สหัส นุชนารถ. 2548. **การศึกษาเปรียบเทียบผลของการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้าและแบบ Vitrification ต่อคุณภาพตัวอ่อนโคนมที่ตัดแบ่งเซลล์เพื่อคัดเพศด้วยเทคนิค PCR.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. [ISBN 974-284-010-5]

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รศ.ดร. เทวินทร์ วงษ์พระลับ,
ผศ.ดร. สุภร กตเวทิน,
ผศ.ดร. มนต์ชัย ดวงจินดา,
อ. ดร. ยุพิน ผาสุข

บทคัดย่อ

170821

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์ 1) เพื่อศึกษาเปรียบเทียบวิธีการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้า (slow freezing) กับ วิธี vitrification ต่อคุณภาพของตัวอ่อนโคนมก่อนและหลังการแช่แข็ง 2) เพื่อเปรียบเทียบวิธีการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้า และ วิธี vitrification ต่ออัตราการรอดชีวิตของตัวอ่อนโคนมที่ถูกตัดแบ่งเซลล์ โดยการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนภายนอกร่างกาย (in vitro culture) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 3) เพื่อศึกษาผลของการคัดเพศตัวอ่อนโคนมด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยตัวอ่อนที่ใช้ในการศึกษา มีจำนวน 72 ตัวอ่อน (อายุ 7-8 วัน) ซึ่งได้จากเทคนิคกระตุ้นเพิ่มการตกไข่หลายใบจากโคสาวพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียน โดยการสุ่มตัวอ่อนลงในทรีตเมนต์ทั้ง 3 ทรีตเมนต์ คือ วิธีการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้ากับตัวอ่อนปกติที่ไม่ตัดแบ่งเซลล์ (กลุ่มควบคุม) วิธีการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้ากับตัวอ่อนที่ตัดแบ่งเซลล์ และวิธีการแช่แข็งแบบ vitrification กับตัวอ่อนที่ตัดแบ่งเซลล์ ประเมินสภาพรูปร่าง การเจริญ และการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนทันทีภายหลังจากการทำละลายชั่วโมงที่ 12 และ 24 จากการศึกษาพบว่า วิธีการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้ากับตัวอ่อนปกติมีคุณภาพระดับ 1 และ 2 (77.27 %, 17/22) มีความแตกต่างจาก วิธีการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้ากับตัวอ่อนที่ตัดแบ่งเซลล์ (56.52 %, 13/23) และวิธีการแช่แข็งแบบ vitrification กับตัวอ่อนที่ตัดแบ่งเซลล์ (34.78 %, 8/23) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (χ^2, $P<0.05$) และเมื่อเพาะเลี้ยงตัวอ่อนที่ผ่านการแช่แข็งและทำละลายร่วมกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โค พบว่า อัตราการมีชีวิตรอดชั่วโมงที่ 12 ของตัวอ่อนที่ใช้วิธีการแช่แข็งทั้ง 3 วิธีการ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ วิธีการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้ากับตัวอ่อนปกติที่ไม่ตัดแบ่งเซลล์ (90.90 %, 20/22) วิธีการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้ากับตัวอ่อนที่ตัดแบ่งเซลล์ (69.57 %, 16/23) และวิธีการแช่แข็งแบบ vitrification กับตัวอ่อนที่ตัดแบ่งเซลล์ (47.83 %, 11/23) (χ^2, $P<0.01$) ตามลำดับ และอัตราการมีชีวิตรอดชั่วโมงที่ 24 ของทั้ง 3 วิธีการ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วยเช่นเดียวกัน คือ วิธีการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้ากับตัวอ่อนปกติที่ไม่ตัด

แบ่งเซลล์ (81.82 %, 18/22) วิธีการแช่แข็งแบบลดอุณหภูมิอย่างช้ากับตัวอ่อนที่ตัดแบ่งเซลล์ (34.78%, 8/23) และวิธีการแช่แข็งแบบ vitrification กับตัวอ่อนที่ตัดแบ่งเซลล์ (17.39%, 4/23) (χ^2, P<0.01) ในการใช้เทคนิคพีซีอาร์ตัดสินเพศตัวอ่อนโดยการเพิ่มชิ้นส่วนยีนบริเวณ ZFX และ ZFY พบว่า ให้สัดส่วนเพศผู้และเพศเมียไม่แตกต่างกันทางสถิติ (χ^2, P > 0.05) (53.65 และ 46.34 %)

จากการศึกษาสรุปได้ว่า การแช่แข็งตัวอ่อนที่ถูกตัดแบ่งเซลล์ ด้วยใบมีดที่ใช้มือควบคุมโดยตรง ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการใช้เทคนิค nested PCR เพื่อตรวจหาเพศตัวอ่อน พบว่า มีความแม่นยำในการตัดสินเพศตัวอ่อนโคในระดับสูง

Sahat Nuchanart. 2005. **Comparative Study on the Effect of Slow Freezing and Vitrification Methods on Quality of Bisected Dairy Embryo for Sex Determination by PCR.** Master of Science Thesis in Animal Science, Graduate School, Khon Kaen University.
[ISBN 974-284-010-5]

Thesis Advisors : Assoc.Prof. Dr. Thevin Vongpralub,
Asst.Prof. Dr. Suporn Katawatin,
Asst.Prof. Dr. Monchai Duangjinda,
Dr. Yupin Phasuk

ABSTRACT

170821

The objective of this study were as followed: 1) to compared the quality of post-thaw bisected dairy cattle embryos frozen by slow freezing or conventional method and vitrification. 2) to compared post-thaw survival rate in objective (1). 3) to study of embryos sex determination by nested PCR. Seventy two dairy cattle embryos (Day 7-8) collected from superovulated heifers (HF) were assigned randomly to one of three groups: bisected embryo slow freezing, bisected embryo vitrification and intact embryo slow freezing (control). Morphology, cell alterations and in vitro survival were evaluated immediately after thawing or after 12 and 24 h.The rates of grade 1 to 2 embryo were significantly different between intact embryo slow freezing (77.27 %, 17/22), bisected embryo slow freezing (56.52 %, 13/23) and bisected embryo vitrification (34.78 %, 8/23) (χ^2, $P<0.05$). After co-culture of bovine oviductal epithelial cells. Survival rate at 12 h. was significantly different between intact embryo slow freezing (90.90 %, 20/22), bisected embryo slow freezing (69.57%, 16/23) and bisected embryo vitrification (47.83 %, 11/23) (χ^2, $P<0.01$). The survival rates at 48 h. of embryo slow freezing, bisected embryo slow freezing and bisected embryo vitrification were as 81.82 % (18/22), 34.78 % (8/23) and 17.39 % (4/23) (χ^2, $P<0.01$), respectively.

Sexing determination were used 46 parts of embryos to amplification of genes ZFX and ZFY. The proportion of male and female embryos were not significantly different ($P>0.05$) (53.65 and 46.34 %).

In conclusion, the manual section of embryo before freezing resulted in a significant decreasing in survival rates and sex determination by nested PCR showed highly accuracy to sexing bovine embryos.