รายงานผลการวิจัย
ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

เรื่อง

การย้ายฝากตัวอ่อนระหว่างกระบือพันธุ์มูร่าห์และกระบือปลัก

โดย

มงคล เตชะกำพุ
พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป
ชัยณรงค์ โลหชิต
ทุนจิโร โคบายาชิ

วส
สพ 15
007550

2533

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การย้ายฝากตัวอ่อน
ระหว่าง
กระบือพันธุ์มูร่าห์และกระบือปลัก

โดย

มงคล เตชะกำพุ

พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป

ชัยณรงค์ โลหิต

กุนจิโร โคบายาชิ

กันยายน 2533

I14952104 - 6 M.A. 2542

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณสามารถ ทรงกลด และคุณสาธิต ทรงกลด และเจ้าหน้าที่ของ บริษัทพัฒนาเกษตรและปศุสัตว์จำกัด ที่ได้อนุเคราะห์และให้ความสะดวกด้านสัตว์ทดลองและทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภชที่ได้ให้ทุนสนับสนุนในการวิจัยครั้งนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการวิจัย การย้ายฝากตัวอ่อนระหว่างกระบือมูร่าห์และกระบือปลัก

ชื่อผู้วิจัย มงคล เตชะกำพุ
พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป
ชัยณรงค์ โลหชิต
กุนจิโร โดบายาชิ

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ กันยายน 2533

บทคัดย่อ

ศึกษาความเป็นไปได้ ในการย้ายฝากตัวอ่อนระหว่างกระบือมูร่าห์และกระบือปลักไทย โดยทำการเก็บตัวอ่อนจากการตกไข่ตามธรรมชาติหรือหลังการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนแพรกแนนแมร์ชีรัม โกนาโดโทรปิน (พี.เอ็ม.เอส.จี) ในขนาด 2400-2800 ไอยู จากกระบือมูร่าห์จำนวน 5 ตัว เก็บตัวอ่อนจากการตกไข่ธรรมชาติได้ตัวอ่อน 85% (4/5) โดยมีตัวอ่อนปกติเท่ากับ 75% (3/4) และจากการกระตุ้นการตกไข่เพิ่ม พบว่าการตอบสนองเฉลี่ย (ในแง่ของจำนวนคอร์ปัส ลูเทียม และฟอลลิเกิล ϕ> 5 มม.) เท่ากับ 11.0 ± 3.8 จำนวนตกไข่เฉลี่ย/ตัวเท่ากับ 4.4 ± 4.3 มีอัตราการเก็บตัวอ่อนเท่ากับ 45.5% (10/22) ตัวอ่อนปกติที่ได้ทั้งหมด 8 ตัว นำไปย้ายฝากในกระบือปลักตัวรับที่มีวงจรการเป็นสัดใกล้เคียงหรือแตกต่างกันไม่เกิน 24 ชั่วโมง ผลการตรวจการตั้งท้องที่ประมาณ 2-3 เดือน หลังย้ายฝากไม่พบว่ากระบือปลักตัวรับมีการตั้งท้อง อย่างไรก็ตามพบว่ากระบือปลักตัวรับ 4 ใน 7 ตัว มีแนวโน้มของการพัฒนาของตัวอ่อนในระยะแรก แต่ไม่สามารถเจริญจนสิ้นสุดการตั้งท้องได้ เนื่องจากการตรวจวัดระดับโปรเจสเตอโรนได้ในระดับสูงที่ 21 วันของรอบการเป็นสัด

Project title : Embryo transfer between Murrah buffalo and Swamp buffalo

Name of Investigators : Mongkol Techakumphu
Peerasak Chantaraprateep
Chainarong Lohachit
Gunjiro Kobayashi

Year : September 1990.

Abstract

The feasibility of embryo transfer between Murrah buffalo to Thai swamp buffalo was studied. Embryos were collected by non surgical method from five Murrah buffaloes after single ovulation or after superovulation. From single egg collection, 85% (4/5) of recovery rate and 75% (3/4) of normality rate were obtained. While with the superovulation by PMSG at dose of 2400-2800 IU, the average ovarian response in term of corpus lutea and follicles ϕ> 5 mm. was 11.0 ± 3.8 and the ovulation was 4.4 ± 4.3. The percentage of recovered eggs was 45.5% (10/22). Eight normal embryos (1/8 from single egg collection and 7/8 from superovulation) were transferred to seven recipients. Pregnancy diagnosis was performed by progesterone assay and rectal palpation at 60-90 days after transfer. No pregnancy after transfer was found, but four from seven recipients had a high level of progesterone at Day 21 of estrus cycle. This showed that Murrah buffalo embryo can survive in uterus of swamp buffalo recipient but the development can not continue until term.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	II
บทคัดย่อ	III
Abstract	IV
สารบัญ	V
รายการตารางประกอบ	VI
รายการรูปประกอบ	VII
รายการสัญลักษณ์และคำย่อ	VIII
บทนำ	I
อุปกรณ์และวิธีการ	2
ผลการทดลอง	9
วิจารณ์	17
เอกสารอ้างอิง	23

เลขหมู่ จฬ
สพ 15
เลขทะเบียน 007550
วัน.เดือน.ปี ๒๑ ก.ย. ๓๖

รายการตารางประกอบ

		หน้า
ตารางที่ 1	รายละเอียดของการย้ายฝากตัวอ่อนระหว่างกระบือมูร่าห์และกระบือปลัก	7
ตารางที่ 2	ผลการเก็บตัวอ่อนจากการตกไข่ธรรมชาติ	9
ตารางที่ 3	การตอบสนองของรังไข่ต่อฮอร์โมน พี.เอ็ม.เอส.จี ขนาด 2400-2800 ไอยู และจำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้	12
ตารางที่ 4	สรุปผลการเก็บตัวอ่อนจากการตกไข่ตามธรรมชาติและจากการกระตุ้นการตกไข่เพิ่ม	16
ตารางที่ 5	ผลการตรวจระดับโปรเจสเตอโรนที่ 21 วันของการตั้งท้องและการตรวจท้อง โดยการล้วงตรวจทางทวารหนักที่ 60-90 วันของการตั้งท้อง	17

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการรูปประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	โปรแกรมการกระตุ้นการตกไข่เพิ่มในกระบือตัวให้ (ก) และการปรับขนานการเป็นสัด ระหว่างกระบือตัวให้ (ก) และกระบือตัวรับ (ข)	4
รูปที่ 2	สรุปขั้นตอนการย้ายฝากตัวอ่อนระหว่างกระบือตัวให้และกระบือตัวรับ	8
รูปที่ 3	ตัวอ่อนระยะมอรูล่าอายุ 6.0 วัน เก็บจากการตกไข่ตามธรรมชาติ	10
รูปที่ 4	ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส หลุดจากเปลือกหุ้ม (ZP) อายุ 7.0 วัน เก็บจากการตกไข่ตามธรรมชาติ	10
รูปที่ 5	ไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (ด้านซ้าย) มีเซลล์โคโรน่า (C) ล้อมรอบ และตัวอ่อนระยะมอรูล่าอายุ 6.0 วัน (ด้านขวา) เก็บจากการตกไข่ตามธรรมชาติ	11
รูปที่ 6	ไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิหลังเอาเซลล์โคโรน่าที่ล้อมรอบออก	12
รูปที่ 7	ตัวอ่อนปกติระยะมอรูล่าจำนวน 4 ตัวอ่อน และตัวอ่อนที่ถูกทำลาย (D) จากการเก็บหลังการกระตุ้นการตกไข่เพิ่มด้วยฮอร์โมน พี.เอ็ม.เอส.จี	14

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการสัญลักษณ์และคำย่อ

พี.เอ็ม.เอส.จี	=	Prognant Mare Serum Gonadotropin
	=	P.M.S.G
พี.จี	=	Prostaglandin = PGF2 alpha
ไอ.ยู	=	International Unit
นก./มล.	=	นาโนกรัม/มิลลิลิตร
D	=	Day = วันที่
M	=	Murrah Buffalo
T	=	Thai Swamp Buffalo
Single	=	Single egg collection การเก็บตัวอ่อนจากการตกไข่ตามธรรมชาติ
Sup.	=	Superovulation การกระตุ้นการตกไข่เพิ่ม
P.B.S.	=	Phosphate Buffer Saline
C	=	Corona cells = เซลล์รอบตัวอ่อน
ZP	=	Zona pellucida = เปลือกหุ้มรอบตัวอ่อน
M	=	Morula = ตัวอ่อนระยะมอรูล่า
D	=	Damaged embryo = ตัวอ่อนที่ถูกทำลาย
UNF	=	Unfertilized egg = ไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ
(-)	=	ผลลบ
x 200, x 400	=	กำลังขยาย 200 เท่า, 400 เท่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

กระบือเป็นสัตว์ที่มีประโยชน์ต่อเศรษฐกิจของประเทศ โดยสามารถนำมาใช้เป็นแรงงานทางเกษตรกรรม ให้เนื้อและผลิตภัณฑ์อื่นๆ รวมทั้งช่วยเสริมระบบเกษตรกรรมผสมผสานในชนบทให้สมบูรณ์ขึ้น (วิวัฒน์, 2531) ในประเทศไทยมีการเลี้ยงกระบืออยู่ 2 ชนิด ชนิดแรกเป็นกระบือปลักพื้นบ้านที่เลี้ยงกันในทุกภาค โดยเฉพาะภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ชนิดที่สองเป็นกระบือมูร่าห์ที่สามารถให้นมได้ซึ่งนำเข้ามาจากต่างประเทศเพื่อผสมพันธุ์กับกระบือปลัก ได้ลูกผสมที่ให้เนื้อและให้นม กระบือทั้งสองชนิดมีความแตกต่างกันในลักษณะรูปร่าง อวัยวะสืบพันธุ์ (Lohachit, 1987a) และลักษณะทางพันธุกรรมคือ มีจำนวนโครโมโซมแตกต่างกัน โดยในกระบือมูร่าห์มี 2n=50 คู่ ในขณะที่กระบือปลักมี 2n=48 คู่ (Chuanchai and Luesakul, 1987)

การผสมข้ามพันธุ์ระหว่างกระบือทั้ง 2 ชนิด จะได้โดยลูกผสมชั่วแรกที่มีจำนวนโครโมโซม 2n=49 คู่ การศึกษาการนำตัวอ่อนของกระบือแต่ละชนิดมาย้ายฝากระหว่างกันยังไม่เคยมีรายงาน จากเอกสารอ้างอิงพบว่าความสำเร็จของการย้ายฝากตัวอ่อนระหว่างสัตว์ต่างสายพันธุ์หรือต่างชนิดที่มีจำนวนโครโมโซมไม่เท่ากันนั้น มีรายงานที่แตกต่างกัน Tarkowski (1962) รายงานว่าตัวอ่อนของหนูแรท (Mus rattus) ไม่สามารถเจริญในแม่หนูเม้าส์ (Mus musculus) ตัวรับ เช่นเดียวกับรายงานของ Hancock and McGovern (1968) ที่แสดงให้เห็นความล้มเหลวของการเจริญของตัวอ่อนแกะในแพะตัวรับ หรือตัวอ่อนแพะในแกะตัวรับ การย้ายตัวอ่อนกระหว่างกระบือมูร่าห์ (Bubalus bubalis) กับโค (Bos taurus) ได้มีรายงานโดย Drost et al. (1986) พบว่าตัวอ่อนของกระบือไม่สามารถเจริญในโคตัวรับได้ แต่ทางตรงข้ามพบว่าตัวอ่อนของโคจาก 1 ใน 2 ตัวอ่อน สามารถเจริญในตัวรับที่เป็นกระบือได้ แต่เกิดการตายของตัวอ่อนก่อนกำหนด ความเป็นไปได้ของการย้ายฝากตัวอ่อนของสัตว์ต่างพันธุ์ แต่ชนิดใกล้เคียงกันได้รายงานในสัตว์ประเภทม้าและสัตว์เคี้ยวเอื้องอื่น ๆ Summers et al. (1987) ได้รายงานความสำเร็จของการฝากตัวอ่อนระหว่างม้าลาย (Equus burchelli, 2n=46) กับม้าบ้าน (E.caballus, n= 64) และม้าปามองโกเลียน (E.przewatskii, 2n=66) กับม้าบ้าน (2n=50) เช่นเดียวกับกวาง Bongo (Tragelaphus euryceros) ไปยังกวาง Eland (Tragelaphus oryx) (Dresser et al., 1985)

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นของความเป็นไปได้ของการย้ายฝากตัวอ่อนกระบือมูร่าห์ไปยังกระบือปลัก เพื่อเป็นการขยายจำนวนกระบือมูร่าห์ซึ่งมีจำนวนน้อยในประเทศไปยังกระบือปลักตัวรับซึ่งมีเป็นจำนวนมาก อีกทั้งเป็นการศึกษาการนำเทคนิคการเก็บตัวอ่อนในกระบือปลัก (Lohachit et al., 1988) มาศึกษาในการเก็บตัวอ่อนในกระบือพันธุ์มูร่าห์และศึกษาการเพิ่มจำนวนการตกไข่ในกระบือพันธุ์มูร่าห์

<u>อุปกรณ์และวิธีการ</u>

ทำการทดลองในฟาร์มเลี้ยงกระบือของบริษัท พัฒนาเกษตรและปศุสัตว์ จำกัด ณ อำเภอวัฒนานคร จังหวัดปราจีนบุรี ระหว่างเดือนตุลาคม 2532 ถึง กันยายน 2533

<u>กระบือทดลอง</u> : ใช้กระบือเพศเมียในการทดลองทั้งหมด 12 ตัว แบ่งเป็นกระบือพันธุ์มูร่าห์จำนวน 5 ตัว เพื่อใช้สำหรับเก็บตัวอ่อน (ตัวให้) กระบือปลักไทยจำนวน 7 ตัว ใช้เป็นกระบือสำหรับรับตัวอ่อนที่เก็บจากกระบือพันธุ์มูร่าห์

กระบือมูร่าห์ตัวให้คัดเลือกจากฝูงโดยดูจากลักษณะพันธุ์ สุขภาพ และเป็นกระบือตั้งท้องประมาณ 7 เดือนขึ้นไป กระบือเหล่านี้จะนำมาใช้หลังการคลอดประมาณ 2-3 เดือน เมื่อการเข้าอู่ของมดลูกและการทำงานของรังไข่สมบูรณ์และปกติแล้ว โดยทำการล้วงตรวจอวัยวะสืบพันธุ์ผ่านทางทวารหนัก 2 ครั้ง หลังคลอดห่างกัน 1 เดือน

กระบือปลักไทยตัวรับคัดเลือกจากกระบือที่มีความปกติของมดลูกและรังไข่โดยการล้วงคลำทางทวารหนัก และเป็นกระบือที่มีประวัติการให้ลูกมาแล้วหรือกำลังเลี้ยงลูกอยู่ กระบือทั้ง 2 ชนิดอายุประมาณ 4-7 ปี น้ำหนักประมาณ 350-400 กก.นำมาเลี้ยงรวมกันในฝูงเดียวกัน โดยให้น้ำ หญ้าสด หญ้าแห้งไม่จำกัด และนำปล่อยออกทุ่งประมาณ 9.00-16.00 น. กระบือทั้งหมดได้รับอาหารข้นเสริมตัวละประมาณ 2 กก./วัน

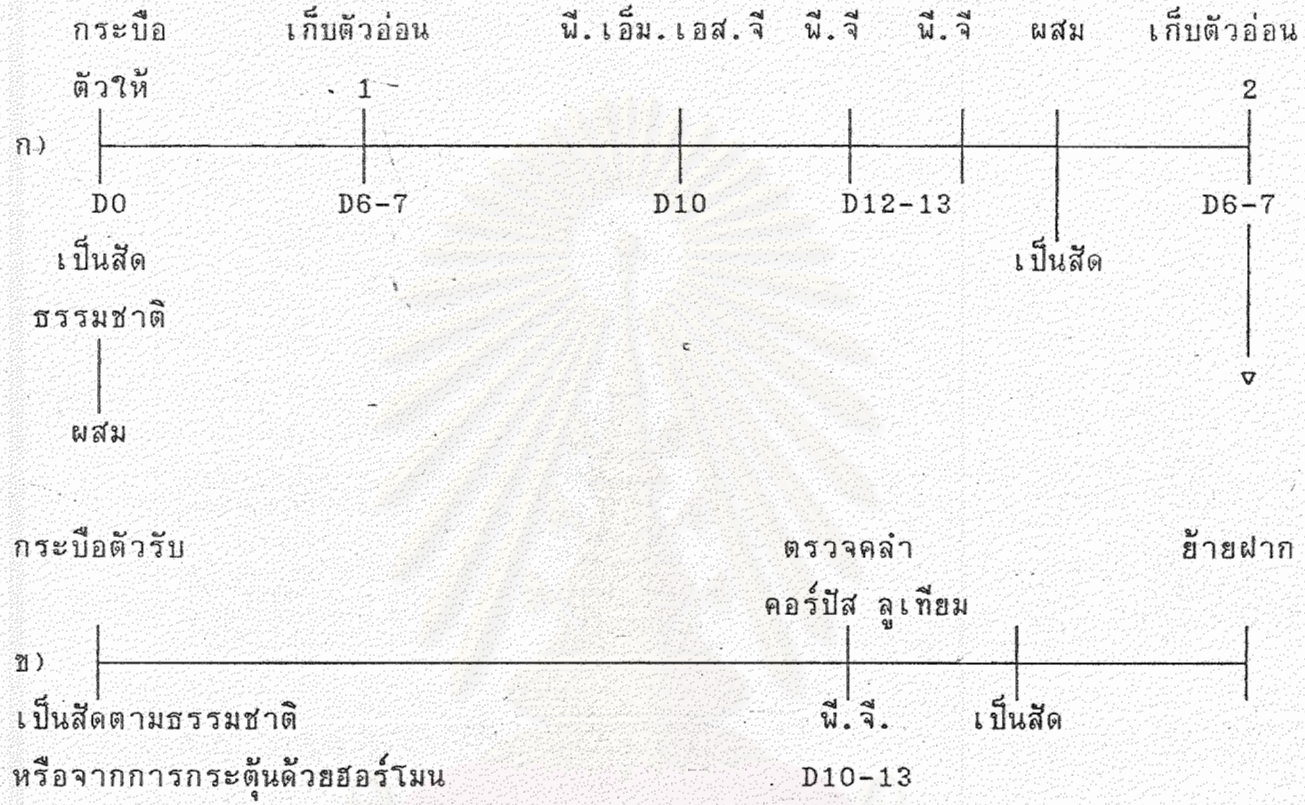
สังเกตการเป็นสัดในกระบือเพศเมียวันละ 2 ครั้ง ในเวลาเช้า 7.00 น. และในเวลาเย็น 17.00 น. โดยใช้กระบือเพศผู้ที่ตัดท่อนำน้ำเชื้อ (Epididymectomy) และเบี่ยงเบนอวัยวะเพศไปด้านข้าง (Lateral deviation of penis) โดยเทคนิคของ Lohachit (1987b) กระบือเพศผู้ตรวจสัดดังกล่าวนี้ติดลูกกลิ้งบรรจุสีใต้คาง (Chin-ball marking) ทำการสังเกตแถบสีกลางหลังกระบือตัวให้และตัวรับ ซึ่งแสดงถึงการเป็นสัดและยอมรับการผสม (Standing heat)

โปรแกรมการกระตุ้นการตกไข่เพิ่ม

โปรแกรมการกระตุ้นการตกไข่เพิ่ม (Superovulation) จะเริ่มหลังการเก็บตัวอ่อนจากการตกไข่ตามธรรมชาติ (Single egg collection) แล้วครั้งหนึ่ง เมื่อตรวจพบกระบือมูร่าห์ตัวให้เป็นสัดตามธรรมชาติ ทำการผสมกับพ่อพันธุ์มูร่าห์และทำการเก็บตัวอ่อนในวันที่ 6-7 หลังการเป็นสัดแล้ว ฉีดฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน ชนิด พี.เอ็ม.เอส.จี. (Pregnant Mare Serum Gonadotropin, Folligon®, Intervet) ขนาด 2400-2800 ไอ.ยู เข้ากล้ามเนื้อ ในวันที่ 10-11 ของรอบวงจรการเป็นสัดเดียวกัน เพื่อกระตุ้นการตกไข่เพิ่มคือ ประมาณ 3-4 วัน หลังจากการเก็บตัวอ่อนจากการตกไข่ตามธรรมชาติ ฉีดสารพรอสตราแกลนดิน เอฟ ทู อัลฟา (PGF 2 alpha, Lutalyse, Upjohn) ขนาด 25 มก. หลังจากฉีดฮอร์โมน พี.เอ็ม.เอส.จี แล้ว 2 วัน โดยฉีดให้ 2 ครั้ง ครั้งแรกในตอนเช้าและครั้งที่สองในตอนเย็นห่างกันประมาณ 8 ชม. (รูปที่ 1) สังเกตการเป็นสัดโดยการใช้กระบือตรวจสัด ผสมแม่กระบือตัวให้ที่เป็นสัดโดยใช้พ่อพันธุ์มูร่าห์ ตรวจสอบผลตอบสนองของการกระตุ้นการตกไข่เพิ่มโดยการล้วงผ่านทางทวารหนักหลังจากผสมประมาณ 6 วัน บันทึกจำนวนการตกไข่ (คอร์ปัส ลูเทียม) บนรังไข่และฟอลลิเกิลที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 5 มม.ขึ้นไป (Anovulatory follicle) ในแม่กระบือพันธุ์มูร่าห์ที่ฉีด พี.เอ็ม.เอส.จี แต่ละตัว

การปรับขนานการเป็นสัด

ทำการปรับขนานการเป็นสัดของกระบือปลักตัวรับ ให้ใกล้เคียงกับกระบือมูร่าห์ตัวให้ที่ทำการเก็บตัวอ่อนจากการตกไข่ตามธรรมชาติหรือจากการกระตุ้นการตกไข่เพิ่ม โดยการฉีดสารพรอสตาแกลนดิน เอฟ ทู อัลฟา เข้ากล้ามจำนวน 25 มก. ในกระบือปลักตัวรับที่ตรวจพบคอร์ปัส ลูเทียม จากการล้วงผ่านทางทวารหนักโดยสัตให้ประมาณ 12 ชม.ก่อนฉีดสาร พี.จี ครั้งแรก ในกระบือมูร่าห์ตัวให้ (รูปที่ 1) ตรวจการเป็นสัดของกระบือตัวรับโดยวิธีเดียวกับกระบือตัวให้โดยใช้กระบือตัวผู้ตรวจสัด ทำการจดบันทึกวันและเวลาของการเป็นสัด



<u>รูปที่ 1</u> โปรแกรมการกระตุ้นการตกไข่เพิ่มในกระบือตัวให้ (ก) และการปรับขนานการเป็นสัดระหว่างกระบือตัวให้ (ก) และกระบือตัวรับ (ข)

D = วันของวงจรการเป็นสัด

1 = เก็บตัวอ่อนจากการตกไข่ตามธรรมชาติ

2 = เก็บตัวอ่อนหลังการกระตุ้นการตกไข่เพิ่ม

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การเก็บตัวอ่อน

ทำการเก็บตัวอ่อนจากการตกไข่ตามธรรมชาติ หรือหลังกระตุ้นด้วยฮอร์โมน พี.เอ็ม.เอส.จี โดยวิธีไม่ผ่าตัด (Nonsurgical method) โดยสอดท่อโฟเลย์ผ่านทางปากมดลูก และชะล้างเอาตัวอ่อนที่อยู่ในโพรงมดลูกตามวิธีที่รายงาน โดย Kobayashi et al. (1981) ในโคและโดย Lohachit et al. (1988) ในกระบือปลักไทย โดยมีขั้นตอนสรุปได้ดังนี้

- อดอาหารและน้ำกระบือที่จะเก็บตัวอ่อน 24 ชม.
- ฉีดยาซึม Xylazine HCl จำนวน 0.8 มล.เข้ากล้าม
- ทำความสะอาดตัวกระบือโดยเฉพาะส่วนท้าย
- หลังฉีดยาซึมประมาณ 10 นาที ทำการฉีดยาชา 2% Xylocaine HCl จำนวน 2.0 มล. เข้าไขสันหลัง
- สอดท่อโฟเลย์เบอร์ 18 เข้าไปในมดลูกโดยผ่านคอมดลูก ทำการยึดท่อโฟเลย์กับผนังมดลูกโดยอัดลมให้ลูกบัลลูนปลายท่อโฟเลย์ขยาย
- ทำการชะล้างตัวอ่อนในมดลูก โดยปล่อยน้ำยาฟอสเฟต บัฟเฟอร์ ซาไลน์ (P.B.S., Flow laboratories®, N.S.W., Australia) โดยปล่อยเข้าและออกครั้งละประมาณ 30-40 มล. ทำการชะล้างมดลูกข้างที่มีไข่ตกเพียงข้างเดียวกรณีเก็บแบบการตกไข่ตามธรรมชาติและทำการเก็บทั้ง 2 ข้าง กรณีที่ทำการกระตุ้นการตกไข่เพิ่มแต่ละข้างใช้น้ำยาชะล้างข้างละ 500 มล. เก็บน้ำยา พี.บี.เอส. ที่ชะล้างแล้วในกระบอกตวงขนาด 500 มล. ก่อนนำมาตรวจหาตัวอ่อน

การตรวจหาตัวอ่อน

ขั้นตอนในการหาตัวอ่อนทำ ณ อุณหภูมิห้อง (27-29° ซ.) นำไซลินเดอร์ที่บรรจุน้ำยาชะล้างตัวอ่อน มาตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้ตัวอ่อนนอนก้น แล้วดูดเอาน้ำยาส่วนบน 400 มล. ออกโดยทำกาลักน้ำที่ควบคุมการไหลของน้ำยาที่ดูดออกในอัตราเร็วหยดต่อหยด นำเอาน้ำยาชะล้างส่วนที่เหลือประมาณ 100 มล. เทลงใน Petridish ขนาด 100 มล. แล้วส่องหาตัวอ่อนใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคปขนาดกำลังขยาย 10 ถึง 40 เท่า ดูดตัวอ่อนที่พบใส่ใน petridish ขนาด 20 มล. ซึ่งบรรจุน้ำยา พี.บี.เอส ตรวจคุณภาพและระยะของตัวอ่อนที่พบ และทำการบันทึกภาพของตัวอ่อน ตัวอ่อนที่มีคุณภาพดี

จะทำการย้ายฝากในกระบือปลักตัวรับทันที หรือหากไม่มีตัวรับจะทำการเก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวตามวิธีการที่เคยรายงานโดย Techakumphu et al.(1989).

การย้ายฝากตัวอ่อน

บรรจุตัวอ่อนที่มีคุณภาพดีในหลอดผสมเทียมขนาด 0.25 มล. นำหลอดผสมเทียมที่มีตัวอ่อนอยู่สอดในท่อผสมเทียม (Inseminating gun) วิธีการย้ายฝากตัวอ่อนทำเช่นเดียวกับการผสมเทียม โดยสอดท่อผสมเทียมผ่านคอมดลูก ปล่อยตัวอ่อนในโพรงมดลูกข้างที่ตรวจพบคอร์ปัส ลูเทียม ของกระบือปลักตัวรับที่มีวงจรการเป็นสัดใกล้เคียงหรือแตกต่างประมาณ +12 - 24 ชม. เมื่อเทียบกับกระบือตัวให้ ระยะเวลาตั้งแต่เก็บตัวอ่อนจนถึงย้ายฝากในกระบือตัวรับกินเวลาประมาณ 30-40 นาที

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการย้ายฝากตัวอ่อน 3 ครั้ง (ตารางที่ 1)

ครั้งที่ 1 : ทำการย้ายฝากตัวอ่อนระยะมอรูล่าที่ได้จากการตกไข่ตามธรรมชาติจากตัวให้ M12 ไปยังตัวรับ T9 ที่ปีกมดลูกข้างขวา โดยกระบือตัวรับเป็นสัดหลังตัวให้ประมาณ 24 ชม.

ครั้งที่ 2 : ทำการย้ายฝากตัวอ่อนระยะมอรูล่าที่ได้จากการกระตุ้นการตกไข่เพิ่มจากตัวให้ M12 ไปยังตัวรับ T0, T1 และ T8 ที่ปีกมดลูกข้างซ้าย โดยกระบือตัวรับมีความแตกต่างของการเป็นสัดจากตัวให้ 0-(+12) ชม.

ครั้งที่ 3 : การย้ายฝากตัวอ่อนระยะมอรูล่าที่ได้จากการกระตุ้นการตกไข่เพิ่มจากตัวให้ M15 ไปยังตัวรับ T3, T4 และ T1 ที่ปีกมดลูกข้างซ้าย โดยกระบือตัวรับและตัวให้มีช่วงเวลาเป็นสัดใกล้เคียงกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 รายละเอียดของการย้ายฝากตัวอ่อนระหว่างกระบือมูร่าห์และกระบือปลัก

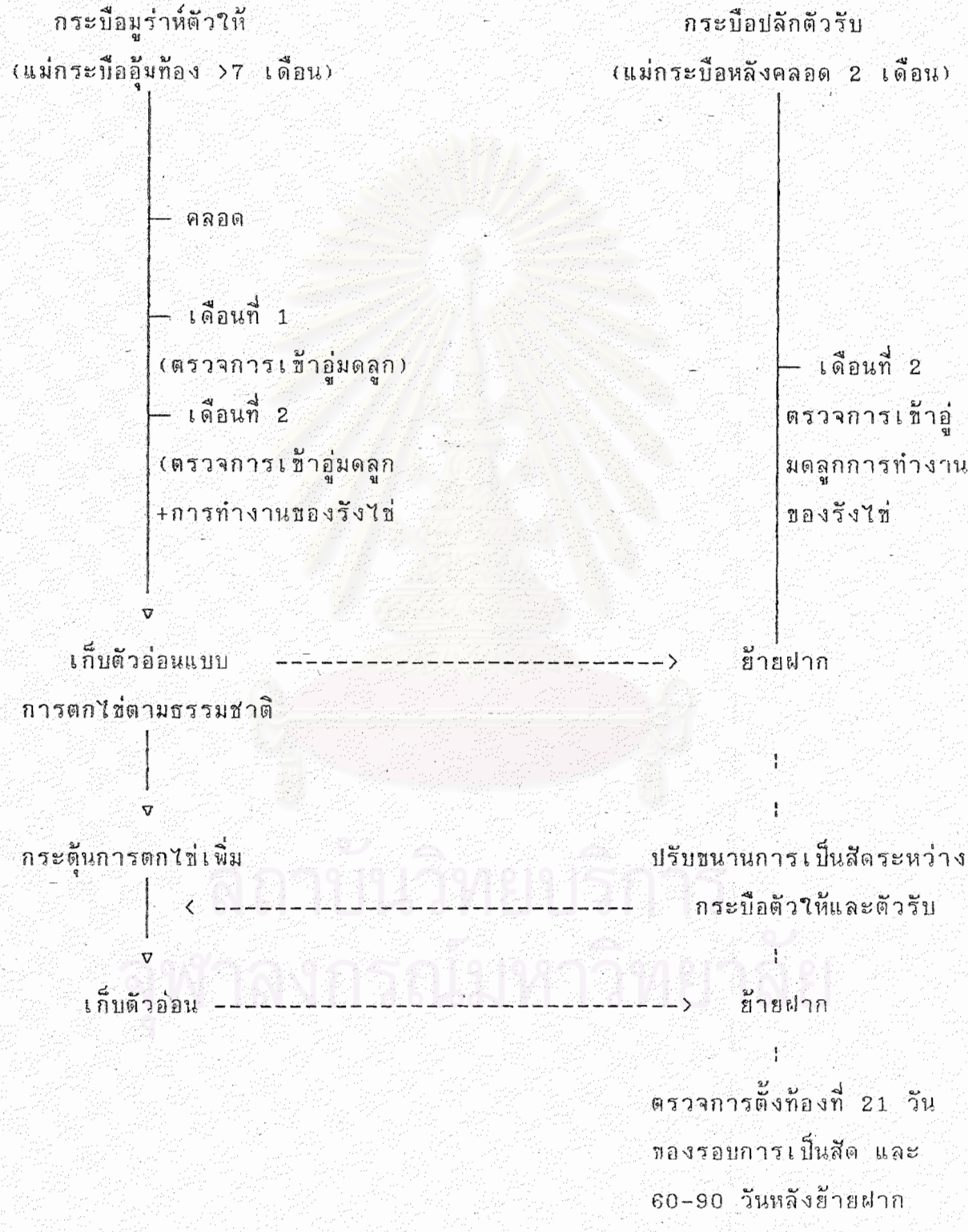
ครั้งที่	ตัวรับ	จำนวนตัวอ่อน	ชนิดตัวอ่อน	ตัวให้	ระยะตัวอ่อน	ปีกมดลูก	ความแตกต่างตัวให้กับตัวรับ (ชม.)
1	T9	1	Single	M12	Morula	ขวา	-24
2	T0	2	Sup.	M12	Morula	ซ้าย	+12
	T1	1	Sup.	M12	Morula	ซ้าย	+12
	T8	1	Sup.	M12	Morula	ซ้าย	0
3	T3	1	Sup.	M15	Morula	ซ้าย	0
	T4	1	Sup.	M15	Morula	ซ้าย	0
	T7	1	Sup.	M15	Morula	ซ้าย	0

หมายเหตุ : Single = ตัวอ่อนที่ได้จากการตกไข่ตามธรรมชาติ
Sup. = ตัวอ่อนที่ได้จากการกระตุ้นการตกไข่เพิ่ม
ความแตกต่างระหว่างตัวให้กับตัวรับ
-24 = ตัวรับแสดงอาการเป็นสัดก่อนตัวให้ 24 ชม.
+12 = ตัวรับแสดงอาการเป็นสัดหลังตัวให้ 12 ชม.
0 = ตัวรับและตัวให้แสดงการเป็นสัดใกล้เคียงกัน

การตรวจการตั้งท้อง

ทำการตรวจการตั้งท้องระยะแรก โดยเจาะเลือดวัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน โดยวิธี Solid phase RIA kit ณ วันที่ 21 วันของรอบการเป็นสัดหรือประมาณ 15 วันหลังทำการย้ายฝาก และทำการล้วงตรวจผ่านทางทวารหนัก เพื่อตรวจการขยายตัวของมดลูกที่ประมาณ 60-90 วันหลังย้ายฝาก

ขั้นตอนทั้งหมดของการศึกษาของการย้ายฝากตัวอ่อนระหว่างกระบือมูร่าห์ - และกระบือปลักได้สรุปแสดงในรูปที่ 2



<u>รูปที่ 2</u> : สรุปขั้นตอนการย้ายฝากตัวอ่อนระหว่างกระบือตัวให้และกระบือตัวรับ

ผลการทดลอง

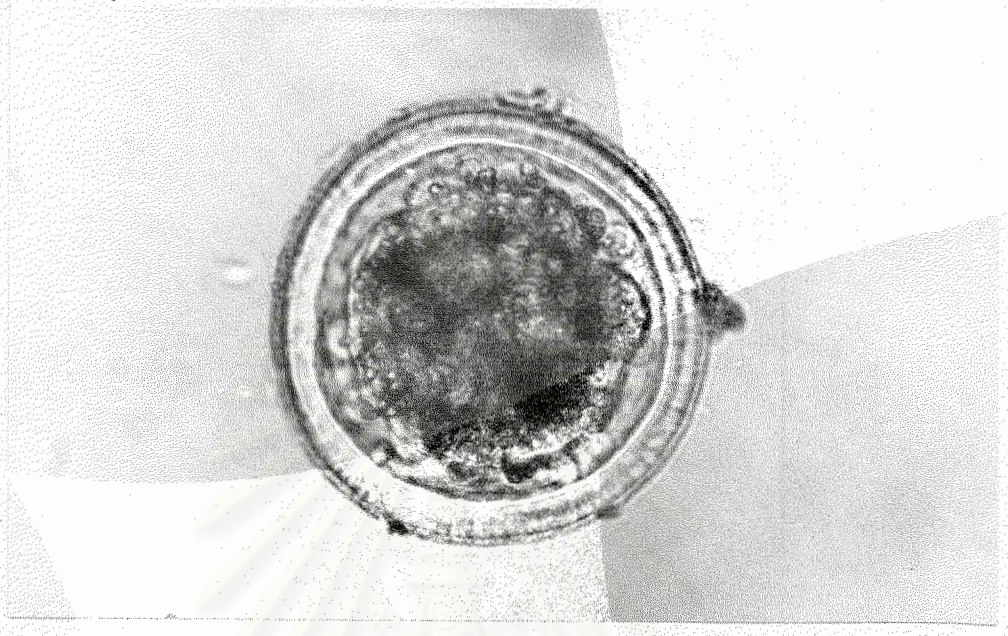
จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า วิธีการเก็บตัวอ่อนโดยไม่ผ่าตัดที่ใช้ในโคและกระบือปลักสามารถนำมาดัดแปลงใช้กับกระบือมูร่าห์ได้ โดยใช้เครื่องมือและวิธีการชะล้างตัวอ่อนจากโพรงมดลูกเช่นเดียวกัน โดยสามารถเก็บตัวอ่อนจากการตกไข่ตามธรรมชาติจากการเก็บ 5 ครั้ง ได้ตัวอ่อน 4 ครั้ง คิดเป็น 80% (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ผลการเก็บตัวอ่อนจากการตกไข่ธรรมชาติ

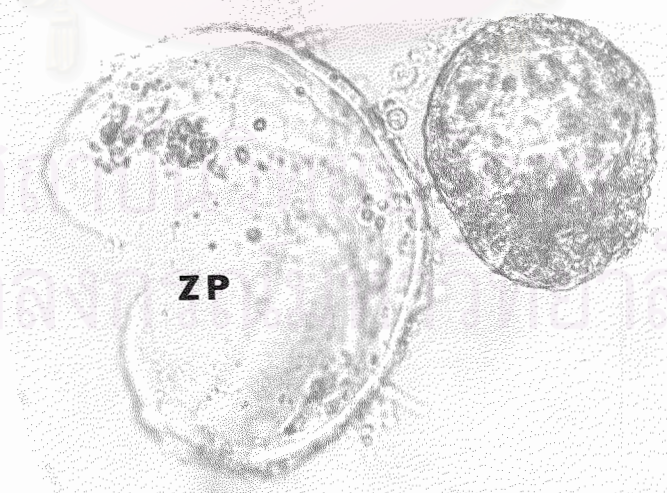
กระบือตัวให้	วันที่เก็บตัวอ่อนหลังผสม (วัน)	ระยะตัวอ่อน
M10	6.0	Compact Morula
M11	5.5	ไม่พบตัวอ่อน
M12	6.0	Compact Morula
M15	7.0	Hatched Blastocyst
M16	6.0	Unfertilized egg

ตัวอ่อนที่เก็บได้ 4 ตัวอ่อน พบเป็นตัวอ่อนปกติ 3 ตัวอ่อน คิดเป็น 75% โดยเป็นระยะมอรูล่า 2 ตัวอ่อน ที่เก็บวันที่ 6.0 (รูปที่ 3) และตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่หลุดจากชั้นเปลือกหุ้ม (รูปที่ 4) ส่วนตัวอ่อนที่ผิดปกติคือ ตัวอ่อนที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิมีเซลล์โคโรนาหุ้มรอบ (รูปที่ 5, 6) สำหรับตัวอ่อนจำนวน 1 ตัวอ่อน มอรูล่า จากตัวให้ M12 ได้ทำการย้ายฝากในกระบือตัวรับ

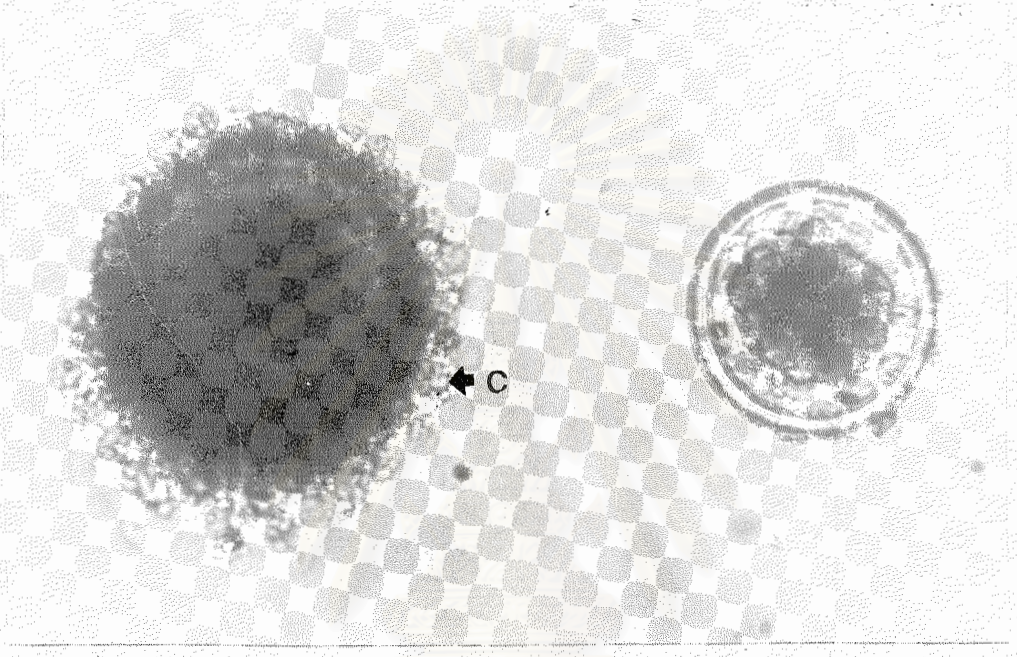
ผลการกระตุ้นการตกไข่เพิ่มด้วยฮอร์โมน พี.เอ็ม.เอส.จี พบว่ากระบือตัวให้ทั้ง 5 ตัว แสดงอาการเป็นสัดหลังฉีดสาร พี จี เอฟ ทู อัลฟา 48 และ 72 ชม. และมีการตอบสนองของรังไข่ (จำนวนคอร์ปัส ลูเทียม และจำนวนฟอลลิเกิลขนาด ϕ> 5 มม. รวมกัน) เฉลี่ยข้างขวาเท่ากับ 6.0 ± 2.0 และข้างซ้ายเท่ากับ 5.0 ± 2.6 จำนวนเฉลี่ยรวมทั้ง 2 ข้าง เท่ากับ 11.0 ± 3.8 โดยกระบือ 3 ใน 5 ตัว เท่านั้นที่มีการตกไข่ และมีจำนวนการตกไข่เฉลี่ยข้างขวาและข้างซ้ายเท่ากันคือ 2.2 ± 2.2 และ 2.2 ± 2.4 ตามลำดับ เฉลี่ยคิดเป็นจำนวนเฉลี่ยต่อตัวเท่ากับ 4.4 ± 4.3 (ตารางที่ 3)



<u>รูปที่ 3</u> : ตัวอ่อนระยะมอรูล่าอายุ 6.0 วัน เก็บจากการตกไข่ตามธรรมชาติ (x 400)

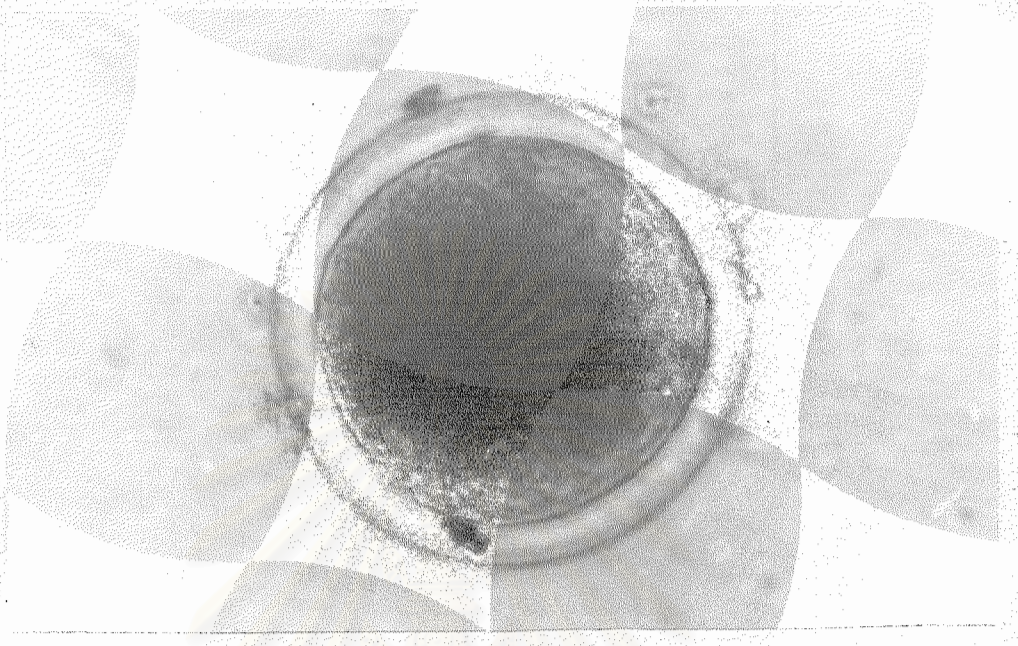


<u>รูปที่ 4</u> : ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่หลุดจากเปลือกหุ้ม (ZP) อายุ 7.0 วัน เก็บจากการตกไข่ตามธรรมชาติ (x 200)



<u>รูปที่ 5</u> : ไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (ด้านซ้าย) มีเซลล์โคโรน่า (C) ล้อมรอบและตัวอ่อนระยะมอรูล่าอายุ 6.0 วัน (ด้านขวา) เก็บจากการตกไข่ตามธรรมชาติ (x 200)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 6 : ไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิหลังเอาเซลล์โคโรน่าที่ล้อมรอบออก (x 400)

ตารางที่ 3 : การตอบสนองของรังไข่ต่อฮอร์โมน พี.เอ็ม.เอส.จี ขนาด 2400-2800 ไอยู และจำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้

กระบือตัวให้	ขนาดพี.เอ็ม.เอส.จี(ไอยู)	จำนวนการตกไข่ (ก) + จำนวนฟอลลิเคิล (ข)			จำนวนการตกไข่ (ก)			จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้ (อัตราการเก็บตัวอ่อน)	
		ขวา	ซ้าย	ทั้งหมด	ขวา	ซ้าย	ทั้งหมด		
M10	2500	9	6	15	6	4	10	1	Morula (10%)
M11	2800	7	4	11	-	-	-	-	

กระบือตัวให้	ขนาดพี.เอ็ม. เอส.จี(ไอยู)	จำนวนการตกไข่ (ก) + จำนวนฟอลลิเคิล (ข) ขวา	ซ้าย	ทั้งหมด	จำนวนการตกไข่ (ก) ขวา	ซ้าย	ทั้งหมด	จำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้ (อัตราการเก็บตัวอ่อน (ค))
M12	2400	5	9	14	3	6	9	4 Morula 1 Damaged Embryo 1 Unfertilized egg (55.6%)
M15	2400	3	1	4	2	1	3	3 Morula (100%)
M16	2800	6	5	11	-	-	-	-
จำนวนทั้งหมด	-	30	25	55	11	11	22	10/22 (45.5%)
ค่าเฉลี่ย± ค่าเบี่ยงเบน	-	6.0± 2.0	5.0± 2.6	11.0± 3.8	2.2± 2.2	2.2± 2.4	4.4± 4.3	-
จำนวนผันแปร (เฉลี่ย)	-	4-15			0-10			

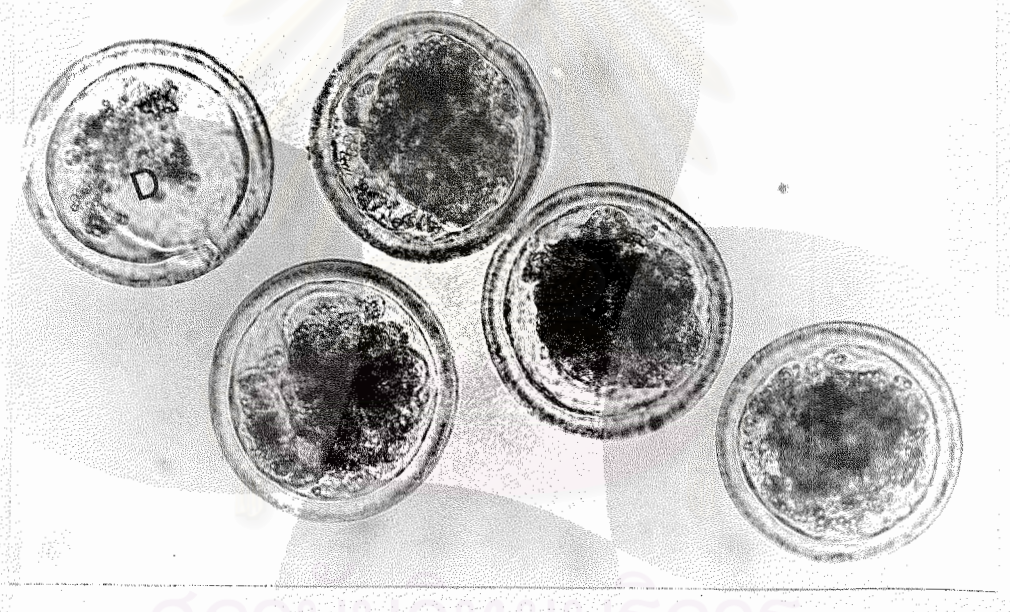
(ก) จำนวนคอร์ปัส ลูเทียม

(ข) จำนวนฟอลลิเคิล ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 5 มม.

(ค) อัตราการเก็บตัวอ่อน (%) เท่ากับจำนวนตัวอ่อนที่เก็บได้ / จำนวนการตกไข่ x 100

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวอ่อนที่เก็บได้หลังการกระตุ้นการตกไข่เพิ่มจากกระบือตัวให้ 3 ตัว (M10, M12 และ M15) รวม 10 ตัวอ่อน มีตัวอ่อนปกติระยะมอรูล่า (Morula) จำนวน 8 ตัวอ่อน ตัวอ่อนที่ถูกทำลาย (Damaged embryo) 1 ตัวอ่อน และไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ (Unfertilized egg) 1 ใบ รูปของตัวอ่อนจากการกระตุ้นการตกไข่เพิ่มแสดงในรูปที่7



รูปที่ 7 : ตัวอ่อนปกติระยะมอรูล่าจำนวน 4 ตัวอ่อน และตัวอ่อนที่ถูกทำลาย (D) จากการเก็บหลังการกระตุ้นการตกไข่เพิ่มด้วยฮอร์โมน พี.เอ็ม.เอส.จี (x 200)

อัตราการเก็บตัวอ่อนหลังการกระตุ้นการตกไข่เพิ่มคิดเป็น 45.5% (10/22) จากกระบือจำนวน 3 ตัว ที่ตรวจพบมีการตกไข่คือ M10, M12 และ M15 พบว่ากระบือที่มีจำนวนการตกไข่สูง (M10) มีอัตราการเก็บตัวอ่อนเท่ากับ 10%(1/10) ในขณะกระบือ M12 และ M16 มีจำนวนการตกไข่ต่ำกว่า มีอัตราการได้ตัวอ่อนเท่ากับ 55.6% (5/9) และ 100% (3/3) ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

สรุปจากการศึกษาครั้งที่สามารถเก็บตัวอ่อนทั้งจากการตกไข่ตามธรรมชาติได้รวม 4 ตัวอ่อน และจากการกระตุ้นการตกไข่ได้รวม 10 ตัวอ่อน รวมทั้งหมด 14 ตัวอ่อน ตัวอ่อนปกติทั้งหมดคิดเป็น 78.6% (11/14) (ตารางที่ 4) ตัวอ่อนทั้งหมดจำนวน 8 ตัวอ่อนใน ระยะมอรูล่าซึ่งได้จากการตกไข่ตามธรรมชาติจำนวน 1 ตัวอ่อน และอีกจำนวน 7 ตัวอ่อน จากการกระตุ้นการตกไข่เพิ่ม ได้ทำการย้ายฝากในกระบือตัวรับ 7 ตัว รายละเอียดแสดงในตารางที่ 1 ตัวอ่อนระยะมอรูล่า 1 ตัวอ่อน ที่เหลือได้ทำการเก็บในไนโตรเจนเหลว เนื่องจากไม่มีตัวรับที่เหมาะสมและที่เหลืออีก 2 ตัวอ่อนได้บันทึกภาพเก็บไว้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

074481 I47952104

ตารางที่ 4 สรุปผลการเก็บตัวอ่อนจากการตกไข่ตามธรรมชาติ และจากการกระตุ้นการตกไข่เพิ่ม

กระบือตัวให้	การเก็บตัวอ่อนจาก		จำนวนตัวอ่อนทั้งหมด	ตัวอ่อนปกติ (%)
	การตกไข่ตามธรรมชาติ	การกระตุ้นการตกไข่เพิ่ม		
M10	1M	1M	2	2
M11	-	-	-	-
M12	1M	4M, 1D, 1UNF	7	5
M15	1HB	3M	4	4
M16	1UNF	-	1	-
รวมทั้งหมด	4	10	14	11 (78.6%)

M = ตัวอ่อนระยะ Morula
HB = ตัวอ่อนระยะ Hatched Blastocyst
UNF = ไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ
D = ตัวอ่อนที่ถูกทำลาย
(%) = เปอร์เซ็นต์ของตัวอ่อนปกติ = จำนวนตัวอ่อนปกติ/จำนวนตัวอ่อนทั้งหมด x 100

ในส่วนผลการตรวจสอบการตั้งท้องที่ 21 วัน ของรอบวงจรการเป็นสัด โดยตรวจระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนพบว่ากระบือตัวรับ T0, T1, T8, T9 มีระดับเท่ากับ 5.05, 4.15, 3.05 และ 2.34 นาโนกรัม/มล. ตามลำดับ ในขณะที่ตัวรับ T3, T4 และ T7 มีค่าของโปรเจสเตอโรนน้อยกว่า 1 นาโนกรัม/มล. (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ผลการตรวจระดับโปรเจสเตอโรนที่ 21 วัน ของการตั้งท้องและการตรวจท้อง โดยการล้วงตรวจผ่านทางทวารหนักที่ 60-90 วันของการตั้งท้อง

กระบือตัวรับ	จำนวนตัวอ่อน	ระดับโปรเจสเตอโรน (นก./มล.)	การล้วงตรวจทางทวารหนัก
T0	2	5.1	(-)
T1	1	4.2	(-)
T8	1	3.1	(-)
T9	1	2.3	(-)
T3	1	<1	(-)
T4	1	<1	(-)
T7	1	<1	(-)

และจากการล้วงตรวจการตั้งท้องผ่านทางทวารหนักในกระบือตัวรับทั้ง 7 ตัว ที่ประมาณ 60-90 วันของการตั้งท้อง พบว่ากระบือตัวรับทุกตัวไม่ตั้งท้อง (ตารางที่ 5) มดลูกที่ตรวจพบมีขนาดเล็กไม่ขยาย ยกเว้นในตัวรับ T0 ที่พบมีมดลูกขยายขึ้นเล็กน้อย แต่ไม่เท่ากับมดลูกของการตั้งท้องที่ 60-90 วัน

วิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค และอุปกรณ์การเก็บตัวอ่อนที่ใช้ในโค (Kobayashi et al., 1981) และในกระบือปลักไทย (Lohachit et al., 1988) สามารถนำมาใช้ในการเก็บตัวอ่อนกระบือมูร่าห์ได้ โดยสามารถเก็บตัวอ่อนจากการตกไข่ตามธรรมชาติได้ถึง 80% และจากการกระตุ้นการตกไข่เพิ่มได้ 46% ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาในกระบือปลัก (Chantaraprateep et al., 1988a)

ในการศึกษาครั้งนี้ ได้จัดโปรแกรมการตกไข่เพิ่มไว้หลังจากการเก็บแบบตกไข่ใบเดียว โดยมีวัตถุประสงค์จะตรวจสอบความเป็นไปได้ของการเก็บตัวอ่อนโดยเฉพาะความเป็นไปได้ของการสอดผ่านคอมดลูกของตัวให้แต่ละตัว และนอกจากนี้ยังเป็นการประเมินคุณ

ภาพของกระบือตัวให้โดยดูจากตัวอ่อนที่ได้ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่ากระบือตัวให้ 2 ตัว M11 และ M16 ที่ให้ผลตอบสนองต่อการฉีดฮอร์โมน พี.เอ็ม.เอส.จี ต่ำและไม่มีการตกไข่ จะเป็นกระบือตัวให้ที่ไม่ให้ตัวอ่อน หรือได้ไข่ที่ไม่ปฏิสนธิจากการเก็บตัวอ่อนแบบตกไข่ตามธรรมชาติ ตรงข้ามกระบือตัวให้ 3 ตัว ที่สามารถเก็บตัวอ่อนได้ทั้งหมด 10 ใบ เป็นกระบือที่สามารถเก็บตัวอ่อนได้ทุกตัวเมื่อเก็บตัวอ่อนแบบตกไข่ตามธรรมชาติ แม้การศึกษานี้จะใช้กระบือตัวให้เพียง 5 ตัว แต่การประเมินคุณภาพของกระบือตัวให้โดยการใช้โปรแกรมการเก็บตัวอ่อนแบบตกไข่ตามธรรมชาติก่อนการทำการเพิ่มการตกไข่ น่าจะเป็นแนวทางสำคัญต่อการคัดเลือกกระบือหรือสัตว์ที่จะใช้เป็นแม่พันธุ์ผลิตตัวอ่อน โดยเฉพาะในการกระตุ้นการตกไข่เพิ่มเพื่อจุดประสงค์ให้ได้ตัวอ่อนจำนวนมากในกระบือ ซึ่งมีปัญหาอย่างมาก

ปัญหาหลักของการกระตุ้นการตกไข่เพิ่มในกระบือคือ ความผันแปรของการตอบสนองจากการศึกษาพบว่ากระบือตัวให้ 5 ตัวที่ฉีดด้วย ฮอร์โมน พี.เอ็ม.เอส.จี ขนาด 2400-2800 ไอยู มีการตอบสนองของรังไข่ (จำนวนคอร์ปัส ลูเทียม และจำนวนฟอลลิเกิล ϕ>5 มม.) ตั้งแต่ 4-15 อัน การใช้ขนาดสูง 2800 ไอยู ในกระบือ 2 ตัว แม้จะให้ผลตอบสนองสูงแต่ไม่มีการตกไข่จึงไม่สามารถเก็บตัวอ่อนได้ ขณะเดียวกันเมื่อทำการลดขนาดของฮอร์โมนลงเหลือ 2400-2500 ไอยู สามารถทำให้เกิดการตกไข่ได้ จำนวนเฉลี่ยของการตกไข่ในการศึกษาครั้งนี้ได้เท่ากับ 4.4 ± 4.3 คอร์ปัส ลูเทียม/ตัว และจำนวนตัวอ่อนเท่ากับ 2.0 ตัวอ่อน/ตัว ซึ่งจำนวนที่ได้ใกล้เคียงและสูงกว่าในเอกสารอ้างอิงบางฉบับ Sharifuddien and Jainudeen (1984) ศึกษาการกระตุ้นการเพิ่มการตกไข่กระบือมูร่าห์ก่อนถึงวัยเจริญพันธุ์ ด้วยฮอร์โมน พี.เอ็ม.เอส.จี ขนาด 3000 ไอยู พบว่าได้มีการตกไข่เฉลี่ยวันละ 2.4 คอร์ปัส ลูเทียม แต่ไม่สามาถเก็บตัวอ่อนได้ Singh and Madan (1990) ได้รายงานจำนวนการตกไข่จำนวน 4.75 ± 0.85 คอร์ปัส ลูเทียม เมื่อฉีดฮอร์โมน พี.เอ็ม.เอส.จี ขนาด 2500 ไอยู ในขณะที่ Deshpande et al. (1989) รายงานจำนวนตกไข่เฉลี่ย 4.2 คอร์ปัส ลูเทียม ต่อตัวและได้จำนวนตัวอ่อน 0.7 ตัวอ่อน/ตัว ซึ่งจัดว่าอยู่ในระดับต่ำ Sharifuddin and Jainudeen (1984) ได้เสนอแนะว่าการใช้ โกนาโดโทรปิน รีลิชชิ่ง ฮอร์โมน (จี.เอ็น.อาร์.เอช) ร่วมกับฮอร์โมน พี.เอ็ม.เอส.จี จะช่วยเพิ่มผลตอบสนองได้ หรือการใช้ ฟอลลิกูล่าร์ สติมูเลตติ้ง ฮอร์โมน (เอฟ.เอส.เอช.) ฉีดติดต่อกัน 3-4 วัน จะให้จำนวนการตกไข่และจำนวนตัวอ่อนสูงกว่าฮอร์โมน พี.เอ็ม.เอส.จี Misra et al. (1990) พบว่าจำนวนตกไข่สูงถึง 5.3 ± 7.9 คอร์ปัส ลูเทียมต่อ/ตัว จากการฉีด เอฟ.เอส.เอช ขนาด 21.6 มก. ในขณะที่

Deshpande et al. (1990) รายงานเช่นกันว่าฮอร์โมน เอฟ.เอส.เอช ให้จำนวนตกไข่มากกว่า พี.เอ็ม.เอส.จี และจำนวนตัวอ่อนได้มากกว่า 1-2 ตัวอ่อน/ตัว นอกจากนี้การใช้ฮอร์โมน เอฟ.เอส.เอช ยังให้จำนวนถุงไข่ที่ไม่ตกน้อยกว่าด้วย ถึงอย่างไรก็ตามจำนวนตกไข่และจำนวนตัวอ่อนเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกระบือและโค ด้วยขนาดและชนิดของฮอร์โมนเดียวกันจะต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ Madan et al. (1989) ได้รวบรวมข้อมูลพบว่าจำนวนตัวอ่อนที่ได้ต่อตัวจากการกระตุ้นการตกไข่เพิ่มในกระบือเท่ากับ 0.62 ตัวอ่อน/ตัว เทียบกับในโคเท่ากับ 7.21 ตัวอ่อน/ตัว

สาเหตุของความแตกต่างระหว่างจำนวนตัวอ่อน ที่ได้จากการกระตุ้นการเพิ่มการตกไข่ในกระบือและโคนั้น Danell (1987) ได้ศึกษาจำนวนฟอลลิเกิลหรือถุงไข่ทั้งชนิด Primordial และ Antral พบว่าจำนวนถุงไข่เหล่านี้ในกระบือมูร่าห์มีจำนวนน้อย ซึ่งเป็นเช่นเดียวกันกับที่พบในกระบือปลัก โดย Ty et al. (1990) ดังนั้นเมื่อทำการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน จึงได้จำนวนการตกไข่และจำนวนตัวอ่อนต่อตัวน้อย นอกจากนี้ยังพบว่า การตอบสนองต่อฮอร์โมนโกนาโดโทรปินยังขึ้นกับระดับเฉลี่ยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือด ในกระบือที่มีระดับเฉลี่ยของฮอร์โมนสูงกว่า 2 นาโนกรัม (นก.)/มล. จะให้จำนวนการตกไข่เฉลี่ยเท่ากับ 2-4 คอร์ปัส ลูเทียม/ตัว ในขณะที่หากมีระดับเฉลี่ยของฮอร์โมนน้อยกว่า 0.5 นก./มล. จะให้ผลตอบสนองเพียง 1 คอร์ปัส ลูเทียม/ตัว เท่านั้น (Madan et al., 1989) ปรากฏการณ์เช่นนี้พบได้เช่นกันในโค แต่ต่างกันที่ระดับสูงสุดของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนของโคสูงกว่าในกระบือถึง 7 เท่า ดังนั้นการตอบสนองของการกระตุ้นการเพิ่มการตกไข่ในกระบือจึงต่ำกว่าในโคเมื่อเทียบกัน นอกจากนี้ Chantaraprateep et al. (1988a) เสนอแนะว่าคุณภาพของตัวอ่อนมีส่วนสัมพันธ์กับคุณภาพของกระบือตัวให้ กระบือที่มีคุณภาพดีย่อมจะให้ตัวอ่อนที่มีคุณภาพดีด้วย ดังนั้นในการคัดเลือกตัวให้ที่มีคุณภาพและการเลือกใช้หรือปรับโปรแกรมการกระตุ้นการเพิ่มการตกไข่ น่าจะเป็นแนวทางการเพิ่มการผลิตตัวอ่อนที่มีคุณภาพจากกระบือ

ในส่วนระยะของตัวอ่อนนั้น พบว่าตัวอ่อนกระบือมูร่าห์มีการพัฒนาตัวในอัตราเดียวกับกระบือปลักไทย (Chantaraprateep et al., 1988b) โดยตัวอ่อนที่เก็บ ณ วันที่ 6.0 จะอยู่ในระยะมอรูล่า และวันที่ 7.0 จะอยู่ในระยะบลาสโตซีส การศึกษานี้สอดคล้องกับ Drost and Elsden (1985) ซึ่งชี้ให้เห็นว่าตัวอ่อนของกระบือแม่น้ำจะมีการพัฒนาตัวในช่วงต้น ๆ เร็วกว่าตัวอ่อนของโคประมาณ 24 ชั่วโมง เทียบในระยะของ

ตัวอ่อนเดียวกัน การศึกษานี้นับเป็นข้อมูลสำคัญในการย้ายฝากตัวอ่อนในกระบือโดยเฉพาะอย่างยิ่งช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอ่อน เป็นไปได้ว่าความสำเร็จของการเก็บตัวอ่อนที่ค่อนข้างต่ำจากรายงานในเอกสารอ้างอิง ส่วนหนึ่งน่าจะมีสาเหตุจากการเก็บตัวอ่อนในระยะเวลาที่ไม่เหมาะสมโดยการยึดเอาแบบอย่างของในโคเป็นบรรทัดฐาน

ผลของการย้ายฝากตัวอ่อนจากกระบือมูร่าห์ไปยังกระบือตัวรับ ซึ่งเป็นกระบือปลักไทย จากการตรวจท้องโดยการล้วงตรวจผ่านทางทวารหนักไม่พบมีการตั้งท้องเกิดขึ้นในกระบือตัวรับทั้ง 7 ตัว ทั้ง ๆ ที่ตัวอ่อนที่ถ่ายฝากจัดว่ามีคุณภาพดี รวมทั้งกระบือตัวรับมีการเป็นสัดใกล้เคียงกับอายุของตัวอ่อนที่ทำการย้ายฝาก และระยะเวลาการเก็บจนถึงการย้ายฝากสั้นไม่เกิน 1 ชม. หรือตลอดจนชนิดของน้ำยาล้างเก็บตัวอ่อน ซึ่งเป็นน้ำยาคุณภาพดีบริสุทธิ์ ปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้เป็นปัจจัยหลัก ๆ ที่สำคัญของการย้ายฝากตัวอ่อนซึ่งไม่น่าจะเป็นสาเหตุของการล้มเหลวของการตั้งท้องของตัวอ่อน เป็นที่น่าสังเกตว่าในกระบือตัวรับจำนวน 4 ใน 7 ตัว มีค่าระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูง Kamonpatana et al. (1981) รายงานว่าในช่วงตั้งท้องของกระบือปลักระดับของโปรเจสเตอโรนจะสูงกว่า 1.47 นก./มล. และกระบือจำนวน 1 ใน 4 ตัว ดังกล่าวมีขนาดของมดลูกขยายเล็กน้อยเมื่อล้วงตรวจการตั้งท้องที่ประมาณ 3 เดือน ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าอาจเกิดการตายของตัวอ่อนของกระบือมูร่าห์เกิดขึ้นในโพรงมดลูกของกระบือปลัก Drost et al. (1986) ได้รายงานความล้มเหลวของการเกิดการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนของกระบือแม่นั้นจำนวน 13 ตัวอ่อน ไปยังตัวรับซึ่งเป็นโคพันธุ์โฮลสไตน์ในขณะที่ตัวอ่อนของโคสามารถพัฒนาได้ระยะหนึ่งในมดลูกของกระบือปลักแต่เกิดการแท้งเกิดขึ้น - ความล้มเหลวของการตั้งท้อง ได้พบเช่นกันในการย้ายฝากตัวอ่อนระหว่างแพะไปแกะหรือแกะไปยังแพะ โดยจะเกิดการแท้งหรือการล้มเหลวของการตั้งท้องก่อนกำหนด (Hancock and McGovern, 1968) หรือจากหนูเม้าส์ไปยังหนูแรท (Tarkowski, 1962) ได้มีข้อสันนิษฐานว่าสาเหตุของความล้มเหลวของการตั้งท้อง หรือการตายของตัวอ่อนหรือการแท้งก่อนกำหนดการตั้งท้อง เกิดจากการปฏิเสธการยอมรับของผนังมดลูกของตัวรับต่อเซลล์ของตัวอ่อนโดยปฏิกริยาทางภูมิคุ้มกัน (Immuno Incompatability) ปฏิกริยาดังกล่าวน่าจะเป็นในระดับของเซลล์ของตัวอ่อนที่เรียกว่า "Intra Embryonic Incompatability" ทั้งนี้จากการทดลองของ Fehilly et al., 1984a) พบว่าด้วยวิธีทางจุลศัลยกรรมหากนำเอาส่วนหนึ่งของตัวอ่อนของแกะมารวมกับอีกส่วนหนึ่งของตัวอ่อนของแพะ ซึ่งเรียก

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวอ่อนที่รวมกันนี้ว่า "Chimaeric embryo" พบว่าตัวอ่อนดังกล่าวสามารถฝังตัวและตั้งท้องคลอดออกมาเป็นสัตว์ที่มีลักษณะของสัตว์ทั้งสองชนิดเรียกว่า "Chimaera" ได้

การเกิดการตายของตัวอ่อนต่างชนิดในมดลูกของสัตว์ตัวรับ Drost et al. (1986) ได้ให้ข้อเสนอแนะว่าอาจเกิดจาก 2 ปัจจัยคือ ปัจจัยแรกผิวเซลล์ตัวอ่อนไม่สามารถแตะกับผิว Endometrium ของมดลูกตัวรับ ดังนั้นปุ่มรก (Caruncles) จึงไม่สามารถเกิดได้ หรือปัจจัยที่สองคือเซลล์ของตัวอ่อนชนิด Trophoblast สามารถเกิดการฝังตัวเข้าไปในเนื้อเยื่อของมดลูกได้ แต่ในลักษณะที่มากกว่าปกติ การเกิดปฏิกริยาการฝังตัวที่มากเกินไปทำให้เกิดสภาพเนื้อตายของเนื้อเยื่อรกของทั้งด้านของตัวอ่อนและด้านของตัวแม่ ซึ่งผลตามมาคือเกิดการตายของตัวอ่อนตามมา อย่างไรก็ตามการเกิดความล้มเหลวของการเจริญจนสมบูรณ์ของตัวอ่อนต่างชนิดในโพรงมดลูกของสัตว์ตัวรับ ที่กล่าวเบื้องต้นเป็นเพียงข้อสันนิษฐานเหตุผลที่แท้จริงของการไม่เข้ากันทางอิมมูน (Immune Incompatability) ยังเป็นสิ่งที่ไม่สามารถพิสูจน์ได้แน่ชัด

การศึกษาการย้ายฝากตัวอ่อนระหว่างกระบือต่างสายพันธุ์ จากการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นที่ชี้ให้เห็นว่าจากการใช้เทคนิคทางชีวภาพ โดยการชะล้างเอาตัวอ่อนของสัตว์พันธุ์หนึ่งไปฝากในมดลูกของสัตว์อีกพันธุ์หนึ่ง ยังไม่สามารถทำได้สำเร็จคือไม่เกิดการตั้งท้องขึ้น หนทางของการศึกษาหาสาเหตุคือ การทำให้เกิดความเป็นไปได้โดยวิธีอื่น ๆ ร่วมอาทิเช่น การทำให้สัตว์ตัวรับยอมรับตัวอ่อนของสัตว์ต่างชนิดว่าเป็นตัวอ่อนของมันเองโดยการให้ (pretreatment) สัตว์ตัวรับด้วยเลือดหรือน้ำเชื้อของสัตว์ตัวให้ตัวอ่อน (Bratanov and Dikov, 1962) หรือโดยอาศัยวิธีทางจุลศัลยกรรม (Micromanipulaton) ของตัวอ่อนต่างชนิดมารวมกัน (fusion) เป็นเนื้อเดียวกัน ดังการทดลองของ Fehilly et al., 1984a; Fehilly et al., 1984b) น่าจะเป็นวิธีที่ทำให้ตัวอ่อนของกระบือมูร่าห์สามารถเจริญได้ในมดลูกของกระบือปลักได้

สรุป

แม้การศึกษาครั้งนี้จะไม่ประสบความสำเร็จในแง่การทำให้เกิดการตั้งท้องในกระบือตัวรับก็ตาม แต่ผลการศึกษาสามารถสรุปประโยชน์เป็นข้อสำคัญ ๆ 5 ประการ

1. ด้วยวิธีการมาตรฐานที่ใช้ในการเก็บตัวอ่อนโคและกระบือปลัก สามารถนำมาใช้ในการเก็บตัวอ่อนในกระบือมูร่าห์ได้เป็นผลสำเร็จ

2. การเก็บตัวอ่อนแบบตกไข่ใบเดียว (Single egg collection) สามารถใช้เป็นแนวทางในการบ่งบอกถึงคุณภาพของกระบือตัวให้ที่จะใช้ในการกระตุ้นการตกไข่หลายใบ (Superovulation)

3. การใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินชนิด พี.เอ็ม.เอส.จี สามารถกระตุ้นให้เกิดการตกไข่หลายใบและได้ตัวอ่อนที่มีคุณภาพ โดยมีข้อควรระมัดระวังในด้านขนาดของฮอร์โมนที่ใช้

4. การศึกษาครั้งนี้ยังชี้ให้เห็นการพัฒนาของตัวอ่อนของกระบือมูร่าห์กับกระบือปลักไทยมีความคล้ายคลึงกัน และแตกต่างจากโคระยะเวลาการเก็บตัวอ่อนที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 6.0-7.0 วัน หลังกระบือแสดงอาการเป็นสัดยืนนิ่งพร้อมผสม การเก็บนอกเหนือจากเวลาดังกล่าวมีแนวโน้มของความสำเร็จลดลง

5. ควรทำการศึกษาต่อไป โดยใช้กระบือตัวให้ (พันธุ์มูร่าห์) และกระบือตัวรับ (กระบือปลัก) มีจำนวนมากขึ้น เช่น 10 และ 20 ตัว ตามลำดับ เพื่อขจัดข้อผิดพลาดเนื่องจากโอกาสของการใช้สัตว์ทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

วิวัฒน์ ชวนะนิกุล 2531. ความรู้ปัจจุบันเรื่องกระบือ. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. หน้า 3.

Bratanov, K. Dikov, D. 1962. Fecondation entre les especes brebris et chevres et obtention d' hybrides inter-species. Proc. IVth Intl Congress Anim Reprod AI. The Hague. p. 744-749. cited by Drost et al.(1986).

Chantaraprateep, P., Lohachit, C., Virakul, P., Kobayashi, G., Techakumphu, M., Kunavongkrit, A. and Prateep, P. 1988a. Ovarian response to gonadotrophin stimulation in swamp buffalo. Buffalo Bullentin. 7(4): 82-86.

Chantaraprateep, P., Lohachit, C., Techakumphu, M., Kobayashi, G., Virakul, P., Kunavongkrit, A., Prateep, P. and Limsakul, A. 1988b. Early embryonic development in Thai swamp buffalo (Bubalus bubalis). Theriogenology, 31(6): 1131-1139.

Chuanchai, V. and Luesakul, C. 1987. Cytogenetic sutdies in swamp buffalo. In : Swamp buffalo reproduction. Chantaraprateep, P., Virakul, P., Lohachit, C. and Kunavongkrit, A. (eds) 2nd edition. Chulalongkorn University Press. PP 319-338.

Danell, B. 1987. Oestrous behaviour, ovarian morphology and cyclical variation in follicualr system and endocrine pattern in water buffalo heifers. Severiges Lantbruks Universitet Uppsala,Sweden. cited by Madan et al.,(1989)

Deshpande, LV., Singal, S.P., Lohan, I.S., Georgie, G.C. and Razdan, M.N. 1989. Superovulation in Murrah buffalo. Proc. 2nd World Buffalo Congress New Delhi India, Dec. 111-114.

Dresser, B.L., Pope, C.E., Kramer, L., Kuehn, G., Dahlhausen, R.D., Maruska, E.J., Reece, B. and Thomas, W.D. 1985. Birth of Bongo antelope (Tragelaphus euryceros) to Eland antelope (Trage laphus oryx) and cryopreservation of Bongo embryos. Theriogenology 23: 190 (Abstract).

Drost, M. and Elsden, R.P. 1985. Blastocyst development in the water buffalo (Bubalus bubalis). Theriogenology 23:191 (Abstract).

Drost, M., Wright, J.M. and Elsden, R.P. 1986. Intergeneric embryo transfer between water buffalo and domestic cattle. Theriogenology. 25(1): 13-23.

Fehilly, C.H., Willadsen, S.M. and Tucker, E.M. 1984a. Interspecific chimaerism between sheep and goat. Nature. 307:634-636.

Fehilly, C.H., Willadsen, S.M. and Tucker, E.M. 1984b. Experimental chimaerism in sheep. J. Reprod. Fert. 70:347-351.

Hancock, J.L., McGovern, P.T. 1968. Transfer of goat x sheep hybrid eggs to sheep and reciprocal transfer of eggs between sheep and goats. Res. Vet. Sci. 9:411-415.

Kamonpatana, M., Virakul, P., Lohachit, C., Kunavongkrit, A., Ngramsuriyaroj, C. and Mathias, E. 1981. Plasma progesterone, oestrone sulphate and LH levels during pregnancy, parturition and postpartum in the swamp

buffaloes (Bubalus bubalis). Proc. 2nd Coordination Meeting of Regional Cooperative Agreement on the Use of Nuclear Techniques to improve domestic buffalo production in Asia, Bangkok, Thailand, 124-134.

Kobayashi, G., Sakamoto, K. and King, S.T. 1981. Results of non-surgical cattle embryo recovery. J. Res. Anim. Husb. 35. 399-400.

Lohachit, C. 1987a. Anatomy and clinical examination on female reproductive organ of swamp buffalo. In : Swamp buffalo reproduction . Chantaraprateep, P., Virakul, P., Lohachit, C. and Kunavongkrit, A. (eds) 2nd edition Chulalongkorn University Press. pp. 93-115.

Lohachit, C. 1987b. Surgical preparation of estrus detector bull. In Swamp buffalo reproduction. Chantaraprateep, P., Virakul, P., Lohachit, C. and Kunavongkrit, A. (eds) 2nd edition Chulalongkorn University Press. pp. 83-90.

Lohachit, C., Chantaraprateep, P., Virakul, P., Kunavongkrit, A. and Bodhipaksha, P. 1988. Technic of embryo transfer in buffalo. In : In vitro fertilization and embryo transfer. M. Kamonpatana (ed) Chulalongkorn University Press. pp 135-200.

Madan, M.L., Singla, S.K., Singh, C., Prakash, B.S. and Jailkhani, S. 1989. Embryo transfer technology in buffaloes : Endocrine responses and limitations. Proc. 2nd World Buffalo Congress, India, Dec. 195-211.

Misra, A.K., Joshi, B.V., Agrawal, P.L., Kasiraj, R. Sivaiah, S. Rangareddi, N.S. and Siddigui, M.U. 1990. Multiple ovulation and embryo transfer in Indian buffalo (Bubalus bubalis). Theriogenology. 33(5): 11131-1141

Sharifuddin, W. and Jainudeen, M.R. 1984. Superovulation and non-surgical collection of ova in water buffalo (Bubalus bubalis). Proc. 10th Int. Con. in Anim. Reprod. and AI Univ. of Illinois. 11: 240.

Singh, C. and Madan, M.L. 1990. Estrus behaviour and ovarian response to superovulation among prepuberal buffaloes. Theriogenology. 33(1): 325 (Abstract).

Summers, P.M., Shephard, A.M., Hodges, J.K,. Kydd, J., Boyle, M.S. and Allen, W.R. 1987. Successful transfer of the embryos of przewatskii's horses (Equus przewatskii) and Grant's zebra (E. caballus). J. Reprod. Fert. 80: 13-20.

Tarkowski, A.K. 1962. Interspecific transfers of eggs between rat and mouse. J. Embryol. Exp. Morphol. 10: 476-495.

Techakumphu, M., Lohachit, C., Chantaraprateep, P., Prateep, P. and Kobayashi, G. 1989. Preliminary report on cryo-preservation of Thai swamp buffalo embryos: Manual and Automatic methods. Buffalo Bullentin. 8(2): 29-36.

Ty,L.V., Nguyen, B.X., Chupin, D. and Driancourt, M.A. 1989. Histological study of follicular population in swamp buffaloes. Proc. II World Buffalo Congress, New Delhi, India, December. p. 122. (Abstract)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณสามารถ ทรงกลด และคุณสาธิต ทรงกลด และเจ้าหน้าที่ของ บริษัทพัฒนาเกษตรและปศุสัตว์จำกัด ที่ได้อนุเคราะห์และให้ความสะดวกด้านสัตว์ทดลองและทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภชที่ได้ให้ทุนสนับสนุนในการวิจัยครั้งนี้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย