

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวแบบระยะสั้นและโดยวิธีการแช่แข็ง มีการดำเนินงานวิจัยทั้งในภาคสนามและในห้องปฏิบัติการ ในส่วนของห้องปฏิบัติการนั้นใช้ห้องปฏิบัติการ สรีรวิทยาและกายวิภาคสัตว์ อาคารเครื่องมือ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำหรับการศึกษาในภาคสนาม นั้นใช้ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์กบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี และฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีเป็น สถานที่ในการดำเนินงานวิจัย โดยการศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์ เหลืองหางขาว แบบระยะสั้น

การทดลองที่ 2 ศึกษาชนิดของสาร extender สาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บ รักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวโดยวิธีการแช่แข็ง

การทดลองที่ 3 ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวโดยวิธีการแช่แข็ง

โดยการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวทั้งและแบบระยะสั้นและโดยวิธีการแช่แข็ง มีการ ประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อจากอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการผสมติด ซึ่งใช้วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี พร้อมทั้งวิธีการศึกษา ดังนี้

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. หลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร
2. กระดาษทิชชู
3. กระบอกน้ำกลั่น
4. กระตักน้ำแข็ง
5. ependorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
6. micropipette (ขนาด 10, 100, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร)
7. small and large pipettes tips
8. หลอดทดลองพลาสติกขนาด 5 และ 15 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิด
9. beaker ขนาด 250, 100, 50, 25 มิลลิลิตร
10. volumetric flasks ขนาด 250 มิลลิลิตร
11. graduated syinders ขนาด 25 มิลลิลิตร
12. ขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร
13. hemacytometer
14. glass stirring rod
15. counter
16. rack
17. กระดาษ lable
18. เทปใส
19. ปากกา lable
20. vortex mixer

21. pH meter
22. osmometer
23. ตู้เย็น
24. slides และ cover slides
25. ไม้จิ้มฟัน
26. หลอดแช่แข็ง (french straws) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร
27. forcep
28. ตะเกียงแอลกอฮอล์
29. ขวดสีชา ขนาด 50 มิลลิลิตร
30. กระดาษเช็ดเลนส์
31. แผ่น DVD
32. ไม้ขีด
33. เข็มเย็บ
34. Liquid nitrogen containers dewar 20 XT (Taylor-Wharton U.S.A.)
35. Liquid nitrogen storage with dispenser
36. cryobath
37. cryochamber
38. cryocane
39. cryo gloves
40. freezer control (CL 3300)
41. computer and software operating manual (cryogenesis version 4 for windows)
42. compound microscope and Stereo microscope
43. Image j software
44. Computer Assisted Semen Analysis (CASA)

3.2 สารเคมี

1. Water cell culture grade
2. ไนโตรเจนเหลว
3. Sodium chloride
4. sodium acetate
5. potassium citrate
6. sodium glutamate
7. dipotassium hydrogen phosphate
8. potassium dihydrogenphosphate
9. Fructose
10. Tes(N-Tris(hydrxy methal) methyl-2-amino ethane sulfonic acid)
11. magnesium acetate
12. potassium acetate
13. Polyvinylpyrrolidone (PVP)

14. sodium dihydrogen phosphate
15. Glucose
16. Inositol
17. Protamine sulfate
18. Anhydrous sodium hydrogen phosphate
19. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
20. Dimethyl acetamide (DMA)
21. Glycerol
22. Dimethyl sulfonamide (DMF)
23. Eosin B
24. Nigrosin
25. Sodium citrate dehydrate
26. น้ำยาเซ็ดเลนส์
27. น้ำยาเคลือบเล็บ
28. immersion Oil

3.3 วิธีการศึกษา

3.3.1 การคัดเลือกพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว

คัดเลือกไก่ตั้งแต่อายุ 6 เดือน ที่มีความสมบูรณ์พันธุ์และมีลักษณะเด่นตรงตามสายพันธุ์เหลืองหางขาว คือ ด้านบนของหงอนหินบางเรียบ ปลายหงอนยาวเลียดา โคนหงอนโค้งติดกับศรีษะ ลักษณะลำตัวและอกแน่น มีเนื้อเต็ม กระดูกอกยาวตรง หลังเป็นแผ่นกว้างมีกล้ามเนื้อมาก เรียบตรงไม่โค้งนูน ไหล่กว้างยกตั้งตรงคอใหญ่ กระดูกคอถี่ ปั้นขาใหญ่ กล้ามเนื้อมาก เนื้อแน่น แข็งแรง ผิวหนังขาวอมเหลือง สีขนลำตัวดำมีขาวแซมบ้างที่หัว หัวปึก ข้องา สร้อยคอเหลืองชัดเจน ยาวประปราย สร้อยหลังเป็นสีเดียวกับสร้อยคอเรียงกันเต็มแผ่น หลัง เริ่มจากโคนคอถึงโคนหาง เส้นขนละเอียดยาวเป็นระย้า สร้อยปีกสีเดียวกับสร้อยคอเรียงกันแน่นเต็มบริเวณหัวปีกถึงปีกชัย ขนหางกะลวยมีสีขาวพุ่มออกยาว ขนหางควรพุ่งตรงและยาว ปลายโค้งตกลงเล็กน้อย ขาแข้งมีเดือยขาวอมเหลืองสีเดียวกับปาก เกล็ดแข้งแน่นหนาเรียบ เดือยใหญ่แข็งแรง นิ้วยาว เล็บสีขาวอมเหลือง ไม่มีสีดำปน

3.3.2 การรีดน้ำเชื้อ

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้พ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวจากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์กบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี และฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อายุประมาณ 7 เดือนขึ้นไป จำนวน 60 ตัวโดยจะรีดสัปดาห์ละ 2 ครั้ง การรีดน้ำเชื้อจะมีผู้รีด 2 คน คือ คนอุ้มไก่จะกระชับพอไก่ไว้ที่เอวยื่นหางไก่ออกข้างหน้าหัวไก่อยู่ด้านหลังของคนอุ้ม มือหนึ่งจะจับขาไก่ทั้ง 2 ข้างรวบเข้าหากัน โดยใช้นิ้วชี้และนิ้วกลางอยู่ระหว่างขาทั้งสอง แล้วใช้มืออีกข้างหนึ่งลูบหลังพอไก่เบาๆ จากโคนปีกผ่านมาที่หลังและโคนหางพอถึงโคนหางใช้นิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้บีบกระดุนอย่างรวดเร็วที่โคนหาง ไก่จะแสดงปฏิกิริยากระดกหางขึ้น พร้อมกับดันอวัยวะเพศรูปร่างเป็นลอนคู่ปลายแหลมยื่นออกมาจากรูทวาร ซึ่งอวัยวะดังกล่าวเป็นที่เก็บน้ำเชื้อและฉีดน้ำเชื้อ คนรีดอีกคนหนึ่งจะใส่ภาชนะที่สะอาดรองรับน้ำเชื้อที่ไหลออกมาดังแสดงในภาพที่ 1 ข้อควรระวัง ก่อนรีดน้ำเชื้อจะต้องทำความสะอาดบริเวณทวารด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำสะอาด และใช้กระดาษทิชชูซับ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากน้ำ และอุจจาระ ซึ่งน้ำเชื้อที่นำมาทำการเก็บรักษาจะต้องไม่ปนเปื้อนจากสิ่งดังกล่าว และจะทำ

การประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิของไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวเป็นรายตัว โดยน้ำเชื้อที่จะนำมาศึกษานั้นจะต้องมีอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ 75% ขึ้นไป จากนั้นนำน้ำเชื้อที่รีดได้มาผสมรวมกันก่อนนำไปศึกษาต่อไป



ภาพที่ 1 การรีดน้ำเชื้อไก่

3.3.3 การศึกษาส่วนประกอบไอออนของน้ำเลือด ค่า pH และค่าออสโมลาลิตีของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว

เนื่องจากน้ำเชื้อไก่มีปริมาณน้อย ในการศึกษานี้จึงใช้น้ำเลือดของไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว เพื่อศึกษาส่วนประกอบไอออน โดยการนำเลือดที่ได้จากการเจาะเส้นเลือดบริเวณปีก (Wing vein) มาทำการ centrifuged ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที โดยการใช้เครื่อง universal high speed centrifuges รุ่น Z 323 K (Hermle Labortechnik, Wehingen, Germany) หลังจากการ centrifuged จะสังเกตเห็นได้ว่าตัวอย่างเลือดมีการแยกออกเป็นสองส่วน โดยส่วนล่างจะมีลักษณะสีแดงเข้ม คือ เม็ดเลือด และส่วนบนจะมีลักษณะเป็นสีเหลืองใส คือ น้ำเลือด (plasma) จากนั้นนำไมโครไปเปิดดูส่วนของน้ำเลือดใส่ ependrof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C เพื่อนำไปศึกษาส่วนประกอบของไอออนชนิดต่างๆ ได้แก่ แคลเซียม และแมกนีเซียม โดยใช้เครื่อง Cobas Integra 800 (Roche, Mannheim, Germany) และวิเคราะห์ โซเดียม โพแทสเซียม และคลอไรด์ ด้วยเครื่อง NOVA 4 CRT (Nova Biomedical, Waltham, USA) เป็นต้น สำหรับค่า pH และค่าออสโมลาลิตีของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว ทำได้โดยนำน้ำเชื้อไก่มาวัดค่า pH ด้วยเครื่อง Hach pH Meter รุ่น EC10 (Hach, Loveland, USA) และทำการวัดค่าออสโมลาลิตีด้วยเครื่อง Fiske Associates Osmometer รุ่น 210 (Fiske Associates, Massachusetts, USA)

3.3.4 วิธีประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

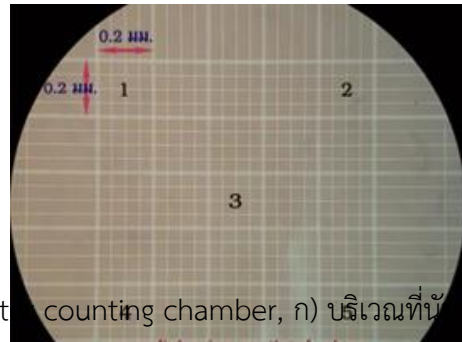
3.3.4.1 การประเมินลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ

ควรสังเกตทันทีภายหลังจากการรีดน้ำเชื้อ โดยดูสี ความเข้มข้น และสิ่งเจือปน เช่น อุจจาระ ปัสสาวะ และของเสียอื่นๆ โดยน้ำเชื้อที่จะนำมาศึกษาต้องปราศจากสิ่งปนเปื้อน (อุจจาระ ปัสสาวะ)

3.3.4.2 การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อ (จำนวนอสุจิต่อหนึ่งมิลลิลิตร)

การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อหาได้โดยการเจือจางน้ำเชื้อสดด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน น้ำเชื้อต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1: 1,000 เท่า ขณะที่ทำการดูน้ำเชื้อควรใช้กระดาศทิชชูซับน้ำเชื้อส่วนเกินที่ติดมากับ pipettes tips จากนั้นทำการนับจำนวนอสุจิ โดยใช้สไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (heamacytometer counting chamber) (ภาพที่ 2 ก) ภายใต้กล้อง compound microscope (40X) นับจำนวนอสุจิจากมุมบน-ล่าง ทั้ง 4 มุม และช่องตรงกลาง รวม 5 ช่อง (ภาพที่ 2 ข) แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนอสุจิที่นับได้ต่อ 1 มิลลิลิตร ดังนี้

$$\text{จำนวนอสุจิ / มิลลิลิตร} = (\text{รวมจำนวนอสุจิที่นับได้ทั้ง 5 บริเวณ} / 5) \times 25 \times \text{dilution rate} \times 10^4$$



ภาพที่ 2 สไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (heamacytometer counting chamber, ก) บริเวณที่นับจำนวนอสุจิทั้ง 5 บริเวณ (1, 2, 3, 4 และ 5, ข)

3.3.4.3 ศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ

การศึกษ้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิมิวิธีการศึกษา 3 วิธี คือ

วิธีที่ 1 เป็นวิธีการศึกษ้อัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิที่ใช้ในภาคสนามก่อนนำน้ำเชื้อมาทำการศึกษา ทำได้โดยการหยดน้ำเกลือ 1 หยด (5 ไมโครลิตร) ลงบนสไลด์ และหยดน้ำเชื้อ 1 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยน้ำเกลือมาแตะกับน้ำเชื้อเพียงเล็กน้อย แล้วสังเกตการเคลื่อนที่ภายใต้กล้อง compound microscope (10X) โดยให้เกณฑ์การเคลื่อนที่ของอสุจิ ดัดแปลงจาก Guest (1973) ดังรายละเอียดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 หลักเกณฑ์การสังเกตอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ

หลักเกณฑ์	คะแนน	การเคลื่อนที่ (%)
อสุจิทุกตัวเคลื่อนที่	4	100
อสุจิส่วนใหญ่เคลื่อนที่ (3/4)	3	75
อสุจิบางตัวเคลื่อนที่ (2/4)	2	50
อสุจิส่วนใหญ่ไม่เคลื่อนที่ มีเพียงเล็กน้อยที่เคลื่อนที่ (1/4)	1	25
อสุจิไม่มีการเคลื่อนที่	0	0

ดัดแปลงจาก: Guest (1973)

โดยน้ำเชื้อที่จะนำมาศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวแบบระยะสั้นและโดยวิธีการแช่แข็งนั้น ต้องมีการเคลื่อนที่มากกว่า 75%

วิธีที่ 2 เป็นวิธีการศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะแบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ 1). ใช้โปรแกรม Image J ประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิที่ทำการเก็บรักษาแบบระยะสั้น ทำได้โดยการนำตัวอย่างที่มีอัตราการการเจือจาง 1:3 (Sperm:Extender) มาเจืออีกครั้งด้วยสาร extender ที่อัตราการเจือจาง 1:60 (diluted milt: extender) และใช้ micropipette ดูดตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร โหลดลงบน Dual Slided Sperm Analysis ที่ปิดด้วย Cover Glass (Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA) แล้วสังเกตการเคลื่อนที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound รุ่น Axioskop 40 ที่กำลังขยาย 10X และทำการอัดวิดีโอาน 10 วินาที โดยใช้กล้องถ่ายวิดีโอรุ่น Sony Model SSC-E458P color video camera SuperExwave ซึ่งต่ออยู่กับกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นนำภาพวิดีโอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image J โดยมีการกำหนดค่า sperm tracker ดังรายละเอียดในตารางที่ 2 (ดัดแปลงจาก Sontakke et al. (2004))

ตารางที่ 2 ค่า Sperm tracker

Minimum sperm size (pixels)	5
Maximun sperm size (pixels)	30
Minimum track length (frames)	30
Maximun sperm velocity between frame (pixels)	20
Minimum VSL for motile (um/s)	4
Minimum VAP for motile (um/s)	5
Minimum VCL for motile (um/s)	5
Low VAP speed (um/s)	5
Maximum percentage of path with zero VAP	1
Maximum percentage of path with low VAP	25
Low VAP speed 2 (um/s)	25
Low VCL speed (um/s)	35
High WOB (percent VAP/VCL)	80
High LIN (percent VSL/VAP)	80
High WOB two (percent VAP/VCL)	50
High LIN two (percent VSL/VAP)	60
Frame Rate (frames per second)	60
Microns per 1000 pixels	ต้อง set scale
Print xy co-ordinate for all tracked sperm	0
Print motion characteristics for all motile sperm	0
Print median values for motion characteristics	0

ดัดแปลงจาก: Sontokke et al. (2004)

2). ใช้เครื่อง Computer Assisted Semen Analysis (CASA) รุ่น version 10 HTM-IVOS (Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA) สำหรับประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิที่ทำการเก็บรักษา โดยวิธีการแช่แข็ง ทำได้โดยการนำตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งมาเจืออีกครั้งด้วยสาร extender ที่อัตราการเจือจาง 1:15 (Frozen semen: Extender) และใช้ micropipette ดูดตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร โหลดลงบน Dual Slided Sperm Analysis ที่ปิดด้วย Cover Glass (Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA) ที่วางอยู่บน stage ของเครื่อง IVOS จากนั้นเลื่อน stage เข้าไปในเครื่อง IVOS และทำการวิเคราะห์ โดยมีการ กำหนดค่า Analysis setup ดังรายละเอียดในตารางที่ 3 (ดัดแปลงจาก Sontakke et al. (2004))

ตารางที่ 3 ค่า Analysis setup

Temperature (°C)	37.0
Apply sort	0
Frames Acquired	30
Frames rate (Hz)	60
Minimum contrast	25
Minimum Cell Size (pixels)	4
Minimum Static Contrast	15
Straightness (STR) Threshold (%)	80
VAP Cutoff (µm/sec)	5
Prog. Min VAP (µm/sec)	20
VSL Cutoff (µm/sec)	20
Cell Size (pixels)	4
Cell Intensity	50
Static Head Size	0.72-8.82
Static Head Intensity	0.14-1.84
Static Elongation	0-47
Slow Cell Motile	Yes
Magnification	1.92
Video Frequency	60
Bright Field	No
Chamber depth (µm)	20
Field Selection Mode	Auto

ดัดแปลงจาก: Sontakke et al. (2004)

3.3.4.4 ศึกษาอัตราการมีชีวิตรอด

การศึกษอัตราการมีชีวิตรอดใช้เทคนิคการย้อมสีด้วย Eosin และ Nigrosin โดยมีวิธีการเตรียมสีย้อมและขั้นตอนการศึกษอัตราการมีชีวิตรอดดังนี้

วิธีการเตรียมสีย้อม

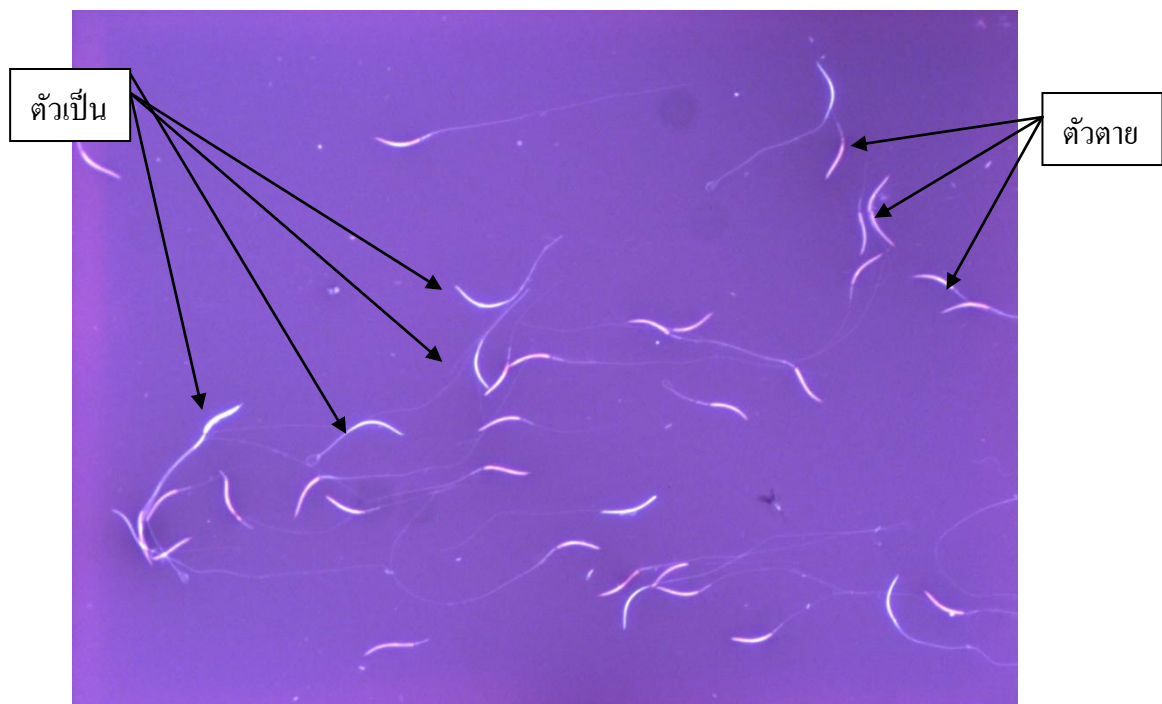
ชั่ง Eosin B 1 กรัม, Nigrosin 5 กรัม, Sodium citrate dehydrate 1.5 กรัม ใส่ใน Beager และเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร โดยให้ความร้อนขณะเตรียมสารเพราะสารจะไม่ละลาย เมื่อสารละลายเข้ากันดีแล้วนำไปกรอง จนไม่มีตะกอนเหลืออยู่ แล้วนำสีย้อมที่ได้เก็บไว้ในขวดสีชาโดยเก็บที่อุณหภูมิห้อง

วิธีการศึกษาอัตราการมีชีวิตมีขั้นตอนดังนี้

- หยดสี Eosin-Nigrosin dye ลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด (5 ไมโครลิตร) แล้วหยดน้ำเชื้อตัวอย่างข้างๆ สีย้อมประมาณ 1 ไมโครลิตร
- ใช้เข็มเขี่ยคนน้ำเชื้อกับสีย้อมให้เข้ากันจากนั้นใช้แผ่นสไลด์อีกแผ่นหนึ่งเกลี่ยน้ำเชื้อให้กระจายบางๆ โดยเกลี่ยเพียงครั้งเดียว
- นำแผ่นสไลด์ที่ smear แล้ว ผึ่งให้แห้งในอุณหภูมิห้อง
- หยดน้ำยาทาเล็บลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด แล้วปิดด้วย cover slide นำไปส่องดูภายใต้กล้อง

compound microscope กำลังขยาย 100 เท่า

- นับจำนวนเซลล์ตัวเป็นและตัวตายโดยการสุ่มนับ 5 บริเวณๆ ละ 20 เซลล์ โดยที่เซลล์ตัวเป็นจะมีลักษณะสีขาวไม่ติดสีย้อม ส่วนตัวตายจะติดสีย้อมเป็นสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้มดังแสดงในภาพที่ 3



ภาพที่ 3 อสุจิมิชีวิตมีลักษณะสีขาว และอสุจิตายจะติดสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้ม เมื่อย้อมด้วยสี Eosin - nigrosin (ภายใต้กล้อง compound microscope กำลังขยาย 100 เท่า)

3.3.4.5 การศึกษาอัตราการผสมติด

การศึกษาอัตราการผสมติดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวแบบระยะสั้นและโดยวิธีการแช่แข็งเป็นการศึกษาในภาคสนามที่มีวิธีการศึกษาดังนี้

ใช้แม่ไก่สายพันธุ์ Isa Brown (จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี) อายุระหว่าง 7 เดือน ถึง 1 ปี จำนวน 300 ตัว ซึ่งจะทำการผสมเทียม 2 ครั้ง วันเว้นวัน นาน 1 สัปดาห์ โดยการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวแบบระยะสั้น จะใช้จำนวนตัวสุจิต่อแม่ไก่ 1 ตัว (total number spermatozoa/hen) เท่ากับ 300×10^6 และจะเริ่มเก็บไข่ภายหลังจากการผสมเทียม 1 วันต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ โดยจะทำการเก็บไข่ทุกวันในช่วงบ่ายและนำไข่เข้าฟักทุกๆ 1 สัปดาห์ โดยการเรียงไข่ลงในถาดฟักและนำเข้าตู้ฟักที่มีอุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ซึ่งถาดไข่จะวางเอียงทำมุม 45 องศา และมีการกลับไข่ทุกๆ 1 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบการผสมติดโดยการส่องไข่ที่อายุฟัก 10 วัน แล้วนำจำนวนไข่ที่ผสมติดมาคำนวณหาอัตราการผสมติดดังนี้

$$\text{อัตราการผสมติด} = (\text{จำนวนไข่ที่ผสมติด} / \text{จำนวนไข่ที่เข้าฟัก}) \times 100$$

3.3.5 ขั้นตอนและวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว แบบระยะสั้นและโดยวิธีการแช่แข็ง

การเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวแบบระยะสั้นและโดยวิธีการแช่แข็งแบ่งออกเป็น 3 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวแบบระยะสั้น มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

ขั้นตอนการทดลอง

1. ทำการเตรียมสาร extender 5 สูตร ได้แก่ Modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตีที่ระดับ 300, 350 และ 400 mOsm/kg, BPSE, Lake's diluted, IGGKP และ EK ตามส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 4 โดยใช้ 0.9%NaCl ร่วมกับ 0.2%glucose เป็นกลุ่มควบคุม ทำการวัดค่า pH และค่าออสโมลาลิตีของสาร extender นำสาร extender ที่เตรียมไว้ใส่ขวดแก้วปิดฝาให้สนิทเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5°C

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบทางเคมี (g/v) ของสาร extender ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว

Composition	Dilutent (g/25ml)							
	Control	Modified extender	Modified extender	Modified extender	BPSE	Lake's diluent	IGGKP	EK
		300mOsm/kg	350mOsm/kg	400mOsm/kg				
Sodium chloride	0.2250	-	-	-	-	-	-	-
magnesium acetate	-	0.0200	0.0200	0.0200	0.0085	0.0292	-	-
sodium acetate	-	-	-	-	0.1075	-	-	-
potassium citrate	-	0.1000	0.1000	0.1000	0.0170	-	0.0371	0.0350
sodium glutamate	-	0.5000	0.5000	0.5000	0.2442	0.5311	0.3873	0.3873
dipotassium hydrogen phosphate	-	-	-	-	0.4160	-	-	-
potassium dihydrogen phosphate	-	-	-	-	0.0163	-	-	-
Fructose	-	0.0494	0.2662	0.5392	-	0.2000	-	0.0500
Tes(N-Tris(hydrxy methal) methyl-2-amino ethane sulfonic acid	-	0.2500	0.2500	0.2500	0.0488	-	-	-
potassium acetate	-	-	-	-	-	0.1480	-	-
Polyvinylpyrrolidone(PVP)	-	-	-	-	-	0.0750	-	0.0250
Glucose	0.0500	-	-	-	0.1250	-	0.2250	0.1750
sodium dihydrogen phosphate	-	-	-	-	-	-	0.0525	0.0525
Inositol	-	-	-	-	-	-	0.2250	0.1750
Protamine sulfate	-	-	-	-	-	-	-	0.0050
Anhydrous sodium hydrogen phosphate	-	-	-	-	-	-	0.2450	0.2450
Osmolarity (mOsm kg ⁻¹)	297±0.58	303±1.73	353±2.00	404±1.73	377±1.53	363±0.58	384±2.65	391±1.00
pH	6.59±0.02	7.44±0.02	7.45±0.01	7.42±0.03	7.53±0.02	7.18±0.02	7.62±0.02	7.61±0.01

2. นำน้ำเชื้อสดที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 75% ขึ้นไป มาเจือจางกับสาร extender ทั้ง 5 สูตร และกลุ่มควบคุมที่เตรียมไว้ในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อสาร extender 1:3 ใน efpendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาอย่างเบาๆ หลังจากนั้นนำมาเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1-7 วัน ดังแผนการทดลองแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แผนการทดลองผลของสาร extender 5 ชนิด (Modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตีที่ระดับต่างๆ (300, 350 และ 400 mOsm/kg), BPSE, Lake's diluent, IGGKP และ EK) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวแบบระยะสั้น โดยใช้ 0.9%NaCl ร่วมกับ 0.2%glucose เป็นกลุ่มควบคุม และทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิตรอด ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1-7 วัน

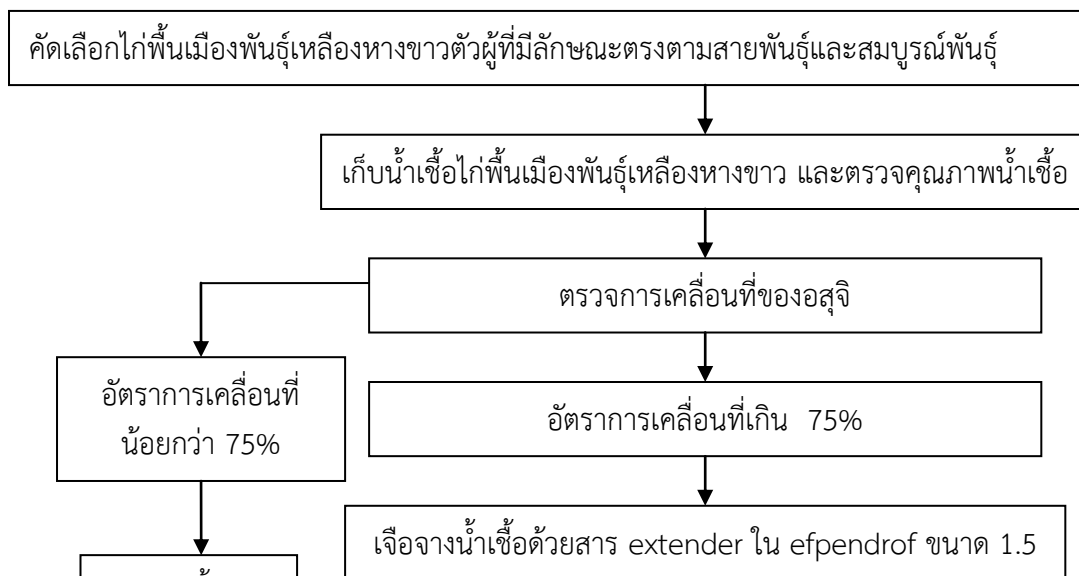
กลุ่มการทดลอง	สาร extender	อัตราการเคลื่อนที่ (%)							อัตราการมีชีวิต (%)						
		ระยะเวลาการเก็บ (วัน)							ระยะเวลาการเก็บ (วัน)						
		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
1	Control														
2	Modified extender 300 mOsm/kg														
3	Modified extender 350 mOsm/kg														
4	Modified extender 400 mOsm/kg														
5	BPSE														
6	Lake's diluent														
7	IGGKP														
8	EK														

3. นำสาร extender ที่ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่มากกว่า 60% ได้แก่ Modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตีที่ระดับต่างๆ (300, 350 และ 400 mOsm/kg), BPSE, Lake's diluent และกลุ่มควบคุม (0.9%NaCl ร่วมกับ 0.2%glucose) มาทำการทดสอบอัตราการผสมติดที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1-5 วัน ดังแผนการทดลองแสดงในตารางที่ 6 โดยขั้นตอนและกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวแบบระยะสั้นดังแสดงในแผนภาพที่ 4

ตารางที่ 6 แผนการทดลองผลของสาร extender 5 ชนิด (Modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตีที่ระดับต่างๆ (300, 350 และ 400 mOsm/kg), BPSE, Lake's diluent, IGGKP และ EK) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวแบบระยะสั้น โดยใช้ 0.9%NaCl ร่วมกับ 0.2%glucose เป็นกลุ่มควบคุม และทำการทดสอบอัตราการผสมติด ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1-5 วัน

กลุ่มการทดลอง	สาร extender	อัตราการผสมติด (%)
---------------	--------------	--------------------

		ระยะเวลาการเก็บ (วัน)				
		1	2	3	4	5
1	Control					
2	Modified extender 300 mOsm/kg					
3	Modified extender 350 mOsm/kg					
4	Modified extender 400 mOsm/kg					
5	BPSE					
6	Lake's diluent					
7	IGGKP					
8	EK					



ภาพที่ 4 กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว แบบระยะสั้น

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

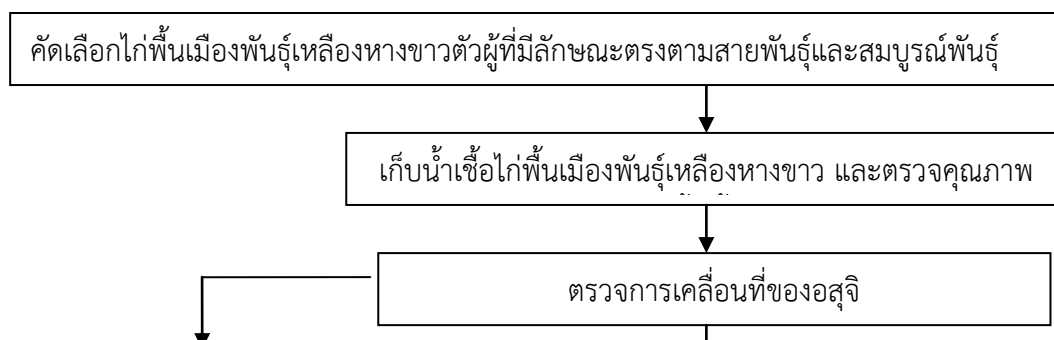
วิเคราะห์ผลของสาร extender 5 ชนิด (Modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตีที่ระดับต่างๆ (300, 350 และ 400 mOsm/kg), BPSE, Lake's diluent, IGGKP และ EK) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวแบบระยะสั้น โดยใช้ 0.9%NaCl ร่วมกับ 0.2%glucose เป็นกลุ่มควบคุม โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) ที่มีการวัดซ้ำ (Repeated Measurements) ซึ่งในแต่ละทรีทเมนต์จะทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ 10 ชั่วโมงต่อทรีทเมนต์ ทดสอบอัตราการมีชีวิต 5 ชั่วโมงต่อทรีทเมนต์ และทดสอบอัตราการผสมติด 3 ชั่วโมงต่อทรีทเมนต์ ก่อนวิเคราะห์ความแปรปรวนนำผลอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการผสมติดไป transformed โดยใช้วิธี Arcsine Transformation จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างทรีทเมนต์ (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ CRD ที่มีการวัดซ้ำ และเปรียบเทียบผลของสาร extender แต่ละชนิดที่ระยะเวลาการเก็บต่างๆ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ด้วยวิธี Duncan's test ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 10

การทดลองที่ 2 ศึกษาชนิดของสาร extender และสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวโดยวิธีการแช่แข็ง

ทำการศึกษาชนิดของสาร extender และสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวโดยวิธีการแช่แข็ง ในการศึกษาครั้งนี้ใช้สาร extender 3 ชนิด ได้แก่ Modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตีที่ระดับ 350 mOsm/kg, BPSE และ Lake's diluent ร่วมกับสาร cryoprotectant 4 ชนิด ได้แก่ 6%DMA, 6%DMF, 10%DMSO และ 11%Glycerol โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

ขั้นตอนการทดลอง

1. เตรียมสาร extender (Modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตีที่ระดับ 350 mOsm/kg, BPSE และ Lake's diluent) วัดค่า pH และค่าออสโมลาลิตี ใส่ขวดแก้วปิดฝาให้สนิทเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5°C
2. เตรียมสาร cryoprotectant 4 ชนิด ได้แก่ 6%DMA, 6%DMF, 10%DMSO และ 11%Glycerol โดยใช้สาร extender ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 เป็นตัวทำละลาย และนำสาร cryoprotectant ที่เตรียมไว้ใส่ขวดสีชาปิดฝาให้สนิทเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5°C
3. นำน้ำเชื้อสดที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 75% ขึ้นไปมาเจือจางด้วยสาร extender ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ในอัตราส่วน 1:3 (Sperm: Extender) ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติมสาร cryoprotectant แต่ละชนิด (6%DMA, 6%DMF, 10%DMSO และ 11%Glycerol) โดยใช้สัดส่วน 1: 3 (diluted milt: cryodiluent) ซึ่งมีขั้นตอนและกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวโดยวิธีการแช่แข็ง ดังแสดงในแผนภาพที่ 5 และแผนการทดลองดังแสดงในตารางที่ 7



ภาพที่ 5 กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวโดยวิธีการแช่แข็ง

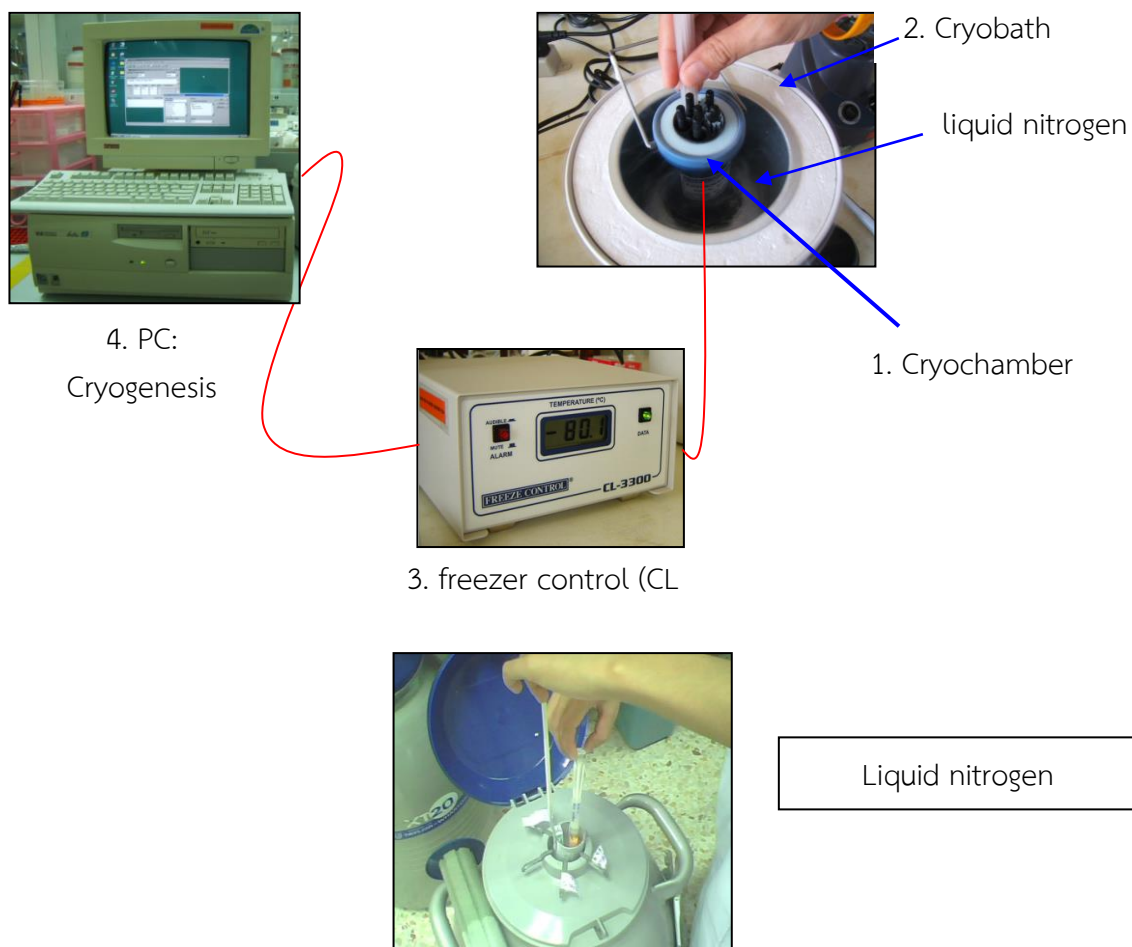
ตารางที่ 7 แผนการทดลองผลของสาร extender 3 ชนิด (Modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตีที่ระดับ 350 mOsm/kg, BPSE และ Lake's diluent) ร่วมกับสาร cryoprotectant 4 ชนิด (6%DMA, 6%DMF, 10%DMSO และ 11%Glycerol) ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวโดยวิธีการแช่แข็ง

กลุ่ม การทดลอง	สาร extender	สาร cryoprotectant	อัตราการเคลื่อนที่ (%)	อัตราการ เคลื่อนที่รวม (%)	อัตราการมีชีวิต (%)
-------------------	-----------------	-----------------------	---------------------------	-------------------------------	------------------------

1	Modified	6%DMA
2	extender	6%DMF
3	350	10%DMSO
4	mOsm/kg	11%Glycerol
5	BPSE	6%DMA
6		6%DMF
7		10%DMSO
8		11%Glycerol
9	Lake's	6%DMA
10	diluent	6%DMF
11		10%DMSO
12		11%Glycerol
13	กลุ่มควบคุม (น้ำเชื้อสด)	

4. ใช้ micropipet ดูดน้ำเชื้อปริมาณ 240 ไมโครลิตร ใส่หลอดแช่แข็ง (French straw ขนาด 250 ไมโครลิตร) แล้วปิดหลอดแช่แข็งโดยใช้ forcep ลนไฟจนร้อนแล้วหนีปากหลอดแช่แข็ง ซึ่งหลังจากการเติมสาร cryoprotectant จะเริ่มจับเวลาจนถึงการนำหลอดแช่แข็งใส่ลงใน cryochamber โดยใช้เวลาประมาณ 10 นาที

5. การเตรียม freezer control และคอมพิวเตอร์เพื่อควบคุมการลดอุณหภูมิ ทำได้โดยเติมไนโตรเจนเหลว (LN₂) ลงใน cryobath ให้สูงประมาณ 15 เซนติเมตร จากนั้นใส่ cryochamber ลงใน cryobath แล้วปิดฝา โดยที่ cryochamber ต่อกับ freezer control (CL 3300) และ freezer control ต่อกับคอมพิวเตอร์อีกทีเพื่อควบคุมการทำงานของ freezer control จากนั้นเลือกอัตราการลดอุณหภูมิ ตัดแปลงตามวิธีของ Tselutin et al. (1999) โดยลดอุณหภูมิ 7°C/นาที จากอุณหภูมิ 5°C ถึง -35°C และลดอุณหภูมิ 20 7°C/นาที จากอุณหภูมิ -35°C ถึง -90°C โดยใช้เมนู execute โปรแกรม Cryogenesis version 4 นำ straw ที่บรรจุตัวอย่างน้ำเชื้อใส่ลงใน cryochamber ปิดฝา แล้วทำการ run program จากนั้นรอให้คอมพิวเตอร์ และ freezer control ทำงานจนอุณหภูมิที่ freezer control ถึง -90°C (ภาพที่ 6) จึงนำ straw ออกจาก cryochamber เก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปทดสอบอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิต



ภาพที่ 6 ชุดควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองโดยใช้ Freezer control (CL 3300) ร่วมกับ cryogenesis version 4

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การศึกษาชนิดของสาร extender และสาร cryoprotectant ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวโดยวิธีการแช่แข็ง โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD ที่มีการจัดทรีทเมนต์แบบ 3x4 factorial คือใช้สาร extender 3 ชนิด ได้แก่ Modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตีที่ระดับ 350 mOsm/kg, BPSE และ Lake's diluent ร่วมกับสาร cryoprotectant 4 ชนิด ได้แก่ 6%DMA, 6%DMF, 10%DMSO และ 11%Glycerol โดยใช้น้ำเชื้อสดเป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งในแต่ละทรีทเมนต์ได้ทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการเคลื่อนที่รวม และอัตราการมีชีวิต 3 ชั่วโมงต่อทรีทเมนต์ ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวนนำผลอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการเคลื่อนที่รวม และอัตราการมีชีวิตไป transform โดยใช้วิธี Arcsine Transformation จากนั้นวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ด้วยวิธี Duncan's test ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS

การทดลองที่ 3 ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวโดยวิธีการแช่แข็ง

การทดลองนี้เป็นการทดลองต่อเนื่องจากการทดลองที่ 2 โดยการเลือกสาร extender และสาร cryoprotectant ที่ให้ผลดีที่สุด คือ 11%Glycerol ร่วมกับ Lake's diluent มาทำการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวโดยวิธีการแช่แข็ง โดยทำการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ 2 แบบ ได้แก่ 1). การลดอุณหภูมิโดยใช้ Freezer control ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 7°C/นาทิจาก 5°C ถึง -35°C และ 20°C/นาทิจาก -35°C ถึง -90°C 2). การลดอุณหภูมิโดยการอ้งไอไนโตรเจนเหลว ที่ระดับเหนือไอไนโตรเจนเหลว 11 เซนติเมตร นาน 12 นาที และ 3 เซนติเมตร นาน 5 นาที โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

ขั้นตอนการทดลอง

1. นำน้ำเชื้อสดที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 75% ขึ้นไป มาเจือจางด้วยสาร extender (Lake's diluent) ที่อัตราส่วน sperm: extender 1: 3 (diluted milt) จากนั้นนำมาผสมกับสาร cryoprotectant (11%Glycerol) โดยใช้สัดส่วน 1: 3 (diluted milt: cryodiluent)
2. ใช้ไมโครไปเปตดูดตัวอย่างน้ำเชื้อในข้อ 1 ปริมาตร 240 ไมโครลิตร ใส่หลอดแช่แข็ง (French straw ขนาด 250 ไมโครลิตร) แล้วปิดหลอดแช่แข็งโดยใช้ forcep ที่ลนไฟจนร้อนแล้วหนีบปากหลอดแช่แข็ง ซึ่งหลังจากที่เติมสาร cryoprotectant จะเริ่มจับเวลาจนถึงการนำหลอดแช่แข็งใส่ลงใน cryochamber ใช้เวลาประมาณ 10 นาที
3. เตรียม freezer control และ คอมพิวเตอร์เพื่อควบคุมการลดอุณหภูมิ นำ cryobath ใส่ไนโตรเจนเหลวสูงประมาณ 15 เซนติเมตร จากนั้นใส่ cryochamber ลงใน cryobath แล้วปิดฝา โดยที่ cryochamber ต่อกับ freezer control (CL 3300) และ freezer control ต่อกับคอมพิวเตอร์อีกทีเพื่อควบคุมการทำงานของ freezer control จากนั้นจากนั้นเลือกอัตราการลดอุณหภูมิ ดังแสดงในแผนการทดลองตารางที่ 8 โดยใช้โปรแกรม Cryogenesis version 4 สำหรับทำการลดอุณหภูมิโดยการอ้งไอไนโตรเจนเหลวทำได้โดย ใช้กล่องโฟมที่บรรจุไนโตรเจนเหลวและวางหลอดน้ำเชื้อลงบนตะแกรงสำหรับวางหลอดน้ำเชื้อ จากนั้นเลื่อนระดับของตระแกรงตามระดับที่กำหนดดังแสดงในแผนการทดลองตารางที่ 8 จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C เพื่อรอการทดสอบหาอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิต

ตารางที่ 8 แผนการทดลองผลของอัตราการลดอุณหภูมิแบบต่างๆ ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวโดยวิธีการแช่แข็ง

Freezing method	Freezing rate
Freezer control	7°C/นาทิจาก 5°C ถึง -35°C และ 20°C/นาทิจาก -35°C ถึง -90°C
LN ₂ vapour	11 เซนติเมตร (นาน 12 นาที) และ 3 เซนติเมตร (นาน 5 นาที)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวโดยวิธีการแช่แข็ง มีการวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ 2 แบบ ได้แก่ การลดอุณหภูมิโดยใช้ Freezer control และการลดอุณหภูมิโดยการอังไอน์โตรเจนเหลว โดยใช้น้ำเชื้อสดเป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งในแต่ละทรีทเมนต์จะทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิต 3 ชั่วโมงต่อทรีทเมนต์ ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวนนำผลอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิตรอดไป transform โดยใช้วิธี Arcsine Transformation จากนั้นวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ด้วยวิธี Duncan's test ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS