รหัสโครงการ SUT3-303-51-12-63

รายงานการวิจัย

อิทธิพลของยีน Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase1 ต่อปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบของน้ำนมในโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ลูกผสม

(The Effect of Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase1 gene on Milk Production and Milk Fat in Crossbred Holstein)

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ อมรรัตน์ โมพี

สาขาวิชา เทคโนโลยีการผลิตสัตว์

สำนักวิชา เทคโนโลยีการเกษตร

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2551

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

19 มีนาคม 2553

กิตติกรรมประกาศ

นักวิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ชาญ ณ ลำปาง ที่กรุณาให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการวางแผนและดำเนินงานวิจัย ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อารักษ์ ธีระอำพน ผู้จัดการฟาร์มมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และ คุณเพลิน เมินกระโทก และคุณสมพงษ์ ปาติตัง นักวิชาการฟาร์มมหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างเลือด และให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลในการวิจัย เป็นอย่างดี ขอบพระคุณไร่ไชยสาส์นฟาร์ม อำเภอวิหารแดง จังหวัดสระบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างเลือด และข้อมูลผลผลิต ขอบพระคุณศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลของไร่ไชยสาส์นฟาร์ม ขอขอบพระคุณนักศึกษาบัณฑิตศึกษาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือทั้งในด้านการเก็บตัวอย่าง เก็บข้อมูล ด้วยความทุ่มเทและรับผิดชอบเป็นอย่างดี และท้ายที่สุด นักวิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้การสนับสนุนเงินทุนวิจัย ในการดำเนินโครงการวิจัยครั้งนี้

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือ เพื่อศึกษาความถี่ของ allele และ genotype ของยีน Acyl – CoA: diacylglycerol acyltransferase1 ; DGAT1 gene ในกลุ่มตัวอย่างโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ และศึกษาอิทธิพลของยีนนี้ต่อผลผลิตน้ำนมและองค์ประกอบในน้ำนม เพื่อใช้เป็น gene marker เพื่อช่วยในการคัดเลือก เก็บตัวอย่างเลือดจากแม่โคนมรีดนมลูกผสมโฮลสไตน์จำนวน 227 ตัว ศึกษารูปแบบของยีนด้วยเทคนิค PCR RFLP และศึกษาอิทธิพลของยีนด้วยวิธี ordinary least square เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละ genotype ด้วยวิธี Least significant difference ผลการศึกษาพบว่ายีนนี้มี 2 allele (K, A) และมี 3 genotype (AA, KA, KK) โดย allele และ genotype ที่มีความถี่สูงที่สุด คือ allele A และ genotype AA ตามลำดับ genotype รูปแบบ AA และ KA มีอิทธิพลทางบวกต่อลักษณะผลผลิตน้ำนม แต่มีอิทธิพลทางลบต่อลักษณะองค์ประกอบน้ำนม ผลการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่ายีน DGAT1 สามารถใช้เป็น gene marker เพื่อช่วยคัดเลือกลักษณะผลผลิตน้ำนม แต่ไม่เหมาะสำหรับใช้ เพื่อเพิ่มองค์ประกอบน้ำนม

คำสำคัญ โคนมลูกผสมโฮลสไตน์, ผลผลิตน้ำนม, ยีนเครื่องหมาย, ยีน Acyl – CoA: diacylglycerol acyltransferase1, องค์ประกอบน้ำนม

ABSTRACT

The objectives of this study were to study the allele and genotype frequency of Acyl – CoA: diacylglycerol acyltransferase1 gene, DGAT1 gene, in the sample of crossbred Holstein dairy cattle, and to study the effect of this gene on milk production and milk composition for using as marker assisted selection. Two hundred and twenty- seven crossbred Holstein cows were collected for blood sampling. PCR-RFLP was used to identify the allele and genotype of DGAT1 gene. Ordinary least square and least significant difference were used to estimate the effect of gene on the traits, and to compare the mean of each trait between genotype. Two alleles (K, A) and 3 genotypes (AA, KA, KK) were detected, the highest allele and genotype frequencies were A and AA, respectively. Positive effect of AA and KA were shown on milk yield but the negative effect on milk composition traits. The results suggested that DGAT1 gene has ability to use as gene marker for assisting selection in milk production trait but it is not suitable for milk composition traits.

Keywords Acyl – CoA: diacylglycerol acyltransferase1gene, crossbred Holstein, gene marker, milk composition, milk production

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
ขอบเขตของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	2
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
ข้อมูล	7
ศึกษารูปแบบจีโนไทป์ของยีน DGAT1	8
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	9
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	
อภิปรายผล	10
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	15
บรรณานุกรม	16
ประวัติผู้วิจัย	18

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์ที่พบในโคนมแต่ละประชากร	5
ตารางที่ 2	อิทธิพลของ *DGAT1 K232A* ต่อลักษณะปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมในโคนมพันธุ์ต่างๆ บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	6
ตารางที่ 3	ความถี่ allele และ genotype ค่า *P-value* ในการทดสอบการเบี่ยงเบนจากสภาพสมดุล Hardy – Weinberg และค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของลักษณะต่างๆ	12
ตารางที่ 4	อิทธิพลของ genotype รูปแบบต่างๆของยีน DGAT1 (Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase1) ต่อลักษณะผลผลิตและองค์ประกอบในน้ำนม	13
ตารางที่ 5	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของลักษณะผลผลิตและองค์ประกอบน้ำนมในแต่ละ genotype	14

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	กลไกการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์	3
ภาพที่ 2	การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ K232A บน exon 8	4
ภาพที่ 3	ลักษณะ triple code ของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลง	4
ภาพที่ 4	ตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ *Cfr*I	9
ภาพที่ 5	รูปแบบ allele และ genotype ของยีน Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase1; DGAT1 ที่พบในโคนมลูกผสมโฮลสไตล์ ซึ่งได้จากเทคนิค PCR-RFLP โดยแถวที่ 1 เป็นแถบ DNA เครื่องหมาย แถวที่ 2 เป็นรูปแบบgenotype AA แถวที่ 3 เป็นรูปแบบ genotype KK และแถวที่ 4 เป็น genotype KA	11

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

การซื้อขายน้ำนมดิบในประเทศไทยใช้องค์ประกอบของน้ำนมอันได้แก่สัดส่วนไขมันนมและของแข็งรวมทั้งหมดเป็นตัวกำหนดราคา ดังนั้นถ้าเกษตรกรสามารถผลิตน้ำนมดิบที่มีสัดส่วนไขมันนมและของแข็งรวมทั้งหมดสูง ย่อมสามารถจำหน่ายน้ำนมได้ในราคาที่สูงขึ้น และหากสามารถผลิตน้ำนมดิบได้ในปริมาณที่สูง ก็ย่อมจะมีรายได้สูงยิ่งขึ้นตามไปด้วย ซึ่งลักษณะความสามารถในการให้น้ำนมและองค์ประกอบของน้ำนมของโคสามารถทำการปรับปรุงให้ดีขึ้นได้โดยการคัดเลือกและการปรับปรุงพันธุ์

ปัจจุบันมีการศึกษาพบว่ายีน Acyl – CoA: diacylglycerol acyltransferase1 (DGAT1 gene) เป็นยีนที่มีบทบาทสำคัญต่อองค์ประกอบที่สำคัญในน้ำนมโค ซึ่งได้แก่ ระดับไขมันนม โปรตีนนม และรวมถึงปริมาณน้ำนมในโคนมด้วย ดังนั้นจึงเห็นว่า ยีน DGAT1 มีศักยภาพในการที่จะใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรม (genetic marker) ประกอบในการคัดเลือกเพื่อปรับปรุงลักษณะปริมาณน้ำนม ไขมันนม และ โปรตีนในโคนมได้

ยีน DGAT1 มีลักษณะเป็น diallele โดยรูปแบบแรกของยีนนี้เป็นรูปแบบที่กำหนดรหัสของกรดอะมิโน lysine และรูปแบบที่สองกำหนดรหัสของกรดอะมิโน alanine ซึ่งมีผลทำให้อิทธิพลของยีนนี้ที่มีผลต่อผลผลิตน้ำนมและส่วนประกอบในน้ำนมมีความแตกต่างกันเมื่อมีรูปแบบแตกต่างกัน นอกจากนั้นยังพบว่าในประชากรโคนมที่มีสายพันธุ์แตกต่างกันจะมีความถี่ของรูปแบบของยีนดังกล่าวที่แตกต่างกันไป ซึ่งเป็นผลให้ในแต่ละประชากรที่มีสายพันธุ์ต่างกันนั้น จึงมีความสามารถในการแสดงออกซึ่งลักษณะต่างๆ ดังกล่าวที่แตกต่างออกไปด้วย

ผลที่ได้จากงานวิจัยนี้ จะก่อให้เกิดองค์ความรู้ที่สำคัญ คือ สามารถทราบได้ว่า รูปแบบต่างๆของยีน DGAT1 จะมีอิทธิพลอย่างไรต่อลักษณะปริมาณน้ำนม และองค์ประกอบที่สำคัญในน้ำนมในโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ลูกผสม ซึ่งเป็นกลุ่มประชากรหลักของโคนมในประเทศ องค์ความรู้ดังกล่าวจะสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลสำหรับนักปรับปรุงพันธุ์โคนมในการพัฒนาพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และรวมถึงเป็นข้อมูลสำหรับการคัดเลือกโค อันมีส่วนทำให้เกษตรกรมีโคนมที่สามารถผลิตน้ำนมได้ในปริมาณมากขึ้น และมีคุณภาพสูงขึ้นได้ ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมของประเทศมีรายได้ที่สูงขึ้น และมีความสามารถในการแข่งขันที่สูงขึ้นด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1) เพื่อศึกษาความถี่ของแต่ละรูปแบบของยีน DGAT1 ในประชากรโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ลูกผสม
2) เพื่อศึกษาอิทธิพลของยีน DGAT1 ต่อปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบของน้ำนมที่สำคัญในโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ลูกผสม

ขอบเขตของการวิจัย

ทำการศึกษาในประชากรโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ โดยจะทำการศึกษารูปแบบจีโนไทป์ของยีน DGAT1 ด้วยวิธี PCR RFLP และหาความถี่จีโนไทป์รูปแบบต่างๆ และใช้วิธี Ordinary least square (OLS) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณน้ำนม และ องค์ประกอบที่สำคัญของน้ำนมที่แตกต่างกันกับรูปแบบของจีโนไทป์ของยีน DGAT1

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

☑ เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป

กลุ่มเป้าหมาย *นักวิชาการทางด้านการปรับปรุงพันธุ์ โดยองค์ความรู้นี้นักวิชาการในสาขาดังกล่าวสามารถนำไปขยายผลการศึกษาในประชากรโคนมในวงกว้างขึ้น ซึ่งอาจเป็นในระดับประเทศ เพื่อศึกษาถึงความถี่ยีนของอัลลีลที่ต้องการในภาพรวมของประชากรโคนมทั้งประเทศเพื่อใช้ในการกำหนดทิศทางการปรับปรุงพันธุ์โคนมได้อย่างชัดเจน*

☑ นำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

กลุ่มเป้าหมาย *องค์กรทั้งภาครัฐและเอกชนที่มีจำหน่ายโคสาวเพื่อเป็นแม่โครีดนมโดยสามารถนำความรู้จากผลงานวิจัยนี้ในการตรวจสอบพันธุกรรมของโคนมให้มีความสามารถทางพันธุกรรม ที่จะแสดงลักษณะการให้ผลผลิตตามที่ต้องการ*

☑ เพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต

กลุ่มเป้าหมาย *เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมสามารถนำความรู้ดังกล่าวไปใช้ในการคัดเลือกโคนมในฟาร์มเพื่อให้ในฟาร์มมีโคนมที่มีพันธุกรรมที่สามารถเพิ่มคุณภาพน้ำนมให้สูงขึ้นได้ซึ่งเป็นการเพิ่มความสามารถให้แก่เกษตรกรในการแข่งขันในตลาดนมดิบได้*

รวจเอกสาร

genetic marker เพื่อช่วยในการคัดเลือกสัตว์

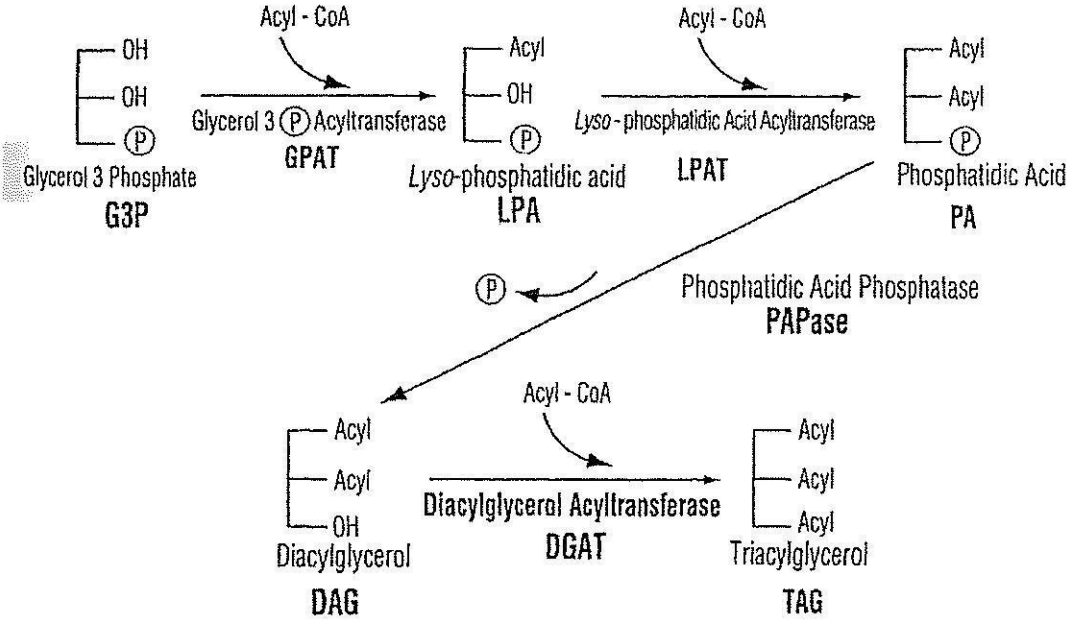
การศึกษาเกี่ยวกับการคัดเลือกสัตว์โดยใช้ genetic marker มาเป็นตัวช่วยในการคัดเลือกสัตว์ จะเป็นการเพิ่ม genetic gain ในการปรับปรุงพันธุ์ เพิ่มความแม่นยำในการประเมินค่าทางพันธุกรรมและการประเมินความสามารถของพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ (Meuwissen and Van Arendonk., 1992) Meuwissen et al. (2001) พบว่า การประเมินค่า EBV จากข้อมูลของ MAS ทำให้เกิดความแม่นยำในการคัดเลือกพ่อพันธุ์ด้วย progeny test ประมาณ 75-85 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับ Druet et al. (2005) ซึ่งรายงานว่า การใช้ตัวแบบตัวสัตว์ที่มีอิทธิพลของ MAS ในการประเมินโคนมมีความแม่นยำในการคัดเลือกสูงถึง 72 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การใช้ตัวแบบตัวสัตว์ปกติมีความแม่นยำในการคัดเลือกเพียง 50 เปอร์เซ็นต์ จากรายงานการวิจัยที่กล่าวมาในข้างต้น จะเห็นได้ว่า การใช้ genetic marker มาเป็นตัวช่วยในการประเมินพันธุกรรมสัตว์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกได้ ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษา genetic markers เพื่อนำมาช่วยในการปรับปรุงพันธุกรรมโคนมในประเทศต่อไป

การพิจารณายีนที่มีศักยภาพในการเป็นเครื่องหมายพันธุกรรม จะต้องพิจารณาจากมีคุณสมบัติของยีนดังต่อไปนี้ ขนาดของอิทธิพลของเครื่องหมายพันธุกรรมที่ใช้ต่อลักษณะที่สนใจ ซึ่งยีนที่เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมที่ดีจะต้องมีอิทธิพลต่อลักษณะโดยตรง มีความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic polymorphism) และมีความถี่ของอัลลีลต่างๆของเครื่องหมายพันธุกรรม (Alison, 2009) ปัจจุบันในการปรับปรุงพันธุกรรมสัตว์มีการศึกษาความเป็นไปได้ในการนำ Candidate gene มาใช้เป็น genetic marker อย่างแพร่หลาย เพื่อนำข้อมูลอิทธิพลของยีนที่มีต่อลักษณะมาใช้เป็นปัจจัยหนึ่งในการประเมินค่าทางพันธุกรรมของสัตว์หรือ EBV เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกสัตว์จากลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจ

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

ยีน *DGAT1* ที่พบในโคนมจะอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 14 มีขนาดของยีนประมาณ 2714 bp (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) มีทั้งหมด 17 exon และแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนได้ 489 ตัว (Grisart et al., 2002)

ยีน *DGAT1* เป็น strong candidate gene ซึ่งจะทำงานร่วมกับยีนอื่นในการควบคุมลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนม (Grisart et al., 2002) โดยยีน *DGAT 1* จะแปลรหัสได้เป็นโปรตีน Acyl-CoA:diacylglycerol acyl transferase 1 (EC 2.3.1.20) ซึ่งเป็น microsomal enzyme ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาขั้นตอนสุดท้ายในกระบวนการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ (Winter et al., 2002) ดังแสดงดังภาพที่ 1



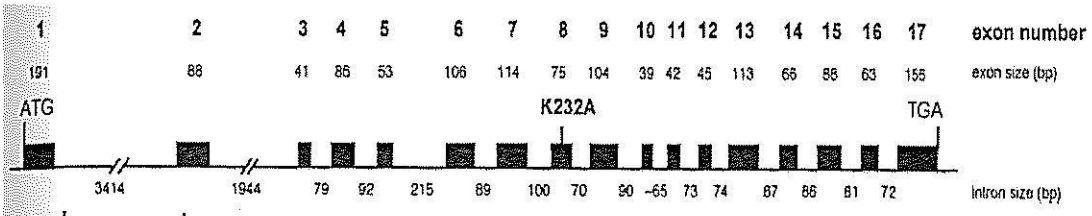
ภาพที่ 1 กลไกการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์

ที่มา: http://www.freepatentsononline.com/ 7015373.html

จากภาพที่ 1 สารตั้งต้นในการสังเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ คือ กรดไขมันและกลีเซอรอล โดยขั้นตอนแรกของการสังเคราะห์ จะมีการต่อโมเลกุลของกรดไขมัน 2 โมเลกุลเข้าไปที่หมู่ ไฮดรอกซิล (-OH) ของกลีเซอรอลไตรฟอสเฟต (glycerol-3-phosphate) ได้เป็นกรดฟอสฟาทิดิก (phosphatidic acid) ต่อมาจะสลายเอาหมู่ฟอสเฟตออกโดยเอนไซม์ phosphatidic acid phosphatase ได้เป็น 1,2 ไดเอซิลกลีเซอรอล (1,2-diacylglycerol) ซึ่งจะ

เปลี่ยนเป็นไตรเอซิลกลีเซอรอลโดยการเติมกรดไขมันเข้าไปอีก 1 โมเลกุล โดยจะเกิดจากการทำงานร่วมกันของ Acyl-CoA กับเอนไซม์ Diacylglycerol Acyltransferase (DGAT) (พัชรี, 2551) จากนั้นไตรกลีเซอไรด์ที่ได้จากการสังเคราะห์ในข้างต้น ส่วนหนึ่งจะไปเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ไขมันนมที่ต่อมน้ำนมต่อไป

ต่อมาได้มีการศึกษา ยีน *DGAT1* ซึ่งมีการแทนที่ของลำดับนิวคลีโอไทด์ บน exon 8 ดังภาพที่ 2 (Winter et al., 2002)



ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงลำดับนิวคลีโอไทด์ K232A บน exon 8

ที่มา: Winter et al. (2002)

จากภาพที่ 2 เมื่อมีเกิดการแทนที่ของนิวคลีโอไทด์ ในลักษณะ Non-conservative ทำให้กรดอะมิโน Lysine เปลี่ยนแปลงเป็นกรดอะมิโน Alanine เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับ นิวคลีโอไทด์ ทำให้ triple code ของกรดอะมิโน มีการเปลี่ยนแปลง ดังภาพที่ 3

ภาพที่ 3 ลักษณะ triple code ของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนแปลง

ที่มา: Madhu et al. (2006)

ภาพที่ 3 แสดงให้เห็นว่า AAG ซึ่งเป็น triple code ของกรดอะมิโน Lysine ถูกแทนที่ด้วยเบส GC ที่ตำแหน่งเบส AA สองตัวแรก ซึ่งการแทนที่ดังกล่าวทำให้เกิดการเปลี่ยน triple code เป็น GCG ซึ่งแปลรหัสเป็นกรดอะมิโนตัวใหม่ คือ Alanine

จากการรวบรวมเอกสาร พบว่า ยีน *DGAT1 K232A* ในแต่ละประชากรโคนมมีความถี่ของอัลลีลและความถี่ของจีโนไทป์ที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์ที่พบในโคนมแต่ละประชากร

Breed	N	Allele		Genotype			Reference
		K	A	KK	AK	AA	
Swedish Holstein	96	0.14	0.86	0.03	0.20	0.76	Näslund et al. (2008)
France Holstein	2259	0.369	0.631	177	944	965	Gautier et al. (2007)
Polish Black and White	252	-	-	0.277	0.267	0.456	Szyda et al. (2007)
Brazilian Holstein	50	0.27	0.73	14	26	60	Lacort et al. (2006)
Polish Holstein-Friesian	177	0.40	0.6	0.31	0.58	0.11	Strzalkowska et al. (2005)
New Zealand Holstein-Friesian	1527	0.6	0.4	583	666	278	Spelman et al. (2002)

N คือ จำนวนประชากรที่ศึกษา

จากตารางที่ 1 ซึ่งเป็นการรวบรวมงานวิจัยที่ศึกษารูปแบบของอัลลีลของยีน *DGAT1* ในประชากรโคนมแต่ละประชากร จะเห็นได้ว่า อัลลีลที่พบมี 2 รูปแบบ ได้แก่ K และ A ประชากรส่วนใหญ่ที่ทำการศึกษาจะพบความถี่ของอัลลีล K มีน้อยกว่าความถี่ของอัลลีล A จึงเป็นที่น่าสนใจศึกษาในประชากรลูกผสมโฮสไตน์ว่าจะพบความถี่ของอัลลีล A ในลักษณะเช่นนี้หรือไม่ และอิทธิพลของอัลลีลต่อลักษณะปริมาณน้ำนม องค์ประกอบน้ำนม และความสมบูรณ์พันธุ์ในโคนมลูกผสมโฮสไตน์ฟรีเซี่ยนจะมีความแตกต่างหรือไม่ อย่างไร เนื่องจากว่า ข้อมูลที่ได้จากการรวบรวมเอกสารในข้างต้นนั้น ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในกลุ่มประชากร *Bos taurus* ของต่างประเทศ แต่สำหรับประชากรโคนม *Bos taurus indicus* ของประเทศไทยยังไม่มีความชัดเจนและไม่มีการศึกษากันอย่างแพร่หลาย

ดังที่กล่าวในข้างต้น ความถี่อัลลีลและความถี่จีโนไทป์ที่พบในโคนมแต่ละประชากรมีการกระจายตัวที่แตกต่างกัน ทำให้เห็นได้ว่าอัลลีลทั้งสองอาจส่งผลต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมแตกต่างกัน แม้ว่าจะเป็นโคนมพันธุ์เดียวกัน จึงมีการรวบรวมงานวิจัยที่ทำการศึกษาอิทธิพลของยีน DGAT 1 ต่อปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม สรุปได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 อิทธิพลของ *DGAT1 K232A* ต่อลักษณะปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมในโคนมพันธุ์ต่างๆ

Breed	Genotype	Milk yield (kg)	Fat yield (kg)	Protein yield (kg)	Fat content (%)	Protein content (%)	Reference
Polish	AA	166.18	-3.47	1.51	-0.19	-0.77	Joanna
Holstein-	KA	19.90	-0.15	- 0.98	-0.03	-0.03	et al. (2008)
Friesian	KK	-350.21	2.01	9.19	0.31	0.04	
German	AA	256	29.6	10.9	0.23	0.02	Citek et al.
Holstein	KA	498	22.7	17.3	0.03	0.01	(2007)
	KK	811	15.9	25	-0.19	-0.03	
Dutch Holstein-Friesian	K232A	-351	14.9	-4.63	3.43	0.76	Grisart et al. (2002)

จากตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่า อิทธิพลเนื่องจากจีโนไทป์ AA, KA และ KK ส่งผลต่อปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมในแต่ละประชากรโคนมได้แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาอิทธิพลของจีโนไทป์ AA และ KA จะพบว่า มีผลในทางบวกต่อปริมาณน้ำนมเช่นกัน แต่อิทธิพลของจีโนไทป์ดังกล่าวต่อองค์ประกอบน้ำนมในแต่ละประชากรยังไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน ส่วนจีโนไทป์ KK พบว่า เมื่อประชากรเปลี่ยนแปลงอิทธิพลของยีนต่อปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมเปลี่ยนแปลงไป และเมื่อพิจารณาอิทธิพลเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโน Lysine เข้าไปแทนที่กรดอะมิโน Alanine (K232A) พบว่า K232A มีอิทธิพลที่แตกต่างกันในแต่ละกลุ่มประชากรโคนม ความแตกต่างของอิทธิพลของยีนในแต่ละประชากรโคนมที่กล่าวมานี้ จึงเป็นแนวคิดในการศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหาอิทธิพลของยีนแต่ละจีโนไทป์ในประชากรโคนมลูกผสมในครั้งนี้

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง

โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ระดับสายเลือดต่างๆ ของฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และไชยสาส์นฟาร์มจำนวน 227 ตัว

การจัดการอาหาร

อาหารข้นจะใช้อาหารสำเร็จรูปโดยโคหลังคลอดถึงประมาณ 150 วันใช้อาหารโครีดนม 21 %โปรตีนและหลังจากนั้นลดระดับโปรตีนลงเป็น 17 %โปรตีน ส่วนอาหารหยาบเป็นข้าวโพดหมัก หญ้าหมัก และหญ้าสด โดยอาหารหยาบนี้จะเปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาล

ข้อมูล

ข้อมูลที่ใช้ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบของยีนกับลักษณะที่สนใจได้แก่ ประกอบด้วย ข้อมูลพันธุ์ประวัติโคนมของฟาร์ม และ ข้อมูลผลผลิต ซึ่งได้แก่ ข้อมูลปริมาณน้ำนม ปริมาณและระดับเปอร์เซ็นต์ไขมันนม ปริมาณและระดับเปอร์เซ็นต์โปรตีน ปริมาณและระดับของแข็งไม่รวมไขมันของโคนมรายตัว โดยใช้จำนวนข้อมูลที่ใช้อยู่ในช่วง 2,218 - 2,257 ข้อมูล โดยเป็นข้อมูล ตั้งแต่ปี 2551 - 2553

ตัวอย่างเลือดและการสกัด DNA

เก็บตัวอย่างเลือดโดยใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 18 (1.5 นิ้ว) เจาะที่เส้นเลือดดำบริเวณโคนหางปริมาณ 10 ml บรรจุในหลอดสุญญากาศที่มีส่วนประกอบของ EDTA เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด และเก็บในตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิที่ -20°C เพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอ (genomic DNA extraction) โดยใช้ชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปสำหรับตัวอย่างเลือด (Geneaid Biotech Ltd.) ในขั้นตอนต่อไป

การสกัดดีเอ็นเอด้วยชุดน้ำยาสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูปสำหรับตัวอย่างเลือด (Genomic DNA Mini Kit Protocal-Blood) มีทั้งหมด 5 ขั้นตอนดังนี้

1. ขั้นตอน RBC Lysis นำเลือดจากหลอดสุญญากาศที่มีส่วนประกอบของEDTA เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว ที่เก็บในตู้แช่เย็นอุณหภูมิ -20 $^{\circ}$C ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกว่าเลือดจะเปลี่ยนสภาพจากที่แข็งตัวกลายเป็นของเหลว ดูดตัวอย่างเลือดด้วย micropipet ปริมาณ 300 μl ใส่ลงใน microcentrifuge tube (1.5 ml) ใส่ RBC Lysis Buffer 3 เท่าของตัวอย่างเลือด (900 μl) ผสมให้เข้ากัน incubate 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำไป Centrifuge นาน 2 นาที ที่ 10,000 rpm ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง ใส่ 100 μl RBC Lysis Buffer อีกครั้ง
2. ขั้นตอน Cell Lysis ใส่ Proteinase K 20 μl (10-20 mg/ml) และ vortex เบาๆ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3-5 นาที ใส่ 200 μl GB Buffer และผสมกันด้วยเครื่อง Vortex นำไป Incubate 10 นาที ที่อุณหภูมิ 60°C จนกระทั่งตัวอย่างย่อย ทุกๆ 3 นาทีให้ทำการกลับหลอดไปมา ใน

ระหว่างนี้ นำ Elution Buffer ไปอุ่นใน Water bath ที่อุณหภูมิ 60°C เพื่อใช้ในขั้นตอน DNA Elution (100 μl ต่อ 1 ตัวอย่าง)

3. ขั้นตอน DNA Binding ใส่ Ethanol 200 μl และ Vortexing 10 วินาที ดูดสารละลายทั้งหมดใส่ลงใน GD column ที่วางอยู่บน collection tube (2 ml) นำไป Centrifuge 13,000 rpm นาน 5 นาที
4. ขั้นตอน Wash ใส่ 400 μl W1 Buffer ลงใน GD column นำไป Centrifuge 13,000 rpm นาน 30 วินาที ทิ้งสารละลายที่ทำการล้างออกไปที่อยู่ใน collection tube (2 ml) ใส่ 600 μl Wash Buffer (ethanol added) ลงใน GD column นำไป Centrifuge 13,000 rpm นาน 30 วินาที ทิ้งสารละลายที่ทำการล้างออกไปที่อยู่ใน collection tube (2 ml) และนำไป Centrifuge 13,000 rpmนาน 3 นาทีอีกครั้งเพื่อให้แห้งและเหลือเฉพาะส่วนที่เป็นดีเอ็นเอที่สกัดได้
5. ขั้นตอน DNA Elution นำ GD column ใส่ลงใน microcentrifuge tube (1.5 ml) ใหม่ ใส่ 100 μl Elution Buffer ที่เตรียมไว้ลงใน GD column ตั้งทิ้งไว้ 3-5 นาที นำไป Centrifuge 13,000 rpm นาน 3 วินาที และจะได้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (purified DNA) เก็บดีเอ็นเอที่สกัดได้ (Genomic DNA) ไว้ในตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิที่ -20 °C

หลังจากทำการสกัดเรียบร้อยแล้ว นำไปตรวจสอบคุณภาพ ปริมาณและความคมชัดของแถบดีเอ็นเอ ด้วย 0.8% agarose gel electrophoresis ย้อมด้วย ethidium bromide นำไปส่องดูในตู้ภายใต้แสง UV และทำการวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอ ด้วยเครื่อง spectrophotometer (optical-density, 260 nm and 280 nm) เพื่อทำการปรับความเข้มข้นของทุกตัวอย่างเป็น 10 ng/μl สำหรับใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) เก็บในตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิที่ -20°C รอทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR) เพื่อตรวจหารูปแบบจีโนไทป์ในขั้นตอนต่อไป

ศึกษารูปแบบจีโนไทป์ของยีน DGAT1

- นำ genomic DNA ที่ได้เข้าสู่ขบวนการ PCR RFLP (Polymerase Chain Reaction Restriction Fragment Length Polymorphism) นำ genomic DNA มาตรวจหารูปแบบของอัลลีล โดย Primers และเอนไซม์ตัดจำเพาะที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ อ้างอิงจากงานวิจัยของ Kuehn et al.(2007), Lacort et al. (2006),Winter et al. (2002)

  Forward primer : 5'-GCA CCA TCC TCT TCC TCA AG-3'

  Reverse primer : 5'-GGA AGC GCT TTC GGA TG-3'

- PCR Reaction mix รวมทั้งหมดเท่ากับ 25 µl ประกอบด้วย genomic DNA เข้มข้น 10 ng 1 µl เติมสารประกอบต่าง ๆ ในปฏิกิริยา ซึ่งประกอบด้วย 10X PCR buffer 2.5 µl , 1.25 mM dNTP's 4 µl, Primers ความเข้มข้น 20 µM อย่างละ 0.5 µl 0.5 U *Taq* DNA polymerase 0.5 µl และเติม Nuclease free water เพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 25 µl ก่อนปฏิกิริยาในช่วง PCR (initial denaturation) จะเริ่มที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 4 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 35 รอบ แต่ละรอบมีรายละเอียดในปฏิกิริยา ดังนี้ เริ่มที่อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที Primer annealing ที่อุณหภูมิ 56 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ Primer extension ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 60 วินาที และขั้นตอนสุดท้าย (final extension) ที่อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 10 นาที

จากนั้นตัดด้วยเอนไซด์ตัดจำเพาะ *Cfr*I โดยเติม 0.2 µl, 10X buffer Tango 2 µl , PCR product 8 µl, เติมน้ำ DI เพื่อปรับปริมาตรให้ได้ 20 µl นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°c เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งตำแหน่งการตัดของเอนไซม์แสดงดังภาพที่ 6 (Fermentas) และศึกษารูปแบบของจีโนไทป์ด้วยเทคนิค gel electrophoresis โดยใช้ Agarose gel 2.0%

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

ภาพที่ 4 ตำแหน่งการตัดของเอนไซม์ *Cfr*I

รูปแบบของยีน DGAT1 จากการศึกษาของ Lacort et al. (2006) พบว่ายีนมีรูปแบบจีโนไทป์จำนวน 3 รูปแบบ ได้แก่ KK ขนาด 411 bp , KA ขนาด 411bp และ 208 bp และ AA ขนาด 208 bp ตามลำดับ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความถี่ของ allele และ genotype ของยีน *DGAT1*

วิเคราะห์ความถี่ allele และ genotype รวมถึงการทดสอบ Hardy-Weinberg Equilibrium (HWE) ของยีน DGAT1 ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป GENEPOP version 3.4 (Raymond M. and Rousset F., 1995; Rousset, F., 2008)

การตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูล

ตรวจสอบความถูกต้องของข้อมูลซึ่งได้แก่ outlier การกระจายตัวของข้อมูลแบบ normal distribution ค่าเฉลี่ย การส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

การศึกษาความสัมพันธ์และอิทธิพลของยีนรูปแบบต่างๆ ต่อลักษณะที่สนใจ

การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบต่างๆของยีนกับลักษณะที่สนใจ ได้แก่ปริมาณน้ำนมต่อตัวต่อวัน ปริมาณและเปอร์เซ็นต์ไขมันนม ปริมาณและเปอร์เซ็นต์โปรตีนนม ปริมาณและเปอร์เซนต์ของแข็งที่ไม่รวมไขมัน ด้วยวิธี *Regression* และประมาณค่าอิทธิพลของยีนต่อลักษณะที่สนใจโดยใช้ *Ordinary Least Square (OLS)* ดังตัวแปรที่แสดงในสมการด้านล่างนี้

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

เมื่อ y คือ ค่าสังเกต ได้แก่ ปริมาณน้ำนมต่อตัวต่อวัน ปริมาณและเปอร์เซ็นต์ไขมันนม ปริมาณและเปอร์เซ็นต์โปรตีนนม ปริมาณและเปอร์เซนต์ของแข็งที่ไม่รวมไขมันปริมาณน้ำนมรายตัว , μ คือ ค่าเฉลี่ยกลางประชากร, β_1 คือ อิทธิพลเนื่องจากปัจจัยคงที่ ได้แก่ ระยะการให้นม ระดับสายเลือด ฝูง-ปี-ฤดูกาล จำนวนวันที่รีดนม (day in milk) β_2 เป็นอิทธิพลเนื่องจาก allele และ genotype , ε คือ อิทธิพลของความคลาดเคลื่อนอื่นๆ X_1, X_2 คือ incidence matrix ที่แสดงการปรากฏของอิทธิพลคงที่ และแสดงการปรากฏของรูปแบบ allele หรือ genotype ในแต่ละค่าสังเกต ตามลำดับ

บทที่ 3

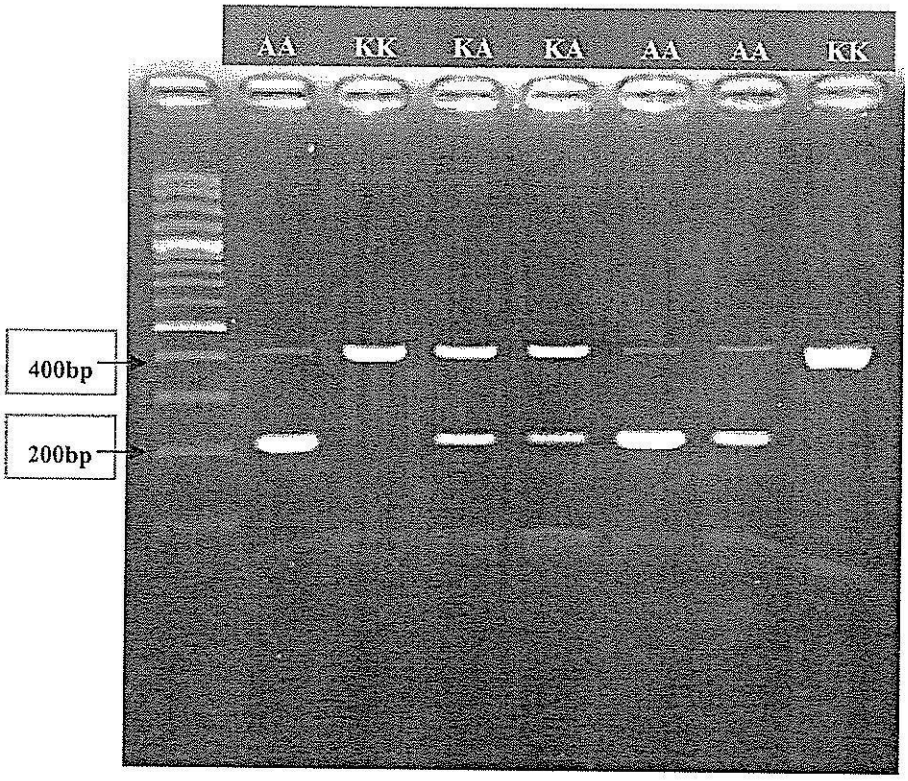
ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

เพื่อให้ได้ข้อสรุปว่ายีน DGAT1 มีศักยภาพในการประยุกต์เป็น gene marker สำหรับการช่วยในการคัดเลือกโคนมลูกผสมโฮลสไตล์ในประเทศให้มีผลผลิตน้ำนม ไขมันนม และ ส่วนประกอบต่างๆในน้ำนมสูงขึ้นได้หรือไม่นั้น การศึกษานี้ จึงได้ ศึกษาประเด็นที่สำคัญ คือ จำนวนรูปแบบของยีนที่พบในโคนมลูกผสมโฮลสไตล์ การศึกษาความถี่ของรูปแบบต่างๆของยีนนี้ในโคนมลูกผสมโฮลสไตล์ เพื่อบอกถึงสภาพความสมดุล Hardy – Weinberg ซึ่งจะบอกถึงความสามารถในการเพิ่มความถี่ของยีนในบางรูปแบบที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับลักษณะที่สนใจ และ การศึกษาถึงความสัมพันธ์และระดับของอิทธิพลของยีนดังกล่าวกับการเพิ่ม หรือลด ลักษณะที่สนใจ เพื่อระบุว่ายีนดังกล่าวสามารถนำมาใช้เป็น gene marker ได้หรือไม่ และ ดังนั้นในการรายงานผลการศึกษาจึงรายงานตามประเด็นที่กล่าวมา ดังนี้

รูปแบบของยีน DGAT1

ผลการศึกษารูปแบบของยีน DGAT1 ในกลุ่มตัวอย่างของโคนมลูกผสมโฮลสไตน์สามารถยืนยันได้ว่ารูปแบบของยีนนี้มีสภาพเป็น diallele เช่นเดียวกับการศึกษาในโคนมสายพันธุ์อื่นๆ เช่น พันธุ์ Jersey (Spelman et al.,2002) โคนมพันธุ์ German Angeln (Sanders et al.,2006) พันธุ์ Dutch Holstein (Schennink et al., 2007), พันธุ์ Ayrshire (Spelman et al., 2002), พันธุ์ UK Holstein (Banos et al., 2008) กล่าวคือ พบรูปแบบของ allele ที่แตกต่างกัน 2 ประกอบด้วย รูปแบบ K ซึ่งมีขนาดของแถบ DNA ประมาณ 411 bp และรูปแบบ A ซึ่งเป็นรูปแบบที่พบการปรากฏแถบ DNA จำนวน 2 แถบ ขนาด 203, 208 bp ดังแสดงในรูปที่ 1 และประกอบด้วยรูปแบบของ genotype ทั้งหมด 3 รูปแบบ คือ KK, KA, และ AA ดังแสดงในภาพที่ 5

จากผลการศึกษานี้เป็นข้อมูลเพิ่มเติมด้วยว่าในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์นั้น แม้ว่าจะมีโครงสร้างพันธุกรรมที่แตกต่างจากโคนมสายพันธ์ต่างๆ เนื่องจากมีโครงสร้างพันธุกรรมของ *Bos indicus* ผสมอยู่ด้วยแต่ก็ไม่เป็นสาเหตุให้ไม่พบบางรูปแบบของยีนนี้ จากที่กล่าวในข้างต้นว่า การศึกษารูปแบบของยีน DGAT1 นั้น เป็นการศึกษาจุดที่เกิด mutation ของ nucleotide base บริเวณ exon ที่ 8 อันมีผลทำให้การแปลงข้อมูลเป็น amino acid sequence ตำแหน่งที่ 232 มีการเปลี่ยนแปลงจาก lysine เป็น alanine (Grisart et al., 2002) ซึ่งจากผลการศึกษาครั้งนี้ พบว่าในโคนมลูกผสมโฮลสไตล์มีรูปแบบ allele ทั้ง 2 รูปแบบ ซึ่งหมายความว่าในโคนมสายพันธุ์นี้มีการเกิด point mutation เช่นเดียวกับสายพันธุ์อื่นๆ



ภาพที่ 5 รูปแบบ allele และ genotype ของยีน Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase1; DGAT1 ที่พบในโคนมลูกผสมโฮลสไตล์ ซึ่งได้จากเทคนิค PCR-RFLP โดยแถวที่ 1 เป็นแถบ DNA เครื่องหมาย แถวที่ 2 เป็นรูปแบบgenotype AA แถวที่ 3 เป็นรูปแบบ genotype KK และแถวที่ 4 เป็น genotype KA

ความถี่ allele และ genotype และสมดุล Hardy – Weinberg ของยีน DGAT1

การศึกษาครั้งนี้พบว่า allele K ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้านี้ Grisart et al.(2002) และ Winter et al.(2002) พบว่าเป็นรูปแบบที่มีผลบวกต่อการเพิ่มผลผลิตน้ำนม และ องค์ประกอบที่สำคัญ มีความถี่ในกลุ่มตัวอย่างต่ำกว่า A (จากตารางที่ 3) และเมื่อพิจารณาความถี่ genotype พบว่า genotype KK เป็น genotype ที่มีความถี่ต่ำที่สุด และเมื่อพิจารณาถึงสภาพความสมดุล Hardy – Weinberg พบว่ารูปแบบของยีน DGAT1 อยู่ในสภาพสมดุลซึ่งแสดงให้เห็นว่าประชากรโคนมลูกผสมที่ศึกษาในครั้งนี้ยังไม่มีการคัดเลือกโดยเฉพาะอย่างยิ่งลักษณะที่เกี่ยวข้องกับไขมันนม และองค์ประกอบในน้ำนม ซึ่งผลการศึกษานี้สามารถชี้ให้เห็นได้ว่า ประชากรโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ในประเทศนี้ยังมีศักยภาพในการที่จะปรับปรุงให้มีไขมันนม และองค์ประกอบอื่นๆในน้ำนมให้ดีขึ้นได้โดยการคัดเลือกถ้าพบว่ารูปแบบของยีนนี้มีความสัมพันธ์กับลักษณะดังกล่าว

อนึ่งความถี่ allele ในกลุ่มโคนมลูกผสมนี้ตรงกันข้ามกับประชากรของ โคนมพันธุ์โฮลสไตล์ 100% และพันธุ์ Jersey ที่ศึกษาโดย Spelman et al. (2002) โคนมพันธุ์ German Angeln ที่ศึกษาโดย Sanders et al.(2006) ในขณะเดียวกันผลการวิจัยนี้สอดคล้องกับการศึกษาในโคนมพันธุ์ Dutch Holstein (Schennink et al., 2007), พันธุ์ Ayrshire (Spelman et al., 2002), พันธุ์ UK Holstein (Banos et al., 2008), พันธุ์ Israeli Holstein (Weller et al., 2003), พันธุ์ Fleckvich และ German Holstein (Thaller et al., 2003) พันธุ์ Montbe'liarde, พันธุ์ Normande และ

พันธุ์ French Holstein (Gautier et al., 2007) ความเหมือนและความแตกต่างในด้านความถี่ของรูปแบบต่างๆที่พบนี้ อาจอธิบายได้ว่า แนวโน้มของการคัดเลือกโคนมในแต่ละประเทศนั้นมีความแตกต่างกัน จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้การพบรูปแบบ K ในแต่ละประชากรมีความแตกต่างกัน เมื่อพิจารณาถึงสภาพอุตสาหกรรมการเลี้ยงโคนมในประเทศ แม้ว่าเราใช้ความเข้มข้นของไขมันนมเป็นเกณฑ์หนึ่งในการเพิ่มหรือลดราคาน้ำนมดิบแต่ในสภาพการเลี้ยงโคนมของเกษตรกรรายย่อยและรายกลางซึ่งเป็นกลุ่มผู้เลี้ยงกลุ่มใหญ่ของประเทศ ยังไม่มีการคัดเลือกโคเพื่อให้ได้ผลผลิตน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมที่สูง จึงอาจเป็นเหตุผลที่จะใช้ในการอธิบายถึงสภาพความถี่ของรูปแบบ K ที่ต่ำในโคนมลูกผสมในประเทศ

ตารางที่ 3 ความถี่ allele และ genotype ค่า *P-value* ในการทดสอบการเบี่ยงเบนจากสภาพสมดุล Hardy – Weinberg และค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของลักษณะต่างๆ

Item	Total	Allele		Genotype		
	Number	K	A	KK	KA	AA
Frequency	227	0.36	0.64	0.115	0.480	0.405
P-value of Hardy – Weinberg equilibrium test	0.57					
Average ± SD	No. of data					
Milk yield (kg./day)	2257			9.99 ± 3.41	10.54± 3.95	11.09± 4.25
Protein yield (g./day)	2255			305.23 ± 103.32	314.82 ± 111.79	316.35 ± 115.72
Fat yield (g./day)	2218			397.02 ± 136.94	387.23 ± 135.12	384.26 ± 139.18
SNF (g./day)	2218			846.59 ± 283.71	876.41 ± 322.24	907.02 ± 338.89
Total solid (g./day)	2257			1254.36 ± 419.47	1261 ± 444.17	1290 ± 467.35
% protein	2255			3.07 ± 0.39	3.03 ± 0.37	2.90 ± 0.34
%fat	2218			4.02 ± 0.70	3.75 ± 0.68	3.54 ± 0.61
%SNF	2218			8.49 ± 0.51	8.35 ± 0.48	8.21 ± 0.49
%Total solid	2257			12.62 ± 1.12	12.14 ± 0.99	11.77 ± 0.95

อิทธิพลรูปแบบของยีน DGAT1 ต่อลักษณะปริมาณน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนม

จากการศึกษาพบว่า ยีนดังกล่าวมีอิทธิพลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทุกลักษณะ ยกเว้นลักษณะปริมาณไขมันนม โดยยีนนี้มีอิทธิพลในการเพิ่มผลผลิตน้ำนม ปริมาณโปรตีนนม และปริมาณของแข็งที่ไม่รวมไขมัน แต่กลับมีอิทธิพลในทางลดลงของความเข้มข้นขององค์ประกอบที่สำคัญ คือ %ไขมันนม โปรตีนนม และ %SNF (ตารางที่ 4) ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การใช้ยีน DGAT1 เพื่อเป็น gene marker เพื่อช่วยในการคัดเลือกโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ประชากรโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ในประเทศมีไขมันนม และองค์ประกอบน้ำนมอื่นๆ สูงขึ้นอาจยังไม่สามารถใช้ได้ ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Schennick et al. (2007) ซึ่งทำการศึกษาอิทธิพลของยีนนี้ในประชากรโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ในประเทศเนเธอร์แลนด์ แต่ขัดแย้งกับการศึกษาของ,

Banos et al.(2008), Bennewitz et al.(2004), Gautier et al. (2007), Grisart et al.(2002), Kuehn et al.(2007), Spelman et al.(2002), Thaller et al.(2003), Weller et al.(2003) ซึ่งการศึกษาเหล่านี้พบว่า ยีนนี้มีผลต่อการลดลงของปริมาณน้ำนม และปริมาณโปรตีน แต่มีผลในการเพิ่มปริมาณและเปอร์เซนต์ไขมัน อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลของรูปแบบ KK เทียบกับรูปแบบ KA หรือ AA (ตารางที่ 5) จะเห็นได้ว่าผลการศึกษาครั้งนี้เป็นไปทฤษฎี ที่เสนอโดย Grisart et al.(2002) และ Winter et at.(2002) ซึ่งพบว่า ยีน DGAT1 รูปแบบ K นั้นมีผลทำให้การทำงานของเอ็นไซม์ diacylglycerol acyltransferase1 ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์ triglyceride จากตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่าอิทธิพลของ KK เมื่อเทียบกับรูปแบบ KA และ AA จะมีอิทธิพลในการลดปริมาณน้ำนม ในขณะที่จะมีอิทธิพลในการเพิ่มไขมันนม โปรตีนนม และของแข็งที่ไม่รวมไขมันนม และของแข็งทั้งหมด สูงกว่ารูปแบบ KA และ AA อย่างไรก็ตามอิทธิพลของรูปแบบ KK ในโคนมลูกผสมโฮลสไตล์อาจไม่สูงจนสามารถใช้ในการคัดเลือกเพื่อเพิ่มองค์ประกอบที่สำคัญในน้ำนมได้ ซึ่งอาจมีสาเหตุจากอิทธิพลระหว่างยีนที่อยู่ต่างตำแหน่งกันมีผลข่มการแสดงออกของยีนนี้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากโครงสร้างพันธุกรรมของโคลูกผสมโฮลสไตน์ส่วนหนึ่งประกอบด้วยสายเลือดโคพื้นเมือง อาจมีพันธุกรรมที่เกี่ยวข้องกับองค์ประกอบน้ำนมที่ต่ำ และพันธุกรรมดังกล่าวอาจมีผลต่อการแสดงออกของยีนนี้ อย่างไรก็ตาม คำอธิบายนี้เป็นเพียงสมมุติฐานที่ต้องพิสูจน์ต่อไป

ตารางที่ 4 อิทธิพลของ genotype รูปแบบต่างๆของยีน DGAT1 (Acyl-CoA:diacylglycerol acyltransferase1) ต่อลักษณะผลผลิตและองค์ประกอบในน้ำนม

Item[1/]	Effect of genotype ± SE		
	AA	KA	KK
MY (kg./day)	1.15 ± 0.28***	0.85 ± 0.27**	0
PY (g./day)	17.02 ± 8.10*	15.53 ± 7.69*	0
FY (g./day)	-14.89 ± 9.86	-2.09 ± 9.39	0
SNF (g./day)	75.76 ± 23.55**	52.41 ± 22.41**	0
TS (g./day)	51.67 ± 32.09	39.87 ± 30.49	0
% prot	-0.13 ± 0.02***	-0.07 ± 0.02**	0
%fat	-0.55 ± 0.05***	-0.32 ± 0.05***	0
%SNF	-0.23 ± 0.03***	-0.18 ± 0.03***	0
%TS	-0.82 ± 0.07***	-0.53 ± 0.07***	0

MY, PY, FY, SNF, TS, %prot, %SNF, %TS หมายถึง ปริมาณน้ำนม, ปริมาณโปรตีน, ปริมาณไขมัน, ปริมาณของแข็งที่ไม่รวมไขมันนม, ปริมาณของแข็งทั้งหมด, เปอร์เซ็นต์โปรตีน, เปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ไม่รวมไขมันนม, และเปอร์เซ็นต์ของแข็งทั้งหมด ***, **, * หมายถึง *P-value<0.0001, < 0.01, <0.05*

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของลักษณะผลผลิตและองค์ประกอบน้ำนมในแต่ละ genotype

	MY[1/]	PY[1/]	FY[1/]	SNFY[1/]	TS[1/]	%prot[1/]	%fat[1/]	%SNF[1/]	%TS
AA VS KA	0.30	1.49	-12.8**	23.35	11.80	-0.06***	-0.23***	-0.04*	-0.28***
AA VS KK	1.15***	17.02*	-14.89	75.76**	51.67	-0.13***	-0.55***	-0.23***	-0.82***
KA VS AA	-0.30	-1.49	12.8**	-23.33	-11.80	0.06***	0.23***	0.04*	0.28***
KA VS KK	0.85**	15.53*	-2.09	52.41*	39.87	-0.07**	-0.32***	-0.18***	-0.53***
KK VS AA	-1.15***	0.13**	14.89	75.76**	-51.67	17.02*	0.55***	0.23***	0.82***
KK VS KA	-0.85**	0.07**	2.09	-52.41*	-39.87	-15.53*	0.32***	0.18***	0.53***

MY, PY, FY, SNF, TS, %prot, %SNF, %TS หมายถึง ปริมาณน้ำนม, ปริมาณโปรตีน, ปริมาณไขมัน, ปริมาณของแข็งที่ไม่รวมไขมันนม, ปริมาณของแข็งทั้งหมด, เปอร์เซ็นต์โปรตีน, เปอร์เซ็นต์ของแข็งที่ไม่รวมไขมันนม, และเปอร์เซ็นต์ของแข็งทั้งหมด ***, **, * หมายถึง *P-value<0.0001, < 0.01, <0.05*

บทที่ 4

สรุปและข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาที่กล่าวมาสามารถสรุปยีน DGAT1 ยังไม่มีความเหมาะสมในการนำมาประยุกต์ใช้เป็น gene marker เพื่อช่วยในการคัดเลือกในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ให้มีผลผลิตน้ำนมที่มีองค์ประกอบน้ำนมโดยเฉพาะไขมันนมที่สูงขึ้น อย่างไรก็ตามการใช้ gene ดังกล่าวเพื่อช่วยในการคัดเลือกให้โคมีผลผลิตน้ำนมที่สูงขึ้นอาจสามารถทำได้ อย่างไรก็ตามในการเพิ่มองค์ประกอบน้ำนมอาจต้องใช้การจัดการสิ่งแวดล้อมและอาหารเข้าช่วย

อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษามีความเป็นไปได้ที่การแสดงออกของยีน DGAT1 ต่อผลผลิตและองค์ประกอบน้ำนมในส่วนไขมันนม นั้นอาจถูกอิทธิพลของยีนในตำแหน่งอื่นๆ ข่ม ดังนั้นจึงเกิดเป็นสมมุติฐานว่าลักษณะที่เกี่ยวข้องกับไขมันนมในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ของประเทศไทยอาจมีการทำงานร่วมกันของยีน DGAT1 และยีนตำแหน่งอื่นๆ ด้วย ดังนั้นในการศึกษาต่อไปจึงควรทำการศึกษาอิทธิพลของยีนดังกล่าวร่วมกับยีนที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบน้ำนมตำแหน่งอื่นๆ เพื่อให้ได้ข้อสรุปที่ชัดเจนต่อไป

บรรณานุกรม

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

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

Gautier M., Captan A., Fritz S., Eggen A., Boichard D., and Druet T.. 2007. Characterization of the *DGAT1* K232A and variable number of tandem repeat polymorphisms in French dairy cattle. Journal of Dairy Science. 90. 2980-2988.

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

Kuehn C., C. Edel, R. Weikard1 and G. Thaller. 2007. Dominance and parent-of-origin effects of coding and non-coding alleles at the acylCoA-diacylglycerol-acyltransferase (*DGAT1*) gene on milk production traits in German Holstein cows. BMC Genetics. 8. 62-70.

Kühn, Ch., G. Thaller, A. Winter, O. R. P. Bininda-Emonds, B. Kaupe, G. Erhardt, J. Bennewitz, M. Schwerin, and R. Fries. (2004). Evidence for multiple alleles at the *DGAT1* locus better explains a quantitative trait locus with major effect on milk fat content in cattle. Genetics Society of America. 167. 1873–1881.

Ripoli, M.V., P. Corva, G. Giovambattista. (2006). Analysis of a polymorphism in the *DGAT1* gene in 14 cattle breeds through PCR-SSCP methods. Research in Veterinary Science 80. 287–290

Sanders, K., J. Bennewitz, N. Reinsch, G. Thaller, E. M. Prinzenberg, C. Kühn, and E. Kalm. (2006). Characterization of the *DGAT1* mutations and the *CSN1S1* promoter in the German Angeln dairy cattle population. Journal of Dairy Science. 89. 3164–3174.

Schennink A., W.M Stoop, M.H.P.W Visher. (2007). *DGAT1* underlies large genetic variation in milk-fat composition of dairy cows. Animal Genetics . 38. 467–73.

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

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

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

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

ประวัตินักวิจัย

1. **ชื่อ – นามสกุล** **(ภาษาไทย)** นางอมรรัตน์ โมพี
(ภาษาอังกฤษ) Ms.Amonrat Molee

2. **คุณสมบัติทางวิชาการ มีรายละเอียดดังนี้**
   1. **ประเภทงาน** เป็นอาจารย์มหาวิทยาลัย
   2. **ตำแหน่ง** อาจารย์

3. **หน่วยงานและที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวกพร้อมหมายเลขโทรศัพท์, โทรสาร, มือถือ และ e-mail**

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา
โทรศัพท์ 0897446440 e-mail amonrat2369@yahoo.com

4. **ประวัติการศึกษา**

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (สัตวศาสตร์)	2533	มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สัตวศาสตร์)	2538	มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย
ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (ปรับปรุงพันธุ์สัตว์)	2548	มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประเทศไทย

5. **สาขาวิชาการที่ชำนาญที่สุด (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ (ถ้ามี)**

ด้านการปรับปรุงพันธุ์ ทั้งด้าน conventional และ Molecular breeding และการจัดการฐานข้อมูล

6. **ผลงานวิจัย**

   1. **ผลงานที่ตีพิมพ์ โปรดเขียนแยกเป็นรายหัวข้อ**

ผลงานตีพิมพ์วารสารภายในประเทศ

อมรรัตน์ โมพี, และ มนต์ชัย ดวงจินดา. 2549. ผลตอบสนองการคัดเลือกเมื่อใช้โมเดลที่มี อิทธิพลของยีนหลัก โดยการจำลองข้อมูลในโคนม. วารสารแก่นเกษตร.4(33).

ผลงานตีพิมพ์ในรายงานการประชุม

อมรรัตน์ โมพี, มนต์ชัย ดวงจินดา, วิโรจน์ ภัทรจินดา, สุภร กตเวทิน, จิรวัฒน์ สนิทชน, กนก ผลารักษ์, และ พงษ์ชาญ ณ ลำปาง. 2547. การตรวจหา quantitative trait loci ต่อ ลักษณะปริมาณน้ำนมบนโครโมโซมคู่ที่ 3 ในประชากรโคนมลูกผสม. งานประชุมประจำปีเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ครั้งที่ 16. มหาวิทยาลัยนเรศวร, พิษณุโลก.

อมรรัตน์ โมพี, และ มนต์ชัย ดวงจินดา. 2548. ผลตอบสนองการคัดเลือกเมื่อใช้โมเดลที่มีอิทธิพลของยีนหลักโดยการจำลองข้อมูลในโคนม. งานประชุมสัมมนา วิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 1. คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อมรรัตน์ โมพี, และ มนต์ชัย ดวงจินดา. 2549. ขนาดประชากรที่เหมาะสมในการ วิเคราะห์หายีนควบคุมลักษณะเชิงปริมาณน้ำนมในโคนโดยการจำลองข้อมูล.งานประชุมสัมมนาวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 1. คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Molee A., M. Duangjinda, V. Pattarajinda, S. Katawatin, J. Sanitchon, K Phalaraksh, and P. Na-Lampang. 2005. Detection of putative quantitative trait loci affecting milk yield on chromosome 3 in Thai crossbred Holstein. Annaul conference for 2nd graduate agriculture biotechnology, Juraporn research centre. Bangkok. (Poster)

กนก เชาวภายี อมรรัตน์ โมพี และ วาณี ชัยวัฒนสิน. 2551. การประมาณค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมและคุณค่าการผสมพันธุ์ของลักษณะทางเศรษฐกิจบางลักษณะในโคกำแพงแสน. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 46 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บทความทางวิชาการ

อมรรัตน์ โมพี, และ มนต์ชัย ดวงจินดา. 2549. ยีนเครื่องหมายที่นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์. วารสารสัตวบาล.16(77).

มนวิไล เสรีบุตร, และ อมรรัตน์ โมพี. 2551. การใช้ยีน MC4R และยีน IGF2 เป็นเครื่องทางพันธุศาสตร์เพื่อช่วยในการคัดเลือกสุกร. วารสารสัตวบาล. 18(82)

7. บทบาทความรับผิดชอบในโครงการ เช่น เป็นหัวหน้าโครงการ/ นักวิจัยหลักในโครงการ / นักวิจัยที่สนับสนุนเพียงบางกิจกรรม

7.1 *โครงการวิจัยที่เสร็จสิ้น*	โครงการการสำรวจเพื่อศึกษาสถานภาพการเลี้ยงกวางในประเทศไทย
หน้าที่รับผิดชอบ	ผู้วิจัยและเลขานุการโครงการ
แหล่งให้ทุน	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
7.2*โครงการวิจัยที่เสร็จสิ้น*	การศึกษาความสัมพันธ์ของยีนไทโรโกลบูลินต่อลักษณะคุณภาพเนื้อของโคกำแพงแสน
หน้าที่รับผิดชอบ	ผู้ร่วมวิจัย
แหล่งให้ทุน	สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7.3 *โครงการวิจัยที่อยู่ระหว่างการดำเนินการ*	ความสัมพันธ์ของรูปแบบยีนเคซีนกับระดับสายเลือดโฮลสไตล์ในโคนมลูกผสม
หน้าที่รับผิดชอบ	หัวหน้าโครงการวิจัย
แหล่งให้ทุน	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา
7.4 *โครงการวิจัยที่อยู่ระหว่างการดำเนินการ*	รูปแบบของยีน Luteinizing Hormone Receptor ต่อลักษณะความ สมบูรณ์พันธุ์ในโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ลูกผสม
หน้าที่รับผิดชอบ	หัวหน้าโครงการวิจัย
แหล่งให้ทุน	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
7.5 *โครงการวิจัยที่อยู่ระหว่างการดำเนินการ*	รูปแบบของยีน Major Histocompatibility Complex ต่อลักษณะความสามารถในการต้านทานโรคในไก่พื้นเมืองไทย
หน้าที่รับผิดชอบ	หัวหน้าโครงการวิจัย
แหล่งให้ทุน	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
7.6 *โครงการวิจัยที่อยู่ระหว่างการดำเนินการ*	การสร้างสายพันธุ์ “ไก่เนื้อโคราช” เพื่อการผลิตเป็นอาชีพวิสาหกิจชุมชน
หน้าที่รับผิดชอบ	ผู้ร่วมวิจัย
แหล่งให้ทุน	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย