ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (การผลิตสัตว์)

ปริญญา

การผลิตสัตว์ | สัตวบาล

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง ผลของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งและวิตามินอีที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่สามเหลือง

Effects of Cryoprotectants and Vitamin E on Quality of Three-yellow Cocks Frozen Semen

นามผู้วิจัย นายปิยะรัฐ จันทร์อ่อน

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(รองศาสตราจารย์วรวิทย์ สิริพลวัฒน์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(รองศาสตราจารย์อนุชัย ภิญโญภูมิมินทร์, D.Vet.Med.Sc.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(รองศาสตราจารย์เนรมิตร สุขมณี, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ผลของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งและวิตามินอีที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่สามเหลือง

Effects of Cryoprotectants and Vitamin E on Quality of Three-yellow Cocks Frozen Semen

โดย

นายปิยะรัฐ จันทร์อ่อน

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (การผลิตสัตว์)
พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปิยะรัฐ จันทร์อ่อน 2556: ผลของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งและวิตามินอีที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่สามเหลือง ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (การผลิตสัตว์) สาขาการผลิตสัตว์ ภาควิชาสัตวบาล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์วรวิทย์ สิริพลวัฒน์, Ph.D. 80 หน้า

พ่อพันธุ์ไก่สามเหลืองจำนวน 10 ตัว นำมารีดน้ำเชื้อเพื่อศึกษาผลของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง (การทดลองที่ 1) และการผสมวิตามินอีในสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่สามเหลือง (การทดลองที่ 2) ในการทดลองที่ 1 ทำการเจือจางน้ำเชื้อด้วย SP-TALP และแบ่งการแช่แข็งน้ำเชื้อเป็น 6 กลุ่มคือ SP-TALP + 6% DMSO, SP-TALP + 8% DMSO, SP-TALP + 10% DMSO และ SP-TALP + 6% EG, SP-TALP + 8% EG, SP-TALP + 10% EG พบว่า SP-TALP + 10% EG ให้คุณภาพน้ำเชื้อดีที่สุดหลังการแช่แข็งโดยมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อสุจิรูปร่างปกติ ส่วนหัวอสุจิผิดปกติ ส่วนกลางอสุจิผิดปกติ ส่วนหางอสุจิผิดปกติและมีการตายของตัวอสุจิ เท่ากับ 51.17, 56.50, 13.42, 13.58, 16.50, และ 35.17 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ในการทดลองที่ 2 ทำการเจือจางน้ำเชื้อด้วย SP-TALP และแบ่งการทดลองเป็น 4 กลุ่ม คือ 10% EG+Vit E 0, 10% EG+Vit E 4, 10% EG+Vit E 8 และ10% EG+Vit E 12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรพบว่ากลุ่มของ 10% EG+VitE 4 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตรเป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อของไก่สามเหลืองดีสุดโดยมีอสุจิรูปร่างปกติ ส่วนหัวอสุจิผิดปกติ ส่วนกลางอสุจิผิดปกติ และมีการตายของตัวอสุจิ เท่ากับ 48.33, 16.83, 12.50 และ54.33 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ผลการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งในห้องปฏิบัติการครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถเลือกใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ SP-TALP ร่วมกับ 10% EG+Vit E 4 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่สามเหลือง

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Piyarat Jun-On 2013: Effects of Cryoprotectants and Vitamin E on Quality of Three-yellow Cocks Frozen Semen. Master of Science (Animal Production), Major Field: Animal Production, Department of Animal Science. Thesis Advisor: Associate Professor Voravit Siripholvat, Ph.D. 80 pages.

Semen was collected from 10 Three-yellow Cocks by a massage technique. Pooled semen was treated to determine the effect of cryoprotectant (experiment 1) and the effect of freezing protocol and vitamin E on frozen/thawed semen quality (experiment 2). In experiment 1, semen was diluted and frozen in 6 treatments: SP-TALP + 6% DMSO, SP-TALP + 8% DMSO, SP-TALP + 10% DMSO and SP-TALP + 6% EG, SP-TALP + 8% EG, SP-TALP + 10% EG. The superior result as followed was obtained by using SP-TALP + 10% EG : motility, morphological normal, head abnormal, midpiece abnormal tail abnormal and death equal 51.17%, 56.50 %, 13.42 %, 13.58 %, 16.50 % and 35.17 % respectively.

In experiment 2, SP-TALP was used as a basis extender. Semen was diluted and frozen in 4 treatments: 10% EG+Vit E 0, 10% EG+Vit E 4, 10% EG+Vit E 8 and 10% EG+Vit E 12 µl/ml. The result show 10% EG+Vit E 4 µl/ml was the best: morphological normal, head abnormal, midpiece abnormal and death equal 48.33 %, 16.83 %, 12.50 % and 54.33 % respectively.

This study indicated that from in vitro analysis, SP-TALP with 10% EG+Vit E 4 µl/ml was the cryoprotectants of choice for cryopreservation three-yellow cock.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงได้ ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. วรวิทย์ สิริพลวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รศ.ดร. อนุชัย ภิญโญภูมิมินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้คำแนะนำ คำปรึกษา อบรมสั่งสอนให้ความรู้ในทุกด้าน รวมทั้งตรวจแก้ไขข้อบกพร่องในการเขียนวิทยานิพนธ์จนสำเร็จด้วยดี

ขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิตสัตว์ปีก สถาบันสุวรรณวาจกกสิกิจเพื่อการค้นคว้าและพัฒนาปศุสัตว์และผลิตภัณฑ์สัตว์ และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพด้านระบบสืบพันธุ์สัตว์และเซลล์ชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ที่สนับสนุนสถานที่สำหรับการทำงานวิจัย รวมทั้งเจ้าหน้าที่และพนักงานทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการดำเนินการทดลอง

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณคุณพ่อโชติ จันทร์อ่อน คุณแม่วิไลวรรณ จันทร์อ่อน พี่น้อง เพื่อน และป้าประดับศรี เรืองเกษมที่เป็นทั้งกำลังใจ และสนับสนุนทุนการศึกษาแก่ข้าพเจ้าตลอดมา จนวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ข้าพเจ้าขอมอบประโยชน์และคุณค่าของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้แด่ผู้มีอุปการคุณทุกท่านและคณาจารย์ที่สั่งสอนข้าพเจ้ามาตั้งแต่อดีตจนปัจจุบัน ขอให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จงเป็นประโยชน์และเป็นแนวทางในการวิจัยและพัฒนาสืบต่อไป

ปิยะรัฐ จันทร์อ่อน

มีนาคม 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	24
อุปกรณ์	24
วิธีการ	26
ผลและวิจารณ์	32
ผล	32
วิจารณ์	58
สรุปและข้อเสนอแนะ	63
สรุป	63
ข้อเสนอแนะ	63
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	64
ภาคผนวก	75
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	80

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ส่วนประกอบของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ	13
2	ส่วนประกอบของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่	14
3	ค่าเฉลี่ยคุณภาพของน้ำเชื้อสดที่นำมารวมกันหลังรีดเก็บจากพ่อพันธุ์ไก่สามเหลืองจำนวน 10 ตัว	32
4	เปรียบเทียบลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ DMSO และ EG ในระดับที่แตกต่างกัน	35
5	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ DMSO และ EG ในระดับที่แตกต่างกัน	36
6	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ DMSO และ EG ในระดับที่แตกต่างกัน	37
7	เปรียบเทียบค่า VAP ของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ DMSO และ EG ในระดับที่แตกต่างกัน	38
8	เปรียบเทียบค่า VSL ของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ DMSO และ EG ในระดับที่แตกต่างกัน	39
9	เปรียบเทียบค่า VCL ของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ DMSO และ EG ในระดับที่แตกต่างกัน	40
10	เปรียบเทียบค่า ALH ของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ DMSO และ EG ในระดับที่แตกต่างกัน	41

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
11	เปรียบเทียบค่า BCF ของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ DMSO และ EG ในระดับที่แตกต่างกัน	42
12	เปรียบเทียบค่า STR ของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ DMSO และ EG ในระดับที่แตกต่างกัน	43
13	เปรียบเทียบค่า LIN ของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ DMSO และ EG ในระดับที่แตกต่างกัน	44
14	เปรียบเทียบลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ EG ที่ผสมวิตามินอีในระดับที่แตกต่างกัน	47
15	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ EG ที่ผสมวิตามินอีในระดับที่แตกต่างกัน	48
16	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ EG ที่ผสมวิตามินอีในระดับที่แตกต่างกัน	49
17	เปรียบเทียบค่า VAP ของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ EG ที่ผสมวิตามินอีในระดับที่แตกต่างกัน	50
18	เปรียบเทียบค่า VSL ของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ EG ที่ผสมวิตามินอีในระดับที่แตกต่างกัน	51

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

19 เปรียบเทียบค่า VCL ของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ EG ที่ผสมวิตามินอีในระดับที่แตกต่างกัน 52

20 เปรียบเทียบค่า ALH ของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ EG ที่ผสมวิตามินอีในระดับที่แตกต่างกัน 53

21 เปรียบเทียบค่า BCF ของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ EG ที่ผสมวิตามินอีในระดับที่แตกต่างกัน 54

22 เปรียบเทียบค่า STR ของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ EG ที่ผสมวิตามินอีในระดับที่แตกต่างกัน 55

23 เปรียบเทียบค่า LIN ของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ EG ที่ผสมวิตามินอีในระดับที่แตกต่างกัน 56

ตารางภาคผนวกที่

1 ค่าการทำงานของเครื่อง HTM-IVOS motility สำหรับวิเคราะห์การเคลื่อนที่ 76

2 ส่วนประกอบทางเคมี ค่าออสโมลาลิตี และ pH ของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ 77

3 ส่วนประกอบทางเคมีของ EOSIN NIGROSIN 78

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ไก่สามเหลือง	3
2	แสดงระบบสืบพันธุ์เพศผู้ในสัตว์ปีก	5
3	แสดงโครงสร้างของตัวอสุจิ ไก่	7
4	แสดงการรีดน้ำเชื้อไก่	10
5	การยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชั่นเมื่อมีการเติมวิตามินอี	17
6	แสดงการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในเครื่อง CASA	18

ภาพผนวกที่

1	แสดงลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิ	79
2	แสดงลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิส่วนหางผิดปกติ	79

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งและวิตามินอีที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่สามเหลือง

Effects of Cryoprotectants and Vitamin E on Quality of Three-yellow Cocks Frozen Semen

คำนำ

ไก่สามเหลืองจัดเป็นไก่พื้นเมืองของประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ซึ่งปัจจุบันได้รับการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์เพื่อเน้นความอร่อยของเนื้อและไก่สามเหลืองได้ถูกนำเข้าประเทศไทยโดยหน่วยงานของรัฐ สามารถเปรียบเทียบไก่สามเหลืองกับไก่พื้นเมืองไทยคือต่างก็เป็นสัตว์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจต่อเกษตรกรในชนบท โดยพบว่าเกษตรกรแต่ละครอบครัวในไทยจะมีการเลี้ยงไก่พื้นเมือง 10-45 ตัว เพื่อใช้ในการบริโภคในครัวเรือนและจำหน่ายในกรณีที่มีไก่เกินความต้องการบริโภค (บัญญัติ และคณะ, 2529; สวัสดิ์, 2540) เมื่อเปรียบเทียบคุณภาพเนื้อแล้ว จะพบว่าเนื้อของไก่พื้นเมืองไทยมีรสชาติ ความอร่อย และเนื้อแน่นกว่าไก่พันธุ์ทั่วไป ถึงแม้ว่าไก่พื้นเมืองไทยจะโตช้ากว่าไก่พันธุ์เนื้อแต่เมื่อเปรียบเทียบราคาแล้วพบว่าไก่พื้นเมืองไทยมีราคาสูงกว่าไก่พันธุ์เนื้อ 2-3 เท่า หลายหน่วยงานได้พยายามพัฒนาสายพันธุ์ไก่ให้เหมาะสมกับสภาพพื้นที่ สภาพอากาศ และคุณภาพเนื้อเป็นที่ต้องการของตลาด เพื่อให้ได้พันธุ์ที่ดีและทนทานต่อโรค การใช้เทคโนโลยีทางการสืบพันธุ์ เช่น การเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์ โดยการแช่แข็ง เพื่อการผสมเทียม มีความสำคัญต่อการเก็บรักษาพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตนั้น เพื่อนำไปใช้ในอนาคตเพื่อที่จะดำรงความหลากหลายทางชีวภาพให้คงอยู่และที่สำคัญคือเป็นการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์ที่มีคุณลักษณะดีเด่น หายาก มีความเสี่ยงที่จะสูญพันธุ์ ในประเทศไทยมีรายงานความสำเร็จเกี่ยวกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่น้อย

วีระศักดิ์และคณะ (2552) ได้ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่สามเหลือง การทดลองแรกเปรียบเทียบชนิดของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่สามเหลือง การทดลองที่ 2 เปรียบเทียบขั้นตอนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอน ผลการทดลองพบว่าสารละลายเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งนั้นสามารถเก็บน้ำเชื้อได้เป็นระยะเวลานาน

เพื่อเป็นการศึกษาต่อและเก็บรักษาพันธุกรรมเพื่อใช้สำหรับการคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์และช่วยคงความหลากหลายทางชีวภาพ การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่สามเหลืองเพื่อให้มีคุณภาพดียิ่งขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดและระดับของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่สามเหลือง

2. เพื่อศึกษาผลของการผสมวิตามินอีร่วมกับสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่สามเหลือง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

ไก่สามเหลือง (Three yellow Cocks) (ภาพที่ 1) เป็นไก่อีกชนิดหนึ่งมีถิ่นกำเนิดในประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีน ลักษณะเด่นประจำพันธุ์คือ มีขนสีเหลือง ขาเหลือง หนังมีสีเหลือง เลี้ยงง่าย โตเร็ว หากินเก่ง มีความทนทานต่อโรค สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพดิน ฟ้า อากาศแบบร้อนชื้นได้เป็นอย่างดี เนื้อมีรสชาติหวาน กลิ่นหอมชวนกินและเนื้อนุ่มพอเหมาะ สมรรถภาพการให้ผลผลิตน้ำหนักที่อายุ 4 สัปดาห์เท่ากับ 254.34 ± 22.39 กรัม น้ำหนักที่อายุ 8 สัปดาห์เท่ากับ 758.34 ± 67.41 กรัม น้ำหนักที่อายุ 12 สัปดาห์เท่ากับ 1,418.00 ± 213.55 กรัม อายุเมื่อให้ไข่ฟองแรกเท่ากับ 150 ± 5 วัน น้ำหนักตัวเมื่อให้ไข่ฟองแรกเท่ากับ 2,070.33 ± 184.62 กรัม น้ำหนักไข่ฟองแรกเท่ากับ 41.67 ± 8.34 กรัม ไข่ปีละ 150 ± 4 ฟอง (สุชาติ, 2547)

ภาพที่ 1 ไก่สามเหลือง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

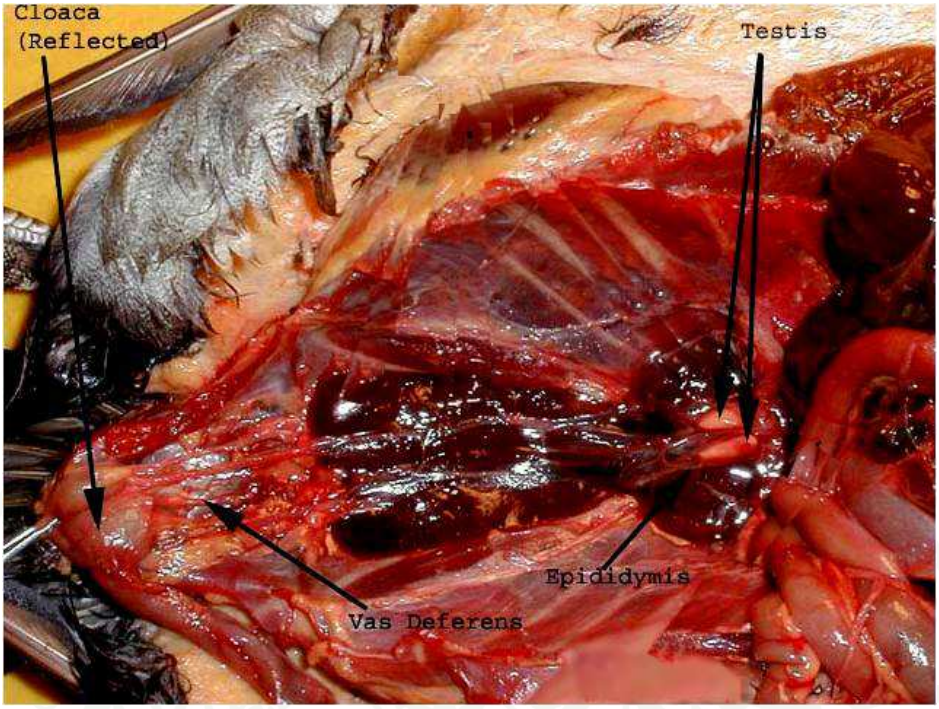
ระบบสืบพันธุ์เพศผู้ของสัตว์ปีก

ระบบสืบพันธุ์เพศผู้ของสัตว์ปีกประกอบไปด้วยส่วนสำคัญคือ อัณฑะ (testis) (ภาพที่ 2) และอวัยวะร่วมเพศ (copulatory organ) อัณฑะมีรูปร่างคล้ายเมล็ดถั่ว สีเหลืองอ่อน วางขนานกันอยู่ในตำแหน่งซี่โครงคู่สุดท้ายของลำตัวและอยู่ด้านหน้าไตทั้ง 2 ข้าง ด้านท้ายของอัณฑะเป็นเส้นเลือดดำคอมมอน อิลิแอก (common iliac vein) ด้านหน้าอยู่ใกล้กับปอด อัณฑะของสัตว์ปีกจะแตกต่างกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมทั่วไปคือ อัณฑะของสัตว์ปีกจะอยู่ในช่องท้องไม่ลงมาอยู่ในถุงหุ้มอัณฑะและไม่มีต่อมสำรองต่าง เช่น ต่อมพรอสเตท (Prostate gland) เซมินอล เวซิเคิล (Seminal vesicle) ต่อมบัลโบยูรีทรัล (Bulbourethral glands) ภายในอัณฑะประกอบไปด้วยท่อสร้างเซลล์อสุจิ (seminiferous tubule) ภายในแต่ละท่อจะมีเซลล์อสุจิ (sperms) อยู่ในระยะต่าง อสุจิที่สมบูรณ์จะเคลื่อนไปอยู่ตรงกลางท่อแล้วจะเคลื่อนไปรวมกันที่ท่อรวมอสุจิ (vas deferens) ซึ่งมีของเหลวที่หลั่งจากลิมโฟลด์ (lymph fold) ปนมาด้วยระหว่างที่อสุจิเคลื่อนมาจะมีของเหลวสีขาวขุ่นออกมาด้วยเรียกรวมกันว่า น้ำเชื้อ (semen)

น้ำเชื้อประกอบด้วยอสุจิและของเหลวดังกล่าวซึ่งได้จากท่อสร้างเชื้ออสุจิ (seminiferous tubule) และจากท่อน้ำเชื้อ (vas deferens) ท่อน้ำเชื้อแต่ละข้างของอัณฑะจะเป็นท่อขนาดเล็กและเริ่มขดงอเล็กน้อยและจะขยายใหญ่ขึ้นขดงอมากขึ้น จนขยายเป็นถุงน้ำกามก่อนเริ่มเข้าสู่ทวารร่วม (cloaca) โดยเป็นตุ่มหรือติ่ง (papillae) ซึ่งเทียบได้กับองคชาตเหมือนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ในขณะผสมพันธุ์พ่อพันธุ์จะสัมผัสเข้าไปในช่องคลอด (vagina) ของเพศเมียและหลั่งน้ำเชื้อโดยผ่านจากปลายของปุ่มยึดตัวตามร่องเกลียวจากโคนถึงปลาย papillae ในไก่และไก่งวง papillae จะเป็นเพียงติ่งเนื้อเล็ก ซึ่งติดอยู่กับผนังตอนล่างของทวารหนัก

ตัวอสุจิของไก่มีลักษณะแตกต่างไปจากของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม คือ ส่วนหัวของตัวอสุจิจะไม่มนแต่จะยาวโค้งเล็กน้อยและส่วนปลายจะแหลม (สุจินต์, 2532; McIntosh and Porter, 1967) ไม่มีไซโตพลาสมิคดรอพเลท (cytoplasmic droplet) ในน้ำเชื้อจะพบสารจำพวกไขมัน (lipid) และไกลโคโปรตีน (glycoprotein) รอบตัวอสุจิ นอกจากนั้นยังพบฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ที่บริเวณหางของตัวอสุจิ ซึ่งคาดกันว่าจะเป็นแหล่งพลังงาน (สุจินต์, 2532)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 แสดงระบบสืบพันธุ์เพศผู้ในสัตว์ปีก

ที่มา: http://campus.murraystate.edu/academic/faculty/tderting/cva_atlases/canduck/Image016.jpg (2012)

กระบวนสร้างเซลล์อสุจิ (Spermatogenesis)

ภายในเนื้อเยื่อลูกอัณฑะของสัตว์ปีกจะมีกลีบเล็ก (lobules) แต่ละเนื้อเยื่อจะประกอบไปด้วยท่อขนาดเล็ก (seminiferous tubules) มากมายสำหรับสร้างเซลล์อสุจิ ระหว่างแต่ละท่อ seminiferous tubules จะมีเนื้อเยื่อชนิดเกี่ยวพันชนิดมีเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยงมากมาย ซึ่งเป็นที่อยู่ของเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนตัวผู้เทสโทสเตอโรน (testosterone) เรียกว่า Leydig cells ท่อสร้างน้ำเชื้อของไก่ตัวผู้ที่ยังไม่โตเต็มที่จะมีท่อสร้างน้ำเชื้อขนาดใหญ่ มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-120 ไมโครเมตรและถูกหุ้มด้วยเยื่อ tunica propria รูปร่างไม่แน่นอน โดยส่วนที่ฐานของท่อจะมีเนื้อเยื่อบุผิว 2 ชนิด คือ เซลล์เซอร์โตไล (sertoli cells) และเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่างที่เกิดจากกระบวนการสร้างเซลล์อสุจิ (Spermatogenesis) (วิโรจน์, 2537) โดยมีขบวนการแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. ระยะการแบ่งเซลล์ (spermatocytogenesis)

เมื่อไก่เข้าสู่วัยสมบูรณ์เซลล์สเปอร์มาโตโกเนีย (spermatogonia) ซึ่งเป็นเซลล์ตั้งต้นที่มีโครโมโซม 2 ชุด (2n) มีการแบ่งตัวแบบไมโตซิส (mitosis) เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ต้นแบบขึ้นมาทดแทนตัวเก่าอยู่ตลอดเวลา ทำให้การผลิตอสุจิดำเนินอยู่ได้ตลอดวัยเจริญพันธุ์ โดยเซลล์สเปอร์มาโตโกเนียที่อยู่รอบขอบท่อผลิตอสุจิ มีการแบ่งตัวและพัฒนาไปเป็นสเปอร์มาโตโกเนียโดยมีขั้นตอนที่สำคัญ ดังนี้

เซลล์สเปอร์มาโตโกเนีย (spermatogonia) (2n) มีการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิสหลายครั้งเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ โดยแต่ละเซลล์มีโครงสร้างเหมือนเซลล์เดิมทุกประการ

เซลล์สเปอร์มาโตไซท์ขั้นต้น (primary spermatocyte) (2n) เป็นเซลล์ที่เกิดจากการเจริญของเซลล์ตั้งต้นที่แบ่งตัวจะเคลื่อนย้ายไปตรงกลางท่อผลิตอสุจิ โดยเซลล์สเปอร์มาโตไซท์ขั้นต้น 1 เซลล์เกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) ได้เซลล์สเปอร์มาโตไซท์ขั้นที่สอง (secondary spermatocyte) (n) 2 เซลล์ ซึ่งแต่ละเซลล์มีจำนวนโครโมโซมลดลงเหลือครึ่งหนึ่ง (n)

2. ระยะการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (spermiogenesis)

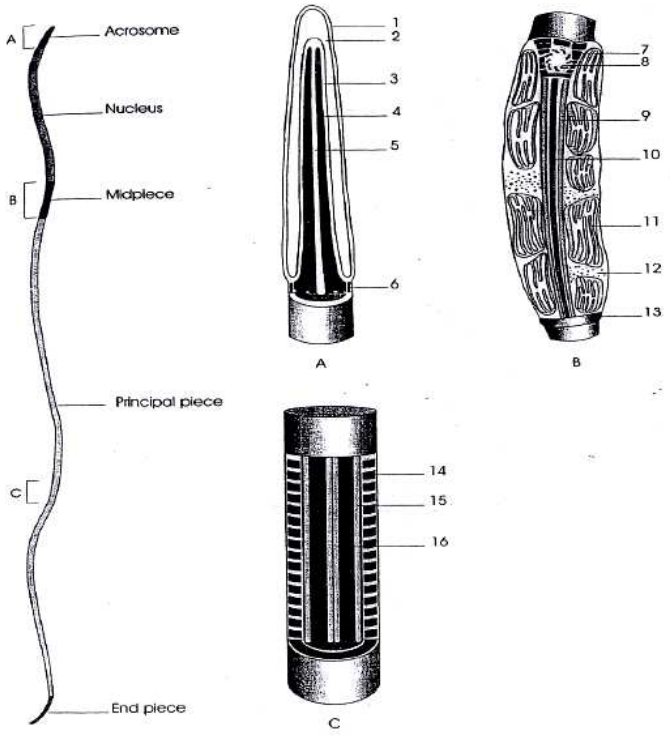
สเปอร์มาติด (n) แต่ละเซลล์ มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างหลายขั้นตอนจนได้เป็นตัวอสุจิ (sperm) โดยสเปอร์มาติดแต่ละเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงทั้งนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมจากเซลล์ที่ไม่เคลื่อนไหวเปลี่ยนเป็นเซลล์ที่เคลื่อนไหวอย่างรวดเร็ว โดยมีส่วนของแฟลกเจลลัม (flagellum) เจริญขึ้นมาทำให้เกิดเป็นตัวอสุจิ (สุวิทย์, 2550)

ลักษณะโครงสร้างของตัวอสุจิของสัตว์ปีก

ตัวอสุจิที่โตเต็มที่ (mature sperm) ของสัตว์ปีกแต่ละชนิดจะมีขนาดรูปร่างแตกต่างกันตามแต่ชนิดของสัตว์ปีก (species) ตัวอสุจิมีความยาวประมาณ 100 ไมโครเมตร ส่วนหัวมีขนาดยาวกว่าส่วนอื่นตรงปลายจะมีส่วนอโครโซม (acrosome) และส่วนกลางตัว (midpiece) มีขนาดสั้นยึดติดอยู่กับส่วนหาง (Principle piece)ที่ยาว (ภาพที่ 3) ตัวอสุจิมีปริมาตร 9.2 ลูกบาศก์ไมโครเมตร มี acrosome ยาว 1.75 ไมโครเมตร ส่วนหัวยาว 12.5 ไมโครเมตร ส่วนกลางยาว 4 ไมโครเมตร และส่วนหางยาว 80ไมโครเมตร ส่วนกลางคือ distal centriole ที่มีลักษณะกลมและคลุมด้วย mitochondrial sheath

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในสัตว์ปีกตัวอสุจิไม่มี cytoplasmic droplet เช่นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ทั้งตัวของตัวอสุจิ ล้อมรอบด้วย cytoplasmic membrane ส่วนของ acrosome เป็นแบบง่าย ภายในมี spine ฝังอยู่ ส่วนปลายของหัวนี้อยู่ภายใน cap ที่มีลักษณะเป็นรูปโคน mitochondrial sheath ของส่วนกลางมีลักษณะเป็นแผ่นโค้งและไม่มี outer fiber อยู่รอบนอกของ fiber เก้าคู่ที่อยู่ภายในเหมือนตัวอสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (สุจินต์, 2532;วิโรจน์, 2537; ปฐม, 2540; Bakst and Howarth, 1975)



ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างของตัวอสุจิ ไก่

A ส่วน Acrosome, B ส่วน Midpiece และ C ส่วน Principle piece

1 plasmalemma, 2 acrosome, 3 sub-acrosomal space, 4 nucleus, 5 endonuclear canal 6 posterior ring, 7 segmented connecting piece, 8 proximal centriole, 9 wall of distal centriole, 10 rod of dense material lying within distal centriole, 11 mitrochondrion, 12 intermitochondrialcement, 13 annulus, 14 ribs of fibrous sheath, 15 outer double microtubules of axoneme, 16 inner microtubular pair of axoneme

ที่มา: Soley and Groenewald (1999)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คุณสมบัติของน้ำเชื้อและส่วนประกอบทางเคมี

น้ำเชื้อประกอบไปด้วย sperm และ epididymal secretion มีลักษณะเป็นของเหลว เหมือนกับของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม แต่ในสัตว์ปีกจะต่างกับสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมตรงที่ว่า น้ำหรือของเหลวในน้ำเชื้อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมได้มาจากตัวอัณฑะจากท่อน้ำเชื้อส่วนที่เชื่อมอยู่ในลูกอัณฑะ (juxtaglomerular ducts) หรือ epididymis และ vas deferens ร่วมกับของเหลวที่ได้มาจากอวัยวะที่ทำหน้าที่พิเศษ เช่น จากต่อม seminal vesicle, cowper's gland, prostate gland และ bubourethral gland แต่สำหรับของสัตว์ปีกจะได้มาจาก 1) เซลล์ที่ทำหน้าที่ค้ำจุนหรือให้อาหารแก่เซลล์สร้างตัวอสุจิ (sustentocytes หรือ sertoli cell) และจากเซลล์บุผิวภายในท่อของถุงเก็บน้ำเชื้อ (epididymal ducts) และของท่อ vas deferens 2) จากส่วน vascular bodies และ lymphatic folds ของทวาร

ส่วนหัวของตัวอสุจิประกอบด้วย DNA (deoxyribonucleotide) และสารที่เกี่ยวข้องกับ DNA เป็นส่วนใหญ่ มี cytoplasm น้อย สารที่อยู่ใน cytoplasm ได้แก่ ไขมัน, ไกลโคโปรตีน, acrosome และส่วนหางมีต้นกำเนิดมาจากบริเวณ Golgi ของเซลล์อสุจิ ซึ่งมีไขมันและไกลโคโปรตีนเป็นส่วนประกอบเช่นกัน ในส่วนกลางมีแต่ไขมันซึ่งน่าจะมาจาก mitochondria และ cytoplasm ตัวอสุจิไก่มีเอนไซม์ใน acrosome ที่สามารถทำให้ vitelline membrane ของ ovum สลายตัวได้ ชนิดของเอนไซม์อาจจะเป็น Hyaluronidase หรือสารที่มีคุณสมบัติคล้าย Trypsin ในของเหลวที่ได้จากเซลล์อสุจิพบว่ามีการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด เช่น Lactic dehydrogenase, Hydroxybutyric dehydrogenase, Glutamic, Oxaloacetic transaminase, Creatinine kinase, Alolase, Sorbital dehydrogenase, Glucose-6-phosphate dehydrogenase, Phospaohexase isomerase, Acetylcholinesterase และ Leucine-amino-peptidase โดยทั่วไปเมตาบอลิซึมของเซลล์อสุจิไก่คล้ายกับของสัตว์อื่น คือ มีการใช้ anaerobic glycolytic pathway และ aerobic citric acid cycle (สุจินต์, 2532; Yanagimachi, 1972)

ส่วนประกอบทางเคมีของน้ำเชื้อในสัตว์ปีกจะแตกต่างไปจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ความแตกต่างนี้เกิดจากการที่สัตว์ปีกไม่มีต่อม seminal vesicles และต่อมลูกหมาก (prostate gland) และการที่มีเพียงส่วนท่อของถุงเก็บน้ำเชื้อขนาดเล็ก น้ำอสุจิของไก่จะไม่มี fructose citrate ergothionine inositol phosphoryle choline และ glyceryl phosphoryle choline มี chloride ต่ำ แต่มี potassium และ glutamate สูง แหล่งที่มาของ glutamate อาจเป็นท่อสร้างเชื้ออสุจิ น้ำเชื้อของไก่มีสีขาวขุ่น มีความเป็นกรด-ด่างประมาณ 7-7.6 (สุจินต์, 2532; วิโรจน์, 2537)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การรีดน้ำเชื้อไก่

น้ำเชื้อของไก่ที่หลั่งแต่ละครั้งจากการรีดมีปริมาณ 0.2-0.5 มิลลิลิตร (Hafez, 1980) และมีอสุจิเฉลี่ย 3 พันล้านตัวต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์และความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อไก่ ซึ่งปริมาตรจะแตกต่างกันออกไปตามการรีดเก็บแต่ละครั้ง ขึ้นอยู่กับความชำนาญ ประสบการณ์ของผู้รีด และปริมาณของของเหลวใสจากลิมโฟลด์ ซึ่งหลั่งออกมาปนในน้ำเชื้อ ในไก่ที่มีความสมบูรณ์พันธุ์สามารถรีดเก็บน้ำเชื้อได้ 3 ครั้งต่อสัปดาห์ เป็นระยะเวลาติดต่อกันนานโดยไม่มีผลต่อปริมาณและคุณภาพของน้ำเชื้อที่เก็บได้ การรีดเก็บน้ำเชื้อบ่อยครั้งจะมีผลต่อปริมาณคุณภาพของน้ำเชื้อตามความถี่ที่รีด (Hammond, 1983) เมื่อรีดน้ำเชื้อออกมาแล้วควรเก็บไว้ในที่เย็นอุณหภูมิต่ำ อาจใช้กระติกน้ำแข็งเพื่อช่วยป้องกันความร้อนอันเป็นสาเหตุทำให้เชื้ออสุจิอ่อนแอหรือตายได้ การปนเปื้อนอุจจาระและปัสสาวะเป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้อสุจิตายได้เช่นกัน (สวัสดิ์, 2503)

พ่อพันธุ์ไก่ไม่ควรได้รับอาหารก่อนรีดประมาณ 4-6 ชั่วโมง ดังนั้นการรีดน้ำเชื้อในช่วงเช้าจึงเป็นเวลาที่เหมาะสมเพราะจะทำให้ได้น้ำเชื้อที่มีการปนเปื้อนอุจจาระและปัสสาวะน้อย (สุจินต์, 2532) อาวุธ (2538) กล่าวว่า น้ำเชื้อที่รีดได้ในตอนเช้าจะมีปริมาตรอัตราการเคลื่อนที่อสุจิดีกว่าการรีดเก็บน้ำเชื้อตอนบ่ายและมีความเข้มข้นของตัวอสุจิมากกว่าเล็กน้อย การตัดขนและทำความสะอาดบริเวณทวารร่วม ก่อนการรีดน้ำเชื้อจะช่วยทำให้ได้น้ำเชื้อที่สะอาดขึ้น (สุจินต์, 2532) North and Bell (1990) กล่าวว่า ควรจะมีการรีดน้ำเชื้อมาตรวจอยู่บ่อยประมาณ 1 ครั้งต่อสัปดาห์หรือทุก 5-7 วัน แม้จะไม่ได้อยู่ในช่วงการผสมเทียมก็ตามเพื่อเป็นการทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อและรักษาระดับคุณภาพน้ำเชื้อให้มีประสิทธิภาพคงที่ Perry (1968) กล่าวว่า การรีดโดยใช้ผู้ทำงาน 2 คนเป็นวิธีที่ง่ายและใช้กันมากที่สุดโดยมีผู้ช่วยทำการจับพ่อไก่และผู้รีดเก็บน้ำเชื้อ (ภาพที่ 4) ผู้ช่วยจะจับพ่อไก่ที่บริเวณโคนขาและโคนปีกทั้งสองข้างไว้เพื่อป้องกันการกระพือปีก เทคนิคสำคัญในการรีดน้ำเชื้อคือ ความเร็วระหว่างที่บีบกระตุ้นโคนห่างไก่ให้กระดกชี้ขึ้นกับการเปลี่ยนมือมาบีบโคนอวัยวะเพศ ถ้าทำได้เร็วจะทำให้รีดน้ำเชื้อได้มาก (อาวุธ, 2538) การรีดน้ำเชื้อครั้งแรกมักจะไม่ได้ผล แต่เมื่อกระตุ้นครั้งที่ 2-3 ตัวผู้จะปล่อยน้ำเชื้อออกมาอย่างอิสระ ฉะนั้นจะเป็นการดีถ้าผู้ฝึกใหม่ผ่านการฝึกรีดน้ำเชื้อมาเป็นอย่างดี ในบางขั้นตอนการลูบหลังอาจไม่จำเป็นอาจใช้เพียงการสัมผัสตรงบริเวณรูเปิดของทวารร่วมด้วยนิ้วมือก็เพียงพอที่จะทำให้พ่อพันธุ์หลั่งน้ำเชื้อออกมาได้ (อภิชัย และสุทัศน์, ม.ป.ป.)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพที่ 4 แสดงการรีดน้ำเชื้อไก่

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างน้ำเชื้อและคุณภาพน้ำเชื้อ

ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างน้ำเชื้อได้แก่ อุณหภูมิ แสง พันธุกรรม โภชนาการ และปัจจัยอื่น

1. อุณหภูมิ เป็นสาเหตุทำให้ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิลดลง (Hartman, 1951) และมีผลทางอ้อมต่อประสิทธิภาพการผสมพันธุ์ โดยการลดการกินอาหารซึ่งมีผลต่อพันธุ์ต่างไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับการปรับตัวของสัตว์และอุณหภูมิมีผลต่อการฉีดน้ำเชื้อเข้าผสมเทียม ซึ่งการผสมเทียมที่ดีควรอยู่ในช่วงเวลาบ่ายแก่จัดประมาณ 15.00-17.00 นาฬิกา (North and Bell, 1990)

2. แสง มีผลต่อการสร้างน้ำเชื้อ โดยการกระตุ้นการหลั่งฟอลลิเคิล สติมูเลติงฮอร์โมน (Follicle Stimulating Hormone, FSH) และ ลูทิไนท์ซิงฮอร์โมน (Lutinizing Hormone, LH) โดยมี FSH เป็นตัวกระตุ้นการขยายตัวและสร้างเซลล์อสุจิของท่อสร้างเซลล์อสุจิ ส่วน LH จะกระตุ้นเลดิกเซลล์ (Leydig cell) ให้ผลิตแอนโดรเจน (androgen) และเทสโทสเตอโรน (testosterone) ซึ่งเป็นฮอร์โมนเพศผู้ (สุจินต์, 2532) Hartman (1951) กล่าวว่า ระยะเวลาในการได้รับแสงที่เหมาะสม คือ ประมาณ 12-14 ชั่วโมงต่อวัน หากได้รับเกิน 14 ชั่วโมงขึ้นไป จะมีผลทำให้ความสมบูรณ์พันธุ์ลดลง เนื่องมาจากความร้อนที่ได้จากแสงทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นทำให้ความเข้มข้นของตัวอสุจิลดลง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. พันธุกรรม สามารถถ่ายทอดได้ในกระบวนการสร้างน้ำเชื้อ ลักษณะพันธุกรรมที่ถูกถ่ายทอดได้คือ การเคลื่อนไหว และความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ เพราะน้ำเชื้อในสัตว์ปีกมีค่าอัตราพันธุกรรมสูง (heritability, h^2)

4. โภชนาการ Morris (1989) กล่าวว่า สารอาหารทุกประเภทไม่ว่าจะเป็นโปรตีน, คาร์โบไฮเดรต, ไขมัน, เกลือแร่และวิตามิน ต่างก็มีผลต่อกระบวนการสร้างน้ำเชื้อทั้งนั้น การจำกัดอาหารมีส่วนทำให้การสร้างอสุจิลดลงและสามารถสร้างอสุจิได้ปกติภายใน 14 วันเมื่อได้รับอาหารปกติ (สุจินต์, 2532)

5. ปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการสร้างน้ำเชื้อและคุณภาพน้ำเชื้อ เช่น ฤดู อายุ ฮอร์โมน โรค ยาและสารเคมี เป็นต้น (วิโรจน์, 2537)

สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ (Semen extender)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อมักจะต้องเก็บในลักษณะที่เจือจางโดยใช้สารละลายที่ทำให้น้ำเชื้อเจือจางลงเรียกว่า “สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ” (semen extender หรือ diluent) (พีรศักดิ์, 2528) สารละลายเจือจางน้ำเชื้อคือ สารที่เกิดจากการนำเอาสารที่มีคุณสมบัติช่วยในการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิ ยืดอายุของตัวอสุจิให้มีชีวิตนานขึ้น ป้องกันอันตรายจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ปรับสภาพกรด-ด่าง และยังเป็นแหล่งพลังงานและสารอาหารให้กับตัวอสุจิอีกด้วย (Mitchell and Doak, 2004) จุดประสงค์หลักของการใช้เจือจางน้ำเชื้อคือ เพื่อเพิ่มปริมาตรของน้ำเชื้อให้มากขึ้นทำให้สามารถผสมพันธุ์ให้แม่ไก่จำนวนมากได้ สำหรับสารละลายเจือจางน้ำเชื้อไก่ระยะแรกมีการใช้ Ringer’s solution, Locke’s solution, นมและไข่แดง-ฟอสเฟต ในการเก็บอสุจิไก่ที่ 4°C โดยหากเก็บไม่เกิน 4 ชั่วโมง ให้ผลการผสมติดถึง 90 % นอกจากนั้นยังมีการทดลองใช้สารเจือจางกลูโคสซิเตรตและสารเจือจางฟอสเฟตในการเจือจางน้ำเชื้อไก่และเก็บรักษาในระยะเวลาสั้นอีกด้วย (Bootwalla and Miles, 1992)

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของน้ำเชื้อไก่พบว่าร้อยละ 80 ของสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (non-protein nitrogen) ได้แก่กรดกลูตามิค (glutamic acid) และคลีอะตีน (creatine) ซึ่งกรดกลูตามิคนี้มีบทบาทอย่างมากต่อการรักษาระดับแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ของน้ำเชื้อไก่เมื่อมีการพัฒนาสารละลายเจือจางน้ำเชื้อไก่โดยใช้สารเคมีที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับองค์ประกอบทางเคมีของน้ำเชื้อและใช้น้ำตาลฟรุ๊คโตส (Fructose) เป็นแหล่งพลังงานพร้อมกับการปรับระดับ pH ให้อยู่ 6.8 - 7.1 ปรากฏว่าสามารถเก็บอสุจิได้นาน 24 – 48 ชั่วโมง โดยให้อัตราการผสมติดเท่ากับ 47 – 64 % สารละลายเจือจางน้ำเชื้อไก่ที่เหมาะสมในการเก็บน้ำเชื้อไก่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในสภาพน้ำเชื้อเหลว (ตารางที่ 1) เช่น BPSE (Beltsville poultry semen extender) ซึ่งให้อัตราการผสมติด 88 % เมื่อทำการผสมเทียมสัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยใช้จำนวนอสุจิ/ครั้งของการผสมเท่ากับ 20 ล้านตัว และอัตราการผสมติดสูงกว่า 90 % หากใช้อสุจิเท่ากับ 100 ล้านตัว/โด๊ส นอกจากนั้นการใช้ยาปฏิชีวนะตัวอย่างเช่น เจนตามัยซิน (gentamicin), กาน่ามัยซิน (kanamycin), นีโอมัยซิน (neomycin)และโท บรามัยซิน (tobramycin) ช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เมื่อเก็บน้ำเชื้อไก่ที่เจือจางแล้วที่อุณหภูมิ 5°C นาน 24 ชั่วโมง (Bootwalla and Miles, 1992)

นอกจากนั้นในกลุ่มประเทศสหภาพโซเวียตเดิมได้มีการพัฒนาสารละลายเจือจางน้ำเชื้อสูตรต่างๆ (ตารางที่ 2) เพื่อใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่แช่แข็งด้วยและจากการเปรียบเทียบสารละลายเจือจางน้ำเชื้อสูตรต่างๆ ปรากฏว่าสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ LKS-1 ให้ผลในการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งไก่ได้ดีกว่าสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ VIRGJ-2, IGGKPh, IRGKPh และ A8 เมื่อพิจารณาส่วนประกอบทางเคมีของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อสูตรต่างๆ ในตารางที่ 1 และ 2 แล้วพบว่าค่าแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อจะได้ผลดีก็ต่อเมื่อมีค่าแรงดันออสโมติกสูงกว่า แรงดันออสโมติกของน้ำเชื้อเท่ากับ 50 – 100 มิลลิออสโมล/กก. (m Osmol/kg) (Surai and Wishart, 1996)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ (กรัม/ลิตร)

ส่วนประกอบ	ไก่			ไก่งวง		
	BPSE	Lake's	Egg yolk	Saline	Phosphate	Milk
Fructose	5.00	10.00	-	-	-	-
Magnesium chloride ($6H_2O$)	0.34	0.68	-	-	-	-
Tripotassium citrate (H_2O)	0.64	1.28	-	-	-	-
Sodium acetate ($3H_2O$)	4.30	8.51	-	-	-	-
Sodium glutamate (H_2O)	8.67	19.20	-	-	-	-
Glucose	-	-	42.50	-	-	-
Egg yolk, chicken (ml)	-	-	150.00	-	-	-
Sodium chloride	-	-	-	10.00	-	-
TES*	1.95	-	-	-	-	-
Potassium monophosphate (anhydrous)	0.75	-	-	-	14.56	-
Dipotassium hydrogen Phosphate ($3H_2O$)	12.70	-	-	-	8.37	-
Whole milk (%)	-	-	-	-	-	100
pH	7.5	7.0	6.9	6.9	7.2	6.4
Osmotic pressure (mOs/kg H_2O)	333	375	327	378	373	303

* N-tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid

ที่มา: Bootwalla and Miles (1992)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่

ส่วนประกอบ	VIRGJ-2	LKS-1	A-8	IGGKPh	IRGKPh
Glacial acetic acid (ml)	-	-	0.015	-	-
Potassium acetate	-	0.5	-	-	-
Sodium acetate	-	-	1.0	-	-
Sodium bicarbonate	-	-	0.15	-	-
Potassium citrate	-	-	-	0.14	0.14
Sodium glutamate	2.8	1.92	-	1.4	1.4
Disodiumhydrogenphosphate	-	-	-	0.98	0.98
Sodiumdihydrogenphosphate	-	-	-	0.21	0.21
Protaminesulphate	-	0.032	-	-	-
Glucose	1.8	-	1.0	0.9	-
Fructose	-	0.8	-	-	-
Inositol	-	-	-	0.9	1.0
Ruffinose	-	-	-	-	2.4
Sucrose	-	-	4.0	-	-
Polyvinylpyrrolidone	-	0.3	-	-	-
pH	-	-	-	6.95	6.9

ที่มา: Surai and Wishart (1996)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง (Cryoprotectant)

สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง (cryoprotectant) เป็นสารที่มีความจำเป็นในการแช่แข็งเซลล์อสุจิ โดยทำหน้าที่ป้องกันอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับเซลล์อสุจิในขณะที่ลดอุณหภูมิ (freezing) และขณะละลาย (thawing) (มนต์ชัย, 2534) ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งชนิดซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ (permeating cryoprotectant) ได้แก่ กลีเซอรอล (glycerol) dimethylacetamide (DMA) dimethyl sulfoxide (DMSO) และ ethylene glycol (EG) เป็นสารที่นิยมใช้มากสำหรับการแช่แข็ง โดยใช้ความเข้มข้นในช่วง 1-2 M (Maurer, 1978; Lehn-Jensened *et al*., 1981; Niemann *et al*., 1982b; Leibo, 1984) จากรายงานของ Bouyssou and Chupin (1982b) พบว่ากลีเซอรอลกับ dimethyl sulfoxide มีประสิทธิภาพในการป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามจากรายงานของ Bouyssou and Chupin (1982b); Prather *et al*. (1987) แสดงให้เห็นว่าการใช้กลีเซอรอลมีแนวโน้มการผสมติดสูงกว่า

2. สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งชนิดไม่ซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Nonpermeating cryoprotectant) ได้แก่ สารจำพวกน้ำตาล hexose หลายชนิด เช่น sucrose, trehalose และraffinose พบว่ามีความสามารถในการรักษาสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ให้คงรูปอยู่ได้ภายหลังการแช่แข็ง (Friedler *et al*., 1988) อย่างไรก็ตาม sucrose เป็นสารตัวเดียวในกลุ่มที่นิยมใช้ แต่ลำพัง sucrose ไม่สามารถใช้เป็นสารป้องกันการแข็งตัวได้ (Kasai *et al*., 1981; Miyamoto and Ishibashi, 1986) จึงนิยมใช้ร่วมกับสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งชนิดผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ในการขจัดน้ำออกไปบางส่วน (partial dehydration หรือ partial dilution) เพื่อลดปัญหาเนื่องจากน้ำถูกดึงออกจากเซลล์หรือเข้าสู่เซลล์เร็วเกินไป (osmotic shock) ซึ่งความเข้มข้นของ sucrose ที่ใช้กันทั่วไปประมาณ 0.25-2.0 M (Bui-Xuan-Nguyen *et al*., 1984)

นอกจากนี้ยังช่วยลดอันตรายที่เกิดกับระบบ active transport ซึ่งเกิดขึ้นโดยกลีเซอรอลเข้ายับยั้งเอ็นไซม์ Na^+, K^+-ATPase ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Barnet, 1978) สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งเหล่านี้มีผลทำให้คุณสมบัติของน้ำยาเก็บรักษาน้ำเชื้อเปลี่ยนแปลงไปคือทำให้แรงดันไอ จุดเดือด จุดเยือกแข็ง และแรงดันออสโมติกของของเหลวทั้งภายในและภายนอกเซลล์เปลี่ยนไป การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของน้ำยาเก็บรักษาน้ำเชื้อ ในด้านจุดเยือกแข็งและแรงดันออสโมติกมีส่วนช่วยทำให้เซลล์อสุจิรอดชีวิตจากการแช่แข็งเนื่องจาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1) ป้องกันการลดขนาดของเซลล์ลงไปมากจนเกิดอันตรายต่อเซลล์อสุจิ
2) ช่วยรักษาสภาพและคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิให้ปกติ
3) ช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์
4) ช่วยป้องกันอันตรายที่เป็นผลมาจากความไม่สมดุลย์ของเกลือแร่และอิเล็คโทรไลท์
5) ช่วยเพิ่มความหนืดของสารละลายภายในเซลล์และป้องกันการตกผลึกของตัวถูกละลาย

การป้องกันอันตรายที่เกิดขึ้นในประการแรกและประการที่สี่อาจทำได้โดยการที่สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งเคลื่อนที่เข้าไปภายในเซลล์หรือช่วยรักษาความสมดุลย์ของโซเดียมภายในและภายนอกเซลล์อสุจิ ซึ่งส่งผลให้มีการเคลื่อนย้ายน้ำเข้าสู่เซลล์ด้วย ส่วนการรักษาสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ให้ปกติเกิดขึ้นโดยการที่สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งสามารถมีพันธะของไฮโดรเจน (hydrogen bond) กับส่วนที่เป็นประจุ (polar head groups) ของไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ได้ และการป้องกันการเกิดภายเกล็ดน้ำแข็งโดยการลดอุณหภูมิการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์จาก –15 องศาเซลเซียส ไปเป็น –35 ถึง –40 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงทำให้มีปริมาณน้ำที่เหลืออยู่ภายในเซลล์อสุจิน้อยลง (กฤษณ์, 2536; Woelders, 1997)

บทบาทของวิตามินอีในการต้านอนุมูลอิสระ

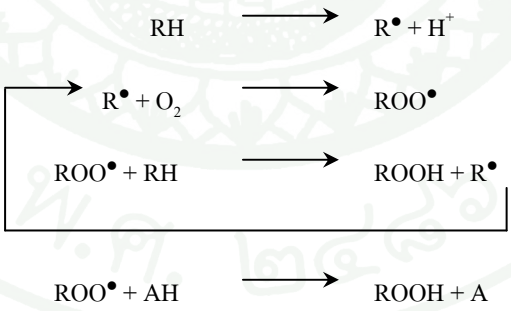
อนุมูลอิสระ (Free radical) เป็นอะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนเดี่ยวอย่างน้อย 1 ตัวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุดที่มีระดับพลังงานสูง อนุมูลอิสระเกิดขึ้นได้เมื่อพันธะระหว่างอะตอมแตกออกและมีอิเล็กตรอนเดี่ยวคงเหลือ อิเล็กตรอน เดี่ยวนี้ทำให้อนุมูลอิสระมีความเสถียรต่ำและพยายามจับคู่กับอิเล็กตรอนเดี่ยวอื่น ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงมีคุณสมบัติเฉพาะ คือ มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาสูงจึงทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่อยู่รอบโดยดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลข้างเคียงเพื่อให้ตัวมันเสถียร โมเลกุลข้างเคียงที่สูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่ไม่เสถียรและเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นต่อไป ซึ่งลิพิด โปรตีนและดีเอ็นเอ เป็นสารชีวโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนหรืออะตอมไฮโดรเจนที่หลุดออกโดยง่าย ทำให้อนุมูลอิสระเข้าไปทำปฏิกิริยาโดยเข้าไปจับคู่กับอิเล็กตรอนของชีวโมเลกุล ทำให้คุณสมบัติและการทำงานของชีวโมเลกุลเปลี่ยนไป (โอภา, 2550)

เยื่อหุ้มเซลล์ของสิ่งมีชีวิตมีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบ (สิริพันธุ์, 2541; บุญล้อม, 2546) ทำให้ถูกออกซิไดส์ได้ง่าย แต่อย่างไรก็ตามในเยื่อหุ้มเซลล์มีวิตามินอีแทรกตัวอยู่ (Wang and Quinn, 1999) ซึ่งมีบทบาทในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระให้กับเซลล์ โดยอาศัยคุณสมบัติในการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เป็นสารที่ไวต่อการถูกออกซิไดส์ (สิริพันธุ์, 2541; บุญล้อม, 2546) ทำให้ไขมันที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ไม่ถูกทำลายจากอนุมูลอิสระ แต่อย่างไรก็ตาม หากวิตามินอีในร่างกายมีไม่เพียงพอจะทำให้เกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชั่น (lipid peroxidation) ได้ ซึ่งทำให้โครงสร้างของเซลล์ถูกทำลาย การทำงานของเอนไซม์ถูกยับยั้ง และมีการสะสมของสารที่เกิดจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่น เช่น ลิโปฟิวซิน (lipofuscin) ขึ้น ทำให้เซลล์ที่มีการทำงานหนัก เช่น กล้ามเนื้อลาย และกล้ามเนื้อที่อยู่นอกเหนืออำนาจจิตใจ ซึ่งเป็นแหล่งสะสมไขมันได้รับอันตรายจากอนุมูลอิสระ (McDowell, 1989)

วิตามินอีมีโครงสร้างที่ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดออกซิเดชั่นให้กับเซลล์คือ วงแหวนโคร-มานอล ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ทำหน้าที่ให้ไฮโดรเจนกับอนุมูลอิสระ เพื่อตัดขั้นตอนของปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชั่น ไม่ให้สร้างอนุมูลอิสระออกมา (นัยนา, 2546) การยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชั่นเมื่อมีการเติมวิตามินอี (ภาพที่ 5) โดยในการเกิดออกซิเดชั่นของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (RH) จะเกิดตรงตำแหน่งพันธะคู่ ทำให้สูญเสียอิเล็กตรอนออกไป เกิดเป็นอนุมูลอิสระ ($R^{\bullet}$) ขึ้น ซึ่งเข้าทำปฏิกิริยากับออกซิเจน (O_2) เกิดเป็นสารเปอร์ออกซิล แรดิคัล ($ROO^{\bullet}$) ที่สามารถดึงอิเล็กตรอนจากกรดไขมันไม่อิ่มตัวโมเลกุลอื่น ต่อไป กลายเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ แต่อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาลูกโซ่นี้ถูกยับยั้งได้เมื่อเติมวิตามินอี (AH) ลงไป เนื่องจากวิตามินอีถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้กับเปอร์ออกซิล แรดิคัล รวมถึงอนุมูลอิสระอื่น แล้ววิตามินอีก็จะเปลี่ยนไปเป็นสารที่ไม่เป็นอันตราย (A) ต่อเซลล์ (Hughes *et al*., 1992)



ภาพที่ 5 การยับยั้งปฏิกิริยาลิพิดเปอร์ออกซิเดชั่นเมื่อมีการเติมวิตามินอี
ที่มา : Hughes *et al*. (1992)

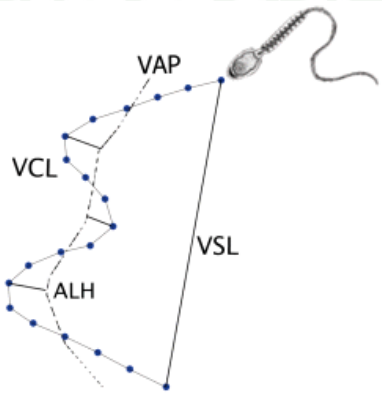
ลักษณา (2543) รายงานว่า ในกรณีที่ไม่มีวิตามินอีช่วยกำจัดเปอร์ออกไซด์ของไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ จะทำให้เกิดการออกซิเดชั่นของไขมันสูง ส่งผลให้โครงสร้างและหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลง ผนังหุ้มไลโซโซมถูกทำลาย เกิดการไหลออกของเอนไซม์ไลโซโซม ซึ่งสามารถทำ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปฏิกิริยากับโปรตีน เอนไซม์ และกรดนิวคลีอิก เป็นผลให้สารเหล่านี้ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ แต่ถ้ามีวิตามินอีอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ การเกิดเปอร์ออกซิเดชั่นของไขมันจะลดลง ทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึม และการทำลายสารพิษภายในเยื่อหุ้มเซลล์เป็นไปอย่างปกติ

ค่าพารามิเตอร์การเคลื่อนที่ของอสุจิโดยใช้ Computer-aided sperm motility analysis (CASA)

การตรวจดูลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิด้วยเครื่อง CASA โดยใช้ในกรณีของน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วแปรผลออกมาเป็น ค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ (% Motility) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ (% Progressive motile) ค่าตัวแปรของความเร็วและทิศทางการเคลื่อนที่มีหน่วยเป็นไมโครเมตรต่อวินาที (μm/s) ได้แก่ ความเร็วเฉลี่ยของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (Average Path Velocity; VAP) ความเร็วของการเคลื่อนที่ในแนวเส้นโค้งของตัวอสุจิ (Curvilinear Line Velocity; VCL) ความเร็วของการเคลื่อนที่เป็นเส้นตรงของตัวอสุจิ (Straight Line Velocity; VSL) แสดงรูปแบบลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ ความกว้างในการส่ายหัวไปมาของตัวอสุจิหน่วยเป็นไมครอน (Amplitude of Lateral Head Displacement; ALH) ความถี่ของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิมีหน่วยเป็นเฮิร์ซ (Beat Cross Frequency; BCF) อัตราส่วนระหว่าง VSL/VAP (Straightness; STR) อัตราส่วนระหว่าง VSL/VCL (Linearity; LIN) ความยาว (Elongation) และพื้นที่ (Area) และค่าการแบ่งระดับของความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ ได้แก่ เปอร์เซ็นต์อสุจิที่เคลื่อนที่เร็ว (% Rapid) เปอร์เซ็นต์อสุจิที่เคลื่อนที่ปานกลาง (% Medium) เปอร์เซ็นต์อสุจิที่เคลื่อนที่ช้า (% Slow) และเปอร์เซ็นต์อสุจิที่หยุดนิ่งอยู่กับที่ (% Statitic) (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 แสดงการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในเครื่อง CASA

ที่มา: http://www.micropticsl.com/eng/products/sperm_analysis_sca_motility_concentration.html (2013)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

average path velocity (VAP) = ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (μm/s)

Straight line velocity (VSL) = ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรง (μm/s)

curvilinear velocity (VCL) = ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้ง (μm/s)

beat cross frequency (BCF) = ความถี่ของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (Hz)

straightness of track (STR) = การเคลื่อนที่แนวเส้นตรง (%)

amplitude of lateral head displacement (ALH) = การส่ายหัวไปมา (μm)

linearity of track (LIN) = ความสัมพันธ์เชิงเส้น (%)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อของสัตว์ปีก

การเก็บรักษาน้ำเชื้อของสัตว์ปีกเริ่มขึ้นตั้งแต่ปี ค.ศ.1939 แต่ไม่ประสบผลสำเร็จ จนกระทั่งในปี ค.ศ.1941 Shaffner *et al*. (1941) ได้แสดงให้เห็นว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่แบบเม็ด (pellet) โดยใช้น้ำตาลฟรุกโตส (fructose) เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งในระหว่างการแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง (-76°C) หลังจากการละลายน้ำเชื้อพบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิดีขึ้น วิธีนี้ยังไม่สามารถทำให้มีลูกไก่ฟักออกมาได้ จนกระทั่งเมื่อปี ค.ศ.1989 ได้มีการค้นพบคุณสมบัติของกลีเซอรอลในการป้องกันอันตรายเซลล์อสุจิจากการแช่แข็งที่ผสมอยู่ใน Ringer's solution ร่วมกับกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์แล้วทำการแช่แข็ง เมื่อทำการละลายน้ำเชื้อแบบเร็วพบว่าอสุจิมีอัตราการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างจากอสุจิที่ไม่ผ่านการแช่แข็ง สามารถทำให้ลูกไก่ฟักออกมาได้ 1 ตัวจากการเอาไข่เข้าฟักหลายร้อยใบ (Polge and Parkes, 1949)

หลังจากนั้นได้มีการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่โดยการปรับลดอุณหภูมิและการละลายน้ำเชื้ออย่างช้าโดยใช้กลีเซอรอล (Lake and Stewart, 1978; Wishart, 1995b) dimethyl sulfoxide (DMSO) (Bakst and Sexton, 1979; Sexton, 1980) dimethylacetamide (DMA) (Kurbatov *et al*., 1984; Tselutin *et al*., 1995) และethylene glycol (EG) (Kurbatov *et al*., 1980) เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง Tselutin *et al*. (1999) ทำการศึกษาเปรียบเทียบสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งแต่ละชนิดในเก็บน้ำเชื้อไก่แช่แข็งโดยใช้ กลีเซอรอล, DMA, DMSO เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งพบว่ากลีเซอรอลให้เปอร์เซ็นต์การมีเชื้อและอัตราการฟักออกดีที่สุดเมื่อเทียบกับสารชนิดอื่น รองลง DMA และDMSO ขณะที่การศึกษาของ Blesbois (2007); Blesbois and Brillard. (2007) ได้ศึกษาแนวโน้มการแช่แข็งน้ำเชื้อของ ไก่ ไก่งวง และห่าน โดยใช้กลีเซอรอลเป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งใช้วิธีเก็บแบบหลอดฟาง (Straws) เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และนำไปทำการผสมเทียม จากนั้นนำไข่เข้าตู้ฟักเพื่อดูเปอร์เซ็นต์การมีเชื้อและการฟักออกของไข่ พบว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่มีแนวโน้มที่ดีกว่าไก่งวงและห่าน

Buss (1993) รายงานว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้กลีเซอรอลเป็นสารป้องกันอันตรายจากความเย็นเมื่อนำไปผสมเทียมโดยใช้อสุจิ 156 ล้านตัว/โด๊ส พบอัตราการผสมติดระหว่าง 7-79 เปอร์เซ็นต์ ต่อมา Calvert (1978) พบว่าการใช้กลีเซอรอลเป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งมีผลเสียต่อการปฏิสนธิของตัวอสุจิ และการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิ สอดคล้องกับ Lake (1986); Donoghue and Wishart (2000); Long and Kulkarni (2004) รายงานว่ากลีเซอรอลมีความเป็นพิษต่อระบบสืบพันธุ์เพศเมียบริเวณช่องคลอด หากใช้สารดังกล่าวจะต้องมีการกำจัดออกจากน้ำเชื้อก่อนการผสมเทียมจะทำให้อัตราการผสมติดดีขึ้น

ในประเทศไทยมีรายงานเกี่ยวกับการศึกษาการผลิตน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองแช่แข็งอยู่น้อย จำกัดอยู่ในหน่วยงานราชการและสถาบันทางการศึกษา ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากกระบวนการในการผลิตนั้นค่อนข้างมีความยุ่งยากพอสมควรและอีกอย่างหนึ่งสารเคมีที่ใช้ป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งนั้นยังมีความจำเพาะแน่นอนน้อยกว่าการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งในโค สุนทรและคณะ (2548) ได้ทำการศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไทยภายหลังการเจือจางด้วยน้ำยา BPSE, Egg yolk-Tris และ Kiev และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าน้ำเชื้อที่เจือจางด้วย BPSE มีการเคลื่อนที่รายตัวดีที่สุดนานถึง 6 วัน ในขณะที่ Kiev มีการเคลื่อนที่ต่ำสุดเพียง 1 วัน เมื่อทำการผสมเทียมแม่ไก่ด้วยน้ำเชื้อหลังการเจือจางและเก็บไว้ที่4 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน พบว่ามีอัตราการผสมติดของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ BPSE, Egg yolk-Tris และ Kiev คือ 44.64, 21.68 และ 4.69 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ในขณะที่การศึกษาผลของอุณหภูมิที่ 4 และ10 องศาเซลเซียสกับชนิดของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ BPSE, Egg yolk-Tris และ Kiev พบว่าอัตราการฟักออกของลูกไก่ไม่มีความแตกต่างกัน การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่งผลให้มีอัตราการผสมติดและการฟักออกสูงกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

ภูมินทร์และคณะ (2549) ได้ศึกษาระดับความเข้มข้นของเอทธิลีนไกคอลที่เหมาะสมในการทำน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไทยแช่แข็งพบว่าการใช้เอทธิลีนไกคอลที่ระดับความเข้มข้น 7 เปอร์เซ็นต์ให้อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิสูงกว่าที่ระดับความเข้มข้น 3, 5 และ10 เปอร์เซ็นต์ อดิศักดิ์และคณะ (2545) ได้ศึกษาความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมในการผลิตน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองแช่แข็งพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 4-8 เปอร์เซ็นต์มีการเคลื่อนที่รายตัวของตัวอสุจิประมาณ 36 เปอร์เซ็นต์และเมื่อทำการผสมเทียมด้วยความเข้มข้นของตัวอสุจิ 100 ล้านตัว/โด๊ส มี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อัตราการผสมติด 16.39 เปอร์เซ็นต์ สุนทรและคณะ (2547) ได้ศึกษาการผลิตน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไทยแช่แข็งโดยทำการรีดเก็บน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไทย 4 วันติดต่อกันพบว่าน้ำเชื้อที่รีดเก็บวันที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อแช่แข็งหลังทำการละลายสูงกว่าที่รีดเก็บในวันที่ 3 และ 4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) อัตราการผสมติดและการฟักออกของน้ำเชื้อที่เก็บรักษา 24 ชั่วโมงไม่แตกต่างกันกับที่เก็บรักษานาน 3 เดือน (37.50 และ 46.66 เปอร์เซ็นต์, 34.37 และ 36.36 เปอร์เซ็นต์)

สราวุธและคณะ (2549) ได้ศึกษาผลของระยะเวลาในการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อไปที่ 5 องศาเซลเซียส ที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อในไก่พื้นเมืองไทยพบว่าการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ที่ผ่านการลดอุณหภูมิแบบทันทีและลดอุณหภูมิอย่างคงที่โดยใช้เวลา 30 นาที 1, 2 และ3 ชั่วโมง มีอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ สูงกว่ากลุ่มที่ใช้เวลา 4 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) อัตราการมีชีวิตของตัวอสุจิ และการใช้สีเมทิลีนบลูในกลุ่มที่ใช้การลดอุณหภูมิทันทีมีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ใช้เวลา4 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ใช้เวลา 30 นาที 1, 2 และ3 ชั่วโมงและยังพบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ และการใช้เมทิลีนบลูมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ในทางลบค่อนข้างสูง ($R^2=0.74$)

เทวินทร์และคณะ (2550ค) ได้ศึกษาผลของวิธีการผสมพันธุ์ต่ออัตราการผสมติดของไก่พื้นเมือง โดยวิธีการผสมตามธรรมชาติแบบฝูงเล็ก การผสมเทียมโดยน้ำเชื้อไม่เจือจางและการผสมเทียมโดยน้ำเชื้อเจือจางพบว่าวิธีการผสมพันธุ์ดังกล่าวให้อัตราการผสมติดไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของตำแหน่งที่ปล่อยน้ำเชื้อในการผสมเทียมต่ออัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองและไก่ไข่ทางการค้า โดยมีตำแหน่งในการปล่อยน้ำเชื้อที่ความลึก 2 และ4 เซนติเมตร พบว่าตำแหน่งการปล่อยน้ำเชื้อที่ความลึกทั้งสองตำแหน่งให้ผลต่ออัตราการผสมติดไม่แตกต่างกันทั้งในไก่พื้นเมืองและไก่ไข่ทางการค้า การศึกษาความยาวนานในการผสมติดด้วยน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อเจือจางภายหลังการผสมเทียมครั้งเดียว พบว่าความสามารถในการผสมติดจากการผสมเทียมลดน้อยลงจากสัปดาห์ที่ 1 ถึง 3 และการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อไม่เจือจางให้อัตราการผสมติดสูงกว่าการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อเจือจางในสัปดาห์ที่ 2

เทวินทร์และคณะ(2550ก) ได้ศึกษาผลของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ที่ 41 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง ของไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว, คละสี และพ่อพันธุ์ไก่โร๊ดไอร์แลนด์เรด โดยเปรียบเทียบสูตรของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ 5 สูตร คือ BPSE, Pre-freeze Lake, Tselutin et al. modified, Schramm และ IGGKP พบว่า น้ำเชื้อของไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว, คละสี สารละลายเจือจางน้ำเชื้อสูตร IGGKP และ BPSE ให้คุณภาพอสุจิภายหลัง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเก็บรักษาสูงสุด ส่วนพ่อพันธุ์ไก่โร๊ดไอร์แลนด์เรด น้ำยาเจืองจางน้ำเชื้อสูตร IGGKPให้ผลดีที่สุด และเมื่อนำน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยาสูตร Pre-freeze Lake, Tselutin et al. modified, Schramm, BPSE และ IGGKP ให้อัตราการผสมติด 93.65, 89.39, 96.53, 93.43 และ 94.78 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เทวินทร์และคณะ(2550ข) ได้ศึกษาผลของชนิดสารละลายเจือจางน้ำเชื้อและชนิดของ cryoprotectant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่เก็บรักษาไว้ที่ 5 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง โดยใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อสูตร BPSE, Pre-freeze Lake และ Tselutin et al. modifiled พบว่ามีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไม่แตกต่างกัน และเมื่อทำการผสมเทียมด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อดังกล่าวให้ผลอัตราการผสมติด 81.97, 77.04 และ 78.99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ผลการศึกษาชนิดของ cryoprotectant ที่เสริมในน้ำเชื้อที่เจือจางด้วย BPSE โดยใช้ ethylene glycol, glycerol, dimethylacetamide และ dimethyl sulfoxide ที่ระดับความเข้มข้น 0, 2, 4, 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์เป็นพิษต่อตัวอสุจิยกเว้น glycerol และเมื่อทำการศึกษาผลของ cryoprotectant ต่ออัตราการผสมติด พบว่า cryoprotectant มีผลทำให้อัตราการผสมติดลดลง

วีระศักดิ์และคณะ (2550ค) ได้ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อในการเก็บรักษาแบบแช่แข็งของไก่สามเหลือง โดยได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง การทดลองแรก เปรียบเทียบชนิดของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่สามเหลือง การทดลองที่ 2 เปรียบเทียบขั้นตอนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวและแบบสองขั้นตอน ผลการทดลองแรกพบว่า ลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิที่ปกติมีค่าลดลงภายหลังการแช่แข็งโดยกลุ่มที่ใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 56.67±1.10 และ 49.25±1.48 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอสุจิที่ใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 42.33±1.58 และ 40.75±0.69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

แสดงให้เห็นว่าอสุจิที่ใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO มีลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิปกติหลังจากการแช่แข็งสูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ หลังจากการแช่แข็งกลุ่มที่ใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO และ6% DMA มีค่า 48.50±3.40 และ 33.50±7.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ กลุ่มที่ใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด BPSE ร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 17.00±2.80 และ 11.50±3.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ กลุ่มที่ใช้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด SP-TALP ร่วมกับ 8% DMSO มีค่ามากกว่ากลุ่มอื่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ผลการทดลองที่ 2 พบว่าลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิที่ปกติภายหลังการแช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 6% DMA มีค่า 40.42±0.40 เปอร์เซ็นต์ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิที่ปกติที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO, 6% DMA และอสุจิที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO มีค่า 50.17±0.63, 48.83±1.27 และ 51.50±0.85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ หลังการแช่แข็ง กลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 47.00±8.82 และ 34.17±4.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 8% DMSO และ 6% DMA มีค่า 40.83±3.82 และ 28.00±2.73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบว่าการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ กลุ่มที่แช่แข็งแบบขั้นตอนเดียวร่วมกับ 8% DMSO มีค่ามากกว่ากลุ่มอื่น และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับ กลุ่มที่แช่แข็งแบบสองขั้นตอนร่วมกับ 6% DMA

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

พ่อพันธุ์ไก่สามเหลืองอายุระหว่าง 1-3 ปี จำนวน 10 ตัว โดยการสุ่ม และแม่ไก่ไข่ลูกผสมทางการค้าจำนวน 48 ตัวสำหรับการทดสอบอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยไก่ทุกตัวเลี้ยงในกรงเลี้ยงแบบแยกขังเดี่ยว ได้รับแสง 14 ชั่วโมงต่อวัน ให้อาหารวันละ 2 ครั้งในช่วงเช้าและช่วงเย็น (อาหารสำเร็จรูปคุณค่าทางโภชนาการโปรตีนไม่ต่ำกว่าร้อยละ 17 ให้กินประมาณ 125 กรัม/ตัว/วัน) มีน้ำสะอาดให้กินตลอดเวลา

อุปกรณ์

สารเคมี

1. เทส (TES, N-tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid)
2. HEPES (N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N-(2-ethanesulfonic acid))
3. โบไวน์ซีรัมอัลบูมิน (Bovine serum albumin)
4. กลูโคสโมโนฮัยเดรต (Glucose monohydrate)
5. ฟรุคโตส (Fructose)
6. เพนนิซิลิน จี (Penicillin G)
7. แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_26H_2O$)
8. แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_26H_2O$)
9. โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
10. โพแทสเซียมซิเตรต ($C_6H_5K_3O_7$)
11. ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4)
12. โมโนโพแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4)
13. โซเดียมกลูตาเมต ($C_5H_8NNaO_4$)
14. โซเดียมอะซิเตต ($NaCH_3COO$)
15. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)
16. โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)
17. โซเดียมไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

18. โซเดียมไพรูเวท ($C_3H_3NaO_3$)
19. กรดแลคติค (Lactic acid; 60% syrup)
20. ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide; DMSO)
21. เอทธิลีนไกคอล (Ethylene glycol; EG)
22. วิตามินอี (D-α-tocopherol) ชนิดละลายในน้ำ

วัสดุและอุปกรณ์

1. ถังไนโตรเจนเหลวพร้อมไนโตรเจนเหลว
2. ตู้ควบคุมความเย็น (ASECO® system,Inc)
3. เครื่องอุ่นสไลด์ (Slide warmer)
4. สไลด์แก้ว (Glass slide)
5. แผ่นปิดสไลด์ (Cover slip)
6. หลอดเก็บน้ำเชื้อ (Straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร
7. กล่องโฟม (Styrofoam box)
8. แร็ค (Vaporization rack)
9. ผงอุดหลอดน้ำเชื้อ (Sealing power)
10. สีย้อมอีโอซิน-นิโกรซิน (Eosin-Nigrosin stain)
11. หลอดจุลภาค (Microcentrifuge tube) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
12. หลอดทดลอง (Test tube) ขนาด 3 มิลลิลิตร
13. เคาท์ติ้งแชมเบอร์ (Counting chamber)
14. เครื่องจับเวลา
15. เครื่องนับด้วยมือ (Hand counter)
16. สไลด์ใช้นับเม็ดเลือด (Hemacytometer)
17. มาตรวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
18. มาตรวัดออสโมลาริตี้ (Osmolarity meter)
19. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
20. ไมโครปิเปต ขนาด 1-20, 10-100, 100-1000 ไมโครลิตร
21. กล้องจุลทรรศน์แสงส่องผ่าน (Ligh microscope)
22. ปากคีบ (Forcep)
23. ขวดรูปชมพู่ (Flask)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

24. มาตรวัดอุณหภูมิ (Thermometer)
25. ปากกาเขียนถาวร
26. น้ำยาเช็ดเลนส์
27. กระดาษเช็ดเลนส์

วิธีการ

การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

การรีดเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อจากไก่สามเหลืองด้วยวิธีการนวดทวารรวมตามวิธีของ Burrows and Quinn (1937) 2 ครั้ง/สัปดาห์ จำนวน 6 ครั้ง รองรับน้ำเชื้อด้วยหลอดทดลองขนาด 5 มิลลิลิตร โดยรีดน้ำเชื้อไก่พ่อพันธุ์ 10 ตัว และนำน้ำเชื้อมารวมกัน (pooled semen)

นำน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้มาตรวจสอบคุณภาพโดย การวัดปริมาตรของน้ำเชื้อ(Volume), ความเป็นกรด-ด่าง (pH), ค่าความดันสารละลายของน้ำเชื้อ (Osmotic pressure), ความเข้มข้นของตัวอสุจิ (Sperm concentration), ลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิ (Sperm morphology), เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (Percentage of motile sperm) และเปอร์เซ็นต์ของตัวอสุจิที่ปกติและผิดปกติ (Percentage of normal and abnormal sperm)

การวัดปริมาตรน้ำเชื้อและค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ทำการวัดปริมาตรน้ำเชื้อที่รีดมาทั้งหมด 10 ตัว โดยใช้ไมโครปิเปต วัด pH ของน้ำเชื้อโดยใช้กระดาษลิตมัสสำเร็จรูป ใช้แท่งแก้วคนน้ำเชื้อให้เข้ากัน แล้วแตะกับกระดาษลิตมัส นำไปเทียบสีข้างกล่องของกระดาษลิตมัสว่ามีค่า pH อยู่ในช่วงไหน จากนั้นบันทึกผล

ตรวจความเข้มข้นของตัวอสุจิ (Sperm concentration)

นับความเข้มข้นโดยใช้ Hemocytometer ใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำเชื้อจากหลอดทดลอง 0.5 ลูกบาศก์มิลลิเมตร แล้วดูดสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ SP-TALP จนถึงขีด 1.01 ลูกบาศก์มิลลิเมตร เขย่า ไมโครปิเปตเพื่อให้น้ำเชื้อกระจายตัวได้ดี หยดทิ้งไป 4-5 หยด จึงค่อยหยดลงบนช่องของ Hemocytometer ที่มี cover glass วางปิดอยู่ ทิ้งไว้ 5 นาที เพื่อให้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อกระจายทั่ว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

chamber หยุดนิ่งแล้วจึงเริ่มนับ การนับตัวอสุจิโดยใช้กำลังขยายต่ำของกล้องจุลทรรศน์ และนับ 5 ช่องใหญ่ เมื่อนับตัวอสุจิได้ทั้งหมดแต่ละสไลด์ นำไปหารด้วย 5 คูณด้วย 10^6 จะได้จำนวนความเข้มข้นเฉลี่ยของตัวอสุจิต่อลูกบาศก์มิลลิลิตร

การตรวจอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ด้วยกล้องจุลทรรศน์

ทำการหยดน้ำเชื้อ 1 หยดบนสไลด์ที่อุ่นไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ ทำการประเมินภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า ทำการตรวจการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ จาก 5 ตำแหน่งบนสไลด์และประเมินการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ โดยให้คะแนนการเคลื่อนที่ตั้งแต่ 0-100 เปอร์เซ็นต์ ทำการประเมินการเคลื่อนที่ตัวอย่างละ 3 สไลด์และหาค่าเฉลี่ยของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ

การตรวจอัตราการมีชีวิตของตัวอสุจิ ด้วยกล้องจุลทรรศน์

โดยการหยดน้ำเชื้อ 1 หยดลงบนสไลด์ที่อุ่นไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสและเติมสี eosin-nigrosin 2 หยดใช้ไม้จิ้มฟันสะอาดผสมน้ำเชื้อและสีให้เข้ากัน เสมียร์บนสไลด์ เป่าให้แห้งและตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า อสุจิที่มีชีวิตจะไม่ติดสี ส่วนอสุจิที่ตายจะติดสีแดงของสี eosin ทำการตรวจนับอสุจิจำนวน 200 ตัวต่อ 1 ตัวอย่างแล้วจึงคำนวณเทียบเป็นร้อยละของตัวอสุจิ ที่มีชีวิต

การตรวจโดยใช้ Computer-aided sperm motility analysis (CASA)

ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ โดยเจือจางน้ำเชื้อ 1:100 ของสารละลายน้ำเชื้อ จากนั้นนำไปหยดลงบนสไลด์ที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการประเมินการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ด้วยเครื่อง CASA โดยจะแสดงผลค่าพารามิเตอร์ของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ประกอบไปด้วยการวัด velocity ได้แก่ average path velocity (VAP) (μm/s), Straight line velocity (VSL) (μm/s), curvilinear velocity (VCL) (μm/s) ซึ่งจะทำให้ทราบถึงความเร็วในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิและการวัด kinetic movement ได้แก่ beat cross frequency (BCF) (Hz), straightness of track (STR) (%), amplitude of lateral head displacement (ALH) (μm) และ linearity of track (LIN) (%) (Girija *et al*., 1994 และ Shivaji *et al.,* 1995) ทำให้ทราบถึงลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การทดลองที่ 1 เปรียบเทียบสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งแต่ละระดับในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่สามเหลือง

โดยปัจจัยที่ศึกษามี 2 ปัจจัย ได้แก่ 1) สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 2 ชนิดคือ DMSO (dimethyl sulfoxide) และ EG (ethylene glycol) 2) ระดับของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 3 ระดับคือ 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์ ทำการเก็บข้อมูลจำนวน 6 ครั้ง (2 ครั้ง/สัปดาห์)

นำน้ำเชื้อรวม (pooled semen) มาแบ่งเป็น 6 กลุ่มการทดลองแต่ละกลุ่มผสมกับสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ (SP-TALP) Parrish *et al.* (1988) อัตราส่วน 1:6 (น้ำเชื้อ:สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ) โดยแบ่ง

กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่เจือจางน้ำเชื้อใช้ DMSO เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่ระดับ 6 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่เจือจางน้ำเชื้อใช้ DMSO เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่ระดับ 8 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 3 กลุ่มที่เจือจางน้ำเชื้อใช้ DMSO เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 4 กลุ่มที่เจือจางน้ำเชื้อใช้ EG เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่ระดับ 6 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 5 กลุ่มที่เจือจางน้ำเชื้อใช้ EG เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่ระดับ 8 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 6 กลุ่มที่เจือจางน้ำเชื้อใช้ EG เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์

ผสมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อลงในน้ำเชื้อรวมครึ่งหนึ่งก่อนจากนั้นนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาผสมกับสารละลายเจือจางน้ำเชื้อส่วนที่เหลือที่มีสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งผสมอยู่โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO 6, 8 และ10

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปอร์เซ็นต์ EG 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ นำส่วนที่ได้ไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที บรรจุส่วนผสมที่ได้ในหลอดน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตร ลดอุณหภูมิโดยนำไปวางไว้เหนือระดับไนโตรเจนเหลว 5 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ -120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแช่ลงไปในถังไนโตรเจนเหลว ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

ทำการตรวจสอบคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งหลังจากเก็บรักษาไว้นาน 1 สัปดาห์ โดยนำหลอดน้ำเชื้อมาอุ่นละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที จากนั้นผสมด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้ออัตราส่วน 1:5 (น้ำเชื้อแช่แข็ง:สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ) ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ด้วยเครื่อง CASA

การทดลองที่ 2 เปรียบเทียบสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่มีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ดีที่สุดจากการทดลองที่1 ผสมวิตามินอีแต่ละระดับ

โดยนำกลุ่มน้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนของตัวอสุจิ ดีที่สุดจากการเปรียบเทียบสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งในการทดลองที่ 1 ผสมกับสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ (SP-TALP) Parrish *et al.* (1988) อัตราส่วน 1:6 (น้ำเชื้อ:สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ) แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มการทดลอง แต่ละกลุ่มการทดลองผสมวิตามินอีระดับ 0, 4, 8 และ12 µl/ml ตามลำดับ โดยแบ่ง

กลุ่มที่ 1 สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งในการทดลองที่ 1 ผสมกับสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ + Vitamin E 0 µl/ml

กลุ่มที่ 2 สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งในการทดลองที่ 1 ผสมกับสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ + Vitamin E 4 µl/ml

กลุ่มที่ 3 สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งในการทดลองที่ 1 ผสมกับสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ + Vitamin E 8 µl/ml

กลุ่มที่ 4 สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งในการทดลองที่ 1 ผสมกับสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ + Vitamin E 12 µl/ml

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผสมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อลงในน้ำเชื้อรวมครึ่งหนึ่งก่อนจากนั้นนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาผสมกับสารละลายเจือจางน้ำเชื้อส่วนที่เหลือที่มีสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่มีการเคลื่อนที่อสุจิดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 ผสมกับวิตามินอีระดับ 0, 4, 8 และ12 µl/ml ตามลำดับ นำส่วนที่ได้ไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที บรรจุส่วนผสมที่ได้ในหลอดน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตร ลดอุณหภูมิโดยนำไปวางไว้เหนือระดับไนโตรเจนเหลว 5 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ -120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นแช่ลงไปในถังไนโตรเจนเหลว ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

ทำการตรวจสอบคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งหลังจากเก็บรักษาไว้นาน 1 สัปดาห์ โดยนำหลอดน้ำเชื้อมาอุ่นละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที จากนั้นผสมด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้ออัตราส่วน 1:5 (น้ำเชื้อแช่แข็ง:สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ) ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ด้วยเครื่อง CASA

การบันทึกข้อมูล

1. ปริมาตรของน้ำเชื้อ (Volume)
2. ความเป็นกรด-ด่าง (pH)
3. ค่าความดันสารละลายของน้ำเชื้อ (Osmotic pressure)
4. ความเข้มข้นของตัวอสุจิ (Sperm concentration)
5. ลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิ (Sperm morphology)
6. เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (Percentage of motile sperm)
7. เปอร์เซ็นต์ของตัวอสุจิที่ปกติและผิดปกติ (Percentage of normal and abnormal sperm)
8. ความเร็วและทิศทางในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (velocity and movement) ซึ่งได้แก่ average path velocity (VAP) (µm/s), Straight line velocity (VSL) (µm/s), curvilinear velocity (VCL) (µm/s), beat cross frequency (BCF) (Hz), straightness of track (STR) (%), amplitude of lateral head displacement (ALH) (µm) และ linearity of track (LIN) (%)
9. ความผิดปกติของตัวอสุจิ (sperm abnormality)
10. เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ (Percentage of live sperm)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สถานที่ทดลอง

ดำเนินการทดลองที่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาการผลิตสัตว์ปีก มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพด้านระบบสืบพันธุ์สัตว์และเซลล์ชีววิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม

ระยะเวลาในการดำเนินการทดลอง

เริ่มต้นการทดลอง: ธันวาคม พ.ศ. 2552
สิ้นสุดการทดลอง: ตุลาคม พ.ศ. 2553

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษาครั้งนี้ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Random Design, CRD) โดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่ม (mean ± standard error) ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ในการวิเคราะห์ ($P<0.05$) พารามิเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ประกอบด้วย เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของตัวอสุจิ ลักษณะอสุจิรูปร่างปกติ เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีการเคลื่อนที่ เปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ส่วนหัวของตัวอสุจิ ผิดปกติ ส่วนกลางของตัวอสุจิ ผิดปกติและส่วนหางของตัวอสุจิ ผิดปกติ แบบหุ่นทางคณิตศาสตร์ของแผนการทดลองแบบ Completely Random Design

$$Y_{ij} = \mu + A_i + e_{ij}$$

Y_{ij} = ค่าสังเกตจากปัจจัยของทรีทเมนต์ที่ i ซ้ำที่ j เมื่อ j = 1,2,3,4,5,6
μ = ค่าเฉลี่ยรวม
A_i = อิทธิพลของ treatment ที่ i (i = 1,2,3,4,5,6)
e_{ij} = ความคลาดเคลื่อนของการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผล

การทดลองที่ 1 เปรียบเทียบสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งแต่ละระดับในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่สามเหลือง

คุณภาพของน้ำเชื้อสด

ผลจากการศึกษาคุณภาพของน้ำเชื้อสดที่รีดจากพ่อพันธุ์ไก่สามเหลืองจำนวน 10 ตัว ทำการเก็บข้อมูลจำนวน 6 ครั้ง (2 ครั้ง/สัปดาห์) ลักษณะที่ทำการศึกษาคือ ปริมาตรของน้ำเชื้อรวม (volume), ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH), ค่าความดันสารละลายของน้ำเชื้อ (Osmotic pressure), ความเข้มข้นของตัวอสุจิต่อมิลลิลิตร (sperm concentration) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยคุณภาพของน้ำเชื้อสดที่นำมารวมกันหลังรีดเก็บจากพ่อพันธุ์ไก่สามเหลือง จำนวน 10 ตัว

ลักษณะที่ศึกษา	ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน	พิสัย
1. ปริมาตรของน้ำเชื้อรวม (มิลลิลิตร)	2.17±0.14	(2.00-2.40)
2. ค่าความเป็นกรด-ด่าง	7.83±0.41	(7.00-8.00)
3. ค่าความดันสารละลายของน้ำเชื้อ	347.58±5.11	(340.80-354.40)
4. ความเข้มข้นของตัวอสุจิ (ล้านตัว/มิลลิลิตร)	3,546.83±26.56	(3,521.00-3,579.00)
5. เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ	93.00±2.10	(91.00-96.00)

ลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิก่อนการแช่แข็งและหลังการแช่แข็ง

ลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิ (Sperm morphology), เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (percentage of motile sperm) และเปอร์เซ็นต์ของตัวลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิปกติและผิดปกติ (percentage of normal and abnormal sperm) ดังแสดงในตารางที่ 4 เมื่อนำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิที่ปกติมีค่าลดลงหลังการแช่แข็งเมื่อเทียบ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กับก่อนการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิที่ผิดปกติ head abnormal, mid piece abnormal, tail abnormal และอสุจิที่ตาย พบว่าภายหลังการแช่แข็งมีค่าสูงกว่าอสุจิก่อนการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิที่ปกติ ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ10% EG มีค่า 90.00±2.37, 92.00±0.84, 92.50±1.70, 90.42±1.24, 91.33±1.25 และ94.00±3.05 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิที่ปกติภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ10% EG มีค่า 41.58±3.22, 47.75±2.88, 39.58±5.83, 43.50±3.48, 43.92±3.02 และ56.50±2.28 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG มีลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิที่ปกติหลังการแช่แข็งสูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO กับ 10% DMSO มีลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิปกติหลังการแช่แข็งต่ำกว่า 8% DMSO อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% EG กับ 8% EG

ลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิส่วนหัวผิดปกติ (head abnormal) ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ10% EG มีค่า 4.83±1.04, 2.75±0.29, 4.00±0.71, 4.67±0.76, 4.17±0.29 และ2.00±0.41 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 8% DMSO กับ 10% EG มีค่าน้อยกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สำหรับลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิส่วนหัวผิดปกติ ภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง กลุ่มที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG มีค่า 13.42±0.97 เปอร์เซ็นต์ น้อยกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ใช้ 8% DMSO กับ 8% EG มีค่า 15.58±3.47 กับ 15.92±1.50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ส่วน 6% DMSO มีค่า 19.83±2.44 เปอร์เซ็นต์ มากที่สุด รองลงมาคือกลุ่มที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% DMSO กับ 6% EG มีค่า 17.42±3.89 กับ 16.25±1.21 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิส่วนกลางตัวอสุจิผิดปกติ (mid piece abnormal) ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ10% EG มีค่า 4.17±0.76, 2.83±0.29, 3.00±0.71, 3.83±0.29,

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.50±0.79 และ1.38±0.85 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG มีค่าน้อยกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สำหรับลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิส่วนกลางตัวอสุจิผิดปกติ ภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 8% DMSO, 10% EG และ6% DMSO มีค่า 13.50±0.89, 13.58±0.66 และ14.33±1.91 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ น้อยกว่ากลุ่มอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% DMSO, 6% EG และ8% EG มีค่า 16.58±1.36, 16.50±1.92 และ16.42±1.72 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิส่วนหางผิดปกติ (tail abnormal) ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ10% EG มีค่า 3.50±1.08, 1.80±0.57, 2.13±0.25, 3.33±0.29, 2.63±0.25 และ0.75±0.29 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG มีค่าน้อยกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สำหรับลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิส่วนหางผิดปกติภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ10% EG มีค่าเท่ากับ 24.25±1.51, 23.17±1.86, 26.42±4.02, 23.75±3.00, 23.75±1.21 และ16.50±2.05 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG มีอสุจิลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิส่วนหางผิดปกติหลังการแช่แข็งต่ำกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO กับ 10% DMSO มีอสุจิลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิส่วนหางผิดปกติหลังการแช่แข็งสูงกว่า 8% DMSO อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% EG กับ 8% EG

อสุจิที่ตาย (death) ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ10% EG มีค่าเท่ากับ 24.33±3.08, 13.50±2.74, 27.67±3.72, 18.33±4.84, 20.33±1.37 และ10.83±1.17 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG มีค่าน้อยกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 8% DMSO สำหรับอสุจิที่ตาย ภายหลังการแช่แข็งพบว่ากลุ่มที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG มีค่า 35.17±0.75 เปอร์เซ็นต์ น้อยกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) รองลงมา 8% DMSO, 6% EG, 8% EG, 6% DMSO และ10% DMSO มีค่าเท่ากับ 42.50±2.07, 57.17±1.72, 57.83±1.72, 64.17±1.72 และ69.83±2.14 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ DMSO และ EG ในระดับที่แตกต่างกัน

Parameter (%)	Pre-freeze						Post-thaw					
	DMSO (%)			EG (%)			DMSO (%)			EG (%)		
	6	8	10	6	8	10	6	8	10	6	8	10
Morphological normal	90.00±2.37^{B}	92.00±0.84^{B}	92.50±1.70^{AB}	90.42±1.24^{B}	91.33±1.25^{B}	94.00±3.05^{A}	41.58±3.22^{C}	47.75±2.88^{B}	39.58±5.83^{C}	43.50±3.48^{BC}	43.92±3.02^{BC}	56.50±2.28^{A}
Head Abnormal	4.83±1.04^{B}	2.75±0.29^{A}	4.00±0.71^{B}	4.67±0.76^{B}	4.17±0.29^{B}	2.00±0.41^{A}	19.83±2.44^{C}	15.58±3.47^{AB}	17.42±3.89^{BC}	16.25±1.21A^{B}	15.92±1.50^{AB}	13.42±0.97^{A}
Mid piece Abnormal	4.17±0.76^{C}	2.83±0.29^{B}	3.00±0.71^{BC}	3.83±0.29^{BC}	3.50±0.79^{BC}	1.38±0.85^{A}	14.33±1.91^{A}	13.50±0.89^{A}	16.58±1.36^{B}	16.50±1.92^{B}	16.42±1.72^{B}	13.58±0.66^{A}
Tail Abnormal	3.50±1.08^{D}	1.80±0.57^{B}	2.13±0.25^{B}	3.33±0.29^{CD}	2.63±0.25^{BC}	0.75±0.29^{A}	24.25±1.51B^{C}	23.17±1.86^{B}	26.42±4.02^{C}	23.75±3.00^{BC}	23.75±1.21^{BC}	16.50±2.05^{A}
Death	24.33±3.08^{C}	13.50±2.74^{A}	27.67±3.72^{C}	18.33±4.84^{B}	20.33±1.37^{B}	10.83±1.17^{A}	64.17±1.72^{D}	42.50±2.07^{B}	69.83±2.14^{E}	57.17±1.72^{C}	57.83±1.72^{C}	35.17±0.75^{A}

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{ABCDE} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในแถวแนวนอนช่วงของเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ค่าพารามิเตอร์ของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ

ผลจากการศึกษาการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ และค่าพารามิเตอร์ของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิก่อนและหลังการแช่แข็งพบว่าการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ภายหลังการแช่แข็งยังคงมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าคล้ายกับก่อนการแช่แข็งแต่มีความเร็วน้อยกว่า สำหรับค่าพารามิเตอร์ของการเคลื่อนที่พบว่าเปอร์ เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (motile) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ (progressive motile), VAP, VSL, VCL, ALH มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สำหรับค่า STR และ LIN มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในขณะที่ค่า BCF ไม่แตกต่างทางสถิติระหว่างก่อนการแช่แข็งและหลังการแช่แข็ง

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ DMSO และ EG ในระดับที่แตกต่างกัน

	Motile (%)	
	Pre-freeze	**Post-thaw**
6% DMSO	83.17 ± 4.49^{AB}	27.67 ± 4.04^{B}
8% DMSO	84.00 ± 2.90^{A}	46.00 ± 11.17^{A}
10% DMSO	76.00 ± 7.62^{B}	29.60 ± 4.22^{B}
6% EG	84.33 ± 6.22^{A}	29.60 ± 5.27^{B}
8% EG	83.83 ± 6.68^{A}	28.80 ± 6.42^{B}
10% EG	85.83 ± 4.79^{A}	50.17 ± 11.41^{A}

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{AB} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (motile) ดังตารางที่ 5 ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ 10% EG มีค่าเท่ากับ 83.17±4.49, 84.00±2.90, 76.00±7.62, 84.33±6.22, 83.83±6.68 และ 85.83±4.79 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าเกือบทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติยกเว้นกลุ่มที่ใช้ 10% DMSO มีค่าน้อยที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตัวอสุจิ ภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ10% EG มีค่าเท่ากับ 27.67±4.04, 46.00±11.17, 29.60±4.22, 29.60±5.27, 28.80±6.42 และ50.17±11.41 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่ใช้ 10% EG กับ 8% DMSO มีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ DMSO และ EG ในระดับที่แตกต่างกัน

	Progressive motile (%)	
	Pre-freeze	**Post-thaw**
6% DMSO	29.83±3.87	13.00±2.94^{B}
8% DMSO	32.83±5.04	19.25±4.57^{A}
10% DMSO	29.50±4.51	12.75±1.89^{B}
6% EG	30.33±5.05	13.00±1.58^{B}
8% EG	29.33±4.89	12.00±2.83^{B}
10% EG	27.83±5.31	20.00±3.92^{A}

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{AB} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ (progressive motile) ดังตารางที่ 6 ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ10% EG มีค่าเท่ากับ 29.83±3.87, 32.83±5.04, 29.50±4.51, 30.33±5.05, 29.33±4.89 และ27.83±5.31 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าแต่ละกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ ภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ10% EG มีค่าเท่ากับ 13.00±2.94, 19.25±4.57, 12.75±1.89, 13.00±1.58, 12.00±2.83 และ20.00±3.92 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่ใช้ 10% EG กับ 8% DMSO มีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 7 เปรียบเทียบค่า VAP ของตัวอสุจิ ไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ DMSO และ EG ในระดับที่แตกต่างกัน

	Average path velocity (μm/s)	
	Pre-freeze	**Post-thaw**
6% DMSO	54.35 ± 4.81^{AB}	27.02 ± 3.03^{C}
8% DMSO	53.52 ± 5.09^{AB}	29.25 ± 1.33^{BC}
10% DMSO	46.35 ± 4.50^{B}	33.32 ± 0.74^{B}
6% EG	61.43 ± 5.71^{A}	33.30 ± 1.88^{B}
8% EG	63.62 ± 3.43^{A}	40.57 ± 1.91^{A}
10% EG	63.25 ± 2.31^{A}	38.22 ± 1.17^{A}

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{ABC} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ค่าความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (average path velocity, VAP) ดังตารางที่ 7 ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ10% EG มีค่าเท่ากับ 54.35±4.81, 53.52±5.09, 46.35±4.50, 61.43±5.71, 63.62±3.43 และ63.25±2.31 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ พบว่าเกือบทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติยกเว้นกลุ่มที่ใช้ 10% DMSO มีค่าน้อยที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ค่า VAP ภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ10% EG มีค่าเท่ากับ 27.02±3.03, 29.25±1.33, 33.32±0.74, 33.30±1.88, 40.57±1.91 และ38.22±1.17 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่ใช้ 8% EG กับ 10% EG มีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 เปรียบเทียบค่า VSL ของตัวอสุจิ ไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ DMSO และ EG ในระดับที่แตกต่างกัน

	Straight line velocity (µm/s)	
	Pre-freeze	**Post-thaw**
6% DMSO	38.33 ± 3.90^{AB}	19.00 ± 1.94^{D}
8% DMSO	37.10 ± 4.06^{AB}	21.27 ± 1.25^{CD}
10% DMSO	32.07 ± 3.59^{B}	23.63 ± 0.79^{BC}
6% EG	42.02 ± 5.30^{AB}	21.95 ± 1.36^{BCD}
8% EG	41.48 ± 2.12^{A}	27.72 ± 1.55^{A}
10% EG	43.18 ± 2.53^{A}	25.05 ± 0.94^{AB}

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{ABCD} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ค่าความเร็วเฉลี่ยการเคลื่อนที่ในแนวตรงของตัวอสุจิ (straight line velocity, VSL) ดังตารางที่ 8 ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ10% EG มีค่าเท่ากับ 38.33±3.90, 37.10±4.06, 32.07±3.59, 42.02±5.30, 41.48±2.12 และ43.18±2.53 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ พบว่าเกือบทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติยกเว้นกลุ่มที่ใช้ 10% DMSO มีค่าน้อยที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ค่า VSL ภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ10% EG มีค่าเท่ากับ 19.00±1.94, 21.27±1.25, 23.63±0.79, 21.95±1.36, 27.72±1.55 และ25.05±0.94 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่ใช้ 8% EG กับ 10% EG มีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบค่า VCL ของตัวอสุจิ ไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ DMSO และ EG ในระดับที่แตกต่างกัน

	Curvilinear velocity (µm/s)	
	Pre-freeze	**Post-thaw**
6% DMSO	95.85 ± 7.18^{BC}	54.47 ± 5.62^{E}
8% DMSO	96.48 ± 7.35^{BC}	57.00 ± 2.58^{DE}
10% DMSO	85.25 ± 6.64^{C}	64.08 ± 1.79^{CD}
6% EG	108.05 ± 7.39^{AB}	68.35 ± 3.20^{BC}
8% EG	113.77 ± 6.23^{A}	77.07 ± 2.80^{A}
10% EG	110.43 ± 2.95^{AB}	75.15 ± 2.78^{AB}

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{ABCDE} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ค่าความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้งของตัวอสุจิ (curvilinear velocity, VCL) ดังตารางที่ 9 ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ10% EG มีค่าเท่ากับ 95.85±7.18, 96.48±7.35, 85.25±6.64, 108.05±7.39, 113.77±6.23 และ110.43±2.95 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่ใช้ 10% DMSO มีค่าน้อยกว่ากลุ่มอื่นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ค่า VCL ภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ10% EG มีค่าเท่ากับ 54.47±5.62, 57.00±2.58, 64.08±1.79, 68.35±3.20, 77.07±2.80 และ75.15±2.78 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่ใช้ 8% EG กับ 10% EG มีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบค่า ALH ของตัวอสุจิ ไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ DMSO และ EG ในระดับที่แตกต่างกัน

	Amplitude of lateral head displacement (µm)	
	Pre-freeze	**Post-thaw**
6% DMSO	4.37 ± 0.24^{AB}	2.30 ± 0.32^{C}
8% DMSO	4.47 ± 0.32^{AB}	2.58 ± 0.15^{CB}
10% DMSO	4.05 ± 0.35^{B}	2.80 ± 0.21^{CB}
6% EG	4.72 ± 0.22^{AB}	2.87 ± 0.15^{B}
8% EG	4.93 ± 0.22^{A}	3.48 ± 0.20^{A}
10% EG	5.00 ± 0.18^{A}	3.40 ± 0.17^{A}

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{ABC} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ค่าการส่ายหัวไปมาของตัวอสุจิ (amplitude of lateral head displacement, ALH) ดังตารางที่ 10 ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ10% EG มีค่าเท่ากับ 4.37±0.24, 4.47±0.32, 4.05±0.35, 4.72±0.22, 4.93±0.22 และ5.00±0.18 ไมโครเมตรตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่ใช้ 10% DMSO มีค่าน้อยกว่ากลุ่มอื่นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ค่า ALH ภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ 10% EG มีค่าเท่ากับ 2.30±0.32, 2.58±0.15, 2.80±0.21, 2.87±0.15, 3.48±0.20 และ3.40±0.17 ไมโครเมตรตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่ใช้ 8% EG กับ 10% EG มีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 11 เปรียบเทียบค่า BCF ของตัวอสุจิ ไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ DMSO และ EG ในระดับที่แตกต่างกัน

	Beat cross frequency (Hz)	
	Pre-freeze	**Post-thaw**
6% DMSO	29.83±0.98	32.98±0.65^{A}
8% DMSO	30.65±0.54	31.32±0.95^{AB}
10% DMSO	31.27±0.96	30.42±0.93^{B}
6% EG	31.05±1.50	33.08±0.53^{A}
8% EG	28.45±1.40	30.87±0.70^{B}
10% EG	28.47±1.05	31.42±0.43^{AB}

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{AB} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ค่าความถี่ของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (beat cross frequency, BCF) ดังตารางที่ 11 ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ10% EG มีค่าเท่ากับ 29.83±0.98, 30.65±0.54, 31.27±0.96, 31.05±1.50, 28.45±1.40 และ28.47±1.05 เฮิร์ทซ์ตามลำดับ พบว่าทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ค่า BCF ภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ10% EG มีค่าเท่ากับ 32.98±0.65, 31.32±0.95, 30.42±0.93, 33.08±0.53, 30.87±0.70 และ31.42±0.43 เฮิร์ทซ์ตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่ใช้ 10% DMSO กับ 8% EG มีค่าน้อยกว่ากลุ่มอื่นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบค่า STR ของตัวอสุจิ ไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ DMSO และ EG ในระดับที่แตกต่างกัน

	Straightness of track (%)	
	Pre-freeze	**Post-thaw**
6% DMSO	66.00 ± 1.55^{A}	72.00 ± 2.83^{A}
8% DMSO	64.83 ± 1.36^{AB}	71.17 ± 2.56^{AB}
10% DMSO	65.00 ± 0.63^{AB}	70.00 ± 1.82^{ABC}
6% EG	62.67 ± 1.91^{AB}	66.00 ± 1.97^{CD}
8% EG	61.00 ± 1.58^{B}	66.33 ± 0.98^{BCD}
10% EG	63.33 ± 2.04^{AB}	63.50 ± 1.04^{D}

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{ABCD} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ค่าการเคลื่อนที่แนวเส้นตรงของตัวอสุจิ (straightness of track, STR) ดังตารางที่ 12 ของตัวอสุจิ ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ10% EG มีค่าเท่ากับ 66.00±1.55, 64.83±1.36, 65.00±0.63, 62.67±1.91, 61.00±1.58 และ63.33±2.04 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่ใช้ 8% EG มีค่าน้อยกว่ากลุ่มอื่นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ส่วนค่า STR ภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ10% EG มีค่าเท่ากับ 72.00±2.83, 71.17±2.56, 70.00±1.82, 66.00±1.97, 66.33±0.98 และ 63.50±1.04 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่ใช้ 10% EG มีค่าน้อยกว่ากลุ่มอื่นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบค่า LIN ของตัวอสุจิ ไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ DMSO และ EG ในระดับที่แตกต่างกัน

	Linearity of track (%)	
	Pre-freeze	**Post-thaw**
6% DMSO	38.67±1.21	38.00±2.41^{AB}
8% DMSO	37.50±1.21	38.33±2.32^{AB}
10% DMSO	36.00±0.95	38.83±2.06^{A}
6% EG	36.83±2.42	34.33±1.13^{AB}
8% EG	35.83±1.20	36.83±1.24^{AB}
10% EG	38.00±1.90	33.83±1.07^{B}

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{AB} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นของตัวอสุจิ (linearity of track, LIN) ดังตารางที่ 13 ของตัวอสุจิก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ10% EG มีค่าเท่ากับ 38.67±1.21, 37.50±1.21, 36.00±0.95, 36.83±2.42, 35.83±1.20 และ38.00±1.90 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนค่า LIN ภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 6% DMSO, 8% DMSO, 10% DMSO, 6% EG, 8% EG และ10% EG มีค่าเท่ากับ 38.00±2.41, 38.33±2.32, 38.83±2.06, 34.33±1.13, 36.83±1.24 และ33.83±1.07 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่ากลุ่มที่ใช้ 10% EG มีค่าน้อยกว่ากลุ่มอื่นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ผลการศึกษาการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ภายหลังการอุ่นละลายน้ำเชื้อแช่แข็งเมื่อพิจารณาจากข้อมูลที่ได้ทำการทดลองพบว่ากลุ่มอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG มีผลต่อลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิ การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ ค่าพารามิเตอร์ VAP VSL VCL ALH BCF STR LIN และเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ตาย อยู่ในเกณฑ์ที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น จึงนำมาพิจารณาทำการทดลองต่อในการทดลองที่ 2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การทดลองที่ 2 ผลของระดับวิตามินอีต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่สามเหลือง

จากการศึกษาผลของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ในระดับที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 14) เมื่อนำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่าลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิที่ปกติมีค่าลดลงหลังการแช่แข็งเมื่อเทียบกับก่อนการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิที่ผิดปกติ head abnormal, mid piece abnormal, tail abnormal และอสุจิที่ตาย พบว่าภายหลังการแช่แข็งมีค่าสูงกว่าอสุจิก่อนการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิที่ปกติ ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่า 91.50±0.85, 92.33±0.38, 92.25±0.47, 90.58±0.37 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าที่ระดับ 12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าน้อยกว่ากลุ่มอื่นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สำหรับลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิที่ปกติภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่า 43.33±0.82, 48.33±0.52, 42.58±0.56 และ43.33±0.52 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 4 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิปกติหลังการแช่แข็งสูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิส่วนหัวผิดปกติ (head abnormal) ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 3.67±0.44, 2.83±0.30, 2.75±0.38 และ3.67±0.41 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สำหรับลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิส่วนหัวผิดปกติ ภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่า 18.67±0.52, 16.83±0.26, 17.33±0.34 และ17.33±0.20 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิส่วนหัวผิดปกติ หลังการแช่แข็งสูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิส่วนกลางตัวอสุจิผิดปกติ (mid piece abnormal) ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 2.25±0.61, 3.25±0.26, 2.92±0.25 และ2.83±0.26 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าที่ระดับ 4 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่ามากกว่ากลุ่มอื่นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สำหรับลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิส่วนกลางตัวอสุจิผิดปกติภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่า 14.25±0.92, 12.50±0.22, 16.92±0.37 และ 17.58±0.25 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 8 กับ 12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิส่วนกลางตัวอสุจิผิดปกติ หลังการแช่แข็งสูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิส่วนหางผิดปกติ (tail abnormal) ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 2.58±0.56, 1.58±0.19, 2.08±0.29 และ2.92±0.19 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าที่ระดับ 4 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีน้อยกว่ากลุ่มอื่นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สำหรับลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิส่วนหางผิดปกติภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่า 23.75±0.47, 22.33±0.34, 23.17±0.26 และ21.75±0.26 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0 กับ 8 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิส่วนหางผิดปกติหลังการแช่แข็งสูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

อสุจิที่ตาย (death) ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 15.00±0.89, 14.00±1.05, 19.33±1.08 และ14.83±0.58 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าที่ระดับ 8 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีมากกว่ากลุ่มอื่นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สำหรับอสุจิที่ตาย ภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่า 55.83±0.92, 54.33±0.82, 54.50±0.52 และ54.83±0.38 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าแต่ละกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ EG ที่ผสมวิตามินอีในระดับที่แตกต่างกัน

Parameter (%)	Pre-freeze				Post-thaw			
	10% EG+Vit E (µl/ml)				10% EG+Vit E (µl/ml)			
	0	4	8	12	0	4	8	12
Morphological normal	91.50±0.85^{AB}	92.33±0.38^{A}	92.25±0.47^{A}	90.58±0.37^{B}	43.33±0.82^{B}	48.33±0.52^{A}	42.58±0.56^{B}	43.33±0.52^{B}
Head Abnormal	3.67±0.44	2.83±0.30	2.75±0.38	3.67±0.41	18.67±0.52^{A}	16.83±0.26^{B}	17.33±0.34^{B}	17.33±0.20^{B}
Mid piece Abnormal	2.25±0.61^{B}	3.25±0.26^{A}	2.92±0.25^{AB}	2.83±0.26^{AB}	14.25±0.92^{B}	12.50±0.22^{C}	16.92±0.37^{A}	17.58±0.25^{A}
Tail Abnormal	2.58±0.56^{A}	1.58±0.19^{B}	2.08±0.29^{AB}	2.92±0.19^{A}	23.75±0.47^{A}	22.33±0.34^{B}	23.17±0.26^{A}	21.75±0.26^{B}
Death	15.00±0.89^{B}	14.00±1.05^{B}	19.33±1.08^{A}	14.83±0.58^{B}	55.83±0.92	54.33±0.82	54.50±0.52	54.83±0.38

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{ABC} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในแถวแนวนอนช่วงของเวลาเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ค่าพารามิเตอร์ของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ

ผลจากการศึกษาการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ และค่าพารามิเตอร์ของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิก่อนและหลังการแช่แข็งพบว่าการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ภายหลังการแช่แข็งยังคงมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าคล้ายกับก่อนการแช่แข็งแต่มีความเร็วน้อยกว่า สำหรับค่าพารามิเตอร์ของการเคลื่อนที่พบว่าเปอร์ เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (motile) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ (progressive motile), VAP, VSL, VCL, ALH, STR และLIN มีค่าลดลง สำหรับค่า BCF มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ EG ที่ผสมวิตามินอีในระดับที่แตกต่างกัน

	Motile (%)	
	Pre-freeze	**Post-thaw**
10% EG Vit E 0	90.17±1.63	45.17±3.82
10% EG Vit E 4	90.17±1.50	45.00±4.19
10% EG Vit E 8	89.33±1.63	44.17±4.14
10% EG Vit E 12	89.00±1.61	44.17±3.47

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (motile) ดังตารางที่ 15 ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 90.17±1.63, 90.17±1.50, 89.33±1.63 และ89.00±1.61 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 45.17±3.82, 45.00±4.19, 44.17±4.14 และ44.17±3.47 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับพบว่าทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ EG ที่ผสมวิตามินอีในระดับที่แตกต่างกัน

	Progressive motile (%)	
	Pre-freeze	**Post-thaw**
10% EG Vit E 0	32.67±3.59	18.67±2.14
10% EG Vit E 4	32.33±4.07	18.67±2.04
10% EG Vit E 8	31.50±2.44	18.33±2.27
10% EG Vit E 12	29.17±4.97	17.67±1.51

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ (progressive motile) ดังตารางที่ 16 ก่อนการแช่แข็ง พบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 32.67±3.59, 32.33±4.07, 31.50±2.44 และ29.17±4.97 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ ภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 18.67±2.14, 18.67±2.04, 18.33±2.27 และ17.67±1.51 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 17 เปรียบเทียบค่า VAP ของตัวอสุจิ ไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ EG ที่ผสมวิตามินอีในระดับที่แตกต่างกัน

	Average path velocity (μm/s)	
	Pre-freeze	**Post-thaw**
10% EG Vit E 0	71.25±4.85	54.18±2.87
10% EG Vit E 4	67.93±5.54	53.83±1.69
10% EG Vit E 8	67.82±1.90	53.57±1.81
10% EG Vit E 12	67.78±4.99	49.20±1.38

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

ค่าความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (average path velocity, VAP) ดังตารางที่ 17 ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 71.25±4.85, 67.93±5.54, 67.82±1.90 และ 67.78±4.99 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ พบว่าทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ค่า VAP ของตัวอสุจิ ภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 54.18±2.87, 53.83±1.69, 53.57±1.81 และ49.20±1.38 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ พบว่าทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 18 เปรียบเทียบค่า VSL ของตัวอสุจิ ไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ EG ที่ผสมวิตามินอีในระดับที่แตกต่างกัน

	Straight line velocity (μm/s)	
	Pre-freeze	**Post-thaw**
10% EG Vit E 0	49.92±4.80	43.45±2.81
10% EG Vit E 4	47.40±4.82	41.73±2.97
10% EG Vit E 8	46.98±1.30	40.60±3.20
10% EG Vit E 12	46.05±5.18	37.03±3.18

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

ค่าความเร็วเฉลี่ยการเคลื่อนที่ในแนวตรงของตัวอสุจิ (straight line velocity, VSL) ดังตารางที่ 18 ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 49.92±4.80, 47.40±4.82, 46.98±1.30 และ46.05±5.18 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ พบว่าทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ค่า VSL ของตัวอสุจิ ภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 43.45±2.81, 41.73±2.97, 40.60±3.20 และ37.03±3.18 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ พบว่าทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 19 เปรียบเทียบค่า VCL ของตัวอสุจิ ไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ EG ที่ผสมวิตามินอีในระดับที่แตกต่างกัน

	Curvilinear velocity (μm/s)	
	Pre-freeze	**Post-thaw**
10% EG Vit E 0	121.68±5.50	86.33±1.60
10% EG Vit E 4	119.27±7.99	85.67±0.88
10% EG Vit E 8	117.50±3.82	85.50±0.94
10% EG Vit E 12	116.97±6.22	85.38±0.61

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

ค่าความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้งของตัวอสุจิ (curvilinear velocity, VCL) ดังตารางที่ 19 ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 121.68±5.50, 119.27±7.99, 117.50±3.82 และ116.97±6.22 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ พบว่าทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ค่า VCL ของตัวอสุจิ ภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 86.33±1.60, 85.67±0.88, 85.50±0.94 และ85.38±0.61 ไมโครเมตรต่อวินาทีตามลำดับ พบว่าทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 20 เปรียบเทียบค่า ALH ของตัวอสุจิ ไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ EG ที่ผสมวิตามินอีในระดับที่แตกต่างกัน

	Amplitude of lateral head displacement (μm)	
	Pre-freeze	**Post-thaw**
10% EG Vit E 0	5.12±0.22	4.15±0.23
10% EG Vit E 4	5.07±0.19	4.13±0.12
10% EG Vit E 8	5.05±0.07	3.93±0.23
10% EG Vit E 12	5.05±0.21	3.93±0.25

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

ค่าการส่ายหัวไปมาของตัวอสุจิ (amplitude of lateral head displacement, ALH) ดังตารางที่ 20 ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอีระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 5.12±0.22, 5.07±0.19, 5.05±0.07 และ 5.05±0.21 ไมโครเมตรตามลำดับ พบว่าทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ค่า ALH ของตัวอสุจิภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอีระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 4.15±0.23, 4.13±0.12, 3.93±0.23 และ 3.93±0.25 ไมโครเมตรตามลำดับ พบว่าทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 21 เปรียบเทียบค่า BCF ของตัวอสุจิ ไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ EG ที่ผสมวิตามินอีในระดับที่แตกต่างกัน

	Beat cross frequency (Hz)	
	Pre-freeze	**Post-thaw**
10% EG Vit E 0	29.35±1.56	33.23±3.50^{A}
10% EG Vit E 4	28.83±0.90	33.17±0.72^{A}
10% EG Vit E 8	28.67±1.04	32.60±0.63^{A}
10% EG Vit E 12	28.60±0.72	26.42±0.55^{B}

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

^{AB} ตัวอักษรที่ต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ค่าความถี่ของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (beat cross frequency, BCF) ดังตารางที่ 21 ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 29.35±1.56, 28.83±0.90, 28.67±1.04 และ 28.60±0.72 เฮิร์ทซ์ตามลำดับ พบว่าทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ค่า BCF ของตัวอสุจิภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 33.23±3.50, 33.17±0.72, 32.60±0.63 และ 26.42±0.55 เฮิร์ทซ์ตามลำดับ พบว่ากลุ่มอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าน้อยกว่ากลุ่มอื่นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 22 เปรียบเทียบค่า STR ของตัวอสุจิ ไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ EG ที่ผสมวิตามินอีในระดับที่แตกต่างกัน

	Straightness of track (%)	
	Pre-freeze	**Post-thaw**
10% EG Vit E 0	65.33±2.02	70.33±2.68
10% EG Vit E 4	64.83±2.68	69.67±0.97
10% EG Vit E 8	64.33±1.83	69.17±0.58
10% EG Vit E 12	63.17±3.07	68.83±0.82

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

ค่าการเคลื่อนที่แนวเส้นตรงของตัวอสุจิ (straightness of track, STR) ดังตารางที่ 22 ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 65.33±2.02, 64.83±2.68, 64.33±1.83 และ 63.17±3.07 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ค่า STR ของตัวอสุจิภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 70.33±2.68, 69.67±0.97, 69.17±0.58 และ 68.83±0.82 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 23 เปรียบเทียบค่า LIN ของตัวอสุจิ ไก่สามเหลืองก่อนและหลังแช่แข็งของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของ EG ที่ผสมวิตามินอีในระดับที่แตกต่างกัน

	Linearity of track (%)	
	Pre-freeze	**Post-thaw**
10% EG Vit E 0	39.5±02.07	40.33±2.02
10% EG Vit E 4	39.50±2.20	38.83±1.02
10% EG Vit E 8	38.83±1.39	38.50±0.52
10% EG Vit E 12	37.83±2.81	38.17±0.58

ค่าที่แสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน

ค่าความสัมพันธ์เชิงเส้นของตัวอสุจิ (linearity of track, LIN) ดังตารางที่ 23 ก่อนการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 39.5±02.07, 39.50±2.20, 38.83±1.39 และ37.83±2.81 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ค่า LIN ของตัวอสุจิ ภายหลังการแช่แข็งพบว่าอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG ผสมกับวิตามินอี ระดับ 0, 4, 8 และ12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 40.33±2.02, 38.83±1.02, 38.50±0.52 และ38.17±0.58 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ พบว่าทุกกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อัตราการผสมติด

ผลจากการศึกษาอัตราการผสมติดน้ำเชื้อแช่แข็งของไก่สามเหลืองในแม่ไก่ไข่ลูกผสมทางการค้าจำนวน 48 ตัว เลี้ยงในกรงตับ กรงละ 3 ตัว ให้อาหารวันละ 2 ครั้งในช่วงเช้าและช่วงเย็น (อาหารสำเร็จรูปคุณค่าทางโภชนาการโปรตีนไม่ต่ำกว่าร้อยละ 17 ให้กินประมาณ 125 กรัม/ตัว/วัน) มีน้ำสะอาดให้กินตลอดเวลา Burrows and Quinn (1937) ทำการผสมเทียมโดยใช้แรงบีบที่ท้องของแม่ไก่และเอาปากมดลูก (vaginal orifice) ที่อยู่ด้านในออกมาด้านนอกผ่านทางรูทวารหนัก (cloaca) นำหลอดน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตร มาอุ่นละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 15 วินาที จากนั้นตัดหลอดน้ำเชื้อ 2 หลอด ใส่ลงในหลอดฉีดยา ได้ปริมาตรน้ำเชื้อ 0.50 มิลลิลิตร ความเข้มข้นอสุจิ 591 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร สอดเข้าไปลึกประมาณ 2-4 เซนติเมตร พร้อมกับการปล่อยแรงดันบนท้องแม่ไก่ แล้วปล่อยรูทวารหนักให้กลับสู่สภาพเดิม เวลาที่ใช้ในการผสมเทียม 15.30 นาฬิกา เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (2 ครั้ง/สัปดาห์) โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 กลุ่มที่ใช้ 10% EG ผสมกับวิตามินอีที่ระดับ 0 µl/ml ในน้ำเชื้อแช่แข็ง

กลุ่มที่ 2 กลุ่มที่ใช้ 10% EG ผสมกับวิตามินอีที่ระดับ 4 µl/ml ในน้ำเชื้อแช่แข็ง

กลุ่มที่ 3 กลุ่มที่ใช้ 10% EG ผสมกับวิตามินอีที่ระดับ 8 µl/ml ในน้ำเชื้อแช่แข็ง

กลุ่มที่ 4 กลุ่มที่ใช้ 10% EG ผสมกับวิตามินอีที่ระดับ 12 µl/ml ในน้ำเชื้อแช่แข็ง

ทำการเก็บไข่หลังจากการผสมเทียม 1 วัน นำไข่ไปฟักในเครื่องฟักไข่ที่ความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 37.8 องศาเซลเซียส ทำการส่องไข่ในวันที่ 7 เพื่อหาร้อยละผสมติดและหาร้อยละการฟักออกเมื่อครบ 21 วัน จากการนำไข่เข้าฟักจำนวน 268 ฟอง ไม่พบไข่ที่ผสมติด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิจารณ์

การรีดเก็บน้ำเชื้อในไก่สามเหลืองเพื่อนำมาเก็บรักษาแบบแช่แข็ง โดยมีการนำมาตรวจคุณภาพก่อนการแช่แข็งพบว่า ปริมาตรของน้ำเชื้อรวมเฉลี่ยเท่ากับ 2.17 มิลลิลิตรหรือมีปริมาตรของน้ำเชื้อเฉลี่ย 0.22 มิลลิลิตรต่อตัว ความเข้มข้นเฉลี่ย 3,546.83 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.83 และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ เฉลี่ยเท่ากับ 93.00 เปอร์เซ็นต์พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไทยที่ได้มีการศึกษามาก่อนหน้านี้ สุนทรและคณะ (2548) ได้รายงานคุณภาพของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไทยโดยการรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์จำนวน 20 ตัว พบว่ามีความเข้มข้นเฉลี่ย 2,950 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.5 และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ เฉลี่ยเท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ ภูมินทร์และคณะ(2549) รายงานการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไทยก่อนการแช่แข็งจากพ่อพันธุ์ 20 ตัวมีปริมาตรน้ำเชื้อรวมเฉลี่ย 2.55 มิลลิลิตรหรือมีปริมาตรน้ำเชื้อเฉลี่ย 0.11 มิลลิลิตรต่อตัว ความเข้มข้นเฉลี่ย 2.25 พันล้านตัว/มิลลิลิตร และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ เฉลี่ยเท่ากับ 67.78 เปอร์เซ็นต์ สำหรับค่าความดันสารละลายมีค่า 328-402 mOsmol/kg พบว่ามีค่ามากกว่าค่าความดันสารละลายของไก่งวง, นกกระทาและห่าน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 320-340, 270-345 และ 250-260 mOsmol/kg ตามลำดับ (Chelmonska et al., 2006)

การศึกษาผลของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิโดยการย้อมสี eosin-nigrosin พบว่ากลุ่มที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG มีค่าเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีลักษณะรูปร่างปกติมีค่าสูงที่สุด คือ 64.83±0.75 และ 56.50±2.28 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ กลุ่มอสุจิที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% DMSO มีค่าเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีลักษณะรูปร่างปกติต่ำที่สุด 30.17±2.14 และ 39.58±5.83 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ขณะที่ลักษณะรูปร่างที่ผิดปกติของตัวอสุจิ ภายหลังการแช่แข็งพบว่ามีลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิส่วนหางผิดปกติมากที่สุด เมื่อพิจารณาผลของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อค่าพารามิเตอร์ของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (motile) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ (progressive motile), VAP, VSL, VCL, ALH มีค่าลดลงตามกระบวนการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สำหรับค่า STR, และ LIN มีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในขณะที่ค่า BCF ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ระหว่างก่อนการแช่แข็งและหลังการแช่แข็งแสดงให้เห็นว่าเมื่อทำการละลายน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งอสุจิยังคงมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าได้เหมือนกับก่อนการแช่แข็งแต่อัตราเร็วในการเคลื่อนที่จะน้อยกว่า จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้สารป้องกัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG มีผลเสียต่อลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิและลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ น้อยที่สุด เมื่อเปรียบเทียบผลของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อของสัตว์ปีกจากผลการทดลองพบว่าการใช้ EG ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ SP-TALP พบว่าลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิที่ปกติมีค่าสูงกว่าการใช้ DMSO ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ SP-TALP ทั้งก่อนการแช่แข็งและหลังการแช่แข็ง รวมทั้งอสุจิที่มีลักษณะรูปร่างที่ผิดปกติและอสุจิที่ตายมีค่าน้อยกว่าทั้งก่อนและหลังการแช่แข็งนอกจากนี้ส่วนของพารามิเตอร์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน สำหรับการศึกษาผลของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งของสัตว์ปีกจากการที่พบว่ากลีเซอรอลมีคุณสมบัติเป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่เหมาะสมที่สุดแต่เนื่องจากพบว่ากลีเซอรอลมีผลต่ออัตราการผสมติด ทำให้อัตราการผสมติดลดลง

Sexton (1973) รายงานการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่ออสุจิไก่ พบว่าการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ก่อนการแช่แข็ง กลีเซอรอลมีการเคลื่อนที่ดีที่สุด รองลงมาคือ DMSO และ EG ตามลำดับ ส่วนประสิทธิภาพการผสมติด DMSO มีการประสิทธิภาพการผสมติดดีที่สุด รองลงมา EG และกลีเซอรอล (Donoghue and Wishart, 2000) มีการศึกษาวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพการผสมติดของน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้กลีเซอรอล พบว่าการกำจัดกลีเซอรอลก่อนนำไปผสมเทียมจะช่วยทำให้อัตราการผสมติดสูงขึ้น ขณะที่ Long and Kulkarni (2004) ได้ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการกำจัดกลีเซอรอลจากน้ำเชื้อแช่แข็ง พบว่าการใช้วิธี Accudenz centrifugation จะทำให้มีอัตราการผสมติดเพิ่มขึ้น 17.90-37.17 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้มีการกำจัดกลีเซอรอลออกก่อนการผสมขณะที่วิธี Dialyze มีผลทำให้อัตราการผสมติดลดลงจาก 26.4 เปอร์เซ็นต์ถึง 0 เปอร์เซ็นต์ แม้ว่าวิธีการ Dialyze และ Accudenz centrifugation จะช่วยกำจัดกลีเซอรอลก่อนการผสมแต่พบว่ามีข้อเสียคือเสียเวลาและอาจทำให้เกิดอันตรายต่ออสุจิระหว่างปฏิบัติงานได้ Sexton (1975) รายงานการใช้ DMSO สำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่ว่ามีข้อจำกัดในการใช้คือ DMSO จะมีประสิทธิภาพที่ดีเมื่อใช้กับสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยอาจมีสาเหตุเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อซึ่งมีผลทำให้อสุจิมีชีวิตอยู่ได้นานขึ้น ส่วนการศึกษาเกี่ยวกับการใช้ EG Hee-Jun *et al*. (2002) รายงานการใช้ EG สำหรับการแช่แข็งเซลล์โดย EG จะซึมผ่านทั่วเซลล์ส่งผลให้เซลล์คงสภาพอยู่ซึ่งมีการศึกษาการใช้ EG กันอย่างแพร่หลายในเซลล์ไข่ (Newton *et al*., 1998) เซลล์อสุจิ (Gilmore *et al*., 1995) และเซลล์ตัวอ่อน (Emiliani *et al*., 2000) นอกจากความสามารถในการซึมผ่านได้ทั่วเซลล์แล้ว EG ยังมีความเป็นพิษต่ำส่งผลให้เซลล์ทนต่อแรงดันออสโมติกในระหว่างการแช่แข็งจึงส่งผลให้เซลล์มีคุณภาพดีกว่าการผสมสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งชนิดอื่น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รายงานการศึกษาผลของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งในสัตว์ปีกชนิดอื่น Lukaszewicz (2002) ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อของ White Italian gander โดยใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ EK diluent ร่วมกับ 6% DMF พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของรูปร่างอสุจิคือ ลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิที่ปกติมีค่าลดลงภายหลังการแช่แข็งและลักษณะรูปร่างที่ผิดปกติร่วมกับอสุจิที่ตายมีค่าสูงขึ้นภายหลังการแช่แข็ง นอกจากนี้ยังได้รายงานว่าจำนวนอสุจิที่อยู่รอดภายหลังการแช่แข็งไม่ขึ้นอยู่กับจำนวนอสุจิที่ปกติก่อนการแช่แข็งดังรายงานของ Lukaszewicz (2001) ที่ได้ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อห่านที่มีรูปร่างปกติก่อนการแช่แข็งสูงโดยใช้ DMA เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง พบว่าภายหลังการแช่แข็งมีอสุจิที่มีลักษณะปกติเพียง 29 เปอร์เซ็นต์ดังนั้นจึงควรให้ความสำคัญในการเลือกสารละลายเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง Sontakke *et al.* (2004) รายงานว่า DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์มีความเหมาะสมสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อของ Blue rock pigeon มากกว่าการใช้ polyethylene glycol และกลีเซอรอล Han *et al.* (2005) รายงานว่า DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์มีความเหมาะสมสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อเป็ดมากกว่าการใช้กลีเซอรอล, dimethylacetamide และ dimethyl formamide เนื่องจากมีรายงานการศึกษาสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งสำหรับสัตว์ปีกมากมายหลายชนิดซึ่งให้ผลที่มีความแตกต่างกันไปทั้งนี้ควรจะต้องมีการศึกษาถึงความเป็นพิษต่ออสุจิ, ความเข้มข้นของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่เหมาะสมสำหรับสัตว์แต่ละชนิด, อุณหภูมิสำหรับการปรับสภาพ, ระยะเวลาการปรับสภาพ (equilibration time), รูปแบบการแช่แข็ง, อุณหภูมิและระยะเวลาสำหรับการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

การศึกษาเปรียบเทียบสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งที่มีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ดีที่สุดจากการทดลองแรกผสมวิตามินอีแต่ละระดับต่อลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิโดยการย้อมสี eosin-nigrosin พบว่ากลุ่มที่ใช้สารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง 10% EG + Vit E 4 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่าเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีลักษณะรูปร่างปกติมีค่าสูงที่สุด คือ 45.67±0.82 และ 48.33±0.52 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ขณะที่ลักษณะรูปร่างที่ผิดปกติของตัวอสุจิ ภายหลังการแช่แข็งพบว่ามีลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิส่วนหางผิดปกติมากที่สุด เมื่อพิจารณาผลของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งผสมวิตามินอีแต่ละระดับต่อค่าพารามิเตอร์ของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (motile) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ (progressive motile), VAP, VSL, VCL, ALH, STR และLIN มีค่าลดลงตามกระบวนการแช่แข็งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) ในขณะที่ค่า BCF กลุ่มที่ใช้ 10% EG + Vit E 4 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีค่ามากแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ระหว่างก่อนการแช่แข็งและหลังการแช่แข็งแสดงให้เห็นว่าเมื่อทำการละลายน้ำเชื้อภายหลังการแช่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แข็งอสุจิยังคงมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าได้เหมือนกับก่อนการแช่แข็งแต่อัตราเร็วในการเคลื่อนที่จะน้อยกว่า จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ SP-TALP ร่วมกับ 10% EG + Vit E 4 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีผลเสียต่อลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิและลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ น้อยที่สุดเมื่อพิจารณาจากค่า VAP, VSL, VCL, ALH, STR และLIN แต่ได้ปรับปรุงค่า BCF ของตัวอสุจิ ทั้งนี้เนื่องจากการได้รับ Vit E 4 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร เท่ากับเป็นการเติม ADP (Adenosine diphosphate) ให้กับหางของตัวอสุจิ โดยที่ ADP จะไปมีผลต่อการกับ dynein ของ B-subtubule อย่างเหนียวแน่น ทำให้ flagella ซึ่งก็คือส่วนหางของตัวอสุจิเกิดการแกว่งตัวเร็วขึ้น ทำให้เกิดการการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิแบบ BCF แต่เมื่อเติม Vit E 12 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร เท่ากับไปลด ADP ของหางตัวอสุจิ จึงมีผลทำให้ตัวอสุจิแกว่งหางได้ช้าลง มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิแบบ BCF ลดลงตามมา (Kathleen *et al*., 2008)

สำหรับการศึกษาเรื่องการผสมวิตามินอีในสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง Hu *et al*. (2011) พบว่าวิตามินอีมีส่วนช่วยลดการเกิดกระบวนการ lipid peroxidation และช่วยปรับปรุงคุณภาพของตัวอสุจิ ในระหว่างการแช่แข็งให้ดีขึ้น ส่วน Zaniboni and Cerolini. (2009) พบว่าการผสมวิตามินอีในสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งในตัวอสุจิไก่งวงจะช่วยป้องกันการตายของตัวอสุจิ โดยที่กลุ่มที่ไม่ได้เติมวิตามินอีมีการตายของตัวอสุจิ 37 เปอร์เซ็นต์แต่ในกลุ่มที่เติมวิตามินอีอสุจิมีการตายของตัวอสุจิ เพียง 31.7 เปอร์เซ็นต์ และRadomil *et al*. (2011) พบว่าการผสมวิตามินอีร่วมกับไขมันในสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งจะช่วยปรับปรุงการมีชีวิตของตัวอสุจิ หมู Geva *et al*. (1996) รายงานว่าการผสมวิตามินอีในสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งอสุจิจะช่วยให้เซลล์อสุจิมีชีวิตมากขึ้นโดยที่วิตามินอีจะช่วยป้องกันการเกิด oxidative reduction จากการศึกษาครั้งนี้พอที่จะชี้ชัดได้ว่าการใช้วิตามินอีผสมกับสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งจะช่วยลดการเกิดอนุมูลอิสระ

สำหรับการศึกษาการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ และค่าพารามิเตอร์ของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ด้วยวิธี computer-aided sperm motility analysis ได้มีรายงานการศึกษาในตัวอสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด เช่น หนูแฮมเตอร์ สิงโต เสือ เสือดาว กระต่าย โค รวมทั้งมนุษย์ สำหรับการศึกษาในตัวอสุจิของสัตว์ปีกพบว่ามีข้อมูลน้อยมากจากการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีลักษณะสอดคล้องกับรายงานของ Sontakke *et al*. (2004) ที่ศึกษาค่าพารามิเตอร์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิก่อนและหลังการแช่แข็งของ Blue rock pigeon (Columba livia) พบว่าภายหลังการแช่แข็งมีการลดลงของค่าพารามิเตอร์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ คือ VAP, VSL,VCL, BCF, ALH, STR และ LIN นอกจากนี้ Blesbois *et al*. (2007) ได้รายงานการศึกษาค่าพารามิเตอร์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ก่อน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และหลังการแช่แข็งของไก่พบว่าภายหลังการแช่แข็งมีการลดลงของค่าพารามิเตอร์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ คือ VAP, VSL, STR, LIN, percentage of motile sperm, percentage of Progressive motile และ percentage of rapid sperm King *et al*. (2000) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ของค่าพารามิเตอร์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ กับลักษณะการเคลื่อนของตัวอสุจิ ในไก่งวง พบว่า VAP, VSL,VCL, BCF และ LIN จะมีค่าสูงในกลุ่มที่มีลักษณะการเคลื่อนที่แบบเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่มีการเคลื่อนที่แบบปานกลางและแบบช้า นอกจากนี้ค่า VSL, BCF และ LIN มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ไก่งวง

สำหรับการศึกษาการผสมติด โดยทำการผสมเทียมโดยใช้ปริมาตรน้ำเชื้อ 0.50 มิลลิลิตร ความเข้มข้นอสุจิ 591 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร จากการนำไข่เข้าฟักจำนวน 268 ฟอง ไม่พบไข่ที่ผสมติด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะอัตราส่วนสำหรับการเจือจางน้ำเชื้อ อัตราความเร็วในการลดอุณหภูมิ รูปแบบของการแช่แข็ง อุณหภูมิและระยะเวลาสำหรับการอุ่นละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ปริมาณความเข้มข้นของตัวอสุจิ ที่เหมาะสมในการผสมเทียมไม่ดีพอ (วีระศักดิ์.,2552) นอกจากนี้ปัจจัยของการผสมเทียมไม่ติด อาจเนื่องมาจากกระบวนการแช่แข็งส่งผลกระทบต่อ รูปร่าง เยื่อหุ้มเซลล์ acrosome หาง รวมไปถึง DNA ของตัวอสุจิ (Aitken and Sawyer., 2003)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การใช้ EG ที่ระดับความเข้มข้นที่ 10 เปอร์เซ็นต์มีผลต่อลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิ การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ ค่าพารามิเตอร์ VAP VSL VCL ALH BCF STR LIN และเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ตาย อยู่ในเกณฑ์ที่ดีเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น ดังนั้นจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในการใช้เป็นสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งสำหรับการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งในไก่สามเหลือง การผสมวิตามินอีที่ระดับ 4 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร มีผลต่อลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิที่ปกติดีขึ้นมีแนวโน้มทำให้คุณภาพน้ำเชื้อดีกว่าระดับความเข้มข้นอื่น

ข้อเสนอแนะ

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาเปรียบเทียบสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งและการผสมวิตามินอีที่ระดับต่างและนำน้ำเชื้อที่ได้ไปทำการผสมเทียมแต่ภายหลังจากการผสมเทียมพบว่าไม่มีการผสมติด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะอัตราส่วนสำหรับการเจือจางน้ำเชื้อ อัตราเร็วในการลดอุณหภูมิ รูปแบบของการแช่แข็ง อุณหภูมิและระยะเวลาสำหรับการอุ่นละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ปริมาณความเข้มข้นของตัวอสุจิ ที่เหมาะสมในการผสมเทียมไม่ดีพอ ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลการศึกษาที่สมบูรณ์และสามารถนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. **การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง หลักการ/วิธีการ/ประโยชน์**. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เทวินทร์ วงษ์พระลับ, ยุพิน ผาสุก, บัญญัติ เหล่าไพบูล์, จุฬานีย์ น่วมสุข และ พรจิตร สอนสีดา. 2550ก. ผลของชนิดสารละลายเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่, น. 196-203. *ใน* **รายงานการประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 3**. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

_____, บัญญัติ เหล่าไพบูลย์, พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา, สจี กัณหาเรียง, สราวุธ ศรีงาม และ ยุพิน ผาสุก. 2550ข. ผลของชนิดสารละลายเจือจางน้ำเชื้อและชนิด cryoprotectant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่เก็บรักษา, น. 188-195. *ใน* **รายงาน การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ครั้งที่ 3**. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

_____, บัญญัติ เหล่าไพบูลย์, พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา, สจี กัณหา และ ยุพิน ผาสุก. 2550ค. การศึกษาผลการผสมติดจากการผสมเทียมโดยน้ำเชื้อไก่พื้นเมือง, น. 180-187. *ใน* **รายงานการประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 3**. มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

นัยนา บุญทวียุวัฒน์. 2546. **ชีวเคมีทางโภชนาการ**. บริษัท ซิกม่าดีไซน์กราฟฟิก จำกัด, กรุงเทพฯ.

บัญญัติ เหล่าไพบูลย์ เชิดชัย รัตนเศรษฐากุล และประภาส เนรมิตมานสุข. 2529. การศึกษาสภาพการเลี้ยงไก่พื้นเมืองของเกษตรกรจังหวัดชัยภูมิ. **แก่นเกษตร**. 14(3): 195-202.

บุญล้อม ชีวะอิสระกุล. 2546. **ชีวเคมีทางสัตวศาสตร์**. พิมพ์ครั้งที่ 2. หจก. ธนบรรณการพิมพ์, เชียงใหม่.

ปฐม เลาหะเกษตร. 2540. **การเลี้ยงสัตว์ปีก**. พิมพ์ครั้งที่ 3. สำนักพิมพ์รั้วเขียว, กรุงเทพมหานคร.

พีรศักดิ์ สุทธิโยธิน. 2528. **การผสมเทียม**. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ลักษณา อินทรกลับ. 2543. **โภชนศาสตร์เชิงชีวเคมี วิตามิน เกลือแร่ น้ำ และใยอาหาร**. มีเดียการพิมพ์, กรุงเทพฯ.

ภูมินทร์ สุมามาลย์, สุรศักดิ์ จันที, อเนก แสนกอง และ นงเยาว์ สุวรรณธาดา. 2549. ระดับความเข้มข้นของเอทธิลีนไกคอลที่เหมาะสมในการทำน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไทยแช่แข็ง, น. 179-183. *ใน* **ประมวลเรื่องการประชุมวิชาการทางสัตวแพทย์และการเลี้ยงสัตว์ ครั้งที่ 32**, กรุงเทพ.

มนต์ชัย ดวงจินดา. 2534. **อิทธิพลของการใช้กลีเซอรอลและซูโครสเป็นสารป้องกันการแข็งตัวที่มีต่อคุณภาพของตัวอ่อนโคนมภายหลังการแช่แข็งที่ -196 องศาเซลเซียส**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิโรจน์ จันทรัตน์. 2537. **กายวิภาคและสรีรวิทยาของสัตว์ปีก**. พิมพ์ครั้งที่ 1. ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว์. คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่

วีระศักดิ์ ฟุ้งเฟื่อง. 2552. **การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อในการเก็บรักษาแบบแช่แข็งของไก่สามเหลือง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สราวุธ ศรีงาม, บัญญัติ เหล่าไพบูลย์, มนต์ชัย ดวงจินดา และ เทวินทร์ วงษ์พระลับ. 2549. ผลของระยะเวลาในการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อไปที่ 5 ^{o}C ที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อในไก่พื้นเมืองไทย. **วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.**16(1): 18-26.

สวัสดิ์ ธรรมบุตร. 2540. การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไก่พื้นเมือง. **สาส์นไก่**. 45: 13-14.

สวัสดิ์ วีระเดชะ. 2503. **การเลี้ยงไก่**. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพมหานคร.

สิริพันธุ์ จุลกรังคะ. 2541. **โภชนศาสตร์เบื้องต้น**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุจินต์ สิมารักษ์. 2532. **สรีรวิทยาการสืบพันธุ์ของสัตว์ปีก**. โครงการผลิตสิ่งตีพิมพ์ทางเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

สุชาติ สงวนพันธุ์. 2547. ลูกผสมไก่เบตงและไก่สามเหลือง. **วารสารสัตว์บก**11(130): 88-91.

สุวิทย์ จันละคร. 2550. **กายวิภาคและสรีรวิทยาของสัตว์เลี้ยง**. ธรรมรักษ์การพิมพ์, ราชบุรี.

สุนทร สุนาทัย, เทอดศักดิ์ ชมชื่นจิตร, กุลภัทร โพธิกนิษฐ และ เทวินทร์ วงษ์พระลับ.2547. การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งของไก่พื้นเมืองไทย. **วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข**. 14(1):26-33

_____, สราวุธ ศรีงาม อดิศักดิ์ สังข์แก้ว อภิชัย พูลชัย และกังวาน กาญจนพงศ์กิจ.2548. การศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไทยภายหลังการเจือจางและเก็บรักษาโดยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ BPSE, Egg yolk-Tris และKiev. **วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.** 15(1): 18-27

อดิศักดิ์ สังข์แก้ว, ประยงค์ แสงศรีเรือง, กิ่งกาญจน์ สาระชู, วีระศักดิ์ วงศ์ศรีแก้ว, สุณีรัตน์ เอี่ยมละมัย, มงคล โปร่งเจริญ, ชัยวัฒน์ จรัสแสง และพงษ์ธร สุวรรณธาดา.2545. ระดับความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่เหมาะสมในการทำน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไทยแช่แข็ง. **วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข.**12(1): 51-62.

อภิชัย รัตนวราหะ และสุทัศน์ ศิริ. ม.ป.ป. **การผสมพันธุ์สัตว์ปีก**. ม.ป.ท.

อาวุธ ตันโช. 2538. **การผลิตสัตว์ปีก**. ภาคเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพมหานคร.

โอภา วัชระคุปต์. 2550. **สารต้านอนุมูลอิสระ.** บริษัทนิวไทยมิตรการพิมพ์ (1996) จำกัด, กรุงเทพฯ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Aitken, R.J. and D. Sawyer. 2003. The human spermatozoo-not waving but drowning. **Adv.Exp. Med Bio**. 518:85-98

Bakst, M.R. and B. JR. Howarth. 1975. The head, neck and midpiece of cock sperm examinded with the transmission electron microscope. **Biol. Reprod.** 12: 632-640.

Bakst, M.R. and T.J. Sexton. 1979. Fertilising capacity and ultrastructure of fowl and turkey sperm before and after freezing. **J.Reprod. Fertil.** 28: 108-120.

Barnet, R.E.1978. The effect of dimethyl sulfoxide and glycerol on Na^{+}, K^{+}-ATPase and membrane structure. **Cryobiology.** 15:227-229.

Blesbois E.2007.Current status in avian semen cryopreservation. **World's Poult Sci J.**63: 213-222.

_____and J.B.Brillard. 2007. Specific features of in vivo and in vitro sperm storage in birds. **Animal.** 10: 1472-1481.

Bootwalla, S.M. and R.D. Miles. 1992. Development of diluents for domestic fowl semen. **World's Poult Sci J.** 48:121-128.

Bouyssou, B. and D. Chupin. 1982b. Two step freezing of cattle blastocysts witdimethyl-sulfoxide (DMSO) or glycerol. **Theriogenology.** 17:159-165.

Burrow, W.H. and J.P.Quinn. 1937. The collection of sperm from the domestic fowl and turkey. **Poult. Sci.** 16: 19-24.

Buss, E.G.1993. Cryopreservation of rooster sperm. **Poult. Sci.** 72: 944-954.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Bui-Xuan-Nguyen, N.Y.Heyman and J.P.Ranard. 1984. Direct freezing of cattle embryos after partial dehydration at room tempertature. **Theriogenology.** 22:389-400.

Calvert, J.A. 1978. **Artificial insemination in poultry. Bulletin 213.** Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London, England

Chelmonska, B., E. Lukaszewicz, A. Kowalczyk, and A. Jerysz. 2006. The effect of DMA level on morphology and fertilizing ability of Japanese quail (*Coturnix japonica*) sperm. **Theriogenology**.65:451-458

Donoghue, A.M. and G.J. Wishart. 2000. Storage of poultry semen. **Anim.Reprod.Sci**.62:213-232.

Emiliani, S., M.V.D. Bergh, A.S. Vannin, J. Biramane and Y. Englery. 2000. Comparison of ethylene glycol, 1,2-propanediol and glycol for cryopreservation of slow-cooled mouse zygotes, 4-cell embryos and blastocysts. **Hum. Reprod**. 15, 905-910.

Friedler, S., L.C. Guidice and E.J.Lamb. 1988. Cryopreservation of embryo and ova. **Fertil. Steril**.49:743-764.

Geva E.,B.Bartoov , N. Zabludovsky , J.B. Lessing , L.Lerner-Geva and A.Amit . 1996. The effect of antioxidant treatment on human sperm and fertilization rate in an in vitro fertilization program. **Fertil. Steril.** 66, 430–434.

Gilmore, J.A., L.E. McGann, J. Liu, D.Y. Gao, A.T. Peter, F. W. Kleinhans and J. K. Crister. 1995. Effect of cryoprotectant solutes on water permeability of human sperm. **Biol. Reprod**. 53. 985-995.

Girija, D.L. and S.Shivaji. 1994. Computerized analysis of motility parameters of hamster sperm during maturation. **Mol. Reprod. Dev.** 38: 94-106.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Hafez, E.S.E. 1980, **Reproduction in Farm Animal**, Balliere Tindell, London.

Hammond, J.J.C. Bowman and J.J. Robinson. 1983, **Hammond farm animal**, Buther tanner Ltd. London. England.

Han, X.F., Z.Y. Niu, F.Z. Liu and C.S. Yang. 2005. Effects of diluents, cryoprotectant, equilibration time and thawing temperature on cryopreservation of duck semen. **Int J. Poult. Sci.** 4: 197-201.

Hartman, R.C. 1951. **Keeping Chickens in Cages**. 2nd. ed. Redlands, California.

Hee-Jun, C., K. Jung-Jin, K. Moon-Young, J. Jin-Young, C. Sang-Sik and C. Kil-Saeng. 2002. Cryopreservation of human embryos using ethylene glycol in controlled slow freezing. **Human Reprod**. 17(8):2146-2151.

Hu. J.H., X.L. Zhao, W.Q. Tian, L.S. Zan and Q.W. Li1.2011. Effects of vitamin E supplementation in the extender on frozen-thawed bovine semen preservation. **Animal** 5: (1)107–112.

Hughes, L., G. W. Burton, K. U. Ingold, M. Slaby and D. O. Foster. 1992. Custom design of better *in vivo* antioxidants structurally related to vitamin E, pp. 184-199. *In* M. T. Huang, C. T. Ho and C. Y. Lee, eds. **Phenolic Compound in Food and Their Effects on Health II: Antioxidants & Cancer Prevention**. American Chemical Society, USA.

Kasai, M., K. Niwa and A.Iritani. 1981. Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen mouse embryos**. J.Reprod. Fertil.** 63:175.

Kathleen A Lesich, W.Pelle Dominic, and B.lindemann Charles.2008. Insights into the Mechanism of ADP Action on Flagellar Motility Derived from Studies on Bull Sperm. **Biophys. J.** 95: 472-482.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

King, L.M., D.R. Holsberger and Donoghue A.M. 2000. Correlation of CASA velocity and linearity parameters with sperm mobility phenotype in Turkeys. **J. Androl.** 21: 65-71.

Kurbatov, A.D., Kurbatov, A.D., L.Narubita., G.Bubliaeva. and G.B.Moskalenko.1980.Effect of ETG on cock sperm at temperatures above and below 0๐ C. **Bull. VNIRGJ**. 43: 15-20.

_____ and K.V.Tselutin.1984. Cryopreservation of cock semen. **Ptitsevodstvo**. 11: 28-29.

Lake, P.E. and J.M.Stewart 1978. Preservation of fowl semen in liquid nitrogen-an improved method. **Br. Poult. Sci.** 19: 187-194.

_____.1986. The history and future of cryopreservation of avian germ plasm. **Poult. Sci.** 65: 1-15.

Lehn-Jensen, H., T. Greve and A. Perez-Navas. 1981. Two step freezing of cow embryos in 1.4M glycerol. **Theriogenology.** 15: 427-432.

Leibo, S.P.1984. A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. **Theriogenology.** 21:767-790.

Long, J.A. and G.Kulkarni. 2004. An effective method for improving the fertility of glycerol-exposed poultry semen. **Poult. Sci.** 83: 1594-1601.

Lukaszewicz, E. 2001. Effective of semen filtrationand dilution rate on morphology and fertility of frozen gander sperm. **Theriogenology.** 55: 1819-29.

_____. 2002. An effective method for freezing white Italian gander semen. **Theriogenology.** 58: 19-27.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Maurer, R.R. 1978. Freezing mammalian embryos: a review of techniques. **Theriogenology.** 9: 45-68.

McDowell, L. R. 1989. **Vitamin in Animal nutrition**. Acdemic press, Inc., Califonia.

McIntosh, J.R. and K.R. Porter. 1967. Microtubules in the spermatids of the domestic fowl. **J. Cell Biol**. 35: 153.

Microptic. 2013. **SCA® System Motility and concentration.** Available Source: http://www.micropticsl.com/eng/products/sperm_analysis_sca_motility_concentration. Html, December 10, 2013.

Mitchell, J.R. and G.A. Doak. 2004. **The Artificial Insemination and Embryo Transfer of Dairy and Beef Cattle**. 9th.ed. Upper Sadle River, New Jersey.

Miyamoto, H. and T. Ishibashi. 1986. Liquid nitrogen vapour freezing of mouse embryos. **J.Reprod. Fertil.** 78:471-478.

Morris, T.R. 1989. **The interpretation of response data from animal feeding trials**. Recent Developments in Poultry nutrition. Butterworths, London.

Murraystate University. 2013. **Reproductive system.** Available Source: http://campus.murraystate.edu/academic/faculty/terry.derting/cva_atlases/canduck/Image016.jpg, November 22, 2012.

Newton, H., J. Fisher, J.R.P. Arnold, D.E. Pegg, M.J. Faddy and R.G. Gosden. 1998. Permeation of human ovarian tissue with cryoprotective agents in preparation for cryopreservation . **Hum. Reprod**. 13. 376-380.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Niemann, H., W.W. Lampeter, B. Sacher and B. Kruff. 1982b. Comparision of survival rates of day 7 and day 8 bovine embryos after fast freezing and thawing. **Theriogenology.** 25:519-523.

North, M.O. and D.D. Bell. 1990. **Commerial Chicken Production manual**. 4th . ed. Van Nostrand Reinhold, New York.

Parrish, J.J., J. Susko-Parrish, M.A. Winer and N.L. First. 1988. Capcitation of bovine sperm by heparin. **Biol. Reprod.** 39: 1171-1180.

Perry, E.J. 1968. **The artificial insemination of farm animal**, Rutgers University, New Brunswick.

Polge, C. and Parkes A.S. 1949. Revival of sperm after vitrification and dehydration at low temperature. **Nature**.164: 666.

Prather, R. S., M.F. Spire and R.R. Schalles. 1987. Evaluation of cryopreservation techniques for bovine embryos. **Theriogenology.** 28:195-204.

Radomil L, M.J. Pettitt , K.M.Merkies, K.D. Hickey and M.M. Buhr .2011. Stress and dietary factors modify boar sperm for processing. **Reprod. Domest. Anim**. 2:39-44.

Sexton, T.J., 1973. Effect of various cryoprotective agents on the viability and reproductive efficiency of chicken sperm. **Poult. Sci**. 52, 1353–1357.

_____. 1975. Relationship of the method addition and temperature of cryoprotective agents to the fertilizing capacity of cooled chicken sperm. **Poult. Sci.** 54: 845-848.

_____.1980. Optimal rate for cooling chicken semen from +5 °C to -196 °C. **Poult. Sci.** 59: 1142-1144.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Shaffner, C.S.,E.W. Henderson and C.G. Card.1941. Viability of sperm of the chicken under various environmental conditions. **Poult Sci**. 20: 259-265.

Shivaji, S., J. Peedicayil and D. Girija. 1995. Analysis of the motility parameter of in vitro hyperactived hamster sperm. **Mol. Reprod. Dev.** 42: 325-33.

Sontakke, S.D., G. Umapathy, V. Sivaram, S.D. Kholkute and S. Shivaji. 2004. Semen characteristics, cryopreservation, and successful artificial insemination in the Blue rock pigeon (Columba livia). **Theriogenology.** 62: 139-153.

Soley, J.T. and H.B. Groenewald. 1999. Reproduction, pp. 129-158. *In* D.C. Deeming, ed. **The ostrich biology, production and healt**. Cambridge University Press, Cambridge.

Surai, P.F. and G.J. Wishart. 1996. Poultry artificial insemination technology in the countries of the former USSR. **World's Poult Sci J.** 52: 27-43.

Swanson EW, Bearden HJ, 1951. An eosin-nigrosin stain for differentiating live and dead bovine spermatozoa. **J. Anim Sci.** 10:981-87

Tselutin L., L.Narubina, T. Maorodina and B.Tur. 1995. Cryopreservation of poultry semen. **Br. Poult. Sci.** 36: 805-811.

_____, K., F. Seigneurin and Blesbois E. 1999. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl sperm. **Poult. Sci**.78:586-590.

Yanagimachi, R. and R.J. Teichman. 1972. Cytochemical demonstration of acrosome proteinase in mammalian and avian sperm by a silver proteinate method. **Biol. Reprod**. 6: 87.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Wang, X. and P. J. Quinn. 1999. Vitamin E and its function in membranes. **Progress in Lipid Research** 38: 309-336.

Wishart, G.J.1995b. Cryopreservation of avian sperm. In: Day, J.G., Mclellan, M.R. (Eds.), Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. Methods in Molecular Biology **Humana Press**; 38: 167-177.

Woelders, H. 1997. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. **Vet Quart.**19(3): 135-138.

Zaniboni L., S. Cerlolini.2009. Liquid storage of turkey semen: changes in quality parameters, lipid composition and susceptibility to induced in vitro peroxidation in control, n-3 fatty acids and alpha-tocopherol rich sperm. **Anim. Reprod. Sci**.;112(1-2):51-65.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 ค่าการทำงานของเครื่อง HTM-IVOS motility สำหรับวิเคราะห์การเคลื่อนที่

Parameter setup	
Temperature (^{o}C)	37
Apply sort	None
Frame acquired	30
Frame rate (Hz)	60
Minimum contrast	50
Minimum cell size (pixels)	4
Minimum static contrast	50
Threshold straightness (%)	80
Low VAP cut off (um/s)	5
Medium VAP cut off (um/s)	24.9
Low VSL cut off (um/s)	15
Non-motile head size (pixels)	4
Non-motile head intensity	50
Static head size	0.1-2.92
Static head intensity	0.48-3.0
Static elongation (limits)	50-99
Slow cell motile	Yes
Magnification	2.04
Video source	Camera
Video frequency	60
Bright field	No
Image type	Phase contrast
Brightness for LED	2681
Minimum track point	15

ดัดแปลงจาก: Sontakke *et al.* (2004)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 2 ส่วนประกอบทางเคมี ค่าออสโมลาลิตี และ pH ของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ

ส่วนประกอบ (กรัม)	สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ SP-TALP[1]
Magnesium chloride 6 H_2O	0.08
Sodium chloride	5.69
Potassium chloride	0.23
Sodium dihydrogen phosphate	0.04
Sodium bicarbonate	2.09
Calcium chloride 6 H_2O	0.29
Sodium pyruvate	0.02
Glucose monohydrate	0.90
Lactic acid (60% syrup)	3.68
HEPES	2.38
BSA	6.00
Penicillin G	0.01
Distilled water	1,000 ml
Osmolality (mOsm/kg H_2O)	280-290
pH	7.4

HEPES = N-(2-hydroxyethyl) piperazine-N-(2-ethanesulfonic acid)

BSA = Bovine serum albumin

ที่มา: [1] Parrish *et al.* (1988)

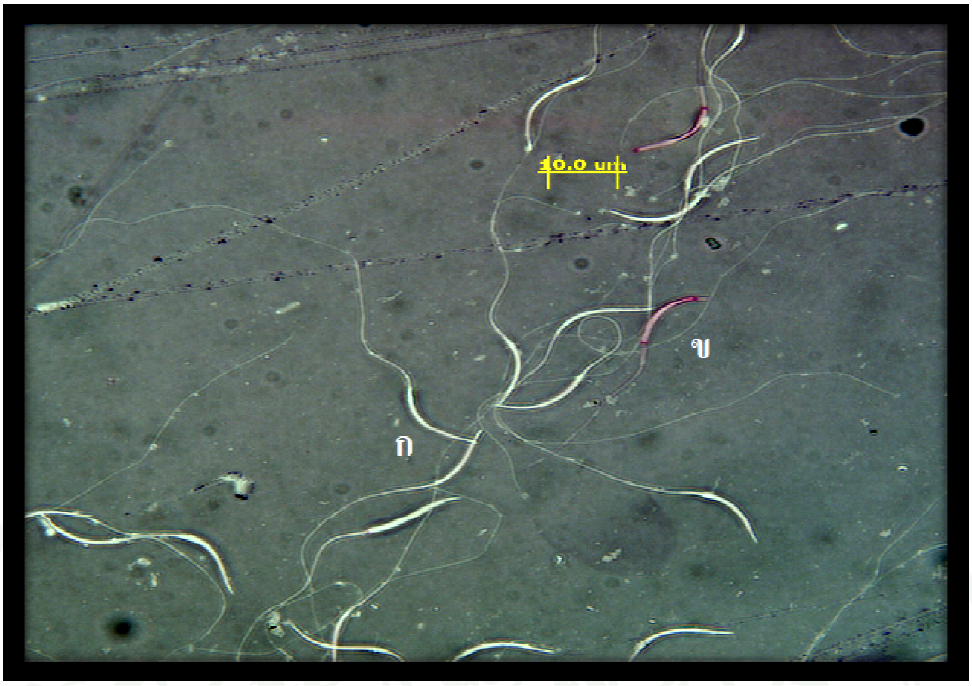
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางภาคผนวกที่ 3 ส่วนประกอบทางเคมีของ EOSIN NIGROSIN

ส่วนประกอบ	เปอร์เซ็นต์ (%)
Nigrosin (w/v)	5
Eosin (w/v)	0.6
Sodium citrate	3
Water (ml.)	100 ml.

ที่มา: Swanson *et al.* (1951)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 1 แสดงลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิ

ก อสุจิที่มีชีวิต (ไม่ติดสี)

ข อสุจิที่ตาย (ติดสีแดง)

ภาพที่ 2 แสดงลักษณะรูปร่างสัณฐานของตัวอสุจิส่วนหางผิดปกติ (tail abnormal)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ–นามสกุล	นายปิยะรัฐ จันทร์อ่อน
วัน เดือน ปี ที่เกิด	7 มกราคม 2527
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์
ประวัติการศึกษา	วท.บ. สัตวศาสตร์ (สัตว์ปีก) มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์