การแยกเพศตัวอ่อนของโคด้วยเทคนิคเซลล์พันธุศาสตร์แบบง่าย

ปาริฉัตร สุขโต นุสสรา วัฒนกุล

กองผสมเทียม กรมปศุสัตว์ ถนนพญาไท กรุงเทพฯ 10400

บทคัดย่อ

ศึกษาการแยกเพศตัวอ่อนของโคก่อนการถ่ายฝาก ด้วยเทคนิคเซลล์พันธุศาสตร์แบบง่าย ซึ่งประสบผลสำเร็จเป็นอย่างดีในการแยกเพศตัวอ่อนของหนูและแกะ โดยปรับช่วงเวลาการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนของโคใน colcemid เพื่อให้ได้ช่วงเวลาที่สั้นที่สุดที่จะเพาะเลี้ยงตัวอ่อนของโค โดยทำให้มีจำนวนเมตาเฟสเพียงพอที่จะตรวจวินิจฉัยโครโมโซมเพศได้ถูกต้อง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สามารถเพาะเลี้ยงตัวอ่อนของโคใน colcemid โดยใช้ระยะเวลาเพียง 2 ชม. เท่านั้น ก็ทำให้มีจำนวนเมตาเฟสเพียงพอที่จะตรวจวินิจฉัยโครโมโซมเพศได้ และการแยกเพศตัวอ่อนของโคด้วยเทคนิคนี้ใช้เวลาในการปฏิบัติงานทั้งสิ้นไม่เกิน 4 ชั่วโมง

คำสำคัญ : โค, แยกเพศตัวอ่อน

บทนำ

การขาดแคลนโคนมเพศเมียพันธุ์ดีที่ให้ผลผลิตน้ำนมสูง เป็นปัญหาหนึ่งที่เป็นอุปสรรคสำคัญต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงโคนมของประเทศ จึงได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีต่างๆ มาช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตสัตว์และการขยายพันธุ์สัตว์ให้มีจำนวนมากขึ้น การถ่ายฝากตัวอ่อนเป็นเทคโนโลยีหนึ่งที่ได้รับการสนับสนุนให้นำมาใช้เพื่อเพิ่มจำนวนแม่โคนมพันธุ์ดีในระยะเวลาอันสั้น แต่เนื่องจากอัตราการตั้งท้องจากการถ่ายฝากตัวอ่อนยังค่อนข้างต่ำ และอัตราการเกิดลูกเพศเมียตามปกติจะประมาณไม่เกิน 50% (Powell et al., 1975; Foote, 1977) จึงทำให้การเพิ่มจำนวนโคนมเพศเมียพันธุ์ดีแม้จะสูงขึ้นบ้าง แต่ก็ยังไม่เพียงพอ เทคโนโลยีการแยกเพศตัวอ่อนก่อนการถ่ายฝาก เพื่อคัดเลือกตัวอ่อนเพศเมียพันธุ์ดีนำมาถ่ายฝากให้โคตัวรับ จะเป็นวิธีที่สำคัญและมีประโยชน์อย่างยิ่งในการเพิ่มจำนวนโคนมเพศเมียพันธุ์ดีให้มีจำนวนมากขึ้นในระยะเวลาอันสั้น นอกจากนั้นยังเป็นการลดค่าใช้จ่าย และเวลาที่สูญเสียไปในการเลี้ยงลูกโคนมเพศผู้โดยไม่จำเป็น โดยสามารถนำเทคนิคนี้มาใช้ร่วมกับเทคโนโลยีการถ่ายฝากตัวอ่อนครึ่งใบ ซึ่งประสบผลสำเร็จเป็นอย่างดีในสภาวะแวดล้อมของประเทศไทย (นุสสรา และคณะ, 2538) ทำให้สามารถตัดแยกตัวอ่อนส่วนหนึ่งมาทำการตรวจแยกเพศ ในขณะที่ตัวอ่อนอีกครึ่งหนึ่งจะเพาะเลี้ยงไว้เพื่อรอผลการแยกเพศ เมื่อทราบว่าเป็นเพศที่ต้องการแล้ว จึงนำมาถ่ายฝากให้โคตัวรับต่อไป

เทคโนโลยีการแยกเพศตัวอ่อนก่อนทำการถ่ายฝากนี้กำลังเป็นที่ศึกษากันในประเทศที่พัฒนาแล้ว เพื่อให้ได้เทคโนโลยีที่มีความแม่นยำ สะดวกในทางปฏิบัติ และทราบผลในระยะเวลาอันสั้น ทำให้สามารถนำตัวอ่อนที่ทราบเพศแล้วไปถ่ายฝากให้โคตัวรับเร็วที่สุด อันจะทำให้อัตราการตั้งท้องสูงขึ้น เทคนิคนี้อาจทำได้หลายวิธีได้แก่ cytological method (Wintenberger-Torres and Popescu, 1980, Singh and Hare, 1980, King, 1984), immunological method (Wachtel, 1984, Anderson, 1987), gene dosage (Willams, 1986, Monk and Handyside, 1988) และ DNA hybridization (Herr et al., 1989) โดยให้ความแม่นยำเกือบ 100% วิธี DNA hybridization เป็นเทคนิคที่กำลังได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน แต่จำเป็นต้องมีการสกัด DNA และมีความจำเพาะในสัตว์แต่ละชนิด และใช้ค่าใช้จ่ายในการวิเคราะห์ค่อนข้างสูง ในขณะที่เทคนิคเซลล์พันธุศาสตร์จะมีค่าใช้จ่ายที่ต่ำกว่า และยังสามารถตรวจความผิดปกติทางพันธุกรรมของตัวอ่อนก่อนการถ่ายฝากได้ด้วย แต่เทคนิคเซลล์พันธุศาสตร์แบบมาตรฐานที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการตรวจโครโมโซมเพศในเลือดนั้นมีข้อเสียคือขั้นตอนในการปฏิบัติงานค่อนข้างยุ่งยาก และใช้เวลานานหลายวันกว่าจะทราบผล (Betteridge et al., 1981) จึงไม่เหมาะสำหรับการนำมาตรวจโครโมโซมของตัวอ่อน เพื่อการแยกเพศ เพราะจะทำให้การมีชีวิตรอดของตัวอ่อนครึ่งใบที่เพาะเลี้ยงไว้ระหว่างรอผลการตรวจเพศลดลง

นอกจากนี้ในการปฏิบัติงานในท้องที่จริงๆ จำเป็นต้องถ่ายฝากตัวอ่อนครึ่งใบที่เพาะเลี้ยงไว้นั้น ให้แก่โคตัวรับภายในวันเดียวกัน จึงจะทำให้ไม่มีผลกระทบต่อการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนครึ่งใบนั้น และอัตราการตั้งท้องที่ได้ก็จะไม่แตกต่างกับการถ่ายฝากตัวอ่อนเต็มใบด้วย (Williams et al., 1984, Takeda et al., 1986, Voelkel et al., 1984, Warfield et al., 1986, นุสสราและคณะ, 2538) ดังนั้นจึงมีการพัฒนาให้ได้เทคนิคเซลล์พันธุศาสตร์แบบง่ายขึ้น โดยตัดขั้นตอนที่ยุ่งยากออกไป ทำให้การปฏิบัติงานง่ายขึ้นและใช้ระยะเวลาสั้น และได้มีการศึกษาในตัวอ่อนของหนูไม้ซ์และแกะจนได้ผลที่น่าพอใจแล้ว (Vadhanakul, 1990, นุสสราและคณะ, 2536) การศึกษาครั้งนี้เป็นการนำเอาเทคนิคเซลล์พันธุศาสตร์แบบง่ายมาทดลองใช้ในการแยกเพศตัวอ่อนของโค โดยใช้ colcemid ที่ความเข้มข้น 0.05 μg/ml ซึ่ง Singh และ Hare (1980) ได้เคยทดลองใช้แยกเพศตัวอ่อนของโคสำเร็จมาแล้ว แต่ใช้เทคนิคเซลล์พันธุศาสตร์ที่แตกต่างกับเทคนิคนี้ และใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงที่นานกว่า ในการศึกษาครั้งนี้จะศึกษาหาช่วงเวลาในการเพาะเลี้ยงที่สั้นที่สุดที่ยังทำให้มีจำนวนเมตาเฟสเพียงพอที่จะใช้ตรวจวินิจฉัยโครโมโซมเพศได้ โดยทดลองใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับที่ใช้ในเทคนิคการแยกเพศตัวอ่อนของหนูไม้ซ์และแกะ คือ 2 และ 3 ชม.ตามลำดับ (Vadhanakul, 1990, นุสสราและคณะ, 2536) และทดลองเพาะเลี้ยงในช่วงเวลาที่นานขึ้นเล็กน้อยด้วย เพื่อศึกษาว่าจะมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเมตาเฟสอย่างไร แต่จะไม่ใช้ช่วงเวลาในการเพาะเลี้ยงที่นานเกินไป เพราะจะมีผลเสียต่อการรอดชีวิตของตัวอ่อน นอกจากนี้ยังศึกษาลักษณะและการกระจายตัวของโครโมโซมที่ได้จากเทคนิคนี้ด้วยว่าเหมาะสมพอที่จะสามารถตรวจวินิจฉัยโครโมโซมเพศได้หรือไม่ เพื่อให้ได้เทคนิคที่มีความแม่นยำสูง ไม่ยุ่งยาก ประหยัด และใช้เวลาในการปฏิบัติงานที่สั้นที่สุด

อุปกรณ์และวิธีการ

ชะล้างตัวอ่อนโคนมอายุ 7 วัน ระยะ morula หรือ blastocyst ออกจากแม่โคตัวให้ (donor) ซึ่งได้รับการกระตุ้นให้มีการตกไข่หลายใบพร้อมกัน (superovulation) ด้วยวิธีเดียวกับ นุสสราและคณะ (2538) คัดเลือกเฉพาะตัวอ่อนที่มีคุณภาพดี (เกรด A) แล้วนำตัวอ่อนแต่ละใบมาตัดแยกเป็น 2 ส่วน โดยใช้ใบมีดขนาดเล็ก และน้ำยาเลี้ยงตัวอ่อน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดอินเวอร์ต ตามวิธีเดียวกับ นุสสราและคณะ (2538)

นำตัวอ่อนแต่ละส่วนที่ได้ (demi-embryo) มาศึกษาทดลองแยกเพศด้วยเทคนิคเซลล์พันธุศาสตร์แบบง่าย ซึ่งดัดแปลงมาจากเทคนิคที่ประสบผลสำเร็จมาแล้วในตัวอ่อนของหนูไม้ซ์ (Vadhanakul, 1990) และตัวอ่อนของแกะ (นุสสราและคณะ, 2536) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม ในแต่ละกลุ่มจะเพาะเลี้ยงชิ้นของตัวอ่อนในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนชนิด F10[1] ซึ่งมี โปรตีน 20% และมีสาร colcemid ที่ความเข้มข้น 0.05 μg/ml และเก็บไว้ในตู้อบที่ 37 °C ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% โดยใช้ระยะเวลาเพาะเลี้ยงในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 เป็น 2, 3 และ 3.5 ชม. ตามลำดับ

หลังจากการเพาะเลี้ยง นำชิ้นตัวอ่อนแต่ละชิ้นมาทำให้เกิดการกระจายของนิวเคลียสและโครโมโซมบนสไลด์ โดยขั้นแรกทำให้เกิดการกระจายตัวของเซลล์ตัวอ่อนในระดับหนึ่งก่อนด้วย hypotonic solution (0.5% KCl) โดยจะหยดบนชิ้นตัวอ่อนบนสไลด์ และทิ้งไว้อย่างน้อย 15 นาที แล้วจึงหยดน้ำยา fixing solution (absolute methanol : glacial acetic acid = 3:1) ลงบนชิ้นตัวอ่อนทีละหยด ประมาณ 3-4 หยด เพื่อรักษาสภาพเซลล์ของตัวอ่อน และทำให้การติดสีสม่ำเสมอ หลังจากนั้นจึงทำให้นิวเคลียสและโครโมโซมของชิ้นตัวอ่อนเกิดการกระจายต่อไปด้วยน้ำยา softening solution A (absolute methanol : 75% glacial acetic acid = 1:1) และน้ำยา softening solution B (absolute methanol : 75% glacial acetic acid = 1:4) ขณะที่หยดน้ำยาแต่ละหยดสังเกตการกระจายตัวของเซลล์ตัวอ่อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดสเตอริโอ พบว่าเมื่อไม่มีการกระจายของเซลล์ของตัวอ่อนเพิ่มขึ้นอีกต่อไป จึงหยด drying solution (absolute methanol : glacial acetic acid = 1:1) เพื่อให้เซลล์ที่กระจายตัวอยู่นั้นแบนลง (flatten) และเกาะติดกับแผ่นสไลด์ ปล่อยให้แห้ง แล้วย้อมด้วย 10% Giemsa solution

ตรวจนับจำนวนเมตาเฟส (metephase spread) และตรวจลักษณะและการกระจายตัวของโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด compound

ผล

จากการตรวจสไลด์ทางกล้องจุลทรรศน์พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นตัวอ่อนที่ต้องการแยกเพศใน colcemid ที่ระยะเวลาต่างๆกัน จะทำให้ได้จำนวนเมตาเฟส (metaphase spread) ที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.01$) (ตาราง 1)

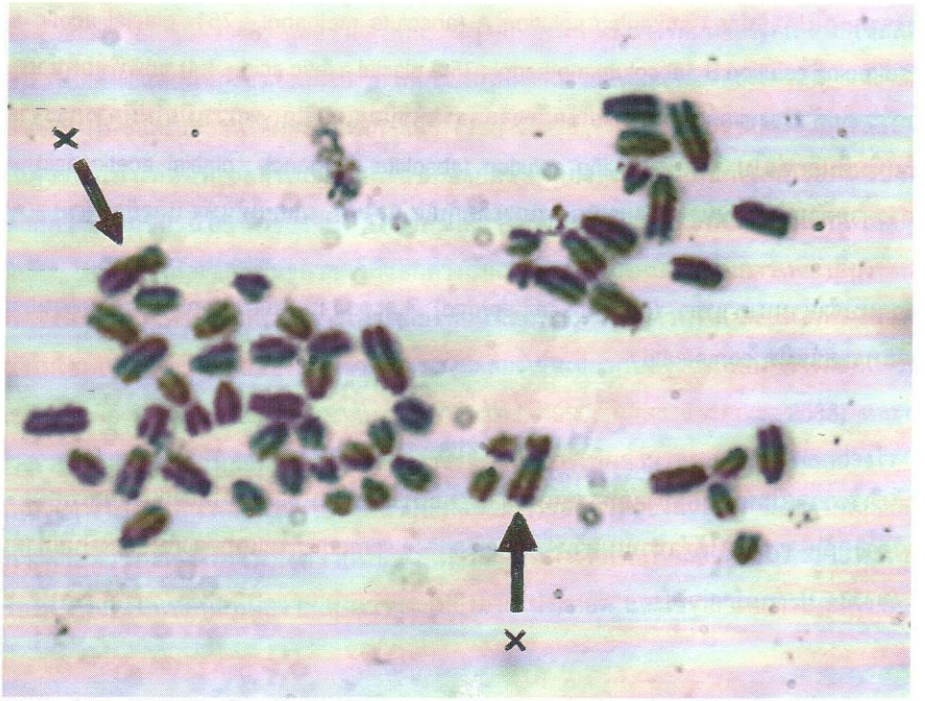
---

[1] Gibco Laboratories, Life Technology, Inc., Grand Island, N.Y.

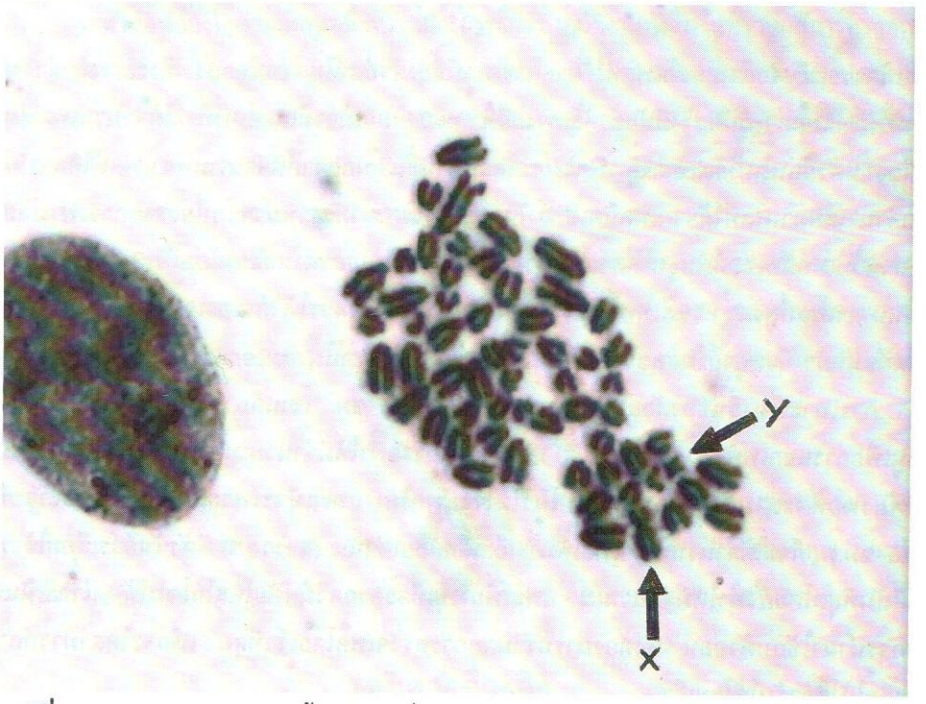
ตารางที่ 1 จำนวนเมตาเฟสที่ได้เมื่อเพาะเลี้ยงตัวอ่อนในสาร colcemid ที่เวลาต่างๆ

กลุ่ม	เวลาในการเพาะเลี้ยง (ชม.)	จำนวนตัวอ่อนครึ่งใบ (ชม.)	จำนวนเมตาเฟสที่ได้ (กลุ่ม) ($\bar{X} \pm SD$)
1	2	30	7.9 ± 3.26
2	3	30	8.1 ± 2.59
3	3.5	30	8.6 ± 2.19

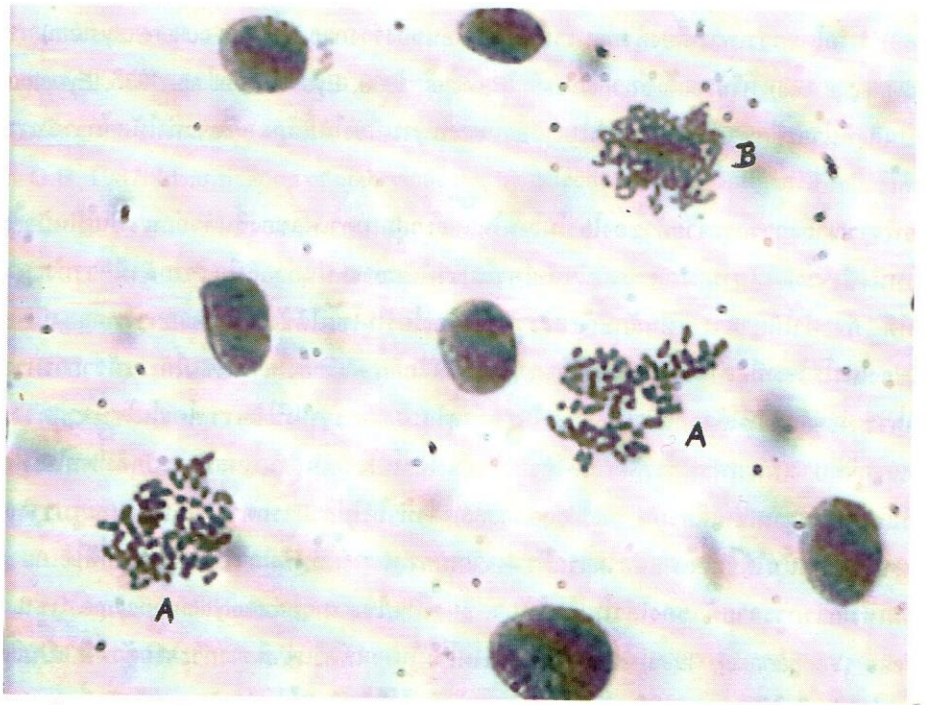
เมื่อตรวจดูลักษณะ รูปร่าง และการติดสีของโครโมโซมในแต่ละเมตาเฟสของตัวอ่อนทั้ง 3 กลุ่ม พบว่า โครโมโซมของทุกเมตาเฟส มีลักษณะและการติดสีที่ชัดเจน และมีการกระจายตัวของโครโมโซมที่ดีพอสมควรที่จะสามารถตรวจวินิจฉัยโครโมโซมเพศได้ (รูป 1 และ 2) แต่การกระจายตัวที่ดีของโครโมโซมนั้นจะไม่พบในทุกเมตาเฟส คือบางเมตาเฟสอาจมีการติดหรือทับกันของโครโมโซมบ้าง (รูป 3) จึงทำให้ไม่สามารถตรวจวินิจฉัยโครโมโซมจากเมตาเฟสกลุ่มนั้นได้ชัดเจน แต่จะสามารถตรวจลักษณะของโครโมโซมจากเมตาเฟสกลุ่มที่มีการกระจายตัวที่ดีได้



รูปที่ 1 กลุ่มเมตาเฟสของชิ้นตัวอ่อนที่ทำการแยกเพศแสดงให้เห็นโครโมโซมเพศเมีย (XX)



รูปที่ 2 กลุ่มเมตาเฟสของชิ้นตัวอ่อนที่ทำการแยกเพศแสดงให้เห็นโครโมโซมเพศผู้ (XY)



รูปที่ 3 การกระจายตัวของโครโมโซมในแต่ละกลุ่มเมตาเฟสของชิ้นตัวอ่อน แสดงให้เห็นการกระจายตัวที่ดีในบางกลุ่ม และมีการทับกันของโครโมโซมในบางกลุ่ม (A: กลุ่มเมตาเฟสที่มีการกระจายตัวที่ดี, B: กลุ่มเมตาเฟสที่มีการทับกัน)

วิจารณ์

เมื่อพิจารณาถึงจำนวนเมตาเฟสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนใน colcemid ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน จะเห็นว่า ค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.01$) แม้ว่ามีแนวโน้มที่จะได้จำนวนเมตาเฟสที่สูงขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงชิ้นตัวอ่อนใน colcemid เป็นระยะเวลาที่นานขึ้น นอกจากนี้จำนวนเมตาเฟสที่ได้จากการศึกษานี้จะน้อยกว่าจำนวนเมตาเฟสที่ได้จากเทคนิคเซลล์พันธุศาสตร์แบบมาตรฐานมาก เนื่องจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน colcemid สำหรับเทคนิคเซลล์พันธุศาสตร์แบบมาตรฐานนั้น จะใช้เวลานานอย่างน้อยถึง 3 วัน (Eldridge, 1985) จึงได้จำนวนเมตาเฟสที่สูงกว่า แต่เทคนิคที่ใช้ในการศึกษานี้ ต้องการให้ได้ระยะเวลาในการแยกเพศที่สั้นที่สุดโดยยังให้ผลที่แม่นยำ จึงพยายามลดช่วงเวลาในการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนใน colcemid ให้สั้นที่สุด ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การเพาะเลี้ยงชิ้นของตัวอ่อนเป็นระยะเวลาเพียง 2 ชม. เช่นเดียวกับเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนของหนูเพื่อการแยกเพศ (Vadhanakul, 1990) ก็สามารถทำให้มีจำนวนเมตาเฟสได้ถึง 7.9 ± 3.26 กลุ่ม ซึ่งนับว่าเพียงพอที่จะสามารถตรวจวินิจฉัยโครโมโซมเพศได้ และแม้จะเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาที่นานขึ้น (3 ชม., 3.5 ชม.) ก็จะได้จำนวนเมตาเฟสเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยเท่านั้น (ตาราง 1) ดังนั้นการเลือกใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงที่สั้นที่สุดโดยยังทำให้มีจำนวนเมตาเฟสเพียงพอที่จะตรวจวินิจฉัยโครโมโซมได้ น่าจะเป็นทางเลือกที่ดีสำหรับการนำมาใช้กับตัวอ่อน ซึ่งต้องการทราบผลการตรวจเพศโดยเร็วที่สุด เพื่อจะได้สามารถถ่ายฝากชิ้นตัวอ่อนที่เหลือให้โคตัวรับได้โดยเร็ว

อย่างไรก็ดีการกระตุ้นให้เซลล์ของตัวอ่อนแบ่งตัวมากขึ้น เพื่อให้มีจำนวนเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวในระยะเมตาเฟสเพิ่มขึ้น โดยใช้สารกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ (mitogenic agent) เช่น phytohemagglutinin (Menino et al., 1989) หรือโดยการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนร่วมกับเซลล์อื่นของร่างกายสัตว์ (co-culture system) เช่น เซลล์ท่อนำไข่ (oviductal cell) หรือเซลล์ trophoblast (Bavister, 1988, Eyestone et al., 1985, Eyestone et al., 1987) ก็เป็นสิ่งที่น่าจะศึกษาต่อไปเพื่อย่นระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงให้สั้นลง ซึ่งจะทำให้สามารถทราบผลการตรวจเพศได้เร็วยิ่งขึ้น

เมื่อพิจารณาถึงการกระจายตัวของโครโมโซมในแต่ละกลุ่มเมตาเฟสของชิ้นตัวอ่อน อันเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งซึ่งจะทำให้สามารถตรวจวินิจฉัยโครโมโซมได้อย่างแม่นยำ เนื่องจากถ้ามีการกระจายตัวของโครโมโซมที่ดี ก็จะทำให้สามารถเห็นลักษณะและรูปร่างของโครโมโซมได้ชัดเจน จากการทดลองนี้พบว่ามีการกระจายตัวของโครโมโซมที่ดีเพียงพอที่จะสามารถตรวจวินิจฉัยลักษณะของโครโมโซมได้ แม้ว่าการกระจายตัวนี้จะน้อยกว่าการกระจายตัวที่ได้จากเทคนิคเซลล์พันธุศาสตร์แบบมาตรฐานที่ใช้ตรวจโครโมโซมจากตัวอย่างเลือดก็ตาม ส่วนกรณีที่บางเมตาเฟสมีการติดกันหรือทับกันของโครโมโซมนั้น ก็เป็นสภาวะปกติที่พบในเทคนิคเซลล์พันธุศาสตร์แบบมาตรฐานเช่นเดียวกัน (Eldridge, 1985) จึงทำให้ไม่สามารถตรวจลักษณะและรูปร่างของโครโมโซมจากเมตาเฟสกลุ่มนั้นได้ชัดเจน แต่สามารถตรวจจากเมตาเฟสกลุ่มอื่นที่มีการกระจายตัวที่ดีได้ อย่างไรก็ตามการพยายามเพิ่มการกระจายตัวของโครโมโซมให้มากขึ้น โดยใช้สาร proteolytic enzyme เช่น trypsin, hyaluronidase (Vadhanakul, 1990) เพื่อช่วยให้โครโมโซมในทุกเมตาเฟสมีการกระจายตัวที่ดี เป็นสิ่งที่ควรจะทำการศึกษาต่อไป เพื่อให้การตรวจวินิจฉัยโครโมโซมเพศเป็นไปได้อย่างแม่นยำและรวดเร็วยิ่งขึ้น

การแยกเพศตัวอ่อนของโคด้วยเทคนิคนี้ พบว่าใช้เวลาในการปฏิบัติงานทั้งสิ้นจนทราบผลการตรวจเพศภายใน 4 ชม. เท่านั้น ซึ่งจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการปฏิบัติงานในท้องที่ เพราะเป็นเทคนิคที่ง่าย ประหยัด และใช้เวลาสั้น ทำให้สามารถถ่ายฝากตัวอ่อนครึ่งที่เหลือที่ทราบว่าเป็นเพศที่ต้องการแล้วให้โคตัวรับได้โดยเร็ว นอกจากนั้นเทคนิคนี้ยังทำให้สามารถตรวจความผิดปกติอื่นๆ ของโครโมโซมของตัวอ่อนก่อนทำการถ่ายฝากได้ด้วย ซึ่งจะป้องกันไม่ให้มีการถ่ายทอดโครโมโซมที่ผิดปกติไปยังลูกหลาน

อย่างไรก็ดี ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการถ่ายฝากชิ้นตัวอ่อนครึ่งที่เหลือ แต่นำชิ้นตัวอ่อนที่ตัดแยกไว้แต่ละครึ่งนั้น มาใช้ในการแยกเพศด้วยเทคนิคเซลล์พันธุศาสตร์แบบง่ายทั้งหมด เนื่องจากตัวอ่อนมีจำนวนจำกัด จึงจำเป็นต้องใช้ชิ้นของตัวอ่อนทั้งหมดให้มีประโยชน์สูงสุดในการศึกษาค้นคว้า เพื่อให้ได้เทคนิคที่แม่นยำที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ นายสัตวแพทย์ สัมพันธ์ สิงหจันทร์ ผู้เชี่ยวชาญด้านวิจัย (ผสมเทียม) กรมปศุสัตว์ ที่กรุณาให้การสนับสนุนและคำปรึกษาในการศึกษานี้เป็นอย่างดียิ่ง และขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์ภาณุพันธ์ พงษ์เพ็ง สัตวแพทย์บุญชู ศรีสุข และคุณอนุชาติ ศิริรัตน์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการศึกษานี้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

นุสสรา วัฒนกุล, Galloway, D.B. และ Brandon, M.R. 2536 เทคนิคการแยกเพศคัพภะของแกะด้วยวิธีเซลล์พันธุศาสตร์แบบง่าย การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 31 3-6 กุมภาพันธ์ 2536 หน้า 606-614.

นุสสรา วัฒนกุล, ปาริฉัตร สุขโต, พรรณพิไล เสกสิทธิ์, วินิจ คำสังข์, ภาณุพันธ์ พงษ์เพ็ง และ บุญชู ศรีสุข 2538 การผลิตลูกโคนมจากตัวอ่อนครึ่งใบ สัตวแพทยสาร 46(3): 11-25.

Anderson, G.B. 1987. Identification of embryonic sex by detection of H-Y antigen. Theriogenology 27: 81-97.

Bavister, B.D. 1988. Role of oviductal secretions in embryonic growth in vivo and in vitro. Theriogenology 29: 77-88.

Betteridge, K.L., Hare, W.C.D. and Singh, E.L. 1981. Approaches to sex selection in farm animals. In: New Technologies in Animal Breeding, Bracket et al. Academic Press, NewYork. p. 109-125.

Eldridge, F.E. 1985. Cytogenetics of Livestock. AVI Publishing Company Inc., Westport, Connecticut. p. 125-144.

Eyestone, W.H., Northey, D.L., and Leibfried-Rutledge, M.L. 1985. Culture of one-cell bovine embryos in the sheep oviduct. Biol. Reprod. 32 (Supp. 1): 100.

Eyestone, W.H., Vignieri, J., and First, N.L. 1987. Co-culture of early bovine embryos with oviductal epithelium. Theriogenology 27: 228.

Foote, R.H. 1977. Sex ratios in dairy cattle under various conditions. Theriogenology 8: 349-356.

Herr, C., Matthaei, K.I. and Reed, K.C. 1989. Accuracy of a rapid Y-chromosome detecting bovine embryo sexing assay. Proc. Aust. N.N.Z. Soc. for Cell Biol. p. 50.

King, W.A. 1984. Sexing embryos by cytological methods. Theriogenology 21: 7-17.

Menino, A.R. Jr., Williams, J.S. and Gardiner, C.S. 1989. Development of mouse embryos in media containing lectins. Theriogenology 31: 821-834.

Monk, M. and Handyside, A.H. 1988. Sexing of preimplantation mouse embryos by measurement of X-linked gene dosage in a single blastomere. J. Reprod. Fertil. 82: 365-368.

Powell, R.L., Norman, H.D. and Dickinson, F.N. 1975. Sire differences in sex ratio of progeny. J. Dairy Sci. 58: 1723-1726.

Singh, E.L. and Hare, W.C.D. 1980. The feasibility of sexing bovine morula stage embryos prior to embryo transfer. Theriogenology 14: 421-427.

Takeda, T., Hallowell, S.V., McCauley, A.D. and Hasler, J.F. 1986. Pregnancy rates with intact and split bovine embryos transferred surgically and nonsurgically. Theriogenology 25: 204.

Vadhanakul, N. 1990. Cytogenetic sex determination of embryos. Master Degree Thesis. The University of Melbourne, Australia. 116 pp.

Voelkel, S.A., Humes, P.E. and Godke, R.A. 1984. Pregnancy rates resulting from non-surgical transfer of micromanipulated bovine embryos. 10th Cong. Anim. Reprod. and A.I. p. 251-253.

Wachtel, S.S. 1984. H-Y antigen in the study of sex determination and control of sex ratio. Theriogenology 21: 18-28.

Warfield, S.J., Seidel, G.E., Jr. and Elsden, R.P. 1986. Transfer of bovine demi-embryos with and without zonae pellucidae. Theriogenology 25: 212.

Williams, T.J., Elsden, R.P. and Seidel, G.E., Jr. 1984. Pregnancy rates with bisected bovine embryos. Theriogenology 22: 521-531.

Williams, T.J. 1986. A technique for sexing mouse embryos by a visual colorimetric assay of the X-linked enzyme glucose 6-phosphate dehydrogenase. Theriogenology 25: 733-739.

Wintenberger-Torres, S and Popescu, P.C. 1980. Transfer of cow blastocysts after sexing. Theriogenology 14: 309-318.

Sex Determination of Bovine Embryos Using a Simplified Cytogenetic Technique

Parishat Sukhato Nussara Vadhanakul

Division of Artificial Insemination, Department of Livestock Development, Pyathai Road, Bangkok 10400

Abstract

Sex determination of bovine embryos before transfer was studied by using a simplified cytogenetic technique which was successfully established for sexing mouse and ovine embryos. The culture period of bovine embryos with colcemid was adjusted in order to obtain the shortest duration that could produce enough metaphase spreads to allow accurate sex chromosome identification. The results indicated that only 2 hour-culture-period of bovine embryos with colcemid was sufficient to produce enough metaphase spreads for sex chromosome identification. This technique required less than 4 hours for sexing bovine embryos.

Key words : embryo sexing, bovine embryo, simplified cytogenetic technique

อภินันทนาการ

จาก

ELANCO
ANIMAL HEALTH
TM.

ผู้ผลิต และ นำเข้า

- ไทแลนพรีมิกซ์
- ไทแลนชนิดฉีด
- แอปพราแลนพรีมิกซ์
- เซอร์แม็ก
- อีแลนโคบาน
- แมคซิบาน
- ไทแลนซัลฟา
- ไทแลนละลายน้ำ
- แอปพราแลนละลายน้ำ
- ไฮโกรมิกซ์
- มอนทีบาน

บริษัท อีไล ลิลลี่ เอเซีย อิงค์ - สาขาประเทศไทย

แกรนด์อัมรินทร์ ทาวเออร์ ชั้น 14, เลขที่ 1550 ถนนเพชรบุรีตัดใหม่ มักกะสัน ราชเทวี กรุงเทพฯ 10310

โทรศัพท์ 207-0920 แฟ็กซ์ 207-0925