

บทที่ 3

ระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

กิจกรรมที่ 1 ศึกษาข้อมูลคุณภาพน้ำเชื้อสดเบื้องต้นในไถ่วงแต่ละสายพันธุ์

เป็นการศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อทั้งหมด 3 สายพันธุ์ เปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นภายในห้องปฏิบัติการ ได้แก่ อเมริกันบอร์น จำนวนทั้งสิ้น 6 ตัว เบลล์สวิลล์สโมลล์ไวท์ จำนวนทั้งสิ้น 6 ตัว และลูกผสม จำนวนทั้งสิ้น 6 ตัว เก็บข้อมูลคุณภาพน้ำเชื้อสดเบื้องต้น ได้แก่ ความเข้มข้น (concentration), ปริมาตรน้ำเชื้อ(volume), เปอร์เซ็นต์อสุจิที่เคลื่อนที่แบบตรง (progressive motile), เปอร์เซ็นต์ของอสุจิที่มีชีวิตและรูปร่างปกติ(%live normal sperm), เปอร์เซ็นต์ของตัวอสุจิที่รูปร่างผิดปกติ (% abnormal sperm) และลักษณะของตัวอสุจิที่ผิดปกติ ทำการศึกษา ณ สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรและเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยนครพนม

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดสอบความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design)

หลังจากกิจกรรมที่ 1 จะสามารถทราบคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นของน้ำเชื้อไถ่วงเพื่อนำมาเป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ใช้ในการทำกิจกรรมของการเก็บรักษาน้ำเชื้อต่อไป

กิจกรรมที่ 2 เป็นการศึกษาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นต่อคุณภาพน้ำเชื้อในห้องปฏิบัติการ

2.1 ผลของน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อไถ่วง โดยศึกษาเปรียบเทียบน้ำยาเจือจาง 4 ชนิด คือ 0.9% NaCl, BPSE, IGGKP, และ Sharm

2.2 ผลของอัตราการเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อของไถ่วง โดยศึกษาเปรียบเทียบเจือจาง 6 ชนิด คือ 1:0, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 และ 1:5 (น้ำเชื้อ:น้ำยาเจือจาง)

2.3 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เย็นที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ โดยศึกษาเปรียบเทียบระยะเวลาในการเก็บรักษา 4 เวลา คือ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การทดสอบความแตกต่างทางสถิติ โดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยใช้แผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design)

กิจกรรมที่ 3 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการผสมติดและฟักออกของไข่

2.1 ศึกษาอิทธิพลของจำนวนอสุจิของน้ำเชื้อไข่ต่ออัตราการผสมติด และฟักออกภายหลังการผสมเทียมโดย

ศึกษาเปรียบเทียบการฉีดน้ำเชื้อที่มีจำนวนอสุจิ 4 ระดับ คือ 100, 200, 300 และ 400 ล้านตัว เพียง 1 ครั้ง/ 2 สัปดาห์ เพื่อทำการเปรียบเทียบจำนวนอสุจิที่นำไปใช้ได้อย่างเหมาะสมในการผสมเทียม โดยศึกษาอัตราการผสมติดด้วยวิธีการผสมเทียม.ให้กับแม่ไก่วงสายกลุ่มละ 15 ตัว รวมทั้งสิ้นเป็น 60 ตัว

ทำการศึกษา ณ สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรและเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยนครพนม ใช้แผนการทดลองแบบ CRD โดยรวมน้ำเชื้อที่รีดมาได้ก่อนนำไปดำเนินการ การทดสอบความแตกต่างทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การผสมติดและฟักออก โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test

2.2 ศึกษาอิทธิพลของความบ่อยครั้งในการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแบบแช่เย็น ต่ออัตราการผสมติดและฟักออกในของไข่

โดยทำการเปรียบเทียบการความบ่อยครั้งในการผสมเทียม ได้แก่ 1, 2, 3 และ 4 ครั้ง/ 2 สัปดาห์ เพื่อหาความบ่อยครั้งในการผสมอย่างเหมาะสมในการผสมเทียมของไข่

ใช้แผนการทดลองแบบ CRD โดยรวมน้ำเชื้อที่รีดมาได้ก่อนนำไปดำเนินการ การทดสอบความแตกต่างทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การผสมติดและฟักออก วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test

2.3 อิทธิพลของสายพันธุ์ต่ออัตราการผสมติดและการฟักออกในไข่ทั้งหมด

3 สายพันธุ์คือ อเมริกันบอร์น, ไวท์, ลูกผสม

จำนวนทั้งสิ้นสายพันธุ์ละ 6 ตัว รวมเป็น 18 ตัวโดยการศึกษาอัตราการผสมติดด้วยวิธีการผสมเทียมใช้แม่ไก่วงสายพันธุ์ละ 15 ตัว รวมทั้งสิ้นเป็น 45 ตัว

ใช้แผนการทดลองแบบ CRD โดยรวมน้ำเชื้อที่รีดมาได้ก่อนนำไปดำเนินการ ทดสอบความแตกต่างทางสถิติของเปอร์เซ็นต์การผสมติดและฟักออก วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test

กิจกรรมที่ 4 ศึกษาอัตราการผสมติดและฟักออกจากการผสมเทียมแม่ไก่วง เป็นการศึกษาเพื่อจำลองสภาพจริงในฟาร์มของเกษตรกร ซึ่งจะใช้วิธีการที่ดีที่สุดในการเก็บรักษาไข่ซึ่งได้จากกิจกรรมที่ 1-3 เพื่อทำการเปรียบเทียบการผสมติด

โดยเปรียบเทียบอัตราการผสมติดจากการผสมเทียมและการผสมจริงของฟาร์ม
เกษตรกรของศูนย์ภูมิพลัง และบ้านโคกกล่อง ซึ่งใช้แผนการทดลองแบบ group
t-test

3.2 วิธีการศึกษา

3.2.1 สัตว์ทดลอง

ใช้ไก่วงพ่อพันธุ์สมบุรณ์ จำนวน 9 ตัว อายุประมาณ 14 – 16 เดือน เลี้ยงในคอกแบบขัง
เดี่ยวขนาดความกว้างของพื้นที่ประมาณ 1.2 x 2.5 เมตร ได้รับแสงและอุณหภูมิตามอากาศธรรมชาติ
ป้อนอาหารวันละ 2 ครั้ง เช้าและเย็น อาหารสำเร็จรูปที่ใช้เลี้ยงมีคุณค่าทาง
โภชนาการโปรตีนประมาณ 14 เปอร์เซ็นต์ ให้น้ำสะอาดและอาหารกินแบบเต็มที่

3.2.2 เตรียมสูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อไก่ 5 สูตร ได้แก่ NaCl, Tirs, Lake, BPSE และ IGGKP
โดยทำการชั่งสารเคมีใช้เครื่องชั่งดิจิตอล วัตถุประสงค์ในการทำน้ำยาเจือจางคือเพื่อต้องการให้ได้
สารละลายที่มีส่วนประกอบและคุณสมบัติคล้ายกับน้ำเชื้อสดมากที่สุด หลังจากทำการรีดน้ำเชื้อ
แล้วจะมีการเติมน้ำยาเจือจาง เพื่อเป็นการถนอมและเพิ่มปริมาณของน้ำเชื้อที่ได้จากการหลังของ
พ่อพันธุ์แต่ละครั้ง ทำให้สามารถนำไปผสมกับแม่พันธุ์ได้เป็นจำนวนมาก และทำให้การเก็บรักษา
คุณภาพน้ำเชื้อเป็นไปได้ดีและยาวนานขึ้น โดยองค์ประกอบทางเคมีในน้ำยาเจือจางมีองค์ประกอบ
ที่คล้ายกับน้ำเชื้อของสัตว์ปีก (Lake, 1995) Dumpala et al (2006) รายงานว่าในการเก็บรักษา
น้ำเชื้อเจือจางเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ทำการประเมินคุณภาพทุกๆ ชั่วโมง คุณภาพของน้ำเชื้อจะค่อย
ๆ ลดต่ำลงเป็นลำดับๆ เทวินทร์และยุพิน (2552) ทำการศึกษาเปรียบเทียบอัตราการผสมติดของ
น้ำเชื้อเจือจางและน้ำเชื้อสด พบว่าไม่มีความแตกต่างในเรื่องอัตราการผสมติดและฟักออก ตัวอย่าง
ของน้ำยาเจือจางที่นิยมใช้ได้แก่ 5 สูตรโดยมีสูตร Lake' diluent, Tselutin et al., (1995),
Schamm diluent, BPSE และ IGGKP โดยมีองค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจางต่อ 1000
มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจางต่อ 1000 มิลลิลิตร

ส่วนประกอบทางเคมีของน้ำยา เจือจาง(กรัม/ลิตร)	สูตรที่				
	1	2	3	4	5
Magnesium acetate	0.7		0.7		
Magnesium chloride				0.34	
Sodium acetate				4.3	
Potassium citrate				6.4	1.4
Sodium glutamate	19.2	19.2	28.5	8.67	14
Dipotassiumhydrogen phosphate				12.7	9.8

Potassium dihydrogen phosphate			0.65
Disodium hydrogen phosphate			2.1
Glucose	8.0	5.0	9.0
Fructose		8.0	5.0
Inositol		2.5	9.0
TES			1.95
Protamine sulfate		0.32	
Protassium acetate	5.0	5.0	5.0
PVP (polyvinyl pyrrolidone)	3.0	3.0	

หมายเหตุ สูตรที่ 1 คือ Prefreezing Lake'diluent (Lake, 1960 อ้างโดย Han et al., 2005)

สูตรที่ 2 คือ Tselutin (Tselutin et al., 1995 อ้างโดย Han et al., 2005)

สูตรที่ 3 คือ Schramm diluent (Schramm., 1976 อ้างโดย Chalah et al., 1999)

สูตรที่ 4 คือ BPSE (Sexton, 1977)

สูตรที่ 5 คือ IGGKP (Surai and Wishart, 1996)

3.2.3 การเก็บรักษาน้ำยาเจือจางและอุปกรณ์เก็บน้ำเชื้อ

เก็บรักษาน้ำสูตรน้ำยาเจือจางที่อุณหภูมิประมาณ 0 – 5 องศาเซลเซียส เตรียมอุปกรณ์เก็บน้ำเชื้อที่สะอาด ได้แก่ Syringe และหลอดขนาด 1.5 มิลลิเมตร เพราะมีส่วนสำคัญอย่างยิ่งต่อการรอดชีวิตของตัวสpermatozoa อุปกรณ์ที่ใช้รีดน้ำเชื้อควรมีพื้นที่สัมผัสน้ำเขื่อนน้อยที่สุดระหว่างการรีดน้ำเชื้อ และหลังจากได้น้ำเชื้อมาแล้วต้องป้องกันไม่ให้น้ำเชื้อสัมผัสกับแสงแดด น้ำ ฝุ่นละอองตลอดจนการปนเปื้อนอื่นๆ

3.2.4 วิธีรีดน้ำเชื้อและการเก็บรักษาน้ำเชื้อก่อนนำไปตรวจ

รีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ไก่ทองทั้ง 9 ตัว เริ่มต้นรีดที่เวลา 16.00 น. ใช้เวลารีดไม่เกิน 30 นาที รีดวันเว้นวัน การรีดน้ำเชื้อใช้คนรีด 3 คน คนที่ 1 เป็นคนจับขาและปีกบังคับไม่ให้ไก่ทองขยับได้ วางหน้าอกไก่ทองไว้ในที่นุ่ม คนที่ 2 เป็นคนกระตุ้นไก่ทองโดยจะใช้มือลูบไล้บริเวณหลังลงมาถึงบริเวณโคนหางและใช้มืออีกข้างนวดเบาๆ ที่บริเวณด้านท้อง เมื่อไก่ทองตัวผู้ตอบสนองจะสังเกตเห็นก้นเผยอแข็งและมีสีแดงออกมาและใช้มือบีบบริเวณก้นทันทีเพื่อรีดเก็บน้ำเชื้อ ส่วนคนที่ 3 เป็นคนดูดเก็บน้ำเชื้อโดยใช้ Syringe ดูดเอาน้ำเชื้อไก่ทองแล้วเก็บไว้ในหลอด Micro tube หลังจากรีดไก่ทองที่ทำการทดลองครบทุกตัวแล้ว เอาน้ำเชื้อที่รีดได้เก็บไว้ในกล่องโฟมที่มีน้ำอยู่ในกล่องที่อุณหภูมิ 25-27 องศาเซลเซียส ดังภาพที่ 3.1



ภาพที่ 3.1 วิธีการรีดน้ำเชื้อในพ่อพันธุ์ไก่อว

3.2.5 ตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังเจือจาง

ทำการตรวจวัดคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น ได้แก่ ระดับการเคลื่อนที่แบบกลุ่ม (Mass movement) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ขนาดขยาย 4×10 เท่า ตรวจเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (%Total motile) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ขนาดขยาย 10×10 เท่า ตรวจเปอร์เซ็นต์ของตัวอสุจิที่ปกติ (%Live sperm) เปอร์เซ็นต์อสุจิผิดปกติ (%Abnormal sperm shape) กล้องจุลทรรศน์ขนาดขยาย 40×10 เท่า ดังภาพที่ 3.2



ภาพที่ 3.2 การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

3.2.6 การผสมเทียม ในการผสมเทียมของไก่อวนั้นใช้คนที่ช่วยในการผสมเทียมทั้งสิ้น 2 คน โดยคนที่ 1 จะเป็นคนปลี่ยนกันไก่อวแม่พันธุ์โดยจับรวบขาแม่พันธุ์หลังจากนั้นแล้วหนีบแม่พันธุ์ตรงบริเวณอกโดยใช้หัวเข่าเพื่อไม่ให้แม่พันธุ์ดิ้น แล้วใช้มือทั้งสองกดลงบริเวณกันแม่พันธุ์เพื่อให้นักปลี่ยนออกมาเพื่อให้เห็นท่อสืบพันธุ์โผล่ให้เห็น หลังจากนั้นคนที่ 2 ทำการดูดน้ำเชื้อบรรจุที่ไซริงค์ขนาด 1 ซีซี ที่ถอดปลายเข็มออกแล้ว สอดเข้าไปในท่อสืบพันธุ์เพศเมียลึกประมาณ 3 เซนติเมตร แล้วค่อยปล่อยน้ำเชื้อออกพร้อมกับคนที่ 1 ปล่อยมือจากการปลี่ยนกัน ดังภาพที่ 3.3



ภาพที่ 3.3 การปลิ้นกันแม่พันธุ์และผสมเทียมในไก่อว

3.3. ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย (ระยะเวลา 1 ปี)

การวิจัยนี้ มีระยะเวลาดำเนินโครงการวิจัยทั้งสิ้น 12 เดือน โดยเริ่มดำเนินโครงการทันทีหลังจากที่โครงการได้รับอนุมัติงบประมาณ (1 กุมภาพันธ์ 2558 ถึง 31 มกราคม 2559)

3.4 สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

- 1) เกษตรกรที่เลี้ยงไก่อวที่บ้านโคกก่อง อำเภอเมือง จังหวัดนครพนม
- 2) เกษตรกรที่เลี้ยงไก่อวบ้านคำแก้ม อำเภอเมือง จังหวัดนครพนม
- 3) คณะเกษตรและเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนครพนม