

วารสารเกษตร 8(3) : 314-320 (2535)

Journal of Agriculture 8(3) : 314-320 (1992)

การย้ายฝากตัวอ่อนแช่เย็นจัด และอัตราการตั้งครรภ์ในโคนม

สัมพันธ์ สิงห์จันทร์¹, จูรีรัตน์ เอี่ยมวิทยาการ¹ และ กัลยา นิครนัยบุญ¹

FROZEN EMBRYO TRANSFERRING AND PREGNANCY RATES IN DAIRY CATTLE

Samphan Singhanjan¹, Jurcerat Uamwuthayakarn¹

and Kalaya Mithibhoon¹

ABSTRACT : The report on the pregnancy rates of frozen-thawed bovine embryos in 94 heads of recipient was 52.1%. There was a higher survival rates of cryopreserved embryos in a group of heifer compared to cows (72.9 vs 38.9). The success rates of transferring embryo in morula stage was higher than blastocyst and expand blastocyst respectively (64.7, 50.0 and 31.2).

บทคัดย่อ : จากการย้ายฝากตัวอ่อนแช่เย็นจัดและอัตราการตั้งครรภ์ในโคนม จำนวน 94 ตัว พบว่าอัตราการตั้งครรภ์ทั้งหมด 52.1% โดยมีอัตราการตั้งครรภ์ในกลุ่มตัวรับที่เป็นโคสาวไฮสไตน์เฟรีเซียนสูงกว่ากลุ่มตัวรับซึ่งเป็นแม่โคพันธุ์ผสม (72.9 vs 38.6) และพบว่าตัวอ่อนระยะ Morula มีอัตราการตั้งครรภ์ดีกว่าระยะ Blastocyst และ Expand Blastocyst (64.7, 50.0 และ 31.2) ตามลำดับ.

คำนำ

ความก้าวหน้าทางวิชาการใหม่ๆ สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์หรือเพิ่มผลผลิตสัตว์ให้สูงขึ้นได้ เช่น การผสมเทียมทำให้สามารถใส่พ่อพันธุ์ที่ดีขยายพันธุ์ได้มากกว่าการผสมตามธรรมชาติสำหรับแม่พันธุ์ที่ดีนั้น วิธีการที่จะช่วยทำให้แม่พันธุ์สามารถขยายพันธุ์ได้มากขึ้นกว่าปกติวิธีหนึ่งก็คือ การย้ายฝากตัวอ่อน โดยอาศัยหลักการง่ายๆ คือ ทำให้แม่พันธุ์มีการตกไข่ครั้งละ

¹ ศูนย์ผสมเทียมปทุมธานี, ตำบลบางกระเจี, อำเภอบึงเมือง, จังหวัดปทุมธานี 12000.

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

หลายๆ ฟอง แล้วผสมด้วยน้ำเชื้อจากฟองพันธุ์ที่ดี แล้วเก็บตัวอ่อนแล้วนำไปถ่ายฝากให้กับสัตว์เพศเมียที่พันธุ์ไม่ดี หรืออาจจะทำการเก็บเป็นตัวอ่อนแช่เย็นจัด แล้วจึงนำไปใช้ถ่ายฝากในโอกาสต่อไป วิธีการดังกล่าวจะทำให้ได้ลูกที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ดีครั้งละหลายตัว โดยเฉพาะอย่างยิ่งโคกระบือซึ่งปกติให้ลูกเพียงปีละตัว สามารถให้ลูกได้หลายตัวในหนึ่งปี ถึงแม้จะให้หลักการที่ไม่สลับซับซ้อน แต่ในทางปฏิบัติจำเป็นต้องใช้เทคนิคและวิธีการที่รัดกุมจึงประสบผลสำเร็จ.

เทคโนโลยีของการย้ายฝากตัวอ่อนหรือการถ่ายฝากก็พหุมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาปศุสัตว์ สามารถลดระยะเวลาของการปรับปรุงพันธุ์และขยายพันธุ์สัตว์ได้ อย่างไรก็ตามได้มีการพัฒนาเทคนิคอย่างจริงจังในประเทศไทย ถึงแม้จะได้มีการศึกษาขั้นตอนของการย้ายฝากตัวอ่อนไปบ้างแล้ว.

การที่รัฐบาลอนุญาตให้มีการส่งซื้อนมผงจากต่างประเทศเข้ามาในขณะนี้ เป็นผลสะท้อนมาจากการที่มีจำนวนน้ำนมที่ผลิตขึ้นในประเทศยังไม่พอกับความต้องการของผู้บริโภค ทั้งนี้มีสาเหตุหนึ่งมาจากขีดความสามารถของโคพันธุ์พื้นเมืองของประเทศซึ่งให้ผลผลิตต่ำ.

ในแผนพัฒนาการปศุสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการส่งเสริมการเลี้ยงโคนมของกรมปศุสัตว์ เพื่อที่จะเพิ่มคุณภาพของโคนมในการผลิตน้ำนมได้สูง จึงได้นำฟอโคพันธุ์ยุโรป อเมริกา *Bos taurus* ซึ่งให้ผลผลิตน้ำนมสูงมาผสมกับแม่โคพันธุ์พื้นเมือง *Bos indicus* ซึ่งทนต่อสภาพอากาศร้อนได้ดี ทำให้ลูกมีความต้านทานต่ออากาศร้อนและโรคต่างๆ ได้ดีกว่าโคพันธุ์ยุโรป อเมริกา และทำให้ผลผลิตสูงกว่าโคพันธุ์พื้นเมือง ในการนี้ได้มีการผลิตโคลูกผสมพันธุ์ต่างประเทศ 75% เพื่อใช้เป็นฟอพันธุ์ขึ้นก่อนทำการเลี้ยงจนครบอายุที่สามารถจะใช้ทำการเก็บน้ำเชื้อฟอพันธุ์เพื่อผสมพันธุ์ได้.

อย่างไรก็ดี จำนวนฟอโคลูกผสมเหล่านี้ที่ให้น้ำเชื้อคุณภาพดีมีเพียง 30% ของโคลูกผสมทั้งหมดซึ่งนับว่าน้อยมาก และจากสถิติการผสมเทียมของประเทศไทยในหลายปีที่ผ่านมา (กรมผสมเทียม กรมปศุสัตว์) ก็นับว่ามีอัตราการเจริญพันธุ์ยังต่ำ คือ มีจำนวนแม่โคที่ผสมติดจากการผสมเทียมครั้งเดียวเพียง ประมาณ 40% เช่นเท่านั้น ที่เหลือต้องทำการผสมหลายครั้ง เป็นผลให้มีการผลิตลูกโคขึ้นทดแทนฝูงน้อย เกิดการขาดแคลนแม่โคและเกี่ยวโยงไปถึงการผลิตนมได้น้อยไม่พอกับความต้องการของประเทศ.

ดังนั้น เพื่อให้สอดคล้องกับนโยบายและแผนพัฒนาการปศุสัตว์ของรัฐบาล อุตสาหกรรมโคนมตลอดจนอุตสาหกรรมนมของประเทศ คณะผู้ทำการศึกษาจึงมีความเห็นว่าควรที่จะพัฒนาเทคโนโลยีของการย้ายฝากตัวอ่อน และนำไปปรับใช้ให้เหมาะสมกับสภาพท้องถิ่นในประเทศไทย เพื่อเร่งอัตราการเพิ่มปริมาณของโคนมและน้ำนมในประเทศ รวมทั้งขจัดปัญหาของการผสมไม่ติดหรือผสมติดยากอันเป็นการลดการสูญเสียทางเศรษฐกิจในการเลี้ยงดูโคนมที่มีปัญหาเหล่านี้ เป็นการประหยัดเวลาค่าใช้จ่ายและต้นทุนการผลิตให้สามารถแข่งขันกับตลาดต่างประเทศได้ จึงได้ทำการ

ศึกษาเทคนิคและวิธีการย้ายฝากตัวอ่อนแช่เย็นจัดให้มากขึ้น เพื่อนำมาใช้ในการผลิตสัตว์โดยเฉพาะอย่างยิ่งโคนม เพื่อเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้นในอนาคต.

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์ : ประกอบด้วย ตัวอ่อนแช่เย็นจัดจากแมโคพันธุ์ไฮลด์สไนด์ฟรีเซียน จำนวน 94 ตัว, โคตัวรับ รวมทั้งหมด จำนวน 176 ตัว แบ่งเป็นโคสาวพันธุ์ไฮลด์สไนด์ฟรีเซียน จำนวน 63 ตัว, แมโคนมลูกผสมพันธุ์ไฮลด์สไนด์ฟรีเซียน จำนวน 113 ตัว, โรงเรือนทดลอง โรงเรือนตัวรับ มีลักษณะโปร่ง หลังคากระเบื้องพื้นซีเมนต์มีบริเวณรอบเดินได้รอบโรงเรือน ด้านหน้ามีรางอาหาร ตามแนวบริเวณคอกและรางน้ำซึ่งปิดเปิดน้ำโดยอัตโนมัติ.

อาหารสัตว์ : อาหารหยาบใช้หญ้าสด, หญ้าหมักหรือฟาง, ต้นข้าวโพดหมัก ขึ้นอยู่กับฤดูกาล อาหารข้นใช้อาหารที่มีโปรตีน ประมาณ 15 - 18% .

ฮอร์โมนที่ใช้ในการเหนี่ยวนำและควบคุมการเป็นสัด คือ PGF_2 (Lutalyse, Upjohn).

อุปกรณ์ในการตรวจหาและประเมินคุณภาพตัวอ่อน : ประกอบด้วย กล้องสเตอริโอสโคป; Plastic petti dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 ซม.; กระติกน้ำร้อน; เทอร์โมมิเตอร์; กระติกน้ำเย็น; กรรไกรตัดหลอด; หลอดดูดตัวอ่อน ใช้หลอดพลาสติกที่เก็บน้ำเชื่อมผสมเทียมแบบแช่แข็ง (Straw) ขนาด 0.25 ลบ.ซม. ต่อเข้ากับเข็มเบอร์ 16 ปลายตัดและกระบอกฉีดยาทูเบอร์คูลิน ขนาด 1 ลบ.ซม.; ปากคีบ; ผ้าเช็ดมือและกระดานทิชชู; น้ำยาที่ใช้ขณะประเมินคุณภาพและเก็บตัวอ่อนก่อนถ่ายฝาก คือ : 1.5 M Glycerol, Culture medium หรือ Holding medium, 1.0 M Sucrose.

อุปกรณ์ในการย้ายฝากตัวอ่อน : Cassou AI Gun, Sterile plastic sheath, หลอดพลาสติกขนาด 0.25 ลบ.ซม., ยาชา (Xylocaine hydrochloride 2%), ยาฆ่าเชื้อ (Dettol), กระบอกฉีดยาขนาด 10 ml., เข็มเบอร์ #18 ขนาดยาว 1 1/2 นิ้ว, plastic rod (ใช้หุ้มพลาสติก จีท), ถุงมือพลาสติก, รองเท้าบูทยางยาว.

วิธีการ : ก่อนเริ่มการทดลอง โคตัวรับฝากจะได้รับการถ่ายพยาธิภายใน นิดครึ่งชั่วโมงป้องกันโรคปากเท้าเปื่อย, โรคเฮโมเรจิกเซฟติคซีเมีย และตรวจโรคทางติดต่อ.

ขั้นตอนเตรียมตัวรับฝาก : ที่จังหวัดเชียงใหม่ เตรียมโคสาวพันธุ์แท้ อายุ 1 ปี 4 เดือน (ประมาณ) จำนวน 63 ตัว เหนี่ยวนำให้เป็นสัดด้วยการฉีด $\text{PGF}_{2\alpha}$ ขนาด 25 mg. ต่อตัว จำนวน 2 ครั้ง ห่างกัน 10 วัน. ที่จังหวัดสระบุรี เตรียมแมโคพันธุ์ต่างๆ ที่เป็นลูกผสม จำนวน 113 ตัว เหนี่ยวนำให้เป็นสัดด้วยการฉีด $\text{PGF}_{2\alpha}$ จำนวน 2 ครั้งเช่นกัน สังเกตการเป็นสัดหลังฉีด $\text{PGF}_{2\alpha}$ ทุกวันๆ ละ 4 ครั้ง ทุก 6 ชั่วโมง และเฝ้าดูอาการสัด.

ตัวอ่อนที่ใช้ : เป็นตัวอ่อนจากโคพันธุ์ต่างประเทศ (ไฮลด์ไนด์ฟรีเซียน) ซึ่งทำเป็นตัวอ่อนแช่แข็งโดย 1 - step Glycerol ใช้ Glycerol เป็นสารป้องกันการแข็งตัวโดยใส่ให้กับตัวอ่อนครั้งเดียว โดยวิธีดัดแปลงจาก Nieman (1985) โดย Freezing solution เป็น 1.5 M Glycerol ประกอบด้วย : 10 ml. Glycerol, 79 ml. Culture media, 10 ml. Fetal calve serum (FCS), 1 ml. Antibiotic เช่น DHS, ตัวอ่อนทั้งหมดมีอยู่ 94 ตัวอ่อน.

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

การหึ่งสารป้องกันการแข็งตัวออกจากเซลล์ : ก่อนที่จะนำตัวอ่อนไปใช้ต้องทำการหึ่งสารป้องกันการแข็งตัวออกจากเซลล์ ทั้งนี้เนื่องจากสารมีความเป็นพิษต่อเซลล์เมื่อทิ้งไว้เป็นระยะเวลานาน การหึ่งสารป้องกันการแข็งตัวนี้แบ่งได้เป็นขั้นโดยมีการเตรียมสารละลายใช้ 3 Steps - 1, 2 และ 3 (Step 1 : 2.0 ml. 1.5 M Glycerol, 0.1 ml. Phosphate-buffered Saline (PBS) + Serum, 0.9 ml. 1.0 M Sucrose, Step 2 1.0 ml. 1.5 M Glycerol, 1.1 ml. PBS + Serum, 0.9 ml. 1.0 M Sucrose, Step 3 6.0 ml. 1.5 M Glycerol, 2.1 ml. PBS + Serum, 0.9 ml. 1.0 M Sucrose) ทิ้งตัวอ่อนในแต่ละ step นานเป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างตัวอ่อนโดย Culture Media หรือ Holding Media 5-6 ครั้ง.

การประเมินคุณภาพตัวอ่อน : เมื่อละลายตัวอ่อนแล้วต้องประเมินคุณภาพโดยมองผ่านกล้องสเตอริโอสโคป ตามวิธีการของ Lindner และ Wright (1983) ซึ่งแบ่งคุณภาพของตัวอ่อนออกเป็น 4 ระดับ คือ :

1. Excellent หรือ Good ได้แก่ตัวอ่อนที่มีลักษณะกลม Blastomere มีลักษณะและสีสม่ำเสมอ.
2. Fair ได้แก่ตัวอ่อนที่มี Blastomere ขึ้นออกมาเป็นถุง มีบางเซลล์ผุไป.
3. Poor ได้แก่ตัวอ่อนที่มี Blastomere ขึ้นออกมาเป็นจำนวนมาก บางเซลล์ผุไป ขนาดของเซลล์เปลี่ยนไปมาก มีถุงน้ำ (Vesicle) จำนวนมาก แต่ยังมีลักษณะ viable appearing cmbryo mass อยู่.
4. Dead หรือ Degenerating ได้แก่ตัวอ่อนที่มีสีค่อนข้างดำหรืออาจมีเซลล์เหี่ยวผุไปหมด.

และตัวอ่อนเหล่านี้จัดแบ่งเป็นกลุ่มตามระยะการเจริญเติบโตของตัวอ่อน ดังนี้ : Unfertilized, 2 - to 12 cells, Early Morula, Morula, Early Blastocyst, Blastocyst, Expanded Blastocyst, Hatched blastocyst, และ Expanding Hatched Blastocyst.

ตัวอ่อนทั้ง 94 ตัวนี้เมื่อประเมินคุณภาพตัวอ่อนแล้วเก็บไว้ในน้ำยา Culture media (PBS + 20 % FCS) จนกว่าจะถ่ายฝากให้กับโคตัวรับต่อไป.

การถ่ายฝากตัวอ่อน : นำตัวอ่อนไปถ่ายฝากให้กับโคตัวรับที่มีการเป็นสัดคล้องกับอายุของตัวอ่อน 6 และ 7 วัน โดยแปลงจากวิธีการของ Jillella (1982) ดังนี้ : ๑. คัดตัวอ่อนที่จะถ่ายฝากเข้าหลอดพลาสติกขนาด 0.25 ลบ.ซม. โดยให้ตัวอ่อนอยู่ระหว่างฟองอากาศทั้งสองข้าง, บรรจุหลอดพลาสติกที่มีตัวอ่อนอยู่เข้ากับ ET. Gun และหุ้มด้วย Plastic sheath, ฉีดยาชาเข้าโคนหางประมาณ 5 ลบ.ซม., ส่องมูออกจากช่องทวารหนักโคตัวรับให้หมด ตรวจดูคอร์ปัสลูเทียมว่าอยู่ที่รังไข่ด้านใด, ใช้กระดากชำระเช็ดบริเวณปากช่องคลอดให้สะอาด ให้ผู้ช่วยใช้มือเปิดปากช่องคลอดสอด ET. Gun เข้าไปยังปีกมดลูกข้างที่มีคอร์ปัสลูเทียมอยู่ พยายามสอดให้เข้าลึกที่สุด โดยใช้มือที่ส่องอยู่ในช่องทวารหนัก วางตัวลูกอ่อนในพื้นที่เหมาะสมแล้วดึงออก.

ตรวจการตั้งครรภ์ในโคตัวรับ : ทำการตรวจท้องให้แก่โคตัวรับฝากทั้งหมดหลังจากครบ 2 เดือน ส่องตรวจทางทวารหนัก บันทึกการติดตั้งท้อง เปรียบเทียบอัตราการติดตั้งท้องในโคสาวและแม่โค.

ผลการทดลองและวิจารณ์

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

พบว่าเมื่ออัตราติดตั้งท้องในตัวรับที่เป็นโคสาวพันธุ์ไฮลส์ไคน์ฟรีเซียนสูงกว่าตัวรับแม่โคลูกผสมพันธุ์ไฮลส์ไคน์ฟรีเซียน (72.9 VS. 38.6) และเปอร์เซ็นต์การติดตั้งท้องจากตัวอ่อนระยะ Morula สูงสุดเมื่อเทียบกับระยะ Blastocyst และ Expand Blastocyst โดยมีอัตราการติดตั้งท้อง 64.7, 50.0 และ 31.2 ตามลำดับ (ตารางที่ 2).

สรุปผลจากการทำการย้ายฝากตัวอ่อนแช่เย็นจัดในโคสาวและแม่โคทั้งหมด 94 ตัว มีอัตราการติดตั้งท้องทั้งหมด 52.1% นับว่าได้ผลเป็นที่น่าพอใจ เมื่อเทียบกับ Renard *et al.* (1983) ได้รายงานผลการติดตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็ง 46.8 เปอร์เซ็นต์.

Table 1. Stage of development, classification and number of collected embryos.

Classification		Number
Morula	Quality 1	31
	Quality 2	2
	Quality 3	1
	Total	34
Blastocyst	Quality 1	41
	Quality 2	3
	Total	44
Expand Blastocyst	Quality 1	7
	Quality 2	9
	Total	16
Grand total		94

Table 2. The effect of stage of development and quality of embryos on pregnancy rate of dairy cattle.

		Heifer				Cow			
		Transferred	Pregnant	Nonpregnant	Pregnancy rate, %	Transferred	Pregnant	Nonpregnant	Pregnancy rate, %
Morula	Quality 1	19	16	3	89.2	12	5	7	41.7
	Quality 2	-	-	-	-	2	0	2	0
	Quality 3	1	1	0	100.0	-	-	-	-
Blastocyst	Quality 1	12	8	4	66.7	29	11	18	37.9
	Quality 2	-	-	-	-	3	3	0	100.0
Expand Blastocyst	Quality 1	1	0	1	0	6	2	4	33.3
	Quality 2	4	2	2	50.0	5	1	4	20.0
Total		37	27	10	72.9	57	22	35	38.6
Pregnancy rate of Morula stage, %				64.7					
Pregnancy rate of Blastocyst stage, %				50.0					
Pregnancy rate of Expand Blastocyst stage, %				31.2					

การเก็บตัวอ่อนในลักษณะแช่แข็งมีเป้าหมายสำคัญ คือ เพื่อเก็บรักษาพันธุ์สัตว์ที่มีคุณค่าทางพันธุกรรมสูงไว้ใช้ได้เป็นเวลานานๆ นอกจากนี้ ยังประหยัดในการขนย้ายและสะดวกต่อการควบคุมโรคระบาดสัตว์ เทคนิคนี้ได้เริ่มพัฒนาขึ้นมาเป็นเวลานาน Whittingham *et al.* (1972) รายงานความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งในหนูขาวเป็นรายแรกในโลก ต่อมา Wilmot และ Rowson (1973) ได้รายงานความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งในโค ได้มีการพัฒนาเทคนิคในการแช่แข็งตัวอ่อนขึ้นเรื่อยๆ จนถึงทุกวันนี้ การรอดชีวิตของตัวอ่อนที่ผ่านขบวนการแช่แข็งมีอัตราสูงเกินกว่าที่ผ่านๆ มา มาก Mapletoft (1987) พบว่าอัตราการติดตั้งท้องในการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งมีประมาณ 50% ของอัตราการติดตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนสด โดยคิดเป็นอัตราการติดตั้งท้องประมาณ 40-50% อย่างไรก็ตามตัวเลขนี้อาจมีความคลาดเคลื่อนบ้างทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการในการทำการย้ายฝากแต่ละครั้ง.

เอกสารอ้างอิง

- Jillella, D. (1982). A monograph in embryo transfer technology and its application in developing countries. America's Development Foundation Warshington, 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.
- Neimann, 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.
- Wilmot, I. and Rowson, L, E, A. (1973). Experiments on the low - temperature preservation of cow embryos. *Vet. Rec.* 92, 686.