

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



208806



การปรับปรุงเทคนิคการเก็บรักษาชิ้นเนื้อแบบแช่แข็งในกระบือปลั่ง
DEVELOPMENT OF SEMEN CRYOPRESERVATION TECHNIQUES
IN SWAMP BUFFALO

นางสาวกษศิรินทร์ กลิ่นวิชัย

วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

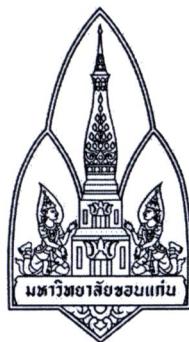
พ.ศ. 2554

๖๐๐๒๕๖๗๔๔

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



208806



การปรับปรุงเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในกระบือปลัก
DEVELOPMENT OF SEMEN CRYOPRESERVATION TECHNIQUES
IN SWAMP BUFFALO



นางสาวเกษศิริรินทร์ กลิ่นวิชัย

วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พ.ศ. 2554

การปรับปรุงเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในกระบือปลัก

นางสาวเกษศิริรินทร์ กลิ่นวิชัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น

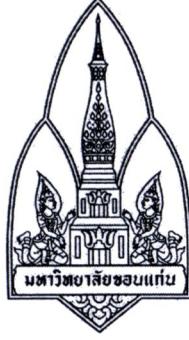
พ.ศ. 2554

**DEVELOPMENT OF SEMEN CRYOPRESERVATION TECHNIQUES
IN SWAMP BUFFALO**

MISS KETSIRIN KLINWICHAI

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN ANIMAL SCIENCE
GRADUATE SCHOOL KHON KAEN UNIVERSITY**

2011



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
หลักสูตร
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวศาสตร์

ชื่อวิทยานิพนธ์: การปรับปรุงเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในกระบือปลัก

ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์: นางสาวเกษศิริรินทร์ กลิ่นวิชัย

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร. ภาวดี ภักดี	ประธานกรรมการ
	รศ. ศรีสุวรรณ ชมชัย	กรรมการ
	รศ. ดร. เทวินทร์ วงษ์พระลับ	กรรมการ
	ผศ. ดร. สุภร กตเวทิน	กรรมการ
	ผศ. ดร. ยุกิน ผาสุข	กรรมการ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์:

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. เทวินทร์ วงษ์พระลับ)

อาจารย์ที่ปรึกษา

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุภร กตเวทิน)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ยุกิน ผาสุข)

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ลำปาง แม่นมาตย์)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.อนันต์ พลธานี)

คณบดีคณะเกษตรศาสตร์

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยขอนแก่น

เกษศิริรินทร์ กลิ่นวิชัย. 2554. การปรับปรุงเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในกระป๋องปลัก.

วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: รศ.ดร.เทวินทร์ วงษ์พระลับ,
ผศ.ดร.สุภร กตเวทิน,
ผศ.ดร.ยุพิน ผาสุข

บทคัดย่อ

208806

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลของเซมิโนลพลาสมา สารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง และอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวร่วมกับอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อกระป๋องปลักภายหลังการแช่แข็ง ซึ่งในการทดลองใช้พ่อพันธุ์กระป๋องปลักจำนวน 4 ตัว รีดน้ำเชื้อด้วยโยนิเทียม ประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยเครื่อง CASA และความสมบูรณ์ของอะโครโซมด้วยการย้อมสี FITC-PNA การศึกษาแบ่งออกเป็น 3 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 อิทธิพลของการแยกเซมิโนลพลาสมาต่อคุณภาพน้ำเชื้อกระป๋องปลักภายหลังการแช่แข็ง โดยแบ่งงานทดลองออกเป็น 3 ทริทเมนต์ คือ ทริทเมนต์ที่ 1 กลุ่มที่ไม่ปั่นแยกเซมิโนลพลาสมา (กลุ่มควบคุม) ทริทเมนต์ที่ 2 กลุ่มที่ปั่นที่ความเร็ว 3,700 รอบ 3 นาที ไม่แยกเซมิโนลพลาสมา และทริทเมนต์ที่ 3 กลุ่มที่ปั่นที่ความเร็ว 3,700 รอบ 3 นาที และแยกเซมิโนลพลาสมา จากผลการศึกษาพบว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ไม่แยกเซมิโนลพลาสมา ให้ค่า MOT (39.50 และ 38.44%), PMOT (20.41 และ 21.22%), velocity distribution rapid (28.72 และ 28.72%), BCF (26.60 และ 27.28 Hz) และ intact acrosome (67.06 และ 64.34%) ภายหลังการแช่แข็งสูงกว่ากลุ่มที่แยกเซมิโนลพลาสมา (33.97%, 16.28%, 24.71 Hz, 24.25% และ 58.03%) ตามลำดับ ($P < 0.05$)

การทดลองที่ 2 อิทธิพลของชนิดและระดับของสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อกระป๋องปลักภายหลังการแช่แข็ง โดยทดสอบถึงชนิดของสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง 4 ชนิดๆ ละ 3 ระดับ รวม 12 ทริทเมนต์ ประกอบด้วย Glycerol ความเข้มข้น 5, 7 และ 9%, Dimethylsulfoxide (DMSO) ความเข้มข้น 5, 7 และ 9%, Dimethylacetamide (DMA) ความเข้มข้น 5, 7 และ 9% และ Dimethylformamide (DMF) ความเข้มข้น 5, 7 และ 9% จากผลการศึกษาพบว่ากลุ่มที่ใช้ Glycerol ความเข้มข้น 5 และ 7% ให้ค่า MOT (34.06 และ 34.06%) สูงที่สุด และกลุ่มที่ใช้ Glycerol ความเข้มข้น 5, 7 และ 9% ให้ค่า velocity distribution rapid (26.25, 25.66 และ 25.28%), velocity distribution medium (7.94, 8.53 และ 8.22%), VAP (73.99, 73.31 และ 73.05 $\mu\text{m/s}$) และ intact acrosome (62.34, 64.27

208806

และ 61.13%) หลังการแช่แข็งสูงกว่ากลุ่มที่ใช้ DMSO ความเข้มข้น 5, 7 และ 9%, DMA ความเข้มข้น 5, 7 และ 9% และ DMF ความเข้มข้น 5, 7 และ 9% ตามลำดับ ($P < 0.05$)

การทดลองที่ 3 อิทธิพลของอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวร่วมกับอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อกระบือปลักภายหลังการแช่แข็ง โดยทดสอบอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว 3 ระดับคือ -100 , -120 และ -140°C และอุณหภูมิก่อนการละลายน้ำเชื้อมี 2 ระดับคือ การละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 วินาที และที่อุณหภูมิ 50°C นาน 15 วินาที มี 6 ทริทเมนต์ (combination) จากผลการศึกษาพบว่าอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวร่วมกับอุณหภูมิก่อนการละลายน้ำเชื้อไม่มีอิทธิพลร่วมกันทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -120 และ -140°C ให้ค่า MOT (49.75 และ 53.48%), PMOT (30.31 และ 32.33%), velocity distribution rapid (40.73 และ 43.89%) และ velocity distribution medium (9.00 และ 8.89%) หลังการแช่แข็งสูงกว่าอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -100°C (42.20, 24.75, 34.36 และ 7.91%) ตามลำดับ ($P < 0.01$) และกลุ่มที่ละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 วินาที ให้ค่า intact acrosome (76.09%) หลังการแช่แข็งสูงกว่ากลุ่มที่ละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 50°C นาน 15 วินาที (65.86%) ตามลำดับ ($P < 0.01$)

จากการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเซมินอลพลาสมาส่งผลดีกับคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งและการใช้ Glycerol เป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งที่ระดับ 5% ในสูตรน้ำยาเจี๊องมีประสิทธิภาพมากที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อกระบือปลักแบบแช่แข็ง นอกจากนั้นยังพบว่าอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่เหมาะสมคืออุณหภูมิ -120 และ -140°C และระดับอุณหภูมิก่อนการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งกระบือปลักคือระดับอุณหภูมิ 37°C นาน 30 วินาที

Ketsirin Klinwichai. 2011. **Development of Semen Cryopreservation Techniques**

in Swamp buffalo. Master of Science Thesis in Animal Science, Graduate School,

Khon Kaen University.

Thesis advisors: Assoc. Prof. Dr. Thevin Vongpralub,

Asst. Prof. Dr. Suporn Katawatin,

Asst. Prof. Dr. Yupin Phasuk

ABSTRACT

208806

The objectives of this study were to investigate the effects of seminal plasma, cryoprotectants, and plunge temperature and thawing temperature on post-thaw semen quality in swamp buffalo. Semen samples were collected by artificial vagina from 4 swamp buffalo bulls. Frozen-thawed buffalo semen motility was evaluated by a CASA instrument and acrosome integrity was assessed by a fluorescein isothiocyanate conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA). There were series of three experiments.

Experiment 1. Effect of seminal plasma removal on post-thaw of deep frozen semen quality was evaluated. Semen samples were divided into three treatments. Treatment I: raw semen (control). Treatment II: semen was centrifuged at 3,700 rpm for 3 min and no seminal plasma removal. Treatment III: semen was centrifuged at 3,700 rpm for 3 min and seminal plasma was discarded. The results showed that treatment I and II gave significant higher ($P < 0.05$) post-thaw MOT (39.50 and 38.44%), PMOT (20.41 and 21.22%), velocity distribution rapid (28.72 and 28.72%), BCF (26.60 and 27.28 Hz) and intact acrosome (67.06 and 64.34%) compared with treatment III (33.97%, 16.28%, 24.71 Hz, 24.25% and 58.03% for MOT, PMOT, velocity distribution rapid, BCF and intact acrosome, respectively)

Experiment 2. Effects of type and level of cryoprotectant on post-thaw of deep frozen semen quality. The experiment consisted of 4 types of cryoprotectant i.e. Glycerol, Dimethylsulfoxide (DMSO), Dimethylacetamide (DMA) and Dimethylformamide (DMF), and 3 levels of cryoprotectant i.e. 5, 7 and 9%. Therefore, there were 12 treatment combinations. The results showed that Glycerol at levels of 5 and 7% gave significant highest ($P < 0.05$) post-thaw MOT (34.06 and 34.06%), and Glycerol at 5, 7 and 9% gave significant higher ($P < 0.05$) post-thaw velocity distribution rapid (26.25, 25.66 and 25.28%), velocity distribution medium (7.94, 8.53 and 8.22%), VAP (73.99, 73.31 and 73.05 $\mu\text{m/s}$) and

208806

intact acrosome (62.34, 64.27 and 61.13%) than DMSO at 5, 7 and 9%, DMA at 5, 7 and 9% and DMF at 5, 7 and 9%.

Experiment 3. Effects of plunge temperature and thawing temperature on post-thaw of deep frozen semen quality. The six treatment combinations were carried out on three different plunge temperatures at -100, -120 and -140°C and two thawing temperatures were at 37°C for 30 sec and at 50°C for 15 sec. The results showed that there were no interaction between plunge temperature and thawing temperature treatments. Plunge temperature at -120 and -140°C gave significant higher ($P<0.01$) post-thaw MOT (49.75 and 53.48%), PMOT (30.31 and 32.33%), velocity distribution rapid (40.73 and 43.89%) and velocity distribution medium (9.00 and 8.89%) than plunge temperature at -100°C (42.20, 24.75, 34.36 and 7.91% for MOT, PMOT, velocity distribution rapid and velocity distribution medium, respectively). Thawing temperature at 37°C for 30 sec gave significant higher ($P<0.01$) intact acrosome (76.09%) than thawing temperature at 50°C for 15 sec (65.86%).

The results of this study indicated that seminal plasma could improve post-thaw of deep frozen semen quality. Glycerol 5% was the best cryoprotectant in extender for buffalo semen storage. Additionally, optimum plunge temperatures were at -120 and at -140°C and optimum thawing temperature was at 37°C for 30 sec.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ซึ่งได้รับความกรุณาอย่างยิ่งจากรองศาสตราจารย์ ดร.เทวินทร์ วงษ์พระลับ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้ให้คำแนะนำในการวิจัย ตรวจสอบแก้ไข วิทยานิพนธ์และช่วยดูแลในระหว่างการศึกษาตลอดมา ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุภร กตเวทิน และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ยุพิน ผาสุข ที่ได้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ ทำให้งานวิจัยครั้งนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพ เกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการ อุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ และศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอขอบพระคุณ อาจารย์ น.สพ.ดร. ศักดิ์ศิริ ศิริเสถียร และ อาจารย์ น.สพ.สรารุณี ศรีงาม ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านอุปกรณ์สารเคมีรวมถึงคำแนะนำในการตรวจ คุณภาพน้ำเชื้อ ขอขอบพระคุณ น.สพ.อภิรักษ์ อุทธา ผู้อำนวยการศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ ภาควิชาวันออกเฉียงเหนือ ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านสัตว์ทดลองและอุปกรณ์ในการทดลอง ตลอดจน เจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อฯ ที่ทำให้การทดลองนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี และขอขอบพระคุณ น.สพ.ภาณุพันธ์ พงษ์เพ็ง ผู้อำนวยการศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ผสมเทียมลำพูนกลาง และ คุณจตุพร พงษ์เพ็ง ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านอุปกรณ์และเครื่องมือสำหรับการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ แช่แข็ง และขอขอบพระคุณ ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ห้องปฏิบัติการภาควิชาสัตวศาสตร์และวิทยาการสืบพันธุ์และห้องปฏิบัติการ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และน้องชาย ที่เป็นกำลังใจให้ตลอดมาจน ตลอดจน คณาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอนและแนะนำ และขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นักศึกษา ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความช่วยเหลือตลอดมา

เกษศิริินทร์ กลิ่นวิชัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ฅ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้อง	
2.1 กระบือ	4
2.2 น้ำเชื้อ	4
2.3 การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อและคุณลักษณะของน้ำเชื้อกระบือปลัก	8
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ	11
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์อสุจินอกร่างกาย	13
2.6 การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น	14
2.7 การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง	15
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
3.1 แผนการดำเนินการวิจัย	24
3.2 การเก็บข้อมูล	29
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	30
3.4 วิธีการทดลอง	31
3.5 สถานที่ทำการวิจัย	35
3.6 ระยะเวลาดำเนินการวิจัย	35

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	
4.1 ผลของเขมินอลพลาสมาต่อต่อลักษณะการเคลื่อนที่ และความสมบูรณ์ของอะโครโซมของเซลล์อสุจิกระบือปลัก ภายหลังการแช่แข็ง	36
4.2 ผลของสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งต่อลักษณะการเคลื่อนที่ และความสมบูรณ์ของอะโครโซมของเซลล์อสุจิกระบือปลัก ภายหลังการแช่แข็ง	39
4.3 ผลของอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวและอุณหภูมิ ในการละลายน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อกระบือปลักภายหลังการแช่แข็ง	41
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	
5.1 สรุปผลการทดลอง	49
5.2 ข้อเสนอแนะ	49
เอกสารอ้างอิง	51
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก ภาพงานทดลอง	62
ภาคผนวก ข อุปกรณ์และสารเคมี	66
ภาคผนวก ค การเตรียมสารเคมี	69
ภาคผนวก ง Parameter setting for CASA (computer assisted sperm analysis)	71
ประวัติผู้เขียน	73

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 4-1 ผลของเซมินอลพลาสมาต่อลักษณะการเคลื่อนที่ ของเซลล์สุจิกระบือปลักภายหลังการแช่แข็ง	36
ตารางที่ 4-2 ผลของเซมินอลพลาสมาต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซม ของเซลล์สุจิกระบือปลักภายหลังการแช่แข็ง	37
ตารางที่ 4-3 ผลของสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งต่อลักษณะการเคลื่อนที่ ของเซลล์สุจิกระบือปลักภายหลังการแช่แข็ง	45
ตารางที่ 4-4 ผลของสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งต่อความสมบูรณ์ ของอะโครโซมของเซลล์สุจิกระบือปลักภายหลังการแช่แข็ง	46
ตารางที่ 4-5 ผลของอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว และอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อต่อลักษณะการเคลื่อนที่ ของเซลล์สุจิกระบือปลักภายหลังการแช่แข็ง	47
ตารางที่ 4-6 ผลของอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว และอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซม ของเซลล์สุจิกระบือปลักภายหลังการแช่แข็ง	48

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2-1 โครงสร้างของเซลล์อสุจิ	5
ภาพที่ 3-1 แผนภาพขั้นตอนการทำการทดลองที่ 1	26
ภาพที่ 3-2 แผนภาพขั้นตอนการทำการทดลองที่ 2	27
ภาพที่ 3-3 แผนภาพขั้นตอนการทำการทดลองที่ 3	28
ภาพที่ 3-4 ลักษณะการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ	29
ภาพที่ 3-5 กระบวนการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อแช่แข็ง	32
ภาพที่ 3-6 รูปแบบอะโครโซมของเซลล์อสุจิกระป๋องปลัก	35