หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1
บทนำ

เป็นการยอมรับกันทั่วไปว่า กระบือที่เป็นสัตว์เลี้ยงแบ่งได้เป็น 2 พวกใหญ่ ๆ คือ

1. กระบือปลัก หรือ swamp buffalo
2. กระบือแม่น้ำ หรือ river buffalo

กระบือทั้งสองชนิดนี้มีชื่อวิทยาศาสตร์เหมือนกัน คือ *Bubalus bubalis* Linn. กระบือปลักมีจำนวนโครโมโซม 2n = 48 ในขณะที่กระบือแม่น้ำมีจำนวนโครโมโซม 2n = 50 กระบือทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถผสมกันได้ ซึ่งลูกผสมจะมีโครโมโซม 2n = 49 (วิวัฒน์ ชวนะนิกุล, 2531)

การกระจายตัวของกระบือ

กระบือปลัก เป็นกระบือที่เลี้ยงในแถบประเทศจีน, เวียดนาม, ลาว, เขมร, พม่า, ไทย, มาเลเซีย, ฟิลิปปินส์, อินโดนีเซีย และออสเตรเลีย

กระบือแม่น้ำ เป็นกระบือที่เลี้ยงในแถบประเทศอินเดีย, ปากีสถาน, บังคลาเทศ, ศรีลังกา, ประเทศแถบทะเลเมดิเตอร์เรเนียน, ประเทศแถบอเมริกากลาง และอเมริกาใต้

ทางด้านลักษณะการสืบพันธุ์ของกระบือปลักนั้น กระบือปลักเพศผู้จะขึ้นผสมพันธุ์กระบือปลักเพศเมียตั้งแต่อายุประมาณ 2 ปี แต่จะผสมติดเมื่ออายุ 3 - 3 1/2 ปี ส่วนกระบือเพศเมียจะมีวงจรการเป็นสัด (estrous cycle) เฉลี่ย 20 วัน 9.6 ชั่วโมง และเป็นสัดนาน 1-3 วัน (ประสบ บูรณมานัส, 2531) 20-34 วัน และเป็นสัดนาน 24-36 ชั่วโมง (จรัญ จันทลักขณา, 2527), 22.3±2.1 วัน (มณีวรรณ กมลพัฒนะ และสรรเพชญ โสภณ, 2530) อายุที่กระบือเพศเมียถึงวัยหนุ่มสาว 1.6-3.0 ปี และเริ่มให้ลูกตัวแรก 3.5-4.7 ปี (จรัญ จันทลักขณา, 2527), 35-36 เดือน (ประสบ บูรณมานัส, 2531) แม่กระบือจะอุ้มท้องนานประมาณ 308-332 วัน (Charan Chantalakhana, 1981)

สำหรับกระบือปลักในประเทศไทย เป็นสัตว์เลี้ยงที่อยู่คู่กับสังคมชนบทของไทยมา ช้านาน เป็นแรงงานที่ใช้เพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรคู่กับเกษตรกรไทยมาตลอด กระบือซึ่งเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้อง (ruminant) เช่นเดียวกับโค แพะ แกะ สามารถเปลี่ยนหญ้าหรือของเหลือจากผลผลิตทางการเกษตรที่มีคุณภาพต่ำ มาเป็นอาหารโปรตีนที่มีคุณภาพสูง เช่น เนื้อ นม เพื่อการบริโภคของมนุษย์

จากสภาวะการณ์ในอดีตถึงปัจจุบัน ปริมาณกระบือไทยลดลงเป็นจำนวนมาก จากประมวลสถิติประจำปีของกรมปศุสัตว์ ดังแสดงในตารางที่ 1 จะเห็นว่าปริมาณกระบือมีแนวโน้มที่ลดลงมากกว่าเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบระหว่างปีพ.ศ.2523 กับปีพ.ศ. 2537 กระบือลดลงประมาณ 29.39% ในขณะที่โคนั้นเพิ่มขึ้นประมาณ 56.18% ในช่วงเวลาเดียวกัน

ตารางที่ 1 สถิติจำนวนปศุสัตว์และสัตว์พาหนะของไทย
(ประมวลสถิติประจำปีกรมปศุสัตว์ 2537)

ปี	โค	การเพิ่มหรือลดของโค (%)	กระบือ	การเพิ่มหรือลดของกระบือ (%)
2523	4,890,037		5,983,382	
2524	4,335,411	-11.34	5,427,169	-9.29
2525	4,515,763	+4.16	5,388,139	-0.72
2526	4,433,831	-1.81	5,205,377	-3.39
2527	4,408,026	-0.58	5,118,913	-1.66
2528	4,314,487	-2.12	5,252,233	+2.60
2529	4,351,461	+0.86	4,980,794	-5.17
2530	4,399,099	+1.09	4,683,599	-5.97
2531	4,595,667	+4.47	4,619,826	-1.36
2532	5,119,717	+11.40	4,611,692	-0.18
2533	5,668,530	+10.72	4,694,290	+1.79
2534	6,626,971	+16.91	4,805,071	+2.36
2535	7,121,479	+7.46	4,728,271	-1.60
2536	7,472,573	+4.93	4,804,146	+1.60
2537	7,637,350	+2.21	4,224,791	-12.06

หมายเหตุ - คือ %การลดลงของปศุสัตว์จากปีก่อนหน้า
+ คือ %การเพิ่มขึ้นของปศุสัตว์จากปีก่อนหน้า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในสภาพชนบทเกษตรกรมักตอนกระบือพ่อพันธุ์ที่ตัวใหญ่ เพื่อให้เชื่องสำหรับไว้ใช้งาน จึงเหลือพ่อพันธุ์ที่ตัวเล็กไว้ใช้ผสมพันธุ์ สำหรับกระบือเพศเมียมักจะเป็นสัดเงียบ (silent heat) ส่วนการสังเกตการเป็นสัดก็ทำได้ยาก เนื่องจากกระบือปัสสาวะบ่อย จึงไม่เห็นน้ำเมือกที่อวัยวะสืบพันธุ์ ส่วนการบวมแดงก็ดูได้ยาก เพราะกระบือมีสีผิวค่อนข้างดำ เมื่อสังเกตการเป็นสัดได้ยากทำให้เลยระยะเวลาที่เหมาะสมในการผสมพันธุ์ การมีลูกจึงยืดยาวออกไปอีก ซึ่งปกติกระบือจะมีอายุการเป็นหนุ่มเป็นสาวช้ากว่าโคอย่างน้อย 6 เดือน และจะอุ้มท้องนานกว่าโคประมาณ 35 วัน ส่วนใหญ่กระบือจะให้ลูก 2 ตัวต่อ 3 ปีมากที่สุด (ประสบ บูรณมานัส, 2531) ข้อมูลดังกล่าวทำให้เห็นว่าการที่จะปรับปรุงพันธุ์กระบือปลักมีอุปสรรคเป็นอย่างมาก ดังนั้นการนำเอาเทคโนโลยีชีวภาพทางการสืบพันธุ์เข้ามาช่วยวิจัยและพัฒนากระบือเป็นวิธีที่ดีวิธีหนึ่ง เช่น การผสมเทียม และเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนเป็นต้น

การย้ายฝากตัวอ่อน (embryo transfer) เป็นเทคโนโลยีชีวภาพทางการสืบพันธุ์ เพื่อประโยชน์ในการปรับปรุงและขยายพันธุ์สัตว์ ซึ่งประกอบด้วยสัตว์เพศเมียที่ทำหน้าที่เป็นแม่ตัวให้ (donor) ซึ่งจะได้รับการกระตุ้นให้มีไข่ตกมากกว่าสภาวะปกติ (superovulation) แล้วทำการผสมพันธุ์ จะโดยการใช้พ่อพันธุ์ผสมตามธรรมชาติ หรือโดยการผสมเทียม แล้วทำการชะล้างเก็บตัวอ่อนนำไปถ่ายฝากยังแม่สัตว์อีกตัวหนึ่งที่เรียกว่าแม่ตัวรับ (recipient) ซึ่งทำหน้าที่เพียงการอุ้มท้องและเลี้ยงดูตัวอ่อนที่ได้รับการถ่ายฝาก ลูกสัตว์ที่เกิดมาจะมีลักษณะพันธุกรรมเช่นเดียวกับแม่สัตว์ตัวให้และพ่อพันธุ์ที่ใช้ผสม

ในปี ค.ศ.1890 Walter Heape นักวิทยาศาสตร์ชาวอังกฤษ ประสบความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนในกระต่าย ซึ่งนับเป็นความสำเร็จครั้งแรกในการย้ายฝากตัวอ่อนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จากการทดลองของ Heape แสดงให้เห็นว่าตัวอ่อนจากสัตว์ตัวหนึ่งสามารถย้ายฝากเข้าไปเจริญเติบโตในมดลูกที่เหมาะสมของสัตว์อีกตัวหนึ่งได้ ต่อมาได้มีผู้ศึกษาการย้ายฝากตัวอ่อนในโค (Hartman et al., 1931; Dowling, 1949; Umbaugh, 1949) การศึกษาได้ก้าวหน้าอย่างรวดเร็วจนประสบความสำเร็จครั้งแรกในปี 1951 โดย Willett และคณะ อ้างโดย สรรเพชญ โสภณ (2530) และต่อมาได้มีกลุ่มนักวิจัยที่พยายามใช้เทคโนโลยีนี้ในกระบือปลักไทยขึ้นโดย พิทยา ตั้งธนะวัฒน์ และคณะ (2524), Smith Nitayavardhana et al., (1982), Maneewan Kamonpatana et al., (1985), Peerasak Chantaraprateep et al., (1988) ซึ่งประสบความสำเร็จในการเก็บตัวอ่อนได้ในอัตราที่ต่ำ และได้รับตัวอ่อนในระยะการเจริญเติบโตที่ต่างกันไป และได้พยายามย้ายฝากไปยังตัวรับ แต่ยังไม่ประสบความสำเร็จ

จากการรวบรวมผลงานของนักวิทยาศาสตร์ ที่ได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับการย้ายฝากตัวอ่อนในกระบือทั่วโลก โดย Maneewan Kamonpatana ในปี ค.ศ. 1990 นั้น พบว่าได้ผลสำเร็จอยู่ในอัตราที่ต่ำ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 สรุปผลสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนกระบือในโลก (Maneewan Kamonpatana, 1990)

ข้อมูล	ความสำเร็จต่อกระบือ 1 ตัวให้
ตัวอ่อนที่เก็บได้เฉลี่ย	1.16 ตัวอ่อน
ตัวอ่อนมีคุณภาพย้ายฝากได้	0.51 ตัวอ่อน
ตัวรับตั้งท้อง	0.60 ตัวอ่อน
ลูกที่ได้	0.03 ตัวอ่อน

ในปี ค.ศ. 1983 Drost และคณะ ได้รายงานความสำเร็จครั้งแรกในการย้ายฝากตัวอ่อนในกระบือพันธุ์ Jaffarabadi ที่เลี้ยงอยู่ในสหรัฐอเมริกา โดยแม่ตัวรับตั้งท้องเป็นเวลา 300 วัน ได้ลูกเพศผู้ น้ำหนักแรกคลอด 35 กิโลกรัม และต่อจากนั้น ในปี ค.ศ. 1989 Peerasak Chantaraprateep และคณะ ได้รายงานความสำเร็จครั้งแรกของการย้ายฝากตัวอ่อนแบบไม่ผ่าตัดในกระบือปลักไทย โดยถ่ายฝากตัวอ่อนในระยะ morula ให้กับแม่กระบือตัวรับ ซึ่งได้ตั้งท้องและคลอดลูกออกมาเป็นกระบือเพศผู้

พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป (2531) ได้กล่าวว่า เทคนิคการย้ายฝากตัวอ่อนให้ประโยชน์หลายประการ กล่าวโดยสรุป คือ ช่วยในการปรับปรุงพันธุ์และเพิ่มการผลิตสายพันธุ์สัตว์ที่ต้องการโดยเฉพาะกรณีสัตว์เพศเมีย ช่วยในการวางแผนการผสมพันธุ์ เพื่อช่วยกระจายแหล่งยีนที่มีอยู่ค่อนข้างจำกัดให้แพร่ไปได้อย่างกว้างขวาง ใช้เพื่อการทดสอบพ่อพันธุ์ที่ใช้อยู่ในสถานีผสมเทียม เพื่อกำจัดลักษณะที่ไม่ต้องการออก ช่วยผลิตลูกแฝด โดยฝากตัวอ่อนที่ปีกมดลูกข้างละตัวให้แก่แม่ตัวรับที่ไม่ได้รับการผสม หรือฝากตัวอ่อนเพิ่มอีกหนึ่งตัวให้แก่แม่ตัวรับที่ได้รับการผสมแล้ว โดยฝากตัวอ่อนในปีกมดลูกตรงกันข้ามกับด้านที่มีไข่ตก ใช้เป็นธุรกิจเกี่ยวกับตัวอ่อนนานาชาติ ซึ่งจะช่วยลดปัญหาการขนส่งสัตว์มีชีวิต ซึ่งตัวอ่อนจะมีโอกาสปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีกว่ากรณีสัตว์มีชีวิต ช่วยเสริมการทำงานของระบบสืบพันธุ์ กรณีที่แม่พันธุ์ผสมติดยากอันเนื่องจากการเป็นสัด หรือล้มเหลวจากการปฏิสนธิ โดยเฉพาะจากการควบคุมโรค เพราะตัวอ่อนมีโอกาสน้อยหรือแทบไม่มีเลยในการแพร่โรคติดต่อที่สำคัญ

จากข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้กล่าวมาแล้วในตอนต้น จะเห็นว่าการศึกษาหาแนวทางในการปรับปรุงพันธุ์กระบือปลักนั้นยังมีปัญหาอยู่อีกมาก โดยเฉพาะในงานย้ายฝากตัวอ่อน ผลการศึกษาในรายงานต่าง ๆ นั้นก็ประสบผลสำเร็จในอัตราที่ต่ำ และมีความแปรปรวนอยู่สูง ดังนั้นการศึกษาเพื่อหาข้อมูลเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มอัตราความสำเร็จ ลดความแปรปรวนจึงเป็นสิ่งที่ควรกระทำเป็นอย่างยิ่งก่อนที่กระบือปลักสัตว์พื้นบ้านไทยจะสูญพันธุ์ไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาเทคนิคการเหนี่ยวนำกระบือปลักตัวให้ที่มีลักษณะพันธุกรรมที่ดี ให้ตกไข่มากกว่าสภาวะปกติ และทำการผสมพันธุ์

2. ศึกษาเทคนิคการชะล้างและย้ายฝากตัวอ่อน เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการปรับปรุงพันธุ์กระบือปลัก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงเทคนิคและวิธีการย้ายฝากตัวอ่อนในกระบือปลัก เพื่อที่จะนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์กระบือปลักให้ดีขึ้น และสามารถที่จะร่นระยะเวลาในการทดสอบพันธุ์ให้รวดเร็วยิ่งขึ้น และจะเป็นพื้นฐานที่จะประยุกต์ใช้กับเทคโนโลยีขั้นสูงต่อไป เช่น การผลิตลูกแฝด การถ่ายฝากนิวเคลียส การถ่ายฝากยีน เป็นต้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การตรวจเอกสาร

การย้ายฝากตัวอ่อนในกระบือ มีขั้นตอนต่าง ๆ ที่สำคัญดังนี้

1. การคัดเลือกตัวให้ที่มีลักษณะพันธุกรรมที่ดี และตัวรับ
2. การกระตุ้นให้ไข่ตกเพิ่มขึ้นในตัวให้
3. การควบคุมการเป็นสัดและการผสมพันธุ์ตัวให้
4. การเก็บตัวอ่อนจากตัวให้
5. การตรวจหาและประเมินคุณภาพตัวอ่อน
6. การเก็บแช่แข็งตัวอ่อน
7. การย้ายฝากตัวอ่อนไปยังตัวรับ

การคัดเลือกตัวให้ที่มีลักษณะพันธุกรรมที่ดีและตัวรับ

ในการทดลองการย้ายฝากตัวอ่อนที่ทำมาในประเทศไทย ยังไม่มีการคัดเลือกตัวให้จริงจังมากนัก เนื่องจากมีข้อจำกัดจากจำนวนแม่กระบือที่ใช้ทดลอง โดยทั่วไปยึดหลักดังนี้ คือ เป็นกระบือที่มีคุณภาพต่าง ๆ ดี เช่น ลักษณะทางพันธุกรรมดี มีความสามารถในการสืบพันธุ์ที่ดี มีการแสดงการเป็นสัดให้เห็นอย่างเด่นชัด และผสมติดง่าย ถ้ามีลูกมาแล้วอย่างน้อยหนึ่งตัวจะยิ่งแสดงว่ามีความสมบูรณ์พันธุ์ ต้องปลอดโรคต่าง ๆ และได้รับวัคซีนป้องกันโรคที่สำคัญด้วย ส่วนตัวรับก็มีความสำคัญในความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนเช่นกัน ซึ่งแม่ตัวรับควรมีระบบสืบพันธุ์เป็นปกติดี มีวงจรการเป็นสัดสม่ำเสมอ ไม่มีประวัติการคลอดยาก หรือปัญหาใด ๆ เกี่ยวกับการคลอดมาก่อน ควรคลอดลูกมาแล้วอย่างน้อย 1-2 ตัว และควรคลอดลูกมาแล้วนานเกิน 4 เดือน (ชัยณรงค์ โลหชิต และคณะ, 2530; พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2531)

การกระตุ้นให้ไข่ตกเพิ่มขึ้นในตัวให้

กระบือและโคเป็นสัตว์ที่ออกลูกครั้งละหนึ่งตัว เนื่องจากมีการตกไข่ครั้งละหนึ่งใบ หรือบางครั้งอาจมีสองใบ (Moor et al, 1984) ดังนั้นในการทำการย้ายฝากตัวอ่อน จึงจำเป็นต้องกระตุ้นให้มีไข่ตกมากกว่าสภาวะปกติ โดยอาศัยฮอร์โมน gonadotropin ซึ่งที่นิยมใช้มี 2 ชนิด ดังนี้

1. Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG)

เป็นฮอร์โมนที่ได้จากเซรั่มของแม่ม้าขณะตั้งท้อง ซึ่งการใช้ฮอร์โมน PMSG เร่งการตกไข่ในโคนมลูกผสมในระดับ 2,000 และ 2,500 I.U. ให้อัตราการตกไข่ไม่แตกต่างกัน (รังสรรค์ พาลพ่าย และคณะ, 2530) ส่วนการกระตุ้นให้มีไข่ตกมากกว่าสภาวะปกติในกระบือปลักโดยปกติจะใช้ที่ระดับ 2,500-2,700 I.U. (Peerasak Chantaraprateep, 1990) แต่นิยมใช้ที่ระดับ 2,500 I.U. ซึ่งให้ผลผลิตโดยเฉลี่ยดี (Newcomb et al., 1979) ในปีค.ศ. 1986 Saumande และ Chupin กล่าวว่า การเพิ่มปริมาณ PMSG มากกว่าปกติ 2-3 เท่า นอกจากไม่สามารถเพิ่มอัตราการตกไข่แล้ว ยังไปยับยั้งการเจริญของ follicle ทำให้อัตราการตกไข่ลดลง ดังงานทดลองของเขาในการกระตุ้นให้เกิด superovulation ด้วย PMSG ที่ระดับ 2,500, 5,000 และ 7,500 I.U. ได้ค่าเฉลี่ยของอัตราการตกไข่ 16.2±7.7, 3.2±2.1 และ 1.4±0.6 ตามลำดับ ซึ่งที่ระดับ 2,500 I.U. จะให้ผลดีที่สุด การให้ฮอร์โมน PMSG จะให้เพียงครั้งเดียว เนื่องจาก PMSG มีค่ากึ่งอายุขัย (half life) นานถึง 5 วัน (Moor et al., 1984) ซึ่งนับว่ามีความสะดวกในการปฏิบัติงาน และจะฉีดให้ในระหว่างวันที่ 8-14 ของวงจรการเป็นสัด (Elsden, 1981) การศึกษาที่ผ่านมาการใช้ PMSG เร่งการตกไข่จะแปรปรวนในระยะเวลาที่ไข่ตก ตรวจสอบจากการล้วงตรวจทางทวารหนัก หรือดูจากรังไข่โดยตรง หลังผ่าซากพบว่ามี follicle เหลืออยู่อีกจำนวนหนึ่ง นอกจากนี้แล้ว การให้ PMSG ทำให้เกิดการสร้าง antibody เมื่อฉีด PMSG ซ้ำ การตอบสนองต่อฮอร์โมนในการเหนี่ยวนำให้ไข่ตกจะลดลง (Newcomb et al., 1979; Jillella, 1982; Betteridge, 1977; Almeida, 1987) แต่มีบางรายงานพบว่า การฉีด PMSG ซ้ำหลาย ๆ ครั้งในโค อัตราการตกไข่และคุณภาพของตัวอ่อนจะไม่แตกต่างกัน แต่โคมีแนวโน้มที่จะไม่ตอบสนองเพิ่มขึ้นเมื่อฉีดซ้ำในครั้งต่อ ๆ มา (Almeida, 1987) Parnpai และคณะ (1985) ได้ใช้ PMSG 2,500 I.U. เร่งการตกไข่ในแม่กระบือที่มีสภาพไม่สมบูรณ์พันธุ์ โดยรังไข่ไม่ทำงานตามปกติ มีช่วงห่างการตกลูกระหว่าง 863-1415 วัน ชะล้างตัวอ่อนได้ 1 ใบ ในวันที่ 5 หลังเป็นสัด อยู่ในระยะ morula แสดงว่า PMSG สามารถเหนี่ยวนำรังไข่กลับมาทำงานได้ดังเดิม

2. Follicle Stimulating Hormone (FSH)

FSH ที่จำหน่ายในท้องตลาดเป็นฮอร์โมนที่สกัดจากต่อมใต้สมองของม้า, หมู, แกะ ส่วนใหญ่เป็นของหมู มีค่ากึ่งอายุขัย 2-5 ชั่วโมง ฉะนั้นจำเป็นต้องให้ทุกวันเช้าและเย็นติดต่อกัน 4-5 วัน รวมแล้ว FSH ที่ใช้เร่งการตกไข่ประมาณ 30-50 mg (รังสรรค์ พาลพ่าย, 2530) การให้มีวิธีที่นิยม 3 วิธีด้วยกัน (Mapletoff, 1986) แต่ยังคงมีการดัดแปลงให้แตกต่างจากทั้ง 3 วิธีนี้ได้อีก เช่น FSH 32 mg โดยแบ่งให้ 5 วันติดต่อกัน 5/5, 4/4, 3/3, 2/2, 2/2 หรือให้ 4 วัน 6/6, 5/5, 3/3, 2/2 หรืออาจให้เพียง 3 วันติดต่อกัน คือ 7/7, 5/5, 4/4 ซึ่ง Chupin และ Procureur (1982) ได้ศึกษาการกระตุ้นเพิ่มการตกไข่ในโค พบว่า การแบ่งฉีดวันละ 2 หรือ 3 ครั้ง จะให้อัตราการตกไข่และจำนวนตัวอ่อนคุณภาพดีกว่าการแบ่งฉีดเพียงครั้งเดียว และการแบ่งฉีดวันละ 2 ครั้ง แบบ ลดปริมาณลงทุกวันให้ผลดีกว่าแบบฉีดวันละ 2 ครั้ง ๆ ละเท่า ๆ กัน และในโคเช่นเดียวกันกับElsden และคณะ (1978) พบว่า การตกไข่และเก็บตัวอ่อน ตลอดจนการตั้งท้องจะเพิ่มมากขึ้นหลังการกระตุ้นให้ไข่ตกเพิ่มขึ้น โดยการใช้ FSH และ LH ในอัตราส่วน 5:1 โดยฉีดให้ตัวให้วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 5 วันติดต่อกัน ในขนาดที่ลดลง สำหรับในกระบือนั้น ชัยณรงค์ โลหะชิต และคณะ (2530) กล่าวว่า การให้ FSH นั้นเป็นเช่นเดียวกับในโคคือ เริ่มให้ในวันที่ 8 ของวงรอบการเป็นสัด และให้ PGF_2 alpha ในวันที่ 3 ควบไปกับ FSH เมื่อเทียบผลการตอบสนองเมื่อกระตุ้นการตกไข่ด้วย FSH กับ PMSG จะได้ค่าเฉลี่ยของจำนวน corpus luteum 4 และ 3 ใบต่อตัวตามลำดับ ซึ่ง FSH จะให้ผลดีกว่า และได้ตัวอ่อนที่มีคุณภาพสูงกว่าด้วย (Sharifuddin and Jainudeen, 1984; Vlahov et al., 1985; Karaivanov, 1986) เป็นที่ทราบกันว่า FSH มีข้อดี คือ มีค่ากึ่งอายุขัยสั้น และไม่สร้าง antibody ต่อการ กระตุ้นครั้งต่อไป แต่ก็มีข้อเสีย คือ ต้องฉีดหลาย ๆ ครั้ง และ มีราคาแพงเมื่อเทียบกับ PMSG และต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ (มงคล เตชะกำพุ และคณะ, 2538) Lambertson และ Lamberth (1986) พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันของจำนวนและคุณภาพของตัวอ่อนที่ชะล้างได้จากการใช้ FSH เร่งการตกไข่ซ้ำ 3 ครั้ง ในแม่โคเนื้อการใช้ฮอร์โมน gonadotropin PMSG และ FSH ในการกระตุ้นการเจริญของ follicle ในรังไข่ของลูกกระบือปลักก่อนวัยเจริญพันธุ์ พบว่า FSH ให้ค่าตอบสนองที่มากกว่า PMSG (มงคล เตชะกำพุ และคณะ, 2538)

ตารางที่ 3 โปรแกรมการเร่งการตกไข่ในแม่กระบือด้วย PMSG และ FSH

(Peerasak Chantaraprateep, 1991)

วันที่ในวงรอบการเป็นสัด	เวลา	วิธีที่ 1	วิธีที่ 2	วิธีที่ 3
9	24.00-12.00 น.	2,000-3,000 I.U. PMSG	5 mg FSH	5 mg FSH
	12.00-24.00 น.		5 mg FSH	5 mg FSH
10	24.00-12.00 น.	ให้ PGF_2 alpha ตัวรับ	4 mg FSH	5 mg FSH
	12.00-24.00 น.	ให้ PGF_2 alpha ตัวให้	4 mg FSH	5 mg FSH
11	24.00-12.00 น.		3 mg FSH	5 mg FSH
	12.00-24.00 น.		3 mg FSH	5 mg FSH
12	24.00-12.00 น.		2 mg FSH	5 mg FSH
	12.00-24.00 น.		2 mg FSH	5 mg FSH
13	24.00-12.00 น.	ผสมเทียม	2 mg FSH	5 mg FSH
	12.00-24.00 น.	ผสมเทียม	2 mg FSH	5 mg FSH
14	24.00-12.00 น.	ผสมเทียม	ผสมเทียม	ผสมเทียม
	12.00-24.00 น.		ผสมเทียม	ผสมเทียม

<u>การควบคุมการเป็นสัดและการผสมพันธุ์ตัวให้</u>

การสังเกตการเป็นสัดของกระบือปลักนั้น นับว่ามีความลำบากในการตรวจเป็นอย่างมาก และสัตว์ก็จะไม่แสดงอาการให้เห็นครบตามรายละเอียดต่าง ๆ (Peerasak Chantaraprateep, 1985) การควบคุม การตรวจการเป็นสัด การหาจุดเริ่มต้นของวงจรการเป็นสัด และการผสมพันธุ์ตัวให้ นับว่ามีความสำคัญมาก ปกติวันที่เป็นสัดถือเป็นวันที่ 0 การดำเนินงานในขั้นตอนต่าง ๆ มีรายละเอียดดังนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การควบคุมวงจรการเป็นสัด

มีหลักการคล้าย ๆ กันกับในโค (พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2531; Peerasak Chantaraprateep, 1987) ซึ่งฮอร์โมนที่ใช้มีดังนี้

1. Prostaglandin F_2 alpha (PGF_2 alpha)

PGF_2 alpha เป็นฮอร์โมนที่ใช้ควบคุมการเป็นสัดของตัวให้และตัวรับให้สอดคล้องกัน ซึ่ง PGF_2 alpha นี้เป็น luteolytic agents (สุวิชัย โรจนเสถียร, 2534) ซึ่งเมื่อให้ PGF_2 alpha จะไปมีผลทำให้ corpus luteum ของรังไข่เกิดการฝ่อตัวลง (พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2531; ชัยณรงค์ โลหชิต และคณะ, 2530; Cooper, 1974) ระหว่างวันที่ 5-8 ของวงจรการเป็นสัด หรือ ในช่วง luteal phase ซึ่งกระบือออยู่ในระยะ diestrus และทำให้เกิดการเป็นสัดขึ้น ภายใน 48-72 ชั่วโมงหลังฉีด กระบือที่อยู่ในระยะอื่น เช่น proestrus, estrus, metestrus ก็ยังคงดำเนินต่อไปตามวงจร ดังนั้นอีก 11-12 วันต่อมา กระบือส่วนใหญ่จะอยู่ในระยะ diestrus ซึ่งเมื่อฉีด PGF_2 alpha อีกครั้ง ก็จะทำให้เกิดการฝ่อตัวของ corpus luteum และเกิดการเป็นสัดขึ้นภายใน 48-72 ชั่วโมง ซึ่งการใช้ PGF_2 alpha 15 mg ต่อตัว ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ 2 ครั้ง ห่างกัน 11 วัน แม่กระบือจะแสดงอาการเป็นสัดเกิดขึ้นในเวลาใกล้เคียงกัน (พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป และคณะ, 2524; พิทยา ตั้งธนวัฒน์ และคณะ, 2524) จะประสบความสำเร็จ 50-70% เมื่อใช้พ่อพันธุ์เข้าตรวจสอบ สำหรับกรณีที่ต้องการเหนี่ยวนำให้เป็นสัดพร้อมกันทั้งตัวให้และตัวรับ ต้องฉีด PGF_2 alpha ให้กับตัวรับ 12-18 ชั่วโมงก่อนฉีดให้กับตัวให้ ซึ่งจะมีผลทำให้ตัวรับเป็นสัดก่อนตัวให้ หรืออาจเป็นพร้อมกัน (พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2531)

2. Progestagens

ฮอร์โมน progestagen ออกฤทธิ์ตรงข้ามกับ PGF_2 alpha คือ ทำให้ corpus luteum คงสภาพอยู่ต่อไปไม่ฝ่อสลาย ทำให้ไม่มีการเจริญของ follicle จึงไม่มีการตกไข่เกิดขึ้น และขัดขวางการเป็นสัด การให้ฮอร์โมน progestagen ช่วงระยะเวลาหนึ่ง ซึ่งเพียงพอที่จะทำให้เกิดการฝ่อตัวไปตามธรรมชาติของ corpus luteum ในสัตว์ทุกตัวที่ได้รับ ซึ่งทำให้เกิดการเป็นสัดเมื่อหยุดให้ฮอร์โมน (พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2531) การให้ progestagen กับ prostaglandin, estradiol และ gonadotropin มีผลในการชักนำการเป็นสัด ดีกว่า สามารถควบคุมการตกไข่ได้ดีกว่า (Narasimha and Suryaprakasam, 1991)

PRID เป็นผลิตภัณฑ์รูปหนึ่งของฮอร์โมน progestagen ซึ่งทำเป็นรูปแท่ง ทำด้วยสแตนเลส เคลือบด้วยยางซิลิโคน มีเอสโตเจนขนาด 5 mg บรรจุในแคปซูล ยึดติดกับห่วง แล้วใส่ไว้ในช่องคลอด 9-12 วัน แล้วดึงออก ให้สังเกตการเป็นสัด ซึ่งมักเกิดขึ้นภายใน 56 ชั่วโมง หลังเอา PRID ออก ได้อัตราการผสมติด 40% (พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2531; Peerasak Chantaraprateep et al., 1983) การให้ PRID ร่วมกับ PMSG จะให้อัตราการผสมติดสูง เมื่อผสมเทียม 2 ครั้ง หลังเหนี่ยวนำการเป็นสัด (Narasimha and Surgaprakasam, 1991) หรือผสมเมื่อ 12 ชั่วโมงหลังเริ่มเป็นสัด จะให้ผลการผสมติดเท่ากับกลุ่มที่ผสมโดยไม่ใช้ฮอร์โมน (พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2531) ปัญหาที่พบคือ แม่กระบือมีอายุมาก และลงปลักโอกาสที่ PRID จะหลุดออกจากช่องคลอดสูง (Peerasak Chantaraprateep et al., 1983)

ดังที่กล่าวมาแล้วว่า กระบือมักไม่แสดงอาการเป็นสัดให้เห็นครบตามรายละเอียดต่าง ๆ การใช้คนเลี้ยงคอยตรวจสอบจะเป็นปัญหามาก โอกาสตรวจพบมีน้อย แม้จะใช้ความพยายามและเอาใจใส่มากก็ตาม ดังนั้นไม่ว่าจะควบคุมการเป็นสัดด้วยวิธีใดก็ตาม การใช้พ่อกระบือตรวจสอบจะให้ผลดี โดยเฉพาะพ่อกระบือที่เบี่ยงเบนลึงค์แล้ว ปล่อยให้คุมฝูงตลอดเวลา จะช่วยการตรวจการเป็นสัดของทั้งตัวให้และตัวรับได้ดีที่สุด เพราะพ่อกระบือจะประกบตัวที่เป็นสัดตลอดเวลา และพยายามขึ้นผสมวันละหลาย ๆ ครั้ง นอกจากนี้การล้วงตรวจอวัยวะสืบพันธุ์และลักษณะต่าง ๆ ที่พบก็จะช่วยยืนยันได้ (พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2531)

<u>การผสมพันธุ์ตัวให้</u>

การผสมพันธุ์แม่กระบือตัวให้นั้น การผสมโดยวิธีธรรมชาติจะให้ผลในแง่อัตราการปฏิสนธิดีที่สุด แต่อย่างไรก็ตาม การผสมเทียมก็สามารถกระทำได้เช่นกันเมื่อไม่มีปัญหาในแง่เทคนิคการผสมในงานการย้ายฝากตัวอ่อน เนื่องจากมีไข่ที่พร้อมจะตกเป็นจำนวนมาก ดังนั้น นับตั้งแต่ไข่ใบแรกจนถึงใบสุดท้ายตกลงมาจะกินเวลาประมาณ 24 ชั่วโมงหลังจากเป็นสัด จึงควรผสมเทียมมากกว่า 1 ครั้ง (รังสรรค์ พาลพ่าย, 2530) และอาจถึง 3 ครั้ง ห่างกันทุก 12 ชั่วโมง เริ่มผสมครั้งแรกประมาณ 12 ชั่วโมง หลังจากแม่กระบือตัวให้ยืนนิ่งยอมรับการผสม (พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2531) สำหรับการกำหนดเวลาในการผสมเทียมนั้น แนะนำให้ผสมเทียมกระบือ ดังนี้ คือ ถ้าพบกระบือเป็นสัดในตอนเช้าให้ผสมเทียมในตอนบ่าย และผสมซ้ำอีกครั้งในตอนเช้าวันรุ่งขึ้น ถ้าพบกระบือเป็นสัดในตอนบ่าย ต้องผสมเทียมในตอนเช้าและซ้ำในตอนบ่ายของวันรุ่งขึ้น (Weerasak Wongsrikeao and Cherdchai Ratanasetakul, 1983)

การเก็บตัวอ่อนจากตัวให้

เทคนิคการชะล้างตัวอ่อนในระยะแรกเริ่มการชะล้างเก็บตัวอ่อนโดยการฆ่า ซึ่ง ครั้งแรกทำในโค โดย Hartman และคณะ (1931) ส่วนการชะล้างเก็บตัวอ่อนด้วยวิธีผ่าตัดได้พัฒนาครั้งแรกในคน และนำมาใช้ในแกะและแพะ (Warwick et al., 1934) และในโค (Umbaugh, 1949) และได้พัฒนามาเป็นวิธีไม่ผ่าตัดตามลำดับ (Rowson and Dowling, 1949) อ้างโดยสรรเพชญ โสภณ (2530) สำหรับในกระบือปลักการเก็บตัวอ่อนสามารถกระทำได้ทั้งผ่าตัดและไม่ผ่าตัด แต่นิยมกระทำแบบวิธีไม่ผ่าตัดมากกว่า Peerasak Chantaraprateep et al. (1989) กล่าวว่า ควรเก็บ ตัวอ่อนกระบือปลักในวันที่ 6.0 ถึง 6.5 วันหลังแม่กระบือยืนนิ่งยอมรับการผสมพันธุ์ ซึ่งจะได้ ตัวอ่อนในระยะ morula ถึง blastocyst

Peerasak Chantaraprateep และคณะ (1989) ก็ได้พูดถึงวิธีการเก็บตัวอ่อนจากตัวให้ว่า ก่อนทำการเก็บตัวอ่อน ควรทำการอดอาหารแม่กระบือตัวให้อย่างน้อย 24 ชั่วโมง ให้ขาหน้าของสัตว์ถูกยกให้สูงขึ้น เพื่อที่จะทำให้การไหลกลับของน้ำยาชะล้างตัวอ่อนเป็นไปได้สะดวกยิ่งขึ้น ทำการพันหางแม่กระบือไว้ แล้วทำความสะอาดบริเวณปากช่องคลอด โคนหาง และฝีเย็บ ให้สะอาด ฉีดยากล่อมประสาท xylazine hydrochloride (20 mg/IM) (Rompun® - Bayer) ในปริมาณ 0.8 mg/ตัว และฉีด xylocaine hydrochloride 2% ประมาณ 2 ml/ตัว เข้าไขสันหลัง เพื่อไม่ให้สัตว์เคลื่อนไหวส่วนท้ายและหาง ทำการตรวจคลำรังไข่ โดยการล้วงทางทวารหนัก เพื่อตรวจดูจำนวนการตกไข่โดยการนับจำนวน corpus luteum ที่มีอยู่ เครื่องมือที่ใช้ทั้งหมดจะต้องถูกทำการฆ่าเชื้อโรค และต้องป้องกันการติดเชื้อให้มากที่สุด มือข้างหนึ่งจะล้วงเข้าทางทวารหนักเพื่อที่จะจับคอมดลูก และช่วยนำทางของเครื่องมือที่ใช้เก็บตัวอ่อน ใช้ cervical dilator ค่อย ๆ ถ่างและยึด cervix ออก แล้วนำ foley catheter (French gauze 18 หรือ 20) โดยมีก้านเหล็ก (stylette) อยู่ภายใน ค่อย ๆ สอดผ่านเข้าไปใน cervix ในโพรงของปีกมดลูก เมื่อ cuff ของ foley catheter ถูกวางในตำแหน่งที่แน่นอนแล้ว จะถูกอัดอากาศเข้าไปประมาณ 10-15 ml ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดของปีกมดลูก หลังจาก foley catheter ถูกวางในตำแหน่งที่เหมาะสมแล้ว และ cuff ยึดแน่นกับโพรงปีกมดลูกแล้ว stylette จะถูกดึงออก ปลายของ foley chatheter จะถูกต่อเข้ากับข้อต่อรูปตัว Y ที่ติดอยู่กับท่อทางออกและทางเข้า ท่อทางเข้าจะถูกต่อเข้ากับขวดน้ำยาชะล้างตัวอ่อน ท่อทางออกจะถูกใส่ไว้ในกระบอกตวง ทั้งท่อทางเข้าและทางออกจะถูกหนีบไว้ด้วยคีมห้ามเลือด ขวดน้ำยาชะล้างตัวอ่อนจะถูกวางไว้ให้สูงจากพื้นประมาณ 2.5 เมตร น้ำยาที่ใช้ล้างเก็บตัวอ่อน คือ Dulbecco's phosphate buffer saline (PBS) ซึ่งต้องเติมยาปฏิชีวนะลงไปในน้ำยาล้างเก็บตัวอ่อนด้วย เพื่อป้องกันการติดเชื้อ ปีกมดลูกจะถูกเติมน้ำยาชะล้างตัวอ่อนโดยการเปิดทางเข้าของน้ำยาที่ถูกหนีบ

ไว้ด้วยคีมห้ามเลือด น้ำยาล้างเก็บตัวอ่อนจะไหลเข้าไปในมดลูกด้วยแรงดันน้ำ เมื่อมดลูกมีน้ำยาเข้าไปพอสมควร หรือจนมดลูกมีขนาดใหญ่ถึงเส้นผ่าศูนย์กลาง 6-7 เซนติเมตร ปิดท่อทางเข้าด้วยการหนีบด้วยคีมห้ามเลือด แล้วปล่อยท่อทางออก น้ำยาชะล้างตัวอ่อนก็จะไหลชะล้างเอาตัวอ่อนไหลออกมาลงสู่กระบอกตวงที่เตรียมเอาไว้ ทำเช่นนี้ซ้ำ ๆ กันจนกระทั่งหมดน้ำยาชะล้างตัวอ่อน ซึ่งจะใช้ในการชะล้างตัวอ่อนปีกมดลูกข้างละ 500 ml แล้วกระทำเช่นนี้ซ้ำกับปีกมดลูกอีกข้างหนึ่ง

การตรวจหาและประเมินคุณภาพตัวอ่อน

นำน้ำยาที่ไหลกลับลงมาในกระบอกตวงที่รองรับไว้ มาตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ในอุณหภูมิห้อง เพื่อให้ตัวอ่อนตกลงไปที่ก้น เมื่อได้เวลาแล้วดูดเอาน้ำยาส่วนบนออก โดยใช้วิธีกาลักน้ำจนกระทั่งเหลือที่ก้นกระบอกตวง ประมาณ 100 ml เขย่าเบา ๆ แล้วเทลงบนจานเลี้ยงเชื้อ แล้วนำไปหาตัวอ่อนภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ปกติแล้วตัวอ่อนที่เก็บได้ระหว่างวันที่ 5-7 จะอยู่ในระยะ morula หรือ blastocyst ซึ่งควรเป็นระยะเดียวกับวันที่ทำการเก็บ (ชัยณรงค์ โลหชิต และคณะ, 2530) และ Mongkol Techakumphu et al. (1991) กล่าวว่า ตัวอ่อนระยะ morula และ blastocyst เกิดขึ้นหลังวันที่ 6.0 ซึ่งเหมือนทั้งกระบือปลักและในโค ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบระยะการพัฒนาของตัวอ่อนระยะแรกระหว่างกระบือปลักและโค Mongkol Techakumphu et al. (1991)

วันที่หลังเป็นสัด	ระยะการพัฒนาของตัวอ่อน	
	กระบือปลัก	โค
5.5	8-16 cells	16-32 cells
6.0	morula early blastocyst	morula
6.5	blastocyst	-
7.0	hatched blastocyst	early blastocyst
7.5	hatched expanding blastocyst	-
8.0-9.0	-	blastocyst
10.0	-	hatched blastocyst
11.0	-	hatched blastocyst blastocyst

การประเมินคุณภาพตัวอ่อนดำเนินตามกฎเกณฑ์ของ Mongkol Techakumphu et al. (1991) ซึ่งแบ่งคุณภาพตัวอ่อนออกเป็น 4 เกรด ดังนี้

เกรด A (ดี) ตัวอ่อน: มีรูปร่างเป็นทรงกลม, zona pellucida และ blastomeres ที่ปรากฏต้องมีสีกลมกลืนกัน ตัวอ่อนระยะ blastocyst พบ inner cell mass, trophoblast และ blastocoele

เกรด B (พอใช้) ตัวอ่อน: มีรูปร่างทรงกลม, zona pellucida ปกติ แต่ blastomeres ผิดปกติ บนผิวของ blastomeres อาจมี vesicles บางส่วน หรือ cell ที่ตายแล้วปรากฏอยู่

เกรด C (เลว) ตัวอ่อน: มีรูปร่างไม่เป็นทรงกลม เช่น รูปไข่ หรือแบน บ่งบอกให้เห็นว่าพิการ และอาจมีช่องว่างใน zona pellucida blastomeres มีการแบ่งตัวผิดปกติ มีเซลกระจัดกระจาย ในระยะ blastocyst ส่วนของ inner cell mass และ trophoblast ไม่ชัดเจน

เกรด D (เลวมาก) ตัวอ่อน: เป็นไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิ ตัวอ่อนถูกทำลายอย่างมาก หรือกำลังสลายตัว หรือสลายตัวไปแล้ว

<u>การเก็บแช่แข็งตัวอ่อน</u>

ตัวอ่อนที่เก็บได้และผ่านการประเมินคุณภาพแล้ว สามารถนำไปถ่ายฝากได้ทันที หรือเก็บไว้รอถ่ายฝาก 6-8 ชั่วโมง โดยเก็บไว้ใน PBS ร่วมด้วย 20% FCS และถ้าต้องการเก็บไว้นานกว่านี้ เช่น 24-48 ชั่วโมง ต้องใช้การเลี้ยงในหลอดแก้ว (culture in vitro) ที่ 37 องศาเซลเซียส หรือเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งจะเก็บได้นานถึง 5 วัน นอกจากนี้อาจเก็บไว้เป็นระยะเวลานาน ๆ โดยการเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส (Jillella, 1982)

การเก็บตัวอ่อนโดยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ดำเนินตามขั้นตอนของ Mongkol Techakumphu et al. (1991) ดังนี้

1. การใส่สารป้องกันการแช่แข็ง (addition of cryoprotectant)
2. การแช่แข็ง (freezing)
3. การละลาย (thawing)
4. การเอาสารป้องกันการแช่แข็งออก (dilution of cryoprotectant)

1. การใส่สารป้องกันการแช่แข็ง

ใช้ glycerol เป็นสารป้องกันการแช่แข็ง โดยใส่ตัวอ่อนในสารละลายจากความเข้มข้นน้อยไปหามากตามตารางที่ 5 โดยที่สารป้องกันการแช่แข็งนี้รวมอยู่ในสารละลาย PBS ร่วมกับ 10% FCS

ตารางที่ 5 แสดงระดับความเข้มข้นของสารป้องกันการแช่แข็งของตัวอ่อน (มงคล เตชะกำพุ และคณะ, 2354)

ระดับความเข้มข้น (M)	ระยะเวลาในการแช่แข็งตัวอ่อน (นาที)
0.25	5-10
0.5	5-10
1.0	5-10
1.5	10-15

เมื่อใส่สารป้องกันการแช่แข็งแล้ว นำตัวอ่อนเก็บไว้ในหลอดพลาสติก ที่นิยมคือ French mini-straw ขนาด 0.25 ml

2. การแช่แข็ง

หลังจากใส่สารป้องกันการแช่แข็งและเก็บตัวอ่อนใน French mini-straw เรียบร้อยแล้ว ทำการชักนำให้เกิดการเปลี่ยนสภาวะของเหลวเป็นของแข็ง (seeding) โดยใช้ปากคีบโลหะจุ่มไว้ในไนโตรเจนเหลวสักระยะหนึ่ง จนเมื่ออุณหภูมิในการแช่แข็งประมาณ -7 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำปากคีบดังกล่าวแตะข้าง straw บริเวณตัวอ่อนบรรจุอยู่ แล้วนำ straw กลับเข้าไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิเดิมประมาณ -7 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ประมาณ 10-15 นาที เรียกว่า ช่วงสมดุลย์ แล้วจึงค่อย ๆ ลดอุณหภูมิลงไปที่ -35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 0.3 องศาเซลเซียสต่อนาที และลดลงอีกจนถึง -38 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรา 0.1 องศาเซลเซียสต่อนาที จากนั้นจึงจุ่ม straw ลงไปในไนโตรเจนเหลวทันที

3. การละลาย

เป็นวิธีดำเนินการเช่นเดียวกับการละลายตัวอสุจิของโค-กระบือ เพื่อใช้ในการผสมเทียม (มงคล เตชะกำพุ, 2534) โดยการนำ straw ที่บรรจุตัวอ่อนอยู่ไปจุ่มน้ำอุ่นที่อุณหภูมิประมาณ 37 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ไม่เกิน 1 นาที จึงนำตัวอ่อนออกจาก straw เพื่อดึงเอาสารป้องกันการแช่แข็งออกก่อนนำไปถ่ายฝากต่อไป

4. การเอาสารป้องกันการแช่แข็งออก

การเอาสารป้องกันการแช่แข็งออกจากเซลล์นี้ เป็นขั้นตอนที่สวนทางกับตอนใส่เข้าไป โดยเริ่มเอาตัวอ่อนใส่ในสารป้องกันการแช่แข็งจากความเข้มข้นมากไปหาน้อย เช่น จาก 1.5 M, 1.0 M, 0.5 M และ 0.25 M ตามลำดับ แล้วนำตัวอ่อนไปใส่ในน้ำยา PBS โดยอาจผสม 10-15% FCS แล้วทำการล้างตัวอ่อนโดยดูดตัวอ่อนผ่านน้ำยา PBS ประมาณ 3-4 ครั้ง แล้วประเมินผลแล้วถ่ายฝากตัวอ่อนไปยังตัวรับต่อไป

<u>การย้ายฝากตัวอ่อนไปยังตัวรับ</u>

การย้ายฝากตัวอ่อนในกระบือปลัก สามารถกระทำได้ 2 วิธี คือ แบบผ่าตัด และแบบไม่ผ่าตัด (Drost et al., 1983; Peerasak Chantaraprateep et al., 1989) แต่อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปนิยมใช้แบบไม่ผ่าตัด เนื่องจากทำได้รวดเร็ว และใช้อุปกรณ์น้อยกว่าวิธีผ่าตัด รวมทั้งค่าใช้จ่ายก็ต่ำกว่า (พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2531) การย้ายฝากตัวอ่อนโดยวิธีไม่ผ่าตัดนี้กระทำเช่นเดียวกับการผสมเทียม (Drost et al., 1983) การย้ายฝากตัวอ่อนจะประสบความสำเร็จได้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น วันที่ทำการถ่ายฝาก ระยะการเจริญของตัวอ่อน บริเวณที่ฝากตัวอ่อน เป็นต้น

การย้ายฝากตัวอ่อนจะประสบความสำเร็จ เมื่อการเป็นสัดของตัวให้และตัวรับเกิดขึ้นในเวลาใกล้เคียงกัน (Wright, 1981; Linder and Wright, 1983; Donalson, 1985; Hasler et al., 1987) และให้ผลดีที่สุดเมื่อตัวให้และตัวรับเป็นสัดพร้อมกัน ให้ผลดีพอสมควรเมื่อการเป็นสัดแตกต่างกัน ±1 วัน และผลไม่ดีเมื่อการเป็นสัดแตกต่างกัน ±2 วัน บางกรณีตัวรับที่เป็นสัดหลังตัวให้ 1 วัน จะให้ผลดีเช่นเดียวกับทั้งตัวให้และตัวรับเป็นสัดพร้อมกัน (พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2531)

ระยะการเจริญเติบโตของตัวอ่อนก็มีผลต่ออัตราความสำเร็จในการถ่ายฝากตัวอ่อนด้วย โดยการย้ายฝากตัวอ่อนที่มีอายุ 3-4 วัน ให้อัตราการตั้งท้องต่ำกว่าการย้ายฝากตัวอ่อนที่มีอายุ 5-8 วัน (Seidel, 1980) นั่นก็คือ ตัวอ่อนระยะ morula ถึง blastocyst จะให้อัตราการตั้งท้องสูงกว่าระยะก่อนหน้าหรือหลังจากนี้ (พีระศักดิ์ จันทร์ประทีป, 2531; Donaldson, 1988; Hasler et al., 1987)

สำหรับปีกมดลูกที่นำเอาตัวอ่อนไปถ่ายฝากต้องเอาไปฝากในปีกมดลูกข้างที่มี corpus luteum จึงจะทำให้ตัวรับมีโอกาสตั้งท้องสูง เนื่องจาก corpus luteum จะหลั่งฮอร์โมนไปช่วยให้การตั้งท้องในปีกมดลูกข้างเดียวนั้นดำเนินไปได้ตลอด (Del Compo et al., 1977)