยะเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ได้ดีกว่าการใช้เพื่อประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของค่า testicular echogenicity หรือค่า PI มีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงของ Sertoli cells และการเพิ่มขึ้นของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ seminiferous tubule

การศึกษาในครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างอายุและ PI ซึ่งแตกต่างจากผลจากการศึกษาในสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่น การศึกษาในแกะที่พบความสัมพันธ์ในเชิงบวกระหว่างค่า PI ของอวัยวะกับอายุ (Juca et al., 2011) ส่วนการศึกษาของ Andrade et al. (2011), Cartee et al. (1990) และ Moura et al. (2008) ซึ่งใช้เทคนิคอัลตราซาวด์ในแกะพบว่า echogenicity ของอวัยวะเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับอายุของแกะที่

เพิ่มขึ้น เนื่องจากโดยปกติแล้ว สัตว์พ่อพันธุ์ที่มีอายุมากขึ้นจะพบความเสื่อมที่บริเวณอัณฑะ ซึ่งอาจเนื่องมาจากเนื้ออัณฑะ (testicular parenchyma) ของพ่อพันธุ์มีความหนาแน่นเพิ่มขึ้นตามอายุ เป็นที่น่าสังเกตว่า แม้ว่าผลการศึกษาในครั้งนี้จะไม่พบความสัมพันธ์ระหว่าง PI ลักษณะทางกายภาพ (อายุ และเส้นรอบวงอัณฑะ) และคุณภาพน้ำเชื้อ ($p>0.05$) แต่พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) มีแนวโน้มที่จะมีทิศทางเดียวกันกับการศึกษาอื่นๆ การเพิ่มขนาดตัวอย่างในการศึกษาอาจจะช่วยให้สามารถตรวจสอบพบความสัมพันธ์ในระดับที่มีนัยสำคัญได้ ในทางตรงกันข้ามกับค่า PI พบว่าค่า focal point มีความสัมพันธ์กับลักษณะปริมาณและคุณภาพน้ำเชื้อหลายลักษณะ (Table 3) โดย focal point มีความสัมพันธ์เชิงลบในระดับต่ำกับความเข้มข้นของอสุจิ และอสุจิที่ผลิตได้ ($r \approx -0.19$; $p<0.05$) แต่พบว่า ลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อ (ร้อยละอสุจิมีชีวิต ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ) ส่วนใหญ่แล้วมีความสัมพันธ์เชิงลบในระดับปานกลางกับ focal point ($r = -0.43$ ถึง -0.51 ; $p<0.0001$) ส่วนร้อยละอสุจิผิดปกติ นั้น มีความสัมพันธ์เชิงบวกในระดับต่ำกับค่า focal point ($r = 0.21$) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาหาความสัมพันธ์โดยใช้คะแนนรอยโรคกับคุณภาพน้ำเชื้อของ Barth et al. (2008) จากผลการศึกษา สามารถบ่งชี้ได้ว่าหากค่า focal point เพิ่มขึ้น จะส่งผลให้ปริมาณและคุณภาพน้ำเชื้อโดยรวมแย่ลง แต่ความสัมพันธ์ที่พบอยู่ในระดับต่ำ ถึง ระดับกลาง ดังนั้น จะเห็นได้ว่าค่าคะแนนรอยโรค หรือ focal point สามารถใช้เป็นตัวแทนลักษณะการเกิด fibrosis ที่บริเวณอัณฑะ สำหรับใช้ในการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดรอยโรคและคุณภาพน้ำเชื้อ รวมถึงมีศักยภาพในการเป็นตัวแปรทำนาย (predictor) เพื่อทำนายคุณภาพน้ำเชื้อทั้งในเชิงปริมาณและเชิงคุณภาพต่อไป

Table 3 Correlation coefficients (r) between bull's physical characteristics, ultrasound evaluation and semen characteristics

Item	Age		SC ¹		Pixel intensity ²		Focal point	
	R	p-value	r	p-value	r	p-value	r	p-value
Physical characteristics								
Age (years)	-	-	0.501	<0.0001	0.178	0.031	0.116	0.163
Scrotal circumference (cm)	0.501	<0.0001	-	-	0.118	0.155	0.003	0.975
Semen quantity								
Volume (ml.)	0.208	0.011	0.205	0.013	0.137	0.099	0.057	0.490
Concentration (sperm $\times 10^6$ cells)	-0.164	0.047	-0.224	0.006	-0.265	0.791	-0.193	0.019
Total sperm (cells/ml)	0.003	0.972	-0.051	0.538	0.135	0.103	-0.185	0.024
Semen quality								
Viability (%)	-0.346	<0.0001	-0.201	0.015	-0.048	0.562	-0.516	<0.0001
Plasma	-0.309	<0.001	-0.199	0.016	-0.004	0.964	-0.483	<0.0001

membrane								
integrity (%)								
Sperm defect (%)	0.055	0.507	0.002	0.975	-0.051	0.537	0.209	0.01087
Total motility (%)	-0.317	<0.0001	-0.214	0.009	-0.041	0.624	-0.489	<0.0001
Progressive	-0.353	<0.0001	-0.211	0.011	-0.130	0.115	-0.433	<0.0001
Motility (%)								

¹ Scrotal circumference (cm.)

² Pixel intensity (PI) based on the average of PI assessed from vertical and horizontal planes of testis

4. สมการทำนายอัตราการเคลื่อนที่ของสpermatozoa จากรอยโรคของอัณฑะ

จากการวิเคราะห์สมการถดถอยพหุคูณ เพื่อสร้างสมการทำนายคุณภาพน้ำเชื้อโดยใช้ลักษณะทางกายภาพของอัณฑะ ได้แก่ อายุของพ่อพันธุ์ และ เส้นรอบวงอัณฑะของพ่อพันธุ์ และค่าที่ได้จากการวัดโดยใช้เทคนิคอัลตราซาวด์ ได้แก่ คะแนนรอยโรค (focal point) และ pixel intensity สมการทำนายสำหรับทุกลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อที่นำเสนอ เป็นสมการที่ให้ค่าประสิทธิภาพของโมเดลดีที่สุด ไม่พบปัญหา multicollinearity ระหว่างตัวแปรอิสระในโมเดล (ค่า Tolerance มากกว่า 0.65) และทุกสมการทำนายมีนัยสำคัญทางสถิติ (overall model p-value <0.05) (Tables 4 – 11)

นอกจากการรายงานผลสมการทำนายในรูปแบบปกติ (รายงานค่า regression coefficients) ยังได้รายงานสมการทำนายในรูปแบบของสัมประสิทธิ์การถดถอยมาตรฐาน (Standardized coefficients or Beta) ซึ่งการทำ Standardized coefficients ของแต่ละตัวแปร เป็นหนึ่งในวิธีการที่ใช้บ่อยสำหรับการเปรียบเทียบความสำคัญหรือระดับของอิทธิพลของตัวแปรในการทำนายตัวแปรตามในการวิเคราะห์การถดถอย (importance of independent variables or X's in determining Y) โดยมีการปรับหน่วยของตัวแปรทำนายให้มีหน่วยเดียวกัน คือ standard deviation (SD) ช่วยในการเปรียบเทียบค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยระหว่างตัวแปรต้นในสมการได้ง่ายยิ่งขึ้น โดยที่ไม่ทำให้ระดับนัยสำคัญทางสถิติของตัวแปรทำนายเปลี่ยนแปลง (Bring, 1994) ค่า Standardized coefficients บ่งบอกถึง การเปลี่ยนแปลงตัวแปรตาม (Y) ในหน่วย SD เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงตัวแปรทำนาย (X) 1 SD ซึ่งแตกต่างจากการแปรผลค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยตามปกติที่ใช้หน่วยจริงของตัวแปรนั้นๆ

การทำนายปริมาณน้ำเชื้อ

สมการทำนายปริมาณน้ำเชื้อที่ได้จากการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ Stepwise มีเพียงอายุของพ่อพันธุ์ (Age) เท่านั้นที่มีผลต่อปริมาณน้ำเชื้ออย่างมีนัยสำคัญ (Table 4) โดยอายุของพ่อพันธุ์ที่เพิ่มขึ้น 1 ปี ส่งผลให้ปริมาณน้ำเชื้อเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ย 0.317 ml. สามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปแบบคะแนนดิบได้ดังต่อไปนี้

$$\text{ปริมาณน้ำเชื้อ} = 3.748 + (0.317 \times \text{Age})$$

และสามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนมาตรฐาน (Standardized coefficients หรือ Beta) ได้ดังต่อไปนี้

$$Z_{\text{ปริมาณน้ำเชื้อ}} = 0.213 \times (Z_{\text{Age of Bull}})$$

พบว่าสมการทำนายที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจค่อนข้างต่ำ ($R^2 \approx 0.045$) แสดงให้เห็นว่าสมการทำนายดังกล่าวสามารถอธิบายความผันแปร หรือการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำเชื้อได้ค่อนข้างต่ำ หรือกล่าวอีกนัยหนึ่ง สมการมีความแม่นยำไม่มากเพียงพอในการทำนาย ซึ่งโดยปกติแล้วค่า R^2 (มีค่า 0 ถึง 1) ของโมเดลที่สูงบ่งบอกถึงความแม่นยำในการทำนายที่สูง โดยทั่วไป ค่า R^2 มากกว่า 0.70 ถือว่าอยู่ในระดับสูง ค่า R^2 ระหว่าง 0.5 และ 0.7 ค่า ถือว่าอยู่ในระดับปานกลาง ค่า R^2 ระหว่าง 0.3 และ 0.5 ถือว่าอยู่ในระดับต่ำ ส่วนค่า R^2 น้อยกว่า 0.30 จัดว่าอยู่ในระดับค่อนข้างต่ำ (Henseler et al., 2009; Moore et al., 2013) โดยค่า R^2 ที่ยอมรับได้ไม่ควรต่ำกว่า 0.25 แต่ทั้งนี้ ก็ยังขึ้นอยู่กับศาสตร์ หรือสาขาวิชาแต่ละแขนงด้วย (Garson, 2016)

Table 4 Regression analysis of semen volume

Independent variable	b ¹	Beta ²	t-value	p-value
Intercept	3.748	-	6.74	<0.0001
Age of bull	0.317	0.213	2.61	0.010
R=0.213; R ² =0.045; F=6.81; p-value = 0.010				

¹ Regression coefficients

² Standardized coefficients

การทำนายความเข้มข้นอสุจิ

สมการทำนายความเข้มข้นอสุจิที่ได้จากการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ Stepwise พบว่าขนาดเส้นรอบวงอวัยวะและ focal point มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นอสุจิ ($p < 0.05$) (Table 5) และสามารถร่วมกันทำนายคุณภาพน้ำเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเมื่อตัวแปรทำนายอื่นๆ คงที่ ค่า focal point ที่เพิ่มขึ้น 1 คะแนน ส่งผลให้ความเข้มข้นอสุจิลดลงโดยเฉลี่ย 7.3×10^6 เซลล์ ในขณะที่เมื่อเส้นรอบวงอวัยวะเพิ่มขึ้น 1 cm. ทำให้ความเข้มข้นอสุจิลดลง 37.74×10^6 เซลล์ สมการทำนายความเข้มข้นอสุจิที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจค่อนข้างต่ำ โดยสามารถอธิบายการผันแปรของความเข้มข้นอสุจิได้เพียงร้อยละ 9 ($R^2 \approx 0.09$) สามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนดิบได้ดังต่อไปนี้

$$\text{ความเข้มข้นอสุจิ} = 3235.11 - (37.735 \times \text{Scrotal circumference}) - (7.312 \times \text{focal point})$$

และสามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนมาตรฐานได้ดังต่อไปนี้

$$Z_{\text{ความเข้มข้นอสุจิ}} = -0.224 \times (Z_{\text{circumference}}) - 0.187 \times (Z_{\text{focal point}})$$

จากสมการทำนายในรูปคะแนนมาตรฐาน พบว่าเส้นรอบวงอวัยวะมีอิทธิพลต่อความเข้มข้นอสุจิสูงกว่า focal point เล็กน้อย ($Beta = -0.224$ และ -0.187 ตามลำดับ)

Table 5 Regression analysis of sperm concentration

Independent variable	b^1	$Beta^2$	t-value	p-value
Intercept	3235.11	-	5.31	<0.0001
Scrotal circumference	-37.735	-0.224	-2.79	0.006
Focal point	-7.312	-0.187	-2.33	0.021
$R = 0.292$; $R^2 = 0.085$; $F = 6.63$; $p\text{-value} < 0.01$				

¹ Regression coefficients

² Standardized coefficients

การทำนายอสุจิทั้งหมด

สมการทำนายอสุจิทั้งหมดที่ได้จากการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ Stepwise พบว่ามีเพียง focal point ที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นอสุจิ ($p < 0.05$) (Table 6) โดยค่า focal point ที่เพิ่มขึ้น 1 คะแนน ส่งผลให้อสุจิทั้งหมดลดลงโดยเฉลี่ย 37 เซลล์/mL. สมการทำนายที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจค่อนข้างต่ำ โดยสามารถอธิบายการผันแปรของอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิได้เพียงร้อยละ 3 ($R^2 \approx 0.03$) สามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนดิบได้ดังต่อไปนี้

$$\text{อสุจิทั้งหมด} = 8589.19 - (37.037 \times \text{focal point})$$

และสามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนมาตรฐานได้ดังต่อไปนี้

$$Z_{\text{อสุจิทั้งหมด}} = -0.176 \times (Z_{\text{Focal point}})$$

Table 6 Regression analysis of total sperm

Independent variable	b^1	$Beta^2$	t-value	p-value
Intercept	8589.19	-	5.02	<0.0001
Focal point	-37.037	-0.176	-2.13	0.035
$R = 0.176$; $R^2 = 0.031$; $F = 4.55$; $p\text{-value} < 0.05$				

¹ Regression coefficients

² Standardized coefficients

การทำนายอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ

สมการทำนายอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิที่ได้จากการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ Stepwise พบว่า อายุโคและ focal point มีอิทธิพลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ($p < 0.001$) (Table 7) และสามารถร่วมกันทำนายคุณภาพน้ำเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเมื่อตัวแปรทำนายอื่นๆ คงที่ ค่า focal point

ที่เพิ่มขึ้น 1 คะแนน ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิของลดลงโดยเฉลี่ยร้อยละ 0.63 ในขณะที่เมื่อโคอายุเพิ่มขึ้น 1 ปี จะส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงประมาณร้อยละ 3.1 สมการทำนายที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจในระดับต่ำ โดยสามารถอธิบายการผันแปรของอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิได้ร้อยละ 31 ($R^2 \approx 0.31$) สามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนดิบได้ดังต่อไปนี้

$$\text{อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (\%)} = 144.07 - (3.142 \times \text{Age}) - (0.626 \times \text{focal point})$$

และสามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนมาตรฐานได้ดังต่อไปนี้

$$Z_{\text{อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ}} = -0.268 \times (Z_{\text{Age of Bull}}) - 0.457 \times (Z_{\text{Focal point}})$$

จากสมการทำนายในรูปคะแนนมาตรฐาน พบว่า focal point มีอิทธิพลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิมากกว่าอายุโคอย่างชัดเจน (Beta = -0.457 และ -0.268 ตามลำดับ)

Table 7 Regression analysis of total motility

Independent variable	b ¹	Beta ²	t-value	p-value
Intercept	144.07	-	14.78	<0.0001
Age of bull	-3.142	-0.268	-3.81	<0.001
Focal point	-0.626	-0.457	-6.51	<0.0001
R=0.556; R ² =0.309; F=31.80; p-value <0.0001				

¹ Regression coefficients

² Standardized coefficients

การทำนายอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ

สมการทำนายอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิที่ได้จากการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ Stepwise พบว่าอายุโคและ focal point มีอิทธิพลต่ออัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ ($p < 0.001$) (Table 8) และสามารถร่วมกันทำนายคุณภาพน้ำเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเมื่อตัวแปรทำนายอื่นๆ คงที่ ค่า focal point ที่เพิ่มขึ้น 1 คะแนน ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ข้างหน้าของอสุจิลดลงโดยเฉลี่ยร้อยละ 0.41 ในขณะที่เมื่อโคอายุเพิ่มขึ้น 1 ปี จะส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงประมาณร้อยละ 2.8 สมการทำนายที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจในระดับต่ำ โดยสามารถอธิบายการผันแปรของอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิได้ร้อยละ 28 ($R^2 \approx 0.28$) สามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนดิบได้ดังต่อไปนี้

$$\text{อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (\%)} = 95.80 - (2.809 \times \text{Age}) - (0.410 \times \text{focal point})$$

และสามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนมาตรฐานได้ดังต่อไปนี้

$$Z_{\text{อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ}} = -0.315 \times (Z_{\text{Age of Bull}}) - 0.393 \times (Z_{\text{Focal point}})$$

จากสมการทำนายในรูปคะแนนมาตรฐาน พบว่า focal point มีอิทธิพลต่ออัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ มากกว่าอายุโคเล็กน้อย (Beta = -0.393 และ -0.315 ตามลำดับ)

Table 8 Regression analysis of progressive motility

Independent variable	b ¹	Beta ²	t-value	p-value
Intercept	95.80	-	12.68	<0.0001
Age of bull	-2.809	-0.315	-4.40	<0.0001
Focal point	-0.410	-0.393	-5.50	<0.0001
R= 0.532; R ² = 0.283; F=27.97; p-value <0.0001				

¹ Regression coefficients² Standardized coefficients

การทำนายร้อยละของอสุจิมิชีวิต

สมการทำนายร้อยละของอสุจิมิชีวิตที่ได้จากการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ Stepwise พบว่าอายุโคและ focal point มีอิทธิพลต่อร้อยละอสุจิมิชีวิต ($p < 0.0001$) (Table 9) และสามารถร่วมกันทำนายคุณภาพน้ำเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเมื่อตัวแปรทำนายอื่นๆ คงที่ ค่า focal point ที่เพิ่มขึ้น 1 คะแนน ส่งผลให้อสุจิมิชีวิตลดลงโดยเฉลี่ยร้อยละ 0.61 ในขณะที่เมื่อโคอายุเพิ่มขึ้น 1 ปี จะส่งผลให้อสุจิมิชีวิตลดลงประมาณร้อยละ 3.1 สมการทำนายที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจในระดับต่ำ โดยสามารถอธิบายการผันแปรของอสุจิมิชีวิตได้ร้อยละ 35 ($R^2 \approx 0.35$) สามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนดิบได้ดังต่อไปนี้

$$\text{อสุจิมิชีวิต (\%)} = 147.42 - (3.106 \times \text{Age}) - (0.609 \times \text{focal point})$$

และสามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนมาตรฐานได้ดังต่อไปนี้

$$Z_{\text{อสุจิมิชีวิต}} = -0.287 \times (Z_{\text{Age of Bull}}) - 0.428 \times (Z_{\text{Focal point}})$$

จากสมการทำนายในรูปคะแนนมาตรฐาน พบว่า focal point มีอิทธิพลต่ออสุจิมิชีวิตมากกว่าอายุโคอย่างชัดเจน (Beta = -0.428 และ -0.287 ตามลำดับ)

Table 9 Regression analysis of sperm viability

Independent variable	b ¹	Beta ²	t-value	p-value
Intercept	147.42	-	16.90	<0.0001
Age of bull	-3.106	-0.287	-4.2872	<0.0001
Focal point	-0.609	-0.482	-7.1418	<0.0001
R=0.652; R ² = 0.348; F=38.85; p-value <0.0001				

¹ Regression coefficients² Standardized coefficients

การทำนายร้อยละของอสุจิผิดปกติ

สมการทำนายร้อยละของอสุจิผิดปกติที่ได้จากการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ Stepwise พบว่ามีเพียง focal point ที่มีอิทธิพลต่อร้อยละของอสุจิผิดปกติ ($p < 0.05$) (Table 10) โดยค่า focal point ที่เพิ่มขึ้น 1 คะแนน ส่งผลให้อสุจิผิดปกติเพิ่มขึ้นโดยเฉลี่ยร้อยละ 0.16 สมการทำนายที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจค่อนข้างต่ำ โดยสามารถอธิบายการผันแปรของร้อยละของอสุจิผิดปกติได้เพียงร้อยละ 4 ($R^2 \approx 0.04$) สามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนดิบได้ดังต่อไปนี้

$$\text{อสุจิผิดปกติ (\%)} = (0.161 \times \text{focal point}) - 6.142$$

และสามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนมาตรฐานได้ดังต่อไปนี้

$$Z_{\text{อสุจิผิดปกติ}} = 0.210 \times (Z_{\text{Focal point}})$$

Table 10 Regression analysis of sperm defects

Independent variable	b ¹	Beta ²	t-value	p-value
Intercept	-6.142	-	-0.990	0.323
Focal point	0.161	0.210	2.572	<0.05
R=0.210; R ² =0.044; F=6.62; p-value=0.011				

¹ Regression coefficients

² Standardized coefficients

การทำนายร้อยละของความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ

สมการทำนายความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิที่ได้จากการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบ Stepwise พบว่าอายุโคและ focal point มีอิทธิพลต่อความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ ($p < 0.001$) (Table 11) และสามารถร่วมกันทำนายคุณภาพน้ำเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเมื่อตัวแปรทำนายอื่นๆ คงที่ ค่า focal point ที่เพิ่มขึ้น 1 คะแนน ส่งผลให้ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิลดลงโดยเฉลี่ยร้อยละ 0.59 ในขณะที่เมื่อโคอายุเพิ่มขึ้น 1 ปี จะส่งผลให้อสุจิมีชีวิตลดลงประมาณร้อยละ 2.9 สมการทำนายที่ได้มีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจในระดับต่ำ โดยสามารถอธิบายการผันแปรของอสุจิมีชีวิตได้ร้อยละ 30 ($R^2 \approx 0.30$) สามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนดิบได้ดังต่อไปนี้

$$\text{ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ (\%)} = 145.97 - (2.891 \times \text{Age}) - (0.589 \times \text{focal point})$$

และสามารถเขียนสมการพยากรณ์ในรูปคะแนนมาตรฐานได้ดังต่อไปนี้

$$Z_{\text{ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ}} = -0.259 \times (Z_{\text{Age of Bull}}) - 0.452 \times (Z_{\text{Focal point}})$$

จากสมการทำนายในรูปคะแนนมาตรฐาน พบว่า focal point มีอิทธิพลต่อความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิมากกว่าอายุโค (Beta = -0.452 และ -0.259 ตามลำดับ)

Table 11 Regression analysis of plasma membrane integrity

Independent variable	b ¹	Beta ²	t-value	p-value
Intercept	145.97	-	15.643	<0.0001
Age of bull	-2.891	-0.259	-3.664	<0.001
Focal point	-0.589	-0.452	-6.400	<0.0001
R=0.547; R ² = 0.299; F=30.35; p-value <0.0001				

¹ Regression coefficients² Standardized coefficients

จากการวิเคราะห์สมการถดถอยพหุคูณเพื่อพยากรณ์คุณภาพน้ำเชื้อ พบว่าค่า focal point มีอิทธิพลต่อคุณภาพน้ำเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทั้งคุณภาพเชิงปริมาณ (ปริมาตรน้ำเชื้อ และความเข้มข้นอสุจิ) และเชิงคุณภาพ (อสุจิทั้งหมด อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ อสุจิมีชีวิต อสุจิผิดปกติ และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ) เมื่อพิจารณาจากค่าสัมประสิทธิ์ถดถอยมาตรฐาน จะเห็นได้ว่าเมื่อค่าคะแนนรอยโรคหรือ focal point สูงขึ้น (บ่งบอกว่ารอยโรคในอสุจิมีมากขึ้น) มีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อโดยรวมแย่ลง คิดเป็นประมาณ 0.18 ถึง 0.48 SD ต่อค่า focal point ที่เพิ่มขึ้น 1 SD (SD of focal point = 13.3) (Tables 5-12) ซึ่งพบว่า focal point มีผลกระทบมากที่สุดต่อ ร้อยละของอสุจิมีชีวิต อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ (พิจารณาจากค่า standardized coefficients ซึ่งมีค่าระหว่าง -0.40 และ -0.48)

เมื่อพิจารณาความสามารถในการทำนายของสมการที่ประกอบด้วย focal point และอายุโคเป็นตัวแปรทำนาย สำหรับคุณภาพน้ำเชื้อ 4 ลักษณะ ได้แก่ ร้อยละของอสุจิมีชีวิต อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ พบว่าโมเดลมีค่าสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ หรือ R² ที่ต่ำ โดยมีค่าระหว่าง 0.28 (อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า) และ 0.35 (ร้อยละของอสุจิมีชีวิต) ซึ่งถือว่าสมการทำนายดังกล่าวสามารถอธิบายความผันแปรของคุณภาพน้ำเชื้อได้ในระดับต่ำ (ร้อยละ 28 ถึง 35) (Henseler et al., 2009; Moore et al., 2013) ดังนั้น จึงแสดงให้เห็นว่า การใช้ค่า focal point ร่วมกับ อายุโค ยังให้ความแม่นยำในการพยากรณ์คุณภาพน้ำเชื้อดังกล่าวได้ไม่มากนัก เนื่องจากโมเดลที่มีค่า R² ต่ำ จะมีความคลาดเคลื่อน (error) สูงกว่า ซึ่งจะส่งผลให้การทำนายค่าสังเกตมีความแม่นยำ (precision) ต่ำลง อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาว่าค่า R² ที่ยอมรับได้ไม่ควรต่ำกว่า 0.25 (Garson, 2016) สมการทำนายคุณภาพน้ำเชื้อทั้ง 4 ลักษณะดังกล่าว อาจมีศักยภาพในการใช้ในการพยากรณ์ ซึ่งผู้วิจัยประเมินว่า หากต้องการให้การทำนายคุณภาพน้ำเชื้อมีความแม่นยำมากขึ้น อาจต้องเพิ่มจำนวนข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์ รวมทั้งอาจต้องศึกษาตัวแปรอิสระอื่นๆ ที่อาจใช้ในการทำนาย เพื่อให้มีความแม่นยำในการพยากรณ์เพิ่มมากขึ้นในระดับที่ยอมรับได้

สำหรับลักษณะคุณภาพน้ำเชื้ออื่นๆ ได้แก่ ปริมาตร ความเข้มข้นอสุจิ อสุจิทั้งหมด และอสุจิผิดปกติ มีแนวโน้มว่าไม่สามารถใช้สมการที่สร้างขึ้นในการทำนายได้เนื่องจากสามารถอธิบายความผันแปรของคุณภาพ

น้ำเชื้อได้ต่ำกว่าร้อยละ 10 ($R^2 \approx 0.03$ ถึง 0.09) ทั้งนี้ไม่พบการศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับการทำนายคุณภาพน้ำเชื้อด้วยค่าที่ประเมินได้จากเทคนิคอัลตราซาวด์ จึงไม่สามารถเปรียบเทียบผลที่ได้กับการศึกษาอื่นได้

สรุปผลการทดลอง

1. การใช้เทคนิคอัลตราซาวด์เพื่อประเมินสมรรถภาพระบบสืบพันธุ์สามารถใช้ตรวจรอยโรคที่อัณฑะ สามารถระบุระดับความรุนแรงของรอยโรคที่เกิดขึ้นได้เบื้องต้น ซึ่งการเกิดรอยโรคเพิ่มขึ้นจะส่งผลกระทบต่อความเข้มข้นอสุจิ อสุจิทั้งหมด อัตราการเคลื่อนที่อสุจิ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าอสุจิ ร้อยละอสุจิมิชีวิต ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ รวมถึงร้อยละความผิดปกติของอสุจิ
2. การใช้ค่าคะแนนรอยโรค หรือ focal point ที่ได้จากการใช้เทคนิคอัลตราซาวด์ เป็นตัวแทนของการเกิดรอยโรค ร่วมกับปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ อายุของพ่อพันธุ์และขนาดเส้นรอบอัณฑะ สามารถใช้ในการสร้างสมการเพื่อพยากรณ์คุณภาพน้ำเชื้อได้ แต่ค่าที่ได้จากการพยากรณ์ยังมีความแม่นยำไม่มากเพียงพอ แต่ถือว่ามีศักยภาพในการทำนายสำหรับลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อบางลักษณะ (ร้อยละของอสุจิมิชีวิต อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และ ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ) ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อสร้างโมเดลที่เหมาะสมมากยิ่งขึ้น

ข้อเสนอแนะ

การศึกษาเกี่ยวกับเทคโนโลยีอัลตราซาวด์เพื่อประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อสมรรถภาพระบบสืบพันธุ์ เป็นเทคนิคที่สามารถทำได้ง่าย ไม่เกิดอันตรายต่อสัตว์ (non-invasive) สามารถประยุกต์ใช้ในการเฝ้าระวังปัญหาด้านการผลิตน้ำเชื้อได้ทั้งโคเพศผู้ที่ใช้ในการคุมฝูง และพ่อพันธุ์ผลิตน้ำเชื้อ แชนแชน นอกจากนี้ยังสามารถประยุกต์ใช้ในสัตว์พ่อพันธุ์ชนิดอื่นได้อีกด้วย ดังนั้นจึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติม ทั้งในส่วนของการเพิ่มจำนวนประชากรให้มากขึ้น รวมถึงโคสายพันธุ์อื่น โดยอาจสามารถประยุกต์ใช้ในสัตว์ชนิดอื่นได้อีกด้วย นอกจากนี้ ยังควรเพิ่มตัวแปรอิสระอื่นๆ ที่อาจสามารถเป็นตัวแปรทำนาย (predictors) เพื่อให้ได้สมการที่มีความแม่นยำในการพยากรณ์มากยิ่งขึ้น ซึ่งจะช่วยให้สามารถใช้ในการประเมินสมรรถภาพระบบสืบพันธุ์ในโคเพศผู้ และใช้ในการคัดโคพ่อพันธุ์ออกจากฝูงได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้อำนวยการและเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ลำพูนกลาง ที่ให้การช่วยเหลือและสนับสนุนให้สามารถดำเนินการวิจัยเป็นไปตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

- รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล. 2551. คู่มือการปฏิบัติงานการควบคุมคุณภาพน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ผสมเทียม (Quality control of livestock semen for artificial insemination. ม.ป.ท. ปทุมธานี.
- สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 2563. สมุดพ่อพันธุ์โคนม 2563 (DLD dairy sire summary 2020).

ม.ป.ท. ปทุมธานี.

- Ahmad, E., N. Ahmad, Z. Naseer, M. Aleem, M.S. Khan, M. Ashiq and M. Younis. 2011. Relationship of age to body weight, scrotal circumference, testicular ultrasonograms, and semen quality in Sahiwal bulls. *Tropical Animal Health and Production*. 43(1):159-164.
- Andrade A.K.G., A.T. Soares, F.F. Freitas, S.V. Silva, C.E. Peña-Alfaro, A.M. Batista and M.M.P. Guerra. 2014. Testicular and epididymal ultrasonography in Santa Inês lambs raised in Brazil. *Anim. Reprod.* 11(2):110-118.
- Arteaga, A.A., A.D. Barth and L.F.C. Brito. 2005. Relationship between semen quality and pixel intensity of testicular ultrasonograms after scrotal insulation in beef bulls. *Theriogenology*. 64:408-415.
- Barth, A.D., L. Alisio, M. Avilés, A.A. Arteaga, J.R. Campbell and S.H. Hendrick. 2008. Fibrotic lesions in the testis of bulls and relationship to semen quality. *Anim Reprod Sci*. 106(3-4):274-288.
- Bhuminand, D., T. Koseki, M. Matsui, M. Sasaki, E. Kaneko, A. Miyamoto and Y.I. Miyake. 2008. Relationships among age, body weight, scrotal circumference, semen quality and peripheral testosterone and estradiol concentrations in pubertal and post-pubertal Holstein bulls. *Journal of Veterinary Medical Science*. 70(1):119-121.
- Brace, N., R.S. Snelgar and R. Kemp. 2012. *SPSS for psychologists*. 5th edition. London Palgrave Macmillan.
- Bring, J. 1994. How to standardize regression coefficients. *The American Statistician*. 48(3):209-213.
- Brito, L.F.C., A.D. Barth, R.E. Wilde and J.P. Kastelic. 2012. Testicular ultrasonogram pixel intensity during sexual development and its relationship with semen quality, sperm production and quantitative testicular histology in beef bulls *Theriogenology*. 78:69-76.
- Cartee, R.E., B.W. Gray, T.A. Powe, R.S. Hudson and J. Whitesides. 1989. Preliminary implications of B-mode ultrasonography of the testicles of beef bulls with normal breeding soundness examinations. *Theriogenology*. 31:1149-1157.
- Cartee, R.E., P.F. Rumph, S. Abuzaid and R. Carson. 1990. Ultrasonographic examination and measurement of ram testicles. *Theriogenology*. 33:867-875.
- Chandolia, R.K., A. Honaramooz, B.C. Omeke, R. Pierson, A.P. Beard and N.C. Rawlings. 1997. Assessment of development of the testes and accessory glands by ultrasonography in bull calves and associated endocrine changes. *Theriogenology*. 48:119-132.
- Coulter, G.H. and D.R.C. Bailey. 1988. Effects of ultrasonography on the bovine testis and

- semen quality. *Theriogenology*. 30(4):743-749.
- Coulter, G.H. and G.C. Kozub. 1989. Efficacy of methods used to test fertility of beef bulls used for multiple-sire breeding under range conditions. *J Anim Sci*. 67:1757-1766.
- 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.
- Eilts, B.E. and R.D. Pechman. 1988. B-mode ultrasound observations of bull testes during breeding soundness examinations. *Theriogenology*. 30(6):1169-1175.
- Evans, A.C.O., R.A. Pierson, A. Garcia, L.M. McDougall, F. Hrudka and N.C. Rawlings. 1996. Changes in circulating hormone concentrations, testes histology and testes ultrasonography during sexual maturation in beef bulls. *Theriogenology*. 46:345-357.
- Garson, G.D. 2016. *Partial Least Squares: Regression and Structural Equation Models*. Asheboro. NC: Statistical Associates Publishers.
- Gipsona, T.A., D.W. Vogtl and J.W. Massey. 1985. Associations of scrotal circumference with semen traits in young beef bulls. *Theriogenology*. 24:217-225.
- Gloria, A., A. Carluccio, L. Wegher, D. Robbe, C. Valorz and A. Contri. 2018. Pulse wave Doppler ultrasound of testicular arteries and their relationship with semen characteristics in healthy bulls. *Journal of animal science and biotechnology*. 9(1):1-7.
- Henseler, J., C. Ringle and R. Sinkovics. 2009. The use of partial least squares path modeling in international marketing. *Advances in International Marketing (AIM)*. 20:277-320.
- Juca, A.F., L.F.B. Pinto, A.K.F. Moita, R.J.F. Oliveira, G.M.F. Melo, L.B. Santos, M.S. Fiuza and H.C. Azevedo. 2011. Testicular echotexture by ultrasonography in Santa Inês rams. *Maceió*, 23:1-3.
- Kastelic J.P. and L.F.C. Brito. 2012. Ultrasonography for monitoring reproductive function in the bull. *Reprod Domest Anim*. 47:45-51.
- Kavak, A, N. Lundeheim, M. Aidnik and S. Einarsson. 2004. Sperm morphology in Estonian and Tori breed stallions. *Act.Vet*. 45:11-18.
- Latif, M.A., J.U. Ahmed, M.M.U. Bhuiyan and M. Shamsuddin. 2009. Relationship between scrotal circumference and semen parameters in crossbred bulls. *Bangladesh Veterinarian*. 26(2):61-67.
- Kupferschmied, H., U. Kihm, P. Bachmann, K. Muller and M. Ackerman. 1986. Transmission of IBR/IPV virus in bovine semen: a case report. *Theriogenology*. 25:439-443.
- McClurkin, A., M. Coria and R. Cutlip. 1979. Reproductive performance of apparently healthy

- cattle persistently infected with bovine viral diarrhea virus. J. Am. Vet. Med. Assoc. 174:1116–1119.
- McEntee, K. 1990. Reproductive Pathology of Domestic Animals. Academic Press Inc., San Diego. pp 263.
- Moore, D.S., W.I. Notz and M.A. Flinger. 2013. The basic practice of statistics (6th ed.). New York. NY: Freeman and Company.
- Moura, J.C.A., A.F. Juca, A.L. Gusmão, T. Bittencourt, T.G. Pinho and C.M.P. Barbosa. 2008. Testicular echotexture of the Santa ins rams. A Hora Veterinaria, 27:9-22.
- Nagaraja, T., M. Galyean and N. Cole. 1998. Nutrition and disease. In: Hunt, E. (Ed.), Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice. W.B. Saunders Co., Philadelphia, PA, pp. 257–277.
- Parkinson, T.J. 2004. Evaluation of fertility and infertility in natural service bulls. Vet J. 168:215-229.
- Pinho R.O., D.S. Costa, J.B. Siqueira, L.F. Martins, L.A. Teixeira, S.E. Guimarães and J.D. Guimarães. 2013. Lack of relationship between testicular echotexture and breeding soundness evaluation in adult Nelore bulls. Livestock Science. 154(1-3):246-249.
- Powe, T.A., R.E. Cartee, R. Carson, D. Wolfe and R. Hudson. 1988. B-mode ultrasonography of testicular pathology in the bull. Agri-Practice. 9:43–45.
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria.
- Rota, A., N. Penzo, L. Vincenti and R. Mantovani. 2000. Hypoosmotic swelling (HOS) as a screening assay for testing in vitro fertility of bovine spermatozoa. Theriogenology. 53(7):1415-1420.
- Tomlinson, M., A. Jennings, A. Macrae and I. Truysers. 2017. The value of trans-scrotal Ultrasonography at bull breeding soundness evaluation (BBSE): The relationship between testicular parenchymal pixel intensity and semen quality. Theriogenology. 89:169-177.
- Weisburd, D. and C. Britt. 2014. Statistics in criminal justice. Springer.

Yimer, N., Y. Rosina, H. Wahid, A.A. Saharee, K.C. Yap and P. Ganesamurthi. 2001. Trans- scrotal ultrasonography and breeding soundness evaluation of bulls in a herd of dairy and beef cattle with poor reproductive performance. *Pertanika J Trop Agric Sci.* 34:217-228.

ปัจจัยที่ส่งผลต่อความสามารถในการรอดชีวิตและคุณภาพตัวอ่อนโคตัดแบ่งครึ่ง ที่ได้มาจากการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายหลังเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อน

อรรถพล พรประไพ^{1/} พิงค์ลานนา กุญชร^{2/}

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอาหารเลี้ยงตัวอ่อนและระยะตัวอ่อนโคต่ออัตราการรอดชีวิตและคุณภาพของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง โดยใช้ตัวอ่อนที่ผลิตจากกระบวนการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย ซึ่งได้จากการดัดแปลงโอโอไซด์และการกรีดผิวรังไข่จากรังไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ และสามารถผลิตตัวอ่อนได้ 229 ตัวอ่อน จากนั้นนำตัวอ่อนมาตัดแบ่งครึ่งด้วยใบมีดขนาดเล็ก ได้ปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งจำนวน 458 ตัวอ่อน แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนแต่ละชนิด คือ D-PBS, SOF และ BO-IVC[®] โดยตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่ได้จากตัวอ่อนระยะ M ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อน นาน 24 ชั่วโมง และตัวอ่อนระยะ EB ถึง HB ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อน นาน 3 ชั่วโมง ผลจากการศึกษา พบว่าอาหารเลี้ยงตัวอ่อนและระยะของตัวอ่อนมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตและคุณภาพของตัวอ่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยตัวอ่อนที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด BO-IVC[®] และชนิด SOF จะมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าชนิด D-PBS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และพบว่า อาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด BO-IVC[®] ได้ปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง เกรด 1 สูงกว่าชนิด SOF และสูงกว่าชนิด D-PBS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และเมื่อเลี้ยงตัวอ่อนในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด D-PBS ได้ปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง เกรด 3 สูงกว่าชนิด SOF และ BO-IVC[®] อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) สำหรับปัจจัยระยะของตัวอ่อน พบว่า ตัวอ่อนระยะ ExB, HB และ B มีอัตราการรอดชีวิต และได้ปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง เกรด 1 สูงกว่าตัวอ่อนระยะ M อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) และตัวอ่อนระยะ M ได้ปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง เกรด 3 สูงกว่าตัวอ่อนระยะ B, HB และ ExB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง เกรด 2 หลังเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนและระยะของตัวอ่อนที่แตกต่างกันจากการศึกษานี้ สรุปได้ว่า ชนิดของอาหารเลี้ยงตัวอ่อนและระยะตัวอ่อนมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตและคุณภาพของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งหลังเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ดังนั้นการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตและการผลิตตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งให้ได้คุณภาพ เกรด 1 ควรเลือกตัวอ่อนระยะ ExB, HB และ B มาตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนด้วยใบมีดขนาดเล็กและนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด BO-IVC[®] และ SOF ตามลำดับ

คำสำคัญ : ความสามารถในการรอดชีวิต โค ตัวอ่อน ตัดแบ่งครึ่ง ตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง

เลขทะเบียนวิชาการ : ๖๔(๒)-๐๒๐๘-๑๓๒

^{1/}ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

^{2/}สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ อ.เมือง จ.ปทุมธานี

Factor affecting survivability and quality of cattle demi-embryo derived from *in vitro* embryo production (IVP) after culture

Attapol pornprapai^{1/} Pinglanna Kunchorn^{2/}

Abstract

The objective of this study was to investigate the effect of culture medium and embryonic stage on survival rate and quality of cattle demi-embryo after culture. All oocytes were aspirated and slashed from abattoir ovaries and brought into *in vitro* embryo production (IVP) program. A total of 229 embryos were obtained, to produced 458 demi-embryos by embryo bisection from micro-blade. Then all demi-embryos were separated equally 3 groups and cultured in each culture medium which were D-PBS, SOF and BO-IVC[®]. M was cultured for 24 hr, EB to HB were culture for 3 hr. The results showed that survival rate of BO-IVC[®] and SOF were higher than D-PBS significantly different ($p < 0.01$). The quality of demi-embryos after culture for grade 1, BO-IVC[®] was higher than SOF and it be higher than D-PBS significantly different ($p < 0.01$). There was no significantly different in grade 2. For grade 3, D-PBS was higher than SOF and BO-IVC[®]. The survival rate of ExB, HB and B were higher than M significantly different ($p < 0.01$). There were also higher quality of demi-embryos after culture for grade 1 than M. There was no significantly different in grade 2. For grade 3, M was higher than B, HB and ExB significantly different ($p < 0.01$). This study indicates that culture medium and embryonic stage affect to surviability and quality of cattle demi-embryo after culture that there were significantly different ($p < 0.01$). Thus, Increasing survival rate and quality of demi-embryo grade 1 production, ExB, HB and B were more appropriate for embryo bisection by micro-blade and culture with BO-IVC[®] and SOF, respectively.

keywords : surviability, cattle, embryo, bisection, demi-embryo

Registered No. : 64(2)-0208-132

^{1/}Embryo Transfer Technology and Animal Germplasm Research Center, Pakchong, Nakornrachasima.

^{2/}Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Muang, Pathumthani.

คำนำ

การใช้เทคโนโลยีที่ช่วยในการขยายพันธุ์สัตว์ (assisted reproduction technology, ART) ได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มความก้าวหน้าทางพันธุกรรม (Baldassarre et al., 2004) โดยการใช้เทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อน (embryo transfer) เป็นวิธีหนึ่งที่สามารถเพิ่มจำนวนสัตว์ที่มีพันธุกรรมดี ในระยะเวลาอันสั้น ทั้งนี้การผลิตตัวอ่อนสำหรับการย้ายฝากตัวอ่อน สามารถจำแนกได้เป็น 2 วิธี คือ การผลิตและย้ายฝากตัวอ่อนที่ปฏิสนธิภายในร่างกาย (multiple ovulation embryo transfer, MOET) และการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย (in-vitro embryo production, IVP) ซึ่งปัจจุบันการผลิตตัวอ่อนแบบ IVP เป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมและมีแนวโน้มในการนำมาผลิตตัวอ่อนเชิงพาณิชย์เพิ่มมากขึ้น และได้มีการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการย้ายฝากตัวอ่อนในโค (Baker and Shea, 1985) เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถเพิ่มจำนวนตัวอ่อนได้ปริมาณที่มาก ในระยะเวลาสั้น หากมีการนำเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนและการผลิตตัวอ่อนมาประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคโนโลยีที่ช่วยเพิ่มจำนวนตัวอ่อนจากตัวอ่อนใบเดียวกัน เช่น การผลิตแฝดเหมือน (monozygotic twins) ซึ่งเป็นการตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อน (embryo bisection) ตั้งแต่ระยะ morula (M) จนถึงระยะ hatched blastocyst (HB) ภายหลังจากการปฏิสนธิ (fertilization) 6-8 วัน (Chaweewan et al., 1997) หรือวิธีการเพิ่มจำนวนตัวอ่อนขณะที่ตัวอ่อนกำลังแบ่งตัวของเซลล์ เช่น การแยกเซลล์ตัวอ่อน (blastomere separation) ในระยะ 2 เซลล์ เพื่อเพิ่มจำนวนตัวอ่อนในโค (Hashiyada, 2017) การแยกเซลล์ตัวอ่อนในระยะ 4-10 เซลล์ (Illmensee and Levanduski, 2010) เป็นต้น

การผลิตแฝดเหมือนด้วยเทคนิคการตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนตั้งแต่ระยะ M ขึ้นไป โดยใช้ใบมีดขนาดเล็ก (Willaden et al., 1981; Seidel, 1982) หรือเข็มแก้วเล็กๆ (William et al., 1984) สำหรับการตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อน หลังจากการผ่าตัดแบ่งครึ่งแล้ว เซลล์ของตัวอ่อนแต่ละครึ่งจะเริ่มมีการพัฒนาเพื่อรักษารูปร่างเซลล์ โดยจะเริ่มมีการรัดตัวแน่นปรับเปลี่ยนรูปร่างให้กลับมาอยู่ในรูปลักษณะกลม และมีการสร้าง blastocoel cavity ขึ้นมาใหม่ (McEvoy and Sreenan, 1990; Chaweewan et al., 1997) ซึ่งการทำแฝดเหมือนจากตัวอ่อนที่มาจากโคพันธุ์ดี ทำให้เพิ่มจำนวนสัตว์พันธุ์ดีได้อย่างรวดเร็ว และมีอัตราการตั้งท้องด้วยการย้ายฝากตัวอ่อนไม่แตกต่างกับการย้ายฝากตัวอ่อนที่ไม่ถูกตัดแบ่งครึ่ง (Willaden et al., 1981; William et al., 1984)

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ เป็นหน่วยงานราชการที่ทำหน้าที่ ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ โดยมีหน่วยงานในสังกัดที่ได้ดำเนินการย้ายฝากตัวอ่อนมาเป็นระยะเวลานานทั่วประเทศไทย อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการนำเทคโนโลยีการเพิ่มจำนวนตัวอ่อนภายหลังจากการปฏิสนธิในโคจากตัวอ่อนใบเดียวกันอย่างเป็นรูปธรรม ในขณะที่ปัจจุบันการพัฒนาการเลี้ยงตัวอ่อนในห้องปฏิบัติการมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง และมีความพร้อมทั้งอุปกรณ์ สารเคมี อาหารเลี้ยงตัวอ่อนที่ถูกพัฒนาในรูปแบบเชิงการค้า ดังนั้น การศึกษาปัจจัยที่ส่งผลต่อความสามารถในการรอดชีวิตและคุณภาพของตัวอ่อนโคที่ถูกตัดแบ่งครึ่งด้วยการใช้ใบมีดขนาดเล็กหลังเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนจึงเป็นสิ่งที่จำเป็น เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้อาหารเลี้ยงตัวอ่อน เป็นการเพิ่มจำนวนตัวอ่อนและลดต้นทุนในการผลิตตัวอ่อนได้ และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานย้ายฝากตัวอ่อนของกรมปศุสัตว์ต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

จำนวนตัวอย่าง

ตัวอ่อนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นตัวอ่อนคุณภาพดีที่ได้จากการนำรังไข่ของโคจากโรงฆ่าสัตว์ มาเข้าสู่กระบวนการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย สามารถผลิตตัวอ่อน จำนวน 229 ตัวอ่อน และนำมาตัดแบ่ง ครั้งได้ปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง จำนวน 458 ตัวอ่อน และถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม และนำมาเลี้ยงในอาหาร เลี้ยงตัวอ่อนแต่ละชนิด (Table.1) โดยตัวอ่อนทั้งหมดถูกเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ การย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

Table 1. Number of embryos and demi-embryos

Culture medium	Embryonic stage	No. of embryos	No. of demi-embryos
D-PBS	Morula	19	38
	Early blastocyst	13	26
	Blastocyst	21	42
	Expanded blastocyst	12	24
	Hatched blastocyst	11	22
SOF	Morula	19	38
	Early blastocyst	13	26
	Blastocyst	22	44
	Expanded blastocyst	12	24
	Hatched blastocyst	11	22
BO-IVC®	Morula	18	36
	Early blastocyst	14	28
	Blastocyst	20	40
	Expanded blastocyst	13	26
	Hatched blastocyst	11	22

วิธีการทดลอง

1. การเก็บโอโอไซต์จากรังไข่

1.1 การดูดเก็บโอโอไซต์ด้วยไซริงค์และเข็มฉีดยา (aspiration method)

นำรังไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ แชในสารละลาย Dulbecco's phosphate buffered saline (D-PBS) (Gibco, USA) มีแคลเซียมคลอไรด์เป็นส่วนผสมและปราศจากน้ำตาลกลูโคส เตรียมไซริงค์ ขนาด 5 มิลลิลิตร เชื่อมต่อกับเข็มฉีดยา เบอร์ 18G ยาว 1 นิ้ว เพื่อสำหรับการดูดเก็บโอโอไซต์ และเตรียมสารละลาย hepes ประกอบด้วย TCM-199 hepes (Gibco, USA) เสริมด้วย fetal calf serum (FCS) (Gibco, USA) 5% และ penicillin-streptomycin 10,000 IU/ml (Gibco, USA) ก่อนดำเนินการดูดเก็บโอโอไซต์ นำไซริงค์ที่เชื่อมต่อกับ

เข็มดูดสารละลาย hepes ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจาะดูดโอโอไซต์พร้อมของเหลวจากฟอลลิเคิล ตามตำแหน่งของฟอลลิเคิลที่กระจายทั่วบนผิวรังไข่ เมื่อของเหลวไหลเข้าไซริงค์ ประมาณ 1.0 – 1.5 มิลลิลิตร นำของเหลวในไซริงค์ฉีดลงไปในหลอด centrifuge tube ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีสารละลาย hepes และวางรังไข่บนภาชนะที่สะอาด เมื่อเจาะดูดโอโอไซต์จากรังไข่ทั้งหมดแล้ว ตั้งหลอด centrifuge tube ทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้โอโอไซต์ตกตะกอนที่ก้นหลอด จากนั้นเตรียมดูดสารละลาย hepes ใส่ petridish ขนาด 35x10 มิลลิเมตร จำนวน 4 จาน จานละ 3 มิลลิลิตร นำ glass pipette ดูดตะกอนก้นหลอด centrifuge tube มาใส่ใน petridish จานที่ 1 ที่อุณหภูมิ 37.5 องศาเซลเซียส และนำไปหาโอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สเตอริโอ จากนั้นทำการล้างโอโอไซต์ด้วยสารละลาย hepes ที่อยู่ใน petridish อีก จำนวน 3 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 37.5 องศาเซลเซียส และจดบันทึกจำนวนและคุณภาพของโอโอไซต์

1.2 การกรีดผิวรังไข่เพื่อเก็บโอโอไซต์ (slashing method)

นำปีกเกอร์ ใส่สารละลาย D-PBS และดูดสารละลายใส่ในไซริงค์ ขนาด 50 มิลลิลิตร เชื่อมต่อกับเข็มฉีดยา เบอร์ 21G ยาว 1 นิ้ว จากนั้นนำรังไข่ที่ดำเนินการดูดเก็บโอโอไซต์แล้ว มาทำการกรีดผิวรังไข่เพื่อเก็บโอโอไซต์อีก 1 ครั้ง โดยเริ่มจาก การใช้ tissue forceps จับรังไข่ตำแหน่งเยื่ออีตรงไข่ จากนั้นใช้ใบมีดโกนกรีดตามแนวยาวและแนวขวางบนผิวรังไข่ ลักษณะเป็นช่องสี่เหลี่ยมจตุรัส ขนาด 1 ตารางมิลลิเมตร ให้รอบพื้นผิวทุกด้านของรังไข่ จากนั้น นำรังไข่ที่ถูกกรีดรอบทิศทางเป็นสี่เหลี่ยมเล็กๆ มาแกว่งในสารละลาย D-PBS เพื่อเป็นการทำให้โอโอไซต์หลุดจากรังไข่ลงสู่สารละลาย D-PBS หลังจากนั้นดูดสารละลาย D-PBS จากไซริงค์ ขนาด 50 มิลลิลิตร เชื่อมต่อกับเข็มฉีดยา เบอร์ 21G ยาว 1 นิ้ว เพื่อเป็นการฉีดล้างโอโอไซต์ที่เกาะกับเนื้อเยื่อรังไข่ จากนั้นนำสารละลาย D-PBS ที่มีโอโอไซต์แบ่งใส่ใน petridish ขนาด 60x15 มิลลิเมตร และนำไปหาโอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ที่อุณหภูมิ 37.5 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการล้างโอโอไซต์ด้วยสารละลาย hepes ที่อยู่ใน petridish อีก จำนวน 3 ครั้ง พร้อมกับโอโอไซต์ที่ได้จากการดูดเก็บโอโอไซต์ด้วยไซริงค์และเข็มฉีดยา ที่อุณหภูมิ 37.5 องศาเซลเซียส และจดบันทึกจำนวนและคุณภาพของโอโอไซต์

2. การผลิตตัวอ่อนด้วยวิธีปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (*in vitro* embryo production, IVP) ดำเนินการตามขั้นตอน ดังนี้

2.1 การเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ (*in vitro* maturation, IVM)

นำโอโอไซต์จาก petridish ที่มีสารละลาย hepes ย้ายมาสู่หลอด petridish ขนาดเล็กที่มีน้ำยา BO-IVM Oocyte maturation medium (IVF Bioscience, UK) 2-3 มิลลิลิตร และคัดเลือกโอโอไซต์ที่เสื่อมสภาพ (degenerated oocyte) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ออกจากกระบวนการ IVP จากนั้นนำโอโอไซต์ทั้งหมด มาล้าง 3 ครั้ง ในน้ำยา BO-IVM Oocyte maturation medium (IVF Bioscience, UK) ที่อุณหภูมิ 37.5 องศาเซลเซียส สำหรับเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ โดยนำโอโอไซต์ใส่ในน้ำยาปริมาณ 500 ไมโครลิตร ในจานเพาะเลี้ยงแบบ 4 หลุม (4-well petri dishes, Nunc, Roskilde, Denmark) และเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์มากกว่า 95% นาน 21-24 ชั่วโมง

2.2 การเตรียมน้ำเชื้อโคและการปฏิสนธิกับโอโอไซต์ในจานทดลอง (semen preparation and *in vitro* fertilization, IVF)

ก่อนเตรียมน้ำเชื้อ ทำการปรับสมดุลน้ำยาสำหรับปฏิสนธิระหว่างโอโอไซต์กับตัวอสุจิ โดยใส่น้ำยา BO-IVF fertilization medium (IVF Bioscience, UK) ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 4 หลุมๆ ละ 400 ไมโครลิตร นำเข้าในตู้เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 2 ชั่วโมงก่อนใช้งาน จากนั้นทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง และนำมาปั่นล้าง 2 ครั้ง ที่ 300g นาน 5 นาที ในน้ำยา BO-SemenPrep medium (IVF Bioscience, UK) ใช้น้ำยาปั่นครั้งละ 2 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง ในการปั่นครั้งที่ 2 ให้เหลือน้ำยาที่มีตะกอนน้ำเชื้อประมาณ 200 ไมโครลิตร และประเมินการเคลื่อนไหวและการรอดชีวิตของน้ำเชื้อ พร้อมตรวจนับอสุจิด้วย haemocytometer จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของน้ำเชื้อและปริมาณน้ำเชื้อที่จะเติมในจานเพาะเลี้ยงชนิด 4 หลุม ที่มีน้ำยา BO-IVF fertilization medium (IVF Bioscience, UK) 400 ไมโครลิตร โดยจำนวนน้ำเชื้อที่ใช้ในกระบวนการ IVF ประมาณ 1 ล้านตัว ทั้งนี้ระหว่างที่รอการปั่นน้ำเชื้อ นำโอโอไซต์ที่เพาะเลี้ยงจนครบเวลาพร้อมปฏิสนธิ มาล้าง 3 ครั้ง ด้วยน้ำยา BO-IVF fertilization medium ที่อุ่นในตู้เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ย้ายโอโอไซต์ลงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 4 หลุม ที่มีน้ำยา BO-IVF fertilization medium 400 ไมโครลิตร ที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี้ นำกลับเข้าตู้เพาะเลี้ยงเดิม เพื่อรอการหยอดน้ำเชื้อในหลุมดังกล่าว หลังจากหยอดน้ำเชื้อลงในหลุมที่มีโอโอไซต์แล้ว เพาะเลี้ยงต่อในตู้เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 18-19 ชั่วโมง

2.3 การเพาะเลี้ยงตัวอ่อน (*in vitro* embryo culture, IVC)

เมื่อสิ้นสุดเวลาการปฏิสนธิ ย้ายตัวอ่อนลงในน้ำยา TCM-199 เสริมด้วย FCS 5% และ penicillin-streptomycin 10,000 IU/ml อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ล้างอสุจิส่วนเกินและกำจัดเซลล์คิมูลัสออกจากโอโอไซต์ที่ผ่านกระบวนการ IVF แล้ว ด้วยเครื่อง vertex mixer และใช้ปิเปตต์ดูดตัวอ่อนเข้าออกหลายๆครั้ง จากนั้นล้าง 3 ครั้ง และเพาะเลี้ยงในน้ำยา BO-IVC 1 step culture medium (IVF Bioscience, UK) ที่อุ่นในตู้เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ออกซิเจน 5% อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ก่อนหน้า 2 ชั่วโมง โดยเพาะเลี้ยงตัวอ่อนในน้ำยาปริมาณ 500 ไมโครลิตร ปิดทับด้วย BO-OIL liquid paraffin (IVF Bioscience, UK) ปริมาณ 350 ไมโครลิตร เพาะเลี้ยงจนถึงวันที่ 6 (วันที่ 1 คือวันที่เริ่มเพาะเลี้ยง) จึงนำออกมาตรวจสอบการพัฒนาของตัวอ่อน ติดตามการพัฒนาของตัวอ่อนต่อไปทุกวันจนถึงวันที่ 8 บันทึกข้อมูลจำนวนตัวอ่อนที่มีพัฒนาการตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง จากนั้นแบ่งตัวอ่อนออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ เท่าๆกัน และนำเข้าสู่กระบวนการตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อน และเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนแต่ละชนิดต่อไป

3. การตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อน (embryo bisection)

ทำการอุ่นสารละลาย D-PBS ที่ไม่มีส่วนประกอบของแคลเซียมและแมกนีเซียม และมีน้ำตาลซูโครส 2.0 M (เพื่อทำให้ตัวอ่อนมีประจุเป็นลบ และติดที่พื้นจานเลี้ยงเชื้อที่มีประจุเป็นบวก) ที่อุณหภูมิ 37.5 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นน้ำยาดัดแบ่งตัวอ่อน จากนั้นหยดสารละลาย D-PBS ปริมาตร 60 ไมโครลิตร จำนวน 3-4 หยด ลงบนจานเลี้ยงเชื้อพลาสติกขนาด 90x20 มิลลิเมตร ใช้ micropipette ย้ายตัวอ่อนคุณภาพดีที่จะตัดแบ่งครึ่ง มาชะล้างอาหารเลี้ยงตัวอ่อนออกในสารละลาย D-PBS โดยย้ายตัวอ่อนที่ทำการชะล้างจากสารละลายหยดที่ 1 ไปจนถึงหยดที่ 4 ตามลำดับ เพื่อให้ตัวอ่อนติดบนจานเลี้ยงเชื้อพลาสติก (Herr et al., 1990) ใช้ใบมีดขนาดเล็กตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ทำการจุ่มใบมีดตัดตัวอ่อนลงใน

สารละลาย 95% ethyl alcohol น้ำกลั่น และอาหารเลี้ยงตัวอ่อน ตามลำดับ ก่อนทำการตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อน ทุกครั้ง เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอ่อนที่ถูกตัดแบ่งครึ่งติดใบมีด โดยตัวอ่อนระยะ M จะใช้วิธีการตัดแบ่งครึ่งให้เท่าๆกัน ในขณะที่ตัวอ่อนระยะ early blastocyst (EB) และ expanded blastocyst (ExB) จะใช้วิธีการตัดแบ่งครึ่งให้ตัวอ่อนแต่ละครึ่ง มีส่วนของ inner cell mass (ICM) และ trophoblast อย่างละเท่าๆกัน ดังปรากฏใน Figure. 1 จากนั้นนำตัวอ่อนที่ถูกตัดแบ่งครึ่งไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนแต่ละชนิด โดยเติมสารละลาย bovine serum albumin (BSA) เข้มข้น 0.7 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 2 ไมโครลิตร ลงในหยดน้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อนที่มีตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งภายใน เพื่อทำลายความแตกต่างของประจุ และทำให้สามารถเก็บตัวอ่อนขึ้นจากน้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อนได้ง่าย (Chaweewan et al., 1997)

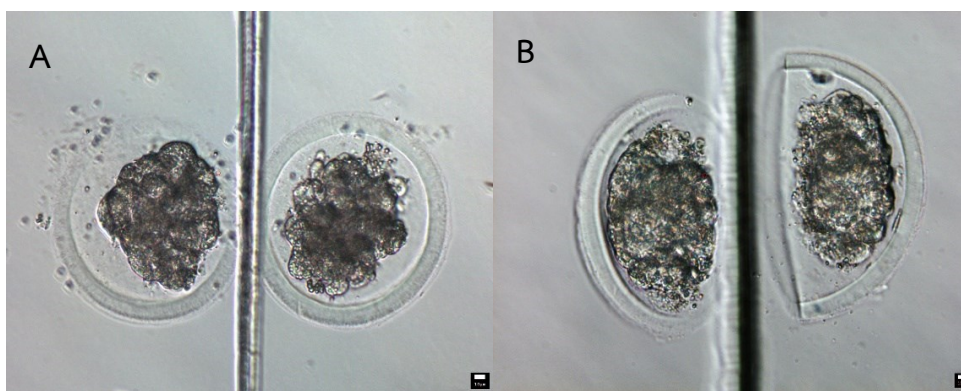


Figure 1. Morula (A) and blastocyst (B) were bisected by micro-blade before culture. (original magnification, X200 and white scale bar is 10 μ m)

4. การเลี้ยงตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง (demi-embryo culture)

อุ่นอาหารเลี้ยงตัวอ่อนที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนใช้งาน อาหารเลี้ยงตัวอ่อนแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ดังนี้

1) อาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิดที่ 1: D-PBS อ้างอิงจาก Chaweewan et al. (1997) มีส่วนประกอบดังนี้ D-PBS (14287-080, Gibco) มีส่วนผสมของ D-glucose 1 mg/ml และ Na pyruvate 0.036 mg/ml, Penicillin-streptomycin (15140-122, Gibco) ปริมาณ penicillin 100 IU/ml และ streptomycin sulfate 100 μ g/ml และเสริมด้วย FCS 20%

2) อาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิดที่ 2: Syntatic Oviductal fluid (SOF) อ้างอิงจาก Takahashi and First (1992) มีส่วนประกอบ ดังนี้ NaCl (S-1679, Sigma) 6.294 mg/ml, KCl (P-5405, Sigma) 0.534 mg/ml, KH_2PO_4 (P-5379, Sigma) 0.162 mg/ml, $\text{CuCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (C-7902, Sigma) 0.251 mg/ml, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (M-0250, Sigma) 0.1 mg/ml, NaHCO_3 (S-5761, Sigma) 2.106 mg/ml, Na Pyruvate (P-4562, Sigma) 0.033 mg/ml, BSA (A-4378, Sigma) 3 mg/ml, Phenol red (P-3532, Sigma) 0.001 mg/ml, Na Lactate (L-4263, Sigma) 28.2 μ l, L-Glutamine (G-8540, Sigma) 0.5%, Amino acid essentials (basal medium Eagle's, BME) 50x (B-6766, Sigma) 20%, Amino acid non-essentials (minimum essential medium, MEM) 100x (M7145, Sigma) 10% เสริมด้วย Epidermal growth factor (EGF) (E-9644, Sigma) 5% และ FCS 10%

3) อาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิดที่ 3: Bio-IVC® (IVF Bioscience, UK)

จากนั้นแบ่งจานเลี้ยงเชื้อพลาสติก ขนาด 35x10 มิลลิเมตร แบ่ง 4 ส่วนเท่าๆกัน จากนั้นเตรียมน้ำยาสำหรับเลี้ยงตัวอ่อน ปริมาตร 60 ไมโครลิตร จำนวน 4 หยด บนจานเลี้ยงเชื้อพลาสติกและปิดทับด้วย mineral oil และปิดฝาเตรียมไว้ในตู้เลี้ยงตัวอ่อนอุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เตรียมอาหารเลี้ยงตัวอ่อน ปริมาตร 60 ไมโครลิตร จำนวน 3-4 หยด ลงบนจานเลี้ยงเชื้อพลาสติก ขนาด 90x20 มิลลิเมตร จากนั้นใช้ micropipette ย้ายตัวอ่อนที่ถูกตัดแบ่งครึ่งในสารละลายสำหรับการตัดตัวอ่อน มาชะล้างสารละลายที่ตัดตัวอ่อนออกในอาหารเลี้ยงตัวอ่อน จำนวน 3-4 ครั้ง และย้ายตัวอ่อนลงเลี้ยงในหยดอาหารเลี้ยงตัวอ่อนจนครบ 4 หยด (2 ตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งต่อหยด) โดยตัวอ่อนระยะ M ใช้เวลาเลี้ยง 24 ชั่วโมง และตัวอ่อนระยะ EB ถึงระยะ HB ใช้เวลาเลี้ยง 3 ชั่วโมง เมื่อเลี้ยงครบในเวลาที่กำหนดแล้ว เข้าสู่กระบวนการประเมินพัฒนาการและคุณภาพของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งต่อไป

5. การประเมินพัฒนาการและคุณภาพของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง (demi-embryo evaluation) หลังเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อน

ตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง หลังเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อน จะถูกประเมินพัฒนาการและคุณภาพภายใต้กล้อง inverted microscope กำลังขยาย 100-200 เท่า โดยใช้เกณฑ์ของ Nagashima et al. (1989) และ Chaweewan et al. (1997) โดยคุณภาพตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง แบ่งออกได้เป็น 3 เกรด (Figure. 2) ดังนี้

1) เกรด 1: ตัวอ่อนที่ถูกตัดแบ่งครึ่ง มีการพัฒนารูปร่างเซลล์ โดยจะเริ่มมีการรัดตัวแน่นปรับเปลี่ยนรูปร่างให้กลับมาอยู่ในรูปลักษณะกลม คล้ายคลึงกับลักษณะของตัวอ่อนระยะ blastocyst (B) อีกครั้ง และมีการสร้าง blastocoel cavity ขึ้นมาใหม่ และสังเกตเห็น ICM ได้อย่างชัดเจน ไม่มีความผิดปกติของเซลล์หรือมีเพียงเล็กน้อย (น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์) เป็นตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่มีความสามารถในการรอดชีวิต

2) เกรด 2: ตัวอ่อนที่ถูกตัดแบ่งครึ่ง มีการพัฒนารูปร่างเซลล์ โดยจะเริ่มมีการรัดตัวแน่นปรับเปลี่ยนรูปร่างให้กลับมาอยู่ในรูปลักษณะกลม คล้ายคลึงกับลักษณะของตัวอ่อนระยะ B อีกครั้ง และมีการสร้าง blastocoel cavity ขึ้นมาใหม่ แต่สังเกตเห็น ICM ได้ไม่ชัดเจน และมีความผิดปกติของเซลล์หรือเซลล์ฝ่อ 10 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่มีความสามารถในการรอดชีวิต

3) เกรด 3: ตัวอ่อนที่ถูกตัดแบ่งครึ่ง มีพัฒนาการของเซลล์ไม่ดี ไม่มีการปรับเปลี่ยนคืนรูปกลับมาเป็นลักษณะกลม ไม่มีการสร้าง blastocoel cavity ขึ้นมาใหม่ ไม่พบ ICM มีความผิดปกติของเซลล์หรือเซลล์ฝ่อมากกว่า 20% มีการเกิดถุงน้ำ (vesicle) มาก หรือมี blastomere ที่ไม่เกาะกลุ่ม เป็นตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่ไม่มีความสามารถในการรอดชีวิต

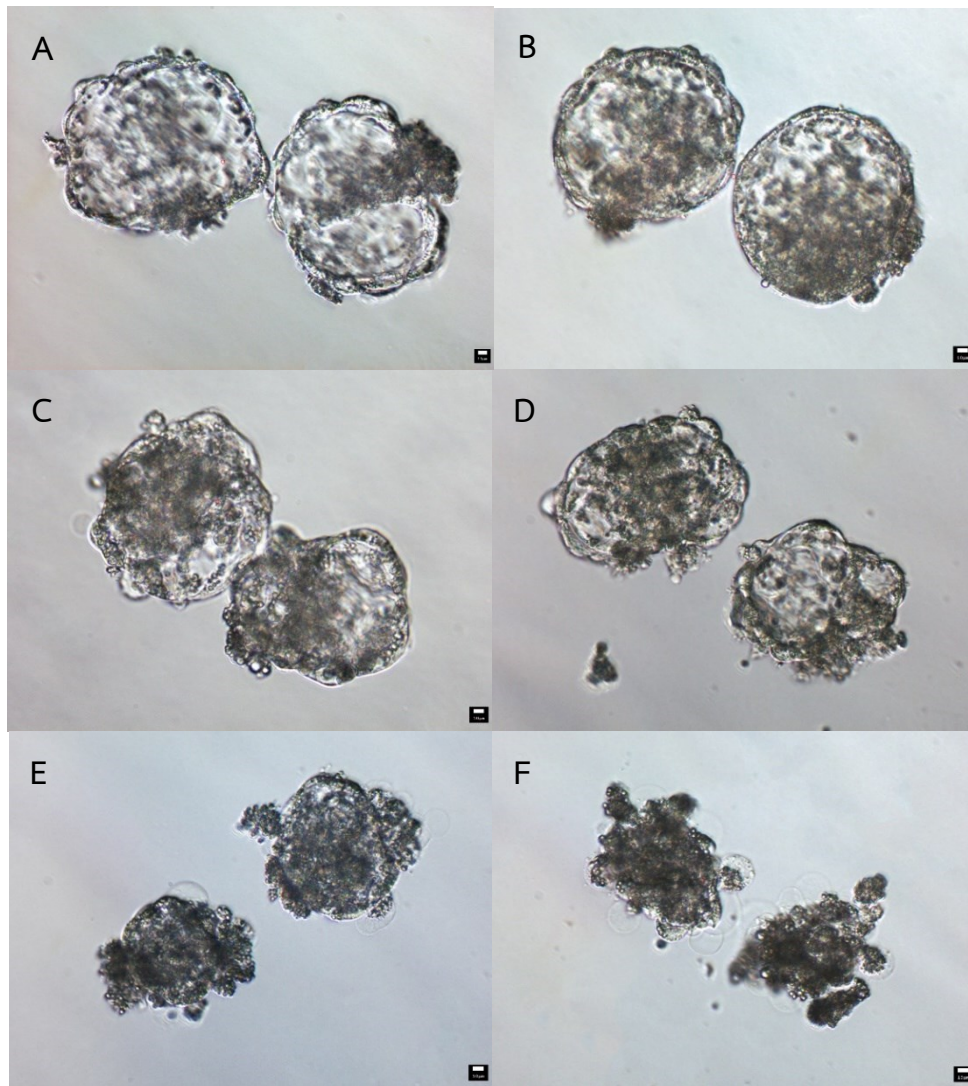


Figure 2. The quality of demi-embryos after culture which consist of grade 1: typical blastocyst with a distinct inner cell mass (A-B), grade 2: blastocyst with obscure inner cell mass (C-D) and grade 3: poorly developed or remarkably damaged blastocyst and trophoctodermal vesicle without a inner cell mass (E-F) (original magnification, X200 and white scale bar is 10 um)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (Statistical analysis)

หุ่นจำลองทางสถิติที่ใช้ในการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการรอดชีวิตและคุณภาพของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง ประกอบด้วย ชนิดของน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน ระยะของตัวอ่อนก่อนทำการตัดแบ่งครึ่ง และอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนกับระยะตัวอ่อนก่อนทำการตัดแบ่งครึ่ง จะถูกประมาณค่าด้วยวิธีการวิเคราะห์การถดถอยโลจิสติก (logistic regression) โดยสามารถเขียนอธิบายได้ดังนี้

$$\ln \left(\frac{P_i}{1 - P_i} \right) = b_0 + b_1 \text{State} + b_2 \text{cMedia} + b_3 (\text{State} \times \text{cMedia}) + e$$

เมื่อ

P_i = ความน่าจะเป็นของความสามารถในการรอดชีวิตและคุณภาพของตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง

b_0 = จุดตัดแกน y

b_1, b_2, b_3 = ค่าสัมประสิทธิ์ regression ของตัวแปรอิสระที่ประมาณได้จากข้อมูล

State = อิทธิพลของระยะของตัวอ่อนก่อนทำการตัดแบ่งครั้ง

cMedia = อิทธิพลของชนิดของน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน

(State x cMedia) = อิทธิพลร่วมระหว่างระยะของตัวอ่อนก่อนทำการตัดแบ่งครั้งกับชนิดของน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน

e = ความคลาดเคลื่อนจากปัจจัยอื่น, $NID \sim (0, \sigma_e^2)$

ทั้งนี้ ค่าประมาณความน่าจะเป็นสำหรับความสามารถในการรอดชีวิตและคุณภาพของตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง (P_i) คำนวณได้โดย

$$\hat{P}_i = e^{b_0 + b_i} / (1 + e^{b_0 + b_i})$$

เมื่อ

b_0 = เป็นค่า intercept ที่ประมาณได้

b_i = ค่าสัมประสิทธิ์ regression ของตัวแปรอิสระที่ประมาณได้จากข้อมูล

e = exponential constant

ผลการทดลองและวิจารณ์

การศึกษารั้งนี้ พบว่า อาหารเลี้ยงตัวอ่อนและระยะของตัวอ่อนก่อนทำการตัดแบ่งครั้งมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตและคุณภาพของตัวอ่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ในขณะที่ไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างระยะของตัวอ่อนก่อนทำการตัดแบ่งครั้งกับชนิดของน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่ส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตและคุณภาพของตัวอ่อนหลังการตัดแบ่งครั้ง

ตัวอ่อนที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด BO-IVC® และชนิด SOF มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าอาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด D-PBS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ดังปรากฏใน Table 2 และเมื่อพิจารณาคุณภาพของตัวอ่อนหลังการตัดแบ่งครั้ง พบว่า ตัวอ่อนที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด BO-IVC® ได้ปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง เกรด 1 สูงกว่าอาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด SOF และสูงกว่าชนิด D-PBS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างกันของปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง เกรด 2 ในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนที่แตกต่างกัน และพบว่า อาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด D-PBS ได้ปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง เกรด 3 สูงกว่าชนิด SOF และ BO-IVC® อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างของปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง เกรด 3 ในตัวอ่อนที่เลี้ยงใน อาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด SOF และชนิด BO-IVC® (Table 3)

สำหรับอิทธิพลของระยะของตัวอ่อนก่อนทำการตัดแบ่งครึ่ง พบว่า ตัวอ่อนระยะ ExB, HB และ B มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าตัวอ่อนระยะ M อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ในขณะที่ตัวอ่อนระยะ EB มีอัตราการรอดชีวิตไม่แตกต่างกับตัวอ่อนระยะอื่นๆ (Table 2) ตัวอ่อนก่อนการตัดแบ่งครึ่งระยะ ExB, HB และ B จะได้ตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง เกรด 1 ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน โดยตัวอ่อนระยะ ExB และ HB จะได้ปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง เกรด 1 มากกว่าตัวอ่อนระยะ EB และ M อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) ขณะที่ไม่พบความแตกต่างของปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง เกรด 1 ที่ได้จากตัวอ่อนระยะ B และ EB และไม่พบความแตกต่างของปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง เกรด 2 ที่ได้จากตัวอ่อนที่มีระยะแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่า ตัวอ่อนระยะ M และ EB จะได้ปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง เกรด 3 มากกว่า ตัวอ่อนระยะ ExB และ HB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) โดยตัวอ่อนระยะ B และ EB จะได้ปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง เกรด 3 ไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง เกรด 3 ที่ได้จากตัวอ่อนระยะ ExB, HB และ B (Table 3)

Table 2. Effect of culture medium and embryonic stage on survival rate of cultured demi-embryo

Factor	No. of demi- embryos	No. of Survived demi-embryo	Total survival rate (%)	Probability of Survived demi-embryo (P_i)
Culture medium				
D-PBS	152	76	50.00	0.69 ^a
SOF	154	123	79.87	0.93 ^b
BO-IVC®	152	132	86.84	0.96 ^b
Embryonic stage				
Morula	112	66	58.93	0.80 ^a
Early blastocyst	80	53	66.25	0.86 ^{ab}
Blastocyst	126	96	76.19	0.91 ^b
Expanded blastocyst	74	62	83.78	0.94 ^b
Hatched blastocyst	66	54	81.82	0.93 ^b

^{a,b} Probability of survived demi-embryo within a column with different superscripts are different ($P < 0.01$)

Table 3. Effect of culture medium and embryonic stage on quality of demi-embryos after culture

Factor	No. of demi-embryos	Quality of demi-embryos after culture			Probability of demi-embryos quality (P _i)		
		Grade	Grade	Grade	Grade		
		1	2	3	1	2	3
Culture Medium							
D-PBS	152	23 (15.1)	53 (34.9)	76 (50.0)	0.25 ^a	0.44	0.45 ^a
SOF	154	71 (46.1)	52 (33.8)	31 (20.1)	0.70 ^b	0.43	0.17 ^b
BO-IVC [®]	152	91 (59.9)	41 (26.9)	20 (13.2)	0.84 ^c	0.34	0.10 ^b
Embryonic stage							
Morula	112	30 (26.8)	36 (32.1)	46 (41.1)	0.42 ^a	0.44	0.39 ^a
Early blastocyst	80	28 (35.0)	25 (31.2)	27 (33.8)	0.52 ^{ab}	0.43	0.34 ^{ab}
Blastocyst	126	53 (42.1)	43 (34.1)	30 (23.8)	0.62 ^{bc}	0.48	0.22 ^{bc}
Expanded blastocyst	74	40 (54.1)	22 (29.7)	12 (16.2)	0.70 ^c	0.42	0.15 ^c
Hatched blastocyst	66	34 (51.5)	20 (30.3)	12 (18.2)	0.70 ^c	0.43	0.17 ^c

^{a,b,c} Probability of demi-embryos quality within a column with different superscripts are different ($P < 0.01$)

การพิจารณาการรอดชีวิตของตัวอ่อนจะพิจารณาจากการพัฒนาของตัวอ่อนจากการสร้าง blastocoel cavity ขึ้นมาใหม่และสังเกตเห็น ICM ได้อย่างชัดเจน (McEvoy and Sreenan, 1990; Chaweewan et al., 1997) จากการศึกษาครั้งนี้ ชี้ให้เห็นถึงอิทธิพลของอาหารเลี้ยงตัวอ่อนที่มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง เนื่องจากปัจจุบันอาหารเลี้ยงตัวอ่อนมีการพัฒนาเป็นอย่างมาก ส่งผลให้การเลี้ยงตัวอ่อนมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ในการทดลองนี้ผู้วิจัยได้ใช้อาหารเลี้ยงตัวอ่อนสำเร็จรูปชนิด BO-IVC[®] และอาหารเลี้ยงตัวอ่อนที่ผสมเอง ชนิด SOF ซึ่งปกติอาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด SOF จะถูกนำมาใช้เป็นอาหารสำหรับในกระบวนการ IVF และ IVC การศึกษาครั้งนี้ได้นำมาประยุกต์ใช้ในการเลี้ยงตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง พบว่าประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงตัวอ่อนทั้ง 2 ชนิดนี้ มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตที่ไม่แตกต่างกัน อาจเป็นผลมาจากส่วนผสมและคุณสมบัติทางเคมีในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนทั้ง 2 ชนิด มีความเหมาะสมกับการพัฒนาการเจริญของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งมากกว่าอาหารเลี้ยงตัวอ่อนที่ผสมเองชนิด D-PBS ที่ผ่านมา มีการศึกษาการเลี้ยงตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งด้วยการเสริมสารต่างๆ เพื่อเพิ่มอัตราการรอดชีวิตและพัฒนาการของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งให้ดีขึ้น โดยส่วนผสมหลักของอาหารเลี้ยงตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง มีส่วนผสมของสารละลาย PBS และเสริมด้วย FCS ร้อยละ 10-20 และมีการนำไปใช้เลี้ยงตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งในหลายชนิดสัตว์ เช่น ตัวอ่อนโค (Niemann et al., 1986; Seike et al., 1989; Arave et al., 1987; Lucas-Hahn and Niemann, 1991) ตัวอ่อนสุกร (Nagashima et al., 1989; Stein-Stefani and Holtz, 1994) และตัวอ่อนแพะ (Yong and Jianchen,

1990; Chaweewan et al., 1997) อาหารเลี้ยงตัวอ่อน ชนิด BO-IVC[®] ได้ปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง เกรด 1 สูงกว่าชนิด SOF และสูงกว่าชนิด D-PBS ปัจจุบันอาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด BO-IVC[®] ได้รับความนิยมนำมาใช้เลี้ยงตัวอ่อนในหลายชนิดสัตว์ เช่น การผลิตตัวอ่อนโค (Nielsen et al., 2014) การผลิตตัวอ่อนอูฐ (Olsson et al., 2021) การผลิตตัวอ่อนแพะและแกะ (Markle et al., 2018; Stoltzfus et al., 2018; Monendrez-Blanco et al., 2019) และการผลิตตัวอ่อนแมว (Kij et al. 2020) เป็นต้น เนื่องจาก สามารถผลิตตัวอ่อนที่มีคุณภาพดีลดขั้นตอนของกระบวนการเตรียมอาหารเลี้ยงตัวอ่อน ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของกระบวนการ IVP ส่วนอาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด SOF ได้ปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง เกรด 1 สูงกว่าชนิด D-PBS เมื่อพิจารณาส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งทั้ง 2 ชนิดนี้ พบว่า มีปริมาณของ pyruvate ที่ใกล้เคียงกัน (0.0033 mg/ml และ 0.0036 mg/ml) จากรายงานของ Takahashi and First (1992) พบว่า อาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด SOF ที่มีการเติม lactate 3.3 mM และ pyruvate 0.3 mM จะมีความสำคัญในการสร้างพลังงานและช่วยส่งผลต่อพัฒนาการของตัวอ่อน โดยเฉพาะในตัวอ่อนระยะ M ในขณะที่อาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด D-PBS จะมี pyruvate และ glucose เป็นแหล่งพลังงานให้กับตัวอ่อน แต่กลับได้ปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง เกรด 1 ต่ำที่สุด โดยในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด D-PBS มีระดับ glucose มีปริมาณที่สูงเกินความจำเป็นในการพัฒนาของตัวอ่อนและมีแนวโน้มเป็นอันตรายต่อเซลล์ตัวอ่อน โดยเฉพาะตัวอ่อนระยะ M (Takahashi and First, 1992) จากการศึกษาเมแทบอลิซึม (metabolism) ของสารตั้งต้นที่เป็นแหล่งพลังงาน เช่น glucose, glutamine และ pyruvate ในการเลี้ยงตัวอ่อนโคระยะ B (ตัวอ่อนวันที่ 7) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง โดยพิจารณาจากปริมาณสารตั้งต้นที่ถูกใช้ไป (substrate consumed) และผลิตน้ำและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า มีการขัดขวางการทำงานของกระบวนการ glycolysis ของตัวอ่อน โดยพบว่า ปริมาณ glucose ที่ถูกนำไปใช้ รวมถึงปริมาณน้ำและแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ไม่มีความแตกต่าง แสดงให้เห็นว่า ตัวอ่อนระยะ B มีการขาด หรือถูกยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pyruvate kinase จึงส่งผลให้ไม่สามารถเปลี่ยน phosphoenolpyruvate (PEP) เป็น pyruvate ได้ (Rieger and Guay, 1988) ซึ่งให้เห็นว่า glucose อาจไม่มีความจำเป็นในการใช้เป็นแหล่งพลังงานของตัวอ่อนและตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง ทั้งนี้ควรให้ความสำคัญกับสารตั้งต้นที่ใช้เป็นแหล่งพลังงานตัวอื่น เช่น lactate, pyruvate และ glutamine เป็นต้น อย่างไรก็ตามการเติม lactate และ pyruvate ในปริมาณที่ไม่เหมาะสม อาจส่งผลต่อการปรับเปลี่ยนของสัดส่วน ATP ต่อ ADP ภายในเซลล์สูงขึ้น ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport chain, ETC) และลดความสามารถของ NAD⁺ ในการเปลี่ยน lactate เป็น pyruvate ด้วยเอนไซม์ lactate dehydrogenase (Quinn et al., 1973) จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า อาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด SOF มีอัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งเทียบเคียงกับชนิด BO-IVC[®] แตกต่างกันในด้านคุณภาพของตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง เกรด 1 เท่านั้น จึงเป็นการยืนยันได้ว่าการเติม lactate และ pyruvate ในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด SOF เหมาะสมต่อการนำมาใช้เลี้ยงตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง สำหรับการเติม glutamine อย่างที่ได้กล่าวข้างต้น glutamine เป็นแหล่งของพลังงานในกระบวนการเมแทบอลิซึมของตัวอ่อนในโค และยังเป็นสารตั้งต้นที่ช่วยกระตุ้นการเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle) เพื่อให้ได้พลังงานแก่เซลล์ตัวอ่อน (Rieger and Guay, 1988) และการเติม amino acid ชนิด BME และ MEM มีส่วนช่วยในการพัฒนาและเพิ่มจำนวนเซลล์ของตัวอ่อนระยะ M และ B (Takahashi and First, 1992) นอกจากนี้การเสริม BSA มีส่วนช่วยในการพัฒนาของตัวอ่อน ทำให้เซลล์ของตัวอ่อนยึดเกาะกันได้ดี และมีส่วนช่วยป้องกันสารพิษจากส่วนประกอบในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน หรือสารที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของตัวอ่อน (Kane, 1987) และ

น้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนชนิด SOF มีการเสริม EGF ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม polypeptide มีส่วนช่วยในการเพิ่มจำนวนเซลล์ (cell proliferation) ของตัวอ่อนโค จากการศึกษากของ Mtango et al. (2002) ที่ทำการศึกษากลุ่มของ growth hormone (GH) และ EGF ในการผลิตตัวอ่อนโค พบว่า มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ตัวอ่อนระยะ B ในกลุ่ม GH และ EGF เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่นๆ ทั้ง GH และ EGF ยังสามารถพัฒนาคุณภาพตัวอ่อนและส่งผลต่อการตั้งท้องที่สูงขึ้นด้วย และยังมีรายงานสนับสนุนว่า EGF ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนตัวอ่อน ระยะ B (Zahmatkesh et al., 2013; Sirisathien and Brackette, 2003) โดยตัวรับ (receptor) ของ EGF จะอยู่ที่ cumulus-oocyte complex (COCs) และตัวอ่อนทุกระยะจนถึงระยะ B (Lanergan et al., 1996) และ EGF ยังมีประโยชน์ในการลดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ที่เกิดจากความไม่สมดุลระหว่างอนุมูลอิสระ (Kurzawa et al., 2004) ส่งผลให้สารพันธุกรรม (DNA) โปรตีน และสารอื่นๆ ถูกทำลายและทำให้เกิดการตายของเซลล์ (apoptosis) ตัวอ่อนได้ ดังนั้น EGF จึงมีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ DNA รวมไปถึงการสังเคราะห์โปรตีนที่ส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ (Carpenter and Cohen, 1990) และพบว่า การเติม EGF ร่วมกับ hyaluronic acid (HA) สามารถช่วยให้มีการพัฒนาของนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์ให้สมบูรณ์ และสามารถช่วยในการพัฒนาของตัวอ่อนโคถึงระยะ B เพิ่มสูงขึ้น (Rios et al., 2014) และอาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด BO-IVC®, SOF และ D-PBS มีผลต่อปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง เกรด 2 ไม่แตกต่างกัน และอาหารเลี้ยงตัวอ่อน ชนิด D-PBS ได้ปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง เกรด 3 สูงกว่า อาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด SOF และ BO-IVC จากการศึกษาดังกล่าวอาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด D-PBS อาจจะมีสารอาหารไม่เหมาะสมต่อการพัฒนาของตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง เนื่องด้วยอาหารเลี้ยงตัวอ่อน ชนิด D-PBS มีส่วนผสมของ glucose 1 mg/ml หรือเทียบเท่า 0.56 mM ซึ่งมีความเป็นอันตรายต่อเซลล์ตัวอ่อน จึงส่งผลทำให้อัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งอยู่ในระดับต่ำ ลดลงเหลือเพียง ร้อยละ 50 และได้ปริมาณคุณภาพตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง เกรด 3 สูงกว่าตัวอ่อนระยะอื่นๆ และอาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด SOF และ BO-IVC® มีผลต่อคุณภาพตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง เกรด 3 ไม่แตกต่างกัน

ตัวอ่อนระยะ ExB, HB และ B มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าตัวอ่อนระยะ M อย่างชัดเจน แต่ไม่มีความแตกต่างกับตัวอ่อนระยะ EB สอดคล้องกับการศึกษาของ Chaweewan et al. (1997) ได้ทำการศึกษ้อัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนแพะตัดแบ่งครั้ง พบว่า ระยะ ExB และ HB มีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าตัวอ่อนตัดแบ่งครั้งที่ได้จากตัวอ่อนระยะอื่นๆ และตัวอ่อนระยะ M มีอัตราการรอดชีวิตที่ต่ำที่สุด และไม่สามารถพัฒนาจนมีคุณภาพที่ดีได้ในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด D-PBS และพบว่า ตัวอ่อนระยะ M มีความทนทานต่อการตัดแบ่งครั้งได้ไม่ดี มีการสูญเสียเซลล์มากกว่า และมีการยึดเกาะกันระหว่างเซลล์ที่น้อยกว่าตัวอ่อนระยะ ExB และ HB ร่วมกับการยึดเกาะของเซลล์ยังไม่แน่น อาจส่งผลทำให้ลดประสิทธิภาพการขนส่งสารอาหาร สารเคมีระหว่างเซลล์ต่อการพัฒนาของตัวอ่อนที่ถูกตัดแบ่งครั้งและส่งผลต่ออัตราการรอดชีวิตที่ต่ำ ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ McEvoy and Sreenan (1990) ได้ทำการศึกษในตัวอ่อนโคตัดแบ่งครั้ง ซึ่งเสริมสารในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนที่แตกต่างจากการศึกษาครั้งนี้ และระยะเวลาที่ใช้เลี้ยงตัวอ่อนตัดแบ่งครั้ง นาน 48 ชั่วโมง ไม่พบความแตกต่างของอัตราการรอดชีวิตระหว่างตัวอ่อนระยะ M และ B อย่างไรก็ตาม มีรายงานสนับสนุนว่า การนำตัวอ่อนระยะท้ายๆของการพัฒนาก่อนมีการฝังตัวมาตัดแบ่งครั้ง จะทำให้ประสบความสำเร็จสูงกว่าการตัดแบ่งครั้งตัวอ่อนที่อยู่ระยะการพัฒนาลดกว่า (Nowshari and Holtz., 1993) และตัวอ่อนระยะ HB มีจำนวนเซลล์ที่มีขนาดเล็กอัดแน่นจำนวนมาก ทนต่อการถูกตัดแบ่งครั้งได้ดีกว่าตัวอ่อนระยะอื่นๆ (Tsunoda et al., 1985)

ตัวอ่อนระยะ ExB, HB และ B ได้ปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง เกรด 1 สูงกว่า ตัวอ่อนระยะ M และตัวอ่อนระยะ ExB และ HB ได้ปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง เกรด 1 สูงกว่าตัวอ่อนระยะ EB ที่สอดคล้องกับรายงานของ Nagashima *et al.* (1989) พบว่า ตัวอ่อนระยะ B สามารถผลิตตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง เกรด 1 ได้มากกว่าเกรดอื่นๆ จากการรายงานของ Chaweewan *et al.* (1997) พบว่า ตัวอ่อนระยะ ExB, HB และ B เป็นตัวอ่อนที่มีพัฒนาการสูงกว่าตัวอ่อนระยะ M ซึ่งผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและหน้าที่ (differentiate) ของเซลล์ครั้งแรกแล้ว ส่งผลทำให้มีศักยภาพในการพัฒนาสูง และตัวอ่อนระยะ M ไม่สามารถพัฒนาจนมีคุณภาพที่ดีได้ในอาหารเลี้ยงตัวอ่อน และจากรายงานของ Shelton (1992) พบว่า ตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่ได้จากตัวอ่อนระยะ B มีการรอดชีวิตสูงกว่าตัวอ่อนระยะ M จากข้อมูลข้างต้นนี้ สามารถยืนยันได้ว่า ตัวอ่อนที่มีพัฒนาการระยะที่สูงกว่า มีจำนวนเซลล์ที่มากกว่า มีการยึดเกาะกันแน่นกว่า เป็นส่วนสำคัญทำให้ได้ปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งหลังเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อน มีพัฒนาการและมีคุณภาพดี (Udy 1987; Losskutoff *et al.*, 1993) ตัวอ่อนระยะ B และ EB ได้ปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง เกรด 1 ไม่แตกต่างกัน และตัวอ่อนทุกระยะได้ปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง เกรด 2 ไม่แตกต่างกัน ตัวอ่อนระยะ M มีตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง เกรด 3 สูงกว่าตัวอ่อนระยะ B, HB และ ExB ตัวอ่อนระยะ EB ได้ปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง เกรด 3 สูงกว่าตัวอ่อนระยะ HB และ ExB โดยที่ตัวอ่อนระยะ EB และ B มีตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง เกรด 3 ไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า การใช้ใบมีดตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนระยะ M ส่งผลทำให้ได้ปริมาณตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง เกรด 3 สูงถึง 41 % อาจเป็นผลจากจำนวนเซลล์และการอัดแน่นของเซลล์ของตัวอ่อนระยะ M ที่น้อยกว่าระยะอื่นๆ และจากการตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนด้วยใบมีด พบว่า มีการสูญเสียเซลล์ประมาณ 25–30 เปอร์เซ็นต์ของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่เจริญและรอดชีวิตในเกรด A และ B และการสูญเสียเซลล์ประมาณ 65 เปอร์เซ็นต์ของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่เสื่อมสลายในเกรด C (Tao *et al.*, 1995) ดังนั้น การสูญเสียของเซลล์มีผลต่อการเจริญเติบโตหรือการรอดชีวิตและสัมพันธ์กับคุณภาพตัวอ่อนที่ถูกตัดแบ่งครึ่งหลังจากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อน

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้ สรุปได้ว่า ชนิดของอาหารเลี้ยงตัวอ่อนและระยะตัวอ่อนมีผลต่ออัตราการรอดชีวิตและคุณภาพของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง ดังนั้น การเพิ่มอัตราการรอดชีวิตและการผลิตตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งให้ได้คุณภาพ เกรด 1 ควรเลือกตัวอ่อนระยะ ExB, HB และ B มาตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อนด้วยใบมีดขนาดเล็ก และนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด BO-IVC® และ SOF ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

สามารถนำองค์ความรู้และวิธีการผลิตตัวอ่อนโคตัดแบ่งครึ่ง ด้วยการใช้ใบมีดขนาดเล็กไปใช้ขยายพันธุ์ในโคที่มีพันธุกรรมดีและราคาสูง หรือในปศุสัตว์ชนิดอื่นๆ เพื่อให้ได้ปริมาณตัวอ่อนจำนวนมากขึ้นในระยะเวลาสั้น ลดต้นทุนค่าใช้จ่ายการผลิตตัวอ่อน คำนึงต่อการลงทุน เพิ่มความสำเร็จของการย้ายฝากตัวอ่อน และลดการนำเข้าตัวอ่อน พ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ราคาสูงจากต่างประเทศ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อน และเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ คุณนิตยา วาปีกา นักวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความรู้และตรวจหาโอโอไซด์รวมถึงปฏิบัติงานผลิตตัวอ่อนจากการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ช่วยเหลืองานวิจัยครั้งนี้ ประสบความสำเร็จเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Arave, C. W., T. D. Bunch, C. H. Michelsen and K. Warnick. 1987. Factor affecting survivability of transferred whole and demi-embryos in a commercial dairy herd. *Theriogenology* 28(3): 373-382.
- Baker, R. D. and B. F. Shea. 1985. Commercial splitting of bovine embryos. *Theriogenology* 23: 3-12.
- Baldassarre, H. and C.N. Karatzas. 2004. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Animal Reproduction science*. 82-83: 255-266.
- Carpenter, G. and S. Cohen. 1990. Epidermal growth factor. *J. Biol. Chem.* 265:7709-7712.
- Chaweewan, K., S. Simarak, J. Sumretprasong and S. Katawatin. 1997. Effect of embryonic stage and quality on survivability of goat demi-embryos after culture. *Proceedings of 35th Kasetsart University Annual Conference: Animal Science, Veterinary Science*, 3-5 February 1997 :11-19.
- Hashiyada, Y. 2017. The contribution of efficient production of monozygotic twins to beef cattle breeding. *J. Repro. Dev.* 63:527-538.
- Herr, C. M., N. A. Holtz, Y. Pietrzak, K. Old and K. Reed. 1990. Increased number of pregnancies per collected embryo by bisection of blastocyst stage ovine embryos. *Theriogenology* 33:244.
- Kane, M.T. 1987. In vitro growth of preimplantation rabbit embryos. *The mammalian preimplantation embryo*. 193-217.
- Kij, B., J. Kochan, A. Nowak, W. Nizanski, S. Prochowska, K. Fryc and M. Bugno-Poniewieska. 2020. Using Time Lapse Monitoring for Determination of Morphological Defect Frequency in Feline Embryos after in Vitro Fertilization (IVF). *Animal* 10(3):1-7.
- Kurzawa, R., W. Glabowski, T. Baczkowski, B. Wiszniewska and M. Marchlewicz. 2004. Growth factors protect in vitro cultured embryos from the consequences of oxidative stress. *Zygote*. 12:231-240.
- Illmensee, K. and M. Levanduski. 2010. Embryo splitting. *Middle East Fertility Society Journal* 15: 57-63

- Lonergan, P., C. Carolan, A. Van Langendonckt, I. Donnay, H. Khatir and P. Mermillod. 1996. Role of epidermal growth factor in bovine oocyte maturation and preimplantation embryo development in vitro. *Biol. Reprod.* 54:1420-1429.
- Loskutoff, N.M., W.H. Johnson and K.J. Betteridge. 1993. The developmental competence of bovine embryos with reduced cell numbers. *Theriogenology* 39(1):95-107
- Markle, M., C.K. Mak, V. Medina and C.R. Pinto. 2018. In vitro maturation of ovine and caprine oocytes during breeding and nonbreeding seasons. *Reproduction, Fertility and Development* 31(1) 207-207 Online. <https://doi.org/10.1071/RDv31n1Ab165>
- McEvoy, T.G. and J.M. Sreenan. 1990. Effect of embryo quality and stage of development on the survival of zona pellucida-free cattle demi-embryo. *Theriogenology* 33(6):1245-1253
- Menendez-Blanco, I., M.G. Catala, M. Roura, S. Soto-Heras, A.R. Piras, D. Izquierdo and M.T. Paramio. 2019. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) of prepubertal goat oocytes using fresh and frozen-thawed semen. *Small Ruminant Research* 170:137-142.
- Mtango, N.R., M.D. Varisanga and T. Suzuki. 2002. Effects of growth hormone and growth factors on the improvement of culture conditions of in vitro produced bovine embryos. *Pakis. J. Biol. Sci.* 5(5): 604-606.
- Nagashima, H., Y. Kato and S. Ogawa. 1989. Microsurgical bisection of porcine morulae and blastocysts to produce monozygotic twin pregnancy. *Gamete Research* 23:1-9.
- Nielsen, J.M.K., C. Wrenzycki, P. Hyttel, F. Poppicht and L. Strobech. 2014. New culture media affects blastocyst development And gene expression levels in in vitro-produced bovine embryo. *Reproduction, Fertility and Development* 27(1):206-207. Online. <https://doi.org/10.1071/RDv27n1Ab234>
- Niemann, H., G. Brem, B. Sacher, D. Smidt and H. Krausslich. 1986. An approach to successful freezing of demi-embryos derived from day-7 bovine embryos. *Theriogenology* 25(4):519-524.
- Nowshari, M.A., and W. Holtz. 1993. Transfer of split goat embryos without zonae pellucidae either fresh or after freezing. *J. Anim. Sci.* 71: 3403-3408.
- Olsson, P.O., A. H. Tinson, N.A. Shamsi, K.S. Kuhad, R. Singh, Y.B. Son, Y. Jeong, Y. W. Jeong, L. Cai, K. Sakaguchi, S. Kim, E. J. Choi, X. Yu and W. S. Hwang. 2021. Blastocyst formation, embryo transfer and breed comparison in the first reported large scale cloning of camels. Online. <https://www.nature.com/articles/s41598-021-92465-9>
- Quinn, P. and R.G. Wales. 1973. Uptake and metabolism of pyruvate and lactate during preimplantation development of mouse embryo in vitro. *J. Reprod. Fertil.* 35: 273-287.

- Reichelt, B. and H. Niemann. 1994. Generation of identical twin piglets following bisection of embryos at the morula and blastocyst stage. *Journal of Reproduction and Fertility* 100: 163-172.
- Rieger, D. and P. Guay. 1988. Measurement of the metabolism of energy substrates in individual bovine blastocysts. *J. Reprod. Fertil.* 83: 585-591.
- Rios, G.L., J. Buschiazzi, N.C. Mucci, G.G. Kaiser and A. Cesari. 2014. Combined epidermal growth factor and hyaluronic acid supplementation of in vitro maturation medium and its impact on bovine oocyte proteome and competence. *Theriogenology* 83(5):874-880.
- Seidal, Jr., G. E. 1982. Applications of micro surgery of mammalian embryos. *Theriogenology* 17: 23-24.
- Seike, N., M. Teranishi, S. Yamada, R. Takakura, Y. Nagao and H. Kanagawa. 1989. Increase in claf production by the transfer of bisected bovine embryos. *The Japanese Journal of Veterinary Science* 51(6):1193-119.
- Shelton, J.N. 1992. Factors affecting viability of fresh and frozen-thawed sheep demi-embryos. *Theriogenology* 37:713-721.
- Sirisathien, s. and B.G. Brackett. 2003. Tunel analyses of bovine blastocysts after culture with EGF and IGF-I. *Mol. Reprod. Dev.* 65:51-56.
- Stein-Stefani, J. and W. Holtz. 1994. Splitting of porcine embryos at the four-cell or morula stage. *Theriogenology* 41:961-968.
- Stoltzfus, M., J. Wayman, R. Stilz and D. Bresnahan. 2018. Sex ratio of in vitro-produced goat embryos. *Reproduction, Fertility and Development* 31(1):197-197. Online.<https://doi.org/10.1071/RDv31n1Ab144>
- Takahashi, Y. and N.L. First. 1992. In vitro development of bovine one-cell embryo: influence of glucose, lactate, pyruvate, amino acids and vitamins. *Theriogenology* 24:963-978.
- Tao, T., B. Reichelt and H. Niemann. 1995. Ratio of inner cell mass and trophoblastic cells in demi- and intact pig embryos. *Journal of Reproduction and Fertility* 104:251-258.
- Tsunoda, Y., T. Tokunaga, T. Sugie and M. katsumata. 1985. Production of monozygotic twins following the transfer of bisected embryos in the goats. *Theriogenology* 24(3):337-343.
- Udy, G.B. 1987. Commocial splitting of goat embryos. *Theriogenology* 28(6):837-847.
- Willadsen, S.M., H. Lehn-Jensen, C.B. Fehilly and R. Newcomb. 1981. The production of monozygotic twins of preselected parentage by micromanipulation of non-surgically collected cow embryos. *Theriogenology* 15:23-29.
- William, T. J., R. P. Elsdon, and G. E. Seide Jr. 1984. Pregnancy rate with bisected bovine embryos. *Theriogenology* 22:521-531.

- Yong, Z. and W. Jianchen. 1990. Production of monozygotic goat twins by transfer of frozen-thawed demi-embryos. *Theriogenology* 33(1):3.
- Zahmatkesh, A., M.A. Roudbar and M.D. Joupari. 2013. A comparative study of EGF effects on in vitro bovine embryo development in monoculture and sequential media. *Turk. J. Biol.* 37:670-674

การเพิ่มประสิทธิภาพการย้ายฝากตัวอ่อนด้วยฮอร์โมน GnRH ในแม่โคเนื้อพันธุ์บราห์มันลูกผสม ในระดับฟาร์มเกษตรกร

ทิวกร ดอนสิงห์^{1/} บัญชา สืบสีมา^{2/} ณรงค์กร เกษมสุข^{1/} นพรัตน์ บุญชูใส^{1/}

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการย้ายฝากตัวอ่อนด้วยฮอร์โมน GnRH ในแม่โคเนื้อพันธุ์บราห์มันลูกผสมในระดับฟาร์มเกษตรกร ในพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานีและจังหวัดศรีสะเกษ จำนวน 3 ฟาร์มๆละ 24 ตัว รวมแม่โคตัวรับ 72 ตัว โดยดำเนินการฝากตัวอ่อนให้กับแม่โคภายหลังการเป็นสัดตามธรรมชาติ 7 วัน ระหว่างเดือนตุลาคม 2562 ถึง มีนาคม 2563 วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design ; RCBD) กำหนดให้ฟาร์มเป็นบล็อกและทรีทเมนต์เป็นรูปแบบการใช้ฮอร์โมนในขั้นตอนการย้ายฝากตัวอ่อน 3 รูปแบบ ได้แก่ 1) กลุ่มควบคุมไม่ฉีดฮอร์โมน GnRH 2) กลุ่มที่ฉีดฮอร์โมน GnRH ในวันที่แสดงอาการเป็นสัดขึ้นนิ่ง 3) กลุ่มที่ฉีดฮอร์โมน GnRH วันที่เป็นสัดขึ้นนิ่งและวันที่ 5 หลังการเป็นสัด และทำการตรวจท้องด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ภายหลังการย้ายฝากตัวอ่อน 45 วัน ผลการทดลองพบว่าแม่โคกลุ่มที่ฉีดฮอร์โมน GnRH ด้วยรูปแบบที่ 2 และ 3 มีผลทำให้โคมี CL เกรด A สูงกว่าโคที่ไม่ฉีดฮอร์โมน GnRH ซึ่งมีค่า 66.67%(16/24), 54.17%(13/24) และ 20.83%(5/24) ตามลำดับ ($P<0.05$) ในขณะที่อัตราการตั้งท้องของโคทั้ง 3 กลุ่ม มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) มีค่า 16.67%(4/24), 33.33%(8/24) และ 16.67%(4/24) ในโคกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ สรุปผลการทดลองได้ว่าการฉีดฮอร์โมน GnRH ในการย้ายฝากตัวอ่อนในวันที่เป็นสัดและการฉีด 2 ครั้งในวันที่เป็นสัดขึ้นนิ่งและวันที่ 5 ภายหลังการเป็นสัดสามารถกระตุ้นการพัฒนาของ CL ให้เป็น CL ที่สมบูรณ์ขนาดใหญ่ได้ แต่ไม่มีผลต่ออัตราการตั้งท้อง

คำสำคัญ : การย้ายฝากตัวอ่อน โคเนื้อ ฟาร์มเกษตรกร ฮอร์โมน GnRH

เลขทะเบียนวิจัย : 64(2)-0208-130

^{1/}ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพอุบลราชธานี อ.เมือง จ.อุบลราชธานี

^{2/}ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์อุบลราชธานี อ.เมือง จ.อุบลราชธานี

Enhancement of embryo transfer efficiency using GnRH in Hybrid Brahman cows on smallholder farms

Thiwakon Donsing^{1/} Bancha Suebsima^{2/} Narongkorn Kasemsuk^{1/}
Nopparat Boonchoosai^{1/}

Abstract

The objective of this experiment was to study the Enhancement of embryo transfer efficiency using GnRH in Hybrid Brahman cows on smallholder farms. This study was conducted in Ubon Ratchathani and Sisaket provinces, 3 farms, each farm has 24 cows for a total of 72 recipient cows, were embryo transfer to the cows 7 days after estrus. (Period October 2019 and March 2020) The experiments were divided into 3 groups such as 1. Control group without GnRH injections. 2. The group GnRH injection on the day of estrus. 3. The group GnRH injection on the day of estrus and on the 5 day after estrus. In a randomized complete block design. Pregnancy examination by ultrasound 45 days after embryo transfer. The results showed that, cows injected with GnRH in groups 2 and 3 had Grade A CL higher than group 1 non-inject 66.67%(16/24), 54.17%(13/24), and 20.83%(5/24), respectively. ($P < 0.05$) The pregnancy rate of all 3 groups of cows, found that group 2 was higher than group 1 and 3 33.33% (8/24), 16.67% (4/24), and 16.67% (4/24) respectively. There were not significantly. ($P > 0.05$) It could be concluded that, GnRH injection on the day of estrus was able to stimulate accessory CL function by inducing CL bigger but had no effect on the pregnancy rate.

Keywords: Embryo transfer, Hybrid Brahman cows, Smallholder farms, GnRH

Registered No : 64(2)-0208-130

^{1/} Ubon Ratchathani Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Muang, Ubon Ratchathani.

^{2/} Ubon Ratchathani Livestock Research and Breeding Center, Muang, Ubon Ratchathani.

คำนำ

โคเนื้อพันธุ์บราห์มันลูกผสม มีการเลี้ยงกระจายอยู่ในพื้นที่ภาคอีสานของประเทศไทยเป็นจำนวนมาก ปัจจุบันแม่โคเนื้อพันธุ์บราห์มันลูกผสม ของเกษตรกร นิยมขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการผสมเทียม ซึ่งวิธีการผสมเทียมเป็นวิธีการปรับปรุงพันธุ์ที่ดีอย่างหนึ่ง แต่ถ้าหากเกษตรกรต้องการปรับปรุงให้ได้ โคบราห์มันพันธุ์แท้ต้องใช้เวลานานหลายปี เทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนจึงเป็นทางเลือกประการหนึ่งที่สามารถย่นระยะเวลาปรับปรุงพันธุ์ ทำให้เกษตรกรสามารถได้โคบราห์มันพันธุ์แท้ ในระยะเวลารวดเร็วยิ่งขึ้น

การย้ายฝากตัวอ่อน (embryo transfer) เป็นเทคโนโลยีการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์และขยายพันธุ์ โดยการนำตัวอ่อน (embryo) ระยะก่อนการฝังตัวออกจากมดลูกของแม่สัตว์ตัวหนึ่ง ซึ่งเรียกว่าแม่ตัวให้ (donors) ไปฝากกับแม่ตัวรับอีกตัวหนึ่ง ซึ่งเป็นสัตว์ชนิดเดียวกัน เรียกว่าแม่ตัวรับ (recipients) ให้ตัวอ่อนฝังตัว ในมดลูกของแม่ตัวรับ ตั้งท้องและเจริญเติบโตต่อไป ลูกสัตว์ที่เกิดขึ้นจะได้ลักษณะพันธุกรรมครึ่งหนึ่งจากพ่อพันธุ์และอีกครึ่งหนึ่งจากแม่ตัวให้ ทำให้สามารถคัดเลือกพันธุกรรมที่ดีจากทั้งสายพ่อและแม่ สามารถควบคุม ป้องกันโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์ได้เป็นอย่างดี แต่ปัญหาที่พบของการย้ายฝากตัวอ่อนคืออัตราการตั้งท้องยังไม่สูงมาก อันอาจเนื่องมาจากฮอร์โมนที่ผลิตจาก Corpus Luteum (CL) อยู่ในระดับที่ไม่สามารถคงสภาพการตั้งท้องของโคได้

ฮอร์โมน Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) ถูกสร้างและหลั่งจากสมองส่วน Hypothalamus จะไปกระตุ้นให้ต่อมใต้สมองส่วนหน้า (anterior pituitary gland) สร้างและหลั่งฮอร์โมน Follicle stimulating Hormone (FSH) และ Luteinizing Hormone (LH) ไปมีผลต่อรังไข่โดยกระตุ้นให้ Follicle พัฒนาเพิ่มขนาดและมีการผลิตฮอร์โมน Estrogen ในระหว่างวันที่ 16-18 ของวงจรการเป็นสัดในโค ในช่วง 25 ชั่วโมงก่อนตกไข่ การเกิด LH-surge จะมีผลไปกระตุ้น Granulosa cell ของ Follicle ให้เจริญขึ้นและผลิต Progesteroneออกมา ในช่วงเวลาเดียวกันจะมีเอนไซม์ย่อยคอลลาเจนมีผลต่อผนังของ Follicle ทำให้เกิดการอ่อนและเปาะบางมากขึ้นง่ายต่อการแตกของ Follicle โดยแรงดันของของเหลวภายในกลไกนี้ทำให้เกิดการตกไข่ ในโคจะเกิดการตกไข่ประมาณ 10-11 ชั่วโมงหลังหมดการเป็นสัดเมื่อตกไข่แล้ว รังไข่ส่วนที่เคยมี Follicle อยู่จะเป็นแอ่ง (ovulation depression) จากนั้นเซลล์จะเปลี่ยนเป็น Luteum cell แล้วเจริญต่อไปเป็น corpus hemorrhagicum (CH) ซึ่งเป็นสีเหลืองแดง ต่อมาเซลล์นี้จะเจริญมากขึ้นเรื่อยๆ จนกลายเป็น CL ประมาณวันที่ 5 หลังการตกไข่ CL จะสร้าง Progesterone ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ควบคุมการ ตั้งท้อง ถ้าไข่ที่ตกจากรังไข่ได้รับการผสมกับอสุจิ เรียกว่าเกิดการปฏิสนธิ ตัวอ่อนก็จะฝังตัวที่ปีกมดลูกเกิดการตั้งท้อง เมื่อตัวอ่อนมีการฝังตัวที่ปีกมดลูก CL ก็จะคงอยู่ต่อไปเพื่อสร้าง Progesterone ตลอดระยะการตั้งท้อง (สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์, 2560)

โดยส่วนใหญ่ฮอร์โมน GnRH นิยมฉีดในวันที่ผสมเทียม เพื่อช่วยเพิ่มระดับฮอร์โมน FSH และ LH ให้สูงขึ้นและส่งผลให้เกิดการตกไข่ในช่วงที่ทำการผสมเทียมและเพิ่มอัตราสมติดได้ 16.6% (Khan et al., 2012) การฉีด GnRH ในวันที่เป็นสัด สามารถเพิ่มการไหลเวียนของฮอร์โมน Progesterone ในกระแสเลือด ในช่วงกลางของรอบการเป็นสัดซึ่งมีผลให้เพิ่มโอกาส การฝังตัวของตัวอ่อน โดยกระตุ้นให้เกิด Accessory Corpora Lutea เพื่อที่จะผลิตฮอร์โมน Progesterone เพื่อเพิ่มความเข้มข้นฮอร์โมน Progesterone ในกระแสเลือดให้สูงขึ้นส่งผลในการเพิ่มอัตราการตั้งท้องเพิ่มขึ้นด้วย (Chandraprasad and Anandarao, 2014) แต่การใช้

GnRH เพื่อเพิ่มอัตราการตั้งท้องจากตัวอ่อนโคברהมัน ในแม่โคตัวรับของเกษตรกรรายย่อยนั้น ยังไม่พบรายงานในประเทศไทย ดังนั้นจึงทำการศึกษการเพิ่มประสิทธิภาพการย้ายฝากตัวอ่อนด้วยฮอร์โมน GnRH ในแม่โคเนื้อพันธุ์บราห์มันลูกผสมในระดับฟาร์มเกษตรกร

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

แม่โคเนื้อพันธุ์บราห์มันลูกผสมที่มีระบบสืบพันธุ์สมบูรณ์พันธุ์และเคยให้ลูกมาแล้วอย่างน้อย 1 ตัว ร่างกายสมบูรณ์แข็งแรง มีน้ำหนักตัวประมาณ 330 - 430 กิโลกรัม อายุ 4 - 8 ปี มีวงรอบการเป็นสัดปกติ จำนวน 72 ตัว จากฟาร์มเกษตรกรในพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานี และจังหวัดศรีสะเกษ จำนวน 3 ฟาร์ม ฟาร์มละ 24 ตัว มีรูปแบบการเลี้ยงดู และการจัดการที่ใกล้เคียงกัน ปลอดโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์ ทำการฉีดวิตามินบำรุงร่างกาย และถ่ายพยาธิ ทำการศึกษาระหว่างเดือนตุลาคม 2562 ถึง มีนาคม 2563 วางแผนการทดลองแบบสุ่มบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design ; RCBD) กำหนดให้ฟาร์มเป็นบล็อก และเปรียบเทียบการใช้ฮอร์โมนในขั้นตอนการย้ายฝากตัวอ่อนเป็นทรีทเมนต์ (Table 1)

Table 1 Embryo transfer programs in cows.

group	Day 0	Day 5	Day 7	References
1	Standing heat	-	CL evaluation and Embryo transfer	
2	Standing heat GnRH* 2.5 ml. (IM**)	-	CL evaluation and Embryo transfer	Karimi et al.,2007
3	Standing heat GnRH* 2.5 ml. (IM**)	GnRH* 2.5 ml. (IM)	CL evaluation and Embryo transfer	Karimi et al.,2007

* Receptal®,VET – MSD Animal Health,Netherland

** Intra muscular

วิธีการทดลอง

สังเกตอาการเป็นสัดของโค บันทึกข้อมูลโคที่แสดงอาการเป็นสัดยืนนิ่ง เป็นวันที่ 0 และทำการสุ่มทรีทเมนต์ทั้ง 3 ทรีทเมนต์ให้กับโคภายในฟาร์มเดียวกัน จากนั้นดำเนินการย้ายฝากตัวอ่อนให้กับโคภายหลังโคแสดงอาการเป็นสัดยืนนิ่งในวันที่ 7 ด้วยตัวอ่อนแช่แข็ง (Frozen) โดยวิธี Direct Transfer จากวิธีของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ (2556) โดยใช้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิส และทำการตรวจการตั้งท้องด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ในวันที่ 45 ภายหลังการย้ายฝากตัวอ่อน

การบันทึกข้อมูล

1) ขนาด CL ประเมินด้วยการใช้เครื่องอัลตราซาวด์ วัดขนาด CL ในวันที่ 7 ภายหลังโคแสดงอาการเป็นสัดยืนนิ่งและแบ่งเกรดดังนี้

เกรด A หมายถึง CL ขนาดใหญ่เกินครึ่งหนึ่งของรังไข่ มีความกว้างตั้งแต่ 15 มิลลิเมตร ขึ้นไป

เกรด B หมายถึง CL ขนาดครึ่งหนึ่งของรังไข่ มีความกว้างระหว่าง 10-14 มิลลิเมตร

เกรด C หมายถึง CL ขนาดเล็กกว่าครึ่งหนึ่งของรังไข่ มีความกว้างน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร

2) การตรวจการตั้งท้อง ตรวจการตั้งท้องด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ 45 วันหลังทำการฝากตัวอ่อน

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เปรียบเทียบเกรดของ CL ในวันที่ฝากตัวอ่อน และ อัตราการตั้งท้อง (pregnancy rate) จากการฝากตัวอ่อน ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติแบบไคสแควร์ (Chi-Square Test)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลของการฉีดฮอร์โมน GnRH ต่อคุณภาพของ CL ในแม่โคตัวรับที่เป็นสัตว์ธรรมชาติ 3 กลุ่ม ได้แบ่งกลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมไม่ฉีดฮอร์โมน GnRH กลุ่มที่ 2 ฉีดฮอร์โมน GnRH ในวันที่แสดงอาการเป็นสัดยืนนิ่ง และกลุ่มที่ 3 กลุ่มที่ฉีดฮอร์โมน GnRH วันที่เป็นสัดยืนนิ่งและวันที่ 5 หลังการเป็นสัด พบว่าแม่โคกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 มีคุณภาพของ CL เกรด A จำนวน 5, 16 และ 13 ตัว คิดเป็น 20.83%, 66.67% และ 54.17% ตามลำดับ มี CL เกรด B จำนวน 12, 8 และ 11 ตัว คิดเป็น 50%, 33.33% และ 45.83% ตามลำดับ โดยแม่โคกลุ่มที่ 2 และ 3 มี CL เกรด A และ B สูงกว่าแม่โคกลุ่มที่ 1 ($P < 0.05$) ส่วน CL เกรด C พบเฉพาะในแม่โคกลุ่มที่ 1 เท่านั้น (Table 2)

Table 2 CL grade of 3 groups in 72 cows.

Parameter	Group 1		Group 2		Group 3		P-value
	No.	Percent	No.	Percent	No.	Percent	
Estrus recipient	24	100	24	100	24	100	
Recipient with CL grade A	5	20.83	16	66.67	13	54.17	0.001
Recipient with CL grade B	12	50	8	33.33	11	45.83	0.001
Recipient with CL grade C	7	29.17	-	-	-	-	-

จากการศึกษาในครั้งนี้ ผลการทดลอง ทั้ง 3 กลุ่มทดลอง กลุ่มทดลองที่ 2 และ 3 พบ CL เกรด A และ B ไม่มี CL เกรด C ส่วนกลุ่มทดลองที่ 1 พบ CL เกรด A, B และ C และพบว่า จำนวน CL เกรด A และ B มากกว่าเกรด C สอดคล้องกับรายงานของ Tomomi et al.(2017) รายงานว่าการใช้ GnRH ในวันที่ 5 หลังการเป็นสัดในโคนม ช่วยทำให้พบ CL มีความสมบูรณ์ ซึ่งเป็น CL เกรด A ในวันที่ฝากตัวอ่อน และ GnRH ยังช่วยเพิ่มการไหลเวียนเลือดใน CL กระตุ้นให้เกิด Accessory Corpora Lutea เพื่อที่จะผลิตฮอร์โมน Progesterone เพื่อเพิ่มความเข้มข้นฮอร์โมน Progesterone ในกระแสเลือดให้สูงขึ้นจึงเพิ่มอัตราการตั้งท้อง

ด้วย (Chandraprasad and Anandarao, 2014) ซึ่งการให้ GnRH เพื่อกระตุ้นการสร้าง Accessory CL ส่วนใหญ่ มักเกิดขึ้นในช่วงแรกของวงจรการเป็นสัดหรือในช่วงคลื่นฟอลลิคูลาร์แรกมากกว่าในช่วงคลื่นที่สอง เพราะจุดเริ่มต้นและความยาวของคลื่นฟอลลิคูลาร์ลูกที่สองขึ้นอยู่กับจำนวนคลื่นในวัฏจักรการเป็นสัด (Jaiswal et al., 2009) และสามารถคงสภาพการทำงานของ CL และเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของฮอร์โมน Progesterone ให้สูงขึ้นในโค โดยมีผลกับ CL ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10–14 มิลลิเมตร และ 15–20 มิลลิเมตร ได้ดีกว่าโคที่มี CL ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ≤ 9 มิลลิเมตร ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ พบว่ากลุ่มที่ให้ GnRH พบโคมี CL เกรด A และ B ในขณะที่ไม่มี CL เกรด C

การย้ายฝากตัวอ่อนให้กับโคเนื้อบราห์มันลูกผสมที่เป็นสัตว์ธรรมชาติ โดยเปรียบเทียบการไม่ให้ออร์โมน GnRH กับ การให้ออร์โมน GnRH 1 ครั้งในวันที่เป็นสัดเย็นนิ่ง และ 2 ครั้งในวันที่เป็นสัดเย็นนิ่งและวันที่ 5 ภายหลังการเป็นสัดเย็นนิ่งจากผลการทดลอง พบว่า แม่โคกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 มีการตั้งท้องจำนวน 4, 8 และ 4 ตัว ตามลำดับ และพบว่าอัตราการตั้งท้องของแม่โคกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 คือ 16.67%, 33.33% และ 16.67% ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) (Table 3)

Table 3 Pregnancy rate of Embryo Transfer in cattle

Parameters	Group 1		Group 2		Group 3		P-value
	No.	Percent	No.	Percent	No.	Percent	
Transfers recipient	24	100	24	100	24	100	
Pregnancy recipient	4	16.67	8	33.33	4	16.67	0.276
- Pregnancy of recipient with CL grade A	1	25	4	50	2	50	0.368
- Pregnancy of recipient with CL grade B	2	50	4	50	2	50	0.607
- Pregnancy of recipient with CL grade C	1	25	-	-	-	-	-

เมื่อพิจารณาอัตราการตั้งท้องในภาพรวมของ CL เกรด A, B และ C พบว่าอัตราการตั้งท้องจากการให้ออร์โมน GnRH ในวันที่เป็นสัด มีแนวโน้มดีกว่าการไม่ให้ออร์โมน GnRH และการให้ออร์โมน GnRH ในวันที่เป็นสัดและวันที่ 5 ภายหลังการเป็นสัด คิดเป็น 33.33%, 16.67% และ 16.67% ตามลำดับ ในส่วนผลการให้ออร์โมน GnRH ในวันที่เป็นสัดและวันที่ 5 นั้น กลับพบว่าอัตราการตั้งท้องน้อยกว่าการให้ออร์โมน GnRH เพียงครั้งเดียวในวันที่เป็นสัด สาเหตุอาจเนื่องมาจากการให้ออร์โมนจำนวนสองครั้งนอกจากส่งผลต่อ

ความชัดเจนของ CL แล้วยังส่งผลให้ในมดลูกมีสารคัดหลั่งปริมาณมากเนื่องจากการตอบสนองมากเกินไป จึงรบกวนการฝังตัวของตัวอ่อน มีรายงานว่า การใช้ฮอร์โมน GnRH ในวันที่ 5 นั้นจะส่งผลดีต่ออัตราการตั้งท้อง ภายหลังจากการฝากตัวอ่อนหรือไม่ขึ้นกับว่าตัวอ่อนที่ใช้อยู่ในระยะใดด้วย (Alvarogarcia et al., 2020) นอกจากนี้ มีรายงานว่า การใช้ฮอร์โมน GnRH ในระดับ 10 µg. ในวันที่ 7 หลังเป็นสัดเพิ่มอัตราการตั้งท้องและ ลดการตายของตัวอ่อนในระยะแรกจากการฝากตัวอ่อนได้ (Abdulkareem et al., 2019) สอดคล้องกับ รายงานการใช้ฮอร์โมน GnRH ในโคนม ในวันที่ 5 และ 12 หลังการผสมเทียม ช่วยเพิ่มระดับฮอร์โมน Progesterone และเพิ่มอัตราการตั้งท้อง (Karimi et al., 2007) อย่างไรก็ตามอัตราการตั้งท้องจากการย้าย ฝากตัวอ่อนในโคนมโดยเฉพาะในระดับฟาร์มเกษตรกรรายย่อย ยังมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องหลายปัจจัย เช่น ความสมดุลของอาหาร ระบบการเลี้ยงการจัดการ สภาพภูมิอากาศ เทคนิคในการปฏิบัติงาน การเตรียมความพร้อมโคตัวรับก่อนและหลังฝากตัวอ่อน (พิงค์ลานนา และกอบสุข, 2563)

สรุปผลการทดลอง

การฉีดฮอร์โมน GnRH ให้กับแม่โคเนื้อพันธุ์บราห์มันลูกผสมในวันที่เป็นสัดและการฉีด 2 ครั้งในวันที่ เป็นสัดยืนนิ่งและวันที่ 5 ภายหลังจากการเป็นสัดสามารถกระตุ้นการพัฒนาของ CL ให้เป็น CL ที่สมบูรณ์ขนาด ใหญ่ได้แต่ไม่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการตั้งท้องให้กับแม่โคเนื้อพันธุ์บราห์มันลูกผสมในระดับ ฟาร์มเกษตรกรได้

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากโปรแกรมการทดลองนี้เป็นการดัดแปลงจากการใช้ GnRH ของการผสมเทียม เพื่อเทียบเคียง โปรแกรมการย้ายฝากตัวอ่อน จากการทดลองในครั้งนี้สามารถใช้เป็นแนวทางศึกษาโปรแกรมการฝากตัวอ่อน ในแม่โคตัวรับของเกษตรกรเพิ่มเติม เพื่อให้มีประสิทธิภาพและเหมาะสมกับโคในประเทศไทย ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ นายสัตวแพทย์อนนท์ เทืองสันเทียะ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัย เทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์ และนายศรชัย คงสุข ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและบำรุง พันธุ์สัตว์อุบลราชธานี ที่สนับสนุนการดำเนินงานข้าราชการและพนักงานราชการของศูนย์วิจัยการผสมเทียม และเทคโนโลยีชีวภาพอุบลราชธานี และศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์อุบลราชธานี ส่งผลให้การศึกษาครั้งนี้ สำเร็จได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- พิงค์ลานนา กุญชร และกอบสุข ทองสอดแสง. 2563. ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝาก ตัวอ่อนโคในประเทศไทย. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ : 24-33.
- สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์. 2556. คู่มือปฏิบัติงานกระบวนการย้ายฝากตัว อ่อนโค : 17-27.
- สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์. 2560. กลไกของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับวงจรการ

เป็นสัตว์. แหล่งที่มา : <http://biotech.dld.go.th/webnew/index.php/th/61-2013-02-18-13-46-32/208-2013-02-18-14-34-01>. 1 มีนาคม 2563.

- Abdulkareem, T.A., S.M. Eidan, F.F. Ibrahim and O.A. Mohamad. 2019. Effect of GnRH treatment at embryo transfer on pregnancy rate and early embryonic death of Holstein-Friesian cows. Available source: **Error! Hyperlink reference not valid.**
- AlvaroGarcia, G., V.S. Rodrigo, S. LucianaCarrenho, M.B.Giovanni, C.L.M.Jessica, F. Meliton, F.M.Juan and C.W.Milo . 2020. Postovulatory treatment with GnRH on day 5 reduces pregnancy loss in recipients receiving an in vitro produced expanded blastocyst. *Theriogenology*. 141(1): 202-210.
- ChandraPrasad, B. and K.AnandaRao. 2014. Effect of administration of burselin acetate on different days of estrous cycle in graded murraha buffaloes. *International Journal of Recent Scientific Research Research*. 5(9): 1558-1559.
- Jaiswal, R.S., J. Singh, L. Marshall and G.P. Adams. 2009. Repeatability of 2-wave and 3-wave patterns of ovarian follicular development during the bovine estrous cycle. *Theriogenology*. 72: 81–90.
- Karimi, A., H.K. Shabankareh and M.M. Moeini. 2007. The effect of administration of different levels of GnRH on the day 0, 5 and 12 post-insemination on progesterone concentration in dairy heifers. *Pak J Biol Sci*. 10(20): 3620-5.
- Khan, Q., U.Z. Rehman, M.U. Samo, A. Raziq, I. Ahmad, F.A. Khan, M. Younus, F.H. Samo and D. Muhammad. 2012. The effect of PGF 2 α analogue with or without GnRH on Fertility rate of anestrous Kundhi Buffalo. *The Journal of Animal and Plant Sciences*, 22(2): 51-54.
- Tomomi, K., S.Motohide, I. Keiki, A. Masao, I. Yoshiaki and T.Toru. 2017. Administration of gonadotropin-releasing hormone agonist on Day 5 increases luteal blood flow and improves pregnancy prediction accuracy on Day 14 in recipient Holstein cows. *J Reprod Dev*. 63(4): 389–399.

อนุนิติวิทยาศาสตร์ทางสัตว์: Case report 1

การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอสุนัขจากวัตถุพยาน: กรณีศึกษาด้านนิติวิทยาศาสตร์ทางสัตว์

สายใจ ชื่นสุข^{1/}

บทคัดย่อ

บทความนี้เป็นการรายงานถึงการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอสุนัข ซึ่งเกี่ยวเนื่องกรณีต้องสงสัยการเกิดการทารุณกรรมสุนัขในเขตพื้นที่จังหวัดสระแก้ว โดยเจ้าหน้าที่ตำรวจได้รับแจ้งเหตุสุนัขถูกฆ่าตายจึงทำการตรวจสอบและเก็บตัวอย่างจากสุนัขที่ถูกฆ่าตายได้แก่เลือดและตัวอย่างเนื้อของสุนัขรวมถึงวัตถุพยานจากบ้านของผู้ต้องสงสัย ได้แก่มีดปลายแหลมสำหรับทำครีว กางเกงของผู้ต้องสงสัย ขนสุนัข ในบริเวณต้องสงสัยว่าเป็นที่เกิดเหตุ ตัวอย่างไม่สำคัญสำหรับทำความสะอาดบริเวณที่มีลักษณะคล้ายคราบเลือด และนำส่งห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีและความหลากหลายทางชีวภาพปศุสัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสุนัขที่ตายและเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอที่พบจากวัตถุพยานดังกล่าว ผลการตรวจพบว่าจากวัตถุพยานทั้งหมดสามารถจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอสุนัขได้เฉพาะจากมีดปลายแหลมเท่านั้น และเมื่อเปรียบเทียบกับลายพิมพ์ดีเอ็นเอของสุนัขที่ถูกฆ่าพบว่าเป็นดีเอ็นเอจากสุนัขตัวเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าการตรวจสอบพยานหลักฐานทางนิติวิทยาศาสตร์โดยใช้วิธีการตรวจดีเอ็นเอสามารถนำมาใช้เป็นพยานหลักฐานที่มีน้ำหนักและทำให้สำนวนมีความเชื่อถือ เพื่อพิสูจน์ได้ว่าการกระทำความผิดเกิดขึ้นจริง หรือพิสูจน์ยืนยันผู้กระทำความผิดและมีผลต่อการพิจารณาคดีของพนักงานอัยการและศาล

คำสำคัญ: ทารุณกรรมสัตว์ นิติวิทยาศาสตร์ทางสัตว์ วัตถุพยาน ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ สุนัข

เลขทะเบียนวิชาการ: 65(2)-0208-003

^{1/} สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ อ.เมือง จ.ปทุมธานี

Canine DNA Fingerprint Analysis: A Forensic Case Study.

Saijai Cheunsuk^{1/}

Abstract

The aim of this article was to report the technique of DNA fingerprint analysis in canine which was involved in a suspected case of animal cruelty in Sa Kaeo Province. Police officer was notified that plaintiff's was killed. Upon the officer's investigation, several evidences from the crime scene were collected including a kitchen knife, 2 suspect's shorts, dog's hair, blood-like stain swab, killed dog's tissue and blood and delivered to the Animal molecular laboratory of Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Department of Livestock Development in order to perform DNA analysis. DNA Fingerprinting technique had been used to identify individual identity of the animal. However, only DNA from the knife could be extracted as well as from the blood and tissue. The results showed that the DNA recovered from the knife had the same pattern of fingerprinting as those from the dead dog's tissue and blood. In conclusion, DNA analysis technique could be used to unravel the case of animal forensic science enhancing law enforcement.

Keywords: animal cruelty, animal forensics, evidence, DNA fingerprint, dog

Registered No.: 65(2)-0208-003

^{1/} Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Muang, Pathum Thani

บทนำ

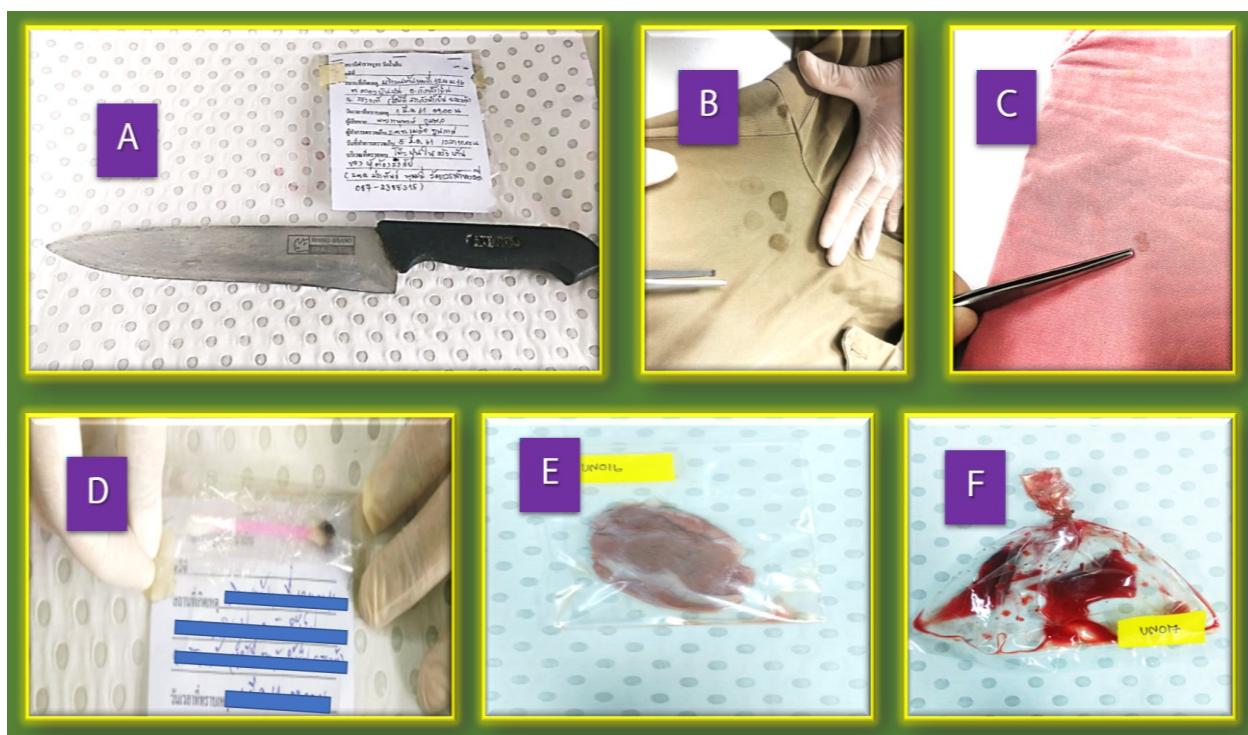
อนุนิติวิทยาศาสตร์คือการนำกระบวนการทางวิทยาศาสตร์ด้านชีวโมเลกุลมาใช้เพื่อประโยชน์แห่งกฎหมาย ซึ่งงานในด้านคดีความของมนุษย์นั้นได้มีการพัฒนาและใช้อย่างต่อเนื่องจนเป็นที่ยอมรับทั่วโลกว่าสามารถใช้ประกอบการพิจารณาตัดสินคดีความได้ เนื่องจากสามารถพิสูจน์ด้วยหลักฐานทางวิทยาศาสตร์โดยอาศัยหลักการของคุณลักษณะของดีเอ็นเอที่มีความเฉพาะในแต่ละตัวบุคคล แต่อนุนิติวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ยังไม่มีผู้ดำเนินการและกำหนดขอบเขตที่ชัดเจนและต่อเนื่อง เพื่อที่จะสามารถดำเนินงานได้อย่างมีประสิทธิภาพในด้านการคลี่คลายปัญหาและพิสูจน์ข้อเท็จจริงในคดีความที่เกี่ยวข้องกับสัตว์ เพื่อผลในการบังคับใช้กฎหมาย การป้องปรามการกระทำผิดและการลงโทษ โดยอาศัยหลักการตรวจลักษณะทางเครื่องหมายดีเอ็นเอซึ่งมีลักษณะเฉพาะในสัตว์แต่ละชนิดและการตรวจอัตลักษณ์ในสัตว์แต่ละตัว เช่นเดียวกับในคน ซึ่งทำให้สามารถตรวจพิสูจน์ได้ในหลายกรณี ได้แก่ การตรวจชนิดของเนื้อสัตว์ในกรณีต้องสงสัยว่ามีการปลอมปนหรือแอบอ้างชนิดของเนื้อสัตว์ การฆ่าสัตว์อย่างผิดกฎหมาย การลักลอบขนส่งเนื้อสัตว์ผิดประเภทซึ่งมีความสำคัญมากในแง่ความปลอดภัยทางอาหาร (food safety) ความเชื่อทางศาสนาเช่น สันติศาลาล และการป้องกันการแพร่ระบาดของโรคที่ติดมากับการขนส่งที่ผิดกฎหมาย การแอบอ้างหรือปลอมปนน้ำเชื้อแช่แข็งปศุสัตว์ที่มีราคาแพงสำหรับใช้ในการผสมเทียม ในกรณีหาความสัมพันธ์ทางเครือญาติในสัตว์สามารถคลี่คลายกรณีพิพาทเรื่องการอ้างกรรมสิทธิ์ในตัวสัตว์รวมถึงการลักขโมยสัตว์ รวมถึงการสนับสนุนการบังคับใช้พ.ร.บ.ป้องกันการทารุณกรรมสัตว์ พ.ศ. 2557 ซึ่งการตรวจอัตลักษณ์และชนิดสัตว์สามารถใช้ประกอบการบังคับคดีในการกระทำผิดกฎหมายได้ในวงกว้างมากขึ้น และมีการขยายขอบข่ายจากปศุสัตว์ไปสู่สัตว์เลี้ยงอื่นๆ เช่น สุนัขและแมว เป็นต้น สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์โดยกลุ่มงานวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีและความหลากหลายทางชีวภาพปศุสัตว์ได้พัฒนาวิธีการตรวจหาลายพิมพ์ดีเอ็นเอเพื่อระบุอัตลักษณ์เฉพาะตัวของสัตว์หลายชนิด และได้รับการร้องขอให้อนุเคราะห์การตรวจดังกล่าวทั้งจากหน่วยราชการภายในกรมปศุสัตว์เองและจากภายนอกโดยเฉพาะอย่างยิ่งจากทางเจ้าหน้าที่ตำรวจเพื่อใช้ผลการตรวจดีเอ็นเอไปประกอบสำนวนคดีต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการทารุณกรรมสัตว์

วัตถุประสงค์ของรายงานฉบับนี้เพื่อรายงานการพัฒนาวิธีการตรวจทางนิติวิทยาศาสตร์ทางสัตว์ โดยการหาอัตลักษณ์ (Identity) ของสุนัขและการวิเคราะห์หาลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) จากวัตถุพยานซึ่งเกี่ยวเนื่องกรณีต้องสงสัยการเกิดการทารุณกรรมสุนัขในเขตพื้นที่จังหวัดสระแก้ว

ประวัติความเป็นมาของคดี

สถานีตำรวจภูธรแห่งหนึ่งในเขตจังหวัดสระแก้วขอความอนุเคราะห์ตรวจตัวอย่างลายพิมพ์ดีเอ็นเอสุนัขจากคดีความเกี่ยวเนื่องกับการทารุณกรรมสัตว์ โดยพนักงานสอบสวนได้รับคำร้องทุกข์ว่ามีการทารุณกรรมสัตว์โดยสุนัขพันธุ์ลาบราดอร์ เพศเมีย อายุ 3 เดือนถูกแทงบริเวณชายโครงด้านซ้ายด้วยของมีคมยาวเล็กถึงอวัยวะภายในและวิ่งมาตายที่บ้านเจ้าของผู้เลี้ยง จากการตรวจสอบบริเวณบ้านเพื่อนบ้านที่มีเรื่องทะเลาะวิวาทมานานและคาดว่าจะเป็นที่เกิดเหตุซึ่งห่างกันประมาณ 10 เมตร พบรอยคราบเลือดติดอยู่ที่ประตูหน้าบ้านและตามพื้นดินหลังบ้าน เจ้าพนักงานสอบสวนได้ทำการเก็บและส่งตัวอย่างวัตถุพยานที่ได้ตรวจยึดจากบ้านผู้ต้องสงสัยและตัวอย่างซากสุนัข จำนวน 6 รายการ (รูป 1) เพื่อเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอสุนัขประกอบการสอบสวนดำเนินคดีต่อไป ได้แก่

1. มีดปลายแหลม ยี่ห้อ RHINO ยาวขนาด 1 ฟุต (คาดว่าเป็นมิดใช้แทงสุนัข) จำนวน 1 เล่ม และซองพลาสติกใส่เส้นขนสุนัขที่พบในที่เกิดเหตุ (A)
2. กางเกงขาสั้นส่วนสีน้ำตาลของผู้ต้องสงสัยซึ่งสวมใส่ในวันและเวลาที่เกิดเหตุ มีคล้ายคราบเลือดแห้งติดอยู่ จำนวน 1 ตัว (B)
3. กางเกงขาสั้นสีชมพูของบุตรผู้ต้องสงสัยซึ่งอยู่ในบ้านขณะเกิดเหตุ จำนวน 1 ตัว (C)
4. ตัวอย่างไม้ส้อมสำหรับทำความสะอาด ที่ได้ซุ่มเก็บที่คาดว่าเป็นคราบเลือดที่อยู่บนโต๊ะปูนภายในครัวของผู้ต้องสงสัย จำนวน 1 อัน (D)
5. ตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ได้จากซากสุนัข จำนวน 1 ชิ้น (E)
6. ตัวอย่างเลือดที่ได้จากซากสุนัข จำนวน 1 ถุง (F)



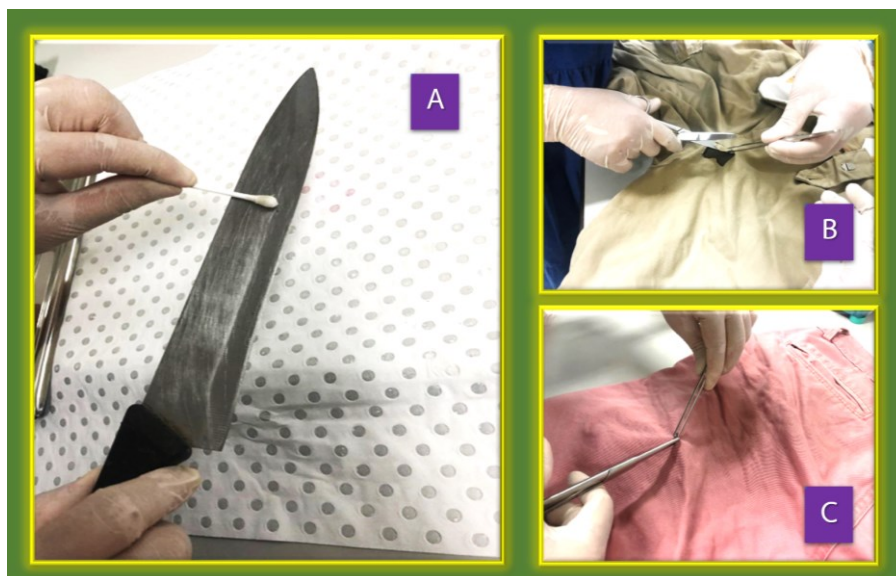
รูป 1.: แสดงวัตถุพยานที่เจ้าหน้าที่ตำรวจนำส่งมายังห้องปฏิบัติการ

การเตรียมตัวอย่างและการสกัดดีเอ็นเอ

ตัวอย่างเลือดและชิ้นเนื้อของสุนัขที่ถูกฆ่าถูกนำมาสกัด genomic DNA ด้วยชุดสกัด DNA สำเร็จรูป (QIAGEN Genomics DNA Extraction Kit, QIAGEN. Germany) 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 ทั้งนี้เตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอควบคุมจำนวน 1 ตัวอย่างจากเลือดของสุนัขตัวอื่นที่สกัดด้วยวิธีเดียวกัน

ตัวอย่างจากวัตถุพยานอื่นทั้งหมดได้แก่ มีดปลายแหลม กางเกงของผู้ต้องสงสัย ตัวอย่างส้อมที่ซุ่มเก็บตัวอย่างที่คาดว่าจะเป็นคราบเลือด ถูกนำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีดังนี้ สำหรับมีดปลายแหลม ใช้ส้อมที่พัน

ปลายไม้ (swab) ชุบสารละลาย Tris EDTA (TE buffer) ให้เปียกชุ่ม เช็ดบริเวณใบมีดทั้งหมดโดยเน้นย้ำในบริเวณที่เป็นรอยต่อของใบมีดและด้ามมีด จากนั้นแช่สำลีดึงกล่าวลงในสารละลาย Tris EDTA ที่ข้มคินก่อนนำมาสกัด ดีเอ็นเอ เช่นเดียวกับตัวอย่างไม้สำลีสำหรัทำความสะดวกที่ได้ชุบเก็บบริเวณที่คาดว่าเป็นคราบเลือด สำหรัทางเงของผูต้งสงสัที่พบคราบคล้ายคราบเลือดซึ่งทำการตัดเฉพาะบริเวณคราบด้วยกรรไกร นำลงแชในสารละลาย Tris EDTA ที่ข้มคินก่อนนำมาสกัดดีเอ็นเอ ส่วนเส้นขนที่พบในที่เกิดเหตุ นำมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธี Salting off นำสารละลาย Tris EDTA ที่แช่ตัวอย่างข้มคินทั้งหมดมาสกัด genomic DNA ด้วยชุดสกัด DNA สำเร็จรูปและวัดปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีข้างต้น (รูป 2)



รูป 2.: แสดงการเก็บตัวอย่างดีเอ็นเอจากวัตถุพยาน (A): มีดทำครัว; (B): กางเกงผู้ต้องสงสัย; (C): กางเกงบุตรของ ผู้ต้องสงสัย

การทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างดีเอ็นเอทั้งหมดมาทำปฏิกิริยา Multiplex PCR ด้วยชุดตรวจสอบลายพิมพ์ดีเอ็นเอสำหรับสุนัข (StockMarks® for Canine Genotyping Kit, Applied Biosystems™, UK) ที่ประกอบด้วยไพรเมอร์ดีดีสียฟลูออเรสเซนส์ที่จำเพาะต่อเครื่องหมายดีเอ็นเอสุนัขจำนวน 10 ตำแหน่ง ได้แก่ PEZ1, FHC2054, FHC2010, PEZ5, PEZ20, PEZ12, PEZ3, PEZ6, PEZ8, และ FHC2079 ดังนี้ StockMarks PCR buffer 1.5 µL; Amplification primer mix 2.75 µL; 5 U/µL AmpliTaq Gold DNA polymerase 0.25 µL; 1.25 mM dNTPs 2.0 µL; distilled water; ปริมาตรรวม 7 µL และ PCR condition คือ pre-denaturation 95°C นาน 2 นาที ตามด้วย denaturation 95°C นาน 45 วินาที annealing 62°C นาน 60 วินาทีและ extension 72°C นาน 45 วินาที จำนวน 40 รอบ และ 72°C นาน 10 นาที นำตัวอย่างทั้งหมดมาวิเคราะห์ขนาดผลผลิตพีซีอาร์ด้วยเครื่อง Automated Genetic Analyzer, ABI 3500 และวิเคราะห์เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Mapper

ผลการวิเคราะห์และวิจารณ์

จากการเก็บตัวอย่างวัตถุพยานคือ กางเกง เส้นขนและไม้ swab เพื่อสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีข้างต้นพบว่าไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอได้เลย ยกเว้นจากมิดปลายแหลมซึ่งก็มีปริมาณดีเอ็นเอน้อยมากและมีค่าความบริสุทธิ์ต่ำมาก (ไม่แสดงข้อมูล) เมื่อนำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากวัตถุพยาน (มิดปลายแหลม ตัวอย่างชิ้นเนื้อและเลือดสุนัขที่ตาย) และตัวอย่างเลือดสุนัขที่ใช้เป็นตัวควบคุมมาจัดทำลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยวิธี Multiplex PCR ด้วยการตรวจเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด microsatellite จำนวน 10 ตำแหน่ง ได้ผลตามรูปที่ 3



รูป 3.: แสดง Electrophelogram ของขนาด microsatellite ในแต่ละตำแหน่งของเครื่องหมายดีเอ็นเอ จำนวน 10 ตำแหน่งจากตัวอย่าง (1):เลือดของสุนัขควบคุม; (2) มิดปลายแหลม; (3): เลือดสุนัขที่ตาย; (4): ชิ้นเนื้อสุนัขที่ตาย

จากนั้นนำขนาดของเครื่องหมายดีเอ็นเอของแต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์เปรียบเทียบกับโปรแกรม Gene Mapper จะได้ขนาดแสดงเป็นตัวเลขดังรูปที่ 4 โดยที่แต่ละตำแหน่งอาจมีค่าแตกต่างกัน (heterozygous) หรือเท่ากัน (homozygous) ตามลักษณะที่ถ่ายทอดมาจากพ่อแม่ ในกรณีนี้พบว่าดีเอ็นเอที่ได้จากมิดปลายแหลม ชิ้นเนื้อจากสุนัขที่ตายและเลือดจากสุนัขที่ตายมีค่าขนาดของเครื่องหมายชนิด microsatellite เท่ากันหรือแตกต่างกันไม่เกิน 1.0 ในทั้ง 10 ตำแหน่ง (StockMarks® Canine Paternity PCR Typing Kits, Applied Biosystems Manual, UK) ซึ่งเมื่อเทียบกับตัวอย่างเลือดควบคุมจะพบว่าไม่มีตำแหน่งใดตรงกันเลย จึงสามารถสรุปได้ว่าตัวอย่างดีเอ็นเอจากวัตถุพยานมิดปลายแหลมเป็นดีเอ็นเอที่มาจากสุนัขที่ถูกฆ่าตาย

ลำดับ	ชนิดตัวอย่าง	รหัส	รหัส	Primer ที่ใช้ทดสอบ (Canine Kit)																			
		DNA	PCR	PEZ1		FHC2054		FHC2010		PEZ5		PEZ20		PEZ12		PEZ3		PEZ6		PEZ8		FHC2079	
1	มีดปลายแหลม	UN012	FA071 62	114.92	123.08	150.99	163.50	228.18	236.07	102.85	110.99	179.74	183.84	268.04	268.04	124.25	127.43	183.04	186.89	237.41	245.64	273.62	273.62
2	ชิ้นเนื้อจากซากสุนัข	UN016.2	FA068 62	114.80	122.99	150.99	163.51	228.13	236.15	102.73	110.87	179.79	183.89	268.08	268.08	124.17	127.24	182.98	186.85	237.49	245.63	273.56	273.56
3	เลือดจากซากสุนัข	UN017.1	FA069 62	114.78	122.90	150.99	163.40	228.16	236.03	102.75	110.82	179.64	183.77	268.13	268.13	124.20	127.30	182.97	186.75	237.49	245.70	273.55	273.55
4	เลือดสุนัขควบคุม	c141161	FA062-069	119.07	123.15	150.86	171.70	232.15	232.15	102.96	102.96	172.16	179.70	260.50	296.87	115.13	121.52	180.27	186.83	229.37	237.48	273.65	273.65

รูป 4.: แสดงขนาดของเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด microsatellite ทั้ง 10 ตำแหน่งในตัวอย่างวัตถุพยานมีดปลายแหลม ชิ้นเนื้อและเลือดสุนัขที่ตายและเลือดจากสุนัขควบคุม

ลายพิมพ์ดีเอ็นเอ (DNA fingerprint) เป็นลักษณะทางพันธุกรรมเฉพาะของแต่ละตัวสัตว์ มีหลักการคือใช้เครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA marker) ของแต่ละตำแหน่งที่ต่างกันในตัวแต่ละชนิด โดยใช้คุณสมบัติของรหัสพันธุกรรมที่มีการเรียงตัวของลำดับเบสของสายดีเอ็นเอ (DNA sequence) ที่มีความแตกต่างหรือมีขนาดความยาวที่ต่างกันซึ่งเกิดจากการซ้ำกันเป็นชุดๆของลำดับเบส (Variation Number of Tandem Repeat; VNTR) โดยลักษณะที่มีจำนวนเบสซ้ำ 2 – 6 เบส และต่อเนื่องไม่เกิน 100 ครั้ง มีชื่อเรียกว่า short tandem repeat (STR) หรือ microsatellites เกิดเป็นชุดอัลลีลที่แตกต่างกัน สามารถถ่ายทอดจากพ่อแม่สู่ลูกได้ตามหลักของเมนเดลทำให้แยกความจำเพาะของอัตลักษณ์บุคคลหรือตัวสัตว์ได้ (Cunningham and Meghan, 2001) อาศัยเทคนิคการเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยา multiplex PCR โดยใช้ไพรเมอร์ที่มีการติดสีฟลูออเรสเซนซ์ ทำให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอขนาดต่างๆกัน ประกอบเป็นรูปแบบลายพิมพ์ดีเอ็นเอหลายรูปแบบสามารถนำมาใช้ระบุเอกลักษณ์เฉพาะตัว โดยที่จำนวนเครื่องหมายดีเอ็นเอสำหรับการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสัตว์จะมีจำนวนแตกต่างกันตามมาตรฐานสากลที่ WHO และ The International Society for Animal Genetics (ISAG) ให้การรับรอง (FAO Animal Production and Health guidelines, 2011) การตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอถูกนำมาใช้ในงานทางนิติวิทยาศาสตร์โดยเฉพาะอย่างยิ่งในคดีอาชญากรรมในคนและสามารถใช้เป็นหลักฐานประกอบการพิจารณาคดีได้ตั้งแต่ปีค.ศ. 1985 โดย Jeffreys และคณะ โดยใช้หลักการตรวจเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิด microsatellite เช่นกัน สำหรับการตรวจลายพิมพ์ดีเอ็นเอในสุนัขนั้นได้เริ่มมีการตรวจในต่างประเทศทั้งเพื่อจุดประสงค์ในการติดตามคดีที่เกิดจากการกระทำต่อตัวสัตว์หรือที่สัตว์เป็นต้นเหตุแห่งคดีนั้นๆ (Padar et al., 2001)

ในการสืบสวนคดีนี้ไม่มีพยานบุคคลหรือพยานอื่นใดที่สามารถระบุผู้ก่อเหตุ เจ้าหน้าที่ตำรวจจึงเก็บวัตถุพยานเท่าที่สามารถหาได้ในบริเวณที่ต้องสงสัยซึ่งการเก็บรักษาตัวอย่างไม่ได้กระทำอย่างถูกต้อง ประกอบกับเจ้าของสุนัขไม่ได้ส่งซากสุนัขไปชันสูตรร่าง ทำให้ไม่สามารถระบุสาเหตุการตายตลอดจนลักษณะอาวุธที่ทำร้ายได้ การพิสูจน์หาดีเอ็นเอจึงถูกนำมาเป็นเครื่องมือในการสืบสวน ในการตรวจวิเคราะห์ครั้งนี้สามารถบ่งชี้ถึงอัตลักษณ์ของสุนัขที่ถูกทารุณกรรมโดยการเปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอ แต่ปัญหาและอุปสรรคที่พบคือตัว

วัตถุพยานที่นำมาส่งไม่ได้อยู่ในสภาพที่เหมาะสม เช่นตัวอย่างเส้นขนไม่มีปมรากขนที่เป็นแหล่งเก็บดีเอ็นเอทำให้ไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอได้ รวมถึงกางเกงผู้ต้องสงสัยและไม้ swab ที่ไม่สามารถสกัดดีเอ็นเอได้อาจเนื่องมาจากคราบที่พบไม่ใช่คราบเลือดจากสุนัขที่ตายจริงหรือมีปริมาณดีเอ็นเอน้อยมากจนไม่เพียงพอต่อการตรวจ ทางนิติวิทยาศาสตร์ของคน ในการอำพรางคราบเลือดแม้ล้างออกแล้วก็ยังสามารถตรวจหาคราบเลือดได้โดยใช้สารเคมีที่มีชื่อว่า ลูมินอล (Luminol) ซึ่งหน่วยงาน Crime Scene Investigation (CSI) ของสหรัฐอเมริกาจะใช้ในการหาร่องรอยเลือดที่ถูกทำความสะอาดและไม่มีการใช้สารเคมีเฉพาะในการล้างคราบเลือด โดยคราบเลือดเหล่านี้ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่า ทั้งนี้อาศัยหลักการที่ลูมินอลจะทำปฏิกิริยา Chemiluminescence กับฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงทำให้เกิดแสงออกมา (Domala et al., 2017; Nagesh et al., 2017; Luczak et al., 2006.) อย่างไรก็ตามในกรณีนี้ถึงแม้จะไม่มีสารลูมินอลเพื่อการตรวจสอบคราบเลือดหรือถ้าตรวจสอบได้ก็ไม่สามารถระบุว่าเป็นเลือดของสุนัขที่ถูกฆ่าจริงเพราะมีดปลายแหลมนี้เป็นมีดทำครัวที่มีโอกาสสัมผัสหรือปนเปื้อนเลือดจากสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้จากการทำอาหารอยู่แล้วแต่ทางห้องปฏิบัติการก็สามารถสกัดดีเอ็นเอสุนัขที่ตายได้จากมีดปลายแหลม แม้ว่าสภาพที่พบคือมีดได้ถูกทำความสะอาดอย่างดีจนดูด้วยตาเปล่าก็ไม่พบคราบสกปรกใดๆ ดังนั้นการเตรียม swab เพื่อเก็บตัวอย่างจากมีดจึงมีความสำคัญมากและสามารถนำไปสู่การตรวจพิสูจน์ได้ว่าเป็นมีดที่ใช้ฆ่าสุนัขนั้นจริง โดยการ swab กระทำโดยถูปลายไม้พันสำลีที่ชุบสารละลาย Tris buffer ให้มีความชื้นและเช็ดถูครอบคลุมทั้งตัวมีดเน้นในบริเวณรอยต่อของใบมีดและด้ามจับเนื่องจากจะเป็นบริเวณซอกมุมที่การทำความสะอาดเป็นไปได้ยาก

สรุปผลการตรวจวิเคราะห์

จากการตรวจวิเคราะห์เปรียบเทียบลายพิมพ์ดีเอ็นเอในกรณีนี้สามารถสรุปได้ว่าสุนัขถูกฆ่าโดยใช้อาวุธมีดปลายแหลมที่พบในบริเวณบ้านของผู้ต้องสงสัย โดยผลการตรวจสอบนั้นได้นำส่งเจ้าหน้าที่ตำรวจเจ้าของคดีเพื่อดำเนินการเอาผิดต่อผู้ต้องสงสัยตามกฎหมาย พรบ.การป้องกันการทารุณกรรมสัตว์ ปีพศ.2558 อย่างไรก็ตามทางห้องปฏิบัติการฯควรต้องพัฒนาหาวิธีที่จะเพิ่มขยายปริมาณดีเอ็นเอในตัวอย่างให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นให้เพียงพอต่อการตรวจวิเคราะห์ขั้นต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Commission on genetic resources for food and agriculture food and agriculture organization of the United Nations. 2011. Molecular genetic characterization of animal genetic resources. FAO Animal Production and Health guidelines. 100 p.
- Cunningham, E.P. and C.M. Meghen. 2001. Biological identification systems: genetic markers. Rev. Sci. tech. int. Epiz. 20(2): 491
- Domala S. K. and S. Samuel. 2017. Development of Latent Blood Stain Using Luminol from Four Different Surfaces after Subjecting to Different Agents over Periods of Time. International Journal of Applied Biology and Forensics. 1(2): 68-71.

- Jeffreys, A.J., V. Wilson, and S.L. Thein. 1985. Individual-specific fingerprints of human DNA. *Nature*, 1985. 316(6023): p. 76-79
- Luczak, S., M. Wozniak, M. Papuga, K. Stopiniska and K. Sliwka. 2006. A comparison of the Bluestar and luminol effectiveness in bloodstain detection. *Forensic Science International*. 56: 239-245.
- Nagesh, D. and S. Ghosh. 2017. A time period study on the efficiency of luminol in the detection of bloodstains concealed by paint on different surfaces. *Forensic Science International*. 275: 1-7.
- Padar, Z., M. Angyal, B. Egyed, S. Furedi, J. Woller, L. Zoldag and S. Fekete. 2001. Canine microsatellite polymorphisms as the resolution of an illegal animal death case in a Hungarian Zoological Gardens. *Int. J. Legal. Med.* 115:79-81.

การประเมินสมรรถภาพของโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลส์ไต้หวันเพศผู้

ภัทรพล สำเร็จดี^{1/} เจริญภูมิ วรภูมิ^{2/}

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินสมรรถภาพของลักษณะการเจริญเติบโต ขนาดร่างกาย และขนาดอวัยวะของโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลส์ไต้หวันเพศผู้ และเปรียบเทียบสมรรถภาพระหว่างโคที่เกิดจากพ่อที่มีถิ่นกำเนิดต่างกัน (พ่อเกิดในประเทศไทย และพ่อเกิดในต่างประเทศ) ใช้ข้อมูลการทดสอบสมรรถภาพโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลส์ไต้หวันเพศผู้ ที่บันทึกในระหว่างเดือนเมษายน 2547 ถึง เดือนธันวาคม 2563 ซึ่งประกอบด้วยข้อมูลสมรรถภาพของโคตั้งแต่อายุ 1 ถึง 18 เดือน จำนวน 3 กลุ่มลักษณะที่วัดเป็นประจำทุกเดือน ได้แก่ การเจริญเติบโต (378 ตัว) ขนาดร่างกาย (376 ตัว) และขนาดอวัยวะ (355 ตัว) กำหนดให้กลุ่มโคที่มีพ่อเกิดในประเทศไทย (domestic sire) เป็นตัวแทนสำหรับการประเมินสมรรถภาพของโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลส์ไต้หวัน วิเคราะห์อิทธิพลของถิ่นกำเนิดของพ่อต่อลักษณะสมรรถภาพด้วยโมเดลเชิงเส้นผสมและรายงานผลด้วย least-squares (LS) means ผลการศึกษา พบว่า กลุ่มโคที่มีพ่อพันธุ์เกิดในต่างประเทศ (foreign sire) มีค่า LS mean ของน้ำหนักตัวเมื่อเริ่มทดสอบ มากกว่ากลุ่ม domestic sire (71.06 และ 65.84 กก. ตามลำดับ) มีความสูงที่สะโพกเมื่ออายุ 12 เดือน มากกว่าโคกลุ่ม domestic sire (127.99 และ 125.65 ซม.) รวมถึงมีความยาวลำตัวมากกว่าโคกลุ่ม domestic sire ทั้งที่เมื่ออายุ 4 เดือน (87.63 และ 85.06 ซม.) และ 18 เดือน (134.84 และ 131.23 ซม.) (p-value<0.05) อย่างไรก็ตาม สมรรถภาพส่วนใหญ่จำนวน 31 ลักษณะ ของโคทั้งสองกลุ่มไม่แตกต่างกัน ผลการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ พบว่า สมรรถภาพทั้ง 3 กลุ่มลักษณะมีความสัมพันธ์กันเชิงบวกในระดับต่ำมาก ถึง สูงมาก สำหรับลักษณะการเจริญเติบโต ($r = 0.23$ ถึง 0.98) ขนาดร่างกาย ($r = 0.23$ ถึง 0.82) และขนาดอวัยวะ ($r = 0.15$ ถึง 0.90) (p-value<0.05) ผลการประเมินสมรรถภาพ พบว่า โคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลส์ไต้หวันเพศผู้ อายุ 12 เดือน มีค่าเฉลี่ย ($\pm$ SD) ของน้ำหนักตัว ความสูง ความยาวรอบอก ความยาวลำตัว และเส้นรอบวงอวัยวะ เท่ากับ 329.3 ± 55.5 กก., 128.0 ± 6.4 , 159.1 ± 8.0 , 121.7 ± 8.4 และ 31.1 ± 2.7 ซม. ตามลำดับ และมีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ยต่อวัน จากวันเริ่มทดสอบ ถึงอายุ 1 ปี เท่ากับ 0.857 ± 0.180 กก./วัน สรุปได้ว่า โคนมเพศผู้ที่มีพ่อที่เกิดและถูกเลี้ยงดูในประเทศไทยมีสมรรถภาพใกล้เคียงกับโคที่มีพ่อเกิดในต่างประเทศ โดยสมรรถภาพของโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลส์ไต้หวันเพศผู้ในด้านการเจริญเติบโต ขนาดร่างกาย และขนาดอวัยวะ ตั้งแต่ก่อนหย่านม จนถึงวัยเจริญพันธุ์ สามารถใช้เป็นค่ามาตรฐานของสายพันธุ์ และเป็นข้อมูลประกอบในการคัดเลือกและประเมินความพร้อมของพ่อพันธุ์ในการเป็นพ่อพันธุ์ผสมเทียม

คำสำคัญ: การเจริญเติบโต ขนาดร่างกาย ขนาดอวัยวะ พ่อพันธุ์โคนม สหสัมพันธ์

เลขทะเบียนวิชาการ: 64(2)-0108-170

^{1/} ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพนครราชสีมา อ.เมือง จ.นครราชสีมา

^{2/} ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี อ.แก่งคอย จ.สระบุรี

Performance Evaluation of Tropical Holstein Dairy Bulls

Pattarapol Sumreddee^{1/} Roengwut Worawut^{2/}

Abstract

This study aimed at evaluating performance on growth, body measurements and testicular size of performance-tested Tropical Holstein dairy bulls and comparing their performances between bulls with different origins of sires (domestic vs. foreign sires). Data sets were obtained from performance-tested Tropical Holstein dairy bulls recorded during April 2004 to December 2020. Monthly performance data from 1 to 18-month-old bulls was consisted of 3 trait groups, namely, growth (378 bulls), body measurements (376 bulls), and testicular size (355 bulls). A performance evaluation of Tropical Holstein bulls were based on a group of bulls with domestic sires. Linear mixed model was used to investigate the effects of sire origin on bull's performance and results were reported using least-squares (LS) means. Results showed that foreign sire bull group had slightly greater LS means than that of domestic sire group for on-test weight (71.06 vs 65.84 kg), 12-month hip height (127.99 vs 125.65 cm), body length at 4 month (87.63 vs 85.06 cm) and 18 months of age (134.84 vs 131.23 cm) (p-value<0.05). Nevertheless, most of performance (31 traits) did not differ between groups. There were very low to high positive correlations among growth ($r = 0.23$ to 0.98), body measurements ($r = 0.23$ to 0.82), and testicular size traits ($r = 0.15$ to 0.90) (p-value<0.05). The performance means of body weight, height, heart girth, body length, and scrotal circumference of 12-month-old Tropical Holstein dairy bulls were 329.3 ± 55.5 kg, 128.0 ± 6.4 cm, 159.1 ± 8.0 cm, 121.7 ± 8.4 cm and 31.1 ± 2.7 cm, respectively. An average dairy gain from on-test to 1-year-old was 0.857 ± 0.180 kg/day. In conclusion, dairy bulls with domestic sires (sires that were born and raised in Thailand) had similar performance to those with foreign sires. Performance on growth, body measurements and testicular size from pre-weaning period to puberty of Tropical Holstein dairy bulls can be used as performance standards of the breed. Furthermore, information on performance traits can be used for selection and assessment of artificial insemination bull's readiness.

Keywords: growth, body measurements, testicular size, dairy bulls, correlations

Registered No: 64(2)-0108-170

^{1/} Nakhon Ratchasima Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Muang, Nakhon Ratchasima

^{2/} Saraburi Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Kaeng Khoi, Saraburi

คำนำ

โคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ได้รับการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์อย่างต่อเนื่องโดยกรมปศุสัตว์ ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 (จรรีรัตน์, 2555) เพื่อให้ได้โคนมมีความเหมาะสมต่อสภาพการเลี้ยงดูในภูมิอากาศแบบร้อนชื้น (tropical climate) และตลาดผลิตภัณฑ์นมของประเทศไทย จากแผนการผสมพันธุ์ระหว่างพ่อและแม่พันธุ์ชั้นเลิศ (bull sires and bull dams) ที่ผ่านการคัดเลือก ลูกโคนมเพศผู้ที่เกิดขึ้นจากการวางแผนผสมพันธุ์ (planned mating) ดังกล่าวจะได้รับการทดสอบสมรรถภาพ โดยใช้โปรแกรมการทดสอบสมรรถภาพโคนมเพศผู้มาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2540 ซึ่งดำเนินการที่สถานีทดสอบกลาง (national performance test station) ภายใต้สภาวะการเลี้ยงดูและการจัดการด้านต่างๆ ที่เหมือนกันตามช่วงอายุ ทำการวัดลักษณะต่างๆ ได้แก่ การเจริญเติบโต โครงสร้างหรือขนาดร่างกาย และขนาดอวัยวะ เป็นประจำทุกเดือนตั้งแต่อายุประมาณ 1 ถึง 12 เดือน เพื่อใช้สำหรับการประเมินสมรรถภาพและคัดเลือกโคหนุ่มที่มีลักษณะที่ดีสำหรับนำไปทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อ (semen quality test) และทดสอบความสามารถในการถ่ายทอดลักษณะโดยใช้ข้อมูลของลูกสาว (progeny test) เพื่อให้ได้มาซึ่งพ่อพันธุ์โคที่มีพันธุกรรมที่ดีเยี่ยมต่อไป (สายันท์ และคณะ, 2563; สายันท์, 2564) โดยในช่วงแรกของการพัฒนาโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ได้ใช้น้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคนมพันธุ์แท้พันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียน (Holstein-Friesian, HF) จากต่างประเทศ ผสมกับแม่พันธุ์ที่เกิดภายในประเทศ หลังจากนั้น การสร้างลูกโคนมเพศผู้อาศัยพ่อพันธุ์โคนมลูกผสม HF ที่เกิดในประเทศเป็นหลัก (สายันท์ และคณะ, 2563) ปัจจุบัน พ่อพันธุ์โคนมที่สร้างขึ้นเป็นโคที่มีพ่อและแม่เกิดในประเทศทั้งหมด ซึ่งคาดว่าโคกลุ่มนี้น่าจะมีความสามารถในการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมในประเทศไทยได้ดีกว่าโคที่เกิดจากพ่อโคพันธุ์แท้จากต่างประเทศ (สายันท์ บัวบาน, สัมภาษณ์, 26 ตุลาคม 2564)

สำหรับโคเพศผู้ สมรรถภาพการเจริญเติบโต ลักษณะโครงสร้าง รวมถึงระบบสืบพันธุ์เพศผู้ ตั้งแต่แรกเกิดจนกระทั่งเข้าสู่ก่อนวัยเจริญพันธุ์ ถือเป็นลักษณะที่สำคัญที่บ่งชี้ถึงการเป็นพ่อพันธุ์ที่ดี การคัดเลือกโคเพศผู้ด้วยลักษณะดังกล่าวจึงมีความสำคัญเนื่องจากสามารถบ่งชี้ให้เห็นถึงความพร้อมในการผลิตน้ำเชื้อ ความแข็งแรงคงทนของพ่อพันธุ์โคเมื่อนำไปใช้งานในการผลิตน้ำเชื้อ รวมถึงการถ่ายทอดลักษณะที่ดีต่างๆ ไปยังลูกหลาน ซึ่งจะส่งผลต่อประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์ของฝูง ทำให้ได้แม่โคลักษณะรูปร่างดี แข็งแรง ให้ผลผลิตได้ยืนยาว และช่วยเพิ่มโอกาสในการเพิ่มกำไรให้แก่เกษตรกร ซึ่งค่ามาตรฐานการเจริญเติบโตปกติของโคนมมีความสำคัญอย่างมากทั้งต่อเกษตรกร นักปรับปรุงพันธุ์ รวมทั้งนักวิจัย เนื่องจากสามารถใช้เป็นค่ามาตรฐานการเจริญเติบโตที่อายุต่างๆ สำหรับการเปรียบเทียบในแผนการทดลอง หรือใช้เปรียบเทียบการเจริญเติบโตของโคในฝูงว่ามีค่าสูงหรือต่ำกว่าค่ามาตรฐานของแต่ละสายพันธุ์ (Espe et al., 1932) การเจริญเติบโตของโคตั้งแต่ช่วงแรกเกิด ถึงช่วงก่อนเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของโคในระยะเจริญพันธุ์และโตเต็มวัย ส่งผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อและแม่พันธุ์โค และยังมีผลต่อการให้ผลผลิตของโคเพศเมีย (Lamb and Barker, 1975; Van Amburgh et al., 1998; Van De Stroet et al., 2016) นอกจากนี้ ลักษณะโครงสร้างหรือขนาดร่างกายของโคนม (เช่น ความสูง ความยาวรอบอก) ยังมีความเกี่ยวข้องกับการให้ผลผลิตน้ำนมและการให้ผลผลิตยืนนานในฝูง ส่งผลโดยตรงต่อประสิทธิภาพการผลิตของโค (Hagger and Hofer, 1991; Getu and Campus, 2015)

การวิเคราะห์ข้อมูลสมรรถภาพการเจริญเติบโตของโคพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์เฟสผู้ ตลอดช่วงอายุของการทดสอบสมรรถภาพ จึงมีความสำคัญเพื่อใช้เป็นหลักเกณฑ์ในการกำหนดค่ามาตรฐานการเจริญเติบโตปกติในช่วงอายุต่างๆ ลักษณะเด่นประจำพันธุ์ และยังมีประโยชน์ในการศึกษาวิจัยเพื่อการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์กรรมต่อไป ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ประเมินสมรรถภาพของลักษณะการเจริญเติบโต ขนาดร่างกาย และขนาดอวัยวะของโคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์เฟสผู้ และ 2) เปรียบเทียบสมรรถภาพของลักษณะดังกล่าวระหว่างโคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์เฟสผู้ที่เกิดจากพ่อพันธุ์ที่เกิดในประเทศไทย และพ่อพันธุ์ที่เกิดในต่างประเทศ

อุปกรณ์และวิธีทดลอง

ข้อมูลสัตว์ทดลอง

การศึกษานี้ใช้ข้อมูลการทดสอบสมรรถภาพของโคนมเพศผู้พันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ ซึ่งเข้ารับการทดสอบสมรรถภาพการเจริญเติบโตที่สถานทดสอบสมรรถภาพและฝึกสัตว์พ่อพันธุ์ผสมเทียมสระบุรี จังหวัดสระบุรี (พิกัด 14°36'17.3"N; 101°02'56.3"E) ในระหว่างเดือนเมษายน 2547 ถึงเดือนธันวาคม 2563 เริ่มต้นการทดสอบ (on-test) ที่อายุประมาณ 1 ถึง 4 เดือน จนถึง สิ้นสุดการทดสอบ (off-test) เมื่ออายุประมาณ 12 เดือน บันทึกข้อมูลการเจริญเติบโต ขนาดร่างกาย และขนาดอวัยวะ เป็นประจำทุกเดือน หรือบันทึกข้อมูลต่อเนื่องจนกว่าโคจะถูกย้ายออกไป ช่วงเวลาการเกิดของโคทดสอบกระจายตลอดทั้งปี โดยโคส่วนใหญ่ (~ 43%) เกิดในฤดูฝน (กรกฎาคม – ตุลาคม) ตามด้วยฤดูหนาว (พฤศจิกายน – กุมภาพันธ์, ~ 31%) และร้อน (มีนาคม – มิถุนายน, ~ 26%) ระดับสายเลือด HF ตามที่แบ่งโดย Buaban et al. (2021) โคส่วนใหญ่ (~ 72%) มีระดับสายเลือด HF (%HF) ระหว่าง 87.5 และ 93.75% ส่วนสายเลือด HF<87.5% และ HF>93.75% มีสัดส่วนใกล้เคียงกัน (~ 15 และ 13% ตามลำดับ) (จากชุดข้อมูลการเจริญเติบโต) เนื่องจากข้อมูลสมรรถภาพของโคนมเพศผู้ถูกบันทึกจนถึงอายุ 18 เดือน จึงทำการศึกษาสมรรถภาพของโคต่อเนื่องจนถึงอายุ 18 เดือน เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงสมรรถภาพของโคจนถึงวัยเจริญพันธุ์

การจัดการ

การทดสอบสมรรถภาพของโคเพศผู้ทำในโรงเรือนระบบเปิด ลูกโคเพศผู้ที่ส่งมาทดสอบจะถูกแยกเลี้ยงในกรงเดี่ยว (ขนาดกว้าง 1.5 เมตร ยาว 2.5 เมตร พื้นกรงสูงจากพื้น 1.5 เมตร) ลูกโคจะถูกเลี้ยงอนุบาลโดยได้รับ นมเทียม ประมาณ 4 kg/ตัว/วัน (เข้า 2 kg เย็น 2 kg) ฝึกให้ลูกโคกินอาหารหยาบตั้งแต่อายุในกรงเดี่ยว ภายหลังการหย่านมลูกโคที่อายุประมาณ 4 เดือน ลูกโคจะถูกย้ายไปเลี้ยงที่คอกโครุ่น (อายุ 4 ถึง 9 เดือน; ขนาดคอกกว้าง 4 เมตร ยาว 4 เมตร) และคอกโคหนุ่ม (อายุ 9 ถึง 15 เดือน; ขนาดคอกกว้าง 4 เมตร ยาว 9 เมตร) ตามลำดับ โดยแยกเลี้ยงคอกละ 1 ตัว ในระหว่างการทดสอบสมรรถภาพ โคจะได้รับอาหารหยาบคุณภาพดี อาหารข้น และน้ำสะอาด ตามแนวทางการจัดการอาหารที่กรมปศุสัตว์กำหนด อาหารหยาบประกอบด้วย หญ้าแพงโกล่าแห้ง อาหารข้นประกอบด้วย อาหารข้นสำเร็จรูปโปรตีน 21% สำหรับโคอายุ 1 ถึง 4 เดือน อาหารข้นสำเร็จรูปโปรตีน 18% สำหรับโคอายุ 4 ถึง 15 เดือน และอาหารข้นสำเร็จรูปโปรตีน 16% สำหรับโคอายุ 15 เดือนขึ้นไป ในปริมาณ 1.25% ของน้ำหนักตัว ส่วนอาหารหยาบให้กินเต็มที่ (ad libitum) และมีน้ำดื่มสะอาดให้ตลอดเวลา โคทุกตัวจะได้รับการจัดการด้านสุขภาพตามโปรแกรมสุขภาพตามข้อกำหนดของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ภายหลังสิ้นสุดการทดสอบเมื่ออายุ 12 เดือน โคทุก

ตัวจะได้รับการประเมินด้วยเกณฑ์ที่กำหนดโดยคณะกรรมการคัดเลือกโคพ่อพันธุ์ โคหนุ่มที่ผ่านการทดสอบสมรรถภาพจะถูกส่งไปทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อที่ศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ลำพญากลาง จังหวัดลพบุรี ในระหว่างรอการเคลื่อนย้าย โคหนุ่มที่ผ่านการทดสอบจะได้รับการฝึกรีดน้ำเชื้อและทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อในเบื้องต้น รวมทั้งวัดค่าสมรรถภาพด้านต่างๆ ต่อเนื่อง

การจัดการข้อมูล

ข้อมูลสมรรถภาพจากโคเพศผู้ในเบื้องต้น มีจำนวนทั้งสิ้น 4,927 บันทึก จากโค 406 ตัว ทำการคัดกรองข้อมูลในเบื้องต้นด้วยเงื่อนไขต่างๆ ได้แก่ โคมีพันธุ์ประวัติทั้งพ่อและแม่ มีข้อมูลวันเกิด ระดับสายเลือด HF อย่างน้อย 50% อายุเมื่อเริ่มทดสอบอยู่ระหว่าง 1 และ 4 เดือน โคต้องมีข้อมูลบันทึกอย่างน้อย 2 บันทึก บันทึกจากโคอายุไม่เกิน 18 เดือน และโคที่ตายหรือถูกคัดทิ้งก่อนสิ้นสุดการทดสอบถูกตัดทิ้ง ภายหลังการจัดการข้อมูลสามารถจัดกลุ่มข้อมูลการทดสอบสมรรถภาพ ออกเป็น 3 กลุ่มลักษณะ คือ 1) การเจริญเติบโต (growth) ได้แก่ น้ำหนักตัว (body weight) 2) ขนาดร่างกาย (body measurements) ได้แก่ ความสูงที่สะโพก (hip height, ลำดับถัดไปใช้คำว่า “ความสูง”) ความยาวรอบอก (heart girth) และความยาวของลำตัว (body length) และ 3) ขนาดอวัยวะ (testicular size) ได้แก่ เส้นรอบวงอวัยวะ (scrotal circumference) ความกว้างอวัยวะซ้ายและขวา (testicular width) ความหนาอวัยวะซ้ายและขวา (testicular depth or thickness) ความยาวอวัยวะซ้ายและขวา (testicular length) ซึ่งโคแต่ละตัวในชุดข้อมูลลักษณะขนาดร่างกาย และขนาดอวัยวะจะต้องมีข้อมูลครบทุกลักษณะที่เป็นองค์ประกอบ ไม่มีการขาดหายของข้อมูลบันทึกบางลักษณะ (missing data)

ชุดข้อมูลสุดท้ายสำหรับการวิเคราะห์ มีจำนวนทั้งสิ้น 4,719 บันทึก จากโค 378 ตัว สำหรับลักษณะการเจริญเติบโต 4,592 บันทึก จากโค 376 ตัว สำหรับลักษณะขนาดร่างกาย และ 3,926 บันทึก จากโค 355 ตัว สำหรับลักษณะขนาดอวัยวะ โดยเฉลี่ยแล้วมีจำนวนบันทึก ($\pm$ SD) เท่ากับ 12.5 ± 4.2 , 12.2 ± 4.2 และ 11.1 ± 3.3 บันทึก ต่อโค 1 ตัว สำหรับชุดข้อมูลการเจริญเติบโต ขนาดร่างกาย และขนาดอวัยวะ ตามลำดับ (Table 1) ซึ่งโคอาจมีข้อมูลบันทึกไม่ครบทุกเดือนในระหว่างเริ่มการทดสอบ จนถึงอายุ 18 เดือน ข้อมูลโคบางส่วนในปีสุดท้ายยังอยู่ระหว่างการทดสอบ จึงมีจำนวนบันทึกน้อย

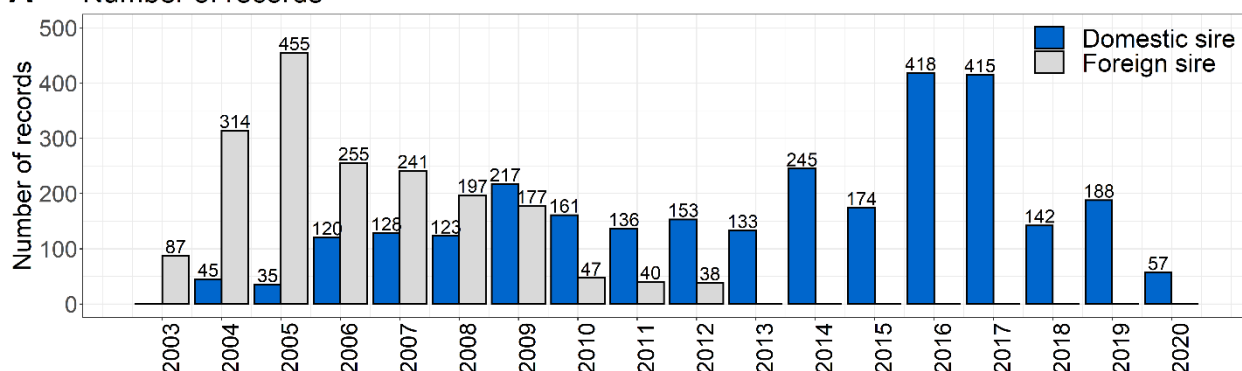
Table 1. Number of bulls and records for growth, body measurements, and testicular size of performance-tested dairy bulls recorded up to 18 months of age

Trait group	No. of bulls	No. of records	No. of records per bull		
			Mean (SD)	Min	Max
Growth	378	4,719	12.5 (4.2)	2	18
Body measurements	376	4,592	12.2 (4.2)	2	18
Testicular size	355	3,926	11.1 (3.3)	2	16

การจำแนกโคตามถิ่นกำเนิดพ่อ

การศึกษานี้ได้จำแนกโคเพศผู้ตามถิ่นกำเนิดของพ่อ (sire origin) ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ โคที่เกิดจากน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ที่เกิดในประเทศไทย (domestic sire) และโคที่เกิดจากน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ที่เกิดในต่างประเทศ (foreign sire) โดยโคทั้งสองกลุ่มมีแม่เกิดในประเทศไทยทั้งหมด ตามแผนการสร้างโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ที่ได้ดำเนินการตามลำดับเวลาอย่างต่อเนื่อง (สายัณห์, 2564) โดยใช้โคกลุ่ม domestic sire เป็นตัวแทนของโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ สำหรับการประเมินสมรรถภาพต่อไป ซึ่งการกระจายของจำนวนโคทดสอบและข้อมูลบันทึกจำแนกตามปีเกิดและถิ่นกำเนิดของพ่อแสดงใน Figure 1

A Number of records



B Number of bulls

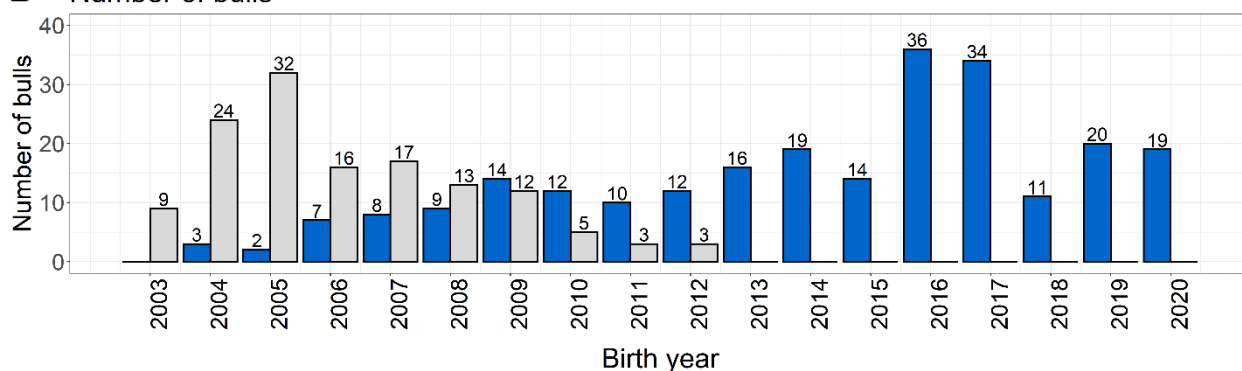


Figure 1. Number of records (A) and bulls (B) across birth years by sire origin of performance-tested dairy bulls (based on weight dataset). Domestic and foreign sires represent group of bulls with domestic and foreign sires, respectively.

ข้อมูลสมรรถภาพตลอดช่วงอายุการทดสอบสมรรถภาพ

เนื่องจากการวัดเพื่อเก็บข้อมูลสมรรถภาพเสร็จสิ้นในวันเดียว โคจึงอาจมีอายุแตกต่างกันในวันที่วัด ดังนั้น ชุดข้อมูลสมรรถภาพของโคทั้ง 3 กลุ่มลักษณะ ซึ่งเป็นข้อมูลที่มีการบันทึกต่อเนื่องในโคตัวเดิม (longitudinal data) ได้ถูกแบ่งออกตามช่วงอายุ (age classes) ตั้งแต่อายุ 1 ถึง 18 เดือน (ระยะห่าง 30 วัน) (ยกเว้นขนาดอัตรหะที่เริ่มวัดเมื่ออายุ 3 เดือน) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลในลำดับถัดไป ยกตัวอย่างเช่น ช่วงอายุ 1 ถึง <2 เดือน (อายุ 30 ถึง 59 วัน), 2 ถึง <3 เดือน (อายุ 60 ถึง 89 วัน) และ 18 ถึง <19 เดือน (อายุ 540 ถึง 569 วัน) เป็นต้น จากนั้น ตัดข้อมูลภายในช่วงอายุที่มีค่าผิดปกติ (outliers) ออกด้วยวิธี standard deviation (SD) (ตัดข้อมูลที่มีค่าต่ำกว่า $\text{mean} - 3\text{SD}$ และสูงกว่า $\text{mean} + 3\text{SD}$) นอกจากนี้ ข้อมูลบันทึกที่มี

ค่าผิดปกติไม่สอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงตามช่วงอายุของโคแต่ละตัวจะถูกตัดออก สำหรับขนาดอณฑะ (ยกเว้น scrotal circumference) หาค่าเฉลี่ยจากอณฑะซ้ายและขวาเพื่อเป็นตัวแทนของลักษณะ

ข้อมูลสมรรถภาพจำเพาะตามช่วงอายุ

สร้างลักษณะปรากฏ (phenotype) จากชุดข้อมูลบันทึกต่อเนื่อง ดังนี้

1) **ลักษณะการเจริญเติบโต** ได้แก่ น้ำหนักตัวเมื่อเข้าทดสอบ (on-test weight, kg; **WT-on-test**) ซึ่งกำหนดให้ WT-on-test เป็นน้ำหนักที่วัดครั้งแรกในการทดสอบสมรรถภาพและวัดเมื่อโคอายุระหว่าง 1 ถึง 4 เดือน น้ำหนักตัวเมื่อหย่านม (weaning weight, kg; **WWT**) น้ำหนักตัวเมื่ออายุ 1 ปี (yearling weight, kg; **YWT**) น้ำหนักตัวเมื่ออายุ 18 เดือน (1.5 ปี) (18 month weight, kg; **WT-18m**) อัตราการเจริญเติบโตต่อวัน (average dairy gain, **ADG**, kg/day) จากวันเริ่มทดสอบ ถึง อายุ 1 ปี (**ADG-on-12m**) จากอายุหย่านม ถึง อายุ 1 ปี (**ADG-wean-12m**) และจากวันเริ่มทดสอบ ถึง อายุ 18 เดือน (**ADG-on-18m**) โดยคำนิยามของ WWT คือ น้ำหนักตัวเมื่อโคอายุ 4 ถึง <5 เดือน (อายุ 120 ถึง 149 วัน); YWT คือ น้ำหนักตัวเมื่อโคอายุ 12 ถึง <13 เดือน (360 ถึง 389 วัน); และ WT-18m คือ น้ำหนักตัวเมื่อโคอายุ 18 ถึง <19 เดือน (540 ถึง 569 วัน)

2) **ขนาดร่างกาย** ได้แก่ heart girth, height และ body length (cm)

3) **ขนาดอณฑะ** ได้แก่ scrotal circumference, testicular width, testicular depth และ testicular length (cm)

โดยลักษณะขนาดร่างกาย และขนาดอณฑะ กำหนดเป็น 4 ลักษณะตามช่วงอายุ ได้แก่ 4 เดือน (อายุ 120 ถึง 149 วัน), 6 เดือน (180 ถึง 209 วัน), 12 เดือน (360 ถึง 389 วัน) และ 18 เดือน (540 ถึง 569 วัน)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

1) **การวิเคราะห์อิทธิพลของถิ่นกำเนิดต่อการเจริญเติบโต ขนาดร่างกาย และขนาดอณฑะ**

ใช้โมเดลเชิงเส้นผสม (Linear mixed model, **LMM**) ในการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อประมาณค่าที่สนใจ คือ อิทธิพลของถิ่นกำเนิดของพ่อของโคที่ทดสอบ (sire origin) วิเคราะห์ข้อมูลแยกทีละลักษณะ (univariate analysis) โดยใช้โมเดลในรูปแบบของแมทริกซ์ ดังนี้

$$y = Xb + Zu + e \quad (1)$$

เมื่อ **y** คือเวกเตอร์ของค่าสังเกต (observations) สำหรับลักษณะการเจริญเติบโต ขนาดร่างกาย และขนาดอณฑะ ที่แบ่งตามช่วงอายุจำเพาะ, **b** คือเวกเตอร์ของอิทธิพลของปัจจัยคงที่ (fixed effect) **u** คือเวกเตอร์ของอิทธิพลสุ่ม (random effect) **e** คือเวกเตอร์ของความคลาดเคลื่อน (residuals) **X** และ **Z** คือ incidence matrices ที่เชื่อมโยงค่าสังเกตและอิทธิพลที่กล่าวมาข้างต้น อิทธิพลคงที่ที่ใช้ในโมเดล ได้แก่ ค่าเฉลี่ยประชากร (overall mean, μ) sire origin (domestic และ foreign sires) ซึ่งเป็นปัจจัยที่สนใจศึกษา ตัวแปรร่วม (covariate) ของระดับสายเลือด HF (%) และอายุที่ทำการวัดค่าสังเกต (age at measuring, days) (ยกเว้นการวิเคราะห์ ADG) อิทธิพลสุ่มที่ใช้ในโมเดล ได้แก่ ปีเกิดของสัตว์ (year of birth, **ys**) การกำหนดให้ปีเกิดเป็นปัจจัยสุ่มเนื่องจากจำนวนกลุ่ม/ชั้น (levels) มีจำนวนมาก ในบางปีพบว่าถิ่นกำเนิดพ่อพันธุ์มีเพียงกลุ่มเดียว (partially nested) และปีเกิดไม่ใช่ปัจจัยที่สนใจ (nuisance parameter) รวมทั้งคณะผู้วิจัยต้องการนำผลที่ได้ไปใช้กับสัตว์ที่เกิดในปีอื่นๆ นอกเหนือจากที่มีในข้อมูล ดังนั้นการใช้ปัจจัยของอิทธิพลสุ่ม

ดังกล่าวจึงมีความเหมาะสม ในการศึกษาเบื้องต้น พบว่าฤดูกาลเกิดของสัตว์ (ร้อน ฝน และหนาว) ไม่มีอิทธิพลต่อทุกลักษณะที่ศึกษา ($p\text{-value} > 0.05$) จึงไม่ใช้ปัจจัยดังกล่าวในโมเดล เนื่องจากการผสมข้ามเป็นองค์ประกอบหลักของการสร้างโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ การใช้ปัจจัยคงที่ของระดับสายเลือด HF จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับความแตกต่างที่เกิดจากอิทธิพลของสายพันธุ์ (breed effect) (Buaban et al., 2021)

นอกจากนี้ ใช้โมเดล LMM ในการวิเคราะห์ข้อมูลที่เป็น longitudinal data ได้แก่ น้ำหนักตัว ขนาดร่างกาย และขนาดอวัยวะ ซึ่งโคแต่ละตัวมีข้อมูลบันทึกซ้ำมากกว่าหนึ่งค่า (repeated measurements) โมเดลที่ใช้เหมือนกับที่กล่าวมาข้างต้นในสมการที่ (1) ยกเว้น เพิ่มอิทธิพลคงที่ของตัวแปรร่วมกำลังสองของอายุเมื่อวัดค่าสังเกต (a quadratic term for age at measuring) และกำหนดให้อิทธิพลของตัวโค (α) เป็นปัจจัยสุ่มอีกหนึ่งปัจจัย เนื่องจากค่าสังเกตที่บันทึกจากโคแต่ละตัวไม่มีความเป็นอิสระต่อกัน (non-independent records) โดยอิทธิพลของตัวโคซ้อนอยู่ภายใต้ปีเกิดของสัตว์ (animals nested within birth years) สามารถเขียนโมเดลในรูปแบบของแมทริกซ์ได้ดังนี้

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xb} + \mathbf{Zu} + \mathbf{Wa} + \mathbf{e} \quad (2)$$

เมื่อ $\mathbf{W}$ คือ incidence matrix ที่สอดคล้องกับอิทธิพลสุ่มของตัวโค ส่วนสัญลักษณ์อื่นๆ เหมือนตามที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น

ใช้โมเดล LMM วิเคราะห์ข้อมูลทีละลักษณะตามสมการที่ (1) และ (2) ด้วยวิธี Restricted maximum likelihood (REML) โดยใช้ *lme4 package* (Bates et al., 2015) ในโปรแกรม R (R Core Team, 2020) ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มด้วยสถิติ F (F-statistic) รายงานอิทธิพลของถิ่นกำเนิดของพ่อในรูปแบบของค่าเฉลี่ย least squares means (LS means) ปรับค่า p-values ด้วยวิธี Tukey (Tukey adjusted p-values) กำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ($\alpha=0.05$)

2) การวิเคราะห์สหสัมพันธ์

วิเคราะห์สหสัมพันธ์ระหว่างสมรรถภาพของลักษณะปรากฏจากข้อมูลทั้งหมด (ไม่คำนึงถึงถิ่นกำเนิดพ่อ) โดยใช้ Pearson's correlation coefficients เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงเส้นระหว่างสมรรถภาพทั้ง 3 ด้าน รายงานผลในรูปแบบของแผนภาพสหสัมพันธ์ (correlogram) ซึ่งจัดแบ่งกลุ่มและเรียงลำดับความสัมพันธ์ตามขนาดและทิศทางของความสัมพันธ์ (hierarchical clustering order) เพื่อให้ง่ายต่อการระบุรูปแบบและโครงสร้างของความสัมพันธ์ รายงานเฉพาะค่าสหสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p\text{-value} < 0.05$)

3) การประเมินสมรรถภาพด้วยสถิติเชิงพรรณนา

การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา (ค่าเฉลี่ย ค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด และ SD) ของลักษณะต่างๆ เพื่อให้ได้ค่ามาตรฐานปกติของโคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์เพศผู้ตลอดช่วงอายุการทดสอบ โดยใช้โคกลุ่ม domestic sire เป็นตัวแทนของโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ตามที่กล่าวมาแล้วข้างต้น

การจัดการข้อมูล การวิเคราะห์สถิติเชิงพรรณนา การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ การวิเคราะห์โมเดล LMM การทดสอบสถิติต่างๆ และการสร้างแผนภาพ อาศัยโปรแกรมทางสถิติสำเร็จรูป R (R Core Team, 2020)

ผลการทดลองและวิจารณ์

อิทธิพลของถิ่นกำเนิดของพ่อต่อการเจริญเติบโต ขนาดร่างกาย และขนาดอวัยวะ

อิทธิพลของถิ่นกำเนิดของพ่อต่อลักษณะการเจริญเติบโต ขนาดร่างกาย และขนาดอวัยวะของโคนมเพศผู้ที่เข้าทดสอบสมรรถภาพ รวมทั้งสิ้น 35 ลักษณะ ถูกวิเคราะห์ด้วยโมเดลเชิงเส้นผสม แสดงผลด้วยค่า LS means ของโคกลุ่ม domestic sire และ foreign sire ผลการศึกษาพบว่า มีเพียงบางลักษณะที่พบความแตกต่างระหว่างโคสองกลุ่ม ($p\text{-value} < 0.05$) โดยสมรรถภาพด้านการเจริญเติบโต พบว่าโคนมเพศผู้ในกลุ่ม foreign sire มีค่าเฉลี่ยของ WT-on-test (71.06 kg) มากกว่าโคกลุ่ม domestic sire (65.84 kg) แต่ไม่พบความแตกต่างของน้ำหนักตัวที่อายุอื่นๆ (WWT, YWT และ WT-18m) และ ADG (ADG-wean-12m, ADG-on-12m, และ ADG-on-18m) (Table 2) สำหรับลักษณะขนาดร่างกาย พบว่าโคกลุ่ม foreign sire มี height ที่อายุ 12 เดือน (127.99 cm) มากกว่าโคกลุ่ม domestic sire (125.65 cm) และมี body length ที่อายุ 4 เดือน (87.63 cm) และ 18 เดือน (134.84 cm) ยาวกว่าโคกลุ่ม domestic sire (85.06 และ 131.23 cm ตามลำดับ) แต่ไม่พบความแตกต่างของ heart girth ทุกช่วงอายุที่ศึกษา (Table 3) นอกจากนี้ ไม่พบอิทธิพลของถิ่นกำเนิดของพ่อที่มีต่อลักษณะขนาดอวัยวะทุกลักษณะในทุกช่วงอายุที่ศึกษา (อายุ 4, 6, 12 และ 18 เดือน รวม 16 ลักษณะ) ($p\text{-value} > 0.05$, ภาคผนวก Table S1)

Table 2. Effects of sire origin on growth traits in performance-tested dairy bulls

Trait ¹	No. of bulls	Sire origin ²		p-value
		Domestic	Foreign	
WT-on-test, kg	321	65.84 (1.69)	71.06 (2.27)	0.034
WWT, kg	318	112.12 (2.35)	112.14 (3.01)	0.994
YWT, kg	310	311.69 (11.38)	312.96 (12.09)	0.861
WT-18m, kg	90	447.31 (21.22)	458.42 (21.80)	0.406
ADG-wean-12m, kg/day	272	0.837 (0.038)	0.820 (0.042)	0.545
ADG-on-12m, kg/day	261	0.797 (0.040)	0.803 (0.043)	0.800
ADG-on-18m, kg/day	78	0.787 (0.046)	0.810 (0.048)	0.401

¹ WT-on-test = weight at start of the test; WWT=weaning weight (4-month weight); YWT = yearling weight (12-month weight); WT-18m=18-month weight; ADG-wean-12m=average dairy gain from weaning to yearling; ADG-on-12m=average dairy gain from on-test to 12-month; ADG-on-18m=average dairy gain from on-test to 18-month

² Least squares means (SE)

โดยภาพรวมแล้ว สมรรถภาพส่วนใหญ่ (31 ลักษณะ) ของโคทั้งสองกลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p\text{-value} > 0.05$) ทั้งนี้ ความแตกต่างระหว่างโคสองกลุ่มสำหรับลักษณะ 4 ลักษณะข้างต้น มีเพียงเล็กน้อย (คิดเป็น 1.9 ถึง 3.0% สำหรับลักษณะขนาดร่างกาย และ 7.9% สำหรับ WT-on-test) จึงอาจกล่าว

ได้ว่าโคนมเพศผู้ที่มีพ่อเกิดในประเทศ (เกิดจากน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ที่พัฒนาภายในประเทศ) มีสมรรถภาพโดยรวมไม่แตกต่างจากโคกลุ่มที่เกิดจากน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ เป็นที่น่าสังเกตว่า หากพิจารณาจากค่าเฉลี่ย (arithmetic means) ของลักษณะสมรรถภาพทุกลักษณะที่ศึกษา พบว่าโคเพศผู้กลุ่ม domestic sire มีค่าเฉลี่ยสูงกว่าโคกลุ่ม foreign sire (ไม่แสดงผล)

Table 3. Effects of sire origin on body measurements in performance-tested dairy bulls

Trait ¹	No. of bulls	Sire origin ²		p-value
		Domestic	Foreign	
4-mon Heart girth, cm	312	106.79 (1.05)	109.14 (1.32)	0.073
6-mon Heart girth, cm	313	121.55 (1.15)	122.73 (1.36)	0.330
12-mon Heart girth, cm	298	157.65 (1.43)	159.52 (1.61)	0.164
18-mon Heart girth, cm	86	179.64 (2.10)	182.30 (2.15)	0.191
4-mon Height, cm	312	97.14 (1.08)	98.08 (1.23)	0.329
6-mon Height, cm	313	105.91 (1.39)	107.36 (1.50)	0.129
12-mon Height, cm	298	125.65 (1.53)	127.99 (1.61)	0.011
18-mon Height, cm	86	135.76 (1.63)	137.89 (1.67)	0.150
4-mon Length, cm	312	85.06 (1.47)	87.63 (1.63)	0.028
6-mon Length, cm	313	96.05 (1.45)	96.98 (1.57)	0.365
12-mon Length, cm	298	119.53 (1.77)	119.83 (1.87)	0.781
18-mon Length, cm	86	131.23 (2.12)	134.84 (2.17)	0.035

¹ Body sizes (heart girth, height, body length) measured at 4 months (4-mon), 6 months (6-mon), 12 months (12-mon), and 18 months (18-mon) of age

² Least squares means (SE)

เมื่อวิเคราะห์อิทธิพลของถิ่นกำเนิดของพ่อต่อลักษณะสมรรถภาพทั้ง 3 ด้าน ด้วยข้อมูลบันทึกที่มีลักษณะต่อเนื่อง (longitudinal data) ซึ่งเป็นข้อมูลที่บันทึกซ้ำในโคตัวเดิมตลอดช่วงการทดสอบ พบว่า ถิ่นกำเนิดของพ่อไม่มีอิทธิพลต่อน้ำหนักตัว และขนาดอวัยวะทุกลักษณะ แต่มีอิทธิพลต่อขนาดร่างกาย (height และ body length, p-value <0.05) ยกเว้น heart girth (Table 4) ซึ่งโคเพศผู้ในกลุ่ม foreign sire มีความสูงและความยาวลำตัวโดยเฉลี่ยมากกว่าโคกลุ่ม domestic sire เพียงเล็กน้อย (คิดเป็นประมาณ 1.7 - 2% ของค่าเฉลี่ยของโคกลุ่ม domestic sire) ค่าทำนายความสูงและความยาวลำตัว (predicted height and body length) ตลอดช่วงอายุตั้งแต่ 1 ถึง 18 เดือน ของโคนมเพศผู้ทั้งสองกลุ่มที่มีถิ่นกำเนิดพ่อต่างกันถูกคำนวณต่อมาภายหลัง โดยใช้ผลจากการวิเคราะห์โมเดลในสมการที่ 2 (Figure 2) โดยค่าทำนายของความสูงของโคกลุ่ม domestic sire ที่อายุ 6, 12 และ 18 เดือน เท่ากับ 103.6, 124.6 และ 136.7 cm, ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่ากลุ่ม foreign sire เล็กน้อย (106.1, 127.1 และ 139.2 cm, ตามลำดับ) โดยผลดังกล่าวสอดคล้องกัน

กับค่าทำนายความยาวลำตัว ที่อายุเดียวกัน (6, 12 และ 18 เดือน) ซึ่งโคกลุ่ม domestic sire (93.9, 118.5 และ 133.4 cm, ตามลำดับ) มีลำตัวสั้นกว่าโคกลุ่ม foreign sire (95.7, 120.3 และ 135.2 cm, ตามลำดับ) เพียงเล็กน้อย จะสังเกตได้ว่า ความแตกต่างของค่าทำนายดังกล่าวมีเพียงเล็กน้อยเมื่อโคมีอายุน้อย และความแตกต่างจะเห็นได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้นตามอายุที่มากขึ้น

Table 4. Effects of sire origin on growth, body measurements, and testicular size in performance-tested dairy bulls, analyzed using longitudinal data

Trait ¹	No. of records	Sire origin ²		p-value
		Domestic	Foreign	
Weight, kg	4,719	223.6 (7.0)	230.0 (7.5)	0.177
Heart girth, cm	4,592	139.2 (1.1)	140.8 (1.2)	0.127
Height, cm	4,592	115.9 (1.3)	118.3 (1.3)	<0.001
Body length, cm	4,592	108.2 (1.6)	110.0 (1.7)	0.023
Scrotal circumference, cm	3,926	26.0 (0.4)	26.0 (0.4)	0.970
Testicular width, cm	3,926	4.85 (0.08)	4.86 (0.09)	0.909
Testicular depth, cm	3,926	4.65 (0.07)	4.59 (0.08)	0.437
Testicular length, cm	3,926	9.52 (0.10)	9.56 (0.13)	0.723

¹ Testicular widths, depths, and lengths represented by mean of left and right testes

² Least squares means (SE)

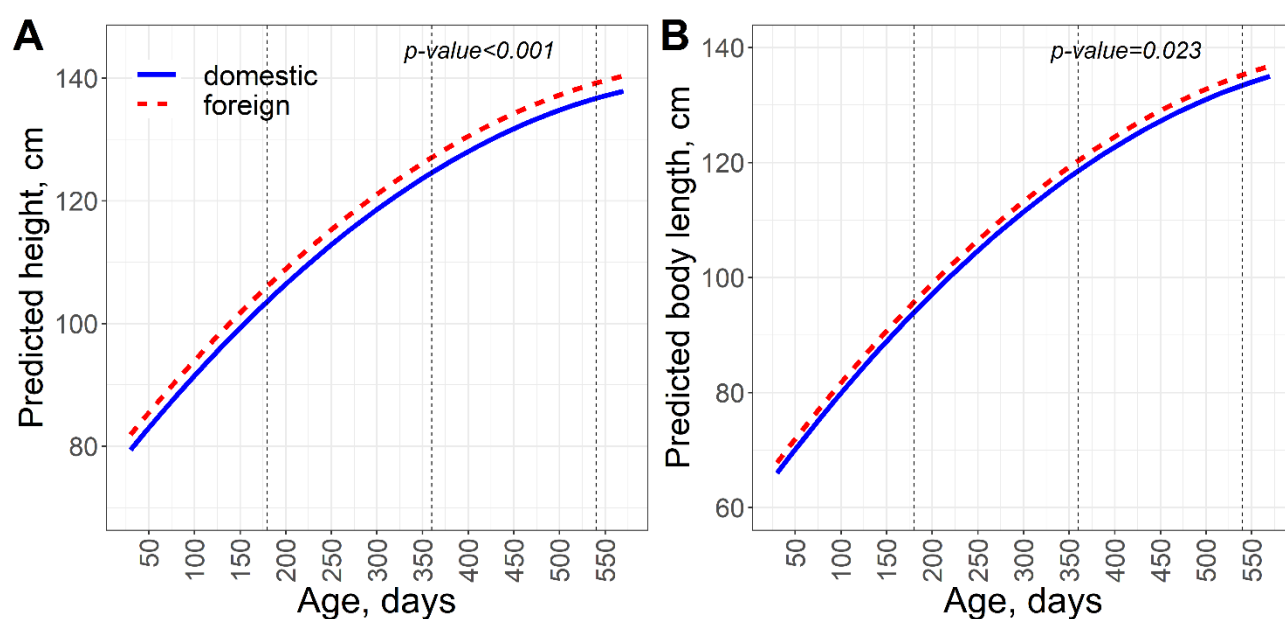


Figure 2. Predicted height (A) and body length (B) by origin of sire across age of performance-tested dairy bulls. Vertical dashed lines represent age at 180, 360, and 540 days (6, 12, and 18 months).

ผลที่ได้ในครั้งนี้ ซึ่งพบว่าลักษณะสมรรถภาพส่วนใหญ่ในโคนมเพศผู้ที่เข้าทดสอบสมรรถภาพ เมื่อปรับด้วยปัจจัยอื่นๆ (เช่น ปัจจัยคงที่ของอายุเมื่อทำการวัด และระดับสายเลือด และปัจจัยสุ่มของปีเกิดของสัตว์ และตัวสัตว์) มีความใกล้เคียงกันโดยไม่คำนึงถึงถิ่นกำเนิดของพ่อ แม้ว่ามีบางลักษณะที่พบว่าสมรรถภาพของโคเพศผู้ที่มีพ่อเกิดในต่างประเทศ มีค่าสูงกว่ากลุ่มโคที่มีพ่อเกิดในประเทศ แต่ความแตกต่างที่พบมีเพียงเล็กน้อย (เช่น น้ำหนักเมื่อเริ่มทดสอบ ความสูง และความยาวลำตัวตลอดช่วงอายุการทดสอบ) ซึ่งการที่โคเพศผู้ที่มีถิ่นกำเนิดของพ่อที่ต่างกัน มีสมรรถภาพที่ใกล้เคียงกัน อาจมีเหตุผลมาจากความสามารถในการปรับตัวของสัตว์ (adaptability) โดยพ่อโคที่เกิดและถูกเลี้ยงดูในประเทศไทยอาจมีความสามารถในการปรับตัวต่อสภาพภูมิอากาศ การจัดการเลี้ยงดู คุณภาพพืชอาหารสัตว์ในท้องถิ่น รวมถึงโรคและแมลงในเขตร้อนชื้นของประเทศไทย ดีกว่าโคกลุ่มที่มีพ่อเกิดในต่างประเทศ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นโคนมพันธุ์แท้จากประเทศเขตอบอุ่น (สหรัฐอเมริกา และแคนาดา) (สายัณห์ และคณะ, 2563) ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการปรับตัวเข้ากับสภาพภูมิอากาศในเขตร้อนชื้นของโค (tropical adaptation-related traits) ได้ถูกศึกษามาอย่างต่อเนื่อง (เช่น Prayaga et al., 2009; Porto-Neto et al., 2014; Kasarapu et al., 2017; Naval-Sánchez et al., 2020) โดยลักษณะดังกล่าว ได้แก่ ความทนร้อน สีขนและลักษณะขน คะแนนร่างกาย ขนาดร่างกาย อัตราการเจริญเติบโต น้ำหนักตัวที่อายุ 1 ปี ความต้านทานต่อแมลง เห็บ พยาธิ และความสมบูรณ์พันธุ์ เป็นต้น ซึ่งลักษณะเหล่านี้มีพื้นฐานทางพันธุกรรม (genetic background) ที่แตกต่างกัน ทั้งจำนวนยีนที่เกี่ยวข้อง (major genes, oligogenes or polygenes) และขนาดอิทธิพลของยีน (effect size) (Barendse, 2017) Porto-Neto et al. (2014) รายงานอัตราพันธุกรรมระดับปานกลาง (20 ถึง 50%) ถึง สูง (>50%) สำหรับลักษณะ tropical adaptation-related traits ในโคเขตร้อนชื้น ซึ่งสามารถใช้ในการคัดเลือกเพื่อให้ได้สัตว์ที่เหมาะสมต่อการผลิตในเขตร้อนชื้น ดังนั้น ผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าโคกลุ่มที่มีพ่อเกิดและได้รับการเลี้ยงดูในสภาพแวดล้อมของประเทศไทย มีการแสดงออกของลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการปรับตัวเข้ากับสภาพภูมิอากาศในเขตร้อนชื้น (เช่น อัตราการเจริญเติบโต น้ำหนักตัว และขนาดอวัยวะ) แตกต่างจากกลุ่มโคที่มีพ่อที่เกิดจากน้ำเชื้อโคพันธุ์แท้จากต่างประเทศ แม้ว่าโคในกลุ่มหลัง จะมีขนาดร่างกาย (ความสูง ความยาวลำตัว) ที่ใหญ่โตกว่าเล็กน้อย (Table 4) จึงสามารถกล่าวเป็นนัยได้ว่า ความสามารถในการปรับตัวของสัตว์อาจมีส่วนทำให้ลูกโคเพศผู้ในกลุ่ม domestic sire ที่แม้ว่ามีขนาดรูปร่างที่เล็กกว่า สามารถคงสมรรถภาพได้ไม่ด้อยไปกว่าโคกลุ่ม foreign sire (สำหรับน้ำหนักตัว อัตราการเจริญเติบโต และขนาดอวัยวะ) อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมในเชิงลึก ทั้งการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม ความแตกต่างในระดับยีนและเครือข่ายยีนที่เกี่ยวข้อง เพื่อให้เกิดความเข้าใจที่มากยิ่งขึ้นถึงพื้นฐานทางพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับการปรับตัวของโคพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ต่อสภาพภูมิอากาศเขตร้อนชื้นในประเทศไทย

นอกจาก tropical adaptability แล้ว กระบวนการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์โคนมอาจเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ทำให้โคนมเพศผู้ที่เกิดจากน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคที่เกิดภายในประเทศ และโคที่เกิดจากพ่อพันธุ์ต่างประเทศ (พันธุ์แท้) โดยรวมแล้วไม่มีความแตกต่างกันของสมรรถภาพ โคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ เป็นโคที่ถูกพัฒนาในประเทศไทยมานานกว่า 30 ปี โดยใช้การผสมภายในรุ่น (inter se mating) เพื่อสร้างโคนมพันธุ์แท้ ทำให้ในปัจจุบัน โคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ส่วนใหญ่มีพ่อแม่ ปู่ย่า ตายาย เกิดและเจริญเติบโตในประเทศไทย (สายัณห์ และคณะ, 2563) การคัดเลือกพ่อพันธุ์โคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ ได้เน้นด้านผลผลิตน้ำนม และลักษณะรูปร่างเป็นสำคัญ (สายัณห์, 2564) อาจส่งผลให้โคนมมีการเจริญเติบโตที่ดีตั้งแต่ช่วงระยะแรกของชีวิต

จนถึงวัยสืบพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับข้อสรุปบางส่วนของ Coffey et al. (2006) ที่แสดงให้เห็นว่าโคนมที่ถูกคัดเลือกเพื่อให้มีคุณค่าทางพันธุกรรมสูง (high genetic merit) สำหรับการให้ผลผลิตน้ำนม (ปริมาณโปรตีนและไขมันนม) มีการเจริญเติบโตในช่วงอายุน้อยเร็วกว่า และมีน้ำหนักตัวเมื่อให้ลูกครั้งแรกมากกว่าโคกลุ่มที่มีพันธุกรรมในระดับค่าเฉลี่ยของฝูง (average genetic merit) ซึ่งในความเป็นจริงนั้น ในช่วงแรกของการพัฒนาโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ ได้มีการนำเข้าน้ำเชื้อโคนมพันธุ์แท้จากต่างประเทศ จึงทำให้มีโคเพศผู้กลุ่ม foreign sire จำนวนมากในช่วงแรกๆ ของการทดสอบสมรรถภาพ (ระหว่าง พ.ศ. 2546 - 2555) และภายหลังจากที่กรมปศุสัตว์สามารถทดสอบและคัดเลือกพ่อพันธุ์โคนมที่มีพันธุกรรมดีเพื่อผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งได้เองภายในประเทศ การใช้น้ำเชื้อพ่อพันธุ์จากต่างประเทศเพื่อสร้างลูกโคเพศผู้จึงค่อยๆ ลดลง และตั้งแต่ปี พ.ศ. 2555 เป็นต้นมา ลูกโคเพศผู้ที่เข้าทดสอบสมรรถภาพเพื่อการสร้างพ่อพันธุ์โคนม เกิดจากน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ที่เกิดและเติบโตภายในประเทศทั้งหมด (Figure 1) อย่างไรก็ตาม โคในกลุ่ม domestic sire ในการศึกษาครั้งนี้มีการกระจายตัวตลอดช่วงเวลาที่ศึกษา (พ.ศ. 2547 ถึง 2563) ความแตกต่างของการกระจายตัวของข้อมูลตามปีเกิดนี้ เกี่ยวข้องโดยตรงกับปัจจัยด้านการจัดการต่างๆ ที่มีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงที่ดีขึ้น (เช่น การจัดการเลี้ยงดู คุณภาพอาหาร การจัดการสุขภาพ เป็นต้น) ประกอบกับกระบวนการคัดเลือกโคเพศผู้หนุ่มที่มีสมรรถภาพที่ดี (ในระหว่างการทดสอบสมรรถภาพ) และการคัดเลือกด้วยค่าทางพันธุกรรมที่ดำเนินมาอย่างต่อเนื่อง (สายัณห์, 2564) ปัจจัยเหล่านี้ ส่งผลให้โคในกลุ่ม domestic sire มีค่าเฉลี่ย arithmetic means ของสมรรถภาพทุกลักษณะที่ศึกษา สูงกว่าโคกลุ่ม foreign sire (ไม่แสดงผล) เพื่อขจัดปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อมที่อาจเกี่ยวข้องกับการจัดการที่อาจแตกต่างกัน รวมถึงผลจากกระบวนการคัดเลือกโคตลอดช่วงระยะเวลาที่ศึกษา อิทธิพลของปีเกิดของสัตว์จึงถูกใช้เป็นปัจจัยสุ่มในโมเดลสำหรับการวิเคราะห์ทุกลักษณะ ทั้งนี้ พบว่าอิทธิพลของปีเกิดของสัตว์ สามารถอธิบายความแปรปรวนของลักษณะ (phenotypic variance) ได้ตั้งแต่ 11 ถึง 73% สำหรับลักษณะการเจริญเติบโต 19 ถึง 60% สำหรับลักษณะขนาดร่างกาย และ 7 ถึง 35% สำหรับลักษณะขนาดอวัยวะ (ไม่แสดงผล) การปรับโมเดลด้วยปีเกิดของสัตว์ ช่วยขจัดความแตกต่างที่เกิดจากการจัดการ และสภาพแวดล้อมที่อาจต่างกันตลอดระยะเวลา 17 ปี ที่ศึกษา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกรณีที่มีการกระจายของข้อมูลไม่สมดุลตลอดช่วงเวลาที่ศึกษา ดังเช่นที่ปรากฏในชุดข้อมูลที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้

สำหรับลักษณะที่พบความแตกต่างระหว่างโคกลุ่ม foreign และ domestic sires ได้แก่ ความสูงและความยาวลำตัว (Table 4) เป็นลักษณะที่โดยทั่วไปแล้วมีการถ่ายทอดพันธุกรรมได้ปานกลางถึงสูง (heritable traits) (เช่น Northcutt and Wilson, 1993; Magnabosco et al., 2002; Afolayan et al., 2007; Supriyanton et al., 2012) โคเพศผู้กลุ่ม foreign sire มีค่าเฉลี่ย LS means ของลักษณะดังกล่าวสูงกว่าโคกลุ่ม domestic sire ซึ่งสอดคล้องกับความดีเด่นทางฟีโนไทป์ของลักษณะดังกล่าวในโคนมเขตอบอุ่น นอกจากนี้ เป็นที่น่าสังเกตว่า ลักษณะการเจริญเติบโต (น้ำหนักตัว และ ADG) ไม่มีความแตกต่างระหว่างโคสองกลุ่ม ยกเว้นน้ำหนักตัวเมื่อเริ่มทดสอบ (Table 2) ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าลักษณะหลัง (น้ำหนักเมื่อเริ่มทดสอบ) ของโคกลุ่ม foreign sire ที่สูงกว่าโคกลุ่ม domestic sire มีสาเหตุมาจากโคกลุ่มแรกมีน้ำหนักเมื่อแรกเกิดสูงกว่า แม้ว่าข้อมูลเกี่ยวกับน้ำหนักแรกเกิดไม่ได้มีการบันทึกไว้ Demeke et al. (2003) สรุปว่าน้ำหนักแรกเกิดในประชากรโคพันธุ์แท้ *Bos indicus* และโคลูกผสมระหว่าง *Bos indicus* และโคนม มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในเชิงบวกปานกลางกับน้ำหนักหย่านมที่อายุ 3 เดือน ($r_g = 0.66$) ซึ่งอาจสนับสนุนผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องมีการเก็บบันทึกข้อมูลน้ำหนักแรกเกิดของโคนมพันธุ์

ทรอปิคอลโฮลสไตน์เพิ่มเติมสำหรับการประมาณค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมในอนาคต นอกจากนี้ เป็นที่สังเกตว่า เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักตัวจากข้อมูล longitudinal data (โมเดลในสมการที่ 2) ไม่พบความแตกต่างระหว่างน้ำหนักตัวของโคสองกลุ่ม (Table 4) ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลที่ได้สำหรับน้ำหนักเมื่อเริ่มทดสอบซึ่งวิเคราะห์ด้วยโมเดลในสมการที่ 1 การวิเคราะห์ข้อมูล longitudinal data ใช้โมเดลที่พิจารณาข้อมูล repeated measurements ในตัวสัตว์ตลอดช่วงอายุที่ศึกษา ซึ่งได้นำความไม่เป็นอิสระของข้อมูลบันทึกของสัตว์ตัวเดียวกัน (dependency) มาพิจารณา และให้ผลเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวโดยรวมจากข้อมูลน้ำหนักตัวทั้งหมด ส่วนการวิเคราะห์ด้วยโมเดลในสมการที่ 1 นั้นมุ่งเน้นการเปรียบเทียบสมรรถภาพในช่วงอายุต่างๆ ที่สนใจที่ละช่วงอายุ ดังนั้น ผลที่ค้นพบว่าค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวโดยรวมระหว่างโคสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน แต่มีความแตกต่างของน้ำหนักเมื่อเริ่มทดสอบ จึงเป็นผลที่สามารถเกิดขึ้นได้

เป็นที่น่าสังเกตว่า ลักษณะขนาดอวัยวะ (เส้นรอบวงอวัยวะ ความกว้าง ความยาว และความหนาของอวัยวะ) ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างโคสองกลุ่ม ซึ่งอาจกล่าวเป็นนัยได้ว่า ความสมบูรณ์พันธุ์ของโคสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน โดยอาจมีเหตุผลหลายประการ ทั้งกระบวนการคัดเลือกพ่อพันธุ์หนุ่มที่เข้มข้น (selection pressure) ในด้านความสมบูรณ์ของอวัยวะสืบพันธุ์ รวมทั้งความสามารถในการผลิตน้ำเชื้อของโคหนุ่มที่เข้าสู่โปรแกรมการสร้างพ่อพันธุ์โคหนุ่มของกรมปศุสัตว์ (สายพันธ์, 2564) อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ไม่มีข้อมูลที่บ่งบอกถึงความสมบูรณ์พันธุ์ของโคหนุ่มในแง่ของปริมาณและคุณภาพน้ำเชื้อ รวมถึงความสมบูรณ์พันธุ์ในลูกสาว การศึกษาในอนาคตอาจพิจารณาเปรียบเทียบความสมบูรณ์พันธุ์ของโคเพศผู้ทั้งสองกลุ่มเพื่อให้ทราบถึงอิทธิพลของถิ่นกำเนิดพ่อพันธุ์ต่อความสมบูรณ์พันธุ์ต่อไป

สหสัมพันธ์ระหว่างลักษณะการเจริญเติบโต ขนาดร่างกาย และขนาดอวัยวะ

ค่าสหสัมพันธ์เพียร์สันถูกนำมาใช้ในการวัดระดับความสัมพันธ์หรือความเชื่อมโยงระหว่างลักษณะสมรรถภาพต่างๆ รวม 35 ลักษณะ (ใช้ข้อมูลทั้งหมดโดยไม่คำนึงถึงถิ่นกำเนิดของพ่อ) โดยทั่วไป พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะต่างๆ (ทั้งภายในและหว่างกลุ่มลักษณะ) มีค่าเป็นบวก (positive relationships) ในระดับต่ำมาก ถึง สูงมาก ($r = 0.05$ ถึง 0.98) (ไม่ได้แสดงผล) ซึ่งประมาณ 10, 39, 42 และ 9% ของคู่ลักษณะ (pairwise) มีความสัมพันธ์ในระดับต่ำมากหรือไม่มีความสัมพันธ์ ($r < 0.30$) ต่ำ ($r > 0.30$ ถึง 0.50) ปานกลาง ($r > 0.50$ ถึง 0.70) และสูง ($r > 0.70$) ตามการแบ่งของ Mukaka (2012) ตามลำดับ

โดยทั่วไปพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะการเจริญเติบโต มีความสัมพันธ์กันเชิงบวกในระดับต่ำมาก ถึง สูงมาก ($r = 0.23$ ถึง 0.98) (Figure 3) โดยความสัมพันธ์สูงที่สุดพบระหว่าง WT-on-test และ ADG-on-18m ($r = 0.98$) รองลงมาคือความสัมพันธ์ระหว่าง YWT กับ ADG-on-12m ($r = 0.96$) และ ADG-wean-12m ($r = 0.93$) เป็นที่น่าสังเกตว่า WT-on-test มีความสัมพันธ์สูงกับการเจริญเติบโตอื่นๆ โดยเฉพาะความสัมพันธ์กับ YWT ($r = 0.76$), ADG-wean-12m ($r = 0.75$), ADG-on-12m ($r = 0.78$) และ ADG-on-18m ($r = 0.98$) ในขณะที่ WWT มีความสัมพันธ์ต่ำ ถึง ปานกลางกับลักษณะการเจริญเติบโตอื่นๆ ($r = 0.23$ ถึง 0.55) นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่าง ADG ที่คำนวณจาก 3 วิธีที่คำนวณในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีความสัมพันธ์กันในระดับสูง ($r = 0.75$ ถึง 0.96) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ADG-wean-12m และ ADG-on-

12m ($r = 0.96$) ดังนั้น การคำนวณค่า ADG ที่อายุ 12 เดือน จึงสามารถคำนวณได้ทั้งสองวิธี โดยคำนวณจากวันเริ่มทดสอบ หรือจากวันหย่านม

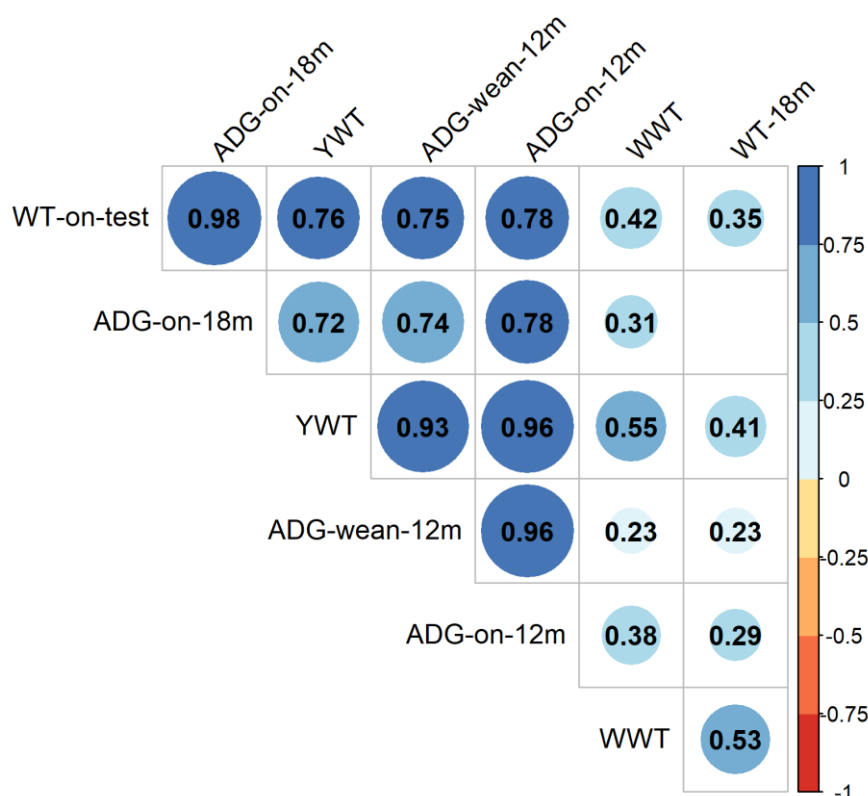


Figure 3. Correlations between growth traits, only significant correlation coefficients were shown (p -value < 0.05). WT-on-test = weight at start of the test; WWT=weaning weight (4-month weight); YWT = yearling weight (12-month weight); WT-18m=18-month weight; ADG-wean-12m=average dairy gain from weaning to yearling; ADG-on-12m=average dairy gain from on-test to 12-month; ADG-on-18m=average dairy gain from on-test to 18-month

ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะขนาดร่างกายในภาพรวมพบว่า ลักษณะที่อยู่ภายในกลุ่มลักษณะเดียวกันแต่วัดที่ต่างอายุกัน (4, 6, 12, และ 18 เดือน) มีความสัมพันธ์กันในระดับต่ำถึงสูง ($r = 0.43$ ถึง 0.82) (ภาคผนวก Figure S1) โดยค่าสหสัมพันธ์ของลักษณะขนาดร่างกายที่อายุต่างกันมีค่าตั้งแต่ 0.69 ถึง 0.80 สำหรับ height, 0.55 ถึง 0.82 สำหรับ heart girth และ 0.43 ถึง 0.69 สำหรับ body length โดยความสัมพันธ์สูงสุดพบระหว่าง heart girth ที่อายุ 12 กับ 18 เดือน ($r = 0.82$) และ ที่อายุ 4 กับ 6 เดือน ($r = 0.81$) และระหว่าง height ที่อายุ 4 กับ 6 เดือน ($r = 0.80$) และ ที่อายุ 6 กับ 18 เดือน ($r = 0.80$) เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะจากต่างกลุ่มลักษณะกัน พบว่าความสัมพันธ์มีค่าต่ำกว่าความสัมพันธ์ภายในลักษณะเดียวกัน ($r = 0.23$ ถึง 0.75) โดยความสัมพันธ์สูงสุดพบระหว่าง heart girth กับ height ที่อายุ 12 เดือน ($r = 0.75$) และ body length ที่อายุ 6 เดือน กับ heart girth ที่อายุ 18 เดือน ($r = 0.75$)

สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะขนาดอวัยวะ โดยทั่วไปพบว่ามีค่าความสัมพันธ์กันในระดับต่ำมาก ถึง สูง ($r = 0.15$ ถึง 0.90) (ภาคผนวก Figure S2) โดยเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ภายในกลุ่มลักษณะเดียวกัน

แต่สัตว์ที่ต่างอายุกัน พบว่าความสัมพันธ์มีค่าต่ำมาก ถึง สูง ($r = 0.29$ ถึง 0.74) โดยพบว่า scrotal circumference ที่อายุต่างกันมีความสัมพันธ์กันสูงกว่าลักษณะอื่น ($r = 0.48$ ถึง 0.74) โดยค่าสูงที่สุดพบได้จากความสัมพันธ์ระหว่าง scrotal circumference ที่อายุ 4 กับ 6 เดือน ($r = 0.74$) และ ที่อายุ 12 กับ 18 เดือน ($r = 0.74$) สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะขนาดอวัยวะที่ต่างกัน พบว่าความสัมพันธ์มีค่าต่ำมาก ถึง สูง ($r = 0.15$ ถึง 0.90) โดยค่าสูงที่สุดพบระหว่าง testicular width และ testicular depth ที่อายุ 6 เดือน ($r = 0.90$) และระหว่างสองลักษณะดังกล่าวที่อายุ 12 เดือน ($r = 0.89$)

การศึกษาในครั้งนี้ ถือเป็นครั้งแรกที่วิเคราะห์ความสัมพันธ์ของลักษณะสมรรถภาพของโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์เฟสผู้ในช่วงเจริญเติบโตแบบองค์รวม ครอบคลุมลักษณะการเจริญเติบโต ขนาดร่างกาย และขนาดอวัยวะ การศึกษาในโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ ก่อนหน้านี้มีเพียง ธวัชชัย และ จิตศักดิ์ (2558) ที่พบความสัมพันธ์ต่ำ ระหว่างเส้นรอบวงอวัยวะที่อายุ 6, 12 และ 18 เดือน กับ ปริมาตรน้ำเชื้อ ($r = 0.12$ ถึง 0.17) และจำนวนอสุจิทั้งหมด ($r = 0.17$ ถึง 0.29)

ความสัมพันธ์ระหว่างลักษณะสมรรถภาพต่างๆ มีประโยชน์ในการประเมินเพื่อคัดเลือกโคเพศผู้ โดยเฉพาะในแง่ของการเป็นลักษณะที่เป็นตัวแทน (indicator trait) สำหรับใช้ในการคัดเลือกลักษณะอื่นๆ โดยทั่วไป ความสัมพันธ์ในเชิงบวกระหว่างลักษณะสมรรถภาพของโคนมเพศผู้ในช่วงอายุต่างๆ ชี้ให้เห็นถึงความสัมพันธ์ที่ต้องการ (favorable associations) ยกตัวอย่างเช่น น้ำหนักเมื่อเริ่มทดสอบที่สูง ส่งผลให้โคนมการเจริญเติบโตอื่นๆ ที่ดี (ความสัมพันธ์ของ WT-on-test กับ YWT, ADG-wean-12m, ADG-on-12m และ ADG-on-18m เท่ากับ 0.75 ถึง 0.98 , Figure 3) นอกจากนี้ รูปแบบความสัมพันธ์ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ยังสามารถใช้ประโยชน์ในการทำนายลักษณะต่างๆ ที่สนใจ (prediction) โดยอาศัยเทคนิคการวิเคราะห์ทางสถิติ (เช่น การวิเคราะห์ด้วยสมการถดถอย) ซึ่งสามารถใช้ในการทำนายลักษณะที่สนใจในอนาคตได้ตั้งแต่โคอายุยังน้อย หรือทำนายลักษณะที่สนใจจากลักษณะอื่นๆ นอกจากนี้ ผลที่ได้จากรูปแบบความสัมพันธ์ในครั้งนี้ยังสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการตัดสินใจคัดเลือกหรือคัดทิ้งโค ควบคู่กับการพิจารณาด้วยหลักเกณฑ์อื่นๆ โดยเฉพาะในกรณีที่มีลูกโคเพศผู้เข้าทดสอบสมรรถภาพเป็นจำนวนมากเกินกว่าขีดความสามารถของสถานีทดสอบสมรรถภาพในบางปี อย่างไรก็ตาม เพื่อให้เกิดความก้าวหน้าทางพันธุกรรมของลักษณะสมรรถภาพต่างๆ อย่างรวดเร็ว จำเป็นต้องมีการศึกษาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม (genetic correlations) ระหว่างลักษณะสมรรถภาพต่างๆ เพื่อประกอบการวางแผนการคัดเลือก

สมรรถภาพของโคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์เฟสผู้

โคกลุ่ม domestic sire ถูกใช้เป็นตัวแทนของโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์สำหรับการประเมินสมรรถภาพ ด้วยเหตุผลที่โคกลุ่มนี้เป็นตัวแทนของโคที่เข้าทดสอบสมรรถภาพในปัจจุบันซึ่งโคทั้งหมดเป็นโคกลุ่ม domestic sire ประกอบกับผลการศึกษาข้างต้นที่พบว่าสำหรับลักษณะสมรรถภาพส่วนใหญ่ของโคนมเพศผู้ไม่แตกต่างกัน

1. สมรรถภาพด้านการเจริญเติบโต

Table 5 แสดงค่าสมรรถภาพของลักษณะการเจริญเติบโตตามช่วงอายุของโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์เฟสผู้ โดยค่าเฉลี่ย ($\pm$ SD) ของ WT-on-test เท่ากับ 69.2 ± 20.9 kg (อายุเฉลี่ยประมาณ 70 ± 24 วัน)

WWT เท่ากับ 112.8 ± 23.1 kg (อายุเฉลี่ยประมาณ 133 ± 9 วัน) YWT เท่ากับ 329.3 ± 55.5 kg (อายุเฉลี่ยประมาณ 374 ± 9 วัน) และ WT-18m เท่ากับ 462.6 ± 85.2 kg (อายุเฉลี่ยประมาณ 553 ± 9 วัน)

เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญเติบโต พบว่า ADG-on-12m มีค่าเฉลี่ย เท่ากับ 0.857 ± 0.180 kg/day ซึ่งต่ำกว่า ADG-wean-12m (0.903 ± 0.190 kg/day) สามารถบ่งชี้ได้ว่าในช่วงแรกเกิดถึงก่อนหย่านม โคมีการเจริญเติบโตที่ช้ากว่าช่วงภายหลังหย่านม เนื่องจากลูกโคอาจได้รับผลกระทบจากปัจจัยภายนอก เช่น ภาวะเครียดจากการเคลื่อนย้าย การปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมและสภาพการจัดการที่เปลี่ยนแปลงไปจากฟาร์มต้นทาง ส่วน ADG-on-18m มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.815 ± 0.171 kg/day ซึ่งต่ำกว่า ADG-on-12m เล็กน้อย แสดงให้เห็นว่าอัตราการเจริญเติบโตเริ่มช้าลงเมื่อโคอายุตั้งแต่ 1 ปี เป็นต้นไป

Table 5. Summary description of phenotypes for growth traits of performance-tested dairy bulls

Trait ¹	No. of bulls	Mean	SD	Min	Max
WT-on-test, kg	209	69.2	20.9	37	162
WWT, kg	205	112.8	23.1	61	170
YWT, kg	193	329.3	55.5	144	450
WT-18m, kg	45	462.6	85.2	275	628
ADG-wean-12m, kg/day	174	0.903	0.190	0.244	1.292
ADG-on-12m, kg/day	164	0.857	0.180	0.272	1.198
ADG-on-18m, kg/day	42	0.815	0.171	0.429	1.143

¹ WT-on-test = weight at start of the test; WWT=weaning weight (4-month weight); YWT = yearling weight (12-month weight); WT-18m=18-month weight; ADG-wean-12m=average dairy gain from weaning to yearling; ADG-on-12m=average dairy gain from on-test to 12-month; ADG-on-18m=average dairy gain from on-test to 18-month

2. สมรรถภาพด้านขนาดร่างกาย

สมรรถภาพด้านขนาดร่างกายของโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลส์ไต้หวันเพศผู้แสดงใน Table 6 พบว่า ค่าเฉลี่ย ($\pm$ SD) ของ heart girth เมื่ออายุ 4, 6, 12 และ 18 เดือน เท่ากับ 107.0 ± 8.2 , 122.3 ± 7.7 , 159.1 ± 8.0 , และ 180.5 ± 9.8 cm ตามลำดับ height เมื่ออายุ 4, 6, 12 และ 18 เดือน เท่ากับ 98.3 ± 6.3 , 108.1 ± 6.8 , 128.0 ± 6.4 และ 136.6 ± 7.4 cm ตามลำดับ ส่วน body length ของโคเมื่ออายุ 4, 6, 12 และ 18 เดือน มีค่าเท่ากับ 85.6 ± 7.7 , 97.3 ± 7.3 , 121.7 ± 8.4 และ 132.1 ± 8.6 cm ตามลำดับ

3. สมรรถภาพด้านขนาดอวัยวะ

เมื่อพิจารณาสมรรถภาพด้านขนาดอวัยวะของโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลส์ไต้หวันเพศผู้ ซึ่งแสดงใน Table 7 พบว่า เมื่อโคอายุ 4, 6, 12 และ 18 เดือน ค่าเฉลี่ย ($\pm$ SD) ของ scrotal circumference มีค่าเท่ากับ 15.6 ± 1.7 , 19.0 ± 2.2 , 31.1 ± 2.7 และ 34.2 ± 3.4 cm; testicular width มีค่าเท่ากับ 2.5 ± 0.4 , 3.3 ± 0.5 , 5.9 ± 0.5 และ 6.6 ± 0.7 cm; testicular depth มีค่าเท่ากับ 2.3 ± 0.3 , 3.1 ± 0.5 , 5.7 ± 0.5 และ 6.4 ± 0.7 cm; และ testicular length มีค่าเท่ากับ 5.3 ± 0.6 , 6.7 ± 0.9 , 11.3 ± 1.0 และ 13.4 ± 1.5 cm ตามลำดับ

Table 6. Summary description of phenotypes for body measurements at 4, 6, 12, and 18 month-old of performance-tested dairy bulls

Trait	No. of records	Mean	SD	Min	Max
4-mon Heart girth, cm	202	107.0	8.2	86	125
6-mon Heart girth, cm	202	122.3	7.7	101	143
12-mon Heart girth, cm	184	159.1	8.0	134	178
18-mon Heart girth, cm	42	180.5	9.8	158	204
4-mon Height, cm	202	98.3	6.3	77	115
6-mon Height, cm	202	108.1	6.8	88	129
12-mon Height, cm	184	128.0	6.4	103	145
18-mon Height, cm	42	136.6	7.4	123	147
4-mon Length, cm	202	85.6	7.7	69	112
6-mon Length, cm	202	97.3	7.3	78	119
12-mon Length, cm	184	121.7	8.4	97	146
18-mon Length, cm	42	132.1	8.6	117	148

Table 7. Summary description of phenotypes for testicular size at 4, 6, 12, and 18 month-old of performance-tested dairy bulls

Trait ¹	No. of bulls	Mean	SD	Min	Max
4-mon Scrotal circumference, cm	166	15.6	1.7	12.0	21.0
6-mon Scrotal circumference, cm	196	19.0	2.2	13.0	26.0
12-mon Scrotal circumference, cm	167	31.1	2.7	23.0	37.0
18-mon Scrotal circumference, cm	30	34.2	3.4	26.4	41.0
4-mon Width, cm	166	2.5	0.4	1.65	3.50
6-mon Width, cm	196	3.3	0.5	2.00	4.45
12-mon Width, cm	167	5.9	0.5	4.30	7.20
18-mon Width, cm	30	6.6	0.7	5.05	7.90
4-mon Depth, cm	166	2.3	0.3	1.50	3.15
6-mon Depth, cm	196	3.1	0.5	1.65	4.35
12-mon Depth, cm	167	5.7	0.5	4.35	6.75
18-mon Depth, cm	30	6.4	0.7	4.95	7.75
4-mon Length, cm	166	5.3	0.6	3.70	6.50
6-mon Length, cm	196	6.7	0.9	4.25	9.60
12-mon Length, cm	167	11.3	1.0	8.95	13.40
18-mon Length, cm	30	13.4	1.5	10.50	16.50

¹ Testicular widths, depths, and lengths were represented by means of left and right testes

ขนาดของอัณฑะ ถือเป็นลักษณะที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อโค โดยมีความสัมพันธ์อย่างมากกับปริมาณของอัณฑะ ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อความสามารถในการผลิตน้ำเชื้อเมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ ขนาดอัณฑะที่เล็กเกินไป ส่งผลให้โคผลิตน้ำเชื้อได้น้อย ทำให้ไม่สามารถนำมาใช้เป็นพ่อโคเพื่อผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งได้ เส้นรอบวงอัณฑะ ถือเป็นหนึ่งในพารามิเตอร์ที่ใช้ในการประเมินความสมบูรณ์ของระบบสืบพันธุ์ของโคเพศผู้ (Menegassi et al., 2011) ค่าเฉลี่ยของเส้นรอบวงอัณฑะของโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ ที่อายุ 12 (31.1 cm) และ 18 เดือน (34.2 cm) แสดงให้เห็นถึงการเจริญเติบโตที่ดีของอัณฑะ สอดคล้องกับ Latif et al. (2009) ที่แนะนำว่าโคนมลูกผสมอายุ 18 เดือนขึ้นไป ควรมีเส้นรอบวงอัณฑะมากกว่า 30 เซนติเมตร ซึ่งจะทำให้สามารถผลิตน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีทั้งปริมาณและความเข้มข้น นอกจากนี้ ยังมีความเป็นไปได้ที่ลูกสาวที่เกิดจากพ่อพันธุ์โคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์จะเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เมื่ออายุน้อย เนื่องจากพ่อโคที่มีเส้นรอบวงอัณฑะที่ใหญ่ จะให้ลูกสาวที่เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เร็วขึ้น (Van Melis, 2010)

เมื่อพิจารณาเส้นโค้งของการเจริญเติบโต (growth curve) ซึ่งแสดงการเปลี่ยนแปลงสมรรถภาพของทั้ง 3 กลุ่มลักษณะตามช่วงอายุ (จากเริ่มทดสอบ จนถึงอายุ 18 เดือน) (Figure 4) โดยทั่วไปพบว่า ค่าเฉลี่ยสมรรถภาพทั้ง 3 กลุ่มลักษณะของโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์เพศผู้ มีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นตามอายุโคที่มากขึ้น โดยรูปแบบของการเพิ่มขึ้นมีความเหมือนหรือแตกต่างกันไปแล้วแต่ลักษณะ โดยจะเห็นว่า น้ำหนักตัวโคมีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นตามอายุที่มากขึ้นเกือบเป็นเส้นตรง (straight line) (Figure 4A) ขนาดร่างกายมีการ

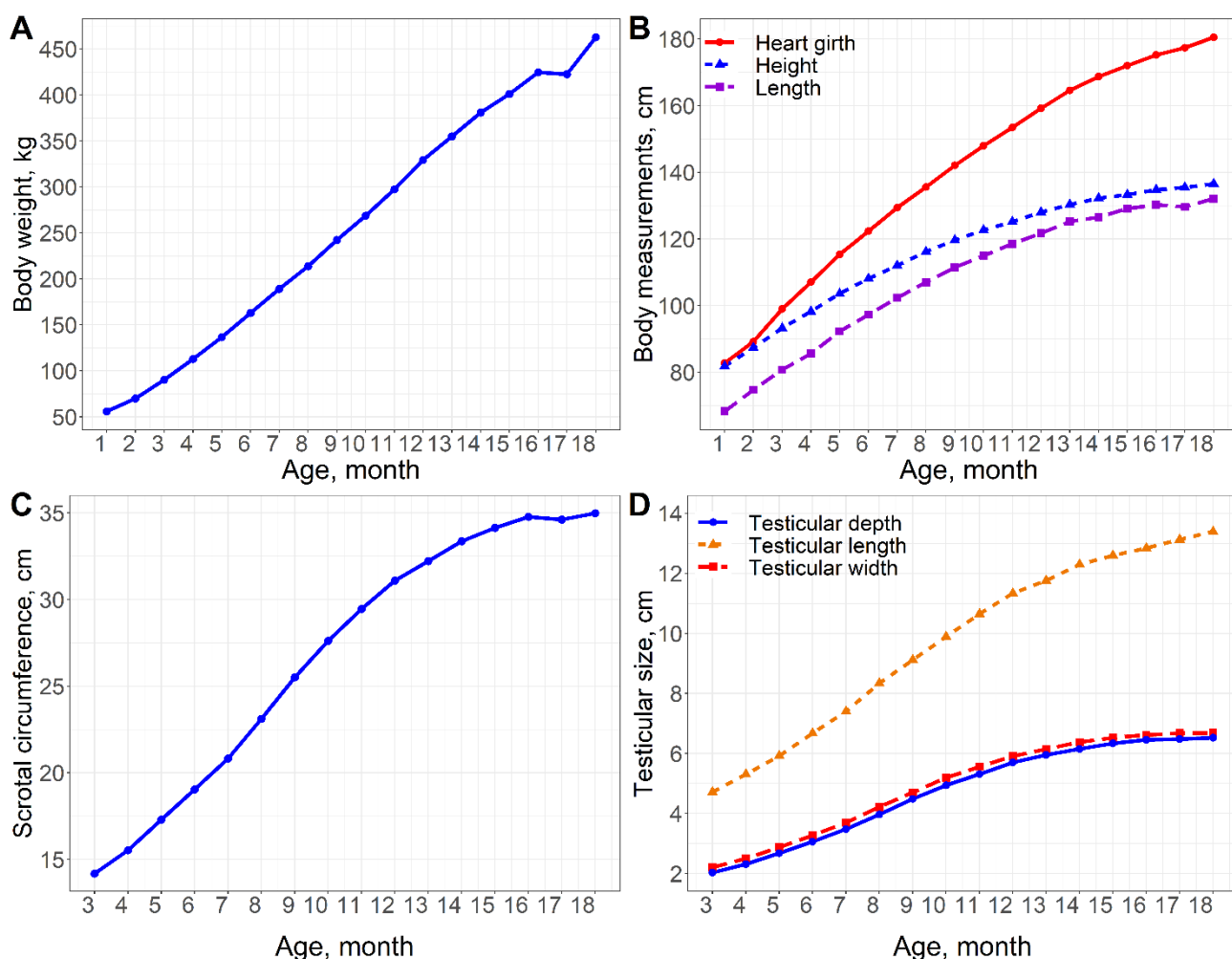


Figure 2. Means of body weight (A), body measurements (B), scrotal circumference (C), and testicular sizes (D) across ages of performance-tested dairy bulls

เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น โดยลักษณะเกือบเป็นเส้นตรงในช่วงอายุ 1 ถึง 12 เดือน จากนั้นอัตราการเพิ่มขึ้นค่อยๆ ลดลง (เส้นโค้งเป็นเว้าลง หรือ concave downward) (Figure 4B) เป็นที่น่าสังเกตว่าความยาวรอบอกมีอัตราการเจริญเติบโตที่เร็วกว่าความสูงและความยาวลำตัวตลอดอายุที่ศึกษา สำหรับแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของขนาดอัตรานั้น มีลักษณะคล้ายเส้นโค้งรูปตัวเอส (S-shaped curve) โดยการเพิ่มของขนาดอัตรเกือบเป็นเส้นตรงในช่วงแรก (อายุ 3 ถึง 12 เดือน) หลังจากนั้นอัตราการเพิ่มขึ้นค่อยๆ ลดลง จนแทบไม่เปลี่ยนแปลงตั้งแต่อายุ 16 เดือน เป็นต้นไป (ยกเว้นความยาวอัตร) (Figure 4C, 3D) สำหรับค่าสมรรถภาพทั้ง 3 ด้าน ตั้งแต่อายุ 1 ถึง 18 เดือน แสดงไว้ในภาคผนวก Tables S2 – S5 ซึ่งสามารถใช้เป็นค่าอ้างอิงมาตรฐานของโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์เพศผู้ได้

การศึกษาเกี่ยวกับการเจริญเติบโตในโคนมมีน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาในโคเนื้อเนื่องจากการเจริญเติบโตเป็นลักษณะที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจที่สำคัญสำหรับโคเนื้อ การศึกษาด้านพันธุกรรมของลักษณะการเจริญเติบโตของโคนมส่วนมากทำในโคเพศเมีย เช่น การศึกษาอัตราพันธุกรรมของการเจริญเติบโตในระยะต่างๆ ของโคสาวก่อนการคลอดลูกครั้งแรกในโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ (Groen and Vos, 1995) และการศึกษาความแตกต่างของน้ำหนักตัวและการเจริญเติบโตตั้งแต่เกิดจนถึงโตเต็มวัยในโคนมที่มีการคัดเลือกต่างกันสำหรับปริมาณผลผลิต (Coffey et al., 2006) ส่วนการศึกษาในโคนมเพศผู้มีไม่มาก ยกตัวอย่างเช่น Demeke et al. (2003) ศึกษาคุณค่าทางพันธุกรรมของน้ำหนักตัวของโคเพศผู้และเมียตั้งแต่แรกเกิด ถึงอายุ 1 ปี ในโคพันธุ์แท้ *Bos indicus* และโคลูกผสมกับโคยุโรป Alberti et al. (2008) เปรียบเทียบน้ำหนักตัว อัตราการเจริญเติบโต ขนาดร่างกาย และลักษณะซากของโคหนุ่มอายุน้อย ระหว่างโคนม โคเนื้อ และโคพื้นเมืองในยุโรปตะวันตก รวม 15 สายพันธุ์ สำหรับในประเทศไทย พบว่า การศึกษาส่วนใหญ่เป็นการเปรียบเทียบน้ำหนักตัว และประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของโคนมเพศผู้ในช่วงอายุต่างๆ ตามการจัดการด้านอาหาร ความต้องการโภชนา หรือการเลี้ยงดูที่แตกต่างกัน เพื่อประโยชน์ในการผลิตโคขุนวัยอ่อน (veal calves) หรือขุนเป็นโคเนื้อ (พิสุทธิ และคณะ, 2536; สุนน โพธิ์จันทร์, 2551; พิลาสลักษณ์ และคณะ, 2562) ส่วนการศึกษาเกี่ยวกับการเจริญเติบโตของโคนมเพศผู้เพื่อการคัดเลือกสำหรับการสร้างพ่อพันธุ์โคนม Sarakul et al. (2019) ศึกษาในประชากรโคนมหลายสายพันธุ์ (dairy multibreed population) ที่มีระดับสายเลือดโฮลสไตน์แตกต่างกัน (ลูกผสม และพันธุ์แท้) ซึ่งได้ผลสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ โดยคณะนักวิจัยดังกล่าวรายงานว่า growth curve ของน้ำหนักตัวโคนมเพศผู้มีรูปแบบค่อนข้างเป็นเส้นตรงในช่วงแรกของการเจริญเติบโต (อายุ 5.5 ถึง 30 เดือน) การวิเคราะห์ค่าสมรรถภาพของโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์เพศผู้ มีประโยชน์ไม่เพียงแต่ใช้เป็นค่าอ้างอิงมาตรฐานของสายพันธุ์ แต่ยังสามารถนำไปใช้เพื่อให้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับรูปแบบการเจริญเติบโตของลูกที่เกิดจากพ่อพันธุ์เหล่านี้เมื่อนำไปขุนเพื่อผลิตเป็นโคเนื้อ (steer progeny) (อายุ 1 ถึง 18 เดือน) รวมทั้งรูปแบบการเจริญเติบโตของลูกสาวที่จะใช้เป็นโคนมทดแทนอีกด้วย

สรุปผลการทดลอง

1) โคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์เพศผู้ มีสมรรถภาพใกล้เคียงกันโดยไม่คำนึงถึงถิ่นกำเนิดของพ่อ ได้แก่ ลักษณะสมรรถภาพด้านการเจริญเติบโต ขนาดร่างกาย และขนาดอัตร ยกเว้น ความสูงและความยาวลำตัวซึ่งกลุ่มโคเพศผู้ที่มีพ่อเกิดในต่างประเทศมีค่าเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มโคที่มีพ่อเกิดในประเทศ แต่ขนาดของความแตกต่างมีเพียงเล็กน้อย

2) ความสัมพันธ์ภายในลักษณะสมรรถภาพด้านการเจริญเติบโต ขนาดร่างกาย และขนาดอวัยวะ อยู่ในระดับต่ำมากถึงสูง ($r = 0.15$ ถึง 0.98) โดยความสัมพันธ์ในระดับสูงที่สำคัญ ได้แก่

ลักษณะสมรรถภาพด้านการเจริญเติบโต เช่น ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักตัวเมื่อเข้าทดสอบ กับ ADG จากวันเริ่มทดสอบถึงอายุ 1 ปี ($r = 0.78$) และ ADG จากวันเริ่มทดสอบถึงอายุ 18 เดือน ($r = 0.98$) และ ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักตัวเมื่ออายุ 1 ปี กับ ADG จากวันทดสอบถึงอายุ 1 ปี ($r = 0.96$)

ลักษณะสมรรถภาพด้านขนาดร่างกาย เช่น ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวรอบอกที่อายุ 12 กับ 18 เดือน ($r = 0.82$) และ ที่อายุ 4 กับ 6 เดือน ($r = 0.81$) และ ความสัมพันธ์ระหว่างความสูงที่อายุ 4 กับ 6 เดือน ($r = 0.80$) และ ที่อายุ 6 กับ 18 เดือน ($r = 0.80$)

ลักษณะสมรรถภาพด้านขนาดอวัยวะ เช่น ความสัมพันธ์ระหว่างเส้นรอบวงอวัยวะที่อายุ 4 กับ 6 เดือน ($r = 0.74$) และ ที่อายุ 12 กับ 18 เดือน ($r = 0.74$) และ ความสัมพันธ์ระหว่างความกว้าง กับ ความหนาของอวัยวะที่อายุ 6 เดือน ($r = 0.90$) และ 12 เดือน ($r = 0.89$)

3) สมรรถภาพของโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลส์ไต้หวันเพศผู้ในด้านการเจริญเติบโต ขนาดร่างกาย และขนาดอวัยวะ ตั้งแต่ก่อนหย่านม จนถึงวัยเจริญพันธุ์ (ประมาณ 18 เดือน) สำหรับใช้เป็นค่าปกติมาตรฐานของสายพันธุ์ และเป็นข้อมูลประกอบในการคัดเลือก และประเมินความพร้อมในการผลิตน้ำเชื้อ อ้างอิงในช่วงอายุที่สำคัญ มีดังต่อไปนี้

สมรรถภาพด้านการเจริญเติบโต

1. น้ำหนักตัวเมื่อหย่านม (อายุ 4 เดือน) เท่ากับ 112.8 ± 23.1 kg
2. น้ำหนักตัวเมื่ออายุ 12 เดือน เท่ากับ 329.3 ± 55.5 kg
3. น้ำหนักตัวเมื่ออายุ 18 เดือน เท่ากับ 462.6 ± 85.2 kg
4. อัตราการเจริญเติบโตต่อวันจากวันเริ่มทดสอบ ถึง อายุ 1 ปี เท่ากับ 0.857 ± 0.180 kg/day
5. อัตราการเจริญเติบโตต่อวันจากวันหย่านม ถึง อายุ 1 ปี เท่ากับ 0.903 ± 0.190 kg/day
6. อัตราการเจริญเติบโตต่อวันจากวันเริ่มทดสอบ ถึง อายุ 18 เดือน เท่ากับ 0.815 ± 0.171 kg/day

สมรรถภาพด้านขนาดร่างกาย

1. ความยาวรอบอก เมื่ออายุ 6 เดือน เท่ากับ 122.3 ± 7.7 cm
2. ความยาวรอบอก เมื่ออายุ 12 เดือน เท่ากับ 159.1 ± 8.0 cm
3. ความยาวรอบอก เมื่ออายุ 18 เดือน เท่ากับ 180.5 ± 9.8 cm
4. ความสูง เมื่ออายุ 6 เดือน เท่ากับ 108.1 ± 6.8 cm
5. ความสูง เมื่ออายุ 12 เดือน เท่ากับ 128.0 ± 6.4 cm
6. ความสูง เมื่ออายุ 18 เดือน เท่ากับ 136.6 ± 7.4 cm
7. ความยาวลำตัว เมื่ออายุ 6 เดือน เท่ากับ 97.3 ± 7.3 cm
8. ความยาวลำตัว เมื่ออายุ 12 เดือน เท่ากับ 121.7 ± 8.4 cm
9. ความยาวลำตัว เมื่ออายุ 18 เดือน เท่ากับ 132.1 ± 8.6 cm

สมรรถภาพด้านขนาดอวัยวะ

1. เส้นรอบวงอวัยวะ เมื่ออายุ 6 เดือน เท่ากับ 19.0 ± 2.2 cm

2. เส้นรอบวงอณฑะ เมื่ออายุ 12 เดือน เท่ากับ 31.1 ± 2.7 cm

3. เส้นรอบวงอณฑะ เมื่ออายุ 18 เดือน เท่ากับ 34.2 ± 3.4 cm

4) การพัฒนาโคนมโดยการสร้างพ่อพันธุ์โคนมขึ้นเองภายในประเทศของกรมปศุสัตว์ สามารถสร้างโคนมเพศผู้หนุ่มที่มีสมรรถภาพที่ดีทั้งการเจริญเติบโต ขนาดร่างกาย และขนาดอณฑะ ซึ่งส่งผลให้โคนมมีความพร้อมที่ดีในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ผลจากการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ พบว่า WT-on-test มีความสัมพันธ์สูงกับการเจริญเติบโตอื่นๆ เช่น YWT และ ADG จึงสามารถใช้เป็นลักษณะตัวแทนสำหรับลักษณะการเจริญเติบโตอื่นๆ เมื่อสิ้นสุดการทดสอบ เพื่อใช้ในการคัดเลือกลูกโคเพศผู้ที่จะนำเข้าทดสอบ โดยต้องอาศัยศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาโมเดลในการทำนาย

2. ควรมีการศึกษาในอนาคตทั้งการวิเคราะห์ทางพันธุกรรม (genetic analysis) ได้แก่ อัตราพันธุกรรม ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และการประเมินพันธุกรรม (genetic evaluation) ด้วยเทคนิคทางการปรับปรุงพันธุ์ สำหรับลักษณะสมรรถภาพของโคนมเพศผู้ เพื่อให้สามารถคัดเลือกโคนมเพศผู้ที่มีลักษณะสมรรถภาพที่ดี และมีความเหมาะสมต่อการผลิตน้ำเชื้อ ควบคู่ไปกับการคัดเลือกลักษณะความดีเด่นทางพันธุกรรมด้านการให้ผลผลิต และลักษณะอื่นๆ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณเจ้าหน้าที่สถานทดสอบสมรรถภาพและฝึกสัตว์พ่อพันธุ์ผสมเทียมสระบุรีทุกท่านที่เก็บรวบรวมข้อมูลบันทึกที่ใช้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบคุณ ดร.สายัณห์ บัวบาน ผู้เชี่ยวชาญด้านการพัฒนาโคนม สำนักพัฒนาพันธุ์สัตว์ สำหรับคำแนะนำในการออกแบบวิธีการวิจัยและให้ข้อคิดเห็นในการปรับปรุงงานวิจัย และขอขอบคุณผู้บริหารและบุคลากรสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ในการสนับสนุน ส่งเสริมและมีส่วนร่วมในการดำเนินงานโครงการผลิตพ่อโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. 2564. สมุดพ่อพันธุ์กรมปศุสัตว์ 2563 สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. พิมพ์ที่ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. 94 หน้า. แหล่งที่มา : http://biotech.dld.go.th/webnew/images/Sire_Summary/2563/Sire_Summary2563.pdf, สืบค้นเมื่อ 27 ตุลาคม 2564.
- จूरรัตน์ แสนโกษณ์. 2555. ทิศทางการพัฒนาพันธุ์โคนม TROPICL HOLSTEIN. แก่นเกษตร 40 ฉบับพิเศษ 2: 104 - 109.
- ธวัชชัย โพธิ์คำ และ จิตศักดิ์ เมืองเขียว. 2558. ความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเส้นรอบวงอณฑะกับปริมาตรและคุณภาพน้ำเชื้อของโคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์. 147-156. ใน การประชุมวิชาการปศุสัตว์แห่งชาติ ประจำปี 2558. สถาบันสุขภาพสัตว์แห่งชาติ กรมปศุสัตว์, กรุงเทพฯ.

- พิลาสลักษณ์ ปานประเสริฐ อรอนงค์ พวงชมพู และ ขวัญชัย บุญรักษา. 2562. การศึกษาเบื้องต้นของสมรรถภาพการเจริญเติบโต และคุณภาพเนื้อของลูกโคนมเพศผู้ที่เสริมนมหมักผสมแคลเซียมโซป. แก่นเกษตร 47 ฉบับพิเศษ 2.
- พิสุทธิ เนียมทรัพย์ อนุชา ศิริ ปราโมช ศีตะโกเศศ สมปอง สรวมศิริ และ เสนอ วงกลม. 2536. การเจริญเติบโตของลูกโคนมเพศผู้ที่นำมาขุนเพื่อการค้าหลังหย่านมที่อายุต่างกัน. รายงานผลงานวิจัยสถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้. (เอกสารไม่ตีพิมพ์).
- สายัณห์ บัวบาน มนต์ชัย ดวงจินดา วุฒิไกร บุญคุ้ม สมศักดิ์ เปรมปรีดิ์ เกียรติศักดิ์ เหล็งหนูดำ และ ญัฐนันท์ ศิริรัตนัญญะกุล. 2563. การประเมินพันธุกรรมจีโนมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์โคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์ในประเทศไทย. พิมพ์ที่ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยม นนทบุรี.
- สายัณห์ บัวบาน. 2564. คู่มือแนวทางการสร้างพ่อโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์. บริษัท ละม่อม จำกัด, กรุงเทพฯ.
- สุมน โพธิ์จันทร์. 2551. การให้อาหารโคนมเพศผู้เพื่อผลิตเนื้อ. กองอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์, กรุงเทพมหานคร.
- Afolayan, R.A., W.S. Pitchford, M.P.B. Deland, and W.A. McKiernan. 2007. Breed variation and genetic parameters for growth and body development in diverse beef cattle genotypes. *Animal*, 1 (1): 13-20.
- Albertí, P., B. Panea, C. Sañudo, J.L. Olleta, G. Ripoll, P. Ertbjerg, M. Christensen, S. Gigli, S. Failla, S. Concetti and J.F. Hocquette. 2008. Live weight, body size and carcass characteristics of young bulls of fifteen European breeds. *Livestock Science*, 114(1):19-30.
- Barendse, W. 2017. Climate adaptation of tropical cattle. *Annual review of animal biosciences*, 5, 133-150.
- Bates, D., M. Mächler, B. Bolker and S. Walker. 2015. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *Journal of Statistical Software*, 67(1):1-48.
- Buaban, S., S. Prempre, P. Sumreddee, M. Duangjinda and Y. Masuda. 2021. Genomic prediction of milk-production traits and somatic cell score using single-step genomic best linear unbiased predictor with random regression test-day model in Thai dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 104(12): 12713-12723.
- Coffey, M. P., J. Hickey and S. Brotherstone. 2006. Genetic aspects of growth of Holstein-Friesian dairy cows from birth to maturity. *J. Dairy. Sci.* 89(1):322-329.
- Demeke, S., F.W.C. Naser and S.J. Schoeman. 2003. Variance components and genetic parameters for early growth traits in a mixed population of purebred *Bos indicus* and crossbred cattle. *Livest. Prod. Sci.* 84:11-21.
- Espe, D. L., C. Y. Cannon and E.N. Hansen. 1932. Normal growth in dairy cattle. *Iowa Agriculture and Home Economics Experiment Station Research Bulletin*. 12(154), 1.

- Falconer, D.S. and T.F.C. Mackay. 1996. Introduction to Quantitative Genetics. Longmans Green, Harlow, Essex, UK.
- Getu, A. and S. Campus. 2015. The role of conformational traits on Dairy cattle production and their longevities. Open Access Library Journal, 2(03), 1.
- Groen, A. F. and H. Vos. 1995. Genetic parameters for body weight and growth in Dutch Black and White replacement stock. Livest. Prod. Sci. 41:201–206.
- Hagger, C. and A. Hofer. 1991. Phenotypic and genetic relationships between wither height, heart girth and milk yield in the Swiss Braunvieh and Simmental breeds. Livestock Production Science. 28(3):265-271.
- Kasarapu, P., L.R. Porto-Neto, M.R. Fortes, S.A. Lehnert, M.A. Mudadu, L. Coutinho, L. Regitano, A., George and A. Reverter. 2017. The Bos taurus–Bos indicus balance in fertility and milk related genes. PloS one, 12(8), p.e0181930.
- Lamb, R.C., and B.O. Barker. 1975. Genetic relationship between birth weight and adult weight in Holsteins. Journal of dairy science. 58(5):724-728.
- Latif, M.A., J.U. Ahmed, M.M.U. Bhuiyan and M. Shamsuddin. 2009. Relationship between scrotal circumference and semen parameters in crossbred bulls. Bangladesh Veterinarian. 26(2):61-67.
- Magnabosco, C.D.U., M. Ojala, A. De Los Reyes, R.D. Sainz, A. Fernandes and T.R. Famula. 2002. Estimates of environmental effects and genetic parameters for body measurements and weight in Brahman cattle raised in Mexico. Journal of Animal Breeding and genetics, 119(4): 221-228.
- Menegassi, S.R.O., J.O.J. Barcellos, V. Peripolli, P.R.R.X. Pereira, J.B.S. Borges and V.D.N. Lampert. 2011. Measurement of scrotal circumference in beef bulls in Rio Grande do Sul. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia. 63(1):87-93.
- Mukaka, M.M. 2012. A guide to appropriate use of correlation coefficient in medical research. Malawi medical journal, 24(3):69-71.
- Naval-Sánchez, M., L.R. Porto-Neto, D.F. Cardoso, B.J. Hayes, H.D. Daetwyler, J. Kijas and A. Reverter. 2020. Selection signatures in tropical cattle are enriched for promoter and coding regions and reveal missense mutations in the damage response gene HELB. Genetics Selection Evolution, 52:1-19.
- Northcutt, S.L. and D.E. Wilson. 1993. Genetic parameter estimates and expected progeny differences for mature size in Angus cattle. Journal of animal science, 71(5):1148-1153.

- Porto-Neto, L.R., A. Reverter, K.C. Prayaga, E.K. Chan, D.J. Johnston, R.J. Hawken, G. Fordyce, J.F. Garcia, T.S. Sonstegard, S. Bolormaa and M.E. Goddard. 2014. The genetic architecture of climatic adaptation of tropical cattle. *Plos one*, 9(11), p.e113284.
- Prayaga, K.C., N.J. Corbet, D.J. Johnston, M.L. Wolcott, G. Fordyce and H.M. Burrow. 2009. Genetics of adaptive traits in heifers and their relationship to growth, pubertal and carcass traits in two tropical beef cattle genotypes. *Animal Production Science*, 49(6):413-425.
- R Core Team. 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Sarakul, M., S. Koonawootrittriron, M.A. Elzo and T. Suwanasopee. 2019. Growth curve of dairy artificial insemination bulls raised under Thai tropical conditions. *Agriculture and Natural Resources*, 53(5):538-544.
- Supriyantono, A., M. Tomiyama and K. Suzuki. 2012. Estimation of (co) variance components and genetic parameter of withers height, chest girth and body length of Bali cattle using animal model. *International Journal of Molecular Zoology*, 2(5).
- Van Amburgh, M.E., D.G. Fox, D.M. Galton, D.E. Bauman and L.E. Chase. 1998. Evaluation of National Research Council and Cornell Net Carbohydrate and Protein systems for predicting requirements of Holstein heifers. *J. Dairy. Sci.* 81(2):509-526.
- Van De Stroet, D. L., J.C. Díaz, K.J. Stalder, A.J. Heinrichs and C.D. Dechow. 2016. Association of calf growth traits with production characteristics in dairy cattle. *J. Dairy. Sci.* 99(10):8347-8355.
- Van Melis, M.H., J.P. Eler, G.J.M. Rosa, J.B.S. Ferraz, L.G.G. Figueiredo, E.C. Mattos and H.N.D. Oliveira. 2010. Additive genetic relationships between scrotal circumference, heifer pregnancy, and stayability in Nellore cattle. *Journal of Animal Science*. 88(12):3809-3813.

ภาคผนวก

Table S1. Effects of sire origin on testicular size in performance-tested dairy bulls

Trait ¹	No. of bulls	Sire origin ²		p-value
		Domestic	Foreign	
4-mon SC, cm	251	15.20 (0.25)	15.26 (0.30)	0.812
6-mon SC, cm	303	18.68 (0.32)	18.29 (0.38)	0.236
12-mon SC, cm	251	30.40 (0.51)	30.52 (0.59)	0.801
18-mon SC, cm	60	34.71 (0.64)	33.69 (0.74)	0.275
4-mon Width, cm	251	2.43 (0.06)	2.44 (0.07)	0.886
6-mon Width, cm	303	3.20 (0.08)	3.13 (0.09)	0.319
12-mon Width, cm	251	5.80 (0.09)	5.75 (0.11)	0.574
18-mon Width, cm	60	6.64 (0.14)	6.49 (0.16)	0.430
4-mon Depth, cm	251	2.27 (0.05)	2.22 (0.06)	0.445
6-mon Depth, cm	303	3.01 (0.07)	2.99 (0.08)	0.824
12-mon Depth, cm	251	5.60 (0.08)	5.57 (0.11)	0.813
18-mon Depth, cm	60	6.52 (0.13)	6.32 (0.15)	0.301
4-mon Length, cm	251	5.31 (0.07)	5.33 (0.09)	0.813
6-mon Length, cm	303	6.68 (0.10)	6.63 (0.13)	0.675
12-mon Length, cm	251	11.25 (0.15)	11.32 (0.19)	0.725
18-mon Length, cm	60	13.35 (0.30)	12.76 (0.34)	0.147

¹ Testicular size (SC=scrotal circumference, width, depth, length) measured at 4 months (4-mon), 6 months (6-mon), 12 months (12-mon), and 18 months (18-mon) of age

² Least squares means (SE)

Table S2. Summary description of body weights (kg) across age classes of performance-tested dairy bulls

Age class (months)	Low - High (days) ¹	n ²	Mean	SD	Min	Max
1 to <2	30-59	78	56.0	10.4	37	89
2 to <3	60-89	156	70.0	14.5	43	123
3 to <4	90-119	195	90.3	19.5	48	162
4 to <5	120-149	207	112.9	23.0	61	170
5 to <6	150-179	206	136.7	25.7	73	201
6 to <7	180-209	206	162.9	30.9	85	250
7 to <8	210-239	197	189.1	34.5	92	285
8 to <9	240-269	199	213.7	38.6	102	311
9 to <10	270-299	202	242.4	39.7	125	345
10 to <11	300-329	199	268.8	45.6	142	395
11 to <12	330-359	198	297.4	52.0	127	413
12 to <13	360-389	193	329.3	55.5	144	450
13 to <14	390-419	179	355.0	57.0	165	455
14 to <15	420-449	149	380.9	63.1	175	499
15 to <16	450-479	123	401.0	68.6	200	536
16 to <17	480-509	100	424.6	72.6	225	562
17 to <18	510-539	58	422.6	81.1	250	554
18 to <19	540-569	45	462.6	85.2	275	628

¹ Age definition: 30 days interval for each age class² Number of records

Table S3. Summary description of body measurements (in cm) cross age classes of performance-tested dairy bulls

Age class (months)	Low - High (days) ¹	n ²	Heart girth			Height			Body length		
			Mean (SD)	Min	Max	Mean (SD)	Min	Max	Mean (SD)	Min	Max
1 to <2	30-59	73	82.7 (6.2)	69	100	81.8 (6.0)	65	98	68.3 (7.2)	55	89
2 to <3	60-89	154	89.2 (7.8)	65	110	87.3 (6.0)	69	102	74.7 (8.5)	50	97
3 to <4	90-119	191	99.0 (8.0)	78	123	93.2 (6.1)	76	109	80.8 (8.1)	64	103
4 to <5	120-149	204	107.0 (8.1)	86	125	98.2 (6.3)	77	115	85.6 (7.7)	69	112
5 to <6	150-179	203	115.4 (8.0)	92	132	103.6 (6.3)	82	117	92.3 (8.0)	67	121
6 to <7	180-209	202	122.3 (7.7)	101	143	108.1 (6.8)	88	129	97.3 (7.3)	78	119
7 to <8	210-239	194	129.4 (8.2)	101	148	112.0 (6.5)	90	129	102.3 (8.5)	74	126
8 to <9	240-269	196	135.6 (8.3)	109	154	116.2 (6.2)	96	131	107.0 (7.6)	83	128
9 to <10	270-299	200	142.0 (8.2)	114	164	119.6 (6.6)	96	134	111.5 (8.0)	89	136
10 to <11	300-329	193	147.9 (7.3)	126	164	122.6 (6.2)	98	135	115.0 (8.1)	87	137
11 to <12	330-359	193	153.5 (8.1)	121	173	125.2 (6.2)	104	138	118.6 (8.3)	96	143
12 to <13	360-389	184	159.1 (8.0)	134	178	128.0 (6.4)	103	145	121.7 (8.4)	97	146
13 to <14	390-419	173	164.6 (7.7)	138	187	130.3 (6.6)	107	142	125.2 (9.0)	103	152
14 to <15	420-449	147	168.7 (8.7)	137	189	132.2 (6.5)	111	145	126.5 (9.1)	100	151
15 to <16	450-479	120	172.0 (8.8)	146	195	133.3 (6.6)	111	147	129.1 (9.4)	100	152
16 to <17	480-509	94	175.2 (8.8)	155	193	134.8 (7.3)	116	150	130.2 (9.0)	106	146
17 to <18	510-539	57	177.4 (8.9)	158	193	135.5 (6.6)	119	145	129.6 (8.7)	105	147
18 to <19	540-569	42	180.5 (9.8)	158	204	136.6 (7.4)	123	147	132.1 (8.6)	117	148

¹ Age definition: 30 days interval for each age class² Number of records

Table S4. Summary description of scrotal circumference and testicular width (in cm) across age classes of performance-tested dairy bulls

Age class (months)	Low - High (days) ¹	n ²	Scrotal circumference			Testicular width ³		
			Mean (SD)	Min	Max	Mean (SD)	Min	Max
3 to <4	90-119	119	14.2 (1.8)	10.0	18.4	2.2 (0.4)	1.3	3.4
4 to <5	120-149	184	15.5 (1.7)	12.0	21.0	2.5 (0.4)	1.7	3.5
5 to <6	150-179	197	17.3 (2.0)	12.5	23.0	2.9 (0.4)	1.4	4.2
6 to <7	180-209	196	19.0 (2.2)	13.0	26.0	3.3 (0.5)	2.0	4.5
7 to <8	210-239	191	20.8 (2.3)	14.5	26.0	3.7 (0.5)	2.2	5.0
8 to <9	240-269	189	23.1 (2.8)	14.0	30.0	4.2 (0.6)	2.5	5.8
9 to <10	270-299	197	25.5 (3.0)	16.0	33.0	4.7 (0.6)	2.5	6.2
10 to <11	300-329	191	27.6 (2.9)	19.0	34.0	5.2 (0.6)	3.5	6.7
11 to <12	330-359	193	29.5 (3.0)	19.0	36.6	5.6 (0.6)	3.4	7.1
12 to <13	360-389	185	31.1 (2.8)	22.0	37.4	5.9 (0.5)	4.3	7.2
13 to <14	390-419	171	32.2 (2.8)	22.2	38.0	6.1 (0.6)	4.3	7.5
14 to <15	420-449	137	33.4 (2.8)	24.7	39.0	6.4 (0.6)	4.6	7.7
15 to <16	450-479	116	34.1 (2.9)	25.5	40.5	6.5 (0.6)	4.8	7.8
16 to <17	480-509	91	34.8 (3.1)	25.7	40.8	6.6 (0.6)	5.2	7.8
17 to <18	510-539	55	34.6 (3.3)	25.4	41.0	6.7 (0.6)	5.3	8.4
18 to <19	540-569	39	35.0 (3.5)	26.4	41.0	6.7 (0.7)	5.1	7.9

¹ Age definition: 30 days interval for each age class² Number of records³ Testicular width was represented by the mean of left and right testes

Table S5. Summary description of testicular depth (thickness) and length (in cm) across age classes of performance-tested dairy bulls

Age class (months)	Low-High (days) ¹	n ²	Testicular depth ³			Testicular length ³		
			Mean (SD)	Min	Max	Mean (SD)	Min	Max
3 to <4	90-119	119	2.0 (0.4)	1.2	3.3	4.7 (0.8)	2.1	7.2
4 to <5	120-149	184	2.3 (0.4)	1.5	3.2	5.3 (0.6)	3.7	6.9
5 to <6	150-179	197	2.7 (0.4)	1.5	3.9	5.9 (0.8)	3.8	8.5
6 to <7	180-209	196	3.1 (0.5)	1.7	4.4	6.7 (0.9)	4.3	9.6
7 to <8	210-239	191	3.5 (0.5)	2.0	4.8	7.4 (1.0)	5.4	10.1
8 to <9	240-269	189	4.0 (0.6)	2.4	5.6	8.3 (1.2)	4.8	11.9
9 to <10	270-299	197	4.5 (0.6)	2.2	6.3	9.1 (1.2)	5.2	12.1
10 to <11	300-329	191	4.9 (0.6)	3.4	6.4	9.9 (1.2)	6.7	12.9
11 to <12	330-359	193	5.3 (0.6)	3.4	6.8	10.6 (1.2)	6.6	13.7
12 to <13	360-389	185	5.7 (0.5)	4.4	6.9	11.3 (1.1)	8.7	14.6
13 to <14	390-419	171	6.0 (0.6)	4.0	7.4	11.8 (1.1)	8.4	14.0
14 to <15	420-449	137	6.2 (0.5)	4.6	7.1	12.3 (1.0)	9.5	14.6
15 to <16	450-479	116	6.3 (0.6)	4.7	7.7	12.6 (1.0)	9.4	14.9
16 to <17	480-509	91	6.5 (0.6)	5.0	7.5	12.8 (1.2)	9.4	15.3
17 to <18	510-539	55	6.5 (0.6)	4.9	7.8	13.1 (1.4)	9.2	15.7
18 to <19	540-569	39	6.5 (0.7)	5.0	7.8	13.4 (1.4)	10.5	16.5

¹ Age definition: 30 days interval for each age class² Number of records³ Testicular depth and length were represented by the mean of left and right testes

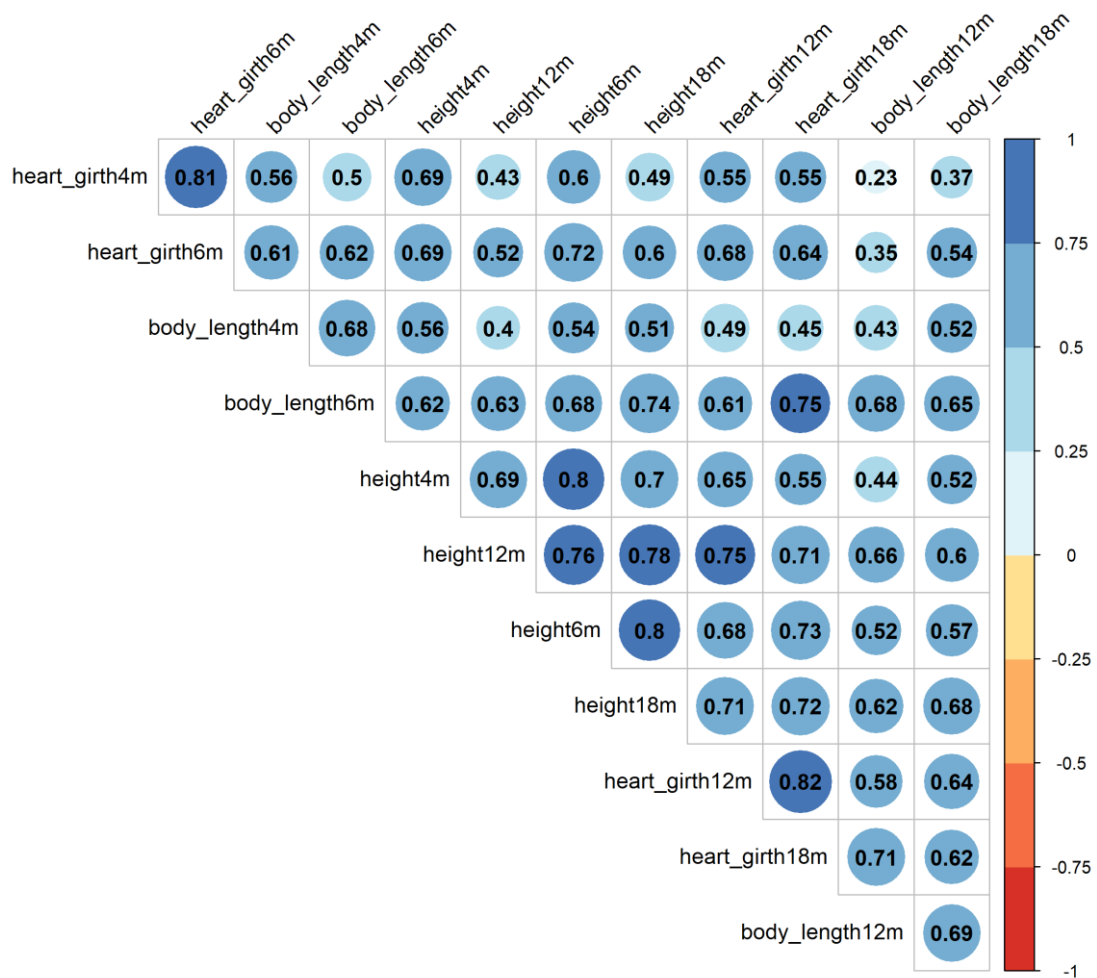


Figure S1 Correlations between body measurement traits at 4, 6, 12, and 18 months (m) of age. Only significant correlation coefficients were shown (p-value < 0.05).

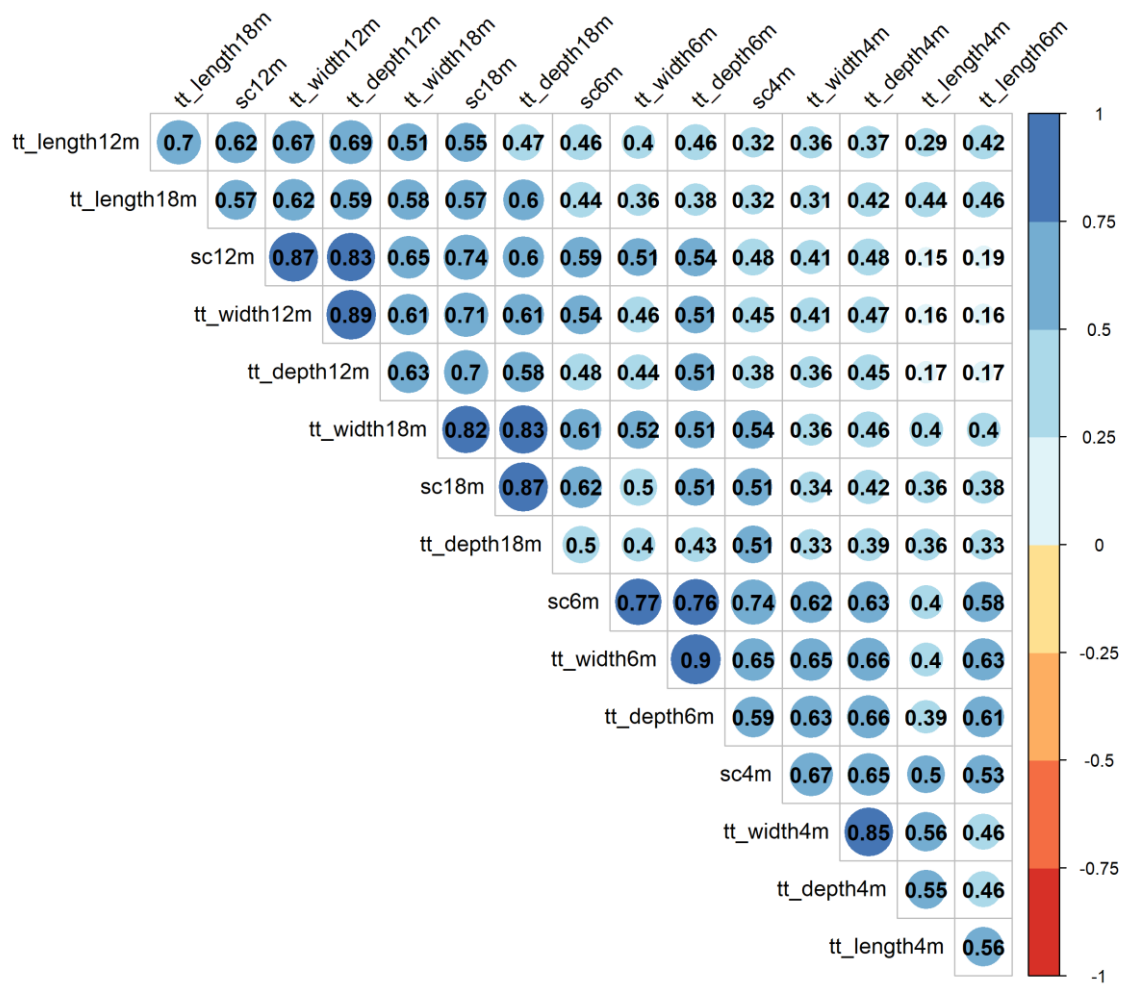


Figure S2 Correlations between testicular size traits at 4, 6, 12, and 18 months (m) of age. Only significant correlation coefficients were shown (p-value < 0.05). SC = scrotal circumference; tt = testicular size