



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง
และการผสมเทียมในไก่พื้นเมือง”

โดย เทวินทร์ วงษ์พระลับ และ ยุพิน ผาสุข

กันยายน 2550

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง
และการผสมเทียมในไก่พื้นเมือง”

คณะผู้วิจัย

1. รศ.ดร.เทวินทร์ วงษ์พระลับ
2. ผศ.ดร.ยุพิน ผาสุข

สังกัด

ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น
ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ชุดโครงการ “การพัฒนาไก่พื้นเมือง”

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

คำนำ

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง และการผสมเทียม นับได้ว่าเป็นเทคโนโลยีทางการสืบพันธุ์ที่มีประโยชน์ และมีประสิทธิผลในแง่การเป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์อย่างแท้จริงที่สุด การปรับปรุงพันธุ์โคนมที่ก้าวหน้ามาจนถึงปัจจุบันนี้นับได้ว่าเป็นตัวอย่างที่ประจักษ์ชัดที่สุดของประโยชน์ที่ได้รับจากเทคโนโลยีการผสมเทียม นอกจากนี้ประโยชน์ที่เกิดขึ้นในเชิงการค้าแล้ว เทคโนโลยีน้ำเชื้อแช่แข็งและการผสมเทียม ยังเป็นประโยชน์ในเชิงอนุรักษ์เพื่อรักษาพันธุกรรมของสัตว์ที่ใกล้สูญพันธุ์ (Endanger species) ตลอดจนการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์พื้นเมือง (Indigenous) เพื่อคงความหลากหลายทางชีวภาพ (Biodiversity)

ร่างรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์นี้เรียบเรียงจากเอกสารงานวิจัยที่ได้มีการศึกษาในไก่ของต่างประเทศ ผลที่ได้จากการศึกษาในโครงการนี้รวมทั้งประสบการณ์ในการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับไก่พื้นเมืองของผู้เขียนเอง

ผู้เขียนหวังเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์ต่อผู้อ่าน ยังประโยชน์ต่อการอนุรักษ์และปรับปรุงพันธุกรรมไก่พื้นเมือง อันเป็นสัตว์คู่บ้านคู่เมืองที่พึ่งพิงในแง่ความเป็นแหล่งอาหารโปรตีนของประชาชนรากหญ้าสืบไป

เทวินทร์ วงษ์พระลับ

ยุพิน ผาสุข

คำขอบคุณ

ผู้เขียนขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ได้สนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัย การพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งและการผสมเทียมในไก่พื้นเมือง ขอขอบคุณ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้การสนับสนุนสถานที่ในการวิจัย และจัดฝึกอบรมฯ และขอขอบคุณ คุณสุภามาส บุญคุ้ม ที่ได้ช่วยจัดพิมพ์เอกสารในครั้งนี้

เทวินทร์ วงษ์พระลับ

ยุพิน ฝาสุข

สารบัญ

หัวข้อ	เลขหน้า
บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร	1
บทคัดย่อ	3
Abstract	5
บทนำทั่วไป	7
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	19
งานวิจัย 1 ผลของชนิดน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่อพื้นเมือง	20
งานวิจัย 2 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่อพื้นเมืองต่ออัตราการผสมติด	29
งานวิจัย 3 ความทนต่อกระบวนการแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อของอสุจิไก่อพื้นเมือง	38
งานวิจัย 4 การศึกษาเปรียบเทียบผลของ Cryoprotectants ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไก่อภายใต้การเก็บรักษา	45
งานวิจัย 5 การศึกษากรรมวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งที่เหมาะสมภายใต้สภาพสนามในไก่อพื้นเมือง	54
งานวิจัย 6 ผลของกลัยซีนต่ออสุจิในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่อพื้นเมืองแบบแช่แข็ง	81
งานวิจัย 7 ผลของระยะเวลาภายหลังการวางไข่ต่ออัตราการผสมติดและฟักออกในไก่อพื้นเมืองที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง	87
งานวิจัย 8 ผลของความลึกของการสอดไซริงค์ในการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งต่ออัตราการผสมติดและฟักออกในไก่อพื้นเมือง	94
งานวิจัย 9 ผลของจำนวนอสุจิและปริมาตรน้ำเชื้อในการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแบบแช่แข็งต่ออัตราการผสมติดและฟักออกในไก่อพื้นเมือง	99
งานวิจัย 10 ความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่อพื้นเมือง	107
สรุปผลการศึกษาภาพรวม	113
ภาคผนวก	

บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร

ไก่พื้นเมืองเป็นสัตว์ที่มีอยู่คู่บ้านคู่เมืองปรับตัวได้ดีในสภาพแวดล้อมของประเทศ นับเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญโดยเฉพาะสำหรับประชาชนในเขตชนบท มีบทบาทเป็นแหล่งโปรตีนที่เข้าถึงง่าย ก่อให้เกิดรายได้ภายใต้การพึ่งพาปัจจัยการผลิตภายในครัวเรือน กระบวนการผลิตยังเป็นอิสระอยู่ในมือของครอบครัวและชุมชน จึงพบเห็นการเลี้ยงไก่พื้นเมืองในหมู่ประชาชนระดับรากหญ้าอย่างกว้างขวาง ไก่พื้นเมืองจึงมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจระดับครัวเรือนและชุมชนเป็นอย่างสูง

ไก่พื้นเมืองเป็นสัตว์ที่สืบเชื้อสายมายาวนานในท้องถิ่น ยังคงมีความหลากหลายทางชีวภาพ หากได้มีการศึกษาวิจัยและจัดการอย่างเป็นระบบ จากจุดเด่นทางพันธุกรรมด้านรสชาติของเนื้อและความแข็งแรงทนทาน อาจสามารถใช้ประโยชน์ในการผลิตเชิงพาณิชย์ โดยเฉพาะในระบบการผลิตสัตว์อินทรีย์ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันเสถียรภาพทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองได้ถูกคุกคามจากปัจจัยหลายด้าน อันเป็นอันตรายต่อความหลากหลายทางชีวภาพของไก่พื้นเมือง โดยเฉพาะอย่างยิ่งมาตรการทำลายสัตว์ปีกเพื่อควบคุมโรคไข้หวัดนก ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องดำเนินการด้านการอนุรักษ์พันธุกรรมไก่พื้นเมืองดังกล่าว การอนุรักษ์พันธุกรรมในรูปแบบน้ำเชื้อแช่แข็งเป็นวิธีการหนึ่งในการอนุรักษ์พันธุกรรมของสัตว์ปีก และเป็นรูปแบบที่มีประสิทธิภาพที่สุดของเทคโนโลยีทางการสืบพันธุ์ในสัตว์ปีกปัจจุบัน อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งในสัตว์ปีกต่างชนิดหรือต่างสายพันธุ์กันก็ให้ผลที่แตกต่างกันไป สำหรับในไก่พื้นเมืองไทยยังขาดข้อมูลดังกล่าว ดังนั้นการศึกษาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งและการผสมเทียมในไก่พื้นเมืองจึงมีความสำคัญและเป็นพันธกิจที่จะยังประโยชน์ในด้านการอนุรักษ์สายพันธุ์ไก่พื้นเมืองไทย อีกทั้งองค์ความรู้ในการวิจัย อาจนำไปปรับใช้ประโยชน์สนับสนุนงานด้านการปรับปรุงพันธุ์ไก่ และสัตว์ปีกชนิดอื่นในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกของไทยได้

งานวิจัยโครงการ “การพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งและการผสมเทียมในไก่พื้นเมือง” นี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้เทคนิคที่มีประสิทธิภาพและสะดวกต่อการนำไปใช้จริงสำหรับการเก็บน้ำเชื้อแบบแช่แข็งและการผสมเทียมในไก่พื้นเมือง โดยได้ดำเนินกิจกรรมหลักดังนี้ คือ

การศึกษาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่พื้นเมือง โดยได้ดำเนินกิจกรรมรองในการศึกษาหลายกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาเปรียบเทียบผลของชนิดน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพและความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อสดที่เก็บรักษา, ความแตกต่างในการทนได้ของอสุจิต่อกระบวนการแช่แข็งและละลายในไก่พื้นเมือง, การศึกษาผลของชนิดและระดับสารที่ใช้ในการป้องกันความเสียหายของอสุจิในกระบวนการแช่แข็ง (Cryoprotectant, CPA), การศึกษาวิธีการในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง, ตลอดจนการปรับปรุงสูตรน้ำยาเจือจางภายใต้หัวข้อผลของกลัยซีนต่ออสุจิในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่พื้นเมือง จากผลการศึกษาในหัวข้อข้างต้นทำให้ทราบว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่นิยมใช้กันในปัจจุบันให้ผลต่ออัตราการผสมติดไม่แตกต่างกัน หากเจือจางน้ำเชื้อแล้วผสมเทียมโดยไม่เก็บรักษา

น้ำเชื้อ แต่เมื่อทำการเก็บน้ำเชื้อเจือจางเป็นเวลา 1-2 วัน พบว่าคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดต่ำลง นอกจากนี้ยังพบว่า CPA ทุกชนิดเป็นพิษต่ออสุจิ และเป็นพิษมากยิ่งขึ้นเมื่อความเข้มข้นที่ใช้สูงขึ้น จากการศึกษาเทคนิคการแช่แข็งพบว่า เทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่สะดวกและมีประสิทธิภาพคือ วิธีการแช่แข็งโดยการวางหลอดบรรจุน้ำเชื้ออังไอโนโตรเจนเหลวภายใต้สุตรน้ำยา Schramm และเมื่อเสริมกลัยซีนในน้ำยาเจือจาง พบว่าทำให้น้ำเชื้อแช่แข็งมีคุณภาพดียิ่งขึ้น

กิจกรรมหลักลำดับต่อไปเป็นการศึกษาเทคนิคในการผสมเทียมแม่ไก่พื้นเมืองด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยได้ศึกษาถึงผลของระยะเวลาภายหลังการวางไข่ต่ออัตราการผสมติดและฟักออก, ผลของควมลึกของการสอดไข่รังค์ในการผสมเทียมต่ออัตราการผสมติดและฟักออก, ผลของจำนวนอสุจิและปริมาณน้ำเชื้อต่ออัตราการผสมติดและฟักออก และการศึกษาเปรียบเทียบความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของพ่อพันธุ์ของพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ต่างๆ 4 สายพันธุ์

จากการศึกษาดังกล่าว พบว่าการผสมเทียมแม่ไก่พื้นเมืองด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง ไม่ควรดำเนินการภายหลังการวางไข่เสร็จใหม่ ในการผสมเทียมควมลึกในการสอดไข่รังค์ให้ผลไม่แตกต่างกัน การผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งควรใช้จำนวนอสุจิและปริมาณน้ำเชื้อที่มาก และพบว่าน้ำเชื้อของไก่พ่อพันธุ์แต่ละตัวมีความแตกต่างกัน โดยไม่เกี่ยวข้องกับสายพันธุ์

จากการวิจัยครั้งนี้คาดว่าผู้ที่สนใจสามารถนำความรู้จากผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งและการผสมเทียมไก่พื้นเมืองได้โดยสามารถดำเนินการภายใต้การใช้เครื่องมืออุปกรณ์ที่ไม่ซับซ้อน

บทคัดย่อ

ไวก์พื้นเมืองเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญต่อสังคมชนบทและเศรษฐกิจพื้นฐานของประเทศ สายพันธุ์ของไวก์พื้นเมืองได้ลดจำนวนลง การอนุรักษ์พันธุ์กรรมเพื่ออนุรักษ์สายพันธุ์และคงความหลากหลายทางชีวภาพจึงเป็นภารกิจที่มีความสำคัญ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้เทคนิคที่มีประสิทธิภาพ และสะดวกต่อการนำไปใช้จริงสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งและการผสมเทียมในไวก์พื้นเมืองโดยได้ดำเนินการศึกษาหัวข้อการวิจัยต่างๆ ในประเด็นที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคในการแช่แข็งและการผสมเทียม

ดำเนินการศึกษาผลของน้ำยาเจือจาง 5 ชนิด (prefreezing Lake, Tselutin, Schramm, BPSE และ IGGKPh) ต่อคุณภาพน้ำเชื้อไวก์ อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการรอดชีวิต พบว่าน้ำยาให้ผลต่ออัตราการผสมติดภายหลังการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อเจือจางไม่แตกต่างกัน

ศึกษาผลของชนิดน้ำยาเจือจาง 5 ชนิด (prefreezing Lake, Tselutin, Schramm, BPSE และ IGGKPh) ต่ออัตราการเคลื่อนที่และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิ เมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชม. ที่ 5 °ซ พบว่าน้ำยา IGGKPh ให้ผลดีที่สุด และเมื่อศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อในน้ำยา IGGKPh ต่ออัตราการผสมติด พบว่าน้ำเชื้อเจือจางที่เก็บรักษาเป็นเวลา 24 และ 48 ชม. ให้อัตราการผสมติดต่ำกว่าน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อเจือจาง

อสุจิของไวก์พื้นเมืองแต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการรอดชีวิตภายหลังการแช่แข็งไม่แตกต่างกัน แต่พ่อพันธุ์แต่ละตัวในแต่ละสายพันธุ์ให้อัตราการรอดชีวิตภายหลังการแช่แข็งและละลายที่แตกต่างกันมาก

Cryoprotectant 3 ชนิด คือ dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethyl acetamide (DMA) และ dimethyl formamide (DMF) เป็นพิษต่ออสุจิไวก์พื้นเมืองไม่แตกต่างกัน และเป็นพิษรุนแรงขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น

เทคนิคการแช่แข็งที่มีประสิทธิภาพภายใต้การใช้อุปกรณ์แบบประหยัด คือ เทคนิคภายใต้การลดอุณหภูมิโดยวางหลอดน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยา Schramm โดยมี DMA ร้อยละ 6 แช่แข็งโดยวางอังไอน์โตรเจนเหลวที่ระดับอุณหภูมิ -35 °ซ เป็นเวลา 10 นาที และย้ายไปวางทำที่ระดับ -135 °ซ นาน 10 นาที ก่อนจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว และการละลายใช้อุณหภูมิละลายที่ 2-5 °ซ

ดำเนินการศึกษาผลของการเสริมกลัยซีนในน้ำยาต่ออัตราการเคลื่อนที่และอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแช่แข็ง ผลปรากฏว่ากลัยซีนมีผลต่ออัตราการผสมติดและกลัยซีนระดับ 40 มิลลิโมล ให้อัตราการผสมติดสูงสุด (ร้อยละ 71)

สำหรับเทคนิคในการผสมเทียมแม่ไวก์พื้นเมืองด้วยน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไวก์พื้นเมืองนั้น พบว่าไม่ควรผสมเทียมในช่วงที่ภายหลังที่แม่ไวก์วางไข่ใหม่ ความลึกในการผสมเทียมในช่องคลอดระดับ 3

และ 6 ซม. ให้ผลไม่ต่างกัน การผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อปริมาตร 0.4 มล. จำนวนอสุจิ 600 ล้านตัวขึ้นไป มีความเหมาะสมที่สุด ให้อัตราการผสมติดและฟักออกในระดับที่น่าพอใจ

เมื่อนำน้ำเชื้อที่แช่แข็งที่ได้จากการรีดเก็บจากพ่อพันธุ์แบบสุ่มในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ต่างๆ ไปผสมเทียมเพื่อทดสอบอัตราการผสมติด พบว่ามีอัตราการผสมเทียมโดยเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 42.10, 59.05, 47.37, 28.85 และ 39.05 ในพันธุ์โรดไอส์แลนด์เรด ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว ซี แดง และประดู่ ตามลำดับ ไม่แตกต่างกันในทางสถิติ โดยมีความแปรปรวนสูงภายในแต่ละสายพันธุ์

คำสำคัญ: ความสมบูรณ์พันธุ์, น้ำเชื้อแช่แข็ง, การผสมเทียม, ไก่พื้นเมือง

Abstract

Native chickens are still important to rural community and economy of the country. But number of their breed lines have declined, conservation and maintaining diversity of their species therefore are important. Objective of this research is to generate simple but effective technique for freezing and maintaining semen and artificial insemination in native chickens. Series of experiments related to semen freezing and artificial insemination were conducted.

Effects on semen quality of five semen extenders (prefreezing Lake, Tselutin, Schramm, BPSE and IGGKPh) were tested. There was no significant different of the five extenders on fertility after artificial insemination.

The effect of various diluents (prefreezing Lake, Tselutin, Schramm, BPSE and IGGKPh) on sperm motility and viability after storage of 48 h at 5°C were also determined. It was established that IGGKPh was the best diluent. Diluted semen with IGGKPh was stored at 5 °C for 24 and 48 h and fertility was tested. Fresh semen and fresh diluted semen were served as control. Store semen groups gave lower fertility than that of control groups.

No significant different of post-thaw spermatozoa motility and viability of the native chickens, Luang hang Kaow, Klasee and Rhode Island Red. However there were considerable variation of motility and viability of post-thaw spermatozoa among males in each breed line.

There was no different deleterious effect on spermatozoa of three cryoprotectants , dimethylsulfoxide (DMSO), dimethylacetamide (DMA) and dimethylformamide (DMF). Deleterious effect increased as concentration of the cryoprotectant concentration increased.

Simple and effective technique for cryopreservation was by using Schramm extender with 6% DMA. Straws containing diluted semen were rotated on liquid nitrogen vapor at -35°C for 10 minutes, then at -135°C for 10 minutes before putting them into liquid nitrogen. Thawing temperature was 2 - 5°C.

Effect of addition of glycine to freezing medium glycine on post – thaw motility and fertility of frozen semen were evaluated. The results showed that glycine had beneficial effect on fertility of chicken frozen semen and glycine at concentration of 40 mM. yielded highest fertility (71%)

Artificial insemination by using thawed frozen semen should not be done right after egg laying. Semen deposition in vagina at the dept of 3 to 6 centimeters yielded no different in fertility. Volume of 0.4 ml. with 600 million spermatozoa in each dose of artificial insemination gave satisfactory fertility and hatchability.

Random test for fertility by using frozen semen in native chicken, Luang Hang Kaow, Chee, Dang and Phadue, fertility rate were not significantly different among these breed lines (42.1,59.05,47.37,28.85 and 39.05 respectively). However there was high variation among individual male with in a breed line.

Keywords: fertility, frozen semen, artificial insemination, native chicken

บทนำทั่วไป

ความสำคัญของทรัพยากรทางพันธุกรรมของสัตว์รวมถึงสัตว์ปีกเป็นประเด็นที่มีความสำคัญอย่างเห็นพ้องต้องกันในที่ประชุมระดับสากล (Woelders et al., 2006) มีการประเมินว่าพันธุ์ของสัตว์ปีกที่เป็นสัตว์เลี้ยงประมาณครึ่งหนึ่งได้สูญหายจากโลกไปแล้ว (Dohner, 2001) ในสหรัฐอเมริกาพบว่าการสูญเสียพันธุกรรมของสัตว์ปีกทั้งในระบบการค้าและพันธุ์ที่อยู่นอกระบบการค้า (Blackburn, 2006) ในยุโรปเองได้ประสบปัญหาและตระหนักถึงวิกฤตทางพันธุกรรมของสัตว์ปีกนี้เช่นเดียวกัน (Woelders et al., 2006) โดยมีการจัดตั้งศูนย์อนุรักษ์พันธุกรรมและความหลากหลายทางชีวภาพของสัตว์รวมถึงสัตว์ปีกขึ้น

สำหรับไก่พื้นเมืองไทยนับเป็นสัตว์เลี้ยงที่มีอยู่คู่มานานแล้ว โดยเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญในครัวเรือนสนองต่อความต้องการในบทบาทการเป็นแหล่งอาหารของประชาชนอย่างกว้างขวางเป็นที่ประจักษ์ชัดโดยเฉพาะประชาชนในระดับรากหญ้า เนื่องจากไก่พื้นเมืองเป็นสัตว์ที่เลี้ยงง่ายต้องการปัจจัยการผลิตต่ำ กระบวนการผลิตทุกขั้นตอนยังเป็นอิสระอยู่ในมือของครัวเรือนและชุมชน มีการพึ่งพาปัจจัยภายนอกครัวเรือนต่ำ ดังนั้นจึงพบเห็นการเลี้ยงไก่พื้นเมืองในชนบทแทบทุกครัวเรือน ไก่พื้นเมืองจึงมีความสำคัญต่อเศรษฐกิจระดับครัวเรือนและชุมชนเป็นอย่างสูง สวัสดิ์ (2540) คาดว่าไก่พื้นเมืองมีประชากรประมาณ 200 ล้านตัว ส่วนเกรียงไกร และคณะ (2543) ประเมินว่า ประชากรของไก่พื้นเมืองมีประมาณ 90–120 ล้านตัว ก่อให้เกิดมูลค่าทางเศรษฐกิจประมาณ 5.4-7.2 พันล้านบาท กรมปศุสัตว์ (2550) โดยศูนย์สารสนเทศ ได้รายงานว่ ไก่พื้นเมืองในประเทศมีประมาณ 63 ล้านตัว อยู่ในการครอบครองของเกษตรกรเกือบ 3 ล้านครัวเรือน ซึ่งประมาณครึ่งหนึ่งอยู่ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ไก่พื้นเมืองจึงมีส่วนใกล้ชิดในบทบาทเสริมสร้างความยั่งยืนทางเศรษฐกิจให้กับครอบครัวและชุมชนชนบท ไก่พื้นเมืองซึ่งเป็นสัตว์ที่สืบเชื้อสายมายาวนานในท้องถิ่น ปรับตัวได้ดีในระบบการผลิตในไร่นา ดังกล่าวนมาแล้ว ยังคงความหลากหลายทางชีวภาพ มีความมั่นคงทางพันธุกรรมในระดับหนึ่ง หากมีการศึกษาวิจัยและจัดการอย่างเป็นระบบ อาจสามารถใช้ประโยชน์ในการผลิตเชิงพาณิชย์ โดยเฉพาะในระบบปศุสัตว์อินทรีย์ อย่างไรก็ตามในปัจจุบัน เสถียรภาพทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองได้ถูกคุกคามจากหลายด้าน ได้แก่ การนำเข้าพันธุ์ไก่ชนจากต่างประเทศของนักธุรกิจและผู้นิยมกีฬาไก่ชน ซึ่งจะทำลายความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมืองลงไป และนอกจากนี้ภาวะคุกคามของโรคระบาดในสัตว์ปีก เช่น ไข้หวัดนก เป็นต้น เป็นการคุกคามต่อความหลากหลายทางพันธุกรรมไก่พื้นเมืองที่สำคัญ เนื่องจากในระบบการป้องกันการแพร่ระบาด ซึ่งในทางปฏิบัติจำเป็นต้องมีการทำลายไก่พื้นเมืองจำนวนมาก ดังนั้นทุกภาคส่วนของไทยจึงควรมีการกำหนดยุทธศาสตร์ ยุทธวิธีที่เป็นจริงร่วมกันเพื่ออนุรักษ์พันธุ์ไก่พื้นเมืองไทย

ในสัตว์ปีกนอกเหนือจากการอนุรักษ์โดยการคงฝูงพันธุ์ (in situ) ไว้แล้ว การเก็บรักษาพันธุกรรมภายนอกตัวสัตว์ (ex situ) ตัวอย่างเช่นการเก็บรักษาพันธุกรรมในรูปแบบน้ำเชื้อแช่แข็ง

นับเป็นวิธีการที่มีประสิทธิผลที่สุดในสัตว์ปีก ทั้งนี้เนื่องจากการเก็บรักษาพันธุ์กรรมในรูปแบบตัวอ่อนแช่แข็ง และไข่แช่แข็งยังประสบปัญหาและมีค่าใช้จ่ายสูง (Blesbois, 2007)

ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงควรมีการศึกษาวิจัยถึงวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองโดยการแช่แข็งให้มีประสิทธิภาพ เพื่อใช้เป็นเครื่องมือหนึ่งในการอนุรักษ์สายพันธุ์ไก่พื้นเมือง ตลอดจนช่วยในการกระจายพันธุ์กรรมไก่พื้นเมืองที่ตีเด่นจากการปรับปรุงพันธุ์ให้คงอยู่และแพร่กระจาย เพื่อประโยชน์ในทางเศรษฐกิจในอนาคตได้ อีกทั้งองค์ความรู้จากการวิจัยครั้งนี้อาจนำไปปรับใช้ประโยชน์ สนับสนุนงานด้านการปรับปรุงพันธุ์ไก่และสัตว์ปีกชนิดอื่นในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกของประเทศได้เช่นกัน

ความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อแช่แข็ง

โดยทั่วไปแล้วอัตราการผสมติดจากน้ำเชื้อแช่แข็งในสัตว์ปีกจะต่ำกว่าร้อยละ 30 (Fulton, 2006) ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดสัตว์ (Blesbois, 2007) โดยค่าเฉลี่ยของอัตราการผสมติดในไก่ ไก่วง และห่าน เท่ากับร้อยละ 60 (0-90), 30 (0-65) และ 60 (0-70) ตามลำดับ (Blesbois, 2007) โดยมีความแตกต่างกันระหว่างพันธุ์ และสายพันธุ์ (Ansah and Buckland, 1983; Brillard et al., 2003) ในกลุ่มไก่เล็ดชิด (Bacon et al., 1986; Kirby et al., 1998) และในไก่พื้นเมืองจะมีอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแช่แข็งต่ำกว่าไก่ทางการค้า (Blesbois et al., 2005) พันธุ์กรรมของสัตว์จึงนับว่ามีผลต่อคุณภาพการรอดชีวิตภายหลังการแช่แข็งและละลายหรือความทนต่อการแช่แข็ง (freezability) คุณสมบัติดังกล่าวนี้ขึ้นกับองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ของสัตว์ปีกแต่ละชนิด แต่ละสายพันธุ์ ซึ่งมีคุณสมบัติที่ต่างกัน (Blanco et al., 2001; Blesbois et al., 2005; Blesbois et al., 2007) และส่งผลต่อระดับการถูกทำลายภายหลังการแช่แข็งที่ต่างกันไป ซึ่งพบว่า ATP ภายในเซลล์ของสัตว์ปีกภายหลังการแช่แข็งระดับที่ต่างกัน (Long, 2006) และมีระดับสัดส่วนของ cholesterol/ phospholipids เป็นตัวบ่งชี้ถึงระดับ freezability (Blesbois et al., 2005)

เทคนิคการรีดน้ำเชื้อ

เทคนิคในการรีดเก็บน้ำเชื้อไก่ก็มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อเช่นกัน ในการรีดน้ำเชื้อควรกระตุ้นพ่อพันธุ์และการรีดเก็บเพียงครั้งเดียวในการรีดแต่ละวัน หากรีดซ้ำในคราวเดียวกันจะมีสิ่งคัดหลั่งจากบริเวณใกล้เคียงปนลงไปในน้ำเชื้อ ซึ่งมีผลเสียต่ออสุจิ (Sexton, 1988) น้ำเชื้อที่ปนเปื้อนด้วยมูลจะไม่นำไปใช้ ควรมีการกำจัดสิ่งปลอมปนต่างๆ ออกก่อนการเจือจาง (Brillard, 1995) และการมี urea ปนอยู่ในปริมาณมากจะทำให้น้ำเชื้อมีคุณภาพต่ำ (Blanco et al., 2001) คุณภาพเบื้องต้นของน้ำเชื้อมีผลต่อการเก็บรักษา น้ำเชื้อที่จะนำไปใช้จึงต้องมีคุณภาพดี กล่าวคือ มีอสุจิที่แข็งแรง เคลื่อนที่ได้เป็นจำนวนมาก และมีความเข้มข้นสูง (Tajima et al., 1989; Buss, 1993; Thurston, 1995; Blesbois et al., 2007) ภายหลังการรีดต้องดำเนินการเจือจางน้ำเชื้อโดยเร็วภายใน 10-15 นาที (Sexton, 1977; Van Voorst and Leenstra, 1995) การเจือจางในเวลาอันรวดเร็วจะทำให้น้ำเชื้อที่ได้มีคุณภาพดีกว่าการดำเนินการที่ช้ากว่า (Park and McDaniel, 2006)

ความบ่อยครั้งในการรีดน้ำเชื้อมีผลต่อคุณภาพภายหลังการแช่แข็งโดย Van Voorst and Leenstra (1995) รายงานว่าในการรีดเก็บน้ำเชื้อเพื่อทำน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่ โดยรีดติดต่อกัน 4 วัน นั้น น้ำเชื้อที่รีดในวันที่ 3 และ 4 ให้อัตราการผสมติดดีกว่าน้ำเชื้อที่รีดและทำน้ำเชื้อแช่แข็งในวันที่ 1 และ 2 ซึ่งคณะผู้วิจัยดังกล่าวมีความเห็นว่าน่าจะเกิดจากการที่ไก่ไม่มี epididymis กักเก็บอสุจิที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นน้ำเชื้อในช่วงแรกจึงเป็นน้ำเชื้อเก่า โดยทั่วไปแล้วการรีดน้ำเชื้อฟอพันธุ์ไก่เพื่อนำมาเก็บรักษาแบบแช่แข็งจะรีดเก็บเป็นประจำ สัปดาห์ละ 2-3 ครั้ง (Chalah et al., 1999; Tselutin et al., 1999) อายุฟอพันธุ์มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ ส่วนใหญ่แล้วมักใช้ฟอพันธุ์ที่อยู่ในช่วงอายุ 7-12 เดือน (Van Voorst and Leenstra, 1995; Kirby et al., 1998)

การเจือจางน้ำเชื้อ

วัตถุประสงค์ในการเจือจางน้ำเชื้อ คือ เพื่อให้อสุจิสามารถมีชีวิตอยู่ได้ยาวนานขึ้น และมีปริมาณน้ำเชื้อเพื่อประโยชน์ในการผสมเทียมให้ได้จำนวนการผสมเทียมที่มากขึ้น การที่น้ำยาเจือจางเกื้อกูลต่อการมีชีวิตรอดของอสุจิได้จึงต้องมีคุณสมบัติที่เหมาะสมดังต่อไปนี้

1. มี Osmolarity ที่เหมาะสม

ความดันสารละลายของน้ำยาเจือจางหากสูงหรือต่ำเกินไปจะทำให้ตัวอสุจิเสียหาย น้ำเชื้อเจือจางแล้วใช้ผสมเทียมเลยโดยไม่ต้องเก็บรักษา สามารถเจือจางด้วยน้ำยาที่มีความดันสารละลายระหว่าง 250–330 mOsmol/Kg สำหรับน้ำเชื้อไก่ซึ่งมีการเก็บรักษาไว้ใช้ภายใน 6 ชั่วโมง ควรมีความดันสารละลายระหว่าง 280–350 mOsmol/Kg (Sexton and Fewlass, 1978 อ้างโดย Christensen, 1995) อย่างไรก็ตาม Donoghue and Wishart (2000) รายงานว่าอสุจิของสัตว์ปีกสามารถทนต่อความดันสารละลายในช่วง 250–410 mOsmol/Kg

2. pH Buffers

ระดับ pH ที่สูงหรือต่ำเกินไปเป็นอันตรายต่อตัวอสุจิ Lake and Ravie (1979) อ้างโดย Christensen (1995) รายงานว่าระดับ pH ที่เหมาะสมของน้ำยาเจือจาง สำหรับเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ที่อุณหภูมิ 5 °C ระดับ pH ที่เหมาะสมคือ ค่า 6.8–7.1 แต่ในไก่วง Sexton and Giesen (1982) อ้างโดย Christensen (1995) รายงานว่าระดับ pH ที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อคือ 6.5 ภายใต้ความดันสารละลาย 355 mOsmol/Kg สารเคมีที่ใช้เป็นส่วนประกอบของน้ำยาเจือจางเพื่อคงระดับ pH ในน้ำเชื้อเจือจางโดยทั่วไปมักเป็นกลุ่มฟอสเฟต ซิเตรท สาร zwitterionic molecules เช่น BES [N,N-bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethane sulfonic acid] และ TES [N-Tris (hydroxymethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid] (Sexton, 1977; Christensen, 1995)

3. แหล่งพลังงาน

อสุจิต้องการแหล่งพลังงานเพื่อการอยู่รอดและการเคลื่อนไหว น้ำยาเจือจางที่ใช้อยู่ในปัจจุบันนิยมเติมฟรุคโตส หรือกลูโคสเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับอสุจิ (Sexton and Fewlass, 1978; Lake and Ravie, 1979 อ้างโดย Christensen, 1995)

4. ออกซิเจน

ออกซิเจนของไ้แกว่งต้องการออกซิเจนสำหรับ aerobic metabolism และได้มีการศึกษาถึงการเติมออกซิเจนลงในน้ำเชื้อเจ็จจางระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งต่อมาพบว่ามีการเติม perfluorochemicals (PFC) มีผลดีต่อการมีออกซิเจนในน้ำเชื้อเจ็จจาง และทำให้ออกซิเจนของไ้แกว่งยืนยาวขึ้น เทียบเคียงกับการเขย่น้ำเชื้อตลอดการเก็บรักษา (Christensen, 1995)

5. น้ำบริสุทธิ์

น้ำที่ใช้เตรียมน้ำยาเจ็จจางนั้นหากเป็นน้ำที่ไม่บริสุทธิ์ที่ปนเปื้อนโลหะหนัก และ Ca^{2+} จะมีผลเสียต่ออสุจิ Froman and Thurston (1985) รายงานว่าน้ำเชื้อเจ็จจางที่เก็บรักษาในอุณหภูมิเย็นจะมีการไหลเข้าของ Ca^{2+} สูงขึ้นส่งผลให้มีการไหลออกของ acrosin จากอะโครโซมที่หัวอสุจิ ส่งผลถึงการผสมติดต่ำ (Van Voorst and Leenstra, 1995) มีข้อสังเกตว่าการให้ ultrapure water ในการประกอบน้ำยาเจ็จจางน่าจะให้ผลดีกว่าน้ำกลั่น

6. ยาปฏิชีวนะ

จุลินทรีย์ที่พบในน้ำเชื้อมักมีแหล่งที่มาจากกันของไ้ น้ำยาเจ็จจางส่วนใหญ่จึงมีการเสริมยาปฏิชีวนะลงไป ซึ่งพบว่าสามารถควบคุมจุลินทรีย์ได้ โดยไม่มีผลเสียต่ออัตราการผสมติด (Christensen, 1995)

7. การเจ็จจางเพื่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง

เนื่องจากการแช่แข็งน้ำเชื้อจะก่อให้เกิดความเสียหายแก่ตัวอสุจิจำนวนหนึ่ง ดังนั้นในการผสมเทียมจึงต้องการอสุจิจำนวนมาก จึงทำให้อัตราการเจ็จจางต่ำกว่าน้ำเชื้อในสภาพเหลว โดยเมื่อรวมการเจ็จจางด้วยน้ำยาที่มี cryoprotectant แล้ว การเจ็จจางจะอยู่ประมาณ 1:2–1:5 (Sexton, 1979; Chalah et al., 1999)

8. Cryoprotectant

สารเคมีที่เสริมในน้ำยาเจ็จจาง เพื่อบรรเทาความเสียหายแก่ตัวอสุจิในขบวนการแช่แข็ง (Cryoprotectant agent, CPA) ที่นิยมใช้ได้แก่ glycerol, dimethylsulphoxide (DMSO), dimethylacetamide (DMA), ethyleneglycol (EG), dimethylformamid (DFM) และ propyleneglycol (PG) โดยผลการวิจัยส่วนใหญ่แสดงให้เห็นว่า glycerol มีพิษต่อตัวอสุจิน้อยที่สุด และมีผลทำให้อสุจิมีอัตราการรอดชีวิตภายหลังการละลายสูงสุด แต่เนื่องจากสารชนิดนี้เป็นอันตรายต่อช่องคลอดไ้ตัวเมีย จึงมีการกำจัดออกก่อนการผสมเทียมด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น dialysis เป็นต้น (Donoghue and Wishart, 2000) นอกจากนี้ Buss (1993) ได้รายงานถึงผลการกำจัด glycerol โดยการบรรจุน้ำเชื้อใน Biopore Cryocell® container

Tselutin et al. (1999) ได้ศึกษาเปรียบเทียบความเป็นพิษในความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ของ CPA 3 ชนิด คือ glycerol, DMA และ DMSO บ่มระดับอุณหภูมิที่ 4°C 30 นาที พบว่า glycerol มีพิษน้อยที่สุด ตามด้วย DMA ส่วน DMSO มีพิษสูงมากขึ้นตามลำดับ

อย่างไรก็ตามแม้จะพบว่า DMSO เป็นพิษสูงกว่า glycerol แต่ไม่เป็นอันตรายต่อระบบสืบพันธุ์ของไก่ตัวเมีย การใช้ DMSO จึงมีความสะดวกสูง ดังนั้นจึงยังคงมีความนิยมใช้อยู่พอสมควร ซึ่ง Van Voorst and Leenstra (1995) พบว่า การแช่แข็งโดยมี DMSO เป็น CPA ให้ผลการผสมติดในระดับที่สูง สำหรับในเปิด DMSO ระดับ 10 % ในน้ำเชื้อแช่แข็งให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิสูงสุด (Han et al., 2005)

วิธีการแช่แข็ง

ผลสำเร็จในการแช่แข็งเซลล์ขึ้นกับปัจจัย 3 อย่าง ที่มีปฏิสัมพันธ์ซึ่งกันและกันคือ 1) CPA ที่มีคุณสมบัติเหมาะสม 2) อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อควบคุมการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง และ 3) อัตราการละลายคืนสภาพปกติในขณะที่กำลังละลายมีการก่อตัวของน้ำแข็งอีกครั้งในระดับที่น้อยที่สุด โดยกลไกในการปกป้องเซลล์ของ CPA ยังไม่เป็นที่กระจ่างชัด แต่น่าจะเกี่ยวพันกับทั้ง lipid ของ membrane และองค์ประกอบที่เป็นน้ำ (Hammerstedt, 1995) Sexton (1980) ได้รายงานถึงความจำเพาะของการลดอุณหภูมิในการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่อย่างไรก็ตามเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่ที่ได้ผลในระดับน่าพอใจมีหลายเทคนิค

Donoghue and Wishart (2000) ได้รายงานว่โดยทั่วไปแล้วในการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง จะเริ่มจากลดอุณหภูมิน้ำเชื้อเจือจางไปที่ 5 °ซ จากนั้นจึงเติมน้ำยาที่มี CPA และทิ้งไว้ที่ 5 °ซ ประมาณ 10 นาที จึงดำเนินการแช่แข็งตามขั้นตอนต่อไป ซึ่งอาจแบ่งได้เป็น 5 ระบบ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ระบบการแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์ปีก

ระบบ	วิธีการ	เอกสารอ้างอิง
1. แบบเม็ดวิธีการที่ 1	หยดน้ำเชื้อเจือจางปริมาตร 0.2 มล. ลงบนหลอดที่เจาะไว้บนก้อนน้ำแข็งแห้ง จากนั้นจึงนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่เป็นเม็ดแล้วเก็บในไนโตรเจนเหลว	Watanabe and Terada (1980); Terada et al. (1989)
2. แบบเม็ดวิธีการที่ 2	หยดน้ำเชื้อเจือจางปริมาตร 0.2 มล. ลงบนแผ่น fluoroplastic ที่อังไอนไนโตรเจนเหลวที่ -70 °ซ จากนั้นจึงนำน้ำเชื้อแช่แข็งเก็บในไนโตรเจนเหลว	Rurbator et al. (1984); Tselutin et al. (1999)
3. แบบเม็ดวิธีการที่ 3	หยดน้ำเชื้อเจือจางปริมาตร 0.2 มล. ลงในถังไนโตรเจนเหลวโดยตรง	Yerashevich (1990); Tselutin et al. (1999)
4. แบบเม็ดวิธีการที่ 4	บรรจุน้ำเชื้อเจือจาง 1.0 มล. ในหลอดแก้ว 10 มล. จากนั้นหมุนหลอดอังไอนไนโตรเจนเหลวที่ระดับอุณหภูมิ -70°ซ ก่อนที่จะจุ่มในไนโตรเจนเหลว	Kurbatov et al. (1984)
5 การแช่แข็งที่ควบคุมโดยระบบคอมพิวเตอร์ (Programmable freezer)	บรรจุน้ำเชื้อเจือจางในหลอดแก้วหรือหลอดพลาสติก จากนั้นลดอุณหภูมิจาก 5 ถึง -35 °ซ ในอัตรา 1 ถึง 10 °ซ / นาที จากนั้นจึงจุ่มหลอดน้ำเชื้อในไนโตรเจนเหลว	Seigneurin and Blesbois (1995)

ที่มา: Donoghue and Wishart (2000)

Chalah et al. (1999) ได้ศึกษาเปรียบเทียบเทคนิคการแช่แข็ง 3 แบบในไก่ทางการค้า ต่ออัตราการผสมติดของน้ำเชื้อภายหลังการผสมเทียม คือ

เทคนิคที่ 1 นำน้ำเชื้อไก่ที่รีดมาได้ 2 มล. เจือจาง 1:1 ด้วย prefreezing lake's diluent นำน้ำเชื้อเจือจางที่ได้ 4 มล. นี้ ไปลดอุณหภูมิลงไปที่ 4 °ซ ภายในเวลา 30 นาที จากนั้นจึงเจือจางด้วยน้ำยา

ที่มีส่วนผสมของ glycerol 2 มล. โดยให้น้ำเชื้อเจือจางรวม 6 มล. ซึ่งมี glycerol ร้อยละ 11 จากนั้นบ่มไว้ที่ 4 °ซ 30 นาที บรรจุหลอดแล้วลดอุณหภูมิจาก 4 °ซ ไปที่ -35 °ซ ด้วยอัตรา 7 °ซ/นาที และจาก -35 ถึง -140 °ซ ในอัตรา 20 °ซ/นาที จากนั้นจุ่ม straw ลงในไนโตรเจนเหลว

เทคนิคที่ 2 เจือจางน้ำเชื้อ 2 มล. ด้วยน้ำยาเจือจางสูตร Tselutin (Tselutin et al., 1995) ในสัดส่วน 1:1 จากนั้นลดอุณหภูมิไปที่ 4 °ซ ภายในเวลา 20 นาที โดยใช้ portable refrigerator ซึ่งปรับอุณหภูมิไว้ที่ -6 °ซ จากนั้นเติม DMA 0.24 มล. (ความเข้มข้นสุดท้ายในน้ำเชื้อเจือจางเป็นร้อยละ 6) บ่ม 1 นาที จากนั้นหยดน้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลวโดยตรง

เทคนิคที่ 3 เจือจางน้ำเชื้อ 2 มล. ด้วยน้ำยาเจือจางสูตร Schramm (Schramm, 1982) 1:2 เป็น 6 มล. จากนั้นลดอุณหภูมิไปที่ 4 °ซ ภายในเวลาไม่น้อยกว่า 30 นาที และเติมน้ำยาเจือจาง 2 มล. DMF 0.52 มล. ซึ่งมีอุณหภูมิ 4 °ซ ซึ่งจะทำให้มี DMF ความเข้มข้นร้อยละ 6.5 จากนั้นดูดน้ำเชื้อเจือจาง 1 มล. ลงใน vials plastic 2 มล. แล้วลดอุณหภูมิจาก 4 °ซ ไปที่ -35 °ซ (1.3 °ซ/นาที) จากนั้นลดอุณหภูมิจาก -35 °ซ ไป -140 °ซ (20 °ซ/นาที) จึงจุ่มแช่ลงในไนโตรเจนเหลว

สำหรับการละลายน้ำเชื้อ วิธีการที่ 1 ละลายในน้ำอุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 3 นาที แล้วเจือจาง 1:19 ด้วยน้ำยา prefreezing Lake และปั่นแยกด้วยเครื่อง centrifuge ดูดน้ำใสออกไป วิธีการที่ 2 ละลายเม็دنน้ำเชื้อ 25 – 30 วินาที โดยเทลงในภาชนะ (ทำบน Thermoregurable conical hotplate) อุณหภูมิ 60 °ซ วิธีการที่ 3 ละลายโดยทิ้ง vials ลงในอ่างน้ำอุณหภูมิ 20 °ซ ใช้เวลานาน 3 นาที

จากการทดสอบการผสมติดพบว่ามีอัตราการผสมติดร้อยละ 76, 88 และ 79 ในวิธีการที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมซึ่งผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสด มีอัตราการผสมติดเท่ากับร้อยละ 93 ซึ่งไม่แตกต่างจากวิธีการที่ 2

Tselutin et al. (1999) ได้ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่ 5 แบบ ดังนี้ คือ

แบบที่ 1 เก็บน้ำเชื้อลงในหลอดที่มีน้ำยา Lake โดยตรง (1:4, น้ำเชื้อ:น้ำยา) จากนั้นลดอุณหภูมิไปที่ 5 °ซ ไม่เร็วกว่า 20 นาที จากนั้นเจือจางน้ำเชื้อเจือจางด้วยการเติมน้ำยาเจือจางที่มี glycerol 1.32 มล. ใน 4 มล. ของน้ำยา (ความเข้มข้นสุดท้ายของ glycerol เท่ากับร้อยละ 11) บ่มทิ้งไว้ที่ 5 °ซ อีก 30 นาที ดูดน้ำเชื้อเข้าหลอด 0.5 มล. แช่แข็งโดยลดอุณหภูมิจาก 5 °ซ ไป -35 °ซ ในอัตรา 7 °ซ/นาที และจาก -35 °ซ ไปยัง -140 °ซ ในอัตรา 20 °ซ/นาที แล้วจึงเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

แบบที่ 2 ทำเช่นเดียวกับแบบที่ 1 ยกเว้นการบ่มเปลี่ยนจาก 30 นาที เป็น 1 นาที

แบบที่ 3 ทำเช่นเดียวกับแบบที่ 1 ยกเว้นจากการลดอุณหภูมิ ทำโดยนำน้ำเชื้อเจือจาง 1:1 ไปวางไว้ในอุณหภูมิ -6 °ซ นาน 20 นาที เติม DMA ลงในน้ำเชื้อ ให้ความเข้มข้นในน้ำเชื้อเจือจางเป็นร้อยละ 6 DMA คนให้เข้ากัน 1 นาที แช่แข็งในรูปแบบเม็ดยอดน้ำเชื้อเจือจาง ครั้งละ 0.05 มล. หยดลงในไนโตรเจนเหลว

แบบที่ 4 ทำเช่นเดียวกับแบบที่ 3 ยกเว้นตอนลดอุณหภูมิให้ลดไปที่ 5 °ซ โดยใช้เวลา 20 นาที ส่วนการแช่แข็งทำเช่นเดียวกัน

แบบที่ 5 ทำเช่นเดียวกับแบบที่ 4 แต่ภายหลังบ่มกับ DMA แล้ว 1 นาที บรรจุน้ำเชื้อเข้า straw จากนั้นแช่แข็งเช่นเดียวกับวิธีการที่ 1

เมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งทั้ง 5 แบบ ไปผสมเทียม พบว่ามีอัตราการผสมติดเท่ากับร้อยละ 63.9, 53.7, 92.7, 84.7, 26.7 และ 94.7 ในน้ำเชื้อแช่แข็ง แบบที่ 1 ถึง 5 และกลุ่มควบคุม ตามลำดับ การศึกษาครั้งนี้ให้ผลสอดคล้องกับ Chalah et al. (1999) แสดงให้เห็นถึงอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแช่แข็งอย่างน้อยก็ขึ้นกับ CPA รูปแบบการบรรจุ และวิธีการลดอุณหภูมิ นอกเหนือจากพันธุกรรมของสัตว์ดังที่กล่าวมาข้างต้น

แม้ว่าวิธีการแช่แข็งที่ใช้ glycerol เป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง จะได้รับการยอมรับว่า เป็นวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่ โดยสามารถทำให้อัตราการผสมติดของไก่ในสายพันธุ์ที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ มีอัตราการผสมติดที่ดี (Blesbois, 2007) อย่างไรก็ตามก็มีความจำเป็นต้องกำจัด glycerol ซึ่งเป็นพิษต่อ utero vaginal junction ของแม่ไก่ออกไป ดังนั้นจึงเพิ่มความซับซ้อนในการปฏิบัติงานในภาคสนาม สำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่ในรูปแบบเม็ดโดยใช้ DMA เป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง ซึ่งให้อัตราการผสมติดที่สูงกว่ารูปแบบบรรจุหลอดข้างต้น แต่ก็มีปัญหาด้านความสะดวกและคำถามด้านการระบาดของโรค ดังนั้นในการศึกษาจึงควรมุ่งเน้นที่จะศึกษาวิจัยการเก็บรักษาน้ำเชื้อในรูปแบบการแช่แข็ง ลักษณะบรรจุหลอด และเมื่อละลายแล้วสามารถนำไปผสมเทียมได้เลย โดยไม่ต้องมีขั้นตอนยุ่งยากเพิ่มเติม

ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการผสมติด

ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่ นอกเหนือจากคุณภาพของน้ำเชื้อเองแล้ว ยังมีปัจจัยตัวเกี่ยวข้องอื่น ๆ ได้แก่

1. พันธุกรรมของแม่พันธุ์

Buss (1993) รายงานว่าแม่พันธุ์บางตัวให้อัตราการผสมติดจากการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งต่ำกว่าตัวอื่นโดยพบว่ามีประมาณร้อยละ 25 ทั้ง ๆ ที่ให้ไข่ปกติ

2. อายุแม่พันธุ์

Gumulka and Kapkowska (2005) รายงานว่าแม่พันธุ์ที่อายุมากอัตราการผสมติดจะต่ำลง ช่วงระยะเวลาของไข่มีเชื้อภายหลังการผสมเทียมจะสั้นลง จำนวนอสุจิที่เจาะผ่าน perivitelline layer ต่ำลง ทั้งนี้เนื่องจาก sperm storage tubules ในท่อนำไข่มีจำนวนลดลง

3. ความบ่อยครั้งในการผสมเทียม

Das et al. (2006) รายงานว่า estrogen receptor RNA ที่บริเวณ uterovaginal junction (UVJ) ในไก่พันธุ์ไข่จะลดน้อยถอยลงหากมีการผสมเทียมซ้ำ ๆ ติดต่อกัน ซึ่ง Das (2005) ได้รายงานว่าการบวมของ sperm storage tubules และเซลล์เยื่อบุบาง ปริมาณเม็ดเลือดขาวสูง และไม่พบตัวอสุจิที่บริเวณดังกล่าว

4. ตำแหน่งของการฉีดน้ำเชื้อผสมเทียม

ในการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งมีการผสมเทียมในช่องคลอดลึก 4–6 ซม. (Tselutin et al., 1999; Van Voorst and Leenstra, 1995) ที่มดลูก และ magnum (Bacon et al., 1985) ซึ่งให้อัตราการผสมติดสูงกว่าที่ช่องคลอดสอดคล้องกับรายงานโดย Sexton (1979) แต่ไม่สะดวกในการปฏิบัติ

5. จำนวนอสุจิที่ใช้ในการผสมเทียมในแต่ละครั้ง

มีรายงานการผสมเทียมแม่ไก่ด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งโดยมีจำนวนอสุจิที่แตกต่างกันไปคือ 150 ล้านตัว/โดส (Sexton, 1980), 180 ล้านตัว/โดส (Buss, 1993), 300 ล้านตัว/โดส (Chalah et al., 1999; Seigneurin and Blesbois, 1995; Tselutin et al., 1999), 600 ล้านตัว/โดส (Blesbois et al., 2007) และประมาณ 700 ล้านตัว/โดส (Van Voorst and Leenstra, 1995) ซึ่งจำนวนอสุจิที่ใช้ผสมเทียมจะสูงกว่าการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสด สำหรับปริมาณน้ำเชื้อในการผสมเทียมใช้ปริมาณในการผสมเทียมระหว่าง 0.1–0.6 มล.

เทคโนโลยีน้ำเชื้อกับการพัฒนาพันธุ์ไก่พื้นเมือง

การพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมตลอดจนการเปลี่ยนแปลงทางด้านสิ่งแวดล้อม และระบาดของโรคบางอย่าง ก่อให้เกิดวิกฤตด้านความมั่นคงทางความหลากหลายทางชีวภาพ โดยสัตว์พื้นเมืองประมาณครึ่งหนึ่งได้สูญหายไป ปัญหาเดียวกันนี้ได้คุกคามไก่พื้นเมืองเช่นเดียวกัน การอนุรักษ์พันธุ์กรรมเพื่อคงความหลากหลายทางชีวภาพ ตลอดจนเพื่อการใช้ประโยชน์ในเชิงธุรกิจ จากจุดเด่นทางพันธุ์กรรมของไก่พื้นเมืองจึงมีความสำคัญ การเก็บรักษาพันธุ์กรรมในรูปแบบน้ำเชื้อแช่แข็งนั้นเป็นรูปแบบที่มีประสิทธิภาพที่สุดในไก่ ณ ปัจจุบัน อย่างไรก็ตามระดับของความสำเร็จในด้านความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่พื้นเมืองในต่างประเทศ มักต่ำกว่าไก่ทางการค้า สำหรับไก่พื้นเมืองไทยยังมีข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคโนโลยีน้ำเชื้ออยู่จำกัด การวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อหาเทคนิคที่มีประสิทธิภาพและสะดวกต่อการนำไปใช้จริง สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งตลอดจนเทคนิคที่เกี่ยวข้องในการผสมเทียมในไก่พื้นเมือง

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. 2550. สถิติการเลี้ยงสัตว์ประจำปี 2549 ศูนย์สารสนเทศ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตร.
เกรียงไกร ไชยประการ, วัชรพงษ์ วัฒนกุล, กิตติ วงศ์วิเศษณ์ และวรพงษ์ สุริยจันทร์ทาทอง. 2543. ไก่
พื้นเมืองและไก่ลูกผสมพื้นเมืองอดีตและปัจจุบัน. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. 80 น.
สวัสดิ์ ธรรมบุตร. 2540. การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไก่พื้นเมือง. สาส์นไก่. 45: 13-14.
- Ansah, G.A. and R.B. Bluckland. 1983. Eight generations of selection for duration of fertility
of frozen thawed semen in the chicken. Poultry Sci. 62: 1529-1539.
- Bacon, L. D., D. W. Salter, J. B. Motta, L. B. Crittenden, and F. X. Ogasawara. 1986.
Cryopreservation of chicken semen of inbred or specialized strains. Poultry Sci. 65:
1965–1971.
- Blanco, J. M., G. F. Gee, D.E.Wildt and A.M. Donoghue. 2000. Species variation
osmotic,cryoprotectant and cooling rate tolerance in poultry, eagle and peregrine
falcon spermatozoa. Biol. Reprod. 63: 1164-1171.
- Blackburn, H. D. 2006. The national animal germplasm program : Challenges and
opportunities for poultry genetic resources. Poultry Sci. 85: 210–215.
- Blesbois, E. 2007. Current status in avian semen cryopreservation. World's Poult. Sci. 63:
213–232.
- Blesbois, E., I. Grasseau and F. Seigneurin. 2005. Membrane fluidity and ability to survive
cryopreservation in domestic bird spermatozoa. Reproduction 129: 371–378.
- Blesbois, E., F. Seigneurin, I. Grasseau, C. Limouzin, J. Besnard, D. Gourichon, G.
Coquerella, P. Rault and M. Tixier – Boichard. 2007. Poultry Sci. 86: 555–564.
- Brillard,J.P. 1995. Artificial insemination: How many sperm, how often. Pages 176-183 in:
Proceedings: First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry
Science. M. R. Bakst and G. J. Wishart,(eds.) Poultry Science Association, Savoy, IL.
- Buss, E.G. 1993. Cryopreservation of rooster sperm. Poultry Sci. 72: 944–954.
- Chalah, T.,F. Seigneurin, E. Blesbois and J.P. Brillard. 1999. In Vitro comparison of fowl
sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship
with subsequent fertility in vivo. Cryobiology 39: 185–191.
- Christensen, V.L.1995.Diluent, dilution and storage of poultry semen for six hours. Pages
90–106 in: Proceedings: First International Symposium on the Artificial Insemination
of Poultry Science. M. R. Bakst and G. J. Wishart, (eds.) Poultry Science Association,
Savoy, IL.

- Das, S. C., N. Nagasaka and Y. Yoshimura. 2006. Changes in the expression of estrogen receptor mRNA in the utero – vaginal junction containing sperm storage tubules in laying hens after repeated artificial insemination. *Theriogenology* 65: 893–900.
- Donoghue, A. M. and G. J. Wishart. 2000. Storage of poultry semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 213–232.
- Dohner, J. V. 2001. The encyclopaedia of historic and endangered livestock and poultry breeds. Yale Univ. Press, New Haven, CT.
- Fulton, J. E. 2006. Avian genetic stock preservation : An industry perspective. *Poultry Sci.* 85: 227–231.
- Froman, D. P. and R. J. Thurston. 1985. Effects of incubation at 4°C on calcium uptake and acrosin activity in turkey spermatozoa. *Poultry Sci.* 64: 396–400.
- Gumulka, M. and E. Kapkowska. 2005. Age effect of broiler breeders on fertility and sperm penetration of perivitelline layer of the ovum. *Anim. Reprod. Sci.* 90: 135–148.
- Han, X.F., Z.Y. Nui, F.Z. Liu and C.S. Yang. 2005. Effects of diluents, cryoprotectants, equilibration time and thawing temperature on cryopreservation of duck semen. *Int. J. Poult. Sci.* 4: 197–201.
- Hammerstedt, R.H. 1995. Cryopreservation of poultry semen current status and economics. Pages 229–250 in: *Proceedings: First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry Science*. M. R. Bakst and G. J. Wishart, (eds.) Poultry Science Association, Savoy, IL.
- Kirby, J. D., C. J. Tressler and Y. K. Kirby. 1998. Evaluation of the duration of sperm fertilizing ability in five lines of commercial broiler breeder and Delaware cross males. *Poultry Sci.* 77: 1688–1694.
- Long, J. A. Avian semen cryopreservation: What are the biological challenges. *Poultry Sci.* 85: 232–236.
- Park, H. M. and C. D. McDaniel. 2006. The immediate impact of semen diluent and rate of dilution on the sperm quality index, ATP utilization, gas exchange and ionic balance of broiler breeder sperm. *Poultry Sci.* 85: 106–116.
- Seigneurin, F. and E. Blesbois. 1995. Effect of freezing rate on viability and fertility of frozen-thawed fowl spermatozoa. *Theriogenology* 43: 1331–1338.
- Sexton, T.J. 1977. A new poultry semen extender. 1 Effect of extension on the fertility of chicken semen. *Poultry Sci.* 56: 1443–1446.

- Sexton, T. J. 1979. Preservation of poultry semen. A review. Beltsville Symp. Agric. Res. No. 3, Anim.Reprod.,Allanheld, Osmum Co., Montclair,N.J.
- Sexton, T. J. 1980. Optimal rates for cooling chicken semen from +5 to -196 °C. Poultry Sci. 59: 2765–2770.
- Tajima, A., E. F. Graham and D. M. Hawkins. 1989. Estimation of the relative fertilizing ability of frozen chicken spermatozoa during a heterospermic competition method. J. Reprod. Fertil. 85: 1–5.
- Tselutin, K., F. Seigneurin and E. Blesbosis.1999. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. Poultry Sci. 78: 586 – 590.
- Van Voorst, A. and F. R. Leenstra. 1995. Fertility rate of daily collected and cryopreserved fowl semen. Poultry Sci. 74: 136–140.
- Woelders, H., C. A. Zuidberg and S. J. Hiemstra. 2006. Animal genetic resources conservation in The Natherlands and Europe: Poultry perspective. Poultry Sci. 85: 216–222.

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์หลักของการวิจัยคือ

เพื่อให้ได้เทคนิคที่มีประสิทธิภาพและสะดวกในการนำไปใช้จริง สำหรับการเก็บน้ำเชื้อแบบ
แช่แข็งและการผสมเทียมในไก่พื้นเมือง

งานวิจัย 1: ผลของชนิดน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมือง

Research 1: Effect of various extender on native chicken semen quality

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ เปรียบเทียบชนิดของน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อ (อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิ) ระหว่างกลุ่มควบคุม(น้ำเชื้อสด) และน้ำเชื้อเจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง 5 สูตร คือ Prefreezing Lake, Tselutin, Schramm, BPSE และ IGGKPh โดยศึกษาในไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว ไก่พื้นเมืองคละสี และไก่พันธุ์โรดไอส์แลนด์เรด ภายหลังการบ่มน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 41°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่า ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาวน้ำยาเจือจางสูตร BPSE และ IGGKPh ให้อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิตีที่สูงที่สุด ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม($P>0.05$) ส่วนในไก่พื้นเมืองคละสีพบว่าน้ำยาเจือจางสูตร BPSE และ IGGKPh ให้อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิตีสูงสุด สำหรับไก่พันธุ์โรดไอส์แลนด์เรดนั้น พบว่าน้ำยาเจือจางสูตร IGGKPh ให้ให้อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิตีสูงสุด และเมื่อนำน้ำยาเจือจางทั้ง 5 สูตร เจือจางน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองและผสมเทียมให้กับไก่ไข่ทางการค้า พบว่าให้อัตราการผสมติดร้อยละ 96.23, 93.65, 89.39, 96.53, 93.43 และ 94.78 สำหรับกลุ่มควบคุม และน้ำเชื้อเจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง 5 สูตร ตามลำดับ ซึ่งไม่พบแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

คำสำคัญ: น้ำยาเจือจาง, น้ำเชื้อ, การผสมติด, ไก่พื้นเมือง

Abstract

The aim of this present study was to compare various diluents on the semen qualities (motility and viability rate) between control group (fresh undiluted semen) and diluted semen with various diluents; Prefreezing Lake, Tselutin, Schramm, BPSE and IGGKPh. The semen was collected from two lines of Thai native (Luang Hang Khaw and Kla See) and Rhode Island Red chickens. The fresh undiluted semen and diluted semen samples were incubated at 41°C for 6 h. The result showed that IGGKPh and BPSE were the best diluent groups in Luang Hang Khaw and compare to control, IGGKPh and BPSE were the best diluents group in KlaSee and IGGKPh was the best diluent group in Rhode Island Red. Fertility of fresh undiluted semen and each of diluted semen were also determined. The fresh undiluted semen and each of diluted semen (5 diluents) were inseminated to commercial layer hen. The results showed that fertility were 96.23, 93.65, 89.39, 96.53, 93.43 and 94.78 % in control group and each of diluted semen groups respectively with no significant difference ($P > 0.05$).

Keywords: diluent, semen, fertility, native chicken

บทนำ

การผสมเทียมสัตว์ปีกในเชิงการค้านิยมปฏิบัติในไก่วงโดยผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อเจือจาง แต่สัตว์ปีกชนิดอื่นไม่นิยมผสมเทียม (Donoghue and Wishart, 2000) อย่างไรก็ตามมีแนวโน้มที่จะนำมาใช้ในขบวนการผลิตลูกไก่ในอุตสาหกรรมไก่เนื้อ ซึ่งพบว่าอัตราการผสมติดมีปรากฏการณ์ที่ลดน้อยถอยลงอันเป็นผลจากการคัดเลือกพันธุ์ เพื่อให้ไก่มีอัตราการเจริญเติบโตเร็ว พ่อพันธุ์มีน้ำหนักมากกว่าแม่พันธุ์มาก ดังนั้นการนำวิธีการผสมเทียมมาใช้จึงอาจให้ผลคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ (Reddy, 1995) นอกเหนือจากการใช้เทคนิคการผสมเทียมในเชิงการค้าในสัตว์ปีกแล้ว ยังได้มีการนำมาใช้ในเชิงการอนุรักษ์ในกลุ่มนกที่ใกล้สูญพันธุ์ เช่น นกกระเรียน และอื่นๆ (Gee, 1995) สำหรับในไก่พื้นเมืองไทยได้มีการนำเทคนิคการผสมเทียมมาใช้เช่นกัน แต่จำกัดอยู่ในหน่วยงานราชการและสถานศึกษา ข้อมูลที่เกี่ยวข้องต่างๆมีน้อยโดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับน้ำยาเจือจาง (diluent หรือ extender) ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของน้ำยาเจือจางของสัตว์ปีกที่ใช้กันทั่วไปต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมือง

วิธีการศึกษา

การศึกษาแบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย คือ

การทดลองที่ 1 ผลของน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่

สัตว์ทดลอง

ใช้พ่อพันธุ์ 3 กลุ่ม ได้แก่ ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว ไก่พื้นเมืองคละสี และไก่พันธุ์โรดไอส์แลนด์ เรด อายุระหว่าง 1-2 ปี กลุ่มละ 6 ตัว จำนวนรวม 18 ตัว แยกเลี้ยงพ่อพันธุ์ในกรงขังเดี่ยว ไก่ได้รับอาหารไก่ไข่ ประมาณ 110 กรัม/ตัว/วัน และมีน้ำสะอาดให้ดื่มตลอดเวลา

การรีดน้ำเชื้อ

รีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โดยใช้ทีมผู้รีด 2 คน โดยจับบังคับไก่ 1 คน ด้วยการอุ้มไก่อวบปีก และขาด้วยมือแต่ละข้าง ส่วนอีกคนหนึ่งเป็นผู้กระตุ้นพ่อพันธุ์ ด้วยการลูบหลังจากด้านหน้าไปด้านหลัง โดยเพิ่มน้ำหนักจากเบาแล้วลงน้ำหนัก พ่อพันธุ์ที่มีสุขภาพดีจะตอบสนองด้วยการเกร็งและกระดกหาง บีบโคนก้นเพื่อเก็บน้ำเชื้อทันที รองเก็บน้ำเชื้อด้วยหลอดที่สะอาด ขนาด 1.5 ml. น้ำเชื้อที่ปนเปื้อนจะไม่นำมาศึกษา รวบรวมน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์แต่ละกลุ่มในหลอดเดียวกัน (pooled semen) เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

น้ำยาเจือจาง

ใช้น้ำยาเจือจางจำนวน 5 สูตร ได้แก่ Prefreezing Lake (Lake, 1960 อ้างโดย Chalah, 1999), Tselutin (Tselutin et al., 1995 อ้างโดย Chalah, 1999), Schramm (Schramm, 1976 อ้างโดย Chalah, 1999), BPSE (Sexton, 1977), IGGKPh (Lukaszewicz, 2001) สารเคมีที่ใช้ในการประกอบสูตรน้ำยาเจือจางเป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma และน้ำที่ใช้ละลายเป็นน้ำกลั่น 2 ครั้ง (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจางแต่ละสูตร ในปริมาตร 1,000 มล.

องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจาง (กรัม/1,000 มล.)	น้ำยาเจือจางสูตร				
	Prefreezing Lake	Tselutin	Schramm	BPSE	IGGKPh
Magnesium acetate	0.70		0.70		
Magnesium chloride				0.34	
Sodium acetate				4.30	
Potassium citrate				6.40	1.40
Sodium glutamate	19.20	19.20	28.50	8.67	14.00
Dipotassium hydrogen phosphate				12.70	9.80
Potassium dihydrogen phosphate				0.65	
Sodium dihydrogen phosphate					2.10
Glucose			5.00		9.00
Fructose	8.00	8.00		5.00	
Inositol			2.50		9.00
TES				1.95	
Potamine sulfate		0.32			
Potassium acetate	5.00	5.00	5.00		
PVP (Polyvinyl pyrrolidone)	3.00	3.00			

การเจือจางน้ำเชื้อ

แบ่งน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์แต่ละกลุ่มเป็น 6 ส่วน 5 ส่วน เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจาง 5 สูตร ในสัดส่วน 1:3 (น้ำเชื้อ : น้ำยาเจือจาง) และ 1 ส่วน เป็นน้ำเชื้อไม่เจือจาง (กลุ่มควบคุม) บ่มตัวอย่างน้ำเชื้อทั้ง 6 ส่วน ที่อุณหภูมิ 41° ซ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

ประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิและอัตราการรอดชีวิตของอสุจิจากการย้อมสี ตามวิธีการที่อ้างโดย Lake and Stewart (1978) และ Sorensen (1979)

การทดสอบทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) 6 ปัจจัยการทดลอง (น้ำเชื้อสด และน้ำยาเจือจาง 5 สูตร), จำนวน 4 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิ โดยวิธี Duncan's multiple range test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (SAS, 1985)

การทดลองที่ 2 ผลของน้ำยาเจือจางต่ออัตราการผสมติด

สัตว์ทดลอง

ใช้พ่อพันธุ์ 2 กลุ่ม ได้แก่ ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว และไก่พื้นเมืองคละสี อายุระหว่าง 1-2 ปี กลุ่มละ 6 ตัว จำนวนรวม 12 ตัว แยกเลี้ยงพ่อพันธุ์ในกรงขังเดี่ยว และใช้แม่พันธุ์ไก่ไข่ทางการค้า รวมทั้งสิ้นจำนวน 72 ตัว เลี้ยงในกรงตับ กรงละ 2 ตัว ให้อาหารไก่วันละ 100 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำสะอาดกินแบบเต็มที่

การรีดน้ำเชื้อ

รีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โดยใช้ทีมผู้รีด 2 คน โดยจับบังคับไก่ 1 คน ด้วยการอุ้มไก่อวบปีก และขาด้วยมือแต่ละข้าง ส่วนอีกคนหนึ่งเป็นผู้กระตุ้นพ่อพันธุ์ ด้วยการลูบหลังจากด้านหลังไปด้านหลัง โดยเพิ่มน้ำหนักจากเบาแล้วลงน้ำหนัก พ่อพันธุ์ที่มีสุขภาพดีจะตอบสนองด้วยการเกร็งและกระดกหาง บีบโคนก้นเพื่อเก็บน้ำเชื้อทันที รongเก็บน้ำเชื้อด้วยหลอดที่สะอาด ขนาด 1.5 ml. น้ำเชื้อที่ปนเปื้อนจะไม่นำมาศึกษา รวมน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์แต่ละกลุ่มในหลอดเดียวกัน (pooled semen) เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

การเจือจางน้ำเชื้อ

แบ่งน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ทั้งหมดเป็น 6 ส่วน 5 ส่วน เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจาง 5 สูตร ในสัดส่วน 1:3 (น้ำเชื้อ:น้ำยาเจือจาง) และ 1 ส่วน เป็นน้ำเชื้อไม่เจือจาง (กลุ่มควบคุม)

การผสมเทียม

ผสมเทียมในเวลา 15.00 น. ให้กับแม่ไก่ไข่ทางการค้าภายในเวลา 1 ชั่วโมงหลังการรีดน้ำเชื้อ ผสมเทียมน้ำเชื้อส่วนละ 12 ตัว โดยกลุ่มควบคุมใช้ปริมาณน้ำเชื้อ 0.03 มล./แม่ และน้ำเชื้อเจือจางใช้ปริมาณน้ำเชื้อ 0.1 มล./แม่ เพื่อปรับให้จำนวนอสุจิที่ใช้ผสมเทียมมีความใกล้เคียงกัน ซึ่งปริมาณดังกล่าวเป็นวิธีการปฏิบัติในการผสมเทียมตามมาตรฐานทั่วไป ทำการผสมเทียมสัปดาห์ละ 1 ครั้ง/แม่ ติดต่อกัน 2 สัปดาห์

การเก็บข้อมูลการผสมติด

เริ่มเก็บไข่ในวันที่ 2 ภายหลังการผสมเทียมครั้งแรกรวบรวมไข่ติดต่อกัน 2 สัปดาห์ นำไข่เข้าฟัก สัปดาห์ละ 1 ครั้ง นำไข่ที่เข้าฟักมาทดสอบอัตราการผสมติดโดยการกะเทาะเปลือกออกเพื่อดูการพัฒนาศัพพะภายหลังฟัก 7 วัน

การทดสอบทางสถิติ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการผสมติดจากน้ำเชื้อ และน้ำเชื้อเจือจาง โดยใช้ Chi-square test

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

การทดลองที่ 1 ผลของน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่

เมื่อบ่มน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว ไก่พื้นเมืองคละสี และไก่พันธุ์โรดไอส์แลนด์เรด กับน้ำยาเจือจาง 5 สูตร ที่ 41°C เป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่า น้ำยาเจือจางสูตร IGKPh และ BPSE ให้อัตราการรอดชีวิตของอสุจิไก่พื้นเมืองสูงสุดทั้ง 2 สายพันธุ์ ส่วนในไก่โรดไอส์แลนด์เรด น้ำยาสูตร IGKPh ดีที่สุด รองลงมาคือ BPSE อย่างไรก็ตามแม้ว่าไก่พื้นเมืองน้ำยา IGKPh และ BPSE ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติภายหลังการบ่ม 6 ชั่วโมง แต่น้ำยาเจือจางสูตร IGKPh มีแนวโน้มที่ให้น้ำเชื้อคุณภาพดีกว่า (ตารางที่ 3) การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงอิทธิพลของน้ำยาเจือจางต่างชนิดกันต่อคุณภาพน้ำเชื้อเมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมภายนอกร่างกาย ณ อุณหภูมิ 41°C ซึ่งอสุจิมีกระบวนการเมตาโบลิซึมที่สูง มีสูตรน้ำยาเจือจางจำนวนมากที่นิยมใช้ในการผสมเทียมสัตว์ปีกทั้งทางด้านวิชาการและการนำไปใช้ในการการค้า และได้มีการเปรียบเทียบผลของน้ำยาเจือจางต่ออัตราการผสมติด แต่ผลที่ได้ยากที่จะสรุปว่าสูตรน้ำยาเจือจางใดดีที่สุดและเป็นมาตรฐาน (Bootswala and Mile, 1982; Bakst, 1990 อ้างโดย Christensen, 1995) คุณสมบัติโดยรวมของน้ำยาเจือจางเหล่านี้คือ การรักษาระดับ pH, ความดันสารละลายที่เหมาะสม และมีแหล่งพลังงานให้กับตัวอสุจิ (Christensen, 1995) การมี pH ที่ต่ำเป็นผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง ในขณะที่ pH สูงเป็นผลทำให้อัตราการเมตาโบลิซึมสูง เมื่อศึกษาในร่างกาย น้ำเชื้อไก่และไก่วงสามารถทนต่อ pH ระดับ 6.0–8.0 (Bogdonoff and Shaffner, 1954; Wilcox, 1959; Van Wambeke, 1967 อ้างโดย Christensen, 1995) ในการศึกษาครั้งนี้ น้ำยาเจือจางมี pH ระหว่าง 7.1–7.4 และน้ำยาเจือจางภายหลังการบ่ม 6 ชั่วโมงที่ 41°C มี pH ระหว่าง 6.8–7.1 ในเรื่องความดันสารละลายนั้น Bakst (1980) อ้างโดย Christensen (1995) รายงานอสุจิของไก่สามารถให้อัตราการผสมติดที่ปกติในช่วงความดันสารละลายระหว่าง 250–460 mOsmol/gk. ในการศึกษาครั้งนี้ความดันสารละลายน้ำยาเจือจางระหว่าง 330–460 mOsmol/gk. โดย IGKPh มีความดันสารละลายสูงสุด น้ำตาลฟรุคโตสเป็นน้ำตาลที่อสุจิของไก่สามารถใช้ได้ดีกว่า กลูโคส และ inositol อย่างไรก็ตามมีหลายรายงานที่ระบุว่ากลูโคสและฟรุคโตสต่างให้ผลดีในการเป็นองค์ประกอบ ของน้ำยาเจือจาง (Christensen, 1995) Sexton (1979) ได้รายงานว่า น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อในสัตว์ปีกมีองค์ประกอบพื้นฐานที่มีบทบาทต่าง ๆ ดังนี้คือ 1) บัฟเฟอร์ได้แก่ TES, Phosphates (Na^+ หรือ K^+) และ Tris เป็นต้น 2) พลังงาน ซึ่งได้แก่ ฟรุคโตส กลูโคส Inositol และ raffinose เป็นต้น 3) chelator ซึ่งได้แก่ กลูตาเมต อัลบูมิน และนม เป็นต้น 4) องค์ประกอบที่เกี่ยวข้องกับความดันสารละลาย ได้แก่ magnesium chloride, sodium acetate, potassium citrate และ sodium chloride เป็นต้น 5) ยาปฏิชีวนะยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ นอกจากนี้ Bootwalla and Miles (1992) ได้รายงานว่า glutamic acid ยังมีคุณสมบัติในการรักษาสภาวะความดันสารละลายที่เหมาะสม ใน การศึกษานี้ น้ำยาเจือจางสูตร IGKPh และ BPSE ซึ่งให้ผลดีในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่อีกมากกว่าน้ำยาเจือจางสูตรอื่นๆ นั้น ต่างก็มีองค์ประกอบพื้นฐานที่กล่าวมาข้างต้น จึงน่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้น้ำเชื้อ

เจือจางในน้ำยาเจือจางสูตร IGKPh และ BPSE มีคุณภาพดีกว่าน้ำเชื้อเจือจางจากน้ำยาเจือจาง 3 สูตรดังกล่าว โดยภาพรวมน้ำยาเจือจางสูตร IGKPh ให้ผลต่อการบ่มน้ำเชื้อที่ดีกว่าสูตร BPSE ซึ่งมีข้อสังเกตว่าน้ำยาเจือจางสูตร BPSE มีองค์ประกอบที่สูตร IGKPh ไม่มี คือ magnesium chloride, sodium acetate และ potassium dihydrogen phosphate และ TES ในขณะที่ น้ำยาเจือจางสูตร IGKPh มี sodium dihydrogen phosphate ซึ่งต่างจาก BPSE ส่วนแหล่งพลังงานนั้น BPSE ใช้ฟรุคโตส ในขณะที่ IGKPh ใช้กลูโคส และ inositol เป็นแหล่งพลังงาน อย่างไรก็ตามระดับ pH และความดันสารละลายสูตรต่างๆ ยังคงอยู่ในช่วงที่ไม่มีผลเสียหายอย่างรุนแรงต่ออสุจิ ตามที่ได้มีการศึกษาในรายงานการวิจัยอื่นๆที่ผ่านมา ในการศึกษาครั้งนี้ ผลของระยะเวลาในการบ่มน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพของอสุจิพบว่ามีความแตกต่างของคุณภาพน้ำเชื้อมากเมื่อบ่มเป็นเวลานาน ซึ่งอาจเป็นผลมาจากความแตกต่างกันในด้านคุณสมบัติและองค์ประกอบของน้ำยาเจือจางแต่ละสูตร

ตารางที่ 3 อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการรอดของอสุจิน้ำเชื้อไก่ในน้ำยาเจือจางสูตรต่างๆ เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 41 °ซ ที่ระยะเวลาต่างๆ

สูตรน้ำยา เจือจาง	อัตราการเคลื่อนที่ (%) ณ ชั่วโมงที่			อัตราการรอดชีวิตของอสุจิ (%) ณ ชั่วโมงที่		
	0	3	6	0	3	6
น้ำเชื้อสดไม่เจือจาง	93.78 ^ก ± 1.10	78.00 ^ข ± 6.14	27.06 ^ค ± 8.78	93.06 ^ก ± 1.69	93.06 ^ก ± 1.69	55.22 ^ก ± 8.21
พันธุ์เหลืองหางขาว	Lake	77.22 ^ข ± 6.49	29.33 ^ข ± 8.43	3.67 ^ค ± 1.29	90.44 ^ก ± 1.13	90.44 ^ก ± 1.13
	Tselutin	68.33 ^ก ± 6.13	21.78 ^ข ± 6.84	2.11 ^ค ± 0.65	90.33 ^ก ± 1.30	90.33 ^ก ± 1.30
	Schramm	75.56 ^ข ± 5.88	19.22 ^ข ± 5.80	7.61 ^ค ± 3.19	91.00 ^ก ± 1.17	91.00 ^ก ± 1.17
	BPSE	74.00 ^ข ± 6.42	68.89 ^ก ± 6.90	34.22 ^{กข} ± 8.11	91.67 ^ก ± 1.17	91.67 ^ก ± 1.17
	IGKPh	90.22 ^ก ± 2.21	77.11 ^ก ± 5.62	49.39 ^ก ± 8.18	92.88 ^ก ± 1.06	92.88 ^ก ± 1.06
น้ำเชื้อสดไม่เจือจาง	96.56 ^ก ± 0.54	76.67 ^ก ± 8.46	2.67 ^ค ± 2.69	94.77 ^ก ± 0.83	94.77 ^ก ± 0.83	21.06 ^ข ± 7.07
พันธุ์ดิลลี่	Lake	88.89 ^ข ± 2.23	44.11 ^ข ± 9.62	16.67 ^{คข} ± 5.52	92.67 ^ก ± 0.74	92.67 ^ก ± 0.74
	Tselutin	81.44 ^ก ± 2.89	36.00 ^ข ± 8.19	21.11 ^ข ± 6.74	92.33 ^ก ± 0.79	92.33 ^ก ± 0.79
	Schramm	88.33 ^ข ± 2.79	38.44 ^ข ± 7.63	22.67 ^ข ± 6.17	92.67 ^ก ± 0.80	92.67 ^ก ± 0.80
	BPSE	89.33 ^ข ± 1.80	64.89 ^ก ± 5.83	54.33 ^ก ± 6.22	92.88 ^ก ± 0.83	92.88 ^ก ± 0.83
	IGKPh	92.44 ^{กข} ± 1.43	88.33 ^ก ± 2.65	59.89 ^ก ± 6.42	93.24 ^ก ± 0.85	93.24 ^ก ± 0.85
น้ำเชื้อสดไม่เจือจาง	87.28 ^ข ± 3.75	69.67 ^ก ± 8.31	24.50 ^ข ± 8.02	85.72 ^ก ± 2.18	85.72 ^ก ± 2.18	45.50 ^ข ± 7.14
พันธุ์ไรต์เฮล์แลนด์เรด	Lake	75.00 ^{กข} ± 6.01	33.56 ^{คข} ± 6.66	15.11 ^ค ± 5.40	85.83 ^ก ± 3.04	85.83 ^ก ± 3.04
	Tselutin	56.67 ^ค ± 8.43	22.22 ^ข ± 5.76	8.94 ^ค ± 3.56	85.56 ^ก ± 3.10	85.56 ^ก ± 3.10
	Schramm	64.67 ^{คข} ± 5.92	28.00 ^{คข} ± 7.68	11.11 ^ข ± 3.99	84.89 ^ก ± 3.38	84.89 ^ก ± 3.38
	BPSE	68.00 ^{คข} ± 5.32	45.00 ^{คข} ± 6.70	24.11 ^ข ± 6.33	87.11 ^ก ± 2.70	87.11 ^ก ± 2.70
	IGKPh	71.33 ^{กขค} ± 4.67	62.44 ^{กข} ± 7.05	49.78 ^ก ± 7.00	88.22 ^ก ± 2.24	88.22 ^ก ± 2.24

หมายเหตุ

^{ก-ง} อักษรที่แตกต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันของไก่แต่ละพันธุ์ แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติ ($P < 0.05$)

การทดลองที่ 2 ผลของน้ำยาเจือจางต่ออัตราการผสมติด

จากการศึกษาพบว่าอัตราการผสมติดจากการผสมเทียม โดยน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางสูตรต่างๆ ให้ผลไม่แตกต่างกันในทางสถิติและไม่ต่างจากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสดไม่เจือจาง ($P > 0.05$) (ตารางที่ 4) แสดงให้เห็นว่าหากเจือจางน้ำเชื้อภายหลังการรีดทันทีและผสมเทียมภายในเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากการรีด น้ำยาเจือจางสูตรต่างๆ ดังกล่าวไม่ได้ก่อผลเสียหายใดๆ ต่อการผสมติด ในกรณีการบ่มน้ำเชื้อนอกร่างกายที่ 41°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิร่างกายของไก่ พบว่าความสามารถในการรอดชีวิตของอสุจิแตกต่างกันในแต่ละสูตรน้ำยา แต่เมื่อผสมเทียมด้วยน้ำยาเจือจางโดยเร็วพบว่าการผสมติดไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าระบบสืบพันธุ์ของไก่เพศเมียมีสภาพที่เอื้ออำนวยต่อการมีชีวิตรอดเพื่อปฏิสนธิได้ของอสุจิ จึงทำให้ผลการผสมติดของทรีทเมนต์ต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกัน ในกรณีของการบ่มน้ำเชื้อนอกร่างกายที่ทำให้อสุจิเสียหาย อาจมีความเป็นไปได้ว่าองค์ประกอบที่มีในน้ำกามของไก่เป็นพิษต่ออสุจิไม่มากนักอยู่ในสภาพนอกร่างกาย (Sexton, 1988; Blesbois and de Revier, 1992; Van Voorst and Leenstra, 1995)

ตารางที่ 4 ผลของน้ำเชื้อเจือจางไก่พื้นเมืองต่ออัตราการผสมติด ภายหลังการผสมเทียมแม่ไก่ไข่

สูตรน้ำยาเจือจาง	ปริมาณที่ใช้ในการผสมเทียม (มล.)	จำนวนไข่เข้าฟัก	จำนวนไข่มีชีวิต	อัตราการผสมติด (%)
น้ำเชื้อสดไม่เจือจาง	0.03	159	153	96.23± 1.33
Lake	0.1	126	118	93.65± 0.72
Tselutin	0.1	132	118	89.39± 5.20
Schramm	0.1	144	134	93.05± 1.69
BPSE	0.1	137	128	93.43± 3.32
IGGKPh	0.1	115	109	94.78± 3.81

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาพบว่า การเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ที่อุณหภูมิสูงน้ำเชื้อจะเสื่อมสภาพรุนแรงขึ้นตามระยะเวลาของการบ่มที่นานขึ้น ในกรณีการเจือจางน้ำเชื้อ และบ่มภายนอกร่างกาย สูตรน้ำยามีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่และอัตราการผสมติดของอสุจิ โดยน้ำยาเจือจางสูตร IGGKPh เอื้ออำนวยต่อการมีชีวิตรอดของอสุจียาวนานที่สุด แต่กรณีรีดน้ำเชื้อไก่ แล้วเจือจางและผสมเทียมภายใน 1 ชั่วโมง น้ำยาเจือจางทุกสูตรให้ผลการผสมติดไม่แตกต่างกันและไม่ต่างจากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสด ดังนั้น ภายหลังจากการรีดน้ำเชื้อ หากใช้น้ำเชื้อเจือจางผสมเทียมไก่ให้แล้วเสร็จภายในเวลาไม่นาน สูตรน้ำยาเจือจางที่ใช้ในปัจจุบันให้ผลอัตราการผสมติดไม่แตกต่างกัน

เอกสารอ้างอิง

- Bakst, M. R. and G. J. Wishart. 1995. Semen handling. Pages 90-123 in: Proceedings: First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry Science. M. R. Bakst and G. J. Wishart, (eds.) Poultry Science Association, Savoy, IL.
- Blesbois, E., M. de Reviers. 1992. Effect of different fractions of seminal plasma on the fertilizing ability of fowl spermatozoa in vitro. J. Reprod. Fert. 95: 265-268.
- Bootwalla, S. M. and R. D. Miles. 1992. Development of diluents for domestic fowl semen. World's Poultry Sci. 48: 121-128.
- Chalah, T.F., and J.P. Brillard. 1999. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. Cryobiology 39: 185-191.
- Christensen, V.L. 1995. Diluents, dilution and storage of poultry semen for six hours. Pages 90-106 in: Proceedings: First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry Science. M. R. Bakst and G. J. Wishart, (eds.) Poultry Science Association, Savoy, IL.
- Donoghue, A.M. and G.J. Wishart. 2000. Storage of poultry semen. Anim.Reprod.Sci. 62: 213-232.
- Gee, G.F. 1995. Artificial insemination and cryopreservation of semen from domestic birds. Pages 90-116 in: Proceedings: First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry Science. M. R. Bakst and G. J. Wishart, (eds.) Poultry Science Association, Savoy, IL.
- Lake, P.E. and J. M. Stewart. 1978. Artificial Insemination in Poultry. Bulletin 213. Ministry of Agriculture, Fish and Food, Her Majesty's Stationery office, London, UK.
- Lukaszczak, E. 2001. Effects of semen filtration and dilution rate on morphology and fertility of frozen gander spermatozoa. Theriogenology 55: 1819-1829.
- Reddy, R.P. 1995. Artificial Insemination of broilers: Economic and management implications. Pages 73-89 in: Proceedings: First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry. M. R. Bakst and G. J. Wishart, (eds.) Poultry Science Association, Savoy, IL.
- Sexton, T.J. 1977. A new poultry semen extender. 1. Effect of extension on the fertility of chicken semen. Poultry Sci. 56: 1443-1446.

- Sexton, T.J. 1979. Preservation of poultry semen-A review. Beltsville Symposia in Agricultural Research. No. 3, Animal Reproduction, Allanheld, Osmun & co., Montclair, N.Y. 159-170.
- Sexton, T.J. 1988. Influence of seminal plasma on the fecundity of chicken spermatozoa. Theriogenology 30: 711-720.
- Sorensen, A. M. 1979. Animal Reproduction on principle and practices, McGraw, Hill, Inc, USA. 496p.
- Van voorst, A., and F.R. Leenstra.,1995. Effect of dialysis before storage or cryopreservation on fertilizing ability of fowl semen. Poultry Sci. 74: 141–146.

งานวิจัย 2: ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองต่ออัตราการผสมติด

Research 2: The effect of storage times on the fertilizing capacity of native chicken semen

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ศึกษาผลของน้ำยาเจือจาง 5 สูตร ได้แก่ Prefreezing Lake, Tselutin, Schramm, BPSE และ IGGKPh ต่ออัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิ ของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองเจือจางที่เก็บรักษา ณ อุณหภูมิ 5 °ซ เป็นเวลา 0, 24, และ 48 ชั่วโมง โดยมีน้ำเชื้อสดไม่เจือจางเป็นกลุ่มควบคุม จากการศึกษาพบว่า น้ำยาเจือจางสูตร IGGKPh ให้อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิสูงกว่าสูตรอื่น เมื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ($P < 0.05$) 2) ศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อเจือจางด้วยน้ำยาสูตร IGGKPh ต่ออัตราการผสมติด โดยแบ่งกลุ่มทดลองเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 น้ำเชื้อสดที่ไม่ได้เจือจาง, กลุ่มที่ 2 น้ำเชื้อเจือจางด้วยน้ำยา IGGKPh, กลุ่มที่ 3 น้ำเชื้อเจือจางด้วยน้ำยา IGGKPh เก็บรักษาไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, และกลุ่มที่ 4 น้ำเชื้อเจือจางด้วยน้ำยา IGGKPh เก็บรักษาไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่า อัตราการผสมติดเฉลี่ยใน 2-15 วันภายหลังการผสมเทียม ในกลุ่มที่ 1 และ กลุ่มที่ 2 ให้อัตราการผสมติดสูงกว่ากลุ่มที่ 3 และ กลุ่มที่ 4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) มีค่าเท่ากับร้อยละ 77.30, 79.75, 54.82 และ 46.65 ตามลำดับ

คำสำคัญ : น้ำเชื้อสด, น้ำเชื้อที่เก็บรักษา, อัตราการผสมติด, ไก่พื้นเมือง

Abstract

The objective of these studies were : 1) To determine the effect of various diluents; Prefreezing Lake, Tselutin, Schramm, BPSE and IGGKPh on sperm motility and viability after storage times of 0, 24 and 48 h. at 5 °C. Fresh undiluted semen was served as control. It was established that IGGKPh gave the highest percentage of motility and viability of spermatozoa at 24 and 48 h. of storage. 2) To compare the effect of storage times on the fertility capacity of native chicken semen. Pooled semen sample was allocated to 4 groups; fresh undiluted semen, 0 h. stored IGGKPh diluted semen, 24 h. stored IGGKPh diluted semen and 48 h. stored IGGKPh diluted semen. For fertility test, each semen groups were inseminated to layer hens and eggs were collected from day 2 to 15 after AI. Fertility of eggs from fresh undiluted semen and 0 h. stored IGGKPh diluted semen were higher ($p < 0.05$) than that of 24 h. stored IGGKPh diluted semen and 48 h. stored IGGKPh diluted semen (77.3%, 79.75%, 54.82% and 46.65% respectively).

Keywords: fresh semen, stored semen, fertility, native chicken

บทนำ

การผสมเทียมในไก่นั้นมีประโยชน์ในหลายด้านได้แก่ ด้านการปรับปรุงพันธุ์ โดยเป็นเทคโนโลยีที่ใช้เป็นเครื่องมือในการกระจายพันธุกรรมของพ่อพันธุ์ที่ดีได้รวดเร็วขึ้น ด้านการอนุรักษ์พันธุกรรมของสัตว์ที่ใกล้จะสูญพันธุ์ นอกจากนั้นการผสมเทียมยังมีประโยชน์ในเรื่องการควบคุมโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์ มีการใช้เทคโนโลยีการผสมเทียมอย่างกว้างขวางในสัตว์เศรษฐกิจโดยเฉพาะในโค และสุกร ในสัตว์ปีกนิยมทำกันในไก่วง สำหรับไก่มีการใช้การผสมเทียมบ้างโดยเฉพาะอย่างยิ่งในระยะต้นหรือปลายฤดูการผสมพันธุ์เป็นช่วงที่การผสมพันธุ์ตามธรรมชาติไม่ให้เกิดผล ทั้งนี้ยังช่วยลดปัญหาการผสมพันธุ์แบบธรรมชาติที่อาจเกิดปัญหาจากพ่อพันธุ์ เช่นพ่อพันธุ์ไม่สามารถขึ้นทับได้ การผสมเทียมในไก่โดยการใช้ไข่แช่เย็น เป็นวิธีที่ง่าย ซึ่ง Sexton (1978) รายงานว่า การเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่แจ้จางที่อุณหภูมิ 5 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้อัตราการผสมติดภายหลังการผสมเทียม ต่างจากน้ำเชื้อที่ใช้ผสมเทียมภายหลังการรีดเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ที่แจ้จางแล้วเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าอสุจิสูญเสีย total lipid (Blesbois and Reviers, 1992) Dumpala et al. (2006) รายงานว่าในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแจ้จางเป็นเวลา 8 ชั่วโมง ประเมินคุณภาพทุกๆ ชั่วโมงคุณภาพของน้ำเชื้อค่อยๆ ลดต่ำลงเป็นลำดับ และการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ น้ำเชื้อจะมีคุณภาพดีกว่าการเก็บที่อุณหภูมิร่างกายของไก่ น้ำเชื้อไก่ภายหลังการรีด 1 ชั่วโมงขึ้นไป มีความจำเป็นต้องแจ้จางด้วยน้ำยาแจ้จางที่เหมาะสม ไมเช่นนั้นแล้วจะทำให้การผสมติดต่ำลง (Christensen, 1995)

อย่างไรก็ตามความรู้ที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นในไก่พื้นเมืองยังขาดข้อมูล การศึกษาในเรื่องนี้จึงน่าสนใจและผลจากการศึกษาอาจนำไปประยุกต์ใช้ในการผสมเทียมไก่ด้วยน้ำเชื้อที่เก็บรักษาในอุณหภูมิแบบแช่เย็น ที่จำเป็นที่ต้องเก็บรักษาน้ำเชื้อ ในช่วงระยะ 1-2 วัน เช่นระหว่างการเดินทางน้ำเชื้อที่แจ้จางของพ่อพันธุ์ที่อยู่ไกลมาทำการผสมเทียมเพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่ต้องการ ซึ่งไม่ต้องสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการขนย้ายและค่าเลี้ยงดูพ่อพันธุ์ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแจ้จางไก่พื้นเมืองต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติด ซึ่งแบ่งการศึกษาออกเป็น 2 การทดลอง โดยการทดลองที่ 1 ศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อในอุณหภูมิ 5 °ซ ชั่วโมงที่ 0, 24, และ 48 ของน้ำยาแจ้จางสูตรต่างๆ ต่ออัตราการเคลื่อนไหวและอัตราการรอดชีวิตของอสุจิ และการทดลองที่ 2 เป็นการนำน้ำยาแจ้จางสูตรที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 ไปศึกษาเปรียบเทียบผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแจ้จาง ต่ออัตราการผสมติดต่อไป

วิธีการศึกษา

การศึกษาแบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของน้ำยาเจือจางต่ออัตราการเคลื่อนที่และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิของน้ำเชื้อไก่พื้นเมือง ณ อุณหภูมิ 5 °ซ เป็นเวลา 0, 24 และ 48 ชม.

สัตว์ทดลอง

ใช้พ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว และคละสี อายุระหว่าง 1.5-2 ปี และเป็นพ่อพันธุ์ที่ผ่านการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อผ่านแล้ว กลุ่มละ 5 ตัว แยกเลี้ยงพ่อพันธุ์ในกรงขังเดี่ยว ให้อาหารวันละ 110 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำสะอาดกินแบบเต็มที่

การรีดน้ำเชื้อ

รีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โดยใช้ทีมผู้รีด 2 คน โดยจับบังคับไก่ 1 คน ด้วยการขู่ไก่รวบปีก และขาไก่ด้วยมือแต่ละข้าง ส่วนอีกคนหนึ่งเป็นผู้กระตุ้นพ่อพันธุ์ด้วยการลูบหลังจากด้านหน้าไปด้านหลัง โดยเพิ่มน้ำหนักจากเบาแล้วลงน้ำหนัก พ่อพันธุ์ที่มีสุขภาพดีจะตอบสนองด้วยการเกร็งและกระดกหาง การบีบโคนกันเพื่อเก็บน้ำเชื้อจะต้องกระทำโดยทันที รongเก็บน้ำเชื้อด้วยหลอดที่สะอาด ขนาด 1.5 ml. น้ำเชื้อที่ปนเปื้อนจะไม่นำมาศึกษา จากนั้นรวบรวมน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์แต่ละกลุ่มในหลอดเดียวกัน (pooled semen) เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

น้ำยาเจือจาง

น้ำยาเจือจางที่ใช้จำนวน 5 สูตร เช่นเดียวกับงานวิจัย 1

การเจือจางและการเก็บรักษาน้ำเชื้อ

แบ่งน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์แต่ละกลุ่มเป็น 6 ส่วน เพื่อเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางจำนวน 5 สูตร สูตรละ 1 ส่วนและกลุ่มควบคุม 1 ส่วน (ไม่เจือจาง) เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางในสัดส่วน 1:4 (น้ำเชื้อ: น้ำยาเจือจาง) เก็บรักษาน้ำเชื้อทั้ง 6 ส่วน ที่อุณหภูมิ 5° ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

ประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิและอัตราการรอดชีวิตของอสุจิจากการย้อมสี ตามวิธีการที่อ้างโดย Lake and Stewart (1978) และ Sorensen (1979) ที่ชั่วโมงที่ 0, 24, และ 48 ตามลำดับ

การทดสอบทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Complete Randomized Design (CRD) 6 ปัจจัยการทดลอง (น้ำเชื้อสด และน้ำยาเจือจาง 5 สูตร), จำนวน 4 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ของค่าเฉลี่ยอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิ และเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี Duncan's multiple range test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (SAS, 1985)

การทดลองที่ 2 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางสูตร IGKKP ต่ออัตราการผสมติด

สัตว์ทดลอง

ใช้พ่อพันธุ์ 2 กลุ่ม ได้แก่ ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว และไก่พื้นเมืองคละสี อายุระหว่าง 1.5-2 ปี กลุ่มละ 5 ตัว จำนวนรวม 10 ตัว แยกเลี้ยงพ่อพันธุ์ในกรงขังเดี่ยว และใช้แม่พันธุ์ไก่ไข่ทางการค้า รวมทั้งสิ้นจำนวน 72 ตัว เลี้ยงในกรงตับ กรงละ 2 ตัว ให้อาหารไก่พ่อพันธุ์วันละ 110 กรัม/ตัว/วัน สำหรับแม่พันธุ์ได้รับอาหารวันละ 100 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำสะอาดกินแบบเต็มที่

การรีดน้ำเชื้อ

ทำการรีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โดยใช้ทีมผู้รีด 2 คน โดยจับบังคับไก่ 1 คน ด้วยการอุ้มไก่รวบปีก และขาไก่ด้วยมือแต่ละข้าง ส่วนอีกคนหนึ่งเป็นผู้กระตุ้นพ่อพันธุ์ด้วยการลูบหลังจากด้านหลังไปด้านหลัง โดยเพิ่มน้ำหนักจากเบาแล้วลงน้ำหนัก พ่อพันธุ์ที่มีสุขภาพดีจะตอบสนองด้วยการเกร็งและกระดกหาง การบีบโคนกันเพื่อเก็บน้ำเชื้อจะต้องกระทำโดยทันที ร่องเก็บน้ำเชื้อด้วยหลอดที่สะอาด ขนาด 1.5 ml. น้ำเชื้อที่ปนเปื้อนจะไม่นำมาศึกษา จากนั้นรวบรวมน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์จำนวน 12 ตัว รวมในหลอดเดียวกัน (pooled semen) เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

การเจือจางและการเก็บรักษาน้ำเชื้อ

แบ่งน้ำเชื้อเป็น 4 ส่วน กลุ่มควบคุม 1 ส่วน (ไม่เจือจาง) และ 3 ส่วนที่เหลือ เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางสูตร IGKKPh ซึ่งเป็นสูตรที่ให้ผลการทดลองดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 ในสัดส่วน 1:4 (น้ำเชื้อ: น้ำยาเจือจาง) แบ่งน้ำเชื้อ 3 ส่วนที่เหลือ แบ่งเป็นส่วนที่ 2 น้ำเชื้อเจือจางด้วยน้ำยา IGKKPh, ส่วนที่ 3 น้ำเชื้อเจือจางด้วยน้ำยา IGKKPh เก็บรักษาไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, และส่วนที่ 4 น้ำเชื้อเจือจางด้วยน้ำยา IGKKPh เก็บรักษาไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเก็บรักษาน้ำเชื้อส่วนที่ 3 และ 4 ที่อุณหภูมิ 5° ซ

การผสมเทียม

ทำการผสมเทียมในเวลา 15.00 น. ให้กับแม่ไก่ไข่ทางการค้า ส่วนละ 24 ตัว น้ำเชื้อส่วนที่ 1 กลุ่มควบคุม และส่วนที่ 2 ผสมเทียมภายในเวลา 30 นาที ส่วนที่ 3 น้ำเชื้อเจือจางด้วยน้ำยา IGKKPh เก็บรักษาไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง, และส่วนที่ 4 น้ำเชื้อเจือจางด้วยน้ำยา IGKKPh เก็บรักษาไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนการผสมเทียม โดยกลุ่มควบคุมใช้ปริมาณน้ำเชื้อ 0.03 มล./แม่ และน้ำเชื้อเจือจางใช้ปริมาณน้ำเชื้อ 0.1 มล./แม่ เพื่อปรับให้จำนวนอสุจิที่ใช้ผสมเทียมมีความใกล้เคียงกัน ซึ่งปริมาณดังกล่าวเป็นวิธีการปฏิบัติในการผสมเทียมตามมาตรฐานทั่วไป ทำการผสมเทียมเพียงครั้งเดียว เป็นเวลา 14 วัน (เริ่มจากวันที่ 2-15 หลังจากการผสมเทียม)

การเก็บไข่เข้าฟักและการส่องไข่

เก็บไข่เข้าฟักในวันที่ 2 – 15 หลังการผสมเทียม รวมระยะเวลา 14 วัน โดยรวบรวมไข่ครบ 7 วันแล้วจึงเอาเข้าฟัก 1 ครั้ง รวม 2 ครั้ง หลังจากนั้นเมื่อไข่เข้าฟักได้เป็นเวลา 7 วัน ทำการส่องไข่เพื่อประเมินอัตราการผสมติด

การบันทึกข้อมูลการผสมติด

เก็บบันทึกอัตราการผสมติด นำไข่ที่เข้าฟักมาทดสอบอัตราการผสมติดโดยการกะเทาะเปลือกออกเพื่อดูการพัฒนาของคัพภะภายหลังฟัก 7 วัน

การทดสอบทางสถิติ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยอัตราการผสมติดจากน้ำเชื้อ และน้ำเชื้อเจือจาง โดยใช้ Chi-square test

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของน้ำยาเจือจางต่ออัตราการเคลื่อนที่และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่เก็บรักษา ณ อุณหภูมิ 5 °ซ เป็นเวลา 0, 24, และ 48 ชั่วโมง

ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อชั่วโมงแรก พบว่าน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางสูตร Tselutin มีคุณภาพน้ำเชื้อในด้านอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิ ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม และน้ำยาเจือจางสูตร BPSE และ IGGKPh อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 5)

ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ 24 ชั่วโมง ผลการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อพบว่า น้ำเชื้อเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางสูตร IGGKPh มีคุณภาพดีที่สุดทั้งการเคลื่อนที่และการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิ รองลงมาคือ น้ำเชื้อเจือจางสูตร BPSE และในกลุ่มที่มีคุณภาพน้ำเชื้อต่ำที่สุดคือกลุ่มน้ำเชื้อเจือจางสูตร Schamm, น้ำเชื้อเจือจางสูตร Tselutin, น้ำเชื้อเจือจางสูตร Prefreezing Lake และน้ำเชื้อสดที่ไม่ได้เจือจาง (ตารางที่ 5) ในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นน้ำเชื้อสดไม่เจือจาง เมื่อทำการเก็บรักษาไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมงคุณภาพน้ำเชื้อต่ำลงมากจนไม่เหมาะกับการนำไปผสมเทียมแสดงให้เห็นว่าการเจือจางนั้นมีความจำเป็นอย่างมากในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ ควรมีการเจือจางทันทีหลังรีดน้ำเชื้อ ส่วนในน้ำเชื้อเจือจางนั้นในกลุ่มน้ำเชื้อเจือจางสูตร IGGKPh นั้นมีคุณภาพของอสุจิสูงที่สุดเมื่อทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อ รองลงมาเป็นกลุ่มน้ำเชื้อเจือจางสูตร BPSE และกลุ่มที่มีคุณภาพน้ำเชื้อต่ำที่สุดคือกลุ่มน้ำเชื้อเจือจางสูตร Schamm, Tselutin และ Prefreezing Lake ตามลำดับ แสดงว่าสูตรน้ำยาเจือจางมีผลต่อการเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัย 1

ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ 48 ชั่วโมง พบว่าคุณภาพน้ำเชื้อมีค่าลดต่ำลงทุกกลุ่มการทดลอง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองต่างๆ พบว่าให้ผลเช่นเดียวกับผลการตรวจคุณภาพใน 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 5) ผลความแตกต่างระหว่างสูตรน้ำยาต่อคุณภาพน้ำเชื้อในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ของการเก็บรักษา อาจเป็นผลมาจากหลายสาเหตุ ตัวอย่างเช่น องค์ประกอบ และคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ของน้ำยาเจือจาง (Christenson, 1995) ซึ่งเชื้ออสุจิต่อการรอดชีวิตของอสุจิที่แตกต่างกันไป ดังที่ได้

กล่าววิจารณ์ในงานวิจัยที่ 1 นอกจากนี้พบว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อของสัตว์ปีกในสภาพเหลวก่อให้เกิด lipid oxidation ทำให้เซลล์อสุจิเสื่อมสภาพอันมีผลต่ออัตราการผสมติด (Wishart, 1989) และ Sexton (1988) ยังได้รายงานถึงผลเสียของ seminal plasma ของน้ำเชื้อไก่ต่อตัวอสุจิของน้ำเชื้อที่เก็บรักษา

ตารางที่ 5 คุณภาพของน้ำเชื้อเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางสูตรต่างๆ เก็บรักษาที่ 5 °ซ (ค่าเฉลี่ย±SE)

สูตรน้ำยา เจือจาง	อัตราการเคลื่อนที่ (%) ณ ชั่วโมงที่			อัตราการรอดชีวิตของอสุจิ (%) ณ ชั่วโมงที่		
	0	24	48	0	24	48
น้ำเชื้อสดไม่ เจือจาง	91.44 ⁿ ±2.08	1.00 ⁱ ±11.66	1.00 ⁱ ±9.09	93.44 ⁿ ±0.93	1.00 ⁱ ±13.11	1.00 ⁱ ±11.40
Prefreezing						
Lake	71.67 ⁿ ±11.63	8.88 ⁱ ±9.43	1.22 ⁱ ±5.00	76.00 ⁿ ±11.38	12.33 ⁱ ±11.03	2.56 ⁱ ±6.47
Tselutin	65.00 ⁿ ±1.80	5.88 ⁱ ±3.48	1.00 ⁱ ±2.32	71.88 ⁿ ±1.63	7.22 ⁱ ±5.55	1.00 ⁱ ±3.99
Schramm	72.56 ⁿ ±2.26	5.66 ⁱ ±12.84	1.22 ⁱ ±14.95	83.67 ⁿ ±1.36	11.00 ⁱ ±13.17	2.56 ⁱ ±15.43
BPSE	87.89 ⁿ ±8.68	44.77 ⁿ ±13.85	32.56 ⁿ ±14.95	91.56 ⁿ ±8.64	58.11 ⁿ ±13.19	40.89 ⁿ ±15.41
IGGKPh	91.78 ⁿ ±4.14	84.11 ⁿ ±14.72	83.72 ⁿ ±14.18	93.56 ⁿ ±2.61	88.56 ⁿ ±15.29	85.11 ⁿ ±15.56

หมายเหตุ

^{n-ข} อักษรที่แตกต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันของไก่แต่ละพันธุ์ แสดงความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

การทดลองที่ 2 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางสูตร IGKKP ต่ออัตราการผสมติด

อัตราการผสมติดเฉลี่ยในช่วง 2-15 วัน พบว่ากลุ่มที่ 1 มีค่าเฉลี่ยอัตราการผสมติดเท่ากับ ร้อยละ 77.30 ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(P>0.05) กับกลุ่มที่ 2(ร้อยละ 79.75) แสดงให้เห็นว่าการเจือจางน้ำเชื้อไม่มีผลเสียต่ออัตราการผสมติด ส่วนน้ำเชื้อที่เก็บรักษาในกลุ่มที่ 3 กับน้ำเชื้อเจือจางเก็บรักษาที่ 24 ชั่วโมงและกลุ่มที่ 4 น้ำเชื้อเจือจางเก็บรักษาที่ 48 ชั่วโมงซึ่งมีอัตราการผสมติด เท่ากับร้อยละ 54.82 และ 46.65 ตามลำดับ (ตารางที่ 6 และ กราฟที่ 1) ให้อัตราการผสมติดต่ำกว่าน้ำเชื้อที่ไม่ได้เก็บรักษา (ทั้งน้ำเชื้อสดไม่เจือจาง และน้ำเชื้อสดเจือจาง) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) แสดงว่าระยะเวลาการเก็บรักษามีผลเสียต่ออัตราการผสมติดซึ่งสอดคล้องกับ Sexton (1978) รายงานว่า การเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ที่เจือจางแล้วที่อุณหภูมิ 5 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อัตราเจือจาง 1 : 2 (น้ำเชื้อ : น้ำยาเจือจาง) เมื่อนำไปผสมเทียมให้อัตราการผสมติดภายหลังการผสมเทียมต่างจากน้ำเชื้อที่ใช้ผสมเทียมภายหลังการรีด และ Dumpala et al. (2006) รายงานว่าในการรักษาคุณภาพน้ำเชื้อที่ 4 °ซ หลังจากเก็บน้ำเชื้อในชั่วโมงที่ 2 และ 4 คุณภาพของน้ำเชื้อจะค่อย ๆ ลดต่ำลงเป็นลำดับๆ และการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ น้ำเชื้อจะมีคุณภาพดีกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ

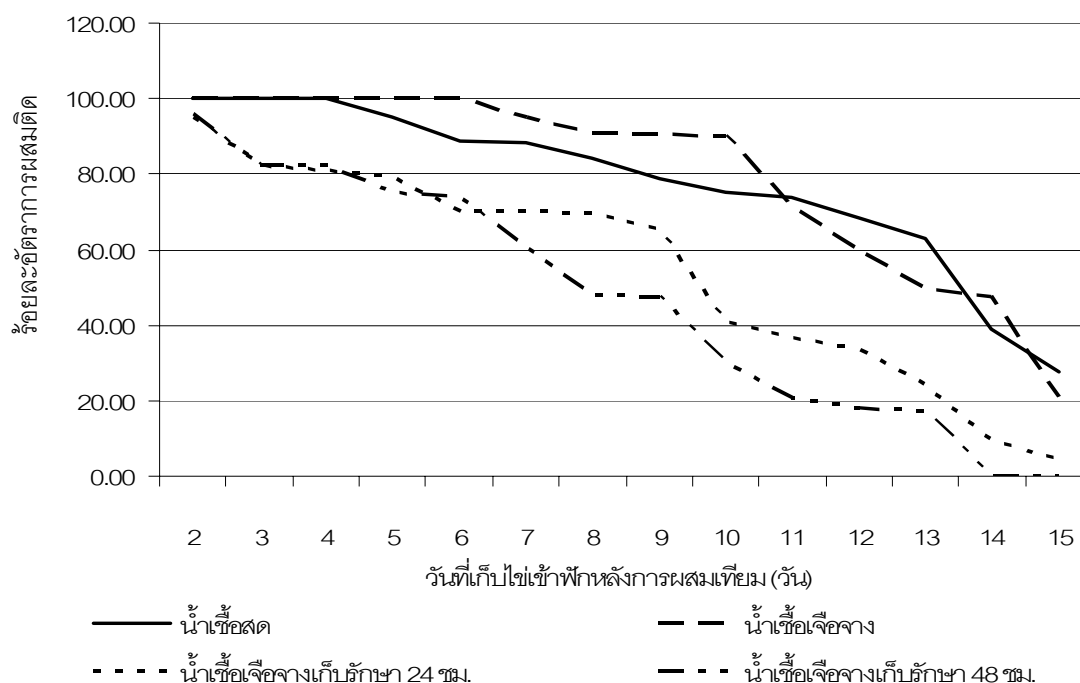
ร่างกายของไก่ การศึกษาของ Blesbois et al.(1999) ได้กล่าวไว้ว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 2-5 °ซ ความเข้มข้นของ total lipid จะลดลงจาก 820 มคก./10⁹ เซลล์ เหลือ 620 มคก./10⁹ เซลล์ เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง แสดงให้เห็นถึงความเสื่อมสภาพของอสุจิ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ถึงแม้จะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำแต่คุณภาพของน้ำเชื้อก็ลดลงเช่นกัน ดังจะเห็นได้ว่าอัตราการผสมติดลดลง (กราฟที่ 1) แสดงให้เห็นว่า แม้ว่าน้ำยาสูตร IGKKPh จะเป็นน้ำยาที่มีคุณสมบัติดีกว่าสูตรอื่น ๆ ที่ได้ศึกษาก็ตาม แต่ก็ไม่สามารถชะลอความเสื่อมสภาพของอสุจิไก่เมื่อเจือจางและเก็บรักษาได้ ซึ่งให้เห็นถึงองค์ประกอบของน้ำยาเจือจางที่ยังไม่เหมาะสมเพียงพอสำหรับการใช้เจือจางและเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ ซึ่งควรจะมีการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 6 ผลของอายุการเก็บรักษาน้ำเชื้อต่อการผสมติดในไก่พื้นเมือง

กลุ่มที่	จำนวนไข่	เฉลี่ยอัตราการผสมติด (2 – 15 วัน)
1. น้ำเชื้อสด	166	77.30 ⁿ
2. น้ำเชื้อเจือจาง	106	79.75 ⁿ
3. น้ำเชื้อเจือจางเก็บรักษา 24 ชั่วโมง	139	54.82 ^ข
4. น้ำเชื้อเจือจางเก็บรักษา 48 ชั่วโมง	141	46.65 ^ข

หมายเหตุ

ก-ข อักษรที่แตกต่างกันภายในสดมภ์เดียวกัน แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



กราฟที่ 1 อัตราการผสมติดเฉลี่ย ในวันที่ 2-15 ภายหลังการผสมเทียม โดยใช้น้ำเชื้อสด, น้ำเชื้อเจือจาง น้ำเชื้อเจือจางเก็บรักษา 24 ชม. และ น้ำเชื้อเจือจางเก็บรักษา 48 ชม.

สรุปผลการศึกษา

จากการทดลองที่ 1 เป็นการเปรียบเทียบสูตรน้ำยาเจือจางสูตรต่างๆ เมื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 5 °C ภายหลังการเก็บรักษาในชั่วโมงที่ 0 , 24, และ 48 พบว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตรที่ให้ น้ำเชื้อเจือจางที่มีคุณภาพดีที่สุด คือสูตร IGGKPh รองลงมาคือ BPSE, Schamm, Tselutin , และ Lake ตามลำดับ การทดลองที่ 2 เป็นการศึกษาผลของน้ำเชื้อเจือจางสูตร IGGKPh ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 0, 24, และ 48 ชั่วโมงต่ออัตราการผสมติด ผลปรากฏว่า น้ำเชื้อเจือจางที่เก็บรักษาเป็นเวลา 24, และ 48 ชั่วโมง ให้อัตราการผสมติดต่ำกว่าน้ำเชื้อที่ไม่ได้เก็บรักษา ดังนั้นในการใช้ประโยชน์น้ำเชื้อไก่พื้นเมืองอย่างมีประสิทธิภาพที่สุด คือการเจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง แล้วผสมเทียมแม่ไก่ภายหลังจากการรีดน้ำเชื้อ ในการศึกษาต่อไปควรทำการศึกษาถึงการปรับปรุงสูตรน้ำยาเจือจาง ตลอดจนวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อ เพื่อยืดอายุน้ำเชื้อที่เก็บรักษาให้ยาวนานขึ้น ซึ่งจะให้อัตราการผสมติดสูงขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- Blesbois E. , I. Grasseau and D. Hermier.1999. Changes in lipid content of fowl spermatozoa after liquid storage at 2 to 5 °C. *Theriogenology* 52: 326-334.
- Blesbois E and M. Reviers. 1992. Effect of different fraction of seminal plasma on the fertilizing ability on flow spermatozoa . *Asian. J. Androl* . 7(1): 86-92.
- Chalah, T.F., Seigneurin, E. Blesbosis and J.P. Brillard. 1999. In Vitro comparison of fowl sperm viability In vivo *Cryobiology* 39: 185–191.
- Christensen, V.L. 1995. Diluent, dilution and storage of poultry semen for six hour. pp. 90–106 in: *Proceedings: First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry Science*. M. R. Bakst and G. J. Wishart, (eds.) Poultry Science Association, Savoy, IL.
- Donoglu, A.M. and G.J. Wishart. 2000. Storage of poultry semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 213-232.
- Dumpala, P.R., H.M. Parker and C.D. McDaniel. 2006. The effect of semen storage temperature and diluent type on the sperm quality index of broiler breeder semen. *Int J. Poult Sci.* 5(9): 838–845.
- Lake, P.E. and J. M. Stewart. 1978. *Artificial Insemination in Poultry*. Bulltin 213. Ministry of Agriculture, Fish and Food, Her Majesty's Stationery office, London, UK.
- Lukaszczysz, E. 2001. Effects of semen filtration and dilution rate on morphology and fertility of frozen gander spermatogoa. *Theiogenology* 55: 1819-1829.

- Sexton, T.J. 1977. A new poultry semen extender. 1 Effect of extension of the fertility of chicken semen. Poultry Sci. 56: 1443–1446.
- Sexton, T.J. 1978. A new poultry semen extender. 3. Effect of storage conditions on the fertilizing Capacity of chicken semen stored at 5 °C. Poultry Sci. 57: 285–289.
- Sexton, T. J. 1988. Research note: Influence of damage spermatozoa on the fertility of turkey semen stored 24 h at 5 °C . Poultry Sci. 67: 1483.
- Sexton, T.J. 1988. Influence of seminal plasma on the fecundity of chicken spermatozoa. Theriogenology 30: 711-720.
- Sorensen, A. M. 1979. Animal Reproduction on principle and practices, McGraw, Hill, Inc, USA. 496p.
- Tselutin, K., F. Seignearin and E. Blesbois. 1999. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. Poultry Sci. 78: 586-590.
- Wishart, G. J. 1984. Effect of lipid peroxide formation in fowl semen on sperm mobility, ATP content and fertilizing ability. J. Reprod. Fertil. 71: 113-118.

งานวิจัย 3: ความทนต่อการแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อของอสุจิไก่พื้นเมือง

Research 3: Freezability of Native Chicken Spermatozoa

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความทนต่อการแช่แข็งและละลาย (freezability) ของน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองไทยเหลืองหางขาว คละสี และพ่อพันธุ์ไก่ไรต์ไอร์แลนด์เรด ภายหลังการรีดน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์แต่ละตัว เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางสูตร Beltsville Poultry Semen Extender (BPSE) 1:4 โดยมี DMSO ในน้ำเชื้อเจือจางคิดเป็นร้อยละ 4.5 ดำเนินการลดอุณหภูมิจาก 4°C ถึง -20°C โดยเครื่องควบคุมอุณหภูมิในอัตรา 1°C/นาที และจากอุณหภูมิ -20°C ถึง -95°C โดยการอังไอน์โตรเจนเหลวก่อนที่จะจุ่มหลอดบรรจุน้ำเชื้อลงในไอน์โตรเจนเหลว ทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 5°C 5 นาที ก่อนที่จะนำมาตรวจคุณภาพ น้ำเชื้อของพ่อพันธุ์แต่ละตัว ดำเนินการแช่แข็ง 3 ครั้ง จากการศึกษาพบว่า พ่อพันธุ์แต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันในเรื่องอสุจิมีชีวิตและอัตราการเคลื่อนไหวที่ภายหลังการละลาย แต่พบว่าพ่อพันธุ์แต่ละตัวในกลุ่มไก่คละสีและไก่พันธุ์ไรต์ไอร์แลนด์แดงมีอัตราการเคลื่อนไหวที่หลังละลายและ recovery rate แตกต่างกัน ($P < 0.05$) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งขึ้นกับคุณสมบัติของพ่อพันธุ์แต่ละตัว

คำสำคัญ: ความทนต่อการแช่แข็ง, อสุจิ, ไก่พื้นเมือง

Abstract

The aim of this study was to compare the sperm freezability of two lines of Thai native chicken, Luang Hang Khaw, Klasee and Rhode Island Red cocks. Semen of each male was diluted 1:4 with Beltsville Poultry Semen Extender containing 4.5% (v/v) dimethylsulfoxide. Semen straws were cooled down from 4°C to -20°C at freezing rate of 1°C / min and from -20°C to -95°C by placing in liquid nitrogen vapor in a zone at -95°C for 3 min before plunging into liquid nitrogen. Three replications of semen freezing were carried on of each male. Frozen semen was thawed at 5°C for 5 min and post-thaw motility, post-thawed recovery rate of motility and viability were assessed. The post-thawed viability and motility and recovery rate were not significantly different among groups, whereas there were large differences in freezability among individual males within a line ($P < 0.05$). The result of the present study suggest that post – thaw quality of frozen semen in native chicken depend on individual males.

Keywords : freezability, spermatozoa, native chicken

บทนำ

คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลายแล้วมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการผสมติดของอสุจิ กระบวนการแช่แข็งและละลายได้ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์อสุจิของสัตว์ปีกโดยมีการสูญเสียองค์ประกอบโปรตีนและ ATP ภายในเซลล์ (Long, 2006) รูปร่างพื้นฐานของอสุจิสัตว์ปีกซึ่งมีลักษณะยาวคล้ายไส้เดือน ทำให้อสุจิของสัตว์ปีกไวต่อความเสียหายจากการแช่แข็งเป็นพิเศษ (Donoghue and Wishart, 2000) จากข้อมูลศึกษาเปรียบเทียบน้ำเชื้อแช่แข็งของไก่ ไก่วง และนกต่างๆ พบว่าแต่ละ species มีความเสียหายจากการแช่แข็งในระดับที่แตกต่างกัน (Blanco et al., 2000) ซึ่งเกิดจากความแตกต่างของ membrane fluidity (Blesbois et al., 2005) นอกจากชนิดของสัตว์ปีกแล้วพันธุ์ในสัตว์ชนิดเดียวกันดังเช่นในไก่สายพันธุ์ต่างๆ ก็ให้ผลการผสมติดจากน้ำเชื้อแช่แข็งที่แตกต่างกันไป (Kirby et al., 1998) โดยพบว่าในสายพันธุ์เลือดชิดความสามารถในการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งจะต่ำ (Bacon et al., 1986; Blesbois, 2007) Blesbois et al. (2007) ได้ศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อของฝูงไก่พื้นเมืองของฝรั่งเศส พบอัตราการผสมติดมีความแปรปรวนสูงแม้ว่าจะเป็นพันธุ์เดียวกัน ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความทนได้ต่อกระบวนการแช่แข็งและละลายของอสุจิในไก่พื้นเมืองของกลุ่มคือ เหลืองหางขาว คละสี และไก่พันธุ์ไวต์ไฮสแลนด์เรด

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดลอง

ใช้พ่อพันธุ์ 3 กลุ่ม ได้แก่ ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว ไก่พื้นเมืองคละสี และไก่พันธุ์ไวต์ไฮสแลนด์เรด อายุระหว่าง 1-2 ปี กลุ่มละ 10 ตัว จำนวนรวม 30 ตัว แยกเลี้ยงพ่อพันธุ์ในกรงขังเดี่ยว ไก่ได้รับอาหารไก่ไข่ ประมาณ 110 กรัม/ตัว/วัน และน้ำสะอาดให้ดื่มตลอดเวลา

การรีดน้ำเชื้อ

รีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โดยใช้ทีมผู้รีด 2 คน โดยจับบังคับไก่ 1 คน ด้วยการอุ้มไก่อวบปีก และขาด้วยมือแต่ละข้าง ส่วนอีกคนหนึ่งเป็นผู้กระตุ้นพ่อพันธุ์ ด้วยการลูบหลังจากด้านหน้าไปด้านหลัง โดยเพิ่มน้ำหนักจากเบาแล้วลงน้ำหนัก พ่อพันธุ์ที่มีสุขภาพดีจะตอบสนองด้วยการเกร็งและกระดกหาง บีบโคนกันเพื่อเก็บน้ำเชื้อทันที รองเก็บน้ำเชื้อด้วยหลอดที่สะอาด ขนาด 1.5 ml. น้ำเชื้อที่ปนเปื้อนจะไม่นำมาศึกษา รวบรวมน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์แต่ละกลุ่มในหลอดเดียวกัน (pooled semen) เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

น้ำยาเจือจาง

ใช้น้ำยาเจือจางจำนวน 1 สูตร คือ สูตร BPSE (Sexton, 1977) และใช้ DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 4.5 เป็น cryoprotectant (CPA) สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการประกอบสูตรน้ำยาเจือจาง เป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma และน้ำที่ใช้ละลายเป็นน้ำกลั่น 2 ครั้ง (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจาง BPSE ในปริมาตร 1,000 มล.

องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจาง	กรัม
Magnesium chloride	0.34
Sodium acetate	4.30
Potassium citrate	6.40
Sodium glutamate	8.67
Dipotassium hydrogen phosphate	12.70
Potassium dihydrogen phosphate	0.65
Fructose	5.00
TES	1.95

การเจือจางน้ำเชื้อ

เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางสูตร BPSE (Sexton, 1977) ในสัดส่วน 1:4 โดยมี DMSO เป็น cryoprotectant ในระดับความเข้มข้นสุดท้ายของร้อยละ 4.5

การบรรจุน้ำเชื้อ

ใช้หลอด straw ขนาดจุ 0.5 มล.

การแช่แข็งน้ำเชื้อ

ลดอุณหภูมิไปที่ 5 °ซ โดยใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง บรรจุน้ำเชื้อใน straw 0.5 มล. ปิดปลายหลอดด้วย polyvinyl alcohol นำ straw บรรจุใน canister สำหรับแช่แข็งในแนวดิ่ง ระยะเวลาที่ใช้ตั้งจากรีดน้ำเชื้อจนบรรจุเครื่องแช่แข็งประมาณ 1.5 ชั่วโมง ลดอุณหภูมิจาก 5 ถึง -20°ซ (อัตรา 1°ซ/นาที่) จากนั้นย้ายหลอดบรรจุน้ำเชื้อไปอังไอน์โตรเจนเหลวอย่างรวดเร็วที่บริเวณอุณหภูมิ -95 °ซ เป็นเวลา 3 นาที จึงจุ่มหลอดบรรจุน้ำเชื้อลงในไอน์โตรเจนเหลว ในการแช่แข็งใช้ biological freezer ควบคุมด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Freeze control, Cryologic PTY, Australia) สำหรับการอังไอน์โตรเจนเหลว อุปกรณ์คือ กล่องโฟม ขนาด 28X38X29 ซม. มีตระแกรงสำหรับวางหลอดน้ำเชื้อที่เลื่อนระดับได้ และในขณะที่แช่แข็งจะเติมนไอน์โตรเจนเหลวสูงจากพื้นกล่องโฟม 8 ซม.

การละลายน้ำเชื้อ

ทำการละลายน้ำเชื้อด้วย อุณหภูมิ 5°ซ นาน 5 นาที (ใช้กล่องโฟมบรรจุน้ำแข็งและน้ำ)

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

ประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ตามวิธีการที่อ้างโดย Sorensen (1979) และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิจากการย้อมสี SYBR-14+PI ประเมินภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Olympus IX71, Japan) ตามวิธีการที่อ้างโดย Chalah and Brilland (1998)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบค่าความทนได้ของอสุจิในกระบวนการแช่แข็งและละลาย (freezability) ภายในไก่แต่ละสายพันธุ์ วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) 10 ทรีทเมนต์ๆ ละ 3 ซ้ำ แปลงค่าสังเกตของอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของอสุจิโดย $\arcsin \sqrt{x}$ หาความแปรปรวนโดยการวิเคราะห์ ANOVA เมื่อพบความแตกต่างทางสถิติเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างทรีทเมนต์โดย Duncan's new multiple range test

เปรียบเทียบค่า freezability ของอสุจิระหว่างสายพันธุ์ โดยวางแผนวิเคราะห์ทางสถิติแบบ 2 – level nested design 3 ทรีทเมนต์ๆ ละ 30 ซ้ำ แปลงค่าสังเกตของอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของอสุจิโดย $\arcsin \sqrt{x}$ หาความแปรปรวนโดยการวิเคราะห์ ANOVA เมื่อพบความแตกต่างทางสถิติเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างทรีทเมนต์โดย Duncan's new multiple range test

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากการศึกษาพบว่าอัตราการรอดชีวิตอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจีก่อนการแช่แข็งหลังละลาย และสัดส่วนของการเคลื่อนที่หลังการแช่แข็งและละลาย/อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจีก่อนการแช่แข็ง (recovery rate) ไม่แตกต่างกันระหว่างพันธุ์/สายพันธุ์ ($P>0.05$) (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจีก่อนแช่แข็งและภายหลังการละลายของน้ำเชื้อไก่พื้นเมือง
เหลืองหางขาว ไก่พื้นเมืองคะสี และไก่พันธุ์โรดไอส์แลนด์เรด

พันธุ์ / สายพันธุ์	หมายเลข	อัตราการเคลื่อนที่ (Mean $\pm$ SE)		
		ก่อนแช่แข็ง	หลังการละลาย	Recovery rate
ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว	1	91.00 $\pm$ 5.57	31.67 $\pm$ 1.67	34.98 $\pm$ 2.19
	2	97.00 $\pm$ 1.15	38.33 $\pm$ 1.67	39.43 $\pm$ 1.35
	3	96.67 $\pm$ 0.88	40.00 $\pm$ 0.00	41.39 $\pm$ 0.38
	4	96.67 $\pm$ 0.88	43.33 $\pm$ 3.33	44.79 $\pm$ 3.13
	5	96.67 $\pm$ 0.33	43.33 $\pm$ 3.48	45.40 $\pm$ 3.57
	6	96.67 $\pm$ 0.88	41.67 $\pm$ 3.33	43.05 $\pm$ 3.11
	7	96.00 $\pm$ 1.00	33.33 $\pm$ 4.41	34.82 $\pm$ 4.90
	8	98.00 $\pm$ 0.00	41.67 $\pm$ 4.41	42.52 $\pm$ 4.50
	9	96.00 $\pm$ 1.00	33.33 $\pm$ 3.31	34.77 $\pm$ 3.68
	10	89.33 $\pm$ 5.21	31.67 $\pm$ 9.28	34.60 $\pm$ 8.25
เฉลี่ย		95.43 $\pm$ 0.83	37.93 $\pm$ 1.41	39.61 $\pm$ 1.32
ไก่พื้นเมืองคะสี	1	85.00 $\pm$ 5.00	30.00 $\pm$ 10.00 ⁿ	34.21 $\pm$ 9.21 ⁿ
	2	91.67 $\pm$ 3.33	31.67 $\pm$ 4.41 ⁿ	34.37 $\pm$ 3.92 ⁿ
	3	93.33 $\pm$ 1.67	40.00 $\pm$ 2.89 ⁿ	42.79 $\pm$ 2.47 ⁿ
	4	75.00 $\pm$ 0.00	15.00 $\pm$ 2.89 ⁿ	20.20 $\pm$ 3.85 ⁿ
	5	76.67 $\pm$ 6.67	10.00 $\pm$ 2.89 ⁿ	13.23 $\pm$ 4.26 ⁿ
	6	90.00 $\pm$ 0.00	31.67 $\pm$ 7.26 ⁿ	35.18 $\pm$ 8.07 ⁿ
	7	93.33 $\pm$ 1.67	35.00 $\pm$ 7.64 ⁿ	37.82 $\pm$ 9.00 ⁿ
	8	95.00 $\pm$ 0.00	40.00 $\pm$ 10.00 ⁿ	42.11 $\pm$ 10.53 ⁿ
	9	91.67 $\pm$ 3.33	25.00 $\pm$ 2.89 ⁿ	27.55 $\pm$ 4.16 ⁿ
	10	86.67 $\pm$ 3.33	35.00 $\pm$ 7.64 ⁿ	39.81 $\pm$ 7.58 ⁿ
เฉลี่ย		87.83 $\pm$ 1.17	29.77 $\pm$ 2.45	32.76 $\pm$ 2.48
โรดไอส์แลนด์เรด	1	83.33 $\pm$ 4.41	31.67 $\pm$ 4.41 ⁿ	37.94 $\pm$ 4.45
	2	93.33 $\pm$ 1.67	36.67 $\pm$ 1.67 ⁿ	39.37 $\pm$ 2.53
	3	93.33 $\pm$ 1.67	41.67 $\pm$ 6.01 ⁿ	44.44 $\pm$ 5.76
	4	90.00 $\pm$ 0.00	28.33 $\pm$ 4.41 ⁿ	31.48 $\pm$ 4.90
	5	88.33 $\pm$ 4.41	16.67 $\pm$ 1.67 ⁿ	18.82 $\pm$ 1.27
	6	81.67 $\pm$ 7.26	35.00 $\pm$ 2.89 ⁿ	43.23 $\pm$ 3.80
	7	91.67 $\pm$ 1.17	31.67 $\pm$ 4.41 ⁿ	34.69 $\pm$ 5.28
	8	86.67 $\pm$ 3.33	43.33 $\pm$ 4.41 ⁿ	50.23 $\pm$ 5.17
	9	91.67 $\pm$ 1.67	41.67 $\pm$ 4.41 ⁿ	45.32 $\pm$ 3.99
	10	90.00 $\pm$ 2.89	40.00 $\pm$ 10.00 ⁿ	45.17 $\pm$ 12.72
เฉลี่ย		89.00 $\pm$ 0.76	34.67 $\pm$ 1.93	39.12 $\pm$ 2.19

หมายเหตุ

^{n-ข} อักษรที่แตกต่างกันภายในสดมภ์เดียวกันของไก่แต่ละพันธุ์ แสดงความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

อย่างไรก็ตามพบว่า อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการละลาย และ recovery rate มีความแตกต่างระหว่างพ่อพันธุ์ภายในไก่พันธุ์โรดไอแลนด์แดง และภายในไก่พื้นเมืองกลุ่มคละสี (P < 0.05) ส่วนในกลุ่มเหลืองหางขาวพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน

จากข้อมูลการศึกษาของนักวิจัยหลายคนะได้แสดงให้เห็นว่าความทนได้ของอสุจิในกระบวนการแช่แข็งและละลายมีความแตกต่างกันระหว่าง species (Blanco et al., 2000) ระหว่างสายพันธุ์ (Kirby et al., 1998; Blesbois et al., 2007) และระหว่างพ่อพันธุ์ไก่แต่ละตัว (Blesbois et al., 2006; Blesbois et al., 2007) ซึ่ง freezability ดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับระดับการถูกทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ซึ่งมีผลเสียต่อ metabolism และระดับ ATP ภายในเซลล์ Blesbois (2007) ได้ชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของคุณภาพน้ำเชื้อสดก่อนการแช่แข็งว่ามีความสำคัญมากต่อความสามารถของอสุจิที่จะทนต่อกระบวนการแช่แข็งและละลาย ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ไก่แต่ละตัว มีความทนได้ต่อกระบวนการแช่แข็งและละลายที่แตกต่างกัน และแม้ว่าจะไม่มีความแตกต่างกันในเรื่อง freezability ของอสุจิระหว่างพันธุ์/สายพันธุ์ แต่ได้สะท้อนให้เห็นถึงแนวโน้มเพียงที่ที่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มพ่อพันธุ์ดังกล่าว (P<0.05) เมื่อวินิจฉัยโดยภาพรวมแล้วจึงกล่าวได้ว่าความสามารถในการทนได้ต่อกระบวนการแช่แข็งและการละลายมีความแตกต่างกันระหว่างสัตว์ทดลองแต่ละตัว สอดคล้องกับรายงานของ Blesbois et al. (2006) และ Blesbois et al. (2007) นอกจากนี้ Ansah and Buckland (1983) ได้แสดงให้เห็นว่าการคัดเลือกสายพันธุ์ที่อสุจิทนต่อการแช่แข็ง ทำให้ได้รับอัตราการผสมติดสูงขึ้น ดังนั้นการคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่มีค่า freezability สูง จะเป็นแนวทางหนึ่งที่จะทำให้ได้น้ำเชื้อแช่แข็งที่มีคุณภาพสูงขึ้น

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษานี้พบว่า ค่า freezability ของอสุจิในไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว ไก่พื้นเมืองคละสี ไม่แตกต่างจากไก่พันธุ์โรดไอส์แลนด์เรด มีความแปรปรวนสูงของคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งและละลายในทุกกลุ่ม ไก่พื้นเมืองคละสีมีความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่

เอกสารอ้างอิง

- Ansah, G. A. and R. B. Bluckland. 1983. Eight generations of selection for duration of fertility of frozen thawed semen in the chicken. *Poultry.Sci.* 62: 1529-1539.
- Bacon, L. D., D. W. Salter, J. B. Motta, L. B. Crittenden, and F. X. Ogasawara. 1986. Cryopreservation of chicken semen of inbred or specialized Strains. *Poultry Sci.* 65: 1965–1971.
- Blanco, J. M., G. F. Gee, D. E. Wildt and A. M. Donoghue. 2000. Species variation osmotic, cryoprotectant and cooling rate tolerance in poultry, eagle and peregrine falcon spermatozoa. *Biol. Reprod.* 63: 1164-1171.
- Blesbois , E. 2007. Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poult. Sci. J.* 63: 213–222.
- Blesbois, E., I. Grasseau and F. Seigneurin. 2005. Membrane fluidity and ability to survive cryopreservation in domestic bird spermatozoa. *Reproduction* 129: 371–378.
- Blesbois, E., F. Dubos, I. Grasseau, M. M. Richrad, Y. Roman, M. Saint Jalme, and F. Seigneurin. 2006. Cryopreservation of avian spermatozoa and predictors ability to freezing. *Les actes du BRG.* 6: 415–431.
- Chalah, T. and J. P. Brillard. 1998. Comparison of fowl sperm viability by eosin–nigrosin and dual fluorescence (SYBR – 14). *Theriogynology* 50: 487–496.
- Donoghue, A. M. and G. J. Wishart. 2000. Storage of poultry semen. *Anim.Reprod.Sci.* 62: 213-232.
- Kirby, J. D., C. J. Tressler and Y. K. Kirby. 1998. Evaluation of the duration of sperm fertilizing ability in five lines of commercial broiler breeder and Delaware cross males. *Poultry Sci.* 77: 1688–1694.
- Long, J. A. 2006. Avian semen cryopreservation: What are the biological challenges. *Poultry Sci.* 85: 232–236.
- Sexton, T.J. 1977. A new poultry semen extender.1 Effect of extension on the fertility of chicken semen. *Poultry Sci.* 56: 1443–1446.
- Sorensen, A. M. 1978. *Animal Reproduction on Principle and Practices.* Mc.Graw. Hill, Inc., USA. 496 p.

งานวิจัย 4: การศึกษาเปรียบเทียบผลของ Cryoprotectants ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไก่ภายใต้การเก็บรักษา

Research 4: Comparison of Cryoprotectants on Motility of Preserved Chicken Spermatozoa

บทคัดย่อ

ศึกษาเปรียบเทียบชนิดและระดับของ cryoprotectant (CPA) 3 ชนิด คือ dimethylsulfoxide (DMSO), dimethylacetamide (DMA) และ dimethylformamide (DMF) ระดับร้อยละ 0, 2, 4, 6 และ 8 ในน้ำยาเจือจาง Beltsville Poultry Semen Extender (BPSE) ศึกษาเนื้อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว คละสี และไก่พันธุ์โรดไอส์แลนด์เรดที่เจือจางและเก็บรักษาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่าระดับความเป็นพิษของ DMSO, DMA และ DMF ไม่มีความแตกต่างที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน ระดับความเป็นพิษของ CPA ขึ้นกับระดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น เมื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของ DMSO ต่ออัตราการเคลื่อนที่และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิภายหลังการแช่แข็ง พบว่าระดับร้อยละ 8 ให้ผลดีที่สุด เพื่อทดสอบความเป็นพิษของ CPA ต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของอสุจิ ดำเนินการผสมเทียมแม่ไก่ไข่น้ำเชื้อเจือจางที่มีส่วนผสมของ DMSO ในระดับความเข้มข้นร้อยละ 8 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อเจือจาง ผลปรากฏว่า DMSO ทำให้อัตราการผสมติดของไข่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (ร้อยละ 62.1 และ 95.6 ตามลำดับ; $P < 0.05$)

คำสำคัญ: Cryoprotectant , การเก็บน้ำเชื้อ, การผสมเทียม, ไก่พื้นเมือง

Abstract

The deleterious effect of three cryoprotectants: dimethylsulfoxide (DMSO), dimethylacetamide (DMA) and dimethylformamide (DMF) at concentrations of 0, 2, 4, 6 and 8% in Beltsville Poultry Semen Extender (BPSE) were compared on chicken spermatozoa. Pooled semen of Luang Hang Khaw (Native), Kla-see (Native) and Rhode Island Red groups was diluted and stored at 5°C for 24h. The deleterious effect of DMSO, DMA and DMF on Chicken spermatozoa were non significantly difference. The deleterious effect of the cryoprotectants were dependent on their concentration. The effect of DMSO concentration on post – thaw motility and viability of frozen spermatozoa were compared. The results showed that 8% DMSO was the most effective on sperm post – thaw quality. To confirm the deleterious effect of cryoprotectant on spermatozoa, DMSO was added to diluted semen at final concentration of 8% (v/v) and inseminated to layer hens. Fertility eggs obtained from hens inseminated with DMSO was lower than control (62.1 and 95.6% respectively; $P < 0.05$)

Keywords : cryoprotectant, stored semen, artificial insemination, native chicken

บทนำ

ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่อ มีความจำเป็นต้องเติมสารป้องกันความเสียหายจากกระบวนการแช่แข็ง (cryoprotectant, CPA) ลงในน้ำเชื้อเจือจาง ทั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้อสุจิมีชีวิตรอดจากการลดอุณหภูมิที่เย็นจัด จากการศึกษาต่างๆ พบว่า CPA ที่ใช้ในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์ปีกมีหลายชนิด ตัวอย่างเช่น glycerol, dimethylsulfoxide, dimethylacetamide, ethyleneglycerol, dimethylformamide และ propyleneglycol เป็นต้น โดยมีรายงานการวิจัยถึงประสิทธิภาพของ CPA ที่แตกต่างกันไป (Donoghue and Wishart, 2000) ทั้งนี้ glycerol ได้รับการยอมรับว่าเป็น CPA ที่มีผลดีต่อตัวอสุจิภายหลังการแช่แข็งสูงสุด (Blesbois, 2007) แต่มีปัญหาต่อแหล่งพักพิงของอสุจิบริเวณส่วนต่อระหว่างช่องคลอดกับมดลูกของไก่ หากผสมเทียมที่บริเวณช่องคลอด (Donoghue and Wishart, 2000) อย่างไรก็ตามวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่ที่เป็นวิธีการมาตรฐานเป็นที่นิยมในปัจจุบัน มีการใช้ CPA ชนิดที่ต่างกัน เช่น glycerol, DMA และ DMF (Chalah et al., 1999) DMSO (Van Voorst and Leestra, 1995) เป็นต้น อย่างไรก็ตาม CPA ทุกชนิดแม้จะมีความจำเป็นต่อการป้องกันความเสียหายจากกระบวนการแช่แข็ง แต่ก็ล้วนแล้วแต่เป็นพิษต่ออสุจิทั้งสิ้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบชนิดและระดับของ CPA ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิในสภาพการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง

วิธีการศึกษา

การศึกษาแบ่งเป็น 2 การทดลองย่อย คือ

การทดลองที่ 1 ผลของชนิดและระดับ cryoprotectant ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ

สัตว์ทดลอง

ใช้พ่อพันธุ์ 3 กลุ่ม ได้แก่ ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว ไก่พื้นเมืองคละสี และไก่พันธุ์โรดไอส์แลนด์ เรด อายุระหว่าง 1-2 ปี กลุ่มละ 6 ตัว จำนวนรวม 18 ตัว แยกเลี้ยงพ่อพันธุ์ในกรงขังเดี่ยว และใช้แม่พันธุ์ไก่ไข่ทางการค้า รวมทั้งสิ้นจำนวน 24 ตัว เลี้ยงในกรงตับ กรงละ 2 ตัว ให้อาหารไก่พ่อพันธุ์วันละ 110 กรัม/ตัว/วัน สำหรับแม่พันธุ์ได้รับอาหารวันละ 100 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำสะอาดกินแบบเต็มที่

การรีดน้ำเชื้อ

ทำการรีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โดยใช้ทีมผู้รีด 2 คน โดยจับบังคับไก่ 1 คน ด้วยการอุ้มไก่อวบน้ำ และขาไก่ด้วยมือแต่ละข้าง ส่วนอีกคนหนึ่งเป็นผู้กระตุ้นพ่อพันธุ์ด้วยการลูบหลังจากด้านหลังไปด้านหลัง โดยเพิ่มน้ำหนักจากเบาแล้วลงน้ำหนัก พ่อพันธุ์ที่มีสุขภาพดีจะตอบสนองด้วยการเกร็งและกระดกหาง การบีบโคนกันเพื่อเก็บน้ำเชื้อจะต้องกระทำโดยทันที รองเก็บน้ำเชื้อด้วยหลอดที่สะอาด ขนาด 1.5 ml. น้ำเชื้อที่ปนเปื้อนจะไม่นำมาศึกษา จากนั้นรวบรวมน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์จำนวน 12 ตัว รวมในหลอดเดียวกัน (pooled semen) เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

น้ำยาเจือจาง

ใช้น้ำยาเจือจางสูตร BPSE (Sexton, 1977) สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการประกอบสูตรน้ำยาเจือจาง เป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma และน้ำที่ใช้ละลายเป็นน้ำกลั่น 2 ครั้ง (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจาง BPSE ในปริมาตร 1,000 มล.

องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจาง	กรัม
Magnesium chloride	0.34
Sodium acetate	4.30
Potassium citrate	6.40
Sodium glutamate	8.67
Dipotassium hydrogen phosphate	12.70
Potassium dihydrogen phosphate	0.65
Fructose	5.00
TES	1.95

การเจือจางและการเก็บรักษาน้ำเชื้อ

แบ่งน้ำเชื้อเป็น 15 ส่วน เพื่อเจือจางในน้ำยาเจือจางแต่ละหลอดที่มี CPA 3 ชนิด คือ DMSO, DMA และ DMF ชนิดละ 5 ระดับ คือ ร้อยละ 0, 2, 4, 6 และ 8 อัตราการเจือจาง 1 : 4 เก็บรักษาน้ำเชื้อเจือจางที่ 5°C

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

ประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ตามวิธีการที่ อ้างโดย Lake and Stewart (1978) และ Sorensen (1979) ที่ช่วงโมเมนต์ 0 และ 24 ตามลำดับ

การผสมเทียม

จากการทดสอบผลของความเป็นพิษของ CPA พบว่า DMSO มีแนวโน้มที่เป็นพิษน้อยที่สุด ภายใต้การเจือจางน้ำเชื้อโดยน้ำยาเจือจางสูตร BPSE จึงได้เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางสูตร BPSE ที่มี DMSO ร้อยละ 8 ในอัตราการเจือจาง 1 : 4 และทำการผสมเทียมแม่ไก่จำนวน 12 ตัว เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม(ใช้น้ำเชื้อเจือจาง 1 : 4 ด้วยน้ำยาเจือจางที่ไม่มี DMSO) ซึ่งใช้แม่ไก่จำนวน 12 ตัว ผสมเทียมภายหลังการเจือจาง 30 นาที ในเวลา 15.00 น. ความเข้มข้นของอสุจิ ประมาณ 120 ล้านตัว/มล. ปริมาตรของน้ำเชื้อที่ใช้ผสมเทียมเท่ากับ 0.1 มล./แม่ ทำการผสมเทียมเพียงครั้งเดียว

การเก็บไข่เข้าฟักและการส่องไข่

เก็บไข่เข้าฟักในวันที่ 2 – 10 หลังการผสมเทียม หลังจากนั้นเมื่อไข่เข้าฟักได้เป็นเวลา 7 วัน ทำการส่องไข่เพื่อประเมินอัตราการผสมติด

การบันทึกข้อมูลการผสมติด

เก็บบันทึกอัตราการผสมติด นำไข่ที่เข้าฟักมาทดสอบอัตราการผสมติดโดยการกะเทาะเปลือก ออกเพื่อดูการพัฒนาของคัพภะภายหลังฟัก 7 วัน

การทดสอบทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ complete randomized design ทำการศึกษา 4 ครั้ง

ปัจจัยที่ศึกษาคือ CPA ที่แตกต่างกัน มี 3 ชนิด ชนิดละ 5 ระดับ รวม 15 ปัจจัย

วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการผสมติดของอสุจิ โดยใช้ Chi' square test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (SAS, 1985)

การทดลองที่ 2 ผลของระดับ DMSO ต่อคุณภาพของอสุจิภายหลังการแช่แข็งและละลาย

สัตว์ทดลอง

ใช้พ่อพันธุ์ 3 กลุ่ม ได้แก่ ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว ไก่พื้นเมืองคละสี และไก่พันธุ์โรดไอส์แลนด์ เรด อายุระหว่าง 1-2 ปี กลุ่มละ 6 ตัว จำนวนรวม 18 ตัว แยกเลี้ยงพ่อพันธุ์ในกรงขังเดี่ยว ให้อาหารไก่ พ่อพันธุ์วันละ 110 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำสะอาดกินแบบเต็มที่

การรีดน้ำเชื้อ

ทำการรีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โดยใช้ทีมผู้รีด 2 คน โดยจับบังคับไก่ 1 คน ด้วยการอุ้มไก่อวบปีก และ ขาไก่ด้วยมือแต่ละข้าง ส่วนอีกคนหนึ่งเป็นผู้กระตุ้นพ่อพันธุ์ด้วยการลูบหลังจากด้านหน้าไปด้านหลัง โดยเพิ่มน้ำหนักจากเบาแล้วลงน้ำหนัก พ่อพันธุ์ที่มีสุขภาพดีจะตอบสนองด้วยการเกร็งและกระดกหาง การบีบโคนกันเพื่อเก็บน้ำเชื้อจะต้องกระทำโดยทันที รองเก็บน้ำเชื้อด้วยหลอดที่สะอาด ขนาด 1.5 ml. น้ำเชื้อที่ปนเปื้อนจะไม่นำมาศึกษา จากนั้นรวบรวมน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์จำนวน 12 ตัว รวมในหลอดเดียวกัน (pooled semen) เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

น้ำยาเจือจาง

ใช้น้ำยาเจือจางสูตร BPSE (Sexton, 1977) สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการประกอบสูตรน้ำยาเจือจาง เป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma และน้ำที่ใช้ละลายเป็นน้ำกลั่น 2 ครั้ง (ตารางที่ 9)

การเจือจางและการเก็บรักษาน้ำเชื้อ

แบ่งน้ำเชื้อรวมของพ่อพันธุ์แต่ละกลุ่มเป็น 7 ส่วน เจือจางด้วยน้ำยา BPSE ในอัตรา 1 : 2 ลดอุณหภูมิไปที่ 5 °ซ โดยใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางเพิ่มด้วยน้ำยาให้มี DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายระดับร้อยละ 0, 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 ในน้ำเชื้อ เจือจางบ่มที่ 5 °ซ เป็นเวลา 30 นาที บรรจุน้ำเชื้อเข้าหลอดขนาด 0.5 มิลลิลิตร ปิดปลายหลอดด้วย ผงอุด polyvinyl alcohol แล้วแช่แข็งโดยใช้ biological freezer ควบคุมโดยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Freezer control, Cryological PTY, Australia) โดยลดอุณหภูมิจาก 4 °ซ ไปยัง -20 °ซ ในอัตรา 1 °ซ/นาที จากนั้นนำหลอดบรรจุน้ำเชื้อไปวางในไนโตรเจนเหลว ทุกขั้นตอนกระทำอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ ดำเนินการศึกษาซ้ำ 3 ครั้ง

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

ประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ตามวิธีการที่ อ้างโดย Lake and Stewart (1978) และ Sorensen (1979) ที่ชั่วโมงที่ 0 และ 24 ตามลำดับ

การทดสอบทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ complete randomized design

ปัจจัยที่ศึกษาคือ ระดับความเข้มข้นของ DMSO ที่แตกต่างกัน มี 7 ระดับ

ทำการศึกษา 3 ครั้ง

แปลงค่าอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตของอสุจิภายหลังการละลาย โดย $\arcsin \sqrt{x}$ วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการผสมติดของอสุจิ โดยใช้ Chi' square test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (SAS, 1985)

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากการศึกษาพบว่าอัตราการเคลื่อนที่ภายหลังการเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางที่มี CPA ต่างชนิดและระดับต่างๆ ในระยะเวลาชั่วโมงแรก พบว่า ในไก่เหลืองหางขาว DMSO, DMA และ DMF ทุกระดับให้ผลไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) ส่วนในไก่คณะสีและโรดไอส์แลนด์เรด พบว่า DMSO, DMA และ DMF ในระดับร้อยละ 6-8 มีผลเสียต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิ ส่วนที่ระดับต่ำ (ร้อยละ 2 – 4) ให้ผลไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม

ภายหลังการเก็บรักษาที่ 5 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในไก่เหลืองหางขาว พบว่า DMSO, DMA และ DMF ระดับร้อยละ 2 ให้ผลไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม ส่วนความเข้มข้นในระดับสูงขึ้นมีผลเสียต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิ ในไก่คณะสีพบว่า CPA ทุกระดับมีผลเสียต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิ ยกเว้น DMA ระดับร้อยละ 2 – 4 ส่วนในไก่โรดไอส์แลนด์เรดพบว่า DMSO ทุกระดับให้ผลไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับ DMA และ DMF ระดับร้อยละ 2 ส่วนระดับอื่นๆ ให้อัตราการเคลื่อนที่ต่ำ

กว่ากลุ่มควบคุม (ตารางที่ 10) จากตารางที่ 10 โดยภาพรวมจะเห็นได้ว่า DMSO, DMA และ DMF เป็นพิษต่ออสุจิรุนแรงขึ้นตามความเข้มข้นที่สูงขึ้น เทวินทร์และคณะ (2547) รายงานว่า DMSO และ DMA ระดับร้อยละ 2 – 8 มีผลเสียต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไก่พื้นเมืองภายหลังการเก็บรักษา 24 ชั่วโมง Tselutin et al. (1999) ได้ศึกษาเปรียบเทียบพิษของ CPA 3 ชนิด คือ Glycerol, DMA และ DMSO ในระดับความเข้มข้นต่างๆ คือ ร้อยละ 4, 6, 8 และ 12 พบว่า cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้นเป็นพิษต่อการมีชีวิตของอสุจิ โดย glycerol มีพิษน้อยที่สุด ส่วน DMSO มีพิษสูงสุด อย่างไรก็ตามน้ำยาเจือจางที่ใช้คือ สูตร Lake diluent ซึ่งโดยปกติแล้ว DMSO จะใช้กับน้ำยาสูตร BPSE ความแตกต่างขององค์ประกอบของน้ำยาเจือจางอาจมีผลต่อระดับความรุนแรงของพิษที่เกิดขึ้น

จากการทดสอบระดับ DMSO ที่เหมาะสมสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพบว่า DMSO ร้อยละ 8 ให้ค่าอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการรอดชีวิตภายหลังละลายสูงสุด การใช้ DMSO โดยทั่วไปแล้วหากแช่แข็งโดยเทคนิคของ Beltsville มักใช้ DMSO ระดับร้อยละ 4–4.5 อย่างไรก็ตามในการแช่แข็งน้ำเชื้อเปิด Han et al. (2005) รายงานว่า ระดับที่ดีที่สุดของ DMSO คือ ร้อยละ 10 ความเหมาะสมของระดับ DMSO อาจขึ้นกับเทคนิคปลีกล้วยที่อาจแตกต่างกันหรือความแตกต่างของชนิดพันธุ์/สายพันธุ์ของสัตว์

ในการทดสอบพิษของ CPA โดยผสมเทียมแม่ไก่ด้วยน้ำเชื้อเจือจางที่มี DMSO ในน้ำยาร้อยละ 8 พบว่า อัตราการผสมติดต่ำกว่า (ร้อยละ 62.1, 59/95) กลุ่มควบคุมที่เป็นน้ำเชื้อเจือจางปราศจาก DMSO (ร้อยละ 95.6, 89/93) แสดงให้เห็นว่า DMSO อาจเป็นพิษต่ออสุจิหรืออาจไปรบกวนประสิทธิภาพเซลล์บริเวณแหล่งพักพิงอสุจิ (UVJ) ของแม่ไก่ ทั้งนี้ผลที่ได้สอดคล้องกับเทวินทร์และคณะ (2547) ซึ่งรายงาน ethylene glycol และ DMSO ระดับร้อยละ 2 มีผลเสียต่ออัตราการผสมติดของน้ำเชื้อเจือจางในระหว่างวันที่ 2 – 8 ภายหลังการผสมเทียม Blanco et al. (2000) รายงานว่า การมีชีวิตรอดของอสุจิของไก่จะต่ำลง เมื่อความดันสารละลายของน้ำยาสูงขึ้นกว่าช่วงความดันสารละลายที่สามารถทนได้ ผลเสียต่ออสุจิส่วนหนึ่งของการเติม CPA ลงในน้ำเชื้อเจือจางมาจากความดันสารละลายที่สูงกว่าปกติ

ตารางที่ 10 ผลของชนิดและระดับของ cryoprotectant (CPA) ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไก่
พื้นเมืองเหลืองหางขาว คละสี และโรตไฮสแลนด์เรด ภายหลังการเจือจางและเก็บรักษา

ชนิด CPA	ระดับ (%)	พันธุ์					
		เหลืองหางขาว		คละสี		โรต ไฮแลนด์ เรด	
		0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
DMSO	0	98.67±0.33	90.33±0.33 ^ก	98.67±0.33	90.33±0.33 ^ก	98.67±0.33	90.33±0.33 ^ก
	2	98.67±0.33	85.00±5.00 ^ก	97.67±1.33	70.00±5.77 ^{กข}	97.67±1.33	78.33±4.41 ^{กข}
	4	98.67±0.33	70.00±7.64 ^{กข}	97.67±1.33	60.00±5.77 ^{กค}	97.67±1.33	66.67±6.01 ^{กค}
	6	98.67±0.33	53.00±10.93 ^ก	97.67±1.33	41.00±9.28 ^{กข}	97.67±1.33	53.33±8.82 ^{กข}
	8	98.67±0.33	45.00±10.40 ^ก	97.67±1.33	33.33±8.33 ^ก	97.67±1.33	41.67±4.41 ^ก
DMA	0	98.67±0.33	90.33±0.33 ^ก	98.67±0.33	90.37±0.33 ^ก	98.67±0.33	90.37±0.33 ^ก
	2	97.67±0.33	81.67±1.67 ^ก	98.67±0.33	80.00±2.89 ^ก	97.67±0.33	81.67±1.67 ^ก
	4	97.00±1.16	70.00±2.89 ^ก	98.67±0.33	68.33±4.41 ^ก	97.00±1.16	71.67±3.33 ^ก
	6	97.00±1.16	50.00±5.77 ^ก	93.33±1.67	43.33±8.82 ^ก	90.37±0.33	48.33±7.26 ^ก
	8	94.00±2.08	38.33±7.26 ^ก	90.33±0.33	30.00±7.64 ^ก	90.37±0.33	41.67±9.28 ^ก
DMF	0	98.67±0.33	90.33±0.33 ^ก	98.67±0.33	90.33±0.33 ^ก	98.67±0.33	90.37±0.33 ^ก
	2	98.67±0.33	78.33±1.67 ^ก	98.67±0.33	73.33±6.67 ^{กข}	98.67±0.33	80.00±2.89 ^{กข}
	4	97.67±0.33	61.67±10.93 ^{กข}	97.00±1.16	56.67±12 ^{กข}	96.33±1.33	60.00±7.64 ^{กค}
	6	93.33±1.67	46.67±8.82 ^ก	93.33±1.67	50.00±12.58 ^{กค}	91.67±1.67	48.33±7.26 ^{กข}
	8	90.33±0.33	35.00±7.64 ^ก	88.33±1.67	31.67±20.21 ^{กค}	88.33±1.67	40.00±5.77 ^ก

หมายเหตุ

ชนิดของ CPA มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

^{ก-ง} อักษรที่แตกต่างกันในสมมุติเดียวกันของ CPA แต่ละชนิดแยกในไก่แต่ละพันธุ์ แสดงถึงความแตกต่างทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 11 ผลของระดับ DMSO ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งในไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เหลืองหางขาว ไก่พื้นเมืองคละสี และไก่พันธุ์โรดไอส์แลนด์เรด (mean±se)

ระดับ DMSO (%)	ลักษณะที่ศึกษา											
	อัตราการเคลื่อนที่ก่อนแช่แข็ง (%)			เฉลี่ย (%)	อัตราการเคลื่อนที่หลังละลาย (%)			เฉลี่ย (%)	อัตราการรอดชีวิตหลังละลาย (%)			เฉลี่ย (%)
	เหลือง	คละสี	โรด		เหลือง	คละสี	โรด		เหลือง	คละสี	โรด	
2	90.00±0.33	88.33±1.67	90.00±0.33	89.67±0.60 ^ก	19.33±6.36	11.00±4.58	28.33±11.67	19.55±4.77	11.00±4.58	12.33±3.93	23.33±13.33	15.56±4.66 ^ก
4	89.33±0.67	88.33±1.67	90.33±0.33	89.33±0.67 ^ก	23.33±6.01	16.67±4.41	30.00±10.41	23.33±7.22	18.33±8.33	15.00±2.89	31.67±9.28	21.67±7.77 ^{กข}
6	87.33±1.45	85.33±0.33	90.33±0.33	87.76±0.85 ^{กข}	24.33±5.36	16.67±3.33	41.67±13.64	27.56±9.87	26.67±8.33	28.33±6.01	40.00±10.40	31.67±8.04 ^ก
8	86.67±1.67	81.67±1.67	87.33±1.45	83.56±0.57 ^{กค}	35.00±7.64	25.00±8.66	52.67±17.33	37.56±7.25	28.33±10.93	28.33±9.28	45.00±10.41	33.89±5.82 ^ก
10	83.33±3.33	78.33±1.67	87.33±1.45	83.00±0.58 ^{กข}	26.67±4.41	20.00±7.64	43.33±12.02	30.00±5.53	21.67±4.41	23.33±6.67	41.67±6.01	28.89±4.31 ^ก
12	83.33±3.33	76.67±3.33	86.00±2.08	82.00±2.03 ^ก	17.67±5.04	15.67±4.70	33.33±14.53	22.22±5.42	18.33±6.01	25.00±7.64	35.00±10.00	26.11±4.69 ^ก

หมายเหตุ

^{ก-ข} อักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกัน แสดงถึงความแตกต่างกันในทางสถิติ (P < 0.05)

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่า

1. CPA ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นจะเป็นพิษต่อตัวอสุจิไก่พื้นเมือง และการสัมผัส CPA ในระยะเวลาที่ยาวนานทำให้อสุจิเสียหายมากขึ้น
2. น้ำยาเจือจางสูตร BPSE และ DMSO เป็น CPA ที่ระดับความเข้มข้นระดับร้อยละ 8 เป็นระดับที่เหมาะสมที่สุดในการเสริมในน้ำเชื้อเพื่อเก็บรักษาแบบแช่แข็งในไก่พื้นเมือง
3. DMSO ที่ระดับความเข้มข้นระดับร้อยละ 8 ในน้ำยาเจือจางมีผลเสียต่ออัตราการผสมติดของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่ผสมเทียมในไก่ไข่

เอกสารอ้างอิง

- เทวินทร์ วงษ์พระลับ, บัญญัติ เหล่าไพบูลย์, พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา, และ ศราวุธ ศรีงาม. 2549. การศึกษาวิธีเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองโดยวิธีแช่แข็ง. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ โครงการฯ พุนอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีงบประมาณ 2547.
- Blanco, J. M., G. F. Gee, D. E. Wildt and A. M. Donoghue. 2000. Species variation osmotic, cryoprotectant and cooling rate tolerance in poultry, eagle and peregrine falcon spermatozoa. Biol. Reprod. 63: 1164-1171.
- Blesbois, E. 2007. Current status in avian semen cryopreservation. World's Poult. Sci. J. 63 : 213-222.
- Chalah, T., F. Seigneurin, E. Blesbosis and J. P. Brillard. 1999. in Vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. Cryobiology 39: 185-191.
- Donoghue, A. M. and G. J. Wishart. 2000. Storage of poultry semen. Anim. Reprod. Sci. 62: 213-232.
- Han, X. F., Z. Y. Nui, F. Z. Liu and C. S. Yang. 2005. Effects of diluents, cryoprotectants, equilibration time and thawing temperature on cryopreservation of duck semen. Int. J. of Poultry Sci. 4: 197-201.
- Sexton, T. J. 1977. A new poultry semen extender. 1 Effect of extension on the fertility of chicken semen. Poultry Sci. 56: 1443 – 1446.
- Tselutin, K., F. Seigneurin and E. Blesbosis. 1999. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. Poultry Sci. 78: 586 – 590.
- Van Voorst, A. and F. R. Leenstra. 1995. Fertility rate of daily collected and cryopreserved fowl semen. Poultry Sci. 74: 136-140.

งานวิจัย 5: การศึกษากรรมวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งที่เหมาะสมภายใต้สภาพสนาม ในไก่พื้นเมือง

Research 5: Study on procedures for cryogenic preservation of native chicken semen
in field condition

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาวิธีการที่เกี่ยวข้องและเหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่พื้นเมืองภายใต้สภาพสนาม โดยได้ทำการทดสอบในประเด็นต่างๆ ดังนี้ คือ

การทดลองที่ 1 ผลของวิธีการแช่แข็งและอุณหภูมิละลายต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ โดยศึกษาเปรียบเทียบวิธีการแช่แข็ง 4 วิธี คือ 1) แช่แข็งน้ำเชื้อโดยใช้เครื่องควบคุมลดอุณหภูมิจาก 4°C ถึง -20°C ในอัตรา 1°C/นาาที จากนั้นอังไอน์โตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -95°C นาน 5 นาที จากนั้นจุ่มหลอดบรรจุน้ำเชื้อลงในถังไนโตรเจนเหลว 2) แช่แข็งโดยการวางหลอดบรรจุน้ำเชื้ออังไอน์โตรเจนเหลวที่ระดับอุณหภูมิ -35°C นาน 15 นาที จากนั้นจุ่มหลอดบรรจุน้ำเชื้อลงในถังไนโตรเจนเหลว 3) แช่แข็งน้ำเชื้อโดยวางหลอดบรรจุน้ำเชื้อบนถาดสแตนเลส อังไอน์โตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -80°C นาน 8 นาที จากนั้นจุ่มหลอดลงในถังไนโตรเจนเหลว และ 4) แช่แข็งน้ำเชื้อโดยการหยดน้ำเชื้อเจือจางลงในไนโตรเจนเหลวโดยตรง ละลายน้ำเชื้อจากการแช่แข็ง 4 วิธีการ ดังกล่าวด้วยอุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 2, 40 และ 60°C จากการศึกษาพบว่า วิธีการแช่แข็งและอุณหภูมิในการละลายมีปฏิสัมพันธ์ร่วม การแช่แข็งโดยการวางหลอดน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ -80°C และการละลายที่อุณหภูมิ 5°C ให้ผลดีที่สุด และการละลายที่อุณหภูมิ 5°C ให้ผลดีในทุกวิธีการแช่แข็ง

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของวิธีการแช่แข็ง 3 วิธี คือ 1) เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยา prefreezing Lake โดยมี glycerol ร้อยละ 11 เป็น Cryoprotectant (CPA) ลดอุณหภูมิจาก 4°C ถึง -35°C ในอัตรา 4°C/นาาที จากนั้นอังไอน์โตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -120°C ก่อนเก็บในไนโตรเจนเหลว 2) เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยา BPBS ระดับ DMSO ร้อยละ 8 ลดอุณหภูมิจาก 4°C ถึง -20°C ในอัตรา 1°C/นาาที จากนั้นอังไอน์โตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -95°C ก่อนเก็บในไนโตรเจนเหลว 3) เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยา IGGKP โดยมี DMSO ร้อยละ 8 เป็น CPA ลดอุณหภูมิจาก 4°C ถึง -20°C ในอัตรา 1°C/นาาที อังไอน์โตรเจนเหลวที่ -95°C ก่อนเก็บในไนโตรเจนเหลว อุณหภูมิที่อุณหภูมิ 2-5°C นาน 5 นาที การตรวจคุณภาพและผสมเทียมในแม่ไก่ จากการศึกษาพบว่า อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิจากการแช่แข็งด้วยวิธีที่ 1 ดีกว่าวิธีอื่น แต่อัตราการรอดชีวิตไม่มีความแตกต่างกัน และทุกวิธีการให้อัตราการผสมติดต่ำ

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของสูตรน้ำยาและวิธีการแช่แข็ง ต่ออัตราการเคลื่อนที่และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิ โดยศึกษาน้ำยาเจือจาง 2 สูตร คือ IGGKPh และ EK วิธีการแช่แข็ง 2 วิธีการคือ ลดอุณหภูมิโดยใช้เครื่องควบคุม และลดอุณหภูมิโดยการอังไอน์โตรเจนเหลว จากการศึกษาพบว่า วิธีการแช่แข็งให้ผลต่ออสุจิหลังละลายไม่แตกต่างกัน น้ำยา EK ให้อสุจิรอดชีวิตสูงกว่าน้ำยา IGGKPh

การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของสูตรน้ำยาเจือจาง วิธีการลดอุณหภูมิ และอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อ ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการละลาย โดยใช้น้ำยาเจือจาง 2 สูตร คือ IGGKPh และ EK ลดอุณหภูมิ 2 แบบ คือ 1) แบบเร็วโดยวางหลอดน้ำเชื้อที่ระดับอุณหภูมิ -80°C นาน 5 นาที และที่อุณหภูมิต่ำกว่า -135°C นาน 5 นาที 2) แบบเร็วมากโดยวางหลอดบรรจุน้ำเชื้อที่ -135°C นาน 10 นาที ก่อนที่จะเก็บในไนโตรเจนเหลว ละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ $2-5^{\circ}\text{C}$ หรือ 40°C จากการศึกษาพบว่า สูตรน้ำยา และวิธีการลดอุณหภูมิให้ผลไม่แตกต่างกัน การละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ $2-5^{\circ}\text{C}$ ให้ผลดีกว่าที่ 40°C

การทดลองที่ 5 ศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิด้วยโปรแกรมควบคุม 3 ระดับ และอุณหภูมิในการละลายต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิและอัตราการผสมติดภายหลังการละลาย จากการศึกษาพบว่า การลดอุณหภูมิจาก 4°C ถึง -35°C ด้วยอัตรา 1, 2 และ $3^{\circ}\text{C}/\text{นาที่}$ และการละลายที่ 5 และ 15°C ให้ผลไม่แตกต่างกัน และความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อก็ไม่แตกต่างกัน

การทดลองที่ 6 ศึกษาผลของระยะเวลาในการวางหลอดบรรจุน้ำเชื้อที่ระดับอุณหภูมิ -35°C และ -135°C ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการละลาย จากการศึกษาพบว่า การวางหลอดน้ำเชื้อที่ระดับอุณหภูมิ -35°C นาน 10 นาที จากนั้นการวางหลอดที่ระดับอุณหภูมิ -135°C นาน 5-10 นาที ให้ผลดีกว่าการวางหลอดที่ระดับ -35°C และ -135°C เป็นเวลาจุลละ 5 นาที

การทดลองที่ 7 ศึกษาเปรียบเทียบผลของวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองแบบแช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติด โดยศึกษาวิธีการ 4 วิธี คือ 1) แช่แข็งแบบเม็ดยาลดอุณหภูมิเร็วยิ่งใช้น้ำยาสูตร Tselutin โดยมี DMA เป็น CPA 2) แช่แข็งแบบบรรจุหลอดลดอุณหภูมิด้วยความเร็วสูงใช้น้ำยาสูตร Tselutin โดยมี DMA เป็น CPA 3) แช่แข็งแบบบรรจุหลอดลดอุณหภูมิแบบช้าใช้น้ำยาสูตร Schramm โดยมี DMF เป็น CPA และ 4) แช่แข็งแบบบรรจุหลอดลดอุณหภูมิแบบเร็วปานกลางใช้น้ำยาสูตร EK โดยมี DMF เป็น CPA จากการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าวิธีการแช่แข็งวิธีที่ 3 เป็นวิธีการที่สะดวกและให้อัตราการผสมติดสูงสุด

จากการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า ในการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่ วิธีการแช่แข็งและอุณหภูมิละลายมีปฏิสัมพันธ์ต่อกัน การละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ $2-5^{\circ}\text{C}$ มีผลดีต่ออสุจิ การแช่แข็งน้ำเชื้อไก่โดยใช้อุปกรณ์แบบง่ายให้ผลไม่แตกต่างจากการแช่แข็งโดยอุปกรณ์ที่ควบคุมด้วยระบบคอมพิวเตอร์ การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งโดยการบรรจุน้ำเชื้อในหลอดและวางหลอดลงในไนโตรเจนเหลวที่ระดับ -35°C นาน 10 นาที และวางที่ระดับ -135°C นาน 5 นาที น่าจะเป็นวิธีการแช่แข็งที่เหมาะสม

คำสำคัญ: วิธีการแช่แข็ง, การละลาย, น้ำยาเจือจาง, น้ำเชื้อ, ไก่พื้นเมือง

Abstract

A series of six experiments were conducted to generate appropriate procedures for freezing and thawing native chicken semen under field condition.

Experiment 1, involved comparisons of four freezing techniques 1) freezing semen from 4°C to -20°C at a rate of 1°C per minute using programmable freezer, followed by putting the straws in -135°C for 15 minutes then plunged into liquid nitrogen 2) freezing semen straw at -35°C for 15 minutes and plunged into liquid nitrogen 3) freezing semen straw on stainless steel plate at -135°C for 8 minutes and plunged into liquid nitrogen and 4) dropping semen samples into liquid nitrogen. Frozen semen of each method was thawed at 2, 40 or 60°C. Post-thaw motility of spermatozoa depended on freezing techniques and thawing temperature. The third technique and thawing temperature at 2°C gave highest spermatozoa motility and 2°C thawing was superior to 40°C and 60°C thawing.

Experiment 2, was to compare between three different treatments on post-thaw spermatozoa motility, viability and fertility. Treatment 1, pooled semen was diluted in prefrozen Lake diluent and adjusted to a final concentration of 11% glycerol before putting diluted semen in straw to be frozen from 4°C to -35°C at a rate of 1°C per minute and plunged into liquid nitrogen vapor at -120°C then plunged into liquid nitrogen. Treatment 2, pooled semen was diluted in BPSE diluent and adjusted to a final concentration of 8% DMSO and frozen from 4°C to -20°C at a rate of 1°C per minute and plunged into liquid nitrogen vapor at -95°C before plunging into liquid nitrogen. Treatment 3, the last pooled semen aliquote was diluted in IGGKPh diluents and adjusted to a final concentration of 8% DMSO and frozen from 4°C to -20°C at a rate of 1°C per minute, then put in liquid nitrogen vapor at -95°C before plunging into liquid nitrogen. Frozen semen was thawed at 2–5°C and post-thaw motility and viability of spermatozoa were assessed. Highest percentage of motile spermatozoa was found in prefrozen Lake diluent. Spermatozoa viability and fertility were not significant different in different treatments.

Experiment 3, effect of diluents; IGGKPh and EK and freezing methods were determined by using programmable freezer. Semen was frozen by liquid nitrogen vapor. There were no significant different between freezing methods but EK diluents was superior to the IGGKPh diluents.

Experiment 4, effect of diluents, freezing procedures and thawing temperature on post-thaw motility were investigated. Pooled semen was diluted in IGGKPh or EK diluents.

Freezing procedures were 1) put semen straw at -80°C for 5 minutes and then at -135°C for 5 minutes, then plunged the straws into liquid nitrogen, 2) put semen straw at -135°C for 10 minutes then plunged the straws into liquid nitrogen. Frozen semen were thaw at $2-5^{\circ}\text{C}$ or 40°C . There were no significant differences between diluents and thawing temperature at $2-5^{\circ}\text{C}$ produced higher spermatozoa motility.

Experiment 5, effect of freezing and thawing rates on post-thaw motility were studied. Three different freezing rate 1, 2 and 3°C per minute were used. There were no significant different effects between freezing rates and between thawing temperatures on motility and fertility of eggs obtained from hens inseminated with the frozen semen.

Experiment 6, effect of suspension times above liquid nitrogen at -35°C and -135°C on post-thaw motility was investigated. Semen suspension at -35°C for 10 minutes and at -135°C for 5 minutes yielded best post – thaw motility.

Experiment 7, was compare between four difference freezing protocols on post-thaw sperm motility and fertility. Treatment 1, pooled semen was diluted in Tselutin diluent with DMA. Semen samples were frozen by very rapid freezing dropped directly in liquid nitrogen. Treatment 2, pooled semen was diluted in Tselutin diluent with DMA. The straws were frozen with rapid freezing in nitrogen vapor. Treatment 3, pooled semen was diluted in Schramm diluent with DMF. The straws were frozen with slow freezing in nitrogen vapor and Treatment 4, pooled semen was diluted in EK diluent with DMF with moderate freezing rates in nitrogen vapor. The results showed that slow freezing (Treatment 3) gave highest fertility.

In conclusion, this researched suggested that freezing procedure interaction with thawing temperature, the best thawing temperature was between $2-5^{\circ}\text{C}$ and freezing semen by programmable freezer was comparable to styrofoam box containing liquid nitrogen. The best fertility were obtained with semen frozen with DMF suspension at -35°C for 10 minutes and at -135°C for 5 minutes before put in liquid nitrogen.

Keywords: freezing procedure, thawing, diluents, semen, native chicken

บทนำ

ผลสำเร็จในการเก็บรักษาเซลล์แบบแช่แข็ง ซึ่งเมื่อทำการละลายแล้วได้รับเซลล์ที่มีอัตราการรอดชีวิตที่สูงนั้น ขึ้นกับปัจจัยที่มีผลปฏิสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน 3 ประการ คือ 1) คุณสมบัติของสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง (cryoprotectant, CPA) ที่เลือกใช้ 2) อัตราการลดอุณหภูมิในขณะทำการแช่แข็ง 3) อัตราการละลาย (Hammerstedt, 1995) นอกจากนี้แล้วสรีรวิทยาของสัตว์ปีกต่าง species หรือต่างสายพันธุ์ ซึ่งมีองค์ประกอบโครงสร้างอสุจิที่แตกต่างกัน ก็เป็นปัจจัยพื้นฐานอย่างหนึ่ง นอกเหนือจากปัจจัย 3 ประการข้างต้น อันมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง (Hammerstedt, 1995) ดังนั้นจึงพบความหลากหลายในการเลือกใช้ชนิดและระดับของ CPA อัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลายน้ำเชื้อในสัตว์ปีก (Donoghue and Wishart, 2000) โดยมีวิธีการหรือเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่ที่สำคัญโดยสังเขป ได้แก่

การแช่แข็งโดยมี DMSO ระดับร้อยละ 4 เป็น CPA ลดอุณหภูมิจาก 5 ถึง -20°ซ (อัตรา 1°ซ/นาที่) ใน alcohol bath และจาก -20°ซ ถึง -80°ซ ในไนโตรเจนเหลวในอัตรา 30°ซ/นาที่ จากนั้นจุ่มในไนโตรเจนเหลว ละลายที่ 2°ซ ก่อนใช้ผสมเทียม ให้อัตราการผสมติดใกล้เคียงร้อยละ 50 (Sexton, 1979) ต่อมา Van Voorst and Leenstra (1995) ได้ปรับปรุงวิธีการโดย แช่แข็งน้ำเชื้อภายใต้ biological freezer ลดอุณหภูมิจาก 5 ถึง -20°ซ ในอัตรา 1°ซ/นาที่ และจาก -20 ถึง -95°ซ ในอัตรา 25°ซ/นาที่ จากนั้นจุ่มหลอดน้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลวและละลายน้ำเชื้อที่ 5°ซ ก่อนผสมเทียมด้วยอสุจิ ประมาณ 600 ล้านตัว/แม่ โดยรายงานว่ามีอัตราการผสมติดสูงถึงร้อยละ 83 - 93

Lake and Stewart (1978) ได้รายงานถึงความสำเร็จที่น่าพอใจของการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่โดยใช้ glycerol เป็น CPA ในน้ำเชื้อเจือจางที่ความเข้มข้นร้อยละ 11 ต่อมา Seigneurin and Blesbois (1995) ศึกษาการแช่แข็งภายใต้ biological freezer และได้รายงานว่าคุณสมบัติที่เหมาะสมในการลดอุณหภูมิมะหว่าง 5°ซ ถึง -35°ซ คือ -7°ซ/นาที่ ก่อนที่จะจุ่มหลอดบรรจุน้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลวเพื่อเก็บรักษา ละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 5°ซ บั่นน้ำเชื้อแยก glycerol ออก เนื่องจากเป็นพิษกับระบบสืบพันธุ์เพศเมีย อัตราการผสมติดที่ได้รับภายหลังการผสมเทียมคือ ร้อยละ 76 เมื่อใช้อสุจิ 300 ล้านตัว/แม่ ผสมเทียม 2 ครั้ง/สัปดาห์

Chalah et al. (1999) และ Tselutin et al. (1999) รายงานถึงอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแช่แข็งแบบเม็ดที่สูง ระดับใกล้เคียงร้อยละ 90 ในการแช่แข็งใช้ dimethylacetamide (DMA) เป็น CPA ในน้ำเชื้อเจือจางที่ความเข้มข้นร้อยละ 6.6 หยดน้ำเชื้อที่เตรียมไว้ลงในไนโตรเจนเหลวโดยตรง และก่อนนำมาผสมเทียมนำมาอุ่นที่ 60°ซ วิธีการดังกล่าวให้อัตราการผสมติดสูงกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่ทำโดยมี glycerol หรือ dimethylformamide (DMF) เป็น CPA แต่การทำน้ำเชื้อแช่แข็งแบบเม็ด มีปัญหาด้านการควบคุมการติดเชื้อและความไม่สะดวกในการใช้ มีรายงานการใช้ DMA เป็น CPA ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งในไก่แบบบรรจุหลอด Woelders et al. (2006) รายงานว่าใช้น้ำยาที่จดสิทธิบัตรชื่อ ASG (Animal Science Group of Wageningen University) โดยมี DMA ความเข้มข้นร้อยละ 0.6 โมล/ลิตร

เป็น CPA ลดอุณหภูมิจาก 5 ถึง -190°ซ ในอัตรา 200°ซ/นาที่ เมื่อละลายที่ 5°ซ แล้วนำไปผสมเทียม 2 ครั้ง/สัปดาห์ ด้วยอุณหภูมิจำนวน 300 ล้านตัว/แม่ ให้อัตราการผสมติดร้อยละ 88 สูงกว่าแต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับน้ำเชื้อแช่แข็งแบบเม็ดที่ใช้ในน้ำยาเจือจางสูตร Lake ส่วน Blesbois et al. (2007) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่ด้วยน้ำยาสูตรที่อ้างโดย Lake ที่มี DMA เป็น CPA ในความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 6 (v/v) ลดอุณหภูมิจาก 5°ซ ถึง -140°ซ ในอัตรา 50°ซ/นาที่ ก่อนจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว คำนวณน้ำเชื้อที่ 50°ซ 5 วินาทีก่อนนำไปผสมเทียม จากการผสมเทียมด้วยอสุจิ 600 ล้านตัว/แม่ 4 วัน/ครั้ง พบว่าให้อัตราการผสมติดร้อยละ 7-68 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ไก่

ในห่านการแช่แข็งน้ำเชื้อที่ได้ผลดีคือ การเจือจางด้วยน้ำยา EK (Modified IGGKP) โดยมี DMF ความเข้มข้นร้อยละ 6 (v/v) เป็น CPA ลดอุณหภูมิจาก 4°ซ ถึง -140°ซ ในอัตรา 60°ซ/นาที่ ละลายที่ 60°ซ แล้วผสมเทียม ให้อัตราการผสมติดร้อยละ 88.24 ในไข่ที่เก็บพัก 2-8 วัน ภายหลังการผสมเทียม (Lukaszewicz, 2002)

จากข้อมูลข้างต้นพบว่า มีความหลากหลายในการใช้สูตรน้ำยา ชนิด CPA อัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ซึ่งล้วนเป็นปัจจัยที่ทำให้ผลการผสมติดจากน้ำเชื้อแช่แข็งแตกต่างกันไป ทั้งนี้ไม่รวมผลจากความแตกต่างระหว่างพันธุ์และสายพันธุ์ของไก่ สำหรับในไก่พันธุ์พื้นเมืองข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์ของอสุจิที่เก็บรักษาในรูปแบบแช่แข็งยังมีน้อยมาก การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์หลัก เพื่อค้นหาเทคนิคที่มีประสิทธิภาพที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่พื้นเมือง

วิธีการศึกษา

ศึกษาตามลำดับการทดลองต่อเนื่องกันจำนวน 7 การทดลองย่อยดังนี้

- การทดลองที่ 1 ผลของวิธีการแช่แข็งและอุณหภูมิละลายต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิในไก่
- การทดลองที่ 2 ผลของวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อ 3 วิธี ต่ออัตราการเคลื่อนที่ อัตราการรอดชีวิตของอสุจิ และอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองภายหลังการแช่แข็ง
- การทดลองที่ 3 ผลของสูตรน้ำยาแช่แข็ง และวิธีการแช่แข็ง ต่ออัตราการเคลื่อนที่และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิ
- การทดลองที่ 4 ผลของชนิดน้ำยา วิธีการลดอุณหภูมิโดยการอังไอน้ำ และอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อ ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการละลาย
- การทดลองที่ 5 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิด้วยโปรแกรมควบคุม 3 ระดับและอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อ ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ และอัตราการผสมติด ภายหลังการละลาย
- การทดลองที่ 6 ผลของระยะเวลาในการวางหลอดบรรจุน้ำเชื้อที่ระดับ -35°ซ และ -135°ซ ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการละลาย
- การทดลองที่ 7 ผลของวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองแบบแช่แข็ง 4 วิธีการต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติด

การทดลองที่ 1 ผลของวิธีการแช่แข็งและอุณหภูมิละลายต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิในไก่

การทดลองที่ 1 มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อ 4 วิธี และอุณหภูมิการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง 3 ระดับต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิในไก่

สัตว์ทดลอง

ใช้พ่อพันธุ์ 3 กลุ่ม ได้แก่ ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว ไก่พื้นเมืองคละสี และไก่พันธุ์ไรต์ไอร์แลนด์ เรด อายุระหว่าง 1-2 ปี กลุ่มละ 12 ตัว จำนวนรวม 36 ตัว แยกเลี้ยงพ่อพันธุ์ในกรงขังเดี่ยว ให้อาหารไก่ พ่อพันธุ์วันละ 110 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำสะอาดกินแบบเต็มที่

การรีดน้ำเชื้อ

รีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โดยใช้ทีมผู้รีด 2 คน โดยจับบังคับไก่ 1 คน ด้วยการอุ้มไก่อวบปีก และขาด้วยมือแต่ละข้าง ส่วนอีกคนหนึ่งเป็นผู้กระตุ้นพ่อพันธุ์ ด้วยการลูบหลังจากด้านหลังไปด้านหลัง โดยเพิ่มน้ำหนักจากเบาแล้วลงน้ำหนัก พ่อพันธุ์ที่มีสุขภาพดีจะตอบสนองด้วยการเกร็งและกระดกหาง บีบโคนกันเพื่อเก็บน้ำเชื้อทันที รองเก็บน้ำเชื้อด้วยหลอดที่สะอาด ขนาด 1.5 ml. น้ำเชื้อที่ปนเปื้อนจะไม่นำมาศึกษา รวมน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์แต่ละกลุ่มในหลอดเดียวกัน (pooled semen) เพื่อนำไปศึกษาต่อไป น้ำเชื้อเก็บสัปดาห์ละ 3 ครั้ง

น้ำยาเจือจาง

ใช้น้ำยาเจือจางสูตร BPSE (Sexton, 1977) และใช้ DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 8 เป็น CPA สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการประกอบสูตรน้ำยาเจือจาง เป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma และน้ำที่ใช้ละลายเป็นน้ำกลั่น 2 ครั้ง (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจาง BPSE ในปริมาตร 1,000 มล.

องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจาง	กรัม
Magnesium chloride	0.34
Sodium acetate	4.30
Potassium citrate	6.40
Sodium glutamate	8.67
Dipotassium hydrogen phosphate	12.70
Potassium dihydrogen phosphate	0.65
Fructose	5.00
TES	1.95

การเจือจางน้ำเชื้อ

เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางสูตร BPSE ในสัดส่วน 1:3 (น้ำเชื้อ:น้ำยาเจือจาง) ลดอุณหภูมิ น้ำเชื้อเจือจางจาก 25°C ไปที่ 5°C โดยใช้เวลาประมาณ 1 ชม. จากนั้นเจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง

อุณหภูมิ 5°ซ ที่มี DMSO อีก 1 ส่วน โดยมี DMSO เป็น CPA คิดเป็นความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 8 บ่มน้ำเชื่อมดังกล่าวที่ อุณหภูมิ 5°ซ นาน 30 นาที จึงดำเนินการแช่แข็ง

การแช่แข็งน้ำเชื้อ แบ่งเป็น 4 วิธีการคือ

วิธีที่ 1 ลดอุณหภูมิภายใต้เครื่องควบคุมอุณหภูมิด้วยระบบคอมพิวเตอร์ (Freeze control, Cryologic PTY, Australia) โดยลดอุณหภูมิจาก 4°ซ ถึง -20°ซ ในอัตรา 1°ซ/นาที แล้วอ้งไอที่อุณหภูมิ -95°ซ นาน 5 นาที จึงจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว

วิธีที่ 2 แช่แข็งโดยวางหลอดน้ำเชื้ออ้งไอไนโตรเจนเหลวที่ระดับอุณหภูมิ -35°ซ นาน 15 นาที แล้วจุ่มหลอดน้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลว

วิธีที่ 3 แช่แข็งโดยวางหลอดบรรจุน้ำเชื้อบนภาตสแตนเลส อ้งไอไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -80°ซ นาน 8 นาที แล้วจึงจุ่มหลอดน้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลว

วิธีที่ 4 แช่แข็งโดยใช้ไปแปตอัดโนมิติหยดน้ำเชื้อขนาด 0.1 มล. ลงในไนโตรเจนเหลวโดยตรง

หมายเหตุ

วิธีที่ 1, 2 และ 3 อุปกรณ์ในการอ้งไอไนโตรเจนเหลวคือ กล่องโฟมขนาด 28X38X29 ซม. มีตระแกรงสำหรับวางหลอดน้ำเชื้อที่เลื่อนระดับได้ และขณะแช่แข็งเติมไนโตรเจนเหลวสูงจากพื้น 8 ซม.

การละลายน้ำเชื้อ

แบ่งน้ำเชื้อใน 4 วิธีการแช่แข็ง มาละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ

ระดับที่ 1 อุณหภูมิ 2°ซ นาน 5 นาที (ใช้กล่องโฟมบรรจุน้ำแข็งและน้ำ)

ระดับที่ 2 อุณหภูมิ 40°ซ นาน 30 วินาที (ใช้อ่างควบคุมอุณหภูมิ)

ระดับที่ 3 อุณหภูมิ 60°ซ นาน 5 วินาที (ใช้อ่างควบคุมอุณหภูมิ)

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

ประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ตามวิธีการที่อ้างโดย Sorensen (1979)

การทดสอบทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ 4X3 factorial in randomized complete block design ทำการศึกษา 3 ซ้ำ ปัจจัยที่ศึกษา ได้แก่ ปัจจัยที่ 1 คือ วิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อ มี 4 วิธี ปัจจัยที่ 2 คือ ระดับอุณหภูมิการละลาย มี 3 ระดับ Block คือ น้ำเชื้อจากไก่ 3 กลุ่ม ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว ไก่พื้นเมืองคละสี และไก่พันธุ์โรดไอส์แลนด์เรด

วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ โดยวิธี Duncan's multiple range test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (SAS, 1985)

การทดลองที่ 2 ผลของวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อ 3 วิธี ต่ออัตราการเคลื่อนที่ อัตราการรอดชีวิตของอสุจิ และอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองภายหลังการแช่แข็ง

การทดลองที่ 2 มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อ 3 วิธี ต่ออัตราการเคลื่อนที่ อัตราการรอดชีวิตของอสุจิ และอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแช่แข็ง

สัตว์ทดลอง

ใช้พ่อพันธุ์ 2 กลุ่ม ได้แก่ ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว และไก่พื้นเมืองคละสี อายุระหว่าง 1-2 ปี กลุ่มละ 12 ตัว จำนวนรวม 24 ตัว แยกเลี้ยงพ่อพันธุ์ในกรงขังเดี่ยว และใช้แม่พันธุ์ไก่ไข่ทางการค้า อายุประมาณ 60 สัปดาห์ รวมทั้งสิ้นจำนวน 60 ตัว เลี้ยงในกรงตับ กรงละ 2 ตัว ให้อาหารไก่พ่อพันธุ์วันละ 110 กรัม/ตัว/วัน สำหรับแม่พันธุ์ได้รับอาหารวันละ 100 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำสะอาดกินแบบเต็มที่ การรีดน้ำเชื้อ

ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

น้ำยาเจือจาง

ใช้น้ำยาเจือจาง 3 สูตร คือ Prefreezing Lake (Lake, 1960 อ้างโดย Chalah, 1999) มี glycerol ความเข้มข้นร้อยละ 11 เป็น CPA, BPSE (Sexton, 1977) มี DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 8 เป็น CPA และสูตร IGGKPh (Lukaszewicz, 2001) มี DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 8 เป็น CPA สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการประกอบสูตรน้ำยาเจือจางเป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma และน้ำที่ใช้ละลายเป็น น้ำกลั่น 2 ครั้ง (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจางแต่ละสูตร ในปริมาตร 1,000 มล.

องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจาง(กรัม/1,000 มล.)	สูตรน้ำยาเจือจางที่		
	Prefreezing Lake	BPSE	IGGKPh
Magnesium acetate	0.70		
Magnesium chloride		0.34	
Sodium acetate		4.30	
Potassium citrate		6.40	1.40
Sodium glutamate	19.20	8.67	14.00
Dipotassium hydrogen phosphate		12.70	9.80
Potassium dihydrogen phosphate		0.65	
Sodium dihydrogen phosphate			2.10
Glucose			9.00
Fructose	8.00	5.00	
Inositol			9.00
TES		1.95	
Potassium acetate	5.00		
PVP (Polyvinyl pyrrolidone)	3.00		

การเจือจางน้ำเชื้อ

นำน้ำเชื้อที่ได้มาแบ่งเป็น 3 ส่วน เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางสูตร BPSE และ IGGKPh ในสัดส่วน 1:3 วิธีการลดอุณหภูมิ และเติม CPA ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การบรรจุน้ำเชื้อ ให้หลอด straw ขนาดจุ 0.5 มล.

การแช่แข็งน้ำเชื้อ

แบ่งเป็น 3 วิธีการคือ

วิธีที่ 1 เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาสูตร Prefreezing Lake (Lake, 1960 อ้างโดย Chalah, 1999) โดยมี glycerol เป็น CPA ในระดับความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 11 ทำการลดอุณหภูมิจาก 4°C ถึง -35°C ในอัตรา 4°C/นาที จากนั้นอ้งไอไนโตรเจนเหลวที่ -120°C นาน 3 นาที จึงจุ่มหลอดน้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลว

วิธีที่ 2 เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาสูตร BPSE (Sexton, 1977) โดยมี DMSO ระดับร้อยละ 8 เป็น CPA ลดอุณหภูมิจาก 4°C ถึง -20°C ในอัตรา 1°C/นาที อ้งไอไนโตรเจนเหลวที่ -95°C นาน 5 นาที จึงจุ่มหลอดลงในไนโตรเจนเหลว

วิธีที่ 3 เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาสูตร IGKGP (Lukaszewicz, 2001) โดยมี DMSO ระดับร้อยละ 8 เป็น CPA ลดอุณหภูมิจาก 4°C ถึง -20°C ในอัตรา 1°C/นาที อ้งไอไนโตรเจนเหลวที่ -95°C นาน 5 นาที จึงจุ่มหลอดลงในไนโตรเจนเหลว

หมายเหตุ

ในการอ้งไอไนโตรเจนเหลวอุปกรณ์คือ กล้องโฟม ขนาด 28X38X29 ซม. มีตระแกรงสำหรับวางหลอดน้ำเชื้อที่เลือนระดับได้ และ ในขณะที่แช่แข็งจะเติมนิโตรเจนเหลวสูงจากพื้นกล้องโฟม 8 ซม.

การละลายน้ำเชื้อ

ทุกวิธีการแช่แข็ง ดำเนินการโดยจุ่มหลอดลงในน้ำอุณหภูมิอุณหภูมิ 2 - 5°C นาน 5 นาที จากนั้นล้างอสุจิโดยการปั่นแยกเพื่อกำจัด glycerol ก่อนการผสมเทียม

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

ประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ตามวิธีการที่อ้างโดย Sorensen (1979) และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิจากการย้อมสี SYBR-14+PI ประเมินภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Olympus IX71, Japan) ตามวิธีการที่อ้างโดย Chalah and Brilland (1998)

การผสมเทียม

ผสมเทียมในเวลา 15.00 น. ให้กับแม่ไก่ไข่ทางการค้าหลังการละลายและประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อวิธีการละ 20 ตัว

การเก็บข้อมูลการผสมติด

เก็บไข่ระหว่างวันที่ 2-4 ภายหลังการผสมเทียมเข้าฟัก นำไข่ที่เข้าฟักมาทดสอบอัตราการผสมติดโดยการกะเทาะเปลือกออกเพื่อดูการพัฒนาของคัพภะภายหลังฟัก 7 วัน

การทดสอบทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ complete randomized design ทำการศึกษา 3 ครั้ง ปีวิจัยที่ศึกษา คือ วิธีการลดอุณหภูมิ มี 4 วิธี

วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิ โดยวิธี Duncan's multiple range test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (SAS, 1985)

การทดลองที่ 3 ผลของสูตรน้ำยาแช่แข็ง และวิธีการแช่แข็ง ต่ออัตราการเคลื่อนที่และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิ

การทดลองที่ 3 มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบผลของสูตรน้ำยาแช่แข็ง 2 ชนิด คือ IGGKPh และ EK (น้ำยาที่ดัดแปลงจากสูตร IGGKPh), 2 วิธีการแช่แข็ง คือ เครื่องควบคุมอุณหภูมิด้วยระบบคอมพิวเตอร์ (Freeze control, Cryologic PTY, Australia) และ กล่องโฟม ต่ออัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิ

สัตว์ทดลอง

ใช้พ่อพันธุ์ 2 กลุ่ม ได้แก่ ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว และไก่พื้นเมืองคละสี อายุระหว่าง 1-2 ปี กลุ่มละ 12 ตัว จำนวนรวม 24 ตัว แยกเลี้ยงพ่อพันธุ์ในกรงขังเดี่ยว ให้อาหารไก่พ่อพันธุ์วันละ 110 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำสะอาดกินแบบเต็มที่

การรีดน้ำเชื้อ

ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

น้ำยาเจือจาง

ใช้น้ำยาเจือจาง 2 สูตร คือ IGGKPh (Lukaszewicz, 2001) และ สูตร EK (Lukaszewicz, 2001) ซึ่งทั้ง 2 สูตร มี DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 8 เป็น CPA สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการประกอบสูตรน้ำยาเจือจางเป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma และน้ำที่ใช้ละลายเป็นน้ำกลั่น 2 ครั้ง (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจางแต่ละสูตร ในปริมาตร 1,000 มล.

องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจาง (กรัม/1,000 มล.)	สูตรน้ำยาเจือจาง	
	IGGKPh	EK
Potassium citrate	1.40	1.40
Sodium glutamate	14.00	14.00
Dipotassium hydrogen phosphate	9.80	9.80
Sodium dihydrogen phosphate	2.10	2.10
Glucose	9.00	9.00
D-Fructose	-	2.00
Inositol	9.00	7.00
Protamine sulphate	-	0.20
PVP (Polyvinyl pyrolidone)	-	1.00

การเจือจางน้ำเชื้อ

นำน้ำเชื้อที่ได้มาแบ่งเป็น 2 ส่วน เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางสูตร IGPKh หรือ EK ในสัดส่วน 1:3 วิธีการลดอุณหภูมิ และเติม CPA ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การบรรจุน้ำเชื้อ ให้หลอด straw ขนาดจุ 0.5 มล.

การแช่แข็งน้ำเชื้อ

แบ่งเป็น 2 วิธีการคือ

วิธีที่ 1 ใช้อุปกรณ์ที่ควบคุมด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ลดอุณหภูมิจาก 4°C ถึง -20°C ในอัตรา 1°C/นาทิจากนั้นวางอังไที่ระดับ -95°C เป็นเวลา 5 นาที ก่อนจุ่มหลอดลงในไนโตรเจนเหลว

วิธีที่ 2 วางหลอด straw อังไที่ระดับอุณหภูมิ -135°C เป็นเวลา 10 นาที ก่อนจุ่มหลอดลงในไนโตรเจนเหลว การอังไไนโตรเจนเหลวอุปกรณ์คือ กล่องโฟม ขนาด 28X38X29 ซม. มีตระแกรงสำหรับวางหลอดน้ำเชื้อที่เลือนระดับได้ และ ในขณะที่แช่แข็งจะเติมนิโตรเจนเหลวสูงจากพื้นกล่องโฟม 8 ซม.

การละลายน้ำเชื้อ

ทุกวิธีการแช่แข็ง ดำเนินการโดยจุ่มหลอดลงในน้ำอุณหภูมิอุณหภูมิ 2 - 5°C นาน 5 นาที จากนั้นล้างอสุจิโดยการปั่นแยกเพื่อกำจัด glycerol ก่อนการผสมเทียม

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

ประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ตามวิธีการที่อ้างโดย Sorensen (1979) และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิจากการย้อมสี SYBR-14+PI ประเมินภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (Olympus IX71, Japan) ตามวิธีการที่อ้างโดย Chalah and Brilland (1998)

การทดสอบทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ 2X2 factorial in complete randomized design ทำการศึกษา 2 ครั้ง ครั้งละ 3 ตัวอย่าง ปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ ปัจจัยที่ 1 คือ สูตรน้ำยาแช่แข็งน้ำเชื้อ มี 2 สูตร ปัจจัยที่ 2 คือ วิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อ มี 2 วิธี

วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิ โดยวิธี Duncan's multiple range test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (SAS, 1985)

การทดลองที่ 4 ผลของชนิดน้ำยา วิธีการลดอุณหภูมิโดยการอังไ และอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อ ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการละลาย

การทดลองที่ 4 มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบผลของสูตรน้ำยาแช่แข็ง 2 ชนิด (IGGKPh และ EK (น้ำยาที่ดัดแปลงจากสูตร IGGKPh), วิธีการลดอุณหภูมิโดยการอังไ 2 วิธีการ

(แบบเร็วและเร็วมาก), และอุณหภูมิในการละลายน้ำแข็ง 2 ระดับ (อุณหภูมิ 2-5°C และอุณหภูมิ 40°C) ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการละลาย

สัตว์ทดลอง

ใช้พ่อพันธุ์ 2 กลุ่ม ได้แก่ ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว และไก่พื้นเมืองคละสี อายุระหว่าง 1-2 ปี กลุ่มละ 12 ตัว จำนวนรวม 24 ตัว แยกเลี้ยงพ่อพันธุ์ในกรงขังเดี่ยว ให้อาหารไก่พ่อพันธุ์วันละ 110 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำสะอาดกินแบบเต็มที่

การรีดน้ำเชื้อ

ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

น้ำยาเจือจาง

น้ำยาเจือจาง 2 สูตร คือ IGGKPh (Lukaszewicz, 2001) และ สูตร EK (Lukaszewicz, 2001) ซึ่งทั้ง 2 สูตร มี DMSO ความเข้มข้นร้อยละ 8 เป็น CPA สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการประกอบสูตร น้ำยาเจือจางเป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma และน้ำที่ใช้ละลายเป็นน้ำกลั่น 2 ครั้ง (ตารางที่ 14)

การเจือจางน้ำเชื้อ

นำน้ำเชื้อที่ได้มาแบ่งเป็น 2 ส่วน เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางสูตร IGGKPh หรือ EK ใน สัดส่วน 1:3 วิธีการลดอุณหภูมิ และเติม CPA ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การบรรจุน้ำเชื้อ ใช้หลอด straw ขนาดจุ 0.5 มล.

การแช่แข็งน้ำเชื้อ

แบ่งเป็น 2 วิธีการคือ

วิธีที่ 1 แบบเร็ว โดยวางหลอดบรรจุน้ำเชื้ออังไอน์โตรเจนเหลวที่ระดับอุณหภูมิ -80°C นาน 5 นาที และที่ระดับ -135°C นาน 5 นาที ก่อนการจุ่มหลอดลงในไนโตรเจนเหลว

วิธีที่ 2 แบบเร็วมาก โดยวางหลอดบรรจุน้ำเชื้ออังไอน์โตรเจนเหลวที่ระดับอุณหภูมิ -135°C นาน 10 นาที ก่อนการจุ่มหลอดลงในไนโตรเจนเหลว

หมายเหตุ

การอังไอน์โตรเจนเหลวอุปกรณ์คือ กล่องโฟม ขนาด 28X38X29 ซม. มีตระแกรงสำหรับวาง หลอดน้ำเชื้อที่เลือนระดับได้ และ ในขณะที่แช่แข็งจะเติมนิโตรเจนเหลวสูงจากพื้นกล่องโฟม 8 ซม.

การละลายน้ำเชื้อ

แบ่งน้ำเชื้อใน 2 วิธีการแช่แข็ง มาละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 2 ระดับ คือ

ระดับที่ 1 อุณหภูมิ 2-5°C นาน 5 นาที (ใช้กล่องโฟมบรรจุน้ำแข็งและน้ำ)

ระดับที่ 2 อุณหภูมิ 40°C นาน 30 วินาที (ใช้อ่างควบคุมอุณหภูมิ)

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

ประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ตามวิธีการที่อ้างโดย Sorensen (1979)

การทดสอบทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ 2x2x2 factorial in Completely Randomized Design

ปัจจัยที่ 1 คือ สูตรน้ำยาแช่แข็งน้ำเชื้อ มี 2 สูตร

ปัจจัยที่ 2 คือ วิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อ มี 2 วิธี

ปัจจัยที่ 3 คือ วิธีการละลายน้ำเชื้อ มี 2 วิธี

ทำการศึกษา 3 ครั้ง

วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตราการเคลื่อนที่ของสperm โดยวิธี Duncan's multiple range test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (SAS, 1985)

การทดลองที่ 5 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิด้วยโปรแกรมควบคุม 3 ระดับและและอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อ ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของสperm และอัตราการผสมติด ภายหลังการละลาย

การทดลองที่ 5 มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบผลของอัตราการลดอุณหภูมิด้วยโปรแกรมควบคุม 3 ระดับและและอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อ ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของสperm ภายหลังการละลาย และอัตราการผสมติด

สัตว์ทดลอง

ใช้พ่อพันธุ์ 2 กลุ่ม ได้แก่ ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว และไก่พื้นเมืองคลสี อายุระหว่าง 1-2 ปี กลุ่มละ 12 ตัว จำนวนรวม 24 ตัว แยกเลี้ยงพ่อพันธุ์ในกรงขังเดี่ยว และใช้แม่พันธุ์ไก่ไข่ทางการค้า อายุประมาณ 60 สัปดาห์ รวมทั้งสิ้นจำนวน 60 ตัว เลี้ยงในกรงตับ กรงละ 2 ตัว ให้อาหารไก่พ่อพันธุ์วันละ 110 กรัม/ตัว/วัน สำหรับแม่พันธุ์ได้รับอาหารวันละ 100 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำสะอาดกินแบบเต็มที่ การรีดน้ำเชื้อ

ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

น้ำยาเจือจาง

น้ำยาเจือจางสูตร Schramm (Schramm, 1976 อ้างโดย Chalah, 1999) มี DMF ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 6 เป็น CPA สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการประกอบสูตรน้ำยาเจือจางเป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma และน้ำที่ใช้ละลายเป็นน้ำกลั่น 2 ครั้ง (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 15 องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจาง Schramm ในปริมาตร 1,000 มล.

องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจาง	กรัม
Magnesium acetate	0.70
Sodium glutamate	28.50
Glucose	5.00
Inositol	2.50
Potassium acetate	5.00

การเจือจางน้ำเชื้อ

นำน้ำเชื้อที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ในสัดส่วน 1:3 วิธีการลดอุณหภูมิและเติม CPA ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การบรรจุน้ำเชื้อ ให้หลอด straw ขนาดจุ 0.5 มล.

การแช่แข็งน้ำเชื้อ

แบ่งเป็น 3 วิธีการคือ

วิธีที่ 1 ลดอุณหภูมิภายใต้เครื่องควบคุมอุณหภูมิด้วยระบบคอมพิวเตอร์ (Freeze control, Cryologic PTY, Australia) โดยลดอุณหภูมิจาก 4°C ถึง -20°C ในอัตรา 1°C/นาที แล้วอ้งไอน้ำที่อุณหภูมิ -95°C นาน 5 นาที จึงจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว

วิธีที่ 2 ลดอุณหภูมิภายใต้เครื่องควบคุมอุณหภูมิด้วยระบบคอมพิวเตอร์ (Freeze control, Cryologic PTY, Australia) โดยลดอุณหภูมิจาก 4°C ถึง -20°C ในอัตรา 2°C/นาที แล้วอ้งไอน้ำที่อุณหภูมิ -95°C นาน 5 นาที จึงจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว

วิธีที่ 3 ลดอุณหภูมิภายใต้เครื่องควบคุมอุณหภูมิด้วยระบบคอมพิวเตอร์ (Freeze control, Cryologic PTY, Australia) โดยลดอุณหภูมิจาก 4°C ถึง -20°C ในอัตรา 3°C/นาที แล้วอ้งไอน้ำที่อุณหภูมิ -95°C นาน 5 นาที จึงจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว

หมายเหตุ

การอ้งไอน้ำไนโตรเจนเหลวอุปกรณ์คือ กล้องโฟม ขนาด 28X38X29 ซม. มีตระแกรงสำหรับวางหลอดน้ำเชื้อที่เลื่อนระดับได้ และ ในขณะที่แช่แข็งจะเติมน้ำไนโตรเจนเหลวสูงจากพื้นกล่องโฟม 8 ซม.

การละลายน้ำเชื้อ

แบ่งน้ำเชื้อใน 3 วิธีการแช่แข็ง มาละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 2 ระดับ คือ

ระดับที่ 1 อุณหภูมิ 2-5°C นาน 5 นาที (ใช้กล่องโฟมบรรจุน้ำแข็งและน้ำ)

ระดับที่ 2 อุณหภูมิ 15°C นาน 5 นาที (ใช้กล่องโฟมบรรจุน้ำแข็งและน้ำ)

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

ประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ตามวิธีการที่อ้างโดย Sorensen (1979)

การผสมเทียม

ผสมเทียมในเวลา 15.00 น. ให้กับแม่ไก่ไข่ทางการค้าหลังการละลายและประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อวิธีการละ 2 ตัว

การเก็บข้อมูลการผสมติด

เก็บไข่ระหว่างวันที่ 2-4 ภายหลังการผสมเทียมเข้าฟัก นำไข่ที่เข้าฟักมาทดสอบอัตราการผสมติดโดยการกะเทาะเปลือกออกเพื่อดูการพัฒนาของคัพภะภายหลังฟัก 7 วัน

การทดสอบทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ 3x2 factorial in Completely Randomized Design ทำการศึกษา 3 ครั้ง ปัจจัยที่ศึกษาได้แก่ ปัจจัยที่ 1 คือ วิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อ มี 3 วิธี และปัจจัยที่ 2 คือ วิธีการละลายน้ำเชื้อ มี 2 วิธี

วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการผสมติดของอสุจิ โดยวิธี Duncan's multiple range test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (SAS, 1985)

การทดลองที่ 6 ผลของระยะเวลาในการวางหลอดบรรจุน้ำเชื้อที่ระดับ -35°C และ -135°C ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการละลาย

การทดลองที่ 6 มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาเพื่อประเมินระยะเวลาที่เหมาะสมในการลดอุณหภูมิเมื่อแช่แข็งน้ำเชื้อไก่พื้นเมือง โดยวิธีการอังไอน์โตรเจนเหลวแบบ 2 ขั้นตอน

สัตว์ทดลอง

ใช้พ่อพันธุ์ 2 กลุ่ม ได้แก่ ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว และไก่พื้นเมืองคละสี อายุระหว่าง 1-2 ปี กลุ่มละ 12 ตัว จำนวนรวม 24 ตัว แยกเลี้ยงพ่อพันธุ์ในกรงขังเดี่ยว ให้อาหารไก่พ่อพันธุ์วันละ 110 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำสะอาดกินแบบเต็มที่

การรีดน้ำเชื้อ

ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

น้ำยาเจือจาง

ใช้น้ำยาเจือจางสูตร Schramm (Schramm, 1976 อ้างโดย Chalah, 1999) มี DMF ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 6 เป็น CPA สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการประกอบสูตรน้ำยาเจือจางเป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma และน้ำที่ใช้ละลายเป็นน้ำกลั่น 2 ครั้ง (ตารางที่ 15)

การเจือจางน้ำเชื้อ

นำน้ำเชื้อที่ได้เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางสูตร ในสัดส่วน 1:3 วิธีการลดอุณหภูมิ และเติม CPA ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การบรรจุน้ำเชื้อ ใช้หลอด straw ขนาดจุ 0.5 มล.

การแช่แข็งน้ำเชื้อ

แบ่งเป็น 3 วิธีการคือ

วิธีที่ 1 วางหลอดบรรจุน้ำเชื้อ ที่อุณหภูมิระดับ -35°C 5 นาที และที่ระดับ -135°C 5 นาที ก่อนลงเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

วิธีที่ 2 วางหลอดบรรจุน้ำเชื้อ ที่อุณหภูมิระดับ -35°C 5 นาที และที่ระดับ -135°C 10 นาที ก่อนลงเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

วิธีที่ 3 วางหลอดบรรจุน้ำเชื้อ ที่อุณหภูมิระดับ -35°C 10 นาที และที่ระดับ -135°C 5 นาที ก่อนลงเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

วิธีที่ 4 วางหลอดบรรจุน้ำเชื้อ ที่อุณหภูมิระดับ -35°C 10 นาที และที่ระดับ -135°C 10 นาที ก่อนลงเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

หมายเหตุ

ในการอ้งไอนไนโตรเจนเหลวอุปกรณ์คือ กล่องโฟม ขนาด $28 \times 38 \times 29$ ซม. มีตระแกรงสำหรับวางหลอดน้ำเชื้อที่เลื่อนระดับได้ และ ในขณะแช่แข็งจะเติมนไนโตรเจนเหลวสูงจากพื้นกล่องโฟม 8 ซม.

การละลายน้ำเชื้อ

ทุกวิธีการแช่แข็ง ดำเนินการโดยจุ่มหลอดลงในน้ำอุณหภูมิอุณหภูมิ $2 - 5^{\circ}\text{C}$ นาน 5 นาที

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

ประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ตามวิธีการที่อ้างโดย Sorensen (1979) ที่ เวลา 30 นาที และ 24 ชั่วโมงภายหลังการละลาย

การทดสอบทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทำการศึกษา 2 ครั้ง แต่ละครั้ง 3 หลอด น้ำเชื้อ/ปัจจัย ปัจจัยที่ศึกษา คือ วิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อ มี 4 วิธี

วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการผสมติดของอสุจิ โดยวิธี Duncan's multiple range test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (SAS, 1985)

การทดลองที่ 7 ผลของวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองแบบแช่แข็ง 4 วิธีการต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติด

การทดลองที่ 7 มีวัตถุประสงค์ในการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองแบบแช่แข็ง 4 วิธีการต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติด

สัตว์ทดลอง

ใช้พ่อพันธุ์ 2 กลุ่ม ได้แก่ ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว และไก่พื้นเมืองคละสี อายุระหว่าง 1-2 ปี กลุ่มละ 12 ตัว จำนวนรวม 24 ตัว แยกเลี้ยงพ่อพันธุ์ในกรงขังเดี่ยว และใช้แม่พันธุ์ไก่ไข่ทางการค้า อายุประมาณ 60 สัปดาห์ รวมทั้งสิ้นจำนวน 60 ตัว เลี้ยงในกรงตับ กรงละ 2 ตัว ให้อาหารไก่พ่อพันธุ์วันละ 110 กรัม/ตัว/วัน สำหรับแม่พันธุ์ได้รับอาหารวันละ 100 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำสะอาดกินแบบเต็มที่

การรีดน้ำเชื้อ

ดำเนินการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

น้ำยาเจือจาง

น้ำยาเจือจางที่ใช้จำนวน 3 สูตร ได้แก่ Tselutin (Tselutin et al., 1995 อ้างโดย Chalah, 1999) มี DMA ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 6 เป็น CPA, Schramm (Schramm, 1976 อ้างโดย Chalah, 1999) และ EK (Lukaszewicz, 2001) ซึ่งมี DMF ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 6 เป็น CPA (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจางแต่ละชนิด ในปริมาตร 1,000 มล.

องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจาง(กรัม/1,000 มล.)	สูตรน้ำยาเจือจาง		
	Tselutin	Schramm	EK
Potassium citrate	-	-	1.40
Sodium glutamate	19.20	28.50	14.00
Dipotassium hydrogen phosphate	-	-	9.80
Sodium dihydrogen phosphate	-	-	2.10
Magnesium acetate		0.70	-
Glucose		5.00	9.00
Fructose	8.00		2.00
Inositol		2.50	7.00
Potamine sulfate	0.32		0.20
Potassium acetate	5.00	5.00	
PVP (Polyvinyl pyrolidone)	3.00		1.00

การเจือจางน้ำเชื้อ นำน้ำเชื้อที่ได้มาแบ่งเป็น 4 ส่วน เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางสูตร Tselutin หรือ Schramm หรือ EK ในสัดส่วน 1:3 ตามวิธีการในหัวข้อการแช่แข็งน้ำเชื้อ

การบรรจุน้ำเชื้อ ให้อัด straw ขนาดจุ 0.5 มล.

การแช่แข็งน้ำเชื้อ แบ่งเป็น 4 วิธีการคือ

- วิธีที่ 1 การแช่แข็งแบบเม็ด เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางสูตร Tselutin ในสัดส่วน 1:2 ลดอุณหภูมิไปที่ 4°ซ ในเวลาประมาณ 1 ชม. จากนั้นเติมน้ำยาเจือจางที่มี DMA อุณหภูมิ 4°ซ อีก 1 ส่วน (คิดเป็น 1 : 3 กับน้ำเชื้อเจือจางเดิม ซึ่งจะทำให้ความเข้มข้น DMA เป็นร้อยละ 6) หลังจากเติม DMA 1 นาที ให้ไปเปิดอัตโนมัติดูดน้ำเชื้อแล้วหยดลงในไนโตรเจนเหลวด้วยปริมาตร 0.1 มล./หยด น้ำเชื้อจะกลายเป็นเม็ดโดยทันที รวบรวมน้ำเชื้อบรรจุในหลอดเก็บ
- วิธีที่ 2 การแช่แข็งแบบบรรจุหลอด ลดอุณหภูมิด้วยความเร็วสูง ใช้น้ำยาเจือจางและดำเนินการเช่นเดียวกับวิธีที่ 1 ภายหลังจากเติม DMA แล้ว ดำเนินการบรรจุน้ำเชื้อเข้าหลอดฟางขนาด 0.5 มล. ปิดปลายหลอดด้วย polyvinylalcohol แช่แข็งโดยวางหลอดลงในไนโตรเจนเหลว ที่ระดับ -180°ซ (ห่างจากไนโตรเจนเหลวประมาณ 1 ซม.) เป็นเวลา 5 นาที จึงจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว

วิธีที่ 3 การแช่แข็งแบบบรรจุหลอด ลดอุณหภูมิแบบช้า เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ในสัดส่วน 1:2 ลดอุณหภูมิไปที่ 4°C โดยใช้เวลาประมาณ 1 ชม. จากนั้นเจือจางด้วยน้ำยาที่มี DMF อุณหภูมิ 4°C อีก 1 ส่วน คูดน้ำเชื้อเข้าหลอด 0.5 มล. ปิดปลายหลอดด้วย polyvinylalcohol แช่แข็งโดยวางหลอด อังไอไนโตรเจนเหลวที่ระดับอุณหภูมิ -35°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิไปที่ -135°C เป็นเวลา 5 นาที จึงจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว

วิธีที่ 4 การแช่แข็งแบบบรรจุหลอด ลดอุณหภูมิด้วยความเร็วปานกลาง เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางสูตร EK ในสัดส่วน 1:2 ลดอุณหภูมิไปที่ 4°C โดยใช้เวลาประมาณ 1 ชม. จากนั้นเจือจางด้วยน้ำยาที่มี DMF อุณหภูมิ 4°C อีก 1 ส่วน คูดน้ำเชื้อเข้าหลอด 0.5 มล. ปิดปลายหลอดด้วย polyvinylalcohol แช่แข็งโดยวางหลอด อังไอไนโตรเจนเหลวที่ระดับอุณหภูมิ -35°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิไปที่ -135°C เป็นเวลา 5 นาที จึงจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว

หมายเหตุ

การอังไอไนโตรเจนเหลวอุปกรณ์คือ กล่องโฟม ขนาด 28X38X29 ซม. มีตระแกรงสำหรับวางหลอดน้ำเชื้อที่เลื่อนระดับได้ และ ในขณะที่แช่แข็งจะเติมนิโตรเจนเหลวสูงจากพื้นกล่องโฟม 8 ซม.

การละลายน้ำเชื้อ

น้ำเชื้อจากวิธีที่ 1 ละลายน้ำเชื้อโดยเทเม็दन้ำเชื้อลงในกล่องโฟมที่สะอาด แล้วเทลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มล. ที่วางอยู่ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 60°C เมื่อน้ำเชื้อเริ่มละลาย นำบีกเกอร์น้ำเชื้อไปวางในน้ำเย็นอุณหภูมิ 4°C จากนั้นนำไปตรวจคุณภาพ เพื่อนำไปผสมเทียมต่อไป

น้ำเชื้อจากวิธีที่ 2 ละลายโดยจุ่ม straw ลงในน้ำเย็น 60°C เป็นเวลา 5 วินาที จากนั้นนำ straw ไปวางไว้ที่ 4°C เช็ดหลอดให้แห้ง ตัดปลายหลอด เทน้ำเชื้อลงในหลอด (test tube) ขนาด 15 มล. นำไปตรวจคุณภาพเพื่อนำไปผสมเทียมต่อไป

น้ำเชื้อจากวิธีที่ 3 ละลายโดยจุ่ม straw ลงในน้ำเย็นอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น เช็ดหลอดให้แห้ง ตัดปลายหลอด เทน้ำเชื้อลงในหลอด (test tube) ขนาด 15 มล. นำไปตรวจคุณภาพเพื่อนำไปผสมเทียมต่อไป

น้ำเชื้อจากวิธีที่ 4 ละลายโดยจุ่ม straw ลงในน้ำเย็นอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 8 วินาที จากนั้นนำ straw ไปวางไว้ในน้ำที่อุณหภูมิ 4°C เช็ดหลอดให้แห้ง ตัดปลายหลอด เทน้ำเชื้อลงในหลอด (test tube) ขนาด 15 มล. นำไปตรวจคุณภาพ เพื่อนำไปผสมเทียมต่อไป

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

ประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ตามวิธีการที่อ้างโดย Sorensen (1979)

การผสมเทียม

ผสมเทียมในเวลา 15.00 น. ให้กับแม่ไก่ไข่ทางการค้า ภายหลังการละลายและประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อวิธีการละ 20 ตัว

การเก็บข้อมูลการผสมติด

เก็บไข่ระหว่างวันที่ 2-4 ภายหลังจากผสมเทียมเข้าฟัก นำไข่ที่เข้าฟักมาทดสอบอัตราการผสมติดโดยการกะเทาะเปลือกออกเพื่อดูการพัฒนาของคัพภะภายหลังฟัก 7 วัน

การทดสอบทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทำการศึกษา 5 ครั้ง ปีวิจัยที่ศึกษา คือ วิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อ มี 4 วิธี

วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตราการเคลื่อนไหวและอัตราการผสมติดของอสุจิ โดยวิธี Duncan's multiple range test ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (SAS, 1985)

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

การทดลองที่ 1 ผลของวิธีการแช่แข็งและอุณหภูมิละลายต่ออัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิในไก่

จากการศึกษาพบว่าวิธีการแช่แข็งและอุณหภูมิละลาย มีปฏิสัมพันธ์ร่วมกันต่ออัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิหลังการละลาย การวางหลอดน้ำเชื้อบนแผ่นสแตนเลสอังไอน์โตรเจนเหลวที่ระดับอุณหภูมิ -80°C เป็นเวลา 8 นาที และละลายน้ำเชื้อในน้ำที่อุณหภูมิ 2°C ให้ผลดีที่สุด (ตารางที่ 18 และกราฟที่ 2) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลร่วมของปัจจัยระหว่างการลดอุณหภูมิและการละลาย ต่ออัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิของน้ำเชื้อแช่แข็ง (Hammerstedt, 1995; Donoghue and Wishart, 2000) และแสดงให้เห็นถึงอุณหภูมิที่ใช้ละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่ปลอดภัยที่สุดคือการละลายน้ำเชื้อแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำ

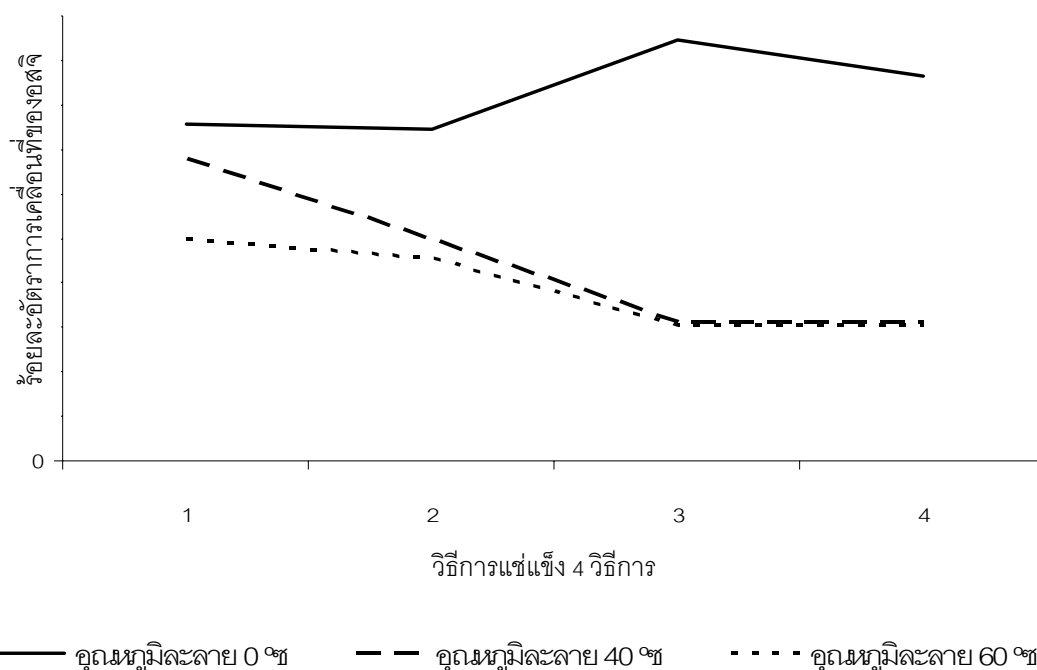
ตารางที่ 18 ผลของวิธีการแช่แข็งและอุณหภูมิที่ใช้ละลายต่ออัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิ (%)

อุณหภูมิละลาย ($^{\circ}\text{C}$)	วิธีการแช่แข็ง ^{1/}				เฉลี่ย
	1	2	3	4	
0	37.78 ^{กข}	37.22 ^{กข}	47.22 ^ก	43.33 ^{กข}	41.39
40	33.89 ^{ขค}	25.00 ^{คง}	15.56 ^ง	22.50 ^{คง}	22.50
60	25.00 ^{คง}	22.78 ^{คง}	15.22 ^ง	19.56 ^ง	19.56
เฉลี่ย	32.22	28.33	26.00	24.70	

หมายเหตุ

^{1/} วิธีการแช่แข็ง วิธีที่ 1, 2, 3 และ 4

^{ก-ง} อักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันแสดงความแตกต่างกันในทางสถิติ ($P < 0.05$)



กราฟที่ 2 ความสัมพันธ์ของวิธีการแช่แข็ง อุณหภูมิละลายต่อร้อยละอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ

การทดลองที่ 2 ผลของวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อ 3 วิธี ต่ออัตราการเคลื่อนที่ อัตราการรอดชีวิตของอสุจิ และอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองภายหลังการแช่แข็ง

พบว่าวิธีการแช่แข็งโดยวิธีที่ 1 ซึ่งใช้น้ำยาสูตร Prefreezing Lake มี glycerol เป็น CPA ให้ อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิสูงสุด ($P < 0.05$) แต่อัตราการรอดชีวิตของอสุจิไม่แตกต่างจากวิธีการอื่น ส่วนอัตราการผสมติด พบว่ามีอัตราการผสมติดต่ำมากทุกวิธีการ (ตารางที่ 19) ซึ่งต่ำกว่าที่รายงานโดย Sexton (1979) และ Seigneurin et al. (1995) แสดงให้เห็นว่า มีอสุจิจำนวนเพียงเล็กน้อยที่รอดชีวิต ภายในระบบสืบพันธุ์ของแม่ไก่บ่งชี้ว่ามีจุดบกพร่องในเทคนิคด้านต่างๆ ซึ่งต้องดำเนินการศึกษาต่อไป

ตารางที่ 19 การศึกษาเปรียบเทียบผลของวิธีการแช่แข็งต่ออัตราการเคลื่อนที่ อัตราการรอดชีวิต และอัตราการผสมติดของอสุจิภายหลังการละลาย ($\bar{x} \pm SE$)

	วิธีการแช่แข็งวิธีที่		
	1	2	3
อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังละลาย (n=3)	$66.11 \pm 1.27^{\text{ก}}$	$59.33 \pm 2.08^{\text{ข}}$	$55.40 \pm 1.76^{\text{ข}}$
อัตราการรอดชีวิตของอสุจิหลังละลาย (n=3)	46.33 ± 3.64	36.67 ± 3.11	38.55 ± 3.14
อัตราการผสมติด	1/32	2/31	2/32

หมายเหตุ

^{กข} อักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันแสดงความแตกต่างกันในทางสถิติ ($P < 0.05$)

ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อปริมาตร 0.2 มล.

การทดลองที่ 3 ผลของสูตรน้ำยาแช่แข็ง และวิธีการแช่แข็ง ต่ออัตราการเคลื่อนที่และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิ

จากการศึกษาพบว่า การใช้อุปกรณ์ควบคุมให้ผลไม่แตกต่างจากการแช่แข็งโดยวิธีการวางหลอดอ้งไอน์โตรเจนเหลว ส่วนน้ำยาที่ใช้ในการศึกษาน้ำเชื้อสำหรับการแช่แข็ง พบว่าน้ำยา IGGKPh ให้ผลดีกว่าน้ำยา EK ในกรณีอัตราการรอดชีวิต ดังแสดงในตารางที่ 20

แสดงให้เห็นว่า ขบวนการลดอุณหภูมิด้วยการอ้งไอน์โตรเจนในระดับที่เหมาะสม จากการใช้อุปกรณ์แบบง่าย สามารถให้ผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งไม่ได้แตกต่างจากอุปกรณ์ที่ควบคุมด้วยระบบคอมพิวเตอร์ และน้ำยาสูตร EK เป็นน้ำยาดัดแปลงให้ผลดีกว่าน้ำยาสูตร IGGKPh เมื่อใช้ในไก่ โดยให้ผลดีเช่นเดียวกับ การใช้น้ำยาแช่แข็งน้ำเชื้อห่าน รายงานโดย Lukaszewicz (2002) อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น ภายนอกร่างกาย

ตารางที่ 20 ผลของวิธีการแช่แข็งด้วยเครื่องควบคุมการลดอุณหภูมิด้วยวิธีการอ้งไอน์โตรเจนเหลว เมื่อใช้สูตรน้ำยาเจือจาง IGGKPh และ EK ต่ออัตราการเคลื่อนที่และอัตราการรอดชีวิตของอสุจิ

วิธีการ	อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ			อัตราการรอดชีวิตของอสุจิ		
	หลังละลาย (%)		เฉลี่ย	หลังละลาย (%)		เฉลี่ย
	IGGKPh	EK		IGGKPh	EK	
ลดอุณหภูมิโดย ใช้เครื่องควบคุม n=6	30.00 ± 1.29	31.67 ± 3.33	30.83 ± 1.72	29.17 ± 1.54	39.17 ± 6.91	34.17 ± 3.84
ลดอุณหภูมิโดย การอ้งไอน์ n=6	37.50 ± 4.23	35.83 ± 3.52	36.67 ± 2.64	31.67 ± 2.11	46.67 ± 4.01	39.17 ± 3.13
เฉลี่ย	33.75 ± 0.29	33.75 ± 2.40		30.42 ± 1.30 ^ก	42.92 ± 4.10 ^ข	

หมายเหตุ

^{ก-ข} อักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันในทางสถิติ (P < 0.05)

การทดลองที่ 4 ผลของชนิดน้ำยา วิธีการลดอุณหภูมิโดยการอ้งไอน์ และอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อ ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการละลาย

จากการศึกษาพบว่า น้ำยาและวิธีการแช่แข็งให้ผลไม่แตกต่างกัน (P>0.05) ส่วนในการละลายน้ำเชื้อ การละลายที่อุณหภูมิ 2-5°C ให้ผลดีต่ออัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการละลายที่อุณหภูมิ 40°C (P<0.05) ส่วนผลต่ออัตราการรอดชีวิตของอสุจิไม่แตกต่างกัน (P>0.05) ดังแสดงในตารางที่ 21 จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การละลายน้ำเชื้อแบบแช่แข็งที่ลดอุณหภูมิโดยวิธีการอ้งไอน์โตรเจนเหลว ควรดำเนินการละลายที่อุณหภูมิต่ำซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ 1 อย่างไรก็ตามอุณหภูมิน้ำเชื้อแช่แข็ง ภายหลังการละลายขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง (Hemmerstedt, 1995; Chalahetal, 1999) ตลอดจนถึงพันธุกรรมหรือชนิดพันธุ์และสายพันธุ์ด้วย (Blesbois et al., 2005)

ตารางที่ 21 ผลของชนิดน้ำยา วิธีการแช่แข็งโดยการอังไอลและอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังละลายของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่พื้นเมือง (%)

อุณหภูมิละลายวิธีแช่แข็ง	สูตรน้ำยา				เฉลี่ย
	IGGKPh		EK		
	2°ซ	40°ซ	2°ซ	40°ซ	
ลดอุณหภูมิเร็วปานกลาง	65.67±1.35	48.56±5.70	66.00±1.81	49.00±5.57	57.31±2.45
ลดอุณหภูมิเร็วมาก	59.56±7.41	47.22±3.74	69.44±1.04	48.33±4.33	58.08±2.25
เฉลี่ย	66.5±0.92	47.89±3.31	67.72±1.09	48.67±3.42	
ค่าเฉลี่ยในสูตรน้ำยาเดียวกัน	57.19±2.31		58.19±2.39		
	2°ซ		40°ซ		
ค่าเฉลี่ยในอุณหภูมิเดียวกัน	67.11±0.71 ^ก		48.28±2.35 ^ข		

หมายเหตุ

^{ก-ข} อักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันแสดงถึงความแตกต่างกันในทางสถิติ ($P < 0.05$)

การทดลองที่ 5 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิด้วยโปรแกรมควบคุม 3 ระดับและอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อ ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ และอัตราการผสมติด ภายหลังการละลาย

จากการศึกษาพบว่าอัตราการลดอุณหภูมิ 1, 2 และ 3°ซ/นาที่ จาก 4 ถึง -35°ซ ก่อนการอังไอลแช่แข็ง ให้ผลไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) และให้อัตราการผสมติดร้อยละ 17.24, 15.38 และ 34.21 ตามลำดับไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 22)

ตารางที่ 22 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิในขณะแช่แข็งระหว่าง 4 ถึง 35°ซ ต่ออัตราการเคลื่อนที่หลังละลายและอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อไก่พื้นเมือง

อัตราการลดอุณหภูมิ	อัตราการเคลื่อนที่หลังละลาย (%)		
	1°ซ / นาที่	2°ซ / นาที่	3°ซ / นาที่
อุณหภูมิละลาย			
5°ซ	53.33 ±2.04	46.89±4.14	47.22±5.01
15°ซ	54.44 ± 1.76	50.00±3.54	49.17±5.33
อัตราการผสมติด 2 - 4 วัน ภายหลังผสมเทียม	17.24 (5/29)	15.38 (6/39)	34.21 (13/38)

ผลการทดลองจากตารางที่ 20 แสดงให้เห็นว่าการลดอุณหภูมิจาก 4 ถึง -35°ซ ในระดับ 1 - 3°ซ/นาที่ ให้ผลไม่แตกต่างกัน Chalah et al. (1999) แช่แข็งน้ำเชื้อไก่ โดยเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยา Schramm และมี DMF เป็น CPA โดยลดอุณหภูมิจาก 4 ถึง -35°ซ ในอัตรา 1.3°ซ/นาที่ และจาก -35°ซ ถึง -140°ซ ในอัตรา -20°ซ/นาที่ อัตราการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อแช่แข็งในสัตว์ปีกมีความแตกต่าง

กันไป (Chalah et al., 1999) ทั้งนี้ขึ้นกับ น้ำยา, CPA, ตลอดจนสายพันธุ์ (Donoghue and Wishart, 2000) อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้อัตราการผสมติดของน้ำเชื้อยังต่ำกว่าที่ได้มีรายงานกันโดยทั่วไป (Chalah et al., 1999; Donoghue and Wishart, 2000; Blesbois, 2007; Blesbois et al., 2007)

การทดลองที่ 6 ผลของระยะเวลาในการวางหลอดบรรจุน้ำเชื้อที่ระดับ -35°C และ -135°C ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการละลาย

จากการศึกษาพบว่าภายหลังการละลาย 30 นาที ระยะเวลาในการวางหลอดน้ำเชื้อที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ ก่อนทำการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังละลาย แต่อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิที่ 24 ชม. ภายหลังการละลาย และเก็บรักษาที่ 5°C ในกลุ่มที่วางไว้ระดับ -35°C นาน 10 นาที และวางไว้ที่ -135°C นาน 5 – 10 นาที ให้ค่าสูงกว่าการวางไว้ที่ -35°C และ -135°C จุดละ 5 นาที ($P < 0.05$) (ตารางที่ 23) แสดงให้เห็นว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่เจือจางด้วยน้ำยา Schramm โดยมี DMF ระดับร้อยละ 6 การลดอุณหภูมิในอัตราที่ช้า (ใช้เวลานานที่ระดับ 4°C ถึง -35°C) ซึ่งการวางหลอดน้ำเชื้อที่ระดับ -35°C เป็นเวลา 10 นาที และที่ระดับ -135°C 5 – 10 นาที ให้ผลดีที่สุด ทั้งนี้ Hammerstedt (1995) ได้รายงานว่าผลสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อขึ้นกับปฏิกริยารวมของ CPA, อัตราการลดอุณหภูมิและอัตราการละลาย

ตารางที่ 23 อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการละลายที่ 0 ชม. และที่ 24 ชม. ของน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่แช่แข็งโดยการวางหลอดที่ระดับ -35°C และ -135°C ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวในระยะเวลาที่ต่างกัน

ระดับอุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$) ระยะเวลา (นาที)		อัตราการเคลื่อนที่หลังละลาย (mean $\pm$ SE)/	
-35°C	-135°C	0 ชม.	24 ชม.
5	5	65.00 $\pm$ 1.83	31.67 $\pm$ 3.33 ^ก
5	10	65.00 $\pm$ 1.83	33.83 $\pm$ 2.52 ^{กข}
10	5	71.67 $\pm$ 2.79	41.67 $\pm$ 3.80 ^ก
10	10	71.33 $\pm$ 1.76	42.50 $\pm$ 2.14 ^ก

หมายเหตุ

ละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ $2 - 5^{\circ}\text{C}$ 5 นาที

^{ก, ข} อักษรที่แตกต่างกันในสมมุติเดียวกันแสดงความแตกต่างกันในทางสถิติ ($P < 0.05$)

การทดลองที่ 7 ผลของวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองแบบแช่แข็ง 4 วิธีการต่อคุณภาพน้ำเชื้อและ อัตราการผสมติด

จากการศึกษาพบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการละลายมีค่าเท่ากับร้อยละ 71.11 ± 3.32 , 58.13 ± 0.44 , 64.17 ± 5.35 และ 74.10 ± 2.92 (Mean $\pm$ SE) ในวิธีที่ 1 ถึง 4 ตามลำดับ (ตารางที่ 24) โดยไม่มีความแตกต่างในทางสถิติ ($P=0.06$) Chalah et al. (1999) ได้ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการแช่แข็ง 3 วิธี คือ แบบบรรจุหลอด โดยใช้ glycerol เป็น CPA ลดอุณหภูมิจาก 4°C ถึง -35°C ในอัตรา $7^{\circ}\text{C}/\text{นาที่}$ และจาก -35°C ถึง -140°C ในอัตรา $20^{\circ}\text{C}/\text{นาที่}$ แบบเม็ดโดยใช้ DMA เป็น CPA และแบบบรรจุหลอดลดอุณหภูมิจาก 4°C ถึง -35°C ในอัตรา $1.3^{\circ}\text{C}/\text{นาที่}$ และจาก -35°C ถึง -140°C ในอัตรา $-20^{\circ}\text{C}/\text{นาที่}$ พบว่าอัตราการรอดชีวิตของอสุจิภายหลังการละลาย วิธีที่ 2 และ 3 ไม่แตกต่างกัน แต่ต่ำกว่าวิธีที่ 1 แต่รายงานดังกล่าวไม่ได้เสนอข้อมูลของอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อที่แช่แข็งวิธีที่ 3 ซึ่งวางหลอดยังไอน้ำที่อุณหภูมิ -35°C 10 นาที แล้วย้ายไปวางหลอดที่ระดับ -135°C เป็นเวลา 5 นาที มีอัตราการผสมติดสูงสุด (ร้อยละ 43.15) ไม่แตกต่างจากการแช่แข็งน้ำเชื้อแบบเม็ดโดยวิธีการหยดน้ำเชื้อลงในโตรเจนเหลวโดยตรง (ร้อยละ 31.7) แต่มีอัตราผสมติดสูงกว่าการแช่แข็งแบบบรรจุหลอดในวิธีที่ 2 ซึ่งลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (ร้อยละ 12.20) โดยมี DMA เป็น CPA การแช่แข็งวิธีที่ 4 ซึ่งบรรจุหลอดและลดอุณหภูมิเร็วปานกลาง โดยมี DMF เป็น CPA (ร้อยละ 17.45) ซึ่งแตกต่างจากรายงานของ Chalah et al. (1999) และ Tselutin et al. (1999) ซึ่งต่างระบุว่า การแช่แข็งแบบเม็ดให้อัตราการผสมติดสูงสุด ส่วนการแช่แข็งแบบบรรจุหลอด โดยมี DMA เป็น CPA นั้นให้ผลการผสมติดต่ำสุด ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษานี้ จากรายงานของ Tselutin et al. (1999) ได้ชี้ให้เห็นว่าวิธีการลดอุณหภูมิ, CPA และรูปแบบภาชนะการบรรจุน้ำเชื้อ มีผลโดยตรงต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง อันส่งผลต่ออัตราการผสมติดในการศึกษาครั้งนี้ วิธีการแช่แข็ง และละลายน้ำเชื้อได้ปรับตามสภาพของห้องปฏิบัติการ ซึ่งอาจมีสิ่งแตกต่างจากวิธีการของผู้วิจัยทั้ง 2 คณะ ข้างต้น ตัวอย่างเช่นวิธีการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งแบบเม็ด ซึ่งอาจมีข้อผิดพลาดได้ง่าย อาจส่งผลต่อข้อมูลที่แตกต่างกันได้ จากวิธีดำเนินการในการวิจัยครั้งนี้ จึงอาจสรุปได้ว่า วิธีการแช่แข็งแบบที่ 3 ซึ่งเป็นการลดอุณหภูมิแบบช้า และละลายแบบช้าที่อุณหภูมิ 4°C เป็นวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองที่ได้ผลดีที่สุด ในสภาพการใช้เครื่องมือแบบประหยัด

ตารางที่ 24 อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการละลาย และอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแช่แข็งในไก่
พื้นเมืองที่ดำเนินการแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยวิธีการที่ต่างกัน

วิธีการ	CPA	วิธีการลดอุณหภูมิ	รูปแบบการบรรจุ	อุณหภูมิละลาย	อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (%)	อัตราการผสมติด (%)
1	DMA	เร็วมากยิ่ง	เม็ด	60°ซ	71.11 ± 3.32 (60-80)	31.70 ^{กข} (7.14-40.54)
2	DMA	เร็วมาก	หลอด	60°ซ	58.13 ± 0.44 (40-70)	12.20 ^ก (4.34-21.43)
3	DMF	ช้า	หลอด	5°ซ	64.17 ± 5.35 (60-80)	43.15 ^ก (22.73-76.00)
4	DMF	เร็วปานกลาง	หลอด	40°ซ	74.10 ± 2.92 (65-80)	17.45 ^{ขค} (7.69-30.77)

หมายเหตุ

ก-ค อักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันในทางสถิติ (P < 0.05)

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาสรุปผลได้ดังนี้ วิธีการลดอุณหภูมิและอุณหภูมิที่ใช้ละลาย มีปฏิกริยาร่วมกัน ทำให้มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของอสุจิภายหลังการละลาย การละลายที่อุณหภูมิต่ำมีผลดีกว่าการละลายที่อุณหภูมิสูง น้ำยาเจือจางให้ผลแตกต่างกันไม่มากนักต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลาย การแช่แข็งน้ำเชื้อไก่พื้นเมือง ภายใต้การใช้อุปกรณ์ที่ควบคุมการลดอุณหภูมิโดยระบบคอมพิวเตอร์ ให้ผลไม่แตกต่างจากการวิธีการลดอุณหภูมิโดยการอังไอน์โตรเจนเหลว การแช่แข็งน้ำเชื้อไก่พื้นเมือง อาจดำเนินการภายใต้อุปกรณ์แบบง่าย ๆ และประหยัด โดยการอังไอน์โตรเจนเหลวที่ระดับ -35° ซ เป็นเวลา 10 นาที และย้ายไปวางที่ระดับ -135 ° ซ เป็นเวลา 5-10 นาที และอุณหภูมิที่เหมาะสมสะดวกในการละลายน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง คือ 2-5 ° ซ โดยให้ผลดีในด้านอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ และอัตราการผสมติดในน้ำเชื้อไก่พื้นเมือง

เอกสารอ้างอิง

- Blesbois, E. 2007. Current status in avian semen cryopreservation. World's Poult. Sci. J. 63: 213-232.
- Blesbois, E., I. Grasseau and F. Seigneurin. 2005. Membrane fluidity and ability to survive cryopreservation in domestic bird spermatozoa. Reproduction. 129: 371-378.

- Chalah, T.,F. Seigneurin, E. Blesbois and J.P. Brillard. 1999. In Vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology*. 39: 185–191.
- Chalah, T. and J.P. Brillard 1998 Comparison of fowl sperm viability by eosin-nigrosin and dual fluorescence (SYBR-14). *Theriogenology*. 50: 487-496.
- Donoghue, A. M. and G. J. Wishart. 2000. Storage of poultry semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 213–232.
- Hammerstedt, R.H. 1995. Cryopreservation of poultry semen: current status and economics. Pages 229-250 in: *Proceedings: First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry Science*. M. R. Bakst and G. J. Wishart, (ed.) Poultry Science Association, Savoy, IL.
- Lake, P.E. and J. M. Stewart. 1978. Artificial Insemination in Poultry. Bulltin 213. Ministry of Agriculture, Fish and Food, Her Majesty's Stationery office, London, UK.
- Lukaszczysz, E. 2001. Effects of semen filtration and dilution rate on morphology and fertility of frozen spermatozoa. *Theriogenology*. 55: 1819-1129.
- Lukaszczysz, E. 2002. An Effective method for freezing White Italian gander semen *Theriogenology*. 59: 19-27.
- Seigneurin F. and E. Blesbois. 1995. Effect of freezing rate on viability and fertility of frozen fowl spermatozoa. *Poultry Sci.* 52: 1353-1357.
- Sorensen, A.M. 1979 *Animal Reproduction on Principle and Practices*. McGraw. Hill, Inc, USA. 496-498.
- Sexton, T.J. 1977. A new poultry semen extender.1 Effect of extension on the fertility of chicken semen. *Poultry Sci.* 56: 1443–1446.
- Sexton,T.J. 1979. Preservation of poultry semen. A review. Beltsville Symp. Agric. Res. No. 3, *Anim.Reprod.*,Allanheld, Osmum Co., Montchair,N.J.
- Tselutin,K.,F.Seigneurin and E. Blesbosis.1999. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poultry Sci.* 78: 586–590.
- Van Voorst, A. and F. R. Leenstra. 1995. Fertility rate of daily collected and cryopreserved fowl semen. *Poultry Sci.* 74: 136–140.
- Woelders, H., C. A. Zuidberg and S. J. Hiemstra. 2006. Animal genetic resources conservation in The Natherlands and Europe : Poultry perspective. *Poultry Sci.* 85: 216–222.

งานวิจัย 6: ผลของกลัยซีนต่ออสุจิในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองแบบแช่แข็ง

Research 6: Effect of Glycine on Cryopreservation of Native Chicken Spermatozoa

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมกรดอะมิโน กลัยซีน ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งและอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่พื้นเมือง น้ำเชื้อที่ใช้ศึกษาได้จากการรีดน้ำเชื้อรวมกันจากไก่พ่อพันธุ์หลายตัวแบ่งน้ำเชื้อเป็น 4 ส่วน แล้วเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ที่เสริมกรดอะมิโน ในระดับ 0, 20, 40 และ 60 มิลลิโมล ในสัดส่วน 1:3 ลดอุณหภูมิน้ำเชื้อเจือจางไปที่ 5°ซ จากนั้นเติมน้ำยาที่มี dimethylformamide (DMF) คิดเป็นร้อยละ 6 ของปริมาตรทั้งหมดของน้ำเชื้อเจือจางโดยปริมาตรสุดท้ายที่เพิ่มเข้าไปนี้คิดเป็น 1 ส่วน บรรจุน้ำเชื้อเข้าหลอด straw ขนาด 0.5 มิลลิลิตร แช่แข็งโดยวางเหนือไนโตรเจนเหลวที่ระดับอุณหภูมิ -35°ซ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นวางที่ระดับอุณหภูมิ -135°ซ เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว การละลายน้ำเชื้อแช่แข็งโดยการวางหลอดในน้ำเย็นอุณหภูมิ 2-5°ซ นาน 5 นาที จากนั้นประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ซึ่งพบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม ($P>0.05$) สำหรับผลของกลัยซีนต่ออัตราการผสมติดนั้น พบว่าการเสริมในระดับ 20, 40 และ 60 มิลลิโมล ทำให้อัตราการผสมติดสูงกว่ากลุ่มควบคุม (ร้อยละ 65.85, 73.33, 58.92 และ 45.55 ตามลำดับ, $P<0.05$) และการเสริมในระดับ 40 มิลลิโมล ให้ผลดีที่สุดสูงกว่าระดับอื่น ($P<0.05$)

คำสำคัญ: ไก่พื้นเมือง, น้ำเชื้อ, การแช่แข็ง, กลัยซีน, อสุจิ

Abstract

The effect of glycine on post-thaw motility and fertility were evaluated. Pooled semen of native cocks was divided to four aliquots and diluted 1:3 with Schramm diluent supplemented with 0, 20, 40 and 60 mM. of glycine. Semen samples were cooled to 5°C and added 1 part of diluent containing dimethylformamide (DMF) at final volume of 6% in diluted semen. Semen was transferred to 0.5 ml plastic straws, freeze by locate at -35°C for 10 min, then placed at -135°C for 5 min and finally plunged into liquid nitrogen. Frozen semen thawed at 2-5°C for 5 min and post-thaw motility was assessed. The percentage of motile sperm in the presence of glycine did not differ significantly from percentage of motile sperm of semen frozen without amino acid. ($P>0.05$) Fertility of eggs from hens inseminated with semen frozen in 20, 40 and 60 mM. of glycine were significantly higher than that of control (65.85, 73.33, 58.92 and 45.55 respectively; $P<0.05$). The 40 mM. glycine treatment yielded highest fertility ($P<0.05$) when compared to the other treatments.

Keywords: native chicken, semen, cryopreservation, glycine, sperm

บทนำ

การเก็บรักษาพันธุกรรมของสัตว์ปีกพื้นเมืองเพื่อคงสภาพความหลากหลายทางชีวภาพนั้นเป็นพันธกิจที่สำคัญของนักวิทยาศาสตร์ในหลายประเทศ (Blesbois, 2007) การเก็บรักษาพันธุกรรมของสัตว์ปีกในรูปแบบน้ำเชื้อแช่แข็งนับว่าเป็นรูปแบบหลักที่เป็นจริงที่สุด (Gee, 1995; Hammerstedt, 1995) แม้ว่าผลสำเร็จในด้านความสมบูรณ์พันธุ์จะมีระดับที่แตกต่างกันไปขึ้นกับ species, สายพันธุ์ ตลอดจนความแปรปรวนของสัตว์ภายในพันธุ์เดียวกันก็ตาม (Blesbois, 2007; Blesbois et al., 2007) ได้มีการพัฒนาเทคนิคในการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่จนให้ผลอยู่ในระดับที่น่าพอใจ (Donoghue and Wishart, 2000) แต่การพัฒนาให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นก็ยังคงดำเนินการต่อไป มีการเสริมกรดอะมิโนหลายชนิดลงในน้ำยาเพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของสัตว์ต่าง ๆ เช่น การเสริม glycine ในแกะ (Sanchez – Partida et al., 1992) ในม้า (Trimeche et al., 1999) ในปลา strip bass (He and Wood III, 2003 และ 2004) และในลิง cynomolgus (Li et al., 2003) ซึ่งพบว่ามีผลดีต่ออัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังละลาย อย่างไรก็ตามข้อมูลการศึกษาผลของการเสริมกลัยซีน (glycine) ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่ยังไม่มีข้อมูล การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเสริมกลัยซีน (glycine) ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ และอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแช่แข็งในไก่พื้นเมือง

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดลอง

ใช้พ่อพันธุ์ 3 กลุ่ม ได้แก่ ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว ไก่พื้นเมืองคละสี และไก่วิดิไฮส์แลนด์เรด อายุระหว่าง 2 – 2½ ปี กลุ่มละ 8 ตัว จำนวนรวม 24 ตัว แยกเลี้ยงพ่อพันธุ์ในกรงขังเดี่ยว และใช้แม่พันธุ์ไก่ไข่ทางการค้า อายุประมาณ 60 สัปดาห์ รวมทั้งสิ้นจำนวน 50 ตัว เลี้ยงในกรงตับ กรงละ 2 ตัว ให้อาหารไก่พ่อพันธุ์วันละ 110 กรัม/ตัว/วัน สำหรับแม่พันธุ์ได้รับอาหารวันละ 100 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำสะอาดกินแบบเต็มที่

การรีดน้ำเชื้อ

รีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โดยใช้ทีมผู้รีด 2 คน โดยจับบังคับไก่ 1 คน ด้วยการอุ้มไก่อวบปีก และขาด้วยมือแต่ละข้าง ส่วนอีกคนหนึ่งเป็นผู้กระตุ้นพ่อพันธุ์ ด้วยการลูบหลังจากด้านหน้าไปด้านหลัง โดยเพิ่มน้ำหนักจากเบาแล้วลงน้ำหนัก พ่อพันธุ์ที่มีสุขภาพดีจะตอบสนองด้วยการเกร็งและกระดกหาง บีบโคนกันเพื่อเก็บน้ำเชื้อทันที รongเก็บน้ำเชื้อด้วยหลอดที่สะอาด ขนาด 1.5 ml. น้ำเชื้อที่ปนเปื้อนจะไม่นำมาศึกษา รวบรวมน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์แต่ละกลุ่มในหลอดเดียวกัน (pooled semen) เพื่อนำไปศึกษาต่อไป น้ำเชื้อเก็บสัปดาห์ละ 3 ครั้ง

น้ำยาเจือจาง

ใช้น้ำยาเจือจางสูตร Schramm (Schramm, 1976 อ้างโดย Chalah, 1999) มี DMF ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 6 เป็น CPA สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการประกอบสูตรน้ำยาเจือจางเป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma และน้ำที่ใช้ละลายเป็นน้ำกลั่น 2 ครั้ง (ตารางที่ 25)

ตารางที่ 25 องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจาง Schramm ในปริมาตร 1,000 มล.

องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจาง	กรัม
Magnesium acetate	0.70
Sodium glutamate	28.50
Glucose	5.00
Inositol	2.50
Potassium acetate	5.00

การเจือจางน้ำเชื้อ

แบ่งน้ำเชื้อเป็น 4 ส่วน แล้วเจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง Schramm ที่มีส่วนประกอบของกลัยซีน (glycine) 0, 20, 40 และ 60 มิลลิโมล ในสัดส่วน 1:3 จากนั้นลดอุณหภูมิเหลือ 5°C โดยใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เตรียมน้ำยาที่มีส่วนผสมของ dimethylformamide (DMF) โดยคำนวณองค์ประกอบของ DMF เป็นร้อยละ 6 ในน้ำเชื้อเจือจางสุดท้าย 4 ส่วน (ส่วนเดิม 3 ส่วน ส่วนที่มี DMF 1 ส่วน) เตรียมไว้ที่อุณหภูมิ 5°C เติมส่วนผสมลงในน้ำเชื้อเจือจางกลับหลอดบรรจุไปมาเบาๆ เพื่อให้ส่วนผสมคลุกเคล้ากัน บรรจุน้ำเชื้อเจือจางในหลอด straw ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ปิดปลายหลอดด้วยผง polyvinyl alcohol บ่มหลอดน้ำเชื้อเจือจางที่อุณหภูมิ 5°C นาน 15 นาที ก่อนดำเนินการแช่แข็งในชั้นต่อไป

แช่แข็งน้ำเชื้อ 6 ครั้ง เพื่อใช้ในการผสมเทียมแม่พันธุ์ 6 ครั้ง ความเข้มข้นของอสุจิของน้ำเชื้อแช่แข็งอยู่ในช่วงประมาณ 1,000 – 1,500 ล้านตัว/มิลลิลิตร หรือประมาณ 500 – 750 ล้านตัว/หลอด

การแช่แข็งน้ำเชื้อ

ภายหลังการบ่มน้ำเชื้อเจือจางที่มี DMF ที่อุณหภูมิ 5°C นาน 15 นาที เช็ดหลอดบรรจุน้ำเชื้อให้แห้งโดยใช้เวลาให้สั้นที่สุดเพื่อป้องกันการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ จากนั้นนำหลอดน้ำเชื้อวางบนตะแกรงในกล่องโฟมเหนือไนโตรเจนเหลวบริเวณที่มีอุณหภูมิประมาณ -35°C เป็นเวลานาน 10 นาที ลดอุณหภูมิลงมาที่ระดับ -135°C นาน 5 นาที ก่อนจุ่มหลอดลงในไนโตรเจนเหลว

การละลายน้ำเชื้อ

นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อออกจากถังไนโตรเจนเหลววางในกล่องโฟมเปล่าประมาณ 5-8 วินาที จุ่มลงในน้ำเย็นอุณหภูมิ 2-5°C นาน 5 นาที เช็ดหลอดให้แห้งแล้วตัดปลายหลอดบรรจุน้ำเชื้อ ถ่ายเทน้ำเชื้อลงในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร ที่จุ่มในน้ำเย็น นำไปผสมเทียมแม่ไก่โดยทันที

การผสมเทียม

ทำการผสมเทียมในช่วงเวลา 16.00 – 17.00 น. แม่ไก่ที่มีไข่ภายในมดลูกจะไม่ผสมเทียม ดำเนินการเช่นนี้รวม 6 ครั้ง (replication) แม่ไก่ที่ใช้มีอัตราการไข่ประมาณร้อยละ 65 ต่อวัน มีการกระตุ้นแม่ไก่ก่อนผสมโดยลูบหลังออกแรงกดที่บริเวณท้องพร้อมกับการใช้นิ้วถ่างกัน สอดไซริงค์ขนาด 1 มิลลิเมตร บรรจุน้ำเชื้อ 0.4 มิลลิเมตร ความลึกในการสอดไซริงค์ประมาณ 4 ซม. ค่อยๆ ปล่อน้ำเชื้อเข้าช่องคลอด โดยใช้เวลาปล่อน้ำเชื้อประมาณ 5 – 8 วินาที

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

ภายหลังการผสมเทียม นำน้ำเชื้อที่เหลือเก็บที่อุณหภูมิ 5°C แล้วนำมาประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ตามวิธีการที่อ้างโดย Sorensen (1979) ภายในเวลา 1 ชม.

การเก็บข้อมูลการผสมติด

เก็บไข่ระหว่างวันที่ 2-4 ภายหลังการผสมเทียมเข้าฟัก นำไข่ที่เข้าฟักมาทดสอบอัตราการผสมติดโดยการกะเทาะเปลือกออกเพื่อดูการพัฒนาของคัพภะภายหลังฟัก 7 วัน

การทดสอบทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ complete randomized design ทำการศึกษา 6 ครั้ง ปัจจัยที่ศึกษา คือ ระดับของการเสริมกลัยซีนในสูตรน้ำยาเจือจาง มี 4 ระดับ ข้อมูลอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิและอัตราการผสมติดนำมาแปลงค่าเป็น $\arcsin \sqrt{x}$

วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการผสมติดของอสุจิ โดยวิธี Duncan's multiple range test และ Orthogonal polynomial ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (SAS, 1985)

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากการศึกษาพบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิของตัวอย่างที่เหลือจากการผสมเทียมมีค่าเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 62.50, 60.33, 59.17 และ 58.00 ในตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีกลัยซีนในระดับ 0, 20, 40 และ 60 มิลลิโมล ตามลำดับ ซึ่งไม่พบความแตกต่างในทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 26) แตกต่างจากรายงานที่ศึกษาในน้ำเชื้อแกะ (Sanchez – Partida et al., 1992) ในแกะ (Sanchez – Partida et al., 1998) ในโค (Zang et al., 2001) ในลิง cynomolgus (Li et al., 2003) และในปลา striped bass (He and Woods III, 2003 และ 2004) อย่างไรก็ตามในม้ามี่รายงานว่ายาน้ำ glycine betaine ในระดับต่ำให้ผลไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม แต่ในระดับสูงจะทำให้ให้อสุจิของน้ำเชื้อแช่แข็งเคลื่อนที่ต่ำลง (Lindeberg et al., 1999)

จากการทดสอบความสมบูรณ์พันธุ์ โดยการผสมเทียมในแม่ไก่ไข่ พบว่าการเสริมกลัยซีนในน้ำยาเจือจางมีผลดีต่ออัตราการผสมติด ($P<0.05$) โดยมีอัตราการผสมติดเท่ากับร้อยละ 45.54, 65.85, 73.33 และ 58.92 ในกลุ่มควบคุมและน้ำเชื้อที่เสริมกลัยซีนในระดับ 20, 40 และ 60 มิลลิโมล

ตามลำดับ กลัยขึ้นระดับ 40 มิลลิโมล ให้อัตราการผสมติดสูงสุด ($P < 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 26 และกราฟที่ 3

กลไกทางสรีรวิทยาของกลัยขึ้น ต่อตัวอสุจิยังไม่เป็นที่ชัดเจน อย่างไรก็ตาม Flipse and Almyuist (1955) รายงานว่าอสุจิของโคสามารถใช้กลัยขึ้นในขบวนการเมตาบอลิซึมได้ และยังรายงานว่าลดการสะสมกรดแลคติก (lactic) ในน้ำเชื้อเจ็จางได้ (Flipse and Almquist, 1956) ส่วน Lahnsteiner et al. (1992) รายงานว่า กลัยขึ้นมีผลดีต่อโครงสร้างอะโครโซมของอสุจิแบบแช่แข็งในปลา grayling

สำหรับในสัตว์ปีกยังขาดข้อมูลในเรื่องผลของกลัยขึ้นต่อคุณภาพน้ำเชื้อและความสมบูรณ์พันธุ์ของอสุจิ แต่จากการศึกษาครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีการเสริมกลัยขึ้น ในระดับที่เหมาะสมจะมีผลดีต่อความสามารถในการปฏิสนธิได้ของอสุจิที่ผ่านการแช่แข็งในไก่พื้นเมือง อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาถึงผลของกลัยขึ้นในทางสรีรวิทยาต่อตัวอสุจิของไก่ต่อไป

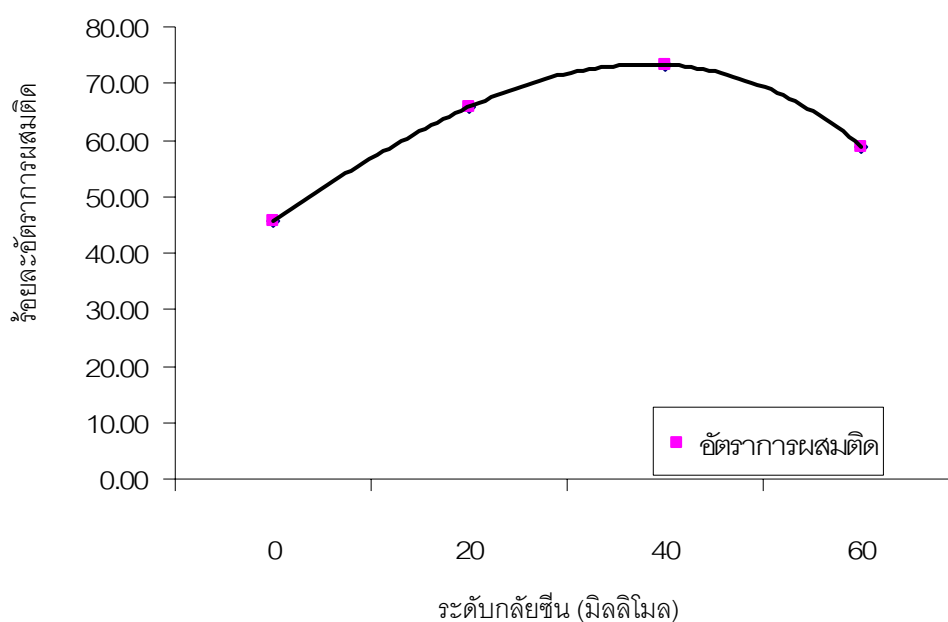
ตารางที่ 26 ผลของระดับกลัยขึ้นต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ และอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่พื้นเมือง

ระดับกลัยขึ้น มิลลิโมล	ร้อยละอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ภายหลังการละลาย (ค่าเฉลี่ย $\pm$ SE)	จำนวนไข่	ร้อยละอัตราการผสมติด ของไข่ ^{1/} (mean $\pm$ SE)
0	58.58 $\pm$ 0.23	88	45.55 $\pm$ 0.6 ^ก
20	60.00 $\pm$ 0.29	91	65.85 $\pm$ 0.52 ^{กข}
40	60.88 $\pm$ 0.23	84	73.33 $\pm$ 0.59 ^ก
60	58.19 $\pm$ 0.17	84	58.92 $\pm$ 0.47 ^ข

หมายเหตุ

^{1/} เก็บไข่เข้าฟักในวันที่ 2 – 4 หลังจากผสมเทียมแม่ไก่จำนวน 6 ครั้ง (replication)

^{ก-ข} อักษรที่แตกต่างกันในสดมภ์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันในทางสถิติ ($P < 0.05$)



กราฟที่ 3 อัตราการรอดของน้ำเชื้อแช่แข็งที่เสริมกลัยซีนระดับแตกต่างกัน วิเคราะห์แนวโน้มโดย Orthogonal polynomial

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาครั้งนี้ สรุปได้ว่าการเสริมกลัยซีนในน้ำยาเจือจางมีผลดีต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อแช่แข็งในไก่พื้นเมือง โดยระดับที่เหมาะสมคือ 40 มิลลิโมล

เอกสารอ้างอิง

- Blesbois, E. 2007. Current status in avian semen cryopreservation. Word's Poult. Sci. J. 63: 213-222.
- Blesbois, E., F. Seigneurin, I. Grasseau, C. Limouzin, J. Besnard, D. Gourichon, G. Coquerella, P. Rault and M. Tixier – Boichard. 2007. Poultry Sci. 86: 555-564.
- Donoghue, A. M. and G. J. Wishart. 2000. Storage of poultry semen. Anim. Reprod. Sci. 62: 213-232.
- Flipse, R. J. and J. Q. Almquist. 1955. Effect of milk – glycine and egg yolk – glycine diluents on the survival of bovine spermatozoa. J. Anim. Sci. 14: 1182.
- Flipse, R. J. and J. Q. Almquist. 1956. Diluters for bovine semen. IX. Motility of bovine spermatozoa in milk-glycine and egg yolk-glycine diluents with and without glycerol. Pages 1690-1696 in: Journal series of the Pennsylvania. Agricultural Experimental Station.

- Gee, C. F. 1995. Artificial insemination and cryopreservation of semen from nondomestic birds. Pages 262–280 in: Proceedings: First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry Science. M. R. Bakst and G. J. Wishart, (eds.) Poultry Science Association, Savoy, IL.
- Hammerstedt, R. H. 1995. Cryopreservation of poultry semen current status and economics. Pages 229-250 in: Proceedings: First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry Science. M. R. Bakst and G. J. Wishart, (eds.) Poultry Science Association, Savoy, IL.
- He, S. and L. C. Woods III. 2003. Effects of glycine and alanine on short – term storage and cryopreservation of striped bass (*Morone saxatilis*) spermatozoa. *Cryobiology*. 46: 17–25.
- He, S. and L. C. Woods III. 2004. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology*. 48: 254 - 262.
- Lahnsteiner, F., T. Weismann and R. A. Patzner. 1992. Fine structural changes in spermatozoa of the grayling, *Thymallus Thymallus* (Pisces: Teleostei), during routine cryopreservation. *Aquaculture*. 103: 73-84.
- Li, Y., W. Si, X. Zhang, A. Dinnyes and W. Ji. 2003. Effect of amino acids on cryopreservation of cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) sperm. *Am. J. Primatol.* 59: 159–165.
- Lindeberg, H., A. Kurten, E. Koskinen and T. Kalila. 1999. Freezing of stallion semen with addition of glycine betaine. *J. Vet. Med.* 46: 87-90.
- Sanchez – Parida, L. G., W. M. C. Maxwell, L. G. Paleg and B. P. Setchell. 1992. Proline and glycine betaine in cryoprotective diluents for ram spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 4: 113–118.
- Sanchez – Parida, L. G., W. M. C. Maxwell, L. G. Paleg and B. P. Setchell. 1998. Effect of compatible solutes and diluent composition on the post – thaw motility of ram sperm. *Reprod. Fertil. Dev.* 10: 347– 357.
- Trimeche, A., J. M. Yvon, M. Vidament, E. Palmer, M. Magistrini. 1999. Effect of glutamine, proline, histidine and betaine on post – thaw motility of stallion spermatozoa. *Theriogenology* 52: 181–189.
- Zhang, B. R., M. Buhr, T. Kroetsch and S. P. Leibo. 2001. Glycine betaine improves survival of fresh bovine spermatozoa. *Reprod. Fertil. Dev.* 13: 187–192.

**งานวิจัย 7: ผลของระยะเวลาภายหลังการวางไข่ต่ออัตราการผสมติดและฟักออก
ในไก่พื้นเมืองที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง**

**Research 7: The Effect of time post oviposition on fertility and hatchability
in native chicken inseminated by frozen semen**

บทคัดย่อ

รวบรวมน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองจากหลายพ่อพันธุ์เจือจางด้วยน้ำยาสูตร Schramm ในสัดส่วน 1:3 ลดอุณหภูมิจาก 25°C ไปที่ 5°C ในเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำยาที่มี dimethylformamide (DMF) อีก 1 ส่วนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ DMF ในน้ำเชื้อเจือจางทั้งหมดเป็นร้อยละ 6 บรรจุน้ำเชื้อเจือจางในหลอดฟางปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อไปอังไอน้ำโตรเจนเหลวที่ระดับอุณหภูมิ -35°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นย้ายหลอดลงไปวางที่ระดับอุณหภูมิ -135°C เป็นเวลา 5 นาที จึงจุ่มหลอดลงในไนโตรเจนเหลว ก่อนการผสมเทียมนำหลอดบรรจุน้ำเชื้อมาอุ่นให้น้ำเชื้อละลายในน้ำ อุณหภูมิ 2-5°C เป็นเวลา 5 นาที ผสมเทียม 1 ครั้งในแม่ไก่พื้นเมือง 2 กลุ่ม คือ กลุ่มวางไข่ใหม่ไม่เกิน 30 นาที และกลุ่มที่วางไข่แล้วเป็นเวลา 2 ชั่วโมงขึ้นไป จากการศึกษพบว่า อัตราการผสมติดและฟักออกของไข่ 7 วัน โดยเริ่มเก็บไข่วันที่ 2 ภายหลังการผสมเทียมของกลุ่มที่ผสมเทียมภายหลังการวางไข่เป็นเวลา 2 ชั่วโมงขึ้นไปสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับการผสมเทียมภายหลังการวางไข่ไม่เกิน 30 นาที แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

คำสำคัญ: การผสมเทียม, เวลาวางไข่, การผสมติด, ไก่พื้นเมือง, การฟักออก, น้ำเชื้อแช่แข็ง

Abstract

Pooled semen was diluted 1:3 with Schramm diluent and cooled from 25°C to 5°C for 1 hr. before adding 1 part of solution containing at final volume of 6% DMF. Diluted semen was transferred to 0.5 ml plastic straw, frozen by place in a zone at -35°C for 10 min then, located in a zone at -135°C for 5 min before plunging into liquid nitrogen. After thawing, the semen was single inseminated to native hens; within 30 min post oviposition group (A) and more than 2 hrs post oviposition group (B). Egg were collected for 7 d starting 2 d after insemination. Fertility and hatchability of B group were higher than A group ($P<0.05$)

Keywords: artificial insemination, oviposition, fertility, native chicken

บทนำ

Hammerstedt (1995) รายงานว่า การผสมเทียมไก่ด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง มีมานานนับตั้งแต่ปี 1941 โดย Schaffner et al. เทคนิคในการผสมเทียมและการเก็บรักษาน้ำเชื้อได้รับการพัฒนามาเป็นลำดับ ในการผสมเทียมมักดำเนินการในช่วงบ่ายเพื่อหลีกเลี่ยงการผสมเทียมในขณะที่มีไข่เปลือกแข็ง ซึ่งเป็นอุปสรรคในการผสมเทียม (Donoghe and Wishart, 2000) Bacon et al. (1986) กล่าวว่า การผสมเทียมที่มดลูกจะให้ผลการผสมติดสูงขึ้นเมื่อผสมเทียมในช่วงที่ไข่ว่างไข่แล้วไม่เกิน 30 นาที อย่างไรก็ตาม Giesen and McDaniel (1978) และ Brillard et al. (1987) รายงานว่า การผสมเทียมภายหลังการวางไข่ใหม่ ๆ จะมีผลให้อัตราการผสมติดต่ำลง ทั้งนี้เนื่องจากผลตกค้างของการบีบตัวของระบบสืบพันธุ์ภายหลังการวางไข่ส่งผลให้อสุจิถูกขับออกมา (Shimada and Asai, 1978)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบอัตราการผสมติดและฟักออกของไข่จากแม่ไก่ที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการวางไข่ใหม่ และภายหลังการวางไข่แล้ว 2 ชั่วโมงขึ้นไปในไก่พื้นเมือง

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดลอง

ใช้พ่อพันธุ์ 2 กลุ่ม ได้แก่ ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว และคละสี อายุระหว่าง 2-2½ ปี กลุ่มละ 10 ตัว จำนวนรวม 20 ตัว แยกเลี้ยงพ่อพันธุ์ในกรงขังเดี่ยว ให้อาหารไก่พ่อพันธุ์วันละ 110 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำสะอาดกินแบบเต็มที่ ใช้แม่พันธุ์ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว และคละสี อายุ 2 ปี รวมทั้งสิ้นจำนวน 39 ตัว แยกเลี้ยงแม่พันธุ์ในกรงขังเดี่ยว สำหรับแม่พันธุ์ได้รับอาหารวันละ 100 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำสะอาดกินแบบเต็มที่

การรีดน้ำเชื้อ

รีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โดยใช้ทีมผู้รีด 2 คน โดยจับบังคับไก่ 1 คน ด้วยการอุ้มไก่อ้อมปีก และขาด้วยมือแต่ละข้าง ส่วนอีกคนหนึ่งเป็นผู้กระตุ้นพ่อพันธุ์ ด้วยการลูบหลังจากด้านหน้าไปด้านหลัง โดยเพิ่มน้ำหนักจากเบาแล้วลงน้ำหนัก พ่อพันธุ์ที่มีสุขภาพดีจะตอบสนองด้วยการเกร็งและกระดกหาง บีบโคนก้นเพื่อเก็บน้ำเชื้อทันที ร่องเก็บน้ำเชื้อด้วยหลอดที่สะอาด ขนาด 1.5 ml. น้ำเชื้อที่ปนเปื้อนจะไม่นำมาศึกษา รวมน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์แต่ละกลุ่มในหลอดเดียวกัน (pooled semen) เพื่อนำไปศึกษาต่อไป น้ำเชื้อเก็บสัปดาห์ละ 3 ครั้ง

น้ำยาเจือจาง

ใช้น้ำยาเจือจางสูตร Schramm (Schramm, 1976 อ้างโดย Chalah, 1999) มี DMF ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 6 เป็น CPA สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการประกอบสูตรน้ำยาเจือจางเป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma และน้ำที่ใช้ละลายเป็นน้ำกลั่น 2 ครั้ง (ตารางที่ 27)

ตารางที่ 27 องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจ็จจาง Schramm ในปริมาตร 1,000 มล.

องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจ็จจาง	กรัม
Magnesium acetate	0.70
Sodium glutamate	28.50
Glucose	5.00
Inositol	2.50
Potassium acetate	5.00

การเจ็จจางน้ำเชื้อ

เจ็จจางน้ำเชื้อที่ได้ด้วยน้ำยาเจ็จจาง Schramm ในอัตราส่วน 1 : 3 จากนั้นลดอุณหภูมิเหลือ 5°C โดยใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เตรียมน้ำยาที่มีส่วนผสมของ dimethylformamide (DMF) โดยคำนวณองค์ประกอบของ DMF เป็นร้อยละ 6 ในน้ำเชื้อเจ็จจางสุดท้าย 4 ส่วน (ส่วนเดิม 3 ส่วน ส่วนที่มี DMF 1 ส่วน) เตรียมไว้ที่อุณหภูมิ 5°C เติมน้ำมันลงในน้ำเชื้อเจ็จจางกลับหลอดบรรจุไปมาเบาๆ เพื่อให้ส่วนผสมคลุกเคล้ากัน บรรจุน้ำเชื้อเจ็จจางในหลอด straw ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ปิดปลายหลอดด้วยผง polyvinyl alcohol บ่มหลอดน้ำเชื้อเจ็จจางที่อุณหภูมิ 5°C นาน 15 นาที ก่อนดำเนินการแช่แข็งในขั้นตอนต่อไป ความเข้มข้นของอสุจิของน้ำเชื้อแช่แข็งอยู่ในช่วงประมาณ 1,200 ล้านตัว/มล.

การแช่แข็งน้ำเชื้อ

ภายหลังการบ่มน้ำเชื้อเจ็จจางที่มี DMF ที่อุณหภูมิ 5°C นาน 15 นาที เช็ดหลอดบรรจุน้ำเชื้อให้แห้งโดยใช้เวลาให้สั้นที่สุดเพื่อป้องกันการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ จากนั้นนำหลอดน้ำเชื้อวางบนตะแกรงในกล่องโฟมเหนือไนโตรเจนเหลวบริเวณที่มีอุณหภูมิประมาณ -35°C เป็นเวลานาน 10 นาที ลดอุณหภูมิลงมาที่ระดับ -135°C นาน 5 นาที ก่อนจุ่มหลอดลงในไนโตรเจนเหลว

การละลายน้ำเชื้อ

นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อออกจากถังไนโตรเจนเหลว วางในกล่องโฟมเปล่าประมาณ 5 วินาที จุ่มลงในน้ำเย็นอุณหภูมิ 2-5°C นาน 5 นาที เช็ดหลอดให้แห้งแล้วตัดปลายหลอดบรรจุน้ำเชื้อ ถ่ายเทน้ำเชื้อลงในหลอดขนาด 15 มล. ที่จุ่มในน้ำเย็น รักษาอุณหภูมิไว้ที่ 5°C ในระหว่างการผสมเทียม (ก่อนการละลายน้ำเชื้อต้องสำรวจจำนวนแม่ไก่ที่จะผสมเทียมก่อนโดยการบันทึกเวลาการวางไข่)

การผสมเทียม

ทำการผสมเทียมบริเวณช่องคลอดโดยปลิ้นกัน และสอด syringe ขนาด 1 มล. ผสมเทียมแม่ไก่ตัวละ 0.4 มล. (อสุจิประมาณ 480×10^6 เซลล์) ความลึก 4 ซม. แบ่งแม่ไก่ที่ผสมเทียมเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่วางไข่มาแล้วไม่เกิน 30 นาที และกลุ่มที่วางไข่มาแล้ว 2 ชั่วโมงขึ้นไป

การเก็บข้อมูลการผสมติด

เก็บไข่ระหว่างวันที่ 2-8 ภายหลังการผสมเทียมเข้าฟัก นำไข่ที่เข้าฟักมาทดสอบอัตราการผสมติดโดยการส่องไข่ภายหลังฟัก 7 วัน และเก็บข้อมูลการฟักออกภายหลังฟัก 22 วัน

การทดสอบทางสถิติ

เปรียบเทียบอัตราการผสมติดและฟักออกระหว่างกลุ่มโดย Chi - square ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (SAS, 1985)

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากการทดลองพบว่า การผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งในแม่ไก่ที่วางไข่แล้วนานกว่า 2 ชั่วโมง มีแม่ไก่ที่ผสมติดร้อยละ 52.38 (11/21) ส่วนการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งในแม่ไก่ที่วางไข่เสร็จใหม่ภายใน 30 นาที มีแม่ไก่ที่ผสมติดร้อยละ 33.33 (6/18) อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 28)

จำนวนไข่มีเชื้อของไข่ภายหลังการผสมเทียม 2 - 4 วัน เท่ากับร้อยละ 22.24 และ 34.21 ในกลุ่มที่ผสมเทียมภายหลังการวางไข่ภายใน 30 นาที และนานกว่า 2 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างในทางสถิติ ($P>0.05$) เช่นเดียวกับอัตราการฟักออกซึ่งไม่แตกต่างกันในทางสถิติเช่นเดียวกัน (ร้อยละ 18.18 และ 26.32 ตามลำดับ)

อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราการผสมติดจาก 2 - 8 วัน หลังการผสมเทียมในกลุ่มที่ผสมเทียมภายหลังการวางไข่ 2 ชั่วโมงขึ้นไป (ร้อยละ 30.95) สูงกว่ากลุ่มที่ผสมเทียมภายในเวลา 30 นาที ภายหลังการออกไข่ (ร้อยละ 14.81) ($P<0.05$) และเปอร์เซ็นต์ไข่ฟักออกจากไข่เข้าฟักในกลุ่มที่ผสมเทียมภายหลังการวางไข่ 2 ชั่วโมงขึ้นไป (ร้อยละ 23.81) สูงกว่า ($P<0.05$) กลุ่มที่ผสมเทียมภายใน 30 นาทีหลังการวางไข่ (ร้อยละ 11.11) สอดคล้องกับรายงานของ Giesen and McDaniel (1978) และ Brillard et al. (1987)

โดยปกติแล้วน้ำเชื้อแช่แข็งของไก่จะมีการสูญเสียมาก ซึ่งมีผลให้มีอัตราการผสมติดต่ำและช่วงเวลาที่มีเชื้อภายหลังการผสมเทียมจะสั้นกว่าการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสด (Donoghue and Wishart, 2000; Blesbois, 2007) Bakst et al. (1994) รายงานว่าโดยทั่วไปแล้วอสุจิจากการผสมพันธุ์ในไก่จะสามารถไปถึง sperm storage tubules (SST) เพียงประมาณร้อยละ 1-2 ของอสุจิทั้งหมดเท่านั้น และ Wishart (1985) ได้แสดงให้เห็นว่าอสุจิของน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีประสิทธิภาพในการปฏิสนธิมีเพียงร้อยละ 1-2 ของอสุจิจากน้ำเชื้อสดเท่านั้น ผลจากการศึกษารังนี้แสดงให้เห็นว่าการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งภายใน 30 นาที ภายหลังการวางไข่อาจมีผลทำให้จำนวนอสุจิที่พักอยู่ที่บริเวณ SST มีจำนวนต่ำกว่าการผสมเทียมภายหลังการวางไข่ 2 ชั่วโมงขึ้นไป ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากการบีบตัวแบบ peristaltic ของระบบสืบพันธุ์ภายหลังการวางไข่โดยมีทิศทางตรงข้ามกับการเดินทางของอสุจิไปยังแหล่งฟักฟิง ส่งผลให้มีอสุจิจำนวนที่เดินทางไปปฏิสนธิได้น้อยลง (Brillard et al., 1987) ในการศึกษาครั้งนี้ไม่มีปัญหาในด้านเทคนิคการผสมเทียมเนื่องจากได้ผสมเทียมแม่ไก่จำนวนหนึ่งด้วยน้ำเชื้อสดจากพ่อพันธุ์กลุ่มเดียวกันจำนวน 25 แม่ พบว่าผสมติด 23 แม่ ให้ไข่มีเชื้อเท่ากับร้อยละ 89.41 และมีการฟักออกเท่ากับร้อยละ 58.82 ของไข่เข้าฟัก

ตารางที่ 28 อัตราการผสมติดและฟักออกของไข่ในแม่ไก่พื้นเมืองที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง
 ภายหลังการวางไข่ภายใน 30 นาที เปรียบเทียบกับการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง
 ภายหลังการวางไข่ 2 ชั่วโมงขึ้นไป

ลักษณะที่ศึกษา	ช่วงการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการวางไข่	
	ภายใน 30 นาที	หลังวางไข่ 2 ชั่วโมงขึ้นไป
<u>จำนวนแม่ไก่</u>	18	21
- อัตราการผสมติด (%)	33.33	52.28
<u>จำนวนไข่มีเชื้อภายหลังการผสมเทียม 2 – 4 วัน</u>	33	38
- อัตราการผสมติด (%)	24.24	34.21
- อัตราการฟักออกจากไข่เข้าฟัก (%)	18.18	26.32
<u>จำนวนไข่มีเชื้อภายหลังการผสมเทียม 2 – 8 วัน</u>	81	84
- อัตราการผสมติด (%)	14.81 ^ก	30.95 ^ก
- อัตราการฟักออกจากไข่เข้าฟัก (%)	11.11 ^ก	23.81 ^ก

หมายเหตุ

^{1/} จำนวนอสุจิ 480×10^6 เซลล์/แม่ ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร

^{ก-ข} อัตราที่แตกต่างในแถวเดียวกันแสดงความแตกต่างกันในทางสถิติ ($P < 0.05$)

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาครั้งนี้ สรุปได้ว่าอัตราการผสมติดและฟักออกของไข่จากแม่ไก่ที่ผสมเทียมด้วย
 น้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการวางไข่ใหม่ ต่ำกว่าแม่ไก่ที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการวางไข่
 แล้ว 2 ชั่วโมงขึ้นไป

เอกสารอ้างอิง

- Bakst, M. R., G. J. Wishart and J. P. Brillard. 1994. Oviductal sperm selection, transport and storage in poultry. *Poult. Sci. Review*. 5: 117– 43.
- Bacon, L. D., D. W. Salter, J. B. Motta, L. B. Crittenden, and F. X. Ogasawara. 1986. Cryopreservation of chicken semen of inbred or specialized Strains. *Poultry Sci.* 65: 1965–1971.
- Blesbois, E. 2007. Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poultry Sci. J.* 63: 213–222.
- Brillard, J. P., O. Galut and Y. Nys. 1987. Possible causes of subfertility in hens following insemination near the time of oviposition. *Br. Poultry Sci.* 28: 307–318.
- Donoghue, A. M. and G. J. Wishart. 2000. Storage of poultry semen. *Anim. Reprod. Sci.* 62: 213–232.
- Giesen, A. F. and G. R. McDaniel. 1978. Influence of time of oviposition and time of artificial insemination on fertility. *Poultry Sci.* 57: 1138 (Abst).
- Hammerstedt, R.H. 1995. Cryopreservation of poultry semen: current status and economics. Pages 229-250 in: *Proceedings: First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry Science*. M. R. Bakst and G. J. Wishart, (ed.) Poultry Science Association, Savoy, IL.
- Shimada, K. and I. Asai. 1978. Uterine untraction during the ovulatory cycle of the hen. *Biol. Reprod.* 19: 1057–1062.
- Wishart, G. J. 1985. Quantitative of the fertilizing ability of fresh compared with frozen and thawed fowl spermatozoa. *Br. Poultry Sci.* 26: 375–380.

**งานวิจัย 8: ผลของความลึกของการสอดใส่รังไข่ในการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง
ต่ออัตราการผสมติดและฟักออกในไก่พื้นเมือง**

**Research 8: Effect of depth of frozen semen deposition on
fertility and hatchability in native chicken**

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของระดับความลึกในการสอดใส่อุปกรณ์ผสมเทียมในการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งในช่องคลอดในระดับ 3 และ 6 เซนติเมตรตามลำดับ ต่ออัตราการผสมติดและฟักออกในไก่พื้นเมือง ทำการรีดน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองรวมกันเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ดัดแปลงในสัดส่วน 1:4 โดยมี dimethylacetamide ร้อยละ 6 โดยปริมาตร บรรจุน้ำเชื้อเจือจางในหลอดพลาสติกขนาดจุ 0.5 มิลลิลิตร แช่แข็งโดยการวางหลอดบรรจุน้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลวที่ระดับ -35°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นย้ายไปวางในระดับ -135°C อีก 5 นาที จึงจุ่มหลอดบรรจุน้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลว ละลายน้ำเชื้อโดยการวางหลอดในน้ำ $2-5^{\circ}\text{C}$ นาน 5 นาที จากนั้นนำน้ำเชื้อไปผสมเทียมในแม่ไก่โดยสอดใส่รังไข่ผสมเทียมเข้าไปใน ช่องคลอดลึก 3 ซม. (จำนวน 35 แม่) หรือ 6 ซม. (จำนวน 38 แม่) เก็บไข่เข้าฟักภายหลังการผสมเทียม 2-8 วัน จากการศึกษาพบว่าอัตราการผสมติดและฟักออกจากแม่ไก่ทั้ง 2 กลุ่มไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)
คำสำคัญ: ความลึกของการสอดใส่รังไข่, การผสมเทียม, การผสมติด, น้ำเชื้อแช่แข็ง, ไก่พื้นเมือง

Abstract

The objective of this study was to investigate the effect of depth of frozen semen deposition into vagina on fertility and hatchability in native chicken. Pooled semen of native chicken was diluted 1:4 with modified Schramm diluents containing 6% (v/v) dimethylacetamide. Semen was processed at 5°C , frozen by cooling in a zone at -35°C for 10 min, located in a zone at -135°C for 5 min, then plunged in liquid nitrogen. Frozen semen straws were thawed at $2-5^{\circ}\text{C}$ and inseminated to native hens at depth of 3 or 6 cm in vagina. Fertility and hatchability were measured after single insemination. No significant differences were found in fertility and hatchability percentages between the two depths of semen deposition into vagina.

Keywords: deposition, AI, fertility, frozen semen, native chicken

บทนำ

ในการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งมักสอดอุปกรณ์การผสมเทียมเข้าช่องคลอดในระดับที่แตกต่างกันไป แต่มีเป้าหมายเพื่อหลักประกันที่ทำให้สperm ไปถึงแหล่งพักพิงบริเวณส่วนต่อของช่องคลอดและมดลูก (utero-vaginal junction, UVJ) ให้ได้มากที่สุด โดย Lake และ Stewart (1978) รายงานถึงอัตราการผสมติดที่สูงเมื่อมีการสอดอุปกรณ์ผสมเทียมในส่วนลึกของช่องคลอด Kurbatov et al. (1984) อ้างโดย Donoghue และ Wishart (2000) รายงานเกี่ยวกับการผสมเทียมในระดับความลึก 3-4 ซม. Van Voorst และ Leenstra (1995) รายงานถึงอัตราการผสมติดที่ดีของการผสมเทียมที่ระดับความลึก 6 ซม. ส่วน Bacon et al. (1985) ได้ศึกษาเปรียบเทียบตำแหน่งการผสมเทียมที่เหมาะสมระหว่างช่องคลอด มดลูก และแอมนัมของท่อนำไข่ในไก่สายพันธุ์พิเศษเลือดชิด พบว่าการผสมที่แอมนัมให้อัตราการผสมติดและฟักออกดีที่สุด อย่างไรก็ตามไม่สะดวกในทางปฏิบัติ นอกจากนี้มีรายงานว่าน่าสนใจว่าการผสมเทียมติดต่อกันบ่อย ๆ ทำให้อัตราการผสมติดลดลง โดยพบว่าการบวมและเซลล์เยื่อเมือกบางลงที่บริเวณ UVJ ทำให้สperm ไม่สามารถพักพิงได้ส่งผลต่อการผสมติดต่ำ (Das et al., 2005) ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคการผสมเทียมในไก่พื้นเมืองซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไข่ไม่ตกยังมีน้อย การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของความลึกในการสอดอุปกรณ์ผสมเทียมต่ออัตราการผสมติดและฟักออกของไข่ภายหลังการผสมเทียม 1 ครั้ง ในระยะเวลา 2-8 วัน

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดลอง

ใช้พ่อพันธุ์ 2 กลุ่ม ได้แก่ ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว และคละสี อายุระหว่าง 2-3 ปี กลุ่มละ 10 ตัว จำนวนรวม 20 ตัว แยกเลี้ยงพ่อพันธุ์ในกรงขังเดี่ยว ให้อาหารไก่พ่อพันธุ์วันละ 110 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำสะอาดกินแบบเต็มที่ ใช้แม่พันธุ์ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว และคละสี อายุ 9 เดือน-2 ปี รวมทั้งสิ้นจำนวน 73 ตัว แยกเลี้ยงแม่พันธุ์ในกรงขังเดี่ยว สำหรับแม่พันธุ์ได้รับอาหารวันละ 100 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำสะอาดกินแบบเต็มที่

การรีดน้ำเชื้อ

รีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โดยใช้ทีมผู้รีด 2 คน โดยจับบังคับไก่ 1 คน ด้วยการอุ้มไก่อวบปีก และขาด้วยมือแต่ละข้าง ส่วนอีกคนหนึ่งเป็นผู้กระตุ้นพ่อพันธุ์ ด้วยการลูบหลังจากด้านหน้าไปด้านหลัง โดยเพิ่มน้ำหนักจากเบาแล้วลงน้ำหนัก พ่อพันธุ์ที่มีสุขภาพดีจะตอบสนองด้วยการเกร็งและกระดกหาง บีบโคนกันเพื่อเก็บน้ำเชื้อทันที รongเก็บน้ำเชื้อด้วยหลอดที่สะอาด ขนาด 1.5 ml. น้ำเชื้อที่ปนเปื้อนจะไม่นำมาศึกษา รวบรวมน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์แต่ละกลุ่มในหลอดเดียวกัน (pooled semen) เพื่อนำไปศึกษาต่อไป น้ำเชื้อเก็บสัปดาห์ละ 3 ครั้ง

น้ำยาเจือจาง

ใช้น้ำยาเจือจางสูตร Schramm (Schramm, 1976 อ้างโดย Chalah, 1999) เสริมกลัยซีน 40 มิลลิโมล มี DMF ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 6 เป็น CPA สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการประกอบสูตร น้ำยาเจือจางเป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma และน้ำที่ใช้ละลายเป็นน้ำกลั่น 2 ครั้ง (ตารางที่ 29)

ตารางที่ 29 องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจาง Schramm ในปริมาตร 1,000 มล.

องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจาง	กรัม
Magnesium acetate	0.70
Sodium glutamate	28.50
Glucose	5.00
Inositol	2.50
Potassium acetate	5.00

การเจือจางน้ำเชื้อ

เจือจางน้ำเชื้อที่ได้ด้วยน้ำยาเจือจาง Schramm ในอัตราส่วน 1:3 จากนั้นลดอุณหภูมิที่ 5°C โดยใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เตรียมน้ำยาที่มีส่วนผสมของ dimethylformamide (DMF) โดยคำนวณองค์ประกอบของ DMF เป็นร้อยละ 6 ในน้ำเชื้อเจือจางสุดท้าย 4 ส่วน (ส่วนเดิม 3 ส่วน ส่วนที่มี DMF 1 ส่วน) เตรียมไว้ที่อุณหภูมิ 5°C เติมน้ำผสมลงในน้ำเชื้อเจือจางกลับหลอดบรรจุไปมาเบาๆ เพื่อให้ส่วนผสมคลุกเคล้ากัน บรรจุน้ำเชื้อเจือจางในหลอด straw ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ปิดปลายหลอดด้วยผง polyvinyl alcohol บ่มหลอดน้ำเชื้อเจือจางที่อุณหภูมิ 5°C นาน 15 นาที ก่อนดำเนินการแช่แข็งในขั้นตอนต่อไป ความเข้มข้นของอสุจิของน้ำเชื้อแช่แข็งอยู่ในช่วงประมาณ 1,250-1,500 ล้านตัว/มล.

การแช่แข็งน้ำเชื้อ

ภายหลังการบ่มน้ำเชื้อเจือจางที่มี DMF ที่อุณหภูมิ 5°C นาน 15 นาที เช็ดหลอดบรรจุน้ำเชื้อให้แห้งโดยใช้เวลาให้สั้นที่สุดเพื่อป้องกันการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ จากนั้นนำหลอดน้ำเชื้อวางบนตะแกรงในกล่องโฟมเหนือไนโตรเจนเหลวบริเวณที่มีอุณหภูมิประมาณ -35°C เป็นเวลานาน 10 นาที ลดอุณหภูมิลงมาที่ระดับ -135°C นาน 5 นาที ก่อนจุ่มหลอดลงในไนโตรเจนเหลว

การละลายน้ำเชื้อ

นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อออกจากถังไนโตรเจนเหลว วางในกล่องโฟมเปล่าประมาณ 5 วินาที จุ่มลงในน้ำเย็นอุณหภูมิ 2-5°C นาน 5 นาที เช็ดหลอดให้แห้งแล้วตัดปลายหลอดบรรจุน้ำเชื้อ ถ่ายเทน้ำเชื้อลงในหลอดขนาด 15 มล. ที่วางจุ่มในน้ำเย็น 5°C จากนั้นนำน้ำเชื้อไปผสมเทียมแม่ไก่โดยทันที

การผสมเทียม

เล้าโลมแม่ไก่โดยการลูบบริเวณหลัง จากนั้นปลิ้นกันผสมเทียมโดยการสอดไขว้รังค์พลาสติก ขนาด 1 มล. ลึก 3 หรือ 6 ซม. ตามกลุ่มสลับกันไป ใช้ปริมาณน้ำเชื้อ 0.4 มล. จำนวนอสุจิประมาณ 500 – 600 ล้านตัว/แม่ ดำเนินการผสมเทียมในเวลา 16.00 น. – 17.00 น.

การเก็บข้อมูลการผสมติด

เก็บไข่ระหว่างวันที่ 2–8 ภายหลังการผสมเทียมเข้าฟัก นำไข่ที่เข้าฟักมาทดสอบอัตราการผสมติดโดยการส่องไข่ภายหลังฟัก 7 วัน เก็บข้อมูลอัตราการฟักออกภายหลังฟัก 22 วัน

การทดสอบทางสถิติ

เปรียบเทียบอัตราการผสมติดและฟักออกระหว่างกลุ่มโดย Chi – square ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (SAS, 1985)

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

จากตารางที่ 30 พบว่าอัตราการผสมติดของแม่ไก่ที่ได้รับการผสมเทียมจากความถี่ระดับ 3 และ 6 ซม. ไม่มีความแตกต่างกัน โดยมีอัตราการผสมติดของแม่ไก่เท่ากับร้อยละ 74.29 และ 73.68 ตามลำดับ

อัตราการผสมติดและอัตราการฟักออกของไข่ภายหลังการผสมเทียม 2–4 วัน ของวิธีการผสมเทียมโดยสอดไขว้รังค์ลึก 3 และ 6 ซม. ไม่มีความแตกต่างกัน ($P>0.05$) โดยมีอัตราการผสมติดและอัตราการฟักออกเท่ากับร้อยละ 76.63, 45.07 และ 63.15, 44.74 ในกลุ่มที่สอดไขว้รังค์ลึก 3 และ 6 ซม. ตามลำดับ

สำหรับอัตราการผสมติดและอัตราการฟักออกของไข่ภายหลังการผสมเทียม 2–8 วัน ของทั้ง 2 วิธีการผสมเทียมก็ไม่แตกต่างกันเช่นเดียวกัน โดยมีอัตราการผสมติดและอัตราการฟักออก เท่ากับร้อยละ 54.76, 41.67 และ 46.06, 33.71 ในกลุ่มที่สอดไขว้รังค์ลึก 3 และ 6 ซม. ตามลำดับ

ผลการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าความถี่ในการสอดไขว้รังค์ผสมเทียมแม่ไก่พื้นเมืองในระดับ 3 และ 6 ซม. ให้ผลไม่แตกต่างกัน สอดคล้องกับเทวินทร์และคณะ (2549) รายงานว่าการผสมเทียมแม่ไก่ไข่ด้วยน้ำเชื้อสดในช่องคลอดด้วยระดับความถี่ 2 และ 4 ซม. ให้ผลต่ออัตราการผสมติดและไข่ไม่แตกต่างกัน และสอดคล้องกับแนวปฏิบัติทั่วไปในการผสมเทียมไก่ ซึ่งมักผสมเทียมโดยการสอดอุปกรณ์การผสมลึก 2–6 ซม. ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในการตรวจเอกสารข้างต้น

อย่างไรก็ตาม คณะผู้วิจัยมีข้อสังเกตว่าในการสอดไขว้รังค์ผสมเทียมระดับ 6 ซม. ไขว้รังค์อาจเข้าไปยังมดลูก และพบว่ามีแม่ไก่ในกลุ่มที่ผสมเทียมระดับ 6 ซม. จำนวน 3 ตัว มีอาการอักเสบของช่องคลอด ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าได้รับผลกระทบในการผสมเทียม โดยอาจเกิดจากอุปกรณ์ที่ใช้ยังไม่เหมาะสมพอ และการสอดอาจลึกเกินไปสำหรับไก่พื้นเมือง ดังนั้นการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งในไก่พื้นเมืองจึงควรสอดไขว้รังค์ผสมเทียมในระดับลึกประมาณ 3 ซม. ก็น่าจะเป็นการเพียงพอแล้ว

ตารางที่ 30 ผลของความถี่ของการสอดใส่จริงคี่ในการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งต่อ อัตราการผสมติดและฟักออกในไก่พื้นเมือง

ลักษณะที่ศึกษา	ระดับความถี่ในการสอดใส่จริงคี่	
	3 ชม.	6 ชม.
<u>จำนวนแม่ไก่</u>	35	38
- อัตราการผสมติด (%)	74.29	73.68
<u>จำนวนไข่มีเชื้อภายหลังการผสมเทียม 2 – 4 วัน</u>	71	76
- อัตราการผสมติด (%)	76.65	63.15
- อัตราการฟักออกจากไข่เข้าฟัก (%)	45.07	44.74
<u>จำนวนไข่มีเชื้อภายหลังการผสมเทียม 2 – 8 วัน</u>	168	178
- อัตราการผสมติด (%)	54.76	46.06
- อัตราการฟักออกจากไข่เข้าฟัก (%)	41.67	33.71

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาครั้งนี้ สรุปได้ว่าความถี่ในการสอดใส่จริงคี่ผสมเทียมในระดับ 3 หรือ 6 ชม. ให้ผลต่ออัตราการผสมติดและฟักออกของไข่ภายหลังการผสมเทียม 1 ครั้ง ในระยะเวลา 2–8 วัน ไม่มีความแตกต่างกัน

เอกสารอ้างอิง

- เทวินทร์ วงษ์พระลับ, บัญญัติ เหล่าไพบูลย์, พิษณุรัตน์ แสนไชยสุริยา และศราวุธ ศรีงาม. 2549. การศึกษาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองโดยวิธีการแช่แข็ง. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภททุนอุดหนุนทั่วไป มหาวิทยาลัยขอนแก่น ปีงบประมาณ 2547.
- Bacon, L. D., D. W. Salter, J. B. Motta, L. B. Crittenden, and F. X. Ogasawara. 1986. Cryopreservation of chicken semen of inbred or specialized Strains. Poultry Sci. 65: 1965–1971.
- Das, S. C., N. Nagasaka and Y. Yoshimura. 2005. Effect of repeated artificial insemination on the structure and function of oviducal sperm storage. Poultry Sci. 42: 39–47.
- Donoghue, A. M. and G. J. Wishart. 2000. Storage of poultry semen. Anim. Reprod. Sci. 62: 213–232.
- Lake, P. E. and J. M. Stewart. 1978. Artificial insemination in poultry. Minist. Agric., Fish. Food, Bull. 213, Her Majesty's Stationery Office, London, UK.
- Van Voorst, A. and F. R. Leenstra. 1995. Effect of dialysis before storage or cryopreservation on fertilizing ability of fowl semen. Poultry Sci. 74: 141–146.

งานวิจัย 9: ผลของจำนวนอสุจิและปริมาตรน้ำเชื้อในการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง
ต่ออัตราการผสมติดและฟักออกในไก่พื้นเมือง

Research 9: Effect of sperm number and volume of frozen semen
on fertility and hatchability in native chicken

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของจำนวนอสุจิในการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งต่ออัตราการผสมติดและฟักออกในไก่พื้นเมือง รีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองรวมกันแบ่งน้ำเชื้อเป็น 3 ส่วน เจือจางด้วยน้ำยาสูตร Schramm (ดัดแปลง) ปรับให้มีความเข้มข้นของอสุจิประมาณ 600, 1,200 และ 1,800 ล้านเซลล์/มล. โดยน้ำเชื้อเจือจางมี dimethylformamide ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 6 โดยปริมาตร บรรจุน้ำเชื้อเจือจางในหลอดพลาสติกขนาด 0.5 มล. แช่แข็งน้ำเชื้อโดยการวางหลอดน้ำเชื้ออังไอน์โตรเจนเหลวที่ระดับ -35°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นย้ายไปวางที่ระดับ -135°C เป็นเวลา 5 นาที จึงจุ่มหลอดลงในไนโตรเจนเหลว ละลายน้ำเชื้อแช่แข็งโดยวางหลอดในน้ำเย็น 5°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปผสมเทียมแม่ไก่พื้นเมืองโดยใช้น้ำเชื้อปริมาตร 0.4 มล./ตัว แบ่งแม่ไก่เป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ได้รับอสุจิ 240, 480 และ 720 ล้านตัว ตามลำดับ จากการศึกษาพบว่าการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยความเข้มข้นของจำนวนอสุจิ 3 ระดับดังกล่าวให้อัตราการผสมติดและอัตราการฟักออกเท่ากับร้อยละ 38.33, 31.67; 38.57, 30.00 และ 61.54, 42.31 ตามลำดับ การผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีจำนวนอสุจิ 720 ล้านตัว ให้ความสมบูรณ์พันธุ์ดีที่สุด ($P<0.05$) เมื่อผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งปริมาตร 0.2 และ 0.4 มล. (ความเข้มข้นของอสุจิ 600 ล้านตัว/แม่) พบว่ามีความแตกต่างกันของอัตราการผสมติดที่ร้อยละ 30.00 และ 64.52 ตามลำดับ

คำสำคัญ: จำนวนอสุจิ, ปริมาตร, ผสมเทียม, น้ำเชื้อแช่แข็ง, ไก่พื้นเมือง, อัตราการผสมติด, อัตราการฟักออก

Abstract

The effect of sperm number of frozen semen on fertility and hatchability after insemination in native chicken was investigated. Pooled semen was divided to three aliquots and extended with Schramm diluent containing 6% (v/v) dimethylformamide at concentration of 600, 1,200 and 1,800x10⁶ sperm / ml. Semen was transferred to 0.5 ml plastic straw, freeze by locate at -35°C for 10 min, placed at -135°C for 5 min in liquid nitrogen vapour, and the straws were then plunged into liquid nitrogen. The straws were thawed in a water bath at $2-5^{\circ}\text{C}$ for 5 min. Three groups of hens were inseminated with 0.4 ml of thawed

semen as number of 240, 480 and 720×10^6 sperm/hen respectively. The results showed that fertility and hatchability of the three groups were 38.33, 31.67; 38.57, 30.00 and 61.54, 42.31% respectively. The sperm number of 720×10^6 group gave superior results to 240×10^6 and 540×10^6 groups ($P < 0.05$). Fertility was affected ($P < 0.05$) by volume of insemination (600×10^6 sperm) with lower fertility of 0.2 ml than 0.4 ml (30.00 and 61.67% respectively)

Keywords: sperm number, volume, AI, frozen semen, native chicken

บทนำ

อัตราการผสมติดของไข่ขึ้นกับจำนวนอสุจิจำนวนหนึ่งที่ไปถึงบริเวณ infundibulum ในช่วงที่มีการตกไข่ ซึ่งจำนวนอสุจิดังกล่าวขึ้นกับจำนวนอสุจิที่ผสมเทียมและความบ่อยครั้งของการผสมเทียม ซึ่งอสุจิจากการผสมเทียมจะไปพักพิงที่บริเวณ sperm storage tubules ของ uterovagina junction (Brillard, 1995) ภายหลังการผสมพันธุ์จะมีเพียงอสุจิประมาณร้อยละ 1-2 เท่านั้นที่ไปถึงบริเวณนี้ (Bakst et al., 1994) ในอุตสาหกรรมการผลิตไก่จึงนิยมผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสดที่มีจำนวนอสุจิ 150-200 ล้านตัว/แม่ ในช่วงต้นฤดู และ 200-250 ล้านตัว/แม่ ในช่วงปลายฤดู โดยมีความบ่อยครั้งในการผสม 1 ครั้ง/สัปดาห์ ในต้นฤดู และ 3 ครั้ง ใน 10 วัน สำหรับปลายฤดูกาล (Brillard, 1995) สำหรับในไก่การผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง พบว่าอสุจิจะอ่อนแอ อายุสั้น และมีประสิทธิภาพไม่เกินร้อยละ 1-2 ของน้ำเชื้อสด (Wishart, 1985) ดังนั้นจึงต้องผสมเทียมด้วยอสุจิจำนวนที่สูงกว่าและบ่อยครั้งกว่าการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสด (Hammerstedt, 1995) ซึ่งหากจะให้มียอัตราการผสมติด ที่สูงกว่าร้อยละ 90 จะต้องผสมด้วยอสุจิ 400-600 ล้านตัว ทุกๆ 1-2 วัน (Van Voorst and Leenstra, 1995) อย่างไรก็ตามความสมบูรณ์พันธุ์ที่ได้จากน้ำเชื้อแช่แข็งขึ้นกับสายพันธุ์ไก่ด้วย โดย Blesbois et al. (2007) ได้ศึกษาการอนุรักษ์น้ำเชื้อในไก่แบบแช่แข็งของฝรั่งเศส และรายงานว่ให้มียอัตราการผสมติดระหว่างร้อยละ 7-68 แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์หลังจากผสมเทียมด้วยจำนวนอสุจิ 600 ล้านตัว/แม่ สำหรับไก่พื้นเมืองไทยนั้นยังไม่มีรายงานดังกล่าว การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบผลของจำนวนอสุจิจากน้ำเชื้อแช่แข็งต่อการผสมติดในไก่พื้นเมือง

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดลอง

ใช้พ่อพันธุ์ 2 กลุ่ม ได้แก่ ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว และคละสี อายุระหว่าง 2-3 ปี กลุ่มละ 10 ตัว จำนวนรวม 20 ตัว แยกเลี้ยงพ่อพันธุ์ในกรงขังเดี่ยว ให้อาหารไก่พ่อพันธุ์วันละ 110 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำสะอาดกินแบบเต็มที่ ใช้แม่พันธุ์ไก่พื้นเมืองเหลืองหางขาว และคละสี อายุ 10 เดือน-2 ปี รวมทั้งสิ้นจำนวน 57 ตัว แยกเลี้ยงแม่พันธุ์ในกรงขังเดี่ยว สำหรับแม่พันธุ์ได้รับอาหารวันละ 100 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำสะอาดกินแบบเต็มที่

การรีดน้ำเชื้อ

รีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โดยใช้ทีมผู้รีด 2 คน โดยจับบังคับปีก 1 คน ด้วยการอุ้มไกวรอบปีก และขาด้วยมือแต่ละข้าง ส่วนอีกคนหนึ่งเป็นผู้กระตุ้นพ่อพันธุ์ ด้วยการลูบหลังจากด้านหน้าไปด้านหลัง โดยเพิ่มน้ำหนักจากเบาแล้วลงน้ำหนัก พ่อพันธุ์ที่มีสุขภาพดีจะตอบสนองด้วยการเกร็งและกระดกหาง บีบโคนก้นเพื่อเก็บน้ำเชื้อทันที ร่องเก็บน้ำเชื้อด้วยหลอดที่สะอาด ขนาด 1.5 ml. น้ำเชื้อที่ปนเปื้อนจะไม่นำมาศึกษา รวบรวมน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์แต่ละกลุ่มในหลอดเดียวกัน (pooled semen) เพื่อนำไปศึกษาต่อไป น้ำเชื้อเก็บสัปดาห์ละ 3 ครั้ง

น้ำยาเจือจาง

ใช้น้ำยาเจือจางสูตร Schramm (Schramm, 1976 อ้างโดย Chalah, 1999) เสริมกลัยซีน 40 มิลลิโมล มี DMF ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 6 เป็น CPA สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการประกอบสูตร น้ำยาเจือจางเป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma และน้ำที่ใช้ละลายเป็นน้ำกลั่น 2 ครั้ง (ตารางที่ 31)

ตารางที่ 31 องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจาง Schramm ในปริมาตร 1,000 มล.

องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจาง	กรัม
Magnesium acetate	0.70
Sodium glutamate	28.50
Glucose	5.00
Inositol	2.50
Potassium acetate	5.00

การเจือจางน้ำเชื้อ

ในการศึกษาผลของจำนวนอสุจิของน้ำเชื้อแช่แข็งต่ออัตราการผสมติด รวมน้ำเชื้อที่ผ่านมาตรฐาน (อสุจิมีอัตราการเคลื่อนที่ร้อยละ 80 ขึ้นไป) ในหลอดขนาด 15 มล. ตรวจวัดความเข้มข้นด้วย hemacytometer โดยดูดน้ำเชื้อ 20 ไมโครลิตร เจือจาง 1,000 เท่า ในน้ำยา 4% NaCl ตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แบ่งน้ำเชื้อเป็น 3 ส่วน ปรับความเข้มข้นเป็น 900, 1,800 และ 2,700 ล้านตัว/มล. ตามลำดับ ลดอุณหภูมิไปที่ 5°C ภายในเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นเติมน้ำยาเจือจางอุณหภูมิ 5°C เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของอสุจิเป็น 600, 1,200 และ 1,800 ล้านตัว/มล. โดยน้ำยาดังกล่าวมีส่วนผสมของ dimethylformamide (DMF) ความเข้มข้นสุดท้ายเป็นร้อยละ 6 ของน้ำเชื้อเจือจางแต่ละหลอด กลับหลอดไปมาเพื่อให้ส่วนผสมคลุกเคล้ากันอย่างทั่วถึง บรรจุน้ำเชื้อเจือจางในหลอดพลาสติกขนาด 0.5 มล. ปิดปลายหลอดด้วยผง polyvinyl alcohol จุ่มหลอดไว้ในน้ำอุณหภูมิ 5°C ระยะเวลา 30 วินาที แล้วปล่อยให้หลอดเย็นในตู้เย็นที่ 5°C

การศึกษาผลของปริมาตรของน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ผสมเทียมต่ออัตราการผสมติด แบ่งน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีออกเป็น 2 ส่วน 2:1 ปรับความเข้มข้นสุดท้ายของอสุจิในน้ำเชื้อเป็น 3,000 และ 1,500 ล้านตัว/มล. ในน้ำยาที่มี DMF ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 6 และดำเนินการเช่นเดียวกับการศึกษาแรก

การแช่แข็งน้ำเชื้อ

ภายหลังการบ่มน้ำเชื้อเจือจางที่มี DMF ที่อุณหภูมิ 5°C นาน 15 นาที เช็ดหลอดบรรจุน้ำเชื้อให้แห้งโดยใช้เวลาให้สั้นที่สุดเพื่อป้องกันการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ จากนั้นนำหลอดน้ำเชื้อวางบนตะแกรงในกล่องโฟมเหนือไนโตรเจนเหลวบริเวณที่มีอุณหภูมิประมาณ -35°C เป็นเวลานาน 10 นาที ลดอุณหภูมิลงมาที่ระดับ -135°C นาน 5 นาที ก่อนจุ่มหลอดลงในไนโตรเจนเหลว

การละลายน้ำเชื้อ

นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อออกจากถังไนโตรเจนเหลว วางในกล่องโฟมเปล่าประมาณ 5 วินาที จุ่มลงในน้ำเย็นอุณหภูมิ 2-5°C นาน 5 นาที เช็ดหลอดให้แห้งแล้วตัดปลายหลอดบรรจุน้ำเชื้อ ถ่ายเทน้ำเชื้อลงในหลอดขนาด 15 มล. ที่วางจุ่มในน้ำเย็น 5°C จากนั้นนำน้ำเชื้อไปผสมเทียมแม่ไก่โดยทันที

การผสมเทียม

การผสมเทียมให้กระตุ้นแม่ไก่โดยการลูบหลังก่อนที่จะปลิ้นกันโดยออกแรงกดที่บริเวณท้อง พร้อมกับการใช้นิ้วถ่างกัน จะทำให้การปลิ้นกันทำได้ง่ายสอดไซริงค์พลาสติกกลี 4 ซม. ในช่องคลอด การศึกษาแรก ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งความเข้มข้น 3 ระดับให้กับแม่ไก่โดยการสุ่มใช้ปริมาตร 0.4 มล. ดังนั้นแม่ไก่ในแต่ละกลุ่มจะได้รับอสุจิ 240, 480 และ 720 ล้านตัว/แม่ ในการศึกษาใช้แม่ไก่พื้นเมือง 17, 19 และ 21 แม่ ตามลำดับ ดำเนินการผสมเทียมในช่วงเวลาประมาณ 16.00 – 17.00 น.

การศึกษาที่ 2 ผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อปริมาตร 0.2 และ 0.4 มล. ในแม่ไก่กลุ่มละ 16 แม่ จำนวนอสุจิ 600 ล้านตัว/แม่ ดำเนินการผสมเทียมในช่วงบ่าย 16.00 – 17.00 น.

การเก็บข้อมูลการผสมติด

เก็บไข่ระหว่างวันที่ 2-8 ภายหลังการผสมเทียมเข้าฟัก นำไข่ที่เข้าฟักมาทดสอบอัตราการผสมติดโดยการส่องไข่ภายหลังฟัก 7 วัน และเก็บข้อมูลอัตราการฟักออกภายหลังฟัก 22 วัน

การทดสอบทางสถิติ

เปรียบเทียบอัตราการผสมติดและฟักออกระหว่างกลุ่มโดย Chi – square ด้วย SAS (1985)

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 32 โดยพบว่าอัตราการผสมติดของแม่ไก่ภายหลังการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีความเข้มข้นของอสุจิ 240, 480 และ 720 ล้านตัว/แม่ มีค่าร้อยละ 64.71, 78.95 และ 90.48 ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

อัตราการผสมติดของไข่ภายหลังการผสมเทียม 2-4 วัน มีค่าร้อยละ 36.67, 38.46 และ 62.50 และอัตราการฟักออกของไข่ที่เข้าฟักมีค่าร้อยละ 20.00, 30.77 และ 53.13 ตามลำดับ โดยการผสมเทียมด้วยอสุจิจำนวน 720 ล้านตัว/แม่ ให้อัตราการฟักออกของไข่สูงสุด ($P<0.05$)

เมื่อศึกษาอัตราการผสมติดของไข่ภายหลังการผสมเทียม 2-8 วัน (เก็บไข่ 1 สัปดาห์) มีค่าร้อยละ 38.33, 38.57 และ 61.54 โดยการผสมเทียมด้วยอสุจิจำนวน 720 ล้านตัว/แม่ ให้อัตราการผสมติดดีที่สุด ($P<0.01$) ส่วนอัตราการฟักออกของไข่เข้าฟักนั้นมีค่าร้อยละ 31.67, 30.00 และ 42.31

ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างในทางสถิติ ($P>0.05$) แสดงให้เห็นว่าการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งในไก่พื้นเมืองด้วยอสุจิจำนวนมากจะให้ผลดีกว่าการผสมเทียมด้วยอสุจิจำนวนที่น้อย จากรายงานการศึกษาของต่างประเทศที่ศึกษาในไก่พันธุ์ไข่ พบว่าการผสมเทียมด้วยอสุจิที่แตกต่างกันไป เช่น 300 ล้านตัว/แม่ (Duplaix and Sexton, 1983; Duplaix, 1984; Seigneurin and Blesbois, 1995; Tselutin et al., 1999) ประมาณ 425 – 700 ล้านตัว/แม่ (Van Voorst and Leenstra, 1995) และประมาณ 600 ล้านตัว/แม่ ในการผสมเทียมไก่พันธุ์ของฝรั่งเศส (Blesbois et al., 2007) ซึ่งจากรายงานทั้งหมดผสมเทียมสัปดาห์ละ 2 ครั้ง ส่วนผลการผสมติดก็มีความแตกต่างกันไปโดย Van Voorst and Leenstra (1995) รายงานว่า มีอัตราการผสมติดสูงถึงร้อยละ 86.8 และ Tselutin et al. (1999) รายงานว่า อยู่ระหว่างร้อยละ 26.7 ถึง 92.7 ทั้งนี้ขึ้นกับวิธีการแช่แข็งและละลายน้ำเชื้อ ส่วน Blesbois ซึ่งทำการศึกษาในไก่ของฝรั่งเศส 4 สายพันธุ์ โดยดัดแปลงวิธีของ Tselutin et al. (1999) พบอัตราการผสมติดร้อยละ 7–68 แตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์ Blesbois (2007) รายงานว่าระดับการผสมติดของน้ำเชื้อไก่แบบแช่แข็งโดยเฉลี่ยมีค่าประมาณร้อยละ 60 (ช่วงร้อยละ 0–90) ในการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่ทำให้ความสมบูรณ์พันธุ์ของอสุจิลดลงอย่างมาก พบ accessory sperm ที่บริเวณ perivitelline membranes ของไข่เล็กน้อยมาก (Wishart, 1985; Alexander et al., 1993) ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุให้มีการผสมเทียมไก่ด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีอสุจิจำนวนมากและบ่อยครั้งกว่าการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสด จากการศึกษาครั้งนี้แม้จะเป็นการผสมเทียมเพียงครั้งเดียว (single insemination) แต่ก็ให้ค่าอัตราการผสมติดที่อยู่ในเกณฑ์ใกล้เคียงค่าเฉลี่ย จึงอาจสรุปได้ว่าการผสมเทียมแม่ไก่พื้นเมืองด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งของไก่พื้นเมืองที่ดำเนินการแช่แข็งด้วยอุปกรณ์แบบง่าย สามารถให้อัตราการผสมติดที่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน แม่ไก่ควรได้รับอสุจิประมาณ 700 ล้านตัว/การผสมเทียม

ตารางที่ 32 ผลของจำนวนอสุจิเมื่อผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแบบแช่แข็งต่ออัตราการผสมติดและฟักออกในไก่พื้นเมือง

ลักษณะที่ศึกษา	จำนวนอสุจิ / การผสม		
	240 ล้านเซลล์	480 ล้านเซลล์	720 ล้านเซลล์
จำนวนแม่ไก่	17	19	21
ร้อยละของแม่ที่ผสมติด	64.71	78.95	90.48
จำนวนไข่มีเชื้อระหว่าง 2 – 4 วัน	30	26	32
ภายหลังการผสมเทียม			
- อัตราการผสมติด (%)	36.67	38.46	62.50
- อัตราการฟักออกของไข่ที่เข้าฟัก (%)	20.00 ^{ก,ข}	30.77 ^ก	53.13 ^ก
จำนวนไข่มีเชื้อระหว่าง 2 – 8 วัน	60	70	78
ภายหลังการผสมเทียม			
- อัตราการผสมติด (%)	38.33 ^ก	38.57 ^ก	61.54 ^ก
- อัตราการฟักออกของไข่ที่เข้าฟัก (%)	31.67	30.00	42.31

หมายเหตุ

ผสมเทียม 1 ครั้ง ด้วยน้ำเชื้อปริมาตร 0.4 มล.

ก,ข

อักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันแสดงความแตกต่างกันในทางสถิติ ($P<0.05$)

สำหรับผลของปริมาณในการผสมเทียมพบว่า การผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งปริมาณ 0.4 มล. ให้ผลอัตราการผสมติดและฟักออกสูงกว่าการผสมเทียมด้วยปริมาณ 0.2 มล. (ตารางที่ 33) ทั้งที่จำนวนอสุจิที่ใช้ผสมเทียมเท่ากัน อย่างไรก็ตามมีรายงานการศึกษาอื่นที่ใช้ปริมาณน้ำเชื้อระดับ 0.1 มล. ในการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งเป็นวิธีการที่ปฏิบัติทั่วไป (Buss, 1993; Tselutin et al., 1999) มีข้อสังเกตว่าในการแช่แข็งน้ำเชื้อโดยการบรรจุหลอดมักใช้ความเข้มข้นสุดท้ายก่อนการแช่แข็ง ประมาณ $1,000-2,000 \times 10^6$ /มล. (Blesbois et al., 2007; Buss, 1993; Van Voorst and Leenstra, 1999) ซึ่งมีการเจือจางน้ำเชื้อ:น้ำยาประมาณ 1:2-1:5 ในขณะที่ในการศึกษาครั้งนี้ในกลุ่มที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อปริมาณ 0.2 มล./แม่ เจือจางน้ำเชื้อ:น้ำยา ประมาณ 1:1 ซึ่งอาจเกิดสภาวะไม่เหมาะสมก่อนการแช่แข็งเนื่องจากอสุจินานและในขบวนการแช่แข็งและละลาย จึงก่อให้เกิดความเสียหายต่อตัวอสุจิในเรื่องสัดส่วนของ CPA/cell อสุจิ อย่างไรก็ตาม สมมติฐานนี้ก็ขัดแย้งกับงานของ Tselutin et al. (1999) ซึ่งแช่แข็งอสุจิภายใต้ความเข้มข้น $2.5-3.5 \times 10^9$ ตัว/มล. และให้อัตราการผสมติดที่สูง ผลการผสมติดต่ำของทรีทเมนต์ที่ 1 จึงยังไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริง

ตารางที่ 33 ผลของปริมาณน้ำเชื้อแช่แข็งต่ออัตราการผสมติดและฟักออกจากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง

ลักษณะที่ศึกษา	ปริมาณน้ำเชื้อ (มิลลิลิตร)	
	0.2	0.4
จำนวนแม่ไก่	20	20
ร้อยละของแม่ที่ผสมติด	70.00	90.00
จำนวนไข่มีเชื้อระหว่าง 2 – 4 วัน หลังการผสมเทียม	30	31
- อัตราการผสมติด (%)	33.33	64.52
- อัตราการฟักออกของไข่ที่เข้าฟัก (%)	26.67	58.06
จำนวนไข่มีเชื้อระหว่าง 2 – 8 วัน หลังการผสมเทียม	72	70
- อัตราการผสมติด (%)	29.17 ^ก	61.14 ^ก
- อัตราการฟักออกของไข่ที่เข้าฟัก (%)	25.00 ^ก	57.14 ^ก

หมายเหตุ

^{ก, ข} อักษรที่แตกต่างกันในแถวเดียวกันแสดงความแตกต่างกันในทางสถิติ ($P < 0.05$)

ผสมเทียมด้วยอสุจิจำนวน 600 ล้านตัว/แม่

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาครั้งนี้ สรุปได้ว่าการผสมเทียมแม่ไก่พื้นเมืองด้วยน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมือง จำนวนอสุจิที่ใช้ผสมมีผลต่ออัตราการผสมติดและฟักออก โดยควรมีจำนวนอสุจิใกล้เคียง 700 ล้านตัว/การผสม จึงจะทำให้ได้รับอัตราการผสมติดและฟักออกในระดับที่น่าพอใจ ส่วนปริมาณของน้ำเชื้อที่ใช้ในการผสมเทียมแม่ไก่ก็มีผลต่ออัตราการผสมติดและการฟักออกเช่นกัน โดยปริมาณน้ำเชื้อ 0.4 มล. ให้ผลดีกว่า 0.2 มล. ในการศึกษาครั้งต่อไป ควรศึกษาถึงผลของความเข้มข้นของอสุจิในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการละลายของไก่พื้นเมือง เพื่อให้ทราบอัตราส่วนการเจือจาง ตลอดจนจำนวนอสุจิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง

เอกสารอ้างอิง

- Alexander, A., J. K. Graham and R. H. Hammerstedt. 1993. Effect of genotype and cryopreservation of avian semen on fertility and number of perivitelline spermatozoa. Br. Poult. Sci. 34: 757–764.
- Bacon, L. D., D. W. Salter, J. B. Motta, L. B. Crittenden, and F. X. Ogasawara. 1986. Cryopreservation of chicken semen of inbred or specialized Strains. Poultry Sci. 65: 1965–1971.
- Bakst, M. R., G. J. Wishart and J. P. Brillard. 1994. Oviductal sperm selection, transport and storage in poultry. Poultry Sci. Rev. 5: 117–143.
- Blesbois, E. 2007. Current status in avian semen cryopreservation. World's Poult. Sci. J. 63: 213–222.
- Blesbois, E., F. Seigneurin, I. Grasseau, C. Limouzin, J. Besnard, D. Gourichon, G. Coquerella, P. Rault and M. Tixier – Boichard. 2007. Poultry Sci. 86: 555–564.
- Brillard, J. P. 1995. Artificial insemination: How many sperm, how often. Pages 176-183 in: Proceedings: First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry Science. M. R. Bakst and G. J. Wishart, (eds.) Poultry Science Association, Savoy, IL.
- Buss, E.G. 1993. Cryopreservation of rooster sperm. Poultry Sci. 72: 944–954.
- Duplaix, M. 1984. Effects of type of freeze straw and thaw temperature on the fertilizing capacity of frozen chicken semen. Poultry Sci. 63: 775–780.
- Duplaix, M. and J. J. Sexton. 1983. Effects of prefreeze treatments on the fertilizing capacity of unfrozen and frozen semen extender characteristics and dilution method. Poultry Sci. 62: 2255–2260.

- Hammerstedt, R.H. 1995. Cryopreservation of poultry semen current status and economics. Pages 229-250 in: Proceedings: First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry Science. M. R. Bakst and G. J. Wishart, (eds.) Poultry Science Association, Savoy, IL.
- Seigneurin, F. and E. Blesbois. 1995. Effects of the freezing rate on viability and fertility of frozen thawed fowl spermatozoa. *Theriogenology* 43: 1351–1358.
- Tselutin, K., F. Seigneurin and E. Blesbois. 1999. Comparison of cryoprotectants and methods of cryopreservation of fowl spermatozoa. *Poultry Sci.* 78: 586–590.
- Van Voorst, A. and F. R. Leenstra. 1995. Fertility rate of daily collected and cryopreserved fowl semen. *Poultry Sci.* 74: 136–140.
- Wishart, G. J. 1985. Quantitative of the fertilizing ability of fresh compared with frozen and thawed fowl spermatozoa. *Br. Poult. Sci.* 26: 375–380.

งานวิจัย 10: ความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่พื้นเมือง

Research 10: Fertilizing ability of Thai native chicken frozen semen

บทคัดย่อ

เก็บน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ไก่โดยแยกเก็บรายตัวในไก่พันธุ์โรดไอส์แลนด์เรด และในไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์ คือ ชี, เหลืองหางขาว, แดง และประดู่ นำน้ำเชื้อที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำยา Schramm ดัดแปลง โดยมี dimethylformamide (DMF) ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 6 โดยปริมาตร เป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง บรรจุน้ำเชื้อเจือจางในหลอดพลาสติกขนาด 0.5 มล. ทำการแช่แข็งโดยวางลงในไนโตรเจนเหลวที่ระดับความเย็น -35°C เป็นเวลา 10 นาที และที่ระดับ -135°C เป็นเวลา 5 นาที ก่อนที่จะจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว ละลายน้ำเชื้อโดยการจุ่มในน้ำเย็นอุณหภูมิ $2-5^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 5 นาที ก่อนที่จะนำไปผสมเทียมแม่ไก่โดยใช้น้ำเชื้อพ่อพันธุ์ ๆ ละ 4 พ่อ/สายพันธุ์ แยกผสมเทียมแม่ไก่ภายหลังพัก 7 วัน พ่อละ 5 แม่ สืบดาห์ละครั้ง รวม 3 ครั้ง จากการศึกษาพบว่าน้ำเชื้อพ่อพันธุ์จากแต่ละสายพันธุ์ให้อัตราการผสมติดร้อยละ 42.1, 59.05, 47.37 และ 28.85 ตามลำดับ ซึ่งไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$)

คำสำคัญ: ความสมบูรณ์พันธุ์, น้ำเชื้อแช่แข็ง, ไก่พื้นเมือง

Astract

Semen was collected individually from Rhode Island Red groups (control) and four lines of Thai native chicken, Chee, Luang hang khaw, Dang and Pradou. The semen was mixed and diluted with modified Schramm extender with 6% (v/v) dimethylformamide as a cryoprotectant. Each sample was filled in 0.5 ml plastic straw and frozen in nitrogen vapor in a zone at -35°C for 10 min, located in a zone at -135°C for 5 min, then plunged in liquid nitrogen. The straws were thawed at $2-5^{\circ}\text{C}$ and inseminated to layer hens. A set of 4 males representing each line was used to individually inseminate 5 females per male once a week over three weeks. Fertility were examined at 7 days postincubation. The results showed that fertility of frozen semen each line were 42.1, 59.05, 47.37, 28.85 and 39.05 respectively which no significant difference ($P>0.05$).

Keywords: fertility, frozen semen, native chicken

บทนำ

การอนุรักษ์ความหลากหลายทางพันธุกรรมของสัตว์เลื้อยมีความจำเป็นต่อความยั่งยืนในการผลิตอาหารเลี้ยงมนุษย์ชาติ Dohner (2001) ได้ระบุว่า ครึ่งหนึ่งของสัตว์เลื้อยตระกูลนกอยู่ในสถานะใกล้สูญพันธุ์ด้วยมูลเหตุที่แตกต่างกันไป รวมทั้งภัยคุกคามของโรคระบาด เช่น ไข้หวัดนก เป็นต้น นอกเหนือจากการอนุรักษ์พันธุกรรมโดยการคงฝูงสัตว์ไว้แล้วการอนุรักษ์แบบ ex situ ก็เป็นแนวทางหนึ่งในการรักษาความหลากหลายทางชีวภาพ สำหรับแนวทางที่เป็นจริงที่สุดทางหนึ่งในการอนุรักษ์พันธุกรรมของสัตว์ปีก คือ การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง (Gee, 1995; Hammerstedt, 1995; Reed et al., 1995) ทั้งนี้เนื่องจากไข่ของสัตว์ปีกมีขนาดใหญ่จึงไม่เหมาะในการเก็บตัวอ่อน ส่วนการเก็บรักษา blastoderm cells และ primordial germ cells มีความยุ่งยากในการนำไปใช้ ต้นทุนสูง ตลอดจนมีการแสดงออกของพันธุกรรมที่ต้องการในอัตราที่ต่ำ แม้ว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในสัตว์ปีกจะได้ผลในระดับที่น่าพอใจ แต่อัตราการผสมติดก็ให้ผลที่แปรปรวนขึ้นกับชนิดสัตว์ สายพันธุ์ และพ่อพันธุ์แต่ละตัว (Blesbois et al., 2005; Blesbois et al., 2007) สำหรับไก่พื้นเมืองไทยซึ่งมีประชากรประมาณ 54 ล้านตัว (กรมปศุสัตว์, 2550) กระจายอยู่ตามชนบททั่วไป และมีความหลากหลายทางชีวภาพ อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรักษาพันธุกรรมในรูปแบบน้ำเชื้อแช่แข็ง ตลอดจนข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อแช่แข็งดังกล่าว การศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแช่แข็ง ในไก่ 4 สายพันธุ์ คือ ชี, เหลืองหางขาว, แดง และประดู่ เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อแช่แข็งจากไก่พ่อพันธุ์โรดไอแลนด์แดง

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดลอง

สุ่มพ่อพันธุ์เพื่อเก็บน้ำเชื้อจากแต่ละพันธุ์หรือสายพันธุ์ละ 4 พ่อ จากพ่อพันธุ์ที่มีสุขภาพดี ของพันธุ์โรดไอแลนด์เรด พันธุ์พื้นเมืองสายพันธุ์ ชี, เหลืองหางขาว, แดง และประดู่ โดยไก่สายพันธุ์ชี และประดู่ได้รับความอนุเคราะห์จากโครงการ “การพัฒนาไก่พื้นเมือง” ซึ่งได้รับการสนับสนุนงบประมาณการวิจัยจาก สกว. พ่อพันธุ์มีอายุระหว่าง 2-3 ปี แยกเลี้ยงพ่อพันธุ์ในกรงขังเดี่ยว ให้อาหารไก่พ่อพันธุ์วันละ 110 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำสะอาดกินแบบเต็มที่ ให้แม่พันธุ์แม่ไก่ไข่ทางการค้าอายุ 70 สัปดาห์ แยกเลี้ยงแม่พันธุ์ในกรงขังเดี่ยว สำหรับแม่พันธุ์ได้รับอาหารวันละ 100 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำสะอาดกินแบบเต็มที่

การรีดน้ำเชื้อ

รีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โดยใช้ทีมผู้รีด 2 คน โดยจับบังคับไก่ 1 คน ด้วยการอุ้มไก่รวบปีก และขาด้วยมือแต่ละข้าง ส่วนอีกคนหนึ่งเป็นผู้กระตุ้นพ่อพันธุ์ ด้วยการลูบหลังจากด้านหน้าไปด้านหลัง โดยเพิ่มน้ำหนักจากเบาแล้วลงน้ำหนัก พ่อพันธุ์ที่มีสุขภาพดีจะตอบสนองด้วยการเกร็งและกระดกหาง บีบโคนก้นเพื่อเก็บน้ำเชื้อทันที ซึ่งภายในบรรจุน้ำยาเจือจาง 0.1 มล. ทำการแยกน้ำเชื้อแต่ละพ่อ โดยก่อนรีด

น้ำเชื้อเพื่อการศึกษาจะทำการรีดน้ำเชื้อทิ้ง 1 วันก่อนที่จะรีดเก็บ ทั้งนี้เนื่องจากเป็นการจำลองเหตุการณ์หากมีการรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อพันธุ์นอกสถานที่ ซึ่งควรมีการรีดน้ำเชื้อเก่าเก็บในตัวพ่อพันธุ์ที่จะนำมาใช้จริง น้ำเชื้อที่มีการปนเปื้อนของมูลจะไม่ถูกนำไปใช้ นำหลอดน้ำเชื้อไปแช่ในน้ำอุณหภูมิ 25°C จากนั้นตรวจคุณภาพเบื้องต้น น้ำเชื้อที่มีอสุจิก่อนที่ร้อยละ 80 ขึ้นไป จึงจะนำไปใช้ในการทดลอง น้ำยาเจือจาง

ใช้น้ำยาเจือจางสูตร Schramm (Schramm, 1976 อ้างโดย Chalah, 1999) มี DMF ความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 6 เป็น CPA สำหรับสารเคมีที่ใช้ในการประกอบสูตรน้ำยาเจือจางเป็นผลิตภัณฑ์ของ Sigma และน้ำที่ใช้ละลายเป็นน้ำกลั่น 2 ครั้ง (ตารางที่ 34)

ตารางที่ 34 องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจาง Schramm ในปริมาตร 1,000 มล.

องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาเจือจาง	กรัม
Magnesium acetate	0.70
Sodium glutamate	28.50
Glucose	5.00
Inositol	2.50
Potassium acetate	5.00

การเจือจางน้ำเชื้อ

เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางสูตร Schramm ให้มีปริมาตรเป็น 1 มล. ซึ่งในทางปฏิบัติจะเป็นการเจือจางระหว่าง 1:2.5-1:5 โดยปริมาตร ด้วยน้ำยาที่มีอุณหภูมิ 20°C จากนั้นลดอุณหภูมิไปที่ 5°C ใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เติมน้ำยาที่มีส่วนผสมของ dimethylformamide (DMF) 66 มล. และรวมปริมาตรกับน้ำยา 100 มล. อุณหภูมิ 5°C ลงในน้ำเชื้อเจือจาง กลับหลอดให้ส่วนผสมคลุกเคล้าอย่างทั่วถึง จึงบรรจุในหลอดพลาสติกขนาดจุ 0.5 มล. รักษาอุณหภูมิไว้ที่ระดับ 5°C

การแช่แข็งน้ำเชื้อ

ภายหลังการบ่มน้ำเชื้อเจือจางร่วมกับ DMF ตามวิธีการเตรียมน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็ง เป็นเวลา 15 นาที เช็ดหลอดบรรจุน้ำเชื้อให้แห้งอย่างรวดเร็ว แล้วนำไปวางบนตระแกรงในกล่องโฟมที่บรรจุไนโตรเจนเหลวที่ระดับอุณหภูมิ -35°C เป็นเวลา 10 นาที แล้วเลื่อนลงไปที่ระดับอุณหภูมิ -135°C เป็นเวลา 5 นาที จึงจุ่มหลอดลงในไนโตรเจนเหลว และเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวดำเนินการแช่แข็งน้ำเชื้อพ่อพันธุ์แต่ละตัว 3 ครั้ง รวมพ่อละ 6 หลอด/ชุด ดำเนินการเก็บน้ำเชื้อแบบแช่แข็งพ่อละ 3 ชุด

การละลายน้ำเชื้อ

นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อออกจากถังไนโตรเจนเหลววางในกล่องโฟมเปล่าประมาณ 5 - 8 วินาที จึงจุ่มลงในน้ำเย็นอุณหภูมิ 2 - 5°C นาน 5 นาที เช็ดหลอดให้แห้งแล้วตัดปลายหลอดบรรจุน้ำเชื้อเทน้ำเชื้อลงในหลอดขนาด 15 มล. โดยก้นหลอดจุ่มในน้ำเย็นนำไปผสมเทียมแม่ไก่ไข่ทางการค้าโดยทันที

การผสมเทียม

การผสมเทียมก่อนการผสมเทียมกระตุ้นแม่ไก่ โดยการลูบหลังก่อนที่จะปลิ้นกันโดยออกแรงกดที่บริเวณท้องพร้อมกับการใช้นิ้วถ่างกัน ซึ่งจะทำให้มีความสะดวกในการปลิ้นกัน สอดไซริงค์ 1 มล. เข้าช่องคลอดลึกประมาณ 4 ซม. ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อปริมาตร 0.4 มล. ดำเนินการผสมเทียมในช่วงเวลา 16.00 – 17.00 น. ดำเนินการเช่นนี้ 3 ครั้งต่อฟlock โดยเว้นระยะห่างไม่น้อยกว่า 1 สัปดาห์

การเก็บข้อมูลการผสมติด

เก็บไข่ระหว่างวันที่ 2–4 ภายหลังการผสมเทียมเข้าฟัก นำไข่ที่เข้าฟักมาทดสอบอัตราการผสมติดโดยการกะเทาะเปลือกออกเพื่อดูการพัฒนาของคัพภะภายหลังฟัก 7 วัน

การทดสอบทางสถิติ

เปรียบเทียบอัตราการผสมติดและฟักออกระหว่างกลุ่มโดย Chi – square ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป (SAS, 1985)

ผลและวิจารณ์ผลการศึกษา

ผลการศึกษาแสดงในตารางที่ 35 โดยพบว่าภาพรวมของอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของพ่อพันธุ์ไก่โรดไอส์แลนด์เรด, ซี, เหลืองหางขาว แดง และประดู่ มีค่าร้อยละ 42.10, 59.05, 47.37, 28.85 และ 39.05 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันในทางสถิติ ($P>0.05$) แตกต่างจากรายงานอื่น (Ansah and Buckland, 1983; Brillard et al., 2003; Blesbois et al., 2007) ซึ่งรายงานถึงผลของความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งในไก่ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าพ่อพันธุ์แต่ละตัวในแต่ละกลุ่มให้อัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแช่แข็งแตกต่างกัน มีความแปรปรวนในแต่ละพ่อพันธุ์และในน้ำเชื้อที่รีดได้แต่ละครั้งก็มีความแตกต่างกัน ซึ่งด้านหนึ่งอาจมีสาเหตุมาจากจำนวนอสุจิที่ใช้ในการผสมเทียมในบางพ่อมีจำนวนน้อยประมาณ 100–300 ล้านตัว/การผสม เมื่อแช่แข็งและละลายจึงเหลืออสุจิที่มีชีวิตที่มีคุณภาพสำหรับการไปปฏิสนธิได้จำนวนน้อยมาก จึงทำให้มีผลการผสมติดต่ำ ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการควบคุมคุณภาพด้วยจำนวนอสุจิ เนื่องจากพยายามดำเนินการจำลองสภาพของการดำเนินงานภาคสนามให้ใกล้เคียงสภาพความเป็นจริง นอกจากนี้แล้วสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาอาจมีอายุที่มากเกินไปโดยพ่อพันธุ์มีอายุ 2–3 ปี มีรายงานว่าในพ่อไก่องค์ประกอบของ lipid และ antioxidant ในน้ำเชื้อลดลงตามอายุที่สูงขึ้นทำให้ความสามารถในการผสมติดต่ำลง (Kelso et al., 1996; Cerolini et al., 1997) และในการศึกษาครั้งนี้ใช้แม่พันธุ์ไก่ไข่มีการให้ไข่มาประมาณ 1 ปีเศษ มีอัตราการไข่ประมาณร้อยละ 60 ซึ่งช่วงอายุดังกล่าวน่าจะให้อัตราการผสมติดต่ำกว่าไก่สาว (Gumulka and Kapkowska, 2005; Ingram et al., 2007)

ตารางที่ 35 อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการละลาย จำนวนอสุจิที่ผสมเทียม และอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในพ่อพันธุ์ไก่โรดไอส์แลนด์เรด ไก่พื้นเมืองสายพันธุ์ซี เหลืองหางขาว แดง และประดู่

พันธุ์ – สายพันธุ์	จำนวนพ่อ	อัตราการเคลื่อนที่ ของอสุจิ ¹ ภายหลัง การละลาย (%) (mean±SE)	จำนวนแม่ไก่			
			จำนวนอสุจิ ที่ผสมเทียม (mean±SE)	จำนวน แม่ไก่	จำนวนไข่ ทดสอบ	อัตราการ ผสมติด (%)
โรดไอส์แลนด์เรด	4	53.33±1.06	655.8±5.35	20	107	42.1 (4.17–73.33)
ซี	4	48.58±1.24	494.67±6.31	20	105	59.05 (20.83–84.62)
เหลืองหางขาว	4	42.83±1.17	481.67±6.21	20	114	47.37 (20.00–79.17)
แดง	4	47.83±1.37	289.00±3.51	20	104	28.85 (14.81–43.48)
ประดู่	4	42.92±1.61	465.00±2.90	20	105	39.01 (13.04–64.29)

หมายเหตุ

^{1/} อัตราการเคลื่อนที่ภายหลังผสมเทียม 1 ชั่วโมง

สรุปผลการศึกษา

การศึกษานี้สรุปได้ว่าภายใต้การรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ที่ทำการสุ่มเพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง อัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแช่แข็งจากพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองต่างสายพันธุ์ที่สุ่มรีดเก็บน้ำเชื้อดังกล่าวไม่แตกต่างกัน และไม่แตกต่างจากไก่โรดไอส์แลนด์เรด ในการศึกษาต่อไปผู้สนใจควรศึกษาเปรียบเทียบถึงผลของอายุพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง ซึ่งอายุพ่อพันธุ์อาจมีอิทธิพลต่อน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง และในการศึกษาควรมีพ่อพันธุ์จำนวนมากพอ และแม่ไก่ที่ใช้ทดสอบความสมบูรณ์พันธุ์ ควรอยู่ในช่วงที่มีอัตราการไข่ใกล้เคียงกับร้อยละ 85 ต่อวัน

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. 2550. สถิติการเลี้ยงสัตว์ประจำปี 2549. กรมปศุสัตว์กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- Ansah, G. A. and R. B. Bluckland. 1983. Eight generations of selection for duration of fertility of frozen thawed semen in the chicken. Poultry Sci. 62: 1529-1539.

- Blesbois, E., F. Seigneurin, I. Grasseau, C. Limouzin, J. Besnard, D. Gourichon, G. Coquerella, P. Rault and M. Tixier – Boichard. 2007. Poultry Sci. 86: 555–564.
- Blesbois, E., I. Grasseau and F. Seigneurin. 2005. Membrane fluidity and the ability to survive cryopreservation in domestic bird spermatozoa. *Reproduction* 129:371– 378.
- Brillard, J. P. 2003. Practical aspects of fertility in poultry. *World Poult.Sci.J.* 59: 441-446.
- Cerolini, S., K. A. Kelso, R. C. Noble, B. K. Speake, F. Pizzi and L. G. Cavalchini. 1997. Relationship between spermatozoan lipid composition and fertility during ageing of chickens. *Biol. Reprod.* 57: 976–980.
- Dohner, J. V. 2001. The encyclopaedia of historic and endangered livestock and poultry breeds. Yale Univ. Press, New Haven, CT.
- Gumulka, M. and E. Kapkowska. 2005. Age effect of broiler breeders on fertility and sperm penetration of perivitelline layer of the ovum. *Anim. Reprod. Sci.* 90: 135–148.
- Gee, C. F. 1995. Artificial insemination and cryopreservation of semen from nondomestic birds. Pages 262– 280 in: *Proceedings: First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry Science*. M. R. Bakst and G. J. Wishart, (eds.) Poultry Science Association, Savoy, IL.
- Hammerstedt, R.H. 1995. Cryopreservation of poultry semen current status and economics. Pages 229-250 in: *Proceedings: First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry Science*. M. R. Bakst and G. J. Wishart, (eds.) Poultry Science Association, Savoy, IL.
- Ingram, D. R., L. F. Hatten, III and K. D. Homan. 2007. Reproductive performance of broiler breeders as affected by age at initiation of laying cycle lighting program. *Int. Poult. Sci.* 6: 462–465.
- Kelso, K. A., S. Cerolini, R. C. Noble, N. H. Sparks and B. K. Speake. 1996. Lipid and antioxidant changes in semen of broiler fowl from 25 to 60 weeks of age. *Reproduction* 106: 201–206.
- Reedy, S. E., S. P. Leibo, M. E. Clark and R. J. Etches. 1995. Beyond freezing semen. Pages 229–261 in: *Proceedings: First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry Science*. M. R. Bakst and G. J. Wishart, (eds.) Poultry Science Association, Savoy, IL.

สรุปผลการศึกษาภาพรวม

General Conclusion

จากการศึกษาครั้งนี้สามารถสรุปผลกิจกรรมในการวิจัยได้ดังต่อไปนี้
ศึกษาผลของสูตรน้ำยาเจือจาง 5 ชนิด (prefreezing Lake; Tselutin; Schramn; BPSE และ IGGKPh) ต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่ต่างสายพันธุ์ภายใต้การเก็บรักษาในอุณหภูมิตู้เย็น

พบว่าสูตรน้ำยาเจือจางมีผลต่อคุณภาพเมื่อเก็บรักษากายนอกร่างกาย (In vitro) ที่อุณหภูมิ 4°C โดยสูตรที่ได้ผลดี คือ IGGKPh รองลงมาคือ BPSE สอดคล้องกันในทุกกลุ่มพ่อพันธุ์คือ พันธุ์เหลืองหางขาว คละสี และไก่พันธุ์โรดไอส์แลนด์เรด เมื่อนำน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองเจือจางด้วยน้ำยา 5 สูตรดังกล่าวไปผสมเทียมภายใน 30 นาที ภายหลังการเจือจาง พบว่าได้อัตราการผสมติดไม่แตกต่างกัน และไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่า การผสมเทียมภายหลังที่อสุจิสัมผัสน้ำยาเจือจางในระยะเวลาอันสั้นแล้วผสมเทียมไม่มีผลเสียต่อตัวอสุจิ คุณภาพน้ำเชื้อของไก่ทั้ง 3 กลุ่ม

ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองต่ออัตราการผสมติด

เมื่อเจือจางน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองด้วยน้ำยาเจือจางสูตร IGGKPh เก็บรักษาเป็นเวลา 48 ชม. พบว่าการเก็บรักษา 1-2 วัน จะมีอัตราการผสมติดลดลงต่ำกว่าการผสมเทียมในวันแรก แสดงให้เห็นว่า แม้ น้ำยา IGGKPh จะเป็นน้ำยาที่มีประสิทธิภาพ แต่ยังมีประสิทธิภาพไม่ดีพอสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นเวลาหลายวัน

ความทนได้ของอสุจิในขบวนการแช่แข็ง (Freezability)

พบว่าอสุจิของพ่อพันธุ์ไก่แต่ละตัวมีความทนได้ต่อขบวนการแช่แข็งที่แตกต่าง ไม่พบความแตกต่างระหว่างไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว, ไก่พื้นเมืองคละสี และพันธุ์โรดไอส์แลนด์เรด แสดงให้เห็นว่าหากสามารถคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่อสุจิมีความทนได้ต่อการแช่แข็ง ก็จะทำให้งานประสบผลสำเร็จ ได้ดีกว่าการได้รับพ่อพันธุ์แบบสุ่ม

ผลของชนิดและระดับ CPA ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่แต่ละสายพันธุ์

พบว่า DMSO, DMA และ DMF ต่างเป็นพิษต่ออสุจิของไก่พื้นเมือง DMSO ระดับร้อยละ 8 น่าจะเป็นระดับที่มีความเหมาะสม อย่างไรก็ตาม DMSO ระดับร้อยละ 4-10 ได้ผลดีต่อคุณภาพ ภายหลังการแช่แข็งไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามในการศึกษาต่อมาพบว่า การใช้ DMSO เป็น CPA ใน น้ำยา IGGKPh ผสมติดต่ำมาก จึงได้ทดสอบผลของ DMSO ต่ออัตราการผสมติด โดยเติม DMSO ลงในน้ำเชื้อเจือจางความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับร้อยละ 8 ซึ่งเป็นระดับที่คาดว่าจะมีผลดีต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง ภายหลังการทดสอบพบว่า DMSO มีผลทำให้ความยาวนานของอัตราการผสมติดในแม่ไก่ลดต่ำลง แสดงถึง DMSO อาจเป็นพิษโดยตรงต่อตัวอสุจิ หรือไปรบกวน sperm storage tubules

การศึกษากรรณวิธีในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่อพื้นเมือง

ทำการศึกษาศึกษาเทคนิคการแช่แข็ง ชนิดของสุตรน้ำยาเจือจาง ตลอดจนการละลายที่เหมาะสมกับการทำน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง โดยดำเนินการทดลองหลายการทดลองย่อย สรุปผลได้ดังนี้

วิธีการแช่แข็งและอุณหภูมิละลายมีปฏิสัมพันธ์ร่วมกัน การละลายที่อุณหภูมิ 2-5 °ซ. ให้ผลดีกว่าการละลายที่อุณหภูมิสูง การดำเนินการแช่แข็งด้วยสุตรน้ำยาเจือจาง prefreezing Lake โดยมี glycerol ระดับร้อยละ 11 เป็น CPA ให้อัตราการเคลื่อนที่หลังการละลายของอสุจิสูง แต่ไม่สะดวกในการดำเนินการเพื่อนำไปใช้ การแช่แข็งโดยวิธีการวางหลอดน้ำเชื้ออ้งไอโนโตรเจนเหลวให้ผลดีไม่แตกต่างจากการใช้อุปกรณ์แช่แข็งที่ควบคุมโดยระบบคอมพิวเตอร์ กรรณวิธีในการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่อพื้นเมืองที่เหมาะสมภายใต้สภาพสนาม คือวิธีการแช่แข็งโดยการวางหลอดบรรจุน้ำเชื้ออ้งไอโนโตรเจนเหลวที่ระดับอุณหภูมิ -35 °ซ. นาน 10 นาที จากนั้นวางที่ระดับอุณหภูมิ -135 °ซ. เป็นเวลา 5 นาที ก่อนจุ่มหลอดลงในไนโตรเจนเหลว

การปรับปรุงสุตรน้ำยา Schramm โดยการเสริมกรดอะมิโนกลัยซีน (glycine)

โดยพบว่ากลัยซีน (glycine) ระดับ 40 มิลลิโมล ให้อัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่อพื้นเมืองสูงสุดในการดำเนินกิจกรรมที่ 9 เป็นต้นไป ได้ปรับปรุงมาตรฐานในการเตรียมน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็ง ในขั้นตอนการเลือกน้ำเชื้อโดยรีดน้ำเชื้อแล้วเจือจางทันที แยกน้ำเชื้อพ่อพันธุ์เป็นรายตัว หากพบว่าน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ใดที่คุณภาพต่ำจะไม่นำไปใช้ศึกษา

ผลของระยะเวลาที่ดำเนินการผสมเทียมภายหลังการวางไข่ต่ออัตราการผสมติดและฟักออกในไก่อพื้นเมือง

จากการศึกษาพบว่าไม่ควรผสมเทียมในช่วงภายหลังการวางไข่ใหม่ ทั้งนี้เนื่องจากมีการบีบตัวในทิศทางที่สามารถขับอสุจิออกจากช่องคลอดของไก่ จึงทำให้ส่งผลต่ออัตราการผสมติดที่ต่ำลง

ผลของตำแหน่งการผสมเทียมต่ออัตราการผสมติดและฟักออกในไก่อพื้นเมือง

จากการศึกษาพบว่าการสอดอุปกรณ์ผสมเทียมในช่องคลอดลึก 3 และ 6 ซม. ให้ผลไม่แตกต่างกัน อาจเนื่องจากจำนวนอสุจิที่ใช้ผสมเทียมมีมากเพียงพอที่จะคงจำนวนอสุจิในท่อไข่ ซึ่งทำให้อัตราการผสมติดและฟักออกไม่แตกต่างกัน

ผลของปริมาณน้ำเชื้อและความเข้มข้นของอสุจิต่ออัตราการผสมติดและฟักออก

พบว่าปริมาตรน้ำเชื้อ 0.4 มล. ให้ผลต่ออัตราการผสมติดสูงกว่า 0.2 มล. ส่วนความเข้มข้นของอสุจิพบว่า จำนวนอสุจิที่ใช้ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งระดับสูงจะให้อัตราการผสมติดและฟักออกที่สูงกว่าการใช้จำนวนอสุจิที่ต่ำกว่า

การเก็บรักษาน้ำเชื้อและการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่อพื้นเมืองสายพันธุ์ต่างๆ

โดยดำเนินการนำผลการศึกษาดำเนินการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่อพื้นเมือง 4 สายพันธุ์ คือ เหลืองหางขาว ซี แดง และประดู่ จำนวน 8 พ่อ/สายพันธุ์ น้ำเชื้อแช่แข็ง 10 หลอด/พ่อ

ความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อแช่แข็งในไก่พื้นเมืองแต่ละสายพันธุ์

ดำเนินการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่พื้นเมือง 4 สายพันธุ์ คือ เหลืองหางขาว ชี แดง และประดู่ และไก่พันธุ์โรดไอส์แลนด์เรด พบว่าความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อพันธุ์แต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกัน โดยพ่อพันธุ์แต่ละตัวในแต่ละกลุ่มมีความสมบูรณ์พันธุ์ที่แตกต่างกันไป

จากกิจกรรมการศึกษาวิจัยข้างต้น สามารถสรุปได้ว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่พื้นเมือง ภายใต้เทคนิคการแช่แข็งที่สะดวก และการผสมเทียมที่มีประสิทธิภาพ ให้อัตราการผสมติดไม่น้อยกว่าร้อยละ 60 ภายหลังการผสมเทียม 2 ครั้ง/สัปดาห์ ภายใต้วิธีการดังนี้คือ

1. การรีดเก็บน้ำเชื้อต้องดำเนินการสม่ำเสมอสัปดาห์ละ 3 ครั้ง เจือจางน้ำเชื้อโดยทันทีภายหลังการรีด
2. ต้องตรวจคุณภาพน้ำเชื้อทุกตัวอย่าง และกำจัดน้ำเชื้อที่คุณภาพต่ำหรือปนเปื้อน
3. ไม่ลดอุณหภูมิระหว่างการเตรียมน้ำเชื้อแช่แข็งเร็วเกินไป การลดอุณหภูมิภายหลังการรีดน้ำเชื้อจนถึง 5°C ควรใช้เวลาประมาณ 1 ชม.
4. ระมัดระวังการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิของน้ำเชื้อเจือจางอย่างกะทันหัน
5. น้ำยาเจือจางที่ได้ผลดีที่สุด จากการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ น้ำยาเจือจางสูตร Schramm
6. Cryoprotectant ที่ได้ผลดีคือ DMF ระดับร้อยละ 6 ของปริมาตรน้ำเชื้อเจือจางทั้งหมด
7. การเติม DMF ลงในน้ำเชื้อเจือจาง ต้องเจือจางในน้ำยาก่อน ควรมือสุจิแช่ในน้ำประมาณ 1,500 ล้านตัว/มล.และปรับอุณหภูมิให้ได้ 5°C
8. บรรจุน้ำเชื้อใน straw 0.5 มล. และแช่แข็งภายหลังการเติม DMF ประมาณ 15 นาที
9. การแช่แข็งกระทำโดยวางหลอดบรรจุน้ำเชื้อ อังไดไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟมที่ระดับ -35°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นย้ายลงไปวางในระดับอุณหภูมิในระดับอุณหภูมิ -135°C เป็นเวลา 5 นาที จึงจุ่มหลอดน้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลว และเก็บในถังไนโตรเจนเหลวต่อไป
10. ก่อนนำน้ำเชื้อไปใช้ให้หยิบหลอดน้ำเชื้อวางลงในน้ำเย็นอุณหภูมิประมาณ 2-5°C นาน 5 นาที เช็ดหลอดให้แห้ง แล้วตัดปลายหลอด ถ่ายเทน้ำเชื้อลงในหลอดขนาดที่เหมาะสม
11. ควรผสมเทียมแม่ไก่ในช่วง 16.00 น.-17.00 น.
12. ก่อนการผสมเทียมแม่ไก่ ควรเล้าโลมแม่ไก่โดยการใช้มือลูบหลังกระตุ้น
13. ควรสอดอุปกรณ์ผสมเทียมเข้าช่องคลอดลึกประมาณ 4 ซม. ไม่ควรผสมเทียมแม่ไก่ที่พบไขในมดลูก
14. ปริมาตรน้ำเชื้อที่ใช้ประมาณ 0.4-0.5 มล. ระมัดระวังไม่ให้น้ำเชื้อไหลออก และควรมีจำนวนอสุจิ 600-700 ล้านตัว/การผสม 1 ครั้ง 1-2 ครั้ง/สัปดาห์

ภาคผนวก

รูปภาพกิจกรรมต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา



1. การอุ้มพ่อไก่



2. การดูหลังและปีกที่บริเวณก้นทันที



3. การรีดน้ำเชื้อ โดยบีบที่ก้น



4. น้ำเชื้อที่ได้สีขาวขุ่น

รูปที่ 1 ขั้นตอนการรีดน้ำเชื้อไก่



(1)



(2)



(3)



(4)

รูปที่ 2 การผสมเทียมไก่แบบที่ 1



(1)



(2)



(3)



(4)

รูปที่ 3 การผสมเทียมไก่แบบที่ 2

รูปภาพขั้นตอนการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง



รูปที่ 4 การกระตุ้นพ่อพันธุ์



รูปที่ 5 การรีดน้ำเชื้อ



รูปที่ 6 การลดอุณหภูมิ



รูปที่ 7 การลดอุณหภูมิไป 5 องศาเซลเซียส



รูปที่ 8 การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ



รูปที่ 9 การบรรจุน้ำเชื้อเข้าหลอด



รูปที่ 10 การดูดปลายหลอด



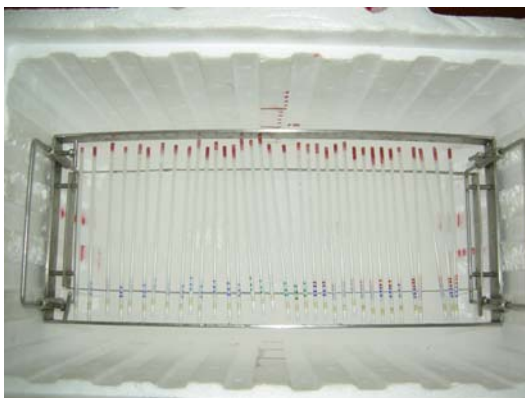
รูปที่ 11 อุปกรณ์ที่ใช้วางหลอดน้ำเชื้อ



รูปที่ 12 อุปกรณ์ต่างๆ ปรับอุณหภูมิไว้ที่ 5 องศาเซลเซียส



รูปที่ 13 การเตรียมหลอดก่อนการแช่แข็ง



รูปที่ 14 การวางหลอดน้ำเชื้ออ้งไอนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม



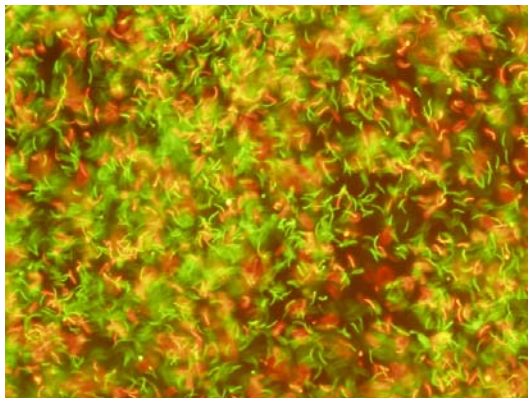
รูปที่ 15 การแช่แข็งโดยใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิด้วยระบบคอมพิวเตอร์



รูปที่ 16 การแช่แข็งโดยหยดน้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลวเพื่อทำน้ำเชื้อแช่แข็งแบบเม็ด



รูปที่ 17 การละลายน้ำเชื้อที่ 5 องศาเซลเซียสก่อนการผสมเทียม



รูปที่ 18 การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ ตัวมีชีวิต (สีเขียว) โดยการย้อมสีและเทคนิคฟลูออเรสเซนส์



รูปที่ 19 การผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง



รูปที่ 20 การฟักไข่ที่ได้จากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง



รูปที่ 21 ลูกไก่ที่ได้จากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง

บทความสำหรับการเผยแพร่

กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

คือ การจัดฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการฯ ซึ่งได้ดำเนินการส่งเอกสารให้ทางสกว.และผู้
ประสานงานฯเป็นที่เรียบร้อยแล้ว