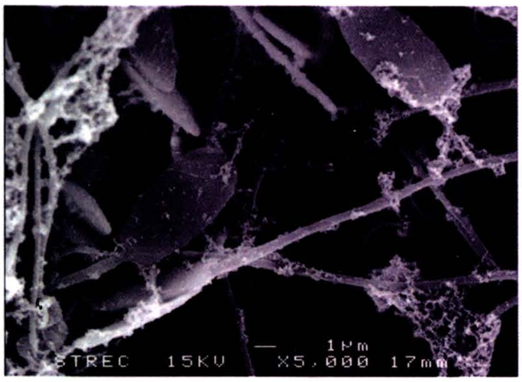
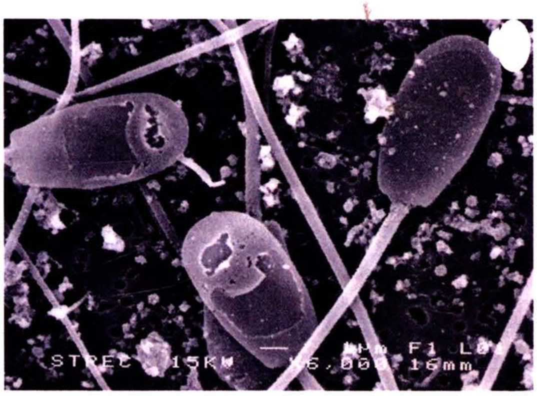
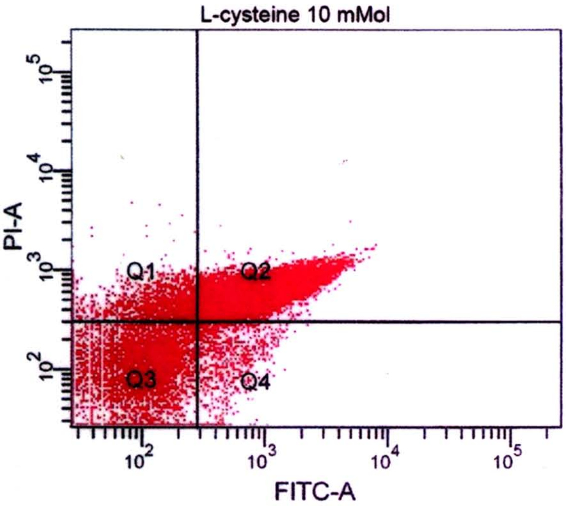
ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
246500

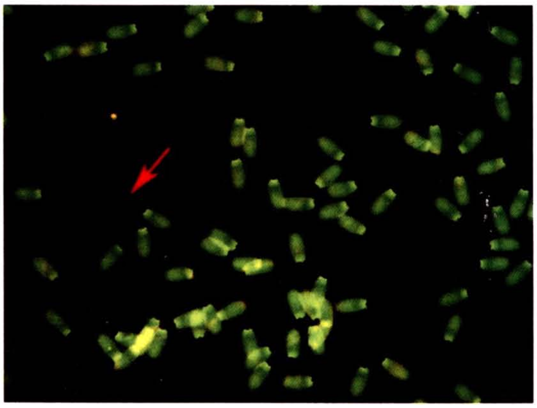
รายงานการวิจัย

เรื่อง การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งและการประยุกต์ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งสำหรับการผสมเทียมในอุตสาหกรรมการผลิตสุกร









โดย

รศ. น.สพ. ดร. กัมพล แก้วเกษ — คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ. น.สพ. ดร. เผด็จ ธรรมรักษ์ — คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อ. สพ.ญ. ดร. สุกัญญา มณีอินทร์ — คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
ศ. น.สพ. ดร. มงคล เตชะกำพุ — คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ 2553

b00254571

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

246500

วช.
NRCT

รายงานการวิจัย

เรื่อง การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งและการประยุกต์ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งสำหรับการผสมเทียมในอุตสาหกรรมการผลิตสุกร

Development of boar semen cryopreservation technology and the application of frozen-thawed boar semen for artificial insemination in swine industry

โดย

รศ. น.สพ. ดร. กัมพล แก้วเกษ	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ. น.สพ. ดร. เผด็จ ธรรมรักษ์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อ. สพ.ญ. ดร. สุกัญญา มณีอินทร์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ. น.สพ. ดร. ไพศาล เทียนไทย	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ. สพ.ญ. ดร. ศยามณ ศรีสุวัฒนาสกุล	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
สพ.ญ. พนิดา ชนาภิวัฒน์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศ. น.สพ. ดร. มงคล เตชะกำพุ	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ประจำปีงบประมาณ 2553

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

รายงานการวิจัย

เรื่อง การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งและการประยุกต์ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งสำหรับการผสมเทียมในอุตสาหกรรมการผลิตสุกร

Development of boar semen cryopreservation technology and the application of frozen-thawed boar semen for artificial insemination in swine industry

โดย

รศ. น.สพ. ดร. กัมพล แก้วเกษ	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ. น.สพ. ดร. เผด็จ ธรรมรักษ์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อ. สพ.ญ. ดร. สุกัญญา มณีอินทร์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
รศ. น.สพ. ดร. ไพศาล เทียนไทย	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ผศ. สพ.ญ. ดร. ศยามณ ศรีสุวัฒนาสกุล	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
สพ.ญ. พนิดา ชนาภิวัฒน์	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ศ. น.สพ. ดร. มงคล เตชะกำพุ	คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ประจำปีงบประมาณ 2553

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ได้สนับสนุนงบประมาณประจำปี 2553 สำหรับการทำวิจัยในโครงการนี้

แผนงานวิจัยเรื่อง (ภาษาไทย) การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งและการประยุกต์ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งสำหรับการผสมเทียมในอุตสาหกรรมการผลิตสุกร

(ภาษาอังกฤษ) Development of boar semen cryopreservation technology and the application of frozen-thawed boar semen for artificial insemination in swine industry

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปี 2553 **จำนวนเงิน** 2,140,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี **ตั้งแต่** เดือน มิถุนายน ปี พ.ศ. 2553 ถึง มิถุนายน ปี พ.ศ. 2554

รายนามคณะผู้วิจัยพร้อมทั้งหน่วยงานที่สังกัด และหมายเลขโทรศัพท์

รองศาสตราจารย์กัมพล แก้วเกษ

ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกและการสาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล พุทธมณฑล นครปฐม 73170

โทรศัพท์ 0-24415242 ต่อ 1526 โทรสาร 0-24410937 E-mail:vskkk@mahidol.ac.th

รศ. น.สพ. ดร. เผด็จ ธรรมรักษ์

ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 02-2189644-5 E-mail: Padet.T@chula.ac.th

รศ. น.สพ. ดร. ไพศาล เทียนไทย

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 0-2218-9658 โทรสาร 0-2218-9657 E-mail: Paisan.T@chula.ac.th

ผศ.สพ.ญ. ดร. ศยามณ ศรีสุวัฒนาสกุล

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330 โทรศัพท์ 0-2218-9708 โทรสาร 0-2218-9657 E-mail: ssayamon@chula.ac.th

สพ. ญ. พนิดา ชนาภิวัตน์

ภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-2189644-5 E-mail:vet011@hotmail.com

บทคัดย่อ

246500

ในกระบวนการการแช่แข็งน้ำเชื้อนั้นจะทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น ซึ่งอนุมูลเหล่านี้จะเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอออกซิเดชันของเยื่อหุ้มเซลล์ของตัวอสุจิและส่งผลให้มีความสามารถในการเคลื่อนที่ลดลงและมีผลกระทบเชิงลบต่อคุณภาพด้านอื่นๆด้วย ในปัจจุบันการผสมเทียมสุกรด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งมีการพัฒนาและใช้งานในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรอย่างรวดเร็วในสหรัฐอเมริกา ยุโรป และประเทศไทย ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง ในประเทศไทยยังขาดข้อมูลพื้นฐานหลายด้านที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิต ขั้นตอน และเทคนิคการผลิต จนถึงเทคนิคการผสมพันธุ์ การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของซิสเทอีนในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรและเพื่อศึกษาแนวทางในการการผสมเทียมแบบสอดท่อเข้ามดลูกและเข้าปีกมดลูกในแม่สุกรหย่านมด้วยน้ำเชื้อสุกรแช่แข็ง ตลอดจนศึกษาแนวทางการกำหนดเวลาในการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อพ่อสุกรแช่แข็งน้ำเชื้อสดจากพ่อสุกรจะถูกนำมาแช่แข็งโดยใช้สารละลายสำหรับการแช่แข็งที่มีการเติมสารต้านอนุมูลอิสระชนิดแอลซิสเทอีน ที่ระดับความเข้มข้นต่างกันดังนี้ ระดับแอลซิสเทอีน 0 มิลลิโมลา (กลุ่มควบคุม) 5 มิลลิโมลา 10 มิลลิโมลา และ 15 มิลลิโมลาและจะถูกนำไปบรรจุในหลอดฟางขนาด 0.5 มิลลิลิตร เพื่อแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งแบบควบคุมอุณหภูมิภายหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อสุกร น้ำเชื้อจะถูกนำมาละลายเพื่อประเมินการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า การรอดชีวิตของตัวอสุจิ ความสมบูรณ์ของอะโครโซมการเกิดคาปาซิเตชัน และรูปร่างของตัวอสุจิ รวมทั้งตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนนอกจากนี้ น้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้จะถูกนำไปผสมกับแม่สุกรทั้งในสถานีวิจัยและในฟาร์มสุกรทั้งนี้เพื่อประเมินผลเกี่ยวกับการกระจายตัวของอสุจิในมดลูก อัตราการเกิดการปฏิสนธิ อัตราการตั้งท้อง และขนาดครอกจากผลการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของแอลซิสเทอีน ที่ 5 มิลลิโมลาหรือ 10 มิลลิโมลา จะทำให้น้ำเชื้อสุกรแช่แข็งมีคุณภาพดีกว่ากลุ่มควบคุม การแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนและโปรเจสเตอโรนมีความแตกต่างกัน กล่าวคือ พบการแสดงออกของตัวรับเอสโตรเจนอัลฟา บริเวณ mid-piece และส่วนหางของตัวอสุจิ สำหรับเอสโตรเจนเบตา พบการแสดงออกบริเวณส่วนอะโครโซมของตัวอสุจิและมีการแสดงออกของตัวรับโปรเจสเตอโรน ที่บริเวณ mid-piece ของตัวอสุจิ น้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้สามารถนำไปผสมเทียมทั้งในสถานีวิจัยและในฟาร์มสุกรได้ โดยสามารถใช้ได้ทั้งท่อผสมเทียมแบบสอดเข้าไปในตัวมดลูกและแบบสอดลึกเข้าไปในปีกมดลูก

Cryopreservation is associated with the production of reactive oxygen species which leads to lipid peroxidation of the sperm membrane and consequently a reduction of sperm motility and decreased fertility potential of boar semen. The use of cryopreserved boar semen for artificial

insemination (AI) in the pig industry is increasing continuously in USA, Europe and Thailand. In Thailand, information concerning the technique and the process of cryopreservation of pig semen is lackingand also the AI technique use of cryopreserved boar semen in pig is being developed. Therfore, the aims of this study were to determine the optimal concentration of L-cysteine needed for cryopreservation of boar semen and also toexamine the possibility to inseminate the pig using IUI and DIUI technique in weaned sows with cryopreserved boar semen.The freezing extender for boar semen was supplemented with various concentration of L-cysteine to reach 0 mM (control), 5 mM, 10 mM and 15 mM before freezing in straws (0.5 ml) by using a controlled-rate freezer. After cryopreservation, frozen semen samples were thawed and investigated for progressive motility, viability, acrosome integrity, capacitation and sperm morphology as well as estrogen and progesterone receptors on spermatozoa.For AI technique testing, sows were inseminated with frozen semen both in the research station (Chulalongkorn University) and under field condition (pig farm). The fertility data such as sperm distribution, fertilization, farrowing rate and litter size were recorded.The results revealed that L-cysteine at a concentration of 5 or 10 mM to freezing extender was the optimum concentration of L-cysteine for improving the quality of frozen-thawed boar semen.Regarding the estrogen and progesterone receptors (ER and PR), their expression depend upon the location of spermatozoa, i.e.ER alpha expressed on mid-piece and tail; ER beta expressed on acrosome region and PR expressed on mid-piece. For fertility trial, artificial insemination can be accomplished under research station and field conditions in Thailand using either IUI or DIUI technique.

คำสำคัญ (Key words)

น้ำเชื้อแช่แข็ง (frozen semen) พ่อสุกร (boar) สารต้านอนุมูลอิสสระ (antioxidants)L-cysteine น้ำเลี้ยงเชื้อ (seminal plasma) การผสมเทียมแบบสอดท่อเข้ามดลูก (Intra-uterine insemination) การผสมเทียมแบบสอดท่อเข้าปีกมดลูก(Deep intra-uterine insemination)ระบบภูมิคุ้มกัน(immune system) คาปาซิเตชั่น (capacitation) สัณฐานวิทยาของเซลล์อสุจิ (sperm morphology) ตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจน (Estrogen receptor) ตัวรับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน(Progesterone receptor)

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทนำรวม	**10**
รายงานการวิจัยเรื่องการศึกษาจำนวนอสุจิ อัตราการปฏิสนธิ และจำนวนคัพภะในท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์แม่สุกรหลังการผสมเทียมแบบสอดท่อเข้าตัวมดลูกและเข้าปีกมดลูกด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งในสุกร	**15**
รายงานการวิจัยเรื่องการศึกษาหาความเข้มข้นของ L-cysteine ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อสุกร และผลของการใช้สารละลายส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง (supernatant) สำหรับเป็นสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง และเป็นสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ก่อนการผสมเทียมต่อประสิทธิภาพในการสืบพันธุ์ของสุกรนาง	**46**
รายงานการวิจัยเรื่องการแสดงออกของตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจน และโปรเจสเตอโรนบนตัวอสุจิของสุกรในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง	**89**
สรุปภาพรวมของแผนงานวิจัย	**123**
ข้อเสนอแนะที่ได้จากการวิจัย	**125**
ประโยชน์ในทางประยุกต์ของผลงานวิจัย	**125**
ประวัติและผลงานวิจัยที่สำคัญของนักวิจัยและคณะ	**126**

คำอธิบายคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

AI	= Artificial Insemination
CTC	= Chlortetracycline
DIUI	= Deep Intrauterine Insemination
ER	= Estrogen receptor
FR	= Farrowing rate
FITC-PNA	= Fluoresceinisothiocyanate-labeled peanut agglutinin
hCG	= Human chorionic gonadotropin
IUI	=Intrauterine insemination
PR	= Pregnancy rate
PR	= Progesterone receptor
PUFA	= Polyunsaturated fatty acid
ROS	= Reactive oxygen species
SEM	= Scanning electron microscopy
TEM	= Transmission electron microscopy
UTJ	=Utero-tubal junction