

การศึกษาที่มีความสัมพันธ์กับโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะ และอัณฑะทองแดงในสุกร

Association study of candidate genes with scrotal hernia and cryptorchidism in pigs

พิชญานิภา กล่อมทอง¹, มนต์ชัย ดวงจินดา^{1*}, สุภร กตเวทิน¹, ยูพิน ผาสุก¹
และ คมสัน ดวงสิทธิทานนท์¹

Pitchayanipa Klomtong¹, Monchai Duangjinda^{1*}, Suporn Katawatin¹, Yupin Phasuk¹
and Komson Tuangsitithanon¹

บทคัดย่อ: การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบยีน Follicle stimulating hormone beta (*FSHB*), Insulin like -3 (*INSL3*), Steroidogenic factor -1 (*SF-1*) และยีน Mullerian inhibiting substance (*MIS*) กับโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะทองแดงในสุกร โดยใช้ตัวอย่างสุกรจำนวน 257 ตัว แบ่งสุกรออก 3 กลุ่ม คือ สุกรปกติ (ไม่มีพันธุประวัติการให้ลูกเป็นโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะทองแดง) สุกรเป็นโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะ และสุกรเป็นโรคอัณฑะทองแดง จำนวน 75, 82 และ 100 ตัว ตามลำดับ ตรวจสอบรูปแบบยีนของยีน *FSHB* ด้วยเทคนิค PCR, ยีน *INSL3*, *SF-1* ด้วยเทคนิค PCR-SSCP และยีน *MIS* ด้วยเทคนิค PCR-RFLP และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบยีนกับโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะทองแดงด้วยวิธี Logistic regression จากการศึกษาพบว่ารูปแบบยีนใน *FSHB* และ *MIS* มีความสัมพันธ์กับการเป็นโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะทองแดง ($P < 0.05$) และยีน *INSL3* มีความสัมพันธ์กับการเป็นโรคอัณฑะทองแดง ($P < 0.05$) ซึ่งยีนดังกล่าวมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงและเคลื่อนที่ของอัณฑะซึ่งอาจมีกลไกทางพันธุกรรมที่เป็นผลเนื่องจากการทำงานของยีนร่วมกัน ส่งผลให้เป็นโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะทองแดง ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาต่อไประดับโมเลกุลของยีนดังกล่าวเพื่อที่พัฒนาไปใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมในระดับอุตสาหกรรมการผลิตสุกรต่อไป

คำสำคัญ: ยีน, รูปแบบของยีน, สุกร, โรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะ, โรคอัณฑะทองแดง

ABSTRACT: This study proposed to investigate the associations between Follicle stimulating hormone beta (*FSHB*), Insulin - like 3 (*INSL3*), Steroidogenic factor-1 (*SF-1*) and Mullerian inhibiting substance (*MIS*) genes with scrotal hernia and cryptorchidism in pigs. A total of 257 pig blood samples were collected from 3 groups, the first group consisted of normal pigs (parents had not occur of scrotal hernia and cryptorchidism) (n=75), the second group composed of scrotal hernia pigs (n =82) and the third group revealed cryptorchidism symptom (n=100). The polymorphism of *FSHB* gene was detected by PCR, *INSL3* and *SF-1* genes were analyzed by PCR-SSCP and *MIS* gene was detected by PCR-RFLP. Analysis of association between pattern of genes with scrotal hernia and cryptorchidism were performed by Logistic regression. The results revealed that the *FSHB* and *MIS* genes were associated with scrotal hernia and cryptorchidism ($P < 0.05$) and *INSL3* gene was associated with only cryptorchidism ($P < 0.05$). Theses genes were involved testis differentiation and descent, the genetic mechanism important might be controlled by interaction of genes, which are associated with scrotal hernia and cryptorchidism in pigs. Therefore, further study on the molecular level for genes that could be developed as genetic markers in the pig industry.

Keywords: Gene, Pattern of gene, Pig, Scrotal hernia, Cryptorchism

¹ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

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

* Corresponding author: Monchai@kku.ac.th

บทนำ

โรคผิดปกติทางพันธุกรรมแต่กำเนิดก่อให้เกิดความสูญเสียต่ออุตสาหกรรมการผลิตสุกรเป็นอย่างมาก จากสถิติการเลี้ยงสุกรในปี 2550 จำนวน 9.3 ล้านตัว (กรมปศุสัตว์, 2550) พบการสูญเสียเนื่องจากโรคผิดปกติทางพันธุกรรมเป็นเงินสูงถึง 19-95 ล้านบาท (Gatphayak et al., 2005) โดยโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะทองแดงเป็นโรคผิดปกติทางพันธุกรรมแต่กำเนิดที่พบได้บ่อย โรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะคือการที่ไส้หรืออวัยวะภายในช่องท้องยื่นโผล่ผ่านช่อง inguinal canal ไปยังถุงอัณฑะ ส่งผลให้สุกรที่เป็นโรสดังกล่าวมีการเจริญเติบโตช้า (เรื่องวิทย์ และคณะ, 2542) ปัจจุบันใช้วิธีการผ่าตัดซึ่งมีค่าใช้จ่ายต่อตัวประมาณ 100-200 บาท สำหรับโรคอัณฑะทองแดง คือ การที่อัณฑะค้างอยู่ภายในช่องท้องหรือขาหนีบ ซึ่งอาจเกิดกับอัณฑะเพียงข้างเดียวหรือสองข้าง โดยสุกรที่เป็นโรสดังกล่าวมีการผสมติดต่ำและเป็นหมันได้ (Pinart et al., 1999) หากส่งชำแหละขายจะถูกตัดราคาถึง 300 บาท/ตัว (Gatphayak et al., 2005) อย่างไรก็ตามการคัดเลือกลักษณะดังกล่าว สามารถลดปริมาณจำนวนสุกรที่เป็นโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะทองแดงได้ แต่เนื่องจากโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะทองแดงเป็นโรคที่ถูกจำกัดด้วยเพศมีการแสดงออกในเพศผู้เท่านั้น ทำให้ยังมีสุกรที่มียีนแฝงก่อให้เกิดโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะทองแดงอยู่ หากนำไปใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์จะทำให้มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะทองแดงเพิ่มขึ้น แนวทางที่สามารถช่วยในการลดโอกาสการพบสุกรที่เป็นโรสดังกล่าวอย่างมีประสิทธิภาพ ได้แก่ การคัดทิ้งยีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคออกจากฝูง

โรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะทองแดงอาจเป็นลักษณะจะถูกควบคุมด้วยยีนหลายคู่ (polygenes) (Magee, 1951; Rothschild et al., 1988) จากรายงานการศึกษายีนที่มีความสัมพันธ์กับโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะ ได้แก่ ยีน *INSL3* (Knorr et al., 2004), ยีน *ELF5* และ *CAT* (Du et al., 2009) และยีน *HOXA10*, *ZFPM2*, *MMP2* และ *COL2A1* (Zhao et al., 2009) และ

ยีน *FSHB*, *GPX4* และ *MIS* (Yu et al., 2004) สำหรับโรคอัณฑะทองแดงยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อนในสุกร แต่มีรายงานการวิจัยเกี่ยวกับยีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเคลื่อนที่ของอัณฑะ เช่น ยีน *INSL3* และ *SF-1* ซึ่งเป็นยีนที่มีบทบาทหน้าที่ความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการเคลื่อนที่ของอัณฑะ โดยพบว่าการกลายพันธุ์บนยีน *INSL3* ในหนู mice ซึ่งมีการขาดหายของเบส โดยมีรูปแบบจีโนไทป์แบบ homozygous มีผลให้หนู Mice เกิดอัณฑะทองแดงทั้งสองข้าง (Zimmerman et al., 1997) จุดกลายพันธุ์ของยีน *SF-1* บริเวณ +146 bp ซึ่งมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงจากกรดอะมิโน glycine ไปเป็น alanine และมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคอัณฑะทองแดงในเพศชาย (Wada et al., 2006) โดยเลือกยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและพัฒนาของอัณฑะคือ ยีน *FSHB*, *MIS*, *INSL3* และ *SF-1* ซึ่งหากเกิดความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับกระบวนการดังกล่าวอาจเป็นสาเหตุของการเกิดโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะทองแดงในสุกร

จากข้อมูลดังกล่าวมาข้างต้นจะเห็นได้ว่ายีน *FSHB*, *INSL3*, *SF-1* และ *MIS* มีศักยภาพต่อการบ่งชี้ลักษณะไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะทองแดงในสุกร ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อตรวจความหลากหลายของยีน *FSHB*, *MIS*, *INSL3* และ *SF-1* และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีนดังกล่าวกับลักษณะของโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะทองแดงในสุกรด้วยเทคนิคทางพันธุศาสตร์โมเลกุล

วิธีการศึกษา

กลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาและการสกัดดีเอ็นเอ

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ใช้สุกรสายพันธุ์ทางการค้าจำนวน 257 ตัว จากฟาร์มเอกชนแห่งหนึ่งเป็นสัตว์ทดลอง โดยแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ สุกรปกติ 75 ตัว สุกรเป็นโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะ 82 ตัว และสุกรเป็นโรคอัณฑะทองแดง 100 ตัว เก็บข้อมูลพันธุ์ประวัติประกอบด้วย หมายเลขประจำตัวสัตว์ของสัตว์รวมทั้งหมายเลขพ่อแม่พันธุ์สุกรที่นำมาศึกษา (เพื่อตรวจสอบพันธุ์ประวัติการให้ลูกเป็นไส้เลื่อนถุงอัณฑะและ

อิมมูโนโบลอต) สกัดดังกล่าวถูกเก็บเลือดเพื่อนำมาสกัดดีเอ็นเอ ด้วย Silica-Guanidine HCl ตามวิธีของ Goodwin et al. (2007) ตรวจสอบคุณภาพดีเอ็นเอด้วย agarose gel electrophoresis ที่ความเข้มข้น 0.8 %

การเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีน *FSHB*, *MIS*, *INSL3* และ *SF-1* ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction (PCR)

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยใช้จีโนมิกดีเอ็นเอ จากสุกรปกติและสุกรโรคไ้เลื่อนอุ้งอ้นและอ้นทงแดง ในแต่ละปฏิกิริยาทั้งหมด 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย ดีเอ็นเอ ความเข้มข้นดีเอ็นเอ 50 นาโนกรัม/ไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 10X PCR buffer และ MgCl₂ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, 1 mM ของแต่ละ dNTPs ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, ไพรมเมอร์ Forward และ Reverse ในแต่ละยีน ความเข้มข้น 3 พิโคโมล อย่างละ 1 ไมโครลิตร (Table 1) โดยทำการออกแบบไพรมเมอร์ ด้วยโปรแกรม “Primer 3” (www.genome.wi.mit.edu) (Rozen and Skaletsky , 2000) ในบริเวณ coding region ของยีน Insulin like 3 (*INSL3*) accession

number X73636 (Burkhardt et al., 1994) จำนวน 4 คู่ คือ INSL011, INSL021, INSL022 และ INSL023 ตามลำดับ และยีน Steroidogenic factor-1 (*SF-1*) NM_001102473 (Pilon et al., 1998) จำนวน 6 คู่ คือ SF011, SF021, SF031, SF032, SF041 และ SF051 ตามลำดับ, 0.5 ยูนิท Taq polymerase ปริมาตร 0.1 ไมโครลิตร (RBC Bioscience) ปรับปริมาตรด้วย Sterile RO water ปริมาตร 4.9 ไมโครลิตร เพื่อให้ปริมาตรครบ 10 ไมโครลิตร มีวงรอบของการทำ PCR ดังนี้ เริ่ม Initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำปฏิกิริยา 30 รอบ มีรายละเอียด ดังนี้ Denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 30 วินาที อุณหภูมิ Annealing ของไพรมเมอร์ (Table 1) เป็นเวลา 30 วินาที Extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 45 วินาที และ Final extension ที่อุณหภูมิ 72°C เป็นเวลา 1.30 นาที หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยา นำ PCR product ไปตรวจสอบขนาดของยีนด้วยโปรแกรม Gene Snap และ Gene Tool

Table 1 Primer characteristics

Gene name	Chr.	Primer	Seq 5'	3'	Region	Ta ^{3'} (°C)	Product size (bp)		
INSL3	2	INSL011F	CAGGGGGCAGCATGTAGT		Exon 1	59	245		
		INSL011R	GGGACAAGGTATCTGGCTAC						
		INSL021F	GTCCCCAGGTGAAGTCTGCTAC		Exon 2	60	267		
		INSL021R	ACTGGATCCCCCTCTGGAT						
		INSL022F	GACTTGCTGACCCTCTGTCC		Exon 2	55	268		
		INSL022R	TGGTATTCTGCAAAGCCAAG						
		INSL023F	CAAACCCTGCTTGGAGGAC		Exon 2	62	158		
		INSL023R	CATTATGTCTGCAGGCATCTTATTT						
SF-1	1	SF011F	AGGCCAGACCCATGAAGAG		Coding region	65	229		
		SF011R	ATGTGAGCAGCCCGTAGTG						
		SF021F	GGGACAAGGTATCTGGCTAC					58	282
		SF021R	CCTTCTTTTGCTGCTTTCAGG						
		SF031F	CAGAGCTGCAAGATCGACAA					60	320
		SF031R	CAGGGGGCAGCATGTAGT						
		SF032F	GGCTTCAAGCTGGAAACAGG					63	300
		SF032R	GTAGGGCTCCGGGTACTTCA						
		SF041F	CCACTGGCTGGCTACCTCTA					64	295
		SF041R	CGATGGAAATGAAGGTCTGG						
		SF051F	CTGCAGGAACCAGCCAAA					62	271
		SF051R	GTGGTCAGCTCCACCTCCT						

Table 1 Primer characteristics. (cont.)

Gene name	Chr.	Primer	Seq 5'	3'	Region	Ta ^{3/} (°C)	Product size (bp)
MIS ^{1/}	2	HMIS F	GACTCCACCTCTGCCTTCTC		5' UTR	60	1,200
		HMIS R	GGAAGTTCAGCAAGGGTGTGG				
		PMIS-F	CCAGCAACAGACAAATACACG		Coding region	69	200
		PMIS-R	GCTCCAGGTGCCAAACCTGC				
		BMIS-F	CTGCGACGCCGCCGCGGAAT				
		BMIS-R	GATGGAGGCAGGAGCTGGCTCA				
		SMIS-F	GGATGTTTAGGGCAGCA				
		SMIS-R	GCGGCGTCGCAGGGTCAGA				
FSHB ^{2/}	2	FSHb-F	CCTTTAAGACATCAATGGCA		Intron	67	200
		FSHb-R	AGTGGTTTTCTTCCTTTTC				

^{1/}Yu et al., 2003, ^{2/}Zhao et al., 1998, ^{3/} annealing temperature

การตรวจรูปแบบยีน *INSL3* และ *SF-1* ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction - Single strand conformation polymorphism (PCR-SSCP)

นำผลผลิต PCR ที่ได้เพิ่มปริมาณขึ้นส่วนยีน *INSL3* และยีน *SF-1* ในไพรเมอร์คือ *INSL011*, *INSL021*, *INSL022* และ *INSL023* (Table 1) มาตรวจหาความหลากหลายด้วยเทคนิค SSCP ทั้งนี้เนื่องจากยังไม่ทราบตำแหน่ง SNP ในตำแหน่งดังกล่าวมาก่อน โดยนำ PCR product มาผสมกับ Loading buffer (94% Formamide, 5 M NaOH, 0.0006% Bromphenol blue และ 0.0007 % Xylene cyanol) ในอัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากันนำไป Denature ที่อุณหภูมิ 95°C นาน 10 นาที แล้วแช่น้ำแข็งทันทีที่ทิ้งไว้อย่างน้อย 2 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอคงอยู่ในสภาพสายเดี่ยว ก่อนตรวจวิเคราะห์ด้วย 5% nondenaturing polyacrylamide gel (acrylamide : bis-acrylamide (19:1)) แนวตั้ง ขนาด 8x12 ซม. ทำดีเอ็นเอให้อยู่ในสภาพสายเดี่ยว มาทำ electrophoresis แนวตั้ง ในสารละลาย 0.5x TBE ที่กระแสไฟฟ้าคงที่ 200 โวลต์ ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้ไปตรวจสอบรูปแบบยีนต่อไปด้วยโปรแกรม Gene Snap

การตรวจรูปแบบยีน *MIS* ด้วยเทคนิค Polymerase chain reaction - Restriction fragment polymorphism (PCR-RFLP)

นำผลผลิต PCR ที่เพิ่มปริมาณขึ้นส่วนยีนด้วยไพรเมอร์ *BMIS*, *PMIS*, *SMIS* และ *HMIS* จากยีน *MIS* (Yu et al., 2004) (Table 1) มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) คือ *BsaI*, *PmlI*, *ScrFI* และ *Hae III* ตามลำดับ โดยแบ่ง PCR product ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 มล. หลอดละ 5 ไมโครลิตร และใส่องค์ประกอบในการตัดเอนไซม์ (NEB, Inc.) และปรับปริมาตรด้วย Sterile RO water ให้ครบ 20 ไมโครลิตร ก่อนที่จะนำป้อนเข้าเครื่องที่อุณหภูมิ 60°C, 37°C, 37°C และ 37°C ตามลำดับ หลังจากนั้นทำการตรวจสอบชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วย 2%, 3% agarose electrophoresis, 5% polyacrylamide gel electrophoresis และ 2% agarose electrophoresis ตามลำดับ จากนั้นนำแผ่นเจลที่ได้ไปตรวจสอบความหลากหลายของยีน และตรวจสอบขนาดของดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Gene Snap และ Gene Tool

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบยีนกับการเป็นโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะทองแดง

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบยีนกับการเป็นโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะทองแดง

ด้วยวิธี Logistic Regression Analysis โดยใช้ proc logistic descending ของโปรแกรม SAS (SAS, 1998) ซึ่งกำหนดค่าตัวแปรจะมีค่าเป็น 0 กับ 1 โดยกำหนดให้สุกรปกติ เป็น 0 และสุกรเป็นโรคได้เลื่อนอุ้งอ้นทะหรือสุกรเป็นอ้นทะทองแดงเป็น 1 โดยสุกรแต่ละตัวจะแปลงข้อมูลจากรูปแบบยีน โดยกำหนดให้รูปแบบยีนที่ปรากฏในสุกรปกติ, สุกรเป็นโรคได้เลื่อน

อุ้งอ้นทะและอ้นทะทองแดง เป็น 1 และรูปแบบยีนที่ไม่ปรากฏ เป็น 0 ถ้าผลการวิเคราะห์พบรูปแบบยีน ($P < 0.05$) แสดงว่ามีความน่าจะเป็นที่สามารถใช้รูปแบบยีนเหล่านี้ในการบ่งชี้ว่าสุกรตัวใดปกติ หรือสุกรตัวใดเป็นโรคได้เลื่อนอุ้งอ้นทะหรืออ้นทะทองแดง โดยมีโมเดลที่ใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ ดังสมการที่ 1

$$L = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_n X_n + \varepsilon_{ij} \text{ --- (1)}$$

$$\text{เมื่อ } L = \ln\left(\frac{P_i}{1-P_i}\right)$$

P_i = ค่าความน่าจะเป็น (Probability) ของการพบในสุกรที่เป็นโรคได้เลื่อนอุ้ง

อ้นทะและอ้นทะทองแดง

β_0 = จุดตัดแกน y (Intercept)

$\beta_1, \beta_2, \dots, \beta_n$ = ค่าสัมประสิทธิ์ Regression ของรูปแบบยีนที่ 1, 2, ... n

$i = 1, 2, \dots, 14$

X_1, X_2, \dots, X_n = ตัวแปรดัมมี่ของการปรากฏรูปแบบยีน ที่ 1, 2, 3, ..., n

$i = 1, 2, \dots, 4$

ε_{ij} = ค่าความคลาดเคลื่อน (Random error term)

ผลการศึกษา

ความหลากหลายของยีน FSHB, INSL3, SF-1 และ MIS

ตรวจสอบความหลากหลายของยีน FSHB ด้วยเทคนิค AS-PCR พบความหลากหลายของรูปแบบยีน FSHB จำนวน 3 รูปแบบ คือ II, ID และ DD มีขนาด 460 bp, 460 bp และ 168 bp และ 168 bp ตามลำดับ และมีการกระจายความถี่ของรูปแบบอัลลีล ในสุกรปกติ, สุกรเป็นโรคได้เลื่อนอุ้งอ้นทะ และสุกรเป็นโรคอ้นทะทองแดง ดังนี้ รูปแบบอัลลีล I (0.00, 0.34 และ 0.15) และรูปแบบอัลลีล D (1.00, 0.66 และ 0.85) โดยพบว่ารูปแบบอัลลีล I พบเฉพาะในสุกรเป็นโรคได้เลื่อนอุ้งอ้นทะ และโรคอ้นทะทองแดง ดัง Figure 1

โดยรูปแบบยีนที่เกิดขึ้นสอดคล้องกับรายงานของ Zhao et al. (1998) ที่พบรูปแบบยีน FSHB

บริเวณ Intron จำนวน 3 รูปแบบ โดยขนาดดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน เป็นผลมาจากการ insertion ของยีนที่เกิดจาก Non-viral retroposon พร้อมกับการเพิ่มของโครงสร้าง Poly A ในตำแหน่ง +809 และ +810 โดยมีการเพิ่มขึ้นของชิ้นยีน ขนาด 292 bp เข้าไป ทั้งนี้การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นในบริเวณ Intron อาจจะทำให้ยับยั้งกระบวนการ Splicing ของ mRNA ได้ (Vijayraghavan et al., 1986)

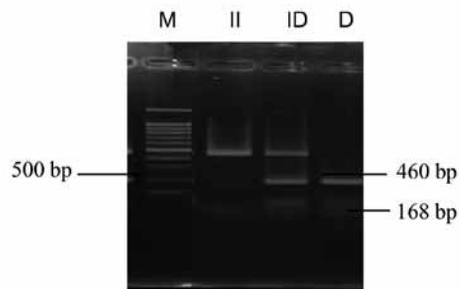


Figure 1 Patterns of FSHB gene

สำหรับยีน *INSL3* และ *SF-1* ในไพรเมอร์ INSL011, INSL021, INSL022, INSL023 SF011, SF021, SF031, SF032, SF041 และ SF051 หลังจากเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนด้วย PCR พบว่าปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 245, 267, 268, 158, 151, 248, 320, 300, 222 และ 208 bp ตามลำดับซึ่งขนาดของชิ้นดีเอ็นเอในแต่ละไพรเมอร์ในสุกรปกติ สุกรเป็นไส้เลื่อนถุงอัณฑะ และสุกรเป็นอัณฑะทองแดง มีขนาดไม่แตกต่างกัน จากนั้นนำมาตรวจสอบความหลากหลายของยีน *INSL3* และ *SF-1* ด้วยเทคนิค PCR-SSCP พบความหลากหลายของแถบดีเอ็นเอในไพรเมอร์ INSL011, SF031 และ SF041 โดยมีจำนวนรูปแบบ SSCP ที่เกิดขึ้น 3, 2 และ 2 รูปแบบ ตามลำดับดัง **Figure 2**

โดยแต่ละไพรเมอร์และแต่ละรูปแบบ มีการกระจายของความถี่ในสุกรปกติ, สุกรเป็นโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและสุกรเป็นอัณฑะทองแดง ดังนี้ ไพรเมอร์ INSL011 รูปแบบ INP1 (0.79, 0.15 และ 0.08) รูปแบบ INP2 (0.03, 0.51 และ 0.66) และรูปแบบ INP3 (0.18, 0.34 และ 0.26) ไพรเมอร์ SF031 รูปแบบ SP1 (0.92, 0.88 และ 0.87) และ รูปแบบ SP2 (0.08, 0.12 และ 0.13) และไพรเมอร์ SF041 รูปแบบ SFP1 (0.82, 0.64 และ 0.60), SFP2 (0.17, 0.22 และ 0.29) และ SFP3 (0.01, 0.14 และ 0.12) ตามลำดับ และเนื่องจากในแต่ละรูปแบบในแต่ละไพรเมอร์ มีขนาดแถบดีเอ็นเอแตกต่างกันซึ่งในแต่ละรูปแบบพบแถบดีเอ็นเออย่างน้อย 2 แถบ Orita et al. (1989) กล่าวว่า แถบดีเอ็นเอที่พบจากการตรวจสอบด้วยเทคนิค SSCP อาจพบมากกว่า 2 แถบได้ซึ่งเป็นผลเนื่องมาจากดีเอ็นเอที่ถูกทำให้อยู่ในสภาพสายเดี่ยวสามารถแยกตัวออกเป็น 2 แถบหรือมากกว่า 2 แถบ แม้ว่าจะมีลำดับเบสเหมือนกันเมื่อตรวจสอบบน non denaturing polyacrylamide gel และแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏเป็นแถบ จำนวน 2 แถบ อาจจัดเป็น homozygous ส่วนแถบดีเอ็นเอที่พบ จำนวน 4 แถบ อาจจัดเป็น Heterozygous (Barosso et al., 1998) อย่างไรก็ตาม ในการเพิ่มปริมาณชิ้นส่วนยีนก่อนจะนำไปตรวจสอบด้วยเทคนิค SSCP พบว่าได้แถบ

แบนจำนวน 1 แถบ ซึ่งโดยทั่วไปในการตรวจสอบความหลากหลายของยีนด้วยเทคนิค SSCP จะพบจำนวนแถบดีเอ็นเอได้มากที่สุดไม่เกิน 4 แถบ จากการศึกษาค้นคว้านี้มีพบแถบดีเอ็นเอในบางไพรเมอร์มากกว่า 4 แถบ ซึ่งในบางครั้งในปฏิกิริยาการทำ PCR นั้น อาจใช้ความเข้มข้นของไพรเมอร์ที่มากเกินไป ซึ่งอาจทำให้เกิดการสอดแทรกเข้าไปลำดับเบสที่เพิ่มปริมาณขึ้นมา และอาจเกิดการ re-pairing ระหว่างการทำ eletrophoresis หรืออาจเนื่องมาจากโครงสร้างทุติยภูมิ หรือ ตติยภูมิของตัวเบสในระยะเวลา annealing เกิดปฏิกิริยาร่วมระหว่างดีเอ็นเอในสภาพสายเดี่ยวที่ตำแหน่ง complementary region และความแตกต่างขององค์ประกอบของการทำ SSCP ในแต่ละยีน (Cai and Touitou, 1993) และอาจเกิดจากการมี SNP มากกว่า 1 ตำแหน่งใน PCR fragment

ความหลากหลายของยีน *MIS* ในไพรเมอร์ HMIS1, BMIS, PMIS และ SMIS ตรวจสอบด้วยเทคนิค PCR ปรากฏแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดประมาณ 1,200, 200, 200 และ 120 bp ตามลำดับ โดยขนาดของชิ้นยีนในแต่ละไพรเมอร์ ในสุกรปกติ สุกรเป็นไส้เลื่อนถุงอัณฑะ และสุกรเป็นอัณฑะทองแดง มีขนาดไม่แตกต่างกัน จากนั้นนำมาตรวจสอบรูปแบบยีนด้วยเทคนิค PCR-RFLP ในไพรเมอร์ HMIS, PMIS, BMIS และ SMIS พบรูปแบบจิ้นโนไทป์จำนวน 3 รูปแบบในสุกรทั้งสามกลุ่ม มีขนาดและความถี่ของรูปแบบที่พบเป็น homozygous และ heterozygous ดัง **Figure 3**

ไพรเมอร์ BMIS มีการกระจายความถี่ของรูปแบบอัลลีล ในสุกรปกติ, สุกรเป็นโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะ และสุกรเป็นอัณฑะทองแดง ดังนี้ รูปแบบอัลลีล B1 (0.55, 0.55 และ 0.59) และรูปแบบอัลลีล B2 (0.45, 0.45 และ 0.41), ไพรเมอร์ PMIS รูปแบบอัลลีล M1 (0.71, 0.62 และ 0.71) และ รูปแบบอัลลีล M2 (0.29, 0.38 และ 0.29), ไพรเมอร์ SMIS รูปแบบอัลลีล C1 (0.47, 0.40 และ 0.49) และ รูปแบบอัลลีล C2 (0.53, 0.60 และ 0.51) และ ไพรเมอร์ HMIS รูปแบบอัลลีล H1 (0.50, 0.77 และ 0.77) และรูปแบบอัลลีล H2 (0.50, 0.23 และ 0.23) ตามลำดับ

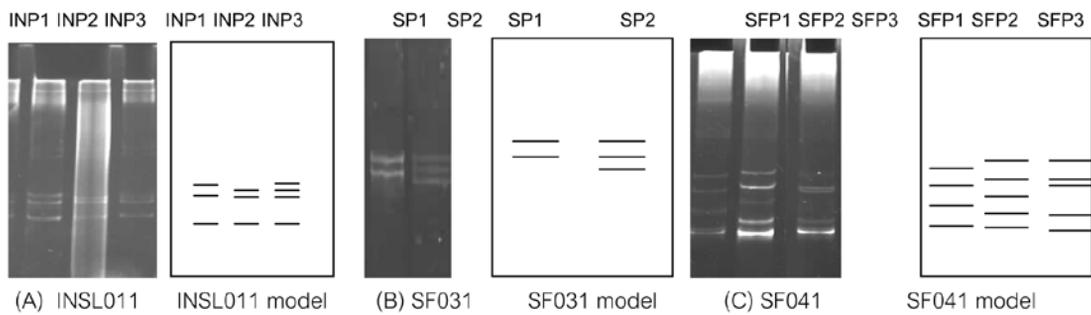


Figure 2 SSCP patterns of INSL011 (A), SF031 (B) and SF041(C) genes and model, respectively in pigs.

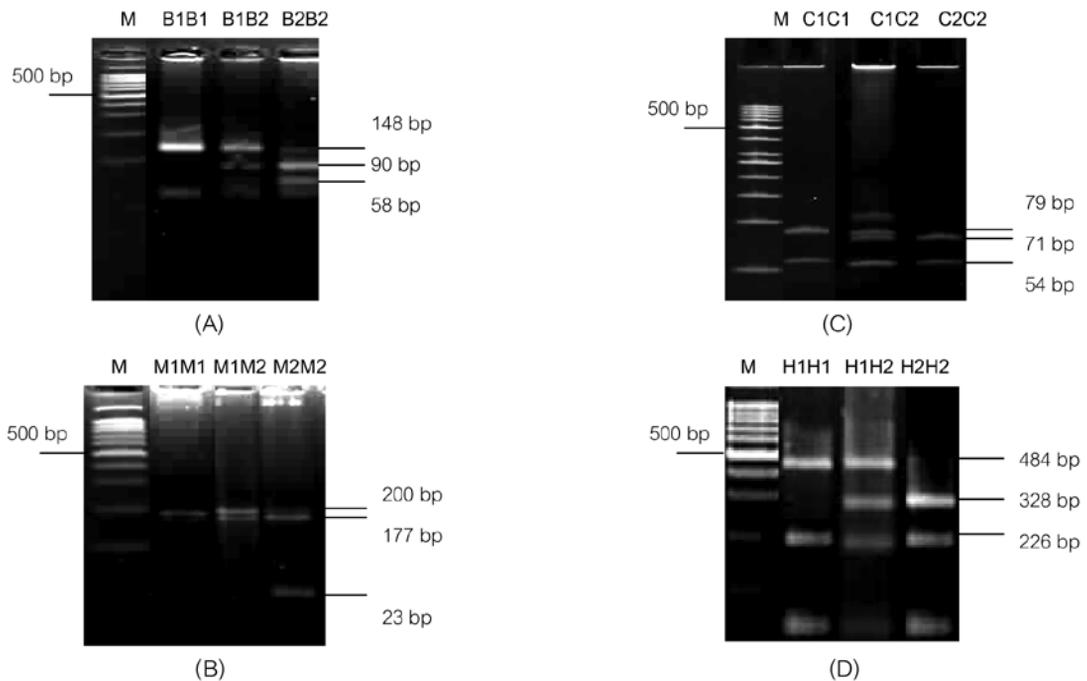


Figure 3 RFLP pattern of *MIS* gene and Primer BMIS (A), PMIS (B), SMIS (C) and HMIS (D)

ความสัมพันธ์ของรูปแบบยีนกับโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะทองแดง

วิเคราะห์ในไพรเมอร์ *FSHB*, *INSL011*, *SF031*, *SF041*, *HMIS*, *PMIS*, *BMIS* และ *SMIS* กับโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะทองแดง พบว่า รูปแบบอัลลีลของยีน *FSHB* มีความสัมพันธ์กับโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะทองแดง ($P < 0.01$), รูปแบบยีน *INSL3* พบความสัมพันธ์ของรูปแบบ SSCP (INP2)

ในไพรเมอร์ *INSL011* กับการเกิดโรคอัณฑะทองแดงในสุกร ($P < 0.01$), ยีน SF-1 ที่พบในไพรเมอร์ *SF031* และ *SF041* ไม่มีความแตกต่างกันในสุกรเป็นโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะทองแดง ($P > 0.05$) หรือหมายความว่ารูปแบบ SSCP ที่เกิดขึ้นในยีน SF-1 ในตำแหน่งที่ศึกษาไม่มีผลต่อการเกิดโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะทองแดงในสุกร และรูปแบบอัลลีลของยีน *MIS* ในไพรเมอร์ *HMIS* มีความสัมพันธ์

กับโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะ ($P < 0.01$) และอัณฑะทองแดง ($P < 0.05$) ซึ่งเป็นตำแหน่งในไพรเมอร์ HMIS อยู่ในบริเวณ 5' Utrated region (5' UTR) ซึ่งหากมีการเกิด SNP บริเวณนี้อาจจะทำให้เพิ่มหรือลดการ transcription ของยีน จึงอาจไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนแต่อาจจะเป็นส่วนที่ส่งสัญญาณในการควบคุมการแสดงออกของยีน (Table 2)

อย่างไรก็ตาม จากรายงานการศึกษา Grindflek et al. (2006) แม้ว่าจะพบความสัมพันธ์ของ QTL บริเวณโครโมโซมคู่ที่ 5 ($P < 0.00005$) กับสุกรที่เป็นไส้เลื่อนขาหนีบหรือถุงอัณฑะนั้น ยังพบความสัมพันธ์ในตำแหน่งโครโมโซมคู่ที่ 2 ซึ่งเป็นตำแหน่งของยีน *INSL3*, *CGRP* และ *MIS* ($P < 0.001$) นอกจากนี้ตามรายงานของ Du et al. (2009) ที่ศึกษาความสัมพันธ์ของตำแหน่งยีนบนโครโมโซมคู่ที่ 2 และ 15 ซึ่งทำการศึกษารอบๆโครโมโซมคู่ที่ 2 มีระยะ 67 cM กับสุกรเป็นโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะ ซึ่งพบความสัมพันธ์ของยีน *ELF5* และ *CAT* บนโครโมโซมคู่ที่ 2 ($P < 0.001$) จะเห็นได้ว่าจากรายงานที่ผ่านมาและการศึกษาครั้งนี้พบความสัมพันธ์ของยีนที่มีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 2 ซึ่งเป็นไปได้ว่ายีนที่เป็นสาเหตุของโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะในสุกรมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 2

การศึกษาที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคอัณฑะทองแดงยังไม่เคยมีรายงานในสุกรมาก่อน ซึ่งผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับรายงานในมนุษย์ซึ่งพบว่า ความผิดปกติของยีน *MIS* และ *MIS* receptor ส่งผลให้มีระดับของฮอร์โมน *MIS* น้อย และส่งผลให้เกิดการเจริญเติบโตของท่อมุลเลอเลียน ซึ่งต่อมาจะกลายเป็นท่อตันคล้ายท่อหน้าไข่ หรือเป็นโรค Persisting mullerian duct syndrome (PMSD) ในเพศชาย และพบว่าไม่มีการเคลื่อนที่ของอัณฑะ ลักษณะของกูเบอร์นาคูลัมที่ยาวและบาง มีผลต่อกระบวนการ swelling ของกูเบอร์นาคูลัมผิดปกติ (Hutson et al., 1997) Adham and Agoulnik (2004) พบว่ากระบวนการ

เคลื่อนที่ของอัณฑะจากช่องท้องหนู mice ต้องอาศัยฮอร์โมน *INSL3* ในการกระตุ้นการเจริญของกูเบอร์นาคูลัม โดยหนู mice ที่มีรูปแบบจีโนไทป์ *INSL3* แบบ homozygous ที่มีการ deletion เกิดขึ้นพบว่ากูเบอร์นาคูลัม จะมีลักษณะบางและยาว และพบอัณฑะค้างอยู่ในช่องท้อง ส่วนหนู Mice ที่มีจีโนไทป์แบบ heterozygous จะเกิดกระบวนการ swelling ของกูเบอร์นาคูลัม ตามปกติแต่จะช้ากว่าเดิมเล็กน้อย

สำหรับเพศชายที่มีการขาดหายไปของฮอร์โมน *FSH* นั้น ส่งผลให้เป็นหมัน ลดขนาดของอัณฑะและปริมาณสเปิร์มลดลง (Kumar et al., 1997) Abel et al. (2009) รายงานว่าการแสดงออกของหนู Mice เมื่อได้รับฮอร์โมน *FSH* เข้าไปในร่างกายจะมีการเพิ่มระดับของฮอร์โมน *INSL3* ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการแสดงออกของยีน *INSL3* มีการทำงานร่วมกับกันฮอร์โมน *FSH* โดยมี *FSH* เป็นตัวควบคุม ดังนั้น เป็นไปได้ว่าที่พบความสัมพันธ์ระหว่างรูปแบบยีนของยีน *FSHB*, ยีน *INSL3* และยีน *MIS* กับโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะทองแดง อาจมีกลไกการเกิดโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะค้างแยกจำนวนยีนที่มีการ Transcripts อย่างซับซ้อนโดยเป็นผลเนื่องจากการควบคุมของ *FSH* ซึ่งพบว่าเมื่อหนู Mice ที่อัณฑะทองแดงซึ่งเป็นผลมาจากการทำงานของยีนร่วมกัน

นอกจากนี้จะพบว่าจากรายงานการศึกษาเกี่ยวกับโรคอัณฑะทองแดงและไส้เลื่อนถุงอัณฑะ หรือขาหนีบพบว่ามีความสัมพันธ์กัน โดยในคนเพศชายที่เป็นอัณฑะทองแดงข้างเดียวและอัณฑะค้างอยู่บริเวณ inguinal ข้างซ้าย จะมีไส้เลื่อนเกิดขึ้นในตำแหน่งดังกล่าวด้วย (Radmayr et al., 1999; Tomiyama et al., 2005) โดยโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะทองแดงในสุกร มีค่าสหสัมพันธ์ทางพันธุกรรม อยู่ในช่วง 0.2-0.7 (Mikami and Fredeen, 1979; Liu, 2003) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ที่พบความสัมพันธ์ของไพรเมอร์ *FSHB* และ *HMIS* ทั้งในสุกรเป็นโรคไส้เลื่อนถุงอัณฑะและอัณฑะทองแดงร่วมกัน (Table 2)

Table 2 Results of association of gene with scrotal hernia and Cryptorchidism in pigs by logistic regression analysis

Gene name	Chr.	Primer name	Primer location	P-value	
				Scrotal hernia pigs	Cryptorchidism pigs
<i>FSHB</i>	2	FSHB	Intron	0.0108	0.0003
<i>INSL3</i>	2	INSL011	Exon	ns	0.0090
<i>SF-1</i>	1	SF031	Exon	ns	ns
		SF041	Exon	ns	ns
<i>MIS</i>	2	BMIS	Exon	ns	ns
		PMIS	Exon	ns	ns
		SMIS	Exon	ns	ns
		HMIS	5'UTR	0.0130	0.0500

สรุป

การศึกษายีนที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยนแปลงพัฒนาและการเคลื่อนที่ของอันทะกับโรคได้เลื่อนอันทะและอันทะทองแดงในสุกรพบว่ายีน *FSHB*, *INSL3* และ *MIS* มีความสัมพันธ์กับโรคได้เลื่อนอันทะและอันทะทองแดง เหมาะแก่การพัฒนาเพื่อนำไปเป็นยีนเครื่องหมายในการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ให้สุกร เพื่อลดโอกาสของการมีสุกรที่มียีนผิดปกติก่อให้เกิดโรคได้เลื่อนอันทะและอันทะทองแดงในฟาร์ม อย่างไรก็ตามจากการที่พบความสัมพันธ์ในยีน *FSHB*, *INSL3* และ *MIS* อาจเป็นไปได้ว่ากลไกการเกิดโรคได้เลื่อนอันทะและอันทะทองแดงน่าจะเป็นผลมาจากการทำงานของยีนร่วมกัน ซึ่งควรมีการศึกษาต่อไปเกี่ยวกับการตรวจหากลไกในระดับโมเลกุลของยีนเพื่อที่จะพัฒนาไปใช้เป็นเครื่องหมายพันธุกรรมในอุตสาหกรรมการผลิตสุกร

คำขอบคุณ

การศึกษานี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสำนักงานสนับสนุนกองทุนวิจัย (สกว.) สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ภายใต้โครงการเชื่อมโยงภาคผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.- อุตสาหกรรม

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. 2550. ข้อมูลจำนวนสัตว์ในประเทศไทย ปี 2550. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. แหล่งข้อมูล: <http://www.dld.go.th>. ค้นเมื่อ 15 สิงหาคม 2553.
- เรืองวิทย์ บรรจงรัตน์, วรุดมิ จุฬาลักษณ์านุกุล, พรรณี ชินรักษ์, ปิยนุตร เต็มยศียง, จเร อุดมยิง และ อลงกลด แทนอมทอง. 2542. เซลล์พันธุศาสตร์ของสุกรที่เป็นโรคได้เลื่อนอันทะ. สุกรสารสิน. 24:65-71.
- Abel, M. H., D. Baban, S. Lee, H. M. Charlton, and P. J. O. Shaughnessy. 2009. Effects of FSH on testicular mRNA transcript levels in the hypogonadal mouse. *J. Mol. Endocrinol.* 42:291-303.
- Adham, I. M., and A. I. Agoulnik. 2004. Insulin-like 3 signaling in testicular descent international. *Int. J. Androl.* 27:257-265.
- Barroso, A., S. Dunner, and J. Canon. 1998. Technical Note: Detection of Bovine Kappa-Casein Variants A, B, C, and E by Means of Polymerase Chain Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism (PCR-SSCP). *J. Anim. Sci.* 76:1535-1538.
- Burkhardt, E., I. Adham, M. Brosig, B. Gastmann, A. M. G. Mattai, and W. Engel. 1994. Structural organization of the porcine and human genes coding for a Leydig cell-specific insulin-like peptide (LEY I-L) and chromosomal localization of the human gene (*INSL3*). *Genomics.* 20:13-19.
- Cai, Q. Q., and I. Touitou. 1993. Excess PCR primers may dramatically affect SSCP efficiency. *Nucl. Acids Res.* 21:3909-3910.

- Du, Z. Q., X. Zhao, N. Vukasinovic, F. Rodriguez, A. C. Clutter, and M. F. Rothschild. 2009. Association and Haplotype Analyses of Positional Candidate Genes in Five Genomic Regions Linked to Scrotal Hernia in Commercial Pig Lines. *PLoS ONE*. 4:1-8.
- Gatphayak, K., N. Chongkasikit, R. Charoensook, W. Laenoi, T. Vearaslip, V. Sardsud, C. Knorr, U. ter Meulen, and B. Brenig. 2005. Present situation of porcine hernia inguinalis/scrotalis in Thailand. *Deutscher Tropentag*, Hohenheim, Germany.
- Goodwin, W., L. Adrian, and H. Sibte. 2007. *An Introduction to Forensic Genetics*. John Wiley & Sons Ltd, Oxford.
- Grindflek, E., M. Moe, H. Taubert, H. Simianer, S. Lien, and T. Moen. 2006. Genome-wide linkage analysis of inguinal hernia in pigs using affected sib pairs. *BMC Genet*. 7:25.
- Hutson, J. M., S. Hasthorpe, and C. F. Heyns. 1997. Anatomical and Functional Aspects of Testicular Descent and Cryptorchidism. *Endocr. Rev.* 18:259-280.
- Kumar, T. R., Y. Wang, N. Lu, and M. M. Matzuk. 1997. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet*. 15:201-204.
- Knorr, C., H. Taeubert, U. Peters, and B. Brenig. 2004. Characterization of two SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) in the porcine *INSL3* gene and their exclusion as a common genetic basis of hernia inguinalis in pigs. *Biol. Chem. Genet*. 42:11-19.
- Liu, Y. 2003. Are ridgling and scrotal rupture caused by abnormal size of inguinal canal (Poster). NSIF Conference and USDA Industry Workshop on QTL Mapping Des Moines, Iowa.
- Magee, W. T., 1951. Inheritance of scrotal hernia in swine. *J. Anim. Sci*, 10:516-522.
- Mikami, H. and H. T. Fredeen. 1979. A genetic study of cryptorchidism and scrotal hernia in pigs.. *Can. J. Genet. Cytol*. 1:9-19. (Abstr.)
- Pinart, E., S. Sancho, M. D. Briz, S. Bonet, and N. Garcia. 1999. Characterization of the semen quality of postpubertal boars with spontaneous unilateral abdominal cryptorchidism on the right side. *Anim. Reprod. Sci*. 55:269-278.
- Pilon, N., R. Behdjani, I. Daneau, J. G. Lussier, and D W. Silversides. 1998. Porcine steroidogenic factor-1 gene (pSF-1) expression and analysis of embryonic pig gonads during sexual differentiation. *Endocrinol*. 139:3803-3812.
- Radmayr, C., S. Corvin, M. Studen, G. Bartsch, and G. Janetschek. 1999. Cryptorchidism, Open Processus vaginalis, and Associated Hernia: Laparoscopic Approach to the Internal Inguinal Ring. *Eur. Urol*. 36:631-634.
- Rothschild, M. F., L. L. Christian, and W. Blanchard. 1988. Evidence for multigene control of cryptorchidism in swine.. *J. Hered*. 79:313-314. (Abstr.)
- SAS. 1998. *User's guide: statistics*. V.6.12. Cary, NC.
- Rozen, S., and H. J. Skaletsky. 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ. 365-386.
- Tomiyama, H., Y. Sasaki, J. Huynh, E. Yong, A. Ting, and J. M. Hutson. 2005. Testicular descent, cryptorchidism and inguinal hernia: the Melbourne perspective. *J. Ped. Urol*. 111-125.
- Vijayraghavan, U., R. Parker, J. Tamm, Y. Iimura, J. Rossi, J. Abelson, and C. Guthrie. 1986. Mutations in conserved intron sequences affect multiple steps in the yeast splicing pathway, particularly assembly of the spliceosome. *The EMBO Journal*. 5:1683-1695.
- Wada, Y., Okada M, Fukami M, Sasagawa I, and T. Ogata. 2006. Association of cryptorchidism with Gly146Ala polymorphism in the gene for steroidogenic factor-1. *Fertil Steril*. 85:787-790.
- Yu, T. P., N. G. Hopkins, S. Shoji, W. Lizhen, B. W. M. Johannes, D. Nader, W. R. Eldon, and M. J. Alan. 2003. Genetic marker associate with scrotal hernia in pigs. 20040126795.
- Zhao X, Z.Q. Du , N. Vukasinovic N, Rodriguez F, A. C. Clutter , and M. F. Rothschild. 2009. Association of HOXA10, ZFPM2, and MMP2 genes with scrotal hernias evaluated via biological candidate gene analyses in pigs. *Am J Vet Res*. 70:1006-1012.
- Zhao, X., Z. Q. Du, and M. F. Rothschild. 2010. An association study of 20 candidate genes with cryptorchidism in Siberian Husky dogs. *J. Anim. Breed. Genet*. 127:327-331.
- Zhao X, Z.Q. Du , N. Vukasinovic N, Rodriguez F, A. C. Clutter, and M. F. Rothschild. 1998. FSHB subunit gene is associated with major gene controlling litter size in commercial pig breeds. *Science in china*. 41:664-668.
- Zimmermann, S., S. Ttler, P. Engel, and I. M. Adham. 1997. Mouse Leydig insulin-like (Ley I-L) gene: structure and expression during testis and ovary development. *Mol. Reprod. Dev*. 47:30-38.