บทคัดย่อ

ตามปกติแล้วการเลี้ยงโคนมเกษตรกรต้องการลูกโคเพศเมีย การใช้เทคโนโลยีการกระตุ้นให้โคพันธุกรรมดีตกไข่หลายใบเพื่อผสมเทียมแล้วชะล้างตัวอ่อนออกมาย้ายฝากให้โคตัวรับที่พันธุกรรมทั่วไปจะทำให้ได้ลูกโคพันธุกรรมดีมากกว่าการผสมเทียมอย่างต่ำ 10 เท่า การเลือกเพศตัวอ่อนโคนมก่อนนำไปย้ายฝากให้โคตัวรับ จะทำให้ได้ลูกเพศเมียมากขึ้น ดังนั้นเราจึงควรมีการวิจัยวิธีการแยกเพศตัวอ่อนให้มีประสิทธิภาพ เพื่อจะได้นำไปใช้ในการผลิตโคนมของประเทศไทย การวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 5 การทดลอง

การทดลองที่ 1: ทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบการเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้ว ในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่มีและไม่มีเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โคเลี้ยงร่วมด้วย การทดลองนี้ใช้ไข่ที่เจาะดูดจากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ หลังจากเลี้ยงไข่ให้พร้อมปฏิสนธิแล้ว นำน้ำเชื้อโคนมแช่แข็งมาทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว หลังจากนั้นนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในหลอดแก้วในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน ที่มีและไม่มีเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โค เป็นเวลา 7 วัน เพื่อดูอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนถึงระยะบลาสโตซีส จากการทดลองพบว่าการเลี้ยงตัวอ่อนที่มีเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โคร่วมด้วยให้อัตราการเจริญถึงระยะบลาสโตซีส 30.8% (37/120) สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เลี้ยงร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โคเล็กน้อย (35/120, 29.16%) และไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

การทดลองที่ 2: ทำการทดลองเพื่อเปรียบเทียบผลของการตัดเก็บเซลล์ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสโดยใช้ microblade และการแช่แข็งตัวอ่อนหลังการตัดเก็บเซลล์ ต่ออัตราการเจริญของตัวอ่อนในหลอดแก้ว การทดลองนี้ใช้ไข่ที่เจาะดูดจากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ หลังจากเลี้ยงไข่ให้พร้อมปฏิสนธิแล้ว นำน้ำเชื้อโคนมแช่แข็งมาทำปฏิสนธิในหลอดแก้ว หลังจากนั้นนำตัวอ่อนไปเลี้ยงในหลอดแก้วในน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อนที่ไม่มีเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โค หลังจากเลี้ยง 7 วัน คัดเลือกตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 1-2 มาทำการตัดเก็บเซลล์ตัวอ่อนด้วย microblade หลังจากนั้นนำตัวอ่อนไปแช่แข็งด้วยวิธี vitrification แล้วทำละลายตัวอ่อนออกมาเลี้ยงในหลอดแก้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อดูอัตราการเจริญถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีส จากการทดลองพบว่าตัวอ่อนกลุ่มที่ไม่ตัดและตัดเก็บเซลล์ และไม่ได้นำไปแช่แข็ง มีอัตราการเจริญถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีส ไม่แตกต่างกัน (29/30, 96.66% และ 28/30, 93.33% ตามลำดับ) ตัวอ่อนกลุ่มที่ตัดเก็บเซลล์และไม่ได้แช่แข็ง มีอัตราการเจริญถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีส (28/30, 93.33%) สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ตัดและแช่แข็ง (23/30, 76.66%) ตัวอ่อนกลุ่มที่ไม่ตัดเก็บเซลล์และแช่แข็ง มีอัตราการเจริญถึงระยะแฮชชิ่งบลาสโตซีส (26/30, 86.66%) สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มที่ตัดและแช่แข็ง (23/30, 76.66%)

การทดลองที่ 3: ทำการทดลองแยกเพศตัวอ่อนโคที่ผลิตในหลอดแก้วที่ได้จากไข่ที่เจาะดูดจากรังไข่ที่เก็บจากโรงฆ่าสัตว์ โดยวิธี PCR Y-specific DNA คัดเลือกตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 1-2 มาทำการตัดเก็บเซลล์ด้วย microblade แล้วนำเซลล์ตัวอ่อนที่เก็บได้ไปทำ PCR คัดเลือกตัวอ่อนที่เป็นเพศเมียไปย้ายฝากให้โค

ตัวรับที่เป็นสัดมาแล้ว 7-8 วัน ในกรณีที่มีโคตัวรับไม่เพียงพอย้ายฝากตัวอ่อนสด จะนำตัวอ่อนเพศเมียไปแช่แข็งโดยวิธี vitrification จากการทดลองพบว่าได้ประสิทธิภาพการทำ PCR 91.86% (79/86) ในจำนวนนี้เป็นตัวอ่อนเพศเมีย 50.63% (40/79) และตัวอ่อนเพศผู้ 49.37% (39/79) ได้อัตราการตั้งท้องหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสดเพศเมียให้ตัวรับ 28 ตัว 42.85% (12/28) ในจำนวนนี้ตัวรับ คลอดลูกเพศเมีย 11 ตัว ได้ความแม่นยำในการแยกเพศ 91.66% ส่วนตัวอ่อนที่เหลืออีก 12 ใบนำไปแช่แข็งโดยวิธี vitrification หลังจากนำตัวอ่อนทำละลาย ได้ตัวอ่อนคุณภาพดี 75% (9/12) ได้อัตราการตั้งท้องหลังจากนำตัวอ่อนเพศเมียแช่แข็งไปย้ายฝากให้ตัวรับ 9 ตัว 33.33% (3/9) ตัวรับคลอดลูกเพศเมีย 3 ตัวได้ความแม่นยำในการแยกเพศ 100%.

การทดลองที่ 4: ทำการทดลองแยกเพศตัวอ่อนโคที่ผลิตในหลอดแก้วที่ได้จากไข่ที่เจาะดูดจากโคมีชีวิตด้วยอัลตราซาวด์ โดยวิธี PCR Y-specific DNA คัดเลือกตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 1-2 มาทำการตัดเก็บเซลล์ด้วย microblade แล้วนำเซลล์ตัวอ่อนที่เก็บได้ไปทำ PCR คัดเลือกตัวอ่อนที่เป็นเพศเมียไปย้ายฝากให้โคตัวรับที่เป็นสัดมาแล้ว 7-8 วัน ในกรณีที่มีโคตัวรับไม่เพียงพอย้ายฝากตัวอ่อนสด จะนำตัวอ่อนเพศเมียไปแช่แข็งโดยวิธี vitrification จากการทดลองพบว่าได้ประสิทธิภาพการทำ PCR 90.00% (90/100) ในจำนวนนี้เป็นตัวอ่อนเพศเมีย 51.11% (46/90) และตัวอ่อนเพศผู้ 48.89% (44/90) ได้อัตราการตั้งท้องหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสดเพศเมียให้ตัวรับ 23 ตัว 43.47% (10/23) ในจำนวนนี้ตัวรับ 1 ตัว (10.00%) แท้งลูก เหลือโคตัวรับ 9 ตัวตั้งท้องครบกำหนดคลอด ได้ลูกเพศเมีย 8 ตัว ได้ความแม่นยำในการแยกเพศ 88.88% ส่วนตัวอ่อนที่เหลืออีก 23 ใบ นำไปทำตัวอ่อนแช่แข็งโดยวิธี vitrification หลังจากนำตัวอ่อนทำละลาย ได้ตัวอ่อนคุณภาพดี 82.60% (19/23) หลังจากนำตัวอ่อนแช่แข็งไปย้ายฝากให้โคตัวรับ 19 ตัว มีการตั้งท้อง 31.57% (6/19) คลอดลูกเพศเมีย 6 ตัวได้ความแม่นยำในการแยกเพศ 100%

การทดลองที่ 5: ทำการทดลองแยกเพศตัวอ่อนโคที่ผลิตจากการกระตุ้นให้ตกไข่หลายใบ โดยวิธี PCR Y-specific DNA คัดเลือกตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสเกรด 1-2 มาทำการตัดเก็บเซลล์ตัวอ่อนด้วย microblade แล้วนำเซลล์ตัวอ่อนที่เก็บได้ไปทำ PCR คัดเลือกตัวอ่อนที่เป็นเพศเมียไปย้ายฝากให้โคตัวรับที่เป็นสัดมาแล้ว 7-8 วัน ในกรณีที่มีโคตัวรับไม่เพียงพอย้ายฝากตัวอ่อนสด จะนำตัวอ่อนเพศเมียไปแช่แข็งโดยวิธี vitrification เพื่อนำไปย้ายฝากให้โคตัวรับ ผลการทำ PCR พบว่า สามารถแยกเพศได้ 90.90% (40/41) เป็นตัวอ่อนเพศเมีย 52.50%, (21/40) และตัวอ่อนเพศผู้ 47.50% (19/40) ได้อัตราการตั้งท้องหลังจากย้ายฝากตัวอ่อนสดเพศเมียให้ตัวรับ 10 ตัว 60% (6/10) ตัวรับคลอดลูกเพศเมีย 6 ตัว ได้ความแม่นยำในการแยกเพศ 100% ส่วนตัวอ่อนที่เหลืออีก 11 ใบ นำไปทำตัวอ่อนแช่แข็งโดยวิธี vitrification หลังจากนำตัวอ่อนทำละลาย ได้ตัวอ่อนคุณภาพดี 90.90% (10/11) หลังจากนำตัวอ่อนแช่แข็ง 10 ใบไปย้ายฝากให้โคตัวรับ มีการตั้งท้อง 40.00% (4/10) คลอดลูกเพศเมีย 4 ตัว ได้ความแม่นยำในการแยกเพศ 100%

จากการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่า การแช่แข็งตัวอ่อนหลังจากการตัดเก็บเซลล์โดยวิธี vitrification ให้อัตราการรอดต่ำกว่าตัวอ่อนสด การแยกเพศตัวอ่อนโคที่ผลิตจากการปฏิสนธิใน หลอดแก้ว และการกระตุ้นให้ตกไข่หลายใบด้วยวิธี PCR เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ และมีความแม่นยำสูงในการผลิตลูกโคนมเพศเมียจากการย้ายฝากตัวอ่อน ควรมีการทำการทดลองเพื่อเพิ่มอัตราการรอดของตัวอ่อนหลังจากการตัดเก็บเซลล์ แล้วแช่แข็งโดยวิธี vitrification

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Abstract

In general, dairy farmers needed female calves. Multiple ovulation and embryo transfer technology have obviously shown to speed up the production of superior genetics calves at least 10 times when compared with artificial insemination. Sexing dairy cattle embryos before transfer to recipients will give the great opportunity to get more female calves. Thus, we should do research to find out the efficient technique of embryo sexing in order to utilize in dairy production in Thailand. The research divided into five experiments.

Experiment 1: This research aimed to compare the *in vitro* culture of embryo in medium with and without bovine oviductal epithelial cells (BOEC). The slaughterhouse derived oocytes were *in vitro* matured (IVM) and *in vitro* fertilized (IVF) with frozen-thawed dairy cattle semen. The development of embryos to blastocyst stage in the medium with and without BOEC was examined at day 7. The results showed that co-cultured of embryos with BOEC gave slightly higher number of blastocysts than those without BOEC co-cultured (37/120, 30.8% and 35/120, 29.16% respectively) but was not significant different.

Experiment 2: This research aimed to compare the effects of biopsy embryos at blastocyst stage with microblade and subsequent freezing after biopsied on *in vitro* development of embryos. The slaughterhouse derived oocytes were IVM and IVF with frozen-thawed dairy cattle semen. The embryos were cultured in medium without BOEC for 7 days and grade 1-2 blastocysts were subjected to biopsy with microblade. The biopsied blastocysts were frozen by vitrification technique. The vitrified embryos were thawed and cultured *in vitro* for 24 h and examined the development to hatching blastocyst stage. The results showed that non-biopsied and biopsied embryos without freezing had similar development to hatching blastocysts (29/30, 96.66% and 28/30, 93.33%, respectively). The biopsied embryos without freezing showed development to hatching blastocysts (28/30, 93.33%) which were significantly higher than those biopsied and vitrified embryos (23/30, 76.66%). The non-biopsied and vitrified embryos showed significant higher development to hatching blastocysts than those in biopsied and vitrified embryos (26/30, 86.66% and 23/30, 76.66%, respectively).

Experiment 3: This research aimed to sexing *in vitro* produced embryos which derived from slaughterhouse oocytes by PCR Y-specific DNA technique. Grade 1-2 blastocysts were subjected to biopsy with microblade and the collected cells were determined sex by PCR. The fresh female embryos were transferred to recipients at day 7-8 after estrous. In case of not enough recipients for fresh embryos, the female embryos were vitrified. The results showed that efficiency of PCR was 91.86% (79/86), from these were female embryos 50.63% (40/79) and male embryos 49.37% (39/79). The pregnancy rate after transferred fresh female embryos to 28 recipients was 42.85% (12/28), from these; recipients gave birth to 11 female calves which achieved 91.66% accuracy of sexing. The 12 female embryos were vitrified and warmed, 75% (9/12) good quality embryos were detected. The pregnancy rate after transferred vitrified-warmed female embryos to 9 recipients was 33.33% (3/9), from these; recipients gave birth to 3 female calves which achieved 100% accuracy of sexing.

Experiment 4: This research aimed to sexing *in vitro* produced embryos which derived from ultrasound ovum-picked up oocytes by PCR Y-specific DNA technique. Grade 1-2 blastocysts were subjected to biopsy with microblade and the collected cells were determined sex by PCR. The fresh female embryos were transferred to recipients at day 7-8 after estrous. In case of not enough recipients for fresh embryos, the female embryos were vitrified. The results showed that efficiency of PCR was 90.00% (90/100), from these were female embryos 51.11% (46/90) and male embryos 48.89% (44/90). The pregnancy rate after transferred fresh female embryos to 23 recipients was 43.47% (10/23), from these; 1 recipient aborted, remaining 9 recipients gave birth to 8 female calves which achieved 88.88% accuracy of sexing. The 23 female embryos were vitrified and warmed, 82.60% (19/23) good quality embryos were detected. The pregnancy rate after transferred vitrified-warmed female embryos to 19 recipients was 31.57% (6/19), from these; recipients gave birth to 6 female calves which achieved 100% accuracy of sexing.

Experiment 5: This research aimed to sexing *in vivo* produced embryos which derived from multiovulation by PCR Y-specific DNA technique. Grade 1-2 blastocysts were subjected to biopsy with microblade and the collected cells were determined sex by PCR. The fresh female embryos were transferred to recipients at day 7-8 after estrous. In case of not

enough recipients for fresh embryos, the female embryos were vitrified. The results showed that efficiency of PCR was 90.90% (40/41), from these were female embryos 52.50%, (21/40) and male embryos 47.50% (19/40). The pregnancy rate after transferred fresh female embryos to 10 recipients was 60.00% (6/10), and recipients gave birth to 6 female calves which achieved 100% accuracy of sexing. The 11 female embryos were vitrified and warmed, 90.90% (10/11) good quality embryos were detected. The pregnancy rate after transferred vitrified-warmed female embryos to 10 recipients was 40.00% (4/10), from these; recipients gave birth to 4 female calves which achieved 100% accuracy of sexing.

The experiments can be concluded that vitrified biopsied embryos gave lower survival rate than fresh embryos. PCR sexing of *in vitro* and *in vivo* derived embryos could achieved high efficiency and accuracy of predicted female calves. Need to do further research to improve survival rate of biopsied embryos after vitrification.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี