



รายงานการวิจัย

ความแตกต่างของรูปร่างโครโมโซมโคพื้นเมืองไทย
(*Bos indicus*) ปกติ กับโคที่มีลักษณะผิดปกติ อันเนื่องมาจาก
พันธุกรรม

**Karyotypic Differences between Normal and Abnormal
Characteristics of Native Cattle (*Bos indicus*)**

ผศ. ดร. งามา	อินทร์สังข์
อาจารย์วีระเกียรติ	ทรัพย์มี
ผศ. กัณหา	ไผขาว

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยประเภทอุดหนุนทั่วไป
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2549
จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องความแตกต่างของรูปร่างโครโมโซมโคพื้นเมืองไทย (*Bos indicus*) ปกติ กับ โคที่มีลักษณะผิดปกติอันเนื่องมาจากพันธุกรรม ได้รับการสนับสนุนงบประมาณการวิจัยที่เป็น เงินงบประมาณผลประโยชน์ในหมวดอุดหนุนทั่วไปประจำปี พ.ศ. 2549 จากมหาวิทยาลัย เทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช ใต้ใหญ่ ซึ่งผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย นอกจากนี้ผู้วิจัยขอขอบคุณนักศึกษาในระดับปริญญาตรีชั้นปีที่ 4 สาขาวิชาสัตวศาสตร์ ดัง รายนามในภาคผนวกทุกคนที่เป็นผู้ช่วยในการดำเนินงานวิจัย จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และ เนื่องจากงบประมาณที่ได้รับการสนับสนุนในการวิจัยนี้มีจำนวนค่อนข้างน้อย ดังนั้นค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานบางอย่างจึงจำเป็นต้องใช้ทรัพยากรของห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์ สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ และห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์ สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ ซึ่ง คณะผู้วิจัย ขอขอบคุณในการให้ความอนุเคราะห์ด้วย นอกจากนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนางสาว จารุณี อิ่มเอิบ นิสิตนิสิตบัณฑิตวิทยาลัย ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ซึ่งเป็นผู้เรียบเรียงงานวิจัยจนเป็นเล่มที่สมบูรณ์

ผู้วิจัย

2 มกราคม 2551

เรื่อง

หน้า

สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
บทนำ	1
วิธีการวิจัย	3
ผลการวิจัย	9
วิจารณ์ผลการทดลอง	31
สรุปผลการทดลอง	34
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก	36
รายชื่อนักศึกษาผู้ช่วยวิจัย	37

ตารางที่		หน้า
1	ตารางแสดงค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm, L_p) ความยาวแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm, L_s) และ ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (L_T) ค่าเฉลี่ย relative length (R_L) ค่า centromeric index (C_p) ของโคลัสกษณะปกติ	12
2	ตารางแสดงค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm, L_p) ความยาวแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm, L_s) และ ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (L_T) ค่าเฉลี่ย relative length (R_L) ค่า centromeric index (C_p) ของโคลัสกษณะแกระ	16
3	ตารางแสดงค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm, L_p) ความยาวแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm, L_s) และ ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (L_T) ค่าเฉลี่ย relative length (R_L) ค่า centromeric index (C_p) ของโคลัสกษณะสี่เฟือก	21
4	ตารางแสดงค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm, L_p) ความยาวแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm, L_s) และ ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (L_T) ค่าเฉลี่ย relative length (R_L) ค่า centromeric index (C_p) ของโคลัสกษณะเขาพิคปกติ	26

ภาพที่		หน้า
1	ก. ลักษณะของสีเลือดที่สามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ซึ่งมีสีแดง ข. ลักษณะของสีเลือดที่ไม่สามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ซึ่งมีสีเขียวคล้ำ	9
2	ลักษณะโครโมโซมระยะเมทาเฟส	10
3	ก. โคลักษณะที่ปกติเพศผู้ ข. โครโมโซมโคปกติ	11
4	คาริโอแกรมของโคลักษณะปกติ	15
5	ก. โคลักษณะแคระ ข. โครโมโซมโคแคระ	16
6	คาริโอแกรมของโคลักษณะแคระ	20
7	ก. โคลักษณะสีเผือก ข. โครโมโซมโคสีเผือก	21
8	คาริโอแกรมของโคลักษณะสีเผือก	25
9	ก. โคลักษณะเขาผิดปกติ ข. โครโมโซมโคที่เขาผิดปกติ	26
10	คาริโอแกรมของโคลักษณะเขาผิดปกติ	30
11	คาริโอไทป์ของโคเพศเมียที่เกิดความผิดปกติแบบ Double Translocation ในโครโมโซมคู่ 1/29 และ 5/21	32
12	คาริโอไทป์ของโคที่เกิดจากความผิดปกติแบบ Trisomy ในโครโมโซมคู่ที่ 17	33
13	คาริโอไทป์ของโคพันธุ์ Brown Swiss เพศผู้ที่เกิดความผิดปกติแบบ 1/29 Robertsonian Translocation	33

**ความแตกต่างของรูปร่างโครโมโซมโคพื้นเมืองไทย (*Bos indicus*) ปกติ กับโคที่มี
ลักษณะผิดปกติ อันเนื่องมาจากพันธุกรรม**

**Karyotypic Differences between Normal and Abnormal Characteristics of
Native Cattle (*Bos indicus*)**

บทคัดย่อ

การศึกษาคาร์ิโอไทป์ของโคพื้นเมืองในภาคใต้ของไทยครั้งนี้ดำเนินการโดยคัดเลือกโคพื้นเมืองที่มีลักษณะภายนอกที่ปกติและที่ผิดปกติอีก 3 ลักษณะ ได้แก่ โคที่มีลักษณะแคะระ โคที่มีขนสีเผือก และโคที่มีเขาหักหย้อย เพื่อทำการศึกษาคาร์ิโอไทป์ว่ามีความแตกต่างกันของโครโมโซม โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นเวลา 72 ชั่วโมง และทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยใช้เทคนิคโคลชิซิน-ไฮโปโทนิคฟิเคชัน-แอร์คาร์ยอิง ซึ่งใช้สีย้อมซาฟรีย้อม แล้วทำการศึกษาลักษณะโครโมโซมของโคลักษณะต่างๆ ทั้ง 4 ลักษณะ ซึ่งพบว่า มีจำนวนโครโมโซม $2n$ (diploid) เท่ากับ 60 โดยเป็นโครโมโซมร่างกาย 29 คู่ และโครโมโซมเพศ 1 คู่ และมีจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (fundamental number: FN) ของโคที่มีลักษณะปกติ โคที่มีลักษณะแคะระ และโคที่มีลักษณะสีเผือก อยู่ในช่วง 80-90 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโคทั้งลักษณะทั้ง 2 ลักษณะคือลักษณะแคะระ และลักษณะสีเผือก มีจำนวนโครโมโซมพื้นฐานไม่แตกต่างจากโคปกติ แต่ในโคที่มีลักษณะเขาหักหย้อยมีค่าความถี่ของโครโมโซมพื้นฐานในช่วง 60-70 ซึ่งใกล้เคียงกับค่าจำนวนโครโมโซมพื้นฐานของโคยุโรป (*Bos taurus*) ที่รายงานโดย Cymbron *et al* (2004) ซึ่งพบว่าจำนวนโครโมโซมพื้นฐานของโคยุโรปมีค่าเท่ากับ 70 ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าโคพื้นเมืองเขาหักหย้อยเป็นโคที่มีพันธุกรรมของโคยุโรปอยู่ด้วย เนื่องจากโคยุโรปบางสายพันธุ์เมื่อมีอายุมากก็มีลักษณะเขาหักหย้อยด้วยเช่นกัน

คำสำคัญ : คาร์ิโอไทป์, โคพื้นเมือง

Karyotypic Differences between Normal and Abnormal Characteristics of Native Cattle (*Bos indicus*)

ABSTRACT

The research was conducted to elucidate the karyotypes of the indigenous cattle in southern Thailand. The normal cattle and other there abnormal characteristics of the cattle including dwarfism, albino and dropped horn cattle were selected using for this research. Blood samples were collected through the jugular vein using for t-lymphocytes incubation. The lymphocytes were cultured in stock media for 72 houses. Colchicine was used for blocking the development of the cell at the metaphase stage. The karyotypes of ten cells for each characteristics of the cattle were studied. It was found that all four characteristics of the cattle had sixty chromosomes (2n) with fifty-eight pieces of the autosome and two pieces of the sexchromosome. The karyotypes of the dwarfism and of the albino cattle showed the similar fundamental number (FN) which is ranged from 80-90. The fundamental number of the dropped horn cattle was ranged from 60-70, similar with the *Bos Taurus* cattle reported by Cymbron *et .al* (2004) which had the fundamental number about 70. This research result implied that the dropped horn cattle may carried some genetic materials of the western cattle through cross breeding with the local Thai cattle. More deeply study in chromosome abnormality must be focus to this characteristic of the native cattle in southern Thailand.

Key word: Cytogenetics, Karyotypes, Native Cattle

ความแตกต่างของรูปร่างโครโมโซมโคพื้นเมืองไทย (*Bos indicus*) ปกติ กับโคที่มี

ลักษณะผิดปกติ อันเนื่องมาจากพันธุกรรม

Karyotypic Differences between Normal and Abnormal Characteristics of Native Cattle (*Bos indicus*)

บทนำ

โคยุโรป (*Bos taurus*) เป็นสัตว์เลี้ยงที่มีโครโมโซมจำนวน 60 แท่ง โดยเป็น autosome จำนวน 58 แท่ง และอีก 2 แท่ง เป็น sex chromosome ในบรรดา autosome ทั้งหมดมีลักษณะเป็น submetacentric ในการศึกษาโดยเทคนิคการย้อมสี Giemsa สามารถเห็นรูปร่างของโครโมโซมที่แบ่งออกเป็นขนาดต่างๆ ได้หลายขนาด ซึ่งมีโครโมโซม X ที่สามารถแยกได้อย่างชัดเจน เนื่องจากมี 2 แขน และมีขนาดใหญ่ใกล้เคียงกับ autosome ชิ้นที่ใหญ่ที่สุด ขณะที่โครโมโซม Y นั้นมีขนาดเล็กที่สุด และเล็กพอๆ กับ autosome แท่งที่มีขนาดเล็กที่สุดเช่นกัน (Fries and Popescu, 1999)

ในขณะที่การศึกษา karyotype ของโครโมโซมของโคยุโรปได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางมีความเข้าใจในด้านต่างๆ ของโครโมโซมของโคอย่างลึกซึ้งและสามารถใช้ประโยชน์จากการศึกษาเพื่อการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์โคให้มีความก้าวหน้ามาโดยตลอด แต่สำหรับโคพื้นเมืองของไทย (*Bos indicus*) ยังมีข้อมูลน้อยมาก ทางภาคเหนือก็มีโคขาวลำพูน ซึ่งได้รับการตรวจสอบลักษณะของโครโมโซมไปบ้างแล้ว โดยประเทศและสุวพันธ์ (2527) แต่ยังเป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้น ไม่ได้ทำการตรวจสอบลักษณะโครโมโซมของโคที่มีลักษณะผิดปกติทางพันธุกรรม ดังนั้นเพื่อให้สามารถได้ข้อมูลที่สามารถให้รายละเอียดเกี่ยวกับความปกติและลักษณะที่ผิดปกติของโคพื้นเมืองเพิ่มเติม จึงควรทำการศึกษาลักษณะโครโมโซมของโคพื้นเมืองที่มีลักษณะผิดปกติจากสาเหตุทางพันธุกรรมด้วย ทั้งนี้เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์โคพื้นเมืองได้ในลำดับต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษารูปร่างโครโมโซมของโคพื้นเมือง (*Bos indicus*) ทั้งที่เป็นโคซึ่งมีลักษณะภายนอกที่ผิดปกติและโคที่มีลักษณะปกติ ซึ่งเป็นลักษณะที่สามารถถ่ายทอดได้ทางพันธุกรรม เพศละไม่น้อยกว่า 1 ลักษณะ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้รูปร่างของโครโมโซมของโคพื้นเมือง (*Bos indicus*) ที่มีลักษณะปกติและมีลักษณะผิดปกติ ซึ่งเป็นลักษณะที่สามารถถ่ายทอดได้ทางพันธุกรรม ซึ่งสามารถใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ของโคพื้นเมืองได้ในโอกาสต่อไป

วิธีการวิจัย

การวิจัยนี้ดำเนินการใน 2 แหล่งได้แก่

1. การดำเนินการภายในมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช

1.1 สัตว์ทดลอง

1.1.1 โคพื้นเมืองที่มีลักษณะปกติ เพศผู้ จากสถานีวิจัยบำรุงพันธุ์สัตว์ จังหวัด นครศรีธรรมราช จำนวน 1 ตัว

1.1.2 โคพื้นเมือง เพศผู้ ที่มีลักษณะผิดปกติ คือเป็นโคแคะระ จากสถานีวิจัย บำรุงพันธุ์สัตว์ จังหวัด นครศรีธรรมราช จำนวน 1 ตัว

1.1.3 โคพื้นเมืองเพศผู้ ที่มีลักษณะผิดปกติที่เป็นลักษณะโคเผือก จากสถานีวิจัย บำรุงพันธุ์สัตว์ จังหวัด นครศรีธรรมราช จำนวน 1 ตัว

1.1.4 โคพื้นเมืองเพศเมียที่มีลักษณะผิดปกติของลักษณะเขาที่หักห้อยลง (Broken horn) จากสถานีวิจัยบำรุงพันธุ์สัตว์ จังหวัด นครศรีธรรมราช จำนวน 1 ตัว

1.2 อุปกรณ์

1.2.1 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.2.2 ไมโครปีเปต

1.2.3 ปีเปต

1.2.4 ขวดเลียงเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร

1.2.5 ตัวกรอง , แผ่นกรอง , กระดาษกรอง

1.2.6 แผ่นสไลด์

1.2.7 เครื่องปั่นเหวี่ยง

1.2.8 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 1000 มิลลิลิตร

1.2.9 ตู้อบ

1.3.0 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ

1.3 การเตรียมเลือด

เจาะเลือดจากเส้นเลือดดำของตัวอย่างสัตว์แต่ละชนิดประมาณ 15 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารเฮปาริน เขย่าเบาๆ ให้เลือดกับเฮปารินเข้ากันโดยใช้เฮปาริน 50 I.U. ต่อเลือด 1 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันไม่ให้เลือดแข็งตัว

1.4 วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ต่อปริมาตร 1 ลิตร

1.4.1. ละลายอาหารผสมผง RPMI 1640 medium supplemented with L-glutamine น้ำบริสุทธิ์ 900 ml จนเป็นเนื้อเดียวกัน

1.4.2. เตรียม HEPES 15 μ M (2g) ในน้ำบริสุทธิ์ 50 ml เติมน้ำลงไปแล้วค่อยๆ เติมน้ำลงไปในสารละลายอาหารในข้อที่ 1 แล้วกวนเป็นเนื้อเดียวกัน

1.4.3. ปิเปตสารละลายยาปฏิชีวนะ 1 ml ที่มี penicillin 250 U/ml และ Streptomycin 250 mg/ml ลงในสารละลายอาหาร

1.4.4. เติมน้ำ Fetal calf serum ความเข้มข้น 15 % ขนาด 100 ml ลงไปหลังจากที่สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันได้ดีแล้ว โดยผ่านการกระตุ้น (activation)

1.4.5. เติมน้ำ PHA 180 μ g/ml แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

1.4.6. กรองแบบ negative pressure และปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 7.0

1.4.7. ปิดฝาแล้วเก็บในตู้เย็นจนกว่าจะนำมาใช้

1.5 การเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว

เตรียมขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อแล้ว ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน 4.8 มิลลิลิตรซึ่งประกอบด้วย RPMI medium 1640 with L-glutamine 83 เปอร์เซ็นต์ fetal bovine serum 15 เปอร์เซ็นต์ และ phytohemagglutinin-m 2 เปอร์เซ็นต์ แล้วใส่เลือดลงไป 0.2 มิลลิลิตร ปิดจุกให้สนิท เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบชั่วโมงที่ 71 จึงหยดโคลชิซินความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปในขวด ขวดละ 25 ไมโครลิตร ทุกขั้นตอนทำในตู้ปลอดเชื้อ และในชั่วโมงที่ 72 ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์

1.6 การเก็บเกี่ยวเซลล์

1.6.1 เมื่อเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดครบ 72 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยเทอาหาร และเซลล์ลงในหลอดอาหาร นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์เม็ดเลือดขาว

1.6.2 ดูดเอาน้ำส่วนใสตอนบนทิ้ง ใส่สารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.075 โมลต่อลิตร ลงไปประมาณ 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง โดยสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น Hypotonic solution เพื่อช่วยให้เซลล์พองตัว และโครโมโซมภายใน เซลล์จะละลายออกง่ายต่อการศึกษาแยกสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ทิ้งโดยการนำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาน้ำใสตอนบนทิ้ง

1.6.3 ทำให้เซลล์คงสภาพ โดยใส่น้ำยาคงสภาพเซลล์ (fixative solution) ซึ่งประกอบด้วยเมทานอล 3 ส่วน และกรดอะซิติก ลงไป 5 มิลลิลิตร เป็นเวลาไม่น้อยกว่า 30 นาที แล้วนำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน

1.6.4 ดูดน้ำใสตอนบนทิ้ง เติมน้ำยาคงสภาพเซลล์ลงไปอีก 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นทำเช่นนี้อีก 2-3 ครั้ง จนพบว่าตะกอนสีขาวที่ก้นหลอดทดลองสะอาดดี ซึ่งก็คือกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ต้องการศึกษา แล้วเติมน้ำยาคงสภาพลงไป 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

1.7 การย้อมสีโครโมโซม

นำสไลด์ที่แห้งแล้วไปย้อมสีโครโมโซม โดยใช้สีกิมซ่า (Giemsa) ความเข้มข้น 5.0 เปอร์เซ็นต์ ในไวสัฟเฟอร์ pH 7.2 นานประมาณ 7-10 นาที แล้วนำมาผ่านน้ำไหลเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

1.8 การเลือกเซลล์ที่ทำการตรวจนับ

ในการนับโครโมโซมกระทำเซลล์ที่อยู่ในระยะเมตาเฟส (metaphase) เท่านั้น โดยนำสไลด์ตัวอย่างที่ย้อมสีแล้วมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งตรวจสอบและบันทึกภาพเพื่อใช้สำหรับการศึกษาถึงความแตกต่างของรูปร่างโครโมโซมของโคแต่ละลักษณะ

2. การดำเนินการบริษัทโปรเฟสชันแนลลาโบราทอรีแมนเนจเม้นท์ คอร์ป จำกัด เลขที่ 9/23 ซอยลาดพร้าว แขวงวังทองหลาง เขต วังทองหลาง กรุงเทพฯ 10410

ส่งเลือดโคซึ่งมีลักษณะปกติ และมีลักษณะผิดปกติทั้ง 3 ลักษณะไปตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือที่ทันสมัยและมีเทคนิคที่สูงกว่าที่ดำเนินการใน มทร. ศรีวิชัย

2.1 การเก็บและเตรียมตัวอย่างเลือด เพื่อการศึกษาลักษณะของโครโมโซม

2.1.1 เจาะเลือดสัตว์ตัวอย่าง จากเส้นเลือดดำบริเวณลำคอ (Jugular vein) เก็บเลือดในหลอดสุญญากาศ ที่มีสาร heparin เคลือบอยู่ เพื่อป้องกันเลือดแข็งตัว เก็บเลือดในกระดิกน้ำแข็ง ในระหว่างการขนส่ง

2.1.2 ทำการเตรียม stock อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว RPMI 1640 โดยใช้สารเพื่อกระตุ้นการแบ่งเซลล์ phytoheagglutinin (PHA) แล้วแบ่งอาหารลงขวดเพาะเลี้ยงขวดละ 10 มล.

2.1.3 หยดเลือดลงในขวดเพาะเลี้ยง 15 หยด แล้วบ่ม (incubated) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เขย่าขวดทุกๆ เช้า - เย็น

2.1.4 ก่อนเก็บเกี่ยวเซลล์ประมาณ 30 นาที หยดสารโคลชิซิน ความเข้มข้น 0.1 มก./มล. หรือ 0.2 มก./ มล. ปริมาณ 100 ไมโครลิตร เขย่าให้โคลชิซินละลายจนทั่วขวดเพาะเลี้ยงนำเข้าตู้บ่มอีก 30 นาที แล้วจึงทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ระหว่างชั่วโมงที่ 71-73

2.2 การเก็บเกี่ยวเซลล์ (Cell Harvesting)

2.2.1 แยกเซลล์เม็ดเลือดออกจากอาหารเพาะเลี้ยง โดยย้ายสารละลายเลือด (เลือดกับอาหารเพาะเลี้ยงเลือด) จากขวดเพาะเลี้ยงเลือดลงใน centrifugal tube ขนาด 15 มล. จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 2,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำมาดูดส่วนใสทิ้งไป

2.2.2 ทำให้เซลล์พองโตกว่าเดิมเพื่อให้โครโมโซมกระจายตัวดี โดยการเติม 0.075 M KCl ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น hypotonic solution จำนวน 10 มล. ลงในตะกอนเม็ดเลือด ผสมให้เข้ากันดีด้วย vortex mixture แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2.2.3 เมื่อครบเวลาทำการแยก KCl ออกโดย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาทีดูดส่วนใสทิ้งไป

2.2.4 ตรึงเซลล์ (fixative) โดยการเติม fresh cold fixative ซึ่งมีส่วนผสมเป็น methanol และ glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3:1 ที่เตรียมใหม่ โดยใช้หลอดหยด เติมนลงไป

ปริมาณ 10 มล. ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex mixture แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2,500 รอบ/นาทีเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นดูด fixative ส่วนบนทิ้งไป

2.2.5 ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 4 อีก 3 ครั้ง จนได้ตะกอนขาวที่ก้นหลอด แล้วดูดสารละลายส่วนบนทิ้งไปเกือบหมดเหลือไว้เพียงตะกอนเซลล์ (cell pellet) ประมาณ 0.5-1 มล. เติม fixative เพื่อเจือจางตะกอน อีกประมาณ 1-2 มล. (ขึ้นอยู่กับปริมาณตะกอนเซลล์) ผสมให้เข้ากันดี

2.2.6 ใช้หลอดหยดดูดสารละลายตะกอนเซลล์เมื่อดูดขาว หยดลงบนสไลด์ที่สะอาดและเย็นจัดประมาณ 3 หยด โดยไม่ให้ซ้ำตำแหน่งเดิม และหยดให้สูงจากสไลด์ 2 ฟุต เพื่อให้เซลล์แตกและโครโมโซมแผ่กระจายดี ทิ้งสไลด์ให้แห้ง จึงนำมาตรวจโครโมโซมด้วย กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เลือกลำโพงที่โครโมโซมกระจายดีเพื่อใช้สำหรับการย้อมสีตามข้อ 1.7 ต่อไป

3. การศึกษาโครโมโซมที่ตัดแปลงตาม กันยาร์ตน์ (2532)

3.1 นำภาพโครโมโซมที่ได้จากการถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ และพิมพ์เรียบร้อยแล้วไปถ่ายเอกสารโดยการขยายขนาดเป็น 2 เท่า

3.2 ทำการวัดขนาดของโครโมโซม โดยเริ่มต้นด้วยการเติมจุดเซนโทรเมียร์บนแท่งโครโมโซม แล้วทำการวัดแขนแต่ละข้างจากจุดเซนโทรเมียร์ โดยใช้เวอร์เนียวัดระยะแขนทั้งแขนโครโมโซมข้างยาว (Long arm, L_L) และแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm, L_S)

3.3 นำค่า L_L และค่า L_S ที่ได้มาจากการวัดมาคำนวณหาความยาวโครโมโซมทั้งหมด total length: L_T ค่าความยาวสัมพัทธ์ (relative length: R_L) และค่า centromeric index (C_1) ตามสูตรดังนี้

$$L_T = (L_L + L_S)$$

$$R_L = (L_T / \sum L_T)$$

$$C_1 = (L_L / L_T)$$

โดยที่ L_T = total length

R_L = relative length

C_1 = centromeric index

L_L = long arm

L_S = short arm

ทำการจัดชนิดของโครโมโซมตามค่า centromeric index ตามเกณฑ์ของ กันยาร์ตน์ (2532) ดังนี้

1. เมตาเซนตริก (metacentric chromosome) มีค่า C_1 ระหว่าง 0.500 – 0.599
2. ซับเมตาเซนตริก (submetacentric chromosome) มีค่า C_1 ระหว่าง 0.600 – 0.699

3. แอโครเซนตริก (acrocentric chromosome) มีค่า C_1 ระหว่าง 0.700 – 0.899

4. เทโลเซนตริก (Telocentric chromosome) มีค่า C_1 ระหว่าง 0.900 – 1

3.4 นำภาพโครโมโซมที่ขยายขนาดเป็น 2 เท่า และถ่ายเอกสารแล้วมาตัดโครโมโซมออกเป็นแท่งๆ แล้วทำการจัดคู่โครโมโซมเป็นคู่ๆ จัดเรียงขนาดจากใหญ่ไปหาขนาดเล็ก โดยพิจารณาจากค่า R_1 และ C_1 ที่ใกล้เคียงกัน จากนั้นนำโครโมโซมแต่ละคู่ที่จัดเรียง ติดลงบนกระดาษ A 4

3.5 ศึกษาจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (Fundamental number) แบ่งตามเกณฑ์ของ อมรา (2540) ซึ่งแบ่งเป็น 4 ระดับได้แก่

ชนิด เมตาเซนตริก (metacentric chromosome) มีค่า FN เท่ากับ 2

ซับเมตาเซนตริก (submetacentric chromosome) มีค่า FN เท่ากับ 2

แอโครเซนตริก (acrocentric chromosome) มีค่า FN เท่ากับ 1

เทโลเซนตริก (telocentric chromosome) มีค่า FN เท่ากับ 1

3.6 การจัดกลุ่มของจำนวนแขนของโครโมโซมโดยวิธีคำแนะนำของ Cymbron *et al* (2004) ที่ได้ดำเนินการศึกษาในโคยูโรป (*Bos taurus*) มาก่อน และพบว่าจำนวนแขน FN เท่ากับ 70 ซึ่งในการจัดกลุ่มของจำนวนแขนของโครโมโซมนั้นจะจัดให้อยู่เพียงช่วงๆ ละ 10 แขน

4. สถานที่ทำการศึกษา

ห้องปฏิบัติการชีววิทยา 1 สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช ตำบลลำใหญ่ อำเภอทุ่งสง จังหวัดนครศรีธรรมราช

บริษัท โปรเฟสชันแนล ลาโบราทอรี แมเนจเม้นท์ คอร์ป จำกัด เลขที่ 9/2-3 ซอย ลาดพร้าว แขวงวังทองหลาง เขต วังทองหลาง กรุงเทพฯ 10410

5. ระยะเวลาในการทดลอง

17 มกราคม 2550 ถึง 20 ตุลาคม 2550 รวมระยะเวลาในการดำเนินการ 10 เดือน

ผลการวิจัย

1. ผลการทดลองจากห้องปฏิบัติการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช

1.1 ผลการเพาะเลี้ยงเซลล์ ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวจากเลือดโคพื้นเมือง ภายในห้องปฏิบัติการของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตนครศรีธรรมราช พบว่าภายในขวดอาหารเลี้ยงเซลล์เมื่อมีเวลาครบตามกำหนดแล้วจะมีตะกอนเป็นสีแดงอยู่ภายในขวดเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนที่สามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ และยังพบว่าขวดเลี้ยงเซลล์ที่ทำการทดลองบางครั้งจะมีสีเขียวคล้ำอยู่ภายในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนที่ไม่สามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ (ภาพที่ 1)



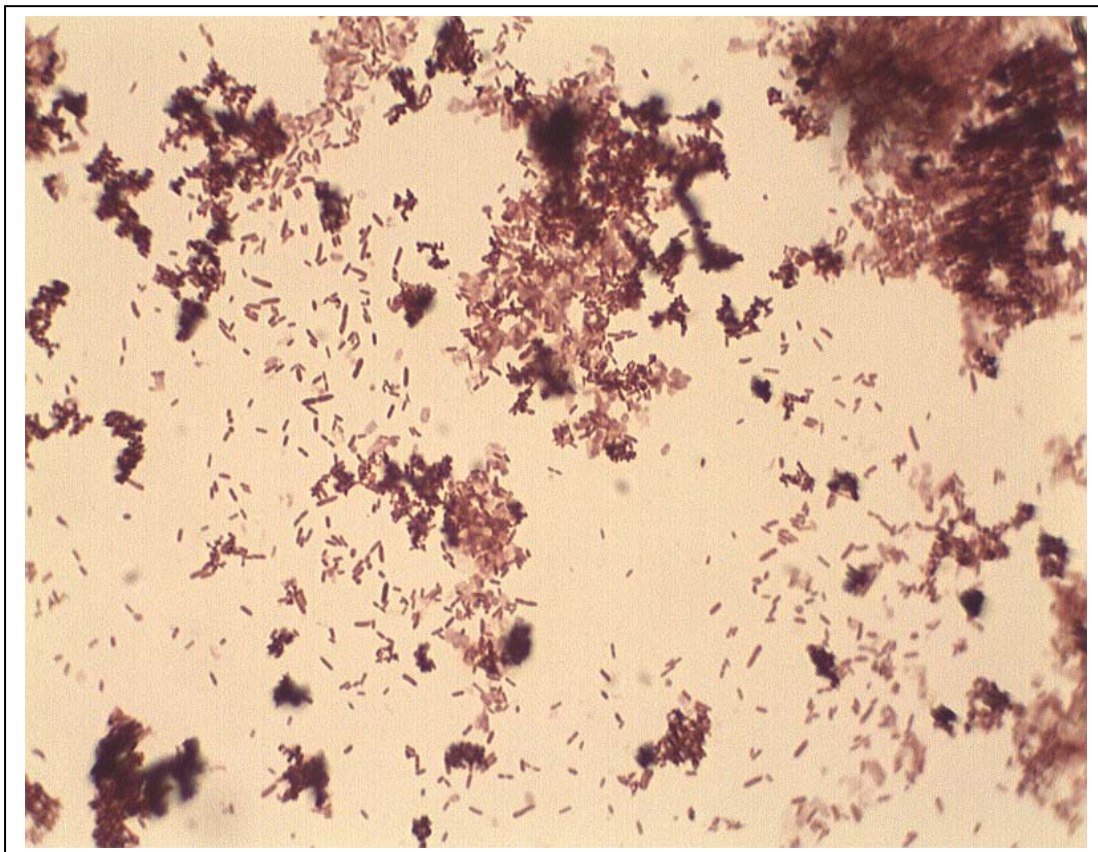
ก.



ข.

ภาพที่ 1 ก. ลักษณะของสีเลือดที่สามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ซึ่งมีสีแดง
ข. ลักษณะของสีเลือดที่ไม่สามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ได้ซึ่งมีสีเขียวคล้ำ

1.2 ผลการศึกษาโครโมโซม ในขวดที่เก็บเกี่ยวเซลล์ได้แล้วจะนำไปย้อมสี และนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่ามีเป็นแท่งโครโมโซมกระจายตัวบนอยู่กับเศษเยื่อหุ้มเซลล์ จึงไม่สามารถนับจำนวน และศึกษาขนาดของแขนโครโมโซมต่อไปได้ (ภาพที่ 2)



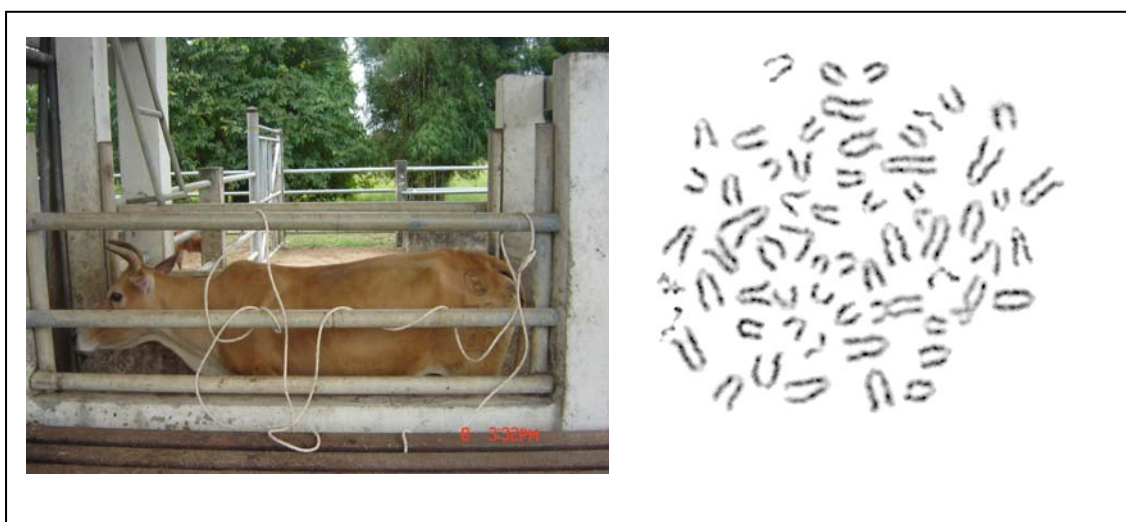
ภาพที่ 2 ลักษณะโครโมโซมระยะเมทาเฟส

2. ผลการทดลองจากห้องปฏิบัติการบริษัทโปรเฟสชันแนล ลาโบราทอรี แมเนจเม้นท์ คอร์ป จำกัด เลขที่ 9/2-3 ซอย ลาดพร้าว แขวงวังทองหลาง เขต วังทองหลาง กรุงเทพฯ 10410

จากการศึกษาความแตกต่างของโครโมโซมของโคที่มีลักษณะปกติ และโคที่มีลักษณะผิดปกติทั้งที่เป็นโคแคะระ โคเผือก และโคลักษณะเขาผิปกติ ด้วยวิธีการย้อมแถบสี ได้ผลการศึกษาในแต่ละลักษณะดังนี้

1. โครโมโซมของโคที่มีลักษณะปกติ เพศผู้

จากการศึกษาโครโมโซมของโคที่มีลักษณะที่ปกติจำนวน 5 เซลล์ พบว่า มีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ ($2n = 60$) ทั้ง 5 เซลล์ (ภาพที่ 3) มีค่าความถี่ของ Fundamental number อยู่ในช่วง 83 – 90 (ตารางที่ 1 , ภาพที่ 4)



ก.

ข.

ภาพที่ 3 ก. โคลักษณะที่ปกติเพศผู้

ข. โครโมโซมโคปกติ

ตารางที่ 1 ตารางแสดงค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm, L_l) ความยาวแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm, L_s) และ ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (L_T) ค่าเฉลี่ย relative length (R_L) ค่า centromeric index (C_i) ของโคลิกันณะปกติ

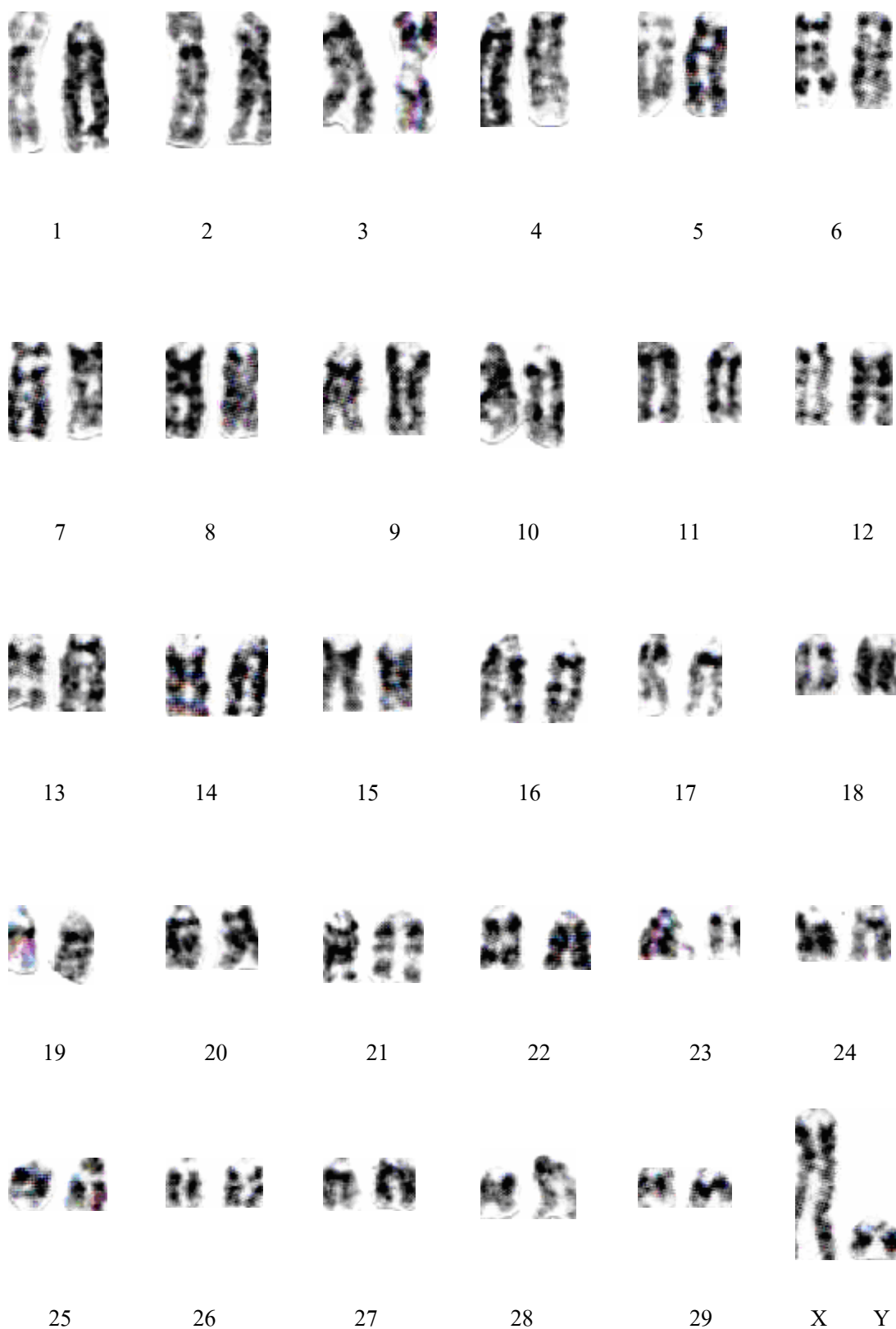
โครโมโซมโคปปกติ							
โครโมโซมแท่งที่	L_l	L_s	L_T	$R_L = (L_l / \sum L_T)$	$C_i = (L_l / L_T)$	ชนิดโครโมโซม	FN
1	1.64	0.72	2.36	0.026	0.69	submetacentric	2
2	1.72	0.51	2.23	0.025	0.77	acrocentric	1
3	1.51	0.71	2.22	0.025	0.68	submetacentric	2
4	1.47	0.64	2.11	0.023	0.70	submetacentric	2
5	1.62	0.44	2.06	0.023	0.79	acrocentric	1
6	1.69	0.35	2.04	0.023	0.83	acrocentric	1
7	1.30	0.74	2.04	0.023	0.64	submetacentric	2
8	1.51	0.46	1.97	0.022	0.77	acrocentric	1
9	1.22	0.71	1.93	0.021	0.63	submetacentric	2
10	1.32	0.56	1.88	0.021	0.70	acrocentric	1
11	1.41	0.42	1.83	0.020	0.77	acrocentric	1
12	1.48	0.33	1.81	0.020	0.82	acrocentric	1
13	1.45	0.36	1.81	0.020	0.80	acrocentric	1
14	1.39	0.41	1.80	0.020	0.77	acrocentric	1
15	1.28	0.49	1.77	0.020	0.72	acrocentric	1
16	1.37	0.39	1.76	0.020	0.78	acrocentric	1
17	1.13	0.61	1.74	0.019	0.65	submetacentric	2
18	1.09	0.63	1.72	0.019	0.63	submetacentric	2
19	1.10	0.57	1.67	0.019	0.66	submetacentric	2
20	1.37	0.29	1.66	0.018	0.83	acrocentric	1
21	1.38	0.28	1.66	0.018	0.83	acrocentric	1
22	1.14	0.49	1.63	0.018	0.70	submetacentric	1
23	1.19	0.39	1.58	0.018	0.75	acrocentric	1

ตารางที่ 1 ตารางแสดงค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm, L_l) ความยาวแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm, L_s) และ ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (L_T) ค่าเฉลี่ย relative length (R_L) ค่า centromeric index (C_1) ของโคไลกษณะปกติ (ต่อ)

โครโมโซมแท่งที่	L_l	L_s	L_T	$R_L = (L_l / \sum L_T)$	$C_1 = (L_l / L_T)$	ชนิดโครโมโซม	FN
24	0.93	0.64	1.57	0.017	0.59	metacentric	1
25	1.11	0.46	1.57	0.017	0.71	acrocentric	1
26	0.94	0.62	1.56	0.017	0.60	submetacentric	2
27	1.11	0.45	1.56	0.017	0.71	acrocentric	1
28	1.14	0.39	1.53	0.017	0.75	acrocentric	1
29	1.16	0.36	1.52	0.017	0.76	acrocentric	1
30	0.93	0.53	1.46	0.016	0.64	submetacentric	2
31	1.03	0.41	1.44	0.016	0.72	acrocentric	1
32	1.01	0.43	1.44	0.016	0.70	acrocentric	1
33	1.01	0.40	1.41	0.016	0.72	acrocentric	1
34	0.96	0.40	1.36	0.015	0.71	acrocentric	1
35	0.83	0.48	1.31	0.015	0.63	submetacentric	2
36	0.77	0.52	1.29	0.014	0.60	metacentric	2
37	0.87	0.42	1.29	0.014	0.67	submetacentric	2
38	0.98	0.30	1.28	0.014	0.77	acrocentric	1
39	0.82	0.46	1.28	0.014	0.64	submetacentric	2
40	0.67	0.61	1.28	0.014	0.52	metacentric	2
41	0.97	0.28	1.25	0.014	0.78	acrocentric	1
42	0.91	0.30	1.21	0.013	0.75	acrocentric	1
43	0.81	0.40	1.21	0.013	0.67	submetacentric	2
44	0.71	0.47	1.18	0.013	0.60	submetacentric	2
45	0.72	0.45	1.17	0.013	0.62	submetacentric	2
46	0.61	0.50	1.11	0.012	0.55	metacentric	2

ตารางที่ 1 ตารางแสดงค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm, L_l) ความยาวแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm, L_s) และ ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (L_T) ค่าเฉลี่ย relative length (R_L) ค่า centromeric index (C_l) ของโคลักษณะปกติ(ต่อ)

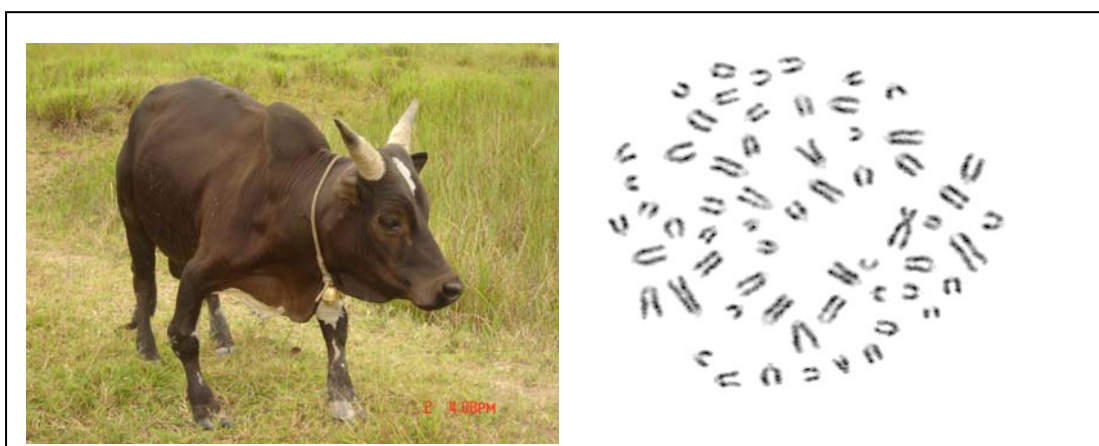
โครโมโซมแท่งที่	L_l	L_s	L_T	$R_L = (L_l / \sum L_T)$	$C_l = (L_l / L_T)$	ชนิดโครโมโซม	FN
47	0.63	0.48	1.11	0.012	0.57	metacentric	2
48	0.70	0.41	1.11	0.012	0.63	submetacentric	2
49	0.65	0.46	1.11	0.012	0.59	metacentric	2
50	0.83	0.28	1.11	0.012	0.75	acrocentric	1
51	0.71	0.39	1.10	0.012	0.65	submetacentric	2
52	0.62	0.47	1.09	0.012	0.57	metacentric	2
53	0.61	0.48	1.09	0.012	0.56	metacentric	2
54	0.63	0.39	1.02	0.011	0.62	submetacentric	2
55	0.68	0.30	0.98	0.011	0.69	submetacentric	2
56	0.61	0.33	0.94	0.010	0.65	submetacentric	2
57	0.55	0.37	0.92	0.010	0.60	metacentric	2
58	0.42	0.42	0.84	0.009	0.50	metacentric	2
59	1.74	0.71	2.45	0.027	0.71	acrocentric	1
60	0.59	0.18	0.77	0.009	0.77	acrocentric	1
ผลรวม	62.75	27.45	90.20	1.000	41.15		90



ภาพที่ 4 คาร์ิโอแกรมของโคตักขณะปกติ

2. โคลักษณะแคระ

จากการศึกษาโครโมโซมของโคลักษณะแคระจำนวน 5 เซลล์ พบว่า มีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ ($2n = 60$) ทั้ง 5 เซลล์ (ภาพที่ 5) เซลล์ มีค่าความถี่ของ Fundamental number อยู่ในช่วง 83 - 86 (ตารางที่ 2, ภาพที่ 6)



ก.

ข.

ภาพที่ 5 ก. โคลักษณะแคระ

ข. โครโมโซมโคแคระ

ตารางที่ 2 ตารางแสดงค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm, L_1) ความยาวแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm, L_s) และ ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (L_T) ค่าเฉลี่ย relative length (R_L) ค่า centromeric index (C_1) ของโคลักษณะแคระ

โครโมโซมโคแคระ							
โครโมโซมแท่งที่	L_1	L_s	L_T	$R_L = (L_T / \sum L_T)$	$C_1 = (L_1 / L_T)$	ชนิดโครโมโซม	FN
1	1.31	0.49	1.80	0.027	0.73	acrocentric	1
2	1.45	0.32	1.77	0.027	0.82	acrocentric	1
3	1.15	0.51	1.66	0.025	0.69	submetacentric	2
4	0.86	0.76	1.62	0.025	0.53	metacentric	2
5	1.29	0.25	1.54	0.023	0.84	acrocentric	1
6	0.22	1.32	1.54	0.023	0.14	metacentric	2
7	1.24	0.25	1.49	0.023	0.83	acrocentric	1

ตารางที่ 2 ตารางแสดงค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm, L_1) ความยาวแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm, L_s) และ ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (L_T) ค่าเฉลี่ย relative length (R_L) ค่า centromeric index (C_1) ของโคลิกันณะแคระ(ต่อ)

โครโมโซมแท่งที่	L_1	L_s	L_T	$R_L = (L_1 / \sum L_T)$	$C_1 = (L_1 / L_T)$	ชนิดโครโมโซม	FN
8	1.17	0.31	1.48	0.022	0.79	acrocentric	1
9	1.17	0.28	1.45	0.022	0.81	acrocentric	1
10	0.92	0.48	1.40	0.021	0.66	submetacentric	2
11	1.06	0.34	1.40	0.021	0.76	acrocentric	1
12	1.04	0.32	1.36	0.021	0.76	acrocentric	1
13	1.17	0.17	1.34	0.020	0.87	acrocentric	1
14	1.08	0.24	1.32	0.020	0.82	acrocentric	1
15	0.89	0.43	1.32	0.020	0.67	submetacentric	2
16	0.99	0.31	1.30	0.020	0.76	acrocentric	1
17	0.95	0.34	1.29	0.020	0.74	acrocentric	1
18	1.06	0.23	1.29	0.020	0.82	acrocentric	1
19	0.97	0.31	1.28	0.019	0.76	acrocentric	1
20	1.04	0.23	1.27	0.019	0.82	acrocentric	1
21	0.96	0.24	1.20	0.018	0.80	acrocentric	1
22	0.87	0.33	1.20	0.018	0.73	acrocentric	1
23	0.80	0.34	1.14	0.017	0.70	acrocentric	1
24	0.77	0.35	1.12	0.017	0.69	submetacentric	2
25	0.82	0.29	1.11	0.017	0.74	acrocentric	1
26	0.84	0.25	1.09	0.017	0.77	acrocentric	1
27	0.72	0.36	1.08	0.016	0.67	submetacentric	2
28	0.82	0.22	1.04	0.016	0.79	acrocentric	1
29	0.68	0.34	1.02	0.015	0.67	submetacentric	2
30	0.82	0.19	1.01	0.015	0.81	acrocentric	1
31	0.67	0.33	1.00	0.015	0.67	submetacentric	2

ตารางที่ 2 ตารางแสดงค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm, L_l) ความยาวแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm, L_s) และ ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (L_T) ค่าเฉลี่ย relative length (R_L) ค่า centromeric index (C_i) ของโคคลิกษณะแกระ(ต่อ)

โครโมโซมแท่งที่	L_l	L_s	L_T	$R_L = (L_l / \sum L_T)$	$C_i = (L_l / L_T)$	ชนิดโครโมโซม	FN
32	0.78	0.22	1.00	0.015	0.78	acrocentric	1
33	0.70	0.29	0.99	0.015	0.71	acrocentric	1
34	0.64	0.33	0.97	0.015	0.66	submetacentric	2
35	0.66	0.29	0.95	0.014	0.69	submetacentric	2
36	0.65	0.30	0.95	0.014	0.68	submetacentric	2
37	0.78	0.16	0.94	0.014	0.83	acrocentric	1
38	0.76	0.17	0.93	0.014	0.82	acrocentric	1
39	0.57	0.35	0.92	0.014	0.62	submetacentric	2
40	0.62	0.30	0.92	0.014	0.67	submetacentric	2
41	0.61	0.29	0.90	0.014	0.68	submetacentric	2
42	0.59	0.30	0.89	0.014	0.66	submetacentric	2
43	0.65	0.23	0.88	0.013	0.74	acrocentric	1
44	0.65	0.21	0.86	0.013	0.76	acrocentric	1
45	0.58	0.22	0.80	0.012	0.73	acrocentric	1
46	0.52	0.26	0.78	0.012	0.67	submetacentric	2
47	0.55	0.23	0.78	0.012	0.71	acrocentric	1
48	0.40	0.38	0.78	0.012	0.51	metacentric	2
49	0.51	0.27	0.78	0.012	0.65	submetacentric	2
50	0.52	0.25	0.77	0.012	0.68	submetacentric	2
51	0.57	0.18	0.75	0.011	0.76	acrocentric	1
52	0.54	0.21	0.75	0.011	0.72	acrocentric	1
53	0.54	0.21	0.75	0.011	0.72	acrocentric	1
54	0.46	0.27	0.73	0.011	0.63	submetacentric	2
55	0.44	0.26	0.70	0.011	0.63	submetacentric	2

ตารางที่ 2 ตารางแสดงค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm, L_l) ความยาวแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm, L_s) และ ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (L_T) ค่าเฉลี่ย relative length (R_L) ค่า centromeric index (C_i) ของโคลิกันณะแควะ(ต่อ)

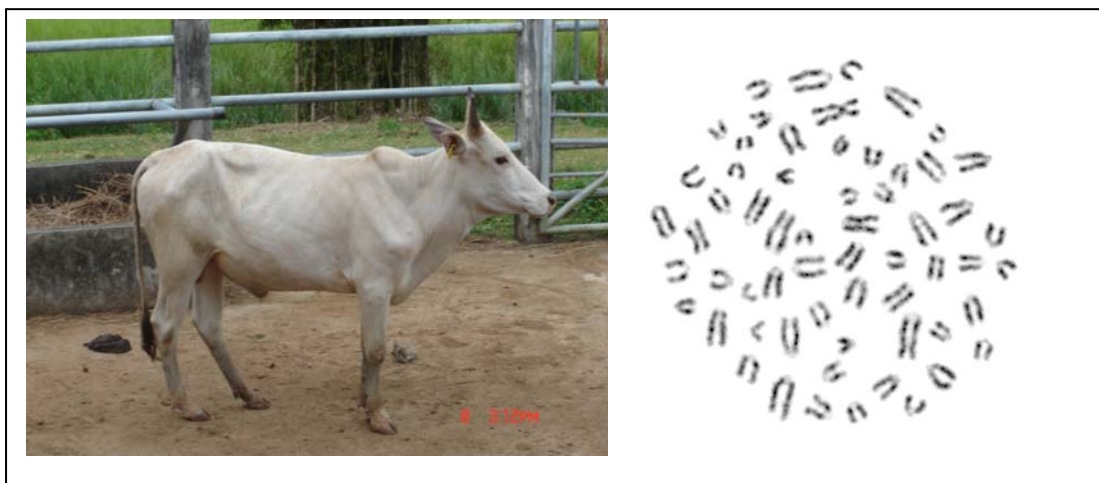
โครโมโซมแท่งที่	L_l	L_s	L_T	$R_L = (L_l / \sum L_T)$	$C_i = (L_l / L_T)$	ชนิดโครโมโซม	FN
56	0.50	0.20	0.70	0.011	0.71	acrocentric	1
57	0.39	0.30	0.69	0.010	0.57	metacentric	2
58	0.47	0.18	0.65	0.010	0.72	acrocentric	1
59	1.13	0.63	1.76	0.027	0.64	submetacentric	2
60	0.48	0.17	0.65	0.010	0.74	acrocentric	1
ผลรวม	47.06	18.79	65.85	1.000	42.73		83



ภาพที่ 6 คาร์ิโอแกรมของโคตักษณะแคะระ

3. โคัลักษณะสีเผือก

จากการศึกษาโครโมโซมของโคลักษณะสีเผือก จำนวน 5 เซลล์ พบว่า มีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ ($2n = 60$) ทั้ง 5 เซลล์ (ภาพที่ 7) และมีค่าความถี่ของ Fundamental number อยู่ในช่วง 83 - 86 (ตารางที่ 3, ภาพที่ 8)



ก.

ข.

ภาพที่ 7 ก. โคลักษณะสีเผือก

ข. โครโมโซมโคสีเผือก

ตารางที่ 3 ตารางแสดงค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm, L_L) ความยาวแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm, L_S) และ ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (L_T) ค่าเฉลี่ย relative length (R_L) ค่า centromeric index (C_I) ของโคลักษณะสีเผือก

โครโมโซมโคสีเผือก							
โครโมโซมแท่งที่	L_L	L_S	L_T	$R_L = (L_T / \sum L_T)$	$C_I = (L_L / L_T)$	ชนิดโครโมโซม	FN
1	1.26	0.93	2.19	0.030	0.42	metacentric	2
2	0.42	1.60	2.02	0.028	0.79	acrocentric	1
3	0.41	1.56	1.97	0.027	0.79	acrocentric	1
4	0.52	1.28	1.80	0.025	0.71	acrocentric	1
5	0.26	1.50	1.76	0.024	0.85	acrocentric	1
6	0.80	0.96	1.76	0.024	0.55	metacentric	2
7	0.35	1.37	1.72	0.024	0.80	acrocentric	1

ตารางที่ 3 ตารางแสดงค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm, L_l) ความยาวแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm, L_s) และ ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (L_T) ค่าเฉลี่ย relative length (R_L) ค่า centromeric index (C_1) ของโคลักษณะสี่เฟือก (ต่อ)

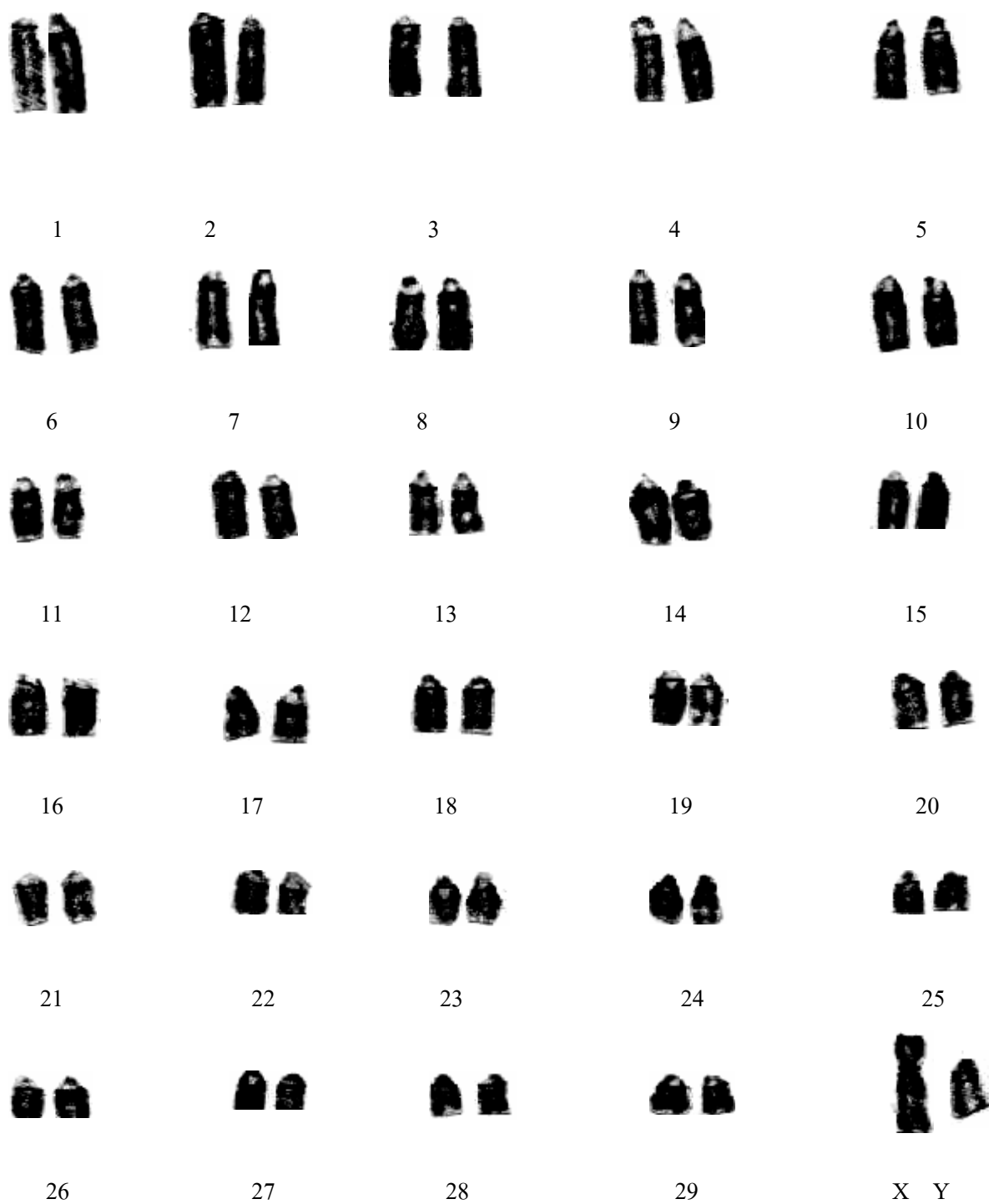
โครโมโซมแท่งที่	L_l	L_s	L_T	$R_L = (L_l / \sum L_T)$	$C_1 = (L_l / L_T)$	ชนิดโครโมโซม	FN
8	0.12	1.58	1.70	0.024	0.93	telocentric	1
9	0.49	1.18	1.67	0.023	0.71	acrocentric	1
10	0.31	1.34	1.65	0.023	0.81	acrocentric	1
11	0.16	1.44	1.60	0.022	0.90	acrocentric	1
12	0.32	1.22	1.54	0.021	0.79	acrocentric	1
13	0.37	1.15	1.52	0.021	0.76	acrocentric	1
14	0.56	0.90	1.46	0.020	0.62	submetacentric	2
15	0.75	0.70	1.45	0.020	0.48	metacentric	2
16	0.28	1.17	1.45	0.020	0.81	acrocentric	1
17	0.35	1.10	1.45	0.020	0.76	acrocentric	1
18	0.50	0.90	1.40	0.019	0.64	submetacentric	2
19	0.31	1.07	1.38	0.019	0.78	acrocentric	1
20	0.41	0.96	1.37	0.019	0.70	acrocentric	1
21	0.41	0.92	1.33	0.019	0.69	submetacentric	2
22	0.67	0.63	1.30	0.018	0.48	metacentric	2
23	0.34	0.88	1.22	0.017	0.72	acrocentric	1
24	0.17	1.02	1.19	0.017	0.86	acrocentric	1
25	0.37	0.80	1.17	0.016	0.68	submetcentric	2
26	0.36	0.80	1.16	0.016	0.69	submetacentric	2
27	0.19	0.95	1.14	0.016	0.83	acrocentric	1
28	0.20	0.91	1.11	0.015	0.82	acrocentric	1
29	0.18	0.92	1.10	0.015	0.84	acrocentric	1
30	0.46	0.64	1.10	0.015	0.58	metacentric	2
31	0.17	0.93	1.10	0.015	0.85	acrocentric	1

ตารางที่ 3 ตารางแสดงค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm, L_l) ความยาวแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm, L_s) และ ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (L_T) ค่าเฉลี่ย relative length (R_L) ค่า centromeric index (C_i) ของโคลักษณะสีเฟือก (ต่อ)

โครโมโซมแท่งที่	L_l	L_s	L_T	$R_L = (L_l / \sum L_T)$	$C_i = (L_l / L_T)$	ชนิดโครโมโซม	FN
32	0.40	0.70	1.10	0.015	0.64	submetacentric	2
33	0.53	0.54	1.07	0.015	0.50	metacentric	2
34	0.45	0.60	1.05	0.015	0.57	metacentric	2
35	0.16	0.89	1.05	0.015	0.85	acrocentric	1
36	0.33	0.72	1.05	0.015	0.69	submetacentric	2
37	0.37	0.67	1.04	0.014	0.64	submetacentric	2
38	0.46	0.50	0.96	0.013	0.52	metacentric	2
39	0.14	0.76	0.90	0.013	0.84	acrocentric	1
40	0.17	0.72	0.89	0.012	0.81	acrocentric	1
41	0.25	0.63	0.88	0.012	0.72	acrocentric	1
42	0.31	0.57	0.88	0.012	0.65	submetacentric	2
43	0.38	0.50	0.88	0.012	0.57	metacentric	2
44	0.25	0.62	0.87	0.012	0.71	acrocentric	1
45	0.24	0.63	0.87	0.012	0.72	acrocentric	1
46	0.13	0.74	0.87	0.012	0.85	acrocentric	1
47	0.33	0.50	0.83	0.012	0.60	submetacentric	2
48	0.17	0.65	0.82	0.011	0.79	acrocentric	1
49	0.29	0.50	0.79	0.011	0.63	submetacentric	2
50	0.22	0.55	0.77	0.011	0.71	acrocentric	1
51	0.26	0.50	0.76	0.011	0.66	submetacentric	2
52	0.04	0.70	0.74	0.010	0.95	telocentric	1
53	0.19	0.55	0.74	0.010	0.74	acrocentric	1
54	0.16	0.56	0.72	0.010	0.78	acrocentric	1
55	0.03	0.67	0.70	0.010	0.96	telocentric	1

ตารางที่ 3 ตารางแสดงค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm, L_l) ความยาวแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm, L_s) และ ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (L_T) ค่าเฉลี่ย relative length (R_L) ค่า centromeric index (C_i) ของโคลักษณะสี่เฟือก (ต่อ)

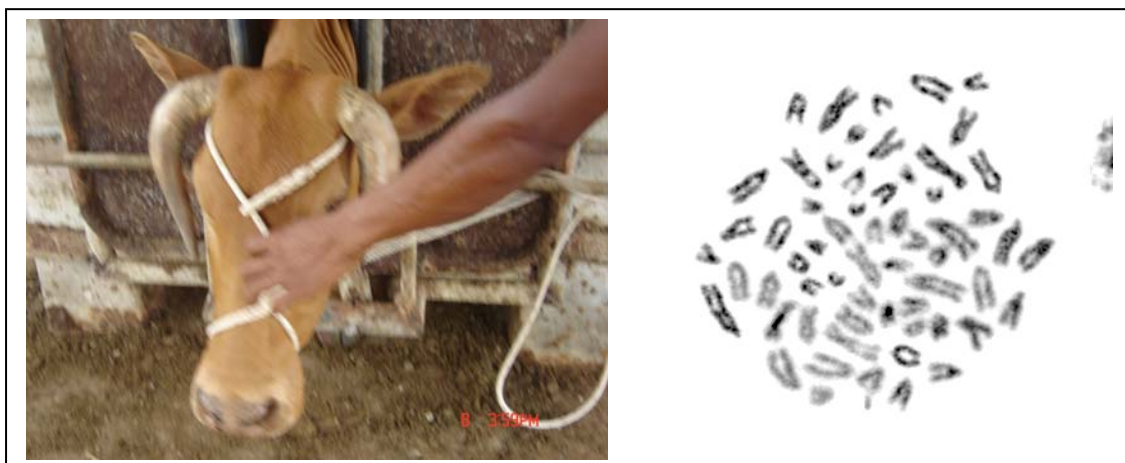
โครโมโซมแท่งที่	L_l	L_s	L_T	$R_L = (L_T / \sum L_T)$	$C_i = (L_l / L_T)$	ชนิดโครโมโซม	FN
56	0.22	0.48	0.70	0.010	0.69	submetacentric	2
57	0.26	0.42	0.68	0.009	0.62	submetacentric	2
58	0.19	0.48	0.67	0.009	0.72	acrocentric	1
59	0.61	1.45	2.06	0.029	0.70	acrocentric	1
60	0.18	0.56	0.74	0.010	0.76	acrocentric	1
ผลรวม	20.19	51.67	71.86	1.000	43.23		83



ภาพที่ 8 คาริโอแกรมของโคดักขณะตีเฟือก

4. โคัลักษณะเขาผิดปกติ

จากการศึกษาโครโมโซมของโคัลักษณะที่มีเขาผิดปกติจำนวน 5 เซลล์ พบว่า มีจำนวนโครโมโซมเป็น ดิพลอยด์ ($2n = 60$) ทั้งจำนวน 5 เซลล์ (ภาพที่ 9) และมีค่าความถี่ ของ Fundamental number อยู่ในช่วง 63 – 75 (ตารางที่ 4, ภาพที่ 10)



ก.

ข.

ภาพที่ 9 ก. โคัลักษณะเขาผิดปกติ

ข. โครโมโซมโคที่ผิดปกติ

ตารางที่ 4 ตารางแสดงค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm, L_1) ความยาวแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm, L_s) และ ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (L_T) ค่าเฉลี่ย relative length (R_L) ค่า centromeric index (C_1) ของโคัลักษณะเขาผิดปกติ

โครโมโซมเขาผิดปกติ							
โครโมโซมแท่งที่	L_1	L_s	L_T	$R_L = (L_T / \sum L_T)$	$C_1 = (L_1 / L_T)$	ชนิดโครโมโซม	FN
1	0.30	1.00	1.30	0.028	0.77	acrocentric	1
2	0.19	1.10	1.29	0.028	0.85	acrocentric	1
3	0.17	0.96	1.13	0.025	0.85	acrocentric	1
4	0.10	0.96	1.06	0.023	0.91	telocentric	1
5	0.16	0.90	1.06	0.023	0.85	acrocentric	1
6	0.12	0.94	1.06	0.023	0.89	acrocentric	1
7	0.19	0.87	1.06	0.023	0.82	acrocentric	1

ตารางที่ 4 ตารางแสดงค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm, L_l) ความยาวแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm, L_s) และ ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (L_T) ค่าเฉลี่ย relative length (R_L) ค่า centromeric index (C_l) ของโคถัลักษณะเขาผิดปกติ(ต่อ)

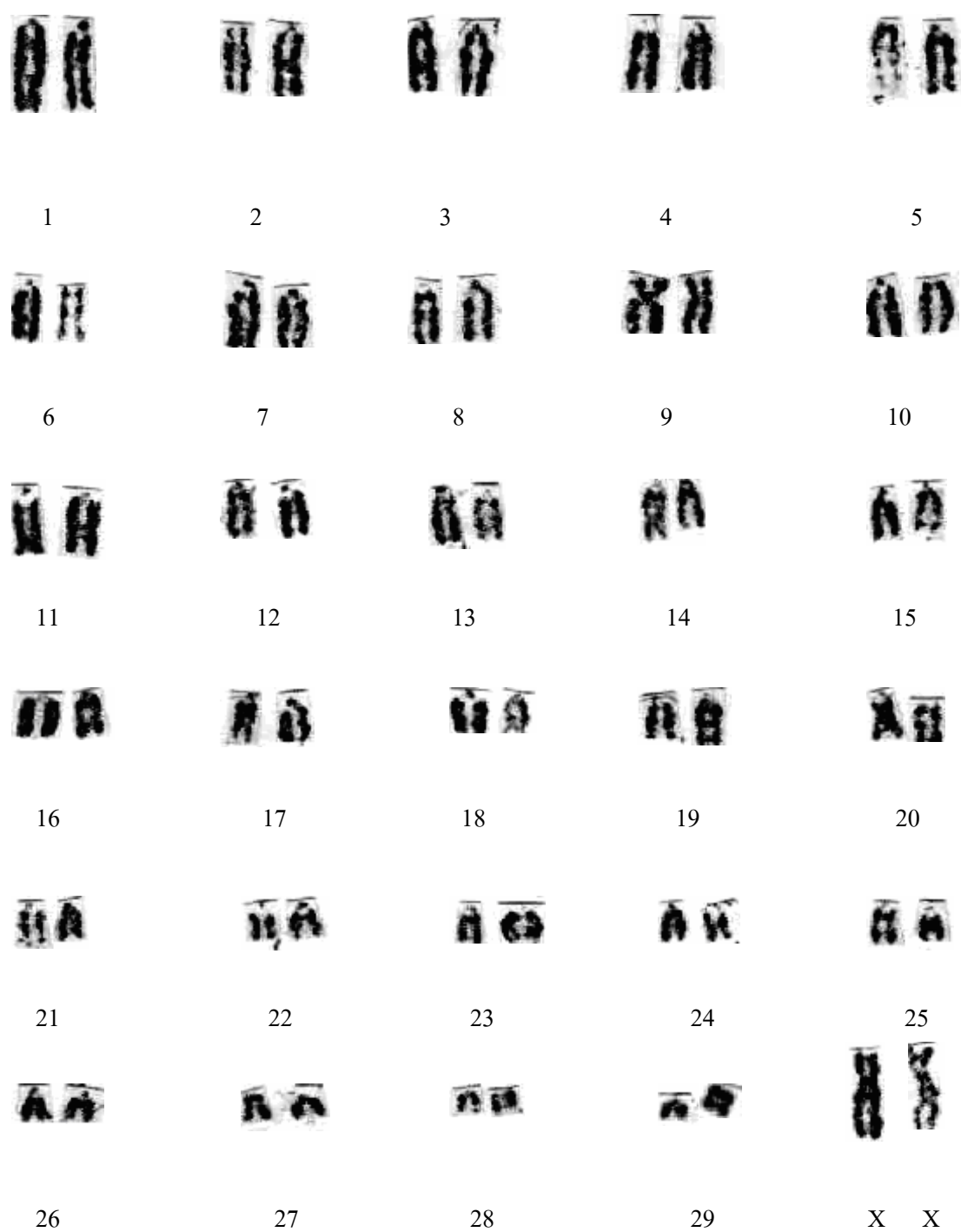
โครโมโซมแท่งที่	L_l	L_s	L_T	$R_L = (L_l / \sum L_T)$	$C_l = (L_l / L_T)$	ชนิดโครโมโซม	FN
8	0.20	0.83	1.03	0.022	0.81	acrocentric	1
9	0.13	0.90	1.03	0.022	0.87	acrocentric	1
10	0.10	0.92	1.02	0.022	0.90	telocentric	1
11	0.18	0.81	0.99	0.022	0.82	acrocentric	1
12	0.12	0.80	0.92	0.020	0.87	acrocentric	1
13	0.12	0.78	0.90	0.020	0.87	acrocentric	1
14	0.05	0.85	0.90	0.020	0.94	telocentric	1
15	0.19	0.71	0.90	0.020	0.79	acrocentric	1
16	0.13	0.77	0.90	0.020	0.86	acrocentric	1
17	0.37	0.53	0.90	0.020	0.59	metacentric	2
18	0.37	0.52	0.89	0.019	0.58	metacentric	2
19	0.12	0.76	0.88	0.019	0.86	acrocentric	1
20	0.14	0.74	0.88	0.019	0.84	acrocentric	1
21	0.25	0.60	0.85	0.019	0.71	acrocentric	1
22	0.30	0.50	0.80	0.017	0.63	submetacentric	2
23	0.17	0.63	0.80	0.017	0.79	acrocentric	1
24	0.13	0.67	0.80	0.017	0.84	acrocentric	1
25	0.03	0.77	0.80	0.017	0.96	telocentric	1
26	0.09	0.68	0.77	0.017	0.88	acrocentric	1
27	0.05	0.70	0.75	0.016	0.93	telocentric	1
28	0.19	0.56	0.75	0.016	0.75	acrocentric	1
29	0.19	0.55	0.74	0.016	0.74	acrocentric	1
30	0.17	0.57	0.74	0.016	0.77	acrocentric	1
31	0.10	0.62	0.72	0.016	0.86	acrocentric	1

ตารางที่ 4 ตารางแสดงค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm, L_L) ความยาวแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm, L_S) และ ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (L_T) ค่าเฉลี่ย relative length (R_L) ค่า centromeric index (C_I) ของโคไลกษณะเขาผิดปกติ(ต่อ)

โครโมโซมแท่งที่	L_L	L_S	L_T	$R_L = (L_L / \sum L_T)$	$C_I = (L_L / L_T)$	ชนิดโครโมโซม	FN
32	0.12	0.58	0.70	0.015	0.83	acrocentric	1
33	0.11	0.59	0.70	0.015	0.84	acrocentric	1
34	0.19	0.51	0.70	0.015	0.73	acrocentric	1
35	0.11	0.56	0.67	0.015	0.84	acrocentric	1
36	0.15	0.50	0.65	0.014	0.77	acrocentric	1
37	0.09	0.55	0.64	0.014	0.86	acrocentric	1
38	0.04	0.59	0.63	0.014	0.94	telocentric	1
39	0.24	0.37	0.61	0.013	0.61	submetacentric	2
40	0.11	0.50	0.61	0.013	0.82	acrocentric	1
41	0.11	0.49	0.60	0.013	0.82	acrocentric	1
42	0.12	0.47	0.59	0.013	0.80	acrocentric	1
43	0.19	0.40	0.59	0.013	0.68	submetacentric	2
44	0.14	0.43	0.57	0.012	0.75	acrocentric	1
45	0.16	0.40	0.56	0.012	0.71	acrocentric	1
46	0.07	0.49	0.56	0.012	0.88	acrocentric	1
47	0.10	0.45	0.55	0.012	0.82	acrocentric	1
48	0.15	0.40	0.55	0.012	0.73	acrocentric	1
49	0.08	0.42	0.50	0.011	0.84	acrocentric	1
50	0.09	0.41	0.50	0.011	0.82	acrocentric	1
51	0.11	0.39	0.50	0.011	0.78	acrocentric	1
52	0.10	0.33	0.43	0.009	0.77	acrocentric	1
53	0.11	0.32	0.43	0.009	0.74	acrocentric	1
54	0.10	0.30	0.40	0.009	0.75	acrocentric	1
55	0.11	0.29	0.40	0.009	0.73	acrocentric	1

ตารางที่ 4 ตารางแสดงค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm, L_l) ความยาวแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm, L_s) และ ความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ (L_T) ค่าเฉลี่ย relative length (R_L) ค่า centromeric index (C_1) ของโคตักษณะเขาพิศปกติ(ต่อ)

โครโมโซมแท่งที่	L_l	L_s	L_T	$R_L = (L_l / \sum L_T)$	$C_1 = (L_l / L_T)$	ชนิดโครโมโซม	FN
56	0.13	0.25	0.38	0.008	0.66	submetacentric	2
57	0.14	0.21	0.35	0.008	0.60	metacentric	2
58	0.14	0.20	0.34	0.007	0.59	metacentric	2
59	0.39	0.90	1.29	0.028	0.70	submetacentric	2
60	0.38	0.86	1.24	0.027	0.69	submetacentric	2
ผลรวม	9.20	36.66	45.86	1.000	47.46		70



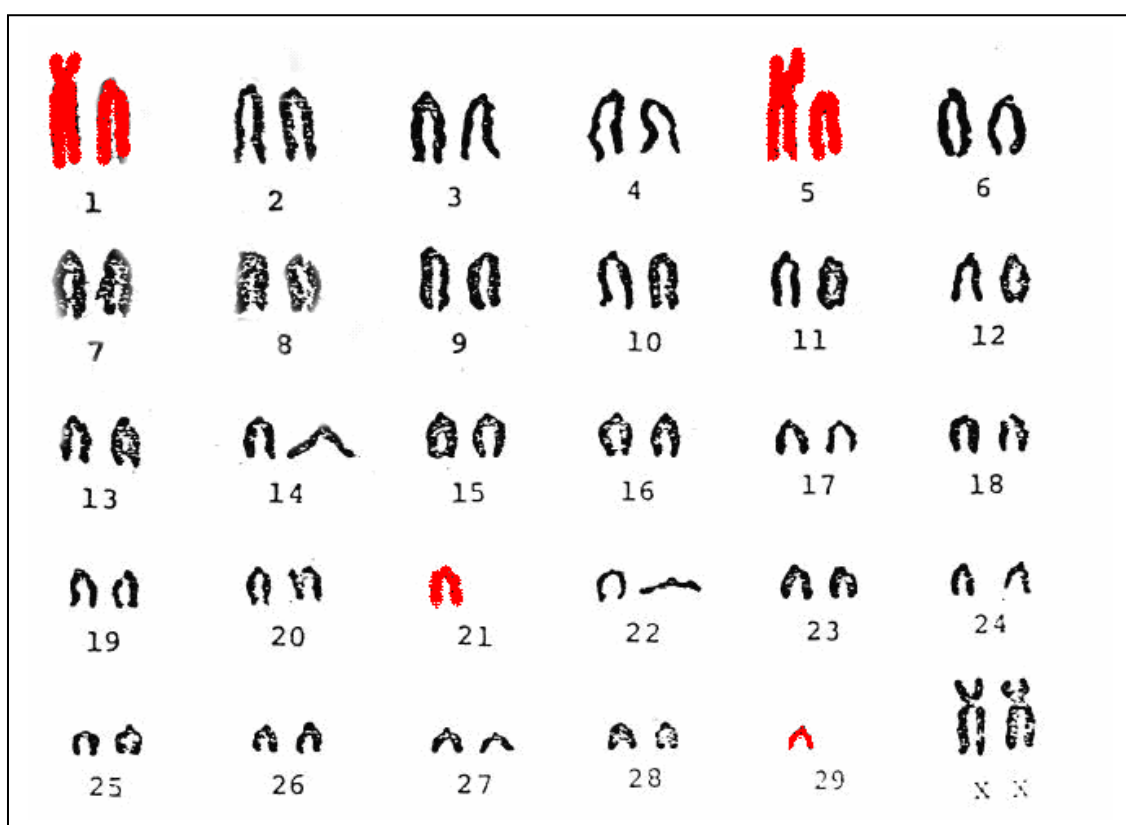
ภาพที่ 10 คาริโอแกรมของโคลัสกษณะเขาเผดปกติ

วิจารณ์ผลการทดลอง

ความผิดปกติของลักษณะโครโมโซมที่มีทั้งที่มีสาเหตุมาจากความผิดปกติทางพันธุกรรม และความผิดปกติที่มีได้มีสาเหตุมาจากความผิดปกติทางพันธุกรรม โดยที่ลักษณะที่ผิดปกติอันเนื่องมาจากสาเหตุทางพันธุกรรมนั้น ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากความผิดปกติระดับ gene และโครโมโซม ซึ่งในกรณีที่เป็นความผิดปกติระดับโครโมโซมนั้นอาจมีสาเหตุมาจากความผิดปกติอันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของ gene ที่ควบคุมลักษณะต่างๆ การเปลี่ยนแปลงของสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของ gene และอาจจะมีสาเหตุมาจากปัจจัยทางกายภาพที่เป็นรังสีประเภทต่างๆ ตลอดจนปัจจัยทางด้านชีววิทยา อีกด้วย (วิสุทธิ, 2536) ในขณะที่ความผิดปกติระดับ gene นั้น จะเกี่ยวข้องกับ การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของ gene ซึ่งมีสาเหตุมาจากปัจจัยภายนอกต่างๆ เป็นผลการคู่เบส (base pairing) ที่จับคู่กัน มีการเปลี่ยนแปลงซึ่งส่งผลให้ gene ที่ควบคุมลักษณะมีความผิดปกติ เป็นผลให้ลักษณะที่แสดงออกมาผิดปกติได้ ซึ่งในการศึกษาถึงความผิดปกติระดับ gene นี้จำเป็นต้องตรวจสอบถึงองค์ประกอบและโครงสร้างของ DNA ที่กำหนดลักษณะต่างๆ เหล่านั้นว่ามีความผิดปกติอย่างไรด้วย ในขณะที่ความผิดปกติของบางลักษณะสามารถตรวจสอบได้โดยดูขนาดและลักษณะของโครโมโซมก็ได้ เนื่องจากการตรวจสอบถึงความผิดปกติของลักษณะในระดับความผิดปกติของ gene เป็นการศึกษที่ใช้งบประมาณจำนวนมาก เพราะต้องใช้เครื่องมือที่ซับซ้อน ทันสมัย และมีราคาแพง (Sophisticated Instruments) ดังนั้นระดับความลึกของการวิจัยที่สามารถดำเนินได้ ซึ่งเหมาะสมกับสภาพความพร้อมที่มีจึงได้ทำการตรวจสอบความผิดปกติของลักษณะที่เป็นการตรวจสอบเพียงระดับโครโมโซมเท่านั้น ซึ่งอาจจะเป็นการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงจำนวนของโครโมโซม (numeral aberration) ทั้งที่เป็น aneuploidy และ euploidy

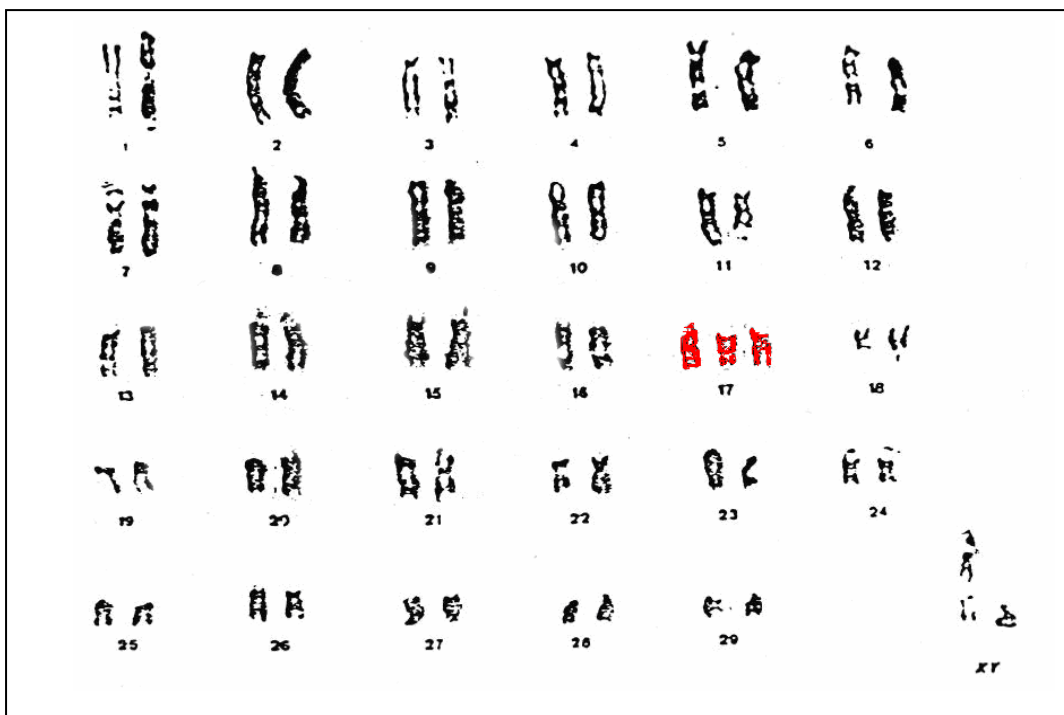
ความผิดปกติของโครโมโซมของโครโมโซมของโครโมโซมนั้นอาจจะพบได้หลายๆ ลักษณะแต่ความผิดปกติที่เป็น Translocation ของโครโมโซมนับเป็นความผิดปกติที่พบได้มาก โดยเฉพาะความผิดปกติที่เป็นชนิด 1/29 Robertsonian translocation ซึ่งพบได้มากในโครโมโซมทุกสายพันธุ์ (วิวัฒน์, 2525) ซึ่งมักจะเกิดความผิดปกติกับโครโมโซมคู่ที่ 1 5 21 และ 29 (ภาพที่ 11) นอกจากนี้ในโครโมโซมสายพันธุ์อาจจะพบว่าโครโมโซมคู่ที่ 17 มีลักษณะเป็น Trisomy คือมีโครโมโซมเป็น 3 แท่ง (ภาพที่ 12) ซึ่งผลมาจากความผิดปกติดังกล่าว จึงทำให้ลูกโคมีลักษณะภายนอกที่ผิดปกติได้ (ภาพที่ 13) อย่างไรก็ตาม ลักษณะผิดปกติของโคที่มีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมสามารถพบได้น้อย เนื่องจากมักจะตายตั้งแต่เป็นตัวอ่อนในท้อง ทั้งในระยะ embryo และ fetus (วิสุทธิ, 2536) ด้วยเหตุนี้ การตรวจสอบลักษณะความผิดปกติของโครโมโซมอันเนื่องมาจากสาเหตุของความผิดปกติที่สามารถ

ตรวจสอบได้ในระดับของโครโมโซมในครั้งนี จึงตรวจสอบพบความผิดปกติเฉพาะได้ในด้านจำนวนโครโมโซมพื้นฐาน (fundamental number: FN) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับโครโมโซมพื้นฐานของโคยูโรปตามที่ Cymborn *et al.*, (2004) ได้รายงานว่าโคยูโรปมีค่าโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 70 ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่า โคที่เข้าใจว่าเป็นโคพื้นเมืองไทยและมีเขาหักห้อยนั้นเป็นโคที่มีพันธุกรรมของโคยูโรปอยู่ด้วย ทั้งนี้เนื่องจากโคยูโรปบางสายพันธุ์ เช่น Aberdeen angus, Santa gurtudis และสายพันธุ์อื่นๆ มักพบว่ามีเขาหักห้อยเช่นเดียวกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในโคที่มีอายุมากแล้ว อย่างไรก็ตามเพื่อให้ได้ข้อมูลที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงสัตว์ได้ดียิ่งขึ้น จึงสมควรศึกษาพันธุกรรมของโคที่มีลักษณะเขาหักห้อยในเชิงลึกต่อไปด้วย

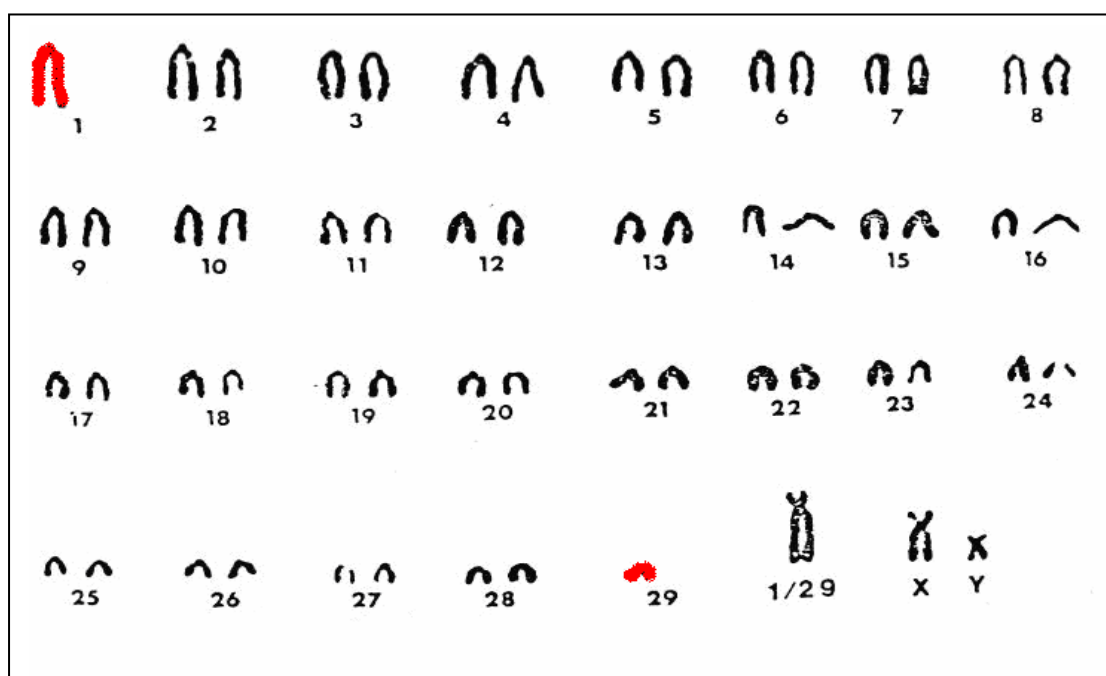


ภาพที่ 11 คาร์ิโอไทป์ของโคเพศเมียที่เกิดความผิดปกติแบบ Double Translocation ในโครโมโซมคู่ 1/29 และ 5/21

ที่มา : ดัดแปลงจาก นิกร, (มปป.)



ภาพที่ 12 คาริโอไทป์ของโคที่เกิดจากความผิดปกติแบบ Trisomy ในโครโมโซมคู่ที่ 17
ที่มา: คัดแปลงจาก นิกร, (มปป.)



ภาพที่ 13 คาริโอไทป์ของโคพันธุ์ Brown Swiss เพศผู้ที่เกิดความผิดปกติแบบ 1/29 Robertsonian
Translocation
ที่มา: คัดแปลงจาก นิกร, (มปป.)

สรุปผลการทดลอง

โคที่มีลักษณะปกติ โคแกระ และโคเผือก มีจำนวนโครโมโซมร่างกายและโครโมโซมเพศ และจำนวนโครโมโซมพื้นฐานที่เหมือนกัน เฉพาะโคที่มีลักษณะเขาหักห้อยเท่านั้นที่มีค่าจำนวนของโครโมโซมพื้นฐาน (Fundamental number) ของทุกโครโมโซมเมื่อรวมกันแล้วน้อยกว่าของโครโมโซมที่มีลักษณะปกติ และโคที่มีลักษณะผิดปกติอีก 2 ลักษณะ จึงสมควรที่จะทำการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของ gene ที่อยู่บนโครโมโซมของโคลักษณะนี้ในเชิงลึกในขั้นตอนต่อไป ซึ่งอาจจะได้คำตอบที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ให้ได้ลักษณะตามที่พึงประสงค์ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- ประเทศ ดวงพัตรา และสุวัฒน์ รัตนธนาชาติ.2527.การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับคาริโอไทป์ของ โคขาวลำพูน.จุลสาร โคกระบือ.7(2): 37-42
- ปรารธนา พุกกะศรี. 2535. คู่มือการเลี้ยงโคพื้นเมืองฉบับชาวบ้าน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. วิทยาเขตกำแพงแสน. จังหวัดนครปฐม.
- ไพศาล เหล่าสุวรรณ.2535.พันธุศาสตร์.คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 342 หน้า.
- ยอดชาย ทองไธยนันท์. 2528. คำแนะนำการเลี้ยงโคเนื้อสำหรับเกษตรกรรายย่อย กองส่งเสริม การปศุสัตว์. กรมปศุสัตว์. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
- วิวัฒน์ ชวนใช้.2525.พันธุศาสตร์ของสัตว์.ภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย.กรุงเทพฯ.
- วิสุทธิ ใบไม้.2536.พันธุศาสตร์ฉบับปรับปรุงใหม่(3). ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.กรุงเทพฯ
- สมชัย จันทรสว่าง.2530. การปรับปรุงพันธุ์สัตว์. ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- Cymbron , T. R. Chaves , F. Adega , H. Guedes-Pinto , and M. I. Malheiro 2004. Standardization of Msp I and Hae III restriction karyotypes in cattle. (online). Available. <http://www.blackwell-synergy.com/action/showPdf?submitPDF=Full+Text+PDF+%28250+KB%29&doi=10.1111%2Fj.1601-5223.2004.01801.x>

ภาคผนวก

รายชื่อนักศึกษาผู้ช่วยวิจัย

- | | |
|----------------------|------------|
| 1. นางสาวนิษฐา | สงแก้ว |
| 2. นางสาวจุฑารัตน์ | เที่ยงธรรม |
| 3. นางสาวนงคัลลักษณ์ | บัวคง |
| 4. นายนริศร | บุญรัตนา |