



วารสารเทคโนโลยีชีวภาพ การผลิตปศุสัตว์

ISSN :
1905-6877



JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY IN LIVESTOCK PRODUCTION

ปีที่ 14 : พ.ศ. 2566

Vol 14 : 2023

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

BUREAU OF BIOTECHNOLOGY IN LIVESTOCK PRODUCTION
DEPARTMENT OF LIVESTOCK DEVELOPMENT

สาส์นจากบรรณาธิการบริหาร

วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ (Journal of Biotechnology in Livestock Production) ดำเนินการต่อเนื่องเข้าสู่ปีที่ 14 โดยมุ่งเน้นการเผยแพร่ผลงานวิจัยและบทความทางวิชาการ อันเป็นส่วนหนึ่งของการพัฒนาทักษะให้แก่นักวิจัยและนักวิชาการ ในด้านเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ เพื่อตอบโจทย์การพัฒนาการเลี้ยง ผลิตและขยายพันธุ์สัตว์ให้มีผลผลิต ระบบสืบพันธุ์ และสุขภาพที่ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่งการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูงที่ทันสมัย ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตปศุสัตว์ทุกชนิด ไม่ว่าจะเป็นด้านการจัดการฟาร์ม การผสมเทียม การผลิตน้ำเชื้อและตัวอ่อน การคัดเลือกและประเมินพันธุกรรมสัตว์ในระดับดีเอ็นเอ และจีโนม ไปจนถึงระดับโมเลกุล และสาขาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

สถานการณ์ในปัจจุบัน ยังคงมีความท้าทายในส่วนของโรคระบาดในสัตว์ ได้แก่ โรคล้มปัสกิน (Lumpy Skin Diseases) ในโคกระบือ และโรคอหิวาแอฟริกาในสุกร (African Swine Fever Diseases; AFS) ร่วมกับสถานะต้นทุนอาหารสัตว์และต้นทุนการผลิตอื่นที่เพิ่มสูงขึ้นจากวิกฤตพลังงาน ประกอบกับการแข่งขันในยุคการค้าเสรี ดังนั้นการศึกษาวิจัยจึงน่าจะเป็นทางออกที่สำคัญ เพื่อนำมาแก้ไขปัญหาต่างๆ และเพิ่มศักยภาพการผลิตให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น อันจะส่งผลต่อความสามารถในการแข่งขันให้เกษตรกร สร้างรายได้ สร้างอาชีพ สร้างความมั่นคงทางอาชีพและเศรษฐกิจฐานราก และเศรษฐกิจโดยรวมของประเทศที่ดีขึ้น

วารสารฉบับนี้ ยินดีเปิดรับบทความที่เป็นบทความวิจัย และบทความวิชาการในทุกสาขา โดยทุกบทความ จะได้รับการตรวจพิจารณาจากกองบรรณาธิการ เพื่อคุณภาพและคุณค่าของวารสารที่เหมาะสมต่อการเผยแพร่ และเป็นแหล่งข้อมูลในการศึกษาค้นคว้า อ้างอิง โดยทางกองบรรณาธิการหวังเป็นอย่างยิ่งว่าจะสามารถเป็นแหล่งสืบค้นและเป็นองค์ความรู้ที่เป็นประโยชน์ ในการพัฒนางานวิจัยนวัตกรรมใหม่ๆ และนำไปสู่การใช้ประโยชน์ในวงการปศุสัตว์และสาขาอื่นที่เกี่ยวข้อง ต่อไป



(นายกิติกรณ เจนไพบูลย์)

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 0-2501-2438

กำหนดออก

ปีละ 1 ฉบับ

บรรณาธิการบริหาร

น.สพ. กิติกรณ์ เจนไพบูลย์

บรรณาธิการ

นางจตุพร พงษ์เพ็ง

ผู้ช่วยบรรณาธิการ

สพ.ญ. เพชรร้อย เพชรเรียง

กองบรรณาธิการ

น.สพ. ภาณุพันธ์ พงษ์เพ็ง

น.สพ. ณัฐนันท์ ศิริรัตนธัญญกุล

น.สพ. อรุณ จันทร์กระจ่าง

น.สพ. พีระพงษ์ สำราญทรัพย์

น.สพ. รัชชัย โพธิ์คำ

น.สพ. วรพงษ์ พงษ์ศิริ

นายสมศักดิ์ เปรมปรีดี

น.สพ. ภัทรพล สำเร็จดี

สพ.ญ. เพชรร้อย เพชรเรียง

ผู้จัดการวารสาร

นายเริงวุฒิ วรวุฒิ

สพ.ญ. เพชรร้อย เพชรเรียง

นางอัมภาพันธุ์ ลีละสิริ

ข้อเสนอแนะสำหรับผู้เขียน

วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ เป็นวารสารทางวิชาการของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพ การผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ กำหนดออกปีละ 1 ฉบับ โดยวารสารจะตีพิมพ์บทความ ผลงาน ค้นคว้าวิจัยด้านการผลิตปศุสัตว์ ทั้งด้านการพัฒนา และปรับปรุงพันธุ์ การจัดการอาหาร สุขภาพ และ ระบบสืบพันธุ์ ตลอดจนการขยายพันธุ์ และการใช้ เทคโนโลยีชีวภาพที่ก้าวหน้าในการปรับปรุงและพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตปศุสัตว์ด้าน ต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น คณะผู้จัดทำวารสาร เทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ยินดีรับเรื่อง จากทุกท่านที่ส่งมาเพื่อเผยแพร่ และเพื่อความ สะดวกในการพิจารณา ขอเสนอแนะดังนี้

1. เรื่องที่จะตีพิมพ์

1.1 งานทดลอง วิจัย ทางวิชาการ (Technical/ Research papers) หรือวิทยานิพนธ์ เป็นการเสนอ ผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้ทำขึ้นเอง

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

1.3 เรื่องอื่นๆ ที่กองบรรณาธิการพิจารณา เห็นสมควร

2. ต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่ ส่งมาตีพิมพ์ในวารสาร เทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ไม่ควรเป็นเรื่อง ที่เคยเผยแพร่ หรือ กำลังอยู่ระหว่างการพิจารณา เพื่อเผยแพร่ในวารสารอื่น

2.2 ต้นฉบับเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ พิมพ์บนกระดาษ เอ 4 จำนวนไม่เกิน 12 หน้า โดย จัด พิมพ์ ด้วย Microsoft Word for Windows หรือใช้ชนิดและขนาดตัวอักษรตามที่กำหนด

2.3 ไม่มีการส่งคืนต้นฉบับ

3. การลำดับเรื่องในต้นฉบับ

เพื่อให้ขบวนการการพิจารณาผลงาน วิชาการและการดำเนินการจัดพิมพ์วารสารเป็นไป อย่างเรียบร้อยรวดเร็ว และถูกต้อง จึงจำเป็นต้อง ให้ผู้เขียนผลงานวิชาการปฏิบัติตามข้อกำหนด อย่างเคร่งครัด ดังนี้

3.1 ให้ส่งต้นฉบับเอกสารผลงาน จำนวน 1 ชุด พร้อมไฟล์ Microsoft word

3.2 ต้นฉบับผลงานที่ส่งมา ให้ตรวจสอบความ ถูกต้องของตัวสะกด รูปแบบการจัดพิมพ์ให้ถูกต้อง ตามที่กำหนด

3.3 เมื่อผลงานผ่านการพิจารณาจากกอง บรรณาธิการแล้ว จะแจ้งกลับไปยังเจ้าของผลงาน พร้อมส่งต้นฉบับเพื่อให้แก้ไขตามที่กองบรรณาธิการ เสนอแนะ

ส่งผลงานที่ แก้ไข ถูกต้องแล้วตามข้อ แนะนำของกองบรรณาธิการ ในรูปแบบเอกสาร ไฟล์ 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)** เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้ง
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
ปัญหาและวัตถุประสงค์และควมมีการตรวจเอกสาร
(literature review)

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

4.7.3 ผลการทดลอง (Results) รายงาน
ผลการทดลองเป็นคำบรรยาย ให้ละเอียดและ
เข้าใจง่าย โดยแบ่งเป็นหลายๆ ย่อหน้า และจัด
ข้อความที่มีเนื้อหาเดียวกันไว้ด้วยกัน หากเป็นไปได้
ควรเสนอในรูปแบบของตารางหรือรูปภาพ 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
พยายามเน้นถึงปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญ
ของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อ
การวิจัยในอนาคตและลู่ทางที่จะนำไปใช้เป็น
ประโยชน์

4.7.5 สรุปผลการทดลอง (Conclusion)
ควรเป็นใจความที่สำคัญ กระชับเป็นไปตาม

วัตถุประสงค์และคุณค่าของงานเพื่อให้ผู้อ่านเข้าใจง่ายขึ้น

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 แปนตุ้ม 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 วิจัย 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 ให้ยกค่านั้นทั้งคำไปพิมพ์ในบรรทัดต่อไป ไม่ควรตัดส่วนท้ายของ คำไปพิมพ์ในบรรทัดใหม่ เช่น กระบือปลัก ไม่ให้แยกเป็น กระบือ-ปลัก เป็นต้น จุลชีพ เช่น *Escherichia coli* หรือพิมพ์ตัวเอน *Escherichia coli*
- หลังเครื่องหมาย . และ , หรือ; เคาะ 1 เคาะพืช เช่น *Oryza sativa* หรือพิมพ์ตัวเอน *Oryza sativa*
- ระหว่างคำสุดท้าย กับเครื่องหมาย . และ , ไม่เว้นช่องว่าง สัตว์ เช่น *Bos taurus* หรือ พิมพ์ด้วยตัวเอน *Bos taurus*

- ไม่ต้องเว้นช่องว่าง ระหว่างวงเล็บ และคำ
ข้างในวงเล็บ เช่น (รพีพรรณ และคณะ)

การลำดับหน้า

- ลำดับหน้าโดยใช้หมายเลข 1,2,3.....

ที่กึ่งกลางหน้ากระดาษ

ตาราง รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ

- ตารางประกอบด้วย เลขที่ของตาราง
(table number) ชื่อของตาราง (table title) หัว
ตาราง (table heading) และที่มาของตาราง (ถ้า
มี) โดยให้ทำเป็นภาษาอังกฤษหรือภาษาไทยทั้ง
ตาราง พิมพ์อยู่ในหน้าเดียวกันทั้งหมด

- กรณีตารางมีความยาวมาก ไม่สามารถ
สิ้นสุดในหน้าเดียวได้ ให้พิมพ์ส่วนที่เหลือในหน้า
ถัดไปโดยพิมพ์เลขที่ตารางและตามด้วยคำว่า (ต่อ)

- กรณีรูปภาพ แผนที่ แผนภูมิ กราฟ ควร
เป็นภาพขาวดำ และใช้แนวทางข้างต้น

การพิมพ์ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิต ให้
ใช้ตามประมวลนามศาสตร์สากล (International
code of nomenclature) คือ **ขีดเส้นใต้** หรือ
พิมพ์ด้วยตัวเอน ชื่อวิทยาศาสตร์เป็นไปตามการ
ตั้งชื่อ

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
1. การศึกษาเปรียบเทียบการย้ายฝากตัวอ่อนแพะชนิดตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งจากการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย (พิงค์ลันนา กุญชร อรรถพล พรประไพ)	1
2. ผลของโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบต่อปริมาณ คุณภาพของโอโอไซต์และตัวอ่อนด้วยวิธี LOPU-IVP ในแม่แพะตัวให้ (อรรถพล พรประไพ พิงค์ลันนา กุญชร)	14
3. รูปแบบของยีน melanocortin-1 receptor (MC1R) ต่อการแสดงออกของสีขนในโคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์ (ณัฐนันท์ ศิริรัตนัญญกุล เพชรร้อย เพชรเรียง)	32
4. การตรวจยีนด้อยก่อโรค Complex Vertebral Malformation (CVM) ในโคทรอปิคอลโฮลสไตน์ด้วยเทคนิค real-time PCR (ณัฐนันท์ ศิริรัตนัญญกุล ณชัย ศราธพันธุ์ บุหงา จินดาวานิชสกุล)	52
5. การประเมินความหลากหลายของลายพิมพ์พันธุกรรมในโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ (กัลยา เก่งวิทย์กรรม ณรงค์กร เกษมสุข ณัฐนันท์ ศิริรัตนัญญกุล)	65
6. ผลของคอร์ปัสลูเทียม ฟอลลิเคิลและระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในวันย้ายฝากตัวอ่อนต่ออัตราการตั้งท้องของโคนเนื้อตัวรับ (กอบสุข ทองสอดแสง ธนพล แอมปรัชฌาย์)	77
7. การพัฒนาแอปพลิเคชันสำหรับการจัดการฟาร์มโคนม iFarmer Plus (मुखसुदा रेड्ढागी चक्रित बुढररररर)	94



การศึกษาเปรียบเทียบการย้ายฝากตัวอ่อนแพะชนิดตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็ง

จากการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย

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

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของการย้ายฝากตัวอ่อนแพะชนิดตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งจากการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย ในแพะตัวรับที่ได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมน progesterone PGF_{2α} และ PMSG จำนวน 50 ตัว ด้วยตัวอ่อนอายุ 7 วัน ที่พัฒนาในระยะที่ 5 (early blastocyst) 6 (blastocyst) 7 (expanded blastocyst) หรือ 8 (hatched blastocyst) ซึ่งผลิตด้วยวิธี laparoscopic ovum pick up and *in vitro* embryo production (LOPU-IVP) หลังจากแพะแสดงอาการเป็นสัด 7 วัน ทำการย้ายฝากตัวอ่อนด้วยเทคนิค semi-laparoscopy จำนวน 2 ตัวอ่อน/ตัวรับ ให้กับแพะตัวรับ 2 กลุ่ม (กลุ่มละ 25 ตัว) กลุ่มที่ 1 ย้ายฝากด้วยตัวอ่อนสด และกลุ่มที่ 2 ย้ายฝากด้วยตัวอ่อนที่แช่แข็งด้วยวิธี conventional slow freezing และใช้สารเอทิลีนไกลคอลชนิดสำเร็จรูปเป็นน้ำยาแช่แข็ง จากนั้นทำการตรวจการตั้งท้องแพะด้วยอัลตราซาวด์ หลังจากย้ายฝากตัวอ่อน 38 วัน ผลการทดลองพบว่าแพะตัวรับทั้ง 2 กลุ่ม มีอัตราการตั้งท้อง อัตราการแท้ง จำนวนลูกต่อครอก และอัตราการให้ลูกแฝดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งร้อยละ 52.00 และ ร้อยละ 36.00 ตามลำดับ อัตราการแท้งจากการย้ายฝากตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งร้อยละ 7.69 และ ร้อยละ 0 ตามลำดับ โดยการย้ายฝากตัวอ่อนสด และแช่แข็งจะให้ค่ามัธยฐานจำนวนลูกต่อครอก เท่ากับ 1 และอัตราการให้ลูกแฝดจากการย้ายฝากตัวอ่อนสด และ ตัวอ่อนแช่แข็ง ร้อยละ 30.77 และ ร้อยละ 11.11 ตามลำดับ นอกจากนี้ ระยะของตัวอ่อนที่พัฒนาในระยะที่ 5 และ 6 หรือ 7 และ 8 ที่ใช้ในการย้ายฝาก มีผลต่ออัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากด้วยตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งไม่แตกต่างกันสรุปได้ว่าผลของการย้ายฝากตัวอ่อนแพะชนิดตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งจากการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายในแพะตัวรับที่ได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัด มีอัตราการตั้งท้อง อัตราการแท้ง จำนวนลูกต่อครอก และอัตราการให้ลูกแฝดไม่แตกต่างกัน และสามารถใช้ตัวอ่อนที่ผลิตภายนอกร่างกายได้ทั้งระยะ early blastocyst blastocyst expanded blastocyst และ hatched blastocyst

คำสำคัญ : การย้ายฝากตัวอ่อน การผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย การแช่แข็งตัวอ่อน แพะ

เลขทะเบียนวิชาการ : 65(2)-0208-118

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

A Comparative Study on Fresh and Frozen Embryo Transfer after *In vitro* embryo production in goats

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

Abstract

This study aimed to compare the outcome of fresh and frozen embryo transfer after *in vitro* embryo production (IVP) in goats. Fifty recipients were synchronized by progesterone, PGF2 α and PMSG hormones. Day 7 IVP embryos at development stages of (5) early blastocyst, (6) blastocyst, (7) expanded blastocyst or (8) hatched blastocyst from laparoscopic ovum pick up and *in vitro* embryo production (LOPU-IVP) were used. On day-7 after estrus, 2 embryos/recipient were transferred into 2 groups of recipients (25 recipients per group) using semi-laparoscopy technique. The first group of recipients received fresh embryos while the second group received frozen embryos produced by conventional slow freezing method with commercial ethylene glycol as cryoprotectants. The pregnancy were determined at 38 days after embryo transfer. Results showed that pregnancy rate, abortion rate, litter size and twin rate were not significantly different between 2 groups ($p < 0.05$). Pregnancy rate from fresh and frozen embryo transfer were 52.00% and 36.00%, respectively. Abortion rate from fresh and frozen embryo transfer were 7.69 % and 0%, respectively. Median of litter size was 1 in both groups while twin rate were 30.77 and 11.11 for fresh and frozen embryo transfer groups, respectively. Furthermore, pregnancy rate from embryo transfer with 5 and 6 or 7 and 8 embryo stages were not different between 2 groups ($p < 0.05$). In conclusion, the outcome of fresh and frozen embryo transfer after *In vitro* embryo production in synchronized recipient goats were not significantly different for pregnancy rate, abortion rate, litter size and twin rate. Embryos produced *in vitro* from stages early blastocyst, blastocyst, expanded blastocyst and hatched blastocyst can be used for embryo transfer.

keywords : embryo transfer, *In Vitro* Embryo Production, embryo cryopreservation, goat.

Registered No. : 65(2)-0208-118

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

คำนำ

การผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย (*In vitro* embryo production) เป็นเทคโนโลยีชีวภาพที่นำเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียหรือโอโอไซต์และเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้หรือสเปิร์มาปฏิสนธิกันในห้องทดลองภายใต้สภาวะที่เหมาะสม พัฒนาเป็นตัวอ่อนในระยะที่สามารถนำไปย้ายฝากในมดลูกของสัตว์เพศเมียที่เป็นตัวรับให้ตั้งท้องต่อไป โดยเทคโนโลยีการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย ถูกพัฒนาและนำมาใช้จนประสบความสำเร็จในปศุสัตว์หลายชนิด ได้แก่ โค สุกร ม้า แพะ แกะ และกระบือ มีรายงานว่าในต่างประเทศสามารถผลิตแพะจากการย้ายฝากตัวอ่อนที่ผลิตภายนอกร่างกายสำเร็จเป็นครั้งแรก ในปี ค.ศ. 1993 และมีการพัฒนาเทคโนโลยีนี้ในปศุสัตว์เรื่อยมา (Han et al., 2001) จากรายงานสถิติของการย้ายฝากตัวอ่อนปศุสัตว์ ใน 5 ทวีป ได้แก่ แอฟริกา เอเชีย ยุโรป อเมริกา และโอเชียเนีย ของ The International Embryo Technology Society (IETS) พบว่าตั้งแต่ปี ค.ศ. 2001 - 2019 ตัวอ่อนที่ผลิตภายนอกร่างกาย (*In vitro* produced; IVP) มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น สวนทางกับตัวอ่อนที่ผลิตภายในร่างกาย (*In Vivo* derived; IVD) ที่มีแนวโน้มลดลง (Chair, 2019) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในแพะ ที่มีรายงานว่าในปี ค.ศ. 2020 การผลิตตัวอ่อน IVP เพิ่มขึ้นร้อยละ 204.1 และการย้ายฝากตัวอ่อน IVP เพิ่มขึ้นร้อยละ 45.8% เมื่อเปรียบเทียบกับปี ค.ศ. 2019 (Chair, 2020) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการผลิตตัวอ่อน IVP กำลังเข้ามามีบทบาทแทนที่การผลิตตัวอ่อน IVD ที่เคยนิยมใช้

ในประเทศไทย ส่วนใหญ่ใช้การผลิตตัวอ่อน IVD และประสบปัญหาการใช้ประโยชน์จากแพะตัวให้ได้จำกัดอันเนื่องมาจากการยึดติดของอวัยวะภายในหลังการผ่าตัดผ่านทางหน้าท้อง (Laparotomy) เพื่อเก็บตัวอ่อน ทำให้สามารถผลิตตัวอ่อน IVD เข้าในแพะตัวเดิมได้เพียง 2-3 ครั้งเท่านั้น และแพะตัวให้ที่นำมาผลิตตัวอ่อน IVD ต้องมีระบบสืบพันธุ์ที่สมบูรณ์ สามารถปฏิสนธิในภายในร่างกายได้ ดังนั้น จึงมีการเริ่มต้นพัฒนาการผลิตตัวอ่อน IVP ขึ้นมาเพื่อลดข้อจำกัดของการผลิตตัวอ่อน IVD มีรายงานการผลิตตัวอ่อน IVP ในแพะมีชีวิตสำเร็จครั้งแรกในปี พ.ศ. 2564 โดยศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ (อรรถพล และคณะ, 2564) ด้วยการเก็บโอโอไซต์แบบการส่องกล้องลาพารอสโคปี หรือที่เรียกว่า เทคนิค laparoscopic ovum pick up and *in vitro* embryo production (LOPU-IVP) จนได้ ตัวอ่อนอายุ 7 วัน ที่ระยะ blastocyst แต่อย่างไรก็ตาม การพัฒนาของตัวอ่อนในระยะนี้สามารถจำแนกย่อยตามคู่มือ IETS ออกเป็น ระยะที่ 5 (early blastocyst) 6 (blastocyst) 7 (expanded blastocyst) และ 8 (hatched blastocyst) ซึ่งอาจมีผลต่อความสำเร็จในการย้ายฝากให้กับแพะตัวรับ และเหมาะสมสำหรับการใช้งานที่แตกต่างกัน โดย Li et al. (1990) รายงานว่าตัวอ่อนแพะระยะที่ 4 (morular) และ 5 (early blastocyst) เหมาะสมกับการนำไปย้ายฝากเป็นตัวอ่อนสด แต่ระยะที่ 7 (expanded blastocyst) และ 8 (hatched blastocyst) เหมาะสมกับการนำไปเก็บรักษาเป็นตัวอ่อนแช่แข็ง เนื่องจากเมื่อนำไปย้ายฝากให้กับแพะตัวรับจะทำให้อัตราการตั้งท้องสูงกว่าการใช้ตัวอ่อนในระยะอื่น ในขณะที่ Kharche et al. (2011) รายงานว่าตัวอ่อนระยะที่ 6 (blastocyst) เป็นระยะที่เหมาะสมที่สุดต่อการนำมาย้ายฝากให้กับแพะตัวรับ

การผลิตตัวอ่อน IVP จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะสามารถนำมาแก้ไขปัญหาลดข้อจำกัดของแพะตัวให้ที่ลักษณะพันธุกรรมดี มีรังไข่และฟอลลิเคิลสมบูรณ์แต่มีข้อจำกัดต่อการปฏิสนธิในภายในร่างกายหรือไม่สามารถการชะล้างตัวอ่อนได้ เนื่องจากท่อนำไข่หรือปีกมดลูกผิดปกติ (อรรถพล และคณะ, 2564) ให้สามารถผลิตตัวอ่อนได้ครั้งละมากๆ และทำซ้ำได้บ่อยครั้ง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตตัวอ่อน สามารถเก็บพันธุกรรมแพะเพื่อการอนุรักษ์ หรือแพะที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ ในรูปแบบตัวอ่อนแช่แข็ง เพื่อนำกลับมาใช้ประโยชน์สำหรับการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์แพะได้อย่างสูงสุด ดังนั้น การศึกษาค้นคว้าจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของการย้ายฝากตัวอ่อนแพะชนิดตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งจากการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายเพื่อให้สามารถเลือกใช้นิดและระยะของตัวอ่อน IVP ได้อย่างเหมาะสม

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

แพะพันธุ์ผสมพื้นเมือง สำหรับเป็นแพะตัวรับ จำนวน 50 ตัว อายุ 2-3 ปี ให้ลูกมาแล้วอย่างน้อย.1 ตัว มีสุขภาพสมบูรณ์ แข็งแรง ระบบสืบพันธุ์และรอบการเป็นสัดปกติ ได้รับการเลี้ยงดูในศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ จ.นครราชสีมา โดยให้อาหารหยากเป็นหญ้าแพงโกล่าแห้งกินตลอดเวลา และอาหารข้นวันละ 300 กรัม/ตัว/วัน แบ่งแพะตัวรับออกเป็น 2 กลุ่มตามชนิดของตัวอ่อนที่ย้ายฝากเพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของการย้ายฝากตัวอ่อนแพะชนิดตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งจากการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย

การผลิตและการแช่แข็งตัวอ่อน

ผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย ด้วยเทคนิค LOPU-IVP จากแม่แพะนม ด้วยวิธีของอรรถพล และคณะ (2564) จำนวน 100 ตัวอ่อน แบ่งเป็นตัวอ่อนสด จำนวน 50 ตัวอ่อน ตัวอ่อนแช่แข็ง จำนวน 50 ตัวอ่อน ตัวอ่อนทั้งหมดเป็นตัวอ่อนอายุ 7 วัน ที่คุณภาพดี เกรด 1 (excellent or good) มีรูปร่างสมมาตร ขนาด สี และความหนาแน่นของเซลล์สม่ำเสมอ มีเปลือกของตัวอ่อน (zona pellucida) สมบูรณ์ เรียบ ไม่ขรุขระ และพัฒนาในระยะที่ 5 6 7 หรือ 8 จากประเมินภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตามเกณฑ์ของ IETS (Stringfellow et al., 2010) ดังนี้

- ระยะที่ 5 เรียกว่า early blastocyst stage มี blastocoel น้อยกว่าครึ่งหนึ่งของปริมาตรตัวอ่อน
- ระยะที่ 6 เรียกว่า blastocyst stage มี blastocoel มากกว่าครึ่งหนึ่งของปริมาตรตัวอ่อน
- ระยะที่ 7 เรียกว่า expanded blastocyst stage มี blastocoel มีขนาดใหญ่กว่าblastocoel ในระยะ blastocyst และ zona pellucida จะบางลงครึ่งหนึ่ง รวมทั้งตัวอ่อนจะขยายขนาดใหญ่ขึ้น
- ระยะที่ 8 เรียกว่า hatched blastocyst stage ตัวอ่อนฟักตัวหลุดออกมาจากเปลือกของตัวอ่อน (zona pellucida) แล้ว

แช่แข็งตัวอ่อน ด้วยวิธี conventional slow freezing ที่ประยุกต์มาจากวิธีของ Fonseca et al. (2018) โดยใช้น้ำยาแช่แข็งชนิดสำเร็จรูป ที่มีส่วนผสมของ ethylene glycol และ sucrose (ABT360, USA) และเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ (Cryologic®)

การเหนี่ยวนำการเป็นสัด

แพะตัวรับทุกตัวได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัด ด้วยโปรแกรมอ้างอิงจากศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ก่อนการย้ายฝากตัวอ่อน (Figure 1.) ดังนี้

วันที่ 0 สอดฮอร์โมน progesterone ชนิดสอดช่องคลอด (CIDR-G®, 0.3 g progesterone, Eazi Breed, InterAg, New Zealand) เวลา 09.00 น.

วันที่ 14 ฉีดฮอร์โมน PGF_{2α} (Estrumate® MSD, Germany) 0.5 mL. เข้ากล้ามเนื้อ (Intramuscular; IM) และ ฮอร์โมน PMSG (Folligon®, Intervet, Netherland) 0.75 mL. เข้ากล้ามเนื้อ เวลา 09.00 น.

วันที่ 16 ถอด CIDR-G® ออกจากช่องคลอด เวลา 09.00 น. หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง แพะจะแสดงอาการเป็นสัด

วันที่ 24 ดำเนินการตรวจรังไข่และ คอร์ปัสลูเทียม (CL) ผ่านกล้องลาพาโรสโคป และย้ายฝากตัวอ่อน ในปีกมดลูกข้างที่พบ CL คุณภาพดี

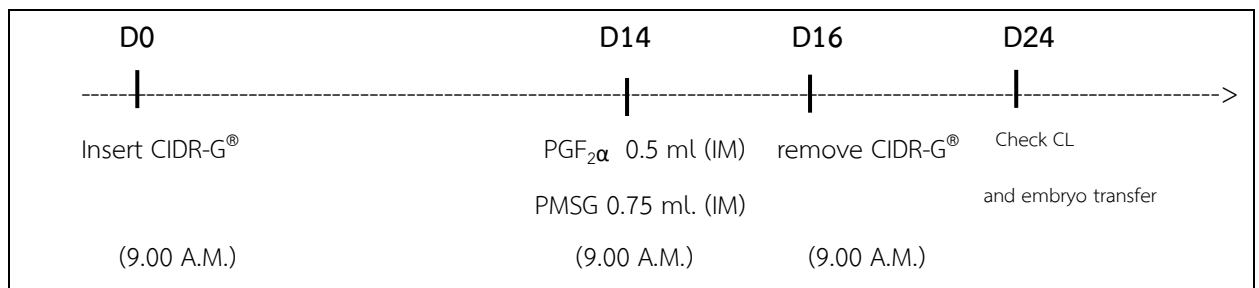


Figure 1. Hormone synchronized protocol for recipient goats.

การย้ายฝากตัวอ่อน

ทำการระงับความรู้สึกให้แพะตัวรับแบบทั่วร่างกายด้วยการฉีดยาระงับประสาท (tranquilizer drug) กลุ่ม alpha-2 agonist ด้วย xylazine HCL 0.2 mg/kg ร่วมกับ atropine 0.04 mg/kg เข้ากล้ามเนื้อ และ ยาระงับปวด (analgesic drug) ด้วย phenylbutazone 4 mg/kg เข้ากล้ามเนื้อ และยาปฏิชีวนะก่อนเริ่มผ่าตัด (prophylaxis antibiotic drug) ด้วย penicillin-streptomycin 20,000 IU/kg เข้ากล้ามเนื้อ (อรรถพล และคณะ, 2564) จากนั้นตรวจรังไข่ และ CL ผ่านกล้องลาพาโรสโคป โดยแพะตัวรับที่จะนำมาย้ายฝากตัวอ่อน ต้องมี CL คุณภาพดี สีชมพูแดง ขนาดประมาณครึ่งหนึ่งของรังไข่ขึ้นไปอย่างน้อย 1 ข้าง บรรจุตัวอ่อน ใน tomcat catheter ที่ต่อกับไซริงค์ 1 mL จำนวน 2 ตัวอ่อน/ตัวรับ โดยตัวอ่อนที่ย้ายฝากในแพะตัวรับแต่ละตัว ต้องมีระยะการพัฒนาเดียวกัน ดำเนินการย้ายฝากตัวอ่อน ด้วยเทคนิคการผ่าตัดแบบ กึ่ง

ส่องกล้องลาพาโรสโคปี (semi-laparoscopy technique) ที่ประยุกต์มาจากวิธีของ Fonseca et al. (2018) บนปลายปีกมดลูกข้างใดข้างหนึ่งที่มี CL คุณภาพดี

การบันทึกข้อมูล

การตั้งท้อง ทำการตรวจการตั้งท้องแพะด้วยวิธีอัลตราซาวนด์ ผ่านทางทวารหนัก ในวันที่ 38 ภายหลังจากการย้ายฝากตัวอ่อน บันทึกจำนวนแพะตั้งท้องและอัตราการตั้งท้อง (ร้อยละของแพะที่ตั้งท้อง/แพะตัวรับทั้งหมด)

การคลอด บันทึกจำนวนลูกต่อครอก (Litter size) (จำนวนลูกเกิดต่อจำนวนแพะตัวรับที่ตั้งท้อง) จำนวนลูกแฝด (คู่) อัตราการให้ลูกแฝด (ร้อยละของลูกแฝดต่อจำนวนแพะตัวรับที่ตั้งท้อง) จำนวนแพะตัวรับที่แท้งลูก (ตัว) และอัตราการแท้งจากแพะตัวรับที่ตั้งท้อง (ร้อยละของแพะที่แท้งต่อแพะตัวรับที่ตั้งท้อง)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Chi-Square test เพื่อทดสอบความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรสองตัว (test of independence) ซึ่งเป็นตัวแปรเชิงคุณภาพ ได้แก่ ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดตัวอ่อน (สด หรือ แช่แข็ง) กับ การตั้งท้อง สำหรับการวิเคราะห์ที่ไม่เป็นไปตามข้อตกลงเบื้องต้นของ Chi-Square test (เช่น มีค่าคาดหวังน้อยกว่า 5 อย่างน้อย 1 เซลล์) ใช้การวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Fisher's exact test ได้แก่ ความสัมพันธ์ระหว่างชนิดตัวอ่อนกับการตั้งท้อง (เมื่อวิเคราะห์ในกลุ่มตัวอ่อนระยะที่ 7 และ 8) การแท้ง และการเกิดลูกแฝด นอกจากนี้ ทำการวิเคราะห์ทางสถิติแบบ Mann-Whitney U test สำหรับเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่ามัธยฐาน (median) ของจำนวนลูกต่อครอกซึ่งไม่มีการแจกแจงแบบปกติ กับ ชนิดตัวอ่อน

การวิเคราะห์ทางสถิติในการศึกษาในครั้งนี้ ใช้โปรแกรมสถิติสำเร็จรูป โดยกำหนดช่วงความเชื่อมั่นที่ 95%

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลของการศึกษา พบว่าแพะตัวรับมีอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนที่ผลิตภายนอกร่างกายแบบสดและแช่แข็งไม่แตกต่างกันอย่างนัยสำคัญ ($p < 0.05$) โดยมีอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนสด และ ตัวอ่อนแช่แข็ง ร้อยละ 52.00 และ ร้อยละ 36.00 ตามลำดับ (Table 1)

Table 1. Effect of embryo status on pregnancy result after *in vitro* embryos transfer in 50 recipient goats.

Embryo status	No. of transfer recipient	No. of Pregnant recipient	Pregnant rate (%)	P-value
Fresh	25	13	52.00	0.393
Frozen	25	9	36.00	

ในการศึกษาครั้งนี้ อัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนที่ผลิตภายนอกร่างกายแบบสดและแช่แข็งไม่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากคุณภาพตัวอ่อน IVP ที่นำมาย้ายฝากแก่แพะตัวรับทั้งหมด เป็นตัวอ่อนคุณภาพดี เกรด 1 (excellent or good) ที่มีสภาพสมบูรณ์ ซึ่ง Fonseca et al. (2018) รายงานว่า คุณภาพของตัวอ่อนที่นำมาแช่แข็ง มีผลต่อการรอดของตัวอ่อนหลังละลายและอัตราการตั้งท้อง โดยตัวอ่อนแพะที่มีคุณภาพดี สามารถนำไปแช่แข็งและย้ายฝากได้ โดยไม่ทำให้อัตราการตั้งท้องลดลง แต่ในขณะเดียวกัน ตัวอ่อนแพะที่คุณภาพไม่ดี ไม่ควรนำไปแช่แข็ง ควรนำไปย้ายฝากแบบตัวอ่อนสดเท่านั้น เนื่องมาจากโครงสร้างเซลล์และชีวเคมีของตัวอ่อน IVP ทำให้ตัวอ่อนมีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิได้น้อย (Cognie et al., 2003; Mencheca et al., 2016) และ เมื่อเข้าสู่กระบวนการแช่แข็งอาจเกิดภาวะการตายของเซลล์ (apoptosis) หากนำตัวอ่อนแช่แข็งนั้นไปย้ายฝากแก่แพะตัวรับจะทำให้อัตราการตั้งท้องลดลง (Ferreira- Saliva et al., 2007) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้อัตราการตั้งท้องของแพะตัวรับจากการย้ายฝากตัวอ่อน IVP แช่แข็งเท่ากับร้อยละ 36 สอดคล้องกับค่าปกติในรายงานของ Youngs (2011) ที่ระบุว่าอัตราการตั้งท้องแพะจากการย้ายฝากตัวอ่อน IVP แช่แข็ง จะอยู่ในช่วง ร้อยละ 30-40 แต่อย่างไรก็ตาม อัตราการรอดของตัวอ่อน IVP แช่แข็งที่นำไปย้ายฝากก็ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ คุณภาพของตัวอ่อนที่นำมาแช่แข็ง (Fonseca et al., 2018) ระยะของตัวอ่อนที่นำมาแช่แข็ง ขั้นตอนการลดอุณหภูมิในกระบวนการแช่แข็ง และชนิดของน้ำยาแช่แข็ง เป็นต้น (Menchaca et al., 2016)

ในการศึกษาครั้งนี้ แพะตัวรับมีอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อน IVP ร้อยละ 36-52 (Table 1) ซึ่งใกล้เคียงกับการย้ายฝากตัวอ่อน IVD ที่เคยนิยมใช้ ที่มีอัตราการตั้งท้อง ร้อยละ 30-60 (นิธิรา และคณะ, 2556; Youngs, 2011) แสดงให้เห็นว่า การผลิตแพะด้วยการย้ายฝากตัวอ่อน IVP มีประสิทธิภาพดีเทียบเท่าการย้ายฝากตัวอ่อน IVD แต่ในขณะเดียวกันเมื่อพิจารณาถึงความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจพบว่าตัวอ่อน IVP มีข้อได้เปรียบกว่าตัวอ่อน IVD เนื่องจากการผลิตตัวอ่อน IVP เป็นเทคนิคที่สามารถนำมาใช้ในแม่พันธุ์ที่มีปัญหาในการปฏิสนธิซึ่งการผลิตตัวอ่อน IVD ไม่สามารถทำได้ อีกทั้งยังเป็นวิธีที่สามารถผลิตตัวอ่อนได้ครั้งละมากๆอย่างรวดเร็ว โดยที่แพะตัวให้แต่ละตัวสามารถเก็บโบโอไอโซต์เพื่อผลิตตัวอ่อน IVP ได้ซ้ำมากถึง 10 ครั้งใน 1 ปี (Baldassarre H., 2021) จึงเป็นเทคนิคการผลิตตัวอ่อนที่ลดต้นทุนการผลิต และสามารถเก็บพันธุ์กรรมจากแม่พันธุ์ที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจให้เกิดประโยชน์สูงสุด

(พิงค์ลานนา และอรรถพล, 2565) ดังนั้น จึงเป็นโอกาสของกรมปศุสัตว์ ที่จะนำเทคโนโลยี IVP มาใช้ผลิตแพะพันธุ์ดี เพื่อทดแทน IVD ที่ใช้อยู่เดิม นำไปสู่การพัฒนาองค์ความรู้ด้านการผลิตให้ได้มาตรฐานเป็นที่ยอมรับในระดับสากล และรองรับการขยายตัวของตลาดปศุสัตว์ในอนาคต

Table 2. Embryo development stage and embryo status on pregnancy rate after *in vitro* embryos transfer in 50 recipient goats.

Embryo development stage	Fresh Embryo		Frozen Embryo		P-value
	No.does		No.does		
	pregnant/No.	%	pregnant/No.	%	
	recipients		recipients		
5, 6	9/15	60.00	4/14	28.57	0.089
7, 8	4/10	40.00	5/11	45.45	1*

* Fisher's exact test

เมื่อพิจารณาอัตราการตั้งท้อง ที่เกิดจากการย้ายฝากในระยะที่แตกต่างกัน โดยแบ่งออกเป็นกลุ่มที่มีการพัฒนาในระยะที่ 5 และ 6 ที่เหมาะสมสำหรับการย้ายฝากสด กับกลุ่มที่พัฒนาในระยะที่ 7 และ 8 ที่เหมาะสมกับการแช่แข็ง ประยุกต์ตามรายงานของ Li et al. (1990) (Table2) พบว่าแพะตัวรับในกลุ่มที่ได้รับการย้ายฝากตัวอ่อนระยะ ที่ 5 และ 6 มีอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็ง ไม่แตกต่างกัน ($p < 0.05$) โดยมีอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนสด และตัวอ่อนแช่แข็ง ร้อยละ 60.00 และ ร้อยละ 28.57 ตามลำดับ ในขณะที่เดียวกัน แพะตัวรับที่ได้รับการย้ายฝากตัวอ่อนระยะ ระยะที่ 7 และ 8 มีอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งไม่แตกต่างกัน ($p < 0.05$) โดยมีอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนสด และตัวอ่อนแช่แข็ง ร้อยละ 40.00 และ ร้อยละ 45.45 ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองครั้งนี้ ขัดแย้งกับรายงานของ Li et al. (1990) ที่สนับสนุนว่า ระยะของตัวอ่อนที่นำมาแช่แข็งแบบ conventional slow freezing นั้น มีความสำคัญที่สุดต่อการรอดของตัวอ่อนหลังละลายและอัตราการตั้งท้อง โดยสนับสนุนว่าตัวอ่อนแพะระยะที่ 4 และ 5 เหมาะสมกับการนำไปฝากเป็นตัวอ่อนสด แต่ตัวอ่อนระยะที่ 7 และ 8 เหมาะสมกับการเก็บรักษาเป็นตัวอ่อนแช่แข็ง เมื่อนำตัวอ่อนระยะดังกล่าวไปย้ายฝากจะทำให้ได้ อัตราการตั้งท้องที่สูงกว่าการใช้ตัวอ่อนในระยะอื่น แต่อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองครั้งนี้ สามารถใช้ตัวอ่อนที่พัฒนาได้ทั้งระยะ ที่ 5 6 7 และ 8 โดยกลุ่มตัวอ่อนที่พัฒนาในระยะที่ 5 และ 6 หรือ 7 และ 8 ที่ใช้ในการย้ายฝาก มีผลต่ออัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากด้วยตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งไม่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากระยะการพัฒนาของตัวอ่อนข้างต้นนั้นใกล้เคียงกันมากและใช้เวลาในการพัฒนาระหว่างวันที่ 7 ของกระบวนการ IVP เหมือนกัน (Gibbons et al., 2011)

Table 3. Comparison of results between fresh and frozen *in vitro* embryos transfer.

Parameter	Fresh embryo	Frozen embryo	P-value
no. of transfer recipients	25	25	
no. of pregnancy recipients	13	9	
- no. of abortion	1	0	
- abortion rate (%)	1/13 (7.69)	0/9(0)	1*
- no. of kids	16	10	
- litter size ¹	1	1	0.31**
- no. of twins	4	1	
- twin rate (%)	4/13(30.77)	1/9(11.11)	0.36*

¹ median

* Fisher's exact test

** Mann-Whitney U test

เมื่อตรวจการตั้งท้องแพะ ภายหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนเป็นเวลา 38 วัน แพะที่ตั้งท้องจะพบมดลูกที่ขยายขนาดชัดเจนวางตัวอยู่บริเวณหน้าขอบกระดูกเชิงกราน (Kutty, 1999) เห็นลักษณะ anechoic fluid ในช่องว่างของมดลูก และพบการเคลื่อนไหวหรือจังหวะการเต้นของหัวใจของตัวอ่อน ซึ่งเป็นสิ่งยืนยันว่าตัวอ่อนที่ย้ายฝากมีการฝังตัวและพัฒนาต่อเนื่องจนเป็นผลสำเร็จของการย้ายฝากตัวอ่อน (Matsas, 2022) ทั้งนี้ การฝังตัวของตัวอ่อนอย่างสมบูรณ์จนพัฒนาต่อเป็นระยะฟิตัสได้นั้น ขึ้นกับคุณสมบัติตัวอ่อนและความพร้อมของแพะตัวรับ เช่น สรีระฮอร์โมนระบบสืบพันธุ์ คุณภาพของ CL บนรังไข่ ซึ่ง CL นี้มีความสำคัญต่อการสังเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสำหรับพยุงการตั้งท้อง หากปราศจาก CL จะส่งผลให้แพะเกิดภาวะแท้งและวงรอบของการเป็นสัดผิดปกติ (จิรัฐติ และคณะ, 2560) ในการศึกษาครั้งนี้ มีการคัดเลือกแพะตัวรับที่แข็งแรง วงรอบการเป็นสัดปกติและมี CL คุณภาพดี มีการจัดการโภชนาการที่เหมาะสม เพื่อป้องกันปัญหาการแท้งเนื่องจากความไม่สมบูรณ์ของแพะตัวรับ โดยแพะตัวรับควรได้รับการจัดการที่ดี โภชนาการเหมาะสมตั้งแต่ช่วงแรกของการตั้งท้อง ซึ่งส่งผลต่อน้ำหนักตัวที่มีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์ (กฤติยา และคณะ, 2555) แต่อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษาครั้งนี้ ก็พบการแท้งเกิดขึ้นภายหลังได้รับการยืนยันการตรวจตั้งท้อง จากการย้ายฝากตัวอ่อน IVP สด โดยมีอัตราการแท้งจากการย้ายฝากตัวอ่อน IVP สด ร้อยละ 7.69 (1/13) แต่ในขณะเดียวกันไม่พบการแท้งจากการย้ายฝากตัวอ่อน IVP แช่แข็งเลย (Table 3) ซึ่งอัตราการแท้งจากการศึกษาครั้งนี้ ไม่เกินค่าปกติที่สามารถพบได้ ตามรายงานของ Mencheca et al. (2016) ที่กล่าวว่า การย้ายฝากตัวอ่อน IVP สามารถพบอัตราการแท้งได้ ประมาณร้อยละ 14.9 และเทคนิคการแช่แข็งตัวอ่อนนั้น ไม่ได้มีความเกี่ยวข้องกับการแท้งแต่อย่างใด ทั้งนี้ โดยทั่วไปการที่แพะแท้ง อาจเนื่องมาจากสาเหตุการจัดการแพะตัวรับหลังการย้ายฝากตัวอ่อนที่ไม่

เหมาะสม สรีระฮอร์โมนในร่างกายของแพะตัวรับหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนไม่สมบูรณ์ หรือ ความผิดปกติของตัวอ่อนนั่นเอง (Fonseca et al., 2021)

เมื่อติดตามจนถึงกระทั่งคลอด พบว่าการย้ายฝากตัวอ่อน IVP สดและแช่แข็งในแพะตัวรับที่ได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัด ให้จำนวนลูกต่อครอก รวมถึงอัตราการให้ลูกแฝดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (Table 3) โดยการย้ายฝากตัวอ่อน IVP สด และแช่แข็งจะให้ความมัยฐานจำนวนลูกต่อครอก เท่ากับ 1 ทั้งนี้ จากการย้ายฝากตัวอ่อนจากทั้งตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็ง โดยส่วนใหญ่แล้วพบว่า แพะตัวรับคลอดลูก 1 ตัวต่อครอก (คลอดลูก 1 ตัวต่อครอก ทั้งสิ้น 17 แม่ และคลอดลูก 2 ตัวต่อครอก ทั้งสิ้น 5 แม่) สำหรับร้อยละอัตราการให้ลูกแฝดการย้ายฝากตัวอ่อน IVP สด และแช่แข็ง พบว่ามีค่าเท่ากับ 30.77 และ 11.11 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการย้ายฝากตัวอ่อน IVP สดในแพะตัวรับที่เป็นสัตว์ธรรมชาติ จากรายงานของ Kharche et al. (2011) ที่มีอัตราการให้ลูกแฝด ร้อยละ 12.5 โดยการศึกษาในครั้งนี้ให้อัตราการให้ลูกแฝดสูงกว่ารายงานการศึกษาข้างต้น อาจเนื่องมาจากผลของการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะตัวรับที่ทำการศึกษา

จากการศึกษาครั้งนี้ เป็นความก้าวหน้าของงานเทคโนโลยีชีวภาพที่สามารถสร้างลูกแพะจากการย้ายฝากตัวอ่อนที่ผลิตด้วยวิธี LOPU-IVP สำเร็จเป็นครั้งแรกในประเทศไทย โดยการย้ายฝากตัวอ่อนแพะ IVP ทั้งชนิดตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็ง ให้ผลการย้ายฝากอยู่ในเกณฑ์ดี และไม่แตกต่างกัน ดังนั้น ผู้ปฏิบัติงานสามารถใช้ชนิดตัวอ่อน ได้ตามความสะดวกและวัตถุประสงค์ของการใช้งาน

สรุปผลการทดลอง

ผลของการย้ายฝากตัวอ่อนแพะชนิดตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งจากการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย ในแพะตัวรับที่ได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัด มีอัตราการตั้งท้อง อัตราการแท้ง จำนวนลูกต่อครอก และ อัตราการให้ลูกแฝดไม่แตกต่างกัน และสามารถให้ตัวอ่อนที่ผลิตภายนอกร่างกายได้ทั้งระยะ early blastocyst blastocyst expanded blastocyst และ hatched blastocyst

ข้อเสนอแนะ

ในปัจจุบันเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายแพะของประเทศไทยยังอยู่ระหว่างการพัฒนา ทางผู้เขียนมีความคิดเห็นว่าควรศึกษาในประเด็นอื่นที่เกี่ยวข้องเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต เช่น การพัฒนาโปรแกรมการแช่แข็งที่เหมาะสมยิ่งขึ้น ใช้เวลาน้อย ลดขั้นตอนการปฏิบัติงาน และการเพิ่มสาร antioxidant แก่ตัวอ่อน IVP ก่อนแช่แข็งเพื่อลดอัตราการสูญเสียของตัวอ่อนระหว่างแช่แข็งส่งผลให้สามารถผลิตตัวอ่อนแพะพันธุ์ดีได้จำนวนมาก เพียงพอต่อความต้องการ เป็นการเพิ่มขีดความสามารถเพื่อกระจายแพะพันธุ์ดี สู่เกษตรกร ทั้งในและต่างประเทศอย่างทั่วถึง เป็นการพัฒนา

อุตสาหกรรมปศุสัตว์ให้ปรับตัวเท่าทันกับแนวโน้มตลาดปศุสัตว์ของโลก เพิ่มรายได้แก่เกษตรกรและผู้ประกอบการด้านปศุสัตว์ได้อย่างยั่งยืน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณจตุพร พงษ์เพ็ง ที่ปรึกษา นายสัตวแพทย์ภัทรพล สำเร็จดี และคณะกรรมการวิจัยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ทุกท่านที่ให้ความรู้และคำแนะนำด้านรูปแบบการเขียนงานวิจัย นายสัตวแพทย์อนนท์ เทืองสันเทียะ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ ที่ให้ความรู้เกี่ยวกับสัตว์ทดลองและปฏิบัติงานด้านผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย นายสัตวแพทย์สุรวิทย์ จินสุข คุณนิทยา วาปีกา คุณกมลวรรณ มัดสิงห์ คุณจิราภา ขาวสุข เจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ ให้ปฏิบัติงานผลิตตัวอ่อนจากการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย การแช่แข็งตัวอ่อน และย้ายฝากตัวอ่อน ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทีมดูแลสุขภาพแพะที่ช่วยปฏิบัติงานเกี่ยวกับแพะทดลองตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ช่วยเหลือ งานวิจัยครั้งนี้ประสบความสำเร็จเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานด้านเทคโนโลยีชีวภาพในวงการปศุสัตว์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- ภฤติยา เลิศขุนหะเกียรติ ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์ วินัย ใจขาน อารีย์ ไกรสุรย์ กนกวรรณ จารุกำจร และ ทศพล มุลมณี. 2555. การเจริญเติบโตของลูกในท้องและของแม่แพะพื้นเมืองไทยในระยะแรกของการตั้งท้อง. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 22(1): 18-28.
- จิรัฐติ ธรรมศิริ ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์ จารึก ัญญากรกุล สมจิตร ก้นชาพรหม และ วิไลวรรณ ชันธุแสง. 2560. การประเมินการเจริญเติบโตและพัฒนาของคอร์ปัสลูเทียมแพะโดยใช้ proliferating cell nuclear antigen (PCNA) และ Ki-67 เป็นตัวบ่งชี้การเพิ่มจำนวนของเซลล์. แก่นเกษตร. 45(1): 746-752.
- พิงค์ลานนา กุญชร และ อรรถพล พรประไพ. 2565. เทคนิคการเจาะเก็บโอโอไซด์แพะด้วยวิธี Laparoscopic ovum pick-up (LOPU) และการผลิตตัวอ่อนแพะด้วยวิธีปฏิสนธิภายนอกร่างกาย. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 13(1): 48-61.
- นิธิรา อนันกุล จันทรเพ็ญ สุวิมล ธีระบุตร สฤณีวิทย์ ปัญญาภิบาลย์ ศราวณี ชันมณี ัญญกานต์ ถนอมสุขสินชัย และ มงคล เตชะกำพุ. 2556. การผลิตแพะด้าด้วยการผสมเทียมด้วยเทคนิคส่องกล้องลาพาโรสโคป และการย้ายตัวฝากตัวอ่อน. เวชศาสตร์สัตวแพทย์. 43(2): 259-263.

อรรถพล พรประไพ อนนท์ เทืองสันเทียะ พิงค์ลานนา กุญชร และ มาลี อภิเมธีธำรง. 2564. การศึกษาความเป็นไปได้ในการเจาะเก็บโอโอไซด์แพะด้วยวิธี laparoscopic ovum pick-up (LOPU) และการ

ผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายในประเทศไทย. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 12(1): 136-160.

Baldassarre, H. 2021. Laparoscopic ovum pick-up followed by in vitro embryo production and transfer in assisted breeding programs for ruminant. *Animals*. 11:216-228.

Chair, J.V. 2020. 2019 Statistic of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*. 38(4). Available source: https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2019.pdf, August 8, 2022.

Chair, J.V. 2021. 2020 Statistic of embryo production and transfer in domestic farm animals. *Embryo Technology Newsletter*. 39(4). Available source: https://www.iets.org/Portals/0/Documents/Public/Committees/DRC/IETS_Data_Retrieval_Report_2020.pdf, August 8, 2022.

Cognie, Y., G. Baril, N. Poulin and P. Mermillod. 2003. Current status of embryo technologies in sheep and goat. *Theriogenology*. 59(1):171-188.

Ferreira-Saliva, J.C., M.T. Moura, T.D. Ailva, L.R.S. Oliveira, A. Chiamenri, V.J.F. Freitas and M.A.L.J. Oliveira. 2007. Full term potential of goat in vitro produced embryos after different cryopreservation methods. *Cryobiology*. 75:75-79.

Fonseca, J.F., G. B. Vergani, L. R. Cortes, J. N. D. Rodrigues, L. G. B. Siqueira, J.M.G. Souza-Fabjan and M.E.F. Oliveira. 2021. Induction of accessory corpus luteum in goats and sheep : From physiological basis to reproductive effects. *Revista Brasileira de Saude e Producao Animal*. 45(4):309-317.

Fonseca, J.F., R. I. T. P. Batista, J. M. G. Souza-Fabjan, M. E. F. Oliveira, F.Z. Brandao and J.H.M. Viana. 2018. Freezing goat embryos at different development stages and quality using ethylene glycol and a slow cooling rate. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia*. 70(5):1489-1496.

Gibbons, A. and M. Cueto. 2011. *Embryo Transfer in Sheep and Goats A training manual*. Bariloche Experiment Station. National Institute for Agricultural Technology. Argentina.

Han, Y., M. Meintjes, K. Graff, R. Dennistion, L.Zhang, C. Ziomek and R. Godek. 2001. Caprine offspring born from fresh and frozen-thawed in vitro-produced embryos. The veterinary record. 149(23):714-716.

- Kharche, S. D., A. K. Goel, S. K. Jindal, P. Goel and K. Jha. 2011. Birth of twin kids following transfer of in-vitro produce goat embryos. *Indian Journal of animal science*. 81(11):1132-1134.
- Kutty, C.I. 1999. Gynecological examination and pregnancy diagnosis in small ruminants using bimanual palpation technique: a review. *Theriogenology*. 51:1555-1564.
- Li, R., A. W. N. Cameron, P. A. Batt and A. O. Trounson. 1990. Maximum survival of frozen goat embryos is attained at the expanded, Hatching and Hatched Blastocyst stage of development. *Reproduction, Fertility and Development*. 2:345-350.
- Matsas, D. 2022. Pregnancy diagnosis in goats. Available source: <https://veteriankey.com/pregnancy-diagnosis-in-goats/>, August 8, 2022.
- 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. *Animal Reproduction Science*. 13 (3):273-278.
- Stringfellow, David A. and M. Daniel Givens. 2010. *Manual of the International Embryo Transfer Society*. 4th edition. International Embryo Transfer Society, INC. Illinois. USA.
- Youngs, R. C. 2011. Cryopreservation of preimplantation embryo of cattle, sheep, goats. *Journal of Visualized Experiments*. 54:1-4.

ผลของโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบต่อปริมาณ คุณภาพของโอโอไซต์และตัวอ่อน

ด้วยวิธี LOPU-IVP ในแม่แพะตัวให้

อรรณพ พรประไพ^{1/} พิงค์ลานนา กุญชร^{1/}

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบต่อปริมาณ คุณภาพของโอโอไซต์และตัวอ่อน ด้วยวิธี LOPU-IVP ในแม่แพะตัวให้ อายุระหว่าง 2-4 ปี จำนวน 56 ตัว แม่แพะตัวให้พันธุ์แองโกลนูเบียน จำนวน 28 ตัว และพันธุ์ซาเนน จำนวน 28 ตัว ถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 14 ตัว (พันธุ์แองโกลนูเบียน 7 ตัว และซาเนน 7 ตัว ต่อกลุ่ม) แม่แพะตัวให้ถูกนำเข้าโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบจำนวน 4 โปรแกรม ประกอบด้วย โปรแกรม FSH100 (FSH 100 mg) FSH100-PG (FSH 100 mg + PGF₂-alpha 125 ug) FSH200 (FSH 200 mg.) และ FSH200-PG (FSH 200 mg + PGF₂-alpha 125 ug) และถูกนำมาเจาะดูดฟอลลิเคิลเพื่อเก็บโอโอไซต์และนำเข้าสู่กระบวนการ IVP ผลการศึกษาพบว่า จำนวนฟอลลิเคิลที่ถูกเจาะดูดของโปรแกรม FSH100 FSH200 และ FSH200-PG สูงกว่าโปรแกรม FSH100-PG ($p < 0.05$) จำนวนโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ของโปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG สูงกว่าโปรแกรม FSH100 และ FSH100-PG ($p < 0.05$) และโปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG มีอัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ได้สูงกว่าโปรแกรม FSH100 ($p < 0.05$) ในด้านคุณภาพของโอโอไซต์ พบว่าโปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG มีจำนวนโอโอไซต์ เกรด A สูงกว่าโปรแกรม FSH100 และ FSH100-PG ($p < 0.05$) จำนวนโอโอไซต์ที่เข้าสู่กระบวนการ IVP จากโปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG สูงกว่าโปรแกรม FSH100 และ FSH100-PG ($p < 0.05$) เมื่อพิจารณาจำนวนตัวอ่อน ระยะคลีเวลและบลาสโตซิสต์ พบว่า โปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG ให้จำนวนสูงกว่าโปรแกรม FSH 100 และ FSH100-PG ($p < 0.05$) จำนวนตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ของโปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG สูงกว่าโปรแกรม FSH100-PG ($p < 0.05$) และจำนวนตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ เกรด 1 ของโปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG สูงกว่าโปรแกรม FSH100-PG ($p < 0.05$) ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างของอัตราการแบ่งตัว และอัตราการเจริญถึงตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าทั้ง 4 โปรแกรมมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน จากผลการทดลองสรุปได้ว่า โปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบทั้ง 4 โปรแกรม สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลเพื่อสามารถเจาะดูดฟอลลิเคิลสำหรับเก็บโอโอไซต์ และผลิตตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ด้วยวิธี LOPU-IVP ได้ โดยโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบที่มีความเหมาะสมที่สุดต่อปริมาณและคุณภาพของโอโอไซต์ที่สามารถนำเข้าสู่กระบวนการ IVP ได้แก่ โปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG หากต้องการได้ปริมาณ และคุณภาพของตัวอ่อนที่ดีที่สุด ควรใช้โปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG รองลงมาคือโปรแกรม FSH100

คำสำคัญ : การเหนี่ยวนำการตกไข่หลายใบ การผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย ตัวอ่อน แพะ โอโอไซต์

เลขทะเบียนวิชาการ : 65(2)-0208-119

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

Effect of superovulation programs on quantity-quality of oocyte and embryo by LOPU-IVP in goat donors

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

Abstract

The objective of this study was to investigate the effect of superovulation programs on quantity-quality of oocytes and embryos produced by LOPU-IVP in 56 donor goats (28 Anglo-Nubians and 28 Saanens, at 2 to 4 years of age). The donor goats were randomly assigned into 4 groups (7 Anglo-Nubians and 7 Saanens per group), corresponding to 4 superovulation programs, namely, FSH100 (FSH 100 mg), FSH100-PG (FSH 100 mg + PGF₂-alpha 125 ug), FSH200 (FSH 200 mg) and FSH200-PG (FSH 200 mg + PGF₂-alpha 125 ug). The recovery of oocytes, were performed by LOPU in FSH stimulated donors and oocytes were then subjected to IVP procedures. Results showed that the number of follicles aspirated from FSH 100, FSH200 and FSH200-PG programs were greater than that of FSH100-PG program ($p<0.05$). The number of oocytes aspirated from FSH200 and FSH200-PG programs were greater than that of FSH100 and FSH100-PG programs ($p<0.05$). For recovery rate, FSH200 and FSH200-PG programs had higher recovery rate than FSH100 program. Considering the quality of oocytes, FSH200 and FSH200-PG programs resulted in a greater number of grade A oocytes compared to FSH100 and FSH100-PG programs ($p<0.05$). The number of oocytes subjected to IVP procedures from FSH200 and FSH200-PG programs were greater than that of FSH100 and FSH100-PG program ($p<0.05$). Besides, considering cleavage-stage embryos and blastocysts, FSH200 and FSH200-PG programs led to a greater number of cleavage-stage embryos compared to FSH100 and FSH100-PG programs while the former two programs had a greater number of blastocysts than that of FSH100-PG program ($p<0.05$). With regard to the quality of blastocysts, FSH200 and FSH200-PG program had a greater number of grade 1 blastocysts compared to FSH100-PG program ($p<0.05$). However, there was no significant difference in cleavage and blastocyst rates for 4 superovulation programs, indicating similar effectiveness of embryo production. In conclusion, the use of 4 superovulation programs prior to oocyte recovery was capable of improving follicular development, leading to acceptable quantity-quality of oocytes and blastocysts produced by LOPU-IVP procedures. To retrieve the best quantity-quality of oocytes to be used in IVP, FSH200 and FSH200-PG were recommended. Meanwhile, for best quantity-quality of embryos, FSH200 and FSH200-PG should be considered, followed by FSH100.

Keywords : superovulation, in-vitro embryo production, embryos, goats, oocytes

Registered No. : 65(2)-0208-119

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

คำนำ

การเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี Laparoscopic ovum pick up และการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย (*in-vitro* embryo production, IVP) หรือเรียกระบวนการนี้ว่า “LOPU-IVP” จากแม่แพะตัวให้ที่มีมูลค่าเป็นการพัฒนาและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตตัวอ่อนและสามารถขยายการนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตตัวอ่อนด้วยการเจาะเก็บโอโอไซต์จากแพะตัวให้ที่ยังไม่ถึงวัยเจริญพันธุ์ได้ (Baldassarre et al., 2004) การเก็บโอโอไซต์จากแพะ สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การเก็บโอโอไซต์จากฟอลลิเคิลบนรังไข่ที่ได้จากโรงฆ่าสัตว์ การผ่าเปิดหน้าท้องนำรังไข่ขึ้นมาเจาะเก็บโอโอไซต์ และการเก็บโอโอไซต์ร่วมกับการผ่าตัดด้วยการส่องกล้องลอปาร์สโคป หรือเรียกว่า การเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี LOPU ในสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก เช่น แพะและแกะ เป็นต้น ปัจจุบันเป็นที่นิยมอย่างแพร่หลาย (Mondal et al., 2008; Souza-Fabjan et al., 2016; Wieczorek et al., 2020; Baldassarre H., 2021) เนื่องด้วยเป็นวิธีที่สามารถเก็บโอโอไซต์จากแม่แพะได้หลายครั้ง ผลผ่าตัดมีขนาดเล็ก เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเก็บโอโอไซต์ด้วยการผ่าตัดผ่านบริเวณหน้าท้อง และในประเทศไทย โดยกรมปศุสัตว์ สามารถเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี LOPU และผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายแพะได้เช่นกัน (อรรถพล และคณะ, 2564; พิงค์ลานนา และอรรถพล, 2565) ซึ่งมีข้อดีกว่าการผลิตตัวอ่อนภายในร่างกาย (*in-vivo* embryo production) ที่มีรอบการผลิตตัวอ่อนได้เร็วกว่า รวมไปถึงการได้มาของตัวอ่อนที่มีปริมาณสูงกว่า และเพื่อเป็นการลดข้อจำกัดบางประการที่อาจจะส่งผลต่อความสำเร็จของการผลิตตัวอ่อนภายในร่างกาย เช่น ขั้นตอนการเก็บตัวอ่อนด้วยการชะล้างตัวอ่อนออกจากปีกมดลูกที่มีโอกาสเก็บตัวอ่อนคุณภาพดีได้ปริมาณน้อย หรืออาจไม่สามารถเก็บตัวอ่อนได้ อันเนื่องมาจากสาเหตุของความผิดปกติภายในโพรงมดลูก หรือการตีตันบริเวณตำแหน่งของท่อไข่ส่งผลทำให้โอโอไซต์ (oocyte) ไม่เกิดการปฏิสนธิกับอสุจิ ทำให้ได้ตัวอ่อนที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (unfertilized oocyte, UFO) โดยปัญหาดังกล่าวมีโอกาสเกิดขึ้นได้ทุกรอบของการผลิตตัวอ่อนภายในร่างกาย

การผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายเป็นเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพระบบสืบพันธุ์ ที่นำเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียหรือโอโอไซต์และเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้หรืออสุจิ มาผสมกันในหลอดทดลองภายใต้สภาวะที่เหมาะสมทำให้เกิดกระบวนการปฏิสนธิภายนอกร่างกายในห้องปฏิบัติการจนเกิดเป็นตัวอ่อนและสามารถนำตัวอ่อนมาย้ายฝากในมดลูกของเพศเมียเพื่อให้ตั้งท้องต่อไป ซึ่งการที่จะได้มาของโอโอไซต์คุณภาพดีที่เหมาะสมสำหรับการผลิตตัวอ่อน นั้น จะต้องอาศัยการกระตุ้นการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลบนรังไข่ โดยฮอร์โมนที่เป็นส่วนสำคัญในการช่วยในการผลิตตัวอ่อนอย่างมีประสิทธิภาพ คือ ฮอร์โมน follicle stimulating hormone (FSH) ที่ออกฤทธิ์กระตุ้นการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลหลายใบ (multiple follicle growth) และการเหนี่ยวนำการตกไข่หลายใบ (superovulation) โดยจัดอยู่ในกลุ่มฮอร์โมนละลายน้ำได้ดี (hydrophilic) มีโครงสร้างทางเคมีเป็นสารในกลุ่ม glycoprotein ที่มีฤทธิ์กระตุ้นการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิล ทำให้ฟอลลิเคิลเจริญเติบโตและขยายขนาดใหญ่ขึ้น มีการสะสมฮอร์โมน estrogen เพื่อกระตุ้นการเป็นสัดตามธรรมชาติ ซึ่งเป็นฮอร์โมนสำคัญของกระบวนการผลิตตัวอ่อนภายในร่างกาย อีกทั้งยังทำให้มีการตกไข่หลายใบและได้ตัวอ่อนจำนวนมากสำหรับนำไปย้ายฝาก (multiple ovulation embryo transfer; MOET) และเป็นฮอร์โมนที่มีความสำคัญใน

กระบวนการ LOPU-IVP ในแพะ การใช้ฮอร์โมน FSH สังเคราะห์จากภายนอกร่างกาย (exogenous FSH) ที่นิยมใช้ในการกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลและทำให้การตกไข่หลายใบในสัตว์ เช่น โค แพะ สุกร เป็นต้น โดยปกติแล้วมี ค่าครึ่งชีวิต (half-life) ประมาณ 5 ชั่วโมง (Demoustier et al., 1988) จำเป็นต้องมีการฉีดทุก 12 ชั่วโมงแบบลดปริมาณการฉีด (decreasing dose) เข้ากล้ามเนื้อ เพื่อรักษาระดับของฮอร์โมนในการกระตุ้นฟอลลิเคิลเจริญเติบโตได้อย่างสมบูรณ์และเกิดการตกไข่พร้อมกันที่หลายๆใบ จากการศึกษาของ Avelar et al. (2012) รายงานว่า ความสำเร็จของการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย หรือ IVP ด้วยวิธี LOPU สำหรับแกะ ดูดฟอลลิเคิลเพื่อเก็บโอโอไซต์นั้น จำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องให้ได้โอโอไซต์ที่มีคุณภาพดี ที่ได้จากฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ ดังนั้น แพะตัวให้ที่นำมาแกะดูดฟอลลิเคิลเพื่อเก็บโอโอไซต์ จำเป็นต้องได้รับการ กระตุ้นจากฮอร์โมน FSH ภายนอกร่างกาย

ปัจจัยความสำเร็จของการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย ในแพะด้วยวิธี LOPU-IVP โดยใช้ฮอร์โมน FSH ได้แก่ ขนาดของฮอร์โมน FSH ในโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบที่ส่งผลให้กระตุ้นการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลให้มีขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อสามารถทำการแกะดูดฟอลลิเคิลเพื่อเก็บโอโอไซต์เข้าสู่กระบวนการ IVP และมีอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนจนถึงตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ที่สูง เหมาะสมต่อการนำไปย้ายฝากตัวอ่อนให้กับแพะตัวรับ จากการศึกษาของอรรถพล และคณะ (2564) และพิงค์ลานนา และอรรถพล (2565) พบว่าการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย ในแพะด้วยวิธี LOPU-IVP โดยใช้ฮอร์โมน FSH 100 มิลลิกรัม ฉีดเข้ากล้ามเนื้อแบบลดปริมาณการฉีด พบว่า มีจำนวนฟอลลิเคิลที่ถูกแกะดูดเฉลี่ยเท่ากับ 13.67 ± 1.15 และ 17.80 ± 6.23 ฟอลลิเคิลต่อตัว ตามลำดับ จากผลการทดลองก่อนหน้านี้ แสดงให้เห็นว่าที่ปริมาณ FSH 100 มิลลิกรัม สามารถกระตุ้นการเจริญของฟอลลิเคิลให้มีขนาดใหญ่ขึ้นเพื่อที่ให้อาจทำการแกะดูดฟอลลิเคิลเพื่อเก็บโอโอไซต์นำไปเข้าสู่กระบวนการ IVP และสามารถผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายได้ ซึ่งอยู่ในระดับปานกลาง ยังเก็บโอโอไซต์ได้ปริมาณไม่สูงมากนัก ดังนั้น หากสามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลให้มีขนาดใหญ่จำนวนมากขึ้น จะทำให้เป็นการเพิ่มโอกาสที่จะสามารถเก็บโอโอไซต์และผลิตตัวอ่อนได้สูงขึ้น จากการศึกษาของ Sanchez et al. (2014) พบว่า ผลของการกระตุ้นการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลด้วยฮอร์โมน FSH ปริมาณ 180 มิลลิกรัม แบบลดปริมาณการฉีด ร่วมกับฮอร์โมน PGF₂-alpha ในกลุ่มแพะพันธุ์ลูกผสมแองโกลนูเบียน จำนวน 12 ตัว และแกะเก็บโอโอไซต์ซ้ำ 7 ครั้ง และห่างกัน 3 สัปดาห์ ด้วยวิธี LOPU พบว่า มีความแตกต่างของขนาดฟอลลิเคิลที่ถูกแกะดูดในกลุ่มฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ (≥ 5 มิลลิเมตร) ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างในกลุ่มฟอลลิเคิลขนาดเล็ก (< 3 มิลลิเมตร) และขนาดกลาง (3-4 มิลลิเมตร) ค่าเฉลี่ยของจำนวนฟอลลิเคิลที่ถูกแกะดูดเท่ากับ 18.0 ± 5.8 ฟอลลิเคิลต่อตัว และสอดคล้องกับการศึกษาผลของการกระตุ้นการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลด้วยฮอร์โมน FSH ปริมาณ 200 มิลลิกรัม แบบลดปริมาณการฉีด ในแพะพันธุ์พื้นเมืองและลูกผสมพื้นเมือง อายุ 9 เดือน – 5 ปี จำนวน 50 ตัว และแกะเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีผ่าตัดหน้าท้อง 2 ครั้ง ระยะห่าง 2-4 เดือน พบว่า จำนวนฟอลลิเคิลที่ถูกแกะดูดอยู่ในช่วง 21.0 ± 5.0 และ 25 ± 6.9 ฟอลลิเคิลต่อตัว (มาลี และคณะ, 2548) อีกทั้งขนาดฟอลลิเคิลที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลต่อคุณภาพของโอโอไซต์และการพัฒนาของตัวอ่อนที่ดีขึ้น (Gandolfi et al., 2005) จากรายงานของ Crozet et al. (1995) พบว่า ขนาดของฟอลลิเคิลมีความสัมพันธ์กับอัตราการเจริญถึงตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ โดยฟอลลิเคิลที่เข้าใกล้สู่ระยะการตกไข่ อัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซิสต์สูงถึงร้อยละ 41 ขณะที่ฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่กว่า 5 มิลลิเมตร ฟอลลิเคิลที่มีขนาด

3.1-5 มิลลิเมตร และฟอลลิเคิลที่มีขนาด 2-3 มิลลิเมตร จะมีการพัฒนาของตัวอ่อนจนถึงตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ เท่ากับร้อยละ 26 12 และ 6 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าขนาดของฟอลลิเคิลมีความสัมพันธ์ต่ออัตราการเจริญถึงตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ ซึ่งการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน FSH ในปริมาณที่เหมาะสมจะสามารถเพิ่มจำนวนและขนาดฟอลลิเคิล ส่งผลให้ได้โอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้จำนวนมากขึ้น และส่งผลต่อคุณภาพโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ จึงมีการศึกษาการใช้ฮอร์โมน FSH ขนาด 100 และ 200 มิลลิกรัมในโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบโดยคาดว่าปริมาณฮอร์โมน FSH ที่สูงขึ้นจะส่งผลต่อจำนวนและขนาดฟอลลิเคิลที่เพิ่มขึ้น ส่งผลทำให้การเจาะดูดฟอลลิเคิลเพื่อเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี LOPU ได้ง่ายและมีประสิทธิภาพมากขึ้น ได้จำนวนโอโอไซต์คุณภาพดีมากขึ้นและส่งผลให้มีอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนจนถึงตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ที่สูงขึ้น และการฉีดฮอร์โมนพรอสตาแกลนดิน ($PGF_2\text{-}\alpha$) ในโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบเพื่อต้องการสลายคอร์ปัสลูเทียมที่ผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ทำให้ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ถูกผลิตจากคอร์ปัสลูเทียมลดลง ส่งผลทำให้มีการส่งการกลับไปยัง ไฮโปทาลามัส (hypothalamus) ให้มีการปลดปล่อยโกนาโดโทรปิน รีลีสซิงฮอร์โมน (gonadotropin releasing hormone, GnRH) มาที่ต่อมใต้สมองส่วนหน้าเพื่อกระตุ้นการปลดปล่อยฮอร์โมน FSH มากระตุ้นการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิล ซึ่งเป็นลดการควบคุมการหลั่งฮอร์โมนแบบยับยั้งย้อนกลับ (negative feedback) จากอิทธิพลของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และเพื่อความสำเร็จของการกระตุ้นการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิล สำหรับสร้างโอโอไซต์คุณภาพดีและผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายแพะด้วยกระบวนการ LOPU-IVP ทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพของโอโอไซต์และตัวอ่อน ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบต่อปริมาณ คุณภาพของโอโอไซต์และตัวอ่อนด้วยวิธี LOPU-IVP ในแม่แพะตัวให้

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

แพะทดลองเพศเมีย มีสุขภาพแข็งแรงและระบบสืบพันธุ์สมบูรณ์ อายุ 2-4 ปี คะแนนความสมบูรณ์ร่างกาย 3.0-4.0 พันธุ์แองโกลนูเบียน จำนวน 28 ตัว และพันธุ์ซานเนน จำนวน 28 ตัว รวมทั้งสิ้น 56 ตัว ถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 14 ตัว (พันธุ์แองโกลนูเบียน จำนวน 7 ตัว และพันธุ์ซานเนน จำนวน 7 ตัว) แพะทดลองทั้งหมดถูกเลี้ยงดูโดยให้อาหารหยาบเป็นหญ้าแพงโกล่าแห้งกินตลอดเวลา และอาหารข้นวันละ 300 กรัมต่อตัวต่อวัน ในศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา

แผนการทดลอง

แผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกหรือบล็อกสมบูรณ์ (randomized complete block design, RCBD) โดยวิเคราะห์ปัจจัยที่เป็นทรีทเมนต์ จำนวน 4 ทรีทเมนต์ (โปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบ 4 โปรแกรม) ได้แก่ โปรแกรม FSH100 โปรแกรม FSH100-PG โปรแกรม FSH200 และโปรแกรม FSH200-PG โดยกำหนดบล็อกเป็นสายพันธุ์แพะ จำนวนทั้งสิ้น 2 สายพันธุ์ ประกอบด้วยสายพันธุ์แองโกลนูเบียนและซานเนน และจำนวนซ้ำ 14 ซ้ำต่อทรีทเมนต์ รายละเอียดดังนี้

- ทรีทเมนต์ที่ 1** แพะตัวให้ จำนวน 14 ตัว (สายพันธุ์แอ่งโกลนุเปียน 7 ตัวและซาเนน 7 ตัว) ถูกกระตุ้นการตกไข่หลายใบด้วยโปรแกรม FSH100 เป็นระยะเวลา 12 วัน โดยใช้ฮอร์โมน FSH ปริมาณ 100 มิลลิกรัม และฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด
- ทรีทเมนต์ที่ 2** แพะตัวให้ จำนวน 14 ตัว (สายพันธุ์แอ่งโกลนุเปียน 7 ตัวและซาเนน 7 ตัว) ถูกกระตุ้นการตกไข่หลายใบด้วยโปรแกรม FSH100-PG เป็นระยะเวลา 10 วัน โดยใช้ฮอร์โมน FSH ปริมาณ 100 มิลลิกรัม ร่วมกับฮอร์โมน PGF₂-alpha 125 ไมโครกรัม และฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด
- ทรีทเมนต์ที่ 3** แพะตัวให้ จำนวน 14 ตัว (สายพันธุ์แอ่งโกลนุเปียน 7 ตัวและซาเนน 7 ตัว) ถูกกระตุ้นการตกไข่หลายใบด้วยโปรแกรม FSH200 เป็นระยะเวลา 12 วัน โดยใช้ฮอร์โมน FSH ปริมาณ 200 มิลลิกรัม และฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด
- ทรีทเมนต์ที่ 4** แพะตัวให้ จำนวน 14 ตัว (สายพันธุ์แอ่งโกลนุเปียน 7 ตัวและซาเนน 7 ตัว) ถูกกระตุ้นการตกไข่หลายใบด้วยโปรแกรม FSH200-PG เป็นระยะเวลา 10 วัน โดยใช้ฮอร์โมน FSH ปริมาณ 200 มิลลิกรัม ร่วมกับฮอร์โมน PGF₂-alpha 125 ไมโครกรัม และฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด

วิธีการทดลอง

1. โปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบ

ประกอบไปด้วย โปรแกรม FSH100 FSH100-PG FSH200 และ FSH200-PG กระตุ้นการตกไข่หลายใบ เป็นระยะเวลา 10-12 วัน โดยใช้ฮอร์โมน FSH ปริมาณ 100-200 มิลลิกรัม ร่วมกับฮอร์โมน PGF₂-alpha 125 ไมโครกรัม และฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด รายละเอียดดังนี้

1.1 โปรแกรม **FSH100** (ปริมาณฮอร์โมน FSH รวม 100 มิลลิกรัม) และโปรแกรม **FSH200** (ปริมาณฮอร์โมน FSH รวม 200 มิลลิกรัม) อ้างอิงและดัดแปลงจากอรรถพลและคณะ (2564) (Figure 1) ดังนี้

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

วันที่ 9 โปรแกรม **FSH100** ฉีดฮอร์โมน FSH (Folttropin-V®, Ontario, Canada) ปริมาณ 30 มิลลิกรัม เข้ากล้ามเนื้อ เวลา 18.00 น.

โปรแกรม **FSH200** ฉีดฮอร์โมน FSH ปริมาณ 50 มิลลิกรัม เข้ากล้ามเนื้อ เวลา 06.00 น. และเวลา 18.00 น.

วันที่ 10 โปรแกรม **FSH100** ฉีดฮอร์โมน FSH ปริมาณ 30 มิลลิกรัม เข้ากล้ามเนื้อเวลา 06.00 น. และปริมาณ 20 มิลลิกรัม เข้ากล้ามเนื้อ เวลา 18.00 น.

โปรแกรม **FSH200** ฉีดฮอร์โมน FSH ปริมาณ 35 มิลลิกรัม เข้ากล้ามเนื้อเวลา 06.00 น. และ เวลา 18.00 น.

วันที่ 11 โปรแกรม **FSH100** ฉีดฮอร์โมน FSH ปริมาณ 20 มิลลิกรัม เข้ากล้ามเนื้อเวลา 06.00 น.

โปรแกรม **FSH200** ฉีดฮอร์โมน FSH ปริมาณ 30 มิลลิกรัม เข้ากล้ามเนื้อเวลา 06.00 น.

และถอด CIDR-G® เวลา 18.00 น. (12 ชั่วโมงหลังจากฉีดฮอร์โมน FSH เข็มสุดท้าย)
วันที่ 12 เก็บไข่ด้วยวิธี LOPU เวลา 06.00 น. (12 ชั่วโมง หลังจากถอด CIDR-G® หรือ 24 ชั่วโมงหลังจากฉีดฮอร์โมน FSH เข็มสุดท้าย)

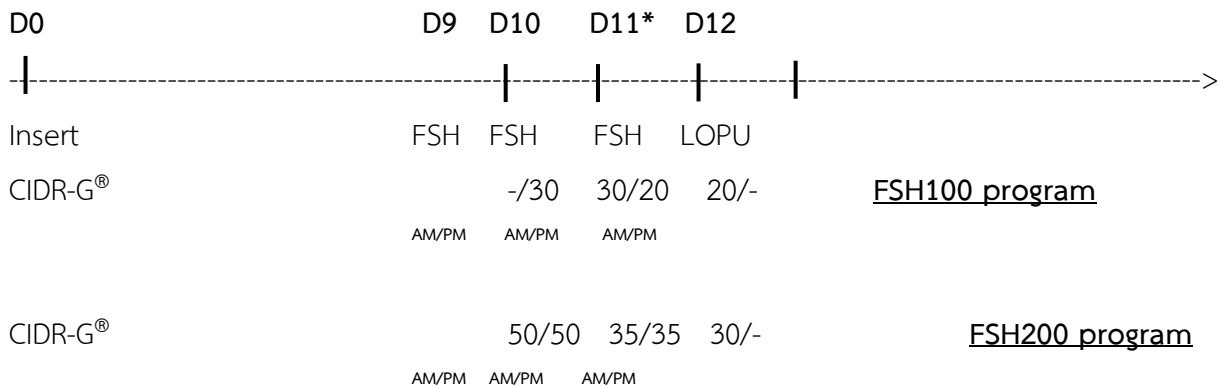


Figure 1. FSH100 and FSH200 superovulation program for LOPU, FSH was given and ovarian stimulation started with 100 and 200 mg. (injection 4-5 times by decreasing dose) every 12 hour at 06.00 a.m. and 06.00 p.m., the symbol “*” means CIDR-G® will be removed before LOPU 12 hours.

1.2 โปรแกรม **FSH100-PG** (ปริมาณฮอร์โมน FSH รวม 100 มิลลิกรัม และโปรแกรม **FSH200-PG** (ปริมาณฮอร์โมน FSH รวม 200 มิลลิกรัม) ตัดแปลงมาจาก Sanchez *et al.* (2014) (Figure 2) ดังนี้

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

วันที่ 7 โปรแกรม **FSH100-PG** ฉีดฮอร์โมน FSH (Folltropin-V®, Ontario, Canada) ปริมาณ 30 มิลลิกรัม เข้ากล้ามเนื้อ เวลา 18.00 น.

โปรแกรม **FSH200-PG** ฉีดฮอร์โมน FSH ปริมาณ 50 มิลลิกรัม. เข้ากล้ามเนื้อ เวลา 06.00 น. และเวลา 18.00 น.

และฉีดฮอร์โมน PGF₂-alpha (Estrumate®) ปริมาณ 125 ไมโครกรัม เวลา 18.00 น.

วันที่ 8 โปรแกรม **FSH100-PG** ฉีดฮอร์โมน FSH ปริมาณ 30 มิลลิกรัม เข้ากล้ามเนื้อ เวลา 06.00 น. และฉีดฮอร์โมน FSH ปริมาณ 20 มิลลิกรัม. เข้ากล้ามเนื้อ เวลา 18.00 น.

โปรแกรม **FSH200-PG** ฉีดฮอร์โมน FSH ปริมาณ 35 มิลลิกรัม เข้ากล้ามเนื้อ เวลา 06.00 น. และเวลา 18.00 น.

วันที่ 9 โปรแกรม **FSH100-PG** ฉีดฮอร์โมน FSH ปริมาณ 20 มิลลิกรัม เข้ากล้ามเนื้อ เวลา

06.00 น

โปรแกรม FSH200-PG ฉีดฮอร์โมน FSH ปริมาณ 30 มิลลิกรัม เข้ากล้ามเนื้อเวลา 06.00 น

วันที่ 10 ถอด CIDR-G® หลังจากฉีดฮอร์โมน FSH เข็มสุดท้ายและดำเนินการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี LOPU เวลา 06.00 น. (24 ชั่วโมงหลังฉีดฮอร์โมน FSH เข็มสุดท้าย)

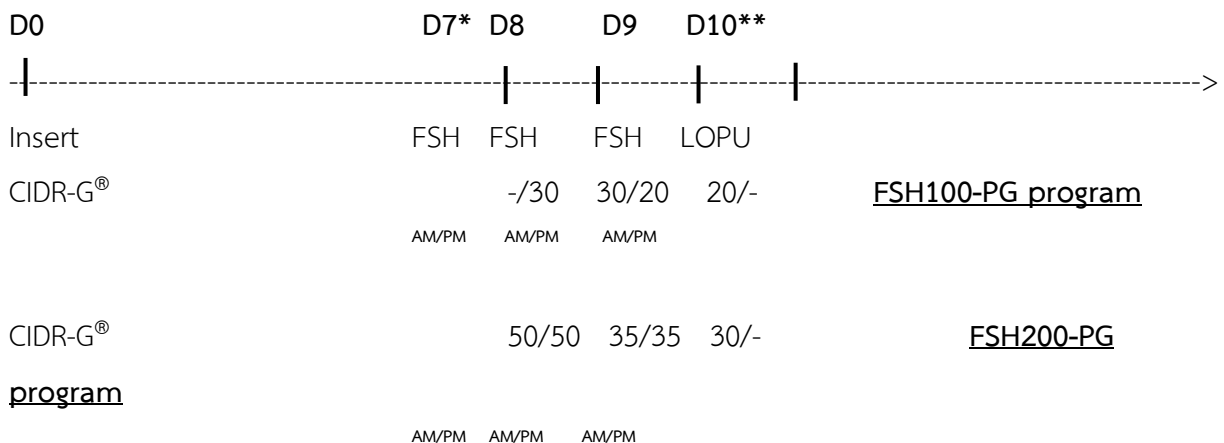


Figure 2. FSH100-PG and FSH200-PG superovulation program for LOPU, FSH was given and ovarian stimulation started with 100 and 200 mg. (injection 4-5 times by decreasing dose) every 12 hour at 06.00 a.m. and 06.00 p.m., the symbol “*” means PGF₂-alpha 125 ug. injection at 06.00 p.m., the symbol “**” means CIDR-G® will be removed after last FSH administration

2. การเตรียมตัวสัตว์

ก่อนดำเนินการเก็บโอโอไซต์ แพะถูกงดน้ำและอาหารเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการวางยาสงบประสาท (tranquilizer) กลุ่ม alpha-2 agonist ด้วย xylazine HCL ขนาด 0.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ร่วมกับ atropine ขนาด 0.04 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้ากล้ามเนื้อ และยาระงับปวด (analgesic) ด้วย phenylbutazone ขนาด 4 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เข้ากล้ามเนื้อ และยาปฏิชีวนะ (prophylaxis antibiotic drug) ด้วย penicillin-streptomycin ขนาด 20,000 I.U. ต่อกิโลกรัม เข้ากล้ามเนื้อ เมื่อแพะมีอาการซึม ทำการโกนขนและเตรียมบริเวณผ่าตัดด้วยเทคนิคการกีดกันเชื้อ (aseptic technique) จากนั้นนำแพะขึ้นบนเตียงผ่าตัดและจัดท่าแพะให้อยู่ในท่านอนหงาย (dorsal recumbency) โดยให้ส่วนหัวของแพะอยู่ต่ำกว่าส่วนท้ายลำตัว (อรรถพล และคณะ, 2564)

3. การเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี LOPU

โดยอุปกรณ์สำหรับเจาะดูดฟอลลิเคิลเพื่อเก็บโอโอไซต์ ประยุกต์จากอุปกรณ์สำหรับผสมเทียมแพะและแกะ แบบลาพาโรสโคปิก (laparoscopic artificial insemination, LAI) เรียกว่า Robertson standard pipette (Minitube, Germany) และเชื่อมต่อกับเข็มสำหรับเจาะดูดฟอลลิเคิลเพื่อเก็บโอโอไซต์ ชนิด short

bevel ขนาดเข็มเบอร์ 20G เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.9 มิลลิเมตร ความยาว 70 มิลลิเมตร (CHIRANA Medoject, Slovakia) เชื่อมต่อเข้ากับชุดอุปกรณ์การเจาะเก็บโอโอไซต์และเครื่องปั๊มสุญญากาศและ heating block (N-FTH-2012, COOK, Australia) ด้วยสายซิลิโคน ทำการเก็บโอโอไซต์ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 3 มิลลิเมตร ร่วมกับการใช้กล้องลาพาโรสโคป โดยใช้แรงดูดที่ 50-70 มิลลิเมตรปรอท จากนั้นนำหลอด centrifuge tube ที่มีสารละลาย PBS และของเหลวในฟอลลิเคิลเข้าห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจหาโอโอไซต์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ พร้อมทั้งบันทึกจำนวนและคุณภาพของโอโอไซต์ (อรรถพล และคณะ, 2564)

4. การผลิตตัวอ่อนนอกร่างกาย

การผลิตตัวอ่อนนอกร่างกาย ประยุกต์มาจากวิธีของ Maria *et al.* (2014) และอ้างอิงจาก อรรถพลและคณะ (2564)

4.1 การเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ (*in vitro* maturation, IVM) โดยนำโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ คุณภาพเกรด A B และ C เพาะเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส และความชื้นสัมพัทธ์ มากกว่า 95% นาน 23-25 ชั่วโมง

4.2 การเตรียมน้ำเชื้อแพะและการปฏิสนธิกับโอโอไซต์ในจานทดลอง (semen preparation and *in vitro* fertilization, IVF) จำนวนอสุจิจากการละลายน้ำเชื้อแพะแช่แข็งที่ใช้สำหรับการปฏิสนธิ ภายนอกนอกร่างกาย ประมาณ 1×10^6 ตัวต่อจำนวนโอโอไซต์ของแม่แพะตัวให้ 1 ตัว ทั้งนี้ระหว่างที่รอการป็น นำโอโอไซต์ที่เพาะเลี้ยงจนครบเวลาการเจริญพร้อมปฏิสนธิแล้ว มาล้าง 3 ครั้ง ด้วยน้ำยา BO-IVF fertilization medium ที่อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส

4.3 การเพาะเลี้ยงตัวอ่อน (*in vitro* embryo culture, IVC) เพาะเลี้ยงที่มีปริมาณแก๊สคาร์บอน-ไดออกไซด์ 5% ออกซิเจน 5% อุณหภูมิ 38.5 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงจนถึงวันที่ 6 (วันที่ 1 คือวันที่เริ่มเพาะเลี้ยง) จึงนำออกมาตรวจสอบการพัฒนาของตัวอ่อน ติดตามการพัฒนาของตัวอ่อนต่อไปทุกวันจนถึงวันที่ 8 บันทึกข้อมูลจำนวนตัวอ่อนที่มีพัฒนาการตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยง เมื่อได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ สามารถนำตัวอ่อนไปย้ายฝากสดให้แก่แม่แพะตัวรับ หรือนำตัวอ่อนมาแช่แข็งโดยใช้น้ำยาแช่แข็งที่มีส่วนผสมของ ethylene glycol และ sucrose (ABT360, USA) ด้วยวิธี conventional method ตามวิธีที่ปฏิบัติทางห้องปฏิบัติการ

5. การบันทึกข้อมูล

5.1 จำนวนฟอลลิเคิลที่เจาะดูดเก็บโอโอไซต์ (follicle aspirated)

5.2 จำนวนโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ (oocyte recovered)

5.3 จำนวนโอโอไซต์จำแนกตามคุณภาพโอโอไซต์ อ้างอิงจาก ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัย เทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ ดังนี้

เกรด A : cumulus-oocyte complexes (COCs) มี cumulus ไม่น้อยกว่า 2 ชั้น

เกรด B : partial cumulus cells (Partial CCs) มี cumulus บางส่วน

เกรด C : denuded oocytes (DOs) ไม่มี cumulus

เกรด D : degenerated oocytes (Deg)

5.4 จำนวนโอโอไซต์ที่เข้าสู่กระบวนการ IVP ประกอบด้วย IVM IVF และ IVC

5.5 จำนวนตัวอ่อนระยะ cleavage ถึงระยะ blastocyst

5.6 จำนวนตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ในคุณภาพเกรด 1 2 3 และ 4 อ้างอิงจาก Manual of the International Embryo Transfer Society, 4th Edition (Chapter 9, IETS Manual, 4th Edition) ดังนี้

เกรด 1 : excellent or good

เกรด 2 : fair

เกรด 3 : poor

เกรด 4 : dead or degenerating

5.7 อัตราการเก็บโอโอไซต์ที่เก็บได้ (recovery rate) จากจำนวนโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ ด้วยวิธี LOPU เทียบกับจำนวนฟอลลิเคิลที่เจาะดูดเก็บโอโอไซต์ หรือ oocyte recovered/follicle aspirated

5.8 อัตราการแบ่งตัว (cleavage rate) ได้จากจำนวนตัวอ่อนระยะ cleavage ที่ผลิตด้วยวิธีปฏิสนธิภายนอกร่างกายเปรียบเทียบกับจำนวนตัวอ่อนที่ผ่านกระบวนการ IVC หรือ cleavage/ IVC

5.9 อัตราการเจริญถึงตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ (blastocyst rate) ได้จากจำนวนตัวอ่อนระยะ blastocyst ที่ผลิตด้วยวิธีปฏิสนธิภายนอกร่างกายเปรียบเทียบกับจำนวนตัวอ่อนที่ผ่านกระบวนการ IVC หรือ blastocyst/IVC

6. การวิเคราะห์ข้อมูลสถิติ

แผนการทดลองที่ใช้ในการศึกษารั้งนี้แบบสุ่มในบล็อกหรือบล็อกสมบูรณ์ โดยมีหุ่นจำลองทางสถิติที่ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) สำหรับวิเคราะห์ข้อมูล จำนวนฟอลลิเคิลที่ถูกเจาะดูดเก็บโอโอไซต์ จำนวนโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ จำนวนโอโอไซต์ที่สามารถเก็บได้ในคุณภาพ เกรด A B C และ D จำนวนโอโอไซต์ที่เข้าสู่กระบวนการ IVP จำนวนตัวอ่อนระยะคลีเวจ จำนวนตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ และจำนวนตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ในคุณภาพเกรด 1 2 และ 3 หลังผ่านกระบวนการ IVP ทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่ม ด้วยวิธี Duncan's multiple range test นอกจากนี้ ใช้การวิเคราะห์การถดถอยโลจิสติก (logistic regression) สำหรับวิเคราะห์ร้อยละการเก็บโอโอไซต์ที่เก็บได้ ร้อยละการแบ่งตัว และร้อยละการเจริญถึงตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ ตัวแปรต้นในโมเดลทางสถิติ ประกอบด้วย อิทธิพลของโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบ และอิทธิพลของสายพันธุ์แพะ กำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 ($\alpha=0.05$) ใช้โปรแกรมสถิติสำเร็จรูปในการวิเคราะห์ทางสถิติ

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลของโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบต่อปริมาณและคุณภาพโอโอไซต์

Table 1 แสดงผลของโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบต่อปริมาณและคุณภาพโอโอไซต์ จากการวิเคราะห์ข้อมูล สายพันธุ์แพะไม่มีอิทธิพลต่อทั้งปริมาณและคุณภาพของโอโอไซต์ โดยจากผลการทดลองพบว่า โปรแกรม FSH100 FSH200 และ FSH200-PG มีจำนวนฟอลลิเคิลที่ถูกเจาะสูงสุดสูงกว่าโปรแกรม FSH100-PG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และโปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG มีจำนวนโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้สูงกว่าโปรแกรม FSH100 และ FSH100-PG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ส่วนอัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ได้พบว่าโปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG มีค่าสูงกว่าโปรแกรม FSH100 ($p < 0.05$) และโปรแกรม FSH200-PG มีค่าสูงกว่าโปรแกรม FSH100-PG ($p < 0.05$) และเมื่อพิจารณาคุณภาพโอโอไซต์ พบว่า โปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG มีจำนวนโอโอไซต์คุณภาพ เกรด A สูงกว่าโปรแกรม FSH100 และ FSH100-PG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และโปรแกรม FSH200-PG มีจำนวนโอโอไซต์คุณภาพ เกรด B สูงกว่าโปรแกรม FSH100 FSH100-PG และ FSH200 ($p < 0.05$) และโปรแกรม FSH200 มีจำนวนโอโอไซต์คุณภาพ เกรด B สูงกว่าโปรแกรม FSH100-PG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ขณะที่ไม่มี ความแตกต่างของจำนวนโอโอไซต์คุณภาพ เกรด B ในโปรแกรม FSH100 กับโปรแกรม FSH100-PG และไม่พบความแตกต่างของจำนวนโอโอไซต์คุณภาพ เกรด C และ D ที่ได้จากโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบทั้ง 4 โปรแกรม ส่วนโปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG มีจำนวนโอโอไซต์ที่เข้าสู่กระบวนการ IVP สูงกว่าโปรแกรม FSH100 และ FSH100-PG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

Table 1. Number of follicles aspirated, oocytes recovered, oocyte grade, oocytes subjected to IVP (mean $\pm$ SEM) and recovery rate (percentage and probability) derived from in-vitro embryo production from different superovulation programs

Parameter	Superovulation program			
	FSH100	FSH100-PG	FSH200	FSH200-PG
Follicle aspirated (follicles/doe)	21.07 $\pm$ 1.25 ^a	16.93 $\pm$ 1.26 ^b	23.71 $\pm$ 1.46 ^a	23.29 $\pm$ 1.17 ^a
Oocyte recovered (oocytes/doe)	14.14 $\pm$ 0.70 ^b	12.36 $\pm$ 0.87 ^b	18.71 $\pm$ 1.14 ^a	18.93 $\pm$ 1.07 ^a
Recovery rate (%)	67.12(0.67) ^C	73.00(0.73) ^{BC}	78.92(0.79) ^{AB}	81.29(0.81) ^A
Oocyte grade (oocytes/doe)				
A	1.86 $\pm$ 0.26 ^b	1.71 $\pm$ 0.40 ^b	3.79 $\pm$ 0.53 ^a	3.29 $\pm$ 0.47 ^a
B	3.93 $\pm$ 0.21 ^{bc}	3.50 $\pm$ 0.39 ^c	5.29 $\pm$ 0.69 ^b	7.00 $\pm$ 0.57 ^a
C	5.07 $\pm$ 0.41	4.21 $\pm$ 0.45	5.71 $\pm$ 0.48	5.79 $\pm$ 0.74
D	3.29 $\pm$ 0.56	2.93 $\pm$ 0.40	3.93 $\pm$ 0.54	2.86 $\pm$ 0.58
Oocytes subjected to IVP (oocytes/doe)	11.00 $\pm$ 1.77 ^b	10.50 $\pm$ 0.72 ^b	15.21 $\pm$ 1.02 ^a	14.93 $\pm$ 0.52 ^a

^{a,b,c} Means within a row with different superscripts are different ($p < 0.05$)

^{AB,C} Probability of recovery rate within a row with different superscripts are different ($p < 0.05$)

จากโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบในโปรแกรมที่มีขนาด FSH 200 มิลลิกรัมจะพบว่า มีจำนวนโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ จำนวนโอโอไซต์คุณภาพเกรด A และจำนวนโอโอไซต์ที่เข้าสู่กระบวนการ IVP สูงกว่าโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบในโปรแกรมที่มีขนาด FSH 100 มิลลิกรัม นั่นคือปริมาณของฮอร์โมน FSH ที่มากขึ้นมีผลโดยตรงต่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลให้มีขนาดใหญ่จำนวนมากขึ้น ส่งผลทำให้การเจาะดูดฟอลลิเคิลเพื่อเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี LOPU เป็นไปได้โดยง่ายและมีประสิทธิภาพมากขึ้น ทำให้ได้จำนวนโอโอไซต์คุณภาพดีมากขึ้นจึงนำไปสู่การมีจำนวนโอโอไซต์ที่เข้าสู่กระบวนการ IVP สูงขึ้นตามมา ส่วนกรณีจำนวนฟอลลิเคิลที่ถูกเจาะดูด พบว่า โปรแกรม FSH100 ไม่มีความแตกต่างของจำนวนฟอลลิเคิลที่ถูกเจาะดูด เมื่อเทียบกับโปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG ถึงแม้จะมีความแตกต่างของปริมาณฮอร์โมน FSH ถึง 100 มิลลิกรัม อาจเกิดจากอิทธิพลของการตอบสนองต่อฮอร์โมน FSH ที่ดีกว่าและคลื่นฟอลลิเคิลของแพะในกลุ่มโปรแกรม FSH100 อาจมีปริมาณของฟอลลิเคิลขนาดเล็กก่อนการกระตุ้นด้วยโปรแกรมที่มีจำนวนสูงกว่าโปรแกรม FSH100-PG ซึ่งอาจจะต้องมีการศึกษาปัจจัยภายในที่มีผลต่อปริมาณฟอลลิเคิลขนาดเล็กก่อนการเหนี่ยวนำฮอร์โมน FSH ต่อไป และจากโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบที่มีการใช้ฮอร์โมน $\text{PGF}_2\text{-alpha}$ ร่วมกับฮอร์โมน FSH โดยโปรแกรม FSH100-PG พบว่า จำนวนฟอลลิเคิลที่สามารถเจาะดูดได้ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับโปรแกรมทั้งหมด และต่ำกว่าโปรแกรม FSH100 ถึงแม้มีปริมาณ FSH 100 มิลลิกรัม เท่ากันก็ตาม และเมื่อพิจารณาจำนวนโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ระหว่างโปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG ที่มีปริมาณ FSH 200 มิลลิกรัมเท่ากัน และระหว่างโปรแกรม FSH100 และ FSH100-PG ที่มีปริมาณ FSH 100 มิลลิกรัมเท่ากัน พบว่าไม่แตกต่างกัน อีกทั้งจำนวนโอโอไซต์คุณภาพเกรด A ระหว่างโปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG ที่มีปริมาณ FSH 200 มิลลิกรัมเท่ากัน และระหว่างโปรแกรม FSH100 และ FSH100-PG ที่มีปริมาณ FSH 100 มิลลิกรัมเท่ากัน พบว่าไม่แตกต่างกัน ดังนั้นการใช้ฮอร์โมน $\text{PGF}_2\text{-alpha}$ ร่วมกับฮอร์โมน FSH จึงไม่มีความจำเป็นในโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบที่ส่งผลต่อจำนวนฟอลลิเคิลที่ถูกเจาะดูด จำนวนโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ และจำนวนโอโอไซต์คุณภาพเกรด A

จากการศึกษาการฉีดฮอร์โมน FSH 200 มิลลิกรัม แบบลดปริมาณการฉีดและเจาะดูดเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธีผ่าตัดหน้าท้อง หลังฉีดฮอร์โมน FSH เข็มสุดท้าย 24 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณฟอลลิเคิลที่สามารถเจาะดูดได้เฉลี่ย 21.0 ± 5.0 ถึง 25 ± 6.9 (มาลี และคณะ, 2548) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ และยังสอดคล้องกับรายงานของ Sanchez *et al.* (2014) พบว่าการใช้ฮอร์โมน FSH ขนาด 180 มิลลิกรัม แบบลดปริมาณการฉีดและเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี LOPU หลังฉีดฮอร์โมน FSH เข็มสุดท้าย 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่เจาะเก็บโอโอไซต์ 1 ครั้ง และกลุ่มที่เจาะเก็บโอโอไซต์ซ้ำ 8 ครั้ง และห่างกัน 3 สัปดาห์ พบว่า ค่าเฉลี่ยปริมาณฟอลลิเคิลที่ถูกเจาะดูด 19.4 ± 7.8 และ 18.0 ± 5.8 ตามลำดับ และพบว่า โปรแกรม FSH100-PG ได้ปริมาณฟอลลิเคิลที่ถูกเจาะดูด ใกล้เคียงกับการรายงานของพิงค์ลันนา และอรรถพล (2565) พบว่า การใช้ฮอร์โมน FSH ปริมาณ 100 มิลลิกรัม แบบลดปริมาณการฉีด ได้ปริมาณฟอลลิเคิลที่ถูกเจาะดูด เฉลี่ย 17.80 ± 6.23 ฟอลลิเคิลต่อตัว และจำนวนโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ พบว่า โปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG มีจำนวนโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้สูงกว่าโปรแกรม FSH100 และ FSH100-PG ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานของมาลีและคณะ (2548) สามารถเจาะดูดเก็บโอโอไซต์ได้ เฉลี่ยช่วง 18 ± 4.4 ถึง 22.0 ± 6.7 โอโอไซต์ต่อตัว ซึ่งเป็นผลของฮอร์โมน FSH โดยตรงที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลให้มีขนาดใหญ่จำนวนมากขึ้น ส่งผลทำให้การเจาะดูดฟอลลิเคิลเพื่อเก็บ

โอโอไซต์ด้วยวิธี LOPU ได้ง่ายและมีประสิทธิภาพมากขึ้น ในขณะที่โปรแกรม FSH100 และ FSH100-PG มีจำนวนโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ สอดคล้องกับการศึกษาของฟิงค์ลานนา และอรรถพล (2565) ที่มีจำนวน 13.5 ± 5.44 โอโอไซต์ต่อตัว และจำนวน 12.7 ± 5.6 โอโอไซต์ต่อตัว (Baldassarre *et al.*, 2002) เมื่อพิจารณาอัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ได้ พบว่าโปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG มีอัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์สูงกว่าโปรแกรม FSH100 และยังพบว่าโปรแกรม FSH200-PG มีอัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์สูงกว่าโปรแกรม FSH100-PG ซึ่งเป็นผลของโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบและปริมาณฮอร์โมน FSH ที่มีผลต่ออัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ได้ และยังสอดคล้องกับการศึกษาของมาลี และคณะ (2548) พบว่า อัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ได้ เฉลี่ยอยู่ในช่วงร้อยละ 86.7 ถึง 86.9 จากการใช้ฮอร์โมน FSH 200 มิลลิกรัม แบบลดปริมาณการฉีด และมีรายงานการใช้ฮอร์โมน FSH 180 มิลลิกรัม แบบลดปริมาณการฉีด พบว่าอัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ได้ในกลุ่มที่เจาะเก็บโอโอไซต์ 1 ครั้ง และในกลุ่มเจาะเก็บโอโอไซต์หลายครั้งมีค่าเท่ากับ ร้อยละ 81.4 และ 68.5 ตามลำดับ (Sanchez *et al.*, 2014) แสดงว่าอิทธิพลของฮอร์โมน FSH มีผลต่อประสิทธิภาพการเจาะดูดฟอลลิเคิลเพื่อเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี LOPU ในขณะที่ไม่พบความแตกต่างของโปรแกรม FSH100 และ FSH100-PG จากการศึกษาในครั้งนี้ที่ปริมาณ FSH 100 มิลลิกรัม และสอดคล้องกับการศึกษาการใช้ฮอร์โมน FSH ปริมาณ 100 มิลลิกรัม แบบลดปริมาณการฉีด พบว่า อัตราการเจาะเก็บโอโอไซต์ได้มีค่าเท่ากับร้อยละ 73.17 (อรรถพล และคณะ, 2564) และร้อยละ 75.84 (ฟิงค์ลานนา และอรรถพล, 2565)

ทั้งนี้คุณภาพของโอโอไซต์ยังเป็นปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในกระบวนการ IVP ดังนั้น การเลือกโอโอไซต์ที่ดีที่สุดที่จะนำมาปฏิสนธิ ต้องใช้การประเมินจากขนาดของฟอลลิเคิล เส้นผ่านศูนย์กลางของโอโอไซต์ รูปร่างของโอโอไซต์และการย้อมสีโอโอไซต์เพื่อตรวจสอบความสมบูรณ์ของโอโอไซต์ เพื่อช่วยในการตัดสินใจนำโอโอไซต์นั้นๆเข้าสู่กระบวนการ IVP เพื่อให้การผลิตตัวอ่อนมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น (Paramio and Izquierdo, 2016) และมีรายงานผลการศึกษาว่า การนำโอโอไซต์คุณภาพเกรด A (cumulus-oocyte complexes, COCs) เข้าสู่กระบวนการ IVP จะส่งผลทำให้ตัวอ่อนที่ติกว่าโอโอไซต์คุณภาพ เกรด B (Mondal *et al.*, 2008) จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า โปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG มีจำนวนโอโอไซต์ที่เข้าสู่กระบวนการ IVP สูงกว่าโปรแกรม FSH100 และ FSH100-PG ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนฟอลลิเคิลที่ถูกเจาะดูด จำนวนโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ จำนวนโอโอไซต์คุณภาพ เกรด A และ B กล่าวคือ ผลของโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบ และปริมาณฮอร์โมน FSH จากการศึกษาครั้งนี้มีความสำคัญเป็นอย่างมากต่อปริมาณ และคุณภาพโอโอไซต์ หากทำการกระตุ้นการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลให้มีขนาดมากกว่า 3 มิลลิเมตรได้จำนวนมาก จะส่งผลทำให้สามารถเก็บโอโอไซต์ได้จำนวนมากขึ้น และโอโอไซต์ที่เก็บได้นั้นเป็นโอโอไซต์ที่มีคุณภาพดี ส่งผลทำให้สามารถนำโอโอไซต์เข้าสู่กระบวนการ IVP จำนวนมากเช่นกัน

ผลของโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบต่อปริมาณและคุณภาพตัวอ่อน

Table 2 แสดงผลของโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบต่อปริมาณและคุณภาพตัวอ่อน จากการศึกษาวิเคราะห์ข้อมูล สายพันธุ์แพะไม่มีอิทธิพลต่อทั้งปริมาณและคุณภาพของตัวอ่อน โดยพบว่า จำนวนตัวอ่อนระยะคลีเวจของโปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG มีค่าสูงกว่าโปรแกรม FSH100 และ FSH100-PG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ขณะที่ไม่พบความแตกต่างในโปรแกรม FSH100 และ FSH100-PG ส่วนจำนวนตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์พบว่าโปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG มีค่าสูงกว่าโปรแกรม FSH100-PG

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ขณะที่ไม่พบความแตกต่างในโปรแกรม FSH200-PG กับ FSH100 และไม่พบความแตกต่างในโปรแกรม FSH100 กับ FSH100-PG และโปรแกรม FSH100 กับ FSH200-PG เมื่อพิจารณาจำนวนคุณภาพตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ พบว่า โปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG มีจำนวนตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ เกรด 1 สูงกว่าโปรแกรม FSH100-PG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ขณะที่ไม่พบความแตกต่างของจำนวนตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ เกรด 1 ในโปรแกรม FSH100 กับ FSH100-PG และไม่พบความแตกต่างของจำนวนตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ เกรด 2 และ 3 และโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบไม่มีผลต่ออัตราการแบ่งตัวและอัตราการเจริญถึงอ่อนระยะบลาสโตซิสต์

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า ผลของโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบต่อจำนวนตัวอ่อนระยะคลีเวจ ในโปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG ที่มีจำนวนสูงกว่าซึ่งสอดคล้องกับจำนวนโอโอไซต์ที่เข้าสู่กระบวนการ IVP และเมื่อพิจารณาตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ พบว่า โปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG มีจำนวนสูงกว่าโปรแกรม FSH100-PG ซึ่งเป็นผลเกี่ยวเนื่องจาก โปรแกรม FSH100-PG มีจำนวนฟอลลิเคิลที่ถูกเจาะดูดและจำนวนโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้น้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับโปรแกรมทั้งหมด จึงส่งผลทำให้ผลิตตัวอ่อนระยะ

Table 2. Number of cleavages, blastocysts, blastocyst grade (mean $\pm$ SEM), cleavage rate and blastocyst rate (percentage and probability) derived from in-vitro embryo production from different superovulation programs

Parameter	Superovulation program			
	FSH100	FSH100-PG	FSH200	FSH200-PG
Cleavage (cleavages/doe)	6.36 $\pm$ 0.25 ^b	5.36 $\pm$ 0.46 ^b	8.71 $\pm$ 0.73 ^a	9.43 $\pm$ 0.48 ^a
Cleavage rate (%)	65.44 (0.65)	62.50 (0.63)	67.40 (0.64)	68.75 (0.69)
Blastocyst (blastocysts/doe)	3.14 $\pm$ 0.29 ^{bc}	2.64 $\pm$ 0.39 ^c	4.50 $\pm$ 0.41 ^a	4.21 $\pm$ 0.40 ^{ab}
Blastocyst rate (%)	32.35 (0.32)	30.83 (0.31)	34.81 (0.35)	30.73 (0.31)
Blastocyst grade (blastocysts/doe)				
Grade 1	1.71 $\pm$ 0.28 ^{ab}	1.43 $\pm$ 0.29 ^b	2.57 $\pm$ 0.25 ^a	2.50 $\pm$ 0.32 ^a
Grade 2	1.29 $\pm$ 0.23	1.14 $\pm$ 0.24	1.79 $\pm$ 0.30	1.50 $\pm$ 0.23
Grade 3	0.14 $\pm$ 0.09	0.07 $\pm$ 0.07	0.14 $\pm$ 0.09	0.21 $\pm$ 0.11

^{a,b,c} Means within a row with different superscripts are different ($p < 0.05$)

บลาสโตซิสต์ได้จำนวนน้อยและมีจำนวนตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ เกรด 1 ต่ำที่สุดเช่นกัน ส่วนกรณีจำนวนตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ เกรด 1 ในโปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG สูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับจำนวนโอโอไซต์ที่เข้าสู่กระบวนการ IVP ที่มีจำนวนสูง ซึ่งจะเห็นได้ว่า ผลของโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบที่ใช้ FSH ปริมาณ 200 มิลลิกรัม ส่งผลให้ได้ตัวอ่อนคุณภาพ เกรด 1 สูง อันเนื่องมาจากการมีจำนวนโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ทั้งหมด และจำนวนโอโอไซต์ที่เจาะเก็บได้ คุณภาพเกรด A ที่แตกต่างจากโปรแกรมที่ใช้ FSH ปริมาณ 100 มิลลิกรัม

จากผลของอัตราการแบ่งตัว พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันของทั้ง 4 โปรแกรม ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Sanchez *et al.* (2014) รายงานว่า อัตราการแบ่งตัวในกลุ่มที่เจาะเก็บโอโอไซต์ 1 ครั้ง และกลุ่มเจาะเก็บโอโอไซต์หลายครั้ง ร้อยละ 67.0 และ 68.6 ตามลำดับ และใกล้เคียงกับการศึกษาการใช้ฮอร์โมน FSH ปริมาณ 100 มิลลิกรัม พบว่า มีอัตราการแบ่งตัวร้อยละ 60.71 (อรรถพล และคณะ, 2564) และร้อยละ 55.17 (พิงค์ลานนา และอรรถพล, 2565) และสอดคล้องกับการศึกษาการใช้ฮอร์โมน FSH ร่วมกับฮอร์โมนชนิดอื่นๆ พบว่า มีอัตราการแบ่งตัวร้อยละ 72 (Baldassarre *et al.*, 2007) และผลของอัตราการเจริญถึงตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันของทั้ง 4 โปรแกรม ใกล้เคียงกับการศึกษาของ Sanchez *et al.* (2014) รายงานว่า อัตราการเจริญถึงตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ในกลุ่มที่เจาะเก็บโอโอไซต์ 1 ครั้ง และในกลุ่มเจาะเก็บโอโอไซต์หลายครั้งร้อยละ 31.8 และ 27.9 ตามลำดับ และการศึกษาการใช้ฮอร์โมน FSH ปริมาณ 100 มิลลิกรัม พบว่า อัตราการเจริญถึงตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ร้อยละ 28.57 (อรรถพล และคณะ, 2564) และร้อยละ 36.21 (พิงค์ลานนา และอรรถพล, 2565) จากผลของอัตราการแบ่งตัวและอัตราการเจริญถึงตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ ทั้ง 4 โปรแกรมที่ไม่มีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าผลของโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบและปริมาณของฮอร์โมน FSH ไม่มีผลต่ออัตราการแบ่งตัวและอัตราการเจริญถึงตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์

สรุปผลการทดลอง

โปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบทั้ง 4 โปรแกรม สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลเพื่อสามารถเจาะดูดฟอลลิเคิลสำหรับเก็บโอโอไซต์ และผลิตตัวอ่อนระยะบลาสโตซิสต์ด้วยวิธี LOPU-IVP ได้ โดยโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบที่มีความเหมาะสมที่สุดทั้งปริมาณและคุณภาพของโอโอไซต์ที่สามารถนำเข้าสู่กระบวนการ IVP คือ โปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG และโปรแกรมกระตุ้นการตกไข่หลายใบที่มีความเหมาะสมที่สุดต่อปริมาณและคุณภาพของตัวอ่อน คือ โปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG รองลงมาคือโปรแกรม FSH100

ข้อเสนอแนะ

หากต้องการใช้โปรแกรมสำหรับการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายแพะ ด้วยวิธี LOPU-IVP อาจจะต้องพิจารณาเรื่องต้นทุนร่วมด้วย เนื่องจากด้วยโปรแกรม FSH100 และ FSH100-PG มีต้นทุนที่ต่ำกว่าโปรแกรม FSH200 และ FSH200-PG ประมาณ 50% หรืออาจจะมีการศึกษาเพิ่มเติมร่วมกับฮอร์โมนชนิดอื่นๆ รูปแบบการฉีด รวมไปถึงการศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่ส่งผลต่อปริมาณและคุณภาพโอโอไซต์และตัวอ่อนในอนาคตต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์อรุณ จันทร์กระจ่าง ที่ปรึกษาโครงการฯ นายสัตวแพทย์ภัทรพล สำเร็จจิต และคณะกรรมการวิจัยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ทุกท่านที่ให้ความรู้และคำแนะนำการเขียนงานวิจัย นายสัตวแพทย์อนนท์ เทืองสันเทียะ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ ที่ให้ความรู้การจัดการสุขภาพแพะและการฝึกฝนการเจาะเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี LOPU และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์

สืบพันธุ์สัตว์ นายสัตวแพทย์สุรวิทย์ จินสุข คุณนิตยา วาปีกา คุณกมลวรรณ มัดสิงห์ ที่ให้ความรู้และตรวจหาโอโอไซต์รวมถึงการปฏิบัติงานผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย คุณจีราภา ขาวสุข นักวิทยาศาสตร์ ที่ให้ความรู้และตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อแพะ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ช่วยเหลือและงานวิจัยครั้งนี้ประสบความสำเร็จเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- พิงค์ลานนา กุญชร และ อรรถพล พรประไพ. 2565. เทคนิคการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะด้วยวิธี Laparoscopic ovum pick-up (LOPU) และการผลิตตัวอ่อนแพะด้วยวิธีปฏิสนธิภายนอกร่างกาย. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 13(1):48-61.
- มาลี อภิเมธีธำรง อนนท์ เทืองสันเทียะ ณรงค์ เลี้ยงเจริญ วิบูลย์ เยี่ยงวิศวกูร จุรีรัตน์ สำเร็จประสงค์ อรรถพคุณาวงษ์ฤกษ์ และ มงคล เตชะกำพุ. 2548. การเก็บโอโอไซต์โดยการผ่าตัดเข้าและผลของการผ่าตัดเข้าต่อการตั้งท้องในแพะ. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตรศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์. 39(5):16-22.
- อรรถพล พรประไพ อนนท์ เทืองสันเทียะ พิงค์ลานนา กุญชร และ มาลี อภิเมธีธำรง. 2564. การศึกษาความเป็นไปได้ในการเจาะเก็บโอโอไซต์แพะด้วยวิธี laparoscopic ovum pick-up (LOPU) และการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายในประเทศไทย. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 12(1):136-160.
- Avelar, S.R.G., R.R. Moura, F.C. Sousa, A.F. Pereira, K.C. Almeida, C.H.S. Melo, A.C.A. Teles-Filho, G. Baril, L.M. Melo, D.I.A. Teixeira and V.J.F. Freitas. 2012. Oocyte production and in vitro maturation in Canindé goats following hormonal ovarian stimulation. *Animal Reproduction* 9: 27-32
- Baldassarre, H., B. Wang, N. Kafidi, C.Keefer, A. Lazaris and C.N. Karatzas. 2002. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. *Theriogenology*. 57:275-284.
- Baldassarre, H., K.M. Rao, N. Neveu, E. Brochu, I.Begin, E. Behboodi and D.K. Hockley. 2007. Advances in the production and propagation of transgenic goats using laparoscopic ovum pick-up and in vitro embryo production technologies. *Reproduction, Fertility and Development*. 19:612-616
- Baldassarre, H. and C.N. Karatzas. 2004. Advanced assisted reproduction technologies (ART) in goats. *Animal Reproduction science*. 82-83:255-266.
- Baldassarre, H., 2021. Laparoscopic ovum pick-up followed by in vitro embryo production and transfer in assisted breeding programs for ruminant. *Animals*. 11:216-228.
- Berisha, B., D. Schams, D. Rodler, F. Sinowatz and M.W. Pfaffl. 2018. Changes in the expression of prostaglandin family members in bovine corpus luteum during the estrous cycle and pregnancy. *Molecular Reproduction and Development*. 85:622-634.

- Choi, B.H., B. Jae-Il, J. Jong-In, K. Seong-Su, J. Hyun-Tae, D. Gautam Kumar, D. Nasser, C. Kyu-Woan and K. Il-Keun. 2013. Coculturing cumulus oocyte complexes with denuded oocytes alters zona pellucida ultrastructure in in vitro matured bovine oocytes. *Theriogenology*. 80:1117–1123.
- Crozet, N., M. Ahmed-Ali and M.P. Dubos. 1995. Developmental competence of goat oocytes from follicles of different size categories following maturation fertilization and culture in vitro. *Journal of reproduction and fertility*. 103:293-298
- Demoustier, M.M., J.F. Beckers, P. Van Der Zwalmen, J. Closset, J.L. Gillard and F. Ectors. 1988. Determination of porcine plasma follitropin levels during superovulation treatment in cows. *Theriogenology*. 30:379–86
- Gandolfi, F., T.A. Brevini, F. Cillo and S. Antonini. 2005. Cellular and molecular mechanisms regulating oocyte quality and the relevance for farm animal reproductive efficiency. *Revue scientifique et technique*. 24:413–423.
- Hamilton, S.A., H.A. Garverick, D.H. Keisler, Z.Z. Xu, K. Loos, R.S. Youngquist and B.E. Salfen. 1995. Characterization of ovarian follicular cysts and associated endocrine profiles in dairy cows. *Biology of Reproduction*. 53(4):890-898.
- Maria, J.G., F. Souza, 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: Slughterhouse and laparoscopic ovum pick up- derived oocytes have different kinetics and requirements regarding maturation media. *Theriogenology* 81: 1021-1031.
- 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. *Bangladesh Journal of Animal Science*.37(1):1-9
- Paramio, M.-T. and D. Izquierdo. 2016. Recent advances in *in vitro* embryo production in small ruminants. *Theriogenology*. 86:152-159.
- Sanchez, D.J.D., C.H.S. Melo, J.M.G. Souza-Fabjan, F.C. Sousa, A.A. Rocha, I.S. Campelo, D.I.A. Teixeira, A.F. Pereira, L.M. Melo and V.J.F Freitas. 2014. Repeated hormonal treatment and laparoscopic ovum pick-up followed by in vitro embryo production in goats raised in the tropics. *Livestock Science*. 165:217-222.
- Souza-Fabjan, J.M.G., Y. Locatelli, N. Duffard, E. Corbin, R.I.T. Pereira-Batista, V.J.F. Freitas, J.F. Beckers and P. Mermillod. 2016. Intrinsic quality of goat oocytes already found denuded at collection for in vitro embryo production. *Theriogenology*. 86(8):1989-1998.

- Stringfellow, David A. and M. Daniel Givens. 2010. Manual of the International Embryo Transfer Society. 4th edition. International Embryo Transfer Society, INC. Illinois. USA.
- 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.

รูปแบบของยีน melanocortin-1 receptor (MC1R) ต่อการแสดงออกของสีขน

ในโคนมทรอปิคอลโฮลส์ไตน์

ณัฐนันท์ ศิริรัตนัญญกุล^{1/} เพชรร้อย เพชรเรียง^{1/}

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์รูปแบบของยีนแฝงขนแดง (MC1R gene) ในโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลส์ไตน์ด้วยเทคนิค real time PCR ใช้สำหรับในการตรวจคัดกรอง คัดทิ้งและคัดเลือกยีน MC1R ที่แสดงออกของสีขนสีแดง ออกจากฝูงประชากรโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลส์ไตน์ในประเทศไทย ทำการศึกษา ในโค 9 สายพันธุ์ จำนวนสายพันธุ์ละ 10 ตัว ได้แก่ โคสายพันธุ์ทรอปิคอลโฮลส์ไตน์ แองกัส บีฟมาสเตอร์ บลอนด์ดาคิตเตน วากิว เจแปนีส-เบล์ค บรามันห์แดง ชาวลำพูน และพื้นเมือง และโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลส์ไตน์ จำนวน 382 ตัว โดยการเก็บตัวอย่างเลือดนำมาสกัดดีเอ็นเอและตรวจยีน MC1R ด้วยไพรเมอร์และโพรบติดสารเรืองแสง ฟลูออเรสเซนต์ ที่มีความจำเพาะต่อยีน MC1R ด้วยเทคนิค real time PCR และยืนยันผลตรวจด้วยเทคนิควิเคราะห์ลำดับเบส (PCR sequencing) ของยีน MC1R ผลการศึกษาพบว่า การตรวจวิเคราะห์ยีน MC1R ด้วยเทคนิค real time PCR ด้วยตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ของยีน MC1R จำนวน 3 ตำแหน่ง ได้แก่ ลำดับเบสที่ 296 667 และ 748 มีรูปแบบอัลลีลได้ 4 รูปแบบคือ E^D E1 e และ E2 ผลการตรวจในโค 9 สายพันธุ์ จำนวน 90 ตัว พบมีรูปแบบ อัลลีล 2 รูปแบบ คือ อัลลีล E^D และ E2 สำหรับการตรวจวิเคราะห์ยีน MC1R ด้วยเทคนิค PCR sequencing ด้วยตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ของยีน MC1R จำนวน 7 ตำแหน่ง ได้แก่ ตำแหน่งที่เบส Thymine (T) แทนที่ Cytosine (C) ในลำดับเบสที่ 296 และ 748 (substitution) ตำแหน่งที่เบส C แทนที่ T ในลำดับเบสที่ 667 872 และ 869 (substitution) ตำแหน่งที่เบส Guanine (G) หายไป 1 ตัว ในลำดับเบสที่ 310 (deletion) และตำแหน่งที่เกิดการซ้ำของ นิวคลีโอไทด์ 12 เบสในลำดับเบสที่ 650 (duplication) มีรูปแบบอัลลีลได้ 6 รูปแบบคือ E^D E1 e E2 E3 และ e1 ผลการตรวจพบมีรูปแบบอัลลีล 3 รูปแบบ คือ E^D e1 และ E3 โดยพบอัลลีล E^D ให้ผลเหมือนกับการตรวจด้วยเทคนิค real time PCR ส่วนอัลลีล E3 พบว่า นิวคลีโอไทด์ที่ลำดับเบสที่ 667 เป็น C เช่นเดียวกับ อัลลีล E2 แต่ต่างกับอัลลีล E1 ที่พบเกิดการแทนที่ (substitution) นิวคลีโอไทด์จาก C เป็น T และไม่พบการเกิดลำดับเบสซ้ำ (duplication) 12 เบสแพร่ที่ลำดับเบสที่ 650 เช่นเดียวกับอัลลีล E1 ซึ่งต่างจากอัลลีล E2 ที่พบการเกิดลำดับเบสซ้ำ สำหรับอัลลีล e1 เป็นอัลลีลที่พบเพิ่มขึ้นใหม่ในการศึกษารุ่นนี้ โดยมีความแตกต่างจากอัลลีล e ที่ลำดับเบส 748 ของอัลลีล e พบนิวคลีโอไทด์ชนิด C แต่อัลลีล e1 พบเป็น T ผลการเปรียบเทียบเทคนิคการตรวจทั้ง 2 วิธีพบว่าให้ผลการตรวจวิเคราะห์สอดคล้องตรงกันในทุกตัวอย่างคิดเป็น 100 % ผลการตรวจยีนแฝงขนแดงในโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลส์ไตน์ จำนวน 384 ตัว พบรูปแบบจีโนไทป์ เป็น E^D / E^D จำนวน 286 ตัว (74.48 %) E^D / E2 จำนวน 91 ตัว (23.70 %) และ E2 / E2 จำนวน 7 ตัว (1.82%) จากการศึกษาพบว่าการตรวจวิเคราะห์รูปแบบของยีนแฝงขนแดงในโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลส์ไตน์ ด้วยเทคนิค real time PCR สามารถนำมาใช้เป็นวิธีในการตรวจสอบยีน MC1R ในการคัดแยกยีนแฝงขนแดง เพราะมีความจำเพาะ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความไว มีความถูกต้องแม่นยำ มีความน่าเชื่อถือและเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว

คำสำคัญ : โคทรอปิคอลโฮลส์ไตน์ ยีนเอ็มซี1อาร์ สีขน

เลขทะเบียนวิชาการ : 65(2)-0208-142

^{1/} สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ 91 ถนนติวานนท์ ต. บางกะดี อ. เมือง จ. ปทุมธานี 12000

Polymorphisms of melanocortin-1 receptor gene in coat color expression of Tropical-Holstein cattle

Nattanan Sirirattanatanyakul^{1/} Petchroi petchreing ^{1/}

Abstract

The aim of this study was to identify or screening and gradually eradicate the carried red/yellow coat colour (melanocortin-1 receptor gene; MC1R gene) from the Thai-Tropical Holstein population, by using real-time PCR. Samples were from 9 breeds (10 from each breed), namely, Tropical Holstein, Angus, Beef Master, Blonde d'Aquitaine, Wagyu, Japanese Black, RED Brahman, Khaw Lumpoon and Native. Additional 382 samples were from Tropical Holstein. DNA was extracted from blood samples and analyzed in Real-Time PCR by primers and fluorescence probes, which are specific to MC1R gene, subsequently, confirmed the results by direct DNA sequencing. The results showed that three of MC1R gene's mutation position are nucleotide base at 296, 667 and 748 combinations of the polymorphic site, resulting in 4 different alleles; E^D, E1, e and E2 for predicted genotype using real time PCR technique in 9 breeds, which found 2 polymorphic alleles, E^D and E2. The sequences of MC1R gene by PCR sequencing techniques found 7 different variants which are characterized as follows: a T/C base substitution at position 296 and 748, a C/T base substitution at position 667, 872 and 869, a deletion of one G at position 310, and a duplication of 12 nucleotides at position 650 combinations of the polymorphic site which result in 6 different alleles E^D, E1, e, E2, E3 and e1. Three different alleles were found in 9 breeds; E^D, e1 and E3. The E^D alleles, which showed the same polymorphism patterns from sequencing and real time PCR. The E3 alleles found nucleotide at position 667 is base C as the same E2 alleles but different E1 alleles is base T and not found duplicate 12 base at position 650 in E1 and E3 alleles but found in E2 alleles. In this study e1 alleles is new alleles contains T at position 748 different from e alleles contains C at same position. Results from two analysis techniques were in 100% accordance. The genotyping assay of 384 Tropical Holstein cows were composed of E^D / E^D (286, 74.48%), E^D /E2, (91, 23.70 %) and E2/E2 (7, 1.82%). In conclusion, detection of melanocortin-1 receptor gene (MC1R) in Tropical Holstein cattle using real-time PCR is simple, rapid, sensitivity, reliable and efficiently for identifying/screening of MC1R gene

Keywords: Tropical-Holstein cows, MC1R gene, coat color

Registered No. : 65(2)-0208-142

^{1/} Bureau of Biotechnology in Livestock Production, 91 Tiwanon road, Bangkadi subdistrict, Amphoe Muang, Pathumthani Province. 12000

คำนำ

แผนการพัฒนาสายพันธุ์โคนมของประเทศไทยในระยะเริ่มต้น เป็นการผสมข้ามสายพันธุ์ (cross-breeding) โดยใช้น้ำเชื้อของพ่อโคนมพันธุ์แท้ที่ให้ผลผลิตน้ำนมสูง โดยส่วนใหญ่จะใช้พันธุ์โฮลสไตน์ ฟรีเซียนเป็นพันธุ์หลัก นำมาผสมกับแม่โคพื้นเมืองซึ่งมีคุณสมบัติเด่นในด้านการทนทานต่อโรค แมลงกัดเคี้ยว และสภาพภูมิอากาศร้อนชื้น เพื่อรวมยีนที่ควบคุมลักษณะดีของทั้งสองพันธุ์เข้าด้วยกัน และได้ปรับปรุงพันธุ์ต่อมาโดยการผสมแบบเพิ่มระดับเลือดจนถึงปัจจุบันให้มีระดับสายเลือดโฮลสไตน์ ฟรีเซียนสูงขึ้นให้อยู่ระหว่าง 87.5 - 93.75 % (สมุดพ่อพันธุ์โคนม 2564) เพื่อให้ได้สายพันธุ์โคนมสำหรับประเทศไทยที่มีลักษณะให้ผลผลิตน้ำนมสูง อัตราการเจริญเติบโตดี โครงสร้างรูปร่าง สุขภาพเต้านมดี สามารถเจริญเติบโตในสภาวะอากาศร้อนขึ้นได้ และมีการตั้งชื่อเป็นโคนมสายพันธุ์ “ทรอปิคอล โฮลสไตน์” ซึ่งในการปรับปรุงสายพันธุ์นอกจากเพิ่มศักยภาพทางด้านการคุณภาพและปริมาณผลผลิตแล้ว ได้มีการกำหนดลักษณะประจำพันธุ์ให้เป็นโคที่มีสีขนเป็นขาว-ดำ โดยการคัดตรวจสอบทางเทคนิคชีวโมเลกุลเพื่อคัดแยกโคที่มียีนแฝงขนสีแดงออกจากฝูง อันอาจเกิดจากโคพื้นเมืองหรือโคสายพันธุ์อื่น

การแสดงออกของสิ่งมีชีวิตถูกควบคุมด้วยยีน ซึ่งเป็นหน่วยควบคุมลักษณะที่อยู่บนโครโมโซม ในนิวเคลียสของเซลล์ สามารถถ่ายทอดจากพ่อแม่ไปสู่ลูกหลานได้ เรียกว่า ลักษณะทางพันธุกรรม ยีนที่ควบคุมลักษณะต่าง ๆ มีตำแหน่งหรือโลกัส (locus) ที่แน่นอนบนโครโมโซม ยีนจะปรากฏเป็นคู่ ๆ ยีนที่เป็นคู่กันบนตำแหน่งเดียวกันบนโครโมโซม เรียกว่า อัลลีล (allele) ต่อกัน การแสดงออกของยีนใด ๆ จะปรากฏออกมาในรูปของลักษณะปรากฏให้เห็นภายนอกเรียกว่า ฟิโนไทป์ (phenotype) ส่วนลักษณะผสมของรูปแบบของยีนต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิตที่ต้องการจะทำการศึกษาค้นคว้าเป็นลักษณะที่มองไม่เห็น เรียกว่า จีโนไทป์ (Genotype) จะอยู่เป็นคู่ ๆ แบ่งได้เป็นยีนควบคุมลักษณะเด่น (dominant gene) และยีนควบคุมลักษณะด้อย (recessive gene) โดยยีนทั้งคู่เหมือนกันเรียกว่า พันธุ์แท้ (homozygous) อัลลีลที่เป็นคู่เหมือนกัน เช่น TT หรือ tt ส่วนยีนทั้งคู่แตกต่างกันเรียกว่า พันธุ์ทางหรือลูกผสม (heterozygous) อัลลีลที่เป็นคู่ต่างกัน เช่น Tt (ประดิษฐ์, 2554)

กระบวนการสร้างเม็ดสีของขนและผิวหนังในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมถูกควบคุมด้วยยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดสีเมลานิน (melanin pigment) จากเซลล์เมลานोไซต์ (melanocyte) เม็ดสีมีด้วยกัน 2 ชนิดคือ ยูเมลานิน (eumelanin) เป็นสีน้ำตาลหรือดำ และ พีโอเมลานิน (pheomelanin) เป็นสีเหลืองหรือแดง (Cone et al., 1996) โดยในกระบวนการสังเคราะห์เม็ดสีทั้ง 2 ชนิดถูกควบคุมด้วยระดับของเอนไซม์ tyrosinase ถ้ามีปริมาณสูงส่งผลให้มีการสร้าง eumelanin ในขณะที่มีปริมาณต่ำจะเป็นการสร้าง pheomelanin เนื่องมาจากเมื่อ melanocyte-stimulating hormone (MSH) เข้าจับกับ melanocyte-stimulating hormone receptor (MSHR) ทำให้ระดับเอนไซม์ tyrosinase สูงขึ้นมีผลทำให้เกิดการผลิต eumelanin แต่เมื่อมี Agouti signalling peptide ซึ่งเป็นสารแอนตาโกนิสต์ เข้าจับกับ MSHR ทำให้เกิดการป้องกันการเกิดปฏิกิริยาระหว่าง MSH กับ MSHR มีผลทำให้เกิดการสังเคราะห์ pheomelanin ขึ้น (Bultman et al., 1992) ยีน melanocortin 1 receptor (MC1R) หรือ melanocyte-stimulating hormone receptor (MSHR) เป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมกระบวนการสร้างเม็ดสี eumelanin (สีดำ/ สีน้ำตาล) และ pheomelanin (สีแดง / สี เหลือง) (Robbins et al., 1993; Jackson, 1997) ในโคยีน MC1R พบอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 18 ในส่วนของ exon มีความ

ยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ 954 เบสแพร์ (Werth et al., 1996) ในกระบวนการสร้างเมดสีเมลานินถูกควบคุมด้วย 2 อัลลีล คือ Extension (E) และ Agouti (A) (Seo et al., 2007) ตำแหน่งอัลลีล เด่นของ E ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีความเกี่ยวข้องร่วมกับเมดสีขนสีดำ ขณะที่ตำแหน่งอัลลีลด้อยมีความเกี่ยวข้องร่วมกับเมดสีขนสีแดงหรือสีเหลือง (Searle, 1968; Jackson, 1997) สำหรับตำแหน่งอัลลีลเด่นของ A มีส่วนร่วมกับการสร้างเมดสีขนสีเหลืองในหนูไมค์ และตำแหน่งอัลลีลด้อยมีส่วนร่วมกับการสร้างเมดสีขนสีดำ (Jackson, 1997) จากการศึกษาของ Klungland et al., 1995 และ Klungland et al., 2000 พบว่าอัลลีลที่พบบนตำแหน่งที่จำเพาะของยีน MSHR คือ อัลลีล E ใช้ในการถอดรหัสสำหรับ MSHR หรือ MC1R มีด้วยกัน 3 อัลลีล คือ E^D เป็นอัลลีลลักษณะเด่น (dominant allele) ควบคุมลักษณะขนสีดำ e เป็นอัลลีลลักษณะด้อย (recessive allele) ควบคุมลักษณะขนสีแดง/เหลือง และ E⁺ เป็นอัลลีลชนิด wild-type ที่ให้ลักษณะของสีขนที่มีหลากหลายสีเช่น น้ำตาล น้ำตาลแดง แดงดำ เป็นต้น ซึ่งเกิดจากการทำหน้าที่ร่วมของอัลลีล A โดยอัลลีล A⁺ ทำให้เกิดเป็นสีน้ำตาล หรือจากยีนด้อย อัลลีล a ทำให้เกิดสีดำ

ดังนั้นจึงทำการศึกษาดูหา ยีน MC1R ซึ่งเป็นยีนที่มีผลต่อการแสดงออกของสีขนในโคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์ด้วยเทคนิค real-time PCR โดยอาศัยหลักการใช้ไพรเมอร์ติดสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (primer probe) ที่ได้รับการออกแบบจำเพาะเพื่อค้นหาตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนลำดับเบสที่ต้องการตรวจ และสามารถจับตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไปได้อย่างถูกต้อง เพื่อใช้ในการคัดเลือกหรือคัดกรองยีนแฝงขนสีแดงออกจากฝูงประชากรโคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์ และประยุกต์ใช้กับการคัดเลือกหรือตรวจสอบลักษณะขนสีแดงในโคสายพันธุ์อื่นให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์ของการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

เป็นโคในฟาร์มเครือข่ายที่อยู่ในความรับผิดชอบของศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี ราชบุรี ขอนแก่น และเชียงใหม่ จำนวน 9 สายพันธุ์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีลักษณะสีขนเป็นลักษณะประจำพันธุ์ที่แตกต่างกัน ได้แก่กลุ่มโคที่มีลักษณะปรากฏสีขนสีดำ น้ำตาลดำหรือน้ำตาลเข้ม ได้แก่โคพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ แอวกัส วากิว และแจแปนีส-แบล็ค กลุ่มโคที่มีลักษณะปรากฏสีขนสีน้ำตาลแดง แดงดำหรือน้ำตาลอมเหลือง ได้แก่ โคพันธุ์บีฟมาสเตอร์ บลอนด์ดาคิตัน บรามันท์แดง และพันธุ์พื้นเมือง กลุ่มโคที่มีลักษณะปรากฏสีขนสีขาว ได้แก่ โคพันธุ์ขาวลำพูน สายพันธุ์ละ 10 ตัวรวมเป็นจำนวน 90 ตัว และโคพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ 382 ตัว เพื่อใช้ในการทดสอบการกระจายความถี่ของยีน MC1R ในฝูงโคพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์

การเก็บตัวอย่างเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือดดำที่บริเวณโคนหางจำนวน 6 มิลลิลิตร ใส่หลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 – 8 องศาเซลเซียส ซึ่งดำเนินการตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2563 ถึงกันยายน 2564 ทดสอบและวิเคราะห์ผลที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ จังหวัดปทุมธานี

การสกัดดีเอ็นเอ

นำตัวอย่างเลือดมาสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนการสกัดที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIAmp-Blood DNA Extraction Kit (QIAGEN®, Germany) ตัวอย่างทั้งหมดถูกเก็บไว้ในสารละลาย TE buffer และทำการวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA ให้มีค่า OD ที่ 260/280 ระหว่าง 1.8-2.0 ด้วย Microvolume Spectrophotometer (DeNovix®, USA) โดยนำตัวอย่าง DNA ที่ได้มาทำเจือจางให้มีความเข้มข้นที่ 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองในขั้นตอนต่อไป

ไพรเมอร์และโพรบ สำหรับปฏิกิริยา real-time PCR

เป็นไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน MC1R ขนาด 954 เบสแพร์ และ โพรบที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิด VIC และ FAM (TaqMan MGB-Probe) ตาม Table 1 เพื่อใช้สำหรับตรวจสอบตำแหน่ง สนิป (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ของยีน MC1R ลำดับที่ 296 667 และ 748 โดยเปลี่ยนจาก Thymine (T) เป็น Cytosine (C) หรือ Cytosine (C) เป็น Thymine (T) ทั้ง 3 สนิป (GenBank accession number: U39469) (Joerg et al., 1996) ออกแบบด้วยโปรแกรม Primer 5 software

Table 1. Real-time PCR specific primers and probes for Specific SNP MC1R gene underline and bold letter represented SNP polymorphisms

Specific SNP MC1R gene	Primer/probe Sequences (5' → 3')	Product size (bp)
Assay Mix	F-GGTGAGCGTCAGCAACGT-	70
MC1R-p296	R-CTGGGTGGCCAGGACAC-	
	Probe VIC – CCAGCAGC G GCATGA -NFQ	
	Probe FAM – CCAGCAGC A GCATGA -NFQ	
Assay Mix	F-CGGGCCTGCCAGCAT-	72
MC1R-p667	R- GCCAAAGCCCTGATGAATGG-	
	Probe VIC – TGGAGCC C GGCAAT -NFQ	
	Probe FAM – TGGAGCC A GGCAAT -NFQ	

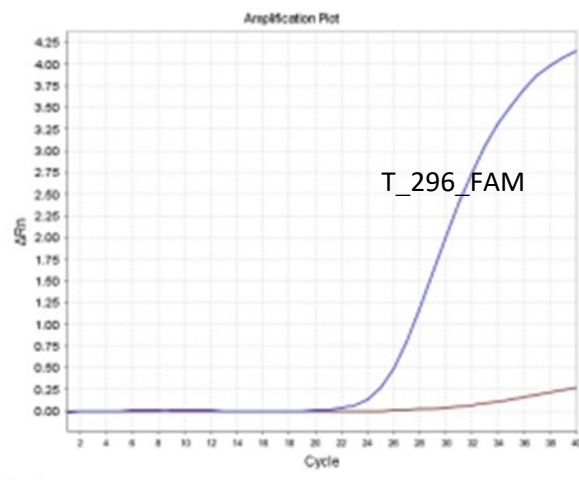
Assay Mix	F-TGCCACCCTCACCATCCT-	68
MC1R-p748	R- GCGAGAGGTGCAGGAAGAAG-	
	Probe VIC – AGAGGAAGAAGACGCC -NFQ	
	Probe FAM – AGAGGAAGAGGACGCC -NFQ	

การเพิ่มชิ้นขนาดของยีน MC1R ด้วยเทคนิค real-time PCR

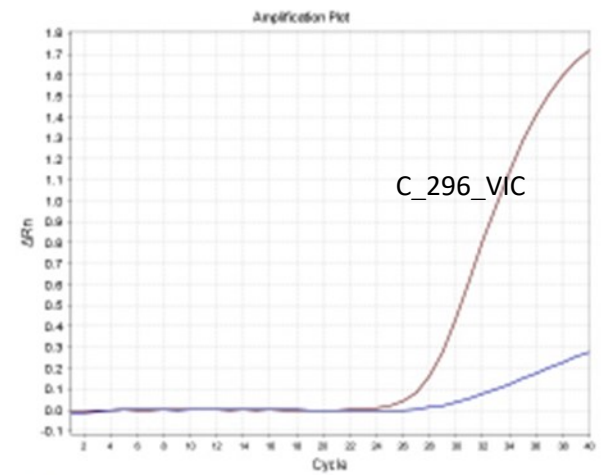
เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของยีน MC1R ด้วยเครื่อง Step-One Plus Real-Time PCR (Applied Biosystem, USA) โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบ ที่มีความจำเพาะต่อยีน MC1R ตาม Table 1 โดยการเพิ่มจำนวน ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Real-Time Polymerase Chain Reaction (real-time PCR) มีองค์ประกอบของปฏิกิริยาดังนี้ ปริมาณปฏิกิริยาทั้งหมด 5 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 20X Assay Mix MC1R 0.25 ไมโครลิตร และ 2X TaqMan® GTXpress™ Master Mix (Applied Biosystem, USA) 2.50 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 1.25 ไมโครลิตร และ DNA template 1 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ Pre-incubation 95 องศาเซลเซียส 20 วินาที ตามด้วย Amplification 95 องศาเซลเซียส 3 วินาที และ 60 องศาเซลเซียส 30 วินาที จำนวน 40 รอบ ตรวจวัดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนซ์ด้วย SDS Software ของเครื่อง Step-One Plus Real-Time PCR โดยทำปฏิกิริยาเพิ่มชิ้นขนาดดีเอ็นเอแยกแต่ละ Assay Mix MC1R

การตรวจวิเคราะห์ผล

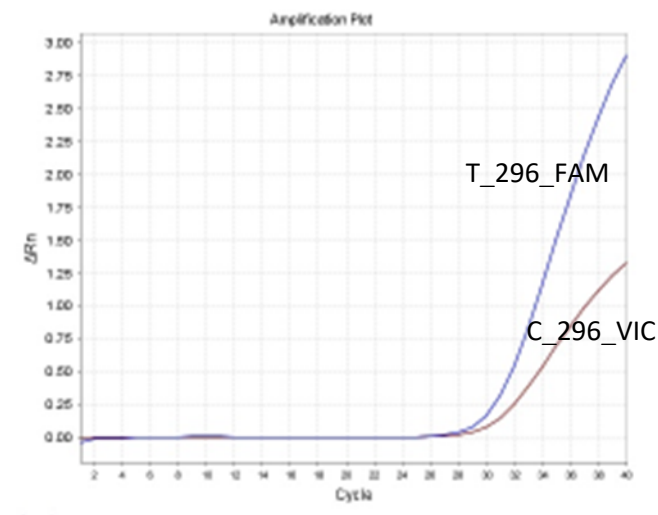
วิเคราะห์ผลโดยการตรวจเช็คการเพิ่มขึ้นของ PCR Product โดยการตรวจวัด fluorescence ด้วยโปรแกรมในเครื่อง Step-One Plus Real-Time PCR การแปลผลมีเกณฑ์ดังนี้ PCR Product ที่เกิดขึ้นจากไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน MC1R โดยนิวคลีโอไทด์ของยีน MC1R ลำดับที่ 296 667 และ 748 โดยจะมีนิวคลีโอไทด์ได้ 2 ชนิดคือเป็น T หรือ C เพราะฉะนั้นเส้นกราฟที่สามารถพบได้ โดยถ้าเป็น T ติดด้วย probe FAM แต่ถ้าเป็น C ติดด้วย probe VIC ของนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 296 และ 667 ส่วนนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 748 นิวคลีโอไทด์ T ติดด้วย probe VIC แต่นิวคลีโอไทด์ C ติดด้วย probe FAM ดังตัวอย่างผลการวิเคราะห์ตัวอย่างนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 296 พบนิวคลีโอไทด์ได้ 3 รูปแบบคือ TT หรือ CC หรือ TC ดังแสดงในรูปภาพ (Figure 1)



Panel A



Panel B



Panel C

Figure 1. Real-Time PCR amplification plot of the MC1R gene sequence at 296 position (panel A) the TT allele (T_296_FAM) (panel B) the CC allele (C_296_VIC) and (panel C) the TC allele (T_296_FAM and C_296_VIC) Genotype distribution 3 pattern

การตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน MC1R

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือดของโค ปริมาณตัวอย่างละ 2 ไมโครลิตร มาเพิ่มขยายชิ้นส่วน DNA ของยีน MC1R ด้วยเทคนิค PCR ดังนี้ไพรเมอร์ MC1R -F และ MC1R -R (Forward และ Reverse primers) (Table 2) อย่างละ 0.4 ไมโครลิตร (10 ไมโครโมล) 2X Platinum® Multiplex PCR Master Mix (Applied Biosystem, USA) 10 ไมโครลิตร GC Enhancer (Applied Biosystem, USA) 1.0 ไมโครลิตร distilled water 6.2 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 20 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ initial denaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ตามด้วย denaturation 95 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที annealing 60 องศาเซลเซียส นาน 90 วินาที และ extension 72 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที จำนวน 28 รอบ และตามด้วย 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที (Table 2) ตรวจสอบผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR โดยการ นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR มาคัดแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธี purification โดยใช้ NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Germany) จากนั้นย้อมสีด้วย GelRed Loading Buffer (Biotium, USA) แยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอใน 5% (w/v) Nusieve agarose gel electrophoresis ที่ 100 V นาน 1.5 ชั่วโมงตรวจขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (954 bp) ด้วยเครื่อง Gel-Doc system (Alpha image 3400, USA) นำ PCR product ที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยชุด BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing Kit โดยใช้เครื่อง AB 3500 DNA Analysis Sequencer (Applied Biosystem, USA) ด้วยโปรแกรม 3500 Data Collection และวิเคราะห์หาลำดับเบสของดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม SeqScape Software Version 3.0 (Figure 2)

Table 2. Specific primers, PCR condition and PRC product used for identification of melanocortin 1 receptor (MC1R) gene.

Gene	Primer Sequences (5'→3')	PCR condition	Time	Number of cycles	PCR product
MC1R	F: ACGATGCCTGCACTTGGCTCCCAG	95 °C	2 min	1	954 bp
	R: CCTCACCAGGAGCACTGCAGCAC	95 °C	30 sec	28	
		60 °C	90 sec	28	
		72 °C	60 sec	28	
		60 °C	30 min	1	



Figure 2. The nucleotide sequences of MC1R gene (954 bp) are shown position of nucleotide base 5 positions (296, 310, 650, 667 and 748) which found substitution deletion and duplication (650 duplication not found in this study)

การศึกษาก่อนหน้านี้ของ Graphodatskaya et al. (2000) ทำการศึกษาลำดับเบสของยีน MC1R อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 18 ในส่วนของ exon มีความยาวของนิวคลีโอไทด์ 954 เบสแพร์ (accession number U39469) พบว่า ลำดับของนิวคลีโอไทด์บนสายดีเอ็นเอของยีน MC1R มีการเปลี่ยนไปของตำแหน่ง

นิวคลีโอไทด์ เช่น การขาดหายไป (Deletion) การแทนที่ (substitution) หรือการเกิดการซ้ำ (duplication) เป็นต้น ตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนไปของนิวคลีโอไทด์ที่พบมีทั้งหมด 7 ตำแหน่งทำให้เกิดรูปแบบ polymorphism 4 อัลลีล (E^D E1 e และ E2) ได้แก่ ตำแหน่ง และ นิวคลีโอไทด์ลำดับเบสที่ 310 เบส G หายไป (310 G deletion) นิวคลีโอไทด์ลำดับเบสที่ 296 748 เปลี่ยนจาก T เป็น C (T296C and T748C base substitution) นิวคลีโอไทด์ลำดับเบสที่ 667 869 และ 872 เปลี่ยนจาก C เป็น T (C667T C869T and C872T base substitution) และเกิดการซ้ำของนิวคลีโอไทด์ 12 เบสตั้งแต่นิวคลีโอไทด์ลำดับเบสที่ต่อจากตำแหน่ง 650 (650 duplication) ดังแสดงใน Figure 3 ทำการคัดเลือกตำแหน่งที่มีการเปลี่ยนไปของนิวคลีโอไทด์เพื่อใช้ในการคัดแยกยีน MC1R ที่แสดงออกของสีขนดำหรือน้ำตาล และขนสีแดงหรือเหลือง โดยพิจารณาคัดเลือกได้ 3 ตำแหน่ง คือ นิวคลีโอไทด์ลำดับเบสที่ 296 667 และ 748 โดยการใช้เทคนิค real time PCR ในการตรวจสอบยีน MC1R จะได้รูปแบบ อัลลีลที่แตกต่างกัน 4 รูปแบบ ดังแสดงใน Table 3

E ^D	ATGCCTGCAC	TTGGCTCCCA	GAGGCGGCTG	CTGGGTTCCT	TTAACTGCAC	50
E1	ATGCCTGCAC	TTGGCTCCCA	GAGGCGGCTG	CTGGGTTCCT	TTAACTGCAC	50
e	ATGCCTGCAC	TTGGCTCCCA	GAGGCGGCTG	CTGGGTTCCT	TTAACTGCAC	50
E2	ATGCCTGCAC	TTGGCTCCCA	GAGGCGGCTG	CTGGGTTCCT	TTAACTGCAC	50
E ^D	GCCCCAGCC	ACCTTCCCCT	TCACCTGGC	CCCCAACCAG	ACGGGGCCCC	100
E1	GCCCCAGCC	ACCTTCCCCT	TCACCTGGC	CCCCAACCAG	ACGGGGCCCC	100
e	GCCCCAGCC	ACCTTCCCCT	TCACCTGGC	CCCCAACCAG	ACGGGGCCCC	100
E2	GCCCCAGCC	ACCTTCCCCT	TCACCTGGC	CCCCAACCAG	ACGGGGCCCC	100
E ^D	AGTGCCTGGA	GGTGTCCATC	CCTGACGGGC	TCTTTCTCAG	CCTGGGGCTG	150
E1	AGTGCCTGGA	GGTGTCCATC	CCTGACGGGC	TCTTTCTCAG	CCTGGGGCTG	150
e	AGTGCCTGGA	GGTGTCCATC	CCTGACGGGC	TCTTTCTCAG	CCTGGGGCTG	150
E2	AGTGCCTGGA	GGTGTCCATC	CCTGACGGGC	TCTTTCTCAG	CCTGGGGCTG	150
E ^D	GTGAGTCTCG	TGGAGAACGT	GCTGGTAGTG	GCTGCCATTG	CCAAGAACCG	200
E1	GTGAGTCTCG	TGGAGAACGT	GCTGGTAGTG	GCTGCCATTG	CCAAGAACCG	200
e	GTGAGTCTCG	TGGAGAACGT	GCTGGTAGTG	GCTGCCATTG	CCAAGAACCG	200
E2	GTGAGTCTCG	TGGAGAACGT	GCTGGTAGTG	GCTGCCATTG	CCAAGAACCG	200
E ^D	CAACCTGCAC	TCCCCATGT	ACTACTTTAT	CTGCTGCCTG	GCTGTGTCTG	250
E1	CAACCTGCAC	TCCCCATGT	ACTACTTTAT	CTGCTGCCTG	GCTGTGTCTG	250
e	CAACCTGCAC	TCCCCATGT	ACTACTTTAT	CTGCTGCCTG	GCTGTGTCTG	250
E2	CAACCTGCAC	TCCCCATGT	ACTACTTTAT	CTGCTGCCTG	GCTGTGTCTG	250
E ^D	ACTTGCTGGT	GAGCGTCAGC	AACGTGCTGG	AGACGGCAGT	CATGCTGCTG	300
E1	ACTTGCTGGT	GAGCGTCAGC	AACGTGCTGG	AGACGGCAGT	CATGCTGCTG	300
e	ACTTGCTGGT	GAGCGTCAGC	AACGTGCTGG	AGACGGCAGT	CATGCTGCTG	300
E2	ACTTGCTGGT	GAGCGTCAGC	AACGTGCTGG	AGACGGCAGT	CATGCTGCTG	300
E ^D	CTGGAGGCCG	GTGTCCTGGC	CACCCAGGCG	GCCGTGGTGC	AGCAGCTGGA	350
E1	CTGGAGGCCG	GTGTCCTGGC	CACCCAGGCG	GCCGTGGTGC	AGCAGCTGGA	350
e	CTGGAGGCCG	GTGTCCTGGC	CACCCAGGCG	GCCGTGGTGC	AGCAGCTGGA	349
E2	CTGGAGGCCG	GTGTCCTGGC	CACCCAGGCG	GCCGTGGTGC	AGCAGCTGGA	350
E ^D	CAATGTCATC	GACGTGCTCA	TCTGCGGATC	CATGGTGTCC	AGCCTCTGCT	400
E1	CAATGTCATC	GACGTGCTCA	TCTGCGGATC	CATGGTGTCC	AGCCTCTGCT	400
e	CAATGTCATC	GACGTGCTCA	TCTGCGGATC	CATGGTGTCC	AGCCTCTGCT	399
E2	CAATGTCATC	GACGTGCTCA	TCTGCGGATC	CATGGTGTCC	AGCCTCTGCT	400

E ^D	TCCTGGGTGC	CATTGCTGTG	GACCGCTACA	TCTCCATCTT	CTACGCCCTG	450
E1	TCCTGGGTGC	CATTGCTGTG	GACCGCTACA	TCTCCATCTT	CTACGCCCTG	450
e	TCCTGGGTGC	CATTGCTGTG	GACCGCTACA	TCTCCATCTT	CTACGCCCTG	449
E2	TCCTGGGTGC	CATTGCTGTG	GACCGCTACA	TCTCCATCTT	CTACGCCCTG	450
E ^D	CGGTACCACA	GTGTTGTGAC	ACTGCCCCGA	GCGTGGAGGA	TCATTGCGGC	500
E1	CGGTACCACA	GTGTTGTGAC	ACTGCCCCGA	GCGTGGAGGA	TCATTGCGGC	500
e	CGGTACCACA	GTGTTG <u>TGAC</u>	ACTGCCCCGA	GCGTGGAGGA	TCATTGCGGC	499
E2	CGGTACCACA	GTGTTGTGAC	ACTGCCCCGA	GCGTGGAGGA	TCATTGCGGC	500
E ^D	CATCTGGGTG	GCCAGCATCC	TCACCAGCCT	GCTCTTCATC	ACCTACTACA	550
E1	CATCTGGGTG	GCCAGCATCC	TCACCAGCCT	GCTCTTCATC	ACCTACTACA	550
e	CATCTGGGTG	GCCAGCATCC	TCACCAGCCT	GCTCTTCATC	ACCTACTACA	549
E2	CATCTGGGTG	GCCAGCATCC	TCACCAGCCT	GCTCTTCATC	ACCTACTACA	550
E ^D	ACCACAAGGT	CATCCTGCTG	TGCCTCGTTG	GCCTCTTCAT	AGCTATGCTG	600
E1	ACCACAAGGT	CATCCTGCTG	TGCCTCGTTG	GCCTCTTCAT	AGCTATGCTG	600
e	ACCACAAGGT	CATCCTGCTG	TGCCTCGTTG	GCCTCTTCAT	AGCTATGCTG	599
E2	ACCACAAGGT	CATCCTGCTG	TGCCTCGTTG	GCCTCTTCAT	AGCTATGCTG	600
E ^D	GCCCTGATGG	CCGTCCTCTA	CGTCCACATG	CTGGCCCCGGG	CCTGCCAGCA	650
E1	GCCCTGATGG	CCGTCCTCTA	CGTCCACATG	CTGGCCCCGGG	CCTGCCAGCA	650
e	GCCCTGATGG	CCGTCCTCTA	CGTCCACATG	CTGGCCCCGGG	CCTGCCAGCA	649
E2	GCCCTGATGG	CCGTCCTCTA	CGTCCACATG	CTGGCCCCGGG	CCTGCCAGCA	650
E ^D	-----	--TGCCCCGGG	GCATTGCCCG	GCTCCAGAAG	AGGCAGCGCC	688
E1	-----	--TGCCCCGGG	GCATTGCC <u>TG</u>	GCTCCAGAAG	AGGCAGCGCC	688
e	-----	--TGCCCCGGG	GCATTGCCCG	GCTCCAGAAG	AGGCAGCGCC	687
E2	TGCCCCGGGGC	ATTGCCCGGG	GCATTGCCCG	GCTCCAGAAG	AGGCAGCGCC	700
E ^D	CCATTTCATCA	GGGCTTTGGC	CTCAAGGGCG	CTGCCACCCT	CACCATCCTG	738
E1	CCATTTCATCA	GGGCTTTGGC	CTCAAGGGCG	CTGCCACCCT	CACCATCCTG	738
e	CCATTTCATCA	GGGCTTTGGC	CTCAAGGGCG	CTGCCACCCT	CACCATCCTG	737
E2	CCATTTCATCA	GGGCTTTGGC	CTCAAGGGCG	CTGCCACCCT	CACCATCCTG	750
E ^D	CTGGGCGTCT	TCTTCCTCTG	CTGGGGCCCC	TTCTTCCTGC	ACCTCTCGCT	788
E1	CTGGGCGTCT	TCTTCCTCTG	CTGGGGCCCC	TTCTTCCTGC	ACCTCTCGCT	788
e	CTGGGCGTCT	<u>C</u> TTCCTCTG	CTGGGGCCCC	TTCTTCCTGC	ACCTCTCGCT	787
E2	CTGGGCGTCT	TCTTCCTCTG	CTGGGGCCCC	TTCTTCCTGC	ACCTCTCGCT	800
E ^D	CATCGTCCTC	TGCCCCCAGC	ACCCACCTG	TGGCTGCATC	TTCAAGAACT	838
E1	CATCGTCCTC	TGCCCCCAGC	ACCCACCTG	TGGCTGCATC	TTCAAGAACT	838
e	CATCGTCCTC	TGCCCCCAGC	ACCCACCTG	TGGCTGCATC	TTCAAGAACT	837
E2	CATCGTCCTC	TGCCCCCAGC	ACCCACCTG	TGGCTGCATC	TTCAAGAACT	850
E ^D	TCAACCTCTT	CCTGGCCCTC	ATCATTTGCA	ACG <u>T</u> CATTGT	GGACCCCTC	888
E1	TCAACCTCTT	CCTGGCCCTC	ATCATTTGCA	ACGCCATTGT	GGACCCCTC	888
e	TCAACCTCTT	CCTGGCCCTC	ATCATTTGCA	<u>A</u> TGCCATTGT	GGACCCCTC	887
E2	TCAACCTCTT	CCTGGCCCTC	ATCATTTGCA	ACGCCATTGT	GGACCCCTC	900
E ^D	ATCTATGCCT	TCCGCAGCCA	GGAGCTCCGG	AAGACGCTCC	AAGAGGTGCT	938
E1	ATCTATGCCT	TCCGCAGCCA	GGAGCTCCGG	AAGACGCTCC	AAGAGGTGCT	938
e	ATCTATGCCT	TCCGCAGCCA	GGAGCTCCGG	AAGACGCTCC	AAGAGGTGCT	937
E2	ATCTATGCCT	TCCGCAGCCA	GGAGCTCCGG	AAGACGCTCC	AAGAGGTGCT	950
E ^D	GCAGTGCTCC	TGGTGA	954			
E1	GCAGTGCTCC	TGGTGA	954			
e	GCAGTGCTCC	TGGTGA	953			
E2	GCAGTGCTCC	TGGTGA	966			

Figure 3. Comparison of the coding sequences of the four bovine MC1R alleles. The non identical nucleotides are shown in bold and under line. The first stop codon occurring in e allele after deletion (310/311G deletion) is shown in bold and under line.

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลใช้สถิติเชิงพรรณนา และเปรียบเทียบร้อยละ

Table 3. The four alleles of MC1R gene combining three position polymorphic sites for predicted genotype using real time PCR technique

Alleles	Phenotype	Genotype	Position 296	Position 667	Position 748
E ^D (CCT)	black	E ^D /E ^D	CC	CC	TT
E1 (TTT)	brown	E ¹ /E ¹	TT	TT	TT
e (TCC)	red	e/e	TT	CC	CC
E2 (TCT)	brown	E ² /E ²	TT	CC	TT

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดสอบยีน MC1R ด้วยเทคนิค real-time PCR

ผลการทดสอบยีน MC1R ด้วยไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน MC1R ขนาด 954 เบสแพร์ และไพรเมอร์ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ชนิด VIC และ FAM (TaqMan MGB-Probe) ตาม Table 1 เพื่อใช้สำหรับตรวจสอบตำแหน่ง สนิป (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ของยีน MC1R ลำดับที่ 296 667 และ 748 (T296C C667T และ T748C ตามลำดับ) พบว่า ทั้ง 3 ตำแหน่ง สามารถใช้คัดแยกความแตกต่างชนิดอัลลีลของยีน MC1R ได้ 4 อัลลีลได้แก่ อัลลีล E^D e E1 และ E2 มีรูปแบบอัลลีลเป็น CCT TCC TTT และ TCT ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 3 (Graphodatskaya et al., 2000) จากผลการทดสอบยีน MC1R ด้วยเทคนิค real-time PCR บนตำแหน่ง สนิป 3 ตำแหน่งในโคทั้ง 9 สายพันธุ์ จำนวน 90 ตัว พบว่ามีรูปแบบ 2 รูป คือ CCT หรือเรียกว่า อัลลีล E^D และ TCT หรือเรียกว่า อัลลีล E2 ซึ่งในผลการทดสอบที่ตำแหน่ง 667 ไม่พบนิวคลีโอไทด์ชนิด T และที่ตำแหน่ง 748 ไม่พบนิวคลีโอไทด์ชนิด C จึงทำให้ไม่พบอัลลีล E1 และ e ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 4 โดยในกลุ่มโคที่มีลักษณะปรากฏสีขนสีน้ำตาลดำ ที่พบ genotype แบบ E^D/E^D ในโคพันธุ์ แองกัส ทรอปิคอลโฮลสไตน์ และวากิว (จำนวน 10 (1.0) 8(0.8) และ 2(0.2) ตัว(สัดส่วน) ตามลำดับ) พบ genotype E^D/E2 ในโคพันธุ์ เจแปนนิส-แบล็ค วากิว และทรอปิคอลโฮลสไตน์ (จำนวน 5(0.5) 3(0.3) และ 2(0.2) ตัว(สัดส่วน) ตามลำดับ) พบ genotype E2/E2

ในพันธุ์ เจแปนนิส-แบล็ค และ วากิว (จำนวน 5(0.5) และ 5(0.5) ตัว(สัดส่วน)) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโคที่มีลักษณะปรากฏขนสีสีดำ น้ำตาลดำ ยังคงมียีนแฝงขนแดงผสมอยู่หากไม่ได้ตรวจด้วยวิธีทางเทคนิคซีวโมเลกุลก็ไม่สามารถบอกได้มียีนแฝงขนแดง สำหรับในกลุ่มโคที่เหลืองพบ genotype E2/E2 แบบเดียวเท่านั้น ยกเว้นโคพันธุ์บีฟมาสเตอร์ พบ genotype E^D/E2 จำนวน 1(0.1) จะเห็นได้ว่าในกลุ่มโคหลากหลายสีรวมทั้งโคสีขาวส่วนใหญ่พบมียีนแฝงขนแดงซึ่งลักษณะปรากฏเป็นขนสีแดงดำ น้ำตาลแดง แต่ก็ยังมีบางสายพันธุ์ที่ตรวจพบอัลลีลขนสีดำ(E^D)

Table 4. Genotype distribution, genotypic (in bracket) and alleles frequencies at MC1R locus in nine breeds using real time PCR technique

Breed	n	Phenotype	Genotypes (n(prop.))			Alleles (prop.)	
			E ^D /E ^D	E ^D /E2	E2/E2	E ^D	E2
			(CCT/CCT)	(CCT/TCT)	(TCT/TCT)	(CCT)	(TCT)
Tropical Holsteins	10	black&white	8 (0.8)	2 (0.2)	0	0.9	0.1
Angus	10	black	10 (1.0)	0	0	1.0	0
Wugyu	10	dark brown	2 (0.2)	3 (0.3)	5 (0.5)	0.35	0.65
Japanese Black	10	dark brown	0	5 (0.5)	5 (0.5)	0.25	0.75
Blonde d'Aquitaine	10	brown	0	0	10 (1.0)	0	1.0
Red Brahman	10	red	0	0	10 (1.0)	0	1.0
Beef Master	10	red	0	1 (0.1)	9 (0.9)	0.05	0.95
Khaw Lumpoon	10	white	0	0	10 (1.0)	0	1.0
Native	10	red&brown	0	0	10 (1.0)	0	1.0

prop. = proportion n = number

ผลการศึกษาลำดับเบสของยีน MC1R

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน MC1R ความยาว 954 เบสแพร์ ด้วยการออกแบบไพรเมอร์ สำหรับการเพิ่มชิ้นของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (Table 2) และวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยโปรแกรม SeqScape Software Version 3.0 จากตัวอย่างโค 9 สายพันธุ์ จำนวน 90 ตัวเป็นตัวอย่างเดียวกันกับการตรวจด้วยเทคนิค real-time PCR เพื่อยืนยันผลความถูกต้องด้วยการทำวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน MC1R พบว่า จากการวิเคราะห์ยีน MC1R ด้วยเทคนิค real-time PCR ใช้ 3 ตำแหน่งในการคัดแยกชนิดอัลลีลของยีน MC1R (Table 4) ยืนยันผลด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสของทั้ง 3 ตำแหน่งเดียวกันคือ ลำดับที่ 296 667 และ 748 (T296C C667T และ T748C ตามลำดับ) ผลการยืนยันพบว่าให้ผลการตรวจตรงกันคือพบมีรูปแบบ 2 อัลลีล คือ อัลลีล E^D (รูปแบบ CCT) และ อัลลีล E2 (รูปแบบ TCT) ผลการทดสอบทั้ง 2 วิธีให้ผลตรงกันทุกตัวอย่าง คิดเป็น 100 %

เมื่อพิจารณาวิเคราะห์ลำดับเบสดีเอ็นเอของยีน MC1R ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ของยีน MC1R เช่น การขาดหายไป (Deletion) การแทนที่ (substitution) หรือการเกิดการซ้ำ (duplication) เป็นต้น โดยตำแหน่งของความผิดปกติของนิวคลีโอไทด์มีทั้งหมด 7 ตำแหน่ง (T296C G310/311deletion C667T T748C 650duplicationC872T และ C869T ตามลำดับ) ตามที่แสดงใน Figure 3 พบว่า รูปแบบอัลลีลที่ได้จะแตกต่างกัน 6 รูปแบบ คือ E^D E1 e E2 E3 และ e1 โดยทั้ง 6 รูปแบบสามารถแยกความแตกต่างได้ดังนี้ (ดังแสดงใน Table 5)

E^D พบเกิดการแทนที่นิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 296 จาก T เป็น C (T296C) และ 872 จาก C เป็น T (C872T) ซึ่งในการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ จาก T เป็น C (T296C) มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนจากลิวซีนเป็นโปรลีน ซึ่งพบในโคพันธุ์ black Norwegian ตามรายงานของ Klungland et al. (1995) และ Rouzaud et al. (2000) พบในโคพันธุ์ Holstein ตามรายงานของ Graphodatskaya et al. (2000)

E1 พบเกิดการแทนที่นิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 667 จาก C เป็น T (C667T)

E2 พบเกิดการซ้ำของลำดับเบสจำนวน 12 เบสโดยนับจากตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ 650 (duplication 12 bp)

E3 ไม่พบการแทนที่นิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง C667T และ duplication 12 bp

e พบเกิดการขาดหายไปของนิวคลีโอไทด์ G ที่ตำแหน่ง 310 และพบการแทนที่นิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 748 จาก T เป็น C (T748C)

e1 พบเกิดการขาดหายไปของ นิวคลีโอไทด์ G ตำแหน่ง 310 เช่นเดียวกับ e แต่ต่างกันที่ ไม่พบการแทนที่นิวคลีโอไทด์ที่ตำแหน่ง 748 และเป็นอัลลีลที่พบเพิ่มขึ้นใหม่ในการศึกษาครั้งนี้ รูปแบบของ E^D E1 E2 E3 และ e ที่พบในครั้งนี้มีรูปแบบเหมือนกับการศึกษาของ Graphodatskaya et al. (2000)

Table 5 The 6 bovine MC1R alleles found 7 Polymorphic sites on DNA sequencing data at nucleotide position 296, 310, 650, 667, 748, 872 and 896

Allele	nucleotide Position						
	296	310	650 (duplication 12 bp)	667	748	872	869
E ^D	C	-	-	C	T	T	C
E1	T	-	-	T	T	C	C
E2	T	-	dup	C	T	C	C
E3	T	-	-	C	T	C	C
e	T	de	-	C	C	C	T
e1	T	de	-	C	T	C	T

de = presence of the deletion nucleotide G

dup = presence of the duplication nucleotide 12 bp at 650 position

The dashes (-) = show the absence of the deletion and duplication

ผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน MC1R ในโค 9 สายพันธุ์ รูปแบบ genotype ดังนี้ โคพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์พบ genotype รูปแบบ E^D/E^D (8 ตัว/0.8) และ E^D/E3 (2 ตัว/0.2) พันธุ์แองกัสพบ E^D/E^D (10 ตัว/1.0) วากิวพบ E^D/E^D (2 ตัว/0.2) E3/E3 (3 ตัว/0.3) E^D/E3 (3 ตัว/0.3) และ e1/e1 (2 ตัว/0.2) เจแปนีสแบล็คพบ E3/E3 (5 ตัว/0.5) และ E^D/E3 (5 ตัว/0.5) บลอนด์ดาคิตัน พบ e1/e1 (10 ตัว/1.0) บรามันห์แดงพบ E3/E3 (10 ตัว/1.0) ปีพมาสเตอร์พบ E3/E3 (3 ตัว/0.3) E^D/E3 (1 ตัว/0.1) และ e1/e1 (6 ตัว/0.6) ขาวลำพูนพบ E3/E3 (10 ตัว/1.0) และพื้นเมืองพบ E3/E3 (10 ตัว/1.0) ดังแสดงใน Table 6 โดยในกลุ่มโคที่มีลักษณะปรากฏสีขนสีดำ น้ำตาลดำ พบ genotype แบบ E^D/E^D มากกว่า E^D/E3 และ e1/e1 ยกเว้นพันธุ์วากิวและเจแปนีส-แบล็ค ในกลุ่มโคหลากหลายสี และสีขาวที่เหลืองพบ genotype E3/E3 และ e1/e1 ไม่พบ E^D/E^D ยกเว้นโคพันธุ์ปีพมาสเตอร์พบอัลลีล E^D พบเพียง 1 ตัว แสดงให้เห็นว่าโคในกลุ่มนี้จะไม่มีสีขนเป็นสีดำ แนวโน้มไปในทางเดียวกันกับการตรวจด้วยเทคนิค real time PCR

Table 6 Genotype distribution and alleles frequencies of the 7 polymorphic sites and predicted genotype in 9 cattle breeds by DNA sequencing method.

Breed	N	Phenotype	Genotypes				Alleles		
			E ^D /E ^D	E3/E3	E ^D /E3	e1/e1	E ^D	E3	e1
Tropical Holstien	10	black-white	8 (0.8)	0	2 (0.2)	0	0.9	0.1	0
Angus	10	black	10 (1.0)	0	0	0	1.0	0	0
Wugyu	10	dark brown	2 (0.2)	3 (0.3)	3 (0.3)	2 (0.2)	0.35	0.45	0.2
Japanese Black	10	dark brown	0	5 (0.5)	5 (0.5)	0	0.25	0.75	0
Blonde d'Aquitaine	10	brown	0	0	0	10 (1.0)	0	0	1.0
Red Brahman	10	red	0	10 (1.0)	0	0	0	1.0	0
Beef Master	10	red	0	3 (0.3)	1 (0.1)	6 (0.6)	0.05	0.35	0.6
Khaw Lumpoon	10	white	0	10 (1.0)	0	0	0	1.0	0
Native	10	red&brown	0	10 (1.0)	0	0	0	1.0	0

ผลการวิเคราะห์รูปแบบของอัลลีลของยีน MC1R พบ อัลลีล E^D และ E3 มีรูปแบบเหมือนกับการศึกษาของ Graphodatskaya et al. (2000) พบอัลลีล E^D E1 E2 e และ E3 ในโค 5 สายพันธุ์ ได้แก่ บราวน์สวิส แบล็คโฮลสไตน์ ลูกผสมแบล็คโฮลสไตน์-ซีเมนทอล ซีเมนทอล และเรดโฮลสไตน์ สำหรับอัลลีล e1 เป็นรูปแบบใหม่ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ที่พบในโคพันธุ์ปีพาสเตอร์ บลอนด์ดาคิตแตน และวากิว ซึ่งต่างจากการศึกษาที่ผ่านมา จากการศึกษาของ Han et al. (2011) รูปแบบของสีขนกับลักษณะการแสดงออกทาง genotype ของยีน MC1R ในโค 7 สายพันธุ์ได้แก่ แบล็คโฮลสไตน์ เรดโฮลสไตน์ แองกัส เฮียร์ฟอร์ด เจอูแบล็ค ฮานวู้ด และลูกผสมฮานวู้ด-เจอูแบล็ค ด้วยเทคนิค PCR-RFLP ที่ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 2 ตำแหน่งได้แก่ ลำดับที่ 296 และ 310 ผลการศึกษาพบมี 3 อัลลีลในการควบคุมการแสดงออกของสีขนได้แก่ E^D สำหรับขนสีดำ E⁺ สำหรับสีขนหลากหลายสี และ e สำหรับขนสีแดง/สีน้ำตาลอมเหลือง มีความคล้ายคลึงกับการศึกษาในครั้งนี้ด้วยเทคนิค real time PCR ใช้ ตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ 3 ตำแหน่ง (ลำดับที่ 296 667 และ 748) โดยอัลลีล E1 และ E2 เป็นอัลลีลที่แบ่งแยกออกมาจากอัลลีล E⁺ เป็นเพราะมีการเพิ่มตำแหน่งนิวคลีโอไทด์ที่ใช้ในการศึกษาทำให้เกิดความแตกต่างเพิ่มมากขึ้น ซึ่งจะเห็นความแตกต่างได้อย่างชัดเจนมากยิ่งขึ้นจากการใช้เทคนิคศึกษา ลำดับเบสของยีน MC1R มาทำการวิเคราะห์พบจำนวนอัลลีลมากที่สุด (Table 5)

การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์รูปแบบของยีน MC1R

ผลการเปรียบเทียบวิธีการวิเคราะห์รูปแบบของยีน MC1R ด้วยเทคนิค real time PCR และเทคนิค PCR sequencing หาลำดับเบสของสายดีเอ็นเอ โดยพบว่า เทคนิค real time PCR ให้ผลการตรวจ

วิเคราะห์รูปแบบของยีน MC1R ได้ 4 รูปแบบคือ E^D $E1$ $E2$ และ e โดยใช้ตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนไปของนิวคลีโอไทด์ 3 ตำแหน่ง (T296C C667T และ T748C ตามลำดับ) ดังแสดงใน Table 3 ส่วนเทคนิค PCR sequencing ให้ผลการตรวจวิเคราะห์รูปแบบของยีน MC1R ได้ 6 รูปแบบคือ E^D $E1$ $E2$ $E3$ e และ $e1$ โดยใช้ตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนไปของนิวคลีโอไทด์ 7 ตำแหน่ง (T296C G310/311deletion C667T T748C 650duplication C872T และ C869T ตามลำดับ) ดังแสดงใน Table 5 ซึ่งผลการวิเคราะห์ให้ผลความถูกต้องเหมือนกันทั้ง 2 วิธีทุกตัวอย่างทดสอบคิดเป็น 100 % โดยเฉพาะอัลลีล E^D ซึ่งเป็นอัลลีลที่ควบคุมการแสดงออกของขนสีดำ พบว่าในโคพันธุ์ Angus Wugyu และ Tropical Holsteins ให้ผลตรงกันทั้ง 2 วิธี (10 (1.0) 2 (0.2) และ 8 (0.8) ตามลำดับ) ซึ่งสามารถตรวจแยกออกจากอัลลีลที่ควบคุมการแสดงออกของขนสีแดงที่รูปแบบอัลลีลแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับจำนวนตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนไปของนิวคลีโอไทด์ที่นำมาใช้ทดสอบ ดังนั้นในการตรวจยีน MC1R เพื่อคัดแยกสีขนดำและสีขนแดงในโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์สามารถใช้เทคนิค real time PCR ในการตรวจวิเคราะห์ซึ่งให้ผลได้อย่างถูกต้องแม่นยำ อีกทั้งยังใช้เวลาในการตรวจสอบได้อย่างรวดเร็วและยังลดค่าใช้จ่ายในการตรวจวิเคราะห์ ในส่วนการตรวจด้วยเทคนิคหาลำดับเบสใช้สำหรับการตรวจยืนยันผลกรณีตรวจพบว่ามียีนแฝงสีแดง

ผลการตรวจยีน MC1R โคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าผลการทดสอบยีน MC1R ด้วยเทคนิค real time PCR ในโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ จำนวน 384 ตัว พบ genotype เป็นรูปแบบ E^D/E^D จำนวน 286 ตัว (74.48 %) $E^D/E2$ จำนวน 91 ตัว (23.70 %) และ $E2/E2$ จำนวน 7 ตัว (1.82%) ดังแสดงใน Table 7 จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์มีรูปแบบ genotype แบบ E^D/E^D เป็นลักษณะ homozygous ของอัลลีล E^D ซึ่งเป็นลักษณะเด่นที่แสดงออกเป็นขนสีดำมากที่สุด พบมีรูปแบบ genotype แบบ $E^D/E2$ เป็นลักษณะ heterozygous เป็นลักษณะผสมของ อัลลีล E^D และ $E2$ สีขนที่แสดงออกเป็นสี ดำปนน้ำตาล ส่วนรูปแบบ genotype $E2/E2$ เป็นลักษณะ homozygous ของอัลลีล $E2$ ซึ่งเป็นลักษณะพันธุ์ทาง (wild type allele, E^+) สีขนที่แสดงออกเป็นสีน้ำตาลดำหรือน้ำตาลเข้ม แต่ไม่พบรูปแบบ genotype e/e ซึ่งเป็นลักษณะ homozygous ของอัลลีล e ซึ่งเป็นลักษณะด้อยที่แสดงออกเป็นขนสีแดง/น้ำตาลอมเหลือง ในฝูงประชากรทรอปิคอลโฮลสไตน์ที่ทดสอบนี้เลย ในการศึกษาแบบสีขนของยีน MC1R ในโคนมพันธุ์แบล็คโฮลสไตน์ในประเทศเกาหลี ของ Han et al. (2011) พบว่ามีรูปแบบ genotype E^D/E^D 93.5 % E^D/E^+ 4.3% และ E^D/e 2.2% ซึ่งยังคงมียีนแฝงสีแดงอยู่เช่นกัน การที่ยังพบอัลลีล $E2$ ในโคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์อาจเป็นเพราะ โคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์เป็นโคนมที่ได้มีการพัฒนาปรับปรุงให้มีพันธุกรรมดีมีความสามารถในการเจริญเติบโตในสภาวะอากาศร้อนชื้น มีความต้านทานโรค ให้ผลผลิตคุณภาพดี โดยใช้โคนมโฮลสไตน์ฟรีเซียนพันธุ์ขาว-ดำเป็นพันธุ์หลักในการปรับปรุงสายพันธุ์ผสมกับโคพื้นเมืองซึ่งใช้เป็นโคพื้นฐานนำมาปรับปรุงให้มีระดับสายเลือดโฮลสไตน์ฟรีเซียนสูงขึ้นแต่ไม่เกิน 93.75 % ซึ่งลักษณะสีขนที่ต้องการของโคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์ให้ปรากฏเป็นสีขาว-ดำ แต่ด้วยพื้นฐานมีการปรับปรุงจากโคที่เป็นสายเลือดพันธุ์โคพื้นเมืองที่มี

ลักษณะสีขนแดง (มีรูปแบบ genotype เป็น E2/E2) ที่ถูกถ่ายทอดต่อกันมา เป็นยีนแฝงที่สามารถพบได้ในโคพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีการตรวจสอบและคัดทิ้งยีนขนแดงในโคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์เพื่อเป็นโคพันธุ์ขาว-ดำอย่างแท้จริง และสามารถนำไปใช้เป็นข้อกำหนดในการประกอบการรับรองสายพันธุ์โคทรอปิคอลโฮลสไตน์ จะต้องผ่านการตรวจคัดกรองยีนแฝงขนแดง MC1R

Table 7 Genotype patterns of MC1R gene in Tropical Holstein using real time PCR with three different variants position

Breed	nucleotide Position			Genotype	Phenotype	animals (%) (n=384)
	296	667	748			
Tropical Holstein	CC	CC	TT	E ^D /E ^D	Black&white	286 (74.48%)
	TC	CC	TT	E2/E ^D	Black&white	91 (23.70%)
	TT	CC	TT	E2/E2	Black&white	7 (1.82%)

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองในครั้งนี้พบว่า รูปแบบของยีน melanocortin-1 receptor (MC1R) ต่อการแสดงออกของสีขนในโคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์ สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ด้วยเทคนิค real time PCR โดยมีรูปแบบได้ 4 อัลลีล คือ E^D E1 E2 และ e ซึ่งเป็นอัลลีลที่อยู่บนตำแหน่ง Extension (E) locus ของยีน MC1R โดย E^D เป็นลักษณะเด่น (dominant type) สีขนเป็นสีดำ E1 และ E2 เป็นลักษณะย่อยของ อัลลีล E⁺ สำหรับลักษณะพันธุ์ทาง (wild type) สีขนเป็นสีน้ำตาลดำ หรือน้ำตาลเข้ม ส่วน e เป็นลักษณะด้อย (recessive type) สีขนเป็นสีแดงหรือน้ำตาลอมเหลือง ซึ่งในการทดลองนี้พบเพียง 2 อัลลีลคือ E^D และ E2 วิธีการตรวจนี้สามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกหรือคัดกรองยีนแฝงขนสีแดงออกจากฝูงเพื่อคัดเลือกเฉพาะโคนมที่มียีนขนสีดำเท่านั้นให้ผลการตรวจสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความถูกต้องแม่นยำ มีความน่าเชื่อถือและเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว และสามารถยืนยันผลการตรวจวิเคราะห์ด้วยเทคนิคหาลำดับเบสสำหรับตัวที่พบยีนแฝงขนแดงเหมาะสำหรับใช้เป็นระบบการตรวจสอบพ่อ-แม่พันธุ์โคนมทุกตัวในโปรแกรมการปรับปรุงสายพันธุ์โคนมเพื่อคัดกรองและคัดทิ้งยีน MC1R ออกจากฝูงประชากรโคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี ราชบุรี ขอนแก่น และเชียงใหม่ ที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเลือด เกษตรกรโคนมในจังหวัดสระบุรี ราชบุรี ขอนแก่น และเชียงใหม่ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่าง รวมทั้งเจ้าหน้าที่กลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีและความหลากหลายทางชีวภาพปศุสัตว์ทุกท่าน ที่ช่วยเหลือด้านการเตรียมอุปกรณ์ สารเคมีและตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2554. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตร.

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์. 2563. สมุดพ้อพันธุ์โคนม 2564.

Bultman, S.J., E.J. Michaud and R. P. Woychik. 1992. Molecular charaterisation of mouse agouti locus. Cell. 71:1195-1204.

Cone, R. D., D. Lu, S. Koppula, D. I. Vlge, H. Klungland, B. Boston, W. Chen, D. N. Orth, C. Pouton and R. A Kesterson. 1996. The melanocortin receptors: Agonist Antagonists, and the hormonal control of pigmentation. Recent Prog. Horm. Res. 51:287-318.

Graphodatskaya, D., H. Joerg and G. Stranzinger. 2000. Polymorphism in the MSHR gene of different cattle breeds. VET. MED. CZECH. 45,(10-11): 290-295.

Han, S. H., I. C. Cho, J. H. Kim, M. S. Ko, Y. H. Kim, E. Y. Kim, S. P. Park and S. S. Lee. 2011. Coat Color Patterns and Genotypes of Extension and Agouti in Hanwoo and Jeju Black Cattle. J. Life Sci. 21:494-501.

Jackson, I. J. 1997. Homologous pigmentation mutations in human, mouse and other model organisms. Hum. Mol. Genet. 6:1613-1624.

Joerg, H., H. R. Fries, E. Meijerink and GF. Stranzinger. 1996. Red coat color in Holstein cattle is associated with a deletion in the MSHR gene. Mammalian Genome. 7:317-318.

Klungland, H., D. I. Våge, L. Gomez-Raya, S. Adalsteinsson and S. Lien. 1995. The role of melanocyte-stimulating hormone (MSH) receptor in bovine coat color determination. Mammalian Genome. 6:636-639.

Klungland, H., H. G. Olsen, M. S. Hassanane, K. Marhrous and D. I. Våge. 2000. Coat colour gene in diversity studies. J. Anim. Breed. Genet. 116:1-9.

Robbins, L. S., J. H. Nadeau, K. R. Johnson, M. A. Kelly, L. Roselli-Rehfuss, E. Baack, K. G. Mountjoy and R.D. Cone. 1993. Pigmentation phenotypes of variant extension locus alleles results from point mutations that alter MSH receptor function. Cell. 72:827-834.

Rouzaud, F., J. Martin, P. F. Gallet, D. Delourme, V. Goulemot-Leger, Y. Amigues, F. Ménissier, H. Levéziel, R. Julien and A. Oulmouden. 2000. A first genotyping assay of French cattle

breeds based on a new allele of the extension gene encoding the melanocortin-1 receptor (MC1R). *Genetics Selection Evolution*. 32:511–520.

Searle A.G. (1963). *Comparative Genetics of coat colour in mammals*. London, Logos Press.

Seo, K.S., T.R. Mohanty, T. Choi and I.H. Hwang. 2007. Biology of epidermal and hair pigmentation in cattle: a mini-review. *Veterinary Dermatology*. 18:392–400.

Werth, L.A., G.A. Hawkins, A. Eggen, E. Petit, C. Elduque, B. Kreigesmann and M.D. Bishop. 1996. Rapid communication: melanocyte stimulating hormone receptor (MC1R) maps to bovine chromosome 18. *Journal of Animal Science*. 74:262.

การตรวจยีนด้อยก่อโรค Complex Vertebral Malformation (CVM)

ในโคทรอปิคอลโฮลสไตน์ด้วยเทคนิค real-time PCR

ณัฐนันท์ ศิริรัตนัญญะกุล^{1/} ณชัย ศรารักษ์^{1/} บุนหา จินดาวานิชสกุล^{1/}

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหายีนด้อยก่อโรค Complex Vertebral Malformation (CVM) ในโคทรอปิคอลโฮลสไตน์ด้วยเทคนิค real-time PCR สำหรับใช้ในการตรวจคัดกรอง และคัดทิ้งยีนด้อยก่อโรค CVM ออกจากฝูงประชากรโคนมในประเทศไทย ทำการศึกษาโดยการเก็บตัวอย่างเลือดโคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์ของเกษตรกรในเขตท้องที่จังหวัดสระบุรี ลพบุรีและราชบุรี แบ่งโคนมเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นโคนมที่มีพันธุ์ประวัติ (Pedigree) ที่เกิดจากสายเลือดของพ่อพันธุ์โคนม Carlin-M Ivanhoe Bell หรือ Pennstate Ivanhoe Star หรือ Osborndale Ivanhoe Star กลุ่มที่ 2 เป็นโคนมที่มีพันธุ์ประวัติที่ไม่ได้เกิดจากสายเลือดของพ่อพันธุ์โคนมตามที่กล่าวข้างต้น โดยสืบค้นในข้อมูลพันธุ์ประวัติจากระบบฐานข้อมูลโคนมสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ จำนวน 160 ตัวและ 253 ตัว ตามลำดับ สกัดดีเอ็นเอและตรวจยีนด้อยก่อโรค CVM ด้วยไพรเมอร์และโพรบติดสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ที่มีความจำเพาะต่อยีน SLC35A3 ด้วยเทคนิค real time PCR และยืนยันผลตรวจด้วยวิธีการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน SLC35A3 ผลการศึกษาพบว่า ตรวจพบยีนด้อยก่อโรค CVM ในโคนมกลุ่มที่ 1 มากกว่ากลุ่มที่ 2 (22.5% (36/160), 4.35% (11/253) ตามลำดับ ยืนยันความถูกต้องด้วยวิธีการตรวจวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน SLC35A3 ที่ตำแหน่ง G559T ของทุกตัวที่มียีนด้อยก่อโรค CVM (47 ตัว) และตัวอย่าง 366 ตัว ที่ไม่มียีนด้อยก่อโรค CVM ผลการเปรียบเทียบทั้ง 2 วิธีให้ผลสอดคล้องตรงกัน โดยมีค่าความถูกต้อง (accuracy) 100 % แต่วิธีการตรวจด้วย real-time PCR ใช้ระยะเวลาตรวจเพียง 30 นาที ซึ่งน้อยกว่าวิธีเดิมที่ใช้ PCR-SSCP และ PCR-PIRA ที่ต้องใช้เวลานาน 230 และ 1,030 นาทีตามลำดับ สรุปว่าการตรวจยีนด้อยก่อโรค CVM ในโคทรอปิคอลโฮลสไตน์ด้วยเทคนิค real-time PCR สามารถนำมาใช้เป็นวิธีในการตรวจสอบยีนด้อยก่อโรค CVM เพราะมีความจำเพาะต่อยีน SLC35A3 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความไว มีความถูกต้องแม่นยำ มีความน่าเชื่อถือและเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว โดยสามารถตรวจคัดกรองและคัดทิ้งยีนด้อยก่อโรค CVM ออกจากฝูงโคนมได้ 47 ตัวจากโคนมกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 413 ตัว คิดเป็นร้อยละ 11.38

คำสำคัญ : โคทรอปิคอลโฮลสไตน์ ซีวีเอ็ม เทคนิคเรียลไทม์ พีซีอาร์ ยีนด้อย

เลขทะเบียนวิจัย : 57(1)-0108-012

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

Detection of recessive gene causing Complex Vertebral Malformation (CVM) in Tropical Holstein cattle using real-time PCR.

Nattanan Sirirattanatanyakul^{1/} Nachai Sarataphan^{1/}, Buh-nga Chindawanichsakul^{1/}

Abstract

The purpose of this study was to develop a simple, rapid, sensitivity and reliable assay for Detection of recessive gene causing Complex Vertebral Malformation (CVM) in Tropical Holstein cattle using real-time PCR for implementing a routine testing to gradually eradicate the carried lethal gene from the Thai-Tropical Holstein population. Blood sample were collected from farms in Saraburi, Lopburi and Ratchaburi province were divided into 2 groups using the pedigree databases of dairy cow system of Bureau of Biotechnology in Livestock Production. Group 1, 160 dairy cows with pedigree traced back to the common ancestor, the elite sire Pennstate Ivanhoe Star or Carlin-M Ivanhoe Bell or Osborndale Ivanhoe Star and group 2, 253 dairy cows were have another pedigree in group 1. DNA was extracted from blood sample and analysed in real-time PCR utilizing two different sets of primers and fluorogenic probe primers are specific SLC35A3 gene and confirm the results by direct DNA sequencing. The results showed that Group 1 found recessive gene causing CVM more than group 2 (22.5% (36/160), 4.35% (11/253)) respectively. Confirm the position base of SLC35A3 gene (G559T) 47 sample found recessive gene and 366 sample not found recessive gene. The results showed no discrepancies between the two assay strategies and 100 % accuracy. Real-time PCR use 30 min. for analyze less than PCR-SSCP and PCR-PIRA 230 and 1,030 min. respectively. In conclusion, detection of recessive gene causing Complex Vertebral Malformation (CVM) in Tropical Holstein cattle using real-time PCR is simple, rapid, sensitivity, reliable and efficiently for identify/screening SLC35A3 gene and showed that 47 positive recessive gene from 413 samples of totals Tropical Holstein cattle (11.38 %).

Keywords: Tropical Holstein cattle, CVM, real-time PCR technique, recessive gene

Registered No.: 57(1)-0108-012

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

คำนำ

ปัญหาการตายของลูกโคในท้องหรือเกิดการแท้งลูก ส่วนใหญ่จะตรวจสอบสาเหตุการตายไปในแนวทางการติดเชื้อโรคที่ทำให้เกิดความเจ็บป่วยอันมีผลต่อความไม่สมบูรณ์ของแม่โค หรือการเกิดอุบัติเหตุที่อาจกระทบต่อลูกในท้อง โดยไม่ได้คำนึงถึง หรือไม่ทราบว่ามีสาเหตุความผิดปกติทางพันธุกรรม หรือโรคทางพันธุกรรมบางอย่างที่ส่งผลให้มีลักษณะความผิดปกติอันเป็นเหตุให้ลูกโคตายได้ ทำให้ยังคงพบปัญหาการแท้งลูกโคเกิดขึ้นอยู่อย่างต่อเนื่อง ถึงแม้ว่าจะมีการเฝ้าระวังการกระทบกระเทือนและการติดเชื้อเป็นอย่างดี

โรค Complex Vertebral Malformation (CVM) เป็นโรคที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมควบคุมโดยยีนด้อยบนอโตโซม (Revell, 2001) ความผิดปกติที่เกิดขึ้นเป็นการถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์จากพ่อแม่สู่ลูกโดยตรง ซึ่งจะมีอาการ ผิดปกติของรูปร่าง และโครงสร้างของกระดูกสันหลัง คอและขาสั้น มีการโค้งงอ (Chu et al., 2008) เป็นสาเหตุให้เกิดการตายของลูกโค เนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของยีน SLC35A3 ที่ตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ลำดับที่ 559 โดยเปลี่ยนจาก Guanine (G) เป็น Thymine (T) (Thomsen et al., 2006) จากรายงานของ Agerholm et al. (2001) พบว่าโรค CVM ก่อให้เกิดการแท้งลูกในระยะ 159 วันของการตั้งท้อง เกิดลูกตายในท้องเป็นลักษณะของ Homozygous Recessive สำหรับลูกโคที่เป็นโรคแต่ไม่มีอาการ มีสุขภาพปกติ เป็นลักษณะของ Heterozygous Recessive ซึ่งเรียกว่าเป็นพาหะของโรค CVM (Betka et al., 2008) รายงานการศึกษาย้อนหลังพบว่าพ่อพันธุ์ชื่อ Pennstate Ivanhoe Star มีลูกที่เป็นพ่อพันธุ์เช่นกันชื่อ Carlin-M Ivanhoe Bell ซึ่งภายหลังได้มีการตรวจพบว่าเป็นพาหะของโรค CVM โดยได้รับการถ่ายทอดยีนก่อโรค CVM มาจากโคพ่อ (Konersmann et al., 2003) ได้มีการใช้น้ำเชื้อพันธุ์โฮลสไตน์จากแหล่งดังกล่าวผสมเทียมให้กับแม่โคอย่างกว้างขวาง ทำให้เกิดมีการแพร่กระจายของโรคสูงขึ้น มีรายงานที่พบในประเทศสหรัฐอเมริกา (Duncn et al., 2001) สหราชอาณาจักร (Revell., 2001) เนเธอร์แลนด์ (Wouda et al., 2000) สาธารณเชค (Citek et al., 2006) และญี่ปุ่น (Nagahata et al., 2002) จากการตรวจสอบข้อมูลการใช้น้ำเชื้อจากระบบฐานข้อมูลโคนมสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ พบโคนมที่มีพันธุ์ประวัติ (Pedigree) ที่เกิดจากสายเลือดของพ่อพันธุ์โคนม Carlin-M Ivanhoe Bell หรือ Pennstate Ivanhoe Star หรือ Osborndale Ivanhoe Star ด้วยเช่นกัน

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบหาสาเหตุความผิดปกติของโรค CVM จำเป็นต้องใช้ความรู้ทางเทคโนโลยีชีวภาพ โดยเทคนิคที่ใช้ในการตรวจตำแหน่งของยีน SLC35A3 ซึ่งมีด้วยกันหลายวิธี อาทิเช่น

1. วิธี PCR-SSCP (Polymerase chain reaction – single-stranded conformational polymorphism) เป็นวิธีการตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของ ดีเอ็นเอเพียง 1 เบสในสายของดีเอ็นเอสั้น ๆ ซึ่ง Chu et al. ในปี 2008 ได้ใช้เทคนิค PCR-SSCP ในการตรวจยีนด้อยของโรค CVM ในโคนมพันธุ์ Chinese Holstein พบความแตกต่างของยีนได้ 2 แบบคือ AA (ปกติ) และ AB (พาหะ)

2. วิธี PCR-PIRA (Polymerase chain reaction-primer introduced restriction analysis) Logar et al. (2008) ได้นำมาใช้ในการตรวจจำแนกความแตกต่างในระดับเบสของสายดีเอ็นเอของยีน SLC35A3 ในพ่อโคนมโฮลสไตน์ โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ พบว่าโคตัวที่ปกติจะมีชิ้นของดีเอ็นเอ 1 ชิ้น เพราะไม่ถูกตัดด้วยเอนไซม์ แต่โคตัวที่เป็นพาหะของโรค CVM จะมีชิ้นของดีเอ็นเอ 2 ชิ้นเพราะถูกตัดด้วยเอนไซม์

ซึ่งทั้ง 2 วิธีที่กล่าวมานี้ มีข้อจำกัดในส่วนของระยะเวลาและขั้นตอนในการดำเนินงาน กล่าวคือ ใช้เวลานานประมาณ 4 – 17 ชั่วโมง และมีหลายขั้นตอนในการตรวจ ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการปนเปื้อนของตัวอย่างและความผิดพลาดระหว่างขั้นตอนได้มาก ดังนั้นจึงนำเทคนิค real-time PCR มาทำการศึกษาตรวจหายีน SLC35A3 ซึ่งเป็นยีนด้อยที่ก่อโรค Complex Vertebral Malformation (CVM) ในโคทรอปิคอลโฮลสไตน์ โดยอาศัยหลักการความจำเพาะของไพรเมอร์ต่อลำดับเบสที่เกิดการเปลี่ยนแปลง ดัดสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ (primer probe) ที่ได้รับการออกแบบจำเพาะเพื่อค้นหาตำแหน่งที่เกิดการเปลี่ยนลำดับเบสที่ต้องการตรวจ สามารถจับตำแหน่งของนิวคลีโอไทด์ที่เปลี่ยนไปได้อย่างถูกต้อง ทำให้สามารถตรวจสอบยีน SLC35A3 ได้ โดยคาดหวังว่าจะส่งผลให้มีถูกต้องแม่นยำและรวดเร็ว ลดขั้นตอนการปฏิบัติงาน เพื่อนำไปใช้ในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์โคในโครงการปรับปรุงพ่อพันธุ์โคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์และให้บริการตรวจหายีนด้อยก่อโรค CVM กับเครือข่ายเกษตรกรที่ร่วมโครงการเป็นการคัดออกยีนด้อยก่อโรค CVM ให้หมดไปจากอุตสาหกรรมเลี้ยงโคนมในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

โคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์ของเกษตรกรในเขตท้องที่จังหวัดสระบุรี ลพบุรีและราชบุรี เป็นโค ที่มีพันธุ์ประวัติ (Pedigree) ที่เกิดจากสายเลือดของพ่อพันธุ์โคนม Carlin-M Ivanhoe Bell หรือ Pennstate Ivanhoe Star หรือ Osborndale Ivanhoe Star โดยสืบค้นในข้อมูลพันธุ์ประวัติจากระบบฐานข้อมูลโคนม สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ จำนวน 160 ตัวและโคที่พันธุ์ประวัติที่ไม่ได้เกิดจากสายเลือดของพ่อพันธุ์ตามที่กล่าวข้างต้นจำนวน 253 ตัว เก็บตัวอย่างเลือดเพื่อตรวจหายีนด้อยก่อโรค Complex Vertebral Malformation (CVM) จากเส้นเลือดดำที่บริเวณโคนหางจำนวน 6 ซี่ซี่ ในหลอดเก็บเลือดที่มีสารกันเลือดแข็ง (EDTA) เพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 – 8 องศาเซลเซียส ซึ่งดำเนินการตั้งแต่เดือนตุลาคม 2556 ถึงกันยายน 2558 ทดสอบและวิเคราะห์ผลที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีและความหลากหลายทางชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ จังหวัดปทุมธานี

วิธีการทดลอง

นำตัวอย่างเลือดมาสกัดดีเอ็นเอตามขั้นตอนการสกัดที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำ ด้วยชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป QIAmp-Blood DNA Extraction Kit (QIAGEN®, Germany) ตัวอย่างทั้งหมดถูกเก็บไว้ในสารละลาย TE buffer และทำการวัดปริมาณและความบริสุทธิ์ของ DNA ให้มีค่า OD ที่ 260/280 ระหว่าง 1.8-2.0 ด้วย Microvolume Spectrophotometer (Nanodrop, DeNovix, USA) โดยนำตัวอย่าง DNA ที่ได้มาทำเจือจางให้มีความเข้มข้นที่ 10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และดีเอ็นเอควบคุมผลบวก (positive control DNA) ที่ให้ผลพบยีนแฝงก่อโรค CVM (ได้มาจาก Queensland University, AUS) เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์ดังนี้

1) การตรวจหายีน SLC35A3 ด้วยเทคนิค real-time PCR

ใช้ไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อยีน SLC35A3 และ โพรบที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสงฟลูออเรสเซนต์ ชนิด VIC และ FAM (TaqMan MGB-Probe) ตาม Table 1 เพื่อใช้สำหรับตรวจสอบตำแหน่ง สนิป (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) ที่เกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์ของยีน SLC35A3 ลำดับที่ 559 โดยเปลี่ยนจาก G เป็น T (GenBank accession number: HM183013) (Meydan et al., 2010) ด้วย โปรแกรม Primer 5 software

Table 1 Real-time PCR specific primers and probes (Assay mixed) for SLC35A3 gene underline and italic letter represented SNPs

Specific gene	Primer/probe Sequences (5' → 3')	Product size (bp)
SLC35A3	F -AGCTGGCTCACAATTTGTAGGT-	79
	R -CTCAAAGTAAACCCCAGCAAAGC-	
	Probe VIC -TCATGGCA <u>G</u> TTCTCA-NFQ	
	Probe FAM -TCATGGCA <u>T</u> TTCTCA-NFQ	

การตรวจหายีน SLC35A3 ด้วยเครื่อง Step-One Plus Real-Time PCR (Applied Biosystem, USA) โดยใช้ไพรเมอร์และโพรบ ที่มีความจำเพาะต่อยีน SLC35A3 (Table 1) ด้วยเทคนิค real-time PCR มีองค์ประกอบของปฏิกิริยาดังนี้ ปริมาณปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 20X Assay mixed (Applied Biosystem, USA) 0.25 ไมโครลิตร 2X EXPRESS qPCR SuperMix (invitrogen, USA) 2.5 ไมโครลิตร 500 ROX™ (Thermo Fisher, UK) 0.1 ไมโครลิตร น้ำกลั่น 6.15 ไมโครลิตร และ DNA template 1 ไมโครลิตร โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ Pre-incubation 50 องศาเซลเซียส 2 นาที incubation 95 องศาเซลเซียส 20 วินาที ตามด้วย Amplification 95 องศาเซลเซียส 10 วินาที และ 60 องศาเซลเซียส 20 วินาที จำนวน 50 รอบ ตรวจวัดสัญญาณแสงฟลูออเรสเซนต์ด้วย SDS Software ของเครื่อง StepOne Plus

การแปลผลโดยการตรวจเช็คการเพิ่มขึ้นของ PCR Product โดยการตรวจวัด fluorescence ด้วยโปรแกรมในเครื่อง Real-Time Thermal cycle การแปลผลมีเกณฑ์ดังนี้ PCR Product ที่เกิดขึ้นจาก primers ที่มีความจำเพาะต่อ SLC35A3 gene โดยนิวคลีโอไทด์ของยีน SLC35A3 ลำดับที่ 559 เป็นอัลลิล Thymine (T) ติดด้วย probe FAM (เส้นกราฟสีน้ำเงิน) แต่ถ้าเป็นอัลลิล Guanine (G) ติดด้วย probe VIC (เส้นกราฟ สีเขียว) ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างที่ปกติจะพบอัลลิล G (เส้นสีเขียว) เพียงเส้นเดียว และตัวอย่างที่มี

ยีนด้อยก่อโรค CVM จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์พบบอัลลีล G/T (เส้นสีเขียวและสีน้ำเงิน) เกิด point mutation ที่ตำแหน่งลำดับเบสที่ 559 (Figure 1)

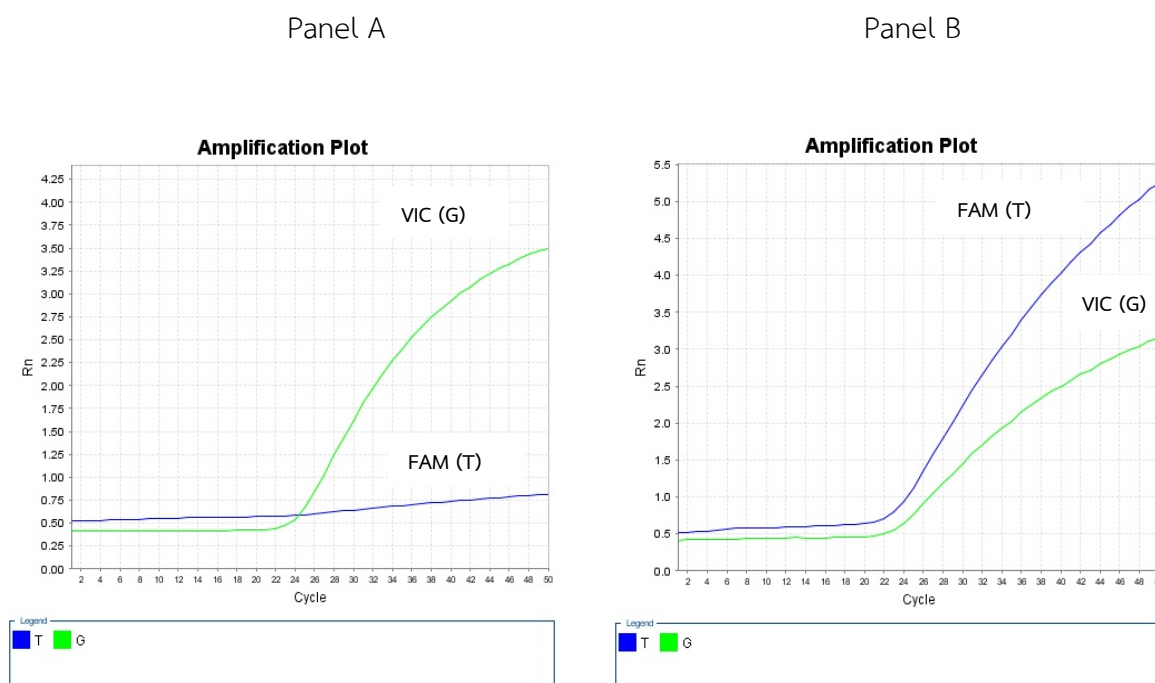


Figure 1 real-time PCR amplification plot of (panel A) the normal cattle and (panel B) the carrier of CVM gene cattle, FAM-labeled (T) probe is complementary to mutant allele and VIC-labeled (G) probe is complementary to wild type allele.

2) การตรวจยืนยันผลด้วยวิธีวิเคราะห์ลำดับเบส (sequencings analysis) ของยีน SLC35A3

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้จากตัวอย่างเลือดของโค ปริมาณตัวอย่างละ 4 ไมโครลิตร (10 นาโนกรัม/ไมโครลิตร) มาเพิ่มขยายชิ้นส่วน DNA ของยีน SLC35A3 ด้วยเทคนิค PCR ดังนี้ 10x PCR buffer 1 ไมโครลิตร primer CVM-F และ CVM-R (Forward และ Reverse primers) (Table 2) อย่างละ 0.2 ไมโครลิตร (5 ไมโครโมล) Platinum Taq DNA polymerase 0.2 ไมโครลิตร (5 ยูนิต) dNTPs 1 ไมโครลิตร (2 มิลลิโมล) MgCl₂ 0.6 ไมโครลิตร (50 มิลลิโมล) distilled water 2.8 ไมโครลิตร ปริมาตรรวม 10 ไมโครลิตร และ โดยตั้งโปรแกรม (PCR condition) ดังนี้ pre-denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ตามด้วย denaturation 94 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที annealing 55 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาทีและ extension 72 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที จำนวน 35 รอบ และตามด้วย 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที (Table 2) นำผลผลิตจากปฏิกิริยา PCR (PCR product) มาคัดแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ต้องการด้วยวิธี purification โดยใช้ NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey-Nagel, Germany) จากนั้นย้อมสีด้วย GelRed Loading Buffer (Biotium, USA) แยกขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอใน 5% (w/v) Nusieve agarose gel electrophoresis ที่ 100 V นาน 1.5

ชั่วโมงตรวจขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (281 bp) ด้วยเครื่อง Gel-Doc system (Alpha image 3400, USA) นำ PCR product ที่ได้มาวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยชุด BigDye® Terminator v3.1 cycle sequencing Kit (ABI, USA) โดยใช้เครื่อง ABI 3500 DNA Analysis Sequencer (ABI, USA) ด้วยโปรแกรม 3500 Data Collection และวิเคราะห์หาลำดับเบสของดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม SeqScape Software Version 3.0 (Figure 2)

Table 2 Specific primers, PCR condition and PCR product used for identification of complex vertebral malformation (CVM)

Genetic disorder	Primer Sequences (5' 3') →	PCR condition	Time	Number of cycles	PCR product
CVM	F: CAGATTCTCAAGAGCTTAATTCTA	94 °C	5 min	1	281 bp
	R: TATTTGCAACAACAAGCAGTT	94 °C	45 sec	35	
		55 °C	45 sec	35	
		72 °C	60 sec	35	
		72 °C	10 min	1	

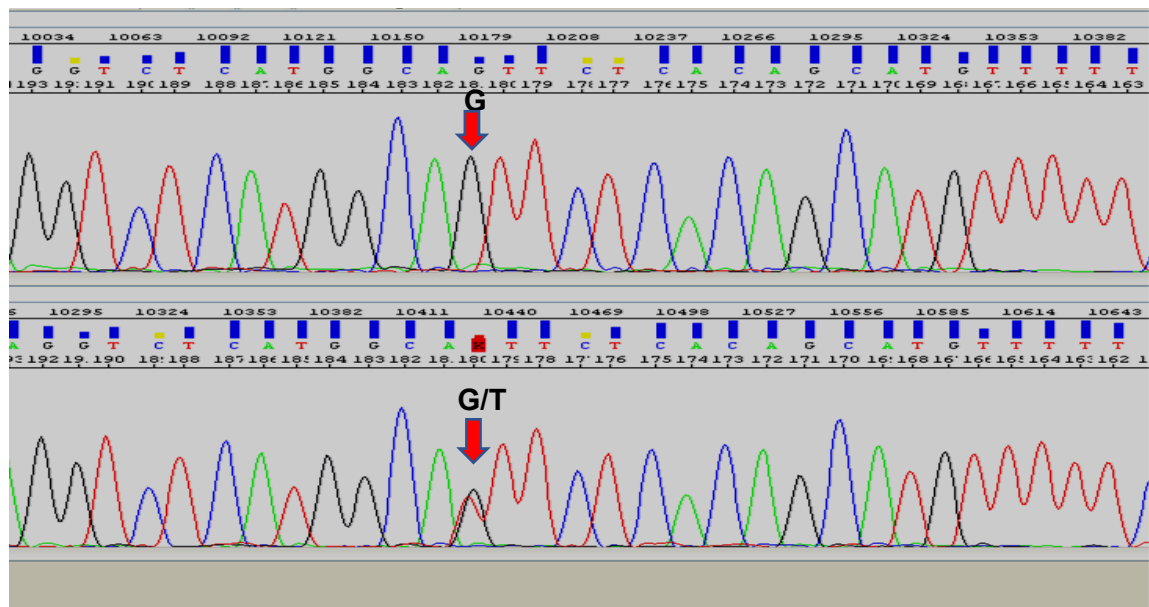


Figure 2 Electropherograms showing the nucleotide sequences across the G→T mutation (indicated by an arrow) in normal (G/G) animal and carrier (G/T) CVM animals.

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ใช้การวิเคราะห์สถิติเชิงพรรณนา เปรียบเทียบร้อยละและค่าความถูกต้อง (accuracy)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจวิเคราะห์ยีนด้อยก่อโรค Complex Vertebral Malformation (CVM) ในโคทรอปิคอลโฮลส์ไต้หวันด้วยเทคนิค real-time PCR ด้วยการออกแบบ primers และ probes ที่จำเพาะต่อ SNP ของยีน SLC35A3 ที่ตำแหน่ง G559T (Table 1) โดยการตรวจติดตามการเพิ่มขึ้นของ PCR product โดยการวัดปริมาณสี fluorescence 2 ชนิด ได้แก่ G allele ด้วย VIC-fluorescence dye (สีเขียว) และ T allele ด้วย FAM-fluorescence dye (สีน้ำเงิน) แสดงออกโดยดูจากเส้นกราฟตาม Figure 1 การแปรผลพบว่า ตัวอย่างโคที่ปกติจะพบอัลลีล G (เส้นสีเขียว) เพียงเส้นเดียว และตัวอย่างโคที่มียีนด้อยก่อโรค CVM จะพบเส้นกราฟ 2 เส้นของอัลลีล G/T (เส้นสีเขียวและสีน้ำเงิน) ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของนิวคลีโอไทด์เกิด point mutation ที่ตำแหน่งลำดับเบสที่ 559 และยืนยันผลการตรวจสอบด้วยการเทคนิควิเคราะห์หาลำดับเบส (DNA Sequencing analysis) ของยีน SLC35A3 ด้วยการออกแบบ primers สำหรับการเพิ่มขนาดของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR (Table 2) และวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยโปรแกรม SeqScape Software Version 3.0 (Figure 2) โดยพบว่าตัวอย่างโคที่ปกติจะพบอัลลีล G เพียงตัวเดียว และตัวอย่างโคที่มียีนด้อยก่อโรค CVM จะพบอัลลีล G และ T เมื่อเปรียบเทียบผลของทั้ง 2 วิธีให้ผลสอดคล้องตรงกัน

Table 3 Group 1, result of CVM analysis using real time PCR in 160 dairy cows with pedigree traced back to the common ancestor, the elite sire Pennstate Ivanhoe Star or Carlin-M Ivanhoe Bell or Osborndale Ivanhoe Star

Sire name	CVM	no. calf	CVM (n)	
			positive	negative
1	positive	8	2	6
2	positive	34	20	14
3	positive	2	0	2
4	positive	8	6	2
5	negative	32	4	28
6	negative	30	4	26
7	negative	12	0	12
8	negative	34	0	34
Total (%)		160	36 (22.5%)	124 (77.5%)

ผลการตรวจวิเคราะห์ยีนด้อยก่อโรค CVM ด้วยเทคนิค real-time PCR โคนมทรอปิคอลไฮลส์ไดน์ของเกษตรกรในเขตท้องที่จังหวัดสระบุรี ลพบุรีและราชบุรี ทั้งหมด 413 ตัว แบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่1 เป็นกลุ่มโคที่มีพันธุ์ประวัติ (Pedigree) สายสัมพันธ์ที่เกิดจากสายเลือดของพ่อพันธุ์โคนม Carlin-M Ivanhoe Bell หรือ Pennstate Ivanhoe Star หรือ Osborndale Ivanhoe Star จำนวน 160 ตัว เกิดจากพ่อพันธุ์ 8 ตัว ผลการตรวจพบ ลูกโคมียีนด้อยก่อโรค CVM จำนวน 36 ตัว ไม่มียีนด้อยก่อโรค CVM จำนวน 124 ตัว คิดเป็น 22.5% (36/160) และ 77.5 % (124/160) ตามลำดับ ทำการตรวจยีนด้อยก่อโรค CVM ในพ่อพันธุ์ทั้ง 8 ตัว ผลตรวจพบว่า พ่อพันธุ์ 4 ตัวมียีนด้อยก่อโรค CVM (ลำดับที่ 1 – 4) และให้ลูกโคมียีนด้อยก่อโรค CVM 28 ตัว ส่วนลูกโคที่เหลืออีก 8 ตัวเกิดจากพ่อพันธุ์ 4 ตัวที่ไม่มียีนด้อยก่อโรค (ลำดับที่ 5 – 8) แต่ตรวจพบว่าแม่โคของลูกทั้ง 8 ตัวมียีนด้อยก่อโรค CVM แสดงให้เห็นว่าลูกโคได้รับการถ่ายทอดยีนด้อยก่อโรค CVM มาจากโคพ่อ-แม่พันธุ์ที่มียีนด้อยก่อโรคแฝงอยู่ ตาม Table 3

Table 4. Group 2, result of CVM analysis using real time PCR in 253 dairy cows were not have pedigree traced back to the common ancestor, the elite sire Pennstate Ivanhoe Star or Carlin-M Ivanhoe Bell or Osborndale Ivanhoe Star.

Sire name	CVM	no. calf	CVM	
			positive	negative
1	negative	6	1	5
2	negative	46	3	43
3	negative	26	3	23
4	negative	57	2	55
5	negative	34	0	34
6	negative	35	0	35
7	negative	24	1	23
8	negative	2	1	1
9	negative	18	0	18
10	negative	5	0	5
Total (%)		253	11 (4.35%)	242 (95.65%)

สำหรับกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มลูกโคที่มีประวัติที่ไม่ได้เกิดจากสายเลือดของพ่อพันธุ์ตามทีกล่าวข้างต้น จำนวน 253 ตัวเกิดจากพ่อพันธุ์ 10 ตัว ผลการตรวจพบ ลูกโคมียืนด้อยก่อโรค CVM จำนวน 11 ตัว ไม่มียืนด้อยก่อโรค CVM จำนวน 242 ตัว คิดเป็น 4.35% (11/253) และ 95.65% (242/253) ตามลำดับ โดยพ่อพันธุ์ 10 ตัว ได้ทำการตรวจสอบพบว่าไม่มียืนด้อยก่อโรค CVM และได้ตรวจสอบแม่โคทั้งหมดพบว่าแม่โคของตัวอย่างลูกโคที่มียืนด้อยก่อโรค CVM ทั้ง 11 ตัว มียืนด้อยก่อโรค CVM แสดงให้เห็นว่าแม่โคที่มียืนด้อยก่อโรค CVM เมื่อมีลูกก็สามารถถ่ายทอดยืนด้อยก่อโรค CVM จากแม่โคให้กับลูกโคได้เช่นกัน โดยไม่ได้รับการถ่ายทอดมาจากพ่อโคเนื่องจากพ่อตรวจสอบแล้วไม่มียืนด้อยก่อโรค CVM ตาม Table 4 ตรวจสอบความถูกต้องของผลการตรวจ โดยยืนยันด้วยการตรวจวิเคราะห์หาลำดับเบสของตำแหน่งยืน SLC35A3 ที่ตำแหน่ง G559T ทุกตัวที่มียืนด้อยก่อโรค CVM (47 ตัว) และตัวอย่าง 366 ตัว ที่ไม่มียืนด้อยก่อโรค CVM ผลการเปรียบเทียบทั้ง 2 วิธีให้ผลสอดคล้องตรงกันและมีค่าความถูกต้อง (accuracy) 100 เปอร์เซนต์ (Table 5)

Table 5. Comparison accuracy of two methods analysis by real-time PCR and sequencings for detected CVM.

Method analysis	CVM			Accuracy (%)
	positive	negative	totals	
real-time PCR	47	366	413	100
sequencings	47	366	413	100

สำหรับระยะเวลาที่ใช้ในการตรวจ ด้วยวิธี real-time PCR ใช้ระยะเวลาตรวจเพียง 30 นาที ซึ่งน้อยกว่าวิธีเดิมที่ใช้ PCR-SSCP และ PCR-PIRA ที่ต้องใช้เวลานาน 230 และ 1,030 นาที ตามลำดับ (Table 6) เนื่องจากมีวิธีการและขั้นตอนในการทำที่แตกต่างกัน

Table 6. Comparisons method and time using detected CVM.

Method analysis	Process	Times (min.)
real-time PCR	1. amplification DNA with primer probe and detected fluorescent dye	30
	2. analysis	
PCR-SSCP (Chu et al.,2008)	1. amplification DNA with primers	30
	2. denaturation	20
		180

	3. separated by 14% Polyacrylamide gel electrophoresis and detected by silver staining	
	4. analysis	
PCR-PIRA	1. amplification DNA with primers	30
(Logar et al.,2008)	2. digestion with restriction enzyme (over night)	960
	3. separated by 2% agarose gel electrophoresis	40
	4. analysis	

ผลการศึกษาของ Zhang et al. (2012) การตรวจสอบโรค CVM แบบใหม่ในโคพันธุ์โฮลสไตน์ด้วยเทคนิค real time PCR และจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยการใช้ยีนหลังของพันธุ์โฮลสไตน์ในจีนพบว่า การแพร่กระจายของโรค CVM เกิดจากพ่อพันธุ์โค 29 ตัวที่มีพันธุกรรมสืบทอดสายพันธุ์มาจากจากพ่อโคพันธุ์ Pennstate Ivanhoe Star และ Carlin-M Ivanhoe Bell ซึ่งเป็นลูกของ Pennstate Ivanhoe Star เช่นกัน ผลการศึกษาก่อนหน้าของ Chu et al. (2008) การตรวจยืนยันแฝง CVM ในโคโฮลสไตน์ด้วยเทคนิค PCR-SSCP พบว่าลูกโคจำนวน 602 ตัวที่เกิดจากพ่อพันธุ์โคที่มียืนด้อยก่อโรค CVM จำนวน 10 ตัว จาก 3 จังหวัด คือ Beijing Tianjin และ Hebei ตรวจพบว่าลูกโค 282 ตัวมียืนด้อยก่อโรค CVM คิดเป็น 46.84 % (282/602) ซึ่งพ่อโคพันธุ์ 10 ตัวมีพันธุกรรมที่ติดมาจากพ่อโคพันธุ์ Pennstate Ivanhoe Star และ Carlin-M Ivanhoe Bell นอกจากนี้โคนมพันธุ์โฮลสไตน์ในอิหร่านมีการสำรวจโรค CVM ผลการสำรวจพบโคนมมียืนด้อยก่อโรค CVM 17 ผูกใน 50 ผูกที่เกิดจากพ่อโคนมที่มียืนด้อยก่อโรค CVM (Hemati et al., 2015)

สรุปผลการทดลอง

การตรวจยืนด้อยก่อโรค CVM ในโคทรอปิคอลโฮลสไตน์ด้วยเทคนิค real-time PCR สามารถนำมาใช้เป็นวิธีในการตรวจสอบยืนด้อยก่อโรค CVM เพราะมีความจำเพาะต่อยีน SLC35A3 ได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความไว มีความถูกต้องแม่นยำ มีความน่าเชื่อถือและเป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว สามารถตรวจคัดกรองและคัดทิ้งยืนด้อยก่อโรค CVM ออกจากฝูงโคนมได้ 47 ตัว จากโคนมกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 413 ตัว คิดเป็นร้อยละ 11.38

ข้อเสนอแนะ

การตรวจสอบยืนด้อยก่อโรค CVM ในพ่อ-แม่พันธุ์โคนมทุกตัวในโปรแกรมการปรับปรุงสายพันธุ์โคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์ มีความสำคัญอย่างมากเพื่อคัดกรองและคัดทิ้งยืนด้อยก่อโรค CVM ออกจากฝูงประชากรโคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในพ่อพันธุ์ที่จะต้องผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อนำไปใช้บริการผสมเทียมให้กับเกษตรกรมิให้มีการแพร่กระจายเพิ่มขึ้นอีก ซึ่งในการเป็นศูนย์ผลิตน้ำเชื้อสำหรับผสม

พันธุ์สัตว์ ที่จะขอใบรับรองมาตรฐานศูนย์ผลิตน้ำเชื้อที่จะต้องมีการควบคุมตรวจสอบโรคระบาดและโรคทางพันธุกรรมตามระเบียบกรมปศุสัตว์ที่กำหนดไว้ ซึ่งการตรวจสอบยืนด้อยก่อโรค CVM สามารถนำมาใช้เป็นมาตรการในการตรวจสอบคัดกรองโดยเฉพาะอย่างยิ่งในพันธุ์โคนม รวมทั้งหากในพื้นที่ที่ตรวจพบการเกิดการตายของลูกสัตว์ในท้องหรือเกิดการแท้งแล้วลูกตายมีลักษณะที่มีรูปร่างผิดปกติ แนะนำว่าควรเก็บตัวอย่างเลือดหรือชิ้นเนื้อมาส่งตรวจสอบยืนด้อยก่อโรค CVM เพื่อใช้แยกหาสาเหตุการตายจากสาเหตุอื่น ๆ

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ นายนรินทร์ จารี ที่ช่วยเหลือในการค้นหาพันธุ์ประวัติพ่อ-แม่พันธุ์โคในระบบฐานข้อมูลโปรแกรม dairy cow เกษตรกรโคนมในจังหวัดสระบุรี ลพบุรี และราชบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่าง เจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี และราชบุรี ที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างเลือด รวมทั้งเจ้าหน้าที่กลุ่มวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีและความหลากหลายทางชีวภาพปศุสัตว์ทุกท่าน ที่ช่วยเหลือด้านการเตรียมอุปกรณ์ สารเคมีและตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Agerholm, J.S., C. Bendixen, O. Andersen and J. Arnbjerg. 2001. Complex vertebral malformation in Holstein calves. J. Vet. Diagn. Invest. 13: 283–289.
- Betka, L., K. Tatjana and M. Vladimir. 2008. Detection of recessive mutations (CVM, BLAD and RED Factor) in holstein bulls in Slovenia. J. Cent. Euro. Agr. 9: 101-106.
- Citek, J., V. Rehout, J. Hajkova and J. Pavkova. 2006. Monitoring of the genetic health of cattle in the Czech Republic. Vetrinarni Medicina. 51: 333-339.
- Chu, Q., D. Sun, Y. Yu and Y. Zhang. 2008. Identification of complex vertebral malformation carriers in Chinese Holstein. J. VET. Diagn. Invest. 20: 228-230.
- Duncan, R.B., C.B. Carrig, J.S. Agerholm and C. Bendixen. 2001. Complex vertebral malformation in a Holstein calf: report of a case in the USA. J. Vet. Diagn. Invest. 13: 333–336.
- Konersmann, Y., W. Wemheuer and B. Brenig. 2003. Origin, distribution and relevance of the CVM defect within the Holstein-Friesian population. Zuechtungskunde. 75: 9–15.
- Logar. B., T. Kavar and V. Meglic. 2008. Detection of recessive mutations (CVM, BLAD AND RED FACTOR) in Holstein Bulls in Slovenia. JCEA. 9(1): 101-106.

- Nagahata, H., H. Oota, A. Nitani, S. Oikawa, H. Higushi, T. Nakade, T. Kurosawa, M. Morita and H. Ogawa. 2002. Complex vertebral malformation in a stillborn Holstein calf in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 64:1107–1112.
- Revell, S. 2001. Complex vertebral malformation in a Holstein calf in the UK. *Vet. Rec.* 149: 659–660.
- Thomsen, B., P. Horn, F. Panitz, E. Bendixen and A. H. Petersen. 2006. A missense mutation in the bovine SLC35A3 gene, encoding a UDP-Nacetylglucosamine transporter, causes complex vertebral malformation. *Genome Research.* 16: 97–105.
- Wouda, W., I.J. Visser and G.H. Borst. 2000. Developmental anomalies in aborted and stillborn calves in the Netherlands. *Vet. Rec.* 147: 612.
- Meydan, H., M.A., Yildiz and J.S., Agerholm. 2010. Screening for bovine leukocyte adhesion deficiency, deficiency of uridine monophosphate synthase, complex vertebral malformation, bovine citrullinaemia, and factor XI deficiency in Holstein cows reared in Turkey. *Acta Veterinaria Scandinavica.* 52: 56.
- Hemati, B., S. Gharaie-Fathabad, M.H. Fazeli, Z. Namvar and M. Ranji. 2015. Investigation of Bovine Leukocyte Adhesion Deficiency (BLAD) and Complex Vertebral Malformation (CVM) in a Population of Iranian Holstein Cows. *Iranian Journal of Applied Animal Science.* 5(1): 69-72.
- Zhang, Y., X. Fan, D. Sun, Y. Wang, Y. Yu, Y. Xie, S. Zhang and Y. Zhang. 2012. A novel method for rapid and reliable detection of complex vertebral malformation and bovine leukocyte adhesion deficiency in Holstein cattle. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 3:2–6.

การประเมินความหลากหลายของลายพิมพ์พันธุกรรมในโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์

ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์^{1/}

กัลยา เก่งวิทย์กรรม^{2/} ณรงค์กร เกษมสุข^{3/} ณัฐนันท์ ศิริรัตนัญญกุล^{2/}

บทคัดย่อ

โคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ เป็นโคนมที่พัฒนาปรับปรุงพันธุ์มาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้มีลักษณะที่เหมาะสมให้ผลผลิตสูงในประเทศไทย การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อการประเมินความหลากหลายของลายพิมพ์พันธุกรรมในโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ ตัวอย่างที่ทำการศึกษาคือโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์รวม 588 ตัว ที่มีสายเลือดโฮลสไตน์ 100, 93.75%, 90.63%, 87.5%, 81.25%, และ 75 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 30, 110, 41, 242, 35, และ 131 ตัว ตามลำดับ ตัวอย่างดีเอ็นเอของสัตว์แต่ละตัวได้นำมาเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ซึ่งใช้ไพรเมอร์ดีไซน์ฟลูออเรสเซนต์จำนวน 11 เครื่องหมาย ได้แก่ TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225 และ BM1824 เมื่อนำผลขนาดชิ้นส่วนไมโครแซทเทลไลต์ดีเอ็นเอแต่ละเครื่องหมายของแต่ละตัวอย่างมาวิเคราะห์ความหลากหลายทางพันธุกรรม พบว่ามีความหลากหลายของลายพิมพ์พันธุกรรมสูงโดยมีค่าเฉลี่ยเฮเทอโรซัยโกซิตี (He) เท่ากับ 0.8932 มีค่าเฉลี่ยรูปแบบพันธุกรรม (PIC) เท่ากับ 0.8833 ค่าเฉลี่ย fixation index F_{IS} และ F_{IT} เท่ากับ -0.0131 และ 0.0063 ส่วนค่า F_{ST} มีค่า 0.0837-0.1466 ซึ่งแสดงว่าประชากรโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ที่ทำการศึกษานี้มีส่วนน้อยเพียง 1.31 % ที่เป็นเฮเทอโรซัยโกตเกินในระหว่างกลุ่ม และมีส่วนน้อยเพียง 0.63 % ที่เป็นเฮเทอโรซัยโกตที่ขาดในประชากรทั้งหมด ส่วนในประชากรกลุ่มย่อยมีความแตกต่างทางพันธุกรรมปานกลาง (8.37-14.66%) ค่าสหสัมพันธ์เฉลี่ยของลายพิมพ์พันธุกรรมของกลุ่มโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ที่มีสายเลือดโฮลสไตน์ 100, 93.75, 90.63, 87.5, 81.25 และ 75 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 0.4218, 0.1300, 0.2797, 0.1106, 0.3353 และ 0.1529 ตามลำดับ เมื่อนำค่าความห่างทางพันธุกรรมมาสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบต้นไม้พบว่าสามารถจำแนกออกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ โคนมไทยโฮลสไตน์สายเลือด 75% โคนมไทยโฮลสไตน์สายเลือดอื่นๆ และโคนมโฮลสไตน์พันธุ์แท้ ผลการศึกษาความหลากหลายของลายพิมพ์พันธุกรรมในโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ในครั้งนี้ สามารถนำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 11 เครื่องหมายมาประยุกต์ใช้ในการตรวจความแตกต่างและหาเปอร์เซ็นต์สายเลือดโฮลสไตน์ในฝูงประชากรโคนมโฮลสไตน์ได้

คำสำคัญ : ความหลากหลายของลายพิมพ์พันธุกรรม โคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ เครื่องหมายดีเอ็นเอ ไมโครแซทเทลไลต์

^{1/} เลขทะเบียนวิจัย : 51(1)-0208-050

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

^{3/} ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพอุบลราชธานี

Evaluation of DNA fingerprint diversity in Thai Holstein crossbred dairy cattle using microsatellite markers^{1/}

Kalaya Kaengvikkum^{2/} Narongkorn Kasemsuk^{3/}

and Nattanan Sirirattanathayakul^{2/}

Abstract

Thai Holstein crossbred dairy cattle are progressively developed for high milk production in tropical conditions of Thailand. The aim of this study was to evaluate DNA fingerprint diversity in Thai Holstein crossbred dairy cattle using microsatellite markers. A total of 588 animals including 30, 110, 41, 242, 35 and 131 animals of 100, 93.75, 90.63, 87.5 and 75 % Holstein, respectively, were used in this study. DNA samples of each animals were amplified microsatellite DNA by polymerase chain reaction using fluorescently-labelled primer sets of 11 loci including TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225 and BM1824. DNA fragments of 11 loci in each sample were analyzed genetic diversity of DNA fingerprint. The results revealed that high genetic diversity of DNA fingerprint was observed with 0.8932 of mean expected heterozygosity (H_e) and 0.8833 of mean polymorphic information content (PIC). The mean fixation index (F_{IS}) and F_{IT} were found to be -0.0131, 0.0063 and 0.0191, respectively, as well as F_{ST} was 0.0837-0.1466. The results indicates that there is a little shortfall, 1.31% of heterozygotes excess among group and 0.63% of heterozygotes deficit in the population. There was a moderate genetic differentiation (8.37-14.66%) among Thai Holstein dairy cattle groups. The mean correlation of multilocus analysis for single populations were 0.4218, 0.1300, 0.2797, 0.1106, 0.3353 and 0.1529 of 100, 93.75, 90.63, 87.5, 81.25 and 75 % Holstein populations, respectively. Phylogenetic tree was constructed using genetic distance by UPGMA method showing 3 clusters of 75% Holstein, 100% Holstein and the other Holstein crossbred dairy cattle. The results of this study suggested that 11 microsatellite markers can be used for discriminating and detecting unknown percentage of Holstein cattle population.

Keywords : DNA fingerprint, diversity, Thai Holstein crossbred dairy cattle, microsatellite markers

^{1/} Registered No : 51(1)-0208-050

^{2/} Bureau of Biotechnology in Livestock Production (BBLP), Muang, Pathumthani, Thailand

³ Ubonratchathni Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Muang, Ubonratchathani, Thailand

คำนำ

โคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ เป็นโคนมที่พัฒนาปรับปรุงพันธุ์อย่างต่อเนื่อง เพื่อให้มีลักษณะที่เหมาะสมให้ผลผลิตสูงในประเทศไทย ในการปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพได้แก่การผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อโคนมโฮลสไตน์เลือด 100 % จากต่างประเทศ กับโคแม่พันธุ์พื้นเมืองไทย จนกระทั่งได้โคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์สายเลือดสูงขึ้นเรื่อยๆ จนถึง 93.75 % ถ้าหากข้อมูลการทำทะเบียนประวัติโคไม่ถูกต้องหรือหายไป การหาเปอร์เซ็นต์สายเลือดโฮลสไตน์ในโคนมลูกผสมที่สงสัย สามารถใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมมาช่วยตรวจความแตกต่างของสายเลือดได้ (Blott *et al.*, 1998) นอกจากนี้เครื่องหมายทางพันธุกรรมสามารถนำมาเป็นเครื่องมือช่วยแยกแยะพันธุ์แท้และพันธุ์ผสมในการอนุรักษ์พันธุ์กรรมปศุสัตว์พื้นเมืองเพื่อคงไว้ให้เป็นฝูงสายพันธุ์แท้ หรือนำไปใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน (Bradley *et al.*, 1994) การตรวจสอบเอกลักษณ์ประจำพันธุ์สัตว์จะมีค่ามากสำหรับสินค้าปศุสัตว์ เพื่อนำข้อมูลไปจัดทำตราสินค้าว่ามาจากสัตว์พันธุ์อะไร เช่น Aberdeen Angus' beef หรือ Jersey ' milk การปกป้องตราสินค้าจึงต้องอาศัยการตรวจดีเอ็นเอเพื่อยืนยันเอกลักษณ์ประจำพันธุ์สัตว์

เครื่องหมายทางพันธุกรรมที่นิยมนำมาใช้ได้แก่ เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ เป็นเครื่องหมายที่มีประโยชน์ในการจำแนก แยกแยะในฝูงประชากรนั้นๆ ซึ่งแสดงให้เห็นได้จากการสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบต้นไม้ (Phylogenetic tree) จากข้อมูลดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ที่ผ่านการวิเคราะห์แล้ว นอกจากนี้ Bowcock *et al.* (1994) แนะนำให้ใช้ค่าเฮเทอโรซัยโกซิตี (Expected heterozygosity, H_e) และค่าความแตกต่างทางพันธุกรรม (F_{ST}) ของแต่เครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์ เป็นดัชนีชี้วัดความแตกต่างสายพันธุ์สัตว์ในฝูง มีการนำเอาเครื่องหมายทางพันธุกรรมที่นิยมนำมาใช้ในการจำแนกสายพันธุ์โค (Edwards *et al.*, 2000; Canon *et al.*, 2001; Rehman and Khan, 2009) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการนำเอาเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์มาใช้ในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ การศึกษาในครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อการประเมินความหลากหลายของลายพิมพ์พันธุกรรมในโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจความแตกต่างและหาเปอร์เซ็นต์สายเลือดโฮลสไตน์ในฝูงประชากรโคนมโฮลสไตน์

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ตัวอย่างโคนมลูกผสมโฮลสไตน์

สุ่มคัดเลือกโคนมลูกผสมโฮลสไตน์เพศผู้ และเพศเมียที่มีเปอร์เซ็นต์สายเลือดโฮลสไตน์ต่างๆ ได้แก่ 93.75%, 90.63%, 87.5%, 81.25%, และ 75 % จากโครงการ Master bull ของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ส่วนโคนมเปอร์เซ็นต์สายเลือดโฮลสไตน์ 100% เป็นน้ำเชื้อแช่แข็ง และโคที่มีชีวิตที่นำเข้ามาจากต่างประเทศ

การดำเนินการวิจัย/เก็บข้อมูล และสถานที่ทดลอง

1. การเก็บรวบรวมข้อมูล

- 1) เก็บตัวอย่างเลือด โดยการเจาะที่เส้นเลือดดำใหญ่ (Jugular vein) บริเวณใต้ลำคอ จำนวน 5 มิลลิลิตร เก็บในหลอดทดลองที่มีสารป้องกันเลือดแข็ง EDTA เพื่อนำไปสกัดดีเอ็นเอ

- 2) การสกัดดีเอ็นเอ นำตัวอย่างเลือดจำนวน 200 ไมโครลิตร มาสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป (AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep kit: Axygen Bio Science, USA) ส่วนน้ำเชื้อแช่แข็ง สกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอล: โครโรฟอร์ม (Sambrook *et al.*, 1989) ตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้นำมาหาความเข้มข้น และความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 260 และ 280 นาโนเมตร เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอได้ที่ -20°C จนกว่าจะนำไปทดสอบ

2. การวิเคราะห์ตัวอย่าง

- 1) เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์ที่ใช้ทำการศึกษามีจำนวน 11 เครื่องหมาย คัดเลือกมาจากคำแนะนำของ FAO-ISAG (<http://www.fao.org/docrep/014/i2413e/i2413e00.pdf>) ดังแสดงในตารางที่ 1
- 2) การเพิ่มขยายดีเอ็นเอด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสแบบมัลติเพล็กซ์ ในหลอดทดสอบประกอบด้วย 10x PCR buffer จำนวน 2 μL dNTPs ความเข้มข้น 2mM จำนวน 2 μL MgCl_2 ความเข้มข้น 50 mM จำนวน 1.2 μL แต่ละไพรเมอร์ที่ติดสีเรืองแสงความเข้มข้น 5 μM ผสมกันจำนวน 0.4 μL เอนไซม์ Platinum Taq polymerase ความเข้มข้น 5 U/ μL จำนวน 0.4 μL และ ดีเอ็นเอตัวอย่างความเข้มข้น 20 ng/ μL จำนวน 1 μL ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 20 μL ด้วย DDW นำตัวอย่างในหลอดทดสอบเข้าเครื่องเพิ่มลดอุณหภูมิ (MJ Mini Personal Thermal Cycler) โดยตั้งโปรแกรมดังนี้ 94°C เป็นเวลา 5 นาที ตามด้วยวงรอบอุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที 58°C เป็นเวลา 30 วินาที 72°C เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 30 รอบ ตามด้วย 72°C เป็นเวลา 1 นาที นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่เพิ่มขยายแล้วนี้มาจำนวน 1 μL มาตรวจสอบเบื้องต้นด้วยการแยกด้วยกระแสไฟฟ้าบนวุ้นอะกาโรส 2%
- 3) การหาขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้จากเพิ่มขยายมาทำให้บริสุทธิ์ และนำไปหาขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอด้วยเครื่องหาลำดับเบส (3130 Genetic Analyzer, Applied Biosystem, USA) โดยใช้ขนาดดีเอ็นเอมาตรฐานเปรียบเทียบ (GeneScan™-500 ROX Size Standard (Applied Biosystem) วิเคราะห์ผลขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ ด้วย โปรแกรม GeneScan® and GeneMapper

Table 1 ISAG-FAO recommended microsatellite markers were used in this study

Locus name (bp)	Chromosome	Primer sequence (5'>3') Forward Reverse	Annealing Temp. ($^{\circ}\text{C}$)	GenBank accession no.	Allele range
TGLA227 158	18	CGAATTCCTAAATCTGTTAATTTGCT ACAGACAGAACTCAATGAAAGCA	57	X89252	120-
BM2113 156	2	GCTGCCTTCTACCAATACCC CTTCCTGAGAGAGAAGCAACACC	55-60	M97162	122-

TGLA53 191	16	GCTTTCAGAAATAGTTTGCATTCA	55		143-
		ATCTTCACATGATATTACAGCAGA			
ETH10 231	5	GTTTCAGGACTGGCCCTGCTAACAA	55-65	Z22739	207-
		CCTCCAGCCCACCTTTCTCTTCTC			
SPS115 258	15	AAAGTGACACAACAGCTTCTCCAG	55-60	FJ828564	234-
		AACGAGTGTCCTAGTTTGGCTGTG			
TGLA126 131	20	CTAATTTAGAAATGAGAGAGAGGCTTCT	55-58		115-
		TTGGTCTCTATTCTCTCTGAATATTCC			
TGLA122 184	21	CCCTCCTCCAGGTAAATCAGC	55-58		136-
		AATCACATGGCAAATAAGTACATAC			
INRA23 225	3	GAGTAGAGCTACAAGATAAACTTC	55	X67830	195-
		TAACACAGGGTGTTAGATGAATC			
ETH3 133	19	GAACCTGCCTCTCCTGCATTGG	55-65	Z22744	103-
		ACTCTGCCTGTGGCCAAGTAGG			
ETH225 159	9	GATCACCTTGCCACTATTTCTCT	55-65	Z14043	131-
		ACATGACAGCCAGCTGCTACT			
BM1824 197	1	GAGCAAGGTGTTTTTCCAATC	55-60	G18394	176-
		CATTCTCCAAGTCTTCCTTG			

3. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

- 1) ข้อมูลขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลท์แต่ละเครื่องหมายของตัวอย่างโคนมลูกผสมโฮลสไตน์แต่ละกลุ่ม นำมาคำนวณหาจำนวน (k) ชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (Allele) ต่อหนึ่งเครื่องหมาย (locus) ขนาดชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (bp) ค่าเฮเทอโรซัยโกซิตีจากการสังเกต (H_e) ค่าเฮเทอโรซัยโกซิตีจากการคำนวณ (H_0) และค่ารูปแบบพันธุกรรม (PIC) ด้วยโปรแกรม CERVUS 3.0.7 (Marshall *et al.* 1998)
- 2) ค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่ม (F_{ST}) ตามวิธีของ Wright (1978) คำนวณโดยโปรแกรม STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000)
- 3) ค่าสัมประสิทธิ์เลือดชิด (Inbreeding) F_{IS} และ F_{IT} ค่าความห่างทางพันธุกรรม (Nei's 1978) ค่าสหสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างกลุ่ม การสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบต้นไม้ และการตรวจหาเปอร์เซ็นต์สายเลือดโฮลสไตน์จากตัวอย่างโคที่สงสัย ด้วยโปรแกรม POPGENE version 1.31 (Yeh and Yang, 1999)

4. สถานที่ทำการทดลอง

- 1) สถานที่เก็บรวบรวมข้อมูล : ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี อำเภอกำแพงคอย จังหวัดสระบุรี ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อโค อำเภอลำสนธิ จังหวัดลพบุรี

- 2) สถานที่วิเคราะห์ตัวอย่างเลือด เพื่อตรวจความหลากหลายของลายพิมพ์พันธุกรรมในโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ : กลุ่มวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพการปศุสัตว์ อำเภอมือง จังหวัดปทุมธานี
5. ระยะเวลาทำการทดลอง ตั้งแต่ ตุลาคม 2550 - กันยายน 2552

ผลการทดลองและวิจารณ์

ความหลากหลายของลายพิมพ์พันธุกรรม

ในตารางที่ 2 ผลจากการศึกษาลายพิมพ์พันธุกรรมโคนมจำนวน 588 ตัว มีจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (อัลลีล) เฉลี่ยต่อหนึ่งเครื่องหมายเฉลี่ยเท่ากับ 25.82 อัลลีล ทุกเครื่องหมายมีค่าเฮเทอโรซัยโกซิตีจากการสังเกต (H_o) และจากการคำนวณ (H_e) เกิน 0.70 ซึ่งมีค่าเฉลี่ย H_e เท่ากับ 0.893 เฮเทอโรซัยโกซิตีเป็นเครื่องชี้วัดที่ดีของความหลากหลายทางพันธุกรรม ถ้าค่า H_e มีค่าสูงแสดงถึงเป็นพันธุ์ผสมในประชากรนั้น (Arranz *et al.*, 2000) ค่ารูปแบบพันธุกรรม (PIC) เป็นเครื่องชี้วัดของความหลากหลายทางพันธุกรรมอย่างหนึ่ง จากการศึกษาทุกเครื่องหมายมีค่า PIC สูง ซึ่งเฉลี่ยเท่ากับ 0.883 ถ้า PIC มีค่าสูงกว่า 0.5 แสดงว่า สามารถนำเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์นี้ไปใช้วิเคราะห์ต่อไปได้ (Arora *et al.*, 2004)

Table 2. Allele frequency analysis of observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e) and polymorphic information content (PIC) using program CERVUS 3.0.3

Locus	n	k	Allele range	Ho	He	PIC
TGLA227	588	36	67-107	0.913	0.939	0.935
BM2113	588	29	116-150	0.815	0.919	0.912
TGLA53	588	32	141-185	0.770	0.885	0.875
ETH10	588	20	206-223	0.747	0.860	0.847
SPS115	588	20	150-280	0.702	0.845	0.828
TGLA126	588	16	108-138	0.787	0.872	0.858
TGLA122	588	38	122-213	0.801	0.925	0.920
INRA23	588	24	122-213	0.854	0.902	0.893
ETH3	588	25	99-134	0.798	0.884	0.874
ETH225	588	27	124-163	0.774	0.911	0.904
BM1824	588	17	178-194	0.760	0.884	0.872
Mean		25.82		0.792	0.893	0.883

ค่าสัมประสิทธิ์เลือดชิด

ค่า F_{IS} และ F_{IT} เป็นค่าสัมประสิทธิ์เลือดชิด (Inbreeding) ภายในกลุ่มย่อย และภายในประชากรทั้งหมดในฝูง ถ้ามีค่าเป็น + แสดงว่าประชากรในกลุ่มย่อย หรือภายในประชากรทั้งหมดในฝูงเกิดการขาดเฮเทอโรซัยโกต หรือเกิดเลือดชิด ถ้ามีค่าเป็น - แสดงว่าประชากรในกลุ่มย่อย หรือภายในประชากรทั้งหมดในฝูงมีเฮเทอโรซัยโกตเกิน หรือไม่เกิดเลือดชิด

จากการศึกษานี้ ค่าเฉลี่ย F_{IS} และ F_{IT} เท่ากับ -0.0131 และ 0.0063 ตามลำดับ ซึ่งแสดงว่า ประชากรโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ที่ทำการศึกษานี้มีส่วนน้อยเพียง 1.31 % ที่เป็นเฮเทอโรซัยโกตเกินในระหว่างกลุ่ม และมีส่วนน้อยเพียง 0.63 % ที่เป็นเฮเทอโรซัยโกตที่ขาดหรือเกิดเลือดชิดในประชากรทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 3

ถ้าค่า F_{IS} ที่มีค่ามากกว่า 0 และเป็น + จะเป็นการยืนยันว่าการถ่ายทอดทางพันธุกรรมเป็นไปตามกฎของ Hardy Weiberg อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้น จากการศึกษานี้ ค่าเฉลี่ย F_{IS} เท่ากับ -0.0131 แสดงว่าการถ่ายทอดทางพันธุกรรมเป็นไปตามกฎของ Hardy Weiberg อย่างไม่มีนัยสำคัญ

Table 3 F -Statistics analysis, F_{IS} , F_{IT} and F_{ST} values for 11 microsatellite loci in Thai Holstein dairy cattle using program POPGENE version 1.31

Locus	F - Statistics	
	F_{IS}	F_{IT}
TGLA227	-0.0357	-0.0122
BM2113	-0.0068	0.0024
TGLA53	0.0888	0.1066
ETH10	-0.0227	0.0005
SPS115	0.0962	0.1397
TGLA126	-0.1734	-0.1586
TGLA122	0.1222	0.1395
INRA23	-0.0665	-0.0590
ETH3	-0.1853	-0.1487
ETH225	-0.0231	-0.0041
1824	0.0518	0.0658
Mean	-0.0131	0.0063

ความแตกต่างทางพันธุกรรม

ส่วนค่า F_{ST} เป็นดัชนีที่นิยมนำมาใช้ความแตกต่างทางพันธุกรรมในกลุ่มย่อยของประชากร (Hartl and Clark, 1997) ซึ่งจะมีค่า 0-1 ถ้าค่า F_{ST} อยู่ระหว่าง 0-0.05, 0.05-0.15, 0.15-0.25 และ >0.25 แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมน้อย ปานกลาง มาก และมากที่สุด ตามลำดับ

จากการศึกษานี้ ค่าเฉลี่ย fixation index (F_{IT}) ในแต่ละกลุ่มย่อย มีค่าอยู่ระหว่าง 0.0837-0.1466 แสดงว่ามีความแตกต่างทางพันธุกรรมปานกลาง (8.37-14.66%) ดังแสดงในตารางที่ 4

Table 4 Mean value of F_{ST} in each subpopulation of Thai Holstein dairy cattle obtained from program STRUCTURE 2.3.4

% Holstein	F_{ST}
100	0.1361
93.75	0.1070
90.63	0.1101
87.5	0.0837
81.25	0.1243
75	0.1466

ความห่างทางพันธุกรรมและการจัดกลุ่มของโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์

ค่าความห่างทางพันธุกรรมของโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์แต่ละกลุ่ม มีค่าตั้งแต่ 0.0030 ถึง 0.0526 จะเห็นว่าโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ที่มีสายเลือด 93.75% กับโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ที่มีสายเลือด 90.63% มีค่าความห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.0030 ในขณะที่โคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ที่มีสายเลือด 75% กับโคนมเลือด 100% มีค่าความห่างทางพันธุกรรมเท่ากับ 0.0526 ดังแสดงในตารางที่ 5

Table 5 Nei's unbiased measures of genetic distance among 6 Holstein crossbred dairy cattle populations

Populations		100%	93.75%	90.63%	87.5%	81.25%	75%
100%	Holstein	-	0.0123	0.0152	0.0246	0.0244	0.0526
93.75%	Holstein		-	0.0030	0.0039	0.0058	0.0248
90.63%	Holstein			-	0.0033	0.0064	0.0306
87.5%	Holstein				-	0.0042	0.0270
81.25%	Holstein					-	0.0237
75%	Holstein						-

เมื่อนำค่าความห่างทางพันธุกรรมมาสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบต้นไม้ พบว่าสามารถจำแนกออกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ โคนมไทยโฮลสไตน์สายเลือด 75% โคนมไทยโฮลสไตน์สายเลือดอื่นๆ และโคนมโฮลสไตน์พันธุ์แท้ ดังแสดงในรูปที่ 1

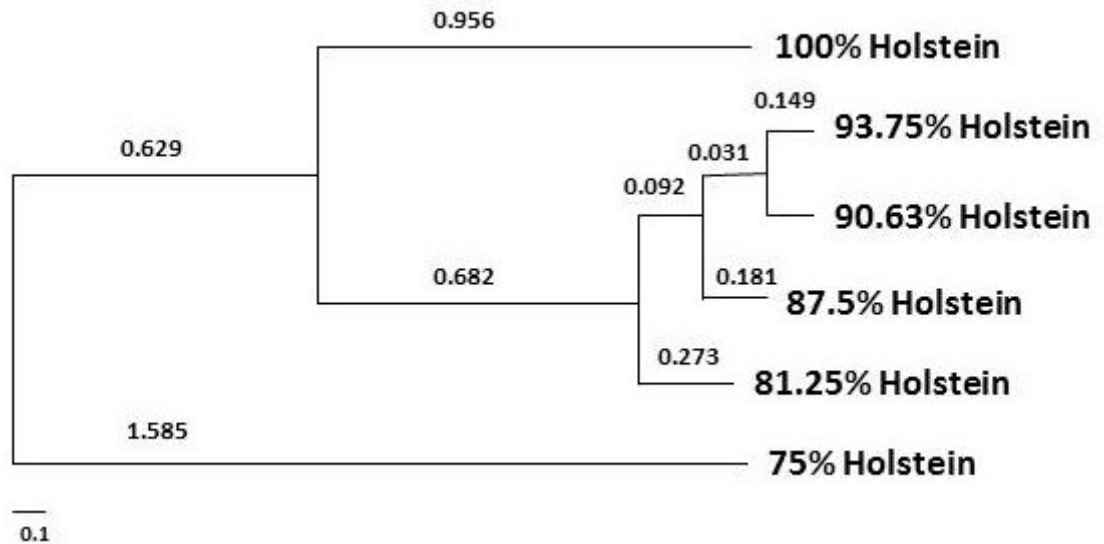


Figure 1. Phylogenetic tree construction based on genetic distance from microsatellite marker genotypes by UPGMA method

ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของกลุ่มโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์

ค่าสหสัมพันธ์เฉลี่ยของลายพิมพ์พันธุกรรมของกลุ่มโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ที่มีสายเลือดโฮลสไตน์ 100, 93.75, 90.63, 87.5, 81.25 และ 75 เปอร์เซนต์ เท่ากับ 0.4218, 0.1300, 0.2797, 0.1106, 0.3353 และ 0.1529 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6

Table 6. Smouse's multilocus analysis of correlation for single populations of 6 Holstein crossbred dairy cattle populations

Populations	n	Average correlation	df	Chi-square	Probability
100% Holstein	30	0.4218	55	117.27	0.0000
93.75% Holstein	110	0.1300	55	61.90	0.2435
90.63% Holstein	41	0.2797	55	85.07	0.0057
87.5% Holstein	242	0.1106	55	103.39	0.0001
81.25% Holstein	35	0.3353	55	93.17	0.0010
75% Holstein	131	0.1529	55	95.80	0.0005

เมื่อนำค่าเฉลี่ยของสหสัมพันธ์ของลายพิมพ์พันธุกรรมของกลุ่มโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ที่มีสายเลือดโฮลสไตน์ต่างๆ มาสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์สายเลือดโฮลสไตน์ พบแนวโน้มมีความสัมพันธ์สูงขึ้นเมื่อเปอร์เซ็นต์สายเลือดโฮลสไตน์ สูงขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 2

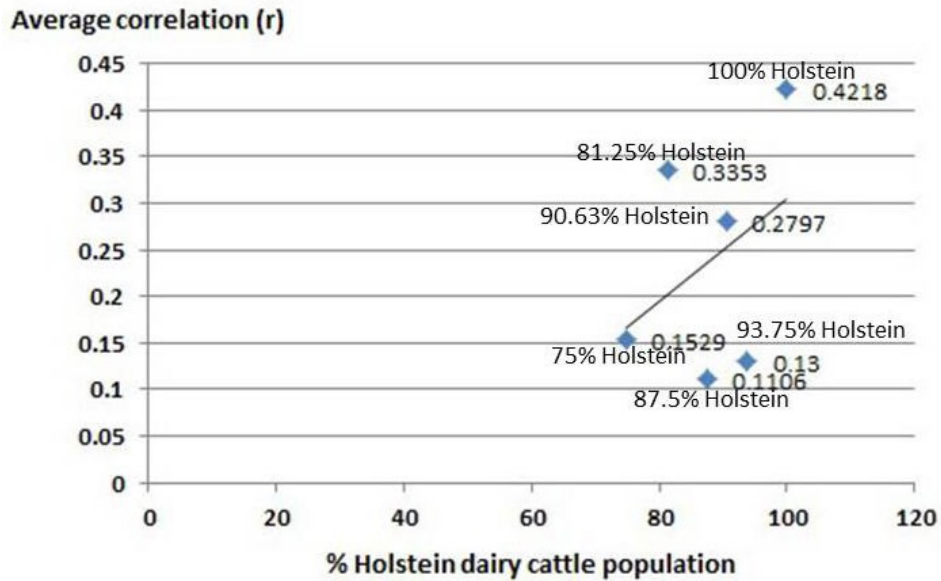


Figure 2. Average correlation values (r) plotted against % Holstein dairy cattle population

การตรวจหาเปอร์เซ็นต์สายเลือดโฮลสไตน์จากตัวอย่างโคที่สงสัย

การตรวจหาเปอร์เซ็นต์สายเลือดโฮลสไตน์จากตัวอย่างโคที่สงสัย โดยนำข้อมูลลายพิมพ์พันธุกรรม จัดให้เป็นประชากรกลุ่มที่ 7 (pop7) มาเปรียบเทียบกับข้อมูลลายพิมพ์พันธุกรรมของโคนมที่ทำการศึกษานี้ทั้ง 6 กลุ่ม โดยโปรแกรม POPGENE Version 1.31 วิเคราะห์ ถ้าค่าความห่างทางพันธุกรรมของตัวอย่างโคที่สงสัย มีค่าน้อยที่สุด ตรงกับกลุ่มโคนมที่ทำการศึกษานี้เป็นกลุ่มอะไร แสดงว่าตัวอย่างโคที่สงสัยมีสายเลือดโฮลสไตน์ตรงกับกลุ่มนั้น ดังแสดงตัวอย่างในรูปที่ 3

```

*****
**
**      Nei's Unbiased Measures of Genetic Identity and Genetic distance      **
**      [See Nei (1978)  Genetics 89:583-590]                                **
**
*****

```

pop ID	1	2	3	4	5	6	7
1	****	0.9878	0.9849	0.9757	0.9759	0.9488	0.9640
2	0.0123	****	0.9970	0.9961	0.9942	0.9755	0.9740
3	0.0152	0.0030	****	0.9967	0.9936	0.9699	0.9945
4	0.0246	0.0039	0.0033	****	0.9958	0.9734	0.9761
5	0.0244	0.0058	0.0064	0.0042	****	0.9766	0.9556
6	0.0526	0.0248	0.0306	0.0270	0.0237	****	0.9321
7	0.0366	0.0264	0.0056	0.0242	0.0454	0.0703	****

Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal).

Figure 3. Percent Holstein detection of unknown sample (pop7) based on genetic distance among 100% Holstein (1), 93.75 Holstein (2), 90.63% Holstein (3), 87.5% Holstein (4), 81.25% Holstein (5) and 75% Holstein (6)

จากการทดสอบพบว่าให้ผลตรงกับความเป็นจริง เมื่อตัวอย่างโคนมที่มีสายเลือดโฮลสไตน์ 100, 93.75, 90.63, 81.25 และ 75% ยกเว้นตัวอย่างที่มีสายเลือดโฮลสไตน์ 87.5% ที่ให้ผลไม่ตรงกับความเป็นจริง เนื่องจาก โคนมลูกผสมโฮลสไตน์สายเลือด 87.5% มีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมต่ำ (0.0837) และมีค่าสหสัมพันธ์ต่ำ (0.1106) ดังนั้นการทดสอบจะให้ผลตรงกับความเป็นจริง เมื่อมีค่าความแตกต่างทางพันธุกรรมตั้งแต่ 0.1000 ขึ้นไป (ตารางที่ 4) และมีค่าสหสัมพันธ์ตั้งแต่ 0.1300 ขึ้นไป (ตารางที่ 6)

สรุปผลการทดลอง

การประเมินความหลากหลายของลายพิมพ์พันธุกรรมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ ในโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ที่มีสายเลือดโฮลสไตน์ 100, 93.75%, 90.63%, 87.5%, 81.25%, และ 75 เปอร์เซ็นต์ รวม 588 ตัว ตัวอย่างดีเอ็นเอของสัตว์แต่ละตัวได้นำมาเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส ซึ่งใช้ไพรเมอร์ดีดิสฟลูออเรสเซนต์จำนวน 11 เครื่องหมาย ได้แก่ TGLA227, BM2113, TGLA53, ETH10, SPS115, TGLA126, TGLA122, INRA23, ETH3, ETH225 และ BM1824 พบว่าโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์มีความหลากหลายของลายพิมพ์พันธุกรรมสูงโดยมีค่าเฉลี่ยเฮเทอโรซัยโกซิตี (H_e) เท่ากับ 0.8932 เครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ทั้ง 11 เครื่องหมายสามารถนำมาใช้วิเคราะห์ทางพันธุกรรมได้โดยมีค่าเฉลี่ยรูปแบบพันธุกรรม (PIC) เท่ากับ 0.8833 ประชากรโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ที่ทำการศึกษานี้ไม่เกิดเลือดชิดในระหว่างกลุ่ม และประชากรในกลุ่มย่อยมีความแตกต่างทางพันธุกรรมปานกลาง (8.37-14.66%) โดยพบแนวโน้มมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในแต่ละกลุ่มสูงขึ้น เมื่อเปอร์เซ็นต์สายเลือดโฮลสไตน์สูงขึ้น เมื่อนำค่าความห่างทางพันธุกรรมมาสร้างความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมแบบต้นไม้พบว่าสามารถจำแนกออกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ โคนมไทยโฮลสไตน์สายเลือด 75% โคนมไทยโฮลสไตน์สายเลือดอื่นๆ และโคนมโฮลสไตน์พันธุ์แท้ ผลการศึกษาความหลากหลายของลายพิมพ์พันธุกรรมในโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ ด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ในครั้งนี้ สามารถนำเครื่องหมายไมโครแซทเทลไลต์จำนวน 11 เครื่องหมายมาประยุกต์ใช้ในการตรวจความแตกต่างและหาเปอร์เซ็นต์สายเลือดโฮลสไตน์ในฝูงประชากรโคนมโฮลสไตน์ได้

ข้อเสนอแนะ

ผลจากการศึกษาประเมินความหลากหลายของลายพิมพ์พันธุกรรมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ ในโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ในครั้งนี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในงานดังต่อไปนี้

1. นำเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์นี้จำนวน 11 เครื่องหมาย มาใช้กับโคพื้นเมืองของไทย เช่น โคขาวลำพูน โคอีสาน โคลาน โชนภาคใต้ เพื่อจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ทางพันธุกรรม จะได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการอนุรักษ์สายพันธุ์ให้คงอยู่ต่อไป
2. นำเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์นี้จำนวน 11 เครื่องหมาย มาใช้กับโคเนื้อลูกผสม เช่น โคตาก โคกบินทร์ โคไทยแบล็ค เพื่อจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ทางพันธุกรรม จะได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการออกใบรับรองสายพันธุ์ และรับรองสินค้าที่มาจากโคเนื้อลูกผสมต่างๆ เพื่อเป็นเอกลักษณ์ และเป็นตราสินค้ารับรองพันธุ์
3. นำเอาหลักการประเมินความหลากหลายของลายพิมพ์พันธุกรรมด้วยเครื่องหมายดีเอ็นเอชนิดไมโครแซทเทลไลต์ มาใช้กับสัตว์ชนิดอื่น เช่น ไก่ แพะ เพื่อจำแนกความแตกต่างของสายพันธุ์ทางพันธุกรรม

พันธุกรรมพื้นเมือง หรือพันธุ์ผสม จะได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการอนุรักษ์สายพันธุ์ และการใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน

เอกสารอ้างอิง

- Arora, R., Lakhchaura, B.D., Prasad, R.B., Tania, M.S. and R.K. 2004. Genetic diversity analysis of two buffalo populations of northern India using microsatellite markers. *J. Anim. Breed. Genet.* 121: 111-118.
- Arranz, J.J., Bayon, Y. and F. San Primativo. 2000. Genetic variation at microsatellite loci in Spanish sheep. *Small Ruminant Res.* 39: 3-10.
- Blott, S. C., Williams, J. L. and C.S Haley.1998. Genetic relationships among European cattle breeds. *Anim. Genet.* 29: 273-282.
- Bowcock, A.M., Ruiz-Linares, A., Tomfohrde, J., Minch, E., Kidd, J. R. and L.L. Cavalli-Sforza. 1994. High resolution of human evolutionary trees with polymorphic microsatellites. *Nat.* 368: 455-457.
- Bradley, D. G., Machugh, D. E., Loftus, R. T., Sow, R. S., Hoste, C. H. and E. P. Cunningham. 1994. Zebu-taurine variation in Y chromosomal DNA: a sensitive assay for genetic introgression in West African trypanotolerant cattle populations. *Anim Genet.* 25: 7-12.
- Canon, J., Alexandrino, P., Bessa, I., Carleos, C., Carretero, Y., Dunner, S., Ferran, N., Garcia, D., Jordan, J., Laloe, D., Peteira, A., Sanchez, A. and K. Moazami-Goudarzi. 2001. Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation purposes. *Genet. Sel. Envol.* 33: 311-332.
- Edwards, C.J., Loftus, R.T., Bradley, D.G., Doft, G. and C. Looft. 2000. Relationships between the endangered Pustertaler-Sprinzen and three related European cattle breeds as analyzed with 20 microsatellite loci. *Anim. Genet.* 31: 329-332.
- Hartl, D.L. and A.G. Clark. 1997. Principles of population Genetics. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA. 542 pp.
- Marshall, T.C., Slate, Kruuk, L.E.B. and J.M. Pemberton. 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molec. Ecol.* 7: 639-655.
- Nei, S. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Pritchard, J.K, Stephen, M and P. Donnelly. 2000. Inference of Population structure using multilocus genotype data. *Genet.* 155: 945-959.
- Rehman, M.S. and M.S. Khan. 2009. Genetic diversity of Haryana and Hissar cattle from Pakistan using microsatellite analysis. *Pakistan Vet. J.* 29: 67-71.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and T. Maniatis. 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Yeh, F.C., Yang, R.C and T. Boyle. 1999.. POPGENE Version 1.32: Microsoft Window-Based Freeware for population Genetics analysis: University of Alberta, Edmonton.
- Wright, S. 1978. Evolution and the genetics of populations. A treatise in four volumes. Volume 4. Variability within and among natural populations. pp. 580.

ผลของคอร์ปัสกูเทียม ฟอลลิเคิลและระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในวันย้ายฝากตัวอ่อน

ต่ออัตราการตั้งท้องของโคเนื้อตัวรับ

กอบสุข ทองสอดแสง^{1/} ธนพล แอมปรัชฌาย^{2/}

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของปัจจัยในวันย้ายฝากตัวอ่อนต่ออัตราการตั้งท้องของโคเนื้อตัวรับได้แก่ คอร์ปัสกูเทียม ฟอลลิเคิล ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและความเข้มข้นเอสตราไดโอดในเลือดตลอดจนสถานะของโคตัวรับ ในโคเนื้อเพศเมียลูกผสม อายุ 3-6 ปี จำนวน 125 ตัว ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นสัดและเก็บข้อมูลสถานะและระบบสืบพันธุ์ของโคตัวรับในวันย้ายฝากตัวอ่อน ได้แก่ ฟอลลิเคิล ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสกูเทียมและรังไข่โดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์ และเจาะเลือดตรวจความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและฮอร์โมนเอสตราไดโอด โดยดำเนินการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งด้วยวิธี direct transfer ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มโคตัวรับที่ตั้งท้องมีค่าเฉลี่ยของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในวันย้ายฝากตัวอ่อนเท่ากับ 6.01 ± 2.06 ng/ml ซึ่งสูงกว่ากลุ่มโคตัวรับที่ไม่ตั้งท้องที่มีค่าเฉลี่ยของโปรเจสเตอโรนในเลือดเท่ากับ 4.91 ± 2.13 ng/ml อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และพบว่าความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสกูเทียมมีความสัมพันธ์เชิงบวกในระดับต่ำกับความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือด ($r = 0.204$) และความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสกูเทียมมีความสัมพันธ์เชิงลบในระดับปานกลางกับความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางรังไข่ ($r = -0.453$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทั้งนี้ เมื่อวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องของโคเนื้อตัวรับ คือ สถานะของโคตัวรับ เกรดคอร์ปัสกูเทียม ฟอลลิเคิล ความเข้มข้นฮอร์โมนเอสตราไดโอดและระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในวันที่ย้ายฝากตัวอ่อน พบว่าโคตัวรับที่มีคอร์ปัสกูเทียมเกรด A ในวันย้ายฝากตัวอ่อนจะมีโอกาสตั้งท้องมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับโคตัวรับที่มีคอร์ปัสกูเทียมเกรด B ในวันย้ายฝากตัวอ่อนถึง 2.56 เท่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) และพบว่า โคตัวรับที่มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดไม่น้อยกว่า 5 ng/ml จะมีโอกาสตั้งท้องมากกว่าโคตัวรับที่มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่น้อยกว่า 5 ng/ml ถึง 2.51 เท่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตาม ปัจจัยด้านสถานะของโคตัวรับ ฟอลลิเคิลและความเข้มข้นฮอร์โมนเอสตราไดโอดในเลือดนั้น ไม่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องของโคเนื้อตัวรับในวันที่ย้ายฝากตัวอ่อน ($p > 0.05$) สรุปว่าเกรดคอร์ปัสกูเทียมและระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในวันย้ายฝากตัวอ่อนเป็นปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องของโคเนื้อตัวรับ

คำสำคัญ: การย้ายฝากตัวอ่อน คอร์ปัสกูเทียม โปรเจสเตอโรน ฟอลลิเคิล อัตราการตั้งท้อง

เลขทะเบียนวิชาการ : 66(2)-0208-023

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

^{2/} ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น

Effect of corpus luteum, follicle and progesterone level at the day of embryo transfer on pregnancy rate of recipient beef cattle

Korbsook Thongsodsaeng^{1/} Tanapol Ampratchar^{2/}

Abstract

The present study aimed to examine factors that affect pregnancy rate of recipient beef cattle at the day of embryo transfer, including corpus luteum (CL), follicle, plasma progesterone level, plasma estradiol concentration, and recipient status. One hundred and twenty-five crossbred female beef cattle, aged 3 – 6 years, were estrus synchronized. The status and reproductive data from recipients at the day of embryo transfer, were recorded including follicle, corpus luteum diameter and ovary diameter using ultrasound machine, and the recipients were collected blood samples for plasma progesterone and estradiol concentration analysis. All recipients were embryo transferred using direct transfer technique. The results showed average plasma progesterone at the day of embryo transfer in the pregnant group was 6.01 ± 2.06 ng/ml that was significantly higher than those in the non-pregnant group that had the plasma progesterone level at 4.91 ± 2.13 ng/ml ($p < 0.05$). There was weakly positive correlation ($r = 0.204$) between CL diameter and plasma progesterone concentration, and there was moderately negative correlation ($r = -0.453$) between CL diameter and ovary diameter with statistical significance ($p < 0.05$). For the factors that affect pregnancy rate of recipient beef cattle, including recipient status, CL grade, follicle, plasma estradiol concentration and plasma progesterone level at the day of embryo transfer, the results showed that the recipients with CL grade A at the day of embryo transfer had significantly high probability of pregnancy rate than the recipients with CL grade B at 2.56 times ($p < 0.05$). Moreover, the recipients with plasma progesterone level ≥ 5 ng/ml, had significantly higher probability of pregnancy rate than those with plasma progesterone level < 5 ng/ml at 2.51 times ($p < 0.05$). However, there was no effect of recipient status, follicle and plasma estradiol concentration on pregnancy rate of recipient beef cattle at the day of embryo transfer ($p > 0.05$). In conclusion, the CL grade and plasma progesterone level at the day of embryo transfer, were factors that affect the pregnancy rate of recipient beef cattle.

Keywords: embryo transfer, corpus luteum, progesterone, follicle, pregnancy rate

Registered No : 66(2)-0208-023

^{1/} Saraburi Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Muang district, Saraburi province

^{2/} Khon Kaen Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Muang district, Khon Kaen province

คำนำ

เทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนได้ถูกนำมาใช้ในการผลิตโคอย่างยาวนาน (Hasler, 2014) เพื่อเร่งให้เกิดความก้าวหน้าทางพันธุกรรมภายในฝูงโค (Bo et al. 2002) อีกทั้งการย้ายฝากตัวอ่อนในโคสามารถเพิ่มโอกาสในการตั้งท้องได้ เนื่องจากสามารถลดผลกระทบจากความเครียดของสัตว์ที่เกิดจากความร้อน ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อทั้งคุณภาพของไข่และการพัฒนาของตัวอ่อนในระยะแรกได้ (Vasconcelos et al. 2006) โดยในปัจจุบันการย้ายฝากตัวอ่อนโคยังคงมีเทคนิคการปฏิบัติที่ซับซ้อน โดยเฉพาะการใช้ฮอร์โมนและอุปกรณ์ต่างๆ เพื่อเตรียมทั้งโคตัวให้และโคตัวรับ ซึ่งการคัดกรองโคตัวรับสำหรับการย้ายฝากตัวอ่อนมักใช้การตรวจระบบสืบพันธุ์ เช่น การล้างตรวจรังไข่ทางทวารหนักหรือการใช้เครื่องอัลตราซาวด์เพื่อตรวจสอบโครงสร้างของรังไข่ ลักษณะคอร์ปัสลูเทียม และการมีหรือไม่มีฟอลลิเคิล เป็นต้น (Nishigai et al., 2000) โดยการใช้เครื่องอัลตราซาวด์จะช่วยประเมินคุณภาพรังไข่ของโคตัวรับก่อนการย้ายฝากตัวอ่อน ทำให้สามารถคัดกรองโคตัวรับที่มีองค์ประกอบของรังไข่ที่เหมาะสมสำหรับการย้ายฝากตัวอ่อน ซึ่งจะช่วยลดค่าใช้จ่ายจากการสูญเสียอันเนื่องมาจากโคตัวรับ และยังช่วยเพิ่มโอกาสการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนของโคตัวรับได้อีกด้วย (Oshba et al., 2019) แต่อย่างไรก็ตาม การคัดกรองโคตัวรับด้วยวิธีการล้างตรวจรังไข่ทางทวารหนักหรือการใช้เครื่องอัลตราซาวด์ต้องอาศัยความชำนาญของบุคลากร ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการที่ชัดเจนในการคัดกรองโคตัวรับที่มีความเหมาะสมสำหรับการย้ายฝากตัวอ่อน อีกทั้งการย้ายฝากตัวอ่อนมีหลายปัจจัยสำคัญที่ส่งผลกระทบต่อความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อน (Hasler, 2014) ซึ่งการประเมินผลของปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการย้ายฝากตัวอ่อนจะช่วยให้การประเมินหรือคัดกรองโคตัวรับที่อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนได้

สำหรับปัจจัยที่มีผลต่อการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนพบว่า มีหลายปัจจัยที่ส่งผลการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนในโค เช่น คอร์ปัสลูเทียมของโคตัวรับ โดยการศึกษาของ Sunagawa et al. (1987) พบว่าอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนจะสูง หากโคตัวรับมีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสลูเทียมที่มากกว่า 1.5 เซนติเมตร และการศึกษาของ Humbolt et al. (1989) พบว่าโคตัวรับที่มีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสลูเทียมที่มากกว่า 2 เซนติเมตร จะมีอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนมากกว่าโคตัวรับที่มีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสลูเทียมน้อยกว่า 2 เซนติเมตร สำหรับฟอลลิเคิลก็เป็นหนึ่งในปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อน โดยการศึกษาของ Nishigai et al. (2000) พบว่ากลุ่มโคที่พบฟอลลิเคิลที่มีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 1 เซนติเมตรขึ้นไปจะมีอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนน้อยกว่ากลุ่มโคที่พบฟอลลิเคิลที่มีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 1 เซนติเมตร สำหรับฮอร์โมนของโคตัวรับเป็นอีกหนึ่งปัจจัยสำคัญที่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อน ทั้งฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Wallace et al., 2011) และฮอร์โมนเอสตราไดออล (Choi et al., 2021) โดยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่สร้างจากคอร์ปัสลูเทียมในรังไข่ซึ่งเกี่ยวข้องกับวงจรการเป็นสัดในโคและมีความสำคัญในการรักษาสภาพการตั้งท้องในโคด้วย (Rao and Mahesh, 2013) โดยการศึกษาของ Rani et al. (2018) พบว่าในโคที่มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนลดต่ำลงจะทำให้การฝังตัวของตัวอ่อนไม่สมบูรณ์และเกิดการสูญเสียตัวอ่อน และการศึกษาของ Remsen et al. (1980) ที่พบว่ากลุ่มโคตัวรับที่มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในวันย้ายฝากตัวอ่อนที่สูงถึง 5 ng/ml จะมีอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนสูงกว่าในกลุ่ม

โคตัวรับที่มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในวันย้ายฝากตัวอ่อนที่ต่ำกว่า สำหรับฮอร์โมนเอสตราไดโอด เป็นฮอร์โมนที่สร้างจากฟอลลิเคิลที่รังไข่ (Sirois and Fortune, 1990) โดยระดับฮอร์โมนเอสตราไดโอดที่สูงมีความเกี่ยวข้องกับพัฒนาการของตัวอ่อนผิดปกติที่เพิ่มมากขึ้น (Breuel et al., 1993) และระดับฮอร์โมนเอสตราไดโอดที่สูงยังมีความเกี่ยวข้องกับอัตราการฝังตัวของตัวอ่อนที่ต่ำด้วย (Bryner et al., 1990) นอกจากนี้ สถานะของโคตัวรับก็เป็นอีกหนึ่งในปัจจัยที่สำคัญ โดยมีรายงานที่พบว่าโคสาวจะมีอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนสูงกว่าโคนาง (Hasler, 2006; Ferraz et al., 2016)

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้ เพื่อศึกษาผลของคอร์ปัสลูเทียม ฟอลลิเคิล และฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในวันย้ายฝากตัวอ่อนต่ออัตราการตั้งท้องของโคเนื้อตัวรับ รวมทั้งปัจจัยสำคัญอื่นที่เกี่ยวข้องด้วย คือ ฮอร์โมนเอสตราไดโอดและสถานะของโคตัวรับ ที่อาจนำไปใช้ในการประเมินความพร้อมและใช้ในการคัดกรองโคตัวรับที่มีความเหมาะสมสำหรับการย้ายฝากตัวอ่อน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการย้ายฝากตัวอ่อนให้สูงขึ้น

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

โคเนื้อเพศเมียลูกผสมของฟาร์มเกษตรกรจำนวน 8 ฟาร์มในพื้นที่ปศุสัตว์เขตที่ 4 ที่มีระบบการเลี้ยง และการจัดการลักษณะเดียวกัน อายุ 3-6 ปี จำนวน 125 ตัว ที่มีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ มีคะแนนร่างกาย (body condition score) 2.5 – 3 มีระบบสืบพันธุ์ปกติ มีวงรอบการเป็นสัดปกติ ไม่มีภาวะมดลูกอักเสบ และได้รับการฉีดวัคซีนและถ่ายพยาธิตามโปรแกรมของกรมปศุสัตว์

การเหนี่ยวนำการเป็นสัดและการย้ายฝากตัวอ่อน

โคตัวรับทุกตัวถูกเหนี่ยวนำการเป็นสัดและย้ายฝากตัวอ่อน ตามวิธีของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ด้วย CIDR-B® ซึ่งเป็นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอดมีขนาด 1.9 กรัม เป็นเวลา 11 วัน โดยเริ่มสอด CIDR-B® จากวันเริ่มต้น (Day 0) ฉีดฮอร์โมน PGF2α ขนาด 500 ไมโครกรัม เข้ากล้ามเนื้อ ในวันก่อนถอด CIDR-B® 1 วัน (Day 10) และถอด CIDR-B® ใน Day 11 จากนั้นฉีดฮอร์โมน GnRH ขนาด 10 ไมโครกรัม เข้ากล้ามเนื้อ หลังถอด CIDR-B® 3 วัน (Day 14) แล้วทำการย้ายฝากตัวอ่อนให้กับโคที่แสดงอาการเป็นสัดยืนนิ่งใน 7 วัน (Day 21) ที่มีคอร์ปัสลูเทียมที่มีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางที่เหมาะสมในการย้ายฝากตัวอ่อนตามแนวทางการศึกษาของ Nishigai et al. (1998) โดยต้องมีเส้นผ่านศูนย์กลางของคอร์ปัสลูเทียมตั้งแต่ 1.6 เซนติเมตรขึ้นไป และดำเนินการย้ายฝากตัวอ่อนตามคู่มือปฏิบัติงาน กระบวนการย้ายฝากตัวอ่อนโค (สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์, 2556) ด้วยตัวอ่อนแช่แข็ง (Frozen embryo) ที่มีคุณภาพของตัวอ่อนในระดับเดียวกัน โดยวิธี Direct Transfer (Figure 1)

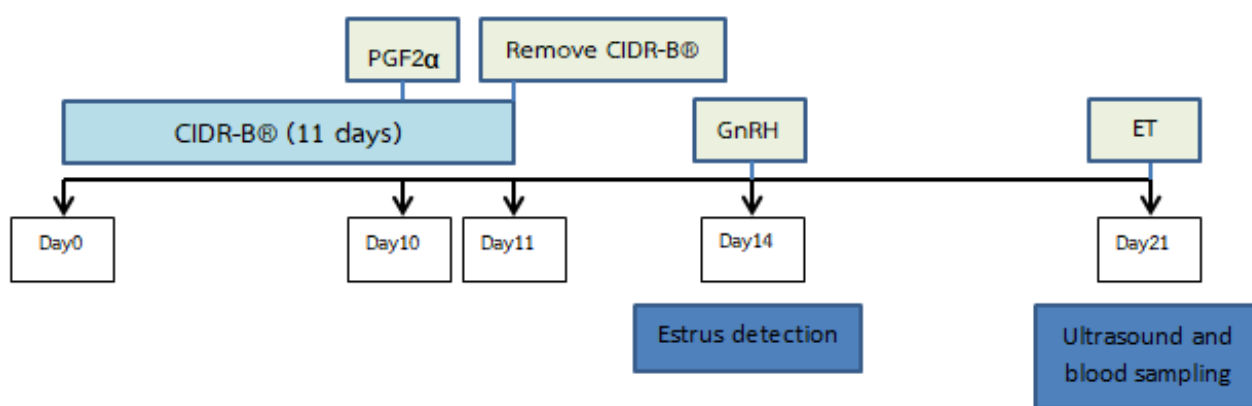


Figure 1. Synchronization protocol for embryo transfer

การตรวจสอบระบบสืบพันธุ์ของโคตัวรับในวันย้ายฝากตัวอ่อน (Day 21)

1) คอรัปัสลูเทียม (CL)

วัดความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอรัปัสลูเทียมและความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางรังไข่ในวันที่ 7 ภายหลังโคแสดงอาการเป็นสัดยืนนิ่ง (Day 21) ด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ (Honda electronics, Japan) ที่ความถี่ 7.5 MHz ทำการจดบันทึกข้อมูลและแบ่งเกรดคอรัปัสลูเทียม โดยใช้แนวทางตามคู่มือปฏิบัติงาน กระบวนการย้ายฝากตัวอ่อนโค (สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์, 2556) ดังนี้

- เกรด A หมายถึง คอรัปัสลูเทียมมีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่าหรือเท่ากับครึ่งหนึ่งของความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางรังไข่ (≥ 0.5 เท่า)
- เกรด B หมายถึง คอรัปัสลูเทียมมีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางรังไข่ (< 0.5 เท่า)

2) ฟอลลิเคิล (follicle)

ตรวจหาฟอลลิเคิลบนรังไข่ทั้งสองข้างโดยเครื่องอัลตราซาวด์ (Honda electronics, Japan) ด้วย linear transducer ความถี่ 7.5 MHz และจดบันทึกข้อมูลโดยแบ่งเป็นกลุ่มโคตัวรับที่พบและไม่พบฟอลลิเคิลที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 1 เซนติเมตร ตามการศึกษาของ Nishigai et al. (2000)

3) การเก็บตัวอย่างเลือดและการตรวจวัดความเข้มข้นฮอร์โมนในเลือด

เก็บตัวอย่างเลือดจากโคนหาง (Coccygeal vein) ของโคเนื้อตัวรับในวันย้ายฝากตัวอ่อน (Day 21) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อตรวจสอบระดับของฮอร์โมนในเลือด

3.1 ความเข้มข้นฮอร์โมนเอสตราไดโอด ด้วยวิธี Enzyme Linked Fluorescence Assay (ELFA) โดยใช้เครื่องตรวจแบบอัตโนมัติ (Vidas principle, France) และชุดทดสอบสำเร็จรูป (Vidas® Estradiol II (E2II), France) และบันทึกผลการตรวจวัดความเข้มข้นฮอร์โมนเอสตราไดโอดในเลือด (pg/ml)

3.2 ความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ด้วยวิธี Enzyme Linked Fluorescence Assay (ELFA) โดยใช้เครื่องตรวจแบบอัตโนมัติ (Vidas principle, France) และชุดทดสอบสำเร็จรูป (Vidas® Progesterone PRG, France) บันทึกผลการตรวจวัดความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือด (ng/ml) และแบ่งระดับความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเป็น 2 ระดับ คือ ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดน้อยกว่า 5 ng/ml

และระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดไม่น้อยกว่า 5 ng/ml ตามแนวทางการศึกษาของ Remsen et al. (1980)

การตรวจการตั้งท้อง

ตรวจการตั้งท้องของโคตัวรับวันที่ 45 ภายหลังทำการฝากตัวอ่อน (Day 66) ด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ (Honda electronics, Japan) โดยใช้ linear transducer ความถี่ 7.5 MHz และจดบันทึกผลการตั้งท้อง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์เปรียบเทียบความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ฮอร์โมนเอสตราไดออล ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสลูเทียมและรังไข่ ในกลุ่มโคตัวรับที่มีการตั้งท้องและกลุ่มโคตัวรับที่ไม่ตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อน โดยใช้ independent samples t-test และวิเคราะห์ความสัมพันธ์จากค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient; r) ระหว่างความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสลูเทียมและรังไข่ ความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือด โดยใช้ Pearson's correlation test รวมทั้งวิเคราะห์ผลของปัจจัยต่ออัตราการตั้งท้องในการศึกษานี้ คือ สถานะของโคตัวรับ เกรดคอร์ปัสลูเทียม ฟอลลิเคิล ความเข้มข้นฮอร์โมนเอสตราไดออลและระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในวันย้ายฝากตัวอ่อน ด้วยการวิเคราะห์ถดถอยโลจิสติก (logistic regression analysis) โดยมีตัวแบบ (model) ในการทดสอบดังต่อไปนี้

$$\ln \left(\frac{P}{1-P} \right) = \beta_0 + \beta_1 E2 + P4_i + Status_j + Grade_k + Follicle_l + \varepsilon$$

เมื่อ

P คือ โอกาสการตั้งท้องเมื่อมีปัจจัยที่เลือกมาศึกษา

1-P คือ โอกาสการไม่ตั้งท้องเมื่อมีปัจจัยที่เลือกมาศึกษา

β_0 คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยคงที่

β_1 คือ ค่าสัมประสิทธิ์การถดถอยของฮอร์โมนเอสตราไดออล

E2 คือ ความเข้มข้นฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือด (pg/ml)

P4_i คือ ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน คือ น้อยกว่า หรือ ไม่น้อยกว่า 5 ng/ml

Status_j คือ สถานะของโคตัวรับ คือ โคอสาว หรือ โคนาง

Grade_k คือ เกรดคอร์ปัสลูเทียม (CL grade) คือ เกรด A หรือ เกรด B

Follicle_l คือ ฟอลลิเคิล คือ ไม่มีฟอลลิเคิล หรือ มีฟอลลิเคิลที่มากกว่า 1 เซนติเมตร

ε คือ ค่าความคลาดเคลื่อน

ทั้งนี้ ในการวิเคราะห์ทางสถิติกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติ (α) เท่ากับ 0.05 โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ R commander version 4.2.0 (R Core Team, 2022)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเปรียบเทียบความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและฮอร์โมนเอสตราไดออล และความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสลูเทียมและรังไข่ในวันย้ายฝากตัวอ่อนของกลุ่มโคตัวรับที่ตั้งท้องและไม่ตั้งท้อง

สำหรับการเปรียบเทียบความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและฮอร์โมนเอสตราไดออล และความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสลูเทียมและรังไข่ในวันย้ายฝากตัวอ่อนของกลุ่มโคตัวรับที่ตั้งท้องและไม่ตั้งท้อง (Table 1) พบว่ากลุ่มโคตัวรับที่ตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อน มีค่าเฉลี่ยของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดเท่ากับ 6.01 ± 2.06 ng/ml ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มโคตัวรับที่ไม่ตั้งท้องโดยมีค่าเฉลี่ยของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในวันย้ายฝากตัวอ่อนเท่ากับ 4.91 ± 2.13 ng/ml โดยสอดคล้องกับรายงานของ Siqueira et al. (2009) ที่ศึกษาความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในวันย้ายฝากตัวอ่อนในโคตัวรับที่พบว่ากลุ่มโคตัวรับที่ตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนมีค่าเฉลี่ยของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดเท่ากับ 5.2 ng/ml ซึ่งสูงกว่ากลุ่มโคตัวรับที่ไม่ตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนที่เท่ากับ 3.8 ng/ml อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้ อาจเนื่องมาจากฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเป็นฮอร์โมนสำคัญที่รักษาสภาพการตั้งท้อง (Rao and Mahesh, 2013) ช่วยทำให้มดลูกมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อตัวอ่อน และยังช่วยลดการบีบตัวของกล้ามเนื้อมดลูก (myometrial contraction) ด้วย (Spencer et al., 2004) จึงทำให้พบว่ากลุ่มโคตัวรับที่ตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนมีค่าเฉลี่ยของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในวันย้ายฝากตัวอ่อนสูงกว่ากลุ่มโคตัวรับที่ไม่ตั้งท้อง สำหรับค่าเฉลี่ยของฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดในวันย้ายฝากตัวอ่อนของกลุ่มโคตัวรับที่ตั้งท้องอยู่ที่ 13.75 ± 4.20 pg/ml และกลุ่มโคตัวรับที่ไม่ตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนอยู่ที่ 15.29 ± 5.83 pg/ml ซึ่งพบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งจากผลการศึกษาในครั้งนี้ อาจเนื่องมาจากโคตัวรับในช่วงของการย้ายฝากตัวอ่อนจะอยู่ในระยะ luteal phase ที่จะมีอิทธิพลของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ทำให้การหลั่งฮอร์โมน gonadotropin-releasing hormone (GnRH) ลดลง และส่งผลให้การหลั่งฮอร์โมน luteinizing hormone (LH) ลดลงด้วย (Badinga et al., 1992) ซึ่งอาจเป็นผลให้ฮอร์โมนเอสตราไดออลไม่แตกต่างกันในกลุ่มโคตัวรับที่ตั้งท้องและไม่ตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อน สำหรับการเปรียบเทียบความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสลูเทียมในวันย้ายฝากตัวอ่อนของกลุ่มโคตัวรับที่ตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.74 ± 0.14 เซนติเมตร และกลุ่มโคตัวรับที่ไม่ตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.70 ± 0.13 เซนติเมตร ซึ่งพบว่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Erkan et al. (2021) ที่พบว่าความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสลูเทียมในกลุ่มโคที่ตั้งท้องและไม่ตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนไม่แตกต่างกันทางสถิติ ทั้งนี้ จากการศึกษาในครั้งนี้มีการใช้โคตัวรับที่มีคอร์ปัสลูเทียมความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 1.6 เซนติเมตรในการย้ายฝากตัวอ่อน ซึ่งเป็นคอร์ปัสลูเทียมที่มีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางที่เหมาะสมในการย้ายฝากตัวอ่อน (Nishigai et al., 1998) จึงอาจเป็นผลให้การเปรียบเทียบความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสลูเทียมในวันย้ายฝากตัวอ่อนของกลุ่มโคตัวรับที่ตั้งท้องและไม่ตั้งท้องพบว่าไม่แตกต่างกัน สำหรับความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางรังไข่ในวันย้ายฝากตัวอ่อนของกลุ่มโคตัวรับที่ตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 2.98 ± 0.49 เซนติเมตร ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มโคตัวรับที่ไม่ตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 3.24 ± 0.48

เซนติเมตร โดยการศึกษาในครั้งนี้มีการใช้โคตัวรับที่มีวงรอบการเป็นสัดที่ปกติ ซึ่งโคตัวรับที่มีความสมบูรณ์ของรังไข่และมีการทำงานของรังไข่ที่เป็นปกติจะมีวงรอบการเป็นสัดที่ปกติด้วย จึงอาจเป็นผลให้การเปรียบเทียบความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางรังไข่ในวันย้ายฝากตัวอ่อนของกลุ่มโคตัวรับที่ตั้งท้องและไม่ตั้งท้องพบว่าไม่แตกต่างกัน

Table 1. Plasma progesterone concentration, plasma estradiol concentration and corpus luteum diameter from non-pregnant and pregnant groups (Mean $\pm$ S.D.)

Parameters	Non-pregnant group (N= 84)	Pregnant group (N= 41)	p-value
Progesterone concentration (ng/ml)	4.91 $\pm$ 2.13	6.01 $\pm$ 2.06	0.01
Estradiol concentration (pg/ml)	15.29 $\pm$ 5.83	13.57 $\pm$ 4.20	0.07
Corpus luteum diameter (cm)	1.70 $\pm$ 0.13	1.74 $\pm$ 0.14	0.12
Ovary diameter (cm)	3.24 $\pm$ 0.48	2.98 $\pm$ 0.49	0.06

2. ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสลูเทียมและรังไข่ ความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและฮอร์โมนเอสตราไดโอลในเลือด

สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสลูเทียมและรังไข่ ความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน และฮอร์โมนเอสตราไดโอลในเลือด (Table 2) พบว่าความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสลูเทียมมีความสัมพันธ์เชิงบวกในระดับต่ำอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r=0.204$, $p<0.05$) กับความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือด โดยการศึกษาในครั้งนี้พบความสัมพันธ์เชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญ อาจเนื่องมาจากคอร์ปัสลูเทียมในรังไข่เป็นส่วนที่สร้างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ซึ่งทำให้พบว่าความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสลูเทียมที่มากขึ้นจะทำให้พบระดับความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดที่สูงขึ้นด้วย โดยสอดคล้องกับการศึกษาของ Rocha et al. (2019) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดและความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสลูเทียม พบว่าความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดและความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสลูเทียมมีความสัมพันธ์เชิงบวก ($r=0.46$) อย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ การศึกษาครั้งนี้พบความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสลูเทียมมีความสัมพันธ์เชิงลบในระดับปานกลางอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r=-0.453$, $p<0.05$) กับความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางรังไข่ ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้พบความสัมพันธ์เชิงลบอย่างมีนัยสำคัญ อาจเนื่องมาจากคอร์ปัสลูเทียมเป็นส่วนหนึ่งที่อยู่ในรังไข่ โดยขนาดคอร์ปัสลูเทียมที่มากขึ้นจึงทำให้สัดส่วนของรังไข่มีขนาดที่น้อยลง ซึ่งความสัมพันธ์ของความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสลูเทียมและรังไข่ดังกล่าวสอดคล้องกับแนวทางการปฏิบัติงานตามคู่มือปฏิบัติงานกระบวนการย้ายฝากตัวอ่อนโค (สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์, 2556) ที่ใช้วิธีการแบ่งเกรดคอร์ปัสลูเทียมตามสัดส่วนของความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสลูเทียมเปรียบเทียบกับความยาวเส้นผ่าน

ศูนย์กลางรังไข่ เพื่อใช้คัดกรองโคตัวรับในการย้ายฝากตัวอ่อน ทั้งนี้ การศึกษาในครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ระหว่างความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสลูเทียมและความเข้มข้นฮอร์โมนเอสตราไดโอลในเลือด ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางรังไข่และความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือด ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางรังไข่และความเข้มข้นฮอร์โมนเอสตราไดโอลในเลือด และความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและฮอร์โมนเอสตราไดโอลในเลือด

Table 2. Correlation coefficient (r) between CL diameter, ovary diameter, plasma progesterone concentration, and plasma estradiol concentration (n=125)

3. ผลของปัจจัยต่ออัตราการตั้งครรภ์ของโคเนื้อตัวรับในวันย้ายฝากตัวอ่อน

สำหรับปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับอัตราการตั้งครรภ์ของโคเนื้อตัวรับในวันการย้ายฝากตัวอ่อน พบว่าเกรดคอร์ปัสลูเทียมและระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือด เป็นปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการตั้งครรภ์ของโคเนื้อ

Parameters	r	p-value
CL diameter and plasma progesterone concentration	0.204	0.02
CL diameter and plasma estradiol concentration	-0.156	0.08
CL diameter and ovary diameter	-0.453	0.02
Ovary diameter and plasma progesterone concentration	-0.175	0.06
Ovary diameter and plasma estradiol concentration	0.014	0.88
Plasma progesterone and estradiol concentration	-0.048	0.59

ตัวรับในวันย้ายฝากตัวอ่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในขณะที่ปัจจัยด้านสถานะของโคตัวรับฟอลลิเคิล และความเข้มข้นฮอร์โมนเอสตราไดโอลในเลือดในวันย้ายฝากตัวอ่อน พบว่าไม่มีผลต่ออัตราการตั้งครรภ์ของโคเนื้อตัวรับในวันย้ายฝากตัวอ่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

Table 3. Odds ratio of the factors on pregnancy rate

Factors	N	N _p	Pregnancy rate (%)	OR	95% CI	p-value
Recipient status						
Heifer	62	22	35.48	1.35	0.59 - 3.06	0.47
Cow	63	19	30.16	Reference	-	-
CL grade						
Grade A	82	33	40.24	2.56	1.04 - 6.83	0.04
Grade B	43	8	18.60	Reference	-	-

Follicle							
Absence	34	13	38.24	Reference	-	-	
Presence	91	28	30.77	0.59	0.22 - 1.50	0.26	
Estradiol concentration				0.94	0.85 - 1.02	0.15	
Progesterone level							
≥ 5 ng/ml	63	27	42.86	2.51	1.09 - 5.98	0.04	
< 5 ng/ml	62	14	22.58	Reference	-	-	

N = Number of recipients

N_p = Number of pregnant recipients

Pregnancy rate = (n/N) × 100

OR = Odds ratio

95% CI = 95% Confidence interval

สำหรับปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับอัตราการตั้งท้องของโคเนื้อตัวรับในวันย้ายฝากตัวอ่อน (Table 3) เมื่อพิจารณาจากค่า odds ratio พบว่าปัจจัยด้านสถานะของโคตัวรับ ไม่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องทั้งในโคตัวรับที่เป็นโคสาวหรือโคนางอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกันกับการศึกษาของ Hasler (2001) ที่พบว่าอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งในโคเนื้อตัวรับที่เป็นโคสาวอยู่ที่ร้อยละ 65.9 ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับในโคนางที่ร้อยละ 68.6 และสอดคล้องกับการศึกษาของ Dochi et al. (2008) ที่พบว่าอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนไม่มีความแตกต่างกันในโคสาวและโคนาง และเป็นไปในทางเดียวกันกับการศึกษาของ Ono et al. (2016) ในโคเนื้อตัวรับสายพันธุ์ Japanese black ที่พบอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนในโคสาวและโคนางอยู่ที่ร้อยละ 32.9 และ 30.8 ตามลำดับ แต่พบว่าปัจจัยด้านสถานะของโคตัวรับดังกล่าวไม่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้มีการใช้โคสาวและโคนางที่มีคะแนนร่างกายที่เหมาะสม มีสุขภาพร่างกายและระบบสืบพันธุ์ที่ดี รวมทั้งมีวงจรการเป็นสัดปกติ ซึ่งอาจเป็นผลให้สถานะของตัวรับโคตัวรับที่เป็นโคสาวและโคนางไม่ส่งผลต่ออัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนอย่างมีนัยสำคัญ

สำหรับปัจจัยด้านเกรดคอร์ปัสลูเทียมในวันย้ายฝากตัวอ่อน เมื่อพิจารณาจากค่า odds ratio พบว่าปัจจัยด้านเกรดคอร์ปัสลูเทียมมีผลต่ออัตราตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนของโคตัวรับอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยพบว่าโคตัวรับที่มี คอร์ปัสลูเทียมเกรด A ในวันย้ายฝากตัวอ่อนจะมีโอกาสตั้งท้องมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับโคตัวรับที่มีคอร์ปัสลูเทียมเกรด B ในวันย้ายฝากตัวอ่อนถึง 2.56 เท่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยการศึกษาในครั้งนี้ได้ใช้แนวทางการแบ่งเกรดคอร์ปัสลูเทียมตามคู่มือปฏิบัติงาน กระบวนการย้ายฝากตัวอ่อนโค (สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์, 2556) ที่มีการใช้สัดส่วนของความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสลูเทียมเปรียบเทียบกับความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางรังไข่ ซึ่งการที่มีคอร์ปัสลูเทียมขนาดใหญ่กว่าเมื่อเปรียบเทียบกับรังไข่นั้น อาจเป็นคอร์ปัสลูเทียมคุณภาพดีที่สามารถสร้างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่มี

ความสำคัญต่อการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนได้มากกว่าและส่งผลให้มีโอกาสที่จะตั้งท้องเพิ่มขึ้นจากการย้ายฝากตัวอ่อน

สำหรับปัจจัยด้านฟอลลิเคิลในวันย้ายฝากตัวอ่อน เมื่อพิจารณาจากค่า odds ratio พบว่าการมีหรือไม่มีฟอลลิเคิลที่มีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 1 เซนติเมตรบนรังไข่ในวันนั้น ไม่ส่งผลต่ออัตราการตั้งท้องของโคตัวรับจากการย้ายฝากตัวอ่อนอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) โดยเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับการศึกษาของ Niemann et al. (1985) ที่รายงานว่า การมีฟอลลิคูลขนาดใหญ่ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 – 2 เซนติเมตร ไม่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ โคตัวรับที่พบฟอลลิเคิลที่มีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 1 เซนติเมตรซึ่งเป็นฟอลลิเคิลที่มีขนาดใหญ่ นั้น แม้ว่าฟอลลิเคิลเป็นแหล่งสร้างฮอร์โมนเอสตราไดออล (Sirois and Fortune, 1990) และพบว่าระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลในวันย้ายฝากตัวอ่อนที่สูงมีความเกี่ยวข้องกับอัตราการฝังตัวของตัวอ่อนที่ต่ำ (Bryner et al., 1990) แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาของ Badinga et al. (1992) พบว่าขนาดของฟอลลิเคิลไม่สัมพันธ์กับปริมาณของฮอร์โมนเอสตราไดออล ดังนั้นจากการศึกษาในครั้งนี้ โคตัวรับที่มีฟอลลิเคิลที่มีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 1 เซนติเมตร แต่การสร้างฮอร์โมนเอสตราไดออลจากฟอลลิเคิลอาจมีปริมาณไม่สูงพอที่จะมีผลต่อการฝังตัวของตัวอ่อนในมดลูก ซึ่งทำให้การมีหรือไม่มีฟอลลิเคิลที่มีความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 1 เซนติเมตรนั้น ไม่ส่งผลต่ออัตราการตั้งท้องของโคตัวรับจากการย้ายฝากตัวอ่อน

สำหรับปัจจัยความเข้มข้นฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดในวันย้ายฝากตัวอ่อน เมื่อพิจารณาจากค่า odds ratio พบว่าไม่ส่งผลต่ออัตราการตั้งท้องของโคตัวรับจากการย้ายฝากตัวอ่อนอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) โดยแตกต่างกับรายงานการศึกษาของ Nishigai et al. (2000) ที่พบว่าอัตราการตั้งท้องของโคเนื้อตัวรับจะสูง หากระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลในวันย้ายฝากตัวอ่อนมีระดับต่ำ ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้มีความแตกต่างกับการศึกษาของ Nishigai et al. (2000) อาจเนื่องมาจากการใช้กลุ่มโคตัวรับที่แตกต่างกันและมีการควบคุมปัจจัยที่แตกต่างกัน จึงทำให้พบว่าผลของฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดต่ออัตราการตั้งท้องของโคตัวรับในวันย้ายฝากตัวอ่อนมีความแตกต่างกันด้วย นอกจากนี้ในวันย้ายฝากตัวอ่อนจะเป็นระยะ luteal phase ซึ่งจะมีอิทธิพลของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ส่งผลให้การหลั่งฮอร์โมน GnRH ลดลง และทำให้การหลั่งฮอร์โมน LH ลดลงด้วย ซึ่งเป็นผลให้ระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลไม่สูง จึงไม่มีผลต่อมดลูกในการฝังตัวของตัวอ่อน (Badinga et al., 1992) และการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าปัจจัยความเข้มข้นฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดในวันย้ายฝากตัวอ่อน ไม่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องของโคตัวรับ อาจเกิดจากอิทธิพลของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่มีผลต่อมดลูกมากกว่าฮอร์โมนเอสตราไดออลในระยะ luteal phase โดยการศึกษาของ Koligian and Stormshak (1977) รายงานว่า ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเป็นฮอร์โมนสำคัญที่ไปขัดขวางการเพิ่มขึ้นของตัวรับฮอร์โมนเอสตราไดออล (estradiol receptors) ที่เยื่อที่ผนังชั้นในของมดลูก (uterine endometrium) ซึ่งอาจทำให้การศึกษานี้พบว่าฮอร์โมนเอสตราไดออลในเลือดในวันย้ายฝากตัวอ่อนไม่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องของโคตัวรับ

สำหรับปัจจัยของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในวันย้ายฝากตัวอ่อน เมื่อพิจารณาจากค่า odds ratio พบว่าโคตัวรับที่มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนไม่ต่ำกว่า 5 ng/ml จะมีโอกาสตั้งท้องมากกว่าโคตัวรับที่มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่น้อยกว่า 5 ng/ml ถึง 2.51 เท่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Remsen et al. (1980) ที่ศึกษาอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนในโคสาวตัวรับ ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างระดับความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในวันย้ายฝากตัวอ่อนและอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อน โดยพบว่าหากมีระดับความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดที่ต่ำกว่า 2 ng/ml จะมีอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนที่ประมาณร้อยละ 20 แต่หากมีระดับความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดที่ 2 – 5 ng/ml จะมีอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 74 และสอดคล้องกับการศึกษาของ Ahmed et al. (2020) ที่พบว่าอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนในกลุ่มโคสาวตัวรับที่มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในวันย้ายฝากตัวอ่อนที่มากกว่า 6.6 ng/ml อยู่ที่ร้อยละ 79.5 ซึ่งมากกว่าอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนในกลุ่มโคสาวตัวรับที่มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในวันย้ายฝากตัวอ่อนที่น้อยกว่า 6.6 ng/ml ที่ร้อยละ 55.4 อย่างมีนัยสำคัญ และเป็นไปในแนวทางเดียวกับกับการศึกษาของ Murakonda and Uma (2013) ในโคที่พบวาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในวันที่แสดงอาการเป็นสัดยืนนิ่ง (standing estrus) นั้นไม่แตกต่างกัน แต่ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในวันย้ายฝากตัวอ่อนภายหลังการแสดงอาการเป็นสัดยืนนิ่งแล้ว 7 วันนั้น พบว่ากลุ่มโคที่ตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนมีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดสูงกว่ากลุ่มโคที่ไม่ตั้งท้อง นอกจากนี้ ยังมีรายงานการศึกษาที่มีการให้ฮอร์โมน eCG เพื่อให้มีการเพิ่มระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในการย้ายฝากตัวอ่อนด้วย เช่น รายงานของ Bo et al. (2002) ที่ทำการศึกษาย้ายฝากตัวอ่อนในโคตัวรับ โดยมีการให้ฮอร์โมน eCG เพื่อเพิ่มจำนวนการตกไข่และทำให้เพิ่มจำนวนของคอร์ปัสลูเทียมที่เป็นผลให้ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดสูงขึ้น และเป็นผลให้อัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนสูงขึ้น และการศึกษาของ Baruselli et al. (2001) ที่พบว่าการให้ฮอร์โมน eCG ในช่วง 4 วันก่อนการเป็นสัด จะทำให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือด ซึ่งทำให้มีอัตราการตั้งท้องในโคตัวรับเพิ่มสูงขึ้น และรายงานการศึกษาของ Binelli et al. (2001) ที่มีการให้ฮอร์โมน eCG ขนาด 800 IU ในกลุ่มโคสาวตัวรับ ซึ่งพบว่ามีผลให้ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในโคตัวรับในช่วงหนึ่งวันก่อนการย้ายฝากตัวอ่อนสูงกว่าระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนของกลุ่มโคสาวตัวรับที่ไม่ได้รับฮอร์โมนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และยังพบว่ากลุ่มโคสาวตัวรับที่มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดที่สูงกว่านี้ มีอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ และเป็นไปในแนวทางเดียวกันกับการศึกษาของ Wallace et al. (2011) ในโคเนื้อตัวรับที่มีการให้ฮอร์โมน eCG ในวันย้ายฝากตัวอ่อน ที่ทำให้พบจำนวนคอร์ปัสลูเทียมเพิ่มขึ้น มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดสูงขึ้น และมีอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนที่สูงขึ้น โดยจากค่า odds ratio พบมีโอกาสการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนของโคตัวรับที่ได้รับฮอร์โมนมีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับฮอร์โมนถึง 1.4 เท่าอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจากรายงานการศึกษาข้างต้นนี้ แสดงให้เห็นว่าระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดที่สูงมีความเกี่ยวข้องกับอัตราการย้ายฝากตัวอ่อนที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งจากผลการศึกษาของคณะผู้วิจัยในครั้งนี้ การพบวากลุ่มโคตัวรับที่มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดที่มากกว่าหรือเท่ากับ 5 ng/ml ในวันย้ายฝากตัวอ่อนจะมีอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนที่สูงกว่านั้น อาจเป็นผลเนื่องจากฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนช่วยลดการบีบตัวของกล้ามเนื้อมดลูก และยังช่วยทำให้มดลูกมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อตัวอ่อนอีกด้วย (Spencer et al., 2004) ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจึงส่งผลต่อการสูญเสียตัวอ่อนโดย Walton and Stubbings (1986) ได้รายงานว่า ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ต่ำเป็นสาเหตุหลัก

ของการตายของตัวอ่อนในระยะแรก (early embryonic mortality) แต่อย่างไรก็ตาม พบว่ามีรายงานที่ให้ผลการศึกษาที่แตกต่างกันด้วย เช่น จากรายงานการศึกษาในโคตัวรับที่พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในวันย้ายฝากตัวอ่อนของกลุ่มโคตัวรับที่ตั้งท้องและไม่ตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อน (Hasler et al. 1980; Spell et al. 2001) โดยในการศึกษาของ Hasler et al. (1980) พบว่าโคตัวรับสามารถตั้งท้องได้โดยที่มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดที่ต่ำกว่า 0.2 ng/ml ในวันย้ายฝากตัวอ่อน ส่วนการศึกษาของ Spell et al. (2001) พบว่าโคตัวรับสามารถตั้งท้องได้แม้มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดที่ต่ำกว่า 0.58 ng/ml ทั้งนี้ ผลของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในวันย้ายฝากตัวอ่อนต่ออัตราการตั้งท้องที่แตกต่างกันจากการศึกษาต่าง ๆ นั้น อาจเกิดจากการที่ในแต่ละการศึกษา มีการควบคุมตัวแปรที่แตกต่างกัน เช่น อายุโค สถานะของโค คุณภาพตัวอ่อน และการใช้ฮอร์โมนเหนี่ยวนำในโปรแกรมการย้ายฝากตัวอ่อนที่แตกต่างกัน เป็นต้น ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้ควบคุมตัวแปรเช่น ชนิดตัวอ่อนและคุณภาพตัวอ่อนเป็นต้น โดยพิจารณาจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องคือ สถานะของโคตัวรับ เกรดคอร์ปัสลูเทียม ฟอลลิเคิล ความเข้มข้นฮอร์โมนเอสตราไดโอดและระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในวันย้ายฝากตัวอ่อนเท่านั้น ซึ่งพบว่าเกรดคอร์ปัสลูเทียมและระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในวันย้ายฝากตัวอ่อนเป็นปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องของโคเนื้อตัวรับจากการย้ายฝากตัวอ่อน

สรุปผลการทดลอง

1. โคตัวรับที่ตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนมีค่าเฉลี่ยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดสูงกว่าโคตัวรับที่ไม่ตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อน
2. ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสลูเทียมมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือด รวมทั้งพบว่าความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางคอร์ปัสลูเทียมมีความสัมพันธ์เชิงลบกับความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางรังไข่
3. เกรดคอร์ปัสลูเทียมและระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดในวันย้ายฝากตัวอ่อน เป็นปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องของโคเนื้อตัวรับในวันย้ายฝากตัวอ่อน ขณะที่ปัจจัยด้านสถานะของโคตัวรับ ฟอลลิเคิล และความเข้มข้นฮอร์โมนเอสตราไดโอดในเลือดนั้น ไม่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องของโคเนื้อตัวรับในวันย้ายฝากตัวอ่อน

ข้อเสนอแนะ

การเลือกโคตัวรับที่มีคอร์ปัสลูเทียมเกรด A และมีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนไม่ต่ำกว่า 5 ng/ml ในวันย้ายฝากตัวอ่อน อาจเป็นแนวทางที่ใช้ในการประเมินหรือคัดกรองโคเนื้อตัวรับที่จะใช้ย้ายฝากตัวอ่อนได้ รวมทั้งสามารถนำไปใช้ในการวางแผนการจัดการในโคตัวรับที่ตั้งท้องได้อย่างมีประสิทธิภาพ แต่อย่างไรก็ตาม การตรวจความเข้มข้นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในภาคสนามอาจต้องมีการใช้เครื่องมือทางห้องปฏิบัติการและเทคนิคเฉพาะ ดังนั้น การลดข้อจำกัดทางด้านเครื่องมือในการตรวจระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน

เตอโรน โดยการพัฒนาอุปกรณ์หรือการใช้ชุดตรวจ (test kit) จะช่วยให้สามารถปฏิบัติงานได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้อำนวยการศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพขอนแก่น และเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพขอนแก่นที่ให้การช่วยเหลือและสนับสนุนให้สามารถดำเนินการวิจัยเป็นไปตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

- สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์. 2556. คู่มือปฏิบัติงาน กระบวนการย้ายฝากตัวอ่อนโค ม.ป.ท.
- Ahmed, M., G. Tamer, A. Emad, Z. Ahmed and E. Hamed. 2020. Factors affecting pregnancy rate per embryo transfer of in vivo produced embryos in recipient Holstein heifers. *Journal of Current Veterinary Research*. 2(2):61-70.
- Badinga, L., M.A. Driancourt, J.D. Savio, D. Wolfenson, M. Drost, R.L. Sota and W.W. Thatcher. 1992. Endocrine and ovarian responses associated with the first-wave dominant follicle in cattle. *Biology of reproduction*. 47(5):871-883.
- Baruselli, P., M.O. Marques, E.H. Madureira, W.P.N. Costa, R.R. Grandinetti and G.A. Bo. 2001. Increased pregnancy rates in embryo recipients treated with CIDR-B devices. *Theriogenology*. 55:355.
- Binelli, M., W.W. Thatcher, R. Mattos and P.S. Baruselli. 2001. Antiluteolytic strategies to improve fertility in cattle. *Theriogenology*. 56:1451-1463.
- Bo, G.A., P.S. Baruselli, D. Moreno, L. Cutaia, M. Caccia, R. Tribulo, H. Tribulo and R.J. Mapletoft. 2002. The control of follicular wave development for self-appointed embryo transfer programs in cattle. *Theriogenology*. 57(1):53-72.
- Breuel, K.F., P.E. Lewis, F.N. Schrick, A.W. Lishman, E.K. Inskeep and R.L. Butcher. 1993. Factors affecting fertility in the postpartum cow: Role of the oocyte and follicle in conception rate. *Biology of Reproduction*. 48(3):655-661.
- Bryner, R.W., M. Garcia-Winder, P.E. Lewis, E.K., Inskeep and R.L. Butcher. 1990. Changes in hormonal profiles during the estrous cycle in old lactating beef cows. *Domestic animal endocrinology*. 7(2):181-189.
- Choi, L., C. Bowers, A. Liu, B. Pier and G. Levy. 2021. Elevated Serum Estradiol Levels Do Not Inhibit Implantation During Frozen Embryo Transfer Cycles. *Reproductive sciences*. 28(10):2855-2860.

- Dochi, O., K. Takahashi, T. Hirai, H. Hayakawa, M. Tanisawa, Y. Yamamoto and H. Koyama. 2008. The use of embryo transfer to produce pregnancies in repeat-breeding dairy cattle. *Theriogenology*. 69(1):124-128.
- Erkan, S., O. Mehmet and S. Hakan. 2021. The influence of corpus luteum size on the conception in embryo transfer recipient cows. *Livestock Studies*. 61(2):77-81.
- Ferraz, P.A., C. Burnley, J. Karanja, A. Viera-Neto, J.E. Santos, R.C. Chebel and K.N. Galvão. 2016. Factors affecting the success of a large embryo transfer program in Holstein cattle in a commercial herd in the southeast region of the United States. *Theriogenology*. 86(7):1834-1841.
- Hasler, J.F., R.A. Bowen, L.D. Nelson and G.E. Seidel. 1980. Serum progesterone concentrations in cows receiving embryo transfers. *Journal of reproduction and fertility*. 58(1):71-77.
- Hasler, J.F. 2001. Factors affecting frozen and fresh embryo transfer pregnancy rates in cattle. *Theriogenology*. 56(9):1401-1415.
- Hasler, J.F. 2006. The Holstein cow in embryo transfer today as compared to 20 years ago. *Theriogenology*. 65(1):4-16.
- Hasler, J.F. 2014. Forty years of embryo transfer in cattle: a review focusing on the journal *Theriogenology*, the growth of the industry in North America, and personal reminisces. *Theriogenology*. 81(1):152-169.
- Humbolt, P., J. Perrin, N. Jeanguyot, M. Nibert and M. Thiber. 1989. Effects of age and quality of thawed embryos, synchronization and corpus luteum function on pregnancy rates of bovine embryo recipients. *Theriogenology*. 27:240.
- Koligian, K.B. and F. Stormshak. 1977. Progesterone inhibition of estrogen receptor replenishment in ovine endometrium. *Biology of Reproduction*. 17(3):412-416.
- Murakonda, R. and Y.M. Uma. 2013. Progesterone Profile in Embryo Transfer Recipient Cows. *The Indian veterinary journal*. 90(1):59-60.
- Niemann, H., B. Sacher and F. Elsasser. 1985. Pregnancy rates relative to recipient plasma progesterone levels on the day of nonsurgical transfer of frozen thawed bovine embryo. *Theriogenology*. 23:631-639.
- Nishigai, M., H. Kamomae, T. Tanaka and Y. Kaneda. 1998. Pregnancy rate and blood progesterone concentrations on the previous day and the day of frozen embryo transfer in parous recipient cows of Japanese black. *Journal of Reproduction and Development*. 44(4):413-419.
- Nishigai, M., H. Kamomae, T. Tanaka and Y. Kaneda. 2000. The Relationship of Blood

- Progesterone and Estrogen Concentrations on the Day Before and the Day of Frozen-Thawed Embryo Transfer to Pregnancy Rate in Japanese Black Beef Cattle. *Journal of Reproduction and Development*. 46(4):235-243.
- Rani, P., R. Dutt, G. Singh and R.K. Chandolia. 2018. Embryonic mortality in cattle – a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 7(7):1501-1516.
- Rao, M. and Y.U. Mahesh. 2013. Progesterone Profile in Embryo Transfer Recipient Cows. *The Indian veterinary journal*. 90(1):59-60.
- R Core Team. 2022. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Remsen, L.G., J.D. Roussel and A.K. Karihaloo. 1980. Pregnancy rates relating to plasma progesterone levels in recipient heifers at the day of transfer. *Theriogenology*. 18:365-372.
- Rocha, C.C., T. Martins, B.O. Cardoso, L.A. Silva, M. Binelli and G. Pugliesi. 2019. Ultrasonography-accessed luteal size endpoint that most closely associates with circulating progesterone during the estrous cycle and early pregnancy in beef cows. *Animal reproduction science*. 201:12–21.
- Ono, T., T. Isobe, Y. Morita, L.T.K. Do, F. Tanihara, M. Taniguchi, M. Takagi and T. Otoi. 2016. Effects of parity and season on pregnancy rates after the transfer of embryos to repeat-breeder Japanese Black beef cattle. *Arch Anim Breed*. 59(1):45-49.
- Oshba, M.R., G. Sosa, M. Nossier, M. Fadel and M.E. Raey. 2019. The effect of recipient Holstein heifers' corpus luteum type, diameter and secretory potential on their pregnancy rate during routine ET program in Egypt. *Benha Veterinary Medical Journal*. 36(1): 77-87.
- Siqueira, L.G.B., C.A.A. Torres, E.D. Souza, P.L.J. Monteiro, E.K.N. Arashiro, L.S.A. Camargo, C.A.C. Fernandes and J.H.M. Viana. 2009. Pregnancy rates and corpus luteum-related factors affecting pregnancy establishment in bovine recipients synchronized for fixed-time embryo transfer. *Theriogenology*. 72(7):949-958.
- Sirois, J. and J.E. Fortune. 1990. Lengthening the bovine estrous cycle with low levels of exogenous progesterone: a model for studying ovarian follicular dominance. *Endocrinology*. 127(2):916–925.
- Spell, A.R., W.E. Beal, L.R. Corah and G.C. Lamb. 2001. Evaluating recipient and embryo factors that affect pregnancy rates of embryo transfer in beef cattle. *Theriogenology*. 56(2):287–297.
- Spencer, T.E., G.A. Johnson, R.C. Burghardt and F.W. Bazer. 2004. Progesterone and placental hormone actions on the uterus: Insights from domestic animals. *Biol Reprod*. 71:2-10.

- Sunagawa, M., T. Kasahara, R. Tsunoda and S. Ohtsu. 1987. Morphological investigation of corpus luteum and plasma progesterone levels in bovine recipients. *Japanese Journal Animal Reproduction*. 33:206-208.
- Vasconcelos, J.L., D.G. Demétrio, R.M. Santos, J.R. Chiari, C.A. Rodrigues and O.G. Sá Filho. 2006. Factors potentially affecting fertility of lactating dairy cow recipients. *Theriogenology*. 65(1):192–200.
- Wallace, L.D., C.A. Breiner, R.A. Breiner, A.R. Spell, J.A. Carter, G.C. Lamb and J.S. Stevenson. 2011. Administration of human chorionic gonadotropin at embryo transfer induced ovulation of a first wave dominant follicle, and increased progesterone and transfer pregnancy rates. *Theriogenology*. 75(8):1506–1515.
- Walton, J.S. and R.B. Stubbings. 1986. Factors affecting the yield of viable embryos by superovulated Holstein-Friesian cows. *Theriogenology*. 26(2):167-177.

การพัฒนาแอปพลิเคชันสำหรับการจัดการฟาร์มโคนม iFarmer Plus

मुखसदा เรืองกรี^{1/} ชาคริต บุตรรักษ์^{2/}

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาแอปพลิเคชัน iFarmer Plus สำหรับการจัดการฟาร์มโคนมบนระบบปฏิบัติการแอนดรอยด์และไอโอเอส และพัฒนาระบบแจ้งเตือนเหตุการณ์สำคัญในฟาร์ม โดยแอปพลิเคชันถูกออกแบบให้ประกอบด้วย 4 เมนูหลัก ได้แก่ เมนูข้อมูลโค ข้อมูลการผลิต ข้อมูลระบบสืบพันธุ์ ข้อมูลรายงานและระบบแจ้งเตือน ซึ่งข้อมูลฟาร์มและข้อมูลโคที่แสดงในแอปพลิเคชันจะเชื่อมโยงกับระบบฐานข้อมูลโคนมของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ผู้ใช้งานสามารถดูข้อมูลโคในฟาร์มและเพิ่มกิจกรรมต่างๆของโคได้ ได้แก่ การผสมเทียม ตรวจท้อง พักท้อง คลอด คัดโคออกจากฟาร์ม ปริมาณน้ำนมรายวัน ข้อมูลการป่วยการรักษา และพัฒนาให้สามารถแจ้งเตือนกิจกรรมที่สำคัญต่อการจัดการฟาร์ม เช่น สังเกตการกลับสัดหลังผสม ควบคุมกำหนดตรวจท้อง ควบคุมกำหนดแท้งนม ควบคุมกำหนดคลอด เป็นต้น จากนั้นดำเนินการทดสอบการใช้งานในฟาร์มเกษตรกร โครงการผลิตพ่อพันธุ์โคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ จำนวน 80 ฟาร์ม และเปิดรับความคิดเห็นหลังการใช้งานเพื่อพัฒนาปรับปรุงแอปพลิเคชัน จากนั้นเปรียบเทียบค่าดัชนีประสิทธิภาพระบบสืบพันธุ์ก่อนและหลังการใช้งาน พร้อมทั้งสำรวจความพึงพอใจในการใช้งานในระหว่างเดือนตุลาคม 2563 ถึง เดือนมีนาคม 2565

ผลการศึกษาพบว่าแอปพลิเคชัน iFarmer Plus สามารถใช้งานได้บนระบบปฏิบัติการแอนดรอยด์และไอโอเอส ซึ่งประกอบด้วยเมนู 1) ข้อมูลโค โดยแสดงข้อมูลโคแบ่งตามกลุ่มโค ได้แก่ ลูกโค โคสาว และแม่โค 2) ข้อมูลการผลิต ได้แก่ ปริมาณน้ำนมแสดงปริมาณน้ำนมที่บันทึกรายตัว 3) ข้อมูลระบบสืบพันธุ์ จะแสดงข้อมูลโคตามกลุ่มกิจกรรมด้านระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ โคท้อง โคหลังคลอดและโคยังไม่ท้อง 4) ข้อมูลรายงานและระบบแจ้งเตือน จะแสดงกิจกรรมโคที่ถูกแจ้งเตือนตามที่ใช้ใช้งานได้ตั้งค่าไว้ โดยแอปพลิเคชันจะแจ้งเตือนเหตุการณ์สำคัญในฟาร์มให้แก่เกษตรกร เช่น กำหนดวันกลับสัด กำหนดวันตรวจท้อง กำหนดวันแท้งนม และกำหนดคลอด เป็นต้น ในเวลา 06.00 น.ของทุกวัน จากการเปรียบเทียบค่าดัชนีประสิทธิภาพระบบสืบพันธุ์ก่อนและหลังการใช้งานพบว่าระยะห่างการคลอดลูก ระยะห่างวันคลอดถึงวันผสมครั้งแรก ระยะห่างวันคลอดถึงวันผสมติด อายุโคสาวที่ได้รับการผสมเทียมครั้งแรก จำนวนครั้งต่อการผสมติดในโคสาว และอัตราการผสมติดในโคสาวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ในขณะที่อัตราการผสมติดในแม่โคก่อนการใช้งานสูงกว่าหลังการใช้งานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนจำนวนครั้งต่อการผสมติดในแม่โคและจำนวนวันท้องว่างหลังการใช้งานสูงกว่าก่อนการใช้งานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากแบบสอบถามเพื่อสำรวจความพึงพอใจของเกษตรกรผู้ใช้งานพบว่าเกษตรกรให้คะแนนความพึงพอใจในการใช้งานในเกณฑ์พึงพอใจอยู่ในระดับมาก-มากที่สุด โดยหัวข้อการแจ้งเตือนที่ผู้ใช้งานเลือกใช้งานมากที่สุด 3 ลำดับแรก ได้แก่ วันครบกำหนดคลอด วันครบกำหนดตรวจท้อง และวันครบกำหนดแท้งนม ตามลำดับ

คำสำคัญ: การจัดการฟาร์มโคนม ดัชนีระบบสืบพันธุ์ ระบบฐานข้อมูล สมาร์ทโฟน แอปพลิเคชัน

เลขทะเบียนวิจัย: 63(1)-0208-023

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

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

Mobile Application for Dairy Farm management; iFarmer Plus

Muksuda Ruangkree^{1/} Chakrit Butrak^{2/}

Abstract

The objective of this study was to develop a mobile application “iFarmer Plus” for dairy farm management on Android and IOS operating system, and to develop a notifying system for important events in dairy farm. The application contained four menus: cow data, production data, reproductive data, and reporting and notification system. All data shown in the application was linked to the Bureau of Biotechnology in Livestock Production (BBLP) dairy database. iFarmer Plus allowed user to view and import cow data such as artificial insemination data, pregnancy check result, dry-off cow, calving, culling, milk production, health and treatment information. The application also provided users the push notification for important events, e.g., estrus detection, pregnancy check due date, the day of starting dry period and calving due date. iFarmer Plus was tested in 80 dairy farms under Tropical Holstein project, BBLP, and user’s feedback was collected to improve the service. The reproductive efficiency was compared before and after using the application, user satisfaction was surveyed from October 2020 to March 2022.

The study showed that iFarmer Plus is compatible with both Android and IOS operating system. There are four features 1) cow data divided into 3 groups such as calves heifers and cows 2) production data such as milk production 3) breeding system data divided into 3 groups which are pregnant cows, postpartum cows and non-pregnant cows 4) reporting and notifying system which would notify the users for important events after their setting up. The application provided the push notification at 6 am every day for important events, e.g., estrus detection, pregnancy check due date, the day of starting dry period and calving due date. The comparison of reproductive indices pre- and post-use of the application showed no statistically significant difference in calving interval, calving to first service, calving to conception, age at first service, number of services per conception in heifers and conception rate in heifers ($p>0.05$). However, the conception rate in cow pre-use was higher than post-use significantly ($p<0.05$) whereas number of services per conception in cows and day open post-use were higher than pre-use significantly ($p<0.05$). The satisfaction survey illustrated that the sample user gave good to excellent satisfaction score. The three most used event notifications by the sample users were the calving due date, pregnancy check due date and the starting of the dry period.

Keyword: Dairy Farm management, Reproductive index, Database, Smartphone, Mobile application.

Registered No: 63(1)-0208-023

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

^{2/} Saraburi Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Kangkoi, Saraburi

คำนำ

ประเทศไทยกำลังก้าวสู่ยุคไทยแลนด์ 4.0 ซึ่งหมายรวมถึงการนำเทคโนโลยีต่างๆ มาช่วยในการพัฒนาประเทศอีกทั้งในช่วงสิบปีที่ผ่านมาภาพรวมของการผลิตในสาขาการปศุสัตว์นั้นมีการเติบโตอย่างต่อเนื่องตามสภาวะการขยายตัวทางเศรษฐกิจ โดยเฉพาะในสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญ เช่น โคเนื้อ ซึ่งมีปริมาณการผลิตที่ขยายตัวได้อย่างต่อเนื่องโดยข้อมูลจากสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรพบว่าในปีพ.ศ.2549 มีปริมาณนํ้านมดิบเพิ่มขึ้นจาก 8.03 แสนตันเป็น 10.84 แสนตันในปีพ.ศ.2558 และมีความต้องการในการบริโภคนํ้านมสูงขึ้นอีกทั้งยังมีเกษตรกรรุ่นใหม่มีความสนใจที่จะเลี้ยงโคเนื้อเพิ่มขึ้นด้วย โดยในอุตสาหกรรมการเลี้ยงโคนมนั้นการจัดการฟาร์มที่ดีจะช่วยให้การเลี้ยงโคนมเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพและการจัดการฟาร์มที่ดีต้องเริ่มจากการมีข้อมูลต่างๆ ในฟาร์มทั้งข้อมูลโค ข้อมูลผลผลิต และบันทึกต่างๆ เพื่อใช้ในการบริหารจัดการและนำข้อมูลไปวิเคราะห์ปัญหาเพื่อนำมาพัฒนาให้มีประสิทธิภาพได้เพิ่มขึ้น

ปัจจุบันโทรศัพท์มือถือแบบสมาร์ตโฟนเป็นอุปกรณ์ที่สำคัญในการติดต่อสื่อสารและการสืบค้นข้อมูล (Deshpande and Kalkundri, 2019) รวมทั้งเข้ามาเป็นอุปกรณ์สำคัญในอุตสาหกรรมเกษตรรวมถึงในระดับฟาร์มโคนม เดิมกรมปศุสัตว์โดยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ มีระบบการใช้งานฐานข้อมูลโคนมออนไลน์ ได้แก่ iService iDairy และ iFarmer แยกตามผู้ใช้งานสำหรับนำเข้าและบันทึกข้อมูลโคในฟาร์ม โดย iFarmer นั้นมีเป้าหมายหลักในการให้บริการข้อมูลฟาร์มโคนมแก่เกษตรกร ซึ่งมีการแสดงข้อมูลประชากรโคในฟาร์ม ข้อมูลระบบสืบพันธุ์ การผสมเทียม ผลผลิตนํ้านมและสามารถบันทึกข้อมูลต่างๆ ได้ในรูปแบบเว็บเบราว์เซอร์ซึ่งไม่สะดวกในการใช้งานผ่านสมาร์ตโฟนและยังไม่สามารถแจ้งเตือนให้ผู้ใช้งานทราบถึงเหตุการณ์สำคัญต่าง ๆ ที่อาจเกิดขึ้นได้ซึ่งการแจ้งเตือนนั้นมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อเกษตรกร เพื่อให้เกษตรกรได้รับข้อมูลเหตุการณ์สำคัญในฟาร์ม เช่น วันคลอด วันครบกำหนดตรวจท้อง วันแห้งนม วันครบกำหนดตรวจหลังคลอด และสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพระบบสืบพันธุ์และลดวันท้องว่างให้แก่เกษตรกร อีกทั้งยังสามารถลดต้นทุนในการเลี้ยงโคนมให้แก่เกษตรกรได้ (Fraser and Cordina, 1999)

ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาแอปพลิเคชันบนระบบปฏิบัติการแอนดรอยด์และไอโอเอสสำหรับเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมโดยใช้ชื่อไอฟาร์มเมอร์ พลัส (iFarmer Plus) เพื่อให้เกษตรกรสามารถเข้าถึงข้อมูลฟาร์มและข้อมูลโคนมได้อย่างสะดวกและรวดเร็ว ได้แก่ ข้อมูลทั่วไปของฟาร์มโคนม ประชากรในฟาร์ม ข้อมูลพันธุ์ประวัติ ข้อมูลระบบสืบพันธุ์และการผสมเทียม ข้อมูลผลผลิตนํ้านม และข้อมูลการจับคู่ผสม และเพื่อพัฒนาระบบแจ้งเตือนข้อมูลและเหตุการณ์สำคัญในฟาร์มให้แก่เกษตรกรได้ทราบอย่างรวดเร็ว เช่น กำหนดวันกลับสัด กำหนดวันแห้งนม กำหนดคลอด และกำหนดวันตรวจท้อง เป็นต้น ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะถูกนำไปใช้ประโยชน์ในการเพิ่มประสิทธิภาพฟาร์มโคนมให้แก่เกษตรกร

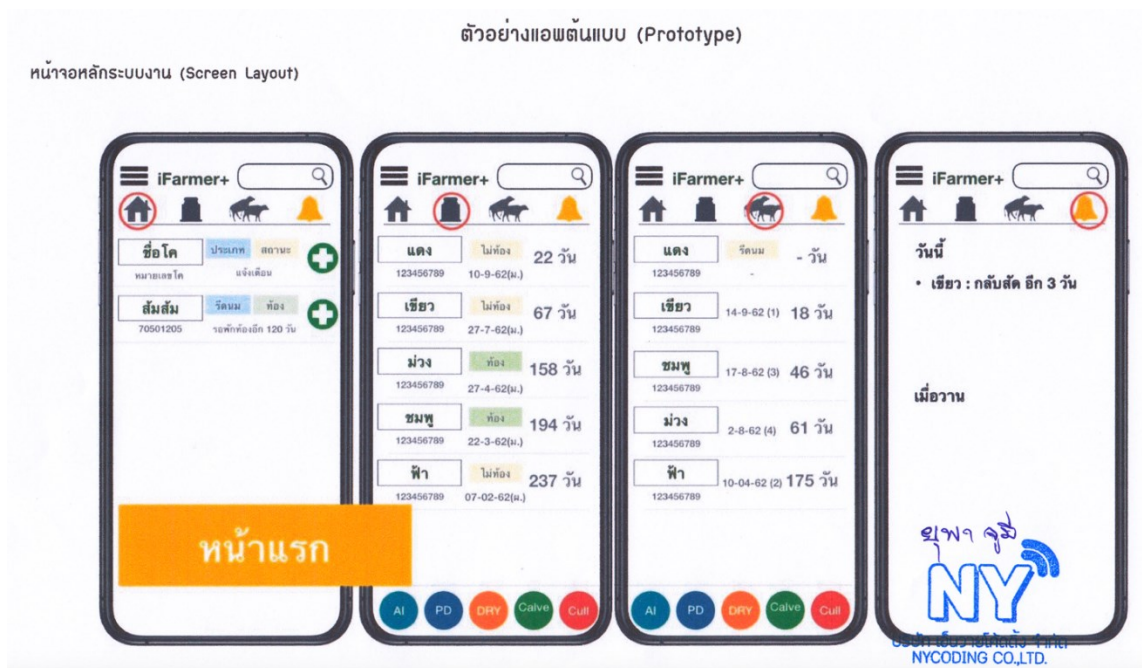
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การวิเคราะห์และออกแบบระบบ

iFarmer Plus ถูกออกแบบในรูปแบบแอปพลิเคชันบนสมาร์ทโฟนทั้งระบบปฏิบัติการแอนดรอยด์และไอโอเอส โดยข้อมูลฟาร์มและข้อมูลโคที่แสดงในแอปพลิเคชันจะเชื่อมโยงกับระบบฐานข้อมูลโคนมของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์และมีส่วนของผู้ดูแลระบบโดยออกแบบให้ผู้ดูแลระบบสามารถนำเข้า แก้ไข ลบ รวมทั้งเป็นผู้ดูแลในการอนุญาตเข้าใช้งานแอปพลิเคชัน

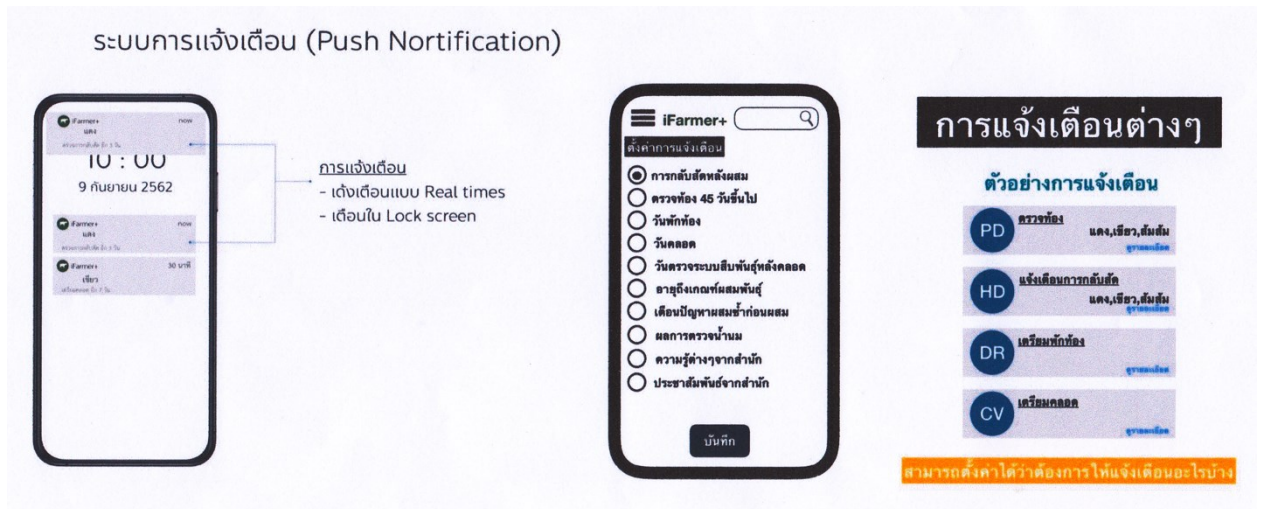
แอปพลิเคชันถูกออกแบบให้ประกอบด้วย 4 เมนูหลัก (ภาพที่ 1) ได้แก่

1. เมนูข้อมูลโค
2. ข้อมูลการผลิต
3. ข้อมูลระบบสืบพันธุ์
4. รายงานและระบบแจ้งเตือน



ภาพที่ 1 ต้นแบบเมนูหลักต่าง ๆ ในแอปพลิเคชันใน iFarmer Plus

โดยแอปพลิเคชันจะถูกออกแบบให้ผู้ใช้งานสามารถเข้าดูข้อมูลโคในฟาร์มและเพิ่มกิจกรรมต่าง ๆ ของโคได้ ได้แก่ การผสมเทียม การตรวจท้อง การพักท้อง การคลอด การคัดโคออกจากฟาร์ม ปริมาณน้ำนม รายวันและข้อมูลการป่วยและการรักษา และพัฒนาให้สามารถแจ้งเตือนกิจกรรมที่สำคัญต่อการจัดการฟาร์ม (ภาพที่ 2) เช่นสังเกตการกลับสัดหลังผสม ครบกำหนดคลอด ครบกำหนดตรวจท้อง ครบกำหนดหยั่งนม เป็นต้น



ภาพที่ 2 ต้นแบบการแจ้งเตือนในแอปพลิเคชันใน iFarmer plus

กำหนดเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

ด้านฮาร์ดแวร์ (Hardware)

1. เครื่องคอมพิวเตอร์ตั้งโต๊ะสำหรับการค้นหาข้อมูลและเขียนแอปพลิเคชัน
2. สมาร์ทโฟนพร้อมระบบปฏิบัติการแอนดรอยด์และไอโอเอสสำหรับการพัฒนาแอปพลิเคชัน

ฟาร์มทดสอบแอปพลิเคชัน

เมื่อพัฒนาแอปพลิเคชัน iFarmer Plus เรียบร้อยแล้วจะทำการประชาสัมพันธ์เชิญชวนฟาร์มโคนมมาทดสอบการใช้งานผ่านช่องทางออนไลน์ (Facebook fanpage) และเชิญชวนฟาร์มเกษตรกรโคนมจากโครงการผลิตฟอพันธุ์โคนมทรอปิคอลโฮลส์ไต้หวัน สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ให้ทดสอบการใช้งานและเปิดรับความคิดเห็นหลังการใช้งานเพื่อพัฒนาปรับปรุงแอปพลิเคชัน

โดยในการศึกษาจะคัดเลือกกลุ่มฟาร์มตัวอย่างจำนวน 80 ฟาร์ม ตามวิธีของ Yamane (1973) กำหนดความคลาดเคลื่อนที่ยอมรับได้เท่ากับร้อยละ 5 จากจำนวนประชากรทั้งหมด 100 ฟาร์มในโครงการผลิตฟอพันธุ์โคนมทรอปิคอลโฮลส์ไต้หวัน สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ โดยเป็นฟาร์มที่มีจำนวนโคในฟาร์ม 21-100 ตัว มีข้อมูลโคในระบบฐานข้อมูลครบถ้วน และมีความสนใจที่จะร่วมมือในการพัฒนาแอปพลิเคชัน ทำการศึกษาระหว่างเดือนตุลาคม 2563 ถึงเดือนมีนาคม 2565

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกข้อมูลดัชนีประสิทธิภาพระบบสืบพันธุ์ของฟาร์มโคนมก่อนใช้งานจากระบบฐานข้อมูลโคนม และหลังการใช้งานแอปพลิเคชัน จำนวน 9 ดัชนี ได้แก่
 - 1.1. ระยะห่างการคลอดลูก (Calving interval)
 - 1.2. ระยะห่างวันคลอดถึงวันผสมครั้งแรก (Calving to first service)
 - 1.3. ระยะห่างวันคลอดถึงวันผสมติด (Calving to conception)
 - 1.4. อายุโคสาวที่ได้รับการผสมเทียมครั้งแรก (Age at first service)
 - 1.5. อัตราการผสมติดในโคสาว (Conception rate Hi)
 - 1.6. อัตราการผสมติดในแม่โค (Conception rate Co)
 - 1.7. จำนวนครั้งต่อการผสมติดในโคสาว (Service per conception Hi)
 - 1.8. จำนวนครั้งต่อการผสมติดในแม่โค (Service per conception Co)
 - 1.9. จำนวนวันที่ท้องว่าง (Days open)
2. แบบสอบถามข้อมูลความพึงพอใจของกลุ่มผู้ใช้งานแอปพลิเคชัน iFarmer Plus ผ่านระบบ google form หลังใช้งานแอปพลิเคชันมาอย่างน้อย 1 ปี แบ่งออกเป็น 4 ส่วนดังนี้
 - 2.1 ความพึงพอใจด้านราคา
 - 2.2 ความพึงพอใจด้านบริการ
 - 2.3 ความพึงพอใจด้านการใช้งาน
 - 2.4 แบบสอบถามเกี่ยวกับข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

จากข้อมูลดัชนีประสิทธิภาพระบบสืบพันธุ์จากฟาร์มกลุ่มตัวอย่างจำนวน 80 ฟาร์ม นำรายงานข้อมูลเปรียบเทียบค่าดัชนีประสิทธิภาพระบบสืบพันธุ์ก่อนและหลังการใช้งานแอปพลิเคชันจำนวน 9 ดัชนีด้วย Chi-square test และใช้แบบสอบถามสำรวจเกษตรกรกลุ่มตัวอย่างผู้ใช้งานแอปพลิเคชันโดยใช้สถิติเชิงพรรณนา ได้แก่ ค่าความถี่ ร้อยละ ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ทั้งนี้กำหนดค่าความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.05 ในทุกการวิเคราะห์ทางสถิติ โดยกำหนดเกณฑ์การให้คะแนนความพึงพอใจไว้ 5 ระดับ ดังนี้

ความพึงพอใจของผู้ใช้งาน

5 = พึงพอใจมากที่สุด 4 = พึงพอใจมาก 3 = พึงพอใจปานกลาง 2 = พึงพอใจน้อย 1 = พึงพอใจน้อยที่สุด

เกณฑ์การแปลผลค่าเฉลี่ยความพึงพอใจ

ค่าคะแนนเฉลี่ยมีเกณฑ์ดังนี้

คะแนนเฉลี่ย 4.51-5.00 หมายถึง ระดับความพึงพอใจ มากที่สุด

คะแนนเฉลี่ย 3.51-4.50 หมายถึง ระดับความพึงพอใจ มาก

คะแนนเฉลี่ย 2.51-3.50 หมายถึง ระดับความพึงพอใจ ปานกลาง

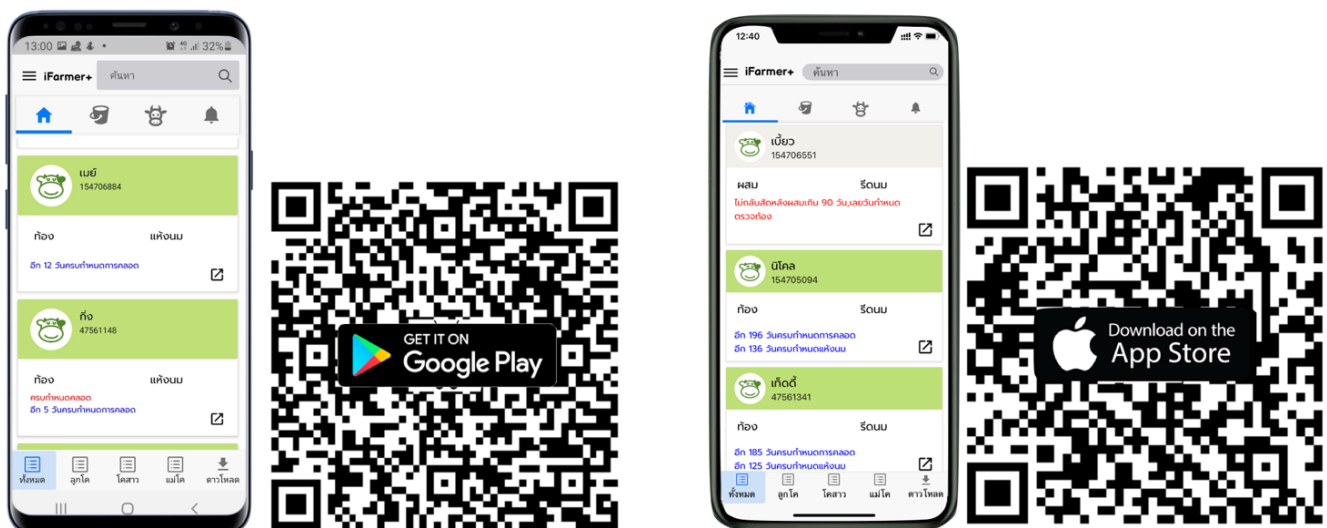
คะแนนเฉลี่ย 1.51-2.50 หมายถึง ระดับความพึงพอใจ น้อย

คะแนนเฉลี่ย 1.00-1.50 หมายถึง ระดับความพึงพอใจ น้อยที่สุด

ผลการทดลองและวิจารณ์

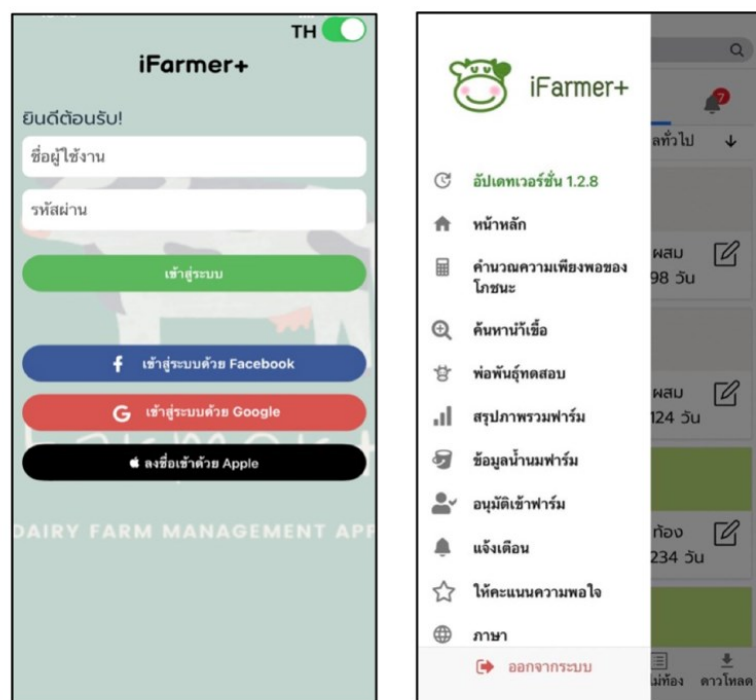
1.การพัฒนาแอปพลิเคชันและระบบการแจ้งเตือน

แอปพลิเคชัน iFarmer Plus ได้รับการพัฒนาเป็นที่เรียบร้อยแล้วโดยสามารถดาวน์โหลดเพื่อใช้งานได้ทั้งในระบบปฏิบัติการแอนดรอยด์และไอโอเอส (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ดาวน์โหลดแอปพลิเคชัน iFarmer plus บนระบบแอนดรอยด์ (ซ้าย) และระบบไอโอเอส (ขวา)

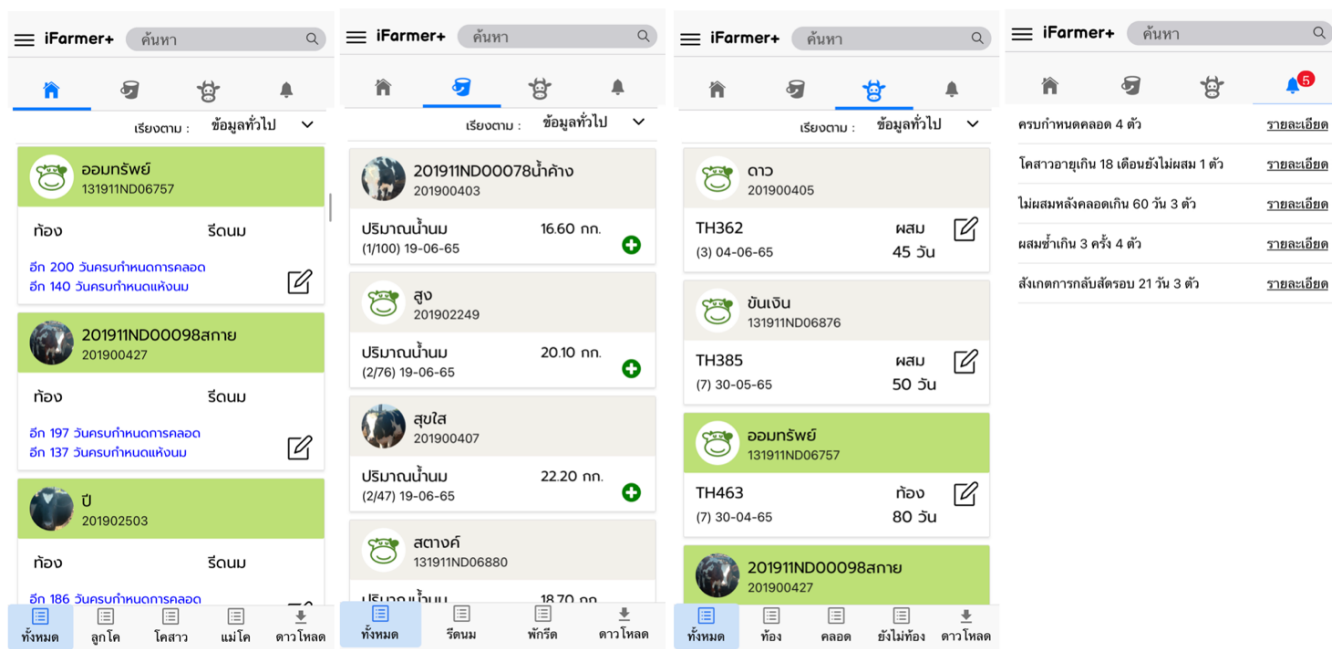
ข้อมูลของโคใน iFarmer Plus เป็นข้อมูลที่ใช้ร่วมกับระบบฐานข้อมูลโคนมของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ โดยผู้ที่ต้องการใช้งานต้องเป็นฟาร์มที่มีการลงทะเบียนฟาร์มจากหน่วยงานของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์และโคในฟาร์มต้องลงทะเบียนด้วยหมายเลขประจำตัวสัตว์ด้วย ซึ่งเกษตรกรสามารถเข้าสู่และนำเข้าสู่ข้อมูลของโคในฟาร์มผ่านแอปพลิเคชันโดยการกรอกชื่อผู้ใช้ (Username) และ รหัสผ่าน (Password) ที่ผู้ดูแลระบบเป็นผู้ออกให้ และจะสามารถดูข้อมูลได้เฉพาะของฟาร์มตนเองเท่านั้น (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ซ้าย ; แสดงหน้าแรกของการเข้าใช้งานผ่านชื่อผู้ใช้ (Username) รหัสผ่าน (Password) ขวา ; แสดงเมนูต่างๆของแอปพลิเคชัน iFarmer Plus

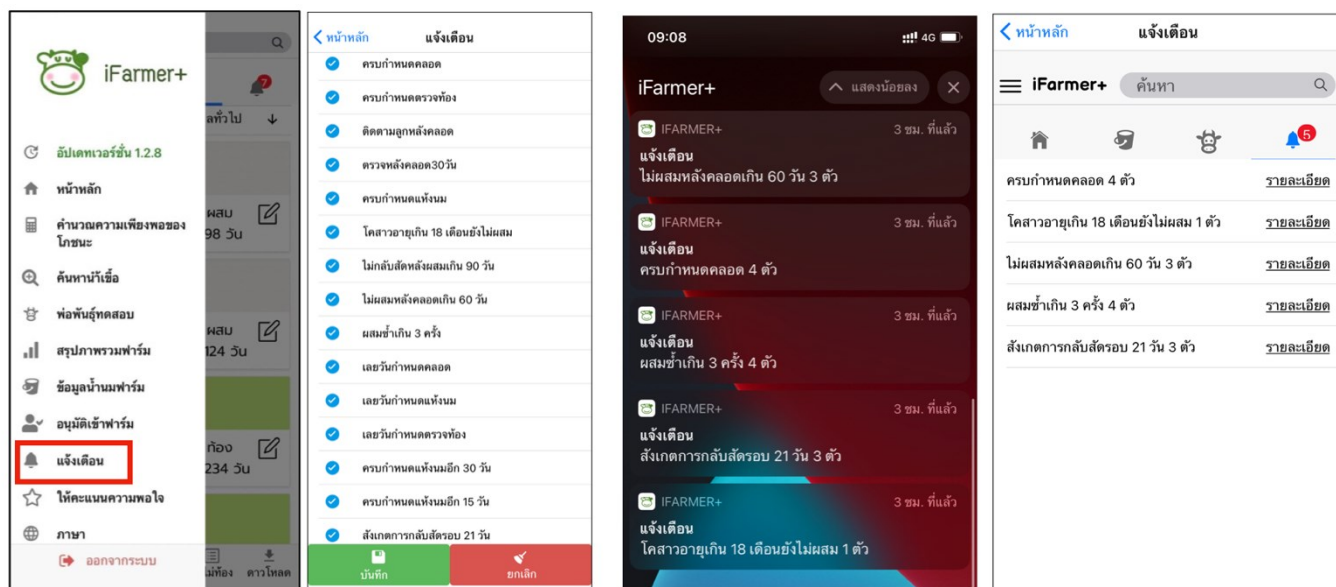
iFarmer plus จะประกอบด้วยเมนูต่างๆ ได้แก่ หน้าหลัก คำนวณความเพียงพอของโภชนะ ค้นหา น้ำเชื้อ พ่อพันธุ์ทดสอบ สรุปภาพรวมฟาร์ม ข้อมูลนํ้านมฟาร์ม การอนุมัติเข้าฟาร์ม การแจ้งเตือน ให้คะแนนความพึงพอใจ เปลี่ยนภาษา เกี่ยวกับเรา และบัญชีผู้ใช้ (ภาพที่ 4) โดยในส่วนของเมนูหน้าหลักจะแสดงข้อมูลเกี่ยวกับโคในฟาร์มทั้งหมด (ภาพที่ 5) ดังนี้

1. ข้อมูลโคทั้งหมด แสดงข้อมูลโคแบ่งตามกลุ่มโค ได้แก่ ลูกโค โคสาว และแม่โค
2. ข้อมูลปริมาณนํ้านม แสดงปริมาณนํ้านมที่บันทึกรายตัว
3. ข้อมูลด้านระบบสืบพันธุ์โค แสดงข้อมูลโคตามกลุ่มกิจกรรมด้านระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ โคท้อง โคหลังคลอดและโคยังไม่ท้อง โดยจะเรียงตามจำนวนวันหลังผสมเทียม
4. ข้อมูลการแจ้งเตือน แสดงกิจกรรมโคที่ถูกแจ้งเตือนตามที่ผู้ใช้งานได้ตั้งค่าไว้ในเมนูแจ้งเตือนในหน้าเมนูหลัก



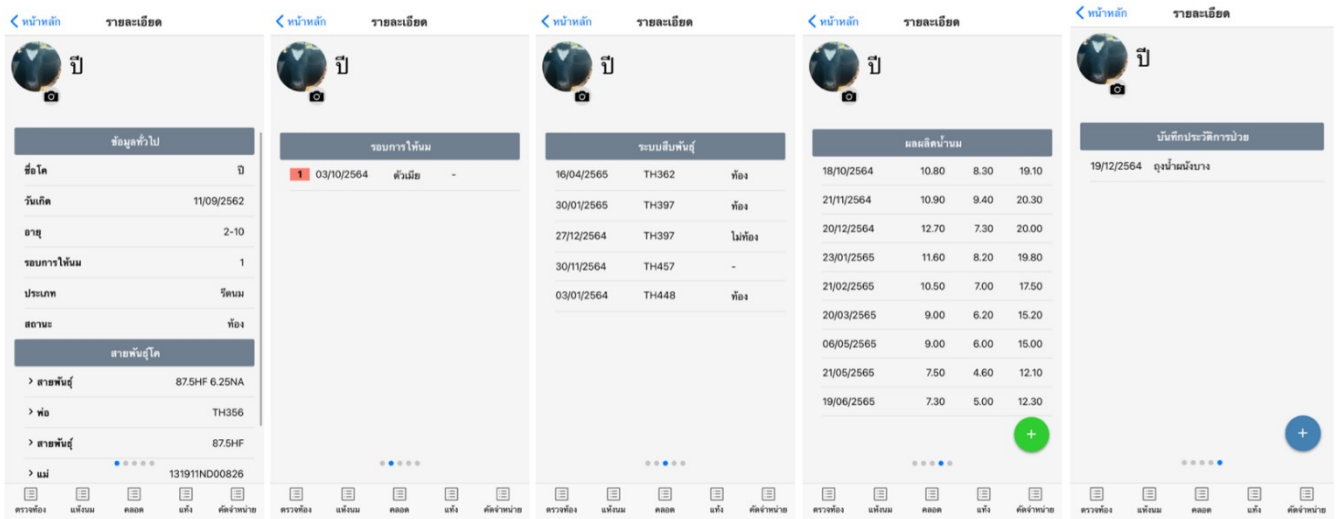
ภาพที่ 5 แสดงเมนูหน้าหลักของแอปพลิเคชัน iFarmer Plus ได้แก่ ข้อมูลโคทั้งหมด ข้อมูลปริมาณน้ำนม ข้อมูลด้านระบบสืบพันธุ์ และข้อมูลการแจ้งเตือน

การแจ้งเตือนกิจกรรมต่างๆของโคในฟาร์มถูกพัฒนาให้มีความเชื่อมโยงกับข้อมูลกิจกรรมต่างๆของโค เพื่อแจ้งให้เกษตรกรผู้ใช้งานรับทราบถึงสิ่งที่กำลังจะเกิดขึ้นและแจ้งเตือนในรูปแบบการแจ้งเตือน (Push notification) ในเวลา 06.00 น.ของทุกวัน (ภาพที่ 6) โดยเกษตรกรสามารถเลือกกิจกรรมที่ต้องการให้แจ้งเตือนได้

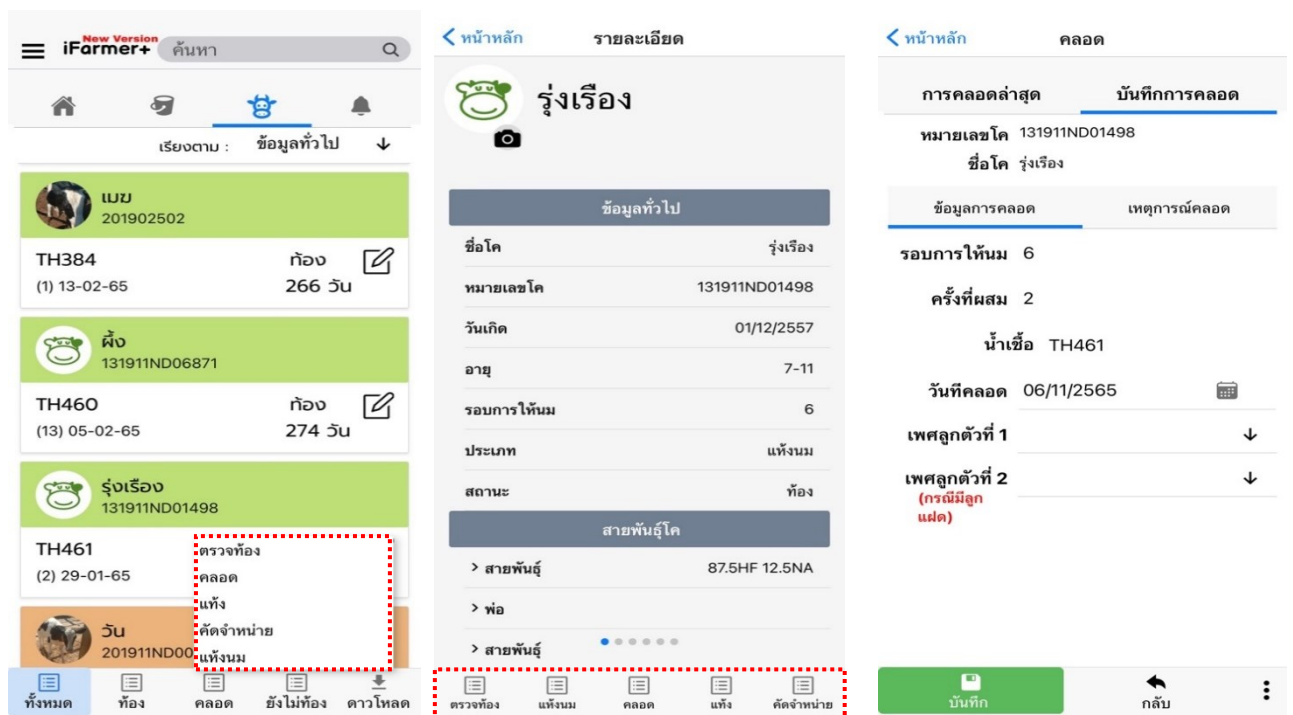


ภาพที่ 6 การตั้งค่าการแจ้งเตือนและรูปแบบการแจ้งเตือน (Push notification)

นอกจากนี้แอปพลิเคชันยังสามารถแสดงข้อมูลรายละเอียดของโครายตัวในฟาร์มได้ ได้แก่ รูปโค ข้อมูลทั่วไป สายพันธุ์โค พันธุ์ประวัติ รอบการให้นม บันทึกประวัติการป่วยและข้อมูลระบบสืบพันธุ์ (ภาพที่ 7) โดยผู้ใช้งานสามารถบันทึกข้อมูลด้านระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ การผสมเทียม ผลการตรวจท้อง การแท้งนม การคลอด การแท้ง การคัดโคออกจากระบบ (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 7 แสดงข้อมูลโครายตัวของแอปพลิเคชัน iFarmer Plus



ภาพที่ 8 แสดงการบันทึกข้อมูลด้านระบบสืบพันธุ์

2.ประเมินผลความพึงพอใจและการทดสอบประสิทธิภาพ

2.1 ประเมินผลความพึงพอใจในการใช้งาน

จากการตอบแบบสอบถามความพึงพอใจของกลุ่มผู้ใช้งานแอปพลิเคชัน iFarmer Plus จำนวน 80 คน โดยผู้ที่ตอบแบบสอบถามจะต้องใช้งานแอปพลิเคชันอย่างน้อย 1 ปี โดยใช้แบบสอบถามที่ผู้วิจัยสร้างขึ้น และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ใช้สถิติร้อยละ ค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยผู้วิจัยได้แบ่งการวิเคราะห์ข้อมูลเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ข้อมูลทั่วไปของผู้ใช้งาน และข้อมูลความพึงพอใจของผู้ใช้งาน

ข้อมูลทั่วไปของผู้ใช้งาน

จากการตอบแบบสอบถามพบว่าผู้ใช้งานส่วนใหญ่เป็นเพศชายร้อยละ 60 มีอายุระหว่าง 41-50 ปี (40%) และร้อยละ 71.30 ประกอบอาชีพการเลี้ยงโคนมมากกว่า 10 ปี (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงข้อมูลทั่วไปของผู้ใช้งานแอปพลิเคชัน iFarmer Plus

ข้อมูล	จำนวน (คน)	ร้อยละ
1.เพศ		
- ชาย	48	60.00
- หญิง	32	40.00
2.อายุ		
- น้อยกว่า 20 ปี	1	1.30
- 21 – 30 ปี	13	16.30
- 31 – 40 ปี	22	27.50
- 41 – 50 ปี	32	40.00
- มากกว่า 50 ปี	12	15.00
3.ระยะเวลาที่ประกอบอาชีพเลี้ยงโคนม		
- น้อยกว่า 5 ปี	11	13.80
- 5 – 10 ปี	12	15.00
- มากกว่า 10 ปี	57	71.30

ข้อมูลความพึงพอใจของผู้ใช้งานแอปพลิเคชัน iFarmer Plus

ผลการประเมินความพึงพอใจ

ผลการประเมินพบว่าผู้ใช้งานส่วนใหญ่มีความพึงพอใจต่อการใช้งานแอปพลิเคชัน iFarmer Plus อยู่ในเกณฑ์พึงพอใจและพึงพอใจมากที่สุด (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงระดับความพึงพอใจในการใช้งานแอปพลิเคชัน iFarmer Plus

หัวข้อการประเมิน	ระดับความพึงพอใจของเกษตรกร (ร้อยละ)					ค่าเฉลี่ยของระดับความพึงพอใจ
	1	2	3	4	5	ระดับความพึงพอใจ
ความพึงพอใจด้านราคาแอปพลิเคชัน	1	0	3.8	18.8	76.3	มากที่สุด
ความพึงพอใจด้านการบริการ						
- สามารถใช้ได้ทั้งระบบแอนดรอยด์และไอโอเอส	0	0	3.8	26.3	70	มากที่สุด
- สามารถติดต่อผู้ดูแลระบบได้สะดวก	1.3	0	20	31.3	47.5	มาก
- มีช่องทางให้ติดตามข่าวสารหลากหลาย	1.3	1.3	12.5	31.3	53.8	มาก
ความพึงพอใจในงานใช้งานแอปพลิเคชัน						
- ความพึงพอใจโดยรวมหลังการใช้งาน	1.3	1.3	6.3	22.5	68.8	มากที่สุด
- ใช้งานง่าย ไม่ซับซ้อน	0	2.5	10	31.3	56.3	มาก
- สามารถเข้าถึงข้อมูลฟาร์มได้ตลอดเวลา	0	0	7.5	25	67.5	มากที่สุด
- สามารถเข้าถึงรายละเอียดของโคแต่ละตัวได้ตลอดเวลา	0	0	6.3	26.3	57.5	มากที่สุด
- การจัดวางตำแหน่งเมนูข้อมูลทั่วไป	0	1.3	11.3	30	57.5	มาก
- การจัดแบ่งกลุ่มโคสะดวกต่อการเรียกดู	0	0	8.8	28.7	62.5	มากที่สุด
- การใช้แถบสีแบ่งกลุ่มโค	0	0	8.8	28.7	62.5	มากที่สุด
- ระบบแจ้งเตือนเหตุการณ์สำคัญในฟาร์ม	0	1.3	11.3	18.8	68.8	มากที่สุด
- เวลาที่แจ้งเตือน	1.3	2.5	11.3	27.5	57.5	มาก

หัวข้อการประเมิน	ระดับความพึงพอใจของเกษตรกร (ร้อยละ)					ค่าเฉลี่ยของระดับความพึงพอใจ
	1	2	3	4	5	ระดับความพึงพอใจ
- ท่านประสงค์จะใช้งานแอปพลิเคชันต่อ	0	0	3.8	17	60	มากที่สุด
- ท่านจะติดตามข่าวสารเกี่ยวกับแอปพลิเคชันต่อ	0	0	8.8	28.7	62.5	มากที่สุด
- ท่านจะแนะนำให้เกษตรกรท่านอื่นๆสมัครเข้าใช้งาน	0	0	10	25	65	มากที่สุด

2.2 การทดสอบประสิทธิภาพการใช้งาน

ทดสอบการใช้งานในฟาร์มโคนมกลุ่มตัวอย่างจำนวน 80 ฟาร์ม มีจำนวนโคนในฟาร์มเฉลี่ย 56 ± 22 ตัวต่อฟาร์ม โดยทดสอบประสิทธิภาพการใช้งานจากการเปรียบเทียบดัชนีระบบสืบพันธุ์จำนวน 9 ดัชนีได้แก่ ระยะห่างวันคลอดลูก ระยะห่างวันคลอดถึงวันผสมครั้งแรก ระยะห่างวันคลอดถึงวันผสมติด อายุโคสาวที่ได้รับการผสมเทียมครั้งแรก อัตราการผสมติดในโคสาว อัตราการผสมติดในแม่โค จำนวนครั้งต่อการผสมติดในโคสาว จำนวนครั้งต่อการผสมติดในแม่โค และจำนวนวันท้องว่าง โดยเทียบกับค่ามาตรฐานอ้างอิงจาก Radostitis O.M. (2001)

เมื่อเปรียบเทียบค่าดัชนีระบบสืบพันธุ์ทั้งก่อนและหลังการใช้งานแอปพลิเคชันพบว่าพบว่ามีอัตราการผสมติดในแม่โคก่อนการใช้งานสูงกว่าหลังการใช้งานแอปพลิเคชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) จำนวนครั้งต่อการผสมติดในแม่โคก่อนการใช้งานต่ำกว่าหลังการใช้งานแอปพลิเคชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.04$) และจำนวนวันท้องว่างหลังการใช้งานสูงกว่าก่อนการใช้งานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.0001$) แต่พบว่าระยะห่างการคลอดลูก ระยะห่างวันคลอดถึงวันผสมครั้งแรก ระยะห่างวันคลอดถึงวันผสมติด อายุโคสาวที่ได้รับการผสมเทียมครั้งแรก อัตราการผสมติดในโคสาวต่ำลงหลังใช้งานเมื่อเทียบกับก่อนใช้งานแอปพลิเคชันแต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและจำนวนครั้งต่อการผสมติดในโคสาวสูงขึ้นหลังใช้งานเมื่อเทียบกับก่อนใช้งานแอปพลิเคชันแต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตามตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ย mean $\pm$ SD ดัชนีระบบสืบพันธุ์ทั้งก่อนและหลังการใช้งานแอปพลิเคชัน iFarmer Plus ในฟาร์มโคนมกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 80 ฟาร์ม เทียบกับค่ามาตรฐานจาก Radostitis O.M. (2001)

ดัชนีระบบสืบพันธุ์	ก่อนใช้งาน	หลังใช้งาน	ค่า มาตรฐาน	p-value
ระยะห่างการคลอดลูก (วัน)	471.71 $\pm$ 66.98	473.93 $\pm$ 60.34	365-385	0.84
ระยะห่างวันคลอดถึงวันผสมครั้งแรก (วัน)	111.00 $\pm$ 57.81	106.43 $\pm$ 33.85	65-80	0.58
ระยะห่างวันคลอดถึงวันผสมติด (วัน)	195.23 $\pm$ 59.38	189.90 $\pm$ 54.59	<85	0.59
อายุโคสาวที่ได้รับการผสมเทียมครั้งแรก (เดือน)	20.25 $\pm$ 4.05	20.24 $\pm$ 3.56	<15	0.99
อัตราการผสมติดในโคสาว (%)	56.06 $\pm$ 22.19	52.46 $\pm$ 25.62	50-60	0.46
อัตราการผสมติดในแม่โค (%)	43.32 $\pm$ 20.12	32.67 $\pm$ 15.74	50-60	<0.0001
จำนวนครั้งต่อการผสมติดในโคสาว (ครั้ง)	1.75 $\pm$ 0.78	1.83 $\pm$ 0.80	1.5	0.58
จำนวนครั้งต่อการผสมติดในแม่โค (ครั้ง)	2.46 $\pm$ 1.02	2.80 $\pm$ 1.13	1.5	0.04
จำนวนวันท้องว่าง (วัน)	140.29 $\pm$ 37.26	185.64 $\pm$ 54.99	<100	<0.0001

ระยะห่างการคลอดลูกเป็นผลมาจากดัชนีที่สำคัญ 2 ค่า คือ ระยะห่างวันคลอดถึงวันผสมครั้งแรก และระยะห่างวันคลอดถึงวันผสมติด และปัจจัยที่มีผลต่อระยะห่างวันคลอดถึงวันผสมครั้งแรก คือ การเป็นสัดครั้งแรกของโคหลังการคลอดและการตรวจจับการเป็นสัด (Ball and Peters, 2004) ซึ่งการแสดงการเป็นสัดของโคนั้นเป็นผลมาจากการทำงานของรังไข่ สุขภาพของแม่โคหลังคลอด รวมทั้งความผิดปกติอื่น ๆ เช่น รกค้าง มดลูกอักเสบ อย่างไรก็ตามแม้ว่าแอปพลิเคชันจะมีระบบการแจ้งเตือนโคไม่ผสมหลังคลอดเกิน 60 วัน และ 90 วันแต่การตัดสินใจของฟาร์มที่จะเริ่มการผสมแม่โคหลังคลอดเป็นอีกปัจจัยที่ต้องพิจารณาเพราะจะส่งผลกระทบต่อระยะปลอดการผสม (Involuntary waiting period) ซึ่งจะมีผลต่อค่าดัชนีระยะการคลอดถึงการผสมครั้งแรกเช่นกัน นอกจากนี้ปัจจัยที่มีผลต่อระยะห่างการคลอดถึงการผสมติดยังรวมถึงประสิทธิภาพการจับสัดและปัญหาสมติดยากอีกด้วย (Brand et al., 1996) และแม้ว่าแอปพลิเคชัน iFarmer Plus จะมีการแจ้งเตือนในหัวข้อโคสาวอายุ 18 เดือนยังไม่ได้ผสมแต่การผสมเทียมในโคสาวต้องพิจารณาจากน้ำหนักของโคสาวเป็นสำคัญรวมถึงสุขภาพของโคสาวอีกด้วย สำหรับค่าดัชนีอัตราการผสมติดและจำนวนครั้งต่อการผสมติดนั้น

ชี้ให้เห็นว่ามีกลุ่มโคที่มีปัญหาสมติดยาอยู่ในกลุ่มโคตัวอย่างรวมไปถึงอาจเกิดได้จากประสิทธิภาพในการจับสัดและสุขภาพของแม่โค (Brand et al., 1996)

อย่างไรก็ตามปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อดัชนีระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ ภาวะโภชนาการและการจัดการอาหารแม่โค ฤดูกาล ประสิทธิภาพการจับสัด ปัญหาระบบสืบพันธุ์ เช่น การคลอดยาก มดลูกอักเสบ รกค้าง และปัญหาสุขภาพอื่นๆ เช่น สุขภาพกีบ โรคระบาด เช่น โรคปากเท้าเปื่อย โรคลัมปีสกิน ซึ่งโรคลัมปีสกินเป็นโรคอุบัติใหม่ในประเทศไทยในช่วง 1-2 ปีที่ผ่านมาและเป็นโรคส่งผลกระทบโดยตรงต่อผลผลิตของโคนม ทำให้ผลผลิตน้ำนมลดลง อัตราการเจริญเติบโตลดลง อัตราการผสมติดลดลง พบปัญหาระบบสืบพันธุ์และการแท้งในโค (Abdulqa et al., 2016) โดยการจากสำรวจฟาร์มกลุ่มตัวอย่างผู้ใช้งานแอปพลิเคชันพบว่าส่วนใหญ่ได้รับผลกระทบจากโรคระบาด เช่น โรคปากเท้าเปื่อย โรคลัมปีสกิน ทำให้ต้องงดเว้นการรับบริการผสมเทียม การตรวจท้อง การตรวจระบบสืบพันธุ์โค รวมไปถึงการคัดจำหน่ายโคในฟาร์ม ซึ่งปัจจัยเหล่านี้อาจส่งผลกระทบต่อค่าดัชนีประสิทธิภาพระบบสืบพันธุ์ในช่วงระยะเวลา 2 ปีที่ผ่านมา

สรุปผลการทดลอง

แอปพลิเคชันสำหรับการจัดการฟาร์มโคนม iFarmer Plus สามารถใช้งานได้บนสมาร์ตโฟนทั้งระบบปฏิบัติการแอนดรอยด์และไอโอเอส เกษตรกรสามารถนำเข้าและแสดงข้อมูลข้อมูลสำคัญของโคนม ได้แก่ ข้อมูลพันธุ์ประวัติโค ข้อมูลระบบสืบพันธุ์ ข้อมูลการผลิต พร้อมทั้งมีระบบแจ้งเตือนเหตุการณ์สำคัญบนสมาร์ตโฟนของเกษตรกรที่เข้าใช้งานได้ พบว่าก่อนและหลังการใช้งานมีค่าดัชนีระบบสืบพันธุ์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ได้แก่ ระยะห่างการคลอดลูก ระยะห่างวันคลอดถึงวันผสมครั้งแรก ระยะห่างวันคลอดถึงวันผสมติด อายุโคสาวที่ได้รับการผสมครั้งแรก อัตราการผสมติดในโคสาว และจำนวนครั้งต่อการผสมติดในโคสาว แต่พบว่าค่าดัชนีอัตราการผสมติดในแม่โคก่อนการใช้งานสูงกว่าหลังการใช้งาน จำนวนครั้งต่อการผสมติดในแม่โคและจำนวนวันท้องว่างหลังการใช้งานสูงกว่าก่อนการใช้งานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการสำรวจความพึงพอใจหลังการใช้งานแอปพลิเคชันในเกษตรกรกลุ่มตัวอย่างให้คะแนนความพึงพอใจอยู่ในเกณฑ์พึงพอใจมาก-มากที่สุด

ข้อเสนอแนะ

การเก็บข้อมูลโค สามารถจัดเก็บได้ทั้งในรูปแบบเอกสาร โปรแกรมหรือแอปพลิเคชันเป็นสิ่งสำคัญพื้นฐานในการบริหารจัดการฟาร์มอย่างมีประสิทธิภาพ แต่สิ่งสำคัญคือความต่อเนื่องและสามารถใช้ประโยชน์ได้จริงจากข้อมูลเหล่านั้น การวัดประสิทธิผลของการใช้งานแอปพลิเคชันโดยใช้ดัชนีระบบสืบพันธุ์อาจจำเป็นต้องใช้เวลาวัดผลที่นานกว่านี้

กิตติกรรมประกาศ

ในงานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้อย่างสมบูรณ์ด้วยความกรุณาของกลุ่มพัฒนาระบบข้อมูลและเครือข่ายชีวภาพการปศุสัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ และเกษตรกรทุกท่านที่ให้ความร่วมมือเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

- Abdulqa, H.Y., H.S. Rahman, H.O. Dyary and H.H. Othman. 2016. Lumpy Skin Disease. Reproductive Immunology, 1(4): 1-6.
- Ball, P.J.H. and A.R. Peters. 2004. Reproduction in cattle, 3rd edition. Blackwell Publishing, Oxford, UK. 7-12 p.
- Barragan, A.A., J.D. Workman, S. Bas, K.L. Proudfoot and G.M. Schuenemann. 2016. Assessment of an application for touchscreen devices to record calving-related events in dairy herds and monitor personel performance. Journal of Dairy Science, 99:5662-5670.
- Brand, A., J.P.T.M Noordhuizen and Y.H. Schukken. 1996. Herd Health and Production Management in Dairy Practice. Wageningen Pers. Wageningen, The Natherlands. 75-136 p.
- Deshpande, P.J. and S.S. Kalkundri. 2019. Android application for dairy farming. International Journal of Advance Research, Ideas and Innovations in Technology, 5(4):565-568.
- Fraser, I and D. Cordina. 1999. An application of data envelopment analysis to irrigated dairy farms in Northern Victoria, Australia. Agriculture Systems, 59(3):267-282.
- Michels, M., V. Bonke and O. Musshoff. 2019. Understanding the adoption of smartphone apps in dairy herd management. Journal of Dairy Science, 102(10):9422-9434.
- Radostitis, O.M. 2001. Herd health : food animal production medicine, 3rd edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pemsylvania. 211-254 p.
- Rose, D.C., W.J. Sutherl, C. Parker, M. Lobley, M. Winter, C. Morris, S. Twinning, C. Foulkes, T. Amano and L.V. Dicks. 2016. Decision support tools for agriculture: Towards effective design and delivery. Agriculture System, 149:165-174.
- Satyanarayan, K., V. Jagadeeswary, P. Belakeri, A. Babu and Y. Srinivas. 2018. Develop and Evaluate Use of Mobile Application for Cattle Farming: A New Generation Technology Transfer for Sustainable Dairy Production. International Journal of Livestock Research, 8(12):224-232.

Yamane, Y. 1973. Statistics: An Introductory Analysis, 3rd Edition, Harper and Row Publisher Inc., New York, USA.