การใช้เทคโนโลยีชีวภาพที่ใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพทางการสืบพันธุ์ และเพื่อรักษาพันธุกรรมสัตว์ป่าตระกูลแมวในประเทศไทย

มงคล เตชะกำพุ [1] เกวลี ฉัตรดรงค์ [1] อัมพิกา ทองภักดี [2] ธีรวัฒน์ ธาราศานิต [1] บริพัตร ศิริอรุณรัตน์ [2]
อังคณา สมนัสทวีชัย [2] สุเมธ กมลนรนารถ [2] ชัยณรงค์ โลหชิต [1]

บทคัดย่อ

เทคโนโลยีชีวภาพเช่น การผสมเทียม การผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกาย การโคลนนิ่ง และการแช่แข็งเซลล์สืบพันธุ์ เป็นเทคโนโลยีที่สำคัญในโปรแกรมการอนุรักษ์สัตว์ป่า สามารถช่วยในการเพิ่มจำนวนสัตว์ป่ามีค่า อยู่ในภาวะถูกคุกคามและ ใกล้สูญพันธุ์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์หลักในการประยุกต์และความเป็นไปได้ในการใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ป่าตระกูลแมว การศึกษานี้แบ่งออกเป็น 3 โครงการย่อยดังนี้ **โครงการที่ 1** ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อแมวป่าจากสวนสัตว์จำนวน 5 แห่งของประเทศไทย ทำการตรวจคุณภาพอสุจิและแช่แข็งน้ำเชื้อแมวป่าเพื่อเก็บเป็นธนาคารน้ำเชื้อ **การศึกษาที่ 2** เป็นการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตตัวอ่อนด้วยเทคนิคโคลนิ่งจากเซลล์ของแมวป่าหัวแบน ทำการตรวจคุณภาพตัวอ่อนและการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่ง **การศึกษาที่ 3** ใช้แมวบ้านเป็นสัตว์ต้นแบบเพื่อศึกษาผลของระยะของตัวอ่อนและวิธีการแช่แข็งต่อความสามารถในการแช่แข็งของตัวอ่อน ทำการตรวจคุณภาพตัวอ่อนทั้งในจานเพาะเลี้ยงและภายหลังการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็ง

ทีมวิจัยประสบความสำเร็จในการรีดเก็บน้ำเชื้อและแช่แข็งน้ำเชื้อแมวป่า จำนวน 66 ตัว จากแมวป่า 8 ชนิด ได้แก่ เสือโคร่ง เสือดาว เสือลายเมฆ แมวดาว เสือปลา เสือไฟ เสือกระต่าย และ แมวป่าหัวแบน ทำการผสมเทียมแมวดาวจำนวน 2 ตัวและเสือไฟจำนวน 1 ตัว ภายหลังทำการกระตุ้นให้แมวป่าเป็นสัดและตกไข่ ไม่พบการตั้งท้องในแมวและเสือดังกล่าว

การศึกษาที่ 2 พบว่าตัวอ่อนโคลนของแมวป่าหัวแบนมีอัตราเจริญสู่โมลูลาร้อยละ 53 ซึ่งสูงกว่าตัวอ่อนโคลนของแมวบ้าน (11%) แต่มีอัตราการเจริญของตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสไม่ต่างกัน (ร้อยละ 8.3 และ 8.5 ตามลำดับ) การศึกษานี้ไม่พบความแตกต่างของ cell line และเพศของเซลล์ต่อการเจริญของตัวอ่อนโคลน ทำการศึกษาการพัฒนาของตัวอ่อนจากการปฏิสนธิภายนอกร่างกายและการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งไปยังตัวรับ พบว่าตัวอ่อนไอ วี เอฟแบ่งตัวที่ 18-27 ชม. มีอัตราการเจริญของระยะบลาสโตซีสและจำนวนเซลล์มากกว่าตัวอ่อนที่แบ่งตัวที่มากกว่า 27-42 ชม. (61.4 กับ 18.6 %, 106±43 กับ 60± 27 เซลล์) ทำการย้ายฝากตัวอ่อนคลีเวจสู่แมวตัวรับจำนวน 6 ตัว แมวตัวรับทั้งหมดตั้งท้อง (ตัวอ่อนไอ วี เอฟ) แต่ไม่พบการตั้งท้องของตัวอ่อนโคลนนิ่งภายหลังการย้ายฝากตัวอ่อนไปยังตัวรับจำนวน 9 ตัว

ทีมงานวิจัยโครงการย่อยที่ 3 ประสบความสำเร็จในการผลิตตัวอ่อนภายนอกร่างกายด้วยการใช้ ฮอร์โมน recombinant human follicle stimulating ร่วมกับโกรทแฟคเตอร์ (epidermal growth factor

หรือ insulin-like growth factor) และสามารถแช่แข็งตัวอ่อนในระยะการเจริญต่างๆกันได้ ถึงแม้ว่าอัตราสำเร็จยังไม่สูงมาก โดยทำการแช่แข็งตัวอ่อนด้วยวิธีการลดอุณหภูมิช้าๆ หรือวิธีวิทริฟิเคชั่น โดยพบว่าตัวอ่อนระยะต้นมีความไวรับต่อความเย็นน้อยกว่าตัวอ่อนระยะโมลูล่าและบลาสโตซีส ซึ่งสอดคล้องกับผลการแช่แข็งตัวอ่อนที่พบว่าตัวอ่อนระยะต้นมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าตัวอ่อนระยะอื่น อย่างไรก็ตามตัวอ่อนระยะบลาสโตซีส มีอัตรารอดสูงเมื่อทำการแช่แข็งด้วยวิธีวิทริฟิเคชั่น ทำการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งในแมวตัวรับจำนวน 12 ตัว ไม่พบการตั้งท้องในแมวดังกล่าว แต่ประสบผลสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง คิดเป็นร้อยละ 50 เปอร์เซ็นต์

---

[1] ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

[2] สำนักอนุรักษ์ วิจัย และการศึกษา องค์การสวนสัตว์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

The Application of Assisted Reproductive Technology for Genetic Conservation of Endangered Wild Felidae in Thailand

Abstract

Assisted reproduction techniques such as artificial insemination, in vitro embryo production somatic cell nuclear transfer and cryopreservation of reproductive cells, known to hold a great promise in propagation of genetically invaluable wild animals, has become a major tool in wild animal conservation especially for wild felids that have been threatened, endangered and nearly extinction. The overall aims of this study were to examine the feasibility of these ART and also to apply the technique for wild felid conservation. In **study I**, we collected semen from 8 species of wild cats in 5 zoological parks of Thailand. The semen was then cryopreserved and stored as semen banking. The semen quality was examined before and after cryopreservation. In **study II**, somatic nuclear transfer (SCNT) technique was used to produce cloned embryos from flat-headed cat and life offspring following embryo transfer. **Study III** used domestic as a model to characterize the effects of embryonic stage at freezing and also freezing technique on embryo cryopreservability. The quality of embryos was assessed both in vitro and in vivo means.

We successfully collected semen from a total of 66 captive wild felids (8 species) including Tiger, Leopard, Clouded leopard, Leopard cat, Fishing cat, Asian golden cat, Jungle cat and Flat-headed cat and semen from these animals was cryopreserved and stored in liquid nitrogen as semen bank. Three Leopard cats and one Fishing cat were inseminated with frozen-thawed semen following estrous and ovulation induction. None of these cats was diagnosed as pregnancy.

In study II, Flat headed cloned embryos developed to morula at higher rate than domestic cat cloned embryo (% morula = 53 and 11, respectively), while the rates of blastocyst (8.3 and 8.5%) were not significantly different. We also found that the embryos that cleaved at 18-27 h post-IVF developed to blastocysts better than those cleaved at 27-42 h post-IVF, the 'fast-developing' embryos also significantly had higher cell numbers (106±43 and 60± 27 cells, respectively). Although all 6 recipients receiving IVF embryos were pregnant, we did not succeed to obtain pregnancy from any transfers of flat headed clone embryos in 9 recipients.

หากท่านต้องการข้อมูลเพิ่มเติมสามารถติดต่อได้ที่สำนักอนุรักษ์ วิจัย และการศึกษา องค์การสวนสัตว์
โทร 02-282-7111-3 ต่อ 161-163

In study III, we successfully produced embryo in vitro using a combination of recombinant human follicle stimulating hormone and growth factors (either epidermal growth factor or insulin-like growth factor). Following in vitro fertilization, different stages of embryos were cryopreserved using either conventional slow freezing or vitrification technique. We found that early stage of embryos tolerated to cold stress better than those later stages of development (morula and blastocyst). We successfully cryopreserved the feline embryos using both freezing technique, although success rate was limited. Early stage of development (the 4-8 cells embryos) survived much better after freezing and thawing when compared to later stages of development. In contrast, survival rate of blastocysts was highest when they were vitrified and warmed. A total of 12 r ecipients were received frozen-thawed embryos and two recipients were received non-frozen control oocytes. No offspring was observed in all recipients transferred with frozen-thawed embryos. Pregnancy rate of 50% were obtained from non-frozen embryos.

หากท่านต้องการข้อมูลเพิ่มเติมสามารถติดต่อได้ที่สำนักอนุรักษ์ วิจัย และการศึกษา องค์การสวนสัตว์
โทร 02-282-7111-3 ต่อ 161-163