อิทธิพลของยีน FOLLICLE-STIMULATING HORMONE RECEPTOR (FSHR) และยีน LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR (LHR) ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน

นางสาวโชติมา ภูมิประหมัน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2555

THE EFFECT OF FOLLICLE-STIMULATING HORMONE RECEPTOR GENE (FSHR) AND LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR GENE (LHR) ON FERTILITY TRAITS IN CROSSBRED HOLSTEIN FRISIAN DAIRY CATTLE

Chotima Poompramun

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 FOLLICLE-STIMULATING HORMONE RECEPTOR (FSHR) และยีน LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR (LHR) ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(อ. ดร.วิทธวัช โมฬี)
ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร.อมรรัตน์ โมฬี)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(รศ. ดร.พงษ์ชาญ ณ ลำปาง)
กรรมการ

(รศ. ดร.กนก ผลารักษ์)
กรรมการ

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

(ผศ. ดร.ปราโมทย์ แพงคำ)
กรรมการ

(ศ. ดร.ชูกิจ ลิมปีจำนงค์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

โชติมา ภูมิประหมัน : อิทธิพลของยีน FOLLICLE-STIMULATING HORMONE RECEPTOR (FSHR) และยีน LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR (LHR) ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน (THE EFFECTS OF FOLLICLE-STIMULATING HORMONE RECEPTOR GENE (FSHR) AND LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR GENE (LHR) ON FERTILITY TRAITS IN CROSSBRED HOLSTEIN FRISIAN DAIRY CATTLE)
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ โมพี, 53 หน้า.

วัตถุประสงค์การศึกษานี้คือ เพื่อศึกษาอิทธิพลของยีน Follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) และยีน Luteinizing hormone receptor (LHR) ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน ได้แก่ จำนวนครั้งการผสมติด จำนวนวันท้องว่าง ระยะห่างการให้ลูก อัตราการผสมติด เพื่อใช้เป็น marker gene เข้าร่วมในการประเมินค่า EBV สำหรับการคัดเลือก โดยเก็บตัวอย่างเลือดจำนวน 124 ตัวอย่าง ศึกษาอัลลีลและจีโนไทป์ของยีน FSHR และยีน LHR ด้วยเทคนิค PCR-RFLP และศึกษาสภาพ Linkage disequilibrium ระหว่างยีน FSHR กับยีน LHR ด้วยวิธี Markov Chain Monte Carlo (MCMC) ศึกษาความสัมพันธ์ของยีนกับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ด้วยวิธี Ordinary Least Square (OLS) ประมาณค่า Estimate Breeding Value (EBV) ของลักษณะใช้ Single trait animal model และเปรียบเทียบลำดับค่า EBV ด้วย Spearman rank correlation coefficient ผลการศึกษาพบว่า ยีน FSHR มี 2 อัลลีล คือ C และ G และ 3 จีโนไทป์ คือ CC CG GG โดยอัลลีล C และจีโนไทป์ CG มีความถี่สูงสุด ยีน LHR มี 2 อัลลีล คือ C และ T และ 3 จีโนไทป์ คือ CC CT TT โดยอัลลีล C และจีโนไทป์ CC มีความถี่สูงสุด ยีน FSHR กับยีน LHR ไม่มี Linkage disequilibrium ต่อกัน ($P>0.05$) และไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างยีน FSHR กับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ ($P>0.05$)

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
ปีการศึกษา 2555

ลายมือชื่อนักศึกษา โชติมา ภูมิประหมัน
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

CHOTIMA POOMPRAMUN : THE EFFECTS OF FOLLICLE-STIMULATING HORMONE RECEPTOR GENE (FSHR) AND LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR GENE (LHR) ON FERTILITY TRAITS IN CROSSBRED HOLSTEIN FRISIAN DAIRY CATTLE. THESIS ADVISOR : ASST.PROF. AMONRAT MOLEE, Ph.D., 53 PP.

FOLLICLE-STIMULATING HORMONE RECEPTOR GENE (FSHR)/ LUTEINIZING HORMONE RECEPTOR GENE (LHR)/CROSSBRED HOLSTEIN FRISIAN

The objectives of this study were to study the effects of the FSHR gene and the LHR gene on fertility traits (number of services, days open, calving intervals, conception rate) in a crossbred Holstein Frisian population using a marker assisted selection. In this study blood samples were obtained from 124 crossbred Holstein dairy cows. The FSHR and LHR genes were investigated with the PCR-RFLP technique. Linkage disequilibrium was analyzed by Markov chain Monte Carlo. A general linear model and an ordinary least square were used to estimate the effects of the genes on the traits. A single trait animal model and the Spearman rank correlation coefficient were used to estimate breeding value (EBV) and to compare the rank correlation of EBV respectively. Two alleles (C, G) and three genotypes (CC, CG, GG) were found in the FSHR gene, the highest allele and genotype frequencies were C and CG respectively. Three genotypes (CC, CT, TT) were found in the LHR gene, the highest allele and genotype frequencies were C and CC respectively, while the frequency of the T allele was very low. Linkage disequilibrium between the FSHR gene and the

LHR gene were non-significant. As a result of this occurrence it was concluded that the LHR gene has no potential to be a marker gene for this population. The association between the FSHR gene and fertility traits was not found to be significant (P>0.05).

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

School of Animal Production Technology

Academic Year 2012

Student's Signature Chotima Poompramun

Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature _____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลืออย่างดียิ่งทั้งด้านวิชาการและด้านการดำเนินงานวิจัย จากบุคคลและบุคลลากรต่าง ๆ ได้แก่

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ โมพี อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้โอกาสทางการศึกษา ให้คำแนะนำปรึกษา ช่วยแก้ปัญหาและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยมาโดยตลอดรวมทั้งช่วยตรวจทาน และแก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ชาญ ณ ลำปาง อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ให้คำแนะนำปรึกษาด้านวิชาการ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.วิทธวัช โมพี ท่านประธานในการสอบวิทยานิพนธ์ และท่านคณะกรรมการที่ร่วมสอบวิทยานิพนธ์ได้แก่ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปราโมทย์ แพงคำ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.ภคนิจ คุปพิทยานันท์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.กนก ผลารักษ์ ผู้ทรงคุณวุฒิที่ให้คำแนะนำปรึกษาด้านวิชาการ

ขอขอบพระคุณ คุณเพลิน เมินกระโทก และคุณสมพงษ์ ปาติตัง นักวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างเลือดและให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลในงานวิจัย

ขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้การสนับสนุนเงินทุนในด้านการศึกษาและเงินทุนวิจัยในการดำเนินโครงการวิจัยนี้

ขอขอบคุณพี่น้องบัณฑิตทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจด้วยดีอย่างเสมอมา

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอบมอบให้กับบิดา มารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ผู้วิจัยตลอดมา จนทำให้ประสบความสำเร็จในชีวิต

โชติมา ภูมิประหมัน

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) ..... ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ง
สารบัญ ..... จ
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญภาพ ..... ซ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ ..... ฌ

บทที่

1 บทนำ 1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 4
1.3 สมมติฐานของการวิจัย 4
1.4 ขอบเขตการวิจัย 4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4
2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6
2.1 ปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนภายในประเทศ 6
2.2 สาเหตุที่ก่อให้เกิดปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนมในประเทศ 7
2.3 ระบบฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับวงจรการเป็นสัดในโคนม 9
2.4 ยีน Follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) และ
ยีน Luteinizing hormone receptor (LHR) 17
2.5 กลไกการส่งสัญญาณของฮอร์โมน FSH และ LH ใน Granulosa cell 18
2.6 กลไกการผลิตฮอร์โมน Estrogen ของ dominant follicle 20
2.7 การปรับปรุงพันธุ์สัตว์ในปัจจุบัน 21
3 วิธีการทดลอง 24

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1 วิธีวิจัย 24
3.2 ประชากรและข้อมูลที่ใช้ 27
3.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ 27
3.4 สถานที่ทำการทดลอง 30
3.5 ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย 30
4 ผลการทดลองและอภิปรายผล 31
4.1 ข้อมูลความสมบูรณ์พันธุ์ที่ทำการศึกษา 31
4.2 จำนวนอัลลีล จำนวนจีโนไทป์ ความถี่ของยีน
และ Linkage disequilibrium ของยีน FSHR กับ ยีน LHR 33
4.3 อิทธิพลของยีน FSHR ต่อความสมบูรณ์พันธุ์ 37
4.4 สหสัมพันธ์ของค่า EBV เมื่อมีอิทธิพลของยีนเป็นปัจจัยคงที่ในตัว
แบบตัวสัตว์และไม่มีอิทธิพลของยีนเป็นปัจจัยคงที่ในตัวแบบตัวสัตว์ 41
5 สรุปและข้อเสนอแนะ 43
รายการอ้างอิง 45
ภาคผนวก ก ภาพประกอบผลการศึกษารูปแบบของยีน 51
ประวัติผู้เขียน 53

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 การแสดงออกของลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนมภายในประเทศ 6

2.2 ข้อมูลงานวิจัยยีนตัวรับ (receptor) ในวงจรการเป็นสัดมาประยุกต์ใช้เป็น Marker gene 14

4.1 ค่าเฉลี่ยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด และค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (CV) ของลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์.....32

4.2 ความถี่อัลลีลและจีโนไทป์ (จำนวนตัว) ของยีน FSHR และยีน LHR.....33

4.3 ข้อมูลผลการศึกษาและข้อมูลงานวิจัยความถี่อัลลีลของยีน FSHR และยีน LHR.....35

4.4 อิทธิพลของยีน FSHR ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ 37

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 การทำงานร่วมกันของฮอร์โมนต่อความสมบูรณ์พันธุ์และการให้นม....8
2.2 ความสัมพันธ์ของฮอร์โมนกับการเป็นสัดในโคนม....10
2.3 ระดับฮอร์โมนในช่วงการตกไข่ของโค....12
2.4 กลไกการส่งสัญญาณของฮอร์โมน FSH และ LH ใน Granulosa cell....18
2.5 การกระตุ้นการทำงานของโปรตีนไคเนส A ใน CREB transcription factor....20
2.6 กลไกการผลิตฮอร์โมน Estrogen เพื่อหยุดการพัฒนาไข่และกระตุ้น
การแสดงอาการเป็นสัด....20
2.7 กรอบงานประเมินพันธุกรรมสัตว์ในปัจจุบัน....21
3.1 ภาพรวมของวิธีการวิจัยในการศึกษานี้....24
4.1 กลไกการส่งสัญญาณการพัฒนา follicle ในมนุษย์ หนู และโค....39
ก.1 รูปแบบอัลลีลและจีโนไทป์ของยีน FSHR ที่พบในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน....52
ก.2 รูปแบบอัลลีลและจีโนไทป์ของยีน LHR ที่พบในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน....52

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำเป็นปัญหาสำคัญในเกษตรกรรมการเลี้ยงโคนมของประเทศ จากข้อมูลของนักวิจัยในประเทศ (ตารางที่ 2.1 บทที่ 2) ชี้ให้เห็นว่าโคนมในประเทศไทยกำลังเผชิญกับปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ ทำให้ส่งผลกระทบต่อต้นทุนการผลิตและสูญเสียโอกาสการให้ผลผลิตที่ต่อเนื่องของโคนม ซึ่งผลการวิเคราะห์สถานการณ์ระบบการผลิตในปัจจุบัน เห็นว่าปัจจัยที่เป็นต้นเหตุให้โคนมในประเทศเกิดปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำพบสามสาเหตุดังนี้

สาเหตุที่หนึ่ง คือ ความสามารถทางพันธุกรรมในลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์ถดถอยลง จากรายงานของวิชัย และคณะ (2548); Toghiani (2012); Riecka and Candrak (2011) ชี้ให้เห็นว่าลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม และลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์มีสหสัมพันธ์ที่เป็นลบต่อกัน ซึ่งการศึกษาเหล่านี้สอดคล้องกับสมเกียรติ และคณะ (2542) พบว่าโคนมลูกผสมที่มีระดับสายเลือดโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนสูง ให้ผลผลิตน้ำนมมาก และมีความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำกว่าดัชนีชี้วัดความสมบูรณ์พันธุ์

สาเหตุที่สอง อาจเกิดจากอัตราเลือดชิดในฝูง ซึ่งเป็นผลกระทบจากการยกระดับพันธุกรรมให้มีผลผลิตน้ำนมเพิ่มขึ้น และการจัดเก็บข้อมูลไม่เป็นระบบ รายงานของ Parland et al. (2007) ชี้ให้เห็นว่าการเกิดอัตราเลือดชิดส่งผลให้จำนวนวันของระยะห่างการให้ลูกเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับ Gonzalez et al. (2007) ชี้ให้เห็นว่าอัตราเลือดชิดส่งผลต่ออัตราการตั้งท้อง

สาเหตุที่สาม อาหาร และการจัดการ เป็นที่ทราบทางทฤษฎีว่าการจัดการอาหารโคนมต้องมีสัดส่วนอาหารหยาบและอาหารข้นที่เหมาะสม และมีโภชนะครบถ้วนตามความต้องการของโคในแต่ละระยะการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิต โดยส่วนใหญ่เกษตรกรในประเทศใช้ฟางเป็นอาหารหยาบตลอดทั้งปี ซึ่งจัดว่าเป็นอาหารหยาบคุณภาพต่ำจึงส่งผลกระทบต่อปริมาณของโภชนะที่จำเป็นต่อความต้องการของโคนม ส่งผลให้เกิด Negative Energy Balance (NEB) และส่งผลกระทบให้ความสมบูรณ์พันธุ์ของโคต่ำ (Rossi et al., 2008)

จากที่กล่าวมาจึงมีความจำเป็นที่จะต้องแก้ไขปัญหาจากสาเหตุต่าง ๆ เพื่อประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม การศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะใช้การปรับปรุงพันธุ์โคนม เพื่อปรับปรุงลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ให้ดีขึ้น

ในด้านการปรับปรุงพันธุ์ประกอบด้วยสองวิธี คือ 1) Conventional breeding จะใช้ข้อมูลลักษณะปรากฏของสัตว์และข้อมูลพันธุ์ประวัติในการคัดเลือกโคนม ซึ่งปัจจุบันวิธีที่นิยมใช้ประเมินค่า EBV เรียกว่า Best Linear Unbiased Prediction (BLUP) และวิธีที่ 2) Molecular breeding เน้นการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุล (Marker Assisted selection) เพื่อนำข้อมูลจีโนไทป์รายตัวในโคเข้าร่วมประเมินค่า EBV ในการคัดเลือก

ผู้วิจัยเห็นว่าการพัฒนาลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ให้ดีขึ้นนั้น จำเป็นต้องใช้วิธีการปรับปรุงพันธุ์สองวิธีร่วมกัน ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์เป็นลักษณะที่มีอัตราพันธุกรรมต่ำอยู่ที่ช่วง 0.012-0.028 (Biffani et al., 2005); (Haja et al., 2003) ส่งผลให้การคัดเลือกมีข้อจำกัดในด้านความหลากหลายทางพันธุกรรมที่ใช้ในการคัดเลือก อีกทั้งการเก็บข้อมูลการแสดงออกในลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ต้องรอระยะเวลาที่โคแสดงออก ดังนั้นจึงนำความรู้ด้านเทคโนโลยีอณูพันธุศาสตร์ที่เรียกว่า Marker–Assisted selection (MAS) มาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือที่ช่วยในการคัดเลือกในทางปรับปรุงพันธุ์ และจากการศึกษาข้อมูลงานวิจัยพบว่าการใช้ข้อมูลจีโนไทป์เข้าร่วมในการประเมินค่า EBV สามารถช่วยลดระยะเวลาในการคัดเลือกได้ เนื่องจากการเก็บข้อมูลจีโนไทป์โครายตัวสามารถเก็บได้โดยไม่ต้องรอให้โคมีการแสดงออก (Ansari et al., 2008); (Boichard et al., 2006); (Williams, 2005); (Meuwissen et al., 2001) นอกจากนี้พบว่าในการประเมินค่า EBV ในลักษณะเชิงปริมาณที่ใช้ตัวแบบที่ประกอบด้วยข้อมูลจีโนไทป์ เปรียบเทียบกับการประเมินค่า EBV ที่ปราศจากข้อมูลจีโนไทป์พบว่าค่า EBV ที่ใช้ข้อมูลจีโนไทป์เข้าร่วมประเมินมีความแม่นยำสูง เนื่องจากข้อมูลจีโนไทป์โครายตัวเป็นข้อมูลทางพันธุกรรมโดยตรงของโค จึงส่งผลให้เพิ่มศักยภาพในการดึงความสามารถทางพันธุกรรมรายตัวของโคที่แท้จริงออกมาประเมินค่า EBV (Oleand and Mogens, 2010)

สำหรับการศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะศึกษาอิทธิพลของยีน FSHR และยีน LHR ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ ทั้งนี้เนื่องจากข้อมูลทางวิชาการของ Hafez and Hafez (2000) ระบุว่าความสมบูรณ์พันธุ์จะสามารถแสดงออกได้อย่างสมบูรณ์ จะต้องอาศัยฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์หลายชนิด โดยฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องต่อระบบสืบพันธุ์และการแสดงอาการเป็นสัด เช่น ฮอร์โมน Gonadotropin releasing hormone (GnRH) ฮอร์โมน Follicle-stimulating hormone (FSH) ฮอร์โมน Luteinizing hormone (LH) ฮอร์โมน Estrogen (E_2) ฮอร์โมน Progesterone (P_4) เป็นต้น โดยฮอร์โมนเหล่านี้จะทำงานได้ต้องผ่านตัวรับ (Receptor) ที่มีความจำเพาะของแต่ละฮอร์โมนหากฮอร์โมนดังกล่าวไม่สามารถจับกับตัวรับ (Receptor) ได้ หรือการจับกันระหว่างฮอร์โมนกับตัวรับ (Receptor) ไม่มีประสิทธิภาพ จะส่งผลให้การแสดงออกของระบบการสืบพันธุ์หรือการแสดงอาการเป็นสัดของโคนมด้อยประสิทธิภาพด้วย สำหรับตัวรับ (Receptor) ของฮอร์โมนแต่ละชนิดที่กล่าวข้างต้นคือ GnRHR FSHR LHR ESR และ PGR ตามลำดับโดยตัวรับ (Receptor) เหล่านี้ถูกควบคุม

การแสดงออกหรือถูกผลิตจากยีน โดยมีงานวิจัยจำนวนหนึ่งที่ศึกษาถึงศักยภาพในการประยุกต์ใช้เป็น marker gene ของยีน GnRHR ยีน ESR และยีน PSR ซึ่งผลการศึกษาของกลุ่มนักวิจัยดังกล่าวพบความสัมพันธ์ระหว่างยีน GnRHR ยีน ESR และยีน PGR กับความสมบูรณ์พันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในโคนม (Tracy et al., 2011); (Szrederetal., 2011); (Okumu et al., 2010); (Ahmad, 2010); (Driver et al., 2009) ส่วนการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับยีน FSHR และยีน LHR ในด้านการนำมาประยุกต์ใช้เป็น marker gene ในโคนมยังไม่ชัดเจน ในประเด็นอิทธิพลของยีน FSHR และยีน LHR ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ แต่อย่างไรก็ตามพบว่า การที่ยีน FSHR ไม่ทำงานส่งผลให้การทำงานของรังไข่เกิดความล้มเหลว (Dimitris et al., 2006) ในทำนองเดียวกัน Varkha et al. (2011) พบว่าการที่ยีน FSHR และยีน LHR ทำงานผิดปกติส่งผลกระทบต่อการปลูกฝังตัวอ่อนระยะ Blastocyst จึงเป็นเหตุให้นำยีน FSHR และยีน LHR มาศึกษาถึงศักยภาพในการนำมาพิจารณาใช้เป็นMarker gene ในครั้งนี้

สำหรับการศึกษาสภาพ Linkage disequilibrium ระหว่างยีน FSHR กับยีน LHR เพื่อเป็นข้อมูลให้ทราบว่าการเกิดรูปแบบของอัลลีลหนึ่งของยีน FSHR จะส่งผลต่อการเกิดรูปแบบอัลลีลหนึ่งของยีน LHR หรือไม่ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวจะเป็นแนวทางในการศึกษาหรือวางแผนการใช้ประโยชน์ทั้งสองยีนในการคัดเลือก

ดังนั้นจากที่กล่าวมาข้างต้น จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาจำนวนจีโนไทป์ในประชากรที่ศึกษาและสภาพ Linkage disequilibrium ของยีน FSHR และยีน LHR ในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน และศึกษาความสัมพันธ์ของยีน FSHR และยีน LHR ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ และเพื่อทดสอบ Rank correlation ของค่า Estimated Breeding Value (EBV) ที่มีการใช้ยีน FSHR และยีน LHR เป็น Marker gene เป็นปัจจัยร่วมในการประเมินค่า Estimated Breeding Value (EBV) ของลักษณะที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์ในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน

ถ้าการศึกษาครั้งนี้พบว่ายีน FSHR และยีน LHR มีศักยภาพในการเป็น Marker gene ผลการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นซึ่งต้องผ่านขั้นตอนทดสอบอีกสี่ขั้นตอนจึงจะบรรลุถึงการใช้ประโยชน์สู่เกษตรกรดังนี้ ขั้นตอนที่หนึ่ง คือ การทดสอบใช้ Marker gene คัดเลือกในฝูงที่ศึกษา ขั้นตอนที่สอง คือ การติดตามผลการแสดงออกของโคนมพร้อมบันทึกข้อมูล ขั้นตอนที่สาม คือ ประเมินศักยภาพของ Marker gene จากข้อมูลที่บันทึกติดตามผลและขั้นตอนที่สี่ คือ นักวิชาการของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีเป็นผู้ประยุกต์ใช้เทคโนโลยี Marker gene ร่วมกับการประเมินค่า EBV ในการคัดเลือกพันธุกรรมโคนมที่เหมาะสมต่อสภาพแวดล้อมของประเทศ และจำหน่ายโคนมสาวร่วมกับการให้ข้อมูลทางวิชาการ ในด้านการจัดการที่เหมาะสมกับพันธุกรรมให้กับกลุ่มเครือข่ายเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนม และช่วยเหลือผลักดันการตลาดให้กับกลุ่มเครือข่ายผู้เลี้ยงโคนมทั้งระบบ เพื่อลดช่องว่างการทำงานระหว่างนักวิชาการกับเกษตรกรในประเทศ

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาศักยภาพของยีน FSHR และยีน LHR ในการนำมาประยุกต์ใช้เป็น Marker–Assisted Selection (MAS) โดยพิจารณาจากตัวชี้วัดดังนี้

- จำนวนอัลลีล จำนวนจีโนไทป์ และความถี่ของยีน FSHR และยีน LHR ในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน
- อิทธิพลของยีน FSHR และยีน LHR ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน

1.2.2 ศึกษาสภาพ Linkage disequilibrium ระหว่างยีน FSHR กับยีน LHR

1.2.3 ทดสอบ Rank correlation ของค่า EBV ที่มีการใช้ยีน FSHR และยีน LHR เป็น Marker gene เป็นปัจจัยร่วมในการประเมินค่า EBV ของลักษณะที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน

1.3 สมมุติฐานการวิจัย

1.3.1 ยีน FSHR และยีน LHR มีศักยภาพในการเป็น Marker gene โดยพบจำนวนอัลลีล 2 อัลลีล พบจำนวนจีโนไทป์มากกว่าหนึ่งจีโนไทป์ และอิทธิพลของยีนมีความสัมพันธ์กับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน

1.3.2 ยีน FSHR และยีน LHR มี Linkage disequilibrium ต่อกันเป็นผลให้การคัดเลือกต้องมีการพิจารณายีนทั้งสองร่วมกัน

1.3.3 การใช้จีโนไทป์ของยีน FSHR และยีน LHR เป็นส่วนร่วมหนึ่งของปัจจัยคงที่ในตัวแบบตัวสัตว์ที่ประเมินค่า EBV ของโคนม ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลำดับของค่า EBV เมื่อเทียบกับลำดับของค่า EBV ที่ไม่ใช้จีโนไทป์ของยีนเข้าร่วมเป็นปัจจัยคงที่

1.4 ขอบเขตการวิจัย

ประชากรเป้าหมายในการศึกษาครั้งนี้ คือ โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ประโยชน์ทางตรงจากผลการศึกษานี้ คือ ทราบถึงศักยภาพของยีน FSHR และยีน LHR ที่จะนำไปประยุกต์ใช้เป็นยีนเครื่องหมาย (Marker gene) เพื่อช่วยในการประเมินค่า EBV ในลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ ในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนในฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.5.2 ประโยชน์ทางวิชาการ คือ ทราบประเด็นที่ต้องศึกษาเพิ่มเติมก่อนนำยีน FSHR และยีน LHR ไปประยุกต์ใช้งานจริงในประชากรที่ศึกษา

บทที่ 2
ปริทัศน์และวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนภายในประเทศ

วัตถุประสงค์ในการรวบรวมข้อมูลงานวิจัย เพื่อชี้ให้เห็นถึงสถานการณ์ปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนในประเทศ โดยข้อมูลความสมบูรณ์พันธุ์ของฝูงโคนมภายในประเทศแสดงดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 การแสดงออกของลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนมภายในประเทศ

ลักษณะ	จำนวนข้อมูล	ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD	CV (%)	เอกสารอ้างอิง
จำนวนครั้งการผสมติด (ครั้ง)				
ดัชนีวัดระบบสืบพันธุ์	-	2	-	กรมปศุสัตว์ (2554)
ฝูงโพธาราม จ.ราชบุรี	103	2.60 ± 1.75	67.07	ชนิตา และคณะ (2553)
ฝูงกำแพงแสน จ.นครปฐม	331	2.94 ± 2.20	74.83	อดิศร และคณะ (2550)
ฝูงกรมปศุสัตว์	1813	1.82 ± 1.18	64.84	วิชัย และคณะ (2548)
ฝูง อ.ส.ค. จ.สระบุรี				สมเกียรติ และคณะ (2542)
เลือดโฮลสไตน์50%	84	2.60 ± 1.66[b]	63.85	
เลือดโฮลสไตน์ ≥ 75%	81	1.95 ± 1.33[b]	68.21	
เลือดโฮลสไตน์ ≥ 87%	22	1.44 ± 0.41[a]	28.47	
จำนวนวันท้องว่าง (วัน)				
ดัชนีวัดระบบสืบพันธุ์	-	90	-	กรมปศุสัตว์ (2554)
ฝูงโพธาราม จ.ราชบุรี	262	188.46 ± 106.17	56.34	ชนิตา และคณะ (2553)
ฝูงกำแพงแสน จ.นครปฐม	331	145.32 ± 84.64	58.24	อดิศร และคณะ (2550)
ฝูงกรมปศุสัตว์	1813	171.21 ± 106.23	62.05	วิชัย และคณะ (2548)
ฝูง อ.ส.ค. จ.สระบุรี				สมเกียรติ และคณะ (2542)
เลือดโฮลสไตน์50%	84	154.48 ± 70[a]	45.31	
เลือดโฮลสไตน์ ≥ 75%	81	141.78 ± 94[a]	66.30	
เลือดโฮลสไตน์ ≥ 87%	22	190.43 ± 111[b]	58.29	

ตารางที่ 2.1 การแสดงออกของลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนมภายในประเทศ (ต่อ)

ลักษณะ	จำนวนข้อมูล	ค่าเฉลี่ย ± SD	CV (%)	เอกสารอ้างอิง
ระยะห่างการให้ลูก (วัน)				
ดัชนีวัดระบบสืบพันธุ์	-	365	-	กรมปศุสัตว์ (2554)
ฝูงโพธาราม จ.ราชบุรี	264	459.65 ± 105.13	22.87	ชนิตา และคณะ (2553)
ฝูงกำแพงแสน จ.นครปฐม	331	430.94 ± 96.07	22.29	อดิศร และคณะ (2550)
ฝูงกรมปศุสัตว์	1813	451.08 ± 108.19	23.98	วิชัย และคณะ (2548)
ฝูง อ.ส.ค. จ.สระบุรี				สมเกียรติ และคณะ (2542)
เลือดโฮลสไตน์ 50%	84	424.28 ± 86[a]	20.27	
เลือดโฮลสไตน์ ≥ 75%	81	449.68 ± 94[ab]	20.90	
เลือดโฮลสไตน์ ≥ 87%	22	457.33 ± 102[b]	22.30	

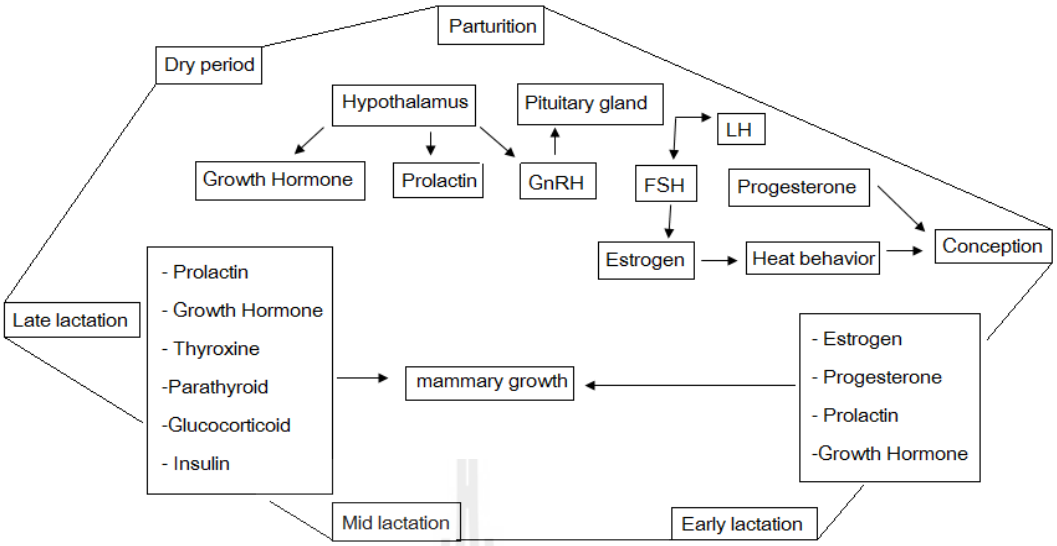
หมายเหตุ: [ab] คือ Superscrip แสดงความแตกต่าง P-value<0.05 CV คือ ค่าสัมประสิทธิ์ความแปรปรวน

ตารางที่ 2.1 ชี้ให้เห็นการเผชิญกับสถานการณ์ความสามารถทางการสืบพันธุ์ที่ต่ำกว่าดัชนีวัดระบบสืบพันธุ์ของโคนมในประเทศ เมื่อพิจารณาจากค่า CV ชี้ให้เห็นว่าการแสดงออกของความสมบูรณ์พันธุ์ของฝูงภายในประเทศมีการแสดงออกที่ใกล้เคียงกัน จากข้อมูลที่สะท้อนปัญหาดังกล่าวเห็นว่า จำเป็นอย่างยิ่งที่ปัญหานี้ควรได้รับการแก้ไขเพื่อประสิทธิภาพในการผลิตของธุรกิจฟาร์มโคนมในประเทศ

2.2 สาเหตุที่ก่อให้เกิดปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนมในประเทศ

วัตถุประสงค์ในการรวบรวมเอกสาร เพื่อวิเคราะห์ให้เห็นสาเหตุที่ทำให้โคนมในประเทศประสบปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ ภายใต้ระบบการผลิตน้ำนมของเกษตรกรในประเทศ โดยพบสาเหตุสามประการดังนี้

สาเหตุที่หนึ่ง การยกระดับพันธุกรรมให้มีการให้ผลผลิตเพิ่มขึ้น เนื่องจากลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมกับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์มีสหสัมพันธ์ที่เป็นลบต่อกัน (Toghiani, 2012); (Oltenacu and Broom, 2010) ซึ่งข้อมูลทางทฤษฎีที่ใช้อธิบายกลไกความสัมพันธ์ของสองลักษณะนี้ยังไม่ชัดเจน แต่อย่างไรก็ตาม จากการวิเคราะห์ทฤษฎีหน้าที่ของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องระหว่างความสมบูรณ์พันธุ์กับการให้ผลผลิตน้ำนม เป็นไปได้ที่มีส่วนทำให้ทั้งสองลักษณะนี้มีสหสัมพันธ์ที่เป็นลบต่อกันแสดงจากการสังเคราะห์ทฤษฎีบทบาทฮอร์โมนในแต่ละระยะการให้นมของโคแสดงดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 การทำงานร่วมกันของฮอร์โมนต่อความสมบูรณ์พันธุ์และการให้นม

จากภาพที่ 2.1 ชี้ให้เห็นความสัมพันธ์ในการทำงานของฮอร์โมนตลอดวงรอบชีวิตของโคนม โดยจุดที่เชื่อมโยงระหว่างการให้นมและการเป็นสัดเกิดขึ้นช่วงก่อนคลอด 2 วัน โดยระดับฮอร์โมน Progesterone ลดลงส่งผลให้สมองส่วน Hypothalamus หลั่งฮอร์โมน GnRH กระตุ้นสมองส่วน Pituitary ให้เกิดการหลั่งฮอร์โมน FSH เพื่อพัฒนา Follicle และเมื่อการพัฒนา Follicle เข้าสู่ระยะ Dominant follicle จะหลั่งฮอร์โมน Estrogen เพื่อทำหน้าที่สองส่วน คือ ส่วนที่หนึ่งพัฒนาเซลล์สร้างน้ำนม และส่วนที่สองแสดงพฤติกรรมการเป็นสัด ซึ่งในหน้าที่ส่วนของการพัฒนาเซลล์สร้างน้ำนมเป็นการพัฒนาขึ้นเพื่อทดแทนเซลล์ที่ตายในช่วงให้นม โดยฮอร์โมน Estrogen จะทำงานร่วมกับฮอร์โมน Progesterone ฮอร์โมน Prolactin และ Growth hormone ในกรณีที่โคนมได้รับการผสมแล้วตั้งท้อง กลุ่มฮอร์โมนที่มีบทบาทต่อการให้นมในช่วงแต่ละช่วงการให้นมจะแตกต่างกัน กล่าวคือ ช่วง early lactation คือ กลุ่มฮอร์โมน Prolactin ฮอร์โมน Insulin และฮอร์โมน Glucocorticoid และในช่วง Maintain of lactation กลุ่มฮอร์โมนที่มีบทบาท คือ ฮอร์โมน Prolactin ฮอร์โมน Glucocorticoid ฮอร์โมน Insulin Growth hormone ฮอร์โมน Parathyroid ฮอร์โมน Thyroxine ซึ่งในช่วงท้ายของการให้นมไปจนถึงคลอดระดับ Growth hormone จะสูงโดยทำงานร่วมกับฮอร์โมน Insulin และ Insulin-like growth factor เพื่อเผาผลาญพลังงานที่ได้รับจากอาหาร และสลายพลังงานไขมันในร่างกายในการผลิตน้ำนมส่งผลให้ในช่วง Early lactation เกิด Negative Energy Balance และจากรายงานของ Lucy (2008) กล่าวว่าโคนมจะเกิด Negative Energy Balance หลังคลอด 4-8 สัปดาห์เกิดจากความไม่สมดุลของฮอร์โมนกล่าวคือ Growth hormone และ GHR สูงแต่ฮอร์โมน IGF-1 ต่ำทำให้ฮอร์โมน IGF-1 ในเลือดต่ำซึ่งฮอร์โมน IGF-1 จะทำงานร่วมกันกับฮอร์โมน FSH ใน

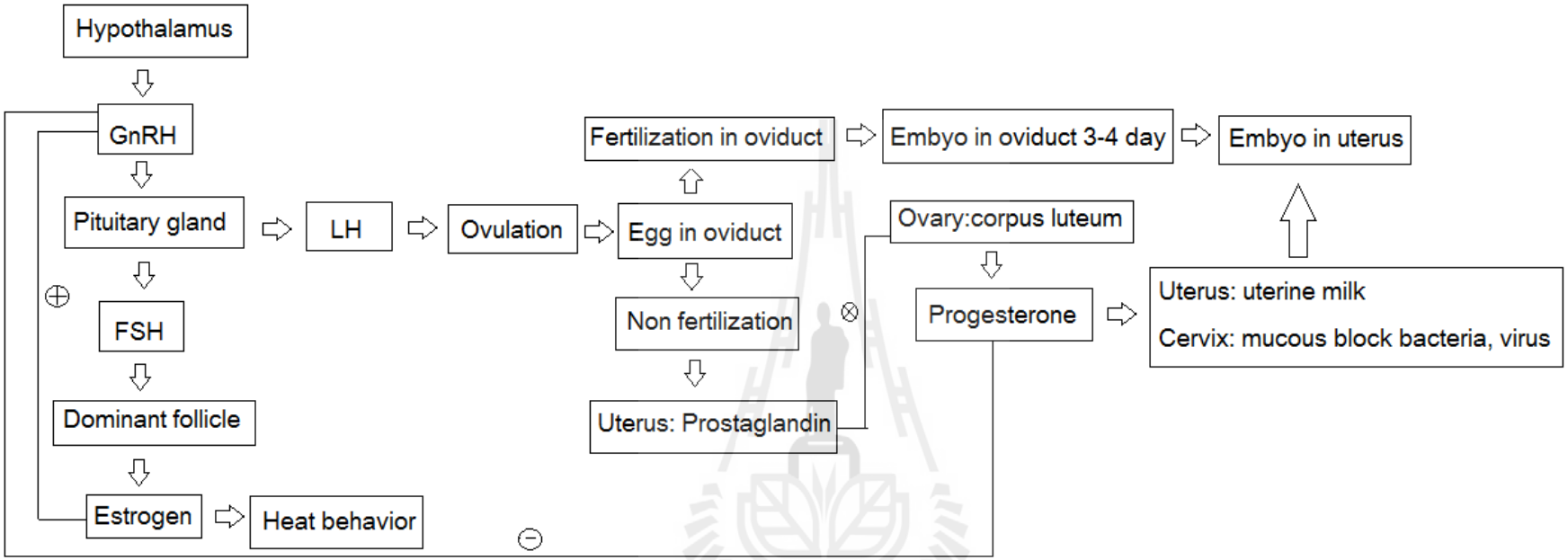
การพัฒนา Follicle เพราะฉะนั้นการที่ฮอร์โมน IGF-1 ต่ำในช่วงหลังคลอด 4-8 สัปดาห์ จึงส่งผลกระทบต่อการทำงานของกระบวนการการพัฒนา Follicle ในโค ดังนั้นในโคที่ให้นมมากจะดึงพลังงานไปใช้ให้เพียงพอต่อความสามารถในการสร้างเซลล์ทดแทนและการให้นม แล้วจึงนำพลังงานไปใช้ในการสืบพันธุ์ โดยพลังงานที่ดึงไปใช้เกิดขึ้นจากกลไกการทำงานฮอร์โมนบางชนิดที่มีบทบาททั้งด้านการให้นมและการสืบพันธุ์ ด้วยเหตุนี้จึงส่งผลให้โคนมที่ให้น้ำนมมากมีความสามารถในการสืบพันธุ์ต่ำ

สาเหตุที่สอง คือ อาหารและการจัดการ พบว่าระบบการผลิตในประเทศส่วนใหญ่ใช้ฟางซึ่งจัดเป็นอาหารหยาบคุณภาพต่ำ ร่วมกับอาหารข้นที่มีข้อจำกัดในด้านคุณภาพโปรตีนเพราะต้นทุนการผลิตต่ำทำให้ส่งผลต่อระบบการสืบพันธุ์ในโคนม จากรายงานของ Ryan et al. (2010); Ryan et al. (2009) ชี้ให้เห็นว่าระดับโปรตีนที่แตกต่างกันในอาหารข้นส่งผลต่อการกลับสัดของโคนมแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ จินดา และคณะ (2543) ที่ชี้ให้เห็นว่าการให้ระดับโปรตีนที่แตกต่างกันร่วมกับคุณภาพอาหารหยาบที่ต่ำโดยระดับโปรตีนในอาหารข้นที่ต่ำ (16%) ร่วมกับคุณภาพอาหารหยาบที่ต่ำ ส่งผลให้ความสมบูรณ์ทางร่างกายอยู่ระดับ 1 ซึ่งเป็นระดับที่ชี้ให้เห็นว่าผอม

สาเหตุที่สาม คือ การเกิดอัตราเลือดชิด ซึ่งผลจากการกระทบจากการยกระดับสายเลือดและการจัดเก็บข้อมูลที่ไม่เป็นระบบของโคนมในประเทศ โดยรายงานของ Gonzalez et al (2007) และ Parland et al. (2007) รายงานว่าการเกิดอัตราเลือดชิดส่งผลต่ออัตราการตั้งท้อง และส่งผลให้จำนวนวันของระยะห่างการให้ลูกเพิ่มขึ้น

2.3 ระบบฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับวงจรการเป็นสัดในโคนม

ความรู้เกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างการทำงานของฮอร์โมน ที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์กับวงจรการเป็นสัดของโคนำไปสู่การเห็นองค์รวมของกลไกการเป็นสัด จากทฤษฎีระบบฮอร์โมนในวงจรการเป็นสัดแสดงดังภาพที่ 2.2



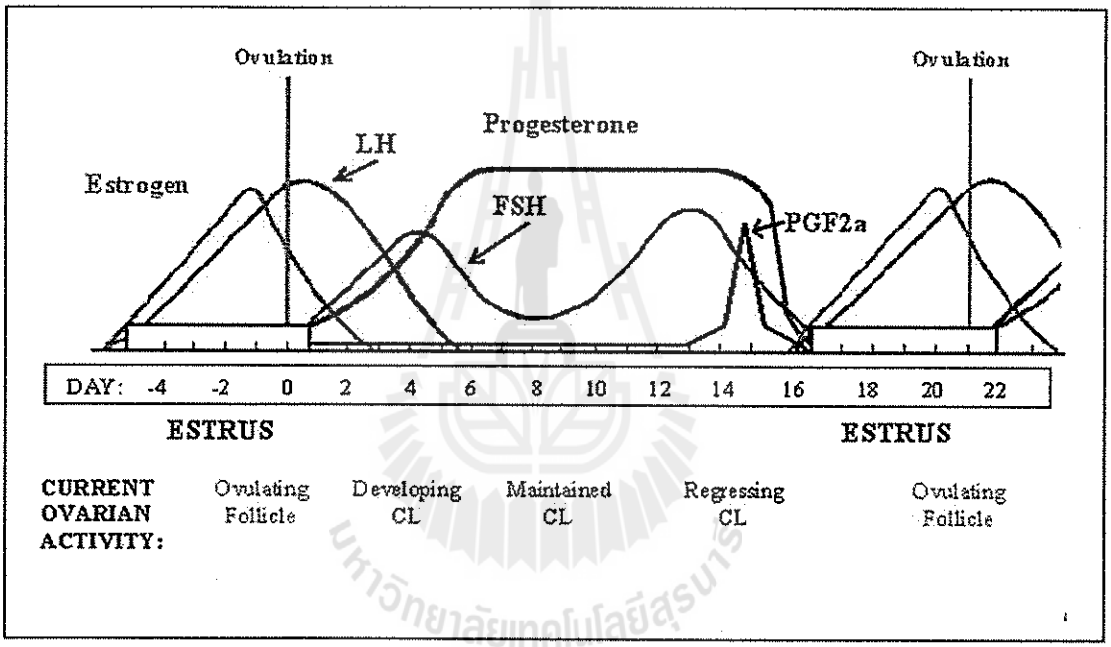
ภาพที่ 2.2 ความสัมพันธ์ของฮอร์โมนกับการเป็นสัดในโคนม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

จากภาพที่ 2.2 ทฤษฎีกล่าวว่าวงรอบการเป็นสัดของโคอยู่ที่ 18-21 วันในวันที่ 0 ของการเป็นสัดฮอร์โมน Estrogen ที่สร้างจากรังไข่โดยการกระตุ้นของ Dominant follicle จะเข้าจับกับตัวรับ (Receptor) เรียก ESR แล้วเข้าสู่กระแสเลือดทั่วร่างกายส่งผลให้เกิดการตอบสนองของอวัยวะภายในและอวัยวะภายนอก ในกรณีการตอบสนองฮอร์โมน Estrogen ของอวัยวะภายนอก คือ อวัยวะเพศบวมแดง ยืนนิ่ง ไม่กินอาหาร ส่งเสียงร้อง และหูตั้ง ในกรณีการตอบสนองฮอร์โมน Estrogen ของอวัยวะภายในมีสองปฏิกิริยา คือ ปฏิกิริยาที่หนึ่งปากมดลูก (Cervix) สร้างสารหล่อลื่นไปยัง vagina และมดลูกตึงเพื่อเป็นช่องทางขนส่งอสุจิไปยัง Oviduct ปฏิกิริยาที่สองฮอร์โมน Estrogen จะกระตุ้นสมองส่วน Hypothalamus ให้หลั่งฮอร์โมน Gonadotrophin releasing hormone (GnRH) จากนั้นฮอร์โมน GnRH จะเข้าจับกับตัวรับ (Receptor) เรียก GnRHR ไปกระตุ้นสมองส่วน Pituitary gland ให้หลั่งฮอร์โมน Luteinizing hormone (LH) แล้วเข้าจับกับตัวรับ (Receptor) เรียก LHR โดยหน้าที่ของฮอร์โมน LH จะกระตุ้นให้เกิดการตกไข่ คือ เกิดการปล่อยไข่ออกมาจากรังไข่สู่ท่อรังไข่ (Oviduct) หลังจากการตกไข่ในรังไข่ฮอร์โมน LH จะกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาเซลล์ที่เรียกว่า Corpus Luteum (CL) เข้าสู่วันที่ 1-5 ของการเป็นสัดการทำงานของร่างกายโคจะแบ่งออกเป็นสองประเด็น คือ ประเด็นที่มีอสุจิมารอผสมกับไข่ที่ท่อรังไข่ (Oviduct) เมื่อเกิดการปฏิสนธิระหว่างไข่กับอสุจิในท่อรังไข่ตัวอ่อนจะอยู่ในท่อรังไข่ (Oviduct) ประมาณ 3-4 วันจึงเคลื่อนเข้าสู่มดลูกในระหว่างนี้ CL ที่ถูกพัฒนาประมาณ 4-5 วันจะหลั่งฮอร์โมน Progesterone แล้วเข้าจับกับตัวรับ (Receptor) เรียก PGR ส่งผลให้เกิดการตอบสนองภายในร่างกายสามปฏิกิริยา คือ ปฏิกิริยาที่หนึ่งปากมดลูก (Cervix) สร้างสารเมือกข้นอุดช่องทางต่อเข้ามดลูก เพื่อป้องกันเชื้อโรคเข้าไปทำร้ายตัวอ่อนในมดลูก (Uterus) ปฏิกิริยาที่สองมดลูก (Uterus) สร้างสารอาหารให้ตัวอ่อนเรียก Uterine milk และปฏิกิริยาที่สามฮอร์โมน Progesterone จะยับยั้งการหลั่งของฮอร์โมน GnRH ส่งผลให้โคไม่เป็นสัดและไม่มีการตกไข่ ในประเด็นที่ไม่มีอสุจิมารอผสมที่ท่อรังไข่ (Oviduct) ทำให้ไม่มีการปฏิสนธิและไม่มีตัวอ่อนในมดลูก (Uterus) จากนั้นมดลูก (Uterus) จะสร้างฮอร์โมน Prostaglandin ($PG_{2\alpha}$) แล้วเข้าจับกับตัวรับ (Receptor) เพื่อไปทำลาย CL ส่งผลให้ระดับฮอร์โมน Progesterone ลดลง นำไปสู่การหลั่งฮอร์โมน GnRH แล้วกระตุ้นให้หลั่งฮอร์โมน Follicle-stimulating hormone แล้วจับกับตัวรับ (Receptor) เรียก FSHR เพื่อกระตุ้นการพัฒนาของ Follicle ในรังไข่ให้เป็น Dominant follicle ที่ทำให้หลั่งฮอร์โมน Estrogen เพื่อกระตุ้นการกลับสัดในรอบถัดไปรอบในโคโดยในช่วงเวลาการตกไข่ระดับการแสดงออกของแต่ละฮอร์โมนแสดงดังภาพที่ 2.3

ภาพที่ 2.3 ชี้ให้เห็นว่าวันที่ 0 ของการเป็นสัด ณ ช่วงเวลาที่ไข่ตกระดับฮอร์โมน Estrogen ลดระดับลงส่งผลต่อการลดพฤติกรรมการเป็นสัดและลดการกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมน GnRH และเห็นว่าระดับของฮอร์โมน LH มีระดับที่สูงโดยกระบวนการหลั่งฮอร์โมน LH จะมีลักษณะเป็นจังหวะ (Pulse) โดยจังหวะที่มีความถี่มากหรือน้อยนั้น จะถูกควบคุมด้วยฮอร์โมน Progesterone ที่

สร้างมาจากก้อนเนื้อเหลือง (Corpus Luteum) บนรังไข่หากปริมาณ Progesterone มากความถี่จังหวะของฮอร์โมน LH จะน้อย ซึ่งการที่ความถี่ของฮอร์โมน LH ไม่สูงพอนั้นส่งผลให้ Follicle ไม่สามารถแตก และไม่เกิดการตกไข่ขึ้น ทำให้เกิดความล้มเหลวในการตกไข่ส่งผลให้การตกไข่ต้องเคลื่อนไปที่คลื่นที่สองของ Follicle ต่อไป หาก Follicle ที่โตเต็มที่นั้นพอดีกับช่วงเวลาที่ก้อนเนื้อเหลือง (Corpus Luteum) บนรังไข่สลาย ส่งผลให้ฮอร์โมน Progesterone ลดลงทำให้ฮอร์โมน LH มีความถี่สูงขึ้นจึงทำให้ Follicle แตกและเกิดการตกไข่ขึ้นและประมาณ 4-5 วันหลังไข่ตกฮอร์โมน FSH จะหลั่ง โดยการกระตุ้นของฮอร์โมน GnRH เพื่อทำหน้าที่พัฒนา Follicle ให้เจริญเติบโตขึ้นมาแทนไข่ฟองที่ตกไปแล้ว (Hafez and Hafez, 2000)



ภาพที่ 2.3 ระดับฮอร์โมนในช่วงการตกไข่ของโค

ที่มา : Mottershead (2001)

จากที่กล่าวมาข้างต้นเห็นว่า การที่แต่ละฮอร์โมนจะทำงานกับอวัยวะเป้าหมายให้ได้ประสิทธิภาพจะต้องเข้าจับกับตัวรับเฉพาะ (Receptor) ดังนั้นหากตัวรับเฉพาะ (Receptor) ของแต่ละฮอร์โมนถูกผลิตอย่างไร้ประสิทธิภาพต่อการเข้าจับกับฮอร์โมน จะส่งผลให้การแสดงออกความสมบูรณ์พันธุ์ในโคไม่มีประสิทธิภาพตามมาด้วย ซึ่งตัวที่ควบคุมการผลิตตัวรับเฉพาะ (Receptor) ของแต่ละฮอร์โมนที่มีหน้าที่สำคัญต่อวงจรการเป็นสัด คือ ยีน ESR ผลิตตัวรับของฮอร์โมน Estrogen (Szreder et al., 2010) ยีน GnRHR ผลิตตัวรับของฮอร์โมน GnRH (Tracy et al. 2011) ยีน LHR ผลิตตัวรับของฮอร์โมน LH (Marson et al., 2008) ยีน PGR ผลิตตัวรับของฮอร์โมน Progesterone (Driver et al., 2009) ยีน FSHR ผลิตตัวรับของฮอร์โมน FSH (Marson et al., 2008) และปัจจุบันมีการ

นำยีนเหล่านี้มาศึกษาถึงศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้เป็น Marker gene โดยมีวัตถุประสงค์ในการค้นข้อมูลงานวิจัย คือ ค้นหายีนที่มีความสำคัญในวงจรการเป็นสัดของโคที่มีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้เป็น Marker gene ซึ่งมีเกณฑ์หลักในการเลือกสองเกณฑ์ คือ เกณฑ์ที่หนึ่งยีนต้องมีจำนวนจีโนไทป์ที่แตกต่างกันมากกว่าหนึ่งจีโนไทป์ เพื่อเป็นทางเลือกทางพันธุกรรมในการคัดเลือก เกณฑ์ที่สอง คือ ยีนต้องมีการแสดงออกสัมพันธ์กับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงดังตารางที่ 2.2

จากตารางที่ 2.2 พิจารณาจากหลักเกณฑ์สองข้อข้างต้นชี้ให้เห็นสองประเด็นกล่าวคือ ประเด็นที่หนึ่งยีนที่มีข้อมูลวิจัยสนับสนุนในประเด็นจำนวนจีโนไทป์ และประเด็นความสัมพันธ์ระหว่างยีนกับความสมบูรณ์ชัดเจน อีกทั้งอยู่ภายใต้ทฤษฎีการสืบพันธุ์ คือ ยีน ERα ยีน GnRHR ยีน PSR ในลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ประเด็นที่สองยีนที่มีศักยภาพยังไม่ชัดเจนในการนำมาประยุกต์ใช้เป็น Marker gene คือ ยีน FSHR ยีน LHR โดยพบว่าทั้งสองยีนมีจำนวนจีโนไทป์ที่แตกต่างกันมาก กว่าหนึ่งจีโนไทป์ แสดงให้เห็นถึงศักยภาพเบื้องต้นแต่ยังไม่พบความชัดเจนในข้อมูลงานวิจัย และใน ทางทฤษฎี ชี้ให้เห็นว่ายีนทั้งสองมีความสัมพันธ์กับความสมบูรณ์พันธุ์ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงเลือกยีน FSHR และยีน LHR มาศึกษา เพื่อนำมาซึ่งข้อสรุปในการประเมินศักยภาพของทั้งสองยีน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.2 ข้อมูลงานวิจัยยีนตัวรับ (Receptor) ในวงจรการเป็นสัดมาประยุกต์ใช้เป็น marker gene

Gene	Position	Exon	Chromosome	Genotype	Technic	Traits	Reference
ERα	-	C	-	AA AG GG	PCR-RFLP(*Bg/I*)	- Calving interval (day) : (P<0.1) - Calving interval to first insemination (day) : (P<0.1)	Zahmatkesh et al. (2012)
ERα	323 396	7	BTA9	Pattern1 Pattern2	SSCP		Szreder et al. (2011)
ERα	-	7	BTA9	AA CA CC	PCR-RFLP(*CfrI*)	- Milk fat content (%) : (P≤0.05) - Milk protein content (%) : (P≤ 0.05) - Sex of calves born : (P≤0.05) - Calving interval (day) : (non-significant) - Number of inseminations per conception (time) : (non-significant)	
ERα	AY340597	C	6	AA AG GG	PCR-RFLP(*Bg/I*) PCR-RFLP(*Sna/I*)	- Milk yield (kg) Fat yield (kg) Protein yield (kg) : (P ≤ 0.05)	Jedrzejczak et al. (2011)
ERα	-1213	B	6	AA AG GG		- Milk yield (kg) Fat yield (kg) Protein yield (kg) : (P ≤ 0.05)	

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.2 ข้อมูลงานวิจัยยีนตัวรับ (Receptor) ในวงจรการเป็นสัดมาประยุกต์ใช้เป็น marker gene (ต่อ)

Gene	Position	Exon	Chromosome	Genotype	Technic		Traits	Reference
GnRHR_-331	-331A>G	Promoter	6	TT TC CC	SNP			
GnRHR_-108	-108T>C[3]	Promoter	6	AA AG GG	SNP		-	Ahmad (2010)
GnRHR_-206	206G>T[3]	1	6	GG AG AA	SNP			
GnRHR_341	341C>T[3]	1	6	CC CT TT	SNP			
GnRHR_410	410C>T[3]	1	6	CC CT TT	SNP			
GnRHR	G286A	I	-	GG GA	PCR-RFLP (*Mbo*II)	-	Motility in frozen semen : ($P \geq 0.01$)	Yang et al. (2010)
	T340C	I	-	TT TC	PCR-RFLP (*BspM*I)	-	Sperm motility Semen volume per ejaculate Lower abnormal spermatozoa rate : ($P < 0.05$)	
PGR	G59752C	Intron 4	-	GG GC CC	SNP	-	Pregnant rate (%) : ($P < 0.05$)	Tang et al. (2013)
PR	AY656812	-	-	-	Real-time PCR	-	Relate their expression to the presence of an embryo, the proximity of the CL and to the region of oviduct.	Marie et al. (2012)
PGR	-	Intron 3	-	GG GC CC	SNP	-	Fertilization rate Embryonic survival rate: ($P < 0.05$)	Driver et al. (2009)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 2.2 ข้อมูลงานวิจัยยีนตัวรับ (Receptor) ในวงจรการเป็นสัดมาประยุกต์ใช้เป็น marker gene (ต่อ)

Gene	Position	Exon	Chromosome	Genotype	Technic	Traits	Reference
FSHR_L502L	C>T	10	11	TT CT CC	SNP		
FSHR_S596s	C>T	10	11	CC CG GG	SNP	- Calving interval (day) Day to first	Ahmad (2010)
FSHR_N669N	C>T	10	11	CC CT TT	SNP	service (day) : (P > 0.05)	
FSHR_T685T	C>A	10	11	AA AC CC	SNP	- Calving interval (day) Day to first	
						service (day) : (P > 0.001)	
FSHR	-	10	11	CC CG GG	PCR-RFLP	- Pregnant rate (%) : (P > 0.05)	Marson et al. (2008)
					(*AluI*)		
LHR_W467C	1401G>T	11	11	GG GT TT	SNP		
LHR_L490L	1470C>T	11	11	CC CT TT	SNP	- Calving interval (day) Day to first	Ahmad (2010)
LHR_Q527H	1581G>T	11	11	GG GT TT	SNP	service (day) : (P < 0.05)	
						- Estrus trait : (P > 0.05)	
LHR	-	11	11	CC CT TT	PCR-RFLP	- Pregnant rate (%) : (P > 0.05)	Marson et al. (2008)
					(*HhaI*)		

หมายเหตุ : PCR–RFLP = Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism SSCP = Single-Strand Conformation Polymorphism

SNP = Single nucleotide polymorphism

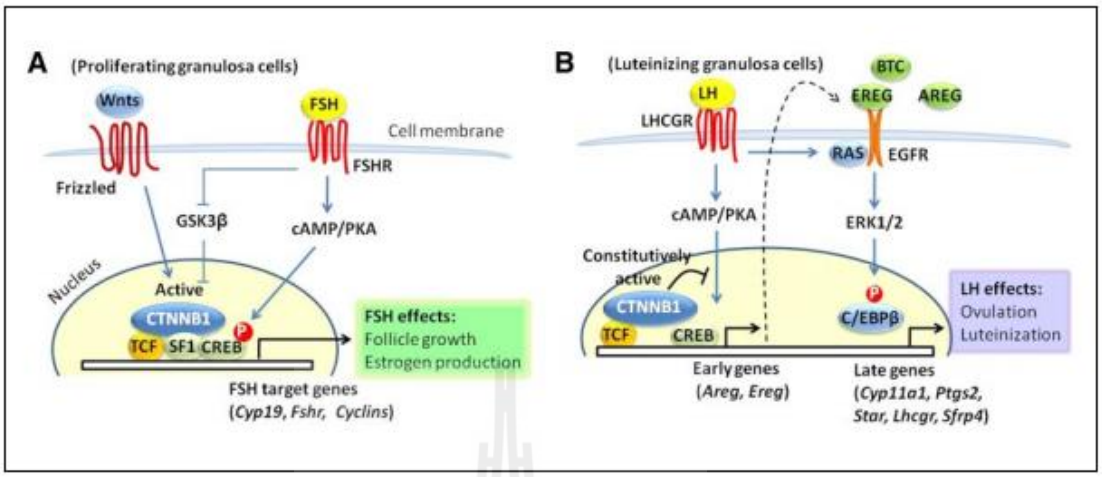
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.4 ยีน Follicle-stimulating hormone receptor (FSHR) และยีน Luteinizing hormone receptor (LHR)

ยีน FSHR มีความยาว 2,375 bp (NCBI 1994) ประกอบด้วย 10 Exon โดยที่ 9 Exon แรกนั้นแปลรหัสแล้วเป็นโปรตีนในส่วน Extracellular domains ส่วน Exon ที่ 10 แปลรหัสแล้วเป็นโปรตีนในส่วน Intracellular domains (Hernandez et al. 2009) ส่วนยีน LHR มีความยาว 2,435 bp (NCBI 2005) ประกอบด้วย 11 Exon โดยที่ 10 Exon แรกนั้นแปลรหัสแล้วเป็นโปรตีนในส่วน Extracellular domains ส่วน Exon ที่ 11 แปลรหัสแล้วเป็นโปรตีนในส่วน Intracellular domains (Jeromeetal. 1999)

ในประเด็นการศึกษาจำนวนจีโนไทป์ของยีน FSHR และยีน LHR ในโคพบว่ามีศักยภาพในการนำมาศึกษาในการประยุกต์ใช้เป็น marker gene และในประเด็นความสัมพันธ์ระหว่างยีนกับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ในงานวิจัยก่อนหน้านี้พบว่ายังไม่ชัดเจน (ตารางที่ 2.2) แต่อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยที่ศึกษายีน FSHR และยีน LHR ในคน หนู พบว่าการกลายพันธุ์ของยีน FSHR ในคนส่งผลให้ระบบรังไข่ล้มเหลว (Ghadami et al., 2010); (Dimitris et al., 2006); (Rannikko et al., 2002) ในทำนองเดียวกัน Varkha et al. (2011) พบว่าการที่ยีน FSHR และยีน LHR ทำงานผิดปกติส่งผลให้รบกวนการปลูกฝังตัวอ่อนระยะ blastocyst จากที่กล่าวมาข้างต้นเห็นว่ายีน FSHR และยีน LHR เป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญในระบบสืบพันธุ์ในด้านการเจริญของรังไข่การตกไข่ ซึ่งเป็นสิ่งที่สำคัญที่สุดในการนำไปสู่การยอมรับการผสมพันธุ์และการตั้งท้อง อีกทั้งข้อมูลงานวิจัยที่ให้ความชัดเจนในด้านความสัมพันธ์ระหว่างทั้งสองยีนกับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ในโคนมมีน้อย ดังนั้นจึงนำมาสู่การศึกษารูปแบบของยีน FSHR และยีน LHR ที่มีต่อระบบความสมบูรณ์พันธุ์ ในโคนมเพื่อพัฒนาเป็นยีนบ่งชี้ (Marker gene) นำมาช่วยในการคัดเลือกโคนมในลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ซึ่งส่งผลให้โคนมมีวงรอบการเป็นสัดที่เป็นไปตามปกติและมีการเจริญของ Follicle พร้อมทั้งมีการตกไข่ที่สมบูรณ์ เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการผสมติดและเพิ่มโอกาสในการตั้งท้องของแม่โคนม

2.5 กลไกการส่งสัญญาณของฮอร์โมน FSH และ LH ใน Granulosa cell

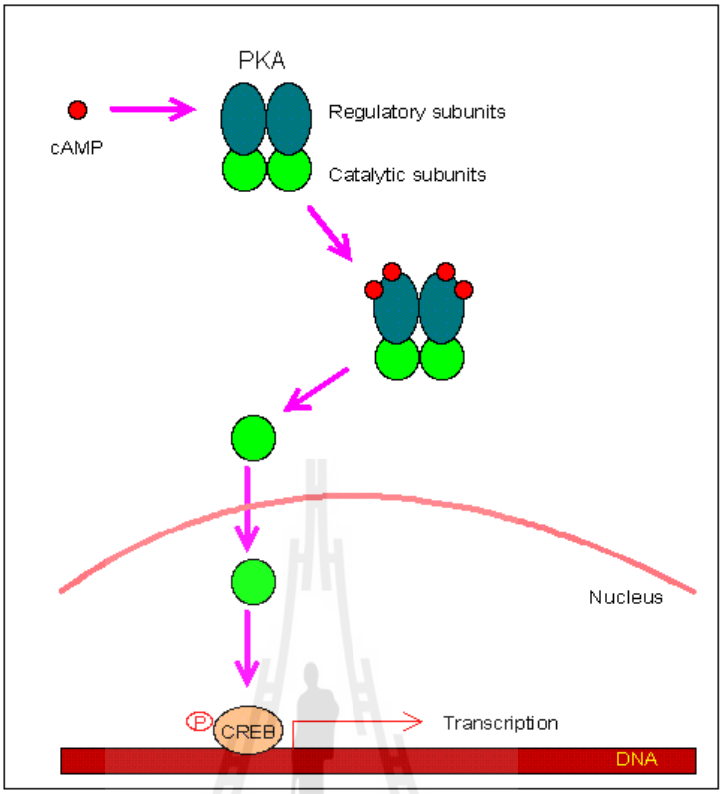


ภาพที่ 2.4 กลไกการขยายสัญญาณเพื่อพัฒนาไข่และกระตุ้นการตกไข่ของฮอร์โมน FSH และLH

ที่มา : Heng-Yuetal.(2010)

จากภาพที่ 2.4 จากการรายงานของ สุกัญญา และวิเชียร (2553) ร่วมกับ Heng-Yu et al. (2010) การส่งสัญญาณของฮอร์โมน FSH เป็นการส่งสัญญาณผ่านตัวรับเชื่อมกับโปรตีน G การส่งสัญญาณเริ่มต้นขึ้นโดยฮอร์โมน FSH จับกับ FSHR ที่บริเวณผิวเซลล์จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของตัวรับสัญญาณส่งผลให้เกิดการกระตุ้นโปรตีน G (Heterotrimeric G protein) ซึ่งยึดติดอยู่กับเยื่อเซลล์ทางด้าน Cytoplasm ด้วยหมู่โพรสเทติกที่เป็นกรดไขมันโปรตีน G ประกอบด้วยหน่วยย่อย 3 หน่วยคือ α β และ γ ในสภาวะปกติโปรตีน G ไม่ทำงานหน่วยย่อย α จับอยู่กับ GDP เมื่อถูกกระตุ้นโครงรูปของหน่วยย่อย α เปลี่ยนแปลงไปมีความจำเพาะกับ GTP มากขึ้นจึงเข้าแทนที่ GDP ซึ่งส่งผลให้โครงรูปของไทรเมอร์เปลี่ยนแปลง ทำให้หน่วยย่อย α แยกตัวออกจากหน่วยย่อยเชิงซ้อน β และ γ เกิดเป็นเอนไซม์จีทีพีเอส (GTPase) ที่ทำงานได้สามารถเร่งการสลาย GTP ให้เป็น GDP โดยเป้าหมายที่สำคัญของหน่วยย่อย α คือ Adenylate cyclase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน ATP เป็น cAMP โดยในกรณีของฮอร์โมน FSH โปรตีน G เป็นโปรตีน G กระตุ้น (Stimulatory G protein, Gs) ซึ่งกระตุ้นการทำงานของ Adenylate cyclase ให้สร้าง cAMP มากขึ้น ซึ่ง cAMP ทำหน้าที่เป็นสารทุติยภูมิ (Secondary messenger) ของฮอร์โมน FSH ซึ่งเป็นตัวนำสารปฐมภูมิ (Primary messenger) โดย cAMP จะเป็นตัวกระตุ้นนำสารในระดับต่อมาซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวเปิด-ปิด (Switch) ของกระบวนการพัฒนาของ Follicle และสร้างฮอร์โมน Estrogen โดย cAMP ไปกระตุ้นเอนไซม์โปรตีนไคเนส (Protein kinase) แล้วโปรตีนไคเนส (Protein kinase) ใช้ ATP เป็นซับสเตรตไปเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ Serine acid และ Threonine acid บน

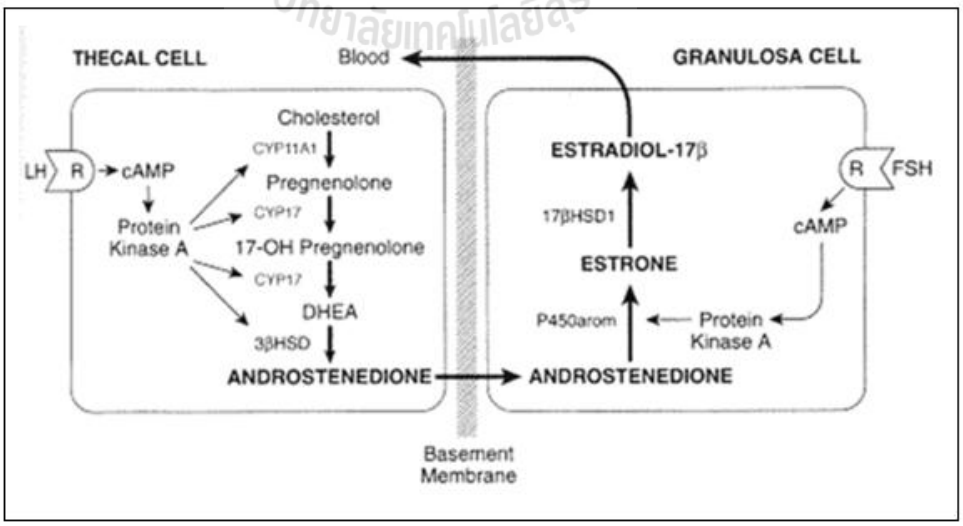
เอนไซม์เป้าหมาย ทำให้หมู่ไฮดรอกซิลของกรดอะมิโนดังกล่าวที่เดิมมีคุณสมบัติเป็นขั้วและไม่มีประจุ จะมีประจุเพราะหมู่ฟอสเฟตเพิ่มมากขึ้นการเปลี่ยนแปลงนี้ ส่งผลให้โครงสร้างของโมเลกุลเปลี่ยนไปจนถึงบริเวณเร่งปฏิกิริยา ซึ่งอาจส่งผลให้การเร่งปฏิกิริยาดีขึ้นหรือเลวลงกว่าเดิมเป็นผลให้เอนไซม์ที่อยู่ในสภาพที่ไม่ทำงานกลับมาทำงานได้ ซึ่งตัวนำสารทุติยภูมิ cAMP ที่สำแดงผลโดยไปกระตุ้นโปรตีนไคเนส A (Protein kinase A PKA) เร่งปฏิกิริยาได้ดีขึ้นซึ่งโปรตีนไคเนส A (Protein kinase A PKA) ประกอบขึ้นมาจากพอลิเพปไทด์ 4 สายแต่ละสายเรียกว่า 1 หน่วยย่อย (Subunit) แบ่งหน่วยย่อยได้เป็น 2 ชนิดได้แก่ หน่วยย่อยเร่งปฏิกิริยา (Catalytic subunit C) 2 หน่วย และหน่วยย่อยควบคุม (Regulatory subunit R) 2 หน่วย เมื่อหน่วยย่อยยังรวมกันอยู่นั้น หน่วยย่อยจะควบคุมปิดกั้นบริเวณเร่งของเอนไซม์ในหน่วยย่อยเร่งปฏิกิริยา (Catalytic subunit C) ทำให้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาเติมหมู่ฟอสเฟตได้แต่เมื่อ cAMP 4 โมเลกุลเข้าจับกับหน่วยควบคุม (Regulatory subunit R) ซึ่งเหนี่ยวนำให้หน่วยควบคุม (Regulatory subunit R) เปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติและหลุดออกทำให้หน่วยเร่งปฏิกิริยา (Catalytic subunit C) เป็นอิสระ และสามารถทำงานกระตุ้น CREB transcription factor ให้เกิดการแปลรหัสดีเอ็นเอของยีน FSHR ให้ผลิต FSHR ไปจับกับฮอร์โมนทำให้เกิดการพัฒนา Follicle และผลิตฮอร์โมน Estrogen (ภาพที่ 2.5) ส่งผลให้เกิดการขยายสัญญาณทวีคูณเป็นขั้น ๆ ไป (Signal amplification cascade) และการนำสัญญาณที่เติมหมู่ฟอสเฟตดังกล่าวเรียกว่า การขยายสัญญาณทวีคูณเป็นขั้น ๆ โดยการเติมหมู่ฟอสเฟต (Phosphorylation cascade) ซึ่งการปิดกระบวนการที่เกิดขึ้นทำได้โดยการตัดหมู่ฟอสเฟต (Dephosphorylation) ออกโดยเอนไซม์ฟอสฟาเทส (Phosphatase) ในส่วนการส่งสัญญาณของฮอร์โมน LH มีขั้นตอนในการส่งสัญญาณเช่นเดียวกับฮอร์โมน FSH คือกลไกการส่งสัญญาณ cAMP/PKA/phosphorylation cascade/CREB transcription factor ส่งผลให้ไปกระตุ้นการทำงานของ EGF-like factor และโดยเฉพาะอย่างยิ่งกระตุ้นการแปลรหัสของยีน Areg และยีน Ereg ซึ่งมีหน้าที่ในการกระตุ้นการทำงานของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตกไข่ โดยการส่งสัญญาณ ของ ERK1/2-C/EBPβ กระตุ้นการแสดงออกของยีน Cyp11a1 Ptgs2 star LHR และ sfrp4 โดยการทำงานของกลุ่มยีนนี้ส่งผลให้เกิดการตกไข่ และผลิตฮอร์โมน Progesterone (Heng-Yu et al. 2010)



ภาพที่ 2.5 การกระตุ้นการทำงานของโปรตีนไคเนส Aใน CREB transcription factor

ที่มา : Molecular Pharmacology (2000)

2.6 กลไกการผลิตฮอร์โมน Estrogen ของ Dominant follicle



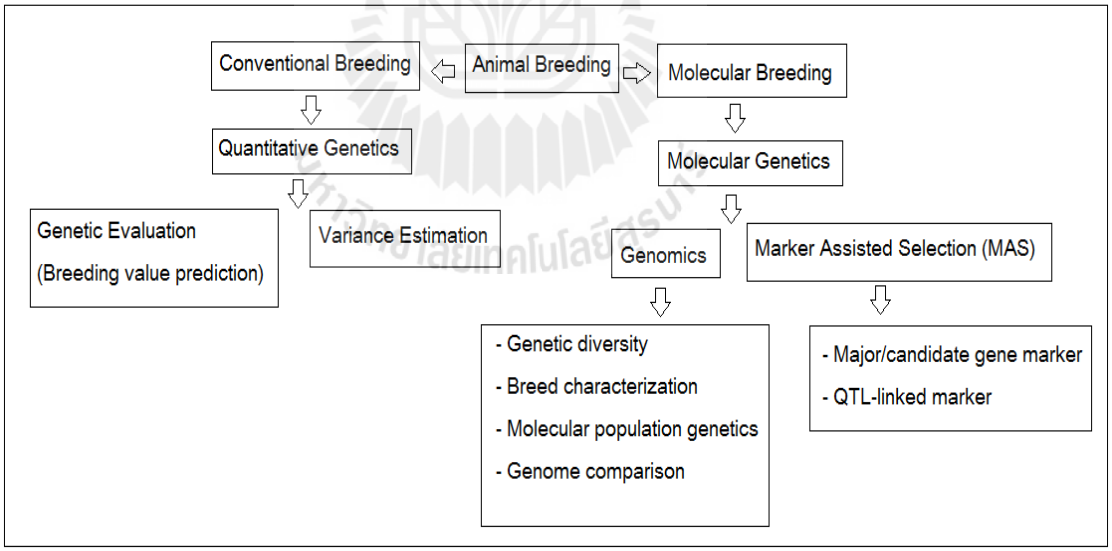
ภาพที่ 2.6 กลไกการผลิตฮอร์โมน Estrogen เพื่อหยุดการพัฒนาไข่และกระตุ้นการแสดงอาการเป็นสัด

ที่มา : Victor and Bruce (2011)

จากภาพที่ 2.6 การเจริญของ Follicle จะมีการสร้างฮอร์โมน Estrogen ในการควบคุมให้หยุดการพัฒนาเมื่อ Follicle โตเต็มที่แล้ว และฮอร์โมน Estrogen จะมีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับพฤติกรรมการเป็นสัดของโคซึ่งในการสร้างฮอร์โมน Estrogen จะต้องอาศัยการทำงานของทั้งฮอร์โมน FSH และฮอร์โมน LH ร่วมกันโดยเมื่อฮอร์โมน LH จับกับตัวรับ (Receptor) ที่บริเวณ Thecal cell ได้ผลผลิตเป็น androstenedione ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการสร้างฮอร์โมน Estrogen และในขณะเดียวกันฮอร์โมน FSH จับกับตัวรับ (Receptor) ที่บริเวณ granulosa cell เกิดปฏิกิริยาทางเคมีเปลี่ยนจาก androstenedione เป็นฮอร์โมน Estrogen และฮอร์โมน FSH จะทำงานร่วมกับฮอร์โมน Estrogen ในการพัฒนาตัวรับ (Receptor) ของฮอร์โมน LH ในช่วงกลางจนถึงช่วงท้ายของ Follicular phage จากนั้นเมื่อฮอร์โมน LH มีจังหวะความถี่ที่เหมาะสมใน luteal phage ฮอร์โมน LH จะกระตุ้นให้เกิดการสร้างฮอร์โมน Progesterone และฮอร์โมน Estrogen จาก Luteinized thecal และ Granulosa cell โดยเรียกกระบวนการที่กล่าวมานี้ว่า 2 Cell 2 Gonadotropin (Alan et al., 2003)

2.7 การปรับปรุงพันธุ์สัตว์ในปัจจุบัน

วัตถุประสงค์ของการแสดงกรอบงานการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ เพื่อชี้ให้เห็นตำแหน่งของวิธีการที่นำมาศึกษาครั้งนี้ ภายใต้กรอบงานรวมของการปรับปรุงพันธุ์สัตว์แสดงดังภาพที่ 2.8



ภาพที่ 2.7 กรอบงานประเมินพันธุกรรมสัตว์ในปัจจุบัน

ที่มา : (มนต์ชัย ดวงจินดา 2548)

จากภาพที่ 2.7 ปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์สัตว์แบ่งออกเป็น 2 วิธี คือหนึ่งการปรับปรุงพันธุ์แบบ Conventional breeding ซึ่งจะเน้นทางพันธุศาสตร์ปริมาณ (Quantitative genetics) หรือพันธุศาสตร์สถิติ (Statistical genetics) และสองการปรับปรุงพันธุ์เชิงโมเลกุล (Molecular breeding) ซึ่ง

จะเน้นงานด้านการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการคัดเลือก (Marker assisted selection)ในส่วนของการปรับปรุงพันธุ์สัตว์เชิงปริมาณนั้นแบ่งได้อีกสองส่วน คือ ส่วนที่หนึ่งงานด้านการประเมินค่าการผสมพันธุ์ (Breeding value prediction) และเนื่องจากการประเมินค่าทางพันธุกรรมจะมีประสิทธิภาพนั้นต้องการประเมินค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมของประชากร เช่น ค่าอัตราทางพันธุกรรม ค่าสหสัมพันธ์ทางพันธุกรรม ฯลฯ ซึ่งในทางปฏิบัติเป็นไปได้ค่อนข้างยาก จึงจำเป็นต้องมีงานส่วนที่สองคือการประมาณค่าความแปรปรวนทางพันธุกรรม (Variance components estimation) และปัจจุบันการประเมินพันธุกรรมสัตว์นิยมใช้วิธีการที่เรียกว่า Best Linear Unbiased Prediction (BLUP) ซึ่งมีการพัฒนาเพื่อประเมินพันธุกรรมที่หลากหลายขึ้นนอกเหนือจากค่าการผสมพันธุ์ เช่น ค่าอิทธิพลสภาพแวดล้อมถาวร (Permanent environment effect) ค่าอิทธิพลเนื่องจากแม่ (Maternal genetic effect) การประเมินพันธุกรรมจากโมเดลวันทดสอบรีเกรซชั่นสุ่ม (Random regression testday model) เป็นต้นส่วนการประมาณค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมนั้นปัจจุบันนิยมใช้วิธี Restricted Maximum Likelihood (REML) และวิธี Bayesian via Gibbs sampling (มนต์ชัย ดวงจินดา 2548)

เนื่องจากวิธี Best Linear Unbiased Prediction (BLUP) เป็นวิธีที่ประเมินด้วยข้อมูลพันธุ์ประวัติสัตว์และข้อมูลลักษณะปรากฏของสัตว์ เนื่องจากข้อมูลลักษณะปรากฏรายตัวในลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์นั้นจะสามารถเก็บได้เมื่อโคนมมีการแสดงออก ส่งผลให้การคัดเลือกต้องใช้ระยะเวลานาน นอกจากนี้เนื่องจากลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์เป็นลักษณะที่มีค่าอัตราพันธุกรรมต่ำอยู่ที่ช่วง 0.012-0.028 (Biffani et al. 2005); (Haja et al. 2003) ส่งผลให้การคัดเลือกมีข้อจำกัดในส่วนของความหลากหลายของพันธุกรรมที่ใช้ในการคัดเลือก ด้วยเหตุที่โคมีพันธุกรรมในลักษณะของระบบสืบพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันนี้ส่งผลให้ความก้าวหน้า (Genetic gain) ในการคัดเลือกล่าช้าเพราะลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ค่อนข้างขึ้นอยู่กับอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม อาจส่งผลให้ไม่สามารถดึงอิทธิพลที่เป็นพันธุกรรมอย่างแท้จริงออกมาประเมินค่า EBV ได้ ซึ่งในปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้ความรู้ทางด้านเทคโนโลยีอณูพันธุศาสตร์โดยการใช้ Marker gene เข้าร่วมในการคัดเลือกเพื่อเพิ่มความแม่นยำ เนื่องจากข้อมูล Marker gene เป็นข้อมูลรายตัวของโคโดยตรง ช่วยลดระยะเวลาในการคัดเลือกเนื่องจากการเก็บข้อมูล Marker gene รายตัวในโคสามารถเก็บได้ไม่ต้องรอให้โคแสดงลักษณะปรากฏ ทำให้ช่วยลดระยะเวลาในการคัดเลือก (Ansari et al., 2008); (Boichard et al., 2006); (Williams, 2005); (Meuwissen et al., 2001)

สำหรับการศึกษาครั้งนี้จะอยู่ในส่วนการปรับปรุงพันธุ์เชิงโมเลกุล (Molecular breeding) ซึ่งจะเน้นงานด้านการค้นหาเครื่องหมายโมเลกุลเพื่อการคัดเลือก (Marker assisted selection) โดยเทคนิคที่ใช้ในปัจจุบันมีหลายเทคนิคเช่น Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR–RFLP) Single-strand Conformation Polymorphism (SSCP) Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP) เป็นต้น (สุรางค์ จินตนา และณัฏฐิยา 2546) โดยการศึกษานี้จะใช้

เทคนิค Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR–RFLP) เนื่องจากมีงานวิจัยที่ศึกษาก่อนหน้านี้ (Marson et al., 2008) จึงทำให้สามารถศึกษาข้อมูลได้เมื่อมีปัญหาในห้องปฏิบัติงานจริงและใช้ค่าใช้จ่ายสารเคมีไม่สูงมาก

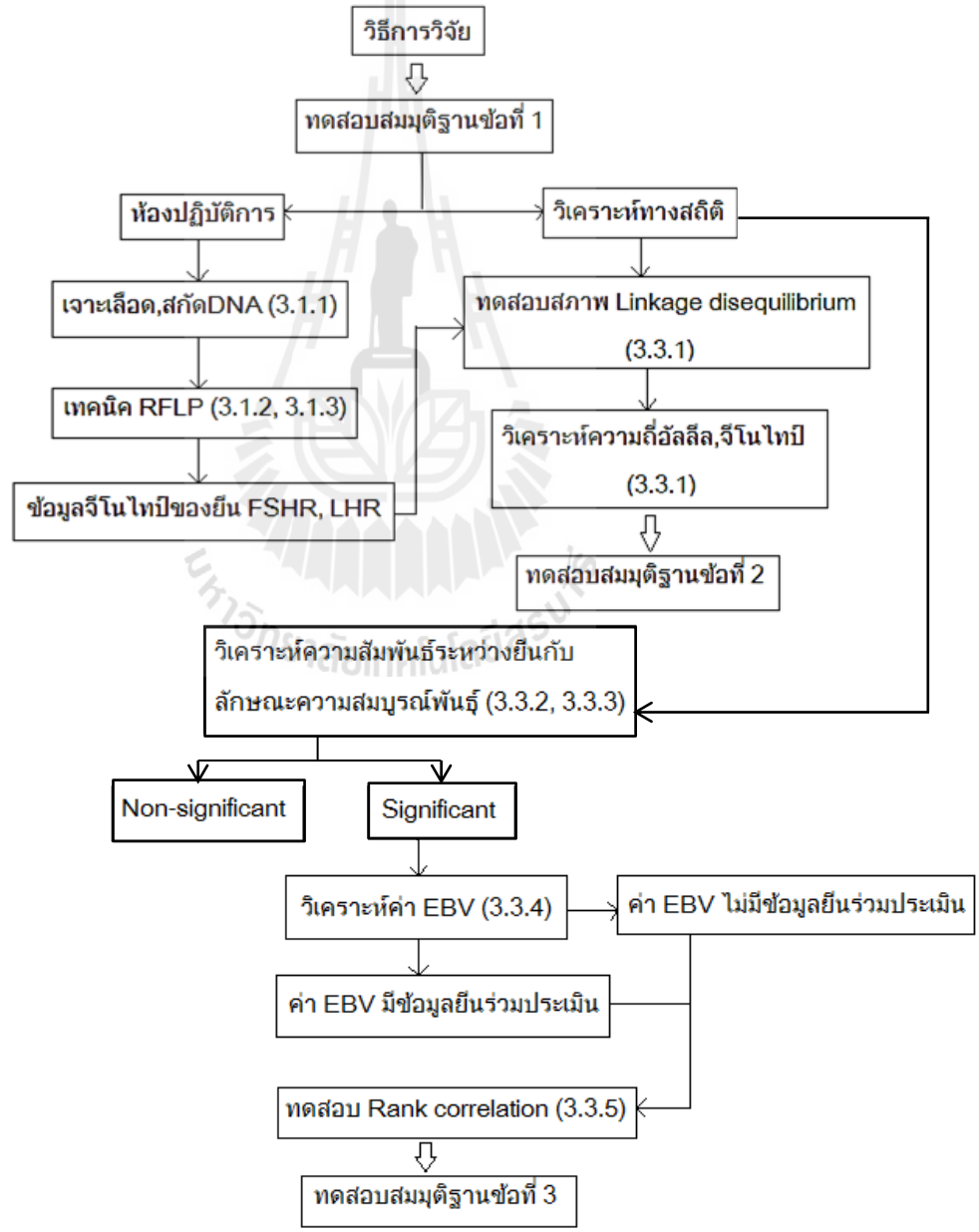
จากที่กล่าวมาข้างต้นชี้ให้เห็นถึงที่มาของสมมุติฐานของงานวิจัยครั้งนี้และนำไปสู่การพิสูจน์เพื่อให้ได้คำตอบในการประเมินศักยภาพของยีน FSHR และยีน LHR

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีการทดลองและเก็บข้อมูล

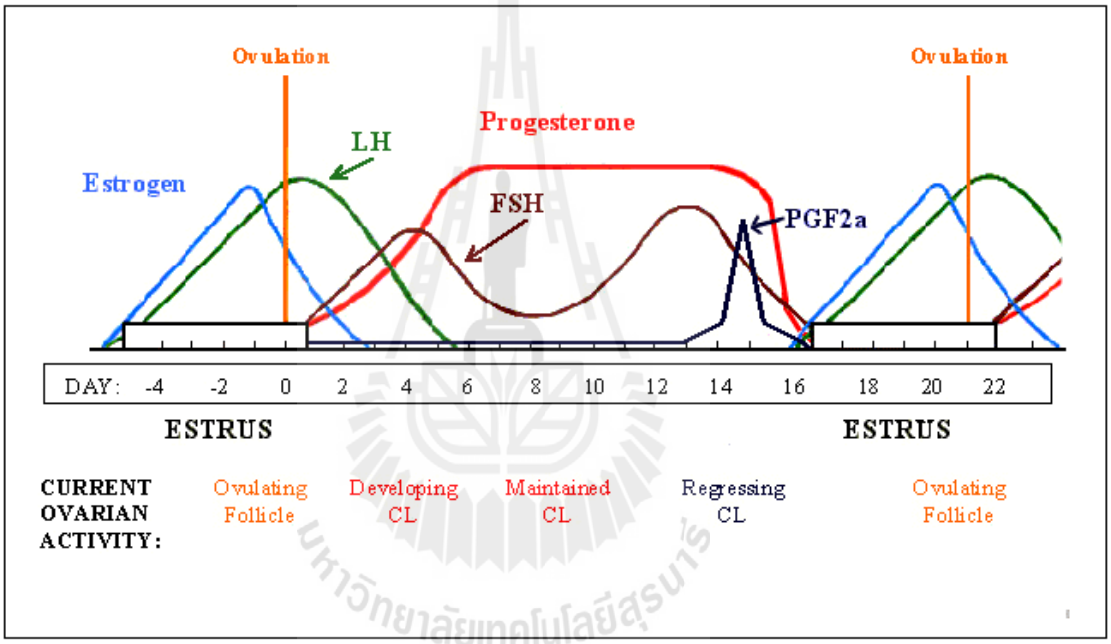
3.1 วิธีวิจัย

ภาพรวมของวิธีการวิจัย เพื่อนำไปสู่การบรรลุวัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้แสดงดังภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 ภาพรวมของวิธีการวิจัยในการศึกษานี้

สร้างมาจากก้อนเนื้อเหลือง (Corpus Luteum) บนรังไข่หากปริมาณ Progesterone มากความถี่จังหวะของฮอร์โมน LH จะน้อย ซึ่งการที่ความถี่ของฮอร์โมน LH ไม่สูงพอนั้นส่งผลให้ Follicle ไม่สามารถแตก และไม่เกิดการตกไข่ขึ้น ทำให้เกิดความล้มเหลวในการตกไข่ส่งผลให้การตกไข่ต้องเคลื่อนไปที่คลื่นที่สองของ Follicle ต่อไป หาก Follicle ที่โตเต็มที่นั้นพอดีกับช่วงเวลาที่ก้อนเนื้อเหลือง (Corpus Luteum) บนรังไข่สลาย ส่งผลให้ฮอร์โมน Progesterone ลดลงทำให้ฮอร์โมน LH มีความถี่สูงขึ้นจึงทำให้ Follicle แตกและเกิดการตกไข่ขึ้นและประมาณ 4-5 วันหลังไข่ตกฮอร์โมน FSH จะหลั่ง โดยการกระตุ้นของฮอร์โมน GnRH เพื่อทำหน้าที่พัฒนา Follicle ให้เจริญเติบโตขึ้นมาแทนไข่ฟองที่ตกไปแล้ว (Hafez and Hafez, 2000)



ภาพที่ 2.3 ระดับฮอร์โมนในช่วงการตกไข่ของโค

ที่มา : Mottershead (2001)

จากที่กล่าวมาข้างต้นเห็นว่า การที่แต่ละฮอร์โมนจะทำงานกับอวัยวะเป้าหมายให้ได้ประสิทธิภาพจะต้องเข้าจับกับตัวรับเฉพาะ (Receptor) ดังนั้นหากตัวรับเฉพาะ (Receptor) ของแต่ละฮอร์โมนถูกผลิตอย่างไร้ประสิทธิภาพต่อการเข้าจับกับฮอร์โมน จะส่งผลให้การแสดงออกความสมบูรณ์พันธุ์ในโคไม่มีประสิทธิภาพตามมาด้วย ซึ่งตัวที่ควบคุมการผลิตตัวรับเฉพาะ (Receptor) ของแต่ละฮอร์โมนที่มีหน้าที่สำคัญต่อวงจรการเป็นสัด คือ ยีน ESR ผลิตตัวรับของฮอร์โมน Estrogen (Szreder et al., 2010) ยีน GnRHR ผลิตตัวรับของฮอร์โมน GnRH (Tracy et al. 2011) ยีน LHR ผลิตตัวรับของฮอร์โมน LH (Marson et al., 2008) ยีน PGR ผลิตตัวรับของฮอร์โมน Progesterone (Driver et al., 2009) ยีน FSHR ผลิตตัวรับของฮอร์โมน FSH (Marson et al., 2008) และปัจจุบันมีการ

3.1.1 การเก็บตัวอย่างเลือดและการสกัด Genomic DNA

เจาะเลือดโคนมจากบริเวณใต้หางโคนมปริมาณ 10 ml. โดยใส่ในหลอด EDTA-NA_2-treated collection tube เก็บตัวอย่างเลือดในอุณหภูมิ –20°C เพื่อนำไปใช้ในการสกัด Genomic DNA สกัด DNA ด้วยวิธี Genomic DNA Mini Kit Protocol-Blood (Geneaid) มี 5 ขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. RBC Lysis (การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง) : ใช้ตัวอย่างเลือด 300 µl ดูดลงใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 ml เติม RBC Lysis Buffer ปริมาณ 900 ml (ใช้ 3 เท่าของตัวอย่างเลือด) ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วนำไป Centrifuge นาน 2 นาที ที่ 3000×g ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง จากนั้นเติม 100 µl RBC Lysis buffer

2. Cell Lysis (การย่อยโปรตีน) : เติม Proteinase K 20 µl แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3-5 นาที เติม 200 µl GB buffer ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex นำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 60°C เวลา 10 นาที โดยทำการกลับหลอดทุก ๆ 3 นาที ระหว่างนี้เตรียม Elution Buffer 100 µl อุ่นที่อุณหภูมิ 60°C เพื่อใช้ในขั้นตอน DNA Elution (100 µl ต่อ 1 ตัวอย่าง)

3. DNA Binding : เติม Ethanol 96-100% 200 µl นำไป Vortex เวลา 10 วินาที หากเกิดการตกตะกอนทำการ pipetting จากนั้นดูดสารละลายทั้งหมดลงใน GD colume collection tube ขนาด 2 µl แล้วนำไป Centrifuge ที่ 13,000 rpm เวลา 5 นาที

4. Wash (ล้างตะกอน) : เติม 400 µl W1 Buffer ลงใน GD column นำไป Centrifuge 13,000 rpm เวลา 30 วินาที จากนั้นทิ้งสารละลายที่ล้างออก เติม Wash Buffer 600 µl ลงใน GD column แล้วนำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เวลา 30 วินาที แล้วทิ้งสารละลายที่ล้างออก จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 13,000 rpm เวลา 3 นาที อีกครั้ง เพื่อให้ GD colume แห้งและเหลือเฉพาะส่วนที่เป็นดีเอ็นเอ

5. DNA Elution : ทำการย้ายย้าย GD colume ลงใน Microtube ขนาด 1.5 µl หลอดใหม่เติม Elution Buffer 100 µl ที่เตรียมไว้ในขั้นตอนที่ 2 ลงใน GD colume ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3-5 นาที แล้วนำไปนำไป Centrifuge ที่ 13,000 rpm เวลา 30 วินาที จะได้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C

จากนั้นตรวจสอบคุณภาพและความคมชัดดีเอ็นเอโดย Agarose gel electrophoresis แล้วนำไปส่องในตู้ภายใต้แสง UV และวัดความเข้มข้นของ Genomic DNA ด้วยเครื่อง Spectro-photometer (Optical-density, 260 nm and 280 nm) เพื่อทำการปรับความเข้มข้นของทุกตัวอย่างเป็น 10 ng/ µl สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) เก็บที่อุณหภูมิที่ -20°C เพื่อทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ และตรวจหารูปแบบจีโนไทป์ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) ต่อไป

3.1.2 การหารูปแบบอัลลีลของยีน FSHR ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR–RFLP)

ใช้ Genomic DNA มาตรวจหารูปแบบของอัลลีล โดย Primers และเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ อ้างอิงจากงานวิจัยของ Marson et al. (2008)

Forward primer : 5'-CTG CCT CCC TCA AGG TGC CCC TC-3'

Reverse primer : 5'-AGT TCT TGG CTA AAT GTC TTA GGG GG-3'

สำหรับ PCR Reaction mix รวมทั้งหมดเท่ากับ 25 µl ประกอบด้วย genomic DNA เข้มข้น 10 ng 1 µl เติมสารประกอบต่าง ๆ ในปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วย 10X PCR buffer 2.5 µl, dNTP's (0.5 mM) 2.5 µl, Primers อย่างละ 0.2 µl, 0.5 U *Taq* DNA polymerase 0.2 µl และเติม Nuclease free water ให้ได้ 25 µl Initial denaturation จะเริ่มที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 35 รอบ แต่ละรอบมีรายละเอียดในปฏิกิริยาดังนี้ เริ่มที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที Primer annealing ที่อุณหภูมิ 57°C เป็นเวลา 30 วินาที และ Primer extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 60 วินาที และขั้นตอนสุดท้าย (Final extension) ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที

ตัดด้วยเอนไซด์ตัดจำเพาะ เอนไซม์จำเพาะที่ใช้ ได้แก่ *Alu I* โดยเติม 2U และ PCR product 8 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งเอนไซม์ *Alu I* มีตำแหน่งการตัดคือ 5'…AG/**C**T…3' และ 3'…TC/GA…5' (Fermentas) และศึกษารูปแบบของจีโนไทป์ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis โดยใช้ Agarose gel 1.5%

จากการศึกษาของ Marson et al. (2008) พบว่ายีนมีรูปแบบจีโนไทป์ 3 รูปแบบคือ GG CG CC ซึ่งมีขนาด 193 และ 63/50 bp, 243/193 และ 63/50 bp, 243 และ 63 bp ตามลำดับ บนโครโมโซมคู่ที่ 11 Exon ที่ 10

3.1.3 การหารูปแบบอัลลีลของยีน LHR ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP)

ใช้ Genomic DNA มาตรวจหารูปแบบของอัลลีล โดย Primers และเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ อ้างอิงจากงานวิจัยของ Marson et al. (2008)

Forward primer : 5'-CAA ACT GAG AGT CCG CTT T-3'

Reverse primer : 5'-CCT CCG AGC ATG ACT GGA ATG GC-3'

สำหรับ PCR Reaction mix รวมทั้งหมดเท่ากับ 25 µl ประกอบด้วย Genomic DNA เข้มข้น 10 ng 1 µl เติมสารประกอบต่าง ๆ ในปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วย 10X PCR buffer 2.5 µl

dNTP's (0.5 mM) 2.5 µl , Primers อย่างละ 0.2 µl, 0.5 U *Taq* DNA polymerase 0.2 µl และเติม Nuclease free water ให้ได้ 25 µl Initial denaturation จะเริ่มที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 35 รอบ แต่ละรอบมีรายละเอียดในปฏิกิริยาดังนี้ เริ่มที่อุณหภูมิ 94°C เป็นเวลา 30 วินาที Primer annealing ที่อุณหภูมิ 63°C เป็นเวลา 30 วินาที และ Primer extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 60 วินาที และขั้นตอนสุดท้าย (Final extension) ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 10 นาที

ตัดด้วยเอนไซด์ตัดจำเพาะ เอนไซม์จำเพาะที่ใช้ ได้แก่ *HhaI* โดยเติม 1U และ PCR product 8 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งเอนไซม์ *HhaI* มีตำแหน่งการตัด คือ 5'…GCG/C…3' และ 3'…C/GCG…5' (Fermentas) และศึกษารูปแบบของจีโนไทป์ด้วยเทคนิค Gel electrophoresis โดยใช้ Agarose gel 1.5%

จากการศึกษาของ Marson et al. (2008) พบว่ายีนมีรูปแบบจีโนไทป์ 3 รูปแบบ คือ TT CT CC ซึ่งมีขนาด 303 bp, 303 และ 155/148 bp, 155/148 bp ตามลำดับ บนโครโมโซมคู่ที่ 11 Exon ที่ 11

3.2 ประชากรและข้อมูลที่ใช้

ประชากรโคนมที่ใช้สำหรับการศึกษารูปแบบจีโนไทป์ของยีน LHR และยีน FSHR เป็นประชากรโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน ระดับสายเลือดประมาณ 75%HF-93.75%HF ของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จำนวนประมาณ 124 ตัว

ข้อมูลที่ใช้ในการประเมินค่า EBV ได้แก่ ข้อมูลพันธุ์ประวัติ ข้อมูลระยะห่างของการให้ลูก ข้อมูลอัตราการผสมติด ข้อมูลจำนวนวันท้องว่าง ตั้งแต่ปี 2549-2553 ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

3.3.1 วิเคราะห์ความถี่ และ Linkage disequilibrium ของยีน FSHR และยีน LHR

นำรูปแบบของยีนมาวิเคราะห์ความถี่ของยีน โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป GENEPOP version 3.4 (Raymond and Rousset, 2003) โดยมีสูตรในการคำนวณหาความถี่จีโนไทป์และความถี่ของอัลลีล ดังนี้

• การหาความถี่ของจีโนไทป์

f (จีโนไทป์) = จำนวนสัตว์ที่มี genotype ที่กำหนด / จำนวนสัตว์ทั้งหมด

• การหาความถี่ของอัลลีล

f (อัลลีล) = จำนวนของอัลลีลที่กำหนด / จำนวนอัลลีลทั้งหมด

• การทดสอบสภาพ Linkage disequilibrium ด้วยวิธี Markov Chain Monte Carlo (MCMC) จากสมการ

$$D_{ij} = X_{ij} - p_i q_j \text{ (Slate and Pemberton, 2007)}$$

เมื่อ D_{ij} คือ โอกาสของการรวมกันของอัลลีล 2 ตำแหน่งของยีน i และ j X_{ij} คือ ความถี่อัลลีลของยีนทั้งสองตำแหน่ง p_i คือ ความถี่ของอัลลีล p q_j คือ ความถี่ของอัลลีล q

3.3.2 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน FSHR กับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์

ข้อมูลที่ใช้ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างยีน FSHR กับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ ประกอบด้วยข้อมูลจำนวนครั้งการผสมติด จำนวนวันท้องว่าง ระยะห่างการให้ลูก และอัตราการผสมติด โดยใช้วิธี Ordinary Least Square (OLS) ดังตัวแปรที่แสดงในสมการด้านล่างนี้

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

เมื่อ y คือ ค่าสังเกต ได้แก่ จำนวนครั้งการผสมติด จำนวนวันท้องว่าง ระยะห่างการให้ลูก และอัตราการผสมติด β_1 คือ อิทธิพลเนื่องจากปัจจัยคงที่ ได้แก่ ระดับสายเลือด ฝูง-ปีเกิด-ฤดูกาลเกิด และลำดับท้อง β_2 คือ อิทธิพลเนื่องจีโนไทป์ของยีน FSHR ε คือ อิทธิพลของความคลาดเคลื่อนอื่น ๆ X_1 X_2 คือ Incidence matrix ที่แสดงการปรากฏของอิทธิพลคงที่ในแต่ละค่าสังเกตตามลำดับ

3.3.3 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน LHR กับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์

ข้อมูลที่ใช้ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างยีน LHR กับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ ประกอบด้วยข้อมูลจำนวนครั้งการผสมติด จำนวนวันท้องว่าง ระยะห่างการให้ลูก และอัตราการผสมติด โดยใช้วิธี Ordinary Least Square (OLS) ดังตัวแปรที่แสดงในสมการด้านล่างนี้

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

เมื่อ y คือ ค่าสังเกต ได้แก่ จำนวนครั้งการผสมติด จำนวนวันท้องว่าง ระยะห่างการให้ลูก และอัตราการผสมติด β_1 คือ อิทธิพลเนื่องจากปัจจัยคงที่ ได้แก่ ระดับสายเลือด ฝูง-ปีเกิด-ฤดูกาลเกิด และลำดับท้อง β_2 คือ อิทธิพลเนื่องจีโนไทป์ของยีน LHR ε คือ อิทธิพลของความคลาดเคลื่อนอื่น ๆ X_1 X_2 คือ Incidence matrix ที่แสดงการปรากฏของอิทธิพลคงที่ ในแต่ละค่าสังเกต ตามลำดับ

3.3.4 การประมาณค่า Estimate Breeding Value (EBV) โดยมีอิทธิพลของยีน FSHR และยีน LHR 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 เวคเตอร์ของค่าสังเกตของลักษณะจำนวนครั้งการผสมติด จำนวนวันท้องว่าง ระยะห่างการให้ลูก และอัตราการผสมติด β คือ เวคเตอร์ของอิทธิพลคงที่ที่มีผลต่อลักษณะ ซึ่งได้แก่ อิทธิพลของยีน FSHR และยีน LHR จำนวนวันให้นม ระดับสายเลือด ฟาร์มโคนมที่แตกต่างกัน ปีเกิด ฤดูกาลเกิด ลำดับท้อง a คือ อิทธิพลสุ่มเนื่องจากตัวสัตว์หรือพันธุกรรมแบบบวกสะสม ε คือ อิทธิพลแบบสุ่มเนื่องจากอิทธิพลของความคลาดเคลื่อนอื่น ๆ X และ Z คือ ณncidence matrix ที่ระบุอิทธิพลคงที่และตัวสัตว์ ตามลำดับ (มนต์ชัย ดวงจินดา, 2548) โดยมีโครงสร้างความแปรปรวนคือ

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

เมื่อ σ_α^2 คือความแปรปรวนเนื่องจากตัวสัตว์สำหรับลักษณะ A คือ Numerator relationship matrix ระหว่างตัวสัตว์ I คือ ความแปรปรวนเนื่องจากความคลาดเคลื่อนสำหรับลักษณะ α คือ เวคเตอร์ของอิทธิพลสุ่มเนื่องจากพันธุกรรมแบบบวกสะสมที่มีต่อลักษณะ e คือ เวคเตอร์ของอิทธิพลแบบสุ่มเนื่องจากอิทธิพลของความคลาดเคลื่อนอื่น ๆ ที่มีต่อลักษณะตามลำดับ มีรูปแบบ Mixed model Equation ดังนี้

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

3.3.5 การเปรียบเทียบลำดับของค่า EBV กรณีที่มีอิทธิพลของยีน FSHR และยีน LHR เป็นปัจจัยคงที่ และกรณีที่ไม่มีอิทธิพลของยีนในตัวแบบ

นำข้อมูลลำดับค่า EBV ของแต่ละลักษณะจากตัวแบบตัวสัตว์กรณีที่มีอิทธิพลของยีน FSHR และยีน LHR เป็นปัจจัยคงที่ และกรณีที่ไม่มีอิทธิพลของยีนในตัวแบบมาวิเคราะห์ความสัมพันธ์ด้วยวิธี Spear's Rank-Order Correlation Coefficient (Kaps and Lamberson, 2004) โดยมีสูตรการคำนวณดังนี้

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

เมื่อ r_s คือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์แบบสเปียร์แมน εD^2 คือผลรวมของกำลังสองของผลต่างของอันดับที่ของข้อมูลค่า EBV แต่ละคู่ N คือ จำนวนข้อมูลทั้งหมด

การศึกษาครั้งนี้ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS for windows version 16 (SPSS Inc., Chicago, IL) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

3.4 สถานที่ทำการทดลอง

3.4.1 งานโคนม ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ.เมือง จ. นครราชสีมา

3.4.2 อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา

3.5 ระยะเวลาในการดำเนินการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้ใช้ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัยเริ่มต้น เดือนมีนาคม พ.ศ. 2553 ถึงเดือนพฤษภาคม 2554

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลการศึกษาและการอภิปราย

วัตถุประสงค์หลักของการศึกษานี้เพื่อประเมินศักยภาพของยีน FSHR และยีน LHR ที่จะเป็น Marker gene เพื่อใช้เป็นเครื่องมือเข้าร่วมการประเมินค่า EBV ในลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนมโดยการศึกษานี้มีสมมุติฐานสามข้อกล่าว คือ ข้อที่หนึ่งยีน FSHR และยีน LHR มีศักยภาพในการเป็น Marker gene โดยพบจำนวนอัลลีล 2 อัลลีล พบจำนวนจีโนไทป์มากกว่าหนึ่งจีโนไทป์ และอิทธิพลของยีนมีความสัมพันธ์กับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน ข้อที่สอง คือ ยีน FSHR และยีน LHR มี Linkage disequilibrium ต่อกัน และข้อที่สาม คือ การใช้จีโนไทป์ของยีน FSHR และยีน LHR เป็นส่วนร่วมหนึ่งของปัจจัยคงที่ในตัวแบบตัวสัตว์ที่ประเมินค่า EBV ของโคนมส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงลำดับของค่า EBV เมื่อเทียบกับลำดับของค่า EBV ที่ไม่ใช้จีโนไทป์ของยีนเข้าร่วมเป็นปัจจัยคงที่ผลการศึกษาทั้งหมดสามารถประเมินได้ว่ายีน FSHR และยีน LHR ณ ตำแหน่งที่นำมาศึกษาครั้งนี้ไม่มีศักยภาพในการใช้เป็น Marker gene สำหรับโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนทั้งนี้เนื่องจากในกรณีของยีน FSHR ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างอิทธิพลของยีน FSHR กับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์แม้ว่ายีน FSHR จะพบจำนวนอัลลีลและจำนวนจีโนไทป์มากกว่าหนึ่งในกรณียีน LHR พบว่าความถี่อัลลีล T ต่ำมากทำให้ไม่สามารถนำไปใช้ในการคัดเลือกได้จึงไม่ศึกษาต่อในประเด็นอิทธิพลของยีนกับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ การที่ผลการศึกษานี้ไม่พบความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญระหว่างอิทธิพลของยีน FSHR จึงไม่ทดสอบสมมุติฐานข้อที่สาม โดยรายละเอียดผลการศึกษา จะกล่าวต่อจากการเสนอข้อมูลความสมบูรณ์พันธุ์ที่ทำการศึกษา

4.1 ข้อมูลความสมบูรณ์พันธุ์ที่ทำการศึกษา

ข้อมูลในตารางที่ 4.1 ทำให้ต้องตระหนักในปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนมในประเทศเป็นอย่างยิ่ง จากข้อมูลที่นำมาศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ จำนวนครั้งการผสมติด จำนวนวันท้องว่าง ระยะห่างการให้ลูก และอัตราการผสมติด ต่ำกว่าดัชนีชี้วัดความระบบสืบพันธุ์ของโคนม ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของชนิตา และคณะ (2553); อดิศร และคณะ (2550); วิชัย และคณะ (2548) จากหลักฐานที่กล่าวแสดงให้เห็นว่าโคนมในประเทศต้องได้รับการแก้ไขปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ ซึ่งปัญหาดังกล่าวเกิดขึ้นจากสองปัจจัยหลัก คือ ระบบการจัดการและพันธุกรรม ดังนั้นการแก้ไขปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ของโคนมควรให้ความสำคัญทั้งสองปัจจัยนี้ร่วมกัน เพื่อประสิทธิภาพการแก้ปัญหาที่สามารถใช้ประโยชน์ได้จริงในประเทศ

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ค่าต่ำสุด ค่าสูงสุด และค่าสัมประสิทธิ์ของความแปรปรวน (CV) ของลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์

ลักษณะ	No.	Mean	SD	Min	Max	CV
จำนวนครั้งการผสมติด (ครั้ง)						
ข้อมูลในการศึกษานี้	210	2.31	1.48	1	9	64.07
[1]ดัชนีชี้วัดระบบสืบพันธุ์	-	2	-	-	-	-
[2]ชนิตา และคณะ (2553)	103	2.60	1.75	1	11	67.30
[3]อดิศร และคณะ (2550)	331	2.94	2.20	1	12	74.83
[4]วิชัย และคณะ (2548)	1813	1.82	1.18	-	-	64.84
[5]Mulleretal. (2010)	16307	2.60	1.91	1	10	73.46
[6]Gredler et al (2007)	38498	1.84	1.23	1	22	66.85
จำนวนวันท้องว่าง (วัน)						
ข้อมูลในการศึกษานี้	206	198.28	96.95	42	524	48.90
[1]ดัชนีชี้วัดระบบสืบพันธุ์	-	90	-	-	-	-
ชนิตา และคณะ (2553)	262	188.46	106.17	43	531	56.34
อดิศร และคณะ (2550)	331	145.32	84.64	41	424	58.24
วิชัย และคณะ (2548)	1813	171.21	106.23	-	-	62.05
Mulleretal.(2010)	16765	146.10	95.50	32	727	65.37
[6]Gredler et al (2007)	38498	105.60	61.00	20	485	57.77
[7]Oyamaetal. (2002)	72740	111.70	65.20	-	-	58.37
ระยะห่างการให้ลูก (วัน)						
ข้อมูลในการศึกษานี้	193	462.53	99.88	196	727	21.59
[1]ดัชนีชี้วัดระบบสืบพันธุ์	-	365	-	-	-	-
ชนิตา และคณะ (2553)	264	459.65	105.13	301	799	22.87
อดิศร และคณะ (2550)	331	430.94	96.07	319	856	22.29
วิชัย และคณะ (2548)	1813	451.08	108.19	-	-	23.98
[8]Arougg et al (2011)	163234	412.80	86.40	261	749	20.93
[6]Gredler et al (2007)	32038	387.90	55.20	300	695	14.23
Oyama et al. (2002)	72740	401.30	65.30	-	-	16.27
เปอร์เซ็นการผสมติด (%)						
ข้อมูลในการศึกษานี้	210	61.21	32.06	11.11	100	52.29
[1]ดัชนีชี้วัดระบบสืบพันธุ์	-	>50	-	-	-	-

หมายเหตุ : [1] อ้างอิงจากสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ (2554),[2]ฟาร์มรายย่อยเขตอำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม,[3]ฟาร์มโคนมในเขตอำเภอโพธารามจังหวัดราชบุรี,[4]ข้อมูลจากกองบำรุงพันธุ์สัตว์กรมปศุสัตว์ตั้งแต่พ.ศ. 2535-2545, [5]South Africa Holstein, [6]Fleckieg cow Australia and German, [7]Japaness Blackcow, [8]Iranian Holstein

4.2 จำนวนอัลลีล จำนวนจีโนไทป์ ความถี่ของยีน และ Linkage disequilibrium ของยีน FSHR กับยีน LHR

การศึกษาจำนวนอัลลีล จำนวนจีโนไทป์ และความถี่อัลลีล เพื่อตรวจสอบจำนวนทางเลือกของพันธุกรรมของยีน FSHR และยีน LHR ถ้าพบว่ายีนดังกล่าวพบจำนวนจีโนไทป์มากกว่าหนึ่งจีโนไทป์ จะชี้ให้เห็นถึงความเหมาะสมของยีนในการใช้เป็น Marker gene ในประชากรที่ศึกษา และในกรณีการศึกษาความถี่ของยีน FSHR และยีน LHR เป็นการตรวจสอบสัดส่วนอัลลีล และจีโนไทป์ที่ปรากฏในประชากรที่ศึกษา เพื่อพิจารณาว่าสัดส่วนอัลลีลและจีโนไทป์ที่พบในประชากรมีความเหมาะสมในการคัดเลือกหรือไม่ ซึ่งใช้เป็นข้อมูลในการวางแผนการปรับปรุงพันธุ์ต่อไป

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่ายีน FSHR มีความเหมาะสมในการเป็น Marker gene เนื่องจากพบจำนวนอัลลีล 2 อัลลีล คือ อัลลีล C กับ G และพบ 3 จีโนไทป์ได้แก่ CC (243, 63bp) CG (243/193 63/50bp) และ GG (193, 63/50bp) (ภาคผนวก ก.ภาพที่ 4) พบความถี่ของอัลลีล C สูงกว่าอัลลีล G (ตารางที่ 4.2)

ในกรณีของยีน LHR พบว่ายีนตำแหน่งที่ศึกษาครั้งนี้ไม่มีศักยภาพในการใช้เป็น Marker gene สำหรับประชากรนี้ เนื่องจากพบอัลลีล T ต่ำมาก (ตารางที่ 4.2) ทำให้ความถี่ของจีโนไทป์ TT ต่ำมาก จนไม่สามารถใช้ในการคัดเลือกได้ แม้ว่าการศึกษาครั้งนี้พบจำนวนอัลลีล 2 อัลลีล คือ อัลลีล C และ T และพบ 3 จีโนไทป์ ได้แก่ CC (155/148bp) CT (303, 155/148bp) และ TT (303bp) (ภาคผนวก ก. ภาพที่ 4) ตามสมมุติฐานที่ตั้งไว้

ตารางที่ 4.2 ความถี่อัลลีล จีโนไทป์ (จำนวนตัว) และ Linkage disequilibrium ของยีน FSHR และยีน LHR

Gene	Allele frequency		Genotypefrequency			Linkage-disequilibrium P-value
	C	**G**	**CC(40)**	**CG(74)**	**GG(10)**	
FSHR	0.62	0.38	0.39	0.47	0.14	0.17
	C	**T**	**CC(108)**	**CT(14)**	**TT(2)**	
LHR	0.93	0.07	0.86	0.13	0.01	

จากการวิเคราะห์ข้อมูลผลการศึกษาความถี่อัลลีลของยีน FSHR และยีน LHR ที่ศึกษาในครั้งนี้ร่วมกับข้อมูลงานวิจัย เพื่อสังเคราะห์ข้อสังเกตหรือการนำไปสู่การสร้างสมมุติฐานใหม่จากงานวิจัยที่ศึกษา โดยข้อมูลในการวิเคราะห์แสดงดังตารางที่ 4.3

จากตารางที่ 4.3 กรณียีน FSHR จะเห็นว่าในกลุ่มของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนโคนมพันธุ์แท้และโคเนื้อพบสัดส่วนระหว่างอัลลีล C กับอัลลีล G แตกต่างกัน ซึ่งความแตกต่างระหว่างสัดส่วนความถี่อัลลีล C กับอัลลีล G อาจบอกถึงวิวัฒนาการทางพันธุกรรมหรือแนวทางการคัดเลือกที่แตกต่างกัน และชี้ให้เห็นในประเด็นว่าตำแหน่งของยีน FSHR ที่ศึกษานี้เป็นตำแหน่งที่มีความเหมาะสมในการนำมาศึกษาเป็น Marker gene ในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนและโคเนื้อ

ในกรณียีน LHR พิจารณาสัดส่วนระหว่างอัลลีล C กับอัลลีล T ในโคนมลูกผสม โคนมพันธุ์แท้ และโคเนื้อพบข้อสังเกต คือ สัดส่วนระหว่างอัลลีล C กับอัลลีล T ในโคนมสอดคล้องกัน (ตารางที่ 4.3) ดังนั้นจากข้อสังเกตจึงมีสมมุติฐานว่าการพบอัลลีล T ต่ำมากเป็นลักษณะเฉพาะในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนโดยเฉพาะอย่างยิ่งในตำแหน่ง BTU20504 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่ายีน LHR ในตำแหน่ง BTU20504 ไม่เหมาะสมในการนำมาศึกษาเป็น Marker gene ในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน และการศึกษาความสัมพันธ์ของยีน LHR กับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์อาจต้องศึกษาตำแหน่งอื่นของยีนนี้

และจากข้อมูลงานวิจัยที่พบเพิ่มเติมหลังจากการทำงานวิจัย พบข้อมูลวิจัยของ Li-ping sun et al. (2012) รายงานว่ายีน LHR ณ ตำแหน่ง 51656G/T พบจำนวนอัลลีล 2 อัลลีล คือ อัลลีล G กับอัลลีล T โดยพบความถี่อัลลีล C กับความถี่อัลลีล T เป็น 0.25 และ 0.75 ตามลำดับ และตำแหน่ง 51703A/G พบ 2 อัลลีล คืออัลลีล A กับอัลลีล G โดยพบความถี่อัลลีล A กับความถี่อัลลีล G เป็น 0.55 และ 0.46 ตามลำดับ และข้อมูลวิจัยของ Ahmad (2010) รายงานว่ายีน LHR ณ ตำแหน่ง LHR_W467C พบจำนวนอัลลีล 2 อัลลีล คือ อัลลีล G กับอัลลีล T โดยพบความถี่อัลลีล C กับความถี่อัลลีล T เป็น 0.63 และ 0.37 ตามลำดับ ดังนั้นแสดงให้เห็นว่ายีน LHR ณ ตำแหน่ง 51656G/T ตำแหน่ง 51703A/G และตำแหน่ง LHR_W467C มีสัดส่วนอัลลีลที่เหมาะสมในการนำมาศึกษาเป็น Marker gene ในโคนม จึงเห็นว่าควรมีการศึกษาศักยภาพของยีน LHR ตำแหน่งดังกล่าวในโคนม

ตารางที่ 4.3 ข้อมูลผลการศึกษาและข้อมูลงานวิจัยความถี่อัลลีลของยีน FSHR และยีน LHR

Reference	Breed	AllelefrequencyFSHR gene		Genotype frequencyFSHR gene			AllelefrequencyLHR gene		Genotype frequencyLHR gene		
		C	G	CC	CG	GG	C	T	CC	CT	TT
ผลการศึกษาครั้งนี้	Holstein × Thai native	0.62	0.38	0.39	0.47	0.14	0.93	0.07	0.86	0.13	0.01
Aron et al. (2012)	Holstein *(Bos tuarus indicus*)	0.72	0.28	0.52	0.39	0.09	-	-	-	-	-
	Jersey	0.83	0.17	0.72	0.21	0.07	-	-	-	-	-
	Angus	0.47	0.53	0.25	0.44	0.31	-	-	-	-	-
	Charolais	0.59	0.41	0.41	0.37	0.22	-	-	-	-	-
Shirazuna et al. (2011)	Holsteinuniversityfarm	0.05	0.95	-	0.10	0.90	1	0	1	-	-
	Holsteincommercialfarm	0	1	-	-	1.00	0.81	0.19	0.62	0.38	-
Ahmad (2010)	Holstein cow	0.76	0.24	0.58	0.36	0.06	0.87	0.13	0.76	0.23	0.01
Marson et al. (2008)	A	0.50	0.50	0.27	0.46	0.27	0.64	0.36	0.36	0.55	0.09
	B	0.43	0.57	0.13	0.61	0.26	0.74	0.26	0.53	0.42	0.53
	C	0.51	0.49	0.25	0.53	0.23	0.76	0.24	0.57	0.37	0.06
	D	0.42	0.58	0.18	0.47	0.35	0.66	0.34	0.40	0.53	0.07
	E	0.53	0.47	0.19	0.67	0.14	0.68	0.32	0.36	0.64	-
	F	0.53	0.47	0.13	0.79	0.08	0.58	0.42	0.15	0.85	-

หมายเหตุ : A : 25% Zebu × 25% Adapted × 25% British × 25% Contineral,B : 25% Zebu × 25% Adapted × 25% Contineral, C : 25% Zebu × 50% Adapted × 25% British, D : 25% Zebu ×50% Adapted × 25% British (2^{a}geracao), E : 50% Zebu × 50% Contineral, F : 50% Zebu × 50% British

การทดสอบสภาพ Linkage disequilibrium ระหว่างยีน FSHR กับยีน LHR เพื่อเป็นข้อมูลให้ทราบการเกิดรูปแบบของอัลลีลหนึ่งของยีน FSHR จะส่งผลต่อการเกิดรูปแบบอัลลีลหนึ่งของยีน LHR หรือไม่ โดยข้อมูลดังกล่าวจะเป็นแนวทางในการศึกษาหรือวางแผนการใช้ประโยชน์ทั้งสองยีนนี้คัดเลือก เช่น ในกรณีที่ยีน FSHR กับ ยีน LHR มี Linkage disequilibrium ต่อกันควรพิจารณาใช้รูปแบบ Haplotype หรือ Composit genotype ในการคัดเลือก หรือในกรณีที่ยีน FSHR กับ ยีน LHR ไม่พบ Linkage disequilibrium ต่อกัน ทำให้สะดวกต่อการคัดเลือกเพราะยีนทั้งสองเป็นอิสระต่อกันในการนำมาใช้คัดเลือก ผลการศึกษาพบว่ายีน FSHR กับยีน LHR ไม่มี Linkage disequilibrium ต่อกัน ($P>0.05$) (ตารางที่ 4.2)

จากการพิจารณาทฤษฎีสูตรการคำนวณ Linkage disequilibrium การศึกษานี้คำนวณจาก

D_{ij}= (ความถี่อัลลีลของยีนทั้งสองตำแหน่ง) - (ความถี่ของอัลลีลยีน FSHR) (ความถี่ของอัลลีลยีน LHR)

เมื่อ D_{ij}คือโอกาสของการรวมกันของอัลลีล 2 ตำแหน่งของยีน FSHR และยีน LHR

เมื่อพิจารณาจากสูตรที่แสดงชี้ให้เห็นว่า ในการศึกษานี้พบความถี่อัลลีล T ของยีน LHR ต่ำมากทำให้ค่า D_{ij} ที่คำนวณได้จากค่าสังเกตมีค่าต่ำ ซึ่งค่า D_{ij} ดังกล่าวนี้นำไปทดสอบความแตกต่างทางสถิติด้วยตัวสถิติ Chi-square ดังสูตร

$$x^2 = \sum_i \frac{(O_i - E_i)^2}{E_i}$$

เมื่อ O_iคือ ความถี่ของอัลลีลค่าสังเกต (D_{ij}) หรือ E_iคือ ความถี่ของอัลลีลที่คาดหวัง

ดังนั้นจากสูตรคำนวณชี้ให้เห็นว่าค่า D_{ij} ที่ต่ำส่งผลให้ค่า Chi-square ที่คำนวณได้มีค่าต่ำด้วย จึงทำให้ให้ค่า Chi-square ที่คำนวณได้มีค่าต่ำกว่าค่ายอมรับระดับนัยสำคัญที่เทียบค่าในตารางแจกแจง Chi-square ดังนั้นการพบอัลลีล T ของยีน LHR ต่ำมาก จึงทำให้การศึกษานี้ไม่เป็นไปตามสมมุติฐานข้อสอง

4.3 อิทธิพลของยีน FSHR ต่อความสมบูรณ์พันธุ์

เพื่อนำมาสู่ข้อสรุปว่ายีน FSHR มีความเหมาะสมในการเป็น Marker gene หรือไม่จึงศึกษาอิทธิพลของทั้งสองยีนต่อความสมบูรณ์พันธุ์โดยการศึกษานี้ใช้ลักษณะจำนวนครั้งการผสมติด ลักษณะจำนวนวันท้องว่าง ลักษณะระยะห่างการให้ลูก และลักษณะอัตราการผสมติดเป็นตัวชี้วัดลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ โดยสมมุติฐานของงานนี้คือยีน FSHR มีความสัมพันธ์กับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ซึ่งผลการศึกษานี้ไม่เป็นไปตามสมมุติฐานโดยมีรายละเอียดดังนี้

ผลการศึกษาพบว่ายีน FSHR ไม่มีความสัมพันธ์กับจำนวนครั้งการผสมติด จำนวนวันท้องว่าง ระยะห่างการให้ลูก และอัตราการผสมติด (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 อิทธิพลของยีน FSHR ต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์

Traits	Mean ± SE (Effect of genotype± SE)		
	CC	CG	GG
จำนวนครั้งการผสมติด (ครั้ง)	2.79±0.28	2.47±0.22	3.69±0.59
	(-0.90±0.55)	(-1.23±0.53)	-
จำนวนวันท้องว่าง (วัน)	192.81±19.29	181.41±15.52	150.35±40.74
	(42.46±38.16)	(31.6±36.85)	-
ระยะห่างการให้ลูก (วัน)	459.54±21.11	435.50±17.15	456.73±367.37
	(2.81±42.23)	(-21.23±41.44)	-
เปอร์เซ็นการผสมติด (%)	54.38±6.21	58.76±4.50	45.55±13.17
	(8.83±12.31)	(13.21±11.93)	-

เนื่องจากก่อนการทำงานวิจัยนี้ปรากฏเพียงข้อมูลงานวิจัย Marson et al.(2008) รายงานว่าผลการศึกษาไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างยีน FSHR และยีน LHR กับอัตราการตั้งท้องในโคผสมระหว่าง *Bos Taurus* × *Bosindicus* เท่านั้น ซึ่งการปรากฏข้อมูลวิจัยเพียงชิ้นเดียวนักวิจัยไม่สามารถประเมินข้อสรุปศักยภาพของยีน FSHR กับยีน LHR ได้แต่อย่างไรก็ตามจากทฤษฎีฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเป็นสัดในโคและข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน FSHR กับยีน LHR ในมนุษย์และหนู ชี้ให้เห็นว่าการกลายพันธุ์ของยีน FSHR ในคนส่งผลให้ระบบรังไข่ล้มเหลว (Ghadami et al.,2010); (Dimitris et al., 2006); (Rannikko et al., 2002) ในทำนองเดียวกัน Varkha et al. (2011) พบว่าการที่ยีน FSHR และยีน LHR ทำงานผิดปกติส่งผลให้รบกวนการปลูกฝังตัวอ่อนระยะ Blastocyst ดังนั้นจากทฤษฎีฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเป็นสัดในโคประกอบกับข้อมูลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน FSHR กับยีน LHR ในมนุษย์และหนูจึงเป็นที่มาการตั้งสมมุติฐานว่ายีน FSHR และยีน LHR มีความสัมพันธ์กับลักษณะความสมบูรณ์

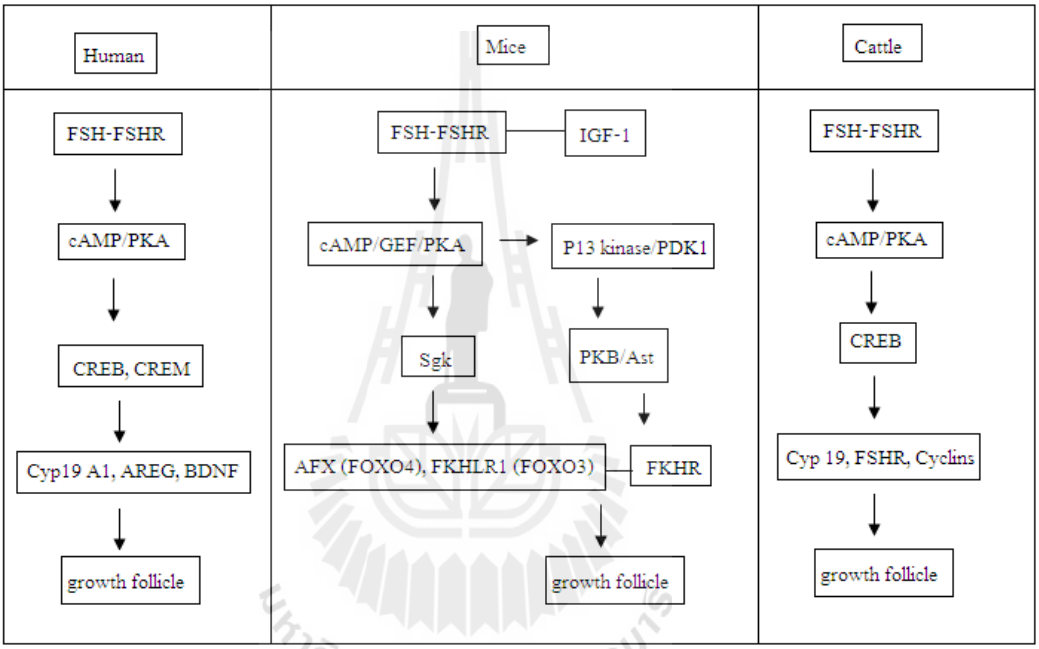
อย่างไรก็ตามผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า อิทธิพลของยีน FSHR ไม่มีอิทธิพลที่มีนัยสำคัญต่อลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ ซึ่งไม่เป็นไปตามสมมุติฐานที่ตั้งไว้จึงจำเป็นต้องอธิบายผลการศึกษาครั้งนี้ว่าเหตุใดจึงเป็นเช่นนั้น จากการวิเคราะห์ทฤษฎีและงานวิจัยที่มีเพิ่มเติมสามารถสรุปสาเหตุที่ทำให้ผลการศึกษานี้ไม่เป็นไปตามสมมุติฐานได้ดังนี้

สาเหตุที่หนึ่ง คือ จากทฤษฎีการแสดงออกของยีน FSHR แสดงออกโดยตรงในการผลิตตัวรับ (Receptor) ที่จำเพาะของฮอร์โมน FSH เพื่อพัฒนา Follicle ให้สุกเต็มที่เมื่อ Follicle เจริญเติบโตเต็มที่แล้วยีน FSHR จะกระตุ้นปัจจัยที่ส่งผลให้เกิดการสร้างฮอร์โมน Estrogen ซึ่งมีหน้าที่ในการพัฒนาเซลล์สร้างน้ำนมทดแทนและแสดงอาการเป็นสัดในโค จากที่กล่าวเห็นว่าควรนำข้อมูลลักษณะการเป็นสัดหลังคลอดมาใช้เป็นลักษณะที่ศึกษาครั้งนี้ด้วย แต่เนื่องจากไม่มีการบันทึกข้อมูลนี้จึงไม่ได้นำมาศึกษาซึ่ง จากทฤษฎีการแสดงออกของยีน FSHR เห็นว่าลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ที่นำมาศึกษาครั้งนี้เป็นลักษณะปลายทาง จากผลการแสดงออกของยีน FSHR จึงส่งผลให้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของยีนกับลักษณะที่นำมาศึกษา

อย่างไรก็ตามเหตุที่การศึกษาครั้งนี้ใช้ข้อมูลลักษณะจำนวนครั้งการผสมติด จำนวนวันท้องว่าง ระยะห่างการให้ลูก อัตราการผสมติดในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีนกับความสมบูรณ์พันธุ์ เนื่องจากมีแนวคิดว่าลักษณะเหล่านี้เป็นลักษณะที่มีความสะดวกในการจัดเก็บข้อมูลและไม่เสียค่าใช้จ่ายในการจัดเก็บข้อมูล ถ้าผลการศึกษาพบความสัมพันธ์ระหว่างยีน FSHR กับลักษณะที่นำมาศึกษามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ จะทำให้ทราบว่าสามารถใช้ข้อมูลลักษณะปรากฏหาความสัมพันธ์กับยีน FSHR ได้โดยไม่ต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการเก็บข้อมูล อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ที่มีนัยสำคัญระหว่างยีนกับลักษณะดังกล่าว ดังนั้นในการศึกษาต่อไปควรศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนไข่ตกกับการแสดงออกของยีน FSHR เพื่อเป็นข้อมูลในการคัดเลือกจีโนไทป์ที่มีศักยภาพในการแสดงออกด้านการเหนี่ยวนำสู่การพัฒนา follicle ที่เจริญรอการตกไข่

สาเหตุที่สอง คือ จากการศึกษาผลงานวิจัยของ Heng-Yu et al. (2010) ได้รายงานหลังจากการศึกษาครั้งนี้ได้เริ่มไปแล้วพบว่า กระบวนการพัฒนา Follicle และคัดเลือกไข่ที่สุกพร้อมตกจนถึงกระบวนการตกไข่ในรอบการเป็นสัดในโคนั้น นอกจากยีน FSHR และยีน LHR แล้วยังมีกลุ่มยีนกับปัจจัยอื่นที่ทำงานร่วมกัน เช่น cAMP PKA phosphorylation cascade CREB transcription factor ยีน Areg ยีน Ereg ยีน Cyp11a1 ยีน Ptgs2 ยีน star และ ยีน sfrp 4 ซึ่งการแสดงออกของยีน FSHR กับยีน LHR เป็นส่วนหนึ่งในการร่วมส่งสัญญาณของฮอร์โมนให้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ จนนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงขบวนการเตรียมพร้อมภายในร่างกายก่อนที่จะแสดงพฤติกรรมการเป็นสัดออกมา จากการตรวจเอกสารข้อมูลงานวิจัยเพิ่มพบข้อแตกต่างของกลไกส่งสัญญาณการพัฒนา Follicle และกระบวนการตกไข่ในมนุษย์ หนู และโค อธิบายได้ดังนี้

กลไกการส่งสัญญาณการพัฒนา Follicle และการตกไข่ของมนุษย์หนูและโคนมยังไม่ชัดเจน แต่อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ข้อมูลงานวิจัยร่วมกับทฤษฎีที่ปรากฏในปัจจุบันพบว่า ในกรณียีน FSHR ในมนุษย์ หนู และโคนม มีอวัยวะเป้าหมายในการแสดงออกของยีนอยู่ที่ Granulosa cell ในรังไข่ (Ovary) โดยยีนมีหน้าที่ในการผลิตตัวรับ (Receptor) ของฮอร์โมน FSH เรียกว่า FSHR เพื่อเข้าจับกับฮอร์โมน FSH บริเวณ Granulosa cell ในรังไข่ (Ovary) พบข้อแตกต่างของกลไกการส่งสัญญาณการพัฒนา Follicle ของมนุษย์ หนู และโคนม ซึ่งสังเคราะห์จากงานวิจัยของ Heng-Yu et al. (2010); Brendan et al. (2007); Joanne et al. (2002) แสดงดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 กลไกการส่งสัญญาณการพัฒนา follicle ในมนุษย์หนูและโค

จากภาพที่ 4.1 ชี้ให้เห็นปัจจัยที่เหมือนกันและแตกต่างกันที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีน FSHR ในมนุษย์ หนู และโคนม ซึ่งจุดที่เหมือนกัน คือ ฮอร์โมน FSH ส่งสัญญาณผ่านตัวรับเชื่อมกับโปรตีน G จากข้อมูลทฤษฎีของ สุกัญญา และวิเชียร (2553) อธิบายการส่งสัญญาณของฮอร์โมน ซึ่งเริ่มต้นด้วยฮอร์โมน FSH จับกับ FSHR ที่บริเวณผิวเซลล์จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงรูปของตัวรับสัญญาณ ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นโปรตีน G (Heterotrimeric G protein) ซึ่งยึดติดอยู่กับเยื่อเซลล์ทางด้าน Cytoplasm ด้วยหมู่โพรสเทติกที่เป็นกรดไขมันโปรตีน G ประกอบด้วยหน่วยย่อย3หน่วยคือ α, β และ γ ในสภาวะปกติโปรตีน G ไม่ทำงานหน่วยย่อย α จับอยู่กับ GDP เมื่อถูกกระตุ้นโครงรูปของหน่วยย่อย α เปลี่ยนแปลงไปมีความจำเพาะกับ GTP มากขึ้นจึงเข้าแทนที่ GDP ซึ่งส่งผลให้โครงรูปของไทรเมอร์เปลี่ยนแปลงทำให้หน่วยย่อย α แยกตัวออกจากหน่วยย่อยเชิงซ้อน β และ γ เกิดเป็นเอนไซม์จีทีพีเอส (GT Pase) ที่ทำงานได้สามารถเร่งการสลาย GTP ให้เป็น

GDP โดยเป้าหมายที่สำคัญของหน่วยย่อย α คือ Adenylate cyclase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน ATP เป็น cAMP โดยในกรณีของฮอร์โมน FSH โปรตีน G เป็นโปรตีน G กระตุ้น (Stimulatory G Protein, Gs) ซึ่งกระตุ้นการทำงานของ Adenylate cyclase ให้สร้าง cAMP มากขึ้น ซึ่ง cAMP ทำหน้าที่เป็นสารทุติยภูมิ (Secondary messenger) ของฮอร์โมน FSH ซึ่งเป็นตัวนำสารปฐมภูมิ (Primary messenger)โดย cAMP จะเป็นตัวกระตุ้นนำสารในระดับต่อมาซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวเปิด-ปิด (Switch) ของกระบวนการพัฒนาของ Follicle และสร้างฮอร์โมน Estrogen โดย cAMP ไปกระตุ้นเอนไซม์โปรตีนไคเนส (Protein kinase) แล้วโปรตีนไคเนส (Protein kinase) ใช้ ATP เป็นซับสเตรตไปเร่งปฏิกิริยาการเติมหมู่ฟอสเฟตที่ Serine acid และ Threonine acid บนเอนไซม์เป้าหมายทำให้หมู่ไฮดรอกซิลของกรดอะมิโนดังกล่าวที่เดิมมีคุณสมบัติเป็นขั้ว และไม่มีประจุจะมีประจุเพราะหมู่ฟอสเฟตเพิ่มมากขึ้นการเปลี่ยนแปลงนี้ส่งผลให้โครงสร้างของโมเลกุลเปลี่ยนไปจนถึงบริเวณเร่งปฏิกิริยาซึ่งอาจส่งผลให้การเร่งปฏิกิริยาดีขึ้นหรือเลวลงกว่าเดิมเป็นผลให้เอนไซม์ที่อยู่ในสภาพที่ไม่ทำงานกลับมาทำงานได้ซึ่งตัวนำสารทุติยภูมิ cAMP ที่สำแดงผลโดยไปกระตุ้นโปรตีนไคเนส A (Protein kinase A, PKA) เร่งปฏิกิริยาได้ดีขึ้นซึ่งโปรตีนไคเนส A (Protein kinase A, PKA) ประกอบขึ้นมาจากพอลิเพปไทด์ 4 สายแต่ละสายเรียกว่า1หน่วยย่อย (Subunit) แบ่งหน่วยย่อยได้เป็น 2 ชนิดได้แก่หน่วยย่อยเร่งปฏิกิริยา (Catalytic subunit, C) 2 หน่วยและหน่วยย่อยควบคุม (Regulatory subunit, R) 2 หน่วยเมื่อหน่วยย่อยยังรวมกันอยู่นั้นหน่วยย่อยจะควบคุมปิดกั้นบริเวณเร่งของเอนไซม์ในหน่วยย่อยเร่งปฏิกิริยา (Catalytic subunit, C) ทำให้ไม่สามารถเร่งปฏิกิริยาเติมหมู่ฟอสเฟตได้แต่เมื่อ cAMP4 โมเลกุลเข้าจับกับหน่วยควบคุม (Regulatory subunit, R) ซึ่งเหนี่ยวนำให้หน่วยควบคุม (Regulatory subunit, R) เปลี่ยนแปลงโครงสร้างสามมิติและหลุดออกทำให้หน่วยเร่งปฏิกิริยา (Catalytic subunit, C) เป็นอิสระและสามารถทำงานกระตุ้นปัจจัยที่แตกต่างกันในมนุษย์ หนู และโค เพื่อให้เกิดการพัฒนา Follicle ดังนี้

หลังจากที่ผ่านการส่งสัญญาณ cAMP/ PKA/ phosphorylation cascade แล้วจุดแตกต่างในการแสดงออกของยีน FSHR ในมนุษย์ หนู และโค คือ Factor และยีนร่วมในกลไกการเกิดการพัฒนาfollicleโดยอธิบายแยกเป็นกรณี คือ กรณีในมนุษย์ใช้ CREB CREM factor และยีน Cyp19A1 ในการร่วมแสดงออกของยีน FSHR และยังไม่เป็นที่ชัดเจนว่ายีน AREG ยีน BDNF มีส่วนเกี่ยวข้องในการร่วมแสดงออกหรือไม่ (Agne et al., 2013) กรณีในหนูใช้ Sgk factor และยีน IGF-1 ยีน AFX (FOXO4) ยีน FKHRL1 (FOXO3) และยีน FKHR ในการร่วมแสดงออกของยีน FSHR (Brendan et al., 2007); (Joanne et al.,2002) และกรณีในโคใช้ CREB factor และยีน Cyp19 ยีน FSHR และยีน Cyclin ในการร่วมแสดงออกของยีน FSHR (Heng-Yu et al.,2010) ซึ่งข้อมูลงานวิจัยที่กล่าวยังไม่ชัดเจนว่าในกระบวนการการพัฒนา Follicle จะมี Factor หรือยีนใดอีกในการร่วมกันเพื่อให้เกิดการพัฒนา Follicle

สาเหตุที่สาม เป็นไปได้ว่ายีน FSHR ณ ตำแหน่ง NM_174061 ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้อาจไม่มีผลโดยตรงต่อกระบวนการการพัฒนา follicle จากรายงานของ Ahmad (2010) พบว่ายีน FSHR ในบริเวณ Exon ที่ 10 ได้แก่ FSHR_S596s FSHR_N669N FSHR_T685T และ FSHR_T658S มีความสัมพันธ์กับระยะห่างการให้ลูก วันที่ผสมติดครั้งแรก อัตราการผสมติด และจำนวนครั้งการผสมติดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปควรเลือกบริเวณดังกล่าวเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างยีนกับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ซึ่งเป็นอีกประเด็นที่น่าสนใจ

จากการวิเคราะห์สาเหตุทั้งสามข้อที่ทำให้ผลการศึกษาครั้งนี้ไม่เป็นไปตามสมมุติฐาน สามารถสังเคราะห์เป็นประเด็นในการศึกษาเพิ่มเติมดังนี้

- การศึกษาอิทธิพลของยีน FSHR ตำแหน่งที่ศึกษานี้ควรเก็บข้อมูลเชิงลึกเช่นจำนวนไข่ที่ตก เพื่อเป็นข้อมูลในการคัดเลือกจีโนไทป์ของยีน FSHR ที่แสดงออกต่อการพัฒนา follicle อย่างมีประสิทธิภาพที่สุด
- การศึกษาอิทธิพลของยีน FSHR ควรศึกษาร่วมกับยีน Cyp19 และยีน Cyclin เนื่องจากมีบทบาทร่วมกันในกลไกการพัฒนา follicle
- ศึกษายีน FSHR ตำแหน่ง FSHR_S596s FSHR_N669N FSHR_T685T และ FSHR_T658S ที่ปรากฏข้อมูลงานวิจัย ที่ผลการศึกษารายงานการพบความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของทั้งสองยีนกับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์

อนึ่งการศึกษาในประเด็นเหล่านี้เป็นความพยายามที่จะหายีนที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ในโคนม และถ้าพบความสัมพันธ์จะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมในอนาคต

4.4 สหสัมพันธ์ของค่า EBV เมื่อมีอิทธิพลของยีนเป็นปัจจัยคงที่ในตัวแบบตัวสัตว์และไม่มีอิทธิพลของยีนเป็นปัจจัยคงที่ในตัวแบบตัวสัตว์

วัตถุประสงค์ของการทดสอบ Rankcor relation ของค่า EBV (ทดสอบการเปลี่ยนแปลงลำดับค่า EBV) ที่มีการใช้ยีน FSHR และยีน LHR เป็น Marker gene เป็นปัจจัยร่วมในการประเมินค่า EBV ของลักษณะที่เกี่ยวข้องกับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซี่ยน เพื่อเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์ในการจัดระบบการจัดเก็บข้อมูลที่ใช้ประเมินค่า EBV ของโคนมในประเทศ และในกรณีที่การทดสอบลำดับค่า EBV มีการเปลี่ยนแปลง เป็นการชี้ให้เห็นว่าการใช้ข้อมูลจีโนไทป์ร่วมประเมินค่า EBV ส่งผลต่อการคัดเลือกโคนมที่มีศักยภาพทางพันธุกรรมอย่างแท้จริง และนักปรับปรุงพันธุ์อาจต้องพิจารณาให้รอบคอบถึงการศึกษาในเรื่องความแม่นยำของตัวแบบตัวสัตว์ต่อไปก่อนจะสรุปว่าจะนำไปใช้หรือไม่ ส่วนในกรณีที่การทดสอบลำดับค่า EBV ไม่มีการเปลี่ยนแปลง เป็นการชี้ให้เห็นว่าการใช้ข้อมูลจีโนไทป์ของยีนหรือไม่ใช้ ไม่ทำให้ลำดับของสัตว์ที่ถูก

คัด เลือกเปลี่ยนแปลงไป เพราะฉะนั้นในการประยุกต์ใช้เราสามารถใช้ลดระยะเวลาในการคัดเลือกทำให้การคัดเลือกทำได้เร็วขึ้น โดยเราสามารถใช้ข้อมูลจีโนไทป์ของสัตว์ที่ยังไม่แสดงลักษณะปรากฏออก มาร่วมกับข้อมูลลักษณะปรากฏของเครือญาติในการประเมินค่า EBV ของตัวสัตว์ได้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาที่กล่าวในบทที่ 4 สรุปได้ว่ายีน FSHR และยีน LHR ในตำแหน่งที่ศึกษาครั้งนี้ยังไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็น Marker gene ในประชากรที่ศึกษาได้

ดังนั้นเพื่อให้ทราบแน่ชัดในประเด็นความสัมพันธ์ระหว่างยีน FSHR กับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนควรศึกษาเพิ่มในประเด็นดังนี้

- การศึกษาอิทธิพลของยีน FSHR ตำแหน่งที่ศึกษานี้ควรเก็บข้อมูลเชิงลึกเช่นจำนวนไข่ตก เพื่อเป็นข้อมูลในการคัดเลือกจีโนไทป์ของยีน FSHR ที่แสดงออกต่อการพัฒนา follicle อย่างมีประสิทธิภาพที่สุด
- การศึกษาอิทธิพลของยีน FSHR ควรศึกษาร่วมกับยีน Cyp19 และยีน Cyclin เนื่องจากมีบทบาทร่วมกันในกลไกการพัฒนา follicle
- ศึกษายีน FSHR ตำแหน่ง FSHR_S596s FSHR_N669N FSHR_T685T และ FSHR_T658S ที่ปรากฏข้อมูลงานวิจัย ที่ผลการศึกษารายงานการพบความสัมพันธ์ระหว่างอิทธิพลของทั้งสองยีนกับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์

ส่วนกรณียีน LHR นั้นเมื่อพิจารณาร่วมกับงานวิจัยก่อนหน้านี้นำมาสู่ข้อสรุปได้ว่ายีน LHR ณ ตำแหน่ง BTU20504 ซึ่งเป็นบริเวณที่เลือกมาศึกษาครั้งนี้ ไม่มีความเหมาะสมในการนำมาศึกษาศักยภาพของการใช้เป็น Marker gene ในโคนม เนื่องจากไม่มี Polymorphism แต่อย่างไรก็ตามพบข้อมูลงานวิจัยที่ชี้ให้เห็นถึงตำแหน่งที่น่าสนใจในการนำมาศึกษาศักยภาพของยีน LHR ได้แก่ ตำแหน่ง 51656G/T ตำแหน่ง 51703A/G และตำแหน่ง LHR_W467C ในประเด็นสัดส่วนความถี่อัลลีล และประเด็นอิทธิพลของยีนกับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์

ข้อเสนอแนะในการใช้ประโยชน์ด้านการขยายผลงานวิจัยสู่เกษตรกร

1. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีควรสร้างกลุ่มเครือข่ายเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมที่มีคุณสมบัติเหมาะสมกับเทคโนโลยีที่จะนำมาใช้ โดยการสำรวจและคัดเลือกกลุ่มเกษตรกรที่ยอมรับข้อตกลงในการเป็นสมาชิกกลุ่มเครือข่ายได้ ซึ่งข้อตกลงหลักของการเป็นกลุ่มสมาชิกคือการมีระเบียบและวินัยในการเก็บข้อมูลการผลิต ข้อมูลการจัดการ และข้อมูลพันธุ์ประวัติ

2. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีต้องตระหนักถึงความสำคัญในระบบการจัดเก็บข้อมูลของฝูงโคนมในองค์กร เพื่อนำข้อมูลมาใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกพันธุกรรมที่มีคุณภาพอย่างแท้จริงกระจายสู่ฟาร์มกลุ่มเครือข่าย โดยนักวิชาการมหาวิทยาลัยเป็นผู้นำข้อมูลมาประยุกต์ใช้

ร่วมกับเทคโนโลยี Marker gene ในการพัฒนาพันธุกรรมในลักษณะเศรษฐกิจของฝูงโคนม มหาวิทยาลัย แล้วผลิตโคสาวที่ผ่านการคัดเลือกพันธุกรรมที่เหมาะสมกับประเทศจำหน่ายให้กลุ่มเครือข่ายผู้เลี้ยงโคนม พร้อมทั้งสร้างความสัมพันธ์ต่อเนื่องด้วยการติดตามข้อมูลจากกลุ่มเครือข่าย อีกทั้งให้คำปรึกษาด้านวิชาการและช่วยดูแลในกรณีที่กลุ่มเครือข่ายประสบปัญหาในฟาร์ม

3. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีควรมีกลยุทธ์สร้างแรงจูงใจในกลุ่มเครือข่าย เช่น มหาวิทยาลัยรับซื้อน้ำนมจากกลุ่มเครือข่ายในราคาสูงกว่าตลาด และใช้กลยุทธ์ทางการตลาดผลักดันผลิตภัณฑ์นมแปรรูปให้แข่งขันและติดตลาดได้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายการอ้างอิง

จินดา สนิทวงศ์, ธวัชชัย สุวรรณกำจาย และศศิธร ถิ่นนคร. (2543). ผลของระดับโปรตีนในอาหารข้นสำหรับโครีดนมในสภาพอาหารหยาบคุณภาพต่ำ. **รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2543.** 147-156.

ชนิตา สุจริตธัญตระกูล, กฤษฎา บำรุงกกิจ และศุภชาติ ปานเนียม. (2553). สมรรถภาพระบบสืบพันธุ์โคนมของฟาร์มโคนมในเขตอำเภอโพธารามจังหวัดราชบุรี. **รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์** สาขาสัตวแพทย์ศาสตร์ครั้งที่ 48. 274-282.

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

วิชัย ทิพย์วงค์, มนต์ชัย ดวงจินดา, เทวินทร์ วงษ์พระลับ, วิโรจน์ ภัทรจินดา และจินตนา วงศ์นาคนา กร. (2548). การประมาณค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมของลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ในโคนม**สัมมนาวิชาการเกษตรประจำปี** 2548. 99-100.

สุกัญญา สุนทรส และวิเชียร ริมพณิชยกิจ. (2553). **ชีวโมเลกุล.** จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมเกียรติ ประสานพานิช, ชลลดา รัตนวิเชียร และพีระ ไชยรุตต์. (2542). ผลผลิตและการสืบพันธุ์ของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนระดับสายเลือดต่างๆภายใต้การเลี้ยงดูขององค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย(อสค.). **การประชุมทางวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 37.** 174-182.

สุรางค์ นุชประยูร, จินตนา จิรถาวร, ณัฏฐิยา หิรัญกาญจน์. (2546). **เวชศาสตร์โมเลกุล.** จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์, กรมปศุสัตว์.(2554). **ดัชนีบ่งชี้ประสิทธิภาพระบบสืบพันธุ์ของโคนม[ออนไลน์].** ได้จากhttp://kaset2.blogspot.com/p/11.html

อดิศร ยะวงศา, คมเดช จีนะเจริญ, วันดี รุ่งรัตนาอุบล และธีระ รักความสุข. (2550). ประสิทธิภาพของแม่โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยนในฟาร์มรายย่อยเขตอำเภอกำแพงแสนจังหวัดนครปฐม. **รายงานการประชุมวิชาการครั้งที่ 41.** 274-282.

Agne Velthut-Meikas, Jaaksimm, Timo Tuuri, Juha S. Tapaninen, Madis Metsis and Andress Salumets. (2013). **Small Rna-seq of human granulose cells reveals miRNAs in FSHR and aromatase genes.**[on-line]. Available :http://mend.endojournals.org/content/early/2013/05/08/ me.2013-1058.abstract

Alan A Arslan., Anne Zeleniuch-Jacquotte1, AnnekatrinLukanova, Sabina Rinaldi, Rudolf Kaaks, and Paolo Toniolo. (2003). Reliability of follicle-stimulating hormone measurements in serum. **Reproductive Biology and Endocrinology**.1;49.

Aron T. Cory, Christopher A. Price, Rejean Befebvre and Marie-France Polin. (2012). Identification of singlenucleotide polymorphisms in the bovine follicle –stimulating hormone receptor and effects of genotypes on superovulatory response traits. **Animal Genetics.** 44 ; 197-201.

Arough – Hadi Faraji, Ali Asghar Aslaminejad, Homayun Farhangfar. (2011). Estimation of genetic parameters and trends for age at frist calving and calving interval in Iranian Hostein cows. **Journal Agriculture science.** 7(1) ; 79-87.

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

Ahmad Sausan Aziz. (2010). Application of BLUP in prediction of breeding values and estimation of SNP effects in dairy cattle. **Thesis submitted to the University of Nottingham for the degree of Doctor of Philosophy.**

Brendan, D., Looyenga and Gary D. Hammer. (2007). Genetic removal of Smad3 from inhibin-null mice attenuates tumor progression by uncoupling extracellular mitogenic signals from the cell cycle machinery. **Journal of Molecular Endocrinology.** 21(10) ; 2440-2457.

Biffani, S., R Canavesi, A. B. Samore. (2005). estimate of genetics parameter for fertility traits of Italain hostein- freisian cattle. **STOCARSTVO.** 2; 145-153.

Boichard, D., S. Fritz 1, M.N. Rossignol , F. Guillaume, J.J. Colleau, and T. Druet. (2006). implementation of marker–assisted selection : practical lessons from dairy cattle. **Genetics Applied to Livestock Production.** 13-18 .

Dimitris Loutradis, EleniPatsoula,Vassilis Minas, Giorgos A. Koussidis, Aristeidis Antsaklis, Stylianos Michalas, and Antonis Makrigiannakis. (2006). FSH receptor gene polymorphisms have a role for different ovarian response to stimulation in patients entering IVF/ICSI-ET programs. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics.**

Driver, A.M., W. Huang, S. Gajic, R.L. Monson, G.J.M. Rosa, and H. Khatib. (2009). Effect of Progesterone receptor variants on fertility traits in cattle. **Journal of Dairy Science.** 92 ; 4082-4085.

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

Ghadami, M., E. EI-Demerdash, S.A. Salama, A.A. Binhazim, A.E. Archibong, X. Chen, B.R. Ballard, M.R. Sairam, and A.A I-Hendy. (2010). Toward gene therapy of premature ovarian failure : intraovurian injection of adenovirus expressing human FSH receptor restores. **Molecular Human Reproduction.** 16(4) ; 241-250.

Gonzalez-Recio, O.,E. Lopezde Maturana, and J.P. Gutierrez. (2007). Inbreeding depression on Female fertility and calvingease in Spanish dairy cattle. **Journal of Dairy Science.** 90 ; 5744-5752.

Gredler, B., C. Fuerstand J. Solkner. (2007). Analysis of new fertility traits for the joint genetic evaluation in Austria and Germany. **Interbull Bulletin.** 23 ; 152-155.

Haja, N. Kadarmideena., Robin Thompsonb, Michael P. Coffey, Mohamad A. Kossaibati. (2003). Genetic parameters and evaluations from single- and multipletrait analysis of dairy cow fertility and milk production. **Livestock Production Science.** 81 ; 183–195.

Hafez, E.S.E., and B. Hafez. (2000). Reproduction in Farm Animals. 7th ed. **Wolters Kluwer Company, USA.**

Heng-YuFan, Annalouise o' Connor, Manami Shitanaka, Masayuki Shimada, Zhilinliu, and Joannes. (2010). β –Catenin (CTNNB1) promotes preovulatory follicular development but represses LH-mediated ovulation and luteinization. **Journal of Molecular Endicrineology.** 24(8) ; 1529-1542.

Hernandez–Cruz, B.C.,P. Cervantes–Acocta, F. Montiel–Palacios, R. Canseco–Sedana, and A. Carrasco–Garcia. (2009). Allele variants of FSHR gene in cow of different genotypes in mexico. **Journal of Animal and Veterinary Advances.** 8(12) ; 2489-2494.

Jedrzejczak Magodalena, Wilhelm Grzesiak, Iwona Szatkowska, Andrzej Dybus, Daniel Zaborski. (2011). Association between polymorphisms of cyp19, Cyp21, and ER1genes and milk production traits in Black-and-White cattle.Trurk. **Journal of Veterinary and Animal Science.** 35(1) ; 41-49.

Jérôme Levallet, Pirjo Pakarinen and Ilpo T. Huhtaniemi. (1999). Follicle-Stimulating Hormone ligand and receptor mutations, and gonadal dysfunction. **Archives of Medical Research.** 30 ;486–494.

Joanne S. Richards, Darryl L. Russell, Scott Ochsner, Minnie Hsieh, Kari H. Doyle, Allison E. Falender, Yuet K. Lo and S. Chidananda Sharma. (2002). Novel signaling pathway that control ovarian follicular development ovulation, and luteinization. **The Endocrine Society.** 195-220.

Kaps, M. and W.R.L amberson. (2004). Biostatistic for animal science.**CABI Publishing USA.**

Li-Ping Sun, Qing-Zhi Du, Ya-Pan Song, Jun-Na Yu, Shu-Juan Wang, Lei Sang, Luo-Wen Song, Yao-Min Yue, Yu-ZeLian, Sheng-Li Zhang, Guo-Hua Hua, Shu-Jun Zhang, Li-Guo Yang. (2012). Polymorphism in luteinizing hormone receptor and hypothalamic gonadotropin-releasing hormone genes and their effect on sperm quality traits in Chinese Holstein bull. **Molecular Biology Reports.** 39 ; 7117-7123.

Lucy MC. (2008). Functional differences in the Growth hormone and Insulin like growth factor Axisin cattle and pig : Implication for post-partum nutrition and reproduction. **Reproduction in Domestic Animals.** 43(2) ; 31-39.

Marie Saint-Dizier, Olivier Sandra, Stephane Ployart, Martine Chebrout, and Fabienne Constant. (2012). Expression of nuclear progesterone receptor and progesterone receptor membrane components 1 and 2 in the oviduct of cyclic and pregnant cows during the post-ovulation period. **Reproductive Biology and Endocrinology.** 10 ;76.

Marson, E.P., J.B.S. Ferraz, F.V. Meirelles, J.C.C. Balieiro and J.P. Eler. (2008). Effects of Polymorphisms of LHR and FSHR genes on sexual precocity in a *Bos Taurus* x *Bos indicus* beef composite population. **Genetics and Molecular Research.** 7(1) ; 243-251.

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

Molecular Pharmacology.**Cell-Type Specific Integra tion of Cross-Talk between Extracellular Signal-Regulated Kinase and cAMP Signaling.** [online]. Available :http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch6F1.htm

Motterhead Jos. (2001). **The Mare'sEstruscycle.** [online]. Available :http://equine-reproduction. com/articles/estrous.htm.

Muller, C., S.W.P. Cloete, J.P. Potgieter and O. Zishiri. (2010). Genetic parameters for fertility traits in South African Holstein cows. **SUN scholar Research Repository.**

NCBI. (2005). **Bos Taurus luteinizing hormone receptor, mRNA.** [on-line]. Available : http:// www.ncbi.nih.gov/nuccore/u20504.

NCBI. (1994). **Bovine follicle stimulating hormone receptor, mRNA.** [on-line]. Available : http:// www.ncbi.nih.gov/nuccore/L22319.1.

Okumu A Lilian, Niamh Forde, Alan G Fahey, Eamonn Fitzpatrick, Jim F Roche, Mark A Crowe, Dat Lonergan. (2010). The effect of elevated progesterone and estrogen receptor in the bovine uterus. **Biology of Reproduction.** 140 ; 143-153.

Ole, F Christensen and Mogans S Lund. (2010). Genomic prediction when some animals are not Genetyped. **Genetic selection Evolution.** 42;2-8.

Oltenacu P A and D M Broom. (2010). The impact of genetic selection for increase milk yield on the welfare of dairy cows. **Animal Welfare Journal.** 39-49.

Oyama, K., T. Katsuta, K. Anada and F. Mukai. (2002). Heritability and repeatability estimates for reproductive traits of Japanese Black cows. **Asian-Australasian Journal of Animal Science.** 15(12) ; 1680-1685.

Parland, S. M C, J.F. Kearney, M. Rath, and D.P. Berry. (2007). Inbreeding effects on milk production, calving performance, fertility and conformation in Irish Holste in Friesian. **Journal of Dairy Science.** 90 ; 4411-4419.

Rannikko Antti, Pirjo Pakarinen, Pulak R. Manna, Isabelle Beau, Micheline Misrahhi, Kristiina Aittomakiand IlpoHuhtaniemi. (2002). Functional characterization of the human FSH receptor with an inactivating Ala 189 Valmutation. **Molecular Human Reproduction.** 8(4) ; 311-317.

Raymond, M.and F. Rousset. (2003). Genepop 3.4., an update version of GenepopV.1.2 (1995) :Population genetic solfware for exact tests and ecumenicism. **Journal of Heredity.** 86 ; 248-9.

Riecka Zuazana and Juraj Candrak. (2011). Analysis of relationship between production and reproduction traits of Holstein cattle population in the Slovak Republic. **Scientific paper.** 44 ; 1-5.

Rossi, F., F. Righi, S. Romanelli, A. Quarantelli. (2008). Reproductive efficiency of dairy cows Under negative energy balance conditions. **Facoltia di MedicinaVeterinaria.** 173-180.

Ryan Law, Fiona Young, Desmond Patterson, and Tianhai Yan. (2010). The effect of reducing the protein content of the diets on the performance of dairy cows. **Project report to Agrisearch.**

Ryan Law, Fiona Young, Sinclair Mayne, Desmond Patterson, Alastair Wylie, David Kilpatrick and Tianhai Yan. (2009). The effect of protein levels in dairy cow diets on body reserves throughout lactation.**Project report to Agrisearch.**

Slate, J. and J.M. Pemberton. (2007). Admixture and patterns of linkage disequilibrium in a free-living vertebrate population. **Journal compilation.** 20 ; 1415-1427.

Shirasuna Koumei, Chio Kawashima, Chiaki Murayama, Yuka Aoki, Yutaka Masuda, Katsuyakida, Motozumi Matsui, Takashi Shimizu, and Akio Miyamota. (2011). Relationships between the frist ovulation postpartum and polymorphism in gene relating to function of immunity, metabolism and reproduction inhigh-producting dairy cows. **Journal of reproduction and development.** (57) ; 135-142.

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

Szreder Tornase, Jolanta Oprzadek, Beata Zelazowka, Edward Dymnicki, Lech Zwierzchowski. (2010). Polymorphism A/C inexon 7 of the bovine estrogen receptor α (ESRα) gene and its association with function and milk production traits in Red-and-White cattle. **Animal Science.** 29(4) : 281-291.

Tang Ke-Qiong, Wu-Cai Yang, Bin Pai, Shu-Jing Li, Long Chen, Li-Guo Yang. (2013). Effect of PGR and ESRα genotypes on the pregnancy rates after embryo transfer in Luxi cattle. **Molecular Biology Reports.** 40 ; 579-584.

Toghini Sajjad. (2012). Genetic relationships between production traits and reproductive performance in Holstein dairy cows. **Archir Tierzucht.** 55; 458-468.

Tracy, L. David, Jennifer D .Whitesell, Jeremy D. Cantlon, Colin M. Clay, Terry M. Nett. (2011). Does a nonclassical signaling mechanism underline and binding in ovine pituitary cell. **Biology of reproduction.** 85 ; 770-778.

Vakha Agrawal, Mukesh Kumar Jaiswal, Yogesh Kumar Jaiswal. (2011). Gonadal and nongonadal FSHR and LHR dysfunction during lipopolysaccharide induced failure of blastocyst implantation in mouse. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics.** 29 ; 163-173.

Victor E Beshay and Bruce R Carr. (2011). The normal menstrual cycle and the control of ovulation. [on-line]. Available :http://www.endotext.org/female/female3/femaleframe3.htm

William, J.L.. (2005). The use of marker-assisted selection in animal breeding and biotechnology. **Revue Scientifique et technique.** 24(1) ; 379-391.

Yang Wu-cai, Ke-Qiong Tang, Jun-Na Yu, Chun-Yan zhang, Xiao-Xia Zhang, Li-Guo Yang. (2011). Effect of MboII and BspMI polymorphisms in the gonadotropin releasing

hormone receptor (GnRHR) gene on sperm quality in Holstein bull. **Molecular Biology Reports.** 38 ; 3411-3415.

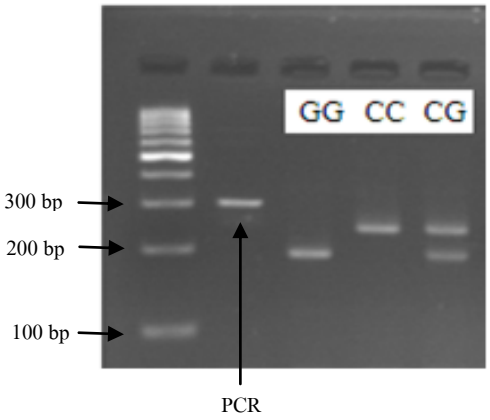
Zahmatkesh A zadeh, Hamidreza Rahmani, Mohammad AliEdriss, Badraldin Ebrahim Sayed Tabatabaei. (2012). Estrogen receptor α (ER-α) gene and bovine perpromance : is there any relation?. **Animal science papers and reports.** 30(4) ; 373-381.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก

ภาพประกอบการศึกษารูปแบบยีน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ ก.1 รูปแบบอัลลีล และจีโนไทป์ของยีน FSHR ที่พบในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน ด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยแถบที่ 1 (นับจากซ้ายมือ) คือ DNA marker 100 bp, แถบที่ 2 คือ PCR product, แถบที่ 3 คือ จีโนไทป์ GG, แถบที่ 4 คือ จีโนไทป์ CC, แถบที่ 5 คือ จีโนไทป์ CG

ภาพที่ ก.2 รูปแบบอัลลีล และจีโนไทป์ของยีน LHR ที่พบในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน ด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยแถบที่ 1 (นับจากขวามือ) คือ DNA marker 100 bp, แถบที่ 2 คือ จีโนไทป์ CT,แถบที่ 3 คือ จีโนไทป์ TT, แถบที่ 4 คือ จีโนไทป์ CC, แถบที่ 5 คือ PCR product

ประวัติผู้เขียน

นางสาวโชติมา ภูมิประหมันเกิดเมื่อวันที่ 27พฤษภาคมพ.ศ. 2530ที่จังหวัดมหาสารคามเข้าศึกษาชั้นอนุบาลชั้นประถมศึกษาที่โรงเรียนเทศบาล 1(บูรพาวิทยากร)จังหวัดนครราชสีมาและเข้าศึกษาชั้นมัธยมศึกษาที่โรงเรียนสุรนารีวิทยา 2จังหวัดนครราชสีมาในปีพ.ศ. 2551สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีสาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีจังหวัดนครราชสีมาและเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทสาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีในปีการศึกษาพ.ศ.2552

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี