# กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2552-2554 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยี สุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการวิจัย ขอขอบคุณฟาร์มมหาวิทยาลัย เทคโนโลยีสุรนารี ผศ.น.สพ.ดร.บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์ หัวหน้าโครงการวิจัยไก่เนื้อโคราช และคุณธีระชัย ช่อไม้ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์กบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ และสัตว์ทดลอง ตลอดจนนักวิชาการ และเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์กบินทร์บุรีทุกๆ ท่าน ที่ได้มีส่วนช่วยให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย
กันยายน 2556

# บทคัดย่อ

การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวโดยวิธีการแช่แข็ง แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 การทดลองดังนี้ 1) ผลของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวแบบระยะสั้น 2) ผลของสาร extender และสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งและ 3) ผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางโดยวิธีการแช่แข็ง

สำหรับการทดลองที่ 1 ศึกษาผลของสาร extender 5 ชนิด ได้แก่ Modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่างๆ (300, 350 และ 400 mOsm/kg), Beltville Poultry Semen Extender (BPSE), Lake's diluent, IGGKP และ EK โดยใช้ 0.9% NaCl ร่วมกับ 0.2% glucose เป็นตัวควบคุม ทำการเจือจางน้ำเชื้อด้วยสาร extender แต่ละชนิด และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-5°C ในตู้เย็นจากนั้นทำการทดสอบผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1 ถึง 7 วัน จากนั้นทำการเลือกสาร extender ที่ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่มากกว่า 60% ซึ่งได้แก่ BPSE, Lake's diluent และ Modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300, 350 และ 400 mOsm/kg โดยใช้ 0.9%NaCl+ 0.2%glucose เป็นตัวควบคุม นำสารมาทดสอบอัตราการผสมติดที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1 ถึง 5 วัน จากการศึกษาพบว่า ระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการผสมติดลดลง ($P<0.05$) การเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ระยะเวลา 1 วัน เมื่อใช้สาร Modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 และ 400 mOsm/kg ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าสาร extender ชนิดอื่นๆ ที่ใช้ในการศึกษา ($P<0.05$) เมื่อใช้สาร Modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm/kg มีผลทำให้อัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมและการใช้ BPSE, Lake's diluent, IGGKP และ EK ($P<0.05$) เมื่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ระยะเวลา 1 วันพบว่าการใช้ สาร Modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm/kg ให้ผลอัตราการผสมติดสูงที่สุด (100±0.00%) ซึ่งไม่แตกต่างกับการใช้สาร Modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm/kg และ BPSE ($P>0.05$) สำหรับกลุ่มควบคุมให้ผลอัตราการผสมติดต่ำที่สุด (33.33±7.07%) ($P<0.05$) เมื่อทำการเก็บรักษาระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น 2 ถึง 3 วัน พบว่าการใช้สาร Modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่างๆ (300, 350 และ 400 mOsm/kg) ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการผสมติดสูงกว่าการใช้สาร extender ชนิดอื่นๆ ที่ใช้ในการศึกษา ($P<0.05$) แต่สาร extender ที่ใช้ในการศึกษาไม่มีผลต่ออัตราการมีชีวิต ($P>0.05$)

การทดลองที่ 2 ศึกษาชนิดของสาร extender และสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้สาร extender 3 ชนิด ได้แก่ สาร Modified extender 300 mOsm/kg, BPSE และ Lake's diluent ร่วมกับสาร cryoprotectant 4 ชนิด ได้แก่ 6%DMA, 6%DMF, 10%DMSO และ 11%Glycerol และเก็บรักษาน้ำเชื้อในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปทดสอบอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิต พบว่าการใช้สาร extender ร่วมกับสาร cryoprotectant ทุกชนิดให้ผลอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิตต่ำกว่าน้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดของสาร cryoprotectant มีอิทธิพลร่วมกัน (Interaction) กับสาร extender ($P<0.05$)

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ 2 แบบ ได้แก่ การลดอุณหภูมิโดยใช้ Freezer control และการลดอุณหภูมิโดยวิธีอังไอไนโตรเจนเหลว ($LN_2$ Vapour) พบว่าการลดอุณหภูมิด้วย Freezer

control ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่รวม (38.67±3.84) อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (14.33±4.91) และอัตราการมีชีวิต(57.00±2.65) ซึ่งสูงกว่าและแตกต่าง ($P<0.05$) จากการใช้วิธีการลดอุณหภูมิโดยวิธีการอังไอไนโตรเจนเหลว

# ABSTRACT

This study examined the feasibility of cryopreservation of Thai indigenous chicken (Leung Hang Kao) spermatozoa. Three major experiments were carried out. The first experiment was to determine the effect of extenders on short-term storage of Thai indigenous chicken (Leung Hang Kao) spermatozoa. The second experiment was to investigate the effect of extender and cryoprotectant on cryopreservation of Thai indigenous chicken sperm. The third experiment was to examine the effect of freezing method on cryopreservation of Thai indigenous sperm.

The effects of five extenders (Modified extender with osmotic pressure 300, 350 and 400 mOsm/kg, Beltsville Poultry Semen (BPSE), Lake's diluted, IGGKP and EK) on the short-term storage of Thai indigenous chicken (Leung Hang Kao) sperm were investigated. Fresh semen, which diluted with 0.9% NaCl and 0.2% glucose, was used as a control. Sperm samples were diluted with each extender and stored for 1 to 7 days at 4-5 $^{\circ}$C, motility and viability rates were assessed. The extender, which yielding good motility rate (more than 60 percentages) after storage for one day, was used as a diluent for fertilization trial. These extenders were included (Modified extender with osmotic pressure of 300, 350 and 400 mOsm/kg, BPSE and Lake's diluent). With increasing storage time, the motility rate, viability rate and fertility rate among treatments were decreased ($P<0.05$). After day one storage, the sperm diluted with Modified extender with osmotic pressure 350 and 400 mOsm/kg were resulted in significantly higher motility rates than that of the other treatments ($P<0.05$). The extenders used did not affect viability rates during storage for three days ($P>0.05$), except Modified extender with osmotic pressure 300 and 400 mOsm/kg in which viability rates were significantly lower than the other extenders at day one storage. In fertility trial, the highest fertilization rate was (100±0.00%) resulting from Modified extender with osmotic pressure 400 mOsm/kg. This was not significantly difference from the Modified extender 350 mOsm/kg (93.21±4.53%) and BPSE (91.25±5.91%). The control treatment yielded the lowest fertility rate (33.33±7.07%). With increasing storage time from two day to three day, the sperm diluted with Modified extender with osmotic pressure 300, 350 and 400 mOsm/kg gave motility rate and fertility rate higher than the other extenders ($P<0.05$).

In experiment 2, the effects of three extenders (Modified extender 300 mOsm/kg, BPSE and Lake's diluent) with four cryoprotectants (10%dimethyl sulfoxide-DMSO, 6% dimethyl acetamide-DMA, 6%dimethyl formamide and 11%Glycerol), on motility and viability of Thai indigenous chicken (Leung Hang Kao) sperm were investigated. Sperm were stored for two days in a liquid nitrogen container (-196 °C). They were thawed at 5 °C, motility, progressive motility and viability rates were assessed. Among treatments used the combination of extender and cryoprotectant yielded lower motility, progressive motility and

viability percentage than that of the control (fresh sperm, $P<0.05$). In addition, they have interaction between the extenders and crtoprotectants used. In experiment 3, the effect freezing methods (Freezer control and $LN_2$ Vapour) were determined. The percentage of motility (38.67±3.84), progressive motility (14.33±4.91) and viability (57.00±2.65) of frozen Thai indigenous chicken sperm resulting from freezer control method yielded a higher rate than that of the $LN_2$ Vapour method ($P<0.05$).