

การศึกษาวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึง (1) อิทธิพลของสภาพภูมิอากาศในแต่ละฤดูกาลและรูปแบบ polymorphism บริเวณ 5' flanking region ของยีน HSP70-2 ต่อปริมาณ HSP70 ในอสุจิและน้ำกาม คุณภาพน้ำเชื้อ และการตอบสนองทางสรีรวิทยา และ (2) ความสัมพันธ์ของ HSP70 ในอสุจิและน้ำกาม กับคุณภาพน้ำเชื้อและการตอบสนองทางสรีรวิทยาของพ่อโคนมพันธุ์โฮลสไตน์ ฟรีเชียน ระดับสายเลือด 87.50-96.87% จำนวน 10 ตัว ภายใต้การเลี้ยงดูของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ผสมเทียมลำพญากลาง เก็บน้ำเชื้อฤดูกาลละ 8 ครั้ง ในฤดูฝน (ก.ย.-ต.ค. 2548) ฤดูหนาว (พ.ย.-ธ.ค. 2548) และฤดูร้อน (มี.ค.-เม.ย. 2549) วิเคราะห์ปริมาณ HSP70 ในอสุจิและน้ำกาม ด้วยเทคนิค Western blot เก็บข้อมูลอัตราการหายใจ และอุณหภูมิทวารหนัก และสัปดาห์โนมิคตีเอ็นเอจากเซลล์อสุจิของพ่อโคจำนวน 10 ตัว เพื่อเพิ่มขึ้นส่วนของยีน HSP70-2 บริเวณ 5' flanking region แล้วโคลนยีนดังกล่าวเพื่อตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์และวิเคราะห์การเกิด polymorphism

การศึกษาสภาพภูมิอากาศพบว่า ค่า THI ในฤดูร้อน (80.05) และฤดูฝน (79.06) มีค่าสูงกว่าฤดูหนาว (74.30) ( $P < 0.01$ ) โดยปัจจัยทางสภาพภูมิอากาศดังกล่าวมีผลต่อปริมาณ HSP70 การตอบสนองทางสรีรวิทยา และคุณภาพน้ำเชื้อ โดยพบว่า ปริมาณ HSP70 ในอสุจิช่วงฤดูหนาว (9.63 ng/ $\mu$ g protein) สูงกว่าฤดูฝน (6.70 ng/ $\mu$ g protein) และฤดูร้อน (5.54 ng/ $\mu$ g protein) ( $P < 0.01$ ) ตามลำดับ นอกจากนี้ปริมาณ HSP70 ในน้ำกามช่วงฤดูหนาว (1.03 ng/ $\mu$ g protein) สูงกว่าฤดูร้อน (0.58 ng/ $\mu$ g protein) และฤดูฝน (0.55 ng/ $\mu$ g protein) ( $P < 0.01$ ) ด้านการตอบสนองทางสรีรวิทยาพบว่า อัตราการหายใจของพ่อพันธุ์โคนมในฤดูร้อน (54.72 ครั้ง/นาที) สูงกว่าฤดูฝน (44.57 ครั้ง/นาที) และฤดูหนาว (41.35 ครั้ง/นาที) ตามลำดับ ( $P < 0.05$ ) ในทำนองเดียวกัน อุณหภูมิทวารหนักในฤดูร้อน (38.96°C) และฤดูฝน (38.85°C) สูงกว่าฤดูหนาว (38.64°C) ( $P < 0.05$ ) ส่วนผลการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อพบว่า จำนวนอสุจิผิดปกติในฤดูหนาว (20.34%) และฤดูฝน (17.43%) สูงกว่า

ฤดูร้อน (7.11%) ( $P < 0.05$ ) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยทางสภาพภูมิอากาศและคุณภาพน้ำเชืพบว่า ปัจจัยทางสภาพภูมิอากาศในวันริคเก็บน้ำเชืมีความสัมพันธ์กับการเคลื่อนที่แบบหมุน ในขณะที่ปัจจัยทางสภาพภูมิอากาศย้อนหลังในช่วงที่อสุจิอยู่ในท่อเอพิดิไดมิส และช่วงกระบวนการสร้างอสุจิมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของอสุจิ และจำนวนอสุจิผิดปกติ

ผลการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ 5' flanking region ของยีน *HSP70-2* พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *HSP70-2* บริเวณ 5' flanking region มีการเกิด polymorphism จำนวน 2 ตำแหน่ง คือ ตำแหน่งที่ -359 (G/-) และตำแหน่งที่ -179 (A/G) ทำให้สามารถแบ่งรูปแบบ haplotype ของการเกิด polymorphism ได้เป็น 2 รูปแบบ คือ GA (พบในพ่อโคจำนวน 7 ตัว) และ -G (พบในพ่อโคจำนวน 3 ตัว) โดยรูปแบบ polymorphism ของยีน *HSP70-2* บริเวณ 5' flanking region ดังกล่าวมีผลต่อปริมาณ HSP70 คุณภาพน้ำเชื และการตอบสนองทางสรีรวิทยา ร่วมกับอิทธิพลของปัจจัยอื่นเนื่องจากฤดูกาล โดยการศึกษาครั้งนี้พบว่า ในฤดูร้อนพ่อโคที่มียีน *HSP70-2* บริเวณ 5' flanking region รูปแบบ -G มีปริมาณ HSP70 ในอสุจิ (5.90 ng/ $\mu$ g protein) สูงกว่าพ่อโคที่มียีน *HSP70-2* บริเวณ 5' flanking region รูปแบบ GA (5.19 ng/ $\mu$ g protein) ( $P < 0.05$ ) ส่วนคุณภาพน้ำเชืพบว่า ในฤดูหนาวปริมาณน้ำเชืของพ่อโคที่มียีน *HSP70-2* บริเวณ 5' flanking region รูปแบบ -G (7.40 มล.) มีค่าสูงกว่าพ่อโคที่มียีน *HSP70-2* บริเวณ 5' flanking region รูปแบบ GA (5.81 มล.) ( $P < 0.01$ ) ด้านการตอบสนองทางสรีรวิทยาพบว่า อุณหภูมิทวารหนักของพ่อโคที่มียีน *HSP70-2* บริเวณ 5' flanking region รูปแบบ -G (38.71 °C) มีค่าต่ำกว่าพ่อโคที่มียีน *HSP70-2* บริเวณ 5' flanking region รูปแบบ GA (38.93 °C) ( $P < 0.05$ )

ผลจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์พบว่า ปริมาณ HSP70 ในอสุจิ มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับค่าการเคลื่อนที่แบบหมุน ( $r = 0.36$ ) จำนวนอสุจิผิดปกติทั้งหมด ( $r = 0.47$ ) และจำนวนอสุจิผิดปกติแบบทุติยภูมิ ( $r = 0.47$ ) ( $P < 0.01$ ) นอกจากนี้พบว่าปริมาณ HSP70 ในอสุจิ ยังมีความสัมพันธ์เชิงลบกับอัตราการหายใจ ( $r = -0.22$ ) และอุณหภูมิทวารหนัก ( $r = -0.52$ ) ในทำนองเดียวกันกับ HSP70 ในอสุจิ HSP70 ในน้ำกามมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับค่าการเคลื่อนที่แบบหมุน ( $r = 0.31$ ) จำนวนอสุจิผิดปกติทั้งหมด ( $r = 0.34$ ) และจำนวนอสุจิผิดปกติแบบทุติยภูมิ ( $r = 0.30$ ) ( $P < 0.01$ ) นอกจากนี้ ปริมาณ HSP70 ในน้ำกามยังมีความสัมพันธ์เชิงลบกับอัตราการหายใจ ( $r = -0.28$ ) และอุณหภูมิทวารหนัก ( $r = -0.36$ ) ( $P < 0.01$ )

ผลการศึกษาสามารถบ่งชี้ได้ว่า มี HSP70 ในอสุจิและน้ำกามของพ่อพันธุ์โคนม โอลด์ไคน์ ฟรีเซียน และพบความสัมพันธ์ของ HSP70 กับคุณภาพน้ำเชื และการตอบสนองทางสรีรวิทยา ภายใต้อิทธิพลร่วมกันของปัจจัยทางสภาพภูมิอากาศในแต่ละฤดูกาลกับรูปแบบ polymorphism บริเวณ 5' flanking region ของยีน *HSP70-2*

The objectives of this study were to determine (1) effects of season and polymorphism in the 5' flanking region of *HSP70-2* gene on the level of HSP70 in spermatozoa and seminal plasma, semen quality and physiological responses and (2) association of HSP70 in spermatozoa and seminal plasma with semen quality and physiological responses of Holstein Friesian bulls at Lampayaklang AI Bull Center Production. Semen from 10 bulls were collected 8 consecutive weeks in the rainy (Sep.-Oct. 2005), winter (Nov.-Dec. 2005), and summer seasons (Mar.-Apr. 2006). The level of HSP70 was detected in bull spermatozoa and seminal plasma by Western blot analysis. The physiological responses including respiration rate (RR) and rectal temperature (RT) were recorded. Genomic DNA isolated from spermatozoa of 10 HF bulls was subjected to PCR amplification of the 5' flanking region of *HSP70-2* gene. The purified PCR products were clone for nucleotide sequences and polymorphism analysis.

The results showed that THI in the summer (80.05) and rainy seasons (79.06) were significantly higher than in the winter season (74.30) ( $P < 0.01$ ). The Western blot analysis showed that the level of HSP70 in spermatozoa during winter season (9.63 ng/ $\mu$ g protein) was significantly higher than in the rainy (6.70 ng/ $\mu$ g protein) and summer seasons (5.54 ng/ $\mu$ g protein) ( $P < 0.01$ ), respectively. In addition, the level of HSP70 in seminal plasma during winter season (1.03 ng/ $\mu$ g protein) was significantly higher than during summer (0.58 ng/ $\mu$ g protein) and rainy seasons (0.55 ng/ $\mu$ g protein) ( $P < 0.01$ ). Additionally, respiration rate during summer season (54.72 breaths/min) showed significantly higher than in the rainy (44.57 breaths/min) and winter seasons (41.35 breaths/min) ( $P < 0.05$ ), respectively. Correspondingly, rectal temperature during summer (38.96°C) and rainy seasons (38.85°C) were significantly higher than winter season (38.64°C) ( $P < 0.05$ ). Evaluation of semen quality showed that the percentage of abnormal

spermatozoa in winter (20.34%) and rainy seasons (17.43%) were significantly higher than in the summer season (7.11%) ( $P<0.05$ ). Furthermore, the THI, temperature, and humidity on the day of collection affected mass movement of the bull spermatozoa while the effects during epididymal transit time and spermatogenesis were found on concentration and the percentage of abnormal spermatozoa.

Two polymorphic sites (nt 61 G/- and nt 241 A/G) were detected in the 5' flanking region of *HSP70-2* gene and could be divided into two haplotypes: GA (nt -359 G, nt -179 A) was found in 7 bulls, and -G (nt -359 G deletion, nt -179 G) was found in 3 bulls. The effect of polymorphism on the level of HSP70 was found only in the summer season. The level of HSP70 in spermatozoa of bulls with -G haplotype showed significantly higher (5.90 ng/ $\mu$ g protein) than bulls with GA haplotype (5.19 ng/ $\mu$ g protein) ( $P<0.05$ ). In addition, the effect of polymorphism on semen quality was found in the winter season, the semen volume of bull with -G haplotype showed significantly higher (7.40 ml) than bulls with GA haplotype (5.81 ml) ( $P<0.01$ ). Moreover, the RT of bulls with -G haplotype showed significantly lower (38.71 °C) than bulls with GA haplotype (38.93°C) ( $P<0.05$ ).

The results of correlation analysis showed that the level of HSP70 in spermatozoa had positive correlation with mass movement ( $r=0.36$ ), percentage of total abnormal spermatozoa ( $r=0.47$ ), and percentage of secondary abnormal spermatozoa ( $r=0.47$ ) ( $P<0.01$ ). In addition, the level of HSP70 in spermatozoa had negative correlation with RR ( $r=-0.22$ ) and RT ( $r=-0.52$ ). In seminal plasma, the level of HSP70 had positive correlation with mass movement ( $r=0.31$ ), percentage of total abnormal spermatozoa ( $r=0.34$ ), and percentage of secondary abnormal spermatozoa ( $r=0.30$ ) ( $P<0.01$ ). However, the level of HSP70 in seminal plasma had negative correlation with RR ( $r=-0.28$ ) and RT ( $r=-0.36$ ) ( $P<0.01$ ).

Taken all the results of this study, it is indicated that the presence of HSP70 in spermatozoa and seminal plasma had correlation with semen quality and physiological responses under the influence of environment factors and polymorphism in 5' flanking region of *HSP70-2* gene.