

บทที่ 3

ทฤษฎีพื้นฐานการประมาณค่าพารามิเตอร์ทางพันธุศาสตร์

ค่าพารามิเตอร์ทางพันธุศาสตร์ได้รับความสนใจในฐานะที่เป็นข้อสรุปด้านปริมาณของการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม และยังบอกได้ว่าลักษณะที่สนใจนั้นมีความแปรปรวนทางพันธุกรรมเพียงพอหรือไม่ที่จะทำการคัดเลือกอย่างมีประสิทธิภาพ หรืออาจจะบอกว่าควรเปลี่ยนวิธีการคัดเลือกเป็นแบบอื่นหรือไม่ ค่าพารามิเตอร์ที่สำคัญสำหรับการศึกษาค้างนี้ คือ อัตราพันธุกรรม (heritability, h^2) ความแปรปรวนเนื่องจากอำนาจของยีนแบบรวมสะสม (additive genetic variance, σ^2_a) คุณค่าการผสมพันธุ์ (breeding value, BV) และแนวโน้มทางพันธุกรรม (genetic trend, ΔG)

เนื่องจากข้อมูลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นข้อมูลที่เก็บมาจากภาคสนาม (field data) ซึ่งปัจจัยต่างๆของสิ่งแวดล้อมมีอิทธิพลต่อลักษณะที่ใช้ในการศึกษา โดยข้อมูลรวบรวมจากสุกรต่างพันธุ์ มีน้ำหนักเมื่อวัดไขมันสันหลัง ฝูง-ปี-ฤดูกาลที่สุกรเกิดแตกต่างกัน อีกทั้งจำนวนข้อมูลในแต่ละชั้นของปัจจัยต่างๆก็ไม่มีเท่ากัน (unequal subclass number) และมีการคัดเลือกเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องจึงต้องพิจารณาหาวิธีที่สามารถวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ทางพันธุศาสตร์ของข้อมูลที่มีลักษณะเช่นนี้

Henderson (1973) กล่าวว่าปกติการวิเคราะห์การทดลองที่มีการวางแผนการทดลองจะใช้วิธีกำลังสองน้อยที่สุด (least squares method , LS) แต่กรณีข้อมูลที่ได้มาจากภาคสนามซึ่งเป็นข้อมูลที่มีจำนวนในชั้นย่อยไม่เท่ากันและมีข้อมูลสูญหาย ต้องวิเคราะห์โดยนำเอาปัจจัยคงที่ (fixed effects) และปัจจัยสุ่ม (random effects) เข้าประเมินพร้อมกันใน

รูปของแบบพหุสมเชิงเส้นตรง (mixed linear model) สามารถเขียนเป็นแบบพหุในรูปทั่วไป (general mixed linear model) โดยใช้เมตริกซ์ หรือ mixed model equation (MME) ดังนี้

$$y = X\beta + Zu + e \quad (1)$$

โดยที่

y = เวกเตอร์ (vector) ของค่าสังเกต

X, Z = เป็นเมตริกซ์ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าสังเกต กับปัจจัยคงที่ และปัจจัยสุ่ม (Incident Matrix)

β = เวกเตอร์ของปัจจัยคงที่ ที่ไม่ทราบค่า

u = เวกเตอร์ของปัจจัยสุ่ม โดยที่ $u \sim \text{NID} (0, IG)$

e = เวกเตอร์ของความคลาดเคลื่อน (error)

โดยที่ $e \sim \text{NID} (0, IR)$

และให้

$$V(u) = G$$

$$V(e) = R$$

$$\text{COV}(u, e') = 0$$

ซึ่งจะทำให้เมตริกซ์ของโคแวนเรียนซ์ระหว่าง ลักษณะปรากฏเป็นดังนี้

$$V(y) = V = ZGZ' + R$$

สามารถคำนวณหาค่าตอบของสมการ (1) คือค่า $\hat{\beta}$ และ \hat{u} ได้โดยง่ายจากสมการแบบพหุสม Henderson's Mixed Modal Equations ซึ่งเขียนในรูปทั่วไป MME จะเป็นดังนี้

$$\begin{bmatrix} XR^{-1}X & XR^{-1}Z \\ ZR^{-1}X & ZR^{-1}Z + G^{-1} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \hat{\beta} \\ \hat{u} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} XR^{-1}y \\ ZR^{-1}y \end{bmatrix} \quad (2)$$

แม้ว่าเมตริกซ์ R จะมีขนาดเท่ากับจำนวนของข้อมูล แต่ปกติในการวิเคราะห์เพียงลักษณะเดียว จะสมมติว่าเมตริกซ์ R เป็น diagonal matrix หรือ $I \sigma^2$. และถ้าเป็นการวิเคราะห์หลายลักษณะ เมตริกซ์ R จะเป็น block diagonal matrix (จำนวน block เท่ากับจำนวนลักษณะที่วิเคราะห์) ดังนั้น R^{-1} จึงง่ายต่อการคำนวณ และผลจากการคำนวณได้รับการพิสูจน์แล้วว่า $\hat{\beta}$ และ $\hat{\mu}$ มีคุณสมบัติเป็น BLUE (best linear unbiased estimator) และ BLUP (best linear unbiased predictor)

การประมาณค่าอัตราพันธุกรรม

ค่าอัตราพันธุกรรม คือ สัดส่วนของความแปรปรวนอันเนื่องมาจากพันธุกรรม ต่อความแปรปรวนของลักษณะปรากฏ (phenotypic variance) ซึ่งเป็นค่าเฉพาะของลักษณะหนึ่งในประชากรหนึ่งที่อยู่ภายใต้สภาพแวดล้อมหนึ่งเท่านั้น โดยทางทฤษฎีแล้วอัตราพันธุกรรมของลักษณะหนึ่งๆ จะมีค่าได้ตั้งแต่ 0 ถึง 1 จากความสำคัญของค่าอัตราพันธุกรรมที่มีต่อการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ จึงได้มีการศึกษาเพื่อประมาณค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจทั้งหลายในสัตว์เลี้ยงทั่วไป (สมชัย จันทร์สว่าง, 2530; Falconer and Mackay, 1996)

ในสุกรได้มีรายงานค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะต่างๆไว้อย่างกว้างขวางสำหรับค่าอัตราพันธุกรรมของลักษณะอายุเมื่อโตเต็มวัย และลักษณะความหนาไขมันสันหลัง มีรายงานค่าแตกต่างกันไปตามประชากรที่ใช้ศึกษาซึ่งมักจะมีค่าความแปรปรวนอยู่เสมอ เนื่องจากค่าอัตราพันธุกรรมขึ้นกับค่าความแปรปรวนต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับลักษณะนั้น ดังนั้นไม่ว่าความแปรปรวนเนื่องจากสาเหตุใดเปลี่ยนแปลงไป เช่น การคัดเลือกในประชากรทำให้ความแปรปรวนของพันธุกรรมเปลี่ยนไป หรือการเปลี่ยนสถานที่เลี้ยงดูทำให้ความแปรปรวนของสภาพแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไป ย่อมทำให้ค่าอัตราพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไปด้วยเสมอ นอกจากนี้ค่าอัตรา

พันธุกรรมของลักษณะเดียวกันในประชากรเดียวกันที่ได้จากวิธีประมาณต่างกันยังต่างกันอีกด้วย (Falconer and Mackay, 1996)

การประมาณค่าอัตราพันธุกรรมกระทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับการประมาณองค์ประกอบความแปรปรวนซึ่งมีหลายวิธีดังจะกล่าวถึงรายละเอียดต่อไป (Quaas et al., 1984; Searle, 1987; Kennedy, 1989a, 1989b; Falconer and Mackay, 1996) นอกจากนี้สามารถประมาณค่าอัตราพันธุกรรมได้อีกทางหนึ่ง ซึ่งเป็นการประมาณทางอ้อมจากประชากรที่มีการคัดเลือก มีค่าเท่ากับสัดส่วนของผลตอบสนองของการคัดเลือก (selection response, R) ต่อความแตกต่างจากการคัดเลือก (selection differential, S) ค่าอัตราพันธุกรรมที่คำนวณได้จากวิธีนี้ เรียกว่าค่าอัตราพันธุกรรมประจักษ์ (realized heritability) หรือ $h^2 = R/S$ (Falconer and Mackay, 1996) การประมาณค่าความแปรปรวนมีหลายวิธี และมีข้อจำกัดแตกต่างกันดังนี้

การวิเคราะห์แบบกำลังสองน้อยที่สุด (Least square statistical analysis, LS)

สำหรับงานวิจัยที่มีการวางแผนการทดลองมาอย่างดี และมีข้อมูลในแต่ละชั้นของปัจจัยต่างๆเท่ากัน (balanced data) สามารถคำนวณองค์ประกอบความแปรปรวนโดยการวิเคราะห์แบบกำลังสองน้อยที่สุด คือ การวิเคราะห์รีเกรสชัน (regression analysis) และการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance, ANOVA)

โดยทั้งสองวิธีนี้สามารถจำแนกลงเป็นวิธีย่อยได้อีกขึ้นอยู่กับระดับความสัมพันธ์ (relative) ของสัตว์ที่ใช้ในการศึกษา แต่การวิเคราะห์แบบกำลังสองน้อยที่สุด ไม่สามารถใช้รายละเอียดความสัมพันธ์ระหว่างสัตว์ที่ทำการศึกษาได้ทั้งหมด เช่น ถ้าเป็นการวิเคราะห์ข้อมูลในพี่น้องร่วมพ่อแต่ต่างแม่กัน ก็จะไม่สามารถใช้ความสัมพันธ์ระหว่างพี่น้องร่วมพ่อแม่เดียวกันได้ และในกรณีที่มีการคัดเลือกในรุ่นพ่อ-แม่ การวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้จะทำให้เกิดอคติขึ้นได้

ก. ตัวอย่างการวิเคราะห์รีเกรสชัน

1. การวิเคราะห์รีเกรสชันของลักษณะในลูกต่อค่าเฉลี่ยลักษณะในพ่อและแม่ (regression of offspring on mid-parent)
2. การวิเคราะห์รีเกรสชันของลักษณะในลูกต่อลักษณะในแม่ (regression of offspring on dam)

ข. ตัวอย่างการวิเคราะห์ความแปรปรวน

1. การวิเคราะห์ข้อมูลในพื้นที่น้องร่วมพ่อแต่ต่างแม่กัน (paternal half-sib analysis)
2. การวิเคราะห์ข้อมูลในพื้นที่น้องร่วมแม่แต่ต่างพ่อกัน (maternal half-sib analysis)

Henderson 's method III

Henderson (1953) ได้เสนอวิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวน (modified ANOVA) ที่เหมาะสำหรับข้อมูลที่มีจำนวนในชั้นย่อยไม่เท่ากัน 3 วิธี ซึ่งแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแบบหุ่่นที่ใช้ในการศึกษาและขั้นตอนการวิเคราะห์ แต่ละวิธีจะเหมาะสมกับข้อมูลต่างกันเช่น วิธีที่ 1 เหมาะสำหรับข้อมูลที่มีปัจจัยสุ่ม (random effects) เพียงอย่างเดียว วิธีที่ 2 และ 3 เหมาะสำหรับข้อมูลที่มีทั้งปัจจัยคงที่ (fixed effects) และปัจจัยสุ่ม แต่ขั้นตอนการคำนวณต่างกัน

วิธีที่ 3 (Henderson 's method III) เป็นวิธีที่น่าพอใจที่สุด เนื่องจากสามารถใช้ในกรณีที่มี interaction ระหว่างปัจจัยคงที่และปัจจัยสุ่มได้ ทำการวิเคราะห์โดยนำเอาปัจจัยคงที่ และปัจจัยสุ่มเข้าประเมินพร้อมกัน

Maximum Likelihood , ML

วิธีนี้สามารถใช้ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่มีอยู่ในข้อมูลได้ทุกระดับ ข้อมูลในแต่ละชั้นย่อยไม่จำเป็นต้องเท่ากัน และข้อมูลไม่จำเป็นต้องมาจากการสุ่ม อีกทั้งสามารถใช้วิเคราะห์ข้อมูลที่มีการคัดเลือกในรุ่นพ่อ-แม่ได้โดยเกิดอคติน้อยกว่าวิธี LS วิธีนี้ต้องทราบความสัมพันธ์ระหว่างตัวสัตว์ และต้องทราบค่าพารามิเตอร์ คือ องค์ประกอบความแปรปรวนหรือค่าอัตราพันธุกรรม สำหรับเป็นค่าเบื้องต้น (initial value) ในการคำนวณ และมีข้อสมมติว่าค่าสังเกตมีการกระจายเป็นแบบปกติ

การประมาณองค์ประกอบความแปรปรวนจากวิธีนี้จะเกิดอคติเนื่องจากเหตุผล 2 ประการ (Kennedy, 1989b; Meyer, 1991; Falconer and Mackay, 1996) คือ

1. การประมาณถูกจำกัดให้อยู่ในพิสัยของค่าพารามิเตอร์เบื้องต้น ที่ใช้ในการคำนวณ และค่าความแปรปรวนไม่สามารถมีค่าน้อยกว่าศูนย์ได้
2. วิธี ML มีข้อกำหนดว่าอิทธิพลของปัจจัยคงที่ และ ไม่คำนึงถึงชั้นของความอิสระที่จะต้องเสียไปเนื่องจากการประมาณอิทธิพลของปัจจัยคงที่ ในกรณีที่มีปัจจัยคงที่หลายระดับ เช่น ฟาร์ม-ปี-ฤดู จะทำให้ค่าความแปรปรวนที่ประมาณได้น้อยกว่าความเป็นจริง

Restricted Maximum Likelihood , REML

ปัจจุบัน REML เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการประมาณค่าอัตราพันธุกรรม และค่าความแปรปรวน (Falconer and Mackay, 1996) วิธีนี้มีการปรับส่วนของปัจจัยคงที่ออกไป แล้วทำให้ส่วนปัจจัยสุ่มที่เหลือมีค่าสูงสุด ซึ่งการใช้ REML จะสามารถหลีกเลี่ยงอคติที่จะเกิดขึ้นเนื่องจากอิทธิพลของปัจจัยคงที่ Sorensen และ Kennedy (1984) แนะนำว่าถ้ามีรายละเอียดความสัมพันธ์ระหว่างสัตว์ที่ถูกต้องสมบูรณ์แล้วจะสามารถประมาณความแปรปรวนของพันธุกรรมจากข้อมูลที่เกิดเนื่องจากการคัดเลือกได้โดยไม่มีอคติ

Meyer (1991) กล่าวว่าวิธี REML นิยมใช้ในงานปรับปรุงพันธุ์สัตว์เนื่องจากค่าประมาณที่ได้มีอคติน้อยกว่าวิธี LS เนื่องจากสามารถวิเคราะห์โดยรวมข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างสัตว์ทุกชนิด ซึ่งต่างจากวิธี LS ที่ต้องใช้ข้อมูลความสัมพันธ์ ให้ตรงกับแผนการทดลองแบบมาตรฐาน (standard design) นั้นๆ

วิธี REML มีแบบหุ้ณผสมสำหรับการประมาณองค์ประกอบประกอบความแปรปรวน และมีวิธีประมาณองค์ประกอบประกอบความแปรปรวนโดยไม่ต้องทำเคอริวาทีฟ (derivative free REML, DF-REML) ดังนี้

ก. แบบหุ้ณผสม เนื่องจากแบบหุ้ณ (2) ที่ใช้ในการวิเคราะห์หาค่าพารามิเตอร์ทางพันธุศาสตร์สามารถเขียนใหม่ให้อยู่ในรูปฟังก์ชันที่น่าจะเป็นไปได้ (likelihood function, L) เพื่อหาค่าของตัวเลขที่จะต้องวิเคราะห์ที่ง่ายขึ้น และในทางปฏิบัติจะหาค่าความแปรปรวนโดยการหาค่าเคอริวาทีฟ ในเทอม \log ของ L ดังสมการ (3)

$$\log L = -0.5 \left[\text{const} + \log|V| + \log|X'V^{-1}X| + (y - X\beta)' V^{-1}(y - X\beta) \right] \quad (3)$$

- โดยที่
- 1) const = ค่าคงที่ที่ไม่มีผลต่อการเลือกค่า V เพื่อทำให้ (3) มีค่าสูงสุด
 - 2) $V = ZGZ' + R$, Var (y)
 - 3) $X'V^{-1}X$ = เมตริกซ์สัมประสิทธิ์ (coefficient matrix) ของ MME
 - 4) $(y - X\beta)' V^{-1}(y - X\beta)$ = generalized residual sum of squares

การประมาณความแปรปรวนโดยวิธี REML จำนวนรอบ (iteration) ของการทำเคอริวาทีฟจะขึ้นอยู่กับจำนวนของปัจจัย และจำนวนของลักษณะที่ทำการศึกษา ดังนั้นถ้ามีปัจจัยจำนวนมากจะทำให้เกิดข้อจำกัดในการคำนวณ ต่อมา Graser และคณะ (1987) ได้เสนอวิธีการที่ไม่ต้องทำเคอริวาทีฟ

ข. การประมาณความแปรปรวนด้วย REML โดยไม่ต้องทำเดอริเวทีฟ Harville และ Searle (1977, 1979 cited by Boldman et al., 1993) ได้พัฒนาฟังก์ชัน (4) ขึ้นมาจากฟังก์ชัน (3) โดยให้อยู่ในรูปของ covariance matrices ของปัจจัยสุ่ม โดยฟังก์ชันใหม่นี้ หรือเรียกว่า equivalent form จะให้ค่าประมาณเท่ากับค่าประมาณจากฟังก์ชันเดิม และสมการยังอยู่บนพื้นฐานของ MME (2)

$$\log L = -0.5[\text{const} + \log|R| + \log|G| + \log|C| + y'Py] \quad (4)$$

- โดยที่
- 1) $R = I\sigma^2$,
 - 2) $G = A\sigma^2$,
 - 3) $C =$ เมตริกซ์สัมประสิทธิ์ (full-rank coefficient matrix) ของ MME
 - 4) $y'Py =$ generalized residual sum of squares
 - 5) $P = V^{-1} - V^{-1}X(X'V^{-1}X)^{-1}X'V^{-1}$

ในปี 1987 Graser และคณะ เสนอวิธีประมาณค่าความแปรปรวนโดยไม่ต้องทำเดอริเวทีฟ โดยใช้ equivalent form ของ Harville และ Searle และแสดงให้เห็นว่า เทอม $\log|C|$ และ $y'Py$ ในสมการ (4) สามารถหาค่าไปพร้อมกันได้ระหว่างการทำ absorption โดยใช้วิธี Gaussian elimination ซึ่งวิธีการ absorption นี้ ทำให้เกิดเมตริกซ์ที่มีจำนวนสมาชิกที่มีค่าไม่เท่ากับศูนย์น้อยลง (sparse matrix) เป็นผลดีให้คอมพิวเตอร์หน่วยความจำ และใช้เวลาในการคำนวณน้อยลง การคำนวณโดยไม่ต้องทำเดอริเวทีฟจึงมีประสิทธิภาพมากขึ้น

ดังนั้นเพื่อให้ได้ค่าของ $\log L$ จึงเหลืออีก 2 เทอมที่ต้องประมาณค่าก็คือ $\log|R|$ และ $\log|G|$ จะเห็นว่าในขบวนการคำนวณไม่ต้องการผลลัพธ์ของเทอม β และ μ

หลักการของวิธี DF-REML คือการหาค่าสูงสุดของ log likelihood ทางอ้อม โดยแทนค่า R และ G ต่างๆนั้นคือค่า σ^2 , และ σ^2 , ลงในสมการ (4) จนกว่าจะพบคู่ที่ทำให้ log likelihood มีค่าสูงสุดซึ่งวิธีนี้จะใช้เวลาในการคำนวณน้อยกว่าการทำเคอริเวททิฟมาก

การประมาณคุณค่าการผสมพันธุ์

ลักษณะต่างๆที่สัตว์แสดงออกถูกควบคุมด้วยปัจจัย 2 ประการคือ พันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม (การจัดการ) ปกติจะพบว่าสิ่งแวดล้อมมีผลต่อลักษณะปรากฏมากกว่าอิทธิพลของพันธุกรรม กลยุทธ์ในการปรับปรุงพันธุกรรมในฝูงปศุสัตว์คือการแยกอิทธิพลเนื่องจากพันธุกรรมออกจากอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม แล้วทำการคัดเลือกเฉพาะสัตว์ตัวที่มีพันธุกรรมดีเลิศ เนื่องจากลักษณะที่เกิดเนื่องจากการจัดการที่ดีไม่สามารถถ่ายทอดไปสู่ลูกรุ่นต่อไปได้ ขณะที่ลักษณะที่เกิดเนื่องจากพันธุกรรมสามารถถ่ายทอดได้ (Kennedy, 1988)

จุดประสงค์ในการปรับปรุงพันธุ์เพื่อพัฒนาปรับปรุงค่าเฉลี่ยของ คุณค่าการผสมพันธุ์ของประชากร คุณค่าการผสมพันธุ์ คือ ความสามารถทางพันธุกรรมซึ่งมีผลเนื่องมาจากอำนาจของยีนแบบบวกสะสม (additive gene effect) แต่เราไม่สามารถมองเห็นยีนที่สัตว์แต่ละตัวมีอยู่จึงไม่ทราบคุณค่าการผสมพันธุ์ของสัตว์นั้น อย่างไรก็ตามเราสามารถประมาณได้จากข้อมูลของตัวสัตว์เองรวมทั้งข้อมูลของเครือญาติ

Henderson (1973) ได้พัฒนาการประมาณคุณค่าการผสมพันธุ์ และให้คำจำกัดความของการประมาณคุณค่าการผสมพันธุ์ว่าเป็นการทำนาย (prediction) ตามปกติคำว่า prediction หมายถึงการทำนายเหตุการณ์ต่างๆในอนาคต (Henderson, 1984a) และยังสามารถหมายถึงการประมาณค่าของปัจจัยสุ่ม (Scheaffer, 1992) ทั้งนี้เนื่องจากลักษณะทางพันธุกรรมใดๆบนโครโมโซมถือว่าเป็นตัวแปรเชิงสุ่มและเป็นปัจจัยเชิงสุ่ม ส่วนปัจจัยอื่นๆที่ไม่เกี่ยวข้องกันกับพันธุกรรม ยกเว้นค่าความคลาดเคลื่อน ถือว่าเป็นปัจจัยคงที่ซึ่งเป็นเรื่องของการประมาณ (estimation)

การประเมินคุณค่าการผสมพันธุ์มีหลายวิธีขึ้นอยู่กับข้อกำหนด (assumption) หรือความรู้เกี่ยวกับประชากรที่จะทำการประมาณ เช่น ความรู้เกี่ยวกับค่าเฉลี่ย ค่าความแปรปรวนเป็นต้น ซึ่งวิธีการต่าง ๆ มีดังนี้

1. Best Prediction (BP)
2. Best Linear Prediction (BLP) หรือ selection index
3. Best Linear Unbiased Prediction (BLUP) หรือ selection index modified for unknown

การประมาณคุณค่าการผสมพันธุ์ด้วยวิธี BLUP

BLUP เป็นวิธีที่ดีที่สุดเนื่องจากมีข้อกำหนดน้อยกว่า 2 วิธีแรก คือ ต้องการทราบค่าความแปรปรวนของประชากรที่จะทำการศึกษาเท่านั้น สามารถใช้ในกรณีไม่ทราบค่าของปัจจัยคงที่ และใช้ได้กับข้อมูลที่มีการคัดเลือกหรือคัดเลือก (Henderson, 1973) นอกจากใช้ข้อมูลของตัวสัตว์เองแล้วยังใช้ข้อมูลของสัตว์ทุกตัวที่มีความสัมพันธ์กับสัตว์ตัวที่ได้รับการประมาณด้วย (Kennedy, 1988) ทำให้การประเมินคุณค่าการผสมพันธุ์มีประสิทธิภาพที่สุด

ปัจจุบัน BLUP ใช้กันอย่างแพร่หลายในงานปรับปรุงพันธุ์ โดย BLUP เป็นวิธีในการประมาณค่าปัจจัยสุ่ม ในเชิงคณิตศาสตร์การประมาณค่าปัจจัยคงที่และการทำนายค่าปัจจัยสุ่มสามารถคำนวณได้พร้อม ๆ กันจากสมการแบบหุ่นผสม (2) ของ Henderson (1973) และ BLUP ถูกนำมาประยุกต์ใช้กับข้อมูลของสุกร (Kennedy, 1987; Belonsky and Kennedy, 1988; Daryl and Kennedy, 1992) และใช้ในการตัดสินใจคัดเลือกสุกรในหลายประเทศ เนื่องจาก BLUP มีข้อดี คือ

1. แก้ไขปัญหาจำนวนข้อมูลของแต่ละกลุ่มไม่เท่ากัน เช่น จำนวนฝูง จำนวนพ่อ จำนวนลูก

2. แก้ไขปัญหาความยากในการแยกปัจจัยคงที่ เช่น อิทธิพลเนื่องจาก ปี ฤดูกาล กลุ่มชั่วคราว (contemporary group) ออกจากปัจจัยสุ่ม

3. ปัจจัยเนื่องจากสภาพแวดล้อมและปัจจัยทางพันธุกรรม จะถูกนำไปประมาณพร้อมๆกัน ทำให้สามารถเปรียบเทียบสัตว์ระหว่างฝูง ระหว่างช่วงเวลา ระหว่างสัตว์ที่ได้รับการจัดการต่างกัน

4. การวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ BLUP จะทำให้ค่าประมาณของคุณค่าการผสมพันธุ์แม่นยำขึ้นโดยการรวมข้อมูลของเครือญาติ และของตัวสัตว์ แล้ววิเคราะห์ไปด้วยกัน

แบบหุ่่นที่ใช้ในการทำนายคุณค่าการผสมพันธุ์

แบบหุ่่นที่ใช้ในการทำนายคุณค่าการผสมพันธุ์โดยทั่วไปแบ่งได้ 2 วิธี (Schneeberger, 1992) คือ

ก. แบ่งตามชนิดของปัจจัยสุ่ม

1. Sire model ปัจจัยสุ่มเกิดขึ้นเนื่องจากพ่อพันธุ์ของสัตว์ตัวที่ทำการศึกษา
2. Animal model ปัจจัยสุ่มที่เกิดขึ้นเนื่องจากตัวของสัตว์ที่ทำการศึกษา

ข. แบ่งตามลักษณะที่ทำการศึกษา

1. Single-trait model ทำการวิเคราะห์เพียง 1 ลักษณะ
2. Multiple-trait model ทำการวิเคราะห์มากกว่า 1 ลักษณะพร้อมกัน

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้ทำการศึกษา จะทบทวนทฤษฎีเกี่ยวกับแบบหุ่่นที่ใช้ในการทำนายคุณค่าการผสมพันธุ์เพียง 2 แบบเท่านั้นคือ Animal Model และ Multiple trait model เนื่องจากข้อมูลที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้มีการคัดเลือกเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง และทำการศึกษา 2 ลักษณะพร้อมกัน Kennedy (1989a) กล่าวว่าคุณค่าการผสมพันธุ์ที่ประมาณด้วยวิธี BLUP

โดยใช้ Animal Model จะไม่เกิดอคติเนื่องจากการคัดเลือก ถ้าใช้เมตริกซ์ความสัมพันธ์ระหว่างสัตว์ที่สมบูรณ์ หมายถึง เมตริกซ์ความสัมพันธ์ที่สามารถโยงความสัมพันธ์จากสัตว์ตัวที่จะทำการศึกษาไปจนถึงประชากรพื้นฐานได้ และการคำนวณ 2 ลักษณะพร้อมกันจะทำให้แม่นยำยิ่งขึ้น

Animal Model

Quaas และ Pollak ใช้คำว่า Animal Model ในการประมาณคุณค่าการผสมพันธุ์เป็นครั้งแรกในปี 1980 ซึ่งทำให้ต่อมาคำว่า Animal Model เป็นที่รู้จักกันทั่วไป ซึ่งก็คือ Simple breeding value model นั้นเอง (Quaas et al., 1984) หมายถึง การทำนายคุณค่าการผสมพันธุ์ของสัตว์ทุกตัวในประชากรที่สนใจ หรือเป็นคำทั่วไปที่อธิบายถึงขั้นตอนการประเมินพันธุกรรมของสัตว์ทุกตัวในครวเดียวกัน

โมเดลนี้ออกแบบให้สามารถใช้ความสัมพันธ์ระหว่างสัตว์ทุกระดับโดยตรง (Quaas et al., 1984) Schaeffer (1992) กล่าวว่า Animal Model เป็นแบบหุ่นที่อธิบายทุกปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อค่าสังเกตในสัตว์แต่ละตัว และสามารถทำนายคุณค่าการผสมพันธุ์ของสัตว์ทุกตัวได้ รวมทั้งทำนายคุณค่าการผสมพันธุ์ของสัตว์ตัวที่ไม่มีค่าสังเกตได้อีกด้วย

ก. แบบหุ่นทั่วไป กรณีปัจจัยสุ่มเกิดเนื่องจากตัวสัตว์เพียงอย่างเดียว (Kennedy, 1989a)

$$y = X\beta + Za + e \quad (5)$$

โดยที่ a = เวกเตอร์คุณค่าการผสมพันธุ์ของสัตว์

$$V(a) = G = A\sigma^2$$

A เป็นเมตริกซ์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวสัตว์

(numerator relationship matrix , NRM)

$$V(e) = R = I\sigma^2,$$

I เป็นเมตริกซ์เอกลักษณ์ (Identity matrix)

และมี MME ดังนี้ (Kennedy, 1989a)

$$\begin{bmatrix} \hat{\beta} \\ \hat{a} \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} XR^{-1}X & XR^{-1}Z \\ ZR^{-1}X & ZR^{-1}Z + A^{-1}\lambda \end{bmatrix}^{-1} \begin{bmatrix} XR^{-1}y \\ ZR^{-1}y \end{bmatrix} \quad (6)$$

โดยที่ $\lambda = \sigma^2_e / \sigma^2_a$
 $\hat{\beta}$ = ค่าตอบสำหรับปัจจัยคงที่มีคุณสมบัติเป็น BLUE
 \hat{a} = ค่าการผสมพันธุ์ มีคุณสมบัติเป็น BLUP

การคำนวณค่าการผสมพันธุ์โดยใช้ Animal Model จาก MME (6) จะเห็นว่ามีการนำ เมตริกซ์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวสัตว์มาร่วมในการคำนวณด้วย ในเทอมของ A^{-1}

ซึ่ง Wright (1992 cited by Quaas et al., 1984) ให้คำจำกัดความ ของสัมพันธ์ความสัมพันธ์ ว่าเป็นความสัมพันธ์ระหว่างค่าการผสมพันธุ์ คำนวณได้จากการวิเคราะห์การถ่ายทอด (path) เมื่อนำมาใช้ใน Mixed Model ความสัมพันธ์นี้ก็คือ ความแปรปรวนร่วมระหว่างสัตว์นั่นเอง

ข. เมตริกซ์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวสัตว์ (A) เมตริกซ์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวสัตว์แสดงถึงการถ่ายทอดยีนจากสัตว์รุ่นหนึ่งไปสู่สัตว์อีกรุ่นหนึ่งรวมทั้งเป็นเมตริกซ์ความแปรปรวนของค่าการผสมพันธุ์ (Sorensen and Kennedy, 1984) Kennedy (1989a) แสดงให้เห็นว่าการใช้เมตริกซ์ A ใน Animal model จะให้คำตอบที่ไร้อคติในกรณีข้อมูลมีการคัดเลือกในรุ่นพ่อแม่พันธุ์ และสามารถประเมินค่าการผสมพันธุ์ของสัตว์ที่ไม่มีค่าสังเกตได้ อีกด้วย

เมตริกซ์ความสัมพันธ์ระหว่างตัวสัตว์ มีคุณสมบัติดังนี้ (Henderson, 1976)

1. เป็นเมตริกซ์ สมมาตร (symmetric matrix)
2. $a_{ii} = 1 + f_i$ โดยที่ a_{ii} เป็นสมาชิกที่ i ของเมตริกซ์เส้นทแยงมุมของ A (diagonal matrix of A) และ f_i เป็น inbreeding coefficient ระหว่างสัตว์ตัวที่ i ซึ่งทำได้โดยวิธีของ Wright (1922 cited by Henderson, 1976)

3. $a_{ij} = r_{ij} \sqrt{a_{ij} a_{ji}}$ โดยที่ r_{ij} เป็น Wright's coefficient of relationship ระหว่างสัตว์ตัวที่ i และ j ซึ่งสามารถคำนวณหาค่าต่าง ๆ นี้ได้โดยวิธี path coefficient

ค. การคำนวณเมตริกซ์ A การคำนวณให้จัดลำดับสัตว์ คือ 1, 2, ... , n. โดยให้พ่อแม่สัตว์อยู่ลำดับต้นๆ สัตว์ตัวใดไม่มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือด (non inbred) คือ กลุ่มสัตว์ในลำดับ 1, 2, ... , b ให้ถือเป็นประชากรพื้นฐาน (base population) สามารถหาค่าสมาชิกของเมตริกซ์ได้ดังนี้

1. กรณีทราบทั้งพ่อและแม่ (p และ q)

$$a_{i1} = a_{1i} = .5(a_{ip} + a_{iq}) \quad \text{โดยที่ } i = 1, \dots, t-1$$

$$a_{it} = 1 + .5a_{pq}$$

2. กรณีทราบเพียงพ่อหรือแม่ (p) ของสัตว์ตัวที่ t จะได้ว่า

$$a_{i1} = a_{1i} = .5 a_{ip} \quad \text{โดยที่ } i = 1, \dots, t-1$$

$$a_{it} = 1$$

3. กรณีไม่ทราบทั้งพ่อและแม่ จะได้ว่า

$$a_{i1} = a_{1i} = 0 \quad \text{โดยที่ } i = 1, \dots, t-1$$

$$a_{it} = 1$$

นอกจากหาค่า A โดยตรงจากขั้นตอนข้างต้นแล้วสามารถคำนวณ A ผ่านทาง L โดย L เป็น Lower triangular matrix ซึ่ง Henderson (1976) ได้พิสูจน์ให้เห็นว่า $LL' = A$

๔. การคำนวณเมตริกซ์ L

1. กรณีทราบทั้งพ่อและแม่ (p และ q)

โดยที่ $p < q$ ของสัตว์ตัวที่ t จะได้ว่า

$$\begin{aligned} l_{1j} &= .5(l_{p1} + l_{q1}) && \text{สำหรับ } j = 1, \dots, p \\ &= .5(l_{q1}) && \text{สำหรับ } j = p+1, \dots, q \\ &= 0 && \text{สำหรับ } j = q+1, \dots, t-1 \end{aligned}$$

ในกรณี $q < t-1$:

$$l_{11} = \sqrt{1 + .5\sum_{p+1}^q l_{1j}^2 - \sum l_{1j}^2}$$

โดยที่ $.5\sum_{p+1}^q l_{1j}^2 = f_t$

และ $l_{11} = \sqrt{.5 - .25(f_p + f_q)}$

2. กรณีทราบเพียงพ่อหรือแม่ (p)

$$\begin{aligned} l_{1j} &= .5 l_{pj} && \text{สำหรับ } j = 1, \dots, p \\ &= 0 && \text{สำหรับ } j = p+1, \dots, t-1 \end{aligned}$$

ในกรณีที่ $p < t-1$:

$$l_{1t} = \sqrt{1 - \sum l_{1j}^2} = \sqrt{.75 + .25f_p}$$

3. กรณีไม่ทราบทั้งพ่อและแม่

$$\begin{aligned} l_{1j} &= 0 && \text{สำหรับ } j = 1, \dots, t-1 \\ l_{1t} &= 1 \end{aligned}$$

จ. การคำนวณเมตริกซ์ A^{-1} สามารถกระทำได้ 2 วิธีคือ

1 Conventional Method เป็นการคำนวณเมตริกซ์ A^{-1} ด้วยวิธีเดิมโดยคำนวณ A หรือ L แล้วกลับเมตริกซ์ (inverse) ดังนั้น

$$A^{-1} = (LL')^{-1}$$

2 Rapid Method จากสมการ (8) การคำนวณคุณค่าการผสมพันธุ์ของทราบค่า A^{-1} ซึ่งกรณีสัตว์ที่ใช้ในการศึกษามีเป็นจำนวนมากจะทำให้เกิดความยุ่งยากในการกลับเมตริกซ์ A Henderson (1975, 1976) ได้เสนอวิธีในการหา A^{-1} โดยตรงจาก L ให้

$$L = TD$$

ดังนั้น $A^{-1} = (LL')^{-1} = (TDDT')^{-1} = (T^{-1})'(D^{-1})^2 T^{-1}$ (7)

โดย D = diagonal matrix ที่มีสมาชิกบนเส้นทแยงมุมเท่ากับสมาชิกบนเส้นทแยงมุมของ L

T = เมตริกซ์ที่คำนวณได้จากวิธีเดียวกับการคำนวณ L เพียงแต่สมาชิกบนเส้นทแยงมุมมีค่าเท่ากับ 1

Henderson (1976) แสดงให้เห็นว่าสามารถคำนวณ A^{-1} ได้โดยง่าย เพียงคำนวณหา L และใช้สมาชิกบนเส้นทแยงมุมของ L มาคำนวณ $(D^{-1})^2$ และสรุปเป็นกฎในการคำนวณ A^{-1} อย่างง่ายดังนี้

จ. กฎในการคำนวณ A^{-1} อย่างง่าย วิธีที่ 1 สำหรับประชากรที่มีการผสมเลือดชิด (inbred population)

1. ให้ $(D^{-1})^2$ เป็นเมตริกซ์ B มีสมาชิกคือ b_{ii}

2. เขียน A^{-1} โดยให้สมาชิกบนเส้นทแยงมุมเท่ากับสมาชิกของเมตริกซ์ B

3. บวกค่าต่อไปนี้เข้ากับสมาชิกของ A^{-1}

ก) กรณีทราบทั้งพ่อและแม่ (p และ q) ของสัตว์ตัวที่ i บวกค่าต่อไปนี้

1) $-.5b_{ii}$ สำหรับสมาชิก (p,i) , (i,p) , (q,i) และ (i,q)

2) $.25b_{ii}$ สำหรับสมาชิก (p,p) , (p,q) , (q,p) และ (q,q)

ข) กรณีทราบเพียงพ่อหรือแม่ (p) บวกค่าต่อไปนี้

1) $-.5b_{ii}$ สำหรับสมาชิก (p,i) และ (i,p)

2) $.25b_{ii}$ สำหรับสมาชิก (p,p)

ช. กฎในการคำนวณ A^{-1} อย่างง่าย วิธีที่ 2 สำหรับประชากรที่ไม่มีการผสม

เลือดชิด (non inbred population) กรณีนี้ไม่ต้องคำนวณ L และ $(D^{-1})^2$ เพราะ b_{ii} มีได้ 3 ค่าเท่านั้นคือ

1. กรณีทราบทั้งพ่อและแม่ $b_{ii} = 2$

2. กรณีทราบเพียงพ่อหรือแม่ $b_{ii} = 4 / 3$

3. กรณีไม่ทราบทั้งพ่อและแม่ $b_{ii} = 1$

เมื่อแทนค่า b_{ii} ตามขั้นตอนในวิธีที่ 1 แล้วสามารถหา A^{-1} ได้โดยตรงคือ

1. เขียน A^{-1} โดยเริ่มต้นให้สมาชิกทุกตัวเป็น 0

2. บวกค่าต่อไปนี้เข้ากับสมาชิกของ A^{-1}

ก) กรณีทราบทั้งพ่อและแม่ (p และ q) ของสัตว์ตัวที่ i บวกค่าต่อไปนี้

1) 2 สำหรับสมาชิก (i,i)

2) -1 สำหรับสมาชิก (p,i) , (i,p) , (q,i) และ (i,q)

3) $.5$ สำหรับสมาชิก (p,p) , (p,q) , (q,p) และ (q,q)

ข) กรณีทราบเพียงพ่อหรือแม่ (p) บวกค่าต่อไปนี้

1) $4 / 3$ สำหรับสมาชิก (i,i)

2) $-2 / 3$ สำหรับสมาชิก (p,i) และ (i,p)

3) 1 / 3 สำหรับสมาชิก (p,p)

ค) กรณีไม่ทราบทั้งพ่อและแม่ บวกค่าต่อไปนี้

1) 1 สำหรับสมาชิก (i,i)

สำหรับทั้ง 2 วิธี เมื่อเติมค่าต่างๆ ตามขั้นตอนข้างต้นลงในแต่ละตำแหน่งของสมาชิก A^{-1} แล้ว ให้ใช้ผลรวมของทุกค่าที่อยู่บนตำแหน่งสมาชิกเดียวกัน เป็นค่าของสมาชิกเพียงค่าเดียว

Multiple trait model

เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่า ถ้าสัตว์มีความสัมพันธ์กันทางสายเลือดหมายถึงสัตว์ 2 ตัวนั้นมีความแปรปรวนที่เกิดจากปัจจัยทางพันธุกรรมร่วมกัน อำนาจของยีนแบบรวมสะสมคือส่วนร่วมของสัตว์ 2 ตัว ลักษณะที่ได้รับความสนใจจากนักปรับปรุงพันธุ์หลายๆลักษณะเป็นลักษณะที่ถูกควบคุมด้วยยีนจากหลายตำแหน่ง ผลรวมของ additive gene effect จากทุกตำแหน่งคือค่าของยีนแบบรวมสะสมของสัตว์แต่ละตัว ซึ่งครึ่งหนึ่งของ allele เหล่านี้สามารถถ่ายทอดไปสู่ลูกได้ (Scheaffer, 1992)

โดยทั่วไปในการปรับปรุงพันธุ์ มีการปรับปรุงหลายลักษณะไปพร้อมกัน และการวิเคราะห์หลายลักษณะพร้อมกันจะเพิ่มความแม่นยำในการวิเคราะห์ยิ่งขึ้น เนื่องจากได้ใช้ข้อมูลความสัมพันธ์ทางพันธุกรรม และทางลักษณะปรากฏ (genetic and phenotypic correlation among traits) ระหว่างลักษณะที่ทำการศึกษา และยังใช้ในกรณีมีการคัดเลือกในลักษณะหนึ่งแล้วมีผลต่ออีกลักษณะหนึ่งได้ (Scheaffer, 1992)

ก. ข้อดีของการวิเคราะห์หลายลักษณะ (Quaas et al., 1984)

1. เพิ่มความแม่นยำ เนื่องจากถ้ามีรายละเอียดของข้อมูล (Information) มากจะทำให้ค่าทำนายของ σ_e^2 ลดลง มากไปด้วย เช่นกรณีสัตว์ไม่มีค่าสังเกตในบางลักษณะ สามารถทำนายโดยใช้ข้อมูลจากลักษณะที่มีความสัมพันธ์กันได้

2. ลดอคติเนื่องจากการคัดเลือก (selection bias) ถ้ามีการคัดเลือกในลักษณะใดลักษณะหนึ่ง หรือเกิดในหลายลักษณะพร้อมกัน เมื่อวิเคราะห์เพียงลักษณะเดียวจะเกิดอคติขึ้นถ้าไม่ได้รวมรายละเอียดของข้อมูลเข้าในการศึกษาด้วย

ข. แบบหุ้ยสมสำหรับการวิเคราะห์ 2 ลักษณะ Quaas และคณะ (1984) แนะนำว่าการเขียนแบบหุ้ยสมสำหรับการวิเคราะห์ 2 ลักษณะกระทำเหมือนกับเขียนแยกแต่ละลักษณะแล้วนำ 2 สมการมาเขียนซ้อนกันไว้ ดังนี้

$$y_1 = X_1\beta_1 + Z_1u_1 + e_1 \quad (8)$$

$$y_2 = X_2\beta_2 + Z_2u_2 + e_2 \quad (9)$$

โดยที่

$$y_1 = \text{เวกเตอร์ของค่าสังเกตลักษณะที่ 1}$$

$$y_2 = \text{เวกเตอร์ของค่าสังเกตลักษณะที่ 2}$$

$$X, Z = \text{เมตริกซ์แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าสังเกตกับปัจจัยคงที่ และปัจจัยสุ่ม}$$

$$\beta = \text{เวกเตอร์ของปัจจัยคงที่ ที่ไม่ทราบค่า}$$

$$u = \text{เวกเตอร์ของปัจจัยสุ่มทุกชนิด}$$

$$e = \text{เวกเตอร์ของความคลาดเคลื่อน (error)}$$

เมื่อนำสมการ (8) และ (9) มาเขียนซ้อนกันจะกลายเป็น

$$\begin{bmatrix} y_1 \\ y_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} X_1 & 0 \\ 0 & X_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} \beta_1 \\ \beta_2 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} Z_1 & 0 \\ 0 & Z_2 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} u_1 \\ u_2 \end{bmatrix} + \begin{bmatrix} e_1 \\ e_2 \end{bmatrix} \quad (10)$$

โดยมีความแปรปรวน และความแปรปรวนร่วมดังนี้

$$\text{Var} \begin{bmatrix} u_1 \\ u_2 \\ e_1 \\ e_2 \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} G_{11} & G_{12} & 0 & 0 \\ G_{21} & G_{22} & 0 & 0 \\ 0 & 0 & R_{11} & R_{12} \\ 0 & 0 & R_{21} & R_{22} \end{bmatrix} \sigma^2 \quad (11)$$

การวิเคราะห์แนวโน้มทางพันธุกรรม

แนวโน้มทางพันธุกรรม (genetic trend) คือ การเปลี่ยนแปลงของลักษณะที่เกิดเนื่องจากอิทธิพลของพันธุกรรมต่อหน่วยเวลา การประเมินความก้าวหน้าทางพันธุกรรมของลักษณะต่างๆ เป็นวิธีในการประเมินประสิทธิภาพของการปรับปรุงพันธุ์ และได้ข้อมูลเพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาแผนการปรับปรุงพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นในอนาคต ลักษณะปรากฏของสัตว์แต่ละตัวเป็นผลเนื่องจากอิทธิพลของพันธุกรรม และสิ่งแวดล้อม การวัดความก้าวหน้าทางพันธุกรรมจะต้องแยกอิทธิพลเนื่องจากพันธุกรรม และสิ่งแวดล้อมออกจากกัน นั่นคือต้องประมาณคุณค่าการผสมพันธุ์ของสัตว์และนำมาวิเคราะห์ความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นต่อหน่วยเวลา

การวัดความก้าวหน้าทางพันธุกรรมสามารถทำได้โดยใช้วิธี Mixed Model ที่เสนอโดย Henderson (Henderson, 1949; Henderson et al., 1959; Henderson, 1973) เมื่อจัด

กลุ่มสัตว์ตามวันเกิดหรือตามเกณฑ์อื่นที่เหมาะสมแล้วหาผลเฉลี่ยของโมเดล ค่าเฉลี่ยของสัตว์แต่ละกลุ่มที่ได้จะเป็นแนวโน้มทางพันธุกรรม นอกจากนี้การทำรีเกรสชันค่าเฉลี่ยของคุณค่าการผสมพันธุ์ที่ได้จาก Animal Model ต่อปี สามารถใช้ทำนายแนวโน้มทางพันธุกรรมได้ (Kaplon et al, 1991) ปัจจัยเนื่องจาก ฝูง-ปี-ฤดูกาล จัดเป็นอิทธิพลเนื่องจากสิ่งแวดล้อม ดังนั้นความเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากปัจจัยนี้ถือเป็นแนวโน้มของสิ่งแวดล้อม



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย