

วารสารเทคโนโลยีชีวภาพ การผลิตปศุสัตว์



JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY IN LIVESTOCK PRODUCTION

ปีที่ 8 ฉบับที่ 1 เดือนพฤศจิกายน 2556

VOL 8 : NOVEMBER 2013

ISSN : 1905-6877



สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

BUREAU OF BIOTECHNOLOGY IN LIVESTOCK PRODUCTION

DEPARTMENT OF LIVESTOCK DEVELOPMENT

สาส์นจากบรรณาธิการบริหาร



ในปี 2558 อาเซียนจะรวมตัวเป็นประชาคมเศรษฐกิจอาเซียน มีเป้าหมายเพื่อส่งเสริมให้อาเซียนเป็นตลาดและฐานการผลิตร่วมกัน (Single market and single production base) มีการเคลื่อนย้ายสินค้า บริการ การลงทุน แรงงานฝีมืออย่างเสรี และเงินทุนอย่างเสรีมากขึ้น (free flows of goods, services, investment, and skilled labors, and freer flow of capital) ผลที่จะเกิดขึ้นหลังจากเป็น AEC ประกอบด้วย การยกเลิกภาษีศุลกากรสำหรับสินค้า การลดขั้นตอน พิธีการศุลกากร อนุญาตให้ผู้ส่งออกรับรองถิ่นกำเนิดสินค้าด้วยตนเอง (Self Certification) ตลอดจน ลดเลิกข้อจำกัด / อุปสรรคในการให้บริการทุกรูปแบบ มีการเปิดเสรีการลงทุน คุ้มครองการลงทุน ส่งเสริมและอำนวยความสะดวกการลงทุนครอบคลุมธุรกิจ 5 ภาคได้แก่ เกษตร ประมง ป่าไม้ เหมืองแร่ และภาคการผลิตรวมถึงบริการที่เกี่ยวข้อง นำไปสู่การเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันของอาเซียน มีการพัฒนาเศรษฐกิจระหว่างประเทศสมาชิกที่เสมอภาคยิ่งขึ้น ทำให้กำลังซื้อของประเทศเพื่อนบ้านดีขึ้น ขยายโอกาสการส่งออกและการลงทุนของไทย และมีการเชื่อมโยงกับประเทศภายนอก โดยเฉพาะประเทศ คู่เจรจาของอาเซียน (+6) เป็นการเพิ่มโอกาสการค้าและการลงทุน

ในด้านปศุสัตว์ ประเทศไทยมีข้อได้เปรียบประเทศในเขตอาเซียนทั้งด้านพันธุกรรมโคเนื้อคุณภาพ และ เทคโนโลยีการผสมเทียม ซึ่งเป็นสองปัจจัยหลักในการผลิต สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิต ปศุสัตว์ จึงได้พัฒนาโครงการเพื่อเตรียมความพร้อมขยายการผลิตโคเนื้อคุณภาพ เพื่อรองรับการเปิด ตลาดเนื้อโคคุณภาพในอาเซียน ประกอบด้วย “โครงการสร้างพันธุ์โคเนื้อคุณภาพไทย-แบล็ค” และ “โครงการเร่งรัดการผลิตโคเนื้อคุณภาพสูง โดยวิธีการผสมเทียม” ซึ่งทำให้สามารถจัดระเบียบฟาร์ม ในประเทศไทยโดยจำแนกเป็น Breeding และ Fattening Farm ด้วยการสร้างระบบการผสมพันธุ์ ที่ชัดเจนมีรูปแบบ เพื่อให้เกษตรกรสามารถบริหารจัดการฟาร์มได้อย่างเหมาะสมและมีประสิทธิภาพ นำไปสู่การเป็นศูนย์กลางผลิตพันธุ์โคเนื้อ และผลิตภัณฑ์เนื้อโคคุณภาพในอาเซียน ในอนาคตอันใกล้

ทั้งนี้สำนักฯ ยังมุ่งมั่นพัฒนางานเพื่อให้ไทยสามารถคงความเป็นผู้นำด้านปศุสัตว์ในอาเซียนด้วยการส่งเสริม สร้างผลงานวิจัย และเผยแพร่ในวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตสัตว์อย่างต่อเนื่องเป็นประจำทุกปี เพื่อให้เกิดการแลกเปลี่ยน เรียนรู้ นำไปสู่การพัฒนาต่อไป

(นายสัตวแพทย์ จีระศักดิ์ ฟีพัฒน์พงษ์โสภณ)

ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

วัตถุประสงค์

- ส่งเสริมการศึกษา ค้นคว้าและวิจัยด้านการผลิตและขยายพันธุ์สัตว์
- รวบรวม เผยแพร่ความรู้ด้านการผลิตและขยายพันธุ์สัตว์โดยเทคโนโลยีชีวภาพ
- ส่งเสริมความสัมพันธ์ และความร่วมมือระหว่างนักวิชาการและสถาบันต่างๆ

เจ้าของ

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

สำนักงาน

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง

จ.ปทุมธานี 12000

โทร/โทรสาร 02-501-2438

กำหนดออก

ปีละ 1 ฉบับ

คณะที่ปรึกษา

ผชช. พรรณพิไล เสกสิทธิ์

ผชช. รพีพรรณ เอื้อเวชนิษฐกุล

ดร. ณชัย ศรราชพันธุ์

ดร. มาลี อภิเมธีธำรง

บรรณาธิการบริหาร

น.สพ. จีระศักดิ์ พิพัฒน์พงศ์โสภณ

บรรณาธิการ

นางจุรีรัตน์ แสนโกชน

ผู้ช่วยบรรณาธิการ

น.สพ. วิษณุ ไพศาลรุ่งพนา

กองบรรณาธิการ

ผชช. ไกรวรรณ หงษ์ยันตรชัย

น.สพ. สาโรช งามจำ

น.สพ. รัตน์ ฉายารัตนศิลป์

สพญ. นุสสรา วัฒนกุล

น.สพ. วิบูลย์ เขียววิสุท

น.สพ.ชาติ ลีละศิริ

นายสายัณห์ บัวบาน

ผู้จัดการวารสาร

น.สพ. ณัฐนันท์ ศิริรัตนัญญะกุล

นายสมศักดิ์ เปรมปรีดี

นายณรินทร์ จารี

ข้อเสนอแนะสำหรับผู้เขียน

วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ เป็นวารสารทางวิชาการของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ กำหนดออกปีละ 1 ฉบับ คือ เดือนกรกฎาคม วารสารนำลงบทความ ผลงานค้นคว้าวิจัยด้านการผลิตปศุสัตว์ ทั้งด้านการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ การจัดการอาหาร สุขภาพ และระบบสืบพันธุ์ ตลอดจนการขยายพันธุ์ และการใช้เทคโนโลยีชีวภาพที่ก้าวหน้าในการปรับปรุงและเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตปศุสัตว์ด้านต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น คณะผู้จัดทำวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ยินดีรับเรื่องจากทุกท่านที่ส่งมาเพื่อเผยแพร่ และเพื่อความสะดวกในการพิจารณาขอเสนอแนะดังนี้

1. เรื่องที่จะนำลง

1.1 งานทดลอง วิจัย ทางวิชาการ (Technical/ Research papers) หรือวิทยานิพนธ์ เป็นการเสนอผลการวิจัยที่ผู้เขียนได้ทำขึ้นเอง

1.2 บทความ (Articles) และข้อเอกสาร (Literature reviewed) ทางวิชาการ ที่รวบรวมข้อมูลความคิดเห็นและประสบการณ์ของผู้เขียน

1.3 เรื่องอื่นๆ ที่คณะผู้จัดทำพิจารณาเห็นสมควร

2. ต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่ส่งมาพิมพ์ในวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ไม่ควรเป็นเรื่องที่เคยพิมพ์ หรือ กำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อลงพิมพ์วารสารอื่น

2.2 ต้นฉบับเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษพิมพ์บนกระดาษเอ 4 จำนวนไม่เกิน 12 หน้า โดยจัดพิมพ์ด้วย Microsoft Word for Windows หรือใช้ชนิดและขนาดตัวอักษรตามที่กำหนด

2.3 ไม่มีการส่งคืนต้นฉบับ

3. การลำดับเรื่องในต้นฉบับ

เพื่อให้ขบวนการการพิจารณาผลงานวิชาการและการดำเนินการจัดพิมพ์วารสารเป็นไปอย่างเรียบร้อยรวดเร็ว และถูกต้อง จึงจำเป็นต้องให้ผู้เขียนผลงานวิชาการปฏิบัติตามข้อกำหนดอย่างเคร่งครัด ดังนี้

3.1 ให้ส่งต้นฉบับผลงานวิชาการจำนวน 1 ชุด และยังไม่ต้องส่งแผ่นบันทึกข้อมูล (Diskette)

3.2 ต้นฉบับผลงานวิชาการที่ส่งมา ให้ตรวจสอบความถูกต้องของตัวสะกด รูปแบบการจัดพิมพ์ ผลงานวิชาการให้ถูกต้องตามที่กำหนด

3.3 ส่งแผ่นบันทึกข้อมูลมาให้ เมื่อผลงานวิชาการนั้นได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการวิจัยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ แล้วเท่านั้น โดยเลขาคณะกรรมการวิจัยฯ จะแจ้งกลับไปยังเจ้าของผลงานวิชาการพร้อมส่งต้นฉบับเพื่อให้แก้ไขตามที่คณะกรรมการวิจัยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ให้ข้อเสนอแนะ

บันทึกผลงานวิชาการที่แก้ไข ถูกต้องแล้วตามข้อเสนอแนะของคณะกรรมการวิจัยสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ลงใน Diskette ขนาด 3.5 นิ้ว หรือ CD-ROM ใช้โปรแกรม Microsoft Word for Windows โดยมีรายละเอียดบนสติกเกอร์ติดหน้า Diskette หรือ CD-ROM ดังนี้

ชื่อผลงานวิชาการ.....

ชื่อเจ้าของผลงาน.....

ชื่อไฟล์.....

ที่อยู่ เบอร์โทรศัพท์/E-Mail.....

หรือส่งทาง Internet มายัง jureeratn@gmail.com

3.4 ต้นฉบับผลงานวิชาการที่ส่งให้คณะกรรมการวิจัย สทป. พิจารณา จะเป็นบทความที่จัดรูปแบบได้ถูกต้องตามที่กำหนดเท่านั้น หากผลงานวิชาการที่ส่งมาให้ไม่ถูกต้องตามข้อกำหนดจะจัดส่งคืนให้เจ้าของผลงานวิชาการกลับไปแก้ไขให้ถูกต้อง

3.5 ต้นฉบับที่จัดส่งมาต้องชัดเจน ทั้งเนื้อหาและรูปภาพประกอบผลงานวิชาการ โดยส่งมาให้

3.6 หรือติดต่อสอบถามได้ที่

นางจุรีรัตน์ แส่นโกชน

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง

จ. ปทุมธานี 12000

โทรศัพท์ 02-967-9791

โทรสาร. 02-5011386

ดูข้อมูลรายละเอียดเกี่ยวกับข้อแนะนำสำหรับ

ผู้เขียนผลงานที่ได้ [http:// biotech.dld.go.th](http://biotech.dld.go.th)

4. การลำดับเรื่อง

4.1 ชื่อเรื่อง (Title) ควรตั้งชื่อให้สั้นและสื่อความหมายให้ดี และพิมพ์โดยใช้ขนาดตัวอักษร 18 และตัวหนา

4.2 ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน (Author and co-workers) เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ วางกึ่งกลางใต้ชื่อเรื่อง พร้อมทั้งสถานที่ทำงานที่ติดต่อได้สะดวกพิมพ์ไว้ใต้ชื่อคณะผู้วิจัย โดยใช้ขนาดตัวอักษร 16 และตัวปกติ

4.3 บทคัดย่อ (Abstract) เขียนสั้นๆได้ เนื้อความคลุมวัตถุประสงค์ วิธีการ และผลการทดลอง ความยาวไม่ควรเกิน 3% ของตัวเรื่อง บทคัดย่อต้องมีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ แยกหน้าต่างหากจากกันส่ง บรรณาธิการวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง จ.ปทุมธานี 12000

4.4 คำสำคัญ (Key words) เป็นคำหรือข้อความสั้นๆ ที่มีความหมายแสดงถึงความเป็นไปของการทดลองนั้นๆ รวมกันแล้วไม่เกิน 5 คำ หากไม่สามารถแปลเป็นภาษาไทยได้ให้ใช้ภาษาอังกฤษแทน โดยการพิมพ์อยู่ใต้บทคัดย่อ (ขึ้นบรรทัดใหม่)

4.5 เนื้อหา (Text) สำหรับงานวิจัยประกอบด้วย

4.5.1 บทนำ(Introduction) อธิบายถึงปัญหาและวัตถุประสงค์และควรมีการตรวจเอกสาร (literature review)

4.5.2 อุปกรณ์และวิธีการ (Materials and Methods) อธิบายเครื่องมือ อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง วิธีการที่ใช้ ถ้าคิดค้นขึ้นควรอธิบายอย่างละเอียด แต่ถ้าเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปให้เขียนในลักษณะอ้างอิงถึง ถ้าเป็นเครื่องหมายตราหรือชื่อการค้า ควรทำเป็น foot note ไว้ที่ด้านล่างของหน้านั้น

4.5.3 ผล (Results) รายงานผลการทดลองเป็นคำบรรยาย ให้ละเอียดและเข้าใจง่าย โดยแบ่งเป็นหลายๆ ย่อหน้า และจัดข้อความที่มีเนื้อหาเดียวกันไว้ด้วยกัน หากเป็นไปได้ควรเสนอในรูปแบบของตารางหรือรูปภาพ หรือกราฟพร้อมทั้งบรรยาย

ประกอบ ทั้งนี้ตาราง รูป หรือกราฟ ไม่ควรแสดงผลที่เหมือนกัน

- ตาราง (Tables) ควรพิมพ์ให้ชัดเจน เหมาะกับหน้า ต้องมีความหมายในตัวเอง และมีคำอธิบายตารางอยู่เหนือตารางนั้นๆ

- รูปภาพ (Figures) ควรเป็นภาพขาว – ดำ ภาพสีหากจำเป็นผู้เขียนต้องเสียค่าใช้จ่ายเอง อธิบายรายละเอียดไว้ใต้รูปนั้นๆ

4.5.4 วิจารณ์ (Discussion) เป็นการวิจารณ์ผลการทดลอง โดยมีจุดมุ่งหมาย เพื่อให้ผู้อื่นเห็นคล้อยถึงหลักการที่แสดงออกมาจากผลการทดลอง หรือเพื่อสนับสนุน หรือคัดค้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน หรือเพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองและการตีความหมายของผู้อื่น ผู้เขียนควรพยายามเน้นถึงปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอแนะเพื่อการวิจัยในอนาคตและสู่ทางที่จะนำไปใช้ประโยชน์

4.5.5 สรุป (Conclusion) เขียนใจความที่สำคัญและคุณค่าของงานเพื่อให้ผู้อ่านเข้าใจง่ายขึ้น

4.5.6 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) ควรมีในกรณีที่ได้รับความช่วยเหลือ หรือความร่วมมือที่สนับสนุนงานค้นคว้าวิจัยนั้นๆ

4.5.7 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. กรณีที่อ้างอิงในเนื้อเรื่อง ควรอ้างอิงดังนี้คือ

1. กรณีที่อ้างจากการตรวจเอกสาร โดยผู้อื่นๆ ให้ใช้คำว่าอ้างถึงโดย (cited by)
2. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นคนไทย เมื่อเป็นประธานของประโยค ใช้ “วิบูลย์ และ จุริรัตน์ (2549), เลิศชัย และคณะ(2549) กล่าวว่า.....” หรือ

เมื่อรายงานอยู่กลาง หรือท้ายประโยค ใช้ (วิบูลย์, 2549) หรือมีเอกสารอ้างอิงในเรื่องเดียวกันมากกว่า 1 ฉบับ ให้ใช้ (ถาวรและคณะ, 2547; นริศ และสินสมุทร, 2543)

3. กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นชาวต่างประเทศ เมื่อเป็นประธานของประโยค ใช้ “Rudbeck and Dissing (1998), Kashi *et al.* (1990) กล่าวว่า..... “ หรือเมื่อผู้รายงานอยู่ระหว่างกลาง หรือท้ายประโยค ใช้ (Rudbeck and Dissing, 1998; Kashi *et al.*, 1990)

4. กรณีอ้างถึงบุคคลหรือเรื่องที่ไม่เคยลงพิมพ์มาก่อน (personal communication) ให้อ้างเฉพาะในเนื้อเรื่องเท่านั้น ไม่ต้องนำไปลงในรายชื่อเอกสารอ้างอิง เช่นsimilar results (Walker, J.M., unpublished data),for other protocols (Walker, J.M., personal communication)

ข. การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง ควรขึ้นต้นเอกสารอ้างอิงภาษาไทยก่อน เขียนเรียงตามลำดับพยางค์ของชื่อผู้เขียน ถ้าเป็นภาษาอังกฤษใช้ชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง แล้วตามด้วยปีชื่อเรื่องชื่อหนังสือ หรือชื่อย่อวารสาร ปีที่ ฉบับที่ และหน้าที่อ้างอิง ดังตัวอย่าง

วิบูลย์ ศุภารักษ์ และ จุริรัตน์ แสนโกชน. 2549. การสกัด ดีเอ็นเอ เซลล์รากขนในโคนมไทยโฮลสไตน์. การประชุมวิชาการสัตวศาสตร์ ครั้งที่ 2 “ก้าวทันสมัยกับปศุสัตว์ไทย” วันที่ 24 มกราคม 2549. โรงแรมโซฟิเทล ขอนแก่น. หน้า 452-463.

เลิศชัย จินตพิทักษ์สกุล รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล และกัลยา เก่งวิทย์กรรม. 2549. การประเมินวิธีสกัดแยกดีเอ็นเอจากเลือด น้ำเชื้อ และเซลล์

รากขนของพ่อพันธุ์โค. สัตวแพทย์สาร. 56 (3):68-79. Jason, R. H. and Callings, D.F. 1971. Transplacental infection of piglets with a porcine parvovirus. Res. Vet. Sci. 12: 570-572.

กรณีอ้างอิงจากตำรา ให้ระบุชื่อผู้เขียน ปีที่ตีพิมพ์ ชื่อเรื่อง ชื่อตำรา (พิมพ์ครั้งที่เท่าใดและบรรณาธิการหากมี) สำนักพิมพ์ เมืองที่พิมพ์ หน้าแรกและหน้าสุดท้ายที่อ้างอิง ดังตัวอย่าง

Allison, P.D.2005. Survival analysis using SAS: A practical guide 8 th edition. SAS institute Inc.,Cary, NC, USA. 292 pp.

Van Oirschot, J. T. 1986. Hog Cholera. In : Disease of Swine, 6 th ed. Leman, A. D. ed. Iowa state university Press. Iowa. p. 293-297.

กรณีอ้างอิงจากเว็บไซต์ (Online references) ดังตัวอย่าง

Weeden, N.F. 1993. Comparison of DNA extraction protocols. [Online] <http://home.twony.rr.com/protocol.htm> Access 29/10/2005.

จันทร์หา เป็นดุ่ม จุฑาพร ศรีวิพัฒน์ วรวิทย์ แสงสิงแก้ว และ พิงพิศ ดุลยพัชร. 2541. อาหารจากข้าวโพด.คู่มือการส่งเสริมการเกษตรที่ 43. แหล่งที่มา: <http://www.ku.ac.th/agri/cornn/corn.htm>. 27 มีนาคม 2541.

5. การพิมพ์ผลงานทางวิชาการ

ตัวพิมพ์ ให้พิมพ์ดีด หรือใช้เครื่องพิมพ์ (Printer) หมึกพิมพ์ต้องเป็นสีดำ กมชัด สะดวกแก่

การอ่านและใช้ตัวพิมพ์แบบเดียวกันทั้งฉบับ กรณีใช้เครื่องคอมพิวเตอร์พิมพ์เพื่อความให้ใช้ตัวอักษร Angsana UPC 16 ตัวปกติ เท่านั้น ยกเว้นหัวข้อใหญ่ เช่น ชื่อเรื่อง บทคัดย่อ บทนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผล วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 18 ส่วนหัวข้อย่อย เช่น ชื่อผู้วิจัยและคณะ คำสำคัญ ตาราง รูปภาพ เป็นต้น พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 16กระดาษที่ใช้พิมพ์ ให้ใช้กระดาษขาวไม่มีบรรทัด ขนาดมาตรฐาน A4 (210 X297 มม.) ใช้เพียงหน้าเดียว

การเว้นที่ว่างขอบกระดาษ

- ตั้งกั้นหน้าบนและซ้ายไว้ที่ 2.5 เซนติเมตร
- ด้านขวาและด้านล่างไว้ที่ 2.0 เซนติเมตร

การเว้นระยะในการพิมพ์

- การเว้นระยะระหว่างบรรทัดและการย่อ

หน้า ควรจัดตามความสวยงาม

- กรณีคำสุดท้ายไม่จบบรรทัดนั้นๆ ให้ยกคำนั้นทั้งคำไปพิมพ์ในบรรทัดต่อไป ไม่ควรตัดส่วท้ายของ คำไปพิมพ์ในบรรทัดใหม่ เช่น กระบือ ปลัก ไม่ให้แยกเป็น กระบือ-ปลัก เป็นต้น

จุลชีพ เช่น *Escherichia coli* หรือพิมพ์ตัวเอน

Escherichia coli

- หลังเครื่องหมาย . และ , หรือ; เคาะ 1 เคาะ

พืช เช่น *Oryza sativa* หรือพิมพ์ตัวเอน *Oryza sativa*

- ระหว่างคำสุดท้าย กับเครื่องหมาย . และ , ไม่เว้นช่องว่าง

สัตว์ เช่น *Bos taurus* หรือ พิมพ์ด้วยตัวเอน *Bos*

taurus

- ไม่ต้องเว้นช่องว่าง ระหว่างวงเล็บ และคำ

ข้างในวงเล็บ เช่น (รพีพรรณ และคณะ)

การลำดับหน้า

- ลำดับหน้าโดยใช้หมายเลข 1,2,3.....ที่
กึ่งกลางหน้ากระดาษ

ตาราง รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ

- ตารางประกอบด้วย เลขที่ของตาราง (table number) ชื่อของตาราง (table title) หัวตาราง (table heading) และที่มาของตาราง (ถ้ามี) โดยให้ทำเป็นภาษาอังกฤษหรือภาษาไทยทั้งตาราง พิมพ์อยู่ในหน้าเดียวกันทั้งหมด

- กรณีตารางมีความยาวมาก ไม่สามารถ
สิ้นสุดในหน้าเดียวได้ ให้พิมพ์ส่วนที่เหลือในหน้า
ถัดไปโดยพิมพ์เลขที่ตารางและตามด้วยคำว่า (ต่อ)

- กรณีรูปภาพ แผนที่ แผนภูมิ กราฟ ควรเป็น
ภาพขาวดำ และใช้แนวทางข้างต้น

การพิมพ์ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิต ให้ใช้
ตามประมวลนามศาสตร์สากล (International code
of nomenclature) คือ **ขีดเส้นใต้** หรือ **พิมพ์ด้วยตัว
เอน** ชื่อวิทยาศาสตร์เป็นไปตามการตั้งชื่อ

สารบัญ

หน้า

ผลของน้ำมันปลาทูน่าในอาหารชั้นต่อคุณภาพน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคทรอปิคอลโฮลสไตน์	1
ผลการเสริมกลูตาไรโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการละลายและอัตราการผสมติดของโคนม	9
ความสัมพันธ์ระหว่างสนิปปของยีนเลปตินกับคุณภาพซากในโคเนื้อลูกผสมแองกัส x พื้นเมือง 50%	17
ผลการเสริม Equex STM ในน้ำยาเจือจางไข่แดงทริส ต่อคุณภาพน้ำเชื้อก่อนและหลังการแช่แข็ง	28
Antimicrobial resistance pattern of <i>E.coli</i> isolated from endometritis dairy cows	35
การใช้ Equex STM ในน้ำยาสำเร็จรูปเจือจางน้ำเชื้อไข่แดงเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อแพะ	42

ผลของน้ำมันปลาทูน่าในอาหารชั้นต่อคุณภาพน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคทรอปิคอลโฮลสไตน์

จิรุตม์ รัตนเทพ¹ ศศิธร เจาะจง² ภาณุพันธ์ พงษ์เพ็ง³

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบระดับการเสริมน้ำมันปลาทูน่าในอาหารชั้นต่อคุณภาพน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อพันธุ์โคทรอปิคอลโฮลสไตน์ ดำเนินการทดลองที่ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ผสมเทียมลำพญากลาง อำเภอลำสนธิ จังหวัดลพบุรี ระหว่างเดือนมกราคม ถึงเดือนกรกฎาคม 2556 วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยใช้โคพ่อพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ อายุ 4-7 ปี จำนวน 18 ตัว สุ่มออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ให้ได้รับอาหารชั้น 3 ชนิด คือ กลุ่มที่ 1 เลี้ยงด้วยอาหารชั้นระดับโปรตีน CP 16% ไม่เสริมน้ำมันปลาทูน่า กลุ่มที่ 2 เลี้ยงด้วยอาหารชั้นระดับโปรตีน 16% เสริมน้ำมันปลาทูน่าที่ระดับ 1% กลุ่มที่ 3 เลี้ยงด้วยอาหารชั้นระดับโปรตีน 16% เสริมน้ำมันปลาทูน่าที่ระดับ 2% เลี้ยงในคอกเลี้ยงเดี่ยวขนาด 5x10 เมตร ทำการรีดเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสัปดาห์ละครั้ง ติดต่อกัน 12 สัปดาห์

ผลการทดลองพบว่าคุณภาพน้ำเชื้อสดของโคพ่อพันธุ์ที่ได้รับอาหารชั้นทั้ง 3 กลุ่ม มีปริมาณของน้ำเชื้อ ความเข้มข้น จำนวนอสุจิทั้งหมดที่รีดเก็บได้ในแต่ละครั้ง และจำนวนอสุจิรูปร่างผิดปกติไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แต่อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิในกลุ่มโคพ่อพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารชั้นที่เสริมน้ำมันปลาทูน่า 2% มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่เสริมและเสริมน้ำมันปลาทูน่า 1% ในขณะที่จำนวนอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมน้ำมันปลาทูน่า 2% มีค่าสูงสุดคือร้อยละ 75.6 ± 0.30 รองลงมาคือกลุ่มที่เสริมน้ำมันปลาทูน่า 1% มีค่าร้อยละ 73.70 ± 0.27 ส่วนพ่อพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่เสริม น้ำมันปลาทูน่ามีค่าต่ำสุดคือมีค่าร้อยละ 71.69 ± 0.21 และเมื่อพิจารณาคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งพบว่าคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งของโคพ่อพันธุ์ทั้ง 3 กลุ่มมีอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และความเร็วในการเคลื่อนที่ทั้ง 3 ลักษณะคือ VAP, VSL และ VCL ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ในขณะที่จำนวนอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ในกลุ่มโคพ่อพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมน้ำมันปลาทูน่า 2% มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมน้ำมันปลาทูน่า 1% และกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่เสริมน้ำมันปลาทูน่า คือ 67.84 ± 0.16 , 64.14 ± 0.18 และ 58.34 ± 0.16 ตามลำดับ ($p<0.05$)

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าการเสริมน้ำมันปลาทูน่า 2% ในอาหารชั้น ไม่มีผลต่อปริมาณและความเข้มข้นของน้ำเชื้อสด แต่มีผลทำให้อัตราเคลื่อนที่ อัตราเคลื่อนที่ไปข้างหน้า จำนวนอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เสริมน้ำมันปลาทูน่า และส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งในส่วน of จำนวนอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์สูงกว่ากลุ่มที่เสริมน้ำมันปลาทูน่า 1% และกลุ่มที่ไม่เสริม

คำสำคัญ: คุณภาพน้ำเชื้อ โคพ่อพันธุ์ น้ำมันปลาทูน่า

เลขทะเบียนผลงานวิจัย : 56(1)-0208-010

¹สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ อ. เมือง จ. ปทุมธานี 12000

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาอาหารสัตว์ขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น 40000

³ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ผสมเทียมลำพญากลาง อ. ลำสนธิ จ. ลพบุรี 15190

Effect of Tuna Oil in Feed on Semen Quality of Tropical Holstein Bulls.

Chirut Ratanadheb¹ Sasitorn Jorjong² Panupan pongpeng³

Abstract

The purpose of the study was to investigate the effects of dietary Tuna oil supplement on fresh semen and frozen semen quality of Tropical Holstein bull. Eighteen bulls age 4-7 year were randomized into 3 groups equally and were fed with 16% crude protein feed for the treatment of 1%, 2% Tuna oil supplement and control for consecutive 12 weeks. Semen samples were weekly collected, evaluated and processed to freezing. Results of the response to Tuna oil supplement on volume, concentration and total sperm of fresh semen of each group were not significantly different ($p>0.05$). The acrosomal integrity of the 2% treatment group was higher than the 1% and control group at 75.60 ± 0.30 , 73.70 ± 0.27 and 71.69 ± 0.21 % respectively. The semen quality after thawing on % motility, % progressive motility and sperm velocity of each group were founded non significantly different. The effect on acrosomal integrity showed the result as the same as on fresh semen of each group with percentage of intact acrosome highest on the 2% treatment group at 67.84 ± 0.16 to 64.14 ± 0.18 % and 58.34 ± 0.16 % of the 1% treatment and control group respectively. The results of this study defined that the 2% Tuna oil supplement on feed had no effect on semen volume concentration and total sperm of fresh semen and no significant effects on after thawing motility and velocity of frozen semen but showed beneficial effect on acrosomal integrity of both fresh and frozen semen which may enhance the ability on fertilization of bull sperm on artificial insemination.

Key words: Semen quality, Bulls, Tuna oil

Registered No. : 56(1)-0208-010

¹The Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Mueang, Pathumthani, 12000

²Khon kaen Animal Nutrition Research and Development Center, Mueang, Khonkaen, 40000

³Lamphayaklang Livestock Semen Production Center, Lamsonthi, Lopburi, 15190

บทนำ

การจัดการด้านอาหารและโภชนาการในโคฟอพันธุ์ที่เหมาะสม เป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อสุขภาพและการให้ผลผลิต โดยเฉพาะฟอพันธุ์โคนมที่ใช้ในการรีดเก็บน้ำเชื้อเพื่อผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง ที่ความต้องการอาหารมีความแตกต่างออกไป เนื่องจากการเลี้ยงโคฟอพันธุ์นั้นการให้อาหารต้องคำนึงถึงความต้องการโภชนาการที่มีต่อกิจกรรมทางเพศควบคู่กับคะแนนร่างกายที่ต้องรักษาไว้ในระดับที่ไม่อ้วนหรือผอมจนเกินไป ดังนั้นองค์ประกอบของวัตถุดิบในสูตรอาหารโคฟอพันธุ์จึงควรมีส่วนในการส่งเสริมให้โคฟอพันธุ์มีสุขภาพแข็งแรงและมีคุณภาพน้ำเชื้อที่ดี และเมื่อนำไปผลิตเป็นน้ำเชื้อแช่แข็งก็จะได้น้ำเชื้อแช่แข็งที่มีคุณภาพดีตามมา

อาหารโคฟอพันธุ์ทดสอบตามรายละเอียดคุณลักษณะเฉพาะที่กรมปศุสัตว์กำหนดเป็นอาหารที่ต้องมีโปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 16 และต้องไม่มีส่วนผสมของยูเรียเนื่องจากยูเรียเป็นพิษต่อสุจิและตัวอ่อน (Yugal et al., 2013) นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดของไขมันมีผลต่อสุจิตัวเนื่องจากเป็นสารที่มีความสำคัญในการผลิตฮอร์โมนในระบบสืบพันธุ์และการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โดยเฉพาะกรดไขมันในกลุ่ม Polyunsaturated Fatty Acid (PUFA) ได้แก่ โอเมก้า 3 โอเมก้า 6 และ Docosahexaenoic Acid (DHA) เป็นสารตั้งต้นที่ใช้ในการสร้างเซลล์สุจิและของเหลวที่อยู่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ และพบมากในบริเวณผิวเยื่อหุ้มเซลล์ทั้งส่วนหัวและหางของสุจิ ซึ่งมีความสำคัญมากต่อความแข็งแรงของสุจิและความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง เช่น การสัมผัสกับของเหลวอื่น และอุณหภูมิที่เปลี่ยนไป (Steven et al., 2005; Strzezek et al., 2004) ดังนั้นถ้าปริมาณของ PUFA ในตัวสุจิเพิ่มขึ้นก็น่าจะสามารถช่วยป้องกันความเสียหายขององค์ประกอบภายในเซลล์ และรักษาความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมของสุจิได้ดีขึ้น ซึ่งมีปัจจัยเหล่านี้มีพบว่าความสัมพันธ์กับการอยู่รอดของสุจิตายหลังการทำละลาย

น้ำมันปลาคุณภาพดีมีไขมันในกลุ่ม PUFA ซึ่งในน้ำมันปลา 100 กรัมมีปริมาณของ DHA 2,877 มิลลิกรัม และ Eicosapentaenoic Acid (EPA) 1,288 มิลลิกรัม (นฤมลและคณิต, 2542) นำมาใช้เลี้ยงโคฟอพันธุ์พบว่าสามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อสดให้สูงกว่าการกินอาหารที่ไม่เสริมกรดไขมันโอเมก้า 3 (Hamid et al., 2011) และในทำนองเดียวกับ Adeel et al. (2009) ที่ทำการเสริม 1% ไขมันในกลุ่มที่มี PUFA ในอาหารกระบือ พบว่ากระบือที่ได้รับอาหารที่เสริมไขมัน มีปริมาณน้ำเชื้อสดเพิ่มขึ้น และอัตราการเคลื่อนที่ของสุจิตีสูงกว่าการไม่เสริมไขมันในอาหาร ส่วนในฟอพันธุ์แพะการเสริมน้ำมันปลาที่ระดับ 2.5% มีผลให้คุณภาพน้ำเชื้อและความสมบูรณ์พันธุ์สูงขึ้น (Dolatpanah et al., 2008)

ดังนั้นจึงทำการทดลองเสริมน้ำมันปลาคุณภาพดีชนิด semi-refined ซึ่งเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วย PUFA สูง และเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมที่ต้นทุนต่ำ ในอาหารสำหรับเลี้ยงฟอพันธุ์โคนม เพื่อศึกษาผลที่มีต่อปริมาณและคุณภาพน้ำเชื้อสด และคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง

วิธีการดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลอง ฟอพันธุ์โครอปิคอลโฮลสไตน์ อายุ 5-7 ปี จำนวน 18 ตัว เลี้ยงในคอกเลี้ยงเดี่ยวขนาด 5x10 เมตร ที่ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งฟอพันธุ์ผสมเทียมลำพญากลาง อำเภอลำสนธิ จังหวัดลพบุรี ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อด้วยวิธี artificial vagina สัปดาห์ละ 1 ครั้ง ติดต่อกัน 12 สัปดาห์

แผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยใช้โคฟอพันธุ์โครอปิคอลโฮลสไตน์ อายุ 4-7 ปี จำนวน 18 ตัว สุ่มออกเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 6 ตัว ให้ได้รับอาหารชั้น 3 ชนิด คือ

- กลุ่มที่ 1 เลี้ยงด้วยอาหารชั้น ระดับโปรตีน 16% ไม่เสริมน้ำมันปลา
- กลุ่มที่ 2 เลี้ยงด้วยอาหารชั้นระดับโปรตีน 16% CP เสริมน้ำมันปลาที่ระดับ 1%
- กลุ่มที่ 3 เลี้ยงด้วยอาหารชั้นระดับโปรตีน 16% เสริมน้ำมันปลาที่ระดับ 2%

การให้อาหารและการเลี้ยงดู ให้อาหารตามความต้องการโภชนะของโคนมพ่อพันธุ์ตาม NRC (2001) โดยใช้อาหารหยาบคือหญ้าแห้งกล้าแห้งวันละ 12 กิโลกรัม และอาหารข้น (ตารางที่ 1) วันละ 4 กิโลกรัม/ตัว โดยแบ่งให้เช้าและบ่ายวันละ 2 เวลา ก่อนเริ่มเก็บข้อมูลทำการเลี้ยงปรับสภาพโคให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมเป็นเวลา 3 สัปดาห์ และเลี้ยงเพื่อเก็บน้ำเชื้อเป็นระยะเวลา 12 สัปดาห์ รวมระยะเวลาทั้งหมด 15 สัปดาห์

ตารางที่ 1 แสดงคุณค่าทางโภชนะของอาหารข้นที่ใช้เลี้ยงโคพ่อพันธุ์ในแต่ละกลุ่มทดลอง

คุณค่าทางโภชนะ	สูตรควบคุม	เสริมน้ำมันปลาทูน่า 1%	เสริมน้ำมันปลาทูน่า 2%
พลังงาน (Kcal)	2,812	2,850	2,845
โปรตีน,%	15.94	15.82	15.84
ไขมัน,%	3.19	4.28	5.28
แคลเซียม,%	0.81	0.79	0.78

การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง น้ำเชื้อที่รีดเก็บได้ในแต่ละสัปดาห์นำมาผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งโดยทำการเจือจางน้ำเชื้อด้วย Egg Yolk Tris ให้มีความเข้มข้น 96 ล้านตัว/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.25 มล. และลดอุณหภูมิไปที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ และเก็บรักษาไว้ภายใต้ระดับไนโตรเจนเหลว จากนั้นทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง 24 ชั่วโมง โดยมีตัวชี้วัดดังนี้

- น้ำเชื้อสด ได้แก่ ปริมาตรของน้ำเชื้อ (volume) ความเข้มข้น (concentration) มีหน่วยเป็นล้านตัวต่อมิลลิลิตร ตรวจสอบด้วยเครื่องตรวจนับความเข้มข้น (spectrophotometer) จำนวนอสุจิทั้งหมดที่รีดเก็บได้ในแต่ละครั้ง คำนวณจากปริมาตรคูณด้วยความเข้มข้น ความหนาแน่น (density) การเคลื่อนไหวหวั่น (mass movement) อัตราการเคลื่อนที่ (motility) จำนวนอสุจิรูปร่างผิดปกติ ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง (phase contrast microscope) และจำนวนอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ ด้วยวิธีการย้อมสี Congo red

- น้ำเชื้อแช่แข็ง ได้แก่ อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วในการเคลื่อนที่ได้แก่ Average path velocity (VAP), Straight-line velocity (VSL), Curvilinear velocity (VCL) ลักษณะการเคลื่อนที่ได้แก่ Amplitude of lateral head (ALH), Beat cross frequency (BCF), Straightness (STR) Linearity (LIN) ลักษณะรูปร่างอสุจิ ได้แก่ Elongation และ Area ตรวจสอบด้วยเครื่อง Computer Assisted Semen Analysis (CASA) รูปร่างอสุจิผิดปกติ และอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์

การวิเคราะห์และประมวลผล วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี Analysis of Variance วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test)

ผลการทดลองและวิจารณ์

คุณภาพน้ำเชื้อสด

จากการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคที่เลี้ยงด้วยอาหารข้นโปรตีน 16% ไม่เสริมน้ำมันปลาทูน่า และเสริมน้ำมันปลาทูน่า 1 และ 2% พบว่าพ่อพันธุ์ที่ได้รับอาหารข้นทั้ง 3 กลุ่ม มีปริมาตรของน้ำเชื้อ ความเข้มข้น และจำนวนอสุจิทั้งหมดที่รีดเก็บได้ในแต่ละครั้งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แต่พบความแตกต่างในส่วนของความหนาแน่นของน้ำเชื้อในกลุ่มพ่อพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารข้นเสริมน้ำมันปลาทูน่า 2% มีค่า 1.99 ± 0.08 สูงกว่า น้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารข้นเสริมน้ำมันปลาทูน่า 1% ส่วนลักษณะการเคลื่อนไหวหวั่นและอัตราการเคลื่อนที่ ในโคพ่อพันธุ์กลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารข้นที่เสริมน้ำมันปลาทูน่า 2% มีค่าสูง

กว่าโคที่เลี้ยงด้วยอาหารชั้นที่เสริมน้ำมันปลาทูน่า 1% ในขณะที่ฟอสฟอรัสโคทั้ง 3 กลุ่มมีจำนวนอสุจิรูปร่างผิดปกติไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แต่จำนวนอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ในฟอสฟอรัสที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมน้ำมันปลาทูน่า 2% มีค่าสูงที่สุดคือร้อยละ 75.6 ± 0.30 รองลงมาคือฟอสฟอรัสที่เลี้ยงด้วยอาหารที่เสริมน้ำมันปลาทูน่า 1% มีค่าร้อยละ 73.70 ± 0.27 ส่วนฟอสฟอรัสที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่เสริมน้ำมันปลาทูน่ามีค่าต่ำสุดคือมีค่าร้อยละ 71.69 ± 0.21 (ตารางที่ 2)

จากผลการทดลองพบว่าโคฟอสฟอรัสที่กินอาหารชั้นที่เสริมน้ำมันปลาทูน่าไม่มีผลให้ปริมาณน้ำเชื้อ ความเข้มข้น และจำนวนอสุจิเพิ่มขึ้น แต่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ และความสมบูรณ์ของอะโครโซม ซึ่งสอดคล้องกับ Hamid et al. (2011) ที่ทำการศึกษโดยให้โคฟอสฟอรัสกินโอเมก้า 3 โดยตรงในรูปของแคปซูล ซึ่งใน 100 กรัม ประกอบด้วย DHA 10% และ EPA 6% ไม่สามารถช่วยเพิ่มปริมาตร ความเข้มข้น หรือจำนวนอสุจิทั้งหมดในน้ำเชื้อโค แต่สามารถช่วยเพิ่มในส่วนของคุณลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ ที่วิเคราะห์ด้วย CASA ได้แก่ อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และ VAP ของอสุจิสูงกว่าโคกลุ่มที่ไม่ได้กิน และให้ผลในทำนองเดียวกับที่ทำการศึกษานใน แพะ (Dolatpanah et al. 2008) และในแกะ (Towhidi et al. 2008) แต่แตกต่างในสุกร (Paulenz et al. 1999) และในม้า (Brinsko et al. 2005) ซึ่งพบว่าฟอสฟอรัสที่ได้รับอาหารที่อุดมไปด้วยสารกลุ่มโอเมก้า สามารถช่วยเพิ่มปริมาณและคุณภาพน้ำเชื้อให้สูงขึ้นได้ ทั้งนี้ได้ให้เหตุผลในทำนองเดียวกันคือ PUFA ที่ได้รับการกินช่วยให้เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิมีความสมบูรณ์แข็งแรงเพิ่มขึ้น

ตารางที่ 2 แสดงลักษณะน้ำเชื้อสดของฟอสฟอรัสโคที่ได้รับอาหารชั้นที่ไม่เสริมและเสริมน้ำมันปลาทูน่า

ฟอสฟอรัสโคนม	อาหารชั้น 16% CP		
	ไม่เสริมน้ำมันปลา	เสริมน้ำมันปลา 1%	เสริมน้ำมันปลา 2%
ปริมาตร (มล.)	6.04 ± 0.19	6.36 ± 0.18	6.01 ± 0.15
ความเข้มข้น ($\times 10^6$ ตัว/มล.)	725.90 ± 19.32	720.37 ± 20.80	751.68 ± 19.21
จำนวนอสุจิทั้งหมด ($\times 10^6$ ตัว)	$5,745.05\pm235.34$	$5,565.51\pm191.27$	$5,593.54\pm196.92$
ความหนาแน่น (Density)	$1.86^{ab}\pm0.05$	$1.76^b\pm0.05$	$1.99^a\pm0.08$
การเคลื่อนไหวหมู่ (Mass movement)	$2.21^a\pm0.06$	$2.02^b\pm0.06$	$2.19^a\pm0.06$
อัตราการเคลื่อนที่ (%)	$66.45^a\pm0.52$	$64.12^b\pm0.88$	$66.74^a\pm0.62$
จำนวนอสุจิรูปร่างผิดปกติ (%)	12.23 ± 0.69	10.57 ± 0.60	11.81 ± 0.65
จำนวนอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ (%)	$71.69^c\pm0.21$	$73.70^b\pm0.27$	$75.60^a\pm0.30$

^{abc} อักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนเดียวกันแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

เมื่อโคฟอสฟอรัสได้รับอาหารที่อุดมไปด้วยกรดไขมันสายยาวจากน้ำมันปลาทูน่า โคฟอสฟอรัสจึงมีปริมาณของ PUFA ในร่างกายเพิ่มขึ้น และ PUFA ที่เพิ่มขึ้นส่งผลต่อการสร้างอสุจิ โดยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิมีปริมาณของ PUFA เพิ่มขึ้นตามไปด้วย โดยพบมากที่ส่วนหางของอสุจิ ซึ่งอาจรวมไปถึง flagellar ช่วยให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิดีขึ้น อีกทั้งยังมีความสำคัญต่อการแลกเปลี่ยนสารระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ จึงช่วยทำให้อสุจิมีเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมสมบูรณ์แข็งแรง (Humid et al., 2011) แต่ PUFA ไม่มีส่วนช่วยในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ทั้งในส่วนการเพิ่มการสร้างอสุจิ และความผิดปกติของรูปร่างอสุจิ จากผลการทดลองในครั้งนี้พบว่าโคที่เลี้ยงด้วยอาหารชั้นเสริมน้ำมันปลาทูน่า 2% เป็นระดับที่น้ำเชื้อมีอะโครโซมสมบูรณ์ที่สุด

คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง

เมื่อนำน้ำเชื้อที่รีดเก็บจากพ่อพันธุ์ทั้ง 3 กลุ่มผลิตเป็นน้ำเชื้อแช่แข็ง พบว่าคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งของโคพ่อพันธุ์ทั้ง 3 กลุ่มมีอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และอสุจิรูปร่างผิดปกติไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แต่ความเร็วในการเคลื่อนที่ทั้ง 3 ลักษณะคือ VAP, VSL และ VCL ของอสุจิโคพ่อพันธุ์กลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารชั้นเสริมน้ำมันปลาทูน่า 1% มีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารชั้นไม่เสริมน้ำมันปลาทูน่า และกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารชั้นเสริมน้ำมันปลาทูน่า 2% ในขณะที่ลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ ค่า ALH ในกลุ่มโคพ่อพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารชั้นเสริมน้ำมันปลาทูน่า 1% มีค่าสูงที่สุด รองลงมาคือกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารชั้นไม่เสริมน้ำมันปลาทูน่า และกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารชั้นเสริมน้ำมันปลาทูน่า 2% มีค่าต่ำที่สุด แต่ลักษณะการเคลื่อนที่อื่น ได้แก่ BCF, STR และ LIN ในกลุ่มที่เสริมน้ำมันปลาทูน่า 1% มีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่ไม่เสริมและเสริมน้ำมันปลาทูน่า 2% ส่วนลักษณะรูปร่างของอสุจิ ค่าส่วนหัวของอสุจิ (Area) ในกลุ่มที่กินอาหารไม่เสริมน้ำมันปลาทูน่ามีค่าสูงกว่า กลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมน้ำมันปลาทูน่า 1 และ 2% ในขณะที่อสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ในกลุ่มโคพ่อพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมน้ำมันปลาทูน่า 2% มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารเสริมน้ำมันปลาทูน่า 1% ส่วนกลุ่มที่เลี้ยงด้วยอาหารไม่เสริมน้ำมันปลาทูน่ามีค่าต่ำสุด (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งของพ่อพันธุ์โคนมที่ได้รับอาหารชั้นแตกต่างกัน

คุณภาพน้ำเชื้อ	อาหารชั้น 16% CP		
	ไม่เสริมน้ำมันปลา	เสริมน้ำมันปลา 1%	เสริมน้ำมันปลา 2%
อัตราการเคลื่อนที่			
Motility (%)	43.23±2.88	39.88±1.32	39.48±1.16
Progressive motility (%)	22.15±0.53	20.78±0.70	21.27±0.80
ความเร็วในการเคลื่อนที่			
Average path velocity:VAP ($\mu\text{m/s}$)	80.92 ^b ±0.80	85.06 ^a ±1.08	77.47 ^c ±0.93
Straight-line velocity:VSL ($\mu\text{m/s}$)	61.99 ^b ±0.51	63.80 ^a ±0.64	59.76 ^c ±0.73
Curvilinear velocity:VCL ($\mu\text{m/s}$)	141.04 ^b ±1.69	152.35 ^a ±2.24	136.03 ^c ±1.72
ลักษณะการเคลื่อนที่			
Amplitude of lateral head: ALH (μm)	6.75 ^b ±0.06	7.33 ^a ±0.08	6.66 ^b ±0.05
Beat cross frequency:BCF (HZ)	24.91 ^a ±0.18	23.56 ^b ±0.23	24.60 ^a ±0.24
Straightness: STR (%)	75.94 ^a ±0.28	74.24 ^b ±0.34	76.27 ^a ±0.23
Linearity: LIN (%)	45.35 ^a ±0.28	43.35 ^b ±0.33	45.27 ^a ±0.24
ลักษณะตัวอสุจิ			
Elongation	45.30 ^b ±0.17	46.17 ^a ±0.20	46.23 ^a ±0.17
พื้นที่ส่วนหัวของอสุจิ (Area; μm)	8.96 ^a ±0.05	8.80 ^b ±0.06	8.69 ^b ±0.04
อสุจิรูปร่างผิดปกติ (%)	19.95±0.70	19.56±0.64	20.09±0.68
อสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ (%)	58.34 ^c ±0.16	64.14 ^b ±0.18	67.84 ^a ±0.16

^{abc} ตัวอักษรต่างกันในแนวนอนเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ($p<0.05$)

การทดลองในครั้งนี้แตกต่างไปจากผลการทดลองในกระบือ (Adeel et al., 2009) และม้า (Steven et al., 2005) ซึ่งการเลี้ยงพ่อพันธุ์ด้วยอาหารที่อุดมไปด้วยโอเมก้า 3 สามารถช่วยเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อภายหลัง

การแช่แข็ง ให้มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าพ่อพันธุ์ที่เลี้ยงด้วยอาหารชั้นที่ไม่มีโอเมก้า 3 โดยเนื่องจากโอเมก้า 3 ช่วยเสริมความแข็งแรงให้กับเยื่อหุ้มเซลล์ และยังทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระตัวหนึ่ง ทำให้สุจิทนต่อการลดอุณหภูมิและการแช่แข็งได้ดี เมื่อกินอาหารที่อุดมไปด้วยโอเมก้า 3 หรือ PUFA ที่กินเข้าไปสามารถช่วยเพิ่ม PUFA ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิมีส่วนช่วยเสริมความแข็งแรงให้สุจิเนื่องจากเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่ง ในการทำหน้าที่ควบคุมการแลกเปลี่ยนสารเข้า-ออกเซลล์ ในขบวนการ flexibility และ compressibility อีกทั้งยังช่วยลดการเกิดปฏิกิริยา oxidation เมื่อสุจิใช้ประโยชน์จากสารต่างๆ ในน้ำยาเจือจาง และขบวนการ metabolism ที่เกิดขึ้นและจะซับซ้อนเสียที่เป็นพิษกับอสุจิเอง (Strzezek et al., 2004)

การทดลองเลี้ยงโคพ่อพันธุ์ด้วยอาหารชั้นเสริมน้ำมันปลาทูน่า ไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ภายหลังการแช่แข็ง แต่มีผลต่อความเร็วในการเคลื่อนที่ ลักษณะการเคลื่อนที่ และจำนวนอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ ซึ่งการพิจารณาคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง โดยทั่วไปใช้อัตราการเคลื่อนที่ในการตัดสิน คือต้องมีอัตราการเคลื่อนที่ไม่น้อยกว่าร้อยละ 40 หรือไม่น้อยกว่า 8 ล้านตัว การทดลองในครั้งนี้ไม่พบความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ โดยน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งทั้ง 3 กลุ่มมีอัตราการเคลื่อนที่ใกล้เคียงเกณฑ์ที่กำหนด ส่วนความเร็วในการเคลื่อนที่และลักษณะการเคลื่อนที่ที่ยังไม่มีเกณฑ์ที่กำหนดชัดเจน ดังนั้นจึงพิจารณาให้ความสำคัญกับจำนวนอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ เนื่องจากอะโครโซมเป็นองค์ประกอบที่ส่วนหัวของอสุจิและบรรจุเอนไซม์ไฮยาลูโรนิเดส (Hyaluronidase) อยู่ภายใน ทำหน้าที่ช่วยในการย่อยสลายชั้นที่ห่อหุ้มไข่ (Zona Pellucida) เพื่อเข้าปฏิสนธิกับไข่ ถ้าน้ำเชื้อที่ใช้ในการผสมเทียมมีจำนวนอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์สูงก็น่าจะเป็นการเพิ่มโอกาสในการเข้าปฏิสนธิกับไข่ได้สูงกว่าน้ำเชื้อที่มีจำนวนอสุจิที่อะโครโซมสมบูรณ์ต่ำกว่า

เมื่อพิจารณาร่วมกับต้นทุนค่าอาหารโคพ่อพันธุ์ซึ่งเป็นอาหารมีส่วนประกอบของโปรตีนไม่น้อยกว่าร้อยละ 16 และไม่มียูเรีย มีต้นทุนประมาณกิโลกรัมละ 10 บาท ถ้าเสริมน้ำมันปลาทูน่า 1 % ต้นทุนจะเพิ่มขึ้นเป็นกิโลกรัมละ 10.58 บาท และต้นทุนของอาหารชั้นเสริมน้ำมันปลาทูน่า 2% ประมาณกิโลกรัมละ 11.16 บาท เมื่อคำนึงถึงผลที่ได้รับคือ ปริมาณและความเข้มข้นของน้ำเชื้อ อัตราการเคลื่อนที่ ไม่ได้เพิ่มขึ้น แต่เพิ่มขึ้นเฉพาะจำนวนอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ ซึ่งถ้ามีจำนวนอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์สูงโอกาสในการเข้าปฏิสนธิกับไข่ก็น่าจะสูงกว่าน้ำเชื้อที่มีจำนวนอสุจิที่อะโครโซมสมบูรณ์ ดังนั้นการเสริมน้ำมันปลาทูน่าในอาหารชั้นจึงนับว่าเป็นอีกทางเลือกที่สามารถช่วยเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อสดและคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยการเพิ่มต้นทุนเพียงเล็กน้อย

สรุปผลการทดลอง

การเสริมน้ำมันปลาทูน่า 2% ในอาหารชั้นที่ใช้เลี้ยงโคพ่อพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์ ไม่สามารถเพิ่มปริมาตร และความเข้มข้นของน้ำเชื้อสดได้ แต่ช่วยเพิ่มอัตราเคลื่อนที่ อัตราเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และจำนวนอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ให้สูงขึ้น ส่วนคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งมีคุณภาพเพิ่มขึ้นในด้านจำนวนอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ จึงมีแนวโน้มให้ผลที่ดีหากพิจารณาเสริมในอาหารโคพ่อพันธุ์เป็นประจำต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ผสมเทียมลำพูนกลางที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการทดลอง การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง และตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ และรวบรวมข้อมูลมาใช้ในการวิเคราะห์ผลให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- นฤมล จิย์โชค และ คณิต กฤษณังกูร. 2542. การเพิ่มความเข้มข้นของ EPA และ DHA ในน้ำมันปลาทูน่าโดยใช้เอนไซม์ไลเปส. Available at:
- Adeel, M., A. Ijaz, M. Aleem, H. Rehman, M.S. Yousaf and M.A. Jabbar. 2009. Improvement of liquid and frozen-thawed semen quality of Nili-Ravi buffalo bulls (*Bubalus bubalis*) through supplementation of fat. *Theriogenology* 71:1220-1225.
- Brinsko, S.P., D.D. Varner, C.C. Love, T.L. Blanchard, B.C. Day and M.E. Wilson. 2005. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. *Theriogenology* 63(5): 1519-1527.
- Dolatpanah, M.B., A. Towhidi, A. Farshad, A. Rashidi and A. Rezayazdi. 2008. Effects of dietary fish oil on semen quality of goats. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*
- Hamid, G., C. Mohamad, T. Armin and H.F. Mohammad. 2011. Improvement of semen quality in Holstein bulls during heat stress by dietary supplementation of Omega-3 fatty acids. *International Journal of Fertility and Sterility* 4(4) : 160-167.
- NRC. 2001. Nutrient Requirement of Dairy Cattle. 7th ed. National Academy Press. Washington, DC.
- Paulenz H., O. Taugbol, E. Kommisrud and I.S. Grevle. 1999. Effect of dietary supplementation with cod liver oil on cold shock and freezability of boar semen. *Reprod Domest Anim.* 34(5): 431-435.
- Steven, P.B., D.V. Dickson, C.L. Charles, L.B. Terry, C.D. Brian and E.W. Mark. 2005. Effect of feeding a DHA-enriched nutraceutical on the quality of fresh, cooled and frozen stallion semen. *Theriogenology* 63: 1519-1527.
- Strzezek, J., L. Fraser, M. Kuklinska, A. Dziekonska and M. Lecewicz. 2004. Effects of dietary supplementation with polyunsaturated fatty acids and antioxidants on biochemical characteristics of boar semen. *Society for Biology of Reproduction* 4(3): 271-287.
- Towhidi, A., F. Samadian, K. Rezayazdi, F. Rostami and F. Ghazaini. 2008. Feeding n-3 fatty acid source improve semen quality by increasing n3/n6 fatty acids ratio in sheep. *Book of abstracts of 10th World Conference on Animal production* : 65.
- Yugal, R.B., S. Sulochana, S. Nabaraj and N.G. Tara. 2013. Adv. Effect of nutrition on reproduction-A review. *Appl. Sci. Res.* 4(1): 421-429.

ผลการเสริมกลูตาไธโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการละลายและอัตรา การผสมติดของโคนม

จิรุตม์ รัตนเทพ¹ สิ้นชัย วิโรจน์วุฒิกุล² สราวุธ ฉายประสาท³ จตุพร พงษ์เพ็ง⁴

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลการเสริมกลูตาไธโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการละลายและอัตราการผสมติดของโคนม วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยใช้ น้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์โคนม ทropicol Holstein อายุ 5-7 ปี จำนวน 5 ตัว (บล็อก) ที่มีน้ำเชื้อสดด้วยอัตราเคลื่อนที่ไม่ต่ำกว่า 70 % ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ติดต่อกัน 5 สัปดาห์ น้ำเชื้อที่รีดเก็บได้จากพ่อพันธุ์แต่ละตัวแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม แล้วเจือจางน้ำเชื้อด้วย Egg Yolk Tris ที่ไม่เสริมและเสริมกลูตาไธโอนที่ระดับความเข้มข้น 0.5 1 และ 2 mM แล้วทำการแช่แข็ง นำน้ำเชื้อแช่แข็งนี้ไปตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ sperm motility, progressive motility, velocity(VAP, VSL, VCL), kinetic movement(ALH,BCF,STR,LIN) and acrosome integrity และผสมเทียม โดยใช้โคนมเพศเมีย 50 ตัวต่อกลุ่ม และทำการตรวจท้องภายหลังการผสมเทียม 60 วัน

ผลการศึกษาพบว่าคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งทั้ง 4 กลุ่ม มีอัตราการเคลื่อนที่ (motility) อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า(progressive motility) ความเร็วในการเคลื่อนที่ (velocity: VAP,VSL,VCL) และลักษณะการเคลื่อนที่(kinetic movement: ALH,BCF,STR) มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แต่ลักษณะการเคลื่อนที่(kinetic movement) ในส่วนของค่า linearity (LIN) พบว่ากลุ่มที่เสริมกลูตาไธโอน 1 mM (42.01 ± 0.30) มีค่าแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) กับกลุ่มที่ไม่เสริมกลูตาไธโอน (42.96 ± 0.45) ส่วนความสมบูรณ์ของอะโครโซม พบว่า acrosome-intact ในกลุ่มที่เสริมกลูตาไธโอน 0.5 mM (67.90 ± 2.45) แตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) กับกลุ่มที่ไม่เสริมกลูตาไธโอน(57.72 ± 3.30) ในขณะที่ acrosome-damage ของกลุ่มที่เสริมกลูตาไธโอน 0.5 mM (28.54 ± 2.72) ก็แตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) กับกลุ่มที่ไม่เสริมกลูตาไธโอน (38.73 ± 2.97) และเมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปผสมเทียมให้กับโคนมเพศเมียพบว่า น้ำเชื้อแช่แข็งกลุ่มที่เสริมกลูตาไธโอน 0.5 และ 1.0 mM และกลุ่มที่ไม่เสริมกลูตาไธโอนมีอัตราการผสมติดแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) คือ 36.00 ± 11.23 31.49 $\pm$ 2.95 และ 15.90 $\pm$ 4.65 ตามลำดับ

การศึกษานี้ชี้ว่าน้ำเชื้อแช่แข็งของโคนมที่เจือจางด้วย Egg Yolk Tris ที่เสริมกลูตาไธโอน มีผลดีต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งและอัตราการผสมติด

คำสำคัญ: กลูตาไธโอน คุณภาพน้ำเชื้อ พ่อพันธุ์โคนม อัตราการผสมติด

เลขทะเบียนวิจัย: 56(1)-0208-011

¹สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ อ. เมือง จ. ปทุมธานี 12000

²ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพนครชลบุรี อ. บ้านบึง จ. นครราชสีมา 20220

³ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์โครงการหลวงอินทนนท์ อ.จอมทอง จ. เชียงใหม่ 50000

⁴ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี อ. เมือง จ. สระบุรี 15190

Effect of Glutathione Supplements in Tris-based extender on Post-Thaw Semen Quality and fertility of Dairy Bulls.

Chirut Ratanadheb¹ Sinchai Wirojwutthikul² Sarawuth Chaiprasat³ Jatuporn pongpeng⁴

Abstract

The aim of this study was to evaluated the effects of Tris-based semen extender supplemented with different concentrations of glutathione, 0.5, 1, and 2 mM, on dairy bulls semen quality and conception rate. Five Tropical Holstein bulls 5-7 years of age with fresh sperm motility rate more than 70 percent were set in Randomized Complete Block Design (RCBD). Semen from all 5 bulls was collected once a week for 5 consecutive weeks. Each batch of collected semen was divided into 4 groups and extended with Egg Yolk Tris supplemented with 4 different concentrations of glutathione, control, 0.5, 1.0, and 2.0 mM, then frozen. After thawing, semen samples were determined for semen quality : sperm motility, progressive motility, velocity(VAP, VSL, VCL), kinetic movement(ALH,BCF,STR,LIN) and acrosome integrity. Fifty cows per group were artificially inseminated (AI) with control and treated semen. Pregnancy check was determined 60 days after AI. The results revealed sperm motility, progressive motility and velocity (VAP, VSL, VCL) of control and all treated groups were non significantly different ($p>0.05$), however, LIN of the control group (42.96 ± 0.45) was significantly different ($p>0.05$) from treated group,1.0mM (42.01 ± 0.30). The acrosome-intact of the control group (57.72 ± 3.30) was significantly different ($p>0.05$) from treated groups, 0.5mM, (67.90 ± 2.45). While acrosome-damage of the control group (38.73 ± 2.97) was also significantly different ($p>0.05$) from treated groups,0.5mM, (28.54 ± 2.72). Conception rate of the control group and treated group,0.5 and 1.0mM, were significant difference ($p>0.05$), 15.90 ± 4.65 , 36.00 ± 11.23 and 31.49 ± 2.95 , respectively.

This study suggested that semen extender supplemented with glutathione had beneficial effects on semen quality and conception rate of dairy bull frozen semen.

Keywords : glutathione, semen quality, dairy bull, conception rate

Registered No. : 56(1)-0208-011

¹Bureau of Biotechnology in Animal Production, Department of Livestock Development, Pathumthani 12000.

²Chonburi Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Chonburi 20220

³Bull Semen Production Center (Inthanond Royal Project), Jomthong ChiangMai. 50000

⁴Lamphayaklang Bull Semen Production Center, Lamsonthi, Lopburi. 15190

คำนำ

องค์ประกอบของสารต่างๆ ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อมีผลต่อความสามารถในการมีชีวิตรอดของอสุจิในกระบวนการแช่แข็ง นอกจากการเจือจางน้ำเชื้อให้มีความเข้มข้นตามความต้องการแล้ว ยังทำหน้าที่เป็นแหล่งให้พลังงานและสารที่จำเป็นต่อการเคลื่อนที่ การมีชีวิตรอด รวมทั้งการป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับตัวอสุจิจากขั้นตอนการลดอุณหภูมิและการแช่แข็ง ซึ่งอสุจิจะมีความไวต่อการตอบสนองในการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม เช่นเมื่ออุณหภูมิเย็นลงกะทันหัน อาจทำให้อสุจิเกิด cold shock และตายได้ หรือการเกิดปฏิกิริยาเมื่อสัมผัสกับสารเคมี ซึ่งจะส่งผลต่อคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซม หรือการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation จากสารอนุมูลอิสระ (Uysal and Bucak, 2007) เป็นต้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้ล้วน ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่และการรอดชีวิตของอสุจิภายหลังการแช่แข็งลดลง (Hu et al., 2010)

กลูตาไธโอนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติช่วยลดจำนวนสารในกลุ่มอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่มีผลเสียต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิ การเสริมกลูตาไธโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ จึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิต และคงสภาพของอะโครโซมของอสุจิให้สมบูรณ์ได้มากขึ้น โดยมีการศึกษาในหลายชนิดสัตว์และให้ผลการทดลองที่แตกต่างกัน Triwulaningsih et al. (2008) รายงานว่าการเสริมกลูตาไธโอน 0.5 mM ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคสามารถช่วยเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์สูงกว่าการเสริมที่ 1 และ 1.5 mM ในขณะที่ Gadea et al. (2007) รายงานว่า การเสริมกลูตาไธโอนที่ 1 mM สามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโคในส่วนของความสมบูรณ์ของอะโครโซมและการเข้าปฏิสนธิกับไข่ดีกว่าการไม่เสริมกลูตาไธโอน สอดคล้องกับ Sariozkan et al. (2009) รายงานว่าการเสริมกลูตาไธโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคสามารถเพิ่มความทนทานต่อการแช่แข็งได้ดีกว่าการไม่เสริม แต่ในการแช่แข็งน้ำเชื้อกระบือ การเสริมกลูตาไธโอนที่ 2 mM ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อทำให้น้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งมีคุณภาพสูงกว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่ไม่เสริมกลูตาไธโอน (Ansari et al., 2010)

ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลการเสริมกลูตาไธโอนที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการละลายและอัตราการผสมติด

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง พ่อพันธุ์โคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์ อายุ 5-7 ปี จำนวน 5 ตัว ที่ตัวอสุจิในน้ำเชื้อสดจากพ่อพันธุ์โคทุกตัวมีอัตราการเคลื่อนที่ไม่ต่ำกว่า 70 % ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์โคทั้ง 5 ตัวนี้ที่ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ผสมเทียมลำพูนกลาง ตำบลหนองรี อำเภอลำสนธิ จังหวัดลพบุรี ระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2555 ถึงเดือนมกราคม 2556

แผนการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ Randomize Complete Block Design (RCBD) กำหนดให้พ่อพันธุ์แต่ละตัวเป็นบล็อก ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์โคทั้ง 5 ตัวสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ติดต่อกัน 5 สัปดาห์ น้ำเชื้อของพ่อพันธุ์แต่ละตัวที่รีดเก็บได้จะถูกแบ่งออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆ กัน แต่ละส่วนนำมาเจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง 4 แบบ เป็น 4 กลุ่มทดลอง ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris (Tris 30.28 g, citric acid 17.0 g, fructose 12.5 g, demineralised water 920.0 ml, glycerol 80 ml, egg yolk 250.0 ml, penicillin G sodium 1,000,000 IU และ streptomycin sulfate 1.0 g.) เป็นกลุ่มควบคุม

กลุ่มที่ 2 เจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris เสริม Glutathione 0.5 mM

กลุ่มที่ 3 เจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris เสริม Glutathione 1.0 mM

กลุ่มที่ 4 เจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris เสริม Glutathione 2.0 mM

กลูตาไธโอน ที่ใช้ในการทดลอง เป็น analytical grade เรียกว่า L-Glutathione reduced (cat. No. G6013; Sigma Chemical Co.)

การแช่แข็งน้ำเชื้อ นำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตร และทำการลดอุณหภูมิในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ (Digitool 5300, ZH350&UE350 with 900 HP program 3T Software, IMV, France) และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ หลังการแช่แข็งน้ำเชื้อ 24 ชม. สุ่มน้ำเชื้อแช่แข็งกลุ่มละ 3 หลอดจากแต่ละสัปดาห์มาทำให้ละลายโดยแช่ในน้ำอุณหภูมิ 37 เซลเซียส นาน 30 วินาที และทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อโดยตรวจ 1.อัตราการเคลื่อนที่ตัวอสุจิ (motility) 2.อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าตัวอสุจิ (progressive motility) 3.ความเร็วในการเคลื่อนที่ตัวอสุจิ (velocity) ได้แก่ average path velocity:VAP, straight-line:VSL, curvilinear velocity:VCL 4.ลักษณะการเคลื่อนที่(kinetic movement) ได้แก่ amplitude of lateral head:ALH, beat cross frequency:BCF, straightness:STR, linearity:LIN ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ CASA โปรแกรมIVOS motility analyzer version 12.0 (Hamilton-Thorne, Biosciences, MA., USA.) และ 5.ความสมบูรณ์ของอะโครโซมตัวอสุจิ acrosome integrity: acrosome-intact, acrosome-damage, acrosome-loss โดยย้อมตัวอสุจิด้วย formal saline แล้วตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง(phase contrast)

การศึกษาอัตราการผสมติด ทำการสุมน้ำเชื้อแช่แข็งจากทั้ง 4 กลุ่มเพื่อใช้ผสมเทียมให้กับแม่โคนมในเขตจังหวัดชลบุรี ที่มี body condition score 2.5–3 คะแนน กลุ่มละ 50 ตัว ผสมครั้งแรกหลังคลอด 60-90 วัน ในช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ 2556 และตรวจท้องด้วยการล้วงตรวจผ่านทางทวารหนักภายหลังการผสม 60 วัน

การวิเคราะห์และประมวลผล ด้วยวิธี Analysis of Variance วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (มนต์ชัย, 2544)

ผลการทดลองและวิจารณ์

คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง

การศึกษาผลของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่ไม่เสริมและเสริมกลูตาไธโอนที่ระดับความเข้มข้น 0.5, .01 และ 2.0 mM ต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง ซึ่งพบว่าอัตราการเคลื่อนที่ (motility) อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility) และความเร็วในการเคลื่อนที่(velocity) ได้แก่ Average path velocity (VAP), Straight-line velocity (VSL), Curvilinear velocity (VCL) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) ในขณะที่ลักษณะการเคลื่อนที่ ได้แก่ Amplitude of lateral head (ALH), Beat cross frequency (BCF), Straightness (STR) มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ($p>0.05$)เช่นกัน แต่ในส่วนของการ Linearity (LIN) พบว่ากลุ่มที่เสริมกลูตาไธโอน 1.0 mM มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) กับกลุ่มที่ไม่เสริมกลูตาไธโอน (ตารางที่ 1) จากข้อมูลการศึกษานี้ชี้ว่าการเสริมกลูตาไธโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ ความเร็วในการเคลื่อนที่ ซึ่งสอดคล้องกับ Gadea et al. (2007) และ Tuncer et al. (2010) ที่รายงานว่า การเสริมกลูตาไธโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการ

ละลาย แต่ขัดแย้งกับ Triwulanningsih et al. (2008) ซึ่งรายงานว่า การเสริม กลูตาไธโอน 0.5 mM ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคมีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการเสริมที่ 1.0 และ 1.5 mM หรือในการศึกษาเปรียบเทียบการเสริมกลูตาไธโอนที่ระดับ 0.5, 1, 2 และ 3 mM ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อกระป๋อง ซึ่งใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิดเดียวกับน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโค พบว่าคุณภาพน้ำเชื้อกระป๋องภายหลังการแช่แข็งที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางที่เสริมกลูตาไธโอนตั้งแต่ 2 mM สามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งได้ โดยทำให้อัตราการเคลื่อนที่ อสุจิมีชีวิต สูงกว่าไม่เสริม (Ansari et al., 2010)

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อแช่แข็งโคภายหลังการละลายที่เสริมและไม่เสริมกลูตาไธโอนในน้ำยาเจือจาง EYT

คุณภาพน้ำเชื้อ	ชนิดของน้ำยาเจือจาง			
	ไม่เสริม กลูตาไธโอน	เสริมกลูตาไธโอน		
		0.5 mM	1 mM	2 mM
Motility (%)	51.73 $\pm$ 2.32	51.20 $\pm$ 1.83	54.42 $\pm$ 2.11	54.08 $\pm$ 2.09
Progressive motility (%)	27.71 $\pm$ 1.30	26.62 $\pm$ 1.05	28.37 $\pm$ 1.35	28.02 $\pm$ 1.17
ความเร็วในการเคลื่อนที่				
Average path velocity: VAP (μ m/s)	91.85 $\pm$ 0.79	93.23 $\pm$ 0.85	93.29 $\pm$ 0.82	93.32 $\pm$ 0.77
Straight-line velocity: VSL (μ m/s)	67.58 $\pm$ 0.51	67.60 $\pm$ 0.49	67.73 $\pm$ 0.58	67.91 $\pm$ 0.51
Curvilinear velocity: VCL (μ m/s)	161.64 $\pm$ 1.75	164.08 $\pm$ 1.73	165.12 $\pm$ 1.57	164.92 $\pm$ 1.59
ลักษณะการเคลื่อนที่				
Amplitude of lateral head: ALH (μ m)	7.43 $\pm$ 0.08	7.47 $\pm$ 0.07	7.59 $\pm$ 0.06	7.56 $\pm$ 0.06
Beat cross frequency: BCF (HZ)	24.43 $\pm$ 0.32	24.31 $\pm$ 0.30	24.07 $\pm$ 0.28	24.43 $\pm$ 0.29
Straightness: STR (%)	72.50 $\pm$ 0.45	71.50 $\pm$ 0.42	71.52 $\pm$ 0.36	71.76 $\pm$ 0.40
Linearity: LIN (%)	42.96 ^b $\pm$ 0.45	42.28 ^{ab} $\pm$ 0.73	42.01 ^a $\pm$ 0.30	42.33 ^{ab} $\pm$ 0.35

^{ab} ตัวอักษรที่แตกต่างกันอยู่ในแนวนอนเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ กำหนดให้น้ำเชื้อแช่แข็งต้องมีอัตราการเคลื่อนที่ Motility (%) ไม่น้อยกว่าร้อยละ 40 หรือมีอสุจิเคลื่อนที่ไม่น้อยกว่า 8 ล้านตัว จึงจะสามารถนำไปใช้ในการผสมเทียมได้ แต่ทั้งนี้จำเป็นต้องพิจารณาควบคู่ไปกับความสมบูรณ์ของอะโครโซม ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ส่วนหัวของอสุจิ บรรจุเอ็นไซม์ hyaluronidase สำหรับทำปฏิกิริยาย่อยสลายชั้นเซลล์ Zona Pellucida ของไข่

จากการทดลองครั้งนี้ น้ำเชื้อแช่แข็งทั้ง 4 กลุ่ม มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่ามาตรฐานที่กรมปศุสัตว์ กำหนดถือว่าเป็นน้ำเชื้อแช่แข็งคุณภาพดี และเมื่อพิจารณาความสมบูรณ์อะโครโซมของอสุจิภายหลังการแช่แข็งโดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง (phase contrast microscope) พบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางที่เสริมกลูตาไธโอน 0.5 mM มีอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ (acrosome-intact) สูงกว่าไม่เสริมกลูตาไธโอน ในขณะที่ อะโครโซมที่เสียหายของอสุจิที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางที่เสริมกลูตาไธโอน 0.5 mM มีค่าต่ำกว่ากลุ่มไม่เสริมและเสริมที่ 2.0 mM (ตารางที่ 2) อาจเนื่องมาจากการทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระของกลูตาไธโอนที่ช่วยลดการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่มีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิ (Uysal and Bucak, 2007 และ Hu et al., 2010) มีการศึกษาการเสริมกลูตาไธโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อพบว่าเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมของตัวอสุจิสมบูรณ์สูงกว่าในกลุ่มที่ไม่เสริมกลูตาไธโอน โดยให้เหตุผล

สอดคล้องกันคือ กลูตาไธโอนสามารถช่วยลดการเกิดปฏิกิริยา oxidation จึงทำให้ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และอะโครโซมสูงขึ้น (Triwulaningsih et al., 2010; Ansari et al., 2010) ดังนั้นน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีค่าอะโครโซมสมบูรณ์สูงจึงน่าจะมีโอกาสในการปฏิสนธิกับไข่ได้สูงตามไปด้วย โดยต้องพิจารณาควบคู่กับการเคลื่อนที่ของอสุจิด้วยเช่นกัน

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE อะโครโซมของอสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็งโคที่เสริมและไม่เสริมกลูตาไธโอนในน้ำยาเจือจาง EYT ภายหลังการละลาย

คุณภาพน้ำเชื้อ	ชนิดของน้ำยาเจือจาง			
	ไม่เสริม กลูตาไธโอน	เสริมกลูตาไธโอน		
		0.5 mM	1 mM	2 mM
acrosome intact (%)	57.72 ^a ±3.30	67.90 ^b ±2.45	63.66 ^{ab} ±3.53	59.17 ^{ab} ±2.80
acrosome damage (%)	38.73 ^b ±2.97	28.54 ^a ±2.72	33.18 ^{ab} ±3.46	37.76 ^b ±2.99
acrosome loss (%)	3.55±0.01	3.56±0.02	3.16±0.01	3.07±0.01

^{ab} ตัวอักษรที่แตกต่างกันอยู่ในแนวนอนเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)

อัตราการผสมติด

ผลจากการนำน้ำเชื้อแช่แข็งในแต่ละกลุ่มไปใช้ในการผสมเทียมให้กับแม่โคกลุ่มละ 50 ตัว ที่มีคะแนนร่างกายที่ระดับ 2.5–3 อายุประมาณ 3–5 ปี โดยทำการผสมให้กับแม่โคหลังคลอดประมาณ 60–90 วัน และตรวจท้องด้วยการล้วงตรวจภายหลังผสมเทียม 60 วัน ผลการศึกษาพบว่า การผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งในกลุ่มที่เสริมกลูตาไธโอน 0.5 และ 1.0 mM มีอัตราการผสมติดตั้งท้องร้อยละ 36.00 ± 11.23 และ 31.49 ± 2.95 ซึ่งสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เสริมกลูตาไธโอน ซึ่งมีค่าร้อยละ 15.90 ± 4.65 ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 3) ผลจากการศึกษาดังกล่าวพบว่า การเสริมกลูตาไธโอนที่ระดับความเข้มข้น 0.5 mM มีอัตราการผสมติดสูงที่สุด โดยเป็นการเสริมที่น้อยกว่า และให้ผลไม่แตกต่างกับการเสริมที่ระดับ 1.0 mM ซึ่งเมื่อพิจารณาร่วมกับผลการทดลองในส่วนของการเคลื่อนที่และความสมบูรณ์ของอะโครโซม ให้ผลสอดคล้องกับรายงานของ Tuncer et al. (2010) ที่ว่าการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระนั้นไม่ช่วยให้น้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งมีอัตราการเคลื่อนที่สูงขึ้น แต่มีความสำคัญต่อประสิทธิภาพในการปฏิสนธิ เนื่องจากการทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระของกลูตาไธโอนในการช่วยลดการเกิดปฏิกิริยา oxidation ส่งผลให้อสุจิมีชีวิตรอดและมีความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์สูง (Gadea et al., 2007)

ตารางที่ 3 แสดงผลการผสมเทียมโคด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่เสริมกลูตาไธโอนและไม่เสริมในน้ำยาเจือจาง EYT

	ชนิดของน้ำยาเจือจาง			
	ไม่เสริม กลูตาไธโอน	เสริมกลูตาไธโอน		
		0.5 mM	1 mM	2 mM
โคที่ได้รับการผสมเทียม (ตัว)	50	49	49	44
อัตราการไม่กลับสัด (%)	43.38 ^a ±6.64	62.54 ^b ±6.71	49.33 ^a ±6.61	42.94 ^a ±7.88
อัตราผสมติดตั้งท้อง (%)	15.90 ^a ±4.65	36.00 ^b ±11.23	31.49 ^b ±2.95	25.35 ^{ab} ±7.19

^{ab} ตัวอักษรที่แตกต่างกันอยู่ในแนวนอนเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p < 0.05$)

ดังนั้นเมื่อพิจารณาตัวชี้วัดทั้งหมดจากผลการทดลอง พบว่าการเสริมกลูตาไธโอนไม่สามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่และความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิได้ แต่สามารถเพิ่มจำนวนอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์และอัตราการตั้งท้องให้สูงกว่าการไม่เสริม โดยการเสริมกลูตาไธโอนที่ระดับ 0.5 mM ให้ผลที่ดีในทุกตัวชี้วัด ดังนั้นการเสริมกลูตาไธโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อน่าจะเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโค

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษครั้งนี้ชี้ว่าการเสริมกลูตาไธโอนในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่และความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการแช่แข็ง แต่การเสริมกลูตาไธโอนที่ระดับ 0.5 mM มีผลทำให้ความสมบูรณ์ของอะโครโซมในน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง และอัตราการท้องจากการผสมเทียมสูงกว่าการไม่เสริมกลูตาไธโอน

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ผสมเทียมลำพญากลางที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการทดลอง การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง และตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ และเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพชลบุรีที่ได้ปฏิบัติงานผสมเทียมในภาคสนาม ตรวจสอบ และรวบรวมข้อมูลมาใช้ในการวิเคราะห์ผล

เอกสารอ้างอิง

- มนต์ชัย ดวงจินดา. 2544. การใช้โปรแกรม SAS เพื่อวิเคราะห์งานวิจัยทางสัตว. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- Ansari, M.S., B.A. Rakha, N. Ullah, S.M.H. Andrabi, S. Iqbaj, M. Khalid and S. Akhter. 2010. Effect of exogenous glutathione in extender on the freezability of Nili-Ravi buffalo (*Bubalus bubalis*) bull spermatozoa. Animal Science Paper and Report 28(3) :235-244.
- Bucak, M.N., A. Atessahin and A. Yuce. 2008. Effect of anti-oxidants and oxidative stress parameters on ram semen after the freeze-thawing process. Small Rumin. Res. 75: 128-134.
- Gadea, J., E. Selles, M.A. Marco, P. Coy, C. Matas, R. Romar and S. Ruiz. 2004. Decrease in glutathione content in boar sperm after cryopreservation. Effect of the addition of reduced glutathione to the freezing and thawing extenders. Theriogenology, 62: 690-701.
- Gadea, J., D. Gumbao, S. Canovas, F.A. Garcia-Vazquez, L.A. Grullon and J.C. Gardon. 2007. Supplementation of the dilution medium after thawing with reduced glutathione improves function and the in vitro fertilizing ability of frozen-thawed bull spermatozoa. International journal of andrology. 1365-2605.

- Hu, J.H., L.S. Zan, X.L. Zhao, Q.W. Li, Z.L. Jiang, Y.K. Li and X. Li. 2010. Effects of trehalose supplementation on semen quality and oxidative stress variables in frozen-thawed bovine semen. *J. Anim. Sci.* 88: 1657-1662.
- Sariozkan, S., P.B. Tuncer, M.N. Bucak and P.A. Ulutas. 2009. Influence of various Antioxidants on Microscopic-Oxidative Stress Indicators and Fertilizing Ability of Frozen-Thawed Bull Semen. *ACTA VET.* 78:463-469.
- Tuncer, P.B., M.N. Bucak, S. Buyukleblebici, S. Sariozkan, H. Kinet, D. Yeni, F. Avdatek, A.F. Fidan and M. Gundogan. 2010. The effect of cysteine and glutathione on sperm and oxidative stress parameters of post-thawed bull semen. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9(18): 2365-2370.
- Triwulaningih, E., P. Situmorang, T. Sugiarti, R.G. Sianturi and D.A. Kusumaningrum. 2008. The effect of glutathione addition in sperm diluents on the quality of bovine chilled semen. *Indonesian Journal of Agriculture* 1: 64-69.
- Uysal, O., and M.N. Bucak. 2007. Effects of Oxidized Glutathione, Bovine Serum Albumin, Cysteine and Lycopene on the Quality of Frozen-Thawed Ram Semen. *ACTA VET.BRNO* 76:383-390.

ความสัมพันธ์ระหว่างสปีของยีนเลปตินกับคุณภาพซาก

ในโคเนื้อลูกผสมแองกัส x พื้นเมือง 50%

ณชัย ศรารักษ์¹ สายใจชื่นสุข¹ กัลยา เก่งวิทย์กรรม¹

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ในการศึกษาครั้งนี้ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างสปีของยีนเลปตินกับคุณภาพซากในโคลูกผสมแองกัส x พื้นเมือง 50% จากการศึกษาความถี่ของสปีจีโนไทป์ยีนเลปตินส่วนโปรโมเตอร์ (Leptin-5UTR) ในโคลูกผสมแองกัส x พื้นเมือง 50% จำนวน 133 ตัว พบว่ามีความถี่จีโนไทป์ของยีนเลปติน CC, CT และ TT เท่ากับ 0.53, 0.44 และ 0.03 ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ตามกฎของ Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) พบว่ามีความถี่จีโนไทป์ของยีนเลปติน CC, CT และ TT เท่ากับ 0.57, 0.37 และ 0.06 ตามลำดับ ซึ่งมีความถี่อัลลีล C และ T เท่ากับ 0.75 และ 0.25 ตามลำดับ อิทธิพลสปีของยีนเลปตินกับคุณภาพซากในขณะมีชีวิตซึ่งวัดโดยใช้เครื่องอัลตราซาวด์ในโคลูกผสมแองกัส x พื้นเมือง 50% จำนวน 81 ตัว ซึ่งเป็นเพศผู้ตอน 16 ตัวและเพศเมีย 65 ตัว พบว่าโคเพศผู้และเพศเมียที่มีสปีจีโนไทป์ CC และ CT มีค่าเฉลี่ยพื้นที่หน้าตัดกล้ามเนื้อสันนอก (นิ้ว²) ไขมันแทรกเนื้อ (%) ความหนาของไขมันที่หลัง (นิ้ว) และความหนาของไขมันที่สะโพก (นิ้ว) ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาคุณภาพซากหลังจากสัตรีถูกฆ่าและบ่มซากเป็นเวลา 14 วัน ในโคเพศผู้ที่ตอน อายุเฉลี่ย 2.43 ± 0.13 ปี น้ำหนักเฉลี่ย 412.42 ± 10.94 กิโลกรัม จำนวน 11 ตัว และเพศเมียอายุเฉลี่ย 2.60 ± 0.17 ปี น้ำหนักเฉลี่ย 391.07 ± 15.12 กิโลกรัม จำนวน 15 ตัว พบว่าโคเพศผู้ที่มีสปีจีโนไทป์ CC มีค่าพื้นที่หน้าตัดสันนอก (นิ้ว²) ต่อน้ำหนัก 100 กิโลกรัม คะแนนไขมันแทรกเนื้อ (0-9) ความหนาของไขมันที่หลัง (นิ้ว) และค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (กิโลกรัม) เฉลี่ยเท่ากับ 2.33, 2.63, 0.22 และ 11.02 ตามลำดับ ส่วนโคเพศผู้ที่มีสปีจีโนไทป์ CT มีค่าเท่ากับ 2.31, 3.00, 0.24 และ 10.43 ตามลำดับ ซึ่งค่าเฉลี่ยของโคทั้งสองกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ในขณะที่โคเพศเมียที่มีสปีจีโนไทป์ CC มีค่าเฉลี่ยพื้นที่หน้าตัดสันนอก (นิ้ว²) ต่อน้ำหนัก 100 กิโลกรัม คะแนนไขมันแทรกเนื้อ (0-9) ความหนาของไขมันที่หลัง (นิ้ว) และค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (กก) เฉลี่ยเท่ากับ 3.22, 1.00, 0.52 และ 19.85 ตามลำดับ ส่วนโคเพศเมียที่มีสปีจีโนไทป์ CT มีค่าเท่ากับ 2.68, 2.00, 0.35 และ 11.61 ตามลำดับ ซึ่งโคเพศเมียที่มีสปีจีโนไทป์ CC มีพื้นที่หน้าตัดกล้ามเนื้อสันนอกมากกว่าโคที่มีสปีจีโนไทป์ CT ($p<0.05$) ในทางตรงกันข้ามโคเพศเมียที่มีสปีจีโนไทป์ CT มีคะแนนไขมันแทรกเนื้อมากกว่า ($p<0.01$) และมีค่าแรงตัดผ่านเนื้อน้อยกว่า ($p<0.05$) โคเพศเมียที่มีสปีจีโนไทป์ CC ผลจากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่า โคเพศเมียที่มีอัลลีล C จะให้คุณลักษณะพื้นที่หน้าตัดกล้ามเนื้อสันนอกมากกว่าอัลลีล T ส่วนอัลลีล T จะให้คุณลักษณะคะแนนไขมันแทรกเนื้อและความนุ่มของเนื้อมากกว่าอัลลีล C

คำสำคัญ : โคลูกผสมแองกัสxพื้นเมืองไทย50% คุณภาพซาก สปี จีโนไทป์ ยีนเลปติน

เลขทะเบียนวิจัย : 53(1)-0408-037

¹ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ต. บางกะดี อ. เมือง จ. ปทุมธานี 1200

Association of SNP in the Bovine *Leptin* gene with Carcass Quality Trait of 50% Angus x Thai Native Crossbred Beef Cattle

Nachai Sarataphan¹ Sajjai Cheunsuk¹ Kalaya. Kengvikkum¹

Abstract

The objective of this study was to determine association of a SNP in the bovine *leptin* gene with carcass quality trait of 50% Angus x Thai native crossbred beef. Total of 133 DNA samples of 50% Angus x Thai native crossbred beef were analyzed genotype frequency of a SNP of *leptin* gene at the promoter region (*leptin*-5UTR). Observed genotype frequencies of CC, CT and TT were 0.53, 0.44 and 0.03, respectively. Expected genotype frequencies from HWE calculation were 0.57, 0.37 and 0.06 respectively. Allele frequencies of C and T were 0.75 and 0.25, respectively. Eighty-one of 50% Angus x Thai native crossbred beef, included 16 castrated male and 65 female animals were evaluated carcass quality trait by real-time ultrasound measurement in live animals. The result revealed that average of ribeye area (REA), intramuscular fat (IMF), back fat (BF) thickness and rump fat (RF) thickness were not significant difference ($p>0.05$) in the male and female animals with *leptin*-5UTR genotype CC and CT. However, carcass quality trait was evaluated after experimental animals, included 11 castrated male and 15 female animals were slaughtered and 14 days of the carcass ageing. The results revealed that average of REA/100 kg (inch²), beef marbling score (BMS) standard (0-9), BF (inch) and Warner-Bratzler Shear Force (WBSF, kg) of the male animals with genotype CC were 2.33, 2.63 0.22 and 11.02, respectively, as well as 2.31, 3.00 0.24 and 10.43, respectively in the male animals with genotype CT. The average values of carcass quality traits in both groups were not difference ($p>0.05$). In contrast, the results revealed that average of REA/100 kg, BMS, BF and WBSF of the female animals with genotype CC were 3.22, 1.00, 0.52 and 19.85, respectively, as well as 2.68, 2.00 0.35 and 11.61, respectively in the female animals with genotype CT. The result indicated that the average of REA/100 kg in female animals with genotype CC was higher than genotype CT ($p<0.05$). Whereas, the average of BMS ($p<0.01$) and WBSF ($p<0.05$) in the female animals with genotype CT was higher than genotype CC. This study concluded that the female animal with allele C would have REA more than the female animal with allele T. The female animals with allele T would have more BMS and meat tenderness than allele C.

Key words: Angus x Thai native 50%, carcass traits, SNP, genotype, *leptin* gene

Registered No. : 53(1)-0408-037

¹Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Tiwanon Road., Bang Kadi, Muang, Pathumthani, 12000

Introduction

Leptin is a 16-kDa protein that is synthesized by adipose tissue and involved in regulation of feed intake, energy balance, fertility, and immune functions (Fruhbeck et al., 1998). Leptin binds to a receptor mainly localized on neuropeptide Y-neurons, which results in a reduction of feed intake and an increase of energy expenditure. Neuropeptide Y is also involved in the control of reproductive function (Magni et al., 2000). Although polymorphisms in the bovine *leptin* gene have been described (Pomp et al., 1997; Haegeman et al., 2000) and an association with fat deposition in beef cattle was reported (Fitzsimmons et al., 1998). These physiological properties support *leptin* as a strong candidate gene for evaluation of genetic polymorphisms that could affect carcass fat content in cattle.

Polymorphisms in the bovine promoter of *leptin* gene (*leptin*-5UTR) had been reported by Nkrumah et al. (2005). The study indicated that *Bos taurus* x *Bos taurus* crossbred cattle with the TT genotype at nucleotide position 528 according to GenBank accession No. AB070368 showed 48 and 39% increases highly significant in serum leptin concentration, 39 and 31% increases in backfat thickness and 13 and 9% increase significant in marbling score, compared with CC or CT genotypes, respectively. Association study of SNP in the bovine *leptin* promoter with carcass quality traits has not been reported yet in 50% Angus x Thai native crossbred beef cattle.

The objective of this study was to determine association of a SNP in the bovine *leptin* gene with carcass quality trait of 50% Angus x Thai native crossbred beef.

Materials and Methods

Animals

SNP genotype frequency analysis

Total of 133 blood samples of 50% Angus x Thai native crossbred beef from the project of high quality Thai-Black beef production under the Bureau of Biotechnology in Livestock Production (BBLP), Department of Livestock Development (DLD) were used to analyze genotype frequency of a single nucleotide polymorphism (SNP) in *leptin* gene at the promoter region (*leptin*-5UTR). In addition, 10 and 6 of frozen semen samples of Angus pure breed bulls and Thai native cattle were also used to determine frequency of the SNP in *leptin*-5UTR.

Carcass quality trait analysis in live animals by real-time ultrasound

Total of eighty-one of animals included 16 male and 65 female of 50% Angus x Thai native crossbred beef were used to determine association of a SNP in the *leptin*-5UTR gene with carcass quality trait by real-time ultrasound measurement. The experiment animals were average of 2.43 ± 0.13 and 1.64 ± 0.10 yr of age, as well as 441.06 ± 16.75 and 329.81 ± 6.70 kg of body weight in male and female animals, respectively. The male animals were reared with stems and sweet corn pulps by-product of sweet corn can. Fourteen percent protein of commercial concentrated pellet were added daily at 4 kg per animal. The female animals were reared with 14 % protein of total mix ration (TMR) including concentrated and dry Pangola hays.

Carcass quality trait analysis by carcass measurement

Total of twenty-six of animals included 11 male and 15 female of 50% Angus x Thai native crossbred beef were used to determine association of a SNP in the *leptin*-5UTR gene with carcass quality trait by carcass measurement. The male and female animals were slaughtered and analyzed at average 2.43 ± 0.13 and 2.60 ± 0.17 yr of age with 412.42 ± 10.94 and 391.07 ± 15.12 kg of live body weight.

DNA samples

Blood samples of each animal were collected from the jugular vein into 6 ml of EDTA tube. The blood samples were kept in ice box and submitted to our laboratory. Two hundred microlitre (μ l) of each blood sample was extracted genomic DNA by commercial kit (AxyPrep Blood Genomic DNA Miniprep kit : Axygen Bioscience; USA). Frozen semen samples of Angus bull were extracted DNA by the standard phenol: chloroform method (Sambrook et al. 1989). Twenty nanogram (ng) of the DNA samples were prepared for detecting the SNP in the *leptin*-5UTR gene.

SNP detection and genotyping

A SNP of bovine *leptin* gene at the promoter according to GenBank accession AB070368 (g528:C>T) was amplified by primers and specific probes. The forward primer: 5'-aggtgccca gggactca-3', the reverse primer: 5'-caacaaaggccgtgtgaca-3' and two ABI TaqMan fluorogenic probes: Probe 1, 5'-caagctctagagcctgtgt-3' and Probe 2, 5'-aagctctagagcctatgt-3' were designed according to Nkrumah et al. (2005). The probe 1 and 2 were tagged with VIC and FAM fluorescent dyes which showed green and blue color of amplification curve in a result of analysis by StepOnePlus software

(StepOnePlus, ABI, USA). A specific match of the probe sequence to the target sequence would be resulted in amplification, during which cleavage and releasing of the reporter dye occurred. Fluorescent signal for one or two dyes indicated homozygous or heterozygous for a particular allele of the SNP.

Ultrasound for carcass quality traits

Economic important traits for carcass quality including, ribeye area (REA) of *Longissimus dorsi* muscle (inch²), back fat (BF) thickness (inch), rump fat (RF) thickness (inch) and percentage of intramuscular fat (%IMF) were measured between the 12th and 13th rib interface. The ultrasound measurement was done before submitting the animals to slaughter house by real-time ultrasound (Aloka, Japan) with a 17 cm, 3.5 MHz linear array transducer. The data were analyzed by Image Analysis Software (Designer Genes Technologies, Inc., USA).

Carcass examination

In each carcass, ribeye area (REA) muscle between the 10th to 13th rib was cut and submitted to our laboratory for 14 d of ageing. One half of the REA muscle samples were cut into 250-300 g of rib eye steak for REA, back fat thickness and beef marbling score (BMS) measurement (0-9) using Australian's score card. The other half of the carcasses were deboned and cut into 3 x 2 x 5 cm of longitudinal *Longissimus dorsi* muscle for submitting to measure Warner-Bratzler Shear Force (WBSF) using the machine of Instron Model 1011 (Instron Corporation, USA) at the Chiang Mai's meat laboratory under the DLD.

Statistical analysis

Observed genotype frequencies of the SNP polymorphism were examined from the laboratory results. Expected genotype and allele frequencies of the SNP polymorphism were calculated according to Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) via online HWE calculator at <http://www.oege.org/software/hwe-mr-calc.shtml> (Rodriguez et al., 2009). The HWE formula is $p^2 + 2pq + q^2 = 1$, when p and q are allele 1 and allele2. A statistical analysis, chi square (χ^2) for differentiation among observed and expected genotype was used in this study. Test of deviation from HWE was performed using the chi-squared test with statistic on 1 degree of freedom. A different mean of two groups was tested by unpaired t-test using SE values in each group. The formula of the unpaired t-test was showed as

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{SE_x}}$$

When,

$$\bar{x}_1 = \text{Mean}_1, \bar{x}_2 = \text{Mean}_2$$

$$SE_x = \sqrt{(SE_1)^2 + (SE_2)^2}$$

$$SE_x = \frac{s}{\sqrt{n}}$$

SE_x = Standard Error of Mean

s = Standard Deviation (SD)

n = number of test

Association of the SNP in the *leptin*-5UTR gene with carcass quality trait of 50% Angus x Thai native crossbred beef was performed using correlation analysis. The correlation coefficient (r) was expressed in each group.

Results and Discussion

SNP genotype and allele frequencies

In table 1, observed frequency of the *leptin*-5UTR genotype CC, CT and TT of 50% Angus x Thai native crossbred animals were 0.53, 0.44 and 0.03, respectively. Expected genotype CC, CT and TT from HWE calculation were 0.57, 0.37 and 0.06, respectively. Then, expected allele frequency of C and T were 0.75 and 0.25, respectively. Whereas, expected allele frequency of C and T of 100% Angus were 0.60 and 0.40, respectively.

Table 1 Observed, expected genotype, allele frequency of *leptin*-5UTR gene and testing for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium in Thai native, 50% Angus and 100% Angus

		<i>Leptin</i> -5UTR								χ^2
Breed	n	Obs. freq.			Exp. freq.			Allele freq.		
		CC	CT	TT	CC	CT	TT	C	T	
Thai native	6	1.00	0	0	1.00	0	0	1.00	0	-
50% Angus	133	0.53	0.44	0.03	0.58	0.36	0.06	0.75	0.25	3.79 ^{ns}
100% Angus	10	0.40	0.40	0.20	0.36	0.48	0.16	0.60	0.40	0.28 ^{ns}

^{ns} = no significance between obs. and exp. frequencies

The result indicated that differentiation among observed and expected genotype of 50% and 100% Angus were not statistical significance ($\chi^2=3.79$ and $\chi^2=0.28$, $p>0.05$). The frequency of the allele T of *leptin*-5UTR gene of the 50% Angus x Thai native crossbred animals in this study (0.25) was nearly similar to experimental animals in a study of Nkrumah et al. (2005), which the T allele frequency (0.11-0.26) was significantly different among crossbred lines using Angus, Herford and Charolais sires. It was noted that no allele T was observed in 6 Thai native cattle. Thus, the allele T of 50% Angus x Thai native animals might be inherited from 100% Angus sires.

SNP genotypic effect on carcass trait by ultrasound measurement

In table 2, SNP genotypic effect of *leptin*-5UTR gene on carcass quality traits were measured by ultrasound in 16 male and 65 female of 50% Angus x Thai native crossbred beef.

Table 2 Genotypic effect of *leptin*-5UTR gene on carcass quality traits were measured by ultrasound in 16 male and 65 female of 50% Angus x Thai native crossbred beef.

Sex	<i>Leptin</i> -5UTR Genotype	Ultrasound measurement				
		REA (inch ²)	REA/100 kg (inch ²)	IMF %	BF (inch)	RF (inch)
M (n=16)	CC (n=10)					
	Mean	11.07 ^a	2.47 ^a	3.05 ^a	0.16 ^a	0.18 ^a
	SE	0.48	0.10	0.22	0.01	0.01
	CT (n=6)					
	Mean	10.54 ^a	2.49 ^a	3.60 ^a	0.20 ^a	0.23 ^a
	SE	0.76	0.12	0.41	0.04	0.07
F (n=65)	CC (n=33)					
	Mean	9.44 ^x	3.04 ^x	2.65 ^x	0.20 ^x	0.20 ^x
	SE	0.28	0.09	0.16	0.01	0.01
	CT (n=32)					
	Mean	10.01 ^x	2.99 ^x	2.46 ^x	0.19 ^x	0.22 ^x
	SE	0.31	0.09	0.21	0.06	0.01

^{a, x} means followed by the same letters on the same column are not significant ($p>0.05$).

The result revealed that average of REA, REA/100 kg, IMF, BF thickness and RF thickness of the male animals with CC genotype were 11.07 inch², 2.47 inch², 3.05 %, 0.16 inch and 0.18 inch, respectively. Whereas in the male animals with CT genotype were 10.54 inch², 2.49 inch², 3.60 %, 0.20 inch and 0.23 inch, respectively. In female

animals, average of REA, REA/100 kg, IMF, BF thickness and RF thickness of the female animals with CC genotype were 9.44 inch², 3.04 inch², 2.65 %, 0.20 inch and 0.20 inch, respectively. Whereas in the female animals with CT genotype were 10.01 inch², 2.99 inch², 2.46 %, 0.19 inch and 0.22 inch, respectively.

The result concluded that average of REA, IMF, BF thickness and RF thickness were not significant difference ($p>0.05$) in the male and female animals with *leptin*-5UTR genotype CC and CT, similarly to a study of Schenkel et al. (2005). However, only significant association of ultrasound rib eye area muscle with the *leptin*-5UTR gene was reported by Corva et al. (2009).

SNP genotypic effect on carcass trait by carcass measurement

In table 3, SNP genotypic effect of *leptin*-5UTR gene on carcass quality traits were measured by carcass measurement in 11 castrated male and 15 female of 50% Angus x Thai native crossbred beef. The result revealed that average of REA, REA/100 kg, BF thickness and BMS of the male animals with CC genotype were 9.84 inch², 2.33 inch², 0.22 inch and 2.63, respectively. Whereas in the male animals with CT genotype were 8.69 inch², 2.31 inch², 0.23 inch and 3.00, respectively. The average values of carcass quality traits by ultrasound measurement in both groups were not significant difference ($p>0.05$).

In female animals, average of REA, REA/100 kg, BF thickness and BMS of the female animals with CC genotype were 12.08 inch², 3.22 inch², 0.52 inch and 1.00, respectively. Whereas in the female animals with CT genotype were 10.36 inch², 2.68 inch², 0.35 inch and 2.00, respectively. The result indicated that the average of REA/100 kg in female animals with genotype CC was higher than genotype CT ($p<0.05$). Whereas, the average of BMS ($p<0.01$) in the female animals with genotype CT was higher than genotype CC.

In table 3, average of REA/100 kg from the female animals carried CC and CT genotype were 3.22 and 2.68 inch², respectively with correlation between CC and CT genotype was negative value ($r = -0.38$). The result indicated that a favorable allele C was slightly associated with REA/100 kg. On the other hand, average of BMS score from the female animals carried CC and CT genotype were 1.00 and 2.00, respectively with correlation between CC and CT genotype was positive value ($r = 0.38$). The result indicated that a favorable allele T was slightly associated with BMS. The result of this study was similar to a study of Nkrumah et al. (2005) that animals inheriting with genotype TT had highly significantly higher BMS ($p=0.01$) compared with genotype CT or CC.

Table 3 Genotypic effect of *leptin*-5UTR gene on carcass quality traits were measured by carcass measurement in 11 castrated male and 15 female of 50% Angus x Thai native crossbred beef.

Sex	<i>Leptin</i> -5UTR Genotype	Carcass measurement			
		REA (inch ²)	REA/100 kg (inch ²)	BF (inch)	BMS (0-9)
M (n=11)					
	CC (n=8)				
	Mean	9.84 ^a	2.33 ^a	0.22 ^a	2.63 ^a
	SE	0.43	0.07	0.03	0.26
	CT (n=3)				
	Mean	8.69 ^a	2.31 ^a	0.24 ^a	3.00 ^a
	SE	0.59	0.07	0.02	0
	Correlation CC and CT				
	r	-0.43	-0.03	0.23	0.27
F (n=15)					
	CC (n=2)				
	Mean	12.08 ^x	3.22 ^{x*}	0.52 ^x	1.00 ^{x**}
	SE	2.16	0.23	0.22	0.00
	CT (n=13)				
	Mean	10.36 ^x	2.68 ^{y*}	0.35 ^x	2.00 ^{y**}
	SE	0.31	0.14	0.02	0.25
	Correlation CC and CT				
	r	-0.41	-0.38	-0.49	0.38

a, x, y means followed by the same letters on the same column are not significant ($p>0.05$) and different letters on the same column are significant (* $p<0.05$, ** $p<0.01$).

In table 4, Meat tenderness defined as Warner-Bratzler Shear Force (WBSF) of REA muscles after 14 d of ageing. Average WBSF of REA muscles of the male animals carried CT and CC genotype were 10.43 and 11.02 kg, respectively ($p>0.05$). The correlation between CC and CT genotype was negative value ($r = -0.16$). Whereas, average WBSF of REA muscles of the female animals carried CT and CC genotype were 11.61 and 19.85 kg, respectively ($p<0.05$). The correlation between CC and CT genotype was also negative value ($r = -0.62$). The result indicated that a favorable allele T was moderately associated with WBSF. The animals with allele T would have more meat tenderness than allele C.

Table 4 Genotypic effect of *leptin*-5UTR gene on meat tenderness carcass were measured by Warner-Bratzler Shear Force (WBSF) in 9 male and 8 female of 50% Angus x Thai native crossbred beef.

Sex	Shear force (kg)			Correlation efficient (r)
	TT	CT	CC	
M (n=9)	0	2	7	
Mean		10.43 ^a	11.02 ^a	-0.16
SE		0.09	0.69	
F (n=8)	0	3	5	
Mean		11.61 ^{a*}	19.85 ^{b*}	-0.62
SE		2.31	2.92	

^{a, b} means followed by the same letters on the same row are not significant ($p>0.05$) and different letters on the same row are significant ($*p<0.05$).

In present study indicated that SNP genotypic effect of *leptin*-5UTR gene might be indirectly influenced on WBSF due to effect of *leptin*-5UTR genotype on BMS. In addition, the mean value of BMS was slightly associated with WBSF value, those were similarly to a study of Bertrand et al. (2001). These studies indicated that greater marbling is slightly associated with greater meat tenderness.

Conclusion

This study concluded that the SNP genotype of *leptin*-5UTR was associated with REA, BMS score and meat tenderness. The female animals carried with allele C would have REA muscle more than those animals carried with allele T. On the contrary, the female animals carried with allele T would have BMS and WBSF more than those animals carried with allele C. Due to the result, economically important traits in this study eg. REA, BMS score and meat tenderness were associated with the SNP genotype of *leptin*-5UTR which found only in the female animals. Thus, this SNP marker would be useful tool to use as a criterion for heifer of 50% Angus x Thai native crossbred selection for breeding program of Thai Black beef production.

References

- Bertrand, J. K., R. D. Green, W. O. Herring, and D. W. Moser. 2001. Genetic evaluation of beef carcass traits. *J. Anim. Sci.* 79 (Suppl E):190–200.
- Buchanan, F. C., C. J. Fitzsimmons, A. G., Van Kessel, T. D., Thue, C. Winkelman –Sim and S. M. Schmutz. 2002. Association of a missense mutation in the bovine leptin gene with carcass fat content and leptin mRNA levels. *Genet. Sel. Evol.* 34: 105-116.
- Corva, P. M., G. V. Fernandez Macedo, L. A., Soria, J. Papaleo Mazzucco, M. Motter, E.L. Vilarreal, A. Schor, C. A. Mezzadra, L. M. Melucci, and M. C. Miquel. 2009. Effect of leptin gene polymorphisms on growth, slaughter and meat quality traits of grazing Brangus steers. *Genet. Mol. Res.* 8: 105-116.
- Fitzsimmons, C. J., S. M. Schmutz, R. D. Bergen, and J. J. McKinnon. 1998. A potential association between the BM1500 microsatellite and fat deposition in beef cattle. *Mamm. Genome* 9:432–434.
- Fruhbeck, G., S. A. Jebb, and A. M. Prentice. 1998. Leptin: Physiology and Pathophysiology. *Clin. Physiol.* 18:399–419.
- Haegeman, A., A. Van Zeveren, and L. J. Peelman. 2000. New mutation in exon 2 of the bovine leptin gene. *Anim. Genet.* 31:79.
- Magni, P., M. Motta, and L. Martini. 2000. Leptin: A possible link between food intake, energy expenditure, and reproductive function. *Regul. Pept.* 92:51–56.
- Nkrumah, J.D., Li, C., Yu, J., Hansen, C., Keisler, D.H. and Moore, S.S. 2005. Polymorphisms in the bovine leptin promoter associated with serum leptin concentration, growth, feed intake, feeding behavior, and measures of carcass merit. *J. Anim. Sci.* 83: 20-28.
- Pomp, D., T. Zou, A. C. Clutter, and W. Barendse. 1997. Rapid communication: mapping of leptin to bovine chromosome 4 by linkage analysis of a PCR-based polymorphism. *J. Anim. Sci.* 75:1427.
- Schenkel, F. S., S. P. Miller, X. Yee, S. S. Moore, J. D. Nkrumah, C. Li, J. Yu, I. B. Mandell, J. W. Wilton, and J. L. Williams. 2005. Association of single nucleotide polymorphisms in the leptin gene with carcass and meat quality traits of beef cattle. *J. Anim. Sci.* 83: 2009-2020.

ผลการเสริม Equex STM ในน้ำยาเจือจางไข่แดงทริส ต่อคุณภาพน้ำเชื้อก่อนและหลังการแช่แข็ง

สุทธิวัฒน์ ขำปัญญา¹ จตุพร พงษ์เพ็ง²

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลการเสริม Equex STM ที่ระดับ 0.25 0.5 0.75 และ 1 % (v/v) ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris (EYT) ต่อคุณภาพน้ำเชื้อของโคนม วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) ใช้พ่อพันธุ์โคนมทรอปิคอลโฮลสไตน์ จำนวน 5 ตัว (บล็อก) ทำการรีดน้ำเชื้อสัปดาห์ละ 1 วัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ (ซ้ำ) ในแต่ละสัปดาห์น้ำเชื้อแต่ละพ่อที่รีดเก็บได้จะถูกแบ่งออกเป็น 5 ส่วนเท่าๆกันเพื่อเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อเสริมด้วย Equex STM ในระดับ 0.25, 0.5, 0.75 และ 1 % (v/v) ผลการศึกษพบว่า ก่อนการแช่แข็งการเสริม Equex STM 0.75% (v/v) ในน้ำยาเจือจางมีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เสริม (75.88 ± 3.15 และ 64.64 ± 4.21) แต่ไม่แตกต่างกันกับกลุ่มที่เสริม Equex STM ที่ระดับ 0.25 0.5 และ 1% (v/v) คือมีอัตราการเคลื่อนที่ 74.94 ± 2.47 73.17 ± 3.70 และ 71.47 ± 3.24 ตามลำดับ ส่วนคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งพบว่า กลุ่มที่เสริม Equex STM ในระดับ 0.5, 0.75 และ 1% (v/v) มีอัตราการเคลื่อนที่ร้อยละ 47.66 ± 1.73 , 48.13 ± 1.82 และ 47.37 ± 1.72 ตามลำดับ สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เสริมซึ่งมีอัตราการเคลื่อนที่ร้อยละ 41.10 ± 1.75 เช่นเดียวกับอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าพบว่า กลุ่มที่เสริม Equex STM ในระดับ 0.75% (v/v) มีค่า 24.76 ± 0.98 สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เสริม Equex STM (22.14 ± 0.97) แต่ไม่มีความแตกต่างกันในกลุ่มที่เสริม Equex STM คือมีค่าร้อยละ 22.68 ± 0.96 24.39 ± 0.98 และ 23.72 ± 0.92 ที่ระดับ 0.25, 0.5 และ 1% (v/v) ตามลำดับ จากการศึกษาแสดงว่าการเสริม Equex STM ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ EYT สามารถช่วยเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อโคนมภายหลังการแช่แข็ง ซึ่งการเสริม Equex STM ในระดับ 0.75 % (v/v) มีอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิที่สูงที่สุด

คำสำคัญ : Equex STM น้ำเชื้อโคนม

¹ ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ผสมเทียมลำพูนกลาง ตำบลหนองรี อำเภอลำสนธิจังหวัดลพบุรี 15190

² ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี ตำบลทับกวาง อำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรี 18260

Effect of Equex STM Supplements in Egg Yolk Tris Extenders on before and after freezing
Semen Quality of Dairy Bulls.

Suttiwat Chapanya¹ Jatuporn Pongpeng²

Abstract

This study was performed to evaluate the effect of Equex STM concentration in Egg Yolk Tris (EYT) diluter on the quality of dairy cattle semen. Semen from five Tropical-Holstein bulls was collected and froze once a week for three consecutive weeks. Each bull's semen sample was accessed for 5 treated groups: non-Equex STM treated (control) and supplement with 0.25, 0.5, 0.75 and 1% (v/v) Equex STM. The result showed that the before freezing motility of 0.75 (v/v) Equex STM supplement was higher than the control group (75.88 ± 3.15 and 64.64 ± 4.21) with no significantly difference between Equex STM treated group (74.94 ± 2.47 , 73.17 ± 3.70 and 71.47 ± 3.24 respectively). Post-thawing sperm motility of 0.5, 0.75 and 1% (v/v) Equex STM supplement at 47.66 ± 1.73 , 48.13 ± 1.82 and $47.37 \pm 1.72\%$ respectively were significantly higher than the control group ($41.10 \pm 1.75\%$) ($P < 0.05$). The progressive motility of 0.75% (v/v) Equex STM supplement at 24.76 ± 0.98 was significantly higher ($P < 0.05$) than the control group ($22.14 \pm 0.97\%$) with no significantly difference among Equex STM treated group (22.68 ± 0.96 , 24.39 ± 0.98 , 23.72 ± 0.92 respectively). The results from this study indicated that the addition of Equex STM in EYT extender improved quality which 0.75% (v/v) Equex STM added showed highest motility and progressive motility.

Keywords : Equex STM, Semen Quality, Dairy Bull

¹Lumphayaklang Livestock Semen Production Center, Lamsonthi, 15190, Thailand

²Saraburi Artificial Insemination And Biotechnology Research Center, Kangkoi, 18260, Thailand.

บทนำ

ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งมีปัจจัยหลักๆ ที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง คือ คุณภาพน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้ อัตราการลดอุณหภูมิ และน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ซึ่งก่อนจะผ่านกระบวนการแช่แข็ง น้ำเชื้อที่รีดเก็บได้ต้องเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ซึ่งประกอบด้วยสารต่างๆที่เป็นแหล่งพลังงานของตัวสุจิ และช่วยลดความเสียหายที่จะเกิดกับตัวสุจิขณะทำการแช่แข็ง นอกจากนี้ยังมีสารเสริมอื่นๆ อีกหลายกลุ่มที่เชื่อว่าช่วยทำหน้าที่เสริมประสิทธิภาพของน้ำยาเจือจางในการช่วยเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งให้สูงขึ้น

Equex STM เป็นสารลดแรงตึงผิว (emulsifying agent) มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี ใช้เติมในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อเพื่อช่วยลดการเกิดเกล็ดน้ำแข็งรอบตัวสุจิ และช่วยให้ผนังเซลล์สุจิมีความแข็งแรงในระหว่างการลดอุณหภูมิไปยังจุดเยือกแข็งในการแช่แข็งน้ำเชื้อ (Loskutoff et al., 2010) มีรายงานการเสริม Equex STM (Nova Chemical SlaesInc.Scituate,MA. USA) ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อเพื่อการแช่แข็งในหลายชนิดสัตว์พบว่า การเสริม Equex STM ในการน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนอสุจิมีชีวิตหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อแพะ (El-Alamy and Foote, 2001; Anakkul et al., 2010) น้ำเชื้อสุกร (Graham and Crabo, 1972) น้ำเชื้อสุนัข (Rota et al., 1997) น้ำเชื้อหนูทดลอง (Davit et al., 2000) โดยเติมในปริมาณต่างๆที่ไม่มากจนทำให้อสุจิเสียหายแต่เพียงพอที่จะทำให้อสุจิมีชีวิตรอดหลังการแช่แข็งมากขึ้น

ดังนั้นการศึกษาระดับการเสริม Equex STM ที่เหมาะสมในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคชนิดไขแดงทริส เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อโคชนิดภายหลังการแช่แข็ง

วิธีการทดลอง

อุปกรณ์และสัตว์ทดลอง

ทำการศึกษาในน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคกรมทรอปิคอลโฮลสไตน์ อายุประมาณ 3-4 ปี จำนวน 5 ตัว วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยกำหนดให้พ่อพันธุ์เป็นบล็อก ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อสัปดาห์ละครั้งติดต่อกัน 3 สัปดาห์ น้ำเชื้อที่ได้ต้องมีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 500 ล้านตัว/มล. มีอัตราการเคลื่อนที่ของตัวสุจิไม่น้อยกว่า 70% โดยใช้ช่องคลอดเทียม (Artificial Vagina:AV) น้ำเชื้อพ่อโคที่รีดเก็บได้นำมาแบ่งเป็น 4 ส่วนเท่าๆกัน เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อให้มีอสุจิ 80 ล้านตัว/มล. โดยเจือจางด้วย

กลุ่มที่ 1 น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris (EYT)

กลุ่มที่ 2 น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris (EYT) ที่เสริมด้วย Equex STM ในระดับ 0.25%(v/v)

กลุ่มที่ 3 น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris (EYT) ที่เสริมด้วย Equex STM ในระดับ 0.5%(v/v)

กลุ่มที่ 4 น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris (EYT) ที่เสริมด้วย Equex STM ในระดับ 0.75%(v/v)

กลุ่มที่ 5 น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Egg Yolk Tris (EYT) ที่เสริมด้วย Equex STM ในระดับ 1%(v/v)

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่อง CASA (Computer Assisted Semen Analyzer) โปรแกรม VIOS motility analyzer version 12.3 (Hamilton-Thorne, Biosciences, MA. USA) เพื่อวิเคราะห์การเคลื่อนที่ของอสุจิก่อนการแช่แข็ง

การบรรจุและการแช่แข็ง

นำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วไปทำการบรรจุน้ำเชื้อใส่หลอดน้ำเชื้อขนาด 0.25 มล. ด้วยเครื่องบรรจุน้ำเชื้อ (Type Machine MRS3, Code YC250, IMV, France) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นทำการแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (Digitcool 5300, ZH350&UE350 with 900 HP program 3T Software, IMV, France) และเก็บไว้ได้ระดับไนโตรเจนเหลวในถังเก็บน้ำเชื้อ ภายหลังแช่แข็งอย่างน้อย 24 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง

การวิเคราะห์และแปรผล วิเคราะห์ค่าตัวชี้วัดต่างๆ ด้วย Analysis of Variance และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์โคนมที่ใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ EYT ที่เสริม Equex STM พบว่า การเจือจางน้ำเชื้อด้วย EYT ที่เสริม Equex STM 0.75% (v/v) ก่อนการแช่แข็ง มีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เสริม (75.88 ± 3.15 และ 64.64 ± 4.21) แต่ไม่แตกต่างกันในกลุ่มที่เสริม Equex STM ที่ระดับ 0.25 0.5 และ 1% (v/v) คือมีอัตราการเคลื่อนที่ 74.94 ± 2.47 73.17 ± 3.70 และ 71.47 ± 3.24 ตามลำดับ ในขณะที่ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ (velocity movement) ได้แก่ VAP VSL และ VCL ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ส่วนลักษณะการเคลื่อนที่ (kinetic movement) พบว่า อสุจิในน้ำยาเจือจาง EYT ที่ไม่เสริม equex STM มีค่า BCF สูงกว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่เสริม equex STM (ตารางที่ 1) แสดงว่าการเสริม Equex STM ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อมีผลต่ออสุจิตั้งแต่สัมผัสกับน้ำยาเจือจาง เพราะจากผลการทดลองที่พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ และค่า BCF แตกต่างกันตั้งแต่เจือจางน้ำเชื้อ ซึ่งน่าจะเป็นผลจากการทำปฏิกิริยาระหว่างสารต่างๆ ที่มีอยู่ในน้ำยาเจือจางกับเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (Thomas et al., 1998)

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ย±SE ของอสุจิภายหลังการเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่เสริม equex ที่ระดับ 0.25 0.5 0.75 1% (v/v) และไม่เสริม equex

Sperm quality parameter	Before freezing semen in YET supplement				
	Control	0.25%Equex	0.50%Equex	0.75%Equex	1.0%Equex
Motility (%)	64.64 ^b ±4.21	74.94 ^{ab} ±2.47	73.17 ^{ab} ±3.70	75.88 ^a ±3.15	71.47 ^{ab} ±3.24
Progressive motility (%)	29.82±2.15	34.00±2.07	33.29±2.27	34.76±2.51	29.76±1.70
Velocity movement					
Average path velocity:VAP (mm/s)	94.40±3.01	99.85±3.00	101.42±3.85	96.67±6.12	99.81±3.66
Straight-line velocity:VSL (mm/s)	67.57±1.89	65.67±3.98	70.62±2.14	69.98±1.65	68.04±2.31
Curve linear velocity:VCL (mm/s)	163.71±5.91	174.20±5.76	175.01±8.07	163.32±8.29	174.49±7.31
Kinetic movement					
Amplitude of lateral head:ALH (mm)	7.41±0.17	7.81±0.14	7.84±0.22	7.74±0.20	7.92±0.20
Beat cross frequency : BCF (HZ)	23.63 ^a ±1.14	22.30 ^{ab} ±0.81	21.54 ^{ab} ±0.89	21.04 ^{ab} ±0.83	20.24 ^b ±0.60
Straightness:STR (%)	71.82±1.21	69.52±0.99	65.89±3.80	69.52±1.36	67.88±0.93
Linearity: LIN (%)	43.52±1.08	41.70±0.91	41.94±1.03	42.47±1.29	40.58±0.91

^{ab} ตัวอักษรที่แตกต่างกันอยู่ในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

ภายหลังการแช่แข็งพบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิในกลุ่มที่เสริม Equex STM ในระดับ 0.5, 0.75 และ 1%(v/v) มีอัตราการเคลื่อนที่ร้อยละ 47.66±1.73, 48.13±1.82 และ 47.37±1.72 ตามลำดับ สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เสริม Equex STM ซึ่งมีอัตราการเคลื่อนที่ร้อยละ 41.10±1.75 แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ระหว่างกลุ่มที่เสริม Equex STM ในระดับ 0.25, 0.5 0.75 และ 1% (v/v) ส่วนอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของกลุ่มที่เสริม Equex STM ในระดับ 0.75%(v/v) มีค่า 24.76±0.98 สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เสริม Equex STM (22.14±0.97) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เสริม EquexSTM ในระดับ 0.25, 0.5 และ 1% (v/v) คือมีค่าร้อยละ 22.68±0.96 24.39±0.98 23.72±0.92 ตามลำดับ (ตารางที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับ Arriola and Foote (1987) รายงานว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อโคโดยเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางที่เติม Equex 0.5%(v/v) มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อมีค่าสูงกว่าการเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางที่ไม่เติม Equex คือมีค่า 52% และ 32% ในทำนองเดียวกับการรายงานของ Chaveiro et al. (2006) พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิโค ภายหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อเมื่อใช้ Equex 2-7 กรัม/ลิตร เติมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคดีกว่าการไม่เติม Equex นอกจากนี้ยังมีรายงานการทดลองในสัตว์หลายชนิดที่ให้ผลใกล้เคียงกัน เช่น รายงานการทดลองเติม Equex ใน

น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนอสุจิมีชีวิตหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อแพะ (El-Alamy and foote, 2001; Anakkul et al.,2010) น้ำเชื้อสุกร (Graham and Crabo,1972) น้ำเชื้อสุนัข (Rota et al.,1997) น้ำเชื้อหนูทดลอง (Davit et al.,2000)

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE ของอสุจิภายหลังการแช่แข็งที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่เสริม Equex ที่ระดับ 0.25 0.5 0.75 1%(v/v) และไม่เสริม Equex

Sperm quality parameter	Post-thawing semen in YET supplement				
	Control	0.25%Equex	0.50%Equex	0.75%Equex	1.0%Equex
Motility (%)	41.10 ^b $\pm$ 1.75	44.68 ^{ab} $\pm$ 1.85	47.66 ^a $\pm$ 1.73	48.13 ^a $\pm$ 1.82	47.37 ^a $\pm$ 1.72
Progressive motility (%)	22.14 ^b $\pm$ 0.97	22.68 ^{ab} $\pm$ 0.96	24.39 ^{ab} $\pm$ 0.98	24.76 ^a $\pm$ 0.98	23.72 ^{ab} $\pm$ 0.92
Velocitymovement					
Average path velocity:VAP (mm/s)	84.26 ^a $\pm$ 1.42	82.97 ^{ab} $\pm$ 1.30	83.70 ^{ab} $\pm$ 1.34	80.99 ^{bc} $\pm$ 1.98	79.67 ^c $\pm$ 1.38
Straight-line velocity:VSL (mm/s)	61.90 ^a $\pm$ 0.81	60.74 ^a $\pm$ 0.98	60.73 ^a $\pm$ 0.93	60.02 ^a $\pm$ 0.84	57.99 ^b $\pm$ 0.92
Curve linear velocity:VCL (mm/s)	155.28 ^a $\pm$ 2.99	153.48 ^a $\pm$ 2.90	154.62 ^a $\pm$ 2.72	151.58 ^{ab} $\pm$ 2.94	147.28 ^b $\pm$ 3.00
Kinetic movement					
Amplitude of lateral head:ALH (mm)	7.43 $\pm$ 0.10	7.59 $\pm$ 0.12	7.59 $\pm$ 0.08	7.46 $\pm$ 0.08	7.46 $\pm$ 0.09
Beat cross frequency:BCF (HZ)	24.69 ^a $\pm$ 0.42	23.40 ^b $\pm$ 0.42	22.86 ^{bc} $\pm$ 0.40	22.34 ^{bc} $\pm$ 0.42	22.00 ^c $\pm$ 0.38
Straightness:STR (%)	73.38 ^a $\pm$ 0.60	71.25 ^b $\pm$ 0.77	71.31 ^b $\pm$ 0.80	72.29 ^{ab} $\pm$ 0.51	72.18 ^{ab} $\pm$ 0.47
Linearity: LIN (%)	41.94 $\pm$ 0.66	40.52 $\pm$ 0.60	40.88 $\pm$ 0.85	40.80 $\pm$ 0.54	40.70 $\pm$ 0.55

^{abc} ตัวอักษรที่ต่างกันอยู่ในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05)

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาแสดงว่าการเสริม Equex STM ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ EYT สามารถช่วยเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อโคผสมภายหลังการแช่แข็ง ซึ่งการเสริม Equex STM ในระดับ 0.75 (v/v) มีอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิที่สูงที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ นายสัตวแพทย์ภาณุพันธ์ พงษ์เพ็ง ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัย และเจ้าหน้าที่ของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ผสมเทียมลำพญากลางที่ให้ความช่วยเหลือในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Anakkul, N., Khunmanee, S., Diloksumpan, P., Promthep, K., Suwimonteerabutr, J. and Techakumpum, M. 2010. Cryopreservatoin of goat semen in extenders supplemented with different concentrations of Equex STM paste. Proc 9th CU. Vet. Sci. Ann. Con. P. 135.
- Arriola, j.and Foote, R.H. 1987.Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders J. dairy Sc. 70: 1664-1670.
- Chaveiro, A., Machado, L., Friters, A., Engel, B. and Woelders, H. 2006. Improve of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using to osmotic supports. Theriogenology. 65: 1875-1890.
- Davit, M., Marley, W.S. and Gramham.J.K. 2000. Fertilizing potential of mouse spermatozoa cryopreserved in a medium containing whole eggs. Cryobiology. 40: 36-45.
- El-Alamy and foote, 2001. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. Anim. Reprod. Sci. 65(3-4): 345-354.
- Graham, E.F. and Crabo B.G. 1972. Some factors influencing the freezing of boar sprtmatozoa. 7th international congress of animal reproduction and artificial insemination. Munich. Germany.p.1627-1632.
- Loskutoff, N.M., Rohr, J., Lomneth, R.B., Wood, D.G and Crichton, E. 2010. Semen extender composition and methods for manufacturing and using. United states Patent. Patent No.: US 7,674,576 B2. Date of Patent: Mar. 9, 2010. P. 14.
- Rota, A., Strom, B., Linde-Forsberg, C. and Rodriquez-Martinez, H. 1997. Effect of Equex STM paste viability of frozen-thawed dog spermatozoa during invitroincubation at 38c Theriogenology . 47: 1093-1101.
- Thomas, C.A., Garner, D.L., deJarnette, J.M. and Marshall, C.E. 1998. Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. Biol Repord. 58: 786-793.

Antimicrobial resistance pattern of *E.coli* isolated from endometritis dairy cows
Veerasak Punyapornwithaya¹, Atcharawan Takamtha², Sukolrat Boonyayatra¹,
Kwanchai Kreusokon¹

Abstract

The objective of this study was to determine the antimicrobial resistance pattern of *Escherichia coli* isolates collected from dairy cows with endometritis. Uterine discharge from 90 dairy cows, 30-90 days postpartum, with abnormal vaginal discharge was collected using transcervical guarded swab with aseptic technique. Bacteriological examination was performed under conventional aerobic conditions. Sensitivity to antibiotics was tested by the disk diffusion method. Of all 120 isolates, 28 isolates were *E.coli*. Most of *E.coli* isolates were resistant to amoxycillin (32%, n=9/28) and streptomycin (28%, n=8/28). Thirteen isolates (46%) were resistant to more than one type of antibiotics. Three isolates were only resistant to amoxycillin/clavulonic acid whereas 2 isolates were only resistant to streptomycin. The resistant pattern of the combination of amoxycillin/clavulonic acid, amoxycillin, ampicillin, oxytetracyclin and streptomycin were found in 2 isolates. In conclusion, the study showed a moderate occurrence of multiple antimicrobial resistance of *E.coli* and some antimicrobial resistance patterns. This finding may reflect to the prudent use of antimicrobial agent in dairy farm.

Keywords: Antimicrobial resistance, *E. coli*, endometritis, dairy cow

¹Department of Food Animal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University

²Satellite Animal Hospital, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University

Introduction

Multiple antimicrobial resistances in bacteria populations are the world wide concern. The use of antimicrobial drugs in food animal has been shown to contribute to the increased prevalence of antibiotic-resistance bacteria of human significance (Mathew *et al*, 2007). Improper use of antibiotic in dairy farm may associate with the increasing of multidrug-resistance bacteria. Although many studies reported the antimicrobial resistance pattern of bacteria isolated from mastitis cows, few data are available from endometritis cows. As the using of antibiotic agents for intrauterine therapy is normally practiced for endometritis cows (Azawi, 2008), it is important to determine the antimicrobial resistance status of bacteria in uterus. One of the most important bacteria types associated with endometritis is *E.coli*. Importantly, the microorganism is concerned for public health as *E. coli* may be transmitted to farm workers as a direct contact with the vaginal discharge, manure mixed with the discharge or other environmental sources such as cow's bedding and floor (Sahoo *et al.*, 2012).

Determination of resistance pattern of bacteria is important for ongoing surveillance and for veterinarian in choosing effective antimicrobial therapy. Therefore, the aim of this study was to determine the antimicrobial resistance pattern of *E.coli* isolated from endometritis cow.

Material and Methods

Definition of endometritis

Cows having physical abnormal discharge at cervix and vagina were defined as endometritis cows based on the criteria described previously (Sheldon and Dobson, 2004; Sheldon *et al.*, 2006).

Animals

Cross bred Holstein-Frisian cows, lactation 1-6, with 30-90 days postpartum with abnormal vaginal discharge were enrolled for the study. The presence or absence of abnormal vaginal discharge was checked using a stainless steel probe with a semi-spherical rubber cup attached at one end (Metricheck™ device) by insertion of the device transvaginal and collection the mucous from vaginal tract and external os cervix. Additionally, all cows were from small holder dairy farms in Mea on district, Chiang Mai.

Collection of uterine discharge

Uterine endometrium discharged will be sampled from endometritis cows. The collection of uterine discharge was operated using technique described previously (Virakul *et al.*, 1995). Briefly, a transcervical guarded swab was used for swabbing cervical

discharge. The swab comprised a 0.3 cm diameter cotton wool tip sheathed in a long sterilized stainless steel 45 cm long, 0.6 cm diameter with 1.5x0.5 cm hole at 0.5 cm from the blocked tip and wrapped with plastic breeding sheath with the hole at the same position. To prevent contamination, this guard tube was covered with sanitary sheath before inserted through the vagina. The guard tube was pushed through the sanitary sheath when it reached external os cervix. Then the guard tube was passed through the cervical canal into the lumen of the uterus guided by palpation per rectum. In the uterine lumen, the swab was extruded from the guarded tube to swab uterine discharge. Withdrew the swab into the guard tube and removed from the uterus. The swab was transferred to the transport media and cultured within 3-4 hours after collection.

Microbiological examination

Bacteriological samples were cultured for aerobic bacteria on sheep blood agar and enriched in brain heart infusion (BHI) medium for 24 h at 37°C. The broths were streaked onto sheep blood agar plates and cultured for a second time 24 h at 37°C. Bacteria were identified on the basis of the characteristics of the colony, gram stain, morphology, hemolysis, biochemical profile with triple sugar iron (TSI) agar and motility-indole-lysine (MIL) medium, and other standard tests such as citrate, catalase, urease and growth on MacConkey agar. Plates containing 1 or more colony-forming units were regarded as positive bacterial growth. Plates with more than 3 species or with mixed culture of moderate degree or higher were considered contaminated (Werner *et al.*, 2012). The contamination plates were excluded for further test.

Antimicrobial sensitivity test

The antimicrobial sensitivity was tested by the disc diffusion method and performed according to Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines in Mueller-Hinton agar (8). The following antibacterial agents (Oxoid) were used: amoxicillin with clavulanic acid (AMC; 30 µg), amoxicillin (AML; 10 µg), ampicillin (AMP; 10 µg), cephalexin (CL; 30 µg), cefazolin (KZ; 30 µg), gentamicin (CN; 10 µg), oxytetracycline (OT; 30 µg), streptomycin (S; 10 µg) and sulfamethoxazole-trimethoprim (SXT; 25 µg). Interpretation of the test results were sensitivity (S), intermediate sensitive (I) and resistant (R) based on CLSI criteria.

Results

Of all 120 isolates, 28 isolates were characterized as *E. coli*. Twenty out of 28 isolates (71%) were resistant to at least one type of antimicrobial agent tested. Most of *E. coli* isolates were most resistant to amoxicillin and streptomycin (Figure 1). Antimicrobial resistance pattern for *E. coli* was shown in Table 1. Thirteen isolates (46%) were resistant to

more than one type of antimicrobial agents. Three isolates were only resistant to amoxycillin/clavulonic acid whereas 2 isolates were only resistant to streptomycin. Interestingly, 3 isolates were resistant up to 5 antimicrobial tested.

Table 1. Antimicrobial resistant pattern of *E.coli* isolates from metritis dairy cows

Resistant phenotype observed	Frequency
AMC	3
CL	1
S	2
CL, KZ	1
CN, S	1
OT, S	1
AMC, AML	2
AMC, AML, AMP	1
AML, AMP, OT	1
AML, AMP, S	1
KZ, OT, SXT	1
AML, AMP, OT, S	1
AML, AMP, OT, SXT	1
AMC, AML, AMP, OT, S	2
AML, AMP, OT, S, SXT	1

AMC=amoxicillin with clavulanic acid, AML= amoxicillin, AMP= ampicillin, CL = cephalexin, CN= gentamicin, KZ =cefazolin, OT=oxytetracycline, S = streptomycin and SXT = sulfamethoxazole-trimethoprim

Discussion

The main objective of this study was to determine the antimicrobial resistant pattern of *E. coli* which is considered to be an important pathogen related with public health. This microorganism may be transmitted from dairy cows to farm workers (Sahoo *et al.*, 2012). In addition, the pathogen may be contaminated in raw milk and transmitted to human by raw milk consumption.

Nearly fifty percent of *E. coli* isolates were resistant to more than 1 type of antimicrobial agents suggesting that the status of antimicrobial resistances in dairy production requires more attention.

Generally, *E.coli* is considered as a major pathogen causing endometritis in dairy cows (Sheldon and Dobson, 2004). Previous report in Thailand indicated that most bacteria isolated from endometrium of metritis cows were most resistant to oxytetracycline (Virakul *et al.*, 1995) which is an antibiotic commonly used for treating postpartum metritis. The finding from this study was consistent with previous report as *E. coli* isolates were highly resistant to oxytetracycline (Figure 1). Furthermore, our results showed that high proportion of *E. coli* isolates (n=7; Table 1) were resistant to the combination of amoxicillin/ampicillin and other antimicrobial agents. Unlike oxyteratcyclyne, amoxicillin and ampicillin is not commonly used for intrauterine therapy. However, these antimicrobial agents have been commonly used in dairy farms for treatment of other diseases such as mastitis, respiratory disease and reproductive diseases. It is possible that *E. coli* isolates causing metritis were from *E. coli* strains resistant to amoxicillin/ampicillin contaminated in environmental sources and transmitted to uterus.

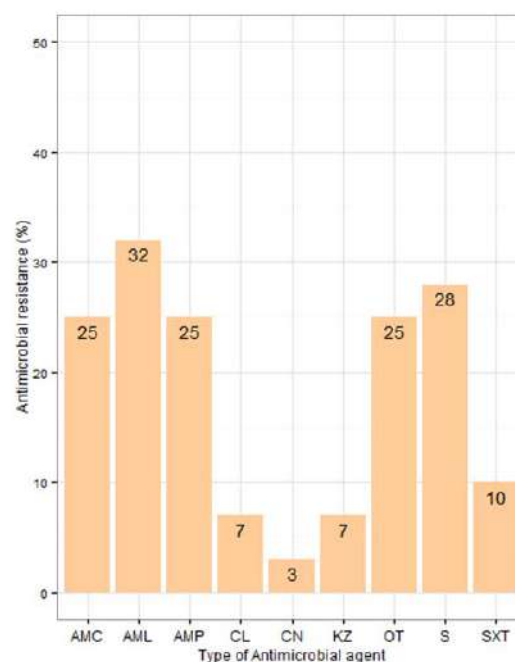


Figure 1. Antimicrobial resistance (%) of *E. coli* isolates for 9 antibiotics tested. AMC=amoxicillin with clavulanic acid, AML= amoxicillin, AMP= ampicillin, CL = cephalixin, CN= gentamicin, KZ =cefazolin, OT=oxytetracycline, S = streptomycin and SXT = sulfamethoxazole-trimethoprim.

It was surprisingly that some isolates were resistant to amoxicillin with clavulanic acid whereas this antimicrobial agent is not commonly used in the study area. A further investigation should be implemented to understand more about this finding. Most of *E. coli* isolates were susceptible to gentamicin and sulfa-trimethoprim. This finding was consistent with an investigation from our veterinarians from veterinary teaching hospital, faculty of veterinary medicine, Chiang Mai University located in the study area which indicated that these antimicrobial agents are not regularly used in the area.

A high proportion of *E. coli* isolates were resistant to more than 3 types of antimicrobial agents which may reflect to the prudent use of various types of antimicrobial agents in dairy farms. In the current study, we found 15 antimicrobial resistant patterns in *E. coli* isolates (Table 1). The most frequency pattern for multiple antimicrobial resistances was the combination of amoxicillin/clavulonic acid, amoxicillin, ampicillin, oxytetracyclin and streptomycin which was found in 2 *E. coli* isolates from dairy cows from different farm. However, the sample size was limited, thus we could not conclude that such pattern was a major pattern. Another benefit of this study is that veterinarian has some information for choosing the effective antimicrobial agent for treatment of metritis cows caused by *E. coli*.

Due to the difference in production system, the use of antimicrobial for each area or each country may differ. In the study area, antimicrobial agents are often used with little or no veterinary consultation. Ideally, decision making for choosing type of antimicrobials, dosage and duration of treatment should be done by veterinarians. However, dairy farmers, livestock technicians and artificial insemination persons are able to purchase antibiotic by themselves. Due to the limitation in education and training, the prudent use of antimicrobial agent is likely to be occurred. Because of the more antibiotics used improperly, the more chances for bacteria to resist to the antimicrobial agents, strategies aimed at decreasing unintended interaction between antibiotic and bacterial pathogens and treating infection with the effective antibiotics should be focused. Antimicrobial uses surveillance should be done periodically to monitor the resistance rate. Education and extension supporting the optimized use of antibiotic by dairy farmers is essential. Finally, the policy to control the usage of antibiotic in dairy farms should be implemented.

In conclusion, this study provided updated information for antimicrobial resistance profile of *E. coli* isolated from endometritis dairy cows. The percentage of multidrug resistance bacteria was remarkable. Most of *E. coli* isolates were resistant to amoxycillin and streptomycin. The ongoing surveillance system on antimicrobial uses in dairy farms should be employed.

References

- Azawi, O.I. 2008. Postpartum uterine infection in cattle. *Anim Reprod Sci*, 105: 187-208.
- Mathew, A.G., R. Cissell, and S. Liamthong. 2007. Antibiotic resistance in bacteria associated with food animals: a United States perspective of livestock production. *Foodborne Pathog Dis* 4(2):115-33
- Sahoo, K.C., A.J. Tamhankar, S. Sahoo, P.S. Sahu, S.R. Klintz, and C.S. Lundborg. 2012. Geographical variation in antibiotic-resistant *Escherichia coli* isolates from stool, cow-dung and drinking water. *Int J Environ Res Health*. 9(3): 746–759.
- Sheldon, I.M. and H. Dobson. .2004. Postpartum uterine health in cattle. *Anim Reprod Sci* 82-83:295-306
- Sheldon, I.M., G.S. Lewis, S.J. LeBlanc, and R.O. Gilbert. 2006. Defining postpartum uterine disease in cattle. *Theriogenology* 65:1516-1530
- Virakul, P., S. Ngarmkum, K. Poonsuk, and C. Suwimontheerakul. 1995. Incidence of metritis in dairy cows at 30 days postpartum: bacterial etiology and sensitivity test. Full research report. Faculty of veterinary medicine, Chulalongkorn University.
- Werner, A, V. Suthar, J. Plontzke, and W. Heuweiser. 2012. Relationship between bacteriological findings in the second and fourth week postpartum and uterine infection in dairy cows considering bacteriological results. *J Dairy Sci*, 95(12):7105-7114.

การใช้ Equex STM ในน้ำยาสำเร็จรูปเจือจางน้ำเชื้อไขแดงเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อแพะ

วิศิษฐ์ ทองเที่ยง¹ ธวัชชัย โพธิ์คำ² จตุพร พงษ์เพ็ง²

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลการเสริม Equex STM ที่ระดับ 0.5 และ 1 % (v/v) ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อผสมสำเร็จรูป (one step) ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งแพะ วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยใช้แพะเพศผู้อายุ 2-3 ปี จำนวน 2 ตัว ที่น้ำเชื้อสดมีการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่ต่ำกว่า 70% ความผิดปกติของอสุจิส่วนหัวไม่เกิน 12% และส่วนหางไม่เกิน 25% รีดเก็บน้ำเชื้อด้วยวิธี artificial vaginal method สัปดาห์ละครั้ง ติดต่อกัน 6 สัปดาห์ ในแต่ละสัปดาห์น้ำเชื้อแต่ละพ่อที่รีดเก็บได้จะแบ่งออกเป็น 3 ส่วนเท่าๆ กันเพื่อเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อไม่เสริม Equex STM และเสริมที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1 % (v/v) ผลการศึกษาพบว่าคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งกลุ่มที่เสริม Equex STM ในระดับ 0.5 และ 1% (v/v) มีอัตราการเคลื่อนที่ร้อยละ 78.71 ± 1.66 และ 78.33 ± 2.19 ตามลำดับซึ่งสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เสริมซึ่งมีอัตราการเคลื่อนที่ร้อยละ 65.72 ± 2.79 ($p < 0.05$) ในทำนองเดียวกับอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าพบว่ากลุ่มที่เสริม Equex STM ในระดับ 0.5% และ 1% (v/v) มีค่า 47.41 ± 1.59 และ 46.11 ± 2.07 สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เสริม Equex STM (43.67 ± 2.14) แต่การเสริม Equex STM ที่ระดับต่างกันไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ($p > 0.05$) จากผลการศึกษารูปร่างการเสริม Equex STM ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อผสมสำเร็จรูป (one step) สามารถช่วยเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อแพะภายหลังการแช่แข็ง ซึ่งการเสริม ในระดับ 0.5 % (v/v) มีอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิสูงที่สุด

คำสำคัญ : น้ำเชื้อแพะ น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อผสมสำเร็จรูป Equex STM

¹ ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสงขลา ตำบลหาดใหญ่ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

² ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี ตำบลทับกวาง อำเภอแก่งคอย จังหวัดสระบุรี 18260

Freezing goat Semen with Equex STM in Egg Yolk one step Extender

Visid Thongthiang¹ Twatchai Pocum² Jatuporn Pongpeng²

Abstract

This study was performed to evaluate the effect of Equex STM concentration in Egg Yolk one step extender on the quality of goat semen. Semen from two bucks were collected and froze once a week for six consecutive weeks. Each sample were accessed weekly for 3 treatment groups : non-Equex STM treated (control) and supplement with 0.5 and 1% (v/v) Equex STM. The result on post-thawing sperm motility of 0.5 and 1% (v/v) Equex STM dilutor at 78.71 ± 1.66 % , 78.33 ± 2.19 % were significantly higher than the control group at 65.72 ± 2.79 % ($P < 0.05$). The progressive motility of 0.5% and 1% (v/v) Equex STM diluter were 47.41 ± 1.59 % , 46.11 ± 2.07 % were significantly higher than the control group at 43.67 ± 2.14 % ($P < 0.05$) with no significantly difference among the treated group. The results from this study indicated that the addition of Equex STM in one step extender improved goat semen quality which 0.5% (v/v) Equex STM supplement showed highest motility and progressive motility.

Keywords : Goat semen, One step extender, Equex STM,

¹ Songkhla Artificial Insemination And Biotechnology Research Center, Hadyai, 90110, Thailand

² Saraburi Artificial Insemination And Biotechnology Research Center, Kangkoi, 18260, Thailand.

บทนำ

การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งแพะในห้องปฏิบัติการขนาดเล็กที่ไม่สะดวกในการเตรียมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อเอง การใช้ยาเจือจางสำเร็จรูปจึงเป็นทางเลือกที่ดีในการช่วยลดขั้นตอนการทำงาน ซึ่งน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อจะมีองค์ประกอบหลักคล้ายกัน คือต้องมีสารกลุ่มที่ให้พลังงาน และสารที่ทำหน้าที่ในการช่วยป้องกันความเสียหายจากการลดอุณหภูมิในกระบวนการแช่แข็ง ที่นิยมใช้กันโดยทั่วไปมีทั้งแบบใช้งานได้ทันที เช่น Optidyl® (Bio-vet, France) และ Bioexcel® (IMV, France) และแบบกึ่งสำเร็จรูปคือต้องเติมไข่แดงสดก่อนใช้ เช่น One step (Continental Plactic Corporation) สามารถเลือกใช้ตามความเหมาะสมของแต่ละห้องปฏิบัติการ การเลือกใช้น้ำยาเจือจางแบบกึ่งสำเร็จรูปโดยการเติมไข่แดงสดก่อนใช้งาน น่าจะเป็นน้ำยาเจือจางที่ได้ประโยชน์อย่างเต็มประสิทธิภาพจากองค์ประกอบของไข่แดงที่เติมเข้าไป ในการทำหน้าที่ช่วยป้องกันความเสียหายที่เกิดจากการลดอุณหภูมิก่อนแช่แข็ง แต่พบว่าการละลายเป็นเนื้อเดียวกันของน้ำยาเจือจางแบบ one step กับไข่แดงไม่ดีเท่าที่ควร จึงมีการเติมสารที่ทำหน้าที่เป็น emulsifier ให้สารละลายรวมเป็นเนื้อเดียวกันได้ดียิ่งขึ้น เช่น สารในกลุ่ม sodium dodecyl sulphate (SDS) จะสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำยาเจือจาง

Equex STM เป็นสารลดแรงตึงผิว (surfactant) ชนิดหนึ่งที่มีสารออกฤทธิ์เป็น SDS มีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี นำมาเติมในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อเพื่อช่วยลดขนาดของไขมันที่มีอยู่ในไข่แดงให้เล็กลงและละลายเป็นเนื้อเดียวกับองค์ประกอบอื่นในน้ำยาเจือจาง ช่วยลดขนาดและปริมาณของผลึกของของเหลวทั้งภายนอกและภายในเซลล์รอบตัวอสุจิ ในระหว่างการลดอุณหภูมิไปยังจุดเยือกแข็งในการแช่แข็งน้ำเชื้อแพะ ส่งผลให้อสุจิทนต่อการลดอุณหภูมิได้ดี และมีความเสียหายจากการแช่แข็งลดลง (Loskutoff et al., 2010) มีรายงานการเสริม Equex STM (Nova Chemical SlaesInc.Scituate, MA. USA) ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อในหลายชนิดสัตว์ พบว่าการเสริม Equex STM ระดับความเข้มข้น 1% ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสามารถช่วยเพิ่มอัตราการรอดของอสุจิแพะในช่วง 2 ชั่วโมงภายหลังการละลาย (Anakkul et al., 2010) และทำให้คุณภาพน้ำเชื้อในสัตว์ชนิดอื่นดีขึ้นเมื่อเติมในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ เช่น สุกร ที่ระดับความเข้มข้น 1.5% (Graham and Crabo, 1972) น้ำเชื้อสุนัข 0.5% (Rota et al., 1997) น้ำเชื้อโค 0.375 % (Underwood et al., 2009) และน้ำเชื้อหนูทดลอง 0.5% (Davit et al., 2000)

ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการเสริม Equex STM ความเข้มข้นที่ 0.5% และ 1% ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อผสมสำเร็จรูป (one step) ที่เติมไข่แดงสด 20% ที่มีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแพะภายหลังการแช่แข็ง

วิธีการทดลอง

อุปกรณ์และสัตว์ทดลอง

ทำการศึกษาในน้ำเชื้อพ่อพันธุ์แพะ อายุประมาณ 2-3 ปี จำนวน 2 ตัว วางแผนการวิจัยแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยกำหนดให้พ่อพันธุ์เป็นบล็อก พ่อแพะที่ใช้น้ำเชื้อสดที่มี

อัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไม่ต่ำกว่า 70% ความผิดปกติของตัวอสุจิส่วนหัวไม่เกิน 12% และส่วนหางไม่เกิน 25% ทำการเก็บน้ำเชื้อด้วยวิธี artificial vaginal method สัปดาห์ละครั้ง ติดต่อกัน 6 สัปดาห์

น้ำเชื้อที่รีดเก็บได้จากพ่อพันธุ์แพะแต่ละตัวนำมาปั่นล้าง seminal plasma โดยการเติมสารละลาย Tris ที่ไม่มี glycerol ที่แรงดันออสโมติก 300 mOsm จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็ว 1,500 รอบ/นาที นาน 10 นาที แยกเอาสารละลายส่วนบนทิ้งไป นำเอาเฉพาะอสุจิที่จับตัวกันอยู่ส่วนล่างมาแบ่งเป็น 3 ส่วนเท่าๆกันโดยเจือจางด้วย

ส่วนที่ 1 น้ำยาผสมสำเร็จรูป (one step) ที่ไม่เสริม Equex

ส่วนที่ 2 น้ำยาผสมสำเร็จรูป (one step) ที่เสริม Equex ระดับ 0.5 % (v/v)

ส่วนที่ 3 น้ำยาผสมสำเร็จรูป (one step) ที่เสริม Equex ระดับ 1.0% (v/v)

กำหนดความเข้มข้นภายหลังการเจือจางให้มีอสุจิ 150 ล้านตัว/มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ทำการบรรจุน้ำเชื้อในหลอดน้ำเชื้อขนาด 0.25 มล. (French ministraw) และนำไปแช่แข็งด้วยการอังเหนือไอไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -120 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาไว้ได้ระดับไนโตรเจนเหลว

ตรวจคุณภาพภายหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อ 24 ชม. ด้วยการส่นน้ำเชื้อแช่แข็ง 3 หลอดจากแต่ละการทดลองมาทำให้ละลายโดยแช่ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที จากนั้นทำการตรวจค่าการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ความเร็วในการเคลื่อนที่ (velocity movement) และลักษณะในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (kinematic movement) ด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ CASA โปรแกรม IVOS motility analyzer version 12.0 (Hamilton-Thorne, Biosciences, MA., USA.)

การวิเคราะห์และแปลผล

วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี Analysis of Variance วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test)

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งแพะที่ใช้ น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อผสมสำเร็จรูป (one step) ที่ไม่เสริมและเสริม Equex STM ที่ระดับ 0.5 และ 1% (v/v) พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิในกลุ่มที่เสริม Equex STM ในระดับ 0.5 และ 1% (v/v) มีอัตราการเคลื่อนที่ร้อยละ 78.71 ± 1.66 และ 78.33 ± 2.19 ตามลำดับสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เสริม Equex STM ซึ่งมีอัตราการเคลื่อนที่ร้อยละ 65.72 ± 2.79 แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ระหว่างกลุ่มที่เสริม Equex STM ส่วนอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของกลุ่มที่เสริม Equex STM ในระดับ 0.5% (v/v) มีค่า 47.41 ± 1.59 สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เสริม Equex STM (43.67 ± 2.14) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่เสริม Equex STM ในระดับ 0.5 และ 1% (v/v) คือมีค่าร้อยละ 47.41 ± 1.59 และ 46.11 ± 2.07 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งผลการศึกษาเป็นไปในทำนองเดียวกับ Anakkul et al. (2010) รายงานว่าการเสริม Equex STM ระดับความเข้มข้น 1% ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแพะมีผลทำให้อัตราการรอด

ของอสุจิได้สูงกว่าน้ำยาเจือจางที่ไม่เสริม Equex ในช่วง 2 ชั่วโมงภายหลังการละลาย และพบรายงานการแช่แข็งน้ำเชื้อโคโดยเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางที่เติม Equex 0.5% (v/v) มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อมีค่าสูงกว่าการเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางที่ไม่เติม Equex คือมีค่าร้อยละ 52 และ 32 ตามลำดับ (Arriola and Foote, 1987) ในทำนองเดียวกับรายงานของ Chaveiro et al. (2006) พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิโคหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อเมื่อใช้ Equex 2-7 กรัม/ลิตร เติมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคให้ผลดีกว่าการไม่เติม Equex นอกจากนี้ยังมีรายงานการทดลองในสัตว์หลายชนิดที่ให้ผลใกล้เคียงกัน เช่น รายงานการทดลองเติม Equex ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนอสุจิมีชีวิตหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อแพะ (El-Alamy and foote, 2001; Anakkul et al.,2010) น้ำเชื้อสุกร (Graham and Crabo,1972) น้ำเชื้อสุนัข (Rota et al.,1997) น้ำเชื้อหนูทดลอง (Davit et al.,2000)

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SE ของอสุจิภายหลังการแช่แข็งที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่เสริม Equex ที่ระดับ 0.5 1%(v/v) และไม่เสริม Equex

Sperm quality parameter	Post-thawing semen in one step supplement		
	Control	0.5%Equex	1%Equex
Motility (%)	65.72 ^a $\pm$ 2.79	78.71 ^b $\pm$ 1.66	78.33 ^b $\pm$ 2.19
Progressivemotility (%)	43.67 $\pm$ 2.14	47.41 $\pm$ 1.59	46.11 $\pm$ 2.07
<u>Velocitymovement</u>			
Averagepathvelocity:VAP (μ m/s)	105.66 ^a $\pm$ 2.20	115.14 ^b $\pm$ 3.06	110.78 ^{ab} $\pm$ 2.89
Straight-linevelocity:VSL (μ m/s)	82.29 $\pm$ 1.66	85.12 $\pm$ 2.02	81.19 $\pm$ 2.06
Curvilinearvelocity:VCL (μ m/s)	180.08 ^a $\pm$ 5.73	204.25 ^b $\pm$ 6.77	198.01 ^{ab} $\pm$ 6.71
<u>Kineticmovement</u>			
Amplitudeoflateralhead:ALH (μ m)	7.02 ^a $\pm$ 0.35	8.06 ^b $\pm$ 0.26	8.00 ^b $\pm$ 0.30
Beatcross frequency:BCF (HZ)	29.02 ^b $\pm$ 0.56	26.79 ^a $\pm$ 0.62	26.44 ^a $\pm$ 0.72
Straightness: STR (%)	77.50 ^b $\pm$ 0.64	73.29 ^a $\pm$ 0.87	72.78 ^a $\pm$ 1.06
Linearity: LIN (%)	47.06 ^b $\pm$ 0.92	43.18 ^a $\pm$ 1.08	42.67 ^a $\pm$ 1.27
<u>Size</u>			
Elongation (μ m)	46.38 $\pm$ 0.52	46.24 $\pm$ 0.35	46.61 $\pm$ 0.58
Area (μ m ²)	5.78 ^a $\pm$ 0.06	6.11 ^b $\pm$ 0.08	6.17 ^b $\pm$ 0.10

^{ab} ตัวอักษรที่แตกต่างกันอยู่ในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05)

จากผลการศึกษาแสดงว่า Equex มีส่วนช่วยในการลดความเสียหายจากการแช่แข็งได้ โดยสันนิฐานว่าเกิดจากการทำหน้าที่ช่วยลดขนาดของไขมันที่มีอยู่ในไข่แดงให้เล็กลงและละลายเป็นเนื้อเดียวกับองค์ประกอบอื่นในน้ำยาเจือจางได้ดีขึ้น เมื่ออุณหภูมิลดลงเลยจุดเยือกแข็ง ทำให้การเกิดผลึกจากการที่ของเหลวกลายเป็นของแข็งมีขนาดและปริมาณลดลง จำนวนอสุจิที่ได้รับความเสียหายที่เกิดจากผลึกน้ำแข็งก็น่าจะลดลงด้วย จึงทำให้อัตราการเคลื่อนที่ และความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิสูงกว่าการใช้น้ำยาเจือจางที่ไม่เสริม Equex (Arriola and Foote, 1987)

คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งที่เพิ่มขึ้น น่าจะส่งผลต่อโอกาสการในการผสมติดเพิ่มขึ้นตามไปด้วย เนื่องจาก อัตราการเคลื่อนที่ และความเร็วในการเคลื่อนที่มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับอัตราการผสมติด (Rodriguez-Martinez, 2003)

สรุปผลการทดลอง

ผลจากการศึกษาสรุปว่าการเสริม Equex STM ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อผสมสำเร็จรูป (one step) สามารถช่วยเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อแพะภายหลังการแช่แข็ง ซึ่งการเสริม Equex STM ในระดับ 0.5 (v/v) มีอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิที่สูงที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณนายสัตวแพทย์จักรภพ จันทร์สะอาด ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัย และเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสงขลา และศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่วงพันธุ์ผสมเทียมลำพูนกลางที่ให้ความช่วยเหลือในการดำเนินการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Anakkul, N., Khunmanee, S., Diloksumpan, P., Promthep, K., Suwimonteerabutr, J. and M. Techakumphu. 2010. Cryopreservation of goat semen in extenders supplemented with different concentrations of Equex STM paste. Proc. 9th CU. Vet. Sci. Ann. Con. p. 135.
- Arriola, J. and R.H. Foote. 1987. Glycerolation and thawing effects on bull spermatozoa frozen in detergent-treated egg yolk and whole egg extenders. J. Dairy Sc. 70: 1664-1670.
- Chaveiro, A., L. Machado, A. Frijters, B. Engel, and H. Woelders. 2006. Improvement of parameters of freezing medium and freezing protocol for bull sperm using two osmotic supports. Theriogenology. 65: 1875-1890.
- Devit, M., W.S. Marley. and J.K. Graham. 2000. Fertilizing potential of mouse spermatozoa cryopreserved in a medium containing whole eggs. Cryobiology. 40: 36-45.
- El-Alamy and R.H. Foote. 2001. Freezability of spermatozoa from Finn and Dorset rams in multiple semen extenders. Anim. Reprod.Sci. 65(3-4): 245-254.
- Graham, E.F. and B.G. Crabo. 1972. Some factors influencing the freezing of boar spermatozoa. 7th International congress of animal reproduction and artificial insemination.Munich, Germany. p. 1627-1632.
- Loskutoff, N.M., J. Rohr, R.B. Lomneth, D.G. Wood and E. Crichton. 2010. Semen extender composition and methods for manufacturing and using. United States Patent. Patent No.: US 7,674,576 B2. Date of Patent: Mar. 9, 2010. P. 14.
- Rodriguez-Martinez, H. 2003. Laboratory semen assessment and prediction of fertility: Still Utopia? Reprod. Dom. Anim. 38: 312-318.

Rota, A., B. Strom, C Linde-Forsberg and H. Rodriguez-Martinez. 1997. Effects of Equex STM paste in viability of frozen-thawed dog spermatozoa during in vitro incubation at 38°C. *Theriogenology*. 47: 1093-1101.

