**แบบประเมินผลงาน**

**โครงการหนึ่งอาจารย์ หนึ่งผลงาน ประจำปี 2546**

ผู้เสนอผลงาน ดร.กัลยา พงษ์พาย สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชา เทคโนโลยีการเกษตร
ชื่อผลงาน การผลิตสารสกัดจากเมล็ดและใบมะรุมด้วยกระบวนการ

ประเภทผลงาน

☐ รายงานการวิจัย ☐ หนังสือ/ตำรา ☐ เอกสารบริการวิชาการ
☐ บทความวิจัยตีพิมพ์ ☐ เอกสารประกอบการสอน ☐ งานบริการวิชาการ
☐ บทความวิชาการตีพิมพ์ ☐ สื่อเพื่อการสอน ☐ สิ่งประดิษฐ์/สิทธิบัตร
☑ อื่น ๆ งานวิจัย

**1. ประเมินโดยผู้เสนอผลงาน**

1.1 ประเมินความสำเร็จของผลงาน

☑ สมบูรณ์ 100% ☐ เกือบเสร็จ ☐ เสร็จครึ่งหนึ่ง ☐ เสร็จบางส่วน ☐ เสร็จเล็กน้อย

1.2 ผลงานเมื่อเทียบกับดัชนีวัดความสำเร็จที่กำหนดไว้เมื่อต้นปี สามารถทำได้

☑ ทั้งหมด ☐ เกือบทั้งหมด ☐ ครึ่งเดียว ☐ บางส่วน ☐ เล็กน้อย

1.3 ความเหมาะสมของผลงานที่ทำได้กับระยะเวลา 1 ปี

☑ มากที่สุด ☐ มาก ☐ ปานกลาง ☐ น้อย ☐ น้อยที่สุด

1.4 ประโยชน์ที่ได้รับจากผลงานนี้

☑ มากที่สุด ☐ มาก ☐ ปานกลาง ☐ น้อย ☐ น้อยที่สุด

1.5 ปัญหา อุปสรรค และข้อเสนอแนะ

ลงชื่อผู้ประเมิน

**2. ประเมินโดยหัวหน้าสาขาวิชา**

2.1 ประโยชน์ที่ได้รับจากผลงานนี้

☐ มากที่สุด ☑ มาก ☐ ปานกลาง ☐ น้อย ☐ น้อยที่สุด

2.2 ความเหมาะสมของปริมาณงาน คุณภาพ ผลงานที่ได้ในระยะเวลา 1 ปี

☐ มากที่สุด ☑ มาก ☐ ปานกลาง ☐ น้อย ☐ น้อยที่สุด

2.3 ข้อเสนอแนะในการใช้ประโยชน์จากผลงานนี้

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มลรินา เกตุทัต-คาร์น
หัวหน้าสาขาวิชา
หัวหน้าสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

หมายเหตุ : หากอาจารย์มีโครงการมากกว่า 1 ผลงาน โปรดใช้แบบประเมินแยกแต่ละผลงาน

# แบบเสนอโครงการหนึ่งอาจารย์หนึ่งผลงาน
# ประจำปี 2546

**ชื่อโครงการ** การผลิตลูกโคนมและโคเนื้อพันธุ์ดี โดยการโคลนนิ่ง

**ผู้เสนอ** อ.ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

**ลักษณะโครงการโดยสังเขป**

เป็นการผลิตลูกโคโคลนนิ่ง โดยใช้เซลล์ใบหูโคนมและโคเนื้อพันธุ์ดีเป็นเซลล์ต้นแบบ

**ระยะเวลาดำเนินการ** 1 ปี

**ขั้นตอนการดำเนินการ**

1. เก็บเซลล์ใบหูโคนม โคเนื้อพันธุ์ดีมาเลี้ยงเก็บไว้ใช้งาน
2. โคลนนิ่งตัวอ่อนโดยใช้เซลล์ใบหูโคนม โคเนื้อพันธุ์ดีเป็นเซลล์ต้นแบบ
3. ย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งให้โคตัวรับ

**ประโยชน์จากโครงการ**

1. ได้ลูกโคนม โคเนื้อพันธุ์ดีจากการโคลนนิ่ง ไว้ใช้ทำพันธุ์ต่อไป
2. ได้เผยแพร่ผลงานของมหาวิทยาลัยต่อสาธารณะ

**ดรรชนีชี้วัดความสำเร็จ**

1. ได้ลูกโคโคลนนิ่งเกิดมา
2. ได้เผยแพร่ผลงานของมหาวิทยาลัยทางหนังสือพิมพ์ โทรทัศน์ วิทยุ

(ลงนาม)_____

วันที่ 2 เมษายน 2546

# เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ ๔๒
# มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

## The Proceedings of 42nd Kasetsart University Annual Conference

สาขาสัตว์ (Subject : Animals)

สาขาสัตวแพทยศาสตร์ (Subject : Veterinary Medicine)

"เกษตรศาสตร์เพื่อการพัฒนาคุณภาพชีวิต"

"Agricultural Science for Life Quality Development"

Table 3 Percentage of complete feed distribution

| Type of feed mills | Complete feed distribution | | | |
|---|---|---|---|---|
| | Farms | Contracted farm | Distributors | Exported feed |
| Export oriented feed mills | | | | |
| Poultry, swine, Duck feed | 51.0 | 24.0 | 25.0 | 0.0 |
| Prawn feed | 2.5 | 2.2 | 91.9 | 3.3 |
| Domestic oriented feed mills | | | | |
| Poultry, swine, Duck feed | 28.9 | 5.2 | 65.9 | 0.0 |
| Prawn feed | 0.0 | 0.0 | 100.0 | 0.0 |

การสำรวจกลุ่มของโรงงานผลิตอาหารสัตว์แสดงให้เห็นว่า ลักษณะการประกอบธุรกิจอาหารสัตว์ระหว่างสัตว์บกและสัตว์น้ำมีความแตกต่าง กล่าวคือ ในกลุ่มอาหารสัตว์บก (ไก่ เป็ด สุกร) เป็นการดำเนินธุรกิจแบบครบวงจรตั้งแต่ การผลิตอาหารสัตว์ ฟาร์มเลี้ยงสัตว์ (ฟาร์มตนเอง ฟาร์มสัญญา หรือฟาร์มจ้างเลี้ยง) จนถึงโรงงานฆ่าชำแหละเนื้อสัตว์และแปรรูป ในกลุ่มธุรกิจอาหารสัตว์น้ำ (กุ้งกุลาดำ) เป็นการดำเนินธุรกิจแบบไม่ครบวงจร โดยโรงงานผลิตอาหารสัตว์ จะผลิตอาหารสัตว์เพื่อจำหน่ายให้กับผู้เลี้ยงเท่านั้น

ความปลอดภัยในอาหารตลอดทั้งห่วงโซ่อาหาร นับเป็นแรงกระตุ้นที่สำคัญต่อการนำระบบประกันคุณภาพมาใช้เพื่อเพิ่มความมั่นใจให้กับผู้บริโภคทั้งภายในและภายนอกประเทศ อาหารสัตว์นับได้ว่าเป็นส่วนสำคัญส่วนต้นของห่วงโซ่อาหารที่ควรจะได้รับการประกันความปลอดภัยก่อนนำไปเลี้ยงสัตว์ โดยเฉพาะสัตว์ที่บริโภคเนื้อเป็นอาหาร ได้แก่ สุกร ไก่ เป็ด และกุ้ง ระบบประกันคุณภาพที่สำคัญต่อธุรกิจอาหารสัตว์ประกอบด้วย หลักเกณฑ์ทั่วไปว่าด้วยการผลิตอาหารสัตว์ที่ดี (Good Manufacturing Practices, GMP) และระบบวิเคราะห์อันตรายและควบคุมจุดวิกฤติ (Hazard Analysis and Critical Control Points, HACCP) (กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์, 2543; 2545)

กรมปศุสัตว์เสนอแนะและสนับสนุนการนำระบบ GMP และระบบ HACCP มาใช้ในโรงงานอาหารสัตว์ กองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ ได้จัดเตรียมความพร้อมของผู้เกี่ยวข้องทั้งข้าราชการและเอกชน ในปี พ.ศ 2544-2546 ด้วยการจัดฝึกอบรม GMP 4 รุ่น จำนวน 227 คน และการจัดฝึกอบรม HACCP 20 รุ่น จำนวน 919 คน และจากการสำรวจโรงงานอาหารสัตว์เชิงพาณิชย์จำนวน 63 โรงงาน พบว่า มีเพียง 1 โรงงาน มีระบบ GMP ในโรงงานอาหารสัตว์ และอีก 35 โรงงานกำลังอยู่ในระหว่างการเตรียมการ ซึ่งคาดว่าจะแล้วเสร็จในระหว่างปี พ.ศ. 2546 - พ.ศ. 2547 และอีก 27 โรงงานยังไม่ได้จัดทำระบบ สำหรับระบบ HACCP ยังไม่มีโรงงานใดจากจำนวนโรงงานที่สำรวจได้รับการรับรองระบบ HACCP ในโรงงานอาหารสัตว์ และอีก 30 โรงงานอยู่ในระหว่างการเตรียมการ ซึ่งคาดว่าจะแล้วเสร็จในปีพ.ศ. 2546 และพ.ศ. 2547 เช่นเดียวกับระบบ GMP ที่เหลืออีก 33 โรงงานไม่มีระบบ HACCP ในโรงงาน (Table 4) การคาดคะเนจากผลการสำรวจการประยุกต์ใช้ระบบประกันคุณภาพ GMP และ HACCP ในโรงงานอาหารสัตว์ สามารถคาดคะเนได้ว่า ภายในปี พ.ศ. - พ.ศ. 2547 โรงงานอาหารสัตว์จะใช้ระบบ GMP และ HACCP ในการผลิตอาหารสัตว์เพิ่มขึ้นจากเดิมโดยประมาณ 30 - 35 โรงงาน

# การใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดีเยี่ยม

The use of cloning technology to produce exotic beef and dairy cattle

รังสรรค์ พาลพ่าย[1] ชุติ เหล่าธรรมธร[1] จันทร์เจ้า ล้อทองพานิชย์[1] สุจิตรา หมื่นไธสง[1] ธวัชชัย เวชยันต์[1]
เสวียน สัมหวาน[1] เพลิน เมืนกระโทก[2] สมพงษ์ ปาติตัง[2] สุริยา กิจสำเร็จ[2] และ สมบัติ สิริอุดมเศรษฐ์[3]

Rangsun Parnpai[1], Chuti Laowtammathron[1], Chanchao Lorthongpanich[1], Suchitra Muenthaisong[1]
Tawatchai Vetchayun[1], Savian Somvan[1], Plern Meinkratoke[2], Sompong Pattang[2]
Suriya Kitsumrej[2] and Sombat Sirudomset[3]

## บทคัดย่อ

เก็บเซลล์ใบหูจากโคเนื้อพันธุ์บราห์มันเพศผู้ที่มีประวัติพันธุกรรมดีเยี่ยมและจากโคนมลูกผสมขาวดำเพศเมียที่มีประวัติการให้น้ำนม 8,000 กก./ปี มาเลี้ยงเก็บไว้เป็นเซลล์ต้นแบบทำโคลนนิ่ง นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ผลิตจากเซลล์ต้นแบบโคนม จำนวน 8 ตัวอ่อน ไปย้ายฝากให้โคตัวรับ 4 ตัว (2 ตัวอ่อน/ตัว) ได้อัตราการตั้งท้อง 60, 180, 200 และ 220 วัน 50% (2/4) และย้ายฝากตัวอ่อนที่ผลิตจากเซลล์ต้นแบบโคเนื้อ จำนวน 56 ตัวอ่อน ให้โคตัวรับ 36 ตัว (1-2 ตัวอ่อน/ตัว) ได้อัตราการตั้งท้อง 60 และ 180 วัน 36.1% (13/36) และได้อัตราการตั้งท้องในวันที่ 200 และ 220 วัน 33.3% (12/36) และ 30.5% (11/36) โดยมีโคตัวรับในกลุ่มนี้ 2 ตัว แท้งในวันที่ 186 และ 209 ของการตั้งท้อง โคตัวรับที่ตั้งท้อง 1 ตัวได้คลอดลูกตามธรรมชาติ 1 ตัวมีสุขภาพแข็งแรงดี และโคตัวรับอีก 1 ตัวได้รับการผ่าตัดทำคลอด ลูกที่เกิดมา 1 ตัวมีรูปร่างปกติและเสียชีวิตหลังคลอด 15 นาที โคตัวรับที่เหลือมีกำหนดคลอดภายในสิ้นเดือนธันวาคม 2546 จากการตรวจ DNA microsatellite พบว่าลูกโคที่เกิดมามีแถบ DNA เหมือนกับโคต้นแบบทุกประการ และแตกต่างจาก DNA ของโคตัวรับ

## ABSTRACT

Ear skin of exotic Brahman bull and female dairy cattle were cultured and frozen storage for use as donor cells for cloning. Eight blastocysts derived from dairy cattle cells were transferred to 4 recipients (2 embryos/recipient), the pregnancy rate of this group at 60, 180, 200 and 220 days was 50% (2/4). Fifty six blastocysts derived from Brahman bull cells were transferred to 36 recipients (1-2 embryos/recipient), the pregnancy rate of this group at 60 and 180 days was 36.1% (13/36) and at 200 and 220 days was 33.3% (12/36) and 30.5% (11/36). Two recipients carried cloned Brahman fetus aborted at day 186 and 209 of pregnant. One pregnant recipient gave naturally birth 1 healthy cloned calf and another one recipient was gave birth by cesarian section to 1 cloned calf with normal morphology and died 15 minute after birth. Rest of pregnant recipients will give birth within the end of

[1] สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, Suranaree University of Technology
[2] ฟาร์มมหาวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, Suranaree University of Technology
[3] เอสเคพัทยา แรนช์, SK Pattaya Ranch

December 2003. DNA microsatellite analysis of cloned calf and donor cells showed the same pattern and obviously different from recipient.

Key words: beef and dairy cattle, cloning

R. Pampai: rangsun@ccs.sut.ac.th

## คำนำ

โคเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โคเนื้อและโคนมพันธุ์ดีมีไม่พอเพียงที่จะผลิตน้ำนมและเนื้อเพื่อการบริโภคภายในประเทศ ต้องนำเข้าจากต่างประเทศปีละเกือบหมื่นล้านบาท การผลิตโคนมเกษตรกรต้องการเฉพาะเพศเมีย ส่วนโคเนื้อเกษตรกรต้องการทั้งสองเพศ สัดส่วนของลูกเพศเมียและเพศผู้เป็น 1:1 การโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบสามารถกำหนดเพศและพันธุกรรมโคได้ ในบ้านเรามีรายงานความสำเร็จการโคลนนิ่งโคมาแล้ว (รังสรรค์ และคณะ, 2543; Parnpai *et al.*, 2000; 2002) การวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อทดสอบการใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดีเยี่ยม

## อุปกรณ์และวิธีการ

**การเตรียมเซลล์ต้นแบบ**

ตัดชิ้นใบหูขนาด 5 x 5 มม. จากโคเนื้อพันธุ์บราห์มัน (Brahman) เพศผู้ชื่อดูมตาม ซึ่งมีประวัติพันธุกรรมดีเยี่ยมและจากโคนมลูกผสมขาวดำ (HF) เพศเมียหมายเลข 346 ซึ่งมีประวัติการให้น้ำนม 8,000 กก./ปี มาทำความสะอาดแล้วเลี้ยงในน้ำยา α MEM + 10% FCS ที่อุณหภูมิ 37°C, 5% $CO_2$ in air เซลล์ไฟโบรบลาสจะเริ่มเจริญขึ้นมาในวันที่ 4 –5 ของการเลี้ยง ทำการเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3 วัน จนเซลล์เจริญเต็มขวดเลี้ยงเซลล์ จึงขยายการเลี้ยงให้มีปริมาณมากๆ แล้วแช่แข็งเซลล์เก็บไว้ใช้งานที่ passage 3 ก่อนใช้งานจะนำเซลล์ที่แช่แข็งไว้มาเลี้ยงในน้ำยา α MEM + 10% FCS เป็นเวลานาน 2-3 วัน แล้วจึงย่อยเซลล์ด้วย Trypsin/EDTA เพื่อให้เซลล์แยกออกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว จะใช้เซลล์จนถึง passage ที่ 8

**การเตรียมไซโตพลาสซึมผู้รับ**

เก็บรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์แช่ไว้ในน้ำเกลือขณะนำเข้าห้องปฏิบัติการ แล้วนำมาดูดไข่ออกจากรังไข่โดยใช้เข็มเบอร์ 21 ต่อกับกระบอกฉีดยา จากนั้นทำการหาไข่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ และนำไข่คุณภาพดีเลี้ยงในน้ำยา IVM ในจานเลี้ยงเซลล์ซึ่งปิดคลุมด้วย mineral oil น้ำยา IVM ประกอบด้วย TCM199 + 10%FCS, 50 IU/ml HCG (Chorulon®, Intervet), 0.02 AU/ml FSH (Antrin®, Denka Phamaceutical) และ 1 μg/ml $E_2$ เลี้ยงในสัดส่วน 20 ใบ/100 μl ที่อุณหภูมิ 38.5°C, 5% $CO_2$ in air นาน 21 ชั่วโมง

หลังจากเลี้ยงไข่ในน้ำยา IVM ครบ 21 ชั่วโมง จะนำมาย่อยเซลล์คิวมูลัสออกด้วย 0.2% Hyaluronidase แล้วคัดเลือกไข่ที่ลุกแล้ว (มี 1st polar body) นำมาดูดนิวเคลียสออกด้วย micromanipulator และตรวจสอบผลสำเร็จการดูดนิวเคลียสด้วยการนำส่วนที่ดูดได้มาย้อมด้วย 5 μg/ml Hoechst 33342 และส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีแสง UV

**การฉีดเซลล์ต้นแบบและการเชื่อมเซลล์**

นำเฉพาะไข่ที่ดูดนิวเคลียสสำเร็จมาฉีดเซลล์ต้นแบบ 1 เซลล์ เข้าไปในบริเวณ perivitteline space จากนั้นนำไข่ครั้งละ 1 ใบไปไว้ระหว่างปลายสองข้างของ fusion electrode ในน้ำยา Zimmermann fusion medium เพื่อเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันด้วยกระแสไฟฟ้าโดยเครื่องเชื่อมเซลล์ที่ผลิตโดยศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คัดเฉพาะเซลล์ที่เชื่อมกันไปกระตุ้นด้วย 7% ethanol เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำไปเลี้ยงในน้ำยาที่มี 1.25 µg/ml Cytochalasin D และ 10 µg/ml Cycloheximide (CD + CHX) ในตู้อบที่อุณหภูมิ 38.5°C, 5% $CO_2$ in air เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

**การเลี้ยงตัวอ่อนโคลนนิ่งในหลอดแก้ว**

นำไข่ที่ผ่านการกระตุ้นมาเลี้ยงในน้ำยา mSOFaa + 1% FCS ในสัดส่วน 20 ใบ/100 µl ที่อุณหภูมิ 38.5°C ภายใต้บรรยากาศที่มี 5% $CO_2$, 5% $O_2$, 90% $N_2$ เป็นเวลา 2 วัน แล้วคัดเลือกตัวอ่อนระยะ 8 เซลล์มาเลี้ยงร่วมกับเซลล์บุท่อนำไข่โคในน้ำยา mSOFaa + 5% FCS ที่อุณหภูมิ 38.5°C, 5% $CO_2$ in air เป็นเวลา 3 วัน โดยเปลี่ยนน้ำยาทุกๆ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะทำการเปลี่ยนน้ำยาเก่าออกครึ่งหนึ่งแล้วเปลี่ยนด้วยน้ำยา mSOFaa + 10% FCS ทุกๆ 12 ชั่วโมง จะเลี้ยงตัวอ่อนในหลอดแก้วรวม 7 วัน

**การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ**

ความแตกต่างของผลการทดลองจะวิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้ ANOVA

## ผลการทดลอง

Table 1 *In vitro* development of cloned bovine embryos derived from ear fibroblasts

| Fused (%) | Embryos cultured | Cleaved (%) | 8-cell (%) | Morula (%) | Blastocyst (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| 464/548 | 451 | 393/451 | 292/451 | 173/393 | 125/393 |
| (84.67) | | (87.14) | (64.75) | (44.02) | (31.80) |

จาก Table 1 พบว่าอัตราการเจริญเติบโตของตัวอ่อนโคลนนิ่งถึงระยะบลาสโตซีส (31.80%) ใกล้เคียงกับที่มีรายงานมาแล้ว (รังสรรค์ และคณะ, 2543; Pampai *et al.*, 2002) แสดงว่าเครื่องเชื่อมเซลล์ที่ผลิตเองมีประสิทธิภาพสูงในการเชื่อมเซลล์และการได้ตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสซึ่งเป็นระยะพร้อมย้ายฝากให้โคตัวรับ

จาก Table 2 ได้ทำการย้ายฝากตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสที่ผลิตจากเซลล์ต้นแบบโคนม จำนวน 8 ตัวอ่อน ให้โคตัวรับ 4 ตัว (2 ตัวอ่อน/ตัว) ได้อัตราการตั้งท้อง 60 , 180, 200 และ 220 วัน 50% (2/4) ส่วนการย้ายฝากตัวอ่อนที่ผลิตจากเซลล์ต้นแบบโคเนื้อ จำนวน 56 ตัวอ่อน ให้โคตัวรับ 36 ตัว (1-2 ตัวอ่อน/ตัว) ได้อัตราการตั้งท้อง 60 และ 180 วัน 36.1% (13/36) ได้อัตราการตั้งท้อง 200 และ 220 วัน 33.3% (12/36) และ 30.5% (11/36) โดยมีโคตัวรับในกลุ่มนี้ 2 ตัวแท้งในวันที่ 186 และ 209 ของการตั้งท้อง โคตัวรับที่ตั้งท้อง 1 ตัวคลอดลูกตามธรรมชาติออกมา 1 ตัวในวันที่ 25 ตุลาคม 2546 มีน้ำหนักแรกเกิด 32.5 กก. มีสุขภาพแข็งแรงดีได้รับการตั้งชื่อว่า ตูมตาม2 และจากการตรวจวิเคราะห์ DNA microsatellite (Marker TGLA126) ของโคตัวรับ ตูมตามซึ่งเป็นเจ้าของเซลล์ต้นแบบ และ ตูมตาม2 พบว่า ตูมตามและตูมตาม 2 มี DNA เหมือนกันทุกประการและแตกต่างจาก DNA ของตัวรับ (Figure 1) นอกจากนี้โคตัวรับอีก 1 ตัวได้รับการผ่าตัดทำคลอดในวันที่ 26 ตุลาคม 2546

ให้ลูกโคเกิดมา 1 ตัวมีน้ำหนักแรกเกิด 45 กิโลกรัมและมีรูปร่างปกติทุกประการและเสียชีวิตหลังคลอด 15 นาที โคตัวรับที่เหลือมีกำหนดคลอดภายในสิ้นเดือนธันวาคม 2546

Table 2 Pregnancy rate after transferred cloned bovine embryos to recipients.

| Breed of donor cell | No. of embryos transferred | No. of recipients | Pregnant at 60 d | Pregnant at 180 d | Pregnant at 200 d | Pregnant at 220 d |
|---|---|---|---|---|---|---|
| HF | 8 | 4 | 2 (50%) | 2 (50%) | 2 (50%) | 2 (50%) |
| Brahman | 56 | 36 | 13 (36.1%) | 13 (36.1%) | 12 (33.3%) | 11 (30.5%) |
| Total | 64 | 40 | 15 (37.5%) | 15 (37.5%) | 14 (35.0%) | 13 (32.5%) |

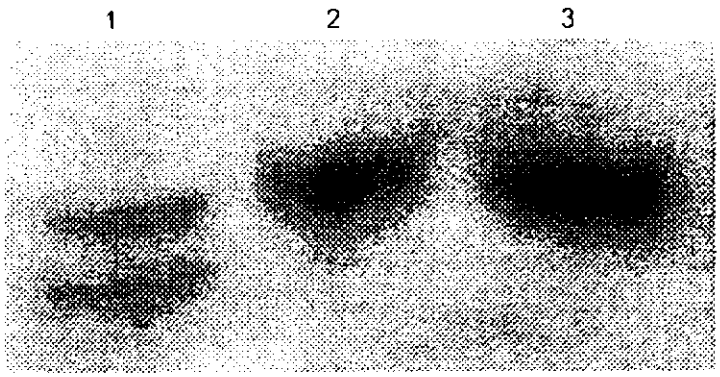



Figure 1 DNA microsatellite analysis comparison of recipient (1). Donor cells (2) and cloned calf (3)

## สรุป

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถประสบความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งที่ได้จากเซลล์ต้นแบบโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดีเยี่ยม ได้โคตัวรับตั้งท้องจนถึง 220 วันในอัตราสูงกว่าที่มีรายงานมาและมีอัตราการแท้งต่ำกว่าที่มีรายงานมาเช่นเดียวกัน (Hill *et al.*, 2000) ดังนั้นเทคโนโลยีโคลนนิ่งจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการเพิ่มปริมาณโคเนื้อและโคนมพันธุ์ดีเยี่ยมโดยกำหนดเพศและพันธุกรรมได้ตามต้องการ

## คำนิยม

การทดลองนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

รังสรรค์ พาลพ่าย เกรียงศักดิ์ ทาศรีภู และ มณีวรรณ กมลพัฒนะ. 2543. ความเป็นไปได้ในการผลิตโคพันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ใบหูเป็นเซลล์ต้นแบบ การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38 สาขาสัตว์ 1-4 กุมภาพันธ์ 2543.

Hill, J.H., R.C. Burghardt, K. Jones, C.R. Long, C.R. Looney, T. Shin, T.E. Spencer, J.A. Thompson, Q.A. Winger, and M.E. Westhusin. 2000. Evidence for placental abnormality as the major cause of mortality in first-trimester somatic cell cloned bovine fetuses. Biol. Reprod. 63: 1787-1794.

Parnpai, R., K. Tasripoo, and M. Kamonpatana. 2000. Developmental potential of cloned bovine embryos derived from quiescent and non-quiescent adult ear fibroblasts after different activation treatments. Theriogenology 53: 239.

Parnpai, R., K. Tasripoo, and M. Kamonpatana. 2002. Comparison of cloning efficiency in bovine and swamp buffalo embryo using fetal fibroblasts ear fibroblasts and granulosa cells. Theriogenology 57: 443.

# ARB Asian Reproductive Biotechnology

April 12-14, HoChiMinh City Vietnam

## Program

## Saturday, April 10, 2004

Arrival and check in at Majestic Hotel, HoChiMinh City, Vietnam.

## Sunday, April 11, 2004

*10:00 – 12:00* Setup conference room, manipulative microscopy.
*14:00 – 16:00* Meeting of the workshop steering committee

## Monday, April 12, 2004

*9:00-* Registration
*10:00-10:15* Welcome and Opening remarks: Prof. Bui Cach Tuyen, Rector of NLU, VIETNAM and Dr. Teruhiko Wakayama, RIKEN, CDB, JAPAN.

### Session I

**Session chairs:** **Dr. Takashi (TAKU) NAGAI**
National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, JAPAN.
**Dr. Trinh Cong THANH**
Nong Lam University, HoChiMinh City, VIETNAM.

*10:15 - 10:45* **Generation of Cloned Mice and ntES Cells From Somatic Cells**
***Dr. Teruhiko WAKAYAMA**, RIKEN, Center for Developmental Biology, Kobe, JAPAN.*

*10:45 - 11:15* **Mammalian Oocyte Growth Outside the Ovary**
***Dr. Takashi MIYANO**, Kobe University, Kobe, JAPAN.*

*11:15 – 11:45* [redacted]
*Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, THAILAND*

*11:45-12:15* **Development of Embryo Biotechnology at Vietnam Academy for Sciences and Technology**
***Dr. Bui Xuan NGUYEN**, Vietnam Academy for Sciences and Technology, Hanoi, VIETNAM*

*12:15 - 14:00* **Lunch**

### Session II

**Session chairs:** **Dr. Takashi MIYANO**
Kobe University, Kobe, JAPAN
**Dr. Nguyen Ngoc TUAN**
Nong Lam University, HoChiMinh City, VIETNAM

*14:00 – 14:30* **Follicle Selection in Porcine Ovaries: Regulation of Granulosa Cell Apoptosis during Atresia**
***Dr. Noboru MANABE,*** *Kyoto University, Kyoto, JAPAN*

*14:30 – 15:00* **ICSI in Pigs; Pretreatment of Sperm with Chemicals**
***Dr. Kazuhiro KIKUCHI,*** *National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, JAPAN*

*15:00 – 15:30* **An Attitude for Science: How to Make a Breakthrough in Difficult Experiments In Taku's Case**
***Dr. Takashi (TAKU) NAGAI,*** *National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, JAPAN*

*15:30 – 18:00* **Demonstration of nuclear transfer and ICSI technique**
Research Scientists of RIKEN, CDB, JAPAN

*19:30 – 22:30* **Welcome party**

## Tuesday, April 13, 2004

### Session III

**Session chairs:** **Dr. Masashi MIYAKE**
Kobe University, JAPAN
**Dr. Teruhiko WAKAYAMA**
RIKEN, Center for Developmental Biology, JAPAN

*9:00 – 9:20* **Overview on Biotechnology Research in Animal Production at NLU, HCMC**
***Dr. Tran Thi DAN,*** *Nong Lam University, HoChiMinh City, Vietnam*

*9:20-9:40* **Similar Time Restriction for ICSI and ROSI into Activated Oocytes for Efficient Offspring Production**
***Dr. Satoshi KISHIGAMI,*** *RIKEN, Center for Developmental Biology, Kobe, JAPAN*

*9:40-10:00* **Spindle Morphogenesis and Effects of In Vitro Remodeling of Donor Somatic Cell on the Developmental Viability in Mouse Cloning**
***Dr. Nguyen Van THUAN,*** *RIKEN, Center for Developmental Biology, Kobe, JAPAN*

*10:00-10:20* **The Study of Sex Reverses from Male to Female after the Androgenic Gland Ablation in *Macrobrachium Nipponenese* De Haan & the Beginning of the Stem Cell Technology Research in Vietnam**
***Dr. Nguyen Mong HUNG,*** *Hanoi University of Science, Hanoi, VIETNAM*

*10:20-10:30* **Coffee break**

### Session IV

**Session chairs:** **Dr. Kazuhiro KIKUCHI**
National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, JAPAN
**Dr. Tran Thi DAN**
Nong Lam University, HoChiMinh City, VIETNAM

*10:30 – 10:50* **Early Development of Porcine Parthenogenetic Diploids in-vitro and in-vivo**
***Dr. Masashi MIYAKE,*** *Kobe University, Kobe, JAPAN*

Program

*10:50 -11:10* **Male Germ Cell Transplantation in Mouse**
***Dr. Hiroshi OHTA,*** *RIKEN, Center for Developmental Biology, Kobe, JAPAN*

*11:10 –11:30* **Regulation of Chromosome Condensation and Decondensation by the Change in Histone H3 (Ser10) Phosphorylation in Pig Oocytes**
***Ms. Bui Hong THUY,*** *Ph.D student, Kobe University, Kobe, JAPAN*

*11:30-11:50* ***In Vitro*** **Production of Porcine Embryos: Utility of a Novel Chemically Defined Medium**
***Dr. Koji YOSHIOKA,*** *National Institute of Animal Health, Tsukuba, JAPAN*

*12:00 – 13:40* **Lunch**

## Session V

**Session chairs:** **Dr. Takashi (TAKU) NAGAI**
National Institute of Agrobiological Sciences, Tsukuba, JAPAN
[redacted]
Suranaree University of Technology, THAILAND

*13:40 – 14:00* **The Results of Bovine in vitro Fertilization Research at National Institute of Animal Husbandry**
***Dr. Nguyen Van LY,*** *National Institute of Animal Husbandry, Hanoi, VIETNAM*

*14:00 – 14:20* **The Control Mechanism of Genomic Imprinting Important for Mammalian Development**
***Dr. Takafusa HIKICHI,*** *RIKEN, Center for Developmental Biology, Kobe, JAPAN*

*14:20 – 14:40* **Fertilizability and Developmental Ability of Mouse Artificial Giant Oocyte**
***Ms. Sayaka WAKAYAMA,*** *Ph.D student, Kobe University, Kobe, JAPAN*

*14:40-14:55* **Coffee break**

## Session VI

**Session chairs:** **Dr. Noboru MANABE**
Kyoto University, Kyoto, JAPAN
**Dr. Nguyen Van THUAN**
RIKEN, CDB, Kobe, JAPAN

*14:55 – 15:10* **Cloning of Leopard cat embryos using enucleated domestic cat oocytes**
[redacted] *Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, THAILAND*

*15:10 – 15:25* ***In Vitro*** **Development of Cloned Swamp Buffalo Embryos Derived from Vitrified Matured Oocytes**
[redacted] *Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, THAILAND*

*15:25 – 15:40* **Fertilization of GV-Enucleated and Maturated Pig Oocytes**
***Ms. Sugako OGUSHI,*** *Ph.D student, Kobe University, Kobe, JAPAN*

*15:40-15:55* **Coffee break**

Program

## Session VII

**Session chair:** **Dr. Bui Xuan NGUYEN**
Vietnam Institute of Science, Hanoi, VIETNAM
**Dr. Satoshi KISHIGAMI**
RIKEN, Center for Developmental Biology, JAPAN

*15:55 – 16:10* **The Effect of Ficoll in Vitrification Solution and Hatching Status of Cloned Bovine Blastocysts on the Survival Rate after Vitrification by Using Cryotop**
[redacted], *Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, THAILAND*

*16:10 – 16:25* **Determination of optimal conditions for parthenogenetic activation and subsequent development of rat oocytes *in vitro***
***Mr. Eiji MIZUTANI**, PhD student, Tohoku University, Sendai,JAPAN*

*16:25 – 16:40* **In Vitro Development of Embryos Cloned from Primordial Germ Cells in Mice**
***Ms. Hiromi MIKI**, Bioresource Center, RIKEN, Tsukuba, JAPAN.*

*16:40-16:55* **Closing remarks**
**Prof. Bui Cach TUYEN** , Nong Lam University, Ho Chi Minh city, VIETNAM
**Dr. Takashi (TAKU) NAGAI,** National Institute of Agrobiological Sciences, JAPAN

*19:30-22:30* **Closing party**

## Wednesday, April 14, 2004

*9:30-11:30* **The meeting of Workshop Committee**

Members of the RIKEN-CDB, Kobe University, National Institute of Agrobiological Sciences, Kyoto University, Suranaree University of Technology-Thailand, and Nong Lam University will meet to discuss the planning of the 2005 Reproductive Biotechnology meeting.

## April 15 - 16, 2004

Study trip to Hue University

# Bovine and swamp buffalo somatic cell nuclear transfer in Thailand

[redacted]
Animal Biotechnology Laboratory, School of Biotechnology,
Institute of Agricultural Technology,
Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand
E-mail: rangsun@ccs.sut.ac.th

## Introduction

The birth of Dolly, a cloned sheep from adult somatic cell stimulated scientists worldwide conducting research in somatic cell nuclear transfer (SCNT) and led to the birth of live offspring in several species. The ultimate goals of research in SCNT are to develop a procedure to propagate valuable genotypes, create genetic modification animals for pharmaceutical protein production, and produce organs for xenotransplantation. This review will show the recent data on bovine and swamp buffalo SCNT in Thailand.

## Bovine

The first SCNT calves were produced from fetal fibroblasts (Cibelli et al., 1998) and adult oviduct epithelial and granulosa cells (Kato et al., 1998). In Thailand, several attempts had been made to produce SCNT embryos, and subsequent transfer of embryos derived from the adult ear fibroblasts of female Brangus breed (SK29) led to the first live calf being born on 6 March 2000, named "Ing". The result of DNA microsatellite analysis (Bovine paternity primers: MGTG4B, TGLA53, TGLA73, TGLA122, TGLA126) showed that Ing is the clone of SK29. The second live calf was born on 3 April 2001, named "Nicol" which derived from ear fibroblasts of female Brahman breed (Parnpai et al., 2000a, 2000b, 2002). The valuable genetics of beef and dairy cattle are interesting features to be propagated by SCNT technology. Recently, seven live cloned calves were produced from SCNT of male Brahman breed (Parnpai et al., 2004) as showed in Table 1 and 2. Additionally, Saikhun et al (2000) showed that SCNT using fetal fibroblasts, adult fibroblasts and cumulus cells could develop to blastocysts and pregnancy could be established. However, there is no report of a live calf being born. As Wilmut et al. (1997) proposed that differentiated cells are successfully reprogrammed only if they are in a quiescent stage (G0) by serum starvation before being used for SCNT. Parnpai et al. (2000a) reported that the proportions of SCNT blastocysts were not different when either cycling or quiescent ear fibroblasts were used as donor cells (Table 3). In contrast, Hill et al. (1999) and Zakhartchenko et al. (1999) demonstrated that quiescent fetal fibroblasts gave higher blastocyst rate than non-quiescent fetal fibroblasts. Bovine blastocysts produced by SCNT have mechanical slits in their zonae pellucidae, and therefore initiate hatching earlier than the non-manipulated embryos. Laowtammathron et al. (2004) reported that SCNT bovine blastocysts regardless of their hatching stages, were relatively resistant to cryopreservation by vitrification.

**Table 1** Pregnancy rate after transferred cloned Brahman cattle embryos to recipients. (Parnpai et al., 2004)

| No. of recipients | No. embryos/recipient | Pregnant at 60 d | Pregnant at 180 d | Pregnant at 200 d | Pregnant at 220 d | Pregnant at 240 d | Pregnant at 260 d | Calving |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 39 | 1.6 | 14 (36%) | 14 (36%) | 13 (33%) | 12 (31%) | 11 (28%) | 10 (26%) | 10 (26%) |

**Table 2** Pregnancy outcome of cloned Brahman calves (Parnpai et al. 2004).

| Recipient no. | Date of birth | Gestation days | Born alive/dead | Type of delivery | Birth Weight (kg) | Life span |
|---|---|---|---|---|---|---|
| CB 13 | 25 Oct 2003 | 276 | Alive | Vaginal | 32.5 | Still alive |
| CB 17 | 26 Oct 2003 | 281 | Dead | Caesarean | 45.5 | 15 min after birth |
| BG 24 | 25 Nov 2003 | 276 | Alive | Vaginal | 45.0 | Still alive |
| BG 47 | 30 Nov 2003 | 281 | Alive | Vaginal | 44.5 | Still alive |
| CB 52 | 11 Dec 2003 | 281 | Dead | Vaginal | 44.0 | 20 h after birth |
| CB 69 | 12 Dec 2003 | 272 | Dead | Vaginal | 19.0 | 5 min after birth |
| | | | | | 25.0 | 15 min after birth |
| CB 23 | 24 Dec 2003 | 283 | Alive | Vaginal | 46.0 | Still alive |
| CB 20 | 28 Dec 2003 | 290 | Alive | Vaginal | 40.0 | Still alive |
| CB 30 | 5 Jan 2004 | 292 | Alive | Vaginal | 42.5 | Still alive |
| CB 5 | 7 Jan 2004 | 286 | Alive | Vaginal | 38.0 | Still alive |

**Table 3** In vitro development of cloned bovine embryos derived from cycling and quiescent adult ear fibroblasts after different activation treatments. (Parnpai et al., 2000a)

| % FCS | Activation treatments | Fused (%) | Cleaved (%) | 8-Cell (%) | Mor. (%) | Blast. (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 10 | EtOH + CH-CD | 98/111 (88) | 90/97 (92) | 71/90 (73) | 52/90 (53) | 48/90 (49)[a] |
| 10 | CH-CD | 98/106 (92) | 85/92 (92) | 60/92 (65) | 42/92 (45) | 33/92 (35)[bc] |
| 0.5 | EtOH + CH-CD | 93/102 (91) | 86/92 (93) | 64/92 (69) | 49/92 (53) | 43/92 (46)[ad] |
| 0.5 | CH-CD | 95/105 (90) | 85/93 (91) | 59/93 (63) | 41/93 (43) | 32/93 (34)[b] |

[ab] $P < 0.01$ ; [cd] $P < 0.05$ (ANOVA)

**Buffaloes**

Although buffaloes are important animal for beef and milk production, there are no reports of a SCNT calf being born in this species. SCNT in swamp buffalo was first reported by Parnpai et al. (1999) which shown that fetal fibroblasts could be used as donor cells to produce SCNT blastocysts. Parnpai et al. (2000c) showed that fetal fibroblasts and granulosa cells had the same ability to be reprogrammed in enucleated oocytes. Parnpai et al. (2002) had attempted to test the SCNT efficiency in bovine and swamp buffalo using fetal fibroblasts, ear fibroblasts and granulosa cells. This experiment demonstrated that all three cell types had the same ability to produce SCNT blastocysts within species and the SCNT blastocyst rates in bovine were significantly higher than those in swamp buffalo (Table 4). The activation protocols are one of the major steps to achieve the high success rate in producing SCNT embryos. The activation of reconstructed swamp buffalo embryos with 7% ethanol followed by culture in the combination of 6-DMAP, cycloheximide (CHX) and cytochalasin D (CD) gave higher morulae and blastocysts yield than culture in 6-DMAP+CD or CHX+CD (Parnpai and Tasripoo, 2003). Kitiyanant et al. (2003) reported that parthenogenetic development to blastocyst stage of buffalo oocytes activated by ethanol or calcium ionophore combined with 6-DMAP was higher than that activated by electrical pulses. The SCNT blastocysts derived from quiescent donor cells showed significantly higher telomerase activity than those derived from non-quiescent donor cells (Saikhun et al., 2003). Several studies have shown that oocyte cytoplasm from bovines, rabbits and sheep can support early development of embryos

produced by SCNT (Chen et al., 2002; Dominko et al., 1999; White et al., 1999; Lanza et al., 2000). Recently, there have been successes in cloning gaur (Lanza et al., 2000), mouflon (Loi et al., 2001) and banteng (http://www.biomedcentral.com/news/20030411/03). In Thailand, blastocysts were successfully produced by interspecies SCNT between swamp buffalos and bovines (Kittiyanan et al., 2001; Saikhun et al., 2002; Sophon et al., 2002). Parnpai et al (2001) reported that SCNT swamp buffalo morulae had high developmental rates after vitrified by solid-surface vitrification method as previously developed by Dinnyes et al (2000).

**Table 4** In vitro development of cloned bovine and swamp buffalo embryos derived from fetal fibroblasts, ear fibroblasts and granulosa cells. (From Parnpai et al., 2002)

| Species | Donor cells types | Fused (%) | Embryos cultured | Cleaved (%) | 8-cell (%) | Mor (%) | Blast (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Bovine | Fetal fibroblasts | 91/102 (89) | 91 | 80 (88) | 59 (65) | 40 (44)[a] | 36 (40)[a] |
| | Ear fibroblasts | 94/103 (91) | 94 | 82 (87) | 60 (64) | 42 (45)[a] | 37 (39)[a] |
| | Granulosa cells | 91/101 (90) | 91 | 81 (89) | 58 (64) | 41 (45)[a] | 37 (41)[a] |
| Swamp buffalo | Fetal fibroblasts | 89/101 (88) | 89 | 76 (85) | 54 (61) | 23 (26)[b] | 17 (19)[b] |
| | Ear fibroblasts | 87/100 (87) | 87 | 73 (84) | 52 (60) | 21 (24)[b] | 18 (21)[b] |
| | Granulosa cells | 90/103 (87) | 87 | 76 (87) | 54 (62) | 22 (25)[b] | 19 (22)[b] |

[a,b] $P < 0.01$ (Chi square)

**Acknowledgements**

This work was supported by R&D Fund of Suranaree University of Technology and Thailand Research Fund.

**References**

Chen, D.Y., Wen, D.C., Zhang, Y.P., Sun, Q.Y., Han, Z.M., Liu, Z.H., Shi, P., Li, J.S., Xiangyu, J.G., Lian, L., Kou, Z.H., Wu, Y.Q., Chen, Y.C., Wang, P.Y. and Zhang, H.M. 2002. Interspecies implantation and mitochondria fate of panda-rabbit cloned embryos. *Biol.Reprod.* 67: 637-642.

Cibelli, J.B., Stice, S.L., Golueke, P.J., Kane, J.J., Jerry, J., Blackwell, C., Ponce de Leon, F.A. and Robl, J.M. 1998. Clones transgenic calves produced from nonquescent fetal fibroblasts. *Science* 280: 1256-1258.

Dinnyes, A., Dai, Y., Jiang, S. and Yang, X. 2000. High developmental rates of vitrified bovine oocytes following parthenogenetic activation, in vitro fertilization, and somatic cell nuclear transfer. *Biol.Reprod.* 63: 513-518.

Dominko, T., Mitalipova, M., Haley, B., Beyhan, Z., Memili, E., Mckusick, B. First, N.L. 1999. Bovine oocyte cytoplasm supports development of embryos produced by nuclear

transfer of somatic cell nuclei from various mammalian species. *Biol.Reprod.* 60: 1496-1502.

Hill, J.R., Winger, Q.A., Jones, K.L., Thomson, J.A., Burghardt, R.C. and Westhusin, M.E. 1999. Serum atarvation of bovine fetal fibroblasts prior to nuclear transfer increases in vitro development rates. *Theriogenology* 51: 204.

http://www.biomedcentral.com/news/20030411/03

Kato, Y., Tani, T., Sotomaru, Y., Kurokawa, K., Kato, J., Doguchi, H., Yasue, H. and Tsunoda, Y. 1998. Eight calves cloned from somatic cells of a single adult. *Science* 282: 2095-2098.

Kitiyanant, Y., Saikhun, J., Chaisalee, B., White, K.L. and Pavasuthipaisit, K. 2001. Somatic cell cloning in buffalo (*Bubalus bubalis*) : effect of interspecies cytoplasmic recipients and activation procedures. *Cloning* 3: 97-104.

Kitiyanant, Y., Saikhun, J., Jaruansuwan, M. and Pavasuthipaisit, K. 2003. Parthenogenetic development of buffalo oocytes after electrical and chemical activation. *Theriogenology* 59: 475.

Lanza, R.P., Cibelli, J., Diaz, F., Moraes, C., Farin, P.W., Farin, C.E., Hammer, C.L., West, M.D., and Damiani, P. 2000. Cloning of endangered species nuclear transfer. *Cloning* 2: 79-90.

Laowtammathron, C., Terao, T., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayan, T., Hochi, S. and Parnpai, R. 2004. Effect of hatching status on vitrification of cloned bovine blastocysts. *Reprod.Fert.Dev.* 16: 174.

Loi, P., Ptak, G., Barboni, B., Fulka, J., Cappai, P. and Clinton, M. 2001. Genetic rescue of an endangered mammal by cross-species nuclear transfer using post-mortem somatic cells. *Nat.Biotechnology* 19: 962-964.

Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 1999. Development of cloned swamp buffalo embryos derived from fetal fibroblasts: comparison *in vitro* cultured with or without buffalo and bovine epithelial cells. *Buffalo J.* 15: 371-384.

Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2000a. Developmental potential of cloned bovine embryos derived from quiescent and non-quiescent adult ear fibroblasts after different activation treatments. *Theriogenology* 53: 239.

Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2000b. The feasibility to produce exotic bovine by cloning technology using ear fibroblasts as donor cells. *Proceeding of the 38th Annual Conference of Kasetsart University, Animal Science section*, Bangkok

Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2000c. Comparison of cloning swamp buffalo embryos using fetal fibroblasts and granulosa cells as donor cells. *Proceeding of the 14th International Congress on Animal Reproduction.* Stockholm, 2-6 July 2000, Abstracts Volume 2: 241.

Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2001. Developmental potential of vitrified cloned swamp buffalo morulae derived from granulosa cells. *Theriogenology* 55: 284.

Parnpai, R., Tasripoo, K. and Kamonpatana, M. 2002. Comparison of cloning efficiency in bovine and swamp buffalo embryo using fetal fibroblasts ear fibroblasts and granulosa cells. *Theriogenology* 57: 443.

Parnpai, R. and Tasripoo, K. 2003. Effects of different activation protocols on the development of cloned swamp buffalo embryos derived from granulosa cells. *Theriogenology.* 59: 279.

Parnpai, R., Laowtammathron, C., Lorthongpanich, C., Muenthaisong, S., Vetchayun, T., Somvan, S., Mernkratoke, P., Patitang, S., Kitsumrej and Siriudomset, S. 2004. The use of cloning technology to produce exotic beef and dairy bovine. *Proceeding of the 42nd Annual Conference of Kasetsart University, Animal Science section*, Bangkok. 94-98.

Saikhun, J., Kitiyanant, Y., Jaruansuwan, M., Chaisalee, B. and Pavasuthipaisit, K. 2000. Development and transfer of cloned bovine embryos using nuclei of cumulus cells, fetal and adult fibroblasts. *Proceeding of the 14th International Congress on Animal Reproduction.* Stockholm, 2-6 July 2000, Abstracts Volume 2: 236.

Saikhun, J., Pavasuthipaisit, K., Jaruansuwan, M. and Kitiyanant, Y. 2002. Xenonuclear transplantation of buffalo (*Bubalus bubalis*) fetal and adult somatic cell nuclei into bovine (*Bos indicus*) oocyte cytoplasm and their subsequent development. *Theriogenology* 57: 1829-1837.

Saikhun, J., Kitiyanant, Y., Sritanaudomchai, H and Pavasuthipaisit, K. 2003. Reprogramming of telomerase activity in nuclear transfer buffalo embryos using quiescent or non-quiescent somatic cells as donor nuclei. *Theriogenology* 59: 284.

Sophon, S., Tasripoo, K. and Srisakwattana, K. 2002. Cloning of swamp bufalo and bovine embryos using their ear fibroblast cells as donor nuclei and in vitro matured swamp buffalo oocytes as ecipient cytoplasts. *Proceeding of the 14th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology.* KhonKaen, 12-15 November 2002. TH/NL: 1-5.

White, K.L., Bunch, T.D., Mitalipov, S. and Reed, W.A. 1999. Establishment of pregnancy after transfer of nuclear transfer embryos produced from the fusion of Argali (*Ovis ammon*) nuclei into domestic sheep (*Ovis aries*) enucleated oocytes. *Cloning* 1: 47-54.

Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J. and Campbell, K.S.H. 1997. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813.

Zakhartchenko, V., Durcova-Hills, G., Stojkovic, M., Schernthaner, W., Prelle, K., Steinborn, R., Muller, M., Brem, G. and Wolf, E. 1999. Effects of serum starvation and re-cloning on the efficiency of nuclear transfer using bovine fetal fibroblasts. *J.Reprod.Fert.* 115: 325-331.

เอกสารประกอบการสัมนางานวิจัยของคณาจารย์ ม.ท.ส และความร่วมมือด้านงานวิจัยในภาคีอุดมศึกษา นครราชสีมา ประจำปี 2546. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา หน้า 54-55.

| | |
|---|---|
| **ชื่อการวิจัย** | การทดสอบการผลิตโคนมและโคเนื้อพันธุ์ดีโดยเทคโนโลยีโคลนนิ่ง |
| **ผู้วิจัย** | ชุติ เหล่าธรรมธร จันทร์เจ้า ล้อทองพาณิชย์ สุจิตรา หมื่นไธสง |
| | ธวัชชัย เวชยันต์ เสวียน ส้มหวาน เพลิน เมินกระโทก |
| | *สมพงษ์ ปาติตัง และ รังสรรค์ พาลพ่าย* |
| **เสนอโดย** | ชุติ เหล่าธรรมธร |
| **สถาบันการศึกษา** | สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร |
| | มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี |
| **ที่อยู่ที่ติดต่อได้** | 111 ถนนมหาวิทยาลัย อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000 |
| | Email: rangsun@ccs.sut.ac.th |
| **สาขาที่ทำวิจัย** | เทคโนโลยีชีวภาพทางสัตว์ |

**<u>จุดมุ่งหมาย</u>**

โคเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย โคนมและโคเนื้อพันธุ์ดีมีไม่พอเพียงที่จะผลิตน้ำนมและเนื้อเพื่อการบริโภคภายในประเทศ ต้องนำเข้าจากต่างประเทศปีละเกือบหมื่นล้านบาท การผลิตโคนมเกษตรกรต้องการเฉพาะเพศเมีย ส่วนโคเนื้อเกษตรกรต้องการทั้งสองเพศ สัดส่วนของลูกเพศเมียและเพศผู้เป็น 1: 1 การโคลนนิ่งโดยใช้เซลล์ร่างกายเป็นเซลล์ต้นแบบสามารถกำหนดเพศและพันธุ์โคได้การวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อทดสอบการใช้เทคโนโลยีโคลนนิ่งผลิตโคนมและโคเนื้อพันธุ์ดี

**<u>วิธีการทดลอง</u>**

เซลล์ต้นแบบทำโคลนนิ่งได้จากการเก็บตัวอย่างเซลล์ใบหูโคนมเพศเมียที่ให้น้ำนมสูงมากกว่า 8,000 กก./ปี และจากโคเนื้อพันธุ์อเมริกันบราห์มันเพศผู้ที่มีพันธุกรรมดีเยี่ยม มาเลี้ยงให้มีจำนวนมากๆแล้วแช่แข็งเก็บไว้ ก่อนใช้จะนำมาทำละลายเลี้ยงเป็นเวลา 2-3 วัน แล้วดูดเซลล์ 1 เซลล์ฉีดเข้าไปในไข่สุกที่ดูดนิวเคลียสออกแล้ว จากนั้นนำไปเชื่อมเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วเลี้ยงในหลอดแก้ว 7-8 วัน นำตัวอ่อนระยะบลาสโตซีสย้ายฝากเข้ามดลูกโคตัวรับซึ่งเป็นสัดมาแล้ว 7-8 วัน ทำการล้วงตรวจการตั้งท้องในวันที่ 60 หลังจากย้ายฝากตัวอ่อน

**ผลการทดลอง**

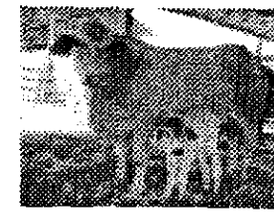
จากการย้ายฝากตัวอ่อนจำนวน 1-2 ตัวอ่อน/ตัวรับ เป็นจำนวนตัวอ่อนทั้งหมด 64 ตัวอ่อนให้โคตัวรับ 40 ตัว ได้โคตัวรับตั้งท้อง 15 ตัว (37.5%) ในจำนวนนี้มี 1 ตัว (6.7%) ที่ตั้งท้องจากตัวอ่อนที่ใช้เซลล์โคบราห์มันเพศผู้เป็นเซลล์ต้นแบบได้แท้งลูกในวันที่ 186 ของการตั้งท้อง ส่วนที่เหลือ 14 ตัว กำลังตั้งท้องระหว่าง 5-6 เดือน ซึ่งมีตัวรับ 2 ตัวตั้งท้องจากตัวอ่อนที่ใช้เซลล์โคนมเป็นเซลล์ต้นแบบ และมีตัวรับ 12 ตัวตั้งท้องจากตัวอ่อนที่ใช้เซลล์โคบราห์มันเพศผู้เป็นเซลล์ต้นแบบ กำหนดคลอดปลายเดือนตุลาคม 2546 เป็นต้นไป

**สรุปผลการทดลอง**

จากการทดลองสามารถย้ายฝากตัวอ่อนโคลนนิ่งให้โคตัวรับตั้งท้องที่ระยะ 5 เดือนในอัตราสูงกว่าที่มีรายงานมาแล้ว และในขณะนี้กำลังประยุกต์ใช้กับเกษตรกรเลี้ยงโคนม โดยย้ายฝากตัวอ่อนให้โคตัวรับ สัปดาห์ละ 20-25 ตัว คาดว่าจะมีโคตัวรับตั้งท้องภายในปี 2546 อย่างน้อย 200 ตัว

**คำขอบคุณ**

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก กองทุนวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (ทุนเมธีวิจัยของ รังสรรค์ พาลพ่าย)



<u>สรุปผลสำเร็จการโคลนนิ่งโคของมทส. ณ วันที่ 27 พฤศจิกายน 2546</u>

***มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (มทส.) ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโคนม-โคเนื้อ มีแม่โคตั้งท้องแล้ว 62 ตัว ตั้งเป้าผลิตลูกโคโคลนนิ่งอย่างน้อย 200 ตัวภายในปี 2547***

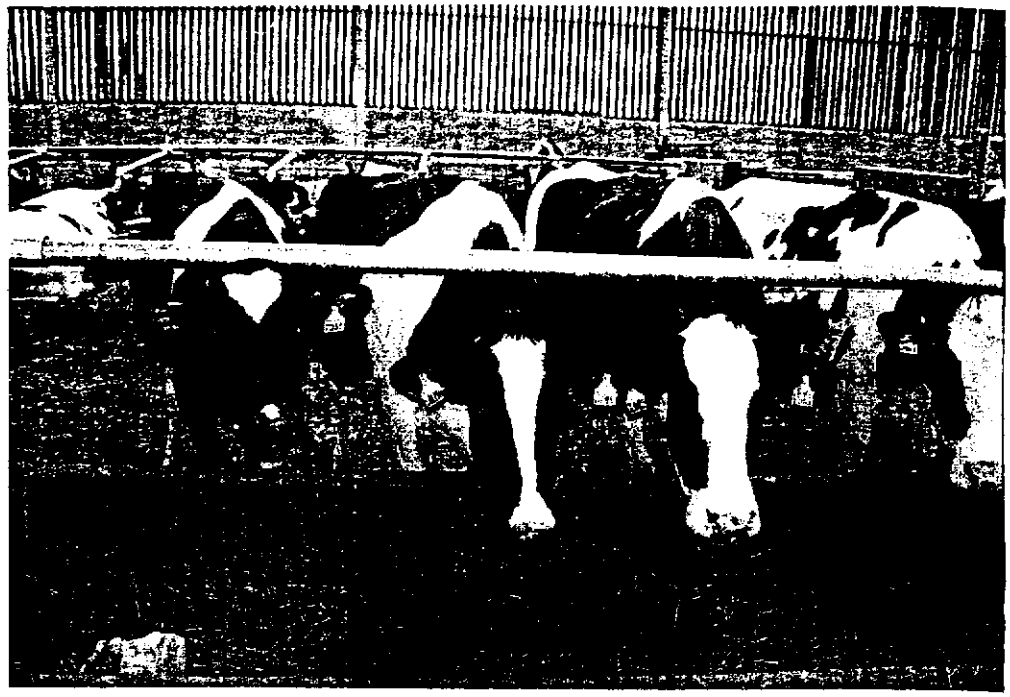
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประสบผลสำเร็จการโคลนนิ่งโคนม-โคเนื้อ ***มีแม่โคตั้งท้องแล้ว 62 ตัว*** จากการวิจัยอย่างต่อเนื่องลูกโคโคลนนิ่งได้คลอดออกมาเมื่อวันที่ 25 ต.ค. 2546 เวลา 21.03 น. มีน้ำหนักแรกเกิด 32.5 กิโลกรัม มีสุขภาพแข็งแรงดีมาก ได้รับการตั้งชื่อว่า "ตูมตาม2" ซึ่งมีจุดกำเนิดจากทีมนักวิจัยโคลนนิ่งของ มทส.ได้เก็บเซลล์ใบหูของ "ตูมตาม" พ่อพันธุ์โคพันธุ์บราห์มัน จากเสเคพัทยาแรนช์ ไปเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อทำธนาคารเซลล์ไว้ทำโคลนนิ่ง แล้วนำตัวอ่อนโคลนนิ่งอายุ 7 วันไปย้ายฝากเข้าสู่มดลูกของโคตัวรับหมายเลข CB13 ในวันที่ 31 ม.ค. 2546 หลังจากนั้นโคตัวรับหมายเลข CB13 ได้ตั้งท้องแล้วคลอดตูมตาม2 ออกมา ***จากการตรวจดีเอ็นเอของตูมตาม, ตูมตาม2 และ แม่โคตัวรับ (CB13) พบว่าดีเอ็นเอของตูมตามและตูมตาม2 เหมือนกันทุกประการ และแตกต่างจากดีเอ็นเอของ CB13 แสดงว่าตูมตาม2 เป็นลูกโคโคลนนิ่งที่แท้จริง*** ในวันที่ 25 พ.ย. 2546 เวลา 15.15 น. ***ตูมตาม3*** ได้คลอดออกมา มีน้ำหนักแรกเกิด 46 กิโลกรัม มีสุขภาพแข็งแรงดีมาก ซึ่งขณะนี้กำลังเตรียมตรวจดีเอ็นเอเช่นเดียวกับตูมตาม2

นอกจากการเกิดมาของตูมตาม2 และ ตูมตาม3 แล้ว ยังมีแม่โคตัวรับอีก 8 ตัว ซึ่งอุ้มท้องลูกโคโคลนนิ่งตูมตาม กำลังท้องแก่ใกล้คลอด โดยอีก 3 ตัว จะคลอดปลายเดือนพ.ย. 2546 และอีก 6 ตัวจะคลอดปลายเดือน ธ.ค. 2546 รวมแล้วจะมีลูกโคโคลนนิ่งจากเซลล์ของตูมตามเกิดมาทั้งหมด 10 ตัว

นอกจากนี้ทีมนักวิจัยโคลนนิ่งยังมีแม่โคตัวรับตั้งท้อง จากการโคลนนิ่ง ดังมีรายละเอียดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 สรุปผลการโคลนนิ่งโคนม-โคเนื้อ โดยทีมนักวิจัยโคลนนิ่งสัตว์ของ มทส

| เซลล์ต้นแบบ ที่ใช้ทำโคลนนิ่ง | จำนวนตัวรับ กำลังตั้งท้อง | จำนวน ตัวรับคลอด | หมายเหตุ |
|---|---|---|---|
| โคเนื้อพันธุ์บราห์มันเทา เพศผู้ (ตูมตาม) | 9 | 2 | -โคตัวรับอีก 9 ตัวกำหนดคลอดภายในสิ้นปี 2546 |
| โคเนื้อพันธุ์บราห์มันแดง เพศเมีย (SK180) | 18 | - | - กำหนดคลอดตั้งแต่ปลายเดือน ก.ค. 2547 และยังมีการทำโคลนนิ่งทุกสัปดาห์ โดยมีเป้าหมายผลิตลูกโคโคลนนิ่งอย่างน้อย 30 ตัว |
| โคนมพันธุ์ดี ของมทส. หมายเลข 346 ให้น้ำนม 7,000กก./ปี | 35 | - | - กำหนดคลอดตั้งแต่ปลายเดือน ก.ค. 2547 และยังมีการทำโคลนนิ่งทุกสัปดาห์ โดยมีเป้าหมายผลิตลูกโคโคลนนิ่งอย่างน้อย 200 ตัว<br>- ในจำนวนตัวรับที่ตั้งท้องนี้ ส่วนหนึ่งเป็นโคนมในฟาร์มมหาวิทยาลัย และของเกษตรกรเลี้ยงโนม |



**ท่ามกลางความหวาดวิตกและกังขาจากทั่วโลกต่อการนำเทคโนโลยีชีวภาพที่เรียกว่า "โคลนนิ่ง" มาใช้อย่างกว้างขวางขึ้นนั้น หลายมุมทั่วโลกก็กำลังดำเนินการทดสอบ พิสูจน์ความเป็นไปได้ในการใช้เทคโนโลยีนี้ให้เกิดประโยชน์ต่อพลเมืองของตน ที่มีแนวโน้มให้เห็นถึงความสำคัญและจำเป็นของเทคโนโลยีดังกล่าวต่อมวลมนุษย์ภายใต้สภาพแวดล้อมและวัฒนาการเปลี่ยนแปลงไปอย่างรวดเร็ว**

ในประเทศไทย เมื่อ 4 ปีก่อน นักวิจัยไทยดำเนินการวิจัยโคลนนิ่งจนประสบความสำเร็จในการผลิตลูกโคเนื้อโคลนนิ่งเป็นรายแรกของเอเชียอาคเนย์ เป็นผลงานที่แสดงให้เห็นถึงขีดความสามารถของนักวิจัยไทยและความเป็นหนึ่งของวิทยาการโคลนนิ่งในภูมิภาคนี้

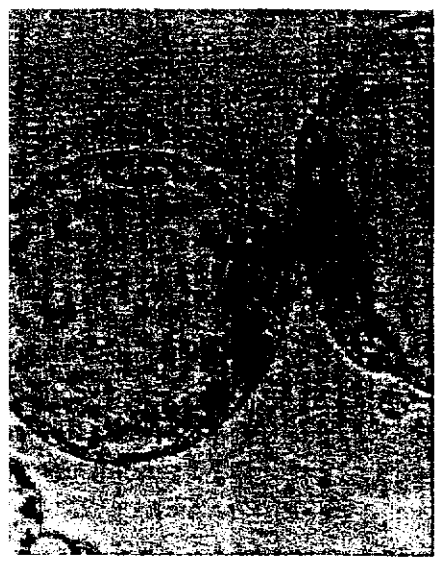
# แช่แข็งตัวอ่อนโคลนนิ่ง

## เทคโนโลยีสร้างฐานวัวนมพันธุ์ดีของไทย

นับแต่นั้น การวิจัยโคลนนิ่งสัตว์ยังได้ดำเนินต่อมาเรื่อยถึงปัจจุบัน ซึ่ง **"ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย"** เจ้าของผลงานลูกโคเนื้อโคลนนิ่งตัวแรกของประเทศ อดีตอาจารย์ประจำคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปัจจุบันเป็นอาจารย์ประจำสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และหัวหน้าทีมนักวิจัยโคลนนิ่งสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ดำเนินการวิจัยเกี่ยวกับโคลนนิ่งสัตว์ต่อเนื่อง ทำการโคลนนิ่งในวัวเนื้อและวัวนมเพิ่มขึ้น กระทั่งค้นพบเทคนิคการเก็บตัวอ่อนโคลนนิ่งโคนมที่สามารถเพิ่มอัตรารอดของตัวอ่อนขึ้นจากวิธีการเดิมอีก 30-40% อันเป็นกุญแจสำคัญของการทำโคลนนิ่ง และเป็นสิ่งสำคัญหนึ่งในการเพิ่มศักยภาพการผลิตโคนมของไทย

แม้ประเทศไทยจะมีการเลี้ยงวัวนมมานานกว่า 40 ปี และมีการส่งเสริมอย่างจริงจังจากภาครัฐอย่างต่อเนื่องก็ตาม แต่เกษตรกรไทยก็ยังประสบกับปัญหาไม่คุ้มทุน สาเหตุสำคัญประการหนึ่ง นั่นคือแม่วัวให้น้ำนมดิบในปริมาณไม่คุ้มกับค่าอาหารและการบริหารจัดการในฟาร์ม โดยปัจจุบันปริมาณน้ำนมดิบเฉลี่ยอยู่ที่ประมาณ 10-15 กิโลกรัม/ตัว/วัน ขณะที่ต่างประเทศนั้นแม่วัวอาจให้น้ำนมได้สูงถึง 50 กิโลกรัม/ตัว/วัน

แม้ประชากรวัวนมในประเทศมีมากราว 5 แสนตัว แต่ให้น้ำนมต่ำเฉลี่ยเพียง 3,500 กิโลกรัม/ตัว/ปี ในจำนวนนี้มีอยู่ประมาณ 50,000 ตัวที่ให้น้ำนมตั้งแต่ 5,000 กิโลกรัม/ตัว/ปีขึ้นไป และในจำนวน 50,000 ตัวนี้ มีแค่ 5,000 ตัวเท่านั้นที่ให้น้ำนมตั้งแต่ 7,000 กิโลกรัม/ตัว/ปี แต่ต่างประเทศวัวนมสามารถให้น้ำนมได้มากกว่า 10,000 กิโลกรัม/ตัว/ปี



สาเหตุใหญ่ของวัวให้น้ำนมน้อย นั่นคือขาดวัวนมพันธุ์ดีเยี่ยม แม้บ้านเราจะมีการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์โคนมลูกผสม และพัฒนาได้พันธุ์ที่ให้นมสูงขึ้นก็ตาม แต่เป็นพันธุ์ที่ไม่ให้ความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจต่อต้นทุนในปัจจุบันที่เปลี่ยนแปลงไป อีกทั้งปัญหาในการผสมเทียมเพื่อได้ลูกวัวนมออกมานั้น ได้เป็นเพศผู้ถึงครึ่งหนึ่ง ได้พันธุ์ดีและไม่ดีบ้าง ซึ่งเกษตรกรไม่ต้องการ นอกจากนี้ระยะการปรับปรุงพันธุ์วัวนมต้องใช้เวลา กว่าแม่โคนมแต่ละตัวจะตั้งท้องและคลอดลูกออกมาแต่ละรุ่นนั้น ใช้เวลาไม่ต่ำกว่า 1 ปี จึงไม่สามารถเพาะขยายพันธุ์โคนมพันธุ์ดีไปสู่เกษตรกรได้อย่างรวดเร็ว ที่สำคัญคือประเทศไทยมีจำนวนวัวนมพันธุ์ดีเยี่ยมไม่มาก

หลังประสบความสำเร็จในการทำโคลนนิ่งวัวเนื้อ และจากปัญหาเบื้องต้นดังกล่าว ทำให้ **"ดร.รังสรรค์ พาลพ่าย"** เลือกดำเนินการวิจัยทำโคลนนิ่งสัตว์ในวัวนมต่อ จนสามารถผลิตตัวอ่อนโคลนนิ่งวัวนมพันธุ์ดีพร้อมฝากท้องในแม่วัว โดยใช้เซลล์ใบหูจากแม่วัวพันธุ์ดีเยี่ยมมาเข้ากระบวนการโคลนนิ่ง ลักษณะทุกอย่างจากวัวต้นแบบจะถ่ายทอดมายังตัวอ่อน ทำให้ได้ตัวอ่อนเพศเมียพันธุ์ดีเยี่ยมทั้งหมด สามารถนำตัวอ่อนที่ผลิตได้ไปย้ายฝากให้กับแม่วัวพันธุ์

เห็นถึงความสำคัญของเทคโนโลยีนี้ อนาคตข้างหน้าจะเกิดการถ่ายทอดเทคโนโลยี มีบุคลากรมาพัฒนาต่อกันกระจายทั่วประเทศ คือสิ่งมุ่งหวัง

ทว่า ความหวาดหวั่นและข้อสงสัยที่ยังเกิดแก่หลายคนจากกรณีปัญหาแกะโคลนนิ่ง "ดอลลี่" ซึ่งแก่ก่อนวัยมาสร้างปัญหากับวัวโคลนนิ่งด้วยหรือไม่นั้น ดร.รังสรรค์ ให้ความมั่นใจว่าสิ่งนี้จะไม่ประสบกับวัวแน่ เนื่องจากทดลองได้ผลมาถูก ดังจะเห็นว่าวัวโคลนนิ่งราว 2,000 ตัวจากทั่วโลกยังไม่มีรายงานถึงความผิดพลาดอย่างแกะดอลลี่ ซึ่งเป็นกรณีพิเศษเพียงกรณีเดียวที่พบ ถึงวันนี้ก็ยังเป็นสิ่งที่ให้คำตอบชัดเจนไม่ได้ว่าทำไมแกะดอลลี่จึงแก่เร็ว มีการสันนิษฐานคร่าวๆ ว่า เซลล์ที่หยิบมาใช้เป็นเซลล์ที่มีปัญหา อาจเป็นเซลล์มาทำโคลนนิ่งมีความผิดปกติเบื้องต้น แต่เป็นเพียงข้อสันนิษฐาน ที่ยังไม่สามารถหาคำตอบได้

*"แต่สำหรับวัวโชคดีว่ามีการดำเนินการมาอย่างถูกต้อง และเราเองก็มีความเชี่ยวชาญเรื่องเซลล์และรู้กระบวนทุกอย่างอย่างดีแล้ว จึงไม่น่าจะเกิดกรณีดอลลี่ขึ้นมาอีกได้โดยเฉพาะกับวัว อย่างวัวเนื้อที่เราเคยทำมาก็ไม่พบปัญหาอะไร แม้จำนวนวัวโคลนนิ่งยังไม่มาก เพราะเทคโนโลยีเริ่มได้ไม่นาน ญี่ปุ่นเขามีวัวโคลนนิ่งอย่างน้อยๆ 500 ตัว อเมริกาก็เช่นกัน นอกจากนี้ยังมีในยุโรป ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ เหล่านี้ก็ยังไม่พบความผิดปกติอย่างดอลลี่ แล้วเราก็เป็นประเทศหนึ่งที่ฝันว่าจะต้องเป็น 1 ใน 5 ประเทศที่ผลิตวัวโคลนนิ่งมากที่สุดในโลก คือตั้งเป้าไว้ปีละ 200 ตัวตามที่กล่าวถึงโครงการอนาคตนั้น เมื่อถึงตอนนั้นเราจะมีข้อมูลวัวโคลนนิ่งตั้งแต่เติบโต การตั้งท้อง คลอด และข้ออื่นๆ อีกสารพัดให้เขียนตำราได้อีกหลายเล่มที่จะทำให้เกิดการพัฒนาในอนาคต"*

อดีตที่ผ่านมา เทคโนโลยีเกี่ยวกับการปรับปรุงพันธุ์สัตว์มีอยู่อย่างเดียวคือ "ผสมเทียม" ที่ต้องนำเชื้อแช่แข็งเท่านั้น นับเป็นเทคโนโลยีทันสมัยที่สุดเมื่อ 50 ปีที่แล้ว อันเป็นเวลาไล่เลี่ยกับการเริ่มต้นเลี้ยงวัวนมในบ้านเรา ซึ่งพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ขึ้นมาด้วยการผสมเทียม พัฒนาจากวัวเนื้อจนสามารถเป็นวัวนมได้ในที่สุด แต่อัตราการพัฒนาล่าช้า บวกกับฐานประชากรวัวนมที่ดีนั้นมีอยู่น้อย ดังนั้นการที่สามารถนำเอาสิ่งที่พัฒนามาแล้ว 50 ปี มาต่อยอดให้มีการพัฒนาเร็วขึ้นจาก 50 ปี เหลือเพียงแค่ 5-10 ปีข้างหน้า ที่ประเทศไทยจะมีวัวนมพันธุ์ดีสักร้อยตัว แล้วเก็บเอาเซลล์จากร้อยตัวนี้มาทำโคลนนิ่งอย่างละร้อยตัวอ่อน ส่งกลับไปยังเกษตรกรไว้ทำพันธุ์ดีร้อยตัว แล้วเก็บเอาเซลล์จากร้อยตัวนี้มาทำโคลนนิ่งอย่างละร้อยตัวอ่อนส่งกลับไปยังเกษตรกรไว้ทำพันธุ์ สามารถมีลูกวัวนมพันธุ์ดีถึงหมื่นตัว คือประโยชน์ที่ได้แก่การผลิตในเกษตรกรรมไทย

**วันนี้ สำหรับวิทยาการโคลนนิ่งแล้วประเทศไทยไม่ด้อยกว่าประเทศอื่นเขาเลย ไม่ว่ายุโรป อเมริกา หรือญี่ปุ่น ทั้งในด้านเทคโนโลยีและบุคลากร จะต่างก็เพียงเรื่องทุนน้อย ที่สวนกับนโยบายสร้างประเทศสู่ยุคไอทีและไบโอเทคโนโลยีของรัฐบาลคิดใหม่ทำใหม่ อีกแต่ 10 ปีข้างหน้า ถ้าภาวะนี้ยังเป็นอยู่ เราสู้เขาไม่ได้อย่างแน่นอน นั่นเพราะการวิจัยคือการหาของใหม่ๆ ทุนเยอะคนทำวิจัยก็เยอะ สามารถแตกออกไปทำได้หลายแง่มุม ได้ความรู้มาก ถ้าทุนน้อยคนทำน้อย ความรู้แค่นิดเดียวย่อมไม่เกิดแนวทางพัฒนาที่รัฐจะนำไปใช้กับพลเมืองในประเทศต่อไป.**

## ประเดิมข่าว

# สภาวะการเลี้ยงจระเข้ในจังหวัดนครปฐม

อ.เมือง จ.นครปฐม ถือเป็นแหล่งเลี้ยงจระเข้ที่ใหญ่ที่สุดแห่งหนึ่งของประเทศ ซึ่งการเลี้ยงจระเข้ในจังหวัดนครปฐมนั้น ไม่เพียงจะเกิดจากความชื่นชอบส่วนตัวของผู้เลี้ยงเท่านั้น แต่ยังมีเหตุผลทางด้านเศรษฐกิจเข้ามาเกี่ยวข้องด้วย เนื่องจากเมื่อมีการเลี้ยงจระเข้ในพื้นที่ก็จะทำให้มีโรงเชือดจระเข้เกิดขึ้นตามมาด้วย ซึ่งจะเชือดจระเข้ที่เลี้ยงได้ขนาดเพื่อส่งขายให้กับโรงงานผลิตหนังจระเข้ และโรงงานจะแจ้งโรงงานผู้ผลิตของตนในสหรัฐอเมริกา (OMES) ตลอดจนผู้ค้าต่างๆ ทั่วโลกเพื่อประชาสัมพันธ์ให้ทราบว่าจะมีหนังจระเข้ส่งออกไปขายที่ประเทศใดบ้าง นอกจากนี้การเลี้ยงจระเข้ยังเป็นอาชีพที่สามารถทำรายได้ให้กับประเทศได้ไม่น้อย เช่น ฟาร์มจระเข้สวนสามพรานจังหวัดนครปฐม หรือในต่างประเทศ เช่น มณฑลกวางเจา ประเทศจีน ได้ใช้ประโยชน์จากการเลี้ยงจระเข้ของกรมประมง จังหวัดนครปฐม ซึ่งส่งจระเข้จำนวน 3,000 ตัวทางเครื่องบินเพื่อไปโชว์ตัวเท่านั้น

แม้ว่าการเลี้ยงจระเข้จะเป็นอาชีพที่มีการลงทุนค่อนข้างสูง แต่ก็เป็นอาชีพที่มีผู้สนใจเลี้ยงกันมาก ปัจจุบันจังหวัดนครปฐมมีผู้เลี้ยงจระเข้ 28 ราย เพาะขยายพันธุ์เพื่อจำหน่าย 4 ราย มีจระเข้ในจังหวัดทั้งสิ้น 35,838 ตัว และมีการจับเคลื่อนย้ายเข้าออกประมาณเดือนละ 2-5 ครั้ง ราคาขายจะเข้ขึ้นอยู่กับขนาดเฉลี่ย ราคาจระเข้วัยรุ่น ความยาวประมาณ 1.2-1.4 เมตร ราคาประมาณ 8,000-10,000 บาท จะเห็นมูลค่าจระเข้ของจังหวัดนครปฐมในขณะนี้ไม่ต่ำกว่า 240 ล้านบาท

การเลี้ยงจระเข้ยังมีส่วนในการเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรด้านปศุสัตว์อีกทางหนึ่ง ทั้งนี้เนื่องจากจังหวัดนครปฐมเป็นจังหวัดที่มีการประกอบอาชีพเลี้ยงไก่และสุกรมากเป็นอันดับต้นๆ ของประเทศ บางครั้งเมื่อการเลี้ยงประสบปัญหา ไม่ว่าจะเป็นในเรื่องการไม่คุ้มทุนหรือเป็นโรค ซากเหล่านี้แต่เดิมไม่มีมูลค่า เกษตรกรไม่ทราบจะนำไปทิ้งที่ใด หลังจากที่มีการนิยมเลี้ยงจระเข้เกิดขึ้น จึงมีการนำซากไปใช้เป็นอาหารจระเข้ จระเข้ตัวหนึ่งจะกินอาหารครั้งละ 3-5 กิโลกรัม กินครั้งหนึ่งจะอยู่ได้นาน 7 วัน ดังนั้นปริมาณอาหารที่จะต้องใช้เลี้ยงจระเข้ต่อเดือนประมาณ 600 ตัว ราคาขายซาก ณ วันนี้กิโลกรัมละ 10-20 บาท คิดเป็นเงินรายได้สมทบสำหรับกิจกรรมด้านปศุสัตว์เดือนละไม่ต่ำกว่า 6 ล้านบาท.