รหัสโครงการ SUT3-303-57-24-15

รายงานการวิจัย

การพัฒนาและการเพิ่มประสิทธิภาพน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว

(The improvement frozen spermatozoa of Thai indigenous chicken, Leung Hang Kao)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-303-57-24-15

รายงานการวิจัย

การพัฒนาและการเพิ่มประสิทธิภาพน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว

(The improvement frozen spermatozoa of Thai indigenous chicken, Leung Hang Kao)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร. สมร พรชื่นชูวงศ์

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

1. รศ.ดร. เทวินทร์ วงษ์พระลับ

2. นายธีระชัย ช่อไม้

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2556-2558

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กรกฎาคม 2560

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556-2558 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการวิจัย ขอขอบคุณฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (ฟาร์มสัตว์ปีก) รศ.ดร.อมรรัตน์ โมพี หัวหน้าโครงการวิจัยไก่เนื้อโคราช และคุณธีระชัย ช่อไม้ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์กบินทร์บุรี จังหวัดปราจีนบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และสัตว์ทดลอง ตลอดจนนักวิชาการ และเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์กบินทร์บุรีทุก ๆ ท่าน ที่ได้มีส่วนช่วยให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัย

มิถุนายน 2560

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของสาร antioxidant ต่อคุณภาพของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งในไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว แบ่งการศึกษาออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้ 1) ผลของสาร extender และสาร cryoprotectant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่ผ่านการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง และ 2) ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant ที่เหมาะสมต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่ผ่านการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง

การทดลองที่ 1 ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง โดยใช้สาร extender 8 ชนิด (modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300, 350 และ 400 mOsm kg^{-1}), Lake's diluent, BPSE, IGGKP, EK และ Schramm) ใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด (DMF, DMA, DMSO) ที่ระดับความเข้มข้น 6% โดยใช้วิธีการลดอุณหภูมิแบบอังไนโตรเจนเหลว และประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งจากอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต อัตราการผสมติด ความสมบูรณ์ของอะโครโซมด้วยสี fluorescein isothiocyanate conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) ร่วมกับ propidium iodide (PI) และการทำงานของไมโตคอนเดรีย ด้วยสี Rhodamine 123 ร่วมกับ propidium iodide (PI) จากการศึกษาพบว่า เมื่อใช้ 6% DMF ร่วมกับ EK ให้อัตราการผสมติดสูงสุด เท่ากับ 42.37±1.45% (46% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับผลการประเมินความสมบูรณ์ของอะโครโซมพบอสุจิมีชีวิตและอะโครโซมสมบูรณ์เท่ากับ 51.00±3.21% และการทำงานของไมโตรคอนเดรียสมบูรณ์เท่ากับ 52.00±3.79% ซึ่งสูงกว่าเมื่อเทียบกับทรีทเมนต์อื่น ๆ ($P<0.05$)

ศึกษาผลของการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระ 3 ชนิด ที่ 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ วิตามินอี ที่ระดับความเข้มข้น 1.16, 2.32 และ 3.48 mM ซีสเทอีนที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 5.0 mM และ กลูต้าไธโอนที่ระดับความเข้มข้น 0.025, 0.05 และ 0.1 mM และประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งจากอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต อัตราการผสมติด และการเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่น พบว่า การเสริมวิตามินอีที่ระดับความเข้มข้น 2.32 mM ให้อัตราการผสมติดเท่ากับ 63.02±5.26% (65% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งสูงและแตกต่างกว่ากลุ่มที่ไม่มีการเสริมวิตามินอี ($P<0.05$) และให้ผลการเกิดปริมาณของ MDA ต่ำเท่ากับ 2.68±0.04 nmol/50x10^6 spz. เมื่อเปรียบเทียบกับทรีทเมนต์อื่น ๆ ($P<0.05$) และพบว่าการเสริมวิตามินอีที่ระดับความเข้มข้น 2.32 mM ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่รวม (68.00±3.46%), อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (39.33±2.91%) และอัตราการมีชีวิตรอด (54.00±2.65%) สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับทรีทเมนต์อื่น ๆ ($P<0.05$) การเสริมซีสเทอีนที่ระดับความเข้มข้น 5.0 mM และ กลูต้าไธโอนที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM ส่งผลให้ประสิทธิภาพของน้ำเชื้อลดต่ำลงเมื่อเปรียบเทียบกับทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ทำการศึกษา

Abstract

The present study examined the feasibility of antioxidant on frozen semen quality in native chickens (Leung Hang Kao). Two experiments were carried out: (1) investigate the effect of extenders and cryoprotectants on quality of sperm and fertility rate of native chickens (Leung Hang Kao), (2) determine the effects of antioxidant on frozen semen quality and fertility rate of native chickens (Leung Hang Kao).

The first experiment was to investigate the effects of eight extenders (modified extenders with osmotic pressure 300, 350 and 400 mOsm kg^{-1}, Lake's diluent, BPSE, IGGKP, EK and Schramm), three cryoprotectants (dimethyl acetamide-DMA, dimethyl formamide-DMF and dimethyl sulfoxide-DMSO,) at concentrations of 6% on the cryopreservation of native chicken (Leung Hang Kao) semen. Sperm samples were frozen using a liquid nitrogen vapour in 500 μL straws and stored for seven days in a liquid nitrogen container. They were then thawed at 5 °C for 5 min, and motility, viability, fertility, acrosome integrity and mitochondria function rates were assessed. The highest fertility rate of 42.37±1.45% (46% of control), acrosome integrity of 51.00±3.21% and mitochondria activity of 52.00 ± 3.79% were achieved with the combination of 6% DMF and EK as the extender. These results were higher when compared with the other treatments ($P<0.05$).

Three antioxidants with three concentrations of vitamin E at concentrations at 1.16, 2.32 and 3.48 mM, cysteine at 0.5, 1.0 and 5.0 mM and glutathione at 0.025, 0.05 and 0.1 mM on the cryopreservation of native chicken (Leung Hang Kao) sperm were investigated. Semen was diluted with EK as the extender, mixed with each antioxidant and 6% DMF was added. Frozen sperm was thawed, and motility, viability, fertility rates and lipid peroxidation were assessed. It was found that vitamin E at a concentration of 2.32 mM yielded a higher fertility rate of 63.02±5.26% (65% of control) and a lower MDA of 2.68± 0.04 nmol/50x10^6 spz. when compared with the other treatments ($P<0.05$). The highest motility rate of 68.00±3.46%, progressive motility rate of 39.33±2.91%, and viability rate of 54.00±2.65% were also achieved from vitamin E at a concentration of 2.32 mM. The supplement cysteine at 5.0 mM and 0.1 mM of glutathione had a negative impact on sperm quality.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการทำงานวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 อสุจิของสัตว์ปีก	4
2.2 วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง	5
2.3 สภาวะการเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่น	7
2.4 ผลของสาร Antioxidant ต่อคุณภาพของน้ำเชื้อสัตว์ที่มีการเก็บรักษาในแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็ง	9
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	14
3.1 วิธีการศึกษา	14
3.2 การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของสาร extender และสาร cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง	20
3.3 การทดลองที่ 2 ศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant ที่เหมาะสมต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่ผ่านการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง	26
บทที่ 4 ผลการศึกษา	29
4.1 ผลของสาร extender และสาร cryoprotectant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่ผ่านการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง	29

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant ที่เหมาะสมต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่ผ่านการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง	36
บทที่ 5 วิจารณ์ สรุป และข้อเสนอแนะ	39
5.1 ผลของสาร extender และสาร cryoprotectant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่ผ่านการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง	39
5.2 ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant ที่เหมาะสมต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่ผ่านการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง	40
สรุป และข้อเสนอแนะ	43
เอกสารอ้างอิง	44
ภาคผนวก	49
ภาคผนวก ก	49
ภาคผนวก ข	53
ประวัติผู้วิจัย	59

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 ความเข้มข้นของ Glutathione ในน้ำเชื้อของสัตว์แต่ละชนิด	13
ตารางที่ 3.1 หลักเกณฑ์การสังเกตอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ	16
ตารางที่ 3.2 ค่า Analysis setup	17
ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบทางเคมี (g/50ml) ของสาร extender ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว	21
ตารางที่ 3.4 แผนการทดลองการศึกษาสาร extender 8 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300, 350 และ 400 mOsm kg^{-1}), Lake's diluent, BPSE, IGGKP, EK และ Schramm) ร่วมกับการใช้ DMF ที่ระดับความเข้มข้น 6% เป็นสาร cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD	23
ตารางที่ 3.5 แผนการทดลองการศึกษาสาร extender 8 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300, 350 และ 400 mOsm kg^{-1}), Lake's diluent, BPSE, IGGKP, EK และ Schramm) ร่วมกับการใช้ DMA ที่ระดับความเข้มข้น 6% เป็นสาร cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD	24
ตารางที่ 3.6 แผนการทดลองการศึกษาสาร extender 8 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300, 350 และ 400 mOsm kg^{-1}), Lake's diluent, BPSE, IGGKP, EK และ Schramm) ร่วมกับการใช้ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 6% เป็นสาร cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD	25
ตารางที่ 3.7 แผนการทดลองการศึกษาผลของสาร antioxidant 3 ชนิด 3 ระดับความเข้มข้นวิตามินอี (1.16, 2.32 และ 3.48 mM) Cysteine (0.5, 1.0 และ 5.0 mM) และ Glutathione (0.025, 0.05 และ 0.1 mM) ต่อคุณภาพของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งในไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวโดยวางแผนการทดลองแบบ CRD	28
ตารางที่ 4.1 ผลของสาร Extender 8 ชนิด ร่วมกับ 6% DMF ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่งแข็งไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง	30

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 4.2 ผลของสาร extender 8 ชนิด ร่วมกับ 6% DMF ต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซมและการทำงานของไมโตคอนเดรียของน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง 31

ตารางที่ 4.3 ผลของสาร Extender 8 ชนิด ร่วมกับ 6% DMA ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง 32

ตารางที่ 4.4 ผลของสาร extender 8 ชนิด ร่วมกับ 6% DMA ต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซมและการทำงานของไมโตคอนเดรียของน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง 33

ตารางที่ 4.5 ผลของสาร Extender 8 ชนิด ร่วมกับ 6% DMSO ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง 34

ตารางที่ 4.6 ผลของสาร extender 8 ชนิด ร่วมกับ 6% DMSO ต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซมและการทำงานของไมโตคอนเดรียของน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง 35

ตารางที่ 4.7 ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant ร่วมกับการใช้ EK+ 6%DMF ต่อคุณภาพของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวที่มีการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง 37

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 โครงสร้างตัวอสุจิของไก่	4
ภาพที่ 2.2 การเข้าทำปฏิกิริยาของ antioxidant ต่ออนุมูลอิสระ (Free radical)	9
ภาพที่ 3.1 การรีดน้ำเชื้อไก่	15
ภาพที่ 3.2 สไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (heamacytometer counting chamber) บริเวณที่นับจำนวนอสุจิทั้ง 5 บริเวณ (1, 2, 3, 4 และ 5)	16
ภาพที่ 3.3 อสุจิมีชีวิตมีลักษณะสีขาว และอสุจิตายจะติดสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้ม เมื่อย้อมด้วยสี Eosin - Nigrosin	18
ภาพที่ 3.4 กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์สายเหลืองหางขาวที่มีการเสริมสาร antioxidant ลงในสาร extender ก่อนเข้าสู่กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง	27
ภาพที่ 4.1 ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant ร่วมกับการใช้ EK+ 6%DMF ต่อปริมาณการเกิด malondialdehyde (MDA) ในน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวที่มีการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง	38

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการทำงานวิจัย

ไก่พื้นเมืองเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญในการเป็นแหล่งอาหารโปรตีน และมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจชุมชน ซึ่งเนื้อไก่พื้นเมืองถือได้ว่าเป็นแหล่งโปรตีนที่มีรสชาติดี, มีเนื้อแน่น และมีไขมันน้อย จึงทำให้ไก่พื้นเมืองมีราคาสูงกว่าไก่กระทงประมาณ 20-30% (วัลลภ, 2544) นอกจากนี้ยังได้มีการจัดตั้งชมรม สมาคม เพื่ออนุรักษ์และพัฒนาสายพันธุ์ไก่พื้นเมืองให้เป็นสายพันธุ์ไก่ชนอีกด้วย แต่ในช่วงที่ผ่านมาได้เกิดการระบาดของโรคในสัตว์ปีก ได้แก่ โรคนิวคาสเซิล, โรคไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 และจากข้อมูลในปี พ.ศ. 2557 ได้มีการตรวจพบเชื้อไข้หวัดนกชนิดรุนแรงสายพันธุ์ H5N2 ในฟาร์มเลี้ยงไก่และไก่งวงที่ประเทศแคนาดา จึงส่งผลให้สัตว์ปีกตายนับหมื่นตัว ซึ่งก่อนหน้านี้ในปีเดียวกัน ได้มีการรายงานถึงการระบาดของไข้หวัดนกชนิดรุนแรงสายพันธุ์ H5N8 ในประเทศแถบยุโรป เช่น เยอรมัน, อังกฤษ, เนเธอร์แลนด์ ส่งผลให้สัตว์ปีก เช่น เป็ด, ไก่, ไก่งวง ที่เลี้ยงไว้ในฟาร์มล้มตายจำนวนมาก และเป็นผลให้รัฐบาลของแต่ละประเทศต้องออกมาตรการกำจัดสัตว์ปีกจำนวนหลายแสนตัว (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2557) ถึงแม้ไข้หวัดนกชนิดรุนแรงสายพันธุ์ดังกล่าวจะยังไม่แพร่ระบาดในประเทศไทยก็ตาม แต่จากข้อมูลก็มีแนวโน้มส่งผลต่ออุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกเป็นอย่างมาก และส่งผลต่อการสูญเสียพันธุกรรมที่ดีของสัตว์ปีกไป ซึ่งจากข้อมูลการระบาดของไข้หวัดนกสายพันธุ์ H5N1 ในประเทศไทยช่วงที่ผ่านมาก็ส่งกระทบต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีกและเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์ปีกเป็นจำนวนมากเช่นกัน จึงทำให้รัฐบาลต้องออกมาตรการควบคุมการระบาดของโรคไข้หวัดนก โดยการทำลายสัตว์ปีกที่เป็นพาหะซึ่งรวมถึงไก่พื้นเมืองด้วยประมาณ 60,811,081 ตัว (ศูนย์ควบคุมโรคไข้หวัดนก สำนักควบคุมป้องกันและบำบัดโรคสัตว์ กรมปศุสัตว์, 2549) ซึ่งการทำลายไก่เป็นจำนวนมากนี้ ส่งผลให้ไก่ที่มีพันธุกรรมที่ดีลดจำนวนลง ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาการอนุรักษ์พันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทยอย่างเร่งด่วน และเทคโนโลยีที่มีบทบาทช่วยในการอนุรักษ์พันธุกรรมที่สำคัญและมีความเป็นไปได้ในการผลิตสัตว์ปีก คือ เทคโนโลยีการผสมเทียม (artificial insemination; AI) ซึ่งในปัจจุบันได้มีการนำเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่แบบระยะสั้นเข้ามาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตด้วยเทคนิคการผสมเทียม การเก็บรักษาน้ำเชื้อและการผสมเทียมนั้นสามารถกระจายพันธุกรรมสัตว์ที่ต้องการได้โดยสะดวกและเป็นประโยชน์ในเรื่องการประหยัดต้นทุนในการเลี้ยงดูพ่อพันธุ์, การควบคุมโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์ นอกจากการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่แบบระยะสั้นแล้ว ยังมีอีกหนึ่งเทคโนโลยีที่สำคัญในการเก็บรักษาพันธุกรรมของสัตว์ปีกนั่นก็คือ การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งนั้น จะต้องอาศัยการทำงานของสาร extender และ สาร cryoprotectant เพื่อป้องกันเซลล์อสุจิจากความเย็นที่ใช้เหนี่ยวนำในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง แต่จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า การขยายพันธุ์สัตว์ปีกโดยใช้น้ำเชื้อไก่แบบแช่

แข็งนั้นยังมีการนำไปใช้ค่อนข้างน้อยมาก เนื่องจากพบปัญหาอัตราการผสมติดต่ำ (Donoghue and Wishart, 2000) เนื่องจากในระหว่างกระบวนการลดอุณหภูมิ และการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งมีผลทำให้ลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของเซลล์เมมเบรนของตัวอสุจิเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งส่งผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่, อัตราการมีชีวิตรอด และอัตราการผสมติดลดลง (Gadea et al., 2004; Satorre et al., 2007) เนื่องจากโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิจะประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) จำนวนมาก ซึ่งในเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของไก่นั้นจะมี phospholipids ประกอบอยู่มากถึง 66.4-70.7% ของไขมันทั้งหมด (Surai et al., 2001) จึงทำให้มีความไวต่อการเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่น (Lipid peroxidation; LPO) ถึงแม้ภายในเซมินอลพลาสมาจะมีสารต้านอนุมูลอิสระก็ตาม แต่ก็สามารถช่วยป้องกันการเกิดเปอร์ออกซิเดชั่นได้เพียงชั่วคราว ฉะนั้นในการเก็บรักษาน้ำเชื้อภายนอกร่างกายในระยะเวลาที่ยาวนานจึงไม่สามารถป้องกันการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นได้ทั้งในสัตว์ปีกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Breque et al., 2003) สำหรับน้ำเชื้อแบบแช่แข็งขั้นตอนหรือกระบวนการต่าง ๆ มีผลต่อการลดปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระ และการเพิ่มปริมาณกลุ่ม reactive oxygen species (ROS) (Bilodeau et al., 2001) จึงเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นเพิ่มสูงขึ้น ส่งผลให้คุณภาพของตัวอสุจิของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งต่ำลง รวมถึงความสามารถในการปฏิสนธิต่ำลงด้วย นอกจากนี้ Safarinejad et al. (2010) และ Fang et al. (2002) พบว่า การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ทำให้มีการผลิตสารอนุมูลอิสระ (ROS) ซึ่งจะส่งผลเสียต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของตัวอสุจิ และทำให้กลไกหรือหน้าที่ความสมบูรณ์พันธุ์ของเพศผู้สูญเสียไป โดยจะมีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิลดลง เกิดการยับยั้งการใช้ออกซิเจนของตัวอสุจิ DNA ของตัวอสุจิถูกทำลาย และ enzyme ที่สำคัญต่าง ๆ ที่ทำหน้าที่ในการเจาะไข่ของตัวเมียถูกทำลายจึงส่งผลทำให้อัตราการผสมติดลดลง (Kaeoket et al., 2008) ซึ่งในช่วงที่ผ่านมาได้มีรายงานการศึกษาถึงผลดีในการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำเชื้อของสัตว์ชนิดต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น มีการเสริมออกซิไดส์กลูต้าไธโอน (oxidizes glutathione), โบวายเซรั่มอัลบูมิน (bovine serum albumin), ซีสเทอีน (cysteine) และ ไลโคปีน (lycopene) ในน้ำเชื้อแพะ (Uysal and Bucak, 2007), การเสริมซีสเทอีนในน้ำเชื้อสุกร (Kaeoket et al., 2008), การเสริมกลูต้าไธโอนในน้ำเชื้อกระบือ (Ansari et al., 2011), การเสริมวิตามินอี (Vitamin E) ในน้ำเชื้อแกะ (Andreea and Stela, 2010) และการเสริมซีสเทอีน และ กลูต้าไธโอน ในน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ประดู่หางดำ (เทวินทร์และคณะ, 2555) พบว่า การเสริมสารต้านอนุมูลอิสระก่อนทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อจะสามารถลดการปฏิกิริยาออกซิเดชั่น และมีผลทำให้อัตราการตายของตัวอสุจิลดลง ซึ่งจากข้อมูลที่รวบรวมมา พบว่า มีข้อมูลของการนำสารต้านอนุมูลอิสระมาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อไก่ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งน้อยมาก จึงทำให้ผู้วิจัยเล็งเห็นถึงประโยชน์และนำมาใช้ศึกษาในการวิจัยครั้งนี้ โดยใช้ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวเป็นต้นแบบในการศึกษาเพื่อศึกษาผลของชนิดและระดับการเสริมสาร antioxidant เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง

1.2 วัตถุประสงค์ในการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาชนิดของสาร extender และสาร cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง

1.2.2 เพื่อศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant ที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

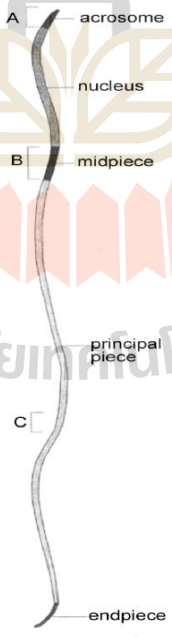
ทำให้ทราบชนิดของสาร extender และสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง ทราบชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant ที่เหมาะสมต่อคุณภาพน้ำเชื้อ เพื่อจะนำองค์ความรู้ดังกล่าวไปเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มผลผลิตไก่พื้นเมืองต่อไป อีกทั้งยังนำไปสู่การใช้ประโยชน์ในหน่วยงานขององค์กรภาครัฐที่เกี่ยวข้องกับการอนุรักษ์พันธุกรรมและความหลากหลายทางชีวภาพในการเก็บรักษาเป็นคลังอสุจิ (sperm bank) หรือสามารถนำน้ำเชื้อไก่แบบแช่แข็งไปใช้ในเชิงพาณิชย์เพื่อการส่งออก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อสุจิของสัตว์ปีก (Spermatozoa)

ตัวอสุจิของไก่มีลักษณะคล้ายไส้เดือน มีความยาวประมาณ 100 มิลลิไมครอน ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ 1) ส่วนหัว มีขนาดยาวประมาณ 12.5 มิลลิไมครอน ภายในประกอบด้วยนิวเคลียส (nucleus) ซึ่งจะบรรจุสารพันธุกรรม (deoxyribonucleic acid, DNA) และโปรตีนฮีสโตน หรือโปรตามีน และมี cytoplasm อยู่ปริมาณน้อย นอกจากนี้ยังมีอะโครโซม (acrosome) ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจาก Golgi apparatus ประกอบด้วย ผนังสองชั้น มีลักษณะคล้ายกระสุนปืน เป็นส่วนที่ครอบหัวอสุจิประมาณ 2 ใน 3 ส่วน ภายในบรรจุเอนไซม์หลายชนิด เช่น proacrosin, hyaluronidase, esterase และ hydrolase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการปฏิสนธิ โดย hyaluronidase จะเข้าไปสลายกลุ่ม cumulus cell, acrosin และ zona pellucida ของเซลล์ไข่ 2) ส่วน midpiece ยังประกอบไปด้วยไมโตรคอนเดรีย (mitochondria) ประมาณ 30 อัน เรียงตัวเป็นเกลียวรอบ ๆ ไมโครทิวบูล (microtubule) เพื่อสร้างพลังงานให้กับตัวอสุจิ และ 3) ส่วนหาง ยาวประมาณ 80 มิลลิไมครอน จะประกอบด้วยเส้นใยเล็ก ๆ เรียงตัวเป็นคู่วางตามแนวยาวไปจนถึงส่วนปลายหาง โดยจะถูกล้อมรอบด้วยเส้นใยอีก 9 คู่ เพื่อช่วยให้อสุจิเคลื่อนที่ไปข้างหน้าได้ โดยโครงสร้างตัวอสุจิของไก่ดังแสดงในภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างตัวอสุจิของไก่
ที่มา: Barrie (2007)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.2 วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในสัตว์ปีกนั้นจะต้องอาศัยการทำงานของสาร extender ร่วมกับสาร cryoprotectant โดยสาร extender จะใช้เพื่อเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อ รักษาคุณสมบัติและการทำงานของเซลล์อสุจิ มีบทบาทในการควบคุม pH, แรงดันออสโมติก, เป็นแหล่งพลังงานให้กับตัวอสุจิเพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม 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 มีผลต่ออัตราเมตาบอลิซึมและการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ซึ่งค่า pH ที่เหมาะสมในสัตว์ปีกจะอยู่ในช่วงระหว่าง 6.0-8.0 (Siudzinska and Lukaszewicz, 2008) และปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ ค่าออสโมลาลิตี้ ซึ่งค่าออสโมลาลิตี้ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์ปีกจะอยู่ในช่วงระหว่าง 250-460 mOsm kg^{-1} (Siudzinska and Lukaszewicz, 2008) หากอสุจิอยู่ในสภาวะที่มีค่าออสโมลาลิตี้ต่ำจะทำให้เซลล์อสุจิบวม แต่ถ้าอสุจิอยู่ในสภาวะที่มีค่าออสโมลาลิตี้สูงจะทำให้เซลล์อสุจิมีการสูญเสียน้ำและเกิดภาวะเซลล์เหี่ยว (Donoghue and Wishart, 2000) สาร extender ที่นิยมใช้อย่างกว้างขวางในไก่และไก่งวง ได้แก่ Lake's diluent (Chalah, 1999), BPSE (Belsville Poultry Extender) (Sexton, 1977), IGGKP (Lukaszewicz, 2001) และ Schramm (Chalah, 1999) และที่ผ่านมาได้มีการศึกษาผลของสาร extender ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อในสัตว์ปีกหลายชนิด โดย Laffaldano et al. (2005) ได้ศึกษาผลของสาร BPSE, Lake's diluent และ IGGKP ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่งวงที่ระยะเวลาการเก็บ 3, 24 และ 48 ชั่วโมง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส พบว่า ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 3 ชั่วโมง เมื่อใช้ BPSE, Lake's diluent และ IGGKP ให้อัตราการเคลื่อนที่, อัตราการมีชีวิตและความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) และเมื่อทำการเก็บรักษาในระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นเป็น 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า เมื่อใช้ BPSE ให้อัตราการเคลื่อนที่, อัตราการมีชีวิต และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิสูงกว่าการใช้ Lake's diluent และ IGGKP ($P<0.05$) สำหรับการศึกษาของ Penfold et al. (2001) ก็พบว่า สามารถใช้ BPSE ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็ดสายพันธุ์ Northern pintail ได้นานถึง 48 ชั่วโมง ซึ่งให้อัตราการเคลื่อนที่รวม, อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการผสมติดไม่แตกต่างจากการเก็บรักษาที่ระยะเวลา 0 ชั่วโมง ($P>0.05$) สำหรับ 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 พบว่า สาร Lake's diluted, EK และ Tselutin ทำให้เกิดความผิดปกติบริเวณหัว midpiece ความผิดปกติอื่น ๆ และอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>$

0.05) ยกเว้นความผิดปกติบริเวณคอ โดยพบว่า EK ทำให้เกิดความผิดปกติบริเวณคอน้อยที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ทั้ง 4 พันธุ์ นอกจากนี้เทวินทร์ และคณะ (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 พบว่า เมื่อเก็บรักษาที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง การใช้ BPSE และ IGGKP ให้อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวและคละสี (P>0.05) สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่โร๊ดไอแลนด์เรด พบว่า เมื่อใช้ IGGKP ให้อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตสูงที่สุด จากการศึกษาของเทวินทร์ และยุพิน (2550) ได้ทำการทดสอบอัตราการผสมติดของการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวและคละสีรวมกัน ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1 ชั่วโมง พบว่า การใช้ Lake's diluent, Tselutin, Schramm, BPSE และ IGGKP ให้อัตราการผสมติดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

นอกจากการเลือกใช้สาร extender ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแล้วนั้นยังต้องอาศัยการทำงานของสาร cryoprotectant ร่วมด้วย โดยสาร cryoprotectant เป็นสารที่สำคัญในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง มีหน้าที่ช่วยป้องกันอันตรายแก่เซลล์อสุจิในระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการละลาย สาร cryoprotectant แต่ละชนิดจะต้องมีระดับความเข้มข้น และระยะเวลา (equilibration time) ที่เหมาะสมเพื่อที่จะออกฤทธิ์และป้องกันการถูกทำลายของเซลล์ หน้าที่ของสาร cryoprotectant จะป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์, ป้องกันการลดขนาดของเซลล์ และอันตรายอันเนื่องมาจากความไม่สมดุลของเกลือแร่และอิเล็กโทรไลท์ โดยสาร cryoprotectant จะช่วยปรับเปลี่ยนให้เกิดความสมดุลของโซเดียมระหว่างภายในและภายนอกเซลล์โดยการขนส่งโซเดียมเข้าสู่ภายในเซลล์ เนื่องจากโซเดียมอิออน มีความสามารถจับกับน้ำได้ ดังนั้นจึงเป็นการขนส่งน้ำเข้าสู่เซลล์ และการแพร่ของสาร cryoprotectant เข้าสู่เซลล์ก็เป็นการเข้าไปแทนที่น้ำที่แพร่ออกจากเซลล์ ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงของแรงดันออสโมซิส อันเนื่องมาจากการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายนอกเซลล์ก่อนที่ของเหลวภายในเซลล์จะแข็งตัว สาร cryoprotectant สามารถช่วยคงไว้ของคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มออแกเนลส์ซึ่งยังไม่มีการอธิบายของกลไกการทำงาน

สาร cryoprotectant ที่นำมาใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์ปีกมีหลายชนิด เช่น glycerol, DMSO, DMA, DMF และ EG เป็นต้น และในอดีตที่ผ่านมาได้มีการศึกษาผลของสาร cryoprotectant ร่วมกับสาร extender หลายชนิดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ ซึ่งจากการศึกษาของ Tseluntin et al. (1999) พบว่า เมื่อใช้ DMA ที่ระดับความเข้มข้น 6% ร่วมกับ Lake's diluent ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่สายพันธุ์ทางการค้า (type I99 roosters) โดยใช้วิธีการลดอุณหภูมิแบบเม็ดให้อัตราการผสมติด (92.7±4.1%) ไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด (94.7±0.4%) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chalah et al. (1999) ก็พบว่าเมื่อใช้ DMA ที่ระดับความเข้มข้น 6% ร่วมกับ Lake's diluent ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่สายพันธุ์การค้า (Shaver Starbro) ด้วยวิธีการลดอุณหภูมิแบบเม็ดให้อัตราการผสมติด (88.0%) ไม่

แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด (93.0%) นอกจากนี้การใช้ DMA ที่ระดับความเข้มข้น 6% ยังประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อห่านโดยใช้ EK เป็นสาร extender ซึ่งพบว่า การเก็บรักษาน้ำเชื้อห่านสายพันธุ์ Greylag ให้อัตราการผสมติดเท่ากับ 37.7% มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การผสมติดสูงที่สุดและไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (P>0.05) สำหรับการศึกษาของ Gee et al. (1993) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อนกเหยี่ยว (Falco sparverius) พบว่า การใช้ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 6% ร่วมกับ BPSE ให้อัตราการผสมติดสูงที่สุด (35.29%) (P<0.05) และนอกจากนี้เทวินทร์ และยุพิน (2550) ได้ทำการศึกษาสาร extender ร่วมกับสาร cryoprotectant โดยใช้ BPSE เป็นสาร extender และใช้ glycerol, Dimethylacetamide (DMA), Ethylene glycol (EG) และ DMSO เป็นสาร cryoprotectant พบว่า การใช้สาร extender สูตร BPSE ร่วมกับ 6% DMSO นั้นช่วยให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิสูงขึ้นเมื่อเทียบกับสาร cryoprotectant ชนิดอื่น ๆ และจากการศึกษาของสุนทร และคณะ (2552) ได้เปรียบเทียบการใช้สาร glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 10% และ DMF ที่ระดับความเข้มข้น 6% โดยใช้ Sharnm เป็นสาร extender ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองด้วยวิธีการลดอุณหภูมิแบบอังไอไนโตรเจนเหลว พบว่า เมื่อใช้ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 10% ให้อัตราการเคลื่อนที่ (60.00±7.50%) สูงกว่าการใช้ DMF ที่ระดับความเข้มข้น 6% (42.8±4.6%) แต่สาร cryoprotectant ทั้งสองชนิดให้ผลอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างกัน (P>0.05) เมื่อนำไปทดสอบอัตราการผสมติด พบว่า glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 10% ไม่ทำให้เกิดการผสมติด (0%) สำหรับ DMF ที่ระดับความเข้มข้น 6% ให้อัตราการผสมติดเท่ากับ 22.83±12.2%

จากผลการศึกษาเกี่ยวกับสาร extender และสาร cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์ปีก พบว่า การเลือกใช้สารทั้ง 2 ชนิด ยังมีความแปรปรวนหลากหลายในการเลือกใช้สารทั้ง 2 ชนิด ซึ่งการเลือกใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ปีก และวิธีในการลดอุณหภูมิ นอกจากนี้การศึกษาผลของสาร extender และสาร cryoprotectant ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อย จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าสาร extender และสาร cryoprotectant ชนิดใดที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง และจากการรวบรวมเอกสาร พบว่า การเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองนิยมใช้วิธีการลดอุณหภูมิแบบอังไอไนโตรเจนเหลว ดังนั้นควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงความเหมาะสมในการเลือกใช้สาร extender และสาร cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวด้วยวิธีการลดอุณหภูมิแบบอังไอไนโตรเจนเหลว

2.3 สภาวะการเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่น

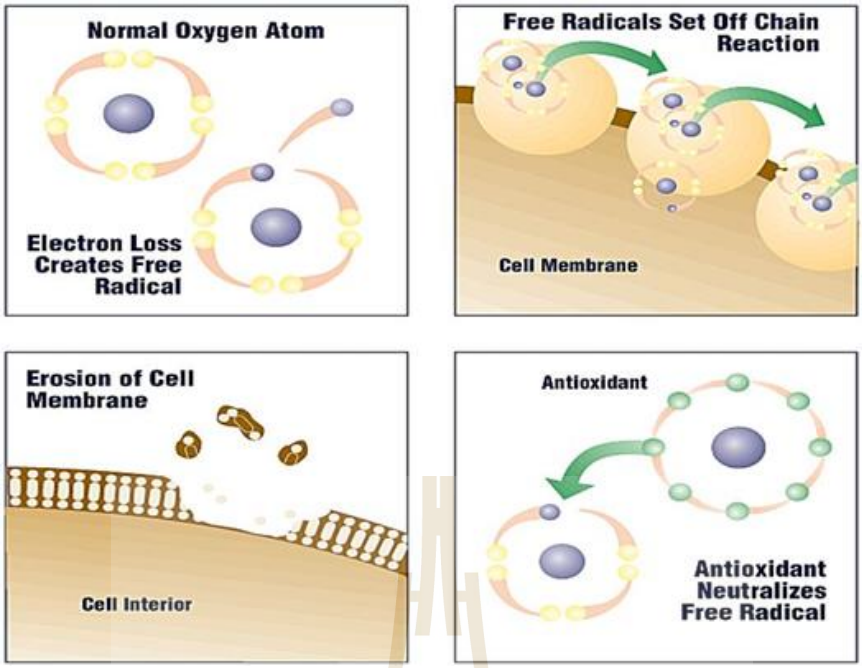
องค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของไก่จะประกอบด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (Polyunsaturated fatty acid) เป็นส่วนประกอบหลัก ซึ่งในไก่จะมี phospholipids ประกอบอยู่ในอสุจิมากถึง 66.4-70.7% ของไขมันทั้งหมด (Surai et al., 2001) การที่โครงสร้างของเซลล์อสุจิของไก่ประกอบด้วย กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวเป็นจำนวนมากนี้ จึงไวต่อการเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นที่จะทำให้เกิดความเสียหายต่อโครงสร้างเซลล์อสุจิได้สูง (Breque et al., 2003) ซึ่งเมื่อเซลล์อสุจิที่มีชีวิต

ถูกเก็บอยู่ในสภาวะที่ใช้ออกซิเจน เช่น ระหว่างการแช่เย็น, แช่แข็ง และละลายตัวอสุจิภายหลังการแช่แข็ง กระบวนการเหล่านี้จะต้องการออกซิเจนเพื่อไปช่วยในกระบวนการสันดาป แต่อย่างไรก็ตามผลิตผลจากการสันดาปออกซิเจนที่มากเกินไป คือ Reactive Oxygen Species (ROS) จะเป็นสาเหตุทำให้โครงสร้างเซลล์อสุจิเกิดความเสียหายและตายได้ โดย ROS คือ พวกอนุมูลอิสระที่มีอิเล็กตรอนไม่เข้าคู่ เช่น superoxide radicals (O_2^-), hydroxyl radicals (OH) หรือ hydrogen peroxide (H_2O_2) (Thuwanut, 2007) ซึ่ง ROS เป็นโมเลกุลหรืออิเล็กตรอนโดดเดี่ยวอยู่รอบนอกและมีอายุสั้นมากประมาณ 10^{-3}-10^{-10} วินาที จึงจัดเป็นโมเลกุลที่ไม่เสถียรและว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยาเคมี (Breque et al., 2003)

ในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อก็มีการเพิ่มปริมาณของ ROS ซึ่งปริมาณการเพิ่มขึ้นของ ROS นั้นมีความเกี่ยวข้องทางสรีรวิทยาในการรักษาความสามารถในการปฏิสนธิ, กระบวนการ capacitation และ acrosome reaction ของตัวอสุจิ โดย ROS ที่มากเกินไปจะทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่และการปฏิสนธินั้นลดน้อยลง (Baumber et al., 2000; Bucak et al., 2008) ซึ่งความเสียหายจากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชั่นที่เกิดขึ้นส่งผลให้เกิดการสูญเสียการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์รวมถึงเกิดความเสียหายของ DNA ที่ส่วนหัวของอสุจิด้วย (Agarwal and Said, 2003) ภายใต้สภาวะปกติตัวอสุจิที่ DNA เกิดความเสียหายนั้นจะไม่สามารถเข้าสู่กระบวนการปฏิสนธิได้ ที่เป็นเช่นนี้เพราะว่าปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชั่นที่เกิดขึ้นนั้นได้ไปเพิ่มความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ดังนั้นสารจำพวกกลุ่ม antioxidant จึงมีบทบาทในการชะลอการเกิดความเสียหายดังกล่าวได้ (ภาพที่ 2.2)

อย่างไรก็ตามการเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นจะเป็นอันตรายต่ออสุจิและส่งผลเสียต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิ ปกติจะสามารถวัดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นที่เกิดขึ้นได้จากการวัดระดับของ malondialdehyde (MDA) ที่เป็นผลผลิตสุดท้ายของการเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นผ่านทางวิธีการ thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) โดย MDA ได้มาจากการทำปฏิกิริยาของ thiobarbituric acid (TBA) กับสารเปอร์ออกไซด์ (peroxide) และอัลดีไฮด์ (aldehyde)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 2.2 การเข้าทำปฏิกิริยาของ antioxidant ต่ออนุมูลอิสระ (Free radical)
ที่มา: http://www.vcharkarn.com/varticle/59646

2.4 ผลของสาร Antioxidant ต่อคุณภาพของน้ำเชื้อสัตว์ที่มีการเก็บรักษาในแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็ง

สาร antioxidant หรือเรียกว่าสารต้านออกซิเดชัน หรือสารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่ทำหน้าที่ยับยั้งหรือต่อต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน หรือเป็นสารที่สามารถขจัดอนุมูลอิสระออกจากร่างกายเซลล์ ซึ่งการต้านออกซิเดชันของร่างกายหรือเซลล์นั้นแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ใหญ่ ๆ คือ 1) กลุ่มที่ป้องกันการเกิดสารอนุมูลอิสระ ได้แก่ เอนไซม์ superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, peroxidase, cytochrome C, peroxidase, ทองแดง, สังกะสี, ซีลีเนียม โปรตีนที่มีทองแดงอยู่ในโมเลกุล (ceruloplasmin) และ 2) กลุ่มที่ทำลายปฏิกิริยาลูกโซ่ ได้แก่ วิตามินอี, เบต้า-แคโรทีน, วิตามินซี, ubiquinone, uric acid, bilirubin, albumin, sulfhydryl groups ในกรดอะมิโน cysteine ซึ่งมีอยู่ในโปรตีน เช่น เนื้อสัตว์ นอกจากนี้สาร antioxidant ยังสามารถแบ่งตามกลไกการยับยั้งได้ออกเป็น 3 ชนิด คือ 1) Preventive antioxidant เป็นสาร antioxidant ที่ป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระ 2) Scavenging antioxidant เป็นสาร antioxidant ที่ทำลายหรือยับยั้งอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้น และ 3) Chain breaking antioxidant เป็นสาร antioxidant ที่ทำให้ปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูลอิสระสิ้นสุดลง ซึ่งอนุมูลอิสระในน้ำเชื้อนั้นสามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะปกติจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของออกซิเจนโดยจะอยู่ในรูป ROS ซึ่งเป็นสารอนุมูลอิสระที่มีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิแดนซ์สูง ประกอบด้วย ซุปเปอร์ออกไซด์แอนไอออน (superoxide anion, O_2^-), ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide; H_2O_2), เพอร์รอกซ์ซิลล์ (peroxyl radicals) และ ไฮดรอกซ์ซิลล์ (hydroxyl radicals; HO) โดยในสภาวะปกตินั้นการมีสารอนุมูล

อิสระในน้ำเชื้อจะสามารถพบได้ในปริมาณเล็กน้อยเนื่องจากในน้ำเลี้ยงเชื้อ (Seminal plasma) มีสารต้านอนุมูลอิสระเป็นองค์ประกอบทำให้เกิดความสมดุลขึ้น ซึ่งเป็นผลดีในการช่วยกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยา capacitation ของตัวอสุจิ กระตุ้นให้เกิดการยึดเกาะของตัวอสุจิกับชั้น zona pellucida ของไข่ และเป็นสารช่วยกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยา acrosome reaction อย่างไรก็ตามเมื่อนำน้ำเชื้อมาผ่านขั้นตอนต่าง ๆ ในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งจะทำให้ปริมาณของน้ำเลี้ยงเชื้อลดลง ส่งผลให้ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระลดลงด้วยเช่นกัน จึงทำให้อนุมูลอิสระในน้ำเชื้อเพิ่มขึ้น ซึ่งก่อให้เกิดอันตรายกับตัวอสุจิได้

ที่ผ่านมาได้มีรายงานการศึกษาผลของสาร antioxidant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อสัตว์ จากการศึกษาของ Tabatabaei et al. (2011) ได้ทำการศึกษาการเสริมวิตามินอีต่อคุณภาพน้ำเชื้อในไก่เนื้อพันธุ์ Ross โดยทำการเสริมลงในสาร extender ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 0 (control), 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.3 mg/ml และทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อในระยะเวลาต่าง ๆ กัน ดังนี้ 0, 3, 6, 10 และ 24 ชั่วโมง พบว่า เมื่อทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ระยะเวลา 3 ชั่วโมง การเสริมวิตามินอีที่ระดับความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.3 mg/ml สามารถให้อัตราการเคลื่อนที่ (71.47±3.16, 73.67±1.88, 72.33±1.70 และ74.09±1.45 ตามลำดับ) ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุม (62.45±1.15) ($P<0.05$) และยังพบว่า ที่ระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อ 3 ชั่วโมง การเสริมวิตามินอีที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 mg/ml ส่งผลให้อัตราการมีชีวิตของตัวอสุจิ (91.05±2.30, 90.27±3.11 และ 92.08±2.90 ตามลำดับ) สูงกว่ากลุ่มควบคุม (82.19±2.26) ($P<0.05$) และเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า การเสริมวิตามินอีที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.3 mg/ml ให้อัตราการเคลื่อนที่สูงขึ้น (69.28±2.53, 71.11±2.49 และ 69.33±2.12 ตามลำดับ) เมื่อเทียบกับการเสริมวิตามินอีในระดับความเข้มข้น 0.05 mg/ml (61.61 ± 2.67) และกลุ่มควบคุม (49.35 ± 3.86) ($P<0.05$) และเมื่อทำการเสริมวิตามินอีในระดับความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.2 และ 0.3 mg/ml ให้อัตราการมีชีวิตของตัวอสุจิสูงกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นระยะเวลา 10 และ 24 ชั่วโมง พบว่า การเสริมวิตามินอีที่ระดับความเข้มข้น 0.2 และ 0.3 mg/ml ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตของอสุจิสูงกว่าการเสริมวิตามินอีในระดับอื่น ๆ ($P<0.05$) และเมื่อทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นเวลา 3, 6 และ 24 ชั่วโมง พบว่า การเสริมวิตามินอีที่ระดับความเข้มข้น 0.2 และ 0.3 mg/ml ส่งผลให้อสุจิมีลักษณะผิดปกติน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับการเสริมในระดับอื่น ๆ แต่สำหรับการเก็บรักษาในระเวลา 10 ชั่วโมงนั้น พบว่า การเสริมวิตามินอีที่ระดับ 0.3 mg/ml ส่งผลให้อสุจิมีลักษณะผิดปกติน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับการเสริมในระดับอื่น ๆ ในการศึกษาของ Funahashi and Sano (2005) ได้ทำการศึกษาการเสริมสาร antioxidant ใน extender ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ซึ่งการศึกษานี้ได้ทำการศึกษาสาร antioxidant 3 ชนิดด้วยกัน คือ Glutathione, Cysteine และ Hypotaurine พบว่า เมื่อมีการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรเป็นเวลา 7 วัน extender ที่เติมด้วย Cysteine จะส่งผลให้มีอัตราการมีชีวิตของอสุจิสูงสุดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) และหลังจากเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรเป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่า extender ที่เติมด้วย Cysteine และ Glutathione ส่งผลให้ตัวอสุจิมีอัตราการมีชีวิตรอดสูงกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้ Funahashi and

Sano (2005) ยังได้ทำการศึกษาระดับการเสริม Cysteine ต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรด้วย โดยทำการเสริม Cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 0 (control), 0.25, 0.5, 1.25, 2.50 และ 5.0 mM พบว่า เมื่อทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรเป็นเวลา 14 วัน การเสริม Cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 2.5-5.0 mM ส่งผลให้ตัวอสุจิมีอัตราการมีชีวิตรอดสูงกว่าการเสริม Cysteine ในระดับอื่น ๆ และการศึกษาของ Carolina et al. (2011) ได้ทำการศึกษาการเสริม Cysteine ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรแบบระยะสั้น โดยทำการเสริม Cysteine ลงใน BTS extender ที่ระดับความเข้มข้น 0 (control), 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10.0 และ 20.0 mM พบว่า หลังจากการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรเป็นเวลา 72 ชั่วโมงนั้นอัตราการมีชีวิตรอดของอสุจิจะต่ำกว่า 60% เมื่อทำการเสริมด้วย Cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 0-5.0 mM และต่ำกว่า 10% เมื่อทำการเสริม Cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 20 mM และเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรเพิ่มมากขึ้น การเสริม Cysteine ในระดับความเข้มข้น 20 mM จะส่งผลให้ความสมบูรณ์ของ plasma membrane นั้นมีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) สำหรับการศึกษาของ Ansari et al. (2011) ได้ทำการศึกษาผลของเสริม Glutathione ในสาร extender ต่อคุณภาพน้ำเชื้อกระบือ โดยในการศึกษานี้จะแบ่งระดับของการเสริมออกเป็นระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 0 (control), 0.5, 1.0, 2.0 และ 3.0 mM และทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 วัน จะพบว่า เมื่อทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นระยะเวลา 3 วัน และ 5 วัน การเสริม Glutathione ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 mM จะส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่, อัตราการมีชีวิต และความสมบูรณ์ของ plasma membrane ของอสุจิสูงกว่าการเสริม Glutathione ที่ระดับอื่น ๆ ($P<0.05$) และเมื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อกระบือในระยะเวลา 3 และ 5 วัน โดยมีการเสริม Glutathione ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 mM สามารถช่วยเพิ่มความสมบูรณ์ของอะโครโซมให้สูงยิ่งขึ้น จากอดีตที่ผ่านมาสำหรับในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งก็ได้มีการศึกษาถึงผลของสาร antioxidant เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อเช่นเดียวกัน โดยจากการศึกษาของ Asadpour et al. (2011) ได้ทำการศึกษาการเสริมวิตามินซีและวิตามินอีลงใน citrate-egg yolk extender (CEY) ต่อคุณภาพน้ำเชื้อโคแบบแช่แข็ง โดยทำการเสริมวิตามินอีลงใน citrate-egg yolk extender มีการเสริมที่ระดับความเข้มข้น 0 (control), 0.043 และ 0.086 mg/ml พบว่า การเสริมวิตามินอีที่ระดับความเข้มข้น 0.043 และ 0.086 mg/ml ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ (56.00±4.00 และ 51.00±5.00 ตามลำดับ) และอัตราการมีชีวิตรอด (66.00±2.00 และ 61.00±1.00 ตามลำดับ) ของอสุจิสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (43.00±3.00 และ 51.00±1.00 ตามลำดับ) ($P<0.05$) นอกจากนี้ Andrabi et al. (2008) ได้ทำการศึกษาผลของการเสริมวิตามินอีลงใน Tris-citric acid (TCA) ต่อคุณภาพน้ำเชื้อกระบือหลังการละลาย โดยได้ทำการเสริมวิตามินอีที่ระดับ 1 mg/ml พบว่า การเสริมวิตามินอีช่วยเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ (60.0±0.0) และความสมบูรณ์ของ plasma membrane ของอสุจิ (82.9±2.5) และความสมบูรณ์ของอะโครโซม (86.5±5.1) สูงกว่ากลุ่มควบคุม (54.0±2.2, 76.9±4.5 และ 80.2±0.8 ตามลำดับ) ($P<0.05$) ในการศึกษาของ Kaeoket et al. (2008) ได้ศึกษาผลของการเติมสาร antioxidant 3 ชนิด ได้แก่ L- cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 605.8 mg/ml,

glutathione ที่ระดับความเข้มข้น 307.32 mg/ml และ vitamin E ที่ระดับความเข้มข้น 86.14 mg/ml ลงใน Lactose-egg yolk extender ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งที่ใช้วิธีการลดอุณหภูมิแตกต่างกัน พบว่า สาร antioxidant ทั้ง 3 ชนิด ไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิ ($P>0.05$) แต่จากการศึกษาของ Satorre et al. (2007) พบว่า การเติม vitamin E ที่ระดับความเข้มข้น 0.2 mg/ml ลงใน BF5 extender ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรแบบแช่แข็ง ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ และความสมบูรณ์ของอะโครโซมสูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) และการเติม vitamin E ระดับความเข้มข้น 0.2 mg/ml ไม่มีผลต่ออัตราการมีชีวิตรอดของอสุจิ ($P>0.05$) และการศึกษาของ Andreea and Stela (2010) ได้ทำการศึกษาผลของการเสริมวิตามินอีที่ระดับความเข้มข้น 0.43 mg/ml ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแกะแบบแช่แข็ง พบว่า การเติมวิตามินอีช่วยเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่, อัตราการมีชีวิตรอด และความสมบูรณ์ของ plasma membrane ให้เพิ่มสูงขึ้น นอกจากศึกษาการเติมวิตามินอีแล้ว ยังได้มีการศึกษาการเสริม cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 10 mM พบว่า การเสริม cysteine นั้นสามารถช่วยปรับปรุงให้อสุจิมีอัตราการเคลื่อนที่, อัตราการมีชีวิตรอด และความสมบูรณ์ของ plasma membrane สูงขึ้นเช่นเดียวกัน จากการศึกษาของ Coyan et al. (2011) ทำการศึกษาการผลของการเสริม cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 0 (control), 1, 2 และ 4 mM ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแกะแบบแช่แข็ง พบว่า การเสริม cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 2 และ 4 mM สามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ให้สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (control) ($P<0.05$) แต่การเติม cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 2 mM จะช่วยให้ความสมบูรณ์ของ plasma membrane สูงกว่าการเติมในระดับอื่น ๆ ($P<0.001$) สำหรับการศึกษาของ Ansari et al. (2010) ซึ่งได้ทำการศึกษาการเสริม L-cysteine ลงในสาร extender ต่อคุณภาพน้ำเชื้อโคพันธุ์ Sahiwal ก่อนนำน้ำเชื้อไปทำการแช่แข็ง โดยในการศึกษานี้ได้ทำการเสริม L-cysteine ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้ 0 (control), 0.5, 1.0 และ 2.0 mM พบว่า เมื่อมีการเสริม L-cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 mM ส่งผลให้อัตรากรเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิตรอด ความสมบูรณ์ของ plasma membrane และความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิสูงกว่าระดับอื่น ๆ ($P<0.05$) จากการศึกษาของ Ursal and Bucak (2007) ได้ทำการศึกษาการเติมสารต้านอนุมูลอิสระต่อคุณภาพน้ำเชื้อแกะแบบแช่แข็ง โดยได้มีการเสริม Glutathione ที่ระดับความเข้มข้น 0 (control), 5, 10 และ 20 mM พบว่า การเสริม Glutathione ที่ระดับความเข้มข้น 5 mM นั้นส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิตรอด และความสมบูรณ์ของ plasma membrane สูงกว่าการเสริม Gluthaione ในระดับอื่น ๆ และยังช่วยป้องกันการถูกทำลายของ acrosome ด้วย และทำการเสริม Cysteine ที่ระดับ 0 (control), 5, 10 และ 20 mM พบว่า การเสริม Cysteine ที่ระดับ 10 mM จะส่งผลให้อสุจิมีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการเสริม Cysteine ในระดับอื่น ๆ แต่สำหรับอัตราการมีชีวิตรอดของอสุจินั้น การเสริม Cysteine ที่ระดับ 5 และ 10 mM ให้ผลไม่แตกต่างกัน จากการศึกษาของเทวินทร์ และคณะ (2555) ได้ทำการศึกษาการเสริม Cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 1, 5 และ 10 mM และ Glutathione ที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.5 และ 1.0 mM ตามลำดับ ในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ประดู่หางดำ พบว่า การเสริม cysteine มีผลต่ออัตราการ

ปฏิสนธิหรืออัตราของไข่มีเชื้อภายหลังการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง โดยระดับที่เหมาะสมคือ 1 mM และสำหรับการเสริม glutathione ที่ระดับ 0.1-1.0 mM มีผลเสียต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองโดยทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ และความสมบูรณ์พันธุ์ลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้ Luberda (2005) ได้รวบรวมการรายงานการศึกษาปริมาณของ Glutathione ในน้ำเชื้อสัตว์แต่ละชนิดดังแสดงในตารางที่ 2.1 เพื่อเป็นการบ่งบอกถึงความต้องการถึงการนำไปใช้ในการเสริม Glutathione ในระดับต่าง ๆ ต่อการลดการเกิดออกซิเดชันในระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อต่อไป

ตารางที่ 2.1 ความเข้มข้นของ Glutathione ในน้ำเชื้อของสัตว์แต่ละชนิด

Species	Glutathione	References
Boar	0.03 nmol/10^8 spz.	
Bull	2.93 nmol /10^8 spz.	
Dog	0.53 ± 0.11 nmol /10^8 spz.	Luberda (2005)
Hamster	30-40 nmol / mg protein	
Mouse	90 nmol /10^8 spz.	
Rabbit	0.01 nmol /10^8 spz.	
Ram	0.45 ± 0.14 nmol /10^8 spz.	

หมายเหตุ: spz = spermatozoa

จากการศึกษาผลของสาร antioxidant ต่อคุณภาพและความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อสัตว์ที่ผ่านมานั้น พบว่า การเสริม antioxidant มีแนวโน้มสามารถเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งได้ แต่จากรายงานการศึกษาข้างต้น จะพบว่าข้อมูลที่ทำการศึกษาในสัตว์ปีกยังค่อนข้างมีข้อมูลที่น้อยมาก จึงทำให้เกิดวัตถุประสงค์ในการศึกษาถึงชนิด และระดับของสารต้านอนุมูลอิสระต่อคุณภาพและความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง เพื่อพัฒนาและเพิ่มประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์จากน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองแบบแช่แข็งให้เกิดประโยชน์สูงสุด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีการดำเนินงานวิจัย

การศึกษาผลของสาร antioxidant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งในไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวมีการดำเนินงานวิจัยทั้งในภาคสนามและในห้องปฏิบัติการ ในส่วนของห้องปฏิบัติการนั้นใช้ห้องปฏิบัติการ การปรับปรุงพันธุ์สัตว์และสรีรวิทยาสัตว์ อาคารเครื่องมือ 10 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำหรับการศึกษาในภาคสนามนั้นใช้ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เป็นสถานที่ในการดำเนินงานวิจัย โดยการศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของสาร extender และสาร cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง

การทดลองที่ 2 การศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant ที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง

โดยทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อจากอัตราการเคลื่อนที่, อัตราการมีชีวิต, อัตราการผสมติด, ความสมบูรณ์ของอะโครโซม, การทำงานของไมโตคอนเดรีย และประสิทธิภาพในการลดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นจากการวัดระดับของ malondialdehyde (MDA) ด้วยวิธีการ thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ในตัวอสุจิโดยมีขั้นตอนและวิธีการศึกษา ดังนี้

3.1 วิธีการศึกษา

3.1.1 การรีดน้ำเชื้อ

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้พ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อายุประมาณ 7 เดือนขึ้นไป จำนวน 60 ตัว โดยจะรีดน้ำเชื้อสัปดาห์ละ 2 ครั้ง การรีดน้ำเชื้อจะมีผู้รีด 2 คน คือ คนอุ้มไก่จะกระชับพ่อไก่ไว้ที่เอวยื่นหางไก่ออกข้างหน้า หัวไก่อยู่ด้านหลังของคนอุ้ม มือหนึ่งจะจับขาไก่ทั้ง 2 ข้างรวบเข้าหากัน โดยใช้นิ้วชี้และนิ้วกลางอยู่ระหว่างขาทั้งสอง แล้วใช้มืออีกข้างหนึ่งลูบหลังพ่อไก่เบา ๆ จากโคนปีกผ่านมาที่หลังและโคนหาง จากนั้นใช้นิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้บีบกระตุ้นอย่างรวดเร็วที่โคนหาง ไก่จะแสดงปฏิกิริยากระดกหางขึ้น พร้อมกับดันอวัยวะเพศ (รูปร่างเป็นลอนคู่ปลายแหลมยื่นออกมาจากรูทวาร) ซึ่งอวัยวะดังกล่าวเป็นที่เก็บน้ำเชื้อและฉีดน้ำเชื้อ คนรีดอีกคนหนึ่งจะใช้ภาชนะที่สะอาดรองรับน้ำเชื้อที่ไหลออกมาดังแสดงในภาพที่ 3.1 ข้อควรระวัง ก่อนรีดน้ำเชื้อจะต้องทำความสะอาดบริเวณทวารด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำสะอาด และใช้กระดาษทิชชูซับ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากน้ำ และอุจจาระ ซึ่งน้ำเชื้อที่นำมาทำการเก็บรักษาจะต้องไม่ปนเปื้อนจากสิ่งดังกล่าว และจะทำการประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิของพ่อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวเป็นรายตัว โดยน้ำเชื้อที่จะนำมาศึกษานั้นจะต้องมีอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ 75% ขึ้นไป จากนั้นนำน้ำเชื้อที่รีดได้มาผสมรวมกันก่อนนำไปศึกษาต่อไป

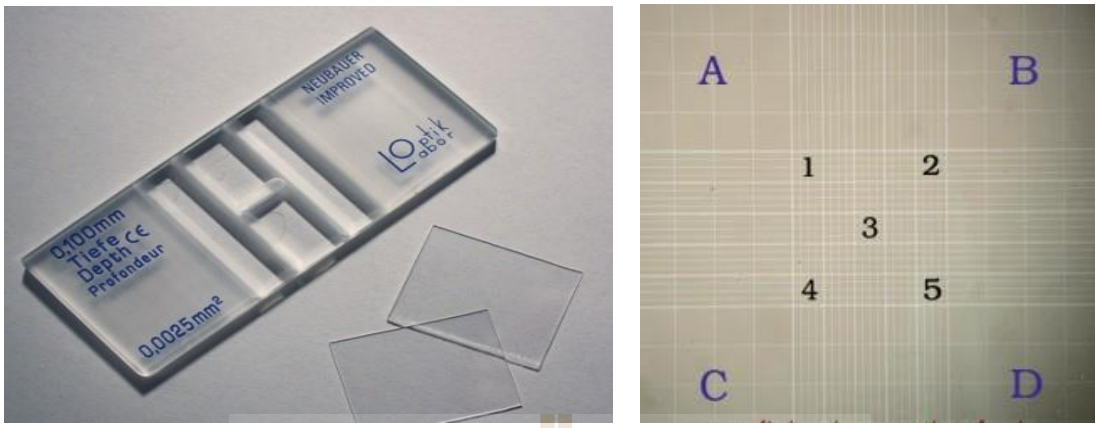
ภาพที่ 3.1 การรีดน้ำเชื้อไก่

3.1.2 การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

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

2) การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อ (จำนวนอสุจิต่อหนึ่งมิลลิลิตร) การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อหาได้โดยทำการเจือจางน้ำเชื้อสดด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1: 1,500 เท่า ขณะที่ทำการดูดน้ำเชื้อควรใช้กระดาษทิชชู่ซับน้ำเชื้อส่วนเกินที่ติดมากับ pipettes tips จากนั้นทำการนับจำนวนอสุจิ โดยใช้สไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (heamacytometer counting chamber, ภาพที่ 3.2 ก) ภายใต้กล้อง compound microscope (40X) นับจำนวนอสุจิจากมุมบน-ล่าง ทั้ง 4 มุม และช่องตรงกลาง รวม 5 ช่อง (ภาพที่ 3.2 ข) แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนอสุจิที่นับได้ต่อ 1 มิลลิลิตร ดังนี้

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



(ก.) (ข.)

ภาพที่ 3.2 สไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (heamacytometer counting chamber; ก) บริเวณที่นับจำนวนอสุจิทั้ง 5 บริเวณ (1, 2, 3, 4 และ 5; ข)

ที่มา: http://www.fisheries.go.th/cf-chan/plankton/hema/40-1-clear-400.jpg

3) ศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ

การศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิมีวิธีการศึกษา 2 วิธี คือ

วิธีที่ 1 เป็นวิธีการศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิที่ใช้ในภาคสนามก่อนนำน้ำเชื้อมาทำการศึกษา ทำได้โดยการหยดน้ำเกลือ 1 หยด (5 ไมโครลิตร) ลงบนสไลด์ และหยดน้ำเชื้อ 1 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยน้ำเกลือมาแตะกับน้ำเชื้อเพียงเล็กน้อย แล้วสังเกตการเคลื่อนที่ภายใต้กล้อง compound microscope (10X) โดยให้เกณฑ์การเคลื่อนที่ของอสุจิ ดัดแปลงจาก Guest (1973) ดังรายละเอียดในตารางที่ 3.1 โดยน้ำเชื้อที่จะนำมาศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็งจะต้องมีการเคลื่อนที่มากกว่า 75% ขึ้นไป

ตารางที่ 3.1 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)

วิธีที่ 2 เป็นวิธีการศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ โดยใช้เครื่อง Computer Assisted Semen Analysis (CASA) รุ่น version 10 HTM-IVOS (Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA) สำหรับประเมินอัตราการเคลื่อนที่ และลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิแบบต่าง ๆ ทำโดยการนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาเจือจางอีกครั้งด้วยสาร extender ที่อัตราการเจือจาง 1: 15 (Frozen semen: Extender) และใช้ micropipette ดูดตัวอย่าง 5 ไมโครลิตร โหลดลงบน Dual Slide Sperm Analysis ที่ปิดด้วย Cover Glass (Hamilton Thorne Biosciences, Beverly, MA, USA) ที่วางอยู่บน stage ของเครื่อง IVOS จากนั้นเลื่อน stage เข้าไปในเครื่อง IVOS และทำการวิเคราะห์ โดยมีการกำหนดค่า Analysis setup ดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 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 Frequency	60
Bright Field	No
Chamber depth (μm)	20
Field Selection Mode	Auto

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4) ศึกษาอัตราการมีชีวิต

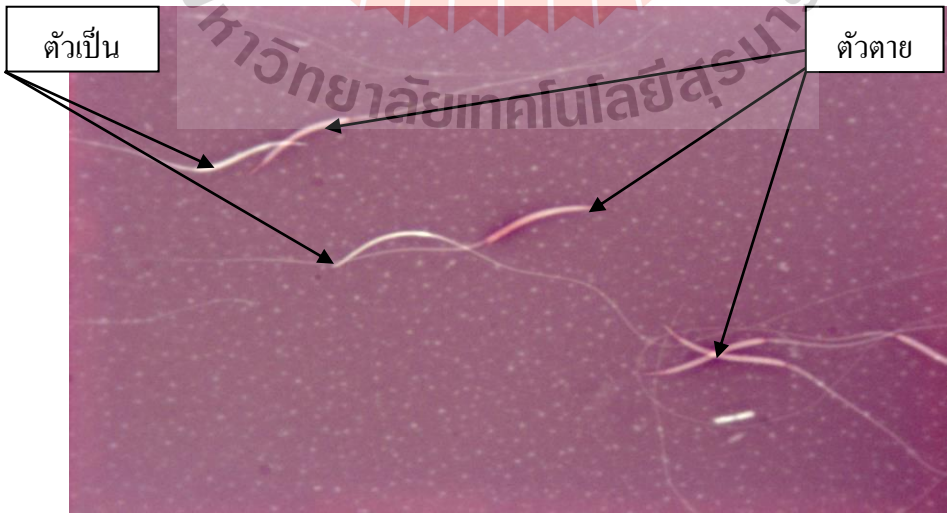
การศึกษาอัตราการมีชีวิตใช้เทคนิคการย้อมสีด้วย Eosin และ Nigrosin โดยมีวิธีการเตรียมสีย้อมและขั้นตอนการศึกษาดังนี้

วิธีการเตรียมสีย้อม

ชั่ง Eosin B 1 กรัม, Nigrosin 5 กรัม และ Sodium citrate dehydrate 1.5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ และเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร โดยให้ความร้อนขณะเตรียมสาร เพราะสารจะไม่ละลาย เมื่อสารละลายเข้ากันดีแล้วนำไปกรอง จนไม่มีตะกอนเหลืออยู่ แล้วนำสีย้อมที่ได้เก็บไว้ในขวดสีชาโดยเก็บที่อุณหภูมิห้อง

วิธีการศึกษาอัตราการมีชีวิตมีขั้นตอนดังนี้

- หยดสี Eosin-Nigrosin 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 3.3



ภาพที่ 3.3 อสุจิมีชีวิตมีลักษณะสีขาว และอสุจิตายจะติดสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้ม เมื่อย้อมด้วยสี Eosin - Nigrosin (ภายใต้กล้อง compound microscope กำลังขยาย 100 เท่า)

5) การประเมินความสมบูรณ์ของอะโครโซม และการทำงานของไมโตคอนเดรีย

- การประเมินความสมบูรณ์ของอะโครโซมโดยสี fluorescein isothiocyanate conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) ร่วมกับ propidium iodide (PI) โดยทำการละลายน้ำเชื้อในน้ำเย็นอุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดูดตัวอย่างน้ำเชื้อปริมาตร 250 ไมโครลิตร เติมสี FITC-PNA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที หลังบ่มเติม propidium iodide (PI) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร จากนั้นทำการประเมินความสมบูรณ์ของอะโครโซม โดยใช้ Flow cytometer (FACSC alibur; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) (ดัดแปลงจาก Partyka et al., 2010)

- การประเมินการทำงานของไมโตคอนเดรียโดยการย้อมสี Rhodamine 123 ร่วมกับ propidium iodide (PI) โดยทำการละลายน้ำเชื้อในน้ำเย็นอุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ดูดตัวอย่างน้ำเชื้อปริมาตร 250 ไมโครลิตร เติมสี Rhodamine 123 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที หลังบ่ม เติม PI ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จากนั้นทำการประเมินการทำงานของไมโตคอนเดรีย โดยใช้ Flow cytometer (FACSCalibur; Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) (ดัดแปลงจาก Partyka et al., 2010)

6) การประเมินระดับการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่น โดยประเมินจากปริมาณ maloaldehyde (MDA) ที่เกิดขึ้น ด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substant (TBARS)

นำน้ำเชื้อแช่แข็งแต่ละทรีตเมนต์มาทำการละลาย (thawed) ในน้ำ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการตัดปลายหลอดแช่แข็ง แล้วเทน้ำเชื้อลงในหลอด Eppendorf เตรียมอสุจิให้ได้ความเข้มข้น 250 ล้านตัว หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 1,800g จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที เพื่อทำการดูดเฉพาะอสุจิที่ตกตะกอน จากนั้นทำการเติม ferrous sulfate ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และ sodium ascrobate ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และนำตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการเติม 15% Trichloroacetic acid ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร และ 0.375% Thiobarbituric acid ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำทุกหลอดมาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge เพื่อนำตะกอนออก ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 5,000g เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm ตามวิธีของ Partyka et al. (2007)

7) การศึกษาอัตราการผสมติด

การศึกษาอัตราการผสมติดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็งเป็นการศึกษาในภาคสนามมีวิธีการศึกษาดังนี้

ใช้แม่ไก่สายพันธุ์ Isa Brown จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อายุระหว่าง 7 เดือน ถึง 1 ปี จำนวน 170 ตัว ซึ่งจะทำการผสมเทียม 2 ครั้ง (2 วัน/ครั้ง) นาน 1 สัปดาห์ โดยทำการละลายน้ำเชื้อ (thawed) ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ซับหลอดให้แห้งแล้วตัดปลายเพื่อถ่ายน้ำเชื้อลงในหลอดรับน้ำเชื้อที่สะอาดและแช่อยู่ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส จากนั้นใช้ไซริ้งค์บรรจุน้ำเชื้อปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร สอดเข้าช่องคลอดลึกประมาณ 4 เซนติเมตร และจะเริ่มทำการเก็บไข่ภายหลังจากการผสมเทียม 1 วันต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ โดยจะทำการเก็บไข่ทุกวันในช่วงบ่ายและนำไข่เข้าฟักทุก ๆ 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ซึ่งถาดไข่จะวางเอียงทำมุม 45 องศา และมีการกลับไข่ทุก ๆ 1 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบการผสมติดโดยการส่องไข่ที่อายุฟัก 10 วัน แล้วนำจำนวนไข่ที่ผสมติดมาคำนวณหาอัตราการผสมติดจากสูตร ดังนี้

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

3.2 การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของสาร extender และสาร cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง

มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1. ทำการเตรียมสาร extender 8 สูตร ได้แก่ modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300, 350 และ 400 mOsm kg^{-1}), Lake's diluent, BPSE, IGGKP, EK และ Scharmm ตามส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 3.3 ทำการวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter และวัดค่าออสโมลาลิตี้ด้วยเครื่อง osmometer ของสาร extender นำสาร extender ที่เตรียมไว้ใส่ขวดแก้วปิดฝาให้สนิทเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส

2. เตรียมสาร cryoprotectant 3 ชนิด ได้แก่ DMF, DMA และ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 6% โดยใช้สาร extender ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 เป็นตัวทำละลาย และนำสาร cryoprotectant ที่เตรียมไว้ใส่ขวดแก้วปิดฝาให้สนิทเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส

3. นำน้ำเชื้อสดที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 75% ขึ้นไปมาเจือจางด้วยสาร extender ที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อสาร extender เท่ากับ 1: 2 (diluted milt) ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมาอย่างเบา ๆ จากนั้นทำการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อจาก 25 องศาเซลเซียส ไปที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง

4. หลังจากนั้นเติมสาร cryoprotectant แต่ละชนิด (DMF, DMA และ DMSO) ที่ระดับความเข้มข้น 6% โดยใช้สัดส่วน 1: 3 (cryodiluent: diluted milt) ดังแผนการทดลองแสดงในตารางที่ 3.4-3.6

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบทางเคมี (g/50 ml) ของสาร extender ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว

Composition	Dilutent (g/50 ml)							
	MOE 300	MOE 350	MOE 400	Lake's diluent	BPSE	IGGKP	EK	Schramm
Magnesium acetate	0.0400	0.0400	0.0400	0.0584	0.0170	-	-	0.0350
Sodium acetate	-	-	-	-	0.2150	-	-	-
Potassium citrate	0.2000	0.2000	0.2000	-	0.0340	0.0700	0.0741	-
Sodium glutamate	1.0000	1.0000	1.0000	1.0622	0.4884	0.7000	0.7000	1.4250
Dipotassium hydrogen phosphate	-	-	-	-	0.8320	0.4900	-	-
Potassium dihydrogen phosphate	-	-	-	-	0.0326	-	-	
Fructose	0.0988	0.5324	1.0784	0.4000	-	-	0.1000	-
TES (N-Tris (hydroxy methyl) methyl-2-aminoethanesulfonic acid	1.0000	1.0000	1.0000	-	0.0976	-	-	-

หมายเหตุ: Modified extender (MOE) หน่วย mOsm kg^{-1}

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบทางเคมี (g/50 ml) ของสาร extender ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว (ต่อ)

Composition	Dilutent (g/50 ml)							
	MOE 300	MOE 350	MOE 400	Lake's diluent	BPSE	IGGKP	EK	Schramm
Potassium acetate	-	-	-	0.2960	-	-	-	0.2500
Polyvinylpyroridone (PVP)	-	-	-	0.1500	-	-	0.0500	-
Glucose	-	-	-	-	0.2500	0.4500	0.3500	0.2500
Sodium dihydrogen phosphate	-	-	-	-	-	0.1050	0.1050	-
Inositol	-	-	-	-	-	0.4500	0.3500	0.1250
Protamine sulfate	-	-	-	-	-	-	0.0100	-
Anhydrous sodium hydrogen phosphate	-	-	-	-	-	-	0.4900	-
Osmolarity (mOsmol/kg)	303±1.73	353±2.00	404±1.73	370±0.67	394±0.67	369±0.33	414±0.67	415±0.33
pH	7.44±0.02	7.45±0.01	7.42±0.03	7.04±0.01	7.65±0.03	7.25±0.01	7.26±0.02	6.96±0.01

หมายเหตุ: Modified extender (MOE) หน่วย mOsm kg^{-1}

ตารางที่ 3.4 แผนการทดลองการศึกษาสาร extender 8 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300, 350 และ 400 mOsm kg^{-1}), Lake's diluent, BPSE, IGGKP, EK และ Schramm) ร่วมกับการใช้ DMF ที่ระดับความเข้มข้น 6% เป็นสาร cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD

กลุ่มการทดลอง	สาร extender	อัตราการเคลื่อนที่รวม (%)	อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	อัตราการมีชีวิต (%)	ความสมบูรณ์ของอะโครโซม (%)	การทำงานของไมโตคอนเดรีย (%)	อัตราการผสมติด (%)
1	modified extender 300 mOsm kg^{-1}						
2	modified extender 350 mOsm kg^{-1}						
3	modified extender 400 mOsm kg^{-1}						
4	Lake' diluent						
5	BPSE						
6	IGGKP						
7	EK						
8	Scharmm						
9	น้ำเชื้อสด (กลุ่มควบคุม)						

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.5 แผนการทดลองการศึกษาสาร extender 8 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300, 350 และ 400 mOsm kg^{-1}), Lake's diluent, BPSE, IGGKP, EK และ Schramm) ร่วมกับการใช้ DMA ที่ระดับความเข้มข้น 6% เป็นสาร cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD

กลุ่มการทดลอง	สาร extender	อัตราการเคลื่อนที่รวม (%)	อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	อัตราการมีชีวิต (%)	ความสมบูรณ์ของอะโครโซม (%)	การทำงานของไมโตคอนเดรีย (%)	อัตราการผสมติด (%)
1	modified extender 300 mOsm kg^{-1}						
2	modified extender 350 mOsm kg^{-1}						
3	modified extender 400 mOsm kg^{-1}						
4	Lake' diluent						
5	BPSE						
6	IGGKP						
7	EK						
8	Scharmm						
9	น้ำเชื้อสด (กลุ่มควบคุม)						

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.6 แผนการทดลองการศึกษาสาร extender 8 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300, 350 และ 400 mOsm kg^{-1}), Lake's diluent, BPSE, IGGKP, EK และ Schramm) ร่วมกับการใช้ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 6% เป็นสาร cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD

กลุ่มการทดลอง	สาร extender	อัตราการเคลื่อนที่รวม (%)	อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	อัตราการมีชีวิต (%)	ความสมบูรณ์ของอะโครโซม (%)	การทำงานของไมโตคอนเดรีย (%)	อัตราการผสมติด (%)
1	modified extender 300 mOsm kg^{-1}						
2	modified extender 350 mOsm kg^{-1}						
3	modified extender 400 mOsm kg^{-1}						
4	Lake' diluent						
5	BPSE						
6	IGGKP						
7	EK						
8	Scharmm						
9	น้ำเชื้อสด (กลุ่มควบคุม)						

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ขั้นตอนและกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็งด้วยวิธีอังไอไนโตรเจนเหลว มีดังนี้

1. ใช้ micropipette ดูดน้ำเชื้อปริมาตร 490 ไมโครลิตร ใส่หลอดแช่แข็ง (French straw ขนาด 500 ไมโครลิตร) แล้วปิดหลอดแช่แข็งโดยใช้ผงอุด polyvinyl alcohol (PVA) ซึ่งหลังจากการเติมสาร cryoprotectant จะเริ่มจับเวลาจนถึงการนำหลอดน้ำเชื้อวางลงในตระแกรงที่วางอยู่เหนือไนโตรเจนเหลว โดยใช้เวลาประมาณ 15 นาที

2. การเตรียมอุปกรณ์อังไอไนโตรเจนเหลว ทำได้โดยการบรรจุไนโตรเจนเหลวสูง 8 เซนติเมตร ลงในกล่องโฟมขนาด 28 × 38 × 29 เซนติเมตร จากนั้นนำตะแกรงวางเหนือไนโตรเจนเหลวที่ระดับ 11 เซนติเมตร นำ straws วางลงบนตะแกรงและจับเวลา โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับเหนือไอไนโตรเจนเหลว 11 เซนติเมตร (12 นาที) และที่ระดับเหนือไอไนโตรเจนเหลว 3 เซนติเมตร (5 นาที) จากนั้นจุ่มตระแกรงที่มีตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งลงในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) และเก็บตัวอย่างลงในถังเก็บน้ำเชื้อ (-196 องศาเซลเซียส) (เทวินทร์ และยุพิน, 2550) เพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อ และรอการทดสอบหาอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความสมบูรณ์ของอะโครโซม การทำงานของไมโตคอนเดรีย และอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแช่แข็งต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ก่อนการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิตินำข้อมูลอัตราการเคลื่อนที่รวม, อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า, อัตราการมีชีวิต, ความสมบูรณ์ของอะโครโซม, การทำงานของไมโตคอนเดรีย และอัตราการผสมติดไป Transformed โดยใช้วิธี Arcsine Transformation จากนั้นวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ CRD และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ด้วยวิธี Duncan's new multiple rang test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 10

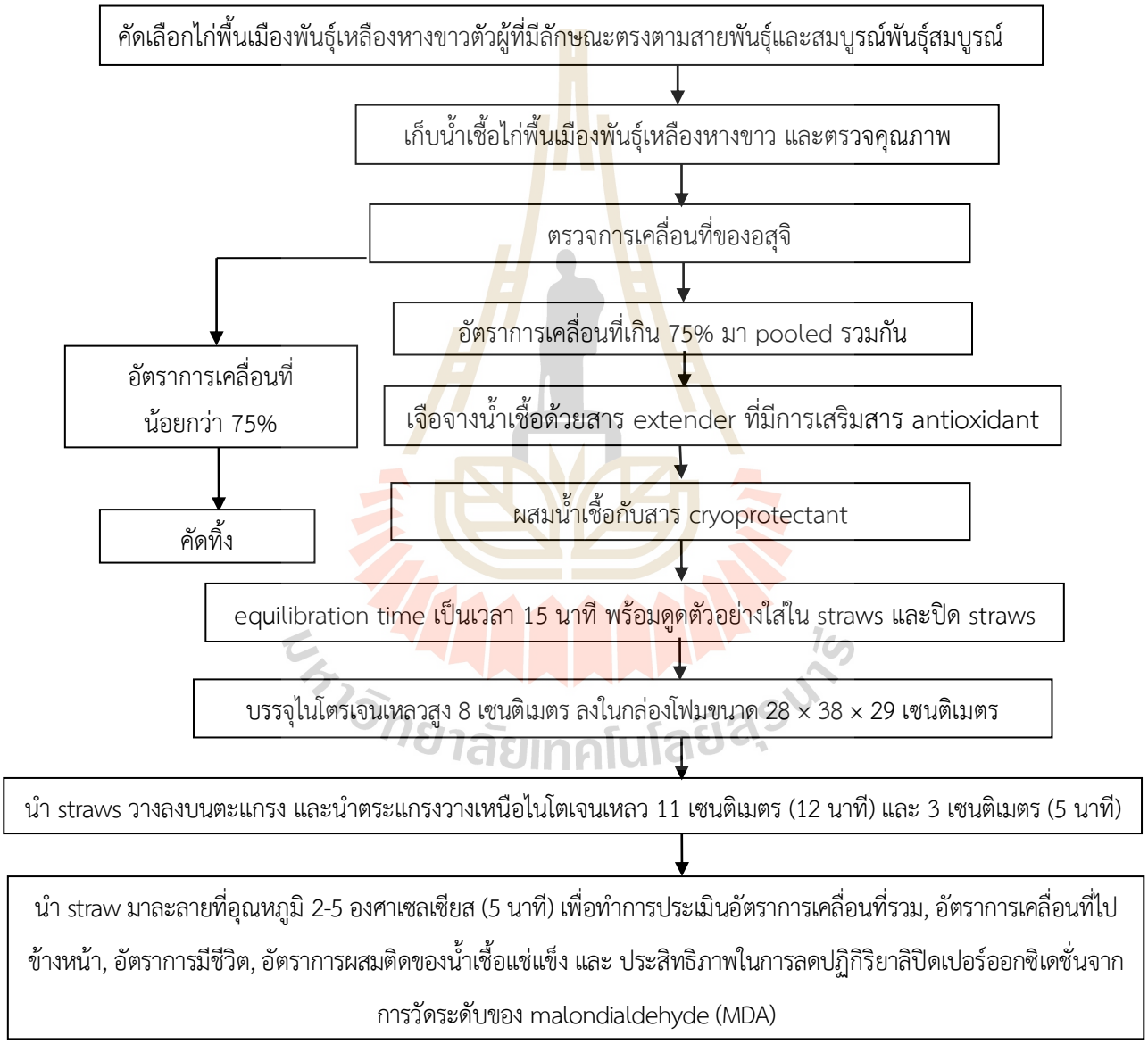
3.3 การทดลองที่ 2 ศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant ที่เหมาะสมต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่ผ่านการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง

1. การเตรียมสาร extender และสาร cryoprotectant ที่ให้ผลอัตราการผสมติดสูงที่สุดจากการทดลองที่ 1 ได้แก่ EK และ 6%DMF และทำการเสริมชนิดของสาร antioxidant ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

- วิตามินอี ที่ระดับความเข้มข้น 1.16, 2.32 และ 3.48 mM (ในรูป water soluble)
- Cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 5.0 mM
- Glutathione ที่ระดับความเข้มข้น 0.025, 0.05 และ 0.1 mM

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

โดยการนำสาร antioxidant แต่ละชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ผสมลงในสาร extender (EK) จากนั้นใส่ขวดแก้วปิดฝาให้สนิทเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส โดยการทดลองนี้จะมีกลุ่มควบคุม คือ extender ที่ไม่มีการเสริม antioxidant และน้ำเชื้อสด ดังแผนการทดลองแสดงในตารางที่ 3.7 ขั้นตอนการทดลองดังแสดงในแผนภาพ 3.4 นำ straw มาละลายที่อุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส (5 นาที) เพื่อทำการประเมินอัตราการเคลื่อนที่รวม อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิต อัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแช่แข็ง และ ประสิทธิภาพในการลดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นจากการวัดระดับของ malondialdehyde (MDA)



ภาพที่ 3.4 กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์สายเหลืองหางขาวที่มีการเสริมสาร antioxidant ลงในสาร extender ก่อนเข้าสู่กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง

ตารางที่ 3.7 แผนการทดลองการศึกษาผลของสาร antioxidant 3 ชนิด 3 ระดับความเข้มข้น วิตามินอี (1.16, 2.32 และ 3.48 mM) Cysteine (0.5, 1.0 และ 5.0 mM) และ Glutathione (0.025, 0.05 และ 0.1 mM) ต่อคุณภาพของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งในไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวโดยวางแผนการทดลองแบบ CRD

กลุ่มการทดลอง	antioxidant	ระดับความเข้มข้น (mM)	อัตราการเคลื่อนที่รวม (%)	อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	อัตราการมีชีวิต (%)	อัตราการผสมติด (%)	ปริมาณ MDA (nmol/ml)
1	วิตามินอี	1.16					
2		2.32					
3		3.48					
4	Cysteine	0.5					
5		1.0					
6		5.0					
7	Glutathione	0.025					
8		0.05					
9		0.1					
10	น้ำเชื้อแช่แข็งไม่เติม antioxidant (กลุ่มควบคุม)						
11	น้ำเชื้อสด (กลุ่มควบคุม)						

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ก่อนการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิตินำข้อมูลอัตราการเคลื่อนที่รวม, อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า, อัตราการมีชีวิต, อัตราการผสมติด และประสิทธิภาพในการลดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นจากการวัดระดับของ malondialdehyde (MDA) ไป Transformed โดยใช้วิธี Arcsine Transformation จากนั้นวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ CRD และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ด้วยวิธี Duncan's new multiple rang test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 10

บทที่ 4
ผลการศึกษา

4.1 ผลของสาร extender และสาร cryoprotectant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่ผ่านการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง

จากการศึกษาผลของสาร extender และสาร cryoprotectant ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่แข็ง โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มการทดลองย่อยตามชนิดของสาร cryoprotectant (DMF, DMA และ DMSO) ที่ระดับความเข้มข้น 6% ร่วมกับสาร extender 8 ชนิด (สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ 300, 350, 400 mOsm kg^{-1}, Lake's diluent, BPSE, IGGKP, EK และ Schramm) โดยใช้วิธีการลดอุณหภูมิแบบอังไอไนโตรเจนเหลว และประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งจากอัตราการเคลื่อนที่, อัตราการมีชีวิต, อัตราการผสมติด, ความสมบูรณ์ของอะโครโซมด้วยสี fluorescein isothiocyanate conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) ร่วมกับ propidium iodide (PI) และการทำงานของไมโตคอนเดรีย ด้วยสี Rhodamine 123 ร่วมกับ propidium iodide (PI)

การใช้ DMF เป็นสาร cryoprotectant พบว่า เมื่อใช้ 6% DMF ร่วมกับ EK ให้อัตราการผสมติดสูงสุด เท่ากับ 42.37±1.45% (46% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งสอดคล้องกับผลการประเมินความสมบูรณ์ของอะโครโซมพบอสุจิมีชีวิตและอะโครโซมสมบูรณ์ (PI-PNA-) (51.00±3.21%) และการทำงานของไมโตรคอนเดรียสมบูรณ์ (PI-R123+) (52.00±3.79%) สูงที่สุดเมื่อเทียบกับทรีทเมนต์อื่น ๆ ($P<0.01$) และเมื่อใช้ EK modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 และ 400 mOsm kg^{-1}, BPSE, IGGKP และ Schramm ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่รวม และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) เมื่อใช้ modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm kg^{-1}, EK และ Schramm พบว่า ให้ผลอัตราการมีชีวิตสูงกว่าทรีทเมนต์อื่น ๆ ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.1 และ 4.2

การใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant พบว่า เมื่อใช้ 6% DMA ร่วมกับ Lake's diluent ให้ผลอัตราการผสมติดเท่ากับ 11.76±5.88% (10% ของน้ำเชื้อสด) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่เมื่อใช้ modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm kg^{-1} พบอัตราการเคลื่อนที่รวม (40.33±2.33%), อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (21.33±1.76%) และอัตราการมีชีวิต (42.00±2.31%) สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับทรีทเมนต์อื่น ๆ แต่พบอสุจิมีชีวิตและอะโครโซมสมบูรณ์ (PI-PNA-) เพียง 3% และพบอสุจิมีชีวิตแต่อะโครโซมถูกทำลาย (PI-PNA+) มากถึง 52% ยังพบความสมบูรณ์ของการทำงานไมโตรคอนเดรีย (PI-R123+) เพียง 8% ดังแสดงในตารางที่ 4.3 และ 4.4

การใช้ DMSO เป็นสาร cryoprotectant พบว่า เมื่อใช้ 6% DMSO ร่วมกับ BPSE พบผลอัตราการผสมติดเท่ากับ 2.08±2.08% (1% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งให้อัตราการผสมติดไม่แตกต่างจากทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษา ($P>0.05$) แต่เมื่อใช้ modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 350 mOsm kg^{-}

[1] มีอัตราการเคลื่อนที่รวม (53.33±4.33%), อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (17.00±1.73%) และอัตราการมีชีวิต (52.00±1.73%) สูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับทรีทเมนต์อื่น ๆ (P<0.05) แต่พบมีอสุจิที่มีชีวิตและมีอะโครโซมสมบูรณ์ (PI-PNA-) เพียง 3% และมีอสุจิมีชีวิตแต่อะโครโซมถูกทำลาย (PI-PNA+) มากถึง 46% และพบความสมบูรณ์ของทำงานไมโตรคอนเดรีย (PI-R123+) เพียง 10% ดังแสดงในตารางที่ 4.5 และ 4.6

ตารางที่ 4.1 ผลของสาร Extender 8 ชนิด ร่วมกับ 6% DMF ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง (Mean±SE)

สาร extender	อัตราการเคลื่อนที่รวม (%)	อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	อัตราการมีชีวิตรอด (%)	อัตราการผสมติด (%)
MOE 300	29.67±1.86^{cd}	12.67±1.45^{c}	26.00±2.08^{d}	1.75±1.75^{d} (0.64)
MOE 350	46.67±2.85^{b}	22.33±2.40^{b}	50.00±1.73^{b}	2.38±2.38^{d} (0.88)
MOE 400	37.00±2.65^{bc}	22.67±0.88^{b}	37.67±1.45^{c}	5.38±0.26^{cd} (5.81)
Lake's diluent	26.00±2.89^{d}	12.00±1.15^{c}	24.00±1.53^{d}	8.77±4.64^{cd} (6.42)
BPSE	36.33±2.60^{bc}	22.33±1.86^{b}	38.00±2.08^{c}	18.29±2.11^{c} (19.65)
IGGKP	44.67±5.49^{b}	16.33±3.18^{bc}	36.00±2.65^{c}	14.52±1.73^{c} (15.58)
EK	43.67±2.33^{b}	21.67±0.67^{b}	51.00±0.58^{b}	42.37±1.45^{b} (45.75)
Schramm	46.00±3.06^{b}	22.00±3.06^{b}	46.67±2.40^{b}	20.26±2.66^{c} (21.74)
Control (น้ำเชื้อสด)	93.33±2.03^{a}	38.33±2.85^{a}	92.33±1.45^{a}	89.03±4.44^{a} (100.00)

หมายเหตุ: Modified extender (MOE) หน่วย mOsm kg^{-1}

ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่คอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตัวเลขในวงเล็บ คือ เปอร์เซ็นต์ของน้ำเชื้อสด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.2 ผลของสาร extender 8 ชนิด ร่วมกับ 6% DMF ต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซมและการทำงานของไมโตคอนเดรียของน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง (Mean±SE)

extender	Acrosome integrity(%)				Mitochondrial activity (%)	
	LIA (PI-PNA-)	LRA (PI-PNA+)	DIA (PI+PNA-)	DRA (PI+PNA+)	Mitochondria functional (PI-R123+)	Dead Sperm (PI+R123+)
MOE 300	1.33±0.88^{e}	24.67±0.88^{cd}	20.00±0.58^{bc}	54.00±1.00^{a}	12.67±1.20^{ef}	37.33±1.20^{ab}
MOE 350	5.67±1.76d^{e}	43.33±3.53^{a}	15.00±1.73^{bc}	36.00±3.61^{c}	13.00±2.00^{ef}	37.00±2.00^{ab}
MOE 400	6.67±2.73^{d}	42.33±0.33^{a}	13.67±2.19^{c}	37.33±1.86^{bc}	7.67±1.45^{f}	42.33±1.45^{a}
Lake's diluent	13.33±2.33^{de}	31.00±2.08^{bc}	19.00±1.73^{bc}	40.00±0.57^{bc}	15.33±1.86^{ef}	34.67±1.86^{b}
BPSE	6.00±2.08^{de}	26.00±3.06^{cd}	29.00±0.58^{a}	39.00±1.52^{bc}	18.67±1.20^{e}	31.33±1.20^{b}
IGGKP	14.00±2.08^{d}	40.33±3.38^{ab}	23.00±3.00^{ab}	22.67±3.84^{d}	31.33±1.20^{d}	18.67±1.20^{c}
EK	51.00±3.21^{b}	15.33±2.33^{d}	20.67±1.20^{abc}	3.00±0.58^{e}	52.00±3.79^{b}	5.33±1.45^{de}
Schramm	23.67±1.86^{c}	17.33±3.38^{d}	12.67±3.48^{cd}	46.33±3.52^{ab}	40.33±0.88^{c}	9.67±0.88^{d}
Control (น้ำเชื้อสด)	91.33±0.88^{a}	3.00±1.53^{e}	4.67±1.45^{d}	1.67±0.33^{e}	90.33±1.45^{a}	3.67±0.67^{e}

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.01)

LIA; Live with intact acrosome LRA; Live with ruptured acrosome, DIA; Dead with intact acrosome DRA; Dead with ruptured acrosome FITC-PNA; fluorescein isothiocyanate conjugated peanut agglutinin R123; Rhodamine 123 PI; propidium iodide ; Modified extender (MOE) หน่วย mOsm kg^{-1}

ตารางที่ 4.3 ผลของสาร Extender 8 ชนิด ร่วมกับ 6% DMA ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง (Mean±SE)

สาร extender	อัตราการเคลื่อนที่รวม (%)	อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	อัตราการมีชีวิตรอด (%)	อัตราการผสมติด (%)
MOE 300	25.33±3.28^{c}	12.00±2.08^{de}	24.00±2.31^{de}	5.83±3.63^{b} (4.44)
MOE 350	40.33±2.33^{b}	21.33±1.76^{b}	42.00±2.31^{b}	0.00±0.00^{b} (0.00)
MOE 400	31.00±1.00^{c}	17.33±1.20^{bc}	26.00±2.08^{d}	0.00±0.00^{b} (0.00)
Lake's diluent	31.33±2.73^{c}	14.33±1.33^{cd}	32.33±1.45^{c}	11.76±5.88^{b} (9.55)
BPSE	14.67±1.45^{d}	8.67±0.67^{e}	10.67±0.67^{f}	6.30±3.87^{b} (4.82)
IGGKP	3.67±1.45^{e}	0.00±0.00^{g}	8.33±0.88^{f}	5.26±5.26^{b} (2.17)
EK	14.67±2.03^{d}	4.33±0.33^{f}	19.00±2.00^{e}	6.67±4.41^{b} (5.00)
Schramm	31.67±0.67^{c}	8.67±1.45^{e}	29.67±1.45^{cd}	5.88±5.88^{b} (2.44)
Control (น้ำเชื้อสด)	93.33±2.03^{a}	38.33±2.85^{a}	92.33±1.45^{a}	82.22±4.41^{a} (100.00)

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขในวงเล็บ คือ เปอร์เซ็นต์ของน้ำเชื้อสด Modified extender (MOE) หน่วย mOsm kg^{-1}

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.4 ผลของสาร extender 8 ชนิด ร่วมกับ 6% DMA ต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซมและการทำงานของไมโตคอนเดรียของน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง (Mean±SE)

extender	Acrosome integrity (%)				Mitochondrial activity (%)	
	LIA (PI-PNA-)	LRA (PI-PNA+)	DIA (PI+PNA-)	DRA (PI+PNA+)	Mitochondria functional (PI-R123+)	Dead Sperm (PI+R123+)
MOE 300	4.00±1.15^{d}	32.67±2.91^{b}	15.67±2.60^{c}	55.67±2.33^{a}	11.33±0.88^{bcd}	38.67±0.88^{abcd}
MOE 350	2.67±0.88^{d}	51.67±2.03^{a}	19.67±0.88^{bc}	24.33±1.86^{c}	8.00±0.58^{cd}	42.00±0.58^{abc}
MOE 400	4.33±0.67^{d}	38.33±2.40^{b}	14.00±2.31^{c}	50.00±1.00^{ab}	5.33±0.33^{d}	44.67±0.33^{a}
Lake's diluent	11.33±0.88^{c}	34.00±1.53^{b}	25.67±2.33^{ab}	32.33±1.67^{c}	17.33±1.45^{b}	32.67±1.45^{d}
BPSE	5.33±1.45^{d}	34.00±2.52^{b}	30.67±0.88^{a}	30.00±1.73^{c}	11.67±1.86^{bcd}	38.33±1.86^{bcd}
IGGKP	12.00±1.15^{bc}	49.33±1.45^{a}	25.00±1.00^{ab}	13.67±1.76^{d}	7.00±1.53^{d}	43.00±1.53^{ab}
EK	5.33±1.45^{d}	14.33±0.88^{c}	22.00±1.73^{bc}	58.33±2.96^{a}	13.67±0.88^{bc}	36.33±0.88^{cd}
Schramm	17.00±2.00^{b}	22.67±2.40^{c}	16.33±2.73^{c}	44.00±3.21^{b}	15.33±2.73^{b}	34.67±2.73^{d}
Control (น้ำเชื้อสด)	91.33±0.88^{a}	3.00±1.53^{d}	4.67±1.45^{d}	1.67±0.33^{e}	90.33±1.45^{a}	3.67±0.67^{e}

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.01)

LIA; Live with intact acrosome LRA; Live with ruptured acrosome, DIA; Dead with intact acrosome DRA; Dead with ruptured acrosome FITC-PNA; fluorescein isothiocyanate conjugated peanut agglutinin R123; Rhodamine 123 PI; propidium iodide; Modified extender (MOE) หน่วย mOsm kg^{-1}

ตารางที่ 4.5 ผลของสาร Extender 8 ชนิด ร่วมกับ 6% DMSO ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง (Mean±SE)

สาร extender	อัตราการเคลื่อนที่รวม (%)	อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	อัตราการมีชีวิตรอด (%)	อัตราการผสมติด (%)
MOE 300	28.67±1.20^{d}	8.00±1.15^{c}	22.67±1.76^{d}	0.00±0.00^{b} (0.00)
MOE 350	53.33±4.33^{b}	17.00±1.73^{b}	52.00±1.73^{b}	0.00±0.00^{b} (0.00)
MOE 400	38.33±2.19^{c}	13.67±0.67^{b}	35.00±2.08^{c}	0.00±0.00^{b} (0.00)
Lake's diluent	11.67±0.33^{f}	4.00±0.58^{de}	12.00±1.15^{e}	0.00±0.00^{b} (0.00)
BPSE	18.00±1.00^{e}	7.33±2.03^{cd}	24.00±2.08^{d}	2.08±2.08^{b} (0.79)
IGGKP	6.33±1.67^{g}	0.33±0.33^{f}	10.00±1.73^{e}	0.00±0.00^{b} (0.00)
EK	18.67±1.76^{e}	5.00±1.00^{cd}	20.33±0.88^{d}	0.00±0.00^{b} (0.00)
Schramm	7.33±1.86^{fg}	1.67±0.33^{e}	13.67±2.33^{e}	0.00±0.00^{b} (0.00)
Control (น้ำเชื้อสด)	93.33±2.03^{a}	38.33±2.85^{a}	92.33±1.45^{a}	88.13±2.66^{a} (100.00)

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขในวงเล็บ คือ เปอร์เซ็นต์ของน้ำเชื้อสด; Modified extender (MOE) หน่วย mOsm kg^{-1}

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.6 ผลของสาร extender 8 ชนิด ร่วมกับ 6% DMSO ต่อความสมบูรณ์ของอะโครโซมและการทำงานของไมโตคอนเดรียของน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง (Mean±SE)

Extender	Acrosome integrity (%)				Mitochondrial activity (%)	
	LIA (PI-PNA-)	LRA (PI-PNA+)	DIA (PI+PNA-)	DRA (PI+PNA+)	Mitochondria function (PI-R123+)	Dead Sperm (PI+R123+)
MOE 300	2.33±0.33^{c}	27.33±3.53^{bc}	29.00±2.00^{a}	41.33±5.49^{c}	6.33±1.86^{cd}	43.67±1.86^{ab}
MOE 350	3.33±1.20^{c}	45.67±3.48^{a}	24.67±0.88^{ab}	26.33±3.76^{d}	9.67±0.67^{bcd}	40.33±0.67^{abc}
MOE 400	2.67±0.33^{c}	29.33±3.38^{b}	17.00±1.53^{c}	51.00±1.53^{c}	6.00±2.08^{cd}	44.00±2.08^{ab}
Lake's diluent	1.33±0.33^{c}	14.00±1.15^{de}	11.00±0.58^{d}	73.67±1.20^{b}	5.33±0.33^{cd}	44.67±0.33^{ab}
BPSE	13.00±1.15^{b}	22.00±1.73^{bcd}	22.00±2.00^{bc}	43.00±4.73^{c}	14.67±1.86^{b}	35.33±1.86^{c}
IGGKP	1.33±0.33^{c}	39.67±2.73^{a}	11.33±1.45^{d}	47.67±4.48^{c}	12.33±1.76^{bc}	37.67±1.76^{bc}
EK	0.33±0.33^{c}	17.33±0.88^{cde}	0.67±0.33^{e}	82.00±1.15^{ab}	5.33±2.73^{cd}	44.67±2.73^{ab}
Schramm	1.00±0.58^{c}	11.00±1.15^{ef}	0.33±0.33^{e}	87.67±0.33^{a}	3.33±1.76^{d}	46.67±1.76^{a}
Control (น้ำเชื้อสด)	91.33±0.88^{a}	3.00±1.53^{f}	4.67±1.45^{e}	1.67±0.33^{e}	90.33±1.45^{a}	3.67±0.67^{d}

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.01)

LIA; Live with intact acrosome LRA; Live with ruptured acrosome, DIA; Dead with intact acrosome DRA; Dead with ruptured acrosome FITC-PNA; fluorescein isothiocyanate conjugated peanut agglutinin R123; Rhodamine 123 PI; propidium iodide; Modified extender (MOE) หน่วย mOsm kg^{-1}

4.2 ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant ที่เหมาะสมต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่ผ่านการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง

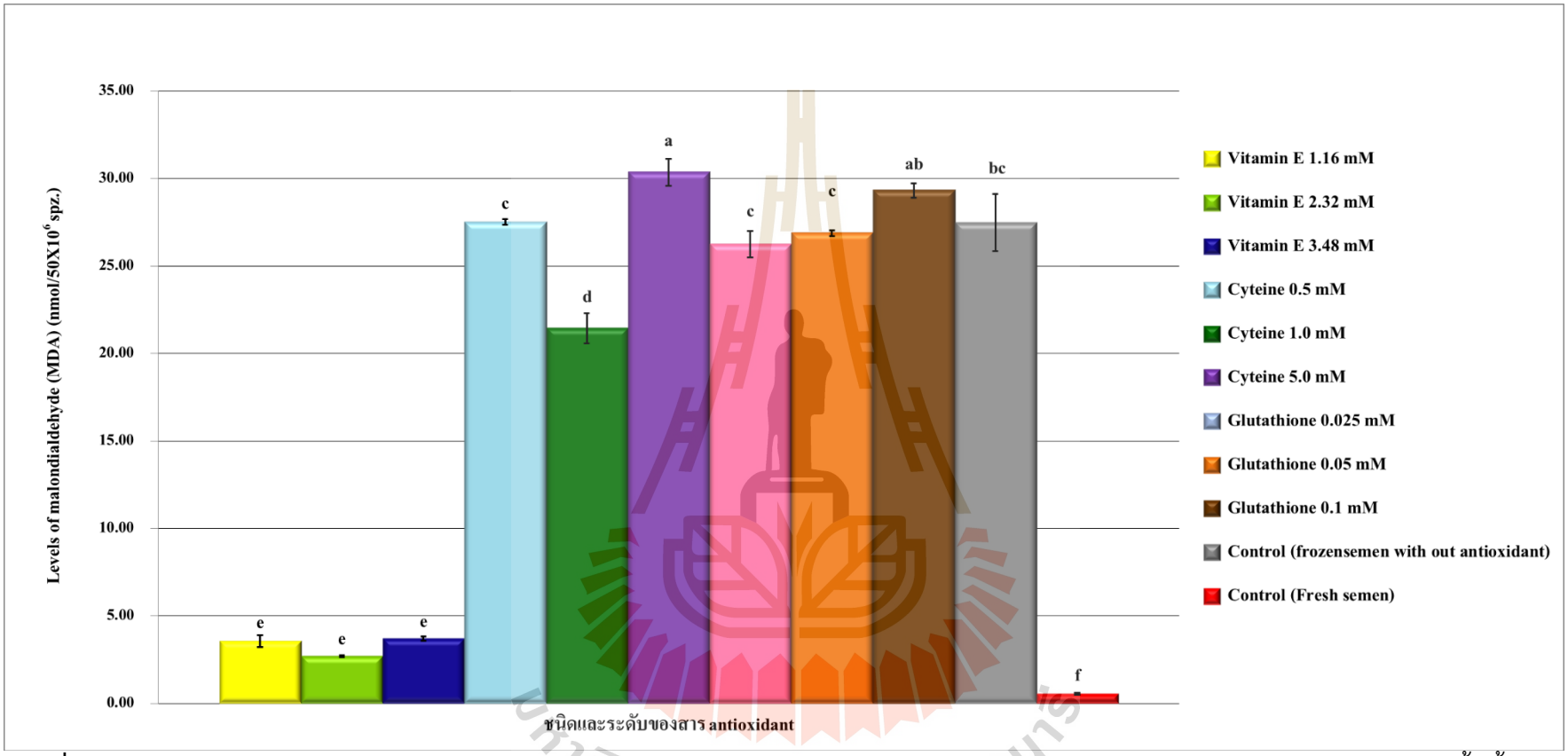
จากการศึกษาผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant ที่เหมาะสมต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่ผ่านการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง พบว่า การเสริมวิตามินอีทุกระดับความเข้มข้นให้ผลอัตราการผสมติดสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับทรีทเมนต์อื่น ๆ แต่ต่ำและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อสด ($P<0.05$) และให้ผลการเกิดปริมาณของ MDA ต่ำที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับทรีทเมนต์อื่น ๆ ($P<0.05$) ยกเว้นการเสริมวิตามินอีที่ระดับความเข้มข้น 2.32 mM ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่รวม, อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการมีชีวิตสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับทรีทเมนต์อื่น ๆ ($P<0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า การเสริม Cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 5.0 mM ให้อัตราการผสมติดต่ำที่สุดเพียง 38% ของน้ำเชื้อสด และให้ผลการเกิดปริมาณของ MDA สูงที่สุดเท่ากับ 30.35±0.75 nmol/50x10^6 spz. ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ทำการศึกษา ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และ ภาพที่ 4.1

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.7 ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant ร่วมกับการใช้ EK+ 6%DMF ต่อคุณภาพของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวที่มีการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง

สาร antioxidant	ระดับความเข้มข้น (ml)	อัตราการเคลื่อนที่รวม (%)	อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (%)	อัตราการมีชีวิตรอด (%)	อัตราการผสมติด (%)
Vitamin E	1.16	53.67±1.85^{c}	27.67±1.45^{c}	44.33±1.20^{def}	59.92±2.21^{b} (61.87)
	2.32	68.00±3.46^{b}	39.33±2.91^{b}	54.00±2.65^{b}	63.02±5.26^{b} (65.19)
	3.48	45.67±1.20^{def}	22.00±1.73^{efg}	41.67±1.45^{fg}	57.80±1.13^{b} (59.66)
Cysteine	0.5	49.67±3.48^{f}	26.00±0.33^{fg}	48.67±0.88^{cd}	42.34±2.66^{cd} (43.68)
	1.0	50.67±2.33^{cd}	25.00±1.00^{cde}	53.33±0.88^{bc}	52.53±3.91^{bc} (54.05)
	5.0	39.67±1.67^{cd}	18.67±0.67^{g}	43.33±1.76^{ef}	36.56±1.93^{d} (37.72)
Glutathione	0.025	48.67±2.40^{cde}	26.67±0.67^{cd}	48.67±0.88^{cd}	42.50±3.82^{cd} (43.82)
	0.05	41.00±1.53^{ef}	18.67±0.33^{g}	47.00±1.73^{de}	40.11±3.12^{cd} (41.36)
	0.1	43.33±2.85^{def}	18.33±1.67^{g}	38.00±1.15^{g}	39.58±2.08^{cd} (40.84)
Control (Frozen sperm without antioxidant)		44.33±0.67^{def}	22.67±1.33^{def}	47.67±1.20^{de}	45.35±0.80^{cd} (46.81)
Control (Fresh sperm)		91.33±0.33^{a}	44.33±1.45^{a}	94.67±0.88^{a}	95.40±2.31^{a} (100.00)

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขในวงเล็บ คือ เปอร์เซ็นต์ของน้ำเชื้อสด



ภาพที่ 4.1 ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant ร่วมกับการใช้ EK+6%DMF ต่อปริมาณการเกิด malondialdehyde (MDA) ในน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาวที่มีการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

บทที่ 5
วิจารณ์ สรุป และข้อเสนอแนะ

5.1 ผลของสาร extender และสาร cryoprotectant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่ผ่านการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง

จากการศึกษาชนิดของสาร extender ทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ สาร modified extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับต่าง ๆ (300, 350 และ 400 mOsm kg^{-1}), Lake's diluent, BPSE, IGGKP, EK และ Schramm ร่วมกับสาร cryoprotectant 3 ชนิด ได้แก่ DMF, DMA, DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 6% โดยใช้วิธีการลดอุณหภูมิแบบอังไอไนโตรเจนเหลว พบว่า เมื่อใช้ DMF เป็นสาร cryoprotectant ร่วมกับ EK ให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูงที่สุด (46%) ซึ่งสอดคล้องกับผลการประเมินความสมบูรณ์ของอะโครโซม การทำงานของไมโตรคอนเดรีย, อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต พบว่า 6% DMF ร่วมกับ EK ให้เปอร์เซ็นต์การประเมินดังกล่าวสูงที่สุด ซึ่งจากการรายงานของ Surai and Wishat (1996) ได้มีการรายงานถึงการศึกษาชนิดของสาร cryoprotectant และพบว่าโดยทั่วไปการใช้ DMF และ DMA ในการเป็นสาร cryoprotectant นั้นส่งผลดีต่อคุณภาพน้ำเชื้อสัตว์ปีกมากกว่าการใช้ DMSO ในการเป็นสาร cryoprotectant และทั้งนี้ยังมีปัจจัยมาจากค่าของแรงดันออสโมติกของสาร extender โดย EK extender มีค่าออสโมลาลิตี้ (414±0.67 mOsm kg^{-1}) สูงกว่าน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่ทำการศึกษา (340.00±0.58 mOsm kg^{-1}) ฉะนั้น EK extender จึงจัดว่ามีคุณสมบัติเป็น hypertonic solution (hyper-osmotic) และจากผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการรายงานของ Surai and Wishat (1996) ได้มีการรายงานว่า ส่วนประกอบของสาร extender ที่แตกต่างกันในแต่ละชนิดมีความสำคัญน้อยกว่าค่าแรงดันออสโมติกของสารละลาย โดยค่าแรงดันออสโมติกของสารละลายนั้นควรมีคุณสมบัติเป็น hypertonic solution (hyper-osmotic) และควรมีค่าความเป็น hyper-osmotic อยู่ในช่วงประมาณ 50-100 mOsm kg^{-1} เมื่อเปรียบเทียบกับค่าออสโมติกภายใน seminal plasma ของสัตว์ปีกแต่ละสายพันธุ์ และจากการรายงานของ Siudzinska and Lukaszewicz (2008) พบว่า สาร extender ที่มีคุณสมบัติเป็น hyper-osmotic เหมาะสมกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่สายพันธุ์ Green-Legged Partridge, สายพันธุ์ Black Minorca, สายพันธุ์ White Crested Black Polish และสายพันธุ์ Italian Partridge โดยจะส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของตัวอสุจิแบบคอโค้งงอต่ำกว่าสาร extender ที่มีคุณสมบัติเป็น isosmotic และ hypo-osmotic และ Giesen and Sexton (1983) ได้มีการเสนอแนะว่าการใช้สาร extender ที่มีคุณสมบัติเป็น hyper-osmotic นั้นสามารถเพิ่มอัตราการมีชีวิตของอสุจิไก่งวงได้ ซึ่งสอดคล้องกับ Lukaszewicz (2002) พบว่า extender สูตร EK ให้ผลดีต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อห่าน โดยค่าออสโมลาลิตี้ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์ปีกจะอยู่ในช่วงระหว่าง 250-460 mOsm kg^{-1} (Siudzinska and Lukaszewic, 2008) นอกจากนี้ส่วนประกอบของสาร extender สูตร EK มีส่วนประกอบของแหล่งน้ำตาลค่อนข้างสูงเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานให้แก่ตัวอสุจิ ซึ่งในส่วนประกอบจะมี

แหล่งของน้ำตาล ได้แก่ glucose, fructose และ inositol อีกทั้ง extender สูตร EK ยังมี PVP ในส่วนประกอบ ซึ่ง PVP มีคุณสมบัติเป็นสาร cryoprotectant ที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ จึงทำให้เซลล์อสุจิได้รับการปกป้องเมื่อเก็บรักษาในสภาพที่เย็น

ในขณะที่การใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant พบว่า เมื่อใช้ 6% DMA ร่วมกับ Lake's diluent ให้ผลอัตราการผสมติดเพียง 10% ของน้ำเชื้อสด ซึ่งต่ำกว่า DMF ร่วมกับ EK ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอิทธิพลร่วมของการทำงานของสาร extender สาร cryoprotectant และวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อ ซึ่งจากการรายงานของทิพย์สุดา (2556) พบอิทธิพลร่วมกันระหว่างชนิดของสาร extender กับชนิดของสาร cryoprotectant ซึ่งอิทธิพลเหล่านี้จะส่งผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการทำงานร่วมกันระหว่างสาร extender และสาร cryoprotectant ต่างชนิดกัน มีผลต่อการเพิ่มแรงดันออสโมติกที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงการใช้ DMA ประสบผลสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ด้วยวิธีการแช่แข็งแบบเม็ด โดยการศึกษาของ Tseluntin et al. (1999) พบว่า เมื่อใช้ DMA ที่ระดับความเข้มข้น 6% ร่วมกับ Lake's diluted ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่สายพันธุ์การค้า (type I 99) ด้วยวิธีแช่แข็งแบบเม็ด ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การผสมติดสูงที่สุดและไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P>0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chalah et al. (1999) พบว่า การใช้ 6% DMA ร่วมกับ Lake's diluents ด้วยวิธีแช่แข็งแบบเม็ด ส่งผลให้อัตราการผสมติดสูงขึ้นเช่นเดียวกัน

การใช้ DMSO เป็นสาร cryoprotectant พบว่า เมื่อใช้ 6% DMSO ร่วมกับ BPSE ให้อัตราการผสมติดสูงสุดเพียง 1% ของน้ำเชื้อสด ทั้งนี้เนื่องมาจาก DMSO อาจเป็นพิษต่อเซลล์อสุจิ ซึ่งสอดคล้องกับเทวินทร์ และคณะ (2547) พบว่า การใช้ ethylene glycol และ DMSO ระดับความเข้มข้น 2% มีผลเสียต่ออัตราการผสมติดของน้ำเชื้อภายหลังการผสมเทียม การใช้ DMSO โดยทั่วไปแล้วหากแช่แข็งน้ำเชื้อโดยเทคนิคของ Bletsville มักใช้ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 4-4.5% อย่างไรก็ตามในการแช่แข็งน้ำเชื้อเป็ด Han et al. (2005) พบว่า การใช้ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 10% ให้ผลดีต่อคุณภาพน้ำเชื้อ โดยความเข้มข้นของการใช้ DMSO นั้นอาจขึ้นกับวิธีการในการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่แตกต่างกันหรือความแตกต่างของชนิดพันธุ์ และสายพันธุ์ของสัตว์

5.2 ผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant ที่เหมาะสมต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่ผ่านการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง

จากการศึกษาการเสริมสาร antioxidant 3 ชนิด และ 3 ระดับความเข้มข้น ได้แก่ วิตามินอีที่ระดับความเข้มข้น 1.16, 2.32 และ 3.48 mM Cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ5.0 mM และ Glutathione ที่ระดับความเข้มข้น 0.025, 0.05 และ 0.1 mM ในการศึกษานี้ทำการเลือกสาร extender และสาร cryoprotectant (EK + 6% DMF) ที่ให้อัตราการผสมติดสูงที่สุดจากการทดลองที่ 1 มาทำการเสริมสาร antioxidant ดังกล่าว เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งให้มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยจาก

ผลการศึกษา พบว่าการเสริมวิตามินอีทั้ง 3 ระดับความเข้มข้น (1.16, 2.32 และ 3.48 mM) ให้อัตราการผสมติดสูงถึง 59 – 65% ของน้ำเชื้อสด และสามารถลดการปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นลงได้มากกว่าการเสริม Cysteine และ Glutathione ทั้งนี้เนื่องมาจากวิตามินอีเป็นวิตามินที่ละลายได้ดีในไขมัน และมีบทบาทสำคัญในการหยุดสายปฏิกิริยาการเกิดสารอนุมูลอิสระ (Chain-breaking antioxidant) จึงเกิดปฏิกิริยาและทำหน้าที่ได้ดีในบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของไก่จะประกอบด้วย กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (Polyunsaturated fatty acid) เป็นส่วนประกอบหลัก ซึ่งในไก่จะมี phospholipids ประกอบอยู่ในอสุจิมากถึง 66.4-70.7% ของไขมันทั้งหมด (Cerolini et al., 1997a; Kelso et al., 1997a; Surai et al., 2000a) การที่โครงสร้างของเซลล์อสุจิของไก่ ประกอบด้วย กรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาวเป็นจำนวนมากนี้จึงไวต่อการเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นทำให้เกิดความเสียหายต่อโครงสร้างเซลล์อสุจิได้สูง (Breque et al., 2003) ซึ่งเมื่อเซลล์อสุจิที่มีชีวิตถูกเก็บอยู่ในสภาวะที่ใช้ออกซิเจน เช่น ระหว่างการแช่เย็น, แช่แข็ง และละลายตัวอสุจิภายหลังการแช่แข็ง กระบวนการเหล่านี้ต้องการออกซิเจนเพื่อไปช่วยในกระบวนการสันดาป แต่อย่างไรก็ตามผลิตผลจากการสันดาปออกซิเจนที่มากเกินไป คือ Reactive Oxygen Species (ROS) จะเป็นสาเหตุทำให้โครงสร้างเซลล์อสุจิเกิดความเสียหายและตายได้ และในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อ พบว่าปริมาณ ROS เพิ่มขึ้น นั้นมีความเกี่ยวข้องทางสรีรวิทยาในการรักษาความสามารถในการปฏิสนธิ กระบวนการ capacitation และ acrosome reaction ของตัวอสุจิ โดย ROS ที่มากเกินไป จะทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่และการปฏิสนธินั้นลดน้อยลง (Baumber et al., 2000; Bucak et al., 2008) ซึ่งความเสียหายจากปฏิกิริยาเปอร์ออกซิเดชั่นที่เกิดขึ้น ส่งผลให้เกิดการสูญเสียการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์รวมถึงเกิดความเสียหายของ DNA ที่ส่วนหัวของอสุจิด้วย (Agarwal and Said, 2003) ภายใต้สภาวะปกติตัวอสุจิที่ DNA เกิดความเสียหายนั้นจะไม่สามารถเข้าสู่กระบวนการปฏิสนธิได้ ซึ่งวิตามินอีเองนั้นมีคุณสมบัติหลัก คือ สามารถที่จะละลายได้ดีในไขมันจึงมีประสิทธิภาพในการปกป้องเซลล์อสุจิได้มากกว่าสาร antioxidant ชนิดอื่น ๆ ที่ทำการศึกษาและด้วยกลไกในการหยุดสายปฏิกิริยาการเกิดสารอนุมูลอิสระของวิตามินอีจึงช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นของน้ำเชื้อไก่ได้จากกระบวนการใช้ออกซิเจนในระหว่างการทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Cerolini et al. (2000) พบว่า การเสริมวิตามินอีสามารถช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหมูที่อุณหภูมิ 19 องศาเซลเซียส และสอดคล้องกับการศึกษาของ Tabatabaei et al. (2011) พบว่า การเสริมวิตามินอีส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่, อัตราการมีชีวิตสูงขึ้น และส่งผลให้อสุจิมีลักษณะผิดปกติต่ำที่สุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเสริมวิตามินอีในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่เนื้อสายพันธุ์ Ross ($P<0.05$) และการศึกษาของ Asadpour et al. (2011) ได้ทำการศึกษาการเสริมวิตามินอีลงใน citrate-egg yolk extender (CEY) ต่อคุณภาพน้ำเชื้อโคแบบแช่แข็ง พบว่า การเสริมวิตามินอีที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mM สามารถช่วยเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของอสุจิสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม

ควบคุม (P<0.05) จากการศึกษาของ Andrabi et al. (2008) ได้ทำการศึกษาการเสริมวิตามินอีลงใน Tris-citric acid (TCA) ต่อคุณภาพน้ำเชื้อกระบือ พบว่า การเสริมวิตามินอีช่วยเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ และความสมบูรณ์ของ plasma membrane ของอสุจิสูงกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (P<0.05) และในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าการเสริม Cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 5.0 mM และ Glutathione ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mM ส่งผลเสียต่อคุณภาพน้ำเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับ Rivlin et al. (2004) รายงานว่า ระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant ที่เหมาะสม สามารถยับยั้งการเกิด ROS ในกระบวนการ capacitation และ acrosome reaction ของเซลล์อสุจิได้ดีกว่าการเสริมสาร antioxidant ที่ระดับความเข้มข้นสูงหรือต่ำเกิน ซึ่งระดับความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสมนี้จะส่งผลให้มีการผลิต ROS ในปริมาณที่สูงขึ้นและเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์อสุจิ แต่ทั้งนี้การเสริม Cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 1.0 mM ยังสามารถให้อัตราการผสมติดสูงกว่า 50% ของน้ำเชื้อสด เนื่องมาจาก Cysteine เป็นสารประเภทกรดอะมิโน อีกทั้งยังเป็นสารตั้งต้นในกระบวนการสร้าง Glutathione จึงช่วยรักษาระดับของ Glutathione ภายในเซลล์และช่วยปกป้องเซลล์จากความเสียหายภายใต้การเกิด oxidative stress (Meister and Anderson, 1983) โดย Cysteine จะทำหน้าที่เป็นตัวดักจับอนุมูลอิสระ (free radical scavengers) เพื่อกำจัด ROS ที่เกิดขึ้น ช่วยปกป้องความเสียหายในการทำงานของเซลล์อสุจิจากกระบวนการในการเก็บรักษาน้ำเชื้อทั้งแบบแช่เย็นและแช่แข็ง (Sagara et al., 1993; Mazor et al., 1996) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Funahashi and Sano (2005) ได้ทำการศึกษาการเสริม Gluthaione, Cysteine และ Hypotaurine ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อมีการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรเป็นเวลา 7 และ 14 วัน extender ที่เสริม Cysteine ส่งผลให้อัตราการมีชีวิตของอสุจิสูงสุดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (P<0.05) และพบว่าเมื่อทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรเป็นเวลา 14 วัน การเสริม Cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 2.5-5.0 mM ส่งผลให้ตัวอสุจิมีอัตราการมีชีวิตรอดสูงกว่าการเสริม Cysteine ในระดับอื่น ๆ นอกจากนี้ยังพบว่าการเสริม Cysteine ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุด 5.0 mM ให้อัตราการผสมติดต่ำที่สุดเท่ากับ 38% ของน้ำเชื้อสด และให้ผลการเกิดปริมาณของ MDA สูงที่สุด เท่ากับ 30.35±0.75 nmol/50x10^6 spermatozoa การศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานของ Uysal and Bucak (2007) ซึ่งศึกษาเปรียบเทียบการเสริม Cysteine ที่ระดับ 0, 5, 10 และ20 mM ในน้ำเชื้อแพะ พบว่า ในระดับ 10 mM ให้ผลดีที่สุดต่อน้ำเชื้อแพะแบบแช่แข็ง และการเสริมในปริมาณที่สูงเกินไปมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ และสอดคล้องกับ Kaeoket et al. (2008) ซึ่งรายงานว่า การเสริม Cysteine มีผลดีต่อน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในสุกร โดยระดับที่เหมาะสม คือ 5 และ 10 mM ส่วนการเสริมในระดับสูงเกินไปเกิดผลเสียเช่นกัน เช่นเดียวกับการศึกษาของ Carolina et al. (2011) ได้ทำการศึกษาระดับความเข้มข้นของการเสริม Cysteine ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกร โดยทำการเสริม Cysteine ลงใน BTS extender พบว่า หลังจากการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรเป็นเวลา 72 ชั่วโมง อัตราการมีชีวิตรอดของอสุจิต่ำกว่า 10% เมื่อทำการเสริม Cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 20 mM และ ในระดับความเข้มข้น 20 mM จะส่งผลให้ความสมบูรณ์ของ plasma membrane

นั้นมีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และสำหรับการเสริม Glutathione นั้นยังให้อัตราการผสมติดต่ำกว่า 50% ของน้ำเชื้อสด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการลดลงของระดับ Glutathione ภายในเซลล์อสุจิในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ซึ่งมีรายงาน พบว่าระดับ Glutathione มีปริมาณลดลงหลังจากผ่านกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในโค (Bilodeau et al., 2000) และหมู (Gadea et al., 2004) การลดลงของ Glutathione เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นได้เร็วขึ้น ซึ่งปฏิกิริยาของกระบวนการ ROS จะมีผลทำให้เกิดอันตรายต่อตัวอสุจิ เช่น ไมโตครอนเดรีย และในส่วนของสารพันธุกรรม (Genomic integrity) (Lamirande et al., 1997) นอกจากนี้ในระหว่างกระบวนการของการละลายน้ำเชื้อก็มีการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นเกิดขึ้น จึงทำให้การเสริม Glutathione ก่อนเข้าสู่กระบวนการแช่แข็งให้ผลไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเสริม Glutathione ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของเทวินทร์ และคณะ (2555) พบว่า การเสริม glutathione ที่ระดับ 0.1-1.0 mM มีผลเสียต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมือง โดยทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่และ ความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำลง อย่างไรก็ตามการเสริม Glutathione ในระดับที่สูงเกินไปเกิดผลเสียต่ออสุจิในทุกรายงาน

สรุป

1) จากการทดลองผลของสาร extender และสาร cryoprotectant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่ผ่านการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง พบว่า การใช้สาร extender สูตร EK ร่วมกับ 6% DMF สามารถให้อัตราการผสมติดสูงที่สุดเท่ากับ 42% (46% ของน้ำเชื้อสด)

2) การเสริมวิตามินอี สามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อไก่แบบแช่แข็งได้ดีกว่าการเสริมสาร antioxidant ชนิดอื่น ๆ (Cysteine และ Glutathione) อีกทั้งยังช่วยลดการเกิดปฏิกิริยาลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นได้ดีกว่าด้วย

ข้อเสนอแนะ

หากต้องการเสริม Glutathione เพื่อใช้เป็นสาร antioxidant นั้นควรจะต้องมีการวัดระดับของ Glutathione ของน้ำเชื้อไก่ก่อนทำการเสริม Glutathione เพื่อเป็นการรักษาระดับของ Glutathione ให้มีความเหมาะสม

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เอกสารอ้างอิง

ทิพย์สุดา บุญมาทัน. (2556). การเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็ง. **วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต.** มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

เทวินทร์ วงษ์พระลับ พรจิต สอนสีดา และบัญญัติ เหล่าไพบูรณ์. (2555). ผลของ cysteine และ glutathione ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่พื้นเมืองไทย. **แก่นเกษตร 40 ฉบับพิเศษ** 2: 339-342.

เทวินทร์ วงษ์พระลับ วิทยา ฉินธิยานนท์ สนั่น เหลียงไพบูลย์ อารียา ทองประยูร ทองใบ ยะวงษา พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา มนต์ชัย ดวงจินดา และบัญญัติ เหล่าไพบูลย์ (2547). การผสมเทียมในกวางป่า.การประชุมสัมมนาวิชาการเกษตรแห่งชาติ สาขาสัตวศาสตร์/สัตวบาล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เทวินทร์ วงษ์พระลับ และยุพิน ผาสุก. (2550). ความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อแช่แข็งในไก่พื้นเมือง. **การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 3** ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

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

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. (2557). การเฝ้าระวังเชื้อไข้หวัดนกชนิดรุนแรงสายพันธุ์ H5N2 และ H5N8. **ฝ่ายไวรัสระบบทางเดินหายใจ กลุ่มไวรัสวิทยาทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข**.

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

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

Agarwal, A. and Said, T. M. (2003). Role of sperm chromatin abnormalities and DNA damage in male infertility. **Human reproduction update.** 9: 331-345.

Andrabi, S. M. H., Ansari, M. S., Ullah, N. and Afzal, M. (2008). Effect of non-enzymatic antioxidants in extender on post-thaw quality of buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. **Pakistan veterinary journal.** 28: 24-29.

Andreea, A. and Stela, Z. (2010). Role of antioxidant additives in the protection of the cryopreserved semen against free radicals. **Roman Biotechnol. Lett**. 15: 3-8.

Ansari, M. S., Rakha, B. A., Ullah, N., Andrabi, S. M. H. and Akhter, B. A. (2011). Glutathioneaddition in tris-critric egg yolk extender improves the quality of cooled buffalo (*Bubalas bubalis*) bull semen. **Pakistan Journal zoology**. 1: 49-55.

Asadpour, S. H., Hamedi, H. R., Eslami-Majd, A. and Sahrai, M. (2011). Enhanced Kerr nonlinearity in a tunnel-coupled double quantum wells. **Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures.** 44: 464-469.

Baumber, J., Ball, B. A., Gravance, C. G., Medina, V. and Davies-Morel, M. C. (2000). The effect of reactive oxygen species on equine sperm motility, viability, acrosomal integrity, mitochondrial membrane potential, and membrane lipid peroxidation. **Journal of Andrology**. 21: 895-902.

Bilodeau, J. F., Blanchette S., Gagnon C. and Sirad, M. A. (2000). Levels of antioxidant defenses are decreased in bovine spermatozoa after a cycle of freezing and thawing. **Molecular Reproduction and Development**. 55: 282-288.

Breque, C., Surai, P. and Brillard, J. P. (2003). Roles of antioxidants on prolonged storage of avian spermatozoa in vivo and in vitro. **Molecular Reproduction and Development**. 66: 314–323.

Bucak, M. N., Ates, S., Ahin, A. and Yuce, A. (2008). Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. **Small Ruminant Research.** 77: 128–134.

Cerolini, S., Kelso, K. A., Noble, R. C., Speake, B. K., Pizzi, F. and Cavalchini, L. G. (1997). Relationship between spermatozoan lipid composition and fertility during aging of chickens. **Biology of Reproduction.** 57: 976-980.

Cerolini, S., Maldjian, A., Surai, P. and Noble, R. (2000). Viability, susceptibility to peroxidation and fatty acid composition of boar semen during liquid storage. **Animal Reproduction Science.** 58: 99-111.

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.

Çoyan, K., Başpınar, N., Bucak, M. N. and Akalın, P. P. (2011). Effects of cysteine and ergothioneine on post-thawed Merino ram sperm and biochemical parameters. **Cryobiology**. 63: 1-6.

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

Fang, Y. Z., Yang, S. and Wu, G. (2002). Free Radicals, Antioxidants and Nutrition. **Nutrition**. 18: 872–879.

Funahashi, H. and Sano, T. (2005). Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 °C. **Theriogenology.** 63: 1605-1616.

Gadea, J., Sellas, E., Marco, M. A., Coy, P., Mattas, C., Romar, R. and Ruiz, S. (2004). Decrease in gluathione content in boar sperm after cryopreservation: effect of the adddition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. **Theriogenology**. 62: 690–770.

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.

Giesen, A. F., and Sexton, T. J. (1983). Beltsville poultry semen extender. 9. Effect of storage temperature on turkey semen held eighteen hours. **Poultry science.** 62: 1305-1311.

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.

Han, Y., Qin, J., Chang, X., Yang, Z., Bu, D. and Du, J. (2005). Modulating effect of hydrogen sulfide on gamma-aminobutyric acid B receptor in recurrent febrile seizures in rats. **Neuroscience research.** 53: 216-219.

Kaeoket, K., Tantiparinyakul, K., Kladkaew, W., Chanapiwat, P. and Techakumphu, M. (2008). Effect of different antioxidants on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. **Thai Journal of Agricultural Science**. 41: 1-9.

Kelso, B., Smith, R. V., Laughlin, R. J. and Lennox, S. D. (1997). Dissimilatory nitrate reduction in anaerobic sediments leading to river nitrite accumulation. **Applied and Environmental Microbiology**. 63: 4679-4685.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Laffaldano, N., Meluzzi, A., Manchisi, A. and Passarella, S. (2005). Improvement of stored turkey semen quality as a result of He–Ne laser irradiation. **Animal reproduction science.** 85: 317-325.

Lake, P. E. (1960). Studies on the Dilution and Storage of Fowl Semen. **Journal of Reproduction and Fertility**. 1: 30-35.

Lamirande, E., Jiang, H., Zini, A., Kodama, H. and Gagnon, C. (1997). Reactive oxygen species and sperm physiology. **Reviews of reproduction.** 2: 48-54.

Luberda, Z. (2005). The role of glutathione in mammalian gametes. **Reprod Biol.** 5: 5-17.

Lukaszewicz, E. (2001). Effects of semen filtation and dilution rate on morphology and fertility of frozen gander spermatozoa. **Theiogenology**. 55: 1819-1829.

Lukaszewicz, E. (2002). An effective method for freezing White Italian gander semen. **Theriogenology.** 58: 19-27.

Mazor, G., Kidron, G. J., Vonshak, A. and Abeliovich, A. (1996). The role of cyanobacterial exopolysaccharides in structuring desert microbial crusts. **FEMS Microbiology Ecology**. 21: 121-130.

Partyka, A., Jerysz, A. and Pokorny, P. (2007). Lipid peroxidation in fresh and stored semen of Green-legged partridge. **Veterinary Medicine**. 10: 3-5.

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. (2001). Characterization of northern pintail (*Anas acuta*) ejaculate and the effect of sperm preservation on fertility. **Reproduction**. 121: 267–275.

Rivlin, J., Mendel, J., Rubinstein, S., Etkovitz, N. and Breitbart, H. (2004). Role of hydrogen peroxide in sperm capacitation and acrosome reaction. **Biology of Reproduction**. 70: 518–522.

Safarinejad, M. R., Hosseini, S. Y., Dadkhah, F. and Asgari, M. A. (2010). Relationship of omega-3 and omega-6 fatty acid with semen characteristic and anti-oxidant status of seminal plasma: A comparison between fertile and infertile men. **Clinical Nutrition**. 29: 100-105.

Sagara, J. I., Miura, K. and Bannai, S. (1993). Maintenance of neuronal glutathione by glial cells. **Journal of neurochemistry.** 61: 1672-1676.

Satorre. M. M., Breininger, E., Beconi, M. T. and Beorlegui, N. B. (2007). Alpha - Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm. **Theriogenology**. 68: 958–965.

Sexton, T. J. (1977). A new poultry semen extender: 1. Effect of extension on the fertility of chicken semen. **Poultry Science.** 56: 1443-1446.

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.

Surai, P. F. and Wishart, G. J. (1996). Poultry artificial insemination technology in the countries of the former USSR. **World's Poultry Science Journal**. 52: 27-43.

Surai, P. F., Fujihara, N. Speak, B. K, Brillard, J. P., Wishart, G. J. and Sparks, N. H. C. (2001). Polyunsaturated fatty acids, lipid peroxidation and antioxidant protection in avian semen. **Asian-Australasian Journal of Animal Sciences.** 7: 1024-1050.

Surai, P. F., Royle, N. J. and Sparks, N. H. (2000). Fatty acid, carotenoid and vitamin A composition of tissues of free living gulls. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology.** 126: 387-396.

Tabatabaei, S. M. and Vahidi, B. (2011). Bacterial foraging solution based fuzzy logic decision for optimal capacitor allocation in radial distribution system. **Electric Power Systems Research.** 81: 1045-1050.

Thuwanut, P. (2007). The effect of antioxidants on motility, viability, acrosome integrity and DNA integrity of post-thaw epididymal cat spermatozoa. **M.S.Thesis**, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Science, Swedish University of Agricultural Sciences, Sweden.

Tseluntin, K., Seigneurin, F. and Blesbois, E. (1999). Comparison of Cryoprotectants and Methodes of Cryopreservation of Fowl Spermatozoa. **Poultry Science**. 78: 586–590.

Uysal, O., Bucak, M. N., Yavas, I., and Varisli, O. (2007). Effect of various antioxidants on the quality of frozen-thawed bull semen. **J. Anim. Vet. Adv.** 6: 1362-1366.

ภาคผนวก ก
วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

1. วัสดุและอุปกรณ์

วัสดุและอุปกรณ์สำหรับใช้ศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant ที่เหมาะสมต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่ผ่านการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง

1. Microtube (efpendorf) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
2. Rack
3. กระดาษ label
4. ปากกา label
5. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
6. ช้อนตักสาร
7. กระดาษชั่งสาร
8. เทอร์โมมิเตอร์
9. กระดาษทิชชู่
10. ตู้เย็น
11. กระบอกน้ำกลั่น
12. กระติกน้ำแข็ง
13. micropipette (ขนาด 10, 100, 200 และ 1,000 ไมโครลิตร)
14. small and large pipettes tips
15. หลอดทดลองพลาสติกขนาด 15 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิด
16. หลอดทดลองพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิด
17. beaker (ขนาด 250, 100, 50, 25 มิลลิลิตร)
18. volumetric flasks ขนาด 250 มิลลิลิตร
19. graduated cylinders ขนาด 25 มิลลิลิตร
20. ขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร
21. glass stirring rod
22. pH meter
23. osmometer

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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 x 38 x 29 เซนติเมตรซ
29. ตะแกรงวางหลอดน้ำเชื้อ
30. นาฬิกาจับเวลา

วัสดุและอุปกรณ์สำหรับใช้ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ ประกอบด้วย

1. กล้องจุลทรรศน์แบบ compound microscope
2. Computer Assisted Semen Analysis (CASA) รุ่น version 10 HTM-IVOS
3. Flow cytometer รุ่น FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)
4. 2X-CEL Dual Sides Sperm Analysis Chamber
5. 2X-CEL Cover Glass
6. Slide และ Cover slide
7. Hemacytometer
8. Counter
9. Microtube (efpendorf) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
10. นาฬิกาจับเวลา
11. กระดาษเช็ดเลนส์
12. แผ่น DVD
13. กรรไกร
14. Cuvette แบบพลาสติก
15. เครื่อง spectrophotometer
16. เครื่อง centrifuge
17. Water bath
18. Votex mixer
19. ตะเกียงแอลกอฮอล์
20. ไม้ขีด
21. นาฬิกาจับเวลา
22. กระติกน้ำแข็ง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

23. หลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร
24. ไม้จิ้มฟัน
25. เข็มเขี่ย
26. กระดาษทิชชู่
27. กรรไกร
28. ถาดไข่
29. ตู้ฟักไข่
30. อุปกรณ์ส่องไข่

2. สารเคมี

สารเคมีสำหรับเตรียมสาร extender ประกอบด้วย

1. Water cell culture grade
2. Magnesium acetate
3. Sodium acetate
4. Potassium citrate
5. Sodium glutamate
6. Dipotassium hydrogen phosphate
7. Potassium dihydrogen phosphate
8. Fructose
9. TES (N-Tris (hydrxy methal)
10. Methyl-2-amino ethane sulfonic acid
11. Potassium acetate
12. Polyvinylpyroridone (PVP)
13. Glucose
14. Sodium dihydrogen phosphate
15. Inositol
16. Protamine sulfate
17. Anhydrous sodium hydrogen phosphate
18. Vitamin E
19. L- cysteine
20. Glutathione

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

กลุ่มสาร cryoprotectant และสารเคมีสำหรับใช้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง ประกอบด้วย

1. Dimethyl formamide (DMF)
2. Dimethyl acetamide (DMA)
3. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
4. ไนโตรเจนเหลว (LN_2)
5. ผงอุด Polyvinyl alcohol (PVA)

สารเคมีสำหรับใช้ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ ประกอบด้วย

1. Eosin B
2. Nigrosin
3. Sodium citrate dihydrate
4. น้ำยาเช็ดเลนส์
5. น้ำยาเคลือบเล็บ
6. Immersion oil

สารเคมีสำหรับเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาความสมบูรณ์ของอะโครโซม และการทำงานของไมโตคอนเดรีย ประกอบด้วย

1. Fluorescein isothiocyanate conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA)
2. Rhodamine 123
3. Propidium iodide (PI)

สารเคมีสำหรับเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาระดับการเกิดลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่นโดยการวิเคราะห์ จากปริมาณ maloaldehyde (MDA) ที่เกิดขึ้น ด้วยวิธี Thiobarbituric acid reactive substant (TBARS) ประกอบด้วย

1. Ferrous sulfate 0.2 mM
2. Sodium ascorbate 1 mM
3. 15% Trichloroacetic acid (TCA)
4. 0.375% Thiobarbituric acid (TBA)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์

1. การศึกษาผลของชนิดของสาร extender และสาร cryoprotectant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่ผ่านการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง

1.1 อัตราการเคลื่อนที่

ตารางที่ ข. 1 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ร่วมกับ 6% DMF ต่ออัตราการเคลื่อนที่รวม

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups	4120.949	8	515.119	45.818	.000
Within Groups	202.370	18	11.243		
Total	4323.318	26			

ตารางที่ ข. 2 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ร่วมกับ 6% DMF ต่ออัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups	683.752	8	85.469	12.101	.000
Within Groups	127.135	18	7.063		
Total	810.886	26			

ตารางที่ ข. 3 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ร่วมกับ 6% DMA ต่ออัตราการเคลื่อนที่รวม

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups	7735.711	8	966.964	108.729	.000
Within Groups	160.080	18	8.893		
Total	7895.791	26			

ตารางที่ ข. 4 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ร่วมกับ 6% DMA ต่ออัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups	2685.353	8	335.669	77.965	.000
Within Groups	77.497	18	4.305		
Total	2762.850	26			

ตารางที่ ข. 5 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ร่วมกับ 6% DMSO ต่ออัตราการเคลื่อนที่รวม

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups	8895.084	8	1111.886	130.941	.000
Within Groups	152.846	18	8.491		
Total	9047.931	26			

ตารางที่ ข. 6 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ร่วมกับ 6% DMSO ต่ออัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups	2690.506	8	336.313	54.642	.000
Within Groups	110.786	18	6.155		
Total	2801.293	26			

1.2 อัตราการมีชีวิต

ตารางที่ ข. 7 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ร่วมกับ 6% DMF ต่ออัตราการมีชีวิต

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups	4202.348	8	525.293	119.456	.000
Within Groups	79.153	18	4.397		
Total	4281.501	26			

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ ข. 8 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ร่วมกับ 6% DMA ต่ออัตราการมีชีวิต

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups	6811.759	8	851.470	186.747	.000
Within Groups	82.071	18	4.559		
Total	6893.830	26			

ตารางที่ ข. 9 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ร่วมกับ 6% DMSO ต่ออัตราการมีชีวิต

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups	7357.536	8	919.692	166.627	.000
Within Groups	99.350	18	5.519		
Total	7456.887	26			

1.3 อัตราการผสมติด

ตารางที่ ข. 10 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ร่วมกับ 6% DMF ต่ออัตราการผสมติด

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups	19631.313	8	2453.914	33.061	.000
Within Groups	1632.906	22	74.223		
Total	21264.219	30			

ตารางที่ ข. 11 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ร่วมกับ 6% DMA ต่ออัตราการผสมติด

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups	19454.360	8	2431.795	19.453	.000
Within Groups	2750.126	22	125.006		
Total	22204.486	30			

ตารางที่ ข. 12 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของสาร extender ร่วมกับ 6% DMSO ต่ออัตราการผสมติด

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups	27330.307	8	3416.288	118.038	.000
Within Groups	636.733	22	28.942		
Total	27967.039	30			

2. การศึกษาผลของชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant ที่เหมาะสมต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาวที่ผ่านการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง

ตารางที่ ข. 13 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของการเสริมชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant ร่วมกับ extender (EK) และ 6%DMF ต่ออัตราการเคลื่อนที่รวม

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (Treatment)	3918.983	10	391.898	69.290	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	124.430	22	5.656		
Total	4043.412	32			

หมายเหตุ: Treatment คือ วิตามินอีที่ระดับความเข้มข้น 1.16, 2.31 และ 3.48 mM, Cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 5.0 mM และ Glutathione ที่ระดับความเข้มข้น 0.025, 0.05 และ 0.1 mM

ตารางที่ ข. 14 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของการเสริมชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant ร่วมกับ extender (EK) และ 6% DMF ต่ออัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (Treatment)	1221.855	10	122.186	51.610	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	52.084	22	2.367		
Total	1273.939	32			

หมายเหตุ: Treatment คือ วิตามินอีที่ระดับความเข้มข้น 1.16, 2.31 และ 3.48 mM, Cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 5.0 mM และ Glutathione ที่ระดับความเข้มข้น 0.025, 0.05 และ 0.1 mM

ตารางที่ ข. 15 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของการเสริมชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant ร่วมกับ extender (EK) และ 6% DMF ต่ออัตราการมีชีวิตรอด

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (Treatment)	4129.186	10	412.919	164.434	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	55.245	22	2.511		
Total	4184.431	32			

หมายเหตุ: Treatment คือ วิตามินอีที่ระดับความเข้มข้น 1.16, 2.31 และ 3.48 mM, Cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 5.0 mM และ Glutathione ที่ระดับความเข้มข้น 0.025, 0.05 และ 0.1 mM

ตารางที่ ข. 16 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของการเสริมชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant ร่วมกับ extender (EK) และ 6% DMF ต่ออัตราการผสมติด

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (Treatment)	4363.585	10	436.358	28.368	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	338.405	22	15.382		
Total	4701.989	32			

หมายเหตุ: Treatment คือ วิตามินอีที่ระดับความเข้มข้น 1.16, 2.31 และ 3.48 mM, Cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 5.0 mM และ Glutathione ที่ระดับความเข้มข้น 0.025, 0.05 และ 0.1 mM

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ ข. 17 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ ผลของการเสริมชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร antioxidant ร่วมกับ extender (EK) และ 6% DMF ต่อการเกิด MDA

Source	Sum of squares	df	Mean squares	F	Sig
Between Groups (Treatment)	4862.728	4	486.273	3.630E3	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	27.043	10	1.229		
Total	4889.771	14			

หมายเหตุ: Treatment คือ วิตามินอีที่ระดับความเข้มข้น 1.16, 2.31 และ 3.48 mM, Cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 5.0 mM และ Glutathione ที่ระดับความเข้มข้น 0.025, 0.05 และ 0.1 mM

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ: (ภาษาไทย) อ.ดร. สมร พรชื่นชูวงศ์

(ภาษาอังกฤษ) Dr. Samorn Ponchunchoovong

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 3 9201 00947 09 0

3. ตำแหน่งปัจจุบัน: อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4. สถานที่ติดต่อ:

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อำเภอเมือง จ.นครราชสีมา 30000 Tel: (044) 224377-8 Fax: (044) 224150

E-mail: samorn@sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา:

Degree	Institution	Year	Country
B.Sc. (Biology)	Prince of Songkhla University	1992	Thailand
M.Sc. (Zoology)	Chulalongkorn University	1995	Thailand
Ph.D (Aquaculture)	Asian Institute of Technology	2003	Thailand

6. สาขาวิชาการที่ชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา):

Cryopreservation of fish spermatozoa

Aquaculture (seed production)

7. ประสบการณ์วิจัย:

7.1 งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว

งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว และได้รับการตีพิมพ์ ดังเอกสารแนบ และอีก 1 เรื่องอยู่ระหว่างการตีพิมพ์ (โดยเป็นหัวหน้าโครงการ 3 เรื่อง)

ผลงานวิจัย: Selected publications

Kwantong, S. and Bart, A. N. 2003. Effect of cryoprotectants, extenders and freezing rates on the fertilization rates of frozen striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), sperm. Aquaculture research, 34: 887-893.

Kwantong, S. and Rodtong, S. 2004. Species identification of Thai rice-field crab using stereomicroscopy and scanning electron microscopy. 8th Asia- Pacific conference on electron microscopy (8APEM). June 7-14, 2004. Kanazawa, Japan. P. 83.

Rodtong S. and **Samorn Kwantong.** 2004. Scanning electron microscopy and nucleic acid technique aid the identification and diversity study of Thai rice-field crab. 8th Asia- Pacific conference on electron microscopy (8APEM). June 7-14, 2004. Kanazawa, Japan. P. 122.

Kwantong, S. and Bart, A. N. 2004. Cryoperservation of striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* sperm. International symposium on animal and plant production for food and environmental security. August 9-11, 2004, Chaophya park hotel, Bangkok. Thailand. P. 105-109.

Kwantong, S. and Bart, A. N. 2006. Cryopreservation of black eared catfish, *Pangasius larnaudii* sperm. Aquaculture research, 37: 955-957.

Ponchunchoovong, S. 2006. Species identification of Thai rice-field crab in the lower north-eastern region of Thailand. Suranaree J. Sci. Technol. 13(3): 245-249.

สมร พรชื่นชูวงศ์ สุพรรณ ขันน้ำเที่ยง สุรชัย ภาสดา สุคนธา เลขะพันธ์รัตน์ นิศารัตน์ ปุณณารักษ์ และนฤพล สุขุมาสวิน. 2550. ผลของสาร extenders และสาร cryoprotectants ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. ปีที่ 1 เล่มที่ 1: 11-22.

Ponchunchoovong, S. 2007. Effects of equilibration times on the fertilization rate of cryopreserved striped catfish, *Pangasius hpophthalmus* (Sauvage, 1878) sperm. First international conference on sustainable animal agriculture in developing countries. 27-29 September, Guandu Hotel, Kunming, China. P. 341-344.

Ponchunchoovong, S. 2008. Effects of freezing rates on the cryopreservation of striped catfish, Pangasius hypophthalmus (Sauvage, 1878) sperm. Proceedings "The 13th Animal Science Congress of the Asian- Australasian Association of Animal Production Societies. September 22-26, 2008, Hanoi, Vietnam. P. 406.

Kwantong, S. and Bart, A. N. 2009. Fertilization efficiency of cryopreserved sperm from striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage). Aquaculture Research, 40: 292-297.

Dokpong, D., **S. Ponchunchoovong**, U. Amsin, U. Piasoongnoen and S. Singhae. 2009. The effect of freezing Rates on the cryopreservation of Small scale mud carp, *Cirrhinus microlepis* Sauvage, 1878) sperm. Proceedings 2nd International conference on sustainable animal agriculture for developing countries 8-11 November, 2009. Kuala Lumpur, Malaysia. P. 268-270.

Ponchunchoovong, S. and S. Kannumteing. Effects of freezing rates on the cryopreservation of black ear catfish, *P. larnaudii* spermatozoa. Proceedings 2nd International conference on sustainable animal agriculture for developing countries. 8-11 November, 2009. Kuala Lumpur, Malaysia. P. 271- 273.

Kainin, S., **S. Ponchunchoovong**, U. Imsin, U. Piasoongnoen and S. Singhae. Successful hybridization of *Pangasius* species using cryopreserved sperm. Proceedings 2nd International conference on sustainable animal agriculture for developing countries. 8-11 November, 2009. Kuala Lumpur, Malaysia. P. 274-275.

Boonanuntanasarn, S. , K. sukoim, T. Changmunwai, **S. Ponchunchoovong** and Y. Manakasem. Effect of *Butea superba* on masculinization of Nile tilapia. Proceedings 2nd International conference on sustainable animal agriculture for developing countries. 8-11 November, 2009. Kuala Lumpur, Malaysia. P. 250-251.

Nipon, S., R. Yahsiro , S. Tunkijjanukij and **S. Ponchunchoovong** . 2009. Preservation of Humpback Grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828) Spermatozoa. Kasetsart University Fisheries research Bulletin Vol. 33(2): May, 2009. p. 12-23.

Samorn, P., Augkana, J. and Tunyaluk, R. 2010. Effect of activators solution on motility and fertilization of frozen striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*. Proceedings " The 14th Animal Science Congress of the Asian- Australasian Association of Animal Production Societies (AAAP). August 23-27, 2010, Pingtung Taiwan, ROC P. 321.

Samorn, P., Duangchan. D., Unnop, I., Uraiwan, P. and Sombut, S. 2010. The effect of dilution ratios on short- term storage of Small scale mud carp, *Cirrhinus microlepis* (Sauvage, 1878) sperm. Proceedings " The 14th Animal Science Congress of the Asian- Australasian Association of Animal Production Societies (AAAP). August 23-27, 2010, Pingtung Taiwan, ROC P. 322.

Ponchunchoovong, S. and Plime S. 2010. Effect of combinations of cryoprotectants and freezing rates on cryopreservation of the spermatozoa of Striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878). Kasetsart J. (Nat. Sci.) 44: 1153-1161.

Ponchunchoovong, S., S. Kainin, U. Imsilp, U. Piasoongnoen and S. Singsee. 2011. The effect of freezing rates and combinations cryodiluents on the cryopreservation of Mekong catfish, *Pangasius bocourti* sperm. Proceedings 3rd International

conference on sustainable animal agriculture for developing countries. 26-29 July, 2011. Nakhon Ratchasima, Thailand. P.76.

Ponchunchoovong, S., D. Dokpong, U. Imsilp, U. Piasoongnoen and S. Singsee. 2011 Fertilization efficiency of fresh and frozen sperm from Small scale mud carp, *Cirrhinus microlepis* (Sauvage, 1878). Proceedings 3rd International conference on sustainable animal agriculture for developing countries. 26-29 July, 2011. Nakhon Ratchasima, Thailand. P.75.

Boonmatun, T., **S. Ponchunchoovong**, T. Chomai, T. Vongpralub and A. Molee. 2011. Effects of extender and storage time on motility of native chicken " Luang hang kao" spermatozoa. Proceedings 3rd International conference on sustainable animal agriculture for developing countries. 26- 29 July, 2011. Nakhon Ratchasima, Thailand. P. 336.

Vechklang, K., S. Boonanuntanasarn, **S. Ponchunchoovong**, N. Pirarat and C. Wanapu. 2011. The potential for rice wine residual as an alternative protein source in a practical diet for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at the juvenile stage. Aquaculture Nutrition. P. 1365-2095.

Ponchunchoovong, S., S. Kainin, U. Imsilp and U. Piasoongnoen. 2011. The effect of freezing procedures on the cryopreservation of Mekong catfish, *Pangasius bocourti* sperm. World academy of science, engineering and technology. 24-26 August, 2011. Paris, France. P.1257-1261.

Thipsuda Boonmatan, **Samorn Ponchunchoovong**, Theerachai chormai and Thevin Vongpralub. 2013. Effect of extenders on preservation of native chicken "Luang hang kao" spermatozoa. International Conference on Engineering and Applied Science. November 2013, Osaka, Japan. P. 2033-2038.

Jiraporn P., **Ponchunchoovong, S.** and Payooha, K. 2013. The effects of partial replacement of fish meal by brewer's yeast on growth performance of Thai Panga. The 3rd International Fisheries Symposium, November 28-30, Pattaya. Thailand.

Kainin, S. **Ponchunchoovong, S.**, U. Imsilp and S. Singsee. 2014. Cryopreservation of Mekong catfish, *Pangasius bocourti* Sauvage, 1880 spermatozoa. Aquaculture Research, 45: 859-867.

Ladoktha, P., Ponchunchoovong, S. and Udomkarn, C. 2015. Effect of activators solution on motility and fertilization of frozen black shark, *Labeo chrysophekadion* spermatozoa. BioEvolution, 2: 62-65.

Tangpakdeewijit, S., S. Ponchunchoovong and T. Vongpralub. 2015. Effect of extenders on frozen semen quality of Thai native chicken (Lueng hang kao). KHON KAEN AGR. J. 43 SUPPL. 2: 86-89.

Jiraporn P., Ponchunchoovong, S. and Payooha, K. 2016. Partial replacement of fishmeal by brewer' s yeast (Saccharomyces cerevisiae) in diets for Thai Panga (*Pangasianodon hypophthalmus* × *Pagasius bocourti*) juveniles. Aquaculture Nutrition, 22:575-585.

Kanjana, T. and Ponchunchoovong, S. 2016. The replacement of fish meal with rice wine residual on growth performance in diets of Thai Panga (*Pangasianodon hypopthalmus* × *Pangasius bocourti*). The 67th Annual Meeting of the European Federation of Animal Science (EAAP 2016). August 29- September 2. Belfast, England.

Kanjana, T. and Ponchunchoovong, S. 2016. The effect of replacement of fishmeal by rice wine residual on growth performance and intestinal morphology of Thai Panga. The 1st International conference on Tropical Animal Science and Production 2016 (TASP 2016). July 26-31, Ambaasader Bangkok, Thailand.

Phimphan, L., Ponchunchoovong, S and Udomkarn, C. 2017. Preservation of black sharkminnow, *Labeo chrysophekadion* (Bleeker, 1849) spermatozoa. Aquaculture Research, 48: 3837-3847.

7.2 งานวิจัยที่กำลังดำเนินการ มี 3 เรื่อง

1. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้โดยวิธีการแช่แข็ง
(เป็นผู้หัวหน้าโครงการวิจัย รับผิดชอบโครงการวิจัย 70%)
2. การเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว โดยวิธีการแช่แข็ง
(เป็นผู้หัวหน้าโครงการวิจัย รับผิดชอบโครงการวิจัย 50%)
3. การพัฒนาและเพิ่มผลผลิตปลาสวายโมง (Thai Panga) เพื่อการส่งออก
(เป็นผู้หัวหน้าโครงการวิจัย รับผิดชอบโครงการวิจัย 35%)

ประวัติผู้ร่วมวิจัย (1)

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย ธีระชัย ช่อไม้

(ภาษาอังกฤษ) Mr. THEERACHAI CHORMAI

2. หมายเลขประจำตัวประชาชน 3-1014-00087-67-1 รหัสนักวิจัย (วช.) 49040073

3. ตำแหน่ง ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์กบินทร์บุรี

4. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญาตรี โท เอก	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2525	ปริญญาตรี	วท.บ.วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต	สัตวศาสตร์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย
2540	ปริญญาโท	วท.ม.วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต	การปรับปรุงพันธุ์สัตว์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย

5. สาขาที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชา

การปรับปรุงพันธุ์โคเนื้อ และสัตว์ปีก

6. ประวัติการทำงาน

ปี	ตำแหน่ง	หน่วยงาน
2526-2541	นักวิชาการสัตวบาล	สถานีบำรุงพันธุ์สัตว์ปราจีนบุรี
2542-2545	นักวิชาการสัตวบาล	สถานีวิจัยทดสอบพันธุ์สัตว์สระแก้ว
2546-ปัจจุบัน	ผู้อำนวยการศูนย์วิจัย	ศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์กบินทร์บุรี

7.ประสบการณ์ที่สำเร็จแล้ว: ชื่อเรื่อง ปีที่พิมพ์ และสถานภาพการทำงานวิจัย เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ	ปีที่เผยแพร่	สถานภาพในการวิจัย
1. ดัชนีคัดเลือกโครุ่นพันธุ์บราห์มัน	2539	หัวหน้าโครงการวิจัย
2. สถานภาพงานวิจัยโคเนื้อในประเทศไทย.	2539	หัวหน้าโครงการวิจัย
3. ค่าพารามิเตอร์ทางพันธุศาสตร์ของโคบราห์มัน	2540	หัวหน้าโครงการวิจัย
4. สถานภาพการเลี้ยงไก่พื้นเมืองในหมู่บ้านรอบสถานีบำรุงพันธุ์สัตว์สระแก้ว	2541	หัวหน้าโครงการวิจัย
5. สมรรถภาพการเจริญเติบโตและลักษณะซากของโคป่าลูกผสม พ่อวัวกระทิงและวัวแดงกับแม่โค บราห์มันและเรดซินดี	2544	หัวหน้าโครงการวิจัย
6. ผลของการใช้มันสำปะหลังต่อผลผลิของไก่พื้นเมือง ช่วงอายุ 0-16 สัปดาห์	2544	หัวหน้าโครงการวิจัย
7. สมรรถภาพการเจริญเติบโต และลักษณะซากของโคป่าลูกผสม พ่อวัวกระทิง และวัวแดง กับแม่พันธุ์	2544	หัวหน้าโครงการวิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บราห์มันและเรดซินดี

8. อัตราพันธุกรรมของลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจของโคกบินทร์บุรีระยะแรกเกิดถึงอายุ 1 ปี 2545 หัวหน้าโครงการวิจัย
9. สมการทำนายน้ำหนักตัวโคกบินทร์บุรีชั่วอายุที่ 1 2545 ผู้ร่วมโครงการวิจัย
10. สมรรถภาพการเจริญเติบโตของเป็ดบาร์บารี่ 2 สายพันธุ์เมื่อเลี้ยงด้วยสำปะหลังระดับต่างๆ 2545 ผู้ร่วมโครงการวิจัย
11. การเปรียบเทียบสมรรถภาพการขุน และลักษณะซากระหว่างโคลูกผสมทาเรนเทส-บราห์มันและโคลูกผสมซิมเมนทอล-บราห์มัน 2546 หัวหน้าโครงการวิจัย
12. การเลี้ยงโคกบินทร์บุรีโดยใช้พื้นที่แปลงหญ้าแบบจำกัด 2546 หัวหน้าโครงการวิจัย
13. การสร้างฝูงไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว ลักษณะภายนอกของไก่เมื่อถึงชั่วอายุที่ 1 และ 2 2548 หัวหน้าโครงการวิจัย
14. สมรรภาพการผลิตไก่พื้นเมืองที่ระดับโปรตีนในอาหารต่างๆกัน 2548 ผู้ร่วมโครงการวิจัย
15. การสร้างฝูงไก่พื้นเมืองจำนวน 4 พันธุ์ (ประดู่หางดำ, เหลืองหางขาว, แดง และชี) 2549 ผู้ร่วมโครงการวิจัย
16. ประสิทธิภาพการใช้กล่องรักษาอุณหภูมิเป็นภาชนะขนส่งน้ำเชื้อแช่เย็น สำหรับผสมเทียมไก่พื้นเมืองในภาคสนาม 2549 ผู้ร่วมโครงการวิจัย
17. การสร้างฝูงไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว สมรรถภาพการผลิตและค่าพารามิเตอร์ทางพันธุกรรมของลักษณะน้ำหนักตัวของไก่ 2550 หัวหน้าโครงการวิจัย
18. สมรรถภาพการเจริญเติบโตของโคกบินทร์บุรีเพศผู้ในระยะทดสอบ 2550 ผู้ร่วมโครงการวิจัย
19. สมรรรถภาพการผลิตของไก่พื้นเมืองพันธุ์ประดู่หางดำ, พันธุ์เหลืองหางขาว, พันธุ์แดง และพันธุ์ชี. 2550 ผู้ร่วมโครงการวิจัย
20. อาทิตย์ ใหญ่ลา, เนรมิต สุขมณี, ธีระชัย ช่อไม้ และวรวิทย์ สิริพลวัฒน์. 2551. การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของสีแข้งในไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์เหลืองหางขาว. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ครั้งที่ 46. กรุงเทพฯ. น. 107-114.
21. อาทิตย์ ใหญ่ลา, เนรมิต สุขมณี, ธีระชัย ช่อไม้ และวรวิทย์ สิริพลวัฒน์. 2551. การถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมของสีขนในไก่พื้นเมืองไทยพันธุ์เหลืองหางขาว. วารวารวิทยาศาสตร์เกษตร. กรุงเทพฯ. (อยู่ระหว่างรอตีพิมพ์).

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ปัจจุบันกำลังดำเนินการวิจัย

1. โครงการย่อยที่ 4. การเลี้ยงโคกบินทร์บุรีของกรมปศุสัตว์ภายใต้การเลี้ยงของเกษตรกร

4.1 สมรรถภาพการผลิตโคกบินทร์บุรีในสภาพฟาร์มเกษตรกรเครือข่าย (2550-2554) (เลขทะเบียนวิจัย (50)(1)-(50:4.1)-0206-006)

4.2 ผลตอบแทนทางเศรษฐกิจและสังคม ของการผลิตโคกบินทร์บุรีของเกษตรกรฟาร์มเครือข่าย (2550-2554)

2. โครงการทดสอบสมรรถภาพโคเนื้อกรมปศุสัตว์และเกษตรกรฟาร์มเครือข่าย (51(1)- 0206-003)

2.3 การทดสอบสมรรถภาพโคพันธุ์กบินทร์บุรีของกรมปศุสัตว์และเกษตรกรฟาร์มเครือข่าย (เลขทะเบียนวิจัย 51(1)-(51.3)- 0206-003)

ปัจจุบันดำเนินโครงการวิจัยสิ้นสุดลงแล้ว

1. โครงการสร้างฝูงไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว” (2546-2550)

ประวัติผู้ร่วมวิจัย (2)

1. ชื่อ – นามสกุล (ภาษาไทย) : นายเทวินทร์ วงษ์พระลับ

(ภาษาอังกฤษ) : Mr. Thevin Vongpralub

2. เลขหมายประจำตัวประชาชน : 3 – 4007 – 00805 – 33 - 9

3. ตำแหน่งปัจจุบัน : รองศาสตราจารย์ ระดับ 9

4. หน่วยงานสังกัด: ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

โทรสาร 043 – 202362 E-mail: vthevi@kku.ac.th

5. ประวัติการศึกษา:

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2522	ปริญญาตรี	วท.บ. (วิทยาศาสตร์บัณฑิต)	เกษตรศาสตร์	สัตวศาสตร์	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย
2530	ปริญญาโท	วท.ม. (วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต)	เกษตรศาสตร์	สัตวบาล	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย
2538	ปริญญาเอก	Dr. Sc. Agr. Doctor in Agriculture	Animal Science	Animal Reproduction	Kyushu Tokai	ญี่ปุ่น

6. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

6.1 ชื่อแผนงานวิจัยในฐานะผู้อำนวยการ: การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ในโคพื้นเมืองโดยวิธีการแช่แข็ง (สิ้นสุดปีงบประมาณ 2550)

6.2 ชื่อโครงการวิจัยในฐานะหัวหน้าโครงการ : การแช่แข็งตัวอ่อนโคพื้นเมืองที่ผ่านการคัดเพศ (สิ้นสุดปีงบประมาณ 2550)

6.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จ : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ และสถานภาพในการวิจัย

เทวินทร์ วงษ์พระลับ, พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา, วีระ ภาคอุทัย, พรชัย ล้อวิลัย, ฉลอง วชิราภากร และ วิษณุ วิเชียรสรรค์. 2534. การศึกษาถาวรภาพในการเลี้ยงโคนมของเกษตรกรรายย่อยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ รายงานการวิจัยเสนอต่อสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยขอนแก่น (หัวหน้าโครงการ)

เทวินทร์ วงษ์พระลับ และ มนต์ชัย ดวงจินดา. 2538. อิทธิพลของจำนวนเซลล์กรานูโลซาต่อการพัฒนาตัวอ่อนของหนูขาวเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันในหลอดทดลอง. แก่นเกษตร 23:37-43. (หัวหน้าโครงการ)

เทวินทร์ วงษ์พระลับ, พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา, บุญตา ธรรมบุตร และ มานิตย์ สนธิไชย. 2539. อิทธิพลของน้ำยาเจือจางและรูปแบบภาชนะที่ใช้ขนส่งในสภาพสนามต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกร. แก่นเกษตร 24(2):81-89.

เทวินทร์ วงษ์พระลับ, บัญญัติ เหล่าไพบูลย์, พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา, ปิยศักดิ์ สุวรรณี, ประมร เมืองพรม และ พิทักษ์ เผ่าผา. 2542. การศึกษาเบื้องต้นในการเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในโคพื้นเมือง. วารสารวิจัย มข. 4:22-28.

เทวินทร์ วงษ์พระลับ, พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา, อดศักดิ์ สังข์แก้ว และ กฤตพล สมมาตย์. 2542. การศึกษาเบื้องต้นในการเก็บรักษาน้ำเชื้อกวางซิก้าแบบแช่แข็ง. วารสารสัตว์ป่าเมืองไทย. 7:9-12.

เทวินทร์ วงษ์พระลับ, พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา, อดิศักดิ์ สังข์แก้ว และ บุญตา ธรรมบุตร. 2543. การเก็บรักษาน้ำเชื้อและตัวอ่อนสุกรพื้นเมืองโดยวิธีแช่แข็ง. รายงานการวิจัยโครงการวิจัยจากทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ปีงบประมาณ 2541. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สุจินต์ สิมารักษ์, เทวินทร์ วงษ์พระลับ, ยุพา หาญบุญทรง และ พิรวิทย์ เชื้อวงษ์บุญ. 2543. การเลือกเพศตัวอ่อนโคนมด้วยเทคนิคการเพิ่มขยายยีน. รายงานการวิจัยโครงการวิจัยจากทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ปีงบประมาณ 2541. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เทวินทร์ วงษ์พระลับ, วิทยา ฉินชิยานนท์, พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา, อดิศักดิ์ สังข์แก้ว, สนั่น เหลียงไพบูลย์, บัญญัติ เหล่าไพบูลย์, พรชัย ล้อวิลัย และ อารียา ทองประยูร. 2544. ความยาวของเส้นรอบวงอัณฑะและคุณลักษณะน้ำเชื้อกวางป่าในฤดูกาลที่แตกต่างกัน. วารสารวิจัย มข. 6:25-33.

สุจิตรา อาจริยะวัฒนกุล, เทวินทร์ วงษ์พระลับ, บัญญัติ เหล่าไพบูลย์ และ พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา. 2544. ผลของระดับเบต้าแคโรทีนในอาหารต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมือง. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 11:1-11.

เทวินทร์ วงษ์พระลับ, พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา, พิทักษ์ เผ่าผา, อดิศักดิ์ สังข์แก้ว, มังกร วงษ์ศรี และ มานิตย์ สนธิไชย. 2545. การเก็บรักษาน้ำเชื้อและคัพภะโคพื้นเมืองไทยโดยวิธีแช่แข็ง. รายงาน

การวิจัย. โครงการวิจัยจากทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ปีงบประมาณ 2542. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เทวินทร์ วงษ์พระลับ, พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา,บัญญัติ เหล่าไพบูลย์ และบุญตา ธรรมบุตร. 2546. ผลของระบบโรงเรือนต่อสมรรถภาพทางการสืบพันธุ์ของสุกรพ่อพันธุ์.แก่นเกษตร.31:110-118.

เทวินทร์ วงษ์พระลับ, วิทยา ฉินธิยานนท์, สนั่น เหลียงไพบูลย์, อารียา ทองประยูร, ทองใบ ยะวงษา, พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา, มนต์ชัย ดวงจินดา และบัญญัติ เหล่าไพบูลย์. 2547. การผสมเทียมในกวางป่า.การประชุมสัมมนาวิชาการเกษตรแห่งชาติ สาขาสัตวศาสตร์/สัตวบาล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา,วิทยา ฉินธิยานนท์,เทวินทร์ วงษ์พระลับ,สนั่น เหลียงไพบูลย์,ยุพิน ผาสุข และอารียา ทองประยูร. 2547. การควบคุมการเป็นสัดในกวางป่าโดยใช้ฮอร์โมนโพรสตาแกรนดิน เอฟ-2 –แอลฟา.การประชุมสัมมนา วิชาการเกษตรแห่งชาติ สาขาสัตวศาสตร์/สัตวบาล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

สุจิตรา อาจริยะวัฒนกุล, เทวินทร์ วงษ์พระลับ, วิศาส ศรีสุริยะ, พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา และ สัมฤทธิ์ แสนบัว. 2547. ผลของการเสริมออกซิโตซินในน้ำเชื้อเจือจางต่ออัตราการผสมติดและจำนวนลูกต่อครอกในสุกร.สุกรสาส์น 30: 67-74.

เทวินทร์ วงษ์พระลับ, พีรวิทย์ เชื้อวงษ์บุญ และพิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา. 2548. ผลของการเลี้ยงเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่โคร่วมกับตัวอ่อนต่อการมีชีวิตรอดของตัวอ่อนสุกรพื้นเมืองที่ผ่านการแช่แข็งแบบ vitrification. แก่นเกษตร33(3): (รอการตีพิมพ์เผยแพร่)

เทวินทร์ วงษ์พระลับ วิทยา ฉินชิยานนท์ สนั่น เหลียงไพบูลย์ อารียา ทองประยูร ทองใบ ยะวงษา พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา มนต์ชัย ดวงจินดา และ บัญญัติ เหล่าไพบูลย์. 2549. การผสมเทียมกวางป่าโดยกำหนดเวลาภายใต้การควบคุมการเป็นสัด. การประชุมสัมมนาวิชาการสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หน้า 405 – 412.

ธัญญา คงนวลอินทร์ เทวินทร์ วงษ์พระลับ และ บัญญัติ เหล่าไพบูลย์. 2549. อิทธิพลของอุณหภูมิน้ำดื่มต่อสมรรถภาพทางการผลิตของไก่ไข่ในช่วงฤดูร้อน. 2549. การประชุมสัมมนาวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 2 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หน้า 506 – 517.

พงศ์เทพ พลแสง และ เทวินทร์ วงษ์พระลับ. 2549 ผลการนวดปุ่มกระสันภายหลังการผสมเทียมต่ออัตราการผสมติดในแม่โค. การประชุมสัมมนาวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 2 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หน้า 426 – 433.

สมยศ เปสี เทวินทร์ วงษ์พระลับ และ พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา. 2549. การใช้มันสำปะหลังในสูตรอาหารพื้นฐานปลายข้าวต่อสมรรถนะการผลิตและคุณภาพซากของสุกรรุ่นและขุน. การประชุมสัมมนาวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 2 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หน้า 336 – 346.

สินีนาฎ พลแสง และ เทวินทร์ วงษ์พระลับ. 2549. ผลของการเปิดแถบบันทึกเสียงแม่สุกรต่อพฤติกรรมและสมรรถภาพทางการผลิตของลูกสุกรหย่านม. การประชุมสัมมนาวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 2 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หน้า 413 – 425.

สุนทร ทองดี และ เทวินทร์ วงษ์พระลับ. 2549. การเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแม่โคนมด้วยเทคนิคการฉีดฮอร์โมนโปรสตาแกลนดิน เอฟ ทู อัลฟา ทางโยนี. การประชุมสัมมนาวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 2 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น หน้า 582 – 590.

เด่นพงษ์ สาฆ้อง เทวินทร์ วงษ์พระลับ และ สหัส นุชนารถ. 2550. การพัฒนาของฟอลิเคิลในแม่กระบือปลัก. ประชุมวิชาการสัตวแพทยศาสตร์ ครั้งที่ 8. คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. หน้า 64-66.

เทวินทร์ วงษ์พระลับ บัญญัติ เหล่าไพบูลย์ พิชรัตน์ แสนไชยสุริยา สจี กัณหาเรียง และ ยุพิน ผาสุข. 2550. การศึกษาผลการผสมติดจากการผสมเทียมโดยน้ำเชื้อไก่พื้นเมือง. ประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 3. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ร่วมกับ กรมปศุสัตว์ และสมาคมสัตวบาลแห่งประเทศไทย. หน้า 180-187.

เทวินทร์ วงษ์พระลับ บัญญัติ เหล่าไพบูลย์ พิชรัตน์ แสนไชยสุริยา สจี กัณหาเรียง และ ศราวุธ ศรีงาม. 2550. ผลของชนิดน้ำเชื้อเจือจาง และชนิด cryoprotectant ต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่เก็บรักษา. ประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 3. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ร่วมกับ กรมปศุสัตว์ และสมาคมสัตวบาลแห่งประเทศไทย. หน้า 188-195.

เทวินทร์ วงษ์พระลับ ยุพิน ผาสุก บัญญัติ เหล่าไพบูลย์ จุฬานีย์ น่วมจิต และ พรจิต สอนสีดา. 2550. ผลของชนิดน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่. ประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 3. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ร่วมกับ กรมปศุสัตว์ และสมาคมสัตวบาลแห่งประเทศไทย. หน้า 196-203.

ชโลธร อัมพร และ เทวินทร์ วงษ์พระลับ. 2551. ระดับฮอร์โมน FSH ที่มีผลต่อการตอบสนองการตกไข่และคุณภาพตัวอ่อนในโคพื้นเมืองไทย. การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ครั้งที่ 4 ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นร่วมกับกรมปศุสัตว์ และสมาคมสัตวบาลแห่งประเทศไทย. หน้า 144-147.

ดำรงรักษ์ รักวงษ์ฤทธิ์ เทวินทร์ วงษ์พระลับ และยุพิน ผาสุข. 2551. ผลของการตัดแบ่งและวิธีแช่แข็งต่อคุณภาพตัวอ่อนโคนม. การประชุมวิชาการครั้งที่ 46 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาสัตว์และสาขาสัตวแพทย์. หน้า 91-98.

เทวินทร์ วงษ์พระลับ และ ยุพิน ผาสุข. 2551. ความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อแช่แข็งในไก่พื้นเมือง. การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ครั้งที่ 4 ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่นร่วมกับกรมปศุสัตว์ และสมาคมสัตวบาลแห่งประเทศไทย. หน้า 127-130.

Simaraks, S. and T. Vongpralub. 1987. Artificial Insemination in Chinese Geese. Thai J. Agric. Sci. 20:65-75.

Vongpralub, T and F. Koyanagi. 1994. Effect of oxytocin on sperm molityty and invitro fertilization in the mouse. Animal Science and Technology (Japan) 65:695-700.

Vongpralub, T. and F. Koyanagi. 1994. Effects of oxytocin and granulosa all co-culture on the development of mouse one-cell stagee embryos. J. Mann. Ova. Res.

Worapol Aengwanich, Udom Chuachan, Yupin Phasuk, Thevin Vongpralab, Parwadee Pakdee, Suporn Katavetin and Suchint Simaraks. 2003. Effect of Ascobic Acid on Respiratory rate, Body Temperature, Heterophil: Lymphocyte Ratio and Microscopic Lession Score in Lung, Liver, Kidney, Cardiac Muscle and Spleen in Broilers under Heat Stress. Thai Journal Agriculture Science.36(2):207-218.

Worapol Aengwanich, Pornchai Sridama, Yupin Phasuk, Thevin Vongpralab, Parwadee Pakdee, Suporn Katavetin and Suchint Simaraks. 2003. Effect of Ascobic Acid on Cell mediated, humoral immune response and phathophysiology of white blood cell in broilers under heat stress. Songklanakarin Journal Science Technology.23(3): 297 – 305.

W. Aengwanich, P. Sridama, Y. Phasuk, T. Vongpralup, P. Pakdee, S. Katawatin and S. Simaraks. 2003. Effects of ascorbic acid on cell mediated, humoral immune response and pathophysiology of white blood cell in broilers under heat stress. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 25(3): 297-305.

W. Aengwanich, U. Chuachan, Y. Phasuk, T. Vongpralup, P. Pakdee, S. Katawatin and S. Simaraks. 2003. Effects of ascorbic acid on respiratory rate, body temperature, heterophil: lymphocyte ratio and microscopic lesion score in lung, liver, kidney, cardiac muscle and spleen in broilers under chronic heat stress. Thai Journal Agricultural Science. 36(2): 207-218.

W. Aengwanich, Y. Phasuk, T. Vongpralup, P. Pakdee, S. Katawatin and S. Simaraks. 2003. Physiological adaptation and effects of ascorbic acid on adaptation in broilers under heat stress. Thai Journal Agricultural Science. 36(3): 225-232.

Chumpawadee, S., K. Sommart, T. Vongpralup and V. Pattarajida. 2004. Effects of synchronizing the rate of degradation rate of dietary energy and nitrogen release on

digestibility, rumen fermentation and average daily gain in Brahman beef cattle. In : The 11th AAAP Animal Science Congress – 2004, The Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. Kuala Lumpur, Malaysia. 2, 364-366.

Jumpawadee, S., K. Sommart, T. Vongpralab and V. Pattarajinda. 2005. Estimating rumen undegradable protein with In situ nylon bug and In vitro enzymatic techniqul in tropical concentrate feedstuffs. Walailuk J. Sci and Tech. 2(1):23-33.

Sangkaew, A. , P. Saengsriraong, P. Suwantada and S. Sringam. 2005. Effect of dimethylsulfoxide (DMSO) on cryopreserved Thai cock semen. The 12th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction, Chaingmai, 2 – 4 August 2005. Abstracts.

Sringams, S. , A. Sangkaew, B. Laopiboon, M. Duangjinda and T. Vongpralab. 2005. Comparison of different diluents on semen quality of Thai native cook. The 12th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction, Chaingmai, 2 – 4 August 2005. Abstracts.

Chumpawadee, S. , K. Sommart, T. Vongpralup and V. Pattarajida. 2006. Effects of Synchronizing the rate of Dietary Energy and Nitrogen Release on Ruminal Fermentation, Microbial Protein Synthesis, Blood Urea Nitrogen and Nutrient Digestibility in Beef Cattle. Asian-Australasian Journal of Animal Science. 19(2): 181-188.

Chumpawadee, S. , K. Sommart, T. Vongpralup and V. Pattarajida. 2006. Effects of synchronizing the rate of degradation of dietary energy and nitrogen release on growth performance in Brahman cattle. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 28(1): 59-70.

ประชุมวิชาการนานาชาติ:

Chumpawadee, S. , K. Sommart, T. Vongpralup and V. Pattarajida. 2004. Effects of synchronizing degradation rate of dietary energy and nitrogen release on growth performance, microbial protein synthesis and blood urea nitrogen in beef cattle. In: The 11th AAAP Animal Science Congress – 2004, The Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. Kuala Lumpur, Malaysia. 3, 364-366.

Chumpawadee, S. , K. Sommart, T. Vongpralup and V. Pattarajida. 2004. Effects of synchronizing the rate of degradation of dietary energy and nitrogen release on

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

growth performance in Brahman beef cattle. In Proceeding The agricultural Annual conference 2004, Khon kaen University, Khon Kaen, Thailand.

Chumpawadee, S., K. Sommart, T. Vongpralup and V. Pattarajida. 2005. Nutritional evaluation of crop residues and selected roughages for ruminant using *in vitro* gas production technique. In: Proceeding Integrating Livestock-crop systems to meet the challenges of globalization. Vol. 2. P53. AHAT/BSAS International Conference. Thailand.

Chumpawadee, S. , K. Sommart, T. Vongpralup and V. Pattarajida. 2005. Ruminal undegradable protein of tropical feed stuffs using nylon bag and enzymatic techniques. In Proceeding The Agricultural Annual conference 2005, Khon kaen University, Khon Kaen, Thailand.

Sangkaew, A. , P. Saengsriraong, P. Suwantada and S. Sringam. 2005. Effect of dimethylsulfoxide (DMSO) on cryopreserved Thai cock semen. The 12th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction, Chaingmai, Thailand.

Sringams, S., A. Sangkaew, B. Laopiloon, M. Duangjinda and T. Vongpralup. 2005. Comparison of different diluents on semen quality of Thai native cock. The 12th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction, Chaingmai, Thailand.

T. Vongpralup and W. Chinchiyanonda. 2005. Effect of serum source on bovine embryo development *in vitro*. The 12th International Congress on Biotechnology in Animal Reproduction, Chaingmai, Thailand.

6.4 งานวิจัยที่กำลังทำ :

การปรับปรุงพันธุ์ไก่พื้นเมืองไทยประดู่หางดำและชีด้วยดัชนีการคัดเลือก (ปีงบประมาณ 2550 – 2553) แหล่งทุนจาก สกว. (ผู้ร่วมวิจัย)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี