รายงานผลการวิจัย
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การอนุรักษ์พันธุกรรมไก่พื้นเมืองไทย โดยการแช่แข็ง blastodermal cells และการสร้าง germline chimeras

Thai Native Chicken Genetic Conservation by Blastodermal Cell Cryopreservation and Germline Chimera Creation

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2545-2546

จำนวน 795200.00 บาท

หัวหน้าโครงการ นายบัญชา พงศ์พิศาลธรรม

ผู้ร่วมโครงการ นางปิยะอร พงศ์พิศาลธรรม

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

วันที่ 30 มีนาคม 2547

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ให้การสนับสนุนงบประมาณวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2545-2546 และขอขอบคุณผู้ร่วมงานทุกๆท่านที่ได้ช่วยเหลือในการทำวิจัย ขอขอบคุณคุณพยุงศักดิ์ อินต๊ะวิชา นักศึกษาบัณฑิตศึกษา ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพที่ได้ให้การช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณฟาร์มสัตว์ปีก มหาวิทยาลัยแม่โจ้ในการเอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัยภาคสนาม ขอบคุณ คุณชวลิต ศิริบูรณ์ คุณกิตติ วิรุณพันธ์ ในการจัดการข้อมูล ขอขอบคุณกองบำรุงพันธุ์สัตว์ สันป่าตองเชียงใหม่ที่ให้ความอนุเคราะห์ไก่พันธุ์ประดู่หางดำ

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ 2
สารบัญ 3
สารบัญตาราง ..... ก
สารบัญภาพ ..... ข
บทคัดย่อ 1
ABSTRACT 2
คำนำ 3
การตรวจเอกสาร 4
วัตถุประสงค์ของการวิจัย 9
วัน เวลา และสถานที่ทำการวิจัย 9
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 9
อุปกรณ์การทำวิจัย 10
วิธีการวิจัย 15
ผลของการวิจัย 18
สรุปผลการวิจัย 46
เอกสารอ้างอิง 47

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงรายชื่อและแหล่งที่มาของอุปกรณ์ 10
ตารางที่ 2 แสดงจำนวนและอัตราการตาย และการฟักออกของไข่ที่ได้รับการเปิดและปิดช่องหน้าต่างแบบต่างๆ..... 19
ตารางที่ 3 ตารางแสดงเปรียบเทียบผลการเปิด ปิดช่องบนเปลือกไข่ ต่ออัตราการตายของตัวอ่อน 20
ตารางที่ 4 แสดงอัตราการตายของตัวอ่อนในแต่ละวันของการเปิด ปิด หน้าต่างแบบต่างๆ 21
ตารางที่ 5 แสดงอัตาการตายของตัวอ่อนในแต่ละวันของการเปิด ปิดหน้าต่างแบบต่างๆ โดยการวิเคราะห์ทางสถิตถแบบต่างๆ CRD 23
ตารางที่ 6 การพัฒนาการของไก่จากการฉีดเซลล์ปริมาณต่างๆกันและการฉีดเซลล์แช่แข็ง 27
ตารางที่ 7 การพัฒนาการของไก่จากการฉีดเซลล์ปริมาณต่างๆกันและการฉีดเซลล์แช่แข็ง 29
ตารางที่ 8 แสดงอัตราการตายของตัวอ่อนในระยะฟักต่างๆ เทียบกับจำนวนตัวอ่อนที่เหลืออยู่ในแต่ละช่วง และอัตราการฟักออกของไก่เมื่อเทียบกับจำนวนที่ทดลองทั้งกลุ่ม 30
ตารางที่ 9 แสดงอัตราการตายของตัวอ่อนในระยะฟักต่างๆ เทียบกับจำนวนตัวอ่อนที่เหลืออยู่ในแต่ละช่วง และอัตราการฟักออกของไก่เมื่อเทียบกับจำนวนที่ทดลองทั้งกลุ่ม 31
ตารางที่ 10 แสดงจำนวนไก่ที่ตายในวันต่างๆของการฟัก ของทุกกลุ่มที่ได้รับการฉีดเซลล์สดและเซลล์แช่แข็ง 33
ตารางที่ 11 แสดงเปอร์เซนต์ไก่ที่ตายในวันต่างๆของการฟัก ของทุกกลุ่มที่ได้รับการฉีดเซลล์สดและเซลล์แช่แข็ง 34
ตารางที่ 12 แสดงเปอร์เซนต์ไก่ที่ตายในวันต่างๆของการฟัก ของกลุ่มที่ได้รับการฉีดเซลล์สดและเซลล์แช่แข็ง 35
ตารางที่ 13 แสดงรายละเอียดของไก่ที่ฟักออกและผลการทดสอบ GERMLINE CHIMERA..... 44

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 การสร้าง CHIMERIC CHICKEN และการผลิตสายพันธุ์เดิมจากพ่อแม่ที่เป็น CHIMERIC PARENTS 7
ภาพที่ 2 แสดงลักษณะทางภายนอกที่แตกต่างกันของพ่อแม่พันธุ์ไก่ทดลอง 13
ภาพที่ 3 แสดงช่องบนเปลือกไข่ 18
ภาพที่ 4 ตัวอย่างไก่ CHIMERA ที่เกิดจากการฉีดเซลล์เข้าในตัวอ่อนของไก่พันธ์โรด จะพบว่าไก่แสดงลักษณะของไก่ตัวรับเป็นส่วนใหญ่ 42
ภาพที่ 5 การพิสูจน์ GERMLINE CHIMERA ที่เกิดขึ้น โดยการผสมกับไก่พันธุ์ไข่ พบว่าลูกบางตัวมีลักษณะของไก่พันธุ์พื้นเมืองเกิดขึ้น (ขนสีดำ) 43

การอนุรักษ์พันธุกรรมไก่พื้นเมืองไทย โดยการแช่แข็ง blastodermal cells และการสร้าง germline chimeras

Thai Native Chicken Genetic Conservation by Blastodermal Cell Cryopreservation and Germline Chimera Creation

บัญชา พงศ์พิศาลธรรม[1] ปิยะอร พงศ์พิศาลธรรม[2] [1]

BUNCHA PONGPISANTHAM[1], PIYAORN PONGPISANTHAM[2], [1]

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว์ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่

[2]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ วิทยาเขตแพร่

.....

บทคัดย่อ

การทดลองได้ทำการแยกเซลล์ตัวอ่อนของไก่ประดู่หางดำ (ไก่ตัวให้) จากไข่มีเชื้ออายุ 0 วัน ด้วยวิธี Tyrpsinization และทดสอบความเข้มข้นของเซลล์ตัวอ่อนตัวให้ที่เหมาะสมเพื่อฉีดให้แก่ตัวอ่อนตัวรับในการผลิต chimeric chicken จากนั้นใช้เซลล์ตัวอ่อนของไก่ประดู่หางดำทั้งในรูปเซลล์สดและเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็ง ฉีดให้แก่ตัวอ่อนไก่ตัวรับ แล้วนำไข่ที่ได้รับการฉีดเข้าฟักที่อุณหภูมิ 100°F เป็นเวลา 21-22 วัน ตรวจการเจริญเป็นระยะ นำลูกไก่ที่รอดชีวิตและฟักเป็นตัวไปเลี้ยงต่อจนเข้าวัยเจริญพันธุ์ เพื่อตรวจความเป็น germline chimerism

จากการทดลองฉีดเซลล์ตัวอ่อนของไก่ประดู่หางดำให้แก่ตัวอ่อนในไข่ของไก่พันธุ์โรด พบว่าอัตราการฟักออกของไข่ที่ได้รับการฉีดเซลล์สดจำนวน 5000 เซลล์ เท่ากับ 3.04 % (10/329) จากตัวอ่อนที่ได้รับการฉีดเซลล์จำนวน 10000 เซลล์เท่ากับ 2.27% (3/127) ส่วนการฉีดเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งและละลายแล้วจำนวน 5000 เซลล์ มีอัตราการฟักออกเท่ากับ 2.72 % (8/292) ทั้งหมดมีลักษณะภายนอก(phenotype) ~ของไก่พันธุ์โรดปกติ ยกเว้นไก่หมายเลข B537 ตาบอด 1 ข้าง และ F123 หางเบี้ยว แต่บางตัวไม่แข็งแรงและตายไปในระยะแรกของการเลี้ยง เหลือไก่ที่มีชีวิตอยู่รอ

พิสูจน์การเป็น germline chimerism ทั้งหมด 15 ตัว ไก่ทั้ง 15 ตัวนี้แสดงลักษณะ phenotype ของไก่ไข่

ในการพิสูจน์ความเป็น germline chimerism โดยนำไก่ chimera ซึ่งมีลักษณะของไก่ไข่ไปผสมกับไก่ไข่พันธุ์โรด แล้วดูลักษณะของลูกที่เกิดว่าเป็นลูกผสมประดู่หางดำหรือไม่ มีไก่ 6 ตัวที่โตพอและเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์จนสามารถผสมกับไก่ไข่ได้ พบว่าไก่ 3 ตัว เป็น germline chimera คือ B138, B417 และ B471 โดยB138 ให้ลูกไก่ขนดำ 1 ตัวจากลูกไก่ 100 ตัว B417 ให้ลูกไก่ขนดำ 3 ตัวจากลูกไก่ 97 ตัว B471 ให้ลูกไก่ขนดำ 1 ตัวจากลูกไก่ 100 ตัว ไก่ที่เหลือตายก่อนผสม บางตัวติดโรคจากไก่อื่นและตายไป ทำให้ไม่ได้ผสมเพื่อทดสอบความเป็น germline chimera

ABSTRACT

Blastodermal cells of Thai native chicken (Pradoo Hangdam) were extracted from zero day old chick embryo by trypsinisation technique. Blastodermal cell concentration was optimized for chimeric production before both fresh and frozen blastoderms were injected in to 0 day old Rhode Island Red chick embryos. The injected eggs were incubated at 100 °F for 21- 22 days. The incubated eggs were candled regularly. The embryoes that can fully developed and hatched were tested for chimerism later on.

The result of injecting Pradoo Hangdam blastodermal cells in to Rhode embryoes showed that the hatchabilities of recipient eggs receiving 5000 and 10000 fresh donor blastodermal cells were 3.04% (10/329) and 2.27% (3/127) respectively. Whereas the hatchabilities of recipients receiving 5000 frozen donor blastodermal cells was 2.72% (8/292). The hatched chicks expressed normal Rhode Island Red phenotype. However one chick (B537) was blinded on one eye. Some of chimeric chicks died at early age. Fifteen chimeric chicks survived until mature stage.

Testing for germ line chimerism, Six healthy survived chimeric chicken were tested by mating with Rhode island red chickens. The result showed that three chimeric chickens, B138, B417 and B471 produced some of offspring that have black Thai native chicken feather (1/100, 3/97 and 1/100 of chik tested respectively).

คำนำ

แหล่งพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองของไทยปรากฏในรูปของพันธุ์และประชากรที่หลากหลาย ซึ่งได้ผ่านการวิวัฒนาการและปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่แตกต่างกันหลายแบบ อย่างไรก็ตาม จำนวนพันธุ์ของสัตว์ปีก ไม่ว่าจะเป็นสัตว์เลี้ยง หรือสัตว์ป่า กำลังลดลงอย่างรวดเร็ว คุณค่าทางพันธุกรรมหลายประการของไก่พื้นเมือง ได้แก่ความแข็งแรงต้านทานต่อโรคต่างๆ รสชาติของเนื้อที่เป็นที่นิยมของประชาชนในการบริโภค กำลังจะหายไปด้วย

การลดลงอย่างรวดเร็วของสายพันธุ์ของไก่พื้นเมืองอยู่ในสภาพที่เสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ด้วยสาเหตุหลายประการได้แก่ สถานการณ์โรคระบาดเช่น ไข้หวัดนก (avian influenza) ในระยะที่ผ่านมา ทำให้ต้องมีการทำลายสัตว์ปีกทั้งที่เลี้ยงในฟาร์มและสัตว์ปีกพื้นเมืองเป็นจำนวนมากเพื่อเป็นมาตรการในการควบคุมโรค (eradication) สาเหตุที่ทำให้ไก่พื้นเมืองของไทยต้องหายไปอีกประการหนึ่งคือการเจือจางสายพันธุ์และการทดแทนฝูงด้วยสายพันธุ์ใหม่ๆ กระแสความนิยมในการผลิตและการส่งเสริมให้มีการเลี้ยงไก่พันธุ์ลูกผสม (ไก่พื้นเมืองผสมพันธุ์ต่างประเทศ) เพื่อให้ได้ผลผลิตมากขึ้นในหมู่เกษตรกร ทำให้มีผสมไก่พันธุ์ต่างประเทศอื่นๆกับไก่พื้นบ้านมากขึ้น นอกจากนี้การนิยมเลี้ยงเฉพาะพันธุ์ใดพันธุ์หนึ่งโดยละเลยพันธุ์อื่นก็เป็นอีกทางหนึ่งที่จะทำให้ไก่พันธุ์แท้ของไทยบางพันธุ์สาบสูญไปได้

วัตถุประสงค์ของการอนุรักษ์พันธุกรรมคือการรักษายีนส์ และพันธุ์หรือประชากร ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ การอนุรักษ์แหล่งพันธุกรรม (Genetic resources conservation) สามารถทำได้ 3 วิธี ได้แก่ 1) การเก็บเซลล์สืบพันธุ์ในรูปไข่ ตัวอสุจิ หรือตัวอ่อนแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C 2) การเก็บรักษาข้อมูลทางพันธุกรรม โดยเก็บในรูปของดีเอ็นเอที่สกัดแล้ว หรือเก็บเป็นเลือด หรือ ตัวอย่างชิ้นเนื้อแช่แข็ง ซึ่งสามารถนำมาสกัด ดีเอ็นเอได้ในในภายหลัง และ 3) การเก็บรักษาพันธุกรรมสัตว์ในรูปของสัตว์ที่มีชีวิต (In situ conservation)

สำหรับสัตว์ปีก การอนุรักษ์พันธุกรรมไก่พื้นเมืองโดยการเลี้ยงฝูงไก่เป็นสิ่งที่ต้องลงทุนสูงและเสี่ยงต่อการสูญเสียจากโรคระบาด การเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งเป็นวิธีแรกเริ่มมาเนิ่นนานแล้วและสามารถใช้ได้ แต่การแช่แข็งตัวอสุจิจะเป็นการเก็บรักษาพันธุกรรมจากเพศผู้เท่านั้น ส่วนการแช่แข็งตัวอ่อนในสัตว์ปีกยังเป็นสิ่งที่เป็นไปได้ยากเนื่องจากโครงสร้างของไข่ไม่เอื้ออำนวยต่อการแช่แข็ง วิธีที่เป็นไปได้อีกวิธีหนึ่งคือการเก็บรักษาเซลล์ตัวอ่อน (Blastoderm) โดยการแช่แข็ง ซึ่งจะเป็นการเก็บสารพันธุกรรมที่สมบูรณ์คือมีส่วนประกอบของจีโนมที่มาจากพ่อและแม่ เซลล์ตัวอ่อนไก่พื้นเมืองที่เก็บรักษาไว้เมื่อนำไปปลูกถ่ายให้แก่ไก่ตัวอ่อนพันธุ์พันธุ์หนึ่ง เพื่อให้เซลล์ตัวอ่อนแทรก

กระจายไปในร่างกายลูกไก่ที่เกิดขึ้นเป็นไก่ Chimera เมื่อลูกไก่ chimera เติบโตขึ้นจะทำการผสมกับไก่ที่เป็น Chimera ด้วยกัน ลูกที่ได้บางส่วนก็จะเป็นไก่พื้นเมืองพันธุ์แท้ที่ต้องการสงวนไว้ได้

การตรวจเอกสาร

Blastodermal cell และ Embryonic Stem (ES) Cells

Embryonic stem (ES) cells หมายถึง เซลล์ต้นตอที่พบในการพัฒนาของตัวอ่อนระยะแรกในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคือเซลล์จาก Inner Cell Mass ของตัวอ่อนในระยะ Blastocyst (Rom, 2000) ในสัตว์ปีกคือ Blastodermal cells จากไข่มีเชื้อที่ยังไม่ได้เข้าฟักหรือระยะการพัฒนาที่เรียกว่า Stage X (Eyal-Giladi, 1984) เซลล์พวกนี้มีคุณสมบัติเป็น Pluripotent stem cells นั่นคือสามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (Differentiate) ไปเป็นเซลล์ชนิดต่าง ๆ ในร่างกายของสัตว์ ทั้งในเซลล์ของร่างกาย (Somatic cells) และเซลล์สืบพันธุ์ (Germline cells) (Rom, 2000) ในการค้นพบ ES cell ครั้งแรกเกิดจากการค้นพบ Embryonic Carcinoma (EC) cells ซึ่ง ES cells มีลักษณะเหมือนกับ EC cells โดย Evans and Kaufman (1981) ได้แยก ES cell ออกจาก EC cell เป็นครั้งแรก โดยการนำ ES cells จากตัวอ่อนไปเพาะเลี้ยงจนเซลล์เปลี่ยนรูปร่างเป็นเซลล์ที่พบในเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น เซลล์ผิวหนัง นอกจากนี้ ES cells จากตัวอ่อนของหนู ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตสัตว์ Chimeras เพราะสามารถเพาะเลี้ยงและเพิ่มจำนวนได้

เซลล์ Blastoderm ของตัวอ่อนจากไก่พื้นเมือง อาจเก็บรักษาในรูปแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลวได้เป็นเวลานาน ซึ่งเป็นแนวทางในการเก็บรักษาพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองในระยะยาวได้วิธีหนึ่ง และมีข้อดีกว่าการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งตรงที่จะเป็นการเก็บสารพันธุกรรมที่สมบูรณ์กว่าคือจะมีส่วนประกอบของจีโนมที่มาจากทั้งพ่อและแม่

ความหมายของสัตว์ Chimeras

สัตว์ Chimeras หมายถึง สัตว์ที่มีเซลล์ในร่างกายมาจาก 2 แหล่งคือ เซลล์ของตัวอ่อนเองและเซลล์จากแหล่งอื่นที่เข้าไปปะปนในตัวอ่อนนั้น การผลิตสัตว์ Chimeras ทำได้โดยการฉีด Embryonic stem (ES) cells เข้าไปยังช่องว่าง Blastocoel ของตัวอ่อนในระยะ Blastocysts ซึ่งอยู่ในระยะที่ยังไม่ได้ฝังตัวที่มดลูก จากนั้นก็นำตัวอ่อนที่ได้ไปถ่ายฝากยังปีกมดลูกของตัวรับ เมื่อตัวอ่อนนั้นเจริญจนครบกำหนดคลอดก็จะได้สัตว์ Chimeras ซึ่งสัตว์ดังกล่าวจะแสดงลักษณะที่สังเกต

ให้เห็นได้ (Phenotype chimerism) เช่น ลักษณะภายนอกเหมือนกับตัวให้และตัวรับและแสดงออกทางพันธุกรรมซึ่งไม่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่า (Genotype chimerism) ซึ่งลักษณะนี้รวมถึง Germline Chimeras นั้นคือ ES cell ที่ฉีดเข้าไปจะปะปนอยู่ในรังไข่หรืออัณฑะของสัตว์ตัวรับ เมื่อเลี้ยงสัตว์ Gemline Chimeras ไปถึงระยะเจริญพันธุ์ก็สามารถผลิตไข่และอสุจิจาก ES cell ที่ฉีดเข้าไป (Puhler, 1993) สำหรับไก่ Chimeras (Chimeric chicken) ก็มีความหมายและวิธีผลิตเช่นเดียวกัน (Petitte *et al.*, 1990; Etches *et al.*, 1993) (ภาพที่ 1)

การผลิต Chimeric chicken โดยการใช้ ES cells สามารถนำมาประยุกต์เพื่อให้เกิดประโยชน์ได้ เนื่องจาก ES cells บางส่วนสามารถเปลี่ยนเป็นเซลล์สืบพันธุ์ในสัตว์ตัวรับ จึงใช้เป็นตัวพายีนในการผลิตไก่ตัดต่อพันธุกรรม (Transgenic Chicken) นอกจากนี้วิธีการผลิตสัตว์ Chimeric chicken เมื่อใช้ร่วมกับเทคนิคการแช่แข็งตัวอ่อนสามารถใช้ในการแช่แข็งสำหรับการอนุรักษ์พันธุ์ไก่ได้

การใช้ Blastodermal Cells เพื่อผลิต Chimeric Chicken

การใช้เทคโนโลยี ES cells สำหรับผลิตสัตว์ Chimeras ส่วนใหญ่ทำในหนูทดลอง โดยการแยก ES cells จากหนู mouse แล้วฉีดเข้าไปยังตัวอ่อนระยะ Blastocysts ของหนูตัวรับ เพื่อผลิต mouse chimeras (Bradley *et al.*, 1984) หรือหนู rat chimeras (Iannaccone *et al.*, 1994) ต่อมา ได้ใช้ ES cells จากหนู rat เป็นตัวให้ และใช้ หนู mouse เป็นตัวรับ ได้ลูกหนู rat-mouse chimeras ซึ่งเป็นการผลิตสัตว์ Chimeras จากสัตว์คนละชนิด (species) (Iannaccone *et al.*, 1997)

การผลิต Chimeras ในสัตว์ฟาร์มก็มีรายงานการแยก ES cells จาก inner cell mass (ICM) ของสัตว์ฟาร์มในระยะ Blastocysts เพื่อฉีดเข้าไปยังไข่ตัวอ่อนของตัวรับชนิดเดียวกัน โดยมีการทดลองในสัตว์หลายชนิดด้วยกัน เช่น ในแกะ (Handysid *et al.*, 1987) โค (Evans *et al.*, 1990) กระต่าย (Giles *et al.*, 1993) สุกร (Kashiwazaki *et al.*, 1992) แพะ (Meinecke-Tillmann and Meineck, 1996) และสัตว์ปีก (Petitte *et al.*, 1990 ; Naito *et al.*, 1992 ; Etches *et al.*, 1993 ; Kino *et al.*, 1997)

.ในสัตว์ปีก การผลิต Chimeric chicken มีหลักการที่สำคัญคือ ย้ายเซลล์ของไก่ตัวให้จากจุดเจริญ (Germinal dish) เข้าไปยังจุดเจริญของไข่มีเชื้อตัวรับ (Recipient) ซึ่งอยู่ในระยะเดียวกัน ตัวอย่างเช่น การย้ายเซลล์จากไก่สีดำ พันธุ์ Barred Plymouth Rock อยู่ในระยะการพัฒนาที่เรียกว่า Stage X (Eyal-Giladi, 1984) เข้าไปยังไข่ของไก่สีขาว พันธุ์ White Leghorn เมื่อไข่ดังกล่าวฟักออกจะได้ลูกไก่ที่เป็น Chimeric chicken ถ้าเป็นตัวผู้จะผลิตตัวอสุจิได้สองชนิดทั้งที่มาจากตัวให้

และตัวรับ เมื่อนำไปผสมกับไก่ตัวเมียพันธุ์ Barred Plymouth Rock จะให้ลูกที่มีสีขนได้สองชนิด ชนิดแรกคือลูกที่ได้จากตัวอสุจิที่ผลิตโดยเซลล์ตัวให้ที่ย้ายเข้าไปในตัวรับพันธุ์ Barred Plymouth Rock ชนิดที่สอง คือลูกจากตัวอสุจิที่ผลิตโดยเซลล์ของตัวรับพันธุ์ White Leghorn (Etches *et al.*, 1993)

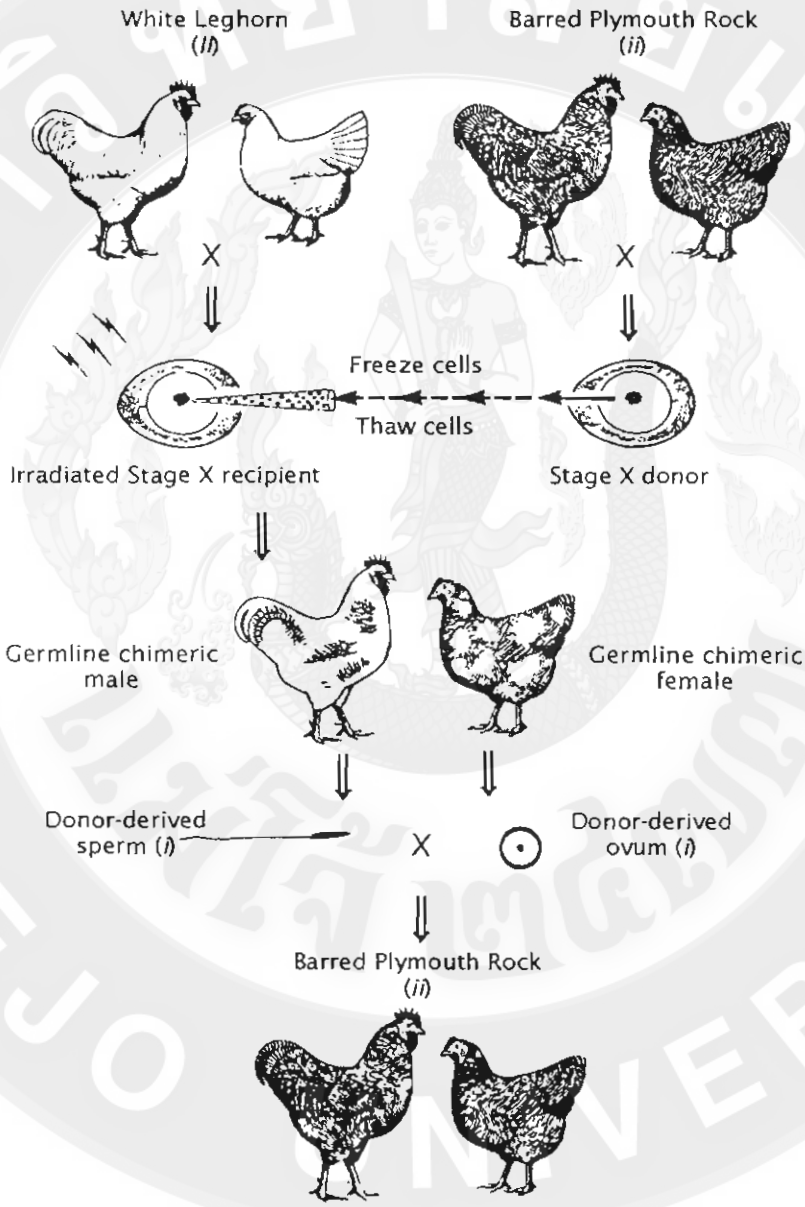
Petitte et al. (1990) เป็นรายแรกที่แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เซลล์จากตัวอ่อนใหม่ๆ ที่ยังไม่ผ่านการฟัก (chicken blastodermal cells) ในการผลิต germ line chimeras. เขาทำการแยกเวลล์ตัวอ่อนไก่พันธุ์Barred Rock ในระยะ stage X embryos แล้วนำไปฉีดเข้าช่องว่างใต้ตัวอ่อน (subgerminal cavity) ของไก่พันธุ์ White Leghorn ในระยะใกล้เคียงกัน ต่อมา Naito et al. (1992) ได้ใช้วิธีเดียวกันเพื่อผลิต quail-chicken chimeras และมีการใช้วิธีทาง histological เพื่อตรวจสอบการเกิด germline chimeras จากการผลิต quail-chicken chimeras (Watanabe et al., 1992) Thoraval et al. (1994) และ Etches et al. (1996) ได้รายงานการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปฉีดยังไก่ตัวรับ ต่อมามีการเพิ่มประสิทธิภาพการเกิด germline chimeras โดยการทำลายเซลล์บางส่วนของตัวอ่อนของตัวรับ ด้วยการฉายรังสีแกมมา (gamma ray) จากโคบอล 60 (Cobalt-60) (Etches et al., 1996; Kino et al., 1997; Fraser,et al., 1993) และ Caesium-137 (Thoraval et al., 1994)

การอนุรักษ์พันธุกรรมสัตว์ปีก

จากผลสำเร็จในการพัฒนาวิธี chimerism ในไก่ ทำให้สามารถแช่แข็งเซลล์ตัวอ่อนไว้เพื่อผลิตเป็นไก่ที่มีชีวิตได้ อันเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการเก็บรักษาพันธุกรรมไก่พื้นเมือง Pain et al. (1996) ได้ชี้ให้เห็นว่า เซลล์ตัวอ่อนไก่ (chicken blastodermal cells) สามารถนำมาเพาะเลี้ยงในห้องทดลองได้ และเซลล์ยังคงสภาพความเป็น multipotent avian embryonic stem (ES) cells ไว้ได้ นั่นคือเซลล์พวกนี้สามารถที่จะแบ่งตัวต่อไปในหลอดทดลองได้เป็นเนื้อเยื่อ 3 ชนิดได้แก่ ectodermal, mesodermal และ endodermal lineages. นอกจากนี้ Pain et al. (1996) ยังสามารถผลิตสัตว์chimera ที่มีเซลล์สืบพันธุ์ของสัตว์พันธุ์หรือชนิดอื่น (Germ line chimeras) ได้สำเร็จจากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้ 7 วัน

นอกจากนั้นมีการทดลองการแช่แข็ง blastodermal cells ในไนโตรเจนเหลว แล้วทำการฉีดเซลล์ที่แช่แข็งเข้าไปยังจุดเจริญของไข่ตัวรับ เพื่อให้เกิด germline chimeras ระหว่างนกกระทาและไก่ (quail-chicken chimeras) (Naito et al., 1992) เพื่อสร้าง germline chimeras ระหว่างไก่ต่างสายพันธุ์ (Kino et al., 1997) และเพื่อสร้าง germline chimeras ระหว่างเป็ดกับไก่ (duck-chicken

chimeras) (Li et al. 2002) การแช่แข็ง PGC เพื่อสร้าง germline chimeras ระหว่างไก่ต่างสายพันธุ์ (Naito et al., 1994) ซึ่งการทดลองที่กล่าวมาจะเป็นพื้นฐานในการผลิตสัตว์ปีก chimeras สำหรับการอนุรักษ์พันธุกรรมสัตว์ปีกที่ใกล้จะสูญพันธุ์



ภาพที่ 1 การสร้าง chimeric chicken และการผลิตสายพันธุ์เดิมจากพ่อแม่ที่เป็น chimeric parents

(ดัดแปลงจาก Kino et al, 1997)

มีรายงานการวิจัยว่าเซลล์ตัวอ่อนที่เพาะเลี้ยงไว้สามารถนำไปผ่านขบวนการแช่แข็งและละลายแข็งได้ถูกใช้ในการผลิต somatic และ germ line chimeras ได้ (Etches et al., 1996; Kino et al., 1997). อย่างไรก็ตามเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งทำให้การเกิด somatic และ germ line chimeras ลดลง เมื่อเปรียบเทียงกับการใช้เซลล์ตัวอ่อนสด (stage X blastodermal cells) ทันทีโดยไม่ผ่านการแช่แข็ง (Etches et al.,1996) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าหลังจากเพาะเลี้ยงเซลล์ตัวอ่อนจะทำให้ความสามารถในการเกิด chimera ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจากความสามารถในการกลายเป็นตัวอ่อน (potency) ของเซลล์ที่เลี้ยงไว้ลดลง เพราะมีการกลายของเซลล์แบบแอบแฝง (inherent differentiation) หรืออาจเกิดจากสภาพในการเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เหมาะสม (suboptimal culture conditions)

ข้อดีของการใช้ เซลล์ blastodermal ในการผลิต chimera ก็คือ เซลล์มักจะเป็นตัวแทนประชากรของเซลล์ที่ยังไม่ differentiated (Petitte et al., 1990) อย่างไรก็ดี ข้อเสียก็คือ การผลิต chimera จาก blastoderm มักมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การฟักของไข่ลดลง (Etches et al., 1997) ตัวอ่อนส่วนใหญ่ตายระหว่างการฟัก เนื่องมาจากการฉีกขาดของเยื่อหุ้มชั้นใน (recipient inner shell membrane) ของไข่ตัวรับในขั้นตอนการเปิดหน้าต่างบนเปลือกไข่เพื่อฉีดเซลล์ (Etches et al., 1997)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อเป็นแนวทางในการอนุรักษ์ไก่พื้นเมืองของไทย
2 เพื่อศึกษาวิธีการเก็บรักษาเซลล์ตัวอ่อนของไก่
3 เป็นแนวทางที่จะนำเทคนิคมาใช้ในการเพิ่มผลผลิตไก่พื้นเมือง

วัน เวลา และสถานที่ทำการวิจัย

เวลาเริ่มทำการทดลอง	วันที่ 1 พฤจิกายน 2544
เสร็จสิ้นการทดลอง	วันที่ 31 ตุลาคม 2546
สถานที่	เลี้ยงไก่ทดลอง ณ ฟาร์มสัตว์ปีก สาขาการผลิตสัตว์ปีก ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว์ คณะผลิตกรรมการเกษตร ตรวจสอบ Chimerism และเพาะเลี้ยง ES cells ที่ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เป็นแนวทางที่จะอนุรักษ์พันธุ์ไก่พื้นเมือง
2 เป็นแนวทางช่วยในการปรับปรุงพันธุ์ไก่พื้นเมือง
3 เป็นแนวทางวิธีที่เหมาะสมที่ใช้ในการเก็บรักษาเซลล์ตัวอ่อนไก่
4 เป็นพื้นฐานในการสร้าง transgenic chicken ซึ่งจะมีประโยชน์ในการผลิตเวชภัณฑ์จากไข่ต่อไป

อุปกรณ์การทำวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงรายชื่อและแหล่งที่มาของอุปกรณ์

อุปกรณ์และเครื่องมือทั่วไป

อุปกรณ์และเครื่องมือ	โมเดล	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
ตู้ปลอดเชื้อ (biohazard Laminar flow)	BLF-120	Dwyer Instruments, Inc.	USA
เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง	AB204	Mettler-Toledo	Switzerland
เครื่องcentrifuge (micro centrifuge)	4214	A.L.C. International S.r.l.	Italy
เครื่องวัด pH			
กล้องจุลทรรศน์ แบบหัวกลับ (inverted microscope)	CK2	Olympus Optical	Japan
อ่างน้ำร้อน (water bath)	600	memert	Germany
ไมโครปิเปต (micropipette) ขนาด 2.5,10, 20, 100, 200, 1,000 ไมโครลิตร	-	Eppendorf Research	Germany
หลอดทดลองขนาด 1.5. 15 และ 50 มล. (centrifuge tube)	-	Sorenson, Bioscience.Inc	USA
หลอดฉีดยา ขนาด 5, 10, 25 และ 50 มล.	Nipro®	-	Japan
cover slip	Menzel-glaser	-	Germany
เครื่องเปิดเปลือกไข่	mini handicraft grinder	-	Taiwan
micro-haematocrit tube			
ตู้พักและตู้เกิด ขนาด 72 ฟอง	SI72A	Siam incubators	Thailand

อุปกรณ์และเครื่องมือ	โมเดล	บริษัทผู้ผลิต	ประเทศ
(incubator and Hatchery)		system	
hemacytometer	Bright-Line	Hausser Scientific	USA
เครื่องช่วยผสม (Touch Mixer)		Kika	Malaysia
เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง		Mettler toledo	Switzerland
เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง		Mettler toledo	Switzerland
เครื่องหมุนเหวี่ยง		Hettich:	Germany
เครื่องมือดูดสารละลาย		Gilson	France
เครื่องให้ความร้อน (Heater)		Kika	Germany
ตู้อบฆ่าเชื้อ		Memmert	Germany
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ		Hirayama	Japan
เครื่องแก้ว		Pyrex , Duran	USA, Germany
ทิป		Gilson	France
หลอดทดลองขนาด 1.5 มิลลิลิตร		Brand	Germany
หลอดทดลองขนาด 0.2 มิลลิลิตร		Sorenson	USA
pH meter		Cyberscan	Singapore
เข็มฉีดยา			
ไซริงค์			
กล้องถ่ายรูป		Nikon	Japan

สารเคมี

สารเคมี	Cat. number	บริษัท
fetal calf serum	S0213	Seromed
paraformaldehyde	P6148	Sigma
sodium chloride, (NaCl)	06404	Merck
Tris-HCl TRIZMA® Hydrochloride (Tris [hydroxymethyl]-aminomethane)	T-3253	Sigma
hydrochloride, ($C_4H_{11}NO_3HCl$)	M8266	Sigma
magnesium chloride, $MgCl_2$	B-6149	Sigma
5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate (BCIP)	N-6876	Sigma
nitroblue tetrazolium	RA-111	Biotech reagent
ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA, ($C_{10}H_{16}N_2O_8$)	AG03620	Fluka Chemcie
deoxynucleotide triphosphate, dNTPs) taq DNA polymerase (250 unit taq, 10X PCR Buffer และ 25 mM $MgCl_2$)	U120B-123B	Promega Bio-Active
acrylamide PAGE (CH_2:$CHCONH_2$)	UN2074	Plusone Pharmacia
ammonium persulphate, $(NH_4)_2S_2O_8$)	A3678	Sigma

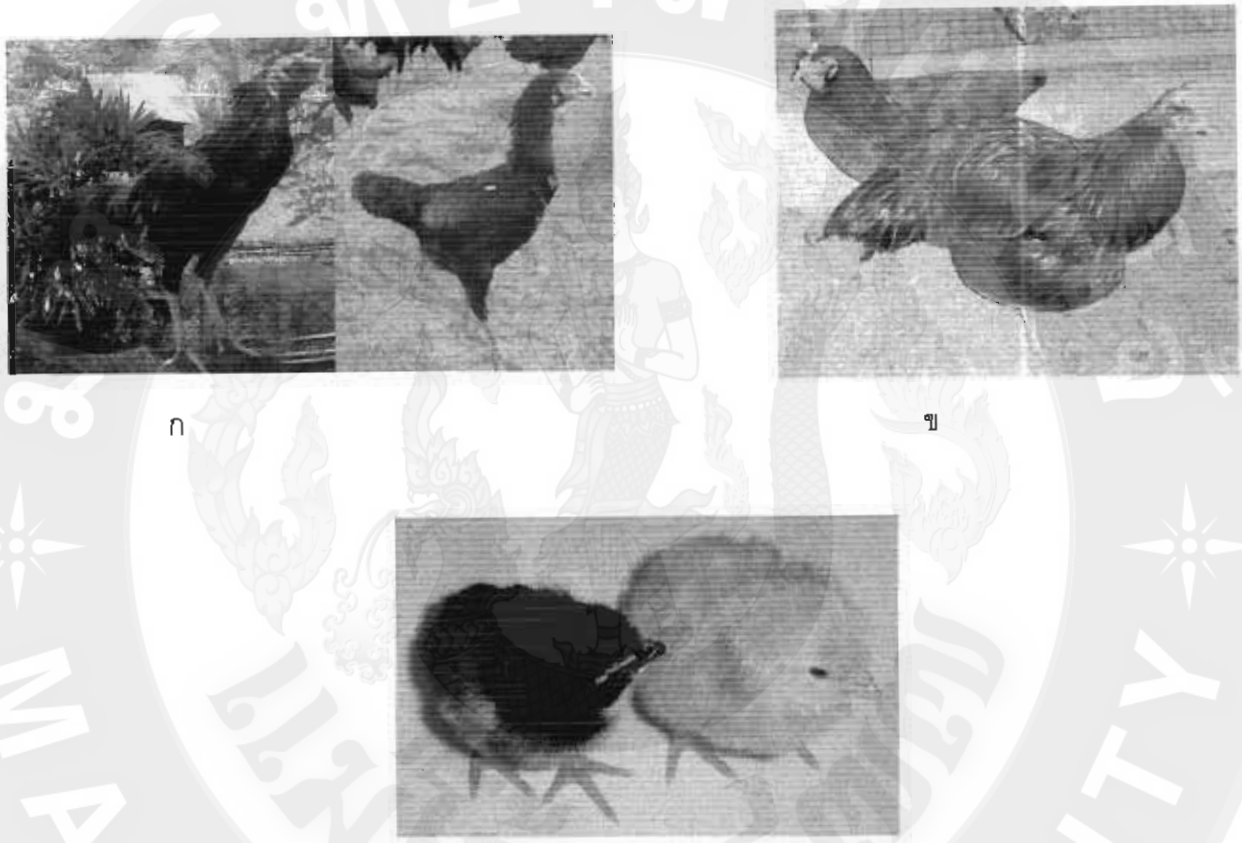
ไก่ทดลอง

พันธุ์ไก่

ไก่ตัวให้ (donor) หรือไก่พ่อแม่พันธุ์ที่ใช้ผลิตตัวอ่อนสำหรับนำไปแยกเซลล์ (ES cells) เพื่อใช้ในการศึกษาเป็นไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์ประดู่หางดำแท้มีลักษณะสีขน (phenotype) สีดำทั้งตัว ไก่พันธุ์ประดู่หางดำได้รับความอนุเคราะห์จากกองบำรุงพันธุ์สัตว์ สันป่าตอง เชียงใหม่

ไก่ตัวรับ (recipient) หรือไก่พ่อแม่พันธุ์ที่ผลิตตัวอ่อนสำหรับรับการฉีด ES cells ตัวเมียใช้ไก่พันธุ์ไข่ทางการค้าของบริษัทเครือเจริญโภคภัณฑ์ ตัวผู้ใช้พันธุ์โรดไอแลนเรซ โดยทั้งเพศผู้และเพศ

เมียมีลักษณะขนสีแดงทั้งตัว ไก่ตัวให้และตัวรับให้ลูกที่ลักษณะทาง phenotype ต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 2



ก ข

ค

ภาพที่ 2 แสดงลักษณะทางภายนอกที่แตกต่างกันของพ่อแม่พันธุไก่ทดลอง

ก = ไก่พันธุตัวให้มีขนสีดำ ข =ไก่พันธุตัวรับมีขนสีแดง และ ค = ลูกพันธุไก่ตัวให้มีขนสีดำแต่ลูกพันธุไก่ตัวรับมีขนแดง

การจัดการฝูงไก่

ไก่เพศเมียที่ใช้เป็นตัวให้ และตัวรับถูกเลี้ยงบนกรงตับในโรงเรือนสัตว์ของสาขาสัตว์ปีก ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว์ คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ไก่เพศผู้ทั้งพันธุ์ที่ใช้เป็นตัวให้ และตัวรับเลี้ยงแบบปล่อยพื้นขนาดสองตารางเมตรต่อสองตัว ขั้นตอนการเลี้ยงมีดังนี้

อาหาร และการให้อาหาร

อาหารสำหรับเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ทั้งไก่ตัวให้ และตัวรับใช้อาหารสำเร็จรูปสำหรับไก่พันธุ์ไข่ตามอายุการให้ไข่จากบริษัทเครือเจริญโภคภัณฑ์ เสริมวิตามิน และแร่ธาตุชนิดผงลายน้ำให้กิน 2 ครั้งต่อสัปดาห์ นอกจากนั้นไก่ที่ใช้เป็นตัวให้ยังเสริมข้าวเปลือก และหญ้าสดเพื่อให้เหมาะสมกับความต้องการตามธรรมชาติของไก่พันธุ์พื้นเมือง

อุณหภูมิและการให้แสง

ไก่ที่ใช้เป็นตัวให้ และตัวรับเลี้ยงในโรงเรือนเปิดมีอุณหภูมิแวดล้อม (ambient temperature) อยู่ในช่วง 15 – 35^{o}C ในแต่ละวันแม่ไก่ที่กำลังให้ไข่ได้รับแสง 15.25 ชั่วโมง และความมืด 8.75 ชั่งโมง

การผสมพันธุ์

การผสมพันธุ์ไก่พ่อแม่พันธุ์ทั้งตัวให้ และตัวรับ มีการผสมพันธุ์แบบธรรมชาติที่อัตราส่วน แม่พันธุ์ 8 ตัวต่อพ่อพันธุ์ 1 ตัว คือนำแม่ไก่ที่เลี้ยงไว้บนกรงตับสองตัวมาขังรวมกับพ่อพันธุ์หนึ่งตัวเป็นเวลาหนึ่งวันเพื่อให้ผสมพันธ์กัน ในวันต่อมาจึงนำแม่ไก่กลับไปเลี้ยงยังกรงตับดังเดิม จากนั้นเปลี่ยนแม่ไก่คู่ใหม่มาขังรวมกับพ่อพันธุ์เพื่อให้ผสมพันธุ์แทน ระบบผสมพันธุ์นี้แม่ไก่จะได้รับการผสมพันธุ์ซ้ำทุก ๆ 4 วัน

การเก็บไข่

เมื่อแม่ไก่ที่ถูกเลี้ยงอยู่บนกรงตับออกไข่จะเก็บไข่แล้วบันทึกหมายเลขพ่อแม่บนเปลือกไข่และวันที่ออกไข่ จากนั้นคัดเลือกไข่ฟองที่สะอาด มีขนาดรูปร่างปกติ เพื่อนำไข่ไปศึกษาในห้องทดลอง

การฟักไข่และการส่องไข่

ไข่ทดลองจะถูกนำเข้าตู้ฟักที่อุณหภูมิ 100 °F ความชื้น 60 % กลับไข่ 90 ° ทุกๆ 3 ชั่วโมง ทำประเมินการพัฒนาของตัวอ่อนโดยการส่องไข่ในวันที่ 10 และ 18 ของการฟัก เมื่อพบไข่ฟองที่ไม่มีเชื้อ และไข่ฟองที่ตัวอ่อนตายจะย้ายออกจากตู้ฟักแล้วเคาะดูการพัฒนาของตัวอ่อน ไข่ฟองที่ตัวอ่อนมีชีวิตจะทำการฟักต่อจนถึงวันที่ 18 ของการฟัก แล้วย้ายไข่ไปยังตู้เกิดที่อุณหภูมิ 96 °F ความชื้น 85 % ลูกไก่จะฟักออกในวันที่ 21 ถึง 22 ของการฟัก จากนั้นทำการบันทึกหมายเลขแล้วนำไปเลี้ยงยังโรงเรือน ณ ฟาร์มสัตว์ปีก มหาวิทยาลัยแม่โจ้

วิธีการวิจัย

1. วางแผนการทดลอง
2. หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิต chimeric chicken
3. หาสภาวะที่เหมาะสมในการแช่แข็ง blastodermal cell
4 การทดสอบ germline chimera
5 รวบรวมข้อมูลและเสนอผลงานวิจัย

วิธีการแยกเซลล์ตัวอ่อนจากไก่ตัวให้

1. วิธีการแยกเซลล์จากไข่มีเชื้อที่ยังไม่เข้าฟักและตัวอ่อนอายุ 1-2 วัน ทำตามขั้นตอนของ Petitte et al. (1990) เริ่มจากการนำไข่ มาเช็ดด้วยสำลีชุบ 70% (V/V) ethanol ทั่วทั้งฟอง เพื่อฆ่าเชื้อแล้วเคาะไข่ใส่ petridish พลิกไข่หาจุดเจริญของตัวอ่อน (blastoderm) ใช้หลอดฉีดยาพลาสติก (Nipro) ขนาด 50 มิลลิเมตร ดูดไข่ขาวออกให้หมด ใช้กระดาษกรอง (Watman) ที่ตัดเป็นวงแหวน วางลงบนตรงตำแหน่งจุดเจริญหรือตัวอ่อน ใช้กรรไกรตัดรอบๆ กระดาษกรองที่ทำเป็นรูปวงแหวน ใช้ปากคีบคีบกระดาษกรองที่ทำเป็นรูปวงแหวนขึ้นมาจากไข่แดง ใช้มีดผ่าตัดที่ฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยไข่แดงออกจาก blastoderm ให้มากที่สุด จากนั้นวางกระดาษกรองที่ทำเป็นรูปวงแหวนลงบน petridish ที่มีหยดของ phosphate buffer saline (PBS) ใช้มีดเกลี่ย blastodermal cell ออกจากกระดาษกรองที่ทำเป็นรูปวงแหวน และสับให้เซลล์ตัวอ่อนหลุดออกจากเนื้อเยื่อ
2. ใช้ auto pipette ดูดเซลล์ตัวอ่อนใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 1.5 มิลลิเมตร
3. นำเซลล์มาล้างโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที ดูดของเหลวส่วนบนทิ้งไปทำการล้างแบบเดิมด้วย PBS อีก 3 ถึง 5 รอบ จนกว่าไข่แดงที่ปนมาจะหมดไป โดยดูจากส่วนที่ตกตะกอนอยู่ข้างล้างต้องสีขาวขุ่นไม่เห็นสีเหลืองของไข่แดง จากนั้นย่อยด้วย trypsin เซลล์ตัวอ่อนอายุ 0 - 2 วันใช้ trypsin 0.025% (W/V) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อให้เซลล์ตัวอ่อนหลุดออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ
4. นำเซลล์มาล้าง trypsin ออกโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที ดูดของเหลวส่วนบนทิ้งไป ทำการล้างแบบเดิมด้วย PBS อีก 2 รอบ
5. นำเซลล์มาล้างในรอบที่ 3 ด้วย 10% FCS-DMEM โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 นาที ดูดของเหลวส่วนบนทิ้งไปเติม 10% FCS- DMEM 100 µl

6. ทำการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ โดยวิธี trypan blue exclusion เซลล์มีชีวิตไม่ติดสีแต่เซลล์ตายจะติดสี
7. ใช้ hemocytometer slide นับจำนวนเซลล์ และตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

วิธีการเปิดปิดช่องหน้าต่างบนเปลือกไข่ตัวรับ

1. นำไข่มีเชื้อที่เพิ่งออกจากแม่ไก่ตัวรับมาทำความสะอาดด้วยสำลีชุบ 70 % (v/v) ethanol
2. วางไข่บนแผงไข่ในแนวด้านข้าง จากนั้นทำเครื่องหมายสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 0.75 x 0.75 บนเปลือกไข่ตรงด้านข้างที่ตำแหน่งสูงสุด
3. ทำความสะอาดบริเวณช่องบนเปลือกไข่อีกรอบด้วย 70 % (v/v) ethanol
4. ทำความสะอาดใบมีดสำหรับการเปิดเปลือกไข่ด้วย 70 % (v/v) ethanol
5. เจาะช่องบนเปลือกไข่
6. ทำความสะอาดช่องบนเปลือกไข่ด้วย 70 % (v/v) ethanol
7. เปิดเปลือกไข่ออกในสภาวะปราศจากเชื้อ
8. ปิดช่องบนเปลือกไข่ด้วย surgical tape
9. จดบันทึกข้อมูลแล้วนำไข่เข้าตู้ฟัก
10. เมื่อทำการฟักครบ 10 และ 18 วันทำการส่องไข่เพื่อย้ายไข่ไม่มีเชื้อ และไข่ฟองที่ตัวอ่อนตายออกจากตู้ฟักแล้วนำมาเคาะดูการพัฒนาของตัวอ่อน
11. ย้ายไข่ฟองที่ตัวอ่อนพัฒนาจนครบกำหนด 18 วัน จากตู้ฟักไปยังตู้เกิด
12. วันที่ 20 – 22 ของการฟัก ลูกไก่ที่ฟักออกจะถูกบันทึกและให้หมายเลขเพื่อนำไปเลี้ยงต่อ

วิธีการฉีดเซลล์ตัวอ่อน

1. การเปิดเปลือกไข่ตัวรับทำตามวิธีข้างต้น

2. เตรียมเข็มสำหรับฉีด โดยใช้หลอดแก้วสำหรับตรวจความเข้มข้นของเลือด (microhaematocrit tube) มายืดปลายให้เล็กลงด้วยเครื่องยืด

3. ล้างเศษแก้วจากเข็มแล้วนำไป sterilize ด้วยการอบแห้ง ที่ 160 ^{0}C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

4. นำเข็มไปต่อกับ auto pipette ขนาด 10 µl ปรับปริมาตรของ auto pipette ให้ได้มากกว่าปริมาตรที่จะฉีด 1 µl

5. ใช้ไฟเย็นส่องเพื่อหาจุดเจริญในฟองไข่

6. ทำการฉีดเซลล์ เข้าไปช่องว่างภายในจุดเจริญ (subgerminal cavity)

7. ทำการปิดช่องบนเปลือกไข่ด้วยเปลือกไข่ตัดที่ฆ่าเชื้อแล้วทาทับด้วยกาว
8. ขั้นตอนการบันทึกข้อมูลและการฟักไข่ตามวิธีข้างต้น

การบันทึกข้อมูล

1. นำไข่ที่ได้รับการฉีดเซลล์มาตรวจดูการพัฒนาของตัวอ่อนหลังเข้าตู้ฟักในวันที่ 10 และ18

2 ทำการเคาะเปลือกไข่ฟองที่ตัวอ่อนไม่มีการพัฒนาของเพื่อบันทึกว่าตัวอ่อนที่ตายพัฒนาถึงวันใด

3. ทำการบันทึกไข่ที่ฟักออก ให้หมายเลขลูกไก่และติดตามผลการผสมกับไก่ไข่เพื่อตรวจการเป็น germline chimera

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ออกแบบการทดลองแบบ completely randomized design โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ซ้ำ ใช้การวิเคราะห์แบบ Analysis of Variance (ANOVA) โดยใช้โปรแกรมสถิติ SAS

วิธีการพิสูจน์ความเป็น germline chimera

1. นำไก่ที่ผ่านการฉีดเซลล์และฟักออก ไปเลี้ยงตามวิธีข้างต้น
2. เมื่อโตพอที่จะผสมได้ นำไปผสมกับไก่ไข่ นำลูกไก่ที่ได้จากการผสมตรวจดูลักษณะของไก่พื้นเมือง

วิธีการแช่แข็งเซลล์ตัวอ่อน

เติม 20% (v/v) DMSO ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ ปริมาตร 0.05 ml ลงในสารละลายเซลล์ blastoderm 0.05 ml อย่างช้าๆ จนความเข้มข้นสุดท้ายของสารแช่แข็งเท่ากับ 10% (v/v) = 1.4 M

บรรจุสารละลายที่มีเซลล์ข้างต้นลงในหลอดฟางปริมาตร 0.1 ml โดยมีปริมาณเซลล์ 200,000 เซลล์ต่อหลอด นำหลอดฟางไปทำการแช่แข็ง โดยแช่ในกล่องโฟมที่เย็นจากนั้นนำไปเก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C

เมื่อจะใช้เซลล์ก็นำมาละลายแข็ง โดยแช่หลอดเซลล์แช่แข็งในน้ำอุณหภูมิ +20°C ประมาณ 10 วินาที ทำการล้าง DMSO โดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ แล้วนำไปปั่นแยก ด้วยความเร็ว -3000 rpm เป็นเวลา 3 นาที เทสารละลายข้างบนทิ้ง นำส่วนเซลล์ที่เหลือก้นหลอดไปละลายใหม่ด้วยน้ำยาเลี้ยงเซลล์อีก 3 รอบ นำสารละลายเซลล์มาปรับความเข้มข้นตามต้องการ เพื่อเตรียมฉีดเซลล์ให้ไก่ตัวรับ

ผลของการวิจัย

1 ผลของการปิดช่องหน้าต่างแบบต่าง ๆ ต่อการฟักออกของไข่

การผลิต chimeric chicken ต้องเปิดช่องบนเปลือกไข่ตัวรับเพื่อฉีดเซลล์ไก่ตัวให้เข้าไปยังจุดเจริญ และปิดช่องที่เปิดก่อนนำไข่เข้าตู้ฟัก วิธีการเปิด-ปิดช่องบนเปลือกไข่เป็นขั้นตอนที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การฟักออกของตัวอ่อน (Petitte et al., 1990; Bednarcyk et al., 2000) การปิดช่องหน้าต่างบนเปลือกไข่มีหลายวิธีที่ใช้กัน แต่ละวิธีมีผลต่อการฟักออกของไข่ เช่นปิดโดบเปลือกไข่ตัด (Thoraval et al., 1994) cover slip (Petitte et al., 1990) และ adhesive tape (Bednarcyk et al., 2000) การทดลองนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการปิดช่องบนเปลือกไข่ เพื่อให้ตัวอ่อนมีการฟักออกสูงที่สุด สำหรับการผลิต chimeric chicken

ในการทดลองนี้ใช้ไข่มีเชื้อจากแม่พันธุ์ จำนวน 368 ฟองโดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น -3 กลุ่ม ใช้แผนการทดลองแบบ CRD ทำการเจาะหน้าต่างบนเปลือกไข่เป็นช่องสี่เหลียมจัตุรัสขนาด 0.75x 0.75 ซม. (ภาพที่ 3) แล้วปิดด้วย surgical tape ก่อนนำไปฟักต่อไป เพื่อทำการเปรียบเทียบผลของการปิดช่องหน้าต่างต่อการอยู่รอดของตัวอ่อนแบบต่างๆ 3 แบบ คือ

window I คือ เปิดเปลือกไข่แล้วปิดด้วย surgical tape 1 ชั้น

window II คือ เปิดเปลือกไข่แล้วปิดด้วย surgical tape 2 ชั้น

window III คือ เปิดเปลือกไข่แล้วเติม 10% FCS-DMEM จนเต็มฟองไข่ หลังจากนั้นปิดหน้าต่างด้วย surgical tape 1ชั้น

ภาพที่ 3 แสดงช่องบนเปลือกไข่

จากผลการทดลองได้ผลดังตารางที่ 2 และตารางที่ 3 พบว่า การปิดหน้าต่าง แบบที่ 3 ให้เปอร์เซนต์การฟักออกสูงถึง 53.28 เปอร์เซ็นต์ เป็นเปอร์เซนต์การฟักออกดีที่สุดและแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบอัตราการตายของตัวอ่อนต่อตัวอ่อนทั้งหมดในแต่ละช่วง และในทุกกลุ่มทดลองพบว่ามีความแตกต่างกันเล็กน้อยโดยไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ(ตารางที่ 3) เมื่อดูการตายของตัวอ่อนในแต่ละวัน พบว่ามีการตายสูงในช่วงวันที่ 7, 12 และ 18 โดยการเปิดหน้าต่างแบบที่ 3 มีการตายต่ำกว่าแบบที่ 1 และ 2 ตลอดมาในทุกวันของการพัฒนาการยกเว้นในวันที่ 18 และ 20 ซึ่งอัตราการของตัวอ่อนที่เปิดหน้าต่าง โดยวิธีที่ 3 นี้มีอัตราสูงกว่าวิธีที่ 1 และ 2 แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 4, ตารางที่ 5 และ กราฟที่ 1) สาเหตุที่การตายของตัวอ่อนที่ปิดช่องหน้าต่างโดยวิธีที่ 3 ซึ่งมีการเติม medium ลงในไข่ก่อนทำการปิดช่องหน้าต่างอาจเนื่องมาจากการที่ในสภาวะปกติไข่จะมีเปลือกไข่ และเยื่อหุ้มไข่ขาวที่ทำหน้าที่ป้องกันไข่ และป้องกันการสูญเสียน้ำจากฟองไข่ แต่การเปิดช่องดังกล่าวทำให้เกิดการฉีกขาดของเยื่อดังกล่าว ทำให้เกิดการสูญเสียน้ำของตัวอ่อน เมื่อทำการเติม medium ลงในฟองไข่ทำให้ลดปัญหานี้ลงได้ตัวอ่อนจึงมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนและอัตราการตาย และการฟักออกของไข่ที่ทำการปิดช่องหน้าต่างแบบต่างๆ

		จำนวนการอยู่รอดของตัวอ่อน ที่อายุการฟักต่างๆ							
		Day 0-10		Day 11-19		Day 20-22		hatch	
Treatment	Total(n)	n	(%*)	n	(%*)	n	(%*)	n	(%*)
Window I	68	31	(45.31)	19	(28.30)	2	(2.95)	16	(23.44)
Window II	162	44	(27.09)	59	(36.52)	18	(11.13)	41	(25.26)
Window III	138	19	(13.76)	36	(25.76)	10	(7.20)	73	(53.28)

* คำนวณจากจำนวนตัวอ่อนที่ตายในช่วงนี้ต่อตัวอ่อนทั้งหมดนกลุ่มนั้นๆ

ตารางที่ 3 ตารางแสดงเปรียบเทียบผลการปิดช่องบนเปลือกไข่ ต่ออัตราการตายของตัวอ่อน

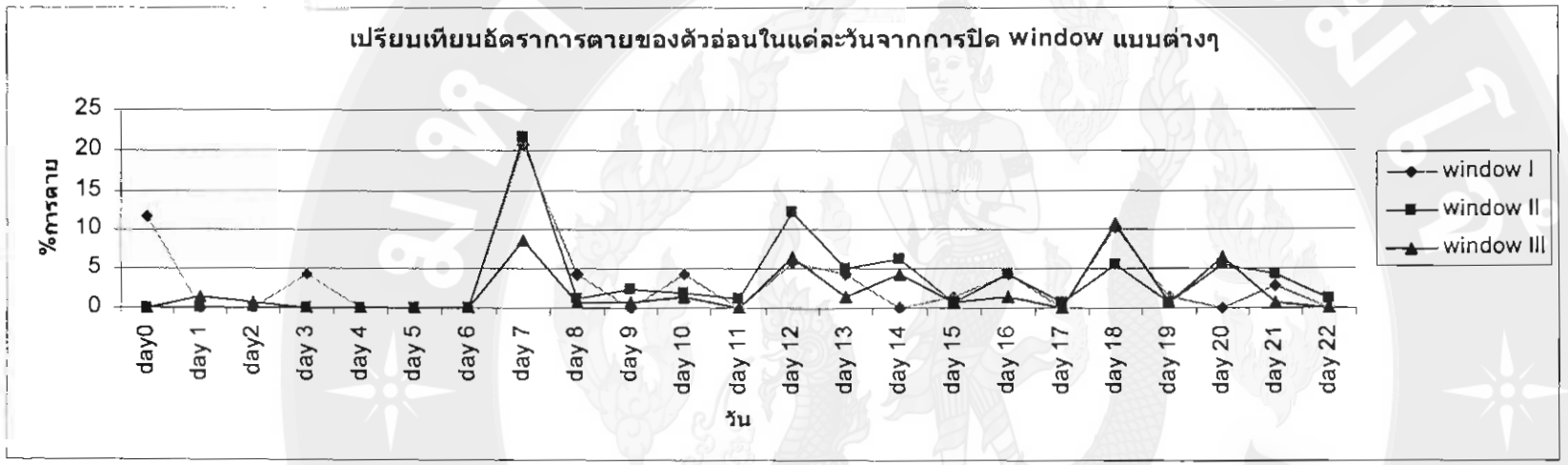
วิธีการปิดหน้าต่าง	อายุการฟัก		ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ค่าเฉลี่ยการตาย (%)
Window I	0-10	T1	40.63	50.00	45.31^{ab}
	11-19	T2	34.38	22.22	28.30^{cd}
	20-22	T3	3.13	2.78	2.95^{f}
	hatch	T4	21.88	25.00	23.44^{cde}
Window II	0-10	T5	21.25	32.93	27.09^{cde}
	11-19	T6	45.00	28.05	36.52^{bc}
	20-22	T7	12.50	9.76	11.13^{ef}
	hatch	T8	21.25	29.27	25.26^{cde}
Window III	0-10	T9	13.89	13.64	13.76^{def}
	11-19	T10	33.33	18.18	25.76^{cde}
	20-22	T11	8.33	6.06	7.20^{f}
	hatch	T12	44.44	62.12	53.28^{a}
Significant	Treatment	CV.			
	**	29.31			

ตารางที่ 4 แสดงอัตราการตายของตัวอ่อนในแต่ละวันของการปิดหน้าต่างแบบต่างๆ

วิธีการปิดหน้าต่าง	n	day0	day 1	day2	day 3	day 4	day 5	day 6	day 7	day 8	day 9	day 10	day 11
Window I	68	11.8	0	0	4.41	0	0	0	20.6	4.41	0	4.41	0
Window II	162	0	0	0	0	0	0	0	21.6	1.23	2.47	1.85	1.23
Window III	138	0	1.449	0.72	0	0	0	0	8.7	0.72	0.72	1.45	0

วิธีการปิดหน้าต่าง	n	day 12	day 13	day 14	day 15	day 16	day 17	day 18	day 19	day 20	day 21	day 22	hatch
Window I	68	5.88	4.41	0	1.47	4.41	0	10.3	1.47	0	2.94	0	23.5
Window II	162	12.3	4.94	6.17	0.62	4.32	0.62	5.56	0.62	5.56	4.32	1.23	25.3
Window III	138	6.52	1.45	4.35	0.72	1.45	0	10.9	0.72	6.52	0.72	0	52.9

กราฟที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบอัตราการตายของตัวอ่อนในแต่ละวันจากการเปิด ปิดหน้าต่างแบบต่างๆ



ตารางที่ 5 แสดงอัตาการตายของตัวอ่อนในแต่ละวันของการปิดหน้าต่างแบบต่างๆ โดยการวิเคราะห์ทางสถิติ

วิธีการปิดหน้าต่าง	อายุการฟัก (วัน)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ค่าเฉลี่ยของการตาย(%)
Window I	0	9.38	13.89	11.63^{cd}
	1	0.00	0.00	0.00^{i}
	2	0.00	0.00	0.00^{i}
	3	0.00	8.33	4.17^{ghi}
	4	0.00	0.00	0.00^{i}
	5	0.00	0.00	0.00^{i}
	6	0.00	0.00	0.00^{i}
	7	15.63	25.00	20.31^{b}
	8	9.38	0.00	4.69^{efghi}
	9	0.00	0.00	0.00^{i}
	10	6.25	2.78	$4.^{51efghi}$
	11	0.00	0.00	0.00^{i}
	12	9.38	2.78	6.08^{defghi}
	13	0.00	8.33	4.17^{ghi}
	14	0.00	0.00	0.00^{i}
	15	3.13	0.00	1.56^{hi}
	16	3.13	5.56	4.34^{fghi}
	17	0.00	0.00	0.00^{i}
	18	15.63	5.56	10.59^{cde}
	19	3.13	0.00	1.56^{hi}
	20	0.00	0.00	0.00^{i}
	21	3.13	2.78	2.95^{ghi}
	22	0.00	0.00	0.00^{i}
	23	21.88	25.00	23.44^{b}
Window II	0	0.00	0.00	0.00^{i}

ตารางที่ 5 แสดงอัตาการตายของตัวอ่อนในแต่ละวันของการปิดหน้าต่างแบบต่างๆ โดยการวิเคราะห์ทางสถิติ

วิธีการปิดหน้าต่าง	อายุการฟัก (วัน)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ค่าเฉลี่ยของการตาย(%)
	1	0.00	0.00	0.00 ^{i}
	2	0.00	0.00	0.00 ^{i}
	3	0.00	0.00	0.00 ^{i}
	4	0.00	0.00	0.00 ^{i}
	5	0.00	0.00	0.00 ^{i}
	6	0.00	0.00	0.00 ^{i}
	7	18.75	24.39	21.57 ^{b}
	8	0.00	2.44	1.22 ^{hi}
	9	1.25	3.66	2.45 ^{hi}
	10	1.25	2.44	1.84 ^{hi}
	11	1.25	1.22	1.23 ^{hi}
	12	17.50	7.32	12.41 ^{c}
	13	6.25	3.66	4.95 ^{efghi}
	14	7.50	4.88	6.19 ^{defghi}
	15	1.25	0.00	0.63 ^{hi}
	16	5.00	3.66	4.33 ^{ghi}
	17	0.00	1.22	0.61 ^{hi}
	18	6.25	4.88	5.56 ^{defghi}
	19	0.00	1.22	0.61 ^{hi}
	20	7.50	3.66	5.58 ^{defghi}
	21	2.50	6.10	4.30 ^{ghi}
	22	2.50	0.00	1.25 ^{hi}
	23	21.25	29.27	25.26 ^{b}
Window III	0	0.00	0.00	0.00 ^{i}
	1	2.78	0.00	1.39 ^{hi}

ตารางที่ 5 แสดงอัตาการตายของตัวอ่อนในแต่ละวันของการปิดหน้าต่างแบบต่างๆ โดยการวิเคราะห์ทางสถิติ

วิธีการปิดหน้าต่าง	อายุการฟัก (วัน)	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ค่าเฉลี่ยของการตาย(%)
	2	0.00	1.52	0.76 ^{hi}
	3	0.00	0.00	0.00 ^{i}
	4	0.00	0.00	0.00 ^{i}
	5	0.00	0.00	0.00 ^{i}
	6	0.00	0.00	0.00 ^{i}
	7	8.33	9.09	8.71 ^{cdefg}
	8	1.39	0.00	0.69 ^{hi}
	9	1.39	0.00	0.69 ^{hi}
	10	0.00	3.03	1.52 ^{hi}
	11	0.00	0.00	0.00 ^{i}
	12	8.33	4.55	6.44 ^{cdefgh}
	13	1.39	1.52	1.45 ^{hi}
	14	4.17	4.55	4.36 ^{fghi}
	15	0.00	1.52	0.76 ^{hi}
	16	1.39	1.52	1.45 ^{hi}
	17	0.00	0.00	0.00 ^{i}
	18	18.06	3.03	10.54 ^{cdef}
	19	0.00	1.52	0.76 ^{hi}
	20	8.33	4.55	6.44 ^{cdefgh}
	21	0.00	1.52	0.76 ^{hi}
	22	0.00	0.00	0.00 ^{i}
	23	44.44	62.12	53.28 ^{a}
significant	Treatment			
	**			

ตัวอักษรยกกำลังในสดมภ์เดียวกันที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

2 **การศึกษาปริมาณ** ES cell **ที่เหมาะสมในการฉีดเพื่อให้เกิด** germline chimera

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการศึกษาจำนวนเซลล์ที่เหมาะสมเพื่อฉีดเข้าไปยังจุดเจริญของตัวรับ และทำให้เกิด germline chimera โดยฉีดเซลล์ตัวอ่อนของตัวให้เข้าไปยังจุดเจริญของไข่ตัวรับ ในการทดลองนี้ใช้ไข่มีเชื้อจากแม่ตัวรับ จำนวน 1,278 ฟองโดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 7 กลุ่ม กลุ่มละ 2 ซ้ำ (ตารางที่ 6) ดังนี้

กลุ่มควบคุม ไม่เจาะช่องบนเปลือก

กลุ่มเปิดช่องหน้าต่างไม่ฉีดเซลล์ เจาะช่องบนเปลือกแต่ไม่ฉีดเซลล์

กลุ่มฉีด 5000 ฉีดเซลล์จากตัวให้จำนวน 5000 เซลล์

กลุ่มฉีด 10000 ฉีดเซลล์จากตัวให้จำนวน 10000 เซลล์

กลุ่มฉีด 15000 ฉีดเซลล์จากตัวให้จำนวน 15000 เซลล์

กลุ่มฉีด 20000 ฉีดเซลล์จากตัวให้จำนวน 20000 เซลล์

กลุ่มฉีดเซลล์แช่แข็ง ฉีดเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งจำนวน 5000 เซลล์

ทำการแยก Embryonic stem cells จากไข่ตัวให้ ระยะ Stage X และปรับความเข้มข้นของเซลล์ที่ด้วย FCS-DMEM medium ให้ได้ตามต้องการในปริมาตรขนาด 3 μl ก่อนนำไปฉีด

เปิดช่องหน้าต่างบนเปลือกไข่ตัวรับ (window) บริเวณกลางฟองขนาด 0.75 cmX0.75 cm ใช้เข็มฉีด Medium ที่มีจำนวนเซลล์ตามต้องการในปริมาณ 3μl ที่บริเวณ subgerminal cavity ปิดช่องหน้าต่างด้วย surgical tape ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำไข่เข้าตู้ฟักที่มีอากาศไหลเวียนที่อุณหภูมิ 37.7 °C และมีความชื้นสัมพัทธ์ 50% กลับไข่ทุก ๆ 3 ชั่วโมง เป็นเวลา 19 วัน ย้ายไข่ไปตู้เกิดที่อุณหภูมิ 37 C และมีความชื้น 85% จนกระทั่งลูกไก่ฟักออก การตรวจ Chimeric chicken ทำได้โดยสังเกตดูสีขน นำไก่ที่ฟักออกไปเลี้ยงจนโตพอที่จะผสมได้นำผสมกับไก่ไข่เพื่อตรวจการเป็น germline chimera

จากการทดลองฉีดเซลล์ไก่ตัวให้เข้าในไก่ตัวรับเพื่อผลิต chimeric chicken ในการทดลองนี้ควบคุมสภาวะของการฟักโดยใช้ไข่ปกติที่ไม่ได้เจาะช่องหน้าต่าง พบว่ามีอัตราการฟักออกเท่ากับ 97.55% แสดงถึงสภาวะการฟักที่เหมาะสมดี ใช้ไข่ตัวรับเจาะช่องหน้าต่างแต่ไม่ได้ฉีดเซลล์เพื่อควบคุมสภาวะการเจาะช่องหน้าต่างพบว่ามีอัตราการฟักออกเท่ากับ 50.3% จัดว่าอยู่ในเกณฑ์ที่ดี ผลการฉีดเซลล์ในระดับต่างๆ เข้าในตัวอ่อนของไข่ตัวรับพบว่า การฉีดเซลล์ขนาด 5000 และ 10000 เซลล์ ในไข่ 329 และ 127 ฟอง ได้ไก่ที่ฟักออกเป็นตัวเท่ากับ 10 ตัว และ 3 ตัว ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการฟักออกเท่ากับ 3.04% และ 2.36 % ตามลำดับ ไม่มีไก่ที่ฟักออกจากการฉีดเซลล์ขนาด 15000 และ 20000 เลย และการฉีดเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งมีไก่การฟักออก 8 ตัว คิดเป็น 2.74%

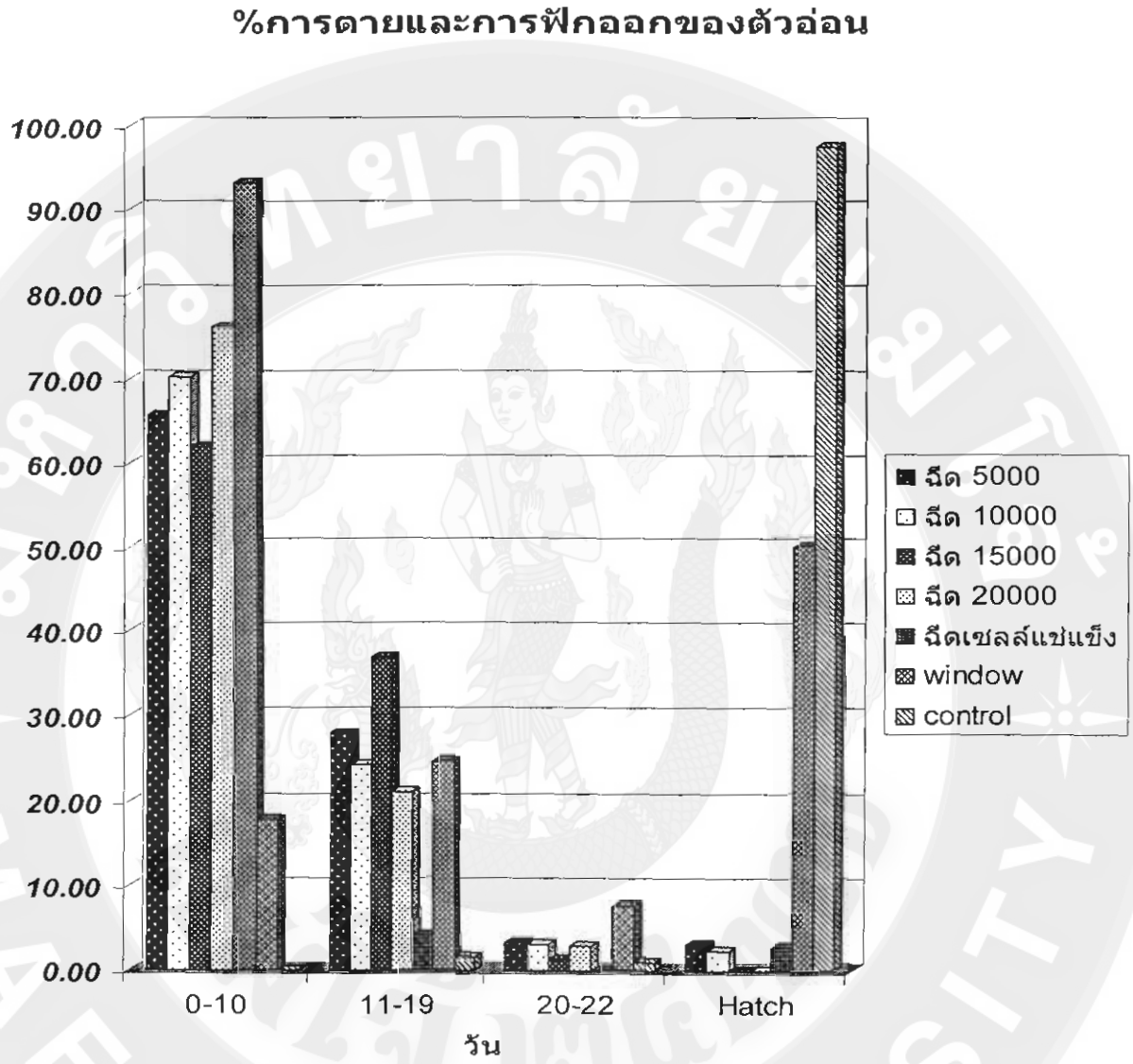
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้

(ตารางที่ 6 และ กราฟที่ 2) แต่เมื่อคำนวณค่าทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติของไก่ที่ฟักออกจากแต่ละกลุ่มที่ฉีดเซลล์ และอัตราการฟักออกนี้ต่างจากกลุ่มที่เปิดช่องหน้าต่างเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 7) แสดงว่าการฉีดเซลล์ขนาด 5000-20000 เซลล์เข้าไปยัง subgerminal cavity มีผลกระทบต่อตัวอ่อนทั้งสิ้น อย่างไรก็ตาม พบว่าไก่ส่วนใหญ่ตายในระยะแรกของการฟักไม่ว่าฉีดเซลล์ขนาดใดก็ตาม แต่เมื่อคำนวณอัตราการตายของแต่ละช่วงของการฟัก โดยคำนวณจากจำนวนที่เหลือในแต่ละช่วง พบว่าไก่ที่ได้รับการฉีดเซลล์สดทุกขนาด อัตราการตายสูงในทุกระยะของการฟัก ส่วนไก่ที่ได้รับการฉีดด้วยเซลล์แช่แข็ง พบว่าอัตราการตายสูงที่สุดอยู่ในระยะ 0-10 วันของการฟัก และสูงกว่าระยะอื่นในกลุ่มเดียวกันอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 8 และ ตารางที่ 9) แม้จะมีอัตราการตายสูงมากในช่วงแรกแต่ตัวอ่อนที่รอดมาพบว่าอัตราการตายจะลดลงมาก และพบว่าอัตราการฟักออกของตัวอ่อนเท่าๆกับไก่ที่ได้รับการฉีดเซลล์ 5000 เซลล์ และ 10000 เซลล์

ตารางที่ 6 การพัฒนาการของไก่จากการฉีดเซลล์ปริมาณต่างๆกันและการฉีดเซลล์แช่แข็ง

		จำนวนการอยู่รอดของตัวอ่อน ที่อายุการฟักต่าง ๆ							
		Day 0-10		Day 11-19		Day 20-22		hatch	
ปริมาณเซลล์ตัวอ่อนที่ฉีด	total (ตัว)	(ตัว)	%*	(ตัว)	%*	(ตัว)	%*	Hatch (ตัว)	%*
ฉีด 5000 เซลล์	329	216	65.6	92	27.9	11	3.4	10	3.0
ฉีด 10000 เซลล์	127	89	70.1	31	24.5	4	3.2	3	2.27
ฉีด 15000เซลล์	76	47	61.9	28	36.9	1	1.3	0	0.0
ฉีด 20000 เซลล์	104	79	75.9	22	21.2	3	2.9	0	0.0
ฉีดเซลล์แช่แข็ง	292	272	93.6	12	3.7.	0	0.0	8	2.7
เปิดช่องหน้าต่างไม่ฉีดเซลล์	146	26	17.4	36	24.7	11	7.7	73	50.3
กลุ่มควบคุม	204	0	0.0	3	1.5	2	1.0	199	97.5

* คำนวณจากการตายของตัวอ่อนในช่วงนี้เมื่อเทียบกับจำนวนของตัวอ่อนทั้งหมดในกลุ่มนั้นๆ



กราฟที่ 2 แสดงเปอร์เซ็นต์การตายและการการฟักออกของไก่ที่ได้รับการฉีดเซลล์ปริมาณต่างๆ

ตารางที่ 7 การพัฒนาการของไก่จากการฉีดเซลล์ปริมาณต่างๆกันและการฉีดเซลล์แซ่แข็ง

ปริมาณเซลล์ที่ฉีด (เซลล์)	เวลาการฟัก	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ค่าเฉลี่ย%การตายและการฟักออก
	0-10	64.78	66.47	65.63^{cd}
ฉีด 5000	11-19	27.04	28.82	27.93^{g}
	20-22	5.03	1.76	3.40^{ijk}
	hatch	3.14	2.94	3.04^{ijk}
ฉีด 10000	0-10	70.49	69.70	70.09^{c}
	11-19	26.23	22.73	24.48^{gh}
	20-22	3.28	3.03	3.15^{ijk}
	hatch	0.00	4.55	2.27^{ijk}
ฉีด 15000	0-10	62.16	61.54	61.85^{d}
	11-19	37.84	35.90	36.87^{f}
	20-22	0.00	2.56	1.28^{k}
	hatch	0.00	0.00	0.00^{k}
ฉีด 20000	0-10	72.55	79.25	75.90^{b}
	11-19	23.53	18.87	21.20^{hi}
	20-22	3.92	1.89	2.90^{ijk}
	hatch	0.00	0.00	0.00^{k}
ฉีดเซลล์แซ่แข็ง	0-10	91.53	95.65	93.59^{a}
	11-19	5.65	1.74	3.69^{ijk}
	20-22	0.00	0.00	0.00^{k}
	hatch	2.82	2.61	2.72^{ijk}
กลุ่มเปิดช่องหน้าต่างไม่ฉีดเซลล์	0-10	22.78	11.94	17.36^{l}
	11-19	24.05	25.37	24.71^{gh}
	20-22	6.33	8.96	7.64^{l}
	hatch	46.84	53.73	50.28^{e}
Significant	Treatment	CV.		
	**	10.61		

ตัวอักษรยกกำลังในสดมภ์เดียวกันที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 8 แสดงอัตราการตายของตัวอ่อนในระยะฟักต่างๆ เทียบกับจำนวนตัวอ่อนที่เหลืออยู่ในแต่ละช่วง และอัตราการฟักออกของไก่เมื่อเทียบกับจำนวนที่ทดลองทั้งกลุ่ม

		เปรียบเทียบอัตราการตายในช่วงต่าง ๆ (%)			
ปริมาณเซลล์ที่ฉีด (เซลล์)	n (ตัว)	Day 1-10 *	Day 11-19*	Day 20-22*	Hatch **
ฉีด 5000	329	65.6	81.4	52.4	3.0
ฉีด 10000	127	70.1	81.6	57.1	2.27
ฉีด 15000	76	61.9	96.6	100.0	0.0
ฉีด 20000	104	75.9	88.0	100.0	0.0
ฉีดเซลล์แช่แข็ง	292	93.2	60.0	62.5	2.7
กลุ่มเปิดช่องหน้าต่างไม่ฉีดเซลล์	146	17.4	30.0	13.1	50.3
กลุ่มควบคุม	204	0.0	1.5	1.0	97.5

* คำนวณจากการตายของตัวอ่อนในช่วงนี้เมื่อเทียบกับจำนวนของตัวอ่อนที่เหลือ หลังจากลบตัวอ่อนที่ตายในช่วงก่อนหน้านี้แล้ว

** คำนวณจากการตายของตัวอ่อนในช่วงนี้เมื่อเทียบกับจำนวนของตัวอ่อนทั้งหมดในกลุ่มนั้นๆ

ตารางที่ 9 แสดงอัตราการตายของตัวอ่อนในระยะฟักต่างๆ เทียบกับจำนวนตัวอ่อนที่เหลืออยู่ในแต่ละช่วง และอัตราการฟักออกของไก่เมื่อเทียบกับจำนวนที่ทดลองทั้งกลุ่ม

Treatment	อายุไข่ฟัก	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	%การตายและการฟักออก
ฉีด 5000	0-10	64.78	66.47	65.63^{abcde}
	11-19	76.79	85.96	81.38^{abcd}
	20-22	61.54	37.50	49.52^{defg}
	hatch	3.14	2.94	3.04^{h}
ฉีด 10000	0-10	70.49	69.70	70.09^{abcd}
	11-19	88.89	75.00	81.94^{abcd}
	20-22	100.00	40.00	70.00^{abcd}
	hatch	0.00	4.55	2.27^{h}
ฉีด 15000	0-10	62.16	61.54	61.85^{bcde}
	11-19	100.00	93.33	96.67^{ab}
	20-22	0.00	100.00	50.00^{defg}
	hatch	0.00	0.00	0.00^{h}
ฉีด 20000	0-10	72.55	79.25	75.90^{abcd}
	11-19	85.71	90.91	88.31^{abc}
	20-22	100.00	100.00	100.00^{a}
	hatch	0.00	0.00	0.00^{h}
ฉีดเซลล์แซ่แข็ง	0-10	91.53	95.65	93.59^{ab}
	11-19	66.67	40.00	53.33^{cdef}
	20-22	0.00	0.00	0.00^{h}
	hatch	2.82	2.61	2.72^{h}
กลุ่มเปิดช่องหน้าต่างไม่ฉีดเซลล์	0-10	22.78	11.94	17.36^{fgh}
	11-19	31.15	28.81	29.98^{efgh}
	20-22	11.90	14.29	13.10^{gh}
	hatch	46.84	53.73	50.28^{def}
Significant	Treatment	CV.		
	**	37.28		

ตัวอักษรยกกำลังในสดมภ์เดียวกันที่เหมือนกันไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

การตายของตัวอ่อนสูงในช่วงต่างๆของการฟัก อาจเนื่องมาจากเซลล์ใน blastoderm ของตัวรับถูกรบกวนการจัดเรียงตัว ในระยะแรกของการพัฒนาการของตัวอ่อน และผลจากการเปิดช่องหน้าต่างร่วมกัน เนื่องจากกลุ่มที่เปิดหน้าต่างอย่างเดียวแต่ไม่ได้ฉีดเซลล์มีการตายถึง 17.40% และไม่พบมีตัวอ่อนตายในกลุ่มควบคุมไม่ได้เปิดหน้าต่างเลย (ตารางที่ 8) ส่วนการฉีดด้วยเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็ง 5000 เซลล์เมื่อเทียบกับการฉีดด้ยเซลล์สด 5000 เซลล์ พบว่ามีอัตราการตายสูงตลอด 0-22 วัน แต่ฉีดเซลล์แช่แข็ง อัตราการตายสูงในช่วง 0-10 วัน(ตารางที่ 9) และเมื่อดูรายละเอียดในการตายในแต่ละวันพบว่าตายในวันที่ 2 ของการฟักสูงกว่าช่วงอื่นในทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 10, ตารางที่ 11 และ ตารางที่ 12) ซึ่งการตายของตัวอ่อนในช่วงนี้สูงที่สุด เมื่อเทียบกับกลุ่มต่างๆอาจเนื่องมาจากผลของการแช่แข็งเซลล์

เมื่อประเมินการตายของตัวอ่อนในแต่ละวันพบว่าในแทบทุกกลุ่มทดลองมีการตายของตัวอ่อนค่อนข้างสูงในช่วงวันที่ 1-2, 7, 12, 16,18 และวันที่ 20 ของการฟักซึ่งไม่พบลักษณะนี้ในกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 12 และ กราฟที่ 3) และผลคล้ายกับการตายของตัวอ่อนในการทดลองปิดหน้าต่างแบบต่างๆ การที่อัตราการตายในแต่ละวันสูงในช่วงดังกล่าว อาจเป็นไปได้ว่าเป็นผลมาจากการเปิดหน้าต่างบนเปลือกไข่และการรบกวนการพัฒนาการของตัวอ่อนจากการฉีดเซลล์ และเป็นช่วงที่ตัวอ่อนมีการพัฒนาการที่สำคัญ อ่อนไหว ไวต่อการกระตุ้น และการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมต่างๆ

ตารางที่ 10 แสดงจำนวนไก่ที่ตายในวันต่างๆของการฟัก ของทุกกลุ่มที่ได้รับการฉีดเซลล์สดและเซลล์แช่แข็ง

จำนวนเซลล์ที่ฉีด	n-uf	day0	day 1	day2	day 3	day 4	day 5	day 6	day 7	day 8	day 9	day 10	day 11
ฉีด 5000	329	13	42	53	21	3	22	6	34	3	3	16	1
ฉีด 10000	127	16	11	8	3	0	9	1	33	3	0	5	2
ฉีด 15000	76	11	3	3	1	0	2	0	20	1	0	6	2
ฉีด 20000	104	11	10	10	9	1	8	0	15	4	0	11	1
ฉีดเซลล์เซลล์แช่แข็ง	292	0	80	107	42	18	6	3	12	1	0	3	1
กลุ่มเปิดช่องหน้าต่างไม่ฉีดเซลล์	368	1	2	1	0	0	0	0	17	0	1	4	0
กลุ่มควบคุม	204	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

จำนวนเซลล์ที่ฉีด	n-uf	day12	day13	day14	day15	day16	day17	day18	day19	day20	day21	day22	hatch
ฉีด 5000	329	27	3	11	9	25	3	12	1	10	0	1	10
ฉีด 10000	127	7	4	1	2	6	2	7	0	4	0	0	3
ฉีด 15000	76	7	0	1	6	3	2	7	0	1	0	0	0
ฉีด 20000	104	10	1	3	3	1	1	2	0	1	2	0	0
ฉีดเซลล์เซลล์แช่แข็ง	292	4	2	1	0	2	0	2	0	0	0	0	8
กลุ่มเปิดช่องหน้าต่างไม่ฉีดเซลล์	368	5	3	4	3	5	0	16	1	7	2	1	73
กลุ่มควบคุม	204	0	0	1	0	0	0	2	0	2	0	0	199

ตารางที่ 11 แสดงเปอร์เซนต์ไก่ที่ตายในวันต่างๆของการฟัก ของทุกกลุ่มที่ได้รับการฉีดเซลล์สดและเซลล์แช่แข็ง

จำนวนเซลล์ที่ฉีด	n-uf	day0	day 1	day2	day 3	day 4	day 5	day 6	day 7	day 8	day 9	day 10	day 11
ฉีด 5000	329	3.95	12.77	16.11	6.38	0.91	6.69	1.82	10.33	0.91	0.91	4.86	0.30
ฉีด 10000	127	12.60	8.66	6.30	2.36	0.00	7.09	0.79	25.98	2.36	0.00	3.94	1.57
ฉีด 15000	76	14.47	3.95	3.95	1.32	0.00	2.63	0.00	26.32	1.32	0.00	7.89	2.63
ฉีด 20000	104	10.58	9.62	9.62	8.65	0.96	7.69	0.00	14.42	3.85	0.00	10.58	0.96
ฉีดเซลล์เซลล์แช่แข็ง	292	0.00	27.40	36.64	14.38	6.16	2.05	1.03	4.11	0.34	0.00	1.03	0.34
กลุ่มเปิดช่องหน้าต่างไม่ฉีดเซลล์	146	0.68	1.37	0.68	0.00	0.00	0.00	0.00	11.64	0.00	0.68	2.74	0.00
กลุ่มควบคุม	204	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

จำนวนเซลล์ที่ฉีด	n-uf	day12	day13	day14	day15	day16	day17	day18	day19	day20	day21	day22	hatch
ฉีด 5000	329	8.21	0.91	3.34	2.74	7.60	0.91	3.65	0.30	3.04	0.00	0.30	3.04
ฉีด 10000	127	5.51	3.15	0.79	1.57	4.72	1.57	5.51	0.00	3.15	0.00	0.00	2.36
ฉีด 15000	76	9.21	0.00	1.32	7.89	3.95	2.63	9.21	0.00	1.32	0.00	0.00	0.00
ฉีด 20000	104	9.62	0.96	2.88	2.88	0.96	0.96	1.92	0.00	0.96	1.92	0.00	0.00
ฉีดเซลล์เซลล์แช่แข็ง	292	1.37	0.68	0.34	0.00	0.68	0.00	0.68	0.00	0.00	0.00	0.00	2.74
กลุ่มเปิดช่องหน้าต่างไม่ฉีดเซลล์	146	3.42	2.05	2.74	2.05	3.42	0.00	10.96	0.68	4.79	1.37	0.68	50.00
กลุ่มควบคุม	204	0.00	0.00	0.49	0.00	0.00	0.00	0.98	0.00	0.98	0.00	0.00	97.55

ตารางที่ 12 แสดงเปอร์เซนต์ไก่ที่ตายในวันต่างๆของการฟัก ของกลุ่มที่ได้รับการฉีดเซลล์สดและเซลล์แช่แข็ง

ขนาดเซลล์ที่ฉีด	วันของการฟัก	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ค่าเฉลี่ย%การตาย
ฉีด 5000	0	8	5	$6.5^{ijklmnop}$
	1	20	22	21^{cd}
	2	23	30	26.5^{3}
	3	8	13	10.5^{ghij}
	4	0	3	1.5^{pqr}
	5	11	11	$11^{(ghi}$
	6	2	4	3^{mnopqr}
	7	18	16	17^{de}
	8	2	1	1.5^{pqr}
	9	1	2	1.5^{pqr}
	10	10	6	$8^{ghijklmn}$
	11	1	0	0.5^{qr}
	12	15	12	13.5^{efg}
	13	0	3	1.5^{pqr}
	14	5	6	$5.5^{ijklmnopqr}$
	15	4	5	$4.5^{klmnopqr}$
	16	10	15	12.5^{efgh}
	17	1	2	1.5^{pqr}
	18	7	5	$6^{ijklmnopq}$
	19	0	1	0.5^{qr}
	20	7	3	$5^{jklmnopqr}$
	21	0	0	0^{r}
	22	1	0	0.5^{qr}
	23	5	5	$5^{jklmnopqr}$
ฉีด 10000	0	6	10	$8^{ghijklmn}$
	1	5	6	$5.5^{ijklmnopqr}$
	2	4	4	$4^{lmnopqr}$
	3	2	1	1.5^{pqr}
	4	0	0	0^{r}
	5	4	5	$4.5^{klmnopqr}$
	6	0	1	0.5^{qr}
	7	17	16	16.5^{def}
	8	3	0	1.5^{pqr}
	9	0	0	0^{r}
	10	2	3	2.5^{nopqr}

ตารางที่ 12 แสดงเปอร์เซนต์ไก่ที่ตายในวันต่างๆของการฟัก ของกลุ่มที่ได้รับการฉีดเซลล์สดและเซลล์แช่แข็ง

ขนาดเซลล์ที่ฉีด	วันของการฟัก	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ค่าเฉลี่ย%การตาย
	11	0	2	1^{pqr}
	12	5	2	3.5^{lmnopq}
	13	2	2	2^{opqr}
	14	1	0	0.5^{qr}
	15	1	1	1^{pqr}
	16	2	4	3^{mnopqr}
	17	2	0	1^{pqr}
	18	3	4	3.5
	19	0	0	0^{r}
	20	2	2	2^{opqr}
	21	0	0	0^{r}
	22	0	0	0^{r}
	23	0	3	1.5^{pqr}
ฉีด 15000	0	7	4	$5.5^{ijklmnopqr}$
	1	2	1	1.5^{pqr}
	2	2	1	1.5^{pqr}
	3	1	0	0.5^{qr}
	4	0	0	0^{r}
	5	1	1	1^{pqr}
	6	0	0	0^{r}
	7	10	10	10^{ghijk}
	8	0	1	0.5^{qr}
	9	0	0	0^{r}
	10	0	6	3^{mnopqr}
	11	1	1	1^{pqr}
	12	4	3	$3.5^{lmnopqr}$
	13	0	0	0^{r}
	14	1	0	0.5^{qr}
	15	3	3	3^{mnopqr}
	16	1	2	1.5^{pqr}
	17	1	1	1^{pqr}
	18	3	4	$3.5^{lmnopqr}$
	19	0	0	0^{r}
	20	0	1	0.5^{qr}
	21	0	0	0^{r}

ตารางที่ 12 แสดงเปอร์เซนต์ไก่ที่ตายในวันต่างๆของการฟัก ของกลุ่มที่ได้รับการฉีดเซลล์สดและเซลล์แช่แข็ง

ขนาดเซลล์ที่ฉีด	วันของการฟัก	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ค่าเฉลี่ย%การตาย
	22	0	0	0^{r}
	23	0	0	0^{r}
ฉีด 20000	0	4	7	$5.5^{ijklmnopqr}$
	1	4	6	$5^{jklmnopqr}$
	2	7	3	$5^{jklmnopqr}$
	3	6	3	$4.5^{klmnopqr}$
	4	0	1	0.5^{qr}
	5	3	5	$4^{lmnopqr}$
	6	0	0	0^{r}
	7	8	7	$7.5^{hijklmno}$
	8	0	4	2^{opqr}
	9	0	0	0^{r}
	10	5	6	$5.5^{jklmnopqr}$
	11	0	1	0.5^{qr}
	12	8	2	$5^{jklmnopqr}$
	13	0	1	0.5^{qr}
	14	0	3	1.5^{pqr}
	15	2	1	1.5^{pqr}
	16	1	0	0.5^{qr}
	17	0	1	0.5^{qr}
	18	1	1	1^{pqr}
	19	0	0	0^{r}
	20	1	0	0.5^{qr}
	21	1	1	1^{pqr}
	22	0	0	0^{r}
	23	0	0	0^{r}
ฉีดเซลล์แช่แข็ง	0	0	0	0^{r}
	1	46	34	40^{b}
	2	72	35	53.5^{a}
	3	26	16	21^{cd}
	4	2	16	9^{ghijkl}
	5	5	1	3^{mnopqr}
	6	2	1	1.5^{pqr}
	7	7	5	$6^{ijklmnopq}$
	8	0	1	0.5^{qr}

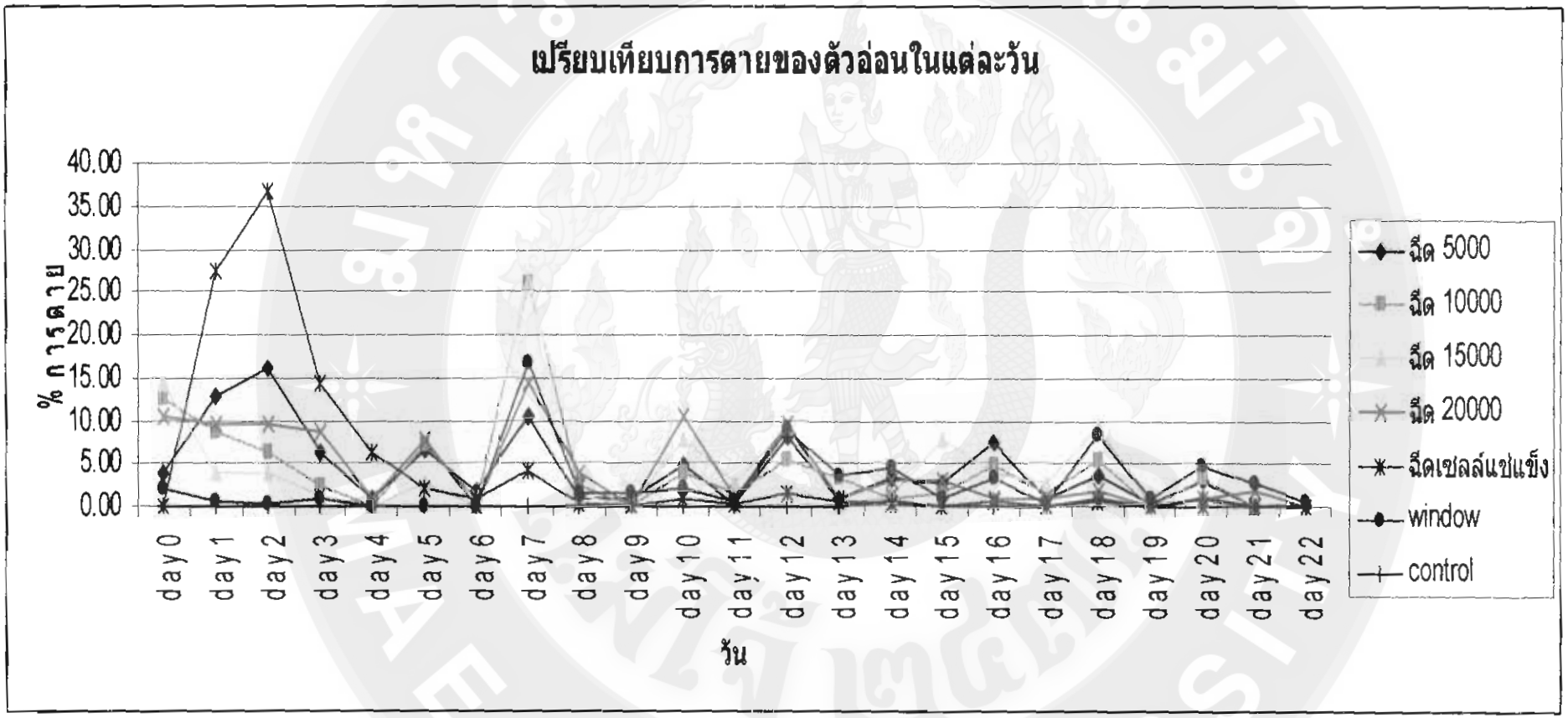
ตารางที่ 12 แสดงเปอร์เซนต์ไก่ที่ตายในวันต่างๆของการฟัก ของกลุ่มที่ได้รับการฉีดเซลล์สดและเซลล์แช่แข็ง

ขนาดเซลล์ที่ฉีด	วันของการฟัก	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ค่าเฉลี่ย%การตาย
	9	0	0	0^{r}
	10	2	1	1.5^{pqr}
	11	1	0	0.5^{qr}
	12	3	1	2^{opqr}
	13	1	1	1^{pqr}
	14	1	0	0.5^{qr}
	15	0	0	0^{r}
	16	2	0	1^{pqr}
	17	0	0	0^{r}
	18	2	0	1^{pqr}
	19	0	0	0^{r}
	20	0	0	0^{r}
	21	0	0	0^{r}
	22	0	0	0^{r}
	23	5	3	$4^{lmnopqr}$
กลุ่มเปิดช่องหน้าต่างไม่ฉีดเซลล์	0	0	1	0.5^{qr}
	1	2	0	1^{pqr}
	2	1	0	0.5^{qr}
	3	0	0	0^{r}
	4	0	0	0^{r}
	5	0	0	0^{r}
	6	0	0	0^{r}
	7	12	5	$8.5^{ghijkln}$
	8	0	0	0^{r}
	9	0	1	0.5^{qr}
	10	3	1	2^{opqr}
	11	0	0	0^{r}
	12	3	2	2.5^{nopqr}
	13	1	2	1.5^{pqr}
	14	2	2	2^{opqr}
	15	2	1	1.5^{pqr}
	16	2	3	2.5^{nopqr}
	17	0	0	0^{r}
	18	8	8	$8^{ghijklmn}$
	19	1	0	0.5^{qr}

ตารางที่ 12 แสดงเปอร์เซนต์ไก่ที่ตายในวันต่างๆของการฟัก ของกลุ่มที่ได้รับการฉีดเซลล์สดและเซลล์แช่แข็ง

ขนาดเซลล์ที่ฉีด	วันของการฟัก	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ค่าเฉลี่ย%การตาย
	20	5	2	3.5
	21	0	2	1
	22	0	1	0.5
	23	37	36	36.5
significant	Treatment			

กราฟที่ 3 แสดงอัตราการตายของตัวอ่อนที่ได้รับการฉีดเซลล์ขนาดต่างๆ ในแต่ละวัน

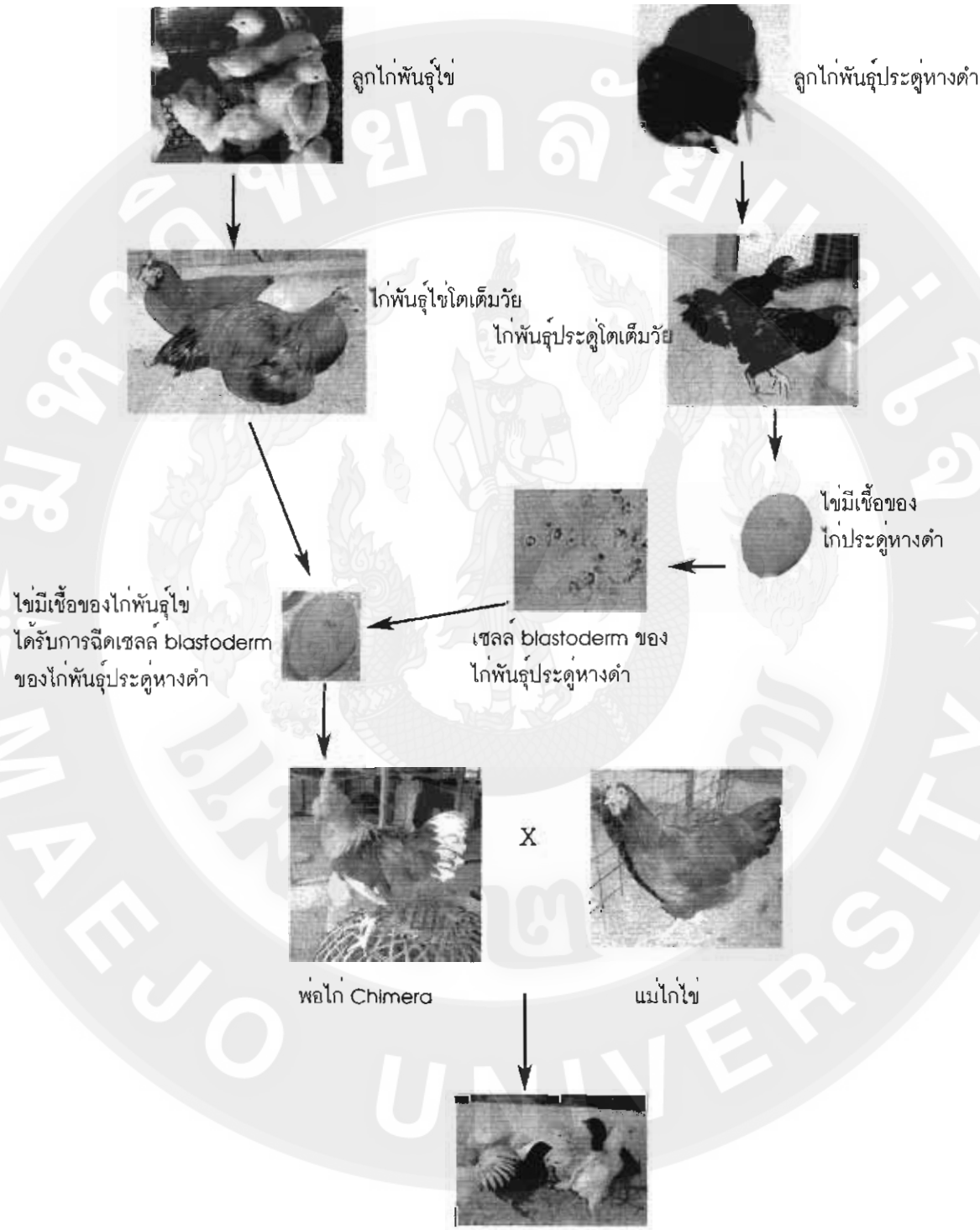


3. การเกิด chimeric chicken และการพิสูจน์ความเป็น germline chimera

จากการฉีดเซลล์ตัวอ่อนของไก่พันธุ์ประดู่หางดำให้แก่ตัวอ่อนไก่ตัวรับพันธุ์ไข่ในปริมาณต่างๆกัน จำนวน 1,278 ฟอง พบว่ามีตัวอ่อนที่ฟักออกมาทั้งหมด 21 ตัว มีลักษณะดังรายละเอียดในตารางที่ 13 พบว่าไก่ 6 ตัวไม่แข็งแรงและตายตั้งแต่ยังเล็ก ไก่ 6 ตัวไม่แข็งแรงและตายก่อนผสม ขณะที่ 3 ตัวที่โตขึ้นมาตายเพราะติดเชื้อ ไก่ 6 ตัวที่โตจนเจริญพันธุ์ สามารถผสมได้ และไก่ 3 ตัวที่เป็น germline chimera ให้ลูกที่มีขนดำ

ไก่ที่ได้ทั้ง 21 ตัวนี้ มี 3 ตัวที่เกิดจากการฉีดเซลล์ขนาด 10000 เซลล์ ที่เหลือเกิดจากการฉีดเซลล์ 5000 เซลล์และไก่ทั้ง 3 ตัวที่เกิดจากการฉีดเซลล์ 10000 เซลล์ไม่แข็งแรงและตายก่อนสามารถนำไปผสมได้ เป็นไปได้ว่าการฉีดเซลล์ในขนาดที่สูงน่าจะมีโอกาสเพิ่มการเกิด germline chimera แต่ทำให้อัตราการฟักออกต่างจากกลุ่มที่ฉีดเซลล์ต่ำกว่าอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และ chimera ที่เกิดมาอาจมีลักษณะที่ผิดปกติกว่าที่ฉีดด้วยเซลล์ขนาดต่ำ ส่วนไก่ที่เกิดจากการฉีดเซลล์สด 5000 เซลล์ จำนวน 10 ตัว มี 5 ตัวที่โตจนสามารถนำไปผสมกับไก่พันธุ์ไข่เพื่อทดสอบการเป็น germline chimera พบว่ามีไก่ถึง 3 ตัว คือ B138, B417 และ B471 เป็น germline chimera สามารถให้ลูกที่มีลักษณะขนแบบไก่ดำไทย นับเป็นสัดส่วนที่สูงพอควร (3 ใน 5 ตัว) ส่วนไก่ที่ได้รับการฉีดเซลล์แช่แข็ง 5000 เซลล์ พบว่ามีเพียง 1 ตัว คือ F123 ที่โตจนสามารถผสมได้ และพบว่าไม่ให้ลูกที่มีลักษณะของไก่ไทย อย่างไรก็ตามอาจเป็นไปได้ว่าไก่ที่นำไปทดสอบความเป็น germline chimera และยังไม่ให้ลูกที่เป็นไก่ดำ อาจเนื่องมาจากการที่มีสัดส่วน germ cell ของไก่ไทยที่อยู่ในไก่ตัวรับที่ผ่านการฉีดเซลล์นั้นน้อยจนทำให้อสุจิที่สร้างขึ้นมามีสัดส่วนของอสุจิที่มาจาก germ cell ของไก่พื้นเมืองน้อยมากเมื่อเทียบกับของไก่ตัวรับเอง จึงทำให้ตรวจสอบไม่พบ จะเห็นได้ว่าไก่ที่เกิดจากการฉีดเซลล์นั้นมีแนวโน้มว่าอาจไม่ค่อยแข็งแรงนัก มีเพียง 6 ตัวจาก 21 ตัวที่โตและแข็งแรงพอจนถึงวัยเจริญพันธุ์ ดังนั้นการเลี้ยงไก่ chimera ที่ได้อาจต้องเพิ่มความระมัดระวังเป็นพิเศษ มีสภาวะแวดล้อมที่ดี แยกพื้นที่การเลี้ยง และการดูแลให้วัคซีนเพื่อป้องกันการติดโรคจากไก่ตัวอื่น

ภาพที่ 4 ตัวอย่างไก่ chimera ที่เกิดจากการฉีดเซลล์เข้าในตัวอ่อนของไก่พันธุ์โรด จะพบว่าไก่แสดงลักษณะของไก่ตัวรับเป็นส่วนใหญ่



ลูกไก่ที่เกิดมาบางตัวมีลักษณะของพันธุ์ประดู่หางดำ(สีดำ)

ภาพที่ 5 การพิสูจน์ germline chimera ที่เกิดขึ้น โดยการผสมกับไก่พันธุ์ไข่ พบว่าลูกบางตัวมีลักษณะของไก่พันธุ์พื้นเมืองเกิดขึ้น (ขนสีดำ)

ตารางที่ 13 แสดงรายละเอียดของไก่ที่ฟักออกและผลการทดสอบ germline chimera

เบอร์ไก่	เพศ	สภาวะของการฉีดเซลล์	ลักษณะภายนอก	ผลการพิสูจน์ความเป็น germline chimera
B138	ผู้	ฉีด 5000 เซลล์	ปกติ	ให้ลูกขนดำ 1 ตัวจาก 100 ตัว
B351	เมีย	ฉีด 10000 เซลล์	ไม่แข็งแรง	ตายก่อนผสม
B359	เมีย	ฉีด 10000 เซลล์	ไม่แข็งแรง	ตายก่อนผสม
B362	-	ฉีด 10000 เซลล์	ตายตอนเล็ก	-
B373	-	ฉีด 5000 เซลล์	ไม่แข็งแรง ตัวเล็ก ตายตอนเล็ก	-
B380	ผู้	ฉีด 5000 เซลล์	ปกติ	ไม่ให้ลูกขนดำ จากลูก 100 ตัว
B417	ผู้	ฉีด 5000 เซลล์	ปกติ	ให้ลูกขนดำ 3 ตัวจาก 97 ตัว
B455	-	ฉีด 5000 เซลล์	ตายตอนเล็ก	-
B471	ผู้	ฉีด 5000 เซลล์	แข็งแรงดี	ให้ลูกขนดำ 1 ตัวจาก 100 ตัว
B519	เมีย	ฉีด 5000 เซลล์	ไม่สามารถเจาะเปลือกไข่เองได้ ต้องช่วยเจาะ ไม่แข็งแรง	ตายก่อนผสม
B537	ผู้	ฉีด 5000 เซลล์	ตาบอด 1 ข้าง	ไม่ให้ลูกขนดำ จากลูก 100 ตัว
B586	เมีย	ฉีด 5000 เซลล์	ตัวเล็ก	ตายก่อนผสม
B592	-	ฉีด 5000 เซลล์	ไม่สามารถเจาะเปลือกไข่เองได้ ต้องช่วยเจาะ ตายตอนเล็ก	-
F73	-	ฉีดเซลล์แช่แข็ง 5000 เซลล์	ตายตอนเล็ก	-

ตารางที่ 13 แสดงรายละเอียดของไก่ที่ฟักออกและผลการทดสอบ germline chimera

เบอร์ไก่	เพศ	สภาวะของการฉีดเซลล์	ลักษณะภายนอก	ผลการพิสูจน์ความเป็น germline chimera
F83	-	ฉีดเซลล์แช่แข็ง 5000 เซลล์	ตายตอนเล็ก	-
F121	เมีย	ฉีดเซลล์แช่แข็ง 5000 เซลล์	ปกติ	ติดโรคไก่อื่น ตายก่อนผสม
F122	?	ฉีดเซลล์แช่แข็ง 5000 เซลล์	ปกติ	ติดโรคไก่อื่น ตายก่อนผสม
F123	ผู้	ฉีดเซลล์แช่แข็ง 5000 เซลล์	หางเบี้ยว	ไม่ให้ลูกขนดำ จากลูก 100 ตัว
F280	?	ฉีดเซลล์แช่แข็ง 5000 เซลล์	ปกติ	ติดโรคไก่อื่น ตายก่อนผสม
F292	ผู้	ฉีดเซลล์แช่แข็ง 5000 เซลล์	ตัวเล็ก	ตายก่อนผสม
F296	เมีย	ฉีดเซลล์แช่แข็ง 5000 เซลล์	ไม่แข็งแรง	ตายก่อนผสม

4. ผลการฉีดเซลล์แช่แข็ง

ผลการแช่แข็งเซลล์ตัวอ่อนพบอัตราการรอดของเซลล์เท่ากับ 90-98% และเก็บเซลล์ได้นาน 2 เดือน แต่อย่างไรยังมีไก่ 8 ตัว (2.7%) ที่เกิดจากการฉีดเซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งด้วย แต่พบว่าไก่ 7 ตัวใน 8 ตัว ตายก่อนผสม มี 1 ตัวคือ F123 ที่โตพบที่จะผสมได้ (ตารางที่ 6 และ ภาพที่ 4) เมื่อผสมแล้วไม่พบว่าไม่ให้ลูกที่มีลักษณะขนดำ ตัวอ่อนที่ได้รับการฉีดเซลล์แช่แข็งพบการตายสูงมากในระยะแรกของการฟัก โดยตายสูงถึง 93.59% ต่างจากช่วงอื่นของการฟักในกลุ่มนี้อย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 9) แต่อย่างไรก็ก็ตามการตายในระยะต่อมาลดลงมากและ พบว่าอัตราการฟักออกไม่ต่างจากกลุ่มที่ฉีดด้วยเซลล์สด ดังนั้นความเป็นไปได้ของการเก็บรักษาเซลล์ตัวอ่อนสายพันธุ์ที่ต้องการโดยวิธีแช่แข็ง และผลิต germline chimera น่าจะเป็นวิธีที่ใช้ได้ แม้ว่า F123 พบว่าไม่ให้ลูกที่มีลักษณะขนดำจากการทดสอบในลูก 100 ตัว แต่หากทำการทดสอบกับลูกไก่มากกว่านี้อาจพบลูกที่มีลักษณะขนดำได้

สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองพบว่า อัตราการฟักออกของไข่ที่เปิดช่องหน้าต่างโดยไม่ฉีดเซลล์ อยู่ในระดับสูง และการฉีดเซลล์ 5000 -10000 เซลล์ อยู่ในระดับ 2.3-3% ไก่ที่โตพบที่จะทดสอบ germline chimera มีถึง 3 ใน 6 ตัวที่เป็น germline chimera นับว่าอยู่ในระดับที่สามารถนำมาใช้เพื่อรักษาพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองได้

วิธีการเก็บรักษาพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองโดยการแช่แข็ง blastodermal cell นั้นเป็นไปได้ ทำให้สามารถเก็บรักษาเซลล์ไว้ได้นานขึ้น และยังเป็นวิธีที่ประหยัดต้นทุนในการเก็บรักษาพันธุกรรมไก่ เพราะไม่ต้องสิ้นเปลืองในการเลี้ยงฝูงไก่มีชีวต ทั้งโรงเรือน แรงงาน และค่าอาหาร ถ้าสามารถผลิต germline chimera ได้ทั้งเพศผู้ และเพศเมียสามารถนำมาผสมกันเองเพื่อผลิตสายพันธุ์ที่ต้องการสงวนรักษาไว้ได้ ถึงแม้อัตราการรอดของไก่ที่ได้รับกการฉีดเซลล์ยังต่ำ และลูกที่เกิดมาบางตัวไม่แข็งแรง แต่ตัวที่รอดและโตมาจนสมบรูณ์พันธุ์กพบว่ามีโอกาสให้ลูกที่มีลักษณะของไก่พันธุ์พื้นเมืองได้มาก และลูกที่เกิดจากไก่ chimera ก็มีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรงดี

อย่างไรก็ตาม วิธีการที่นิยมใช้ในการอนุรักษ์พันธุกรรมไก่พื้นเมืองขึ้นอยู่กับ 1) วิธีการที่ใช้ว่าสามารถทำกลับมาเป็นตัวสัตว์ปกติตามจำนวนที่ต้องการได้ยากง่ายเพียงใด 2) คุณสมบัติของฝูงสัตว์ และ 3) เป็นเทคนิคที่มีอยู่และมีวัสดุอุปกรณ์พร้อมสามารถนำมาใช้ได้ ในทางอุดมคติอาจใช้วิธีการเก็บรักษาพันธุกรรมได้มากกว่า 1 วิธี และควรมีสถานที่ในการเก็บรักษาไว้มากกว่า 1 แห่ง เพื่อป้องกันความเสี่ยงอันเกิดจาก ไฟไหม้ กระแสไฟฟ้าดัด หรือภัยธรรมชาติอื่นๆที่อาจเกิดขึ้น

เอกสารอ้างอิง

กรมปศุสัตว์. 2543. ความหลากหลายทางชีวภาพด้านปศุสัตว์. วารสารสาส์นไก่และการเกษตร ปีที่ 48 ฉบับที่ 7, น. 22-27.

Dunnington, E.A., Stallard, L.C., Hillel, J. and Siegel, P.B. (1994). Genetic diversity among commercial chicken populations estimated from DNA fingerprints. *Poultry Science*. 73 : 1218-1225.

BirdLife International. 2000. Threatened birds of the world. Barcelona, Spain; Cambridge, UK: Lynx Edicions and BirdLife International. 852 p.

Chang, I.K., Tajima, A., Yasuda, Y., Chikamune, T. and Ohno, T. 1992. Simple method for isolation of primordial germ cells from chick embryos. Cell Biol. Int. Rep., 16, 853–857.

Chang, I.K., Tajima, A., Chikamune, T. and Ohno, T. 1995a. Proliferation of chick primordial germ cells cultured on stroma cells from the germinal ridge. Cell Biol. Int., 19, 143–149.

Chang, I.K., Yoshiki, A., Kasube, M., Tajima, A., Chikamune, T., Naito, M. and Ohno, T. 1995. Germline chimera produced by transfer of cultured chick primordial germ cells. Cell Biol. Int., 19, 569–576.

Chang, I.K., Jeong, D.K., Hong, Y.H., Park, T.S., Moon, Y.K., Ohno, T. and Han, J.Y. 1997. Production of germline chimeric chickens by transfer of cultured primordial germ cells. Cell Biol. Int., 21, 495–499.

Etches, R.J., Clark, M.E., Toner, A., Liu, G. and Gibbins, A.M., 1996. Contributions to somatic and germline lineages of chicken blastodermal cells maintained in culture. Mol. Reprod. Dev., 45, 291–298.

Etches,R.J., Clark, M.E. and Verrinder-Gibbins, A.M. 1997. Production of chimeric chickens as intermediates for gene transfer. In Transgenic Animals: Generation and Use, ed. L.M. Houdebine, Harwood Academic Press, Amsterdam, pp. 75–82.

Hamburger, V. and Hamilton, H.L. 1951. A series of normal stages in the development of the chick embryo. J. Morph., 88, 49–92.

Kino, K., Pain, B., Leibo, S.P., Cochran, M., Clark, M.E. and Etches, R.J. 1997. Production

of chicken chimeras from injection of frozen-thawed blastodermal cells. Poult. Sci., 76, 753–760.

Kuwana, T., Maeda-Suga, H. and Fujimoto, T. 1986. Attraction of chick primordial germ cells by gonadal anlage in vitro. Anat. Rec., 215, 403–406.

Naito M, Tajima A, Yasuda Y, Kuwana T. 1994a. Production of germline chimeric chickens, with high transmission rate of donor-derived gametes, produced by transfer of primordial germ cells. Mol Reprod Dev 39:153–161.

Naito M, Tajima A, Tagami T, Yasuda Y, Kuwana T. 1994b. Preservation of chick primordial germcells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring. J Reprod Fert 102: 321–325.

Naito, M., Matsubara, Y., Harumi, T., Tagami, T., Kagami, H., Sakurai, M. and Kuwana, T. 1999. Differentiation of donor primordial germ cells into functional gametes in the gonads of mixed-sex germline chimaeric chickens produced by transfer of primordial germ cells isolated from embryonic blood. J. Reprod. Fertil., 117(2), 291 – 298.

Nakamura, M., Maeda, H. and Fujimoto, T. 1991. Behavior of chick primordial germ cells injected into the blood stream of quail embryos. Okajimas Folia Anat. Jpn, 67(6), 473–477.

Nakamura, M., Yoshinaga, K. and Fujimoto, T. 1992. Histochemical identi□cation and behavior of quail primordial germ cells injected into chick embryos by the intravascular route. J. Exp. Zool., 261(4), 479 – 483.

Pain, B., Clark, M.E., Nakazawa, H., Sakurai, M., Samarut, J. and Etches, R.J. 1996. Long term culture and characterization of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic capabilities. Development, 122, 2339–2348.

Petitte, J.N., Clark, M.E., Liu, G., Verrinder Gibbons, A.M. and Etches, R.J. 1990. Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. Development, 108, 185–189.

Petitte, J.N., Clark, M.E., Liu, G., Verrinder Gibbons, A.M. and Etches, R.J. 1993. Accessing the genome of the chicken using germline chimeras. In Manipulation of the Avian Genome, eds.

R.J. Etches and A.M. Verrinder Gibbins, CRC Press Inc. pp. 81–102.

Petitte, J.N. and Karagenc, L. 1996. Growth factors during early events in avian embryo development. Poult. Av. Biol. Rev., 7, 75–87.

Petitte, J.N., D'Costa, S. and Karagenc, L. 1999. Understanding the origin of avian primordial germ cells: Implications for germ cell culture and Transgensis in poultry. In Transgenic Animals in Agriculture, eds. J.D. Murray, G.B. Anderson, A.M. Oberbauer and M.M. McGloughlin, CABI Publishing, pp. 97–116.

Pisenti J.M., M.E. Delany, R.L. Taylor, Jr., U.K. Abbott, H. Abplanalp, J.A. Arthur, M.R. Bakst, C. Baxter-Jones, J.J. Bitgood, F.A. Bradley, K.M. Cheng, R.R. Dietert, J.B. Dodgson, A.M. Donoghue, A.B. Emsley, R.J. Etches, R.R. Frahm, R.J. Gerrits, P.F. Goetinck, A.A. Grunder, D.E. Harry, S.J. Lamont, G.R. Martin, P.E. McGuire, G.P. Moberg, L.J. Pierro, C.O. Qualset, M.A. Qureshi, F.T. Shultz, and B.W. Wilson (1999) Avian Genetic Resources at Risk: An Assessment and Proposal for Conservation of Genetic Stocks in the USA and Canada". Report No. 20. University of California Division of Agriculture and Natural Resources, Genetic Resources Conservation Program, Davis CA USA. 120 p.

Tajima, A., Naito, M., Yasuda, Y. and Kuwana, T. 1993. Production of germline chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken. Theriogenology, 40, 509–519.

Tajima, A., Naito, M., Yasuda, Y. and Kuwana, T. 1998. Production of germ-line chimeras by transfer of cryopreserved gonadal primordial germ cells (gPGCs) in chicken. J. Exp. Zool., 280, 265–267.

Tajima, A., Hayashi, H., Kamizumi, A., Ogura, J., Kuwana, T. and Chikamune, T. 1999. Study on the concentration of circulating primordial germ cells (cPGCs) in early chick embryos. J. Exp. Zool., 284(7), 759–764.

S. D'Costa, S. L. Pardue and J. N. Petitte