การกำหนดเพศด้วยการคัดแยกอสุจิในโค

Sex Predetermination by Semen Sexing in Bovine

สมพร ดวนใหญ่

Somporn Duanyai

สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

Animal Science Program, Faculty of Agriculture at Ubon Ratchathani University

E-mail: Somduan98@hotmail.com

บทคัดย่อ

บทความทางวิชาการฉบับนี้เรียบเรียงขึ้นจากผลงานวิจัยในอดีตที่พยายามทำให้การคัดแยกอสุจิให้มีเฉพาะ X หรือ Y โครโมโซมซึ่งเมื่อนำอสุจินี้ไปใช้ก็จะทำให้ได้ลูกโคที่มีเพศตรงตามความต้องการของเกษตรกร วิธีการคัดแยกอสุจิที่มีความแม่นยำที่สุด คือ การคัดแยกด้วย Flow cytometry/ cell sorter วิธีนี้อาศัยหลักการที่ว่าอสุจิที่มี X มีปริมาณ DNA มากกว่าอสุจิที่มี Y โครโมโซมราว 4% การแยกอสุจิทำได้ย้อมสี DNA ด้วย Hoeschst 33342 ซึ่งจะให้สีเรืองแสงสีน้ำเงินเมื่อได้รับแสงเลเซอร์ที่มีความยาวคลื่น 351 - 364 nm อสุจิที่มี X โครโมโซม เรืองแสงมากกว่าอสุจิที่มี Y โครโมโซม เมื่อนำอสุจิที่ย้อมเข้าสู่เครื่อง Sorter จะสามารถแยกเก็บอสุจิที่มี X โครโมโซม Y โครโมโซม ออกจากกันโดยมีความแม่นยำในการคัดแยกประมาณ 90% เครื่อง Sorter สามารถคัดแยกได้ 32,000 อสุจิ/วินาที หลังกระบวนการแยกจะได้อสุจิที่มี X และ Y โครโมโซม อย่างละ 8,000 อสุจิ/วินาที ถ้าบรรจุน้ำเชื้อหลอดละ 2 ล้านตัว จะสามารถผลิตได้ 14 หลอด/แต่ละเพศ ในหนึ่งชั่วโมง วิธีการนี้สามารถนำมาใช้ในเชิงการค้าได้ น้ำเชื้อแยกเพศสามารถนำไปใช้เพื่อการผสมเทียมได้ทั้งโคนมและโคเนื้อ การใช้ผสมเทียมโคสาว มีความเหมาะสมกว่าการใช้ในแม่โค อาจมีการเหนี่ยวนำให้โคตกไข่พร้อมกัน (FTAI) เพื่อง่ายต่อการจัดการผสมเทียม น้ำเชื้อแยกเพศเหมาะต่อการนำไปใช้เพื่อการผลิตตัวอ่อนก่อนการย้ายฝากเพื่อให้ได้ลูกโคที่มีเพศตรงตามความต้องการ การใช้น้ำเชื้อแยกเพศช่วยย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์โคและส่งผลต่อรายได้ที่เพิ่มขึ้นภายในฟาร์มของเกษตรกร

คำสำคัญ : การกำหนดเพศ การคัดแยกอสุจิ

ABSTRACT

This academic paper is compiled based on past research that has attempted to isolate sperm to have specific X or Y chromosomes, which, when applied, would result in a calves that meet the needs of farmers. The most accurate sperm screening method is flow cytometry / cell sorter. This method is based on the principle that sperm with X have approximately 4% more DNA content than sperm with Y chromosome. Sperm isolation was performed DNA stained with Hoeschst 33342, which gave a blue glow when receiving a laser light with a wavelength of 351 - 364 nm. Sperms with an X chromosome glow more than sperm with the Y chromosome when the dyed sperm was introduced into the machine. sorter Sperm with X chromosome, Y chromosome, can be separated with approx 90% screening accuracy. The sorter is able to sort 32,000 sperm / sec. After the separation process, 8,000 sperm with X and Y chromosomes are obtained. Semen / second. If containing 2 million semen tubes per tube, 14 ampoules can be produced / each sex. In an hour This method can be used for commercial purposes. Separate semen can be used for insemination of both dairy cattle and beef cattle. It is more suitable than used in the mother cows. Simultaneous induction of ovulation (FTAI) may be performed to facilitate the management of IVF. Gender separated semen is suitable for embryo production prior to transfer in order to obtain calves of the sex they need. The use of separate sexes shortened the time for cattle breeding. And resulting in increased income within the farmers' farms.

Keywords : Flow cytometry, Cell sorter

บทนำ

การเลี้ยงโคของเกษตรกรในประเทศต่าง ๆ ทั่วโลกมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้ผลผลิตที่เป็น น้ำนม เนื้อ หรือเพื่อการใช้แรงงาน การเลี้ยงเพื่อการผลิตน้ำนมนั้นเกษตรกรต้องการโคเพศเมีย ส่วนการเลี้ยงเพื่อการผลิตเนื้อหรือเพื่อใช้แรงงานนั้นต้องการโคเพศผู้ เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมของประเทศไทยในอดีต

หากแม่โคนมคลอดออกมาเป็นลูกโคเพศผู้ เกษตรกรมักจำหน่ายลูกโคออกไปเมื่ออายุยังน้อยในราคาที่ต่ำ ทั้งนี้เพราะไม่ต้องการมีภาระในการเลี้ยงลูกโคเพศผู้ที่ไม่สามารถให้น้ำนมได้ ขณะที่เกษตรกรผู้เลี้ยงโคเนื้อต้องการได้โคเพศผู้เพราะมีอัตราการเจริญเติบโตสูงและให้เนื้อมาก ปัญหาที่เกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมหรือโคเนื้อในทุกประเทศทั่วโลกไม่สามารถได้ลูกโคที่มีเพศตรงตามความต้องการนั้นมีมาอย่างยาวนาน และนักวิชาการเองก็พยายามหาวิธีการหลากหลายวิธีเพื่อทำให้สามารถกำหนดเพศของลูกโคด้วยการคัดแยกอสุจิให้ได้

วิธีการดำเนินการวิจัย

การคัดแยกอสุจิเพื่อการกำหนดเพศ

Singh et al. (2019) และ Sharma and Sharma, (2016) ได้สรุปถึงวิธีการที่ใช้ในการคัดแยกอสุจิเพื่อกำหนดเพศว่ามีหลายวิธี อาทิ

1. Albumin Gradient หลักการของวิธีนี้คือตัวอสุจิที่มี Y โครโมโซม ว่ายลงไปด้านล่างของชั้นสารละลาย Albumin ที่มีระดับความความเข้มข้นต่าง ๆ ได้เร็วกว่าอสุจิที่มี X โครโมโซม (Ericsson et al., 1973) ประสิทธิภาพการคัดแยกอสุจิที่มี X หรือ Y โครโมโซม ประมาณร้อยละ 75 (Beernink et al., 1993; Kumar et al., 2017)

2. Identification of H-Y antigen วิธีนี้ใช้ Antibody ที่มีความจำเพาะกับโปรตีนที่ผิวของอสุจิ (H-Y antigen) แล้วคัดแยกอสุจิที่มี X หรือ Y โครโมโซม ด้วย Chromatography or Magnetic Bead (Hoppe and Koo, 1984)

3. Swim-up Procedure มีหลักการเช่นเดียวกับวิธี 1 คือตัวอสุจิที่มี Y โครโมโซมว่ายขึ้นสู่ผิวของสารละลายได้เร็วกว่าอสุจิที่มี X โครโมโซม มีการรายงานผลสำเร็จถึงร้อยละ 81 (Check et al., 1989)

4. Free Flow Electrophoresis ใช้หลักการที่ตัวอสุจิที่มี Y โครโมโซมมีประจุบวก ขณะที่อสุจิที่มี X โครโมโซมมีประจุลบ และให้กระแสไฟเพื่อแยกตัวอสุจิออกจากกันอย่างไรก็ตามผลสำเร็จค่อนข้างต่ำเพียง 50% (Blottener et al., 1983)

5. Detection of Sex Specific Protein or Immunological Approach ตัวอสุจิมีโปรตีนหลายชนิดที่มีความจำเพาะต่อ X หรือ Y โครโมโซม ความจำเพาะนี้สามารถนำมาใช้เป็น Molecular Markers สำหรับการบ่งชี้ตัวอสุจิที่มี X หรือ Y โครโมโซมโดยอาศัยหลักการของ Immunological Method (วิธีการทางภูมิคุ้มกัน) แล้วจึงแยกอสุจิที่มี X หรือ Y โครโมโซม ด้วย Magnetic Bead,

Affinity Chromatography, Fluorescence-activated Cell Sorting Technique (Yadav et al., 2017)

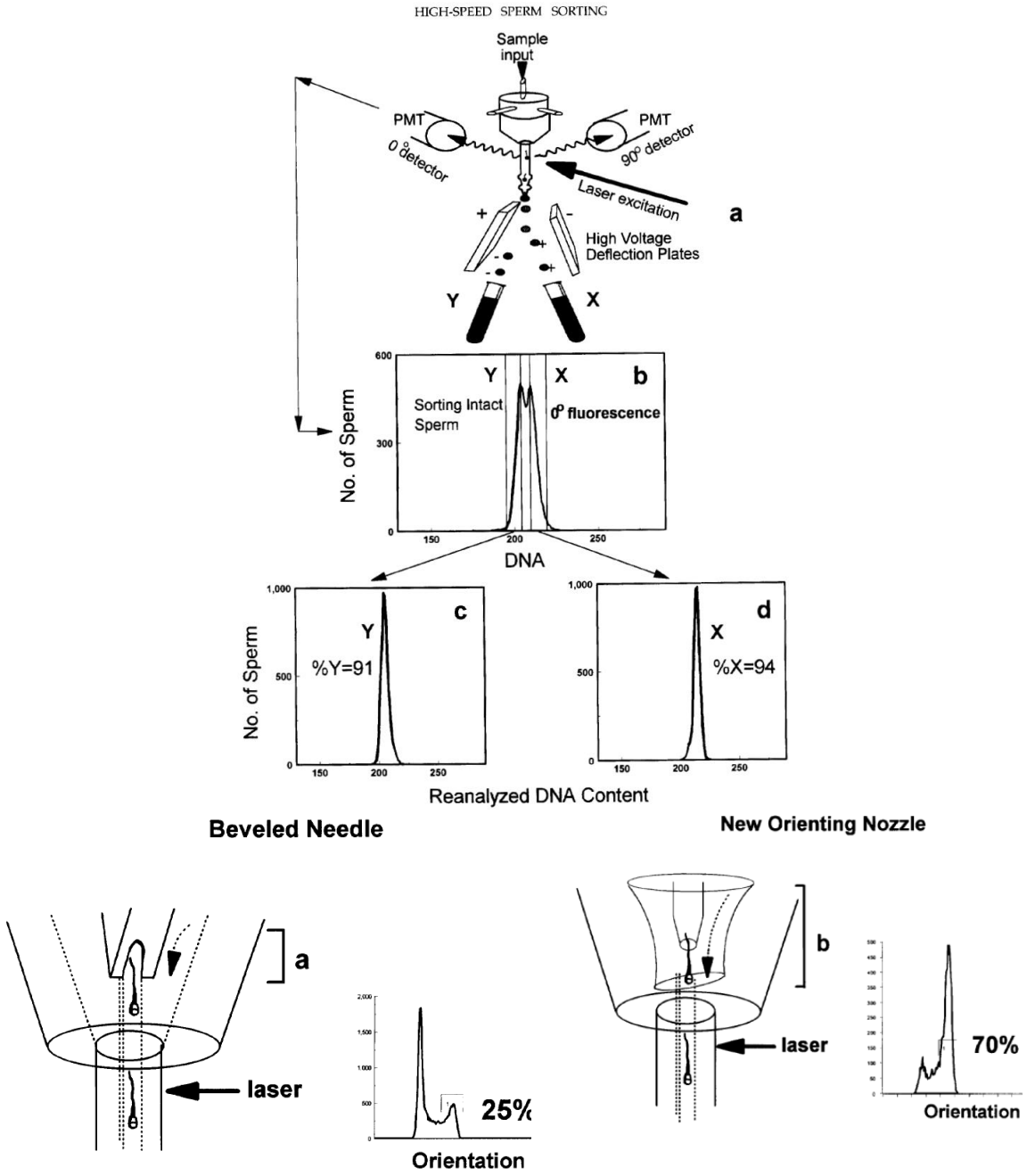
6. Centrifugal Countercurrent Distribution (CCCD) เนื่องจากความหนาแน่นของอสุจิที่มี X หรือ Y โครโมโซม แตกต่างกัน 0.0007 g/cm^3 ดังนั้นอาจเป็นไปได้ที่สามารถแยกอสุจิที่มี X หรือ Y โครโมโซม ออกจากกันโดยอาศัยวิธี CCCD ดังเช่นในการคัดแยกอสุจิแพะที่ให้ผลสำเร็จการคัดแยกอสุจิที่มี Y โครโมโซมถึงร้อยละ 75 (Ollero et al., 2000)

7. Percoll Density Gradient วิธีนี้นิยมใช้สำหรับการคัดเลือกอสุจิที่แข็งแรงสำหรับการผลิตตัวอ่อนในห้องทดลอง Wolf et al. (2008) ใช้วิธีนี้ ปั่นแยกอสุจิในสารละลาย Percoll 90-45% (Discontinuous) or 67.5% (Continuous) แต่เพศของตัวอ่อนที่ได้ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม

8. Volumetric Differences ส่วนหัวของอสุจิที่มี X หรือ Y โครโมโซม มีขนาดต่างกัน จึงมีการประยุกต์ใช้ Interference Microscope and Flow Cytometer เพื่อคัดแยกอสุจิแต่ประสบผลสำเร็จ (van Munster et al., 2002)

9. Transgenic Technology อาทิการผลิต Transgenic Mice สายพันธุ์ที่สามารถให้ลูกเพศผู้มากกว่าเพศเมียสองเท่า (Hermann et al., 1999)

10. Flow Cytometry/ Cell Sorting อาศัยหลักการที่ว่าอสุจิที่มี X มีปริมาณ DNA มากกว่าอสุจิที่มี Y โครโมโซมราว 4 % ทำการย้อมสี DNA ด้วย Hoeschst 33342 ซึ่งจะให้สีเรืองแสงสีน้ำเงินเมื่อได้รับแสงเลเซอร์ที่มีความยาวคลื่น 351 - 364 nm อสุจิที่มี X โครโมโซม เรืองแสงมากกว่าอสุจิที่มี Y โครโมโซม ซึ่งจะมีการประมวลปริมาณแสงที่เปล่งออกมาด้วยซอฟท์แวร์ที่ควบคุมการคัดแยกอสุจิขณะอสุจิเคลื่อนที่ผ่าน Photomultiplier Tube อสุจิเมื่อผ่านลงมาท่อนี้แล้วถ้าอสุจิที่มี X โครโมโซม จะให้ประจุเป็นบวกขณะที่อสุจิที่มี Y โครโมโซมให้ประจุเป็นลบ หลังจากหยดอสุจิผ่านหัวฉีด (Nozzle) ของเครื่อง Sorter และพ่นละอองผ่านแผ่นทองเหลืองที่มีประจุบวกและลบออกแล้ว มาจะแยกไหลลงในหลอดเก็บสามหลอด หลอดแรกเก็บอสุจิที่มี X โครโมโซม หลอดสองเก็บอสุจิที่มี Y โครโมโซม และหลอดสามเก็บอสุจิที่คัดแยกไม่ได้และอสุจิที่ตาย ดังภาพประกอบ 1 (Johnson et al., 1999; Garner and Seidel, 2003; Vishwanath and Moreno, 2018; Naniwa et al., 2018) ที่ระดับความแม่นยำในการคัดแยกประมาณ 90% เครื่องสามารถคัดแยกได้ 32,000 อสุจิ/วินาที หลังกระบวนการแยกจะได้อสุจิที่มี X และ Y โครโมโซม อย่างละ 8,000 อสุจิ/วินาที ถ้าบรรจุน้ำเชื้อหลอดละ 2 ล้านตัว จะสามารถผลิตได้ 14 หลอด/แต่ละเพศ ในหนึ่งชั่วโมง (Seidel, 2014) วิธีการนี้นับว่ามีความแม่นยำที่สุดและสามารถนำมาใช้ในเชิงการค้าได้



ภาพประกอบ 1 ไดอะแกรมการคัดแยกอสุจิด้วยวิธีการ Flow Cytometry

ที่มา: Johnson et al. (1999)

ภาพประกอบ 2 เครื่อง Sorter รุ่น Genesis III ชุดนี้สามารถคัดแยกเพศอสุจิได้ 500 ล้านอสุจิ/ชม.
ที่มา: Vishwanath and Moreno (2018)

ข้อดี/ข้อเสียของการใช้น้ำเชื้อแยกเพศ

Seidel (2014); Holden and Butler (2018); Singh et al. (2019) และ Priya et al. (2020) สรุปถึงข้อดี/ข้อเสียของการใช้น้ำเชื้อแยกเพศดังนี้ การใช้น้ำเชื้อแยกเพศมีข้อดีคือ 1) ช่วยขยายจำนวนโคในฝูงให้มีเพศตรงตามความต้องการได้เร็วขึ้นโดยไม่มีความเสี่ยงการนำเชื้อโรคเข้าฟาร์มหากซื้อโคตัวใหม่เข้าฝูง 2) ความแม่นยำของการได้ลูกโคที่มีเพศตรงความต้องการสูงเกินกว่า 90% 3) ลดปัญหาที่เกิดจากการคลอดยาก 4) ช่วยย่นระยะเวลาในการปรับปรุงพันธุ์โค 5) ลดต้นทุนในการผลิตโคสาวทดแทนเมื่อเทียบกับการซื้อโคเข้าฝูง

ข้อเสียของการใช้น้ำเชื้อแยกเพศ อาทิ 1) ราคาเครื่องแยกเพศสูง และหัวฉีดในเครื่อง Sorter ไม่มีจำหน่ายอย่างแพร่หลาย เพราะเป็นอุปกรณ์ที่จดลิขสิทธิ์ 2) อัตราการผสมติดต่ำ 3) ประสิทธิภาพของเครื่องยังต่ำ 4) ต้องการบุคลากรที่ชำนาญในการใช้เครื่อง 5) การนำไปใช้ในบางประเทศ เช่น

อินเดีย อาจต้องมีการวางมาตรฐานที่ดีของการนำไปใช้ และอินเดียมีพ่อพันธุ์โคพื้นเมืองที่ผ่านการคัดพิสูจน์แล้วในจำนวนที่น้อย

ผลการวิจัย

ผลการใช้น้ำเชื้อแยกเพศ

1. เพื่อการผสมเทียมในโคเนื้อ การใช้น้ำเชื้อแยกเพศสำหรับการผสมเทียมโคเนื้อสาวให้ผลอัตราการผสมติดที่แตกต่างกัน โดยมีอัตราการผสมติดต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อทั่วไประหว่าง 3 – 38% (การใช้น้ำเชื้อทั่วไปให้อัตราการผสมติด 70 – 90%) หากคิดเป็นค่าเฉลี่ยอัตราการผสมติดเมื่อใช้น้ำเชื้อแยกเพศก็พบว่าต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อทั่วไป 10 – 15% กรณีการใช้น้ำเชื้อแยกเพศสำหรับการผสมเทียมแม่โคเนื้อหลังคลอด ให้อัตราการผสมติด 30 – 35%

การผสมเทียมโคเนื้อของประเทศอเมริกา ณ ปัจจุบัน นิยมใช้ฮอร์โมนเพื่อเหนี่ยวนำการเป็นสัดของโคเนื้อให้แสดงอาการเป็นสัดใกล้พร้อมกันก่อนการผสมเทียม โปรแกรมการให้ฮอร์โมนมีหลากหลายโปรแกรม บางโปรแกรมสามารถกำหนดเวลาการผสมเทียมได้ด้วย (Fixed-time AI or FTAI) ผลการวิจัยของ Hall and Glaze (2014) พบว่าอัตราการผสมติดของแม่โคเนื้อหลังคลอดที่ใช้น้ำเชื้อแยกเพศ ร่วมกับ FTAI ต่อเนื่องกันสามฤดูการผสมพันธุ์ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 50% ความผันแปรของอัตราการผสมติดเมื่อใช้น้ำเชื้อแยกเพศร่วมกับ FTAI นั้น อาจเป็นผลเนื่องมาจาก 1) การผสมเทียมขณะที่โคแสดงอาการเป็นสัดหรือไม่ โคที่แสดงอาการเป็นสัดผสมติดดีกว่า 2) ขึ้นกับเวลาที่ผสมเทียม กรณีโคที่ไม่แสดงอาการเป็นสัดควรยืดระยะเวลาออกไปหลังจากกระตุ้นการตกไข่ด้วย GnRH 3) ความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อพันธุ์ น้ำเชื้อแยกเพศจากแต่ละพ่อพันธุ์มีความสมบูรณ์พันธุ์ต่างกัน และ 4) ขนาดของกระเปาะไข่ ขณะผสมเทียม ขนาดที่เหมาะสมคือ ≤ 9 มม.

2. Multiple Ovulation Embryo Transfer (MOET) การใช้น้ำเชื้อแยกเพศในการผสมเทียมแม่โคที่ได้รับการกระตุ้นให้ตกไข่ครั้งละหลาย ๆ ใบ (Super Ovulated Cow) ทำให้ได้ตัวอ่อนที่เหมาะสมต่อการถ่ายฝากลดลง 20 – 35% ทั้งนี้เป็นเพราะจำนวนไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิมีจำนวนมาก (Hall and Glaze, 2014)

3. In Vitro Fertilization (IVF) การใช้น้ำเชื้อแยกเพศเพื่อการทำ IVF ใช้ตัวอสุจิ 600 – 1,500 ตัว/oocyte ซึ่งจะให้อัตราการผสมติด 30 – 50% (Hall and Glaze, 2014)

4. เพื่อการผสมเทียมในโคนม อัตราการผสมติดเมื่อใช้น้ำเชื้อแยกเพศในโคนมสาว และแม่โคนมในประเทศญี่ปุ่น เท่ากับ 46.2% และ 33.6 % ตามลำดับ ขณะที่น้ำเชื้อทั่วไปมีอัตราการผสมติด 58.4% และ 40% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามในปีต่อมาได้มีการปรับปรุงปัจจัยที่ส่งผลต่ออัตราผสมติดหลังการผสมเทียม ก็มีผลทำให้อัตราการผสมติดเมื่อใช้น้ำเชื้อแยกเพศในโคนมสาว และแม่โคนมใน

ประเทศญี่ปุ่นในระหว่างปี 2012 - 2016 เท่ากับ 52.8% และ 40.1% ตามลำดับ Naniwa et al. (2018)

5. ระดับความเข้มข้นของน้ำเชื้อแยกเพศต่อหลอด Vishwanath and Moreno (2018) รายงานผลการวิจัย การใช้น้ำเชื้อแยกเพศด้วยกรรมวิธีแบบ XY Method (อสุจิ 2.1 ล้านตัว/หลอด) เทียบกับการแยกเพศด้วยเทคนิคที่ปรับปรุงแล้ว (SexedULTRA^{TM}) ใช้อสุจิ 2.1 3 หรือ 4 ล้านตัว/หลอด และน้ำเชื้อโดยทั่วไป (อสุจิ 15 ล้านตัว/หลอด) ให้ผลการผสมติด 55.9% 59.9% 60.0% 66.7% และ 66.5% ตามลำดับ

Garner and Seidel (2003) รายงานผลการใช้น้ำเชื้อแยกเพศที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และตำแหน่งการปล่อยน้ำเชื้อ ผลการศึกษาดังตารางที่ 1

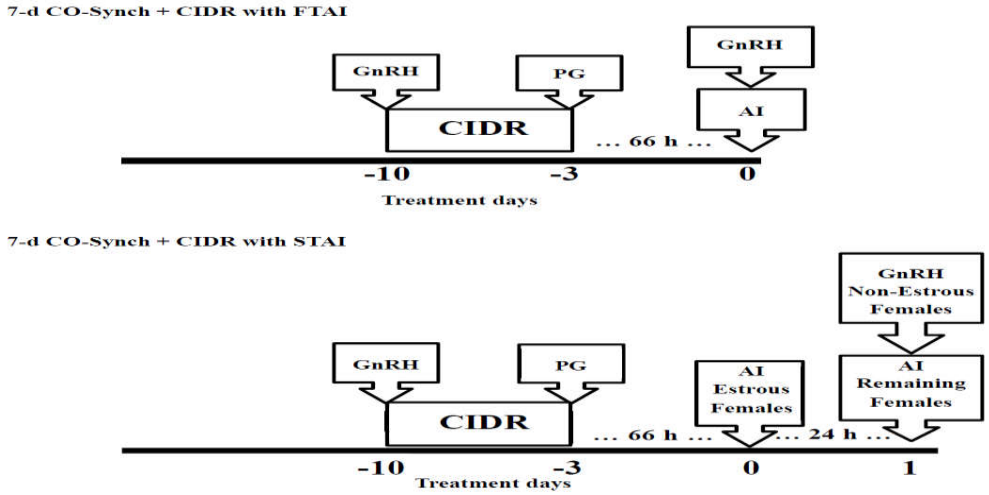
ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของน้ำเชื้อแยกเพศและตำแหน่งที่ปล่อยน้ำเชื้อต่ออัตราการผสมติด

การทดลอง	อสุจิ/ตำแหน่งปล่อยน้ำเชื้อ	โคสาว	แม่โค	อัตราการผสมติด
1	1.0-1.5 x 10^6/ตัวมดลูก	77		47
	3.0 x 10^6/ตัวมดลูก	76		50
	1.0-1.5 x 10^6/ปีกมดลูก	72		44
	3.0 x 10^6/ปีกมดลูก	93		54
	20 x 10^6/ตัวมดลูก กลุ่มควบคุม	93		66
2	1.0-1.5 x 10^6/ตัวมดลูก	176		56
	3.0 x 10^6/ตัวมดลูก	171		51
	20 x 10^6/ตัวมดลูก กลุ่มควบคุม	183		68
3	1.0-1.5 x 10^6/ตัวมดลูก	163		43
	1.0-1.5 x 10^6/ปีกมดลูก	158		54
	20 x 10^6/ตัวมดลูก กลุ่มควบคุม	128		62
4	3.0 x 106/ปีกมดลูก		42	50
	3.0 x 106/ตัวมดลูก		42	55
	20 x 106/ตัวมดลูก กลุ่มควบคุม		21	71

ที่มา: Garner and Seidel (2003)

6. การใช้น้ำเชื้อแยกเพศกับแม่โคเนื้อโตเต็มวัย Thomas et al. (2019) รายงานผลการผสมติดจากการใช้น้ำเชื้อแยกเพศ SexedULTRA 4M^{TM} กับแม่โคเนื้อโตเต็มวัยที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้ตกไข่

พร้อมกันสองวิธีคือ 7-d CO-Synch + CIDR with FTAI และ 7-d CO-Synch + CIDR with STAI (ดังภาพประกอบ 3) เทียบกับน้ำเชื้อทั่วไป ผลปรากฏว่าอัตราการผสมติดเท่ากับ 65^{X}, 65^{X}, 48^{Y} และ 50^{Y} % ในกลุ่ม FTAI - น้ำเชื้อทั่วไป, STAI - น้ำเชื้อทั่วไป} FTAI - SexedULTRA 4M^{TM} และ STAI - SexedULTRA 4M^{TM} ตามลำดับ



ภาพประกอบ 3 โปรแกรมการให้ฮอร์โมนเพื่อการเหนี่ยวนำการตกไข่พร้อมกัน

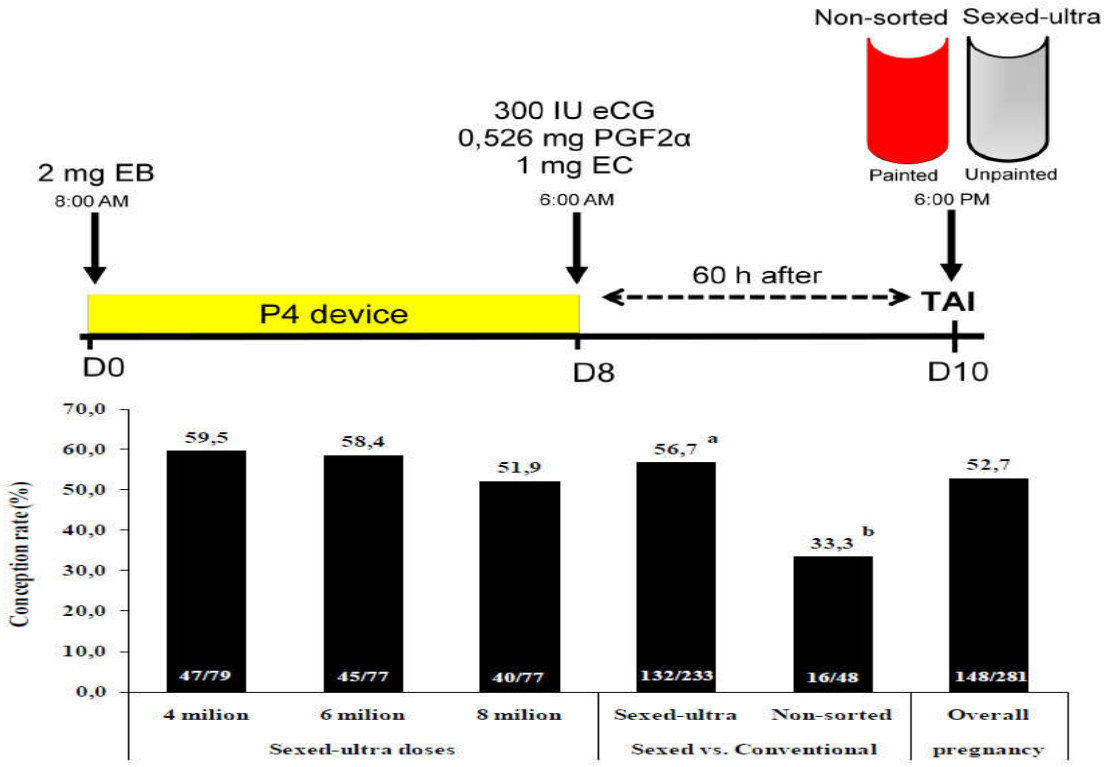
ที่มา: Thomas et al. (2019)

Marques et al. (2018) รายงานผลการใช้น้ำเชื้อแยกเพศ SexedULTRA ที่ระดับความเข้มข้น 4 6 และ 8 ล้านตัว/หลอด กับแม่โคเนื้อที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้ตกไข่พร้อมกัน (ภาพประกอบ 4) ในประเทศบราซิล ผลปรากฏว่า อัตราการผสมติดน้ำเชื้อแยกเพศต่างความเข้มข้นกันมีอัตราการผสมติดไม่ต่างกัน (ภาพประกอบ 4)

7. ความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจจากการใช้น้ำเชื้อแยกเพศ Naniwa et al. (2018) รายงานว่าในประเทศญี่ปุ่น การใช้น้ำเชื้อแยกเพศก่อให้เกิดผลดีต่อเศรษฐกิจของฟาร์มโคนม ทำให้ฟาร์มมีศักยภาพผลิตโคนมสาวทดแทนด้วยตัวเองส่งผลทำให้ผลผลิตน้ำนมสูงขึ้น ตัวอย่างฟาร์มที่มีลูกโคนมคลอด 60 ตัว/ปี การใช้น้ำเชื้อแยกเพศทำให้มีรายได้สูงกว่าฟาร์มที่ใช้น้ำเชื้อทั่วไป คิดเป็นมูลค่า 1.2 ล้านเยน

Obuchi et al. (2019) เปรียบเทียบต้นทุนการผลิตลูกโคนมเพศเมียที่ผลิตด้วยน้ำเชื้อแยกเพศด้วยวิธี 1) MOET with X-sorted Semen การผลิตตัวอ่อนที่กำหนดเพศได้จากการชักนำให้แม่โคตัวให้ตกไข่ครั้งละหลาย ๆ ใบแล้วผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแยกเพศและล้างเก็บตัวอ่อน 7-8 วัน หลังการผสมเทียม 2) MOET and Biopsy Sexing การผลิตตัวอ่อนที่กำหนดเพศได้จากการชักนำให้แม่โคตัวให้ตกไข่ครั้งละหลาย ๆ ใบแล้วผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อทั่วไปและล้างเก็บตัวอ่อน 7-8 วัน หลังการผสมเทียมแล้วจึงตรวจสอบเพศตัวอ่อนด้วยวิธี Loop-mediated Isothermal Amplification Assay จาก

ตัวอย่างที่เก็บจากตัวอ่อนด้วยวิธี Biopsy 3) IVEP with X-sorted Semen and IVM Oocytes ลูกโคเกิดจากการเก็บ Oocyte จากรังไข่ตัวให้ด้วยวิธี OPU แล้วนำเลี้ยงให้ถึงระยะที่พร้อมต่อการมาปฏิสนธิด้วยน้ำเชื้อแยกเพศก่อนการเลี้ยงตัวอ่อนในห้องทดลองจนได้ระยะที่เหมาะแก่การย้ายฝากแก่ตัวรับ 4) IVEP with X-sorted Semen and FGS Oocytes ลูกโคเกิดจากการเก็บ Mature Oocyte จากรังไข่ (Dominance Follicle) ของตัวให้ด้วยวิธี OPU แล้วนำมาปฏิสนธิด้วยน้ำเชื้อแยกเพศก่อนการเลี้ยงตัวอ่อนในห้องทดลองจนได้ระยะที่เหมาะแก่การย้ายฝากแก่ตัวรับ ผลปรากฏว่าวิธีที่ 4 มีต้นทุนการผลิตลูกโคนมเพศเมียต่ำที่สุด เท่ากับ 66,537 เยน/ตัว และ วิธีที่ 2 ต้นทุนแพงที่สุด คือ 131,525 เยน/ตัว



ภาพประกอบ 4 โปรแกรมการให้ฮอร์โมนเพื่อการเหนี่ยวนำการตกไข่พร้อมกัน (บน) และอัตราการผสมติด (ล่าง)

ที่มา: Marques et al. (2018)

สรุปผลการวิจัย

การผลิตน้ำเชื้อแยกเพศด้วยวิธี Flow cytometry/cell sorter เป็นวิธีการที่มีความแม่นยำสูงในการคัดแยกอสุจิให้มี X หรือ Y โครโมโซม และเมื่อนำน้ำเชื้อแยกเพศไปใช้จะได้ลูกโคที่มีเพศตามความต้องการของเกษตรกร การใช้น้ำเชื้อแยกเพศทั้งในโคนมและโคเนื้ออาจส่งผลให้อัตราการผสมติดลดลง

กว่าการใช้น้ำเชื้อทั่วไป แต่หากมีการปฏิบัติที่ดีระหว่างการใช้น้ำเชื้อแยกเพศก็จะทำให้อัตราการผสมติดใกล้เคียงกัน การใช้น้ำเชื้อแยกเพศทำให้ย่นระยะเวลาที่ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ และคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ

เอกสารอ้างอิง

Beernink, F.J., Dmowski, W.P. and Ericsson, R.J. (1993). Sex preselection through albumin separation of sperm. *Fertility and Sterility*, 59, 382-386.

Blottener, S., Nehring, H., Jenichem, W. and Peter, W. (1983). Use of carrier free deflection electrophoresis in experiments for separation of sperm genotypes. *Arch. Exp. Veterinamed*. 37, 641-655.

Check, J.H., Shanis, B.S., Cooper, S.O. and Bollendorf, A. (1989). Male sex preselection: swim-up technique and insemination of woman after ovulation induction. *Archives of andrology*, 23, 165-166.

Chen, X., Zhu. H, Wu, C., Han, W., Hao, H., Zhao, X. *et al*. (2012). Identification of differentially expressed proteins between bull x and Y spermatozoa. *Journal of Proteonics*, 77, 59-67.

Ericsson, R.J., Langevan, C.N. and Nishino, M. (1973). Isolation of fraction rich in Y spermatozoa. *Nature*, 245, 421-424.

Garner, D.L. and Seidel, G.E. (2003). Past, present and future perspectives on sexing sperm. *Can. J. Anim. Sci*, 83, 375-384.

Hall J.B. and Glaze, J.B. (2014). Sexed semen – how it is produced and how can we use it efficiently. Proceedings of the 2014 Applied Reproductive strategies in beef cattle conference. Retrieved 11 January 2020. From https://beefrepro.org/wp-content/uploads/2020/09/Hall_John.pdf.

Herrmann, B.G., Koschorz, B., Wertz, K., McLaughlin, K.J. and Kispert, A. (1999). A protein kinase encoded by the t complex responder gene cause non-Mendelian inheritance. *Nature*, 402, 141-146.

Holden, S.A. and Butler, S.T. (2018). Review Application and benefits of sexed semen in dairy and beef herds. *Animal*.,12(1), 97-103.

Hoppe, P.C. and Koo, G.C. (1984). Reacting mouse sperm with monoclonal H-Y antibodies does not influence sex ratio pf eggs fertilized in vitro. *Journal of Reproductive Immunology*, 6, 1-9.

Johnson, L.A., Welch, G.R. and Rens, W. (1999). The Beltsville sperm sexing technology: high-speed sperm sorting gives improved sperm output for in vitro fertilization and AI. *J. Anim. Sci*, 77, 213-220.

Kumar, N., Gebrekidan, B., Gebrewahd, T.T. and Hadush B. (2017). Sexed semen technology in cattle. *Indian Journal of Animal Health*. 56(2): 157-168.

Li, C.J., Wang, D. and Zhou, X. (2016). Sperm proteome and reproductive technologies in mammals. *Animal Reproduction science*, 173, 1-7.

Marques, M. O., Morotti, F., Lorenzetti, E., Bizarro-Silva, C. and Seneda, M.M. (2018). Intensified use of TAI and sexed semen on commercial farms. Anim. *Reprod*, 15(3), 197-203.

Naniwa, Y., Sakamoto, Y., Toda, S. and Uchiyama, K. (2018). Bovine sperm sex-selection technology in Japan. *Reprod Med Biol*, 18, 17-26.

Obuchi, T., Osada, M., Ozawa, T., Nakagawa, H., Hayashi, M., Akiyama, K., Sakagami, N., Miura, R., Gashi, M. and Ushijima, H. (2019). Comparative evaluation of the cost and efficiency of four types of sexing methods for the production of dairy female calves. *J. Reprod.Dev.,* 65, 345-352.

Ollero, M., Perez-Pe, R., Gargallo, I., Morlanes, S., Osada, J., Muino-Blanco, T. and Cebrian-Perez, J. (2000). Separation of ram spermatozoa bearing X and Y chromosome by centrifugal countercurrent distribution in an aqueous two phase system. *J. Androl.*, 21, 921-928.

Priya, V. and Pratibha, S. (2020). Recent advancement of frozen semen technology in India. *The Pharma Innovation Journal*, 9(2), 376-380.

Sa Filho, Nichi, M.F., Soares, J.G., Vieira, L.M., Melo, L.F., Ojeda, A., Campos, E.P., Filho, A., Gameiro, H., Sartori, R. and Baruselli, P.S. (2014). Sex-sorted sperm for artificial insemination and embryo transfer programs in cattle. *Anim. Reprod*., 11(3), 217-224.

Seidel, G.E. (2014). Update on sexed semen technology in cattle. *Animal*, 8(s1), 160-164.

Sharma, M. and Sharma N. (2016). Sperm sexing in animals. *Adv. Anim. Vet. Sci*., 4(10), 543-549.

Singh, D., Kumar, P., Nehra, K.S. and Kumar, A. (2019). Sexed semen technology in cattle: A revolutionary technique in India dairy industry. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 7(6), 946-950.

Thomas, J.M., Locke, J.W.C., Bonacker, R.C., Knickmeyer, E.R., Wilson, D.J., Vishwanath, R., Arnett, A.M., Smith, M.F. and Patterson, D.J. (2019). Evaluation of SexedULTRA 4M™ sex-sorted semen in timed artificial insemination programs for mature beef cows. *Theriogenology*, 123, 100-107

Van Munster, E.B. (2002). Interferometry in flow to sort unstained X- and Y-bearing bull spermatozoa. *Cytometry,* 47, 192-199.

Vishwanath, R. and Moreno, J.F. (2018). Review: Semen sexing- current state of the art with emphasis on bovine species. Animal, 12(s1), 85-96.

Wolf, C.A., Brass, K.E., Rubin, M.I.B., Pozzobon, S.E., Mozzaquatro, F.D., and De La Corte, F.D. (2008). The effect of sperm selection by percoll or swim-up on the sex ratio of in vitro produced bovine embryos. *Anim. Reprod*., 5(n.3/4), 110-115.

Yadav, S.K., Gangwar, D.K., Singh, J., Tidakar, C.K., Khanna, V.V., Saini, S., Dholpuria, S., Palta, P., Manik R.S., Singh, M.K. and Singla, S.K. (2017). An immunological approach of sperm sexing and different methods for identification of X- and Y-chromosome bearing sperm. *Veterinary world*, 10(5), 498-504.