สำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

ประสิทธิภาพในการให้ผลผลิตในกระบือเพศเมียที่จำกัดเป็นปัญหาสำคัญที่ทำให้จำนวนประชากรกระบือในโลกมีจำนวนลดลง ซึ่งมักเกิดจากลักษณะทางระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ชนิดนี้เอง เช่น อายุช่วงเข้าสู่วัยสมบูรณ์พันธุ์ที่ล่าช้า การแสดงอาการเป็นสัดไม่ชัดเจน ระยะห่างการคลอดลูกแต่ละตัวยาวนาน อัตราการผสมติดขึ้นอยู่กับฤดูกาล การทำงานของรังไข่ที่ลดลงในช่วงฤดูร้อน ปัญหาการจับสัดที่ด้อยประสิทธิภาพ ระยะเวลาที่เป็นสัดที่ไม่แน่นอน ส่งผลให้กำหนดเวลาตกไข่และผสมเทียมยาก (Madam and Raina, 1984.; Madam, 1998; De Araujo Berber *et al.*, 2002; Neglia *et al.*, 2003; Presicce *et al.*, 2004; Campanile *et al.*, 2005; De Rensis *et al.*, 2005; Paul and Prakash, 2005; Lohachit *et al.*, 2006) ปัญหาดังกล่าวส่งผลให้มีการวิจัยคิดค้นหาวิธีการหรือเทคโนโลยีที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพทางระบบสืบพันธุ์กันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ การศึกษาวงรอบการเป็นสัดของกระบือ การนำเทคโนโลยีชีวภาพมาประยุกต์ใช้ เช่น การผสมเทียม การเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ การย้ายฝากตัวอ่อน การปฏิสนธิภายนอกร่างกาย และการโคลนนิง เป็นต้น อย่างไรก็ตามสำหรับในประเทศไทย ได้มีการศึกษาในเรื่องดังกล่าวมากว่า 30 ปี แต่การนำไปใช้กับเกษตรกรในพื้นที่จริงค่อนข้างมีจำกัด โดยเฉพาะการศึกษาข้อมูลของวิธีการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ในกระบือปลักไทยซึ่งมีข้อมูลงานวิจัยน้อยมากเมื่อเทียบกับงานวิจัยในโค

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ข้อมูลพื้นฐานทางชีววิทยาของกระบือ

กระบือเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ในตระกูล Bovidae ซึ่งเป็นพวกสัตว์เคี้ยวเอื้องที่มีกีบคู่ การแบ่งชนิดและสายพันธุ์ เป็นการแบ่งตามลักษณะภูมิศาสตร์และสถานที่ โดยอาศัยลักษณะรูปร่างภายนอกคร่าว ๆ และมักเรียกชื่อตามภาษาท้องถิ่นอยู่นั้น ๆ โดยไม่มีมาตรฐานที่แน่นอน กระบือในโลกนี้จึงสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1.1 กระบือแอฟริกา เป็นกระบือป่าซึ่งมีเพียงชนิดเดียว คือ *Syncerus caffer*

1.2 กระบือเอเชีย จัดอยู่ใน *Bubalus spp.* มีทั้งหมด 3 ชนิด ได้แก่

1.2.1 กระบือเซเลเบส

1.2.2 กระบือมินโดโร

1.2.3 กระบือป่าอินเดีย

กระบือป่าอินเดีย เป็นกระบือชนิดเดียวเท่านั้นที่ได้นำมาเป็นสัตว์เลี้ยงหรือกระบือบ้าน จึงได้มีการเปลี่ยนชื่อทางวิทยาศาสตร์ เป็น *Bubalus bubalis* และแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ กระบือแม่น้ำ (river buffalo) เป็นกระบือที่พบในประเทศอินเดีย ปากีสถาน อียิปต์ และยุโรปตอนใต้ มีจำนวนโครโมโซม 2n = 50 นิยมเลี้ยงไว้เพื่อผลิตน้ำนมซึ่งให้น้ำนมมากถึงวันละ 5 ลิตร จึงนิยมเรียกกันอีกชื่อหนึ่งว่า กระบือนม มีลักษณะนิสัยชอบแช่ตัวในน้ำสะอาด ส่วนกระบืออีกชนิดหนึ่งคือ กระบือปลัก (swamp buffalo) พบได้ในประเทศแถบทวีปเอเชียตะวันออกและตะวันออกเฉียงใต้ ได้แก่ จีน ไทย ฟิลิปปินส์ มาเลเซีย อินโดนีเซีย พม่า เวียดนาม กัมพูชา และลาว มีจำนวนโครโมโซม 2n = 48 นิยมเลี้ยงไว้เพื่อใช้งานทางการเกษตร ชอบอยู่ตามปลักในท้องนาเพื่อป้องกันแสงแดดและแมลงรบกวน (Mahadevan, 1992)

กระบือปลักไทยมีลักษณะ ขนาด และสี คล้ายกระบือในพม่า กัมพูชา ลาว มาเลเซีย ซึ่งมีสี 2 สี คือ สีเทาเข้มเกือบดำและอีกสี คือสีเผือก-ผิวหนังสีชมพู ส่วนใหญ่รูปร่างอ้วนเตี้ย ลำตัวสั้น ท้องกางกลม แข้งขาสั้น เขากางยาว ปลายเขาโค้งเป็นวงคล้ายพระจันทร์เสี้ยว

2. ข้อมูลพื้นฐานทางระบบสืบพันธุ์ในกระบือปลัก

2.1 วัยเจริญพันธุ์ (puberty)

จากการศึกษาระบบสืบพันธุ์ในกระบือ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับโคทั้งทางกายวิภาคและสรีรวิทยา (Jainudeen, 1983; Bodhipaksha, 1985) กระบือปลักเพศเมียจะเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์พร้อมผสมพันธุ์ที่อายุ 1.6-4 ปี (Chantalakhana, 1981) น้ำหนักเฉลี่ย 378.0 ± 38.0 กิโลกรัม (Intaramongkol *et al.*, 1990) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการเลี้ยงและอาหารเป็นสำคัญ (Arora,1979) Intramongkol และคณะ (1990) แนะนำว่ากระบือเพศเมียที่มีอายุประมาณ 2 ปี และมีน้ำหนักมากกว่า 300 กิโลกรัม สามารถรับการผสมครั้งแรกได้โดยไม่เป็นอันตรายใดต่อตัวสัตว์ และมีรายงานการศึกษาในกระบือปลักในประเทศไทยพบว่ากระบือคลอดลูกตัวแรกที่อายุ

ระหว่าง 3.5-6.68 ปี (Chantalakhana, 1981; Intramongkol *et al.*, 1990) ส่วนเพศผู้จะเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เมื่ออายุประมาณ 2 ปี (Chantaraprateep *et al.*, 1985)

2.2 วงรอบการเป็นสัด

ประเทศไทยได้มีการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของรังไข่ในวงรอบการเป็นสัดในกระบือปลักครั้งแรกในปี ค.ศ. 1974 (Bodhipaksha *et al.*, 1978) โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงของรังไข่ด้วยการล้วงตรวจผ่านทางทวารหนักและตรวจระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน 17- ไฮดรอกซีโปรเจสเตอโรน และฮอร์โมนเอสตราไดออล 17-เบตา ในกระบือท้องว่างจำนวน 10 ตัว ระยะเวลา 120 วัน พบว่าวงรอบการเป็นสัดมีค่าเฉลี่ย 22.1 วัน Chantalakhana (1981) ศึกษาวงรอบการเป็นสัดในกระบือปลักไทยเช่นกัน พบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 20-34 วัน และ 20 วัน จากรายงานของ Wetchrutpimon and Mongkonpunya (1978) ส่วนความแตกต่างและความผันแปรของระยะวงรอบการเป็นสัดของกระบือนั้นเกิดจากการพัฒนาของฟอลลิเคิลที่มีลักษณะเป็นคลื่น (follicular wave) ที่แตกต่างกันในกระบือแต่ละตัว การศึกษาในกระบือส่วนใหญ่มีรายงานในกระบือแม่น้ำ (river buffalo) ซึ่งมีการศึกษาทั้งในลูกกระบือและแม่กระบือ แต่ก็ยังมีการศึกษาน้อยมากเมื่อเทียบกับโค (Techakumphu *et al.*, 2006) อย่างไรก็ตาม Presicce et al. (2003) ได้ทำการศึกษาในกระบือเมดิเตอร์เรเนียน อายุ 5-9 เดือน พบว่าการพัฒนาของฟอลลิเคิลในกระบือมีรูปแบบเช่นเดียวกันกับโค Baruselli และคณะ (1997) ศึกษาคลื่นฟอลลิเคิลในวงรอบการเป็นสัดในกระบือพันธุ์เมดิเตอร์เรเนียนจำนวน 30 ตัว พบว่ามีคลื่นฟอลลิเคิล 1-3 คลื่น ซึ่งส่วนใหญ่ (63.3%) จะมี 2 คลื่น และพบว่าจำนวนคลื่นมีความสัมพันธ์กับระยะลูเตียลและระยะเวลาของวงรอบการเป็นสัด โดยวงรอบการเป็นสัดที่มี 2 คลื่นฟอลลิเคิลจะมีระยะสั้นกว่า 3 คลื่น คือ 21 วัน และ 24 วัน ตามลำดับ สอดคล้องกับการรายงานของ De Rensis and Löpez-Gatius (2006) พบว่าโดยปกติกระบือจะมี 1-2 คลื่นฟอลลิเคิลที่ไม่มีการตกไข่ ตามด้วยคลื่นหลังที่เกิดการตกไข่ ในแม่กระบือส่วนใหญ่จะมี 1-2 คลื่น ส่วนในกระบือสาวจะพบว่ามี 2 คลื่น มีรายงานการศึกษาการพัฒนาของฟอลลิเคิลด้วยการใช้เครื่องอัลตราซาวนด์ (ultrasounography) ในกระบือปลักครั้งแรกในประเทศไทยโดย เอกชาติ (2548) โดยทำการศึกษาในกระบือปลัก ช่วงฤดูร้อนและฤดูหนาวทุก ๆวัน พบว่ามีคลื่นฟอลลิเคิล 1-2 คลื่น ซึ่งส่วนมากจะเป็นรูปแบบ 2 คลื่น

จากการศึกษาการพัฒนาของฟอลลิเคิลในแม่กระบือปลักไทยหลังคลอดจำนวน 16 ตัว ของ Yindee และคณะ (2005) พบว่าแม่กระบือมีการตกไข่ครั้งแรกเฉลี่ย 39 ± 13.5 วันหลังคลอด (อยู่ในช่วง 21-59 วัน) อย่างไรก็ตามการตกไข่ครั้งแรกจะไม่สามารถสังเกตอาการเป็นสัดได้ อาจเนื่องจากระดับฮอร์โมนที่ไม่คงที่หลังคลอด และแนะนำให้มีการผสมได้ในช่วงตกไข่ครั้งที่ 2 หรือภายใน 1-2 เดือนหลังคลอด ทั้งนี้ต้องมีการจัดการอภิบาลอย่างดี

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาสามารถแบ่งระยะต่างๆของวงรอบการเป็นสัดในกระบือออกเป็น 4 ระยะ ดังแสดงในรูปที่ 2 (พีระศักดิ์ และคณะ, 2523b, ประสบ, 2527) และมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

2.2.1 ระยะก่อนเป็นสัด (proestrus)

เป็นระยะที่ฟอลลิเคิลถูกกระตุ้นด้วยอิทธิพลของฮอร์โมนฟอลลิเคิล สติมูเลติง ให้เปลี่ยนเป็นฟอลลิเคิลที่เจริญเต็มที่ (graafian follicle) ซึ่งภายในจะมีของเหลวและมีฮอร์โมนเอสโตรเจนจำนวนมาก ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะสืบพันธุ์ โดยจะมีเลือดมาเลี้ยงมากขึ้นที่เยื่อบุด้านในมดลูก ช่องคลอด และเยื่อบุช่องคลอด ทำให้มีความหนาบวมขึ้น ปากมดลูกเริ่มหย่อน อาจมีของเหลวค่อนข้างใสหรือขาวขุ่นเป็นเมือกไหลออกมา ระยะนี้กระบือจะเริ่มแสดงอาการเป็นสัดเป็นเวลานาน 11 – 28 ชั่วโมง (Kanai and Shimizu, 1983)

2.2.2 ระยะเป็นสัด (estrus)

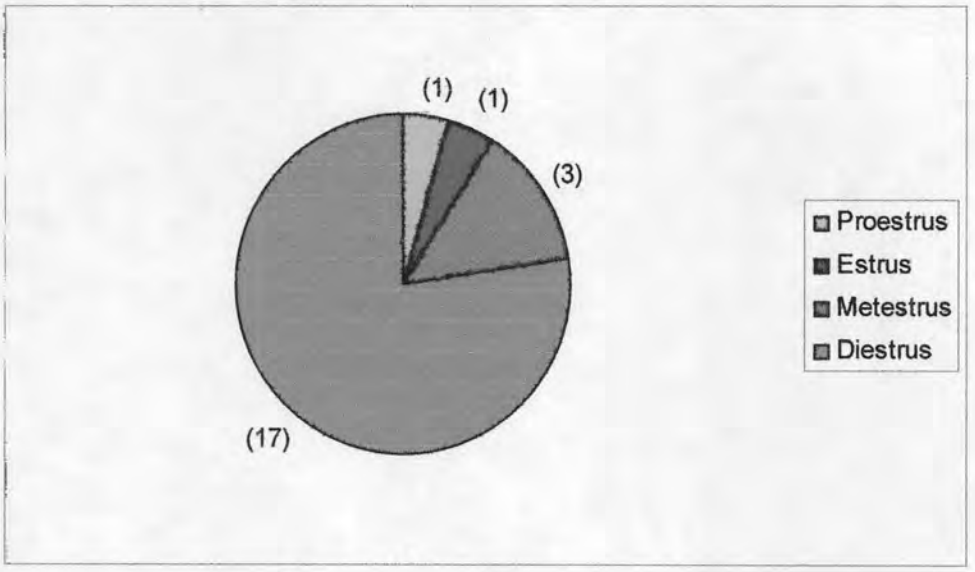
เป็นระยะที่สัตว์แสดงออกถึงการยอมรับการผสมจากเพศผู้ แต่กระบือมีความแตกต่างจากโค โดยกระบือจะไม่ค่อยแสดงอาการสัดต่างๆให้เห็นเด่นชัด มักเป็นสัดเงียบ (silent heat) ระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 28 ชั่วโมง จากการรายงานของ Chantalakhana (1992) พบว่าช่วงระยะการเป็นสัดในกระบือปลักอยู่ระหว่าง 12-36 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามการศึกษาส่วนใหญ่รายงานว่าอยู่ในช่วง 24-36 ชั่วโมง และมีการตกไข่ 6-21 ชั่วโมงหลังสิ้นสุดการเป็นสัด (เฉลี่ย 13.3 ชั่วโมง) (Kanai and Shimizu, 1983)

2.2.3 ระยะหลังเป็นสัด (metestrus)

เป็นระยะที่เกิดหลังเป็นสัด ซึ่งคอร์ปัส ลูเตียมจะเจริญอย่างรวดเร็ว และสร้างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ระยะนี้ยาวนานประมาณ 3 วัน หลังจากระยะเป็นสัด (Fischer and Bodhipaksha, 1992)

2.2.4 ระยะสิ้นสุดการเป็นสัด (diestrus)

เป็นระยะที่นานที่สุดของวงรอบการเป็นสัดประมาณ 17 วัน (Fischer and Bodhipaksha, 1992) โดยคอร์ปัส ลูเตียม จะเจริญและสร้างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมากขึ้น เยื่อบุมดลูกหนาตัวขึ้น เพื่อเตรียมรับการฝังตัวของไข่ที่ได้รับการผสม ในตอนท้ายของระยะนี้คอร์ปัส ลูเตียม จะฝ่อตัวไป และเริ่มมีการเจริญของฟอลลิเคิลขึ้นมาใหม่



รูปที่ 2 ระยะต่างๆของวงรอบการเป็นสัดในกระบือปลัก (จำนวนวัน)

3. การเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ในกระบือ

โปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่นั้นเกี่ยวข้องกับการควบคุมปัจจัยที่สำคัญ 2 ประการ คือ การควบคุมการทำงานของคอร์ปัส ลูเตียมภายในรังไข่ และการเหนี่ยวนำการเจริญและพัฒนาของฟอลลิเคิลและการตกไข่ ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

3.1 <u>การควบคุมการทำงานของคอร์ปัส ลูเตียม ภายในรังไข่</u>

สามารถทำได้โดยใช้โปรแกรมฮอร์โมน 2 รูปแบบ (De Rensis and Löpez-Gatius, 2006) คือ

3.1.1 การฉีดฮอร์โมนพรอสตาแกลนดิน เอฟ ทู แอลฟา (PGF2α) หรือสารสังเคราะห์ในกลุ่มเดียวกัน เช่น คลอโปรสตินอล (cloprostenol), ลูโปรสตีนอล (luprostenol) และไทอะพรอส (tiaprost) (Kornmatitsuk and Kornmatitsuk, 2006) ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้วิธีการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ นอกจากนี้พบว่าสามารถฉีดฮอร์โมนในปริมาณที่ลดต่ำลงบริเวณใต้เยื่อเมือกปากช่องคลอด (intravulvo submucosa) ข้างเดียวกับที่ปรากฏคอร์ปัส ลูเตียม ซึ่งให้ผลดีเช่นเดียวกันกับการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (Rao, 1988; Subramaniam et al., 1989.) ผลการใช้ฮอร์โมนดังกล่าวในกระบือมีลักษณะเช่นเดียวกันกับในโค ซึ่งออกฤทธิ์ทำให้คอร์ปัส ลูเตียม ที่สมบูรณ์เกิดการสลายตัว (luteolysis) ส่งผลให้ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนลดต่ำลงภายใน 24 ชั่วโมง หลังฉีด (De Rensis and Löpez-Gatius, 2006) การหลั่งของฮอร์โมนแอลเอช (LH ; luteinizing hormone) ที่มีความถี่เพิ่มสูงขึ้นกระตุ้นให้มีการพัฒนาของฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ (dominant follicle) ก่อนที่จะเกิดการเพิ่มขึ้นของฮอร์โมนแอลเอชอย่างฉับพลัน (LH surge) เป็นผลให้เกิดการตกไข่ ในขณะเดียวกันฮอร์โมนเอสโตรเจนภายใน

ฟอลลิเคิลจะออกฤทธิ์กระตุ้นให้แสดงพฤติกรรมการเป็นสัด (Mihm *et al.*, 2002) ประสิทธิภาพของการเหนี่ยวนำการเป็นสัดขึ้นอยู่กับระยะของคอร์ปัส ลูเตียม ในวงรอบการเป็นสัด และระยะการพัฒนาของฟอลลิเคิลขณะที่เริ่มโปรแกรมการเหนี่ยวนำ (Chantaraprateep, 1987; Peters, 2005; De Rensis and López-Gatius, 2006) ซึ่งพบว่าควรใช้ในระยะ 5 วัน หลังเป็นสัดถึง 5 วัน ก่อนการเป็นสัดครั้งต่อไป (Chantaraprateep, 1987) จากการศึกษาการฉีดฮอร์โมน PGF2α ครั้งเดียว (single dose) สามารถเหนี่ยวนำการเป็นสัดภายใน 48-144 ชั่วโมงหลังฉีด (Brito *et al.*, 2002) ส่วนการฉีดฮอร์โมน PGF2α 2 ครั้ง (double dose) ระยะห่างกัน 11-14 วัน พบว่าสามารถเหนี่ยวนำการตกไข่ภายใน 4-5 วันหลังฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 2 (Williams *et al.*, 1984) และอาจใช้การผสมเทียมแบบกำหนดเวลาร่วมด้วยได้ (Chantaraprateep, 1987) อย่างไรก็ตามการรายงานของ Peters (2005) พบว่าการผสมเทียมที่สังเกตพบอาการเป็นสัดหลังฉีดฮอร์โมน PGF2α ให้ผลอัตราการตั้งท้องดีกว่าการผสมเทียมแบบกำหนดเวลาหลังการฉีดฮอร์โมน PGF2α 2 ครั้ง ผลของอัตราการตั้งท้องจากการใช้โปรแกรมนี้จากการศึกษาในกระบือ แสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบอัตราการตั้งท้องในกระบือภายหลังการใช้โปรแกรมฮอร์โมนพรอสตาแกลนดินในรูปแบบต่างๆ

โปรแกรม	อัตราการตั้งท้อง	เอกสารอ้างอิง
Single or double PGF2α	25-81.2%	Chantaraprateep, 1987
treatment	41.2% (n=17)	Demakarn *et al.*,1990
	50% (n=24)	Wei and Jea, 2006
	45-50%	De Rensis *et al.*, 2005
	25% in non-breeding season	
Double PGF2α plus GnRH treatment	48%	De Rensis *et al.*, 2005

3.1.2 การใช้โปรแกรมการใช้สารโปรเจสเตอโรนหรือโปรเจสตาเจน ซึ่งมีอยู่หลายรูปแบบ เช่น ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดเข้าช่องคลอด ซึ่งมี 2 แบบ คือ PRID (Progesterone-Releasing Intravaginal Device) และ CIDR (Controlled Internal Drug Release) สารนอร์เจสโทเมท (norgestomet) ชนิดฝังใต้ผิวหนังบริเวณใบหู และสารมีเลนเจสทรอล อะซิเตท (melengestrol acetate; MGA) ชนิดให้กินผสมในอาหาร โดยในแต่ละรูปแบบมีความแตกต่างกันในแง่ของความสะดวกในการใช้และประสิทธิภาพการเหนี่ยวนำ

การเป็นสัดและตกไข่ (Kornmatitsuk and Kornmatitsuk, 2006) อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่ในกระบือค่อนข้างจำกัดเมื่อเทียบกับโปรแกรมที่ใช้ฮอร์โมน PGF2α (De Rensis and Löpez-Gatius, 2006) จากการศึกษาของ Revah and Butler (1996) พบว่าโดยปกติแล้วการให้สารโปรเจสเตอโรนในโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดมีระยะเวลาประมาณ 7-9 วัน หรือไม่เกิน 10-12 วัน เนื่องจากการให้สารดังกล่าวในระยะนาน 14-16 วัน อาจเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะการคงอยู่ของฟอลลิเคิล (persistent follicle) ส่งผลทำให้ไข่ (oocyte) ภายในฟอลลิเคิลมีคุณภาพลดต่ำลง จึงมีการใช้ฮอร์โมนชนิดอื่นร่วมในโปรแกรมด้วย อาทิเช่น ฮอร์โมนเอสตราไดออล เบนโซเอท ฮอร์โมนเอสตราไดออล วาลิเรท ฮอร์โมนเอสตราไดออล ไซพิโอเนต ฮอร์โมนเพรกเนนท์ แมร์ ซีรัม โกนาโดโทรปิน (Pregnant Mare Serum Gonadotropin; PMSG) และ ฮอร์โมน PGF2α เป็นต้น สามารถเหนี่ยวนำให้แสดงอาการเป็นสัดและเกิดการตกไข่หลังจากถอดสารโปรเจสเตอโรนประมาณ 43-117 ชั่วโมง (Rao and Sreemannarayanan, 1982) และ 40-96 ชั่วโมง (De Rensis and Löpez-Gatius, 2006)ตามลำดับ และอัตราการเหนี่ยวนำการเป็นสัดอยู่ระหว่าง 80-93% (Rao and Sreemannarayanan, 1982; Rajamahendran and Thamotharam, 1983; Barile *et al.*, 2001) ขึ้นอยู่กับความแตกต่างในรายละเอียดของโปรแกรมต่างๆที่เลือกใช้ อัตราการตั้งท้องของโปรแกรมการใช้สารโปรเจสเตอโรนในรูปแบบต่างๆ แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การเปรียบเทียบอัตราการตั้งท้องในกระบือภายหลังการใช้โปรแกรมสารฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในรูปแบบต่างๆ

โปรแกรม	อัตราการตั้งท้อง	เอกสารอ้างอิง
PRID®	27.8%	Chantaraprateep, 1987
PRID®+PMSG	48.5%	Chantaraprateep, 1987
	70.5% (n=17)	Presicce *et al.*, 2005
PRID®+PGf2α+ PMSG	28.2% (n=117)	Neglia *et al.*, 2003
CRESTAR®+PMSG	38.89% (n=36)	Vadhanakul *et al.*, 1988
	37.68% (n=69)	Virakul *et al.*, 1992

3.2 การเหนี่ยวนำการเจริญและพัฒนาของฟอลลิเคิลและการตกไข่

นิยมใช้ฮอร์โมนหลายชนิดร่วมกัน (De Rensis and Löpez-Gatius, 2006) แต่ที่นิยมมากที่สุดคือการใช้ GnRH ร่วมกับฮอร์โมน PGF2α จากข้อมูลการใช้โปรแกรม Ovsynch-TAI ในโคที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย De Araujo Berber และคณะ (2002) ได้นำมาใช้ศึกษาในกระบือลูกผสมระหว่างพันธุ์มูร่าห์กับพันธุ์เมดิเตอร์เรเนียนในประเทศบราซิล จำนวน 15 ตัว พบว่าอัตราการตกไข่มีค่า 93.3% ระยะห่างระหว่างฉีดฮอร์โมน GnRH ครั้งที่ 2 จนกระทั่งตกไข่เท่ากับ 26.5±9.6 ชั่วโมง โดยสังเกตการตกไข่ด้วยวิธีอัลตราซาวน์ทุก 6 ชั่วโมง หลังจากฉีดฮอร์โมน GnRH ครั้งที่ 2 จนกระทั่งไข่ตก ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับการศึกษาของ Paul and Prakash (2005) ในกระบือพันธุ์มูราห์ในประเทศอินเดียจำนวน 10 ตัว แล้วทำการล้วงตรวจคลำรังไข่หลังฉีด GnRH ครั้งที่ 2 ทุก 2 ชั่วโมง จนกระทั่งไข่ตกหรือครบ 96 ชั่วโมงหลังจากนั้น พบว่าอัตราการตกไข่และระยะห่างระหว่างฉีด GnRH ครั้งที่ 2 จนกระทั่งตกไข่เท่ากับ 90% และ 23±1.3 ชั่วโมง ตามลำดับ ปริมาณฮอร์โมนแอลเอชในกระแสเลือดสูงสุดที่ 1.2-3.0 ชั่วโมงหลังฉีด GnRH ครั้งที่ 2 สำหรับผลอัตราการตั้งท้องจากการใช้โปรแกรม Ovsynch-TAI ในแต่ละการศึกษาแสดงในตารางที่ 3 สิ่งสำคัญที่ทำให้การใช้โปรแกรม Ovsynch-TAI ประสบความสำเร็จคือการปรากฏฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ (dominant follicle ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่าหรือเท่ากับ 10 มิลลิเมตร) ในเวลาเริ่มต้นฉีด GnRH ครั้งแรก (Vasconcelos *et al.*, 1999; Thatcher *et al.*, 2001; De Rensis *et al.*, 2005) ซึ่งสามารถตรวจสอบโดยการอัลตราซาวนด์รังไข่ (De Rensis *et al.*, 2005) หรือใช้การฉีดฮอร์โมน PGF2α 2 ครั้ง (double dose) ก่อนเข้าสู่โปรแกรมที่เรียกว่า "Co-synch" (Moreira *et al.*, 2001) นอกจากนี้จากรายงานของ De Rensis and Löpez-Gatius (2006) ยังพบว่าลำดับท้อง (parity) เป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการใช้โปรแกรมดังกล่าว ซึ่งพบว่าแม่กระบือที่มีลำดับท้องมากให้ผลดีกว่าแม่กระบือท้องแรก (51% และ 35% ตามลำดับ) อัตราการตั้งท้องหลังใช้โปรแกรม Ovsynch ทั้งการผสมเทียมด้วยการจับสัดและผสมเทียมแบบกำหนดเวลาไม่มีความแตกต่างกัน คือ 30% และ 33% ตามลำดับ (Paul *et al.*, 2005) และจากการศึกษาเปรียบเทียบข้อมูลการใช้โปรแกรม Ovsynch ระหว่างโคและกระบือของ De Rensis and Löpez-Gatius (2006) ได้แนะนำว่าควรผสมเทียมแบบกำหนดเวลา ในช่วงระหว่างชั่วโมงที่ 12-24 หลังจากฉีด GnRH ครั้งที่ 2

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบอัตราการตั้งท้องในกระบือภายหลังการใช้โปรแกรม Ovsynch-TAI ในรูปแบบต่างๆ

โปรแกรม	อัตราการตั้งท้อง	เอกสารอ้างอิง
GnRH+ PGF2α+ GnRH	36.0% (n=111) (3 mts)	Neglia *et al.*, 2003
	40.9% (n=44) (25-30d)	Presicce *et al.*, 2005
	34.0% (n= 243) (40d)	Campanile *et al.*, 2005
	56.5% (n=154) (30d)	De Araujo Berber *et al.*, 2002
GnRH+ PGf2α+ LH	64.2% (n=151) (30d)	De Araujo Berber *et al.*, 2002

4. การใช้โปรแกรมเหนี่ยวนำการตกไข่และผสมเทียมแบบกำหนดเวลาในโค

ได้มีรายงานการศึกษาการใช้โปรแกรมเหนี่ยวนำการตกไข่และผสมเทียมแบบกำหนดเวลา(Ovsynch-TAI) ในโคจากหลายพื้นที่ในโลกเป็นจำนวนมาก ซึ่งมีวัตถุประสงค์การใช้โปรแกรม Ovsynch-TAI หลายประการ ได้แก่ การแก้ไขปัญหาโคไม่เป็นสัดหลังคลอด การลดระยะวันท้องว่าง (days open) และระยะห่างระหว่างการคลอด (calving interval) การรักษาภาวะถุงน้ำในรังไข่ (cystic ovary) การลดปัญหาแรงงานในการจับสัดเพื่อผสมเทียม การจัดการผสมเทียมและประสิทธิภาพทางระบบสืบพันธุ์ของฝูงในฤดูกาลที่พบว่ามีอัตราการผสมติดต่ำ เป็นต้น (Mialot *et al.*, 1999; De Jarnette and Marshall, 2003; Baruselli *et al.*, 2004; Crane *et al.*, 2006; Sakase *et al.*, 2007) ในโคพบว่าโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและตกไข่รูปแบบนี้ได้รับการพัฒนาอย่างมาก มีการใช้ในหลายรูปแบบ ให้ผลดี และได้รับการยอมรับสูง โดยโปรแกรม Ovsynch-TAI เป็นโปรแกรมพื้นฐานที่นิยมใช้ในโค (Kornmatitsuk and Kornmatitsuk, 2006) เริ่มจากการฉีด GnRH ครั้งแรก ซึ่งส่งผลให้ฮอร์โมนแอลเอชสูงขึ้นเพื่อทำให้เกิดการตกไข่ของฟอลลิเคิลขนาดใหญ่ และเหนี่ยวนำให้เกิดการเจริญพัฒนาของฟอลลิเคิลชุดใหม่พร้อมกัน (Thatcher *et al.*, 1989; Thatcher *et al.*, 1993; Wolfenson *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 2000b) หลังจากนั้น 7 วัน จึงฉีดฮอร์โมน PGF2α เพื่อสลายคอร์ปัส ลูเตียมที่อยู่ตามธรรมชาติ หรือคอร์ปัส ลูเตียม ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วย GnRH ในครั้งแรก จากนั้น 48 ชั่วโมงต่อมาจะฉีด GnRH ครั้งที่ 2 เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการตกไข่ที่ระยะ 24-32 ชั่วโมงถัดมา ทำให้สามารถทำการผสมเทียมที่ 16 ชั่วโมงหลังฉีด GnRH ครั้งที่ 2 โดยไม่จำเป็นต้องสังเกตอาการเป็นสัด (Pursley *et al.*,1995) อย่างไรก็ตามการศึกษาส่วนใหญ่เป็นการศึกษาในแม่โคที่เคยให้ลูกซึ่งพบว่าได้ผลดี แตกต่างจากโคสาวซึ่งพบว่าประสิทธิภาพของโปรแกรม Ovsynch-TAI ค่อนข้างต่ำมาก (Pursley *et al.*, 1995; Schmitt *et al.*, 1996) ส่วนการศึกษาของ Tenhagen และคณะ (2004) ถึงอัตราการตั้งท้องของโคนมที่ใช้โปรแกรม Ovsynch-TAI ใน

ประเทศเยอรมัน พบว่าอัตราการผสมติดจากการผสมครั้งแรกหลังคลอดในแม่โคให้ลูกตัวแรกสูงกว่าแม่โคให้ลูกหลายตัวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ 37.9% และ 31.6% ตามลำดับ การเปรียบเทียบผลการตรวจการตั้งท้องของแม่โคนมที่ใช้โปรแกรม Ovsynch-TAI ในประเทศอุรุกวัย โดยตรวจหาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในน้ำนมของวันที่ 20 หลังจากผสมเทียมเทียบกับการตรวจท้องจากการล้วงตรวจผ่านทางทวารหนัก 45 วันหลังผสมเทียม พบว่ามีความแตกต่างของอัตราการตั้งท้องเป็น 33.3% และ 20% ตามลำดับ ซึ่งอาจมีการตายของตัวอ่อนในระยะแรกเกิดขึ้นได้ (Cavestany *et al.*, 2003) อัตราการตั้งท้องของการใช้โปรแกรม Ovsynch-TAI รูปแบบต่างๆในโค แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การเปรียบเทียบอัตราการตั้งท้องในโคภายหลังการใช้โปรแกรม Ovsynch-TAIในรูปแบบต่างๆ

โปรแกรม	อัตราการตั้งท้อง	เอกสารอ้างอิง
GnRH+ PGF2α+ GnRH	36.1% (n=97) (50 d)	Mialot *et al.*, 1999
	48.6% (n=35) (45 d)	Sakase *et al.*, 2005
	28.1% (n=231) (100d)	Cavestany *et al.*, 2003
	30.0% (n= 30)	วีระศักดิ์ และปราจีน, 2543
	29% (n=175) (100d)	De Jarnette and Marshall, 2003
	15.0% (n=100)	Baruselli *et al.*, 2004
	30.6% (n=186) (43 d)	Tenhagen *et al.*, 2001
Ovsynch + CIDR	67.7% (n=31) (45 d)	Sakase *et al.*, 2005

5. การตรวจการตั้งท้องในกระบือ

โดยปกติกระบือมีระยะการตั้งท้องประมาณ 300 – 340 วัน การวินิจฉัยการตั้งท้องนั้นสิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงคือ ต้องมีความแม่นยำสูง ราคาไม่แพง สามารถทำได้ง่ายและสะดวกให้ผลการตรวจทันทีเพื่อหลีกเลี่ยงการตรวจซ้ำ และวิธีการที่ใช้ตรวจนั้นไม่ควรที่จะรบกวนขบวนการตั้งท้องเพราะอาจทำให้เกิดการแท้งได้ (Chantaraprateep, 1987) การตรวจท้องในกระบือมีหลายวิธี ได้แก่

5.1 การล้วงตรวจผ่านทางทวารหนัก (rectal palpation)

สามารถตรวจได้หลังผสม 2 เดือนเป็นต้นไป ซึ่งปฏิบัติตามวิธีการที่ใช้กันทั่วไปเป็นลำดับขั้นตอน โดยเริ่มต้นจากการล้วงตรวจลักษณะปากมดลูก คอมดลูก ปีกมดลูกแต่ละข้างจนสุดปลาย เพื่อตรวจหาความแตกต่างของขนาดปีกมดลูกทั้งสองข้างในกรณีที่ตั้งท้องในระยะแรกๆ จากนั้นตรวจหาลักษณะ กระเพื่อมน้ำ (fluctuation) การเลื่อนหลุดของมดลูกและถุงหุ้มตัวอ่อน (slipping membrane) ปุ่มจากการเกาะระหว่างรกและมดลูก (placentomes) การเด้งกลับของลูก (foetal bump) คลำรังไข่แต่ละข้างเพื่อตรวจหาคอร์ปัส ลูเตียม ดลอดจนเส้นเลือดที่เลี้ยงมดลูก (middle uterine artery) ทั้งสองข้างเพื่อแยกความแตกต่างของด้านที่ตั้งท้องออกจากด้านที่ไม่ตั้งท้อง สำหรับการประมาณอายุของตัวอ่อนที่ 2 เดือน จะพบว่า รังไข่ด้านที่ท้องพบคอร์ปัส ลูเตียม ปีกมดลูกมีทั้งสองข้างมีขนาดไม่เท่ากัน ข้างที่ท้องจะมีขนาดเพิ่มขึ้น พบลักษณะกระเพื่อมน้ำ การเลื่อนหลุดของมดลูกและถุงหุ้มตัวอ่อน (พีระศักดิ์ และคณะ, 2523a; สุวรรณา และคณะ, 2526)

5.2 การตรวจวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (progesterone analysis)

มีรายงานการวิจัยตรวจหาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ (RIA) ในกระบือครั้งแรกในปี ค.ศ. 1976 (Kamonpatana *et al.*, 1976) ซึ่งสามารถนำมาใช้ศึกษาสถานภาพของระบบสืบพันธุ์ของกระบือได้ จากการศึกษาประสิทธิภาพของการตรวจท้องในระยะ 24 วันหลังผสมด้วยวิธีดังกล่าวพบว่า ระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในพลาสมาในกระบือไม่ท้องและกระบือท้องเท่ากับ <0.3 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ > 0.75 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการศึกษาในโคพบว่าระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ลดลงต่ำกว่าระดับที่สามารถมีการคงอยู่ของการตั้งท้องได้นั้น เป็นสาเหตุหนึ่งที่บ่งบอกถึงการตายของตัวอ่อน (embryonic mortality) (Mann *et al.*, 1998; Mann and Lamming, 1999; Mann and Lamming, 2001) สอดคล้องกับกระบือซึ่งมีการศึกษาในกระบือพันธุ์เมดิเตอร์เรเนียนประเทศอิตาลีจำนวน 243 ตัว เหนี่ยวนำการเป็นสัดและดกไข่ด้วยโปรแกรม Ovsynch-TAI และตรวจระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนหลังผสมในวันที่ 10 และ 20 พบว่า กระบือที่ท้องจะมีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูงกว่ากระบือที่มีการตายของตัวอ่อนในระยะดังกล่าว (Campanile *et al.*, 2005) Leenauraksa และคณะ (1979) พบว่า ในวันที่ทำการผสมระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในพลาสมาจะอยู่ในระดับต่ำประมาณ 0.16±0.20 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้น 24 วัน และ 30 วัน กระบือที่ผสมติดจะมีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดยเฉลี่ย 1.81±0.92 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ 2.05±1.08 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่ง Kamonpatana และคณะ (1980) ได้ทำการศึกษาในขณะที่กระบือตั้งท้องระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในพลาสมาจะคงที่อยู่ในระดับสูง โดยเฉลี่ย 1.47±0.23 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และลดลงทันทีในวันคลอดจนถึงระดับปกติ

5.3 การตรวจท้องด้วยคลื่นความถี่สูง (ultrasonography)

การนำเครื่องอัลตราซาวนด์มาใช้เกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ เริ่มมีการใช้ครั้งแรกในแกะโดยนำมาใช้ในการตรวจท้อง และนับจำนวนลูกอ่อน (Russel and Goddard, 1995). นิยมใช้เครื่องอัลตราซาวนด์ชนิดเรียลไทม์ บีโหมด ในการศึกษาระบบสืบพันธุ์ทางสัตวแพทย์ (Boyd and Omran, 1991) Boyd และคณะ (1990) รายงานว่าความแม่นยำในการตรวจในช่วงก่อน 20 วันแรกจะต่ำ ในกระบือ Pawshe และคณะ (1994) ได้ทำการตรวจท้องระยะแรก สามารถพบส่วนของลูกอ่อน (embryonic proper) ได้ในประมาณวันที่ 20 หลังการผสมและยังพบการเต้นของหัวใจได้ประมาณวันที่ 30 ถ้าพบขาหน้า ขาหลัง ประมาณได้ว่าตัวอ่อนนั้นมีอายุประมาณ 30-60 วัน ถ้าพบการเคลื่อนไหวของตัวอ่อนประมาณได้ว่าอายุของตัวอ่อนประมาณ 50 วัน หากพบกระดูกซี่โครงและกระดูกสันหลังประมาณได้ว่าตัวอ่อนมีอายุประมาณ 60 วัน