

ผลของออสโมแลลิตีของน้ำยาเจือจางการแช่แข็งต่อ
คุณภาพน้ำเชื้อหลังการทำละลายและการผสมติดของ
น้ำเชื้อไก่ป่าต๋มหูขาว

Effects of Freezing Extender Osmolality on Post-Thaw
Semen Quality and Fertility of
Thai Red Junglefowl Semen

สินีนานู พลแสง^{1*} พงศ์เทพ พลแสง² สุวิทย์ อินฉายา²
สจี กัณหาเรียง¹ และเทวินทร์ วงษ์พระลับ¹
Sineenart Polsang^{1*}, Pongtep Polsang², Suwit Inchaya³,
Sajee Kunhareang¹ and Thevin Vongpralub¹

ได้รับบทความ: 10 ก.ค. 2565

ได้รับบทความแก้ไข: 29 พ.ย. 2565

ยอมรับตีพิมพ์: 8 ธ.ค. 2565

บทคัดย่อ

ประสิทธิภาพการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในไก่ ขึ้นกับค่าออสโมแลลิตีของน้ำยาเจือจาง การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาออสโมแลลิตีน้ำยาเจือจางสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งไก่ป่าต๋มหูขาวโดยทำการศึกษาน้ำยาเจือจางที่มีออสโมแลลิตีแตกต่างกัน ได้แก่ น้ำยาเจือจางที่มีออสโมแลลิตีต่ำ (LTRJFE), ปกติ (TRJFE) และสูง (HTRJFE) ตามลำดับ เปรียบเทียบกับน้ำยาเจือจาง Schramm ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ โดยใช้ไก่ป่าต๋มหูขาวอายุ 1 ปี จำนวน 25 ตัว ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อหลังทำละลายโดยประเมินการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิด้วยเครื่อง Computer-assisted semen analysis จำนวน 4 ทริทเมนต์ๆ ละ 12 ชั่วโมง และประเมินการผสมติดโดยใช้แม่ไก่ไข่ออกผสมทริทเมนต์ละ 6 ชั่วโมง รวม 144 ตัว

¹ สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น 40002

² Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, KhonKaen University, KhonKaen 40002

³ วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีสุรินทร์ สถาบันการอาชีวศึกษาเกษตรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ยโสธร 35130

⁴ Yasothon College of Agriculture and Technology, Northeastern Vocational Institute of Agriculture, Yasothon 35130

⁵ วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีศรีสะเกษ สถาบันการอาชีวศึกษาเกษตรภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ศรีสะเกษ 33000

⁶ Srisaket College of Agriculture and Technology, Northeastern Vocational Institute of Agriculture, Srisaket, 33000

*ผู้รับผิดชอบประสานงาน (Corresponding author) e-mail: sineenartpol@gmail.com

พบว่าน้ำยาเจือจาง Schramm, LTRJFE, TRJFE และ HTRJFE มีค่าออสโมแลลิตี 441, 365, 452 และ 472 mOsmol kg⁻¹ตามลำดับ การเคลื่อนที่ทั้งหมดของตัวอสุจิหลังทำละลาย พบว่าน้ำยาเจือจาง TRJFE (61.08±0.48%) ดีที่สุด สูงกว่าน้ำยาเจือจาง Schramm (54.83±0.52%), HTRJFE (37.83±0.66%) และ LTRJFE (31.67±0.58%) ($P \leq 0.01$) น้ำเชื้อที่ใช้ น้ำยาเจือจาง TRJFE มีค่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ (24.50±0.79%) สูงที่สุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาเจือจาง Schramm (23.25±0.58%), HTRJFE (21.83±1.04%) และ LTRJFE (21.00±0.83%) อัตราการผสมติด พบว่าน้ำยาเจือจาง TRJFE (57.00±0.70%) และ Schramm (54.22±0.68%) ดีที่สุด สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาเจือจาง HTRJFE (32.90±1.74%) และ LTRJFE (31.02±2.17%) ดังนั้นน้ำยาเจือจาง TRJFE มีความเหมาะสมในการใช้เป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งในไก่ป่าตุ่มหูขาว

คำสำคัญ: น้ำยาเจือจาง การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง อัตราการผสมติด ไก่ป่าตุ่มหูขาว (*Gallus gallus gallus*)

ABSTRACT

The efficiency of frozen semen storage in chicken depends on the osmolality of the extender. The objective of this research was to compare the osmolality of the Thai red junglefowl extenders: low (LTRJFE), normal (TRJFE), and high (HTRJFE) osmolality levels with the Schramm extenders for frozen Thai red junglefowl semen. The experimental design used was the completely randomized design with 4-treatments and 12 replications. Then the quality of extenders was tested in Thai red junglefowl semen of 25 one-year-old males, by measuring the sperm motility after thawing with a computer-assisted semen analysis. The fertility of Thai red junglefowl semen was tested for 4 treatments and 6 replications with 6-hens/each. The total number of hen used in this experiment was 144-hens. The results showed that the osmolarities of Schramm, LTRJFE, TRJFE, and HTRJFE were 441, 365, 452, and 472 mOsmol kg⁻¹, respectively. The total motility after thawing frozen semen of the TRJFE (61.08±0.48%) was the best, highly significant different ($P \leq 0.01$) from the Schramm (54.83±0.52%), HTRJFE (37.83±0.66%), and LTRJFE (31.67±0.58%). The sperm progressive motile after thawing frozen semen of the TRJFE (24.50±0.79%) was the best, significantly different ($P \leq 0.05$) from the Schramm (23.25±0.58%), HTRJFE (21.83±1.04%), and LTRJFE (21.00±0.83%). The fertility rates of the TRJFE (57.00±0.70%) and Schramm (54.22±0.68%) were the best, highly significant different from the HTRJFE (32.90±1.74%) and LTRJFE (31.02±2.17%) ($P < 0.01$). Therefore, the TRJFE was the optimum extender for the cryopreservation of Thai red junglefowl semen.

Keywords: Extender, Semen cryopreservation, Fertility rate, Thai red junglefowl (*Gallus gallus gallus*)

บทนำ

ไก่ป่าตุ้มหูขาว (*Gallus gallus gallus*) เป็นบรรพบุรุษของไก่บ้าน (*Gallus gallusdomesticus*) [1,2] มีความเสี่ยงต่อการสูญเสียนพันธุ์ที่หาได้ในป่าธรรมชาติ[3]เนื่องจากพื้นที่ป่าถูกบุกรุกเพื่อเป็นที่อยู่อาศัยและทำการเกษตร ซึ่งอาจเกิดผลกระทบต่อความหลากหลายทางชีวภาพ ส่งผลกระทบต่อความมั่นคงด้านอาหารสำหรับมนุษย์ได้ [4,5]โดยมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์จากการที่พันธุ์กรรมอาจปนกับไก่พื้นเมืองจากการผสมข้ามกลุ่ม สาเหตุจากถิ่นที่อยู่มีสภาพที่เป็นเนื้อเดียวกันมากขึ้น [6] ด้วยเหตุผลนี้ ไก่ป่าตุ้มหูขาวจึงมีพันธุ์กรรมที่ควรค่าแก่การอนุรักษ์เพื่อรักษาความหลากหลายทางชีวภาพ (Biodiversity) โดยเร่งด่วน การเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งจึงเป็นแนวทางหนึ่งในการอนุรักษ์พันธุ์กรรมไก่ป่าตุ้มหูขาว

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งจะขึ้นอยู่กับปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ เช่น การใช้น้ำยาเจือจางและสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งที่เหมาะสมจะทำให้ในระหว่างกระบวนการลดอุณหภูมิและการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งนั้น มีความเสียหายจากลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของเยื่อหุ้มเซลล์ของตัวสุจิเปลี่ยนแปลงไปลดลงได้นั้นคือทำให้อัตราการเคลื่อนที่อัตราการมีชีวิตรอด และอัตราการผสมติดยังมีประสิทธิภาพอยู่ได้[7,8]สำหรับน้ำยาเจือจางที่เหมาะสมจะต้องมีคุณสมบัติของน้ำยาเจือจางอย่างหนึ่งที่สำคัญคือค่าออสโมแลลิตี(Osmolality)ที่เหมาะสมกับน้ำเชื้อของกลุ่มไก่ด้วยซึ่งมีรายงานถึงผลสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของสัตว์ปีกหลายชนิด ทั้งนี้ น้ำยาเจือจางแช่แข็งของสุจิของสัตว์ปีกแต่ละชนิด แต่ละพันธุ์ แต่ละสายพันธุ์ ให้ผลที่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากสรีรวิทยาการสืบพันธุ์เฉพาะและความแปรปรวนสูงในแต่ละสายพันธุ์ทำให้น้ำเชื้อไก่มีการตอบสนองที่แตกต่างกัน [9-16] ปัจจุบันนี้ยังไม่มีรายงานการศึกษาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่ป่าตุ้มหูขาวมาก่อน ดังนั้น จึงมีความจำเป็นในการพัฒนาสูตรน้ำยาเจือจางที่มีค่าออสโมแลลิตีที่เหมาะสมสำหรับไก่ป่าตุ้มหูขาวต่อไป

ปัจจัยที่มีผลต่อวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในสัตว์แต่ละชนิด ได้แก่ ความเหมาะสมของสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง อัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการทำละลาย [17] เมื่อนำสูตรน้ำยาเจือจางที่เหมาะสมไปใช้กับความเข้มข้นของสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งที่เหมาะสมด้วย จะทำให้มีการดูดซึมและมีค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับเซลล์สุจิของสัตว์ปีกแต่ละชนิด[9,14,18-22] ทั้งนี้หากสุจิอยู่ภายใต้แรงดันออสโมติกที่ไม่เหมาะสมเพราะใช้น้ำยาเจือจางที่มีค่าออสโมแลลิตีไม่เหมาะสม จะทำให้ตัวสุจิไม่สามารถต้านทานได้ จะเกิดอาการช็อกและมีอาการรอที่คอ [23] และหากมีการเปลี่ยนแปลงพีเอชในวงกว้างอาจส่งผลเสียต่ออัตราการรอดชีวิตและอัตราการการผสมติด[24,25] ถ้าตัวสุจิภายหลังการทำละลายมีอัตราการเคลื่อนที่สูงจะเป็นตัวบ่งชี้ในเบื้องต้นว่ามีโอกาสประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งได้[26]

จากการที่คุณสมบัติทางกายภาพของน้ำยาเจือจางเป็นผลจากส่วนประกอบของน้ำยาเจือจางโดยขึ้นกับชนิดของสารเคมี (ตัวถูกละลาย) และชนิดของน้ำที่ใช้ (ตัวทำละลาย) และอัตราการใช้สารเคมีที่ต่างกัน และคุณสมบัติทางกายภาพที่เฉพาะเจาะจงสูงกับน้ำอสุจิของสัตว์แต่ละพันธุ์ตลอดจนขึ้นกับคุณภาพและปริมาณของตัวทำละลายที่แตกต่างกันด้วย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางชีวฟิสิกส์ของเซลล์สุจิในสัตว์ปีกแต่ละชนิด จะมีการตอบสนองที่แตกต่างกันไปตามชนิดของน้ำยาเจือจางที่ใช้[9,10,12-15] ซึ่งองค์ประกอบทางเคมีในน้ำยาเจือจางมักมีองค์ประกอบที่คล้ายกับน้ำเชื้อของสัตว์ปีกชนิดนั้น ๆ [27]ได้แก่ แหล่งพลังงานระดับพีเอชความเป็นบัฟเฟอร์ และค่าออสโมแลลิตีที่ใกล้เคียงกับน้ำเชื้อของสัตว์ชนิดนั้นเช่นกันด้วยเหตุนี้การใช้สูตรน้ำยาเจือจางที่แตกต่างกันทำให้แหล่งพลังงาน ระดับพีเอชความเป็นบัฟเฟอร์และค่าออสโมแลลิตีในสูตรน้ำยาเจือจางมีความแตกต่างกันไป จึงส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อที่ต่างกันได้ [11,28]ปัจจุบันน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อไก่แบบแช่แข็งที่นิยมได้แก่สูตร Tselutin (1995) [28], Schramm diluents (Schramm, 1976 อ้างโดย[29]และIGGKP[30] แต่ยังไม่พบรายงานสูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อไก่ป่าตุ้มหูขาวแบบแช่แข็งโดยเฉพาะ

ดังนั้น การศึกษานี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลการประยุกต์สูตรน้ำยาเจือจางสำหรับเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ป่า ต้มหุขาวแบบแช่แข็งโดยศึกษาหาระดับออสโมแลลิตีที่เหมาะสมของน้ำยาเจือจางกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ป่า ต้มหุขาวแบบแช่แข็ง อันจะเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์พันธุ์กรรมของไก่ป่าชนิดนี้ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1.การวางแผนการวิจัยประเมินคุณภาพน้ำเชื้อหลังทำละลายตามแผนการทดลองแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design, CRD) มี 4 ทรีทเมนต์คือ น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อไก่ป่า ต้มหุขาวที่มีค่าออสโมแลลิตีต่ำ (Low osmolality of Thai red junglefowl extender, LTRJFE) มีค่าออสโมแลลิตี 327-387 mOsmol kg⁻¹, ค่าออสโมแลลิตีปกติ (Thai red junglefowl extender, TRJFE) มีค่าออสโมแลลิตี 388-447 mOsmol kg⁻¹, ค่าออสโมแลลิตีสูง (High osmolality of Thai red junglefowl extender, HTRJFE) มีค่าออสโมแลลิตี 448-507 mOsmol kg⁻¹ และน้ำยาเจือจาง Schramm มีค่าออสโมแลลิตี 441mOsmol kg⁻¹ (ตารางที่ 1) ใช้ร่วมกับ 6% DMF (N,N-dimethyl formamide) แต่ละทรีทเมนต์มี 12 ซ้ำ และคำนวณอัตราการผสมติดโดยการผสมเทียมไก่ไข่ออกผสมด้วยน้ำเชื้อหลังทำละลาย ในแต่ละทรีทเมนต์มี 6 ซ้ำๆ ละ 6 ตัว

2. สัตว์ทดลอง

2.1 พ่อพันธุ์ไก่ป่าต้มหุขาวอายุ 1 ปี จำนวน 25 ตัว ทำเครื่องหมายที่ปลอกขาทุกตัว จัดเลี้ยงในคอกขนาด 4x6 เมตร ซึ่งมีรั้วตาข่ายคลุมบริเวณรอบคอกเลี้ยง เป็นพื้นที่ขนาด 10x30เมตร พื้นที่รอบคอกเลี้ยงเป็นแปลงหญ้าเลี้ยงไก่ป่าต้มหุขาวแบบปล่อยลานจนถึงอายุ 10 เดือน จึงเลี้ยงในกรงตบขนาด 45x60 เซนติเมตร สำหรับฝึกกรีดเก็บน้ำเชื้อ และเมื่ออายุ 1 ปีจะกรีดเก็บน้ำเชื้อเพื่อทำการวิจัย การให้อาหารไก่ป่าต้มหุขาวกิน 80 กรัม/ตัว/วัน ให้น้ำกินเต็มที่ อุณหภูมิเป็นไปตามธรรมชาติ ให้แสงสว่าง 14 ชั่วโมง/วัน ในบริเวณคอกมีรั้วไม้ธรรมชาติ

2.2 แม่ไก่ไข่ออกผสมพันธุ์โบราณสัรวานอายุ 24 สัปดาห์ มีอัตราการให้ไข่ 85-95%จำนวน 144 ตัวแม่ไก่ไข่ออกเลี้ยงในกรงตบขนาดคอก 45x60 เซนติเมตรต่อตัว ให้อาหารไก่ไข่สำเร็จรูปวันละ 110 กรัม/ตัว/วัน ให้น้ำกินเต็มที่ให้แสงวันละ 14 ชั่วโมง

การจัดการเลี้ยงดูไก่ป่าต้มหุขาว ณ วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีสุพรรณบุรี (15° 32' 41'' N) ภายใต้การควบคุมการเลี้ยงดูของโครงการอนุรักษ์และรวบรวมพันธุ์สัตว์ป่า สวนสมเด็จพระศรีนครินทร์วิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีศรีสะเกษ อำเภอเมืองศรีสะเกษ จังหวัดศรีสะเกษ การวิจัยในครั้งนี้อยู่ภายใต้การควบคุมของสาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ได้รับใบอนุญาต (Approval No.: 0514.1.75/15) จากศูนย์สัตว์ทดลองภาคตะวันออกเฉียงเหนือมหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การกรีดเก็บน้ำเชื้อเพื่อประเมินคุณภาพโดยทำการกรีดเก็บน้ำเชื้อไก่ป่าต้มหุขาวจำนวน 25 ตัว ในวันอังคารและวันพฤหัสบดี เวลา 10.00 น.ทุกสัปดาห์ของการทดลอง กรีดเก็บน้ำเชื้อโดยใช้บุคคลที่เหมือนกัน 2 คนสำหรับจับบังคับไก่ 1 คน ส่วนอีกคนหนึ่งเป็นผู้กระตุ้นพ่อพันธุ์ด้วยการลูบหลังจากด้านหลังไปด้านหลัง พ่อพันธุ์จะตอบสนองด้วยการเกร็งและกระดกหาง จากนั้นบีบโคนกันเพื่อเก็บน้ำเชื้อทันที รองเก็บน้ำเชื้อด้วยหลอดที่สะอาดขนาด 1.5 มิลลิลิตรโดยในหลอดจะมีน้ำยาเจือจาง Schramm, LTRJFE, TRJFE และ HTRJFE ตามแผนการทดลองอยู่ 100 ไมโครลิตรเมื่อรีดน้ำเชื้อเสร็จ ปิดฝาหลอดและสับหลอดให้น้ำเชื้อผสมกับน้ำยาเจือจางทันที การสับหลอดเป็นเทคนิควิธีในการทำให้น้ำเชื้อไก่ป่าต้มหุขาวที่มีลักษณะข้นและเหนียวมาโดยจะมีลักษณะเป็นก้อนเกาะติดที่ปากหลอดจะไม่ไหลลงไปกับหลอดที่มีน้ำยาเจือจางอยู่ ดังนั้น เพื่อให้ตัวผสมสุกกับน้ำยาเจือจางอย่างรวดเร็ว ทำให้มีอัตราการตายของตัวสุกไก่ป่าต้มหุขาวอยู่ใน

ระดับต่ำ จึงต้องสับดทั้งหมด โดยทำเพียงครั้งเดียวให้ก้อนน้ำเชื้อไหลไปรวมกับน้ำยาเจือจางทันทีแล้วเก็บหลอดน้ำเชื้อโดยแช่น้ำเย็นที่ควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 20 องศาเซลเซียส ในภาชนะเก็บความเย็นและทึบแสง[31] วิธีการรีดเก็บ เวลา และเงื่อนไขการรีดเหมือนกันในทุกครั้ง น้ำเชื้อที่ได้จะต้องไม่มีการปนเปื้อนของมูล ยูเรต และฝุ่นผงอื่น เพราะจะลดคุณภาพน้ำเชื้อได้ [32] น้ำเชื้อแต่ละหลอดจะถูกประเมินคุณภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ภายใน 15 นาทีหลังการรีดเก็บ และจะเลือกหลอดที่มีตัวอสุจิเคลื่อนที่รวม >4 คะแนน (ช่วงคะแนน 0 ถึง 5) (กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X) ความเข้มข้นของตัวอสุจิ > 3,000x10⁶ เซลล์/มิลลิลิตร (ใช้วิธีตรวจนับด้วย Hemacytometer counting method) [33,34]

3.2 การทำน้ำเชื้อแช่แข็งและการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อหลังทำลายโดยการทำน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยวิธีแบบง่ายโดยใช้ไนโตรเจนเหลว(Simple freezing method by liquid nitrogen vapor) [34-36] เพื่อทดสอบสูตรน้ำยาเจือจางสำหรับเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่ป่าดุ่มหุขาวSchramm, LTRJFE, TRJFE และ HTRJFE (ตารางที่ 1) มีขั้นตอนการเตรียมน้ำยาเจือจาง ดังนี้

3.2.1 วัดค่าออสโมแลลิตีของน้ำเชื้อไก่ป่าดุ่มหุขาวด้วยเครื่อง Osmometer (FISKE Mark 3 Osmometer: FISKE Associates, Norwood, Massachusetts, USA) และวัดพีเอชของน้ำเชื้อไก่ป่าดุ่มหุขาวด้วยเครื่อง pH meter (CRITON Instrument, S.A., Spain) ตามลำดับ

3.2.2 เลือกใช้สารเคมีในสูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสำหรับการแช่แข็งในไก่ป่าดุ่มหุขาว จะเลือกจากคุณสมบัติที่เป็นประโยชน์กับคุณภาพน้ำเชื้อ และเป็นสารเคมีที่ราคาเหมาะสมในการทำงานวิจัย เพื่อได้สูตรน้ำยาเจือจางที่ราคาถูกและดีกว่า ซึ่งสารเคมีและน้ำอูลตราพีวที่ใช้ในสูตรน้ำยาเจือจางเป็นเกรด Molecular biology reagent ของ Sigma Aldrich, St.Louis, MO, USA สำหรับสารเคมีที่เลือกใช้เป็นองค์ประกอบของสูตร TRJFE จะเลือกโดยเปรียบเทียบองค์ประกอบสารเคมีในสูตรน้ำยาเจือจางมาตรฐาน 3 สูตร คือ สูตร Schramm เพราะให้อัตราการผสมติดมากที่สุด 81% สำหรับน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่พื้นเมืองไทย (ประดู่หางดำ) [37] สูตร RFE เพราะให้อัตราการผสมติดมากที่สุด 45.3%สำหรับน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่ป่าแดงอินเดีย [22] และสูตร HS1 เพราะให้อัตราการผสมติดมากที่สุด 80.1%สำหรับน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่เล็กฮอร์นขาว [38]

3.2.3 การประยุกต์สร้างสูตรน้ำยาเจือจาง นำสารเคมีที่เลือกใช้มาประกอบสูตรน้ำยาเจือจาง เพื่อดำเนินการตรวจสอบความเหมาะสมเบื้องต้นจากการวัดค่าออสโมแลลิตีของสารประกอบทุกสูตร (Table1)สำหรับค่าออสโมแลลิตีของน้ำยาเจือจางที่ยอมรับนำไปใช้ได้จะมากกว่าค่าออสโมแลลิตีของน้ำเชื้อไก่ประมาณ 110mOsmol kg⁻¹เป็นแรงดันที่ยอมรับแล้วว่าทำให้สารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งมีความสามารถแตกต่างกันในการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ [39]โดยสูตรน้ำยาเจือจางถูกปรับค่าออสโมแลลิตีด้วยน้ำอูลตราพีว(Ultrapure) [32]น้ำยาเจือจางสูตร TRJFE ปรับค่าออสโมแลลิตีต่ำ (Low osmolality of Thai red junglefowl extender, LTRJFE) และสูง (High osmolality of Thai red junglefowl extender, HTRJFE) กว่าสูตรปกติ (Thai red junglefowl extender, TRJFE) โดยการเติมน้ำอูลตราพีวในสูตรให้ได้ 105 และ 95 มิลลิลิตร ตามลำดับ นำสูตรน้ำยาเจือจางทุกสูตรที่สร้างไปวัดค่าออสโมแลลิตี

บทความวิจัย (Research Article)

วารสารวิชาการสถาบันการอาชีวศึกษาเกษตร

ปีที่ 6 • ฉบับที่ 2 • กรกฎาคม-ธันวาคม 2565

ตารางที่ 1 สูตรน้ำยาเจือจางสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ป่าคุ้มหูขาวแบบแช่แข็ง

สูตรน้ำยาเจือจาง 100 มล.	Schramm	LTRJFE	TRJFE	HTRJFE
แมกนีเซียมอะซิเตทเตตราไฮเดรต (ก.) (Magnesium acetate tetrahydrate (g))	0.07	-	-	-
โพแทสเซียมอะซิเตทแอนไฮไดรอส (ก.) (Potassium acetate anhydrous (g))	0.50	0.50	0.50	0.50
แอล-กลูตามิกแอซิดเกลือโซเดียม โมโนไฮเดรต (ก.) (L-Glutamic acid monosodium salt monohydrate (g))	2.85	2.10	2.10	2.10
ไกลซีน (ก.) (Glycine (g))	-	0.20	0.20	0.20
ดี-(+)-กลูโคส (ก.) (D-(+)-Glucose (g))	0.50	0.50	0.50	0.50
อินโนสิทอล (ก.) (Inositol (g))	0.25	0.25	0.25	0.25
โพลีไวนิลไพร์โรลิโดน (ก.) (Polyvinyl pyrrolidone (g))	-	0.60	0.60	0.60
เพนิโนมัยซิน (ก.) (Penomycin (g))	0.10	0.10	0.10	0.10
น้ำอูลตราพิวรี่ (ก.) (Ultrapure water (mL))	เติมน้ำจนครบ 100 มล.	เติมน้ำจนครบ 105 มล.	เติมน้ำจนครบ 100 มล.	เติมน้ำจนครบ 95 มล.
ออสโมแลลิตี (Osmolality (mOsmol kg ⁻¹))	441	365	452	472

ออสโมแลลิตีของน้ำเชื้อไก่ป่าคุ้มหูขาวคือ 327 mOsmol kg⁻¹

น้ำเชื้อแต่ละหลอดที่รีดเก็บจากพ่อพันธุ์ไก่ป่าคุ้มหูขาวแต่ละตัว จำนวน 25 ตัว ซึ่งผ่านการประเมินคุณภาพแล้วมีปริมาตรน้ำเชื้อเฉลี่ย 0.281 มิลลิลิตร/หลอด และความเข้มข้นของสเปิร์ม $6,320 \times 10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร นำน้ำเชื้อทุกหลอดรวมกันได้ปริมาตร 7.025 มิลลิลิตรและมีจำนวนสเปิร์ม $44,398.10 \times 10^6$ เซลล์ แบ่งเป็น 4 หลอด แต่ละหลอดใช้น้ำยาเจือจางแต่ละสูตรตามทริทเมนต์ที่ 1, 2, 3 และ 4 เป็นสูตรน้ำยาเจือจาง Schramm, LTRJFE, TRJFE และ HTRJFEตามลำดับ แล้วเจือจาง 1:3 (น้ำเชื้อ : น้ำยาเจือจาง) ทำการลดอุณหภูมิจาก 20-25 องศาเซลเซียสของน้ำเชื้อเจือจางลงให้มีอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสภายในเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อเจือจางและปริมาตรของ 6% DMF โดยคำนวณจากแต่ละหลอดมีความเข้มข้นของสเปิร์ม $11,099.50 \times 10^6$ เซลล์ ซึ่งสามารถทำน้ำเชื้อแช่แข็งได้ 22 หลอดพาง ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งในไถ่จะใช้จำนวนสเปิร์มต่อหลอดพางขนาด 0.5 มิลลิลิตรประมาณ 500×10^6 เซลล์ [34-37] ดังนั้นแต่ละหลอดจะมีปริมาตรน้ำเชื้อ (1.756 มิลลิลิตร) น้ำยาเจือจาง (8.677 มิลลิลิตร) และ 6% DMF (0.666 มิลลิลิตร) รวมหลอดละ 11.099 มิลลิลิตรนั่นคือแต่ละหลอดมีความเข้มข้นสเปิร์ม $1,000 \times 10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร หลังจากแต่ละหลอดเติมน้ำยาเจือจางสูตรเดิมที่มี DMF ความเข้มข้นสุดท้าย 6% ที่อุณหภูมิเดียวกันกับน้ำเชื้อเจือจาง ทำการบรรจุน้ำเชื้อเจือจางลงในหลอดพางขนาด 0.5 มิลลิลิตรในแต่ละหลอดพางมีจำนวนตัวสเปิร์ม 500×10^6 เซลล์ปิดหลอดด้วยโพลีไวนิลแอลกอฮอล์บ่มไว้ในความเย็น 5 องศาเซลเซียสนาน 15 นาทีแล้ว

อังตะแกรงสำหรับวางหลอดฟางในกล่องโฟมบรรจุไนโตรเจนเหลว โดยวางเหนือระดับไนโตรเจนที่อุณหภูมิ -35 องศาเซลเซียสนาน 1 นาทีแล้ววางหลอดฟางบนตะแกรงนี้นาน 10 นาทีแล้วลดตะแกรงเข้าใกล้ระดับไนโตรเจนเหลวตำแหน่งที่มีอุณหภูมิ -135 องศาเซลเซียสนาน 5 นาทีแล้วเลื่อนตะแกรงจุ่มในไนโตรเจนเหลวแล้วเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในถังเก็บไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส[34]

นำหลอดน้ำเชื้อที่แช่ในไนโตรเจนเหลวออกมาทำละลายในน้ำเย็น 5 องศาเซลเซียส 5 นาทีเพื่อประเมินการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิด้วยเครื่อง Computer-assisted semen analysis (CASA) (Hamilton-Thorn Motility Analyzer, IVOS) ซึ่งถูกเซ็ต Frames per sec 60 Hz, Minimum contrast 25, Minimum cell size 4 pix, Path velocity: VAP 20.0 μ /s, STR 80%, cell intensity 50, VAP cut off 5.0 μ /s, and VSL cut off 20.0 μ /s โดยนำตัวอย่างน้ำเชื้อหลังทำละลายมาเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางแต่ละชนิดตามการทดลองอัตรา 1: 10 (v/v) โหลดน้ำเชื้อเจือจางดังกล่าว 3 ไมโครลิตรหยอดบนสไลด์ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียสที่ละ Chamber slide บันทึกค่าการเคลื่อนที่หมู่ของตัวอสุจิ (%Total motile sperm, MOT) และการเคลื่อนที่รายตัวไปข้างหน้าของเซลล์อสุจิ (% Progressive motile sperm, PMOT) [40]

3.3 ทำการผสมเทียมในแม่ไก่ไข่เพื่อประเมินอัตราการผสมติด โดยฉีดน้ำเชื้อแต่ละทรีทเมนต์หลังทำละลายให้แม่ไก่ไข่ แต่ละกลุ่มการทดลองในแม่ไก่แต่ละตัวรับการฉีดผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อหลังทำละลาย 0.4 มิลลิลิตรซึ่งมีความเข้มข้นเซลล์อสุจิ 400x10⁶ เซลล์ฉีดผสมเทียมต่อแม่ไก่ไข่ 1 ตัว กลุ่มแม่ไก่ไข่ทดลองมี 4 ทรีทเมนต์ ๆ ละ 6 ซ้ำ ๆ ละ 6 ตัวรวมจำนวนแม่ไก่ไข่ทั้งหมด 144 ตัว ทำการเก็บไข่ในวันที่ 2 หลังการผสมเทียม เก็บไข่นาน 7 วัน ซึ่งจำนวนวันหลังการผสมเทียมไม่มีผลต่ออัตราการผสมติด นำไข่เข้าฟักที่อุณหภูมิ 99-100 องศาฟาเรนไฮต์และมีความชื้นสัมพัทธ์ 65% ส่องไข่ไมโครสโคปในวันที่ 7 หลังจากนำไข่เข้าฟัก [34]

4. การเก็บรวบรวมข้อมูลโดยการวัดค่าออสโมลลิตีและค่า pH ของน้ำเชื้อสดไปกำจัดมูลหูกและน้ำยาเจือจาง และวัดคุณภาพน้ำเชื้อหลังการทำละลาย ด้วยเครื่องมือ CASA analysis เพื่อหาค่าการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (% Motility) และคำนวณอัตราการผสมติดหรืออัตราไขมีเชื้อ (Fertilityrate) ดังนี้

$$\text{อัตราการผสมติด(\%)} = \frac{\text{จำนวนไข่มีเชื้อทั้งหมด}}{\text{จำนวนไข่เข้าฟักทั้งหมด}} \times 100$$

5. การวิเคราะห์ทางสถิตินำค่าการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ และค่าอัตราการผสมติดของตัวอสุจิ มาวิเคราะห์หาความแปรปรวน (ANOVA) ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยแต่ละทรีทเมนต์ด้วยวิธี Duncan's New multiple Range Test ข้อมูลที่เป็นค่าร้อยละถูกแปลงเป็นค่า Arcsin ($\sqrt{y/2}$) ก่อนวิเคราะห์หาความแปรปรวน (ANOVA) หาค่า $P \leq 0.05$ โดยใช้โปรแกรม SASTM Edition SAS University v 9.4 [41]

ผลการวิจัย

1.1 น้ำยาเจือจางเพื่อการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่ป่าตุ้มหูกขาวสุตรซึ่งมีออสโมลลิตีที่เหมาะสม จะให้ผลดีต่อน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่ป่าตุ้มหูกขาวโดยผลการเคลื่อนที่ทั้งหมดของตัวอสุจิหลังทำละลายเมื่อนำน้ำยาเจือจาง TRJFE (61.08±0.48%) ให้ผลดีที่สุด ดีกว่าน้ำยาเจือจาง Schramm (54.83±0.52%), HTRJFE (37.83±0.66%) และ LTRJFE (31.67±0.58%) ตามลำดับ ซึ่งแต่ละทรีทเมนต์ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.01$) การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิหลังทำละลายเมื่อนำน้ำยาเจือจาง TRJFE (24.50±0.79%) และ Schramm (23.25±0.58%) ให้ผลดีที่สุด ดีกว่าน้ำยาเจือจาง HTRJFE

บทความวิจัย (Research Article)

วารสารวิชาการสถาบันการอาชีวศึกษาเกษตร

ปีที่ 6 • ฉบับที่ 2 • กรกฎาคม-ธันวาคม 2565

($21.83 \pm 1.04\%$) และ LTRJFE ($21.00 \pm 0.83\%$) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) อัตราการผสมติดของน้ำเชื้อหลังทำละลายเมื่อใช้น้ำยาเจือจาง TRJFE ($57.00 \pm 0.70\%$) และ Schramm ($54.22 \pm 0.68\%$) ให้ผลดีที่สุด ดีกว่าน้ำยาเจือจาง HTRJFE ($32.90 \pm 1.74\%$) และ LTRJFE ($31.02 \pm 2.17\%$) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.01$) (ตารางที่ 2) ความเป็นกรดเป็นด่างพบว่าในวันที่ 1 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.20 และในวันที่ 30 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 7.80

ตารางที่ 2 ผลของน้ำยา Schramm, LTRJFE, TRJFE และ HTRJFE ที่ผสมสาร DMF ซึ่งเป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งให้มีความเข้มข้น 6% ต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังการทำละลายของไก่ฟอพื้นธุ์จำนวน ($n = 25$ ตัว โดยเป็นน้ำเชื้อที่ตรวจคุณภาพแล้วมาเทรวมกัน (Pooled samples) ก่อนทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง

คุณภาพน้ำเชื้อหลังทำละลาย	T1 (Schramm)	T2 (LTRJFE)	T3 (TRJFE)	T4 (HTRJFE)	SEM	Pr>F
การเคลื่อนที่ทั้งหมดของตัวอสุจิ (Total motile sperm, MOT (%)*)	54.83 ± 0.52^b	31.67 ± 0.58^d	61.08 ± 0.48^a	37.83 ± 0.66^c	0.57	<.0001
การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ (Progressive motile sperm, PMOT (%)*)	23.25 ± 0.58^{ab}	21.00 ± 0.83^b	24.50 ± 0.79^a	21.83 ± 1.04^b	1.55	0.0232
อัตราการผสมติด (Fertility rate (%)* [†])	54.22 ± 0.68^a	31.02 ± 2.17^b	57.00 ± 0.70^a	32.90 ± 1.74^b	1.47	<.0001
จำนวนไข่เข้าฟัก (Total number of eggs)	218	204	212	211		

ผลการทดลองแสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard error of the mean, SEM) (*จำนวนซ้ำ (N) = 12; $\dagger N = 6$) การวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อหลังทำละลายแต่ละวิธีแทนที่โดยวิเคราะห์ค่า MOT และ PMOT ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ (Computer-assisted semen analysis, CASA) และโดยการประเมินค่าอัตราการผสมติดด้วยการผสมเทียม จะใช้น้ำเชื้อหลังการทำละลายที่มาจากตัวอย่างเดียวกัน อักษรที่แตกต่างกันในบรรทัดเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตัวย่อ: LTRJFE เป็นน้ำยาเจือจางที่มีค่าออสโมแลลิตีต่ำสำหรับเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ป่าดุ่มหุขาวแบบแช่แข็ง (Low osmolality of Thai red junglefowl extender); TRJFE เป็นน้ำยาเจือจางที่มีค่าออสโมแลลิตีปกติสำหรับเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ป่าดุ่มหุขาวแบบแช่แข็ง (Normal osmolality of Thai red junglefowl extender); HTRJFE เป็นน้ำยาเจือจางที่มีค่าออสโมแลลิตีสูงสำหรับเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่ป่าดุ่มหุขาวแบบแช่แข็ง (High osmolality of Thai red junglefowl extender)

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

น้ำยาเจือจางสำหรับไก่ป่าดุ่มหุขาว 3 สูตรที่มีออสโมแลลิตีแตกต่างกันได้แก่ น้ำยาเจือจางที่มีค่าออสโมแลลิตีต่ำ (LTRJFE) ค่าออสโมแลลิตีปกติ (TRJFE) และค่าออสโมแลลิตีสูง (HTRJFE) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำยาเจือจาง Schramm ผลการศึกษาพบว่าหากน้ำยาเจือจางมีค่าออสโมแลลิตีสูงหรือต่ำกว่าปกติจะทำให้ให้น้ำยาเจือจางไม่มีประสิทธิภาพในการทำน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่ป่าดุ่มหุขาว ค่าออสโมแลลิตีที่ไม่เหมาะสมจะทำให้จะทำให้ตัวอสุจิมีการงอที่คอ[23]เป็นสาเหตุที่ทำให้อัตราการผสมติดต่ำได้ ซึ่งน้ำยาเจือจางที่ทำให้ได้คุณภาพน้ำเชื้อหลังทำละลาย มีการเคลื่อนที่ของอสุจิและอัตราการผสมติดที่ดีที่สุดคือน้ำยาเจือจาง TRJFE โดยสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งที่เลือกใช้คือ 6%DMF ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นของสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งที่เหมาะสมในไก่พื้นเมืองไทย [35,36,43] โดยพบว่าอสุจิของไก่พื้นเมืองไทย (ประดู่หางดำ) แบบแช่แข็งภายหลังการทำละลายมีการเคลื่อนที่ทั้งหมด 37.95% และการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า 14.25% [35] ซึ่งต่อมา[42] ได้มีรายงานผลของการใช้น้ำยาเจือจางสูตร Schramm+6%DMF ต่อคุณภาพอสุจิของไก่พื้นเมืองไทย (ประดู่หางดำ) แบบแช่แข็งภายหลังการทำละลายมีการเคลื่อนที่ทั้งหมด 57.45% การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า 32.24% และอัตราการผสมติด 85.75% และมีรายงาน [36] ผลของการใช้น้ำยาเจือจางสูตร Schramm+6%DMF ต่อคุณภาพอสุจิของไก่พื้นเมืองไทย (ประดู่หางดำ) แบบแช่แข็งภายหลังการทำละลายมีการเคลื่อนที่ทั้งหมด 64.33% และการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า 28.00%

และอัตราการผสมติด 91.21% ทั้งนี้ ถึงแม้ว่าในไก่พื้นเมืองไทย(ประดู่หางดำ) จะให้ค่าอัตราการผสมติดสูงกว่าในไก่ป่าตุ่มหูขาว (57.00%) อาจเป็นเพราะว่าเป็นไก่ต่างสายพันธุ์กัน และในไก่พื้นเมืองใช้น้ำยาเจือจาง Schramm ผลการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าค่าออสโมแลลิตีที่เหมาะสมของน้ำยาเจือจางคือ 452 mOsmol kg⁻¹ ซึ่งมีค่าออสโมแลลิตีของน้ำยาเจือจางมากกว่าน้ำเชื้อเป็น 125 mOsmol kg⁻¹ ในไก่และไก่วงง ความมีชีวิตของอสุจิต่ำเมื่อค่าออสโมแลลิตีของน้ำยาเจือจางมากกว่าหรือเท่ากับ 800 mOsmol kg⁻¹ [9] ในสภาวะค่าออสโมแลลิตีต่ำกว่า 200 และ 140 mOsmol kg⁻¹ ส่งผลเสียต่อความสามารถในการผสมติดของอสุจิของไก่และไก่วงงตามลำดับ [28] จากการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการรายงานค่าออสโมแลลิตีของน้ำยาเจือจางที่ทำให้ตัวอสุจิไม่มีความสามารถในการปฏิสนธิจะอยู่ในช่วงระหว่าง 250-460mOsm kg⁻¹ [43] และมีข้อมูลสนับสนุนจากรายงานของ [44] ว่าในการทำน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อพันธุ์ไก่เนื้อเพื่อการค้าพันธุ์ฮับบาร์ด (Hubbard commercial broilers) โดยใช้ค่าออสโมแลลิตี 450 mOsm kg⁻¹ ให้คุณภาพน้ำเชื้อดีกว่า 300 mOsm kg⁻¹ อาจเกี่ยวข้องกับการลดลงของการก่อตัวของน้ำแข็งภายในเซลล์อย่างก็ตามการแสวงหาน้ำยาเจือจางสำหรับการแช่แข็งที่เหมาะสมกับไก่ป่าตุ่มหูขาว ต้องทำการศึกษาต่อไป โดยศึกษาเปรียบเทียบ TRJFEกับน้ำยาเจือจางสูตรมาตรฐานที่มีการใช้ในไก่และไก่ป่าในปัจจุบัน

จากผลการนำน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการทำให้ละลายไปผสมเทียมในไก่ไข่มุกผสม ให้อัตราการผสมติดเมื่อใช้น้ำยาเจือจางสูตร TRJFEเป็น 57.00±1.72% ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานของ [45] จากการศึกษาเปรียบเทียบไก่มีค่าเฉลี่ยอัตราการผสมติดด้วยน้ำเชื้อแบบแช่แข็งอยู่ที่ 60% สอดคล้องกับอัตราการผสมติดของการใช้น้ำยาเจือจาง TRJFEถึงแม้จะมีค่าต่ำกว่าในรายงานดังกล่าวก็ตาม ทั้งนี้อาจเนื่องจากความสามารถในการทนได้ต่อสภาพแวดล้อมของอสุจิแต่ละสายพันธุ์ต่างกัน และเป็นการทดลองทำน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่ป่าตุ่มหูขาวเป็นครั้งแรก จึงเป็นข้อมูลที่น่าพอใจในการนำไปวิจัยต่อไปได้

การศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อไก่ป่าตุ่มหูขาว (TRJFE) มีค่าพีเอช 6.82 และระดับออสโมแลลิตี 452 mOsm kg⁻¹ ประกอบด้วยโปแตสเซียมอะซิเตต 0.50 มิลลิกรัมโซเดียมกลูตาเมต 2.10 มิลลิกรัมไกลซีน 0.20 มิลลิกรัมกลูโคส 0.50 มิลลิกรัมอินโนสิทอล 0.25 มิลลิกรัมโพลีไวนิลไพโรลิโดน 0.60 มิลลิกรัมเพนโนมัยซิน 0.10 มิลลิกรัมและเติมน้ำจนครบ 100 มิลลิลิตรมีการเคลื่อนที่อสุจิหลังการทำให้ละลาย และอัตราการผสมติดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ใช้น้ำยาเจือจางสำเร็จรูป (Schramm) สามารถใช้เป็นน้ำยาเจือจางสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่ป่าตุ่มหูขาวได้มีการเคลื่อนที่ที่ดีที่สุดและให้อัตราการผสมติดดีมีศักยภาพในการใช้เป็นน้ำยาเจือจางสำหรับแช่แข็งน้ำเชื้อไก่ป่าตุ่มหูขาวได้

เอกสารอ้างอิง

- [1] กลุ่มวิจัยความหลากหลายทางชีวภาพ. (2559). *ไก่ตั่ง*. กรุงเทพฯ: กองบำรุงพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- [2] Fumihito, A., et al. (1994). One subspecies of the red jungle fowl (*Gallus gallus gallus*) suffices as the matriarchic ancestor of all domestic breeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 12505-12509.
- [3] Akaboot, P., et al. (2012). Genetic characterization of Red Junglefowl (*Gallus gallus*), Thai indigenous chicken (*Gallus domesticus*), and two commercial lines using selective functional genes compared to microsatellite markers. *Genetics and Molecular Research*, 11(3), 1881-1890.
- [4] สำนักความหลากหลายทางชีวภาพ. (2559). *พื้นที่ชีวมวล*. กรุงเทพฯ: สำนักงานนโยบายและแผน

- ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.
- [5] สำนักความหลากหลายทางชีวภาพ. (2559). *การคุกคามระบบนิเวศป่าไม้*. กรุงเทพฯ: สำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.
 - [6] Callaway, E. (2016). When chickens go wild. *Nature*, 529, 270-273.
 - [7] Gadea, J., et al. (2004). The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions. *Reproduction in Domestic Animals*, 39(5), 303-308.
 - [8] Satorre, M. M., et al. (2007). α -Tocopherol modifies tyrosine phosphorylation and capacitation-like state of cryopreserved porcine sperm. *Theriogenology*, 68(7), 958-965.
 - [9] Blanco, J.M., et al. (2000). Species variation in osmotic, cryoprotectant, and cooling rate tolerance in poultry, eagle, and peregrine falcon spermatozoa. *Biology of Reproduction*, 63(4), 1164-1171.
 - [10] Łukaszewicz, E., et al. (2004). Attempts on freezing the Greylag (*Anser anser* L.) gander semen. *Animal Reproduction Science Journal*, 80(1-2), 163-173.
 - [11] Han, X.F., et al. (2005). Effects of diluents, cryoprotectants, equilibration time and thawing temperature on cryopreservation of duck semen. *International Journal of Poultry Science*, 4(4), 197-201.
 - [12] Long, J. A. (2006). Avian semen cryopreservation: what are the biological challenges? *Poultry Science*, 85(2), 232-236.
 - [13] Blesbois, E., et al. (2007). Semen cryopreservation for ex situ management of genetic diversity in chicken: creation of the French avian cryobank. *Poultry Science Journal*, 86(3), 555-564.
 - [14] Blesbois, E., et al. (2008). Predictors of success of semen cryopreservation in chickens. *Theriogenology*, 69(2), 252-261.
 - [15] Blanco, J. M., et al. (2009). Implementing artificial insemination as an effective tool for ex situ conservation of endangered avian species. *Theriogenology*, 71(1), 200-213.
 - [16] Purdy, P. H., et al. (2009). Evaluation of glycerol removal techniques, cryoprotectants and insemination methods for cryopreserving rooster sperm with implications of regeneration of breed or line or both. *Poultry Science Journal*, 88(10), 2184-2191.
 - [17] Hammerstedt, R. H. (1994). Cryopreservation of poultry semen-current status and economics. In *The 1st International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry* (p. 229-250). Savoy: Poultry Science Association.
 - [18] Bakst, M. R. (1980). Fertilizing capacity and morphology of fowl and turkey spermatozoa in hypotonic extender. *Journal of reproduction and fertility*, 60(1), 121-127.
 - [19] Holt, W. V. (2000). Basic aspects of frozen storage of semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 3-22.
 - [20] Holt, W. V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of

- species and individual Differences. *Theriogenology*, 53(1), 47-58.
- [21] Rakha, B.A., et al. (2013). Evaluation of tris-citric acid, skim milk and sodium citrate extenders for liquid storage of Punjab Urial (*Ovis vignei punjabiensis*) spermatozoa. *Reproductive Biology*, 13(3), 238-242.
- [22] Rakha, B.A., et al. (2016). Comparison of extenders for liquid storage of Indian red jungle fowl (*Gallus gallus murghi*) spermatozoa. *Avian Biology Research*, 9(3), 207-212.
- [23] Clarke, R. N., et al. (1984). Morphological changes in chicken and turkey spermatozoa incubated under various conditions. *Poultry Science Journal*, 63(4), 801-805.
- [24] Ashizawa, K., et al. (1994). Inhibition of temperature-dependent immobilization of fowl spermatozoa at body temperature by an increased intracellular pH. *Journal of reproduction and fertility*, 101, 593-598.
- [25] Holm, L. & Wishart, G. J., (1998). The effect of pH on the motility of spermatozoa from chicken, turkey and quail. *Animal Reproduction Science*, 54(1), 45-54.
- [26] Freshney, R. I. (2000). Specialized Cells. In: Freshney, R.I. (Ed). *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 6th ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc.
- [27] Lake, P.E. (1995). Historical perspective of artificial insemination technology. In *First international symposium on the artificial insemination of poultry science*. (p. 1-20). Savoy: Poultry Science Association.
- [28] Tselutin, K., et al. (1995). Cryopreservation of poultry semen. *British Poultry Science*, 36(5), 805-811.
- [29] Chalah, T., et al. (1999). *In vitro* comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility *in vivo*. *Cryobiology*, 39(2), 185-191.
- [30] Surai, P. E. & Wishart, G. J. (1996). Poultry artificial insemination technology in the countries of the former USSR. *World's Poultry Science Journal*, 52(2), 27-43.
- [31] Burrows, W. H. & Quinn. J. P. (1937). The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poultry Science*, 16(1), 19-24.
- [32] Gee, G. F. (1994). Artificial insemination and cryopreservation of semen from nondomestic birds. In *The 1st international symposium on the artificial insemination of poultry* (p. 262-279). College Park: University of Maryland.
- [33] เทวินทร์ วงษ์พระลับ. (2559). *สรีรวิทยาการสืบพันธุ์และการผสมเทียมในสัตว์เลี้ยง*. ขอนแก่น: ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- [34] Vongpralub, T., et al. (2011). A comparison of simple vapour method and programable freezer on Motility and fertility of frozen Thai native chicken semen. In *The 3rd international conference on sustainable animal agriculture for developing countries* (p. 649-652). Nakhon Ratchasima: Suranaree University of Technology.
- [35] ชมัยพร สิทธิเกษมกิจ และคณะ. (2557). ผลของสายพันธุ์และการเสริมคลอโรสเตอร์อลโหลดด้วย

- ไซโครเดกซ์ทรินต่อคุณภาพแบบแช่แข็งของไก่. *วารสารสัตวศาสตร์แห่งประเทศไทย*, 1(พิเศษ 2), 75-78.
- [36] Thananurak, P., et al. (2017). Freeze ability and fertility of Thai native chicken semen in different diluents. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, 47(4). 551-556.
- [37] เทวินทร์ วงษ์พระลับ และคณะ. (2555). ผลของ cysteine และ glutathione ต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไทยแบบแช่แข็ง. *แก่นเกษตร*, 40(พิเศษ 2), 339-342.
- [38] Ehling, C., et al. (2012). Cryopreservation of semen from genetic resource chicken lines. *Agriculture and Forestry Research*, 62(3), 151-158.
- [39] Mocé, E., et al. (2010). Cryoprotectant and freezing process alter the ability of chicken sperm to acrosome react. *Animal Reproduction Science*, 122(3-4), 359-366.
- [40] Abouelezz, F. M. K., et al. (2015). Effect of the interaction between cryoprotectant concentration and cryopreservation method on frozen/thawed chicken sperm variables. *Reproduction in Domestic Animals*, 50(1), 135-141.
- [41] Statistical Analysis System Institute (SAS). (2018). SAS/STAT user's guide SAS University Edition 9.4. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- [42] Chuaychu-noo, N., et al. (2017). Supplementing rooster sperm with cholesterol-loaded-cyclodextrin improves fertility after cryopreservation. *Cryobiology*, 74, 8-12.
- [43] Sexton, T. J. & Fewlass, T. A. (1978). A new poultry semen extender: 2. Effect of the diluents components on the fertilizing capacity of chicken semen stored at 5 °C. *Poultry Science*, 57(1), 277-284.
- [44] Mokrane, I. O., et al. (2018). The interest of hyperosmolar extenders in rooster sperm cryopreservation. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*. 13(4). 396-404.
- [45] Donoghue, A. M. & Wishart. G. J. (2000). Storage of poultry semen. *Animal Reproduction Science*, 62(1-3), 213-232.