



วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ Journal of Biotechnology in Livestock Production

ปีที่ 4 ฉบับที่ 1 เดือนมิถุนายน 2552 Vol.4 ; No. 1 ; June 2009

www.dld.go.th/biotech



เครื่องหมายพันธุกรรมที่สัมพันธ์

ต่อลักษณะไขมันแทรกเนื้อและความนุ่มของเนื้อ

Detection of DNA markers related to marbling and tenderness meat

เครื่องหมายพันธุกรรมที่สัมพันธ์ ต่อลักษณะไขมันแทรกเนื้อและความนุ่มของเนื้อ

Detection of DNA markers
related to marbling and tenderness meat



สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์
กรมปศุสัตว์

DD MAY 07

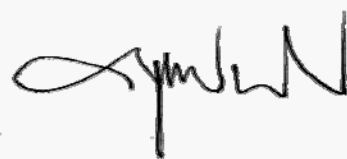
สารจากบรรณาธิการบริหาร

ปัจจุบันการเลี้ยงโคเนื้อในประเทศไทยได้มีการพัฒนาขึ้นอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว จนถือได้ว่าประเทศไทยเป็นผู้นำด้านการผลิตโคเนื้อที่มีคุณภาพที่ดีประเทศหนึ่ง ทั้งนี้เพราะประเทศไทยมีโคเนื้อหลากหลายสายพันธุ์ที่ได้รับการพัฒนาจากทั้งภาครัฐและเอกชน เพื่อผลิตออกมาสนองต่อตลาดและสภาพแวดล้อมระบบการเลี้ยงของไทย อย่างไรก็ตามกรมปศุสัตว์ยังมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องเพื่อยกระดับคุณภาพโคเนื้อให้ดียิ่งขึ้น และให้ผลตอบแทนแก่เกษตรกรมากขึ้น

ดังนั้น สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ จึงได้สนับสนุนการศึกษาและวิจัยในการปรับปรุงและพัฒนาโคเนื้อสายพันธุ์ใหม่ซึ่งโคพันธุ์ดังกล่าวคือ **โคพันธุ์ไทย – แบล็ค** ซึ่งมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม ทั้งยังมีคุณภาพเนื้อที่สูงขึ้น มีความนุ่มและมีไขมันแทรกที่แตกต่างไปจากโคเนื้อที่มีอยู่ในปัจจุบัน เพื่อเพิ่มผลผลิตให้แก่เกษตรกร และยังให้ผลตอบแทนในการเลี้ยงที่สูงขึ้นด้วย

วารสารฉบับนี้นอกจากการนำเสนอผลงานวิจัยด้านการปรับปรุงและพัฒนาโคเนื้อสายพันธุ์ใหม่ ให้มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมและมีคุณภาพดีขึ้นแล้ว ยังได้นำเสนอเนื้อหาสาระในด้านต่างๆ ทางเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ เช่น งานวิจัยด้านการย้ายฝากตัวอ่อนและการโคลนนิ่งโคชาวลำพูนพันธุ์แท้ รวมทั้งการศึกษาวิจัยทางด้านชีวโมเลกุล การสำรวจระดับแอนติบอดีต่อการต้านทานโรค การศึกษาฮอร์โมนที่ควบคุมการให้น้ำนมในโคที่ไม่มีการตั้งท้อง งานวิจัยด้านการผสมเทียมเพื่อเพิ่มอัตราการผสมติด และเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะ งานวิจัยด้านการผลิตน้ำเชื้อเพื่อเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อโคในน้ำยาเจือจาง และการแก้ไขปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ที่มีสาเหตุและปัจจัยมาจากความไม่สมดุลของฮอร์โมนที่มีผลต่อการตกไข่และจำนวนตัวอ่อนในโคพื้นเมืองทางภาคใต้ ฯลฯ

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์หวังเป็นอย่างยิ่งว่าวารสารฉบับนี้จะมีส่วนในการผลักดันให้เกิดนักวิจัยที่มีผลงานทางวิชาการเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ให้เพิ่มยิ่งขึ้น ทั้งนี้เพื่อให้วิทยาการความรู้ทางด้านการผลิตปศุสัตว์ของประเทศไทยได้รับการถ่ายทอดและพัฒนาต่อยอดให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อเกษตรกรในการนำไปประยุกต์ในการเลี้ยงปศุสัตว์ให้ได้ประสิทธิภาพและก้าวหน้ามากยิ่งขึ้น



(นายอยุर्थ หรินทรานนท์)

ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

วัตถุประสงค์

1. ส่งเสริมการศึกษา ค้นคว้าและวิจัยด้านการผลิตและขยายพันธุ์สัตว์
2. รวบรวม เผยแพร่ความรู้ด้านการผลิตและขยายพันธุ์สัตว์โดยเทคโนโลยีชีวภาพ
3. ส่งเสริมความสัมพันธ์ และความร่วมมือระหว่างนักวิชาการและสถาบันต่างๆ

เจ้าของ

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

สำนักงาน

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์
ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง
จ.ปทุมธานี 12000
โทร/โทรสาร 0-2501-2116

กำหนดออก

ปีละ 1 ฉบับ

คณะที่ปรึกษา

ผศช. พรรณพิไล เสกสิทธิ์
ดร. ณชัย ศราทธพันธุ์
ดร. มาลี อภิเมธีอํารง

บรรณาธิการบริหาร

น.สพ. อยุทธิ์ หรินทรานนท์

บรรณาธิการ

สพญ. กัลยา เก่งวิทย์กรรม

ผู้ช่วยบรรณาธิการ

นสพ. วิษณุ ไพศาลรุ่งพนา

กองบรรณาธิการ

นสพ. ไกรวรรณ หงษ์ยันตรชัย
นสพ. สาโรช งามข้า
สพญ. รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล
นสพ. รัตน์ ฉายารัตนศิลป์
สพญ. นุสสรุ วัฒนกุล
นสพ. วิบูลย์ เยี่ยงวิศวกูร
นางจวีรัตน์ แสนโกชน์
นายสายัณห์ บัวบาน

ผู้จัดการวารสาร

นางจวีรัตน์ แสนโกชน์
นายวิบูลย์ เยี่ยงวิศวกูร
นางสาวทัศนีย์ พูนข้า

ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ เป็นวารสารทางวิชาการของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ กำหนดออกปีละ 1 ฉบับ คือ เดือนกรกฎาคม วารสารนำลงบทความ ผลงานค้นคว้าวิจัยด้านการผลิตปศุสัตว์ ทั้งด้านการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ การจัดการอาหาร สุขภาพ และระบบสืบพันธุ์ ตลอดจนการขยายพันธุ์ และการใช้เทคโนโลยีชีวภาพที่ก้าวหน้าในการปรับปรุงและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตปศุสัตว์ด้านต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น คณะผู้จัดทำวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ยินดีรับเรื่องจากทุกท่านที่ส่งมาเพื่อเผยแพร่ และเพื่อความสะดวกในการพิจารณา ขอเสนอแนะดังนี้

1. เรื่องที่จะนำลง

1.1 งานทดลอง วิจัย ทางวิชาการ (Technical/ Research papers) หรือวิทยานิพนธ์ เป็นการเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้ทำขึ้นเอง

1.2 บทความ (Articles) และย่อเอกสาร (Literature reviewed) ทางวิชาการ ที่รวบรวมข้อมูล ความคิดเห็นและประสบการณ์ของผู้เขียน

1.3 เรื่องอื่นๆ ที่คณะผู้จัดทำพิจารณาเห็นสมควร

2. ต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่ส่งมาพิมพ์ในวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ไม่ควรเป็นเรื่องที่

เคยพิมพ์ หรือ กำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อลงพิมพ์วารสารอื่น

2.2 ต้นฉบับเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ พิมพ์บนกระดาษ เอ 4 จำนวนไม่เกิน 12 หน้า โดยจัดพิมพ์ด้วย Microsoft Word for Windows หรือใช้ชนิดและขนาดตัวอักษรตามที่กำหนด 2.3 ไม่มีการส่งคืนต้นฉบับ

3. การลำดับเรื่องในต้นฉบับ

เพื่อให้ขบวนการการพิจารณาผลงานวิชาการและการดำเนินการจัดพิมพ์วารสารเป็นไปอย่างเรียบร้อยรวดเร็ว และถูกต้อง จึงจำเป็นต้องให้ผู้เขียนผลงานวิชาการปฏิบัติตามข้อกำหนดอย่างเคร่งครัด ดังนี้

3.1 ให้ส่งต้นฉบับผลงานวิชาการจำนวน 1 ชุด และยังไม่ต้องส่งแผ่นบันทึกข้อมูล (Diskette)

3.2 ต้นฉบับผลงานวิชาการที่ส่งมา ให้ตรวจสอบความถูกต้องของตัวสะกด รูปแบบการจัดพิมพ์ผลงาน

วิชาการให้ถูกต้องตามที่กำหนด

3.3 ส่งแผ่นบันทึกข้อมูลมาให้ เมื่อผลงานวิชาการนั้นได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการวิจัยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ แล้วเท่านั้น โดยเลขาคณะกรรมกรวิจัยฯ จะแจ้งกลับไปยังเจ้าของผลงานวิชาการพร้อมส่งต้นฉบับเพื่อให้แก้ไขตามที่คณะกรรมการวิจัย สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ให้ข้อเสนอแนะ

บันทึกผลงานวิชาการที่แก้ไข ถูกต้องแล้วตาม
ข้อแนะนำของคณะกรรมการวิจัย สำนัก
เทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ลงใน Diskette
ขนาด 3.5 นิ้ว หรือ CD-ROM ใช้โปรแกรม Microsoft
Word for Windows โดยมีรายละเอียดบนสติกเกอร์
ติดหน้า Diskette หรือ CD-ROM ดังนี้

ชื่อผลงานวิชาการ.....
ชื่อเจ้าของผลงาน.....
ชื่อไฟล์.....
ที่อยู่ เบอร์โทรศัพท์/E-Mail.....

หรือส่งทาง Internet มายัง jureeratn@gmail.com

3.4 ต้นฉบับผลงานวิชาการที่ส่งให้
คณะกรรมการวิจัย สทป. พิจารณา จะเป็นบทความที่
จัดรูปแบบได้ถูกต้องตามที่กำหนดเท่านั้น หากผลงาน
วิชาการที่ส่งมาไม่ถูกต้องตามข้อกำหนด จะจัด
ส่งคืนให้เจ้าของผลงานวิชาการกลับไปแก้ไขให้
ถูกต้อง

3.5 ต้นฉบับที่จัดส่งมาต้องชัดเจน ทั้งเนื้อหา
และรูปภาพประกอบผลงานวิชาการ โดยส่งมาที่

ส่ง
บรรณาธิการวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์
สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์
ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง
จ.ปทุมธานี 12000

3.6 หรือติดต่อสอบถามได้ที่

นางจूरรัตน์ แสนโกชน์

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ถ.ติ

วานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง

จ. ปทุมธานี 12000

โทรศัพท์ 02-967-9791 หรือ 02-967-9792

โทรสาร. 02-5011386

ดูข้อมูลรายละเอียดเกี่ยวกับข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน
ผลงานที่ได้ <http://www.dld.go.th/biotech>

4. การลำดับเรื่อง

4.1 **ชื่อเรื่อง** (Title) ควรตั้งชื่อให้สั้นและสื่อ
ความหมายให้ดี และพิมพ์โดยใช้ขนาดตัวอักษร 18
และตัวหนา

4.2 **ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน** (Author and
co - workers) เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทย
และภาษาอังกฤษ วางกึ่งกลางใต้ชื่อเรื่อง พร้อมทั้ง
สถานที่ทำงานที่ติดต่อได้สะดวกพิมพ์ไว้ใต้ชื่อ
คณะผู้วิจัย โดยใช้ขนาดตัวอักษร 16 และตัวปกติ

4.3 **บทคัดย่อ** (Abstract) เขียนสั้นๆได้
เนื้อความคลุมวัตถุประสงค์ วิธีการ และผลการ
ทดลอง ความยาวไม่ควรเกิน 3% ของตัวเรื่อง
บทคัดย่อต้องมีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ แยก
หน้าต่างหากจากกัน

4.4 **คำสำคัญ** (Key words) เป็นคำหรือ
ข้อความสั้นๆ ที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไป
ของการทดลองนั้นๆ รวมกันแล้วไม่เกิน 5 คำ หากไม่
สามารถแปลเป็นภาษาไทยได้ให้ใช้ภาษาอังกฤษแทน
โดยการพิมพ์อยู่ใต้บทคัดย่อ (ขึ้นบรรทัดใหม่)

4.5 เนื้อหา (Text) สำหรับงานวิจัย

ประกอบด้วย

4.5.1 บทนำ(Introduction) อธิบายถึง ปัญหาและวัตถุประสงค์และควรมีการตรวจเอกสาร (literature review)

4.5.2 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) อธิบายเครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการ ทดลอง วิธีการที่ใช้ ถ้าคิดค้นขึ้นควรอธิบายอย่างละเอียด แต่ถ้าเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปให้เขียนใน ลักษณะอ้างอิงถึง ถ้าเป็นเครื่องหมายตราหรือชื่อ การค้า ควรทำเป็น foot note ไว้ที่ด้านล่างของหน้า นั้น

4.5.3 ผล (Results) รายงานผลการทดลอง เป็นคำบรรยาย ให้ละเอียดและเข้าใจง่าย โดย แบ่งเป็นหลายๆ ย่อหน้า และจัดข้อความที่มีเนื้อหา เดียวกันไว้ด้วยกัน หากเป็นไปได้ควรเสนอในรูปของ ตารางหรือรูปภาพ หรือกราฟพร้อมทั้งบรรยาย ประกอบ ทั้งนี้ตาราง รูป หรือกราฟ ไม่ควรแสดงผลที่ เหมือนกัน

- ตาราง (Tables) ควรพิมพ์ให้ชัดเจนเหมาะสม กับหน้า ต้องมีความหมายในตัวเอง และมีคำอธิบาย ตารางอยู่เหนือตารางนั้นๆ

- รูปภาพ (Figures) ควรเป็นภาพขาว – ดำ ภาพสีหากจำเป็นผู้เขียนต้องเสียค่าใช้จ่ายเองอธิบาย รายละเอียดไว้ใต้รูปนั้นๆ

4.5.4 วิจารณ์ (Discussion) เป็นการ วิจารณ์ผลการทดลอง โดยมีจุดมุ่งหมาย เพื่อให้ผู้อื่น เห็นคล้อยถึงหลัก 3585 การที่แสดงออกมาจากผล การทดลอง หรือเพื่อสนับสนุน หรือคัดค้านทฤษฎีที่มี ผู้เสนอมาก่อน หรือเพื่อเปรียบเทียบกับผลการ ทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น ผู้เขียนควร

พยายามเน้นถึงปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อ การวิจัยในอนาคตและเส้นทางที่จะนำไปใช้เป็น ประโยชน์

4.5.5 สรุป (Conclusion) เขียนใจความที่ สำคัญและคุณค่าของงานเพื่อให้ผู้อ่านเข้าใจง่ายขึ้น

4.5.6 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) ควรมีในกรณีที่ได้รับความ ช่วยเหลือ หรือความร่วมมือที่สนับสนุนงาน ค้นคว้าวิจัยนั้นๆ

4.5.7 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. กรณีที่อ้างอิงในเนื้อเรื่อง ควรอ้างอิง ดังนี้คือ

1. กรณีที่อ้างจากการตรวจเอกสาร โดย ผู้อื่นๆ ให้ใช้คำว่าอ้างถึงโดย (cited by)

2. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นคนไทย เมื่อ เป็นประธานของประโยค ใช้ “วิบูลย์ และ จีรวัฒน์ (2549), เลิศชัย และคณะ(2549) กล่าวว่า.....” หรือ เมื่อรายงานอยู่กลาง หรือท้ายประโยค ใช้ (วิบูลย์, 2549) หรือมีเอกสารอ้างอิงในเรื่องเดียวกันมากกว่า 1 ฉบับ ให้ใช้ (ถาวรและคณะ, 2547; นริศ และสิน สมุทร, 2543))

3. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นชาว ต่างประเทศ เมื่อเป็นประธานของประโยค ใช้ “Rudbeck and Dissing (1998), Kashi et al. (1990) กล่าวว่า..... “ หรือเมื่อผู้รายงานอยู่ระหว่าง กลางหรือท้ายประโยค ใช้ (Rudbeck and Dissing, 1998; Kashi et al.,1990))

4. กรณีอ้างถึงบุคคลหรือเรื่องที่ไม่เคยลง พิมพ์มาก่อน (personal communication) ให้อ้าง เฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปลงในรายชื่อ

เอกสารอ้างอิง เช่นsimilar results (Walker,J.M., unpublished data),for other protocols (Walker,J.M., personal communication)

ข. การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง ควรขึ้นต้นเอกสารอ้างอิงภาษาไทยก่อน เขียนเรียงตามลำดับพยัญชนะของผู้เขียน ถ้าเป็นภาษาอังกฤษใช้ชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง แล้วตามด้วยปีชื่อเรื่องชื่อหนังสือ หรือชื่อย่อวารสาร ปีที่ ฉบับที่ และหน้าที่ย่ออ้างอิง ดังตัวอย่าง

วิบุรณ์ ตูลารักษา และ จุรีรัตน์ แสนโกชน. 2549. การสกัด ดีเอ็นเอ กเซลล์รากขนในโคนมไทยไฮลสไดน์. การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 2 “ก้าวทันสมัยกับปศุสัตว์ไทย” วันที่ 24 มกราคม 2549. โรงแรมโซฟิเทล ขอนแก่น. หน้า 452-463.

เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล และกัลยา เก่งวิทยกรรม. 2549. การประเมินวิธีสกัดแยกดีเอ็นเอจากเลือด น้ำเชื้อ และเซลล์รากขนของพ่อพันธุ์โค. สัตวแพทย์สาร. 56 (3):68-79.
Jason, R. H. and Callings, D.F. 1971. Transplacental infection of piglets with a porcine parvovirus. Res. Vet. Sci. 12: 570-572.

กรณีอ้างอิงจากตำรา ให้ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่ตีพิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อตำรา (พิมพ์ครั้งที่เท่าใดและบรรณาธิการหากมี) สำนักพิมพ์ เมืองที่พิมพ์ หน้าแรกและหน้าสุดท้ายที่ย่างถึง ดังตัวอย่าง

Allison, P.D.2005. Survival analysis using SAS: A practical guide 8 th edition. SAS institute Inc.,Cary, NC, USA. 292 pp.

Van Oirschot, J. T. 1986. Hog Cholera. In : Disease of Swine, 6 th ed. Leman, A. D. ed. Iowa state university Press. Iowa. p. 293-297.

กรณีอ้างอิงจากเว็บไซต์ (Online references) ดังตัวอย่าง

Weeden, N.F. 1993. Comparison of DNA extraction protocols. [Online]

<http://home.twony.rr.com/protocol.htm> Access 29/10/2005.

จันทร์หา เป้นตุ้ม จุฑาพร ศรีวิวัฒน์ วรวิทย์ แสงสิงแก้ว และ ฟังพิศ ดุลยพัชร. 2541. อาหารจากข้าวโพด.คู่มือการส่งเสริมการเกษตรที่ 43. แหล่งที่มา:

<http://www.ku.ac.th/agri/cornn/corn.htm>.

27 มีนาคม 2541.

5. การพิมพ์ผลงานทางวิชาการ

ตัวพิมพ์ ให้พิมพ์ดีด หรือใช้เครื่องพิมพ์ (Printer) หมึกพิมพ์ต้องเป็นสีดำ คมชัด สะดวกแก่การอ่านและใช้ตัวพิมพ์แบบเดียวกันทั้งฉบับ กรณีใช้เครื่องคอมพิวเตอร์พิมพ์เพื่อความให้อักษร Angsana UPC 16 ตัวปกติ เท่านั้น ยกเว้นหัวข้อใหญ่ เช่น ชื่อเรื่อง บทคัดย่อ บทนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผลวิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 18 ส่วนหัวข้อย่อย เช่น ชื่อผู้วิจัยและคณะ คำสำคัญ ตารางรูปภาพ เป็นต้น พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 16

กระดาษที่ใช้พิมพ์ ให้ใช้กระดาษขาวไม่มีบรรทัด ขนาดมาตรฐาน A4 (210 X297 มม.) ใช้เพียงหน้าเดียว

การเว้นที่ว่างขอบกระดาษ

- ตั้งกั้นหน้าบนและซ้ายไว้ที่ 2.5 เซนติเมตร
- ด้านขวาและด้านล่างไว้ที่ 2.0 เซนติเมตร

การเว้นระยะในการพิมพ์

- การเว้นระยะระหว่างบรรทัดและการย่อหน้า ควรจัดตามความสวยงาม
- กรณีคำสุดท้ายไม่จบบรรทัดนั้นๆ ให้ยกคำนั้นทั้งคำไปพิมพ์ในบรรทัดต่อไป ไม่ควรตัดส่วยท้ายของ คำไปพิมพ์ในบรรทัดใหม่ เช่น กระบือปลัก ไม่ให้แยกเป็น กระบือ-ปลัก เป็นต้น
- หลังเครื่องหมาย . และ , หรือ; เคาะ 1 เคาะ
- ระหว่างคำสุดท้าย กับเครื่องหมาย . และ , ไม่เว้นช่องว่าง
- ไม่ต้องเว้นช่องว่าง ระหว่างวงเล็บ และคำข้างในวงเล็บ เช่น (รพีพรรณ และคณะ)

การลำดับหน้า

- ลำดับหน้าโดยใช้หมายเลข 1,2,3.....ที่
- กึ่งกลางหน้ากระดาษ

ตาราง รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ

- ตารางประกอบด้วย เลขที่ของตาราง (table number) ชื่อของตาราง (table title) หัวตาราง (table heading) และที่มาของตาราง (ถ้ามี) โดยให้ทำเป็นภาษาอังกฤษหรือภาษาไทยทั้งตาราง พิมพ์อยู่ในหน้าเดียวกันทั้งหมด
- กรณีตารางมีความยาวมาก ไม่สามารถสิ้นสุดในหน้าเดียวได้ ให้พิมพ์ส่วนที่เหลือในหน้าถัดไปโดยพิมพ์เลขที่ตารางและตามด้วยคำว่า (ต่อ)
- กรณีรูปภาพ แผนที่ แผนภูมิ กราฟ ควรเป็นภาพขาวดำ และใช้แนวทางข้างต้น

การพิมพ์ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิต ให้ใช้ตามประมวลนามศาสตร์สากล (International code of nomenclature) คือ **ขีดเส้นใต้** หรือ พิมพ์ด้วยตัวเอน ชื่อวิทยาศาสตร์เป็นไปตามการตั้งชื่อ

ระบบทวินาม (Binomial nomenclature) คือ ประกอบด้วยคำ 2 คำ คำแรกเป็นชื่อ Genus ขึ้นต้นด้วยอักษรตัวใหญ่ คำหลังเป็น specific epithet พิมพ์เว้นวรรคห่างจากคำแรก และขึ้นต้นด้วยอักษรตัวเล็ก ดังตัวอย่าง

จุลชีพ เช่น *Escherichia coli* หรือพิมพ์ตัวเอน *Escherichia coli*

พืช เช่น *Oryza sativa* หรือพิมพ์ตัวเอน *Oryza sativa*

สัตว์ เช่น *Bos taurus* หรือ พิมพ์ด้วยตัวเอน *Bos taurus*

สารบัญ

หน้า

การผลิตโคเนื้อคุณภาพไทย-แบล็คการตรวจสอบเครื่องหมายพันธุกรรม ที่สัมพันธ์ต่อลักษณะไขมันแทรกเนื้อและความนุ่มของเนื้อ	9
ประสิทธิภาพการลดฮอร์โมน PMSG ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัด และผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งในแพะ	16
ผลของขนาดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ต่อการเพิ่มการตกไข่ และจำนวนตัวอ่อนในโคพื้นเมืองภาคใต้	24
คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคที่ใช้กลีเซอรอลชนิด 87 และ 99% ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ตรวจสอบด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ	31
Effects of cell culture and injectable grades of antibiotics on the quality and fertility of frozen-thawed bull semen	44
การสำรวจระดับแอนติบอดีต่อโรคคัลลามัยเดียในโคเขต 1	53
ระดับฮอร์โมนในโคที่ไม่มีลูกแต่ให้นม	60
การผลิตตัวอ่อนโคขาวลำพูนพันธุ์แท้โดยการเก็บเซลล์ไข่จากรังไข่ผ่านทาง ผนังช่องคลอดและการปฏิสนธิในอกร่างกาย	77
การเปรียบเทียบน้ำยาเจือจาง EGG YOLK TRIS ที่มีไข่แดงของ นกกระทา ไก่ และเปิดเป็นองค์ประกอบต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโค	84

การผลิตโคเนื้อคุณภาพไทย-แบล็ค

การตรวจสอบเครื่องหมายพันธุกรรมที่สัมพันธ์ต่อลักษณะไขมันแทรกเนื้อและความนุ่มของเนื้อ
(Detection of DNA markers related to marbling and tenderness meat)

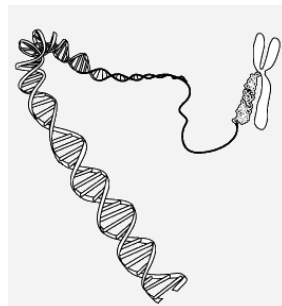
น.สพ. ดร. ณชัย สราภพันธุ

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

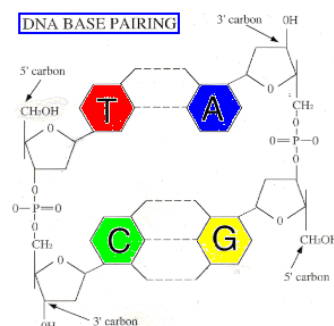
คำนำ

การตรวจหาเครื่องหมายพันธุกรรม(DNA)ของยีน (Gene) ที่สัมพันธ์กับลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจของโคเนื้อ เช่น ไขมันแทรกเนื้อและความนุ่มของเนื้อจะช่วยให้การตัดสินใจคัดเลือกหรือคัดทิ้งโคได้เร็วขึ้นสามารถช่วยลดระยะเวลาในการเลี้ยงลงได้ หากพบเครื่องหมายพันธุกรรมดังกล่าวสามารถทำนายได้เบื้องต้นว่า โคที่ทดสอบจะเป็นโคที่ให้ไขมันแทรกเนื้อและเนื้อจะมีความนุ่ม

ยีนที่สัมพันธ์กับไขมันแทรกเนื้อที่ดำเนินการตรวจในการผลิตโคเนื้อไทย-แบล็ค คือยีน Thyroglobulin (TG) และ Leptin (LT) เครื่องหมายพันธุกรรมของยีน TG และ LT พบอยู่ที่บริเวณส่วน 5-UTR ของยีน TG และ LT จึงเรียกว่ายีน TG5 และ LT5 ซึ่งบริเวณนี้ดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนแปลงชนิดของเบสหนึ่งตำแหน่ง (Single Nucleotide Polymorphism) หรือที่เรียกว่า SNP (สนิป) จากเบส Cytosine (C) เป็น Thymine (T) การเปลี่ยนแปลงชนิดของเบสอาจเกิดขึ้นได้หลายจุดของยีน TG5 และ LT5 ได้มีการศึกษาเครื่องหมายพันธุกรรมของยีนทั้งสองนี้ในโคเนื้อหลายสายพันธุ์ในต่างประเทศพบว่า โคที่มีเครื่องหมายพันธุกรรมของยีนทั้งสองนี้เป็น T จะมีความสัมพันธ์กับไขมันแทรกเนื้อสูงกว่าโคที่มีเครื่องหมายพันธุกรรมเป็น C



รูปที่ 1 ภาพวาดโครโมโซมข้างหนึ่งประกอบด้วยเกลียวสายดีเอ็นเอเส้นคู่



รูปที่ 2 สายดีเอ็นเอหนึ่งเส้นประกอบด้วยโมเลกุลน้ำตาลและเบสเกาะยึดกันเป็นสายด้วยหมู่ฟอสเฟต ดีเอ็นเอสายคู่เกาะยึดกันด้วยพันธะของเบส T กับ A และ C กับ G

Bovine thyroglobulin gene exon 1 and flanks.
(GenBank accession number X05380)

361 gatggtcaag aatccacctg caatgcggga
gacctgggtt tgatccctgg gttgggaaga
421 **tc**ccctggag aagggaatgg ctaccactc
cagtattctg gcctggagaa tcccatggac

Bos taurus gene for leptin, 5' flanking sequence
(GenBank accession number AB070368)

481 gtggagcata ggctccaggt gccagggac
tcagcgggtg caacaca**ctag** gctctagagc
541 ttgggctcgg gagccgtgtc acacggcctt
tgttgctccc agcatgtgga atcttcctca

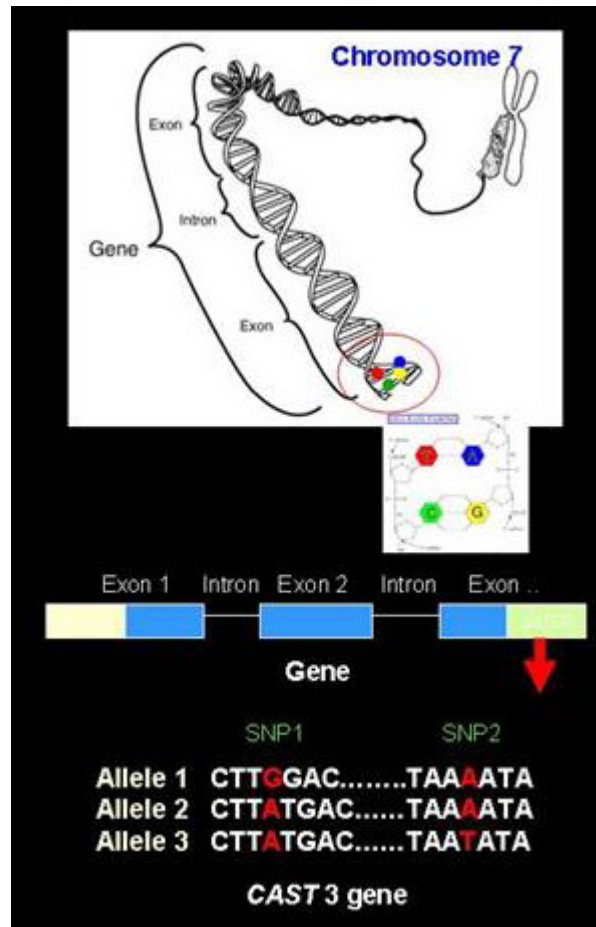
รูปที่ 3 การเรียงลำดับเบสของสายดีเอ็นเอเส้นหนึ่งของยีน TG5 และ LT5 แสดงบริเวณดีเอ็นเอที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของเบสหนึ่งตำแหน่ง (C/T) ณ ตำแหน่งที่ 422 ของยีน TG5 และตำแหน่งที่ 528 ของยีน LT5

ยีน	จีโนไทป์	ลักษณะเนื้อ
TG5<5	TT	ไขมันแทรกสูง
	CT	ไขมันแทรกปานกลาง
	CC	ไม่มีไขมันแทรก

รูปที่ 4 แสดงลักษณะจีโนไทป์ของยีน TG5 และ LT5 ที่มีความสัมพันธ์กับไขมันแทรกเนื้อ

ส่วนยีนที่สัมพันธ์กับความนุ่มของเนื้อที่จะดำเนินการตรวจหาเครื่องหมายพันธุกรรมในการผลิตโคเนื้อไทย-แบล็ค คือยีน Calpastatin (CAST) และ Calpain (CAPN1) เครื่องหมายพันธุกรรมของยีน CAST ที่พบคืออยู่ที่บริเวณส่วน 3-UTR ของยีน CAST มีการเปลี่ยนแปลงของเบสหนึ่งตำแหน่ง (SNP) จาก Adenine (A) เป็น Guanine (G) ได้มีการศึกษาเครื่องหมายพันธุกรรมของยีนนี้ในโคเนื้อหลายสายพันธุ์ในต่างประเทศพบว่า โคที่มีเครื่องหมายพันธุกรรมของยีนนี้เป็น G จะมีความสัมพันธ์กับความนุ่มของเนื้อสูงกว่าโคที่มีเครื่องหมายพันธุกรรมเป็น A

เครื่องหมายพันธุกรรมของยีน CAPN1 มีการเปลี่ยนแปลงของเบสหนึ่งตำแหน่ง (SNP) จาก Thymine (T) เป็น Cytosine (C) ได้มีการศึกษาเครื่องหมายพันธุกรรมของยีนนี้ในโคเนื้อหลายสายพันธุ์ในต่างประเทศพบว่า โคที่มีเครื่องหมายพันธุกรรมของยีนนี้เป็น C จะมีความสัมพันธ์กับความนุ่มของเนื้อสูงกว่าโคที่มีเครื่องหมายพันธุกรรมเป็น T



รูปที่ 5 ยีน CAST3 อยู่บนโครโมโซม 7 ที่บริเวณ UTR3 มีดีเอ็นเอที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของเบสหนึ่งตำแหน่ง (SNP) ซึ่งพบได้ 2 จุด ทำให้มีรูปแบบของสายดีเอ็นเอ (Allele) เป็น 3 แบบ

```
6481 gaaagggaca gatgtggaca ggccagttcc ttctggcat cctccccttg actgggggga
6541 aaac c/t gaggc gcagggctgt gtcaagtac gggggagggc ctgctctaca ggtgacccta
6601 aggctggcac tcagagaaca cccctcccag cctaccccaa ttcaggcctg gctttgggca
```

Bos taurus micromolar calcium activated neutral protease 1 (CAPN1)

GenBank accession number AF248054

รูปที่ 6 การเรียงลำดับเบสของยีน CAPN1 ที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของเบสหนึ่งตำแหน่ง (SNP) หนึ่งจุดที่ตำแหน่ง nt 6545 (C/T)



Gene	Genotype	เนื้อ
CAST 3	11,12	Tender
	22,23	Tough
CAPN 1	TT	Tough
	CT, CC	Tender

รูปที่ 7 การตั้งชื่อจีโนไทป์ของยีน *CAST3* จากรูปแบบการเรียงตัวของสายดีเอ็นเอ (Allele) สองเส้นที่อยู่บนโครโมโซม 7 และการตั้งชื่อจีโนไทป์ของยีน *CAPN1* จากรูปแบบการเรียงตัวของสายดีเอ็นเอที่มีการเปลี่ยนแปลงชนิดของเบสหนึ่งตำแหน่ง (SNP) ซึ่งพบได้ 1 จุด แสดงถึงลักษณะจีโนไทป์ของยีนทั้งสองมีความสัมพันธ์กับความนุ่มของเนื้อหลังจากการบ่ม (Aging)

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อตรวจเครื่องหมายพันธุกรรม(ดีเอ็นเอ) ของยีน(SNP) ที่จำเพาะต่อลักษณะไขมันแทรกเนื้อและความนุ่มของเนื้อด้วยเทคนิค Real-time PCR

2.2 การประเมินคุณภาพเนื้อสูง (High Quality Grade) ได้จากโคที่มีลักษณะจีโนไทป์ของยีนที่มีความสัมพันธ์กับไขมันแทรกเนื้อและความนุ่มของเนื้อสูง

3. วิธีการ

3.1 ออกแบบไพรเมอร์ที่มีความจำเพาะต่อการเรียงตัวของเบสของยีนบริเวณที่ต้องการให้ได้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอเพิ่ม ขึ้นจากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (PCR)

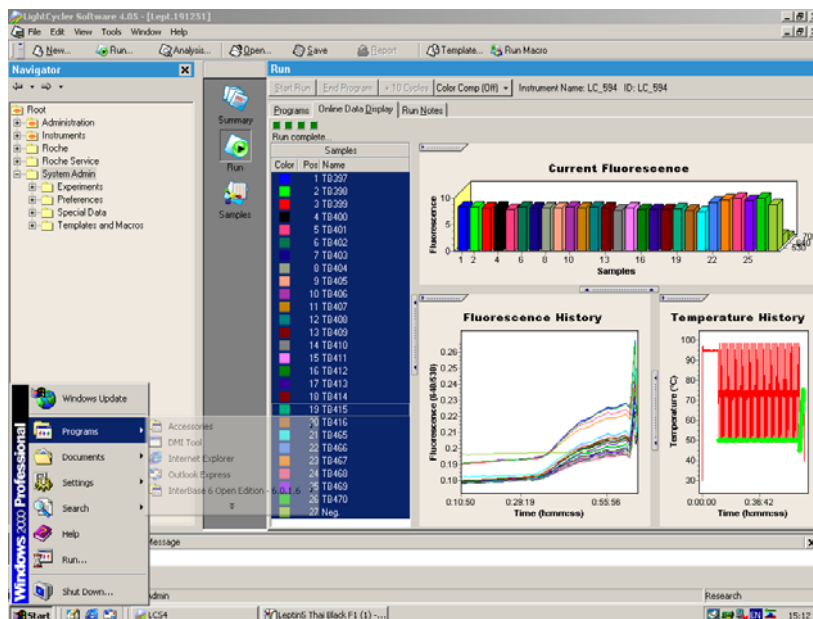
3.2 ออกแบบไพรเมอร์โพรบที่มีความจำเพาะกับเบส (SNP) ที่มีการเปลี่ยนแปลง จำนวนยีนละ 2 โพรบซึ่งติดสีเรืองแสง 2 ชนิด เรียกโพรบแบบนี้ว่า Hybridisation probe

3.3 ทำปฏิกิริยา PCR แบบ Real-time PCR



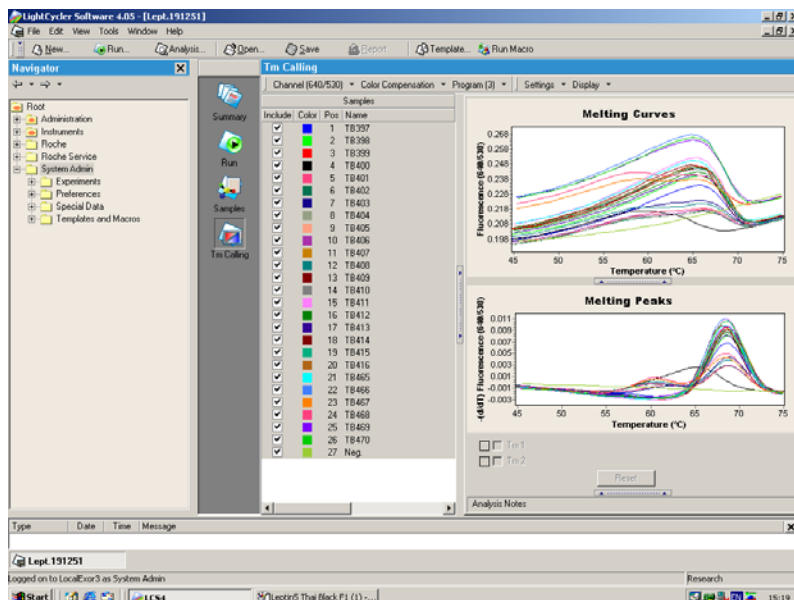
รูปที่ 8 เครื่อง Real-time PCR

3.4 ติดตามผลปฏิกิริยา PCR ที่เกิดขึ้นได้จากจอคอมพิวเตอร์ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

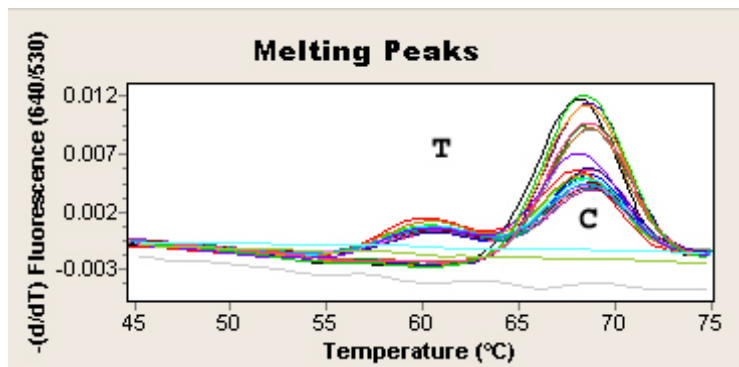


รูปที่ 9 ภาพหน้าจอคอมพิวเตอร์ในขณะที่เครื่อง Real-time PCR กำลังตรวจตัวอย่างดีเอ็นเอ

3.5 วิเคราะห์ผลจากโปรแกรมของเครื่อง LightCycler



รูปที่ 10 เมื่อเสร็จสิ้นปฏิกิริยา PCR เครื่องจะค่อยๆ ให้ความร้อนสูงขึ้น ทำให้ชิ้นส่วนดีเอ็นเอสายคู่ที่ได้ แยกออกเป็น 2 เส้น อุณหภูมิที่ทำให้ดีเอ็นเอแยกออกเป็นสองเส้น 50% เรียกว่า Temperature of melting (T_m)



รูปที่ 11 แสดงผลการวิเคราะห์ค่าของอุณหภูมิ Tm ของแต่ละตัวอย่างที่ทำการตรวจ จะเห็นได้ว่ามีตัวอย่าง 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีอุณหภูมิ Tm เฉลี่ยประมาณ 60 และ 68 องศาเซลเซียส กับกลุ่มที่มีอุณหภูมิ Tm เฉลี่ยประมาณ 68 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ Tm ประมาณ 60 องศาเซลเซียส เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มี SNP เป็น T และ ที่อุณหภูมิ Tm ประมาณ 68 องศาเซลเซียส เป็นชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มี SNP เป็น C

TG5 GENOTYPE	LT5 GENOTYPE	No.	%
CC	CC	6	12.50
CC	CT	20	41.67
CT	CC	16	33.33
CT	CT	5	10.42
TT	CC	1	2.08
		48	100.00

รูปที่ 12 แสดงผลเปรียบเทียบการตรวจเครื่องหมายดีเอ็นเอ (SNP) ของยีน TG5 และ LT5 จากตัวอย่างดีเอ็นเอจากโคเนื้อไทย-แบล็ค F1 เพศเมีย จำนวน 48 ตัวอย่างที่จะนำมาเป็นแม่พันธุ์เพื่อสร้างโคเนื้อไทย-แบล็ค F2 จากตารางจะเห็นได้ว่ามีตัวอย่าง 5 ตัวอย่าง (10.4%) ที่ให้ผลจีโนไทป์ของยีนทั้งสองเป็น CT ที่มีส่วนสัมพันธ์กับไขมันแทรกเนื้อปานกลาง

4. ผลลัพธ์ (Outcome)

ในปีงบประมาณ 2552 (ต.ค.- ธ.ค.) ได้ตรวจเครื่องหมายดีเอ็นเอ (SNP markers) ของยีนจำนวน 2 เครื่องหมาย ในโคไทย-แบล็ค F1 เพศเมีย จำนวน 48 ตัว



รูปที่ 12 กลุ่มโคเนื้อไทย-แบล็ค F1 เพศเมียที่ได้รับการตรวจเครื่องหมายพันธุกรรม เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการคัดเลือกไว้เป็นแม่พันธุ์

5. ตัวชี้วัดความสำเร็จ

ได้ลักษณะจีโนไทป์ของยีนที่มีความสัมพันธ์กับไขมันแทรกเนื้อของโคไทย-แบล็ค F1 ใช้ในการประเมินคุณภาพเนื้อ (Beef Quality Grade) ในโคเพศเมียจำนวน 48 ตัว ช่วยในการตัดสินใจคัดเลือกแม่โคที่จะเป็นโคแม่พันธุ์ เพื่อสร้างโคเนื้อไทย-แบล็ค F2 โดยเทคโนโลยีชีวภาพต่อไป

ประสิทธิภาพการลดฮอร์โมน PMSG ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัด

และผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งในแพะ

พระพงษ์ สำราญทรัพย์¹ สาโรช งามจำ¹ อนนท์ เทื่องสันเทียะ² ณรงค์ เลี้ยงเจริญ²

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลของการลดขนาดของฮอร์โมนเพิร์กแนนท์ แมร์ ซีรัม โกนาโดโทรปิน (PMSG) ในแพะนมพันธุ์ซาเนนที่ได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยวิธีการสอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด (CIDR-G) ต่อการแสดงอาการเป็นสัดและอัตราการผสมติด ใช้แม่แพะนมพันธุ์ซาเนนจำนวน 68 ตัวในการทดลอง แบ่งแพะ ออกเป็น 2 กลุ่มๆละ 34 ตัวทำการสอดฮอร์โมน CIDR-G เป็นเวลา 16 วัน ก่อนการดึง CIDR-G ออกทำการฉีด PMSG เข้ากล้ามเนื้อในวันที่ 14 โดยกลุ่มที่ 1 จำนวน 34 ตัว ฉีด PMSG 150 IU และกลุ่มที่ 2 จำนวน 34 ตัว ฉีด PMSG 250 IU ตรวจอาการเป็นสัดแพะทุกตัว และทำการผสมเทียมโดยปล่อยน้ำเชื้อที่บริเวณคอมดลูก มดลูก ในช่วงเวลาที่ 48 และ 60 หลังถอด CIDR-G ออก น้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้มีจำนวนตัวอสุจิไม่ต่ำกว่า 200 ล้านตัว/โด๊ส หลังจากการผสมเทียมไปแล้ว 35 วัน ตรวจผลการติดตั้งท้องโดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์ จากผลการทดลองพบว่า ในแพะทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันของการแสดงอาการเป็นสัด และอัตราการผสมติด ($P>0.05$) แพะทั้งหมดแสดงอาการเป็นสัด โดยมีระยะเวลาแสดงอาการเป็นสัดในกลุ่มที่ 1 48.2 ± 7.4 ชั่วโมง ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ 2 45.7 ± 9.5 ชั่วโมง และอัตราการผสมติด ในกลุ่มที่ 1 47% (16/34) ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ 2 50% (17/34) สรุปได้ว่าการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย CIDR-G ร่วมกับการลดขนาดของฮอร์โมน PMSG จากเดิม 250 IU เป็น 150 IU มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกัน

คำสำคัญ: การเหนี่ยวนำการเป็นสัด แพะ ฮอร์โมนพีเอ็มเอสจี

เลขทะเบียนผลงาน 51(1)-0208-040

¹ ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพราชบุรี สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

² ศูนย์วิจัยและพัฒนาการย้ายฝากตัวอ่อน สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

Efficiency of PMSG reduction on estrous synchronization and artificial insemination with frozen semen in goats

Peerapong Sumransap¹ Saroch Ngamkhum¹ Anone Thungsanthia² Narong Leingcharoen²

Abstract

The aim of this study was to compare the effective of two dosages of pregnant mare serum gonadotropins (PMSG) in controlled internal drug release (CIDR-G) synchronized Saanen goats on estrus response and conception rate. Sixty eight Saanen goats were used in this study. All goats were randomly divided into two groups and inserted with with CIDR-G in vagina for 16 days and injected with PMSG 150 at day 14. Group I (n=34) was injected with PMSG 150 IU and group II was injected with PMSG 250 IU. All goats were detected for estrus signs and inseminated with one dose of frozen semen which has two hundreds millions spermatozoas at 48 and 60 hr after CIDR-G removals. Pregnancy diagnosis was performed by ultrasound at 35 days after insemination. The results showed there was no statistical difference between the group in estrus response and conception rate ($p>0.05$). All goats showed oestrus. Duration of estrus for both groups were 48.2 ± 7.4 h and 45.7 ± 9.5 h and conception rate of group I was 47% (16/34) and group II was 50% (17/34). It can be concluded that synchronized estrus using CIDR-G with reduction doses of PMSG from 250 IU to 150 IU be the same effective.

Key word: Estrus synchronization, goat, PMSG

¹ Ratchaburi artificial insemination and biotechnology research center, Bureau of biotechnology in livestock production

² Bureau of biotechnology in livestock production

บทนำ

ปัญหาและข้อจำกัดของการปรับปรุงพันธุ์แพะของเกษตรกรคือ จำนวนพ่อพันธุ์แพะที่มีคุณภาพดีมีจำนวนจำกัดและไม่เพียงพอกับความต้องการของเกษตรกร และปัญหาโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์ เช่น โรคแท้งติดต่อ เป็นต้น รวมทั้งการใช้พ่อพันธุ์ตัวเดิมคุมฝูงเป็นเวลานาน มักจะพบปัญหาการผสมเลือดชิด ดังนั้น ถ้านำเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์อันได้แก่ การเหนี่ยวนำการเป็นสัด และการผสมเทียม มาใช้ในการปรับปรุงและขยายพันธุ์แพะ จะช่วยให้การปรับปรุงพันธุ์แพะของเกษตรกรเป็นไปได้อย่างรวดเร็วรวมทั้งทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการผลิตและเป็นการลดต้นทุนด้วย

การเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะที่ได้ผลสำเร็จ ทั้งในระหว่างและนอกฤดูการผสมพันธุ์จะใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนหรืออนุพันธุ์ของโปรเจสเตอโรน (Ak et al., 1998; Amoah and Gelaye, 1990) โดยมันจะไปยับยั้งการหลั่งของลูทีนในซิงฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองส่วนหน้า ทำให้ไม่เกิดการเจริญของกระเปาะไข่และการตกไข่ตามมา หลังจากทีถอดฮอร์โมนออกแพะจะแสดงการเป็นสัดและเกิดการตกไข่ในช่วงเวลาที่คาดได้ (Bretzlaff, 1997; Leboeuf et al., 1998) รูปแบบการใช้ฮอร์โมนที่นิยมกันทั่วไปจะเป็นแท่งซิลิโคนหรือฟองน้ำที่เคลือบฮอร์โมนไว้ สำหรับใส่ในช่องคลอด และชนิดของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนที่ใช้ ได้แก่ เมค็อกซีโปรเจสเตอโรน อะซีเตท และ ฟลูออโรเจสโตน อะซีเตท (Baril et al., 1993; Romano, 1996; Romano, 2004; Motlomelo et al., 2002) โดยมักจะใช้ร่วมกับการให้ ฮอร์โมนเพิร์กเนนซ์ แมร์ ซีรัม โกลาโดโทรปิน (PMSG) ก่อนถอดฮอร์โมนออก 48 ชั่วโมง หรือในช่วงที่ถอดฮอร์โมนออก PMSG ซึ่งมีฤทธิ์ของฮอร์โมนเอฟเอส เอช และ แอล เอช จะไปมีผลทำให้เกิดการเจริญของกระเปาะไข่ รวมทั้งเวลาที่จะเกิดการตกไข่ (Bretzlaff, 1997; Leboeuf et al., 1998) ในขณะเดียวกันก็สามารถใช้ร่วมกับฮอร์โมนพรีสต้าแกลนดิน ซึ่งจะช่วยให้เกิดการเสื่อมสลายของคอร์ปัสลูเทียมในช่วงท้ายของการเหนี่ยวนำการเป็นสัด (Baril et al., 1993; Leboeuf et al., 1998; Motlomelo et al., 2002; Oliveira et al., 2001) ขนาดของ PMSG ที่ใช้ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดร่วมกับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน มีรายงานแตกต่างกันตั้งแต่ 200 - 750 IU (Amarantidis et al., 2004; Dogan, et al., 2004; Fonseca et al., 2005; Freitas et al., 1996; Motlomelo et al., 2002) ในประเทศไทย มีรายงานการใช้ PMSG 100 IU ร่วมกับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสำหรับเหนี่ยวนำการเป็นสัด ของแพะตัวรับในการย้ายฝากตัวอ่อน (Sumretprasong et al., 1995) จะเห็นว่ามีการใช้ฮอร์โมนนี้ในขนาดแตกต่างกันมาก สำหรับแพะที่เลี้ยงในประเทศไทย ซึ่งมักเป็นแพะพันธุ์ลูกผสมพื้นเมือง ที่มีขนาดเล็กกว่า จึงน่าจะศึกษาถึงขนาด PMSG ในขนาดที่ลดลงจากที่รายงานในต่างประเทศในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบผลของการใช้ PMSG 2 ขนาดคือ 150 IU และ 250 IU ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะด้วย CIDR-G

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

การเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแม่แพะ

คัดเลือกแม่แพะนมพันธุ์ชาเนน จำนวน 68 ตัว ที่มีสภาพร่างกายสมบูรณ์ และผ่านการตรวจโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์ อายุ 1 – 5 ปี แบ่งแม่แพะออกเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 34 ตัว โดยวิธีการสุ่มแบบ simple randomization เหนี่ยวนำการเป็นสัดแม่แพะทั้ง 2 กลุ่ม โดยการสอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด (EAZI-BREED™ CIDR® Sheep and Goat Device, Pharmacia & Upjohn, NSW) เข้าช่องคลอด เป็นเวลา 16 วัน และก่อนถอดฮอร์โมนออก 2 วัน ใน กลุ่มที่ 1 ฉีดฮอร์โมนเพิร์กแน้นแมร์ซีรัมโกนาโดโทรปิน (PMSG, Folligon, Intervet International BV, Holland) เข้ากล้ามเนื้อ 150 IU (ตัวละ 0.75 ซีซี) กลุ่มที่ 2 ทำการฉีด PMSG 250 IU (ตัวละ 1.25 ซีซี)

การผสมเทียมแพะ

สังเกตการเป็นสัดในแพะทั้งสองกลุ่ม ทำการผสมเทียมในชั่วโมงที่ 48 และ 60 หลังถอดฮอร์โมนออก แพะทั้งสองกลุ่มโดยปล่อยน้ำเชื้อในคอมดลูก (cervix) โดยทำความสะอาดและเช็ดบริเวณปากช่องคลอดและทำให้แห้ง ทำการสอดเครื่องถ่างช่องคลอด สอดปืนผสมเทียมให้เข้าไปในคอมดลูก และปล่อยน้ำเชื้อ น้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้มีขนาดหลอด 0.25 ซีซี มีจำนวนตัวสperm 200 ล้านตัว/โดส หลังจากทำการผสมเทียมไปแล้ว 35 วันจะตรวจการตั้งท้องด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ ดำเนินการเก็บรวบรวมข้อมูล และเปรียบเทียบอัตราการผสมติด โดยใช้ chi-square test

ผลและวิจารณ์

ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย CIDR-G ร่วมกับ PMSG ในขนาด 150 และ 250 IU นั้นแพะทั้งสองกลุ่มแสดงอาการเป็นสัดทุกตัว และมีระยะเวลาการแสดงการเป็นสัดที่ไม่แตกต่างกัน โดยกลุ่มที่ 1 มีระยะเวลาการแสดงการเป็นสัดเฉลี่ย 48.2 ± 7.4 ชม. และกลุ่มที่ 2 มีระยะเวลาการแสดงการเป็นสัดเฉลี่ย 45.7 ± 9.5 ชม. อัตราการผสมติดในทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกัน โดยกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ให้อัตราการผสมติดร้อยละ 47 (16/34) และ 50 (17/34) ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงร้อยละอัตราการผสมติดและการตอบสนองต่อการเป็นสัด

กลุ่มทดลอง	จำนวน (ตัว)	ขนาดของ PMSG (IU)	การตอบสนองต่อ การเป็นสัด (%)	ระยะเวลาการแสดง การเป็นสัด (ชม.)	อัตรา การผสมติด (%)
กลุ่ม 1	34	150	100	48.2 ± 7.4	47 (16/34)
กลุ่ม 2	34	250	100	45.7 ± 9.5	50 (17/34)

จากผลการศึกษาพบว่าการใช้ฮอร์โมนเพิร์กแน้นแมร์ซีรัมโกนาโดโทรปิน (PMSG) ทั้งสองขนาด คือ 250 IU และ 150 IU ร่วมกับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด (CIDR-G) ในการทดลองนี้มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกันในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะ โดยแพะทั้งสองกลุ่มมีการตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำการเป็นสัดทุกตัว และไม่พบความแตกต่างของระยะเวลาการแสดงการเป็นสัดด้วย สอดคล้องกับการศึกษาของ Motlomelo และคณะ (2002) ที่แพะแสดงการเป็นสัดทุกตัว และมีอัตราการผสมติด 46.71% จากการเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้ CIDR-G ร่วมกับ PMSG ขนาด 300 IU เช่นเดียวกับการศึกษาของ Oliveira และคณะ (2001) ที่พบแพะมีอาการแสดงการเป็นสัดทุกตัวแต่ในการทดลองนี้มีการใช้ฮอร์โมนพรอสต้าแกลนดินร่วมด้วย ระยะเวลาในการแสดงการเป็นสัดของแพะทั้งสองกลุ่มที่ได้รับการสอดฮอร์โมน CIDR-G ร่วมกับการฉีด PMSG มีค่าเฉลี่ย 48.2 ± 7.4 และ 45.7 ± 9.5 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการศึกษาของ Romano (2004) ที่มีค่าเฉลี่ยของระยะเวลาการเป็นสัด 39.2 ± 10.9 ชั่วโมง แต่จะมากกว่าจากการศึกษาของ Motlomelo และคณะ (2002) และ Romano (1996) ที่มีค่าเฉลี่ยระยะเวลาการแสดงเป็นสัดระหว่าง 32.5 -36.1 ชั่วโมง และในส่วนของอัตราการผสมติดพบว่ามีความใกล้เคียงกับการศึกษาที่ผ่านมา ที่มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 46 – 64 % (Baril et al., 1992, Fonseca et al., 1995; Motmelo et a., 2003) การใช้ PMSG ร่วมกับ CIDR-G เพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัดและกำหนดระยะเวลาที่จะผสมเทียมเป็นสิ่งจำเป็น พบว่าเมื่อใช้ PMSG จะทำให้แพะแสดงอาการเป็นสัดเร็วกว่าการใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเพียงอย่างเดียว นอกจากนี้ PMSG ยังมีผลต่อระยะเวลาในการแสดงการเป็นสัดและการตกไข่ด้วย แต่ PMSG ก็มีข้อจำกัดเมื่อใช้บ่อยครั้งหรือใช้ในขนาดที่สูงจะทำให้ร่างกายสัตว์สร้างภูมิคุ้มกันขึ้นมาทำให้ ประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดลดลง แพะอาจจะไม่แสดงการเป็นสัดหรือเกิดการเป็นสัดล่าช้า (Baril et al., 1992; Roy et al., 1999) การตอบสนองของแพะต่อการเหนี่ยวนำการเป็นสัดจะแตกต่างกันตามรูปแบบและชนิดของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Motlomelo et al., 2002; Romano, 1996) พันธุ์ และสภาวะทางโภชนาการ (Mani et al., 1992; Smith, 1991) ความเครียด และสภาพแวดล้อม (Doney et al., 1973) และอิทธิพลของตัวผู้ (Romano, 1998) การพิสูจน์ประสิทธิภาพในการฮอร์โมนต่างๆ

ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัด จะเป็นประโยชน์และเป็นทางเลือกที่จะใช้ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะ ยิ่งไปกว่านั้นก็ยังจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาไปใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตกไข่หลายใบในแพะตัวให้ และการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะตัวรับ ให้ประสบความสำเร็จมากขึ้น

การใช้ฮอร์โมน CIDR-G ร่วมกับ PMSG ในขนาด 150 IU และ 250 IU เพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัดและทำการผสมเทียมหลังจากถอดฮอร์โมนแล้ว 48 และ 60 ชั่วโมง สามารถทำให้แพะแสดงการเป็นสัดและมีอัตราการผสมติดไม่แตกต่างกัน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผู้มีส่วนร่วมในการศึกษาวิจัย ทั้งเกษตรกรเจ้าของฟาร์มและเจ้าหน้าที่ผสมเทียมในสังกัดศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพราชบุรี ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านปฏิบัติการ การเก็บข้อมูล และการอำนวยความสะดวกต่างๆ ในพื้นที่ที่รับผิดชอบ ทำให้การศึกษานี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- Ak, K., Ozturkler, Y., Kasikci, G., Horoz, H., Kilicarslan, R. and Ileri, I.K., 1998. Ankara kecirlerinde farkli ostrus senkronizasyonu yontemleri ve serum progesteron, LH seviyeleri uzerinde arastirmalar. J. Fac. Vet. Med. Univ. Istanbul. 24, 367-377.
- Amarantidis, I., Karagiannidis, A., Saratsi, Ph. and Brikas, P. 2004. Efficiency of methods used for estrous synchronization in indigenous Greek goats. Small Ruminant Research 52 : 247-252.
- Amoah, E.A. and Gelaye, S. 1990. Superovulation, synchronization and breeding of does. Small Rum. Res. 3 : 63-72.
- Baril G, Remy B, Vallet JC, Beckers JF. 1992. Effect of repeated use of progestagen - PMSG treatment for estrus control in dairy goats out of the breeding season. Reprod.Dom. Anim., 27 : 161-168.
- Baril G, Leboeuf B, Saumande J. 1993. Synchronization of estrus in goats: the relationship between time of occurrence of estrus and fertility following artificial insemination. Theriogenology, 49 : 621-628.
- Bretzlaff, K., 1997. Control of the estrous cycle. In: Current therapy in large animal theriogenology. Ed. Youngquist, R.S., W.B. Saunders Company, Philadelphia. pp. 510-514.

- Dogan, I., Nur, Z., Gunay, U., Soylu, M.K. and Sonmez, C. 2004. Comparison of fluorgestone and medroxyprogesterone intravaginal sponges for oestrus synchronization in Saanen does during the transition period. *South African Jour. Anim. Sci.* 34 : 18-22.
- Doney, J.M., Gunn, R.G., Griffiths, J.G., 1973. The effect of pre mating stress on the onset of oestrus and on ovulation rate in Scottish Blackface ewes. *J. Reprod. Fertil.* 35: 381–384.
- Fonseca, J.F., Bruschi, J.H., Zambrini, Demczuk, F.N., Viana, J.H.M., and Palhao, M.P. 2005. Induction of synchronized estrus in dairy goats with different gonadotrophins. *Anim. Reprod.* 2: 50-53.
- Freitas, V.J., Baril, G. and Saumande, J. 1996. Induction and synchronization of estrus in goats: The relative efficiency of one versus two fluorogestone acetate impregnated vaginal sponge. *Theriogenology.* 46 : 1251-1256.
- Leboeuf, B., Manfredi, E., Boue, P., Piacère, A., Brice, G., Baril, G., Broqua, C., Humblot, P. and Terqui, M., 1998. Artificial insemination of dairy goats in France. *Livest. Prod. Sci.* 55, 193-203.
- Mani, A.U., McKelvey, W.A.C., Watson, E.D., 1992. The effects of low level of feeding on response to synchronization of estrus, ovulation and embryo loss in goats. *Theriogenology* 38, 1013–1022.
- Muna, M., Ahmed, M., Malawi, S.E. and Jubara, A.S. 1998. Synchronization of estrus in Nubian goats. *Small Rum. Res.* 30:113-120.
- Motlomelo, K.C., Greyling, J.P.C. and Schwalbach, L.M.J., 2002. Synchronisation of oestrus in goats: the use of different progestagen treatments. *Small Rumin. Res.* 45, 45-49.
- Oliviera, M.A.L., Guido, S.I. and Lima, P.F. 2001. Comparison of different protocols used to induce and synchronize estrus cycle of Saanen goats. *Small Rum. Res.* 40 : 149-153.
- Roy, F., Maurel, M.C., Combes, B., Vaiman, D., Cribiu, E.P., Lantier, I., Pobel, T., Deletang, F., Combanous, Y. and Gillou, F. 1999. the negative effect of repeated equine chorionic gonadotropin treatment on subsequent fertility in Alpine goats is due to a humoral immune response involving the major histocompatibility complex. *Biol. Reprod.* 60 : 805-813.
- Romano, J.E., 1996. Comparison of fluorogestone and medroxyprogesterone intravaginal pessaries for estrus synchronization in dairy goats. *Small Rumin. Res.* 22, 219–223.
- Romano, J.E., 1998. The effect of continuous presence of bucks on hastening the onset of estrus in synchronized does during the breeding season. *Small Rumin. Res.* 30, 99-103.

Romano, J.E., 2004. Synchronization of estres using CIDR, FGA or MAP intravaginal pessaries during the breeding season in Nubian goats. Small Rumin. Res. 55 : 15-19.

Sumretprasong, J., Apimeteetumrong, M. and Sukwongs, Y. 1995. Increasing the number of kids born from each embryo collection by the bisection of the goat embryo: A preliminary study. The Thai Journal of Veterinary Medicine. 25 (4): 317-325.

ผลของขนาดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ต่อการเพิ่มการตกไข่และจำนวนตัวอ่อนในโคพื้นเมืองภาคใต้

ชาญยุทธ กาวล อนนท เทืองสันเทียะ ณรงค์ เลี้ยงเจริญ มาลี อภิเมธีอำรง

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อเปรียบเทียบขนาดฮอร์โมน FSH (Follicle Stimulating Hormone) 2 ระดับ คือ 200 และ 150 มก. ในการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ในโคพื้นเมืองภาคใต้ ใช้แม่โคพื้นเมืองภาคใต้เป็นตัวให้ตัวอ่อน (donor) จำนวน 8 ตัว มีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ และมีวงจรการเป็นสัดปกติ อายุประมาณ 5-8 ปี มีน้ำหนักระหว่าง 250-350 กก. เลี้ยงที่ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสุราษฎร์ธานี จ.สุราษฎร์ธานี เหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดในช่องคลอด และกระตุ้นเพิ่มการตกไข่โดยใช้ฮอร์โมน FSH (Folltropin V[®], Vetrepahrm, Canada) โดยแบ่งกลุ่มแม่โคพื้นเมืองแบบสุ่มเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 4 ตัว วางแผนการทดลองแบบ Crossover design ทำซ้ำ 5 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกันหนึ่งเดือน โคกลุ่มที่หนึ่งใช้ฮอร์โมน FSH ขนาด 150 มก. ต่อตัว และกลุ่มที่สองใช้ฮอร์โมน FSH ขนาด 200 มก.ต่อตัว โดยฉีดแบบลดขนาดเป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอ่อนหลังผสมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อโคภาคใต้ 7 วัน วิเคราะห์ผลโดยใช้ Student's t test ผลการดำเนินการในการเก็บตัวอ่อนทั้งหมด 33 ครั้ง แม่โคที่ให้ออร์โมนขนาด 150 มก. เก็บตัวอ่อน 16 ครั้ง ได้ตัวอ่อนที่มีคุณภาพย้ายฝากได้ (เกรด เอ บี ซี) จำนวน 29 ใบ อัตราการเก็บตัวอ่อนได้ 49.47% (47/95) ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของจำนวน CL และตัวอ่อนคุณภาพย้ายฝากได้เท่ากับ 5.94 ± 0.95 และ 1.81 ± 0.62 ตัวอ่อน (n = 16) สำหรับแม่โคที่ให้ออร์โมน 200 มก.เก็บตัวอ่อน 17 ครั้ง ได้ตัวอ่อนที่มีคุณภาพย้ายฝากได้ (เกรด เอ บี ซี) จำนวน 44 ตัวอ่อน อัตราการเก็บตัวอ่อนได้ 64.29% (72/112, จำนวนไข่/ตัวอ่อนที่เก็บได้ เทียบกับจำนวน corpus luteum; CL) ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ของจำนวน CL และตัวอ่อนคุณภาพย้ายฝากได้เท่ากับ 6.59 ± 0.80 และ 2.59 ± 0.69 ตัวอ่อน (n =17) พบว่า ขนาดฮอร์โมน FSH 200 มก. และ 150 มก.ให้ค่าเฉลี่ยจำนวน CL ตัวอ่อนที่เก็บได้ และตัวอ่อนคุณภาพย้ายฝากได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.5$) ผลการศึกษานี้แสดงว่าขนาดฮอร์โมน FSH 150 มก. และ 200 มก. ให้ผลไม่แตกต่างกันต่อการเพิ่มการตกไข่ จำนวนและคุณภาพตัวอ่อนที่เก็บได้ในโคพื้นเมืองภาคใต้

คำสำคัญ : การกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ โคพื้นเมืองภาคใต้ ตัวอ่อนคุณภาพที่ย้ายฝากได้ ฮอร์โมนเอฟเอสเอช

Effect of FSH Doses on Superovulation and the Number of Embryo in Southern Thai Native Cattle

Chanyuth Kapol Anone Thuangsanthia Narong Liengchareon Malee Apimeteetumrong

Abstract

The objective of this study was to investigate the effect of follicle stimulating hormone (FSH) doses and number of embryos on superovulatory responses in southern Thai native cattle (*Bos indicus*). Eight cyclic cows underwent two superovulatory treatments with a crossover design, 5 replications. They were 5-8 years of age and live weight 250-350 kg., raised at Surachthani AI Research and Biotechnology Center. All cows were estrous synchronized with CIDR-B[®] and Prostaglandin F_{2α} and were injected with FSH (Folltropin V[®], Vetrepfarm, Canada) twice daily for 3 days in decreasing doses according to its dose assignment, 200 or 150 mg. Group 1: treated with 150 mg. FSH and Group 2: treated with 200 mg. FSH. Numbers of corpora lutea were determined by rectal palpation and embryos were collected on day 7 after the artificial insemination with same semen batch of a southern Thai native bull. Data were analyzed by Student's t test. A total of thirty three embryo collections were performed in both treatment groups. In Group 1, a total of 29 transferable embryos were collected in 16 sessions, for a recovery rate of 49.47% (47/95). The numbers of CL and transferable embryos (mean ± SE) were 5.94 ± 0.95 and 1.81 ± 0.62 (n =16). In Group 2, a total of 44 transferable embryos (A, B, C grades) were collected in 17 sessions, for a recovery rate of 64.29% (72/112, total ova/embryos/numbers of CL). The numbers of CL and transferable embryos (mean ± SE) were 6.59 ± 0.80 and 2.59 ± 0.69 (n =17). No significant difference in the numbers of CL and transferable embryos were found between two treatment groups (P>0.05). This study demonstrated that 150 or 200 mg of FSH did not affect the numbers of CL and transferable embryos in southern Thai native cattle.

Keywords: superovulation, Southern Thai native cattle, transferable embryos,

Bureau of Biotechnology in Animal Production, Department of Livestock Development, Muang, Pathumthani. 12000

บทนำ

โคที่เลี้ยงในภาคใต้ส่วนใหญ่เป็นโคพื้นเมืองที่สามารถกินหญ้าทั่วไปที่มีคุณภาพไม่ดี แต่ยังมีสุขภาพสมบูรณ์และให้ลูกได้ตามปกติ โดยเกษตรกรจะเลี้ยงเพื่อเป็นรายได้เสริม เพราะมีราคาดีกว่าโคเนื้อพันธุ์อื่น และเพื่อเป็นเกมกีฬา (วัวชน) มีการคัดเลือกโคที่มีลักษณะดีเพื่อการชนวัวโดยเฉพาะเป็นเวลานาน โดยเกษตรกรผู้เลี้ยงจะไม่ยอมนำไปผสมกับพันธุ์อื่น นับว่าเป็นการอนุรักษ์สายพันธุ์พื้นเมืองแทนไว้ได้เป็นอย่างดี ปัญหาและอุปสรรคในการเลี้ยงโคพื้นเมือง ได้แก่ มีพื้นที่เลี้ยงน้อยลง ขาดการปรับปรุงพันธุ์ มีการเลี้ยงตัวผู้และตัวเมียรวมกัน ทำให้เกิดสายเลือดชิด ลูกเกิดมาแคระแกร็นไม่แข็งแรง ดังนั้นจึงน่าจะมีการศึกษาวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์และอนุรักษ์สายพันธุ์นี้ให้คงอยู่ต่อไปอย่างเร่งด่วน

ในการดำเนินงานการย้ายฝากตัวอ่อน การกระตุ้นเพิ่มการตกไข่โดยใช้ฮอร์โมนเอฟ เอส เอช (FSH, Follicle Stimulating Hormone) เป็นขั้นตอนสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จในกระบวนการผลิตตัวอ่อน มีการดำเนินการอย่างแพร่หลายในโคนม (*Bos Taurus*) มีรายงานว่า *Bos indicus* มีการตอบสนองต่อ FSH มากกว่า *Bos taurus* ซึ่ง Lewis (1992) รายงานว่าสามารถใช้ฮอร์โมนในขนาดที่น้อยกว่าที่ใช้ใน *Bos taurus* 25-30% จากรายงานของณรงค์ และคณะ (2549) มีความสำเร็จในการทดลองใช้ฮอร์โมน FSH กระตุ้นเพิ่มการตกไข่ในโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูน (*Bos indicus*) อย่างไรก็ตาม การดำเนินงานย้ายฝากตัวอ่อนในโคพื้นเมืองภาคใต้ยังไม่เคยมีรายงานเรื่องการใช้ ฮอร์โมน FSH สำหรับการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ ดังนั้นจึงน่าจะศึกษาผลของขนาดฮอร์โมน FSH ต่อการเพิ่มการตกไข่และจำนวนตัวอ่อน โดยใช้ปริมาณเท่ากับที่ใช้ในโคพื้นเมืองพันธุ์ชาวลำพูน วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อเปรียบเทียบขนาดฮอร์โมน FSH 2 ระดับ คือ 150 และ 200 มิลลิกรัม ในการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ในโคพื้นเมืองภาคใต้

วิธีดำเนินการวิจัย

1) ใช้แม่โคพื้นเมืองภาคใต้ที่เป็นตัวให้ตัวอ่อน จำนวน 8 ตัว มีสุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ และมีวงจรการเป็นสัดปกติ อายุประมาณ 5-8 ปี มีน้ำหนักระหว่าง 250-350 กก. เลี้ยงที่ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสุราษฎร์ธานี จ.สุราษฎร์ธานี ดำเนินการเก็บตัวอ่อนระหว่างเดือน พฤศจิกายน 2550 - สิงหาคม 2551 แม่โคได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดในช่องคลอด และกระตุ้นเพิ่มการตกไข่โดยใช้ฮอร์โมน FSH (Folltropin V[®], Vetrepahrm, Canada) โดยแบ่งกลุ่มแม่โคพื้นเมืองแบบสุ่มเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 4 ตัว วางแผนการทดลองแบบ crossover design ทำซ้ำ 5 ครั้ง แต่ละครึ่งห่างกันหนึ่งเดือน

กลุ่มที่หนึ่ง ได้รับฮอร์โมน FSH ขนาด 150 มก.ต่อตัว ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ เข้า-เย็น ห่างกัน 12 ชั่วโมง ฉีดติดต่อกันแบบลดขนาดเป็นเวลา 3 วัน (35-35, 25-25 และ 15-15 มก.)

กลุ่มที่สองได้รับฮอร์โมน FSH ขนาด 200 มก.ต่อตัว ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ เข้า-เย็น ห่างกัน 12 ชั่วโมง ฉีดติดต่อกันแบบลดขนาดเป็นเวลา 3 วัน (50-50 , 30-30 และ 20-20 มก.)

โดยเริ่มให้ FSH ในวันที่ 9 หลังใส่ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดในช่องคลอด (CIDR-B[®], Interag, New Zealand)

2) ในวันที่ 3 ของการฉีดฮอร์โมน FSH ทำการฉีดพรอสตาแกลนดิน (Estrumate[®], New Zealand) ขนาด 2 มล. (500 ไมโครกรัม) เข้ากล้ามเนื้อเข้า-เย็น ร่วมกับการถอด CIDR-B ออกช่วงเย็น ในโคทั้งสองกลุ่ม

3) สังเกตการเป็นสัดและผสมเทียมในแม่โคตัวให้ จำนวน 3 ครั้ง ห่างกัน 12 ชั่วโมง โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อโคพื้นเมืองสายพันธุ์ภาคใต้ (โคชน) ที่ผ่านการทดสอบคุณภาพหลังการละลายแล้ว พร้อมกับฉีดฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (Receptal[®], Germany) ขนาด 5 มล. เข้ากล้ามเนื้อให้กับแม่โคหลังจากผสมเทียมครั้งแรก

4) ในวันที่ 7 หลังอาการสัด ล้างตรวจการตอบสนองต่อการกระตุ้นการตกไข่ โดยการนับจำนวนคอร์ปัสลูเทียม (CL) บนรังไข่ทั้งสองข้าง จากนั้นทำการเก็บตัวอ่อนจากแม่โคตัวให้ โดยใช้น้ำยาชะล้างตัวอ่อน (Emcare[®], New Zealand) ชะล้างตัวอ่อนออกจากปีกมดลูกทั้ง 2 ข้างด้วยน้ำยาข้างละ 500 มล.โดยใช้ชุดสายยางสำหรับชะล้างตัวอ่อน (flushing set) ต่อกับท่อสวนตามวิธีของ Saito (1994) และปล่อยน้ำยาไหลผ่านถ้วยกรองตัวอ่อน ในกรณีที่มีจำนวน CL เท่ากับ 0-1 ถือว่ารังไข่ไม่ตอบสนองต่อฮอร์โมนกระตุ้น จะไม่เก็บตัวอ่อน

5) ตรวจหาตัวอ่อน และประเมินคุณภาพตัวอ่อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ บันทึกจำนวน และประเมินคุณภาพตัวอ่อนที่เก็บได้ ตามวิธีของ Linder และ Wright (1983) ดังนี้ เกรด เอ ตัวอ่อนคุณภาพดีมาก มีพัฒนาการปกติ ลักษณะของเซลล์ตัวอ่อนหรือบลาสโตเมียร์เป็นทรงกลมเกาะกันแน่น ไม่มีเซลล์แตก

เกรด บี ตัวอ่อนคุณภาพดี มีพัฒนาการปกติ ลักษณะของตัวอ่อนเป็นทรงกลม มีบางเซลล์แยกออกจากเซลล์กลุ่มใหญ่ 10- 20% ของเซลล์ทั้งหมด

เกรด ซี ตัวอ่อนคุณภาพพอใช้ ตัวอ่อนอาจมีรูปร่างไม่เป็นทรงกลม มีการเสื่อมของเซลล์ประมาณ 30 - 40%

เกรด ดี เป็นตัวอ่อนที่มีการเสื่อมสลายของเซลล์มาก มีเซลล์ที่ยังเกาะแน่นต่ำกว่า 40% หรือเป็นตัวอ่อนที่มีพัฒนาการช้ากว่าปกติและหยุดเจริญหรือไข่ที่ยังไม่ได้รับการผสม

ตัวอ่อนเกรด เอ บี และ ซี เป็นตัวอ่อนคุณภาพที่สามารถนำไปฝากให้ตัวรับได้ (transferable embryos) และตัวอ่อนเกรด เอ บี เป็นตัวอ่อนที่นำไปแช่แข็งได้

6) รวบรวมผลการดำเนินการ และนำข้อมูลไปวิเคราะห์ผลโดยใช้ Student's t test

ผลและวิจารณ์

อัตราการเก็บตัวอ่อนได้ (recovery rate) ในกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนขนาด 150 มก. ได้ค่าต่ำกว่าครึ่งหนึ่ง (49.47%) ในจำนวนการเก็บ 16 ครั้ง มีถึง 4 ครั้งที่เก็บไข่/ตัวอ่อนไม่ได้เลย (25%, 4/16) ส่วนกลุ่มที่ได้รับฮอร์โมนขนาด 200 มก. อัตราการเก็บตัวอ่อนได้สูงกว่า ขนาด 150 มก. (64.29%) อย่างไรก็ตามผลที่ได้นี้นับว่าต่ำกว่ารายงานในโคพื้นเมือง Sistani cattle (*Bos indicus*) ของอิหร่าน (Barati et al., 2006) ซึ่งได้อัตราการเก็บเฉลี่ย 61-84% เมื่อให้ฮอร์โมน FSH ขนาด 160-200 มก. โดยโคพื้นเมืองอิหร่านมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยมากกว่า (368-391 กก.) เมื่อเทียบกับโคพื้นเมืองไทยที่ใช้ในการศึกษานี้ (250-350 กก.) การที่โคมีขนาดเล็กซึ่งจะมีขนาดของปีกมดลูกเล็ก ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการเก็บตัวอ่อน อาจเป็นสาเหตุทำให้เก็บตัวอ่อนได้น้อยทั้งที่โคมีการตอบสนองต่อฮอร์โมนดี

Table 1 Effects of FSH on CL number and embryo quality

FSH Level	n	CL Number (range)	Recovered embryo number (range)	Transferable embryo number (range)	Recovery rate (%)
150 mg ^a	16	95 (2 -16)	47 (0 -16)	29 (0 - 8)	49.47 (47/95)
200 mg ^b	17	112 (3 -14)	72 (0 -14)	44 (0 -10)	64.29 (72/112)

^a4 cows did not respond to treatment

^b3 cows did not respond to treatment

Recovery rate: Calculated from CL number/Recovered embryo number

Transferable embryo: A B or C grade

Table 2 Effects of FSH on CL number, oval/embryo and transferable embryo numbers (Mean $\pm$ SE)

FSH Level	Mean $\pm$ SE		
FSH mg (n)	CL	total ova/embryos	transferable embryos
150 (16)	5.94 $\pm$ 0.95	2.94 $\pm$ 1.12	1.81 $\pm$ 0.62
200 (17)	6.59 $\pm$ 0.80	4.24 $\pm$ 1.01	2.59 $\pm$ 0.69

Transferable embryos: A B or C grade

ค่าเฉลี่ยจำนวน CL จำนวนไข่/ตัวอ่อนที่เก็บได้ และตัวอ่อนคุณภาพย้ายฝากได้ (table 2) จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ในโคพื้นเมืองที่ได้รับฮอร์โมน FSH ขนาด 200 หรือ 150 มก. ซึ่งให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับรายงานในโคขาวลำพูน (ณรงค์ และคณะ, 2549) ที่ได้

เปรียบเทียบขนาดฮอร์โมน FSH ขนาด 200 และ 150 มก. กล่าวคือ ที่ 200 มก. มีแนวโน้มได้จำนวน CL มากกว่าและจำนวนไข่/ตัวอ่อนที่เก็บได้มากกว่า ที่ FSH 150 มก. อย่างไรก็ตามพบว่าค่าเฉลี่ยจำนวน CL ทั้งจากฮอร์โมน FSH ขนาด 200 และ 150 มก. มีค่าต่ำกว่าในรายงานของโคขาวลำพูนค่อนข้างมาก (ณรงค์ และ คณะ, 2549) โดยใช้ขนาดฮอร์โมนเท่ากัน แสดงให้เห็นว่า รังไข่ของโคพื้นเมืองภาคใต้มีการตอบสนองต่อฮอร์โมน FSH ไม่ดีเท่าโคขาวลำพูน เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนตัวอ่อนคุณภาพย้ายฝากได้ จากผล

การศึกษานี้ (2.59 ± 0.69 และ 1.81 ± 0.62 , table 2) พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันมากกับของโคขาวลำพูน ในรายงานของ ณรงค์ และคณะ (2549) ดังนั้นการศึกษาต่อไป อาจต้องพิจารณาถึงการเพิ่มขนาดของฮอร์โมน FSH เพื่อหาขนาด FSH ที่เหมาะสมสำหรับโคพื้นเมืองภาคใต้ ซึ่งอาจอยู่ในช่วง 220-240 มก.

จากผลการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า ขนาดฮอร์โมน FSH 200 มก. มีแนวโน้มให้ผลสูงกว่าขนาด 150 มก. อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาขนาดที่เหมาะสมในโคพื้นเมืองภาคใต้ เพื่อจะได้ใช้เทคโนโลยีการย้ายฝากอ่อนให้เป็นประโยชน์อย่างสูงสุดสำหรับการอนุรักษ์พันธุ์กรรมโคพื้นเมืองต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์ยุทธ หรินทรานนท์ ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ที่สนับสนุนการดำเนินงาน คุณจตุพร พงษ์เพ็ง นักวิชาการสัตวบาล ระดับชำนาญการที่ช่วยวิเคราะห์ข้อมูลพนักงานราชการของสำนักและศูนย์ที่ช่วยให้การศึกษานี้สำเร็จได้ด้วยดี งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

เอกสารอ้างอิง

- ณรงค์ เลี้ยงเจริญ อนนท์ เทืองสันติยะ วิบูลย์ เยี่ยงวิศวกูร และมาลี อภิเมธีอำรง. 2549. ผลของขนาดฮอร์โมน เอฟ เอส เอช ต่อการเพิ่มการตกไข่และจำนวนตัวอ่อนในโคขาวลำพูน. การประชุมสัมมนา Enhancement of Reproductive Efficiency and Production of Livestock in Thailand ในโอกาสครบรอบ 50 ปีงานผสมเทียมในประเทศไทย. วันที่ 14-16 ธันวาคม 2549 โรงแรมเชียงใหม่ฮิลล์ จ.เชียงใหม่.
- Barati, F., Niasari_Naslaji, A., Bolourchi, M., Sarhaddi, F., Razavi, K., Naghzali, E. and Thatcher, W.W. 2006. Superovulatory response of Sistani cattle to three different doses of FSH during winter and summer. Theriogenology. 66:1149-1155.

- Ireland, J.J., Ward, F., Jimenez-Krassel, F., H.Ireland, J.L., Smith, G.W., Lonergan, P. and Evans, A.C.O. 2007. Follicle numbers are highly repeatable within individual animals but are inversely correlated with FSH concentrations and the proportion of good-quality embryos after ovarian stimulation in cattle. *Hum. Reprod.* 22(6):1687–1695.
- Lerner, S.P., Thayne, W.V, Baker, R.D., Henschen, T., Meredith, S. and Inskeep, E.K. 1986. Age, dose of FSH and other factors affecting superovulation in Holstein cows. *J. Anim. Sci.*63:176–183.
- Lewis, I. 1992. Programming donors and recipients. In: *Embryo transfer and pregnancy diagnosis*. NSW: Post Graduate Committee in Veterinary Science, University of Sydney. pp. 69-88.
- Linder, G.M. and Wright, R.W. 1983. Bovine embryo morphology and evaluation. *Theriogenology*. 20: 407-416.
- Saito, N. 1994. *Manual of embryo Transfer and in vitro fertilization in cattle*. National Livestock Breeding Center, MAFF, Japan, September. pp. 132.

คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคที่ใช้กลีเซอรอลชนิด 87 และ 99% ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ

ตรวจด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ

รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล* จตุพร พงษ์เพ็ง* สิ้นชัย วิโรจน์วุฒิกุล

เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล* กุลณสรณ์ สายขุน**

บทคัดย่อ

การเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคที่ใช้กลีเซอรอลชนิด 87 และ 99% ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อไข่แดงทริส เจือจางน้ำเชื้อด้วยวิธีหนึ่งขั้นตอนและสองขั้นตอน ใช้น้ำเชื้อโคไฮลสไตน์ฟรีเซียนอายุ 3-5 ปี จำนวน 20 ตัว ทดลองสัปดาห์ละครั้งรวม 3 ครั้ง พบว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคที่ใช้กลีเซอรอลชนิด 87 และ 99% มีตัวอสุจิที่มีการเคลื่อนที่หลังละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่ 0 ซม. ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ลักษณะการเคลื่อนที่วัดด้วยค่า ALH (amplitude of lateral head displacement) เมื่อใช้กลีเซอรอลชนิด 99% สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่หลังละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่ 5 ซม. กลีเซอรอลชนิด 87% ให้ตัวอสุจิที่มีการเคลื่อนที่และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าต่ำกว่าชนิด 99% อย่างมีนัยสำคัญคือ 14.85 ± 1.31 เทียบกับ $26.67\pm1.41\%$ และ 8.95 ± 0.90 เทียบกับ $15.85\pm1.18\%$ ($P<0.05$) ตามลำดับ แต่ความเร็วในการเคลื่อนที่วัดด้วยค่า VAP (path velocity) และ VCL (curvilinear velocity) รวมถึงค่า ALH สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) วิธีเจือจางน้ำเชื้อหนึ่งและสองขั้นตอนไม่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังละลายที่ 0 ซม. แต่ที่ 5 ซม. วิธีหนึ่งขั้นตอน มีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญคือ 22.99 ± 1.53 เทียบกับ $18.64\pm1.39\%$ ($P<0.05$) ความยาวและพื้นที่ส่วนหัวของตัวอสุจิ รวมถึงความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มตัวอสุจิและอะโครโซมไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) กลีเซอรอลชนิด 87% ให้คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังละลายที่ 0 ซม. ดีกว่า แต่กลีเซอรอลชนิด 99% ให้คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังละลายที่ 5 ซม. ดีกว่า และไม่พบความแตกต่างของวิธีเจือจางน้ำเชื้อหนึ่งและสองขั้นตอนที่ 0 ซม. ยกเว้นที่ 5 ซม. วิธีเจือจางน้ำเชื้อหนึ่งขั้นตอนดีกว่า

คำสำคัญ: น้ำเชื้อแช่แข็งโค การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ กลีเซอรอล น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ

*สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ถนนติวานนท์ ปทุมธานี 12000

**สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล อำเภอดอนเจดีย์ จังหวัดนครปฐม 73170

Quality of Bull Deep Frozen Semen Extended with 87 and 99% Glycerol Evaluated with Computer Assisted Semen Analysis

Rapiphan Uavechanichkul* Jatuporn Pongpeng* Sinchai Wirojwutthikul*

Lertchai Jintapitaksakul* Kunasant Saikhun**

Abstract

Comparison of after thawing motility of bull deep frozen semen was carried out using two types of glycerol, 87 and 99% to be diluted with one-step and two-step methods in egg yolk Tris extender. Semen of 20 Holstein-Fresian bulls aged 3-5 years were collected once a week for 3 weeks. The result showed the after thawing motility and progressive motility of the sperm from the 87 and 99% glycerol at 0 hour were not significantly different ($P>0.05$), the ALH (amplitude of lateral head displacement) of the sperm from the extender using the 99% glycerol was significantly higher ($P<0.05$). However, after 5 hours the 87% glycerol gave significantly lower motility and progressive motility 14.85 ± 1.31 vs $26.67\pm1.41\%$ and 8.95 ± 0.90 vs $15.85\pm1.18\%$ ($P<0.05$) respectively, with higher VAP (path velocity), VCL (curvilinear velocity) and ALH ($P<0.05$). The dilution methods did not differ significantly at 0 hour except at 5 hours the one-step method revealed significant higher motility 22.99 ± 1.53 vs $18.64\pm1.39\%$ ($P<0.05$). The sperm head elongation and the area including plasma membrane and acrosomal integrity were not different significantly ($P>0.05$). In conclusion 87% glycerol showed better semen quality at 0 hour after thawing except at 5 hour which the 99% glycerol gave a better semen quality. The dilution methods did not alter semen quality at 0 hour after thawing, however, at 5 hours after thawing the one-step dilution method revealed a better semen quality.

Key words: bull deep frozen semen, sperm motility, glycerol, semen extender.

*Bureau of Biotechnology in Animal Production, Department of Livestock Development, Tiwanond Rd., Pathumthani 12000.

**Institute of Science and Technology for Research and Development, Mahidol University, Salaya, Nakhornpathom 73170.

บทนำ

การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งโคของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อต่างๆ มีรายละเอียดในขั้นตอนการผลิตต่างกันซึ่งมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง เช่น การเจือจางน้ำเชื้อ เนื่องจากส่วนประกอบของสารในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง (Liu et al., 1998; Foote and Kaproth, 2002) กลีเซอรอลเป็นส่วนประกอบของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคซึ่งเป็นสารที่เป็นพิษต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตแต่เป็นสารป้องกันตัวอสุจิเสียหายหรือตายระหว่างการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งด้วย (McLaughlin et al., 1992) กลีเซอรอลช่วยลดการเป็นเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์สิ่งมีชีวิตระหว่างการแช่แข็ง โดยผ่านผนังเซลล์เข้าไปแทนที่น้ำในเซลล์เกิด dehydration effect ช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในเซลล์ (Curry, 2000) ลดความเสียหายของผนังเซลล์อสุจิ (Peters and Ball, 1995) เนื่องจากน้ำบางส่วนกลายเป็นน้ำแข็ง ความเข้มข้นของสารละลายโดยรอบเซลล์จึงเพิ่มขึ้น (Holt and North, 1994) ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ที่ผนังเซลล์ เช่น องค์ประกอบของผนังเซลล์ สภาวะของของเหลวที่ผนังเซลล์ คุณสมบัติการผ่านเข้าออกของสาร และส่วนประกอบของไขมันที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของผนังเซลล์สิ่งมีชีวิตรวมทั้งเซลล์อสุจิของโค (Shannon and Vishwanath, 1995) การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ อาจมีมากถึงขั้นวิกฤต ทำให้ผนังเซลล์อสุจิแตก (Lessard et al., 2000) ผนังในส่วนต่างๆ ของเซลล์อสุจิที่ได้รับความเสียหายจากการแช่แข็งจนเกิดการเปลี่ยนแปลงดังที่กล่าวมาแล้วคือ plasma membrane, acrosomal membrane และ mitochondrial membrane (Thomas et al., 1998) ความเสียหายของอะโครโซม (acrosome) ซึ่งคลุมอยู่ที่หัวของตัวอสุจิ บางครั้งไม่ทำให้ตัวอสุจิตายแต่จะทำให้ตัวอสุจิไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้เมื่อนำไปผสมเทียม มีผลให้อัตราการผสมติดต่ำ (Januskauskas et al., 2003) ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมขึ้นกับชนิดของสัตว์ตัวอสุจิโคมีความทนทานต่อกลีเซอรอลได้มากกว่าตัวอสุจิสุกร (Critser et al., 1988) ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 7% ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคชนิดไข่แดงซีเตรท ทำให้การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังแช่แข็งดีกว่าความเข้มข้น 10 และ 11% อย่างมีนัยสำคัญ (Mortimer et al., 1976) ความเข้มข้นของกลีเซอรอลมีผลต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซมหลังการแช่แข็ง (Robbins et al., 1976)

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งโคโดยใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อไข่แดงทริสที่มีส่วนผสมของกลีเซอรอล 7.0% (v/v) (กองผสมเทียม, 2520) โดยไม่ระบุว่าเป็นกลีเซอรอลชนิด 87 หรือ 99% กลีเซอรอลสองชนิดให้ความเข้มข้นในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่างกันเป็น 5.6% และ 6.4% ตามลำดับ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ใช้กลีเซอรอลชนิด 87% ในขณะที่ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งโคในประเทศอื่นใช้กลีเซอรอลชนิด 99% การใช้กลีเซอรอลชนิด 87 และ 99% อาจมีผลต่อตัวอสุจิและคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งต่างกัน

วิธีการเจือจางน้ำเชื้อโคของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ใช้วิธีหนึ่งขั้นตอน ผสมน้ำเชื้อสดกับน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีกลีเซอรอลให้เสร็จในขั้นตอนเดียว แต่ในประเทศอื่นใช้วิธีสอง

ขั้นตอน คือ ผสมน้ำเชื้อสดกับน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่ไม่มีกลีเซอรอลก่อน ในขั้นตอนที่สองจึงผสมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อส่วนที่มีกลีเซอรอล วิธีที่ต่างกันนี้อาจมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง การศึกษานี้จึงเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคที่ใช้กลีเซอรอลชนิด 87 และชนิด 99% โดยใช้วิธีเจือจางน้ำเชื้อสองวิธี ตรวจประเมินคุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ CASA (Computer Assisted Semen Analysis, Hamilton-Thorne Biosciences, MA, USA.) และเครื่อง flow cytometer ที่สามารถประเมินคุณภาพน้ำเชื้อได้ละเอียดแม่นยำและรวดเร็วกว่าการตรวจด้วยสายตา (Graham, 2001)

อุปกรณ์และวิธีการ

วางแผนการทดลองแบบ 2x2 factorial in RCBD (randomized complete block design) ปัจจัยแรกคือน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อไข่แดงทริสที่ใช้กลีเซอรอลชนิด 87 และชนิด 99% ปัจจัยที่สองคือ วิธีเจือจางน้ำเชื้อ วิธีหนึ่งขั้นตอนและสองขั้นตอน

น้ำเชื้อทดลอง ใช้น้ำเชื้อโคโฮลสไตร์นฟรีเชียน ที่มีอายุ 3-5 ปี จำนวน 20 ตัว ของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ผสมเทียมลำพญากลาง จังหวัดนครราชสีมา ใช้น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไม่ต่ำกว่า 70% จำนวนตัวอสุจิที่มีความผิดปกติส่วนหัวไม่เกิน 12% และส่วนหางไม่เกิน 25% รีดเก็บน้ำเชื้อโคด้วย artificial vagina (AV) ทำการทดลองในโคสัปดาห์ละครั้งๆ ละ 20 ตัว ทำ 3 ซ้ำ

การเจือจางน้ำเชื้อ เตรียมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อไข่แดงทริสสองชนิดที่ใช้กลีเซอรอลชนิด 87 และ 99% (tris 30.28 g, citric acid 17.0 g, fructose 12.5 g, demineralised water 920.0 ml, glycerol 80 ml, egg yolk 250.0 ml, penicillin G sodium 1,000,000 IU และ streptomycin sulfate 1g) (กองผสมเทียม, 2520) แบ่งน้ำเชื้อสดโคเป็น 4 หลอด ปริมาตรเท่าๆกัน ทำการเจือจางน้ำเชื้อ ดังนี้

- วิธีหนึ่งขั้นตอน ใช้น้ำเชื้อสดโคสองหลอด เจือจางน้ำเชื้อแต่ละหลอดด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแต่ละชนิด ให้มีจำนวนตัวอสุจิ 100 ล้านตัว/มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ให้ตัวอสุจิปรับสมดุลในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อเป็นเวลา 4 ชั่วโมง

- วิธีสองขั้นตอน **ขั้นตอนที่หนึ่ง** ใช้น้ำเชื้อสดโคสองหลอด ผสมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อไข่แดงทริสที่ไม่มีกลีเซอรอล (tris 30.28 g, citric acid 17.0 g, fructose 12.5 g, demineralised water 920.0 ml, egg yolk 250.0 ml, penicillin G sodium 1,000,000 IU streptomycin sulfate 1 g) ในแต่ละหลอดให้มีจำนวนตัวอสุจิ 200 ล้านตัว/มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง **ขั้นตอนที่สอง** เติมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีกลีเซอรอลชนิด 87 และ 99% หลอดละชนิด ด้วยปริมาตรเท่ากับที่เติมในขั้นตอนที่หนึ่ง เพื่อเจือจางให้จำนวนตัวอสุจิเป็น 100 ล้านตัว/มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

การบรรจุและแช่แข็งน้ำเชื้อ บรรจุน้ำเชื้อในหลอดน้ำเชื้อ French ministraws 0.25 มล. ด้วยเครื่องบรรจุน้ำเชื้อ (Type machine MRS3, Code YC250, IMV, France) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยเครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (Digitcool 5300, ZH350&UE350 with 900 HP program 3T Software, IMV, France) และเก็บไว้ได้ระดับไนโตรเจนเหลวในถังเก็บน้ำเชื้อจนกว่าจะนำมาตรวจ

การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง สุ่มน้ำเชื้อแช่แข็งจากแต่ละการทดลอง มาตรวจวิเคราะห์คุณภาพด้วยเครื่อง CASAโปรแกรม IVOS motility analyzer version 12.0 (Hamilton-Thorne, Biosciences, MA, USA) ตรวจตัวชี้วัดต่างๆ ที่มีรายละเอียดของนิยามและสูตรการคำนวณที่ได้กล่าวไว้ในรายงานของ Agarwal et al. (2003) และ Tardif et al. (1997) ได้แก่

- การเคลื่อนที่ (motility) และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility)
- ความเร็วในการเคลื่อนที่วัดด้วยค่า path velocity (VAP), straight-line velocity (VSL) และ curvilinear velocity (VCL)
- ลักษณะการเคลื่อนที่วัดด้วยค่า amplitude of lateral head displacement (ALH), beat cross frequency (BCF), straightness (STR) และ linearity (LIN)
- ความยาว (elongation) และพื้นที่ส่วนหัวของตัวอสุจิ (area) โดยย้อมตัวอสุจิ ด้วยสี Ident® (Bioscience, MA, USA) ก่อนนำไปวิเคราะห์

ตรวจความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มตัวอสุจิ (plasma membrane integrity) และอะโครโซม (acrosome integrity) ใช้วิธีย้อมตัวอสุจิด้วยสี FITC-PNA/PI (fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin/propidium iodide) และตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่อง flow cytometer

การวิเคราะห์และประมวลผล วิเคราะห์ค่าตัวชี้วัดต่างๆ โดยใช้โปรแกรมสถิติ SAS วิธี Analysis of Variance in RCB และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยตัวชี้วัดด้วยวิธี Duncan multiple range test (DMRT)

ผล

การวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปัจจัยทั้งสอง คือชนิดของกลีเซอรอลและวิธีเจือจางน้ำเชื้อไม่มีปฏิกริยาสัมพันธ์ (interaction) จึงเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวชี้วัดจากแต่ละปัจจัย

ปัจจัยแรกคือชนิดกลีเซอรอล พบว่าการเคลื่อนที่และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิหลังละลายน้ำเชื้อที่ 0 ซม. ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้กลีเซอรอลชนิด 87 และ 99% ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่ที่ 5 ซม. การเคลื่อนที่และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้กลีเซอรอลชนิด 87% ต่ำกว่าชนิด 99% อย่างมีนัยสำคัญคือ 14.85 ± 1.31 เทียบกับ $26.67\pm1.41\%$ และ 8.95 ± 0.90 เทียบกับ $15.85\pm1.18\%$ ($P<0.05$) ตามลำดับ และความเร็วในการเคลื่อนที่วัดด้วยค่า VAP และ VCL แตกต่าง

กันอย่างมีนัยสำคัญคือ 72.80 ± 1.99 เทียบกับ $65.19 \pm 1.61 \mu\text{m/s}$ และ 130.52 ± 3.52 เทียบกับ $114.61 \pm 2.91 \mu\text{m/s}$ ($P < 0.05$) ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังละลายน้ำเชื้อที่ 0 ชม. วัดด้วยค่า ALH ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้กลีเซอรอลชนิด 87% มีค่าต่ำกว่าชนิด 99% อย่างมีนัยสำคัญ คือ 6.60 ± 0.14 เทียบกับ $7.09 \pm 0.13 \mu\text{m}$ ($P < 0.05$) แต่ที่ 5 ชม. มีกลับค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ คือ 6.03 ± 0.12 เทียบกับ $5.36 \pm 0.14 \mu\text{m}$ ($P < 0.05$) ลักษณะการเคลื่อนที่วัดด้วยค่า BCF ที่ 0 ชม. มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเช่นกันคือ 33.84 ± 0.33 เทียบกับ $32.38 \pm 0.31 \text{ Hz}$ ตามลำดับ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 1)

ปัจจัยที่สองคือวิธีเจือจางน้ำเชื้อ พบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งโคหลังละลายที่ 5 ชม. วิธีหนึ่งขั้นตอนทำให้ตัวอสุจิมีการเคลื่อนที่สูงกว่าวิธีสองขั้นตอนอย่างมีนัยสำคัญ คือ 22.99 ± 1.53 เทียบกับ $18.64 \pm 1.39\%$ ($P < 0.05$) แต่ไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วในการเคลื่อนที่ ลักษณะการเคลื่อนที่ รวมถึงความยาวและพื้นที่หัวตัวอสุจิอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 2)

ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มตัวอสุจิและอะโครโซมในน้ำเชื้อแช่แข็งโค เมื่อใช้กลีเซอรอลต่างชนิดและวิธีเจือจางต่างกันไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคหลังละลายที่ 0 และ 5 ชั่วโมง เมื่อใช้กลีเซอรอลชนิด 87 และ 99%

ค่าชี้วัดตัวอสุจิ	น้ำเชื้อแช่แข็งโคหลังละลาย (n=60)			
	ที่ 0 ชม.		ที่ 5 ชม.	
	ชนิดกลีเซอรอล			
	87%	99%	87%	99%
การเคลื่อนที่ (%)	36.96±1.13	35.87±1.19	14.85±1.31 ^a	26.67±1.41 ^b
การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	25.55±0.98	24.96±0.94	8.95 ±0.90 ^a	15.85±1.18 ^b
ความเร็วในการเคลื่อนที่ (µm/s)				
Average path velocity: VAP	105.16±1.85	100.41±1.75	72.80±1.99 ^a	65.19±1.61 ^b
Straight-line velocity: VSL	82.23±1.11	79.47±1.12	56.12±1.62	52.51±1.37
Curvilinear velocity: VCL	175.22±4.46	184.64±3.96	130.52±3.52 ^a	114.61±2.91 ^b

ตารางที่ 1 (ต่อ) คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคหลังละลายที่ 0 และ 5 ชั่วโมง เมื่อใช้กลีเซอรอลชนิด 87 และ 99%

ค่าชี้วัดตัวอสุจิ	น้ำเชื้อแช่แข็งโคหลังละลาย (n=60)			
	ที่ 0 ชม.		ที่ 5 ชม.	
	ชนิดกลีเซอรอล			
	87%	99%	87%	99%
ลักษณะการเคลื่อนที่				
Amplitude of lateral head displacement: ALH (μm)	6.60±0.14 ^a	7.09±0.13 ^b	6.03±0.12 ^a	5.36±0.14 ^b
Beat cross frequency: BCF (HZ)	33.84±0.33 ^a	32.38±0.31 ^b	26.49±0.62	26.71±0.79
Straightness: STR (%)	80.15±0.67	78.82±0.47	77.99±0.93	75.97±1.17
Linearity: LIN (%)	49.32±0.76	47.64±0.53	46.55±0.74	44.23±0.94
ความยาวและพื้นที่ส่วนหัว				
Elongation	66.66±0.29	66.07±0.32	63.59±0.85	60.99±1.09
Area	15.40±0.46	15.07±0.43	14.31±0.38	13.48±0.42

^{ab} ตัวอักษรที่ต่างกันแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 2 คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคหลังละลายที่ 0 และ 5 ชั่วโมง เจือจางน้ำเชื้อด้วยวิธีหนึ่งขั้นตอนและสองขั้นตอน

ค่าชี้วัดตัวอสุจิ	น้ำเชื้อแช่แข็งโคหลังละลาย (n=60)			
	ที่ 0 ชม.		ที่ 5 ชม.	
	วิธีเจือจางน้ำเชื้อ			
	หนึ่งขั้นตอน	สองขั้นตอน	หนึ่งขั้นตอน	สองขั้นตอน
การเคลื่อนที่ (%)	36.78 ± 1.15	36.05 ± 1.58	22.99±1.53 ^a	18.64±1.39 ^b
การที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	25.41±0.92	25.19±0.99	13.84±1.12	11.02±1.07
ความเร็วในการเคลื่อนที่ (µm/s)				
Average path velocity: VAP	103.22±1.76	102.37±1.86	71.16±1.87	66.83±1.79
Straight-line velocity: VSL	81.51±1.15	80.20±1.08	55.88±1.50	52.74±1.51
Curvilinear velocity: VCL	179.31±4.11	180.58±4.36	125.29±3.37	119.85±3.24
Amplitude of lateral head displacement: ALH	6.83±0.14	6.86±0.14	5.74±0.13	5.65±0.15

ตารางที่ 2 (ต่อ) คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคหลังละลายที่ 0 และ 5 ชั่วโมง เจือจางน้ำเชื้อด้วยวิธีหนึ่งขั้นตอนและสองขั้นตอน

ค่าชีวิตตัวอสุจิ	น้ำเชื้อแช่แข็งโคหลังละลาย (n=60)			
	ที่ 0 ชม.		ที่ 5 ชม.	
	วิธีเจือจางน้ำเชื้อ			
	หนึ่งขั้นตอน	สองขั้นตอน	หนึ่งขั้นตอน	สองขั้นตอน
ลักษณะการเคลื่อนที่				
Beat frequency: BCF (HZ)	33.63a±0.32	32.59b±0.33	26.57±0.72	26.23±0.69
Straightness: STR (%)	80.12±0.53	78.85±0.62	77.26±0.93	76.69±1.18
Linearity: LIN (%)	48.79±0.64	48.16±0.67	45.93±0.81	44.85±0.89
ความยาวและพื้นที่ส่วนหัว				
Elongation	66.46±0.29	66.27±0.29	62.46±0.92	62.12±1.05
Area	15.44±0.45	15.04±0.44	13.97±0.41	13.82±0.42

^{ab} ตัวอักษรที่ต่างกันแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 3 ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มตัวสุจิและอะโครโซมในน้ำเชื้อแช่แข็งโคผลิตโดยใช้ กลีเซอรอลชนิด 87 และ 99% เจือจางน้ำเชื้อด้วยวิธีหนึ่งขั้นตอนและสองขั้นตอน

ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มตัวสุจิและอะโครโซม	ตัวสุจิ (%) (n=60)			
	ชนิดกลีเซอรอล		วิธีเจือจางน้ำเชื้อ	
	87%	99%	หนึ่งขั้นตอน	สองขั้นตอน
เยื่อหุ้มตัวสุจิและอะโครโซมสมบูรณ์	43.25 $\pm$ 1.11	40.87 $\pm$ 1.16	42.46 $\pm$ 0.99	41.65 $\pm$ 1.27
เยื่อหุ้มตัวสุจิเสียหาย อะโครโซมสมบูรณ์	26.75 $\pm$ 0.62	26.70 $\pm$ 0.62	27.16 $\pm$ 0.56	26.29 $\pm$ 0.68
เยื่อหุ้มตัวสุจิและอะโครโซมเสียหาย	31.67 $\pm$ 0.88	29.99 $\pm$ 0.98	31.54 $\pm$ 0.85	30.12 $\pm$ 1.01

วิจารณ์

จากการตรวจวิเคราะห์คุณภาพด้วยเครื่อง CASA ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ากลีเซอรอลชนิด 87 และ 99% ให้คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคหลังละลายในด้านการเคลื่อนที่ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าและความเร็วในการเคลื่อนที่ของตัวสุจิไม่แตกต่างกันที่ 0 ชม. แต่หลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งโคที่ 5 ชม. กลับพบว่ากลีเซอรอลชนิด 87% ให้ตัวสุจิที่มีการเคลื่อนที่และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ต่ำกว่าการใช้กลีเซอรอลชนิด 99% อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ถึงแม้ว่าความเร็วในการเคลื่อนที่จะสูงกว่า (ตารางที่ 1) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับ

การศึกษาของจิรัฐม์และคณะ (2547) ที่ใช้วิธีตรวจประเมินด้วยสายตา แต่ไม่สามารถประเมินความเร็วในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิได้

เนื่องจากค่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าบอกถึงจำนวนตัวอสุจิมิชีวิตในน้ำเชื้อ ซึ่งมีรายงานในการทดลองกับตัวอสุจิของแฮมสเตอร์ พบว่ามีความสัมพันธ์กับการไปปฏิสนธิกับไข่ในหลอดทดลอง ($r=0.791$) ($P<0.01$) (Kathiravan et al., 2003) และพบว่าน้ำเชื้อที่มีค่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้ามากกว่าหรือมีจำนวนตัวอสุจิมิชีวิตมากกว่าย่อมมีโอกาสสูงกว่าที่จะเกิดการปฏิสนธิกับไข่ในระบบสืบพันธุ์โคเพศเมียหลังทำการผสมเทียม (Andersson, 2003) จึงเป็นไปได้ว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้กลีเซอรอลชนิด 99% มีศักยภาพในการไปปฏิสนธิกับไข่มากกว่าหลังการละลายน้ำเชื้อที่ 5 ซม.

ลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ วัดด้วยค่า ALH (ความกว้างที่หัวตัวอสุจิส่ายไปมาในขณะเคลื่อนที่) หลังละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่ 0 ซม. เมื่อใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้กลีเซอรอลชนิด 87% มีค่า ALH ต่ำกว่าเมื่อใช้กลีเซอรอลชนิด 99% (6.60 ± 0.14 vs 7.09 ± 0.13) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (ตารางที่ 1) ค่า ALH ที่สูงแสดงถึงลักษณะการเคลื่อนที่แบบ erratic movement ของตัวอสุจิ (Abaigar et al., 1999; Miro et al., 2005) เช่นเดียวกับการทดลองของจิรัฐม์และคณะ (2547) เมื่อใช้กลีเซอรอลชนิด 99% หลังละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่ 0 ซม. ซึ่งพบว่าตัวอสุจิมิลักษณะการเคลื่อนที่แบบ erratic movement แต่ไม่สามารถวิเคราะห์ลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิเป็นค่าตัวเลขที่ใช้อ้างอิงได้ เนื่องจากการประเมินด้วยสายตา (ข้อมูลที่ไม่ได้ตีพิมพ์) ยังไม่พบรายงานของลักษณะการเคลื่อนที่แบบนี้ต่ออัตราการผสมติด

ลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ หลังละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่ 5 ซม. เมื่อใช้กลีเซอรอลชนิด 87% ค่า ALH กลับสูงกว่าการใช้กลีเซอรอลชนิด 99% (6.03 ± 0.12 vs 5.36 ± 0.14) อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (ตารางที่ 1) แสดงถึงลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งพบรายงานว่าลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิมีความแตกต่างและเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะแวดล้อม เช่น ส่วนประกอบของของเหลวรอบตัวอสุจิ หรือความหนาของหยดน้ำเชื้อที่หยดลงบนแผ่นกระจกสไลด์ (Amann, 1988) ในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากช่วงเวลา 5 ซม. หลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ตัวอสุจิต้องใช้น้ำตาลฟรุคโตส เพื่อเป็นพลังงานในการดำรงชีวิต (Bearden et al., 2004) ทำให้ปริมาณน้ำตาลฟรุคโตสในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อเปลี่ยนแปลง และขบวนการเมตาบอลิซึมของตัวอสุจิทำให้เกิดกรดแลคติกสะสมเพิ่มขึ้น (Bearden et al., 2004) การเปลี่ยนแปลงของส่วนประกอบของของเหลวรอบตัวอสุจินี้ อาจมีผลทำให้ตัวอสุจิมิลักษณะการเคลื่อนที่แตกต่างไปจากเดิมหลังละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่ 0 ซม.

วิธีการเจือจางน้ำเชื้อหนึ่งขั้นตอนและสองขั้นตอนไม่แตกต่างกันหลังละลายน้ำเชื้อที่ 0 ซม. แต่ที่ 5 ซม. วิธีการเจือจางน้ำเชื้อหนึ่งขั้นตอนให้ค่าการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (ตารางที่ 2) สอดคล้องกับการทดลองของรพีพรรณและคณะ (2544) แต่ที่ 5 ซม. รพีพรรณและคณะ (2544) ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ผลการศึกษานี้แตกต่างจากการทดลองของจตุพรและคณะ (2551) ที่

พบว่าวิธีเจือจางน้ำเชื้อสองขั้นตอน ตัวอสุจิมีการเคลื่อนที่หลังละลายน้ำเชื้อที่ 0 ซม. สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่ไม่ได้รายงานการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิหลังละลายน้ำเชื้อที่ 5 ซม.

จากการศึกษานี้ น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคที่ใช้กลีเซอรอลชนิด 87 และ 99% ไม่มีความแตกต่างของคุณภาพน้ำเชื้อโคหลังละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่ 0 ซม. ตัวอสุจิที่ใช้กลีเซอรอลชนิด 99% มีลักษณะการเคลื่อนที่วัดด้วยค่า ALH สูง แสดงถึงการเคลื่อนที่แบบ erratic movement แต่ที่ 5 ซม. กลีเซอรอลชนิด 99% ตัวอสุจิมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูงกว่า ลักษณะการเคลื่อนที่วัดด้วยค่า ALH ต่ำกว่า ส่วนวิธีเจือจางน้ำเชื้อทั้งสองวิธีไม่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังละลายที่ 0 ซม. แต่ที่ 5 ซม. วิธีหนึ่งขั้นตอนให้การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิดีกว่า ความยาวและพื้นที่ส่วนหัวของตัวอสุจิ ตลอดจนถึงความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มและอะโครโซมของตัวอสุจิไม่มีความแตกต่างกันเมื่อใช้กลีเซอรอลต่างชนิดและวิธีเจือจางน้ำเชื้อต่างกัน

กลีเซอรอลทั้งสองชนิดให้คุณภาพน้ำเชื้อหลังละลายที่ 0 ซม. ไม่ต่างกัน ยกเว้นกลีเซอรอลชนิด 99% ที่มีลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิแบบ erratic movement กลีเซอรอลชนิด 87% จึงอาจจะดีกว่าสำหรับคุณภาพน้ำเชื้อหลังละลายที่ 0 ซม. แต่เมื่อพิจารณาคุณภาพน้ำเชื้อหลังละลายที่ 5 ซม. กลีเซอรอลชนิด 99% ให้การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิและลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิดีกว่า จึงอาจเป็นประโยชน์ในกรณีที่มีการตกไข่ล่าช้าในโคเพศเมียหลังผสมเทียม เพราะมีตัวอสุจิที่อยู่ได้นานถึง 5 ซม. มากกว่า แต่ทั้งนี้ยังไม่มีการศึกษาสภาวะในช่องคลอดโคที่อาจมีผลต่อตัวอสุจิแตกต่างไปจากการศึกษาในหลอดทดลอง ส่วนวิธีเจือจางน้ำเชื้อหนึ่งขั้นตอนให้ผลการศึกษาไม่ต่างกับวิธีสองขั้นตอนแต่ดีกว่าที่ 5 ซม. ซึ่งในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งโคของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อวิธีหนึ่งขั้นตอนเป็นวิธีที่สะดวกกว่าโดยเฉพาะในกรณีที่มีพ่อพันธุ์จำนวนมาก

เอกสารอ้างอิง

- กองผสมเทียม. 2520. การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง (Deep frozen semen) ของพ่อโคและกระบือ. เอกสารทางวิชาการงานปฏิบัติการเกี่ยวกับน้ำเชื้อ ศูนย์ผสมเทียมไทย-เนเธอร์แลนด์ กองผสมเทียม กรมปศุสัตว์. 4 หน้า.
- จตุพร พงษ์เพ็ง มุขดา รัตนภาสกร สุดา จันทาสี กิตติศักดิ์ แสงสกุล และ จำเนียร สายขุน. 2551. ผลของการเติมกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ 28 องศาเซลเซียสต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโค. http://www.dld.go.th/biotech/Data/Noom/Document_Announces/Journal/Journal2551.pdf accessed 21 March 2009.
- จิรุตม์ รัตนเทพ รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล และภาณุพันธ์ พงษ์เพ็ง. 2547. การพัฒนาคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคโดยใช้ชนิดกลีเซอรอลและเวลาปรับสมดุลของตัวอสุจิที่เหมาะสม. ประมวลเรื่อง การประชุมวิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่ 19 ประจำปี 2547 งานมหกรรมเนื้อ นม ไข่ ปศุสัตว์ไทยปลอดภัยสู่ครัวโลก 26-30 พฤษภาคม 2547 ณ พิพิธภัณฑ์เฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี. 231 หน้า.
- รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล สุรจิต ทองสอดแสง ชาลี ลีละสิริ และสินชัย วิโรจน์วุฒิกุล. 2544. การเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคด้วยน้ำยาเจือจางและวิธีการที่ต่างกัน. สัตวแพทยสาร. 52(1-2) เมษายน-สิงหาคม. หน้า 47-55.
- Abaigar, T., Holt, W.V., Harrison, R.A.P. and del Barrio, G. 1999. Sperm subpopulations in Boar (*Sus scrofa*) and Gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Biol. Reprod.* 60: 32-41.
- Agarwal, A., Sharma, R.K. and Nelson, D.R. 2003. New semen quality scores developed by principal component analysis of semen characteristics. *J. Androl.* 24: 343-352.
- Amann, R.P. 1988. Computerized evaluation of stallion sperm. In: *Proceedings of the 32th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners*. Lexington, Ky. p. 453-473.
- Andersson, M. 2003. Effect of insemination with doses of 2 or 15 million frozen-thawed spermatozoa in semen deposition site on pregnancy rate in dairy cows. *Theriogenology*. 61(8): 1583-1588.
- Bearden, H.J., Fuquay, J.W. and Willard, S.T. 2004. *Applied Animal Reproduction*. 6th ed. Pearson Prentice Hall, New Jersey, USA. p. 427.

- Critser, J.K., Huse-Benda, A.R., Aaker, D.V., Arneson, B.W. and Ball, G.D. 1988. Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertil. Steril.* 50: 314-320.
- Curry, M.R. 2000. Cryopreservation of sperm from domestic livestock. *Rev. Reprod.* 5: 46-52.
- Foote, R.H. and Kaproth, M.T. 2002. Large batch freezing of bull semen: Effect of time of freezing and fructose on fertility. *J. Dairy Sci.* 85: 453-456.
- Graham, J.K. 2001. Assessment of sperm quality: a flow cytometric approach. *Anim. Reprod. Sci.* 68: 239-247.
- Holt, W.V. and North, R.D. 1994. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. *Biol. Reprod.* 51:414-424.
- Januskauskas, A., Johannisson, A., Rodriguez-Martinez, H. 2003. Subtle membrane changes in cryopreserved bull semen in relation with sperm viability, chromatinstructure, and field fertility. *Theriogenology.* 60:743-758.
- Kathiravan, P., Kalatharan, J., Edwin, M.J. and Veerapandian, C. 2003. Computer automated motion analysis of crossbred bull spermatozoa and its relationship with in vitro fertility in zona-free hamster oocytes. *Anim. Reprod. Sci.* 104(1): 9-17.
- Lessard, C., Parent, S., Leclerc, P., Bailey, J. and Sullivan, R. 2000. Cryopreservation alters the levels of the bull sperm surface protein P25b. *J. Androl.* 21(5): 700-707.
- Liu, Z., Foote, R.H. and Brockett, C. 1998. Survival of bull sperm frozen at different rates in media varying in osmolarity. *Cryobiology.* 37(3): 219-230.
- McLaughlin, E.A., Ford W.C., Hull, M.G. 1992. The contribution of the toxicity of a glycerol-egg yolk-citrate cryopreservative to the decline in human sperm motility during cryopreservation. *J. Reprod. Fertil.* 95:749-754.
- Miro, J., Lovo, V., Quintero-Moreno, A., Medrano, A., Pena, A. and Rigau, T. 2005. Sperm motility patterns and metabolism in Catalanian donkey semen. *Theriogenology.* 63: 1706-1716.
- Mortimer, R.G., Berndtson, W.E., Ennen, B.D. and Pickett, B.W. 1976. Influence of glycerol concentration and freezing rate on post-thaw motility of bovine spermatozoa in continental straws. *J. Dairy Sci.* 59(12): 2134-2137.
- Peters, A.R. and Ball, P.J.H. 1995. *Reproduction in Cattle.* 2nd Ed. Blackwell Science Ltd. p. 82-84.

- Robbins, R.K., Saacke, R.G. and Chandler, P.T. 1976. Influence of freeze rate, thaw rate and glycerol level on acrosomal retention and survival of bovine spermatozoa frozen in French straws. J. Anim. Sci. 42(1): 145-154.
- Shannon, P. and Vishwanath, R. 1995. The effect of optimal and suboptimal concentrations of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility differences. Anim. Reprod. Sci. 39:1-10.
- Tardif, A.L., Farrell, P.B., Trouern-Trend, V. and Foote, R.H. 1997. Computer-assisted sperm analysis for assessing initial semen quality and changes during storage at 5°C. J. Dairy Sci. 80: 1606-1612.
- Thomas, C.A., Garner, D.L., deJarnette, J.M. and Marshall, C.E. 1998. Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. Biol. Reprod. 58: 786-793.

Effects of cell culture and injectable grades of antibiotics on the quality and fertility of frozen-thawed bull semen

M. Rattanappaskorn¹, K. Sangsakul², S. Wiroachwuthikul³, R. Uavechnichkul¹,
K. Kornkaewrat⁴ and K. Saikhun⁵

Abstract

Antibiotics added in extender during production of frozen semen play an important role for decreasing microbial contamination. The objective of the present study was to examine the effects of different grade of antibiotics (cell culture grade vs injectable grade) supplemented in the semen extender on the quality and fertility of frozen-thawed bull sperm. Semen samples collected from six bulls were frozen in Tris egg yolk extender containing either cell culture grade antibiotics (GTLS: 250 µg/ml gentomycin, 50 µg/ml Tylosin, 150/300 µg/ml Lincomycin/Spectinomycin) or injectable grade antibiotics (GTLSS₄: 250 µg/ml gentamycin, 50 µg/ml Tylosin, 150/300 µg/ml Lincomycin/Spectinomycin and 400 µg/ml gentomycin. The thawed samples were evaluated for bacteriological contamination, semen quality and fertility.

Progressive motility and curvilinear velocity (VCL) of sperm in GTLS group were significantly ($P < 0.05$) higher than that in GTLSS₄ group. There were no significant differences in percentages of total motility and other motility characteristics, membrane and acrosomal status of sperm among antibiotic grades. There were no significant differences in the calving rates following artificial insemination (AI) with frozen semen derived from GTLS (51.6 ± 6.3) or GTLSS₄ (49.8 ± 3.9) groups. The results indicated that injectable antibiotics which cheaper than cell culture grade can be effectively used for producing frozen semen without affect the semen quality and fertility of bull sperm.

¹Semen Research and Production sub-Division, Bureau of Biotechnology for Animal Production, Pathumthani 12000, Thailand

²Chonburi Biotechnology and AI Research, Bureau of Biotechnology for Animal Production, Chonburi 20170, Thailand

³Lamphayaklang Livestock Semen Production Center, Lopburi 15190, Thailand

⁴Faculty of Veterinary Medicine, Kasetsart University, Nakhonpathom 73140, Thailand

⁵Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya, Nakhonpathom 73170, Thailand

INTRODUCTION

The two major goals for artificial insemination (AI) are genetic improvement of livestock breeds for increasing milk and meat production and elimination of venereal diseases. However, it is well accepted that bacterial and viral agents can be transmitted in semen by AI. It has been shown that microorganisms can be found in ejaculates even during hygienic semen collection in the perfectly and healthy bulls. Semen was contaminated at the time of collection from atmosphere, teaser animals and semen extenders. So, additional of antibiotics into semen diluents is necessary to prevent proliferation of the bacteria present in the ejaculated semen.

In Thailand, 87% of fresh semen samples were contaminated with ureaplasma whereas 52% were contaminated with mycoplasma (REF). The semen samples were also contaminated with *Pseudomonas* (41%), which 6% of them were *Pseudomonas aeruginosa* and 6% were *Corynebacterium pyogenes* but free from *Campylobacter spp.* and *Hemophilus somnus* (Ratanapaskorn et al., 1996). Shin et al (1988) reported that the combination of gentamicin (250 µg/ml), tylosin (50 µg/ml) and Linco-Spectin (150/300 µg/ml) (GTLS) was more effective for the control of mycoplasmas and ureaplasmas and equally effective for the control of *C. fetus subsp. venerealis* and *Haemophilus somnus* than the standard combination of penicillin, dihydrostreptomycin and polymyxin B sulfate. The combination of GTLS was partially controlled ureaplasma and mycoplasma by decreasing the contamination from 87 to 27% and from 51 to 14%, respectively (Ratanapaskorn et al., 1996). Most of laboratory worldwide including in Thailand used cell culture grade antibiotics which typically are pure and have been proven for the quality in producing the frozen semen. Although they are effectiveness for the control of microorganism, however, it is more expensive, while injectable antibiotics available for animals are more cheaper. Therefore, the objective of this study was to investigate the effects of cell culture and injectable grades antibiotics supplemented in the semen extender on the quality and fertility of frozen-thawed bull sperm.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals

All chemicals in this study were purchased from Sigma Chemical Company (Sigma, St. Louis, MO, USA), unless stated otherwise.

Animals and semen collections

Six Thai Holstein dairy bulls housed at the bull stud, Loburi province, Thailand were included in this study. Semen samples from each bull were collected by artificial vagina. Immediately after the collection, each ejaculate was visually assessed for sperm motility under a phase contrast microscope (400x) equipped with a warm stage (37°C). Sperm concentration was assessed using a calibrated spectrophotometer (model REF.Z160, IMV, France). Samples containing $\geq 70\%$ motile sperm, and $\geq 500 \times 10^6$ cells/ml were used in this study.

Semen freezing and thawing

Two consecutive ejaculates were pooled and diluted to a concentration of 80×10^6 cells/ml with a cryodiluent (20% egg yolk-Tris) containing either GTLS (250 µg/ml gentomycin, 50 µg/ml Tylosin, 150/300 µg/ml Lincomycin/Spectinomycin) or GTLSsS₄ (250 µg/ml gentamycin (Gentalvet), 50 µg/ml Tylosin (Tylovet), 150/300 µg/ml Lincomycin/Spectinomycin (Phamacia) and 400 µg/ml gentomycin (Merk). The diluted samples were frozen in the 0.25 ml labeled plastic straw using a Digitcool 5300 controlled rate freezer (IMV, France). The frozen straws were stored in liquid nitrogen until examine. For thawing, the frozen samples were rapidly thawed by placing the straws in a 37 °C water bath for 30 s. The semen samples were expelled into a 50 ml tube and kept in a 37 °C water. Ten microlitres of the thawed semen were then taken and placed on a pre-warmed microscopic slide and the post-thaw sperm motility was assessed under a phase contrast microscopy (400x). The frozen-thawed samples with a $\geq 40\%$ motility were accepted for AI.

Bacteriological examination of fresh and frozen-thawed semen

Fresh and frozen-thawed semen samples were evaluated for *ureaplasma diversum* (Ud), *mycoplasma spp.*, *campylobacter fetus* and *leptospira spp.* contaminations. For detection Ud, semen samples were serially diluted until 10^{-7} with Taylor–Robinson (TR) broth (PPLO broth w/o cv 10 % (w/v), 0.04 % phenol-red solution, 20 % (v/v) horse serum (inactivated), 2.5 % (v/v) fresh yeast extract, 0.1 % (w/v) urea, 5,000 iu/ml Penicillin G, 0.1 % thallium acetate and the pH was adjusted to 5.7 - 5.8) and were incubated at 37 °C for 4 days. To detect mycoplasma, semen was serially diluted until 10^{-5} with modified Hayflick (mH) broth (mH broth has the same fomular with PPLO broth except 0.2% DNA calf thymus were added in stead of urea and adjust pH to 7.8) and incubated for 4 days. Each diluted mH broth was inoculated onto mH agar plate and incubated for 5 days at 37°C under 5% CO₂ atmosphere to observe growth of mycoplasma colony. To detect campylobacter fetus, semen was cultured in blood agar plate No.2 and Butzler (campylobacter selective supplement, Oxoid) using Campygen (Oxoid) to control atmosphere in the dessicator, incubated at 37°C for 3

days. To detect *Leptospira* spp., semen was cultivated in EMJH medium supplemented with inactivated rabbit serum, incubated at 28°C and observed for 8 weeks (Heinemann et al., 2000).

Semen quality evaluation

Motility and movement characteristics Assessment by CASA

In order to assess for motility and movement characteristics, 5 µl of the thawed semen was placed on a prewarmed (37°C) 2X-CELL slide chamber (20 µm depth) and analyzed by CASA (IVOS, Hamilton Thorne Research, Beverly, MA, USA). At least 800 sperm were analyzed for total and progressive motility (PM) and movement characteristics including average path velocity (VAP), progressive velocity (VSL), curvilinear velocity (VCL), beat cross frequency (BCF), straightness of track (STR), amplitude of lateral head displacement (ALH), and linearity of track (LIN).

Membrane and acrosome integrity assessment by flow cytometry

The fluorescent probes used for membrane and acrosome integrity assessment were PI and FITC-PNA, respectively. The thawed semen was washed immediately by dilution with 10-fold volume of Hepes-buffered modified Tyrode medium (SP-TALP; 2.0 mM CaCl₂, 3.1 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂, 100.0 mM NaCl, 25.0 mM NaHCO₃, 0.3 mM NaH₂PO₄, 1.0 mM sodium pyruvate, 21.6 mM sodium lactate, 10.0 mM Hepes, and 6 mg/ml BSA) at 37°C and filtered through 41 mm nylon mesh (Spectrum, Los Angeles, CA) and centrifuged at 500g for 10 min at room temperature to remove cell debris and extenders. The washing procedure was repeated twice. The sperm pellet was resuspended in 1 ml of SP-TALP and the concentration was adjusted to 50×10⁶ cells/ml. For staining, a 440-µl aliquot of sperm suspension was mixed with 10 µl of PI (marker for membrane damage) and 50 µl of FITC-PNA (marker for acrosome damage) to obtain final concentrations of 25 and 10 µg/ml, respectively. Each sample was incubated at 37°C for 30 min in the absence of light. The stained samples were filtered through 41 mm nylon mesh and subjected to flow cytometric analysis.

Assessment of in vivo fertility by AI

Artificial insemination series using frozen semen from six bulls were conducted at Chantaburi and Srakaew provinces. The cows, body condition score ranged from 3 to 4 (REF) were inseminated on the second heat after calving with semen frozen in either GTLS (n= 1260) or GTLSsS₄ (n=1,445). The calving rates were recorded.

RESULTS

Bacteriological examination in fresh and frozen-thawed semen

Fifteen fresh and frozen samples were examined for bacteriological contamination. There was no contamination of mycoplasma, campylobacter, leptospire in either fresh or frozen-thawed semen. By contrast, 14 out of 15 (93%) fresh semen samples were contaminated with ureaplasma at 10^2 to 10^5 CCU/ml, whereas only 1 out of 15 (7%) of frozen-thawed sample was contaminated at 10^2 to 10^4 CCU/ml.

Assessment of motility and movement characteristics by CASA

Effect of different sources of antibiotics on motility and movement characteristics of frozen-thawed sperm analyzed by CASA is summarized in Table 1. There were no significant differences in percentages of total motility of frozen-thawed sperm among antibiotic sources. By contrast, progressive motility of sperm diluted in extender containing GTLS was significantly ($P < 0.05$) higher than that in GTLSsS₄ group. No significant difference in the sperm movement characteristics between groups was observed, except for VCL in GTLS group was significantly higher ($P < 0.05$) than that in GTLSsS₄ group (147.9 ± 17.9 vs 138.8 ± 14.3).

Table 1. Mean $\pm$ SD of motility, progressive motility and movement characteristics of bull sperm following freezing and thawing in egg yolk Tris containing either GTLS or GTLSsS₄.

Parameters	No. of bull	GTLS ¹	GTLSsS ₄ ²
Motility (%)	20	56.0 ± 15.3^a	53.9 ± 13.1^a
PM (%)	20	32.2 ± 10.0^a	27.2 ± 8.2^b
VAP	20	85.2 ± 6.8^a	82.5 ± 7.2^a
VSL	20	65.9 ± 5.1^a	64.0 ± 5.8^a
ALH	20	7.8 ± 1.3^a	7.3 ± 0.9^a
VCL	20	147.9 ± 17.9^a	138.8 ± 14.3^b
BCF	20	25.8 ± 4.0^a	25.5 ± 4.3^a
STR	20	76.4 ± 5.5^a	77.4 ± 5.5^a
LIN	20	46.8 ± 5.5^a	47.4 ± 4.8^a

GTLS: cell culture grade antibiotics; GTLSsS₄: injectable grade antibiotics

Different superscripts in the same rows differ significantly ($P < 0.05$).

Assessment of membrane and acrosome integrity by flow cytometry

Percentage of membrane and acrosome integrity of frozen-thawed sperm analyzed by flow cytometry is summarized in Table 2. There were no significant differences among antibiotic sources (GTLS vs GTLSsS₄) in percentages of sperm with membrane-acrosome intact, membrane damage -acrosome intact and membrane-acrosome damage.

Table 2. Percentages (mean $\pm$ SD) of membrane and acrosomal status of bull sperm following freezing and thawing in egg yolk Tris containing either GTLS or GTLSsS₄.

Parameters	No. of bull	GTLS	GTLSsS ₄
Membrane-acrosome intact	20	53.0 $\pm$ 10.0	54.2 $\pm$ 9.7
Membrane damage - acrosome intact	20	23.4 $\pm$ 7.9	21.8 $\pm$ 5.5
Membrane-acrosome damage	20	23.7 $\pm$ 10.0	24.0 $\pm$ 7.7

GTLS: cell culture grade antibiotics; GTLSsS₄: injectable grade antibiotics

No significant differences in percentages of membrane and acrosomal status of bull sperm among antibiotic groups ($P > 0.05$).

Artificial insemination and calving rate

Number of cow inseminated with sperm from each six bulls frozen in extender containing either GTLS or GTLSsS₄ and calving rate are summarized in Table 3. A total of 2,705 cows were inseminated, 1260 and 1,445 cows were inseminated with sperm treated with GTLS and GTLSsS₄, respectively. There were no significant differences in calving rates following AI with sperm derived from Bulls 1 to 5 (B1 to B5) frozen in extender containing either GTLS or GTLSsS₄. By contrast, calving rate produced by Bull 6 (B6) showed significantly higher ($P < 0.05$) in GTLS group than that in GTLSsS₄ group (62.6 vs 54.5).

Table 3. Calving rates following AI with bull sperm cryopreserved in egg yolk Tris containing either GTLS or GTLSsS₄.

Bulls	GTLS		GTLSsS ₄	
	No. of cow	Calving rate (%)	No. of cow	Calving rate (%)
B1	226	48.7 ^a	238	46.6 ^a
B2	167	52.1 ^a	263	49.8 ^a
B3	224	48.7 ^a	228	50.4 ^a
B4	229	53.3 ^a	241	54.4 ^a
B5	243	44.0 ^a	240	46.6 ^a
B6	171	62.6 ^a	235	54.5 ^b
Total	1260	51.6 ± 6.3	1,445	49.8 ± 3.9

GTLS: cell culture grade antibiotics; GTLSsS₄: injectable grade antibiotics

Different superscripts in the same rows differ significantly ($P < 0.05$).

DISCUSSION

A number of microorganisms can be found either in fresh ejaculated semen or frozen semen that contaminated during the procedures of semen freezing. Moreover, bacterial contamination is also present in the yolks of fresh eggs (Bousseau et al., 1998). Therefore, there is a need to add antibiotics in semen extender to prevent microbial contamination. The present study showed that injectable grade antibiotics (GTLSsS₄) can be successfully used to prevent bacterial contamination without decreasing semen quality and fertilizing ability of frozen semen comparable to cell culture grade ones (GTLS). These findings have a benefit for reducing the cost of frozen semen production due to injectable grade antibiotics were cheaper than cell culture grade ones.

To reduce the risk of semen donors from microbial contamination, all semen donors in the Semen Production Centre have to carefully checked and free from IBR and BVD. Furthermore, prepuce washing before semen collection decreased bacterial contamination such as *Campylobacter fetus*, *Trichomonas* or ureaplasma (Chanarthinat et al., 1997; Rattanapaskorn et al., 1996). The antibiotic combination (gentamicin, tylosin and Linco-Spectin: GTLS) used in this study was effective in controlling microorganisms and was not detrimental to seminal quality (progressive motility and acrosomal integrity), which agrees with previous study (Lorton et al., 1988a). Field fertility (nonreturn rate) studies were performed to evaluate bovine semen

processed for freezing using the antibiotics (GTLS). The results indicated no significant effect on seminal quality as measured by field fertility under the conditions of these experiments using heated whole milk or egg yolk-sodium citrate seminal extenders (Lorton et al., 1988b). The combination of gentamicin, tylosin, and Linco-Spectin® can be safely used in bull semen to control specific contaminating organisms and is being adopted by the artificial breeding industry (Ahmad et al., 1987). It has been reported that gentamicin was harmless to motility and acrosomal status of frozen-thawed bull sperm, by contrast, it appeared to reduce fertility of bull semen in a field trial (Ahmad et al., 1987; Ahmad and Foote, 1986). Tylosin is effective against mycoplasma and ureaplasma in bovine semen (Truscott and Abreo, 1978), addition of this antibiotic to processed bull semen may be useful to inhibit these potential semen contaminants. Moreover, motility and fertility of tylosin-treated bull sperm was comparable with fertility of control semen (Ahmad et al., 1987; Foote and Berndtn, 1976). Linco-Spectin® has been reported successfully used in bull semen as an antimycoplasma agent without affecting sperm motility or fertility (Ahmad et al., 1987).

Injectable grade antibiotics did not affect percentages of motility, plasma and acrosomal membranes of frozen-thawed sperm as compared to cell culture grade ones. Furthermore, differences grade of antibiotics did not affect calving rates following AI. Sperm is complex cell, which need to possess many attributes (motility, an intact acrosome, ability to bind to the zona pellucida, ability to bind to the oolemma, etc.) in order to fertilize an oocyte. A number of motile sperm cells are required for enhancing the fertilizing ability of frozen-thawed semen, sperm may be infertile due to a lack of motility. High fertility sperm after freezing and thawing must has an intact and competent plasma membrane which easily to rupture during the freeze/thaw cycle causes intracellular ice formation (Steponkus et al., 1983), a major cause of cell death during cryopreservation (Mazur, 1977). High fertilizing sperm must maintain an intact acrosome up to the time it binds to the zona pellucida of the oocyte and undergoes the acrosome reaction, which releases the acrosomal enzymes permitting the sperm to digest a hole through the zona pellucida, thereby allowing the spermatozoa access to the oolemma (Yanagimachi, 1981). In conclusion, injectable grade antibiotics which cheaper than cell culture grade can be successfully used to produce frozen semen without affect the semen quality and fertility of bull sperm. These succeed can be used in AI industry.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Monchai Duangjinda, Faculty of Agriculture, Khonkaen University, and Khun Puttana Roongrawee, Information Technology Center, Department of Agriculture, for expert assistance in the statistical analysis.

REFERENCES

- Ahmad K, Foote RH.. Postthaw survival and fertility of frozen bull spermatozoa treated with antibiotics and detergent. J Dairy Sci 1986, 69:535.
- Ahmad K, Foote RH, Kaproth M. Antibiotics for bull semen frozen in milk and egg yolk extenders. J Dairy Sci 1987, 70:2439-43.
- Bousseau S, Brillard JP, Marguant-Le Guienne B, Guérin B, Camus A, Lechat M. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. Theriogenology 1998;50:699-706.
- Chanatinart V, Uavechanichkul,R, Ratanapaskorn M. Enhancing quality of deep frozen bull semen by reducing bacterial contamination. Artificial Insemination Bulletin 1997, 8: 2-10.
- Foote RH, Berndtn WE. Antibacterial agents for bull semen; do they help so? In Proc. 6th Tech. Conf. Artif. Insem. Reprod. Natl. Assoc. Anlm. Breeders, Columbia, MO. 1976. p23.
- Lorton SP, Sullivan JJ, Bean B, Kaproth M, Kellgren H, Marshall C. A new antibiotic combination for frozen bovine semen. 2. Evaluation of seminal quality. Theriogenology 1988a, 29:593-607.**
- Lorton SP, Sullivan JJ, Bean B, Kaproth M, Kellgren H, Marshall C. A new antibiotic combination for frozen bovine semen,3. Evaluation of fertility. Theriogenology 1988b, 29:609-14.**
- Mazur P. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. Cryobiology 1977, 14:251-72.
- Ratanapaskorn M, Ua-Vechnichkul R, Suvimonteerabutr J, Virakul P. Bacteria in Bull's Ejaculate and the use of antibacterial agents in deep frozen Semen. Thai J Vet Med 1996, 26:369-378.
- Shin SJ, Lein DH, Patten VH, Ruhnke LH. A new antibiotic combination for frozen bovine semen 1. Control of . *Mycoplasmas*, *Ureaplasmas*, *Campylobacter fetus subsp. Venerealis* and *Haemophilus somnus* Theriogenology 1988, 29:577-591.**
- Steponkus PL, Dowgert MF, Gordon-Kamm WJ. Destabilization of the plasma membrane of isolated plant protoplasts during a freeze-thaw cycle: the influence of cold acclimation. Cryobiology 1983, 20:448-65.
- Truscott RB, Abreo C. Antibiotics for elimination of mycoplasma and ureaplasma from bovine semen. J Dairy Sci 1978, 60:954.
- Yanagimachi R, Okada A, Tung KS. Sperm autoantigens and fertilization: II. Effects of anti-guinea pig sperm autoantibodies on sperm-ovum interactions. Biol Reprod 1981,24:512-8.

การสำรวจระดับแอนติบอดีต่อโรคคลาไมเดียในโคเขต 1

พรรณพิไล เสกสิทธิ์¹ และ อรุณ จันทร์กระจ่าง²

บทคัดย่อ

ศึกษาในระดับแอนติบอดีต่อโรคคลาไมเดียในโคเพศเมียจำนวน 1672 ตัวจากฟาร์มเกษตรกรในจังหวัดสระบุรีและลพบุรี 167 ฟาร์ม และโคเพศผู้ที่เลี้ยงไว้เป็นพ่อพันธุ์จำนวน 74 ตัวโดยการตรวจจากซีรัมด้วยวิธี ELISA โดยโคเพศเมียที่ศึกษามีประวัติเคยแท้งลูกจำนวน 86 ตัว (6.63%) ผสมติดยากและมีประวัติการผสมซ้ำเกิน 5 ครั้งจำนวน 327 ตัว (25.19%) การวิเคราะห์ระดับแอนติบอดีต่อโรคคลาไมเดียใช้ชุดตรวจโรคคลาไมเดียในโคชนิดสำเร็จรูป (Chlamydia antibody test kit –EVL diagnostic division) อ่านผลจากการวัดแสงเทียบกับน้ำยามาตรฐานบวก และลบ ผลการวิเคราะห์ไม่พบโคตัวใดที่ให้ผลบวก แสดงว่าในโคกลุ่มศึกษาไม่เคยเป็นโรคคลาไมเดีย ปัญหาการผสมพันธุ์ที่เกิดขึ้นอาจจะเกิดจากสาเหตุอื่น

คำสำคัญ: แอนติบอดี คลาไมเดีย โค

1 สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ จังหวัดปทุมธานี 12000

2 ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี จังหวัดสระบุรี 18110

* ผู้รับผิดชอบ โทรศัพท์ 02-9639220 โทรสาร 02-9639220 E-mail : panpilais@dld.go.th

Survey for antibody to Chlaydia psittaci in Cattle in Livestock Region 1

Panpilai Sekasiddhi^{1*} and Arun Chankrachang²

ABSTRACT

Serum samples of 1,672 heifers and cows from 167 farms in Saraburi and Lopburi provinces and 74 young bulls in Saraburi AI and Technology Research Center were examined for chlamydial antibodies using ELISA technique. From the data eighty six cows of this group (6.63%) were aborted and 327 cows (25.19%) were inseminated more than 5 times. Results from ELISA (Chlamydia antibody test kit –EVL diagnostic division) were all negative. We concluded that all of these cattle were free from chlamydiosis. Breeding problems in these cows might be other causative agants

Keywords : antibody, Chlamydia ,cattle

¹ Bureau of Biotechnology in Animal Production, Tambol Banghadee, Amphur Muang, Pathumthani 12000.

² Saraburi AI and Technology Research Center, Tambol Tabkwang, Amphur Kaengkhroi, Saraburi 18110.

* Corrsponding author Tel. 02-9639220 Fax. 02-9639220 E-mail : panpilais@dld.go.th

บทนำ

ปัญหาการผสมติดยาก ผสมซ้ำหลายครั้ง ตลอดจนการผสมติดแต่แท้งลูกเป็นปัญหาที่ผู้เลี้ยงโคมักจะประสบอยู่เสมอ โรคติดต่อทางการสืบพันธุ์โรคหนึ่งที่น่าจะมองข้ามคือโรคคลาเมียเฉียบซึ่งเกิดจากเชื้อแบคทีเรียคือ *Chlamydia* spp. ถึงแม้ว่ายังไม่เคยมีรายงานการเกิดโรคนี้ในโคในไทย แต่โรคนี้ก็มีความสำคัญต่อสุขภาพของสัตว์ตลอดจนการสืบพันธุ์ น่าที่จะทำการสำรวจโรคนี้โดยเฉพาะในฟาร์มที่มีแม่โคมีประวัติแท้งลูก มีปัญหาผสมไม่ติด ผสมซ้ำหลายครั้ง โรคนี้อาจติดจากสัตว์ปีก โคป่วยจะมีน้ำมูก น้ำตาไหล ท้องเสีย และเป็นสาเหตุของการแท้งลูกในโค เชื้อเป็นสาเหตุของการติดเชื้อในระบบหายใจอย่างเฉียบพลัน หลอดลมอักเสบ ปอดบวม เต้านมอักเสบ แท้งลูก ลำไส้อักเสบ ท้องเสีย สมออักเสบ (Fukushi and Hirai, 1992) และเป็นโรคสัตว์ติดคน (Bazala and Renda, 1992) นอกจากนี้ในสัตว์ที่เป็นพาหุพันธุ์ก็อาจเกิดโรคได้และสามารถปล่อยเชื้อลงในน้ำเชื้อ (Teankum et al., 2007) วัตถุประสงค์ของการศึกษารั้งนี้เพื่อสำรวจหาระดับแอนติบอดีต่อโรคคลาเมียเฉียบในลูกโค โคสาว และโคที่มีปัญหาผสมซ้ำหลายครั้ง หรือเคยมีประวัติแท้งลูกในฟาร์มโคที่เลี้ยงอยู่ในจังหวัดสระบุรีและลพบุรีซึ่งเป็นแหล่งที่มีการเลี้ยงโคหนาแน่นส่วนหนึ่งของประเทศและโคเพศผู้วัยรุ่น (young bull) ที่เลี้ยงไว้ในศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี สำหรับเป็นพาหุพันธุ์ผสมเทียม

อุปกรณ์และวิธีการ

วิธีการดำเนินการวิจัย

ทำการสำรวจข้อมูลแม่โค ที่มีปัญหาผสมซ้ำหลายครั้ง หรือเคยมีประวัติแท้งลูก จำนวน 167 ฟาร์มในจังหวัดสระบุรีและลพบุรี เก็บตัวอย่างเลือดจากโคทุกตัวในฟาร์มจำนวน 1672 ตัว เก็บข้อมูลการผสมพันธุ์ในโคแต่ละตัว และเก็บตัวอย่างเลือดโคเพศผู้ (young sire) ที่เลี้ยงที่ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี จำนวน 74 ตัว ปั่นแยกเก็บซีรัมและเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาตรวจหาระดับแอนติบอดีต่อโรคคลาเมียเฉียบด้วยวิธี ELISA โดยใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูป (*Chlamydia* antibody test kit –EVL Diagnostic division) และอ่านผลการเกิดปฏิกิริยาโดยการวัดแสง (Absorbance) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร โดยมีน้ำยามาตรฐานบวกและลบเป็นตัวเทียบสี โดยค่าน้ำยามาตรฐานบวกจะต้องมีค่า O.D. สูงกว่า 0.400 และตัวอย่างที่ให้ผลบวกจะต้องมีค่า O.D. สูงกว่าค่าน้ำยามาตรฐานลบ สูงกว่า 3 เท่า

ผลการทดลอง

จากประวัติโคที่ศึกษาพบว่า จำนวนแม่โค 1298 ตัวเคยแท้งลูกจำนวน 86 ตัว (6.63%) การแท้งลูกอยู่ในช่วง 3 เดือนแรก (first trimester) มีจำนวน 11 ตัว แท้งในช่วงกลาง (second trimester หรือ ช่วงเดือนที่ 4-6) จำนวน 12 ตัว และแท้งในช่วงท้าย (เดือนที่ 7 จนถึงคลอด) จำนวน 10 ตัว มีลูกตายหลังคลอด 26 ตัว โคที่มีปัญหาผสมติดยากผสมซ้ำเกินกว่า 5 ครั้ง จำนวน 327 ตัว (25.19%) ซึ่งเป็นโคที่มีปัญหาผสมซ้ำและแท้งลูกด้วยจำนวน 17 ตัว

การตรวจวัดผลปฏิกิริยาแอนติบอดีต่อโรคคลาไมเดียในโคที่สำรวจทั้งหมดให้ผลลบ แสดงว่าไม่มีสถานะของโรคคลาไมเดียในโคในฟาร์มที่สำรวจและกลุ่มโคเพศผู้ที่เป็น young sire ตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลของปฏิกิริยาแอนติบอดีต่อโรคคลาไมเดียจากการใช้ชุดตรวจสำเร็จรูป

ชนิดของโค	จำนวน	ค่า O.D. ของ +ve control	ค่า O.D. ของ -ve control	ค่า O.D. ของ ตัวอย่าง	ผลการ วิเคราะห์ ตัวอย่าง
ลูกโค	131	1.152	0.310	0.308-0.406	ให้ผลลบ
โครุ่น	243	1.062	0.333	0.320-0.476	ให้ผลลบ
แม่โค	1298	1.086	0.339	0.337-0.555	ให้ผลลบ
เคยแท้งลูก	26				
ลูกตายหลัง คลอด	327				
ผสมติดยาก ผสมซ้ำเกิน 5 ครั้ง	327				
โคผู้	74	1.022	0.340	0.332-0.433	ให้ผลลบ
รวม	1746				ให้ผลลบ

วิจารณ์

ถึงแม้ว่าการศึกษานี้จะไม่พบโคที่ให้ผลบวกต่อโรคคลามัยเดีย แต่โรคนี้อาจเกิดแบบ outbreak ในประเทศญี่ปุ่น (Nabeya et al., 1991) Cavirani et al. (2001) พบ seroprevalence ของ *Chlamydia psittaci* ที่ประเทศอิตาลี Norton et al (1989) พบปัญหาการแท้งลูกที่เกิดจาก *Chlamydia psittaci* 3.1% Lisak et al (1989) พบ 7.1% และ Sachse and Grossmann (2002) พบการเกิดโรคในประเทศเยอรมัน เชื้อคลามัยเดียเป็นเชื้อที่พบได้ใน โค ม้า แมว สุนัข (Ulrike et al., 2004) และแกะ (Travnicek et al , 2001) Griffiths et al (1995) พบว่าโคติดจากแกะในฟาร์มที่มีการเลี้ยงสัตว์สองชนิดร่วมกัน Katoch et al. (2003) พบผลบวกต่อโรคคลามัยเดียใน normal yaks การตรวจกรองปัญหาการแท้งลูกซึ่งเป็นปัญหาที่เกิดจากสาเหตุต่างๆหลายประการนั้น นอกจากจะตรวจโรคเช่น BHV , BVD , *Leptospira hardjo* แล้วก็ควรตรวจ *Chlamydia psittaci* ด้วย (Akkermans and Kreeft, 1992) แต่เนื่องจากการศึกษาในภาพรวมทั้งหมดต้องใช้งบประมาณสูง จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาเฉพาะโรคคลามัยเดียเนื่องจากโรคนี้อาจจะติดเชื้อมาจากนก ซึ่งสภาพการเลี้ยงในฟาร์ม นอกจากการเลี้ยงสุนัขที่อาจจะเดินหรือนอนอยู่ตามคอกสัตว์แล้ว ยังมีการเลี้ยงไก่ซึ่งเดินไปตามรางอาหาร หรือแปลงหญ้า นอกจากนี้ก็มีนกบินเกาะตามต้นไม้ หรือนกกระจอกที่หาอาหารตามรางอาหาร แต่

การติดเชื้อในสัตว์เคี้ยวเอื้องมักจะเป็น serovar 1 (omp I type *Chlamydia psittaci* B 577) ทำให้เกิด enteritis , seminal vesiculitis โคท้องแท้งลูก ซึ่งเชื้อ *Chlamydia psittaci* B 577 นี้จะทำให้คนที่อยู่ใกล้ชิดกับสัตว์ที่เป็นโรคติดโรคได้ (Kaltenboeck et al., 1997) โดย McKinlay et al. (1985) พบว่ามีคนที่ติดเชื้อคลามัยเดียจากแกะที่แท้งลูกแบบ enzootic เชื้อ *Chlamydia trachomatis* ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคสัตว์ติดคนนั้นเป็นเชื้อที่อยู่ในร่างกายของคนและสัตว์แบบปรสิตรได้นาน (Bazala and Renda, 1992) ในโคเชื้อที่เป็นสาเหตุของการแท้งแบบ sporadic abortion เกิดการแท้งในระยะท้ายของการตั้งท้องในช่วงใกล้คลอด (last trimester) แต่อาจจะเกิดในช่วงต้นของการตั้งท้องก็ได้ โดยมีวิธีการที่รบกวนการหดตัวมีการอักเสบ (placentitis) cotyledon และ intercotyledonary area มี exudate สีเหลืองน้ำตาล บางตัวอาจมีปอดบวม และตับอักเสบ (hepatitis) ร่วมด้วย (www.merckvetmedmanual.com) ในฟอโคที่ตรวจพบผลบวกจากการตรวจทาง serology พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับการ shred เชื้อลงในน้ำเชื้อ (Kaufford et al., 2007)

ถึงแม้ว่าในการศึกษานี้จะไม่พบโคที่มีแอนติบอดีต่อโรคคลามัยเดีย ผู้วิจัยคิดว่าควรที่จะเฝ้าระวังโรคนี้อย่างใกล้ชิดเนื่องจาก Wittenbrink et al (1994) พบโคที่ติดเชื้อคลามัยเดียในโคที่เป็น repeat breeder และมดลูกอักเสบเป็นส่วนใหญ่ Cox et al (1998) รายงานการพบเชื้อคลามัยเดียในโคแท้งลูกเป็นชนิด mammalian serovar 1 ซึ่งไม่ได้เกิดจากการแพร่เชื้อจากนก การสำรวจโรคนี้อาจจะใช้วิธี ELISA เนื่องจากโคที่ติดเชื้อคลามัยเดียจะมี Antibody titer ต่อ chlamydial genus-specific-LPS-antigen แต่ในฟอพื้นฐานจะทำการตรวจในน้ำเชื้อ (Teankum et al, 2007)

เอกสารอ้างอิง

- Abortion in cattle : overview.[online] Available :www.merckvetmanual.com/mvm/htm/bc/110400.htm
Access 6/3/2551.
- Akkermans, J.P. and Kreeft, H.J. 1992. Results of studies with aborted cattle fetuses. *Tijdschr Diergeneeskd* 117 : 375 – 379.
- Bazala, E. and Renda, J. 1992. Latent chlamydia infections as the cause of health disorders in swine, cattle and sheep breeders in Czechoslovakia. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* 105 : 145 – 149.
- Cavirani, S., Cabassi, C.S., Donofrio, G., De Iaco, B., Taddei, S. and Flammini, C.F. 2001. Association between *Chlamydia psittaci* seropositivity and abortion in Italian dairy cows. *Pre Vet Med* 50 : 145 – 151.
- Cox, H.U., Hoyt, P.G., Poston, R.P., Snider III, T.G., Lemarchand, T.X. and O'Reilly, K.L. 1998. Isolation of an avian serovar of *Chlamydia psittaci* from a case of bovine abortion. *J Vet Diagn Invest* 10 : 280 – 282.
- Fugushi, H. and Hirai, K. 1992. Proposal of *Chlamydia pecorum* sp. Nov. for *Chlamydia* strains derived from ruminants. *Int J Systematic Bact* 42 : 306 – 308.
- Griffiths, P.C., Plater, J.M., Martin, T.C., Hugher, S.L., Hugher, K.J., Hewinson, R.G. and Dawson, M. 1995. Epizootic bovine abortion in a dairy herd : characterization of a *Chlamydia psittaci* isolate and antibody response. *Br Vet J* 151 : 693 – 693.
- Kaltenboeck, B., Heard, D., DeGraves, F.J. and Schmeer, N. 1997. Use of synthetic antigens improves detection by enzyme-linked immunosorbent assay of antibodies against abortogenic *Chlamydia psittaci* in ruminants. *J Clin Microbiol* 35 : 2293 – 2298.
- Katoch, R.C., Sharma, M., Chahota, R., Dhar, P., Chauhan, B.C. and Singh, C. 2003. Seroprevalence of chlamydial infections among buffaloes of Himachal Pradesh, India. *Buffalo Bulletin* 22 : 75 – 77.
- Kauffold, J., Henning, K., Bachmann, R., Hotzel, H. and Melzer, F. 2007. The prevalence of chlamydiae of bulls from six bull studs in Germany. *Anim Reprod Sci* 102 : 111 – 121.
- Lisak, V., Vosta, J. and Rechacek, J. 1989. Incidence of *Coxiella burnetii* and *Chlamydia psittaci* in cattle in Southern Bohemia. *Vet Med (Praha)* 34 : 403 – 410.

- McKinlay, A.W., White, W., Baxton, D., Inglis, J.M., Johnson, W.A., Kurtz, J.B. and Brett, R.P. 1985. Severe Chlamydia psittaci sepsis in pregnancy. C J Med 57 : 689 – 696.
- Nabeya, M., Kaneko, K., Ogino, H., Wakabayashi, D., Watanabe, T., Murayama, J., Hayashi, K., Fukushi, H., Yamaguchi, T., Hirai, K. et al. 1991. Abortion in Japanese cows caused by Chlamydia psittaci. Vet Microbiol 29 : 261 – 265.
- Norton, J.M., Tranter, W.P. and Campbell, R.S. 1989. A farming systems study of abortion in dairy cattle on the Atherton Tableland. 2. The pattern of infectious diseases. Aust Vet J 66 : 163 – 167.
- Sachse, K. and Grossmann, E. 2002. Chlamydial diseases of domestic animals – zoonotic potential of the agents and diagnostic issues. Dtsch Tierarzt Wochenschr 109 : 142 – 148.
- Teankum, K., Pospischill, A., Janett, F., Brugnera, E., Hoelzle, L.E., Hoelzle, K., Weilenmann, R., Zimmermann, D.R., Gerber, A., Polkinghorne, A. and Borel, N. 2007. Prevalence of chlamydiae in semen and genital tracts of bulls, rams and bucks. Theriogenology 67 : 303 – 310.
- Travnicek, M., Kovacova, D., Zubricky, P. and Cislakova, L. 2001. Serosurvey of sheep and goats to Chlamydia psittaci in Slovakia during the years 1996 – 2000. Vet Med-Czech 46 : 281 - 285.
- Ulrike, C., Zen, L., Lloyd, V., Louis, C., Dieter, Z., Wax, W., Andres, P. and Titus, S. 2004. Chlamydiae in Swiss breeding sows with increased rates of return in oestrus. Prpc of 22 nd meeting of the European Society of Veterinary pathology 15 -18 September 2004. Olsztyn-Poland. P.60.
- Wittenbrink, M.M., Schoon, H.A., Schoon, D., Manfeld, R. and Bisping, W. 1993. Endometritis in cattle experimentally induced by Chlamydia psittaci. Zentralbl Veterinarmed B 40 : 437 – 450.
- Wittenbrink, M.M., Kirpal, G., Thiele, D., Fischer, D., Krauss, H. and Bisping, W. 1994. Detection of Chlamydia psittaci in vaginal discharge of cows : a necessary enlargement of bacteriologic diagnosis for the etiologic clarification of fertility disorders in the female cow. Zentralbl Veterinarmed B 41 : 492 – 503.

ระดับฮอร์โมนในโคที่ไม่มีลูกแต่ให้นม

พรรณไพไล เสกสิทธิ์^{1*} สาทิศ ธนวัฒน์ชัย² จำเนียรน เป็กเครือ³

บทคัดย่อ

ศึกษาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน คอร์ติซอล และธัยรอกซิน (ธัยรอกซินและไตรไอโอโดทัยโรนีน) ทุก 3 วันเป็นระยะเวลา 105 วันในชีร์แม่โค(หมายเลข 259) อายุ 15 ปีประวัติเคยมีลูกเพียงตัวเดียวเมื่อมีอายุ 3 ปี แล้วไม่มีลูกอีกเลยเนื่องจากหลังคลอดไม่แสดงอาการเป็นสัด ผสมไม่ติด แต่สามารถให้น้ำนมได้ เป็นเวลานานกว่า 11 ปี และมีระยะแห้งนมเป็นระยะสั้นๆ แล้วมีการสร้างน้ำนมขึ้นมาใหม่ได้เอง ในช่วงของการศึกษาสามารถรีดนมได้เฉลี่ยวันละ 6.37 ± 0.76 กิโลกรัม และในโคสาวอายุ 4 ปีจำนวน 4 ตัว มีการขยายตัวของเต้านมก่อนการผสมพันธุ์และบางตัวสามารถปล่อยน้ำนมได้ โคสาวตัวหนึ่งเป็นเหลนของแม่โคตัวแรก ให้น้ำนมก่อนการตั้งท้อง และในระหว่างการศึกษาเป็นระยะหลังการคลอดลูกได้ 4 เดือน(ลูกตายหลังคลอด)ให้น้ำนมเฉลี่ยวันละ 8.71 ± 1.78 กิโลกรัม การวิเคราะห์ฮอร์โมนโดยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ พบว่ามีโคสาวเพียงตัวเดียวในกลุ่มศึกษาที่มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูงตลอดระยะการศึกษา (5.65 ± 0.37 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) สอดคล้องกับประวัติการผสมติด โคตัวอื่นๆมีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนผิดปกติไม่เป็นรูปแบบของวงจรการเป็นสัด (noncycling) (ค่าเฉลี่ยโปรเจสเตอโรนจากแม่โคอายุ 15 ปี เหลนของโคหมายเลข 259 และโคสาวอีก 2 ตัวดังนี้ 1.18 ± 0.14 1.87 ± 0.33 3.90 ± 0.48 และ 3.92 ± 0.41 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) โคตัวที่ตั้งท้องมีค่าเฉลี่ยฮอร์โมนคอร์ติซอลต่ำกว่าโคตัวอื่นๆ (0.67 ± 0.25 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่ตัวอื่นมีค่าเฉลี่ย 3.40 ± 0.51 6.78 ± 1.46 2.09 ± 0.58 และ 7.02 ± 0.67 นาโนกรัม/มิลลิลิตรตามลำดับ) ระดับฮอร์โมนธัยรอกซินเฉลี่ยในโคตัวที่ตั้งท้องสูงที่สุดคือ 63.26 ± 2.01 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่ตัวอื่นมีค่าเฉลี่ย 19.15 ± 1.67 32.46 ± 2.12 55.42 ± 5.10 และ 44.47 ± 2.37 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และค่าเฉลี่ยฮอร์โมนไตรไอโอโดทัยโรนีนในโคตัวที่ตั้งท้องคือ 1.56 ± 0.27 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่ตัวอื่นมีค่าเฉลี่ย 1.15 ± 0.04 1.58 ± 0.05 2.44 ± 0.08 และ 1.33 ± 0.05 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ

คำสำคัญ โปรเจสเตอโรน คอร์ติซอล ธัยรอกซินฮอร์โมน โคไม่ตั้งท้อง การให้นม

1 สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ อำเภอเมือง จังหวัดปทุมธานี 12000

2 สำนักสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยที่ 6 อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

3 คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรเวศน์ลำปาง ตำบลบ้านกว้าง อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

* ผู้รับผิดชอบบทความ โทรศัพท์ 0819258787 โทรสาร 029639220 e-mail : panpilais@dld.go.th

Hormonal Profile in Non-Calve Milking Cows

Panpilai Sekasiddhi^{1*} Satis Thanawatchai² Jumnian Pegkrue³

ABSTRACT

Progesterone, cortisol and thyroid (thyroxine and triiodothyronine) hormonal profiles of 15 year nonpregnant anestrous lactating cow and 4 heads of 4 year heifers were analysed by radioimmunoassay. This primiparous cow calved only once (female) when she was 3 years old .After calving she did not show sign of estrus and could not conceive but she had milk letdown for more than 11 years. Her milkyield during the period of hormonal studying was 6.37 ± 0.76 kilograms per day. Her grand- granddaughter and the other 3 heads of heifer that were in the same age of 4 years and could develop mammary glands before pregnancy were also studied. Some of these heifers had milk letdown before insemination. Her grand-granddaughter delivered one female 4 months before studying and showed a long period of anestrus after calving more than 17 months. Her milkyield during the period of studying was 8.71 ± 1.78 kilograms per day. Only one heifer conceived after fist insemination while the other 2 heifers showed abnormal of estrous cycle and non-conceived. Blood sampling was done 3 days apart during 1 September 2006 – 15 December 2006 (105 days). Milk records and A.I. program were investigated till February 2007. Mean $\pm$ S.E. of progesterone profile in pregnant heifer was 5.65 ± 0.37 ng/ml while the 15 year cow and the other heifers were 1.18 ± 0.14 1.87 ± 0.33 3.90 ± 0.48 and 3.92 ± 0.41 ng/ml, respectively. Mean of cortisol in the pregnant heifer was less than the others (0.67 ± 0.25 vs 3.40 ± 0.51 , 6.78 ± 1.46 , 2.09 ± 0.58 and 7.02 ± 0.67 ng/ml, respectively). Thyroxine in the pregnant heifer was 63.26 ± 2.01 ng/ml while the others were 19.15 ± 1.67 , 32.46 ± 2.12 , 55.42 ± 5.10 and 44.47 ± 2.37 ng/ml, respectively. Triiodothyronine were 1.56 ± 0.27 , 1.15 ± 0.04 , 1.58 ± 0.05 , 2.44 ± 0.08 and 1.33 ± 0.05 ng/ml, respectively.

Keywords : progesterone,cortisol,thyroid hormone, nonconceived cattle , lactating

¹ Bureau of Biotechnology in Animal Production, Tambol Banghadee, Amphur Muang, Pathumthani 12000.

² Regional Bureau of Animal Health and Sanitary 6th. Amphur Muang, Pitasunulok 65000.

³ Rajamangala University of Technology Lanna , Pitsanulok Campus. Tambol Bankrang, Amphur Muang Pitsanulok 65000

* Corresponding author Tel 08+19258787 Fax 029639220 E-mail : panpilais@dld.go.th

บทนำ

โคนมเป็นสัตว์ที่ให้น้ำนมมากจนสามารถรีดขายทำรายได้ให้แก่เจ้าของโค ตามปกติโคจะต้องตั้งท้องและคลอดลูกก่อน จึงจะมีการให้น้ำนมหลังคลอดซึ่งจะมี peak หรือมีปริมาณการให้นมในปริมาณสูงในช่วงหลังคลอด แล้วจึงลดระดับการให้นมลงจนเข้าสู่ระยะแห้งนมหรือดราย (dry) ซึ่งเป็นช่วงหยุดรีดนมตามปกติ เพื่อเป็นระยะพักก่อนการคลอดลูกตัวใหม่หรือหลังจากการตั้งท้องได้ 225 วัน (Eissa et al., 1994) โคส่วนใหญ่ที่มีปัญหาผสมไม่ติดหรือ ผสมติดยากเป็นระยะเวลายาวนาน มักจะเป็นโคที่ไม่ให้นม ส่งผลกระทบต่อรายได้ของเจ้าของ จึงมีนักวิจัยหลายท่านคิดหาวิธีการกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำให้โคที่อยู่ในระยะแห้งนมและมีปัญหาผสมไม่ติดมีการผลิตน้ำนมออกมา (induce lactation) ด้วยการฉีดฮอร์โมนเอสตราไดออล และคอร์ติซอลเป็นตัวกระตุ้น (Skarda et al., 1982, Base et al., 1983) หรือสอดฟองน้ำที่มีฮอร์โมนเอสตราไดออล 500 มิลลิกรัมผสมกับ โปรเจสเตอโรน 1000 มิลลิกรัมเข้าช่องคลอด (Davis et al., 1983) แล้วฉีดเด็กซาเมททาโซน (Fulkerson and McDowell, 1975) หรือ รีเซอริปีน reserpine (Collier et al., 1977) สามารถเหนี่ยวนำให้โคสร้างน้ำนมขึ้นมาได้ แต่มีแม่โคที่เลี้ยงอยู่ในมหาวิทยาลัยราชภัฏวชิรสุคนธ์ จ.บุรีรัมย์ ไม่เคยผสมติดเลยหลังจากการมีลูกเพียงตัวเดียวแต่สามารถปล่อยน้ำนมออกมาได้เป็นช่วงระยะเวลาที่เปรียบเสมือนการให้นมปกติของโคทั่วไปเป็นเวลานานนับสิบปี และมีโคสาวจำนวนหนึ่งที่เพิ่งเริ่มเข้าสู่วัยสาวยังไม่ตั้งท้องแต่มีลักษณะเต้านมขยายตัวเหมือนแม่โคที่กำลังจะปล่อยน้ำนม และบางตัวสามารถปล่อยน้ำนมออกมาได้ เป็นความผิดปกติที่แตกต่างจากโคที่มีปัญหาการผสมติดยากทั่วไปที่การให้น้ำนมจะหมดไปเมื่อถึงระยะเวลาหนึ่ง ไม่สามารถรีดนมได้อีก และแตกต่างจากโคสาวปกติทั่วไปที่เต้านมจะขยายเมื่อมีการตั้งท้องและไม่เคยมีรายงานการปล่อยน้ำนมในโคสาว ความผิดปกตินี้น่าจะมีผลกระทบมาจากระดับฮอร์โมน ในร่างกายซึ่งมีผลต่อเต้านมตลอดจนการให้นม การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมน โปรเจสเตอโรน ธีรรอยด์และคอร์ติซอลในแม่โคที่ไม่ตกูกแต่สามารถปล่อยน้ำนมได้ และโคสาวที่ยังไม่คลอดลูกแต่มีลักษณะเหมือนแม่โคที่กำลังจะปล่อยน้ำนมในช่วงระยะการเป็นสัดเป็นเวลา 5 ช่วงหรือ 105 วัน

อุปกรณ์และวิธีการ

ศึกษาประวัติย้อนหลังของแม่โคจำนวน 2 ตัวและโคสาวจำนวน 3 ตัวและประวัติปัจจุบันจดบันทึกการให้นม ปริมาณน้ำนมที่รีดได้ (ตารางที่ 1) เก็บตัวอย่างเลือดทุก 3 วัน(ตั้งแต่ 1 กันยายน 2549 ถึง 15 ธันวาคม 2549) รวม 33 ครั้งเพื่อให้ครอบคลุมถึง 5 ช่วงระยะการเป็นสัด($21 \times 5 = 105$ วัน) แยกปั่นเก็บซีรั่มทันทีที่เลือดแข็งตัว แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนการตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ธีรรอยด์(ธีร รอกซิน T4 และไทรไอยโดรอกซิโรนีน T3) และคอร์ติซอลโดยวิธีเรดิโออิมมูโนเอสเซย์ใช้ชุดตรวจสอบฮอร์โมนสำเร็จรูป^R โดยทำการ validate ชุดตรวจสอบโดยการทดสอบความจำเพาะของเอสเซย์โดยวิธี serial dilution

หาความแม่นยำในการทำเอสเสย์ (precision) โดยความแม่นยำระหว่างการทำเอสเสย์ครั้งนี้ (intraassay) มีค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจาย (CV) ใน^R Adaltis Italia S.p.A. ฮอริโมนแต่ละชนิดตามลำดับดังนี้ 2.48% 1.18% 4.73% และ 3.22% และความแม่นยำระหว่างการทำเอสเสย์แต่ละครั้ง (interassay) มีค่าสัมประสิทธิ์แห่งการกระจายในฮอริโมนแต่ละชนิดตามลำดับดังนี้ 9.35% 7.5% 5% และ 6.07% วิเคราะห์รูปแบบการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอริโมนโปรเจสเตอโรน ธิยรอยด์และคอร์ติซอลในโคแต่ละตัวตลอดระยะเวลาการศึกษา

ตารางที่ 1 ประวัติโคที่ศึกษาแบบย้อนหลังและประวัติปัจจุบัน

หมายเลขโค	วันเกิด	อายุ	หมายเลขพ่อแม่ สายเลือดพันธุ์	ประวัติการผสมพันธุ์	ประวัติการคลอดลูก	ประวัติการให้นม	
						ปี พ.ศ.	ก.ก.
259	1 เม.ย. 2536	15 ปี 8 เดือน	พ่อ 75% HF แม่ หมายเลข 170	ไม่มีอาการเป็น สัดหลังคลอดไม่ เคยผสมติดอีกเลย แต่สามารถตรวจ การเป็นสัดตัวอื่น ได้	คลอดลูกวันที่ 1 ก.ค. 2539 เป็นตัว เมีย หมายเลข 291	2539-2540	4517.0
						2541	1440.9
						2542	2125.8
						2543	3126.6
						2544	2518.4
						2545	2721.2
						2546	2210.2
						2547	2508.2
						2548	3669.0
						2549	2372.7
						2550	1420.8
						สามารถให้น้ำนมได้ตลอด จะหยุดรีดประมาณ 1-2 เดือนเมื่อน้ำนมเริ่มลดลง จากนั้นจะมีการสร้างน้ำนม ขึ้นมาอีก	
376	3 มี.ค. 2547	4 ปี 9 เดือน	พ่อ 87TH 197 แม่ หมายเลข 330 ยาย หมายเลข 291 (เป็นลูกตัว เดียวของโค หมายเลข 259)	15/8/48 27/10/50 11/2/51	เป็นแม่โคที่เคย ให้ลูก 1 ตัว (ตัว เมีย) เมื่อ 18/5/2549 แต่ลูกตาย	เมื่อเริ่มเป็นสาวได้นม ขยายก่อนการผสมมีการ สร้างน้ำนมออกมา ต้องรีด ทิ้ง	
						หลังคลอดเริ่มรีดนมตั้งแต่ 18/5/49 ถึงปี 2550 ได้ 4212.3 ก.ก..	

ตารางที่ 1 (ต่อ) ประวัติโคที่ศึกษาแบบย้อนหลังและประวัติปัจจุบัน

หมายเลขโค	วันเกิด	อายุ*	หมายเลขพ่อแม่ สายเลือดพันธุ์	ประวัติการผสม พันธุ์	ประวัติการคลอด ลูก	ประวัติการให้นม	
						ปี พ.ศ.	ก.ก.
376	3 มี.ค. 2547	4 ปี 9 เดือน	พ่อ 87TH 197 แม่ หมายเลข330 ยาย หมายเลข 291 (เป็นลูกตัว เดียวของโค หมายเลข259)	15/8/48 27/10/50 11/2/51	เป็นแม่โคที่เคย ให้ลูก1ตัว(ตัว เมีย) เมื่อ 18/5/2549 แต่ลูกตาย	เมื่อเริ่มเป็นสาวเต้านม ขยายก่อนการผสมมีการ สร้างน้ำนมออกมา ต้องรีด ทิ้ง หลังคลอดเริ่มรีดนมตั้งแต่ 18/5/49ถึงปี 2550 ได้ 4212.3 ก.ก..	
374	2 ก.พ. 2547	4 ปี 10 เดือน	พ่อ SwPC แม่ หมายเลข346	9/8/49, 4/12/49, 5/1/50, 1/10/50, 19/4/51, 7/6/51	เป็นโคสาว ยัง ผสมไม่ติดยังไม่ ตั้งท้อง	ยังไม่ได้รีดนม แต่มีการ ขยายตัวของเต้านมตั้งแต่ กันยายน 2549	
378	26 เม.ย. 2547	4 ปี 8 เดือน	พ่อ 87TH197 แม่ หมายเลข335	5/10/49, 17/7/50, 29/3/51	เป็นโคสาว ยังไม่ ตั้งท้อง	เต้านมขยายตั้งแต่กันยายน 2549 เริ่มรีดนมได้ตั้งแต่ ก.ค.50 ถึงก.พ.51 ได้ 1415 ก.ก.โดยที่ในแต่ละเดือนรีด ได้ดังนี้165.8 ก.ก. 189.6 ก.ก. 177.6 ก.ก. 177.4 ก.ก. 180.6 ก.ก. 176.8 ก.ก. 189.0 ก.ก. 158.2 ก.ก.	
381	9 ก.ค. 2547	4 ปี 5 เดือน	พ่อ 89TH197 แม่ หมายเลข274	24/8/49 ผสมติด	เป็นโคสาว กำลัง ตั้งท้องขณะเก็บ ชีร์	มีการขยายตัวของเต้านม ตั้งแต่กันยายน 2549 ไม่มี ประวัติการให้นมเนื่องจาก โคตายเมื่อวันที่ 13/7/50	

* นับจนถึงเดือนธันวาคม 2551

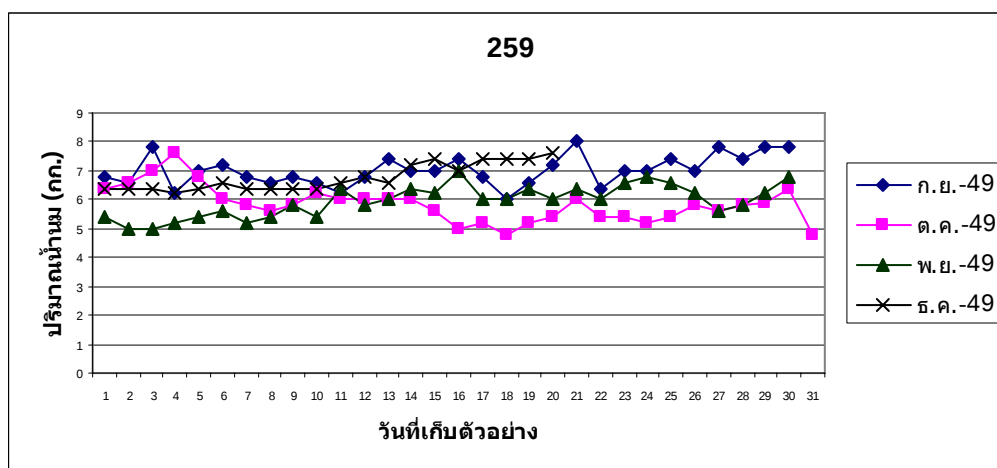
ผล

การศึกษาประวัติ

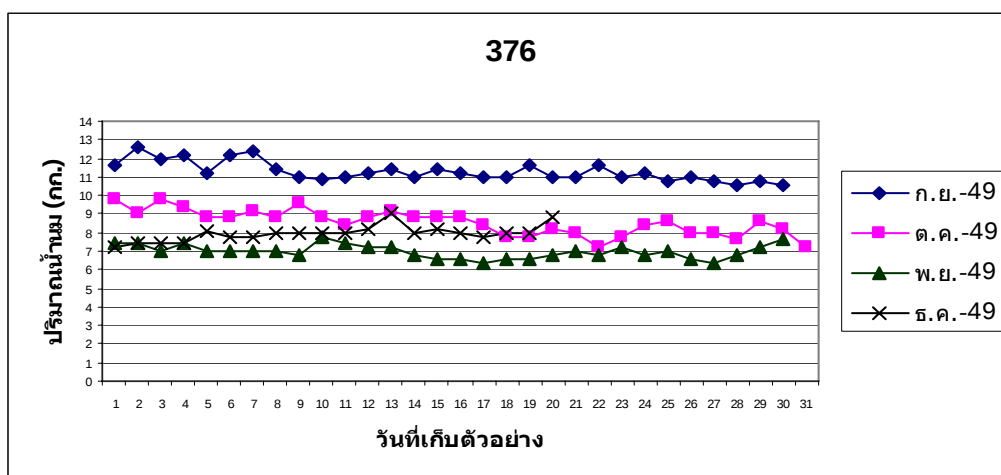
โคหมายเลข 259 เป็นแม่โคที่เคยมีลูกเพียงตัวเดียวเมื่อปีพ.ศ. 2539 ไม่แสดงอาการเป็นสัดและผสมไม่ติดจนถึงปัจจุบัน มีลักษณะการหย่อนตัวของ sacrosciatic ligament ทำให้โคนหางมีลักษณะเป็นแอ่ง สามารถปล่อยน้ำนมทุกวันในบางช่วงเช่นในระหว่างเดือนมกราคม 2549-มีนาคม 2549 สามารถรีดน้ำนมได้ในช่วงเย็น ในกลางเดือนมีนาคม 2549 สามารถให้น้ำนมทั้งมือเช้าและมือเย็น ปริมาณการให้นมในแต่ละมือประมาณ 2.2-3.8 ก.ก. (รูปที่ 1) ในระหว่างการศึกษา (1 ก.ย. 2549-15 ธ.ค. 2549) ให้นมเฉลี่ยวันละ 6.37 ก.ก.

โคหมายเลข 376 มีความสัมพันธ์กับโคหมายเลข 259 ในฐานะเป็นเหลน เป็นแม่โคที่มีการขยายตัวของเต้านมเมื่อเริ่มเป็นสาวก่อนที่จะมีการผสมพันธุ์ มีการสร้างน้ำนมออกมา ต้องรีดทิ้ง ประวัติการผสมเทียมในขณะที่เป็นโคสาว สามารถผสมครั้งเดียวติดตั้งท้อง มีระยะห่างหลังการคลอดถึง การผสม (interval to first A.I.) นานถึง 1 ปี 5 เดือน และผสมซ้ำในครั้งที่ 2 ห่างจากการผสมครั้งแรก 1 ปี 2 เดือน ประวัติการให้นมตามรูปที่ 2 ในระหว่างการศึกษา (1 ก.ย. 2549-15 ธ.ค. 2549) ให้นมเฉลี่ยวันละ 8.96 ก.ก.

โคหมายเลข 374 378 และ 381 เป็นโคสาวที่มีการขยายตัวของเต้านมก่อนการคลอดลูก โคหมายเลข 381 เป็นโคสาวที่กำลังตั้งท้องจากการผสมเพียงครั้งเดียว (first insemination conception)



รูปที่ 1 ปริมาณน้ำนมที่รีดได้ในแต่ละวันของโคหมายเลข 259 ในระหว่างการเก็บตัวอย่างเลือด



รูปที่ 2 ปริมาณน้ำนมที่รีดได้ในแต่ละวันของโคหมายเลข 376 ในระหว่างการเก็บตัวอย่างเลือด

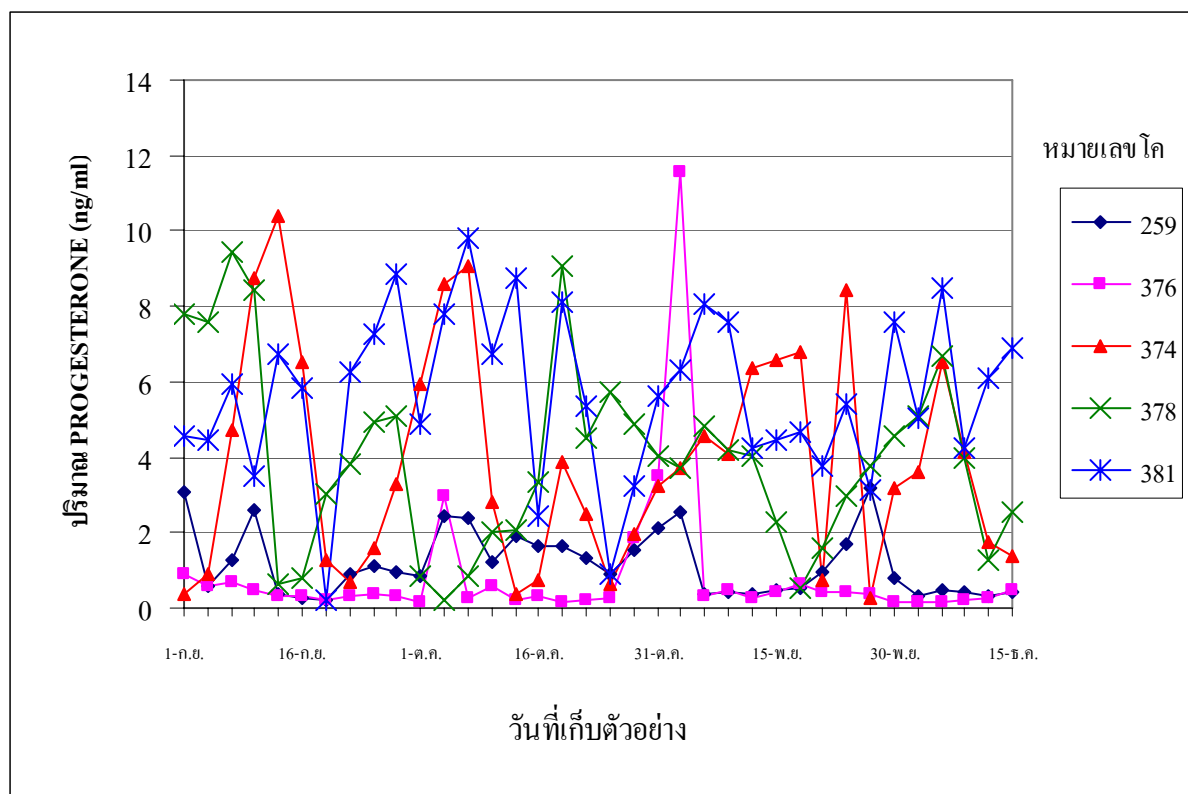
การศึกษาระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน

โคหมายเลข 259 เป็นโคที่มีความผิดปกติทางด้านรังไข่ เนื่องจากไม่มีการสร้างฟอลลิเคิล โคจึงไม่เป็นสัตรระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมีรูปแบบที่ผิดปกติ (รูปที่ 3) คือไม่ลงต่ำถึงระดับต่ำกว่า 0.2 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นของโปรเจสเตอโรนในระยะเป็นสัตร ระดับของโปรเจสเตอโรนเฉลี่ยตลอดระยะการศึกษา(mean $\pm$ S.E.) 1.18 ± 0.14 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (0.22 – 3.17 นาโนกรัม/มิลลิลิตร)

โคหมายเลข 376 มีระดับโปรเจสเตอโรนต่ำในช่วงเดือนแรกที่ศึกษา คือมีค่าเฉลี่ย 0.42 ± 0.07 นาโนกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นมีการเพิ่มระดับโปรเจสเตอโรนเป็น 2.98 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในช่วงสั้นๆแล้วกลับมาอยู่ที่ 0.2-0.5 นาโนกรัม/มิลลิลิตร นานกว่า 21 วันแล้วเพิ่มเป็น 3.5-4.5 นาโนกรัม/มิลลิลิตร เพียง 6 วัน ซึ่งไม่ใช่ลักษณะของการเจริญที่ปกติของคอร์ปัสลูเทียม ระดับโปรเจสเตอโรนเฉลี่ยตลอดการศึกษา 0.87 ± 0.33 นาโนกรัม/มิลลิลิตร

โคหมายเลข 374 และ 378 มีความคล้ายกันคือระดับโปรเจสเตอโรนอยู่ในระดับสูงนานกว่า 1 เดือน (เฉลี่ยตลอดระยะการศึกษา 3.90 ± 0.48 และ 3.92 ± 0.41 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) เป็นลักษณะของการเกิดคอร์ปัสลูเทียมค้าง (persistent corpus luteum) หรือ prolonged luteal phase ไม่กลับเป็นสัตรทุก 21 วันตามวงจรปกติ

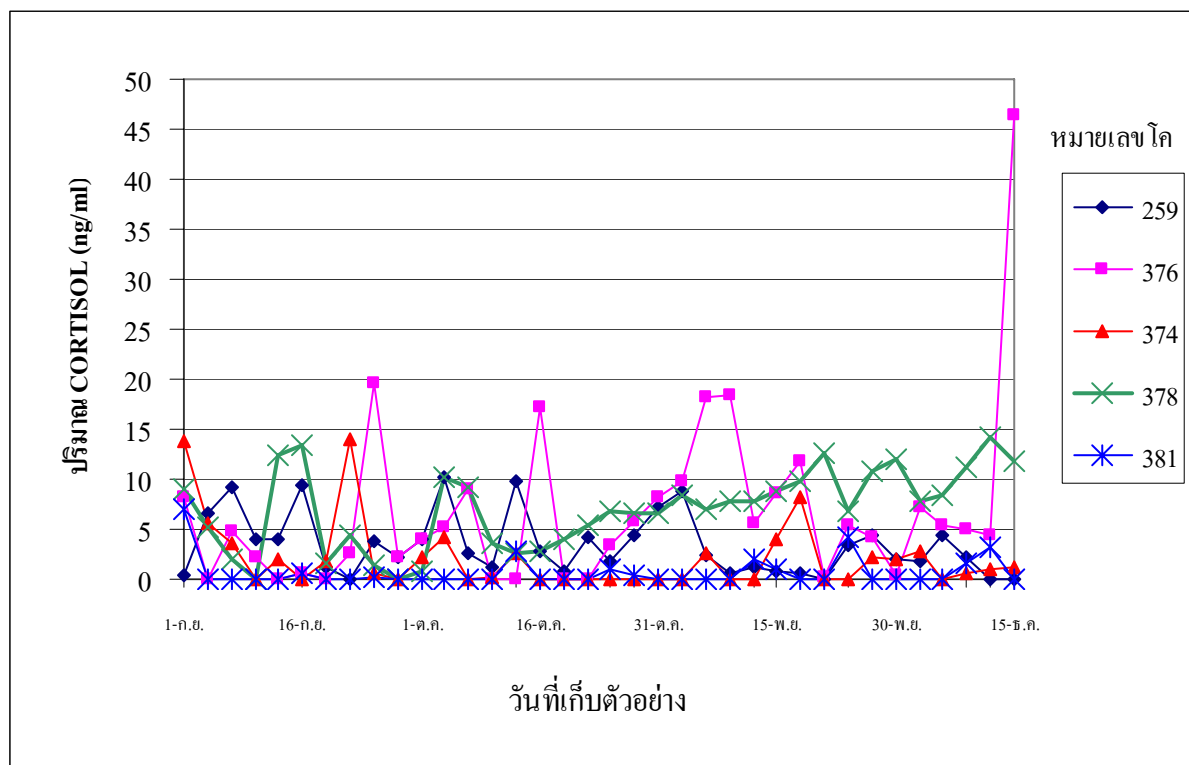
โคหมายเลข 381 ซึ่งเป็นโคตั้งท้อง มีระดับโปรเจสเตอโรนอยู่ในระดับสูงตลอดระยะการศึกษา เฉลี่ย 5.65 ± 0.37 นาโนกรัม/มิลลิลิตร



รูปที่ 3 ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในโคแต่ละตัวที่เก็บทุก 3 วันตั้งแต่วันที่ 1 กันยายนถึง 15 ธันวาคม 2549

การศึกษาระดับฮอร์โมนคอร์ติซอล

ตามรูปที่ 4 โคหมายเลข 259 มีระดับคอร์ติซอลเฉลี่ยตลอดระยะเวลาการศึกษา 3.40 ± 0.51 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (0-10.2 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) โคหมายเลข 376 มีระดับคอร์ติซอลโดยเฉลี่ย 6.78 ± 1.46 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (0-46.38 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) โคหมายเลข 374 และ 378 มีค่าเฉลี่ย 2.09 ± 0.58 และ 7.02 ± 0.67 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (0-14.02 และ 0-14.14 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) ในขณะที่ โคหมายเลข 381 ซึ่งตั้งท้องมีระดับคอร์ติซอลต่ำกว่าโคทุกตัวคือเฉลี่ย 0.67 ± 0.25 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (0-6.96 นาโนกรัม/มิลลิลิตร)



รูปที่ 4 ปริมาณฮอร์โมนคอร์ติซอลทุก 3 วันในโคแต่ละตัวตั้งแต่วันที่ 1 กันยายนถึง 15 ธันวาคม 2549

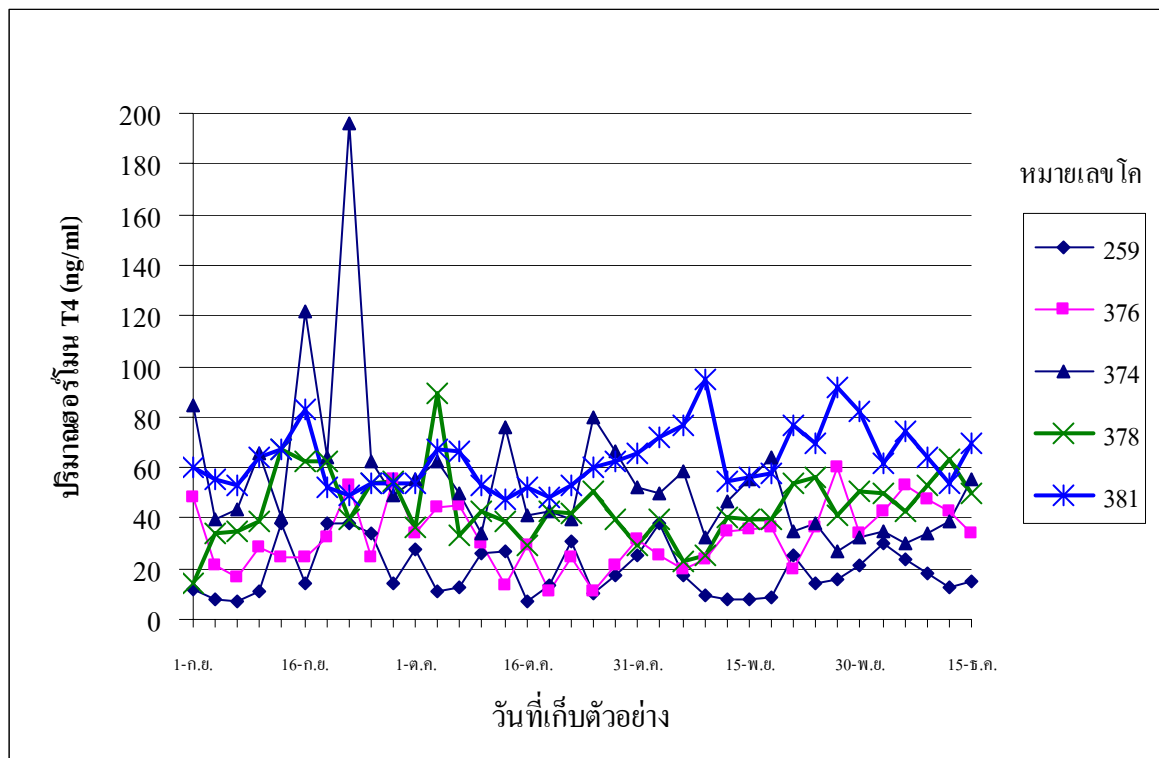
การศึกษาระดับฮอร์โมนคอร์ติซอล

ตามรูปที่ 5 โคหมายเลข 259 มีระดับฮอร์โมนคอร์ติซอลขึ้นๆลงๆแบบ pulsatile ค่าเฉลี่ยตลอดระยะเวลาการศึกษา 19.15 ± 1.67 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (7.07 -38.03 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) โคหมายเลข 376 มีค่าเฉลี่ย 32.46 ± 2.12 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (11.38-60.04 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) ในขณะที่โคหมายเลข 374 และ 378 มีค่าเฉลี่ยของคอร์ติซอลสูงถึง 55.42 ± 5.10 และ 44.47 ± 2.37 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (27.20-195.78 และ 13.96-89.70 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ)โคหมายเลข 374 มีระดับคอร์ติซอลสูงสุด 165.57 นาโนกรัม ในช่วงที่มีระดับโปรเจสเตอโรนต่ำลงใกล้ถึงระยะการเป็นสัดคือ 0.67 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และมีระดับคอร์ติซอล 14.01 นาโนกรัม/มิลลิลิตร โคสาวตั้งท้องหรือหมายเลข 381 มีระดับคอร์ติซอลสูงสุดคือ 63.26 ± 2.01 นาโนกรัม/มิลลิลิตร(47.38 - 95.11 นาโนกรัม/มิลลิลิตร)

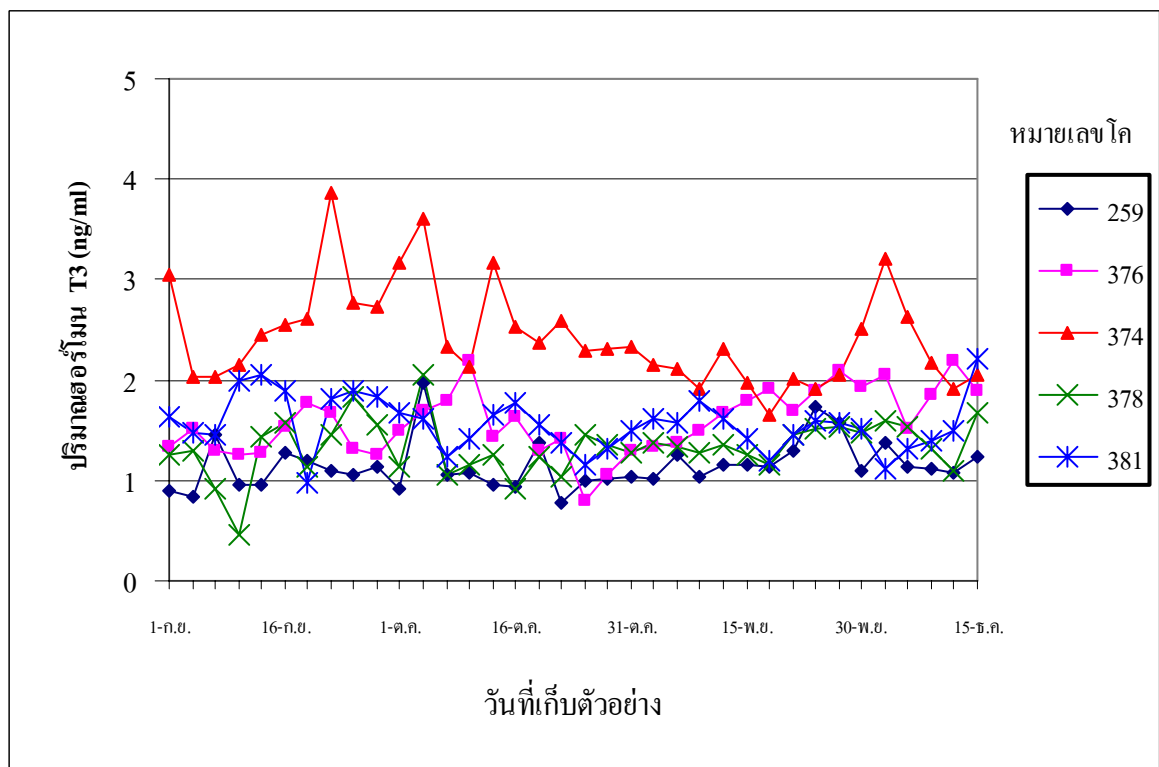
การศึกษาระดับฮอร์โมนไทรไอยโดรอน

ตามรูปที่ 6 โคหมายเลข 259 มีระดับไทรไอยโดรอนเฉลี่ยตลอดระยะเวลาการศึกษา 1.15 ± 0.04 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (0.77 - 1.97 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) โคหมายเลข 376 มีค่าเฉลี่ย 1.58 ± 0.05 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (0.80 - 2.20 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) โคหมายเลข 374 มีค่าเฉลี่ยสูงกว่าโคทุกตัวคือ 2.44 ± 0.08 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (1.66 – 3.87 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) (โคหมายเลข 378 มีค่าเฉลี่ย 1.33 ± 0.05 นาโนกรัม/

มิลลิลิตร (0.45 – 2.05 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) โคหมายเลข 381 มีค่าเฉลี่ย 1.56 ± 0.04 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (0.98 – 2.21 นาโนกรัม/มิลลิลิตร)



รูปที่ 5 ปริมาณฮอร์โมน thyroxine ทุก 3 วันในโคแต่ละตัวตั้งแต่วันที่ 1 กันยายนถึง 15 ธันวาคม 2549



รูปที่ 6 ปริมาณฮอร์โมน triiodothyronine ทุก 3 วันในโคแต่ละตัวตั้งแต่วันที่ 1 กันยายนถึง 15 ธันวาคม 2549

วิจารณ์

ในโคปกติหลังจากที่มีการตกไข่ ฟอลลิเคิลจะเจริญไปเป็นคอร์ปัสลูเทียม ซึ่งสร้างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ระดับโปรเจสเตอโรนจะเพิ่มขึ้นจนถึงระยะกึ่งกลางวงจรการเป็นสัด (mid cycle) ซึ่งอยู่ระหว่างวันที่ 10-17 ซึ่งช่วงนี้เป็นช่วงที่ระดับโปรเจสเตอโรนสูงสุด หลังจากนั้นคอร์ปัสลูเทียมจะเริ่มเสื่อมสลาย ทำให้ระดับโปรเจสเตอโรนลดต่ำลงอย่างรวดเร็วประมาณวันที่ 18 หรือวันที่ 19 (Shearer, 2008) จนถึงต่ำกว่า 0.1 นาโนกรัม/มิลลิลิตรในวันที่ทำการผสมเทียม ในโคที่ผสมติดระดับโปรเจสเตอโรนจะอยู่ในระดับนี้เป็นเวลา 2 วันแล้วจึงเพิ่มระดับเป็น 0.2 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ในวันที่ 3 โปรเจสเตอโรนจะเพิ่มขึ้นตามลำดับจนถึงวันที่ 15 อยู่ในช่วง 2.5-3.5 นาโนกรัม/มิลลิลิตร จนถึงระยะตั้งท้องที่ 106 วันจึงลดลงเป็น 2.2-2.9 นาโนกรัม/มิลลิลิตร จนถึงวันที่ 180 ของการตั้งท้อง จากนั้นระดับโปรเจสเตอโรนจะเพิ่มสูงจนถึง 3.5-3.9 นาโนกรัม/จนถึงระยะแห้งนม (Eissa et al., 1994) มีโคเพียงตัวเดียว ที่อยู่ในระหว่างการตั้งท้อง (โคหมายเลข 381) มีระดับโปรเจสเตอโรนเฉลี่ยเกินกว่า 2.0 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตลอดระยะการศึกษาซึ่งสอดคล้องกับระดับโปรเจสเตอโรนในโคตั้งท้องจากรายงานของ Eissa et al. (1994) และในการศึกษาครั้งก่อน (พรณพิไลและไกรวรรณ 2548)

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาระดับของฮอร์โมนในโคที่มีความผิดปกติจากการที่สามารถให้นมได้โดยไม่ตั้งท้องและโคสาวที่มีการขยายตัวของเต้านมก่อนการคลอด ไม่ได้ศึกษาถึงอวัยวะภายในโดยการผ่าดู ตรวจผ่านทางทวารหนัก โคที่ศึกษานี้ส่วนใหญ่เป็นโคที่มีปัญหาความไม่สมบูรณ์พันธุ์ มีวงจรการเป็นสัดผิดปกติ มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนไม่เป็นรูปแบบปกติ เช่น แม่โคหมายเลข 259 ซึ่งเคยมีลูกหนึ่งตัว แล้วไม่เป็นสัดอีกเลย และเหลนของมัน (โคหมายเลข 376) เพียงแต่โคหมายเลข 376 มีลักษณะของรังไข่ไม่ทำงาน (inactive ovary) ในช่วงระยะสั้นๆ มีการสร้างคอร์ปัสลูเทียมในช่วงสั้น 6-11 วัน โคสาวหมายเลข 374 และ 378 มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูงก่อนวันผสมเทียม และหลังวันผสม แสดงว่าโคไม่ได้ผสมเทียมในระยะการเป็นสัดจริง รูปแบบของโปรเจสเตอโรนเป็นรูปแบบของการเกิด คอร์ปัสลูเทียมค้าง (persistent corpus luteum) และไม่มีประวัติการผสมอีกเลย ซึ่ง Roussel et al. (1977) รายงานว่าโคที่ไม่เป็นสัดตามปกติหรือไม่เป็นสัด (anestrus) จะมีระดับโปรเจสเตอโรนสูงถึง 3.9 นาโนกรัม/มิลลิลิตร Yoshida and Nakao (2005) พบว่าในโคที่รีดนมมีการสร้างฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนจากต่อมหมวกไต (adrenal cortex) มีผลทำให้ระดับโปรเจสเตอโรนเพิ่มสูงขึ้นได้และส่งผลกระทบต่ออาการเป็นสัด Hommeida et al. (2004) รายงานว่าหากโคมีรูปแบบของระดับโปรเจสเตอโรนที่ปกติจะผสมติดดีกว่าโคที่มีรูปแบบโปรเจสเตอโรนผิดปกติ Petersson et al. (2006) พบว่าโคหลังคลอด 56 วัน มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ที่แสดงถึงการทำงานของรังไข่ปกติเพียง 15.6% โคที่มีปัญหาได้แก่รังไข่หยุดการสร้างไข่จำนวน 6.6% และโคที่มีการ prolonged luteal phase จำนวน 7.3% ซึ่งเป็นปัญหาของการผสมพันธุ์ Macmillan (2002) พบว่าโคที่มีปัญหาด้าน infertility ในนิวซีแลนด์มักเป็นพวกที่ไม่ตกไข่และไม่เป็นสัดหลังการคลอด (postpartum anovulatory anoestrus หรือ AA) ซึ่งเกิดจากพันธุ์ พันธุกรรม คะแนนความสมบูรณ์ของร่างกาย (BSC) การจัดการ และฤดูกาล ในโคหมายเลข 259 และ

376 มีความสัมพันธ์กัน จึงอาจจะเป็นได้ที่มีการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรม Peterson et al. (2006) พบว่า ร้อยละ 15.6 ของโคพันธุ์ Swedish Holstein มีปัญหาด้าน delayed onset of cyclicity หลังคลอดนานถึง 56 วันมีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนต่ำ และพบโคที่เป็น prolonged luteal phase 7.3% Shrestha et al. (2004) พบโคหลังคลอดมี luteal activity ยาวนานกว่า 20 วัน ไม่มีการตกไข่หลังคลอดนานกว่า 45 วัน 13.2% และ Leyva-Ocariz et al. (1996) พบว่าความเข้มข้นของฮอร์โมนคอร์ติซอลมีผลลดการหลั่งของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนทำให้เกิดผล infertility ในโคโดยเฉพาะในช่วงฤดูแล้ง

อย่างไรก็ตามการเกิดความผิดปกติด้านการให้นมโดยที่โคไม่มีการคลอดลูก นับว่าเป็นความผิดปกติที่ไม่สามารถสืบค้นรายงานผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์แล้วได้ โคที่ศึกษานี้ อาจเกิดสภาวะท้องเทียม (pseudopregnancy) ซึ่งไม่พบรายงานการเกิดในโค แต่มีรายงานการเกิดในสุนัขบ่อยกว่าสัตว์ชนิดอื่น (Gobello et al., 2001) โดยในสุนัขจะมีเต้านมขยาย เมื่อบีบเต้านมจะมีน้ำนมไหลออกมา ร้อยละ 78.6 มีเต้านมขยาย ร้อยละ 71.4 มีการหลั่งน้ำนม (Darder et al. , 2005) นอกจากนี้ยังอาจเกิดในสุนัขจิ้งจอก (Johnson, 1980) อาจจะเหนียวน้ำให้เกิดได้ในหนู และกระต่าย ในสุกรก็สามารถเหนียวน้ำให้เกิดสภาวะท้องเทียมได้โดยการใช้เอสโตรเจนหลังการเป็นสัด 12 วัน และ 16 วัน (Uzumicu et al., 2008) ในกระต่ายเหนียวน้ำให้เกิดสภาวะท้องเทียม ด้วยการให้เด็กฆ่าเมทาโซน พบว่าเป็นตัวการขัดขวางการเกิดเมตาบอลิซึมของเซลล์ในรังไข่ และมดลูกทำให้เกิดความไม่สมดุลของฮอร์โมน มีการสร้าง สเตียรอยด์ จากต่อมอะดรีนอลซึ่งจะขัดขวางการสร้างไข่ (oogenesis) และการเจริญของฟอลลิเคิล นอกจากนี้เด็กฆ่าเมทาโซนยังไปกดการหลั่ง (secretory activity) ของ endometrial epithelial cell (Dominik and Maria, 2004) โคที่ศึกษามีระดับคอร์ติซอลอยู่ในระดับสูง ยกเว้นโคหมายเลข 381 ที่อยู่ในสภาวะการตั้งท้อง มีระดับคอร์ติซอล ต่ำกว่าตัวอื่น ดังนั้นโคตัวอื่นจึงเกิดปัญหาไม่มีการสร้างไข่

มีรายงานการวิจัยด้านการเหนียวน้ำให้มีน้ำนม (induce lactation) ในโคที่มีปัญหาผสมไม่ติด ไม่สามารถผลิตน้ำนม (Leenanuruksa et al., 1984) โดยการใช้ยาเช่น การฉีดฮอร์โมนเอสโตรเจนร่วมกับโปรเจสเตอโรนเป็นเวลา 1-30 วันขึ้นกับสัดส่วนของฮอร์โมนทั้งสอง ฮอร์โมนที่ฉีดจะไปกระตุ้นต่อมน้ำนมทั้ง ductal system และ secretory cell เป็นระยะที่เรียกว่า priming phase (Fulkerson and McDowell, 1974) จากนั้นจะต้องทำให้เข้าสู่ระยะ trigger phase ซึ่งเป็นระยะของการหลั่งน้ำนมออกมาจากเต้านมที่ develop แล้ว ซึ่งนิยมใช้ รีเซอร์พิน (Collier et al., 1977) ปริมาณน้ำนมที่หลั่งออกมาเป็น 50-70% ของปริมาณน้ำนมปกติ Smith and Schanbecher (1973) ใช้ สเตียรอยด์แทนรีเซอร์พินก็ได้ผลดี จากการที่ใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนร่วมกับเอสโตรเจน และสเตียรอยด์ กระตุ้นให้โคที่อยู่ในระยะแห้งนมสามารถปล่อยน้ำนมออกมาได้ สอดคล้องกับโคที่ศึกษาซึ่งมีระดับโปรเจสเตอโรนและคอร์ติซอลอยู่ในระดับสูง อาจจะเป็นไปได้ว่าการที่โคมีระดับฮอร์โมนทั้งสองชนิดนี้อยู่ในระดับสูงเป็นผลให้ต่อมน้ำนมมีการพัฒนาสามารถผลิตน้ำนมออกมาได้ การกระตุ้นให้สร้างน้ำนมโดยการฉีดฮอร์โมนผสมมักเป็นสาเหตุโน้มนำให้เกิดโรคถุงน้ำในรังไข่ (Lembowicz et al., 1982) การฉีดรีเซอร์พินมีผลทำให้โปรแลคตินในกระแสโลหิตเพิ่มขึ้นโดยการยับยั้งฤทธิ์ของโดพามีน (dopamine) ใน

hypothalamicpituitary axis โคจิสสร้างน้ำนมออกมาได้ (available online www.freepatentsonline.com) แต่เป็นที่น่าเสียดายที่การศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถวัดระดับฮอร์โมนโปรแลคตินเนื่องจากมีความจำกัดด้านห้องปฏิบัติการเรดิโออิมมูโนเอสเสย์

Wiltbank et al. (2006) พบว่าการสร้างน้ำนมในแม่โคทำให้มีการเพิ่มเมตาบอลิซึมของสเตียรอยด์ เป็นเหตุให้ความสมบูรณ์พันธุ์ลดลง ค่าปกติของคอร์ติซอลในพลาสมา อยู่ระหว่าง 5-10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (Nakao et al., 1994) ซึ่งโคที่ศึกษามีระดับคอร์ติซอลอยู่ในเกณฑ์นี้ ยกเว้นโคหมายเลข 376 374 และ 378 ที่มีระดับคอร์ติซอลในบางวันสูงเกินกว่า 10 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ฮอร์โมนที่สร้างมาจากต่อมหมวกไต (adrenal cortex) เป็นฮอร์โมนหนึ่งในอีกหลายฮอร์โมนที่กระตุ้นการเจริญของต่อมน้ำนม และช่วงในการสร้างน้ำนม ในช่วงต้นของการให้นม ตลอดจนการ maintenance การสร้างน้ำนม (Gorewit and Tuckar, 1976)

ในโคปกติ ฮอร์โมนแลคโตเจนในรก (bovine placental lactogen, bPL) เป็นตัวกระตุ้นต่อมน้ำนม ทำให้เต้านมเจริญในระยะตั้งท้อง (Byatt et al., 1997) โดยที่ bPL เป็นโปรตีนฮอร์โมนสร้างจาก trophoblast มีความคล้ายกับ pituitary hormone หรือ somatotropin และ prolactin (Byatt et al., 1992) และหลังการคลอดลูกมีกระบวนการสร้างน้ำนม ซึ่งเป็นอิทธิพลของฮอร์โมนออกซิโตซินร่วมกับโปรแลคติน แต่ฮอร์โมนทั้งสองชนิดเป็นโปรตีนฮอร์โมนซึ่งมีความยุ่งยากจนห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์ไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ Gorewit (1993) พบว่า พบว่าในการทดลองฉีด endotoxin ของเชื้อ *Escherichia coli* เข้าเต้านมจะกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนออกซิโตซินในน้ำนมสูงกว่าระดับปกติ 1.5 ถึง 2 เท่า ในโคนมที่ผลิตน้ำนมจนถึง peak จะมีการลดปริมาณการหลั่งน้ำนมลง เนื่องจากเกิด apoptotic death ของ mammary epithelial cell หากฉีดเอสโตรเจนจะช่วยกระตุ้นการสร้างน้ำนมเพิ่มขึ้นได้ทั้งนี้เนื่องจากเอสโตรเจนช่วยควบคุมการเกิด involution ของเต้านมโค (Dulbecchi and Lacasse, 2006) ในโคหมายเลข 259 และ 376 มีการให้นมเป็นช่วงและมีช่วงหยุดปล่อยนมและมีปริมาณลดลงอาจจะเกิดจาก apoptotic death ของ mammary epithelial cell

ธัยรอยด์ฮอร์โมน (ธัยรอกซิน T4 และไตรไอโอโดธัยโรนีน T3) มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึม เช่นอุณหภูมิของร่างกาย การเต้นของหัวใจ การซ่อมแซมสิ่งที่สึกหรอ และการผลิตน้ำนม (Webster and Wallace) ซึ่งมีผลต่อการให้นม (Gueorguiev, 1999, Akasha et al., 1987) ธัยรอยด์ฮอร์โมนเป็น galactopoietic กระตุ้นการหลั่งน้ำนมให้เพิ่มมากขึ้น (Premachandra and Turner, 1962) ในโคที่กำลังให้นม ปริมาณน้ำนมมีความสัมพันธ์เชิงลบกับปริมาณ T4 และ T3 ในกระแสโลหิต เนื่องจากในช่วงต้นของระยะการให้นม จำเป็นต้องมีกระบวนการเมตาบอลิซึมในเต้านมเพื่อการสร้างน้ำนม (Gueorguiev, 1999) ในช่วงต้นของการให้นม ระดับ T4 ในซีรัมจะต่ำกว่าในช่วงท้ายของการให้นม (50 นาโนกรัม/มิลลิลิตร และ 55 นาโนกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ) ในขณะที่ระดับ T3 อยู่ในระดับ 1200 – 1300 พิโคกรัม/มิลลิลิตร (Akasha et al., 1987) โคหมายเลข 259 และ 376 มีระดับ T4 อยู่ในเกณฑ์ต่ำกว่า และเป็นโคที่กำลังให้นม ในขณะที่โคสาวอีก 3 ตัวมีระดับ T4 สูงกว่าระดับการให้น้ำนม เช่นเดียวกันกับ T3 โคสาวทั้งสามมีระดับสูงกว่าเกณฑ์การให้นม

สรุป

ในการศึกษาครั้งนี้ มีโคสาวเพียงตัวเดียวที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ ผสมติดตั้งท้องมีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน คอร์ติซอลอยู่ในเกณฑ์ปกติ มี T4 และ T3 อยู่ในเกณฑ์สูงกว่ามาตรฐานของโคที่กำลังให้นม โคตัวอื่นมีระดับโปรเจสเตอโรนที่ผิดปกติ และระดับคอร์ติซอลสูงกว่าระดับปกติ ซึ่งการที่มีระดับฮอร์โมนทั้งสองคือโปรเจสเตอโรนและคอร์ติซอลสูงกว่าปกตินี้ อาจจะเป็นสาเหตุให้นมให้ได้นานมีการขยายตัว และบางตัวสามารถปล่อยน้ำนมออกมาได้ ส่วนร้อยละฮอร์โมนเป็นฮอร์โมนที่มีความสำคัญต่อการให้นม โคส่วนใหญ่มีระดับฮอร์โมนทั้งสองค่อนข้างสูง

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นายกร ช่วงชานาในการติดต่อประสานงานและเก็บตัวอย่าง น.ส.อัจฉราวรรณ น้อยกล้า น.ส.จันทรา โพธิ์คำ น.ส.ศศิธร หิรัญเขว่า นายสัมพันธ์ สะท้านถิ่น และนายวรวัฒน์ พ่วงเยี่ยมในการช่วยเหลือในห้องปฏิบัติการและรวบรวมข้อมูล

เอกสารอ้างอิง

พรรณพิไล เสกสิทธิ์และไกรวรรณ หงส์ยันตรชัย 2548 การผสมไม่ติดในโคนมที่เหนียวน่าการเป็นสัดด้วย

พรอสตาแกลนดินและโคนมที่เป็นสัดตามปกติ สัตวแพทยสาร ปีที่ 56 เล่มที่ 1 หน้า 16 - 24

Akasha, M.A., Anderson, R.R., Eilersieck, M. and Nixon, D.A. 1987. Concentration of thyroid hormone and prolactin in dairy cattle serum and milk at three stages of lactation. J Dairy Sci 70 : 271 – 276.

Available online <http://www.freepatentonline.com/4060620.html>. Induction of lactating in nonpregnant dairy animals. 4/3/2551.

Base, J., Skarda, J., Urbanova, E. and Bilek, J. 1983. The proportion of fatty acids in mammary secretion of cows lactating after calving and hormonal induction of lactation. Physiol Bohemoslov 32 : 155 – 161.

Byatt, J.C., Eppard, P.J., Munyakazi, L., Sorbet, R.H., Veenhuizen, J.J., Curran, D.F. and Collier, R.J. 1992. Stimulation of milk yield and feed intake by bovine placental lactogen in dairy cows. J Dairy Sci 75 : 1216 – 1223.

- Byatt, J.C., Sorbet, R.H., Eppard, P.J., Curran, T.L., Curran, D.F. and Collier, R.J. 1997. The effect of recombinant bovine placental lactogen on induced lactation in dairy heifers. *J Dairy Sci* 80 : 496 – 503.
- Collier, R.J., Bauman, D.E., and Hays, R.L. 1977. Effect of reserpine on milk production and serum prolactin of cows hormonally induced into lactation. *J. Dairy Sci.* 60: 89.
- Darder, P., Lopez, J., Fatjo, J.F., Ruiz de la Torre, J.L., Amat, M. and Manteca, X. 2005. Pseudopregnancy in the bitch : an epidemiological study. Current issues and research in veterinary behavioral medicine. Papers presented at the 5th Int Vet Behavior meeting (Mill, D., Levine, E., Landsberg, G., Horwitz, D., Duxbury, M., Mertens, P., Meyer, K., Huntley, L.R., Reich, M. and Willard, J. Ed.) Purdue U Press pp. 243 – 245.
- Davis, S.R., Welch, R.A.S., Pearce, M.G. and Peteson, A.J. 1983. Induction of lactation in Nonpregnant cows by estradiol-17 β and progesterone from an intravaginal sponge. *J Dairy Sci* 66 : 450 – 457.
- Dominik, S. and Maria, K. 2004. The influence of dexamethason on the ovarian and uterine stimulation and ER, PR and -inhibin expression in pseudopregnant rabbits, Pathology in Nowadays, the 22 nd congress of the European Society of Veterinary Pathology, Olsztyn, Poland , 15-18 September 2004, Babinska, L., Szarek, J. and Lipinsien, J. Ed.)
- Dulbecchi, L. and Lacasse, P. 2006. Short communication : suppression of estrous cycles in lactating cows has no effect on milk production. *J Dairy Sci* 89 : 636 – 639.
- Eissa, H.M., Nachreiner, R.F. and Refsal, K.R. 1994. Skim milk progesterone in pregnant cows from insemination throughout lactation. *Vet Res Com* 18 : 149 – 154.
- Fulkerson, W.J. and McDowell, G.H. 1974. Artificial induction of lactation in ewes. *J Endocr* 63 : 167 – 173.
- Fulkerson, W.J. and McDowell, G.H. 1975. Artificial induction of lactation in cattle by use of dexamethasone trimethylacetate. *Australian J. Biol. Sci.* 28: 183.
- Gobello, C., de la Sota, R.L. and Goya, R.G. 2001. A review of canine pseudocyesis. *Reprod Dom Anim* 36 : 283 – 288. 2001
- Gorewit, R.C. and Tucker, H.A. 1976. Glucocorticoid binding in mammary tissue slices of cattle in various reproductive states. *J Dairy Sci* 59 : 1890 – 1896.
- Gorewit, R.C. 1993. Effects of intramammary endotoxin infusion on milking-induced oxytocin release. *J. Dairy Sci.* 76(3): 722-7.

- Gueorguiev, I.P. 1999. Thyroxine and triiodothyronine concentrations during lactation in dairy cows. *Ann Zootech* 48 : 477 – 480.
- Hommeida, A., Nakao, T. and Kubota, T. 2004. Luteal function and conception in lactating cows and some factors influencing luteal function after first insemination. *Theriogenology* 62 : 217 – 225.
- Johnson, S.D. 1980. False pregnancy in the bitch. In Morrow D.A. (ed) *Current Veterinary Theriogenology* . 1st ed. pp.623 – 624.
- Leenanuraksa, D., Chataraprateep, P., Lohachit, C., Timpatpong, S., Prasarnpanich, S., Vittayanupubuyenyong, K. and Siri, A. 1984. Project of investigation on infertile dairy cattle at DFPO, Muak- Lek 1. Artificial induction of lactation. *Thai J Vet Med* 14(3) : 189 – 201.
- Lembowicz, K., Rabek, A. and Skrzeczkowski, L. 1982. Hormonal induction of lactation in the cow. *Br Vet J* 138 : 203 - 208.
- Leyva-Ocariz, H., Querales, G., Saavedra, J. and Hernandez, A. 1996. Corpus luteum activity, fertility, and adrenal cortex response in lactating Carora cows during rainy and dry seasons in the tropics of Venezuela. *Domest Anim Endocrinol* 12 : 297 – 306.
- Macmillan, K.L. 2002. Advances in bovine theriogenology in New Zealand. 1. Pregnancy, parturition and the postpartum period. *N Z Vet J* 50 : 67 – 73.
- Nakao, T., Sato, T., Moriyoshi, M. and Kawata, K. 1994. Plasma cortisol response in dairy cows to vaginoscopy, genital palpation per rectum, and artificial insemination. *J Vet Med, A*. 41 : 16–21.
- Petersson, K.J., Gustafsson, H., Strandberg, E. and Berglund, B. 2006 Atypical progesterone profiles and fertility in Swedish dairy cows. *J. Dairy Sci.* 89(7) : 2529-38
- Premachandra, B.N. and Turner, C.W. 1962. Increased lactation response in cattle with thyroxine 50% above thyroxine secretion rate. *J Dairy Sci* 49 : 1098 – 1101.
- Roussel, J.D., Beatty, J.F. and Lee, J.A. 1977. Influence of season and reproductive status on peripheral plasma progesterone levels in the lactating bovine. *Int J Biomet* 21(1) : 85 – 91.
- Shrestha, H.K., Nakao, T., Suzuki, T., Higaki, T. and Akita, M. 2004. Effects of abnormal ovarian cycles during pre-service period postpartum on subsequent reproductive performance of high-producing Holstein cows. *Theriogenology* 61 : 1559 – 1571.
- Shearer, J.K. 2008. Reproductive anatomy and physiology of dairy cattle. Available online <http://edis.ifas.ufl.edu/DS115>. Skarda, J., Tersch, P., Urbanova, E., Picha, J. and Bilek, J. 1982. Artificial induction of lactation in dairy cows. *Physiol Bohemoslov* 31 : 563 – 568.

- Smith, K.L. and Schanbecher, F.L. 1973. Hormone induced lactation in the bovine 1. Lactational performance following injections of 17 β -estradiol and progesterone. J Dairy Sci 57 : 738.
- Uzumicu, M., Camahan, K.G., Brauleanu, G.T. and Mirando, M.A. 2008. Oxytocin-stimulated phosphoinositide hydrolysis and prostaglandins $F_{2\alpha}$ secretion by luminal epithelial, glandular epithelial and stroma cells from pig endometrium III Responses of cyclic, pregnant and pseudopregnant pigs on days 12 and 1. Reproduction Fertility and Development 12 : 157 – 164.
- Weber, J. and Wallace, C. Diagnostic ultrasonography of the thyroid gland predictive value for the identification of dairy cows at risk for metabolic disease during early lactation Available online <http://www.mac.umaine.edu/index.php?tap=3&pg=PROJECTS&SUBACTION=GET...>
- Wiltbank, M., Lopez, H., Sartori, R., Sangsritavong, S. and Gumer, A. 2006. Changes in reproductive - physiology of lactating dairy cows due to elevated steroid metabolism. Theriogenology 65 : 17 – 29
- Yoshida, C. and Nakao, T. 2005. Respose of plasma cortisol and progesterone after ACTH challenge in ovariectomized lactating airy cows. J Reprod Dev 51 : 99 – 107.

การผลิตตัวอ่อนโคขาวลำพูนพันธุ์แท้โดยการเก็บเซลล์ไข่จากรังไข่ผ่านทาง ผนังช่องคลอดและการปฏิสนธินอกร่างกาย

มาลี อภิเมธีธำรง¹ ณรงค์ เลี้ยงเจริญ¹ อนนท์ เทื่องสันเทียะ¹ วิบูลย์ เยี่ยงวิศวกูร¹

กิริติ ธิแจ้¹ จุริยรัตน์ สำเร็จประสงค์²

บทคัดย่อ

เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตตัวอ่อนโคขาวลำพูนพันธุ์แท้โดยใช้เทคนิคการปฏิสนธินอก
ร่างกายร่วมกับการเก็บเซลล์ไข่ผ่านทางผนังช่องคลอด ใช้แม่โคขาวลำพูน จำนวน 15 ตัว อายุระหว่าง 5-10 ปี
ทำการเก็บเซลล์ไข่โดยการเจาะผ่านทางผนังช่องคลอดหลังจากให้ฮอร์โมนฟอลลิเคิลสติมูเลตติ้งแก่แม่โค
ดำเนินการเจาะเก็บสัปดาห์เว้นสัปดาห์คราวละ 3-5 ตัว ตัวละ 4-6 ครั้ง พบว่า สามารถเจาะเก็บเซลล์ไข่ได้รวม
307 ใบ เลือกเซลล์ไข่เกรด เอ บี และซีบางส่วน จำนวน 216 ใบ นำไปเพาะเลี้ยงและปฏิสนธินอกร่างกาย ได้
อัตราการแบ่งตัว 44% (88/200) อัตราการเจริญถึงระยะบลาสโตซิสต์ 27.27% (24/88) เมื่อเทียบกับจำนวนตัว
อ่อนที่แบ่งตัว และ 11.11% (24/216) เมื่อเทียบกับจำนวนไข่ที่นำไปเพาะเลี้ยงหลังการผสม หลังจากทำการ
ฝากตัวอ่อนสด 6 ใบในตัวรับ 3 ตัวซึ่งเป็นโคนมพันธุ์ผสมที่เป็นสัตว์ธรรมชาติมาแล้ว 7 วัน พบว่าตัวรับตั้งท้อง 1
ตัว และต่อมามีลูกเกิด 1 ตัว ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า มีความเป็นไปได้ในการผลิตตัวอ่อนโคขาว
ลำพูนจากการปฏิสนธินอกร่างกาย โดยใช้เซลล์ไข่ที่เจาะเก็บจากรังไข่ผ่านทางผนังช่องคลอด

คำสำคัญ: การปฏิสนธินอกร่างกาย การเก็บเซลล์ไข่ผ่านผนังช่องคลอด โคขาวลำพูน ตัวอ่อน

¹สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ต.บางกะดี อ.เมือง จ.ปทุมธานี

²คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่

Embryo Production of Kao Lumpoon Cattle Using Ovum Pick-Up and *In Vitro* Fertilization Techniques

Malee Apimeteetumrong¹ Narong Liengchareon¹ Anone Thuangsanthi¹ Viboon Yiengvisavakul¹
Keerati Thijae¹ Jureerat Sumretprasong²

Abstract

This study was carried out to explore the potential for production of embryos in Kao Lumpoon cattle using ovum pick up (OPU: transvaginal follicle aspiration) and *in vitro* fertilization techniques. A group of 15 cows, between 5 to 10 years of age, were used as oocyte donors. Oocyte recovery was performed using OPU, in FSH-stimulated donors, at every 2 weeks during 10-month intervals. Each donor cows was follicle aspirated for 4-6 sessions. A total of 307 oocytes were recovered. Out of the 216 oocytes (A, B and some C grades) were subjected to *in vitro* maturation and *in vitro* fertilization, 88 reached the 2-4 cell stage at day 2 post-fertilization, with a cleavage rate of 40.74% (88/216). Twenty four blastocysts were obtained at day 7 after culture *in vitro*, with a blastocyst rate of 27.27% and 11.11%, based on the numbers of the cleaved zygotes and cultured oocytes, respectively. Six embryos were transferred into 3 recipients at Day 7 post natural estrous. One recipient was pregnant and then gave one calf. This study demonstrates that it is possible to generate the *in vitro* blastocyst-stage embryos from Kao Lumpoon cattle, using oocytes collected by OPU technique.

Keywords: *in vitro* fertilization, ovum pick-up, Kao Lumpoon cattle, embryo

¹Bureau of Biotechnology in Animal Production, Department of Livestock Development.
Pathumthani. 12000

²Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University. Chiang Mai. 50100

โคขาวลำพูนเป็นโคพันธุ์พื้นเมืองไทยที่มีถิ่นที่อยู่เฉพาะในภาคเหนือของประเทศไทยเท่านั้น ซึ่งยังไม่มี การรายงานการพบในประเทศอื่น และจะพบเฉพาะในเขตจังหวัดลำพูนและเชียงใหม่ โคขาวลำพูนพันธุ์แท้เป็น โคที่มีลักษณะเฉพาะพันธุ์ คือ มีขนตัว ขนตา และพู่หางสีขาว โดยจมูกและกีบเท้ามีสีชมพูอ่อน มีรูปร่างสูง ใหญ่สวยงาม โคขาวลำพูนพันธุ์แท้ที่ผ่านการคัดเลือกลักษณะอย่างดีเยี่ยมแล้วจะนำไปใช้ในพิธีพระราชพิธี จรดพระนังคัลแรกนาขวัญ ปัจจุบันจำนวนโคขาวลำพูนพันธุ์แท้ลดลงอย่างต่อเนื่อง (Yiengvisavakul, 1997) เนื่องจากการเลี้ยงเพื่อใช้เป็นแรงงานลดลง นอกจากนั้นยังมีการผสมข้ามสายพันธุ์ คาดว่าโคขาวลำพูนพันธุ์แท้ จะมีน้อยกว่า 1,000 ตัว และกำลังลดจำนวนลงเรื่อยๆ จำเป็นต้องหาวิธีเพิ่มจำนวนโคขาวลำพูนพันธุ์แท้ อย่าง เร่งด่วนพร้อมกับการอนุรักษ์พันธุ์กรรม

เทคโนโลยีเกี่ยวกับการผลิตลูกโคจากการปฏิสนธินอกร่างกาย ได้มีการพัฒนาไปอย่างมาก และมีการ นำมาใช้อย่างแพร่หลายทั้งเพื่อการวิจัยการขยายและการปรับปรุงพันธุ์ (Hasler et al., 1995) การเก็บ เซลล์ไข่ เพื่อนำมาปฏิสนธิกับตัวอสุจิในห้องทดลองโดยการเจาะผ่านทางช่องคลอดร่วมกับการใช้เครื่องอัลตรา ซาวด์ (ultrasound-guided transvaginal ovum pick-up: OPU) ได้เริ่มดำเนินการในสัตว์ เพื่อลดการบาดเจ็บ และอันตรายสำหรับสัตว์ อีกทั้งยังทำซ้ำได้หลายครั้ง มีรายงานการนำเทคโนโลยีดังกล่าวมาประยุกต์ใช้เพื่อการ อนุรักษ์โคพื้นเมืองประจำถิ่น (*Bos indicus*) ในประเทศอินเดียโดย Manik และคณะ (2003) ในปัจจุบันมี รายงานวิจัยในประเทศมากขึ้นเกี่ยวกับการผลิตตัวอ่อน โดยใช้เทคนิคการปฏิสนธินอกร่างกายร่วมกับการเก็บ เซลล์ไข่ผ่านทางช่องคลอดโดยไม่ใช้เครื่องอัลตราซาวด์ ทั้งในโคนมและโคพันธุ์พื้นเมืองภาคใต้ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานในโคพันธุ์ขาวลำพูน วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตตัวอ่อน โคขาวลำพูนพันธุ์แท้โดยใช้เทคนิคการปฏิสนธินอกร่างกาย ร่วมกับการเก็บเซลล์ไข่ผ่านทางผนังช่องคลอด

วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลองและการเตรียมตัวสัตว์

แม่โคขาวลำพูนพันธุ์แท้ อายุระหว่าง 5-10 ปี น้ำหนักประมาณ 250-300 กิโลกรัม จำนวน 15 ตัว เลี้ยง ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อน อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา ในโรงเรือนแบบเปิด อาหารที่ ให้เป็นอาหารอัดเม็ด 1 กก.ต่อวัน ให้อาหารข้น และหญ้าแห้ง 5-7 กก.ต่อวัน แบ่งให้อาหารข้น 2 มื้อ โคทั้งหมดถูก ปรับสภาพของร่างกายให้สมบูรณ์ก่อนเริ่มทำการเก็บเซลล์ไข่ประมาณ 1 เดือน ใช้ฮอร์โมน FSH (Follitropin V, Ontario, Canada) กระตุ้นให้รังไข่มีฟอลลิเคิลเจริญพร้อมๆ กันหลายใบ ขนาด 100 มก. ต่อตัวโดยแบ่งฉีดเป็น 2 โดสเท่ากัน ห่างกัน 12 ชม. (สุรจิต และคณะ, 2547) ฉีดฮอร์โมนเข็มแรกประมาณ 48 ชม. ก่อนเจาะ โดย ก่อนฉีดเข็มแรกทำการตรวจสอบขนาดฟอลลิเคิล หากพบว่ามีความหนาแน่นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 1 ซม. หรือที่มี ขนาดใหญ่ที่สุดให้เจาะทิ้งก่อน ดำเนินการเจาะเก็บเซลล์ไข่หลังฉีดฮอร์โมนเข็มสุดท้าย 24-36 ชม. ให้น้ำยาที่ โคนหาง (2% ลิโดเคน) ในอัตราส่วน 1 มล. ต่อน้ำหนักโค 100 กก. ก่อนเจาะเก็บ แม่โคแต่ละตัวถูกนำมาเก็บ

เซลล์ไข่สัปดาห์ละ 1 ครั้ง สัปดาห์เว้นสัปดาห์ เป็นเวลาต่อเนื่อง 4-6 ครั้ง ใช้เวลาดำเนินงานเจาะเก็บเซลล์ไข่รวม 18 ครั้ง ระหว่างเดือน มิถุนายน 2550 – กรกฎาคม 2551

การเก็บเซลล์ไข่โดยการเจาะผ่านทางผนังช่องคลอด

ทำการเจาะเก็บเซลล์ไข่ตามวิธีที่ได้รายงานก่อนหน้านี้ของ ณรงค์ และคณะ (2547) ด้วยเครื่องมือของ ฮิลล์ (Hill Aspirator, Mable Hill Embryos INC.) น้ำยาที่ใช้เก็บเซลล์ไข่ คือ PBS (Gibco, BRL, USA) เติมด้วย FSH 1% (v/v) ยาปฏิชีวนะ (penicillin-streptomycin) และสารกันเลือดแข็งตัว (50 หน่วย/มล. heparin) ก่อนเจาะเก็บเซลล์ไข่ ทำการตรวจนับจำนวนฟอลลิเคิลบนรังไข่ด้วยโพรบอัลตราซาวด์ชนิด linear transducer (5 MHz) จากนั้นดำเนินการเจาะเก็บ ตามขั้นตอนดังที่รายงานไว้ของณรงค์ และคณะ (2547) เสร็จแล้วตรวจสอบจำนวนฟอลลิเคิลที่รังไข่อีกครั้งด้วยวิธีการเช่นเดียวกับก่อนการเจาะ ตรวจหาเซลล์ไข่ที่เก็บได้และประเมินคุณภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ประเมินคุณภาพตามลักษณะของเซลล์คิวมูลัสที่ล้อมรอบและไซโทพลาสซึม ตามวิธีของ Hasler et al. (1995) ดังนี้

เกรด เอ (A grade) ไข่ที่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบหนาแน่น ตั้งแต่ 4 ชั้นขึ้นไป (cumulus oocyte complexes)

เกรด บี (B grade) ไข่ที่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบ 1-3 ชั้นหรือหลุดลอกบางส่วน (partially denuded oocytes)

เกรด ซี (C grade) ไข่ที่ไม่มีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบ (denuded oocytes)

เกรด ดี (D grade) ไข่ที่มีการแผ่ขยายของเซลล์คิวมูลัส (expanded oocytes)

คัดเลือกเซลล์ไข่เฉพาะเกรด เอและบี นำไปดำเนินการตามขั้นตอนการปฏิสนธิในอกร่างกาย (มาลี และคณะ, 2548) ที่ห้องปฏิบัติการปฏิสนธิในอกร่างกาย ณ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ต.บางกะดี อ.เมือง จ.ปทุมธานี

ผลและวิจารณ์

จาก Table 1 เก็บเซลล์ไข่ได้รวม 307 ใบ ได้เซลล์ไข่เกรดบี มากที่สุด คิดเป็น 41% การศึกษาครั้งนี้สามารถเจาะเก็บไข่เกรด เอ และ บี ซึ่งจะนำไปปฏิสนธิในอกร่างกายได้จากโคทดลองทุกตัว ซึ่งต่างจากรายงานของ Manik et al. (2003) ที่รายงานในโคพื้นเมืองบางตัว (*Bos indicus*) ไม่เคยได้เซลล์ไข่เกรด เอ หรือ บี เลย

ในการศึกษาครั้งนี้ได้เซลล์ไข่เกรด เอ และ บี รวม 67.42% (207/307) ใกล้เคียงกับรายงาน ของณรงค์ และคณะ (2547) และของสุรจิต และคณะ (2547) ในโคพื้นเมืองภาคใต้ (65% และ 56.8%) ผลการผลิตตัวอ่อนโคขาวลำพูนจากการปฏิสนธิในอกร่างกายโดยใช้เซลล์ไข่ที่เจาะเก็บได้ ได้อัตราการแบ่งตัว 40.74% (Table 1) ซึ่งนับว่ายังต่ำเมื่อเทียบกับที่รายงานในโคนม (Ward et al., 2000) ที่ได้ประมาณ 60% หรือในโคพันธุ์ซี

มเมนทอล (Reis et al., 2002) ที่ได้ถึง 70.5-81% แต่ยังสูงกว่าที่รายงานในโคพื้นเมืองในประเทศอินเดีย (33%) ของ Manik et al. (2003) เมื่อพิจารณาสัดส่วนของตัวอ่อนที่เจริญจนถึงระยะบลาสโตซิสต์ ณ วันที่ 7 หลังการเพาะเลี้ยง เทียบกับจำนวนตัวอ่อนที่แบ่งตัวและไข่ที่นำเลี้ยงหลังปฏิสนธินอกร่างกาย จากการศึกษาครั้งนี้ ได้ผลเท่ากับ 27.27% (เทียบกับตัวอ่อนที่แบ่งตัว) และ 11.11% (เทียบกับเซลล์ไข่ที่ใช้) พบว่าได้ค่าใกล้เคียง (25% และ 10.5-12.7%) กับรายงานของ Reis et al. (2002) และรายงานในโคพันธุ์พื้นเมืองแต่เป็นลูกโคก่อนวัยเจริญพันธุ์ (Techakumphu et al., 1996) ที่ได้อัตราการเจริญถึงระยะบลาสโตซิสต์ต่ำกว่า 10% แต่ได้ค่าต่ำกว่าในโคพื้นเมืองภาคใต้ (30% และ 14.63 %) ของสุรจิต และคณะ (2547) อย่างไรก็ตามงานดังกล่าวไม่มีรายงานลูกเกิด

Table 1 Summary on embryo production by ovum-pick up and in vitro fertilization techniques in Kao Lamphoon cattle

Categories	Numbers
No. of oocytes recovered (number of cows)	307 (15)
No. of oocytes grade A (%)	81 (26.38)
No. of oocytes grade B (%)	126 (41.04)
No. of oocytes grade C (%)	87 (28.34)
No. of oocytes grade D (%)	10 (3.26)
No. of oocytes used for IVF (%)	216 (70.36)
% Cleaved zygotes (n/oocytes used)	40.74 (88/216)
% Blastocysts at Day 7 (n/cleaved zygotes)	27.27 (24/88)
% Blastocysts at Day 7 (n/oocytes used)	11.11 (24/216)
No. of embryos transferred/no.recipient	6/3
No. recipient pregnant (%)	1 (33.33)
No. calf born	1

หลังจากทำการฝากตัวอ่อนสด 6 ใบในตัวรับ 3 ตัวซึ่งเป็นโคนมพันธุ์ผสมที่เป็นสัตว์ธรรมชาติมาแล้ว 7 วัน พบว่าตัวรับตั้งท้อง 1 ตัว โดยตัวรับที่ตั้งท้อง เกิดจากการฝากตัวอ่อน 4 ใบในคราวเดียว มีลูกเกิด 1 ตัวเมื่อเดือนพฤศจิกายน 2551 นับเป็นรายงานครั้งแรกในประเทศไทยที่มีลูกโคขาวลำพูนเกิดจากเทคนิคการเก็บเซลล์ไข่ที่เก็บจากรังไข่ผ่านทางผนังช่องคลอดและปฏิสนธินอกร่างกาย

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์ยุทธ หรินทรานนท์ ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ที่สนับสนุนการดำเนินงาน พนักงานราชการของสำนักและศูนย์ที่ช่วยให้การศึกษารั้งนี้สำเร็จได้ด้วยดี งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

เอกสารอ้างอิง

- ณรงค์ เลี้ยงเจริญ อนนท์ เทืองสันเทียะ บุญชู ศรีสุข และ มาลี อภิเมธีธำรง. 2547. การเก็บโอโอไซต์โคพื้นเมืองภาคใต้ผ่านทางผนังช่องคลอดโดยไม่ใช้เครื่องอัลตราซาวด์. ประชุมสัมมนาวิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่ 19. วันที่ 26-30 พฤษภาคม 2547 ณ พิพิธภัณฑ์การเกษตรเฉลิมพระเกียรติ ปทุมธานี. ซีดีรอม.
- มาลี อภิเมธีธำรง ณรงค์ เลี้ยงเจริญ อนนท์ เทืองสันเทียะ และ จุริยรัตน์ สำเร็จประสงค์. 2548. ผลของขนาดฮอร์โมนเอสโตรเจนต่อปริมาณและคุณภาพของโอโอไซต์โคที่เจาะเก็บได้ผ่านทางผนังช่องคลอดโดยไม่ใช้เครื่องอัลตราซาวด์. ประชุมสัมมนาวิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่ 20. วันที่ 26-29 สิงหาคม 2548 โรงแรมรามารไนด์. กรุงเทพมหานคร. ซีดีรอม.
- สุรจิต ทองสอดแสง ณรงค์ เลี้ยงเจริญ และมาลี อภิเมธีธำรง. 2547. การผลิตตัวอ่อนโคพื้นเมืองไทยภาคใต้ (โคชน) โดยการเก็บไข่อ่อนจากรังไข่ผ่านทางช่องคลอด และการปฏิสนธินอกร่างกาย. วารสารสัตวแพทย์ 14 (3): 167-171.
- Hasler, J.F., Henderson, W.B., Hurtgen, P.J., Jin, Z.Q., McCauley, A.D., Mower, S.A., Neely, B., Shuey, L.S., Stokes J.E. and Trimmer, S.A. 1995. Production, freezing and transfer of IVF embryos and subsequent calving results. Theriogenology 43: 141-152.
- Manik, R.S., Singla, S.K. and Palta, P. 2003. Collection of oocytes through transvaginal ultrasound-guide aspiration of follicles in an Indian breed of cattle. Anim. Reprod. Sci. 76: 155-161.
- Reis, A., Staines, M.E., Watt, R.G., Dolman, D.F. and McEvoy, T.G. 2002. Embryo production using defined oocyte maturation and zygote culture media following repeated ovum pick-up (OPU) from FSH-stimulated Simmental heifers. Anim. Reprod. Sci. 72: 137-151.
- Techakumphu, M., Tantasuparak, W. and Singlor, J. 1996. Successful blastocyst production from Native Thai calf oocytes after *in vitro* fertilization. Thai J. Vet. Med. 26: 169-176.

- Yiengvisavakul, V. 1997. Country Reports: Thailand. Proceedings of the Second Regional Training Workshop on the Conservation of Domestic Animal Diversity and the Third National Coordinators' Meeting. FAO, Bangkok, March 1997. p.71.
- Ward, F.A., Lonergan, P., Enright, B.P. and Boland, M.P. 2000. Factors affecting recovery and quality of oocytes for bovine embryo production *in vitro* using ovum pick-up technology. Theriogenology 54: 433-446.

การเปรียบเทียบน้ำยาเจือจาง EGG YOLK TRIS ที่มีไข่แดงของ นกกระทา ไก่ และเปิดเป็นองค์ประกอบต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโค

จตุพร พงษ์เพ็ง¹ อภิชัย พูนชัย²

บทคัดย่อ

การเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด egg yolk Tris (EYT) ที่มีไข่แดงของนกกระทา ไก่ และเปิด เป็นองค์ประกอบ โดยใช้ไข่โคโฮลส์ไธน์-ฟรีเชียน อายุประมาณ 5-7 ปี จำนวน 6 ตัว รีดเก็บน้ำเชื้อติดต่อกัน 5 สัปดาห์ พบว่าน้ำเชื้อโคที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ EYT ที่มีไข่แดงของเปิดและนกกระทาเป็นองค์ประกอบมีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิสูงกว่าน้ำเชื้อโคที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ EYT ที่มีไข่แดงของไก่ ($45.14 \pm 3.25\%$ และ $43.72 \pm 3.08\%$ เทียบกับ $34.18 \pm 3.12\%$) การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิในน้ำเชื้อโคที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ EYT ที่มีไข่แดงของเปิดเป็นองค์ประกอบมีค่าสูงที่สุด เมื่อเทียบกับน้ำเชื้อโคที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ EYT ที่มีไข่แดงของนกกระทาและไก่ ($24.23 \pm 1.95\%$, $21.00 \pm 1.51\%$, $17.90 \pm 1.72\%$) ลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ภายหลังการละลายในลักษณะ beat cross frequency (BCF) ในน้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงของไก่ เป็นองค์ประกอบ(25.20 ± 0.70 Hz) มีค่าสูงกว่าที่มีไข่แดงของเปิด (22.89 ± 0.42 Hz) และไข่แดงของนกกระทา (23.00 ± 0.46 Hz) ความสมบูรณ์ของอะโครโซมภายหลังการละลาย พบว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของเปิดกับนกกระทามีค่าสูงกว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของไก่เป็นองค์ประกอบ $70.14 \pm 3.25\%$, $68.72 \pm 3.08\%$ และ $59.18 \pm 3.12\%$ ตามลำดับ แต่ไม่พบความแตกต่างของลักษณะรูปร่างของตัวอสุจิที่ผิดปกติ จากการทดลองนี้($P > 0.05$) การใช้ไข่แดงของเปิดมีความเหมาะสมที่สุดสำหรับใช้เป็นองค์ประกอบในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคเมื่อเปรียบเทียบกับ การใช้ไข่แดงของนกกระทาและไก่

คำสำคัญ : น้ำเชื้อแช่แข็งโค น้ำยาเจือจาง ไข่แดง

¹ ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ผสมเทียมลำพูนกลาง ลำสนธิ ลพบุรี

² ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพนครราชสีมา เมือง นครราชสีมา

Comparison of Quail, Chicken, and Duck Egg Yolk Tris Extender on Bull Frozen Semen Quality

Jatuporn Pongpeng¹ Apichai PoonChai²

Abstract

Comparison of the quality of bull frozen semen using egg-yolk from quail, chicken and duck in egg-yolk Tris extender (EYT), was carried out once a week for 5 weeks on 6 Holstein-Freisian bulls aged 5-7 years. The result showed higher post-thaw motility of semen extended with duck and quail egg-yolks than those extended with chicken egg-yolk ($45.14 \pm 3.25\%$ and $43.72 \pm 3.08\%$ vs. $34.18 \pm 3.12\%$). Progressive motility was highest in semen extended with duck egg-yolk than those with quail and chicken egg-yolks ($24.23 \pm 1.95\%$ vs. $21.00 \pm 1.51\%$ and $17.90 \pm 1.72\%$). Beat cross frequency (BCF) of spermatozoa in semen extended with chicken egg-yolk (25.20 ± 0.70 Hz) was higher than those with duck (22.89 ± 0.42 Hz) and quail (23.00 ± 0.46 Hz) egg-yolks. Acrosomal integrity of spermatozoa in duck and quail egg-yolk extenders were highest as compared with chicken egg-yolk extender ($70.14 \pm 3.25\%$ and $68.72 \pm 3.08\%$ vs. $59.18 \pm 3.12\%$). Abnormal sperm morphology was not significantly different ($P > 0.05$), in conclusion, duck egg-yolk extender gave the highest after thawing motility of bull spermatozoa compared with the chicken and the quail egg-yolk extenders.

Key words: Bull frozen semen, extender, egg yolk

¹Lamphayaklang Livestock Semen Production Center, Lamsonthi, Lopburi

²NaKonratchasima Artificial Insemination and Biotechnology Centre. Muang, Nakonratchasima

น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่นิยมใช้ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งโค คือ น้ำยาเจือจาง egg yolk Tris ซึ่งมีองค์ประกอบหลัก คือ สารที่เป็นแหล่งพลังงานให้แก่ตัวอสุจิซึ่งได้แก่น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและสารที่ทำหน้าที่เป็น cryoprotectant ซึ่งได้แก่กลีเซอรอลและไข่แดง ทำหน้าที่ช่วยป้องกันความเสียหายที่จะเกิดกับอสุจิในกระบวนการแช่แข็ง (Foote, 1970)

ไข่แดงเป็นองค์ประกอบพื้นฐานในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่ทำหน้าที่ป้องกันความเสียหายของอสุจิจากการเกิด cold shock และป้องกันความเสียหายจากกระบวนการแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อก่อนนำไปใช้ (Salamon and Maxwell, 2000) ซึ่งเชื่อว่าการทำหน้าที่ของไข่แดงสามารถปกป้องตัวอสุจิในระดับ cell membrane สารในไข่แดงที่เป็นตัวทำปฏิกิริยาดังกล่าว คือ สารในกลุ่ม lipoprotein หรือ phospholipid (Bathgate et al., 2006)

สารในกลุ่ม lipoprotein ที่อยู่ในไข่แดงของสัตว์ปีกต่างชนิดกันมีสัดส่วนแตกต่างกัน องค์ประกอบที่ซับซ้อนในไข่แดงประกอบด้วยของแข็งร้อยละ 50 สัดส่วนระหว่างไขมันและโปรตีนคือ 2:1 ไขมันทั้งหมดในไข่แดงอยู่ในรูปของ lipoprotein องค์ประกอบต่างๆ ในไข่แดง เป็นตัวกำหนดพฤติกรรมการทำงานที่ต่างๆ ของไข่แดง โดยเฉพาะการเกิดเจลและอิมัลชัน โดยมี low density lipoproteins หรือ LDL เป็นตัวสำคัญในการเกิดปฏิกิริยา (ณฐมล, 2550) LDL ส่วนใหญ่อยู่ในรูปสารประกอบโคเลสเตอรอลและมีปริมาณต่างกันในไข่แดงของสัตว์ปีกต่างชนิดกัน เช่น ปริมาณโคเลสเตอรอลในไข่แดงของไก่ มี 1480 มิลลิกรัม/100 กรัม ไข่แดงของเป็ดมี 1120 มิลลิกรัม/100 กรัม ซึ่งต่างจากไข่แดงของนกกระทาที่มีโคเลสเตอรอล 3640 มิลลิกรัม/100 กรัม (ภัทรารุทธ, 2542) ดังนั้นเมื่อนำมาใช้เป็นองค์ประกอบในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อจึงน่าจะให้ผลการป้องกันความเสียหายที่เกิดกับตัวอสุจิต่างกัน จากการทดลองของ Briand-amirat และคณะ (2006) พบว่า เมื่อเติม LDL ลงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโค สามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ และจำนวนตัวอสุจิที่มีชีวิตภายหลังการแช่แข็งได้ ส่วน Su และคณะ (2008) รายงานว่าการใช้ไข่แดงของนกพิราบซึ่งมีปริมาณของโคเลสเตอรอลสูงกว่าไข่แดงจากสัตว์ปีกชนิดอื่น เป็นองค์ประกอบในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด EYT ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งดีกว่าการใช้ไข่แดงของ ไก่ เป็ด นกกระทา และห่าน

การศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคเพื่อเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยใช้ น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ egg yolk Tris ที่ใช้ไข่แดงของนกกระทา ไก่ และเป็ด เป็นองค์ประกอบ จะช่วยให้สามารถทราบได้ว่าไข่แดงของสัตว์ปีกชนิดใดเหมาะสมในการทำหน้าที่ป้องกันความเสียหายของตัวอสุจิจากการลดอุณหภูมิในกระบวนการแช่แข็ง

วิธีการทดลอง

ทำการทดลองโดยใช้พ่อพันธุ์โคนมลูกผสมโฮลสไตน์-ฟรีเซียน อายุประมาณ 5-7 ปี จำนวน 6 ตัว ซึ่งน้ำเชื้อมีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไม่ต่ำกว่า 70 % รีดเก็บน้ำเชื้อสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ตลอด 5 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD นำน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้มาแบ่งเป็น 3 ส่วนเท่าๆ กัน เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อให้มีจำนวนตัวอสุจิ 96 ล้านตัว/มล. เจือจางน้ำเชื้อสดด้วยน้ำยาเจือจางตามชนิดของไข่แดง ดังนี้

1. น้ำยาเจือจาง egg yolk Tris ที่มีไข่แดงของนกกะทา 20%
2. น้ำยาเจือจาง egg yolk Tris ที่มีไข่แดงของไก่ 20%
3. น้ำยาเจือจาง egg yolk Tris ที่มีไข่แดงของเป็ด 20%

บรรจุน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.25 มล. และนำไปลดอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ (Digitcool 5300, ZH350&UE350 with 900 HP program 3T Software, IMV, France) และเก็บน้ำเชื้อที่แช่แข็งแล้วไว้ระดับไนโตรเจนเหลว ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งและภายหลังการแช่แข็ง 24 ชั่วโมง โดยตรวจคุณภาพดังนี้

1. การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ตรวจด้วยเครื่อง CASA (computer assisted semen analysis) โปรแกรม IVOS motility analyzer version 12.0 (Hamilton-Thorne, Biosciences, MA, USA) ตรวจตัวชี้วัดต่างๆ ที่มีรายละเอียดของนิยามและสูตรการคำนวณที่ได้กล่าวไว้ในรายงานของ Agarwal et al. (2003) ได้แก่
 - การเคลื่อนที่ (% motility) และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (% progressive motility)
 - ความเร็วในการเคลื่อนที่วัดด้วยค่า path velocity (VAP), straight-line velocity (VSL) และ curvilinear velocity (VCL) มีหน่วยเป็น $\mu\text{m/s}$
 - ลักษณะการเคลื่อนที่วัดด้วยค่า amplitude of lateral head displacement; ALH(μm), beat cross frequency ;BCF(Hz), straightness ;STR(%) และ linearity; LIN(%)
 - ความยาว (elongation) และพื้นที่ส่วนหัวของตัวอสุจิ (area) มีหน่วยเป็น μm
2. ความผิดปกติของอะโครโซมและเยื่อหุ้มเซลล์ ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง (phase contrast microscope)
3. รูปร่างตัวอสุจิที่ผิดปกติ โดยการย้อมตัวอสุจิด้วยสี eosin-nigrosin และตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง

การทดลองในครั้งนี้ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) กำหนดให้ชนิดของไข่แดงเป็นทรีทเมนต์ และเปรียบเทียบร้อยละของความผิดปกติโครโมโซมและเยื่อหุ้มตัวอสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็งและเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ ด้วยตาราง ANOVA เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's Multiple Range Test.

ผลการทดลอง

จากการศึกษาพบว่าเมื่อเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของไก่ เป็ด นกกระทา เป็นองค์ประกอบ ก่อนการแช่แข็ง พบว่ายังไม่พบความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (ตารางที่ 1) แต่เมื่อผ่านขั้นตอนการแช่แข็งแล้ว นำน้ำเชื้อที่ได้มาละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที พบว่าการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของเป็ดและนกกระทาเป็นองค์ประกอบ มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าตัวอสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของไก่เป็นองค์ประกอบ ($45.14 \pm 3.25\%$, $43.72 \pm 3.08\%$, $34.18 \pm 3.12\%$) ส่วนการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า พบว่าตัวอสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของเป็ดเป็นองค์ประกอบมีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูงกว่าตัวอสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงของนกกระทาและไก่เป็นองค์ประกอบ ($24.23 \pm 1.95\%$, $21.00 \pm 1.51\%$, $17.90 \pm 1.72\%$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และทำนองเดียวกันกับค่า recovery rate (ค่าความแตกต่างระหว่างอัตราการเคลื่อนที่เริ่มต้นกับอัตราการเคลื่อนที่ภายหลังละลาย) ที่ตัวอสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของเป็ดเป็นองค์ประกอบมีค่าต่ำที่สุด รองลงมาคือตัวอสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของนกกระทาเป็นองค์ประกอบ และค่ามากที่สุดคือตัวอสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของไก่เป็นองค์ประกอบ คือ $35.33 \pm 2.78\%$, $39.38 \pm 2.78\%$ และ $45.81 \pm 3.28\%$ ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงของเป็ดเป็นองค์ประกอบ มีการสูญเสียอสุจิในระหว่างขั้นตอนการแช่แข็งต่ำที่สุด (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยลักษณะของน้ำเชื้อโคก่อนการแช่แข็งโดยใช้น้ำยาเจือจาง egg yolk Tris (EYT) ที่มีไข่แดงของไก่ เป็ด และนกกกระทาเป็นองค์ประกอบ

ค่าชีวิตตัวอสุจิ	น้ำเชื้อโคก่อนการแช่แข็ง		
	น้ำยาเจือจาง EYT ที่มีไข่แดง 20 %		
	ไก่	เป็ด	นกกกระทา
การเคลื่อนที่ (%)	80.00 ± 1.64	79.45 ± 2.36	80.95 ± 2.32
การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	38.45 ± 3.14	37.59 ± 3.86	41.36 ± 3.81
ความเร็วในการเคลื่อนที่			
Average path velocity: VAP ($\mu\text{m/s}$)	129.38 ± 5.60	127.97 ± 4.88	126.05 ± 4.70
Straight-line velocity: VSL ($\mu\text{m/s}$)	84.11 ± 4.07	83.25 ± 4.35	84.06 ± 4.01
Curvilinear velocity: VCL ($\mu\text{m/s}$)	230.50 ± 11.70	233.95 ± 8.65	243.04 ± 14.21
ลักษณะการเคลื่อนที่			
Amplitude of lateral head displacement: ALH (μm)	7.75 ± 0.36	7.94 ± 0.28	7.80 ± 0.29
Beat cross frequency: BCF (Hz)	32.62 ± 1.11	32.55 ± 1.25	33.70 ± 1.15
Straightness: STR (%)	67.68 ± 2.07	66.95 ± 2.20	68.95 ± 2.20
Linearity: LIN (%)	40.22 ± 1.95	38.81 ± 1.75	40.72 ± 1.81
ความยาวและพื้นที่ส่วนหัว			
Elongation (μm)	58.50 ± 0.45	57.95 ± 0.42	57.38 ± 2.35
Area (μm)	8.23 ± 0.23	8.28 ± 0.22	7.98 ± 0.23

ส่วนลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิพบว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงของไก่เป็นองค์ประกอบมีค่า ลักษณะ Beat cross frequency (BCF) มีหน่วยเป็น Hz (ลักษณะความถี่ที่หัวตัวอสุจิส่ายไปมาในขณะที่เคลื่อนที่) สูงกว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงของเป็ดและนกกกระทาเป็นองค์ประกอบ คือ 25.20 ± 0.70 Hz, 22.89 ± 0.42 Hz และ 23.00 ± 0.46 Hz ตามลำดับ แต่ ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ความยาวของอสุจิ (Elongation) ภายหลังละลายของอสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของนกกกระทายาวกว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงของไก่และเป็ดเป็นองค์ประกอบ คือ $46.40 \pm 0.59 (\mu\text{m})$, $44.36 \pm 0.45 (\mu\text{m})$ และ $44.52 \pm 0.42 (\mu\text{m})$ ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ลักษณะความผิดปกติของรูปร่างตัวอสุจิทั้งก่อนการแช่แข็งและภายหลังการละลายไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่ภายหลังการละลาย ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของตัวอสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของเปิดกับนกระทา มีความสมบูรณ์สูงกว่าตัวอสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่ไก่เป็นองค์ประกอบ $70.14 \pm 3.25\%$, $68.72 \pm 3.08\%$ และ $59.18 \pm 3.12\%$ ตามลำดับ ในทำนองเดียวกับจำนวนอะโครโซมที่เสียหาย พบว่าภายหลังการละลายตัวอสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของไก่ อะโครโซมได้รับความเสียหายสูงกว่าตัวอสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่เปิดและนกระทาเป็นองค์ประกอบ คือ $40.81 \pm 3.12\%$, $29.85 \pm 3.25\%$ และ $31.27 \pm 3.08\%$ ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยลักษณะของน้ำเชื้อโคภายหลังการละลาย แช่แข็งโดยใช้น้ำยาเจือจาง egg yolk Tris (EYT) ที่มีไข่แดงของไก่ เปิดและนกระทาเป็นองค์ประกอบ

ค่าชีวิตตัวอสุจิ	น้ำเชื้อแช่แข็งโคภายหลังการละลาย		
	น้ำยาเจือจาง EYT ที่มีไข่แดง 20 %		
	ไก่	เปิด	นกระทา
การเคลื่อนที่ (%)	$34.18^a \pm 3.12$	$45.14^b \pm 3.25$	$43.72^b \pm 3.08$
การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	$17.90^a \pm 1.72$	$24.23^b \pm 1.95$	$21.00^{ab} \pm 1.51$
ความเร็วในการเคลื่อนที่			
Average path velocity: VAP ($\mu\text{m/s}$)	82.43 ± 2.65	87.94 ± 2.88	84.72 ± 2.95
Straight-line velocity: VSL ($\mu\text{m/s}$)	62.44 ± 1.91	65.37 ± 1.84	62.22 ± 1.77
Curvilinear velocity: VCL ($\mu\text{m/s}$)	144.96 ± 5.09	154.88 ± 5.63	148.50 ± 5.52
ลักษณะการเคลื่อนที่			
Amplitude of lateral head displacement: ALH (μm)	6.81 ± 0.16	7.14 ± 0.19	7.00 ± 0.15
Beat cross frequency: BCF (Hz)	$25.20^a \pm 0.70$	$22.89^b \pm 0.42$	$23.00^b \pm 0.46$
Straightness: STR (%)	76.04 ± 0.81	74.57 ± 0.85	74.13 ± 0.87
Linearity: LIN (%)	45.45 ± 0.81	44.00 ± 0.68	44.04 ± 0.72

ตารางที่ 2 (ต่อ) แสดงค่าเฉลี่ยลักษณะของน้ำเชื้อโคภายหลังการละลาย แช่แข็งโดยใช้น้ำยาเจือจาง egg yolk Tris (EYT) ที่มีไข่แดงของไก่ เป็ด และนกกะทาเป็นองค์ประกอบ

ค่าชีวิตตัวอสุจิ	น้ำเชื้อแช่แข็งโคภายหลังการละลาย		
	น้ำยาเจือจาง EYT ที่มีไข่แดง 20 %		
	ไก่	เป็ด	นกกะทา
ความยาวและพื้นที่ส่วนหัว			
Elongation (μm)	44.36 ^a $\pm$ 0.45	44.52 ^a $\pm$ 0.42	46.40 ^b $\pm$ 0.59
Area (μm)	7.85 $\pm$ 0.17	7.50 $\pm$ 0.08	7.57 $\pm$ 0.43

^{ab} ตัวอักษรที่ต่างกันแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยลักษณะรูปร่างและอะโครโซมของตัวอสุจิกายหลังละลาย แช่แข็งโดยใช้น้ำยาเจือจาง egg yolk Tris (EYT) ที่มีไข่แดงของไก่ เป็ด และนกกะทาเป็นองค์ประกอบ

ลักษณะตัวอสุจิ	น้ำเชื้อโคก่อนการแช่แข็ง			น้ำเชื้อแช่แข็งโคภายหลังการละลาย		
	น้ำยาเจือจาง EYT ที่มีไข่แดง 20 %			น้ำยาเจือจาง EYT ที่มีไข่แดง 20 %		
	ไก่	เป็ด	นกกะทา	ไก่	เป็ด	นกกะทา
รูปร่างผิดปกติ %	11.87 $\pm$ 0.47	11.66 $\pm$ 0.36	11.87 $\pm$ 0.41	18.87 $\pm$ 0.47	18.66 $\pm$ 0.36	18.87 $\pm$ 0.41
อะโครโซมสมบูรณ์ %	75.00 $\pm$ 1.64	74.45 $\pm$ 2.36	75.95 $\pm$ 2.32	59.18 ^a $\pm$ 3.12	70.14 ^b $\pm$ 3.25	68.72 ^b $\pm$ 3.08
อะโครโซมเสียหาย %	25.00 $\pm$ 1.64	25.54 $\pm$ 2.36	24.04 $\pm$ 2.32	40.81 ^a $\pm$ 3.12	29.85 ^b $\pm$ 3.25	31.27 ^b $\pm$ 3.08

^{ab} ตัวอักษรที่ต่างกันแถวเดียวกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลองพบว่าภายหลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งโคที่ใช้ไขมันเจือจางที่มีไขมันของเปิดและนกกะทาเป็นองค์ประกอบ อัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิสูงกว่าน้ำเชื้อโคที่เจือจางด้วยไขมันเจือจางที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ ส่วนการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าพบว่าน้ำเชื้อโคที่ใช้ไขมันเจือจางที่มีไขมันของเปิดเป็นองค์ประกอบมีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าน้ำเชื้อโคที่เจือจางด้วยไขมันเจือจางที่มีไขมันของไก่และนกกะทาเป็นองค์ประกอบ สาเหตุที่ให้ผลแตกต่างกันอาจเนื่องจากสัดส่วนของสารประกอบ phospholipids ที่เป็นตัวทำปฏิกิริยาในการป้องกันความเสียหายของตัวอสุจิในขบวนการแช่แข็ง ซึ่งมีรายงานว่าในไข่เปิดมี monounsaturates fatty acid (MUFA) มากกว่าในไข่ไก่และนกกะทา และยังมีสารในกลุ่ม phosphatidylinositol (PI) มากกว่าในไข่ไก่และนกก (Bathgate et al., 2006) ทั้งนี้ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าสารตัวใดแน่ที่เป็นตัวที่ป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งที่แท้จริงมีผู้ทดลองใช้ไขมันของสัตว์ปีกต่างชนิดกันเป็นส่วนผสมในไขมันเจือจางน้ำเชื้อ เพื่อช่วยป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งในหลายๆ สัตว์ ผลที่ได้มีความแตกต่างกัน เช่น Andrabi และคณะ (2008) พบว่าการใช้ไขมันของเปิดเป็นองค์ประกอบในไขมันเจือจางน้ำเชื้อกระบือ Tris-citric acid glycerol ทำให้การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ plasma membrane integrity มีค่าสูงกว่าการใช้ไขมันจากสัตว์ปีกชนิดอื่น ในทำนองเดียวกันกับน้ำเชื้อแช่แข็งม้าที่ใช้น้ำไขมันเจือจางน้ำเชื้อที่มีไขมันของเปิดเป็นองค์ประกอบ มีคุณภาพน้ำเชื้อดีกว่าการใช้น้ำไขมันเจือจางน้ำเชื้อที่มีไขมันของไก่เป็นองค์ประกอบ (Clulow et al., 2007) แต่น้ำเชื้อแช่แข็งลา การใช้ไขมันของนกกะทาทำให้คุณภาพน้ำเชื้อสูงกว่าการใช้ไขมันของไก่ (Trimeche et al. 1997) ในขณะที่ Su และคณะ (2008) พบว่าการใช้ไขมันของนกกะทาในไขมันเจือจางน้ำเชื้อส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อสูงกว่าการใช้ไขมันของ ไก่ เป็ด ห่าน และนกกะทา ในทางตรงข้ามการใช้ไขมันของไก่ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อสูงกว่าการใช้ไขมันของเปิดและนกกะทา (Bathgate et al., 2006)

ลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิภายหลังการละลาย พบว่าความกว้างในการส่ายของส่วนหัวของตัวอสุจิ (ALH) มีค่าไม่แตกต่างกัน แต่ความถี่ในการส่ายของหัวตัวอสุจิที่เรียกว่า BCF ในไขมันเจือจางที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบมีค่าสูงกว่าที่มีไขมันเปิดและไขมันนกกะทา แสดงให้เห็นถึงลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิมีการเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม ซึ่งพบรายงานว่าลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิโคมีความแตกต่างและเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะแวดล้อม เช่น ส่วนประกอบของของเหลวรอบตัวอสุจิ หรือความหนาของหยดน้ำเชื้อที่หยดลงบนแผ่นกระจกสไลด์ (Amann, 1988) หรืออาจเป็นลักษณะการเคลื่อนที่แบบ erratic movement ของตัวอสุจิ (Abaigar et al., 1999) ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับลักษณะความยาวของอสุจิที่เปลี่ยนไป จากการทดลองพบว่าตัวอสุจิในไขมันเจือจางน้ำเชื้อที่มีไขมันของนกกะทายาวกว่าตัวอสุจิในไขมันเจือจางที่มีไขมันของไก่และเปิดเป็นองค์ประกอบ คือ $46.40 \pm 0.59 \mu\text{m}$, $44.36 \pm 0.45 \mu\text{m}$ และ $44.52 \pm 0.42 \mu\text{m}$ ตามลำดับ แต่ทั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของรูปร่างตัวอสุจิในไขมันเจือจางที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบต่างกัน

ความสมบูรณ์ของอะโครโซมภายหลังละลายในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของเปิดกับนกระทา เป็นองค์ประกอบมีค่าสูงกว่าในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของไก่เป็นองค์ประกอบ คือ $70.14 \pm 3.25\%$, $68.72 \pm 3.08\%$ และ $59.18 \pm 3.12\%$ ตามลำดับ ในทำนองเดียวกับจำนวนอะโครโซมที่เสียหาย พบว่า ภายหลังการละลาย ตัวอสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของไก่ มีอะโครโซมได้รับความเสียหายสูงกว่าตัว อสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่เปิดและนกระทาเป็นองค์ประกอบ คือ $40.81 \pm 3.12\%$, $29.85 \pm 3.25\%$ และ $31.27 \pm 3.08\%$ ตามลำดับ ทั้งนี้จากหลายๆ การทดลองให้เหตุผลคล้ายกัน คือ การทำงานของไข่แดงสามารถ ทำปฏิกิริยาถึงระดับเซลล์เมมเบรน จึงส่งผลกระทบต่ออะโครโซมแตกต่างกัน เนื่องจากมีองค์ประกอบของไข่ แดงแตกต่างกัน (Bathgate et al., 2006)

จากการศึกษาในครั้งนี้ สรุปได้ว่าน้ำเชื้อแช่แข็งโคที่ใช้ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด egg yolk Tris ที่มีไข่ แดงของเปิดเป็นองค์ประกอบ 20 % มีคุณภาพน้ำเชื้อสูงที่สุด และเหมาะสมสำหรับการใช้เป็นองค์ประกอบ ของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคเพื่อเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง รองลงมาคือน้ำเชื้อแช่แข็งโคที่ใช้ในน้ำยา เจือจางน้ำเชื้อชนิด egg yolk Tris ที่มีไข่แดงของนกระทา และน้ำเชื้อแช่แข็งโคที่ใช้ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด egg yolk Tris ที่มีไข่แดงของไก่เป็นองค์ประกอบ

เอกสารอ้างอิง

- ณัฐมล จินดาพรรณ 2550 วารสารเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยสยาม ปีที่ 3 ฉบับที่ 1 มิถุนายน 2549- พฤษภาคม 2550. หน้า 14-20
- ภัทรารุท อินทรกำแหง. 2542. **ความสม่ำเสมอของการออกกำลังกายเป็นหัวใจสู่ความสำเร็จ.**
กรุงเทพฯ : โรงพยาบาลพระมงกุฎเกล้า.
- Abaigar, T., Holt, W.V., Harrison, R.A.P. and del Barrio, G. 1999. Sperm subpopulations in Boar (*Sus scrofa*) and Gazelle (*Gazella dama mhorr*) semen as revealed by pattern analysis of computer-assisted motility assessments. *Bio Reprod.* 60: 32-41.
- Agarwal, A., Sharma, R.K. and Nelson, D.R. 2003. New semen quality scores developed by principal component analysis of semen characteristics. *J. Andro.* 24: 343-352.
- Amann, R.P. 1988. Computerized evaluation of stallion sperm. In: *Proceedings of the 32th Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners.* Lexington, Ky. p. 453-473.
- Andrabi, S.M.H., Ansar, M.S., Ullah, N., Anwar, M., Mehmood A. and Akhter, S. 2007. Duck egg yolk in extender improves the freezability of buffalo bull spermatozoa. *Anim Reprod Sci.* 104 : 427-433.

- Bathgate, R., Maxwell, W.M. and Evans, G. 2006. Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. *Reprod Domest Anim* 41(1): 68-73.
- Briand-Amirat, L., Anton, M., Gerard ET, O., and Tainturier, D. 2006. In vitro bull semen fertility after freezing-thawing with egg yolk LDL : a comparison with Optidyl a commercial egg yolk extend. *Revue Med Vet.* 157 : 205-212.
- Clulow, J.R., Maxwell, W.M.C., Evans, G. and Morris, L.H.A. 2007. A comparison of duck and chicken egg yolk for cryopreservation of stallion sperm. *Australian Veterinary Journal* Volume 85 (6) : 232-235.
- Foot, R.H. 1970. Fertility of bull semen at high extension rates in tris - buffered extenders. *J. Dair Sci.* 53: 1475-1477.
- Salamon, S. and Maxwell, W.M.C. 2000. Storage of ram semen. *Animal Reproduction Science* 62:77-111.
- Su, L., Li, X., Quan, J., Yang, S., Li, Y., He, X. and Tang, X. 2008. A comparison of the protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. *Anim Reprod Sci.* 3: 212-219.
- Trimeche, A., Anton, M., Renard, P., Gandemer, G. and Tainturier, D. 1997. Quail Egg Yolk: A Novel Cryoprotectant for the Freeze Preservation of Poitou Jackass Sperm. *Cryob.* 34 :385-393.