อิทธิพลของยีน *Acyl - CoA : diacylglycerol acyl transferase 1 (DGAT1)* ต่อลักษณะผลผลิตน้ำนมและยีน *Gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR)* ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ในประชากรโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน

นางสาวณัฐญา ดวงหะคลัง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2555

EFFECT OF *Acyl - CoA : diacylglycerol acyl transferase 1 (DGAT1)* GENE ON MILK PRODUCTION TRAITS AND *Gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR)* GENE ON FERTILITY TRAITS IN CROSSBRED HOLSTEIN FRIESIAN POPULATION

Natthaya Duanghaklang

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Animal Production Technology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2012

อิทธิพลของยีน *Acyl - CoA : diacylglycerol acyl transferase 1 (DGAT1)* ต่อลักษณะผลผลิตน้ำนมและยีน *Gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR)* ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ในประชากรโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(อ. ดร.วิทธวัช โมพี)
ประธานกรรมการ

(อ. ดร.อมรรัตน์ โมพี)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(รศ. ดร.พงษ์ชาญ ณ ลำปาง)
กรรมการ

(รศ. ดร.กนก ผลารักษ์)
กรรมการ

(ผศ. ดร.สุรินทร บุญอนันธนสาร)
กรรมการ

(ผศ. น. สพ. ดร.ภคนิจ คุปพิทยานันท์)
กรรมการ

(ศ. ดร.ชูกิจ ลิมปีจำนงค์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ณัฐญา ดวงหะคลัง : อิทธิพลของยีน *Acyl - CoA : diacylglycerol acyl transferase 1 (DGAT1)* ต่อลักษณะผลผลิตน้ำนมและยีน *Gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR)* ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ในประชากรโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน (EFFECT OF *Acyl-CoA : diacylglycerol acyl transferase 1 (DGAT1)* GENE ON MILK PRODUCTION TRAITS AND *Gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR)* GENE ON FERTILITY TRAITS IN CROSSBRED HOLSTEIN FRIESIAN POPULATION) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร.อมรรัตน์ โมพี, 83 หน้า.

วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ คือ เพื่อศึกษาอิทธิพลของยีน *DGAT1* ต่อลักษณะผลผลิตน้ำนมและอิทธิพลของยีน *GnRHR* ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ ซึ่งได้แก่ ลักษณะจำนวนครั้งการผสมติด ลักษณะอัตราการผสมติด ลักษณะจำนวนวันท้องว่างและลักษณะระยะห่างของการให้ลูกในประชากรโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน เพื่อใช้เป็น genetic marker สำหรับช่วยในการคัดเลือกโคนม โดยเก็บตัวอย่างเลือดจากโคนม จำนวน 227 ตัว ศึกษาอัลลีลและจีโนไทป์ของยีน *DGAT1* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP และศึกษายีน *GnRHR* ด้วยเทคนิค PCR-SSCP ตามลำดับ การวิเคราะห์ข้อมูล ประกอบด้วย การศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิดรูปแบบยีนด้วยวิธีการ Logistic regression การศึกษาความสัมพันธ์ของยีนกับลักษณะด้วยวิธี General Linear Model และประมาณค่าอิทธิพลของยีนต่อลักษณะด้วยวิธี Ordinary Least Square ทำการประมาณค่า Estimate Breeding Value (EBV) ของแต่ละลักษณะโดยใช้ Single trait animal model และเปรียบเทียบลำดับของค่า EBV ด้วยวิธี Spearman rank correlation coefficient ผลการศึกษา พบว่า ยีน *DGAT1* มี 2 อัลลีล คือ K และ A แบ่งเป็น 3 จีโนไทป์ คือ KK KA และ AA โดยอัลลีล A และจีโนไทป์ AA มีความถี่สูงสุด ส่วนยีน *GnRHR* มีชิ้นส่วน PCR-SSCP ที่แตกต่างกันทั้งหมด 3 รูปแบบ ทั้งนี้ การเกิดรูปแบบของยีนทั้งสองไม่มีความสัมพันธ์กัน ($P>0.05$) การศึกษาอิทธิพลของยีน พบว่า ยีน *DGAT1* จีโนไทป์ AA และ KA มีอิทธิพลทางบวกต่อลักษณะผลผลิตน้ำนม แต่ทั้งสองจีโนไทป์มีอิทธิพลทางลบต่อลักษณะองค์ประกอบน้ำนมที่สำคัญ ส่วนยีน *GnRHR* ไม่มีอิทธิพลต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ ทั้งลักษณะจำนวนครั้งการผสมติด ลักษณะอัตราการผสมติด ลักษณะจำนวนวันท้องว่าง และลักษณะระยะห่างของการให้ลูก อย่างไรก็ตาม อิทธิพลของยีน *DGAT1* และอิทธิพลของยีน *GnRHR* ไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลำดับของค่า EBV ของลักษณะผลผลิตน้ำนม ลักษณะจำนวนครั้งการ ผสมติด ลักษณะอัตราการผสมติด ลักษณะจำนวนวันท้องว่างและลักษณะระยะห่างของการให้ลูก ผลการศึกษา จึงสรุปได้ว่า ยีน *DGAT1* สามารถใช้เป็น genetic marker สำหรับเป็นตัวช่วยในการคัดเลือกโคนม เพื่อเพิ่มปริมาณน้ำนม แต่ยังไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นตัวช่วยในการคัดเลือกโคนมเพื่อเพิ่ม

องค์ประกอบน้ำนม ส่วนยีน *GnRHR* ยังไม่เหมาะสมหากจะนำยีนมาใช้เป็น genetic marker ในการคัดเลือกลักษณะผลผลิตน้ำนม ลักษณะจำนวนครั้งการผสมติด ลักษณะอัตราการ ผสมติด ลักษณะจำนวนวันท้องว่างและลักษณะระยะห่างของการให้ลูก เนื่องจากอิทธิพลของยีนที่พบในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่ชัดเจน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
ปีการศึกษา 2555

ลายมือชื่อนักศึกษา ณัฐญา ดวงหยุดคลัง
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

NATTHAYA DUANGHAKLANG : EFFECT OF *Acyl - CoA : diacylglycerol acyl transferase 1 (DGAT1)* GENE ON MILK PRODUCTION TRAITS AND *Gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR)* GENE ON FERTILITY TRAITS IN CROSSBRED HOLSTEIN FRIESIAN POPULATION. THESIS ADVISOR : AMONRAT MOLEE, Ph.D., 83 PP.

Acyl - CoA : diacylglycerol acyl transferase 1 (DGAT1) GENE/*Gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR)*/CROSSBRED HOLSTEIN FRIESIAN

The objectives of this study were to investigate the effect of *DGAT1* gene on milk production traits and *GnRHR* gene on fertility traits (number of services, conception rate, days open and calving intervals) in crossbred Holstein-Friesian population for use as markers assisted selection. In this study we obtained blood samples from two hundred and twenty-seven crossbred Holstein dairy cows. *DGAT1* genotype was investigated using the PCR-RFLP technique. *GnRHR* gene was investigated using the PCR-SSCP technique. The logistic regression method was used to analyze the association between genes. The general linear model and ordinary least square were used to estimate the effects of genes on the traits. A single trait animal model and the Spearman rank correlation coefficient were used to estimate breeding values (EBV), and to compare rank correlation of EBV. Two alleles (K, A) and three genotypes were found in *DGAT1* gene, the highest allele and genotype frequencies were A and AA, respectively. Then, 3 patterns of PCR - SSCP were found in *GnRHR* gene. The association between *DGAT1* and *GnRHR* genes was not found to be significant *(P>0.05)*. The *DGAT1* gene, AA genotype and KA genotype showed

positive effects on milk yield but negative effects on milk composition traits. The effects of *GnRHR* genes on fertility traits were not found to be significant *(P>0.05).* The effects of *DGAT1* and *GnRHR* did not change the rankings of EBV. From these results it can be concluded that the *DGAT1* gene is suitable for a marker assisted selection in milk production traits, but it is not suitable for milk composition traits. So the *GnRHR* gene is not suitable for fertility traits because the effects of the genes are not clear from these studies.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Animal Production Technology Student's Signature Natthaya Duanghaklang

Academic Year 2012 Advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ บุคคลและหน่วยงาน ซึ่งมีส่วนสำคัญในการช่วยเหลือทั้งทางด้านวิชาการและด้านการดำเนินงานวิจัย ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. กนก ผลารักษ์ อาจารย์ผู้ทรงคุณวุฒิ ที่ได้สละเวลาในการถ่ายทอดความรู้ด้านการดำเนินงานวิจัยให้เกิดประโยชน์ต่อส่วนรวมและได้ให้คำปรึกษาในการเขียนวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ จนสำเร็จลุล่วง ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.อมรรัตน์ โมพี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และรองศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ชาญ ณ ลำปาง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้โอกาสทางการศึกษา ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ช่วยตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์ รวมทั้งช่วยให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. วิทธวัช โมพี หัวหน้าสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรินทร บุญอนัน-ธนสาร ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ภคนิจ คุปพิทยานันท์ ที่ได้สละเวลาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และได้กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ช่วยตรวจทานและแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณ คุณเพลิน เมินกระโทกและคุณสมพงษ์ ปาติตัง นักวิชาการฟาร์มมหาวิทยาลัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่และพนักงานส่วนงานโคนมทุกท่าน ที่ได้อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างเลือดและให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลโคนมในการวิจัย ขอขอบพระคุณไร่ไชยสาส์นฟาร์ม อำเภอวิหารแดง จังหวัดสระบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างเลือด และข้อมูลผลผลิต ขอขอบพระคุณศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพ สระบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลของไร่ไชยสาส์นฟาร์ม ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ได้ให้การสนับสนุนเงินทุนในการดำเนินงานวิจัยครั้งนี้ และสุดท้ายนี้ ขอขอบคุณ พี่น้องบัณฑิตศึกษาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจอย่างดีเสมอมา

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับบิดามารดา และน้องสาว ครอบครัวซึ่งเป็นที่รักยิ่งและเป็นกำลังใจให้กับผู้วิจัยมาโดยตลอดและขอมอบคุณงามความดีให้กับครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดี ทั้งด้านงานวิจัยและการดำเนินชีวิต ให้แก่ผู้วิจัยตลอดมา

ณัฐญา ดวงหะคลัง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) ..... ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) ..... ค
กิตติกรรมประกาศ ..... จ
สารบัญ ..... ฉ
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญภาพ ..... ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ..... ฏ

บทที่

1 บทนำ 1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3
1.3 สมมุติฐานของการวิจัย 4
1.4 ขอบเขตของการวิจัย 4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 5
2 วรรณกรรมและเอกสารที่เกี่ยวข้อง 6
2.1 สภาพปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์และการให้ผลผลิตของโคนมในประเทศไทย 6
2.2 การประเมินคุณค่าการผสมพันธุ์ด้วยการวิเคราะห์ทีละลักษณะ 9
2.3 การใช้ genetic marker เพื่อช่วยในการคัดเลือกสัตว์ 10
2.4 บทบาทของยีน *DGAT1* ต่อลักษณะผลผลิตน้ำนมและ ยีน *GnRHR* ต่อความสมบูรณ์พันธุ์ 11
2.4.1 ยีน *Acyl-CoA:diacylglycerol acyl transferase 1 (DGAT1)* 12
2.4.2 ฮอร์โมน Gonadotropin releasing hormone (GnRH) ในระบบสืบพันธุ์โคนมเพศเมีย 16
2.4.3 การส่งสัญญาณของฮอร์โมน GnRH ไปยังเซลล์ตัวรับ GnRHR 19
2.4.4 โปรตีน Gonadotropin releasing hormone receptor 20

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4.5 ยีน *Gonadotropin releasing hormone receptor* 20
3 วิธีการทดลองและการเก็บข้อมูล.....22
3.1 กลุ่มตัวอย่าง 22
3.2 การเก็บตัวอย่าง 22
3.3 การทดสอบสมมติฐาน ข้อที่ 1.....22
3.4 การทดสอบสมมติฐาน ข้อที่ 2 25
3.5 การทดสอบสมมติฐาน ข้อที่ 3.....27
3.6 สถานที่ทำการทดลอง.....31
3.7 ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย 31
4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล.....32
4.1 ข้อมูลที่ทำการศึกษา 32
4.2 ความถี่อัลลีล จีโนไทป์และสมดุล Hardy – Weinberg ของยีน *DGAT1* และ ยีน *GnRHR* 36
4.3 ความสัมพันธ์ของรูปแบบยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR*.....38
4.4 อิทธิพลของยีน *DGAT1* ต่อลักษณะปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม 39
4.5 อิทธิพลของยีน *GnRHR* ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์.....46
4.6 อิทธิพลร่วมของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* ต่อลักษณะผลผลิตน้ำนม 47
4.7 อิทธิพลร่วมของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์.....50
4.8 สหสัมพันธ์ของลำดับค่า EBV เมื่อมีอิทธิพลของยีนและไม่มีอิทธิพลของยีนเป็น ปัจจัยคงที่ 52
5 สรุปและข้อเสนอแนะ 54
5.1 สรุป.....54
5.2 ข้อเสนอแนะ.....55
รายการอ้างอิง 56

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ภาคผนวก.....69
ภาคผนวก ก ภาพประกอบผลการศึกษารูปแบบของยีน 70
ภาคผนวก ข ตัวอย่างการจัดข้อมูลเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ Logistic regression.....72
ภาคผนวก ค ค่า Power of test ของการทดสอบอิทธิพลของยีนและค่า EBV ของลักษณะผลผลิตน้ำนมและลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ ที่ได้จากตัวแบบตัวสัตว์ปกติและตัวแบบตัวสัตว์ที่มีอิทธิพลของยีนเป็นปัจจัยคงที่.....76
ภาคผนวก ง ขั้นตอนการสกัด Genomic DNA.....81
ประวัติผู้เขียน.....83

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ค่าเฉลี่ย จำนวนวันท้องว่าง ระยะห่างการให้ลูก จำนวนครั้งการผสมติดและอัตราการผสมติดของโคนมในประเทศ เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน 7

2.2 ค่าสหสัมพันธ์ของลักษณะปริมาณน้ำนม อัตราการผสมติด จำนวนวันท้องว่าง จำนวนครั้งการผสมติดและระยะห่างการให้ลูก 8

2.3 ความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์ของยีน *DGAT1* ที่พบในโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน 14

2.4 อิทธิพลของยีน *DGAT1* K232A ต่อลักษณะปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมในโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน 15

4.1 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของลักษณะผลผลิตน้ำนมในโคนมกลุ่มตัวอย่าง เปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยผลผลิตน้ำนมของโคนมทั้งประเทศและค่ามาตรฐานองค์ประกอบน้ำนม 33

4.2 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของลักษณะจำนวนวันท้องว่าง ระยะห่างการให้ลูก จำนวนครั้งการผสมติด และอัตราการผสมติดในโคนมกลุ่มตัวอย่างเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยของโคนมทั้งประเทศและค่ามาตรฐานความสมบูรณ์พันธุ์ 35

4.3 ความถี่อัลลีลและจีโนไทป์ของยีน *DGAT1* 37

4.4 ความถี่ของชิ้นส่วน PCR - SSCP ของยีน *GnRHR* 38

4.5 ความสัมพันธ์ของรูปแบบยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* 39

4.6 อิทธิพลของยีน *DGAT1* แต่ละจีโนไทป์ ต่อลักษณะผลผลิตน้ำนม 40

4.7 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอิทธิพลของยีน *DGAT1* แต่ละจีโนไทป์ ที่มีต่อลักษณะผลผลิตน้ำนม 45

4.8 อิทธิพลของรูปแบบ PCR-SSCP ของยีน *GnRHR* ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ 47

4.9 อิทธิพลร่วมของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* ต่อลักษณะผลผลิตน้ำนม 49

4.10 อิทธิพลร่วมของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ 51

4.11 ค่าสหสัมพันธ์ของลำดับค่า EBV ของลักษณะผลผลิตน้ำนมเมื่อมีอิทธิพลของยีน *DGAT1* เป็นปัจจัยคงที่และไม่มีอิทธิพลของยีน 53

4.12 ค่าสหสัมพันธ์ของลำดับค่า EBV ของลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ เมื่อมีอิทธิพลของยีน *GnRHR* เป็นปัจจัยคงที่และไม่มีอิทธิพลของยีน 53

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 กลไกการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ 12
2.2 การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ K232A บน exon 8 13
2.3 ลักษณะ triple code ของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลง 13
2.4 กลไกการทำงานของฮอร์โมน GnRH 18
2.5 กลไกการส่งสัญญาณฮอร์โมน GnRH เข้าสู่เซลล์ตัวรับ 19

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

DGAT1	=	*Acyl – CoA: diacylglycerol acyltransferase1*
GnRHR	=	*Gonadotropin releasing hormone receptor*
GnRH	=	Gonadotropin releasing hormone
PCR–RFLP	=	Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism
PCR-SSCP	=	Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism
OLS	=	Ordinary Least Square
FSH	=	Follicle Stimulating Hormone
LH	=	Luteinizing Hormone
BLUE	=	Best Linear Unbiased Estimator
BLUP	=	Best Linear Unbiased Prediction
MY	=	ปริมาณน้ำนม (กิโลกรัม/ตัว/วัน)
PY	=	ปริมาณโปรตีน (กรัม/ตัว/วัน)
FY	=	ปริมาณไขมัน (กรัม/ตัว/วัน)
SNFY	=	ปริมาณของแข็งที่ไม่รวมไขมันนม (กรัม/ตัว/วัน)
TSY	=	ปริมาณของแข็งทั้งหมด (กรัม/ตัว/วัน)
%Prot	=	เปอร์เซ็นต์โปรตีน
%Fat	=	เปอร์เซ็นต์ไขมัน
%SNF	=	เปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ไม่รวมไขมัน
%Lac	=	เปอร์เซ็นต์แลคโตส
%TS	=	เปอร์เซ็นต์ของแข็งทั้งหมด

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการทำวิจัย

ปัจจุบันโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนซึ่งส่วนใหญ่อยู่ภายใต้การดูแลของเกษตรกรรายย่อยของประเทศกำลังประสบปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ จากข้อมูลอัตราการผสมติดโดยรวมของแม่โคนม ที่พบว่า มีอัตราการผสมติดเพียง 51.60 เปอร์เซ็นต์ (สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์, 2552) ผลที่ตามมา ทำให้โคนมมีจำนวนวันท้องว่างและระยะห่างของการให้ลูกที่ยาวนานขึ้น (Pryce, Coffey, and Brotherstone, 2000; Royal, Pryce, Woolliams, and Flint, 2002) นอกจากนี้ ปัญหาที่สำคัญอีกประการหนึ่ง คือ โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนของเกษตรกรรายย่อยนั้น มีความสามารถในการให้ผลผลิตน้ำนมต่ำและองค์ประกอบน้ำนมยังไม่ได้ ตามมาตรฐานของการรับซื้อน้ำนมดิบ ซึ่งทั้งปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์และปัญหาผลผลิตน้ำนมนี้ ทำให้เกษตรกรต้องรับภาระต้นทุนด้านการจัดการฝูงโคนมที่สูงขึ้นและสูญเสียรายได้ เนื่องจากถูกตัดราคาน้ำนมดิบ ดังนั้น หากเกษตรกรมีพันธุ์โคนมที่มีความสมบูรณ์พันธุ์พร้อมที่จะให้ผลผลิตได้อย่างสม่ำเสมอ จะเป็นการลดต้นทุนการผลิตและสามารถสร้างรายได้ให้กับเกษตรกรอย่างต่อเนื่อง จึงจำเป็นต้องมีปรับปรุงพันธุ์โคนมในลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์และความสามารถในการให้ผลผลิตควบคู่กัน เพื่อสอดคล้องกับการจัดการทางด้านอาหารและสภาพแวดล้อมของเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมต่อไป

ลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์และความสามารถในการให้ผลผลิตเป็นลักษณะที่มีสหสัมพันธ์ทางลบต่อกัน (Kühn, Hutchison, and Wiggans, 2006) ซึ่งการคัดเลือกลักษณะใดลักษณะหนึ่งอาจสูญเสียลักษณะที่ดีอีกลักษณะไป เป็นอุปสรรคทำให้การปรับปรุงพันธุ์โคนมในลักษณะผลผลิตน้ำนมและความสมบูรณ์พันธุ์นั้น ไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกันและเป็นไปได้ช้า แนวทางหนึ่งในการลดระยะเวลาการคัดเลือกและเพิ่มความแม่นยำ ในการทำนายคุณค่าการผสมพันธุ์ (Estimated Breeding Value; EBV) ของโคนม คือ การใช้ประโยชน์จาก genetic marker ที่เป็นข้อมูลทางพันธุกรรมของตัวโคนม ร่วมกับข้อมูลพันธุ์ประวัติและข้อมูลลักษณะปรากฏ ซึ่งจะช่วยให้การคัดเลือกโคนมสามารถทำได้ โดยไม่ต้องรอจนถึงช่วงที่โคนมสามารถให้ผลผลิตได้หรือช่วงที่โคนมแสดงอาการที่บ่งบอกถึงปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ เป็นการลดระยะเวลาและเพิ่มความแม่นยำในการคัดเลือกโคนม เนื่องจากเป็นการคัดเลือกโดยตรงจากข้อมูลทางพันธุกรรมของตัวสัตว์

การกำหนดอิทธิพลของ genetic marker ให้เป็นปัจจัยคงที่ปัจจัยหนึ่งในการประเมินค่า

ทางพันธุกรรมของสัตว์ ด้วยวิธีการ BLUP (Best Linear Unbiased Prediction) ในตัวแบบตัวสัตว์ (animal model) จะสามารถประเมินค่าการผสมพันธุ์จากข้อมูลพันธุ์ประวัติและข้อมูลค่าสังเกตของตัวสัตว์เองอย่างไม่มีความอคติทางสถิติ ในระยะเวลาที่รวดเร็วและมีความแม่นยำในการคัดเลือกมากขึ้น เมื่อเทียบกับการประเมินแบบปกติที่ไม่มีอิทธิพลของgenetic marker (Druet et al., 2005; Meuwissen and Van Arendonk, 1992) ซึ่งยีนที่มีการศึกษาพบว่ามีบทบาทสำคัญต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์และความสามารถในการให้ผลผลิต ได้แก่ ยีน *Acyl – CoA: diacylglycerol acyltransferase1* (*DGAT1*) ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม ได้แก่ ไขมันนม โปรตีนนม และยีน *Gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR)* ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ของโค

ยีน *DGAT1* อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 14 (NCBI, 2009a) มีบทบาทสำคัญต่อไขมันนม (Cases et al, 1998) โดยจะแปลรหัสได้เป็นโปรตีน Acyl-CoA:diacylglycerol acyl transferase 1 (EC 2.3.1.20) ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาขั้นตอนสุดท้ายในกระบวนการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ (Winter et al., 2002) และเมื่อเกิดการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ ในลักษณะ Non-conservative จะส่งผลทำให้กรดอะมิโน Lysine เปลี่ยนเป็นกรดอะมิโน Alanine (Grisart et al., 2002) การเปลี่ยนแปลงของยีนในลักษณะดังกล่าว จึงทำให้มีการศึกษาความถี่และอิทธิพลของยีนต่อปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมอย่างแพร่หลาย (Banos, Woolliams, Woodward, Forbes and Coffey, 2008; Gautier, Captan, Fritz, Eggen, Boichard, and Druet, 2007; Kuehn, Edel, Weikard, and Thaller, 2007; Schennink et al., 2007; Bennewitz et al., 2004; Thaller, Krämer, Winter, Kaupe, Erhardt, and Fries, 2003; Weller, Golik, Seroussi, Ezra, and Ron, 2003; Grisart et al.; 2002; ; Spelman, Ford, McElhinney, Gregory, and Snell, 2002;) อย่างไรก็ตาม ยังมีบางประชากรที่พบว่า อิทธิพลของยีนไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน เนื่องจากความแตกต่างของโครงสร้างพันธุกรรรมโคนมในแต่ละประเทศ จากเหตุผลดังกล่าว จึงเป็นแนวคิดในการศึกษาอิทธิพลของยีน *DGAT1* ในประชากรโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนของประเทศไทย เพื่อพัฒนาเป็น genetic marker สำหรับเป็นตัวช่วยในการคัดเลือกโคนมจากลักษณะผลผลิตน้ำนมต่อไป

ส่วนยีน *GnRHR* อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 (NCBI, 2009b) เป็นยีนที่ควบคุมโปรตีน GnRHR ที่อยู่บนผิวเซลล์ gonadotroph ในต่อมใต้สมองส่วนหน้า (Leanos-Miranda, Janovick and Conn, 2002) ซึ่งโปรตีน GnRHR นี้ จะทำหน้าที่เป็นโปรตีนตัวรับของฮอร์โมน GnRH และทำให้ฮอร์โมน GnRH สามารถออกฤทธิ์ เพื่อควบคุมฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ของโคนม เช่น Follicle Stimulating Hormone (FSH) ซึ่งจะไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของไข่ และ Lutienzing Hormone (LH) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการกระตุ้นการตกไข่และกระตุ้นให้เกิดการเป็นสัดในโคและมีบทบาทสำคัญต่อ Timing of puberty ของโค (Lirón et al., 2010) ทั้งนี้ การตอบสนองของเซลล์

gonadotroph ต่อฮอร์โมน GnRH ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและปริมาณของโปรตีนตัวรับ ได้แก่ GnRHR บนผิวเซลล์ด้วย (Wise, Nieman, Stewart, and Nett, 1984) และการกลายพันธุ์ของยีน *GnRHR* อาจจะส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของโปรตีน GnRHR บนเซลล์ gonadotroph แล้วส่งผลต่อการกระตุ้นฮอร์โมนต่าง ๆ ในระบบสืบพันธุ์มากขึ้น (Leanos-Miranda, Janovick and Conn, 2002) จากบทบาทของยีนดังกล่าว จึงทำให้ ยีน *GnRHR* มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์

ทั้งนี้ เพื่อเป็นการกำหนดแนวทางในการใช้ genetic markerทั้งสองตำแหน่งเป็นตัวช่วยในการคัดเลือกโคนมในลักษณะที่มีสหสัมพันธ์ทางลบต่อกัน การศึกษาครั้งนี้จึงจำเป็นจะต้องมีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของการเกิดรูปแบบของยีนร่วมด้วย เนื่องจากความสัมพันธ์ของลักษณะอาจเกิดจากการที่ยีนมีการเกิดรูปแบบที่ไม่อิสระต่อกันหรือ Linkage disequilibrium ซึ่งจะทำให้แนวทางการคัดเลือกต้องพิจารณายีนทั้งสองตำแหน่งไปพร้อมกัน เพื่อไม่ให้เกิดความสูญเสียลักษณะใดลักษณะหนึ่งไป

อย่างไรก็ตาม เป้าหมายการปรับปรุงพันธุ์ที่แตกต่างกันนั้น อาจทำให้โคนมมีโครงสร้างพันธุกรรมโคนมที่แตกต่างกัน ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงจำเป็นจะต้องมีการศึกษาศักยภาพของยีนในกลุ่มตัวอย่างโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน ซึ่งเป็นตัวแทนของโคนมสายพันธุ์หลักที่นิยมเลี้ยงกันมากในประเทศ เพื่อนำยีนมาใช้เป็น genetic marker สำหรับคัดเลือกโคนมกลุ่มตัวอย่างนี้ต่อไป โดยผลงานวิจัยในครั้งนี้ จะทำให้ทราบถึงศักยภาพของการใช้ยีน *DGAT1* และ ยีน *GnRHR* ในการเป็น genetic marker สำหรับเป็นตัวช่วยในการคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนของประเทศ ทั้งนี้ กลุ่มเป้าหมายของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน ที่จะนำงานวิจัยนี้ไปใช้ประโยชน์ คือ โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยนักวิชาการ จะทำหน้าที่ในการใช้ genetic marker เป็นตัวช่วยในการคัดเลือกโคนมและทำการพัฒนาพันธุ์โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนของมหาวิทยาลัย ให้เป็นโคนมฝูงเริ่มต้นที่มีความสามารถทั้งทางด้านความสมบูรณ์พันธุ์ที่ดี สามารถให้ผลผลิตได้อย่างต่อเนื่อง เป็นแหล่งในการผลิตโคนมที่มีพันธุกรรมที่ดี และมีการกระจายพันธุ์โคนมให้เกษตรกรรายย่อย ซึ่งจะเป็นแนวทางการแก้ไขปัญหาในระยะยาวให้กับเกษตรกรต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ในงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาอัลลีล จีโนไทป์ และความถี่ ของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* ในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน และศึกษาความสัมพันธ์ของการเกิดรูปแบบของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR*

1.2.2 เพื่อศึกษาอิทธิพลของยีน *DGAT1* ต่อลักษณะผลผลิตน้ำนมและศึกษาอิทธิพลของยีน *GnRHR* ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ ได้แก่ จำนวนวันท้องว่าง ระยะห่างการให้ลูก จำนวนครั้งการผสมติดและอัตราการผสมติด ของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน

1.2.3 เพื่อศึกษาอิทธิพลของยีนต่อการเปลี่ยนแปลงลำดับค่า EBV ของโคนมในลักษณะผลผลิตน้ำนมและลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ ได้แก่ จำนวนวันท้องว่าง ระยะห่างการให้ลูก จำนวนครั้งการผสมติดและอัตราการผสมติด ของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน

1.3 สมมติฐานของการวิจัย

1.3.1 ยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* มีอัลลีลและจีโนไทป์ มากกว่าหนึ่งรูปแบบ ซึ่งเป็นคุณสมบัติสำคัญของการใช้ยีนเป็น genetic marker และยีนทั้งสองมีรูปแบบยีนที่ไม่อิสระต่อกัน ซึ่งจะทำให้การคัดเลือกอาจต้องพิจารณาทั้งสองยีนไปพร้อม ๆ กัน

1.3.2 ยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* มีอิทธิพลต่อลักษณะปริมาณน้ำนม องค์ประกอบน้ำนมและลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ ได้แก่ จำนวนวันท้องว่าง ระยะห่างการให้ลูก จำนวนครั้งการผสมติดและอัตราการผสมติด ในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน

1.3.3 การใช้ยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* เป็นปัจจัยคงที่ปัจจัยหนึ่ง ในการประเมินค่า EBV ของโคนมทำให้ลำดับค่า EBV ของโคนมมีการเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบค่า EBV ที่ได้จาก animal model ปกติที่ไม่มีการใช้รูปแบบของยีนเป็นปัจจัยคงที่

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นศึกษาศักยภาพของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* เพื่อเป็น genetic marker สำหรับการคัดเลือกโคนมกลุ่มเป้าหมาย ซึ่งได้แก่ โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน โดยผู้ใช้ประโยชน์จากงานวิจัยนี้ คือ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งเป็นหน่วยงานที่มีศักยภาพและมีนักวิชาการที่มีความสามารถในการใช้ genetic marker เพื่อพัฒนาพันธุ์โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนของมหาวิทยาลัย ให้เป็นโคนมฝูงเริ่มต้นที่มีพันธุกรรมดี ทั้งทางด้านความสมบูรณ์พันธุ์และความสามารถในการให้ผลผลิตที่ต่อเนื่อง และนำไปสู่การเป็นแหล่งพันธุกรรมของโคนมให้กับเกษตรกรรายย่อยต่อไป

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงศักยภาพของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* ที่จะนำไปใช้เป็น genetic marker สำหรับโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนของประเทศ ซึ่งหากทราบว่ายีนดังกล่าวมีศักยภาพในการเป็น genetic marker แล้วการศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลร่วมระหว่างยีนและสิ่งแวดล้อม จะเป็นประเด็นที่ต้องมีการศึกษาต่อไป เพื่อนำไปสู่การใช้ยีนทั้งสอง เป็น genetic marker ในประชากรโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2

วรรณกรรมและเอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1 สภาพปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์และการให้ผลผลิตของโคนมในประเทศไทย

ปัญหาหลักของโคนมประเทศไทย คือ ปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์และปัญหาการให้ผลผลิตน้ำนม กล่าวคือ พันธุ์โคนมที่มีการเลี้ยงอยู่ในปัจจุบัน มีการให้ผลผลิตที่ไม่ดีเท่าที่ควร และไม่ทนต่อสภาพภูมิอากาศ โรคและแมลง รวมทั้งสภาพการจัดการในประเทศ (เทพณรงค์, วิศรา และนิธิ กานต์, 2550) ส่งผลทำให้โคนมมีความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ ซึ่งข้อมูลสนับสนุนและตัวบ่งชี้ถึงสภาพปัญหาที่โคนมไทยกำลังประสบอยู่ในปัจจุบัน สามารถวิเคราะห์ได้ดังต่อไปนี้

สภาพปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำสามารถวัดได้จากดัชนีที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของโคนม ได้แก่ จำนวนวันท้องว่าง ระยะห่างการให้ลูก จำนวนครั้งการผสมติดและอัตราการผสมติด ซึ่ง เมื่อพิจารณาจากข้อมูลที่เกิดขึ้นจริงของลักษณะต่าง ๆ เปรียบเทียบกับค่าที่เหมาะสมตามกลไกทางสรีรวิทยาของแม่โคนม (Hafez and Hafez, 2000) และค่ามาตรฐานที่บ่งบอกถึงประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของโคนม (สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์, 2554) พบว่า ลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์นั้น ยังคงเป็นปัญหาที่ต้องได้รับการปรับปรุงและแก้ไขให้มีการเปลี่ยนแปลงในทางที่ดีขึ้น ข้อมูลดังกล่าว สรุปได้ ดังตารางที่ 2.1

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.1 ค่าเฉลี่ย จำนวนวันท้องว่าง ระยะห่างการให้ลูก จำนวนครั้งการผสมติดและอัตราการผสมติดของโคนมในประเทศ เปรียบเทียบกับค่าควรจะเป็นตามทฤษฎีและค่ามาตรฐาน

ดัชนี	ค่าที่ควรจะเป็นตามทฤษฎี	ค่ามาตรฐาน	ค่าที่เกิดขึ้นจริง
จำนวนวันท้องว่าง (วัน)	< 85[1]	-	190.43[3] 171.20[4] 177.06[5] 131.62[7]
ระยะห่างการให้ลูก (วัน)	< 390[1]	-	457.33[3] 451.10[4] 455.36[5]
จำนวนครั้งการผสมติด (ครั้ง)	-	< 2[2]	2.00[6] 3.44[7]
อัตราการผสมติด (%)	-	>70[2]	51.60[6]

หมายเหตุ: [1] Hafez and Hafez (2000); [2] สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์, 2554, [3] สมเกียรติ, ชลลดาและพีระ (2542); [4] วิชัย, มนต์ชัย, เทวินทร์ , วิโรจน์และจินตนา (2548); [5] อดิศร, ณัฐพล และคมเดช (2550); [6] สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ (2552); [7] Panyapornwithaya and Teepatmakorn (2004)

ส่วนสภาพปัญหาการให้ผลผลิตของโคนมในประเทศไทย โคนมลูกผสมส่วนใหญ่ที่มีการเลี้ยงในประเทศไทยนั้น พบว่า มีระดับสายเลือดโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ (Koonawootrittriron, Elzo, Tumwasorn and Nithichai, 2002; Koonawootrittriron, Elzo and Thongprapi, 2009) ซึ่งควรจะมีการให้ผลผลิตที่สูงตามศักยภาพของโคนมพันธุ์ดังกล่าว แต่จากรายงานของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร ณ เดือนกรกฎาคม 2554 พบว่า โคนมทั้งประเทศมีค่าเฉลี่ยของปริมาณน้ำนม เพียง 10.99 กิโลกรัมต่อตัวต่อวันหรือประมาณ 3,300กิโลกรัมต่อระยะการให้นม (305 วัน) ชี้ให้เห็นได้ว่า โคนมไทยมีประสิทธิภาพการผลิตน้ำนมค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับศักยภาพของโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนซึ่งมีความสามารถในการให้ผลผลิตน้ำนมเฉลี่ยสูงถึง 6,000 – 7,000 กิโลกรัมต่อระยะการให้นม (กลุ่มวิจัยและพัฒนาโคนม กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์, 2554) ซึ่งสาเหตุที่ทำให้โคนมของประเทศต้องประสบกับสภาพปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์

และปัญหาการให้ผลผลิตน้ำนมเช่นนี้ สามารถอธิบายได้ใน 2 ประเด็นหลัก คือ สาเหตุเนื่องมาจากพันธุกรรมของโคนมและสาเหตุเนื่องมาจากการจัดการสิ่งแวดล้อม

สาเหตุเนื่องมาจากพันธุกรรมของโคนม เช่น ระดับพันธุกรรมโคนมที่อาจจะยังไม่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อม ทั้งนี้ เป็นเพราะการวางแผนผสมพันธุ์ เพื่อยกระดับสายเลือดให้โคนมสามารถให้ผลผลิตได้สูงขึ้นนั้น ส่งผลในทางกลับกัน คือ โคนมจะมีความสมบูรณ์พันธุ์ลดลง เมื่อระดับสายเลือดของพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนสูงขึ้น (สมเกียรติ และคณะ, 2542; วิชัย และคณะ, 2548; Hoekstra, van der Lugt, van der Werf and Ouweltjes, 1994; Veerkamp, Koenen and DeJong, 2001) โดยโคนมจะมีอัตราการผสมติดต่ำ (จินตนา, ธวัชชัยและกัลยา, 2541; วีระศักดิ์, เอกพจน์และศร, 2549) และมีระยะห่างของการให้ลูกยาวนานขึ้น (สมเกียรติ และคณะ, 2542) ขณะเดียวกันโคนมที่มีระดับสายเลือดโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนสูงขึ้น เมื่อต้องอยู่ในสภาพอากาศร้อนชื้น การกินได้ของโคจะลดลง โภชนะที่ได้รับจึงไม่เพียงพอกับความต้องการ (Beede and Collier, 1986) ผลที่ตามมาคือการให้ผลผลิตน้ำนมก็จะต่ำลงด้วย

เมื่อพิจารณาจากความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลักษณะปริมาณน้ำนม อัตราการผสมติด จำนวนวันท้องว่าง จำนวนครั้งการผสมติด และระยะห่างการให้ลูก (ตารางที่ 2.2) สามารถบ่งชี้ได้ว่าปริมาณน้ำนมที่เพิ่มขึ้นส่งผลทำให้ โคนมมีอัตราการผสมติดลดลง เพิ่มจำนวนครั้งการผสมติด จำนวนวันท้องว่าง และระยะห่างการให้ลูกของโคนมด้วย ฉะนั้น การที่มุ่งเน้นการเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตน้ำนมให้สูงขึ้นเพียงอย่างเดียว ย่อมสูญเสียความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนมในคราวเดียวกัน จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาถึงแนวทางที่จะปรับปรุงพันธุกรรมโคนมที่มีทั้งความสมบูรณ์พันธุ์และความ สามารถในการให้ผลผลิตที่ดีต่อไป

ตารางที่ 2.2 ค่าสหสัมพันธ์ของลักษณะปริมาณน้ำนม อัตราการผสมติด จำนวนวันท้องว่าง จำนวนครั้งการผสมติด และระยะห่างการให้ลูก

ลักษณะ	อัตราการผสมติด	จำนวนวันท้องว่าง	จำนวนครั้งการผสมติด	ระยะห่างการให้ลูก	ปริมาณน้ำนม
อัตราการผสมติด	-	-	-	-	-0.19[(1)]
จำนวนวันท้องว่าง	-	-	0.76[(3)]	0.95[(3)]	0.21[(2)]
จำนวนครั้งการผสมติด	-	-	-	0.73[(3)]	0.24[(3)]
ระยะห่างการให้ลูก	-	-	-	-	0.23[(3)]

หมายเหตุ: [(1)]Kühn et al. (2006), [(2)]Olds, Cooper and Thrift, (1979), [(3)]Kadarmideen, Thompson, Coffey and Kossaibati (2003)

สาเหตุเนื่องมาจากสิ่งแวดล้อมที่ส่งผลทำให้เกิดปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์และปัญหาผลผลิตน้ำนม ได้แก่ การจัดการอาหารที่ไม่เหมาะสมทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ (Badinga, Collier, Thatcher and Wilcox , 1985; Royal et al., 2000), สภาพอากาศซึ่งมีอุณหภูมิและความชื้นสูง (วีระศักดิ์, ศร, ขวัญชาย และวิทยา, 2548; สุรชัยและพัลลภ, 2550; Alnimer, De Rosa, Grasso, Napolitano and Bordi, 2002; White, Wettemann, Looper, Prado, Morgan, 2002, Parra-Bracamonte, Magana, Delgado, Osorio-Arce and Segura-Correa, 2005), ฤดูกาลที่คลอด (พัชรินทร์, สหัทยาและประภาส, 2542; วีระศักดิ์ และคณะ, 2549), ความแตกต่างกันในการจัดการฟาร์มของเกษตรกร(Rhone, Koonawootrittriron and Elzo, 2008; Sarakul, Koonawootrittriron, Suwanasopee, Hirunwong and Thongprapi, 2009) เช่น เกษตรกรบางรายไม่มีการคัดทิ้งโคนมที่ให้ผลผลิตต่ำออกจากฝูง (เทพณรงค์ และคณะ, 2550)

จากสภาพปัญหาและสาเหตุของปัญหา ดังที่กล่าวมานั้น บ่งชี้ให้เห็นว่า ประเทศไทยจำเป็นต้องมีการปรับปรุงพันธุ์โคนมให้เป็นสายพันธุ์โคนมที่มีความจำเพาะ มีความเหมาะสมต่อสภาพการเลี้ยงของประเทศ รวมทั้งเหมาะสมกับความสามารถในการจัดการการเลี้ยงของเกษตรกรภายในประเทศด้วย

2.2 การประเมินคุณค่าการผสมพันธุ์ (EBV) ด้วยการวิเคราะห์ทีละลักษณะ (Single trait animal model)

การศึกษาครั้งนี้มีการประเมินคุณค่าการผสมพันธุ์ด้วยการวิเคราะห์ทีละลักษณะเนื่อง จากข้อมูลของโคนมเป็นข้อมูลที่เก็บในรูปแบบที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ข้อมูลการให้ผลผลิตจะเป็นข้อมูล ณ วันทดสอบ และข้อมูลความสมบูรณ์พันธุ์ จะเป็นข้อมูลของสัตว์ ในแต่ละระยะการให้นม การประเมินค่าการผสมพันธุ์จะอาศัยข้อมูลบันทึกตัวสัตว์จากทุกแหล่งร่วมกับความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของสัตว์ทั้งหมดในพันธุ์ประวัติ ประกอบด้วยข้อมูลพ่อพันธุ์ ข้อมูลแม่พันธุ์ ข้อมูลตัวสัตว์เอง และข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมระหว่างตัวสัตว์ (genetic relationship) แม้สัตว์บางตัวจะมีข้อมูลเพียงบันทึกเดียวหรือสัตว์บางตัวที่ไม่มีบันทึก ก็จะสามารถประเมินพันธุกรรมได้ผ่านทางข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และมีการปรับความแตกต่างเนื่องจากสภาพแวด ล้อมที่แตกต่างกัน เช่น ฤดูกาล ปีเกิด ฝูง กลุ่มพันธุ์ และอิทธิพลเนื่องจากปัจจัยอื่น ๆ ในรูปของโมเดลผสมที่สามารถประมาณอิทธิพลจากปัจจัยคงที่และปัจจัยสุ่มได้พร้อมกัน เพื่อให้ค่าที่ประเมินได้ไม่มีความอคติทางสถิติ (unbiasedness) จึงสามารถประเมินค่า EBV ออกมาพร้อมกันทั้งพ่อพันธุ์ แม่พันธุ์ และตัวสัตว์เองได้ โดยค่าประมาณของอิทธิพลเนื่องจากปัจจัยคงที่ที่ได้จะมีคุณสมบัติเป็น Best Linear Unbiased Estimator (BLUE) และค่าประมาณของอิทธิพลเนื่องจากปัจจัยสุ่มได้จะมีคุณสมบัติเป็น Best Linear Unbiased Prediction (BLUP) ค่าที่ได้เป็นการประเมินจากพันธุกรรม

ของสัตว์โดยตรง ซึ่งจะใช้วิธีการประมาณค่าอิทธิพลคงที่จากข้อมูลของสัตว์ที่มีอยู่ (มนต์ชัย, 2548)

อย่างไรก็ตาม ความแม่นยำของการประเมิน ค่า EBV จะเพิ่มขึ้นเมื่อนำข้อมูลในระดับยีนร่วมในการประเมินด้วย ข้อมูลดังกล่าว ยกตัวอย่างเช่น ข้อมูลของจีโนไทป์ที่อยู่ใกล้ตำแหน่ง Quantitative Trait Loci (Ansari-Mahyari, Sørensen, Lund, Thomsen and Berg, 2008) ข้อมูลของการเกิด Linkage disequilibrium ของยีนศึกษากับตำแหน่ง QTL (Goddard, 2009; Hayes and Goddard, 2008) ถ้าระดับการเกิด Linkage disequilibrium มากขึ้นความแม่นยำก็จะสูงขึ้น (Meuwissen, Hayes, and Goddard, 2001; Calus, Meuwissen, de Roos and Veerkamp, 2008), จำนวนสัตว์ที่มีข้อมูลจีโนไทป์และข้อมูลลักษณะปรากฏ (Hayes, Bowman, Chamberlain and Goddard, 2009) และการกระจายตัวของตำแหน่ง QTL (Goddard, 2009; Hayes and Goddard, 2008) ซึ่งถ้ามีการกระจายตัวอยู่มากประกอบกับการมีข้อมูลค่าสังเกตในการประเมินค่า EBV จำนวนมาก การประเมินค่าจะเกิดความแม่นยำมากขึ้น (Hayes et al., 2009) จากรายงานการวิจัยที่มีการใช้ข้อมูลในระดับยีนมาร่วมในการประเมินพันธุกรรมโคนม พบความสัมพันธ์ในทางบวก (r = 0.52) ระหว่างค่าการผสมพันธุ์จีโนม (GEBV; Genomic Estimated Breeding Value) กับ ค่าการผสมพันธุ์ (EBV) ปกติของโคนม (Zukowski, Suchocki, Gontarek and Szyda, 2009) และบางครั้งการใช้ข้อมูลในระดับยีนอาจจะทำให้การจัดลำดับค่า EBV ของโคมีการเปลี่ยนแปลงได้ เช่น การศึกษา microsatellite ของยีน IGF I ในโคเนื้อ Canchim (Charolais x Nellore) พบว่า อิทธิพลของยีนส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลำดับค่า EBV ลักษณะน้ำหนักแรกเกิดและน้ำหนักหย่านมของโค 50 อันดับแรก (Andrade, Grossi, Paz, Alencar, Regitano and Munari, 2008) จะเห็นได้ว่า การกำหนดอิทธิพลของยีน เป็นปัจจัยคงที่ในการประเมินค่าทางพันธุกรรมของสัตว์ จะทำให้การคัดเลือกมีความแม่นยำสูงขึ้น (Druet et al., 2005) และอาจจะส่งผลทำให้ลำดับของค่า EBV มีการเปลี่ยนแปลงได้ ดังนั้นการใช้ genetic marker มาเป็นตัวช่วยในการประเมินพันธุกรรมสัตว์ จึงเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกโคนมได้

2.3 การใช้ genetic marker เพื่อช่วยในการคัดเลือกสัตว์

การศึกษาเกี่ยวกับการคัดเลือกสัตว์โดยใช้ genetic marker มาเป็นตัวช่วยในการคัดเลือกสัตว์ จะเป็นการเพิ่ม genetic gain ในการปรับปรุงพันธุ์ เพิ่มความแม่นยำในการประเมินค่าทางพันธุกรรมและการประเมินความสามารถของพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ (Meuwissen and Van Arendonk., 1992) Meuwissen et al. (2001) พบว่า การประเมินค่า EBV จากข้อมูลของ genetic marker ทำให้เกิดความแม่นยำในการคัดเลือกพ่อพันธุ์ด้วย progeny test ประมาณ 75-85 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับ Druet et al. (2005) ซึ่งรายงานว่า การใช้ตัวแบบตัวสัตว์ที่มีอิทธิพลของ genetic

marker ในการประเมินโคนมมีความแม่นยำในการคัดเลือกสูงถึง 72 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การใช้ตัวแบบตัวสัตว์ปกติมีความแม่นยำในการคัดเลือกเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ จากรายงานการวิจัยที่กล่าวมาในข้างต้น จะเห็นได้ว่า genetic marker สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้ในการคัดกรองพ่อแม่พันธุ์โคนม ซึ่งเอื้อประโยชน์ทำให้การวางแผนการผสมพันธุ์ เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ ภายในประชากรทำได้ง่ายและมีประสิทธิภาพสูง ส่วนเกษตรกรก็จะมีโอกาสใช้ประโยชน์จากค่าการผสมพันธุ์ที่มีการใช้ genetic marker ร่วมในการประเมินนี้ ในการตัดสินใจคัดเลือกพ่อและแม่พันธุ์โคนมได้ตั้งแต่อายุยังน้อยและมีความแม่นยำสูงกว่าค่า EBV ที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ดังนั้น จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษา genetic marker เพื่อนำมาช่วยในการปรับปรุงพันธุกรรมโคนมในประเทศต่อไป

การพิจารณายีนที่มีศักยภาพในการเป็นเครื่องหมายพันธุกรรม จะต้องพิจารณาจากมีคุณสมบัติของยีน ดังต่อไปนี้ ขนาดของอิทธิพลของเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ต่อลักษณะที่สนใจ ซึ่งยีนที่เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่ดีจะต้องมีอิทธิพลต่อลักษณะโดยตรง มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic polymorphism) และมีความถี่ของอัลลีลต่าง ๆ ของเครื่องหมายพันธุกรรม (Alison Van Eenennaam, 2009) ปัจจุบันในการปรับปรุงพันธุกรรมสัตว์ มีการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำ Candidate gene มาใช้เป็นgenetic marker อย่างแพร่หลาย เพื่อนำข้อมูลอิทธิพลของยีนที่มีต่อลักษณะมาใช้เป็นปัจจัยหนึ่งในการประเมินค่าทางพันธุกรรมของสัตว์หรือ EBV เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกสัตว์จากลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจ

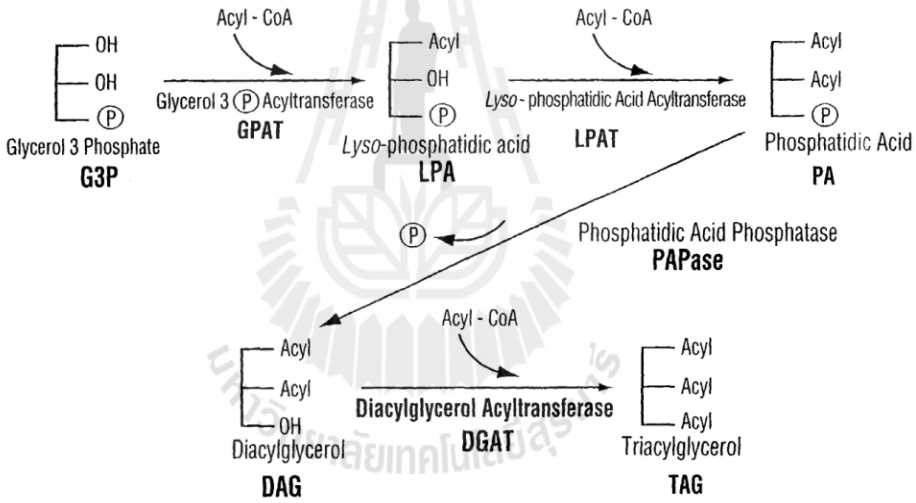
2.4 บทบาทของยีน *DGAT1* ต่อลักษณะผลผลิตน้ำนมและบทบาทของยีน *GnRHR* ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์

จากการที่ลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจของโคนม อย่างเช่น ลักษณะผลผลิตน้ำนมและลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมในลักษณะที่ไม่เอื้อประโยชน์ต่อกัน อันเป็นอุปสรรคทำให้การปรับปรุงพันธุ์เป็นไปได้ช้า ดังนั้น จึงมีความน่าสนใจ ในการนำ genetic marker มาร่วมในการคัดเลือกโคนม เพื่อช่วยลดระยะเวลาและเพิ่มความแม่นยำ โดยทำการศึกษาศักยภาพของยีนที่มีบทบาทต่อการให้ผลผลิตน้ำนมและยีนที่มีบทบาทต่อความสมบูรณ์พันธุ์ รวมทั้งความสัมพันธ์ของยีนทั้งสอง และนำไปประยุกต์ใช้เป็น genetic marker สำหรับการคัดเลือกโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนต่อไป ซึ่งยีนที่มีบทบาทดังที่กล่าวมา ได้แก่ ยีน *DGAT1* มีบทบาทในการสร้างเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ (Winter et al., 2002) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของไขมันนม (Cases et al, 1998) และสัมพันธ์กับลักษณะปริมาณน้ำนม (Näslund, Fikse, Pielberg, and Lundén, 2008) และยีน *GnRHR* เป็นยีนที่ควบคุมการหลั่งของฮอร์โมน GnRH ซึ่งมีความสำคัญมากในการควบคุมฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ของโคนม เช่น FSH ซึ่งจะไป

กระตุ้นการเจริญเติบโตของไข่ และ LH ซึ่งจะทำหน้าที่ในการกระตุ้นการตกไข่และกระตุ้นให้เกิดการเป็นสัดในโค

2.4.1 ยีน *Acyl-CoA:diacylglycerol acyl transferase 1 (DGAT1)*

ยีน *DGAT1* ที่พบในโคนมจะอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 14 มีขนาดของยีนประมาณ 2714 bp (NCBI, 2009a) มีทั้งหมด 17 exon และแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 489 ตัว (Grisart et al., 2002) ยีน *DGAT1* เป็น strong candidate gene ซึ่งจะทำงานร่วมกับยีนอื่นในการควบคุมลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม (Grisart et al., 2002) โดยยีน *DGAT 1* จะแปลรหัสได้เป็นโปรตีน Acyl-CoA:diacylglycerol acyl transferase 1 (EC 2.3.1.20) ซึ่งเป็น microsomal enzyme ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาขั้นตอนสุดท้ายในกระบวนการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ (Winter et al., 2002) แสดงดังภาพที่ 2.1

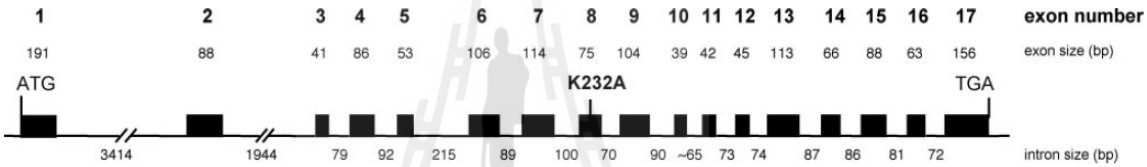


ภาพที่ 2.1 กลไกการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์
ที่มา: Zou, David, Yangdou and Colette (2006)

จากภาพที่ 2.1 สารตั้งต้นในการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ คือ กรดไขมันและกลีเซอรอล โดยขั้นตอนแรกของการสังเคราะห์จะมีการต่อโมเลกุลของกรดไขมัน 2 โมเลกุลเข้าไปที่หมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของ glycerol-3-phosphate ได้เป็น phosphatidic acid ต่อมาจะสลายเอาหมู่ฟอสเฟตออกโดยเอนไซม์ phosphatidic acid phosphatase ได้เป็น 1,2-diacylglycerol ซึ่งจะเปลี่ยนเป็น Triacylglycerol โดยการเติมกรดไขมันเข้าไปอีก 1 โมเลกุลและจะเกิดจากการทำงานร่วมกันของ Acyl-CoA กับเอนไซม์ Diacylglycerol Acyltransferase (DGAT) (พัชรี, เปรมใจ, อุบล

และปีติ, 2551) จากนั้นไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จากการสังเคราะห์ในข้างต้น ส่วนหนึ่งจะไปเป็นสาร ตั้งต้นในการสังเคราะห์ไขมันนมที่ต่อมน้ำนมต่อไป

เมื่อยีน *DGAT1* เกิดการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ ในลักษณะ Non-conservative บน exon 8 ดังภาพที่ 2.2 (Winter et al., 2002) ส่งผลทำให้กรดอะมิโน Lysine เปลี่ยนแปลงเป็นกรดอะมิโน Alanine เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลง triple code ของกรดอะมิโน กล่าวคือ AAG ซึ่งเป็น triple code ของกรดอะมิโน Lysine ถูกแทนที่ด้วยเบส GC ที่ตำแหน่งเบส AA สองตัวแรก ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยน triple code เป็น GCG แล้วจะมีการแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนตัวใหม่ คือ Alanine ดังภาพที่ 2.3 การเปลี่ยนแปลงของยีนในลักษณะดังกล่าวจะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ DGAT1 ในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์และส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมของโคนม



ภาพที่ 2.2 การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ K232A บน exon 8

ที่มา: Winter et al. (2002)

ภาพที่ 2.3 ลักษณะ triple code ของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลง

ที่มา: Tantia, Vijh, Mishra, Mishra, Kumar and Sodhi (2006)

จากการรวบรวมเอกสาร พบว่า ยีน *DGAT1 K232A* มีลักษณะเป็น diallele ได้แก่ อัลลีล K และ A โดยในแต่ละประชากรโคนมมีความถี่ของอัลลีลและความถี่ของจีโนไทป์ที่แตกต่างกันไป (ตารางที่ 2.3) ทั้งนี้ ทิศทางของความถี่ยีนนั้นจะมีความเหมือนหรือแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับเป้าหมายของการคัดเลือกโคนมในแต่ละประชากร

ตารางที่ 2.3 ความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์ของยีน *DGAT1* ในโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน

Populations	N	Allele		Genotype			Reference
		K	A	KK	KA	AA	
Baja California	196	0.18	0.82	0.021	0.32	0.66	Hori-Oshima and Barreras-Serrano (2003)
Brazil	50	0.27	0.73	0.14	0.26	0.60	Lacorte et al. (2006)
China	1222	0.45	0.55	0.14	0.61	0.25	Sun et al. (2009)
France	2086	0.37	0.63	0.09	0.45	0.46	Gautier et al. (2007)
German	315	0.34	0.66	0.14	0.40	0.46	Hradecká, Citek, Panicke, Rehout, and Hanusova (2008)
Greece	497	0.62	0.38	0.24	0.76	0.00	Oikonomou, Angelopoulou, Arsenos, Zygoyiannis, and Banos (2008)
India	281	0.59	0.41	0.21	0.76	0.03	Patel et al. (2009)
Ireland	848	0.32	0.68	0.11	0.42	0.47	Berry et al. (2010)
Italy	116	0.25	0.75	0.05	0.41	0.54	Scotti, Fontanesi, Schiavini, Mattinadro, Bagnato,Russo, (2010)
New Zealand	1527	0.6	0.4	583	666	278	Spelman et al., (2002)
Poland	177	0.40	0.6	0.31	0.58	0.11	Strzalkowska, Siadkowska, Sloniewski, Krzyzewski, and Zwierzchowski, (2005)
Sweden	96	0.14	0.86	0.03	0.20	0.76	Näslund et al. (2008)
Thailand	387	0.71	0.29	0.42	0.57	0.01	Jureerath Sanpote, Sayan Buaban and Kanokporn Triwitayakor (2009)

หมายเหตุ : N คือ จำนวนสัตว์ที่ศึกษาในแต่ละประชากร

จากตารางที่ 2.3 แสดงให้เห็นว่า ยีน *DGAT1* มีลักษณะที่เป็น diallele เช่นเดียวกันในทุกประชากรโคนม โดยทิศทางของความถี่ยีนมีความแตกต่างกันไป อย่างไรก็ตาม เพื่อให้ทราบถึงศักยภาพของยีน DGAT1 ในการเป็น genetic marker สำหรับลักษณะผลผลิตน้ำนม จึงได้มีการศึกษา อิทธิพลของยีน *DGAT1* ต่อลักษณะปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมอย่างแพร่หลาย

โดยการศึกษามีทั้ง การประมาณค่าอิทธิพลจากข้อมูลของตัวสัตว์เองซึ่งเป็นโคนมเพศเมียและการนำข้อมูลการให้ผลผลิตของลูกโคนมเพศเมียมาใช้ในการประเมินพ่อพันธุ์ (progeny test) ซึ่งสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 อิทธิพลของยีน *DGAT1 K232A* ต่อลักษณะปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมในโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน

Holstein populations	Sex	Estimated Method	Milk yield (kg)	Fat yield (kg)	Protein yield (kg)	Fat content (%)	Protein content (%)	Reference
Dutch Holstein	Male	$\alpha/2$	-158.00	5.23	-2.82	0.17	0.04	Grisart et al. (2002)
New Zealand Holstein	Female	α	-161.00	7.46	-2.64	0.42	0.08	Grisart et al. (2002)
New Zealand Holstein	Male	α	-134.00	5.76	-2.45	-	-	Spelman et al. (2002)
German Holstein	Male	$\alpha/2$	-288.00	10.60	-4.48	0.29	0.07	Kaupe, Brandt, Prinzenberg and Erhardt (2007)
French Holstein	Male	α	-351.00	-14.90	-4.63	0.34	0.08	Gautier et al. (2007)
Chinese Holstein	Female	α	248.39	-11.91	5.14	-0.27	0.04	Sun et al. (2009)
Swedish Holstein	Female	α	-0.61	0.11	-0.12	0.49	0.01	Näslund et al. (2008)
Dutch Holstein	Female	KK-KA	-0.84	0.02	-0.02	0.45	0.10	Schennink et al. (2007)
Polish Back and White	Male	KK-KA	-110.00	6.10	-1.60	-	-	Szyda and Komissarek (2007)

หมายเหตุ: $\alpha/2$; QTL allele substitution effect on DYD), α ; average *K* to *A* substitution effect

จากตารางที่ 2.4 จะเห็นได้ว่า ประชากรส่วนใหญ่พบอิทธิพลเนื่องจากเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Lysine (K) เป็นกรดอะมิโน Alanine (K232A) ส่งผลต่อการลดปริมาณน้ำนม ลด

ปริมาณโปรตีนและเพิ่มปริมาณและความเข้มข้นของไขมัน ซึ่งการที่อัลลีล K มีอิทธิพลต่อการเพิ่มไขมันนม มีประเด็นที่ใช้ในการอธิบาย ดังนี้

ประเด็นที่หนึ่ง ยีน *DGAT1* อัลลีล K สัมพันธ์กับการเพิ่มกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) และสัมพันธ์กับการลดลงของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) (Schennink et al., 2007) ซึ่งเป็นส่วนประกอบของกรดไขมันตำแหน่งที่สาม *(sn-3)* (Parodi, 1982) กรดไขมันตำแหน่งสุดท้ายที่เอนไซม์ DGAT1 จะทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะเอสเทอร์ของกรดไขมัน เพื่อให้การสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์สมบูรณ์ ดังนั้นจึง เป็นไปได้ว่าผลการศึกษาที่พบอัลลีล K ที่มีอิทธิพลต่อลักษณะไขมันนมเป็นผลเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของไขมันนมด้วย (Schennink et al., 2007) **ประเด็นที่สอง** กรดอะมิโน lysine อาจมีปฏิกิริยาร่วมกันกับโคเอนไซม์เอ (CoA) ซึ่งจะเป็นตัวนำหมู่ Acyl มาจับกับเอนไซม์ DGAT1 เมื่อเกิดการทำงานร่วมกันแล้วจะส่งผลบวกต่อการสังเคราะห์ไขมัน ขณะที่กรดอะมิโน alanine อาจมีอิทธิพลที่เป็นทางลบต่อ acyl-CoA binding capacity ของเอนไซม์ DGAT1 ลักษณะดังกล่าวจึงบ่งชี้ได้ว่า lysine ซึ่งเกิดจากยีน *DGAT1* อัลลีล K มีประสิทธิภาพในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไขมันได้มากกว่า alanine ซึ่งมาจากอัลลีล A (Winter et al., 2002) ดังนั้น อัลลีล K จึงมีอิทธิพลต่อไขมันนม

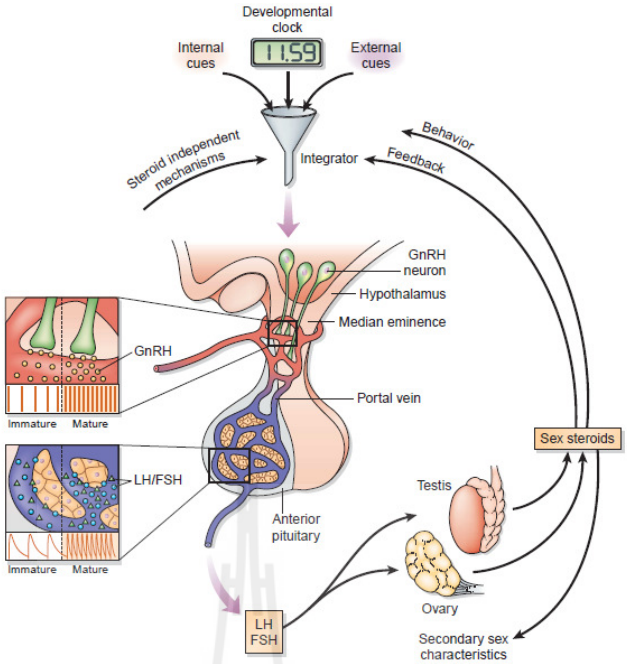
อย่างไรก็ตาม ยังมีบางประชากรที่อิทธิพลของยีนที่ไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งเกิดจากหลายปัจจัย ตามรายงานของ Berry et al. (2010) ได้แก่ ความแตกต่างของความถี่อัลลีลในประชากรที่ทำการศึกษา ลักษณะและจำนวนของข้อมูลที่ใช้ในการวิเคราะห์อิทธิพลของยีน การเกิดปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างยีนกับสิ่งแวดล้อม และ ยีน *DGAT1* อาจเกิดปฏิกิริยาร่วมกับชุดยีนที่อยู่ในโครงสร้างพันธุกรรรมของโคนมแต่ละประเทศ จากเหตุผลดังกล่าว มีความเป็นไปได้ที่จะพบความแตกต่างของอิทธิพลของยีน *DGAT1* ในกลุ่มตัวอย่างโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนของประเทศไทยได้ ดังนั้น จึงเป็นแนวคิดในการศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาอิทธิพลของยีนในประชากรโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนในครั้งนี้

2.4.2 ฮอร์โมน Gonadotropin releasing hormone (GnRH) ในระบบสืบพันธุ์โคนมเพศเมีย

ฮอร์โมน GnRH เป็นเปปไทด์ฮอร์โมน จะประกอบด้วยกรดอะมิโน 10 ตัวมาเชื่อมกันด้วยพันธะเปปไทด์ ทำหน้าที่ควบคุมระบบสืบพันธุ์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ผลิตจาก specific hypothalamic neurons และ preoptic area ของสมองส่วน hypothalamus อย่างเป็นช่วง (pulsatile secretion) เมื่อ GnRH มีความถี่และปริมาณที่พอเหมาะ ฮอร์โมนจะถูกส่งไปยังต่อมใต้สมองส่วนหน้า และเกิดการกระตุ้นเซลล์ gonadotroph ให้มีการสร้างและหลั่ง ฮอร์โมน Follicle stimulating

hormone (FSH) ไปกระตุ้น การเจริญของ follicle ในรังไข่ เพื่อทำหน้าที่ในการสร้าง estrogen และ progesterone และฮอร์โมน Luteinizing hormone (LH) ไปกระตุ้นเซลล์ของมดลูกให้ทำการผลิต testosterone เพื่อเป็นตัวตั้งต้นในการสร้าง estrogen แต่ถ้าความถี่ ลดลงการหลั่ง FSH และ LH จะลดลง และเมื่อมีการกระตุ้นให้มีการผลิต estrogen ออกมามากเกินความจำเป็น จะเกิดการควบคุมการหลั่งฮอร์โมนย้อนกลับแบบลบ (negative feedback control) ไปยังต่อมใต้สมองส่วนหน้าและ hypothalamus ไม่ให้หลั่ง LH และ GnRH ออกมา จึงไม่มีการตกไข่ (Samuel, Robert, and Robert, 1999)

เมื่อโคนมเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ (puberty) ซึ่งเป็นช่วงเวลาหรืออายุที่โคนมจะเริ่มผลิตหน่วยสืบพันธุ์และสามารถผสมพันธุ์ได้ ฮอร์โมนที่ควบคุมระบบสืบพันธุ์จะมีการเปลี่ยนแปลงเพื่อให้เกิดการตกไข่และมีการเป็นสัดครั้งแรก ซึ่งในระยะนี้ ฮอร์โมนในกลุ่ม Hypothalamus pituitary gonad (HPG) ได้แก่ ฮอร์โมน GnRH , FSH และ LH จะมีการกระตุ้นสูงสุด เนื่องจากเซลล์สืบพันธุ์มีการพัฒนาเต็มที่ โดยจะมีการส่งสัญญาณจากสมองส่วนกลาง ทำให้มีการทำงานของ Development clock ซึ่งได้แก่ ยีน *Kiss peptin* (Revel, Ansel, Klosen, Saboureau, Pévet and Simonneaux, 2007) ที่มีหน้าที่ในการควบคุมการเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ และเมื่อมีการกระตุ้นจากปัจจัยทั้งภายในและภายนอกตัวสัตว์ไปยังสมองส่วน hypothalamus จะเกิดการกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมน GnRH โดยลักษณะการหลั่งของฮอร์โมน GnRH ในช่วงนี้จะเกิดขึ้นเป็นจังหวะ (pulse) ผ่านเส้นประสาทส่วนปลายใน median eminence ซึ่งอยู่ในส่วนต้นของสมองส่วน hypothalamus ฮอร์โมนที่หลั่งออกมาจะผ่านเส้นเลือดดำใหญ่ (portal vein) ไปยังต่อมใต้สมองส่วนหน้า เพื่อจับกับตัวรับ คือ GnRHR ที่อยู่บนผิวเซลล์ gonadotroph จากนั้นจึงมีการส่งสัญญาณในการกระตุ้นการสังเคราะห์และหลั่งฮอร์โมน LH และ FSH ไปตามกระแสเลือดเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย ซึ่งได้แก่ รังไข่ และมีการกระตุ้นให้เกิดการเป็นสัดครั้งแรกต่อไป (Sisk and Foster, 2004) โดยกลไกการทำงานดังที่กล่าวมา แสดงดังภาพที่ 2.4

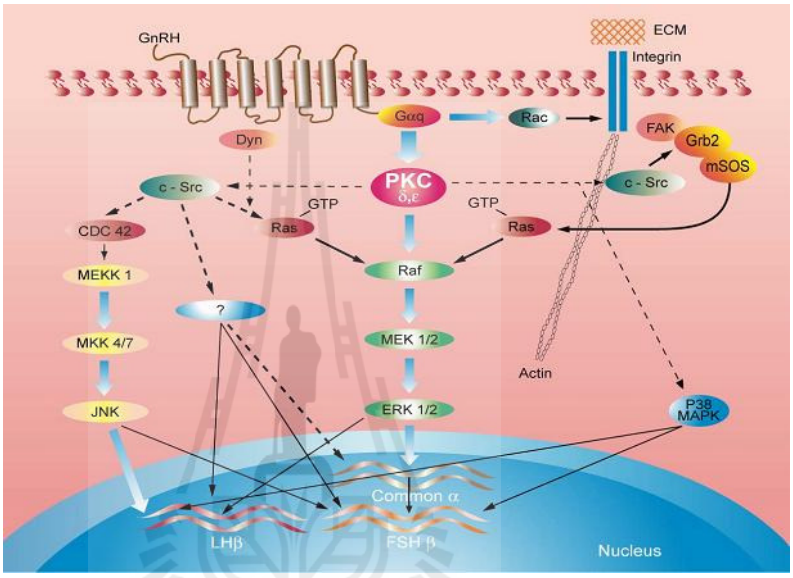


ภาพที่ 2.4 กลไกการทำงานของฮอร์โมน GnRH
ที่มา; Sisk and Foster (2004)

การตอบสนองของต่อมใต้สมองต่อ GnRH ในเพศเมียจะเปลี่ยนแปลงตามช่วงเวลาของการเป็นสัด ได้แก่ **ระยะพัฒนาการการเจริญเติบโตของไข่ (Follicular phase)** granulosa cells จะมีการหลั่ง inhibin ซึ่งจะมีผลยับยั้งการหลั่ง FSH ส่วน estrogen ที่มีการหลั่งออกมาในระยะแรกจะไปกระตุ้นสมองส่วนไฮโปธาลามัสให้มีการหลั่งฮอร์โมน GnRH ไปยังต่อมใต้สมองส่วนหน้าเพื่อให้เกิดการหลั่ง gonadotropin ที่จะมีผลต่อมาทำให้ระดับของ estrogen เพิ่มขึ้น **ช่วงกลางรอบการเป็นสัด (Midcycle)** มีการควบคุมแบบ positive feedback การที่ estrogen ทำให้เกิด LH surge โดยจะกระตุ้นให้ต่อมใต้สมองมีความไวต่อ GnRH จาก hypothalamus มากขึ้น ทำให้ระดับของ LH ที่หลั่งจาก ต่อมใต้สมองเพิ่มสูงขึ้นฉับพลันและทำให้เกิดการตกไข่ ซึ่งการหลั่ง LH จะเพิ่มขึ้นทั้งความถี่ของการหลั่งและปริมาณของ LH ที่หลั่งแต่ละครั้ง เมื่อมีการหลั่ง LH มากขึ้นจะทำให้ปริมาณ estrogen ที่เพิ่มขึ้นมีผลในการยับยั้งการหลั่ง FSH จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า **ระยะการพัฒนาการของ Follicle ไปเป็น Corpus luteum (Luteal phase)** เมื่อมีการหลั่ง estrogen และ progesterone ออกมามากเกินความจำเป็น จะทำให้เกิดการกดการหลั่ง LH estrogen มีผลในการลด amplitude ของสัญญาณ GnRH ส่วน progesterone มีผลในการลดความถี่ของสัญญาณ GnRH โดยการกระตุ้นผ่าน endogenouse opioids ไปยังไฮโปธาลามัสทำให้มีการยับยั้ง estrogen ไม่ให้มีการกระตุ้นการหลั่ง LH และยับยั้งไม่ให้ต่อมใต้สมองส่วนหน้าหลั่ง gonadotropin ออกมา (Gayatri, 2007)

2.4.3 การส่งสัญญาณของฮอร์โมน GnRH ไปยัง เซลล์ตัวรับ GnRHR

การออกฤทธิ์ของฮอร์โมน GnRH ต้องอาศัยตัวรับสัญญาณ (receptor) เป็นโปรตีนที่แทรกอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ (integral protein) เนื่องจากเป็นเปปไทด์ฮอร์โมน มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี (hydrophilic) ทำให้ไม่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมายได้ ตามกระบวนการดังภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 กลไกการส่งสัญญาณฮอร์โมน GnRH เข้าสู่เซลล์ตัวรับ

ที่มา : Naor (2009)

จากภาพที่ 2.5 ฮอร์โมน GnRH ที่ถูกผลิตออกมาจะจับกับตัวรับที่ผิวเซลล์และมีการกระตุ้นผ่าน G-Protein ชนิด Gαq และ Gαs จากนั้นจึงมีการส่งสัญญาณในระยะที่สอง (second messenger system) ไปกระตุ้น phosphatidylinositol-calcium เพื่อสลาย phosphatidylinositol ให้ได้เป็น inositol –triphosphate และ diacylglycerol ไปกระตุ้นให้ protein kinase-C (PKCs) ซึ่งจะมีผลต่อไปกระตุ้นmitogen-activated protein kinase (MAPK) ให้เข้าไปในนิวเคลียสและไปกระตุ้น c-jun และ c-fos ทำให้มีการแสดงออกของยีน (transcription) gonadotropin ให้มีการผลิตและหลั่ง LH หรือ FSH ออกมา และเมื่อมีการกระตุ้นผ่าน Gαs จะมีการส่งสัญญาณไปกระตุ้น adenylate cyclase มีผลทำให้เปลี่ยน ATP ไปเป็น cAMP เพื่อกระตุ้น protein kinase-A จากนั้น protein kinase-A จะส่งหมู่ฟอตเฟสไปให้ c-AMP response element-binding protein (CREB) ซึ่งจะเข้าไปในนิวเคลียสแล้วไปจับกับ c-AMP response element (CRE) ทำให้มีการแสดงออกของยีนที่อยู่ในกลุ่ม gonadotropin

ให้มีการผลิตและหลั่ง LH หรือ FSH ออกมา (Shacham et al., 2001) แต่ถ้า ฮอร์โมน GnRH มีการหลั่งถี่มากขึ้น หรือ หลั่งต่อเนื่องเป็นเวลานาน ทำให้ตัวรับ(receptor) ฮอร์โมนที่อยู่ที่ต่อมใต้สมองส่วนหน้าลดลง และมีผลยับยั้งการสร้างและหลั่ง FSH และ LH ซึ่งผลที่ตามมาอาจจะทำให้โคไม่มีการตกไข่หรือตกไข่ช้าและอาจจะกระทบต่อการเป็นสัดของโคได้ ดังนั้น การศึกษาการคัดเลือกโคนมในลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ โดยใช้ MAS เป็นตัวช่วยในการคัดเลือก จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษายีนที่สังเคราะห์โปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับสัญญาณดังกล่าว ได้แก่ ยีน *Gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR)* ซึ่งจะกล่าวในรายละเอียดต่อไป

2.4.4 โปรตีน Gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR)

โปรตีน GnRHR มี 3 ชนิด คือ GnRHR I II และ III ชนิดที่มีความสำคัญและพบในโคนมและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ GnRHR I ที่ไม่มี carboxyl-terminal tail และจัดอยู่ในกลุ่ม 7 transmembrane (TM) domains ของ G-protein-coupled receptor (GPCRs) หน้าที่และตำแหน่งที่มีการแสดงออกของ GnRH I receptor ในโคนมเพศเมีย ได้แก่ บริเวณรังไข่ (Ovary) พบ GnRH I mRNA ในเซลล์ granulosa ทำหน้าที่ในการกระตุ้นการสลายตัวของ follicle , กระตุ้นให้ oocyst เจริญเต็มที่ในช่วงการเป็นสัด และการแสดงออกของ GnRH จะเปลี่ยนแปลงไปตามพัฒนาการของ follicle นอกจากนี้ยังพบการแสดงออกของ GnRH I receptor บริเวณมดลูกและท่อนำไข่ของโค (Singh, Graves, Roskelley, Giritharan, and Rajamahendran, 2008) โดยการแสดงออกจะอยู่บริเวณผิวเซลล์ gonadotrope ของต่อมใต้สมองส่วนหน้า (Shacham et al., 2001) ซึ่งในการทำงานของ GnRHR บนผิวเซลล์ gonadotrope จะมีผลต่อฮอร์โมนเพศเมียที่ถูกสร้างและหลั่งจาก hypothalamus และจะมีผลต่อไปยังฮอร์โมนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ของโคนมเพศเมีย ต่อไป

2.4.5 ยีน *Gonadotropin releasing hormone receptor (GnRHR)*

ยีน *GnRHR* อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 ของโค ชิ้นส่วนของยีนมี 3 exons และ 2 introns (NCBI, 2009b) โครงสร้างปฐมภูมิของยีน *GnRHR* ในรูปแบบของ cDNA พบที่ต่อมใต้สมองของโค ประกอบด้วย 1326 bp (NCBI, 2009c) เป็นยีนที่ควบคุมการหลั่งของฮอร์โมน GnRH ซึ่งมีความสำคัญมากในการควบคุมฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ของโคนม เช่น Follicle Stimulating Hormone (FSH) ซึ่งจะไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของไข่ และ Lutienzing Hormone (LH) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการกระตุ้นการตกไข่และกระตุ้นให้เกิดการเป็นสัดในโคและมีบทบาทสำคัญต่อ Timing of puberty ของโค (Lirón et al., 2010)

ทั้งนี้ มีงานวิจัยที่ทำการศึกษา อิทธิพลของยีน *GnRHR* ต่อลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์ พบว่า ยีน *GnRHR* มีบทบาทสำคัญต่อลักษณะอายุการเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์

(Timing of puberty) ของโค (Lirón et al., 2010) ซึ่งลักษณะนี้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์ของโค โดยในช่วงที่แม่โคเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์จะเป็นช่วงที่ฮอร์โมน GnRH มีการผลิตออกมาเพิ่มขึ้น เพื่อควบคุมการสังเคราะห์และการหลั่งของฮอร์โมน FSH , LH (Kaiser, Jakubowiak, Steinberger and Chin, 1993) ทั้งนี้ การตอบสนองของเซลล์ gonadotroph ต่อฮอร์โมน GnRH ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและปริมาณของโปรตีนตัวรับ ได้แก่ GnRHR บนผิวเซลล์ด้วย (Wise, Nieman, Stewart, and Nett, 1984) และการกลายพันธุ์ของยีน *GnRHR* อาจจะส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของโปรตีน GnRHR บนเซลล์ gonadotroph แล้วส่งผลต่อการกระตุ้นฮอร์โมนต่าง ๆ ในระบบสืบพันธุ์มากขึ้น (Leanos-Miranda, Janovick and Conn, 2002) จากบทบาทของยีนดังกล่าว จึงทำให้ ยีน *GnRHR* มีความสัมพันธ์กับลักษณะที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ ซึ่งความหลากหลายของยีน *GnRHR* ที่พบในโค สามารถพบได้ทั้งในสภาพที่เป็นรูปแบบดีเอ็นเอสายเดี่ยว (SSCP) (Milazotto et al., 2008) ทั้งหมด 3 รูปแบบ และเมื่อทำ sequencing พบว่า ลำดับเบสของ DNA มีการเปลี่ยนแปลงเบส C หรือ เบส T ที่ตำแหน่ง 342 bp, 409 bp และ 493 bp ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีงานที่ศึกษาพบรูปแบบของยีน *GnRHR* ตำแหน่ง SNPs (Lirón et al., 2010, Heaton et al., 2002)

จากทฤษฎีและงานวิจัยดังที่กล่าวมาในข้างต้น จึงเป็นที่น่าสนใจในการศึกษารูปแบบของ ยีน *GnRHR* ที่มีอิทธิพลต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ในโคนม เพื่อนำมาเป็น genetic marker ในการคัดเลือกโคนม ซึ่งหากพบว่า ยีน *GnRHR* มีศักยภาพในการเป็น genetic marker จะเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกโคนมให้มีความสมบูรณ์พันธุ์ ทำให้มีการเจริญเติบโตของไข่ เกิดการตกไข่ที่เป็นปกติ สามารถตรวจพบอาการเป็นสัดได้ตรงตามเวลา โคนมมีความสมบูรณ์พันธุ์ที่ดี และเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการให้ผลผลิตของโคนมต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีการทดลองและการเก็บข้อมูล

3.1 กลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้สำหรับการศึกษารูปแบบจีโนไทป์ของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* เป็นกลุ่มตัวอย่างโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนระดับสายเลือดตั้งแต่ 75%HF – 99%HF ของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและไชยสาส์นฟาร์ม จำนวนประมาณ 227 ตัว

3.2 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างเลือดของแม่โครีดนม ทั้งหมด 227 ตัว ปริมาณตัวละ 10 ml. เก็บในหลอดสูญญากาศ EDTA-NA_2-treated collection tube และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C

3.3 การทดสอบสมมติฐาน ข้อที่ 1

เพื่อเป็นการทดสอบสมมติฐานข้อที่ 1 คือ พบอัลลีลและจีโนไทป์ของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* ในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนมากกว่าหนึ่งรูปแบบและยีนทั้งสองมี Linkage disequilibrium ต่อกัน ซึ่งจะทำให้การคัดเลือกอาจต้องพิจารณาทั้งสองยีนไปพร้อม ๆ กัน ดังนั้น จึงมีขั้นตอนในการทดสอบสมมติฐาน ได้แก่ การสกัด Genomic DNA การศึกษาหารูปแบบของยีน การหาความถี่ของยีน และการศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* ดังรายละเอียดต่อไปนี้

3.3.1 การสกัด Genomic DNA

ทำการสกัด Genomic DNA ด้วยชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปสำหรับตัวอย่างเลือด (Genomic DNA Mini Kit, Geneaid Biotech Ltd.) โดยรายละเอียดและขั้นตอนต่างๆของการสกัด Genomic DNA ปรากฏในภาคผนวก ง

3.3.2 การศึกษารูปแบบของยีน *DGAT1* ด้วยเทคนิค PCR–RFLP

1. นำ genomic DNA มาตรวจหาจีโนไทป์ โดย Primers และเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ อ้างอิงจากงานวิจัยของ Winter et al. (2002) มีลำดับเบสของ Primers ดังนี้

Forward primer : 5'-GCA CCA TCC TCT TCC TCA AG-3', Reverse primer : 5'-GGA AGC GCT TTC GGA TG-3'

2. PCR Reaction mix รวมทั้งหมดเท่ากับ 25 µl ประกอบด้วย genomic DNA เข้มข้น 10 ng/µl เติมสารประกอบต่าง ๆ ในปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วย 10X PCR buffer 2.5 µl , 1.25 mM dNTP's 4 µl, Primers ความเข้มข้น 20 µM อย่างละ 0.5 µl 0.5 U Dream Taq DNA polymerase 0.5 µl และเติม Nuclease free water เพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 25 µl ก่อนปฏิกิริยาในช่วง PCR (initial denaturation) จะเริ่มที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 35 รอบ แต่ละรอบมีรายละเอียดในปฏิกิริยา ดังนี้ เริ่มที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที Primer annealing ที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ Primer extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 60 วินาที และขั้นตอนสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที

3. นำ PCR product ตัดด้วยเอนไซด์ตัดจำเพาะ C*fr*I ตำแหน่งการตัดของเอนไซม์แสดง ดังภาพที่ 2.6 (Fermentas) โดยเติม 0.2 µl, 10X buffer Tango 2 µl , PCR product 8 µl, เติมน้ำ DI เพื่อปรับปริมาตร ให้ได้ 20 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และศึกษารูปแบบของจีโนไทป์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ Agarose gel 2.0%

5'...Py↓G G C C Pu...3'
3'...Pu C C G G↑Py...5'

ภาพที่ 2.6 ตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ C*fr*I

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.3.3 การหารูปแบบของยีน *GnRHR* ด้วยเทคนิค PCR-SSCP

1. ทำการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนด้วยเทคนิค PCR และตรวจสอบขนาดของชิ้นส่วนของดีเอ็นเอ ที่ตำแหน่ง exon 1 ของยีนและใช้ Primers จากงานวิจัยของ Milazzotto et al. (2008) ลำดับเบสของ Primers ดังนี้ Forward primer: 5′AAACTACAACTGAATCAGTC 3′, Reverse primer: 5′TAG AGAGAAATATCCATATA 3′

2. PCR Reaction mix เท่ากับ 25 µl ประกอบด้วย genomic DNA เข้มข้น 10 ng 1µl เติมสารประกอบต่าง ๆ ในปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วย 10X Dream Tag buffer 2.5 µl, 2 mM dNTP's 2.5 µl, Primers ความเข้มข้น 20 µM อย่างละ 0.5 µl, 0.2 U Dream Tag DNA polymerase 0.2 µl , $MgCl_2$ ความเข้มข้น 2 mM 2 µl และเติม Nuclease free water เพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 25 µl ก่อนปฏิกิริยาในช่วง PCR (initial denaturation) จะเริ่มที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 30 รอบ แต่ละรอบมีรายละเอียดในปฏิกิริยา ดังนี้ เริ่มที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 1 นาที

Primer annealing ที่อุณหภูมิ 54 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ Primer extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 2 นาที และขั้นตอนสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที

3. นำไปตรวจสอบหารูปแบบด้วยวิธี Single strand conformation polymorphism (SSCP) เริ่มจากการ ทำให้ DNA มีสภาพสายเดี่ยว โดยนำ PCR product ที่ได้ผสมกับ 3X SSR loading dye (เตรียมได้จาก Formamide, Xylene cyanol, Bromophenol blue และ EDTA) และทำการ pre-denature ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำ electrophoresis บน 10% polyacrylamide gel แนวตั้ง ในสารละลาย 1X TBE กระแสไฟฟ้าคงที่ 200 โวลต์ที่อุณหภูมิ 20 °C เป็นเวลา 120 นาที ทำการย้อมสีเจลแบบ Post Strain ด้วย ethidium bromide นำไปส่องดูในตู้ภายใต้แสง UV ซึ่งมีวิธีการเตรียม ดังนี้ ethidium bromide 5 µl ละลายใน 1x TBE buffer 50 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำเจลมาย้อมในสารละลายดังกล่าว ใช้เวลาประมาณ 15 นาที จากนั้นนำไปส่องดูด้วย UV Transilluminator

3.3.4 การวิเคราะห์ความถี่ของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR*

นำรูปแบบของยีนที่ได้จากขั้นตอนตรวจหารูปแบบของยีนมาวิเคราะห์ความถี่ของยีนและสมดุล Hardy – Weinberg โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป GENEPOP version 3.4 (Raymond and Rousset, 2003) โดยมีสูตรในการคำนวณหาความถี่จีโนไทป์และความถี่ของอัลลีลและการทดสอบความเบี่ยงเบนออกจากสมดุล Hardy – Weinberg ดังนี้

• การหาความถี่ของจีโนไทป์

$$f(\text{จีโนไทป์}) = \frac{\text{จำนวนสัตว์ที่มี genotype ที่กำหนด}}{\text{จำนวนสัตว์ทั้งหมด}}$$

• การหาความถี่ของอัลลีล

$$f(\text{อัลลีล}) = \frac{\text{จำนวนของอัลลีลที่กำหนด}}{\text{จำนวนอัลลีลทั้งหมด}}$$

• การทดสอบความเบี่ยงเบนออกจากสมดุล Hardy – Weinberg ด้วยวิธี Chi-square ดังสมการ ดังต่อไปนี้

$$X^2 = \Sigma_i \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$ (Kaps and Lamberson, 2004)

เมื่อ O_i เป็นจำนวนของอัลลีลและจีโนไทป์ที่เกิดขึ้นจริง และ E_i เป็นจำนวนของ อัลลีลและจีโนไทป์ที่คาดหมายว่าจะเกิดขึ้น ซึ่งคำนวณจากสูตร

$$\text{Exp } (\textit{homozygous dominant}) = p^2 n$$
$$\text{Exp } (\textit{heterozygous}) = 2pqn$$
$$\text{Exp } (\textit{homozygous recessive}) = q^2 n$$

เมื่อ p คือ ความถี่ของอัลลีลที่เป็น dominant, q คือ ความถี่ของอัลลีลที่เป็น recessive , n คือ จำนวนสัตว์ทั้งหมด โดยมีองศาความเป็นอิสระ (d.f.) เป็น จำนวนจีโนไทป์ – จำนวนอัลลีล

3.3.5 การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* ด้วย Logistic regression

วิธีการ Logistic regression เพื่อวิเคราะห์ความน่าจะเป็นที่รูปแบบของยีนทั้งสองจะมีความสัมพันธ์กัน โดยมีสมมติฐาน คือ การเกิดรูปแบบใด ๆ ของยีนสองตำแหน่งจะมีความสัมพันธ์กัน โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for windows version 16 (SPSS Inc., Chicago, IL) คำนวณจากสูตร (Kaps and Lamberson, 2004)

$$p_i = \frac{e^{\beta_0+\beta_1 X}}{1+e^{-(\beta_0+\beta_1 X)}}$$

เมื่อ p_i คือ ความน่าจะเป็นของยีน *GnRHR* แต่ละรูปแบบ ที่จะพบการปรากฏ จีโนไทป์ AA, KA และ KK ของยีน *DGAT1*, e คือ ค่า natural logarithms มีค่าประมาณ 2.718 , β_0คือ ค่า ประมาณของ intercept , β_1 คือ ค่าสัมประสิทธิ์ regression ของยีน *DGAT1* แต่ละจีโนไทป์, X คือ ตัวแปรดัมมี่ของการปรากฏของจีโนไทป์ของยีน *DGAT1*

3.4 การทดสอบสมมติฐาน ข้อที่ 2

ในการศึกษาครั้งนี้ แบ่งออกเป็น การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *DGAT1* ต่อลักษณะการให้ผลผลิต การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *GnRHR* ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ และการศึกษาอิทธิพลร่วมของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* ต่อลักษณะการให้ผลผลิตและลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ ซึ่งมีรายละเอียด ดังต่อไปนี้

3.4.1 การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *DGAT1* ต่อลักษณะการให้ผลผลิต

ข้อมูลที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *DGAT1* ที่มีต่อลักษณะผลผลิตน้ำนม เป็นข้อมูลการให้ผลผลิตน้ำนมรายตัวของโคนมฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและโคนมของฟาร์มไชยสาส์น ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2550-2553 ประกอบด้วย ข้อมูลปริมาณน้ำนม ค่าองค์ประกอบน้ำนม (เปอร์เซ็นต์โปรตีน, เปอร์เซ็นต์ไขมัน, เปอร์เซ็นต์แลคโตส, เปอร์เซ็นต์ของแข็งไม่รวมไขมัน)

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาความสัมพันธ์ของยีน *DGAT1* ต่อลักษณะการให้ผลผลิต โดยใช้ General Linear Model และวิเคราะห์หาค่าอิทธิพลต่าง ๆ ด้วยวิธี Ordinary Least Square (OLS) ดังตัวแปรที่แสดงในสมการด้านล่างนี้

$$y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \varepsilon$$

เมื่อ y คือ ค่าสังเกต ได้แก่ ปริมาณน้ำนม ค่าองค์ประกอบน้ำนม (เปอร์เซ็นต์โปรตีน, เปอร์เซ็นต์ไขมัน, เปอร์เซ็นต์แลคโตส, เปอร์เซ็นต์ของแข็งไม่รวมไขมัน) , β_1 คือ อิทธิพลเนื่องจากปัจจัยคงที่ ได้แก่ จำนวนวันให้นม ระดับสายเลือด ฝูง-ปีเกิด-ฤดูกาลที่เกิดและลำดับท้อง เป็นต้น, β_2 คือ อิทธิพลเนื่องจากจีโนไทป์ของยีน *DGAT1* , ε คือ อิทธิพลของความคลาดเคลื่อนอื่น ๆ , X_1 และ X_2 คือ incidence matrix ที่แสดงการปรากฏของอิทธิพลคงที่ ในแต่ละค่าสังเกตตามลำดับ

3.4.2 การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *GnRHR* ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์

ข้อมูลที่ใช้ในการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *GnRHR* ต่อลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์ ประกอบด้วย ข้อมูลอัตราการผสมติด จำนวนวันท้องว่าง จำนวนครั้งที่ผสมติด ระยะห่างการให้ลูก ทำการวิเคราะห์ข้อมูลหาความสัมพันธ์ของยีน *GnRHR* ต่อลักษณะโดยใช้ General Linear Model และวิเคราะห์หาค่าอิทธิพลต่าง ๆ ด้วยวิธี OLS ดังตัวแปรที่แสดงในสมการด้านล่างนี้

$$y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \varepsilon$$

เมื่อ y คือ ค่าสังเกต ได้แก่ อัตราการผสมติด จำนวนวันท้องว่าง จำนวนครั้งที่ผสมติด ระยะห่างการให้ลูก, β_1 คือ อิทธิพลเนื่องจากปัจจัยคงที่ ได้แก่ จำนวนวันให้นม ระดับสายเลือด ฝูง-ปีเกิด-ฤดูกาลที่เกิด และลำดับท้อง เป็นต้น, β_2 คือ อิทธิพลเนื่องจากรูปแบบของยีน *GnRHR* , ε

คือ อิทธิพลของความคลาดเคลื่อนอื่น ๆ , X_1 และ X_2 คือ incidence matrix ที่แสดงการปรากฏของอิทธิพลคงที่ในแต่ละค่าสังเกต ตามลำดับ

3.4.3 การศึกษาอิทธิพลร่วมของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* ต่อลักษณะการให้ผลผลิตและลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์

ข้อมูลที่ใช้ในการศึกษาทำการวิเคราะห์อิทธิพลร่วมกันของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* ต่อลักษณะการให้ผลผลิตและลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์ โดยใช้ General Linear Model และวิเคราะห์หาค่าอิทธิพลต่าง ๆ ด้วยวิธี OLS ดังตัวแปรที่แสดงในสมการด้านล่างนี้

$$y = \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \varepsilon$$

เมื่อ y คือ ค่าสังเกต ได้แก่ ปริมาณน้ำนม ค่าองค์ประกอบน้ำนม (เปอร์เซ็นต์โปรตีน, เปอร์เซ็นต์ไขมัน, เปอร์เซ็นต์แลคโตส, เปอร์เซ็นต์ของแข็งไม่รวมไขมัน) อัตราการผสมติด จำนวนวันท้องว่าง จำนวนครั้งที่ผสมติด ระยะห่างการให้ลูก, β_1 คือ อิทธิพลเนื่องจากปัจจัยคงที่ ได้แก่ จำนวนวันให้นม ระดับสายเลือด ฟาร์มโคนมที่แตกต่างกัน, ปีเกิด, ฤดูกาลที่เกิด, ลำดับท้อง เป็นต้น, β_2 คือ อิทธิพลของยีน *DGAT1*, อิทธิพลของยีน *GnRHR* และอิทธิพลร่วมของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR*, , ε คือ อิทธิพลของความคลาดเคลื่อนอื่น ๆ , X_1 และ X_2 คือ incidence matrix ที่แสดงการปรากฏของอิทธิพลคงที่ ในแต่ละค่าสังเกต ตามลำดับ

3.5 การทดสอบสมมติฐาน ข้อที่ 3

เพื่อเป็นการทดสอบสมมติฐานข้อที่ 3 ซึ่งได้แก่ การใช้ยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* เป็นปัจจัยคงที่ปัจจัยหนึ่งในการประเมินค่า EBV ของโคนมทำให้ลำดับค่า EBV ของโคนมมีการเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบค่า EBV ที่ได้จาก animal model ปกติที่ไม่มีการใช้รูปแบบของยีนเป็นปัจจัยคงที่ จึงมีขั้นตอนในการทดสอบสมมติฐาน ได้แก่ การประมาณค่า EBV ของลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมและลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ โดยใช้ Single trait animal model และขั้นตอนการเปรียบเทียบลำดับของค่า EBV ดังรายละเอียดต่อไปนี้

3.5.1 ข้อมูลที่ใช้ในการประเมินค่า EBV

เป็นข้อมูลโคนมรายตัวของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประกอบด้วยข้อมูลพันธุ์ประวัติ ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ ได้แก่ อัตราการผสมติด จำนวนวันท้องว่าง จำนวนครั้งที่ผสมติด ระยะห่างการให้ลูก และข้อมูลการให้ผลผลิต ได้แก่ ปริมาณน้ำนม

และองค์ประกอบน้ำนมของโคนม ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและฟาร์มไชยสาส์น ตั้งแต่ปี 2550 -2553

3.5.2 การประมาณค่า EBV โดยมีอิทธิพลของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* เป็นปัจจัยคงที่

ประเมินค่า EBV ด้วยตัวแบบตัวสัตว์แบบ Single trait animal model ดังตัวแบบตัวสัตว์ข้างล่างนี้ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป BLUPF90-Dairy Pak 3.0 (Duangjinda, Misztal, and Tsurata, 2004)

$$y_i = X\beta + Za + \varepsilon$$

เมื่อ y คือ เวคเตอร์ของค่าสังเกตของลักษณะ i ซึ่งได้แก่ ปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม (เปอร์เซ็นต์โปรตีน, เปอร์เซ็นต์ไขมัน, เปอร์เซ็นต์แลคโตส, เปอร์เซ็นต์ของแข็งไม่รวมไขมัน) อัตราการผสมติด จำนวนวันท้องว่าง จำนวนครั้งที่ผสมติด ระยะห่างการให้ลูก, β คือ เวคเตอร์ของอิทธิพลคงที่ ที่มีผลต่อลักษณะ ซึ่งได้แก่ จำนวนวันให้นม ระดับสายเลือด ฟาร์ม โคนมที่แตกต่างกัน ปีเกิด ฤดูกาลที่เกิด ลำดับท้อง เป็นต้น , a คือ เวคเตอร์ของอิทธิพลสุ่มเนื่องจากตัวสัตว์หรือพันธุกรรมแบบบวกสะสม, ε คือ อิทธิพลแบบสุ่มเนื่องจากอิทธิพลของความคลาดเคลื่อนอื่น ๆ, X และ Z คือ incidence matrix ที่ระบุอิทธิพลคงที่ (β) และตัวสัตว์ (a) ตามลำดับ (มนต์ชัย, 2548) โดยมีโครงสร้างความแปรปรวน คือ

$$Var\begin{bmatrix} a \\ \varepsilon \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A\sigma_a^2 & 0 \\ 0 & I\sigma_e^2 \end{bmatrix}$$

เมื่อ σ_a^2 คือ ความแปรปรวนเนื่องจากตัวสัตว์สำหรับในแต่ละลักษณะ, A คือ numerator relationship matrix ระหว่างตัวสัตว์, I คือ ความแปรปรวนเนื่องจากความคลาดเคลื่อนในแต่ละลักษณะ, a คือ เวคเตอร์ของอิทธิพลสุ่มเนื่องจากพันธุกรรมแบบบวกสะสมที่มีต่อลักษณะ, e คือ เวคเตอร์ของอิทธิพลแบบสุ่มเนื่องจากอิทธิพลของความคลาดเคลื่อนอื่น ๆ ที่มีต่อลักษณะตามลำดับ มีรูปแบบ Mixed model Equation ดังนี้

$$\begin{bmatrix} X'X & X'Z \\ Z'X & Z'Z + \alpha A^{-1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{\beta} \\ \hat{a} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'y \\ Z'y \end{bmatrix}; \text{เมื่อ } \alpha = \frac{\sigma_e^2}{\sigma_a^2}$$

3.5.3 การประมาณค่า EBV ของลักษณะการให้ผลผลิต เมื่อตัวแบบตัวสัตว์ (Animal model) มีอิทธิพลของยีน *DGAT1* เป็นปัจจัยคงที่

$$y = X\beta + Za + \varepsilon$$

เมื่อ y คือ เวคเตอร์ของค่าสังเกตของลักษณะปริมาณน้ำนมและค่าองค์ประกอบน้ำนม (เปอร์เซ็นต์โปรตีน, เปอร์เซ็นต์ไขมัน, เปอร์เซ็นต์แลคโตส, เปอร์เซ็นต์ของแข็งไม่รวมไขมัน), β คือ เวคเตอร์ของอิทธิพลคงที่ที่มีผลต่อลักษณะ ซึ่งได้แก่ อิทธิพลของยีน *DGAT1,* จำนวนวันให้นม ระดับสายเลือด ฟาร์มโคนมที่แตกต่างกัน, ปีเกิด, ฤดูกาลที่เกิดและลำดับท้อง เป็นต้น, a คือ เวคเตอร์ของอิทธิพลสุ่มเนื่องจากตัวสัตว์หรือพันธุกรรมแบบบวกสะสม, ε คือ อิทธิพลแบบสุ่มเนื่องจากอิทธิพลของความคลาดเคลื่อนอื่น ๆ, X และ Z คือ incidence matrix ที่ระบุอิทธิพลคงที่ อิทธิพลคงที่ (β) และตัวสัตว์ (a) ตามลำดับ (มนต์ชัย, 2548) โดยมีโครงสร้างความแปรปรวน คือ

$$Var\begin{bmatrix} a \\ \varepsilon \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A\sigma_a^2 & 0 \\ 0 & I\sigma_e^2 \end{bmatrix}$$

เมื่อ σ_a^2 คือ ความแปรปรวนเนื่องจากตัวสัตว์สำหรับในแต่ละลักษณะ, A คือ numerator relationship matrix ระหว่างตัวสัตว์, I คือ ความแปรปรวนเนื่องจากความคลาดเคลื่อนในแต่ละลักษณะ, a คือ เวคเตอร์ของอิทธิพลสุ่มเนื่องจากพันธุกรรมแบบบวกสะสมที่มีต่อลักษณะ, e คือ เวคเตอร์ของอิทธิพลแบบสุ่มเนื่องจากอิทธิพลของความคลาดเคลื่อนอื่น ๆ ที่มีต่อลักษณะ ตามลำดับ มีรูปแบบ Mixed model Equation ดังนี้

$$\begin{bmatrix} X'X & X'Z \\ Z'X & Z'Z + \alpha A^{-1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{\beta} \\ \hat{a} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'y \\ Z'y \end{bmatrix}; \text{เมื่อ } \alpha = \frac{\sigma_e^2}{\sigma_a^2}$$

3.5.4 การประมาณค่า EBV ของลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ เมื่อมีอิทธิพลของยีน *GnRHR* เป็นปัจจัยคงที่

$$y = X\beta + Za + \varepsilon$$

เมื่อ y คือ เวคเตอร์ของค่าสังเกตของลักษณะอัตราการผสมติด จำนวนวันท้องว่าง จำนวนครั้งที่ผสมติด และระยะห่างการให้ลูก, β คือ เวคเตอร์ของอิทธิพลคงที่ที่มีผลต่อลักษณะ ซึ่งได้แก่ อิทธิพลของยีน *GnRHR* , จำนวนวันให้นม ระดับสายเลือด ฟาร์มโคนมที่แตกต่างกัน, ปีเกิด, ฤดูกาลที่เกิด, ลำดับท้อง เป็นต้น , a คือ เวคเตอร์ของอิทธิพลสุ่มเนื่องจากตัวสัตว์หรือพันธุกรรม

แบบบวกสะสม, ε คือ อิทธิพลแบบสุ่มเนื่องจากอิทธิพลของความคลาดเคลื่อนอื่น ๆ, X และ Z คือ incidence matrix ระบุอิทธิพลคงที่ อิทธิพลคงที่ (β) และตัวสัตว์ (a) ตามลำดับ (มนต์ชัย, 2548) โดยมีโครงสร้างความแปรปรวน คือ

$$Var\begin{bmatrix} a \\ \varepsilon \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} A\sigma_a^2 & 0 \\ 0 & I\sigma_e^2 \end{bmatrix}$$

เมื่อ σ_a^2 คือ ความแปรปรวนเนื่องจากตัวสัตว์สำหรับในแต่ละลักษณะ, A คือ numerator relationship matrix ระหว่างตัวสัตว์, I คือ ความแปรปรวนเนื่องจากความคลาดเคลื่อนในแต่ละลักษณะ, a คือ เวคเตอร์ของอิทธิพลสุ่มเนื่องจากพันธุกรรมแบบบวกสะสมที่มีต่อลักษณะ, e คือ เวคเตอร์ของอิทธิพลแบบสุ่มเนื่องจากอิทธิพลของความคลาดเคลื่อนอื่น ๆ ที่มีต่อลักษณะตามลำดับ มีรูปแบบ Mixed model Equation ดังนี้

$$\begin{bmatrix} X'X & X'Z \\ Z'X & Z'Z + \alpha A^{-1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{\beta} \\ \hat{a} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X'y \\ Z'y \end{bmatrix}; \text{เมื่อ } \alpha = \frac{\sigma_e^2}{\sigma_a^2}$$

3.5.5 การเปรียบเทียบลำดับของค่า EBV เมื่อมีอิทธิพลของยีนเป็นปัจจัยคงที่และไม่มีอิทธิพลของยีนในตัวแบบตัวสัตว์

นำลำดับค่า EBV ของแต่ละลักษณะจากตัวแบบตัวสัตว์ปกติซึ่งไม่มีอิทธิพลของยีนเป็นปัจจัยคงที่และตัวแบบตัวสัตว์ที่มีอิทธิพลของยีนเป็นปัจจัยคงที่ มาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ด้วยวิธี Spearman rank correlation coefficient (Kaps and Lamberson, 2004) สัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบสเปียร์แมน (Spearman rank correlation coefficient หรือ Spearman's rho) ใช้สัญลักษณ์ r_S เป็นวิธีที่ใช้วัดความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรหรือข้อมูล 2 ชุด โดยที่ตัวแปร หรือข้อมูล 2 ชุดนั้นจะต้องอยู่ในรูปของข้อมูลในมาตราจัดอันดับ (Ordinal scale) ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบสเปียร์แมน โดยวิเคราะห์ Rank Correlation ของค่า EBV ที่ได้จากตัวแบบทั้งสอง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for windows version 16 (SPSS Inc., Chicago, IL) คำนวณจากสูตร (Kaps and Lamberson, 2004)

$$r_s = 1 - \frac{6\Sigma D^2}{N(N^2 - 1)}$$

เมื่อ r_s คือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบสเปียร์แมน , ΣD^2 คือ ผลรวมของกำลังสองของผลต่างของอันดับที่ของข้อมูลค่า EBV แต่ละคู่, N คือ จำนวนข้อมูลทั้งหมด

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

3.6.1 งานโคนม ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา

3.6.2 ฟาร์มโคนมไชยสาส์นฟาร์ม อ.วิหารแดง จ.สระบุรี

3.6.3 อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา

3.7 ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้ใช้ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัยเริ่มต้น เดือนกันยายน พ.ศ. 2552 ถึง เดือนธันวาคม พ.ศ. 2553

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลการทดลองและการอภิปรายผล

ผลจากการศึกษาศักยภาพของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* สำหรับนำไปใช้เป็น genetic marker เพื่อช่วยในการคัดเลือก โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน มีประเด็นสำคัญ ได้แก่ ประเด็นที่หนึ่ง อัลลีลและจีโนไทป์ ความถี่อัลลีลและจีโนไทป์ ของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* ซึ่งจะนำไปใช้เป็นข้อมูลในการกำหนดแนวทางการพัฒนาพันธุ์โคนม ประเด็นที่สอง ความน่าจะเป็นที่ยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* จะมีการเกิดรูปแบบที่สัมพันธ์กันซึ่งจะเป็นการบ่งบอกถึงการคัดเลือกที่ควรจะต้องพิจารณา ทั้งสองยีนไปพร้อม ๆ กัน ในลักษณะที่เป็น haplotype ประเด็นที่สาม การศึกษาถึงความสัมพันธ์และอิทธิพลของยีนต่อลักษณะที่สนใจ และนำไปสู่การกำหนดอิทธิพลของยีนดังกล่าวเป็นปัจจัยคงที่ปัจจัยหนึ่งในการประเมินค่า EBV ของลักษณะต่าง ๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการประเมินความสามารถทางพันธุกรรมของโคนม ซึ่งผลการศึกษาในแต่ละประเด็น มีรายละเอียด ดังต่อไปนี้

4.1 ข้อมูลที่ทำการศึกษา

การรายงานลักษณะข้อมูลที่ทำการศึกษา มีวัตถุประสงค์เพื่อเป็นการตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล รวมทั้งเพื่อให้ทราบถึงสถานการณ์ความสามารถในการให้ผลผลิตและความสามารถในการสืบพันธุ์ของโคนมกลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษา โดยเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐานและค่าเฉลี่ยของประเทศ ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ย (mean) ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) ของโคนมกลุ่มตัวอย่าง ดังต่อไปนี้

4.1.1 ข้อมูลลักษณะปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม

ข้อมูลผลผลิตน้ำนม ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ เป็นข้อมูลรายตัวของโคนมที่มีการบันทึกข้อมูล ณ วันทดสอบ มีจำนวนข้อมูล 2,675 – 2,766 ข้อมูล ประกอบด้วย ข้อมูลปริมาณน้ำนม ข้อมูลปริมาณและเปอร์เซ็นต์องค์ประกอบน้ำนมที่สำคัญ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน ของแข็งไม่รวมไขมัน และของแข็งรวมไขมัน (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของลักษณะผลผลิตน้ำนมในโคนมกลุ่มตัวอย่างเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยผลผลิตน้ำนมของโคนมทั้งประเทศและค่ามาตรฐานองค์ประกอบน้ำนม

ลักษณะ	จำนวนข้อมูล	ค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่าง	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยประเทศ
ปริมาณน้ำนม (กก./วัน)	2766	10.81	3.96	10.99[(1)]
ปริมาณโปรตีน (กรัม/วัน)	2712	314.09	109.84	-
ปริมาณไขมัน (กรัม/วัน)	2675	399.20	138.32	-
ปริมาณของแข็งไม่รวมไขมัน (กรัม/วัน)	2675	888.52	317.35	-
ปริมาณของแข็งรวมทั้งหมด(กรัม/วัน)	2714	1287.20	441.48	-
%โปรตีน	2712	2.96	0.37	>3.00[(2)]
%ไขมัน	2675	3.80	0.77	>3.35[(2)]
%ของแข็งไม่รวมไขมัน	2675	8.29	0.55	>8.25[(2)]
%ของแข็งรวมทั้งหมด	2714	12.12	1.14	12.30[(3)]

หมายเหตุ: [(1)] ข้อมูลปริมาณการผลิตน้ำนมดิบรายจังหวัด สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร ณ เดือน กรกฎาคม 2554 (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตรกระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2554)

[(2)] ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง กำหนดมาตรฐานสินค้าเกษตร: น้ำนมโคดิบ ตามพระราชบัญญัติมาตรฐานสินค้าเกษตร พ.ศ. 2551 (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ (มกอช.) กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2553)

[(3)] ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่องมาตรฐานการรับซื้อน้ำนมดิบ (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2549)

จากข้อมูลในข้างต้น ชี้ให้เห็นถึงสภาพปัญหาการให้ผลผลิตของโคนมกลุ่มตัวอย่างและโคนมของเกษตรกรรายย่อยทั่วประเทศ ซึ่งข้อมูลของเกษตรกรรายย่อย เป็นข้อมูลปริมาณการผลิตน้ำนมดิบรายจังหวัด ณ เดือน กรกฎาคม 2554 ที่ได้จากการรวบรวมของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร และหากพิจารณาจากค่าเฉลี่ยการให้ผลผลิต สามารถกล่าวได้ว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับการให้ผลผลิตของโคนมของฟาร์มเอกชน ยกตัวอย่างเช่น ฟาร์มโชคชัย จังหวัด

นครราชสีมา ที่โคนมมีค่าเฉลี่ยน้ำนมสูงถึง 15.65 กิโลกรัมต่อตัวต่อวัน (สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดนครราชสีมา กรมปศุสัตว์, 2554) ทั้งนี้ ปัญหาการให้ผลผลิตอาจเกิดขึ้นจากหลายสาเหตุ เช่น สาเหตุเนื่องมาจาก พันธุกรรม กล่าวคือ โคนมที่มีระดับสายเลือดโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนสูง ซึ่งควรจะมีความสามารถในการให้ผลผลิตที่สูงตามระดับพันธุกรรม แต่โคนมต้องอยู่ในสภาพอากาศร้อนชื้น ส่งผลทำให้การกินได้ของโคลดลง โภชนะที่ได้รับจึงไม่เพียงพอกับความต้องการ (Beede and Collier, 1986) ผลที่ตามมาคือ การให้ผลผลิตน้ำนมที่ลดต่ำลง ส่วนอีกสาเหตุหนึ่ง คือ สาเหตุเนื่องมาจากสิ่งแวดล้อมการจัดการอาหารที่อาจจะไม่เหมาะสมทั้งด้านปริมาณและคุณภาพ (Badinga et al., 1985; Royal et al., 2000), สภาพอากาศ ซึ่งมีอุณหภูมิและความชื้นสูง (วีระศักดิ์และคณะ, 2548; สุรชัยและพัลลภ, 2550; Alnimer et al., 2002; White et al., 2002, Parra-Bracamonte et al., 2005) , ฤดูกาลที่คลอด (พัชรินทร์, สหัทยาและประภาส, 2542; วีระศักดิ์ และคณะ, 2549) จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่า พันธุกรรม เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ผลผลิตน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมที่ต่ำกว่าที่ควรจะเป็น ดังนั้น ในแง่มุมของการปรับปรุงพันธุ์ จึงต้องมีการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์โคนม ซึ่งเพื่อให้การคัดเลือกโคนมมีประสิทธิภาพมากขึ้น จึงได้มีการศึกษาศักยภาพของ genetic marker สำหรับช่วยคัดเลือกโคนมในลักษณะผลผลิตน้ำนม โดยจะนำข้อมูลของโคนมกลุ่มตัวอย่างเหล่านี้ไปใช้ในการประมาณค่าอิทธิพลของยีนต่อลักษณะผลผลิตน้ำนมและนำไปพัฒนาเป็น genetic marker ต่อไป

4.1.2 ข้อมูลลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์

ข้อมูลลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ ที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ เป็นการบันทึกข้อมูลรายตัวโครีดนมของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีในแต่ละระยะการให้นม (Lactation) ช่วงปี 2550 - 2554 มีจำนวนบันทึกข้อมูล ประกอบด้วย ข้อมูลอัตราการผสมติด (Conception rate; %), ข้อมูลจำนวนวันท้องว่าง (Day open; days), ข้อมูลจำนวนครั้งที่ผสมติด (Number of service) และข้อมูลระยะห่างการให้ลูก (Calving interval; day) ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของลักษณะจำนวนครั้งการผสมติด, จำนวนวันท้องว่าง, ระยะห่างของการให้ลูกและอัตราการผสมติดของโคนมกลุ่มตัวอย่างเปรียบ เทียบกับค่าเฉลี่ยของโคนมในประเทศ ค่าตามทฤษฎีและค่ามาตรฐาน

ลักษณะ	จำนวนข้อมูล	ค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่าง	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ยประเทศ	ค่าตามทฤษฎี	ค่ามาตรฐาน
จำนวนครั้งการผสมติด (ครั้ง)	195	2.29	0.10	2.00[(2)]	-	< 2[(4)]
จำนวนวันท้องว่าง (วัน)	191	193.77	6.66	190.43[(1)]	< 85[(3)]	-
ระยะห่างของการให้ลูก(วัน)	178	466.75	7.29	457.33[(1)]	< 390[(3)]	-
อัตราการผสมติด (%)	195	60.55	2.26	51.60[(2)]	-	>70[(4)]

หมายเหตุ: [(1)] สมเกียรติและคณะ (2542); [(2)]สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ (2552); [(3)] Hafez and Hafez (2000); [(4)] สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์, (2554)

จากข้อมูลจะเห็นได้ว่า เมื่อพิจารณาค่าเฉลี่ยของกลุ่มตัวอย่างกับค่าเฉลี่ยของประเทศจะเห็นได้ว่า ค่าดังกล่าวยังต่ำ ซึ่งจำเป็นจะต้องมีการปรับปรุงให้ค่าเฉลี่ยของลักษณะมีการเปลี่ยนแปลงในทางที่ดีขึ้น ทั้งนี้ สาเหตุของปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ มาจากหลายสาเหตุ ซึ่งจากสภาพของโคนม กลุ่มตัวอย่าง สามารถวิเคราะห์สาเหตุของปัญหาได้ดังต่อไปนี้ **ในด้านการจัดการสิ่งแวดล้อม** ประการที่หนึ่ง คือ การที่โคนมเป็นโรคเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ เช่น รกค้าง มดลูกอักเสบ ทำให้ต้องเสียเวลาในการรักษาระยะหนึ่ง ซึ่งโคนมจะไม่ถูกผสม เป็นการเพิ่มระยะห่างการให้ลูกของแม่โคให้ยาวนานขึ้น ประการที่สอง การบันทึกข้อมูลโคนมที่ไม่ต่อเนื่อง กล่าวคือ โคนมบางตัวไม่มีบันทึกข้อมูลลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์ ที่ครบถ้วนทุก lactation เกิดปัญหาข้อมูลสูญหาย ส่งผลเสียต่อการนำข้อมูลไปใช้ประโยชน์ รวมทั้งทำให้ไม่พบปัญหาและสาเหตุที่แท้จริงของปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ที่เกิดขึ้นในฝูง เนื่องจากขาดข้อมูลสำหรับวางแผนการจัดการโคนมด้วย อย่างไรก็ตาม การตรวจพบ ปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนม จะสามารถทำได้ต่อเมื่อโคนมเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์และโคมีการแสดงออกและบางครั้งอาจจะต้องมีการคัดทิ้งด้วย ทำให้สูญเสียเวลาและต้นทุนการจัดการ **ในด้านพันธุกรรม** สาเหตุที่เกิดเนื่องมาจากพันธุกรรมของโคนม เช่น ระดับพันธุกรรมโคนมที่อาจจะยังไม่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อม ทั้งนี้ เป็นเพราะการวางแผนผสมพันธุ์เพื่อยกระดับสายเลือดให้โคนมสามารถให้ผลผลิตได้สูงขึ้น ส่งผลในทางกลับกัน คือ โคนมจะมีความสมบูรณ์พันธุ์ลดลง เมื่อระดับสายเลือดของพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซี่ยนสูงขึ้น (สมเกียรติ และ

คณะ, 2542; วิชัยและคณะ, 2548; Hoekstra, van der Lugt, van der Werf and Ouweltjes, 1994; Veerkamp, Koenen and DeJong, 2001) โดยโคนมจะมีอัตราการผสมติดต่ำ (จินตนา, ธวัชชัยและกัลยา, 2541; วีระศักดิ์, เอกพจน์และศร, 2549) และมีระยะห่างของการให้ลูกยาวนานขึ้น (สมเกียรติและคณะ, 2542) ขณะเดียวกันโคนมที่มีระดับสายเลือดโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนสูงขึ้น เมื่อต้องอยู่ในสภาพอากาศร้อนชื้น การกินได้ของโคจะลดลง โภชนะที่ได้รับจึงไม่เพียงพอกับความต้องการ (Beede and Collier, 1986) ผลที่ตามมาคือ การให้ผลผลิตน้ำนมก็จะต่ำลงด้วย ลักษณะเช่นนี้ แสดงให้เห็นว่า พันธุกรรมของโคนมนั้น ยังไม่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อมและภูมิอากาศของประเทศ ดังนั้น จึงต้องมีการปรับปรุงพันธุ์โคนมให้มีความเหมาะสมกับสภาพแวดล้อม ซึ่งจะส่งผลให้โคนมมีความสมบูรณ์พันธุ์ที่ดีขึ้น ผสมติดง่ายและมีระยะห่างการ ให้ลูกที่ไม่นานเกินไป ทั้งนี้ เพื่อช่วยให้การคัดเลือกโคนมจากลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์สามารถทำได้รวดเร็วยิ่งขึ้น จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาศักยภาพของ genetic marker ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ และนำข้อมูลของยีนที่ได้จากกลุ่มตัวอย่าง ไปใช้ในการประมาณค่าอิทธิพลของยีนต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ นำไปสู่การพัฒนาเป็น genetic marker สำหรับช่วยคัดเลือกโคนมในลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ต่อไป

4.2 ความถี่อัลลีล จีโนไทป์และสมดุล Hardy – Weinberg ของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR*

การศึกษา ความถี่อัลลีล จีโนไทป์ ของยีน *DGAT1*และยีน *GnRHR* เพื่อใช้ในการกำหนดแนวทางการคัดเลือก ในกรณีที่พบว่า จีโนไทป์มีอิทธิพลต่อลักษณะที่สนใจ

4.2.1 ความถี่อัลลีล จีโนไทป์ ของยีน *DGAT1*

ผลการศึกษาในประเด็นของรูปแบบและความถี่ของยีนนั้น สามารถสรุปได้ว่ายีน *DGAT1* มีศักยภาพเบื้องต้นในการเป็น genetic marker สำหรับกลุ่มตัวอย่างนี้ ทั้งนี้ เนื่องจากพบ อัลลีลของยีน *DGAT1* 2 อัลลีล ได้แก่ อัลลีล K (411 bp) และ A (203, 208 bp) 3 จีโนไทป์ ได้แก่ KK, KA และ AA (ภาคผนวก ก. ภาพที่ 7.1) สามารถบอกได้ว่า ยีน *DGAT1* มีศักยภาพในการใช้เป็น genetic marker สำหรับประชากรโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน

ในประเด็นของความถี่ยีน พบความถี่ของ อัลลีล A สูงกว่า อัลลีล K (ตารางที่ 4.3) เช่นเดียวกับ การศึกษาของ Berry et al.(2010), Scotti et al. (2010), Sun et al. (2009), Banos et al. (2008),nHradecká et al. (2008), Spelman et al. (2002) แต่มีทิศทางของความถี่ยีนแตกต่างจากการศึกษาของ Cardoso, Queiroz, Alonso Goulart, Mourão, Benedetti and Goulart (2011), Patel et al. (2009), Thaller et al. (2003) และ Spelman et al. (2002) ทั้งนี้ การพบความถี่ ที่เหมือนและ

แตกต่างกันนั้น อาจเนื่องมาจากการมีเป้าหมายการคัดเลือกโคนมหรือแนวทางการจัดการฝูงโคนมที่แตกต่างกัน สำหรับกรณีของกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาในครั้งนี้ กล่าวได้ว่า ยังไม่มีการคัดเลือกโดยเฉพาะอย่างยิ่งกับลักษณะที่อาจจะมีความสัมพันธ์กับ ยีน *DGAT1* ทั้งนี้ เนื่องจากการวิเคราะห์สมดุล Hardy – Weinberg ที่พบว่า ยีนยังอยู่ในสมดุล

จากผลการศึกษาในข้างต้น จะเห็นได้ว่า ยีน *DGAT1* มีจีโนไทป์มากกว่าหนึ่งจีโนไทป์ ลักษณะเช่นนี้ นับได้ว่ายีน *DGAT1* มีคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็น genetic marker สำหรับ โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน ทั้งนี้ ผลการศึกษาจะนำไปสู่การศึกษาความสัมพันธ์ของยีน *DGAT1* กับลักษณะผลผลิตน้ำนม ดังนั้น การปรับปรุงพันธุ์โคนมในลักษณะผลผลิตน้ำนม จึงมีความเป็นไปได้ที่จะพิจารณาการใช้ยีน *DGAT1* เป็นตัวช่วยในการคัดเลือก หากพบว่า จีโนไทป์ของยีน *DGAT1* มีความสัมพันธ์กับลักษณะดังกล่าว

ตารางที่ 4.3 ความถี่อัลลีลและจีโนไทป์ของยีน *DGAT1*

Item	Total Number	Allele		Genotype		
		K	A	KK	KA	AA
Frequency of *DGAT1* gene	227	0.355	0.645	0.115 (n=26)	0.480 (n=109)	0.405 (n=92)

4.2.2 ความถี่ของรูปแบบ PCR-SSCP ของยีน *GnRHR*

ผลการศึกษาในประเด็นของความถี่ของยีนนั้น สามารถสรุปได้ว่า ยีน *GnRHR* มีศักยภาพเบื้องต้นในการเป็น genetic marker สำหรับโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ พบชิ้นส่วนของยีน *GnRHR* จากการตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR-SSCP ทั้งหมด 3 รูปแบบ (ภาคผนวก ก. ภาพที่ 7.2) รูปแบบที่มีความถี่มากที่สุด คือ รูปแบบที่ 2 (ตารางที่ 4.4)

อย่างไรก็ตาม จากผลการศึกษา จะเห็นได้ว่า ยีน *GnRHR* มีรูปแบบที่สอดคล้องกับการศึกษาในโคพันธุ์ Nellore ซึ่งเป็น *Bos indicus* (Millazotto et al., 2008) จึงมีความเป็นไปได้ที่ยีนอาจมีจุดกลายพันธุ์ในตำแหน่งเดียวกัน และทำให้พบรูปแบบของยีนลักษณะดังกล่าว แสดงให้เห็นว่าโครงสร้างพันธุกรรมของโคนมที่แตกต่างไม่ได้ส่งผลต่อการพบรูปแบบของยีนในแต่ละประชากร

จากผลการศึกษาในข้างต้น จะเห็นได้ว่า ยีน *GnRHR* มีรูปแบบมากกว่าหนึ่งรูปแบบ ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นคุณสมบัติเบื้องต้นของ genetic marker ทั้งนี้ ผลการศึกษาจะนำไปสู่การศึกษาความสัมพันธ์และอิทธิพลของยีนต่อลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์ ได้แก่ จำนวนวันท้องว่าง ระยะห่างการให้ลูก จำนวนครั้งการผสมติดและอัตราการผสมติด ซึ่งหากพบว่า

รูปแบบของยีน *GnRHR* มีอิทธิพลต่อลักษณะดังกล่าว จะมีความเป็นไปได้ที่จะพิจารณาการใช้ยีน *GnRHR* เป็นตัวช่วยในการคัดเลือกโคนมต่อไป

ตารางที่ 4.4 ความถี่ของชิ้นส่วน PCR-SSCP ของยีน *GnRHR*

Item		Pattern		
		1	**2**	**3**
Frequency of *GnRHR* gene	227	0.20 (n=45)	0.45 (n=102)	0.35 (n=80)

จากผลการศึกษา ความถี่อัลลีล จีโนไทป์ในข้างต้น แสดงให้เห็นว่า ยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* มีคุณสมบัติเบื้องต้นในการนำมาใช้เป็นgenetic marker เพื่อช่วยในการคัดเลือก อย่างไรก็ตาม จากความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ไม่ได้เอื้อประโยชน์ซึ่งกันและกันของลักษณะผลผลิตน้ำนมและลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์ ที่ยังคงเป็นอุปสรรคต่อการปรับปรุงพันธุกรรมโคนมมาตลอด ซึ่งสาเหตุของความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมของลักษณะผลผลิตน้ำนมและลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์ในข้างต้นนั้น มีความเป็นไปได้ที่จะเกิดจากการที่ยีนทั้งสองตำแหน่งซึ่งควบคุมการแสดงออกของแต่ละลักษณะ อาจมีรูปแบบที่ไม่อิสระต่อกัน (linkage disequilibrium) ดังนั้น จึงนำไปสู่การศึกษาความน่าจะเป็นที่ยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* จะมีการเกิดรูปแบบที่ไม่อิสระต่อกัน

4.3 ความสัมพันธ์ของรูปแบบยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR*

สมมติฐานในการศึกษาครั้งนี้ คือ ยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* มีการเกิดรูปแบบยีนที่ไม่อิสระต่อกัน เพื่อบ่งชี้ให้เห็นว่ายีนทั้งสองอาจมีการเกิดของรูปแบบยีนที่สัมพันธ์กัน ซึ่งผลการศึกษาจะนำไปใช้ เพื่อกำหนดแนวทางการศึกษาอิทธิพลของยีนต่อลักษณะผลผลิตน้ำนมและลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ ว่าควรจะศึกษา อิทธิพลของจีโนไทป์หรืออิทธิพลของ haplotype

ผลการศึกษา ไม่เป็นไปตามสมมติฐาน (ตารางที่ 4.5) โดยรูปแบบของยีน *DGAT1* และ *GnRHR* มีความน่าจะเป็นในการเกิดรูปแบบที่สัมพันธ์ อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (*P>0.05*) อย่างไรก็ตาม แม้ว่ายีนจะมีความอิสระในการเกิดรูปแบบ แต่ยีนอาจจะมีอิทธิพลร่วมกันในการแสดงออกต่อลักษณะผลผลิตน้ำนมและลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้มีการศึกษา พบว่า ลักษณะผลผลิตน้ำนมและลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์มีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน (Kühn et al., 2006) ดังนั้น เพื่อเป็นข้อมูลในการพิจารณาใช้ยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* เป็นgenetic marker สำหรับการคัดเลือกโคนม ทั้งในลักษณะผลผลิต

และลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ จึงจำเป็นต้องมีการศึกษา ทั้งอิทธิพลหลักของยีนทั้งสองต่อลักษณะ และศึกษาอิทธิพลร่วมของยีนที่มีต่อลักษณะในการศึกษาครั้งนี้

ตารางที่ 4.5 ความสัมพันธ์ของรูปแบบยีน *DGAT1* และ ยีน *GnRHR*

Gene	*P - value*	Exp *(β)*[1/]	Prob (%)[2/]
<u>*GnRHR* pattern 1</u>			
DGAT1-AA	0.91	0.94	48.45
DGAT1-KA	0.49	0.70	41.18
DGAT1-KK	.	.	.
<u>*GnRHR* pattern 2</u>			
DGAT1-AA	0.30	1.59	61.39
DGAT1-KA	0.76	0.88	46.81
DGAT1-KK	.	.	.
<u>*GnRHR* pattern3</u>			
DGAT1-AA	0.29	0.60	37.50
DGAT1-KA	0.40	1.46	59.35
DGAT1-KK	.	.	.

หมายเหตุ: [(1)]$\exp(\beta) = e^{X_1\beta_1 + X_2\beta_2}$, [(2)]Prob (%) = ความน่าจะเป็นของยีน *GnRHR*แต่ละรูปแบบที่จะพบการปรากฏของยีน *DGAT1* จีโนไทป์ AA, KA และ KK

4.4 อิทธิพลของยีน *DGAT1* ต่อลักษณะปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม

เพื่อให้ทราบถึงศักยภาพของ ยีน *DGAT1* ในการเป็นgenetic markerสำหรับช่วยในการคัดเลือกลักษณะผลผลิตน้ำนมในโคนม จึงได้มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์และอิทธิพลของยีนต่อลักษณะผลผลิตน้ำนม โดยมีสมมติฐานของการศึกษา คือ ยีน *DGAT1* มีอิทธิพลต่อลักษณะผลผลิตน้ำนม ซึ่งผลการศึกษาจะนำไปสู่การกำหนดให้อิทธิพลของยีน *DGAT1* เป็นปัจจัยคงที่ปัจจัยหนึ่งในการประเมินค่า EBV ของโคนมต่อไป

ผลการศึกษา เป็นไปตามสมมติฐาน โดยพบว่า ยีน *DGAT1* มีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมทุกลักษณะอย่างมีนัยสำคัญ ยกเว้น ปริมาณโปรตีนนม (PY) และปริมาณของแข็งรวมทั้งหมด(TSY) (ตารางที่ 4.6) ทั้งนี้ การพบอิทธิพลของยีน *DGAT1* อย่างมีนัยสำคัญ มีทั้งในทิศทางที่เพิ่มขึ้นและลดลง ลักษณะที่มีทิศทางเพิ่มขึ้น ได้แก่ ปริมาณน้ำนม (MY),

และปริมาณของแข็งไม่รวมไขมัน (SNF) ซึ่งยีน DGAT1 จีโนไทป์ AA เป็นจีโนไทป์ ที่มีอิทธิพลในลักษณะดังกล่าว ส่วนลักษณะที่มีทิศทางลดลง ได้แก่ ปริมาณไขมัน (FY), %Prot, %Fat, %SNF, และ %TS ซึ่งยีน *DGAT1* ทั้งจีโนไทป์ AA และ KA เป็นจีโนไทป์ ที่มีอิทธิพลต่อลักษณะดังกล่าว

ตารางที่ 4.6 อิทธิพลของยีน *DGAT1* แต่ละจีโนไทป์ ต่อลักษณะผลผลิตน้ำนม

Traits[1]	Effect of genotype ± SE		
	AA	**KA**	**KK**
MY (kg./day)	0.93±0.28**	0.48±0.28	0
PY (g./day)	15.50±8.16	7.50±7.96	0
FY (g./day)	-21.14±10.21*	-13.88±9.99	0
SNFY (g./day)	53.53±23.69*	23.08±23.16	0
TSY (g./day)	15.81±32.36	-8.49±31.59	0
% Prot	-0.06±0.03*	-0.02±0.03	0
%Fat	-0.47±0.06***	-0.26±0.06***	0
%SNF	-0.15±0.04***	-0.09±0.04*	0
%TS	-0.71±0.09***	-0.44±0.09***	0

หมายเหตุ: [1] MY, PY, FY, SNFY, TSY, %Prot, %Fat ,%SNF, %TS หมายถึง ปริมาณน้ำนม, ปริมาณโปรตีน, ปริมาณไขมัน, ปริมาณของแข็งที่ไม่รวมไขมันนม,, ปริมาณของแข็งทั้งหมด, เปอร์เซ็นต์โปรตีน, เปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ไม่รวมไขมันนม และเปอร์เซ็นต์ของแข็งทั้งหมด , ***, **, * หมายถึง *P-value<0.0001, < 0.01, <0.05*

ผลการศึกษาครั้งนี้ พบอิทธิพลของยีน *DGAT1* สอดคล้องกับการศึกษาของ Schennink et al. (2007) ซึ่งศึกษาในกลุ่มตัวอย่างโคนมโฮลสไตน์ของประเทศเนเธอร์แลนด์ ที่ให้ผลผลิตครั้งแรก (first lactation) อย่างไรก็ตาม มีงานวิจัยหลายงานพบ อิทธิพลของยีน *DGAT1* แตกต่างจากการศึกษาครั้งนี้ เช่น Banos et al. (2008), Bennewitz et al. (2004), Gautier et al. (2007), Grisart et al. (2002), Kuehn et al. (2007), Spelman et al. (2002), Thaller et al. (2003), Weller et al.(2003) ซึ่งการศึกษาเหล่านี้ พบว่า ยีน *DGAT1* มีอิทธิพลต่อการลดลงของปริมาณน้ำนม แต่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มไขมันและโปรตีนในนม

ผลการศึกษาครั้งนี้ สามารถอธิบายได้ในประเด็น ดังต่อไปนี้ **ประเด็นที่หนึ่ง** ปัจจัยที่ทำให้พบว่า ยีน *DGAT1* มีอิทธิพลที่ส่งผลต่อปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมที่สำคัญ ทั้งเพิ่มขึ้น

และลดลง **ประเด็นที่สอง** ยีน *DGAT1* อาจจะมีบทบาทในทางอ้อมต่อ %Prot ด้วย **ประเด็นสาม** ปัจจัยที่ทำให้การศึกษาครั้งนี้ พบ อิทธิพลของยีน *DGAT1* จีโนไทป์ KK ต่อลักษณะผลผลิตน้ำนมอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ประเด็นที่หนึ่ง ปัจจัยที่ทำให้พบว่า ยีน *DGAT1* มีอิทธิพลทำให้ปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมเพิ่มขึ้นและลดลง สามารถอธิบายได้จากสาเหตุหลายประการ ***ประการที่หนึ่ง*** ยีน *DGAT1* จีโนไทป์ AA ส่งผลต่อการเพิ่มปริมาณน้ำนม อาจเกิดเนื่องจากการที่ยีนแปลรหัสได้เป็นกรดอะมิโน Alanine ซึ่งเป็นกรดอะมิโนในกลุ่ม glucogenic amino acid โดยกรดอะมิโนกลุ่มนี้จะสามารถเปลี่ยนเป็นกลูโคส (พัชรี, 2551) และกลูโคสจะไปเป็นสารตั้งต้นของการสังเคราะห์แลคโตส ซึ่งเป็นตัวกำหนดปริมาณน้ำนม ในประเด็นนี้อธิบายได้จากทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำงานและบทบาทของกลูโคส กล่าวคือ การสังเคราะห์กลูโคส (gluconeogenesis) ในร่างกายของโคนม ส่วนหนึ่งจะได้รับสารตั้งต้นซึ่งได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตและอีกส่วนหนึ่งจะได้รับสารตั้งต้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโน โดยจะมีกรดอะมิโนกลุ่ม glucogenic amino acid เป็นสารตั้งต้น ซึ่ง Alanine เป็นกรดอะมิโนตัวหนึ่งในกลุ่มนี้ ทำให้เกิดการสังเคราะห์กลูโคสเกิดขึ้นที่ตับ ซึ่งหลังจากกระบวนการเสร็จสิ้น กลูโคสถูกนำไปสู่ต่อมน้ำนมผ่านทางกระแสเลือด ทั้งนี้ ต่อมน้ำนมนั้น จำเป็นต้องใช้กลูโคสสำหรับการสังเคราะห์น้ำนมประมาณ 60-85 % ของกลูโคสที่มีในร่างกาย (Annison and Linzell, 1964; Chaiyabutr et al., 1980; Sunehag et al., 2002, 2003) ระดับกลูโคสที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลทำให้ปริมาณน้ำนมและปริมาณแลคโตสเพิ่มขึ้นแต่จะไม่กระทบต่อไขมันในน้ำนม (Knowlton, 1998) เมื่อพิจารณาบทบาทของกลูโคสดังที่กล่าวมา จึงมีความเป็นไปได้ว่า กรดอะมิโน Alanine ซึ่งมีบทบาทเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์กลูโคสจะส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของปริมาณน้ำนม ปริมาณแลคโตส รวมทั้งปริมาณของแข็งไม่รวมไขมันในโคนมด้วย อย่างไรก็ตาม กรดอะมิโน Alanine เป็นเพียงกรดอะมิโนตัวหนึ่งในหลายตัวที่อยู่ในกลุ่ม glucogenic amino acid ซึ่งอิทธิพลของกรดอะมิโน Alanine ที่จะส่งผลต่อการสังเคราะห์กลูโคสส่วนที่จะถูกดึงมาเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ แลคโตสในน้ำนมนั้น จะมีมากหรือน้อยเพียงใด เมื่อเทียบกับกรดอะมิโนตัวอื่นในกลุ่ม ยังไม่ทราบแน่ชัด ***ประการที่สอง*** ลักษณะการทำงานของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบในสายโพลีเปปไทด์ของเอนไซม์ DGAT1 อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้พบว่า จีโนไทป์ AA และ KA สัมพันธ์กับการลดลงของ %องค์ประกอบน้ำนมที่สำคัญ (ไขมัน, โปรตีน, ของแข็งไม่รวมไขมันและของแข็งรวมทั้งหมด) จีโนไทป์ KK ส่งผลต่อการเพิ่มไขมันนมและองค์ประกอบน้ำนมที่สำคัญ กล่าวคือ เมื่อยีนเกิดการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่ง K232A ซึ่งหากยีนมีการแปลรหัสได้เป็นกรดอะมิโน Alanine จะส่งผลทำให้เอนไซม์มีค่าความเร็วสูงสุด (V_{max}) ของการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ที่ช้ากว่า ส่วนของยีนที่แปลรหัสได้เป็นกรดอะมิโน lysine (Grisart et al., 2004) จากลักษณะดังกล่าว จึงบ่ง

ชี้ให้เห็นว่าการทำหน้าที่ของเอนไซม์ DGAT1 ในการเร่งปฏิกิริยาการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์นั้นอัลลีล K (lysine) จะมีบทบาทต่อการเพิ่มการสังเคราะห์ไขมันที่มากกว่าอัลลีล A (alanine) ซึ่งได้มีงานวิจัยของ Schennink et al. (2007) และ Hradecká et al.(2008) พบอิทธิพลของจีโนไทป์ AA และ KA ที่ส่งผลต่อการลดลงของไขมันนม และองค์ประกอบน้ำนมที่สำคัญ เช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ ขณะที่มีหลายงานวิจัย (Banos et al., 2008; Gautier et al., 2007 ; Grisart et al., 2002; Spelman et al., 2002) ที่พบว่า จีโนไทป์ KK ส่งผลต่อการเพิ่มไขมันนมและองค์ประกอบน้ำนมที่สำคัญ ซึ่งแตกต่างกับผลการศึกษาในครั้งนี้ ***ประการที่สาม*** ยีน *DGAT1* จีโนไทป์ AA สัมพันธ์กับการเพิ่มกรดไขมันชนิดอิ่มตัว (saturated fatty acid) แต่ส่งผลต่อการลดลงของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) (Schennink et al., 2007) ซึ่งกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวนี้ เป็นส่วนประกอบของกรดไขมันตำแหน่งที่สาม *(sn-3)* (Parodi, 1982) กรดไขมันตำแหน่งสุดท้ายที่เอนไซม์ DGAT1 จะทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการสร้างพันธะเอสเทอร์ของกรดไขมัน เพื่อให้การสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์สมบูรณ์ การเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบดังกล่าว จึงอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ ยีน *DGAT1* ส่งผลต่อการลดลงของ % องค์ประกอบน้ำนม ดังเช่นที่พบในการศึกษาครั้งนี้

ประเด็นที่สอง ยีน *DGAT1* อาจจะมีบทบาทในทางอ้อมต่อโปรตีนในน้ำนมด้วย ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้ แม้จะไม่พบอิทธิพลของยีน *DGAT1* ต่อ PY แต่กลับพบว่า ยีน *DGAT1* มีอิทธิพลต่อการลดลงของ %Prot เช่นเดียวกับการศึกษาของ Sun et al. (2009); Hradecká et al.(2008); Näslund et al. (2008) ทั้งนี้ ในประเด็นของการไม่พบอิทธิพลของยีนต่อลักษณะ PY อาจอธิบายได้จากทฤษฎีของการพัฒนาระบบเต้านมของโคนม กล่าวคือ ในช่วงที่โคมีการพัฒนาของระบบต่อมน้ำนมตั้งแต่แรกเกิดจนถึงวัยเจริญพันธุ์ของโคนมนั้น เซลล์ต่างๆในต่อมน้ำนมจะเจริญโดยอาศัยแผ่นไขมัน (fat pad) ที่มีส่วนประกอบหลัก คือ เซลล์ adipocytes (Sheffield, 1988) ซึ่งเป็นเซลล์ที่พบว่า มีการแสดงออกของยีน *DGAT1* ภายในเซลล์ จึงอาจกล่าวได้ว่า ยีน *DGAT1* นั้นมีบทบาทในการพัฒนาระบบเต้านมด้วย แต่เมื่อเข้าสู่ระยะที่แม่โคมีการให้นม การทำหน้าที่ของแผ่นไขมันจะมีบทบาทในการช่วยพยุงเต้านมเท่านั้น ไม่ได้มีหน้าที่โดยตรงในการสังเคราะห์น้ำนม (Anderson, 1985) จึงอาจเป็นไปได้ที่ในระยะนี้ การทำงานของยีน *DGAT1* ไม่ได้ส่งผลต่อการสังเคราะห์ปริมาณโปรตีนและปริมาณน้ำนมด้วย ในส่วนประเด็นที่ยีน *DGAT1* มีอิทธิพลต่อการลดลงของ %Prot อาจเกิดเนื่องจาก มีกลไกการแสดงออกของยีน *DGAT1* ภายในเคซีนไมเซลล์ซึ่งจากการที่ไมเซลล์ (casein micelle) เป็นรูปแบบหนึ่งของไขมัน โดยส่วนนอกของเคซีนไมเซลล์จะประกอบไปด้วยโปรตีน *Kappa* – casein ทำหน้าที่ในการทำให้ไมเซลล์สามารถคงรูปอยู่ได้ (Jenness, 1985) และ

จากการศึกษาในหนูที่พบว่า ยีน *DGAT1* มีปฏิกิริยาในการชักนำยีน β- casein ให้มีการแสดงออกในหนูที่อยู่ในช่วงระยะท้ายของการตั้งครรภ์ (Cases et al., 2004) จึงมีความเป็นไปได้ว่า ยีน *DGAT1* อาจจะมีการแสดงอิทธิพลร่วมกับกลุ่มยีน *Beta* และ *Kappa* casein ต่อการสังเคราะห์โปรตีนในน้ำนมเช่นเดียวกับที่พบในการศึกษาของ Molee, Duanghaklang, and Mernkrathoke (2011) หรือ ยีน *DGAT1* อาจจะมีบทบาทในทางอ้อมต่อการควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนในน้ำนม ซึ่งได้มีงานวิจัยของ Hradecká et al. (2008) ที่มีสมมติฐานในประเด็นดังกล่าวเช่นเดียวกับการศึกษาครั้งนี้ อย่างไรก็ตาม การเกิดอิทธิพลของยีน *DGAT1* ต่อโปรตีนยังไม่ชัดเจนว่าเป็นอิทธิพลของยีน *DGAT1* จีโนไทป์ใดและยีน *DGAT1* นั้นจะมีกลไกต่อการสังเคราะห์โปรตีนอย่างไร ดังนั้น การศึกษาต่อไปจึงควรมีสมมติฐาน คือ บทบาทของยีน *DGAT1* ต่อโปรตีนในน้ำนม ทั้งนี้ หากผลการศึกษาเป็นไปตามสมมุติฐาน จะทำให้เกิดความชัดเจนในประเด็นบทบาทของ ยีน *DGAT1* ต่อการควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนในน้ำนม ซึ่งจะทำให้สามารถใช้ยีน *DGAT1* เป็น genetic marker อีกตัวหนึ่ง ที่เพิ่มเติมจากกลุ่มยีนเคซีน ที่จะใช้สำหรับการคัดเลือกโคนมจากลักษณะโปรตีนนม

ประเด็นที่สาม การศึกษาครั้งนี้ พบอิทธิพลของจีโนไทป์ KK ต่อลักษณะปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งที่ อิทธิพลของจีโนไทป์ KK เมื่อเปรียบเทียบกับ KA และ AA พบว่า จีโนไทป์ KK นั้น ส่งผลต่อการลด MY และเพิ่ม %Fat, %Prot, %SNF และ %TS (ตารางที่ 4.7) และจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ ซึ่งได้พบว่า ยีน *DGAT1* จีโนไทป์ KK มีอิทธิพลต่อการเพิ่มไขมันในน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมสำคัญ (Banos et al., 2008; Bennewitz et al., 2004 ; Gautier et al., 2007 ; Grisart et al., 2002; Kuehn et al., 2007 ; Spelman et al., 2002 ; Thaller et al., 2003 ; Weller et al., 2003) แต่การศึกษาครั้งนี้ไม่พบนัยสำคัญของอิทธิพลของยีนในลักษณะดังกล่าว ทั้งนี้ อาจเกิดจากหลายปัจจัย ซึ่งสามารถอธิบายได้ ในประเด็นของการเกิดปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างยีน แบบ Epistasis และ ประเด็นของการเกิดปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม โดยแต่ละปัจจัยสามารถอธิบายได้ ดังต่อไปนี้ ***ประการที่หนึ่ง*** ปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างยีน แบบ Epistasis กล่าวคือ ยีน *DGAT1* อาจมีปฏิกิริยาร่วมกับยีนอื่นที่อยู่ในโครงสร้างพันธุกรรมของโคนม (Berry et al., 2010) ซึ่งโคนมแต่ละประชากรย่อมมีโครงสร้างของพันธุกรรมที่ต่างกัน จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลทำให้อิทธิพลของยีนในแต่ละประชากรมีความแตกต่างกันด้วย (Sun et al., 2009; Hradecká et al.,2008, Thaller et al., 2003) ทั้งนี้ มีงานวิจัยจำนวนหนึ่งที่ศึกษาพบการเกิด Epistasis ของยีนทั้งในคนและในสัตว์ ซึ่งสามารถนำมาใช้อธิบาย

ที่มาของสมมติฐานครั้งนี้ได้ งานวิจัยในคน เช่น การศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับโรคอ้วนในคน บนโครโมโซมคู่ที่ 10 (Dong, Wang, Li, Li, Zhao and Price, 2003) งานวิจัยในสัตว์ เช่น การศึกษายีน *calpastatin* (*CAST*) and μ-*calpain* (*CAPN1*) ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความนุ่มของเนื้อในโคเนื้อ (Casas et al., 2006), การศึกษาในไก่ พบว่า อิทธิพลของ Epistasis ส่งผลต่อการลดการเจริญเติบโตในช่วงแรกเกิดจนถึงอายุ 46 วัน (Carlborg et al., 2003) และการพบการเกิด epistasis ของยีนที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 2 และ 12 และยีนที่อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 6 และ 12 ในหนู (Yi et al., 2004) นอกจากนี้ ยังได้มีงานวิจัยหลายงานที่มีสมมติฐานในประเด็นของ Epistasis เช่นเดียวกัน ได้แก่ นพนันท์ รังสะกินนิน (2553), De la Rosa Reyna, Montoya, Castrellón, Rincón, Bracamonte and Vera (2010); Banos et al., (2008) จากที่กล่าวมา จึงมีความเป็นไปได้ที่อิทธิพลเช่นนี้ อาจจะเกิดขึ้นได้ในกลุ่มตัวอย่างโคนมที่ทำการศึกษาเช่นกัน แต่เนื่องด้วยการศึกษาการเกิด Epistasis ยังไม่มีข้อสรุปวิธีการในการศึกษาที่ชัดเจน จึงเป็นประเด็นที่ยังต้องมีการศึกษาต่อไป ดังนั้น ข้อสรุปเรื่องของการเกิดอิทธิพลแบบ Epistasis จึงเป็นเพียงสมมติฐานข้อหนึ่งที่อาจจะเกิดขึ้นในการศึกษาครั้งนี้ ***ประการที่สอง*** ปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม ซึ่งหมายถึง การที่พันธุกรรมของโคนมมีการแสดงออกแตกต่างกันสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไป ทั้งนี้เป็นผลจากการที่การแสดงออกของยีนมีปฏิกิริยาร่วมกับสิ่งแวดล้อมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Hayes, Carrick, Bowman and Goddard, 2003; Lillehammer, Hayes, Meuwissen and Goddard, 2009; Hammami et al., 2009) โดยการเกิดปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม เกิดได้ทั้งปฏิกิริยาร่วมระหว่างพันธุ์กับสิ่งแวดล้อม ปฏิกิริยาร่วมระหว่างสัตว์แต่ละตัวกับสิ่งแวดล้อม และปฏิกิริยาร่วมระหว่างยีนกับสิ่งแวดล้อม (Lin and Togashi, 2002) เมื่อพิจารณาจากลักษณะของกลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งเป็นโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ที่มีระดับสายเลือดสูง แต่อยู่ภายใต้สภาพภูมิอากาศแบบร้อนชื้น ส่งผลทำให้การแสดงออกถึงความสามารถทางพันธุกรรมไม่เต็มที่ เนื่องมาจากการโคนมอาจจะเกิดความเครียดจากสภาวะอากาศร้อน ซึ่งความร้อนจะส่งผลทำให้ฮอร์โมนและตัวรับสัญญาณของฮอร์โมน (receptor) ออกฤทธิ์ในการยับยั้งการผลิตน้ำนมด้วย (Dahl, 2007; Rhoad et al., 2009) ในทางตรงกันข้าม หากโคนมได้รับอิทธิพลของช่วงแสงที่สั้น (short day photoperiod) จะส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของ receptor mRNA ของฮอร์โมนที่กระตุ้นการผลิตน้ำนม (Dahl, 2007) และการลดความเครียดจากความร้อนในแม่โคนมที่อยู่ช่วงระยะการตั้งครรภ์จะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโปรตีนและไขมันในน้ำนม

(Adin et al., 2009) เมื่อพิจารณาในระดับยีน การจัดการด้านอาหารที่แตกต่างกันส่งผลต่อการแสดงออกของ mRNA ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์ส่วนประกอบของไขมันนม (Peterson, Matitashvili and Bauman, 2003) จากงานวิจัยในข้างต้น แสดงให้เห็นว่า สิ่งแวดล้อมมีผลอย่างมากต่อการแสดงออกของยีนดังนั้น จึงมีโอกาสที่อิทธิพลของยีน *DGAT1* ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ อาจจะได้รับผลจากการเกิดปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างยีนกับสิ่งแวดล้อมและทำให้อิทธิพลของยีน *DGAT1* ที่พบในแต่ละประชากรโคนมมีความแตกต่างจากประชากรอื่น

ตารางที่ 4.7 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอิทธิพลของยีน *DGAT1* ในแต่ละจีโนไทป์ ที่มีต่อลักษณะผลผลิตน้ำนม

Genotype/ Traits[1/]	**MY**	**PY**	**FY**	**SNFY**	**TS**	**%Prot**	**%Fat**	**%SNF**	**%TS**
AA - KA	0.46**	8.01	-7.26	30.45*	24.29	-0.04**	-0.22***	-0.06*	-0.27***
AA - KK	0.93**	15.50	-21.14*	53.53*	15.81	-0.06	-0.47***	-0.15***	-0.71***
KA - AA	-0.46**	-8.00	7.26	-30.45*	-24.29	0.04**	0.22***	0.06*	0.27***
KA - KK	0.48	7.50	-13.88	23.08	-8.49	-0.02	-0.26**	-0.09*	-0.44***
KK - AA	-0.93**	-15.50	21.14*	-53.53*	-15.81	0.06*	0.47***	0.15***	0.71***
KK - KA	-0.48	-7.50	13.88	-23.08	8.49	0.02	0.26***	0.09*	0.44***

หมายเหตุ: [1] MY, PY, FY, SNFY, TSY, %Prot, %Fat ,%SNF, %TS หมายถึง ปริมาณน้ำนม, ปริมาณโปรตีน, ปริมาณไขมัน, ปริมาณของแข็งที่ไม่รวมไขมัน, ปริมาณของแข็งทั้งหมด, เปอร์เซ็นต์โปรตีน, เปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ไม่รวมไขมันนม และเปอร์เซ็นต์ของแข็งทั้งหมด

***, **, * หมายถึง *P-value<0.0001, < 0.01, <0.05*

จากที่กล่าวมาในข้างต้น จะเห็นได้ว่าอิทธิพลของยีน *DGAT1* ต่อลักษณะผลผลิตน้ำนม ในการศึกษาครั้งนี้ อาจจะมีอิทธิพลในทิศทางที่แตกต่างจากหลายงานวิจัย ซึ่งลักษณะเช่นนี้เกิดจากปัจจัยดังที่กล่าวมา การศึกษาครั้งนี้ จึงทำให้ได้ข้อสรุปในเบื้องต้นสำหรับการใช้ยีน *DGAT1* เพื่อเป็นตัวช่วยในการคัดเลือกในโคนมกลุ่มตัวอย่าง คือ มีความเป็นไปได้ในการใช้ยีน *DGAT1* หากมีเป้าหมายการคัดเลือกให้ปริมาณน้ำนมสูงขึ้น แต่อาจจะยังมีข้อจำกัด จากการที่อิทธิพลของยีนที่ส่งผลต่อการลดลงขององค์ประกอบน้ำนม ซึ่งทำให้ไม่สามารถใช้ยีน *DGAT1* สำหรับเป็นตัวช่วยในการคัดเลือกโคนมจากลักษณะองค์ประกอบน้ำนมที่สำคัญ แต่หากพิจารณาอิทธิพลของยีนร่วมกับเกณฑ์ในการรับซื้อน้ำนมดิบของประเทศ ซึ่งจะพบว่า อิทธิพลของยีน *DGAT1* ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ ยังไม่ส่งผลกระทบต่อรายได้จากการขายน้ำนมดิบมากนัก เนื่องจากอิทธิพลของยีน

ส่งผลต่อการลดลงของ %TS เพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อเทียบกับรายได้ที่จะเพิ่มขึ้นจากปริมาณน้ำนมที่เพิ่มขึ้น กล่าวคือ หากปริมาณน้ำนมเพิ่มขึ้นประมาณ 1 กิโลกรัมเกษตรกรจะมีรายได้เพิ่มขึ้นประมาณ 17 บาท (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2555) ต่อปริมาณน้ำนม 1 กิโลกรัม แต่อาจถูกตัดราคาเล็กน้อยจาก %TS ที่ไม่ถึงเกณฑ์มาตรฐาน ซึ่งกำหนดโดยกระทรวงเกษตรและสหกรณ์

4.5 อิทธิพลของยีน *GnRHR* ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์

เพื่อให้ทราบถึงศักยภาพของ ยีน *GnRHR* ในการเป็น genetic marker สำหรับช่วยในการคัดเลือกลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนม จึงได้มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์และอิทธิพลของยีนต่อลักษณะดังกล่าว โดยมีสมมติฐานของการศึกษา คือ ยีน *GnRHR* มีอิทธิพลต่อลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์ ผลการศึกษา ไม่เป็นไปตามสมมติฐานของงานวิจัย โดยพบว่า ยีน *GnRHR* มีอิทธิพลต่อลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์ ซึ่งได้แก่ จำนวนครั้งการผสมติด จำนวนวันท้องว่าง ระยะห่างการให้ลูก และอัตราการผสมติด อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.8)

ทั้งนี้ การศึกษาควรจะพบอิทธิพลของยีน *GnRHR* ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ เนื่องจากทฤษฎีว่าด้วยการทำงานของฮอร์โมน GnRH จะเห็นได้ว่า ยีน *GnRHR* มีอิทธิพลต่อการควบคุมระบบสืบพันธุ์ตั้งแต่เริ่มแรกที่โคนั้นเริ่มเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ แต่การที่ในกลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษาครั้งนี้ ไม่สามารถพบอิทธิพลดังกล่าวได้ อาจเนื่องมาจากการเกิด Type II error ทำให้การศึกษามีการปฏิเสธ สมมติฐาน H_A และยอมรับ H_0 กล่าวคือ ไม่สามารถพบอิทธิพลของยีนที่มีอยู่จริงได้ ซึ่งเมื่อพิจารณาลักษณะข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์ ในการศึกษาครั้งนี้ จะเห็นได้ว่า มีจำนวนข้อมูลอยู่ในช่วง 217-245 บันทึก ลักษณะข้อมูลดังกล่าวทำให้พบว่า ค่า power of test ของการทดสอบอิทธิพลของยีนมีค่าค่อนข้างต่ำ (ตารางที่ 2 ข. 2 ในภาคผนวก ข) และเมื่อเปรียบเทียบกับการทดสอบอิทธิพลของลักษณะผลผลิตน้ำนม (ตารางที่ 4.1) ซึ่งมีจำนวนข้อมูลอยู่ในช่วง 2675-2766 บันทึก ลักษณะข้อมูลดังกล่าวทำให้ค่า power of test ค่อนข้างสูง (ตารางที่ 1 และตารางที่ 3 ในภาคผนวก ค) ทำให้การศึกษาสามารถพบอิทธิพลของยีนที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตน้ำนมได้ ดังนั้น การวิเคราะห์จำนวนข้อมูลลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์อาจจะต้องมีจำนวนบันทึกที่มากพอเช่นเดียวกับข้อมูลผลผลิตน้ำนม ซึ่งอาจจะทำให้ สามารถพบอิทธิพลที่มีอยู่จริงของยีนต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ได้ และมีค่า power of test ของการทดสอบอิทธิพลของยีนที่สูงขึ้น

ตารางที่ 4.8 อิทธิพลของ รูปแบบ PCR-SSCP ของยีน *GnRHR* ต่อลักษณะจำนวนครั้งการผสมติด, จำนวนวันท้องว่าง, ระยะห่างของการให้ลูกและอัตราการผสมติด

Traits	Effect of pattern + SE		
	1	2	3
Number of service (time)	-0.32±0.65	-0.43±0.27	0
Day open (days)	-15.89±43.18	-6.06±16.52	0
Calving interval (days)	-14.66±52.45	-27.29±19.25	0
Conception rate (%)	7.61±15.00	8.99±6.17	0

4.6 อิทธิพลร่วมของยีน *DGAT1* และ ยีน *GnRHR* ต่อลักษณะผลผลิตน้ำนม

เพื่อนำไปสู่การกำหนดทิศทางการศึกษาอิทธิพลของ genetic marker ที่ใช้ในการคัดเลือกโคนมจากลักษณะผลผลิตน้ำนมว่าควรจะต้องพิจารณายีนเพียงตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งตำแหน่ง ดังนั้น จึงได้มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์และอิทธิพลของยีนต่อลักษณะผลผลิตน้ำนม โดยมีสมมติฐานของการศึกษา คือ ยีน*DGAT1* และยีน *GnRHR* มีอิทธิพลร่วมกันต่อลักษณะผลผลิตน้ำนม

ผลการศึกษาครั้งนี้ เป็นไปตามสมมติฐาน (ตารางที่ 4.9) กล่าวคือ ยีน *DGAT1* และ ยีน *GnRHR* มีอิทธิพลร่วมกันต่อลักษณะปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม ได้แก่ PY, SNFY, TSY, %Prot, %SNF และ %TS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้ การพบอิทธิพลร่วมของยีน มีทั้งในทิศทางที่เพิ่มขึ้นและลดลง ลักษณะที่มีทิศทางเพิ่มขึ้น ได้แก่ %Prot, %SNF และ %TS ส่วนลักษณะที่มีทิศทางลดลงได้แก่ PY, SNFY,และTSY

การที่ผลการศึกษาดังกล่าว เป็นไปตามสมมติฐานของงานวิจัย อาจเกิดจากผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากการทำงานของยีน *DGAT1*และ ยีน *GnRHR* มีปฏิกิริยาร่วมกันและส่งผลต่อการพัฒนาของเซลล์เยื่อบุเต้านม (mammary epithelium cell) และเซลล์เนื้อเยื่อประสาน (stroma cell) ที่อยู่ล้อมรอบเซลล์เยื่อบุเต้านม อาจนำมาซึ่งการเปลี่ยนแปลงผลผลิตน้ำนมได้ กล่าวคือ การเจริญและพัฒนาของเซลล์เต้านมจะมากหรือน้อย สามารถชี้วัดโดยการพัฒนาของเซลล์ epithelialในกระเปาะนม (alveoli) ซึ่งเซลล์ดังกล่าวจะได้ต้องรับการกระตุ้นจากปัจจัยต่าง ๆ ที่อยู่ในเนื้อเยื่อประสานที่อยู่ล้อมรอบเซลล์ด้วย (Aker, 2002) ทั้งนี้ บทบาทของยีน *GnRHR* จะส่งผลต่อการพัฒนาของเซลล์ epithelial ผ่านทางฮอร์โมน GnRHซึ่งจะทำหน้าที่ในการกระตุ้นให้เกิดการสร้างฮอร์โมน estrogen และ progesterone ไปทำงานในส่วนของการพัฒนาของเซลล์ epithelial ต่อไป ส่วนบทบาทของ ยีน *DGAT1* จะเกิดขึ้นในส่วนของเซลล์เนื้อเยื่อประสาน (stroma cell) ที่อยู่ล้อมรอบเซลล์เยื่อบุเต้านม

จากประเด็นดังที่กล่าวมา สามารถอธิบายได้ดังนี้ จากการที่บทบาทหลักของฮอร์โมน GnRH คือ การกระตุ้นต่อมใต้สมองส่วนหน้าให้มีการสร้างและหลั่งฮอร์โมน FSH และ LH เพื่อทำหน้าที่ในการสร้างรังไข่ให้มีการผลิตฮอร์โมน estrogen และ progesterone ขึ้นมา ท้ายที่สุดแล้วฮอร์โมน estrogen และ progesterone จะทำหน้าที่ในการกระตุ้นการพัฒนาระบบเต้านมให้เจริญไปพร้อมกับแผ่นไขมันในช่วงตั้งแต่แรกเกิดจนถึงระยะการเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ของโคนม (Anderson, 1985) ทั้งนี้ การออกฤทธิ์ของฮอร์โมนทั้งสองต่อการพัฒนาของเต้านมจะเกิดขึ้นในเซลล์เยื่อบุเต้านม (epithelium cell) ที่อยู่ในกระเปาะนม (alveoli) โดยออกฤทธิ์ผ่านทางเนื้อเยื่อประสานที่อยู่รอบ ๆ เซลล์เยื่อบุเต้านม ที่เรียกว่า stroma cell ซึ่งมีการทำหน้าที่ของยีน *DGAT1* ในส่วนนี้ เนื่องจาก stroma cell จะประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissue) เป็นจำนวนมาก ซึ่งเซลล์ไขมันที่อยู่ภายใน stroma cell นี้จะมีการสังเคราะห์และการสะสมไตรกลีเซอไรด์เป็นจำนวนมาก เพื่อส่งต่อไปยังเซลล์เยื่อบุเต้านม สำหรับนำไปใช้ในการผลิตน้ำนม (Bell and Coleman., 1980; Bridley, 1991; Lehner and Kuksis, 1996) ดังนั้น หากเกิดความบกพร่องในการทำงานของยีน *DGAT1* จะส่งผลกระทบต่อการพัฒนาของเซลล์ epithelial (Cases et al, 1998) โดยอาจทำให้การส่งสัญญาณของฮอร์โมนต่าง ๆ ที่ใช้ในการพัฒนาเซลล์ epithelial มีการเปลี่ยนแปลงหรือสูญเสียการทำงานได้ (Hovey, McFadden and Akers, 1999) ซึ่งลักษณะเช่นนี้จะทำให้ส่งผลต่อการสร้างน้ำนมของโคนมด้วย

จากทฤษฎีและงานวิจัยดังที่กล่าวมานั้น เป็นการชี้ให้เห็นถึง การทำงานร่วมกันระหว่างเซลล์ epithelial และเซลล์ stroma ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงกลไกการทำงาน จะพบว่า การทำงานของเซลล์ทั้งสองนี้จะเกิดขึ้นภายใต้การควบคุมทำงานของยีน *GnRHR* และยีน *DGAT1* ลักษณะเช่นนี้อาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้การศึกษาครั้งนี้ พบการเกิดอิทธิพลร่วมของ ยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* ต่อผลผลิตน้ำนม อย่างไรก็ตาม อิทธิพลร่วมของยีนทั้งสองจะส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นและลดลงของผลผลิตน้ำนมได้อย่างไรนั้น ยังไม่ทราบสาเหตุและกลไกที่ชัดเจน ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาต่อให้ทราบถึงกลไกการทำงานร่วมกันของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* ในการควบคุมการทำงานของเซลล์ที่มีหน้าที่ในการสังเคราะห์น้ำนม ซึ่งหากพบว่า ยีนทั้งสองนี้มีการทำงานร่วมกันและส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงผลผลิตน้ำนม จะทำให้การศึกษาอิทธิพลของgenetic marker ที่ใช้ในการคัดเลือกโคนมโดยเฉพาะลักษณะผลผลิตน้ำนมจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องพิจารณายีนมากกว่าหนึ่งตำแหน่ง โดยนอกจากจะต้องพิจารณายีนที่เกี่ยวข้องกับการให้ผลผลิตโดยตรงแล้วยังต้องพิจารณายีนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ร่วมด้วย เนื่องจาก ทั้งระบบสืบพันธุ์และระบบการผลิตน้ำนมของโคนม มีบางกลไกที่ทำงานร่วมกัน

ตารางที่ 4.9 อิทธิพลร่วมของยีน *DGAT1* และ ยีน *GnRHR* ต่อลักษณะผลผลิตน้ำนม

Traits[1/]	*DGAT1*		*GnRHR*				*DGAT1*GnRHR* Effect ± SE								
	AA	KA	KK	1	2	3	AA1	AA2	AA3	KA1	KA2	KA3	K1	K2	K3
MY(kg/day)	1.35±0.52**	1.11±0.48*	0	1.46±0.71*	1.49±0.56**	0	-0.49±0.81	-0.76±0.64	0	0.10±0.77	-1.36±0.60*	0	0	0	0
FY (g./day)	11.93±18.58	-5.50±17.38	0	33.45±25.34	56.81±19.91**	0	-17.66±29.04	-58.18±22.94	0	36.22±27.73	-32.40±21.43	0	0	0	0
PY (g./day)	29.48±14.77*	15.89±13.79	0	18.53±20.16	41.95±15.86**	0	13.86±23.18	-34.19±18.30	0	38.26±22.10	-35.31±17.07*	0	0	0	0
SNFY (g./day)	105.48±43.16*	66.89±40.37	0	88.18±58.86	130.29±46.26**	0	-7.36±67.47	-102.01±53.28	0	48.96±64.42	-111.68±49.78*	0	0	0	0
TSY (g./day)	95.31±58.71	36.94±54.80	0	111.32±80.11	182.55±63.01**	0	-13.57±92.12	-155.48±72.71*	0	100.28±87.83	-137.92±67.81*	0	0	0	0
%Fat	-0.7±0.11***	-0.41±0.10***	0	-0.10±0.15	-0.03±0.77	0	-0.06±0.17	-0.15±0.13	0	0.22±0.16	0.23±0.12	0	0	0	0
% Prot	-0.10±0.05*	-0.13±0.04**	0	-0.26±0.06***	-0.04±0.05	0	0.29±0.07***	-0.04±0.06	0	0.34±0.07***	0.06±0.05	0	0	0	0
%SNF	-0.14±0.08	-0.22±0.07**	0	-0.30±0.11**	-0.02±0.08	0	0.33±0.12**	-0.14±0.10	0	0.34±0.11**	0.11±0.09	0	0	0	0
%TS	-0.61±0.16***	-0.72±0.15***	0	-0.47±0.22*	-0.04±0.17	0	0.34±0.25	-0.31±0.20	0	0.61±0.24**	0.33±0.19	0	0	0	0

หมายเหตุ : [1] MY, PY, FY, SNF, LY, TSY, %Prot, %Fat %SNF, %Lac, %TS หมายถึง ปริมาณน้ำนม, ปริมาณโปรตีน, ปริมาณไขมัน, ปริมาณของแข็งที่ไม่รวมไขมันนม,ปริมาณแลคโตส, ปริมาณของแข็งทั้งหมดเปอร์เซ็นต์โปรตีน, เปอร์เซ็นต์แลคโตส, เปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ไม่รวมไขมันนม, และเปอร์เซ็นต์ของแข็งทั้งหมด

***, **, * หมายถึง *P-value<0.0001, < 0.01, <0.05*

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.7 อิทธิพลร่วมของยีน *DGAT1* และ ยีน *GnRHR* ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์

เพื่อนำไปสู่การกำหนดทิศทางการศึกษาอิทธิพลของ genetic marker ที่ใช้ในการคัดเลือกโคนมจากลักษณะลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ ว่าควรจะต้องพิจารณายีนเพียงตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งตำแหน่ง ดังนั้น จึงได้มีการศึกษาถึงความสัมพันธ์และอิทธิพลของยีนต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ โดยมีสมมติฐานของการศึกษา คือ ยีน *DGAT1* และ ยีน *GnRHR* มีอิทธิพลร่วมกันลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์

ผลการศึกษาครั้งนี้ ไม่เป็นไปตามสมมติฐาน (ตารางที่ 4.10) กล่าวคือ ทั้งยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* สัมพันธ์กับลักษณะจำนวนครั้งการผสมติด จำนวนวันท้องว่าง ระยะห่างการให้ลูกและอัตราการผสมติด อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้ การที่ผลการศึกษาไม่เป็นไปตามสมมติฐานสามารถอธิบายได้ในประเด็น การเกิด Type II error ที่ทำให้ไม่สามารถพบอิทธิพลของยีนที่มีอยู่จริง และการที่ Power of test ของการทดสอบอิทธิพลของยีนมีค่าค่อนข้างต่ำ (ตารางที่ 4 ในภาคผนวก ค) ซึ่งใช้ทฤษฎีและงานวิจัยที่สนับสนุนประเด็นดังกล่าวเช่นเดียวกับ ผลการศึกษาอิทธิพลของยีน *GnRHR* ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ ในหัวข้อที่ 4.5

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.10 อิทธิพลร่วมของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* ต่อลักษณะจำนวนครั้งการผสมติด, จำนวนวันท้องว่าง, ระยะห่างการให้ลูก และอัตราการผสมติด

Traits	*DGAT1*			*GnRHR*			*DGAT1*GnRHR* Effect ± SE								
	AA	KA	KK	1	2	3	AA 1	AA 2	AA 3	KA 1	KA 2	KA 3	KK 1	KK 2	KK 3
Number of service (time)	-0.77±0.93	-0.32±0.91	0	-2.61±1.82	-0.34±0.89	0	4.35±2.27	0.20±1.00	0	1.63±2.05	-0.08±0.97	0	0	0	0
Day open (days)	-29.58±58.35	-35.01±56.78	0	-74.86±113.65	-29.79±55.87	0	69.67±157.58	22.23±62.71	0	72.22±127.97	30.17±60.50	0	0	0	0
Calving interval (days)	-63.30±65.11	-97.49±62.78	0	-98.87±124.96	105.43±61.18	0	181.72±173.90	63.75±69.91	0	63.89±147.30	93.11±66.79	0	0	0	0
Conception rate (%)	-0.34±21.62	-7.58±21.01	0	51.33±42.22	1.66±20.72	0	-84.59±52.60	5.74±23.28	0	-31.38±47.52	12.39±22.42	0	0	0	0

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.8 สหสัมพันธ์ของลำดับค่า EBV เมื่อมีอิทธิพลของยีนเป็นปัจจัยคงที่และไม่มีอิทธิพลของยีน

จากผลการศึกษาอิทธิพลของยีนดังที่รายงานมาในข้างต้น ได้นำมาสู่การศึกษาเพื่อให้ทราบถึงสหสัมพันธ์ของลำดับค่า EBV เมื่อมีอิทธิพลของยีนเป็นปัจจัยคงที่และไม่มีอิทธิพลของยีน ทั้งลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตน้ำนมและลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์โดยมีสมมติฐานในการศึกษา คือ สามารถใช้ยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* เป็นปัจจัยคงที่ปัจจัยหนึ่งในการประเมินค่า EBV ของโคนมได้

ผลการศึกษาครั้งนี้ ไม่เป็นไปตามสมมติฐาน โดยพบว่า ค่า EBV ที่ได้จากตัวแบบตัวสัตว์ที่มีอิทธิพลของยีนเป็นปัจจัยคงที่และไม่มีอิทธิพลของยีนมีความสัมพันธ์กันในทางบวกที่สูง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4.11 และ ตารางที่ 4.12 ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่า อิทธิพลของยีนไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงลำดับค่า EBV ในทุกลักษณะของกลุ่มตัวอย่างที่ทำการศึกษา ซึ่งอาจเนื่องมาจากขนาดอิทธิพลของยีนต่อค่า EBV ของลักษณะผลผลิตน้ำนมและลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ (ตารางที่ 5 และ ตารางที่ 6 ในภาคผนวก ค) ที่เป็นอิทธิพลของยีนเพียงตำแหน่งเดียวที่นำมาศึกษานั้นมีน้อยมากจนไม่เพียงพอที่จะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าเฉลี่ยของลักษณะที่เกี่ยวข้องกับผลผลิตน้ำนมและลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์

จากผลการศึกษา ทำให้สามารถกำหนดแนวทางการนำผลการศึกษาครั้งนี้ไปใช้ประโยชน์สำหรับการคัดเลือกโคนมกลุ่มตัวอย่าง ได้เป็นสองกรณีดังนี้ กรณีแรก การประเมินค่า EBV ในแม่โครีดนม สามารถประเมินได้จากข้อมูลพันธุ์ประวัติ ข้อมูลการให้ผลผลิต และข้อมูลความสมบูรณ์พันธุ์ โดยไม่จำเป็นต้องใช้ข้อมูลอิทธิพลของยีนเป็นปัจจัยร่วมในการประเมิน ส่วนกรณีสอง ใช้ข้อมูลอิทธิพลของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* เพื่อคัดเลือกแม่พันธุ์โคนม และนำข้อมูลของยีนที่ได้มาใช้ร่วมกับการประเมินค่า EBV สำหรับการคัดเลือกลูกโคนม เพื่อให้สามารถทำการคัดเลือกโคนมได้โดยไม่ต้องรอให้โคนมอยู่ในช่วงการให้ผลผลิตหรือจนกว่าโคนมจะแสดงอาการที่บ่งบอกถึงความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ ซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาในการคัดเลือกโคนมได้

ตารางที่ 4.11 ค่าสหสัมพันธ์ของลำดับค่า EBV ของลักษณะผลผลิตน้ำนมเมื่อมีอิทธิพลของยีน *DGAT1* เป็นปัจจัยคงที่และไม่มีอิทธิพลของยีน

Item	**Correlation (*DGAT1)***	***P-value***
MY (kg./day)	0.920	<0.0001
PY (g./day)	0.995	<0.0001
FY (g./day)	0.997	<0.0001
SNFY (g./day)	0.994	<0.0001
TSY (g./day)	0.999	<0.0001
% Prot	0.998	<0.0001
%Fat	0.910	<0.0001
%SNF	0.985	<0.0001
%TS	0.930	<0.0001

ตารางที่ 4.12 ค่าสหสัมพันธ์ของลำดับค่า EBV ของลักษณะจำนวนครั้งการผสมติด, จำนวนวันท้องว่าง, ระยะห่างของการให้ลูกและอัตราการผสมติด เมื่อมีอิทธิพลของ ยีน *GnRHR* เป็นปัจจัยคงที่และไม่มีอิทธิพลของยีน

Item	**Correlation *(GnRHR)***	***P-value***
Number of service (time)	0.96	<0.0001
Day open (days)	0.99	<0.0001
Calving interval (days)	0.99	<0.0001
Conception rate (%)	0.97	<0.0001

บทที่ 5
สรุปและข้อแสนอแนะ

5.1 สรุป

จากผลการศึกษาที่กล่าวมา สามารถสรุปเป็นประเด็นหลัก ๆ ดังต่อไปนี้

5.1.1 ความถี่อัลลีล ความถี่จีโนไทป์ และความถี่ของชิ้นส่วน SSCP ของ ยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* อยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสม ที่สามารถบ่งชี้ได้ว่า ยีนทั้งสองมีคุณสมบัติในการนำมาใช้เป็นgenetic marker เพื่อช่วยคัดเลือกโคนมจากลักษณะผลผลิตน้ำนมและลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์ ทั้งนี้ แนวทางในการศึกษารูปแบบของยีนทั้งสองตำแหน่ง สรุปได้ว่าสามารถศึกษาได้อย่างอิสระ เนื่องจาก เทคนิคที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ทำให้ไม่พบ การเกิด Linkage disequilibrium ยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR*

5.1.2 การใช้ยีน *DGAT1* เป็น genetic marker เพื่อช่วยในคัดเลือกโคนมกลุ่มตัวอย่างนี้สามารถใช้ได้ในกรณีที่มีเป้าหมายการคัดเลือกโคนมเพื่อเพิ่มปริมาณน้ำนม ทั้งนี้ แม้ว่าการใช้ยีน *DGAT1* อาจจะยังไม่เหมาะสมในการคัดเลือกโคนมเพื่อเพิ่มองค์ประกอบน้ำนม แต่ยังอยู่ในเกณฑ์ที่สามารถยอมรับได้ หากพิจารณาอิทธิพลของยีนร่วมกับเกณฑ์ในการรับซื้อน้ำนมดิบของประเทศซึ่งจะพบว่ายังไม่ส่งผลกระทบต่อรายได้จากการขายน้ำนมดิบมากนัก เนื่องจากอิทธิพลของยีนส่งผลต่อการลดลงของ %TS เพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อเทียบกับรายได้ที่จะเพิ่มขึ้นจากปริมาณน้ำนมที่เพิ่มขึ้น ส่วนยีน *GnRHR* ยังไม่เหมาะสมหากจะนำมาใช้ในการคัดเลือกลักษณะจำนวนวันท้องว่าง ระยะห่างการให้ลูก จำนวนครั้งการผสมติดและอัตราการผสมติด เนื่องจากลักษณะดังกล่าว อาจจะเป็นลักษณะที่ยีน *GnRHR* มีบทบาทควบคุมโดยอ้อม ทำให้อิทธิพลของยีนที่มีต่อลักษณะนั้นยังไม่ชัดเจน ดังนั้น จึงควรมีการศึกษาและเก็บข้อมูลความสมบูรณ์พันธุ์ในลักษณะอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น อัตราการผสมติดครั้งแรก อายุการเป็นสัดครั้งแรก เป็นต้น เพื่อให้มีความชัดเจนของการเกิดอิทธิพลของยีนต่อไป อย่างไรก็ตาม อิทธิพลร่วมยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* สามารถนำไปใช้เป็น genetic marker เพื่อคัดเลือกโคนมจากลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมได้

5.1.3 ในการคัดเลือกโคนมกลุ่มตัวอย่างนี้สามารถใช้ตัวแบบตัวสัตว์ทั้งแบบที่มีอิทธิพลของยีนเป็นปัจจัยคงที่และไม่มีอิทธิพลของยีนในการประเมินค่า EBV ได้

5.1.4 จากข้อสรุปในแต่ละประเด็นดังที่กล่าวมาในข้างต้น ได้ชี้ให้เห็นถึงข้อสรุปของการใช้genetic marker ในการคัดเลือกโคนมกลุ่มตัวอย่าง ดังนี้ กรณีที่หนึ่ง การประเมินค่า EBV ในแม่โครีดนม สามารถประเมินได้จากข้อมูลพันธุ์ประวัติ ข้อมูลการให้ผลผลิต และข้อมูลความสมบูรณ์

พันธุ์ โดยไม่จำเป็นต้องใช้ข้อมูลอิทธิพลของยีนเป็นปัจจัยร่วมในการประเมิน ส่วนกรณีที่สอง ใช้ข้อมูลอิทธิพลของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* เพื่อคัดเลือกแม่พันธุ์โคนม และนำข้อมูลของยีนที่ได้มาใช้ร่วมกับการประเมินค่า EBV สำหรับการคัดเลือกลูกโคนม เพื่อให้สามารถทำการคัดเลือกโคนมได้โดยไม่ต้องรอให้โคนมอยู่ในช่วงการให้ผลผลิตหรือจนกว่าโคนมจะแสดงอาการที่บ่งบอกถึงความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ ซึ่งจะช่วยลดระยะเวลาในการคัดเลือกโคนมได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากข้อสรุปดังที่กล่าวมา นำมาซึ่งข้อเสนอแนะและแนวทางในการศึกษาเพิ่มเติมดังต่อไปนี้

5.2.1 บทบาทของยีน *DGAT1* ต่อโปรตีนในน้ำนม ทั้งนี้ หากผลการศึกษาเป็นไปตามสมมุติฐาน จะทำให้เกิดความชัดเจนในประเด็นบทบาทของ ยีน *DGAT1* ต่อการควบคุมการสังเคราะห์โปรตีนในน้ำนม ซึ่งจะทำให้สามารถใช้ยีน *DGAT1* เป็น genetic marker อีกตัวหนึ่งที่เพิ่มเติมจากกลุ่มยีนเคซีน ที่จะใช้สำหรับการคัดเลือกโคนมจากลักษณะโปรตีนนม

5.2.2 กลไกการทำงานร่วมกันของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* ในการควบคุมการทำงานของเซลล์ที่มีหน้าที่ในการสังเคราะห์น้ำนม ซึ่งหากพบว่า ยีนทั้งสองนี้มีการทำงานร่วมกันและส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงผลผลิตน้ำนม จะทำให้การศึกษาอิทธิพลของ genetic marker ที่ใช้ในการคัดเลือกโคนมโดยเฉพาะลักษณะผลผลิตน้ำนมจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องพิจารณายีนมากกว่าหนึ่งตำแหน่ง โดยนอกจากจะต้องพิจารณายีนที่เกี่ยวข้องกับการให้ผลผลิตโดยตรงแล้วยังต้องพิจารณายีนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ร่วมด้วย เนื่องจาก ทั้งระบบสืบพันธุ์และระบบการผลิตน้ำนมของโคนม มีบางกลไกที่ทำงานร่วมกัน

5.2.3 การศึกษาปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม ซึ่งจะส่งผลทำให้การแสดงออกของยีนต่อลักษณะเปลี่ยนแปลงไปเมื่อศึกษาในประชากรที่แตกต่างกัน ดังนั้น แนวทางการศึกษาต่อจึงต้องให้ความสำคัญกับการเกิดปฏิกิริยาร่วมกันระหว่างพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม ทั้งนี้เพื่อให้ทราบถึงเงื่อนไขบางประการของการใช้ genetic marker ที่อาจจะมีความจำเพาะในแต่ละประชากร และจะนำไปสู่การกำหนดทิศทางการใช้ genetic marker สำหรับการคัดเลือกโคนมให้เหมาะสมกับสภาพของประชากรนั้น ๆ ด้วย

รายการอ้างอิง

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2549. **ประกาศกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เรื่อง มาตรฐานการรับซื้อน้ำนมดิบ**. [ออนไลน์]. ได้จาก http://www.dld.go.th/transfer/th1/ index.php?option =com _ phocadownload&view=category&id=12&Itemid=169

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2555). **ราคาสินค้าเกษตร: น้ำนมดิบ** [ออนไลน์]. ได้จาก http:// www.rakbankerd. com/view-price-iphone.php?ic=2&p=

กลุ่มวิจัยและพัฒนาโคนม กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์. (2553). **โคนมพันธุ์โฮลส์ไตน์ฟรีเชี่ยน.** [ออนไลน์]. ได้จาก http://www.dld.go.th/km/th/index.php?option=com_content&view= article &id=275:-holstein-friesian&catid=41:present-general&Itemid=59

จินตนา วงศ์นากนากร, ธวัชชัย อินทรตุล และกัลยา บุญญานุวัตร. อิทธิพลของอุณหภูมิและความชื้นของอากาศต่อการผลิตนมและความสมบูรณ์พันธุ์ของแม่โคนมลูกผสมขาวดำ. **รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาสัตว์.** ครั้งที่ 36. 84-95.

จุรีรัตน์ แสนโภชน์, สายัณห์ บัวบาน และ กนกพร ไตรวิทยากร. 2553. อิทธิพลของยีนหลัก *DGAT1* ต่อผลผลิตและคุณภาพน้ำนม ในโคนมลูกผสมไทย – โฮลสไตน์. **วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์.** 5. 9-20.

เทพณรงค์ นพกรวิเศษ, วิศรา ไชยสาลี และนิธิกานต์ อินทร. 2550. **เทคโนโลยีชีวภาพกับโคนมไทย.** ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

นพนันท์ รังสะกินนิน. (2553). อิทธิพลของยีนเบต้าและแคปป้าเคซีนต่อปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ที่มีระดับสายเลือดแตกต่างกัน.**วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต**. สาขาวิชาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พัชรินทร์ สนธิ์ไพโรจน์, สหัทยา ทรัพย์รอด และประภาส มหินชัย. (2542). สมรรถนะความสมบูรณ์พันธุ์และการให้ผลผลิตของโคพันธุ์โฮล์สไตน์ที่นำเข้าจากประเทศแคนาดา. **รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาสัตว์.** ครั้งที่ 37. 237-248.

พัชรี บุญศิริ, เปรมใจ อารีจิตรานุสรณ์, อุบล ชาอ่อน และปีติ รุวจิตต์. (2551). **ตำราชีวเคมี**. ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

มนต์ชัย ดวงจินดา. (2548). **การประเมินพันธุกรรมสัตว์**. ภาควิชาสัตวศาสตร์. คณะเกษตรศาสตร มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วิชัย ทิพย์วงค์, มนต์ชัย ดวงจินดา, เทวินทร์ วงษ์พระลับ, วิโรจน์ ภัทรจินดา และจินตนา วงศ์นาก-นากร. (2548). **รายงานผลการวิจัยโคนม.** กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์.

วีระศักดิ์, ศร, ขวัญชาย และวิทยา. (2548). ผลของอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ต่ออัตราผสมติดของฟาร์มโคนมรายย่อยในจังหวัดเชียงใหม่. **เวชชสารสัตวแพทย์.** 35(4); 73-79.

วีระศักดิ์ ปัญญาพรวิทยา, เอกพจน์ ระงับพิศม์ และศร ธีปฏิมากร. (2549). การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการตั้งท้องในช่วง 120 วันหลังคลอดในแม่โคนมลูกผสมโฮล์สไตน์ฟรีเชี่ยนโดยใช้สมการถดถอยของ Cox. **เชียงใหม่สัตวแพทยสาร**.4 (1); 3-10.

สมเกียรติ ประสานพานิช, ชลลดา รัตนวิเชียร และพีระ ไชยรุตต์ (2542). ผลผลิตและการสืบพันธุ์ของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนระดับสายเลือดต่าง ๆ ภายใต้การเลี้ยงดูขององค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.). **รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ สาขาสัตว์** ครั้งที่ 37. 174 -182.

สุรชัย สุรฤทธิพงศ์ และพัลลภ ลูกอินทร์. (2550). อิทธิพลของค่าดัชนีอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ต่ออัตราการผสมติดของโคนมในพื้นที่อำเภอเมือง จังหวัดเพชรบูรณ์. **วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์.** 2 (1); 82-93.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ (2554). **การผลิตสินค้าการเกษตรที่สำคัญ; ปริมาณการผลิตน้ำนมดิบ จำนวนโครีดนม ครัวเรือนผู้เลี้ยงโคนม ปี 2552-2553 รายจังหวัด.** [ออนไลน์]. ได้จาก http://www.oae.go.th/ewt_news.php?nid=9704.

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์, กรมปศุสัตว์ (2554). **ดัชนีบ่งชี้ประสิทธิภาพระบบสืบพันธุ์ของโคนม.** [ออนไลน์]. ได้จาก http://www.dld.go.th/ biotech /Data/ Nuch/ The_ system_ reproduces/ system_efficiency_reproduce/System_efficiency_reproduces.html

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์, กรมปศุสัตว์. (2552). **ข้อมูลสถิติประจำปี 2552; อัตราการผสมติดโดยรวมของโคสาวและแม่โค ปี2552 .** [ออนไลน์]. ได้จาก http://www.dld.go.th/ biotech/ Data/ Nuch/Statistics/2552/อัตราการผสมติดโดยรวมของโคสาวและแม่โค.htm.

สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดนครราชสีมา, กรมปศุสัตว์. (2554). **รายงานปริมาณน้ำนมดิบของสหกรณ์/กลุ่มเกษตรกร/ศูนย์รวมนม (ข้อมูล ณ วันที่ 1-28 กุมภาพันธ์ 2554).** [ออนไลน์]. ได้จาก www.dld. go.th/pvlo_nak/data/milk/milk54.xls

อดิศร ยะวงศา, ณัฐพล เมืองทอง และคมเดช จีนะเจริญ. (2550). ประสิทธิภาพระบบสืบพันธุ์ของแม่โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนในฟาร์มรายย่อย เขตอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม ปี 2545-2549. **วิทยาสารกำแพงแสน**. 5(2); 11-18.

Adin, G., Gelman, A., Solomon, R., Flamenbaum, I., Nikbachat, M., Yosef, E., Zenou, A., Shamay, A., Feuermann, Y., Mabjeesh, S. J. and Miron, J. (2009). Effects of cooling dry cows under heat load conditions on mammary gland enzymatic activity, intake of food water, and performance during the dry period and after parturition. **Livestock Science.** 124; 189–195.

Aker, R.M. (2002). **Lactation and the mammary gland**. Iowa State University Press, Ames.

Alnimer, M., De Rosa, G., Grasso, F., Napolitano, F., and Bordi, A. (2002). Effect of climate on the response to three oestrous synchronisation techniques in lactating dairy cows. **Animal Reproductive Science.** 71; 157 – 168.

Alison Van Eenennaam. (2009). **Basics of DNA Markers and Genotyping. U.S. Companies Providing Genotyping Services for Beef Cattle**. [Online]. Avaiable: http://animal science.ucdavis.edu /animalbiotech/ Biotechnology/MAS/index.htm.

Andrade, P. C., Grossi, D. A., Paz, C. C. P., Alencar, M. M., Regitano, L. C. A. and Munari, D. P. (2008). Association of an insulin-like growth factor 1 gene microsatellite with phenotypic variation and estimated breeding values of growth traits in Canchim cattle. **Animal Genetics.** 39. 480–485.

Anderson, R.R. (1985). Mammary gland. In: **Lactation** (Edited by Larson B. L.) pp. 3-38., Iowa State University Press, Ames.

Ansari-Mahyari, S., Sørensen, A. C., Lund, M. S., Thomsen, H. and Berg, P. (2008).Across-family marker-assisted selection using selective genotyping strategies in dairy cattle breeding schemes. **Journal of Dairy Science.**91; 1628–1639.

Badinga L, Collier, R. J., Thatcher, W. W., Wilcox, C. J. (1985). Effects of climatic and management factors on conception rate of dairy cattle in subtropical environment. **Journal of Dairy Science.** 68(1); 78-85.

Banos, G., Woolliams, J. A., Woodward, B. W., Forbes, A. B. and Coffey, M. P. (2008). Impact of single nucleotide polymorphisms in leptin, leptin receptor, growth hormone receptor, and diacylglycerol Acyltransferase *(DGAT1)* gene loci on milk production, feed, and body energy traits of UK dairy cows. **Journal of Dairy Science**. 91; 3190–3200.

Beede, D. K. and Collier, R. J. (1986). Potential nutritional strategies for intensively managed cattle during thermal stress. **Journal of Animal Science.** 62 (2); 543-54.

Bell, R. M. and Coleman, R. A. (1980). Enzymes of glycerolipid synthesis in eukaryotes. **The Annual Review of Biochemistry.** 49; 459-487.

Bennewitz, J., Reinsch, N., Paul, S., Looft, C., Kaupe, B., Weimann, C., Erhardt, G., Thaller, G., Kühn, Ch., Schwerin, M., Thomsen, H., Reinhardt, F., Reents, R. and Kalm, E. (2004). The *DGAT1* K232A mutation is not solely responsible for the milk production quantitative trait locus on the bovine chromosome 14. **Journal of Dairy Science .** 87; 431–442.

Berry, D.P., Howard, D., O'Boyle, P., Waters, S., Kearney, J.F. and McCabe, M. (2010). Associations between the K232A polymorphism in the diacylglycerol-O-transferase 1 (DGAT1) gene and performance in Irish Holstein-Friesian dairy cattle. **Irish Journal of Agricultural and Food Research.** 49; 1–9.

Brindley, D. N. (1991). Metabolism of triacylglycerols. In: **Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes** (Edited by Vance, D. E. and Vance, J. E.) pp.171-203. Amsterdam: Elsevier

Cardoso, S. R., Queiroz, L. B., Alonso Goulart, V., Mourão, G. B., Benedetti, E., Goulart, L. R. (2011). Productive performance of the dairy cattle Girolando breed mediated by the fat-related genes DGAT1 and LEP and their polymorphisms

Canabano, M. J and Wade, K. M. and Van Vleck, L. D. (1990). Genotype by environment interactions for milk and fat production across regions of the United States. **Journal of Dairy Science .** 73; 173-180.

Calus, M. P., Meuwissen,T. H., de Roos, A. P. and Veerkamp, R. F. (2008). Accuracy of genomic selection using different methods to define haplotypes. **Genetics.**178; 553–561.

Carlborg, O., Kerje, S., Schütz, Jacobsson, L., Jensen, P. and Andersson, L. (2003). Early growth in the chicken a global search reveals epistatic interaction between QTL for early growth in the chicken. **Genome Research.** 13: 413-421.

Casas, E., White, S. N., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Koohmaraie, M., Riley, D. G., Chase, C. C. Jr., Johnson, D. D. and Smith, T. P. L. (2006). Effects of calpastatin and μ-calpain markers in beef cattle on tenderness traits. **Journal of Animal Science.** 84; 520-525.

Cases, S., Smith, S. J., Zheng, Y.-W., Myers, H. M., Lear, S. R., Sande, E., Novak, S., Collins, C.,

Welch, C. B., Lusis, A. J. et al. (1998). Identification of a gene encoding an acyl CoA :diacylglycerol acyltransferase, a key enzyme in triacylglycerol synthesis. **Proceeding of the National Acadamic Science of the United States of America.** 95; 13018-13023.

Cases, S., Zhou, P., Shillingford, J. M., Wiseman, B. S., Fish, J. D., Angle, C. S., Hennighausen, L., Werb, Z. and Farese Jr, R. V. (2004). Development of the mammary gland requires DGAT1 expression in stromal and epithelial tissues. Development. 131 (13); 3047-3055.

Dahl, G. E. (2007). Effects of short day photoperiod on prolactin signaling in dry cows: A common mechanism among tissues and environments?. **Journal of Animal Science.** 86; 10-14.

De la Rosa Reyna, X.F., Montoya, H. F., Castrellón, V. V., Rincón, A.M.S., Bracamonte, M. P. and Vera, W. A. (2010). Polymorphisms in the IGF1 gene and their effect on growth traits in Mexican beef cattle. **Genetics and Molecular Research.** 9(2); 875-883.

Dong, C., Wang, S., Li, W. D., Li, D., Zhao, H. and Price, R. A. (2003). Interacting genetic loci on chromosomes 20 and 10 influence extreme human obesity. **The American Society of Human Genetics.** 72; 115–124.

Druet, T., Fritz, S., Colleau, J. J., Gautier, M., Eggen, A., Rossignol, M. N., Boscher, M. Y., Malafosse,and Boichard, D. (2005). **Genetic markers in breeding programs.** 26th European Holstein and Red Holstein Conference [Online]. Avaiable: http:// www. whff.info.

Duangjinda, M., Misztal, I. and Tsurata, S. (2004) . BLUPF90-DairyPack 2.4 :User's Manual. **The University of Georgia and Khon Kaen University.**

Fulkerson, W. J., Davison, T. M., Garcia, S. C., Hough, G., Goddard, M. E., Dobos, R. and Blockey, M. (2008). Holstein–Friesian dairy cows under a predominantly grazing system: interaction between genotype and environment. **Journal of Dairy Science.** 91; 826-839.

Gautier, M., Captan, A., Fritz, S., Eggen, A., Boichard, D. and Druet, T. (2007). Characterization of the *DGAT1* K232A and Variable Number of Tandem Repeat Polymorphisms in French dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. 90; 2980-2988.

Gayatri Prakash. (2007). Reproductive biology. **Alpha Science International Ltd. Oxford, U.K.**

Goddard, M. E. (2009). Genomic selection: Prediction of accuracy and maximization of long term

response**. Genetica.** doi:10.1007/s10709-008-9308-0.

Grisart, B., Coppieters,W., Farnir, F., Karim, L., Ford, C., Berzi, P., Cambisano, N., Mni, M., Reid, S., Simon, P., Spelman, R., Georges, M., Snell, R. (2002). Positional candidate cloning of a QTL in dairy cattle: identification of a missense mutation in the bovine DGAT1 gene with major effect on milk yield and composition. **Genome Research.** 12(2); 222–231.

Grisart, B., Farnir, F., Karim, L., Cambisano, L., Kim, J. J., Kvasz, A, Mni, M., Simon, P., Frère, J. M., Coppieters, W. and Georges, M. (2004). Genetic and functional confirmation of the causality of the DGAT1 K232A quantitative trait nucleotide in affecting milk yield and composition. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA. 101(8); 2398–2403.

Hammami, H., Rekik, B., Bastin, C., Soyeurt, H., Bormann, J., Stoll, J. and Gengler, N. (2009). Environmental sensitivity for milk yield in Luxembourg and Tunisian Holsteins by herd management level. **Journal of Dairy Science**. 92; 4604–4612.

Hayes, B. J., Carrick, M., Bowman, P. and Goddard, M. E. (2003). Genotype × environment interaction for milk production of daughters of Australian dairy sires from test-day records. **Journal of Dairy Science.** 86; 3736–3744.

Hayes, B. J. and Goddard, M. E. (2008). Technical note: prediction of breeding values using marker-derived relationship matrices. **Journal of Animal Science.** 86; 2089–2092.

Hayes, B. J., Bowman, P. J., Chamberlain, A. J. and Goddard, M. E. (2009). Invited review: Genomic selection in dairy cattle: Progress and challenges. **Journal of Dairy Science**. 92; 433-443.

Haile-Mariam, M. and Goddard. M. E. (2009). Genotype by environment interaction between registered and commercial herds for dairy traits in Australia. **Proceedings of the 18th Conference of the Association for the Advancement of Animal Breeding and Genetics**. Barossa Valley, South Australia. September 28-October 1. pp. 56-59. [On-line]. Avaiable: http://www.aaabg.org/_proceedings18/_files/haile-mariam056.pdf

Heaton, M.P., Harhay, G.P., Bennett, G.L., Stone, R.T., Grosse, W.M., Casas, E., Keele, J.W., Smith, T.P.L., Chitko-McKown, C.G., Laegreid, W.W. (2002). Selection and use of SNP

markers for animal identification and paternity analysis in US Beef cattle. **Mammalain Genome.** 13; 272–281.

Hoekstra, J., van der Lugt, A. W., van der Werf, J. H. J. and Ouweltjes, W. (1994). Genetic and phenotypic parameter for milk production and reproductive performance traits in upgraded dairy cattle **Livestock Production Science.** 40; 225-232.

Hori – Oshima, S. and Barreras-Serrano, A. (2003). Relationships between DGAT1 and Pit-1 genes polymorphism and milk yield in Holstein cattle. **Proceedings, Western Section, American Society of Animal Science**. 54. [On-line]. Avaiable: http://www.asas.org/ westernsection/2003/ proceedings/1000757.pdf

Hovey, R. C., McFadden, T. B. and Akers, R. M. (1999). Regulation of mammary gland growth and morphogenesis by the mammary fat pad: a species comparison. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia.** 4; 53-68.

Hradecká, E., Citek, J., Panicke, L., Rehout, V., and Hanusova, L. (2008). The relation of *GH1, GHR* and *DGAT1* polymorphisms with estimated breeding values for milk production traits of German Holstein sires. Czech Journal of Animal Science. 53; 238–245.

Jenness, R. (1985). Biochemical and nutritional aspects of milk and colostrum. In: **Lactation** (Edited by Larson B. L.) pp. 164 – 197., Iowa State University Press, Ames.

Kadarmideen, H. N., Thompson, R., Coffey, M. P., Kossaibati, M. A. (2003). Genetic parameters and evaluations from single and multiple traits analysis of dairy cow fertility and milk production. **Livestock Production Science**. 81; 183–195.

Kaiser, U. B., Jakubowiak, A., Steinberger, A., Chin, W. W. (1993). Regulation of rat pituitary gonadotropin-releasing hormone receptor mRNA levels in vivo and in vitro. **Endocrinology.** 133(2); 931-934.

Kalinowski, S. T. and Hedrick, P. W. (2001). Estimation of linkage disequilibrium for loci with multiple alleles: basic approach and an application using data from bighorn sheep. **Journal Heredity.** 87; 698-708.

Kaps, M. and Lamberson, W. R. (2004). Biostatistics for animal science. **CABI Publishing. USA.**

Kolver, E. S., Roche, J. R., de Veth, M. J., Thorne, P. L. and Napper, A. R. (2002). Total mixed rations versus pasture diets: evidence for a genotype x diet interaction in dairy cow

performance. **Proceedings of the New Zealand Society of Animal production**. 62; 246-251.

Koonawootrittriron, S., Elzo, M. A. and Thongprapi, T. (2009). Genetic trends in a Holstein × other breeds multibreed dairy population in central Thailand. **Livestock Production Science.** 122; 186-192.

Koonawootrittriron, S., Elzo, M. A., Tumwasorn, S. and Nithichai, K. (2002). Estimation of covariance components and prediction of additive genetic effects for first lactation 305-d milk and fat yields in a Thai multibreed dairy population. **Thai Journal Agricultural Science.** 35; 245-258.

Kuehn, C., Edel, C., Weikard, R. and Thaller, G. (2007). Dominance and parent-of-origin effects of coding and non-coding alleles at the *Acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1)* gene on milk production traits in German Holstein cows. **Bio Med Central Genetics. 8; 62-70.**

Kühn, M. T., Hutchison, J. L. and Wiggans, G. R. (2006). Characterization of Holstein heifer fertility in the United States. **Journal of Dairy Science.** 89; 4907–4920.

Kaupe, B., Brandt, H., Prinzenberg, E-M. and Erhardt, G. (2007). Joint analysis of the influence of CYP11B1 and DGAT1 genetic variation on milk production, somatic cell score, conformation, reproduction and productive lifespan in German Holstein cattle. **Journal of Animal Science. 85;** 11–21.

Lacorte, G. A., Machado, M. A., Martinez, M. L, Campos, A. L., Maciel, R. P., Verneque, R. S., Teodoro, R. L., Peixoto, M. G. C. D., Carvalho, M. R. S. and Fonseca, C. G. (2006). *DGAT1 K232A* polymorphism in Brazilian cattle breeds. **Genetics and Molecular Research.** 5(3); 475-482.

Leanos-Miranda, A., Janovick, J. A. and Conn, P. M. (2002). Receptor - misrouting: an unexpectedly prevalent and rescuable etiology in gonadotropin-releasing hormone receptor-mediated hypogonadotropic hypogonadism. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism.** 87; 4825–4828.

Lehner, R. and Kuksis, A. (1996). Biosynthesis of triacylglycerols. **Progress in Lipid Research.** 35; 169-201.

Lillehammer, M., Hayes, B. J., Meuwissen, T. H. E., Goddard, M. E. (2009). Gene by environment interactions for production traits in Australian dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. 92; 4008–4017.

Lin, C. Y. and Togashi, K. (2002). Genetic improvement in the presence of genotype by environment interaction. **Animal Science Journal**. 73; 3–11.

Meuwissen, T. H. E., Hayes, B. J. and Goddard, M. E. (2001). Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. **Genetics.** 157; 1819–1829.

Meuwissen, T. H. E. and Van Arendonk, J. A. M. (1992). Potential improvements in rate of genetic gain from marker assisted selection in dairy cattle breeding schemes. **Journal of Dairy Science.** 75; 1651-1659.

Milazzotto, M. P., Rahal, P., Nichi, M., Miranda-Neto, T., Teixeira, L. A., Ferraz, J. B. S., Eler, J. P., Campagnari, F. and Garcia, J. F. (2008). New molecular variants of hypothalamus–pituitary–gonad axis genes and their association with early puberty phenotyp in *Bos taurus indicus* (Nellore). **Livestock Science**. 114; 274–279.

Molee, A., Duanghaklang, N. and Mernkrathoke, P. (2011). Interaction effect of DGAT1 and composite genotype of beta-kappa casein on economic milk production traits in crossbred Holstein. **World Academy of Science, Engineering and Technology.** 80; 16 – 18 .

Naor, Z. (2009). **Signal Transduction in reproduction and cancer.** [On-line]. Avaiable: http:// www.tau.ac.il /lifesci/departments/biochem/members/naor/naor.html

Näslund, J., Fikse, W. F., Pielberg, G. R. and Lundén, A. (2008). Frequency and effect of the Bovine *Acyl-CoA: diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) K232A* polymorphism in Swedish dairy cattle. **Journal of Dairy Science.** 91; 2127–2134.

NCBI. (2009a). ***Bos taurus*** **chromosome 14, reference assembly (based on Btau_4.0), whole Genome shotgun sequence.** [on-line]. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore /194719390 ?report =genbank&log$=seqview&from=444097&to=446810

NCBI. (2009b). **GnRHR gonadotropin-releasing hormone receptor [*Bos taurus*].** [on-line]. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/281798

NCBI. (2009c). ***Bos taurus* gonadotropin-releasing hormone receptor (GNRHR), mRNA.** [on-line]. Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ nucleotide/31343624

Oikonomou, G., Angelopoulou, K., Arsenos, G., Zygoyiannis, D. and Banos, G. (2008). The effects of polymorphisms in the *DGAT1*, leptin and growth hormone receptor gene loci on body energy, blood metabolic and reproductive traits of Holstein cows. **Animal Genetics,** 40; 10–17.

Olds, D., Cooper, T. and Thrift, F.A. (1979). Relationships between milk yield and fertility in dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. 62; 1140-1144 .

Panyapornwithaya, V. and Teepatmakorn, S. (2004). Reproductive efficiency of dairy cows in the northern part of Thailand. **Chiang Mai Veterinary Journal.** 2; 3-8.

Patel, R. K., Chauhan, J. B., Soni, K. J. and Singh, K. M. (2009). Genotype and allele frequencies of *DGAT* 1 gene in Indian Holstein bulls. **Current Trends in Biotechnology and Pharmacy.** 3; 385 – 388.

Parodi, P.W. (1982). Positional distribution of fatty acids in the triglyceride classes of milk fat**. Journal of Dairy Research.** 49; 73–80.

Parra-Bracamonte, G. M., Magana, J. G., Delgado, R., Osorio-Arce, M. M. and Segura-Correa, J. C. (2005). Genetic and non-genetic effects on productive and reproductive traits of cows in dual purpose herds in south eastern Mexico. **Genetics and Molecular Research.** 4; 482 – 490.

Peterson, D. G., Matitashvili, E. A., Bauman, D. E. (2003). Diet-induced milk fat depression in dairy cows results in increased *trans*-10, *cis*-12 CLA in milk fat and coordinate suppression of mRNA abundance for mammary enzymes involved in milk fat synthesis. **Journal Nutrition**. 133; 3098–3102.

Pryce, J. E., Coffey, M. P. and Brotherstone, S. (2000). The genetic relationship between calving interval, body condition score and linear type and management traits in registered Holsteins. **Journal of Dairy Science.** 83; 2662-2671.

Raymond, M. and Rousset, F. (2003). Genepop 3.4., an updated version of Genepop V.1.2 (1995): population genetics software for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity.** 86; 248-9.

Revel, F. G., Ansel., L., Klosen, P., Saboureau, M., Pévet, P., Mikkelsen, J. D. and Simonneaux, V. (2007). Kisspeptin: A key link to seasonal breeding. **Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders.** 8; 57-65.

Rhoads, M. L., Rhoads, R. P., Van Baale, M. J., Collier, R. J., Sanders, S. R., Weber, W. J., Crooker, B. A. and Baumgard, L. H. (2009). Effects of heat stress and plane of nutrition on lactating Holstein cows: I. Production, metabolism, and aspects of circulating somatotropin. **Journal of Dairy Science**. 92(5):1986-1997.

Rhone, J. A., Koonawootrittriron, S. and Elzo, M. A. (2008). Record keeping, genetic selection, educational experience and farm management effects on average milk yield per cow, milk fat percentage, bacterial score and bulk tank somatic cell count of dairy farms in the Central region of Thailand. **Tropical Animal Health and Production.** 40; 627-636.

Royal, M. D., Pryce, J. E., Woolliams, J.A. and Flint, A. P. (2002). The genetic relationship between commencement of luteal activity and calving interval, body condition score, production, and linear type traits in Holstein-Friesian dairy cattle. **Journal of Dairy Science**. 85; 3071-3080.

Royal, M., Mann, G. E. and Flint, A. P. F. (2000). Strategies for reversing the trend towards Subfertility In dairy cattle. **The Veterinary Journal.** 160; 53–60.

Samuel, S. C. Y., Robert, B. J. and Robert L. B. (1999). Reproductive Endocrinology: Physiology, Pathology, and Clinical management. **W.B. Saunders company. USA**.

Sarakul, M., Koonawootrittriron, S., Suwanasopee, T., Elzo, M. A., Hirunwong, A. and Thongprapi, T. (2010). Factors affecting genetic improvement for milk production of dairy cattle at farm level in Central Thailand. **Proceeding of Kasetsart University Annual Conference.** 48; 150 - 157.

Sarakul, M., Koonawootrittriron, S., Suwanasopee, T., Hirunwong, A. and Thongprapi, T. (2009). Situation of production and attitude for sire selection of dairy farmers in Thailand. **Proceeding of Kasetsart University Annual Conference.** 47; 174-181.

Schennink, A., Stoop, W. M., Visker, M. H., Heck, J. M., Bovenhuis, H., van der Poel, J. J., van Valenberg, H. J., van Arendonk, J. A. (2007). *DGAT1* underlies large genetic variation in milk-fat composition of dairy cows. **Animal Genetics.** 38 (5); 467–473.

Scotti, E., Fontanesi, L., Schiavini, F., Mattinadro, V. L., Bagnato, A., Russo., V. (2010). DGAT1 p.K232A polymorphism in dairy and dual purpose Italian cattle breeds. **Italian Journal of Animal Science.** 9(e16). 79-82.

Sheffield, L. G. (1988). Organization and growth of mammary epithelia in the mammary gland fat pad. **Journal of Dairy Science**. 71; 2855-2874.

Singh, R., Graves, M.L., Roskelley, C.D., Giritharan, G. and Rajamahendran, R. (2008). Gonadotropin releasing hormone receptor gene and protein expression and immunohistochemical localization in bovine uterus and oviducts. **Domestic Animal Endocrinology.** 34; 319–326.

Sisk, C.L. and Foster, D.L. 2004. The neural basis of puberty and adolescence. **Nature Neuroscience.** 7; 1040 – 1047.

Spelman, R. J., Ford, C. A., McElhinney, P., Gregory, G. C. and Snell, R. G. (2002). Characterization of the *DGAT1* gene in the New Zealand dairy population. **Journal of Dairy Science**. 85; 3514-3517.

SPSS. (2004). User's Guide, Version 13.0. **SPSS Inc., Chicago, IL.**

Shacham, S., Harris, D., Ben-Shlomo, H., Cohen, I., Bonfil, D., Przedecki, F., Lewy, H.,Askenazi, I.E., Seger, R. and Naor, Z. (2001). Mechanism of GnRH receptor signaling on gonadotropin release and gene expression in pituitary gonadotrophs. **Vitamins and Hormones.** 63; 63-90.

Strzalkowska, N., Siadkowska, E., Sloniewski, K., Krzyzewski, J. and Zwierzchowski, L. (2005). Effect of *DGAT1* gene polymorphism on milk production traits in Black-and – White (Friesian) cows. **Animal Science Papers Reports**. 23; 189–197.

Sun, D., Jia, J., Ma, Y., Zhang, Y., Wang, Y., Yu, Y. and Zhang, Y. (2009). Effects of *DGAT1* and *GHR* on milk yield and milk composition in the Chinese dairy population. **Animal Genetics**. 40; 997–1000.

Szyda, J. and Komissarek, J. (2007). Statistical modeling of candidate gene effects on milk production traits in dairy cattle. **Journal of Dairy Science.** 90; 2971-2979.

Tantia, M. S., Vijh, R. K., Mishra, B. P., Mishra, B., Kumar, S. T. and Sodhi, M. (2006). *DGAT1* and *ABCG2* polymorphism in Indian cattle (*Bos indicus*) and buffalo (*Bubalus bubalis*) breeds. **Biomed central Veterinary Research**. 2; 32 .

Thaller, G., Krämer, W., Winter, A., Kaupe, B., Erhardt, G. and Fries, R. (2003). Effects of *DGAT1* variants on milk production traits in German cattle breeds. **Journal of Animal Science.** 81; 1911 – 1918.

Veerkamp, R. F., Koenen, E. P. C. and DeJong, G. (2001). Genetic correlations among body condition score, yield, and fertility in first-parity cows estimated by random regression models. **Journal of Dairy Science.** 84; 2327-2335.

Weller, J. I., Golik, M., Seroussi, E., Ezra, E. and Ron, M. (2003). Population-wide analysis of a QTL affecting milk-fat production in the Israeli Holstein population. **Journal of Dairy Science.** 86; 2219–2227.

White, F. J., Wettemann, R. P., Looper, M. L., Prado, T. M., Morgan, G.L. (2002). Seasonal effects on estrous behavior and time of ovulation in nonlactating beef cows. **Journal of Animal Science.** 80; 3053-3059.

Winter, A., Krämer, W., Werner, F. A. O., Kollers, S., Kata, S., Durstewitz, G., Buitkamp, J., Womack, J. E., Thaller, G. and Fries, R. (2002). Association of a lysine-232/alanine polymorphism in a bovine gene encoding *Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase 1(DGAT1)* with variation at a quantitative trait locus for milk fat content. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA. 99; 9300–9305.

Wise, M. E., Nieman, D., Stewart, J. and Nett, T. M. (1984). Effect of number of receptors for gonadotropin-releasing hormone on the release of luteinizing hormone. **Biology of Reproduction.** 31; 1007-1013.

Yi, N., Diament, A., Chiu, S., Kim, K., Allison, D. B., Fisler, J. S. and Warden, C. H. (2004). Characterization of epistasis influencing complex spontaneous obesity in the BSB Model. **Genetics.** 167; 399–409.

Zou, J., David, C. T., Yangdou, W. and Colette, J. (2006). Diacylglycerol acyltransferase gene from plants. **National Research Council of Canada.** United States Patent US7015373.

Zukowski, K., Suchocki, T., Gontarek, A. and Szyda. J. (2009). The impact of single nucleotide polymorphism selection on prediction of genomewide breeding values. **Bio Med Central Proceedings**. 3(Suppl 1); S13.

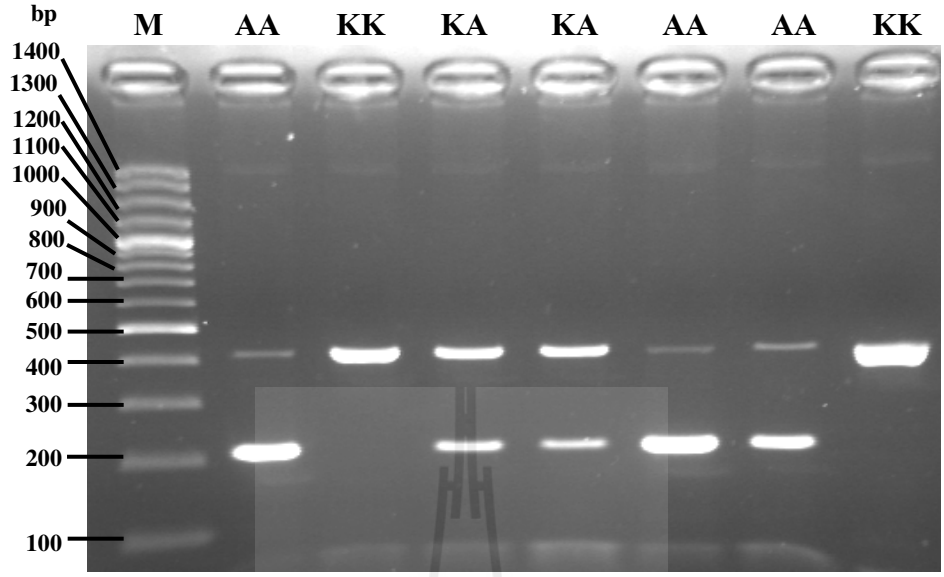
ภาคผนวก ก

ภาคผนวก ก

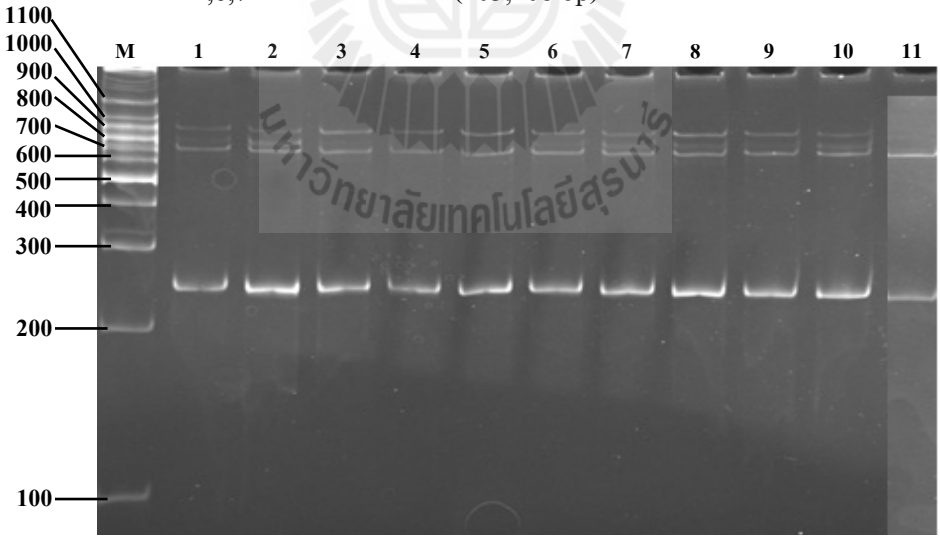
ภาพประกอบผลการศึกษารูปแบบยีน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาพประกอบผลการศึกษารูปแบบยีน



ภาพที่ 7.1 อัลลีลและจีโนไทป์ของยีน *DGAT1* ที่พบในโคนมลูกผสมโฮลสไตล์ฟรีเชี่ยน ซึ่งได้จากเทคนิค PCR-RFLP โดย แถบ 1 คือ DNA marker 100 bp, แถบ 3,8 คือ จีโนไทป์ KK (411 bp), แถบ 4,5 คือ จีโนไทป์ KA (411 bp และ 203,208 bp) และ แถบ 2,6,7 คือ จีโนไทป์ AA (203,208 bp)



ภาพที่ 7.2 รูปแบบชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายเดี่ยวของยีน *GnRHR* ที่พบในโคนมลูกผสมโฮลสไตล์ฟรีเชี่ยน ซึ่งได้จากเทคนิค PCR-SSCP โดยแถบ M คือ DNA marker 100 bp, รูปแบบที่ 1 คือ แถบ 11 , รูปแบบที่ 2 คือ แถบ 1,3,4,5,6,8,9 และ 10

ภาคผนวก ข

ตัวอย่างการจัดข้อมูลเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ Logistic regression

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตัวอย่างการจัดข้อมูลเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ Logistic regression

ตารางที่ ข.1 ตัวอย่างการจัดข้อมูลเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ Logistic regression ข้อมูลชุดที่ 1; ยีน *GnRHR* รูปแบบที่ 1 กำหนดให้เป็น 1 ถ้าเป็นรูปแบบอื่นกำหนดเป็น 0

ID	hf	*GnRHR* 1	*DGAT1*
4243	95.31	0	KK
4257	87.50	0	KA
4631	96.88	0	AA
4743	90.63	0	KA
4746	96.88	0	AA
4747	98.44	1	KA
4749	96.88	0	KA
4810	96.88	1	AA
4819	93.75	0	AA
4831	99.22	0	KA
19461013	87.50	0	KA
ML430314	75.00	1	AA
ML430341	87.50	1	KA
ML430747	75.00	1	KA
ML430919	87.50	0	AA
ML430920	87.50	1	KA
PB450245	87.50	1	AA
PK421383	75.00	0	KA
PK421384	75.00	1	KA
SM440321	87.50	0	KA

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ ข. 2 ตัวอย่างการจัดข้อมูลเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ Logistic regression ข้อมูลชุดที่ 2; ยีน *GnRHR* รูปแบบที่ 2 กำหนดให้เป็น 1 ถ้าเป็นรูปแบบอื่นกำหนดเป็น 0

ID	**hf**	***GnRHR* 1**	***DGAT1***
4243	95.31	1	KK
4257	87.50	1	KA
4721	98.44	0	AA
4725	98.44	1	KA
4732	96.88	1	KA
4746	96.88	1	AA
4747	98.44	0	KA
4810	96.88	0	AA
4819	93.75	1	AA
4831	99.22	1	KA
19445383	87.50	0	KA
ML430314	75.00	0	AA
ML430747	75.00	0	KA
ML430919	87.50	1	AA
ML430920	87.50	0	KA
PB450245	87.50	0	AA
PK421383	75.00	1	KA
PK421384	75.00	0	KA
PK431265	87.50	1	KA
SM430402	75.00	0	KA

ตารางที่ ข. 3 ตัวอย่างการจัดข้อมูลเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ Logistic regression ข้อมูลชุดที่ 3; ยีน *GnRHR* รูปแบบที่ 3 กำหนดให้เป็น 1 ถ้าเป็นรูปแบบอื่นกำหนดเป็น 0

ID	hf	*GnRHR* 1	*DGAT1*
4243	95.31	0	KK
4257	87.50	0	KA
4721	98.44	1	AA
4743	90.63	0	KA
4746	96.88	0	AA
4747	98.44	0	KA
4749	96.88	0	KA
4810	96.88	0	AA
4819	93.75	0	AA
4831	99.22	0	KA
19445383	87.50	0	KA
19461013	87.50	1	KA
ML430314	75.00	0	AA
ML430919	87.50	0	AA
ML430920	87.50	0	KA
PB450245	87.50	0	AA
PK421383	75.00	0	KA
PK421384	75.00	0	KA
PK431265	87.50	0	KA
SM440321	87.50	1	KA

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ค

ค่า Power of test ของการทดสอบอิทธิพลของยีนและ ค่า EBV ของลักษณะผลผลิตน้ำนมและลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ เมื่อมีอิทธิพลของยีนเป็นปัจจัยคงที่และไม่มีอิทธิพลของยีน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ค่า Power of test ของการทดสอบอิทธิพลของยีน

ตารางที่ ค. 1 ค่า Power of test การทดสอบอิทธิพลของยีน *DGAT1* ต่อลักษณะผลผลิตน้ำนม

Traits[1]	Power of test		
	AA	**KA**	**KK**
MY (kg./day)	0.91	0.41	.
PY (g./day)	0.48	0.16	.
FY (g./day)	0.54	0.29	.
SNFY (g./day)	0.62	0.17	.
TSY (g./day)	0.08	0.06	.
% Prot	0.68	0.13	.
%Fat	1.00	0.99	.
%SNF	0.94	0.61	.
%TS	1.00	0.99	.

[1] MY, PY, FY, SNFY, TSY, %Prot, %Fat ,%SNF, %TS หมายถึง ปริมาณน้ำนม, ปริมาณโปรตีน, ปริมาณไขมัน, ปริมาณของแข็งที่ไม่รวมไขมันนม, ปริมาณของแข็งทั้งหมด, เปอร์เซ็นต์โปรตีน, เปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ไม่รวมไขมันนม, และเปอร์เซ็นต์ของแข็งทั้งหมด

ตารางที่ ค. 2 ค่า Power of test การทดสอบอิทธิพลของยีน *GnRHR* ต่อลักษณะจำนวนครั้งการผสมติด; ครั้ง (Number of service), จำนวนวันท้องว่าง; วัน (Day open), ระยะห่างของการให้ลูก;วัน, อัตราการผสมติด; % (Conception rate)

Traits	Power of test		
	1	**2**	**3**
Number of service	0.06	0.31	.
Day open (days)	0.06	0.05	.
Calving interval (days)	0.05	0.12	.
Conception rate (%)	0.06	0.21	.

ตารางที่ ค. 3 ค่า Power of test ของการทดสอบอิทธิพลร่วมของยีน *DGAT1* และยีน *GnRHR* ต่อลักษณะผลผลิตน้ำนม

Traits[1/]	*DGAT1*			*GnRHR*			*DGAT1*GnRHR*								
	AA	**KA**	**KK**	**1**	**2**	**3**	**AA 1**	**AA 2**	**AA 3**	**KA 1**	**KA 2**	**KA 3**	**KK 1**	**KK 2**	**KK 3**
MY(kg/day)	0.74	0.64	.	0.55	0.77	.	0.09	0.22	.	0.05	0.63	.	.	.	.
FY (g./day)	0.10	0.06	.	0.26	0.81	.	0.09	0.72	.	0.26	0.33	.	.	.	.
PY (g./day)	0.51	0.21	.	0.15	0.75	.	0.09	0.46	.	0.41	0.54	.	.	.	.
SNFY (g./day)	0.69	0.38	.	0.32	0.80	.	0.05	0.48	.	0.12	0.61	.	.	.	.
TSY (g./day)	0.37	0.10	.	0.28	0.83	.	0.05	0.57	.	0.08	0.53	.	.	.	.
%Fat	0.94	0.98	.	0.11	0.06	.	0.07	0.20	.	0.21	0.47	.	.	.	.
% Prot	0.57	0.84	.	0.98	0.11	.	0.98	0.10	.	0.28	0.22	.	.	.	.
%SNF	0.15	0.53	.	0.11	0.05	.	0.10	0.18	.	1.00	0.20	.	.	.	.
%TS	0.97	1.00	.	0.56	0.06	.	0.26	0.33	.	0.71	0.42	.	.	.	.

หมายเหตุ : [1] MY, PY, FY, SNF, LY, TSY, %Prot, %Fat %SNF, %Lac, %TS หมายถึง ปริมาณน้ำนม, ปริมาณโปรตีน, ปริมาณไขมัน, ปริมาณของแข็งที่ไม่รวมไขมันนม,ปริมาณแลคโตส, ปริมาณของแข็งทั้งหมดเปอร์เซ็นต์โปรตีน, เปอร์เซ็นต์แลคโตส, เปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ไม่รวมไขมันนม, และเปอร์เซ็นต์ของแข็งทั้งหมด

***, **, * หมายถึง *P-value<0.0001, < 0.01, <0.05*

ตารางที่ ค. 4 ค่า Power of test ของการทดสอบอิทธิพลร่วมของยีน *DGAT1* และ ยีน *GnRHR* ต่อลักษณะจำนวนครั้งการผสมติด, จำนวนวันท้องว่าง, ระยะห่างการให้ลูก และอัตราการผสมติด

Traits	*DGAT1*			*GnRHR*			*DGAT1*GnRHR*								
	AA	**KA**	**KK**	**1**	**2**	**3**	**AA 1**	**AA 2**	**AA 3**	**KA 1**	**KA 2**	**KA 3**	**KK 1**	**KK 2**	**KK 3**
Number of service (time)	0.49	0.19	.	0.50	0.15	.	0.73	0.19	.	0.26	0.06	.	.	.	.
Day open (days)	0.14	0.09	.	0.11	0.12	.	0.10	0.17	.	0.08	0.10	.	.	.	.
Calving interval (days)	0.57	0.70	.	0.25	0.66	.	0.35	0.51	.	0.13	0.55	.	.	.	.
Conception rate (%)	0.12	0.05	.	0.44	0.05	.	0.67	0.06	.	0.23	0.06	.	.	.	.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ค่า EBV ของลักษณะผลผลิตน้ำนมและลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ เมื่อมีอิทธิพลของยีนเป็นปัจจัยคงที่และไม่มีอิทธิพลของยีน

ตารางที่ ค. 5 ค่า EBV ของลักษณะผลผลิตน้ำนมเมื่อมีอิทธิพลของยีน *DGAT1* เป็นปัจจัยคงที่และไม่มีอิทธิพลของยีน

Traits[1]	EBV	Effect of genotype ± SE		
		AA	KA	KK
MY (kg./day)	0.07	0.02±0.29	0.05±0.29	0
PY (g./day)	13.91	-2.31±9.30	1.69±9.12	0
FY (g./day)	17.17	-2.30±12.17	1.17±11.94	0
SNFY (g./day)	39.49	7.08±24.89	3.11±24.41	0
TSY (g./day)	58.18	-11.89±36.22	2.86±0.94	0
% Prot	0.01	-0.004±0.03	0.00±0.03	0
%Fat	0.03	0.002±0.06	0.003±0.06	0
%SNF	0.03	-0.002±0.05	-0.009±0.05	0
%TS	0.06	0.02±0.10	0.02±0.10	0

[1] MY, PY, FY, SNFY, TSY, %Prot, %Fat ,%SNF, %TS หมายถึง ปริมาณน้ำนม, ปริมาณโปรตีน, ปริมาณไขมัน, ปริมาณของแข็งที่ไม่รวมไขมันนม, ปริมาณของแข็งทั้งหมด, เปอร์เซ็นต์โปรตีน, เปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ไม่รวมไขมันนม, และเปอร์เซ็นต์ของแข็งทั้งหมด

ตารางที่ ค. 6 ค่า EBV ของลักษณะอิทธิพลของ รูปแบบ PCR-SSCP ของยีน *GnRHR* ต่อลักษณะจำนวนครั้งการผสมติด, จำนวนวันท้องว่าง, ระยะห่างของการให้ลูกและอัตราการผสมติด เมื่อมีอิทธิพลของยีน *GnRHR* เป็นปัจจัยคงที่และไม่มีอิทธิพลของยีน

Traits	EBV	Effect of pattern + SE		
		1	2	3
Number of service (time)	-0.002	0.01±0.03	0.006±0.01	0
Day open (days)	1.10	2.12±5.19	-0.50±2.22	0
Calving interval (days)	1.62	0.79±6.80	-0.87±2.90	0
Conception rate (%)	-0.27	-0.41±0.85	-0.08±0.36	0

ภาคผนวก ง

ขั้นตอนการสกัด Genomic DNA

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ขั้นตอนการสกัด Genomic DNA

ทำการสกัด Genomic DNA ด้วยชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปสำหรับตัวอย่างเลือด (Genomic DNA Mini Kit, Geneaid Biotech Ltd.) แบ่งเป็น 5 ขั้นตอน แต่ละขั้นตอนมีรายละเอียดดังนี้

1. การย่อยเม็ดเลือดแดง (RBC Lysis) เป็นการย่อยเพื่อทำให้เม็ดเลือดแดงให้สลายตัว โดยเติมเลือด 300 µl ใน 1.5 ml microcentrifuge tube เติม RBC Lysis buffer 3 เท่าของตัวอย่างเลือด ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นนำไป centrifuge 2 นาที ที่ 3000 xg จากนั้นใช้ micropipette ดูดทิ้งส่วนใสด้านบนแล้วเติม 100 µl RBC Lysis buffer

2. การย่อยโปรตีนส่วนที่ไม่ต้องการ (Cell Lysis) โดยเติม Proteinase K 20 µl นำไป vortexing ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3-5 นาที เติม 200 µl GB buffer นำไป vortexing แล้วอุ่นที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 10 นาที พลิกหลอดขึ้น-ลงทุก 3 นาที และเตรียม Elution Buffer 100 µl ต่อตัวอย่าง อุ่นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 60 °C เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนที่สี่ นำตัวอย่างที่อุ่นเสร็จแล้วมาเติม ethanol 96-100% 200 µl จากนั้นนำไป vortex เป็นเวลา 10 วินาที หากเกิดตะกอนให้ pipetting เตรียม GD colume collection tube ขนาด 2 µl นำสารที่ผสมจนเข้ากันแล้ว ใส่ลงใน GD colume collection tube ปิดฝาให้สนิทนำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

3. ล้างตะกอน (Wash) ทำการล้างตะกอนที่อยู่ด้านบน ซึ่งอาจจะยังตกค้างอยู่ลงไปด้านล่างให้หมด โดยเติม W1 buffer ปริมาตร 400 µl ลงใน GD colume นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งส่วนที่ตกอยู่ด้านล่าง เติม Wash Buffer 600 µl (เตรียมจาก Wash buffer : ethanol สัดส่วน 1 : 4) นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ทิ้งส่วนที่ตกอยู่ด้านล่าง นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 3 นาที ให้ GD colume แห้ง

4. ย้าย GD colume มาใส่ใน microtube ขนาด 1.5 µl อันใหม่ เติม Elution Buffer 100 µl ที่อุ่นเตรียมไว้ ลงใน GD colume ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3-5 นาที นำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที ด้านล่างของ tube คือ elute purified DNA นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 °C

5. ตรวจสอบคุณภาพปริมาณและความคมชัดของแถบดีเอ็นเอ ด้วย 1.0% agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย ethidium bromide นำไปส่องดูในตู้ภายใต้แสง UV และวัดความเข้มข้นของ Genomic DNA ด้วยเครื่อง spectrophotometer (optical-density, 260 nm and 280 nm) เพื่อทำการปรับความเข้มข้นของทุกตัวอย่างเป็น 10 ng/ µl สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอ DNA template เก็บที่อุณหภูมิที่ -20 °C เพื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอและตรวจหาจีโนไทป์ด้วยเทคนิค PCR ต่อไป

ประวัติผู้เขียน

นางสาวณัฐญา ดวงหะคลัง เกิดเมื่อวันที่ 27 มกราคม พ.ศ. 2529 ที่จังหวัดขอนแก่น เริ่มเข้าศึกษาระดับชั้นประถมศึกษาที่โรงเรียนเทศบาลสวนสนุก และศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาที่โรงเรียนแก่นนครวิทยาลัย อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น ต่อมาได้เข้าศึกษาระดับปริญญาตรี ในสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา และสำเร็จการศึกษา ในปีการศึกษา 2550 และได้เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโท ในสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 2551

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี