

การศึกษาความสัมพันธ์ของยีนเครื่องหมายต่อการให้ผลผลิตน้ำนม องค์ประกอบน้ำนม และสมดุลพลังงานในโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์

Study on the association of gene markers on milk yield, milk composition and energy balance in crossbred Thai-Holstein dairy cattle

วันทนา เจริญโอสอ¹, ก้องเกียรติ ศรีสุวรรณ², มนต์ชัย ดวงจินดา¹, ทองสา บัวสุข¹,
สรินวล คณานิตย์¹ และ วุฒิไกร บุญคุ้ม^{1*}

Wantana Charern-osot¹, Kongkiat Seesuwat², Monchai Duangjinda¹, Thongsas Buasook¹,
Srinuan Kanant¹ and Wuttigrai Boonkum^{1*}

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ของยีนเครื่องหมาย *LEP*, *ARL4*, *ATP1A1*, *HP3*, *BTN*, *STAT5A* ต่อลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมรวมที่ 305 วัน (Milk 305-day) องค์ประกอบน้ำนม (%Fat, %Pro) และสมดุลพลังงาน (FPR) ในโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์ โดยตัวอย่างเลือดจากแม่โคจำนวน 145 ตัวของฟาร์มบริษัทเอกชนแห่งหนึ่งถูกนำมาวิเคราะห์หาแบบจีโนไทป์ในแต่ละยีนด้วยเทคนิค PCR-RFLP ซึ่งจากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างยีนกับค่าสังเกตต่างๆ พบว่ามีแนวโน้มความสัมพันธ์ในยีน *ATP1A1* กับลักษณะเปอร์เซ็นต์ไขมันนม (AB , $P=0.09$) และสัดส่วนไขมันต่อโปรตีนนม (AB และ BB , $P=0.13$) และพบแนวโน้มความสัมพันธ์ของยีน *HP3* กับสัดส่วนไขมันต่อโปรตีนนม ($P=0.14$) และการให้ผลผลิตน้ำนมรวมที่ 305 วัน (AB , $P=0.07$) สำหรับยีน *ARL4A* พบแนวโน้มความสัมพันธ์กับลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมรวมที่ 305 วัน (AA , $P=0.07$) ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบบจีโนไทป์ของยีนเครื่องหมายต่างๆ กับค่าการผสมพันธุ์พบความสัมพันธ์ในยีน *ARL4A* (AB , $P=0.04$) กับค่าการผสมพันธุ์ของลักษณะการให้ผลผลิตน้ำนมรวมที่ 305 วัน และพบแนวโน้มความสัมพันธ์กับยีน *HP3* (AB , $P=0.12$) กับลักษณะดังกล่าวนี้เช่นกัน นอกจากนี้ยังพบความสัมพันธ์ของค่าการผสมพันธุ์ในลักษณะเปอร์เซ็นต์โปรตีนในยีน *ATP1A1* (AB , $P=0.03$) และพบแนวโน้มความสัมพันธ์ในลักษณะสัดส่วนไขมันต่อโปรตีนนมอีกด้วย (BB , $P=0.08$) สำหรับการรวมยีนเครื่องหมายเข้าด้วยกันพบแนวโน้มความสัมพันธ์ของแบบจีโนไทป์ของยีน *ATP1A1* x *BTN* กับค่าการผสมพันธุ์ของลักษณะ FPR ($P=0.07$) แต่ในทางตรงกันข้ามแม้จะรวมยีนเครื่องหมายเข้าด้วยกันก็ยังไม่พบความสัมพันธ์กับค่าการผสมพันธุ์ของแบบจีโนไทป์กับลักษณะ %Fat และ %Pro ตามลำดับ

คำสำคัญ: สัดส่วนไขมันต่อโปรตีนนม, ผลผลิตน้ำนม, เปอร์เซ็นต์ไขมันนม, เปอร์เซ็นต์โปรตีนนม, ยีนเครื่องหมาย, โคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์

ABSTRACT: The objective of this study was to analyze the association of gene markers including *LEP*, *ARL4*, *ATP1A1*, *HP3*, *BTN*, *STAT5A* with aggregated 305-day milk yield (Milk 305-day), milk composition (%Fat and %Pro), and energy balance (FPR) in crossbred Thai-Holstein dairy cattle. A total of 145 blood samples of crossbred Thai-Holstein dairy cattle from private dairy farm were analyzed the genotype patterns by PCR-RFLP technique.

¹ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kean University, Khon Kaen, 40002

² บริษัทฟาร์มโชคชัยจำกัด นครราชสีมา 30130

Farm Chokchai Co., Ltd, Nakhon Ratchasima, 30130

* Corresponding author: wboonkum@gmail.com

The results found indicated that *ATP1A1* gene marker tended to associate with %Fat (AB, $P=0.09$) and FPR (AB and BB, $P=0.13$) traits. At the same time, *HP3* gene marker tended to associate with FPR ($P=0.14$) and Milk 305-day (AB, $P=0.07$) meanwhile *ARL4A* gene marker tended to associate with Milk 305-day (AA, $P=0.07$). The relationship among genotype patterns of various gene markers on estimated breeding value shown that *ARL4A* was associated with Milk 305-day_EBV (AB, $P=0.04$) and *HP3* gene marker was associated with Milk 305-day_EBV (AB, $P=0.12$). Besides, *ATP1A1* gene marker was associated with %Pro_EBV (AB, $P=0.03$) and FPR_EBV (BB, $P=0.08$). Consideration of combined *ATP1A1*×*BTN* gene markers tended to associate with FPR ($P=0.07$) whereas another combined gene markers (%Fat and %Pro) were not associated with estimated breeding value.

Keywords: fat to protein ratio of milk, milk yield, milk fat percentage, milk protein percentage, genetic marker, crossbred Thai-Holstein dairy cattle

บทนำ

ปัจจุบันการใช้เทคโนโลยีพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยการคัดเลือกสัตว์ที่มีพันธุกรรมดีจากยีนเครื่องหมาย (marker assisted selection) สามารถช่วยเพิ่มความแม่นยำและความก้าวหน้าทางพันธุกรรมอย่างรวดเร็วเนื่องจากสามารถคัดเลือกสัตว์ได้ตั้งแต่ยังไม่ให้ผลผลิตโดยทำควบคู่ไปกับการประเมินพันธุกรรม (จูรีรัตน์ และคณะ, 2553; ศุภมิตร, 2555) การศึกษายีนเครื่องหมาย (genetic marker) นับเป็นวิธีที่ได้รับความนิยมและมีประสิทธิภาพมากในปัจจุบัน (Zhu and Zhao, 2007) เนื่องจากเป็นการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับลักษณะที่สนใจศึกษาเพื่อใช้คัดเลือกสัตว์รายตัว โดยยีนเครื่องหมายที่มีการตรวจวิเคราะห์ในโคนมมีด้วยกันหลายยีน ได้แก่ ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างไขมันนม โปรตีนนม และผลผลิตน้ำนม เช่น ยีน Leptin (*LEP*) อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 4 ซึ่งเป็นเปปไทด์ฮอร์โมนที่ผลิตจากเซลล์ไขมันมีบทบาทต่อการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของไฮโปทาลามัสซึ่งควบคุมการกินได้ สำหรับยีนเกี่ยวกับลักษณะสมดุลพลังงาน ระบบสืบพันธุ์ และผลผลิตน้ำนม คือยีน ADP-ribosylation factor-like 4A (*ARL4A*) (Liefers et al., 2002) อยู่บนโครโมโซมแท่งที่ 4 ในโคนมทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้น (substrate) ของเอนไซม์ N-myristoyltransferase และมีผลต่อพลาสมาเมมเบรนซึ่งมี pH เป็นตัวควบคุมการทำงาน รวมทั้งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งสารระหว่างเซลล์โดยโคนมในช่วงของการให้น้ำมนั้นพบว่ามีการ

แสดงออกของยีนดังกล่าวมากที่สุด (Irmgard et al., 2007; Rincon et al., 2009) ยีน ATPase Na⁺/K⁺ transporting alpha 1 (*ATP1A1*) เป็นรูปร่างชนิดหนึ่งของ enzyme The bovine Na⁺, K⁺-ATPase ซึ่งมีรูปแบบชนิดเอลฟา เอนไซม์ดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องในกระบวนการตอบสนองต่อความเครียดเนื่องจากความร้อนทำให้เกิดภาวะ oxidative stress และยังไวต่อการเปลี่ยนแปลงของ Na⁺, K⁺ ที่เกิดจากภาวะ oxidative stress รวมทั้งยังเป็นตัวชี้วัดในการควบคุมระบบฮอร์โมนของทั้งสองไออน (Liu et al., 2010) ยีน Heat Shock Protein 70-2 (*HP3*) เป็นยีนที่มีบทบาทในการช่วยปกป้องและรักษาสภาพของเซลล์จากหลายปัจจัยยกตัวอย่างเช่น ความร้อนที่จะส่งผลกระทบต่อเซลล์ (จุฬานี, 2553) ยีนดังกล่าวจึงมีความสัมพันธ์กับลักษณะการทนต่อสภาพอากาศร้อนในโคนม ยีน Butyrophillin (*BTN*) เป็นโปรตีนชนิดหนึ่งซึ่งพบได้ใน Milk fat globule membrane ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมโดยเป็นยีนที่ควบคุมลักษณะองค์ประกอบโปรตีนนมและไขมันนมในโคนมลูกผสมไทยไฮลด์ไลน์ (สายใจ และคณะ, 2553) ความสัมพันธ์ของ polymorphisms ใน exon ที่ 7 ของยีน *BTN/HaeIII* และ *BTN/SchI* ซึ่งพบว่าทั้งยีนส่วนมีการแสดงออกที่แตกต่างกันของเปอร์เซ็นต์ไขมันนม ส่วนลักษณะปริมาณโปรตีนนม และผลผลิตน้ำนมสัมพันธ์กับยีน *BTN/HaeIII* (Muszynska et al., 2010) ยีน Signal Transducer and Activator of Transcription 5A (*STAT5A*) เป็นยีนหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับต่อมสร้างน้ำนม และมีผลต่อการทำงานของโปรแลคติน (prolactin)

การแสดงออกของยีนโปรตีนนมใน *STAT5A* มีความเกี่ยวข้องกับลักษณะผลผลิตน้ำนม เปอร์เซ็นต์ไขมันนมในโคนมพันธุ์ Jersey, Polish Black และ White, และ US Holstein cattle (Khatib et al., 2008) จากที่กล่าวมาจะเห็นว่ายีนแต่ละยีนมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงและเกี่ยวข้องกับลักษณะสำคัญทางเศรษฐกิจในโคนมอย่างยิ่ง แต่ในประชากรโคนมที่มีการคัดเลือกอย่างต่อเนื่องและเป็นระยะเวลายาวนาน อาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบางอย่างโดยเฉพาะอย่างยิ่งการสูญหายของยีนและการตอบสนองของยีนของประชากรโคนมในต่างประเทศซึ่งส่วนใหญ่เป็นโคนมพันธุ์กับประชากรโคนมของประเทศไทยซึ่งส่วนใหญ่เป็นโคนมลูกผสมอาจมีความแตกต่างกัน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบยีน *LEP*, *ARL4A*, *ATP1A1*, *HP3*, *BTN* และ *STAT5A* ลักษณะการให้ผลผลิตน้ำมอมองค์ประกอบน้ำนมและสมดุลพลังงานเพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์และการคัดเลือกโคนมพันธุ์ต่อไปในอนาคต

วิธีการศึกษา

ตัวอย่างและข้อมูลที่ใช้ในการศึกษา

การศึกษานี้ใช้ตัวอย่างเลือดและข้อมูลค่าสังเกตของลักษณะต่างๆ จากแม่โคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์จำนวน 145 ตัว ของบริษัทฟาร์มโชคชัย ซึ่งตั้งอยู่ในเขตจังหวัดนครราชสีมา โดยแม่โคนมแต่ละตัวต้องมีข้อมูลระดับเลือด วัน/เดือน/ปีที่เกิด วัน/เดือน/ปีที่คลอด รวมทั้งข้อมูลค่าสังเกต ดังนี้ ข้อมูลเปอร์เซ็นต์ไขมันนม (milk fat percentage, %Fat), เปอร์เซ็นต์

โปรตีนนม (milk protein percentage, %Pro), สัดส่วนไขมันต่อโปรตีนนม (fat to protein ratio of milk; FPR) และการให้ผลผลิตน้ำนมรวม 305 วัน (aggregated 305-day milk yield; Milk 305-day) เพื่อตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ของยีนเครื่องหมายรายตัวจากนั้นนำข้อมูลของสัตว์ที่พบจีโนไทป์ในแต่ละยีนไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ต่อไป

การตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ของยีนเครื่องหมาย

สกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเลือดแม่โคนมตามวิธีการของ (ทองสา 2555) เพื่อตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) โดยในการเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอใช้เทคนิค PCR ในแต่ละปฏิกิริยาประกอบด้วยดีเอ็นเอต้นแบบ (DNA template) ที่มีความเข้มข้น 50 ng/μl มีปริมาตร 1 μl, 10X PCR-buffer มีปริมาตร 1 μl, MgCl₂ มีปริมาตร 0.8 μl, dNTPs (1.0 mM/each) มีปริมาตร 1 μl, Primer forward และ Primer reverse มีปริมาตร 1 μl, 5 U/μl, Taq DNA Polymerase มีปริมาตร 0.1 μl และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นมาเชื้อเพื่อให้มีปริมาตรรวมทั้งสิ้น 10 μl โดยในขั้นตอนการทำ PCR มีดังนี้ 1. ขั้นตอน Initial denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 5 นาที 2. ขั้นตอน Denaturation ใช้อุณหภูมิ 94 °C เป็นเวลา 30 วินาที และ 3. ขั้นตอน Annealing ใช้อุณหภูมิ 60 และ 62 °C แตกต่างกันตามยีนเครื่องหมายที่ใช้ศึกษาโดยใช้เวลา 30 วินาที และ 4. ขั้นตอน Final extension ใช้อุณหภูมิ 72 °C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำยีนเหล่านี้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะดังแสดงใน Table 1

Table 1 PCR primers and PCR-RFLP conditions to detect genetic variation of *LEP ATP1A1 ARL4A HP3 BTN* and *STAT5A* genes.

Genes	5'-sequence-3' Forward / reverse primer	Annealing Temperatures	PCR sizes (bp)	Restriction enzymes	References
<i>LEP</i>	F:GTCTGGAGGCAAAGGGCAGAGT R:CCACCACCTCTGTGGAGTAG	62 °C	522	<i>Bsa</i> AI	ศรีนวล (2553) ¹
<i>LEP</i>	F:TGGAGTGGCTTGTTATTTCTTCT R:GTCCCCGCTTCTGGCTACCTAACT	62 °C	400	<i>Sau</i> 3AI	Liefers et al. (2002)
<i>ATP1A1</i>	F:TGAGCAACCAACGCAACACT R:TGGAAGTGAATCACTGAGGT	62 °C	330	<i>Rsa</i> I	Liu et al. (2010)
<i>ARL4A</i>	F:TTACTGCGACTTGGACCAGTT R:GTCCACGACAAACACAATGC	60 °C	501	<i>Dde</i> I	Rincon et al. (2009)
<i>HP3</i>	F:GCACCACCTACTCCTGCGTA R:CTTCATGTCCGACTGCACCA	60 °C	230	<i>Hpy</i> 188I	จุฬานีย์ (2553)
<i>BTN</i>	F:TGGAGCTCTATGGAAATGGG R:TACCCAACAGGAAGAAACAG	60 °C	501	<i>Hae</i> III	สายใจ และคณะ (2553)
<i>STAT5A</i>	F:CCAGGGTGCATACAGGACAG R:GCAGGTTACGAGGACTCAGG	60 °C	224	<i>Msp</i> A1I	He et al. (2011)

¹In this study

การวิเคราะห์ข้อมูล

รูปแบบจีโนไทป์ในการศึกษาต้องพบความถี่ไม่ต่ำกว่า 5% ของจำนวนตัวอย่างที่ตรวจวิเคราะห์ทั้งหมด จึงจะนำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบจีโนไทป์กับค่าสังเกต และความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบจีโนไทป์กับค่าการผสมพันธุ์ (Estimated Breeding Value, EBV) ซึ่งค่าการผสมพันธุ์ถูกประมาณด้วยวิธี Expectation-Maximization

Restricted Maximum Likelihood (EM-REML) สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS v 9.2 โดยใช้วิธี Generalized Linear Model (PROC GLM) ภายใต้โมเดล [1] สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบจีโนไทป์กับค่าสังเกต และโมเดล [2] สำหรับการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบจีโนไทป์กับค่า EBV โดยรูปแบบโมเดลแสดงดังนี้

$$Y_{ijklm1} = \mu + BG_i + age_j + season_k + year_l + genotypes_m + \varepsilon_{ijklm} \quad [\text{Model 1}]$$

$$Y_{ijklm2} = \mu + genotypes_m + \varepsilon_{ijklm} \quad [\text{Model 2}]$$

เมื่อ Y_{ijklm1} และ Y_{ijklm2} = ค่าสังเกตและค่าการผสมพันธุ์ของลักษณะ %Fat, %Pro, FPR และ Milk 305-day; μ = ค่าเฉลี่ยของค่าสังเกตในแต่ละลักษณะที่ศึกษา; BG_i = อิทธิพลคงที่ของระดับเลือด i (1 คือระดับเลือด $\leq 80.9\%$ HF, 2 คือระดับเลือด 81.0% ถึง 93.6% HF, 3 คือระดับเลือด $\geq 93.7\%$ HF); age_j = อิทธิพลคงที่ของอายุเมื่อคลอดลูกที่ j ; $season_k$ = อิทธิพลคงที่ของฤดูกาลเมื่อคลอดที่ k ; $year_l$ = อิทธิพลคงที่ของปีเมื่อคลอดที่ l ; $genotypes_m$ = อิทธิพลสุ่มเนื่องจากรูปแบบจีโนไทป์ที่ m โดยพิจารณาแยกแต่ละ

ยีนและพิจารณาการเข้าคู่กันระหว่าง 2 ยีน (combined genotype) (m = ยีน *LEP*, *ARL4A*, *ATP1A1*, *HP3*, *BTN* and *STAT5A*) และ ε_{ijklm} = อิทธิพลสุ่มเนื่องจากความคลาดเคลื่อน

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ข้อมูลค่าสังเกตของลักษณะที่ศึกษา ได้แก่ %Fat, %Pro, FPR และ Milk 305-day (Table 2) พบว่า %Fat และ %Pro มีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วงใกล้เคียงกับรายงาน

ของ จีระ (2553) ในขณะที่ลักษณะ FPR พบว่าค่าเฉลี่ยของข้อมูลโคนมลูกผสมไทยโฮลสไตน์มีค่าอยู่ในช่วง 0.68 ถึง 2.48 (ค่ามาตรฐานของลักษณะ FPR มีค่า 1-2) ซึ่งชี้ให้เห็นว่ามีโคนมส่วนหนึ่งที่ประสบปัญหาขาด

สมดุลพลังงาน (Toni et al., 2011) สำหรับค่า Milk 305-day พบว่ามีค่าสูงกว่ารายงานของ จุริรัตน์ และ สายัณห์ (2546); จุริรัตน์ และคณะ (2553)

Table 2 Data of 145 dairy cows description, milk fat percentage (%Fat), milk protein percentage (%Pro), fat to protein ratio of milk (FPR) and aggregated 305-day milk yield (Milk 305-day).

Traits	Mean	Standard Deviation	Min	Max
%Fat	4.38	2.39	0.72	8.88
%Pro	3.14	0.62	2.05	6.89
FPR	1.58	0.90	0.30	3.83
Milk 305-day (kg)	4,674	1,054	2,525	7,699

รูปแบบความถี่จีโนไทป์และความถี่อัลลีล

ผลการตรวจสอบรูปแบบจีโนไทป์ ความถี่จีโนไทป์ และความถี่อัลลีลของยีน *LEP/BsaAI*, *LEP/Sau3AI*, *ARL4A*, *ATP1A1*, *HP3*, *BTN* และ *STAT5A* แสดงใน Figure 1 และ Table 3 โดยพบว่าจีโนไทป์บางรูปแบบมีความถี่ต่ำกว่า 5% ซึ่งอาจเกิดจากความถี่ของกลุ่มตัวอย่างที่ศึกษาได้รับผลกระทบจากการคัดเลือกซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Clempson et al. (2011) โดยพบว่าการแสดงออกของยีน *LEP* เกี่ยวข้องกับการให้ผลผลิตน้ำนมที่ตำแหน่ง A59V โดยรูปแบบจีโนไทป์ *TT* มีความสัมพันธ์กับการลดลงของผลผลิตน้ำนมตลอดระยะเวลาการให้นม หรือแม้แต่งานวิจัยของ Javanmard et al. (2010) พบว่ารูปแบบจีโนไทป์ *AB*

มีความสัมพันธ์กับการให้ผลผลิตไขมันสูง ด้วยเหตุผลเหล่านี้จึงมีความเป็นไปได้ที่จีโนไทป์ของบางยีนอาจสูญหายไปหรือถูกคัดออกจากฝูงโคนม ผลจากการศึกษา ยีน *ATP1A1* ของ Liu et al. (2010) พบรูปแบบ *AB* เป็นรูปแบบที่สามารถทนต่อความเครียดเนื่องจากความร้อนได้ดี รองลงมาคือ *BB* ในขณะที่รูปแบบจีโนไทป์ *AA* ไม่ปรากฏในกลุ่มตัวอย่างนี้อาจเป็นกลุ่มโคที่มีความสามารถในการทนร้อนได้น้อยกว่ารูปแบบจีโนไทป์อื่นนั่นเอง ซึ่งเหตุผลที่กล่าวมาสามารถใช้สรุปในยีน *HP3* (ไม่พบรูปแบบจีโนไทป์ *BB*) (จุฬานีย์ 2553) และยีน *BTN* (ไม่พบรูปแบบจีโนไทป์ *BB*) (สายใจ และคณะ, 2553) ตามลำดับ

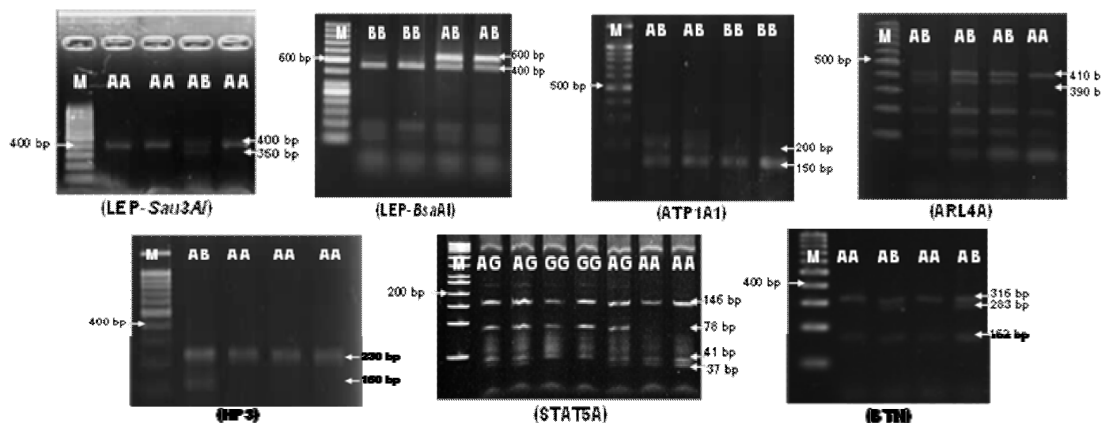


Figure 1 The PCR-RFLP pattern of *LEP/BsaAI*, *LEP/Sau3AI*, *ARL4A*, *ATP1A1*, *HP3*, *BTN*, and *STAT5A* genes.

Table 3 The genotype and allele frequencies of various genes in Thai-Holstein crossbred.

Genes	n ¹	Genotypic frequencies			Allelic frequencies	
		AA (n)	AB (n)	BB (n)	A	B
<i>LEP/Bsa1AI</i>	142	0.10 (15)	0.37 (52)	0.53 (75)	0.29	0.71
<i>LEP/Sau3AI</i>	145	0.51 (74)	0.40 (58)	0.09 (13)	0.71	0.29
<i>ARL4A</i>	145	0.65 (94)	0.28 (41)	0.07 (10)	0.79	0.21
<i>ATP1A1</i>	145	0	0.59 (86)	0.41 (59)	0.30	0.70
<i>HP3</i>	143	0.58 (83)	0.42 (60)	0	0.79	0.21
<i>BTN</i>	128	0.85 (109)	0.15 (19)	0	0.93	0.07
		AA (n)	AG (n)	GG (n)	A	G
<i>STAT5A</i>	133	0.34 (45)	0.40 (53)	0.26 (35)	0.54	0.46

¹n is number of animal

การพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างยีนแต่ละยีนกับค่าสังเกตต่างๆ

ความสัมพันธ์กับลักษณะเปอร์เซ็นต์ไขมันนม (%Fat)

ผลการศึกษาในครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างยีน *LEP*, *ARL4A*, *HP3*, *BTN*, และ *STAT5A* กับค่า %Fat ดังแสดงใน Table 4 และความสัมพันธ์กับการผสมพันธุ์ของ %Fat ดังแสดงใน Table 5 (สายใจ และคณะ, 2553; Liefers et al., 2002; Chebel et al., 2008; He et al., 2011) อย่างไรก็ตามยีน *ATP1A1* พบว่ามีแนวโน้มความสัมพันธ์ระหว่างยีนดังกล่าวกับลักษณะ %Fat ($P=0.09$) โดยรูปแบบจีโนไทป์ *AB* มีแนวโน้มทำให้ %Fat สูงกว่ารูปแบบจีโนไทป์ *BB* อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างยีนดังกล่าวกับค่าการผสมพันธุ์กลับไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ในทั้ง 2 รูปแบบจีโนไทป์ (Table 5) ซึ่งผลดังกล่าวเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับยีนอื่นๆ

ความสัมพันธ์กับลักษณะเปอร์เซ็นต์โปรตีน (%Pro)

ไม่พบความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบจีโนไทป์ใดๆ ในยีนเครื่องหมายที่ศึกษากับค่า %Pro ($P>0.05$) (Table 4) แต่เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบจีโนไทป์กับค่าการผสมพันธุ์ (Table 5) พบว่ายีน *ATP1A1* ที่มีรูปแบบจีโนไทป์ *AB* มีผลทำให้ค่าการ

ผสมพันธุ์ของลักษณะ %Pro สูงขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังนั้นในการประยุกต์ใช้สามารถนำยีน *ATP1A1* ไปใช้ในการคัดเลือกโคนมเพื่อให้มีพันธุกรรมของการให้ %Pro สูงขึ้นได้

ความสัมพันธ์กับลักษณะสัดส่วนไขมันต่อโปรตีนนม (FPR)

ผลการศึกษาครั้งนี้ไม่พบความสัมพันธ์ที่ชัดเจนระหว่างรูปแบบจีโนไทป์กับค่าสังเกตลักษณะ FPR ในยีนเครื่องหมายต่างๆ อย่างไรก็ตามพบว่ายีน *ATP1A1* ($P<0.13$) และ *HP3* ($P<0.14$) มีแนวโน้มสัมพันธ์กับลักษณะ FPR (Table 4) โดยรูปแบบจีโนไทป์ *AB* ของยีน *ATP1A1* มีแนวโน้มทำให้ค่า FPR สูงกว่ารูปแบบจีโนไทป์ *BB* และผลเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับยีน *HP3* สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบจีโนไทป์ของยีนเครื่องหมายต่างๆ กับค่าการผสมพันธุ์ (Table 5) พบว่ารูปแบบจีโนไทป์ *BB* ของยีน *ATP1A1* ($P=0.08$) มีแนวโน้มทำให้ค่า FPR สูงกว่ารูปแบบจีโนไทป์ *AB* สำหรับการประยุกต์ใช้จะเห็นว่รูปแบบจีโนไทป์ทั้ง *AB* ($FPR_{EBV} = -0.01 \pm 0.01$) และ *BB* ($FPR_{EBV} = 0.02 \pm 0.01$) ในส่วนของความสัมพันธ์กับค่าการผสมพันธุ์ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่จะเห็นว่าอัลลีล *B* อาจมีผลต่อค่า FPR ดังนั้นในการคัดเลือกปรับปรุงพันธุกรรมของลักษณะดังกล่าวสามารถเลือกใช้ได้ทั้ง *AB* และ *BB*

ความสัมพันธ์กับลักษณะผลผลิตน้ำนม 305 วัน (Milk 305-day)

ไม่พบความสัมพันธ์ที่ชัดเจนระหว่างรูปแบบจีโนไทป์ในยีนเครื่องหมายต่างๆ กับค่า Milk 305-day แต่พบแนวโน้มความสัมพันธ์ของยีน *ARL4A* ($P=0.07$) และ *HP3* ($P=0.07$) (Table 4) ในขณะที่เดียวกันพบความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบจีโนไทป์กับค่าการผสม

พันธุ์ของยีน *ARL4A* ($P<0.05$) กล่าวคือรูปแบบจีโนไทป์ AB มีผลทำให้ผลผลิตน้ำนมรวมที่ 305 วันสูงขึ้นได้ นอกจากนี้ยังพบแนวโน้มความสัมพันธ์กับยีน *HP3* ($P=0.12$) (Table 5) ดังนั้นในการประยุกต์ใช้ยีนเครื่องหมาย *ARL4A* น่าจะเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการคัดเลือกการพันธุ์กรรม

Table 4 Association analysis for %Fat, %Pro, FPR, and Milk 305-day with genotype of various genes.

Genes	Genotype	Lease square means $\pm$ Standard error			
		%Fat	%Pro	FPR	Milk 305-day (kg)
<i>LEP/BsaAI</i>	AA	4.15 $\pm$ 1.04	3.17 $\pm$ 0.29	1.68 $\pm$ 0.43	4833.96 $\pm$ 345.63
	AB	4.63 $\pm$ 0.57	3.05 $\pm$ 0.16	1.73 $\pm$ 0.26	4943.55 $\pm$ 264.26
	BB	4.11 $\pm$ 0.50	3.07 $\pm$ 0.15	1.40 $\pm$ 0.23	4805.50 $\pm$ 240.81
	P-value ^{1/}	0.57	0.90	0.30	0.80
<i>LEP/Sau3AI</i>	AA	4.42 $\pm$ 0.52	3.03 $\pm$ 0.15	1.53 $\pm$ 0.24	4687.27 $\pm$ 259.35
	AB	4.70 $\pm$ 0.57	3.05 $\pm$ 0.16	1.73 $\pm$ 0.26	4765.38 $\pm$ 262.22
	BB	4.38 $\pm$ 1.06	3.14 $\pm$ 0.29	1.76 $\pm$ 0.44	4865.08 $\pm$ 368.59
	P-value	0.82	0.91	0.60	0.84
<i>ARL4A</i>	AA	4.68 $\pm$ 0.50	3.04 $\pm$ 0.15	1.64 $\pm$ 0.23	4772.93 $\pm$ 244.25
	AB	4.09 $\pm$ 0.60	3.04 $\pm$ 0.17	1.55 $\pm$ 0.27	4713.00 $\pm$ 265.89
	BB	4.51 $\pm$ 1.06	2.74 $\pm$ 0.29	1.66 $\pm$ 0.47	3956.54 $\pm$ 411.03
	P-value	0.49	0.51	0.90	0.07
<i>ATP1A1</i>	AB	4.81 $\pm$ 0.50	3.08 $\pm$ 0.15	1.71 $\pm$ 0.23	4731.21 $\pm$ 242.90
	BB	4.05 $\pm$ 0.55	2.96 $\pm$ 0.16	1.41 $\pm$ 0.25	4762.49 $\pm$ 272.63
	P-value	0.09	0.30	0.13	0.86
<i>HP3</i>	AA	4.678 $\pm$ 0.51	3.00 $\pm$ 0.15	1.72 $\pm$ 0.23	4635.37 $\pm$ 243.72
	AB	4.248 $\pm$ 0.56	3.10 $\pm$ 0.17	1.41 $\pm$ 0.26	4958.54 $\pm$ 259.52
	P-value	0.35	0.43	0.14	0.07
<i>BTN</i>	AA	4.38 $\pm$ 0.58	3.06 $\pm$ 0.17	1.48 $\pm$ 0.26	4815.97 $\pm$ 254.03
	AB	4.44 $\pm$ 0.75	2.89 $\pm$ 0.22	1.85 $\pm$ 0.33	4893.91 $\pm$ 293.70
	P-value	0.92	0.36	0.19	0.79
<i>STAT5A</i>	AA	4.66 $\pm$ 0.63	3.06 $\pm$ 0.18	1.73 $\pm$ 0.28	4804.06 $\pm$ 270.32
	AG	4.03 $\pm$ 0.61	3.02 $\pm$ 0.18	1.43 $\pm$ 0.27	4803.81 $\pm$ 261.78
	GG	4.78 $\pm$ 0.69	2.97 $\pm$ 0.21	1.72 $\pm$ 0.33	4956.30 $\pm$ 268.89
	P-value	0.37	0.87	0.39	0.79

^{1/}P-value for significant within a column in each gene

Table 5 Association analysis for %Fat_EBV, %Pro_EBV, FPR_EBV, and Milk 305-day_EBV with genotype of various genes.

Genes	Genotype	Lease square means $\pm$ Standard error			
		%Fat_EBV	%Pro_EBV	FPR_EBV	Milk 305-day_EBV
LEP/BsaAI	AA	-0.34 $\pm$ 0.19	-0.08 $\pm$ 0.05	-0.02 $\pm$ 0.02	98.72 $\pm$ 76.09
	AB	0.06 $\pm$ 0.07	-0.02 $\pm$ 0.02	0.01 $\pm$ 0.01	235.69 $\pm$ 39.62
	BB	0.04 $\pm$ 0.07	0.01 $\pm$ 0.02	0.00 $\pm$ 0.01	176.27 $\pm$ 34.24
	P-value	0.16	0.24	0.39	0.23
LEP/Sau3AI	AA	0.05 $\pm$ 0.06	0.00 $\pm$ 0.02	0.00 $\pm$ 0.01	178.95 $\pm$ 34.37
	AB	0.02 $\pm$ 0.07	-0.01 $\pm$ 0.02	0.01 $\pm$ 0.01	226.60 $\pm$ 37.65
	BB	-0.34 $\pm$ 0.19	-0.08 $\pm$ 0.05	-0.02 $\pm$ 0.02	121.04 $\pm$ 81.14
	P-value	0.17	0.30	0.50	0.42
ARL4A	AA	0.06 $\pm$ 0.06	-0.00 $\pm$ 0.02	0.00 $\pm$ 0.01	182.28 ^{ab} $\pm$ 29.76
	AB	-0.05 $\pm$ 0.09	-0.01 $\pm$ 0.02	0.01 $\pm$ 0.01	259.69 ^b $\pm$ 44.10
	BB	-0.12 $\pm$ 0.20	-0.08 $\pm$ 0.05	0.01 $\pm$ 0.02	2.58 ^a $\pm$ 94.58
	P-value	0.47	0.30	0.83	0.04
ATP1A1	AB	-0.02 $\pm$ 0.06	0.01 ^a $\pm$ 0.02	-0.01 $\pm$ 0.01	215.21 $\pm$ 31.10
	BB	0.07 $\pm$ 0.07	-0.04 ^b $\pm$ 0.02	0.02 $\pm$ 0.01	160.26 $\pm$ 38.49
	P-value	0.38	0.03	0.08	0.27
HP3	AA	0.05 $\pm$ 0.06	-0.01 $\pm$ 0.02	0.01 $\pm$ 0.01	158.56 $\pm$ 32.18
	AB	-0.01 $\pm$ 0.08	0.01 $\pm$ 0.020	-0.01 $\pm$ 0.01	236.16 $\pm$ 36.88
	P-value	0.52	0.54	0.15	0.12
BTN	AA	0.00 $\pm$ 0.06	-0.01 $\pm$ 0.014	-0.00 $\pm$ 0.01	196.52 $\pm$ 28.49
	AB	0.00 $\pm$ 0.13	-0.02 $\pm$ 0.03	0.01 $\pm$ 0.01	252.25 $\pm$ 69.20
	P-value	0.99	0.70	0.72	0.46
STAT5A	AA	0.07 $\pm$ 0.09	-0.02 $\pm$ 0.02	-0.00 $\pm$ 0.01	245.70 $\pm$ 44.05
	AG	0.04 $\pm$ 0.08	0.01 $\pm$ 0.02	0.01 $\pm$ 0.01	184.93 $\pm$ 40.49
	GG	-0.06 $\pm$ 0.10	-0.02 $\pm$ 0.03	0.01 $\pm$ 0.01	179.34 $\pm$ 50.69
	P-value	0.57	0.61	0.85	0.51

^{a,b/} within a column in each gene with no common superscript are significant difference ($P < 0.05$)

การพิจารณาความสัมพันธ์โดยการรวมยีนกับค่าสังเกตและค่าการผสมพันธุ์ของลักษณะที่ศึกษา

ความสัมพันธ์ของรูปแบบจีโนไทป์โดยการรวมยีนเครื่องหมายเข้าด้วยกัน (combined genes) กับค่าสังเกตและค่าการผสมพันธุ์ในลักษณะที่ศึกษาต่างๆ (Table 6) พบว่าความสัมพันธ์ของรูปแบบจีโนไทป์โดยการรวมยีน *LEP/BsaAI*×*BTN* ($P=0.02$ and 0.21), *LEP/Sau3AI*×*BTN* ($P=0.04$ and 0.33) และ *AT-*

P1A1×*BTN* ($P=0.06$ and 0.07) กับลักษณะ FPR ในทางตรงกันข้ามแม้จะรวมยีนเครื่องหมายเข้าด้วยกันก็ยังไม่พบความสัมพันธ์ทั้งกับค่าสังเกตและค่าการผสมพันธุ์ของรูปแบบจีโนไทป์กับลักษณะ %Fat และ %Pro ตามลำดับ ในการประยุกต์ใช้จะเห็นว่าการเลือกใช้ยีนเครื่องหมาย *ATP1A1*×*BTN* น่าจะเหมาะสมมากกว่ายีนเครื่องหมายอื่นๆ

Table 6 Association analysis for %Fat, %Fat_EBV, %Pro , %Pro_EBV, FPR , and FPR_EBV, with genotype combine of various genes.

Genes	Genotype	Lease square means $\pm$ Standard error					
		%Fat	%Fat_EBV	%Pro	%Pro_EBV	FPR	FPR_EBV
<i>LEP/BsaAI x BTN</i>	ABAA	5.15 $\pm$ 0.70	0.05 $\pm$ 0.09	3.02 $\pm$ 0.21	-0.02 $\pm$ 0.02	1.90 ^b $\pm$ 0.30	0.01 $\pm$ 0.01
	BBAA	3.96 $\pm$ 0.64	-0.01 $\pm$ 0.08	3.09 $\pm$ 0.20	0.01 $\pm$ 0.02	1.20 ^a $\pm$ 0.28	-0.01 $\pm$ 0.01
	BBAB	4.55 $\pm$ 0.86	0.10 $\pm$ 0.16	2.94 $\pm$ 0.27	-0.02 $\pm$ 0.03	1.88 ^{ab} $\pm$ 0.37	0.03 $\pm$ 0.02
	P-value	0.16	0.78	0.84	0.53	0.02	0.21
<i>LEP/Sau3AIx</i> <i>BTN</i>	AAAA	4.01 $\pm$ 0.63	0.01 $\pm$ 0.08	3.08 $\pm$ 0.20	0.01 $\pm$ 0.02	1.24 ^a $\pm$ 0.28	-0.01 $\pm$ 0.01
	AAAB	4.68 $\pm$ 0.83	0.10 $\pm$ 0.15	2.93 $\pm$ 0.26	-0.03 $\pm$ 0.03	1.92 ^b $\pm$ 0.36	0.02 $\pm$ 0.02
	ABAA	5.07 $\pm$ 0.70	0.03 $\pm$ 0.08	3.03 $\pm$ 0.21	-0.02 $\pm$ 0.02	1.85 ^{ab} $\pm$ 0.30	0.01 $\pm$ 0.01
	P-value	0.20	0.88	0.83	0.59	0.04	0.33
<i>ATP1A1x</i> <i>BTN</i>	ABAA	4.47 $\pm$ 0.63	-0.08 $\pm$ 0.07	3.13 $\pm$ 0.19	0.01 $\pm$ 0.01	1.46 ^a $\pm$ 0.27	-0.01 ^a $\pm$ 0.01
	ABAB	5.05 $\pm$ 0.93	0.04 $\pm$ 0.17	2.86 $\pm$ 0.26	-0.01 $\pm$ 0.03	2.30 ^b $\pm$ 0.38	0.02 ^b $\pm$ 0.02
	BBAA	3.98 $\pm$ 0.67	0.12 $\pm$ 0.09	2.96 $\pm$ 0.20	-0.04 $\pm$ 0.02	1.28 ^a $\pm$ 0.30	0.02 ^b $\pm$ 0.01
	BBAB	3.63 $\pm$ 1.06	-0.04 $\pm$ 0.18	2.92 $\pm$ 0.31	-0.03 $\pm$ 0.04	1.11 ^a $\pm$ 0.45	-0.01 ^a $\pm$ 0.02
	P-value	0.56	0.38	0.56	0.40	0.06	0.07

^{a,b/} within a column in each gene with no common superscript are significant difference (P<0.05)

สรุป

แม้ว่าการศึกษาความสัมพันธ์ของยีนเครื่องหมายต่างๆกับค่าสังเกต และค่าการผสมพันธุ์จะไม่สามารถสรุปได้ชัดเจนถึงความสัมพันธ์ อย่างไรก็ตามจากการศึกษาสามารถแสดงถึงแนวโน้มความสัมพันธ์พอสมควร นอกจากนี้การพิจารณาร่วมกันโดยการรวมยีนเครื่องหมาย *ATP1A1xBTN* น่าจะเป็นทางเลือกที่ดีกว่าการพิจารณาแยกในแต่ละยีนโดยเฉพาะกับลักษณะสมมูลพลังงาน แต่ในลักษณะอื่นๆ อาจต้องการข้อมูลสนับสนุนเพิ่มเติมในอนาคต

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และฟาร์มโชคชัย จำกัดที่สนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้ ภายใต้โครงการการพัฒนานักวิจัยและงานวิจัยเพื่ออุตสาหกรรม-ปวอ. ระดับปริญญาโท และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยขอนแก่นที่สนับสนุนทุนวิจัยภายใต้โครงการพัฒนานักวิจัยทุนบ่มเพาะนักวิจัยประจำปี พ.ศ. 2555

เอกสารอ้างอิง

- จรัรัตน์ แสนโกชน, ณชัย ศรราชพันธุ์ และกัลยา เก่งวิทยกรรม. 2553. การศึกษาการแสดงออกของยีน Butyrophillin ต่อปริมาณไขมันในน้ำนมในโคนมลูกผสมไทย-โฮลสไตน์. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 1: 21-32.
- จรัรัตน์ แสนโกชน และ สกยนต์ บัวบาน. 2546. การประเมินค่าทางพันธุกรรมของลักษณะผลผลิตน้ำนมสำหรับโคนมในประเทศไทย. เวชชสารสัตวแพทย์. 33: 79-90.
- จุฬานีย์ น่วมจิตร์. 2553. การศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบและลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน HSP70-2 ระหว่างโคพื้นเมืองไทยและโคโฮลสไตน์ฟรีเชียน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น. ทองสา บัวสุข. 2555. การศึกษาเครื่องหมายพันธุกรรมที่สัมพันธ์กับลักษณะการเจริญเติบโตในโคพื้นเมืองไทยและบราห์มัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- ธีระ รักความสุข. 2553. ปัญหาพลังงานขาดสมดุลในโคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเชียนที่เลี้ยงในฟาร์มรายย่อยเขตภาคตะวันตกของประเทศไทย รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ศรีนวล คณานิษฐ์. 2553. การตรวจหาเครื่องหมายดีเอ็นเอที่สัมพันธ์กับลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ในกระบือปลัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

- ศุภมิตร เมฆฉาย. 2555. การประยุกต์ใช้เครื่องหมายทางพันธุกรรมในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์. แก่นเกษตร. 40: 51-54.
- สายใจ ชื่นสุข, ณชัย ศรารพันธ์, และกัลยา เก่งวิทย์กรรม. 2553. การศึกษาการแสดงออกของยีน Butyrophillin ต่อปริมาณไขมันในน้ำนมโคนมลูกผสมไทย-โฮลสไตน์ วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 1: 22-32.
- Chebel, R. C., F. Susca, and J. E. P. Santos. 2008. Leptin genotype is associated with lactation performance and health of Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 91: 2893-2900.
- Clempson, A. M., G. E. Pollott, J. S. Brickell, N. E. Bourne, N. Munce, and D. C. Wathes. 2011. Evidence that leptin genotype is associated with fertility, growth, and milk production in Holstein cows. *J. Dairy Sci.* 94: 3618-3628.
- He, X. M., X. Chu, L. Qiao, J. N. He, P. Q. Wang, T. Feng, R. Di, G. L. Cao, L. Fang, and Y. F. An. 2011. Polymorphisms of STAT5A gene and their association with milk production traits in Holstein cows. *Mol Biol Rep.* 39: 2901-2907.
- Irmgard, H., A. Thompson, C. M. Sanderson, and S. Munro. 2007. The Arl4 Family of small G proteins can recruit the cytohesin Arf6 exchange factors to the plasma membrane. *Curr. Biol.* 17: 711-716.
- Javanmard, A., K. Khaledi, N. Asadzadeh, and A. R. Solimanifarjam. 2010. Detection of polymorphism in the Bovine Leptin (LEP) gene: association of a single nucleotide polymorphism with breeding value of milk traits in Iranian Holstein Cattle. *J. Mol. Genet.* 2: 10-14.
- Khatib, H., R. L. Monson, V. Schutzkus, D. M. Kohl, G. L. M. Rosa, and J. J. Rutledge. 2008. Mutation in the STAT5A Gene Are Associated with Embryonic Survival and Milk Composition in Cattle. *J. Dairy Sci.* 91: 784-793.
- Liefers, S. C., M. F. W. te Pas, R. F. Veerkamp, and T. van der Lende. 2002. Associations between Leptin Gene Polymorphisms and Production, Live Weight, Energy Balance, Feed Intake, and Fertility in Holstein Heifers. *J. Dairy Sci.* 85: 1633-1638.
- Liu, Y. X., X. Zhou, D. Q. Li, Q. W. Cui, and G. L. Wang. 2010. Association of ATP1A1 gene polymorphism with heat tolerance traits in dairy cattle. *Genet. Mol. Res.* 9: 891-896.
- Muszyńska, M., I. Szatkowska, W. Ihelm Grzesiak, A. Dybus, and D. Zaborski. 2010. Two single nucleotide polymorphisms within bovine butyrophilin gene (BTN/HaeIII and BTN/SchI) and their association with milk performance traits in Jersey cattle. *Arch. Tierz.* 53: 501-509.
- Rincon, G., A. Islas-Trejo, J. Casellas, Y. Ronin, M. Soller, E. Lipkin, and J. F. Medrano. 2009. Fine mapping and association analysis of a quantitative trait locus for milk production traits on *Bos taurus* autosome 4. *J. Dairy Sci.* 92: 758-764.
- Zhu, M., and S. Zhao. 2007. Candidate gene identification approach: progress and challenges. *Int. J. Biol. Sci.* 3: 420-427.