การปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่พันธุ์พื้นเมืองไทยโดยใช้สารกลุ่มโพลีซูโครส

โดย

นางสาวชนน์ชนก ชุมพินิจ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2566

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

การปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่พันธุ์พื้นเมืองไทยโดยใช้สารกลุ่มโพลีซูโครส

โดย
นางสาวชนน์ชนก ชุมพินิจ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตวศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2
มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2566
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

IMPROVEMENT OF FROZEN-THAWED SEMEN QUALITY OF THAI NATIVE CHICKEN THROUGH SUPPLEMENT OF POLYSUCROSE

By

MISS Chonchanok CHUMPINIJ

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Master of Science ANIMAL SCIENCE

Academic Year 2023

Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ	การปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่พันธุ์พื้นเมืองไทย โดยใช้สารกลุ่มโพลีซูโครส
โดย	นางสาวชนน์ชนก ชุมพินิจ
สาขาวิชา	สัตวศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	ดร. พิรวิทย์ เชื้อวงษ์บุญ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร. กฤติยา เลิศชุณหะเกียรติ

คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวศาสตร์และ
(อาจารย์ ดร. วัชราภรณ์ รวมธรรม) เทคโนโลยีการเกษตร

พิจารณาเห็นชอบโดย

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภวัต เสรีตระกูล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ดร. พิรวิทย์ เชื้อวงษ์บุญ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร. กฤติยา เลิศชุณหะเกียรติ)

.....ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พรจิต สอนสีดา)

631120002 : สัตวศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2
คำสำคัญ : ไก่พื้นเมือง, น้ำเชื้อแช่แข็ง, สารโพลีซูโครส, อัตราการผสมติด

นางสาว ชนน์ชนก ชุมพินิจ: การปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่พันธุ์พื้นเมืองไทยโดยใช้สารกลุ่มโพลีซูโครส อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ดร. พิรวิทย์ เชื้อวงษ์บุญ

ไก่พื้นเมืองไทย มีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจและวิถีชีวิตของคนไทยมานาน เนื่องจากสามารถเลี้ยงไว้เพื่อบริโภค หรือขายเพื่อเพิ่มรายได้ในครัวเรือน การเพิ่มจำนวนไก่พื้นเมืองสามารถปล่อยตามธรรมชาติหรือทำการผสมเทียมเพื่อสามารถคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่จะนำมาผสมทำให้เราได้สายพันธุ์ไก่ตามที่ต้องการ แต่อย่างไรก็ตาม การผสมเทียมมีข้อจำกัดคือ น้ำเชื้อไก่อยู่ภายนอกได้ในระยะเวลาสั้น จึงได้มีเทคนิคการทำน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อเพิ่มระยะเวลาในการเก็บรักษา การศึกษานี้จึงจัดทำเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง ซึ่งประกอบด้วย 2 การทดลอง การทดลองที่ 1 มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับที่เหมาะสมของ Histopaque® ต่อคุณภาพน้ำเชื้อ ทำการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) แบ่งออกเป็น 6 กลุ่มการทดลอง กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (Control groups) น้ำยาเจือจาง Schramm+DMF6% กลุ่มที่ 2 น้ำยาเจือจาง Schramm+ DMF6%+Histopaque® 1.25% กลุ่มที่ 3 น้ำยาเจือจาง Schramm+ DMF6%+Histopaque® 2.5% กลุ่มที่ 4 น้ำยาเจือจาง Schramm+DMF6%+Histopaque® 5% กลุ่มที่5 น้ำยาเจือจาง Schramm+DMF6%+ Histopaque® 10% กลุ่มที่ 6 น้ำยาเจือจาง Schramm+ DMF6%+Histopaque® 20% จากการศึกษาร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่ ร้อยละการเคลื่อนที่รวม ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และ อัตราการรอดชีวิต พบว่าในกลุ่มที่เสริม Histopaque 1.25% และ กลุ่มที่เสริม Histoplaque 2.5% มีร้อยละการเคลื่อนที่รวม 53.53% และ 52.11% ตามลำดับ และอัตราการรอดชีวิต 52.24% และ 51.37% ตามลำดับ ($P<0.01$) ในส่วนร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าพบว่า ที่ 1.25% สูงที่สุดที่ 35.90% ในการทดลองที่ 2 เพื่อศึกษาผลของสารในกลุ่มโพลีซูโครส ต่ออัตราการผสมติดและอัตราการฟัก พบว่า ในกลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริมและกลุ่มที่มีการเสริม 1.25% มีค่าการผสมติดมากที่สุดอยู่ 54.32% และ 47.42% ตามลำดับ อัตราการฟักไข่ออกจากไข่มีเชื้อที่มีค่ามากที่สุดอยู่ที่ 66.67% และ75% ตามลำดับ ในส่วนของการฟักไข่จากจำนวนไข่ทั้งหมดอยู่ที่ 42.67% และ 42.33% จึงสรุปได้ว่าการเสริม Histopaque® ที่ 1.25% เหมาะสมในการใช้เป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง (Cryoprotectant) ในน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พันธุ์พื้นเมือง

631120002 : Major ANIMAL SCIENCE
Keyword : Thai native chicken, Artificial insemination, Histopaque, Frozen-thawed semen

MISS Chonchanok CHUMPINIJ : Improvement of frozen-thawed semen Quality of Thai native chicken through supplement of Polysucrose Thesis advisor : Dr. Phirawit Chuawongboon

Thai native chicken are serving as a household food security item to main or additional source of family income. Increasing the number of Thai native chickens can be released naturally or artificial insemination that parents can be selected for breeding, giving us the desired breed of chicken. But sperm of chicken can live short time at outside so we should improve sperm quality by frozen semen. This study consists of two experiments. Experiment 1 aim to study optimal level of polysucrose (Histopaque®) in frozen-thawed semen of Thai native chicken by studying the percentage of sperm motility, progressive motility and viability supplemented in Schramm mix with DMF 6% at concentrations of 0%, 1.25%, 2.5%, 5%, 10% and 20%. All treatments were assigned in a completely randomized design (CRD). This study showed that the sperm in the group 1.25% and 2.5% histoplaque had the highest percentage of total motility (53.53 and 52.11% respectively) and viability (52.14% and 51.37% respectively) compared to the other groups. ($P<0.01$). Therefore, supplemented polysucrose (histoplaque) at 1.25% is the optimal level to be cryoprotectant in frozen-thawed semen of Thai native chicken. The second experiment study on fertility and hatchability rate. In this study showed that the sperm in the group control and 1.25% Histopaque® had the highest percentage in fertility rate (54.32% and 47.42% respectively) hatchability rate of fertilized eggs are 66.67% and 75% respectively and hatchability rate all of eggs 42.67% are 42.33%.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เพราะได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.พิรวิทย์ เชื้อวงษ์บุญ และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ ดร. กฤติยา เลิศชุณหะเกียรติ ให้การดูแล ให้คำแนะนำ ให้ความรู้ และความช่วยเหลือในการศึกษางานวิจัย และขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. พรจิต สอนสีดา ที่ให้ความกรุณาเป็นกรรมการสอบในครั้งนี้ ขอขอบคุณวิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีเพชรบุรี สำหรับพื้นที่เลี้ยงสัตว์ทดลอง และขอขอบคุณคณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร เทคโนโลยีการเกษตร และฟาร์มสาธิตคณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี ที่กรุณาให้ใช้ห้องปฏิบัติการการทดลอง และสัตว์ทดลอง ในการศึกษาและทำงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ และนักวิทยาศาสตร์คณะสัตวศาสตร์เทคโนโลยีการเกษตรทุกท่าน ที่ให้คำแนะนำ สนับสนุนในและช่วยเหลือการทำงานวิจัยให้แก่ผู้วิจัย นอกจากนี้ขอขอบคุณเจ้าของงานวารสาร และวิทยานิพนธ์ทุกเล่มของทุกท่านที่ช่วยให้วิทยานิพนธ์มีความสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ คุณศราวุธ ชุมพินิจ (บิดา) และ คุณวิลัย กุลศักดิ์ (มารดา) ที่ให้การศึกษา ให้กำลังใจ ให้โอกาส และให้การสนับสนุนอย่างสุดความสามารถในการศึกษาครั้งนี้ และขอขอบคุณ คุณกานต์ธิดา โถนารัตน์ ที่ให้คำปรึกษา ช่วยเหลือ และสนับสนุนเสมอมา

ชนน์ชนก ชุมพินิจ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ฎ

สารบัญภาพ ..... ฎ

บทที่1 บทนำ 13

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 13

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย 16

3. สมมติฐานของการศึกษา 16

4. ขอบเขตการศึกษา 17

บทที่ 2 18

1. ไก่พื้นเมืองไทย (Thai native chicken) 18

2. ระบบสืบพันธุ์สัตว์ปีกเพศผู้และการผลิตอสุจิ 18

2.1 ระบบสืบพันธุ์สัตว์ปีกเพศผู้ 18

2.1.1 อัณฑะ (Testis) 19

2.1.2 Epididymis 20

2.1.3 Phallus 20

2.2 การผลิตอสุจิและการควบคุมการผลิตอสุจิ 20

2.2.1 บทบาทและหน้าที่ของอัณฑะ 20

2.2.2 ฮอร์โมนที่ควบคุมการทำหน้าที่ของอัณฑะ 21

2.2.2.1 โกนาโดโทรปินอินฮิบิติงฮอร์โมน (GnIH) 22
2.2.2.2 ลูติไนซิ่งฮอร์โมน (Luteinizing hormone; LH) 23
2.2.2.3 ฟอลลิเคิลสติมูเลติงฮอร์โมน (Follicle stimulating hormones ;FSH) 23
2.2.2.4 อินฮิบิน (inhibin) และแอคทิวิน (activin) 23
2.2.3 ปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อการทำงานของอัณฑะ 24
3.ระบบสืบพันธุ์สัตว์ปีกเพศเมียและการผลิตไข่ 26
3.1 ระบบสืบพันธุ์สัตว์ปีกเพศเมีย 26
3.1.1 รังไข่ 26
3.2 การผลิตไข่และการควบคุมการผลิตไข่ 26
3.2.1 การสร้างไข่แดง 26
3.2.2 การตกไข่ (Ovulation) 27
3.2.3 ท่อนำไข่ 28
4.พฤติกรรมการสืบพันธุ์สัตว์ปีก 30
4.1 รูปลักษณ์ 30
4.2 กลิ่นกาย 31
5.การแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อ 32
5.1 องค์ประกอบและคุณสมบัติของน้ำยาเจือจาง 34
6. ปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อต่อคุณภาพโครงสร้างและหน้าที่ระหว่างการแช่แข็ง 36
6.1 กระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) ของอสุจิ 36
6.2 ปัจจัยที่มีผลในการทำลายโครงสร้างอสุจิ 36
6.3 ผลกระทบจากการแช่แข็งต่อกระบวนการ Capacitation ของอสุจิ 37
7. สารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง (Cryoprotectant) 39
7.1 Cryoprotectant ประเภทซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ 39
7.2 Cryoprotectant ประเภทไม่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ 40

7.2.1 สารในกลุ่ม Polysaccharide 40
8. การผสมเทียมในสัตว์ปีก 41
บทที่ 3 42
การทดลองที่ 1 การคัดเลือกน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ไก่พันธุ์พื้นเมืองไทย 42
1. การจัดการสัตว์ทดลอง 42
2. แผนการทดลอง 42
3. การเตรียมพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองก่อนการรีดเก็บน้ำเชื้อ (วรวิทย์, 2531) 43
4. การเตรียมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง 43
5. การรีดเก็บน้ำเชื้อและขั้นตอนการทำน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยวิธีอังไอไนโตรเจนเหลว 43
6. วิธีประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ 44
6.1 ประเมินจากลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ 44
6.2 การประเมินร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่และร้อยละการเคลื่อนที่รวม 44
6.3 การประเมินร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า 44
6.4 การประเมินอัตราการมีชีวิตรอดด้วยการย้อมสี 45
7. การศึกษาอัตราการผสมติด 45
บทที่ 4 46
การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของการเสริม Histopaque® ในแต่ละระดับ ต่อร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่ ร้อยละการเคลื่อนที่รวม ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการรอดชีวิต ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พันธุ์พื้นเมืองไทย 46
1. ผลของการเสริม Histopaque® ในแต่ละระดับ ต่อร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่ ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พันธุ์พื้นเมืองไทย 46
2. ผลของการเสริม Histopaque® ในแต่ละระดับ ต่อร้อยละการเคลื่อนที่รวม ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พันธุ์พื้นเมืองไทย 47
3. ผลของการเสริม Histopaque® ในแต่ละระดับ ต่อร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พันธุ์พื้นเมืองไทย 47

4. ผลของการเสริม Histopaque® ในแต่ละระดับ ต่ออัตราการรอดชีวิต ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พันธุ์พื้นเมืองไทย 47

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของการเสริม Histopaque® ในแต่ละระดับ ต่ออัตราการผสมติดและอัตราการฟักในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พันธุ์พื้นเมืองไทย 2

1. ศึกษาผลของการเสริม Histopaque® ในแต่ละระดับ ต่ออัตราการผสมติด 3

2. ศึกษาผลของการเสริม Histopaque® ในแต่ละระดับ ต่ออัตราการฟัก 3

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 6

รายการอ้างอิง 7

ภาคผนวก ก 14

ภาคผนวก ข 33

การวิเคราะห์ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ 33

ประวัติผู้เขียน 40

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ผลของการเสริมน้ำยาเจือจาง Schramm ในน้ำเชื้อไก่แช่แข็ง..... 35

ตารางที่ 2 ผลของการเสริม Histopaque® ที่ 6 ระดับ ต่อค่าเฉลี่ยของร้อยละการเคลื่อนที่รวม ก่อนและหลังแช่แข็ง ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และร้อยละอัตราการรอดชีวิตด้วยการย้อมสีหลังแช่แข็ง ของน้ำเชื้อไก่พื้นเมือง 50

ตารางที่ 3 ผลของการเสริม Histoplaque ที่ 6 ระดับ ต่ออัตราการผสมติด และอัตราการฟัก..... 4

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ตัวอสุจิของไก่ 15

ภาพที่ 2 ระบบสืบพันธุ์สัตว์ปีก (ไก่) เพศผู้ 20

ภาพที่ 3 โครงสร้างของอสุจิสัตว์ปีก..... 21

ภาพที่ 4 ตำแหน่งต่อมไร้ท่อบนตัวไก่..... 22

ภาพที่ 5 การทำงานของระบบสืบพันธุ์เพศผู้ที่ถูกควบคุมโดยไฮโปทาลามัสและต่อมใต้สมองส่วนหน้า 24

ภาพที่ 6 ฮอร์โมนทางด้านระบบสืบพันธุ์เพศผู้..... 25

ภาพที่ 7 ท่อนำไข่ไก่..... 29

ภาพที่ 8 รูปทรงไข่ปกติ..... 30

ภาพที่ 9 ต่อมยูโรไพเจียล (Uropygial) 32

ภาพที่ 10 ภาวะ Oxidative damage 34

ภาพที่ 11 ผลกระทบจากการแช่แข็งต่อกระบวนการ Capacitation ของอสุจิ..... 38

ภาพที่ 12 การใช้ Histoplaque® แยกเซลล์เม็ดเลือด..... 41

ภาพที่ 13 กราฟแสดงผลร้อยละการเคลื่อนที่รวม (Total motility) ในแต่ละระดับของการเสริม 1

ภาพที่ 14 กราฟแสดงผลร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (Progressive motility) ในแต่ละระดับของการเสริม Histopaque® 1

ภาพที่ 15 กราฟแสดงผลอัตราการรอดชีวิต (Viability) ในแต่ละระดับของการเสริม Histopaque® 2

ภาพที่ 16 กราฟแสดงผลอัตราการผสมติด ในแต่ละระดับของการเสริม Histoplaque..... 4

ภาพที่ 17 กราฟแสดงผลอัตราการฟักออกจากไข่มีเชื้อในแต่ละระดับของการเสริม Histoplaque ... 5

ภาพที่ 18 กราฟแสดงผลอัตราการฟักออกจากไข่ทั้งหมดในแต่ละระดับของการเสริม Histoplaque 5

บทที่1
บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไก่พื้นเมืองไทย (*Gallus domesticus*) ได้รับความนิยมทั้งตลาดในประเทศและตลาดต่างประเทศเนื่องจากเป็นสัตว์ที่ขยายพันธุ์ได้ง่ายและรวดเร็วกว่าสัตว์เศรษฐกิจชนิดอื่น และยังเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจและวิถีชีวิตของคนไทยมานาน โดยส่วนใหญ่มักนิยมเลี้ยงไว้เพื่อการบริโภคเนื้อ การเลี้ยงเพื่อเป็นไก่สวยงาม และเลี้ยงไว้เพื่อเป็นกีฬาชนไก่ ทำให้สามารถเลี้ยงเพื่อเป็นทั้งอาหารและอาชีพได้ ในปี 2563 พบว่ามีผู้เลี้ยงไก่พื้นเมืองจำนวน 2,678,141 ราย มีจำนวนไก่พื้นเมืองอยู่ที่ 94,130,344 ตัว ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบระหว่างปี พ.ศ. 2562-2563 พบว่ามีการเลี้ยงไก่พื้นเมืองเพิ่มขึ้น จำนวน 415,515 ตัว (กรมปศุสัตว์, 2563) โดยส่วนใหญ่จะนิยมเลี้ยงเพื่อบริโภค เนื่องจากเนื้อมีรสชาติดี เป็นแหล่งโปรตีน มีเนื้อแน่น และมีไขมันน้อย ทำให้ไก่พื้นเมืองมีราคาสูงกว่าไก่กระทงประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์ (วัลลภ, 2544) นอกจากนี้ไก่พื้นเมืองยังมีลักษณะนิสัยที่เลี้ยงง่าย ทนทานต่อสภาพแวดล้อมของประเทศไทยได้ดี สามารถผสมพันธุ์และฟักไข่ได้เองตามสภาพธรรมชาติ มีสัญชาตญาณรักษาตัวรอดได้จากศัตรูต่าง ๆ มีความต้านทานโรคและพยาธิภายนอกได้ดีกว่าไก่พันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ และสามารถนำไปขายเพื่อใช้จ่ายในครอบครัวได้อีกด้วย

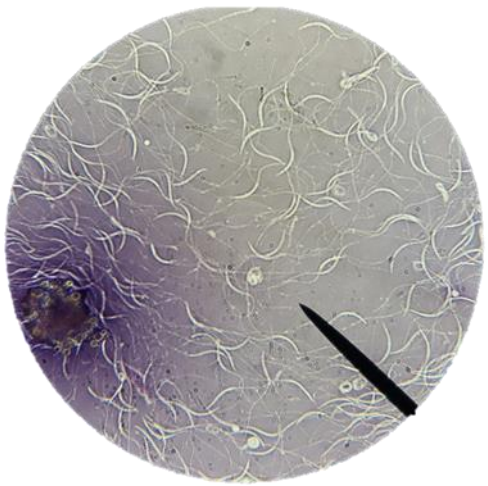
ดังนั้นการเพิ่มจำนวนไก่พันธุ์พื้นเมืองให้มีความหลากหลายจึงเป็นการสนับสนุนให้เกษตรกรสามารถมีรายได้ที่เพิ่มขึ้น และอีกนัยหนึ่งถือเป็นการอนุรักษ์สายพันธุ์ไก่พื้นเมืองไทยให้ได้รู้จักอย่างแพร่หลายยิ่งขึ้น เพื่อเพิ่มความความหลากหลายทางชีวภาพและพันธุกรรม อย่างไรก็ตามการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีให้มีการแพร่กระจายออกไปย่อมดีกว่าการที่ไม่ได้คัดเลือก ทำให้การผสมเทียมเข้ามามีบทบาทอย่างหนึ่ง เนื่องจากสามารถช่วยคัดเลือกพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่มีลักษณะดีตามที่ต้องการได้ ซึ่งหากใช้พ่อพันธุ์ที่มีลักษณะไม่ดีมาทำการผสมเทียมจะทำให้ลักษณะที่ไม่ดีนั้นกระจายออกไปอย่างรวดเร็ว สำหรับการผสมเทียมในสัตว์ปีกได้มีการพัฒนามานานแล้ว ทำให้ต้องมีการเลือกเทคนิคที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อ เนื่องจากน้ำเชื้อไก่ปกติที่รีดออกมา อสุจิไม่สามารถอยู่ภายนอกได้เป็นเวลานาน และการแช่แข็งแบบธรรมดาสามารถเก็บน้ำเชื้อได้เพียง 3-5 วัน เป็นการเก็บรักษาพันธุกรรมได้ในระยะสั้น สะดวกในการนำไปใช้ แต่ไม่สามารถขนส่งน้ำเชื้อไปยังที่ที่ไกลได้เพราะมีระยะเวลาที่จำกัด หากจะส่งตัวพ่อพันธุ์ไปเพื่อการผสมพันธุ์ก็อาจจะเสี่ยงต่อการติดโรคหรือเกิดการแพร่กระจายของโรคได้ จึงได้มีการพัฒนาปรับปรุงการเก็บรักษาน้ำเชื้อขึ้นมา เช่น การทำน้ำเชื้อแช่แข็ง ที่สามารถคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่ต้องการในการนำมาทำน้ำเชื้อแช่แข็งได้ ทำให้สามารถช่วยอนุรักษ์พันธุกรรมและยังช่วยเพิ่มคุณลักษณะที่ดีของไก่พันธุ์พื้นเมืองไทยจากการคัดเลือกและทดสอบพันธุ์พ่อพันธุ์ในการนำมาเพาะขยายพันธุ์ให้กระจายไปยังเกษตรกรรายต่อไป

แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการผสมเทียมต้องใช้การทำน้ำเชื้อแช่แข็ง และสิ่งที่จำเป็นต่อการทำน้ำเชื้อแช่แข็งส่วนหนึ่ง คือ น้ำยาเจือจาง ซึ่งมีหลายชนิดที่นิยมใช้ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งไก่ เช่น BPSE, Schramm เป็นต้น องค์ประกอบสำหรับน้ำยาเจือจางมีหลายอย่าง เช่น แหล่งพลังงานที่ให้ตัวอสุจิมีความดันและสภาวะที่เหมาะสม รวมทั้งสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง

(Cryoprotectant) ที่ช่วยให้เซลล์อสุจิได้รับความเสียหายแค่เพียงเล็กน้อยจากกระบวนการแช่แข็ง โดยสารที่ประกอบอยู่ในน้ำยาเจือจาง จำเป็นต้องมีปริมาณที่เหมาะสมต่อการรักษาเซลล์อสุจิที่อยู่ระหว่างการแช่แข็งและหลังทำละลายจากการแช่แข็ง เพื่อให้อสุจิมีความใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสดหรือถูกทำลายจากการแช่แข็งน้อยที่สุด ดังนั้นการปรับปรุงปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อจึงเป็นสิ่งที่ควรพัฒนาเพื่อให้ได้คุณภาพน้ำเชื้อที่ดีที่สุดในการนำไปผสมเทียมต่อไป

ไก่พื้นเมืองไทยที่เลี้ยงกันอยู่ในปัจจุบันมีความแตกต่างกันออกไปในเรื่องของชนิดพันธุ์ (บัญญัติ และ มนต์ชัย, 2554) คุณภาพ (Peter et al., 2008) สัณฐานวิทยา (ภาพที่ 1) และการรอดชีวิตของอสุจิระหว่างถูกแช่แข็งที่แตกต่างกัน ซึ่งจากการศึกษาในต่างประเทศพบว่า การผสมเทียมที่ใช้สัตว์ที่แตกต่างกันในเรื่องของพันธุ์และสายพันธุ์ มีผลต่อคุณภาพและความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง (Hammerstedt et al., 1995) ในขณะเดียวกันคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และอายุพ่อพันธุ์โดยไก่อายุมาก คุณภาพและความสมบูรณ์พันธุ์จะลดน้อยลง (Long, 2010) สำหรับในประเทศไทยพบว่า สายพันธุ์และอายุไม่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อสดและน้ำชื้อแบบแช่แข็งภายหลังการละลาย ในด้านอัตราการผสมติดโดยการใช้น้ำเชื้อแบบแช่แข็ง พบว่ามีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์แต่ไม่มีความแตกต่างในเรื่องผลของอายุต่ออัตราการผสมติด (พรจิต, 2555)

สำหรับการทำน้ำเชื้อแช่แข็งในไก่เกิดขึ้นมานานแล้ว โดย Sexton (1979) ได้รายงานว่า Shaffner แห่งมหาวิทยาลัย Maryland สามารถฟักลูกไก่จากการผสมเทียม โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งได้ตั้งแต่ปี 1941 ซึ่งพบว่ามีอัตราการผสมติดที่เพิ่มสูงขึ้น และพบว่าการผสมเทียมในสัตว์ปีกนั้นไม่เหมือนกับสัตว์อื่น เนื่องจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ มีการตกไข่เพียงครั้งเดียวในการเป็นสัด ทำให้ทำการผสมเทียมเพียงแค่ 1-2 ครั้ง ในรอบที่เกิดการตกไข่นั้น แต่ในไก่มีการตกไข่และออกไข่เรื่อยๆ จึงจำเป็นต้องมีอสุจิภายในทางเดินอวัยวะสืบพันธุ์ของแม่ไก่เพื่อคอยผสมกับไข่ที่ตกลงมาในแต่ละวัน ซึ่งไก่จะมีอวัยวะที่คาดว่าเป็นตัวเก็บอสุจิบริเวณรอยต่อระหว่างต่อมสร้างเปลือกไข่ และมีท่อรูปตัวเอสเป็นตัวเก็บอสุจิไว้ ซึ่งถูกพบว่าตัวอสุจิสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้นานถึง 32 วัน และในไก่งวงนานถึง 70 วัน น้ำเชื้อของไก่ที่ได้จากการรีดเก็บจะมีปริมาตรเพียง 0.2 – 0.5 มิลลิลิตร (Hafez, 1980) ซึ่งการรีดเก็บน้ำเชื้อจำนวนหลายครั้งจะมีผลต่อปริมาณคุณภาพของน้ำเชื้อตามความถี่ที่รีดเก็บเช่นเดียวกัน (Hammond et al., 1983) โดย Perry (1968) และ Quinn and Burrows (1936) ได้กล่าวไว้ว่าการรีดน้ำเชื้อไก่โดยใช้ผู้ทำงาน 2 คน เป็นวิธีที่ง่ายที่สุดและนิยมใช้กันมากที่สุด



ภาพที่ 1 ตัวอสุจิของไก่

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง มีวัตถุประสงค์ คือ เพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อให้นานขึ้นและสามารถนำไปใช้ผสมเทียมได้ระยะทางที่ไกลตามความต้องการ โดยที่อสุจิจะมีความเสียหายน้อยที่สุดหรือมีคุณภาพใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสด เนื่องจากน้ำเชื้อมีการเผาผลาญพลังงานแบบไม่ใช้อากาศของตัวอสุจิทำให้เกิดกรดแลคติกขึ้นมา มีผลทำให้สภาพความเป็นกรดด่างต่ำลงและเป็นพิษต่อตัวอสุจิเอง จึงต้องเติมสารเจือจางน้ำเชื้อเข้าไปควบคุมการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างให้เปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดหรือไม่เปลี่ยนแปลงเลยและเป็นตัวรักษาความคงตัวของความดันภายในเซลล์อสุจิ (อรรณพ, 2537) โดยปัจจัยที่ทำให้อสุจิได้รับความเสียหาย ได้แก่ ความเข้มข้นของสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง (Cryoprotectant: CPA) ผลจากค่าแรงดันสารละลายและการดึงน้ำออกจากเซลล์มากเกินไป การเกิดปฏิกิริยา Lipid Peroxidation (LPO) อัตราการลดอุณหภูมิ (Cooling rate) ภาวะช็อคจากความเย็น (Cold shock) สภาวะการเกิดผลึกน้ำแข็ง (Ice crystal) ภายในและภายนอกเซลล์ การเผาผลาญพลังงานของอสุจิ (Cell metabolism) น้ำยาเจือจาง (Extender) และองค์ประกอบทางเคมีของน้ำยาเจือจาง (Watson, 2000) เป็นต้น ซึ่งมีผลเสียต่ออสุจิโดยการทำให้อัตราการเคลื่อนที่ และการปฏิสนธิของอสุจิลดต่ำลง ซึ่งการเกิด LPO นั้น เกิดจากการที่มีปริมาณสารอนุมูลอิสระ (Re-active Oxygen Species; ROS) ที่มากเกินไป ทำให้เกิดภาวะเครียดที่เกิดจากการออกซิเดชัน (Oxidation stress) และเหนี่ยวนำทำให้เกิด LPO ที่มีผลต่อความเสียหายแก่อสุจิ ดังนั้นแนวทางการป้องกันการเกิด LPO คือ การลดปริมาณของสารอนุมูลอิสระ (ROS) โดยการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระลงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อยับยั้งปริมาณ ROS

น้ำยาเจือจางนับว่าเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อคุณภาพอสุจิภายหลังการแช่แข็ง ซึ่งมีองค์ประกอบหลายอย่าง รวมทั้งสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง ที่ช่วยให้เซลล์อสุจิได้รับความเสียหายแค่เพียงเล็กน้อยจากกระบวนการแช่แข็ง ในไก่มีรายงานว่าน้ำยาเจือจางที่นิยมใช้ในไก่พื้นเมืองไทย คือ Beltsville poultry semen extender (BPSE), Egg yolk-Tris (สุนทร และคณะ, 2548), Schramm (ณปภัช และคณะ, 2562) เป็นต้น จากการศึกษางานวิจัยพบว่าน้ำเชื้อแบบแช่แข็งทำให้อัตราการรอดชีวิตของอสุจิภายหลังแช่แข็งลดลงอยู่ที่ 47.20% ในน้ำยาเจือจาง Schramm (ณปภัช และคณะ, 2562) ในส่วนของน้ำยาเจือจาง BPSE มีอัตราการผสมติดและฟักออกอยู่ที่ 44.64 % (สุนทร และคณะ, 2548) และเมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำยาเจือจางหลายๆชนิดพบว่า การใช้น้ำยาสูตร Schramm มีผลทำให้อสุจิมีการเคลื่อนที่อยู่ที่ 46% และเคลื่อนที่ไปข้างหน้าอยู่ที่ 22.33% (Tangpakdeewijit et al., 2015) ซึ่งยังเหมาะกับการใช้ในไก่พื้นเมืองของไทยด้วย (Thananurak et al., 2019) จึงได้มีงานวิจัยอย่างต่อเนื่องเพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งไก่พันธุ์พื้นเมืองไทย โดยการใช้น้ำยาเจือจางร่วมกับสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง (Cryoprotectant) หรือสารที่ช่วยบรรเทาความเสียหายแก่ตัวอสุจิจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและแรงดันออสโมติก ในการแช่แข็งและทำละลาย ช่วยลดความเสียหายของอสุจิจากผลึกน้ำแข็งที่จุดเยือกแข็ง (Freezing point) ซึ่งเป็นอุณหภูมิวิกฤตที่พบเมื่อลดอุณหภูมิขณะแช่แข็ง และเพิ่มอุณหภูมิขณะละลายน้ำเชื้อ (Bathgate et al., 2006)

สำหรับน้ำตาลกลุ่มโพลีซูโครส (Dextran, Epichlorohydrin cross-linked polymer) เป็นน้ำตาลที่เป็นกลุ่มอนุพันธ์ของซูโครส จัดอยู่ในกลุ่มโพลีแซคคาไรด์ (Saragusty et al., 2009) ถูกสังเคราะห์จากน้ำตาลซูโครสและอิพิโคลโรไฮดริน หรือที่รู้จักกันในรูปของ Ficoll®, Polysucrose™ 400, Rhodiola sachalinensis saccharide (RSS), Histopaque® ซึ่งไม่มีความเป็นพิษ เป็นโมเลกุลใหญ่ที่เป็นกลางและสามารถละลายได้ง่ายในน้ำ ไม่สามารถซึมผ่านเซลล์ได้หรือซึมได้น้อยมาก (Molinia et al., 1994) และโมเลกุลมีความยืดหยุ่น โดยน้ำตาลโพลีซูโครสจะมีคุณสมบัติในการดึงน้ำออกจากเซลล์ทำให้น้ำในเซลล์ลดลง เกิดการแยกความหนาแน่นของเซลล์ได้ และเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ลดลง พวกน้ำตาลนี้จะทำหน้าที่รักษาสมดุลของความดันสารละลายโดยมีบทบาทแทนพวก Electrolyte ที่ไม่สามารถผ่านเข้าออกเซลล์ได้ในขณะแช่แข็ง สารกลุ่มโพลีซูโครสจึงถูกนำไปพัฒนาในการทำให้อสุจิของมนุษย์สามารถเคลื่อนที่ได้มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามน้ำตาลก็สามารถทำให้เกิดความเสียหายได้จากการเกิดการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติก และภาวการณ์ดึงน้ำออกจากเซลล์มากเกินไป (Dehydration) (Woelders et al., 1997) จากการทดลองของ Andersen และ Grinsted ในปี 1997 ที่ทำในคน พบว่า ในกลุ่มที่ใช้โพลีซูโครสช่วยเก็บรักษาอสุจินั้นสามารถทำให้อสุจิมีร้อยละการเคลื่อนที่รวม 48% และการเสริม Ficoll® ในไก่ที่ระดับ 1 mM. สามารถทำให้อสุจิภายหลังการแช่แข็งมีความสมบูรณ์มากที่สุด (Di Iorio et al., 2020) นอกจากนี้ Kulikova et al. ในปี 2014 ยังมีการศึกษาในกระต่ายที่เสริมสารกลุ่มโพลีซูโครส (Ficoll®) ในการเป็นสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง พบว่าอะโครโซมถูกทำลาย 21.05% และมีร้อยละการเคลื่อนที่รวมมากที่สุดอยู่ที่ 60.17% หลังจากการละลายที่ระยะเวลา 30 นาที

งานวิจัยนี้จึงจัดทำขึ้นเพื่อศึกษาคุณภาพของอสุจิไก่พันธุ์พื้นเมืองไทยหลังทำการละลายที่ถูกเสริมด้วยสารกลุ่มโพลีซูโครส ร่วมกับการใช้น้ำยาเจือจาง Schramm และ DMF6% ส่งผลให้อสุจิมีร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่ ร้อยละการเคลื่อนที่รวม ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการรอดชีวิต อัตราการผสมติด และอัตราการฟักมากน้อยเพียงใด

2. **วัตถุประสงค์ของการวิจัย**

1.2.1 เพื่อศึกษาระดับการเสริม Histopaque® ที่เหมาะสมต่อร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่ ร้อยละการเคลื่อนที่รวม ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการรอดชีวิต ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งของไก่พันธุ์พื้นเมืองไทย

1.2.2 เพื่อศึกษาระดับการเสริม Histopaque® ที่เหมาะสมต่ออัตราการผสมติดและอัตราการฟัก

1.2.3 เพื่อเป็นแนวทางในการปรับปรุงการทำน้ำเชื้อแช่แข็งของไก่พันธุ์พื้นเมืองไทย

3. **สมมติฐานของการศึกษา**

การปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่พันธุ์พื้นเมืองไทยโดยใช้ปริมาณ Histopaque® ที่เหมาะสม ส่งผลให้อสุจิมีร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่ ร้อยละการเคลื่อนที่รวม ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการรอดชีวิต อัตราการผสมติด และอัตราการฟักได้มากขึ้นใกล้เคียง

กับน้ำเชื้อสด เพื่อเพิ่มพันธุกรรมที่ดีของไก่พันธุ์พื้นเมืองไทยจากการใช้เทคโนโลยีชีวภาพทางด้านการสืบพันธุ์

4. **ขอบเขตการศึกษา**

ทำการศึกษาการปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง โดยเสริมสารในกลุ่มโพลีซูโครส ในระดับต่างๆ ลงในน้ำยาเจือจาง เพื่อดูความเหมาะสมต่อการเป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง การทดลองเริ่มจากการทดสอบพ่อพันธุ์ที่เหมาะสมในการรีดน้ำเชื้อเพื่อนำมาขยายพันธุ์ โดยการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นจากร้อยละการเคลื่อนที่รวมก่อนเติมน้ำยาเจือจาง หลังจากนั้นทำการแช่แข็ง และประเมินน้ำเชื้อหลังทำละลาย โดยประเมินค่าร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่ ร้อยละการเคลื่อนที่รวม ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการรอดชีวิต อัตราการผสมติด และอัตราการฟัก และเพื่อให้บรรลุตามวัตถุประสงค์ของงานวิจัย ได้แบ่งงานวิจัยเป็น 2 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของการเสริม Histopaque® ในแต่ละระดับ ต่อร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่ ร้อยละการเคลื่อนที่รวม ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการรอดชีวิต ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พันธุ์พื้นเมืองไทย

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของการเสริม Histopaque® ในแต่ละระดับ ต่ออัตราการผสมติด และอัตราการฟักในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พันธุ์พื้นเมืองไทย

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 2
ตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ไก่พื้นเมืองไทย (Thai native chicken)

ไก่พื้นเมืองมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Gallus domesticus* มีมาพร้อมกับคนไทยสมัยอยู่ทางตอนใต้ของประเทศจีนที่อพยพและได้นำเข้ามาด้วย มีขนาดตัวพอเหมาะสำหรับบริโภคในครัวเรือน ขนย้ายง่าย มีรสชาติเนื้อที่ดี จัดการและดูแลได้ง่าย ทนทานต่อสภาพแวดล้อม สามารถผสมพันธุ์และฟักไข่ขยายพันธุ์ได้เองตามสภาพธรรมชาติ มีสัญชาตญาณรักษาตัวรอดจากศัตรูได้ดี และมีความต้านทานต่อโรคและพยาธิภายนอกดีกว่าไก่ที่นำเข้าจากต่างประเทศ ไม่ต้องใช้เทคนิคสูง และมีราคาแพง และ สอดคล้องกับระบบการเกษตรแบบผสมผสาน หรือแบบไร่นาสวนผสม โดยเป็นได้ทั้งอาหารเพื่อบริโภคในครัวเรือน ซึ่งหากเปรียบเทียบคุณภาพเนื้อของเนื้อไก่พื้นเมือง และไก่พื้นเมืองลูกผสมกับไก่เนื้อ จะพบว่าคุณภาพเนื้อไก่พื้นเมืองและไก่พื้นเมืองลูกผสมดีกว่าไก่เนื้อในแง่รสชาติและสุขภาพของผู้บริโภค เนื่องจากเนื้อมีความเหนียวนุ่ม เปอร์เซ็นต์โปรตีนและสัดส่วนระหว่างกรดไขมันไม่อิ่มตัวต่อกรดไขมันอิ่มตัวในเนื้อสูง แต่มีคลอเลสเตอรอลต่ำกว่า ซึ่งเป็นผลดีต่อสุขภาพของผู้บริโภค ช่วยลดค่าใช้จ่ายด้านอาหาร และสร้างรายได้เสริมให้แก่เกษตรกร (บัญญัติ และ มนต์ชัย, 2555)

โดยปกติไก่พ่อแม่พันธุ์ต้องการโภชนะเพื่อดำรงชีพ, การให้ไข่, การสร้างภูมิคุ้มกันและต้องสะสมโภชนะไว้ในฟองไข่เพื่อส่งต่อไปยังลูก ไก่พ่อแม่พันธุ์ต้องการโปรตีนประมาณ 15-16% ซึ่งในอาหารจะต้องมีวิตามินและแร่ธาตุเพียงพอต่อความต้องการ สำหรับการเลี้ยงไก่แบบปล่อยอิสระ ไก่ต้องได้รับอาหารประมาณ 90-120 กรัม/ตัว/วัน สูตรอาหารสำหรับไก่พ่อแม่พันธุ์อาจแตกต่างกันในแต่ละพื้นที่ขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบที่มีในแต่ละพื้นที่รวมทั้งต้นทุนราคาวัตถุดิบด้วย (ประภากร, 2560) ลักษณะไก่พ่อแม่พันธุ์ที่ดีจะต้องมีรูปร่างสมบูรณ์ แข็งแรง มีน้ำหนักตัวตั้งแต่ 2.5 กิโลกรัม ขึ้นไป มีอายุตั้งแต่ 9 เดือนขึ้นไป แต่ไม่ควรเกิน 3 ปี ในส่วนของลักษณะแม่พันธุ์ที่ดี จะต้องมีรูปร่างสมบูรณ์ แข็งแรง ไข่ดก มีน้ำหนักตัวตั้งแต่ 1.5 กิโลกรัม ขึ้นไป มีอายุตั้งแต่ 7 เดือนขึ้นไป แต่ไม่ควรเกิน 3 ปี และจะต้องมีความสามารถเฉพาะตัว คือ ให้ไข่อย่างน้อยปีละไม่น้อยกว่า 4 ครอก ครอกละไม่น้อยกว่า 12 ฟอง เลี้ยงลูกเก่ง ไม่มีนิสัยดุร้ายและไม่จิกตีลูกของแม่ไก่ตัวอื่น

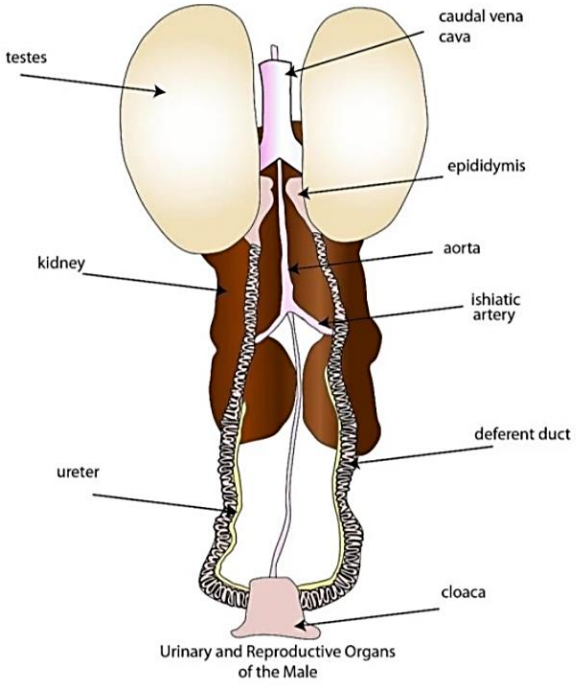
2. ระบบสืบพันธุ์สัตว์ปีกเพศผู้และการผลิตอสุจิ

2.1 ระบบสืบพันธุ์สัตว์ปีกเพศผู้

ประกอบด้วยอัณฑะ ท่อทางเดินอสุจิ และระบบสืบพันธุ์ ในส่วนของท่อทางเดินอสุจิจะเปิดเข้ากับทวารร่วม (Cloaca) ซึ่งเป็นรูเปิดเดียวกับท่อทางเดินระบบขับถ่าย (ภาพที่ 2)

2.1.1 อัณฑะ (Testis)

มี 1 คู่ อยู่ในช่องท้องหุ้มด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และเส้นใยที่ยืดหดได้ (Aire and Ozegbe, 2007) เมื่ออยู่ในช่วงเจริญพันธุ์จะเป็นเนื้อเยื่ออินเตอร์สทิธเชียล (Interstitial tissue) ที่ประกอบด้วยเซลล์เลยิก (Leydig) ทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนแอนโดรเจนหรือฮอร์โมนเพศผู้ (Androgen หรือ Testosterone) และท่อเซมินิเฟอรัส (Seminiferous tubule) ภายในจะประกอบด้วยเซลล์เซอร์โทไล (Sertoli cells) มีลักษณะยื่นยาวออกจากพื้นผิวของท่อเซมินิเฟอรัสไปถึงช่องว่างของท่อ ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาความสมบูรณ์ของอสุจิ และผลิตฮอร์โมน เช่น อินฮิบิน (Inhibin) เป็นต้น การแบ่งตัวและเพิ่มจำนวนของเซลล์นี้จะเกิดในระยะเวลาสั้นระหว่างการเป็นตัวอ่อนขณะไข่อยู่ในช่วงฟัก และเสื่อมลงช่วงปลายฤดูกาลสืบพันธุ์ (Bozkurt et al., 2007) และเมื่อถึงฤดูกาลสืบพันธุ์เซลล์ชนิดนี้จะมีตัวรับฮอร์โมนแอนโดรเจน (Darras et al., 2008) ซึ่งการพัฒนาของเซลล์จนสมบูรณ์รวมถึงการทำหน้าที่อยู่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมน FSH และ เทสทอสเทอโรน ส่งผลให้อัณฑะเพิ่มขนาดและน้ำหนัก และมีส่วนของเซลล์เยื่อบุผิวท่อเซลมินิเฟอรัส (Seminiferous epithelium) ซึ่งมีผลต่อการเจริญของอสุจิระยะต่าง ๆ รวมถึงการเจริญของหงอนและเหนียง ทำให้ไก่ตัวผู้มีนิสัยจัดอันดับข่มเหงกัน (Peck order) จากการศึกษาพบว่าในไก่หนุ่มที่มีความสมบูรณ์พันธุ์สูงจะมีเซลล์เลยิกที่ทำหน้าที่อยู่เป็นจำนวนมาก และมีฮอร์โมนเทสทอสเทอโรนสูงทั้งในเซลล์และในพลาสมา ซึ่งตรงกันข้ามกับพ่อพันธุ์ที่อายุมาก (Rosenstrauch et al, 1998)



ภาพที่ 2 ระบบสืบพันธุ์สัตว์ปีก (ไก่) เพศผู้
ที่มา: จุรีย์รัตน์ (2559)

2.1.2 Epididymis

อยู่ถัดมาจากอัณฑะทำหน้าที่ขนส่งอสุจิจากอัณฑะไปยังท่อ Vas deferens ซึ่งเป็นอวัยวะที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการ sperm maturation นอกจากนี้ Vas deferens ยังเป็นอวัยวะสำคัญในการกักเก็บอสุจิและขนส่งอสุจิไปยังอวัยวะสืบพันธ์เพศผู้ คือ Phallus

2.1.3 Phallus

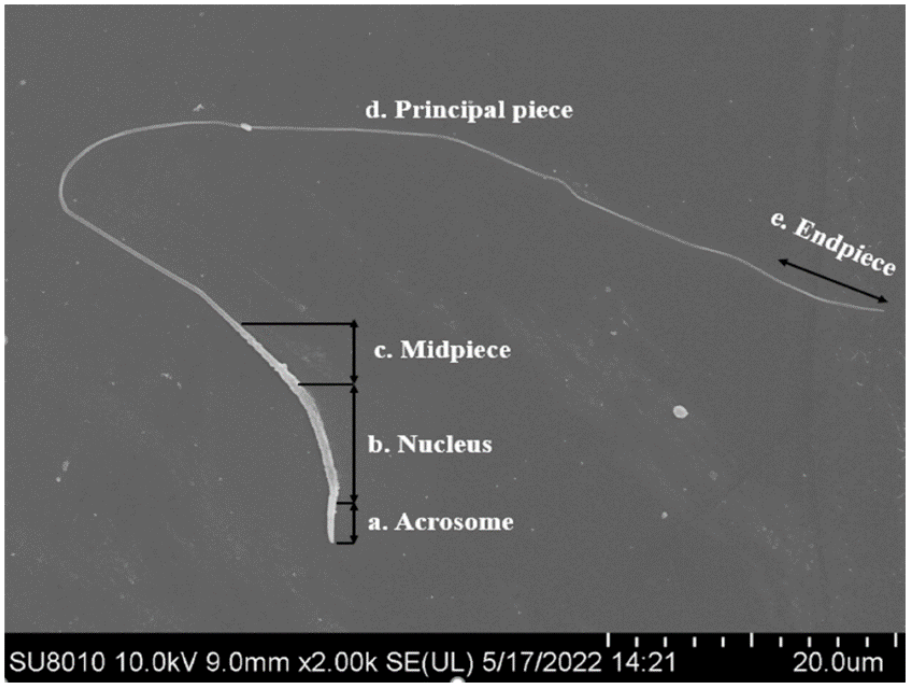
เป็นอวัยวะที่เก็บไว้ภายในร่างกาย ในสัตว์ปีกบางชนิดอาจมีการโผล่ยื่นออกมาในช่วงการผสมพันธุ์ (Intromittent type) เช่น ห่าน เป็ด และนกกระจอกเทศ เป็นต้น ในขณะสัตว์ปีกบางชนิดจะไม่มีการโผล่ยื่นออกมา (Non-intromittent type) ในไก่ไม่มีการพัฒนาอย่างเด่นชัดทำให้เห็นเป็นตุ่มยื่นออกมาใน cloaca เท่านั้น และเนื่องจากสัตว์ปีกนั้นไม่มีต่อมสร้างน้ำเลี้ยงอสุจิเหมือนสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ทำให้ปริมาณน้ำเชื้อที่หลั่งมีปริมาณที่น้อย หนืดข้นจากจำนวนอสุจิที่มีปริมาณพันล้านตัวในปริมาตรเพียงน้อยนิด

2.2 การผลิตอสุจิและการควบคุมการผลิตอสุจิ

2.2.1 บทบาทและหน้าที่ของอัณฑะ

อัณฑะจะผลิตและหลั่งฮอร์โมนแอนโดรเจนจากเนื้อเยื่ออัณฑะของไก่และเปลี่ยนเพรกนิโนโลนเป็นเทสทอสเทอโรนซึ่งเป็นผลผลิตหลักของอัณฑะในไก่ที่เจริญพันธุ์แล้ว นอกจากนี้ยังผลิตอสุจิ (Spermatogenesis) ซึ่งประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ Spermatocytogenesis, Spermatidogenesis และ Spermiogenesis ซึ่งในไก่ ไซโตพลาสซึมของสเปอร์มาติดจะลดลงมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างท้ายสุดประกอบด้วยส่วนหัว คือ มีขนาดยาวประมาณ 12.5 มิลลิไมครอน ภายในประกอบด้วยนิวเคลียส (Nucleus) ที่บรรจุสารพันธุกรรม (Deoxyribonucleic acid, DNA) และโปรตีนฮีสโตน หรือโปรตามีน และมี Cytoplasm อยู่ปริมาณน้อย มีอะโครโซม (Acrosome) ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจาก Golgi apparatus ประกอบด้วย ผนังสองชั้น มีลักษณะคล้ายกระสุนปืน เป็นส่วนที่ครอบหัวอสุจิประมาณ 2 ใน 3 ส่วน ภายในบรรจุเอนไซม์หลายชนิด เช่น Proacrosin, Hyaluronidase, Esterase และ Hydrolase ซึ่งเกี่ยวข้องกับการปฏิสนธิ โดย Hyaluronidase จะเข้าไปสลายกลุ่ม Cumulus cell, Acrosin และ Zona pellucida ของเซลล์ไข่ ส่วน Midpiece ยังประกอบไปด้วยไมโตรคอนเดรีย (Mitochondria) ประมาณ 30 อัน เรียงตัวเป็นเกลียวรอบ ๆ ไมโครทิวบูล (Microtubule) เพื่อสร้างพลังงานให้กับตัวอสุจิ และ ส่วนหาง ยาวประมาณ 80 มิลลิไมครอน จะประกอบด้วยเส้นใยเล็ก ๆ เรียงตัวเป็นคู่วางตามแนวยาวไปจนถึงส่วนปลายหาง โดยจะถูกล้อมรอบ

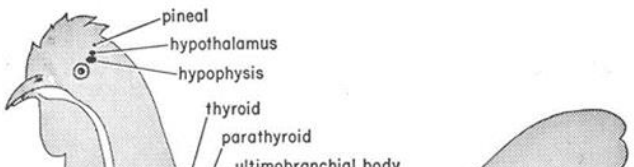
ด้วยเส้นใยอีก 9 คู่ เพื่อช่วยให้อสุจิเคลื่อนที่ไปข้างหน้าได้ (ภาพที่ 3) อสุจิจะถูกขับออกบริเวณใกล้เคียงกับเซลล์เซอร์โทไลสู่ใจกลางของท่อเซมินิเฟอรัส หลังจากพัฒนาจนสมบูรณ์อสุจิจะหลุดจากบริเวณส่วนผิวสู่บริเวณส่วนกลางของท่อเซมิมิเฟอรัสและถูกขับออก ซึ่งประกอบด้วย ริตีเทสทิส (Rete testis) ท่อนำออก (Efferent duct) ท่อเชื่อมต่อ ท่อเอพิดิไดมิส (Epididymis) และท่อส่งอสุจิ (Kirby and Froman, 2000) ก่อนออกสู่บริเวณ Cloaca ในไก่ใช้เวลา 2-3 วัน (De Reviers, 1975) และการเคลื่อนที่ของอสุจิในไก่นั้นขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ โดยการเคลื่อนที่เริ่มจากการที่อุณหภูมิได้ลดลง คือเมื่อมีการหลั่งน้ำอสุจิออกจากร่างกาย นอกจากนี้แล้วการเคลื่อนที่ของอสุจิไก่ยังขึ้นอยู่กับพันธุกรรมซึ่งส่งผลต่อสัณฐานของไมโทคอนเดียและบทบาทหน้าที่ (Forman and Kirby, 2005) ใช้เวลาผลิตอสุจิ 12-13 วัน (De Reviers, 1975)



ภาพที่ 3 **ที่มา:** Zong et al. (2023)

2.2.2 ฮอร์โมนที่ควบคุมการทำหน้าที่ของอัณฑะ

ฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองส่วนหน้ามีบทบาทพื้นฐานที่สำคัญในการควบคุมการผลิตฮอร์โมนที่อัณฑะทั้งแบบต่อมไร้ท่อ (Endocrine) (ภาพที่ 4) และต่อมมีท่อ (Exocrine) ซึ่งหากพบตัวรับฮอร์โมนเหล่านี้ที่เซลล์เซอร์โทไลและท่อเซมิมิเฟอรัสจะแสดงถึงบทบาทความเกี่ยวข้องของกระบวนการผลิตอสุจิ



ภาพที่ 4 ตำแหน่งต่อมไร้ท่อบนตัวไก่
ที่มา: Nesheim et al. (1979)

2.2.2.1 โกนาโดโทรปินอินฮิบิติงฮอร์โมน *(GnIH)*

พบตัวรับของฮอร์โมนนี้ทำหน้าที่ในเซลล์อินเตอร์สธิทเชียล และเซลล์สืบพันธุ์(ภาพที่ 5) โดยควบคุมบทบาทในการผลิตฮอร์โมนสเตรียรอยด์ และเซลล์สืบพันธุ์โดยทำหน้าที่ของฮอร์โมนภายในเซลล์ที่ผลิตเอง (Autocrine) หรือผลิตและส่งผลต่อเซลล์ข้างเคียง (Paracrine) การสืบพันธุ์ของสัตว์ปีกอยู่ภายใต้การควบคุมของโกนาโคโทปินรีลิสซิงฮอร์โมน (GnRH) ที่สร้างจากเซลล์ประสาทส่วนไฮโปทาลามัส โดยฮอร์โมนชนิดนี้ในไก่แยกได้ 2 กลุ่มคือ cGnRH - I และ cGnRH - II แต่เดิมเชื่อว่าโกนาโนโทรปินทั้ง 2 กลุ่มนี้มีผลต่อต่อมใต้สมองส่วนหน้า แต่มีการพิสูจน์ว่ามีเพียง cGnRH - I เท่านั้นที่มีบทบาทควบคุมต่อมใต้สมอง มีการศึกษาในนกกระทาพบว่าโกนาโคโทปินอินฮิบิทติงฮอร์ โมน (GnIH) มีบทบาทยับยั้ง cGnRH - I และ cGnRH – I และพบว่ามีเส้นประสาทของเซลล์ที่ผลิต GnIH จากไฮโปทาลามัสเชื่อมถึงบริเวณ Median eminence ของต่อมใต้สมอง มีผลขัดขวางการผลิตและหลั่งโกนาโดโทรปิน จากต่อมใต้สมอง (Ciccone et al., 2004)

GnRH- I ทำหน้าที่กระตุ้นการผลิตและหลั่งฮอร์โมนจากต่อมได้สมองส่วนหน้า (ภาพที่ 6) ได้แก่ ฮอร์โมนฟอลลิเคิลสติมูลติง (Follicle stimulating hormone: FSH) และฮอร์โมนลูติไนซิง (Luteinizing hormone: LH) และเป็นไปได้ว่าถูกควบคุมโดยนิวโรเพปไทด์ซึ่งเป็นพวกสารสื่อที่ส่งไปตามระบบประสาทที่ทำหน้าที่ขัดขวางกลไกการทำหน้าที่ ได้แก่ Gonadotropin inhibiting hormone (Gall) แต่จากงานทดลองชี้ให้เห็นว่านิวโรเพปไทด์นี้ ทำหน้าที่ในหลายบริเวณ ได้แก่ ไฮโปทาลามัส ต่อมใต้สมองส่วนหน้า และมีความเป็นไปได้ว่าที่บริเวณอัณฑะด้วยเช่นกัน การที่มีการ

ควบคุมต่อมใต้สมองในลักษณะ 2 ทาง ทั้งกระตุ้นและยับยั้งฮอร์โมนโกนาโดรโทรปิน สะท้อนถึงบทบาทของไฮโปทาลามัสที่รับสัญญาณทั้งจากภายในและสิ่งแวดล้อม ส่งผลในการมีบทบาททั้งสนับสนุนและยับยั้งความสมบูรณ์พันธุ์ (Bedecarrais, 2015)

2.2.2.2 ลูตีไนซิ่งฮอร์โมน *(Luteinizing hormone; LH)*

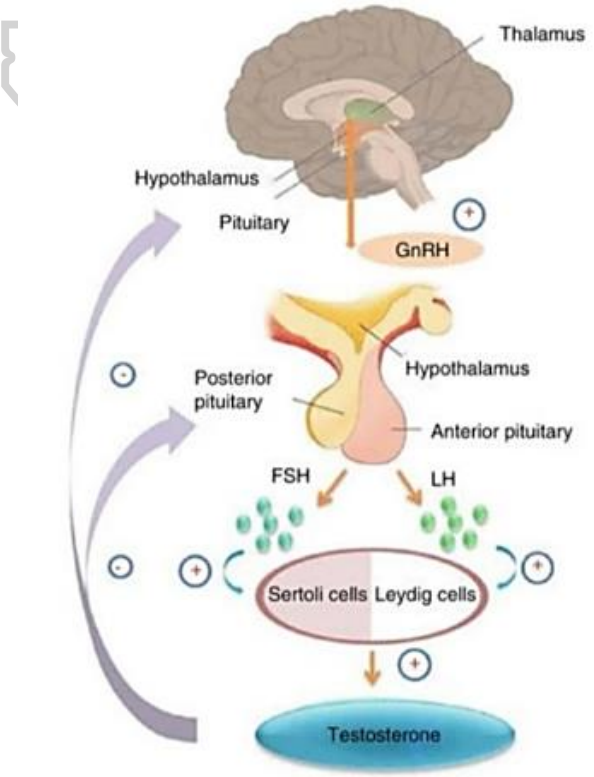
เป็นฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองส่วนหน้า ทำหน้าที่กระตุ้นเซลล์เลยิกให้ผลิตฮอร์โมนแอนโดรเจน การเปลี่ยนแปลงระดับ LH มีความสัมพันธ์กับระดับเทสทอสเทอโรน

2.2.2.3 ฟอลลิเคิลสติมูเลติงฮอร์โมน *(Follicle stimulating hormones ;FSH)*

เป็นฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองส่วนหน้า มีตัวรับบนเซลล์เซอร์โทไล FSH จะสูงเมื่อถึงฤดูผสมพันธุ์ โดยจะผลิตอสุจิตั้งแต่เริ่มช่วงฤดูผสมพันธุ์

2.2.2.4 อินฮิบิน *(inhibin)* และแอคทิวิน *(activin)*

GnRH กระตุ้น LH และ FSH ขณะที่ Activin กระตุ้นการหลั่งของ FSH (Davis and Johnson, 1998) Inhibin ส่งผลให้อัณฑะไวต่อการตอบสนองต่อ FSH ต่ำลง แต่ทั้งสองฮอร์โมนมีผลต่อการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์สืบพันธุ์ (Sedqyar et al., 2008)



ภาพที่ 5 การทำงานของระบบสืบพันธุ์เพศผู้ที่ถูกควบคุมโดยไฮโปทาลามัสและต่อมใต้สมองส่วนหน้า
ที่มา: Singh et al. (2017)

2.2.2.5 เมลาโทนิน (Malatinin; MEL)

ผลิตโดยต่อมไพเนียลและเรตินาของดวงตา มีบทบาทในการควบคุมระบบผสมพันธุ์ จากรายงานพบว่าต่อมไพเนียลส่งผลต่อฤดูกาลผสมพันธุ์โดยมีการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์เอนไซม์และระดับเมลาโทนินในพลาสมา และพบว่าการให้เมลาโทนินในไก่ทำให้อัณฑะไม่พัฒนาและทำให้ไก่เป็นหนุ่มช้า (Lewis et al., 2006)

2.2.2.6 โปรแลคติน (Prolactin)

หลั่งมาจากต่อมใต้สมองส่วนหน้ามีผลต่ออัณฑะและมีหน้าที่สำคัญในการควบคุมฤดูกาลการสืบพันธุ์การฉีดโปรแลคตินให้สัตว์มีผลให้ FSH ลดต่ำลงและอัณฑะฝ่อเหี่ยว

2.2.2.7 กลูโคคอร์ติคอยด์และเมแทบอลิคฮอร์โมนคอร์ติโคสเตอโรน (Corticosterone)

มีผลต่อปริมาณฮอร์โมนเทสทอสเทอโรน ถ้ามีปริมาณที่สูงจะไปขัดขวางการพัฒนาของอัณฑะรวมถึงยับยั้งฮอร์โมนที่ถูกผลิตออกมาเพราะแสดงถึงความเครียดที่เกิดขึ้น

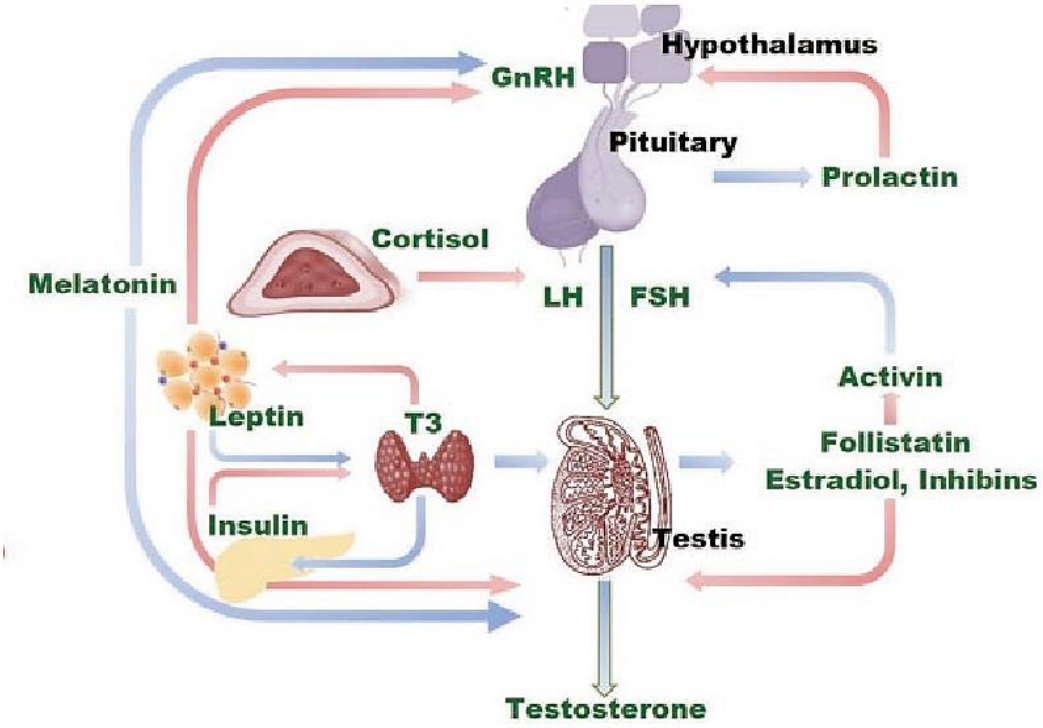
2.2.2.8 แอนโดรเจนไบดิงโปรตีน (Androgen-Binding protein, ABP)

มีบทบาทในการจับกับเทสทอสโทรอน เพื่อช่วยควบคุมกระบวนการผลิตอสุจิ สนับสนุนให้อสุจิเกิดการพัฒนาจนสมบูรณ์ในท่อเอพิดิไดมิส

2.2.3 ปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อการทำงานของอัณฑะ

2.2.3.1 ช่วงแสง

เป็นสิ่งกระตุ้นเบื้องต้นจากสิ่งแวดล้อมซึ่งส่งผลต่อการควบคุมทางด้านการสืบพันธุ์ในไก่ โดยมีผลกระตุ้นและขัดขวางทางการสืบพันธุ์ จากการศึกษา Chawdhyry et al. (2010) ในห้องปฏิบัติการพบว่าเมลาโทนินมีผลมากในการควบคุม GnIH mRNA และการหลั่ง GnIH ก็ขึ้นอยู่กับช่วงแสงซึ่งส่งผลให้มีการผลิตเมทลาโทนินเพิ่มขึ้น



ที่มา: Dutta et al. (2019)

2.2.3.2 การคัดเลือกพันธุ์

ในไก่ที่มีการคัดเลือกพันธุ์จะพบว่ามีการเป็นหนุ่มเป็นสาวตั้งแต่อายุยังน้อย สามารถให้ไข่ต่อเนื่องได้ระยะยาว ในขณะที่ไก่ที่ไม่มีการคัดเลือกให้ไข่ต่ำ และต้องการการกระตุ้นด้วยแสง (Baxter et al., 2014)

2.2.3.3 อุณหภูมิ

ฤดูกาลและอุณหภูมิที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นปัจจัยที่มีผลต่อสภาพทางการสืบพันธุ์ในไก่ อุณหภูมิแวดล้อมที่สูงมีผลกระทบต่ออัณฑะทำให้ผลิตอสุจิได้น้อยลง ในขณะที่อุณหภูมิที่หนาวเย็นจะกดการพัฒนาของอัณฑะและทำให้ความสมบูรณ์ต่ำ อย่างไรก็ตามผลกระทบของอุณหภูมิมีความแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของสัตว์และขึ้นอยู่กับเขตที่อาศัยอยู่ด้วย

2.2.3.4 อาหาร

ชนิด ปริมาณ และคุณภาพของอาหารมีผลต่อการพัฒนาอัณฑะ การอดอาหารในฤดูกาลสืบพันธุ์มีผลต่อการพัฒนาของอัณฑะ ดังนั้นการได้รับอาหารอย่างเพียงพอจึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลในด้านการสืบพันธุ์ ถ้าได้รับอาหารอย่างสมบูรณ์และอยู่ในสภาพช่วงกลางวันที่ยาวนานก็จะทำให้มีการกระตุ้นการพัฒนาอัณฑะได้อย่างสมบูรณ์ (Perfito et al., 2008)

3.ระบบสืบพันธุ์สัตว์ปีกเพศเมียและการผลิตไข่

ระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ปีกเพศเมียมีความแตกต่างกับระบบสืบพันธุ์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมเพศเมีย ในสัตว์ปีกรังไข่และระบบท่อทางเดินของระบบสืบพันธุ์จะมีเพียงด้านซ้ายเท่านั้น

3.1 ระบบสืบพันธุ์สัตว์ปีกเพศเมีย

ในระยะแรกของการเจริญเติบโตของตัวอ่อน (Embryo) จะมีรังไข่และท่อนำไข่ทั้ง 2 ข้าง แต่หลังจากฟักไข่ได้ 8 วัน รังไข่และท่อนำไข่ข้างขวาจะหยุดการเจริญเติบโตและฝ่อไป ทำให้เหลือรังไข่และท่อนำไข่เพียงข้างซ้ายเท่านั้น เมื่อฟักออกเป็นตัวในรังไข่ของลูกไก่จะมีฟองไข่อ่อน (Oocyte) จำนวนหลายพันฟองซึ่งสามารถมองเห็นไข่บางฟองได้ด้วยตาเปล่า ฟองไข่อ่อนเหล่านี้จะไม่เพิ่มจำนวนจนกว่าจะถึงวัยเจริญพันธุ์

3.1.1 รังไข่

รังไข่แขวนติดกับผนังช่องท้องด้านบนโดยเยื่อมีโซวาเรียม (Mesovarium) และเชื่อมติดกับเส้นเลือดดำทางขั้วรังไข่ (Ovarian stalk) ซึ่งประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เส้นเลือด ระบบประสาทและกล้ามเนื้อเรียบ ในช่วงอายุ 3-4 เดือน รังไข่มีน้ำหนักประมาณ 0.3-0.5 กรัม แต่จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็น 2 กรัม เมื่ออายุ 18-20 สัปดาห์และก่อนที่จะมีการวางไข่น้ำหนักจะเพิ่มเป็น 4-6 กรัม โดยการขยายขนาดเซลล์ภายในรังไข่ และถุงหุ้มไข่ (Follicle) เมื่อถึงวัยเจริญพันธุ์รังไข่ซึ่งมีฟองไข่อ่อน อยู่ภายในเป็นจำนวนหลาย ๆ พันฟองจะเจริญขึ้น โดยฟองไข่อ่อนประมาณ 4-6 ฟอง จะมีการเจริญขึ้นอย่างรวดเร็ว และจะมีการแบ่งลำดับขนาดในการเจริญเติบโต ฟองไข่แต่ละฟองจะมีขนาดใหญ่ขึ้น เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 40 มิลลิเมตร น้ำหนักประมาณ 20 กรัม เมื่อฟองแรกเจริญเติบโตเต็มที่แล้วก็จะมีการตกไข่ ฟองไข่ที่มีขนาดเล็กลงไปจะเจริญขึ้นมาแทนที่ และจะตกในวันถัดมาจนครบ 4-6 ฟอง หลังจากนั้นจะหยุดพักประมาณ 24-36 ชั่วโมง แล้วจึงเริ่มมีการตกไข่ต่อเนื่องกันอีก จำนวนไข่แต่ละชุดที่แม่ไก่ไข่ติดต่อกันทุกวันโดยไม่หยุดเรียกว่าตับไข่หรือชุดไข่ (Clutch)

3.2 การผลิตไข่และการควบคุมการผลิตไข่

3.2.1 การสร้างไข่แดง

ไข่แดงไม่ใช่เซลล์สืบพันธุ์แต่เป็นแหล่งอาหารของเซลล์เล็ก ๆ ที่เรียกว่า บลาสโตเดิร์ม (Blastoderm) เมื่อเข้าสู่วัยสาวขนาดของรังไข่และท่อนำไข่จะเกิดการเปลี่ยนแปลงอย่างมาก

โดยก่อนที่แม่ไก่จะวางไข่ฟองแรก 11 วัน การทำงานของระบบฮอร์โมนเพศจะเริ่มขึ้นโดยฮอร์โมน FSH (Follicle stimulating hormone) จากต่อมใต้สมองส่วนหน้าจะไปกระตุ้นกระเปาะรังไข่ (Ovarian follicle) ให้มีการขยายขนาดขึ้น หลังจากนั้นรังไข่จะเริ่มทำงาน ทำให้เกิดการสร้างฮอร์โมนเอสโตรเจน (Estrogen) โปรเจสเตอโรน (Progesterone) และเทสทอสเทอโรน (Testosterone) และเกิดการสะสมโปรตีนและไขมันในฟองไข่ ซึ่งส่งมาจากตับทางกระแสเลือดทำให้ไข่แดงสุก 1-2 วัน ต่อมาไข่แดงฟองที่ 2 จะเริ่มเจริญ เมื่อไข่แดงฟองแรกออกจากตัวแม่ไก่ ไข่แดงอีก 5-10 ฟอง ถัดไปจะเข้ากระบวนการเจริญต่อไป ดังนั้นการที่ไข่แต่ละฟองสุกต้องใช้เวลา 10-11 วัน การสะสมสารต่าง ๆ ในไข่แดงจะช้ามากในระยะแรก แต่เมื่อเส้นผ่าศูนย์กลางไข่ (Ovum) ได้ 6 มิลลิเมตร ไปแล้ว การสะสมสารต่าง ๆ จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เส้นผ่าศูนย์กลางจะเพิ่มขึ้นวันละ 4 มิลลิเมตร การเกิดสีในไข่แดง เนื่องจากการสะสมสารแซนโทฟีลล์ (Xanthophyll) ซึ่งเป็นสารสีเหลือง (Carotenoid pigment) ในอาหาร การสะสมจะเกิดขึ้นมากในช่วงกินอาหารจึงทำให้มีสีเข้ม และจะสะสมน้อยในช่วงที่อดอาหารจึงทำให้มีสีจาง การสะสมจะเริ่มสะสมจากชั้นนอกเข้าไปหาชั้นใน ดังนั้นเราจะเห็นแถบเข้ม และแถบจางในไข่แดงจะมี 7-11 ชั้น ตามระยะเวลาในการสร้างไข่

3.2.2 การตกไข่ (Ovulation)

ไข่ที่กำลังเจริญและขยายขนาดจะอยู่ภายในเยื่อบาง ๆ ที่เรียกว่ากระเปาะไข่ (Follicle) ซึ่งกระเปาะไข่แต่ละอันจะยึดอยู่กับก้านกระเปาะเล็ก ๆ ของรังไข่ที่เรียกว่าขั้วกระเปาะไข่ (Follicular stalk) บริเวณผิวของถุงหุ้มไข่แดงจะมีเส้นเลือดแดงจำนวนมากมาหล่อเลี้ยง ยกเว้นตอนกลางของไข่ ซึ่งจะเป็นบริเวณที่ถุงหุ้มไข่เกิดการฉีกขาดเรียกแนวนี้ว่า Stigma เมื่อไข่แดงสุกรังไข่จะหลั่งฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนไปที่สมองส่วนไฮโปทาลามัสซึ่งส่งผลกระตุ้นต่อไปยังต่อมใต้สมองส่วนหน้าให้หลั่งฮอร์โมน LH (Leuteinizing hormone) มาที่รังไข่เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการตกไข่ ทำให้ถุงหุ้มไข่เกิดการฉีกขาด ไข่ที่สุกจะตกลงสู่ท่อนำไข่ส่วนปากแตร (Infundibulum) ไข่ที่ตก (Ovum) ประกอบด้วยเยื่อหุ้มไข่ (Vitelline membrane) เซลล์สืบพันธุ์ (Germinal disc) และส่วนประกอบของไข่แดง (Yolk) การตกไข่ในครั้งแรกเกิดจากการกระตุ้นโดยระบบประสาทและฮอร์โมน การตกไข่ฟองต่อมาจะเกิดจากการวางไข่ฟองแรก 15-40 นาที ไข่ในแต่ละชุดที่ตกไข่จะมี 4-6 ฟอง แม่ไก่ที่ไข่ดี ตับไข่จะยาวและระยะห่างระหว่างตับสั้น แม่ไก่ที่ไข่ไม่ดีตับไข่จะสั้น และระยะห่างระหว่างตับจะยาว หลังจากเกิดการตกไข่แล้ว ยังต้องใช้เวลาในการสร้างไข่ขาว เยื่อหุ้มไข่และเปลือกไข่อีกประมาณ 23-26 ชั่วโมง ถ้าแม่ไก่ใช้เวลาในการสร้างนานกว่า 24 ชั่วโมงจะทำให้การวางไข่ในแต่ละวันช้าลงและทำให้การตกไข่เกิดขึ้นช้าตามไปด้วย ไข่ที่วางในตอนบ่ายจะอยู่ในท่อนำไข่นานกว่าไข่ที่วางในตอนเช้า และหลังจากตอนบ่ายไปแล้วจะไม่เกิดการตกไข่ แม่ไก่ที่ตับไข่ยาวจะวางไข่ฟองแรกในตอนเช้า การตกไข่ฟองต่อมาจะเกิดขึ้นเร็ว ทำให้ช่วงเวลาที่แม่ไก่วางไข่ช้าไปในแต่ละวันสั้นลง (Lag) เมื่อแม่ไก่เป็นสาวและเริ่มไข่ในช่วงสัปดาห์แรกการตกไข่จะไม่สม่ำเสมอ อาจตกไข่เพียง 2-4 ฟอง เนื่องจากระบบฮอร์โมนยังไม่สมบูรณ์ และนอกจากนี้แม่ไก่ที่เริ่มไข่ใหม่ ๆ มักจะเกิดไข่แฝด เนื่องจากรังไข่ทำงานมากเกินไป มักเกิดในไก่เนื้อมากกว่าไก่ไข่

3.2.3 ท่อนำไข่

ท่อนำไข่ของไก่ (ภาพที่ 7) ที่กำลังอยู่ในช่วงวางไข่มีความยาวประมาณ 70-80 เซนติเมตร เริ่มจากรังไข่ ถึงทวารร่วม ท่อนำไข่ยึดอยู่กับเส้นเอ็นเพอริโตเนียลดอร์ซอล (Peritoneal dorsal) ซึ่งหุ้มไปทาง ด้านล่างกลายเป็นเส้นเอ็นเวนทรัล (Ventral ligament) ท่อนำไข่เป็นส่วนที่มีเส้นเลือด เส้นประสาท มาหล่อเลี้ยงมาก และประกอบด้วยชั้นของกล้ามเนื้อต่าง ๆ ท่อนำไข่ประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้

3.2.3.1 ส่วนปากแตร (Infundibulum)

ส่วนนี้มีลักษณะเป็นรูปกรวย (Funnel-shaped) ที่มีขอบหยักไปมาเรียก Fimbria มีความ ยาวประมาณ 9 เซนติเมตร (3.5 นิ้ว) ปกติจะไม่ทำงาน ยกเว้นหลังจากตกไข่ จะใช้เป็นที่รองรับไข่ ดงที่สุกแล้ว (Ovum) และตกลงมา ไข่แดงจะอยู่ในส่วนนี้ประมาณ 15 นาที ส่วนนี้มีต่อมกักเก็บ อสุจิเรียกว่า sperm nest ส่วนของปากแตรเป็นบริเวณที่เกิดการปฏิสนธิ

3.2.3.2 ส่วนผลิตไข่ขาว (Magnum)

เป็นแหล่งผลิตไข่ขาว (Albumen-secretinportion) มีความยาวประมาณ 33 เซนติเมตร (13 นิ้ว) ไข่แดงจะอยู่ในส่วนนี้นานประมาณ 3 ชั่วโมง ท่อนำไข่ส่วนนี้จะมีความกว้างและผนังหนากว่าส่วนอื่น ๆ ไข่พร้อมเยื่อหุ้มจะค่อย ๆ หมุนลงมารับไข่ขาวที่ถูกสร้างโดยเนื้อเยื่อภายในท่อนี้ ไข่ ขาวที่สร้างในส่วนนี้ประกอบด้วยชั้นต่าง ๆ ดังนี้ Chalaza มีประมาณ 2.7% ทำให้ไข่แดงลอยอยู่ตรงกลาง Liquid inner white มีประมาณ 17.3% Dense white มีประมาณ 57% เป็นส่วนที่ใหญ่ที่สุด Outer thin white มีประมาณ 23% การสร้างยังไม่สมบูรณ์จนกว่าจะผ่านเข้าไปยังส่วนมดลูก

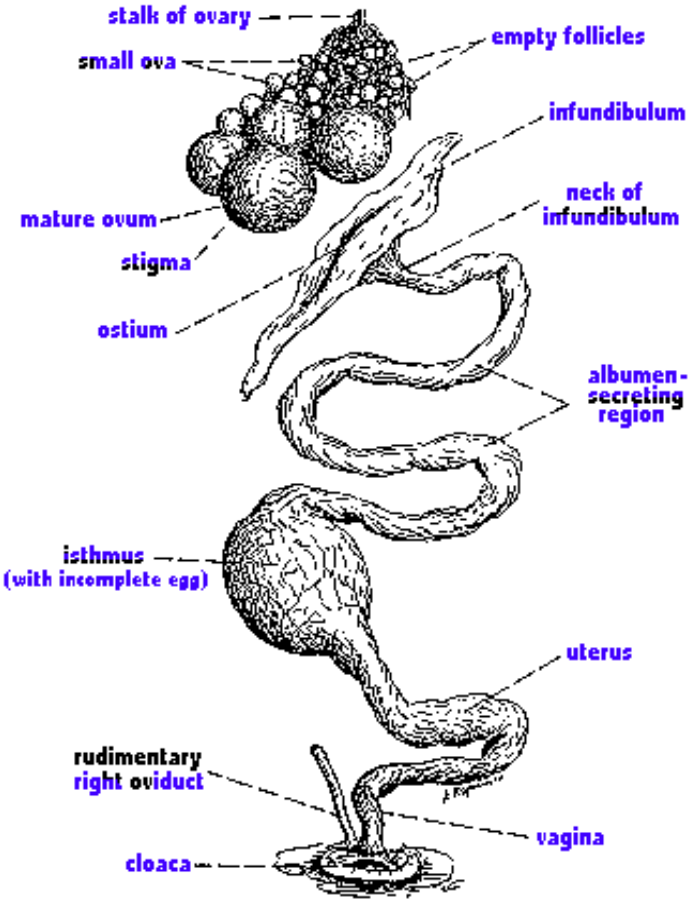
3.2.3.3 ส่วนผลิตเยื่อเปลือกไข่ (Isthmus)

เป็นท่อนำไข่ส่วนที่สั้น มีความยาวประมาณ 10 เซนติเมตร (4 นิ้ว) ไข่จะอยู่ในส่วนนี้นาน ประมาณ 75 นาที ท่อนำไข่ส่วนนี้แตกต่างจากส่วนสร้างไข่ขาวอย่างเห็นได้ชัดคือ membranes เป็นส่วนที่กำหนดรูปทรงไข่ มีการสร้างส่วนของน้ำเหลว เยื่อหุ้มเปลือกไข่ชั้นนอก หนากว่าชั้นในประมาณ 3 เท่า บริเวณที่เยื่อเปลือกไข่แยกออกจากกันมักจะเกิดทางด้านป้านเกิดเป็น ช่องอากาศ ไข่ที่วางใหม่ ๆ จะไม่พบช่องอากาศ เยื่อเปลือกไข่ทำหน้าที่ป้องกันเชื้อโรคและในไก่สาว จะหนากว่าไก่แก่ ลักษณะแคบและผนังยาวกว่า ทำหน้าที่ผลิตเยื่อหุ้มไข่ขาวทั้งชั้นในและชั้นนอก (Inner และ outer shell)

3.2.3.4 ส่วนมดลูก (Uterus)

ท่อนำไข่ส่วนนี้มีลักษณะเป็นถุงมีความยาวประมาณ 10-12 เซนติเมตร (4.0-4.7 นิ้ว) ไข่จะอยู่ในส่วนนี้นานประมาณ 18-20 ชั่วโมง ริ้วของเยื่อบุผิวในมดลูกจะยาวกว่าในส่วนผลิตเยื่อเปลือกและมีปริมาณมากกว่าลักษณะของริ้วซับซ้อนมากกว่าทำให้พื้นที่ผิวของเยื่อมูก (Mucus membrane) สัมผัสกับเปลือกได้มากผนังมดลูกเป็นกล้ามเนื้อหนา ส่วนของมดลูกมีหน้าที่ในการสร้างเปลือกไข่ สีเปลือกไข่ คิวติเคิลหรือนวลไข่ (Cuticle) และ Outer thin white โดยน้ำและเกลือแร่จะ

ซึมผ่านเยื่อเปลือกไข่เข้าไปยังส่วน Outer thin white สารพอร์ไพริน (Porphyrins) ที่ผลิตจากเซลล์เยื่อบุของผนังที่สร้างเปลือกไข่ ทำให้เปลือกไข่มีสีแตกต่างกันไปตามชนิดสัตว์ปีก เปลือกไข่ไก่มีน้ำหนักประมาณ 6.1 กรัม



ภาพที่ 7 ท่อนำไ‘
ที่มา: Bwala (2009)

3.2.3.5 ช่องออกไข่ (Vagina)

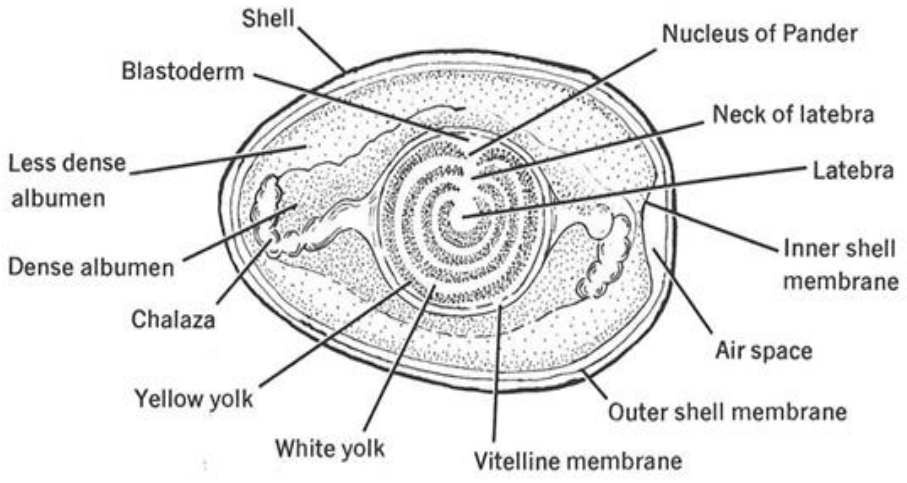
ไข่ก่อนเข้าสู่ทวารร่วมต้องผ่านช่องออกไข่ ซึ่งยาวประมาณ 12 เซนติเมตร และไม่มีส่วนเกี่ยวข้องกับการสร้างไข่ แต่มีหน้าที่ช่วยในการวางไข่ในส่วนนี้มีต่อมกักเก็บอสุจิ เรียกว่า Utero-vaginal gland ลักษณะของท่อนำไข่ส่วนนี้มีรูปร่างเป็นท่อโค้งคล้ายตัวเอส มีกล้ามเนื้อแทรกอยู่ กล้ามเนื้อช่องออกไข่แข็งแรงมาก เมื่อไก่ได้รับการผสมพันธุ์ตัวอสุจิสามารถเดินทางไปถึงท่อนำไข่ ส่วนปากแตรภายในเวลาประมาณ 30 นาที

3.2.3.6 ทวารร่วม (Cloaca)

เป็นท่อร่วมระหว่างระบบขับถ่าย และระบบสืบพันธุ์เป็นที่รอให้ฟองไข่สมบูรณ์แล้วพักอยู่ก่อนที่จะออกไปนอกตัวไก่

3.2.4 รูปทรง ขนาด และสีไข่

ปกติรูปทรงไข่จะถูกกำหนดโดยท่อนำไข่ส่วนสร้างไข่ขาว แต่รูปทรงไข่อาจเปลี่ยนแปลงได้ เมื่อผ่านเข้าสู่ส่วนผลิตเยื่อเปลือกไข่หรือส่วนสร้างเปลือกไข่ถ้ามีสาเหตุที่ทำให้ท่อนำไข่ทั้งสองส่วน ผิดปกติ ขนาดไข่มีความผันแปรอย่างมาก แม่ไก่ที่เริ่มวางไข่จะให้ไข่ฟองเล็ก เนื่องจากไข่แดงมีขนาดเล็กและไข่ขาวมีปริมาณน้อย ส่วนเปลือกจะสร้างตามขนาดไข่ (ภาพที่ 8) ลำดับของไข่ในตับไข่มีผลต่อน้ำหนัก ไข่ด้วย โดยทั่วไปไข่ฟองแรกของตับจะมีขนาดใหญ่ที่สุด ไข่ฟองต่อมาจะมีขนาดลดลงเป็นลำดับ สาเหตุเกิดจากการที่ไข่ขาวมีปริมาณลดลง แต่ไข่แดงมีขนาดค่อนข้างคงที่ สีเปลือกไข่เกิดจากการ สะสมรงควัตถุในเปลือกไข่ในท่อนำไข่ส่วนสร้างเปลือกไข่ โดยปกติแม่ไก่จะให้ไข่ที่มีสีเดียวกันเสมอ แต่สีเปลือกไข่จะแตกต่างกันไปในแม่ไก่แต่ละตัวในสายพันธุ์เดียวกัน (ประภาพร, 2560)

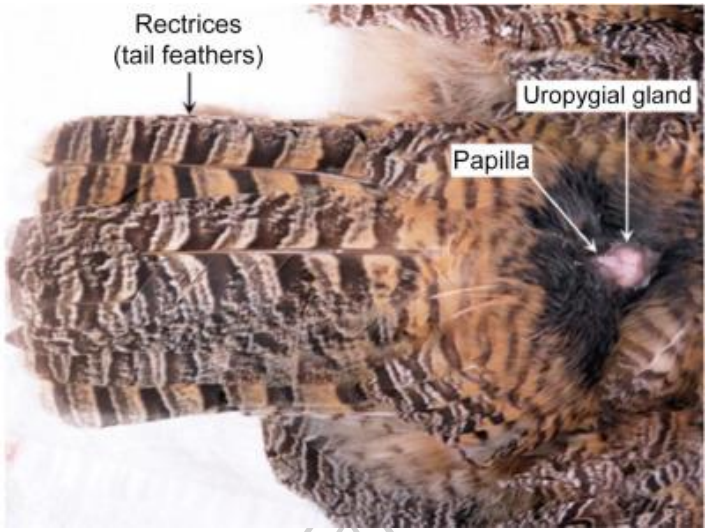


ภา
ที่ม

4.พฤติกรรมการสืบพันธุ์สัตว์ปีก

4.1 รูปลักษณ์

พฤติกรรมทางการสืบพันธุ์ในสัตว์ปีก มีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการเพาะขยายพันธุ์และประสิทธิภาพการผลิตสัตว์ปีกในทุกระดับซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการจัดการด้านผสมพันธุ์และส่งผลต่อประสิทธิภาพทางการผลิตที่สูงสูงสุด โดยระบบประสาทประสาทและฮอร์โมนที่ผลิตจากต่อมต่างๆเป็นปัจจัยภายในที่สำคัญ และรวมถึงปัจจัยภายนอก เช่น แสง อุณหภูมิ ความสมบูรณ์ของอาหาร และปัจจัยทางสังคม ล้วนส่งผลกับการผสมพันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวนประชากรของสัตว์ ไก่ตัวผู้



สามารถแยกแยะไก่ตัวเมียจากความพึงพอใจได้โดยดูจากลักษณะทางกายภาพโดยเฉพาะสีคนในขณะที่แม่ไก่จะเลือกพ่อไก่จากลักษณะทางการเกี้ยวพาราสี โดยมักจะเลือกพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะบ่งบอกถึงความมีสุขภาพดี (Duncan, 2009) หงอนใหญ่สีแดงสดใส รวมถึงลักษณะที่บ่งบอกถึงความเป็นจ่าฝูง

4.2 กลิ่นกาย

สัตว์ปีกสามารถรับรู้กลิ่นได้โดยแหล่งผลิตกลิ่นคือ ต่อมยูโรไพเจียล (Uropygial) (ภาพที่ 9) ซึ่งอยู่บริเวณปลายสุดด้านท้ายของสัตว์ปีกเหนือทวารร่วม สารที่ผลิตจากต่อมโลไพรเจียนจะมีของเหลวคล้ายขี้ผึ้ง มีไขมันที่ระเหยและไม่ระเหยซึ่งมีบทบาทในการบำรุงขน ทำให้ขนไม่เปียกน้ำและอ่อนนุ่ม และยังสามารถป้องกันแบคทีเรีย เชื้อราบริเวณขนได้ บทบาทของต่อมยูโรไพเจียลจะมีผลกระตุ้นพฤติกรรมการผสมของพ่อพันธุ์ โดยแม่พันธุ์ที่ถูกกำจัดต่อมนี้จะถูกตัวผู้ขึ้นผสมน้อยกว่าแม่พันธุ์ที่มีต่อม

นอกจากนี้ในตัวผู้ยังสามารถดูได้จากพฤติกรรม การเกี้ยวพาราสีตัวเมีย โดยจะเดินก้าวเท้าสั้นสั้นรอบตัวเมีย ลำแพนปีกเล็กน้อยสลับทิศทาง มีการตีปีกและก้มลงส่งเสียงเพื่อต้อนตัวเมียหากแม่ไก่หมอบก็จะยกปีกเล็กน้อย

ภาพที่ 9 ต่อมยูโรไพเจียล (Uropygial)
ที่มา: Faux and Logsdon (2022)

5.การแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อ

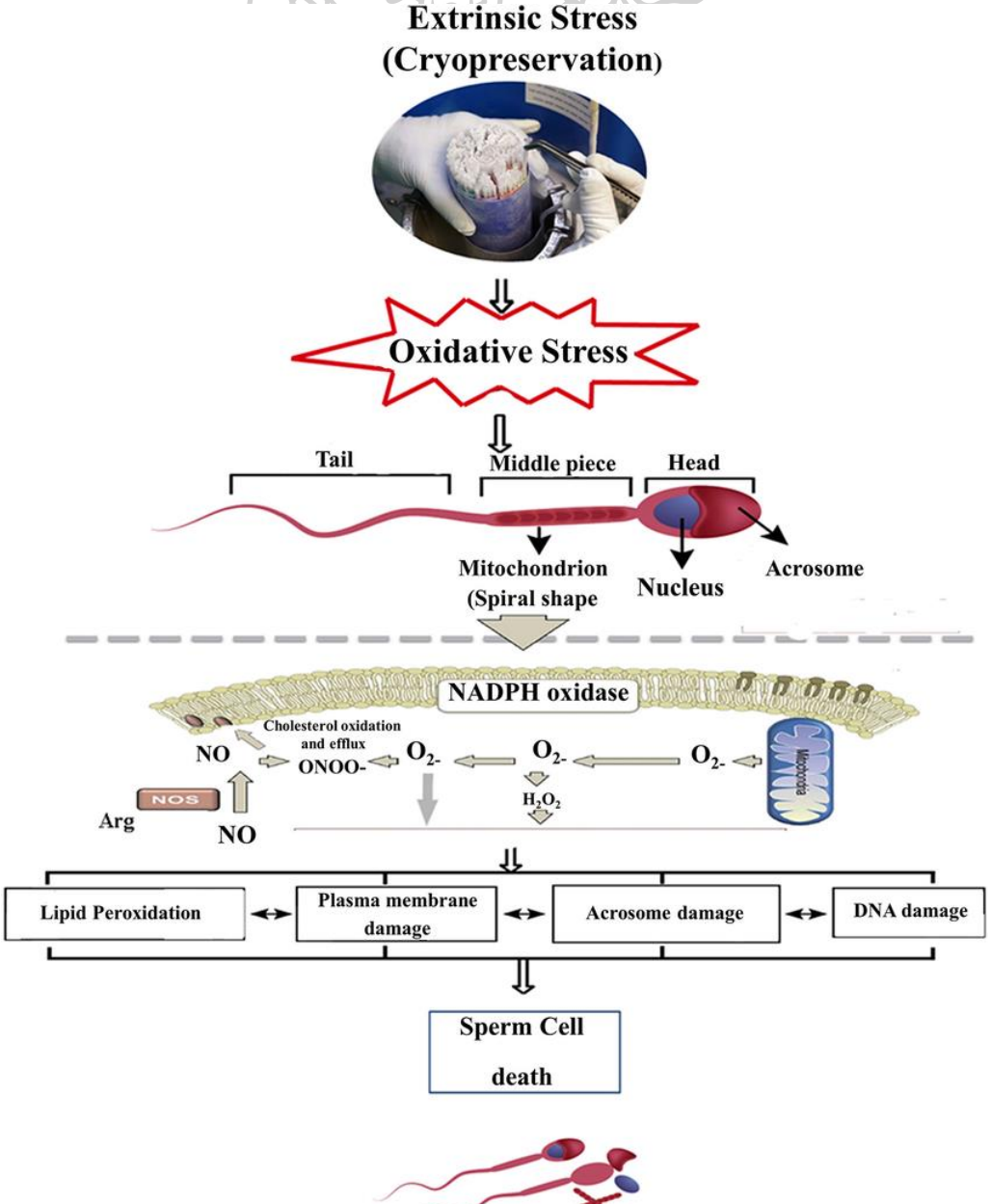
การแช่แข็งน้ำเชื้อเป็นกระบวนการสำหรับเก็บรักษาน้ำเชื้อเพื่อใช้ในการผสมเทียม โดยที่อสุจิที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งและละลายน้ำเชื้อจะมีความสมบูรณ์พันธุ์และมีอัตราการผสมติดที่เป็นที่ยอมรับได้ อย่างไรก็ตาม การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตอสุจิลดลงไป 40-50% ที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาปรับปรุงให้น้ำเชื้อแบบแช่แข็งมีคุณภาพที่สูงขึ้นโดยการลดผลกระทบจากการเกิด ภาวะช็อคจากความเย็น (Cold shock), ภาวะเครียดจากแรงดันออสโมติก (Osmotic stress), การเกิดผลึกน้ำแข็ง (Ice crystal formation) และ การทำลายเซลล์จากการเกิดปฏิกิริยากับออกซิเจน (Oxidative damage) (ภาพที่ 10) ซึ่งเป็นประเด็นหลักในการทำให้อสุจิได้รับความเสียหาย (Cryoinjury) และเป็นสาเหตุของการสูญเสียอสุจิในด้านต่างๆ เช่น หน้าที่การทำงาน, อัตราการรอดชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ ที่ระดับอุณหภูมิร่างกาย อสุจิจะมีกระบวนการเมตาโบลิซึมสูง ส่งผลทำให้อสุจิมีอายุสั้น จึงมีความจำเป็นต้องลดกระบวนการเมตาโบลิซึมของอสุจิ (Woelders, 1997) การลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิร่างกายไปสู่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เรียกว่า การลดอุณหภูมิแบบแช่เย็น จะเป็นการลดอุณหภูมิแบบค่อยเป็นค่อยไปเพื่อป้องกันการช็อคจากความเย็น ส่วนการแช่แข็งน้ำเชื้อเป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยใช้น้ำเชื้อแบบแช่เย็นที่มีการเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางที่เสริมสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง (Cryoprotectant: CPA) ในส่วนของการลดอุณหภูมิจาก 5 องศาเซลเซียส มาที่อุณหภูมิประมาณ -140 องศาเซลเซียส จะเรียกว่าอัตราการลดอุณหภูมิแบบแช่แข็ง และจะเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยยืดอายุของอสุจิ (Aisen et al., 2002)

การแช่แข็งน้ำเชื้อที่ดีคือการจัดการน้ำในเซลล์ของอสุจิให้เหลืออยู่อย่างเหมาะสมซึ่งเมื่อเกิดการแข็งตัวและเมื่อทำละลายน้ำเชื้อแล้วส่งผลเสียหายต่ออสุจิน้อยที่สุด (Hammerstedt, 1995) ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการลดอุณหภูมิแบบแช่เย็นและอัตราการลดอุณหภูมิแบบแช่แข็งกับสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการมีชีวิตรอดของอสุจิ จากการเกิดผลึกน้ำแข็ง และสภาวะช็อคจากความเย็น (Hammerstedt, 1995; Kumar et al., 2003) เนื่องจากในขณะที่การลดอุณหภูมิลงอย่างช้าๆ อสุจิเกิดการสูญเสียน้ำ และเข้าสู่จุดสมดุลระหว่างความเข้มข้นของสารในเซลล์กับภายนอกเซลล์ที่บ้างครั้งอาจทำให้อสุจิได้รับความเสียหาย (Watson, 2000) อย่างไรก็ตาม หากอัตราการลดอุณหภูมิเร็วเกินไปจะไม่สามารถป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ได้ เพราะมีอัตราการดึงน้ำออกช้าเกินไป จึงทำให้น้ำคงอยู่ในเซลล์ในปริมาณที่สูง ที่ส่งผลต่อ

อัตราการรอดชีวิตของอสุจิ ณ อุณหภูมิวิกฤตคือ ระหว่าง 5 องศาเซลเซียส ถึง -15 องศาเซลเซียส (Woelders, 1997)

ส่วนการละลายน้ำเชื้อนับว่ามีความสำคัญเพราะจะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งอีกครั้งหนึ่ง ซึ่งอุณหภูมิของน้ำที่ใช้ละลายน้ำเชื้อจะอยู่ระหว่าง 4 องศาเซลเซียส ถึง 75 องศาเซลเซียส (Kumar et al., 2003; Watson, 2000) ดังนั้น จึงควรเลือกอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการละลายน้ำเชื้อ ซึ่งส่วนใหญ่นิยมละลายน้ำเชื้อไก่ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส

อย่างไรก็ตามระหว่างการละลายน้ำเชื้อพบว่าสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งจะออกมานอกเซลล์และมีการดึงน้ำเข้าสู่เซลล์และทำให้อสุจิเกิดความเครียดจากแรงดันออสโมซีส โดยเซลล์อสุจิจะมีลักษณะบวมและเสียหายได้ (Blasse et al., 2012) ดังนั้น หากมีอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมจะทำให้น้ำในเซลล์ไหลออกภายนอกเซลล์ได้พอเหมาะกับน้ำภายในเซลล์คงเหลืออยู่อย่างเหมาะสม เมื่อนำมาทำการละลายแล้วจะส่งผลดีต่อการรอดชีวิตของน้ำเชื้อแช่แข็งให้มีอัตรา ที่สูงขึ้น (Hammerstedt, 1995)



ภาพที่ 10 ภาวะ Oxidative damage
ที่มา: Khan et al. (2021)

5.1 องค์ประกอบและคุณสมบัติของน้ำยาเจือจาง

น้ำเชื้อที่รีดเก็บมาจากพ่อพันธุ์สัตว์ปีก มีการเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็วประมาณ 20 นาที หลังการรีด (Michel, 1995) หากต้องการเก็บรักษาให้นานขึ้นต้องใช้น้ำยาเจือจางเป็นตัวช่วย ซึ่งสามารถเพิ่มระยะเวลาเก็บรักษาได้ยาวนานขึ้น 1 ชั่วโมง (Christensen, 1995) ปริมาตรน้ำเชื้อไก่ที่ทำการรีดแต่ละครั้งมีปริมาตร และความเข้มข้นที่แตกต่างกัน โดยมีปริมาตรอยู่ที่ 0.2-0.3 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อในการปรับน้ำเชื้อให้มีความเข้มข้นให้ได้มาตรฐาน ประมาณ 20-30 ล้านตัวต่อหลอด สำหรับน้ำยาเจือจางที่เติมลงไปผสมกับน้ำเชื้อที่มีลักษณะที่ดี มีคุณสมบัติได้แก่ รักษาความเป็นกรด-ด่างของน้ำเชื้อให้คงที่ ให้พลังงานกับอสุจิ ทำให้อสุจิมีอายุนานขึ้น ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ โดยการเติมยาปฏิชีวนะ บรรเทาความเสียหายของอสุจิ ขณะทำลดอุณหภูมิในขั้นตอนการแช่เย็น (Cooling) และแช่แข็ง (Freezing) และ ลดการกระทบจากสภาพแวดล้อมภายนอก (Mukhopadhyay et al., 2011) pH ของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง ต้องมี pH บัฟเฟอร์และความดันสารละลายที่เหมาะสมกับน้ำเชื้อและการเลือกใช้น้ำยาเจือจางต้องเหมาะสมกับสัตว์แต่ละชนิด (Li et al., 2008)

5.1.1 แหล่งพลังงาน

อสุจิต้องการพลังงานเพื่อไปเคลื่อนไหวในส่วนของหาง ซึ่งจะสร้างพลังงานผ่านวิธีไกลโคไลติก (Glycolytic pathways) เกิดขึ้นบริเวณไมโทรคอนเดรียชีท (Mitochondrial sheath) ที่หางส่วน Midpiece โดยส่วนมากแหล่งพลังงานที่นิยมใช้ ได้แก่ ฟรุกโตสและกลูโคส

5.1.2 ระดับ pH

น้ำเชื้อสัตว์ปีกโดยปกติจะมี pH อยู่ในช่วง 6.0 ถึง 8.0 ถ้าเกิดการเปลี่ยนแปลง pH แบบกะทันหัน อาจจะส่งผลเสียต่อการรอดชีวิตและอัตราการผสมติดของสัตว์ปีกได้ สารที่มักใช้ควบคุมระดับ pH มักเป็นกลุ่มฟอสเฟต ซิเตรท และสารอินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง เนื่องจากอสุจิของสัตว์ปีกไม่สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลง pH ในระดับกว้าง ดังนั้นสารที่เลือกใช้ควรเป็นสารที่ควบคุมระดับ pH ในระยะแคบ

5.1.3 ความดันออสโมซิสที่เหมาะสม

โดยส่วนใหญ่มักขึ้นอยู่กับจำนวนอนุภาคของตัวถูกละลาย หากอสุจิอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีความดันต่ำ น้ำจะไหลเข้าเซลล์เพื่อปรับสมดุล แต่ถ้าอยู่ในบริเวณที่ความดันสูง น้ำจะไหลออกจากเซลล์ (Bakst, 1980)

5.1.4 ออกซิเจน

ในไก่ เมแทบอลิซึมสามารถเกิดได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

5.1.5 น้ำบริสุทธิ์

น้ำยาเจือจางต้องไม่มีการปนเปื้อนโลหะหนัก และแคลเซียม เนื่องจากมีผลทำให้อะโครโซมเสียสภาพ เกิดการผสมติดต่ำ

5.1.6 ยาปฏิชีวนะ

จุลินทรีย์ที่มักพบในไก่มักมาจากก้นของไก่ ทำให้มีการเสริมยาปฏิชีวนะในน้ำยาเจือจางเพื่อควบคุมปริมาณแบคทีเรีย แต่ก็ส่งผลให้ให้อสุจิเกิดความเป็นพิษได้เช่นเดียวกัน

5.2 การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งจำเป็นต้องมีเทคนิคที่เหมาะสม รวมถึงน้ำยาเจือจางที่ถูกพบว่าสูตรที่มีองค์ประกอบค่อนข้างซับซ้อนมีผลดีมากกว่ามีองค์ประกอบเพียง 2-3 ชนิด อีกสิ่งหนึ่งที่มีผล คือ สารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง (Cryoprotectant)

น้ำยาเจือจางเพื่อการแช่แข็งในสัตว์ปีกมีหลายสูตร ที่มักพบใช้ในประเทศไทย เช่น Beltsville poultry semen extender (BPSE), Egg yolk-Tris (สุนทร และคณะ, 2548), Schramm (ณปภัช และคณะ, 2562) เป็นต้น จากการศึกษางานวิจัยพบว่าน้ำเชื้อแบบแช่แข็งทำให้อัตราการรอดชีวิตของอสุจิภายหลังแช่แข็งลดลงอยู่ที่ 47.20% ในน้ำยาเจือจาง Schramm (ณปภัช และคณะ, 2562) ในส่วนของน้ำยาเจือจาง BPSE มีอัตราการผสมติดและฟักออกอยู่ที่ 44.64 % (สุนทร และคณะ, 2548) และเมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำยาเจือจางหลายๆชนิดพบว่า การใช้น้ำยาสูตร Schramm มีผลทำให้อสุจิมีการเคลื่อนที่อยู่ที่ 46.00% และเคลื่อนที่ไปข้างหน้าอยู่ที่ 22.33% (Tangpakdeewijit et al., 2015) ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลของการเสริมน้ำยาเจือจาง Schramm ในน้ำเชื้อไก่แช่แข็ง

พารามิเตอร์	ผลของการเสริมน้ำยาเจือจาง Schramm (%)	เอกสารอ้างอิง

ร้อยละการเคลื่อนที่รวม	46.00	Tangpakdeewijit et al. (2015)
	54.83	Polsang et al. (2022)
ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า	22.00	Tangpakdeewijit et al. (2015)
	37.17	Polsang et al. (2022)
อัตราการรอดชีวิต	46.67	Tangpakdeewijit et al. (2015)
	63.78	Polsang et al. (2022)

ดัดแปลงมาจาก Tangpakdeewijit et al. (2015); Polsang et al. (2022)

6. ปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อต่อคุณภาพโครงสร้างและหน้าที่ระหว่างการแช่แข็ง

6.1 กระบวนการเมแทบอลิซึม (Metabolism) ของอสุจิ

โดยการเปลี่ยนแหล่งพลังงาน เช่น Fructose, Sorbitol, Glycerophosphocholine (GPC), Plasmalogen และไขมันให้อยู่ในรูป ATP ที่อสุจินำไปใช้ประโยชน์ได้ โดยเฉพาะที่ไมโตคอนเดรีย(Mitochondria) ซึ่งเป็นออแกเนล (Organelle) ในการเปลี่ยนพลังงานที่สำคัญของอสุจิ จาก ATP ไปเป็น ADP และ Pi ในภาวะที่ใช้ออกซิเจน และเปลี่ยนกรดแลคติก (Lactic acid) ในสภาวะไร้ออกซิเจน (Dziekonska et al., 2009) อสุจิเป็นเซลล์ที่แตกต่างจากเซลล์อื่นๆ ในร่างกายที่สามารถเดินทางนำสารพันธุกรรมไปปฏิสนธิกับไข่เพศเมียได้ จึงจำเป็นต้องมีแหล่งพลังงานเพื่อการอยู่รอดและทำหน้าที่จนถึงการปฏิสนธิได้และพลังงานจะใช้มากขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นให้มีการเคลื่อนที่รุนแรงขึ้น (Hyperactivity) นั้น (Granish and Suarez, 2002) สารพลังงานที่นำไปใช้อยู่ในรูป ATP เช่นเดียวกับเซลล์ต่างๆ ของร่างกายมีการเผาผลาญด้วยการไกลโคไลซีส (Glycolysis), วงจรของกรดซิตริก (Citric acid cycle) และออกซิเดทีพฟอสโฟรีเลชั่น (Oxidative phosphorylation) โดย ATP ที่ได้รับมาจาก กระบวนการ Glycolysis เกิดขึ้นใน Cytoplasm มากที่สุด ส่วน Oxidative phosphorylation เกิดขึ้นภายในไมโตคอนเดรีย (Dziekonska et al., 2009) โดยปัจจัยที่มีผลต่อการเมตาโบลิซึม ได้แก่ อุณหภูมิ, ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง, ความดันออสโมซีส, ก๊าซ, ฮอร์โมน, แสง และเทคนิคการแช่แข็ง (Granish and Suarez, 2002)

6.2 ปัจจัยที่มีผลในการทำลายโครงสร้างอสุจิ

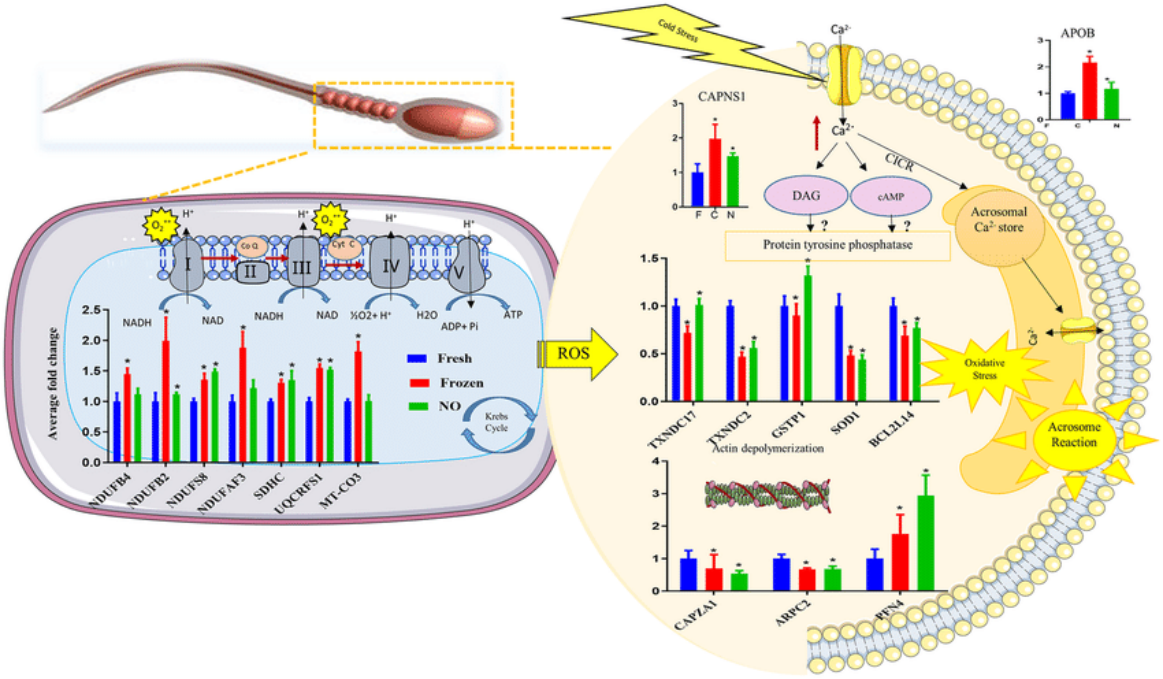
การลดอุณหภูมิในกระบวนการแช่แข็งเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดมีการทำลายโครงสร้างของอสุจิหลายส่วนจากการเกิด Cold shock ทำให้อสุจิได้รับความเสียหาย ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงหากอสุจิได้รับความเสียหายไปแล้ว จะไม่สามารถคืนสภาพกลับมาเคลื่อนที่เช่นเดิมได้ โดยลักษณะความเสียหาย ได้แก่ ส่วนเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มอะโครโซมที่ส่วนหัว,ไมโตรคอนเดรียในส่วน Mid- piece และ Flagellum ในส่วนหางของตัวอสุจิ (Watson, 2000) และลักษณะรูปร่างของอสุจิที่พบบ่อยของสภาวะช็อคจากความเย็น คือการเคลื่อนที่ถอยหลังของอสุจิที่พบลักษณะหางงอ (Bending of tail) หางม้วน (Coiling of tail) โครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของสัตว์หลายชนิดมีสองชั้น

(Lipid bilayer) มีโครงสร้างเป็น Phospholipid ซึ่งช่วยให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความทนทานต่อการแช่แข็ง โดย Phospholipid ประกอบด้วยสัดส่วนของ Phosphatidylcholine, Sphingomyeline และ Phosphatidylethanolamine ทั้งนี้มีความต่างกันในสัตว์แต่ละชนิดโดยลักษณะของ Phosphatidylcholine และ Spingomyeline จะเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกในขณะที่ Phosphotidylethanolamine เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (Cytosolic) การแช่แข็ง เป็นการเปลี่ยนแปลงสถานะจากของเหลวไปเป็นของแข็ง ซึ่งสัมพันธ์กับ ไขมัน โปรตีน และประจุไฟฟ้าบนเยื่อหุ้มเซลล์ สำหรับของเหลวที่มีโครงสร้างเป็นไขมัน หรือ Fatty acyl chain จะใช้เวลาในการเปลี่ยนไขมันไปเป็นของแข็งนานกว่าการเปลี่ยนน้ำไปเป็นของแข็ง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของไขมันแต่ละชนิด ที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ โดยสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนสภาพของ Phospholipid คือการเกิดสภาวะเครียดจากความเย็นหรือการเกิด Cold shock ซึ่งทำให้เกิดการทำงานและความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ผิดปกติไป ซึ่งสังเกตได้จากการเคลื่อนที่ อัตราการรอดชีวิตของอสุจิและการเผาผลาญพลังงานที่ลดลง (Singh et al., 1995) ส่วนองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เป็นโปรตีนจะมีลักษณะที่ขดม้วนอยู่ในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์จะเกิดความผิดปกติจากการแช่แข็งเช่นเดียวกัน เช่น เอนไซม์ (Enzyme), ตัวรับ (Receptor), ช่องของเยื่อหุ้มเซลล์ (Ionic channel) และไกลโคคาลิก (Glycocalyx) ซึ่งเป็นเปลือกนอกที่ห่อหุ้มเยื่อหุ้มเซลล์อีกชั้นหนึ่งซึ่งมีลักษณะเป็นโปรตีนที่อยู่ด้านใดข้างหนึ่งของเยื่อหุ้มเซลล์ (Peripheral protein) ซึ่งปกติมีความคงสภาพและทนทานที่สุด โดย Glycocalyx มีอิทธิพลทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันระหว่างโปรตีนและไขมันโดยเกิดขึ้นในช่วงที่ของเหลวเปลี่ยนแปลงสภาพเป็นเจล นอกจากนี้การแช่แข็งยังทำให้มีความสัมพันธ์กับการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ที่ทำให้อสุจิเกิดกระบวนการ Capacitation และ Acrosome reaction ที่จำเป็นต่อการเกิดการปฏิสนธิซึ่งเป็นสภาวะที่เกิดก่อนเวลาอันควรด้วย และพบการแตกออกของ Acrosome และการทำลายโครงสร้างของ โครมาติน (Chromatin) และ DNA โดยโครงสร้างของโครมาตินที่อัดแน่น (Condensation) ถูกทำลายไปทำให้โครมาตินที่ผิดปกติเพิ่มขึ้น และโครมาตินที่ปกติลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โครงสร้างโครมาตินในอสุจิที่เจริญเต็มที่แล้ว จะมีลักษณะอัดแน่นสูงซึ่งมากกว่าโซมาติกเซลล์ 5-10% ซึ่งเป็นผลมาจากองค์ประกอบของ Nucleoprotein ที่เกิดขึ้นในช่วงที่เปลี่ยนแปลงไปเป็น Spermatid นอกจากนี้ Cysteine ช่วยให้ DNA เกิดการรวมกันที่เสถียรขึ้นซึ่งเป็นการเตรียมตัวของอสุจิในการป้องกันการทำลายโครโมโซมของตัวเอง ในขณะเดินทางเข้าไปสู่ระบบสืบพันธุ์เพศเมีย โดยการลดพื้นที่ผิวของอสุจิที่ลดขนาดของโครมาตินลงให้แน่นขึ้น ซึ่งพ่อพันธุ์ที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำหรือผสมติดต่ำ และโครมาตินเกิดการอัดตัวแน่นมากเกินไป (Over-condensation chomatin) ซึ่งส่งผลให้อสุจิไม่สามารถปฏิสนธิได้

6.3 ผลกระทบจากการแช่แข็งต่อกระบวนการ Capacitation ของอสุจิ

กระบวนการ Capacitation เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในธรรมชาติหลังจากอสุจิเดินทางเข้าสู่ระบบสืบพันธุ์เพศเมีย อสุจิจะเข้าไปสัมผัสกับสารคัดหลั่ง เช่น Albumin และเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่ (Oviductal epithelium cell) ภายในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย ทำให้โดยมีการเปลี่ยนแปลงการ

ทำงานของเซลล์ในระดับโมเลกุล เพื่อเตรียมความพร้อมของตัวอสุจิก่อนการปฏิสนธิกับไข่ (Varner and Johnson, 2007) กลไกการลดลงของ Cholesterol บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ จากการเดินทางและการสัมผัสกับสารคัดหลั่ง และการสัมผัสกับเซลล์เยื่อบุท่อนำไข่นี้ ซึ่งเป็นจุดสำคัญในเกิดการ Capacitation และ Hyperactivation ของอสุจิ ทำให้สัดส่วน Cholesterol ในเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนไป เกิดการรวมกันของเยื่อหุ้มอะโครโซมภายนอกและภายใน และกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ Hyperpolalization โดยการเข้าไปในเซลล์ของ HCO 3 - ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการเมตาโบลิซึมโดยทำให้ HCO 3 - เพิ่มขึ้น (Pommer et al., 2002) และไปกระตุ้น Adenyl cyclase, Proteinkinase A (PKA) ทำให้ Cyclic adenosine mono phosphate (cAMP) เพิ่มขึ้น และเป็นตัวส่งสัญญาณให้แคลเซียมอิออน (Ca 2+) ภายในเซลล์เพิ่มขึ้น Ca 2+ จะไปจับกับแคลโมดูลิน (Calmodulin) ซึ่งการลดลงของแคลโมดูลิน ทำให้ไปกระตุ้นการไหลเข้าของ Ca 2+ ในระหว่างการเกิดกระบวนการ Capacitation นี้มีกลไกการทำงานของ cAMP ที่ถูกกระตุ้นด้วย Angiotensin II ที่พบได้ทุกส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิทั้งบริเวณส่วนหัวจนถึง Flagellum ของตัวอสุจิซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ cAMP อีกทางหนึ่ง (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 ผลกระทบจากการแช่แข็งต่อกระบวนการ Capacitation ของอสุจิ

ที่มา: Hezavehei et al. (2022)

นอกจากนี้มีกระบวนการต่อเนื่องโดยเกิด Acrosome reaction จากการปลดปล่อยเอนไซม์ที่อยู่ใน Acrosome cap ออกมาซึ่งมีประโยชน์ในการเจาะผ่าน ชั้น Cumulus และผ่านเข้าไปในเซลล์ไข่ได้ (Pommer et al., 2002) อย่างไรก็ตามการเกิด Capacitation ของอสุจิที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งจะมีการเหนี่ยวนำให้เกิด Capacitation และการเปลี่ยนแปลงหลายๆ อย่างเช่นเดียวกับที่เกิดในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย ซึ่งรวมถึงการไหลเข้าสู่เซลล์ของแคลเซียมอิออน (Bailey et al., 2000) หากทำการแช่แข็งอสุจิได้ไม่ดีระดับของแคลเซียมที่เข้าสู่ภายในเซลล์จะไม่เหมาะสมทำให้การกลับคืนสู่สภาพของโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์และการเปลี่ยนแปลงระหว่างโปรตีนและไขมันล้มเหลวไป (Cormier et al., 1997; Pommer et al.,2002) ซึ่งการแช่แข็งน่าจะทำให้เกิดการไหลเข้าของแคลเซียมอิออนสู่ภายในเซลล์ซึ่งคล้ายกันกับการเกิด Capacitation และ Acrosome reaction ในธรรมชาติ สภาวะดังกล่าวเรียก Capacitation-like ที่ทำให้เซลล์ Active ขึ้น ซึ่ง Capacitation-like effect หรือ Cryo-capacitation ซึ่งเป็นปัจจัยหลักอย่างหนึ่งที่มีความสำคัญที่ทำให้อสุจิมีอายุสั้นลง ส่งผลให้ความสามารถในการปฏิสนธิในร่างกาย (In vivo fertility) ของอสุจิแช่แข็งลดลง เมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปทำการผสมเทียม

7. สารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง (Cryoprotectant)

สารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง หรือ Cryoprotectant หมายถึง สารบรรเทาความเสียหายแก่ตัวอสุจิจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและแรงดันออสโมติกในการแช่แข็งและทำละลาย ช่วยลดความเสียหายของอสุจิจากผลึกน้ำแข็งที่จุดเยือกแข็ง (Freezing point) ซึ่งเป็นอุณหภูมิวิกฤตที่พบในขณะการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งและการเพิ่มอุณหภูมิขณะทำละลายน้ำเชื้อ (Bathgate et al., 2006) การจำแนกสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งตามลักษณะการซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์มี 2 แบบ คือ แบบที่ซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ไม่ได้และแบบที่ซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้

7.1 Cryoprotectant ประเภทซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์

สารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งแบบซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ (Permeable cryoprotectants) ได้แก่ สารที่เติมลงในน้ำยาเจือจางทำหน้าที่บรรเทาความเสียหายจากการแช่แข็ง ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิได้ โดยมีคุณสมบัติลดความเสียหายของอสุจิจากการเกิดผลึกน้ำแข็งระหว่างการแช่แข็งทั้งภายในและภายนอกเซลล์ โดยทำให้ผลึกน้ำแข็งมีขนาดเล็กลง (Fahy, 1986) สารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งประเภทซึมผ่านเซลล์ ตัวอย่าง เช่น Glycerol, เอทธิลลีนไกลคอล (Ethylene glycol), โพไพลีนไกลคอล (Propyleneglycol), ไดเมทธิลอเซตาไมด์ (Dimethylacetamide: DMA), ไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ (Dimethylsulfoxide: DMSO), และไดเมทธิลฟอร์มาไมด์ (Dimethylformamide: DMF) (Fahy, 1986)

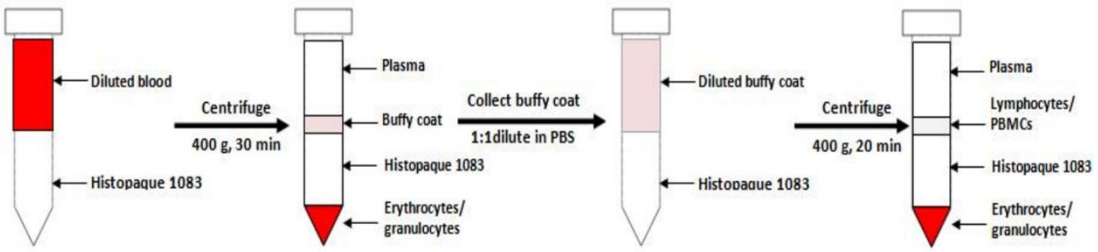
7.2 Cryoprotectant ประเภทไม่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์

เป็นสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ได้แก่ กลุ่มที่เป็นน้ำตาลสำหรับน้ำตาลที่นิยมใช้เป็นองค์ประกอบในน้ำยาเจือจาง โดยมีคุณสมบัติเป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง ที่ไม่สามารถซึมผ่านเซลล์ได้หรือได้น้อยมาก ได้แก่ น้ำตาลในกลุ่มไดแซคคาไรด์ (Disaccharide), โอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharide) และ โพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharide) เช่น ซูโครส (Sucrose) และทีฮาโลส (Thehalose) เป็นต้น โดยน้ำตาลกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการดึงน้ำออกจากเซลล์ ทำให้น้ำในเซลล์ลดลงการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์จึงลดลง อย่างไรก็ตาม บางครั้งน้ำตาล ก็ก่อให้เกิดความเสียหายได้ จากการเกิดการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติกและภาวะการดึงน้ำออกจากเซลล์น้ำมากเกินไป (Dehydration) (Woelders et al., 1997) cryoprotectant ในกลุ่มน้ำตาล หลายชนิด เช่น ซูโครส, แลคโตส (Lactose) ซึ่งเป็นน้ำตาลในกลุ่มไดแซคคาไรด์ รัฟฟิโนส (Raffinose) สตาซีโอส (Stachyose) ซึ่งเป็นน้ำตาลในกลุ่ม โอลิโกแซคคาไรด์ (Woelders et al., 1997) และ Iodixanol® ซึ่งเป็นกลุ่มอนุพันธ์ของซูโครสเรียกว่าโพลีซูโครส (Polysucrose) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม โพลีแซคคาไรด์ (Polysaccharide) (Saragusty et al., 2009)

7.2.1 สารในกลุ่ม Polysaccharide

Polysaccharide หรือ Carbohydrate-polymer ซึ่งหมายถึง สารที่ประกอบไปด้วย Monosaccharide ตั้งแต่ 10 หน่วยขึ้นไปในโมเลกุล เช่น Starch, Glycogen, Cellulose และ Sucrose polymer เป็นต้น นอกจากนี้มีการนำสารในกลุ่ม Polysucrose หรือกลุ่ม Sucrose polymer โดยสารในกลุ่มนี้มีอยู่ด้วยกันหลายชนิด เช่น Ficoll®หรือ Dermacoll®, Irane Ficoll®, Histopaque® และ Iodixanol® เป็นต้น สารในกลุ่ม Polysucrose ที่นำมาใช้เติมลงในน้ำยาเจือจางเพื่อวัตถุประสงค์ ในการเป็นป้องกันความเสียหายต่อเซลล์อสุจิในงานวิจัยนี้ คือ Histopaque®

Histopaque® เป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็น Non-ionic, Iso-osmotic, Non-toxic และสารที่ละลายน้ำได้ โดยส่วนใหญ่มักใช้ทางการแพทย์สำหรับเป็นสารละลายในการแยกความหนาแน่นของเซลล์ (ภาพที่ 12) เพื่อช่วยลดการเกิดกระบวนการ Reactive oxygen species (ROS) ในกระบวนการ Osmotic shock (Halliday et al. 2005)



ภาพที่ 12 การใช้ Histoplaque® แยกเซลล์เม็ดเลือด
ที่มา: Tang, Y. (2016)

8. การผสมเทียมในสัตว์ปีก

การผสมเทียม (Artificial insemination) เป็นวิธีการผสมพันธุ์โดยการรีดน้ำเชื้อจากสัตว์เพศผู้ไปผสมกับสัตว์เพศเมีย ไอแวนนอฟ (Ivanov) เป็นชาวรัสเซียคนแรก ที่ได้ทดลองผสมเทียมในสัตว์ปีกสำเร็จครั้งแรกในปี 1902 ในส่วนของ Quinn และ Burrows เป็นผู้ริเริ่มคิดค้นวิธีการรีดน้ำเชื้อไก่โดยวิธีการนวดช่องท้อง (Abdominal massage) ที่มีผู้รีดน้ำเชื้อจำนวน 2 คน คือผู้รีดน้ำเชื้อและผู้จับไก่ ซึ่งปกติแล้วน้ำเชื้อไก่ไม่สามารถอยู่ภายนอกได้นาน ถ้าต้องการเก็บรักษาไว้จึงต้องนำไปทำการแช่แข็งก่อนจะนำไปผสมเทียม ในส่วนของแม่ไก่ที่นำมาผสม จะต้องตรวจดูก่อนว่า แม่ไก่อยู่ในระยะให้ไข่หรือไม่ ซึ่งข้อดีของการผสมเทียมคือ เป็นวิธีที่สามารถนำไปใช้ปฏิบัติได้ง่ายและได้ผลดี สามารถเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่ต้องการได้ ทำให้สามารถลดจำนวนพ่อไก่พันธุ์ในฟาร์มลงได้โดยจะเลี้ยงเฉพาะไก่ที่ได้รับการคัดเลือกทำให้ลดต้นทุนการผลิตลง เช่นเดียวกับแม่ไก่ที่ได้ทำการคัดเลือกมาแล้วเช่นกัน นอกจากนี้ยังสามารถแก้ไขปัญหาการผสมติดที่เกิดจากสาเหตุ เช่น ไก่เพศผู้มีขนาดใหญ่กว่าเพศเมีย หรือพ่อไก่ที่คัดเลือกมาแล้วมีอาการเจ็บขาทำให้ไม่สามารถผสมกับแม่พันธุ์ได้ ก็สามารถใช้การผสมเทียมเข้ามาช่วยเพื่อลดปัญหาที่เกิดเกิดจากประสิทธิภาพทางการสืบพันธุ์

ปัจจัยปัจจัยที่มีผลต่อการผสมติดมีหลายประการ ได้แก่ อายุและสายพันธุ์ไก่ อัตราการผสมติดจะลดลงเมื่อไก่มีอายุมากขึ้น ในส่วนของอาหารถ้ายิ่งมีการเสริมวิตามินอีจะทำให้ระบบสืบพันธุ์สมบูรณ์มากขึ้น สภาวะเครียด เช่น อากาศ การขัง มีผลทำให้อัตราการผสมติดลดลง อัตราไข่ แม่ไก่ที่ให้ไข่ดกมักมีอัตราการผสมติดที่สูง นอกจากนี้ผู้ทำการผสมเทียมก็เป็นอีกปัจจัยสำคัญที่ทำให้ผสมติด

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย
การทดลองที่ 1 การคัดเลือกน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ไก่พันธุ์พื้นเมืองไทย

1. การจัดการสัตว์ทดลอง

ใช้ไก่พื้นเมืองไทยเพศผู้ อายุไม่เกิน 3 ปี จำนวน 16 ตัว และไก่ไข่เพศเมียจำนวน อายุไม่เกิน 1 ปี 30 ตัว ที่ปราศจากโรคทางระบบสืบพันธุ์ โดยทำการเลี้ยงที่ฟาร์มคณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากรวิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี ไก่จะได้รับการกินอาหารและน้ำอย่างเต็มที่ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม มีการทำวัคซีนรวมนิวคลาสเซิล หลอดลมอักเสบ และอหิวาต์ในเป็ด-ไก่ ถ่ายพยาธิภายนอก ไก่พ่อพันธุ์ได้รับการเลี้ยงภายในกรงขังเดี่ยวขนาด 60x60x70 เซนติเมตร (กว้างxยาวxสูง) ได้รับอาหารปริมาณ 130 กรัม/ตัว/วัน ซึ่งมีโปรตีน 16% มีการให้น้ำและอาหารอย่างเต็มที่ (*ad libitum*) ไก่จะผ่านการฝึกรีดน้ำเชื้อ 1 สัปดาห์ โดยเก็บน้ำเชื้อที่รีดจากพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองจำนวน 16 ตัว นำน้ำเชื้อที่มีร้อยละของการเคลื่อนที่มากกว่า 80% อัตราการมีชีวิตรอดของอสุจิไม่น้อยกว่า 80% มารวมกัน (Pooled semen) จากการรีดน้ำเชื้อสัปดาห์ละ 2 ครั้ง โดยวิธีของ Burrows และ Quinn (1937) ไก่แม่พันธุ์ใช้ไก่ไข่โดยให้น้ำสะอาด มีให้ไก่กินตลอดเวลา และให้อาหารที่มีเปอร์เซ็นต์โปรตีน 17-18% ให้กินอาหารวันละ 100-120 กรัมต่อตัวต่อวัน มีการทำวัคซีนป้องกันโรค

การศึกษาระดับและชนิดของสารกลุ่ม Polysucrose ที่เสริมในน้ำยาเจือจาง ในด้านผลการประเมินและลักษณะทางกายภาพ ร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่ ร้อยละการเคลื่อนที่รวม ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการรอดชีวิต อัตราการผสมติด และอัตราการฟัก ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่พันธุ์พื้นเมืองไทย จัดเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้

น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Schramm (v/v)

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (Control groups) น้ำยาเจือจาง Schramm

กลุ่มที่ 2 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®1.25%)

กลุ่มที่ 3 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®2.5%)

กลุ่มที่ 4 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®5%)

กลุ่มที่ 5 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®10%)

กลุ่มที่ 6 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®20%)

2. แผนการทดลอง

ทำการแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองด้วยกระบวนการสุ่ม และนำข้อมูลมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance: ANOVA) ร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่ ร้อยละการเคลื่อนที่รวม ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการรอดชีวิต อัตราการผสมติด และอัตราการฟัก จะวิเคราะห์ตามรูปแบบของการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) และเปรียบเทียบความ

แตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's new multiple rang test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม R

3. การเตรียมพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองก่อนการรีดเก็บน้ำเชื้อ (วรวิทย์, 2531)

ใช้ไก่พ่อพันธุ์ที่โตเต็มที่แล้วมีสุขภาพดีและมีลักษณะตรงตามพันธุ์ ก่อนนำมารีดนำเชื้อควรนำไก่เพศผู้แยกออกจากฝูงไก่ตัวเมีย อย่างน้อย 24 ชั่วโมง และกำจัดตัวเบียนภายนอก หลังจากนั้นทำการถอนขนรอบทวารร่วม เพื่อให้ง่ายต่อการรีดน้ำเชื้อ และไก่ที่นำมาควรจะได้รับการฝึกฝนการรีดน้ำเชื้อมาแล้วเพื่อให้เชื่องและไม่ตื่นตกใจง่าย ในสัตว์ปีกสามารถรีดน้ำเชื้อได้ทุก ๆ 2-4 วัน/ครั้ง และที่สำคัญควรเลี้ยงพ่อพันธุ์ไก่ในกรงขังเดี่ยว เพราะถ้าขังพ่อพันธุ์ไก่ไว้ 2 ตัว ในกรงเดียวกันจะให้ผลผลิตน้ำเชื้อต่ำ ซึ่งสอดคล้องกับ วิโรจน์ (2537) กล่าวว่า ถ้าเอาไก่พ่อพันธุ์เพศผู้แยกออกขังเดี่ยวๆ ในกรงจะทำให้การสร้างน้ำเชื้อได้มากที่สุดและถ้าขังไก่พ่อพันธุ์เพศผู้ 2 ตัว รวมกันในกรงจะทำให้การสร้างน้ำเชื้อเกิดขึ้นน้อยและ ควรทำการขังไก่พ่อพันธุ์ไว้ ในกรงขังเดี่ยว (Ashizawa et al., 1998; Blesbois et al., 1999)

4. การเตรียมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง

เตรียมสารละลายเจือจาง Schramm ปริมาตร 50 mL. ที่ประกอบด้วยสาร Magnesium acetate 0.0350 กรัม, โซเดียมกลูตาเมต (Sodium glutamate) 1.4250 กรัม, โพแทสเซียมอะซิเตต (Potassium acetate) 0.2500 กรัม, กลูโคลส (Glucose) 0.2500 กรัม และ อิโนซิทอล (Inositol) 0.1250 กรัม ในอัตราส่วนอสุจิต่อน้ำยาเจือจาง 1:2 และใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ในกลุ่ม Polysucrose ที่ระดับความเข้มข้น 1.25%, 2.5%, 5%, 10% และ 20% ลงในน้ำยาเจือจาง Schramm ซึ่งค่าออสโมลาลิตี้ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์ปีกจะอยู่ในช่วงระหว่าง 250-460 mOsm kg^{-1} (Siudzinska and Lukaszewicz, 2008)

5. การรีดเก็บน้ำเชื้อและขั้นตอนการทำน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยวิธีอังไอไนโตรเจนเหลว

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้พ่อพันธุ์ไก่พื้นเมือง จากฟาร์มคณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากรวิทยาเขตสารสนเทศเพชรบุรี ที่มีอายุไม่เกิน 3 ปี จำนวน 16 ตัว ทำการรีดน้ำเชื้อสัปดาห์ละ 2 ครั้ง ตามวิธีของ Burrows และ Quinn (1937) โดยการรีดน้ำเชื้อจะมีผู้รีด 2 คน คือ คนอุ้มไก่จะกระชับพ่อไก่ไว้ที่เอวยื่นหางไก่ออกข้างหน้า หัวไก่อยู่ด้านหลังของคนอุ้ม มือหนึ่งจะจับขาไก่ทั้ง 2 ข้างรวบเข้าหากัน โดยใช้นิ้วชี้และนิ้วกลางอยู่ระหว่างขาทั้งสอง แล้วใช้มืออีกข้างหนึ่งลูบหลังพ่อไก่เบา ๆ จากโคนปีกผ่านมาที่หลังและโคนหาง จากนั้นใช้นิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้บีบกระตุ้นอย่างรวดเร็วที่โคนหาง ไก่จะแสดงปฏิกิริยากระดกหางขึ้น พร้อมกับดันอวัยวะเพศ (รูปร่างเป็นลอนคู่ปลายแหลมยื่นออกมาจากรูทวาร) ซึ่งอวัยวะดังกล่าวเป็นที่เก็บน้ำเชื้อและฉีดน้ำเชื้อ คนรีดอีกคนหนึ่งจะใช้ภาชนะที่สะอาดรองรับน้ำเชื้อที่ไหลออกมา ข้อควรระวัง ก่อนรีดน้ำเชื้อจะต้องทำความสะอาดบริเวณทวารด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำสะอาด และใช้กระดาษทิชชูซับ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากน้ำ และอุจจาระ ซึ่งน้ำเชื้อที่นำมาทำการเก็บรักษาจะต้องไม่ปนเปื้อนจากสิ่งดังกล่าว และจะทำการประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิของพ่อไก่พื้นเมืองสายพันธุ์เขียวห้วยทรายเป็นรายตัว โดย

น้ำเชื้อที่จะนำมาศึกษานั้นจะต้องมีอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ 80% ขึ้นไป จากนั้นนำน้ำเชื้อที่รีดได้มาผสมรวมกันก่อนนำไปศึกษาต่อไป

5.1 ขั้นตอนการทำน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยวิธีอังไอไนโตรเจนเหลว

ใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำเชื้อปริมาตร 490 ไมโครลิตร ใส่หลอดแช่แข็ง (French straw ขนาด 500 ไมโครลิตร) จากนั้นปิดหลอดแช่แข็งโดยใช้ผงอุด Polyvinyl alcohol (PVA) ซึ่งหลังจากการเติมสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งจะเริ่มจับเวลาจนถึงการนำหลอดน้ำเชื้อวางลงในตระแกรงที่วาง อยู่เหนือไนโตรเจนเหลว โดยใช้เวลาประมาณ 15 นาที

เตรียมอุปกรณ์อังไอไนโตรเจนเหลวโดยการบรรจุไนโตรเจนเหลวสูง 8 เซนติเมตร ลงในกล่องโฟมขนาด 28×38 ×29 เซนติเมตร จากนั้นนำตะแกรงวางเหนือไนโตรเจนเหลวที่ระดับ 11 เซนติเมตร นำ Straws วางลงบนตะแกรงและจับเวลา โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับเหนือไอไนโตรเจนเหลว 11 เซนติเมตร (12 นาที) และที่ระดับเหนือไอไนโตรเจนเหลว 3 เซนติเมตร (5 นาที) จากนั้นจุ่มตระแกรงที่มีตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งลงในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) และเก็บตัวอย่างลงในถังเก็บน้ำเชื้อ (-196 องศาเซลเซียส) (เทวินทร์ และยุพิน, 2550) เพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อและรอการทดสอบหาอัตราการเคลื่อนที่รวม ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความสมบูรณ์ของอะโครโซม การทำงานของไมโตคอนเดรีย และอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแช่แข็งต่อไป

6. วิธีประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

6.1 ประเมินจากลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ

สังเกตทันทีภายหลังจากการรีดน้ำเชื้อ โดยดูสี ความเข้มข้น และสิ่งเจือปน เช่น อุจจาระ ปัสสาวะ และของเสียอื่นๆ โดยน้ำเชื้อที่จะนำมาศึกษาต้องปราศจากสิ่งปนเปื้อน (อุจจาระ ปัสสาวะ)

6.2 การประเมินร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่และร้อยละการเคลื่อนที่รวม

การประเมินร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่ (Vigor score 0-5) และร้อยละการเคลื่อนที่รวม (Total motility, %) โดยใช้บุคคลเดียวกันในการประเมิน ซึ่งจะหยดน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ทั้ง 16 ตัว บนสไลด์ที่สะอาด อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปิด cover slip และสังเกตการเคลื่อนที่ผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบประมาณการ ทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งในน้ำอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และตัดหลอดบรรจุน้ำเชื้อทั้งสองด้าน ก่อนจะบรรจุน้ำเชื้อไว้ใน Micro tube และใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่างน้ำเชื้อในแต่กลุ่มการทดลองจำนวน 10 ไมโครลิตร ลงบน Slide และปิด Cover slip และสังเกตการเคลื่อนที่ผ่านกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100 เท่า นับจำนวนอสุจิอย่างน้อย 300 ตัว บันทึกผลและคำนวณเป็นร้อยละ (Bloom, 1973)

6.3 การประเมินร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า

การประเมินการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า ปฏิบัติโดยใช้บุคคลเดียวกันตลอดการศึกษา นำน้ำเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส จำนวน 10 ไมโครลิตร มาหยดบนสไลด์ที่สะอาดที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปิด Cover slip และสังเกตการเคลื่อนที่ผ่านกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย

40 และ 100 เท่า นับจำนวนอสุจิอย่างน้อย 300 ตัว บันทึกผล และคำนวณเป็นร้อยละการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้า (Bloom, 1973)

6.4 การประเมินอัตราการมีชีวิตรอดด้วยการย้อมสี

การศึกษาอัตราการมีชีวิตใช้เทคนิคการย้อมสีด้วย Eosin และ Nigrosin โดยชั่ง Eosin B1 กรัม, Nigrosin 5 กรัม และ Sodium citrate dehydrate 1.5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ และเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร โดยให้ความร้อนขณะเตรียมสาร เพราะสารจะไม่ละลาย เมื่อสารละลายเข้ากันดีแล้วนำไปกรอง จนไม่มีตะกอนเหลืออยู่ แล้วนำสีย้อมที่ได้เก็บไว้ในขวดสีชาโดยเก็บที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นทำการหยดสี Eosin-Nigrosin ลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด (5 ไมโครลิตร) แล้วหยดน้ำเชื้อตัวอย่างข้าง ๆ สีย้อมประมาณ 1 ไมโครลิตร แล้วใช้เข็มเขี่ยคนน้ำเชื้อกับสีย้อมให้เข้ากัน จากนั้นใช้แผ่นสไลด์อีกแผ่นหนึ่งเกลี่ยน้ำเชื้อให้กระจายบาง ๆ โดยเกลี่ยเพียงครั้งเดียว และนำแผ่นสไลด์ที่ Smear แล้ว ผึ่งให้แห้งในอุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นหยดน้ำยาทาเล็บลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด แล้วปิดด้วย Cover slide นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100 เท่า และนับจำนวนเซลล์ตัวเป็นและตัวตายโดยการสุ่มนับ 5 บริเวณ ๆ ละ 20 เซลล์โดยที่เซลล์ ตัวเป็นจะมีลักษณะสีขาวไม่ติดสีย้อม ส่วนตัวตายจะติดสีย้อมเป็นสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้ม (Bloom, 1973)

7. การศึกษาอัตราการผสมติด

การศึกษาอัตราการผสมติดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองแบบแช่แข็ง เป็นการศึกษาในภาคสนาม โดยใช้แม่ไก่ไข่ อายุไม่เกิน 1 ปี จำนวน 30 ตัว ซึ่งจะทำการผสมเทียม 2 ครั้ง นาน 1 สัปดาห์ (มงคล และคณะ, 2013) โดยทำการละลายน้ำเชื้อ (Thawed) ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ซับหลอดให้แห้งแล้วตัดปลายเพื่อถ่ายน้ำเชื้อลงในหลอดรับน้ำเชื้อที่สะอาดและแช่อยู่ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส จากนั้นใช้ไซริ้งค์บรรจุน้ำเชื้อปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร สอดเข้าช่องคลอดลึกประมาณ 4 เซนติเมตร และจะเริ่มทำการเก็บไข่ภายหลังจากการผสมเทียม 1 วันต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์ โดยจะทำการเก็บไข่ทุกวันในช่วงบ่ายและนำไข่เข้าฟักทุก ๆ 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ซึ่งถาดไข่จะวางเอียงทำมุม 45 องศา และมีการกลับไข่ทุกๆ 1 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบการผสมติดโดยการส่องไข่ที่อายุฟัก 10 วัน แล้วนำจำนวนไข่ที่ผสมติดมาคำนวณหาอัตราการผสมติด

ในส่วนของการฟัก จะทำการเก็บไข่ทุกวันในช่วงบ่ายและนำไข่เข้าฟักทุก ๆ 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ถาดไข่วางเอียงทำมุม 45 องศา และมีการกลับไข่ทุกๆ 1 ชั่วโมง ก่อนนำเข้าฟัก ตู้ฟักไข่ต้องได้รับการรมควันโดยใช้ด่างทับทิม 1 กรัม ต่อ ด่างทับทิม 2 ซีซี ทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อฆ่าเชื้อ จากนั้นตรวจสอบการผสมติดโดยการส่องไข่ที่อายุฟัก 10 วัน และนำจำนวนไข่ที่ผสมติดมาคำนวณหาอัตราการผสมติด

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของการเสริม Histopaque® ในแต่ละระดับ ต่อร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่ ร้อยละการเคลื่อนที่รวม ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการรอดชีวิต ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พันธุ์พื้นเมืองไทย

การศึกษานี้ เป็นการประเมินคุณลักษณะ ร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่ ร้อยละการเคลื่อนที่แบบรวม ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และอัตราการรอดชีวิตในน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พันธุ์พื้นเมืองที่ถูกแช่แข็งด้วยน้ำยาเจือจาง Schramm ที่เสริมสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง DMF6% และได้ทำการหาปริมาณที่เหมาะสมต่อการเป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งของ Histoplaque ที่ 6 ระดับ ดังนี้ กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (Control groups) น้ำยาเจือจาง Schramm+DMF6% กลุ่มที่ 2 น้ำยาเจือจาง Schramm+ DMF6%+Histopaque® 1.25% กลุ่มที่ 3 น้ำยาเจือจาง Schramm+ DMF6% + Histopaque® 2.5% กลุ่มที่ 4 น้ำยาเจือจาง Schramm+DMF6% + Histopaque® 5% กลุ่มที่ 5 น้ำยาเจือจาง Schramm+DMF6% + Histopaque® 10% กลุ่มที่ 6 น้ำยาเจือจาง Schramm+ DMF6%+Histopaque® 20% ก่อนและหลังการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ก่อนการแช่แข็งน้ำเชื้อ ร้อยละการเคลื่อนที่รวมมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) โดยจากการทดลองเสริมสารกลุ่มโพลีซูโครส (Histoplaque) ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Schramm+DMF 6% พบว่า กลุ่มควบคุม (Control groups) มีค่าเท่ากับ 87.5, กลุ่มที่ 2 (Histopaque® 1.25%) มีค่าเท่ากับ 88.33, กลุ่มที่ 3 (Histopaque® 2.5%) มีค่าเท่ากับ 85.83, กลุ่มที่ 4 (Histopaque® 5%) มีค่าเท่ากับ 83.33, กลุ่มที่ 5 (Histopaque® 10%) มีค่าเท่ากับ 80 และ กลุ่มที่ 6 (Histopaque® 20%) มีค่าเท่ากับ 80.83 ตามลำดับ

1. ผลของการเสริม Histopaque® ในแต่ละระดับ ต่อร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่ ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พันธุ์พื้นเมืองไทย

ค่าเฉลี่ยของการเคลื่อนที่แบบหมู่ภายหลังการแช่แข็ง มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) โดยจากการทดลองเสริมสารกลุ่มโพลีซูโครส (Histopaque®) ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Schramm+DMF 6% พบว่า กลุ่มที่ 2 (Histopaque® 1.25%) และ กลุ่มที่ 3 (Histopaque® 2.5%) มีร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่สูงที่สุด คะแนนอยู่ที่ 3, กลุ่มควบคุม (Control groups) มีคะแนน 2.67 กลุ่มที่ 4 (Histopaque® 5%) มีคะแนน 2.67 กลุ่มที่ 5 (Histopaque® 10%) มีคะแนน 2.5 และ กลุ่มที่ 6 (Histopaque® 20%) มีคะแนน 2.33 ตามลำดับ

2. **ผลของการเสริม** Histopaque® **ในแต่ละระดับ ต่อร้อยละการเคลื่อนที่รวม ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พันธุ์พื้นเมืองไทย**

ค่าเฉลี่ยร้อยละการเคลื่อนที่รวมภายหลังการแช่แข็ง มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($p<0.01$) โดยจากการทดลองเสริมสารกลุ่มโพลีซูโครส (Histopaque®) ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Schramm+DMF 6% พบว่า กลุ่มที่ 2 (Histopaque® 1.25%) และ กลุ่มที่ 3 (Histopaque® 2.5%) มีร้อยละการเคลื่อนที่รวมสูงที่สุด 53.53 และ 52.11 ตามลำดับ กลุ่มควบคุม (Control groups) มีค่าเท่ากับ 48.95 กลุ่มที่ 4 (Histopaque® 5%) มีค่าเท่ากับ 48.38 กลุ่มที่ 5 (Histopaque® 10%) มีค่าเท่ากับ 45.10 และ กลุ่มที่ 6 (Histopaque® 20%) มีค่าเท่ากับ 32.00 (ภาพที่ 13) ตามลำดับ

3. **ผลของการเสริม** Histopaque® **ในแต่ละระดับ ต่อร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พันธุ์พื้นเมืองไทย**

ในการประเมินร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของน้ำเชื่อไก่พันธุ์พื้นเมืองไทยพบว่า กลุ่มที่ 2 (Histopaque® 1.25%) สูงกว่ากลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง มีค่า 35.90 กลุ่มที่ 3 (Histopaque® 2.5%) มีค่าเท่ากับ 33.36 กลุ่มที่ 4 (Histopaque® 5%) มีค่าเท่ากับ 31.33, กลุ่มควบคุม (Control groups) มีค่าเท่ากับ 30.76 กลุ่มที่ 5 (Histopaque® 10%) มีค่าเท่ากับ 28.57 และ กลุ่มที่ 6 (ภาพที่ 14) (Histopaque® 20%) มีค่าเท่ากับ 20.14 ตามลำดับ 2009)

4. **ผลของการเสริม** Histopaque® **ในแต่ละระดับ ต่ออัตราการรอดชีวิต ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พันธุ์พื้นเมืองไทย**

การศึกษาอัตราการรอดชีวิตด้วยการย้อมสี Eosin-Nigrosin พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทาง ($p<0.01$) โดยจากการเสริมของกลุ่มที่ 2 (Histopaque® 1.25%) และ กลุ่มที่ 3 (Histopaque® 2.5%) พบว่ามีร้อยละการรอดชีวิตสูงที่สุดอยู่ที่ 52.24 และ 51.37 ตามลำดับ, กลุ่มที่ 4 (Histopaque® 5%) มีค่าเท่ากับ 48.00, กลุ่มควบคุม(Control groups) มีค่าเท่ากับ 47.24, กลุ่มที่ 5 (Histopaque® 10%) มีค่าเท่ากับ 45.86 และ กลุ่มที่ 6 (Histopaque® 20%) มีค่าเท่ากับ 31.86 (ภาพที่ 15) ตามลำดับ ดังแสดงตามตารางที่ 1

ซึ่งเมื่อเทียบกับงานวิจัยที่ทำน้ำเชื้อแช่แข็งไก่ด้วยน้ำยาเจือจาง Schramm และ DMF6% พบว่าน้ำเชื้อแบบแช่แข็งทำให้อัตราการรอดชีวิตของอสุจิภายหลังแช่แข็งลดลงอยู่ที่ 47.20% (ณปภัช และคณะ (2562) มีผลทำให้อสุจิมีร้อยละการเคลื่อนที่รวม 46.00% และร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าอยู่ที่ 22.33% (Tangpakdeewijit et al., 2015) และในรายงานของ Thananurak et al. (2017) พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ 49.98% และร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าอยู่ที่ 28% ทำให้เห็นว่าการเสริม Histopaque® เพื่อช่วยเป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งทำให้ความสมบูรณ์ของอสุจิดีขึ้น

การใช้สารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งด้วย Histopaque® ที่มีการศึกษาพบว่าเปอร์เซ็นต์ที่เหมาะสมในการเสริม Histopaque® สำหรับเป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งในน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พันธุ์พื้นเมือง คือ 1.25% และ 2.5% ซึ่งสอดคล้องกับ พิรวิทย์ (2560) รายงานว่า การเสริม Histopaque® 1.25% ในน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของโคหลังทำละลาย มีร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิสูงที่สุด อยู่ที่ 53.78% และร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าอยู่ที่ 33.78% เมื่อเทียบกับเปอร์เซ็นต์อื่นๆ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาการเสริมกลุ่มโพลีซูโครส คือ Ficoll® และ Iodixanol® ในน้ำเชื้อแช่แข็งโค พบว่าการเสริม Iodixanol® ที่ 2.5% ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคดีที่สุด โดยมีร้อยละการเคลื่อนที่รวม 54.72% ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า 34.06% ในส่วนของการเสริม Ficoll® พบว่าการเสริมที่ 1.25% ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคดีที่สุด มีร้อยละการเคลื่อนที่รวม 53.00 และร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า 32.17 ซึ่งแตกต่างกับ Di Iorio et al. (2020) ได้ศึกษาการเสริม Ficoll® ในน้ำเชื้อแช่แข็งไก่งวง Dilution rate ที่ 1:2 และ 1:4 พบว่าการเสริม Ficoll® ที่ระดับ 1 mM ที่อัตราส่วน 1:4 สามารถทำให้อสุจิ ภายหลังการแช่แข็งทำให้อสุจิมีร้อยละการเคลื่อนที่รวมมากที่สุดอยู่ที่ 32.6% นอกจากนี้ รายงานของ Miranda et al. (2017) ได้ทำการศึกษาการเสริม Ficoll® ในน้ำเชื้อแช่แข็งไก่ Ross PM3 พบว่า การเสริม Ficoll® ปริมาณ 0.75 mol/L ร่วมกับ Ethylene glycol ส่งผลให้การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิดีที่สุดและมีการทำลายของเซลล์น้อยที่สุด Kulikova et al. (2014) ศึกษาการเสริม Ficoll 70® ในกระต่ายพบว่าที่ความเข้มข้น 4% มีความสมบูรณืของอสุจิมากที่สุด อัตราการเคลื่อนที่มากที่สุดอยู่ที่ 60.17% นอกจากนี้ มีการศึกษาในการนำ Ficoll 400® มาใช้เป็นสารละลายสำหรับเทคนิคการเตรียมอสุจิ พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่สูง และมีสัณฐานวิทยาปกติที่สุดเมื่อเทียบกับการใช้สารตัวอื่นเพื่อเป็นสารละลายสำหรับแยกเซลล์ (Highland, 2016)

ซึ่งจากการศึกษาพบว่ากลุ่มที่มีการเสริมสารกลุ่มโพลีซูโครส รวมถึง Histopaque® มีร้อยละการเคลื่อนที่หมู่ ร้อยละการเคลื่นที่รวม ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการรอดชีวิตมากกว่าในกลุ่มที่ไม่ได้เสริม ผลอาจเนื่องมาจากคุณสมบัติของน้ำตาลในกลุ่มโพลีซูโครส เช่น Histopaque® , Ficoll®, Polysucrose 400® ถูกพบว่ามีคุณสมบัติในการดึงน้ำออกจากเซลล์ ทำให้น้ำในเซลล์ลดลงและเกิดการแยกความหนาแน่นของเซลล์ น้ำตาลในกลุ่มนี้จะทำหน้าที่รักษาสมดุลของความดันสารละลายโดยมีบทบาทแทนพวก Electrolyte ที่ไม่สามารถผ่านเข้าออกเซลล์ได้ในขณะแช่แข็ง จากคุณสมบัติด้านต้นจึงช่วยรักษาสภาพความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ นอกจากนี้ยังป้องกันการทำลายเซลล์จากกระบวนการแช่แข็งโดยอาจจะซึมเข้าไปในเซลล์เพื่อลดการเกิดผลึกน้ำแข็ง หรือห่อหุ้มพื้นผิวของเซลล์อสุจิทำให้ลดการเกิดผลึกน้ำแข็งระหว่างเซลล์อสุจิกับน้ำยาเจือจางที่อยู่ภายนอก หรือมีบทบาทซึมเข้าเซลล์ช่วยลดการเกิดผลึกขณะทำละลาย (Saragusty et al., 2009) ทำให้อสุจิถูกทำลายในช่วงแช่แข็งและทำละลายน้อยลง จึงมีคุณภาพที่ดีขึ้น

Histopaque® เป็นสารกลุ่มโพลีซูโครสที่ถูกใช้ในการศึกษานี้ มักพบว่า Histopaque® ถูกนำไปใช้ทางการแพทย์เพื่อแยกความหนาแน่นของเซลล์เม็ดเลือด เพื่อช่วยลดการเกิดกระบวนการ

Reactive oxygen species (ROS) ในกระบวนการ Osmotic shock โดยแยก Mononuclear cell จากเลือด โดยการปั่นแยก ซึ่งสามารถแยกเซลล์ด้วยการอาศัยความจำเพาะของเซลล์ที่แตกต่างกัน เพื่อศึกษา Cell-mediated Lympholysis, HLA typing และศึกษา T-cell, B-cell and null lymphocytes เป็นต้น (Halliday et al. 2005)

จากรายงานวิจัยและการศึกษาการเสริมสารกลุ่มโพลีซูโครสเพื่อใช้เป็นสารป้องกันความเสียจากการแช่แข็งพบว่า ปริมาณสารแต่ละชนิดที่ใช้เสริมเพื่อให้อสุจิมีความสมบูรณ์พันธุ์หลังการแช่แข็งได้ดีที่สุดมีค่าแตกต่างกัน ถึงแม้ว่าจะเป็นสารที่อยู่กลุ่มเดียวกันแต่เนื่องจากมีความต่างชนิดกัน ซึ่งอาจจะมีกลไกลจำเพาะของสารแต่ละตัวที่ทำให้มีความสามารถในการป้องกันความเสียหายของอสุจิแตกต่างกัน นอกจากนี้ชนิดของสัตว์ก็อาจจะมีผลต่อปริมาณการเสริมสารป้องกันความเสียหายที่เหมาะสม เนื่องจากสายพันธุ์ สถานที่เลี้ยง รวมถึงขนาดที่แตกต่างกัน

อย่างไรก็ตาม การเสริมสารกลุ่มโพลีซูโครสในปริมาณที่เหมาะสมต่อชนิดสัตว์ จะช่วยป้องกันอสุจิภายหลังการแช่แข็งได้ดีที่สุด เนื่องจากการเสริมปริมาณที่เหมาะสมจะทำให้เกิดความเป็นพิษต่ออสุจิน้อยที่สุด ถ้าเสริมในปริมาณที่ไม่เหมาะสมจะทำให้น้ำตาลเกิดการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติก ทำให้อสุจิเกิดความเครียด เกิดภาวะช็อค และเกิดภาวการณ์ดึงน้ำออกจากเซลล์มากเกินไป (Dehydration) (Woelders et al., 1997) ทำให้อสุจิได้รับความเสียหายในที่สุด

มหาวิทยาลัยศิลปากร

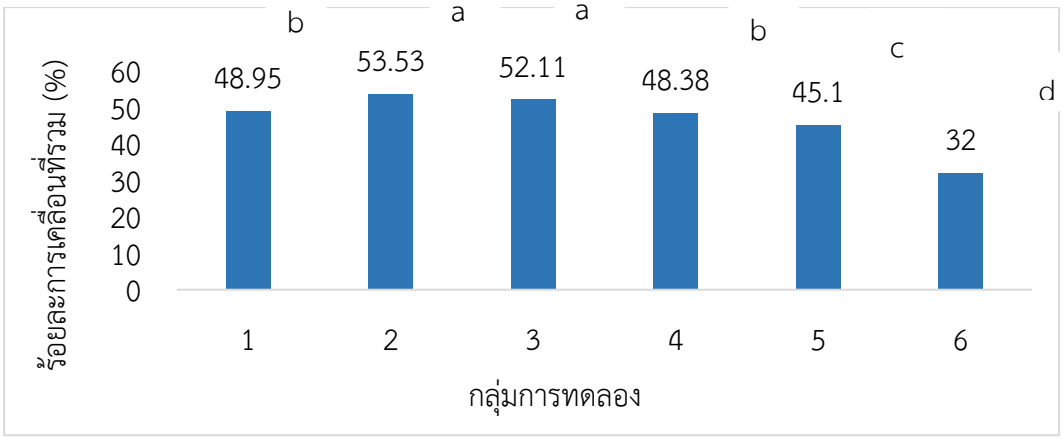
ตารางที่ 2 ผลของการเสริม Histopaque® ที่ 6 ระดับ ต่อค่าเฉลี่ยของร้อยละการเคลื่อนที่รวม ก่อนและหลังแช่แข็ง ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และร้อยละอัตราการรอดชีวิตด้วยการย้อมสีหลังแช่แข็ง ของน้ำเชื้อไก่พื้นเมือง

หมายเหตุ : ^{a,b,c,d} ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันที่อักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (<0.01)

พารามิเตอร์	ระดับการเสริม Histoplaque ในน้ำยาเจือจาง						SEM	p-value
	T1	T2	T3	T4	T5	T6		
ร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่								
	2.67 ^{ab}	3^{a}	3^{a}	2.67 ^{ab}	2.5^{ab}	2.33^{b}	0.11	<0.01
ร้อยละการเคลื่อนที่รวม(%)								
	48.95 ^{b}	53.53 ^{a}	52.11 ^{a}	48.38 ^{b}	45.10 ^{c}	32.00^{d}	1.48	<0.01
ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า(%)								
	30.76^{bc}	35.90^{a}	33.36^{b}	31.33^{b}	28.57^{c}	20.14^{c}	2.22	<0.01
อัตราการรอดชีวิต (%)								
	47.24^{b}	52.24^{a}	51.37^{a}	48.00^{b}	45.86^{b}	31.86^{c}	1.23	<0.01

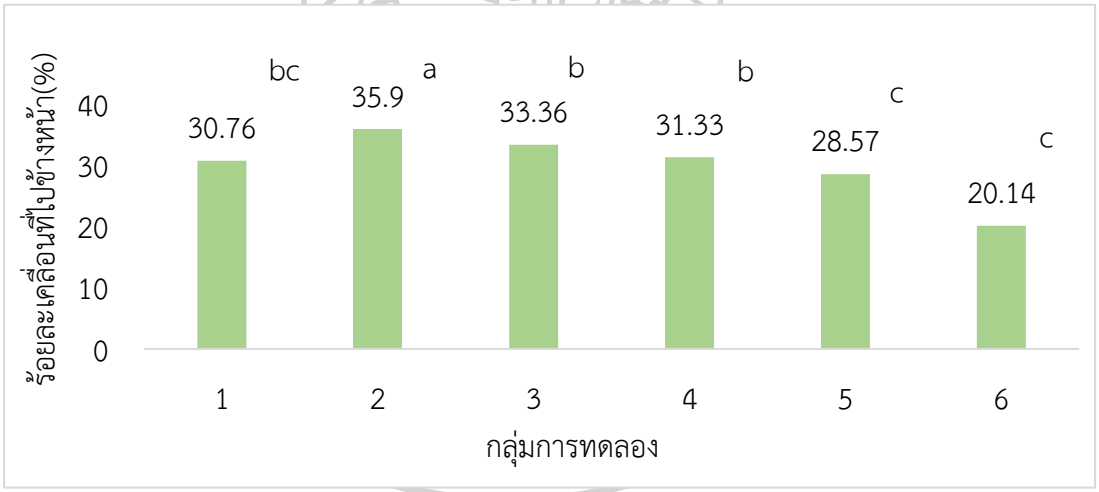
อักษรย่อ : SEM = Standard error of the mean T1: Schramm+DMF6%, T2: Schramm+DMF 6%+Histplaque 1.25%, T3: Schramm+DMF 6%+Histplaque 2.5%, T4: Schramm+DMF 6%+Histplaque 5%, T5:Schramm+DMF 6%+Histplaque 10%, T6: Schramm+DMF 6%+Histplaque 20%

มหาวิทยาลัยศิลปากร



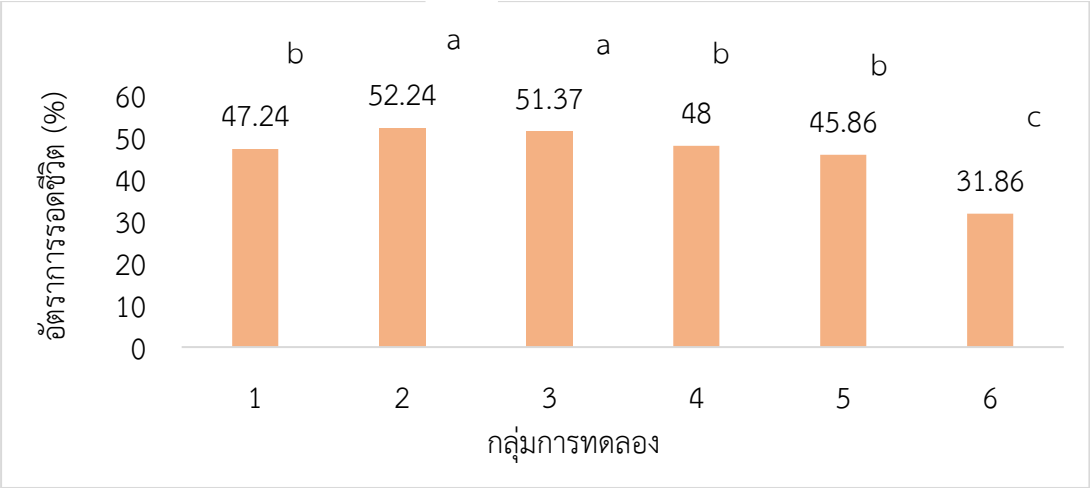
ภาพที่ 13 กราฟแสดงผลร้อยละการเคลื่อนที่รวม (Total motility) ในแต่ละระดับของการเสริม Histoplaque

หมายเหตุ: กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (Control groups) น้ำยาเจือจาง Schramm กลุ่มที่ 2 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®1.25% กลุ่มที่ 3 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®2.5%) กลุ่มที่ 4 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®5%) กลุ่มที่ 5 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®10%) กลุ่มที่ 6 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®20%)



ภาพที่ 14 กราฟแสดงผลร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (Progressive motility) ในแต่ละระดับของการเสริม Histopaque®

หมายเหตุ: กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (Control groups) น้ำยาเจือจาง Schramm กลุ่มที่ 2 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®1.25% กลุ่มที่ 3 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®2.5% กลุ่มที่ 4 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®5% กลุ่มที่ 5 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®10% กลุ่มที่ 6 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®20%



ภาพที่ 15 กราฟแสดงผลอัตราการรอดชีวิต (Viability) ในแต่ละระดับของการเสริม Histopaque®
หมายเหตุ: กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (Control groups) น้ำยาเจือจาง Schramm กลุ่มที่ 2 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®1.25%) กลุ่มที่ 3 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®2.5%) กลุ่มที่ 4 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®5%) กลุ่มที่ 5 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®10%) กลุ่มที่ 6 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®20%)

มหาวิทยาลัยศิลปากร

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของการเสริม Histopaque® ในแต่ละระดับ ต่ออัตราการผสมติดและอัตราการฟักในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พันธุ์พื้นเมืองไทย

การศึกษานี้ เป็นการศึกษาอัตราการผสมติดโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งไก่พันธุ์พื้นเมืองที่ถูกแช่แข็งด้วยน้ำยาเจือจาง Schramm และเสริมสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง คือ Histoplaque

ที่ 6 ระดับ คือ กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (Control groups) น้ำยาเจือจาง Schrammกลุ่มที่ 2 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®1.25%) กลุ่มที่ 3 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®2.5%) กลุ่มที่ 4 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®5%) กลุ่มที่ 5 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®10%) และ กลุ่มที่ 6 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®20%) ก่อนและหลังการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส และทำการผสมเทียมลงในไก่ไข่เพศเมีย จากผลการทดลองพบว่าในแต่ละกลุ่มการทดลองมีอัตราการผสมติด อัตราการฟักจากไข่ที่มีเชื้อ และอัตราการฟักจากไข่ทั้งหมด แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) ดังตารางที่ 3

1. **ศึกษาผลของการเสริม** Histopaque® **ในแต่ละระดับ ต่ออัตราการผสมติด**

การศึกษาอัตราผสมติดพบว่าในกลุ่มควบคุม (Control groups) มีค่าเท่ากับ 54.32, กลุ่มที่ 2 (Histoplaque 1.25%) มีค่าเท่ากับ 47.42, กลุ่มที่ 3 (Histoplaque 2.5%) มีค่าเท่ากับ 40.38 ซึ่งมากที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มการทดลองอื่น (ภาพที่ 16)

2. **ศึกษาผลของการเสริม** Histopaque® **ในแต่ละระดับ ต่ออัตราการฟัก**

ในส่วนของการศึกษาอัตราการฟักจากจำนวนไข่ที่มีเชื้อพบว่า กลุ่มควบคุม (Control groups) มีค่าเท่ากับ 66.67 และ กลุ่มที่ 2 (Histopaque® 1.25%) มีค่าเท่ากับ 75 ซึ่งมีค่ามากที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มการทดลองอื่น (ภาพที่ 17) เช่นเดียวกับการศึกษาอัตราการฟักจากจำนวนไข่ทั้งหมดที่พบว่า กลุ่มควบคุม (Control groups) มีค่าเท่ากับ 42.67 และ กลุ่มที่ 2 (Histopaque® 1.25%) มีค่าเท่ากับ 42.33 (ภาพที่ 18)

ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสารกลุ่มโพลิซูโครส พบว่าการเสริม Iodixanol ที่ระดับ 0, 1.25, 2.5 และ 5% ต่ออัตราการตั้งท้องหลังการผสมเทียม ไม่มีความแตกต่างกันในน้ำเชื้อแช่แข็งโค (พิริวิทย์, 2560) ในส่วนของ Di Iorio et al. (2020) ได้ทำการเสริม Ficoll® ที่ระดับ 1 mM ร่วมกับน้ำยาเจือจาง Lake ในน้ำเชื้อแช่แข็งพบว่ามีอัตราการผสมติดอยู่ที่ 87.2% และอัตราการฟักอยู่ที่ 70.9% นอกจากนี้ยังพบการเสริม Ficoll® 10% ในการทำ In vitro maturation (IVM) และ In vitro fertilization ในแมว เพื่อช่วยในการเก็บรักษา Oocyte (Sowinska et al., 2020)

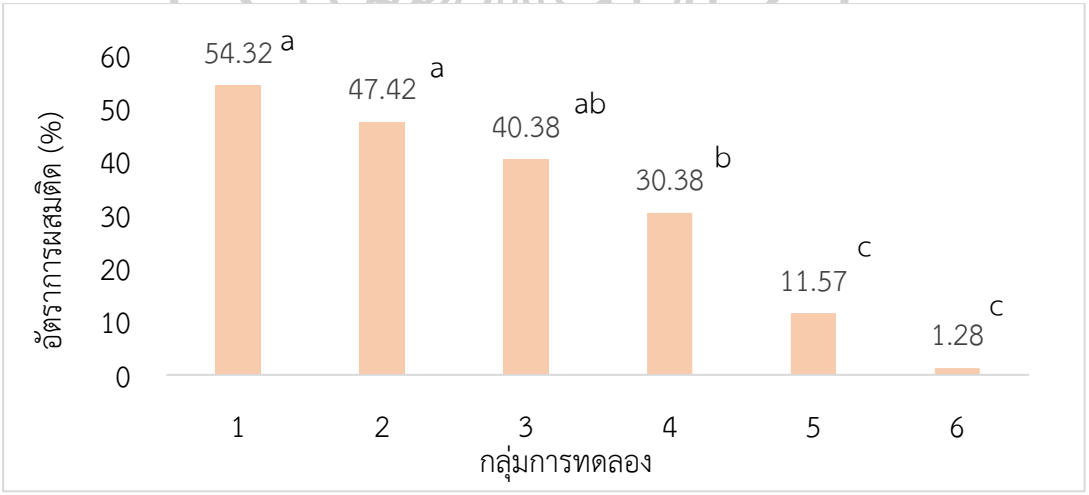
จากการศึกษาอัตราการผสมติด อัตราการฟักจากไข่มีเชื้อ และอัตราการฟักจากไข่ทั้งหมด พบว่าในกลุ่มที่ไม่เสริมสาร Histopaque® และ กลุ่มที่เสริมด้วย 1.25% มีค่าสูงเหมือนกัน อาจเนื่องมาจากจำนวนอสุจิที่ใช้ในการแช่แข็งมีความสมบูรณ์ที่ใกล้เคียงกัน ส่งผลให้อสุจิมีความสามารถในการผสมติดไม่แตกต่างกัน โดยปกติปริมาณน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไทยที่เหมาะสมต่อการผสมเทียมจะมีปริมาตรเฉลี่ยอยู่ที่ 4×10^9 ต่อมิลลิลิตร แตกต่างกันตามสายพันธุ์ (Sonseeda et al, 2013) แต่อย่างไรก็ตาม แม่พันธุ์ไก่ที่ใช้ผสมเทียมแต่ละตัวรวมถึงผู้ผสมเทียมเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อการผสมติดเช่นเดียวกัน ในส่วนอัตราการฟักนอกเหนือจากปัจจัยจากน้ำเชื้อแช่แข็งแล้ว อุณหภูมิและความชื้นของเครื่องฟักไข่ รวมถึงจำนวนไข่ที่เข้าฟักก็ส่งผลต่ออัตราการฟักเช่นเดียวกัน เช่นเดียวกันกับสาย

พันธุ์และอายุไม่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อสดและน้ำชื้อแบบแช่แข็งภายหลังการละลาย แต่ในด้านอัตราการผสมติดโดยการใช้น้ำเชื้อแบบแช่แข็ง พบว่ามีความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์แต่ไม่มีความแตกต่างในเรื่องผลของอายุต่ออัตราการผสมติด (พรจิต, 2555)

ตารางที่ 3 ผลของการเสริม Histoplaque ที่ 6 ระดับ ต่ออัตราการผสมติด และอัตราการฟัก

ค่าพารามิเตอร์	ระดับการเสริม Histoplaque ในน้ำยาเจือจาง						SEM	p-value
	T1	T2	T3	T4	T5	T6		
จำนวนไข่ที่เข้าฟัก	105	91	96	88	112	108		
อัตราการผสมติด (%)	54.32^{a}	47.42^{a}	40.38^{ab}	30.38^{b}	11.57^{c}	1.28^{c}	8.49	<0.01
ฟักออกจากไข่มีเชื้อ (%)	66.67^{a}	75^{a}	64.29^{b}	33.33^{c}	25^{d}	3^{d}	11.61	<0.01
ฟักออกจากไข่ทั้งหมด (%)	42.67^{a}	42.33^{a}	34.67^{b}	14.33^{c}	3.33^{d}	1.00^{d}	7.84	<0.01

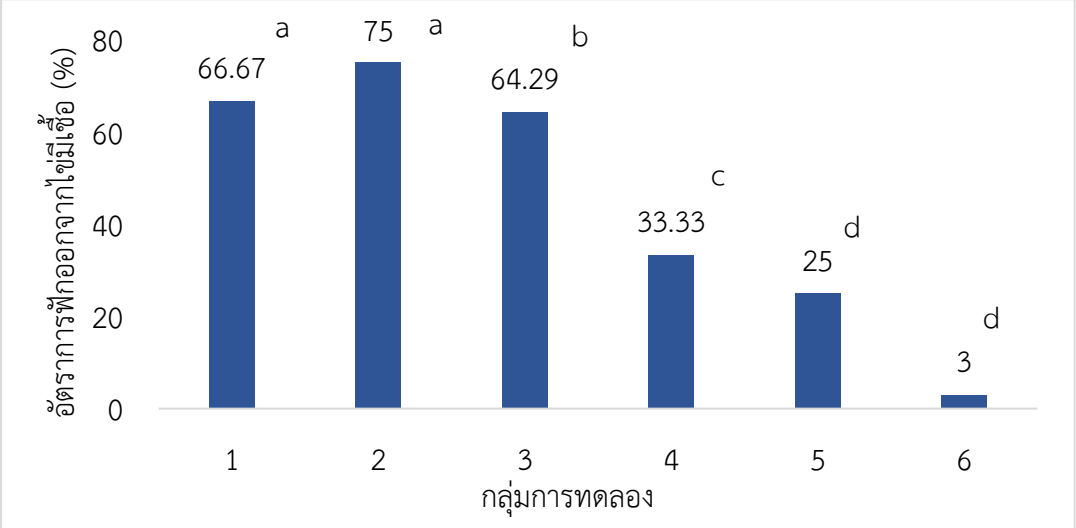
หมายเหตุ : ^{a,b,c,d} ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันที่อักษรกำกับต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (<0.01) อักษรย่อ : SEM = Standard error of the mean T1: Schramm+DMF6%, T2: Schramm+DMF 6%+Histplaque 1.25%, T3: Schramm+DMF 6%+Histplaque 2.5%, T4: Schramm+DMF 6%+Histplaque 5%, T5:Schramm+DMF 6%+Histplaque 10%, T6: Schramm+DMF 6%+Histplaque 20%



ภาพที่ 16 กราฟแสดงผลอัตราการผสมติด ในแต่ละระดับของการเสริม Histoplaque

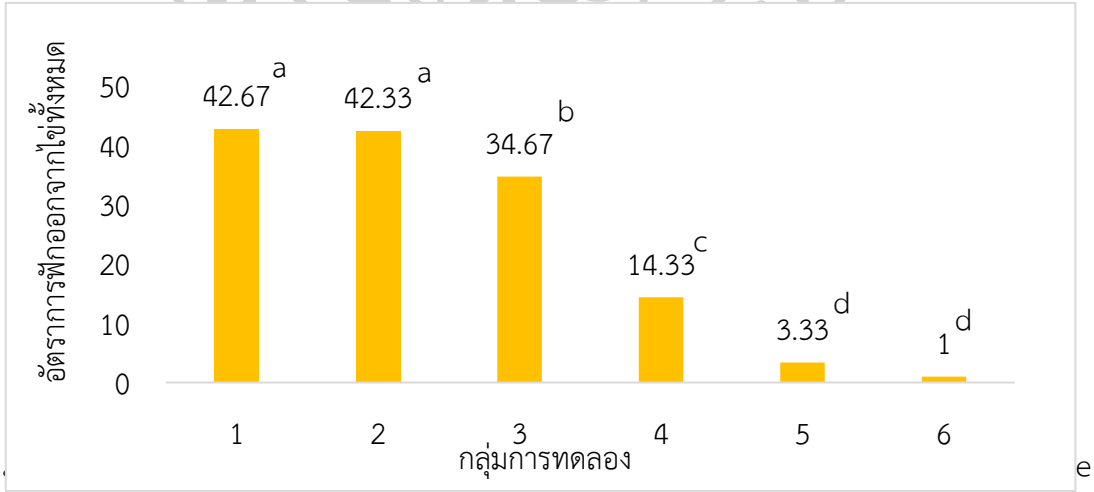
หมายเหตุ: กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (Control groups) น้ำยาเจือจาง Schramm กลุ่มที่ 2 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®1.25%) กลุ่มที่ 3 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®2.5%) กลุ่มที่ 4

น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®5%) กลุ่มที่ 5 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®10%) กลุ่มที่ 6 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®20%)



ภาพที่ 17 กราฟแสดงผลอัตราการฟักออกจากไข่มีเชื้อในแต่ละระดับของการเสริม Histoplaque

หมายเหตุ: กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (Control groups) น้ำยาเจือจาง Schramm กลุ่มที่ 2 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®1.25%) กลุ่มที่ 3 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®2.5%) กลุ่มที่ 4 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®5%) กลุ่มที่ 5 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®10%) กลุ่มที่ 6 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®20%)



e

หมายเหตุ: กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (Control groups) น้ำยาเจือจาง Schramm กลุ่มที่ 2 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®1.25%) กลุ่มที่ 3 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®2.5%) กลุ่มที่ 4 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®5%) กลุ่มที่ 5 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®10%) กลุ่มที่ 6 น้ำยาเจือจาง Schramm+สารกลุ่ม Polysucrose (Histopaque®20%)

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาระดับการเสริม Histopaque® ที่เหมาะสมต่อร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่ ร้อยละการเคลื่อนที่รวม ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอัตราการรอดชีวิต ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งของไก่พันธุ์พื้นเมืองไทย พบว่า การเสริมสารกลุ่มโพลิซูโครส (Histoplaque) ในแต่ระดับ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.01$) โดยที่ระดับ 1.25% ในน้ำยาเจือจาง Schramm และ DMF 6% ให้ผลดีที่สุดต่อร้อยละการเคลื่อนที่รวม, อัตราการรอดชีวิตด้วยการย้อมสี และมีผลดีที่สุดต่อร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเมื่อเทียบกับกลุ่มการทดลองอื่นๆ

ผลจากการศึกษาระดับการเสริม Histopaque® ที่เหมาะสมต่ออัตราการผสมติดและอัตราการฟักไข่ออกจากไข่มีเชื้อ และการฟักไข่ออกจากจำนวนไข่ทั้งหมด พบว่าในกลุ่มที่ไม่เสริม Histopaque® และกลุ่มที่เสริมในระดับ 1.25% ในน้ำยาเจือจาง Schramm และ DMF 6% มีค่ามากที่สุดในทุกพารามิเตอร์ พบว่าการผสมติดมากที่สุดอยู่ที่ 54.32% และ 47.42% ตามลำดับ อัตราการฟักไข่ออกจากไข่มีเชื้อที่มีค่ามากที่สุดอยู่ที่ 66.67% และ75% ตามลำดับ ในส่วนของการฟักไข่จากจำนวนไข่ทั้งหมดอยู่ที่ 42.67% และ 42.33% ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยศิลปากร

รายการอ้างอิง

กรมปศุสัตว์. 2563. ข้อมูลจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทย ปี 2563. กรุงเทพฯ: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.เกรียงไกร โชประการ. 2543. ไก่พื้นเมืองและไก่ลูกผสมพื้นเมือง: อดีตและปัจจุบัน. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย:กรุงเทพฯ.

จุรีย์รัตน์ สำเร็จประสงค์. 2559. ระบบสืบพันธุ์สัตว์ปีก. ภาควิชาสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 1: 90.

ณปภัช ช่วยชูหนู, พัชรา ธนานุรักษ์ และ เทวินทร์ วงษ์พระลับ. 2562. ผลของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่อการเก็บรักษาน้ำชื้อไก่พันธ์ซิลกี้ด้วยวิธีการแช่แข็ง. แก่นเกษตร 47 (ฉบับพิเศษ 1) : 405-409. บัญญัติ เหล่าไพบูลย์ และ มนต์ชัย ดวงจินดา. 2555. ไก่พื้นเมืองไทย: อดีต ปัจจุบัน และอนาคต. วารสารแก่นเกษตร จังหวัดขอนแก่น, 40 : 309-312

ประภากร ธาราฉาย. 2560. การผลิตสัตว์ปีก: การเลี้ยงไก่ไข่. 1-21.

พรจิต สอนสีดา, เทวินทร์ วงษ์พระลับ, บัญญัติ เหล่าไพบูลย์ และ พิชญ์รัตน์ แสนไชยสุริยา. 2555. ผลของอายุ และสายพันธุ์ต่ออัตราการเคลื่อนที่, อัตราการรอดชีวิต และความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมือง. แก่นเกษตร40 (ฉบับพิเศษ 2) :334-338.

มงคล คงเสน, วรวิทย์ วณิชาภิชาติ, สยาม ขุนชำนาญ, อัจฉรา นิยมเดชา. 2013. วิธีการรีดเก็บน้ำเชื้อและการผสมเทียมในไก่พื้นเมืองไทย. Princess of Naradhiwas University Journal. 5(4).

วัลลภ คงเพิ่มพูน. 2544. ไกพื้นเมือง. เกษตรบุค. กรุงเทพมหานคร.

สุนทร สุนาทัย, สราวุธ ศรีงาม, อดิศักดิ์ สังข์แก้ว, อภิชัย พูลชัย และกังวาน กาญจนพงศ์กิจ. 2548. การศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของไก่พื้นเมืองไทยภายหลังการเจือจางและเก็บรักษาโดยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ BPSE, Egg yolk-Tris และ Kiev. วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 15. 18-27.

อรรณพ คุณาวงศกฤต. 2537. วิทยาการสืบพันธุ์สุกร. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

Aire, T. A and P. C. Ozegbe. 2007. The testicular capsule and peritubular tissue of birds: morphometry, histology, ultrastructure and immunohistochemistry. J. Anal. 210: 731-740

Aisen, G., V.H. Medina, and A. Venturino. 2002. Cryopreservation and post-thawed semen frozen in diffeent trehalose concentrations. Theriogenology 57: 1

Bathgate R., W.M.C. Maxwell, and G. Evans. 2006. Studies on the Effect of Supplementing Boar Semen Cryopreservation Media withDifferent Avian Egg Yolk Types on in Vitro Post-thaw Sperm Quality. Reprod Dom Anim. 41. 68–73.

Baxter, M., N. Josepn, V. R. Osborne and G. Y. Bedecarrais. 2014. Red light is necessary to active the reproductive axis in chickens independently of the retina of the eye. Poultry Sci. 93: 1289-1297.

Bedecarrais, G. Y. 2015. Control of the reproductive axis: balancing act between stimulatory and inhibitory inputs. Poultry Sci. 94:810-815

Blasse, A.K., H. Oldenhof, M. Ekhlasi-Hundrieser, W.F. Wolkers, H. Sieme, and H.

Boliwcin. 2012. Osmotic tolerance and intracellula ion concentrations of bovine sperm are affected by cryopreservation. Theriogenology 78:1312-1320.

Bozkurt, H. H., A. Aktas, M. B Ulkay and U. B. Firat. 2007. Serteoli cell proliferation during the post hatching period in Domestic foel. J. Vet. Sei. 8: 219-222.

Bozkurt H. H., A. Aktas, M.B. Ulkay and U.B. Firat. 2007. Sertoli cell proliferation during the posthatching period in domestic fowl. J. Vet. Sci. 8: 219-222.Bwala D. 2009. Challenge studies in chickens to evaluate the efficacy of commercial

Newcastle disease vaccines against the strains of Newcastle disease virus prevalent in South Africa since 2002.

Ciccone, N. A, I. C. Dunn, T. Boswell, K. Tsutsui, T. Ubuka, K. Ukena and P. J. Sharp. 2004. Gonadotropin inhibitory hormone depresses gonadotropin alpha and follicle-stimulating hormone beta subunit expression in the pituitary of the domestic chicken. J. Neuroendocrinol. 16: 999-1006.

Cormier. N., M.A. Sirard, and J.L. Bailey. 1997. Premature capacitation of bovine spermatozoa is initiated by cryopreservation. J. Androl. 18: 461-467.

Darras V.M, S.L.J. Van Herck, S. Geysens and G.E Reyns. 2008. Involvement of thyroid hormones in chicken embryonic brain development. Gen. Comp. Endocrinol. 163: 58-62.

Davis A.J. and P. A. Johnson. 1998. Expressions pattern of messenger ribonucleic acid for follstatin and the Inhibin/activin subunits during Follicular and testicular development in gallus domesticus. Biol. Reprod. 59 271-277.

De Revices. M. 1975 Sperm transport and survival in male bids P 1o-16 IE S E. Hafez andC. G. Thibsul. The Biology of Spermatozoa. S. Karger, Sydney.

Deviche, P.L. L. Hurey and H. B. Fokidis. 201 1I. Avian Testicular Structure. Function. In Hermones and Reproduction of Vertebrates. 4: 22-70. Elseviers Inc.

Di Iorio M, G. Rusco R., R. Iampietro, L. Maiuro, A. Schiavone, S. Cerolini, N. Iaffaldano. 2020. Validation of the Turkey Semen Cryopreservation by Evaluating the Effect of Two Diluents and the Inseminating Doses. Animals (Basel). 1;10(8):1329.

Di Iorio M., G. Rusco, R. Iampietro, M. A. Colonna. L. Zaniboni., S. Cerolini and N. Iaffaldano. 2020. Finding an Effective Freezing Protocol for Turkey Semen: Benefits of Ficoll® as Non-Permeant Cryoprotectant and 1:4 as Dilution Rate Animals 2020. 421.

Dutta S., P. Sengupta, S. Muhamad. 2019. Male reproductive hormones and semen

quality. Asian Pacific Journal of Reproduction 8(5): 189-194. Fahy, G.M. 1986. The relevance of cryoprotectant toxicity to cryobiology. Cryobiology 23 : 1 - 13.

Faux C. M., L. Logsdon Marcie. 2022. Case 28.1 - Impacted uropygial (preen) gland. Comparative Veterinary Anatomy. A Clinical Approach. 1400-1415.

Froman, D. P. and J. D. Kirby. 2005. Sperm mobility: phenotype in roosters (Gallus domesticus) determined by mitochondrial function. Biol. Reprod.72: 562-567.

Graish, H.H.C., and S.K.A. Suarez. 2002. Hyperactivated motility of bull sperm isthe axoneme by Ca2+ and not cAMP. Dev. Biol. 250: 208-217.

Hadley, M. E. 2000. Endocrinology. Englewood Cliffs. Prentice Hall, New Jersey.

Hammerstedt, R. H. 1995. Cryopreservation of poultry semen current status and economics. P. 229-250.1n: Proceedings: First International Symposium on the Artificial Insemination of poultry science. M.R. Bakst and G. J. Wishart. Poultry Science Association, Savoy, IL

Hafez E. S. E. 1980. Reproduction in Farm Animal. Balliere Tindell. London. 495 p

Hammerstedt, R.H., J.K. Graham, and J.P. Nolan. 1990. Cryopreservation of mammalian sperm: what we ask them to survive. J. Androl. 11: 73-88

Hammerstedt R.H. 1995. Cryopreservation of poultrysemen current status and economics. in: Proceedings: First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry Science. M.R. Bakst and G. J. Wishart, (eds.). Poultry ScienceAssociation, Savoy, IL. 229 - 250

Hammond J., J. C. Bowman and J.J. Robinson.1983, Hammond farm animal, Buther tanner Ltd., London. England. 305 p.

Halliday S., Houston F, Hunter N (2005) Expression of PrPC on cellular components of sheep blood. J Gen Virol 86: 1571-1579.

Hezavehei M., M. Mirzaei, M. Sharafi, Y. Wu, V. Gupta, M. Fitzhenry, H. Kouchesfehani, P. Eftekhari-Yazdi, H. Baharvand, A. Dalman, P. Haynes, A. Shahverdi, G.H.

Salekdeh. (2022). Proteomics study reveals the molecular mechanisms underlying cryotolerance induced by mild sublethal stress in human sperm. Cell and Tissue Research. 387. 1-15.

Highland H.N., A.S. Rishika, S.S. Almira and P.B. Kanthi. Ficoll®-400 density gradient method as an effective sperm preparation technique for assisted reproductive techniques. J Hum Reprod Sci. 2016 Jul-Sep;9(3):194-199.

Khan I.M., Z. Cao, H. Liu, A. Khan, S.U., Rahman, M.Z. Khan, A. Sathanawongs and Y.Zhang. 2021. Impact of cryopreservation onspermatozoa freeze-thawed traits and relevance OMICS to assess sperm cryo-tolerance in farm animals. Frontiers in Veterinary Science. doi.org/10.3389/fvets.2021.609180

Kulikova B., M. D. Iorio, E. Kubovicova, L. Kuzelova, N. Iaffaldano and P. Chrenek. 2014. The cryoprotective effect of Ficoll® on the rabbit spermatozoa quality. Zygote. 10p.

Kumar, S., J.D. Millar, and P.F. Watson. 2003. The effect of cooling rate on thecryopreserved bull, ram and boar spermatozoa: a comparison of two controlledrate cooling machines. Cryobiology 46:246-53.

Lei, S., X. Li, J. Quan, S. Yang, Y. Li, X. He, and X. Tang. 2008. A comparison of the protective action of added egg yolks from five avian species to the cryopreservation of bull sperm. Anim. Repro. Sci. 104: 212-219.

Lewis, P.D., B. A. Middleton amd R.M. Gous. 2006. Exogenousmelaton in modifies rete of sexual maturation in domestic pullets. Poultry Sci. 85: 117-122.

Long J. A., D.C. Bongalhands, J. Pelaez, S. Saxena,P. Settar, N. P. O' Sullivan, and J. E. Fulton. 2010. Rooster semen cryopreservation: Effect of pedigreeline and male age on posthaw sperm function. Poult.Sci. 89: 966-973.

Miranda M., B. Kulíková, J Vasicek, L. Olexikova, N. Iaffaldano and P. Chrenek. 2017. Effect of cryoprotectants and thawing temperatures on chicken sperm qualityReproduction in Domestic Animals. 53(1): 93-100.

Mukhopadhyay, C.S.A.K.Gupta, B.R. Yadav, I.S.Chauhan,A. Gupta, T.K. Mohanty,andV.S. Raina. 2011. Effect of cryopreservation on sperm chromatin integrity and fertilizing potential in bovine semen. Lives. Sci. 136: 114-121.

Nesheim M.C., R.E. Austic and L. Cand. 1979. Poultry Production. 12th Edition, Lea and Febiger, Philadelphia, 123-125.

Perfito, N, J. M. Kwong, O. E. Bentiey and M. Hau. 2008. Cue hierarchies and testicular development: is food a more potent satimulus than day length in an opportunistic breeder (Toeniopyzgia g. gutiaia) ?.Horm. Behav. 53: 567-572.

Perry E. J. 1968. The artificial insemination of farm animal, Rutgers University, New Brunswick. 473 p.

Perters S. O., O.D. Shoyebo, B.M. Ilori, M.O. Ozoje,C.O.N. Ikeobi, and O.A. Adebambo. 2008. Semen quality traits of seven strain of chickens raised in the humid tropics. Int. J. Poult. Sci. 7: 949- 953.

Polsang S., P. Thananurak, P. Polsang, S. Inchayad, S. Ponchunchoovong, J. Chapanya, S. Kunhareang and T. Vongpralub. 2022. Effects of extenders and cryoprotectants on cryopreservation of Thai red junglefowl (Gallus gallus gallus) spermatozoa. Cryobiology. 48-54

Pommer, A.C., J.J. Linfor, and S.A. Mayers. 2002. Capacitation and acrosomal exocytosis are enhanced by incubation of stallion of spermatozoa in commercial semen

extender. Theriogenology 57: 1493-1501.Quinn J.P. and W.H. Burrows. 1936. Artificial Insemination in fowl. Journal Heredity. 27. 31-37.

Rosenstrauch, A, S. Weil, A. A. Degen and M. Friedlinder. 1998. Leydig cell functiomal structure and plasma androgen level during the decline in fertility in aging roosters. Gen. Comp. Endocrinal. 109: 251-258.

Saragusty J., H. Gacitua, I. Rozenboim, and A. Arav. 2009. Protective effect of iodixanol during bovine sperm cryopreservation. Theriogenology 71: 1425-1432.

Sexton T.J. 1979. A new poultry semen extender. 3. Effect of storage condition on the fertilizing capacity of chicken stored at 5 C. of Poultry Sci. 57: 285-289.

Singh V., N.K. Agrawal, R. Verma and K. Singh. 2017. HPG Axis: The central regulator of spermatogenesis and male fertility. Male infertility: Understanding, causes and treatment: 25-36.

Sonseeda P., T. Vongpralub and B. Laopaiboon. 2013. Effect of environmental factors ages and breeds on semen characteristics in Thai indigenous chickens: A one year study. Thai J. Vet. Med. 43: 347-352.

Sowinska N., J. Zahmel, W. Nizanski, R. Hribal, L. Fernandez-Gonzalez and K. Jewgenow.

2020. Meiotic status does not affect the vitrification effectiveness of domestic cat oocytes. Animals (Basel). 7;10(8):1371.

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

Tadano R., M. Sekino, M. Nishibori, and M. Tsudzuki.2008. Microsatellite marker analysis for the genetic relationships among Japanese long-tailed chickenbreeds. Poultry Sci. 86:460–469.

Tang Y. (2016). Immune modulation of Salmonella enterica serotype pullorum in thchicken.

Thananurak P., N. Chuaychu-noo, A. Thelie , Y. Phasuk, T. Vongpralub, and E. Blesbois. 2019. Sucrose increases the quality and fertilizing ability of cryopreserved chicken sperms in contrast to raffinose. Poultry Science 98:4161–4171.

Watson P.F. 2000. The causes of reduce fertility with cryopreserved semen. Anim. Reprod. Sci. 60: 481-492.

Woelders H., A. Marthijs, and B. Engel. 1997. Effects of trehalose and sucrose, osmolarity of the freezing medium, and cooling rate on viability and intactness of full sperm after freezing and thawing. Cryobiology. 35: 93-105.

ภาคผนวก

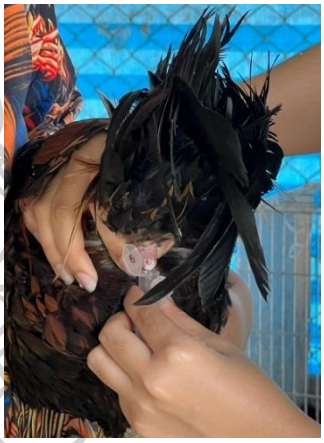
ภาคผนวก ก
ภาพแสดงการเตรียมการทดลอง

ภาคผนวก ก

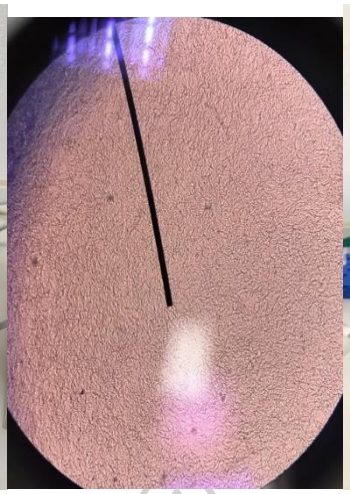
ภาพแสดงการเตรียมการทดลอง

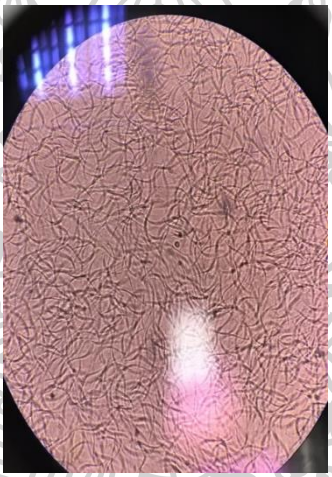
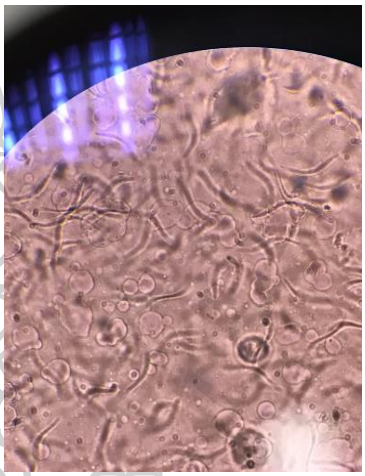
ภาพภาคผนวกที่ 1 สารสำหรับทำน้ำยาเจือจาง Schramm

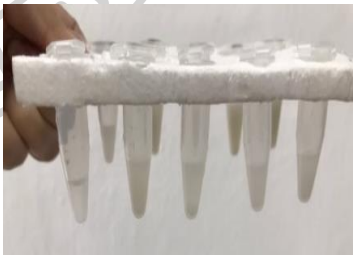
ภาพภาคผนวกที่ 2 น้ำยาเจือจาง Schramm

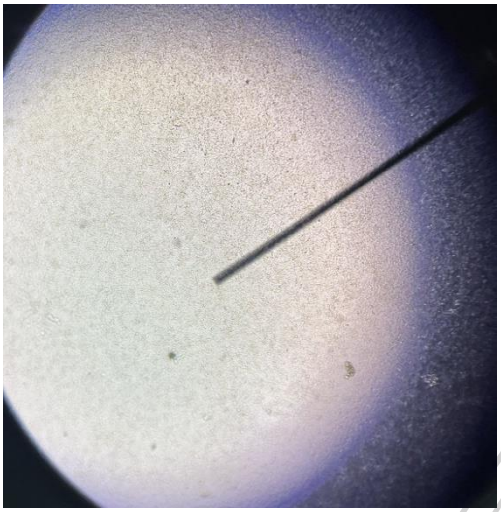


ภาพภาคผนวกที่ 3 การรีดน้ำเชื้อไก่พ่อพันธุ์

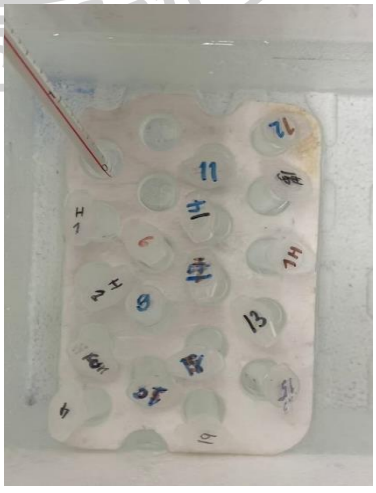


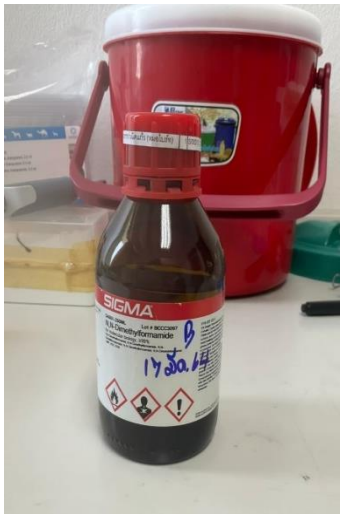


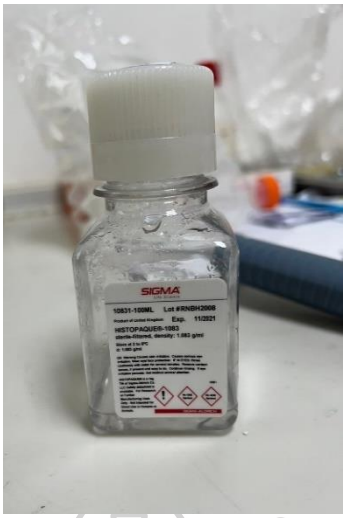


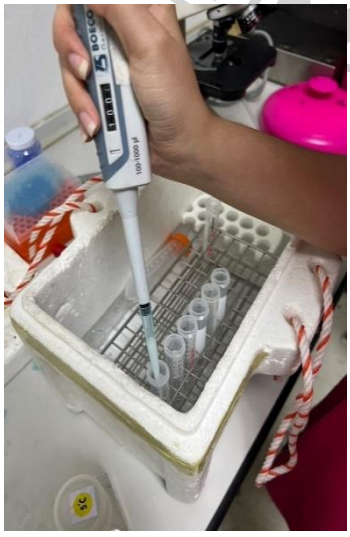
ภาพภาคผนวกที่ 4 ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อพ่อพันธุ์รายตัว



ภาพภาคผนวกที่ 5 ลดอุณหภูมิน้ำเชื้อลงมาที่ 5 องศาสเซลเซียส

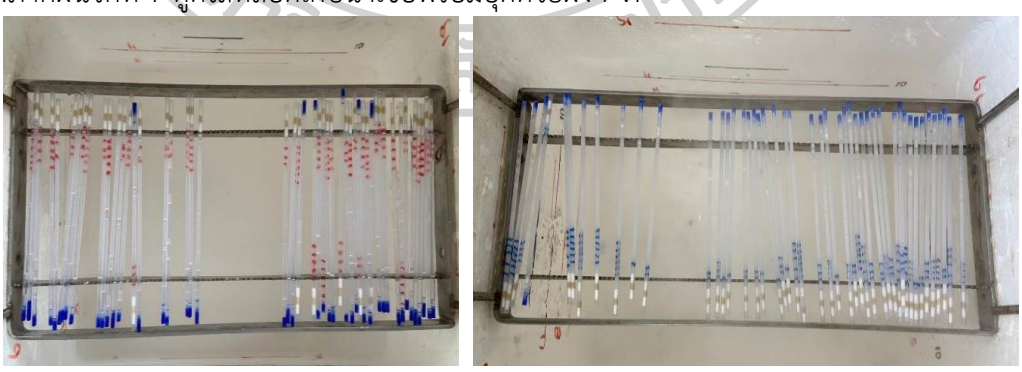

SIGMA

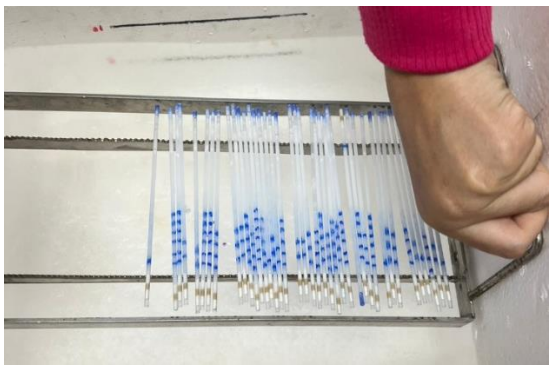
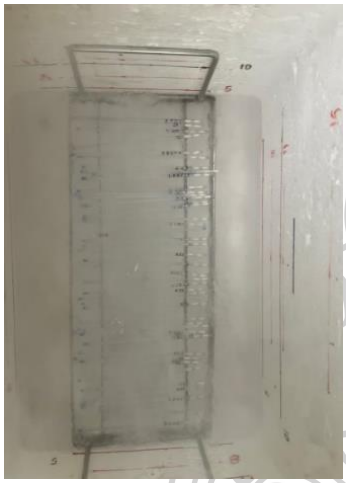

SIGMA

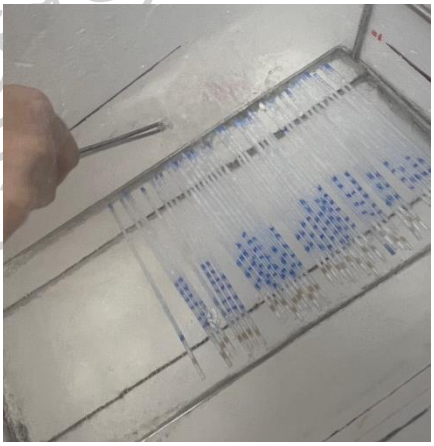


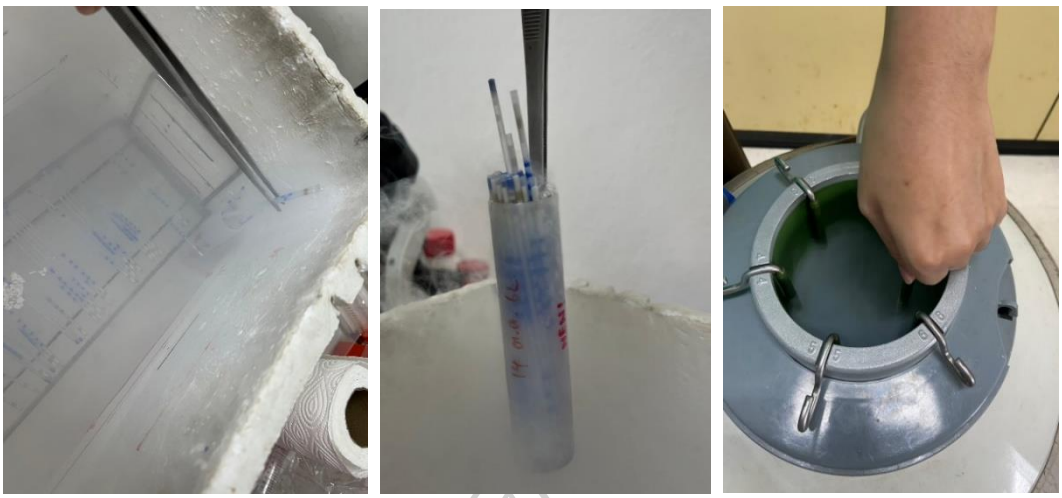
ภาพภาคผนวกที่ 6 แบ่งกลุ่มน้ำเชื้อเป็น 6 กลุ่มการทดลอง

ภาพภาคผนวกที่ 7 ดูดใส่หลอดเก็บน้ำเชื้อพร้อมอุดด้วยผง PVP

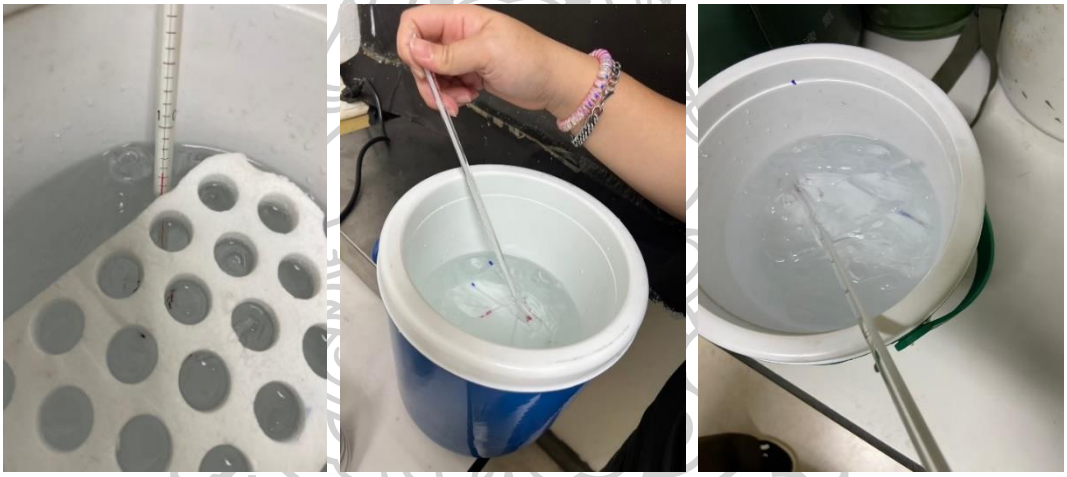


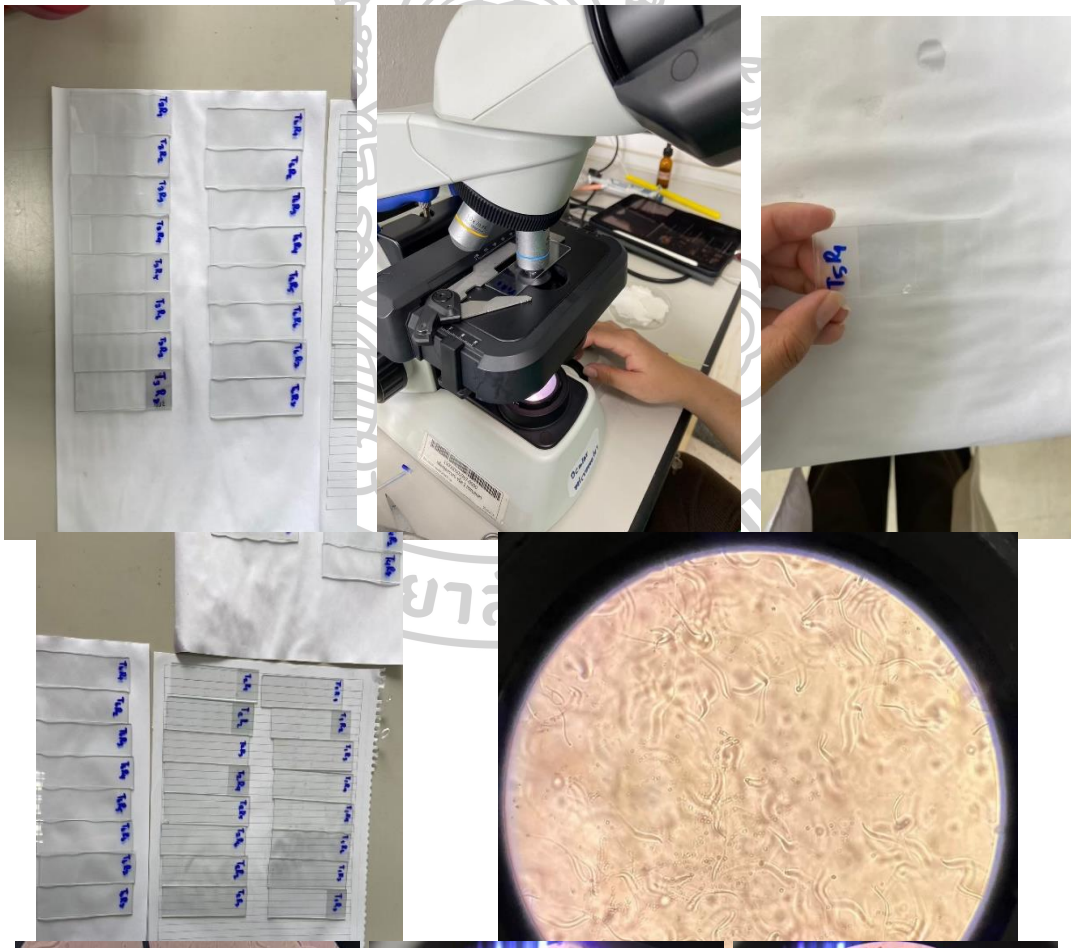


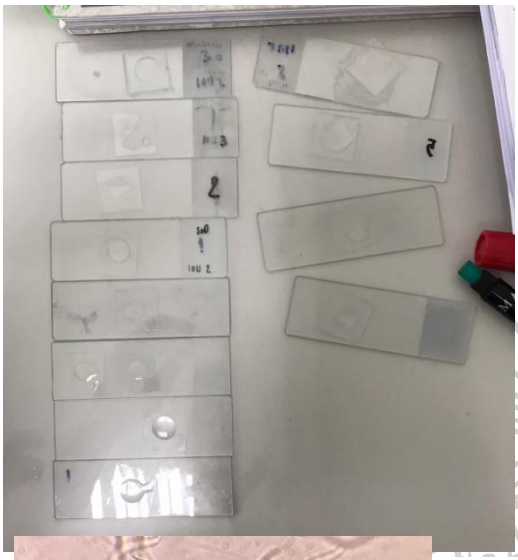


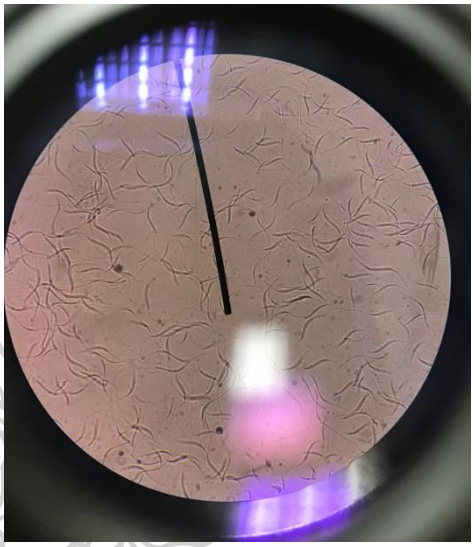
ภาพภาคผนวกที่ 8 อังไนโตรเจนเหลว

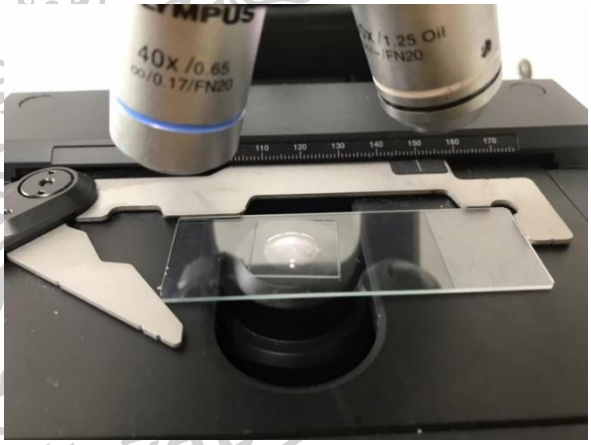


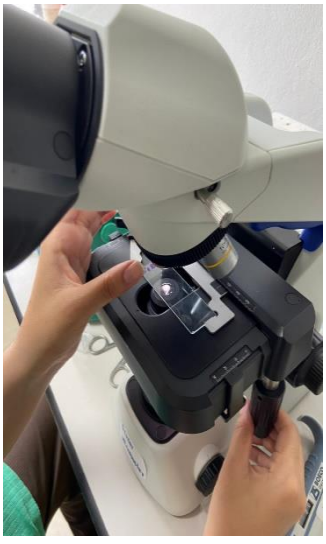
ภาพภาคผนวกที่ 9 ทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

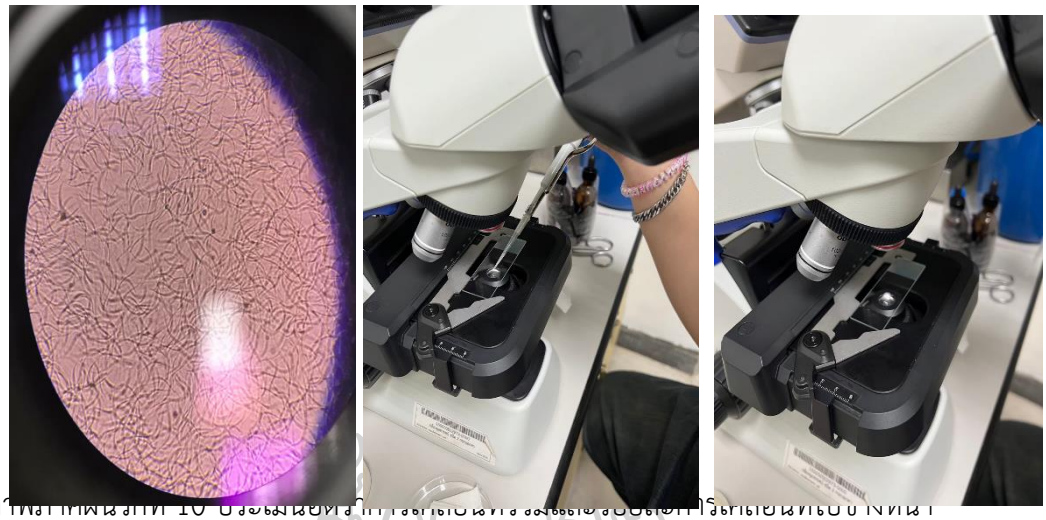




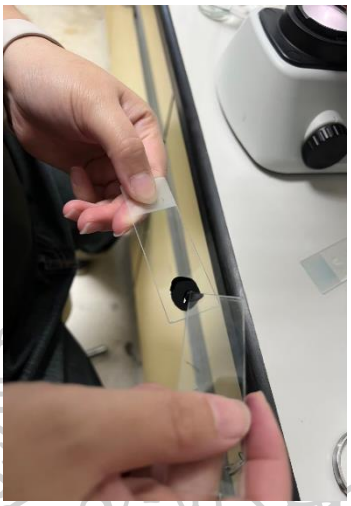


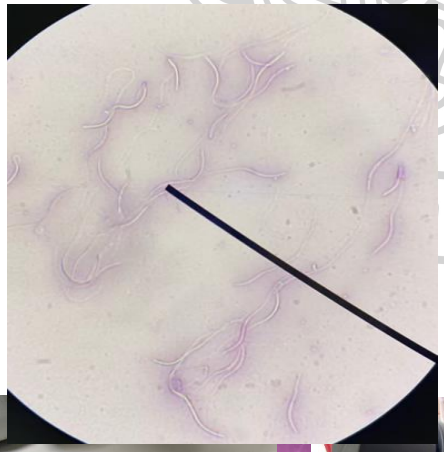
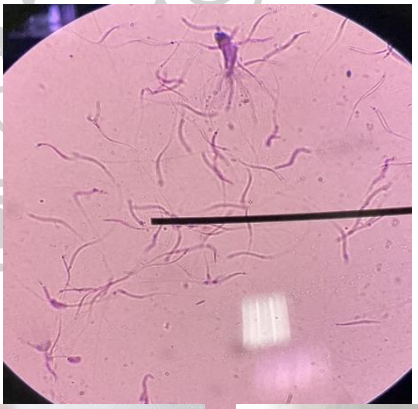

40x /0.65
/0.17/FN20



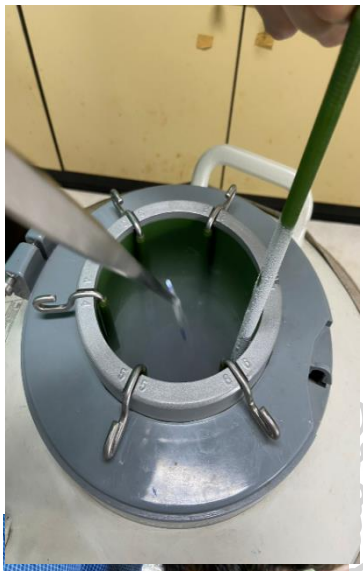


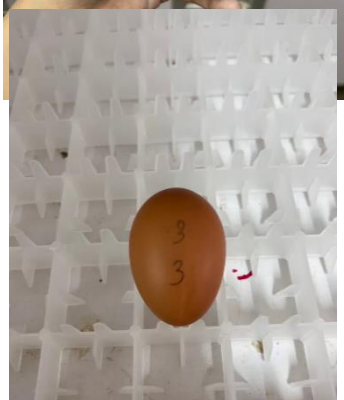
ภาพที่ภาคผนวกที่ 10 ประเมินผลการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวและเชื้อแบคทีเรียที่เคลื่อนที่ในบางทิศทาง

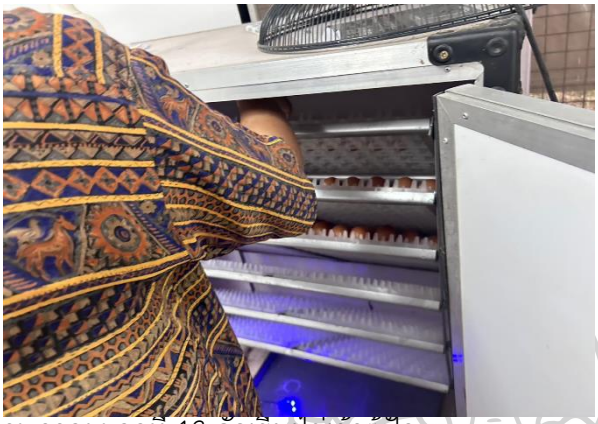


ภาพภาคผนวกที่ 11 ประเมินอัตราการอดชีวิตด้วยการย้อมสี







ภาพภาคผนวกที่ 13 จัดเรียงไข่เข้าตู้ฟัก

ภา

ภาพ

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ตัวอย่างในห้องปฏิบัติการ

เตรียมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็ง Schramm

สารเคมี

1. Magnesium acetate 0.0350 กรัม
2. โซเดียมกลูตาเมต (Sodium glutamate) 1.4250 กรัม
3. โพแทสเซียมอะซิเตต (Potassium acetate) 0.2500 กรัม
4. กลูโคลส (Glucose) 0.2500 กรัม
5. อิโนซิทอล (Inositol) 0.1250 กรัม
6. น้ำ molecular grade ปรับปริมาตร 50 มิลลิลิตร

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
2. หลอดทดลองพลาสติก ขนาด 50 มิลลิลิตร
3. ช้อนตักสาร

อัตราส่วนอสุจิต่อน้ำยาเจือจาง 1:2 และสาร Histopaque® ที่ระดับความเข้มข้น 1.25% (ปริมาตร 125 ไมโครลิตร) 2.5% (ปริมาตร 250 ไมโครลิตร) 5% (ปริมาตร 500 ไมโครลิตร) 10% (ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร) และ 20% (ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร) ลงในน้ำยาเจือจาง Schramm ซึ่งค่าออสโมลาลิตี้ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์ปีกจะอยู่ในช่วงระหว่าง 250-460 mOsm kg^{-1} (Siudzinska and Lukaszewicz, 2008)

การรีดเก็บน้ำเชื้อและขั้นตอนการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง

ใช้ไก่พื้นเมืองเพศผู้ จำนวน 16 ตัว ตัดขนให้สะดวกต่อการรีด ทำความสะอาดบริเวณทวารด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำสะอาด และใช้กระดาษทิชชูซับ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากน้ำ และอุจจาระ ทำการรีดน้ำเชื้อสัปดาห์ละ 2 ครั้ง วิธีการรีดน้ำเชื้อจะมีผู้รีด 2 คน คือ คนอุ้มไก่จะกระชับพ่อไก่ไว้ที่เอว ยื่นหางไก่ออกข้างหน้า หัวไก่อยู่ด้านหลังของคนอุ้ม มือหนึ่งจะจับขาไก่ทั้ง 2 ข้าง รวบเข้าหากัน โดยใช้นิ้วชี้และนิ้วกลางอยู่ระหว่างขาทั้งสอง แล้วใช้มืออีกข้างหนึ่งลูบหลังพ่อไก่เบา ๆ จากโคนปีกผ่านมาที่หลังและโคนหาง จากนั้นใช้นิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้บีบกระตุ้นอย่างรวดเร็วที่โคนหาง ไก่จะแสดงปฏิกิริยากระดกหางขึ้น พร้อมกับดันอวัยวะเพศ (รูปร่างเป็นลอนคู่ปลายแหลมยื่นออกมาจากรูทวาร) ซึ่งอวัยวะดังกล่าวเป็นที่เก็บน้ำเชื้อและฉีดน้ำเชื้อ คนรีดอีกคนหนึ่ง ใช้หลอดเก็บตัวอย่างสะอาดที่มีน้ำยาเจือจาง Schramm บรรจุอยู่ภายใน 200 ไมโครลิตร รองรับน้ำเชื้อที่ไหล ซึ่งน้ำเชื้อที่นำมาทำการเก็บรักษาจะต้องไม่ปนเปื้อน

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อพ่อพันธุ์รายตัวก่อนทำการแช่แข็ง

อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. กล้องจุลทรรศน์
2. Micropipette

3. Micropipette tip

4. Slide

5. Cove slip

6. Micro tube

วิธีการทดลอง

ใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่างน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ไก่ทีละตัวปริมาณเล็กน้อย เพื่อวัดคุณภาพเบื้องต้น โดยหยดลงบนสไลด์ และส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์

1. ประเมินจากลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ

สังเกตทันทีภายหลังจากการรีดน้ำเชื้อ โดยดูสี ความเข้มข้น และสิ่งเจือปน เช่น อุจจาระ ปัสสาวะ และของเสียอื่นๆ โดยน้ำเชื้อที่จะนำมาศึกษาต้องปราศจากสิ่งปนเปื้อน (อุจจาระ ปัสสาวะ)

2. การประเมินร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่และร้อยละการเคลื่อนที่รวม

การประเมินการเคลื่อนที่แบบหมู่ (Vigor score 0-5 หรือ นับคะแนนเป็นเปอร์เซ็นต์) และร้อยละการเคลื่อนที่รวม (Total motility, %) โดยใช้บุคคลเดียวกันในการประเมิน ซึ่งจะหยดน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ทั้ง 16 ตัว บนสไลด์ที่สะอาด อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปิด cover slip และสังเกตการเคลื่อนที่ผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบประมาณการ

ขั้นตอนและกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองแบบแช่แข็งด้วยวิธีอังไอไนโตรเจนเหลว

สารเคมี

1. Histopaque®
2. ไนโตรเจนเหลว

อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. Micropipette
2. Micropipette tip
3. หลอดทดลองพลาสติก ขนาด 15, 50 มิลลิลิตร
4. หลอดบรรจุน้ำเชื้อ (Staw)
5. ผงอุดหลอดน้ำเชื้อ
6. ถังไนโตรเจน
7. กล่องโฟม
8. Lack
9. ตะแกรงเรียงหลอดน้ำเชื้อ
10. Forceps

วิธีการทดลอง

1. ใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำเชื้อปริมาตร 490 ไมโครลิตร ใส่หลอดแช่แข็ง (French straw ขนาด 500 ไมโครลิตร) จากนั้นปิดหลอดแช่แข็งโดยใช้ผงอุด polyvinyl alcohol (PVA) ซึ่งหลังจากการเติมสาร Histopaque® จะเริ่มจับเวลาจนถึงการนำหลอดน้ำเชื้อวางลงในตระแกรงที่วาง อยู่เหนือไนโตรเจนเหลว โดยใช้เวลาประมาณ 15 นาที

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

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อหลังทำละลาย

สารเคมี

1. Eosin
2. Nigrosin
3. Sodium citrate dehydrate

อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. Micropipette
2. Micropipette tip
3. กระติกน้ำ
4. หลอดบรรจุน้ำเชื้อ (Staw)
5. กรรไกร
6. ถังไนโตรเจน
7. Slide
8. Lack
9. Cover slip
10. Forceps
11. Micro tube
12. บีกเกอร์
13. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง
14. ช้อนตักสาร

วิธีการทดลอง

ทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งในน้ำอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และตัดหลอดบรรจุน้ำเชื้อทั้งสองด้าน ก่อนจะบรรจุน้ำเชื้อไว้ใน Micro tube และใช้ไมโครปิเปตดูดตัวอย่างน้ำเชื้อในแต่กลุ่มการทดลองลงบน Slide และปิด Cover slip เพื่อประเมินลักษณะ ดังต่อไปนี้

1. การประเมินการเคลื่อนที่แบบหมู่และร้อยละการเคลื่อนที่รวม

การประเมินการเคลื่อนที่แบบหมู่ และร้อยละการเคลื่อนที่รวม (Total motility, %) โดยใช้บุคคลเดียวกันตลอดการศึกษา นำน้ำเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส จำนวน 10 ไมโครลิตร มาหยดบนสไลด์ที่สะอาดที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปิด Cover slip และสังเกตการเคลื่อนที่ผ่านกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 40 และ 100 เท่า นับจำนวนอสุจิอย่างน้อย 300 ตัว บันทึกผล และคำนวณเป็นร้อยละการเคลื่อนที่รวม

วิธีการคำนวณ

$$\text{ร้อยละการเคลื่อนที่รวม} = \frac{\text{จำนวนอสุจิเคลื่อนที่}}{300} \times 100$$

2. การประเมินการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า

การประเมินการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า ปฏิบัติโดยใช้บุคคลเดียวกันตลอดการศึกษา นำน้ำเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส จำนวน 10 ไมโครลิตร มาหยดบนสไลด์ที่สะอาดที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปิด Cover slip และสังเกตการเคลื่อนที่ผ่านกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 40 และ 100 เท่า นับจำนวนอสุจิอย่างน้อย 300 ตัว บันทึกผล และคำนวณเป็นร้อยละการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้า

วิธีการคำนวณ

$$\text{ร้อยละการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า} = \frac{\text{จำนวนอสุจิเคลื่อนที่ไปข้างหน้า}}{300} \times 100$$

3. การประเมินอัตราการมีชีวิตรอดด้วยการย้อมสี

การศึกษาอัตราการมีชีวิตใช้เทคนิคการย้อมสีด้วย Eosin และ Nigrosin โดยชั่ง Eosin B1 กรัม, Nigrosin 5 กรัม และ Sodium citrate dehydrate 1.5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ และเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร โดยให้ความร้อนขณะเตรียมสาร เพราะสารจะไม่ละลาย เมื่อสารละลายเข้ากันดีแล้วนำไปกรอง จนไม่มีตะกอนเหลืออยู่ แล้วนำสีย้อมที่ได้เก็บไว้ในขวดสีชาโดยเก็บที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นทำการหยดสี Eosin-Nigrosin ลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด (5 ไมโครลิตร) แล้ว

หยดน้ำเชื้อตัวอย่างข้าง ๆ สีย้อมประมาณ 1 ไมโครลิตร แล้วใช้เข็มเขี่ยคนน้ำเชื้อกับสีย้อมให้เข้ากัน จากนั้นใช้แผ่นสไลด์อีกแผ่นหนึ่งเกลี่ยน้ำเชื้อให้กระจายบาง ๆ โดยเกลี่ยเพียงครั้งเดียว และนำแผ่นสไลด์ที่ smear แล้ว ผึ่งให้แห้งในอุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นหยดน้ำยาทาเล็บลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด แล้วปิดด้วย cover slip นำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 40 และ 100 เท่า และนับจำนวนเซลล์ตัวเป็นและตัวตายโดยการสุ่มนับ 5 บริเวณ ๆ ละ 20 เซลล์โดยที่เซลล์ ตัวเป็นจะมีลักษณะสีขาวไม่ติดสีย้อม ส่วนตัวตายจะติดสีย้อมเป็นสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้ม

วิธีคำนวณ

$$\text{อัตราการมีชีวิตรอด} = \frac{\text{อสุจิตัวเป็น}}{20} \times 100$$

การศึกษาอัตราการผสมติด

สารเคมี

1. ด่างทับทิม
2. Formalin

อุปกรณ์ และเครื่องมือ

1. กระติกน้ำแข็ง
2. ถังไนโตรเจนเหลว
3. Forceps
4. กรรไกร
5. กระบอกฉีดยา
6. Micro tube

การศึกษาอัตราการผสมติดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองแบบแช่แข็ง เป็นการศึกษาในภาคสนาม โดยใช้แม่ไก่ไข่ อายุระหว่าง 7 เดือน ถึง 1 ปี จำนวน 30 ตัว ที่ถูกสุ่มมาเลี้ยงในกรงตับ ซึ่งจะทำการผสมเทียม 2 ครั้ง (3 วัน/ครั้ง) นาน 8 สัปดาห์ เริ่มจากการทำละลายน้ำเชื้อ (Thawed) ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และซับหลอดให้แห้ง ตัดปลายเพื่อถ่ายน้ำเชื้อลงใน Micro tube และแช่อยู่ในน้ำเย็นอุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส ตลอดเวลา จับแม่ไก่ในท่าสำหรับพร้อมผสมเทียม โดยการหนีบไว้ระหว่างขาโดยหันก้นขึ้นมาด้านบนและทำการกดลงไปเพื่อให้ทวารหนักปลิ้นออกมา จากนั้นใช้ไซริ้งค์บรรจุน้ำเชื้อปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร สอดเข้าช่องคลอดลึกประมาณ 4 เซนติเมตร และค่อยๆปล่อยน้ำเชื้อจนหมด จะเริ่มทำการเก็บไข่ภายหลังจากการผสมเทียม 1 วัน ต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 8 สัปดาห์

ในส่วนของการฟัก จะทำการเก็บไข่ทุกวันในช่วงบ่ายและนำไข่เข้าฟักทุก ๆ 1 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ถาดไข่วางเอียงทำมุม 45 องศา และมีการกลับไข่ทุกๆ 1 ชั่วโมง ก่อน

นำเข้าฟัก ตู้ฟักไข่ต้องได้รับการรมควันโดยใช้ด่างทับทิม 1 กรัม ต่อ ด่างทับทิม 2 ซีซี ทิ้งไว้ 1 คืน เพื่อฆ่าเชื้อ จากนั้นตรวจสอบการผสมติดโดยการส่องไข่ที่อายุฟัก 10 วัน และนำจำนวนไข่ที่ผสมติดมาคำนวณหาอัตราการผสมติดจากสูตร

วิธีการคำนวณ

$$\text{อัตราการผสมติด} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่ผสมติด}}{\text{จำนวนไข่ที่เข้าฟัก}} \times 100$$

$$\text{อัตราการฟัก} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่ฟัก}}{\text{จำนวนไข่ที่เข้าฟัก}} \times 100$$

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	ชนน์ชนก ชุมพินิจ
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2562 สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร พ.ศ. 2563 ศึกษาต่อระดับปริญญามหาบัณฑิตสาขาสัตวศาสตร์และเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยศิลปากร
ผลงานตีพิมพ์	ชนน์ชนก ชุมพินิจ, พิรวิทย์ เชื้อวงษ์บุญ และ กฤติยา เลิศชุณหะเกียรติ. 2566. ผลของการเสริมสารกลุ่มโพลีซูโครสต่อร้อยละการเคลื่อนที่และอัตราการรอดชีวิตของน้ำเชื้อแช่แข็งไก่พันธุ์พื้นเมืองไทย. วารสารแก่นเกษตร ฉบับเพิ่มเติม. 51(1): 1-6.

มหาวิทยาลัยศิลปากร