

การย้ายฝากตัวอ่อนแช่เย็นจัดและอัตราการติดตั้งท้องในโคนม

สัมพันธ์ สิงหจันทร์¹, จุรีรัตน์ เอี่ยมวิทยาการ¹ และ กัลยา มิตรไพบูลย์¹

FROZEN EMBRYO TRANSFERRING AND PREGNANCY RATE IN DAIRY CATTLE

Samphan Singhajan¹, Jureerat Uamvithayakarn¹ and Kalaya Mitphibhoon¹

ABSTRACTS : The report on the pregnancy rate of frozen-thawed bovine embryos in 94 heads of recipient was 52.1%. There was a higher survival rate of cryopreserved embryos in a group of heifer compared to cows (72.9 VS 38.6). The success rate of transferring embryos in Morula stage was higher than Blastocyst and Expanded Blastocyst respectively (64.7, 50.0 and 31.2).

บทคัดย่อ : จากการย้ายฝากตัวอ่อนแช่เย็นจัดและอัตราการติดตั้งท้องในโคนม จำนวน 94 ตัว พบว่ามีอัตราการติดตั้งท้องทั้งหมด 52.1% โดยมีอัตราการติดตั้งท้องในกลุ่มตัวรับซึ่งเป็นโคสาวพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียน สูงกว่ากลุ่มโครับซึ่งเป็นแม่โคพันธุ์ผสม (72.9 VS 38.6) และพบว่าตัวอ่อนระยะ Morula มีอัตราการติดตั้งท้องดีกว่าระยะ Blastocyst และ Expanded Blastocyst (64.7, 50.0 และ 31.2) ตามลำดับ.

¹ ศูนย์ผสมเทียมปทุมธานี, ตำบลบางกระดี่, อำเภอเมือง, จังหวัดปทุมธานี 12000.

¹ Patumthani Artificial Insemination Research Center, Bang-ga-dee, Muang District, Pratumtani 12000, Thailand.

คำนำ

ความก้าวหน้าทางวิชาการใหม่ ๆ สามารถนำมาใช้ในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ หรือเพิ่มผลผลิตสัตว์ให้สูงขึ้นได้ เช่น การผสมเทียม ทำให้สามารถใช้พ่อพันธุ์ที่ขยายพันธุ์ได้มากกว่าการผสมตามธรรมชาติ สำหรับแม่พันธุ์ที่คิ่นั้น วิธีการที่จะช่วยทำให้แม่พันธุ์สามารถขยายพันธุ์ได้มากขึ้นกว่าปกติวิธีหนึ่งก็คือ การย้ายฝากตัวอ่อน โดยอาศัยหลักการง่าย ๆ คือ ทำให้แม่พันธุ์มีการตกไข่ครั้งละหลาย ๆ ฟองแล้วผสมด้วยน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ที่ดี ล้างเก็บตัวอ่อนแล้วนำไปถ่ายฝากให้กับสัตว์เพศเมียที่พันธุ์ไม่ดี หรืออาจจะทำการเก็บเป็นตัวอ่อนแช่เย็นจัด แล้วจึงนำไปใช้ถ่ายฝากในโอกาสต่อไป วิธีการดังกล่าวจะทำให้ได้ลูกที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ดีครั้งละหลายตัว โดยเฉพาะอย่างยิ่งโค กระบือ ซึ่งปกติให้ลูกเพียงปีละตัวสามารถให้ลูกได้หลายตัวในหนึ่งปี ถึงแม้จะใช้หลักการที่ไม่สลับซับซ้อน แต่ในทางปฏิบัติจำเป็นต้องใช้เทคนิคและวิธีการที่รัดกุมจึงประสบผลสำเร็จ.

เทคโนโลยีของการย้ายฝากตัวอ่อนหรือการถ่ายฝากคัพภะ มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาปศุสัตว์สามารถลดระยะเวลาของการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์สัตว์ได้ อย่างไรก็ตามยังมิได้มีการพัฒนาอย่างจริงจังในประเทศไทย ถึงแม้จะได้มีการศึกษาขั้นตอนของการย้ายฝากตัวอ่อนไปบ้างแล้ว.

การที่รัฐบาลอนุญาตให้มีการสั่งซื้อนมผงจากต่างประเทศเข้ามาในขณะนี้ เป็นผลสะท้อนมาจากการที่มีจำนวนน้ำนมที่ผลิตขึ้นในประเทศยังไม่พอกับความต้องการของผู้บริโภค ทั้งนี้มิใช่สาเหตุหนึ่งมาจากขีดความสามารถของโคพันธุ์พื้นเมืองของประเทศซึ่งให้ผลผลิตต่ำ.

ในแผนพัฒนาการปศุสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการส่งเสริมการเลี้ยงโคนมของกรมปศุสัตว์ เพื่อที่จะเพิ่มคุณภาพของโคนมในการผลิตน้ำนมได้สูง จึงได้นำพ่อโคพันธุ์ยุโรป อเมริกา Bos Taurus ซึ่งให้ผลผลิตน้ำนมสูงมาผสมกับแม่โคพื้นเมือง Bos Indicus ซึ่งทนต่อสภาพอากาศร้อนได้ดี ทำให้ได้ลูกที่มีความต้านทานต่ออากาศร้อนและโรคต่าง ๆ ได้ดีกว่าโคพันธุ์ยุโรป อเมริกา และให้ผลผลิตสูงกว่าโคพื้นเมือง ในการนี้ได้มีการผลิตโคลูกผสมพันธุ์ต่างประเทศ 75 % เพื่อใช้เป็นพ่อพันธุ์ขึ้นก่อน ทำการเลี้ยงจนครบอายุที่สามารถจะใช้ทำการเก็บน้ำเชื้อพ่อพันธุ์เพื่อผสมพันธุ์ได้.

อย่างไรก็ดี จำนวนพ่อโคลูกผสมเหล่านี้ที่ให้น้ำเชื้อคุณภาพดีมีเพียง 30 % ของโคลูกผสมทั้งหมด ซึ่งนับว่าน้อยมาก และจากสถิติการผสมเทียมของประเทศในหลายปีที่ผ่านมา (กองผสมเทียม กรมปศุสัตว์) ก็นับว่ามีอัตราที่เหลือน้อยต้องทำการผสมหลายครั้ง เป็นผลให้มีการผลิตลูกโคนมขึ้นทดแทนฝูงน้อย เกิดการขาดแคลนแม่โคและเกี่ยวโยงไปถึงการผลิตนมได้น้อย ไม่พอกับความต้องการของประเทศ.

ดังนั้น เพื่อให้สอดคล้องกับนโยบายและแผนพัฒนาการปศุสัตว์ของรัฐบาล อุตสาหกรรมโคนม ตลอดจนอุตสาหกรรมนมของประเทศ คณะผู้ทำการวิจัยจึงมีความเห็นว่าจะพัฒนาเทคโนโลยีของการย้ายฝากตัวอ่อนและนำไปปรับใช้ให้เหมาะสมกับสภาพท้องถิ่นในประเทศไทย เพื่อเร่งอัตราการเพิ่มปริมาณของโคนมและน้ำนมในประเทศ รวมทั้งขจัดปัญหาของการผสมไม่ติดหรือผสมติดยาก อันเป็นการลดการสูญเสียทางเศรษฐกิจในการเลี้ยงโคนมที่มีปัญหาเหล่านี้ เป็นการประหยัดเวลา ค่าใช้จ่าย และต้นทุนการผลิตให้สามารถขยายแข่งกับตลาดต่างประเทศได้ จึงได้ทำการศึกษาเทคนิคและวิธีการย้ายฝากตัวอ่อนแช่เย็นจัดให้มากขึ้น เพื่อนำมาใช้ในการผลิตสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโคนม เพื่อเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้นในอนาคต.

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์และสัตว์ทดลอง : ตัวอ่อนแช่เย็นจัดจากแม่โคพันธุ์โฮลสไตน์เฟรเชียน จำนวน 94 ตัว ; โคตัวรับ รวมทั้งหมด จำนวน 176 ตัว

แบ่งเป็น : โคสาวพันธุ์โฮลสไตน์เฟรเชียน จำนวน 63 ตัว, แม่โคนมลูกผสมพันธุ์โฮลสไตน์เฟรเชียน จำนวน 113 ตัว

เรือนทดลอง : โรงเรือนตัวรับ มีลักษณะโปร่ง หลังคากระเบื้องพื้นซีเมนต์ มีบริเวณรอบเดินได้รอบโรงเรือน ด้านหน้ามีรางอาหารตามแนวบริเวณคอกและรางน้ำซึ่งปิดเปิดน้ำโดยอัตโนมัติ

อาหารสัตว์ : อาหารหยาบ ใช้หญ้าสด, หญ้าหมักหรือฟาง, ต้นข้าวโพดหมัก ขึ้นอยู่กับฤดูกาล อาหาร ข้นใช้อาหารที่มีโปรตีนประมาณ 15-18 %

ฮอร์โมนที่ใช้ในการเหนี่ยวนำและควบคุมการเป็นสัด คือ : PGF₂ (Lutalyse, Upjohn)

อุปกรณ์ในการตรวจหาและประเมินคุณภาพตัวอ่อน : กล้องสเตอริโอโคป, Planstic petti dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 ซม., กระดิกน้ำร้อน, เทอร์โมมิเตอร์, กระดิกน้ำเย็น, กรรไกรตัดหลอด, หลอดดูด ตัวอ่อน ใช้หลอดพลาสติกที่เก็บน้ำเชื้อผสมเทียมแบบแช่แข็ง (Straw) ขนาด 0.25 ลบ.ซม. ต่อเข้ากับเข็ม เบอร์ 16 ปลายัดคัตและกระบอกฉีดยาทูเบอร์คูลิน ขนาด 1 ลบ.ซม., ปากคืบ, ผ้าเช็ดมือและกระดาษทิชชู

น้ำยาที่ใช้ขณะประเมินคุณภาพและเก็บตัวอ่อนก่อนถ่ายฝากคือ : (1) 1.5 M Glycerol (2) Culture medium หรือ Holding medium (3) 1.0 M Sucrose

อุปกรณ์ในการย้ายฝากตัวอ่อน : Cassou Al gun, Sterile plastic sheath, หลอดพลาสติก ขนาด 0.25 ลบ.ซม., ยาชา (Xylocaine hydrochloride 2%), ยาน้ำเช็ด (Dettol), กระบอกฉีดยาขนาด 10 มล., เข็มเบอร์ # 18 ขนาดยาว 1 1/2 นิ้ว, Plastic rod (ใช้หุ้มพลาสติก), ถุงมือพลาสติก, รองเท้าบูทยางยาว

วิธีการ : ก่อนเริ่มการทดลอง โคตัวรับฝากจะได้รับการถ่ายพยาธิภายใน จี๊ดวัคซีนป้องกันโรคปากเท้าเปื่อย, โรคเฮอร์เพสเชพคิเคซีเมีย ตรวจโรคแท้งติดต่อก่อน

ขั้นตอนเตรียมตัวรับฝาก :

ที่จังหวัดเชียงใหม่ : เตรียมโคสาวพันธุ์แท้ อายุ 1 ปี 4 เดือน (ประมาณ) จำนวน 63 ตัว เหนียวน้ำให้เป็นสัดด้วยการฉีด PGF₂ ขนาด 25 มก. ต่อตัว จำนวน 2 ครั้ง ห่างกัน 10 วัน

ที่จังหวัดสระบุรี : เตรียมแม่โคพันธุ์ต่าง ๆ ที่เป็นลูกผสม จำนวน 113 ตัว เหนียวน้ำให้เป็นสัดด้วยการฉีด PGF₂ จำนวน 2 ครั้งเช่นกัน สังเกตการเป็นสัดหลังฉีด PGF₂ ทุกวัน วันละ 4 ครั้ง ทุก 6 ชั่วโมง และเฝ้าดูอาการสัด

ตัวอ่อนที่ใช้ : เป็นตัวอ่อนจากโคนมพันธุ์แท้จากต่างประเทศ (โฮลสไตน์ฟริเซียน) ซึ่งทำเป็นตัวอ่อนแช่แข็งโดย 1-Step Glycerol ใช้ Glycerol เป็นสารป้องกันการแข็งตัว โดยใส่ให้กับตัวอ่อนครั้งเดียว โดยวิธีการดัดแปลงจาก Niemann (1985) โดย Freezing solution เป็น 1.5 M Glycerol ประกอบด้วย 10 มล. Glycerol, 79 มล. Culture media, 10 มล. FCS, 1 มล. Antibiotic เช่น DHS. ตัวอ่อนทั้งหมดมีอยู่ 94 ตัวอ่อน

การละลายตัวอ่อน (Thawing) : หลังจากเก็บตัวอ่อนไว้ในถังที่บรรจุไนโตรเจนเหลว นำตัวอ่อนมาละลายเกิดคาน้ำแข็ง โดยนำหลอดพลาสติกที่บรรจุตัวอ่อนมาแช่ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 35° ซ. เป็นเวลานานประมาณ 30 วินาที

การดัดสารป้องกันการแข็งตัวออกจากเซลล์ : ก่อนที่จะนำตัวอ่อนไปใช้ต้องทำการดัดสารป้องกันการแข็งตัวออกจากเซลล์ ทั้งนี้เนื่องจากสารมีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อทิ้งไว้เป็นระยะเวลานาน การดัดสารป้องกันการแข็งตัวนี้แบ่งได้เป็นขั้น โดยมีการเตรียมสารละลายใช้ 3 Steps-1,2 และ 3 ที่ตัวอ่อนในแต่ละ step นานเป็นเวลา 5 นาที : Step 1 : 2.0 มล. 1.5 M Glycerol, 0.1 มล. PBS + Serum, 0.9 มล. 1.0 M Sucrose ; Step 2 : 1.0 มล. 1.5 M Glycerol, 1.1 มล. PBS + Serum, 0.9 มล. 1.0 M Sucrose ; Step 3 : 6.0 มล. 1.5 M Glycerol, 2.1 มล. PBS+Serum, 0.9 มล. 1.0 M Sucrose แล้วล้างตัวอ่อนโดย Culture Media หรือ Holding Media 5-6 ครั้ง.

การประเมินคุณภาพตัวอ่อน : เมื่อละลายตัวอ่อนแล้วต้องประเมินคุณภาพโดยมองผ่านกล้องสเตอริโอไมโครสโคปตามวิธีการของ Lindner และ Wright (1983) ซึ่งแบ่งคุณภาพของตัวอ่อนออกเป็น 4 ระดับ : 1. Excellent หรือ Good ได้แก่ ตัวอ่อนที่มีลักษณะกลม Blastomere มีลักษณะที่สีสม่ำเสมอ, 2. Fair ได้แก่ ตัวอ่อนที่มี Blastomere ยื่นออกมาเป็นถุง มีบางเซลล์ผิออกไป, 3. Poor ได้แก่ ตัวอ่อนที่มี Blastomere ยื่นออกมาเป็นจำนวนมาก บางเซลล์ผิออกไป ขนาดของเซลล์เปลี่ยนไปมาก มีถุงน้ำ (Vesicle) จำนวนมาก แต่ยังมีลักษณะ Viable appearing embryo mass อยู่, 4. Dead หรือ Degenerating ได้แก่ ตัวอ่อนที่มีสีค่อนข้างดำหรืออาจมีเซลล์เยียวผิออกไปหมด และตัวอ่อนเหล่านี้จัดแบ่งเป็นกลุ่มตามระยะการ

เจริญเติบโตของตัวอ่อน ตามวิธีการคือ : Unfertilized, 2- to 12 cell, Early Morula, Morula, Early Blastocyst, Blastocyst, Expanded Blastocyst, Hatched Blastocyst, Expanding Hatched Blastocyst, ตัวอ่อนทั้ง 94 ตัวอ่อนนี้เมื่อประเมินคุณภาพตัวอ่อนแล้ว เก็บไว้ในน้ำยา Culture media (PBS + 20 % FCS) จนกว่าจะถ่ายฝากให้กับโคตัวรับต่อไป.

การถ่ายฝากตัวอ่อน : นำตัวอ่อนไปถ่ายฝากให้กับโคตัวรับที่มีการเป็นสัดคล้องกับอายุของตัวอ่อน 6 และ 7 วัน โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Jillella (1982) ดังนี้ : คุกตัวอ่อนที่จะถ่ายฝากเข้าหลอดพลาสติก ขนาด 0.25 ลบ.ซม. โดยให้ตัวอ่อนอยู่ระหว่างฟองอากาศทั้งสองข้าง, บรรจุหลอดพลาสติกที่มีตัวอ่อนอยู่เข้ากับ ET Gun และหุ้มด้วย Plastic sheath, ล้างมูดยอกจากช่องทวารหนักโคตัวรับให้หมด ตรวจดูคอร์ปัสลูเทียมว่าอยู่ที่รังไข่ด้านใด, ใช้กระดากชำระบริเวณปากช่องคลอดให้สะอาด ให้ผู้ช่วยใช้มือเปิดปากช่องคลอด สอด AI Gun เข้าไปยังปีกมดลูกข้างที่มีคอร์ปัสลูเทียมอยู่ พยายามสอดให้เข้าลึกที่สุด โดยใช้มือที่ล้างอยู่ในช่องทวารหนัก วางตัวลูกอ่อนในพื้นที่เหมาะสมแล้วดึงออก.

ตรวจการตั้งครรภ์ในโคตัวรับ : ทำการตรวจท้องให้แก่โคตัวรับฝากทั้งหมดหลังจากครบ 2 เดือน ล้างตรวจทางทวารหนัก บันทึกการติดตั้งท้อง เปรียบเทียบอัตราการติดตั้งท้องในโคสาวและแม่โค.

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการย้ายฝากตัวอ่อนแช่เย็นจัดและอัตราการติดตั้งท้องในโคนม จากตัวอ่อนแช่แข็งทั้งหมด 94 ตัว แบ่งเป็นระยะ Morula จำนวน 34 ตัวอ่อน Blastocyst จำนวน 44 ตัวอ่อน และ Expanded Blastocyst จำนวน 16 ตัวอ่อน ตามตารางที่ 1.

พบว่ามียัตราการติดตั้งท้องในตัวรับที่เป็นโคสาวพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียนสูงกว่าตัวรับแม่โคลูกผสมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียน (72.9 vs 38.6) และเปอร์เซ็นต์การติดตั้งท้องจากตัวอ่อนระยะ Morula สูงสุดเมื่อเทียบกับระยะ Blastocyst และ Expanded Blastocyst โดยมีอัตราการติดตั้งท้อง 64.7, 50.0 และ 31.2 ตามลำดับ (ตารางที่ 2).

สรุปผลจากการทำการย้ายฝากตัวอ่อนแช่เย็นจัดในโคสาวและแม่โคทั้งหมด 94 ตัว มียัตราการติดตั้งท้องทั้งหมด 52.1 % นับว่าได้ผลเป็นที่น่าพอใจเมื่อเทียบกับ Renard *et al.* (1983) ได้รายงานผลการติดตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็ง 46.8 เปอร์เซ็นต์.

Table 1. Number and quality of embryos.

	Quality	Number
Morula	1	31
	2	2
	3	1
Total		34
Blastocyst	1	41
	2	3
Total		44
Expanded Blastocyst	1	7
	2	9
Total		16

รวมตัวอ่อนทั้งหมด 94 ตัวอ่อน

การเก็บตัวอ่อนในลักษณะแช่แข็ง มีเป้าหมายสำคัญคือ เพื่อเก็บรักษาพันธุ์สัตว์ที่มีคุณค่าทางพันธุกรรมสูงไว้ใช้ได้เป็นเวลานาน ๆ นอกจากนี้ยังประหยัดในการขนย้าย และสะดวกต่อการควบคุมโรคระบาดสัตว์ เทคนิคนี้ได้เริ่มพัฒนาขึ้นมาเป็นเวลานาน Whittingham *et al.* (1972) รายงานความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งในหนูขาวเป็นรายแรกในโลก Wilmut and Rowson (1973) ได้รายงานความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งในโค ได้มีการพัฒนาเทคนิคในการแช่แข็งตัวอ่อนขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงทุกวันนี้ การรอดชีวิตของตัวอ่อนที่ผ่านขั้นตอนการแช่เย็นจัดมีอัตราสูงขึ้นกว่าที่ผ่าน ๆ มา มาก (Mapletoft, 1987) พบว่า อัตราการติดตั้งท้องในการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งมีประมาณ 50 % ของอัตราการติดตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนสด โดยคิดเป็นอัตราการติดตั้งท้องประมาณ 40-50 % อย่างไรก็ตามตัวเลขนี้อาจมีความคลาดเคลื่อนบ้าง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการในการทำการย้ายฝากแต่ละครั้ง.

Table 2. Pregnancy diagnosis of the dairy cows.

	Transferred			Pregnant			Non pregnant		
Morula	1	19	16	3	12	5	7		
	2	-	-	-	2	0	2		
	3	-	1	0	-	-	-		
Blastocyst	1	12	8	4	29	11	18		
	2	-	-	-	3	3	0		
Expanded Blastocyst	1	1	0	1	6	2	4		
	2	4	2	2	5	1	4		
Total		36	27	10	57	22	35		

% Pregnancy rate of heifers 72.9%

% Pregnancy rate of cows 38.6%

% Pregnancy rate of morula 64.7%

% Pregnancy rate of blastocyst 50.0%

% Pregnancy rate of expaned blastocyst 31.2%

เอกสารอ้างอิง

- Jilliella, D. (1982). A monograph in embryo transfer technology and its application in developing countries. America's Development Foundation, Washington, D.C. Alexandria, V.A.
- Lindner, G.N. and Wright, R.W.Jr. (1983). Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology* 20 : 407-416.
- Mapletoft, R.J. (1987). The technology of embryo transfer. In : *International Embryo Movement Proceeding of a Symposium Montreal*, p. 2-39.
- Niemann, H. (1985). Sensitivity of pig morulae to DMSO/PVP or glycerol treatment and cooling to 10° c. *Theriogenology* 23 : 213.
- Renard, J.P., Y., Leymarie, P. and Plat, J.C. (1983). Sucrose dilution : A technique for field transfer of bovine embryo frozen in the straw. *Theriogenology* 19 : 145.
- Whittingham, D.G., Leibo, S.P. and Mazur, P. (1972). Survival of mouse embryos to -196 and -269° C. *Science* 178 : 411 - 414.
- Wilmut, I. and Rowson, L.E.A. (1973). Experiments on the low-temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* 92 : 686.