



วารสารเทคโนโลยีชีวภาพ การผลิตปศุสัตว์

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์
BUREAU OF BIOTECHNOLOGY IN LIVESTOCK PRODUCTION
DEPARTMENT OF LIVESTOCK DEVELOPMENT

ปีที่ 13 : พ.ศ. 2565

Vol 13 : 2022

ISSN : 1905-6877

JOURNAL
OF
BIOTECHNOLOGY
IN ANIMAL PRODUCTION

สาส์นจากบรรณาธิการบริหาร

ในช่วงระยะที่ผ่านมาในแวดวงปศุสัตว์ของประเทศไทยได้พบกับความท้าทายหลายอย่างทั้งโรคอุบัติใหม่ที่ระบาดในสัตว์ ได้แก่ โรคลัมปี สกิน (Lumpy Skin Diseases) ในโคกระบือ และโรคอหิวาต์แอฟริกาในสุกร (African Swine Fever Diseases) เป็นต้น ร่วมกับการระบาดของโรคติดเชื้อไวรัสโคโรนา 2019 (COVID-19) จากเชื้อไวรัส SAR-CoV2 ส่งผลกระทบต่อการเลี้ยงสัตว์ในประเทศเป็นอย่างมากทั้งด้านบุคลากร การเลี้ยง อาหาร การรักษาและควบคุมป้องกันโรค ที่สำคัญที่สุดคือผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์ซึ่งทำให้ผลผลิตสัตว์ลดลงทั้งปริมาณและคุณภาพ

งานวิจัยที่ตอบโจทย์ต่อการพัฒนาการเลี้ยง ผลิตและขยายพันธุ์สัตว์ให้มีคุณภาพและสุขภาพที่ดีจึงเป็นสิ่งจำเป็น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูงที่ทันสมัยซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างและขยายพันธุ์สัตว์ ไม่ว่าจะเป็นด้านการผสมเทียม การผลิตน้ำเชื้อและตัวอ่อน ตลอดจนการคัดเลือกและประเมินพันธุกรรมสัตว์ในระดับดีเอ็นเอและจีโนม ทั้งนี้ ในปี พ.ศ. 2565 สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์จะเริ่มใช้ระบบฐานข้อมูลตามมาตรฐานสากลสำหรับการให้บริการแก่ผู้เกี่ยวข้องด้านการจัดการฟาร์มและระบบสืบพันธุ์ รวมทั้งวิทยาการด้านเทคโนโลยีชีวภาพการปศุสัตว์ทั้งหมด โดยการรวบรวม จัดเก็บ และเชื่อมโยงข้อมูลจากระดับฟาร์มที่ได้จากการปฏิบัติงานในพื้นที่ และข้อมูลจากห้องปฏิบัติการของสำนัก ในรูปแบบของระบบฐานข้อมูลชีวสารสนเทศที่เกี่ยวข้องกับข้อมูลทางด้านพันธุกรรม จีโนม โครโมโซม ดีเอ็นเอ เซลล์ร่างกาย อสุจิ ตัวอ่อน และลักษณะปรากฏของปศุสัตว์ทุกชนิด ประกอบกับการที่กรมปศุสัตว์ได้มีการจัดทำข้อตกลงกับกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อมในการให้ความร่วมมือการจัดทำระบบคลังข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศไทย ซึ่งจะสามารถเชื่อมโยงกับฐานข้อมูลจากหน่วยงานอื่นทั้งภายในและภายนอกประเทศ สามารถอำนวยความสะดวกในการสืบค้น ประมวลผล อ้างอิง ซึ่งจะเอื้อต่อการศึกษา ค้นคว้าวิจัยและต่อยอดไปถึงการสร้างนวัตกรรมใหม่ที่มีประโยชน์ต่อวงการปศุสัตว์

กองบรรณาธิการวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ (Journal of Biotechnology in Livestock Production) จึงคาดหวังว่าบทความวิจัยหรือบทความวิชาการในวารสารนี้จะเป็นส่วนหนึ่งของการพัฒนาทักษะทางด้านงานวิจัยและวิชาการ ตลอดจน สาขาอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องแก่นักวิชาการที่สนใจ



(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 จันทร์กระจำง

น.สพ. พีระพงษ์ สำราญทรัพย์

น.สพ. ธวัชชัย โพธิ์คำ

น.สพ. วรพงษ์ พงษ์ศิริ

นายสมศักดิ์ เปรมปรีย์

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 ผลงานค้นคว้าวิจัยด้านการผลิตปศุสัตว์ ทั้งด้านการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ การจัดการอาหาร สุขภาพ และระบบสืบพันธุ์ ตลอดจนการขยายพันธุ์ และการใช้เทคโนโลยีชีวภาพที่ก้าวหน้าในการปรับปรุงและพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตปศุสัตว์ด้านต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น คณะผู้จัดทำวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ยินดีรับเรื่องจากทุกท่านที่ส่งมาเพื่อเผยแพร่ และเพื่อความสะดวกในการพิจารณา ขอเสนอแนะดังนี้

1. เรื่องที่จะตีพิมพ์

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

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

1.3 เรื่องอื่นๆ ที่กองบรรณาธิการพิจารณาเห็นสมควร

2. ต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่ส่งมาตีพิมพ์ในวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ไม่ควรเป็นเรื่องที่เคยเผยแพร่ หรือ กำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อเผยแพร่ในวารสารอื่น

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

2.3 ไม่มีการส่งคืนต้นฉบับ

3. การลำดับเรื่องในต้นฉบับ

เพื่อให้ขบวนการพิจารณาผลงานวิชาการและการดำเนินการจัดพิมพ์วารสารเป็นไปอย่างเรียบร้อยรวดเร็ว และถูกต้อง จึงจำเป็นต้องให้ผู้เขียนผลงานวิชาการปฏิบัติตามข้อกำหนดอย่างเคร่งครัด ดังนี้

3.1 ให้ส่งต้นฉบับเอกสารผลงาน จำนวน 1 ชุด พร้อมไฟล์ Microsoft word

3.2 ต้นฉบับผลงานที่ส่งมา ให้ตรวจสอบความถูกต้องของตัวสะกด รูปแบบการจัดพิมพ์ให้ถูกต้องตามที่กำหนด

3.3 เมื่อผลงานผ่านการพิจารณาจากกองบรรณาธิการแล้ว จะแจ้งกลับไปยังเจ้าของผลงาน พร้อมส่งต้นฉบับเพื่อให้แก้ไขตามที่กองบรรณาธิการเสนอแนะ

ส่งผลงานที่แก้ไข ถูกต้องแล้วตามข้อเสนอแนะของกองบรรณาธิการ ในรูปแบบเอกสารไฟล์ Microsoft Word และรูปแบบไฟล์ PDF มายัง e-mail : pongpeng.pj@gmail.com โดยมีรายละเอียด ดังนี้

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

กรณีมีข้อสงสัย ติดต่อสอบถามได้ที่

นางจุฑพร 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)** เขียนชื่อ นามสกุลเต็มทั้ง
ภาษาไทยและภาษาอังกฤษ วางกึ่งกลางใต้ชื่อเรื่อง

4.3 บทคัดย่อ (Abstract) เขียนสั้นๆได้
เนื้อหาครอบคลุมวัตถุประสงค์ วิธีการ ผลการ
ทดลอง และสรุปผลการทดลอง ความยาวไม่ควร
เกินหนึ่งหน้ากระดาษ บทคัดย่อต้องมีทั้งภาษาไทย
และภาษาอังกฤษ 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 หาก
ไม่สามารถแปลเป็นภาษาไทยได้ให้ใช้ภาษาอังกฤษ
แทน โดยการพิมพ์อยู่ใต้บทคัดย่อ (ขึ้นบรรทัดใหม่)

4.5 เลขทะเบียนวิจัย (Registered No.)
(ถ้ามี)

4.6 สังกัดผู้วิจัย และสถานที่ติดต่อ ให้ระบุ
ไว้ในเชิงอรรถ (footnote) โดยให้ใช้ระบบเลขบน
ชื่อ เป็นตัวระบุในเชิงอรรถ เป็นชื่อหน่วยงานที่
สังกัด สถานที่ติดต่อได้สะดวก ให้ครบทุกคน กรณี
ผู้วิจัยอยู่หน่วยงานเดียวกันให้ใช้ตัวยก (super
script) เดียวกัน

4.7 เนื้อหา (Text) สำหรับงานวิจัย
ประกอบด้วย

4.7.1 คำนำ (Introduction) อธิบายถึง
ปัญหาและวัตถุประสงค์และควรมีการตรวจ
เอกสาร (literature review)

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

4.7.3 ผลการทดลอง (Results) รายงาน
ผลการทดลองเป็นคำบรรยาย ให้ละเอียดและ
เข้าใจง่าย โดยแบ่งเป็นหลายๆ ย่อหน้า และจัด
ข้อความที่มีเนื้อหาเดียวกันไว้ด้วยกัน หากเป็นไปได้
ควรเสนอในรูปของตารางหรือรูปภาพ หรือ
กราฟพร้อมทั้งบรรยายประกอบ ทั้งนี้ตาราง รูป
หรือกราฟ ไม่ควรแสดงผลที่เหมือนกัน

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

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

4.7.4 วิจารณ์ (Discussion) เป็นการ
วิจารณ์ผลการทดลอง โดยมีจุดมุ่งหมาย เพื่อให้
ผู้อื่นเห็นคล้อยถึงหลักการที่แสดงออกมาจากผล
การทดลอง หรือเพื่อสนับสนุน หรือคัดค้านทฤษฎี
ที่มีผู้เสนอมาก่อน หรือเพื่อเปรียบเทียบกับผลการ
ทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น ผู้เขียนควร
พยายามเน้นถึงปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของ
เรื่องที่กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อ
การวิจัยในอนาคตและลู่ทางที่จะนำไปใช้เป็น
ประโยชน์

4.7.5 สรุปผลการทดลอง
(Conclusion) ควรเป็นใจความที่สำคัญ กระชับ

เป็นไปตามวัตถุประสงค์และคุณค่าของงานเพื่อให้ผู้อ่านเข้าใจง่ายขึ้น

4.7.6 ข้อเสนอแนะ (Suggestion) เป็นการเสนอให้นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (application) ใครหรือหน่วยงานใด ควรทำอะไร คำนี้ถึงสิ่งใดบ้าง ควรปรับปรุง พัฒนาอย่างไร และควรแสดงผลกระทบจากการนำไปใช้ด้วย

4.7.7 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) ควรมีในกรณีที่ได้รับความช่วยเหลือ หรือความร่วมมือที่สนับสนุนงานค้นคว้าวิจัยนั้นๆ

4.7.8 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. กรณีที่อ้างอิงในเนื้อเรื่อง ควรอ้างอิงดังนี้คือ

- 1) **กรณีที่อ้างอิงจากการตรวจเอกสาร**
โดยผู้อื่นให้ใช้คำว่า อ้างถึงโดย (cited by)
- 2) **กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นคนไทย**
เมื่อเป็นประธานของประโยค ใช้ “สาโรชและสายใจ (2562), สายใจและคณะ (2562) กล่าวว่า.....” หรือเมื่อรายงานอยู่กลาง 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) **กรณีอ้างอิงบุคคลหรือเรื่องที่ไม่เคยลงพิมพ์มาก่อน** (personal communication) ให้อ้างเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปลงในรายชื่อเอกสารอ้างอิง เช่นsimilar results

(Walker, J.M., unpublished data),for other protocols (Walker, J.M., personal communication)

ข. การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง
ควรขึ้นต้นเอกสารอ้างอิงภาษาไทยก่อนเขียนเรียงตามลำดับพยัญชนะของผู้เขียน

1) กรณีอ้างอิงจากวารสาร ให้ระบุชื่อผู้เขียน ถ้าเป็นภาษาอังกฤษคนแรกใช้ชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง ผู้เขียนในลำดับถัดมาให้ใช้ชื่อย่อขึ้นก่อนแล้วตามด้วยชื่อสกุล แล้วตามด้วยปี ชื่อเรื่องวารสาร ปีที่ 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. Vejayan, R. Yusoff, H. Hani, M.A. Omar, L.W. Hong, N. Yimer, J.T. Ying and A.M. Othman. 2015. Two- dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of Bali bull (*Bos javanicus*) seminal plasma proteins and

their relationship with semen quality. *Theriogenology*. 84(6):956-968.

2) กรณีอ้างอิงจากตำรา ให้ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่ตีพิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อตำรา (พิมพ์ครั้งที่เท่าใดและ บรรณาธิการหากมี) สำนักพิมพ์ เมืองที่พิมพ์ หน้า แรกและหน้าสุดท้ายที่อ้างอิง 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 แป้นตุ้ม จุฑาพร ศรีวิวัฒน์ วรวิทย์ แสงสิงแก้ว และ พิงพิศ ดุลยพัชร. 2541. อาหารจากข้าวโพด.คู่มือการส่งเสริมการเกษตรที่ 43. แหล่งที่มา:

<http://www.ku.ac.th/agri/cornn/corn.htm>. 27 มีนาคม 2541.

5. การพิมพ์ผลงานทางวิชาการ

ตัวพิมพ์ ให้ใช้เครื่องพิมพ์ (Printer) หมึกพิมพ์ต้องเป็นสีดำ คมชัด สะดวกแก่การอ่านและใช้ตัวพิมพ์แบบเดียวกันทั้งฉบับ กรณีใช้เครื่องคอมพิวเตอร์พิมพ์เนื้อความให้ใช้ตัวอักษร TH Sarabun PSK 16 ตัวปกติ เท่านั้น ยกเว้นหัวข้อใหญ่ เช่น ชื่อเรื่อง บทคัดย่อ บทนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผล วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 16 ส่วนหัวข้อย่อย เช่น ชื่อผู้วิจัย และคณะ 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

- การเว้นระยะระหว่างบรรทัดและการย่อหน้า ควรจัดตามความสวยงาม
- กรณีคำสุดท้ายไม่จบบรรทัดนั้นๆ ให้ยกคำนั้นทั้งคำไปพิมพ์ในบรรทัดต่อไป ไม่ควรตัดส่วท้ายของ คำไปพิมพ์ในบรรทัดใหม่ เช่น กระบือ ปลัก ไม่ให้แยกเป็น กระบือ-ปลัก เป็นต้น
- จุลชีพ เช่น *Escherichia coli* หรือพิมพ์ตัวเอน *Escherichia coli*
- หลังเครื่องหมาย . และ , หรือ; เคาะ 1 เคาะพืช เช่น *Oryza sativa* หรือพิมพ์ตัวเอน *Oryza sativa*
- ระหว่างคำสุดท้าย กับเครื่องหมาย . และ , ไม่เว้นช่องว่าง สัตว์ เช่น *Bos taurus* หรือ พิมพ์ด้วยตัวเอน *Bos taurus*
- ไม่ต้องเว้นช่องว่าง ระหว่างวงเล็บ และคำข้างในวงเล็บ เช่น (รพีพรรณ และคณะ)

การลำดับหน้า

- ลำดับหน้าโดยใช้หมายเลข 1,2,3.....

ที่กึ่งกลางหน้ากระดาษ

ตาราง รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ

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

- กรณีตารางมีความยาวมาก ไม่สามารถสิ้นสุดในหน้าเดียวได้ ให้พิมพ์ส่วนที่เหลือในหน้าถัดไปโดยพิมพ์เลขที่ตารางและตามด้วยคำว่า (ต่อ)

- กรณีรูปภาพ แผนที่ แผนภูมิ กราฟ ควรเป็นภาพขาวดำ และใช้แนวทางข้างต้น

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

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
1. ผลของการเสริมสารแกมมา-โอรีซานอลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งและรูปแบบของโปรตีนในอสุจิโคเนื้อ (จรรยาพร รุ่งเรืองศักดิ์ วรพงษ์ พงษ์ศิริ ณัฐธิญา แสงเรือง วิลาสินี อินญาวิเลิศ)	1
2. ผลของจีโนไทป์โคนมเพศเมียต่อการประเมินค่าพันธุ์กรรมจีโนมในประชากรโคนมไทย (ภัทรพล สำเร็จดี สมศักดิ์ เปรมปรีดี กอบสุข ทองสอดแสง)	20
3. เทคนิคการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะด้วยวิธี Laparoscopic Ovum Pick-Up (LOPU) และการผลิตตัวอ่อนแพะด้วยวิธีปฏิสนธินอกร่างกาย (พิงค์ลานนา กุญชร อรรถพล พรประไพ)	47

ผลของการเสริมสารแกมมา-โอรีซานอลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งและรูปแบบของโปรตีนในอสุจิโคเนื้อ

จรรยาพร รุ่งเรืองศักดิ์^{1/} วรพงษ์ พงษ์ศิริ^{1/} ณัฐธิญา แสงเรือง^{1/} วิลาสินี อินญาวิเลิศ^{2/}

บทคัดย่อ

กระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งมีผลกระทบต่อคุณลักษณะเซลล์อสุจิและอัตราการผสมติด เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิทำให้อนุมูลอิสระเพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งลดลงได้ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อศึกษาผลของการเสริมสารแกมมา-โอรีซานอลที่ระดับความเข้มข้นต่างกันในการละลายเจือจางน้ำเชื้อที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง และรูปแบบของโปรตีนในอสุจิโคเนื้อ โดยใช้น้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคเนื้อ จำนวน 8 ตัว ริดสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ติดต่อกัน 3 สัปดาห์ นำน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์แต่ละตัวที่ริดเก็บได้ แบ่งออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆ กัน ดังนี้ กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุมเจือจางด้วยน้ำยา Tris-citrate egg yolk แต่ไม่เสริมสารแกมมา-โอรีซานอล กลุ่มทดลองที่ 2-4 เจือจางด้วยน้ำยา Tris-citrate egg yolk ที่เสริมสารแกมมา-โอรีซานอลความเข้มข้น 0.1 0.25 และ 0.5 mM ตามลำดับ และนำเข้าสู่กระบวนการแช่แข็ง จากนั้นทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อจากอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิด้วยเครื่องวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ (Computer assisted sperm analyzer, CASA) และรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ร่วมกับเทคนิค Two-Dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis (2D-PAGE) ผลการศึกษาพบว่า การเสริมแกมมา-โอรีซานอลที่ระดับความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 mM ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการเคลื่อนไปข้างหน้าของอสุจิมียค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) สำหรับรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนเมื่อมีการเสริมสารแกมมา-โอรีซานอล ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 mM จะพบปริมาณโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 75 และ 130kDa สูงกว่ากลุ่มควบคุม ยิ่งไปกว่านั้นเมื่อทำการศึกษากับเทคนิค 2D-PAGE พบว่ากลุ่มที่มีการเสริมสารแกมมา-โอรีซานอล 0.25 mM มีความเข้มข้นของโปรตีนจำนวน 12 จุด สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีระดับความเข้มข้นของโปรตีน 3 จุด สูงกว่ากลุ่มที่เสริมด้วยสารแกมมา-โอรีซานอล ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 mM อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งนี้เมื่อวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS พบโปรตีนทั้งหมด 9 ชนิด ที่มีความเกี่ยวข้องกับอสุจิ ได้แก่ Alpha-enolase, Phospholipid hydroperoxide, Glutathione peroxidase, Glutathione S-transferase Mu1, Tektin-3, Outer dense fiber protein 2, Tubulin alpha-3 chain, ATP synthase subunit beta และ Tektin 5 ซึ่งโปรตีนที่พบเหล่านี้อาจใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ทางชีวภาพที่ใช้ในการในการทำนายคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งต่อไป

คำสำคัญ: แกมมา-โอรีซานอล น้ำเชื้อแช่แข็งโค สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ

เลขทะเบียนวิชาการ : 65 (2)-0208-028

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

^{2/}คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร อ.ท่าโพธิ์ จ.พิษณุโลก

Effect of Gamma-oryzanol supplementation on frozen semen quality and spermatozoa proteomic profile in beef cattle

Janyaporn Rungruangsak^{1/} Worapong pongsir^{1/} Nattiya Saengruang^{1/} Wilasinee inyawilert^{2/}

Abstract

Semen cryopreservation procedure induces damage to sperm characteristics and fertilizing ability as a result of the increase in reactive oxygen species caused by temperature changes can reduce frozen semen quality. The aims of this study were to evaluate the effect of different concentrations of Gamma-oryzanol supplementation in extender on the frozen semen quality in bull as well as the protein patterns in beef bull sperm. Four bulls were used for semen collection in which each was collected 3 weeks continuously. Each ejaculate was divided to 4 equal aliquots. After dilution with Tris-citrate egg yolk extender, Gamma-oryzanol was supplemented at the amount of 0 (as a control), 0.1, 0.25, and 0.5 mM into semen extender, and the diluted semen samples were cryopreserved. After cryopreservation process, computer Assisted sperm Analyzer (CASA), Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) and Two-Dimensional Gel Electrophoresis (2D gel) were used to evaluate spermatozoa viability, motility, and protein expression pattern after cryopreservation. The results showed that supplementation of either 0.25 or 0.5 mM Gamma-oryzanol in semen extender resulted in higher percentage of total and progressive sperm motility than control with statistical significance ($P < 0.05$). For protein patterns, the supplementation of Gamma-oryzanol at 0.25 mM showed higher amount of 75 and 130 kDa proteins than those of the control group. Moreover, using 2D-PAGE technique showed there were 12 points of protein intensity of the 0.25 mM Gamma-oryzanol supplementation group that were significantly higher than those of the control group ($P < 0.05$) whereas 3 points of protein intensity of the control group were significantly higher than those of the 0.25 mM Gamma-oryzanol supplementation group ($P < 0.05$). Furthermore, using LC-MS machine revealed 9 proteins associated with spermatozoa such as Alpha-enolase, Phospholipid hydroperoxide, Glutathione peroxidase, Glutathione S-transferase Mu1, Tektin-3, Outer dense fiber protein 2, Tubulin alpha-3 chain, ATP synthase subunit beta and Tektin 5. These proteins might be used as biomarkers for frozen semen quality evaluation in the future.

Keywords: Gamma-oryzanol, Bull frozen semen, Semen extender

Registered No: 65 (2)-0208-028

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

^{2/} Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok province

คำนำ

การผสมเทียมโคด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งเป็นวิธีที่แพร่หลายไปทั่วโลก แต่ข้อจำกัดคือคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งลดลงหลังการละลาย เนื่องจากในขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อจะเกิดผลึกน้ำแข็งในเซลล์อสุจิทำให้เกิดสภาพ cold shock ส่งผลให้เกิดภาวะ osmotic stress และ oxidative stress ทำให้ปริมาณสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น (Bailey et al., 2008; Johnson, 2000) เกิดการสูญเสียกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิจากปฏิกิริยา lipid peroxidation และทำให้ดีเอ็นเอของเซลล์อสุจิเกิดความเสียหาย (DNA damage) และส่งผลให้อสุจิมีชีวิตลดลง (Amidi et al., 2016; Qadeer et al., 2016) นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างของอสุจิ (Sperm morphology) และการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Sperm motility) น้ำมันรำข้าวมีสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ วิตามินอี (กลุ่มโทโคเฟอรอล และโทโคไตรอีนอล) และแกมมา-โอริซานอล (Gamma-oryzanol) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง สารแกมมา-โอริซานอลซึ่งเป็นสารธรรมชาติที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง มีคุณสมบัติในการต้านอนุมูลอิสระได้สูงกว่าวิตามินอีถึง 6 เท่า (Petal and Naik, 2004) โดยสารแกมมา-โอริซานอลสามารถป้องกันการเกิดออกซิเดชันของกรดไขมันไม่อิ่มตัว ลดการเสื่อมสภาพของเซลล์ (ฉลุย ทับศรีม่วงพรวน, 2555) มีรายงานว่า การเสริมสารแกมมา-โอริซานอลจากน้ำมันรำข้าวในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ lactose-egg yolk (LEY) สามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร ซึ่งอาจเกิดจากการลดอนุมูลอิสระที่จะทำลายเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง (Chanapiwat and Kaeoket, 2015)

มีการศึกษาเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระหลายชนิดที่อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงกลไกการสร้างโปรตีนโดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ในสัตว์ชนิดต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโคและสุกร (Lippolis and Reinhardt, 2008) โดย Rodríguez-Martínez et al. (2011) ได้รายงานการศึกษาเกี่ยวกับ biomarker ในสัตว์รวมถึง องค์ประกอบของน้ำเชื้อ และ seminal plasma ที่มีความสัมพันธ์กับความสมบูรณ์พันธุ์ และจากการศึกษาของ Towhidi and Parks (2012) พบว่าโปรตีนในอสุจิโคที่มีอัตราการผสมติดสูง เมื่อเปรียบเทียบกับอสุจิโคที่ให้อัตราการผสมติดต่ำจะมีรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนที่แตกต่างกัน ปัจจุบันเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์ด้านโปรตีโอมิกส์มีหลายวิธี เช่น Two-dimensional Polyacrylamide Gel Electrophoresis (2D-PAGE) และ Mass Spectrometry (MS) เป็นต้น โดยวิธีเหล่านี้สามารถบอกถึงข้อมูลพื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของโปรตีนที่มีความจำเพาะในอสุจิได้ ทำให้มีความสำคัญในการระบุตัวบ่งชี้ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ (Xu et al., 2012) การนำเทคนิคโปรตีโอมิกส์มาประยุกต์ใช้เพื่อศึกษาเกี่ยวกับคุณภาพน้ำเชื้อในเชิงลึกน่าจะทำให้เกิดประโยชน์ต่อการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเติมสารต้านอนุมูลอิสระชนิด แกมมา-โอริซานอลที่สกัดจากน้ำมันรำข้าวในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคต่อคุณภาพน้ำเชื้อ ตลอดจนชนิดและรูปแบบการแสดงออกที่แตกต่างกันของโปรตีนในอสุจิ

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

พ่อพันธุ์โคเนื้อสายพันธุ์บราห์มัน อายุ 4-11 ปี จำนวน 8 ตัว จากศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง พ่อพันธุ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตำบลท่าพระ อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น โดยเป็นพ่อพันธุ์ที่กำลังใช้ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง ทำการรีดน้ำเชื้อสดโดยใช้ช่องคลอดเทียม (Artificial vagina, AV) โดยน้ำเชื้อที่จะนำไปใช้ในการทดลองต้องผ่านเกณฑ์คือมีปริมาณน้ำเชื้อสดที่รีดได้แต่ละครั้ง ไม่น้อยกว่า 5 ml มีความเข้มข้นของอสุจิมากกว่า 0.5×10^9 cells/ml และมีอัตราการเคลื่อนที่ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 70

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) กำหนดให้พ่อพันธุ์แต่ละตัว (individual) เป็นบล็อก (block) โดยนำน้ำเชื้อสดที่รีดเก็บได้ และผ่านเกณฑ์การตรวจคุณภาพเบื้องต้น มาเจือจางด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ egg yolk-tris ตามวิธีการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งของศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ให้ได้ความเข้มข้นของอสุจิเท่ากับ 120×10^6 cells/ml และแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มเท่าๆ กัน ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ไม่เสริมสารแกมมา-โอรีซานอล

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มทดลองที่ เสริมสารแกมมา-โอรีซานอลความเข้มข้น 0.1 mM

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มทดลองที่ เสริมสารแกมมา-โอรีซานอลความเข้มข้น 0.25 mM

กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มทดลองที่ เสริมสารแกมมา-โอรีซานอลความเข้มข้น 0.5 mM

การบรรจุและแช่แข็ง

นำน้ำเชื้อที่ผ่านการเจือจางและเสริมด้วยสารแกมมา-โอรีซานอลความเข้มข้นที่ความเข้มข้นต่างๆ บรรจุใส่ในหลอดน้ำเชื้อขนาด 0.25 ml บ่มและปรับสมดุลที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งแบบอัตโนมัติ และนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวทันทีจนกว่าจะถึงเวลาทดสอบ

การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อหลังการแช่แข็ง

ตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการเก็บรักษาได้ระดับไนโตรเจนเหลวเป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง โดยสุ่มน้ำเชื้อแช่แข็งจากพ่อพันธุ์ทุกชุดการผลิตๆ ละ 3 หลอดจากแต่ละกลุ่มทดลอง ทำการละลายโดยแช่ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 วินาที และบ่มตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 37 °C ตลอดการตรวจคุณภาพ จากนั้นทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ ด้วยเครื่อง CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer) ดังนี้

1) อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (total motility; %) อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (progressive motility; %) อัตราการเคลื่อนที่แบบช้า (slow motility; %) และอสุจิที่ไม่เคลื่อนที่ (static sperm; %)

2) ความเร็วในการเคลื่อนที่ ได้แก่

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

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

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

3) ลักษณะการเคลื่อนที่ ได้แก่

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

- Beat Cross Frequency (BCF; Hz) หมายถึง ความถี่ของการส่ายส่วนหัวของอสุจิ

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

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

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

การศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในอสุจิโคจากน้ำนมโคเลกุล ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

นำตัวอย่างน้ำเชื้อจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่มีคุณภาพน้ำเชื้อสูงสุด (0.25 mM) มาสกัดโปรตีน ดังนี้ละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง 3 หลอด/พ่อพันธุ์/ชุดการผลิต โดยแช่ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1800 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกเซลล์อสุจิออกจากสารละลายเชื้อจาก หลังจากนั้นล้างด้วย 20% glycerol ใน Phosphate buffer saline (PBS) และนำไปปั่นเหวี่ยง 1800 x g ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 5 นาที ทำการสกัดและหาปริมาณโปรตีนรวมของอสุจิโดยวิธี Bradford protein assay (Bradford, 1976) และเก็บไว้ที่ตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -80°C จนกว่าจะถึงการทดสอบ จากนั้นทำการแยกโปรตีนใน 4.5% stacking gel โดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 85 โวลต์ เป็นเวลา 15 นาที ต่อด้วย ใน 10 % separating gel ที่ 125 โวลต์ เป็นเวลา 40 นาที บันทึกผลรูปแบบโปรตีนบนแผ่นเจล โดยใช้เครื่อง gel document system (Biorad, Sweden)

การวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกโปรตีนของตัวสุจิโคด้วยเทคนิค two-dimensional Polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE)

สกัดโปรตีนรวมจากอสุจิโคของกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองที่มีคุณภาพน้ำเชื้อสูงสุด (0.25 mM) ด้วยเทคนิค 2D-PAGE ข้างต้นให้มีความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/ตัวอย่าง ทำการแยกโปรตีนรวมที่สกัดได้ใน immobilized strips (GE Healthcare, Sweden) ที่ความต่างศักย์ 100 V/1h, 500 V/2h, 500 V/4h, 1000V over 1h, 8000V over 3h, 8000V 2.5h อุณหภูมิ 20 °C หลังจากนั้นปรับสมดุลสารละลาย ทำการล้าง strip ด้วย 1X SDS-running buffer และวาง IPG strip ลงบน 12.5% SDS-PAGE และใส่ 0.5 % (w/v) Agarose IEF (GE Healthcare, Sweden) solution (0.5% agarose in the SDS-running buffer) ต่อด้วยการแยกโปรตีนด้วยความต่างศักย์ 600 V และล้างสีย้อมด้วย destain solution จนกว่าจะเห็นจุดโปรตีน (protein spot) ชัดเจน ทำการถ่ายภาพเจลด้วย scanned (400dpi) ChemiDoc™ Touch Imaging System (BIO-RAD) จากนั้นนำเจลแช่ใน 0.1% acetic acid ที่ 4°C จนกระทั่งทำการตัดเก็บจุดโปรตีน

การวิเคราะห์ชนิดโปรตีนด้วย Liquid Chromatography - Mass Spectrometry (LC-MS)

ทำการตัดจุดโปรตีนจากเจล 2D-PAGE ขนาด 1x1 mm³ ล้างด้วย 100% acetonitrile (ACN) เพื่อดึงน้ำออกจากจุดโปรตีน จำนวน 2 ครั้ง และเติม 10 mM TBP in 10 mM ammonium bicarbonate ที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการแอลกิลเลชัน (alkylation) ด้วย 100 mM Iodoacetamide (IAA) และ 10 mM ammonium bicarbonate ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 นาที ในที่มืด จากนั้นทำการดึงน้ำออกจากจุดโปรตีนด้วย 100% ACN ซ้ำอีก 2 ครั้ง เติมทริปซิน (trypsin) เพื่อย่อยจุดโปรตีน และบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นเติม 50% ACN ใน 0.1% formic acids จำนวน 30 µl. ลงในจุดโปรตีน และทำการบ่มต่อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที บนเครื่องเขย่า (shaker) นำโปรตีนที่สกัดได้มาทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 44 °C และเติม 0.1% formic acid ก่อนทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS เพื่อระบุชนิดของโปรตีน หลังจากวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับความเข้มข้นของจุดโปรตีนทางสถิติ ทำการตัดจุดโปรตีนทั้ง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เสริมสารแกมมา-โอรีซานอล ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 mM จำนวน 15 จุด ย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน และวิเคราะห์ชนิดโปรตีนด้วย tandem-mass spectroscopy หลังจากวิเคราะห์ตัวอย่างเสร็จแล้ว ข้อมูล Mass spectra จะถูกนำไปวิเคราะห์ผลโดยอัตโนมัติที่โปรแกรมวิเคราะห์ข้อมูล เพื่อหา MS/MS spectra ประจุ และขนาดโมเลกุลของเปปไทด์ เพื่อสร้างรูปแบบข้อมูล Mascot generic file (mgf) โดยนำไฟล์ mgf ซึ่งเป็นข้อมูล MS/MS ion ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลโปรตีนที่อยู่ในฐานข้อมูลโดยใช้ Mascot database search ที่เป็นโปรแกรมออนไลน์ของ Matrix Science (<http://www.matrixscience.com>) เพื่อวิเคราะห์ข้อมูล MS/MS ion ของเปปไทด์

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลของทั้ง 4 กลุ่มทดลอง ด้วย one-way analysis of variance (one-way ANOVA) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's multiple comparison test และเปรียบเทียบค่าความเข้มข้นโปรตีนของสองกลุ่มที่มีความแตกต่างกันคือกลุ่มควบคุม และ กลุ่มทดลองที่ให้ผลคุณภาพน้ำเชื้อดีที่สุด ด้วย t-test for independent samples ทั้งนี้ การวิเคราะห์ทางสถิติของการทดลองดังกล่าวๆ นี้ กำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับร้อยละ 95 ($P < 0.05$) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ R commander version 4.1.1 (R Core Team, 2021)

ผลการทดลอง

คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลาย

จาก Table 1 ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคภายหลังการละลาย พบว่าอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิจากกลุ่มที่เสริมด้วยแกมมา-โอรีซานอลในทุกระดับความเข้มข้น (0.1, 0.25 และ 0.5 mM) สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เสริมสารแกมมา-โอรีซานอลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และกลุ่มที่เสริมสารแกมมา-โอรีซานอลในปริมาณ 0.25 และ 0.5 mM มีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิสูงกว่ากลุ่ม 0.1mM และกลุ่มควบคุม ทั้งนี้กลุ่มที่มีการเสริมสารแกมมา-โอรีซานอล 0.25 และ 0.5 mM ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่ความเร็วในการเคลื่อนที่ (VAP, VSL และ VCL) รวมทั้งลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ (ALH, BCF, STR, LIN และ WOB) ของน้ำเชื้อแช่แข็งโคระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีการเสริมสารแกมมา-โอรีซานอล ในทุกระดับความเข้มข้น ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) เช่นเดียวกับและ ความผิดปกติของตัวอสุจิพบว่า ความผิดปกติของอสุจิทั้งแบบหางงอ หางม้วนแบบ proximal droplet และ distal droplet ของน้ำเชื้อแช่แข็งโคระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีการเสริมสารแกมมา-โอรีซานอล ในทุกระดับความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

Table 1 Frozen-thawed bull semen quality of 4 experimental groups supplemented with different Gamma-oryzanol concentrations (Least square mean $\pm$ SE)

Parameters	Treatments			
	Control group	Gamma-oryzanol groups		
	0 mM (N=30)	0.1 mM (N=32)	0.25 mM (N=34)	0.5 mM (N=32)
Motility				
Total motility (%)	41.8 $\pm$ 2.18 ^b	52.9 $\pm$ 2.01 ^a	56.7 $\pm$ 1.95 ^a	54.2 $\pm$ 2.07 ^a
Progressive motility (%)	9.77 $\pm$ 0.869 ^c	13.50 $\pm$ 0.801 ^b	16.65 $\pm$ 0.778 ^a	16.60 $\pm$ 0.826 ^a
Velocity				
VAP (μ m/s)	61.2 $\pm$ 1.61	62.0 $\pm$ 1.49	60.4 $\pm$ 1.45	61.8 $\pm$ 1.53
VSL (μ m/s)	45.5 $\pm$ 1.13	46.1 $\pm$ 1.04	44.9 $\pm$ 1.01	45.8 $\pm$ 1.08
VCL (μ m/s)	115 $\pm$ 3.16	116 $\pm$ 2.91	114 $\pm$ 2.83	116 $\pm$ 3.00
Kinematic movement				
ALH (μ m)	6.47 $\pm$ 0.138	6.44 $\pm$ 0.127	6.40 $\pm$ 0.123	6.57 $\pm$ 0.131
BCF (Hz)	24.7 $\pm$ 0.303	24.8 $\pm$ 0.279	24.6 $\pm$ 0.271	24.3 $\pm$ 0.288
STR (%)	74.3 $\pm$ 0.513	74.7 $\pm$ 0.473	74.5 $\pm$ 0.459	74.5 $\pm$ 0.487
LIN (%)	41.1 $\pm$ 0.565	41.8 $\pm$ 0.521	41.7 $\pm$ 0.506	41.7 $\pm$ 0.537
WOB (%)	54.0 $\pm$ 0.380	54.6 $\pm$ 0.351	54.5 $\pm$ 0.340	54.6 $\pm$ 0.361
Morphology				
Bent tail (%)	15.0 $\pm$ 0.853	14.1 $\pm$ 0.787	14.0 $\pm$ 0.764	14.4 $\pm$ 0.811
Coiled tail (%)	2.41 $\pm$ 0.267	2.09 $\pm$ 0.246	1.77 $\pm$ 0.239	1.90 $\pm$ 0.253
Proximal droplet (%)	2.70 $\pm$ 0.245	2.34 $\pm$ 0.226	2.29 $\pm$ 0.219	2.09 $\pm$ 0.233
Distal droplet (%)	6.75 $\pm$ 0.366	5.60 $\pm$ 0.338	5.41 $\pm$ 0.328	5.36 $\pm$ 0.348

^{abc} Different superscripts within the same row demonstrated significant differences (P<0.05)

การศึกษารูปแบบการแสดงออกของโปรตีนของตัวอสุจิหลังจากละลายน้ำเชื้อโคแช่แข็ง ด้วยเทคนิค Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

โปรตีนของอสุจิในกลุ่มที่เสริมสารแกมมา-โอรีซานอล 0.25 mM และ กลุ่มควบคุมที่ถูกสกัดเพื่อดูรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนในเบื้องต้นด้วยเทคนิค SDS-PAGE พบว่า มีโปรตีนรวมทั้งหมดประมาณ 20 แถบโปรตีน แต่มีการแสดงออกของโปรตีนที่เด่นชัดและมีความแตกต่างในแต่ละกลุ่มทดลองเพียง 5 ชนิด ได้แก่ โปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 30 75 100 130 และ 245 kDa (Figure1) โดยกลุ่มที่มีการเสริมสารแกมมา-โอรีซานอล 0.25 mM มีระดับความเข้มของโปรตีนที่มากกว่ากลุ่มควบคุมมีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่ กลุ่มโปรตีนที่มีขนาด 75 และ 130 kDa ส่วนความเข้มของโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลอื่นไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ซึ่งความแตกต่างของความเข้มในแถบโปรตีนนี้ไม่สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าแต่สามารถคำนวณค่าความเข้มได้จากโปรแกรม image J และนำมาเปรียบเทียบกันพบความแตกต่างของความเข้มของโปรตีนตาม Table 2

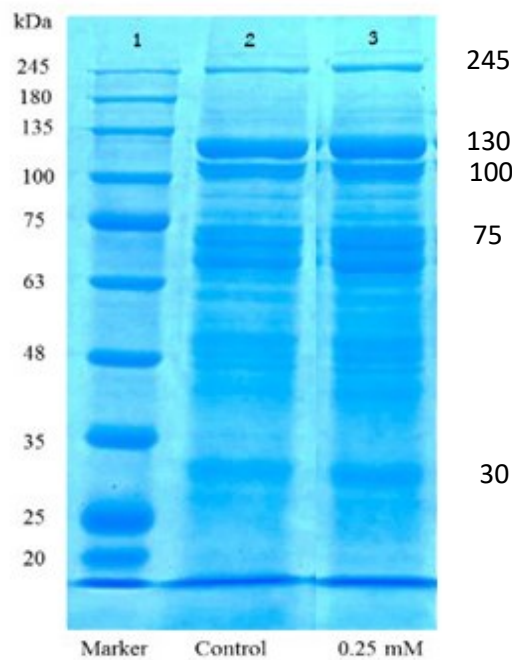


Figure 1. Protein expression patterns using SDS-PAGE gel electrophoresis; Lane 1: Protein Markers, Lane 2: Control, Lane 3: 0.25 mM Gamma-oryzanol

Table 2. Comparison of expressed protein concentrations between post-thawed semen with and without Gamma-oryzanol supplementation at 0.25 mM in semen extender (mean $\pm$ SE).

Molecular weight (kDa)	Protein intensity		p-value
	Control	Gamma-oryzanol 0.25 mM	
30	14614.28 $\pm$ 193.78	15555.89 $\pm$ 49.46	0.0536
75	2476.71 ^b $\pm$ 42.75	2854.86 ^a $\pm$ 61.20	0.02995
100	8925.97 $\pm$ 83.26	11056.51 $\pm$ 1026.69	0.1847
130	14060.24 ^b $\pm$ 92.47	16005.12 ^a $\pm$ 264.17	0.009336
245	4759.31 $\pm$ 9.65	8017.11 $\pm$ 929.53	0.07245

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

การวิเคราะห์รูปแบบการแสดงออกโปรตีนของอสุจิโคด้วยเทคนิค Two-dimensional gel electrophoresis (2D-PAGE)

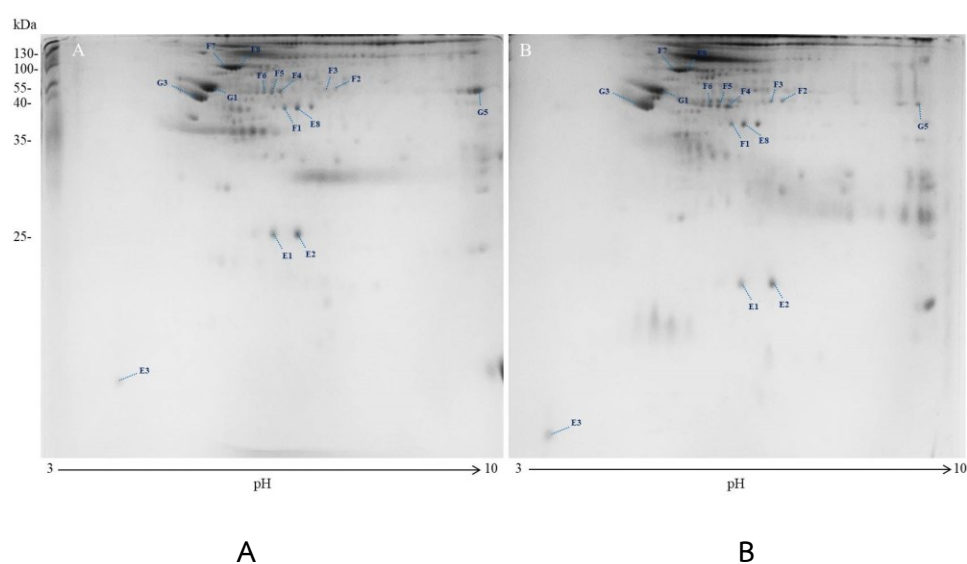


Figure 2. The 15 protein spots of frozen bull semen with or without gamma-oryzanol supplementation in semen extender; control group (A) and 0.25 mM of gamma-oryzanol group (B) and E, G, F letters indicated the spots of protein in 2D-PAGE (analyzed by Malaline 7 software)

การเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณโปรตีนระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เสริมด้วย 0.25 mM สารแกมมา-โอริซานอล

เมื่อถ่ายภาพเจลทั้ง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เสริมด้วยสารแกมมา-โอริซานอล ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 mM ด้วย ChemiDoc™ Touch Imaging System (BIO-RAD) ที่ 400 dpi และวัดความเข้มของจุดโปรตีนที่แสดงถึงปริมาณโปรตีนด้วยโปรแกรม Malaline 7 software พบว่ามีจุดโปรตีน (Figure. 2) ทั้งหมด 15 จุด (E1, E2, E3, E8, F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, G1, G3, และ G5) ที่มีความแตกต่างของความเข้มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยกลุ่มที่มีการเสริมสารแกมมา-โอริซานอล 0.25 mM มีความเข้มของโปรตีนจำนวน 12 จุดได้แก่ E1, E2, E8, F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, G1, G3 สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีระดับความเข้มของโปรตีน 3 จุด คือ E3 F8 และ G5 สูงกว่ากลุ่มที่เสริมด้วยสารแกมมา-โอริซานอล ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 mM อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (Table 3)

Table 3. Comparison of expressed proteins between post-thawed semen with and without gamma-oryzanol supplementation in semen extender (mean $\pm$ SE).

Protein Groups	*Protein name	**Molecular weight	Protein intensity (%)		p-value
			Control	Gamma-oryzanol 0.25 mM	
E1	Alpha-enolase	47.639	5.64938 $\pm$ 0.27 ^b	6.65879 $\pm$ 0.31 ^a	0.0124
	Phospholipid				
E2	hydroperoxide glutathione peroxidase	22.739	6.36552 $\pm$ 0.22 ^b	6.83591 $\pm$ 0.18 ^a	0.0135
E3	Glutathione S-transferase Mu1 (GSTM1)	25.789	4.19844 $\pm$ 0.31 ^a	2.3819 $\pm$ 0.39 ^b	0.0466

E8	Alpha-enolase	47.639	3.73918±0.31 ^b	3.96665±0.37 ^a	0.0484
F1	Alpha-enolase	47.639	2.76446±0.2 ^b	4.20102±0.23 ^a	0.0354
F2	Tektin-3	57.102	1.15324±0.22 ^b	1.27675±0.19 ^a	0.0412
F3	Tektin-3	57.102	0.779228±0.19 ^b	1.80043±0.32 ^a	0.0447
F4	Outer dense fiber protein 2	76.249	2.291±0.19 ^b	2.77725±0.25 ^a	0.0328
F5	Outer dense fiber protein 2	76.249	2.32418±0.26 ^b	2.5396±0.29 ^a	0.0293
F6	Outer dense fiber protein 2	76.249	1.94178±0.19 ^b	2.34295±0.23 ^a	0.0301
F7	Outer dense fiber protein 2	76.249	14.6338±0.23 ^b	15.5135±0.32 ^a	0.0491
F8	Myogenic factor 5 (Myf- 5)	28.851	16.2105±0.12 ^a	15.0278±0.17 ^b	0.0310
G1	Tubulin alpha- 3 chain	50.578	14.2515±0.14 ^b	16.1979±0.2 ^a	0.0129
G3	ATP synthase subunit beta	56.249	19.2756±0.28 ^b	25.1339±0.25 ^a	0.0167
G5	Tektin-5	57.779	4.6851±0.25 ^a	3.74938±0.34 ^b	0.0460

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

*Protein name: The identified proteins obtained from MASCOT search algorithm (<http://www.matrixscience.com>) against Bovine database.

** Calculated molecular weight of proteins by MASCOT search algorithm (<http://www.matrixscience.com>) against Bovine database.

การวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนด้วยเครื่อง Liquid chromatography–mass spectrometry (LC-MS)

หลังจากวิเคราะห์ความแตกต่างของระดับความเข้มข้นของจุดโปรตีน ทำการย่อยจุดโปรตีนทั้ง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เสริมสารแกมมา-โอริซานอล ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 mM จำนวน 15 จุด ด้วยเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin digestion) และวิเคราะห์ชนิดโปรตีนด้วย tandem-mass spectroscopy พบว่าประกอบด้วยโปรตีนทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ Alpha-enolase, Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (GPx-4), Glutathione S-transferase Mu1, Tektin-3, Outer dense fiber protein 2, Myogenic factor 5 (Myf-5), Tubulin alpha-3 chain, ATP synthase subunit beta, และ Tektin-5 (Table3) ซึ่งข้อมูลชนิดโปรตีนได้มาจากการเปรียบเทียบกับข้อมูลโปรตีนที่อยู่ในฐานข้อมูลโดยใช้ Mascot database search ที่เป็นโปรแกรมออนไลน์ของ Matrix Science (<http://www.matrixscience.com>)

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อเสริมสารแกมมา-โอริซานอลที่สกัดจากน้ำมันรำข้าวในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อโดยตรงในปริมาณที่เหมาะสมสามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งให้ดีขึ้นเมื่อวิเคราะห์จากอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิทั้งอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ ซึ่งความเข้มข้นของสารแกมมา-โอริซานอลที่สามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งได้ดีและมีความเหมาะสมที่สุดสำหรับเสริมในสารเจือจางน้ำเชื้อของการทดลองครั้งนี้คือที่ระดับความเข้มข้น 0.25 mM โดยสามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อได้เทียบเท่ากับการเติมสารแกมมา-โอริซานอล 0.5mM ทั้งนี้ในระหว่างกระบวนการแช่แข็งอสุจิจะเกิด oxidative stress ที่จะส่งผลให้เกิด lipid peroxidation ในอสุจิ ทำให้อสุจิเหี่ยวและเกิดผลึกน้ำแข็งจึงส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตลดลง (Hammerstedt et al., 1990; Said et al., 2010; Takeo and Nakagata, 2011) การเสริมสารแกมมา-โอริซานอลซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิในระหว่างกระบวนการแช่แข็งได้ จึงส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาเกี่ยวกับการเสริมสารแกมมา-โอริซานอลในน้ำมันรำข้าวต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งในสุกรพ่อพันธุ์ของ Kaeoket et al. (2012) ที่ทำการเปรียบเทียบการเสริมสารแกมมา-โอริซานอลในน้ำมันรำข้าว 2 ชนิด พบว่า การเสริมสารแกมมา-โอริซานอลในน้ำมันรำข้าวทั้ง 2 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mg/ml สามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิตรอด และร้อยละความสมบูรณ์ของอะโครโซม สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งต่อมา Chanapiwat and Kaeoket (2015) ได้ศึกษาอิทธิพลของสายพันธุ์สุกรและการเสริมสารแกมมา-โอริซานอลในน้ำมันรำข้าวต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยทำการเปรียบเทียบผลของการเสริมสารแกมมา-โอริซานอลในน้ำมันรำข้าวที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน คือ 0, 0.08, 0.16, 0.24 และ 0.32 mM ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรพ่อพันธุ์ครุ๊อค ลาร์จไวท์ และแลนด์เรซ พบว่า การเสริมสารแกมมา-โอริซานอลในน้ำมันรำข้าวที่ระดับความเข้มข้น 0.16 mM สามารถ

เพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งในสุกรพ่อพันธุ์ ดูรี้อย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่สุกรพันธุ์ลาร์จไวท์และแลนด์เรซ พบว่า การเสริมสารแกมมา-โอริซานอลในน้ำมันรำข้าวที่ระดับความเข้มข้น 0.24 mM เพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

อย่างไรก็ตามการศึกษาในสัตว์ชนิดอื่นๆ นั้น ส่วนใหญ่มักใช้การเสริมสารแกมมา-โอริซานอลทางการกิน (oral supplementation) เพื่อศึกษาผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ เช่น การศึกษาผลของการเสริมสารแกมมา-โอริซานอลในอาหารต่อคุณภาพน้ำเชื้อม้าของ Raphael et al. (2006) ซึ่งไม่พบความแตกต่างในการเสริมสารแกมมา-โอริซานอลต่อคุณภาพและปริมาณน้ำเชื้อ ความเข้มข้นอสุจิ ความผิดปกติของอสุจิ และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิ ในขณะที่การศึกษาของ Arlas et al. (2008) ซึ่งใช้การเสริมสารแกมมา-โอริซานอลเพียง 1% ในอาหารต่อคุณภาพน้ำเชื้อม้า พบว่าช่วยเพิ่มความเข้มข้นอสุจิ อัตราการเคลื่อนที่อสุจิ ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิได้อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ Eduarda et al. (2019) ได้รายงานการศึกษาผลของการเสริมสารแกมมา-โอริซานอลทางการกินต่อความเสื่อมของอัณฑะในพ่อพันธุ์แกะ (testicular degeneration) เมื่อถูกเหนี่ยวนำด้วยการหุ้มฉนวนความร้อนที่ถุงหุ้มอัณฑะ (scrotal insulation) พบว่าการเสริมสารแกมมา-โอริซานอลในอาหารช่วยลดอนุมูลอิสระในอัณฑะ และการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ทั้งยังช่วยเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อ ในสัปดาห์ที่ 3 ตั้งแต่เริ่มกินเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการเสริมสารแกมมา-โอริซานอล อย่างไรก็ตาม การเสริมสารแกมมา-โอริซานอลในอาหารอาจมีปัจจัยอื่นๆ เข้ามาด้วยมากกว่าการเสริมสารแกมมา-โอริซานอลในสารละลายเชื้อจากน้ำเชื้อโดยตรงเช่นจากการถูกย่อยในระบบทางเดินอาหารหรือปริมาณที่ถูกดูดซึมไปใช้จริง เป็นต้น ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานการศึกษาผลของการเสริมสารแกมมา-โอริซานอลในสารละลายเชื้อจากน้ำเชื้อโดยตรงในโคเหมือนการศึกษาในครั้งนี้ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ดำเนินการทดลองในโคพ่อพันธุ์สายพันธุ์บรามันท์เพียงสายพันธุ์เดียวและเป็นพ่อโคที่คุณภาพน้ำเชื้ออยู่ในเกณฑ์ปกติที่ใช้ในการผสมเทียม จึงควรมีการศึกษาเปรียบเทียบในสายพันธุ์อื่นด้วยเพื่อให้ทราบระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมในการเสริมสารแกมมา-โอริซานอลในสารละลายเชื้อจากน้ำเชื้อต่อไปหรือศึกษาในพ่อพันธุ์ที่อายุมากหรือน้ำเชื้อมีคุณภาพไม่ดี ว่าจะสามารถปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อได้จริง

การศึกษาความแตกต่างของโปรตีนในอสุจิโคเนื้อ โดยเบื้องต้นจะพิจารณาความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุลของกลุ่มโปรตีนที่พบในน้ำเชื้อเมื่อมีการเสริมสารแกมมา-โอริซานอลเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE ซึ่งเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย ค่าใช้จ่ายน้อย ทั้งนี้ การศึกษาด้วยเทคนิค SDS-PAGE เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น เพื่อดูความแตกต่างของรูปแบบการแสดงออกของโปรตีน แต่ไม่สามารถใช้เปรียบเทียบชนิดและปริมาณของโปรตีนได้ เนื่องจากโปรตีนต่างชนิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากันอาจอยู่ในแถบโปรตีนเดียวกัน (Matsumoto et al., 2019) จึงต้องมีการศึกษาชนิดของโปรตีนด้วยวิธีอื่นๆ ได้แก่ เทคนิค 2D-PAGE และ LC-MS เพื่อระบุชนิดโปรตีนต่อไป 2D-PAGE เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกโปรตีนโดยการรวมวิธีการแยกด้วยประจุ (isoelectric focusing) และ SDS-PAGE เข้าด้วยกัน โดยมีโปรตีนจะถูกแยกด้วย isoelectric focusing ซึ่งจะแยกโดยอาศัยความต่างของ isoelectric point (pI) จากนั้นจึงแยกโปรตีนอีกครั้งในมิติที่สองด้วยวิธี SDS-PAGE โดยอาศัยความแตกต่างของน้ำหนักโมเลกุล (Issaq and Veenstra, 2008 ;

Magdeldin et al., 2014) จากผลการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อในขั้นตอนแรก กลุ่มทดลองที่มีการเสริมสารแกมมา-โอริซานอลที่ความเข้มข้น 0.25 mM ถูกนำมาใช้ในการวิเคราะห์ เนื่องจากคุณภาพน้ำเชื้อไม่มีความแตกต่างกับ 0.5 mM ดังนั้น จึงทำการศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบการแสดงออกของโปรตีนระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เสริมสาร แกมมา-โอริซานอลในสารเจือจางน้ำเชื้อ ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 mM เพื่อหา Potential Biomarkers ที่อาจมีความสัมพันธ์กับคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง และพบว่ามีโปรตีนที่แสดงออกประมาณ 90 จุด (protein spots) แต่เมื่อนำเข้าโปรแกรม Malaline 7 software พบว่ามีความแตกต่างของความเข้มของโปรตีนเพียง 15 จุด (Figure 2) จากผลการเปรียบเทียบความเข้มของโปรตีนใน Table3 ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง จะเห็นว่าโปรตีนส่วนใหญ่ที่พบในกลุ่มที่มีการเสริมสารแกมมา-โอริซานอล 0.25 mM มีความเข้มของโปรตีนที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม ยังต้องมีการศึกษาถึงผลของโปรตีนชนิดนั้นต่อคุณภาพน้ำเชื้อโคโดยตรงต่อไป ทั้งนี้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับโปรตีนบางชนิดในอสุจิ เช่น โปรตีน Alpha-enolase เป็นโปรตีนที่พบในเซลล์อสุจิที่โตเต็มที่ (mature spermatozoa) และเป็นโปรตีนที่มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองต่อความเครียด (Gitlits et al., 2000; Ji et al., 2016) โปรตีน Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์โคพ่อพันธุ์ (Stradaioli et al., 2009) ส่วนกลุ่ม Glutathione S-transferase Mu1 (GSTM1) เป็นโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการป้องกันอนุมูลอิสระ ในกระบวนการต่างๆของการสร้างอสุจิ (Xiong et al., 2015; Yu and Huang, 2015) ซึ่งในโคนมพบว่าหากเกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ของยีนที่สร้าง Glutathione S-transferase Mu1 (GSTM1) จะทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงอย่างมีนัยสำคัญ (Hering et al., 2015) สำหรับ Tektin-4 นั้นเคยมีการศึกษาในโคพันธุ์บราห์มันจำนวน 18 ตัว โดย Thepparat et al. (2012) พบว่าเป็นโปรตีนที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิในเชิงบวก นอกจากนี้ยังพบว่า Tektin-5 ในหนู เป็นโปรตีนในกลุ่ม Tektin ที่พบอยู่บริเวณ middle piece of flagella ส่วน mitochondrial sheath ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (Murayama et al., 2008) โดยการเกิด mutation ในการแสดงออกของยีนที่สร้าง Tektin ในคนจะเกี่ยวข้องกับความผิดปกติในการเคลื่อนที่อสุจิ และส่งผลให้เกิดความไม่สมบูรณ์พันธุ์ในเพศผู้ (Cao et al., 2011) ในขณะที่ Outer dense fiber protein 2 เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างที่สำคัญของเซลล์อสุจิในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และมีหน้าที่สำคัญในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (Zhao et al., 2018) รวมถึง ATP synthase subunit beta เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Ryu et al., 2019) สำหรับการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าโปรตีนที่ตรวจพบทั้งหมด 9 ชนิดนั้น มี 3 ชนิด ได้แก่ Myogenic factor 5 (Myf-5), Glutathione S-transferase Mu1 (GSTM1) และ Tektin 5 ที่กลุ่มควบคุมจะมีความเข้มของโปรตีนสูงกว่ากลุ่มที่มีการเสริมสารแกมมา-โอริซานอล 0.25 mM ในขณะที่โปรตีนอีก 6 ชนิด ได้แก่ Alpha-enolase, Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase, Tektin-3, Outer dense fiber protein 2, Tubulin alpha-3 chain, ATP synthase subunit beta จะพบมากในกลุ่มที่มีการเสริมสารแกมมา-โอริซานอล 0.25mM โดยการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นถึงผลของการเสริมสารแกมมา-โอริซานอลในปริมาณที่แตกต่างกัน ที่ส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ และ ความแตกต่างของชนิดโปรตีนในอสุจิ ทั้งนี้ ข้อมูลที่ได้ยังไม่สามารถบอกได้ว่าโปรตีนแต่ละชนิดที่มี

ปริมาณแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มจะส่งผลในเชิงบวก หรือ เชิงลบ ต่อคุณภาพน้ำเชื้อ จำเป็นต้องมีการศึกษาถึงผลของโปรตีนโดยตรงต่อคุณภาพน้ำเชื้อในอนาคต นอกจากนี้การศึกษานี้เป็นการศึกษาในกลุ่มพ่อพันธุ์ที่มีคุณภาพน้ำเชื้อผ่านเกณฑ์ก่อนการนำมาผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งตามเกณฑ์ของกรมปศุสัตว์แล้ว ไม่ได้เป็นการศึกษาจากพ่อพันธุ์กลุ่มที่มีคุณภาพน้ำเชื้อแตกต่างกัน ซึ่งหากต้องการศึกษากลไกการทำงานของโปรตีนชนิดใดชนิดหนึ่งอาจต้องทำทดสอบโดยสกัดโปรตีนชนิดที่สนใจนำมาเสริมเพื่อทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง เพื่อดูผลของโปรตีนชนิดนั้นต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง หรือใช้กลุ่มพ่อพันธุ์ที่มีคุณภาพน้ำเชื้อที่แตกต่างกัน ทั้งก่อนและหลังการแช่แข็ง เพื่อหากกลุ่มโปรตีนที่มีโอกาสพัฒนาเป็น biomarker เกี่ยวกับคุณภาพน้ำเชื้อต่อไป ทั้งนี้ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การเสริมสารแกมมา-โอริซานอลในความเข้มข้นที่เหมาะสมในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อน่าจะช่วยลดอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการแช่แข็ง ช่วยป้องกันการเสียหายของสุมิ ทำให้สุมิมีชีวิตรอดมากขึ้น รวมถึงสารแกมมา-โอริซานอล อาจช่วยกระตุ้นกลไกการทำงานของยีน ให้สร้างโปรตีนบางตัวในสุมิให้เพิ่มขึ้นหรือลดลง ส่งผลให้สุมิมีชีวิตรอดและมีร้อยละการเคลื่อนที่แตกต่างกับกลุ่มที่ไม่มีการเติมสาร แกมมา-โอริซานอล

สรุปผลการทดลอง

การเสริมสารแกมมา-โอริซานอล ในระดับความเข้มข้น 0.25 mM เป็นปริมาณเหมาะสมที่สามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งในโคเนื้อได้ ทั้งนี้สารแกมมา-โอริซานอลที่สกัดจากน้ำมันรำข้าวเป็นสารที่หาได้ง่าย ราคาไม่สูงมาก และมีขั้นตอนการใช้ที่ไม่ยุ่งยาก ทำให้สามารถนำมาใช้พัฒนาสูตรสารละลายเจือจางน้ำเชื้อในโคเพื่อเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อในโคได้ เมื่อพิจารณาร่วมกับรูปแบบโปรตีนทั้ง 9 ชนิดในน้ำเชื้อที่มีการเสริมด้วยสารละลายแกมมา-โอริซานอลว่ามีความแตกต่างอย่างชัดเจนกับกลุ่มที่ไม่มีการเสริมสารดังกล่าว แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ที่จะนำโปรตีนเหล่านั้นมาเป็น biomarkers เพื่อใช้ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อโคหรือร่วมกับการพัฒนาการผลิตน้ำเชื้อโคให้มีคุณภาพดีต่อไปในอนาคต

ข้อเสนอแนะ

การเสริมสารแกมมา-โอริซานอล ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อในสัตว์แต่ละชนิด หรือในสัตว์ชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์อาจต้องใช้ความเข้มข้นของการเสริมสารแกมมา-โอริซานอลที่ต่างกันเพื่อเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อ ทั้งนี้ อาจต้องมีการศึกษาการเสริมสารแกมมา-โอริซานอลในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อในพ่อพันธุ์โคที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ หรือ ความสามารถในการแช่แข็งต่ำ เพื่อศึกษาผลของการเสริมสารแกมมา-โอริซานอลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อพันธุ์กลุ่มดังกล่าว

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ และสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณในการดำเนินโครงการวิจัย ภายใต้ทุนอุดหนุน

การวิจัยจากงบประมาณสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 และคณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือในการดำเนินโครงการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- ฉลวย ทับศรีม่วงพรวน. 2555. การศึกษาผลการบริโภคผลิตภัณฑ์เสริมอาหารน้ำมันรำข้าวและจมูกข้าว. บริษัท ปทุมสิทธิ์จำกัด, จังหวัดปทุมธานี. ประเทศไทย.
- Amidi, F., A. Pazhohan, M.S. Nashtaei, M. Khodarahmian and S. Nekoonam. 2016. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. *Cell and tissue banking*. 17(4):745-756.
- Arlas, T.R., C.D. Pederzoli and P.B. Terraciano. 2008. Sperm quality is improved feeding stallions with a Rice oil supplement. *Animal Reproduction Science*. 107:306.
- Bailey J.L., C. Lessard, J. Jacques, C. Bre`que, I. Dobrinski, W. Zeng and H.L. Galantino-Homer. 2008. Cryopreservation of boar semen and its future importance to the industry. *Theriogenology*. 70:1251-1259.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. 72(12):248-254.
- Cao, W., T.W. Ijiri, A.P. Huang and G.L. Gerton. 2011. Characterization of a novel tektin member, TEK5, in mouse sperm. *Journal of andrology*. 32(1):55-69.
- Chanapiwat, P. and K. Kaeoket. 2015. Breed of boar influences the optimal concentration of gamma-oryzanol needed for semen cryopreservation. *Reproduction in domestic animals*. 50:221-226.
- Eduarda E., L. Sabrina, M. Cristiano, B.R. Juliana, M. Daniele, F.P. Hirya, B.S. Melina, G.L. Fábio, D.S.B. Daniela and W.S.C. Francielli. 2019. Effect of γ -oryzanol on testicular degeneration induced by scrotal insulation in rams. *Theriogenology*. 128:167-175.
- Gitlits, V., T. Ban-Hock, K. Loveland and J. Sentry. 2000. The glycolytic enzyme enolase is present in sperm tail and displays nucleotide-dependent association with microtubules. *European Journal of Cell Biology*. 79:104-111.
- Hammerstedt, R.H., J.K. Graham and J.P. Nolan. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. *Journal of andrology*. 11:73-88.
- Hering, D.M., M. Lecewicz, W. Kordan, A. Majewska and S. Kaminski. 2015. Missense mutation

- In glutathione-S-transferase M1 gene is associated with sperm motility and ATP content in frozen-thawed semen of Holstein-Friesian bulls. *Anim Reprod Sci.* 159:94-97.
- Issaq, H. and Veenstra T. 2008. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): advances and perspectives. *Biotechniques.* 44:697-8
- Ji, H., J. Wang, J. Guo, Y. Li, S. Lian, W. Guo, H. Yang, F. Kong, L. Zhen, L. Guo and Y. Liu. 2016. Progress in the biological function of alpha-enolase. *Animal Nutrition.* 2:12-17.
- Johnson, L.A. 2000. Sexing mammalian sperm for production of offspring: the state-of-the-art. *Animal reproduction science.* 60:93-107.
- Kaeoket, K., S. Donto, P. Nualnoy, J. Noiphinit and P. Chanapiwat. 2012. Effect of gamma-oryzanol-enriched rice bran oil on quality of cryopreserved boar semen. *The Journal of veterinary medical science.* 74:1149-1153.
- Lippolis, J. D. and T.A. Reinhardt. 2008. Centennial paper: proteomics in animal science. *Journal of Animal Science.* 86(9):2430-2441.
- Magdeldin, S., Enany S, Yoshida Y, Xu B, Zhang Y, Zureena Z, Lokamani I, Yaoita E, Yamamoto T. 2014. Basics and recent advances of two dimensional- polyacrylamide gel electrophoresis. *Clin Proteomics.* 11:16.
- Matsumoto, H., Haniu H, Komori N. Determination of Protein Molecular Weights on SDS-PAGE. *Methods Mol Biol.* 2019;1855:101-105.
- Murayama, E., E. Yamamoto, T. Kaneko, Y. Shibata, T. Inai and H. Iida. 2008. Tektin5, a new Tektin family member, is a component of the middle piece of flagella in rat spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 75:650-658.
- Petal, M. and S.N. Naik. 2004 Gamma-oryzanol from rice bran oil - A review. *J. Sci. Ind. Res.* 63:569-578.
- Qadeer, S., M.A. Khan, Q. Shahzad, A. Azam, M.S. Ansari, B.A. Rakha and S. Akhter. 2016. Efficiency of beetle (*Dendroides canadensis*) recombinant antifreeze protein for buffalo semen freezability and fertility. *Theriogenology.* 86(7):1662-1669.
- Raphael, C.F., A.A.O. Gobesso and A.F.C. Andrade. 2006. Effects of dietary supplementation with gamma-oryzanol on seminal characteristics of stallions. *Animal Reproduction.* 3:253.
- R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for

- Statistical Computing. Vienna. Austria.
- Rodríguez-Martínez, H., U. Kvist, J. Ernerudh, L. Sanz and J.J. Calvete. 2011. Seminal plasma proteins: what role do they play?. *American journal of reproductive immunology*. 66:11-22.
- Ryu, D.Y., W.H. Song, W.K. Pang, S.J. Yoon, M.S. Rahman and M.G. Pang. 2019. Freezability biomarkers in bull epididymal spermatozoa. *Scientific reports*. 9:12797.
- Said, T.M., A. Gaglani and A. Agarwal. 2010. Implication of apoptosis in sperm cryoinjury. *Reproductive biomedicine online*. 21:456-462.
- Stradaoli, G., L. Sylla, M. Monaci and M. Maiorino. 2009. Phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in bull spermatozoa provides a unique marker in the quest for semen quality analysis. *Theriogenology*. 72:91-98.
- Takeo, T. and N. Nakagata. 2011. Reduced glutathione enhances fertility of frozen-thawed C57BL/6 mouse sperm after exposure to methyl-beta-cyclodextrin. *Biology of reproduction*. 85:1066-1072.
- Thepparat, T., S. Katawatin, T. Vongpralub, M. Duangjinda, S. Thammasirirak and A. Utha. 2012. Separation of bovine spermatozoa proteins using 2D-PAGE revealed the relationship between tektin-4 expression patterns and spermatozoa motility. *Theriogenology*. 77:1816-1821.
- Towhidi, A. and J.E. Parks. 2012. Effect of n-3 fatty acids and alpha-tocopherol on post-thaw parameters and fatty acid composition of bovine sperm. *J Assist Reprod Genet*. 29:1051-1056.
- Xiong, D.K., H.H. Chen, X.P. Ding, S.H. Zhang and J.H. Zhang. 2015. Association of polymorphisms in glutathione S-transferase genes (GSTM1, GSTT1, GSTP1) with idiopathic azoospermia or oligospermia in Sichuan. China. *Asian J Androl*. 17:481-486.
- Xu, W., R. Mezencev, B. Kim, L. Wang, J. McDonald and T. Sulchek. 2012. Cell stiffness is a biomarker of the metastatic potential of ovarian cancer cells. *PloS one*. 7:10.
- Yu, B. and Z. Huang. 2015. Variations in Antioxidant Genes and Male Infertility. *Biomed Res Int*. 196-197.
- Zhao, W., Z. Li, P. Ping, G. Wang, X. Yuan and F. Sun. 2018. Outer dense fibers stabilize the axoneme to maintain sperm motility. *J Cell Mol Med*. 22:1755-1768.

ผลของจีโนไทป์โคนมเพศเมียต่อการประเมินค่าพันธุกรรมจีโนมในประชากรโคนมไทย

ภัทรพล สำเร็จดี^{1/} สมศักดิ์ เปรมปรีดิ์^{2/} กอบสุข ทองสอดแสง^{3/}

บทคัดย่อ

ความแม่นยำในการทำนายค่าพันธุกรรมจีโนมเป็นสิ่งที่สำคัญต่อการพัฒนาเพื่อเพิ่มความก้าวหน้าทางพันธุกรรม ซึ่งขึ้นอยู่กับจำนวนสัตว์ที่ทราบลักษณะจีโนไทป์เป็นหลัก ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงจำนวนจีโนไทป์ของแม่โคในประชากรอ้างอิงต่อความแม่นยำของค่าพันธุกรรมจีโนมและการจัดอันดับของสัตว์ด้วยค่าพันธุกรรมในประชากรโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซียนของไทย ข้อมูลที่ใช้ประกอบด้วย ลักษณะปริมาณน้ำนมที่ 305 วัน องค์ประกอบน้ำนม ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ไขมัน เปอร์เซ็นต์โปรตีน และเปอร์เซ็นต์ของแข็งทั้งหมด อายุเมื่อคลอดลูกครั้งแรก และคะแนนรูปร่างรวม โดยใช้ข้อมูลสองชุดคือ ข้อมูลชุดเต็ม และชุดข้อมูลบางส่วนสำหรับแต่ละลักษณะเพื่อการทำนายค่าพันธุกรรม ใช้การคัดเลือกด้วยจีโนมแบบขั้นตอนเดียว (single-step genomic best linear unbiased prediction, ssGBLUP) เปรียบเทียบกับวิธีการแบบดั้งเดิม (pedigree BLUP) มีการออกแบบการเพิ่มจำนวนข้อมูลจีโนไทป์แม่โคแบบสะสมเข้าไปในประชากรอ้างอิง (สัตว์ที่มีข้อมูลพันธุ์ประวัติ จีโนไทป์ และฟีโนไทป์) โดยเพิ่มจำนวนข้อมูลจีโนไทป์แม่โคที่เกิดรุ่นใหม่ๆ เข้าไปในประชากรอ้างอิงพอพันธุอย่างต่อเนื่อง เปรียบเทียบค่าพันธุกรรมที่วิเคราะห์จากข้อมูลบางส่วนและชุดข้อมูลเต็มด้วยความแม่นยำเชิงทฤษฎี สหสัมพันธ์เชิงอันดับ และค่าที่ได้จากวิธี linear regression (LR) method สำหรับโคพ่อพันธุ์ที่ใช้ตรวจสอบ ผลการศึกษาพบว่า การเพิ่มจำนวนข้อมูลจีโนไทป์แม่โคเข้าไปในประชากรอ้างอิงพอพันธุช่วยเพิ่มทั้งความแม่นยำเชิงทฤษฎี ความแม่นยำในการจัดอันดับสัตว์ และสัดส่วนของความแม่นยำ นอกจากนี้ ยังลดอคติของการทำนายค่าพันธุกรรมในอนาคตของพ่อโคที่ใช้ตรวจสอบสำหรับทุกลักษณะที่ศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้เฉพาะข้อมูลจีโนไทป์ของพ่อพันธุ์และวิธีแบบดั้งเดิม ซึ่งผลเชิงบวกที่พบดังกล่าวชัดเจนมากยิ่งขึ้นตามจำนวนข้อมูลจีโนไทป์แม่โคที่เพิ่มขึ้น โดยให้ความแม่นยำในการจัดอันดับ (rank correlation) และสัดส่วนของความแม่นยำที่สูง (>0.70) สำหรับปริมาณน้ำนมเมื่อเพิ่มข้อมูลจีโนไทป์แม่โคที่เกิดรุ่นใหม่ๆ เข้าไปในประชากรอ้างอิง ดังนั้นการเพิ่มขนาดประชากรอ้างอิงมากยิ่งขึ้นจะช่วยเพิ่มความแม่นยำของการทำนายพันธุกรรมจีโนมให้สูงขึ้นสำหรับทุกลักษณะที่ศึกษา การเพิ่มขนาดประชากรอ้างอิงของประชากรโคนมของไทยด้วยการเพิ่มจำนวนข้อมูลจีโนไทป์แม่โคซึ่งมีข้อมูลฟีโนไทป์แบบสะสมในประชากรอ้างอิงร่วมกับข้อมูลจีโนไทป์พอพันธุมีความเหมาะสม อันจะช่วยลดระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุกรรมสำหรับลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจของโคนมไทย

คำสำคัญ: การคัดเลือกด้วยจีโนม การทำนายพันธุกรรมจีโนม โคนม จีโนไทป์ สนิปส์

เลขทะเบียนวิชาการ: 65 (2)-0208-034

^{1/} ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพนครราชสีมา อ.เมือง จ.นครราชสีมา

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

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

Effects of genotyping cows on genomic predictions in Thai dairy cattle population

Pattarapol Sumreddee^{1/} Somsak Prempre^{2/} Korbsook Thongsodsang^{3/}

Abstract

The accuracy of genomic predictions is important for genetic progress, and it strongly depends on the number of genotyped animals. Thus, this study aimed at evaluating effects of the change in number of genotyped cows in reference population on the accuracy of predictions and ranking of animals by breeding values in crossbred Holstein-Friesian cattle in Thailand. Datasets consisted of 305-day milk yield, milk components (fat, protein and total solid percentages) age at first calving and final score. For each trait, two datasets were created, namely, whole and partial datasets, to assess genomic predictions. Single-step genomic best linear unbiased prediction (ssGBLUP) was used to compute genomic predictions and was compared with traditional pedigree BLUP procedure. The reference population (animals with pedigree, genotype and phenotypes) was updated by subsequently adding genotyped cows from newer generations into bull reference population. Genomic predictions were assessed by comparing estimated breeding values of validation bulls obtained from whole and partial datasets using theoretical accuracy and metrics from linear regression (LR) method. Results illustrated that, across traits analyzed, adding genotyped cows into bull reference population generally resulted in an increase in theoretical accuracy, rank correlation and ratio of accuracies, as well as a decrease in biasedness of predictions compared to scenario with only genotyped bulls and traditional pedigree BLUP method. Such positive effects were more pronounced with more cow's genomic information where a high level of rank correlation and ratio of accuracies (>0.70) was observed for milk yield. In conclusion, more genotyped cows in the reference population would result in more positive effect for all traits analyzed. Addition of genotyped cows to enlarge the reference population was encouraging, aimed at accelerating the rate of genetic gain for economically important traits for Thai dairy cattle.

Keywords: genomic selection, genomic prediction, dairy cattle, genotypes, SNPs

Registered No: 65 (2)-0208-034

^{1/} Nakhon Ratchasima Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Muang, Nakhon Ratchasima

^{2/} Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Muang, Pathum Thani

^{3/} Saraburi Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Kaeng Khoi, Saraburi

คำนำ

การคัดเลือกด้วยจีโนม (genomic selection) ถือเป็นวิธีมาตรฐานและเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการปรับปรุงพันธุ์โคนมในปัจจุบัน เนื่องจากสามารถช่วยเร่งให้เกิดความก้าวหน้าทางพันธุกรรม (genetic progress) ได้รวดเร็วขึ้นเนื่องจากความแม่นยำในการทำนายค่าพันธุกรรมที่สูงขึ้น และช่วยลดระยะห่างชั่วรุ่น (generation interval) ในการสร้างพ่อแม่พันธุ์โดยสามารถการคัดเลือกสัตว์ได้ตั้งแต่อายุยังน้อย แม้ว่าจะยังไม่มีข้อมูลผลผลิตหรือข้อมูลจากการทดสอบลูกสาว (Hayes et al., 2009; VanRaden et al., 2009) ทั้งยังสามารถลดต้นทุนในการทดสอบลูกสาว (progeny test) ในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม (Wiggans et al., 2017) ปัจจุบันค่าใช้จ่ายในการตรวจจีโนไทป์ (genotype) สำหรับใช้ในการประเมินพันธุกรรมจีโนม (genomic evaluations) ลดลงอย่างมาก ส่งผลให้การคัดเลือกด้วยจีโนมได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในหลายประเทศผู้นำด้านการเลี้ยงโคนม เช่น สหรัฐอเมริกา แคนาดา ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ และเนเธอร์แลนด์ (Scheifers and Weigel, 2012; VanRaden, 2020) Meuwissen et al. (2001) ได้ริเริ่มการนำข้อมูลจีโนมมาใช้ในการคัดเลือกสัตว์ โดยวิธีการคัดเลือกด้วยจีโนมในโคนมที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ได้แก่ วิธีแบบหลายขั้นตอน (multistep method) (VanRaden, 2008; Lund et al., 2011) และวิธีแบบขั้นตอนเดียว (single step method) (Aguilar et al., 2010; Christensen and Lund, 2010) โดยการประเมินพันธุกรรมจีโนมจะอาศัยข้อมูลลักษณะปรากฏหรือฟีโนไทป์ (phenotype) พันธุ์ประวัติสัตว์ และจีโนไทป์ ร่วมกันเพื่อทำนายค่าพันธุกรรมจีโนม (genomic estimated breeding values, GEBVs)

แม้ว่าจำนวนสัตว์ที่มีข้อมูลจีโนไทป์เพิ่มจำนวนอย่างมากในปัจจุบัน เช่น โคนมพันธุ์โฮลสไตน์ของประเทศสหรัฐอเมริกาที่มีข้อมูลจีโนไทป์มีจำนวนมากกว่า 4 ล้านตัว เป็นต้น (Council on Dairy Cattle Breeding, n.d.) อย่างไรก็ตาม จำนวนสัตว์ที่มีข้อมูลจีโนไทป์ในประเทศอื่นๆ ยังมีจำนวนน้อยกว่ามาก ซึ่งความแม่นยำของการทำนายค่า GEBVs ขึ้นอยู่กับจำนวนสัตว์ที่มีข้อมูลจีโนไทป์เป็นหลัก (VanRaden et al., 2009, Calus et al., 2010; Daetwyler et al., 2010) โดยในการคัดเลือกด้วยจีโนมนั้น ขนาดของประชากรอ้างอิงหรือ reference population ซึ่งต้องประกอบด้วยสัตว์ที่มีข้อมูลฟีโนไทป์ พันธุ์ประวัติ และจีโนไทป์ ถือเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความแม่นยำของการทำนายค่าพันธุกรรมจีโนม (Daetwyler, et al., 2008; Goddard and Hayes, 2009) ซึ่งอาจมีค่าต่ำหรือเทียบเท่ากับการทำนายพันธุกรรมแบบดั้งเดิมที่ไม่ใช้ข้อมูลจีโนมในกรณีที่ประชากรอ้างอิงมีขนาดเล็ก (VanRaden et al., 2009) การเพิ่มจำนวนสัตว์ในประชากรอ้างอิงอย่างต่อเนื่องเป็นวิธีปฏิบัติซึ่งช่วยป้องกันการลดความแม่นยำในการทำนายค่า GEBVs (De Roos et al., 2011; Pryce et al., 2012) โดยปกติแล้ว ประชากรอ้างอิงในประเทศผู้นำด้านอุตสาหกรรมโคนมจะเป็นโคเพศผู้ที่ผ่านการทดสอบลูกสาว (progeny-tested bulls) เนื่องจากค่าพันธุกรรมของโคเหล่านี้มีความน่าเชื่อถือสูง (VanRaden et al., 2009) แต่การสร้างประชากรอ้างอิงด้วยวิธีดังกล่าวเป็นไปได้ยากในบางประเทศที่มีจำนวนพ่อพันธุ์ที่ผ่านการทดสอบลูกสาวไม่มากเพียงพอ ดังนั้น แม่พันธุ์ชั้นเลิศที่ใช้ผลิตลูกโคเพศผู้ (bull

dams) จึงสามารถใช้เป็นแหล่งข้อมูลจีโนมเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มความแม่นยำในการทำนายค่า GEBVs (Tsuruta et al., 2013; Lourenco et al., 2014) ในประชากรโคนมที่มีขนาดเล็กจึงมีการเสนอให้ใช้ข้อมูลจีโนไทป์ของโคเพศเมียเพื่อเพิ่มขนาดประชากรอ้างอิง ซึ่งสามารถเร่งความก้าวหน้าทางพันธุกรรมและถือเป็นการลงทุนที่คุ้มค่า (Thomasen et al., 2014; Gao et al., 2015)

โคนมในประเทศไทยเป็นโคนมลูกผสมซึ่งมีความเหมาะสมกับสภาพแวดล้อมแบบร้อนชื้น ส่วนใหญ่มีสายเลือดโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียน (Holstein-Friesian, HF) ตั้งแต่ 87.50 – 93.75% และสายเลือดโคอินเดีย (*Bos indicus*) (ตั้งแต่ 6.25 – 12.50%) ได้แก่ ชาฮิวาล เรตซินดิ บราห์มัน และโคพื้นเมืองไทย (Buaban et al., 2021) กรมปศุสัตว์ได้นำการคัดเลือกโคนมด้วยจีโนมมาใช้ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2559 เพื่อทดแทนการประเมินพันธุกรรมแบบดั้งเดิม (กรมปศุสัตว์, 2560) โดยการใช้การประเมินพันธุกรรมแบบขั้นตอนเดียวด้วยวิธี single-step genomic best linear unbiased prediction (ssGBLUP) (Aguilar et al., 2010) ปัจจุบันประชากรอ้างอิงสำหรับการประเมินพันธุกรรมจีโนมของโคนมไทยยังมีขนาดเล็กเนื่องจากจำนวนข้อมูลจีโนไทป์ของพ่อพันธุ์ซึ่งผ่านการทดสอบลูกสาวมีจำกัดเพียงประมาณปีละ ≤ 10 ตัว และการเพิ่มขนาดประชากรอ้างอิงมาจากข้อมูลจีโนไทป์ของโคเพศเมีย ได้แก่ แม่พันธุ์ชั้นเลิศ และลูกสาวของพ่อทดสอบ เป็นหลัก Buaban และคณะ ในปี 2021 ได้รายงานถึงประโยชน์ของการคัดเลือกโคนมของไทยด้วยจีโนมสำหรับลักษณะปริมาณการให้ผลผลิตน้ำนม และองค์ประกอบน้ำนมที่ 305 วัน เมื่อใช้ข้อมูลจีโนไทป์จากทั้งพ่อโคและแม่โคในการประเมินพันธุกรรม ซึ่งในปัจจุบันประชากรอ้างอิงมีขนาดใหญ่กว่าการศึกษาดังกล่าวมากกว่า 3 เท่า อย่างไรก็ตาม ยังไม่เคยมีรายงานผลการจัดอันดับค่าพันธุกรรมจีโนมระหว่างสัตว์พ่อแม่พันธุ์ในประชากร (ranking) โดยการจัดอันดับสัตว์ด้วยค่าพันธุกรรมจะช่วยให้ทราบสถานภาพความดีเด่นหรือด้อยของสัตว์แต่ละตัวสำหรับลักษณะต่างๆ ซึ่งจะช่วยให้เพิ่มความมั่นใจในการคัดเลือกสัตว์อายุน้อยเพื่อใช้งานจริงในโปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์โคนมของประเทศไทย อันจะส่งผลให้เกิดความก้าวหน้าทางพันธุกรรมรวดเร็วยิ่งขึ้นจากระยะห่างชั่วรุ่นที่ลดลง ดังนั้น ข้อมูลที่มีอยู่ในปัจจุบันจึงสามารถนำมาใช้ในการประเมินผลการทำนายค่าพันธุกรรมจีโนมการจัดอันดับโคเพศผู้ที่เป็นตัวเลือกสำหรับการคัดเลือกเป็นพ่อพันธุ์ (selection candidates) รวมถึงการประเมินผลของรูปแบบการเพิ่มข้อมูลจีโนไทป์ของแม่โคเพื่อเพิ่มขนาดของประชากรอ้างอิง การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเปลี่ยนแปลงจำนวนข้อมูลจีโนไทป์ของแม่โคในประชากรอ้างอิงต่อความแม่นยำของค่าพันธุกรรมจีโนมและการจัดอันดับของสัตว์ด้วยค่าพันธุกรรม

อุปกรณ์และวิธีทดลอง

ข้อมูลลักษณะปรากฏและพันธุ์ประวัติ (Phenotypes and pedigree)

ข้อมูลของลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม องค์ประกอบน้ำนม ความสมบูรณ์พันธุ์ และรูปร่าง รวมถึงข้อมูลพันธุ์ประวัติ ได้มาจากระบบฐานข้อมูลโคนมของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ซึ่งใช้สำหรับการประเมินพันธุกรรมโคนมของประเทศ ข้อมูลลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม ได้แก่ ปริมาณน้ำนม

(milk yield, MY) องค์ประกอบน้ำนม 3 ลักษณะ ได้แก่ เปอร์เซ็นต์ไขมัน (fat percentage, FP) เปอร์เซ็นต์โปรตีน (protein percentage, PP) และเปอร์เซ็นต์ของแข็งทั้งหมด (total solid percentage, TP) ความสมบูรณ์พันธุ์ ได้แก่ อายุเมื่อคลอดลูกครั้งแรก (age at first calving, AFC) และรูปร่าง ได้แก่ คะแนนรูปร่างรวม (final score, FS) โดยข้อมูลลักษณะปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมเป็นข้อมูลผลผลิตน้ำนมในวันทดสอบรายเดือน (test day records) ของโคนมในรอบการให้นมครั้งแรก ซึ่งคลอดลูกในระหว่าง พ.ศ. 2536 - 2564 ข้อมูลลักษณะ AFC ได้มาจากข้อมูลการผสมเทียม การตรวจท้อง และการติดตามลูกเกิดในระหว่างปี พ.ศ. 2545 - 2564 ส่วนข้อมูลลักษณะ FS ได้มาจากข้อมูลลักษณะรูปร่างของแม่โคในรอบการให้นมครั้งแรก ซึ่งคลอดลูกในระหว่างปี พ.ศ. 2545 - 2564 เพื่อให้ได้ชุดข้อมูลที่เหมาะสมในการวิเคราะห์ ทำการตรวจสอบข้อมูลตามวิธีของ สายัณห์ และคณะ (2563) และ Buaban et al. (2020) เรียกชุดข้อมูลที่สมบูรณ์ซึ่งผ่านการตรวจสอบแล้วว่า “ข้อมูลชุดเต็ม (whole dataset)” โดยชุดข้อมูลเต็ม สำหรับ MY มีจำนวน 232,425 ข้อมูล (จากโค 32,962 ตัว) องค์ประกอบน้ำนม มีจำนวน 222,346 ข้อมูล (จากโค 31,338 ตัว) AFC มีจำนวน 113,040 ข้อมูล (จากโค 113,040 ตัว) และ FS มีจำนวน 16,276 ข้อมูล (จากโค 16,276 ตัว) (Table 1)

ข้อมูลพันธุ์ประวัติที่ใช้ในการวิเคราะห์สำหรับทุกลักษณะสร้างขึ้นโดยการสับย้อนกลับไป 3 ชั่วอายุ (generation) จากสัตว์ที่มีข้อมูลบันทึกลักษณะปรากฏ ดังนั้น จึงมีสัตว์ในชุดข้อมูลพันธุ์ประวัติสำหรับ MY จำนวน 67,205 ตัว องค์ประกอบน้ำนม จำนวน 64,983 ตัว AFC จำนวน 208,943 ตัว และ FS จำนวน 41,165 ตัว ค่าเฉลี่ยของลักษณะที่ศึกษาแสดงใน Table 1

Table 1. A summary description of test-day milk-production traits (based on a 305-d basis), age at first calving and final score; and their respective pedigree-based estimates of heritability

Trait ¹	No. of animals with records	No. of records	Mean (SD) ²	No. of animals in pedigree	Heritability ³
MY, kg	32,962	232,425	14.11 (4.59)	67,205	0.52
FP, %	31,338	222,346	3.57 (0.96)	64,983	0.15
PP, %	31,338	222,346	3.12 (0.38)	64,983	0.22
TP, %	31,338	222,346	12.11 (2.20)	64,983	0.20
AFC, month	113,040	113,040	31.94 (5.74)	208,943	0.21
FS, score	16,276	16,276	69.66 (5.40)	41,165	0.03

¹ MY = test-day milk yield; average FP = fat percentage; PP = protein percentage; TP = total solid percentage, AFC = age at first calving, FS = final score

² Mean and SD were calculated based on all records for each trait.

³ Heritability for MY, FP, PP, and TP were based on 305-d basis

ข้อมูลจีโนม (Genomic information)

ข้อมูลจีโนมได้จากการตรวจหาความแตกต่างทางพันธุกรรมในระดับจีโนม (single nucleotide polymorphisms, SNPs) ของโคนมรายตัวด้วย Illumina BovineSNP50 BeadChip (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) เวอร์ชัน 2 (54,609 SNPs) หรือ เวอร์ชัน 3 (53,218 SNPs) โดยเลือกใช้ SNPs ที่เหมือนกันจากทั้งสองเวอร์ชัน จำนวน 50,908 SNPs ควบคุมคุณภาพข้อมูลจีโนมด้วยโปรแกรม PREGSF90 (Misztal et al., 2018) ได้แก่ call rate >0.9 สำหรับทั้ง SNPs และตัวสัตว์ ความถี่อัลลีลน้อย (minor allele frequency, MAF) >0.05 การออกจากสมดุล Hardy-Weinberg (ความแตกต่างระหว่างความถี่ที่คาดหวังและความถี่ที่สังเกต) <0.15 การทดสอบความขัดแย้งระหว่างคู่พ่อแม่ลูก (parent-progeny conflict) จากนั้นคัดแยก SNPs ที่ไม่ทราบตำแหน่งบนจีโนมหรืออยู่บนโครโมโซมเพศออก (unmapped and non-autosomal SNPs) ดังนั้นข้อมูลจีโนมที่นำมาใช้วิเคราะห์ลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมและ AFC ประกอบด้วยสัตว์จำนวน 2,774 ตัว (42,097 SNPs) โดยมีพ่อพันธุ์โค 183 ตัว และแม่โค 2,591 ตัว และสำหรับลักษณะ FS ใช้จำนวนข้อมูลจากสัตว์จำนวน 2,171 ตัว (42,087 SNPs) โดยมีพ่อพันธุ์โค 183 ตัว และแม่โค 2,188 ตัว ซึ่งข้อมูลจีโนมที่พ่อพันธุ์ดังกล่าวเป็นโคที่เกิดระหว่างปี พ.ศ. 2503 - 2559 ส่วนข้อมูลจีโนมที่แม่โคได้มาจากโคที่เกิดระหว่างปี พ.ศ. 2543 - 2560 ข้อมูลจีโนมที่พ่อพันธุ์ประกอบด้วยพ่อพันธุ์ต่างประเทศ และพ่อพันธุ์ที่เกิดในประเทศ ซึ่งพ่อพันธุ์ในประเทศส่วนใหญ่เป็นโคที่ผ่านการพิสูจน์พันธุ์กรรมในโปรแกรมการทดสอบลูกสาวของกรมปศุสัตว์ แม่โคทุกตัวที่มีข้อมูลจีโนมที่มีข้อมูลบันทึกฟีโนไทป์สำหรับลักษณะที่ศึกษา

การจัดชุดข้อมูลจีโนมแม่โค

เพื่อศึกษาผลของการเพิ่มจำนวนข้อมูลจีโนมแม่โคในประชากรอ้างอิงต่อการทำนายค่าพันธุกรรมจีโนม จึงกำหนดสถานการณ์จำลอง 6 สถานการณ์ (Table 2) เพื่อตรวจสอบผลของจำนวนและรูปแบบของการเพิ่มข้อมูลจีโนมแม่โค โดยเริ่มจากประชากรอ้างอิงที่มีเฉพาะข้อมูลจีโนมพ่อพันธุ์เท่านั้น (scenario 1) จากนั้น เพิ่มข้อมูลจีโนมแม่โคเข้าไปในประชากรอ้างอิงเดิมแบบสะสม (updating reference population) จากข้อมูลจีโนมแม่โคกลุ่มที่เกิดตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 - 2550 สำหรับสถานการณ์ถัดๆ ไปเพิ่มข้อมูลจีโนมแม่โคที่เกิดในทุกๆ 2 ปี ถัดจากแม่โคในสถานการณ์ก่อนหน้า จนถึงแม่โคที่เกิดปี พ.ศ. 2558 ยกตัวอย่างเช่น scenario 2 เพิ่มข้อมูลจีโนมแม่โคกลุ่มที่เกิดตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 - 2550 เข้าไปรวมกับข้อมูลจีโนมพ่อพันธุ์ scenario 3 เพิ่มข้อมูลจีโนมแม่โคที่เกิดปี พ.ศ. 2551 - 2552 จนกระทั่งถึง scenario 6 ซึ่งเพิ่มข้อมูลจีโนมแม่โคที่เกิดปี พ.ศ. 2557 - 2558 โดยที่ scenario 6 ประกอบด้วยข้อมูลจีโนมที่มาจากแม่โคทั้งหมดและพ่อโค รูปแบบการเพิ่มข้อมูลจีโนมแม่โคแบบสะสมดังกล่าวพิจารณาจากเหตุผลที่โคเพศเมียจะเริ่มให้ผลผลิตตั้งแต่อายุ 2 ปี โดยประมาณ ซึ่งการออกแบบเช่นนี้เป็นเพียงการจำลองสถานการณ์เพื่อศึกษาตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้เท่านั้น โดยอาจแตกต่างจากการปฏิบัติจริงในแต่ละปีซึ่งแม่โคชั้นเลิศและลูกสาวที่เกิดจากโปรแกรม progeny test จะถูกเลือกเพื่อเก็บตัวอย่างตรวจจีโนม

Table 2. Amount of genomic information in reference population to assess effects of cow genotypes on genomic predictions

Scenario	Detail ¹	Number of genotyped cows	
		Milk yield and components and AFC ²	FS ³
1	Males only (n=183)	0	0
2	Males + females born from 2543 to 2550	203	202
3	Males + females born from 2543 to 2552	591	587
4	Males + females born from 2543 to 2554	1,068	1,048
5	Males + females born from 2543 to 2556	1,552	1,467
6	Males + females born from 2543 to 2558	2,275	1,938

¹ Number of genotyped bulls was the same for all traits and all scenarios (183 bulls). The remaining genotyped animals were in validation population. Year of birth was based on the Buddhist Era.

^{2,3} AFC = age at first calving, FS = final score

โมเดลทางสถิติ (Statistical models)

โมเดลสำหรับวิเคราะห์ลักษณะปริมาณและองค์ประกอบน้ำนม ใช้โมเดลวันทดสอบถดถอยแบบสุ่ม (random regression test-day model, RR-TDM) สำหรับการวิเคราะห์ด้วยวิธีแบบดั้งเดิม (pedigree-based) และวิธีที่ใช้ข้อมูลจีโนมร่วม (genomic based) แบบขั้นตอนเดียวด้วย ssGBLUP (SS-RR-TDM) ซึ่งคล้ายกับโมเดลที่ใช้ในการประเมินพันธุ์กรรมโคนมของ กรมปศุสัตว์ (กรมปศุสัตว์, 2564) และ Buaban et al. (2021) ใช้การวิเคราะห์ทีละลักษณะ (single-trait analysis) เพื่อคำนวณค่าพันธุ์กรรม โมเดลในรูปของเมทริกซ์แสดงได้ดังนี้

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

โดย $\mathbf{y}$ คือ เวกเตอร์ของบันทึกข้อมูลในวันทดสอบของลักษณะ MY, FP, PP และ TP, $\mathbf{b}_1$ คือเวกเตอร์ของอิทธิพลคงที่ซึ่งประกอบด้วย หน่วยผสมเทียม-ปี-ฤดูกาลที่คลอด กลุ่มพันธุ์-กลุ่มอายุที่คลอด, $\mathbf{b}_2$ คือเวกเตอร์ของค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยคงที่ของ Legendre polynomials (LPs) ที่ซ่อนอยู่ในกลุ่มพันธุ์-กลุ่มอายุที่คลอด, $\mathbf{h}$ คือเวกเตอร์ของอิทธิพลสุ่มเนื่องจาก ผูก-ปี-เดือนทดสอบ, $\mathbf{a}$ และ $\mathbf{p}$ คือเวกเตอร์ของสัมประสิทธิ์การถดถอยแบบสุ่มของ LPs ที่ซ่อนกันภายในอิทธิพลเนื่องจากพันธุ์กรรม และสิ่งแวดล้อมถาวรตามลำดับ, $\mathbf{e}$ คือเวกเตอร์ของความคลาดเคลื่อน (residuals), $\mathbf{X}_1$, $\mathbf{X}_2$, $\mathbf{V}$, $\mathbf{Z}$ และ $\mathbf{W}$ คือ incidence matrices ที่สอดคล้องกันกับอิทธิพลที่กล่าวมาข้างต้น ลำดับของ LPs ซึ่งเป็นค่าแปรผันร่วม (covariates) ของปัจจัยคงที่และปัจจัยสุ่มที่คำนวณจากวันให้นมโดยใช้ LPs ลำดับที่ 3 (constant, linear, quadratic และ cubic) สำหรับลักษณะปริมาณน้ำนม และองค์ประกอบน้ำนม สำหรับทั้งอิทธิพลใน $\mathbf{a}$ และ $\mathbf{p}$ กำหนดสมมุติฐานให้ความแปรปรวนของอิทธิพลใน $\mathbf{e}$ มีค่าเท่ากันตลอดการให้นม (homogeneity of residual

variances) เพื่อลดความซับซ้อนของโมเดล การวิเคราะห์ด้วยวิธี SS-RR-TDM ใช้ข้อมูลฟีโนไทป์ พันธุ์ประวัติ ร่วมกับข้อมูลจีโนไทป์ในการประเมินพันธุกรรม โดยที่เมทริกซ์ของความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสัตว์ในพันธุ์ประวัติ (numerator relationship matrix, **A**) ถูกแทนที่ด้วยเมทริกซ์ **H** (realized relationship matrix) ที่รวมเอาความสัมพันธ์ของสัตว์ในเมทริกซ์ **A** เข้ากับเมทริกซ์ความสัมพันธ์ทางจีโนม **G** (genomic relationship matrices) (Lourenco et al., 2020) เมทริกซ์ **H** ถูกดัดแปลงเพื่อลดความอคติของการทำนายตามวิธีที่แสดงไว้ใน Buaban et al. (2021) ค่าพันธุกรรมของสัตว์รายตัวสำหรับลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมถูกคำนวณออกมาในพื้นฐานของค่าพันธุกรรมที่ 305 วัน (305-d EBV สำหรับ RR-TDM หรือ 305-d GEBV สำหรับ SS-RR-TDM) โดยค่าพันธุกรรมที่ 305 วัน สำหรับ MY คำนวณจากค่าพันธุกรรมสะสมจากวันให้นมที่ 5 ถึง 305 (DIM 5 to 305) และใช้ค่าเฉลี่ยในรอบการให้นม (DIM 5 to 305) สำหรับลักษณะองค์ประกอบน้ำนม (FP, PP และ TP)

โมเดลตัวสัตว์ (animal model) ถูกใช้สำหรับวิเคราะห์ลักษณะ AFC และ FS ซึ่งประยุกต์มาจากโมเดลในการประเมินพันธุกรรมโคนมของกรมปศุสัตว์ (กรมปศุสัตว์, 2564) และที่ใช้โดย สายัณห์ และคณะ (2563) ทำการวิเคราะห์ด้วยวิธีแบบดั้งเดิม (Best linear unbiased prediction, BLUP) และวิธีประเมินพันธุกรรมจีโนมแบบ ssGBLUP เพื่อคำนวณค่า EBV และ GEBV ตามลำดับ โมเดลในรูปของเมทริกซ์แสดงได้ดังนี้

$$\mathbf{y} = \mathbf{Xb} + \mathbf{Vh} + \mathbf{Zu} + \mathbf{e}, \quad (2)$$

โดย **y** คือเวกเตอร์ของบันทึกข้อมูล AFC หรือ FS, **b** คือเวกเตอร์ของอิทธิพลคงที่ ประกอบด้วยปี-เดือนที่คลอดลูก กลุ่มพันธุ์ ตัวแปรร่วม (covariates) ของวันให้นม ตัวแปรร่วมของอายุที่วัดและประเมินรูปร่าง (linear and quadratic terms) สำหรับลักษณะ FS หรือ ปี-เดือน ของการผสมเทียมครั้งแรก และกลุ่มพันธุ์ สำหรับลักษณะ AFC, **h** คือเวกเตอร์ของอิทธิพลสุ่มเนื่องจากหน่วยผสมเทียม-ฝูง-ปี-เดือนที่วัดและประเมินรูปร่าง สำหรับลักษณะ FS หรือ ฝูง-ปีของการผสมเทียมครั้งแรก สำหรับลักษณะ AFC, **u** คือเวกเตอร์ของอิทธิพลสุ่มเนื่องจากอิทธิพลทางพันธุกรรมของตัวสัตว์ (EBV สำหรับ BLUP และ GEBV สำหรับ ssGBLUP), **e** คือเวกเตอร์ของความคลาดเคลื่อน, **X**, **V** และ **Z** คือ incidence matrices ที่สอดคล้องกันกับอิทธิพลที่กล่าวมาข้างต้น

ประมาณค่าองค์ประกอบของความแปรปรวน (variance components) ด้วยวิธี Average information restricted maximum likelihood (AI-REML) โดยใช้โปรแกรม AIREMLF90 (Misztal et al., 2018) ทำการวิเคราะห์แยกทีละลักษณะโดยใช้วิธีแบบดั้งเดิมด้วยชุดข้อมูล whole datasets และโมเดลเหมือนกับที่ใช้ในการประเมินพันธุกรรมข้างต้น แก๊สมการของโมเดลผสม (mixed model equation, MME) เพื่อหาคำตอบของสมการด้วยโปรแกรม BLUPF90 (Misztal et al., 2018) ค่าอัตราพันธุกรรม (heritability) สำหรับลักษณะ MY, FP, PP, TP, AFC และ FS เท่ากับ 0.52, 0.15, 0.22, 0.20, 0.21 และ 0.03 ตามลำดับ (Table 1)

การตรวจสอบผลการทำนายค่าพันธุกรรม (Validation of predictions)

การสร้างชุดข้อมูลประชากรตรวจสอบ (Validation population)

สร้างชุดข้อมูลประชากรตรวจสอบ (validation population) เพื่อใช้ในการตรวจสอบผลของการทำนายค่าพันธุกรรม โดยการตัดข้อมูลฟีโนไทป์ในช่วง 6 ปีสุดท้าย (ประมาณ 1 ชั่วโมง) ออกจากชุดข้อมูล whole dataset เรียกชุดข้อมูลที่เหลือนี้ว่า “ชุดข้อมูลบางส่วน (partial dataset)” โดย partial dataset ประกอบด้วยข้อมูลฟีโนไทป์ที่บันทึกจนถึงปี พ.ศ. 2559 (สำหรับ MY, FP, PP, TP และ FS) และ พ.ศ. 2558 (สำหรับ AFC) จำนวนสัตว์และจำนวนข้อมูลฟีโนไทป์ในชุดข้อมูล partial datasets อยู่ในช่วง 47.0 ถึง 64.3% และ 47.0 ถึง 60.1% ของ whole datasets ตามลำดับ ดังนั้น ประชากรตรวจสอบจึงประกอบด้วยสัตว์ที่มีเฉพาะข้อมูลพันธุประวัติ และข้อมูลจีโนไทป์ (ถ้ามี) แต่ไม่มีข้อมูลฟีโนไทป์

การศึกษารั้ครั้งนี้สนใจการประเมินความแม่นยำในการทำนายค่าพันธุกรรมและการจัดอันดับโคเพศผู้อายุน้อย (young bulls) เพื่อการคัดเลือกในขณะที่โคเหล่านี้ยังไม่มีข้อมูลผลผลิตของลูกสาว ซึ่งในการประเมินพันธุกรรมแบบดั้งเดิม โคเหล่านี้จะถูกคัดเลือกโดยใช้ค่าพันธุกรรมเฉลี่ยของพ่อและแม่ (parent average, PA) เพื่อนำเข้าสู่โปรแกรม progeny test กำหนดให้โคเพศผู้ที่ใช้ตรวจสอบผลการทำนายค่าพันธุกรรม (validation bulls) เป็นโคหนุ่มอายุน้อยซึ่งอยู่ในประชากรตรวจสอบที่เกิดขึ้นตั้งแต่ปี พ.ศ. 2551 ถึง 2555 โดยโคกลุ่มนี้เป็นโคเพศผู้ที่ผ่านการทดสอบลูกสาว มีข้อมูลจีโนไทป์ และมีความแม่นยำเชิงทฤษฎีของค่า EBV (วิเคราะห์ด้วย whole datasets) อย่างน้อย 0.90 สำหรับ MY, FP, PP, TP และ AFC และ 0.75 สำหรับ FS ดังนั้น โคในกลุ่ม validation bulls ไม่มีข้อมูลบันทึกฟีโนไทป์ของลูกสาวในชุดข้อมูล partial datasets แต่มีลูกสาวที่มีข้อมูลบันทึกฟีโนไทป์ในชุดข้อมูล whole datasets โดย validation bulls มีจำนวน 18 (สำหรับ FS) ถึง 26 ตัว (สำหรับ MY) การเตรียมชุดข้อมูลเพื่อตรวจสอบผลของการทำนายค่าพันธุกรรม (ตัวอย่างสำหรับ MY, FP, PP, TP และ FS) แสดงใน Figure 1

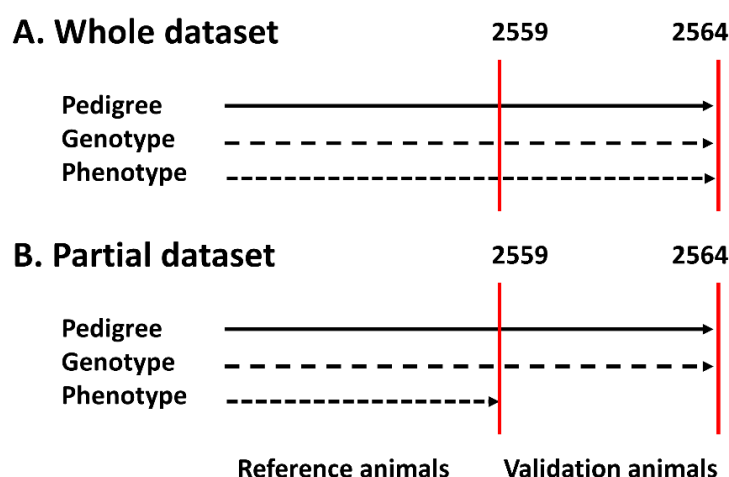


Figure 1. An illustration of whole (A) and reduced datasets (B) for the validation of predictions (for 305-d milk yield, milk components and age at first calving). Year was based on the Buddhist Era.

วิธีการตรวจสอบผลการทำนายค่าพันธุ์กรรม (Validation methods)

เพื่อตรวจสอบผลของการเพิ่มข้อมูลจีโนไทป์แม่โคต่อการทำนายค่าพันธุ์กรรม ใช้หลักการของ linear regression method (LR method) (Legarra and Reverter, 2018) ซึ่งเปรียบเทียบค่าพันธุ์กรรมของกลุ่ม validation bulls ที่คำนวณได้จากการประเมินที่ต่างกันด้วยค่าสถิติต่างๆ โดยใช้ LR method เปรียบเทียบค่าพันธุ์กรรม GEBV ที่คำนวณจากชุดข้อมูล whole และ partial datasets ด้วยโมเดลที่ใช้ข้อมูลจีโนม นอกจากนี้ คำนวณค่าพันธุ์กรรม EBV ด้วยโมเดลดั้งเดิม (ไม่ใช้ข้อมูลจีโนม) จากชุดข้อมูล whole และ partial datasets เพื่อใช้เปรียบเทียบผลที่ได้กับโมเดลที่ใช้ข้อมูลจีโนม โดยเรียกค่าพันธุ์กรรมที่วิเคราะห์โดยใช้ข้อมูล whole และ partial datasets ว่า n_w และ n_p ตามลำดับ ดังนั้น ในแต่ละลักษณะจึงทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยวิธีแบบดั้งเดิม และวิธีการประเมินพันธุ์กรรมจีโนมแบบขั้นตอนเดียวด้วย whole และ partial datasets โดยการประเมินพันธุ์กรรมแบบหลังด้วย partial datasets ทำในชุดข้อมูลจีโนไทป์ที่จำลองการเพิ่มจำนวนข้อมูลจีโนไทป์แม่โคในประชากรอ้างอิงแบบสะสม 6 สถานการณ์

เปรียบเทียบผลของการเพิ่มจำนวนข้อมูลจีโนไทป์แม่โคในการประเมินพันธุ์กรรมจีโนมโดยใช้ค่าความแม่นยำเชิงทฤษฎีของค่าพันธุ์กรรม (theoretical accuracy) ใช้ค่าสถิติของวิธี LR method ที่คำนวณโดยอาศัยการเปรียบเทียบค่าพันธุ์กรรม n_w และ n_p เพื่อตรวจสอบผลการทำนายค่าพันธุ์กรรมสำหรับ validation bulls ได้แก่ ค่าสัดส่วนของความแม่นยำของค่าพันธุ์กรรม (ratio of accuracies) และค่าการกระจายของค่าพันธุ์กรรม (dispersion) และประยุกต์ใช้หลักการของ LR method สำหรับคำนวณค่าสหสัมพันธ์เชิงอันดับ (rank correlation)

1) ความแม่นยำเชิงทฤษฎี (Theoretical accuracy)

ความแม่นยำเชิงทฤษฎี ($r_{individual}$) เป็นความแม่นยำของค่าพันธุ์กรรมของสัตว์รายตัว ซึ่งได้มาจากค่าความแปรปรวนของความคลาดเคลื่อนของการทำนาย (prediction error variance, PEV) (Miszta and Wiggins, 1988) การคำนวณ PEV อาศัยเมตริกซ์สัมประสิทธิ์ (coefficient matrix) ของสมการผสม ซึ่งคำนวณได้จากโปรแกรม BLUPF90 (Miszta et al., 2018) หาค่าเฉลี่ย $r_{individual}$ สำหรับโคในกลุ่ม validation bulls ในแต่ละสถานการณ์ของการเพิ่มข้อมูลจีโนไทป์แม่โคในประชากรอ้างอิง

2) ค่าสหสัมพันธ์เชิงอันดับ (Spearman's rank correlation)

ค่าสหสัมพันธ์เชิงอันดับใช้สำหรับตรวจสอบความคล้ายคลึงกันของอันดับสัตว์ (ranking) ที่จัดอันดับด้วยค่าพันธุ์กรรมที่ได้จากการประเมินพันธุ์กรรมที่ต่างกัน (วิธีการประเมิน และปริมาณข้อมูลจีโนไทป์ที่ต่างกัน) ในการศึกษาในครั้งนี้ ค่าสหสัมพันธ์เชิงอันดับใช้วัดความสามารถของวิธีการประเมินพันธุ์กรรมที่ใช้ปริมาณข้อมูลจีโนไทป์ที่ต่างกัน (scenario 1 – 6) ต่อการจัดอันดับโคในกลุ่ม validation bulls คำนวณจาก Spearman's rank correlation (r_s) ระหว่างค่าพันธุ์กรรม (GEBV หรือ EBV) ที่วิเคราะห์ด้วย partial และ whole datasets สำหรับโคในกลุ่ม validation bulls นั่นคือ เปรียบเทียบการจัดอันดับเมื่อมีข้อมูลไม่สมบูรณ์ (partial datasets) กับเมื่อโคเหล่านี้มีข้อมูลสมบูรณ์ (whole dataset) ค่า r_s เข้าใกล้ 1 บ่งชี้ถึง

ความคล้ายคลึงกันของการจัดอันดับสัตว์ด้วยค่าพันธุ์กรรมที่ได้จากการวิเคราะห์ที่ต่างกัน (นั่นคือ บ่งบอกถึงความแม่นยำในการจัดอันดับสัตว์)

3) สัดส่วนของความแม่นยำของค่าพันธุ์กรรม (Ratio of accuracies)

ค่าสัดส่วนของความแม่นยำของค่าพันธุ์กรรม เป็นค่าสหสัมพันธ์เพียร์สันระหว่าง $\hat{u}_p$ และ $\hat{u}_w$ ($\hat{\rho}_{w,p}$) สำหรับโคในกลุ่ม validation bulls ซึ่งคำนวณจากชุดข้อมูล partial และ whole datasets ตามลำดับ โดยมีค่าคาดหวังเท่ากับสัดส่วนของความแม่นยำของ $\hat{u}_p$ ต่อ $\hat{u}_w$ หรือ $\frac{acc_p}{acc_w}$ ค่า $\hat{\rho}_{w,p}$ สามารถบ่งบอกถึงความสอดคล้อง (consistency) ของค่าพันธุ์กรรมที่ประเมินจากครั้งที่ต่างกัน (เช่น การประเมินพันธุ์กรรมด้วยโมเดล/วิธีการ และปริมาณข้อมูลที่ต่างกัน) ค่า $\hat{\rho}_{w,p}$ ที่สูง >0.70 แสดงว่าการประเมินพันธุ์กรรมด้วยชุดข้อมูล partial dataset (ตัดฟีโนไทป์ออก) ให้ผลที่ค่อนข้างใกล้เคียงกับการใช้ชุดข้อมูลสมบูรณ์ (whole dataset) (Macedo et al., 2020a) ในบริบทของศึกษาในครั้งนี้ สัดส่วนของความแม่นยำของค่าพันธุ์กรรมยังถูกประยุกต์ใช้เพื่อเปรียบเทียบผลของการเพิ่มข้อมูลจีโนไทป์แม่โคในประชากรอ้างอิงต่อการทำนายค่าพันธุ์กรรมจีโนม โดยเปรียบเทียบค่าพันธุ์กรรมที่วิเคราะห์ได้จากข้อมูลที่มีจำนวนข้อมูลจีโนไทป์แม่น้อยกว่า (partial dataset ใน scenarios 1 - 6) กับข้อมูลจีโนไทป์แม่โคทั้งหมด (whole dataset) ซึ่งค่า $\hat{\rho}_{w,p}$ ที่สูงสามารถบ่งบอกถึงความเพียงพอของข้อมูลจีโนไทป์แม่พันธุ์ที่เพิ่มเข้าไปในประชากรอ้างอิงในการทำนายค่าพันธุ์กรรมในอนาคตของสัตว์

4) ค่าการกระจายของค่าพันธุ์กรรม (Dispersion)

ค่าการกระจายของค่าพันธุ์กรรม ใช้บ่งบอกถึงความไม่มีอคติ (unbiasedness) ของค่าทำนายพันธุ์กรรม (ค่าพันธุ์กรรมไม่มีอคติ เมื่อ estimated breeding values = true breeding values) วัดได้จากค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย (regression coefficient, $\hat{b}_p$) ของค่าพันธุ์กรรม $\hat{u}_w$ ต่อ $\hat{u}_p$ สำหรับโคในกลุ่ม validation bulls ซึ่งค่าคาดหวังของ $\hat{b}_p = 1$ เมื่อการทำนายค่าพันธุ์กรรมไม่มีอคติ โดยหาก $\hat{b}_p < 1$ บ่งบอกว่าค่าพันธุ์กรรม $\hat{u}_p$ มีการกระจายตัว (หรือขนาด magnitude) ที่สูงกว่าปกติ (over-dispersion) ส่วน $\hat{b}_p > 1$ บ่งชี้ว่าค่าพันธุ์กรรม $\hat{u}_p$ มีการกระจาย (หรือขนาด) ที่ต่ำกว่าปกติ (under-dispersion) (Macedo et al., 2020a)

การจัดการข้อมูล การวิเคราะห์สถิติต่างๆ (เช่น descriptive statistics, Spearman's rank correlation และ Pearson's correlation) และการคำนวณที่ซับซ้อน อาศัยโปรแกรมทางสถิติสำเร็จรูป R (R Core Team, 2020)

ผลการทดลองและวิจารณ์

ความแม่นยำเชิงทฤษฎี (Theoretical accuracy)

Table 3 แสดงค่าเฉลี่ยของความแม่นยำเชิงทฤษฎี ($r_{individual}$) ของค่าพันธุ์กรรมของโคในกลุ่ม validation bulls ที่ประมาณด้วยโมเดลแบบดั้งเดิม (EBV) และโมเดลที่ใช้ข้อมูลจีโนม (GEBV) ซึ่งวิเคราะห์ด้วยประชากรอ้างอิงที่มีจำนวนข้อมูลจีโนไทป์แม่โคแตกต่างกัน สำหรับลักษณะ MY, FP, PP, TP, AFC

Table 3. Average theoretical accuracy ($r_{individual}$) of estimated breeding values based on pedigree (EBV) or genomic information (GEBV) with different information from cow genotypes; and analyzed using whole or partial datasets (SD in parentheses)

Trait ¹	No. of Validation bulls	No. of Daughters ²	Pedigree -Whole (EBV _w) ³	Genomic-Whole (GEBV _w) ⁴	Pedigree-partial (EBV _p) ⁵	Genomic-partial (GEBV _p) ⁶					
						Scen1 ⁷	Scen2	Scen3	Scen4	Scen5	Scen6
MY	26	71 (37)	0.93 (0.02)	0.94 (0.01)	0.62 (0.18)	0.77 (0.09)	0.77 (0.08)	0.78 (0.08)	0.79 (0.08)	0.79 (0.07)	0.80 (0.07)
FP	23	76 (38)	0.93 (0.02)	0.95 (0.02)	0.69 (0.13)	0.80 (0.07)	0.81 (0.07)	0.82 (0.06)	0.83 (0.06)	0.86 (0.05)	0.89 (0.03)
PP	23	70 (38)	0.96 (0.01)	0.97 (0.01)	0.80 (0.08)	0.87 (0.06)	0.87 (0.06)	0.88 (0.05)	0.89 (0.05)	0.91 (0.04)	0.93 (0.02)
TP	22	73 (38)	0.94 (0.02)	0.95 (0.01)	0.71 (0.12)	0.82 (0.07)	0.82 (0.07)	0.84 (0.06)	0.85 (0.05)	0.87 (0.05)	0.90 (0.03)
AFC	25	107 (31)	0.94 (0.01)	0.95 (0.01)	0.62 (0.14)	0.74 (0.09)	0.74 (0.09)	0.75 (0.09)	0.76 (0.08)	0.76 (0.08)	0.77 (0.08)
FS	18	224 (95)	0.82 (0.04)	0.85 (0.03)	0.51 (0.12)	0.66 (0.07)	0.66 (0.07)	0.67 (0.07)	0.68 (0.07)	0.69 (0.06)	0.70 (0.06)
Average	23	103	0.92	0.94	0.66	0.77	0.78	0.79	0.80	0.81	0.83

¹ MY = 305-d milk yield; FP = fat percentage; PP = protein percentage; TP = total solid percentage; AFC = age at first calving; FS = final score

² Average number of daughters of validation bulls

³ EBV_w = estimated breeding values from whole datasets; ⁴ GEBV_w = genomic estimated breeding values from whole datasets

⁵ EBV_p = estimated breeding values from partial datasets; ⁶ GEBV_p = genomic estimated breeding values from partial datasets

⁷ Scen1 = only genotyped bulls in reference population (RP), scen2, 3, 4, 5, and 6 = inclusion of genotyped cows born from 2543 to 2550, 2552, 2554, 2556, and 2558 (the Buddhist Era), respectively, in the bull reference population

และ FS โดยทั่วไปเมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยจากทุกลักษณะ พบว่า ค่าเฉลี่ย $r_{individual}$ ของค่าพันธุกรรมที่ได้จากชุดข้อมูล whole datasets (มีข้อมูลฟีโนไทป์สมบูรณ์) มีค่าสูง โดยค่า EBV ที่ได้จากวิธีแบบดั้งเดิมมีค่าเฉลี่ย $r_{individual}$ (0.92, range = 0.82 – 0.96) ต่ำกว่าค่าเฉลี่ย $r_{individual}$ ของ GEBV (0.94, range = 0.85 – 0.97) ที่ได้จากวิธีที่ใช้ข้อมูลจีโนมเล็กน้อย ความแม่นยำของการทำนายในระดับสูงดังกล่าวเกิดจากจำนวนลูกสาวของพ่อโคตรวจสอบมีมากเพียงพอ (จำนวนลูกสาว เฉลี่ย 70 ถึง 224 ตัว, Table 3) นอกจากนี้ความแตกต่างของความแม่นยำเชิงทฤษฎีของลักษณะที่ศึกษาขึ้นอยู่กับการอัตราพันธุกรรม โดยจะเห็นว่าค่าเฉลี่ย $r_{individual}$ สำหรับลักษณะ FS มีค่าต่ำที่สุด (0.82 และ 0.85 สำหรับ EBV และ GEBV ตามลำดับ) เนื่องจากมีอัตราพันธุกรรมค่อนข้างต่ำ (0.03) ประกอบกับ FS มีปริมาณข้อมูลฟีโนไทป์น้อยกว่าลักษณะอื่นๆ (Table 2)

เมื่อทำนายค่าพันธุกรรมโดยใช้ข้อมูลที่ตัดฟีโนไทป์จากชุดข้อมูลเต็มออก (partial datasets) เพื่อจำลองสถานการณ์การประเมินพันธุกรรมในขณะที่พ่อโคอายุยังน้อย ค่า GEBV ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยข้อมูลจีโนมทั้งหมด (scenario 6: ใช้ข้อมูลจีโนมทั้งพ่อพันธุ์และแม่โคทั้งหมด) มีความแม่นยำเชิงทฤษฎีโดยเฉลี่ยจากทุกลักษณะ (0.83) สูงกว่าค่าดังกล่าวของ EBV (0.66) ที่ได้จากการประเมินพันธุกรรมแบบดั้งเดิม (pedigree-based) โดยมีการเพิ่มขึ้น ของค่า $r_{individual}$ เท่ากับ 0.17 (gain in accuracy: $r_{individual}$ of GEBV - $r_{individual}$ of EBV) ($\approx 25.7\%$) ค่าความแม่นยำเชิงทฤษฎีที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สูงกว่าที่เคยรายงานไว้ก่อนหน้านี้โดย สายัณห์ และคณะ (2563) และ Buaban et al. (2021) ที่ทำนายค่าพันธุกรรมของโคนมไทยสำหรับลักษณะเดียวกัน ทั้งค่า GEBV (และ EBV) ที่วิเคราะห์ด้วย whole และ partial datasets ซึ่งผลที่พบดังกล่าวเกิดเนื่องจากปริมาณข้อมูลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีมากขึ้น (ทั้งข้อมูลจีโนมและฟีโนไทป์) ยกตัวอย่างเช่น จำนวนสัตว์ที่มีข้อมูลจีโนมสำหรับลักษณะ MY เท่ากับ 876 และ 2,774 ตัว ในการศึกษาของ Buaban et al. (2021) และการศึกษาในครั้งนี้ ตามลำดับ

ผลของการเพิ่มจำนวนข้อมูลจีโนมแม่โคในประชากรอ้างอิงต่อการทำนายค่าพันธุกรรม ซึ่งวิเคราะห์ด้วยชุดข้อมูล partial datasets (scenario 1 – 6) เมื่อพิจารณาจากทุกลักษณะ พบว่าค่าเฉลี่ย $r_{individual}$ จากทุกสถานการณ์ที่มีการเพิ่มข้อมูลจีโนมแม่โคในประชากรอ้างอิง ($r_{individual}$ = 0.78 – 0.81 ใน scenarios 2 – 5) มีค่าสูงกว่าเมื่อประชากรอ้างอิงมีเฉพาะข้อมูลจีโนมของพ่อพันธุ์ ($r_{individual}$ = 0.77 ใน scenario 1) และสูงกว่าการประเมินด้วยวิธีแบบดั้งเดิม ($r_{individual}$ = 0.66) โดยค่าเฉลี่ย $r_{individual}$ ค่อยๆ สูงขึ้นตามจำนวนข้อมูลจีโนมแม่โคที่มากขึ้น คิดเป็น 0.5% (scenario 2) 1.9% (scenario 3) 3.0% (scenario 4) 4.9% (scenario 5) และ 7.0% (scenario 6) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ข้อมูลจีโนมของพ่อพันธุ์เพียงอย่างเดียว (scenario 1) และการเพิ่มขึ้นดังกล่าว คิดเป็น 17.3 – 25.5% เมื่อเปรียบเทียบกับการประเมินพันธุกรรมแบบดั้งเดิม ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับเมื่อพิจารณาเป็นรายลักษณะ (เช่น สำหรับลักษณะ MY (FS) ค่าเฉลี่ย $r_{individual}$ เท่ากับ 0.77 (0.66), 0.78 (0.67) และ 0.80 (0.70) สำหรับ scenarios 1, 3, และ 6 ตามลำดับ) เป็นที่น่าสังเกตว่า สำหรับลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม แม้ว่า MY จะมีอัตราพันธุกรรมสูงกว่า

แต่ค่าความแม่นยำในการทำนายพันธุกรรมจีโนม ($0.77 - 0.80$) ต่ำกว่าลักษณะ FP ($0.80 - 0.89$), PP ($0.87 - 0.93$) และ TP ($0.82 - 0.90$) ซึ่งอาจเกิดจาก MY เป็นลักษณะที่ถูกคัดเลือกอย่างเข้มข้น (intensely selected trait) ในประชากรโคนมของไทย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lourenco et al. (2014) ที่พบว่าค่าความเชื่อมั่นของการทำนายสำหรับลักษณะปริมาณไขมันและปริมาณโปรตีนมีค่าต่ำกว่าลักษณะปริมาณน้ำนม โดยที่ปริมาณไขมันและปริมาณโปรตีนเป็นลักษณะที่ถูกคัดเลือกอย่างเข้มข้นในประชากรโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ของประเทศอิสราเอล และสอดคล้องกับ VanRaden et al. (2009) และ Bijma (2012) ที่สรุปว่าค่าความเชื่อมั่นที่แท้จริงของการทำนายพันธุกรรม (realized reliability) อาจมีค่าต่ำกว่าค่าความเชื่อมั่นเชิงทฤษฎี (ค่ายกกำลังสองของ $r_{individual}$) ถ้าหากลักษณะนั้นเป็นลักษณะที่ถูกคัดเลือกโดยตรง

จะเห็นได้ว่า แม้ว่าจำนวนข้อมูลจีโนไทป์แม่โคในประชากรอ้างอิงเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนข้อมูลจีโนไทป์พ่อพันธุ์ (เช่น จำนวนข้อมูลจีโนไทป์พ่อโค เท่ากับ 183 ตัว ส่วนจำนวนข้อมูลจีโนไทป์แม่โค เท่ากับ 203, 1,068 และ 2,275 ตัว ใน scenarios 2, 4, และ 6 ตามลำดับ สำหรับลักษณะปริมาณและองค์ประกอบน้ำนม) แต่ความแม่นยำเชิงทฤษฎีของค่าพันธุกรรมสำหรับ validation bulls เพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีมีข้อมูลจีโนไทป์พ่อโคเพียงอย่างเดียว (maximum gain $\approx 7\%$) ซึ่งสอดคล้องกับค่าความเชื่อมั่น (reliability) ที่เพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยจากการเพิ่มข้อมูลจีโนไทป์แม่วัวเข้าไปร่วมในการประเมินพันธุกรรมโดย Lourenco et al. (2014) ซึ่งผลดังกล่าวเกิดจากคุณค่าของข้อมูลจากโคเพศเมียมีน้อยกว่าโคเพศผู้ เนื่องจากค่าความเชื่อมั่นของค่าพันธุกรรมที่ต่ำกว่าโคเพศผู้ที่ผ่านการทดสอบลูกสาว (Misztal et al., 2013; Boichard et al., 2015) ดังนั้น ประชากรอ้างอิงของโคเพศเมียจึงจำเป็นต้องมีขนาดใหญ่กว่าของโคเพศผู้อย่างมากเพื่อให้ได้ความแม่นยำของการทำนายพันธุกรรมที่เท่ากัน (Boichard et al., 2015) Boichard et al (2015) สาธิตให้เห็นว่า สำหรับลักษณะที่มีอัตราพันธุกรรมเท่ากับ 0.30 และแม่โคมีข้อมูลฟีโนไทป์หนึ่งข้อมูล (single records) จะต้องใช้ข้อมูลจีโนไทป์แม่โค จำนวน 21 ตัว เพื่อให้ได้ปริมาณข้อมูลเทียบเท่ากับพ่อโคที่ผ่านการทดสอบลูกสาวหนึ่งตัวที่มีค่า reliability ของค่าพันธุกรรมเท่ากับ 0.90 และจำนวนข้อมูลจีโนไทป์แม่โคที่ต้องการดังกล่าวจะเพิ่มมากยิ่งขึ้นเมื่ออัตราพันธุกรรมมีค่าต่ำลง โดย Pryce et al. (2012) ได้ประมาณค่าความเชื่อมั่นของการทำนายว่าอาจสูงถึง 7% เมื่อนำข้อมูลจีโนไทป์แม่โค 10,000 ตัว รวมเข้ากับข้อมูลจีโนไทป์พ่อโค 3,000 ตัว

ผลการศึกษาที่พบว่า การใช้ข้อมูลจีโนไทป์แม่โคร่วมกับพ่อโคในการคัดเลือกด้วยจีโนมเพื่อเพิ่มขนาดประชากรอ้างอิงช่วยเพิ่มความแม่นยำของค่าพันธุกรรม สอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้านี้สำหรับลักษณะเดียวกัน เช่น การศึกษาในโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ของประเทศออสเตรเลียพบความเชื่อมั่นเพิ่มขึ้น 4 - 8% (Pryce et al., 2012) การศึกษาในโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ของประเทศอิสราเอลโดย Lourenco et al. (2014) ที่พบว่าความเชื่อมั่นเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย และผลที่รายงานในโคนมพันธุ์เจอร์ซี่ของกลุ่มประเทศนอร์ดิกที่พบความเชื่อมั่นเพิ่มขึ้น 1.9 - 4.5% (Gao et al., 2015) แต่ต่ำกว่าผลที่รายงานไว้ในโคนมพันธุ์กีร์ของประเทศบราซิลซึ่งพบว่าความเชื่อมั่นเพิ่มขึ้น 14% (Boison et al., 2017) เป็นต้น ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ที่การเพิ่มขึ้นของความแม่นยำต่ำกว่าบางการศึกษาก่อนหน้านี้ เกิดจากประชากรอ้างอิงมีขนาดเล็กกว่ามาก (ทั้ง

ข้อมูลจีโนไทป์โคเพศผู้และเพศเมีย) ทั้งนี้ การเพิ่มขึ้นของความแม่นยำที่แตกต่างกันเมื่อเพิ่มขนาดประชากรอ้างอิงด้วยข้อมูลจีโนไทป์โคเพศเมียในการศึกษาต่างๆ น่าจะขึ้นอยู่กับจำนวนข้อมูลจีโนไทป์พ่อพันธุ์ในประชากรอ้างอิงเดิม และสัดส่วนของข้อมูลจีโนไทป์แม่โคที่เพิ่มเข้าไปในประชากรอ้างอิง (Gao et al., 2015) โดยเมื่อประชากรอ้างอิงมีจำนวนข้อมูลจีโนไทป์พ่อพันธุ์มากเพียงพอแล้ว การเพิ่มขึ้นของความเชื่อมั่นของค่าพันธุ์กรรมมีไม่มากดังเช่นในโคนมโฮลสไตน์ของประเทศสหรัฐอเมริกา (Cooper et al., 2015) นอกจากนี้วิธีการหรือโมเดลที่ใช้ในการประเมินพันธุ์กรรมที่ต่างกักัน (เช่น multi-step และ sing-step) น่าจะมีอิทธิพลต่อผลลัพธ์ที่ได้จากการเพิ่มข้อมูลจีโนไทป์โคเพศเมียในประชากรอ้างอิงด้วยเช่นกัน

ค่าสหสัมพันธ์เชิงอันดับ (Rank correlation)

Table 4 แสดงค่าความแม่นยำในการจัดอันดับสัตว์ด้วยค่าพันธุ์กรรม ซึ่งแสดงด้วยค่า Spearman's rank correlation (r_s) ระหว่างค่าพันธุ์กรรมที่วิเคราะห์จากชุดข้อมูล partial และ whole datasets โดยใช้ r_s เพื่อวัดระดับความคล้ายคลึงกัน (degree of similarity) ของการจัดอันดับโคในกลุ่ม validation bulls ด้วยค่าพันธุ์กรรมที่ได้จากการประเมินที่ต่างกัน (ทั้งวิธีการประเมิน และจำนวนข้อมูลจีโนไทป์ที่ต่างกัน) โดยทั่วไป เมื่อพิจารณาจากทุกลักษณะพบว่าค่าเฉลี่ยของ r_s สำหรับโคในกลุ่ม validation bulls ที่ได้จากการประเมินพันธุ์กรรมแบบดั้งเดิม (0.26) มีค่าต่ำกว่าการทำนายพันธุ์กรรมจีโนมที่ใช้เฉพาะข้อมูลจีโนไทป์พ่อพันธุ์ (0.38 ใน scenario 1) และต่ำกว่าเมื่อมีการเพิ่มข้อมูลจีโนไทป์แม่โคเข้าไปในประชากรอ้างอิง (0.40 – 0.47 ใน scenarios 2 – 6) โดยค่า r_s มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อประชากรอ้างอิงมีจำนวนข้อมูลจีโนไทป์แม่โคมากขึ้น ผลที่ได้บ่งชี้ได้ว่า วิธีการประเมินพันธุ์กรรมแบบ ssGBLUP และการเพิ่มข้อมูลจีโนไทป์แม่โคเข้าไปในประชากรอ้างอิง (scenarios 2 – 6) ช่วยเพิ่มความสามารถในการจัดอันดับสัตว์เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการประเมินพันธุ์กรรมแบบดั้งเดิมสำหรับลักษณะที่ศึกษา

Table 4. Estimates of Spearman's rank correlations (r_s) between estimated breeding values (EBV or GEBV) analyzed using partial and whole datasets; and with different information from cow genotypes

Method ¹	Scenario ²	Trait ³						
		MY	FP	PP	TP	AFC	FS	Average
Genomic	Scen1	0.65	0.49	0.41	0.35	0.28	0.14	0.38
	Scen2	0.66	0.42	0.49	0.45	0.29	0.21	0.42
	Scen3	0.72	0.39	0.47	0.36	0.30	0.17	0.40
	Scen4	0.72	0.44	0.49	0.45	0.30	0.15	0.43
	Scen5	0.76	0.40	0.68	0.58	0.29	0.15	0.47
	Scen6	0.75	0.36	0.62	0.64	0.31	0.14	0.47
Pedigree	-	0.58	0.24	0.39	0.22	0.13	0.01	0.26

¹ Genomic = genomic-based evaluations, Pedigree = traditional pedigree-based evaluations

² Scen1 = only genotyped bulls in reference population (RP), scen2, 3, 4, 5, and 6 = inclusion of genotyped cows born from 2543 to 2550, 2552, 2554, 2556, and 2558 (the Buddhist Era), respectively, in the bull reference population

³ MY = 305-d milk yield; FP = fat percentage; PP = protein percentage; TP = total solid percentage, AFC = age at first calving, FS = final score

เมื่อพิจารณารายลักษณะ พบว่าเมื่อเพิ่มข้อมูลจีโนไทป์แม่โคเข้าไปในประชากรอ้างอิงพ่อพันธุ์ (scenarios 2 – 6) ลักษณะปริมาณน้ำนมที่ 305 วัน มีค่าความสัมพันธ์ของการจัดอันดับในระดับสูง (0.66 – 0.75) และสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเมื่อประชากรอ้างอิงมีเฉพาะข้อมูลจีโนไทป์พ่อพันธุ์ (0.65) โดยค่า r_s มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อประชากรอ้างอิงมีจำนวนข้อมูลจีโนไทป์แม่โคมากขึ้น โดยเมื่อเพิ่มจำนวนข้อมูลจีโนไทป์แม่โคที่เกิดขึ้นถึงปี พ.ศ. 2552 (ค.ศ. 2009) หรือมากกว่า (scenarios 3 – 6) การจัดอันดับโคด้วยค่าทำนายพันธุ์กรรมจีโนมที่ได้จากชุดข้อมูล partial datasets ค่อนข้างมีความคล้ายคลึงกันกับการจัดอันดับด้วยค่าทำนายพันธุ์กรรมจีโนมที่ได้จากชุดข้อมูล whole dataset ซึ่งมีข้อมูลจีโนไทป์และฟีโนไทป์ที่สมบูรณ์ (0.72 – 0.75 ใน scenarios 3 – 6) ดังนั้น ผลที่ได้จากค่าสหสัมพันธ์เชิงอันดับสำหรับลักษณะ MY จึงอาจกล่าวเป็นนัยได้ว่าการทำนายพันธุ์กรรมจีโนมในอนาคตสำหรับปริมาณน้ำนมที่ 305 วัน สำหรับโคหนุ่มอายุน้อยด้วยประชากรอ้างอิงที่มีจำนวนข้อมูลจีโนไทป์แม่โคที่มากเพียงพอร่วมกับข้อมูลจีโนไทป์พ่อพันธุ์ (ใน scenarios 3 – 5) สามารถช่วยให้การจัดอันดับสัตว์ถูกต้องสูงพอสมควรเมื่อเปรียบเทียบค่าทำนายพันธุ์กรรมที่ได้จากช่วงเวลาโคเหล่านี้มีข้อมูลผลผลิตน้ำนมของลูกสาว (whole datasets) เป็นที่น่าสังเกตว่า ในสถานการณ์ที่ใช้ข้อมูลจีโนไทป์แม่โคทั้งหมด (scenario 6) จะมีค่า r_s ต่ำกว่าในสถานการณ์ที่มีจำนวนข้อมูลจีโนไทป์แม่โคน้อยกว่า (scenario 5) เล็กน้อย ($r_s = 0.75$ และ 0.76 ตามลำดับ) ซึ่งความผันผวนดังกล่าวอาจเกิดขึ้นได้เนื่องจากจำนวน validation bulls มีจำนวนจำกัด

สำหรับลักษณะอื่นๆ นอกเหนือจาก MY การทำนายค่าพันธุ์กรรมจีโนมของโคกลุ่ม validation bulls เมื่อประชากรอ้างอิงถูกเพิ่มขนาดด้วยข้อมูลจีโนไทป์แม่โค (scenarios 2 – 6) มีค่าความสัมพันธ์ของการจัดอันดับที่สูงกว่าเมื่อประชากรอ้างอิงมีเฉพาะข้อมูลจีโนไทป์พ่อพันธุ์ (scenario 1) โดยการใช้ข้อมูลจีโนไทป์แม่โคในจำนวนที่แตกต่างกัน ค่า r_s มีค่าอยู่ในระดับปานกลางสำหรับ FP (0.36 – 0.42) ระดับปานกลางถึงสูงสำหรับ PP และ TP (0.36 – 0.68) ระดับต่ำสำหรับ AFC (0.29 – 0.31) และระดับต่ำมากสำหรับ FS (0.14 – 0.21) โดยทุกลักษณะดังกล่าวพบความผันผวนของค่า r_s เมื่อใช้จำนวนข้อมูลจีโนไทป์แม่โคในสถานการณ์ต่างๆ เช่นเดียวกับที่พบใน MY ซึ่งสามารถอธิบายได้ในทำนองเดียวกัน การเพิ่มจำนวน validation bulls มากขึ้นน่าจะช่วยลดความผันผวนของค่า r_s ได้

ในทางการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ค่าสหสัมพันธ์เชิงอันดับของสเปียร์แมนมีความสำคัญโดยใช้สำหรับเปรียบเทียบความคงที่ (stability) ของค่าพันธุ์กรรม วัดความสามารถในการจัดอันดับสัตว์ และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงอันดับสัตว์ (re-ranking) เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงโมเดลหรือวิธีการในการประเมินพันธุ์กรรม (เช่น Schenkel et al., 2002; Zhang et al., 2010; Renzo et al., 2021) โดยเปรียบเทียบค่าพันธุ์กรรมที่ได้ในกลุ่มสัตว์ที่สนใจ เช่น สัตว์ทุกตัว พ่อพันธุ์ทุกตัว พ่อพันธุ์อายุน้อย หรือ พ่อพันธุ์ชั้นเลิศ เป็นต้น สำหรับ

การศึกษาในครั้งนี้ การเปรียบเทียบอันดับสัตว์ทำในโคกลุ่ม validation bulls ซึ่งสมมุติให้เป็นตัวแทนของโคหนุ่มที่ยังไม่มีข้อมูลผลผลิตหรือฟีโนไทป์ของลูกสาว (นั่นคือ เป็น selection candidates) โดยเปรียบเทียบการจัดอันดับโคเหล่านี้ด้วยค่าพันธุกรรมจีโนมที่วิเคราะห์จากประชากรอ้างอิงที่มีจำนวนข้อมูลจีโนไทป์แม่โคที่แตกต่างกัน (partial datasets: scenarios 1 – 6) เปรียบเทียบกับเมื่อโคเหล่านี้มีข้อมูลฟีโนไทป์ลูกสาว (อายุ 5 – 7 ปี โดยประมาณ) และมีข้อมูลจีโนไทป์ที่สมบูรณ์ (วิเคราะห์ด้วย whole dataset) โดยประยุกต์ใช้ LR method (Legarra and Reverter. 2018) สำหรับเปรียบเทียบค่าพันธุกรรมที่ได้จากการประเมินในครั้งที่ต่างกัน ด้วยค่าสหสัมพันธ์เชิงอันดับสเปียร์แมน จากการสืบค้นข้อมูลงานวิจัยก่อนหน้านี้ ยังไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบการจัดอันดับสัตว์ด้วยค่าสหสัมพันธ์เชิงอันดับในวิธีดังกล่าวแต่อย่างใด

สัดส่วนความแม่นยำของค่าพันธุกรรม (Ratio of accuracies)

Table 5. Estimates of ratio of accuracies ($\hat{\rho}_{w,p}$) between estimated breeding values (EBV or GEV) analyzed using partial and whole datasets; and with different information from cow genotypes

Method ¹	Scenario ²	Trait ³						
		MY	FP	PP	TP	AFC	FS	Average
Genomic	Scen1	0.64	0.49	0.40	0.42	0.21	0.15	0.38
	Scen2	0.65	0.44	0.46	0.45	0.22	0.17	0.40
	Scen3	0.67	0.41	0.48	0.47	0.22	0.16	0.40
	Scen4	0.70	0.44	0.54	0.53	0.21	0.17	0.43
	Scen5	0.72	0.37	0.65	0.59	0.19	0.14	0.44
	Scen6	0.72	0.41	0.65	0.62	0.20	0.13	0.46
Pedigree	-	0.62	0.20	0.43	0.21	0.14	0.09	0.28

¹ Genomic = genomic-based evaluations, Pedigree = traditional pedigree-based evaluations

² Scen1 = only genotyped bulls in reference population (RP), scen2, 3, 4, 5, and 6 = inclusion of genotyped cows born from 2543 to 2550, 2552, 2554, 2556, and 2558 (the Buddhist Era), respectively, in the bull reference population

³ MY = 305-d milk yield; FP = fat percentage; PP = protein percentage; TP = total solid percentage, AFC = age at first calving, FS = final score

Table 5 แสดงค่าสัดส่วนของความแม่นยำของค่าพันธุกรรมของโคกลุ่ม validation bulls ซึ่งเป็นค่าสหสัมพันธ์ระหว่างค่าพันธุกรรมที่วิเคราะห์ด้วยชุดข้อมูล partial และ whole datasets ($\hat{\rho}_{w,p}$) โดยค่าที่สูง (เช่น >0.70) บ่งบอกว่าความแม่นยำในการทำนายมีค่าสูงเมื่อวิเคราะห์ด้วยข้อมูล partial datasets แม้ว่าไม่มีข้อมูลผลผลิตของลูกสาว (Macedo et al., 2020a) โดยภาพรวมเมื่อพิจารณาจากทุกลักษณะพบว่า การประเมินพันธุกรรมจีโนมด้วยวิธี ssGBLUP ให้ค่าเฉลี่ยของ $\hat{\rho}_{w,p}$ ในระดับปานกลาง (0.38 – 0.46) ซึ่งสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการแบบดั้งเดิม (0.28) นอกจากนี้ การใช้ข้อมูลจีโนไทป์แม่โคร่วมในการวิเคราะห์

(scenarios 2 – 6) ส่งผลให้ค่า $\hat{\rho}_{w,p}$ (0.40 – 0.46) สูงมากกว่าการใช้เฉพาะข้อมูลจีโนไทป์พ่อพันธุ์ (0.38 ใน scenario 1) โดยการเพิ่มขึ้นของค่า $\hat{\rho}_{w,p}$ ค่อยๆ มากขึ้นตามลำดับตามจำนวนข้อมูลจีโนไทป์แม่โคที่มากขึ้น ซึ่งผลที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าการคัดเลือกด้วยจีโนมด้วยวิธี ssGBLUP และการเพิ่มขนาดประชากรอ้างอิงด้วยการเพิ่มข้อมูลจีโนไทป์แม่โคแบบสะสม ทำให้ค่าทำนายพันธุ์กรรมของโคมีค่าใกล้เคียงกับค่าในอนาคตกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีประเมินพันธุ์กรรมแบบดั้งเดิมที่ไม่ใช้ข้อมูลจีโนม (กล่าวอีกอย่างหนึ่งคือ วิธี ssGBLUP ที่ประชากรอ้างอิงมีเฉพาะข้อมูลจีโนไทป์พ่อพันธุ์ และมีข้อมูลจีโนไทป์แม่พันธุ์เพิ่มแบบสะสม ให้ความแม่นยำในการทำนายค่าพันธุ์กรรมสูงกว่าวิธีแบบดั้งเดิม แม้ว่าจะยังไม่มีข้อมูลฟีโนไทป์ของลูกสาว) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าวิธี ssGBLUP ให้ค่าสัดส่วนของความแม่นยำสูงกว่าวิธีแบบดั้งเดิม (Macedo et al., 2020a; Sungkhapreecha et al., 2021) โดย Sungkhapreecha et al. (2021) รายงานผลการทำนายพันธุ์กรรมการทนร้อนของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ของไทยว่าวิธี ssGBLUP ดีกว่าวิธีแบบดั้งเดิมทั้งในแง่ของความแม่นยำของการทำนาย ค่าสัดส่วนของความแม่นยำของค่าพันธุ์กรรม และค่าอคติของการทำนายสำหรับลักษณะปริมาณน้ำนม

เมื่อพิจารณารายลักษณะ พบว่าลักษณะที่เกี่ยวข้องกับการให้ผลผลิตน้ำนม มีค่า $\hat{\rho}_{w,p}$ สูงกว่าลักษณะ AFC และ FS ในสถานการณ์ที่เหมือนกัน ยกตัวอย่างเช่น การประเมินพันธุ์กรรมจีโนมด้วยข้อมูลจีโนไทป์พ่อพันธุ์เพียงอย่างเดียว (scenario 1) มีค่า $\hat{\rho}_{w,p}$ ตั้งแต่ 0.40 – 0.64 สำหรับ MY, FP, PP และ TP และมีค่าตั้งแต่ 0.15 – 0.21 สำหรับ AFC และ FS และให้ผลสอดคล้องกับในสถานการณ์อื่นๆ เป็นที่น่าสังเกตว่าลักษณะ MY มีค่า $\hat{\rho}_{w,p}$ สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะอื่นๆ ในทุกสถานการณ์ โดยมีค่า ≥ 0.70 ใน scenario 4 - 6 (เพิ่มข้อมูลจีโนไทป์แม่โคที่เกิดปี พ.ศ. 2554 – 2558 เข้าไปในประชากรอ้างอิงเดิม) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สำหรับลักษณะปริมาณน้ำนมที่ 305 วัน การใช้ข้อมูลจีโนไทป์แม่โคที่เกิดจนถึงปี พ.ศ. 2554 ร่วมในการประเมินพันธุ์กรรม (นั่นคือ ไม่ใช้ข้อมูลจีโนไทป์แม่โคที่เกิดหลังปี พ.ศ. 2554 หรือกลุ่มแม่โครุ่นใหม่) ค่าทำนายพันธุ์กรรมของโคหนุ่ม validation bulls มีค่าค่อนข้างใกล้เคียงกับค่าพันธุ์กรรมในอนาคตในขณะที่โคเหล่านี้มีข้อมูลผลผลิตน้ำนมของลูกสาว (Macedo et al., 2020a) การเพิ่มจำนวนข้อมูลจีโนไทป์แม่โคเข้าไปในประชากรอ้างอิงมีแนวโน้มช่วยให้ค่า $\hat{\rho}_{w,p}$ สูงมากขึ้นเรื่อยๆ สำหรับลักษณะ PP และ TP แต่ผลที่ได้ดังกล่าวมีความแตกต่างจากลักษณะ FP, AFC และ FS ที่พบความผันผวนของการเปลี่ยนแปลงค่า $\hat{\rho}_{w,p}$ (FP และ FS) หรือแทบไม่เปลี่ยนแปลง (AFC) ซึ่งผลดังกล่าวอาจเกิดจากพื้นฐานทางพันธุ์กรรมของลักษณะ (genetic background) จำนวน validation bulls ที่มีจำกัด รวมถึงปัจจัยอื่นๆ ซึ่งควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคตสำหรับลักษณะ AFC และ FS ซึ่งพบว่าค่า $\hat{\rho}_{w,p}$ ที่ได้จากการประเมินพันธุ์กรรมแบบดั้งเดิม (0.09 – 0.14) และแบบที่ใช้ข้อมูลจีโนม (0.13 – 0.22) มีค่าค่อนข้างต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับลักษณะอื่นๆ และสอดคล้องกับผลที่พบสำหรับความแม่นยำเชิงทฤษฎี และค่าสหสัมพันธ์เชิงอันดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าข้อมูลฟีโนไทป์ของลูกสาวมีความสำคัญ และการเพิ่มขนาดประชากรอ้างอิงให้มีจำนวนข้อมูลจีโนไทป์มากขึ้น (ทั้งพ่อและแม่พันธุ์) รวมถึงจำนวนสัตว์ที่ใช้ตรวจสอบ (validation animals) มีความจำเป็นเพื่อเพิ่มความแม่นยำในการทำนายค่าพันธุ์กรรม

นอกจากนี้ จะเห็นได้ว่าทุกลักษณะที่ศึกษา มีความสอดคล้องกันของค่าความแม่นยำเชิงทฤษฎี ค่าสหสัมพันธ์เชิงอันดับ และค่าสัดส่วนความแม่นยำของค่าพันธุ์กรรม (การวิเคราะห์โดยใช้ข้อมูลจีโนไทป์ด้วยวิธี ssGBLUP ดีกว่าวิธีแบบดั้งเดิม) เนื่องจากการใช้ข้อมูลจีโนมช่วยเพิ่มความเชื่อมั่นของค่าพันธุ์กรรมที่คำนวณ โดยไม่มีข้อมูลบันทึกฟีโนไทป์ของลูกสาว ซึ่งผลที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ ก่อนหน้า (เช่น Guarini et al., 2019; Buaban et al., 2021; Sungkhapreecha et al., 2021)

การกระจายตัวของค่าทำนายพันธุ์กรรม (Dispersion)

Table 6 แสดงค่าการกระจายตัวของค่าทำนายพันธุ์กรรมสำหรับโคกลุ่ม validation bulls ที่แสดงด้วยค่าสัมประสิทธิ์การถดถอย ($\hat{b}_p$) ของค่าพันธุ์กรรมที่วิเคราะห์ด้วยชุดข้อมูล whole dataset ($\hat{u}_w$) ต่อ partial datasets ($\hat{u}_p$) ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงความไม่สอดคล้องของการทำนายค่าพันธุ์กรรม EBV ด้วยวิธีดั้งเดิม และค่าพันธุ์กรรม GEBV ด้วยวิธีที่ใช้ข้อมูลจีโนม โดยค่า $\hat{b}_p$ ใกล้เคียง 1 บ่งชี้ว่าการทำนายค่าพันธุ์กรรมของสัตว์ไม่มีอคติ (Macedo et al., 2020b) เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยจากทุกลักษณะพบว่า วิธีประเมินพันธุ์กรรมแบบดั้งเดิม และวิธีที่ใช้ข้อมูลจีโนมมีค่าพันธุ์กรรม $\hat{u}_p$ สูงเกินจริง (over-dispersion of EBV and GEBV) อย่างไรก็ตาม การประเมินพันธุ์กรรมที่ใช้ข้อมูลจีโนไทป์ทุกสถานการณ์มีความอคติน้อยกว่าวิธีแบบดั้งเดิม (ค่าเฉลี่ย $\hat{b}_p$ เท่ากับ 0.54 – 0.75 และ 0.36 ตามลำดับ) ในภาพรวม เมื่อพิจารณาการประเมินพันธุ์กรรมที่ใช้ข้อมูลจีโนไทป์แม่โคทั้งหมดรวมกับข้อมูลจีโนไทป์พ่อโค (scenario 6) พบว่าค่า GEBV ของ validation bulls มีค่าสูงเกินจริงสำหรับลักษณะ MY (0.69), FP (0.67), AFC (0.16) และ FS (0.18) (นั่นคือ ค่าทำนาย GEBV ของโคในอนาคตมีค่าสูงกว่าค่าที่ประเมินได้เมื่อโคเหล่านี้มีข้อมูลบันทึกฟีโนไทป์ของลูกสาว) แต่มีค่าต่ำเกินจริง (under-dispersion) สำหรับลักษณะ PP (1.39) และ TP (1.42) (นั่นคือ ค่าทำนาย GEBV ของโคในอนาคตมีค่าต่ำกว่าค่าที่ประเมินได้เมื่อโคเหล่านี้มีข้อมูลบันทึกฟีโนไทป์ของลูกสาว) อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้วิธีแบบดั้งเดิม พบว่าค่า EBV มีความอคติมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดสำหรับทุกลักษณะที่ศึกษา เนื่องจากค่า $\hat{b}_p$ ห่างจาก 1 มากกว่า

Table 6. Estimates of dispersion ($\hat{b}_p$) between estimated breeding values (EBV or GEBV) analyzed using partial and whole datasets; and with different information from cow genotypes

Method ¹	Scenario ²	Trait ³						
		MY	FP	PP	TP	AFC	FS	Average
Genomic	Scen1	0.63	0.62	0.76	0.92	0.16	0.17	0.54
	Scen2	0.61	0.55	0.87	0.95	0.17	0.21	0.56
	Scen3	0.62	0.61	0.89	1.09	0.17	0.20	0.60
	Scen4	0.65	0.64	0.97	1.13	0.17	0.22	0.63
	Scen5	0.67	0.59	1.24	1.36	0.16	0.19	0.70
	Scen6	0.69	0.67	1.39	1.42	0.16	0.18	0.75
Pedigree	-	0.46	0.27	0.77	0.43	0.10	0.11	0.36

¹ Genomic = genomic-based evaluations, Pedigree = traditional pedigree-based evaluations

² Scen1 = only genotyped bulls in reference population (RP), scen2, 3, 4, 5, and 6 = inclusion of genotyped cows born from 2543 to 2550, 2552, 2554, 2556, and 2558 (the Buddhist Era), respectively, in the bull reference population

³ MY = 305-d milk yield; FP = fat percentage; PP = protein percentage; TP = total solid percentage, AFC = age at first calving, FS = final score

นอกจากนี้ การเพิ่มข้อมูลจีโนไทป์แม่โคในการประเมินพันธุกรรมช่วยลดการเกิดค่าสูงเกินจริงของค่าพันธุกรรม (over-dispersion) ในทุกลักษณะ (ค่าเฉลี่ย $\hat{b}_p = 0.56 - 0.75$ ใน scenarios 2 – 6, Table 6) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เฉพาะข้อมูลจีโนไทป์พ่อพันธุ์ (ค่าเฉลี่ย $\hat{b}_p = 0.54$ ใน scenarios 1) โดยค่าเฉลี่ย $\hat{b}_p$ มีแนวโน้มเข้าใกล้ 1 (ค่าทำนายพันธุกรรมไม่มีอคติ) ตามปริมาณข้อมูลจีโนไทป์ที่มากขึ้น อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาเป็นรายลักษณะ พบว่าค่า $\hat{b}_p$ มีความผันแปรแตกต่างกัน โดยลักษณะ MY, PP และ TP ค่า $\hat{b}_p$ มีแนวโน้มสูงขึ้นตามจำนวนข้อมูลจีโนไทป์ที่มากขึ้น ในขณะที่การเปลี่ยนแปลงของค่า $\hat{b}_p$ สำหรับ FP, AFC และ FS ไม่มีรูปแบบที่ชัดเจน Tsuruta et al. (2011) ได้แนะนำว่าค่า $\hat{b}_p$ ที่เบี่ยงเบนไปจาก 1 ภายใน $\pm 15\%$ ถือว่ายอมรับได้ (นั่นคือ 0.85 – 1.15) เมื่อพิจารณาผลจากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าค่า $\hat{b}_p$ ที่ยอมรับได้พบใน scenarios 2 – 4 สำหรับ PP (0.87 – 0.97) และ scenarios 1 – 4 สำหรับ TP (0.92 – 1.13) แต่เมื่อปริมาณข้อมูลจีโนไทป์แม่โคค่อยๆ สะสมเพิ่มเข้าไปในประชากรอ้างอิง ค่าทำนาย GEV มีค่าต่ำเกินจริงมากยิ่งขึ้น ($\hat{b}_p \approx 1.4$ ใน scenario 6) เป็นที่น่าสังเกตว่าค่าทำนาย GEV มีค่าต่ำเกินจริงอย่างมากสำหรับลักษณะ AFC และ FS (0.16 – 0.22) และการเพิ่มข้อมูลจีโนไทป์แม่โคเข้าไปในประชากรอ้างอิงแทบจะไม่ส่งผลต่อค่า $\hat{b}_p$ โดย Luan et al. (2009) แสดงให้เห็นว่าลักษณะที่มีอัตราพันธุกรรมสูงกว่า ให้ค่าความแม่นยำที่มากกว่าและความมีอคติของการทำนายที่ต่ำกว่า ดังนั้น จะเห็นว่าอคติของการทำนายที่สูงสำหรับลักษณะ FS ($\hat{b}_p$ ต่ำกว่า 1 มาก, range = 0.11 – 0.22) น่าจะเกิดจากลักษณะดังกล่าวมีอัตราพันธุกรรมที่ค่อนข้างต่ำ (0.03)

ผลการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าการเพิ่มปริมาณข้อมูลจีโนไทป์แม่โคแบบสะสมเข้าไปในประชากรอ้างอิงช่วยลดอคติของการทำนายค่าพันธุกรรมสำหรับทุกลักษณะที่ศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับประเมินพันธุกรรมจีโนมที่ประชากรอ้างอิงมีเฉพาะข้อมูลจีโนไทป์ของพ่อพันธุ์ และเมื่อใช้การประเมินพันธุกรรมแบบดั้งเดิม โดยในภาพรวม ค่าเฉลี่ยของค่าการกระจายตัวของค่าทำนายพันธุกรรม ($\hat{b}_p$) มีค่าเข้าใกล้ 1 มากยิ่งขึ้น เมื่อมีการเพิ่มข้อมูลจีโนไทป์แม่โคแบบสะสม (Table 6) (การทำนายค่าพันธุกรรมไม่มีอคติเมื่อค่า $\hat{b}_p = 1$) ซึ่งบ่งชี้ให้เห็นถึงอคติของการทำนายที่ลดลง

ค่า $\hat{b}_p$ สำหรับลักษณะปริมาณและเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบน้ำมันที่พบในครั้งนี้ มีค่าโดยรวมใกล้เคียง 1 มากกว่าการศึกษาก่อนหน้านี้ในประชากรโคนมของไทยโดย Buaban et al. (2021) ซึ่งได้รายงานการเกิด over-dispersion ที่มากกว่าสำหรับการทำนายค่าพันธุกรรมจีโนม (ใช้เฉพาะข้อมูลจีโนไทป์พ่อพันธุ์ หรือใช้ข้อมูลจีโนไทป์พ่อและแม่พันธุ์) และค่าพันธุกรรมแบบดั้งเดิม ซึ่งน่าจะเกิดจากจำนวนข้อมูลจีโนไทป์ของสัตว์ที่มากขึ้นในการศึกษาปัจจุบัน (Legarra and Reverter, 2018) รวมทั้งวิธีการคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยที่แตกต่างกัน (Macedo et al. 2020a) การเพิ่มข้อมูลจีโนไทป์แม่โคช่วยลดการเกิดค่า GEV ที่สูงเกินจริง

และการเพิ่มจำนวน validation bulls น่าจะช่วยลดการเกิด over-dispersion ของค่าทำนายพันธุกรรมจีโนมได้ (Buaban et al., 2021)

การเลือกแม่โคเพื่อตรวจจีโนไทป์อาจมีผลต่ออคติของค่าทำนายพันธุกรรม Gao et al. (2015) พบว่า การใช้ข้อมูลจีโนไทป์แม่โคชั้นเลิศเพื่อเพิ่มขนาดประชากรอ้างอิง ส่งผลให้เกิดอคติของการทำนายสูงกว่าการใช้ข้อมูลจีโนไทป์แม่โคที่ได้จากการเลือกแบบสุ่ม ในความเป็นจริงแล้ว การเลือกแม่โคเพื่อตรวจข้อมูลจีโนไทป์สำหรับประชากรโคนมไทยมาจากทั้งแม่โค bull dams (แม่โคที่อยู่ใน 200 อันดับแรกของการประเมินพันธุกรรมในช่วงเวลาที่ทำการเลือกโคเพื่อตรวจข้อมูลจีโนไทป์) และลูกสาวของพ่อโคทดสอบที่มีข้อมูลบันทึกผลผลิตที่สมบูรณ์ ดังนั้น อคติของการทำนายค่าพันธุกรรมในทุกลักษณะที่พบจากการศึกษาในครั้งนี้ บางส่วนอาจเกิดจากวิธีการเลือกโคเพศเมียเพื่อตรวจจีโนไทป์ดังกล่าว การเลือกโคเพศเมียโดยสุ่ม เช่น เลือกโคสาวก่อนที่จะคลอดลูกหรือให้ผลผลิต น่าจะช่วยลดอคติของการทำนายค่าพันธุกรรมได้ นอกจากนี้ อคติของการทำนายอาจเกิดเนื่องจากพันธุประวัติที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ยังมีความไม่สมบูรณ์ในบางส่วน (pedigree incompleteness) (Buaban et al., 2022) การประเมินพันธุกรรมด้วย metafounder model (Legarra et al., 2015) อาจช่วยลดอคติในการทำนายค่าพันธุกรรมลงได้ (Bradford et al., 2019; Macedo et al., 2020a)

การเพิ่มข้อมูลจีโนไทป์จากโครุ่นใหม่ ๆ อย่างต่อเนื่องเข้าไปในประชากรอ้างอิง เป็นสิ่งที่แนะนำให้ปฏิบัติในการทำนายค่าพันธุกรรมจีโนมเพื่อป้องกันการลดลงของความแม่นยำของทำนายพันธุกรรม (persistence of genomic prediction accuracy) ซึ่งการลดลงของความแม่นยำในการทำนายเมื่อใช้เฉพาะชุดข้อมูลจีโนไทป์จากสัตว์รุ่นเก่า (ancestral generations) เกิดจากความน่าเชื่อถือและความเป็นปัจจุบันของอิทธิพลของ SNPs (SNP effects) ที่ต่ำลง ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสัตว์ที่ลดลง รวมถึงผลจากการเปลี่ยนแปลงอิทธิพลของปฏิกริยาร่วมระหว่างยีนที่อยู่ตำแหน่งต่างกัน (epistatic effects) (Varona et al., 2018) เป็นต้น ดังนั้น โดยทั่วไปแล้ว คุณค่าของข้อมูลจีโนไทป์ของสัตว์ต่อการทำนายค่าพันธุกรรมจะค่อย ๆ ลดลง เมื่อความห่างระหว่างรุ่นของสัตว์ที่มีข้อมูลจีโนไทป์กับสัตว์ที่ต้องการทำนายห่างมากยิ่งขึ้น (เช่น Hidalgo et al., 2021; Hollifield et al., 2021)

สรุปผลการทดลอง

การเพิ่มขนาดประชากรอ้างอิงด้วยวิธีเพิ่มข้อมูลจีโนไทป์แม่โคเข้าไปในประชากรอ้างอิงพ่อพันธุ์จะช่วยเพิ่มความแม่นยำเชิงทฤษฎี ความแม่นยำในการจัดอันดับสัตว์ด้วยค่าพันธุกรรม สัดส่วนของความแม่นยำทั้งนี้ ยังลดอคติของการทำนายค่าพันธุกรรมในอนาคตสำหรับทุกลักษณะที่ศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับทั้งกรณีที่ประชากรอ้างอิงมีเฉพาะข้อมูลจีโนไทป์ของพ่อพันธุ์ในการประเมินพันธุกรรมจีโนมและวิธีการประเมินพันธุกรรมแบบดั้งเดิม โดยความแม่นยำเชิงทฤษฎี ความแม่นยำในการจัดอันดับสัตว์ และสัดส่วนของความแม่นยำ จะเพิ่มสูงขึ้นตามการเพิ่มจำนวนข้อมูลจีโนไทป์แม่โคในประชากรอ้างอิง โดยลักษณะปริมาณน้ำนมที่ 305 วัน ได้รับผลเชิงบวกจากการเพิ่มขึ้นแบบสะสมของข้อมูลจีโนไทป์แม่โคเข้าไปในประชากรอ้างอิงชัดเจนที่สุด สำหรับลักษณะอื่นๆ การเพิ่มจำนวนโคตรวจสอบรวมกับการเพิ่มขนาดประชากรอ้างอิง (ทั้งข้อมูลจีโน

ไทป์ของพ่อโคและแม่โค) สามารถแสดงให้เห็นถึงประโยชน์ของการคัดเลือกด้วยจีโนมมากยิ่งขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งกรณีอายุเมื่อคลอดลูกครั้งแรกและคะแนนรูปร่างรวม แม้ว่าความสำคัญของการใช้ข้อมูลของแม่โคมีน้อยกว่าพ่อพันธุ์ด้วยข้อจำกัดด้านความเชื่อมั่นของค่าพันธุกรรมที่ต่ำกว่า แต่สำหรับในประชากรอ้างอิงของโคนมไทยที่ยังมีขนาดเล็ก การเพิ่มขนาดประชากรอ้างอิงด้วยการเพิ่มข้อมูลจีโนไทป์แม่โคแบบสะสมร่วมกับข้อมูลจีโนไทป์พ่อพันธุ์ มีผลในเชิงบวกต่อการทำนายค่าพันธุกรรมสำหรับโคเพศผู้ที่ยังไม่มีข้อมูลผลผลิตหรือฟีนไทป์ของลูกสาว

ข้อเสนอแนะ

1) การเพิ่มขนาดประชากรอ้างอิงด้วยการเพิ่มจำนวนข้อมูลจีโนไทป์แม่โคซึ่งมีข้อมูลฟีนไทป์ในแบบสะสม ซึ่งมีการเพิ่มข้อมูลจีโนไทป์โคที่เกิดรุ่นใหม่เข้าไปในประชากรอ้างอิงแบบสะสม ร่วมกับการเพิ่มจำนวนข้อมูลจีโนไทป์ทั้งจากพ่อพันธุ์ควรดำเนินการต่อไปอย่างต่อเนื่อง อันจะช่วยเร่งความก้าวหน้าในการปรับปรุงพันธุกรรมสำหรับลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประชากรโคนมไทยต่อไป

2) ในอนาคตควรมีการศึกษาเพิ่มเติม เช่น การประเมินคุณค่าของข้อมูลจีโนไทป์เก่าและใหม่ (old vs. recent data) การประเมินความคงทนของความแม่นยำในการทำนายค่าพันธุกรรม (persistency of accuracy of genomic predictions) และการทดสอบวิธีในการลดความอคติของการทำนายค่าพันธุกรรมจีโนม เช่น Metafounder model นอกจากนี้ ควรศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่อาจมีผลต่อการทำนายค่าพันธุกรรมจีโนมเมื่อมีการเพิ่มข้อมูลจีโนไทป์แม่โคเข้าไปในประชากรอ้างอิง เช่น ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างสัตว์ภายในประชากรอ้างอิง และระหว่างประชากรอ้างอิงและประชากรที่ใช้ตรวจสอบ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ที่สนับสนุนข้อมูลสำหรับการวิจัย ขอขอบคุณ ดร.สายัณห์ บัวบาน ผู้เชี่ยวชาญด้านการพัฒนาโคนม สำนักพัฒนาพันธุ์สัตว์ สำหรับคำแนะนำในการออกแบบวิธีการวิจัย และขอขอบคุณผู้บริหารและบุคลากรสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ในการส่งเสริมและมีส่วนร่วมในการดำเนินงานโครงการผลิตพ่อโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. 2560. สมุดพ่อพันธุ์กรมปศุสัตว์ 2559 สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. นนทบุรี. แหล่งที่มา : http://biotech.dld.go.th/webnew/index.php/th/?option=com_content&view=article&id=200:dld-dairy-sire-summary&catid=161:siresummary&lang=th-TH, สืบค้นเมื่อ 3 มิถุนายน 2564.
- กรมปศุสัตว์. 2564. สมุดพ่อพันธุ์กรมปศุสัตว์ 2563 สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. นนทบุรี. แหล่งที่มา :

- http://biotech.dld.go.th/webnew/images/Sire_Summary/2563/Sire_Summary2563.pdf, สืบค้นเมื่อ 31 ตุลาคม 2564.
- สายัณห์ บัวบาน มนต์ชัย ดวงจินดา วุฒิไกร บุญคุ้ม สมศักดิ์ เปรมปรีดิ์ เกียรติศักดิ์ เหล็งหนูดำ และ ญัฐนันท์ ศิริรัตนัญญะกุล. 2563. การประเมินพันธุกรรมจีโนมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์โคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์ในประเทศไทย. ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย. นนทบุรี.
- Aguilar, I., I. Misztal, D. L. Johnson, A. Legarra, S. Tsuruta, and T. J. Lawlor. 2010. Hot topic: A unified approach to utilize phenotypic, full pedigree, and genomic information for genetic evaluation of Holstein final score. *J. Dairy Sci.* 93:743–752.
- Bapst, B., C. Baes, F. R. Seefried, A. Bieber, A., H. Simianer, and B. Gredler. 2013. Effect of cows in the reference population: First results in Swiss Brown Swiss. *Interbull Bulletin*. 47.
- Bijma, P. 2012. Accuracies of estimated breeding values from ordinary genetic evaluations do not reflect the correlation between true and estimated breeding values in selected populations. *J. Anim. Breed. Genet.* 129:345–358.
- 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.
- Boison, S. A., A. T. H. Utsunomiya, D. J. A. Santos, H. H. R. Neves, R. Carneiro, G. Mészáros, Y. T. Utsunomiya, A.S. do Carmo, R.S. Verneque, M.A. Machado, and J.C.C. Panetto. 2017. Accuracy of genomic predictions in Gyr (*Bos indicus*) dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 100(7): 5479-5490.
- Bonifazi, R., J. Vandenplas, J. Ten Napel, R. F. Veerkamp, and M. P. Calus. 2021. The impact of direct-maternal genetic correlations on international beef cattle evaluations for Limousin weaning weight. *J. Anim. Sci.*, 99(9), p.skab222.
- Bradford, H. L., Y. Masuda, P. M. VanRaden, A. Legarra, A., and I. Misztal. 2019. Modeling missing pedigree in single-step genomic BLUP. *J. Dairy Sci.* 102(3):2336-2346.
- Buaban, S., K. Lengnudum, W. Boonkum, and P. Phakdeedindan. 2022. Genome-wide association study on milk production and somatic cell score for Thai dairy cattle using weighted single-step approach with random regression test-day model. *J. Dairy Sci.* 105(1):468-494.
- 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.
- 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.
- Calus, M. P. L. 2010. Genomic breeding value prediction: Methods and procedures. *Animal* 4:157–164.

- Christensen, O. F., and M. S. Lund. 2010. Genomic prediction when some animals are not genotyped. *Genet. Sel. Evol.* 42:2.
- Cooper, T. A., G. R. Wiggans, 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.
- Cooper, T., G. Wiggans, and P. VanRaden. 2014. Including cow information in genomic prediction of Holstein dairy cattle in the US. Page 803 in *Proc. 10th World Congr. Genet. Appl. Livest. Prod.*, Vancouver, BC, Canada.
- Council on Dairy Cattle Breeding. n.d. Genotypes included in evaluations by breed, chip density, presence of phenotypes (old vs. young), and evaluation year-month (cumulative). *Trends & Statistics*. Available source : https://queries.uscdcb.com/Genotype/cur_density.html, January 10, 2022.
- Daetwyler, H. D., R. Pong-Wong, B. Villanueva, and J. A. Woolliams. 2010. The impact of genetic architecture on genome-wide evaluation methods. *Genetics* 185:1021–1031.
- Daetwyler, H.D., B. Villanueva, and J. A. Woolliams. 2008. Accuracy of predicting the genetic risk of disease using a genome-wide approach. *PloS one.* 3(10):e3395.
- De Roos, A. P. W., C. Schrooten, R. F. Veerkamp, and J. A. M. Van Arendonk. 2011. Effects of genomic selection on genetic improvement, inbreeding, and merit of young versus proven bulls. *J. Dairy Sci.* 94(3), 1559-1567.
- Gao, H., P. Madsen, U. S. Nielsen, G. P. 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.
- Gengler, N., A. Tijani, G. R. Wiggans, 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.
- Goddard, M. E., and B. J. Hayes. 2009. Mapping genes for complex traits in domestic animals and their use in breeding programmes. *Nat. Rev. Genet.* 10:381–391.
- Guarini, A. R., D. A. L. Lourenco, L. F. Brito, M. Sargolzaei, C. F. Baes, F. Miglior, S. Tsuruta, I. Misztal, and F. S. Schenkel. 2019. Use of a single-step approach for integrating foreign information into national genomic evaluation in Holstein cattle. *J Dairy Sci.* 102:8175–8183.
- Hayes, B. J., P. J. Bowman, A. J. Chamberlain, and M. E. Goddard. 2009. Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. *J. Dairy Sci.* 92:433–443.

- Hayes, B. J., P. J. Bowman, A. J. Chamberlain, and M. E. Goddard. 2009. Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. *J. Dairy Sci.* 92:433–443.
- Hidalgo, J., D. Lourenco, S. Tsuruta, Y. Masuda, V. Breen, R. Hawken, M. Bermann, and I. Misztal. 2021. Investigating the persistence of accuracy of genomic predictions over time in broilers. *J. Anim. Sci.* 99(9):skab239.
- Hollifield, M. K., D. Lourenco, M. Bermann, J.T. Howard, and I. Misztal. 2021. Determining the stability of accuracy of genomic estimated breeding values in future generations in commercial pig populations. *J. Anim. Sci.* 99(4):skab085.
- Jenko, J., G. R. Wiggins, T. A. Cooper, S. A. E. Eaglen, WG de L. Luff, M. Bichard, R. Pong-Wong, and J. A. Woolliams. 2017. Cow genotyping strategies for genomic selection in a small dairy cattle population. *J. Dairy Sci.* 100(1), 439-452.
- 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., O. F. Christensen, Z. G. Vitezica, I. Aguilar, and I. Misztal. 2015. Ancestral relationships using metafounders: Finite ancestral populations and across population relationships. *Genetics* 200:455–468.
- Lourenco, D., A. Legarra, S. Tsuruta, Y. Masuda, I. Aguilar, and I. Misztal, 2020. Single-step genomic evaluations from theory to practice: using SNP chips and sequence data in BLUPF90. *Genes*, 11(7):790.
- Lourenco, D.A.L., I. Misztal, S. Tsuruta, I. Aguilar, E. Ezra, M. Ron, A. Shirak, and J. I. Weller. 2014. Methods for genomic evaluation of a relatively small genotyped dairy population and effect of genotyped cow information in multiparity analyses. *J. Dairy Sci.* 97(3):1742-1752.
- Luan, T., J. A. Woolliams, S. Lien, M. Kent, M. Svendsen, and T. H. E. Meuwissen. 2009. The accuracy of genomic selection in Norwegian Red Cattle assessed by cross-validation. *Genetics* 183:1119–1126.
- Lund, M. S., A. P. W. de Roos, A. G. de Vries, T. Druet, V. Ducrocq, S. Fritz, F. Guillaume, B. Guldbrandtsen, Z. Liu, R. Reents, C. Schrooten, F. Seefried, and G. Su. 2011. A common reference population from four European Holstein populations increases reliability of genomic predictions. *Genet. Sel. Evol.* 43:43.
- Macedo, F. L., O. F. Christensen, J. M. Astruc, I. Aguilar, Y. Masuda, and A. Legarra, 2020a. Bias and accuracy of dairy sheep evaluations using BLUP and SSGBLUP with metafounders and unknown parent groups. *Genet. Sel. Evol.* 52(1): 1-10.

- Macedo, F. L., A. Reverter, and A. Legarra, 2020b. Behavior of the Linear Regression method to estimate bias and accuracies with correct and incorrect genetic evaluation models. *J. Dairy Sci.* 103(1), 529-544.
- Meuwissen T. H., B. J. Hayes, and M. E. Goddard. 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*. 1;157(4):1819-29.
- Misztal, I., and G. R. Wiggins. 1988. Approximation of Prediction Error Variance in Large-Scale Animal Models. *J. Dairy Sci.* 71:27-32.
- Misztal, I., S. Tsuruta, D. A. L. Lourenco, Y. Masuda, I. Aguilar, A. Legarra, and Z. Vitezica. 2018. Manual for BLUPF90 family programs. University of Georgia. URL <http://nce.ads.uga.edu/wiki/doku.php?id=documentation>
- Misztal, I., S. Tsuruta, I. Aguilar, A. Legarra, P. M. VanRaden, and T. J. Lawlor. 2013. Methods to approximate reliabilities in single-step genomic evaluation. *J. Dairy Sci.* 96:647-654.
- Pryce, J. E., B. J. Hayes, and M. E. Goddard. 2012. Genotyping dairy females can improve the reliability of genomic selection for young bulls and heifers and provide farmers with new management tools. In *Proceedings of the international committee for animal recording 38th annual meeting*. (Vol. 28), Cork, Ireland. ICAR, Rome, Italy.
- 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/>.
- Scheifers, J. M., and K. A. Weigel. 2012. Genomic selection in dairy cattle: Integration of DNA testing into breeding programs. *Animal Frontiers*. 2(1), 4-9.
- Schenkel, F.S., L. R. Schaeffer, and P. J. Boettcher. 2002. Comparison between estimation of breeding values and fixed effects using Bayesian and empirical BLUP estimation under selection on parents and missing pedigree information. *Genet. Sel. Evol.* 34(1):41-59.
- Sungkhapreecha, P., I. Misztal, J. Hidalgo, D. Lourenco, S. Buaban, V. Chankitisakul, and W. Boonkum. 2021. Validation of single-step genomic predictions using the linear regression method for milk yield and heat tolerance in a Thai-Holstein population. *Veterinary World*, 14(12):3119.
- Thomasen, J. R., C. Egger-Danner, A. Willam, B. Guldbandsen, M. S. Lund, and A. C. Sørensen. 2014. Genomic selection strategies in a small dairy cattle population evaluated for genetic gain and profit. *J. Dairy Sci.* 97(1):458-470.
- 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.
- Tsuruta, S., I. Misztal, I. Aguilar, and T. J. Lawlor. 2011. Multiple-trait genomic evaluation of linear type traits using genomic and phenotypic data in U.S. Holsteins. *J. Dairy Sci.*, 94(8): 4198-4204.

- 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.
- Varona, L., A. Legarra, M. A. Toro, and Z. G. Vitezica. 2018. Nonadditive effects in genomic selection. *Front. Genet.* 9:78.
- Wiggans, G. R., J. B. Cole, S. M. Hubbard, and T. S. Sonstegard. 2017. Genomic selection in dairy cattle: the USDA experience. *Annual review of animal biosciences*, 5:309-327.
- Wiggans, G. R., T. A. Cooper, P. M. VanRaden, and J. B. Cole. 2011. Technical note: adjustment of traditional cow evaluations to improve accuracy of genomic predictions. *J. Dairy Sci.* 94:6188–6193.
- Zhang, Z., J. Liu, X. Ding, P. Bijma, D. J. de Koning, and Q. Zhang. 2010. Best linear unbiased prediction of genomic breeding values using a trait-specific marker-derived relationship matrix. *PloS one*, 5(9), p.e12648.

เทคนิคการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะด้วยวิธี Laparoscopic Ovum Pick-Up (LOPU)

และการผลิตตัวอ่อนแพะด้วยวิธีปฏิสนธินอกร่างกาย

พิงค์ลานนา ภูญชร^{1/} อรรถพล พรประไพ^{1/}

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะด้วยวิธี Laparoscopic Ovum Pick-Up (LOPU) และผลิตตัวอ่อนแพะจากโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ด้วยวิธีปฏิสนธินอกร่างกาย (*In Vitro* Embryo Production, IVP) โดยใช้แพะเพศเมียพันธุ์แองโกลนูเบียน จำนวน 10 ตัว ทำการกระตุ้นรังไข่แพะด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและฟอลลิเคิลสติมูเลตติ้ง แล้วนำมาเจาะเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี LOPU โดยใช้ Robertson's pipette เชื่อมต่อ OPU needle ซึ่งเป็นเข็มเบอร์ 18G ยาว 3 นิ้ว แบบความลาดเอียงของเข็มน้อย (short bevel) เข้ากับชุดอุปกรณ์การเจาะเก็บโอโอไซต์และเครื่องปั๊มสุญญากาศ โดยใช้แรงดูดสุญญากาศในการเจาะเก็บโอโอไซต์ 40 -50 มิลลิเมตรปรอท ร่วมกับการใช้กล้องลาพาโรสโคป พบว่าแพะมีการตอบสนองโดยการสร้างฟอลลิเคิลของ ไข่เฉลี่ย 17.8 ± 6.23 ฟอลลิเคิลต่อตัว ในจำนวนนี้มีโอโอไซต์ที่สามารถเจาะเก็บได้เฉลี่ย 13.5 ± 5.44 โอโอไซต์ต่อตัว โดยมีอัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ (recovery rate) ร้อยละ 75.84 (135/178) นำโอโอไซต์ที่เก็บได้ทั้งหมดเข้าสู่กระบวนการผลิตตัวอ่อนด้วยวิธีปฏิสนธิภายนอกร่างกาย โดยใช้ไข่เชื่อมผสมกับโอโอไซต์ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิด้วยการใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงสำเร็จรูป (IVF bioscience, UK) เพาะเลี้ยงโอโอไซต์และตัวอ่อนตลอดกระบวนการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย พบว่าอัตราการปฏิสนธิ ร้อยละ 91.38 (106/116) มีตัวอ่อนเจริญจนถึงระยะคลีเวจและ บลาสโตซิสต์ ร้อยละ 55.17 (64/116) และ 36.21 (42/116) ของจำนวนโอโอไซต์ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิตามลำดับ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าเทคนิคการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะด้วยวิธี LOPU โดยใช้ OPU needle ที่แรงดูดสุญญากาศ 40 -50 มิลลิเมตรปรอท ร่วมกับการใช้กล้องลาพาโรสโคป สามารถเก็บโอโอไซต์จากแพะมีชีวิต ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และสามารถนำโอโอไซต์นั้นมาผลิตเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ด้วยกระบวนการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย

คำสำคัญ : กระบวนการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย การเก็บโอโอไซต์ด้วยการส่องกล้องลาพาโรสโคป แพะ

เลขทะเบียนวิชาการ : 64(2)-0208-119

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

Laparoscopic Ovum Pick-Up (LOPU) Technique and *In Vitro* Embryo Production (IVP) in Goats.

Pinglanna Kunshorn^{1/} Attapol Pornprapai^{2/}

Abstract

The objectives of this study were to develop techniques for collecting goat oocytes using the laparoscopic ovum pick-up (LOPU) and to produce embryos *in vitro*. Ten Anglo-Nubian donor does were superovulated with progesterone and follicle stimulating hormone. LOPU was performed for oocyte collection using an 18G, 3 inch long OPU needle with short bevel mounted on Robertson's pipette connected to a collection tube and a vacuum pump with pressure setting to 40–50 mmHg. Oocytes were obtained by laparoscopy. After the hormonal treatment, the average number of follicles aspirated and oocytes recovered per doe were 17.8 ± 6.23 and 13.5 ± 5.44 , respectively, with oocyte recovery rate of 75.84% (135/178). All harvested oocytes underwent IVP program where fresh semen was used to fertilize matured oocytes by the use of commercial media (IVF bioscience, UK) at all steps. The fertilization rate was 91.38% (106/116). The cleavage rate and the blastocyst rate of all matured oocytes undergoing in vitro fertilization were 55.17% (64/116) and 36.21% (42/116), respectively. In conclusion, goat oocytes could be efficiently collected from live goats using LOPU technique with OPU needle, a vacuum pressure of 40-50 mmHg and laparoscopy. These derived oocytes can develop to the blastocyst stage by IVP.

keywords : *In Vitro* Embryo Production, laparoscopic ovum pick-up, goat

Registered No.: 64(2)-0208-119

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

คำนำ

แพะเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศไทย จากข้อมูลปี พ.ศ. 2564 พบว่าประชากรแพะในประเทศไทย มีจำนวนทั้งสิ้น 1,308,000 ตัว มีเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะ จำนวน 86,000 ราย (ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมปศุสัตว์, 2564) ด้วยคุณลักษณะของแพะที่มีการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้อย่างรวดเร็ว สามารถผสมพันธุ์ได้ตลอดทั้งปี เลี้ยงง่าย ใช้พื้นที่ในการเลี้ยงน้อย ทนทานและสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมในเขตร้อนได้เป็นอย่างดี อีกทั้งมีช่องทางในการจำหน่ายหลากหลาย และยังสามารถส่งออกแพะบางส่วนไปยังประเทศที่มีความต้องการบริโภคได้ราคาสูง ทำให้แพะเป็นสัตว์ที่ได้รับความนิยมในการเลี้ยง สามารถเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกรผู้เลี้ยงได้เป็นอย่างดี โดยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์เป็นหน่วยงานที่ได้รับมอบหมายภารกิจสำคัญที่จะนำเทคโนโลยีชีวภาพมาใช้ เพื่อการเพิ่มจำนวนพัฒนาปรับปรุงและสร้างพันธุ์แพะที่มีคุณลักษณะพันธุ์กรรมที่ดีตอบสนองความต้องการของตลาด ซึ่งการย้ายฝากตัวอ่อน เป็นเทคโนโลยีหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการลดระยะเวลาในการพิสูจน์พ่อพันธุ์และเพิ่มความแม่นยำในการทดสอบพันธุ์ในการสร้างสัตว์พันธุ์ดีโดยการดึงเอาลักษณะพันธุ์กรรมดีจากสายของพ่อและแม่มารวมเสริมจุดเด่นของตัวอ่อน นั้น ๆ ทำให้สามารถกระจายพันธุ์กรรมที่ดีทั้งทางสายพ่อและแม่พันธุ์ได้พร้อมๆ กัน ส่งผลให้เพิ่มความเข้มข้น ในการคัดเลือก (selection intensity) และร่นระยะเวลาช่วงชั่วรุ่น (generation interval) (Paramio, 2010) โดยเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนจะมีประสิทธิภาพดีหรือไม่นั้น ส่วนหนึ่งขึ้นกับคุณภาพตัวอ่อนที่ผลิตได้ ซึ่งอาจได้จากวิธีการผลิตตัวอ่อนภายในร่างกาย (*In vivo* production) หรือ การผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย *In vitro* production, IVP)

การผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย เป็นเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพระบบสืบพันธุ์ ที่นำเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (โอโอไซต์) และเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (อสุจิ) มาผสมกันในหลอดทดลองภายใต้สภาวะที่เหมาะสมทำให้เกิดกระบวนการปฏิสนธิภายนอกในร่างกายในห้องปฏิบัติการจนเกิดเป็นตัวอ่อน และสามารถนำตัวอ่อนที่ได้นั้นไปฝากในมดลูกของเพศเมียเพื่อให้ตั้งท้องต่อไป ซึ่งกระบวนการปฏิสนธิภายนอกร่างกายประกอบ กระบวนการเก็บโอโอไซต์ (Oocyte Recovery) การเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ (*In Vitro* Maturation, IVM) การเตรียมน้ำเชื้อ (Sperm Preparation) การปฏิสนธิระหว่างน้ำเชื้อกับโอโอไซต์ในงานทดลอง (*In Vitro* Fertilization, IVF) และการเพาะเลี้ยงไซโกต (*In Vitro* Culture, IVC) (Mondal et al., 2008) โดยการเก็บโอโอไซต์ (Oocyte Recovery) จากตัวสัตว์มีชีวิตนั้น ทำได้หลายวิธี เช่น วิธีผ่าตัดแบบเปิดหน้าท้อง (Laparotomy) แล้วเจาะดูดโอโอไซต์โดยตรง วิธีเจาะดูดโอโอไซต์ผ่านทางผนังช่องคลอดร่วมกับการใช้เครื่องตรวจอวัยวะภายในด้วยคลื่นความถี่สูง (Transvaginal Ultrasound) และวิธีผ่าตัดด้วยการส่องกล้องลาพารอสโคปและเจาะดูดโอโอไซต์ (Laparoscopic Ovum Pick Up, LOPU) (เอกชาติ และคณะ, 2543; อรรถพล และคณะ, 2564) โดยวิธี LOPU เป็นเทคโนโลยีการเก็บโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลที่รังไข่โดยวิธีการผ่าตัดด้วยการส่องกล้องลาพารอสโคป (Laparoscopy) ทำได้โดยเจาะรูเล็กๆ ที่ผิวหนังหน้าท้องแล้วผ่านกล้องขนาดเล็กเข้าไปทำให้เห็นอวัยวะภายในช่องท้องได้ชัดเจน ทำให้การผ่าตัดมีความปลอดภัยสูง สามารถใส่เครื่องมือการแพทย์ผ่านทางรูที่เจาะไว้เพื่อทำหัตถการภายในช่องท้องได้อย่างง่ายดาย การผ่าตัดวิธี Laparoscopy ไม่

จำเป็นต้องมีการดึงหรือขยายแผลให้กว้างออกเหมือนการผ่าตัดวิธี Laparotomy ทำให้มีการกระทบกระเทือนต่ออวัยวะอื่นในท้องลดลง และการฟื้นตัวหลังผ่าตัดเร็วขึ้นมาก

ในปัจจุบัน ประเทศไทยโดยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ได้มีการศึกษาการนำเทคโนโลยี Laparoscopy มาใช้ในกระบวนการเก็บโอโอไซต์แพะ พบว่ามีความเป็นไปได้ในการเจาะเก็บโอโอไซต์โดยใช้อุปกรณ์ผสมเทียมร่วมกับการผ่าตัดด้วยการส่องกล้องลาพาโรสโคปี (LOPU) (อรรถพล และคณะ, 2564) และคาดว่าหากสามารถพัฒนาเทคนิคและอุปกรณ์ในการเก็บโอโอไซต์ให้เหมาะสมยิ่งขึ้น จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของ LOPU ทำให้ได้โอโอไซต์คุณภาพดี และสามารถนำโอโอไซด์ดังกล่าวไปเข้ากระบวนการ IVP จนพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์จำนวนมากในคราวเดียว สามารถนำไปฝากให้แม่ตัวรับได้ครั้งละมากๆ ทำให้ราคาต้นทุนในการผลิตต่อตัวอ่อนลดลง และสามารถนำเทคโนโลยีนี้ไปใช้แก้ไขปัญหการปฏิสนธิในแม่แพะที่มีพันธุ์กรรมดี รังไข่และฟอลลิเคิลสมบูรณ์แต่อาจมีปัญหที่ท่อนำไข่ ปีกมดลูกหรือมดลูกผิดปกติ นอกจากนั้นยังสามารถใช้ในการณีที่ต้องการขยายพันธุ์จากน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะดีเยี่ยมแต่ปริมาณจำกัด เช่น น้ำเชื้อพ่อพันธุ์ที่อายุมาก น้ำเชื้อพ่อพันธุ์จากต่างประเทศ หรือน้ำเชื้อแยกเพศ เป็นต้น เนื่องจากจะช่วยลดปริมาณอสุจิที่จะทำปฏิสนธิได้ เป็นการเก็บพันธุ์กรรมจากแม่พันธุ์และพ่อพันธุ์ที่ดีให้เกิดประโยชน์สูงสุด ทั้งยังสามารถประยุกต์ใช้ร่วมกับเทคโนโลยีชีวภาพอื่น ๆ เช่น การย้ายฝากสารพันธุ์กรรม (Gene transfer) การย้ายฝากนิวเคลียส (nuclear Transfer) หรือ cloning เพื่อพัฒนางานด้านเทคโนโลยีชีวภาพในวงการปศุสัตว์ต่อไป

ดังนั้น การศึกษาดังนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคนิคการเจาะเก็บโอโอไซด์แพะด้วยวิธี Laparoscopic Ovum Pick-UP และผลิตตัวอ่อนแพะจากโอโอไซด์ที่เจาะเก็บได้ด้วยวิธีปฏิสนธินอกร่างกาย

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

คัดเลือกแพะเพศเมีย พันธุ์แองโกลนูเบียน ในศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา ที่มีสุขภาพแข็งแรง สมบูรณ์ ไม่มีปัญหาระบบสืบพันธุ์ จำนวน 10 ตัว อายุ 2-4 ปี

วิธีการทดลอง

1. การเก็บโอโอไซด์ (Oocyte recovery) จากแพะมีชีวิตด้วยวิธี LOPU

1.1 เหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่หลายใบด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด และฟอลลิเคิลสติมูเลตติง (FSH) ตามโปรแกรมของอรรถพล และคณะ (2564) (Figure 1.) ดังนี้

วันที่ 0 สอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด (CIDR®-G, 0.3 g progesterone, Eazi Breed, InterAg, New Zealand) เวลา 06.00 น. (AM)

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

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

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

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

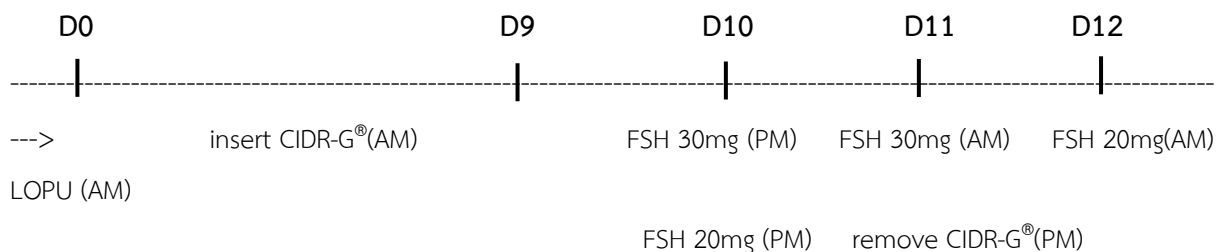


Figure 1. Estrus synchronization and superovulation program for LOPU. AM = 06.00, PM = 18.00

1.2 เตรียมตัวแพะก่อนเจาะเก็บโอโอไซต์ โดยงดน้ำและอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อลดความเสี่ยงที่ปลายเข็มจะไปทิ่มแทงอวัยวะภายในขณะทำ LOPU (Souza-Fabjan et al., 2014; Antonio, 2018) หลังจากนั้นทำการระงับความรู้สึกแพะแบบทั่วร่างกายโดยการฉีดยาระงับประสาท (tranquilizer drug) กลุ่ม alpha-2 agonist ด้วย xylazine HCL 0.2 mg/kg ร่วมกับ atropine 0.04 mg/kg เข้ากล้ามเนื้อ และ ยา ระงับปวด (analgesic drug) ด้วย phenylbutazone 4 mg/kg เข้ากล้ามเนื้อ และยาปฏิชีวนะก่อนเริ่มทำ ผ่าตัด (prophylaxis antibiotic drug) ด้วย penicillin-streptomycin 20,000 IU/kg เข้ากล้ามเนื้อ (อรรถพล และคณะ, 2564) เมื่อแพะมีอาการซึม นำแพะขึ้นบนเตียงผ่าตัด จัดท่าแพะให้อยู่ในท่านอนหงาย (dorsal recumbency) โดยให้ส่วนหัวของแพะอยู่ต่ำกว่าส่วนท้ายลำตัว ทำมุมเอียงประมาณ 30 - 45 องศา เพื่อให้ อวัยวะภายในช่องท้องเคลื่อนไปทางด้านหน้า และสามารถมองเห็นระบบสืบพันธุ์แพะเพศเมียจากกล้องลา พารอสโคป ได้สะดวกยิ่งขึ้น (Antonio, 2018) หลังจากนั้นทำการโกนขนและเตรียมบริเวณผ่าตัดด้วยเทคนิค การปลอดเชื้อ (aseptic technique) (Figure 2.)

1.3 เก็บโอโอไซต์แพทลง ด้วยวิธี LOPU ดังนี้

กำหนดตำแหน่งที่จะทำการเจาะช่องท้องเพื่อสอดอุปกรณ์ 3 ตำแหน่ง โดยตำแหน่งที่ 1 อยู่บริเวณด้านหน้าของเต้านมซ้าย ประมาณ 2-3 เซนติเมตร (ตำแหน่งที่สอดกล้องลาพาโรสโคป) ตำแหน่งที่ 2 ด้านหน้าของเต้านมขวา (ตำแหน่งที่สอด OPU needle) ตำแหน่งที่ 3 ตำแหน่งกึ่งกลางลำตัวค่อนมาทางด้านหน้า (สอด grasping forceps)

ดำเนินการระงับความรู้สึกเฉพาะที่ โดยการฉีดยา lidocaine HCl ณ ตำแหน่งที่มีการกรีดผิวหนังจุดละ 2 ml ทั้ง 3 ตำแหน่ง เจาะผนังช่องท้องตำแหน่งที่ 1 ด้วย trocar (1) นำกล้องลาพาโรสโคปสอดเข้าช่องท้องทางช่องของ trocar ซึ่ง trocar นี้มีที่เชื่อมต่อกับสายแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ จากนั้นเติมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เข้าช่องท้องเพื่อเพิ่มช่องว่างในช่องท้องและเพิ่มมุมมองการมองเห็นจากกล้องลาพาโรสโคป ทำการเจาะผนังช่องท้องตำแหน่งที่ 2 ด้วย trocar (2) เพื่อสอด OPU needle จากนั้นใช้ trocar (3) เจาะที่ตำแหน่งกึ่งกลางลำตัวค่อนมาทางด้านหน้า เพื่อสอด grasping forceps ซึ่งใช้ในการจับเยื่อแวนรังไข่ (mesovarium) และใช้ควบคุมบังคับตำแหน่งรังไข่ให้สะดวกในการเจาะเก็บโอโอไซต์ (Antonio, 2018) (Figure 2.)

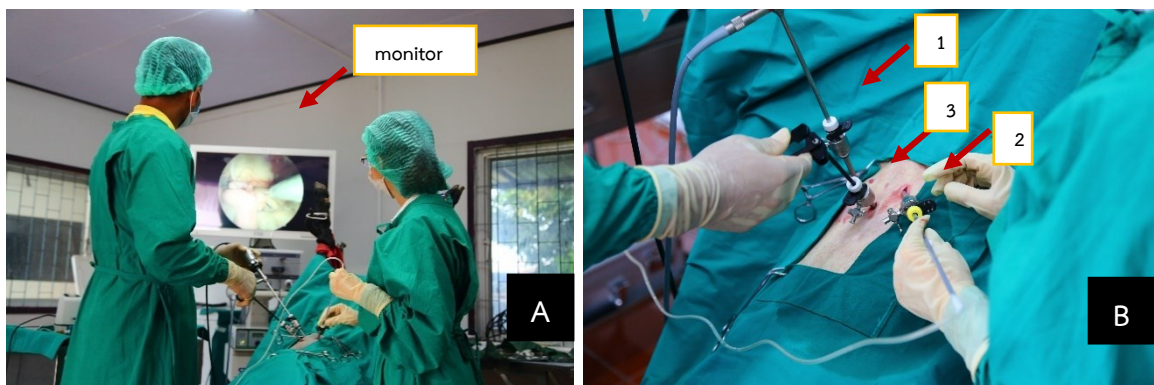


Figure 2. (A) LOPU view from monitor. (B) Positions of three trocars,
1 = laparoscope, 2 = OPU needle and 3 = grasping forceps.

ทำการเจาะฟอลลิเคิลที่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 3 มิลลิเมตร ซึ่งสามารถมองเห็นได้จากบนผิวของรังไข่ (Figure 3.) โดยประยุกต์ใช้ Robertson's pipette เชื่อมต่อกับ OPU needle ซึ่งเป็นเข็มเบอร์ 18G ยาว 3 นิ้ว แบบความลาดเอียงของเข็มน้อย (short bevel) (Watanabe Applied Technology : WTA, Brazil) เข้ากับชุดอุปกรณ์การเจาะเก็บโอโอไซต์และเครื่องปั๊มสุญญากาศ (NF100KT.18 RC (LIQUIDPORT 100), KNF, Switzerland) และ heating block (N-FTH-2012, COOK, Australia) ด้วยสายซิลิโคน โดยใช้แรงดูดสุญญากาศระหว่าง 40-50 มิลลิเมตรปรอท (Antonio, H.M. et al., 2018) ใช้สารละลาย

phosphate buffered saline (PBS) (Gibco, BRL, USA) เสริมด้วย 1% bovine serum (Gibco, New Zealand) เป็นน้ำยาเก็บไอโอไซด์ ซึ่งควบคุมอุณหภูมิสารละลายนี้ไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ใน heating block (figure 4)

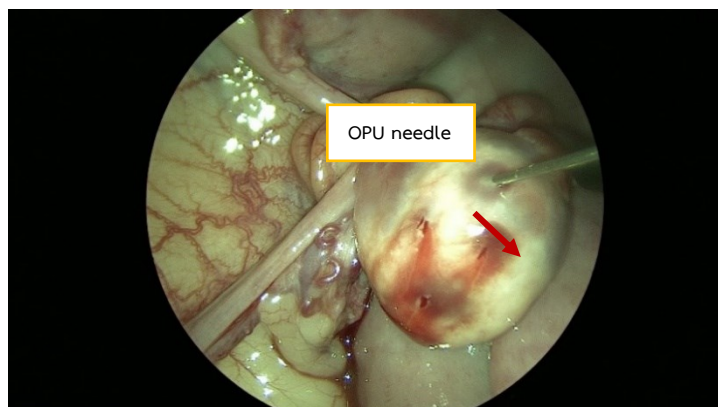


Figure 3. Endoscopic view of using OPU needle

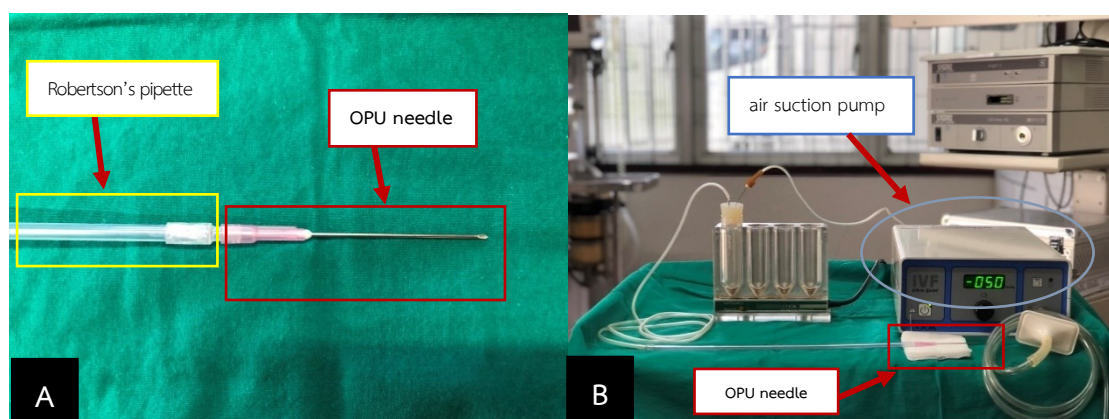


Figure 4. (A) Robertson's pipette and short bevel OPU needle size 18G, 3 inch length.

(B) Robertson's pipette and OPU needle which connected to air suction pump machine.

หลังจากนั้นเติมสารละลาย normal saline 1,000 มิลลิลิตร ผสมกับ heparin 10,000 IU/ml (Gland Pharm Limited, India) 2 มิลลิลิตร ที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ลงในช่องท้อง ปริมาณ 200 - 250 มิลลิลิตร เพื่อชำระล้างรังไข่ และป้องกันการเกิดแผลยึดติด (adhesion) ของอวัยวะระบบสืบพันธุ์และอวัยวะอื่นๆภายในช่องท้อง (Antonio, 2018) เย็บปิดบาดแผล และดูแลบาดแผลหลังการผ่าตัด

1.4 นำของเหลวจากฟอลลิเคิล ไปตรวจหาโอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ บันทึกจำนวน และคุณภาพของโอโอไซต์ โดยจำแนกคุณภาพโอโอไซต์เป็น 4 เกรด ตามวิธีของศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการ ย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ ดังนี้

เกรด A : เป็นโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบไม่น้อยกว่า 2 ชั้น (Cumulus-Oocyte Complexes, COCs)

เกรด B : เป็นโอโอไซต์ที่มีเซลล์คิวมูลัสบางส่วน (Partial Cumulus Cells, Partial CCs)

เกรด C : เป็นโอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัส (denuded oocytes, Dos)

เกรด D : เป็นโอโอไซต์ที่เสื่อมสภาพ (Degenerated oocytes, Deg)

2. นำโอโอไซต์ที่ได้ทั้งหมด มาเข้ากระบวนการผลิตตัวอ่อนนอกร่างกาย (IVP) ที่ดัดแปลงมาจากวิธี ของอรรถพลและคณะ (2564) ดังนี้

2.1 การเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ (*In vitro* maturation, IVM)

เป็นกระบวนการที่เพาะเลี้ยงโอโอไซต์ที่ยังเจริญเติบโตไม่เต็มที่ (Immature Oocyte) ให้มีการเจริญถึงระยะพร้อมปฏิสนธิ (Mature Oocyte) คือ มีสภาพ Nuclear and cytoplasmic Maturation (วิบูลย์ และคณะ, 2540) โดยทำการตรวจหาโอโอไซต์จากของเหลวในฟอลลิเคิล แล้วทำการคัดเลือกโอโอไซต์ ที่เสื่อมสภาพ (degenerated oocytes) ออก จากนั้นนำโอโอไซต์มาล้างในน้ำยา TCM-199 Hepes (Gibco, USA) เสริมด้วย 5% FBS และ penicillin-streptomycin 10,000 IU/ml (Gibco, USA) ปริมาตร 2-3 มิลลิลิตร ใน จานปลอดเชื้อพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร จำนวน 3 ครั้ง โดยใช้ปิเปตต์ดูดโอ โอไซต์ใส่จานปลอดเชื้อที่ 1 แล้วย้ายไปจานปลอดเชื้อที่ 2 และ 3 ตามลำดับ จากนั้นนำโอโอไซต์มาล้างอีก 3 ครั้ง ในน้ำยา BO-IVM Oocyte maturation medium (IVF Bioscience, UK) สำหรับเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญ พร้อมปฏิสนธิด้วยวิธีการเช่นเดิม แล้วจึงนำโอโอไซต์ใส่ในน้ำยา BO-IVM Oocyte maturation medium (IVF Bioscience, UK) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร ในจานเพาะเลี้ยงแบบ 4 หลุม (4-well petri dishes, Nunc, Roskilde, Denmark) และเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่ควบคุมสภาวะ (คาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ มากกว่า 95%) นาน 23-25 ชั่วโมง

2.2 การเตรียมน้ำเชื้อแพะ (semen preparation)

ทำการปรับสมดุลน้ำยาสำหรับปฏิสนธิระหว่างโอโอไซต์กับตัวอสุจิ โดยใส่น้ำยา BO-IVF fertilization medium (IVF Bioscience, UK) ในจานเพาะเลี้ยงชนิด 4 หลุมๆ ละ 400 ไมโครลิตร นำเข้าใน ตู้เพาะเลี้ยงที่ควบคุมสภาวะ (แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อน ใช้งาน

จากนั้นทำการเตรียมน้ำเชื้อ โดยนำน้ำเชื้อสดจากแพะพ่อพันธุ์แองโกลนูเบียน จำนวน 6 ตัว มาตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อสดด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์คุณภาพอสุจิ (computer assisted semen analysis, CASA) รุ่น Hamiton Thorne CEROS II (Hamilton Thorne, USA) และตรวจวัดความเข้มข้น น้ำเชื้อด้วยเครื่อง photometer (Minitube, Germany) ทำการปั่นล้างน้ำเชื้อ 2 ครั้ง ที่ความเร็ว 300 x g นาน

5 นาทีในน้ำยา BO-SemenPrep medium (IVF Bioscience, UK) โดยใช้น้ำยาปั่นครั้งละ 2 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิห้อง ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง ในการปั่นครั้งที่ 2 ให้เหลือน้ำยาที่มีตะกอนน้ำเชื้อประมาณ 200 ไมโครลิตร นำมาตรวจประเมิน motility ตรวจนับอสุจิด้วย hemacytometer จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของน้ำเชื้อ และปริมาณน้ำเชื้อที่จะเติมในงานเพาะเลี้ยงชนิด 4 หลุม โดยแต่ละหลุมจะใช้น้ำเชื้อ 1 ล้วนตัว ต่อน้ำยา BO-IVF fertilization medium (IVF Bioscience, UK) 500 ไมโครลิตร ต่อโอโอไซต์ไม่เกิน 50 โอโอไซต์

2.3 การปฏิสนธิกับโอโอไซต์ในงานทดลอง (*In vitro* fertilization, IVF)

นำโอโอไซต์ที่เพาะเลี้ยงจนครบเวลาการเจริญพร้อมปฏิสนธิแล้ว มาล้างด้วยน้ำยา BO-IVF fertilization medium ปริมาตร 2-3 มิลลิลิตร ในจานปลอดเชื้อพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร จำนวน 3 ครั้ง โดยใช้ปิเปตต์ดูดโอโอไซต์ใส่จานปลอดเชื้อที่ 1 แล้วย้ายไปจานปลอดเชื้อที่ 2 และ 3 ตามลำดับ หลังจากนั้นย้ายโอโอไซต์ลงในจานเพาะเลี้ยงชนิด 4 หลุม (4-well petri dishes, Nunc, Roskilde, Denmark) ที่มีน้ำยา BO-IVF fertilization medium 500 ไมโครลิตรที่เตรียมไว้ก่อนหน้านี้ ทำการหยอดน้ำเชื้อลงในหลุมที่มีโอโอไซต์ เพาะเลี้ยงต่อในตู้เพาะเลี้ยงที่ควบคุมสภาวะ (คาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 18-19 ชั่วโมง

2.4 การเพาะเลี้ยงตัวอ่อน (*In vitro* embryo culture, IVC)

เมื่อสิ้นสุดเวลาการปฏิสนธิ ล้างตัวอ่อนในน้ำยา TCM-199 เสริมด้วย 5% FBS และ penicillin-streptomycin 10,000 IU/ml ปริมาตร 2-3 มิลลิลิตร ในจานปลอดเชื้อพลาสติกขนาด เส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร จำนวน 3 ครั้ง โดยใช้ปิเปตต์ดูดตัวอ่อนดูตัวอ่อนเข้าออกหลายๆครั้ง ใส่จานปลอดเชื้อที่ 1 แล้วย้ายไปจานปลอดเชื้อที่ 2 และ 3 ตามลำดับ เพื่อกำจัดเซลล์ที่หลุดออก จากนั้นนำตัวอ่อนมาล้างอีก 3 ครั้ง ในน้ำยา BO-IVC 1 step culture medium (IVF Bioscience, UK) ด้วยวิธีการเช่นเดิม แล้วจึงนำตัวอ่อนใส่ในน้ำยา BO-IVC 1 step culture medium (IVF Bioscience, UK) ในจานเพาะเลี้ยงแบบ 4 หลุม (4-well petri dishes, Nunc, Roskilde, Denmark) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร และเททับด้วย BO-OIL liquid paraffin (IVF Bioscience, UK) ปริมาณ 350 ไมโครลิตร เลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่ควบคุมสภาวะ (คาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ มากกว่า 95%) เพาะเลี้ยงจนถึงวันที่ 7 (วันที่ 1 คือวันที่เริ่มเพาะเลี้ยง) ทำการตรวจดูพัฒนาการของตัวอ่อน และบันทึกข้อมูล

ผลการทดลองและวิจารณ์

หลังการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่หลายใบด้วยฮอร์โมน พบว่าเพาะทดลองมีอัตราการตอบสนองของรังไข่เฉลี่ย 17.8 ± 6.23 ฟอลลิเคิลต่อตัว จากการเจาะฟอลลิเคิลทั้งหมด 178 ฟอลลิเคิลเพื่อเก็บโอโอไซต์ ได้โอโอไซต์ทั้งหมดจำนวน 135 โอโอไซต์ เฉลี่ย 13.5 ± 5.44 โอโอไซต์ต่อตัว โดยคิดเป็นอัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ (recovery rate) คือ ร้อยละ 75.84 (135/178) โดยพบโอโอไซต์เกรด A (COCs) มากที่สุด ร้อยละ 33.33 (45/135) ดังแสดงใน Table 1

Table 1. No. of aspirated follicles and No. of derived oocytes from LOPU in 10 donors.

Parameters	Total Amount	Mean $\pm$ S.D.	Min-Max
No. of aspirated follicles	178	17.8 $\pm$ 6.23	9-31
No. of derived oocytes (recovery rate)	135 (75.84)	13.5 $\pm$ 5.44	6-21
- No. of oocytes grade A (%)	45 (33.33)	4.5 $\pm$ 4.43	0-12
- No. of oocytes grade B (%)	39 (28.89)	3.9 $\pm$ 4.18	0-15
- No. of oocytes grade C (%)	39 (28.89)	3.9 $\pm$ 2.33	1-7
- No. of oocytes grade D (%)	12 (8.89)	1.2 $\pm$ 1.62	0-5

เมื่อนำโอโอไซต์ที่เก็บด้วยวิธี LOPU มาเข้ากระบวนการ IVP และคัดเลือกโอโอไซต์ที่เสื่อมสภาพออก หลังจากนั้นนำโอโอไซต์เข้าสู่กระบวนการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ (IVM) จนครบเวลา 23-25 ชั่วโมง พบว่ามีโอโอไซต์ที่เจริญพร้อมเข้าสู่กระบวนการปฏิสนธิ (IVF) จำนวน 116 โอโอไซต์ หลังจากกระบวนการปฏิสนธินาน 18-19 ชั่วโมง มีตัวอ่อนที่เข้าสู่กระบวนการการเพาะเลี้ยงตัวอ่อน (IVC) จำนวน 106 ตัวอ่อน และพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะคลีเวลและบลาสโตซิสต์ จำนวน 64 และ 42 ตัวอ่อน ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการปฏิสนธิ (Fertilization rate) คือ ร้อยละ (91.38 (106/116) อัตราการเกิดตัวอ่อนระยะคลีเวล (cleavage rate) ร้อยละ 55.17 และตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ (blastocyst rate) ร้อยละ 36.21 (42/116) ของจำนวนโอโอไซต์ที่เจริญพร้อมเข้าสู่กระบวนการปฏิสนธิตามลำดับ ดังแสดงใน Table 2

Table 2. *In vitro* production of caprine oocytes derived from LOPU.

Parameters	number	Percent
mature oocytes entering IVF	116	
embryos entering IVC	106	
embryos developed to cleavage stage	64	
embryos developed to blastocyst stage	42	
Fertilization rate of all matured oocytes entering IVF		91.38 (106/116)
Cleavage rate of all matured oocytes entering IVF		55.17 (64/116)
Blastocyst rate of all matured oocytes entering IVF		36.21 (42/116)

In vitro fertilization(IVF), *In vitro* embryo culture (IVC).

จุดประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อพัฒนาเทคนิคการเก็บโอโอไซต์แพะมีชีวิตด้วยวิธี LOPU ให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยพิจารณาจากจำนวนและคุณภาพโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ และสามารถนำโอโอไซต์นั้นไปเข้ากระบวนการปฏิสนธิในร่างกาย เพื่อให้ได้ตัวอ่อนที่สามารถพัฒนาจนถึงระยะบลาสโตซิสต์ ซึ่งเป็นระยะ ที่เหมาะสมสำหรับนำไปย้ายฝากให้แก่แม่ตัวรับ

ในการทดลองครั้งนี้ได้นำเอาเทคนิค LOPU ที่ใช้ Robertson's pipette เชื่อมต่อกับ OPU needle ซึ่งเป็นเข็มเบอร์ 18G ยาว 3 นิ้ว แบบความลาดเอียงของเข็มน้อย (short bevel) เข้ากับชุดอุปกรณ์เจาะเก็บโอโอไซต์และเครื่องปั๊มสุญญากาศ ร่วมกับการผ่าตัดแบบใช้กล้องลาพาโรสโคป จาก Table 1 พบว่าได้ผลอัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ (recovery rate) สูงถึงร้อยละ 75.84 และมีสัดส่วนของโอโอไซต์เกรด A มากถึงร้อยละ 33.33 ของโอโอไซต์ที่เก็บได้ทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพกับเทคนิค LOPU ของอรรถพล และคณะ (2564) ที่ทำการศึกษาความเป็นไปได้ของการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะด้วย LOPU และใช้โปรแกรมเดียวกันในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่หลายใบ แต่แตกต่างกันที่เทคนิคและอุปกรณ์ในการเจาะเก็บโอโอไซต์ ที่ใช้เข็ม injection set ซึ่งเป็นอุปกรณ์สำหรับผสมเทียมแพะแบบลาพาโรสโคปิก และแรงดูดสุญญากาศ ในระดับที่ต่ำกว่า คือ 30-40 มิลลิเมตรปรอท ได้ผลอัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ ร้อยละ 73.17 และมีสัดส่วนของของโอโอไซต์เกรด A เพียงร้อยละ 16.7 ของโอโอไซต์ที่เก็บได้ทั้งหมด นอกจากนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพกับเทคนิค LOPU ของ Wieczorek et al. (2020) ที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะด้วยวิธี LOPU โดยมีการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่ด้วยโปรแกรมฮอร์โมนแล้วทำการเจาะเก็บโอโอไซต์โดยใช้อุปกรณ์เข็มเบอร์ 20-22G ร่วมกับเทคนิคการใช้ grasping forceps และใช้ไซริงค์ในการดูดซึ่งเป็นแรงดูดสุญญากาศระดับต่ำและไม่สามารถเฝ้าระวังระดับของแรงดูดสุญญากาศดังกล่าวได้ พบว่ามีอัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ได้ร้อยละ 72 เห็นได้ว่าประสิทธิภาพ LOPU จากการทดลองในครั้งนี้ดีกว่าจากทั้งสองรายงานที่กล่าวถึง และจากข้อสังเกตอาจเป็นไปได้ว่า ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางและความลาดเอียงของเข็มที่เป็นอุปกรณ์ในการเจาะ รวมถึงระดับของแรงดูดสุญญากาศ มีผลต่ออัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ สอดคล้องกับรายงานของ Souza-Fabjan et al. (2014) ที่สนับสนุนว่าในการทำ LOPU แพะ ขนาดของเข็มมีผลทำให้ได้อัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ที่สูงกว่าแต่ไม่มีผลต่อคุณภาพโอโอไซต์ เมื่อพิจารณาแรงดูดสุญญากาศที่ใช้ ก็พบว่าไม่มีผลต่ออัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์และสัดส่วนโอโอไซต์คุณภาพดีด้วยเช่นกัน การศึกษาครั้งนี้ใช้แรงดูดสุญญากาศที่ 40-50 มิลลิเมตรปรอท สอดคล้องกับ Souza-Fabjan et al. (2014) ที่รายงานว่าแรงดูดสุญญากาศที่เหมาะสม ควรอยู่ในช่วง 25-70 มิลลิเมตรปรอท หากแรงดูดสุญญากาศน้อยกว่า 25 มิลลิเมตรปรอท จะทำให้อัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ได้ต่ำ และหากใช้แรงดูดสุญญากาศมากกว่า 100 มิลลิเมตรปรอท จะทำให้สัดส่วนของโอโอไซต์เกรด A ต่อโอโอไซต์ที่เก็บได้ทั้งหมดลดลง สอดคล้องกับรายงานของเอกชาติ และคณะ (2543) ที่สนับสนุนว่าเมื่อใช้แรงดูดสุญญากาศมากเกินไป จะทำให้ได้โอโอไซต์ที่ไม่มีเซลล์นิวเคลียสและยังไม่เจริญเต็มที่ (immature oocyte) เป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นโอ

โอโอไซด์ที่มีคุณภาพไม่เหมาะสมสำหรับนำมาเข้ากระบวนการ IVP นอกจากนั้น Souza Fabjan et al. (2014) ยังได้รายงานว่า อัตราการไหลของของเหลวในการเก็บโอโอไซด์ก็มีผลต่อการเก็บโอโอไซด์คุณภาพดีในแพะด้วยเช่นกัน พบว่าอัตราการไหลของของเหลวที่สม่ำเสมอ 7-7.5 มิลลิลิตร/นาที จะทำให้ได้โอโอไซด์คุณภาพดีมากถึงร้อยละ 70 เมื่อพิจารณาขนาดของเข็มเจาะ แม้ว่าการเจาะดูดโอโอไซด์ด้วยปลายเข็มที่ขนาดใหญ่กว่า อาจทำให้สามารถเก็บโอโอไซด์ได้ปริมาณมากขึ้นแต่ขนาดของปลายเข็มที่ใหญ่เกินไปนั้นก็ยังมีข้อด้อย คือ อาจทำให้รังไข่บอบช้ำได้ อย่างไรก็ตามการบาดเจ็บที่เกิดขึ้นอาจขึ้นอยู่กับทักษะความชำนาญของผู้ปฏิบัติงานด้วย มีรายงานของ Anna et al. (2003) ระบุว่าหากมีการบาดเจ็บของรังไข่เนื่องจาก LOPU จำนวนโอโอไซด์ที่เก็บได้ในแต่ละครั้งจะลดลงสวนทางกับจำนวนครั้งที่เจาะเก็บโอโอไซด์และภายหลังการเก็บโอโอไซด์อาจมีโอกาสดังกล่าวเกิดขึ้นได้ประมาณร้อยละ 30 จากการทำ LOPU ซ้ำ ในช่วงเวลา 10 สัปดาห์ (Mencheca et al., 2016)

สิ่งที่จะทำให้ IVP ประสบความสำเร็จ มี 2 ปัจจัยหลัก คือ คุณภาพโอโอไซด์ที่เหมาะสมสำหรับ IVP และระยะเวลาระหว่างนำโอโอไซด์ออกจากฟอลลิเคิลไปถึงขั้นตอนการเพาะเลี้ยงโอโอไซด์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ (IVM) (Jie et al., 2018) จากการพัฒนาเทคนิค LOPU ครั้งนี้ สามารถเจาะเก็บโอโอไซด์ที่มีคุณภาพเกรด A และเกรด B ได้เป็นจำนวนมากถึงร้อยละ 33.33 และ 28.89 ตามลำดับ ซึ่งโอโอไซด์เกรด A สามารถพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะคอมแพคมอรูล่า และระยะบลาสโตซิสต์ดีกว่าโอโอไซด์เกรด B (Mondal et al., 2008) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้คัดเลือกเฉพาะโอโอไซด์เกรด A และ B เท่านั้น ที่มาเข้ากระบวนการ IVP แต่ได้มีการนำเอาโอโอไซด์เกรด C มาเพาะเลี้ยงรวมด้วย เนื่องจากมีรายงานของ Choi et al. (2013) สนับสนุนว่าการเพาะเลี้ยงโอโอไซด์เกรด A ร่วมกับ เกรด C จะทำให้พัฒนาการและคุณภาพของตัวอ่อนจากการทำ IVF ดีขึ้น

นอกจากนั้น ระยะเวลาระหว่างนำโอโอไซด์ออกจากฟอลลิเคิลไปถึงขั้นตอนการเพาะเลี้ยงโอโอไซด์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ (IVM) ก็มีผลต่อความสำเร็จของกระบวนการ IVP เช่นกัน โดยรายงานของ Jie et al. (2018) สนับสนุนว่า ขั้นตอนนี้ควรใช้เวลาให้น้อยที่สุด เนื่องจากในขณะที่โอโอไซด์หลุดออกจากฟอลลิเคิลบนรังไข่แล้ว โอโอไซด์จะถูกเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการ meiosis ตามธรรมชาติ ส่งผลให้ไซโทพลาสซึมกับนิวเคลียสของโอโอไซด์ไม่สัมพันธ์กัน หากใช้เวลาระหว่างนำโอโอไซด์ออกจากฟอลลิเคิลไปถึงขั้นตอน IVM นาน จะทำให้โอโอไซด์นั้นมีโอกาสเสื่อมสภาพมากยิ่งขึ้น เป็นการลดความสามารถในการพัฒนาของโอโอไซด์ ดังนั้น ทักษะการปฏิบัติงานเป็นทีมภาคสนามเพื่อนำโอโอไซด์ออกจากตัวแพะก่อนส่งต่อไปยังห้องปฏิบัติการควรต้องทำงานประสานสอดคล้องกันอย่างดี ให้เกิดความรวดเร็วและเป็นการป้องกันความเสียหายที่อาจเกิดขึ้นได้ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ ใช้ระยะเวลาในการเก็บโอโอไซด์แพะตั้งแต่ขึ้นเตี้ยผ่าตัดจนถึงนำของเหลวจากฟอลลิเคิลส่งห้องปฏิบัติการ ประมาณ 20 นาทีต่อตัว

ช่วงเวลาที่โอโอไซต์และอสุจิพร้อมที่จะผสมกันมากที่สุด (fertile span) นั้น เป็นช่วงเวลาที่ยากัดและแตกต่างออกไปตามคุณภาพของโอโอไซต์และอสุจิ หากคุณภาพไม่ดีมาก ระยะเวลาที่เหมาะสมอาจสั้น โอกาสในการปฏิสนธิได้ก็จะต่ำลง ดังนั้น จึงจำเป็นต้องมีการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้พร้อมปฏิสนธิ (IVM) และตรวจคุณภาพอสุจีก่อนใช้งาน นอกจากนั้นในห้วงกระบวนการ IVF จำเป็นต้องอาศัยระยะเวลาที่เพียงพอสำหรับการทำปฏิสนธิซึ่งห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งมีการใช้ระยะเวลาในการทำ IVF ที่แตกต่างกันออกไประหว่าง 6-24 ชั่วโมง ตามโปรแกรมของแต่ละห้องปฏิบัติการ (Jie et al., 2018) ในการศึกษาครั้งนี้ เลือกใช้เวลาในขั้นตอน IVF 18-19 ชั่วโมง ซึ่งเพียงพอที่จะให้เกิดการปฏิสนธิ และได้อัตราการปฏิสนธิ ร้อยละ 91.38 (106/116) ของโอโอไซต์ที่เจริญพร้อมเข้าสู่กระบวนการปฏิสนธิ อย่างไรก็ตามการเพิ่มเวลาในกระบวนการ IVF เพื่อเพิ่มอัตราการปฏิสนธิ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

จากผลการทดลองพัฒนาเทคนิคการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะด้วยวิธี LOPU และผลิตตัวอ่อนแพะจากโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ด้วยวิธีปฏิสนธิภายนอกร่างกายครั้งนี้ ทำให้มั่นใจได้ว่า LOPU เป็นเทคนิคที่เหมาะสม ในการเก็บโอโอไซต์จากแพะมีชีวิต เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถเก็บโอโอไซต์ได้จริง มีความปลอดภัยสูง รวดเร็วแพะมีความบอบช้ำจากการผ่าตัดน้อย บาดแผลมีขนาดเล็ก แผลหายเร็ว และหลังการเก็บโอโอไซต์แล้วแพะยังมีสวัสดิภาพที่ดี ความสำเร็จของเทคนิค LOPU ภายใต้การเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่หลายใบด้วยโปรแกรมฟอลลิเคิล ความลาดเอียงของเข็มน้อย แรงดูดสุญญากาศและอัตราการไหลของของเหลวในการเก็บโอโอไซต์ที่เหมาะสม ร่วมกับการยึดตรึงรังไข่เพื่อให้เกิดความแม่นยำ จะทำให้ได้อัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ที่สูงและโอโอไซต์คุณภาพดี เหมาะสำห้รนำไปเข้ากระบวนการ IVP จนเพาะเลี้ยงได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ ซึ่งเป็นระยะที่เหมาะสมที่จะนำไปย้ายฝากให้แก่แม่ตัวรับต่อไป

สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาเทคนิคการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะที่ถูกเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่หลายใบ ด้วยวิธี LOPU โดยการใช้ OPU needle ขนาด 18G ยาว 3 นิ้ว แบบความลาดเอียงของเข็มน้อย (short bevel) ร่วมกับการใช้กล้องลาพาโรสโคป ที่แรงดูดสุญญากาศ 40-50 มิลลิเมตรปรอท พบว่าแพะมีการตอบสนองโดยการสร้างฟอลลิเคิลของรังไข่เฉลี่ย 17.8 ± 6.23 ฟอลลิเคิลต่อตัว ในจำนวนนี้มีโอโอไซต์ที่สามารถเจาะเก็บได้เฉลี่ย 13.5 ± 5.44 โอโอไซต์ต่อตัว โดยมีอัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ (recovery rate) ร้อยละ 75.84 (135/178) เมื่อนำโอโอไซต์นั้นเข้ากระบวนการผลิตตัวอ่อนด้วยวิธีปฏิสนธิภายนอกร่างกาย พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิ ร้อยละ 91.38 (106/116) มีตัวอ่อนเจริญจนถึงระยะคลีเวจและบลาสโตซิสต์ ร้อยละ 55.17 (64/116) และ 36.21 (42/116) ของจำนวนโอโอไซต์ที่เจริญพร้อมปฏิสนธิ

ข้อเสนอแนะ

ในปัจจุบันการพัฒนาเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการปฏิสนธิอกร่างกายแพะของประเทศไทยยังเป็นเพียงจุดเริ่มต้นและอยู่ระหว่างการพัฒนา ทางผู้เขียนมีความคิดเห็นว่าควรศึกษาในประเด็นอื่นที่เกี่ยวข้องเพิ่มเติม นอกเหนือไปจากเทคนิคการเก็บโอโอไซด์เพื่อนำไปผลิตตัวอ่อนอกร่างกาย เป็นการเพิ่มขีดความสามารถของการขยายพันธุ์สัตว์พันธุ์ดีสู่เกษตรกร เช่น การพัฒนาโปรแกรมเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกระตุ้นการตกไข่หลายใบที่เหมาะสมต่อการเกิดฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ที่อาจทำให้ได้โอโอไซด์คุณภาพดีและเหมาะสมต่อการนำมาทำ IVP หรือการลดปริมาณตัวสุจิที่จะทำปฏิสนธิในกระบวนการ IVF เพื่อให้สามารถใช้ประโยชน์จากน้ำเชื้อที่พันธุ์กรรมดีแต่ มีจำนวนจำกัดได้อย่างคุ้มค่า รวมทั้งการพัฒนาโปรแกรมการแช่แข็งตัวอ่อน IVP เพื่อนำไปย้ายฝากแก่แม่ตัวรับให้เป็นลูกเกิดจากการปฏิสนธิอกร่างกายต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสัตวแพทย์หญิง ดร.สายใจ ชื่นสุข นายสัตวแพทย์ฉันทน์ ศิริรัตนัญญกุล และคณะกรรมการวิจัยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ทุกท่านที่ให้ความรู้และคำแนะนำด้านรูปแบบการเขียนงานวิจัย นายสัตวแพทย์อนนท์ เทืองสันเทียะ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ ที่ให้ความรู้เกี่ยวกับสัตว์ทดลองและปฏิบัติงานด้านผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย ดร.สุจิรา ธรรมวัง ที่ให้คำแนะนำด้านการอ่านผลทางห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานห้องปฏิบัติการ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ คุณนิทยา วาปีกา นักวิทยาศาสตร์ที่ให้ความรู้และตรวจหาโอโอไซด์รวมถึงปฏิบัติงานผลิตตัวอ่อนจากการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย คุณจิราภา ขาวสุข นักวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความรู้และตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อแพะ ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ที่มิดูแลสุขภาพและการจัดการแพะพ่อแม่พันธุ์ที่ช่วยควบคุมดูแลแพะและรีดเก็บน้ำเชื้อแพะ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ช่วยเหลือ งานวิจัยครั้งนี้ประสบความสำเร็จเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานด้านเทคโนโลยีชีวภาพในวงการปศุสัตว์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- วิบูลย์ เยี่ยงวิศวกุมมาลี อภิเมธีธารัง ยันต์ สุขวงศ์. 2540. การศึกษาเบื้องต้น: การผลิตตัวอ่อนโคระยะบลาสโตซิสต์โดยการปฏิสนธิอกร่างกาย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 35 : สาขาสัตวแพทยศาสตร์ 3-5 กุมภาพันธ์ 2540. กรุงเทพมหานคร : 475-479
- ศูนย์สารสนเทศและการสื่อสาร กรมปศุสัตว์, 2564. แหล่งที่มา : <https://ict.dld.go.th/webnew/index.php/th/service-ict/report/365-statsummary-typeanimal/statsummary-goat>, 20 สิงหาคม 2564.
- อรรถพล พรประไพ อนนท์ เทืองสันเทียะ พิงค์ลานนา ภูยธร และมาลี อภิเมธีธารัง. 2564. การศึกษาความเป็นไปได้ในการเจาะเก็บโอโอไซด์แพะด้วยวิธี laparoscopic ovum pick-up (LOPU) และการผลิต

- ตัวอ่อนภายนอกร่างกายในประเทศไทย. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 12(1) : 136-160.
- เอกชาติ พรหมดิเรก มงคลเตชะกำพุ นวเพ็ญ ภูติภินิษฐ์ อัญชลี ณ เชียงใหม่. 2543. การศึกษาเบื้องต้นของการเก็บโอโอไซต์. เวชสารสัตวแพทย์. ปีที่ 30 ฉบับที่ 1 : 43-50.
- Anna, A.A., M.N. Hisham, W.E. Wan Khadijah and R.B. Abdullah. 2013. Comparative Study on Goat Oocyte Recovery Methods and Factors Affecting the Quantity of Oocytes. Asian J. Anima. Vet. Adv. Vol8 (3) : 437-448.
- Antonio, H.M., 2018. Aspiration of oocytes by laparoscopy for embryo transfer in goat : a review. ABANICO VETERINARIO. Vol8(2) : 14-23.
- 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.
- Jie, Z., A.R. Moawadb, C. Wanga, H. Lia, J. Rena and Y. Daia. 2018. Review Article Advances in *In vitro* production of sheep embryos. *Int. J. Vet. Sci. Med.* Vol6 : 15-26.
- Mencheca, A., N. Barrera, P.C.D. Santos Neto, F. Cuadro and M. Crispo. 2016. Advances and limitations of in vitro embryo production in sheep and goat. Anim. Reprod. Vol13 (3) : 273-278.
- 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. 37(1) : 1-9.
- Paramio MT. 2010. *In vivo* and *In vitro* embryo production in goats. Reprod Domest Anim. 49 (4) : 37-48
- 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., P. Barbara, D. Nicolas, L. Yann, F. Jose Ricardo, F. F. Vicente Jose and P. Mermillod. 2014. *In vitro* production of small ruminant embryos : Late improvements and future research. Theriogenology. 81 : 1149-1162.
- 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.