การเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็ง

นางสาวทิพย์สุดา บุญมาทัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2556

COLD AND FROZEN STORAGE OF NATIVE CHICKEN " LEUNG HANG KAO " SEMEN

Thipsuda Boonmatan

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Animal Production Technology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2013

การเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็ง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

_____

(อ. ดร.วิทธวัช โมพี)
ประธานกรรมการ

_____

(อ. ดร.สมร พรชื่นชูวงศ์)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

_____

(รศ. ดร.เทวินทร์ วงษ์พระลับ)
กรรมการ

_____

(ผศ. น.สพ. ดร.ภคนิจ คุปพิทยานันท์)
กรรมการ

_____

(ผศ. ดร.อมรรัตน์ โมพี)
กรรมการ

_____

(ศ. ดร.ชูกิจ ลิมปีจำนงค์)
รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและนวัตกรรม

_____

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้โดยได้รับคำแนะนำ ช่วยเหลือ และตรวจแก้ไขของผู้มีพระคุณหลายท่าน ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.สมร พรชื่นชูวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้ให้โอกาสทางการศึกษา ให้คำปรึกษา คำแนะนำ คอยช่วยเหลือเอาใจใส่อย่างดียิ่ง และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เทวินทร์ วงษ์พระลับ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำงานวิจัยครั้งนี้ และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.วิทธวัช โมพี หัวหน้าสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ โมพี และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ. ดร.ภคนิจ คุปพิทยานันท์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ. ดร.บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์ หัวหน้าทีมวิจัยและพัฒนาไก่เนื้อโคราช ที่ให้ความอนุเคราะห์สัตว์ทดลอง ขอขอบพระคุณ คุณธีรชัย ช่อไม้ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์กบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี รวมถึงบุคลากรและพนักงานศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์กบินทร์บุรีทุกท่าน และขอขอบคุณฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี รวมถึงบุคลากรและพนักงานส่วนงานสัตว์ปีก ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ สัตว์ทดลอง ให้คำแนะนำและคอยช่วยเหลือจนวิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อณรงศักดิ์ คุณแม่ระวีวรรณ บุญมาทัน พี่สาว ญาติพี่น้องทุกท่าน ที่สนับสนุนในการศึกษาของข้าพเจ้าตลอดมา สุดท้ายนี้ขอขอบคุณเพื่อน ๆ พี่ ๆ น้อง ๆ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ทุกท่าน ที่ให้ความรัก ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจ จนวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จสมบูรณ์ทุกประการ

ทิพย์สุดา บุญมาทัน

ทิพย์สุดา บุญมาทัน : การเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็ง (COLD AND FROZEN STORAGE OF NATIVE CHICKEN " LEUNG HANG KAO " SEMEN) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร.สมร พรชื่นชูวงศ์, 103 หน้า.

การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็ง แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้ 1) ผลของสารละลายน้ำเชื้อ และระยะเวลาการเก็บรักษาที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็น และ 2) ผลของสารละลายน้ำเชื้อ ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง

การศึกษาผลของสารละลายน้ำเชื้อ และระยะเวลาการเก็บรักษาที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็น โดยใช้สารละลายน้ำเชื้อ 7 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) Beltsville poultry semen extender (BPSE) Lake's diluent IGGKP และ EK) และใช้ 0.9% โซเดียมคลอไรด์ ร่วมกับ 0.2% น้ำตาลกลูโคส เป็นกลุ่มควบคุม ทำการเจือจางน้ำเชื้อในสารละลายน้ำเชื้อแต่ละชนิด และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการทดสอบผลของสารละลายน้ำเชื้อ และระยะเวลาการเก็บรักษาต่ออัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1-7 วัน พบว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ระยะเวลา 1-3 วัน เมื่อใช้สารกลุ่ม modified extender (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) ให้อัตราการเคลื่อนที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมและสารละลายน้ำเชื้อชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษา ($P<0.05$) แต่อย่างไรก็ตามการใช้สารละลายน้ำเชื้อทุกชนิดไม่มีผลต่ออัตราการมีชีวิตที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2-3 วัน เมื่อนำสารละลายน้ำเชื้อที่ให้อัตราการเคลื่อนที่สูงกว่า 60% ซึ่งได้แก่ สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) สาร BPSE และ Lake's diluent มาทำการทดสอบอัตราการผสมติดที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1-5 วัน พบว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ระยะเวลา 1 วัน เมื่อใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ให้อัตราการผสมติดสูงที่สุด 100±0.00% ซึ่งไม่แตกต่างกับการใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm kg^{-1} และ BPSE เมื่อเก็บรักษาในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นเป็นระยะเวลา 4-5 วัน พบว่าการใช้สารกลุ่ม modified extender (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) ให้อัตราการผสมติดสูงกว่ากลุ่มควบคุมและการใช้ Lake's diluent และเมื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพของตัวอสุจิจากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่าระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้โครงสร้างของตัวอสุจิโดยเฉพาะส่วนหัวและส่วน midpiece ถูกทำลาย นอกจากนี้ยังได้ศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (อัตราเร็วในการเคลื่อนที่เฉลี่ยเป็นแนวตรงเมื่อเทียบกับการเคลื่อนที่จริงของตัวอสุจิ (Average Path Velocity : VAP μm/s) อัตราเร็วในการเคลื่อนที่เป็นเส้นโค้ง

ของตัวอสุจิ (Curvilinear Velocity : VCL μm/s) และอัตราเร็วในการเคลื่อนที่เป็นเส้นตรงจากจุดเริ่มต้นถึงจุดสุดท้ายของตัวอสุจิ (Straight Line Velocity : VSL μm/s)) อัตราการมีชีวิต และอัตราการผสมติด ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 5 วัน พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ไม่มีความสัมพันธ์กับอัตราการผสมติดแต่มีความสัมพันธ์กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ ($P<0.01$)

การศึกษาผลของสารละลายน้ำเชื้อ ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็น โดยใช้สารละลายน้ำเชื้อ 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) สาร BPSE และ Lake's diluent) ร่วมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ 4 ชนิด (dimethyl acetamide-DMA dimethyl formamide-DMF dimethyl sulfoxide-DMSO และ glycerol) ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% พบว่าชนิดของสารละลายน้ำเชื้อ และสารไครโอโพรเทคแทนท์มีอิทธิพลร่วมกัน โดยการใช้ BPSE ร่วมกับ DMA และ DMF ที่ระดับความเข้มข้น 15% การใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% DMSO และสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% glycerol ให้อัตราการเคลื่อนที่รวมและอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูงกว่าทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษา ($P<0.05$) จึงได้นำทั้ง 4 ทรีทเมนต์ดังกล่าวมาทดสอบอัตราการผสมติดพบว่า การใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% glycerol ให้อัตราการผสมติดเพียง 9.52±9.52% (4% ของน้ำเชื้อสด) และเมื่อศึกษาลักษณะทางกายภาพของตัวอสุจิจากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่ามีการถูกทำลายโครงสร้างของตัวอสุจิบริเวณส่วนหัวและส่วน midpiece

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2556 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

THIPSUDA BOONMATAN : COLD AND FROZEN STORAGE OF NATIVE CHICKEN " LEUNG HANG KAO " SEMEN. THESIS ADVISOR : SAMORN PONCHUNCHOOVONG, Ph.D.,103 PP.

COLD STORAGE/FROZEN STORAGE/NATIVE CHICKEN/LEUNG HANG KAO/SEMEN

This study examined the feasibility of cold and frozen storage of native chicken " Leung Hang Kao " semen. Two major experiments were carried out. The first experiment was to investigate the effect of extenders and storage times on cold storage of native chicken " Leung Hang Kao " semen. The second experiment was to investigate the effect of extenders, cryoprotectants and their concentrations on the frozen storage of native chicken " Leung Hang Kao " semen.

The effect of seven extenders (modified extenders with osmotic pressure 300, 350 and 400 mOsm kg^{-1}, Beltsville poultry semen extender (BPSE), Lake's diluent, IGGKP and EK) on cold storage of native chicken " Leung Hang Kao " semen was investigated. Fresh semen diluted with 0.9% NaCl and 0.2% glucose was used as a control. Sperm samples were diluted with each extender and stored for seven days at 4°C, and motility and viability rates were assessed every day from day 1 to day 7. After storage for 3 days, the sperm diluted with the modified extenders (300, 350 and 400 mOsm kg^{-1}) showed significantly higher motility rates than the control group and the other extenders ($P<0.05$). None of the extenders used had an effect on viability rates after storage for 3 days ($P>0.05$). Five extenders (modified extenders with osmotic pressure 300, 350 and 400 mOsm kg^{-1}, BPSE and Lake's diluent) were selected and used as a diluent for a fertilization trial, due to yielding motility rates more than 60%. The fertility rate was evaluated from day 1 to day 5. After day 1 of storage, the highest fertility rate (100±0.00%) resulted from the modified

extender with osmotic pressure 400 mOsm kg^{-1}. There was no significant difference between the modified extender with osmotic pressure 350 mOsm kg^{-1} and BPSE ($P>0.05$). With increasing storage times from 4 to 5 days, the sperm diluted with the modified extenders (300, 350 and 400 mOsm kg^{-1}) yielded higher fertility rates than that of the control group and Lake's diluent. The morphological changes of cold semen were observed using Scanning Electron Microscopy (SEM). With increasing storage times, more frequently ruptured plasma membrane damaged were found on the head part and midpiece. In addition, the correlation between motility, velocity parameters (VAP, VCL and VSL), viability and fertility rates were investigated from day 1 to day 5. After storage for 5 days, the correlation between motility, velocity parameters, viability and fertility rates were observed and it was found that the motility rate was no correlation with viability and fertility rates ($p<0.01$).

The effect of five extenders (modified extenders with osmotic pressure 300, 350 and 400 mOsm kg^{-1}, BPSE and Lake's diluent) and four cryoprotectants (DMA, DMF, DMSO and glycerol) at three concentrations (5, 10 and 15%) on the frozen storage of native chicken " Leung Hang Kao " semen were investigated, and an interaction between the extenders and the cryoprotectants were found. The combination of BPSE and 15% DMA or 15% DMF, the modified extender with osmotic pressure 350 mOsm kg^{-1} and 15% DMSO and the modified extender with osmotic pressure 400 mOsm kg^{-1} and 15% glycerol yielded higher progressive rates and motility rates than that of the other treatments ($P<0.05$). These were conducted for fertilization trial. The fertility rate 9.52±9.52% (4% of control) was achieved with a combination of modified extender with osmotic pressure 400 mOsm kg^{-1} and 15% glycerol. SEM was used to assess the physical damage of the frozen semen and it was found that ruptured plasma membrane damaged was commonly found on head part and midpiece.

School of Animal Production Technology Student's Signature_____

Academic Year 2013 Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....ค
กิตติกรรมประกาศ.....จ
สารบัญ.....ฉ
สารบัญตาราง.....ฌ
สารบัญภาพ.....ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....ฑ
บทที่
1 บทนำ.....1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการทำงานวิจัย.....1
1.2 วัตถุประสงค์ในการวิจัย.....2
1.3 สมมุติฐานงานวิจัย.....3
1.4 ขอบเขตของงานวิจัย.....3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3
2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4
2.1 ระบบสืบพันธุ์ในไก่เพศผู้.....4
2.2 กระบวนการสร้างตัวอสุจิ.....5
2.3 โครงสร้างและส่วนประกอบทางเคมีของอสุจิ.....6
2.4 วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อ.....8
2.5 ผลของสาร extender ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์ปีกแบบแช่เย็น.....9
2.6 ผลของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์ปีกแบบแช่แข็ง.....11
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....16
3.1 วิธีการศึกษา.....16
3.1.1 การรีดน้ำเชื้อ.....16

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.1.2 การศึกษาส่วนประกอบไอออนในซีรั่ม (Serum) ค่า pH และค่าออสโมลาลิตี้ของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว....17
3.1.3 การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ....18
1) การประเมินลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ....18
2) การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อ (จำนวนอสุจิต่อหนึ่งมิลลิลิตร)....18
3) ศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ....18
4) ศึกษาอัตราการมีชีวิต....21
5) การศึกษาอัตราการผสมติด....23
6) การศึกษาลักษณะทางกายภาพของตัวอสุจิโดยใช้กล้อง SEM....23
3.1.4 ขั้นตอนและวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็ง....24
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล....38
4.1 ส่วนประกอบไอออนในซีรั่ม ปริมาตร ความเข้มข้น ค่า pH และค่าออสโมลาลิตี้ของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว....38
4.2 ผลของสาร extender และระยะเวลาการเก็บรักษาที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็น....39
4.3 ผลของชนิดของสาร extender ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง....59
5 อภิปรายผล....72
5.1 ผลของสาร extender และระยะเวลาการเก็บรักษาที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็น....72
5.2 ผลของชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง....76
6 สรุปและข้อเสนอแนะ....78
6.1 สรุป....78

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

6.2 ข้อเสนอแนะ.....78
รายการอ้างอิง 79
ภาคผนวก ก. วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี.....84
ภาคผนวก ข. ตารางแสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์.....89
ประวัติผู้เขียน.....103

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1 หลักเกณฑ์การสังเกตอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ.....19

2 ค่า Sperm tracker.....20

3 ค่า Analysis setup.....21

4 ส่วนประกอบทางเคมี (g/25ml) ของสาร extender ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อไก่พื้นเมือง สายพันธุ์เหลืองหางขาว.....25

5 แผนการทดลองการศึกษาสาร extender 7 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) BPSE Lake's diluent IGGKP และ EK) และใช้ 0.9% NaCl ร่วมกับ 0.2% glucose เป็นกลุ่มควบคุม โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD ที่มีการวัดซ้ำ (Repeated Measurements) ซึ่งมีการวัดซ้ำอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิต ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1-7 วัน.....27

6 แผนการทดลองการศึกษาสาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) BPSE และ Lake's diluent) และใช้ 0.9% NaCl ร่วมกับ 0.2% glucose เป็นกลุ่มควบคุม โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD ที่มีการวัดซ้ำ (Repeated Measurements) ซึ่งมีการวัดซ้ำอัตราการผสมติดที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1-5 วัน.....28

7 แผนการทดลองการศึกษาสาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) BPSE และ Lake’s diluent) ร่วมกับการใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็งโดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD.....31

8 แผนการทดลองการศึกษาสาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) BPSE และ Lake’s diluent) ร่วมกับการใช้ DMF เป็นสาร cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD.....32

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

9 แผนการทดลองการศึกษาสาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) BPSE และ Lake's diluent) ร่วมกับการใช้ DMSO เป็นสาร cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD.....32

10 แผนการทดลองการศึกษาสาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) BPSE และ Lake's diluent) ร่วมกับการใช้ glycerol เป็นสาร cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD.....33

11 แผนการทดลองการศึกษาสาร BPSE ร่วมกับ DMA และ DMF ที่ระดับความเข้มข้น 15% สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm kg^{-1}ร่วมกับ 15% DMSO และสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1}ร่วมกับ 15% glycerol ต่ออัตราการผสมติดของการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง.....35

12 ส่วนประกอบไอออนในซีรั่ม ปริมาตร ความเข้มข้น ค่า pH และค่าออสโมลาลิตี้ของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว.....37

13 ผลของสาร extender ที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ (Mean±S.E.) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว เป็นระยะเวลา 1-7 วัน.....40

14 ผลของสาร extender และระยะเวลาการเก็บรักษา ที่มีผลต่ออัตราการมีชีวิต (Mean±S.E.) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว เป็นระยะเวลา 1-7 วัน.....41

15 ผลของสาร extender และระยะเวลาการเก็บรักษา ที่มีผลต่ออัตราการผสมติด (Mean±S.E.) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว เป็นระยะเวลา 1-5 วัน.....45

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

16 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) อัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว ในสาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}), BPSE และ Lake's diluent) ร่วมกับการใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15%.....61

17 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) อัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวในสาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}), BPSE และ Lake's diluent) ร่วมกับการใช้ DMF เป็นสาร cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15%.....63

18 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) อัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวในสาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}), BPSE และ Lake's diluent) ร่วมกับการใช้ DMSO เป็นสาร cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15%.....65

19 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) อัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวในสาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm/kg), BPSE และ Lake's diluent) ร่วมกับการใช้ glycerol เป็นสาร cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15%.....67

20 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) อัตราการผสมติดของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง.....69

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ระบบสืบพันธุ์ของไก่เพศผู้	5
2	โครงสร้างตัวอสุจิของไก่	7
3	การรีดน้ำเชื้อไก่	17
4	สไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (heamacytometer counting chamber ก) บริเวณที่นับจำนวนอสุจิทั้ง 5 บริเวณ (1 2 3 4 และ 5 ข)	18
5	อสุจิมีชีวิตมีลักษณะสีขาว และอสุจิตายจะติดสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้ม เมื่อย้อมด้วยสี Eosin - nigrosin (ภายใต้กล้อง compound microscope กำลังขยาย 100 เท่า)	22
6	กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็น	29
7	กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง	35
8	ผลของระยะเวลาการเก็บรักษา 1-7 วัน ที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว	43
9	ผลของระยะเวลาการเก็บรักษา 1-7 วัน ที่มีผลต่ออัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว	44
10	ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 1-5 วัน ที่มีผลต่ออัตราการผสมติดของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว	47
11	ลักษณะโครงสร้างของตัวอสุจิปกติที่กำลังขยาย 3,000 เท่า โดยใช้กล้อง SEM	48
12	ลักษณะโครงสร้างของตัวอสุจิปกติ ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 วัน ด้วยสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 (A) 350 (B) และ 400 (C) mOsm kg^{-1} สาร BPSE (D) สาร Lake's diluents (E) ที่กำลังขยาย 3,000 เท่าโดยใช้กล้อง SEM	48
13	ลักษณะโครงสร้างของตัวอสุจิที่มีการถูกทำลายเมื่อเก็บรักษาที่ระยะเวลา 1 วัน ด้วยสาร IGGKP (A) สาร EK (B) และ Control (0.9% NaCl ร่วมกับ 0.2% glucose) (C) ที่กำลังขยาย 3,000 เท่า โดยใช้กล้อง SEM	50
14	ลักษณะโครงสร้างของตัวอสุจิปกติเมื่อเก็บรักษาที่ระยะเวลา 4 วัน ด้วยสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 (A), 350 (B) และ 400 (C) mOsm kg^{-1}	51

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

15 ลักษณะโครงสร้างของตัวอสุจิที่มีการถูกทำลายเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 วัน ด้วยสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 (A) 350 (B) และ 400 (C) mOsm kg^{-1} สาร BPSE (D) และ Lake's diluents (E) ที่กำลังขยาย 3,000 เท่า โดยใช้กล้อง SEM.....52

16 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP (A) VCL (B) และ VSL(C)) อัตราการมีชีวิต (D) และอัตราการผสมติด (E) ที่เก็บรักษาเป็นระยะเลา 1 วัน.....54

17 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP (A) VCL (B) และ VSL(C)) อัตราการมีชีวิต (D) และอัตราการผสมติด (E) ที่เก็บรักษาเป็นระยะเลา 2 วัน.....55

18 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP (A) VCL (B) และ VSL(C)) อัตราการมีชีวิต (D) และอัตราการผสมติด (E) ที่เก็บรักษาเป็นระยะเลา 3 วัน.....56

19 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP (A) VCL (B) และ VSL(C)) อัตราการมีชีวิต (D) และอัตราการผสมติด (E) ที่เก็บรักษาเป็นระยะเลา 4 วัน.....57

20 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP (A) VCL (B) และ VSL(C)) อัตราการมีชีวิต (D) และอัตราการผสมติด (E) ที่เก็บรักษาเป็นระยะเลา 5 วัน.....58

21 โครงสร้างของตัวอสุจิปกติของน้ำเชื้อสด (A) และตัวอสุจิที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง ด้วยสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% glycerol (B) ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า โดยใช้กล้อง SEM.....70

22 ลักษณะโครงสร้างของตัวอสุจิที่ถูกทำลายเมื่อเก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยสาร BPSE ร่วมกับ DMA (A) และ DMF (B) ที่ระดับความเข้มข้น 15% สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% DMSO (C) และสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% glycerol (D) ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า โดยใช้กล้อง SEM.....70

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ANOVA	=	การวิเคราะห์ความแปรปรวน
BES	=	N N-bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethane sulfonic acid
BPSE	=	Beltsville poultry semen extender
Ca^{2+}	=	แคลเซียม
cAMP	=	cyclic adenosine monophosphate
Cl^{-}	=	คลอไรด์
CoA	=	coenzyme A
CRD	=	แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design)
DNA	=	กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก (Deoxyribonucleic acid)
DMA	=	ไดเมททิลอะซิตะไมท์
DMF	=	ไดเมททิลฟอร์มมาไมท์
DMSO	=	ไดเมททิลซัลฟอกไซด์
EG	=	เอทิลีนไกคอล
Extender	=	สารละลายน้ำเชื้อ
K^{+}	=	โพแทสเซียม
Mg^{2+}	=	แมกนีเซียม
Na^{+}	=	โซเดียม
NaCl	=	โซเดียมคลอไรด์
OsO_4	=	ออสเมียม
PEG	=	โพลีเอทิลีนไกคอล
PVA	=	โพลีไวนิลแอลกอฮอล์
PVP	=	พอลิไวนิลไพโรลิโดน
r	=	ค่าสหสัมพันธ์
S.D.	=	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
SEM	=	กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscopy)
SE	=	ค่าความคลาดเคลื่อน
TALP	=	Tyrode medium supplemented with albumin lactate and pyruvate
TES	=	N-Tris (hydroxyethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid
TES	=	turkey semen extender

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

VAP	=	อัตราเร็วในการเคลื่อนที่เฉลี่ยเป็นแนวตรงเมื่อเทียบกับการเคลื่อนที่จริงของตัวอสุจิ(Average Path Velocity)
VCL	=	อัตราเร็วในการเคลื่อนที่เป็นเส้นโค้งของตัวอสุจิ (Curvilinear Velocity)
VSL	=	อัตราเร็วในการเคลื่อนที่เป็นเส้นตรงจากจุดเริ่มต้นถึงจุดสุดท้ายของตัวอสุจิ (Straight Line Velocity)

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการทำงานวิจัย

ในอดีตเกษตรกรไทยมีการเลี้ยงไก่พื้นเมืองไว้เพื่อบริโภคในครัวเรือน และมีการขายไก่พื้นเมืองเมื่อเกษตรกรต้องการใช้เงินเพื่อใช้จ่ายในครอบครัว (อภิชัย รัตนวราหะ, 2541) ซึ่งเนื้อไก่พื้นเมืองถือได้ว่าเป็นแหล่งโปรตีนที่มีรสชาติดี มีเนื้อแน่นและมีไขมันน้อย จึงทำให้ไก่พื้นเมืองมีราคาสูงกว่าไก่กระทงประมาณ 20-30% (วัลลภ คงเพิ่มพูน, 2544) นอกจากนี้ยังมีการจัดตั้งชมรมสมาคม เพื่ออนุรักษ์และพัฒนาสายพันธุ์ไก่พื้นเมืองให้เป็นสายพันธุ์ไก่ชนอีกด้วย แต่ในช่วงที่ผ่านมาได้เกิดการระบาดของโรคไข้หวัดนก เกิดจากเชื้อไวรัสสายพันธุ์ H5N1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรครุนแรง จึงก่อให้เกิดความเสียหายต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีกและเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ปีก ประเทศไทยได้พบการระบาดของเชื้อไวรัสไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ครั้งแรกเมื่อวันที่ 23 มกราคม พ.ศ. 2547 จึงทำให้รัฐบาลต้องออกมาตรการควบคุมการระบาดของโรคไข้หวัดนกโดยการทำลายสัตว์ปีกที่เป็นพาหะซึ่งรวมถึงไก่พื้นเมืองด้วยประมาณ 60,811,081 ตัว (สำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรค กรมปศุสัตว์, 2549) ซึ่งการทำลายไก่เป็นจำนวนมากนี้ส่งผลให้ไก่ที่มีพันธุกรรมที่ดีลดจำนวนลง นอกจากนี้ยังเกิดการระบาดของโรคนิวคลาสเซิล ซึ่งสามารถติดต่อได้โดยสัตว์หายใจเอาละอองอากาศที่มีเชื้อไวรัสเข้าไป และสามารถติดต่อผ่านสัตว์พาหะ เช่น นกธรรมชาติ นกป่า และแมลง นอกจากนี้ยังสามารถติดต่อจากการสัมผัสกับสิ่งคัดหลั่งโดยเฉพาะอุจจาระ อาหารและน้ำ รวมถึงการติดต่อผ่านไข่ โดยลูกไก่จะตายภายใน 4-5 วันของการฟัก ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายทั้งระบบการเลี้ยงสัตว์ปีกแบบพื้นบ้านและการเลี้ยงสัตว์ปีกแบบอุตสาหกรรม (วนิดา สร้อยประจักษ์ และ สร้อยนภา กรองสะอาด, 2556) ปัญหาที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ ข้อจำกัดของน้ำเชื้อไก่ที่มีลักษณะหนืดและมีปริมาตรน้อย ซึ่งปริมาตรน้ำเชื้อไก่ที่ได้จากการหลั่งแต่ละครั้งเฉลี่ย 0.11 มิลลิลิตร/ตัว (วิโรจน์ จันทรัตน์, 2540) แต่มีปริมาณความเข้มข้นสูงถึง 600-1,200 ล้านตัว/มิลลิลิตร (Donoghue and Wishart, 2000) จึงทำให้ไม่สะดวกในการนำไปผสมเทียม และจำเป็นต้องมีการเจือจางน้ำเชื้อก่อนนำไปผสมเทียมหรือก่อนนำน้ำเชื้อมาทำการเก็บรักษา โดยพบว่าสามารถเจือจางน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองได้ในอัตราส่วนที่สูงถึง 1 : 8 (อสุจิ : สาร extender) (พรจิต สอนสีดา, เทวินทร์ วงษ์พระลับ และยุพิน ผาสุข, 2552) ดังนั้นการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองน่าจะเป็นเครื่องมือที่จะช่วยแก้ปัญหาดังกล่าว โดยจะสามารถเก็บรักษาพันธุกรรมที่ดีของไก่พื้นเมืองและเป็นวิธีที่ช่วยกระจายพันธุกรรมไก่พื้นเมืองได้รวดเร็ว ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อมีวิธีการเก็บรักษา 2 วิธี คือ

1) การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น จะใช้สาร extender ในการเจือจางน้ำเชื้อจึงเป็นการเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อ และสาร extender ยังเป็นแหล่งพลังงานให้กับตัวอสุจิเพื่อใช้ในกระบวนการเมทาบอลิซึม อีกทั้งสาร extender ยังช่วยยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่และการมีชีวิตให้กับตัวอสุจิ โดยการเลือกชนิดของสาร extender นั้น ควรมีค่า pH และค่าออสโมลาลิตี้ใกล้เคียงกับ seminal fluid ของน้ำเชื้อสัตว์ที่ทำการศึกษา โดยทั่วไปค่า pH และค่าออสโมลาลิตี้ที่เหมาะสมสำหรับสัตว์ปีกจะอยู่ในช่วงระหว่าง 6.0-8.0 และ 250-460 mOsm kg^{-1} ตามลำดับ (Siudzinska and Lukaszewicz, 2008) หากอสุจิอยู่ในสภาวะที่มีค่า pH ต่ำ จะทำให้อสุจิมีการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้น มีการผลิตกรดแลกติก ส่งผลให้อสุจิมีการเคลื่อนที่ลดลง และหากอสุจิอยู่ในสภาวะที่มีค่า pH สูง จะส่งผลให้อสุจิมีอัตราเมทาบอลิซึมสูงขึ้น สำหรับสภาวะที่มีค่าออสโมลาลิตี้ต่ำจะทำให้เซลล์อสุจิบวม และสภาวะที่มีค่าออสโมลาลิตี้สูงจะทำให้เซลล์อสุจิมีการสูญเสียน้ำและเกิดภาวะเซลล์เหี่ยว ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นนี้จะสามารถแก้ปัญหาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่มีลักษณะหนืดและมีปริมาตรน้อยให้สามารถนำไปผสมกับแม่ไก่ได้ง่ายขึ้นและผสมให้กับแม่ไก่ได้ในจำนวนที่เพิ่มขึ้น และแก้ปัญหาการเคลื่อนย้ายพ่อพันธุ์ที่มีคุณภาพดีไปผสมกับแม่ไก่พันธุ์ดี ซึ่งจะช่วยลดการระบาดของโรคติดต่อในสัตว์ปีกได้ 2) การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งจะอาศัยการทำงานของสาร extender ร่วมกับสาร cryoprotectant โดยสาร cryoprotectant มีหน้าที่ป้องกันอันตรายเซลล์อสุจิระหว่างกระบวนการแช่แข็ง ซึ่งจะสามารถเก็บรักษาพันธุกรรมที่ดีของไก่พื้นเมืองไว้ในรูปแบบ sperm bank ถึงแม้พ่อพันธุ์จะไม่มีชีวิตอยู่ โดยมีการรายงานว่าสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งได้นานถึง 9 ปี โดยไม่ลดอัตราการผสมติด (Lake, 1986) ซึ่งในช่วงที่ผ่านมาพบว่าการศึกษาทางด้านการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อย และผลการศึกษายังมีความแปรปรวนซึ่งเนื่องมาจากปัญหาในการเลือกใช้สารเคมีที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อทั้งแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็ง ได้แก่ สาร extender สาร cryoprotectant และอัตราการลดอุณหภูมิ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็ง โดยใช้ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวเป็นต้นแบบในการศึกษา เพื่อที่จะหาชนิดของสาร extender และระยะเวลาการเก็บรักษาที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็น หาชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง เพื่อเป็นประโยชน์ในการใช้น้ำเชื้อไก่พื้นเมืองให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด

1.2 วัตถุประสงค์ในการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาชนิดของสาร extender และระยะเวลาการเก็บรักษาที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็น

1.2.2 เพื่อศึกษาชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง

1.3 สมมุติฐานงานวิจัย

1.3.1 ชนิดของสาร extender และระยะเวลาการเก็บรักษา มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่เก็บรักษาแบบแช่เย็น

1.3.2 ชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

การวิจัยครั้งนี้มุ่งเน้นเพื่อศึกษาชนิดของสาร extender และระยะเวลาการเก็บรักษาที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็น ศึกษาชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง โดยประเมินคุณภาพน้ำเชื้อจากอัตราการเคลื่อนที่ ลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP VCL และ VSL) อัตราการมีชีวิต และอัตราการผสมติด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบชนิดของสาร extender และระยะเวลาการเก็บรักษาที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็น ทราบชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง ซึ่งการศึกษาดังกล่าวนี้จะเป็นประโยชน์ให้กับองค์กรภาครัฐที่เกี่ยวข้องกับการอนุรักษ์พันธุกรรมและความหลากหลายทางชีวภาพ เพื่อเป็นการส่งเสริมและพัฒนาสายพันธุ์ไก่พื้นเมืองไทยให้ยั่งยืน

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ระบบสืบพันธุ์ในไก่เพศผู้

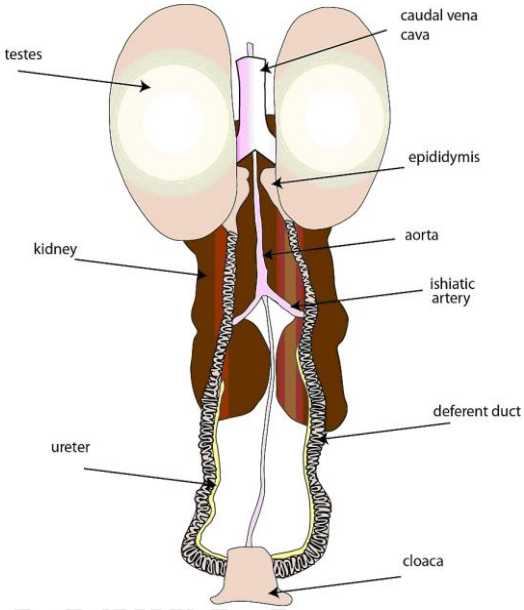
ระบบสืบพันธุ์ของไก่เพศผู้จะอยู่ภายในร่างกาย ซึ่งแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีลูกอัณฑะอยู่ภายนอกร่างกาย โดยระบบสืบพันธุ์ของไก่เพศผู้มีส่วนประกอบดังนี้

1) ลูกอัณฑะ (Testes) มี 1 คู่ ลักษณะคล้ายเมล็ดถั่ว ถูกหุ้มอยู่ใน visceroperitoneal sac ซึ่งจะยึดติดอยู่กับกระเพาะแท้ ตับ และลำไส้เล็ก โดยลูกอัณฑะทั้งสองข้างจะอยู่ติดกับผนังด้านบนของช่องท้องในแนวกลางลำตัว ซึ่งส่วนท้ายของลูกอัณฑะจะเกินขอบเขตไปถึงกลีบหน้าของไตทั้งสองข้าง (ภาพที่ 1) เนื้อเยื่อของลูกอัณฑะจะประกอบไปด้วยท่อ seminiferous สำหรับสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Spermatozoa) ระหว่างท่อ seminiferous จะพบ leydig cell ที่ทำหน้าที่สร้างฮอร์โมนเพศผู้ (Testosterone) โดยท่อ seminiferous ของไก่เพศผู้ที่ยังไม่สมบูรณ์พันธุ์จะมีขนาดเล็ก และถูกหุ้มด้วยเซลล์บุผิวชั้นเดียวเป็นชนิด simple cuboidal epithelium ซึ่งมี sertori cell และ spermatogonia cell อยู่ภายในท่อ สำหรับลูกอัณฑะของไก่เพศผู้ที่สมบูรณ์พันธุ์จะมีท่อ seminiferous ขนาดใหญ่ และถูกหุ้มด้วยเยื่อ tunica propria ที่มีรูปร่างไม่แน่นอน และที่ส่วนฐานของท่อจะมีเนื้อเยื่อบุผิวที่เป็นเซลล์สืบพันธุ์คือ sertori cell ซึ่งเป็นแหล่งอาหารของเซลล์สืบพันธุ์ภายในท่อสร้างน้ำเชื้อ โดยลูกอัณฑะจะมีหน้าที่สร้างตัวอสุจิ ผลิตฮอร์โมนเพศผู้ ควบคุมหน้าที่ของอวัยวะที่ทำหน้าที่พิเศษต่าง ๆ ของระบบสืบพันธุ์ ควบคุมการแสดงออกของลักษณะเพศผู้ และควบคุมการแสดงออกทางการเกี้ยวพาราสีของไก่เพศผู้

2) ถุงเก็บตัวอสุจิ (Epididymis) ในสัตว์ปีกจะมีขนาดเล็กและมองเห็นไม่ชัดเจนเหมือนสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ทั้งนี้เนื่องจากท่อ efferent ductules ไม่ได้อยู่รวมกันอย่างหนาแน่นที่ส่วนปลายหัวของถุงเก็บตัวอสุจิ แต่มันจะเรียงกระจายไปตามความยาวของถุงเก็บตัวอสุจิ ท่อดังกล่าวจะเปิดออกสู่ท่อของถุงเก็บตัวอสุจิ ซึ่งท่อนี้มีลักษณะเป็นท่อตรง และมีขนาดสั้น เยื่อบุผิวภายในคาดอยู่ด้วยเยื่อบุผิวชนิดไม่มีขน ในไก่เพศผู้ที่อยู่ในระยะสมบูรณ์พันธุ์จะมีตัวอสุจิอยู่เป็นจำนวนมากภายในท่อ efferent ductules

3) ท่อ Dectus deferens มีลักษณะการเรียงตัวแบบซิกแซกขนานกับท่อปัสสาวะ (ภาพที่ 1) ปลายท่อนี้จะไปเปิดทางด้านล่างเยื้องไปทางส่วนยูโรเดียมในส้วงทวาร โดยส่วนปลายตำแหน่งที่เปิดเข้าส่วนยูโรเดียมจะขยายโป่งพอง รูปร่างคล้ายกระสวย โดยเรียกส่วนพองของท่อนี้ว่า erectile papilla ซึ่งจะฝังตัวอยู่ในกล้ามเนื้อของส้วงทวาร ยกเว้นส่วนปลายสุดประมาณ 2-3 มิลลิเมตร จะ

ยื่นโผล่ออกมาเป็นติ่งสั้น (papilla) ของ dectus deferens โดยส่วนปลายของท่อจะกว้างที่สุดและผนังหนาที่สุด ภายในท่อ dectus deferens ของไก่เพศผู้ที่อยู่ในช่วงสมบูรณ์พันธุ์ จะมีตัวอสุจิอยู่เป็นจำนวนมาก และตัวอสุจิจะใช้เวลาเคลื่อนตัวจากส่วน rete testis จนถึงปลายท่อ ductus defferns เป็นระยะเวลา 1-4 วัน



ภาพที่ 1 ระบบสืบพันธุ์ของไก่เพศผู้

ที่มา : http://www.poultryhub.org/physiology/body-systems/reproductive-system/

4) Phallus เป็นอวัยวะสืบพันธุ์ของสัตว์ปีกเพศผู้ มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าไม่ชัดเจน จะสังเกตเห็นได้เพียงว่ามีเนื้อเยื่อแข็งตัวขนาดเล็กยื่นโพล่ออกมาทางด้านล่างของส่วน proctodeum ในระหว่างการผสมพันธุ์อวัยวะส่วนนี้จะสัมผัสกับส่วนยื่นของช่องคลอดของไก่เพศเมีย โดยกลไกการแข็งตัวของ phallus จะเกิดขึ้นได้เมื่อมีของเหลวคล้ายน้ำเหลืองมาคั่งที่ส่วนนี้และโครงสร้างอื่น ๆ ภายในส้วงทวารที่เกี่ยวข้อง

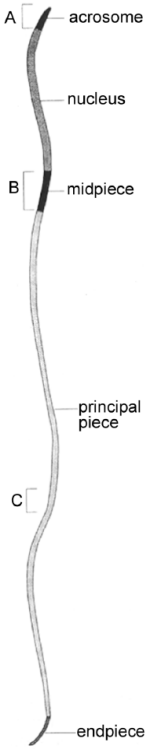
2.2 กระบวนการสร้างตัวอสุจิ

การสร้างตัวอสุจิในลูกอัณฑะจะเกิดขึ้นได้ดีที่สุดเมื่ออุณหภูมิภายในลูกอัณฑะต่ำกว่าอุณหภูมิร่างกายประมาณ 3 หรือ 4 องศาเซลเซียส ดังนั้นการสร้างตัวอสุจิจะเกิดขึ้นในช่วงเวลากลางคืน ซึ่งเป็นช่วงที่สัตว์ปีกอยู่ในระยะพักผ่อน และอุณหภูมิร่างกายลดลงมากกว่าเวลากลางวัน โดยการสร้างตัวอสุจิจะเกิดขึ้นภายในท่อ seminiferous ซึ่งมีลักษณะเป็นท่อเล็ก ภายในประกอบด้วย

เซลล์ที่เรียกว่า spermatogonia ซึ่งเป็นเซลล์เริ่มต้นของเซลล์สืบพันธุ์ จากนั้นจะมีการแบ่งตัวและเจริญเป็นตัวอสุจิ โดยเริ่มจาก spermatogonia ทำการแบ่งตัวแบบ mitosis เกิดเป็น primary spermatocyte จากนั้นจะแบ่งตัวเป็น secondary spermatocyte และแบ่งตัวต่อไปเป็น spermatid ด้วยวิธีการแบ่งตัวแบบ meiosis จากนั้น spermatid ก็จะเจริญต่อไปเป็นตัวอสุจิ (Spermatozoa) นอกจากนี้ภายในท่อ seminiferous ยังมี sertoli cell ที่ทำหน้าที่ช่วยเหลือในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และเป็นแหล่งอาหารให้กับตัวอสุจิ โดยกระบวนการสร้างตัวอสุจิในไก่จะใช้ระยะเวลาประมาณ 13 วัน

2.3 โครงสร้างและส่วนประกอบทางเคมีของอสุจิ

ตัวอสุจิของไก่มีลักษณะคล้ายไส้เดือน มีความยาวประมาณ 100 มิลลิไมครอน ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ 1) ส่วนหัว มีขนาดยาวประมาณ 12.5 มิลลิไมครอน ภายในประกอบด้วยนิวเคลียส (nucleus) ซึ่งจะบรรจุสารพันธุกรรม (deoxyribonucleic acid, DNA) และโปรตีนฮีสโตน หรือโปรตามีน และมี cytoplasm อยู่ปริมาณน้อย นอกจากนี้ยังมีอะโครโซม (acrosome) ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจาก Golgi apparatus ประกอบด้วยผนังสองชั้น มีลักษณะคล้ายกระสุนปืน เป็นส่วนที่ครอบหัวอสุจิประมาณ 2 ใน 3 ส่วน ภายในบรรจุเอมไซม์หลายชนิด เช่น proacrosin hyaluronidase esterase และ hydrolase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการปฏิสนธิ 2) ส่วนหาง ยาวประมาณ 80 มิลลิไมครอน ประกอบด้วยบริเวณคอ ซึ่งเป็นบริเวณที่เชื่อมต่อระหว่างหัวและหาง แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนกลาง (midpiece) ส่วน principal piece และส่วนปลายหาง (endpiece) โดยส่วนกลางจะติดอยู่กับส่วนหัวด้วย proximal centriole ซึ่งจะเป็นตำแหน่งที่อสุจิจะสลัดส่วนหางออกในขณะที่เข้าผสมกับนิวเคลียสของไข่ นอกจากนี้ส่วน midpiece ยังประกอบไปด้วยไมโตรคอนเดรีย (mitochondria) ประมาณ 30 อัน เรียงตัวเป็นเกลียวรอบ ๆ ไมโครทิวบูล (microtubule) เพื่อสร้างพลังงานให้กับตัวอสุจิ สำหรับส่วน principal piece จะมีเส้นแกนกลาง (axial filament) ซึ่งจะประกอบด้วยเส้นใยเล็ก ๆ เรียงตัวเป็นคู่วางตามแนวยาวไปจนถึงส่วนปลายหาง โดยจะถูกล้อมรอบด้วยเส้นใยอีก 9 คู่ เพื่อช่วยให้อสุจิเคลื่อนที่ไปข้างหน้าได้ โดยโครงสร้างตัวอสุจิของไก่ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครงสร้างตัวอสุจิของไก่
ที่มา : Barrie, (2007)

โดยน้ำเชื้อประกอบด้วย ตัวอสุจิ และ epididymal secretion มีลักษณะเป็นของเหลว ในสัตว์ปีกจะแตกต่างกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคือ น้ำหรือของเหลวในน้ำเชื้อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้มาจากลูกอัณฑะ จากท่อน้ำเชื้อส่วนที่เชื่อมต่ออยู่ในลูกอัณฑะ หรือ epididymis และ vas deferens ร่วมกับของเหลวที่ได้มาจากอวัยวะที่ทำหน้าที่พิเศษ เช่น ต่อม seminal vesicle Cowper's gland prostate grand และ bulbourethal gland แต่สำหรับสัตว์ปีกจะได้มาจากเซลล์ที่ทำหน้าที่ค้ำจุนหรือให้อาหารแก่เซลล์สร้างตัวอสุจิ และจากเซลล์บุผิวภายในท่อของถุงเก็บน้ำเชื้อ และท่อของ vas defferns ได้จากส่วนนูนที่มีเลือดมาเลี้ยงมาก และจาก lymphatic fold ของส้วงทวาร นอกจากนี้จากการศึกษาของ Li, Li, Yang, Zhou and Liu (2012) ได้ศึกษาปริมาณสังกะสี แคลเซียม และทองแดงใน seminal plasma ของน้ำเชื้อไก่เนื้อสายพันธุ์ cobb จากการศึกษาพบว่ามีปริมาณของแคลเซียมสูงกว่า (24.80±0.17 ug kg^{-1}) สังกะสีและทองแดง (6.40±0.20 และ 1.80±0.28 ug kg^{-1} ตามลำดับ) Ilori, Isidahomen and Akano (2012) ได้ศึกษาปริมาณไอออนใน seminal plasma ของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองของประเทศไนจีเรีย พบว่ามีปริมาณของโซเดียม และคลอไรด์ เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Bogusawaka-Tryk, Szymeczko and Piotrowska (2012) ก็

พบว่าในซีรั่มของไก่เนื้อสายพันธุ์ cobb มีปริมาณของโซเดียมและคลอไรด์เป็นองค์ประกอบหลักเช่นกัน โดย Pablo, Dario, Jose and Juan (2011) พบว่าโซเดียม และคลอไรด์ มีบทบาทสำคัญที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยา acrosome reaction โดยปฏิกิริยานี้จะเกิดขึ้นหลังจากกระบวนการ capacitation ซึ่งจะเกิดขึ้นขณะที่ตัวอสุจิผ่านเข้าสู่ corona radiate และเกิดการขาดของเยื้อหุ้มเซลล์ของอะโครโซมที่เชื่อมต่ออยู่กับเยื้อหุ้มเซลล์ของตัวอสุจิ ทำให้เอ็นไซม์ที่อยู่ใน acrosomal cap ออกมาย่อยผนังไข่ชั้น zona pellucida เพื่อเข้าปฏิสนธิ นอกจากนี้ยังพบว่าแคลเซียมมีบทบาทสำคัญที่จะช่วยให้อสุจิเคลื่อนที่ โดยจะส่งผลให้ cyclic adenosine monophosphate (cAMP) มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น (Wishart and Ashizawa, 1987) และจากการศึกษาของ Li et al. (2012) พบว่าแคลเซียมยังมีผลต่อการเมทาบอลิซึม ปฏิกิริยา acrosome reaction และการปฏิสนธิของตัวอสุจิ แต่ในทางตรงกันข้ามจากการศึกษาของ Ilori et al. (2012) พบว่าแคลเซียมมีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตของตัวอสุจิลดลง และจากการรายงานของ Karaca (2001) ยังพบว่าโซเดียม คลอไรด์ และแคลเซียม อาจไม่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ แต่อาจจะเกี่ยวข้องกับสภาวะเครียดอันเนื่องมาจากความร้อน ซึ่งมีผลทำให้ไอออนเหล่านี้มีค่าสูงขึ้น จึงส่งผลทำให้ไม่เกิดการปฏิสนธิ

ดังนั้นจากรวบรวมเอกสารพบว่าการสร้างสาร extender ควรคำนึงถึงองค์ประกอบของไอออนใน seminal plasma หรือในซีรั่มของน้ำเชื้อสัตว์ปีกที่นำมาศึกษา โดยควรมีส่วนประกอบของสารเคมีใกล้เคียงกับส่วนประกอบของไอออนใน seminal plasma หรือซีรั่มของสัตว์ปีกที่นำมาศึกษา แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบว่ามีการศึกษาหาองค์ประกอบของไอออนใน seminal plasma หรือในซีรั่มของไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว ดังนั้นจึงควรศึกษาหาองค์ประกอบดังกล่าวเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับนำไปสร้างสาร extender ให้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับ seminal plasma ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ

2.4 วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อ

วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อสามารถเก็บได้ 2 วิธี คือ 1) การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น และ 2) การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ในครั้งนี้จะทำการศึกษาทั้งการเก็บแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็ง โดยในการเก็บแบบแช่เย็นเป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส โดยใช้สาร extender สำหรับเจือจางน้ำเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อ อีกทั้งยังมีบทบาทในการยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่และลดการใช้พลังงานของตัวอสุจิ และอีกวิธีหนึ่งคือการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็งซึ่งจะต้องอาศัยสาร extender สาร cryoprotectant และอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสม จากนั้นนำน้ำเชื้อที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งเก็บในถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

2.5 ผลของสาร extender ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์ปีกแบบแช่เย็น

การเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์ปีกแบบแช่เย็นมีปัจจัยที่สำคัญคือ สาร extender ซึ่งสาร extender จะใช้เพื่อเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อ รักษาคุณสมบัติและการทำงานของเซลล์อสุจิ มีบทบาทในการควบคุม pH แรงดันออสโมติก เป็นแหล่งพลังงานให้กับตัวอสุจิเพื่อใช้ในกระบวนการเมทาบอลิซึม และช่วยยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่และการมีชีวิตให้กับตัวอสุจิ โดยพบว่าโซเดียมกลูตาเมท (sodium glutamate) เป็นสารที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของสาร extender ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์ปีก ซึ่งมีคุณสมบัติในการควบคุมแรงดันออสโมติก (Lake, 1960) และมีคุณสมบัติในการยืดระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (Donoghue and Wishart, 2000) โดยชนิดของสาร extender ที่เลือกใช้นั้นควรมีค่า pH และค่าออสโมลาลิตี้ใกล้เคียงกับ seminal fluid ของน้ำเชื้อสัตว์ที่ทำการศึกษา เนื่องจากค่า pH ของสาร extender มีผลต่ออัตราเมทาบอลิซึมและการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ซึ่งค่า pH ที่เหมาะสมในสัตว์ปีกจะอยู่ในช่วงระหว่าง 6.0-8.0 (Siudzinska and Lukaszewicz, 2008) หากอสุจิอยู่ในสภาวะที่มีค่า pH ต่ำ จะทำให้อสุจิมีการใช้ออกซิเจนสูง มีการผลิตกรดแลกติก และส่งผลให้การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง และยังมีการรายงานว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อในระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นจะทำให้อสุจิมีการผลิตกรดแลกติกออกมามากขึ้น ส่งผลให้อสุจิอยู่ในสภาวะที่มีค่า pH ต่ำ ดังนั้นการเคลื่อนที่ของอสุจิจึงลดลง และถ้าอสุจิอยู่ในสภาวะที่มีค่า pH สูงจะส่งผลให้ตัวอสุจิมีอัตราเมทาบอลิซึมสูงขึ้น ซึ่งการเติมสารประเภท buffer ได้แก่ phosphate citrate และสารที่จัดอยู่ในประเภท zwitterionic (สารที่มีทั้งประจุบวกและประจุลบ) ได้แก่ N N-bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethane sulfonic acid (BES) และ N-Tris (hydroxyethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid (TES) จะสามารถช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงค่า pH ได้ (Donoghue and Wishart, 2000) และปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือค่าออสโมลาลิตี้ ซึ่งค่าออสโมลาลิตี้ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์ปีกจะอยู่ในช่วงระหว่าง 250-460 mOsm kg^{-1} (Siudzinska and Lukaszewic, 2008) หากอสุจิอยู่ในสภาวะที่มีค่าออสโมลาลิตี้ต่ำจะทำให้เซลล์อสุจิบวม แต่ถ้าอสุจิอยู่ในสภาวะที่มีค่าออสโมลาลิตี้สูงจะทำให้เซลล์อสุจิมีการสูญเสียน้ำและเกิดภาวะเซลล์เหี่ยว (Donoghue and Wishart, 2000) ซึ่งที่ผ่านมาได้มีการศึกษาผลของสาร extender ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อในสัตว์ปีกหลายชนิด โดย Morrell, Persson, Tjellstrom, Laessker, Nilsson, Danilova and Holmes (2005) ได้ศึกษาผลของสาร BPSE Ovodyl และ turkey semen extend (TSE) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่งวงที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2 5 20 และ 27 ชั่วโมง โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้ TSE ให้อัตราการเคลื่อนที่สูงที่สุดในทุกช่วงเวลาที่ทำการศึกษา และพบว่าการใช้ BPSE และ TSE ให้อัตราการผสมติด (88.6% และ 84.4% ตามลำดับ) และอัตราการฟักออก (79.0% และ 78.7% ตามลำดับ) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และ Iaffaldano, Manchissi and Rosato (2005) ได้ศึกษาผลของสาร BPSE Lake's diluent และ IGGKP

ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่งวงที่ระยะเวลาการเก็บ 3 24 และ 48 ชั่วโมง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส พบว่าที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 3 ชั่วโมง เมื่อใช้ BPSE Lake's diluent และ IGGKP ให้อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และความสมบูรณ์ของเยื้อหุ้มเซลล์อสุจิไม่แตกต่างกัน (P>0.05) และเมื่อทำการเก็บรักษาในระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นเป็น 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อใช้ BPSE ให้อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และความสมบูรณ์ของเยื้อหุ้มเซลล์อสุจิสูงกว่าการใช้ Lake's diluent และ IGGKP (P<0.05) สำหรับการศึกษาของ Penfold, Harnal, Lynch, Bird, Derrickson and Wildt (2001) ก็พบว่าสามารถใช้ BPSE ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็ดสายพันธุ์ Northern pintail ได้นานถึง 48 ชั่วโมง ซึ่งให้อัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการผสมติดไม่แตกต่างจากการเก็บรักษาที่ระยะเวลา 0 ชั่วโมง (P>0.05) Umapathy, Sontokke, Reddy, Ahmed and Shivaji (2005) ได้ศึกษาผลของสาร Tyrode medium supplemented with albumin lactate and pyruvate (TALP) BPSE และ Lake's diluent ในการเก็บรักษาน้ำเชื้ออีแร้ง (*Gyps bengalensis*) ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 0 1 2 3 4 5 และ 6 ชั่วโมง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อใช้ TALP ให้อัตราการเคลื่อนที่สูงที่สุดและยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิได้ยาวนานที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sontakke, Umapathy, Sivaram, Kholkut and Shivaji (2004) ก็พบว่า TALP ให้อัตราการเคลื่อนที่สูงที่สุด และทำให้ระยะเวลาการเคลื่อนของตัวอสุจิยาวนานที่สุด ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อนกพิราบ (*Columba livia*) ด้วยเช่นกัน จากการศึกษาของ Lake (1960) ได้ศึกษาผลของสาร extender ชนิด A (ไม่มี sodium chloride) และ B (ไม่มีน้ำตาล fructose) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่สายพันธุ์บราวน์เล็กฮอน (Brown Leghorn) ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าสาร extender ชนิด A และ B ให้อัตราการผสมติดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) นอกจากนี้ Pistenma, Shapir and Mel (1971) ได้ศึกษาผลของสาร Egg-yolk medium และ Modified Kreb's solution ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่สายพันธุ์ไวท์เล็กฮอน (White Leghorn) พบว่าการใช้ Modified Kreb's solution ให้อัตราการผสมติดสูงที่สุด นอกจากนี้เทวินทร์ วงษ์พระลับ ยุพิน ผาสุข บัญญัติ เหล่าไพบูลย์ จุฬานีย์ น่วมสุข และพรจิต สอนสีดา (2550) ได้ศึกษาผลของสาร Lake's diluent Tselutin Schramm BPSE และ IGGKP ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ 3 สายพันธุ์ (เหลืองหางขาว คละสี และโร๊ดไอส์แลนด์เรด) ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1 3 และ 6 ชั่วโมง โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อเก็บรักษาที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง การใช้ BPSE และ IGGKP ให้อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวและคละสี (P>0.05) สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่โร๊ดไอแลนด์เรด พบว่าเมื่อใช้ IGGKP ให้อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตสูงที่สุด เทวินทร์ วงษ์พระลับ และคณะ (2550) ยังได้ทำการทดสอบอัตราการผสมติดของการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวและคละสีรวมกัน ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1 ชั่วโมง

พบว่าการใช้ Lake's diluent Tselutin Schramm BPSE และ IGGKP ให้อัตราการผสมติดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) และ Siudzinska and Lukaszewicz (2008) ได้ศึกษาผลของสาร Lake's diluent EK และ Tselutin ต่อลักษณะทางกายวิภาค (morphology) ของตัวอสุจิในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ White Crested Black Polish Italian Partridge Green Legged Partridge และ Black Minorca ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 3 6 และ 24 ชั่วโมง โดยเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าสาร Lake's diluted EK และ Tselutin ทำให้เกิดความผิดปกติบริเวณหัว midpiece ความผิดปกติอื่น ๆ และอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ยกเว้นความผิดปกติบริเวณคอ โดยพบว่า EK ทำให้เกิดความผิดปกติบริเวณคอน้อยที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ทั้ง 4 พันธุ์

จากผลการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับสาร extender ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์ปีก พบว่าการเลือกใช้สาร extender ควรคำนึงถึงชนิดของสัตว์ปีก สำหรับการที่จะคิดค้นสาร extender ขึ้นใหม่นั้นควรที่คำนึงถึงส่วนประกอบไอออนใน seminal plasma ค่า pH และค่าออสโมลาลิตี้ของน้ำเชื้อ ซึ่งสาร extender ที่เตรียมขึ้นควรมีส่วนประกอบใกล้เคียงกับส่วนประกอบใน seminal plasma และควรมีค่า pH ค่าออสโมลาลิตี้ใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสัตว์ที่ทำการศึกษา และที่ผ่านมาการศึกษาในไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวยังมีการศึกษาที่ค่อนข้างน้อย จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าสาร extender ชนิดใดเหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้สาร extender ต่อการเก็บรักษาไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว และจากผลการศึกษาพบว่าอสุจิเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีค่าออสโมลาลิตี้เปลี่ยนแปลงไปจะทำให้ลักษณะทางกายวิภาคของตัวอสุจิเกิดการเปลี่ยนแปลงแตกต่างกัน ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้มีแนวคิดที่จะตรวจสอบคุณสมบัติของสาร extender และระยะเวลาการเก็บรักษาต่อลักษณะของตัวอสุจิที่เปลี่ยนแปลงไป โดยการตรวจสอบด้วยกล้อง SEM

2.6 ผลของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์ปีกแบบแช่แข็ง

ประเทศไทยนั้นยังมีการรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งของไก่พื้นเมืองไทยน้อย และผลการศึกษาค่อนข้างแปรปรวน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัญหาเกี่ยวกับการเลือกใช้สารเคมีต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแช่แข็ง เช่น สาร extender สาร cryoprotectant และนอกจากนี้ยังมีสาเหตุมาจากการเลือกใช้เทคนิคการลดอุณหภูมิที่มีผลทำให้เซลล์อสุจิเกิดการถูกทำลายได้เช่นกัน โดยสาร cryoprotectant เป็นสารที่สำคัญในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง มีหน้าที่ช่วยป้องกันอันตรายแก่เซลล์อสุจิในระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการละลาย สาร cryoprotectant แต่ละชนิด

จะต้องมีระดับความเข้มข้น และระยะเวลา (equilibration time) ที่เหมาะสม เพื่อที่จะออกฤทธิ์และป้องกันการถูกทำลายของเซลล์ ซึ่งสาร cryoprotectant จำแนกออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. สารที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ (Penetrative) ได้แก่ glycerol DMSO DMA Ethylene glycol (EG) และแอลกอฮอล์ เช่น methanol ethanol และ propanediol เป็นต้น สารเคมีเหล่านี้มีมวลโมเลกุลน้อยจึงสามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการละลาย แต่สารเคมีกลุ่มนี้มีข้อเสียอยู่ประการหนึ่งคือ เป็นพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ (Hammerstedt and Graham, 1992)

2. สารที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ (Nonpenetrative) ได้แก่ Polyvinylpyrrolidone (PVP) Polyethylene glycol (PEG) และน้ำตาล เช่น sucrose glucose และ manital เป็นต้น สารเคมีกลุ่มนี้มีมวลโมเลกุลมากจึงไม่สามารถซึมผ่านเซลล์ได้ จึงออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่นอกเซลล์และมีความเป็นพิษน้อยกว่าสาร cryoprotectant ชนิดที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ โดยสาร cryoprotectant ดังกล่าวจะมีผลต่อคุณสมบัติของ ๆ เหลวทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ซึ่งจะช่วยให้เซลล์รอดชีวิตภายหลังจากการแช่แข็งได้เนื่องจาก

- สามารถป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ ซึ่งการเติมสาร cryoprotectant จะทำให้ของเหลวภายในเซลล์แข็งตัวช้ากว่าหรืออุณหภูมิต่ำกว่าของเหลวที่ไม่ได้เติมสาร cryoprotectant และยังช่วยให้น้ำเคลื่อนที่ออกสู่นอกเซลล์ จึงทำให้มีน้ำเหลืออยู่ในเซลล์น้อยลง ดังนั้นการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์จึงน้อยลง

- ป้องกันการลดขนาดของเซลล์ และอันตรายอันเนื่องมาจากความไม่สมดุลของเกลือแร่และอิเล็กโทรไลท์ โดยสาร cryoprotectant จะช่วยปรับเปลี่ยนให้เกิดความสมดุลของโซเดียมระหว่างภายในและภายนอกเซลล์โดยการขนส่งโซเดียมเข้าสู่ภายในเซลล์ เนื่องจากโซเดียมอิออนมีความสามารถจับกับน้ำได้ ดังนั้นจึงเป็นการขนส่งน้ำเข้าสู่เซลล์ด้วย และการแพร่ของสาร cryoprotectant เข้าสู่เซลล์ก็เป็นการเข้าไปแทนที่น้ำที่แพร่ออกจากเซลล์ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของแรงดันออสโมซิส อันเนื่องมาจากการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายนอกเซลล์ก่อนที่ของเหลวภายในเซลล์จะแข็งตัว

- สามารถช่วยคงไว้ของคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มออแกเนลส์ซึ่งยังไม่มีการอธิบายของกลไกการทำงาน แต่อย่างไรก็ตามการควบคุมปริมาณและขนาดของเกล็ดน้ำแข็งที่เกิดขึ้น น่าจะเป็นกลไกหนึ่งที่คงสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มออแกเนลส์ต่าง ๆ

สาร cryoprotectant ที่นำมาใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์ปีกมีหลายชนิด เช่น glycerol DMSO DMA DMF และ EG เป็นต้น ที่ผ่านมาได้มีการศึกษาผลของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์ปีก จากการศึกษาของ Maeda, Hiromi, Takat and Yoshio (1985) ได้ศึกษาการใช้ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 5 7 10 15 และ 20% ร่วมกับ glucose ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ

ไก่สายพันธุ์ไวท์เล็กฮอน (White Leghorn) ด้วยวิธีการแช่แข็งแบบเม็ด โดยมีการทดสอบการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิด้วยวิธีการให้คะแนน 0 (อสุจิทุกตัวไม่เคลื่อนที่) ถึง 5 (อสุจิทุกตัวเคลื่อนที่) พบว่าเมื่อใช้ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 10% ให้การเคลื่อนที่ (4.1±0.7) สูงกว่าการใช้ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 5 15 และ 20% (3.1±0.4 3.0±1.0 และ 2.1±0.6 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) สำหรับการใช้ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 7% ให้อัตราการเคลื่อนที่ (3.8±0.3) ไม่แตกต่างจากการใช้ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 10% (4.1±0.7) จากการศึกษาของ Nural (2002) พบว่าเมื่อใช้ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 7% ร่วมกับ Tris-aminomethan ให้อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตสูงที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ (12.50±4.47% และ 26.56±3.48% ตามลำดับ) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการใช้ glycerol ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็ดเทศโดย Gerzilov (2010) พบว่าเมื่อใช้ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 5% ร่วมกับสาร extender HIA-1 และ AU ด้วยวิธีการแช่แข็งแบบเม็ดมีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่สูงที่สุด (35.33±5.31% และ 31.33±3.63% ตามลำดับ)

Tselutin, Seigneurin and Blesbois (1999) ได้ศึกษาการใช้ glycerol DMA และ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 4 6 8 และ 11% ร่วมกับ Lake's diluent ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่สายพันธุ์ทางการค้า (type I99 roosters) โดยใช้ freezer control ในการลดอุณหภูมิ ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส/นาที จากอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ถึง -35 องศาเซลเซียส และ 20 องศาเซลเซียส/นาที จากอุณหภูมิ -35 องศาเซลเซียส ถึง -140 องศาเซลเซียส พบว่า glycerol เป็นพิษต่อตัวอสุจิน้อยที่สุด ซึ่งให้อัตราการมีชีวิตอยู่ในช่วง 72-76% สำหรับ DMA ให้อัตราการมีชีวิตอยู่ในช่วง 62-68% และการใช้ DMSO มีความเป็นพิษต่อตัวอสุจิสูงที่สุดซึ่งให้อัตราการมีชีวิตอยู่ในช่วง 22-26% และยังพบว่าเมื่อใช้ DMA ที่ระดับความเข้มข้น 6% ร่วมกับ Lake's diluent ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ที่ใช้วิธีการลดอุณหภูมิแบบเม็ดให้อัตราการผสมติด (92.7±4.1%) ไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด (94.7±0.4%) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chalah, Seigneurin, Blesbois and Brillard (1999) ก็พบว่าเมื่อใช้ DMA ที่ระดับความเข้มข้น 6% ร่วมกับ Lake's diluent ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่สายพันธุ์การค้า (Shaver Starbro) ด้วยวิธีการลดอุณหภูมิแบบเม็ดให้อัตราการผสมติด (88.0%) ไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด (93.0%) นอกจากนี้การใช้ DMA ที่ระดับความเข้มข้น 6% ยังประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อห่านโดยใช้ EK เป็นสาร extender ซึ่งพบว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อห่านสายพันธุ์ Greylag ให้อัตราการผสมติดเท่ากับ 37.7% และการเก็บรักษาน้ำเชื้อห่านสายพันธุ์ White Koluda ให้อัตราการผสมติดเท่ากับ 25% ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ Chelmoska, Lukaszewicz, Kowalczyk and Jersz (2006) พบว่าเมื่อใช้ DMA ที่ระดับความเข้มข้น 2 4 และ 6% ร่วมกับ Lake's diluent ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อนกกระทา (*Coturnix* japonica) มีผลทำให้อัตราการผสมติดต่ำ (2.3±5.47% 3.9±6.90% และ 2.8±5.6% ตามลำดับ) ขณะที่น้ำเชื้อสดให้ผลอัตราการผสมติดเท่ากับ 71.5±17.9% Mphaphathi, Luseba and Sutherland (2012) ได้ศึกษาการเก็บ

รักษาน้ำเชื้อไก่สายพันธุ์ Venda โดยใช้ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 8% ร่วมกับ modified Kobidil extender และเปรียบเทียบวิธีการลดอุณหภูมิด้วยการใช้ Freezer control ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียส/นาที จากอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ถึง -20 องศาเซลเซียส กับการลดอุณหภูมิด้วยวิธีอังไอไนโตรเจนเหลว ที่ระดับเหนือไนโตรเจนเหลว 4-6 เซนติเมตร นาน 5 นาที พบว่าการลดอุณหภูมิด้วยวิธีอังไอไนโตรเจนเหลว ให้อัตราการเคลื่อนที่รวมและอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (43.0±7.9% และ 21.6±9.7% ตามลำดับ) สูงกว่าการลดอุณหภูมิด้วยการใช้ Freezer control (2.5±0.9% และ 2.3±1.2% ตามลำดับ) ($P<0.05$) Han, Niu, Liu and Yang (2005) ได้ศึกษาผลของ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 10% ร่วมกับสาร extender 7 ชนิด (Freezing duck semen extender1 Freezing duck semen extender2 BPSE UNIIP-6 B-26 Lake' s diluent และ IGGKP) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็ด พบว่าเมื่อใช้ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 10% ร่วมกับ IGGKP มีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่สูงที่สุด (59%) ($P<0.05$) นอกจากนี้ Han et al., 2005 ยังได้ศึกษาผลของสาร glycerol DMSO DMA และ DMF ที่ระดับความเข้มข้น 4 6 8 และ 10% ร่วมกับ IGGKP ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ซึ่งพบว่าเมื่อใช้ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 10% ให้อัตราการเคลื่อนที่ (73.12%) สูงกว่าและแตกต่างจากทรีทเมนต์อื่น ๆ ยกเว้นการใช้ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 8% (68.12%) และจากการศึกษาของ Gee, Morrell, Franson and Pattee (1993) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อนกเหยี่ยว (*Falco sparverius*) พบว่าเมื่อใช้ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 4 6 8 และ 10% ร่วมกับ BPSE พบว่าการใช้ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 6% ให้อัตราการผสมติดสูงที่สุด (35.29%) ($P<0.05$) นอกจากนี้ Umapathy et al. (2005) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อนกอีแร้ง (*Gyps bengalensis*) โดยใช้ freezer control ในการลดอุณหภูมิ ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียส/นาที จากอุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส ถึง 4 องศาเซลเซียส และ 6 องศาเซลเซียส/นาที จากอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถึง -85 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อใช้ glycerol และ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 4 และ 8% โดยใช้ TALP ร่วมกับ 20% egg yolk เป็นสาร extender ให้อัตราการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) โดยให้ผลอัตราการเคลื่อนที่อยู่ในช่วง 12.5-33.5% Hanzawa, Niinomi, Takahashi, Yamaguchi, Miyata and Tajima (2007) ได้ศึกษาการใช้ N-methyl-acetamide (MA) ที่ระดับความเข้มข้น 7.5% DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 4.5% DMF ที่ระดับความเข้มข้น 4.5% และ DMA ที่ระดับความเข้มข้น 9.0% โดยใช้ HS-1 เป็นสาร extender ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่สายพันธุ์ Barred Plymouth Rock ด้วยวิธีการอังไอไนโตรเจนเหลว ที่ระดับเหนือไอไนโตรเจนเหลว 4-4.5 เซนติเมตร นาน 30 นาที พบว่าการใช้ MA ที่ระดับความเข้มข้น 7.5% ให้อัตราการผสมติดสูงที่สุด (60.8%) ($P<0.05$) นอกจากนี้ยังมีการรายงานการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อในไก่พื้นเมืองไทย โดย ปิยะรัตน์ จันทร์อ่อน วรวิทย์ สิริพลวัฒน์ และอนุชัย ภิญโญภูมิมินทร์ (2554) ได้ศึกษาการใช้สาร DMSO และ EG ที่ระดับความเข้มข้น 6 8 และ 10% โดยใช้ TALP เป็นสาร extender ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่สามเหลืองด้วยวิธีการ

อังไอไนโตรเจนเหลว ที่ระดับเหนือไอไนโตรเจนเหลว 5 เซนติเมตร นาน 10 นาที พบว่าเมื่อใช้ EG ที่ระดับความเข้มข้น 10% และ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 8% ให้อัตราการเคลื่อนที่รวม (50.17±5.71% และ 46.00±5.59% ตามลำดับ) และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (20.00±1.96% และ 19.25±2.29% ตามลำดับ) สูงกว่าทรีทเมนต์อื่น ๆ ($P<0.05$) สำหรับผลอัตราการมีชีวิตพบว่า EG ที่ระดับความเข้มข้น 10% ให้อัตราการมีชีวิตสูงที่สุดเท่ากับ 64.83±0.38% จากการศึกษาของ สุนทร สุนาทัย ธีรชัย ช่อไม้ จตุรงค์ จริยะนรวิชช์ และศิริพันธ์ โมราถบ (2552) ได้เปรียบการใช้สาร glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 10% และ DMF ที่ระดับความเข้มข้น 6% โดยใช้ Sharnm เป็นสาร extender ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองด้วยวิธีการลดอุณหภูมิแบบอังไอไนโตรเจนเหลว พบว่าเมื่อใช้ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 10% ให้อัตราการเคลื่อนที่ (60.00±7.50%) สูงกว่าการใช้ DMF ที่ระดับความเข้มข้น 6% (42.8±4.6%) แต่สาร cryoprotectant ทั้งสองชนิดให้ผลอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) เมื่อนำไปทดสอบอัตราการผสมติดพบว่า glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 10% ไม่ทำให้เกิดการผสมติด (0%) สำหรับ DMF ที่ระดับความเข้มข้น 6% ให้อัตราการผสมติดเท่ากับ 22.83±12.2% และเทวินทร์ วงษ์พระลับ บัญญัติ เหล่าไพบูลย์ พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยาสจี กัณหาเรียง และสราวุธ ศรีงาม (2550) ได้ศึกษาการใช้ EG glycerol DMA และ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 2 4 6 และ 8% ร่วมกับ BPSE ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพบว่าสาร cryoprotectant ทุกชนิด และทุกระดับความเข้มข้น มีผลเสียต่อการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ยกเว้น EG ที่พบว่าให้ผลอัตราการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม และยังได้ศึกษาผลอัตราการผสมติดของสาร DMSO เปรียบเทียบกับ EG ที่ระดับความเข้มข้น 2% ร่วมกับ BPSE พบว่าทั้ง DMSO และ EG ที่ระดับความเข้มข้น 2% ให้อัตราการผสมติดไม่แตกต่างกัน (74.29% และ 59.38% ตามลำดับ) ($P>0.05$)

จากผลการศึกษาเกี่ยวกับสาร cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์ปีก พบว่าการเลือกใช้สาร cryoprotectant ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ปีก ชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant รวมถึงวิธีในการลดอุณหภูมิ และการศึกษาผลของสาร extender และสาร cryoprotectant ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อย จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าสาร extender สาร cryoprotectant และระดับความเข้มข้นใดที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง และจากการรวบรวมเอกสารพบว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองนิยมใช้วิธีการลดอุณหภูมิแบบอังไอไนโตรเจนเหลว ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการใช้สาร extender และสาร cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็ง มีการดำเนินงานวิจัยทั้งในภาคสนามและในห้องปฏิบัติการ ในส่วนของห้องปฏิบัติการนั้นใช้ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยาและกายวิภาคสัตว์ อาคารเครื่องมือ 3 และห้องปฏิบัติการปรับปรุงพันธุ์สัตว์และสรีรวิทยาสัตว์ อาคารเครื่องมือ 10 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำหรับการศึกษาในภาคสนามนั้นใช้ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์กบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี และฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีเป็นสถานที่ในการดำเนินงานวิจัย โดยการศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาชนิดของสาร extender และระยะเวลาการเก็บรักษาที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็น

การทดลองที่ 2 ศึกษาชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง โดยการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวทั้งแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็ง มีการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อจากอัตราการเคลื่อนที่ ลักษณะการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการผสมติด โดยมีวิธีการศึกษา ดังนี้

3.1 วิธีการศึกษา

3.1.1 การรีดน้ำเชื้อ

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้พ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว จากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์กบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี และจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อายุประมาณ 7 เดือนขึ้นไป จำนวน 60 ตัวโดยจะรีดสัปดาห์ละ 2 ครั้ง การรีดน้ำเชื้อจะมีผู้รีด 2 คน คือ คนอุ้มไก่จะกระชับพ่อไก่ไว้ที่เอวยื่นหางไก่ออกข้างหน้า หัวไก่อยู่ด้านหลังของคนอุ้ม มือหนึ่งจะจับขาไก่ทั้ง 2 ข้างรวบเข้าหากัน โดยใช้นิ้วชี้และนิ้วกลางอยู่ระหว่างขาทั้งสอง แล้วใช้มืออีกข้างหนึ่งลูบหลังพ่อไก่เบา ๆ จากโคนปีกผ่านมาที่หลังและโคนหางพอถึงโคนหางใช้นิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้บีบกระตุ้นอย่างรวดเร็วที่โคนหาง ไก่จะแสดงปฏิกิริยากระดกหางขึ้น พร้อมกับดันอวัยวะเพศรูปร่างเป็นลอนคู่ปลายแหลมยื่นออกมาจากรูทวาร ซึ่งอวัยวะดังกล่าวเป็นที่เก็บน้ำเชื้อและฉีดน้ำเชื้อ คนรีดอีกคนหนึ่งจะใช้ภาชนะที่สะอาดรองรับน้ำเชื้อที่ไหลออกมาดังแสดงในภาพที่ 3 ข้อควรระวัง ก่อนรีดน้ำเชื้อจะต้องทำความสะอาดบริเวณทวารด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำสะอาด และใช้กระดาษทิชชู่ซับ เพื่อป้องกันการปนเปื้อน

ปนเปื้อนจากน้ำ และอุจจาระ ซึ่งน้ำเชื้อที่นำมาทำการเก็บรักษาจะต้องไม่ปนเปื้อนจากสิ่งดังกล่าว และจะทำการประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิของพ่อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวเป็นรายตัว โดยน้ำเชื้อที่จะนำมาศึกษานั้นจะต้องมีอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ 75% ขึ้นไป จากนั้นนำน้ำเชื้อที่รีดได้มาผสมรวมกันก่อนนำไปศึกษาต่อไป

ภาพที่ 3 การรีดน้ำเชื้อไก่

3.1.2 การศึกษาส่วนประกอบไอออนในซีรั่ม (Serum) ค่า pH และค่าออสโมลาลิตี้ของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว

เนื่องจากน้ำเชื้อไก่มีปริมาตรน้อย ในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้ซีรั่มของไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวเพื่อศึกษาส่วนประกอบไอออน โดยการนำเลือดที่ได้จากการเจาะเส้นเลือดบริเวณปีก (Wing vain) มาทำการ centrifuged ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยการใช้เครื่อง universal high speed centrifuges รุ่น Z 323 K (Hermle Labortechnik, Wehingen, Germany) หลังจากการ centrifuged จะสังเกตเห็นได้ว่าตัวอย่างเลือดมีการแยกออกเป็นสองส่วน โดยส่วนล่างจะมีลักษณะสีแดงเข้ม คือ เม็ดเลือด และส่วนบนจะมีลักษณะเป็นสีเหลืองใส คือ ซีรั่ม จากนั้นนำไมโครไปเปตดูดส่วนของซีรั่มใส่หลอด ependrof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษาส่วนประกอบของไอออนชนิดต่างๆ ได้แก่ แคลเซียม และแมกนีเซียม โดยใช้เครื่อง Cobas Integra 800 (Roche, Nannhein, Germany) และวิเคราะห์ โซเดียม โพแทสเซียม และคลอไรด์ ด้วยเครื่อง NOVA 4 CRT (Nova Biomedical, Waltham, USA) สำหรับค่า pH และค่าออสโมลาลิตี้ของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว ทำได้โดยนำน้ำเชื้อไก่มาวัดค่า pH ด้วย

เครื่อง Hach pH Meter รุ่น EC10 (Hach, Loveland, USA) และทำการวัดค่าออสโมลาลิตี้ด้วยเครื่อง Fiske Associates Osmometer รุ่น 210 (Fiske Associates, Massachusetts, USA)

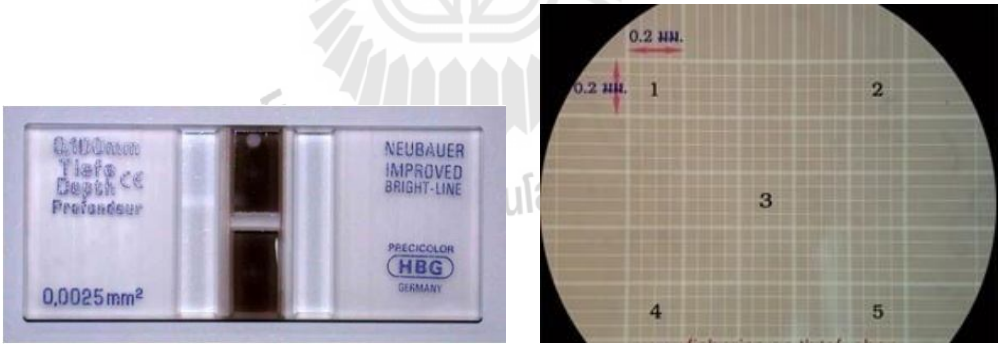
3.1.3 การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

1) การประเมินลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ ควรสังเกตทันทีภายหลังจากการรีดน้ำเชื้อ โดยดูสี ความเข้มข้น และสิ่งเจือปน เช่น อุจาระ ปัสสาวะ และของเสียอื่น ๆ โดยน้ำเชื้อที่จะนำมาศึกษาต้องปราศจากสิ่งปนเปื้อน (อุจจาระ ปัสสาวะ)

2) การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อ (จำนวนอสุจิต่อหนึ่งมิลลิลิตร)

การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อหาได้โดยทำการเจือจางน้ำเชื้อสดด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1 : 1,500 เท่า ขณะที่ทำการดูดน้ำเชื้อควรใช้กระดาษทิชชู่ซับน้ำเชื้อส่วนเกินที่ติดมากับ pipettes tips จากนั้นทำการนับจำนวนอสุจิ โดยใช้สไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (heamacytometer counting chamber) (ภาพที่ 4 ก) ภายใต้กล้อง compound microscope (40X) นับจำนวนอสุจิจากมุมบน-ล่าง ทั้ง 4 มุม และช่องตรงกลาง รวม 5 ช่อง (ภาพที่ 4 ข) แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนอสุจิที่นับได้ต่อ 1 มิลลิลิตร ดังนี้

จำนวนอสุจิ/มิลลิลิตร = (จำนวนอสุจิที่นับได้ทั้ง 5 บริเวณ/5) × 25 × dilution rate × 10^4



(ก.) (ข.)

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

ที่มา : http://shopping.akasdoctor.com/onlinestore/detail.cfm?ID=MEDICARECNR

3) ศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ

การศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิมีวิธีการศึกษา 3 วิธี คือ

วิธีที่ 1 เป็นวิธีการศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิที่ใช้ในภาคสนามก่อนนำน้ำเชื้อมาทำการศึกษา 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)

โดยน้ำเชื้อที่จะนำมาศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็งนั้น ต้องมีการเคลื่อนที่มากกว่า 75%

วิธีที่ 2 เป็นวิธีการศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะแบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ

1) ใช้โปรแกรม Image J สำหรับประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิที่ทำการเก็บรักษาแบบแช่เย็น ทำได้โดยการนำตัวอย่าง (diluted milt) มาเจือจางอีกครั้งด้วยสาร 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) สังเกตการเคลื่อนที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ compound รุ่น Axioskop 40 ที่กำลังขยาย 10X และทำการอัดวีดีโอนาน 10 วินาที โดยใช้กล้องถ่ายวีดีโอรุ่น Sony Model SSC-E458P color video camera SuperExwave ซึ่งต่ออยู่กับกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นนำภาพวีดีโอที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image J โดยมีการกำหนดค่า sperm tracker ดังรายละเอียดในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่า Sperm tracker

	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

2) ใช้เครื่อง Computer Assisted Semen Analysis (CASA) รุ่น version 10 HTM-IVOS (Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA) สำหรับประเมินอัตราการเคลื่อนที่และลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง ทำได้โดยการนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาเจืออีกครั้งด้วยสาร 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 ของเครื่องIVOS จากนั้นเลื่อน stage เข้าไปในเครื่อง IVOS และทำการวิเคราะห์ โดยมีการกำหนดค่า Analysis setup ดังรายละเอียดในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่า Analysis setup

	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 Frequncy	60
Bright Field	No
Chamber depth (μm)	20
Field Selection Mode	Auto

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4) ศึกษาอัตราการมีชีวิต

การศึกษาอัตราการมีชีวิตใช้เทคนิคการย้อมสีด้วย Eosin และ Nigrosin โดยมีวิธีการเตรียมสีย้อมและขั้นตอนการศึกษาอัตราการมีชีวิตดังนี้

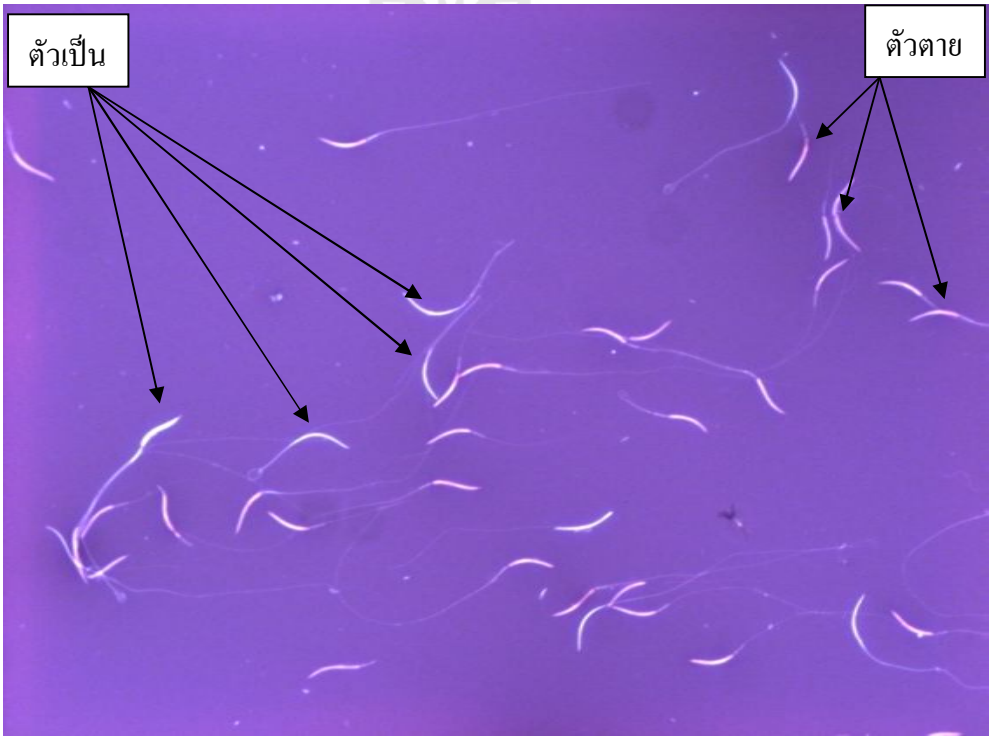
วิธีการเตรียมสีย้อม

ชั่ง Eosin B 1 กรัม Nigrosin 5 กรัม และ Sodium citrate dehydrate 1.5 กรัม ใส่ใน

บีกเกอร์ (Beaker) และเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร โดยให้ความร้อนขณะเตรียมสาร เพราะสารจะไม่ละลาย เมื่อสารละลายเข้ากันดีแล้วนำไปกรอง จนไม่มีตะกอนเหลืออยู่ แล้วนำสีย้อมที่ได้เก็บไว้ในขวดสีชาโดยเก็บที่อุณหภูมิห้อง

วิธีการศึกษาอัตราการมีชีวิตมีขั้นตอนดังนี้

- หยดสี Eosin-Nigrosin dye ลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด (5 ไมโครลิตร) แล้วหยดน้ำเชื้อตัวอย่างข้าง ๆ สีย้อมประมาณ 1 ไมโครลิตร
- ใช้เข็มเขี่ยคนน้ำเชื้อกับสีย้อมให้เข้ากัน จากนั้นใช้แผ่นสไลด์อีกแผ่นหนึ่งเกลี่ยน้ำเชื้อให้กระจายบาง ๆ โดยเกลี่ยเพียงครั้งเดียว
- นำแผ่นสไลด์ที่ smear แล้ว ผึ่งให้แห้งในอุณหภูมิห้อง
- หยดน้ำยาทาเล็บลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด แล้วปิดด้วย cover slide นำไปส่องดูภายใต้กล้อง compound microscope กำลังขยาย 100 เท่า
- นับจำนวนเซลล์ตัวเป็นและตัวตายโดยการสุ่มนับ 5 บริเวณ ๆ ละ 20 เซลล์ โดยที่เซลล์ตัวเป็นจะมีลักษณะสีขาวไม่ติดสีย้อม ส่วนตัวตายจะติดสีย้อมเป็นสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้ม ดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 อสุจิมีชีวิตมีลักษณะสีขาว และอสุจิตายจะติดสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้ม เมื่อย้อมด้วยสี Eosin - nigrosin (ภายใต้กล้อง compound microscope กำลังขยาย 100 เท่า)

5) การศึกษาอัตราการผสมติด

การศึกษาอัตราการผสมติดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็งเป็นการศึกษาในภาคสนามมีวิธีการศึกษาดังนี้

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

อัตราการผสมติด = (จำนวนไข่ที่ผสมติด/จำนวนไข่ที่เข้าฟัก) × 100

6) การศึกษาลักษณะทางกายภาพของตัวอสุจิโดยใช้กล้อง SEM

การศึกษาลักษณะทางกายภาพของตัวอสุจิโดยศึกษาจากภาพถ่ายด้วยกล้อง SEM รุ่น JEOL JSM-640, Japan มีวิธีการเตรียมตัวอย่างดังนี้

- ใช้ไม้จิ้มฟัน smear ตัวอย่างน้ำเชื้อลงบน cover slide ขนาด 0.5 × 0.5 เซนติเมตร แล้วทิ้งไว้ให้แห้ง
- นำแผ่นสไลด์ที่ smear ตัวอย่างแช่ใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1M phosphate buffer pH 7.2 และทิ้งไว้ข้ามคืนในตู้เย็น
- ล้างด้วย phosphate buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที
- แช่ด้วย 1% Osmium (OsO_4) ใน 0.1M phosphate buffer pH 7.2 นาน 2 ชั่วโมง
- ล้างด้วย phosphate 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที
- ขจัดน้ำออกจากตัวอย่างด้วย ethanol ที่ระดับความเข้มข้น 30 50 70 90 95 และ 100% โดยทำระดับความเข้มข้นละ 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
- ทำตัวอย่างให้แห้ง ณ จุดวิกฤต ด้วยเครื่องทำให้แห้ง (Critical point dryer)
- ติดตัวอย่างบนฐานรองตัวอย่าง (stub) ด้วยเทปกาวสองหน้าแบบบาง
- นำไปฉาบทองด้วยเครื่องฉาบทอง (ion sputter)
- นำไปส่องดูเพื่อถ่ายภาพด้วยกล้อง SEM

3.1.4 ขั้นตอนและวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็ง

การเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็ง แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาชนิดของสาร extender และระยะเวลาการเก็บรักษาที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็น มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1. ทำการเตรียมสาร extender 7 สูตร ได้แก่ modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) BPSE Lake's diluent IGGKP และ EK ตามส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 4 โดยใช้ 0.9% NaCl ร่วมกับ 0.2% glucose เป็นกลุ่มควบคุม ทำการวัดค่า pH และค่าออสโมลาลิตี้ของสาร extender นำสาร extender ที่เตรียมไว้ใส่ขวดแก้วปิดฝาให้สนิทเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส

2. นำน้ำเชื้อสดที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 75% ขึ้นไป มาเจือจางกับสาร extender ทั้ง 7 สูตร โดยใช้ 0.9% NaCl ร่วมกับ 0.2% glucose เป็นตัวควบคุม ในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อสาร extender 1 : 3 ในหลอด efpendrof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาอย่างเบา ๆ หลังจากนั้นนำมาเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP VCL และ VSL) และอัตราการมีชีวิต ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1-7 วัน ดังแผนการทดลองแสดงในตารางที่ 5

3. นำสาร extender ที่ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่มากกว่า 60% ได้แก่ สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) BPSE Lake's diluent และกลุ่มควบคุม (0.9% NaCl ร่วมกับ 0.2% glucose) มาทำการทดสอบอัตราการผสมติดที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1-5 วัน ดังแผนการทดลองแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบทางเคมี (g/25ml) ของสาร extender ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว

Composition	Dilutent (g/25ml)							
	Control	modified extender 300 mOsm kg^{-1}	modified extender 350 mOsm kg^{-1}	modified extender 400 mOsm kg^{-1}	BPSE	Lake's diluent	IGGKP	EK
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	-	-
Polyvinylpyroridone (PVP)	-	-	-	-	-	0.0750	-	0.0250

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบทางเคมี (g/25ml) ของสาร extender ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว

Composition	Dilutent (g/25ml)							
	Control	modified extender 300 mOsm kg^{-1}	modified extender 350 mOsm kg^{-1}	modified extender 400 mOsm kg^{-1}	BPSE	Lake's diluent	IGGKP	EK
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

ตารางที่ 5 แผนการทดลองการศึกษาสาร extender 7 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) BPSE Lake's diluent IGGKP และ EK) และใช้ 0.9% NaCl ร่วมกับ 0.2% glucose เป็นกลุ่มควบคุม โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ที่มีการวัดซ้ำ (Repeated Measurements) ซึ่งมีการวัดซ้ำอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1-7 วัน

กลุ่มการทดลอง	สาร extender	อัตราการเคลื่อนที่ (%) ระยะเวลาการเก็บ (วัน)							อัตราการมีชีวิต (%) ระยะเวลาการเก็บ (วัน)						
		1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7
1	Control														
2	modified extender 300 mOsm kg^{-1}														
3	modified extender 350 mOsm kg^{-1}														
4	modified extender 400 mOsm kg^{-1}														
5	BPSE														
6	Lake'sdiluent														
7	IGGKP														
8	EK														

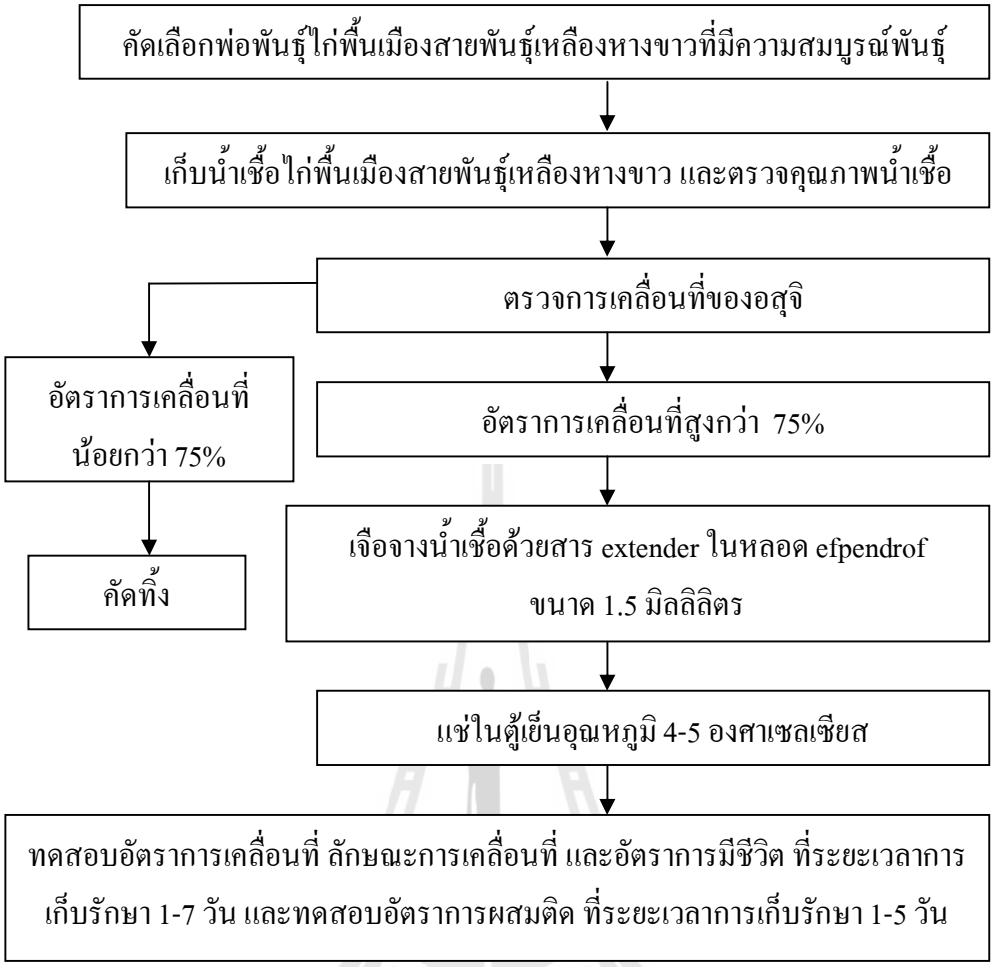
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 6 แผนการทดลองศึกษาสาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) BPSE และ Lake's diluent) และใช้ 0.9% NaCl ร่วมกับ 0.2% glucose เป็นกลุ่มควบคุม โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD ที่มีการวัดซ้ำ (Repeated Measurements) ซึ่งมีการวัดซ้ำอัตราการผสมติด ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1-5 วัน

กลุ่มการทดลอง	**สาร extender**	**อัตราการผสมติด (%)**				
		ระยะเวลาการเก็บ (วัน)				
		1	**2**	**3**	**4**	**5**
1	Control					
2	modified extender 300 mOsm kg^{-1}					
3	modified extender 350 mOsm kg^{-1}					
4	modified extender 400 mOsm kg^{-1}					
5	BPSE					
6	Lake’sdiluent					

โดยขั้นตอนและกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็น ดังแสดงในภาพที่ 6

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 6 กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็น

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ก่อนการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิตินำข้อมูลอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการผสมติดไป Transformed โดยใช้วิธี Arcsine Transformation จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างทรีทเมนต์ (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ CRD ที่มีการวัดซ้ำ (Repeated Measurements) วิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple rang test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างเนื่องจากเวลาด้วย orthogonal polynomials และทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ กับลักษณะการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการผสมติด ด้วยวิธี Pearson's correlation โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 10

การทดลองที่ 2 ศึกษาชนิดของสาร extender ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง

เลือกสาร extender ที่ให้ผลอัตราการผสมติดมากกว่า 50% ซึ่งได้แก่ สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 350 และ 400 mOsm kg^{-1} สาร BPSE และสาร Lake's diluent จากการทดลองที่ 1 มาทำการศึกษาหาชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง ในการศึกษาครั้งนี้ใช้สาร cryoprotectant 4 ชนิด ได้แก่ DMA DMF DMSO และ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% โดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

ขั้นตอนการทดลอง

1. เตรียมสาร extender (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) สาร BPSE และสาร Lake's diluent) วัดค่า pH และค่าออสโมลาลิตี้ จากนั้นนำใส่ขวดแก้วปิดฝาให้สนิทเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส

2. เตรียมสาร cryoprotectant 4 ชนิด ได้แก่ DMA DMF DMSO และ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% โดยใช้สาร extender ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 เป็นตัวทำละลาย และนำสาร cryoprotectant ที่เตรียมไว้ใส่ขวดแก้วปิดฝาให้สนิทเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส

3. นำน้ำเชื้อสดที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 75% ขึ้นไปมาเจือจางด้วยสาร extender ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อสาร extender เท่ากับ 1 : 2 (diluted milt) ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติมสาร cryoprotectant แต่ละชนิด (DMA DMF DMSO และ glycerol) ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% โดยใช้สัดส่วน 1 : 3 (cryodiluent : diluted milt) ดังแผนการทดลองแสดงในตารางที่ 7-10 ซึ่งมีขั้นตอนและกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง ดังแสดงในภาพที่ 7

ตารางที่ 7 แผนการทดลองการศึกษาสาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) สาร BPSE และสาร Lake's diluent) ร่วมกับการใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD

กลุ่มการทดลอง	สาร extender	DMA (%)	อัตราการเคลื่อนที่รวม (%)	อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	อัตราการมีชีวิต (%)
1	modified	5			
2	extender	10			
3	300 mOsm kg^{-1}	15			
4	modified	5			
5	extender	10			
6	350 mOsm kg^{-1}	15			
7	modified	5			
8	extender	10			
9	400 mOsm kg^{-1}	15			
10	BPSE	5			
11		10			
12		15			
13	Lake' diluent	5			
14		10			
15		15			
16	Control	น้ำเชื้อสด			

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 8 แผนการทดลองการศึกษาสาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) สาร BPSE และสาร Lake's diluent) ร่วมกับการใช้ DMF เป็นสาร cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD

กลุ่มการทดลอง	สาร extender	DMF (%)	อัตราการเคลื่อนที่รวม (%)	อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	อัตราการมีชีวิต (%)
1	modified	5			
2	extender	10			
3	300 mOsm kg^{-1}	15			
4	modified	5			
5	extender	10			
6	350 mOsm kg^{-1}	15			
7	modified	5			
8	extender	10			
9	400 mOsm kg^{-1}	15			
10	BPSE	5			
11		10			
12		15			
13	Lake' diluent	5			
14		10			
15		15			
16	Control	น้ำเชื้อสด			

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 9 แผนการทดลองการศึกษาสาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) สาร BPSE และสาร Lake's diluent) ร่วมกับการใช้ DMSO เป็นสาร cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD

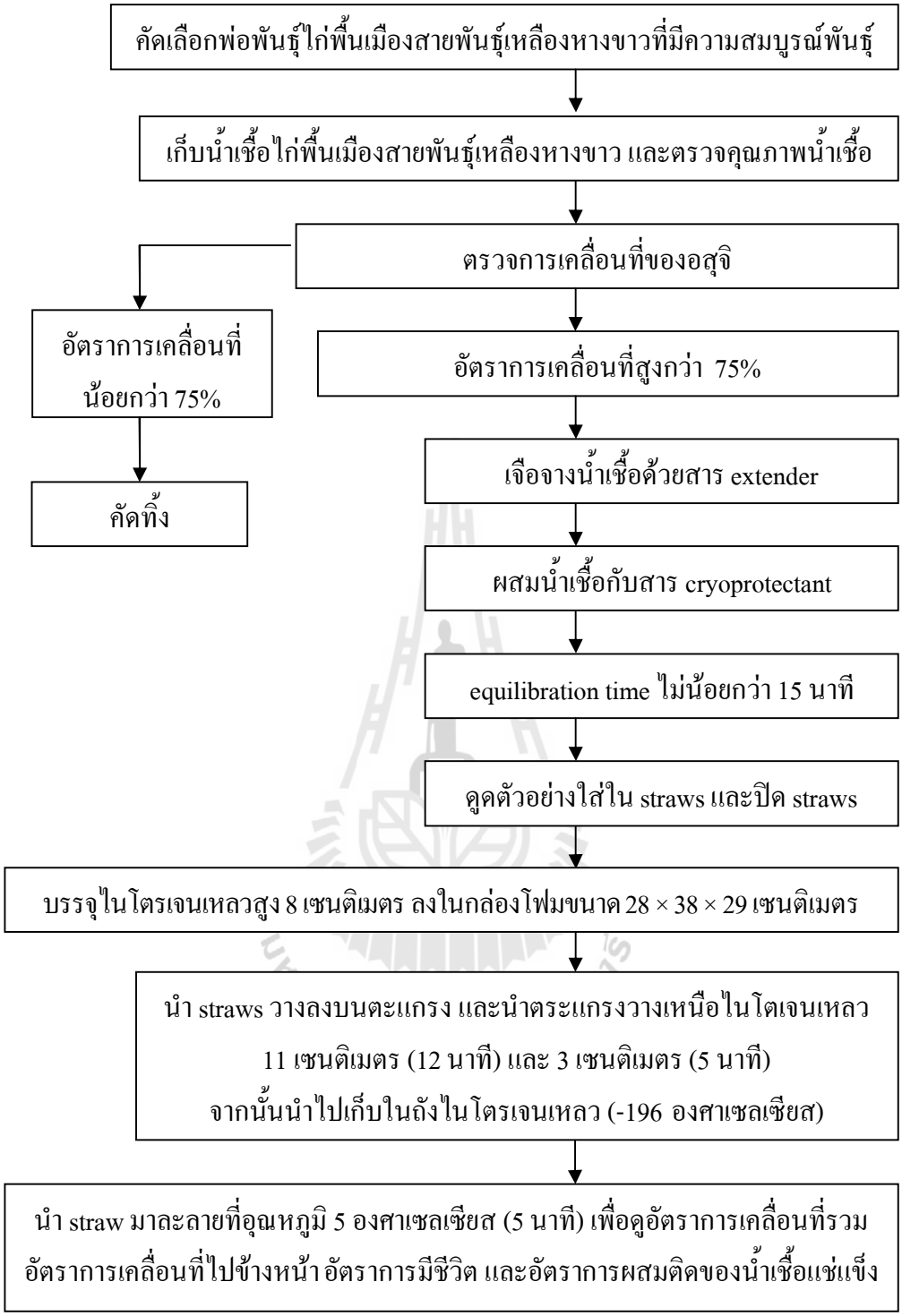
กลุ่มการทดลอง	สาร extender	DMSO (%)	อัตราการเคลื่อนที่รวม (%)	อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	อัตราการมีชีวิต (%)
1	modified	5			
2	extender	10			
3	300 mOsm kg^{-1}	15			
4	modified	5			
5	extender	10			
6	350 mOsm kg^{-1}	15			
7	modified	5			
8	extender	10			
9	400 mOsm kg^{-1}	15			
10	BPSE	5			
11		10			
12		15			
13	Lake' diluent	5			
14		10			
15		15			
16	Control	น้ำเชื้อสด			

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 10 แผนการทดลองการศึกษาสาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) สาร BPSE และสาร Lake's diluent) ร่วมกับการใช้ glycerol เป็นสาร cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD

กลุ่มการทดลอง	สาร extender	glycerol (%)	อัตราการเคลื่อนที่รวม (%)	อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	อัตราการมีชีวิต (%)
1	modified	5			
2	extender	10			
3	300 mOsm kg^{-1}	15			
4	modified	5			
5	extender	10			
6	350 mOsm kg^{-1}	15			
7	modified	5			
8	extender	10			
9	400 mOsm kg^{-1}	15			
10	BPSE	5			
11		10			
12		15			
13	Lake' diluent	5			
14		10			
15		15			
16	Control	น้ำเชื้อสด			

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 7 กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์สายเหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง

4. ใช้ micropipet ดูดน้ำเชื้อปริมาตร 490 ไมโครลิตร ใส่หลอดแช่แข็ง (French straw ขนาด 500 ไมโครลิตร) แล้วปิดหลอดแช่แข็งโดยใช้ผงอุด Polyvinyl alcohol (PVA) ซึ่งหลังจากการเติม

สาร cryoprotectant จะเริ่มจับเวลาจนถึงการนำหลอดน้ำเชื้อวางลงในตระแกรงที่วางอยู่เหนือไนโตรเจนเหลว โดยใช้เวลาประมาณ 15 นาที

5. การเตรียมอุปกรณ์อังไอไนโตรเจนเหลว ทำได้โดยการบรรจุไนโตรเจนเหลวสูง 8 เซนติเมตร ลงในกล่องโฟมขนาด 28 × 38 × 29 เซนติเมตร จากนั้นนำตระแกรงวางเหนือไนโตเจนเหลวที่ระดับ 11 เซนติเมตร นำ straws วางลงบนตะแกรงและจับเวลา โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับเหนือไอไนโตรเจนเหลว 11 เซนติเมตร (12 นาที) และ 3 เซนติเมตร (5 นาที) จากนั้นจุ่มตระแกรงที่มีตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งลงในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) เพื่อเก็บรักษา และรอการทดสอบหาอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิตต่อไป

6. นำทรีทเมนต์ที่ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่รวมและอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าดีสุด ได้แก่ BPSE ร่วมกับ DMA และ DMF ที่ระดับความเข้มข้น 15% สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% DMSO และสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% glycerol มาทำการทดสอบอัตราการผสมติด ดังแผนการทดลองแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แผนการทดลองการศึกษาสาร BPSE ร่วมกับ DMA และ DMF ที่ระดับความเข้มข้น 15% สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% DMSO และสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% glycerol ต่ออัตราการผสมติดของการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง

กลุ่มการทดลอง	สาร extender	สาร cryoprotectant	อัตราการผสมติด (%)
1	BPSE	15% DMA	
2	BPSE	15% DMF	
3	modified extender 350 mOsm kg^{-1}	15% DMSO	
4	modified extender 400 mOsm kg^{-1}	15% glycerol	
5	น้ำเชื้อสด		

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ก่อนการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิตินำข้อมูลอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า

อัตราการมีชีวิต และอัตราการผสมติดไป Transformed โดยใช้วิธี Arcsine Transformation จากนั้นวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ด้วยวิธี Duncan's new multiple rang test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 10

บทที่ 4
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ส่วนประกอบไอออนในซีรั่ม ปริมาตร ความเข้มข้น ค่า pH และค่าออสโมลาลิตี้ของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว

จากการศึกษาพบว่าไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวมีปริมาตรน้ำเชื้อเฉลี่ย 0.39±0.17 มิลลิลิตร/ตัว โดยมีความเข้มข้นของน้ำเชื้อประมาณ 2.40-3.50x10^9 ตัว/มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) มีค่าเท่ากับ 7.23±0.06 ค่าออสโมลาลิตี้มีค่าเท่ากับ 306±0.56 mOsm kg^{-1} และในซีรั่มมีส่วนประกอบของไอออนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ โซเดียม (Na^+) โพแทสเซียม (K^+) แคลเซียม (Ca^{2+}) แมกนีเซียม (Mg^{2+}) และคลอไรด์ (Cl^-) ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ส่วนประกอบไอออนในซีรั่ม ปริมาตร ความเข้มข้น ค่า pH และค่าออสโมลาลิตี้ของน้ำเชื้อไก่พื้นสายเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว

Parameter	*N*	Minimum	Maximum	Mean	S.D.
ปริมาตรน้ำเชื้อ (มิลลิลิตร)	15	0.15	0.80	0.39	0.17
ความเข้มข้นน้ำเชื้อ (x10^9 ตัว/มิลลิลิตร)	15	2.40	3.50	3.03	0.37
ส่วนประกอบไอออนในซีรั่ม					
โซเดียม (mM)	3	152	154	153	1.00
คลอไรด์ (mM)	3	113	115	114	1.00
โพแทสเซียม (mM)	3	4.5	4.8	4.63	0.15
แคลเซียม (mM)	3	10.9	11.1	10.97	0.03
แมกนีเซียม (mM)	3	2.4	2.5	2.47	0.02
pH	3	7.2	7.3	7.23	0.06
Osmolality (mOsm kg^{-1})	3	306	307	306	0.56

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2 ผลของสาร extender และระยะเวลาการเก็บรักษาที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็น

จากการทดลองการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็น ด้วยสาร extender 7 ชนิด ได้แก่ สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) BPSE Lake's diluent IGGKP และ EK โดยใช้ 0.9% NaCl ร่วมกับ 0.2% glucose เป็นกลุ่มควบคุม ภายหลังทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1-7 วัน พบว่าสาร extender ทุกชนิดที่นำมาใช้ในการศึกษามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ โดยการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ระยะเวลา 1 วัน เมื่อใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm kg^{-1} ให้อัตราการเคลื่อนที่ 83.99±0.87% ซึ่งไม่แตกต่างกับสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} (85.67±1.21%) ($P>0.05$) และยังพบว่าให้อัตราการเคลื่อนที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมและสาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษา ($P<0.05$) สำหรับการใช้สาร IGGKP และ EK เป็นสาร extender มีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ต่ำกว่าทรีตเมนต์อื่น ๆ (56.55±1.03% และ 54.84±0.74% ตามลำดับ) ที่ใช้ในการศึกษา ($P<0.05$) เมื่อทำการเก็บรักษาในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นเป็นระยะเวลา 2 วัน พบว่าเมื่อใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) ให้อัตราการเคลื่อนที่สูงไม่แตกต่างกัน (74.55±1.09% 76.79±1.27% และ 76.93±1.04% ตามลำดับ) ($P>0.05$) และให้อัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าทรีตเมนต์อื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษา ($P<0.05$) การเก็บรักษาในระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นเป็นระยะ 3 วัน พบว่าเมื่อใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 mOsm kg^{-1} ให้อัตราการเคลื่อนที่สูง (74.35±2.06%) ซึ่งแตกต่างจากสาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษา ($P<0.05$) ยกเว้นเมื่อใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ให้อัตราการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกัน (70.97±1.48%) ($P>0.05$) การเก็บรักษาในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นเป็นระยะเวลา 4 วัน พบว่าสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 mOsm kg^{-1} ยังคงให้อัตราการเคลื่อนที่สูงที่สุด (62.07±0.86%) และหลังจากการเก็บรักษาที่ระยะเวลา 5 ถึง 7 วัน พบว่าสาร extender ทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษาให้อัตราการเคลื่อนที่ลดลงต่ำกว่า 50% ดังแสดงในตารางที่ 13

สำหรับผลของอัตราการมีชีวิต พบว่าที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1 วัน สาร extender ทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษาให้อัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P>0.05$) ยกเว้นเมื่อใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 และ 400 mOsm kg^{-1} ให้อัตราการมีชีวิตต่ำกว่าและแตกต่างจากทรีทเมนต์อื่น ๆ ($P<0.05$) เมื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อในระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นเป็นระยะเวลา 2 และ 3 วัน พบว่าสาร extender ทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษามีผลทำให้อัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P>0.05$) เมื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นเป็นระยะเวลา 4 ถึง 5 วัน พบว่าสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 mOsm kg^{-1} ให้อัตราการมีชีวิตสูงกว่า

และแตกต่างจากสาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษา ยกเว้นเมื่อใช้สาร IGGKP และสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 และ 400 mOsm kg^{-1} ($P>0.05$) และภายหลังจากการเก็บรักษาที่ระยะเวลา 6 วัน พบว่าเมื่อใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ระดับ 300 mOsm kg^{-1} ให้อัตราการมีชีวิตสูงที่สุด (61.80±1.20%) ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 14

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 13 ผลของสาร extender ที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ (Mean±S.E.) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว เป็นระยะเวลา 1-7 วัน

สาร extender	**ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)**						
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
Control	73.84±1.29^{c}	65.77±1.86^{b}	60.72±1.06^{c}	34.72±1.05^{e}	9.01±1.27^{d}	0.00±0.00^{d}	0.00±0.00^{e}
modified extender 300 mOsm kg^{-1}	80.08±0.93^{b}	74.55±1.09^{a}	74.35±2.06^{a}	62.07±0.86^{a}	37.45±1.25^{a}	26.38±2.33^{a}	14.96±1.49^{c}
modified extender 350 mOsm kg^{-1}	83.99±0.87^{a}	76.79±1.27^{a}	68.11±1.20^{b}	57.62±0.42^{b}	34.77±1.45^{a}	24.89±1.45^{a}	8.26±0.94^{d}
modified extender 400 mOsm kg^{-1}	85.67±1.21^{a}	76.93±1.04^{a}	70.91±1.48^{ab}	38.89±1.01^{d}	20.65±0.98^{c}	8.82±0.61^{c}	7.98±0.87^{d}
BPSE	62.17±1.10^{d}	48.87±3.91^{c}	47.54±1.32^{e}	37.89±0.91^{d}	25.42±0.90^{b}	24.99±2.29^{a}	22.18±0.80^{a}
Lake's diluent	76.65±1.36^{c}	65.87±3.00^{b}	56.10±1.50^{d}	43.24±0.55^{c}	37.87±0.75^{a}	26.52±2.10^{a}	17.96±1.40^{bc}
IGGKP	56.55±1.03^{e}	50.82±1.57^{c}	38.17±1.01^{f}	35.14±0.34^{e}	34.74±0.27^{a}	25.80±0.81^{a}	19.22±0.65^{ab}
EK	54.84±0.74^{e}	47.53±1.73^{c}	34.75±0.97^{f}	34.64±0.99^{e}	26.77±2.61^{b}	19.14±0.76^{b}	15.66±0.91^{c}

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

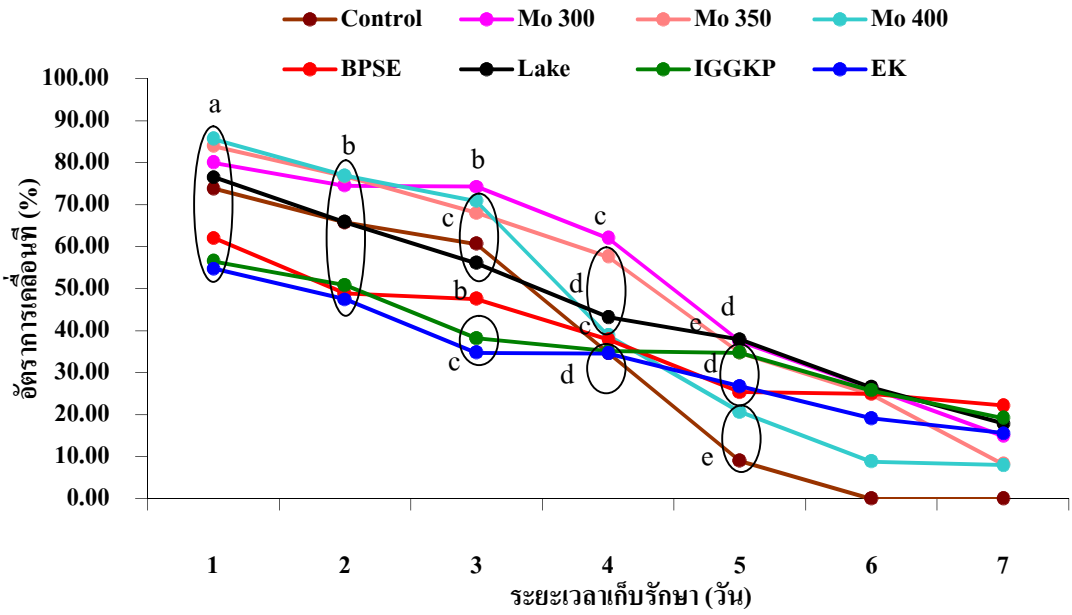
ตารางที่ 14 ผลของสาร extender และระยะเวลาการเก็บรักษา ที่มีผลต่ออัตราการมีชีวิต (Mean±S.E.) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว เป็นระยะเวลา 1-7 วัน

สาร extender	ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)						
	1	2	3	4	5	6	7
Control	88.00±0.63^{a}	77.60±0.60	69.60±0.51	60.80±0.37^{c}	39.40±0.24^{e}	28.20±1.11^{f}	12.80±0.80^{e}
modified extender 300 mOsm kg^{-1}	82.00±0.95^{b}	79.00±1.10	74.00±2.90	70.20±2.18^{a}	61.40±2.38^{a}	61.80±1.20^{a}	37.80±1.46^{a}
modified extender 350 mOsm kg^{-1}	87.00±1.67^{a}	76.60±2.18	73.20±3.15	67.80±1.07^{ab}	59.20±3.09^{ab}	49.20±1.32^{b}	8.00±0.55^{f}
modified extender 400 mOsm kg^{-1}	81.80±1.91^{b}	79.80±1.93	71.40±4.03	68.80±1.36^{a}	59.20±0.97^{ab}	46.80±2.52^{bc}	29.20±2.18^{c}
BPSE	85.00±0.45^{ab}	78.80±0.37	70.60±0.60	55.60±0.87^{d}	46.20±0.58^{d}	37.00±2.70^{ef}	30.80±0.73^{ab}
Lake's diluent	87.60±0.24^{a}	79.40±0.60	72.80±0.49	61.20±1.07^{c}	51.40±1.54^{c}	33.40±1.54^{e}	23.40±1.08^{d}
IGGKP	86.00±0.32^{a}	79.60±0.51	72.00±0.95	67.00±0.95^{ab}	56.80±0.37^{ab}	42.40±1.81^{cd}	33.00±1.14^{bc}
EK	87.20±0.49^{a}	79.40±0.60	71.60±0.51	64.20±1.69^{bc}	55.80±1.11^{bc}	38.20±2.31^{d}	29.20±0.58^{c}

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

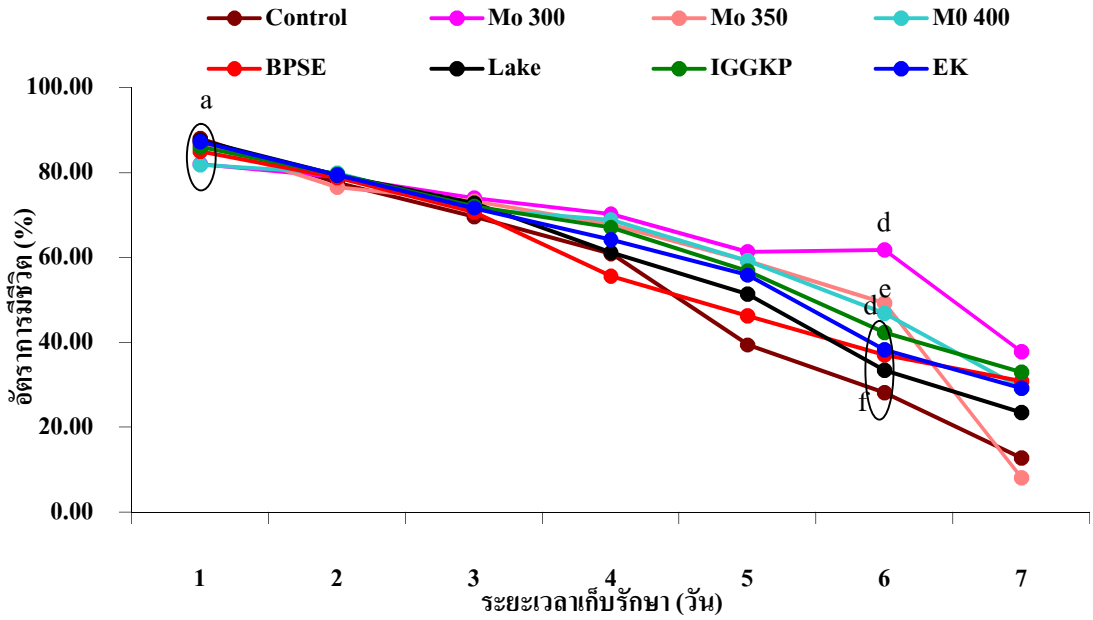
นอกจากนี้จากการศึกษายังพบว่า ระยะเวลาการเก็บรักษามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของตัวอสุจิ โดยพบว่าการใช้สาร extender ทุกชนิดมีแนวโน้มของอัตราการเคลื่อนที่ลดลงแบบเส้นโค้งยกกำลังสี่ เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ($P<0.05$) ซึ่งสาร extender ทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษาให้อัตราการเคลื่อนที่ลดลงเมื่อมีการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ระยะเวลา 2 วัน ($P<0.05$) และการใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 mOsm kg^{-1} สามารถยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิได้ยาวนานที่สุด 4 วัน โดยให้อัตราการเคลื่อนที่เท่ากับ 62.07±0.86% ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษา 1-7 วัน ที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) Mo 300; modified extender 300 mOsm kg^{-1} Mo 350; modified extender 350 mOsm kg^{-1} Mo 400; modified extender 400 mOsm kg^{-1} และ Lake; Lake's diluent

สำหรับผลของอัตราการมีชีวิตพบว่า อัตราการมีชีวิตมีแนวโน้มลดลงแบบเส้นโค้งยกกำลังสี่เช่นเดียวกัน เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ($P<0.05$) โดยการใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 350 และ 400 mOsm kg^{-1} มีการลดลงของอัตราการมีชีวิตช้ากว่าสาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษา และการใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 mOsm kg^{-1} สามารถรักษาอัตราการมีชีวิตได้ยาวนานที่สุด 6 วัน โดยให้ผลอัตราการมีชีวิตเท่ากับ 61.80±1.20% ดังแสดงในภาพที่ 9



ภาพที่ 9 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษา 1-7 วัน ที่มีผลต่ออัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) Mo 300; modified extender 300 mOsm kg^{-1} Mo 350; modified extender 350 mOsm kg^{-1} Mo 400; modified extender 400 mOsm kg^{-1} และ Lake; Lake's diluent

สำหรับผลของสาร extender ต่ออัตราการผสมติด ทำการทดลองโดยนำสาร extender ที่ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่มากกว่า 60% ได้แก่ สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) BPSE และ Lake's diluent โดยมี 0.9% NaCl ร่วมกับ 0.2% glucose เป็นตัวควบคุม มาทำการทดสอบอัตราการผสมติด ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1-5 วัน พบว่าสาร extender ทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษามีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการผสมติด โดยการเก็บรักษาที่ระยะเวลา 1 วัน เมื่อใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ให้อัตราการผสมติดเท่ากับ 100±0.00% ซึ่งไม่แตกต่างจากการใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm kg^{-1} และ BPSE ที่ให้อัตราการผสมติด 93.21±4.53% และ 91.25±5.91% ตามลำดับ ($P>0.05$) สำหรับกลุ่มควบคุมให้อัตราการผสมติดต่ำที่สุด (33.33±7.07%) เมื่อทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อในระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นเป็นระยะเวลา 2 วัน พบว่าเมื่อใช้สารกลุ่ม modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 350 และ 400 mOsm kg^{-1} ให้อัตราการผสมติดสูงกว่าและแตกต่างจากการใช้สาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษา ($P<0.05$) การเก็บรักษาน้ำเชื้อในระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นเป็นระยะเวลา 4 และ 5 วัน พบว่ากลุ่มของสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350

และ 400 mOsm kg^{-1}) ให้อัตราการผสมติดสูงกว่าและแตกต่างจากกลุ่มควบคุมและการใช้ Lake's diluent ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 15

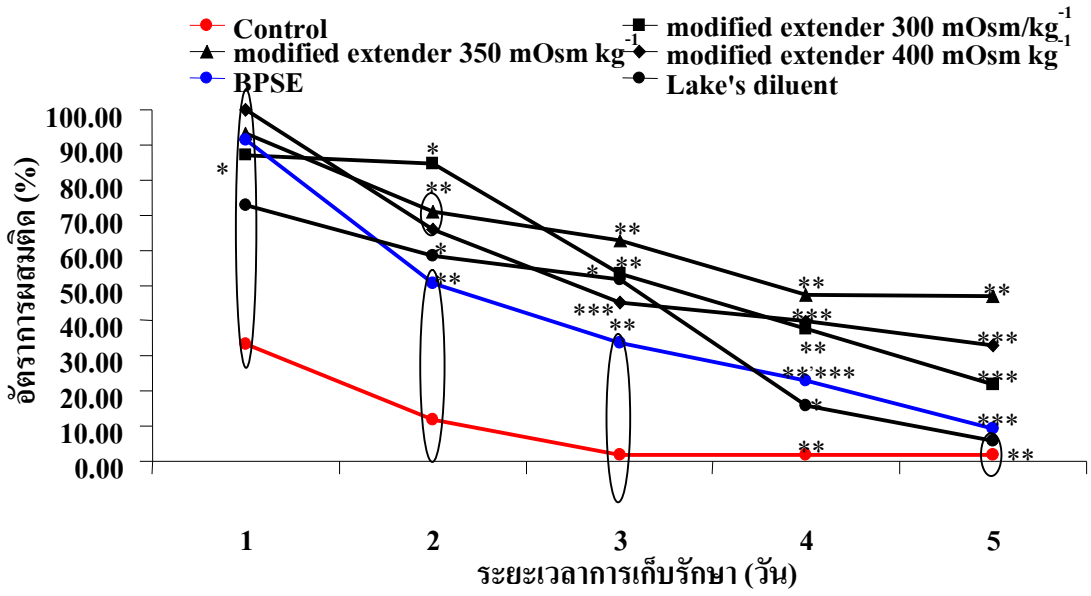
ตารางที่ 15 ผลของสาร extender และระยะเวลาการเก็บรักษา ที่มีผลต่ออัตราการผสมติด (Mean±S.E.) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว เป็นระยะเวลา 1-5 วัน

สาร extender	**ระยะเวลาการเก็บรักษา (วัน)**				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
Control	33.33±7.07^{d}	11.89±8.95^{c}	1.85±1.85^{c}	1.85±1.85^{d}	1.85±1.85^{c}
modified extender 300 mOsm kg^{-1}	86.93±3.60^{bc}	84.52±5.38^{a}	53.45±5.79^{a}	37.58±0.73^{ab}	21.99±1.82^{ab}
modified extender 350 mOsm kg^{-1}	93.21±4.53^{ab}	70.96±3.45^{ab}	62.60±5.12^{a}	47.31±6.65^{a}	46.92±8.58^{a}
modified extender 400 mOsm kg^{-1}	100.00±0.00^{a}	65.81±8.30^{ab}	45.00±4.19^{ab}	39.90±2.39^{ab}	32.90±7.25^{a}
BPSE	91.25±5.91^{ab}	50.56±7.02^{b}	33.68±5.12^{b}	22.77±8.68^{bc}	9.37±6.65^{bc}
Lake's diluent	72.81±2.56^{c}	58.50±4.81^{b}	51.72±2.64^{a}	15.70±2.77^{c}	5.56±5.56^{c}

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการผสมติดมีแนวโน้มลดลงแบบเส้นตรง เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น ($P<0.05$) โดยการใช้ Lake's diluent ไม่มีการเปลี่ยนแปลงผลของอัตราการผสมติดในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา 1 ถึง 3 วัน และการใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 mOsm kg^{-1} ไม่มีการเปลี่ยนแปลงผลของอัตราการผสมติดในช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา 1-2 วัน สำหรับสาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ BPSE และสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 และ 400 mOsm kg^{-1} ให้ผลอัตราการผสมติดลดลง เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นเป็น 2 วัน ดังแสดงในภาพที่ 10

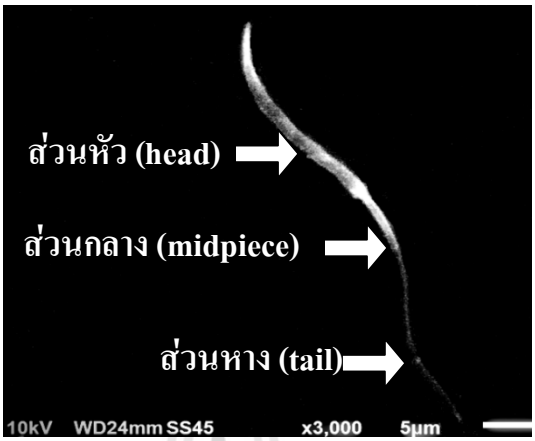


ภาพที่ 10 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาที่ 1-5 วัน ที่มีผลต่ออัตราการผสมติดของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว

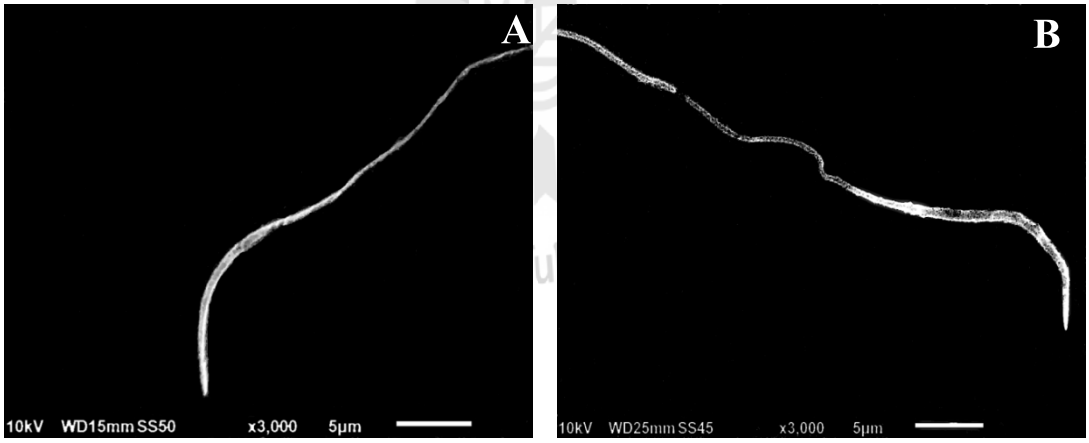
หมายเหตุ : * ** *** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาผลของสาร extender และระยะเวลาการเก็บรักษาต่อลักษณะทางกายภาพของตัวอสุจิ โดยการศึกษาจากภาพถ่ายด้วยกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 3,000 เท่า ซึ่งพบว่าตัวอสุจิปกติของไก่ จะประกอบด้วย 3 ส่วน คือ หัว midpiece และหาง (ภาพที่ 11) โดยส่วนหัวของตัวอสุจิ จะมีลักษณะเรียวแหลมและมีขนาดเล็ก ส่วน midpiece จะมีขนาดสั้นซึ่งต่ออยู่กับส่วนหางที่ยาว แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่าชนิดของสาร extender และระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของตัวอสุจิ โดยการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ระยะเวลา 1 วัน เมื่อใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1})

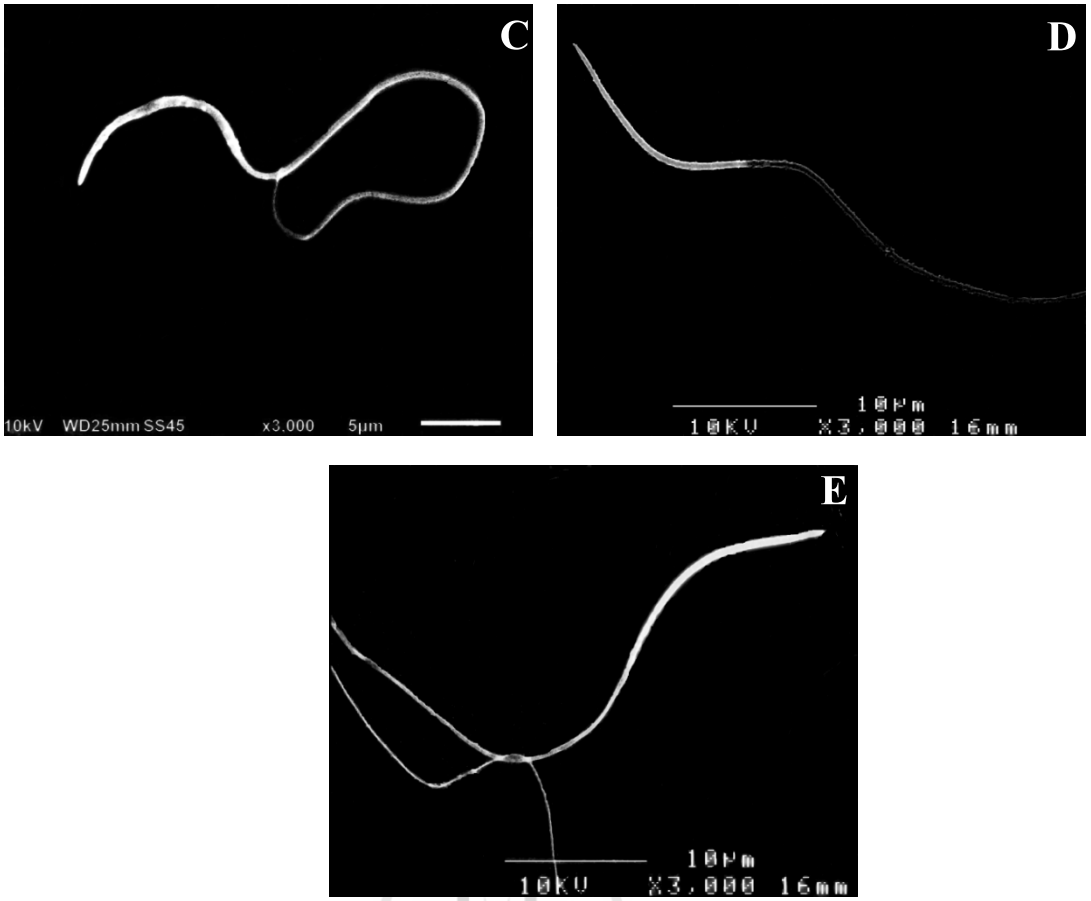
สาร BPSE และสาร Lake's diluent (ภาพที่ 12) พบว่าไม่มีผลต่อโครงสร้างของตัวอสุจิ โดยโครงสร้างของตัวอสุจิยังมีความสมบูรณ์เหมือนกับตัวอสุจิที่ปกติ แต่เมื่อใช้สาร IGGKP (ภาพที่ 13 A) และ EK (ภาพที่ 13 B) เป็นสาร extender พบว่ามีรอยแตกที่บริเวณส่วนของ midpiece นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มควบคุมมีผลทำให้โครงสร้างส่วนหัวของตัวอสุจิขาดหายไป (ภาพที่ 13 C)



ภาพที่ 11 ลักษณะโครงสร้างของตัวอสุจิปกติที่กำลังขยาย 3,000 เท่า โดยใช้กล้อง SEM

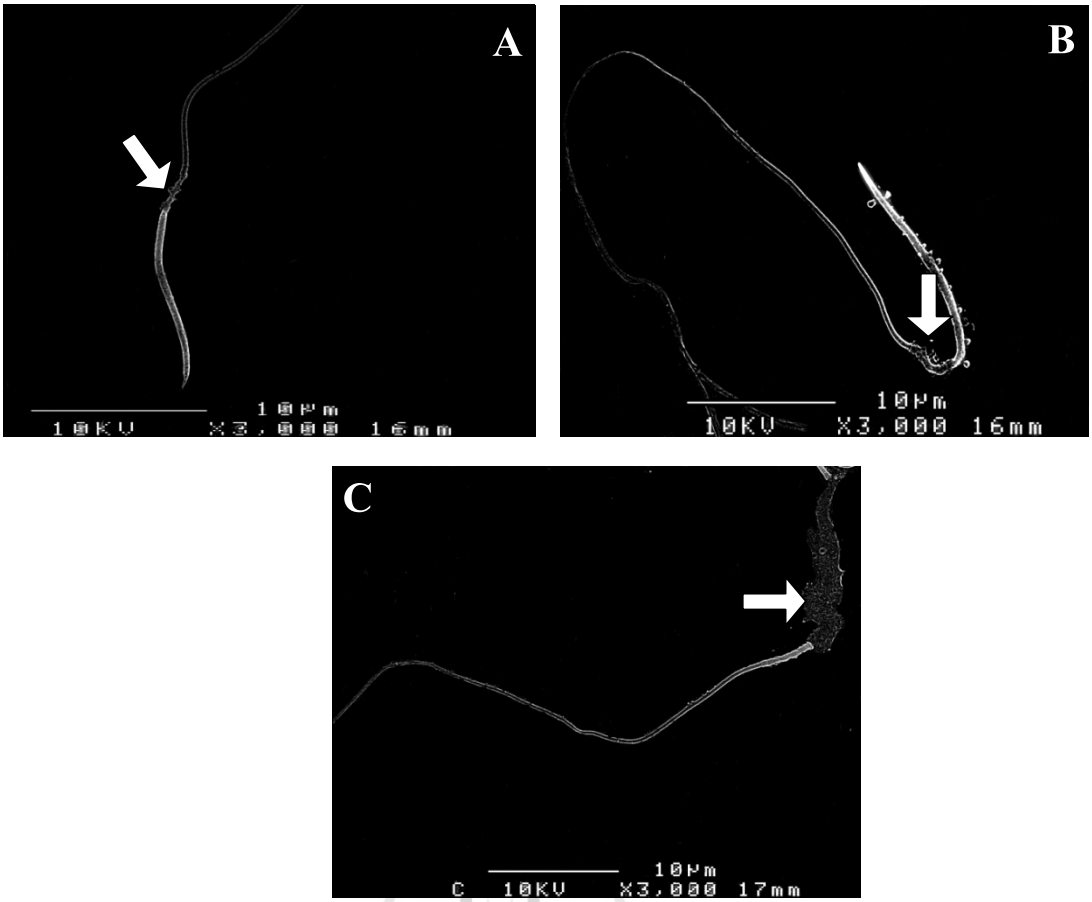


ภาพที่ 12 ลักษณะโครงสร้างของตัวอสุจิปกติ ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 วัน ด้วยสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 (A) 350 (B) และ 400 (C) mOsm kg^{-1} สาร BPSE (D) และสาร Lake's diluent (E) ที่กำลังขยาย 3,000 เท่า โดยใช้กล้อง SEM



ภาพที่ 12 ลักษณะโครงสร้างของตัวอสุจิปกติ ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 วัน ด้วยสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 (A) 350 (B) และ 400 (C) mOsm kg^{-1} สาร BPSE (D) สาร Lake's diluent (E) ที่กำลังขยาย 3,000 เท่า โดยใช้กล้อง SEM (ต่อ)

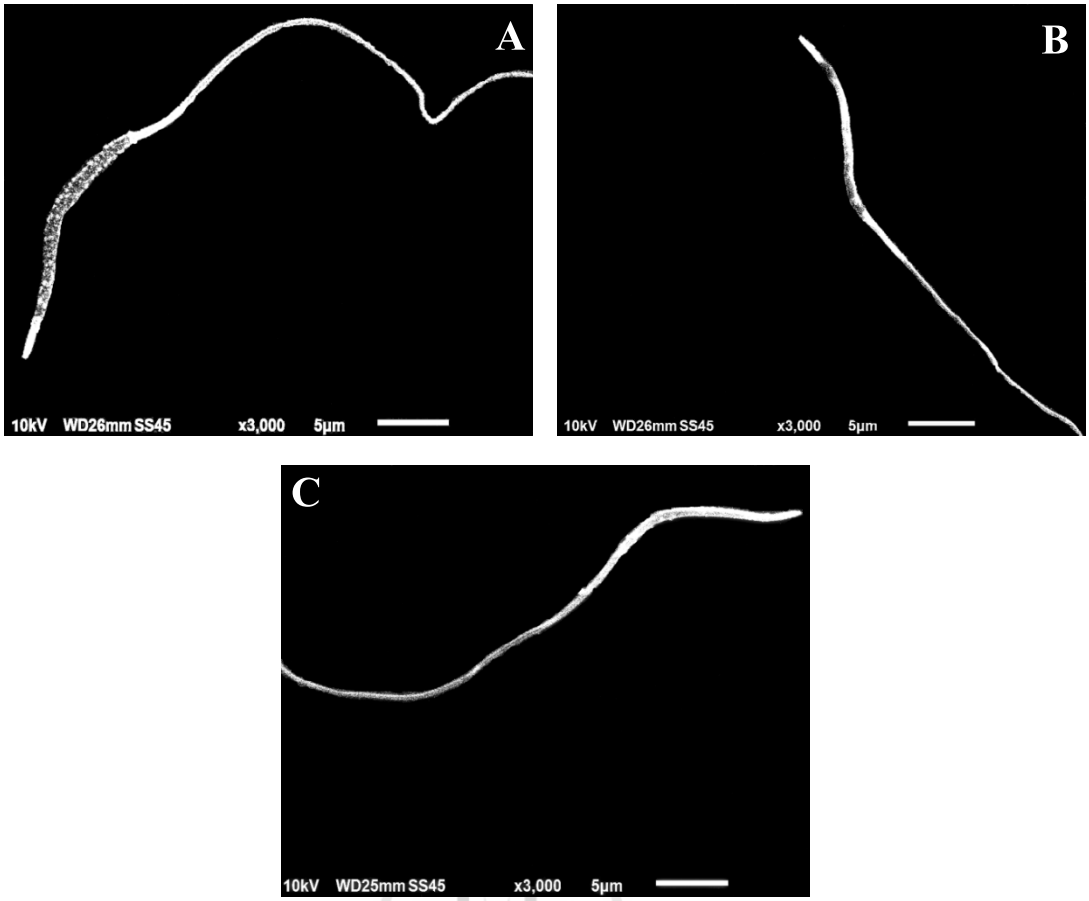
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 13 ลักษณะโครงสร้างของตัวอสุจิที่มีการถูกทำลายเมื่อเก็บรักษาที่ระยะเวลา 1 วัน ด้วยสาร IGGKP (A) สาร EK (B) และ Control (0.9% NaCl ร่วมกับ 0.2% glucose) (C) ที่กำลังขยาย 3,000 เท่า โดยใช้กล้อง SEM

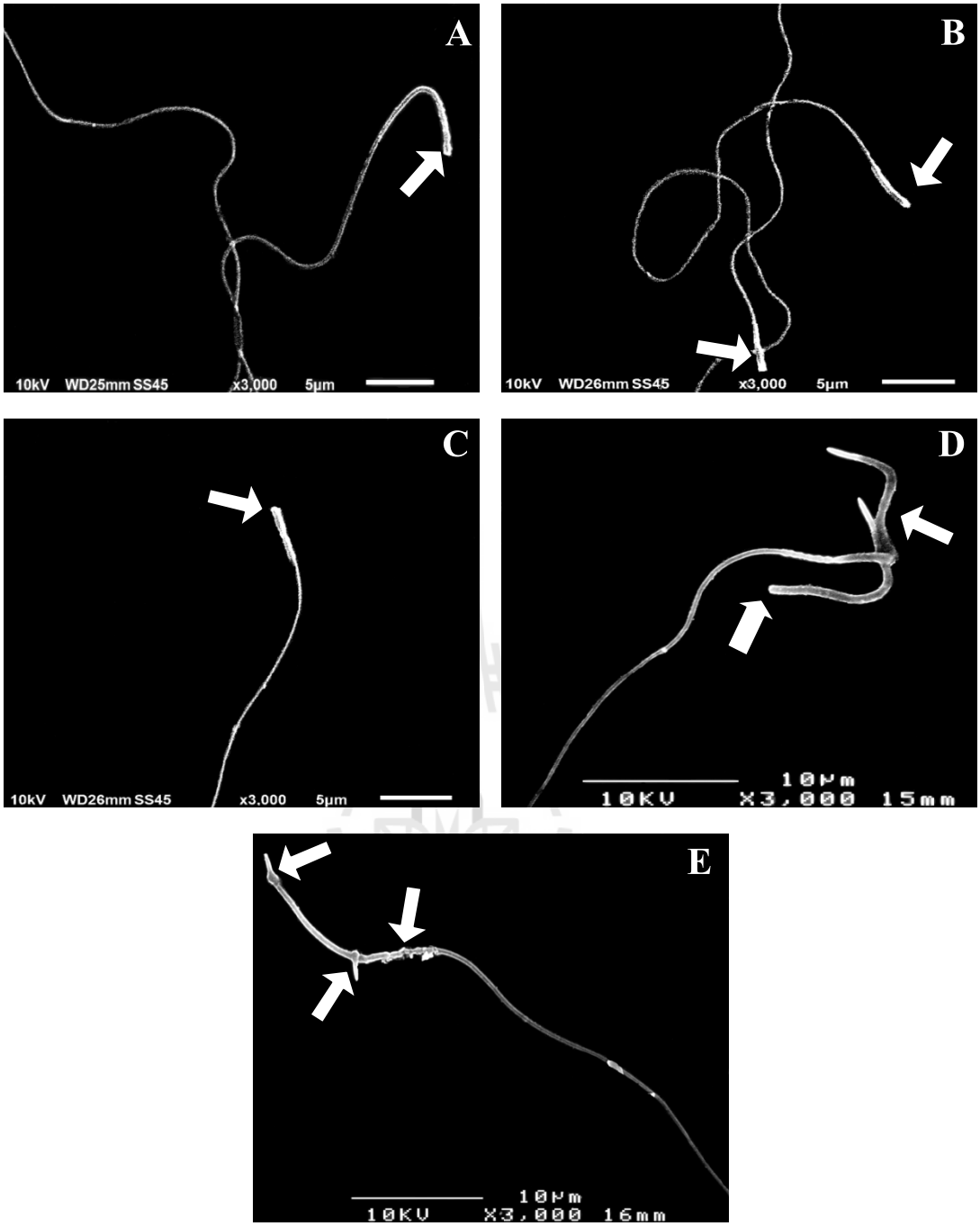
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

และเมื่อทำการเก็บรักษาในระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นเป็นระยะเวลา 4 วัน พบว่าการใช้สารกลุ่ม modified extender (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) มีความเป็นพิษต่อโครงสร้างของตัวอสุจิน้อยกว่าการใช้สาร extender ชนิดอื่น ๆ โดยการใช้สารกลุ่ม modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 (ภาพที่ 14 A) 350 (ภาพที่ 14 B) และ 400 mOsm kg^{-1} (ภาพที่ 14 C) ยังคงมีความสามารถในการรักษาโครงสร้างของตัวอสุจิบางตัวให้มีสภาพที่สมบูรณ์ แต่ก็พบว่ามีอสุจิบางตัวที่โครงสร้างส่วนหัวมีการขาดหายไปเมื่อมีการใช้สารกลุ่ม modified extender (ภาพที่ 15 A-C) สำหรับการใช้สาร BPSE เป็นสาร extender มีผลทำให้โครงสร้างส่วนหัวของตัวอสุจิเกิดการเปลี่ยนรูปร่าง ซึ่งมีลักษณะที่โค้งงอ และอสุจิบางตัวมีการขาดหายไปของบริเวณส่วนหาง (ภาพที่ 15 D) และเมื่อใช้ Lake's diluent มีผลทำให้ส่วนของอะโครโซม เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ และส่วน midpiece ถูกทำลาย (ภาพที่ 15 E)



ภาพที่ 14 ลักษณะโครงสร้างของตัวอสุจิปกติเมื่อเก็บรักษาที่ระยะเวลา 4 วัน ด้วยสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 (A) 350 (B) และ 400 (C) mOsm kg^{-1}

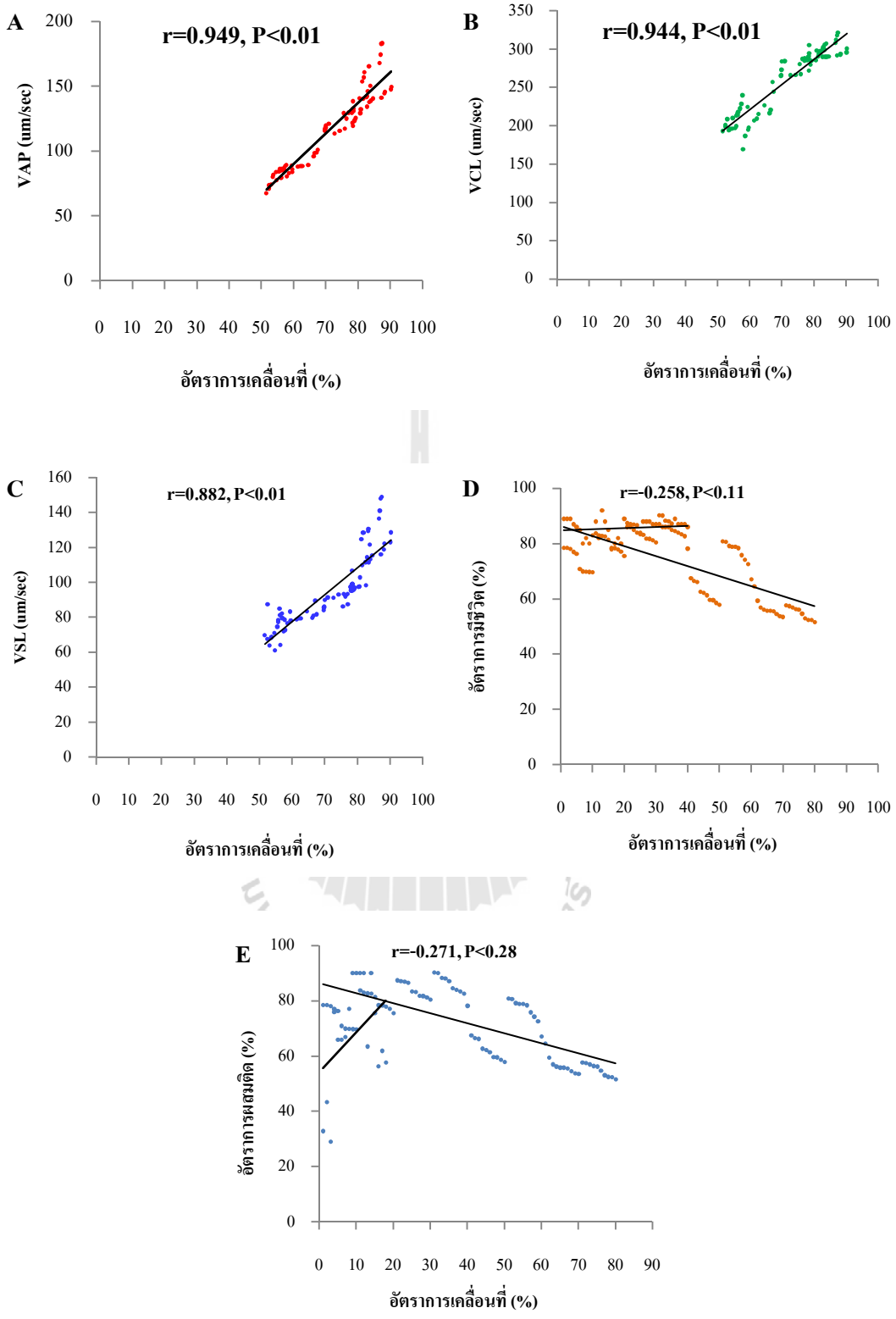
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



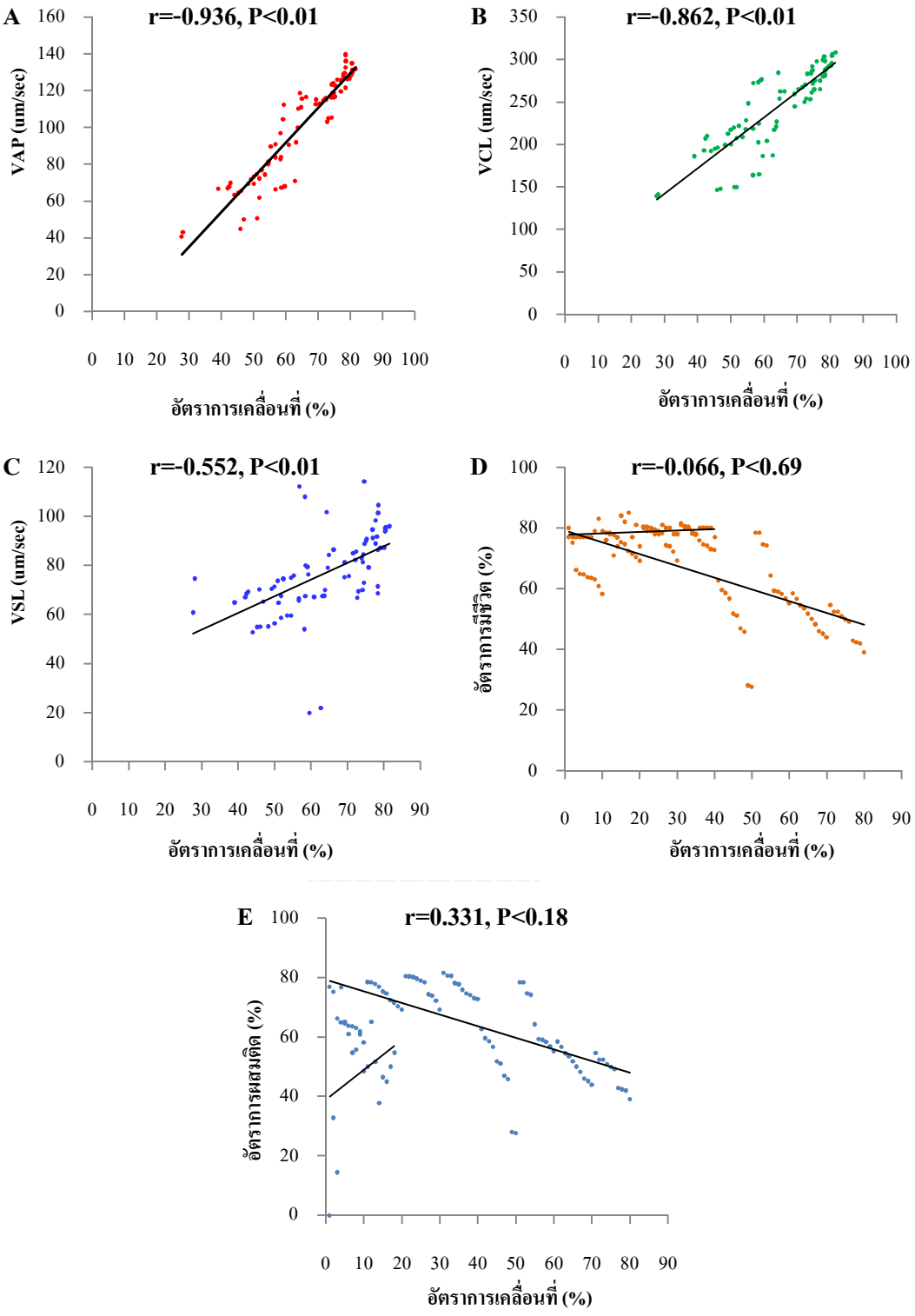
ภาพที่ 15 ลักษณะโครงสร้างของตัวอสุจิที่มีการถูกทำลายเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 วัน ด้วยสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 (A) 350 (B) และ 400 (C) mOsm kg^{-1} สาร BPSE (D) และ Lake's diluents (E) ที่กำลังขยาย 3,000 เท่า โดยใช้กล้อง SEM

จากการศึกษาหาความสัมพันธ์ (Correlation) ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP VCL และ VSL) อัตราการมีชีวิต และอัตราการผสมติด ของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1-5 วัน พบว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ระยะเวลา 1-3 วัน มีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP VCL และ VSL (ภาพที่ 16-18 A-C) มีความสัมพันธ์กัน ($P<0.01$) แต่พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการผสมติดไม่มีความสัมพันธ์กัน ($P>0.01$ ภาพที่ 16-18 D-E) เมื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อในระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นเป็นระยะเวลา 4 วัน พบว่าอัตราการเคลื่อนที่มีความสัมพันธ์กันกับทุกพารามิเตอร์ที่ทำการศึกษา (ลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP VSL และ VCL) อัตราการมีชีวิต และอัตราการผสมติด) (ภาพที่ 19 A-E) แต่อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาในระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นเป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่าอัตราการเคลื่อนที่มีความสัมพันธ์กันกับทุกพารามิเตอร์ (ลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP VSL และ VCL) อัตราการมีชีวิต) ยกเว้นอัตราการผสมติดไม่มีความสัมพันธ์กับอัตราการเคลื่อนที่ (ภาพที่ 20 A-E)

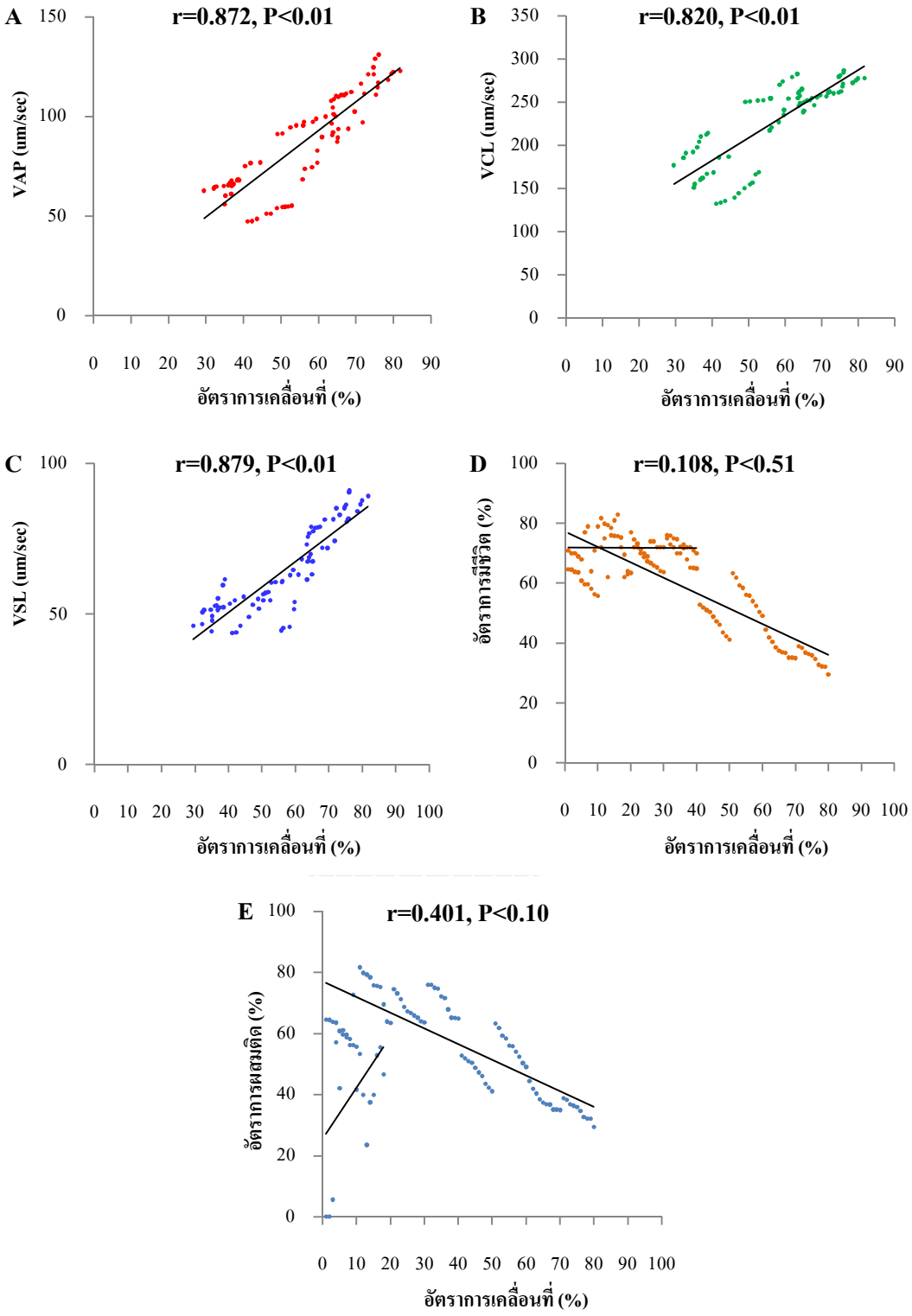
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



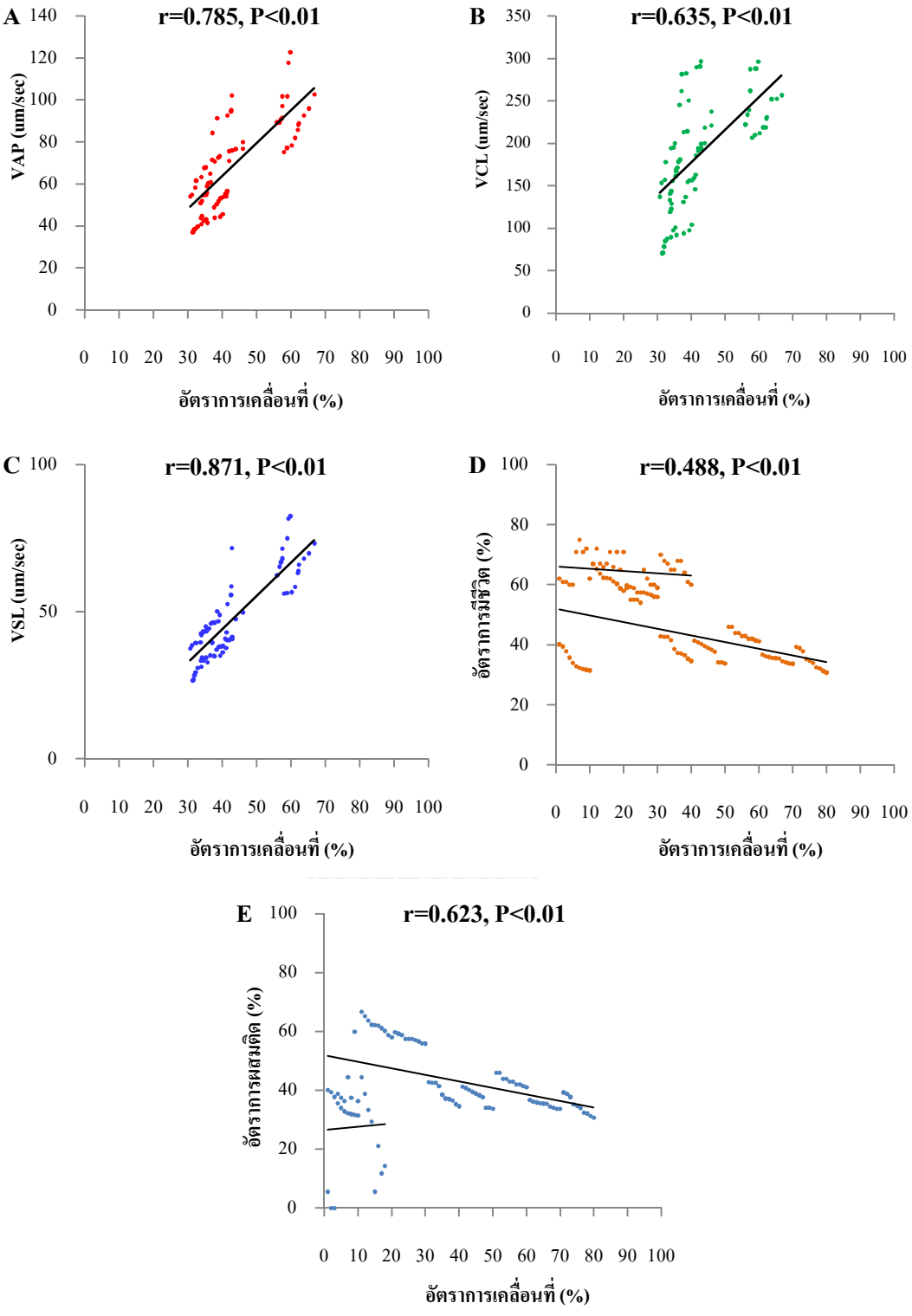
ภาพที่ 16 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP (A) VCL (B) และ VSL (C)) อัตราการมีชีวิต (D) และอัตราการผสมติด (E) ที่ระยะเก็บรักษาเป็นเวลา 1 วัน



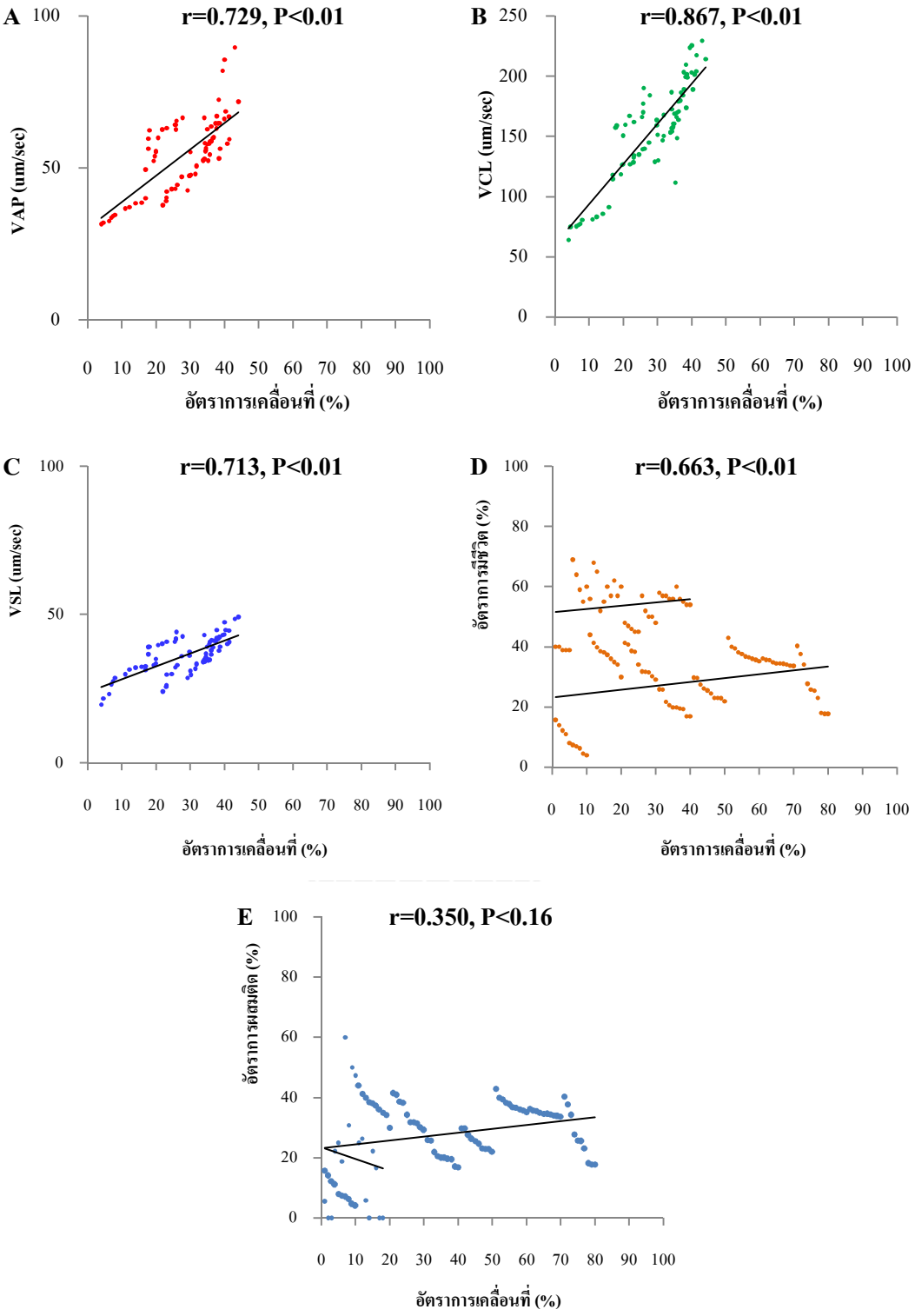
ภาพที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP (A) VCL (B) และ VSL (C)) อัตราการมีชีวิต (D) และอัตราการผสมติด (E) ที่ระยะเก็บรักษาเป็นเวลา 2 วัน



ภาพที่ 18 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP (A) VCL (B) และ VSL (C)) อัตราการมีชีวิต (D) และอัตราการผสมติด (E) ที่ระยะเก็บรักษาเป็นเวลา 3 วัน



ภาพที่ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP (A) VCL (B) และ VSL (C)) อัตราการมีชีวิต (D) และอัตราการผสมติด (E) ที่ระยะเก็บรักษาเป็นเวลา 4 วัน



ภาพที่ 20 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP (A) VCL (B) และ VSL (C)) อัตราการมีชีวิต (D) และอัตราการผสมติด (E) ที่ระยะเก็บรักษาเป็นเวลา 5 วัน

4.3 ผลของชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง

จากการศึกษาชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง โดยใช้สาร extender 5 ชนิด ได้แก่ สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) สาร BPSE และสาร Lake's diluent ร่วมกับสาร cryoprotectant 4 ชนิด ได้แก่ DMA DMF DMSO และ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% และใช้วิธีการลดอุณหภูมิแบบอังไอไนโตรเจนเหลว (ที่ระดับเหนือไอไนโตรเจนเหลว 11 เซนติเมตร นาน 12 นาที และ 3 เซนติเมตร นาน 5 นาที) จากผลของอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิต พบว่ามีอิทธิพลร่วมกัน (interaction) ระหว่างชนิดของสาร extender กับชนิดของสาร cryoprotectant

การใช้สาร DMA เป็นสาร cryoprotectant พบว่า เมื่อใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 10% DMA ให้อัตราการเคลื่อนที่รวม 53.00±2.65% หรือ 58% ของน้ำเชื้อสด ซึ่งสูงกว่าและแตกต่างจากทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษา ($P<0.05$) ยกเว้นเมื่อใช้ BPSE และสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% DMA ให้อัตราการเคลื่อนที่รวมไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) เมื่อพิจารณาผลอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า พบว่าเมื่อใช้ BPSE ร่วมกับ 15% DMA และสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 10% และ 15% DMA ให้อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P>0.05$) สำหรับการใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 10% DMA มีผลทำให้อัตราการมีชีวิตสูงที่สุด (62.33±1.45%, 69% ของน้ำเชื้อสด) ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 16

การใช้สาร DMF เป็นสาร cryoprotectant พบว่า เมื่อใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm kg^{-1} และ BPSE ร่วมกับ 15% DMF ให้อัตราการเคลื่อนที่รวมสูงกว่าและแตกต่างจากทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษา ($P<0.05$) ยกเว้นเมื่อใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% DMF ให้อัตราการเคลื่อนที่รวมไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) การใช้ BPSE ร่วมกับ 15% DMF มีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P>0.05$) และเมื่อพิจารณาผลอัตราการมีชีวิต พบว่าการใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% DMF ให้อัตราการมีชีวิต 40.00±2.00% หรือ 44% ของน้ำเชื้อสด ซึ่งสูงกว่าและแตกต่างจากทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษา ยกเว้นการใช้ Lake's diluents ร่วมกับ 10% และ 15% DMF ที่ให้อัตราการมีชีวิต 37.67±1.45% (42% ของน้ำเชื้อสด) และ 37.33±1.45% (41% ของน้ำเชื้อสด) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 17

การใช้ DMSO เป็นสาร cryoprotectant พบว่า การใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% DMSO ให้อัตราการเคลื่อนที่รวม 60.00±2.65 หรือ 68% ของน้ำเชื้อสด ซึ่งสูงกว่าและแตกต่างจากทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ใช้ในในการศึกษา ($P<0.05$) ยกเว้นการใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 10% DMSO และการใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 และ 400 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% DMSO ($P>0.05$) เมื่อพิจารณาผลอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า พบว่าเมื่อใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 10% DMSO และสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% DMSO ให้อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) สำหรับการใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 และ 350 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% DMSO มีผลทำให้อัตราการมีชีวิตสูงกว่าทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษา ยกเว้นการใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 mOsm kg^{-1} ให้อัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 18

การใช้ glycerol เป็นสาร cryoprotectant พบว่าเมื่อใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% glycerol ให้อัตราการเคลื่อนที่รวม 83.00±2.08% หรือ 94% ของน้ำเชื้อสด ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P>0.05$) และการใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% glycerol ยังมีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูงกว่าทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษา ($P<0.05$) เมื่อพิจารณาผลอัตราการมีชีวิต พบว่าเมื่อใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% glycerol ให้อัตราการมีชีวิต 62.67±1.20% หรือ 72% ของน้ำเชื้อสด ซึ่งสูงกว่าและแตกต่างจาก ทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษา ยกเว้นการใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 10% glycerol และการใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} และ Lake's diluents ร่วมกับ 15% glycerol ให้อัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 16 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) อัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการ มีชีวิตของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว ในสาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) BPSE และ Lake's diluent) ร่วมกับการใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15%

สาร extender	DMA (%)	อัตราการเคลื่อนที่รวม (%)	อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	อัตราการมีชีวิต (%)
modified	5	9.33±2.03^{ij}	1.67±0.33^{i}	0.33±0.33^{h}
extender		(9.98)	(6.72)	(0.12)
300 mOsm kg^{-1}	10	34.00±2.31^{ef}	19.00±2.08^{abc}	18.67±1.76^{e}
		(37.10)	(77.99)	(20.72)
	15	38.67±4.06^{cdef}	17.00±0.58^{abcd}	12.00±1.53^{f}
		(42.15)	(70.09)	(13.27)
modified	5	18.00±2.65^{gh}	6.33±1.76^{fgh}	10.67±0.67^{f}
extender		(19.50)	(25.02)	(11.86)
350 mOsm kg^{-1}	10	18.33±1.76^{gh}	7.67±0.88^{efg}	22.33±1.45^{e}
		(19.95)	(31.42)	(24.83)
	15	44.67±3.38^{bcd}	14.33±1.76^{bcde}	44.33±2.33^{c}
		(48.76)	(58.73)	(49.35)
modified	5	12.33±1.20^{hi}	3.33±0.67^{ghi}	20.33±0.33^{e}
extender		(13.41)	(13.44)	(22.64)
400 mOsm kg^{-1}	10	53.00±2.65^{b}	10.67±2.33^{cdef}	62.33±1.45^{b}
		(57.90)	(43.08)	(69.43)
	15	42.67±2.33^{cde}	13.00±1.00^{bcde}	42.33±2.85^{cd}
		(46.59)	(53.48)	(47.12)
BPSE	5	5.67±2.19^{j}	2.33±0.67^{hi}	2.33±0.67^{g}
		(5.79)	(9.14)	(2.47)
	10	29.67±1.86^{f}	13.33±0.88^{bcde}	23.67±1.20^{e}
		(32.37)	(54.89)	(26.33)

ตารางที่ 16 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) อัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการ มีชีวิตของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว ในสาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) BPSE และ Lake's diluent) ร่วมกับการใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% (ต่อ)

สาร extender	DMA (%)	อัตราการเคลื่อนที่รวม (%)	อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	อัตราการมีชีวิต (%)
BPSE	15	48.33±4.10^{bc} (52.79)	21.00±2.31^{ab} (86.23)	37.67±1.86^{d} (41.92)
Lake's diluent	5	36.33±2.33^{def} (39.65)	10.67±4.18^{def} (41.33)	37.00±2.08^{d} (41.17)
	10	17.67±2.03^{gh} (19.19)	1.00±0.58^{i} (2.68)	37.67±2.19^{d} (41.92)
	15	21.33±4.10^{g} (23.00)	2.00±0.58^{hi} (7.89)	41.67±2.03^{cd} (46.38)
Control	น้ำเชื้อสด	91.25±3.24^{a}	25.00±5.96^{a}	89.75±0.85^{a}

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 17 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) อัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว ในสาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) BPSE และ Lake's diluent) ร่วมกับการใช้ DMF เป็นสาร cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15%

สาร extender	DMF (%)	อัตราการเคลื่อนที่รวม (%)	อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	อัตราการมีชีวิต (%)
modified	5	7.33±0.33^{i}	3.33±0.33^{ef}	9.33±2.33^{g}
extender		(8.05)	(11.18)	(9.97)
300 mOsm kg^{-1}	10	35.00±2.65^{def}	16.00±1.00^{b}	21.33±1.20^{e}
		(38.42)	(53.85)	(23.49)
	15	24.67±1.76^{gh}	7.33±1.76^{cde}	21.00±2.08^{e}
		(27.06)	(23.98)	(23.06)
modified	5	10.33±1.67^{i}	4.67±0.33^{ef}	15.33±1.45^{f}
extender		(11.21)	(15.69)	(16.84)
350 mOsm kg^{-1}	10	42.67±6.57^{cd}	9.33±1.86^{cd}	28.00±1.15^{d}
		(46.71)	(30.94)	(30.85)
	15	58.33±3.71^{b}	17.67±1.33^{b}	40.00±2.00^{b}
		(64.16)	(59.42)	(44.08)
modified	5	9.67±2.40^{i}	2.00±0.58^{f}	6.00±1.00^{g}
extender		(10.28)	(6.45)	(6.52)
400 mOsm kg^{-1}	10	39.33±3.48^{de}	12.00±1.15^{bc}	30.33±0.33^{cd}
		(43.17)	(40.29)	(33.44)
	15	52.33±2.60^{bc}	16.67±2.03^{b}	30.67±2.60^{cd}
		(57.52)	(55.84)	(33.74)
BPSE	5	5.67±0.88^{i}	1.67±0.33^{f}	8.33±0.88^{g}
		(6.15)	(5.49)	(9.14)
	10	28.33±1.86^{fg}	16.67±0.88^{b}	15.00±2.08^{f}
		(31.10)	(56.12)	(16.41)

ตารางที่ 17 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) อัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว ในสาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) BPSE และ Lake's diluent) ร่วมกับการใช้ DMF เป็นสาร cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% (ต่อ)

สาร extender	DMF (%)	อัตราการเคลื่อนที่รวม (%)	อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	อัตราการมีชีวิต (%)
BPSE	15	61.67±1.86^{b} (67.79)	28.33±3.71^{a} (94.96)	30.67±2.91^{cd} (33.72)
Lake' diluent	5	19.00±2.65^{h} (20.73)	9.67±2.60^{cd} (31.42)	30.00±2.89^{d} (32.98)
	10	38.00±3.21^{def} (41.70)	10.00±2.31^{cd} (32.87)	37.67±1.45^{bc} (41.51)
	15	31.00±0.58^{efg} (34.07)	6.33±2.40^{de} (19.97)	37.33±1.45^{bc} (41.15)
Control	น้ำเชื้อสด	90.25±3.52^{a}	29.75±2.29^{a}	90.50±1.55^{a}

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 18 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) อัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว ในสาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) BPSE และ Lake's diluent) ร่วมกับการใช้ DMSO เป็นสาร cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15%

สาร extender	DMSO (%)	อัตราการเคลื่อนที่รวม (%)	อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	อัตราการมีชีวิต (%)
modified extender 300 mOsm kg^{-1}	5	37.33±2.85^{d} (42.06)	10.33±3.84^{cdefg} (33.20)	41.33±1.76^{ef} (46.91)
	10	59.67±3.84^{b} (67.37)	22.00±5.69^{ab} (75.24)	60.00±1.15^{bc} (68.13)
	15	57.00±1.15^{bc} (64.29)	16.33±0.88^{bcd} (57.09)	63.33±1.76^{b} (75.34)
modified extender 350 mOsm kg^{-1}	5	24.67±2.67^{e} (27.72)	7.67±1.45^{fg} (26.36)	31.67±1.20^{g} (35.94)
	10	50.33±3.53^{bc} (56.78)	16.33±2.73^{bcd} (56.45)	55.00±1.73^{cd} (62.45)
	15	60.00±2.65^{b} (67.71)	20.33±2.03^{ab} (70.90)	63.67±1.20^{b} (72.29)
modified extender 400 mOsm kg^{-1}	5	37.33±1.33^{d} (42.10)	10.67±1.67^{cdef} (36.95)	52.67±3.33^{d} (59.80)
	10	48.33±4.26^{c} (54.49)	17.67±2.60^{bc} (61.28)	46.00±3.21^{e} (52.20)
	15	54.33±2.60^{bc} (61.30)	15.33±3.18^{bcde} (52.69)	55.00±2.65^{cd} (62.46)
BPSE	5	8.33±0.88^{f} (9.35)	4.00±0.00^{g} (14.00)	6.33±1.67^{j} (6.91)
	10	27.33±1.45^{e} (30.80)	17.00±0.58^{bc} (59.47)	20.33±2.03^{h} (23.00)

ตารางที่ 18 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) อัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว ในสาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) BPSE และ Lake's diluent) ร่วมกับการใช้ DMSO เป็นสาร cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% (ต่อ)

สาร extender	DMSO (%)	อัตราการเคลื่อนที่รวม (%)	อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	อัตราการมีชีวิต (%)
BPSE	15	26.00±3.21^{e} (29.17)	10.00±1.15^{cdef} (34.79)	10.67±0.88^{i} (12.07)
Lake's diluent	5	19.67±2.67^{e} (22.04)	8.33±2.40^{efg} (28.12)	21.67±2.03^{h} (24.52)
	10	46.67±4.18^{cd} (52.62)	16.67±0.88^{bcd} (58.26)	38.67±2.03^{f} (43.88)
	15	24.33±1.20^{e} (27.42)	9.00±1.53^{defg} (31.11)	41.00±1.53^{ef} (46.54)
Control	น้ำเชื้อสด	88.00±4.04^{a}	28.67±2.85^{a}	88.00±1.53^{a}

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 19 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) อัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว ในสาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm/kg) BPSE และ Lake's diluent) ร่วมกับการใช้ glycerol เป็นสาร cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15%

สาร extender	glycerol (%)	อัตราการเคลื่อนที่รวม (%)	อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	อัตราการมีชีวิต (%)
modified	5	18.67±0.88^{i}	6.67±0.88^{gh}	14.33±0.33^{i}
extender		(21.15)	(21.10)	(16.46)
300 mOsm kg^{-1}	10	52.00±2.89^{de}	10.67±0.88^{ef}	55.33±2.91^{bc}
		(58.99)	(33.95)	(63.59)
	15	67.33±5.46^{b}	18.67±1.86^{c}	62.67±1.20^{b}
		(76.68)	(59.36)	(72.00)
modified	5	37.67±2.33^{gh}	12.00±1.00^{def}	36.33±3.33^{efg}
extender		(42.69)	(38.20)	(41.67)
350 mOsm kg^{-1}	10	60.00±3.06^{bcd}	15.00±0.58^{cde}	44.00±2.08^{de}
		(68.10)	(47.86)	(50.54)
	15	55.33±3.53^{cde}	14.33±1.45^{cde}	50.67±1.20^{cd}
		(62.80)	(45.57)	(58.21)
modified	5	40.33±4.67^{fgh}	9.67±1.20^{fg}	28.33±0.33^{gh}
extender		(45.67)	(30.66)	(32.55)
400 mOsm kg^{-1}	10	32.33±3.38^{h}	13.33±0.33^{cdef}	35.67±6.33^{fgh}
		(36.58)	(42.56)	(40.72)
	15	83.00±2.08^{a}	25.33±2.60^{b}	55.33±0.88^{bc}
		(94.27)	(80.60)	(63.57)
BPSE	5	9.33±2.33^{j}	2.33±0.67^{i}	15.67±3.18^{i}
		(10.25)	(7.08)	(17.72)
	10	21.33±2.60^{i}	11.00±1.53^{ef}	46.67±3.18^{cd}
		(24.07)	(34.84)	(53.60)

ตารางที่ 19 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) อัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว ในสาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm/kg) BPSE และ Lake's diluent) ร่วมกับการใช้ glycerol เป็นสาร cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% (ต่อ)

สาร extender	glycerol (%)	อัตราการเคลื่อนที่รวม (%)	อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	อัตราการมีชีวิต (%)
BPSE	15	46.33±3.84^{efg} (52.52)	18.67±3.38^{c} (58.74)	43.33±1.33^{def} (49.78)
Lake's diluent	5	14.00±3.06^{ij} (15.58)	5.33±0.67^{h} (16.89)	26.67±1.33^{h} (30.61)
	10	49.67±1.67^{def} (56.34)	16.33±1.45^{cd} (51.98)	33.33±1.76^{gh} (38.27)
	15	63.67±1.76^{bc} (72.24)	18.00±2.00^{c} (57.17)	54.67±2.91^{bc} (62.82)
Control	น้ำเชื้อสด	88.00±2.5^{a}	31.33±1.20^{a}	87.00±1.15^{a}

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

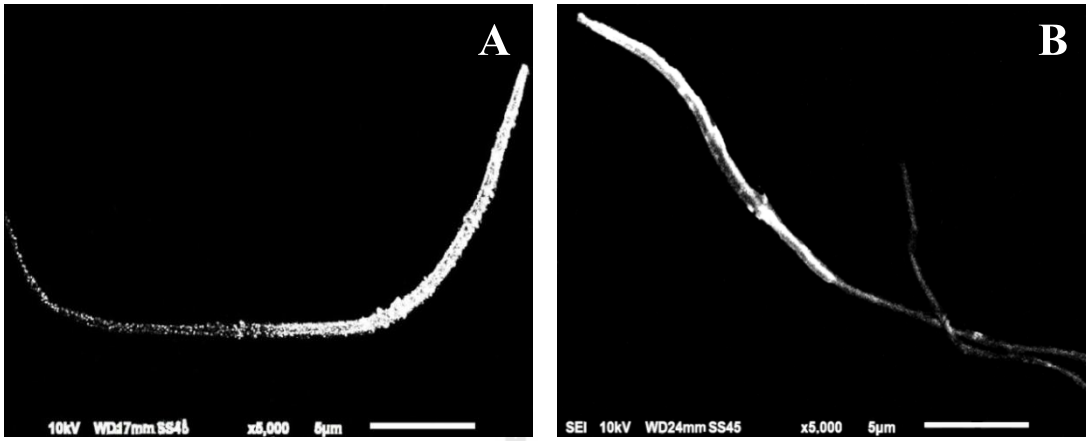
สำหรับผลชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ต่ออัตราการผสมติด ทำการทดลองโดยนำทรีทเมนต์ที่ให้อัตราการเคลื่อนที่รวมและอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าดีที่สุด ได้แก่ BPSE ร่วมกับ DMA และ DMF ที่ระดับความเข้มข้น 15% สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% DMSO และสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% glycerol มาทำการทดสอบอัตราการผสมติด พบว่าทุกทรีทเมนต์ที่นำมาศึกษาให้อัตราการผสมติดต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยการใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% glycerol ให้อัตราการผสมติด 9.52±9.52% (4% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งให้อัตราการผสมติดไม่แตกต่างจากทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษา ($P>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 20 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) อัตราการผสมติดของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง

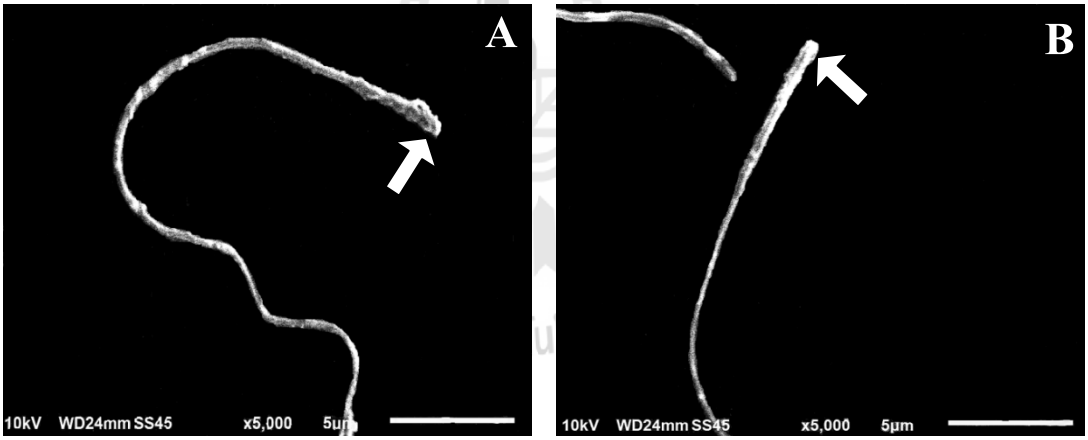
สาร extender + cryoprotectant	อัตราการผสมติด (%)
BPSE + 15% DMA	2.38±2.38[b] (0.95)
BPSE+ 15% DMF	0.00±0.00[b] (0.00)
modified extender 350 mOsm kg^{-1} + 15% DMSO	0.00±0.00[b] (0.00)
modified extender 400 mOsm kg^{-1} + 15% glycerol	9.52±9.52[b] (4.09)
Control (น้ำเชื้อสด)	82.62±3.84[a]

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

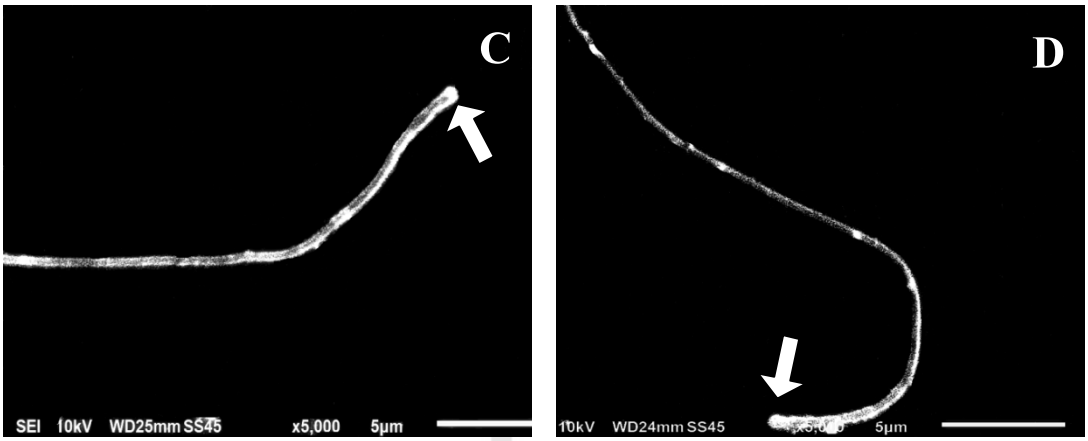
นอกจากนี้ยังได้ศึกษาชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ต่อลักษณะทางกายภาพของตัวอสุจิ โดยศึกษาจากภาพถ่ายด้วยกล้อง SEM ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า โดยนำทรีทเมนต์ที่ใช้ในการศึกษาอัตราการผสมติด ซึ่งได้แก่ BPSE ร่วมกับ DMA และ DMF ที่ระดับความเข้มข้น 15% สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% DMSO และสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% glycerol มาทำการศึกษา พบว่าน้ำเชื้อสด มีลักษณะโครงสร้างของตัวอสุจิที่เป็นปกติ (ภาพที่ 21 A) ซึ่งประกอบด้วยส่วนหัว midpiece และหาง เมื่อนำน้ำเชื้อมาทำการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง พบว่าการใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% glycerol มีความเป็นพิษต่อโครงสร้างของอสุจิน้อยกว่าทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษา ซึ่งพบว่ายังคงสามารถรักษาโครงสร้างของตัวอสุจิบางตัวให้มีสภาพที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 21 B) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% glycerol ก็พบว่าตัวอสุจิส่วนมากมีการถูกทำลายโครงสร้างโดยเฉพาะส่วนหัว ซึ่งทำให้มีลักษณะหัวขาด (ภาพที่ 22 A) เช่นเดียวกับการใช้สาร BPSE ร่วมกับ DMA (ภาพที่ 22 B) และ DMF (ภาพที่ 22 C) ที่ระดับความเข้มข้น 15% และสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% DMSO (ภาพที่ 22 D)



ภาพที่ 21 โครงสร้างของตัวอสุจิปกติของน้ำเชื้อสด (A) และตัวอสุจิที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% glycerol (B) ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า โดยใช้กล้อง SEM



ภาพที่ 22 ลักษณะโครงสร้างของตัวอสุจิที่ถูกทำลายเมื่อเก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยสาร BPSE ร่วมกับ DMA (A) และ DMF (B) ที่ระดับความเข้มข้น 15% สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% DMSO (C) และสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% glycerol (D) ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า โดยใช้กล้อง SEM



ภาพที่ 22 ลักษณะโครงสร้างของตัวอสุจิที่ถูกทำลายเมื่อเก็บรักษาแบบแช่เย็นด้วยสาร BPSE ร่วมกับ DMA (A) และ DMF (B) ที่ระดับความเข้มข้น 15% สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% DMSO (C) และสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% glycerol (D) ที่กำลังขยาย 5,000 เท่า โดยใช้กล้อง SEM (ต่อ)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
อภิปรายผล

5.1 ผลของสาร extender และระยะเวลาการเก็บรักษาที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็น

จากการศึกษาส่วนประกอบไอออนในซีรั่มของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว พบว่า มีโซเดียม (Na^+) และ คลอไรด์ (Cl^-) เป็นองค์ประกอบหลัก สำหรับแคลเซียม (Ca^{2+}) โพแทสเซียม (K^+) และแมกนีเซียม (Mg^{2+}) มีอยู่ในปริมาณต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ilori et al. (2012) โดยศึกษาใน seminal plasma ของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองของประเทศไนจีเรีย และยังสอดคล้องกับ Bogusawaka-Tryk et al. (2012) ก็พบว่าในซีรั่มของไก่เนื้อสายพันธุ์ cobb มีปริมาณของโซเดียมและคลอไรด์เป็นองค์ประกอบหลักเช่นกัน ซึ่งไอออนดังกล่าวโดยเฉพาะโซเดียม คลอไรด์ และแคลเซียม มีบทบาทสำคัญต่อการเคลื่อนที่และกลไกการทำงานทางชีวเคมีของตัวอสุจิ (Pablo et al., 2011; Wishart and Ashizawa, 1987 and Li et al., 2012) แต่จากการศึกษาพบว่ากลุ่มควบคุมซึ่งมีสาร NaCl อยู่ในส่วนประกอบ มีความเป็นพิษต่อตัวอสุจิโดยส่งผลให้โครงสร้างส่วนหัวขาดหายไป และส่งผลทำให้อัตราการผสมติดต่ำ โดยจากการศึกษาของ Hammerstedt and Graham (1992) รายงานว่าโซเดียมไอออนมีคุณสมบัติในการจับกับน้ำได้ดี จึงส่งผลมีประสิทธิภาพในการนำพาน้ำเข้าสู่เซลล์ ดังนั้นอาจส่งผลให้เซลล์มีปริมาณน้ำมากเกินไป จึงมีผลทำให้เซลล์แตก ด้วยเหตุนี้อาจส่งผลทำให้โครงสร้างส่วนหัวของเซลล์อสุจิถูกทำลาย

จากการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็น ด้วยสาร extender 7 ชนิด ได้แก่ สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาริตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) BPSE Lake's diluent IGGKP และ EK โดยใช้ 0.9% NaCl ร่วมกับ 0.2% glucose เป็นกลุ่มควบคุม ทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1 สัปดาห์ จากนั้นทำการเลือกสาร extender ที่ให้อัตราการเคลื่อนที่มากกว่า 60% มาทำการศึกษาอัตราการผสมติด ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 5 วัน ซึ่งได้แก่ สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 mOsm kg^{-1}) BPSE และ Lake's diluent โดยใช้ 0.9% NaCl ร่วมกับ 0.2% glucose เป็นกลุ่มควบคุม พบว่าเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น สาร extender ทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษามีผลทำให้แนวโน้มของอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิตและอัตราการผสมติดลดลง ($P<0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากตัวอสุจิมีการเผาผลาญสารอาหาร เช่น glucose fructose และ inositol เพื่อใช้เป็นพลังงานสำหรับการทำงานของเซลล์ ส่งผลให้แหล่งของสารอาหาร

ลดลง จึงมีสารอาหารไม่เพียงพอสำหรับการดำรงชีพของตัวอสุจิในระหว่างการเก็บรักษา ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการผสมติดลดลง และสาเหตุอีกประการหนึ่งที่ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อลดลง เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น อาจเป็นผลมาจากในระหว่างการเก็บรักษาตัวอสุจิจะไม่ได้สัมผัสกับก๊าซออกซิเจน เนื่องจากไม่มีการรบกวนหลอดเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ จึงทำให้ตัวอสุจิมีการเผาพลาญพลังงานแบบไม่ใช้ออกซิเจน โดยจากการรายงานของ Donoghue and Wishart (2000) พบว่าการเผาผลาญพลังงานแบบไม่ใช้ออกซิเจนนี้ทำให้เกิดการผลิตกรดแลกติก ซึ่งมีผลทำให้ค่า pH ของน้ำเชื้อที่เจือจางอยู่ในสาร extender ลดลง และมีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิลดลงด้วย แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่า การเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ระยะเวลา 1 วัน เมื่อใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 350 และ 400 mOsm kg^{-1} ให้อัตราการเคลื่อนที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมและสาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษา ($P<0.05$) และยังพบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิต่ำเมื่อใช้สาร IGGKP และ EK เป็นสาร extender ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากสาร IGGKP และ EK ไม่มีสารเคมีกลุ่ม acetate อยู่ในส่วนประกอบ ซึ่งจากการรายงานของ Douard, Hermier, Magistrini, Labbe and Blesbois (2004) พบว่า acetate เป็นสารที่สำคัญที่ช่วยในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ซึ่งมีประสิทธิภาพมากกว่าทั้ง fructose และ citrate โดย acetate จะถูกเปลี่ยนรูปให้เป็นสารอนุพันธ์ของ coenzyme A (CoA) และจะเข้าสู่วัฏจักรกรดซิตริก หรือ tricaboxylic acid cycle เพื่อให้ได้พลังงาน นอกจากนี้ผลการศึกษานี้ยังสอดคล้องกับภาพถ่ายด้วยกล้อง SEM ที่พบว่าโครงสร้างของตัวอสุจิเกิดการถูกทำลายบริเวณ midpiece (ภาพที่ 13 A และ B) ซึ่งประกอบไปด้วยไมโตครอนเดีย จึงส่งผลให้เอ็นไซม์ที่ใช้ในการเผาผลาญพลังงานที่อยู่ใน mitochondrial sheath ถูกทำลายด้วยเช่นกัน ด้วยเหตุนี้จึงเป็นผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิลดลง เมื่อพิจารณาผลอัตราการผสมติดพบว่าสาร extender ทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษา ซึ่งได้แก่สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300 350 และ 400 $mOsmkg^{-1}$) สาร BPSE และ Lake's diluent ให้อัตราการผสมติดสูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากน้ำตาล fructose ที่อาจจะเป็นส่วนประกอบสำคัญในสาร modified extender และ Lake's diluents ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นแหล่งพลังงานให้กับตัวอสุจิ เพื่อใช้ในการดำรงชีวิตและการเคลื่อนที่ นอกจากนี้สาร Lake's diluent ยังมี PVP ในส่วนประกอบ ซึ่ง PVP มีคุณสมบัติเป็นสาร cryoprotectant ที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ จึงทำให้เซลล์อสุจิได้รับการปกป้องเมื่อเก็บรักษาในสภาพที่เย็น สำหรับสาร BPSE มี glucose เป็นแหล่งพลังงาน แต่ตัวอสุจิสามารถเปลี่ยนน้ำตาล glucose ให้เป็นน้ำตาล fructose เพื่อใช้ประโยชน์ได้ และยังมีข้อสังเกตว่าองค์ประกอบของสาร BPSE มีสารที่มีคุณสมบัติเป็นบัพเฟอร์หลายชนิด นอกจากนี้ Control ก็มีส่วนประกอบของ glucose เช่นกัน แต่พบว่าให้อัตราการผสมติดต่ำ ทั้งนี้อาจเนื่องจากความเป็นพิษของ sodium chloride ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Takeda (1962) ที่รายงานว่า sodium chloride มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่ผิดปกติของตัวอสุจิ ดังนั้นเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้นอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้สารกลุ่ม

modified extender สาร BPSE และ Lake's diluents มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม ผลการศึกษายังสอดคล้องกับภาพถ่ายด้วยกล้อง SEM (ภาพที่ 12 A-D) ที่พบว่าการใช้ modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 350 และ 400 mOsm kg^{-1} สาร BPSE และสาร Lake's diluents ไม่ทำให้โครงสร้างของตัวอสุจิเกิดการเปลี่ยนแปลง สำหรับกลุ่มควบคุมมีการถูกทำลายบริเวณส่วนหัวของตัวอสุจิ (หัวขาด ภาพที่ 13 C) ซึ่งภายในประกอบด้วยนิวเคลียสที่มีสารพันธุกรรมบรรจุอยู่ และมีเอมไซม์ที่มีคุณสมบัติในการเจาะไข่เพื่อเข้าปฏิสนธิอยู่ในอะโครโซม ด้วยเหตุนี้จึงส่งผลให้อสุจิไม่สามารถปฏิสนธิได้ และเมื่อทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นระยะเวลา 2 วัน และ 3 วัน พบว่าสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 350 และ 400 mOsm kg^{-1} ยังคงให้ผลอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการผสมติดสูงกว่าสาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษา อาจเนื่องมาจากในสาร modified extender มี TES เป็นส่วนประกอบ ซึ่ง TES มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ที่มีไอออนทั้งประจุบวกและประจุลบอยู่ในตัวเอง จึงมีคุณสมบัติเป็นได้ทั้งกรดและเบสเพื่อควบคุมค่า pH ของสารละลายไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงมาก และการที่จะทำให้ TES ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดนั้น ค่า pH ของสาร extender จะต้องมีค่าใกล้เคียงกับค่า pKa ของ TES ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.4 จึงมีข้อสังเกตว่าสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาริตี้ที่ระดับ 300 350 และ 400 mOsm kg^{-1} มีค่า pH เท่ากับ 7.44±0.02 7.45±0.01 และ 7.42±0.03 ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับค่า pKa ของ TES ขณะที่สาร BPSE มีค่า pH เท่ากับ 7.53±0.02 และในสารกลุ่ม modified extender มี TES เป็นส่วนประกอบมากกว่าสาร BPSE ถึง 5 เท่า จึงทำให้ TES ที่ประกอบอยู่ในสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาริตี้ที่ระดับ 300 350 และ 400 mOsm kg^{-1} ทำงานได้มีประสิทธิภาพมากกว่า TES ที่ประกอบอยู่ในสาร BPSE สำหรับสูตรสาร extender ของ Lake's diluent IGGKP EK และ control ไม่มี TES เป็นส่วนประกอบ ดังนั้นการใช้สาร extenders เหล่านี้น่าจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้คุณภาพของน้ำเชื้อไก่ที่มีการเก็บแบบแช่เย็นมีประสิทธิภาพลดลง แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาผลอัตราการผสมติดที่ระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นเป็น 4 วัน พบว่าการใช้สาร modified extender ให้ผลอัตราการผสมติดลดลงต่ำกว่า 50% ซึ่งสอดคล้องกับภาพถ่ายด้วยกล้อง SEM ที่พบว่าเกิดการถูกทำลายโครงสร้างของตัวอสุจิโดยเฉพาะบริเวณส่วนหัว ซึ่งการใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 350 และ 400 mOsm kg^{-1} มีผลทำให้หัวของตัวอสุจิขาด (ภาพที่ 15 A-C) ด้วยเหตุนี้จึงเป็นเหตุผลทำให้ตัวอสุจิไม่สามารถเข้าผสมกับไข่ของเพศเมียได้ จึงส่งผลให้อัตราการผสมติดลดลง ดังนั้นหากพิจารณาผลอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการผสมติด พบว่าสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 mOsm kg^{-1} น่าจะเหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาริตี้ที่ระดับ 300 mOsm kg^{-1} มีค่าออสโมลาริตี้ใกล้เคียงกับค่าออสโมลาริตี้ของน้ำเชื้อไก่ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 306±0.56 ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น isoosmotic การศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Iaffaldano et al.

(2005) ได้ศึกษาการใช้ BPSE Lake's diluent และ IGGKP ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่งวง ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าการใช้ BPSE ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และความสมบูรณ์ของเซลล์เมมเบรนสูงกว่าการใช้ Lake's diluent และ IGGKP ($P<0.05$) เนื่องจากสาร BPSE มีค่าออสโมลาลิตี้ และค่า pH ใกล้เคียงกับ seminal plasma ของไก่งวง และสอดคล้องกับการศึกษาของ Latif, Ijaz, Aleem and Mahmud (2005) ได้ศึกษาค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 375 และ 400 mOsm kg^{-1} ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่เนื้อสายพันธุ์ Hubbard ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 4 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง การใช้สาร extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 375 mOsm kg^{-1} ให้อัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้สาร extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 และ 400 mOsm kg^{-1} ($P>0.05$) เนื่องจากสาร extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 375 mOsm kg^{-1} มีคุณสมบัติเป็น isosmotic การศึกษาในครั้งนี้จะแตกต่างกับรายงานของ Siudzinska and Lukaszewicz (2008) ที่พบว่าสาร extender ที่มีคุณสมบัติเป็น hyperosmotic เหมาะสมกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่สายพันธุ์ Green-Legged Partridge สายพันธุ์ Black Minorca สายพันธุ์ White Crested Black Polish และสายพันธุ์ Italian Partridge โดยจะส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของตัวอสุจิแบบคอโค้งงอต่ำกว่าสาร extender ที่มีคุณสมบัติเป็น isosmotic และ hypoosmotic

นอกจากนี้จากการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP VCL และ VSL) อัตราการมีชีวิต และอัตราการผสมติด ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1-5 วัน จากการศึกษาพบว่า การเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ระยะเวลา 1-3 วัน มีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ไม่มีความสัมพันธ์กับอัตราการมีชีวิต และอัตราการผสมติด แต่เมื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อในระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นเป็นระยะเวลา 4 วัน พบว่าอัตราการเคลื่อนกับอัตราการมีชีวิต และอัตราการผสมติด มีความสัมพันธ์กันไปในทิศทางเดียวกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเก็บรักษาน้ำเชื้อในระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้โครงสร้างของตัวอสุจิโดยเฉพาะส่วนหัว ซึ่งเป็นแหล่งของสารพันธุกรรม และส่วน midpiece ซึ่งเป็นแหล่งของพลังงานถูกทำลาย โดยการถูกทำลายโครงสร้างของตัวอสุจินี้จะส่งผลกระทบต่อทั้งอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการผสมติด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nasrin (2008) โดยศึกษาในน้ำเชื้อมนุษย์พบว่า การถูกทำลายของสารพันธุกรรม (DNA) จะมีความสัมพันธ์กันไปในทิศทางตรงกันข้ามกับโครงสร้างของตัวอสุจิที่ปกติ ($r=-0.317$, $P<0.03$) อัตราการเคลื่อนที่ ($r=-0.263$, $P<0.02$) และอัตราการผสมติด ($r=0.450$, $P<0.002$)

5.2 ผลของชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง

จากการศึกษาชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง โดยใช้สาร extender 5 ชนิด ได้แก่ สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 350 และ 400 mOsm kg^{-1} ร่วมกับสาร cryoprotectant 4 ชนิด ได้แก่ DMA DMF DMSO และ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% จากผลของอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิต พบว่ามีอิทธิพลร่วมกันระหว่างชนิดของสาร extender กับชนิดของสาร cryoprotectant อาจเนื่องมาจากการทำงานร่วมกันระหว่างสาร extender และสาร cryoprotectant ต่างชนิดกันมีผลต่อการเพิ่มแรงดันออสโมติกที่แตกต่างกัน ซึ่งแรงดันออสโมติกที่เพิ่มขึ้นจะมีผลทำให้เซลล์อสุจิถูกทำลาย ดังนั้นการเลือกใช้สาร cryoprotectant จะต้องคำนึงถึงชนิดของสาร extender ด้วย เมื่อพิจารณาผลอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าพบว่าการใช้สาร BPSE ร่วมกับ DMA และ DMF ที่ระดับความเข้มข้น 15% การใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% DMSO และสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% glycerol ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่รวม และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าดีที่สุด จึงได้นำ ทรีทเมนต์ดังกล่าวมาทดสอบอัตราการผสมติดพบว่าทุกทรีทเมนต์ให้ผลอัตราการผสมติดไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) โดยให้ผลอัตราการผสมติดต่ำเพียง 0-10% เท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโครงสร้างอสุจิของไก่บริเวณส่วนหัวมีลักษณะเรียวแหลม และมีขนาดเล็ก (ภาพที่ 16 A) จึงมีผลทำให้อัตราส่วนพื้นที่ผิวของเซลล์ต่อปริมาตรของเซลล์ต่ำ ซึ่งมีผลทำให้การซึมผ่านของสาร cryoprotectant จากภายนอกเข้าสู่ภายในเซลล์มีประสิทธิภาพต่ำด้วยเช่นกัน จึงส่งผลให้เซลล์อสุจิบริเวณดังกล่าวถูกทำลาย และจากการรายงานของ Donoghue and Wishart (2000) พบว่าโครงสร้างส่วนหัวของตัวอสุจิสัตว์ปีกมีปริมาณของ cytoplasm อยู่น้อย ซึ่งเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ความสามารถในการซึมผ่านของสาร cryoprotectant ต่ำ จึงทำให้โครงสร้างของตัวอสุจิโดยเฉพาะส่วนหัวถูกทำลาย และจากผลการศึกษานี้สอดคล้องกับภาพถ่ายที่ศึกษาด้วยกล้อง SEM ซึ่งพบว่าทุกทรีทเมนต์มีผลทำให้โครงสร้างส่วนหัวของตัวอสุจิขาดหายไป (ภาพที่ 17 A-D) จึงส่งผลให้นิวเคลียส (nucleus) ซึ่งจะบรรจุสารพันธุกรรม (DNA) และเอมไซม์ที่เกี่ยวของกับการปฏิสนธิซึ่งอยู่ภายในอะโครโซมที่บริเวณส่วนหัว ที่มีคุณสมบัติในการย่อยสลายผนังไข่เพื่อเข้าปฏิสนธิไม่สามารถทำงานได้ ดังนั้นจึงไม่เกิดการปฏิสนธิ และจากผลการศึกษามีข้อสังเกตว่าอสุจิมีการเคลื่อนที่แต่ไม่สามารถผสมติดได้ ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากอสุจิมีพลังงานไม่เพียงพอที่จะใช้ในการเคลื่อนที่ผ่านท่อระบบสืบพันธุ์ของเพศเมียเพื่อไปผสมกับไข่ สอดคล้องกับการศึกษาของ

Partyka et al. (2010) ซึ่งพบว่าน้ำเชื้อไก่เนื้อสายพันธุ์ Flex ที่เก็บรักษาแบบระยะยาวด้วยสาร extender EK ร่วมกับ 6% DMA มีผลทำให้ค่า mitochondrial activity มีค่าเท่ากับ 28.3±12.1% ซึ่งต่ำมากเมื่อเทียบกับน้ำเชื้อสด (94.7±1.9%) และยังสอดคล้องกับการรายงานของ Guthrie, Welch and Long (2008) ที่พบว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะยาว มีผลทำให้ตัวอสุจิสูญเสียพลังงาน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 6
สรุป และข้อเสนอแนะ

6.1 สรุป

6.1.1 จากการศึกษาพบว่า การใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 mOsm kg^{-1} ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็น isotonic เหมาะสำหรับนำมาใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็น

6.1.2 จากการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง พบว่า ชนิดของสาร extender และสาร cryoprotectant มีอิทธิพลร่วมกัน และยังพบว่าการใช้สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% glycerol ให้อัตราการเคลื่อนที่สูงที่สุด แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำไปทดสอบอัตราการผสมติด พบว่าให้ผลอัตราการผสมติดต่ำ เนื่องจากตัวอสุจิมีการถูกทำลายบริเวณส่วนหัวที่ภายในบรรจุนิวเคลียส ซึ่งเป็นแหล่งของสารพันธุกรรม

6.2 ข้อเสนอแนะ

6.2.1 จากการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง พบว่ายังให้ผลอัตราการผสมติดต่ำ ซึ่งเป็นผลมาจากการถูกทำลายโครงสร้างของตัวอสุจิ ดังนั้นจึงควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการเติมสารที่มีหน้าที่ในการปกป้องโครงสร้างเซลล์อสุจิ เช่น สาร Antioxidant เพื่อเป็นการพัฒนาและเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง

รายการอ้างอิง

เทวินทร์ วงษ์พระลับ บัญญัติ เหล่าไพบูลย์ พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา สจี กัณหาเรียง และ สราวุธ ศรีงาม และยุพิน ผาสุข (2550). ผลของชนิดน้ำยาเจือจางและชนิด cryoprotectant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่เก็บรักษา. **การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้ง 3** ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.: 188-195.

เทวินทร์ วงพระลับ ยุพิน ผาสุข บัญญัติ เหล่าไพบูลย์ จุฬานีย์ น่วมสุข และ พรจิต สอนสีดา (2550). ผลของชนิดน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่. **การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 3** มหาวิทยาลัยขอนแก่น.: 196-203.

ปิยะรัตน์ จันทร์อ่อน วรวิทย์ สิริพลวัฒน์ และ อนุชัย ภิญโญภูมิมินทร์ (2554). ผลของสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็งและวิตตามินอีที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งของไก่สามเหลือง. **สัมมนาวิชาการ** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรจิต สอนสีดา เทวินทร์ วงษ์พระลับ และ ยุพิน ผาสุข (2552). ผลของการเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองภายหลังการเก็บรักษา. **การสัมมนาวิชาการเกษตร ประจำปี 2552** คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.: 73-75.

วิโรจน์ จันทรัตน์ (2540). กายวิภาคและสรีรวิทยาของสัตว์ปีก Avian anatomy and physiology. **ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.**

วนิดา สร้อยประจักษ์ และ สร้อยนภา กรองสะอาด (2556). แนวทางการกำจัดโรคนิวคาสเซิลของประเทศไทย. **ส่วนโรคสัตว์ สำนักควบคุม ป้องกัน และบำบัดโรคสัตว์. สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดชัยนาท.**

วัลลภ คงเพิ่มพูน (2544). ไก่พื้นเมือง. **กรุงเทพมหานคร. เกษตรบุ๊ค**.

สุนทร สุทานัย ธีรชัย ช่อไม้ จตุรงค์ จริยะนรวิชช์ และศิริพันธ์ โมราถบ (2552). ศึกษาเปรียบเทียบการใช้ Glycerol กับ Dimethyl Sulfloxide เป็นสารป้องกันการสูญเสียของเซลล์อสุจิในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พื้นเมือง. **การสัมมนาวิชาการเกษตร ประจำปี 2552** คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.: 70-72.

สำนักงานควบคุม ป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์ (2549). การควบคุมโรคไข้หวัดนกในประเทศไทย. **โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด**.

อภิชัย รัตนวราหะ (2541). ไก่พื้นเมือง : สัตว์เศรษฐกิจระดับชาวบ้าน. **กรุงเทพมหานคร. มติชน**.

Barrie, G.M.J. (2007). Reproductive biology and phylogeny of birds. **Science Publishers.** 609.

Bogusawaka-Tryk, M., Szymeczko, R. and Piotrowska, A. (2012). The level of major proteins and minerals in the blood serum of chickens fed diets with pure cellulose. **Folia biologica.** 60: 65-70.

Chalah, T., Seigneurin, F., Blesbois, E. and Brillard, J.P. (1999). *In vitro* comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniquent fertility *in vivo*. **Cryobiology.** 39:185- 191.

Chelmonska, B., Lukaszewicz, E., Kowalczyk, A. and Jersz, A. (2006). The effect of DMA level on morphology and fertilising ability of japanese quail (*Coturnix japonica*) spermatozoa. **Animal Reproduction.** 65: 451-458.

Donoghue, A.M. and Wishart, G.J. (2000). Storage of poultry semen. **Animal Reproduction Science**. 62: 213-232.

Douard, V., Hermier, D., Magistrini, M., Labbe, C. and Blesbois, E. (2004). Impact of changes in composition of storage medium on lipid content and quality of turkey spermatozoa. **Theriogenology.** 61: 1-13.

Gee, G.F., Morrell, C.A., Franson, J.C. and Pattee, O.H. (1993). Cryopreservation of american kestrel semen with dimethylsulfoxide. **Journal of Raptor Research.** 27: 21-25.

Gerzilov, V. (2010). Influence of various cryoprotectants on the sperm mobility of muscovy semen before and after cryopreservation. **Agricultural Science and Thchnology.** 2: 57-60.

Guest, W.C. (1973). Spermatology and sperm preservation of channel catfish, *Ictalurus punctatus*. **M.S. thesis,** Agricultural and Mechanical college, Louisiana State University, United States of America.

Guthrie, H.D., Welch, G.R. and Long, J.A. (2008). Mitochondrial function and reactive oxygen species action in relation to boar motility. **Theriogenology.** 70: 1209-1215.

Hammerstedt, R. H. and Graham, J. K. (1992). Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. **Cryobiology.** 29: 26-38.

Han, X.F., Niu, Z.Y., Liu, F.Z. and Yang, C.S. (2005). Effects of diluents, cryoprotectants, equilibration time and thawing temperature on cryopreservation of duck semen. **International Journal of Poultry Science.** 4: 197-201.

Hanzawa, S., Niinomi, T., Takahashi, R., Yamaguchi, K., Miyata, T. and Tajima, A. (2007). New method of freezing chicken semen using N-methyl-acetamide as cryoprotecting

agent. **University of Tsukuba, Japan.**

Iaffaldano, N., Manchisi, A. and Rosato, M.P. (2005). The preservability of turkey semen quality during liquid storage in relation to strain and age of males. **Animal ReproductionScience**. 109: 266-273.

Ilori, B.M., Isidahomen, C.E. and Akano, K. (2012). Effect of ambient temperature on reproductive and physiological traits of nigerian indigenous chickens. **Journal of Animal Production Advances.** 2(11): 477-489.

Karaca, A.G. (2001). Determination of the effects of elevated environmental temperatures on broiler breeder male reproductive performance by examining semen quality, semen ion concentration, and fertility. **Ph.D. Dissertation.** Mississippi State University, Mississippi State.

Lake, P. E. (1960). Studies on the dilution and storage of fowl semen. **Journal of reproduction and fertility.** 1: 30-35.

Lake, P.E. (1986). The history and future of the cryopreservation of avian germ plasma. **Poultry Science**. 65: 1-15.

Latif, A., Ijaz, A., Alemm, M. and Mahmud, A. (2005). Effect o osmotic pressure and pH on the short-term storage and fertility of broiler breeder sperm. **Pakistan Veterinary Journal.** 25: 179-182.

Li, J.L., Li, J.C., Yang, H.M., Zhou, R.J. and Liu, S.J. (2012). Impact of cacium, zinc and copper concentrations in seminal plasma on semen parameter in zie geese. **Journal of Animal and Veterinary Advances.** 11(20): 3840-3842.

Maeda, T., Hiromi, S., Takato, T. and Yoshio, T. (1985). Studies on morphological frozen injuries of avian spermatozoa : optimum glycerol concentration for freezing fowl spermatozoa. **Journal of Faculty of Applied Biological Science.** 24: 25-31.

Morrell, J.M., Persson, B., Tjellstrom, H., Laessker, A., Nilsson, H., Danilova, M. and Holmes, P. V. (2005). Effect of semen extender and density gradient centrifugation on the motility and fertility of turkey spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals.** 40: 522-525.

Mphaphathi, M.L., Luseba, D. and Sutherland, B. (2012). Comparison of slow freezing and vitrification methods for Venda cockerel's spermatozoa. **Journal of Animal Science.** 2: 204-210.

Nasrin, S., Iraj, A., Marzieh, F., Rezvan, Na. and Jafar, H. (2008). Correlation between sperm

parameters and sperm DNA fragmentation in fertile and infertile men. **Iranian Journal of Reproductive Medicine.** 6: 13-18.

Nurul, I. (2002). Effect of different concentration of glycerol on the quality of kedu chicken semen. **Journal of Agricultural Science.** 23: 2.

Pablo, E.V., Dario, K., Jose, L., Juan, J. and Alberto, D. (2011). Ion channels, phosphorylation and mammalian sperm capacitation. **Asian Journal of Andrology**. 13: 395–405.

Partyka, A., Nizanski, W. and Lukaszewicz, E. (2010). Evaluation of fresh and frozen-thawed fowl semen by flow cytometer. **Theriogenology.** 74: 1019-1027.

Penfold, L.M., Harnal, V., Lynch, W., Bird, D., Derrickson, S.R. and Wildt, D.E. (2001). Characterization of northern pintail (Anas acuta) ejaculate and the effect of sperm preservation on fertility. **Reproduction.** 121: 267–275.

Pistenma, D.A., Snapir, N. and Mel, H.C. (1971). Biophysical characterization of fowl spermatozoa. I. preservation of motility and fertilizing and low sperm concentrations. **Journal of Reproduction and Fertility**. 24: 153-160.

Siudzinska, A. and Lukaszewicz, E. (2008). Effect of semen extenders and storage time on sperm morphology of four chicken Breeds. **Journal of Applied Poultry Research.** 17: 101-108.

Sontakke, S.D., Umapathy, G., Sivaram, V., Kholkute, S.D. and Shivaji, S. (2004). Semen characteristics, cryopreservation, and successful artificial insemination in the blue rock pigeon (*Columba livia*). **Theriogenology**. 62: 139-153.

Takeda, A. (1986). Study on the senescence of the cock spermatozoa during storage. **Laboratory of Zootecnology,** Faculty of Textile Science and Technology, Shinshu University, 1986, 1-5 p.

Tselutin, K., Seigneurin, F. and Blesbois, E. (1999). Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. **Poultry Science.** 78: 586 – 590.

Umapathy, G., Sontakke, S., Reddy, A., Ahmed, S. and Shivaji, S. (2005). Semen characteristics of the captive indian white-backed vuiture (*Gyps bengalensis*). **Biology of Rerproduction.** 73: 1039-1045.

Wishart, G.J. and Ashizawa, K. (1987). Regulation of the motility of fowl spermatozoa by calcium and cAMP. **Journal of Reproduction and Fertility.** 80 : 607-611.

http://www.poultryhub.org/physiology/body-systems/reproductive-system/

http://shopping.akasdoctor.com/onlinestore/detail.cfm?ID=MEDICARECNR

ภาคผนวก ก.

วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1. วัสดุ และอุปกรณ์

วัสดุและอุปกรณ์สำหรับใช้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็งประกอบด้วย

1. microtube (efpendorf) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2. กระดาษทิชชู
3. กระบอกน้ำกลั่น
4. กระติกน้ำแข็ง
5. เทอร์โมมิเตอร์
6. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
7. ช้อนตักสาร
8. กระดาษชั่งสาร
9. beaker (ขนาด 250 100 และ 50 มิลลิลิตร)
10. volumetric flasks (ขนาด 25 100 และ 250 มิลลิลิตร)
11. glass stirring rod
12. ขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร
13. micropipette (ขนาด 100 และ 1,000 ไมโครลิตร)
14. small and large pipettes tips
15. หลอดทดลองพลาสติกขนาด 15 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิด
16. rack
17. กระดาษ lable
18. เทปใส
19. ปากกา lable
20. ตู้เย็น
21. pH meter
22. osmometer
23. graduated cylinders ขนาด 25 มิลลิลิตร
24. หลอดแช่แข็ง (french straws) ขนาด 0.5 มิลลิลิตร
25. forceps
26. Liquid nitrogen containers dewar 20 XT (Taylor-Wharton U.S.A.)
27. Liquid nitrogen storage with dispenser
28. กล่องโฟมขนาด 28 × 38 × 29 เซนติเมตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

29. ตะแกรงสำหรับวางหลอดน้ำเชื้อ
30. นาฬิกาจับเวลา เป็นต้น

วัสดุและอุปกรณ์สำหรับใช้ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ ประกอบด้วย

1. กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope
2. Computer Assisted Semen Analysis (CASA) รุ่น version 10 HTM-IVOS
3. กล้องถ่ายวีดีโอ
4. โปรแกรม Image J
5. Dual slide และ Cover glass
6. Slide
7. ไม้จิ้มฟัน
8. แผ่น DVD
9. Slide และ Cover slide
10. ขวดสีชา ขนาด 50 มิลลิลิตร
11. ตะเกียงแอลกอฮอล์
12. ไม้ขีด
13. เข็มเขี่ย
14. hemacytometer
15. counter
16. vortex mixer
17. microtube (efpendorf) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
18. หลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร
19. กระติกน้ำแข็ง
20. กระดาษทิชชู
21. กรรไกร
22. ถาดไข่
23. ตู้ฟักไข่
24. ตู้เกิดลูกไก่
25. อุปกรณ์ส่องไข่

วัสดุและอุปกรณ์สำหรับใช้ศึกษาด้วยกล้อง SEM ประกอบด้วย

1. กล้อง Scanning Electron microscope
2. เครื่อง critical point dryer
3. เครื่องฉาบทอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4. cover slide ขนาด 5x5 มิลลิเมตร
5. stubs
6. Microporous
7. หลอดแก้ว พร้อมฝาปิด
8. กระดาษกาวสองหน้า
9. ไม้จิ้มฟัน

2 สารเคมี

สารเคมีสำหรับเตรียมสาร extender ประกอบด้วย

1. Water cell culture grade
2. sodium chloride
3. sodium acetate
4. potassium citrate
5. sodium glutamate
6. dipotassium hydrogen phosphate
7. potassium dihydrogenphosphate
8. fructose
9. Tes (N-Tris(hydrxy methal) methyl-2-amino ethane sulfonic acid)
10. magnesium acetate
11. potassium acetate
12. polyvinylpyroridone (PVP)
13. sodium dihydrogen phosphate
14. glucose
15. inositol
16. protamine sulfate
17. anhydrous sodium hydrogen phosphate

กลุ่มสาร cryoprotectant และสารเคมีสำหรับใช้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง ประกอบด้วย

1. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
2. Dimethyl acetamide (DMA)
3. glycerol
4. Dimethyl formamide (DMF)
5. ไนโตรเจนเหลว (LN_2)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

6. ผงอุด Polyvinyl alcohol (PVA)

สารเคมีสำหรับเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้อง SEM ประกอบด้วย

1. 0.1M Phosphate buffer pH 7.2
2. 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M Phosphate buffer pH 7.2
3. 30 50 70 90 95 และ 100% ethanal
4. 1% osmium

สารเคมีสำหรับใช้ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ ประกอบด้วย

1. Eosin B
2. Nigrosin
3. Sodium citrate dehydrate
4. น้ำยาเช็ดเลนส์
5. น้ำยาเคลือบเล็บ
6. immersion Oil

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ข.

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1. การศึกษาชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็น

1.1 อัตราการเคลื่อนที่

ตารางที่ ข. 1 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 วัน

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	4362.299	7	623.186	114.531	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	391.765	72	5.441		
Total	4754.074	79			

ตารางที่ ข. 2 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 2 วัน

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	4086.888	7	583.841	34.359	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	1223.446	72	16.992		
Total	5310.333	79			

ตารางที่ ข. 3 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 วัน

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	5482.025	7	783.146	111.930	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	503.765	72	6.997		
Total	5985.790	79			

ตารางที่ ข. 4 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 วัน

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	2765.393	7	395.056	169.913	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	167.404	72	2.325		
Total	2932.797	79			

ตารางที่ ข. 5 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 5 วัน

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	3545.759	7	506.537	59.343	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	614.575	72	8.536		
Total	4160.334	79			

ตารางที่ ข. 6 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 วัน

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	8261.890	7	1180.270	109.175	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	778.375	72	10.811		
Total	9040.265	79			

ตารางที่ ข. 7 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 7 วัน

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	5678.641	7	811.234	122.607	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	476.390	72	6.617		
Total	6155.031	79			

1.2 อัตราการมีชีวิต

ตารางที่ ข. 8 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 วัน

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	210.975	7	30.139	5.782	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	166.800	32	5.212		
Total	377.775	39			

ตารางที่ ข. 9 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 2 วัน

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	43.375	7	6.196	.887	.528
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	223.600	32	6.988		
Total	266.975	39			

ตารางที่ ข. 10 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 วัน

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	71.200	7	10.171	.444	.867
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	732.400	32	22.888		
Total	803.600	39			

ตารางที่ ข. 11 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 วัน

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	859.900	7	122.843	14.559	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	270.000	32	8.438		
Total	1129.900	39			

ตารางที่ ข. 12 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 5 วัน

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	859.900	7	122.843	14.559	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	270.000	32	8.438		
Total	1129.900	39			

ตารางที่ ข. 13 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 วัน

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	3853.975	7	550.568	30.355	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	580.400	32	18.138		
Total	4434.375	39			

ตารางที่ ข. 14 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 7 วัน

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	3674.775	7	524.968	75.264	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	223.200	32	6.975		
Total	3897.975	39			

1.3 อัตราการผสมติด

ตารางที่ ข. 15 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการผสมติด ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 วัน

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	5483.340	5	1096.668	16.141	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	815.340	12	67.945		
Total	6298.680	17			

ตารางที่ ข. 16 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ต่ออัตราการผสมติด ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 2 วัน

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	4700.801	5	940.160	11.071	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	1019.045	12	84.920		
Total	5719.846	17			

ตารางที่ ข. 17 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ต่ออัตราการผสมติด ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 วัน

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	4486.022	5	897.204	30.106	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	357.618	12	29.801		
Total	4843.640	17			

ตารางที่ ข. 18 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ต่ออัตราการผสมติด ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 4 วัน

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	3072.464	5	464.493	13.811	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	533.901	12	44.492		
Total	3606.365	17			

ตารางที่ ข. 19 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ต่ออัตราการผสมติด ที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 5 วัน

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	3626.981	5	725.396	7.371	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	1180.921	12	98.410		
Total	4807.901	17			

2. การศึกษาผลของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง

ตารางที่ ข. 20 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร DMA ต่ออัตราการเคลื่อนที่รวม

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (Treatment)	10790.267	15	719.351	65.672	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	361.473	33	10.954		
Total	11151.740	48			

หมายเหตุ : Treatment คือ สาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 350 และ 400 mOsm kg^{-1} สาร BPSE และสาร Lake's diluent) ร่วมกับ DMA ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15%

ตารางที่ ข. 21 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร DMA ต่ออัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (Treatment)	2872.143	15	191.476	13.737	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	459.983	33	13.939		
Total	3332.126	48			

หมายเหตุ : Treatment คือ สาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 350 และ 400 mOsm kg^{-1} สาร BPSE และสาร Lake's diluent) ร่วมกับ DMA ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15%

ตารางที่ ข. 22 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร DMA ต่ออัตราการมีชีวิต

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (Treatment)	13909.692	15	927.313	216.479	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	141.359	33	4.284		
Total	14051.051	48			

หมายเหตุ : Treatment คือ สาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 350 และ 400 mOsm kg^{-1} สาร BPSE และสาร Lake's diluent) ร่วมกับ DMA ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15%

ตารางที่ ข. 23 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร DMF ต่ออัตราการเคลื่อนที่รวม

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (Treatment)	12197.256	15	813.150	63.115	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	425.162	33	12.884		
Total	12622.418	48			

หมายเหตุ : Treatment คือ สาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 350 และ 400 mOsm kg^{-1} สาร BPSE และสาร Lake's diluent) ร่วมกับ DMF ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15%

ตารางที่ ข. 24 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร DMF ต่ออัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (Treatment)	2856.239	15	190.416	23.039	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	272.742	33	8.265		
Total	3128.981	48			

หมายเหตุ : Treatment คือ สาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 350 และ 400 mOsm kg^{-1} สาร BPSE และสาร Lake's diluent) ร่วมกับ DMF ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15%

ตารางที่ ข. 25 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร DMF ต่ออัตราการมีชีวิต

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (Treatment)	9786.713	15	652.448	107.855	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	199.626	33	6.049		
Total	9986.339	48			

หมายเหตุ : Treatment คือ สาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 350 และ 400 mOsm kg^{-1} สาร BPSE และสาร Lake's diluent) ร่วมกับ DMF ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15%

ตารางที่ ข. 26 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร DMSO ต่ออัตราการเคลื่อนที่รวม

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (Treatment)	7370.211	15	491.347	45.968	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	342.045	32	10.689		
Total	7712.256	47			

หมายเหตุ : Treatment คือ สาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 350 และ 400 mOsm kg^{-1} สาร BPSE และสาร Lake's diluent) ร่วมกับ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15%

ตารางที่ ข. 27 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร DMSO ต่ออัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (Treatment)	1261.136	15	84.076	6.599	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	407.674	32	12.740		
Total	1668.810	47			

หมายเหตุ : Treatment คือ สาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 350 และ 400 mOsm kg^{-1} สาร BPSE และสาร Lake's diluent) ร่วมกับ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15%

ตารางที่ ข. 28 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร DMSO ต่ออัตราการมีชีวิต

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (Treatment)	9031.073	15	602.072	116.654	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	165.158	32	5.161		
Total	9196.231	47			

หมายเหตุ : Treatment คือ สาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 350 และ 400 mOsm kg^{-1} สาร BPSE และสาร Lake's diluent) ร่วมกับ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15%

ตารางที่ ข. 29 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร glycerol ต่ออัตราการเคลื่อนที่รวม

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (Treatment)	10030.866	15	668.724	55.656	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	384.490	32	12.015		
Total	10415.356	47			

หมายเหตุ : Treatment คือ สาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 350 และ 400 mOsm kg^{-1} สาร BPSE และสาร Lake's diluent) ร่วมกับ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15%

ตารางที่ ข. 30 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร glycerol ต่ออัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (Treatment)	1758.633	15	117.242	24.090	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	155.736	32	4.867		
Total	1914.370	47			

หมายเหตุ : Treatment คือ สาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 350 และ 400 mOsm kg^{-1} สาร BPSE และสาร Lake's diluent) ร่วมกับ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15%

ตารางที่ ข. 31 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร glycerol ต่ออัตราการมีชีวิต

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (Treatment)	5976.136	15	398.409	54.068	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	235.796	32	7.369		
Total	6211.932	47			

หมายเหตุ : Treatment คือ สาร extender 5 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 300 350 และ 400 mOsm kg^{-1} สาร BPSE และสาร Lake's diluent) ร่วมกับ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15%

ตารางที่ ข. 32 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ต่ออัตราการผสมติด

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (Treatment)	16344.996	4	4086.249	35.225	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	1508.068	13	116.005		
Total	17853.064	17			

หมายเหตุ : Treatment คือ สาร BPSE ร่วมกับ DMA และ DMF ที่ระดับความเข้มข้น 15% สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% DMSO และสาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 400 mOsm kg^{-1} ร่วมกับ 15% glycerol

ประวัติผู้เขียน

นางสาวทิพย์สุดา บุญมาทัน เกิดวันที่ 10 ธันวาคม พ.ศ. 2529 ที่จังหวัดลพบุรี เริ่มศึกษาชั้นประถมศึกษาที่โรงเรียนกำจรวิทย์ อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี ได้ศึกษาต่อชั้นมัธยมศึกษาตอนต้นและตอนปลายที่โรงเรียนวินิตศึกษาในพระราชูปถัมภ์ฯ อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี และสำเร็จการศึกษาสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา เมื่อปี พ.ศ. 2551 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 2552

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี