วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 39(1): 94-103

ผลของการเสริมกรดแอสคอร์บิคในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อที่ระยะเวลาในการเก็บรักษาต่างๆ

The Effect of Ascorbic Acid Supplementation in Semen Diluent on Semen Quality at Different Storage Times

วิชชุดา ยินดี* เบญญาภา สุรสอน กนกกาญจน์ รีบเร่งรัมย์ วรพรภัฏ ปัดภัย
นันทา สมเป็น และณัฏฐวรรณ สมนึก

Witchuda Yindee*, Benyapha Surasorn, Kanokkarn Reebrangrum, Worrapornpat Patpai
Nuntha Sompen and Nuttawan Somnuek

สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์ สุรินทร์ 32000

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture and Agricultural Industry, Surindra Rajabhat University Surin, Thailand 32000

*Corresponding author: Witchuda-tank@hotmail.com

Received: *November 02, 2020*
Revised: *June 17, 2021*
Accepted: *August 16, 2021*

Abstract

Effects of ascorbic acid supplementation in semen extenders on fresh and liquid semen quality of Thai native chicken breed were investigated to determine the appropriate levels of supplementation. In the study, four levels of ascorbic acid supplementation were studied at 0, 10, 20 and 30 mM in Schramm diluents. For preservation of the fresh and liquid semen were stored at 4°C for a period of 24, 48 and 72 hours before percentage of mass movement, percentage of progressive motile sperm, sperm concentration and alive sperm were studied. The results showed that different levels of ascorbic acid supplementation had no significant (P>0.05) effects on fresh semen quality, including the mass movement, percentage of progressive motile sperm, percentage of alive sperm and sperm concentration, The storage of diluted semen at 4°C for a period of 24 hours showed a statistically significant difference in mass movement (P<0.05). The supplementation of ascorbic acid 30 mM gave the best score mass movement (3.12±1.41) followed by ascorbic acid 20, 10 and 0 mM, respectively (2.75±2.36, 2.75±2.62 and 2.25±1.15, respectively) but when kept for 48 and 72 hours, it was found that the mass movement showed no significant difference (P>0.05).

Keywords: ascorbic acid, fresh semen, storage time, semen quality, Thai native chicken

บทคัดย่อ

การศึกษาผลของการเสริมกรดแอสคอร์บิคในน้ำยาเจือจาง ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบสดและแบบเหลวของพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมือง (ประดู่หางดำ) โดยทดสอบถึงระดับที่เหมาะสมในการเสริมกรดแอสคอร์บิคต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบสดและแบบเหลว ของพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมือง (ประดู่หางดำ) ด้วยการเสริมกรดแอสคอร์บิคในระดับที่แตกต่างกัน คือ 0, 10, 20 และ 30 mM ในน้ำยาเจือจางสูตร Schramm diluents หลังจากเก็บรักษาน้ำเชื้อสดและแบบเหลวที่เจือจางแล้ว ที่ไว้ในอุณหภูมิ 4°ซ. เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ศึกษาร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่และร้อยละการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของตัวอสุจิ ความเข้มข้นของตัวอสุจิ ร้อยละของตัวอสุจิที่มีชีวิต ผลการทดลองพบว่า การเสริมกรดแอสคอร์บิคแต่ละระดับไม่พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในคุณภาพน้ำเชื้อแบบสด ให้ร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่ของตัวอสุจิ ร้อยละของตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้า ร้อยละของตัวอสุจิที่มีชีวิต และความเข้มข้นของตัวอสุจิ และการเสริมกรดแอสคอร์บิคในระดับที่แตกต่างกันในคุณภาพน้ำเชื้อแบบเหลว ที่เก็บในอุณหภูมิ 4°ซ. เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ให้ร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่ของตัวอสุจิแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยการเสริม Ascorbic acid 30 mM ให้ร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่ของตัวอสุจิดีที่สุด (3.12±1.41) รองลงมาคือ การเสริม Ascorbic acid 20, 10 และ 0 mM ตามลำดับ (2.75±2.36, 2.75±2.62 และ 2.25±1.15 ตามลำดับ) แต่เมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าให้ร้อยละการเคลื่อนที่แบบหมู่ของตัวอสุจิ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำสำคัญ: กรดแอสคอร์บิค น้ำเชื้อสด ระยะเวลาในการเก็บรักษา คุณภาพน้ำเชื้อ ไก่พื้นเมือง

คำนำ

ไก่พื้นเมืองเป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่สำคัญต่อเศรษฐกิจของชุมชน เนื่องจากมีการเลี้ยงในพื้นที่ชนบททั่วประเทศ ไก่พื้นเมืองเป็นสัตว์ที่เลี้ยงง่าย และมีข้อดีหลายประการ เช่น ใช้ต้นทุนต่ำในการผลิต มีความต้านทานโรคสูง ทนต่อสภาพภูมิประเทศ และภูมิอากาศได้เป็นอย่างดี ผู้เลี้ยงสามารถใช้เวลาว่างให้เกิดประโยชน์ ทั้งนี้ไก่พื้นเมืองยังเป็นสัตว์สวยงาม และเป็นเกมกีฬา และที่สำคัญไก่พื้นเมืองยังมีความหลากหลายทางพันธุกรรมสูง (Yaemkong, 2014) ไก่พื้นเมืองไทยนั้นเคยมีหลากหลายสายพันธุ์ แต่ในปัจจุบันกลับพบว่าไก่พื้นเมืองกำลังประสบปัญหา เสี่ยงต่อการสูญเสียความหลากหลายทางด้านพันธุกรรม เนื่องจากมีการนำเข้าไก่ชนจากต่างประเทศ และไม่มีการวางแผนการคัดเลือกหรือการปรับปรุงพันธุ์ที่เป็นระบบ ก่อให้เกิดความเสี่ยงต่อการสูญเสียความหลากหลายทางพันธุกรรมของไก่พื้นเมือง ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาการอนุรักษ์พันธุกรรมของไก่พื้นเมืองไทยอย่างเร่งด่วน ปัจจุบันเทคโนโลยีหนึ่งที่มีบทบาทสำคัญที่จะช่วยในการอนุรักษ์พันธุกรรม คือ เทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อและการผสมเทียม โดยการเก็บรักษาน้ำเชื้ออาจอยู่ในรูปแบบเหลวหรือรูปแบบแช่แข็ง ซึ่งมีข้อดี คือ สามารถช่วยเก็บรักษาน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ได้เป็นระยะเวลานาน แม้ว่าพ่อพันธุ์ดังกล่าวจะตายแล้วก็ตาม ช่วยในการควบคุมโรคที่ติดต่อได้โดยการสืบพันธุ์ และยังเป็นเครื่องมือที่สำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ และการอนุรักษ์พันธุกรรมได้เป็นอย่างดี (Margherita *et al*., 2013) แต่อย่างไรก็ตามน้ำเชื้อไก่แช่แข็งยังให้อัตราการผสมติดที่ต่ำอยู่ เนื่องจากขณะที่ทำการลดอุณหภูมิในกระบวนการเก็บรักษานั้น จะเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งทางกายภาพและทางเคมี ทำให้เซลล์อสุจิตายมากกว่าร้อยละ 30-60 หรือทำให้ตัวอสุจิลดการเคลื่อนที่หลังการเก็บรักษา ซึ่งเกิดจากการที่ตัวอสุจิไม่สามารถใช้ประโยชน์จากพลังงานในรูป ATP ภายในไมโตคอนเดรียได้ หรือพลังงานภายในไมโตคอนเดรียหมดไป (Long, 2006)

ดังนั้นในการอนุรักษ์พันธุกรรมและการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตของไก่พื้นเมืองไทย จึงควรมีการศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพ การเก็บรักษา และอัตราการรอดชีวิตของน้ำเชื้อ โดยการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ลงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ซึ่งอนุมูลอิสระ (Reactive Oxygen Species: ROS) คือ โมเลกุลหรืออนุภาคที่ไม่เสถียรเนื่องจากรับหรือขาดอิเล็กตรอน (Electron) ไปหนึ่งตัว ปกติธาตุต่าง ๆ ที่อยู่ในโมเลกุลที่เสถียร จะต้องมีอิเล็กตรอนอยู่เป็นจำนวนคู่ ในกรณีที่มีการสูญเสียหรือรับอิเล็กตรอนมาอีกหนึ่งตัวจะทำให้โมเลกุลนั้นไม่เสถียร ต้องไปแย่งอิเล็กตรอนจากเซลล์ข้างเคียง ทำให้เซลล์ที่ถูกแย่งขาดอิเล็กตรอนไป เกิดการแตกหักเสียหาย เสื่อมสภาพลงในที่สุด (Duangdee, 2018) และเนื่องจากเซลล์อสุจิมีความอ่อนไหวต่อการเกิดปฏิกิริยา Lipid peroxidation มาก ซึ่งส่งผลต่อการเกิดความเสียหายของเซลล์อสุจิ อันเป็นผลมาจากการทำงานของสารอนุมูลอิสระ และเกิดการดึงอิเล็คตรอนรอบนอกออกจากเซลล์ ทำให้เซลล์เสื่อมสลายได้ (Mohsen, 2021) การเสริมสารต้านอนุมูลอิสระลงไปในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อด้วยวิตามินซี (Ascorbic acid) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งที่อาจช่วยป้องกันกระบวนการทำลายจากอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในน้ำเชื้อได้ ดังรายงานของ Mustafa *et al*. (2020) ที่ทำการศึกษาผลของการเสริมสาร Ascorbic acid และฟีโนมีนอลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ การเกิด Lipid peroxidation และระดับฮอร์โมนเทสโทสเทอโรนของหนูเพศผู้พบว่า Ascorbic acid และฟีโนมีนอลที่เสริมลงไปในน้ำดื่มของหนู เป็นเวลา 21 วัน ทำให้ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิและระดับการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาออกซิเดชั่นที่เกิดจากความเครียดจากความร้อนในอัณฑะลดลง

Jafaroghlia *et al*. (2014) ศึกษาผลของการเสริมกรดไขมัน (n-3) และวิตามินซี ต่อคุณภาพน้ำเชื้อ องค์ประกอบของกรดไขมันในน้ำเชื้อ และเมตาบอลิซึมของไขมันในส่วนหางของอสุจิ พบว่าการเคลื่อนที่แบบหมู่และการเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้งนี้ยังพบว่าน้ำเชื้อแกะมีสัดส่วนของ Docosahexaenoic acid (DHA) เพิ่มขึ้น Esmat *et al*. (2018) ศึกษาผลการเสริมวิตามินซีต่อคุณภาพน้ำเชื้อ คุณภาพของอะโครโซมและการกลายพันธุ์ในน้ำเชื้อ พบว่าการเคลื่อนที่ของอสุจิ รูปร่างลักษณะของอสุจิ และการรอดชีวิต มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และพบว่าอันตรายจากการเก็บรักษาน้ำเชื้อลดลงเมื่อมีการเสริมวิตามินซี 600 µm Chetna *et al*. (2015) ศึกษาผลของการเสริมวิตามินซีในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อเป็ดพันธุ์บาบาร์รี่พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการรอดชีวิต การเสื่อมสลายของอะโครโซม และการทดสอบการว่ายของอสุจิ (Hypo osmotic swelling test) พบการเสริมวิตามินซีที่ระดับ 56.78 µm. สามารถช่วยป้องกันการเกิดกระบวนการ Oxidant ได้ในกระบวนการแช่แข็ง และ Sejeda (2016) ศึกษาผลของการเสริมวิตามินซี Catalase และ Glutathione ลงในน้ำยาเจือจางสูตร Tris extender ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อโคพันธุ์ Holstein ในระยะที่แตกต่างกัน คือ เก็บรักษาที่ 4°ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 1 เดือน และ 3 เดือน พบว่าภายหลังการเก็บรักษาน้ำเชื้อทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิ การมีชีวิตรอดของอสุจิเพิ่มสูงขึ้น การเสื่อมสลายของ Plasma membrane และอะโครโซมลดลง

จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้น จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ ดังนั้นการศึกษานี้ จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงระดับที่เหมาะสมในการเสริม Ascorbic acid ลงในน้ำยาเจือจาง ที่ระยะเวลาในการเก็บรักษาต่าง ๆ ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบสดและแบบเหลวของพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมือง (ประดู่หางดำ) หากมีผลดีต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบสดและแบบเหลว ก็จะเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตไก่พื้นเมือง เป็นผลดีต่อการอนุรักษ์และคุ้มครองพันธุกรรม และเพื่อเป็นแนวทางในการผลิตไก่พื้นเมืองในเชิงพาณิชย์และสาธารณะ อันเป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนาเศรษฐกิจ โดยการพัฒนาขีดความสามารถในการผลิตและการแข่งขัน และความสำคัญของการพัฒนาประเทศ ที่ต้องอยู่บนพื้นฐานของหลักปรัชญาเศรษฐกิจ

พอเพียง เพื่อลดความเสี่ยง สร้างภูมิคุ้มกัน นำไปสู่การพึ่งพาตนเอง และการปฏิบัติในทุกมิติของการพัฒนา

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลองและโรงเรือน

1. พ่อพันธุ์ไก่พื้นเมือง (ประดู่หางดำ สมบูรณ์พันธุ์ อายุ 8 เดือนขึ้นไป) จำนวน 16 ตัว พ่อพันธุ์มีน้ำหนักตัวเฉลี่ยเท่ากับ 3.32±0.40 กิโลกรัม

2. โรงเรือนที่ใช้ในการศึกษา คือ โรงเรือนเลี้ยงสัตว์ปีก คณะเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์ เป็นโรงเรือนระบบเปิด มีอุณหภูมิ 30°ซ. ความชื้นสัมพัทธ์ 93% คอกที่ใช้เลี้ยงพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองมีขนาด 2X2 เมตร/พ่อพันธุ์ 4 ตัว

3. สัตว์ทดลองได้รับการถ่ายพยาธิภายในและพยาธิภายนอก ให้วัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิลและหลอดลมอักเสบก่อนการทดลอง ภายในคอกสัตว์ทดลองมีรางน้ำและรางอาหารให้สัตว์ ผู้ดูแลและผู้เก็บข้อมูลใช้เวลาปรับตัวสัตว์ทดลองกับโรงเรือน 1 สัปดาห์ ก่อนการเก็บข้อมูล

4. สัตว์ทดลองได้รับอาหาร 2 ครั้งต่อวัน ในเวลาเช้าและเย็น โดยพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองจะได้รับอาหาร 100 กรัม/ตัว/วัน และให้น้ำสะอาดอย่างเต็มที่ (ad libitum) อาหารที่ใช้เป็นอาหารสัตว์ผสมสำเร็จรูปชนิดเม็ด มีโปรตีนไม่น้อยกว่า 14% ไขมันไม่น้อยกว่า 3% กากไม่น้อยกว่า 6% และความชื้นไม่น้อยกว่า 13%

วิธีการทดลอง

การทดลองเพื่อหาปริมาณ Ascorbic acid ที่เหมาะสมต่อคุณภาพน้ำเชื้อสดและแบบเหลวของพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมือง (ประดู่หางดำ) กลุ่มการทดลอง มีจำนวน 4 กลุ่มการทดลอง แต่ละกลุ่มทดลองทำ 4 ซ้ำ คือ

กลุ่มการทดลองที่ 1 ชุดควบคุมที่ไม่มีการเสริม Ascorbic acid ในน้ำยาเจือจาง

กลุ่มการทดลองที่ 2 ชุดเสริม Ascorbic acid 10 mM ในน้ำยาเจือจาง

กลุ่มการทดลองที่ 3 ชุดเสริม Ascorbic acid 20 mM ในน้ำยาเจือจาง

กลุ่มการทดลองที่ 4 ชุดเสริม Ascorbic acid 30 mM ในน้ำยาเจือจาง

Table 1 Chemical components of the Schramm diluents formula

Component	Schramm diluents formula (g/L)
Magnesium acetate	0.70
Sodium glutamate	28.50
Glucose	5.00
Inositol	2.50
Potassium acetate	5.00

Source: Chalah *et al*. (1999)

1. การเก็บข้อมูลหลังจากระยะการปรับตัวของสัตว์ผ่านไป 1 สัปดาห์

2. รีดเก็บน้ำเชื้อในแต่ละทรีทเมนต์ โดยการ Pool semen เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางสูตร Schramm diluents (Table 1) ที่มีการเสริม Ascorbic acid ในระดับแตกต่างกัน ทำการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อสด และคุณภาพน้ำเชื้อแบบเหลว ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ. เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

3. รีดเก็บน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สัปดาห์ละ 2 ครั้ง การรีดน้ำเชื้อโดยการกระตุ้นจากการลูบบริเวณโคนหาง และบีบที่บริเวณโคนก้นโดยทันทีจะได้น้ำเชื้อที่มีสีขาว ซึ่งมีความข้นตามความเข้มข้นของอสุจิ น้ำเชื้อที่มีการปนเปื้อนจะไม่นำมาใช้ในการทดลอง (Vongpralub and Phasuk, 2007)

น้ำเชื้อที่ได้จากพ่อพันธุ์ นำมาประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ ดังนี้

1. การตรวจวัดลักษณะที่มองเห็นด้วยตา

2. การตรวจแบบละเอียดด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.1 การตรวจความเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ (Motility) การตรวจการเคลื่อนไหวของอสุจิสามารถประเมินได้ 2 แบบ คือ

2.1.1 โดยการตรวจการเคลื่อนไหวแบบหมู่ (Wave motion characteristic) สามารถประเมินเป็นคะแนนการเคลื่อนไหวตั้งแต่ 0-5 คะแนน

2.1.2 โดยการตรวจการเคลื่อนไหวแบบตรงไปข้างหน้าโดยสังเกตเป็นรายตัว (Proportion of progressive motile sperm)

2.2 การเปรียบเทียบสัดส่วนของอสุจิที่ยังมีชีวิตและที่ตายแล้วหยุดการเคลื่อนไหว ทำได้โดยการย้อมสีเพื่อแยกอสุจิมีชีวิตและไม่มีชีวิต (Differential staining of live and dead sperm) ด้วยสี Nigrosin–eosin

2.3 ตรวจนับความเข้มข้นของตัวอสุจิ โดยการใช้เครื่องนับเม็ดเลือด (Heamocytometer) โดยรักษาน้ำเชื้อด้วยฟอร์มอลซาไลด์ (Formal saline) โดยทำการเจือจาง 1:200

วิธีคำนวณความเข้มข้น

ความเข้มข้น = $C \times 2 \times 10^6$ spermatozoa/ml

เมื่อ C = จำนวนตัวอสุจิที่นับ 25 ช่อง

*หมายเหตุ การตรวจนับในการศึกษาครั้งนี้ใช้คนตรวจคนเดิมเพียงคนเดียวในการตรวจนับ เพื่อป้องกันความลำเอียง

3. การวิเคราะห์ข้อมูล ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำมาวิเคราะห์หาความแปรปรวน (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบความแตกต่างโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรม SAS System Version 9.1

ผลการวิจัย

1. จากการทดลองการเสริม Ascorbic acid ในระดับที่แตกต่างกันคือ 0, 10, 20 และ 30 mM ในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบสด ให้การเคลื่อนที่แบบหมู่ของตัวอสุจิ ร้อยละของตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้า และร้อยละของตัวอสุจิที่มีชีวิต พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (Table 2)

Table 2 Effects of ascorbic acid supplementation on mass movement, percentage of progressive motile sperm, percentage of alive sperm and sperm concentration of fresh diluted semen (mean±S.D.)

Treatment (Ascorbic acid)	Replication	Mass movement	Percentage of progressive motile sperm	Percentage of alive sperm	Sperm concentration
0 mM	4	4.75±0.50	55.06±1.96	82.56±3.08	2,123.50X10^6±75.71
10 mM	4	4.75±0.50	53.87±2.01	84.68±4.69	2,065.75X10^6±56.32
20 mM	4	4.75±0.50	55.68±1.14	84.87±1.29	2,083.75X10^6±78.56
30 mM	4	4.05±0.57	55.87±1.31	85.31±4.88	2,049.75X10^6±64.27

2. การเสริม Ascorbic acid ในระดับที่แตกต่างกัน คือ 0, 10, 20 และ 30 mM ในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบเหลว ที่เก็บในอุณหภูมิ 4°ซ. เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ให้การเคลื่อนที่แบบหมู่ของตัวอสุจิ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ใน Table 3

Table 3 Effects of ascorbic acid supplementation on mass movement of fresh diluted semen stored at 4°C for a period of 24 hours (mean±S.D.)

Treatment (Ascorbic acid)	Replication	Mass movement
0 mM	4	2.25±1.15^b
10 mM	4	2.75±2.62^b
20 mM	4	2.75±2.36^{ab}
30 mM	4	3.12±1.41^a

^{a,b} Different in the column there were statistically significant differences (P<0.05).

3. การเสริม Ascorbic acid ในระดับที่แตกต่างกันคือ 0, 10, 20 และ 30 mM ในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบเหลว ที่เก็บในอุณหภูมิ 4°ซ. เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ให้การเคลื่อนที่แบบหมู่ของตัวอสุจิ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (Table 4)

Table 4 Effects of ascorbic acid supplementation on mass movement of fresh diluted semen stored at 4°C for a period of 48 hours (mean±S.D.)

Treatment (Ascorbic acid)	Replication	Mass movement
0 mM	4	1.62±0.47
10 mM	4	1.87±0.62
20 mM	4	2.37±0.47
30 mM	4	2.50±0.57

4. การเสริม Ascorbic acid ในระดับที่แตกต่างกัน คือ 0, 10, 20 และ 30 mM ในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบเหลว ที่เก็บในอุณหภูมิ 4°ซ. เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ให้การเคลื่อนที่แบบหมู่ของตัวอสุจิ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (Table 5)

Table 5 Effects of ascorbic acid supplementation on mass movement of fresh diluted semen stored at 4°C for a period of 72 hours (mean±S.D.)

Treatment (Ascorbic acid)	Replication	Mass movement
0 mM	4	1.25±0.28
10 mM	4	1.25±0.28
20 mM	4	1.62±0.25
30 mM	4	1.62±0.25

วิจารณ์ผลการวิจัย

1. จากการทดลองการเสริม Ascorbic acid ในระดับที่แตกต่างกันคือ 0, 10, 20 และ 30 mM ในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบสด ให้การเคลื่อนที่แบบหมู่ของตัวอสุจิ ร้อยละของตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้า ร้อยละของตัวอสุจิที่มีชีวิต และความเข้มข้นของตัวอสุจิ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Mariane *et al*. (2016) ที่ทำการศึกษาเรื่องผลของการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระและกรดไขมันต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแบบสด แบบเหลวและแบบแช่แข็งในม้า การศึกษาดังกล่าวได้ประเมินผลของการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระและกรดไขมันที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสเปิร์ม (L-carnitine, ซีลีเนียม วิตามินอี โอเมก้า 3 Andomega-6) ต่อคุณภาพน้ำเชื้อของม้า โดยแบ่งสัตว์ออกเป็นกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 สำหรับการทดลอง 30 สัปดาห์ มีการประเมินความเข้มข้นของตัวอสุจิ และความสมบูรณ์ของ Plasma membrane ของน้ำเชื้อแบบสด แบบเหลว (เป็นเวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง) และแบบแช่แข็ง พบว่าการเคลื่อนที่โดยรวม ความเร็วในการเคลื่อนที่ ตลอดจนความสมบูรณ์ของ Plasma membrane และ Acrosomal membrane ของตัวอสุจิ จากน้ำเชื้อแบบสด แบบเหลว และแบบแช่แข็ง และความเข้มข้นของตัวอสุจิ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ทั้งนี้เนื่องมาจากน้ำเชื้อแบบสดที่ยังไม่ได้ผ่านกระบวนการเก็บ

รักษา จึงทำให้เซลล์อสุจิเสื่อมสภาพน้อย และหากเป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นที่เก็บรักษายาวนาน จะเสื่อมสภาพรุนแรงกว่าน้ำเชื้อที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลาสั้น ส่วนน้ำเชื้อแบบแช่แข็งนั้น จะมีระดับความเสียหายที่รุนแรงกว่าน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่เย็นมาก (Vongpralub, 2008)

2. การเสริม Ascorbic acid ในระดับที่แตกต่างกันคือ 0, 10, 20 และ 30 mM ในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบเหลว ที่เก็บในอุณหภูมิ 4°ซ. เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ให้การเคลื่อนที่แบบหมู่ของอสุจิ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ให้การเคลื่อนที่แบบหมู่ของอสุจิ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sexton (1988) ที่ศึกษาการผสมเทียมของไก่งวง ภายหลังการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 5°ซ. พบว่าการผสมเทียมภายหลังการรีดน้ำเชื้อให้ผลการผสมติดสูง และการผสมติดจะลดลงเมื่ออายุการเก็บรักษานานขึ้น แสดงให้เห็นถึงแนวโน้มของการเสื่อมสภาพของเซลล์อสุจิภายใต้การเก็บรักษา ซึ่งสามารถเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อได้ในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ เท่านั้น ปัจจุบันยังไม่ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อให้มีคุณภาพดีได้ยาวนานกว่า 48 ชั่วโมง น้ำเชื้อที่เก็บรักษาในสภาพเหลวนี้คุณภาพจะเสื่อมถอยเป็นลำดับ โดยการเสื่อมสภาพจะรุนแรงขึ้นภายหลังผ่านการเก็บรักษา 24 ชั่วโมง ไปแล้ว โดยปรากฏผลประจักษ์ชัดจากอัตราการผสมติดและความยาวนานของอัตราไข่มีเชื้อภายหลังการผสมเทียม การเสื่อมสภาพของน้ำเชื้อมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย ได้แก่ กระบวนการเมตาบอลิซึม (Metabolism) ของตัวอสุจิ การเสื่อมของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ การปนเปื้อนจากสิ่งแปลกปลอม และระบบภูมิคุ้มกัน

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาถึงระดับที่เหมาะสมในการเสริม Ascorbic acid ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบสด และแบบเหลวของพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมือง (ประดู่หางดำ) พบว่าผลของการเสริม Ascorbic acid ในระดับที่แตกต่างกันคือ 0, 10, 20 และ 30 mM ในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบสด ต่อการเคลื่อนที่แบบหมู่ของตัวอสุจิ ร้อยละของตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้า และร้อยละของตัวอสุจิที่มีชีวิต พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่ผลของการเสริม Ascorbic acid ในระดับที่แตกต่างกัน ในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแบบเหลวที่เก็บในอุณหภูมิ 4°ซ. เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ต่อการเคลื่อนที่แบบหมู่ของอสุจิ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่เมื่อเก็บในอุณหภูมิ 4°ซ. เป็นระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ให้การเคลื่อนที่แบบหมู่ของอสุจิไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แสดงให้เห็นถึงน้ำเชื้อมีการเสื่อมสภาพในเวลาต่อมาเป็นลำดับ อาจเนื่องมาจากสาเหตุการปนเปื้อนทั้งมาจากบริเวณทวารร่วมและการมีเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน การเสื่อมที่มีสาเหตุมาจากของเสียจากกระบวนการเมตาบอลิซึมและอนุมูลอิสระ ตลอดจนองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสายยาว (Polyunsaturated fatty acid) ในสัดส่วนที่สูงอันเป็นเป้าหมายการเข้าทำลายของอนุมูลอิสระ ซึ่งมีผลทำให้เซลล์เสื่อมสภาพอย่างรวดเร็ว ดังนั้นแนวทางการศึกษาเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาน้ำเชื้อ อาจทำการศึกษาในประเด็นต่าง ๆ เช่น การกำจัดสิ่งปนเปื้อนและเซลล์ที่ไม่พึงประสงค์ในน้ำเชื้อ การเสริมสารที่มีฤทธิ์ของสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำเชื้อ การเสริมสารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร และการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำยาเจือจาง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์ ที่สนับสนุนในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Chalah, T., F. Seigneurin, E. Blesbosis and J.P. Brillard. 1999. *In Vitro* comparison of fowl sperm viability in ejaculated frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. **Cryobiology** 39: 185-191.

Chetna, G., S.D. Kharche, R. Ranjan, S. Kumar, A.K. Goel, S.K. Jindal and S.K. Agarwal. 2015. Effect of vitamin C supplementation on freezability of Barbari buck semen. **Small Ruminant Research** 129: 104-107.

Duangdee, N. 2018. **Antioxidant.** [Online]. Available https://www.dss.go.th/images/starticle/cp_2_2551_Antioxidant.pdf (13 November 2020).

Esmat, M., A.R. Talebi, M. Anvari, F. Taheri, M. Vatanparast, T. Rahiminia and A. Hosseini. 2018. Vitamin C attenuates negative effects of vitrification on sperm parameters, chromatin quality, apoptosis and acrosome reaction in neat and prepared normozoospermic samples. **Taiwanese Journal of Obstetrics & Gynecology** 57:200-204.

Jafaroghlia, M., H.A. Benemarb, M..J. Zamiric, B. Khalilid, A. Farshade and A.A. Shadparvar. 2014. Effects of dietary n−3 fatty acids and vitamin C on semencharacteristics, lipid composition of sperm and bloodmetabolites in fat-tailed Moghani rams. **Animal Reproduction Science** 147: 17-24.

Long, J.A. 2006. Avian semen cryopresservation: What are the biological challenges? **Poultry Science** 85: 232-236.

Margherita, M., C. Annelisse, S. Simona, C. Lorenzo, R. Silvia, R. Isabella and F. Antonio. 2013. A proteomic approach to identify seminal plasma proteins inroosters (Gallus gallus domesticus). **Animal Reproduction Science** 140: 216-223.

Mariane L.F., S.B. Cristiano, A.P. Tatiana, J.G. Francisco, A.O. Marco and A.O. Rodrigo. 2016. Quality of fresh, cooled, and frozen semen from stallions supplemented with antioxidants and fatty acids. **Journal of Equine Veterinary Science** 46: 1-6.

Mohsen, G.A. 2021. Use of antioxidants to augment semen efficiency during liquid storage and cryopreservation in livestock animals: a review. **Journal of King Saud University–Science** 33: 101226.

Mustafa, S., A.F. Farrag, A.E. Almadaly, A.H. Ghoneim, S.A. Hafez, K. Soad, A. Jaouni, A.S. Mousa and A.H. El-Far. 2020. Transcriptomic and biochemical effects of pycnogenol in ameliorating heat stress-related oxidative alterations in rats. **Journal of Thermal Biology** 93: 102683.

Sajeda, M.E. 2016. Effect on post-cryopreserved semen characteristics of Holstein bulls of adding combinations of vitamin C and eithercatalase or reduced glutathione to Tris extender. **Animal Reproduction Science** 167: 1-7.

Sexton, T.J. 1988. Influence of damage spermatozoa on the fertility of turkey semen stored 24 h at 5°C. **Poultry Science** 67: 1483-1485.

Vongpralub, T. and Y. Phasuk. 2007. **Cryopreservation and Artificial Insemination in Thai Native Chicken.** Khon Kaen: Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University. 62 p. [in Thai]

Vongpralub, T. 2008. Develoment of semen cryopreservation and artificial insemination techniques in Thai native Chicken. 129 p. *In* Thai National Research. Bangkok: The Thailand Research Fund (TRF). [in Thai]

Yaemkong, S. 2014. Diversity of phenotypic characteristics of Thai indigenous chicken in Phitsanulok province. **Rajabhat J. Sci. Humanit. Soc. Sci.** 15(2): 63-73. [in Thai]