ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร | โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา

สาขา | **ภาควิชา**

เรื่อง การรีดเก็บน้ำเชื้อนกกาฮังและนกแก๊กโดยใช้เครื่องกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อด้วยไฟฟ้า

Semen Collection by Electro-ejaculation in Great Hornbill (*Buceros bicornis)* Oriental and Oriental Pied Hornbill (*Anthracoceros albirostris*)

นามผู้วิจัย นายณฐวุฒิ คณาติยานนท์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

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

ประธานสาขาวิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เสริมศิริ จันทร์เปรม, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วัน **เดือน** **พ.ศ.**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การรีดเก็บน้ำเชื้อนกกาฮังและนกแก๊กโดยใช้เครื่องกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อด้วยไฟฟ้า

Semen Collection by Electro-ejaculation in Great Hornbill (*Buceros bicornis*) and Oriental Pied Hornbill (*Anthracoceros albirostris*)

โดย

นายณฐวุฒิ คณาติยานนท์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร)

พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ณฐวุฒิ คณาติยานนท์ 2555: การรีดเก็บน้ำเชื้อนกกาฮังและนกแก๊กโดยใช้เครื่องกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อด้วยไฟฟ้า ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร โครงการสหวิทยาการระดับบัณฑิตศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์อนุชัย ภิญโญภูมิมินทร์, D.Vet.Med.Sc. 68 หน้า

การรีดเก็บน้ำเชื้อในสัตว์ปีกโดยทั่วไปใช้การนวดกระตุ้นท้อง ซึ่งอาจไม่ได้ผลในสัตว์ปีกบางชนิด วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการรีดเก็บน้ำเชื้อด้วยเครื่องกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อด้วยไฟฟ้าในนกตระกูลนกเงือก (Bucerotidae family) ซึ่งไม่สามารถใช้วิธีการนวดกระตุ้นท้องได้ โดยศึกษาในนกกาฮัง (*Buceros bicornis*) จำนวน 8 ตัว และนกแก๊ก (*Anthracoceros albirostris*) จำนวน 4 ตัว ของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ในช่วงที่มีการผสมพันธุ์ การใช้เครื่องกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อด้วยไฟฟ้า กระทำหลังจากนกสลบด้วยไอโซฟลูเรน (isoflurane vaporizer) วิธีการนี้สามารถรีดเก็บน้ำเชื้อได้ 32.2 เปอร์เซ็นต์ (10/31 ครั้ง) จากนกกาฮัง 6 ตัว และ 61.5 เปอร์เซ็นต์ (16/26 ครั้ง) จากนกแก๊ก 4 ตัว อสุจิของทั้งนกกาฮังและนกแก๊ก เป็นแบบ sauropsid ในนกกาฮัง 4 ตัวพบแต่อสุจิที่มีส่วนหัวผิดปกติ ส่วนน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดี พบว่ามีปริมาณ 5 – 8 ไมโครลิตร ความเข้มข้นอสุจิ 6.3 – 7.6 x 10^9 ตัว/มิลลิลิตร อสุจิที่เคลื่อนที่ 70 เปอร์เซ็นต์ อสุจิที่ตาย 3 – 9 เปอร์เซ็นต์ อสุจิที่รูปร่างปกติ 85.5 – 89.0 เปอร์เซ็นต์ และอสุจิที่ไม่มีส่วนอะโครโซม (acrosome) 3.5 – 9.5 เปอร์เซ็นต์ นกแก๊กทั้ง 4 ตัวมีน้ำเชื้อคุณภาพดีใกล้เคียงกัน (p>0.05) โดยมีปริมาณ (mean±SD) 68.7±61.2 ไมโครลิตร ความเข้มข้นอสุจิ 2.2±2.3 x 10^9 ตัว/มิลลิลิตร อสุจิที่เคลื่อนที่ 57.4±14.4 เปอร์เซ็นต์ อสุจิที่ตาย 18.6±12.7 เปอร์เซ็นต์ อสุจิที่รูปร่างปกติ 90.7±2.9 เปอร์เซ็นต์ และอสุจิที่ไม่มีส่วนอะโครโซม 3.6±1.9 เปอร์เซ็นต์ พบความแตกต่างของความยาวมิดพีซ (mid piece) ของอสุจิในนกแก๊กแต่ละตัว (p<0.05) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สามารถใช้เครื่องกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อด้วยไฟฟ้าในนกกาฮังและนกแก๊กได้อย่างปลอดภัยและได้ผลน่าพอใจ ซึ่งข้อมูลคุณภาพน้ำเชื้อที่ได้ เป็นประโยชน์ต่อการวางแผนการผสมพันธุ์และการพัฒนาเทคโนโลยีการผสมเทียมในนกชนิดนี้ต่อไป

_____ _____ ___/ ___/ ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Nathavut Kanatiyanont 2012: Semen Collection by Electro-ejaculation in Great Hornbill (*Buceros bicornis*) and Oriental Pied Hornbill (*Anthracoceros albirostris*). Master of Science (Agricultural Biotechnology), Major Field: Agricultural Biotechnology, Interdisciplinary Graduate Program. Thesis Advisor: Associate Professor Anuchai Pinyopummin, D.Vet.Med.Sc. 68 pages.

The abdominal massage (AM) is a common method for semen collection in avian, but with limit success in some species. The purpose of this study was to determine the efficacy of semen collection method by electro-ejaculation (EE) in hornbills (Bucerotidae family), which were difficult to restrain or practiced for AM. Great hornbill (*Buceros bicornis*) (GH; n = 8) and oriental pied hornbill (*Anthracoceros albirostris*) (OP; n = 4) rearing at Khao Kheow Open Zoo, Thailand were attempted for EE during the breeding period. EE was done under general anesthesia by isoflurane vaporizer. Semen could be collected from 6 GH and 4 OP with the success rates of 32.2 % (10/31 attempts) and 61.5 % (16/26 attempts), respectively. Both species had sauropsid type sperm. Only morphologically abnormal sperm (macrocephalic and round head) were found in 4 GH. Good quality GH semen had volume 5 – 8 µl, concentration 6.3 – 7.6 x 10^9 sperm/ml, motile sperm 70% dead sperm 3 – 9 %, normal sperm 85.5 – 89.0 % and detached acrosome 3.5 – 9.5 %. While all OP had similar fair to good semen quality (p>0.05). Their semen characteristics (mean±SD) were volume 68.7±61.2 µl, concentration 2.2±2.3 x 10^9 sperm/ml, motile sperm 57.4±14.4%, dead sperm 18.6±12.7 %, normal sperm 90.7±2.9 % and detached acrosome 3.6±1.9 %. OP sperm sizes were similar between individual except the mid piece length (p<0.05). The present study demonstrated that semen collection by EE could be safely accomplished in captive great and oriental pied hornbills with acceptable success rates. Their semen data could be useful for breeding management and as an important part for application of artificial insemination to these species.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ. น.สพ. ดร. อนุชัย ภิญโญภูมิมินทร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่กรุณาให้คำแนะนำ คำปรึกษา และร่วมทีมวิจัย ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องในการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ รศ. น.สพ. ดร. ทวีศักดิ์ ส่งเสริม และสพ.ญ. เมทิตา สัสดี ที่ให้คำแนะนำเบื้องต้นสำหรับการเขียนวิทยานิพนธ์ คุณกรไชย กรแก้วรัตน์ คุณปิยวรรณ สุธรรมาภินันท์ เจ้าหน้าที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ น.สพ. สกนธ์ น้อยมูล สพ.ญ. ปิยาณีย์ งามสุข สัตวแพทย์ประจำสวนสัตว์ และคุณ อุฬาริกา กองพรหม หัวหน้าฝ่ายอนุรักษ์วิจัยและสุขภาพสัตว์ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว ซึ่งเป็นผู้ร่วมวิจัยที่ให้ความช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในการทำวิจัยและให้คำแนะนำ คำปรึกษาในงานวิจัย รวมถึงเจ้าหน้าที่ในคณะสัตวแพทยศาสตร์ เจ้าหน้าที่ประจำสวนสัตว์เปิดเขาเขียวทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุน และอำนวยความสะดวกตลอดการเก็บข้อมูลจนวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จได้

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษากระทรวงศึกษาธิการและขอขอบคุณศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน รวมถึงเจ้าหน้าที่ในศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำช่วยเหลือในการศึกษาและวิจัยเป็นอย่างดี

หากงานวิจัยนี้ก่อให้เกิดประโยชน์ใดๆ ขออุทิศความดีเหล่านั้นแด่สรรพสัตว์ทั้งหลายที่ได้เป็นอาจารย์ให้กับข้าพเจ้า

ณฐวุฒิ คณาติยานนท์

กันยายน 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำอธิบายสัญลักษณ์	(6)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	24
อุปกรณ์	24
วิธีการ	27
ผลและวิจารณ์	32
ผล	32
วิจารณ์	40
สรุปและข้อเสนอแนะ	46
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	48
ภาคผนวก	57
ภาคผนวก ก ภาพผลการทดลอง	58
ภาคผนวก ข ขั้นตอนการเตรียม และรายละเอียดการเตรียมสารเคมี	63
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	68

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ช่วงเดือนที่นกแก๊ก และนกกาฮัง มีพฤติกรรมเข้าโพรง	20
2	รายละเอียดลักษณะกรงเลี้ยง และประวัติการสืบพันธุ์ของนกแต่ละตัว	26
3	ชนิดของอาหารในแต่ละวันสำหรับนกแก๊กภายในกรงเลี้ยง	27
4	รูปแบบการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าในนกกาฮังและนกแก๊กให้มีการหลั่งน้ำเชื้อ	28
5	รูปร่างอสุจิของนกกาฮังจำนวน 5 ตัว	32
6	คุณภาพน้ำเชื้อ และรูปร่างอสุจิของนกกาฮังหมายเลข 3	34
7	คุณภาพน้ำเชื้อของนกแก๊ก	35
8	รูปร่างอสุจิของนกแก๊ก	36
9	ขนาดของอสุจินกแก๊ก	37

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ข1	ส่วนประกอบของ Modified Tyrode’s medium	64

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	กระบวนการผลิตอสุจิ (spermatogenesis)	10
2	ภาพตัดขวางของอสุจิไก่ โดยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน	13
3	ก) อสุจิแบบ helical ของนกกลุ่ม passerine ข) อสุจิแบบ sauropsid ของนกกลุ่ม non-passerine	14
4	ภาพวาดอสุจิของนก Common Guillemot (*Uria aalge*)	15
5	ความผันแปรของรูปร่างอสุจิ ของนกในอันดับ Charadriiformes	16
6	การตอบสนองของฮอร์โมนเมื่อได้รับข้อมูลจากสิ่งแวดล้อมภายนอก และสัญญาณจากภายใน	18
7	การควบคุมการหลั่งฮอร์โมน testosterone โดยกลไกแบบ negative feedback	19
8	ลักษณะโพรบที่ใช้รีดน้ำเชื้อในนกกาฮัง	29
9	ลักษณะโพรบที่ใช้รีดน้ำเชื้อในนกแก๊ก	29
10	ภาพถ่ายอสุจินกแก๊กจากกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน	39
11	ภาพถ่ายอสุจินกกาฮังจากกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน ก) ภาพที่มีกำลังขยาย 8,000 เท่า ข) ภาพที่มีกำลังขยาย 9,000 เท่า	44

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวกที่ **หน้า**

ก1	การจัดท่าทางนกเพื่อทำการรีดน้ำเชื้อ	59
ก2	การกระดกขึ้นของหางเมื่อมีการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า	59
ก3	การดูดเก็บน้ำเชื้อด้วยปิเปตในนกแก๊ก	60
ก4	การวัดขนาดส่วนต่างๆของอสุจินกแก๊ก	60
ก5	รูปร่างอสุจิของนกแก๊ก (ภาพกำลังขยาย 1,000 เท่า)	61
ก6	รูปร่างอสุจิของนกกาฮัง (ภาพกำลังขยาย 1,000 เท่า)	62

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AM	=	Abdominal massage
°C	=	Degree Celsius
EE	=	Electro-ejaculation
FSH	=	Follicle stimulating hormone
g	=	Gravity
GH	=	Great hornbill
GnRH	=	Gonadotropin-releasing hormone
M	=	Molar
m	=	Meter
ml	=	Milliliter
M.W.	=	Molecular weight
mM	=	Millimolar
OP	=	Oriental pied hornbill
rpm	=	Round per minute
µm	=	Micrometer
µl	=	Microliter
SD	=	Standard deviation
TALP	=	Modified Tyrode's medium
V.	=	Voltage

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การรีดเก็บน้ำเชื้อนกกาฮัง และนกแก๊กโดยใช้เครื่องกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อด้วยไฟฟ้า

Semen Collection by Electro-ejaculation in Great hornbill (*Buceros bicornis*) and Oriental pied hornbill (*Anthracoceros albirostris*)

คำนำ

นกเงือกเป็นนกที่มีความสำคัญมากต่อระบบนิเวศน์ในป่า ซึ่งถือเป็นชนิดพันธุ์ชี้วัด (index species) ความอุดมสมบูรณ์ของป่า เนื่องจากความต้องการโพรงของต้นไม้ใหญ่เพื่อการทำรังสืบพันธุ์และการเป็นผู้บริโภคอาหารที่มีความหลากหลาย ดังนั้นการมีอยู่หรือหายไปของนกเงือกมีจึงอิทธิพลต่อสภาวะแวดล้อม (keystone species) ที่อาศัยอยู่ ในประเทศไทยประสบปัญหาการเสื่อมโทรมและการลดลงของป่าไม้ทำให้นกมีพื้นที่อยู่อาศัยจำกัด แม้ว่าจะมีการศึกษาวิจัยเพื่ออนุรักษ์สายพันธุ์นกเงือกในธรรมชาติของประเทศไทย แต่เนื่องจากปัญหาดังกล่าวทำให้การศึกษาทำได้ในวงจำกัด หากขนาดของพื้นที่ป่าลดลงร่วมกับจำนวนต้นไม้ขนาดใหญ่ลดจำนวนลงเรื่อยๆ นกเงือกจะไม่สามารถใช้ชีวิตตามธรรมชาติได้ และอาจสูญพันธุ์ได้ในที่สุดดังนั้นการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์นกเงือกในกรงเลี้ยงจึงมีความสำคัญที่จะช่วยเพิ่มจำนวนนก และทำให้นกเงือกดำรงสายพันธุ์ได้

ตามรายงานของ International Union for Conservation of Nature (IUCN) ปีคริสตศักราช 2012 นกเงือกทั่วโลก มีทั้งหมด 58 ชนิด โดยกระจายตัวตามภูมิภาคเอเชีย และแอฟริกา สำหรับในประเทศไทยมีนกเงือกทั้งหมด 13 ชนิด ได้แก่ นกกาฮัง (Great hornbill; *Buceros bicornis*), นกเงือกหัวแรด (Rhinoceros hornbill; *Buceros rhinoceros*), นกเงือกหัวหงอก (White-crowned hornbill; *Aceros comatus*), นกชนหิน (Helmeted hornbill; *Rhinoplax vigil*), นกแก๊ก (Oriental pied hornbill; *Anthracoceros albirostris*), นกเงือกดำ (Black hornbill; *Anthracoceros malayanus*), นกเงือกคอแดง (Rufous-necked hornbill; *Aceros nipalensis*), นกเงือกสีน้ำตาลคอขาว (Austen's brown hornbill; *Anorrhinus austeni*), นกเงือกสีน้ำตาล (Tickell's brown hornbill; *Anorrhinus tickelli*), นกเงือกปากดำ (Bushy-crested hornbill; *Anorrhinus*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

galeritus), นกเงือกปากย่น (Wrinkled hornbill; *Aceros corrugates*), นกเงือกกรามช้างปากเรียบ (Plain-pouched hornbill; *Aceros subruficollis*) และนกเงือกกรามช้างปากย่น (Whreated hornbill; *Aceros undulates*) นกเงือกแต่ละชนิดพบกระจายอยู่ตามภูมิภาคต่างๆ ยกเว้นภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนบน นกเงือกขนาดเล็กที่สุดที่พบในประเทศไทยคือ นกแก๊ก หรือ นกแกง อยู่ในสถานะที่มีความเสี่ยงน้อยต่อการสูญพันธุ์ (Least concern) (IUCN, 2012) เนื่องจากนกแก๊กสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดีจึงมีแนวโน้มประชากรในธรรมชาติคงที่ สำหรับนกกาฮังซึ่งเป็นนกเงือกที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในประเทศไทย ถูกจัดอยู่ในสถานะเกือบมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (Near threatened) (IUCN, 2012) แม้ว่านกเงือกในประเทศไทยจะไม่มีชนิดใดจัดอยู่ในสถานะเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (Endanger species) แต่นกเงือกหลายชนิดมีแนวโน้มประชากรที่ลดลงเรื่อยๆ

ในปัจจุบันมีโครงการเพาะขยายพันธุ์นกเงือกสายพันธุ์ต่างๆในหลายประเทศทั่วโลก สำหรับประเทศไทย สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จ.ชลบุรี สามารถที่จะเพาะขยายพันธุ์นกแก๊กในกรงเลี้ยงได้สำเร็จ ในขณะที่การเพาะขยายพันธุ์นกกาฮังในกรงเลี้ยงยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจากพบปัญหาบางประการในนกหลายๆคู่ เช่น นกตัวผู้ไม่มีพฤติกรรมการผสมพันธุ์และไข่นกไม่ฟักเป็นตัว (Kongprom *et al*., 2012) ดังนั้น การตรวจความพร้อมของระบบสืบพันธุ์ของนกเพศผู้โดยการศึกษาเทคนิคการรีดน้ำเชื้อและประเมินคุณภาพน้ำเชื้อนกเงือกก่อนที่จะทำการจับคู่นกในกรงเลี้ยง จะเป็นอีกหนทางหนึ่งในการแก้ไขปัญหาดังกล่าว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อพัฒนาวิธีการรีดน้ำเชื้อด้วยเครื่องกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อด้วยไฟฟ้าในนกเงือก (กาฮังและแก๊ก)

2. เพื่อศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อนกเงือกที่ได้จากการรีดเก็บด้วยเครื่องกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อด้วยไฟฟ้า

3. เพื่อศึกษารูปร่างของตัวอสุจิในนกเงือก ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

ความสำคัญทางชีววิทยาของนกเงือก และการขยายพันธุ์ในกรงเลี้ยง

ในประเทศไทยได้เริ่มมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับนกเงือกมาตั้งแต่ปีพุทธศักราช2536 โดยศาสตราจารย์พิไล พูนสวัสดิ์ ซึ่งงานวิจัยทั้งหมดเป็นการศึกษาและเก็บข้อมูลของนกเงือกในธรรมชาติ ทั้งนี้ในช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ นกเงือกจะเริ่มแยกจากฝูงเพื่อมาหากินบริเวณโพรงรังเก่าและปกป้องพื้นที่ทำรัง (คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2555) จากรายงานของ Gale and Thongaree, 2006 พบว่า ทางตอนใต้ของประเทศไทยในเขตชายแดนไทย-มาเลเซีย พบว่ามีการใช้พื้นที่ร่วมกันของนกเงือกทั้งหมด 9 ชนิด ได้แก่ นกเงือกหัวแรด นกกาฮัง นกชนหิน นกเงือกดำ นกเงือกปากดำ นกเงือกหัวหงอก นกเงือกปากย่น นกเงือกกรามช้างปากย่น และนกเงือกกรามช้างปากเรียบ ซึ่งการประเมินความหนาแน่นของนกเงือกที่พบในธรรมชาติจะช่วยบอกได้ว่าการอนุรักษ์นั้นประสบผลสำเร็จมากน้อยเพียงใด นกเงือกเป็นตัวช่วยกระจายเมล็ดพันธุ์พืชทางธรรมชาติจากพฤติกรรมการกินอาหารที่หลากหลาย มีการ ศึกษาในเขตอุทยานแห่งชาติเขาใหญ่พบว่า นกเงือก 4 ชนิดได้แก่ นกกาฮัง นกเงือกปากย่น นกแก๊ก และนกเงือกสีน้ำตาล มักจะกินผลของพืชตระกูลไทร (*Ficus spp.*) เป็นอาหารหลัก ซึ่งเมื่อนกเงือกกินลูกไม้ ผลไม้และบินไปยังที่ต่างๆ จนกระทั่งนกเงือกขับถ่ายหรือทำการสำรอกเมล็ดที่ไม่สามารถย่อยได้ออกมา จึงเป็นเสมือนการหว่านกระจายเมล็ดพันธุ์พืชออกสู่ธรรมชาติ (Holbrook and Smith, 2000) เนื่องจากนกเงือกมีพฤติกรรมการกินเมล็ดพืชหลายชนิด เช่น Moraceae family, Annonaceae family, Burseraceae family, Lauraceae family, Meliaceae family, Myrtaceae family เป็นต้น (Kitamura *et al.,* 2008; Kitamura, 2011) ในขณะที่ผลไม้บางอย่างถูกกินโดยนกเงือกบางชนิดเท่านั้น โดยมีศึกษาของ Poonswad *et al.* (1998) พบว่านกแก๊กเท่านั้นที่กินเมล็ดของ *Jasminum sp., Trichosanthes tricuspidata* และ *Sloanea sigun* เช่นเดียวกับนกเงือกสีน้ำตาลที่กินเมล็ดของ *Podocarpus polystachya* นอกจากผลไม้แล้วนกเงือกยังกินแมลง สัตว์เลื้อยคลานขนาดเล็ก และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมขนาดเล็กอีกด้วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นกเงือกทำรังโดยอาศัยโพรงของต้นไม้ใหญ่ที่ยังมีชีวิต ซึ่งนกเงือกกรามช้างปากย่น นกเงือกสีน้ำตาล นกกาฮัง และนกแก๊ก เลือกใช้โพรงของต้นไม้ตระกูลยาง (*Dipterocarpus spp.*) มากถึง 34% และตระกูลหว้า (*Eugenia spp.*) 26% (Poonswad, 1995) สำหรับนกกาฮังต้องการพื้นที่ในการหากินในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ 14.7 ตารางกิโลเมตร ส่วนนกเงือกกรามช้างปากย่นใช้พื้นที่หากินถึง 28 ตารางกิโลเมตร (Poonswad and Tsuji, 1994) แต่ความเสื่อมโทรมและการลดลงของป่าไม้ ทำให้นกหลายชนิดได้รับผลกระทบ (Sodhi and Smith, 2007) การเลือกใช้โพรงของนกเงือกในต้นไม้ซึ่งใกล้ที่อยู่อาศัยของมนุษย์ รวมถึงการที่มนุษย์เข้าใช้พื้นที่ป่าทำให้การสร้างและการใช้โพรงไม่ประสบความสำเร็จ (Datta and Rawat, 2004) การซ่อมแซมปรับปรุงโพรงและการทำความเข้าใจกับชาวบ้านเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยให้นกสามารถขยายพันธุ์ได้เองตามธรรมชาติ (Poonswad *et al*., 2005) อย่างไรก็ตามมีความพยายามที่จะใช้โพรงเทียมเพื่อช่วยในการขยายพันธุ์นกกาฮัง ซึ่งผลที่ได้มีทั้งนกที่ยอมใช้และไม่ใช้โพรงเทียม (James *et al*., 2011; Pasuwan *et al*., 2011)

การเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ในกรงเลี้ยงจึงมีความสำคัญที่จะช่วยเพิ่มจำนวนนก และทำให้นกเงือกดำรงสายพันธุ์ได้ ในปัจจุบันสามารถที่จะเพาะขยายพันธุ์นกแก๊กในกรงเลี้ยงได้ และมีการปล่อยนกแก๊กที่เพาะขยายพันธุ์คืนสู่ธรรมชาติ รวมถึงการศึกษาชนิดของอาหารตลอดจนพื้นที่หากินในธรรมชาติ พบว่านกที่ปล่อยไปยังคงใช้ชีวิตตามธรรมชาติและขยายพันธุ์ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเมษายนได้โดยใช้โพรงเทียม (Chaiyarat *et al*., 2011) นอกจากนี้ยังมี Writhe-billed hornbill ซึ่งเป็นนกเงือกของฟิลิปปินส์ที่มีรายงานการขยายพันธุ์ในกรงเลี้ยงได้ (Myers, 2000) ซึ่งความสำเร็จของการขยายพันธุ์นกเงือกเหล่านี้จะทำให้สายพันธุ์ของนกเงือกคงอยู่ต่อไป ตลอดจนข้อมูลจากนกที่ปล่อยสู่ธรรมชาติอาจใช้เป็นต้นแบบสำหรับนกเงือกชนิดอื่นได้ อย่างไรก็ตามการเพาะขยายพันธุ์นกเงือกบางชนิดในกรงเลี้ยงยังไม่ประสบความสำเร็จ เช่น นกกาฮัง เป็นต้น จากข้อมูลปีคริสตศักราช 1996 ในทวีปอเมริกาเหนือมีนกกาฮังถึง 72 ตัว ที่เลี้ยงอยู่ในสวนสัตว์ ความเหมาะสมในการจับคู่ถือเป็นอีกปัญหาหนึ่งที่พบสำหรับการขยายพันธุ์ในกรงเลี้ยง ขณะที่ American Zoo and Aquarium association มีความพยายามที่จะสร้างโครงงานเพื่อทำการเก็บข้อมูลของนกกาฮัง การสร้างโพรงรังเทียม แต่โครงการนี้ไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร (Crofoot *et al*., 2003)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นอกจากนี้งานวิจัยทางด้านพันธุกรรมของนกเงือกทั้งในธรรมชาติและในกรงเลี้ยง (Morin *et al.*, 1994; Delport *et al.*, 2002; Stanback *et al.*, 2002; Chamutpong *et al*., 2009) มีการศึกษาเพิ่มมากขึ้น ซึ่งอาจจะใช้เป็นแนวทางทำให้การวางแผนจับคู่นกในกรงเลี้ยงให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

โครงสร้างระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ปีกเพศผู้

โครงสร้างของระบบสืบพันธุ์เพศผู้ประกอบไปด้วย Testis, Excurrent ducts, Accessory sex gland, Phallus และ Cloacal protuberance ซึ่งในแต่ละส่วนมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. Testis

อัณฑะ (testis) ของสัตว์ปีกอยู่ในช่องว่างลำตัว ส่วนบนของอัณฑะอยู่ติดกับขอบล่างของปอด ส่วนท้ายของอัณฑะอยู่ติดกับไต อัณฑะวางตัวขนาบอยู่กับเส้นเลือด aorta และเส้นเลือด caudal vena cava โดยมีลักษณะสมมาตรซ้ายขวาเป็นรูปทรงถั่ว (bean-shape) หรือ รูปทรงไข่ (oval- shape) อัณฑะข้างซ้ายอาจมีขนาดใหญ่กว่าข้างขวาได้ในนกบางชนิด ตำแหน่งของอัณฑะ อยู่ทางด้าน dorsomedial ของช่องว่างลำตัว บริเวณส่วนต้นของไตพูแรกโดยมีเยื่อ mesorchium เป็นตัวยึดอัณฑะไว้กับผนังของช่องว่างลำตัว ภายในอัณฑะเป็น interstitial tissue ซึ่งแต่ละข้างจะเชื่อมติดกับ seminiferous tubule ด้านนอกของอัณฑะถูกคลุมด้วย connective tissue ดังนั้นอัณฑะจึงมี parenchymal cell 2 ชนิด คือ interstitial tissue และ seminiferous epithelium ในส่วน interstitial tissue ประกอบด้วยหลอดเลือดและหลอดน้ำเหลือง เส้นประสาท และ peritubular epithelial cells ส่วนของ seminiferous tissue เป็น Leydig's cells ซึ่งมีลักษณะเป็น single layer และเมื่อเข้าสู่ช่วงฤดูผสมพันธุ์ parenchymal cell เหล่านี้จะเปลี่ยนเป็น multi-layered germinal epithelium ที่ทำหน้าที่ผลิตอสุจิ จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้อัณฑะมีขนาดใหญ่ขึ้น (Kirby and Froman, 2000; Aire, 2007)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. Excurrent ducts

Epididymis ในนกมีขนาดสั้นมากเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีตำแหน่งอยู่ด้าน dorsomedial ของอัณฑะภายใน epididymis ประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

- Rete testis แบ่งเป็น intratesticular, intracapsular และ extracapsular region ภายใน rete testis มีเยื่อบุผิวด้วยเซลล์แบบ simple cuboidal epithelium และ simple squamous epithlium cell

- Efferent duct จะเป็นท่อหลักของ epididymis ซึ่งตอนต้นของท่อจะกว้าง แต่ส่วนปลายท่อจะแคบ ตอนต้นของ efferent duct จะมีลักษณะหนาตัวขึ้น เนื่องจากเป็นเยื่อบุผิวแบบ pseudostratified columnar epithelium ที่ประกอบด้วยเซลล์สองชนิดคือ ciliated และ nonciliated epithelial cells

- Connecting duct มีลักษณะเยื่อบุผิวท่อเป็นแบบ pseudostratified columnar epithelium

- Epididymal duct และ ductus deferens มีลักษณะเป็น low mucosal folds ที่มีเซลล์เยื่อบุผิวเป็นแบบ nonciliated pseudostratified columnar epithelial cells ส่วนของ ductus deferens สามารถพบ dense connective tissue และ smooth muscle รอบ mucosa ที่อยู่ภายในท่อช่วงท้ายๆได้ และมีโครงสร้าง dense capillary network คลุมตั้งแต่ตอนต้นจนถึงช่วงท้ายของท่อ ductus deferent จึงแตกต่างจากส่วน epididymal duct ที่ไม่พบโครงสร้างดังกล่าว ในนกทุกชนิด ductus deferens ที่ออกจาก epididymis จะเป็นคลื่น และซับซ้อนขึ้นเรื่อยๆ

ถัดจากตำแหน่งของ epididymis จะเป็น ductus deferens โดยวางตัวขนานกับ ureter ช่วงท้ายของ ductus deferens จะค่อนข้างตรงและขยายใหญ่เป็น seminal vesicle ที่มีรูปทรงถั่ว จึงเป็นอวัยวะหลักที่เก็บสำรองอสุจิ และมาเปิดออกที่บริเวณส่วนกลางของช่องทวารร่วม (cloaca) โดยนกบางชนิดจะมีลักษณะภายนอกเป็น cloacal protuberance ซึ่งเทียบได้กับส่วนถุงอัณฑะของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Kirby and Froman, 2000; Aire, 2007)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. Accessory sex gland

สัตว์ปีกไม่มี accessory sex gland ที่แท้จริงแต่แบ่งเป็นส่วนที่เรียกว่า paracloacal vascular bodies, dorsal proctodeal gland และ lymphatic fold ด้านในของผนัง paracloacal body มีลักษณะเป็น lymphatic fold ที่ตำแหน่งนี้เป็นทางออกของ ductus defference ซึ่งจะอยู่บริเวณ proctodeum ในการผสมพันธุ์ หรือการนวดกระตุ้นเพื่อรีดน้ำเชื้อ lymphatic tissue จะบวมขึ้นได้จากการเกิด ultrafilltration ของเลือดที่มาเลี้ยง ทำให้ช่องทวารปลิ้นออกทันทีที่มีการหลั่งน้ำเชื้อ ดังนั้น seminal fluid ที่มาจาก testis, epididymis และ ductus deference ตลอดจน lymph-like fluid ที่ช่วยในการขยายขนาดของ phallus จะสามารถซึมผ่านชั้น epithelial ต่างๆ และเข้ามารวมอยู่ใน seminal fluid ได้ ซึ่งของเหลวในส่วนนี้ถูกเรียกว่า transparent fluid (Kirby and Froman, 2000; Aire, 2007)

4. Phallus

Phallus เป็นส่วนของอวัยวะสืบพันธุ์ของนกเพศผู้เทียบได้กับ penis ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่โครงสร้างแตกต่างกัน phallus มีลักษณะเป็น tissue fold ซึ่งอยู่ทางด้าน ventral wall ของ proctodeum โดยทั่วไปนกเพศผู้ส่วนใหญ่ไม่สามารถขยายขนาด phallus ได้เหมือนกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ยกเว้นในนกกลุ่ม Anseriforms และ Ratites ซึ่ง phallus มี fibrous และ elastic tissue เจริญดี เมื่อมีการบวมของ vascular fold ซึ่งเป็น lymph จะทำให้เกิดลักษณะของ phallus erection ได้

ในสัตว์ปีก phallus แบ่งเป็น 2 ประเภทโดยแบ่งตามลักษณะทางกายวิภาค คือ 1.) intromittent phallus เมื่อเกิด phallus erection ขอบของ ejaculatory groove จะหนาตัวขึ้นทำให้ปิดร่องนี้ไว้และไม่มีการกระเด็นออกไปของน้ำเชื้อ เช่น ในนกกระจอกเทศ เป็นต้น 2.) non-intromittent phallus สามารถเห็น phallus ได้ด้วยการปลิ้นส่วน vent ออกมา ซึ่งอยู่ด้าน ventral lip เช่น ในไก่และไก่งวง เป็นต้น ในไก่มี phallic body และ lymphatic folds บวมนูนมาชนกันที่กึ่งกลางของ phallus (Kirby and Froman, 2000; Aire, 2007)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

5. Cloacal protuberance

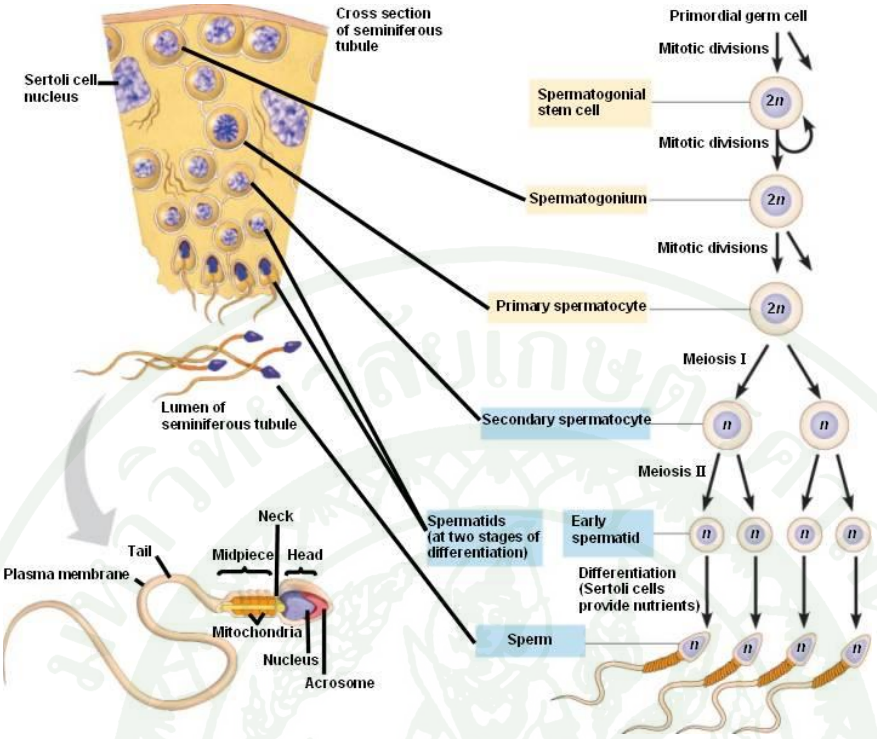
ในช่วงฤดูผสมพันธุ์บริเวณช่องทวารร่วมของนกเพศผู้จะขยายใหญ่ และอาจมีลักษณะเป็นถุงภายนอกผนังลำตัวส่วนท้อง (abdominal wall) ซึ่งเป็นผลของการขยายใหญ่ขึ้นของ seminal vesicle ที่อยู่ภายในขนาดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของนก การนูนออกเป็นถุงนี้จะทำให้อสุจิอยู่ในตำแหน่งที่อุณหภูมิต่ำกว่าในร่างกายนกและการนูนออกมาเช่นนี้อาจมีส่วนช่วยในการผสมพันธุ์กับตัวเมีย แต่ในนกบางชนิดการมี cloacal protuberance เป็นผลจาก gelatinous connective tissue ของชั้นกล้ามเนื้อ หรือเป็นการขยายขนาดของ ejaculatory duct ซึ่งจะมีส่วนช่วยเพิ่มโอกาสการสัมผัสกันของช่องทวารร่วมในระหว่างการผสมพันธุ์ (Kirby and Froman, 2000; Aire, 2007)

กระบวนการผลิตอสุจิ (Spermatogenesis)

Spermatogonia

กระบวนการสร้างตัวอสุจิในสัตว์ปีกแต่ละวงรอบจะใช้เวลาประมาณ 12-13 วัน (ภาพที่ 1) เริ่มต้นจาก spermatogonia ซึ่งในสัตว์ปีกมีลักษณะเป็น heterogeneous cellular แบ่งตัวซ้ำๆ แบบ mitosis เพื่อสร้าง primary spermatocytes และพัฒนาต่อเป็น secondary spermatocytes จากนั้นแบ่งตัวพัฒนาต่อเป็น spermatid กระบวนการเหล่านี้เริ่มต้นจากเซลล์ต้นตอ (stem cell) ซึ่งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีการเก็บสำรอง stem cell ไว้เพื่อใช้ในกระบวนการผลิตอสุจิให้ได้อย่างต่อเนื่อง แต่การสำรอง stem cell นี้พบได้น้อยในสัตว์ปีกจึงทำให้ผลิตอสุจิได้อย่างจำกัด (Aire, 2007)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 1 กระบวนการผลิตตัวอสุจิ (spermatogenesis)

ที่มา: Anonymous (n.d.)

Primary and secondary Spermatocytes

Spermatogonia จะแบ่งตัวแบบ mitosis ครั้งสุดท้ายได้เป็น primary spermatocytes และมีการพัฒนาไปอีกหลายขั้นตอน ในสัตว์ปีกการแบ่งตัวระยะ meiotic prophase เพื่อสร้าง primary spermatocytes แบ่งเป็นระยะย่อยอีก 8 ระยะ ได้แก่ preleptotene, leptotene, zygotene, pachytene, diplotene, diakinesis, metaphase และ anaphase

เมื่อ primary spermatocyte แบ่งตัวแบบ meiotic ครั้งแรกจะได้ 2 secondary spermatocytes แต่ใน seminiferous epithelium จะพบ secondary spermatocytes ได้ยาก เพราะมีช่วงอายุสั้น จากนั้นแบ่งตัวอีกได้ 2 haploid spermatids เพื่อพัฒนาต่อเป็น round spermatids (Aire, 2007)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Round spermatid

Round spermatid เป็นเซลล์แบบ haploid chromosome ที่มีความซับซ้อนของโครงสร้างภายใน ซึ่งเตรียมพร้อมที่จะเปลี่ยนแปลงและขยายออกตามยาวได้ เพื่อเป็นการเข้าสู่กระบวนการที่จำเพาะโดยเกิด cytodifferentiation ที่เรียกว่า spermiogenesis หรือ spermateliosis ซึ่งเป็นระยะสุดท้ายของ spermatogenesis อันเป็นกระบวนการที่สำคัญและทำให้องค์ประกอบของอสุจิมีความสมบูรณ์ โดยมีการสร้างหาง และการหนาตัวขึ้นเป็นส่วน mid piece เพื่อสร้าง mitochondria และ axoneme แล้วเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น mature spermatozoa การพัฒนาเหล่านี้อยู่ภายใต้อิทธิพลของ testosterone อย่างไรก็ตาม mature sperm นี้ยังไม่สามารถเคลื่อนที่จนกระทั่งถูกส่งผ่านเข้าสู่ epididymis ด้วยกระบวนการ peristaltic contraction ซึ่งขณะที่อยู่ใน epididymis อสุจิจะมีความสามารถในการเคลื่อนที่ และปฏิสนธิกับไข่ได้ (Aire, 2007)

Spermiation

Spermiation เป็นกระบวนการในขั้นตอนสุดท้ายของ spermatogenesis ซึ่งเกิดขึ้นโดย sertoli cell ทั้งนี้ก่อนที่ round spermatid จะพัฒนาเป็น mature sperm โดยสมบูรณ์ ไซโตพลาสซึมของ spermatid จะหดเล็กลง และกลายเป็นส่วนหนึ่งของไซโตพลาสซึมของ germ cell เช่น sertoli cell ขณะเดียวกัน residual body จะมีลักษณะวาวแสง และจะถูกกำจัดโดย sertoli cell ต่อไป ซึ่งกระบวนการกำจัดไซโตพลาสซึมส่วนเกินนี้จะเกิดขึ้นช่วงในท้ายของกระบวนการ spermiogenesis (Aire, 2007)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อสุจิของสัตว์ปีก (Avian spermatozoa)

การศึกษารูปร่างอสุจิของสัตว์ปีกโดยใช้อสุจิของไก่ (*Gallus gallus*) เป็นต้นแบบ พบว่าอสุจิถูกจัดอยู่ในกลุ่ม non-passerine แบ่งเป็นส่วน anterior และ posterior (ภาพที่ 2) ส่วนของ head, proximal, distal centrioles และ mid piece รวมความยาวไม่เกิน 14 μm กว้างไม่เกิน 0.5 μm และหากรวมส่วนหางของอสุจิจะมีความยาวไม่ต่ำกว่า 100 μm (Jamieson, 2007) อสุจิมีส่วนประกอบดังต่อไปนี้

- Acrosome มีความยาวประมาณ 2 μm ลักษณะเป็นทรงกรวย (conical shape) ยาว ไม่สมมาตร มีความโค้งเล็กน้อย ภายใน sub acrosomal space มี perforatorium ซึ่งเป็นแท่งเนื้อแน่น spine ของ perforatorium ยังฝังลึกไปถึงส่วนของนิวเคลียสที่ตำแหน่งนี้มีการสร้าง deep anterior nuclear fossa

- Nucleus มีลักษณะเป็นรูปทรง elongate cylindrical โดยช่วงต้นมีลักษณะเรียวเป็นฐานรับกับส่วน perforatorium ส่วนของนิวเคลียสมี chromatin อัดแน่นเป็นลักษณะ electron dense ส่วนท้ายของนิวเคลียส เป็นหลุมตื้นๆที่รับกับ implantation fossa ดังภาพที่ 2

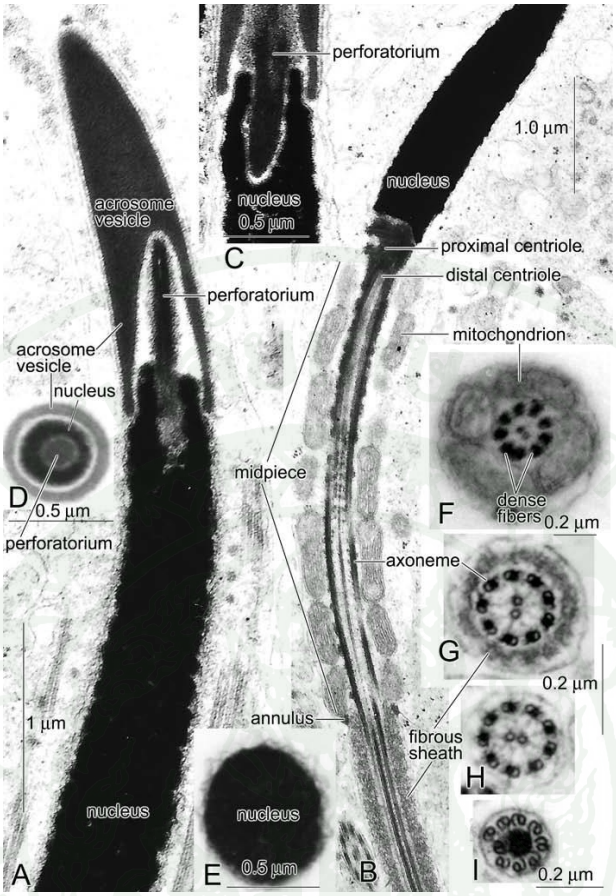
- Midpiece เมื่อตัดขวางจะประกอบด้วย 4 mitochomdria ล้อมรอบ axoneme ตลอดความยาวของ midpiece (ประมาณ 30 μm) พบ mitochondria 7-8 อัน

- Annulus มีขนาดเล็กเป็นจุดสิ้นสุดของ mid piece

- Principle piece เป็นส่วนต่อจาก annulus มีลักษณะเป็น fibrous sheath ซึ่งล้อมรอบ axoneme

- End piece ประกอบด้วย axoneme และ plasma membrane ซึ่งไม่พบส่วน fibrous sheath

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 2 ภาพตัดขวางของอสุจิไก่ โดยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน

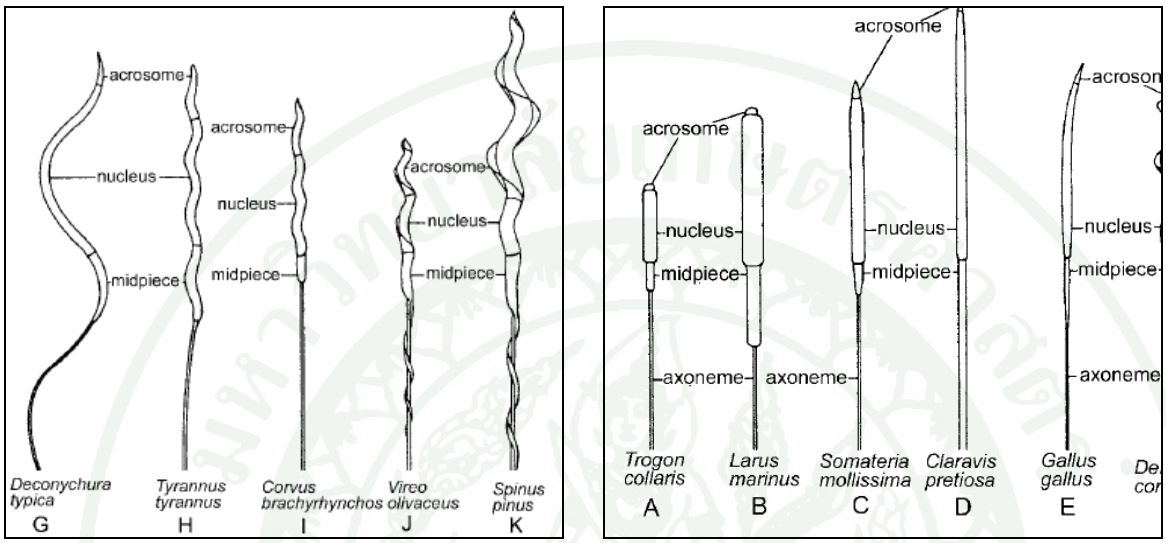
ที่มา: Jamieson (2007)

การจำแนกชนิดของอสุจิสัตว์ปีก (Type of avian sperm)

อสุจิของสัตว์ปีกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ (ภาพที่ 3) กลุ่มแรกเรียกว่า helical type จะมีรูปทรงคล้ายกระสวย (vermiform shape) หรือ ทรงสว่าน (spiral shape) ซึ่งอาจจะมีเกลียว (helix) พันรอบส่วนหัวอสุจิและอาจจะยาวถึงส่วนหาง โดยมี acrosome แบบ conical shape อสุจิลักษณะนี้พบได้จากนกกลุ่ม passerine เช่น นกระจอก นกฟินซ์ นกเอี้ยง และนกขุนทอง เป็นต้น และอสุจิอีกกลุ่มเรียกว่า sauropsid type ซึ่งจะมีรูปทรงกระบอก (cylindrical shape) หรือ ทรงยาว (elongate shape) โดยมี acrosome แบบ button หรือ sub spheroidal shape พบได้ในนกกลุ่ม non-passserine เช่น นกกระจอกเทศ นกอีมู นกคาสโซวารี่ เป็นต้น แต่

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อย่างไรก็ตามอสุจิแบบ sauropsid type มีความผันแปรของรูปร่างได้ เช่น อสุจิของเป็ดที่มี acrosome แบบ conical shape (Jamieson, 2007; Simoes *et al*., 2012)



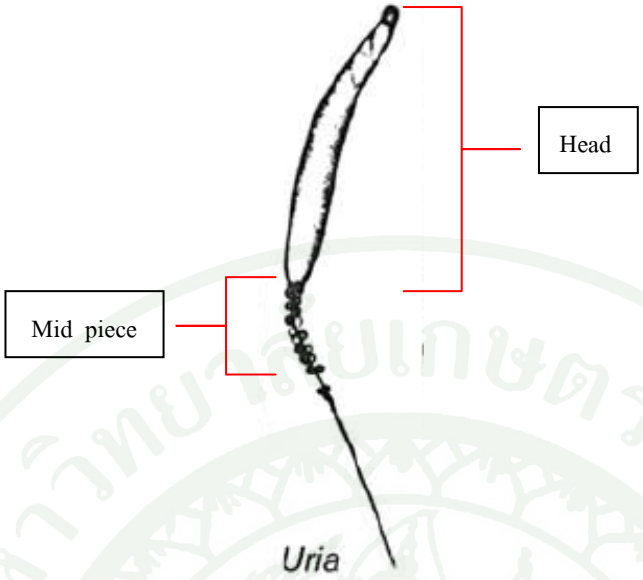
ก) Helical type ข) Sauropsid type

ภาพที่ 3 ก) อสุจิแบบ helical ของนกกลุ่ม passerine ข) อสุจิแบบ sauropsid ของนกกลุ่ม non-passerine

ที่มา: Jamieson (2007)

อสุจิของนกชนิดอื่นที่ได้นำมาศึกษาเปรียบเทียบ คือ นกในอันดับ Charadriiformes ตัวอย่างนกในกลุ่มนี้คือ common guillemot (*Uria aalge*) จะมี acrosome ที่เป็นตุ่มเล็กๆ มีนิวเคลียสทรงยาวเป็นรูปกระสวย (elongate fusiform) (ภาพที่ 4) ส่วน mid piece มีความยาวเป็น 1 ใน 3 ของนิวเคลียส พบ mitochondria 7 อัน (Jamieson, 2007)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

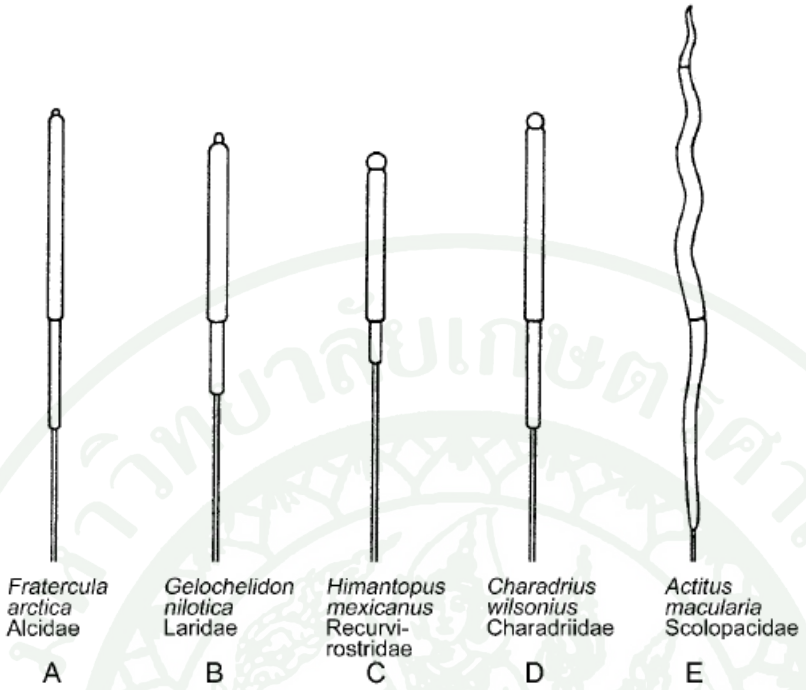


ภาพที่ 4 ภาพวาดอสุจิของนก Common Guillemot (*Uria aalge*)

ที่มา: Jamieson (2007)

นกในวงศ์อื่นๆของอันดับ charadriiformes มีอสุจิเป็น cylindrical shape และส่วน mid piece มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางที่เล็กลงเล็กน้อย มี acrosome ที่มีขนาดเล็กเป็นตุ่ม (button like) หรือครึ่งทรงกลม (sub spheroidal) ดังที่พบในวงศ์ Recurvirostridae (นก stilts และ นก avocets), วงศ์ Charadriidae (นก plovers และ นก lapwings), วงศ์ Laridae (นก skuas gulls และนก terns) และวงศ์ Alcidae (นก auks และนก puffins) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีความผันแปรเพียงเล็กน้อยจากลักษณะที่กล่าวมาข้างต้น ดังภาพที่ 5 (Jamieson, 2007)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 5 ความผันแปรของรูปร่างอสุจิ ของนกในอันดับ Charadriiformes

ที่มา: Jamieson (2007)

การส่งสัญญาณข้อมูล และการควบคุมของระบบต่อมไร้ท่อ ที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์

ต่อมไร้ท่อที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของระบบสืบพันธุ์ ได้แก่ pituitary gland, pineal gland และ gonad (อัณฑะ-รังไข่) ต่อมไร้ท่ออื่นที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ adrenal gland และ thyroid gland เป็นต้น ระบบการควบคุมของฮอร์โมนในสัตว์ปีกมี 4 ส่วนหลักด้วยกันดังนี้ 1) ส่วนที่ทำงานผ่าน environmental signal เป็นสัญญาณจากสิ่งแวดล้อม และการรับรู้การเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ 2) ส่วน Hypothalamus ที่เป็นตัวรวบรวมข้อมูลจากสิ่งแวดล้อมภายนอกและสัญญาณจากภายในร่างกาย เช่น biological clock เป็นต้น 3) Hypothalamo-pituitary เป็นส่วนที่จะทำการแปลงข้อมูลทั้งจากภายนอกและภายใน และส่งผลต่อการหลั่งฮอร์โมนของต่อมไร้ท่อให้มีการตอบสนองอย่างเหมาะสม 4) การทำงานภายใน gonad (อัณฑะ-รังไข่)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สัญญาณจากสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ ทำให้มีการพัฒนาแบบองค์รวม (orchestrate) โดยตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงเพื่อปรับให้เข้ากับความต้องการที่เกิดขึ้น เช่น Maternal effect เป็นต้น การพัฒนาอื่นๆ ทางสรีรวิทยา รูปร่าง และพฤติกรรม ซึ่งเป็นไปตามช่วงเวลาต่างๆ เช่น การอพยพ การเปลี่ยนสีสันเมื่อร่างกายเจริญเติบโตและการเข้าฤดูผสมพันธุ์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีการควบคุมโดยภาวะธำรงดุล (homeostasis) ทำให้เกิดความสมดุลของสิ่งต่างๆในร่างกาย เพื่อให้ร่างกายอยู่ในสภาพปกติ โดยมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่จะมาถึง เช่น การเปลี่ยนฤดูกาล เป็นต้น รวมทั้งมีการส่งสัญญาณต่อการแสดงออกของพฤติกรรม และสรีรวิทยา เช่น การจับคู่ การรักษาเขตแดน เป็นต้น รวมถึงการตอบสนองต่อเหตุการณ์ต่างๆที่ไม่ได้มีการเตรียมตัวไว้ก่อน มีหลายปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการรับรู้การเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ ซึ่งมีความซับซ้อนโดยมี 5 กระบวนการหลักที่เกี่ยวข้อง ดังต่อไปนี้ (Bentley *et al*., 2007)

1. ตัวรับรู้พิเศษที่จะตอบสนองอย่างจำเพาะต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมภายนอก

2. Neural pathway จากตัวรับรู้พิเศษที่จะส่งสัญญาณไปยังสมอง (target area) โดยนำส่งข้อมูลของสิ่งแวดล้อมทำให้เกิดการทำงานทาง physiological ของร่างกายที่สัมพันธ์กัน

3. Signal specific neuron ใน hypothalamus จะปล่อยสารสื่อประสาทที่เป็นตัวเริ่มต้นของฮอร์โมนหลายๆชนิดทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีระ รูปร่าง และพฤติกรรมที่เหมาะสม

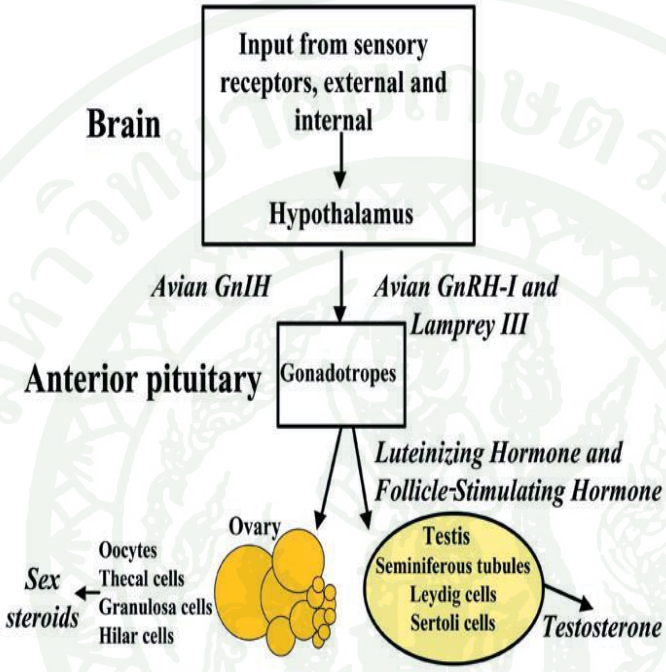
4. การหลั่งสารสื่อประสาทและเอนไซม์ของระบบประสาทส่วนกลาง สามารถแยกระบบการควบคุมการหลั่งสารสื่อประสาทภายในกระแสเลือดออกจาก hypothalamus ได้ และสัญญาณต่างๆในร่างกาย (internal signal) ก็อาจมีบทบาทต่อระดับการหลั่งสารสื่อประสาทในระบบประสาทส่วนกลาง

5. ฮอร์โมนที่อยู่ในกระแสเลือดอาจมีผลเป็น negative feedback ต่อตัวรับสัญญาณในสมอง ตัวรับสัญญาณจำเพาะจากสิ่งแวดล้อม หรือเซลล์ประสาทที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งสารสื่อประสาท สิ่งเหล่านี้อาจเป็นผลจากการควบคุมของ biological clock สภาพทางสังคม ภาวะโภชนาการและภาวะโรค เป็นต้น

การส่งสัญญาณจากสิ่งแวดล้อมโดยการควบคุมผ่าน neural pathway มีหลายรูปแบบ เช่น อาหาร อุณหภูมิ สภาพสังคม เป็นต้น ซึ่งการควบคุมดังกล่าวไม่ได้เป็นการกระตุ้นเสมอไป แต่บางครั้งเป็นการหลั่งสารที่มีผลในการยับยั้งการกระตุ้นนั้นๆ การรับสัญญาณจากภายนอกจะผ่านตัวรับต่างๆ เช่น ทางการมองเห็น การได้ยิน การสัมผัส การรับรู้รสชาติ ตัวรับสัญญาณแสงและความดันบรรยากาศในสมองส่วนลึก เป็น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ต้น รวมไปถึงการตอบสนองต่ออุณหภูมิ ความชื้น ยิ่งไปกว่านั้นบทบาทจากภายนอกและสัญญาณจากภายใน จะเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อระบบ neuroendocrine และ endocrine ดังภาพที่ 6

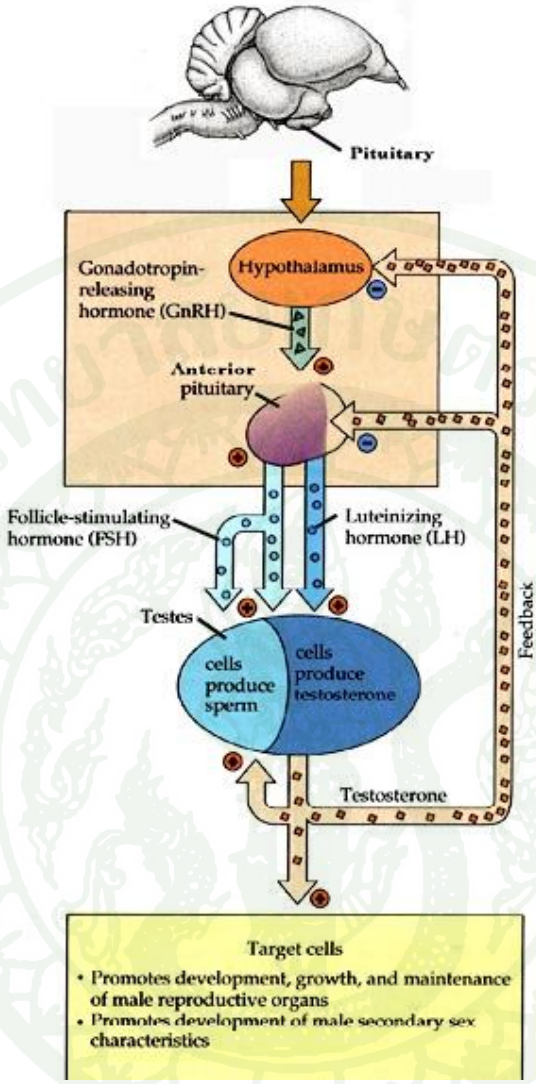


ภาพที่ 6 การตอบสนองของฮอร์โมนเมื่อได้รับข้อมูลจากสิ่งแวดล้อมภายนอก และสัญญาณจากภายใน

ที่มา: Bentley *et al*. (2007)

Luteinizing hormone (LH) หรือ Interstitial cell stimulating hormone ทำหน้าที่กระตุ้นการเจริญของ Leydig's cell ควบคุมการสร้าง sex steroid hormone และสร้าง androgen โดยเฉพาะ testosterone ซึ่งมีบทบาทโดยตรงต่อการสร้างอสุจิ การควบคุมระดับ testosterone ในเลือดจะอาศัยกระบวนการ negative feedback โดยส่งสัญญาณมาที่ anterior pituitary ดังภาพที่ 7 การสังเคราะห์และสร้าง LH ถูกควบคุมโดย gonadotropin releasing hormone (GnRH) จาก hypothalamus แต่ไม่ค่อยมีผลในการควบคุมการสร้าง follicle stimulating hormone (FSH) ส่วน FSH จะควบคุมกระบวนการ spermatogenesis (spermaturation) กับ ovarian follicle stimulation (Kirby and Froman, 2000; Jamieson, 2007)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 7 การควบคุมการหลั่งฮอร์โมน testosterone โดยกลไกแบบ negative feedback

ที่มา: Akins and Burns (2012)

ฤดูผสมพันธุ์ (Seasonal breeding)

การทำงานของระบบการสืบพันธุ์ในสัตว์ปีกหลายชนิดจะถูกจำกัดเป็นฤดูผสมพันธุ์ โดยนกที่อาศัยอยู่ในแถบภูมิอากาศแบบอบอุ่น (temperate climate) จะมีความชัดเจนของฤดูผสมพันธุ์ ซึ่งการมีฤดูผสมพันธุ์จะช่วยเพิ่มโอกาสการรอดชีวิตของลูกนกเนื่องจากจะสัมพันธ์กับความอุดมสมบูรณ์ของอาหาร ในฤดู

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผสมพันธุ์ของนกเงือกจะพบพฤติกรรมการเข้าโพรง มีรายงานการเข้าโพรงของนกเงือกหลายชนิดในช่วงเวลาต่างๆของรอบปี สำหรับนกเงือกที่อยู่ในประเทศไทยซึ่งเป็นพื้นที่เหนือเส้นศูนย์สูตร มีพฤติกรรมการเข้าโพรงในช่วงต้นปี เมื่อพิจารณาจากการรวบรวมข้อมูลโดย Kinnaird and O'Brien (2007) พบว่า ทั้งนกแก๊ก และนกกาฮัง ในประเทศไทยที่อาศัยอยู่ในธรรมชาติมีพฤติกรรมการเข้าโพรงอยู่ในช่วงเดือนมกราคม ถึง เมษายน ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ช่วงเดือนที่นกแก๊ก และนกกาฮัง มีพฤติกรรมเข้าโพรง

Species	**Location**	**Position**	**Month**											
			J	**F**	**M**	**A**	**M**	**J**	**J**	**A**	**S**	**O**	**N**	**D**
Oriental Pied	Thailand	north		E	E/F	F	F							
Oriental Pied	India	north				E	N	N	F					
Oriental Pied	Burma	north		E	E	N	N	F	F					
Great	Thailand	north		E	E	N	N	F	F	F				
Great	Thailand	north	E	E	E	E	N	F	F					
Great	Burma	north	E	N	N	F								

E คือ นกเริ่มเข้าโพรง N คือ มีนกในโพรง F คือ พบลูกนก

ที่มา: Kinnaird and O'Brien (2007)

โดยตามธรรมชาติแล้วช่วงเวลาที่นกกาฮังที่อยู่ทางตอนใต้ของประเทศไทยมีการจับคู่เพื่อเข้าโพรงเริ่มตั้งแต่ต้นเดือนมกราคมถึงปลายเดือนมิถุนายน ซึ่งเมื่อพิจารณาระยะเวลาดังกล่าวจะมีช่วงเวลาให้นกได้ผสมพันธุ์ตั้งแต่เดือนมกราคมจนถึงกลางเดือนมีนาคมก่อนที่นกตัวเมียจะปิดปากโพรง (Chaisuriyanun *et al.*, 2011) ในขณะที่การศึกษานกกาฮังในกรงเลี้ยงในประเทศสิงคโปร์ พบว่านกตัวเมียเริ่มเข้าโพรงตั้งแต่เดือนธันวาคม (Wong and Nyunt, 1998)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การรีดเก็บน้ำเชื้อในสัตว์ปีก (Semen collection in avian)

วิธีการรีดเก็บน้ำเชื้อในสัตว์ปีกมีอยู่หลายวิธี วิธีดั้งเดิมคือ การนวดกระตุ้นบริเวณท้อง (abdominal massage) จากการคิดค้นของ Burrow and Quinn (1935) เป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะอย่างยิ่งในไก่ และทำให้วิธีนี้เป็นที่นิยมในนกอื่นๆอีกหลายชนิด เช่น นกกระเรียน (Gee, 2004), นกแก้วหลายชนิด (Brock, 1991; Stelzer *et al*., 2005), นกแก้ว Quaker parakeet (Anderson *et al*., 2002), ไก่ฟ้าหลายชนิด (Jalme *et al*., 2003), นกแร้งกลุ่ม vulture (Umapathy *et al*., 2005; Madeddu *et al*., 2009) นกเพนกวิน (Waldoch *et al*., 2007), นกล่าเหยื่อ (Blanco *et al.*, 2009) และนกเรีย (Goes *et al*., 2010) แต่ก็มีข้อจำกัดต่างๆในการรีดสำหรับนกบางชนิด เช่น ขนาดของนก ความก้าวร้าวของนก เป็นต้น (Brock, 1991; Jalme *et al*., 2003; Stelzer *et al*., 2005; Umapathy *et al*., 2005; Madeddu *et al*., 2009) แม้ว่าวิธีการนวดกระตุ้นบริเวณท้องจะได้ผลดีในกลุ่มเป็ด ไก่ และนกบางกลุ่ม เช่น เพนกวิน (O'Brien *et al*., 1999; Waldoch *et al*., 2007) เป็นต้น แต่คุณภาพของน้ำเชื้อที่ได้ก็จะพบการปนปัสสาวะได้ ซึ่งจะมีผลต่อการอยู่รอดของตัวอสุจิ (Blanco *et al*., 2002)

Cooperative method เป็นวิธีการรีดน้ำเชื้อที่พัฒนาโดยกลุ่มผู้เลี้ยงนกล่าเหยื่อ (Blanco *et al*., 2009) โดยอาศัยพฤติกรรมการฝังใจ สร้างเงื่อนไขให้นกมีการหลั่งน้ำเชื้อออกมาได้ เช่น การได้ยินเสียงนกตัวเมีย การสวม hood คลุมหัวก่อนรีดน้ำเชื้อ เป็นต้น และอีกหลายเทคนิคดังที่ Samour (2004) ได้รายงานไว้ มีหลายเทคนิคที่ปรับปรุงให้เหมาะสมกับชนิดนก ซึ่งวิธีนี้ให้ผลดีในกลุ่มนกเหยี่ยว (Blanco *et al.*, 2009) แต่สำหรับนกที่มีขนาดใหญ่ ต้องใช้ทีมงานจับบังคับหลายคน (Umapathy *et al*., 2005; Madeddu *el al*., 2009) และนกแก้วขนาดใหญ่ให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจ (Stelzer *et al*., 2005) การใช้หุ่น dummy เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ได้ผลดีมากกับนก Houbara bustard (*Chlamydoitis undulata*) แต่ต้องใช้ dummy ที่มีขนและผิวหนังของนกจริงๆ (Samour, 2004) หรือการใช้ artificial vagina (Setioko and Hetzel, 1984) ซึ่งเป็นวิธีที่ใกล้เคียงกับการใช้ dummy พบรายงานการศึกษาในเป็ดเท่านั้น

Electro-ejaculation เป็นการรีดน้ำเชื้อโดยเครื่องกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อด้วยไฟฟ้า วิธีนี้ใช้กันอย่างแพร่หลายในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมหลายชนิด เช่น ชินชิล่า (Healey and Barbara, 1967), เสือดาว (Jayaprakash *et al*., 2001), ลิงมาโมเส็ท (Schneiders *et al*., 2004), หมี Japanese black bear (Okano *et al.,* 2006), แมว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(Zambelli and Cunto, 2006), อโกติ (Mollineau *et al.,* 2008), กวางแดง (Martı´nez-Pastor *et al*., 2009), สมเสร็จ (Pukazhenthi *et al.,* 2011) เป็นต้น แต่รายงานการศึกษาในสัตว์ปีกยังมีน้อยมากได้แก่ เป็ด (Watanabe, 1957; Setioko and Hetzel, 1984), นกแก้ว (Harrison and Wasmund, 1983), กลุ่มนกน้ำ (waterfowl) (Samour, 1985), นกแก๊ก (Ng *et al*., 1998) ในสัตว์ชนิดอื่นมีการศึกษาความแตกต่างของความต่างศักย์ที่ใช้ในการกระตุ้น จากรายงานในหมี Japanese black bear พบว่าความต่างศักย์ต่ำสามารถที่จะทำให้มีการหลั่งน้ำเชื้อได้โดยไม่พบความแตกต่างของคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น (Okano *et al*., 2006) ทั้งนี้การศึกษาส่วนใหญ่ในสัตว์ปีกใช้ความต่างศักย์ที่สูงมากเพื่อกระตุ้นให้มีการหลั่งน้ำเชื้อ (Watanabe, 1957; Harrison and Wasmund, 1983; Setioko and Hetzel, 1984; Samour *et al*., 1985) และบางงานวิจัยไม่มีการระงับความรู้สึกของสัตว์ก่อนการทดลอง (Kono and Hiura, 1983) จึงอาจทำให้สัตว์เกิดการบาดเจ็บในระหว่างการรีดน้ำเชื้อได้ นอกจากนี้ลักษณะของโพรบ (probe) ที่จะใช้ในสัตว์ปีกต้องมีความเหมาะสมกับขนาดของสัตว์ที่จะรีดน้ำเชื้อด้วย

ผลของการใช้วิธีการรีดน้ำเชื้อที่ต่างกันอาจมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อที่ได้ มีหลายการศึกษาเปรียบเทียบเพื่อพิสูจน์ความแตกต่างระหว่างการใช้เครื่องกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อด้วยไฟฟ้ากับวิธีอื่น เช่น การเปรียบ เทียบระหว่างการใช้อวัยวะเพศเทียมกับเครื่องกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อด้วยไฟฟ้าในเป็ด (Setioko and Hetzel, 1984), วัว (Leon *et al*., 1991), แพะ (Marco-Jime´nez *et al*., 2005) และลามา (Giuliano *et al.,* 2008) เป็นต้น มีการเปรียบเทียบระหว่างการใช้เครื่องไวเบรท และเครื่องกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อด้วยไฟฟ้าในลิงกระรอก (Yeoman *et al.,* 1997) ลิงมาโมเส็ท (Schneiders *et al*., 2004) ซึ่งแต่ละการศึกษาให้ผลที่แตกต่างกันออกไป ทั้งนี้พบว่าในน้ำเชื้อของสัตว์ปีกมีการผลิต seminal fluid บางส่วนจะมาจาก paracloacal vascular body, lymphatic folds หรือ dorsal proctodeal glands ได้ ขึ้นอยู่กับชนิดของนก (Fujihara, 1992) อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังให้คุณภาพของน้ำเชื้อที่ดีกว่าวิธีนวดกระตุ้น (Samour, 2004)

สำหรับวิธีการรีดน้ำเชื้อด้วยเครื่องกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อด้วยไฟฟ้านี้ ต้องระงับความรู้สึกสัตว์ด้วยการวางยาสลบที่เหมาะสมและปลอดภัย ซึ่งในปัจจุบันมียาดมสลบที่มีความปลอดภัยสูงต่อสัตว์ปีก (Gunkel and Lafortune, 2005; Escobar *et al*., 2011) ด้วยวิธีการนี้ทำให้ไม่จำเป็นต้องฝึกฝนสัตว์ปีกเพื่อการรีดน้ำเชื้อ และจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อนกที่ไม่เชื่อง ก้าวร้าว และยากต่อการฝึกฝนเพื่อรีดน้ำเชื้อหรือการจับบังคับ ดังนั้นวิธีการรีดน้ำเชื้อด้วยเครื่องกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อด้วยไฟฟ้า จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รีดเก็บน้ำเชื้อจากนกเงือก และสามารถนำมาประเมินคุณภาพน้ำเชื้อซึ่งจะมีประโยชน์ต่อการจัดการสืบพันธุ์ต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เครื่องดมยาสลบชนิดใช้กับยาดมสลบ Isoflurane
2. หน้ากากดมสลบสำหรับนกเงือก
3. Non-cuff Endotracheal tube no. 2
4. ผ้าขนหนู
5. เครื่องกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อด้วยไฟฟ้า (Model 304, P.T. Electronics, U.S.A.)
6. โพรบแบบประดิษฐ์เอง
7. Micropipette (Gilson), Microtube
8. แผ่นให้ความอบอุ่นสัตว์แบบรองนอน
9. กระดาษตรวจ pH (Universalindikator, Merck Germany)
10. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น Olympus CH B145-2
11. กระจกสไลด์ และแผ่นกระจกปิดสไลด์
12. Hemacytometer (REICHERT, Buffao, N.Y. USA.)
13. โปรแกรม Cell* imaging software (Olympus soft imaging solution GmbH, Munster) ถ่ายภาพด้วยกล้อง Olympus (Model CX 31RBSFA)
14. ไซริงค์ขนาด 1 และ 3 มิลลิลิตร
15. Micro Centrifuge (Spectrafuge Labnet international, Inc. EDISON, NJ USA)
16. Slide warmer (model 77 Fisher Scientific, USA)
17. กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope: SEM) (JEOL model JSM 5600 LV)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารเคมี

1. น้ำเกลือล้างแผล (Normal saline) pH 8
2. น้ำยาดมสลบ Isoflurane
3. สารเจือจางน้ำเชื้อ modified tyrode's medium, TALP (Sontakke *et al*., 2004)
4. Eosin-Nigrosin (5% Nigrosin, 0.6% Eosin, 3% Sodium citrate)
5. Coomassie blue stain solution
6. 4% Paraformaldehyde
7. 0.1 M, pH 9 Ammonium acetate
8. 1% osmium tetroxide (0.1M, pH 7.3)
9. 2.5% Glutaraldehyde
10. ยาปฏิชีวนะแบบครีม (Gentamycin cream)

สัตว์ทดลอง

นกแก๊ก

นกแก๊กเพศผู้จำนวนทั้งหมด 4 ตัว อายุระหว่าง 3-5 ปี เป็นนกที่ได้รับบริจาคจากประชาชนตั้งแต่เล็กและเจริญเติบโตในกรงเลี้ยง โดยนก 2 ตัว (รหัสห่วงขา 1001 SBWR silver, 1001 SBWR blue) ถูกเลี้ยงแยกเดี่ยวในกรงเพาะพันธุ์ขนาด (กว้าง×ยาว×สูง) 3×4×2.5 เมตร อย่างไรก็ตามนกสามารถมองเห็นนกเพศเมียในกรงข้างเคียงได้ และอีก 2 ตัว (รหัสห่วงขา KKOZ TH156, KKOZ 097) ถูกเลี้ยงคู่กับนกเพศเมีย ในกรงทรงกระบอกเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เมตร สูง 4 เมตร รายละเอียดลักษณะกรงเลี้ยง และประวัติการสืบพันธุ์ของนกแต่ละตัวแสดงในตารางที่ 2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นกกาฮัง

นกกาฮังเพศผู้ทั้งหมด 8 ตัว อายุระหว่าง 10-20 ปี เป็นนกที่ได้รับบริจาคจากประชาชนตั้งแต่เล็กและเจริญเติบโตในกรงเลี้ยง นกถูกเลี้ยงแยกเดี่ยวจำนวน 2 ตัว (สามารถเห็นตัวเมียในกรงข้างเคียงได้เช่นเดียวกับนกแก๊ก) และอีก 6 ตัว เลี้ยงอยู่กับคู่กับนกเพศเมีย โดยมีกรงเพาะพันธุ์ 2 ขนาดที่แตกต่างกันดังนี้

แบบที่ 1 กรงเพาะพันธุ์ขนาด กว้าง 4 เมตร ยาว 8 เมตร สูง 3 เมตร

แบบที่ 2 กรงเพาะพันธุ์ขนาด กว้าง 3 เมตร ยาว 4 เมตร ยาว 2.50 เมตร

รายละเอียดลักษณะกรง และประวัติการสืบพันธุ์ของนกแต่ละตัวแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 รายละเอียดลักษณะกรงเลี้ยง และประวัติการสืบพันธุ์ของนกแต่ละตัว

Hornbill ID	Rearing condition	Cage size (m) (W × L × H)	Egg/chick records
Great			
GH1 (Korat 080099)	paired with female	4 × 8 × 3	unhatched eggs
GH2 (NB 009)	paired with female	4 × 8 × 3	chicks
GH3 (Doi 7)	paired with female	4 × 8 × 3	unhatched eggs
GH4 (KKOZ 060)	paired with female	4 × 8 × 3	unhatched eggs
GH5 (KKOZ TH02)	paired with female	3 × 4 × 2.5	no
GH6 (KKOZ TH17)	paired with female	3 × 4 × 2.5	no
GH7 (KKOZ 025)	singly	3 × 4 × 2.5	no
GH8 (Pakhak)	singly	3 × 4 × 2.5	no
Oriental pied			
OP1 (1001 Silver SBWR)	paired with female	4 × 8 × 3	chicks
OP2 (1001 Blue SBWR)	paired with female	4 × 8 × 3	chicks
OP3 (KKOZ TH156)	paired with female	∅ 5 × 4*	chicks
OP4 (KKOZ 097)	paired with female	∅ 5 × 4*	chicks

* กรงเลี้ยงทรงกระบอก เส้นผ่านศูนย์กลาง 5 เมตร สูง 4 เมตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นกทั้งสองชนิดอยู่ในสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ได้รับน้ำและอาหารอย่างเหมาะสม ชนิดของอาหารในแต่ละวันแสดงสำหรับนกแก๊กภายในกรงเลี้ยง ที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จ.ชลบุรี แสดงในตารางที่ 3 สำหรับนกกาฮังมีชนิดของอาหารเหมือนกับนกแก๊ก นกทั้งสองชนิดได้รับการดูแลสุขภาพเป็นประจำโดยสัตวแพทย์ภายในสวนสัตว์

ตารางที่ 3 ชนิดของอาหารในแต่ละวันสำหรับนกแก๊กภายในกรงเลี้ยง

Food type	Moisture (%)	Lipid (%)	Protein (%)	Calcium (%)	Ash (%)
Banana	95.1	0.1	0.2	0.0	0.2
Papaya	70.9	0.1	0.8	0.0	0.9
Rice + boiled yolk + corn	70.8	1.5	2.9	0.0	0.5
Grape	90.3	0.2	0.4	0.0	0.5
Pork	76.8	2.0	20.0	0.0	1.4
Laboratory mice	79.8	5.6	10.3	0.5	2.0
Taro	79.1	0.2	1.5	0.0	0.9
Dog food	5.1	6.4	25.2	1.6	7.6
Squid mantle	-	-	-	31.4	85.4

ที่มา: Chaiyarat *et al*. (2011)

วิธีการ

การรีดเก็บน้ำเชื้อด้วยเครื่องกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อด้วยไฟฟ้าในการศึกษานี้ ได้ดัดแปลงรูปแบบการกระตุ้นเพื่อรีดน้ำเชื้อจากวิธีของ Samour *et al.* (1985) ซึ่งรีดเก็บน้ำเชื้อจากนกน้ำ (waterfowl) ร่วมกับวิธีของ Ng *et al.* (1998) ซึ่งรีดเก็บน้ำเชื้อจากนกแก๊ก การศึกษานี้ออกแบบการกระตุ้นด้วยกระแส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไฟฟ้าเป็น 3 ชุด (series) โดยปล่อยกระแสไฟฟ้า 7 ครั้งต่อหนึ่งระดับความต่างศักย์ จากนั้นจึงกระตุ้นในความต่างศักย์ถัดไป ระยะเวลาพักระหว่างชุดนาน 5 นาที มีรูปแบบการกระตุ้นดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 รูปแบบการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าในนกกาฮังและนกแก๊กให้มีการหลั่งน้ำเชื้อ

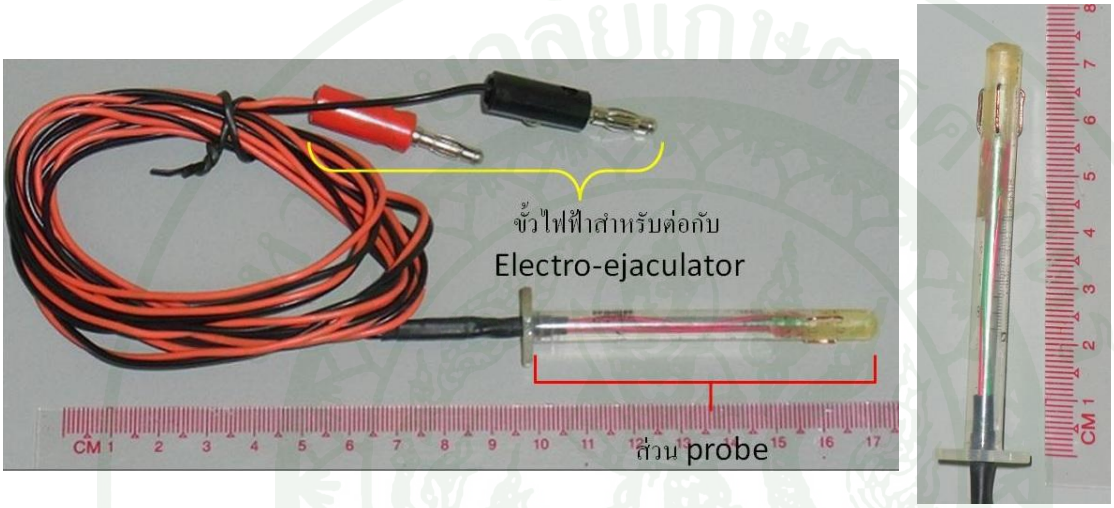
Series	Stimulating voltage (V.)	Stimulating time (second)	Resting time (second)
1	5	3	3
	6	3	3
	7	3	3
	Resting period	-	5 minutes
2	6	3	3
	7	3	3
	8	3	3
	Resting period	-	5 minutes
3	8	3	3
	9	3	3
	10	3	3

การรีดเก็บน้ำเชื้อด้วยเครื่องกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อด้วยไฟฟ้า

นกถูกทำให้สลบด้วยยาดมสลบ Isofurane ซึ่งเป็นวิธีที่ปลอดภัยต่อสัตว์ปีก (Gunkel and Lafortune, 2005; Escobar *et al*., 2011) นกถูกระงับความรู้สึกและจัดอยู่ในท่านอนหงายอยู่บนแผ่นให้ความอบอุ่นตลอดการรีดเก็บน้ำเชื้อ ตัดขนบริเวณรอบช่องทวารร่วมออกเพื่อความสะอาดและความสะดวกในการเก็บน้ำเชื้อ จากนั้นจึงใช้ normal saline, pH 8 สวนล้างช่องทวารร่วมเพื่อทำความสะอาดและลดการปนเปื้อนของสิ่งขับถ่าย ซึ่งการใช้ normal saline ที่มี pH 8 จะช่วยให้อสุจิมีการเคลื่อนที่ดีกว่าที่ pH 7 (Blanco *et al*., 2002) และใช้เครื่องกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อด้วยไฟฟ้าส่งกระแสไฟฟ้าผ่านแท่งโพรบที่ประดิษฐ์จากไซริงค์ขนาด 1มิลลิลิตร (NIPRO®) และไส้ปากกาลูกลื่น ในนกกาฮังใช้โพรบที่ประดิษฐ์จากไซริงค์โดยส่วนปลายของโพรบมีลวดทอง แดงเป็นตัวนำไฟฟ้า 3 แถบ (longitudinal electrode) โดยมีขั้วบวกอยู่ในแนวกลาง 1

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แถบ และขนาบด้วยขั้วลบ 2 แถบ ดังภาพที่ 8 ในขณะที่นกแก๊กจะใช้โพรบที่ประดิษฐ์จากไส้ปากกาลูกลื่น ซึ่งมีลักษณะเป็นวงแหวน (ring electrode) 2 ขั้ว โดยขั้วบวกอยู่ที่ส่วนปลายสุด และถัดมาอีกหนึ่งเซนติเมตร เป็นขั้วลบ ซึ่งมีลักษณะเป็นวงแหวน ดังภาพที่ 9 สอดแท่งกระตุ้นเข้าช่องทวารร่วมโดยหันด้านลวดทองแดงเข้าทางด้านบนของช่องว่างลำตัว (dorsal body wall)



ภาพที่ 8 ลักษณะโพรบที่ใช้รีดน้ำเชื้อในนกกาฮัง

ภาพที่ 9 ลักษณะโพรบที่ใช้รีดน้ำเชื้อในนกแก๊ก

เมื่อมีการหลั่งน้ำเชื้อจะใช้ไมโครปิเปตดูดโดยตรงจาก phallus และพยายามหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนอุจจาระหรือปัสสาวะที่อาจมีการหลั่งออกมาพร้อมน้ำเชื้อ น้ำเชื้อที่ได้จะถูกเก็บไว้ใน microtube เมื่อรีดเก็บน้ำเชื้อเสร็จจะใส่ยาปฏิชีวนะแบบครีม (gentamycin cream) เข้าไปในช่องทวารร่วม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลาการเก็บข้อมูล

การรีดเก็บน้ำเชื้อนกกาฮัง เริ่มเก็บข้อมูลตั้งแต่ต้นเดือนพฤศจิกายน 2554 ถึงปลายเดือนมกราคม 2555 ส่วนนกแก๊กเก็บข้อมูลในช่วงปลายเดือนมกราคม 2555 ถึงสิ้นเดือนพฤษภาคม 2555 โดยนกทั้งสองชนิดมีความถี่ในการรีดเก็บน้ำเชื้อทุก 14-21 วัน

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

น้ำเชื้อที่เก็บได้จากช่องทวารร่วม น้ำเชื้อจะถูกผสมลงในสารละลาย Modified Tyrode's medium (TALP) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร แล้วนำไปตรวจคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น ซึ่งประกอบด้วย

- วัดปริมาตรน้ำเชื้อ (ไมโครลิตร) โดยลบออก 100 ไมโครลิตร ซึ่งเป็นปริมาตรของ TALP
- วัดความเป็นกรด-ด่าง (pH) ก่อนถูกเจือจางในสารละลาย TALP (Sontakke *et al*., 2004) โดยใช้กระดาษลิตมัส
- ตรวจนับตัวอสุจิเป็นและตายด้วยกล้องจุลทรรศน์ Olympus CH B145-2 (×100) โดยการย้อมสี Eosin-Nigrosin (200 sperms/slide)
- น้ำเชื้อที่เจือจางด้วย TALP แล้วจะถูกเติมลงใน 4% paraformaldehyde เพื่อนำไปตรวจนับอัตราส่วนของอสุจิที่มีรูปร่างปกติ โดยการย้อมด้วยสี Coomassie blue (200 sperms/slide)
- วัดความเข้มข้นของอสุจิด้วย Hematocytometer และนำมาคำนวณกลับ จากการเจือจางด้วย TALP 100 ไมโครลิตร โดยมีอัตราส่วนของการเจือจาง = [ปริมาตรทั้งหมด / (ปริมาตรทั้งหมด-100)]
- วัดความยาวของตัวอสุจิซึ่งถูกย้อมด้วยสี Coomassie blue (20 sperms/bird) (×100) โดยวัดความยาวของ head, mid-piece, tail และวัดความกว้างส่วน head ใช้โปรแกรม Cell* soft image system กล้อง Olympus Model CX 31RBSFA
- ศึกษาลักษณะ (morphology) ของอสุจิ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน

นำตัวอย่างน้ำเชื้อสดผสมใน 2.5% glutaraldehyde นาน 3 ชั่วโมง ก่อนปั่นเหวี่ยงที่ 400 g นาน 5 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง แล้วดูดเก็บตะกอนใส่ใน phosphate-buffered นำไป fixed ด้วย 1% osmium tetroxide (0.1M, pH 7.3) กำจัดน้ำออกด้วยการผ่านแอลกอฮอล์ (70-100%) จากนั้นเข้าสู่กระบวนการ critical point drying และนำตัวอย่างที่ได้ไปวางบนกระดาษคาร์บอนที่ติดอยู่บนแท่นวางก่อนนำไปผ่านขั้นตอน gold-coated ตรวจดูตัวอย่างด้วยกล้อง JEOL รุ่น JSM 5600LV

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น รูปร่างของอสุจิของนกแต่ละตัว ความยาวและความกว้างของอสุจินกแก๊ก ใช้หลักการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย Two-way analysis of variance (ANOVA) (Saunders and Trapp, 1994)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

ผล

นกกาฮัง คุณภาพของน้ำเชื้อและรูปร่างอสุจิ

สามารถใช้ Electro-ejaculator กระตุ้นผ่านทางช่องทวารร่วมด้วยการใช้โพรบที่ดัดแปลงจากไซริงค์ขนาด 1 มิลลิลิตร และเหนี่ยวนำให้มีให้มีการหลั่งน้ำเชื้อได้ในนกกาฮังบางตัว โดยนกทุกตัวปลอดภัยจากการรีดเก็บน้ำเชื้อ การรีดเก็บน้ำเชื้อในนกกาฮังเริ่มทำการเก็บข้อมูลตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2554 ถึงเดือนพฤษภาคม 2555 สามารถเก็บน้ำเชื้อได้ 6 ตัว จากนกกาฮังทั้งหมด 8 ตัว (GH1-GH8) (10/31 ครั้ง คิดเป็น 32.2%) โดยในช่วงฤดูผสมพันธุ์สามารถรีดเก็บน้ำเชื้อได้จากนก 5 ตัว ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 รูปร่างอสุจิของนกกาฮังจำนวน 5 ตัว

ID	Date	Total sperms (sperms)	Spindle shaped (%)	Cylindrical shaped (%)	Paddle shaped (%)
GH1	25 Nov. 2011	13	0.0	76.9	23.0
	8 Dec. 2011	669	0.0	0.3	99.7
	21 Dec. 2011	NA	NA	NA	NA
GH2	25 Nov. 2011	6	0.0	50.0	50.0
	8 Dec. 2011	1337	0.0	1.3	98.6
	21 Dec. 2011	NA	0.0	NA	NA
GH4	21 Dec.2011	561	5.8	94.2	0.0
	4 Jan. 2011	1506	99.6	0.3	0.0
GH6	21 Dec. 2011	188	0.5	6.9	92.5
GH7	25 Nov. 2011	778	0.0	0.0	100

NA - not available.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในช่วงแรกของการเก็บข้อมูลน้ำเชื้อจากนกกาฮัง ไม่สามารถนำน้ำเชื้อมาประเมินคุณภาพได้ เนื่องจากปริมาณของน้ำเชื้อมีน้อยมากและไม่มีการเจือจางน้ำเชื้อด้วยวิธีใดๆ จึงนำน้ำเชื้อที่ได้มาตรวจดูรูปร่างของอสุจิ จากการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า สามารถจัดแบ่งรูปร่างอสุจิที่พบได้ 3 แบบ คือ ทรงกระสวย (spindle shape) ทรงกระบอก (cylindrical shape) และทรงใบพาย (paddle shape) ดังตารางที่ 5 โดย spindle shape เกือบจะพบในนกกาฮังหมายเลข 4 เพียงตัวเดียวจาก 5 ตัว ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์สูงถึง 99.6% โดยเป็นน้ำเชื้อที่ถูกรีดเก็บในช่วงต้นเดือนมกราคม และพบ cylindrical shape มีเปอร์เซ็นต์สูงในนกกาฮังตัวหมายเลข 1 (76.9%) หมายเลข 2 (50.0%) หมายเลข 4 (94.2%) และพบ paddle shape มีเปอร์เซ็นต์สูงในนกกาฮังหมายเลข 1 (99.7%) หมายเลข 2 (98.6%) หมายเลข 6 (100%) และหมายเลข 7 (92.5%) ทั้งนี้จำนวนอสุจิทั้งหมด (total sperm) ของนกแต่ละตัว ในแต่ละครั้ง มีความแตกต่างกันมากซึ่งอาจเป็นผลจากความสมบูรณ์พันธุ์ของตัวนกเอง หรือเทคนิคในการดูดเก็บน้ำเชื้อที่อาจส่งผลต่อจำนวนอสุจิ

จากบันทึกการเก็บข้อมูลของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว พบว่านกกาฮังที่อยู่ในสวนสัตว์มีพฤติกรรมการผสมพันธุ์ตั้งแต่เดือนธันวาคม และจะไม่พบพฤติกรรมการผสมพันธุ์หลังจากผ่านเดือนมกราคมไปแล้ว ในการเก็บข้อมูลจึงได้สุ่มนกกาฮังเพื่อตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้ออีกครั้งในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนพฤษภาคม เดือนละ 1 ครั้ง ซึ่งสามารถรีดเก็บน้ำเชื้อได้ในเดือนเมษายน และเดือนพฤษภาคมเท่านั้น โดยเป็นข้อมูลของนกกาฮังหมายเลข 3 การรีดเก็บน้ำเชื้อช่วงนี้ น้ำเชื้อสดจะถูกนำไปผสมในสารละลาย TALP ทันทีที่รีดเก็บได้ เพื่อเจือจางน้ำเชื้อและเพื่อให้สะดวกต่อการนำไปประเมินคุณภาพต่อไป

นกกาฮังหมายเลข 3 สามารถรีดเก็บน้ำเชื้อได้ 2 จาก 4 ครั้ง (เฉลี่ยเดือนละ 1 ครั้งระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนพฤษภาคม) จากการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น และรูปร่างของอสุจิ พบว่าค่าเฉลี่ย (mean±SD) ของปริมาณน้ำเชื้อ (semen volume) มีค่า 6.5±2.1µl อสุจิที่เคลื่อนที่ (sperm motility) มีค่า 70.0±0.0% ความเข้มข้นเฉลี่ยของน้ำเชื้อ (concentration) มีค่า $6.9\pm0.9\times10^{9}$sperm/ml อสุจิรูปร่างปกติ (normal sperm) มีค่า 87.2±2.5% อสุจิที่ตาย (dead sperm) มีค่า 6.0±4.2% อสุจิที่ไม่มี acrosome (detached acrosome) มีค่า 6.5±4.2% และเมื่อพิจารณารูปร่างของอสุจิที่ผิดปกติ พบ bent mid piece มีเปอร์เซ็นต์สูงกว่ารูปร่างอื่นๆ และ short head เป็นรูปร่างผิดปกติที่พบรองลงมา ดังตารางที่ 6

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 6 คุณภาพน้ำเชื้อ และรูปร่างอสุจิของนกกาฮังหมายเลข 3

	Date of experiment		
Parameter	**Apr. 24, 2012**	**May. 29, 2012**	**Mean±SD**
Semen volume (µl)	8.0	5.0	6.5±2.1
Sperm motility (%)	70.0	70.0	70.0±0.0
Concentration ($\times 10^9$)	6.3	7.6	6.9±0.9
Normal sperm (%)	89.0	85.5	87.2±2.5
Dead sperm (%)	3.0	9.0	6.0±4.2
Detached acrosome (%)	3.5	9.5	6.5±4.2
Morphological abnormal sperm (%)			
Amorphous	0.0	0.0	-
Bent head	0.5	0.0	-
Short head	3.0	3.0	-
Mammal head	0.0	1.0	-
Long head	0.0	0.0	-
Giant head	0.5	0.0	-
Double head	0.0	0.0	-
Bent mid piece	3.5	8.0	-
Coil tail	1.0	1.0	-
Multiple tail	2.5	0.5	-
Bent tail	0.0	1.0	-
Megasperm	0.0	0.0	-

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นกแก๊ก คุณภาพของน้ำเชื้อ, รูปร่างและขนาดของอสุจิ

สามารถใช้ Electro-ejaculator กระตุ้นผ่านทางช่องทวารร่วมด้วยการใช้โพรบที่ดัดแปลงจากไส้ปากกาลูกลื่น และเหนี่ยวนำให้มีให้มีการหลั่งน้ำเชื้อได้ในนกแก๊กทุกตัวที่ทำการศึกษา โดยนกทุกตัวปลอดภัยจากการรีดเก็บน้ำเชื้อ จากบันทึกการเก็บข้อมูลของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว นกแก๊กมีพฤติกรรมการเข้าโพรงเทียมในกรงเลี้ยงตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ ดังนั้นจึงทำการรีดเก็บน้ำเชื้อตั้งแต่เดือนมกราคมถึงเดือนพฤษภาคม (รวมทั้งสิ้น 26 ครั้ง) แต่สามารถรีดเก็บน้ำเชื้อได้ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนมีนาคม (16/26 ครั้ง คิดเป็น 61.5%) โดยได้น้ำเชื้อจากนกทั้ง 4 ตัว (OP1-OP4) น้ำเชื้อสดจะถูกนำไปผสมในสารละลาย TALP ทันทีที่รีดเก็บได้เช่นเดียวกับนกกาฮัง เพื่อเจือจางน้ำเชื้อและสะดวกต่อการนำไปประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

ตารางที่ 7 คุณภาพน้ำเชื้อของนกแก๊ก

Semen quality parameter		Mean±SD				
	Range	OP1	OP2	OP3	OP4	Average N=16
Semen volume (µl)	16-220	51.2±30.9	56.0±39.1	31.7±10.3	132.7±87.0	68.7±61.2
pH	6-7	7.0±0.0	6.8±0.3	7.0	6.5±0.5	6.8±0.3
Sperm motility (%)	40-80	60.0±14.1	61.7±10.4	80.0	43.3±5.8	57.7±14.4
Concentration ($\times 10^9$)	0.02-5.59	2.0±2.8	3.2±3.4	2.5	1.5±2.5	2.2±2.3
Normal sperm (%)	87-95	90.0±2.8	91.7±2.2	91.7±4.6	87.0	90.7±2.9
Dead sperm (%)	1.5-43.5	10.1±10.2	24.4±16.9	18.9±4.4	23.8±14.2	18.6±12.7
Detached acrosome (%)	0-7	5.0±1.8	3.5±0.7	3.0	2.0±2.8	3.6±1.9

จากตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ย (mean±SD) ปริมาณน้ำเชื้อนกแก๊กมีค่า 68.7±61.2µl pH มีค่า 6.8±0.3 อสุจิที่เคลื่อนที่มีค่า 57.7±14.4% ความเข้มข้นเฉลี่ยของน้ำเชื้อมีค่า 2.2±2.3$\times 10^9$sperm/ml อสุจิรูปร่างปกติมีค่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

90.7±2.9% อสุจิที่ตายมีค่า 18.6±12.7% อสุจิที่ไม่มี acrosome มีค่า 3.6±1.9% และไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างนกแต่ละตัว (p>0.05)

การศึกษารูปร่างของอสุจิ สามารถเก็บข้อมูลได้จากนกทั้ง 4 ตัว (N=8) โดยนกแก๊กหมายเลข 4 เก็บได้ 1 ครั้ง หมายเลข 1 และหมายเลข 3 เก็บได้ตัวละ 2 ครั้ง และหมายเลข 2 เก็บได้ 3 ครั้ง เปอร์เซ็นต์ของรูปร่างอสุจิแบบต่างๆในนกแต่ละตัว และค่าเฉลี่ยรวม แสดงดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 รูปร่างอสุจิของนกแก๊ก

Sperm Morphology (%)	Bird ID				Average
	OP1	OP2	OP3	OP4	N=8
Normal sperm	90.0	91.7	91.7	87.0	90.7
Amorphous	0.0[a]	0.0[a]	0.0[a]	1.5[b]	0.2
Bent head	0.2	0.5	1.5	1.5	0.8
Short head	0.5	2.2	1.7	0.0	1.4
Mammal head	0.0	1.0	0.7	0.0	0.6
Long Head	0.0	0.0	0.2	0.0	0.1
Giant head	0.5	0.0	0.0	0.5	0.2
Double head	0.0	0.8	0.0	0.0	0.3
Bent mid piece	7.0	2.2	3.7	9.5	4.7
Coil Tail	0.0	0.3	0.0	0.0	0.1
Multiple tails	0.2	1.2	0.0	0.0	0.5
Bent tail	0.7	0.0	0.2	0.0	0.2
Megasperm	0.7	0.2	0.0	0.0	0.2

a, b superscript indicate that the values are significantly different; p<0.05

จากตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยอสุจิที่มีรูปร่างปกติมีค่าสูงถึง 90.7% โดยไม่พบความแตกต่างทางสถิติในนกแต่ละตัว ในขณะที่อสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ของรูปร่าง amorphous เนื่องจากมีนกหมายเลข 4 เพียงตัวเดียวที่พบอสุจิรูปร่าง amorphous (1.5%) ทั้งนี้ bent head และ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

bent mid piece สามารถพบได้ในน้ำเชื้อจากนกทุกตัว โดยค่าเฉลี่ยของ bent mid piece (4.7%) สูงกว่าความผิดปกติแบบอื่นๆ รูปร่างที่พบรองลงมาคือ short head (1.4%) ขณะที่ long head เป็นรูปร่างอสุจิที่พบน้อยที่สุด (0.1%) นอกจากนี้รูปร่างอสุจิ multiple tail สามารถพบได้ทั้งแบบที่มีสองหาง สามหาง และสี่หาง

อสุจิที่ผ่านการย้อมด้วยสี Coomassie blue จะถูกนำมาวัดขนาดของอสุจิที่มีรูปร่างปกติโดยแบ่งเป็นส่วน head (acrosome และ nucleus), mid piece และ tail ทำการวัด 20 ตัวอสุจิต่อนกหนึ่งตัว สามารถเก็บข้อมูลได้จากนกแก๊กทุกตัว ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ขนาดของอสุจินกแก๊ก

Part of sperm	Range	Mean±SD (μm)				
		OP1	OP2	OP3	OP4	Average N=80
Head length	6.51-11.8	9.1±1.6	8.9±1.2	9.0±0.7	8.9±0.8	9.0±1.12
Head width	0.64-1.61	1.0±0.2	1.0±0.1	1.0±0.1	1.1±0.1	1.0±0.1
Mid piece length	3.09-7.13	5.0±0.8 [a]	4.0±0.5 [b]	4.0±0.5 [b]	4.9±0.6 [a]	4.5±0.8
Tail length	33.91-61.3	50.5±5.5	48.4±3.5	49.3±4.5	47.7±5.7	49.0±4.9

a, b superscript indicate that the values are significantly different; $p<0.05$

จากการวัดความยาวส่วนต่างๆของอสุจินกแก๊กในตารางที่ 9 พบว่า ความยาวของส่วนหัวอสุจิ (head length) มีค่าเฉลี่ย 9.0±1.1μm ความกว้างของส่วนหัวอสุจิ (head width) มีค่าเฉลี่ย 1.0±0.1μm ความยาวของส่วน mid piece (mid piece length) มีค่าเฉลี่ย 4.5±0.8μm ความยาวของส่วนหาง (tail length) มีค่าเฉลี่ย 49.0±4.9μm และเมื่อพิจารณาค่า mid piece length พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) ระหว่างนกแก๊ก 2 กลุ่ม คือ กลุ่มแรก (หมายเลข 1 หมายเลข 4) กับ กลุ่มที่สอง (นกแก๊กหมายเลข 2 หมายเลข 3) โดยค่าอื่นๆ ไม่มีนัยสำคัญ ($p>0.05$)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

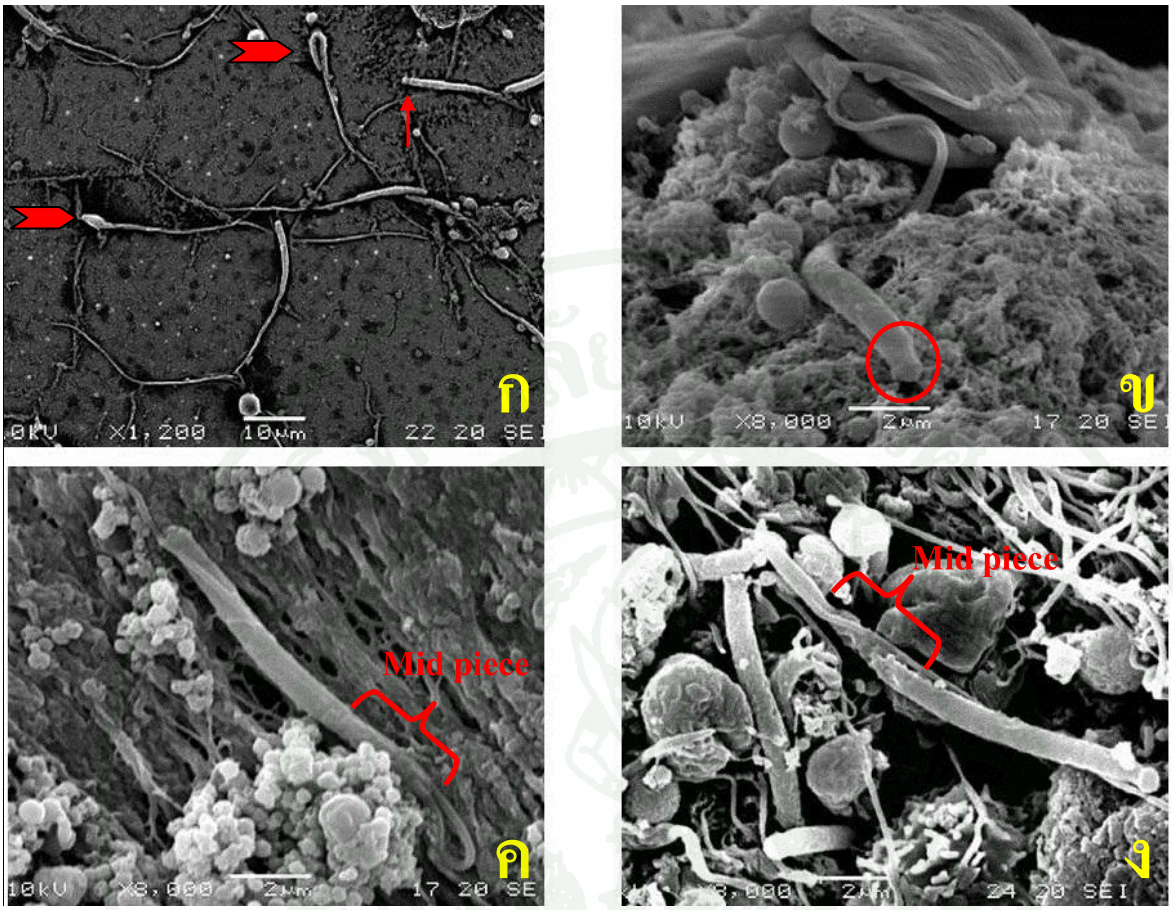
การศึกษาลักษณะของอสุจินกแก๊กด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน

การศึกษาลักษณะของอสุจินกแก๊กด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ที่กำลังขยาย 1,200 เท่า พบว่า ส่วน acrosome ของอสุจินกแก๊ก มีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆ ส่วนหัวอสุจิเป็น cylindrical shape และค่อยๆลดขนาดลงจนเป็นส่วนของหาง ปลายหางส่วน flagellum แหลม และยังพบอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติ (bent head และ short head) ปะปนอยู่ด้วย ดังภาพที่ 10ก

ที่กำลังขยาย 8,000 เท่า แสดงให้เห็นส่วน acrosome ที่มีขนาดเล็ก มีลักษณะมนเป็นครึ่งทรงกลม (sub spheroidal) ส่วน acrosome แยกออกจากนิวเคลียสของส่วนหัวได้ชัดเจน ผิวของนิวเคลียสบริเวณส่วนหัวอสุจิไม่เรียบ ดังภาพที่ 10ข

ลักษณะของส่วนหัวที่เป็น cylindrical shape อย่างชัดเจน ดังภาพที่ 10 ค และ ง ส่วน mid piece มีขนาดเล็กลงเมื่อเทียบกับขนาดของส่วนหัว พื้นผิวของ mid piece ค่อนข้างขรุขระมากเมื่อเปรียบเทียบกับพื้นผิวของส่วนหัว

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 10 ภาพถ่ายอสุจินกแก๊กจากกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน

ก (×1,200) อสุจินกแก๊กบน cover glass

พบอสุจิรูปร่างปกติมีส่วน acrosome เป็นตุ่มที่ปลายสุดของส่วนหัว (→)

อสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติ bent head และ short head (➤)

ข (×8,000) ลักษณะครึ่งทรงกลม (sub spheroidal shape) ของส่วน acrosome (o)

และพื้นผิวของนิวเคลียสที่ไม่เรียบบริเวณส่วนหัวอสุจิ

ค-ง (×8,000) ส่วนหัวอสุจิที่เป็น cylindrical shape และ mid piece ที่ขรุขระ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิจารณ์

การนวดกระตุ้นเพื่อเก็บน้ำเชื้อในนกขนาดใหญ่และไม่เชื่อง ทำให้นกมีความเครียดจากการจับบังคับ การมีสิ่งรบกวนระหว่างการรีดน้ำเชื้อจะส่งผลต่อการตอบสนองการกระตุ้น ซึ่งอาจทำให้หยุดหรือไม่หลั่งน้ำเชื้อได้ รวมทั้งอาจทำให้ปัสสาวะบ่อยขึ้น (Stelzer *et al*., 2005; Della Volpe *et al*., 2011) การออกแรงกดเพื่อนวดกระตุ้นและลักษณะทางกายวิภาคของนกทำให้มีการปนเปื้อนปัสสาวะได้ (Blanco *et al*., 2002) เนื่องจากนกไม่มี ejaculating fossa ที่แท้จริง การรีดน้ำเชื้อด้วย electro-ejaculator จะช่วยลดปัญหาดังกล่าวข้างต้นเพราะนกถูกระงับความรู้สึกด้วยการดมยาสลบจึงไม่ตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมที่รบกวน ในขณะเดียวกันวิธีนี้ยังช่วยลดการปนเปื้อนปัสสาวะได้ โดยการสวนล้างช่องทวารร่วมด้วยน้ำเกลือล้างแผลก่อนการรีดน้ำเชื้อ ตลอดจนการปลิ้นออกของ phallus เมื่อมีการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า ทำให้สามารถดูดเก็บน้ำเชื้อได้โดยตรงจาก phallus ซึ่งช่วยลดการปนเปื้อนได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามยังมีการขับถ่ายปัสสาวะได้ในระหว่างการรีดน้ำเชื้อในนกทั้งสองชนิด

การสอดโพรบเข้าช่องทวารร่วมในนกกาฮัง สามารถใส่เข้าไปได้สุดความยาวของโพรบซึ่งทำจากไซลิงค์ และวางโพรบให้ระนาบของขั้วบวกแนบติดผนังของทางเดินอาหารด้าน dorsal body wall ระหว่างการกระตุ้นด้วย electro-ejaculator สามารถขยับตำแหน่งและความลึกของโพรบให้มีความเหมาะสมกับนกกาฮังแต่ละตัวได้โดยมีความลึกประมาณ 5-7 เซนติเมตร หากตำแหน่งโพรบมีความเหมาะสมจะพบการขยับขึ้น-ลงของหาง และการขยับของขาในระหว่างการกระตุ้น การสอดโพรบไส้ปากกาในนกแก๊ก ใส่โพรบลึกประมาณ 4 เซนติเมตร ให้ส่วนปลายของโพรบซึ่งเป็นขั้วบวกสัมผัสกับทางเดินอาหารด้าน dorsal body wall และพบการตอบสนองต่อการกระตุ้นในลักษณะเดียวกันกับนกกาฮัง อย่างไรก็ตามเทคนิคการขยับตำแหน่งและความลึกของโพรบให้นก(ทั้งสองชนิด) มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นต้องอาศัยประสบการณ์ของผู้ปฏิบัติงาน

การใช้รูปแบบการกระตุ้นด้วยความต่างศักย์ต่ำที่ออกแบบไว้ พบการหลั่งน้ำเชื้อได้ทุกชุดความต่างศักย์ (series) แต่ส่วนใหญ่นกทั้งสองชนิดจะหลั่งน้ำเชื้อในระหว่างการกระตุ้นใน series 2 ซึ่งสามารถหลั่งได้ทุกความต่างศักย์ในช่วง 6-7-8 โวลต์ และนกยังคงหลั่งน้ำเชื้อได้อีกเมื่อกระตุ้นใน series ถัดไป สามารถจะรีดเก็บน้ำเชื้อนกเงือกทั้งสองชนิดได้โดยนกไม่บาดเจ็บ ถือเป็นข้อดีและแตกต่างจากการศึกษาอื่นๆก่อนหน้า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นี้ ซึ่งใช้เครื่องกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อเช่นเดียวกัน (Watanabe, 1957; Harrison and Wasmund, 1983; Kono and Hiura, 1983; Setioko and Hetzel, 1984; Samour *et al*., 1985) รูปแบบการกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อนี้สามารถรีดเก็บน้ำเชื้อนกกาฮังได้ทั้งหมด 10 จาก 31 ครั้ง โดยได้จากนกกาฮัง 6 ใน 8 ตัว ในช่วงต้นการทดลองการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อนกกาฮังทำได้เพียงการตรวจดูรูปร่างของอสุจิ เนื่องจากเทคนิคการเก็บน้ำเชื้อยังมีความเหมาะสมไม่เพียงพอ แต่เมื่อมีการปรับปรุงเทคนิคโดยการเจือจางน้ำเชื้อที่รีดได้ทันที จึงสามารถประเมินคุณภาพน้ำเชื้อได้หลังผ่านฤดูผสมพันธุ์ไปแล้ว ซึ่งแม้ว่าจะเก็บข้อมูลได้เพียงสองครั้ง แต่จากการสืบค้นงานวิจัยที่ผ่านมาไม่ปรากฏว่ามีรายงานการศึกษาใดสามารถรีดเก็บน้ำเชื้อนกกาฮังได้ การทดลองนี้จึงเป็นครั้งแรกที่สามารถรีดเก็บน้ำเชื้อนกกาฮังได้ การเก็บน้ำเชื้อด้วยไมโครปิเปตจาก phallus ต้องอาศัยประสบการณ์และเทคนิค เพราะน้ำเชื้อมีปริมาณน้อยและไม่มีจังหวะการหลั่งที่ชัดเจนเหมือนการนวดกระตุ้นท้อง การสัมผัสของ microtip กับเยื่อเมือกที่รุนแรงและการปล่อยปิเปตที่เร็วเกินไป อาจทำให้ช่องทวารร่วมช้ำแดงและน้ำเชื้อปนเปื้อนเลือด สำหรับนกแก๊กการใช้โพรบที่ดัดแปลงจากไส้ปากกาลูกลื่นเป็นขนาดที่เหมาะสมมากกว่าการใช้ commercial probe หรือโพรบไซลิงค์ ด้วยขนาดของโพรบไส้ปากกาลูกลื่นทำให้ช่องทวารร่วมมีพื้นที่ว่างให้ phallus ปลิ้นออกและหลั่งน้ำเชื้อได้ จึงดูดเก็บน้ำเชื้อนกแก๊กได้สะดวกและสามารถรีดน้ำเชื้อได้ 16 จาก 26 ครั้ง ในนกแก๊กทั้ง 4 ตัว อย่างไรก็ดีต้องมีความชำนาญในการดูดเก็บน้ำเชื้อเช่นเดียวกับนกกาฮัง

จากการเก็บข้อมูลของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ช่วงเดือนธันวาคม ถึงเดือนมกราคม เป็นฤดูกาลที่นกกาฮังในกรงเลี้ยงมีพฤติกรรมการป้อนอาหาร-ผสมพันธุ์ การไม่ทราบอายุที่แท้จริงของนกกาฮังซึ่งอาจจะมีอายุน้อยหรือมากเกินไปสำหรับการรีดเก็บน้ำเชื้อ อาจส่งผลให้รีดน้ำเชื้อไม่ได้ในบางตัว (นกกาฮังหมายเลข 5 และหมายเลข 8) โดยนกกาฮังบางตัว (นกกาฮังหมายเลข 1, 2 และ 7) สามารถเก็บน้ำเชื้อได้ตั้งแต่ครั้งแรกที่ทำการรีดน้ำเชื้อ ทั้งนี้การรีดน้ำเชื้อครั้งแรกของนกบางตัวจะไม่ได้อยู่ในวันเดียวกัน หรือ สัปดาห์เดียวกัน จึงอาจเป็นผลให้เกิดความแตกต่างของรูปร่างอสุจิระหว่างนกแต่ละตัว เป็นที่น่าสังเกตว่าการรีดน้ำเชื้อในครั้งที่สองของนกกาฮังหมายเลข 1 หมายเลข 2 และหมายเลข 4 จะได้จำนวนอสุจิมากกว่าครั้งแรก และรูปร่างของอสุจิที่พบมีการเปลี่ยนแปลงไปด้วย ซึ่งอาจเป็นเพราะการรีดน้ำเชื้อในครั้งถัดมาอยู่ในช่วงกลางฤดูผสมพันธุ์ หรืออาจเป็นลักษณะเฉพาะของนกกาฮังตัวนั้นเอง โดยนกกาฮังหมายเลข 1 และหมายเลข 2 เปลี่ยนจาก cylindrical ไปเป็น paddle shape ในขณะที่นกกาฮังหมายเลข 4 เปลี่ยนจาก cylindrical เป็น spindle shape จากตารางที่ 5 พบว่าเปอร์เซ็นต์รูปร่างต่างๆของอสุจิแตกต่างกันอย่างมากในการรีดแต่ละครั้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แม้ว่าจะเป็นนกกาฮังตัวเดิม และนกกาฮังหมายเลข 4 เกือบจะเป็นนกเพียงตัวเดียวที่มีรูปร่างอสุจิแบบ spindle shape โดยในนกกาฮังตัวอื่นๆอสุจิส่วนใหญ่มีรูปร่างแบบ paddle shape คล้ายกับ round shape ของ American kestrel (Gee *et al*., 2004)

การสุ่มตรวจน้ำเชื้อนกกาฮังหลังฤดูผสมพันธุ์พบว่า สามารถรีดน้ำเชื้อได้จากนกกาฮังหมายเลข 3 ทั้งที่ก่อนหน้าไม่สามารถรีดเก็บน้ำเชื้อได้ ซึ่งปริมาณน้ำเชื้อเฉลี่ยมีค่า 6.5±2.1µl ใกล้เคียงกับนกแก้ว Blue fronted Amazon (1-15µl; Della Volpe *et al*., 2011) แต่ต่ำกว่าเป็ด Alabio (0.14-0.18 ml; Setioko and Hetzel, 1984) และเป็ด Mallard (0.15 ml; Samour *et al*., 1985) ซึ่งในเป็ดทั้งสองชนิดใช้วิธี Electro-ejaculation เช่นเดียวกัน และปริมาณที่ได้นี้ยังต่ำกว่านกขนาดเล็กอื่นๆอย่างนก sparrow และนก canary (10 µl; Gee *et al*., 2004) เป็นไปได้ว่าปริมาณน้ำเชื้อที่น้อยมากอาจเป็นเพราะออกจากฤดูผสมพันธุ์แล้ว ความเข้มข้นเฉลี่ยน้ำเชื้อมีค่า $6.9\pm0.9\times10^{9}$ sperm/ml สูงกว่าเป็ด Alabio ($4.91\text{-}5.04\times10^{9}$sperm/ml; Setioko and Hetzel, 1984), ไก่ฟ้าหลายชนิด ($1.2\text{-}6.6\times10^{9}$sperm/ml; Jalme *et al*., 2003), นกแร้งกลุ่ม vulture ($28.4\pm30.9\times10^{6}$sperm/ml; Maddeddu *et al*., 2009) ($58.4\pm33.2\times10^{6}$sperm/ml; Umapathy *et al*., 2005) การเคลื่อนที่ของอสุจิมีค่าเฉลี่ย 70% ซึ่งสูงกว่านกหลายชนิด (Umapathy *et al*., 2005; Goes *et al*., 2010; Della Volpe *et al*., 2011) แต่หลังจากรีดเก็บได้สองครั้งนกกาฮังเพศผู้ถูกนกเพศเมียจิกตีรุนแรง จึงไม่ทำการรีดน้ำเชื้อในนกกาฮังหมายเลข 3 อีก และสิ้นสุดการเก็บข้อมูลในนกกาฮัง สำหรับปัญหาการจิกตีโดยนกเพศเมีย อาจเป็นเพราะลักษณะเฉพาะตัวของนกกาฮังคู่นั้นๆ หรืออาจเป็นเพราะนกกาฮังตัวอื่นไม่ได้มีการรีดเก็บในช่วงท้ายฤดูผสมพันธุ์ ดังนั้นการแยกนกเพศผู้ออกจากเพศเมียมาทำการรีดน้ำเชื้ออาจทำให้นกทำร้ายกันจนบาดเจ็บได้ ต้องระมัดระวังเป็นพิเศษในการปล่อยนกกลับเข้ากรงเพาะเลี้ยง

การรีดเก็บน้ำเชื้อในนกแก๊กเป็นไปได้ด้วยดี สามารถประเมินคุณภาพน้ำเชื้อได้ครบถ้วนจากนกแก๊กแต่ละตัว (ตารางที่ 7) ค่าคุณภาพน้ำเชื้อส่วนใหญ่ของนกแก๊กหมายเลข 3 ได้รับการประเมินเพียงครั้งเดียว และเมื่อพิจารณาข้อมูลคุณภาพน้ำเชื้อในนกแก๊กหมายเลข 4 พบว่า pH, motility, concentration และ normal sperm ต่ำกว่านกตัวอื่น จึงเป็นไปได้ว่าอาจมีการปนเปื้อนปัสสาวะ อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างของคุณภาพน้ำเชื้อจากนกแต่ละตัว ซึ่งน้ำเชื้อนกแก๊กที่รีดเก็บได้มีปริมาณเฉลี่ย 68.7±61.2µl ซึ่งสูงกว่าในนกพิราบ (10.5±2.6µl; Sontakke *et al*., 2004) นก Griffon vulture (12.5±9.1µl; Maddeddu *et al*., 2009) และไก่ฟ้าหลายชนิด (Jalme *et al*., 2003) ในขณะที่ค่าเฉลี่ย pH ของน้ำเชื้อนกแก๊กเท่ากับ 6.8±0.3 ใกล้เคียงกับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นกพิราบ (6.8±0.2; Sontakke *et al*., 2004) ต่ำกว่านก White back vulture (7.1±0.21; Umapathy *et al*., 2005) นกแก้วหลายชนิด (8.1-9.5; Stelzer *et al*., 2005) และไก่ฟ้าหลายชนิด (7.7-8.7; Jalme *et al*., 2003) ความเข้มข้นเฉลี่ยของน้ำเชื้อนกแก๊กจากการศึกษานี้มีค่า 2.2±2.3×10^9sperm/ml ซึ่งมีค่าสูงกว่าน้ำเชื้อนกแก๊กที่ได้รายงานไว้โดย Ng *et al*. (1998) (0.1-8.5×10^6 sperm/ml)

การตรวจรูปร่างอสุจินกแก๊ก พบว่าในการรีดแต่ละครั้งนกตัวเดียวกันให้อสุจิที่มีรูปร่างต่างกันได้ ในการเก็บข้อมูลครั้งแรกของนกแก๊ก อสุจิถูกย้อมด้วยสี Eosin-Nigrosin พบว่ามีอสุจิรูปร่าง megasperm หรือมีความผิดปกติที่ส่วนหัวในอัตราส่วนที่สูงมาก อาจเป็นเพราะอัตราส่วนผสมในสี Eosin-Nigrosin (Lukaszewicz *et al*., 2008) จึงเปลี่ยนมาใช้สี Coomassie blue ในการย้อมเพื่อประเมินรูปร่างอสุจิ ซึ่งสีชนิดนี้ช่วยทำให้การวัดขนาดส่วน mid piece ทำได้โดยง่าย เห็นขอบเขตแยกจากส่วนนิวเคลียสและส่วนหางอย่างชัดเจน เป็นที่น่าสังเกตว่า ในนกแก๊กหมายเลข 1 และหมายเลข 4 ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของรูปร่าง bent mid piece สูงกว่านกแก๊กหมายเลข 2 และหมายเลข 3 (ตารางที่ 8) อาจจะส่งผลให้ค่า mid piece length ของนกแก๊กหมายเลข 1 และหมายเลข 4 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับนกแก๊กหมายเลข 2 และหมายเลข 3 ($p<0.05$) (ตารางที่ 9) เมื่อเปรียบเทียบความยาวส่วนต่างๆของอสุจินกแก๊กที่ได้จากการศึกษานี้กับอสุจินกแก๊กที่ Ng *et al*. (1998) ได้รายงานไว้พบว่า

-Head length มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.0±1.1µm (6.51-11.8 µm) สั้นกว่าในรายงานของ Ng *et al*. (1998) (9-12µm) และส่วน head width มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.0±0.1µm (0.64-1.61µm) ซึ่งแคบกว่าในรายงานของ Ng *et al*. (1998) (2-2.5µm)

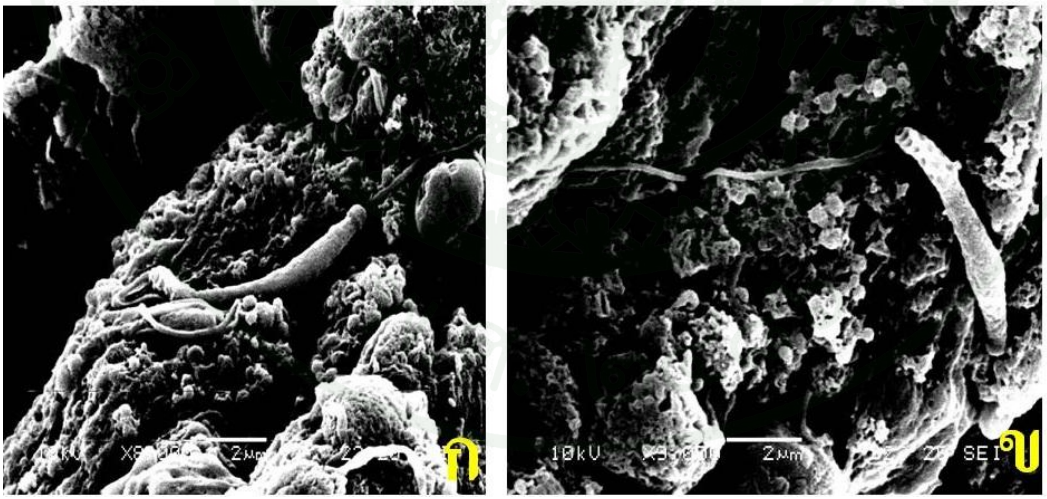
-Mid piece length มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.5±0.8µm (3.09-7.13µm) ยาวกว่าในรายงานของ Ng *et al*. (1998) (3µm)

-Tail length มีค่าเฉลี่ย 49.0±4.9µm (33.91-61.3µm) ซึ่งยาวกว่าในรายงานของ Ng *et al*. (1998) (30-32µm)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อย่างไรก็ตามการวัดขนาดของอสุจิในการศึกษานี้ วัดจากตัวอสุจิที่ย้อมด้วยสี Coomassie blue ทำให้แยกส่วนของ acrosome และ mid piece ได้อย่างชัดเจน การวัดขนาดส่วนต่างๆของอสุจิที่ย้อมด้วยสีชนิดอื่นๆอาจทำให้ข้อมูลที่ได้แตกต่างออกไปเช่น ขนาดของหัวอสุจิที่ไม่เท่ากัน เป็นต้น (Lukaszewicz *et al*., 2008)

การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อนกเงือกเพื่อการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนแบบ SEM สามารถเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อได้จากนกเงือกทั้งสองชนิด แต่ภาพถ่ายอสุจิของนกกาฮังไม่มีความชัดเจนและพบสิ่งสกปรกจำนวนมากบดบังส่วนต่างๆของอสุจินกกาฮัง จึงไม่สามารถวิเคราะห์ส่วนต่างๆของอสุจินกกาฮังได้ อย่างไรก็ตามจากภาพที่ได้ แสดงให้เห็นว่า อสุจินกกาฮังมีรูปร่างแบบ sauropsid (ภาพที่ 11) ในขณะที่ภาพถ่ายอสุจิของนกแก๊กมีความชัดเจนมากกว่า ดังนั้นต้องพัฒนาวิธีการกำจัดสิ่งสกปรกที่ปนอยู่ในเชื้อนกเงือก ก่อนที่จะเข้าสู่ขั้นตอนเตรียมตัวอย่างในห้องปฏิบัติการต่อไป เพื่อคุณภาพที่ดีขึ้นของภาพถ่ายทางกล้องจุลทรรศน์
อิเลกตรอน



ภาพที่ 11 ภาพถ่ายอสุจินกกาฮังจากกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน ก) ภาพที่มีกำลังขยาย 8,000 เท่า ข) ภาพที่มีกำลังขยาย 9,000 เท่า

จากการวิเคราะห์พบว่าอสุจินกแก๊กมีรูปร่างแบบ sauropsid คล้ายอสุจิของกลุ่มสัตว์เลื้อยคลาน และเป็นรูปแบบของอสุจิที่พบได้ในนกกลุ่ม non-passerine ซึ่งต่างจากนกกลุ่ม passerine ที่ส่วนใหญ่อสุจิเป็น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แบบ helical อย่างไรก็ตามอสุจิแบบ sauropsid มีความผันแปรของรูปร่างได้ โดยอสุจินกแก๊กมี acrosome ลักษณะกลม มน เป็น sub spheroidal shape แตกต่างจากอสุจิเป็ด (Simoes *et al*., 2011) และนกกระทาที่มี acrosome แหลมยาวเป็น conical shape (Korn *et al*., 2000) ซึ่งอสุจิของเป็ดและนกกระทาเป็นแบบ sauropsid เช่นกัน ภาพทางกล้องจุลทรรศอิเลกตรอนแสดงให้เห็นว่า อสุจินกแก๊กในส่วนนิวเคลียสมีรูปร่างยาวเป็นแบบ cylindrical shape ผิวไม่เรียบ ส่วน mid piece มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางลดลงจากส่วนหัวอสุจิเล็กน้อย และพื้นผิว mid piece ขรุขระ (ภาพที่ 10) เมื่อพิจารณารูปร่างอสุจินกแก๊กเทียบกับอสุจินกอื่นพบว่ามีลักษณะ acrosome, head, mid piece โดยรวมใกล้เคียงกันกับอสุจินกในอันดับ Charadriiformes ดังภาพที่ 7 โดยเฉพาะในวงศ์ Charadriidae เช่น นก plovers และ นก lapwings เป็นต้น ที่มีรูปร่างอสุจิแบบ cylindrical shape มี acrosome เป็น sub spheroidal shape และส่วน mid piece มีขนาดเล็กลงจากส่วนหัวอสุจิเช่นเดียวกับอสุจิของนกแก๊ก (Jamieson, 2007)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

การรีดเก็บน้ำเชื้อโดยเครื่องกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อด้วยไฟฟ้าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับนกเงือกทั้งนกกาฮังและนกแก๊ก และความต่างศักย์ที่ใช้ในการศึกษานี้มีความปลอดภัยต่อตัวสัตว์ ด้วยวิธีการนี้สามารถรีดเก็บน้ำเชื้อนกเงือกทั้งสองชนิดได้ผลเป็นที่น่าพอใจและสามารถนำมาประเมินคุณภาพตลอดจนทำการศึกษาอื่นๆได้ เช่น ศึกษาส่วนต่างๆของอสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอน เป็นต้น และสามารถใช้เป็นแนวทางในการรีดเก็บน้ำเชื้อนกเงือกชนิดอื่นได้ การประดิษฐ์โพรบที่มีขนาดและรูปร่างเหมาะสมกับขนาดของนกเงือกแต่ละชนิด จะมีประโยชน์ต่อการรีดเก็บน้ำเชื้อเพราะช่วยเพิ่มความสะดวกในการดูดเก็บน้ำเชื้อได้ เนื่องจากนกไม่มีจังหวะการหลั่งน้ำเชื้อที่ชัดเจนและน้ำเชื้อมีปริมาณน้อยมาก ดังนั้นประสบการณ์ในการรีดเก็บน้ำเชื้อนกเงือกของผู้ปฏิบัติงานจึงมีส่วนสำคัญต่อการปฏิบัติงาน นอกจากนี้การใช้ capillary tube แบบไม่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด อาจช่วยในการเก็บน้ำเชื้อจากช่องทวารร่วมได้ดียิ่งขึ้น รวมถึงการเพิ่มความถี่ของการรีดเก็บน้ำเชื้อในช่วงเวลาที่เหมาะสมของนกแต่ละชนิดจะช่วยเพิ่มโอกาสการได้น้ำเชื้อ

การเจือจางน้ำเชื้อทันทีเมื่อรีดเก็บได้ เป็นเทคนิคที่ทำให้ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อนกเงือกได้แม้ว่าน้ำเชื้อจะมีปริมาณน้อย ปริมาณน้ำเชื้อที่ตรวจวัดได้จึงอาจจะคลาดเคลื่อนจากปริมาณที่แท้จริง หากมีการปรับปรุงการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อในขั้นตอนการเจือจางน้ำเชื้อ จะทำให้การวัดปริมาณน้ำเชื้อมีความแม่นยำมากขึ้น รวมถึงการเลือกใช้สีย้อมที่มีความเหมาะสม ไม่ทำให้ขนาดและรูปร่างของอสุจิเปลี่ยนแปลงจะส่งผลให้ขนาดของอสุจิที่วัดได้มีความถูกต้องตามความเป็นจริง คุณภาพน้ำเชื้อนกเงือกที่ตรวจประเมินได้ในการศึกษานี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นของน้ำเชื้อนกเงือกในกรงเลี้ยงที่อาศัยอยู่ในประเทศไทย ดังนั้นปัจจัยด้านอาหาร สถานที่เลี้ยง การจัดการต่างๆ อาจส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ ข้อมูลคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นของนกเงือกทั้งสองชนิดที่ได้นี้ จะเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนการจับคู่ผสมพันธุ์ของนกเงือกในกรงเลี้ยงที่อยู่ในสวนสัตว์เปิดเขาเขียวได้ในอนาคต

การศึกษารูปร่างของอสุจินกเงือกทั้งสองชนิดโดยกล้องจุลทรรศน์พบว่า รูปร่างอสุจิของนกเงือกทั้งสองชนิดเข้ากันได้กับอสุจิแบบ sauropsid ซึ่งเป็นของนกในกลุ่ม non-passerine การศึกษารูปร่างและส่วนต่างๆของอสุจิในสัตว์ปีก ไม่เคยมีรายงานการศึกษาอสุจิของนกเงือกด้วยภาพถ่ายทางกล้องจุลทรรศน์อิเลก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตรอนมาก่อน ดังนั้นภาพที่ได้จึงเป็นการเปิดเผยให้เห็นถึงลักษณะที่แท้จริงของอสุจินกเงือกโดยเฉพาะอสุจิของนกแก๊ก ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับอสุจินกในวงศ์ Charadriidae ทั้งนี้ต้องศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับวิธีการกำจัดสิ่งสกปรกในน้ำเชื้อ เพื่อภาพทางกล้องจุลทรรศน์อิเลกตรอนที่ชัดเจน

อย่างไรก็ตามต้องมีการพัฒนาเทคนิคในการรีดน้ำเชื้อนกเงือกด้วยเครื่องกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อด้วยไฟฟ้าให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นและเพื่อให้สามารถนำไปใช้กับนกเงือกชนิดอื่นได้ ความสามารถในการรีดเก็บน้ำเชื้อนกได้ด้วยวิธีการนี้อาจนำไปประยุกต์ใช้กับนกอื่นๆที่ไม่เชื่องและดุร้ายได้ องค์ความรู้ที่ได้นี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาเทคโนโลยีทางการสืบพันธุ์ โดยเฉพาะเทคโนโลยีการผสมเทียมสัตว์ปีกในอนาคตได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2555. **โครงการศึกษาชีววิทยาและนิเวศวิทยาของนกเงือก**. แหล่งที่มา: http://www.sc.mahidol.ac.th/tha/research/thai_hornbill.htm**,** 15 กันยายน 2555.

Aire, T.A. 2007. Anatomy of the testis and male reproductive tract, pp. 37-113. *In* B.G.M. Jamieson, ed. **Reproductive biology and Phylogeny of birds**, Vol. 6a. Science Publishers, USA.

_____. 2007. Spermatogenesis and testicular cycles, pp. 279-347. *In* B.G.M. Jamieson, ed. **Reproductive biology and Phylogeny of birds**, Vol. 6a. Science Publishers, USA.

Akins, C.A. and M. Burns. 2012. **Visual Control of Sexual Behavior**. Available source: http://www.pigeon.psy.tufts.edu/avc/akins/, September 15, 2012.

Anderson, S.J., D.M. Bird and M.D. Hagen. 2002. Semen characteristics of the Quaker parakeet (*Myiopsitta monachus*). **Zoo Biology** 21: 507–513.

Anonymous. n.d. **Spermatogenesis**. Available source: http://bio1152.nicerweb.com/Locked/media/ch46/spermatogenesis.html**,** September 15, 2012.

Bentley, G.E., K. Tsutsui and J.C. Wingfield. 2007. Endocrinology of reproduction, pp. 181-241. *In* B.G.M. Jamieson, ed. **Reproductive biology and Phylogeny of birds**, Vol. 6a. Science Publishers, USA.

Blanco, J.M., G.F. Gee, D.E. Wildt and A.M. Donoghue. 2002. Producing progeny from endangered birds of prey: treatment of urine-contaminated semen and a novel intramagnal insemination approach**. Journal of Zoo and Wildlife Medicine** 33 (1): 1–7.

_____, D.E. Wildt, U. Höfle, W. Voelker and A.M. Donoghue. 2009. Implementing artificial

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

insemination as an effective tool for *ex situ* conservation of endangered avian species. **Theriogenology**. 71 (1): 200 –213.

Brock, M.K. 1991. Semen Collection and Artificial Insemination in the Hispaniolan Parrot (*Amazona ventralis*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine** 22 (1): 107-114.

Burrows, W.H. and J.P. Quinn. 1935. A method of obtaining spermatozoa from the domestic fowl**.** **Poultry Science**. 14: 253–254.

Chaisuriyanun, S., G.A. Gale, S. Madsri and P. Poonswad. 2011. Food consumed by Great hornbill and Rhinoceros hornbill in tropical rainforest, Budo Su-Ngai Padi national park, Thailand. **The Raffles Bulletin of Zoology** 24: 123–135.

Chaiyarat, R., U. Kongprom, D. Manathamkamon, S. Wanpradab and S. Sangarang. 2011. Captive Breeding and Reintroduction of the Oriental Pied Hornbill (*Anthracoceros albirostris*) in Khao Kheow Open Zoo, Thailand. **Zoo Biology** 30: 1–11.

Chamutpong, S., D.S. Saito, N. Viseshakul, I. Nishiumi, P. Poonswad and M. Ponglikitmongkol. 2009 Isolation and characterization of microsatellite markers from the great hornbill, *Buceros bicornis*. **Molecular Ecology Resources** 9: 591–593.

Crofoot, M., M. Mace, J. Azua, E. MacDonald and N.M. Czekala. 2003. Reproductive Assessment of the Great hornbill (*Buceros bicornis*) by Fecal Hormone Analysis. **Zoo Biology** 22: 135–145.

Datta, A. and G.S. Rawat. 2004. Nest-site selection and nesting success of three hornbill species in Arunachal Pradesh, north-east India: Great Hornbill *Buceros bicornis,* Wreathed Hornbill *Aceros undulates* and Oriental Pied Hornbill *Anthracoceros albirostris*. **Bird Conservation International** 14: 39–52.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Delport, W., J.W.H. Ferguson and P. Bloomer. 2002. Characterization and Evolution of the Mitochondrial DNA Control Region in Hornbills (Bucerotiformes). **Journal of Molecular Evolution** 54: 794–806.

Escobar, A., R. Theisen, N.S. Vitaliano, E.A. Belmonte, K. Werther and C.A.A. Valadao. 2011. Cardiorespiratory effects of isofurane anesthesia in crested Caracarus (*Caracarus plancus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine** 42 (1): 12–17.

Fujihara, N. 1992. Accessory reproductive fluids and organs in male domestic birds. **World's Poultry Science Journal** 48: 39-56.

Gale, G.A. and S. Thongaree. 2006. Density estimates of nine hornbill species in a lowland forest site in southern Thailand. **Bird Conservation International** 16: 57–69.

Gee, G.F., H. Bertschinger, A.M. Donoghue, J.M. Blanco and J. Soley. 2004. Reproduction in non-domestic birds: physiology, semen collection, artificial insemination and cryopreservation. **Avian and Poultry Biology Review** 15: 47–101.

Goes, P.A.A., A.K. da S. Cavalcante, M. Nichi, E.G. de A. Perez, R.C. Barnabe and V.H. Barnabe. 2010. Reproductive Characteristics of Captive Greater Rhea (*Rhea americana*) Males Reared in the State of São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science** 12 (1): 57 – 62.

Guiliano, S., A. Director, M. Gambarotta, V. Trasorrus and M. Miragaya. 2008. Collection method, season and individual variation on seminal characteristics in the llama (*Lama glama*). **Animal Reproduction Science** 104: 359-369.

Gunkel, C. and M. Lafortune. 2005. Current techniques in avian anesthesia. **Seminars in Avian and Exotic Pet Medicine** 14 (4): 263-276.

Harrison, G.J. and D. Wasmund. 1983. Preliminary studies of electroejaculation to facilitate

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

manual semen collection in psittacines. pp. 207–213. *In* **Proceeding Annual Conference Association of Avian Veterinary**. Krakow, Poland.

Healey, P. and B.J. Weir. 1967. A Technique for electro-ejaculation in Chinchillas. **Journal of Reproductive and Fertility** 13: 585-588.

Holbrook, K.M. and T.B. Smith. 2000. Seed dispersal and movement patterns in two species of *Ceratogymna* hornbills in West African tropical lowland forest. **Oecologia** 125: 249-257.

IUCN. 2012. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2012.1. Available source: www.iucnredlist.org, September 19, 2012.

Jalme, M.S., R. Lecoq, F. Seigneurin, E. Blesbois and E. Plouzeau. 2003. Cryopreservation of semen from endangered pheasants: the step towards a cryobank for endandered avian species. **Theriogenology** 59: 875–88.

James, D.A., A. Bachan K. H. and R. Kannan. 2011. Installation of artificial nest cavities for the endangered Great hornbill: A pilot study in South India. **The Raffles Bulletin of Zoology** 24: 73–76.

Jamieson, B.G.M. 2007. Avian spermatozoa: Structure and phylogeny, pp. 349-511. *In* B.G.M. Jamieson, ed. **Reproductive biology and Phylogeny of birds**, Vol. 6a. Science Publishers, USA.

Jayaprakash, D., S.B. Patil, M.N. Kumar, K.C. Majumdar and S. Shivaji. 2001. Semen Characteristics of the Captive Indian Leopard, *Panthera pardus*. **Journal of Andrology** 22 (1): 25-33.

Kinnaird, M.F. and G.T. O'Brien. 2007. **The Ecology and Conservation of Asian Hornbills**. The university of Chicago press, London. 315 pp.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Kitamura, S. 2011. Frugivory and seed dispersal by hornbills (Bucerotidae) in tropical forests. **Acta Oecologica** 37: 531-541.

_____, T. Yumoto, N. Noma, P. Chuailua, T. Maruhashi, P. Wohandee and P. Poonswad. 2008. Aggregated seed dispersal by Wreathed hornbills at a roost site in a moist evergreen forest of Thailand. **Ecological Research** 23: 943–952.

Kirby, J.D. and D.P. Froman. 2000. Reproduction in male birds, pp. 597-615. *In* G.C. Whittow, ed. **Sturkie's Avian Physiology 5th edition**. Academic Press. San Diego.

Kongprom, U., C. Pankong, N. Pankong. 2012. Problems of great hornbill (*Buceros bicornis*) captive breeding in Khao Kheow Open Zoo, Thailand, P. 7. *In* **Proceeding of 7th International Meeting CRYOPHOENIX Project**. 17 – 20 January 2012, Phuket, Thailand.

Kono, N. and Y. Hiura. 1983. Semen collection by rectal electro-ejaculation in the domestic fowl. **Japanese Poultry Science** 20: 267-270.

_____, R.J. Thurston, B.P. Pooser and T.R. Scott. 2000. Ultrastructure of spermatozoa from Japanese quail. **Poultry Science** 79: 86-93.

Leon, H., A.A. Porras, C.S. Galina and R. N. Fietro. 1991. Effect of the collection method on semen characteristics of Zebu and European type cattle in the tropics**. Theriogenology** 36 (3): 349-355.

Lukaszewicz, E., A. Jerysz, A. Partyka and A. Siudzin´ska. 2008. Efficacy of evaluation of rooster sperm morphology using different staining methods. **Research in Veterinary Science** 85. 583–588.

Madeddu, M., F.Berlinguer, M. Ledda, G. Leoni, V. Satta, S. Succu, A. Rotta, V. Pasciu, A. Zinellu, M.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Muzzeddu, C. Carru and S. Naitana. 2009. Ejaculate collection efficiency and post-thaw semen quality in wild-caught Griffon vultures from the Sardinian population. **Reproductive Biology and Endocrinology** 7: 18.

Marco-Jime´nez, F., Puchades, S., Gadea, J., Vicente, J.S. and Viudes-de-Castro, M.P. 2005. Effect of semen collection method on pre- and post-thaw Guirra ram spermatozoa. **Theriogenology** 64: 1756–1765.

Martı´nez-Pastor, F., F. Martı´nez, M. Alvarez, A. Maroto-Morales, O. Garcı´a-Alvarez, A.J. Soler, J.J. Garde, P. de Pazd and L. Ane. 2009. Cryopreservation of Iberian red deer (*Cervus elaphus hispanicus*) spermatozoa obtained by electroejaculation. **Theriogenology** 71: 628–638.

Mollineau, W.M., A.O. Adogwa and G.W. Garcia. 2008. A preliminary technique for electro-ejaculation of agouti (*Dasyprocta leporina*). **Animal Reproduction Science** 108: 92-97.

Morin, A.P., J. Messier and D.S. Woodruff. 1994. DNA extraction, amplification and direct sequencing from hornbill feathers. **Journal of the Science Society of Thailand** 20: 31-41.

Myers, M. S. 2000. Breeding the Writhe-billed hornbill at Audubon Park and Zoological Garden. **New Orleans International Zoo Yearbook** 37: 345-354.

Ng, S.C., J. Mathews, H.M. Wong, A. Bongso and S.W.J. Seager. 1998. Characterisatoin of sperm from the Oriental Pied Hornbill *Anthracoceros albirostris convexus* collection by electroejaculation. pp. 85-92. *In* P. Poonswad, ed. **The Asian Hornbills: Ecology and Conservation**. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok.

O'Brien, J. K., D.A. Oehler, S.P. Malowski and T. L. Roth. 1999. Semen collection, characterization, and cryopreservation in a Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*). **Zoo Biology** l8: 199-214.

Okano, T., T. Murase, C.Yayota, T. Komatsu, K. Miyazawa, M. Asano and T. Tsubota. 2006.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Characteristicsof captive Japanese black bears (*Ursus thibetanus japonicus*) semen collected by electroejaculation with different voltages for stimulation and frozen-thawed under different conditions. **Animal Reproduction Science** 95: 134–143.

Pasuwan, C., S. Pattanakiat, C. Navanugraha, V. Chimchome, S. Madsri, P. Rattanarungsikul, P. Thiensongrusamee, T. Boonsriroj and P. Poonswad. 2011. An Assessment on artificial nest construction for hornbills in Budo Su-Ngai Padi national park, Thailand. **The Raffles Bulletin of Zoology** 24: 85–93.

Poonswad, P. 1995. Nest site characteristics of four sympatric species of hornbills in Khao Yai National Park, Thailand. **Ibis** 137 (2): 183–191.

_____, C. Sukkasem, S. Phataramata, S. Hayeemuida, K. Plongmai, P. Chuailua, P. Thiensongrusame and N. Jirawatkavi. 2005. Comparison of cavity modification and community involvement as strategies for hornbill conservation in Thailand. **Biological Conservation** 122: 385–393.

_____, A. Tsuji, N. Jirawatkavi and V. Chimchome. 1998. Some aspects of food and feeding ecology of sympatric hornbill species in Khao Yai national park, Thailand. pp. 137-157. *In* P. Poonswad, ed. **The Asian Hornbills: Ecology and Conservation**. Bangkok: National Center for Genetic Engineering and Biotechnology.

Pukazhenthi, B.S., G.D. Togna, L. Padilla , D. Smith, C. Sanchez, K. Pelican and O.I. Sanjur . 2011. Ejaculate Traits and Sperm Cryopreservation in the Endangered Baird's Tapir (*Tapirus bairdii*). **Journal of Andrology** 32 (3): 260-270.

Samour, J.H. 2004. Semen Collection, Spermatozoa Cryopreservation, and Artificial Insemination in Nondomestic Birds. **Journal of Avian Medicine and Surgery** 18 (4): 219–223.

_____, D.M.J. Spratt, R.E. Hutton and D.M. Jones. 1985. Studies on semen collection in

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

waterfowl by electrical stimulation. **British Veterinary Journal** 141: 265–268.

Saunders, B.D. and R.G. Trapp. 1994. **Basic and Clinical Biostatistics, 2nd edition**. Appleton & Lange, USA.

Schneiders, A., J. Sonksen and J.K. Hodges. 2004. Penile vibratory stimulation in the marmoset monkey: a practical alternative to electro-ejaculation, yielding ejaculates of enhanced quality. **Journal of Medical Primatology** 33: 98–104.

Setioko, A.R. and Hetzel, D.J.S. 1984. The effect of collection method and housing system on semen production and fertility of Alabio drakes. **British Poultry Science** 25: 167-172.

Simoes, K., A.M. Orsi and S.M.B. Artoni. 2012. Ultrastructure of spermatozoa of the domestic duck (*Anas plastyrhynchors* sp.). **Anatomia Histologia Embryologia** 41 (3): 202-208.

Sodhi, N.S. and K.G. Smith. 2007. Conservation of tropical birds: mission possible? **Journal of Ornithology** 148 (2): 305–309.

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.

Stanback, M., D. S. Richardson, C. Boix-Hinzen and J. Mendelsohn. 2002. Genetic monogamy in Monteiro's hornbill, *Tockus monteiri*. **Animal Behavior** 63: 787–793.

Stelzer, G., L. Crosta, M. Burkle and M.E. Krautwald-Junghanns. 2005. Attempted semen collection using the massage technique and semen analysis in various psittacine species. **Journal of Avian Medicine and Surgery** 19: 7–13.

Umapathy, G., S. Sontakke, A. Reddy, S. Ahmed and S. Shivaji. 2005. Semen characteristics of the

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

captive Indian white-backed vulture. **Biology of Reproduction** 73: 1039–1045.

Waldoch, J., T. Root, J. Ramer and J. Proundfoot. 2007. Semen Collection and Characterization in Rockhopper penguins (*Eudyptes Chrysocome chrysocome*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine** 38 (1): 13-17.

Watanabe, M. 1957. An improved technique of the artificial insemination in ducks. **Journal of Faculty of Fish and Animal Husbandry**. Hiroshima University. 1: 363–367.

Wong. H.M. and K. M. Nyunt. 1998. A review of the captive breeding of Asian hornbills at the Jurong birdpark, Singapore. pp. 93-97. *In* P. Poonswad, ed. **The Asian Hornbills: Ecology and Conservation**. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology. Bangkok.

Yeoman, R.R., R.B. Ricker, L.E. Williams, J. Sonsken and C.R. Abee. 1997. Vibratory Stimulation of Ejaculation Yields Increased Motile Spermatozoa, Compared with Electroejaculation, in Squirrel Monkeys *(Saimiri boliviensis)*. **Laboratory Animal Science** 36 (1): 62-64.

Zambelli, D. and M. Cunto. 2006. Semen collection in cats: Techniques and analysis. **Theriogenology** 66: 159–165.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ก

ภาพผลการทดลอง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพผนวกที่ ก1 การจัดท่าทางนกเพื่อทำการรีดน้ำเชื้อ

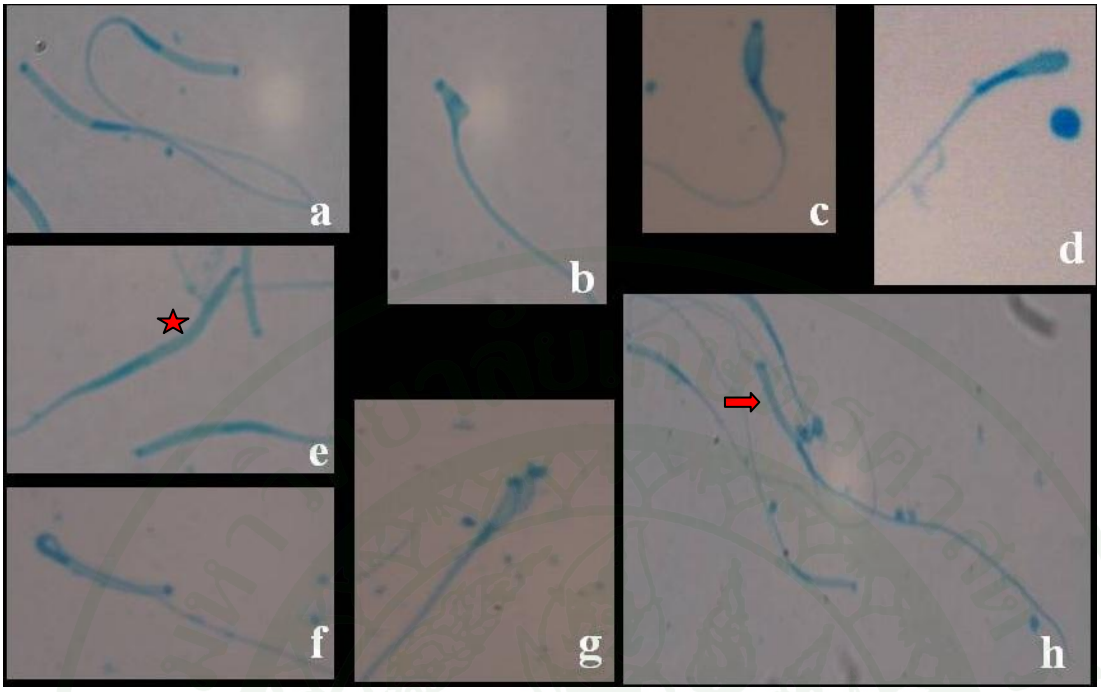
ภาพผนวกที่ ก2 การกระดกขึ้นของหางเมื่อมีการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาพผนวกที่ ก3 การดูดเก็บน้ำเชื้อด้วยปิเปตในนกแก๊ก

ภาพผนวกที่ ก4 การวัดขนาดส่วนต่างๆของอสุจินกแก๊ก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ก5 รูปร่างอสุจิของนกแก๊ก (ภาพกำลังขยาย 1000 เท่า)

a) Normal sperm

b) Amorphous head sperm

c) Short head sperm

d) Mammal head sperm

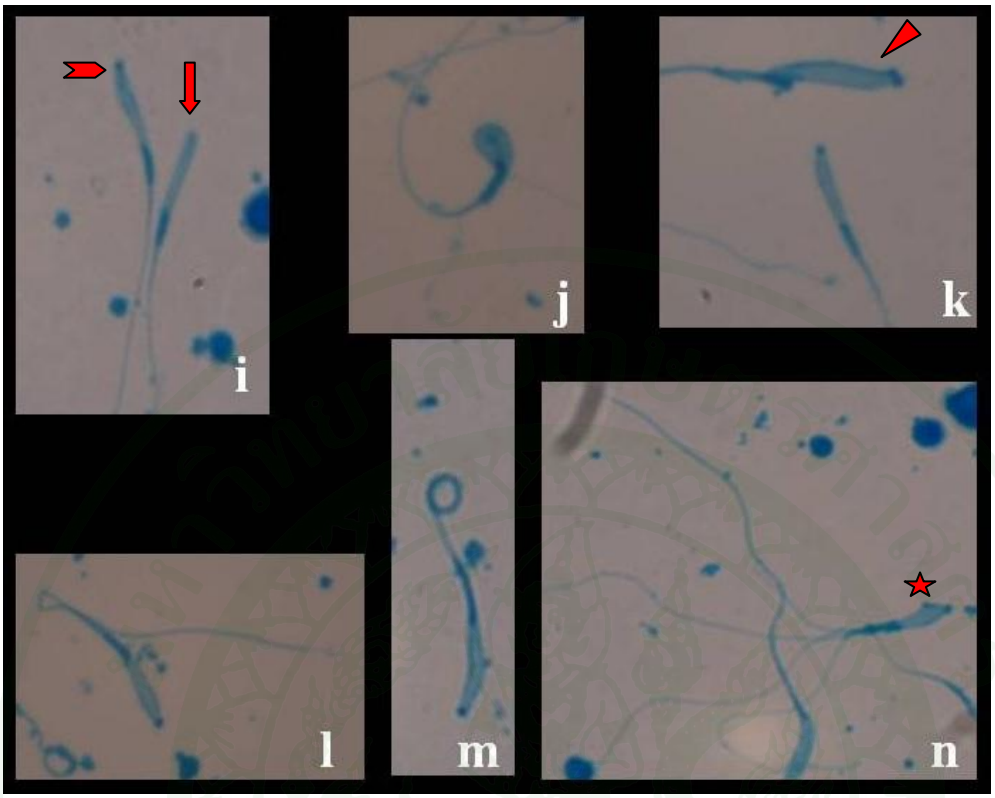
e) Long head sperm (★)

f) Bent midpiece

g) Double head sperm

h) Megasperm (➡)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพผนวกที่ ก6 รูปร่างอสุจิของนกกาฮัง (ภาพกำลังขยาย 1000 เท่า)

i) Normal sperm with intact acrosome ( )

and normal sperm with detached acrosome ( )

j) Bent head sperm

k) Giant head sperm ( )

l) Bent tail

m) Coil tail

n) Multiple tail ( )

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการเตรียมและรายละเอียดการเตรียมสารเคมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ ข1 ส่วนประกอบของ Modified Tyrode's medium

สารเคมี	ปริมาณ	หน่วย
NaCl	0.569	กรัม
KCl	0.0231	กรัม
$NaHPO_4$	0.004	กรัม
$NaHCO_3$	0.209	กรัม
$MgCl_2.6H_2O$	0.081	กรัม
$CaCl_2.2H_2O$	0.0294	กรัม
Na Pyruvate	0.0022	กรัม
D-glucose	0.09	กรัม
Na Lactate	386	ไมโครลิตร
HEPES (Na salt) M.W. 260.3	0.238	กรัม
Bovine Serum Albumin	0.6	กรัม
Penicillin G	0.0012	กรัม

ขั้นตอนการเตรียม

1 ทำการชั่งสารตามตารางผนวกที่ 1 แล้วใส่ลงในขวดที่ 1 ยกเว้น $MgCl_2.6H_2O$ และ $CaCl_2.6H_2O$ ให้แยกไว้ในขวดที่ 2 และยังไม่เติม Na Lactate, Bovine Serum Albumin

2 ทำละลายขวดที่ 1 และขวดที่ 2 เทขวดที่ 2 ลงในขวดที่ 1

3 เติม Na Lactate ตามด้วย Bovine Serum Albumin โดยไม่ต้องคนสาร รอจนกระทั่ง ละลายหมดเอง

4 ทำการปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในกระบอกตวง (cylinder) 100 มิลลิลิตร

5 ปรับ pH ให้ได้ 7.4 โดยเติม HCl หรือ NaOH

6 นำไปวัดค่าออสโมลาริตี้ โดยค่าจะอยู่ที่ 280-300 มิลลิออสโมล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7 นำไปกรองผ่านไนลอนเมสท์ (nylon mesh) ขนาด 22 ไมครอน ใส่ขวดปลอดเชื้อเก็บเข้าตู้เย็น ใช้ได้นาน 30 วัน

ขั้นตอนการเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการสีย้อม Eosin-Nigrosin stain solution

1 ใส่น้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ (Flask) ขนาด 125 มิลลิลิตรเติมโซเดียมซิเตรท 1.45 กรัม ละลายจนหมด

2 ชั่ง Eosin 0.835 กรัมและ Nigrosin 5.00 กรัม ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ คนให้ละลายเข้ากัน

3 นำสารละลายที่ได้ไปต้มในน้ำเดือดนาน 20 นาที

4 กรองด้วยกระดาษกรอง และบันทึกวันที่ข้างขวด รอให้เย็น เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นาน 30 วัน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การย้อมสี Coomassie blue ประกอบด้วยสารละลายสามอย่างดังนี้

1. Sperm fixative: 4% Paraformaldehyde

2. Sperm washing medium: 0.1 M. Ammonium acetate

3. Sperm stain: Coomassie blue stain solution

- ขั้นตอนการเตรียม 4% Paraformaldehyde ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

  Na_2HPO_4 (110mM) 7.81 กรัม

  NaH_2PO_4 (2.5mM) 0.172 กรัม

  ละลายสารข้างต้นในน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร เติม Paraformaldehyde 2 กรัม แล้วต้มที่อุณหภูมิ 50-60 °C โดยคนต่อเนื่อง สามารถปรับ pH ที่ประมาณ 8.5 ด้วย NaOH เพื่อให้ Paraformaldehyde ละลายได้ดี (ห้ามเติมขณะต้มอยู่) จากนั้นเมื่อละลายหมดแล้วจนใสให้ปรับ pH ด้วย HCl ให้เป็น 7.4 โดยใช้ pH strips ในการตรวจวัด สามารถเก็บไว้ได้นาน 3-4 เดือน ที่ 4°C

- ขั้นตอนการเตรียม Washing medium ปริมาตร 500 มิลลิลิตร
  ละลาย Ammonium acetate 3.85 กรัม ในน้ำกลั่น 450 มิลลิลิตร จากนั้นปรับ pH เป็น 9.0 ด้วย NaOH เติมน้ำกลั่นจนครบ 500 มิลลิลิตร เก็บได้นาน 6 เดือน ที่ 4°C

- ขั้นตอนการเตรียมสี Coomassie blue ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
  ใช้ Methanol 50 มิลลิลิตร, glacial acetic acid และ น้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร ผสมกันในขวดแก้ว เติม Coomassie blue G-250 (Fisher Scientific, Ca#BP101-25) 0.22 กรัม ลงไปแล้วคนให้ละลาย เก็บรักษาในตู้เย็นได้นาน 6 เดือน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการย้อมสี Coomassie blue

1. เติมน้ำเชื้อที่เจือจางแล้ว10 µl ใน 4% Paraformaldehyde 0.5 มิลลิลิตร (เก็บที่ 4°C จนกว่าจะนำไปย้อมสี) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 rpm นาน 8 นาที

2. ทิ้ง supernatant แล้วค่อยๆเติม Ammonium acetate 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 5000 rpm นาน 8 นาที

3. ทำซ้ำข้อ2.

4. ทิ้ง supernatant โดยเหลือตัวอย่างไว้ 30-50 µl เพื่อใช้ละลายตะกอน

5. หยดสารละลาย 10-20 µl ลงบนสไลด์ที่ผ่านการเย็น 4°C แล้ว smear ปล่อยทิ้งไว้ให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง

6. หยดสี Coomassie blue ที่เตรียมไว้แล้วบนตัวอย่าง ทิ้งไว้นาน 1-1.30 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำเปล่า ผึ่งให้แห้ง จึงนำไปตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ	นายณฐวุฒิ คณาติยานนท์
เกิดวันที่	4 กันยายน 2522
สถานที่เกิด	อำเภอพญาไท จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตำแหน่งปัจจุบัน	สัตวแพทย์ประจำสถานพยาบาลสัตว์
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	สถานพยาบาลสัตว์ ซีคอน เพ็ทพาร์ค คลินิก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์