

ชื่อวิทยานิพนธ์ การศึกษาการเลี้ยงตัวอ่อนแพะตัดแบ่งครึ่งในอาหารเลี้ยงตัวอ่อนที่เสริมด้วย
สาร solcoseryl[®]

ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์ นายกมล จวีวรรณ

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุจินต์ ลิมาภักย์)

.....กรรมการ
(อาจารย์ ดร.สุกร กตเวทิน)

.....กรรมการ
(สัตวแพทย์หญิง จุริย์รัตน์ สำเร็จประสงค์)

บทคัดย่อ

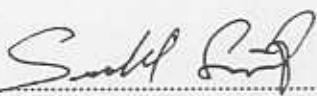
การทดลองนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของการตัดแบ่งครึ่งตัวอ่อน (embryo splitting) แพะ และการเลี้ยงตัวอ่อนแพะหลังตัดแบ่งครึ่ง (demi-embryos) โดยใช้สารเร่งการเจริญของเนื้อเยื่อ solcoseryl[®] ต่อความสามารถในการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง และศึกษาถึงปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการพัฒนาของตัวอ่อนแพะตัดแบ่งครึ่ง ในการทดลองครั้งนี้เก็บตัวอ่อนจากแพะลูกผสมพันธุ์ชาเนนพื้นเมือง โดยนำตัวอ่อนที่มีพัฒนาการอยู่ในระยะ morula ถึง hatched blastocyst ที่มีคุณภาพดีและดีเยี่ยมไปตัดแบ่งครึ่งแบบไม่ใช้ปิเปตยึดตัวอ่อน (holding pipette) และไม่ใส่ตัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งกลับเข้าไปใน zona pellucida ตัวอ่อนระยะ morula, early blastocyst, blastocyst และ hatched blastocyst ตัดแบ่งในน้ำยาตัดแบ่งตัวอ่อน (splitting medium) ตัวอ่อนระยะ expanded blastocyst ตัดแบ่งในน้ำยาเก็บรักษากตัวอ่อน (holding medium) ซึ่งเป็น Modified Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS) ที่เสริมด้วยซีรัมลูกโค (fetal calf serum) 20 เปอร์เซ็นต์ การตัดแบ่งมีการทำรอบปากที่พื้นจานตัดแบ่งตัวอ่อน โดยมีอาหารเลี้ยงตัวอ่อนเป็นทริทเมนต์ทดลองคือ ทริทเมนต์ที่ 1 ใช้น้ำยาเก็บรักษากตัวอ่อนเป็นอาหารเลี้ยงตัวอ่อน (culture

medium) ทริทเมนต์ที่ 2 และ 3 ใช้น้ำยาเก็บรักษาดัวอ่อนเสริมด้วยสาร solcoseryl[®] 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นอาหารเลี้ยงดัวอ่อนตามลำดับ นำดัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งไปเลี้ยงในสภาพอากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 38.5 °C ดัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่ได้จากดัวอ่อนระยะ morula เลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง ดัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่ได้จากดัวอ่อนระยะ early blastocyst ถึง hatched blastocyst เลี้ยงนาน 3 ชั่วโมง หลังจากเลี้ยงนำมาตรวจสอบการพัฒนาโดยดูจากการสร้าง blastocoele ขึ้นมาใหม่เป็นระยะ blastocyst อีกครึ่งหนึ่ง

จากการทดลองพบว่า ดัวอ่อนระยะ morula และ early blastocyst ใช้ระยะเวลาตัดแบ่งน้อยกว่าดัวอ่อนระยะ blastocyst, expanded blastocyst และ hatched blastocyst ($p < 0.05$) คือ 1.26, 1.69, 3.12, 3.38 และ 2.93 นาทีตามลำดับ การเสริมสาร solcoseryl[®] ระดับ 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเลี้ยงดัวอ่อน ไม่ได้เพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดของดัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่อยู่ในระยะการเจริญเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงดัวอ่อนที่ไม่ได้เสริมสาร solcoseryl[®] ($p > 0.05$) ระยะการเจริญของดัวอ่อนที่นำมาตัดแบ่งครึ่งมีผลต่ออัตราการมีชีวิตรอด โดยดัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่ได้จากดัวอ่อนระยะ expanded blastocyst และ hatched blastocyst มีอัตราการมีชีวิตรอดสูงกว่าดัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่ได้จากดัวอ่อนระยะ blastocyst, early blastocyst และ morula ($p < 0.05$) คือ 69.05, 65.31, 32.00, 26.19 และ 5.43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และดัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่ได้จากดัวอ่อนระยะ blastocyst และ early blastocyst มีอัตราการมีชีวิตรอดสูงกว่าดัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งที่ได้จากดัวอ่อนระยะ morula ($p < 0.05$) คุณภาพของดัวอ่อนที่นำมาตัดแบ่งไม่มีผลต่ออัตราการมีชีวิตรอดของดัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งหลังเลี้ยงในอาหารเลี้ยงดัวอ่อน ($p > 0.05$) แต่สัดส่วนจำนวนเซลล์ของดัวอ่อนหลังตัดแบ่งครึ่งของดัวอ่อนระยะ blastocyst และ expanded blastocyst มีความสัมพันธ์กับคุณภาพของดัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งหลังเลี้ยงในอาหารเลี้ยงดัวอ่อนโดยเพิ่มขึ้นแบบเส้นตรง (Lin; $P < 0.05$) ระยะเวลาตัดแบ่งดัวอ่อนไม่มีความสัมพันธ์กับคุณภาพของดัวอ่อนตัดแบ่งครึ่งหลังเลี้ยงในอาหารเลี้ยงดัวอ่อน ($p > 0.05$)

จากการทดลองสรุปได้ว่า การเสริมสาร solcoseryl[®] ในอาหารเลี้ยงดัวอ่อนที่มีซีรัมลูกโค ไม่ได้เพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดของดัวอ่อนตัดแบ่งครึ่ง และดัวอ่อนที่มีระยะการเจริญขั้นที่สูงกว่าระยะ morula เหมาะสมในการนำมาตัดแบ่งครึ่ง เนื่องจากทั้งสาร solcoseryl[®] และซีรัมลูกโคซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของอาหารเลี้ยงดัวอ่อนได้จากเลือดลูกโค การเสริม solcoseryl[®] อาจไม่มีผลในการทดลองนี้ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเสริมสาร solcoseryl[®] ในอาหารเลี้ยงดัวอ่อนที่มีซีรัมลูกโคหรือไม่ซีรัมลูกโค

THESIS TITLE A STUDY ON *IN VITRO* CULTURE OF GOAT DEMI-EMBRYOS IN
MEDIUM SUPPLEMENTED WITH SOLCOSERYL[®]
AUTHOR MR. KAMON CHAWEEWAN
THESIS ADVISORY COMMITTEE

.....Chairman
(Associate Professor Dr. Suchint Simaraks)

.....Member
(Dr. Suporn Katawatin)

.....Member
(Veterinarian Jureerat Sumretrasong)

Abstract

The objectives of this experiment were to study the effects of goat embryos splitting, *in vitro* culture of goat demi-embryos in medium supplemented by solcoseryl[®] on the viability rate and factors influencing the development of demi-embryos. Embryos from morular to hatched blastocystic stages were collected from superovulated Saanen-native goats. Good or excellent morphologically identified embryos were bisected by splitting blade without holding pipette. There were no insertion of the splitted embryos back into serogated zona pellucida. Morulae to hatched blastocysts, except expanded blastocysts, were bisected in the splitting medium. Expanded blastocysts were bisected in the holding medium contained in the plastic splitting dishes that were scratched on the bottom. The experiment consisted of three treatments. The first was the control treatment. Modified Dulbecco's Phosphate Buffer Saline (DPBS) with 20 percent fetal calf serum was used as a culture medium. The second and third treatments, in addition to fetal calf serum, were supplemented with 0.05 and 0.1 percent

solcoseryl[®] respectively. Demi-embryos were cultured at 38.5°C under humidified atmosphere of 5 percent CO₂ immediately after being bisected. Demi-embryos derived from morulae were cultured in the culture medium for 24 h. until they reached the blastocystic stage. Demi-embryos derived from early blastocysts to hatched blastocysts were cultured in the culture medium for 3 h. until they reached the blastocystic stage again. At the end of culture period, demi-embryos were classified as good, fair or degenerated.

The splitting procedure of morulae and early blastocysts took less time ($P < 0.05$) than blastocysts, expanded blastocysts and hatched blastocysts: 1.26, 1.69, 3.12, 3.38 and 2.93 minutes, respectively. The viability rate of demi-embryos which were derived from the same stage when they were cultured in the culture medium supplemented with solcoseryl[®] was not increased ($P > 0.05$). Embryonic stage had the effect to the viability rate of demi-embryos after culture ($P < 0.05$). It was also found that the viability rates of demi-expanded blastocysts and hatched blastocysts were higher than demi-blastocysts, early blastocysts and morulae: 69.05, 65.31, 32.00, 26.19 and 5.43 percent, respectively. While the viability rates of demi-blastocysts and early blastocysts were higher than the demi-morulae. The embryo quality before splitting had no significant effect on the viability rate of demi-embryos after culture ($P > 0.05$). Moreover, there was no relationship between splitting time and demi-embryo quality after culture ($P > 0.05$). The cell proportion of demi-blastocysts and expanded blastocysts had a linear relation on demi-embryo quality after culture ($P < 0.05$).

In conclusion, supplementing the solcoseryl[®] in the culture medium containing fetal calf serum could not increase viability rate of goat demi-embryos in vitro. The advanced stage of goat embryonic development was more effective for bisection than at the morular stage. Solcoseryl[®] was not effective in this experiment may be because of both solcoseryl[®] and fetal calf serum contained in culture medium derived from calf blood. Therefore the effect of solcoseryl[®] supplemented in culture medium with and without fetal calf serum should be further studied.