

[illegible]

รางวัลผลงานประดิษฐ์คิดค้น
ระดับดีเด่น
สาขาเกษตรศาสตร์และชีววิทยา
โคนมพันธุ์ทรอปิคอล โฮลสไตน์



Journal of Biotechnology in Animal Production



ISSN: 1905-6877

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์
กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
Bureau of Biotechnology in Animal Production
Department of Livestock Development

สาส์นจากบรรณาธิการบริหาร

ในนามกองบรรณาธิการวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ต้องขอแสดงความชื่นชมและยินดีกับสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ที่ได้รับรางวัลสภาวิจัยแห่งชาติ : รางวัลผลงานประดิษฐ์คิดค้น ประจำปีงบประมาณ 2563 รางวัลระดับดีเด่น จากสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (วช.) เรื่อง “โคนมพันธุ์ทรอปิคอลโฮลสไตน์” (Tropical Holstein, TH) ซึ่งเป็นความร่วมมือของเจ้าหน้าที่ทุกภาคส่วนในสังกัด รวมทั้งเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมทั่วประเทศ ด้วยความรู้ ความสามารถ และความอดทน เป็นระยะเวลาที่ยาวนานจากอดีตจนถึงปัจจุบันกว่า 30 ปี มุ่งมั่น วิจัย พัฒนาและปรับปรุงพันธุ์จนประสบผลสำเร็จจากเทคโนโลยีหลายด้านร่วมกัน เช่น เทคโนโลยีสารสนเทศ เทคโนโลยีชีวภาพทางด้านอนุพันธุศาสตร์ และเทคโนโลยีทางการปรับปรุงพันธุ์ โดยเฉพาะเทคโนโลยีทางการปรับปรุงพันธุ์ได้มีการวิจัยและพัฒนาเครื่องมือสำหรับการคัดเลือก (การประเมินค่าทางพันธุกรรม) ให้มีความถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้นมาอย่างต่อเนื่องตามลำดับ จนกระทั่งได้พันธุ์โคนมที่ “เลี้ยงง่าย อายุการให้ผลผลิต นานมียืนนาน ในปริมาณที่มากพอเหมาะ” ซึ่งเป็นพันธุ์โคนมหนึ่งเดียวในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่สร้างความภาคภูมิใจให้กับประเทศไทย ในการขับเคลื่อนอุตสาหกรรมโคนมของประเทศให้มีความยั่งยืนและช่วยประหยัดงบประมาณในการนำเข้าน้ำเชื้อจากต่างประเทศปีละไม่น้อยกว่า 50 ล้านบาท

วารสารฉบับนี้ ยินดีเปิดรับบทความทั้งที่เป็นบทความวิจัย และบทความวิชาการ ในทุกสาขา โดยทุกบทความจะได้รับการตรวจพิจารณาจากกองบรรณาธิการ เพื่อคุณภาพและคุณค่าของวารสารที่เหมาะสมต่อการเผยแพร่ และเป็นแหล่งข้อมูลในการศึกษาค้นคว้า อ้างอิง ทางกองบรรณาธิการหวังเป็นอย่างยิ่งว่าวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ (Journal of Biotechnology in Livestock Production) จะเป็นส่วนหนึ่งของการพัฒนาทักษะทางวิจัย และวิชาการ ตลอดจนสาขาอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง อันจะเกิดประโยชน์ต่อการพัฒนานวัตกรรมใหม่ๆ และองค์ความรู้สู่วงการปศุสัตว์และสาขาอื่นที่เกี่ยวข้องต่อไป



(นายณรงค์ เลี้ยงเจริญ)

ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์



วัตถุประสงค์

1. ส่งเสริมการศึกษา ค้นคว้า วิจัยด้านการผลิตปศุสัตว์และเทคโนโลยีชีวภาพ
2. รวบรวม เผยแพร่ความรู้ด้านการผลิตปศุสัตว์และเทคโนโลยีชีวภาพ
3. ส่งเสริมความสัมพันธ์ และความร่วมมือระหว่างนักวิชาการและสถาบันต่างๆ

เจ้าของ

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

สำนักงาน

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์
ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง
จ.ปทุมธานี 12000
โทร/โทรสาร 0-2501-2116

กำหนดออก

ปีละ 1 ฉบับ

คณะที่ปรึกษา

น.สพ. สาโรช งามขำ

บรรณาธิการบริหาร

น.สพ. ณรงค์ เลี้ยงเจริญ

บรรณาธิการ

นางจตุพร พงษ์เพ็ง

ผู้ช่วยบรรณาธิการ

นางจรรยาพร รุ่งเรืองศักดิ์

กองบรรณาธิการ

น.สพ. จิรุตม์ รัตนเทพ
สพ.ญ. สายใจ ชื่นสุข
น.สพ. ภาณุพันธ์ พงษ์เพ็ง
ดร. มาลี อภิเมธีอารัง
ดร. สายัณห์ บัวบาน
น.สพ. ณัฐนันท์ ศิริรัตนัญญกุล
น.สพ. อรุณ จันทร์กระจำ
น.สพ. พีระพงษ์ สำราญทรัพย์
นายสมศักดิ์ เปรมปรีดี
ส.พญ. เพชรร้อย เพชรเรียง

ผู้จัดการวารสาร

นายเรณู วรรุฒิ
สพ.ญ. มนัสวี ชูเชิด
นางอัมภาพันธ์ ลีละศิริ



ข้อแนะนำสำหรับผู้เขียน

วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ เป็นวารสารทางวิชาการของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ กำหนดออกปีละ 1 ฉบับ โดยวารสารจะตีพิมพ์บทความ ผลงาน ค้นคว้าวิจัยด้านการผลิตปศุสัตว์ ทั้งด้านการพัฒนา และปรับปรุงพันธุ์ การจัดการอาหาร สุขภาพ และระบบสืบพันธุ์ ตลอดจนการขยายพันธุ์ และการใช้ เทคโนโลยีชีวภาพที่ก้าวหน้าในการปรับปรุงและพัฒนาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตปศุสัตว์ด้านต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้น คณะผู้จัดทำวารสาร เทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ยินดีรับเรื่องจากทุกท่านที่ส่งมาเพื่อเผยแพร่ และเพื่อความสะดวกในการพิจารณา ขอเสนอแนะดังนี้

1. เรื่องที่จะตีพิมพ์

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

1.2 บทความ (Articles) และย่อเอกสาร (Literature reviewed) ทางวิชาการ ที่รวบรวม ข้อมูล ความคิดเห็นและประสบการณ์ของผู้เขียน

1.3 เรื่องอื่นๆ ที่กองบรรณาธิการพิจารณาเห็นสมควร

2. ต้นฉบับ

2.1 ต้นฉบับที่ส่งมาตีพิมพ์ในวารสาร เทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ไม่ควรเป็นเรื่องที่เคยเผยแพร่ หรือ กำลังอยู่ระหว่างการพิจารณาเพื่อเผยแพร่ในวารสารอื่น

2.2 ต้นฉบับเป็นภาษาไทยหรือภาษาอังกฤษ พิมพ์บนกระดาษ เอ 4 จำนวนไม่เกิน 12 หน้า โดยจัดพิมพ์ด้วย Microsoft Word for Windows หรือใช้ชนิดและขนาดตัวอักษรตามที่กำหนด

2.3 ไม่มีการส่งคืนต้นฉบับ

3. การลำดับเรื่องในต้นฉบับ

เพื่อให้ขบวนการพิจารณาผลงานวิชาการ และการดำเนินการจัดพิมพ์วารสารเป็นไปอย่างเรียบร้อยรวดเร็ว และถูกต้อง จึงจำเป็นต้องให้

ผู้เขียนผลงานวิชาการปฏิบัติตามข้อกำหนดอย่างเคร่งครัด ดังนี้

3.1 ให้ส่งต้นฉบับเอกสารผลงาน จำนวน 1 ชุด พร้อมไฟล์ Microsoft word

3.2 ต้นฉบับผลงานที่ส่งมา ให้ตรวจสอบความถูกต้องของตัวสะกด รูปแบบการจัดพิมพ์ให้ถูกต้องตามที่กำหนด

3.3 เมื่อผลงานผ่านการพิจารณาจากกองบรรณาธิการแล้ว จะแจ้งกลับไปยังเจ้าของผลงาน พร้อมส่งต้นฉบับเพื่อให้แก้ไขตามที่กองบรรณาธิการเสนอแนะ

ส่งผลงานที่แก้ไข ถูกต้องแล้วตามข้อแนะนำของกองบรรณาธิการ ในรูปแบบเอกสารไฟล์ Microsoft Word และรูปแบบไฟล์ PDF มายัง e-mail : singpongpeng@gmail.com โดยมีรายละเอียด ดังนี้

ชื่อผลงาน.....

ชื่อเจ้าของผลงาน.....

ที่อยู่.....

โทรศัพท์.....

E-Mail.....

กรณีมีข้อสงสัย ติดต่อสอบถามได้ที่

นางจตุพร พงษ์เพ็ง

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมือง

จ. ปทุมธานี 12000

โทรศัพท์ 02-967-9791 หรือ 08-6700-3880

ดูข้อมูลรายละเอียดเกี่ยวกับข้อแนะนำสำหรับผู้เขียนผลงานที่ได้ <http://www.dld.go.th/biotech>

4. การลำดับเรื่อง

4.1 ชื่อเรื่อง (Title) ควรตั้งชื่อให้สั้นและสื่อความหมายให้ชัดเจน และพิมพ์ด้วยอักษร TH SarabunPSK ขนาดตัวอักษร 16 และตัวหนา

4.2 ชื่อผู้เขียนและผู้ร่วมงาน (Author and co - workers) เขียนชื่อนามสกุลเต็มทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ วางกึ่งกลางใต้ชื่อเรื่อง

4.3 บทคัดย่อ (Abstract) เขียนสั้นๆได้เนื้อหาครอบคลุมวัตถุประสงค์ วิธีการ ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง ความยาวไม่ควรเกินหนึ่งหน้ากระดาษ บทคัดย่อต้องมีทั้งภาษาไทยและภาษาอังกฤษ แยกหน้าต่างหากจากกัน ส่งบรรณาธิการวารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ 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 เลขทะเบียนวิจัย (Registered No.)... (ถ้ามี)

4.6 สังกัดผู้วิจัย และสถานที่ติดต่อ ให้ระบุไว้ในเชิงอรรถ (footnote) โดยให้ใช้ระบบเลขบนชื่อเป็นตัวระบุในเชิงอรรถ เป็นชื่อหน่วยงานที่สังกัดสถานที่ติดต่อได้สะดวก ให้ครบทุกคน กรณีผู้วิจัยอยู่หน่วยงานเดียวกันให้ใช้ตัวยก (super script) เดียวกัน

4.7 เนื้อหา (Text) สำหรับงานวิจัย
ประกอบด้วย

4.7.1 คำนำ (Introduction) อธิบายถึงปัญหาและวัตถุประสงค์และควรมีการตรวจเอกสาร (literature review)

4.7.2 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง (Materials and Methods) อธิบายเครื่องมืออุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง วิธีการที่ใช้ ถ้าคิดค้นขึ้นควรอธิบายอย่างละเอียด แต่ถ้าเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปให้เขียนในลักษณะอ้างอิงถึง ถ้าเป็นเครื่องหมายตราหรือชื่อการค้า ควรทำเป็น footnote ไว้ที่ด้านล่างของหน้านั้น

4.7.3 ผลการทดลอง (Results) รายงานผลการทดลองเป็นคำบรรยาย ให้ละเอียดและเข้าใจง่าย โดยแบ่งเป็นหลายๆ ย่อหน้า และจัดข้อความที่มีเนื้อหาเดียวกันไว้ด้วยกัน หากเป็นไปได้ควรเสนอใน

รูปของตารางหรือรูปภาพ หรือกราฟพร้อมทั้งบรรยายประกอบ ทั้งนี้ตาราง รูป หรือกราฟ ไม่ควรแสดงผลที่เหมือนกัน

- ตาราง (Tables) ควรพิมพ์ให้ชัดเจน เหมาะกับหน้า ต้องมีความหมายในตัวเอง และมีคำอธิบายตารางอยู่เหนือตารางนั้น

- รูปภาพ (Figures) ควรเป็นภาพขาวดำ หรือภาพสี และอธิบายรายละเอียดไว้ใต้รูปนั้น

4.7.4 วิจารณ์ (Discussion) เป็นการวิจารณ์ผลการทดลอง โดยมีจุดมุ่งหมาย เพื่อให้ผู้อื่นเห็นคล้อยถึงหลักการที่แสดงออกมาจากการทดลอง หรือเพื่อสนับสนุน หรือคัดค้านทฤษฎีที่มีผู้เสนอมาก่อน หรือเพื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลอง และการตีความหมายของผู้อื่น ผู้เขียนควรพยายามเน้นถึงปัญหาหรือข้อโต้แย้งในสาระสำคัญของเรื่องที่กำลังกล่าวถึง ตลอดจนข้อเสนอนะเพื่อการวิจัยในอนาคตและเส้นทางที่จะนำไปใช้เป็นประโยชน์

4.7.5 สรุปผลการทดลอง (Conclusion) ควรเป็นใจความที่สำคัญ กระชับเป็นไปตามวัตถุประสงค์และคุณค่าของงานเพื่อให้ผู้อ่านเข้าใจง่ายขึ้น

4.7.6 ข้อเสนอแนะ (Suggestions) เป็นการเสนอให้นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ (application) ใครหรือหน่วยงานใด ควรทำอะไร คำนี้ถึงสิ่งใดบ้าง ควรปรับปรุง พัฒนาอย่างไร และควรแสดงผลกระทบจากการนำไปใช้ด้วย

4.7.7 กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement) ควรมีในกรณีที่ได้รับความช่วยเหลือ หรือความร่วมมือที่สนับสนุนงานค้นคว้าวิจัยนั้นๆ

4.7.8 เอกสารอ้างอิง (References)

ก. กรณีที่อ้างอิงในเนื้อเรื่อง ควรอ้างอิงดังนี้คือ

1) กรณีที่อ้างจากการตรวจเอกสาร โดยผู้อื่นให้ใช้คำว่า อ้างถึงโดย (cited by)

2) กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นคนไทย เมื่อเป็นประธานของประโยค ใช้ “สาโรชและสายใจ (2562), สายใจและคณะ (2562) กล่าวว่า.....” หรือเมื่อรายงานอยู่กลาง หรือท้ายประโยค ใช้ (สาโรช



และสายใจ, 2562) หรือมีเอกสารอ้างอิงในเรื่องเดียวกันมากกว่า 1 ฉบับ ให้ใช้ (สายใจและคณะ, 2561; จรรยาพรและวรพงษ์, 2562;)

3) กรณีผู้รายงานเอกสารเป็นชาวต่างประเทศ เมื่อเป็นประธานของประโยค ใช้ “Szyda and Komisarek (2007), Rychtarova *et al.* (2014) กล่าวว่..... “ หรือเมื่อผู้รายงานอยู่ระหว่างกลางหรือท้ายประโยค ใช้ (Szyda and Komisarek, 2007; Rychtarova *et al.*, 2014;)

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

ข. การเขียนเอกสารอ้างอิงท้ายเรื่อง ควรขึ้นต้นเอกสารอ้างอิงภาษาไทยก่อน เขียนเรียงตามลำดับปัญหาของของผู้เขียน

1) กรณีอ้างอิงจากวารสาร ให้ระบุชื่อผู้เขียน ถ้าเป็นภาษาอังกฤษคนแรกใช้ชื่อสกุลตามด้วยชื่อย่อของผู้แต่ง ผู้เขียนในลำดับถัดมาให้ใช้ชื่อย่อขึ้นก่อน แล้วตามด้วยชื่อสกุล แล้วตามด้วยปี ชื่อเรื่องวารสารปีที่ ฉบับที่ และหน้าที่อ้างอิง ดังตัวอย่าง

สาริธ ขามขำ และ สายใจ ชื่นสุข. 2562. การศึกษาความสัมพันธ์ของรูปแบบยีน Butyrophilin และ DGAT1 ที่มีผลต่อองค์ประกอบและปริมาณน้ำมันในโคพันธุ์ทรอปิคอลไฮสไนด์ด้วยวิธี Real-time PCR. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 10:1-13.
จรรยาพร รุ่งเรืองศักดิ์ และ วรพงษ์ พงษ์ศิริ. 2562. ความสัมพันธ์ระหว่างโปรตีน PDC-109 ใน seminal plasma ของพ่อพันธุ์โคนมทรอปิคอลไฮสไนด์ต่อความสามารถในการแช่แข็งน้ำเชื้อ. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 10:58-74.

Sarsaifi, K., A.W. Haron, J. Vejayan, R. Yusoff, H. Hani, M.A. Omar, L.W. Hong, N. Yimer, J.T. Ying and A.M. Othman. 2015. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of Bali bull (*Bos javanicus*) seminal plasma proteins and their relationship with semen quality. *Theriogenology*. 84(6):956-968.

2) 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.

3) กรณีอ้างอิงจากเว็บไซต์ (Online references) ดังตัวอย่าง

Lacorte, G.A., M.A. Machado, M.L. Martinez, A.L. Campos, R.P. Maciel, R.S. Verneque, R.L. Teodoro, M.G.C.D. Peixoto, M.R.S. Carlvaho, and C.G. Fonseca. 2006. DGAT1 K232A polymorphism in Brazillian cattle breeds. *Genetics and Molecular Research*.
Online.<http://www.funpecrp.com.br>[access date: 24/7/2007].

จันทร์หา แป้นตุ้ม จุฑาพร ศรีวิพัฒน์ วรวิทย์ แสงสิงแก้ว และ ฟิงพิศ ดุลยพัชร. 2541. อาหารจากข้าวโพด.คู่มือการส่งเสริมการเกษตรที่ 43. แหล่งที่มา:

<http://www.ku.ac.th/agri/cornn/corn.htm>. 27 มีนาคม 2541.

5. การพิมพ์ผลงานทางวิชาการ

ตัวพิมพ์ ให้ใช้เครื่องพิมพ์ (Printer) หมึกพิมพ์ต้องเป็นสีดำ คมชัด สะดวกแก่การอ่านและใช้ตัวพิมพ์แบบเดียวกันทั้งฉบับ กรณีใช้เครื่องคอมพิวเตอร์พิมพ์เนื้อความให้ใช้ตัวอักษร TH Sarabun PSK 16 ตัวปกติ เท่านั้น ยกเว้นหัวข้อใหญ่ เช่น ชื่อเรื่อง บทคัดย่อ บทนำ อุปกรณ์และวิธีการ ผล วิจารณ์ สรุป กิตติกรรมประกาศ และเอกสารอ้างอิง พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 16 ส่วนหัวข้อย่อย เช่น ชื่อผู้วิจัยและคณะ คำสำคัญ ตาราง รูปภาพ เป็นต้น พิมพ์โดยใช้ตัวอักษรแบบหนา (Bold) ขนาด 16 กระดาษที่ใช้พิมพ์ ให้ใช้กระดาษขาวไม่มีบรรทัด ขนาดมาตรฐาน A4 (210 X 297 มม.) ใช้เพียงหน้าเดียว

การเว้นที่ว่างขอบกระดาษ

- ตั้งก้นหน้าบนและซ้ายไว้ที่ 2.5 เซนติเมตร
- ด้านขวาและด้านล่างไว้ที่ 2.0 เซนติเมตร

การเว้นระยะในการพิมพ์

- การเว้นระยะระหว่างบรรทัดและการย่อ

หน้า ควรจัดตามความสวยงาม

- กรณีคำสุดท้ายไม่จบบรรทัดนั้นๆ ให้ยกคำนั้นทั้งคำไปพิมพ์ในบรรทัดต่อไป ไม่ควรตัดส่วยท้ายของ คำไปพิมพ์ในบรรทัดใหม่ เช่น กระบือปลักไม่ให้แยกเป็น 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 และคำข้างในวงเล็บ เช่น (รพีพรรณ และคณะ)

การลำดับหน้า

- ลำดับหน้าโดยใช้หมายเลข 1,2,3.....ที่กึ่งกลางหน้ากระดาษ

ตาราง รูปภาพ แผนภูมิ กราฟ

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

- กรณีตารางมีความยาวมาก ไม่สามารถสิ้นสุดในหน้าเดียวได้ ให้พิมพ์ส่วนที่เหลือในหน้าถัดไปโดยพิมพ์เลขที่ตารางและตามด้วยคำว่า (ต่อ)

- กรณีรูปภาพ แผนที่ แผนภูมิ กราฟ ควรเป็นภาพขาวดำ และใช้แนวทางข้างต้น

การพิมพ์ชื่อวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิต ให้ใช้ตามประมวลนามศาสตร์สากล (International code of nomenclature) คือ **ขีดเส้นใต้** หรือ พิมพ์ด้วยตัวเอน ชื่อวิทยาศาสตร์เป็นไปตามการตั้งชื่อ



สารบัญ

	หน้า
ผลของระยะเวลาปรับสมดุลและการเสริม L-cysteine ในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อ แช่แข็งสุกร (นลิน บัญสพ, พีระพงษ์ สำราญทรัพย์)	1
ความเข้มข้นของอสุจิในหลอดบรรจุน้ำเชื้อชนิด medium straw และชนิดน้ำยาเจือจาง น้ำเชื้อก่อนการผสมเทียมต่อระยะเวลาการมีชีวิตของอสุจิภายหลังการละลาย (เริงวุฒิ วรวุฒิ, จรรยาพร รุ่งเรืองศักดิ์, จุฬฉัตร ชาญปัญญา)	13
ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนโคในประเทศไทย (พิงค์ลานนา กุญชร, กอบสุข ทองสอดแสง)	24
ผลของการเปลี่ยนเขมินอลพลาสมา ต่อคุณภาพน้ำเชื้อโคแช่แข็ง (อภิรักษ์ อุทธา, นิติรัฐ ถียัง, สุจิรา ธรรมวัง, อธิศักดิ์ ศิริบุรี)	34
ผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาโอโอไซต์ในน้ำพอลิเคิลต่อการพัฒนาของเอ็มบริโอโค (นิติรัฐ ถียัง, อภิรักษ์ อุทธา, สุจิรา ธรรมวัง)	43
ความชุกของการสูญเสียตัวอ่อนระยะแรกในแม่โคนมพันธุ์ทรอปิคอล โฮลสไตน์ที่มีปัญหา ผสมติดยากในเขตพื้นที่จังหวัดสระบุรีและลพบุรี (นันท์มนัส สีคง,สถาปัตย์ อิมโพธิ์, ธวัชชัย โพธิ์คำ, จตุพร พงษ์เพ็ง)	52
ผลของ PMSG ร่วมกับโปรเจสเทอโรนชนิดสอดช่องคลอดในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและ ผสมเทียมแบบกำหนดเวลาต่ออัตราการตั้งท้องในกระบือปลัก (กอบสุขทองสอดแสง, ธนพล แอมปรัชฌาย์, ฉัตรชัย สืบคำ, สุกัญญา ลีทองดี)	63
ผลของชนิดน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรภายหลังการละลาย (จุฬฉัตร ชาญปัญญา, พิงค์ลานนา กุญชร)	74



ผลของระยะเวลาปรับสมดุลและการเสริม L-cysteine ในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร

นลิน บุญสห^{1/} พิระพงษ์ สำราญทรัพย์^{2/}

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาปรับสมดุลและผลของการเสริม L-cysteine ในน้ำยาเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร จัดทรีทเมนต์แบบ 2x2 แฟคทอเรียลในแผนการทดลองแบบบล็อกสมบูรณ์ ใช้พ่อพันธุ์สุกรจำนวน 9 ตัว กำหนดให้สายพันธุ์พ่อสุกรเป็นบล็อก (block) สายพันธุ์ละ 3 ตัว ได้แก่ พันธุ์แลนด์เรซ ลาร์จไวท์ และคูร์ค อายุระหว่าง 2-3 ปี เลี้ยงดูภายใต้สภาพแวดล้อมของศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อสุกร จังหวัดราชบุรี ระหว่างเดือนตุลาคม 2558 ถึง เดือนกันยายน 2559 ริดเก็บน้ำเชื้อสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ติดต่อกัน 3 สัปดาห์ การทดลองจะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน น้ำเชื้อที่ริดเก็บได้จะถูกแบ่งในขั้นตอนละ 2 ส่วนเท่าๆกัน ขั้นตอนแรกเพื่อศึกษาระยะเวลาปรับสมดุลโดยมี 2 วิธี (วิธีที่ 1: นำน้ำเชื้อที่เจือจางไปปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 15 °C เป็นเวลา 120 นาที จากนั้นนำน้ำเชื้อบ่มต่อที่ตู้เก็บรักษาอุณหภูมิที่ 5 °C เป็นเวลา 60 นาที และ วิธีที่ 2: นำน้ำเชื้อที่เจือจางไปปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 15 °C เป็นเวลา 150 นาที จากนั้นนำน้ำเชื้อบ่มต่อที่ ตู้เก็บรักษาอุณหภูมิที่ 5 °C เป็นเวลา 90 นาที) ขั้นตอนที่สองเพื่อศึกษาปัจจัยการเสริมและไม่เสริม L-cysteine ในน้ำยาเจือจางสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อสุกร ผลการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยเครื่อง CASA พบว่าระยะปรับสมดุลวิธีที่ 2 มีค่าความเร็วในการเคลื่อนที่ VAP ($93.76 \pm 9.52 \mu\text{m/s}$ และ $90.64 \pm 8.58 \mu\text{m/s}$) ความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีโค้ง VCL ($178.10 \pm 19.82 \mu\text{m/s}$ และ $172.94 \pm 20.57 \mu\text{m/s}$) และลักษณะการเคลื่อนที่ ALH ($7.17 \pm 0.95 \mu\text{m}$ และ $6.91 \pm 0.86 \mu\text{m}$) สูงกว่าระยะปรับสมดุลวิธีที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และการเสริม L-cysteine ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสุกรที่ระดับความเข้มข้น 5 mM มีผลทำให้ความเร็วในการเคลื่อนที่ VAP ($91.64 \pm 10.65 \mu\text{m/s}$ และ $88.96 \pm 9.78 \mu\text{m/s}$) ความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีโค้ง VCL ($176.33 \pm 23.25 \mu\text{m/s}$ และ $166.92 \pm 22.99 \mu\text{m/s}$) มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในขณะที่ค่าอัตราการเคลื่อนที่อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และความสมบูรณ์ของอะโครโซมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ผลที่ได้ชี้ให้เห็นว่าระยะเวลาปรับสมดุลและการเสริม L-cysteine ที่เหมาะสมนั้นจะมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรในส่วนที่เกี่ยวข้องกับความเร็วในการเคลื่อนที่และลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ

คำสำคัญ: น้ำเชื้อแช่แข็งสุกร ระยะเวลาปรับสมดุล L-cysteine

เลขทะเบียนวิจัย : 59 (1) – 0208 - 012

^{1/}สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ต.บางกะดี อ.เมืองปทุมธานี จ.ปทุมธานี 12000

^{2/}ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพราชบุรี ต.หนองโพ อ.โพธาราม จ.ราชบุรี 70120

Effect of equilibration time and L-cysteine supplement to extender on frozen boar semen quality

Nalin Boonsop^{1/} Peerapong Sumransap^{2/}

Abstract

The aim of this study the effect of equilibration time and L-cysteine supplement to extender on frozen boar semen quality. The 2x2 factorial experiments in Randomized Complete Block Design (RCBD) was used with nine boars (Landrace, Large white, Duroc) aged 2-3 years that were raised and fed under the same environment at Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Ratchaburi province during October 2015-September 2016. The semen was collected one time per week for 3 consecutive weeks. The experiment is divided into 2 steps with divided collected semen into 2 equal parts. The first step is to study the equilibration time with 2 methods (First method: bring the semen to freezing at 15°C for 120 min and 5°C for 60 min ; Second method: bring the semen to freezing at 15°C for 150 min and 5°C for 90 min.) The second step is to study the supplementation of L-cysteine in freezing extender III. The results of the frozen semen quality estimated by CASA showed that the second method of equilibration time had VAP movement velocity ($93.76 \pm 9.52 \mu\text{m/s}$ and $90.64 \pm 8.58 \mu\text{m/s}$), the VCL trajectory movement speed ($178.10 \pm 19.82 \mu\text{m/s}$ and $172.94 \pm 20.57 \mu\text{m/s}$) and the ALH kinetic movement characteristics ($7.17 \pm 0.95 \mu\text{m}$ and $6.91 \pm 0.86 \mu\text{m}$) were significantly higher than the first method of equilibration time ($P < 0.05$). The supplementation of L-cysteine to the sperm dilution solution at a concentration of 5 mM resulted in the VAP movement velocity ($91.64 \pm 10.65 \mu\text{m/s}$ and $88.96 \pm 9.78 \mu\text{m/s}$), the VCL trajectory movement speed ($176.33 \pm 23.25 \mu\text{m/s}$ and $166.92 \pm 22.99 \mu\text{m/s}$) were significantly higher than the control group ($P < 0.05$). While motility, progressive motility and acrosome integrity on quality of post-thaw sperm were not significantly different ($P > 0.05$). These results indicated that the equilibration time and appropriate L-cysteine supplementation can affect the quality of swine frozen semen in relation to the velocity and kinetic movement of sperm.

Keywords: frozen boar semen, equilibration time, L-cysteine

Registered No: 59 (1) – 0208 - 012

^{1/}Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Bang Kadi, Muang Pathum Thani, Pathum Thani, 12000

^{2/}Artificial Insemination and Biotechnology Research Center, Nong Pho, Photharam, Ratchaburi, 70120

บทนำ

สุกรเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศที่สร้างรายได้และมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการผลิตปศุสัตว์ของประเทศไทยซึ่งเป็นการผลิตเพื่อบริโภคภายในประเทศเป็นหลัก และมีการส่งออกประมาณ 4.6 % ของปริมาณการผลิตทั้งหมด (สมาคมผู้เลี้ยงสุกรแห่งชาติ, 2562) ในอดีตที่ผ่านมาพบว่ามีต้นทุนพันธุ์สัตว์ที่ต้องสั้ นำเข้าจากต่างประเทศ สุรัส (2549) ศึกษาพบว่าในการผลิตลูกสุกรขุนจากพ่อและแม่พันธุ์แท้ที่เป็นต้นทุนคงที่ ได้แก่ ค่าพ่อแม่พันธุ์ ค่าอุปกรณ์และโรงเรือน คิดเป็น 26 % ของต้นทุนรวม (ไม่รวมค่าอาหารสัตว์ ค่าเวชภัณฑ์ ค่าสาธารณูปโภค) การผสมเทียมสุกรปัจจุบันยังคงใช้น้ำเชื้อสดอยู่เนื่องจากค่าใช้จ่ายถูก แต่ข้อเสียคือสามารถเก็บไว้ได้เพียง 3-4 วันเท่านั้นซึ่งไม่สะดวกในขนส่งระยะทางไกล วิธีการนำเชื้อสุกรแช่แข็งได้ถูกคิดค้นและพัฒนาเทคนิคขึ้นในประเทศไทย โดยรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สุกรแล้วทำการเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีส่วนผสมของไข่แดงและกลีเซอรอลก่อนนำไปแช่แข็งโดยใช้ไนโตรเจนเหลวหรือควบคุมอุณหภูมิ เพื่อให้ตัวอสุจิสามารถมีชีวิตรอดได้นานขึ้นโดยไม่ต้องรีดบ่อยครั้ง สามารถไปผสมกับแม่พันธุ์ในที่ต่างๆที่มีระยะห่างกันได้ อย่างไรก็ตามอสุจิของสุกรภายหลังแช่แข็งและละลายแล้วจะมีอายุสั้นกว่าปกติ Taylor (1991) รายงานว่าหลังผ่านกระบวนการแช่แข็งตัวอสุจิจะตายไปประมาณ 40-60% และ Wagne and Tibier (2000) พบว่าจำนวนลูกเกิดต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสดและมีความผันแปรของคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งค่อนข้างสูง

น้ำเชื้อสุกรมีความแตกต่างจากน้ำเชื้อปศุสัตว์อื่นในส่วนองปริมาณที่มากกว่าและความเข้มข้นต่ำ อสุจิจะมีความไวต่อการเปลี่ยนของอุณหภูมิเกิด cold shock ได้ง่าย ปริมาณของโคเลสเตอรอลในเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิต่ำกว่าสัตว์ชนิดอื่น (Parks and Lynch, 1992) ดังนั้นในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรจำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยหลักที่จะส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง เช่น ระยะเวลาปรับสมดุลของอสุจิ (equilibration time) โดยเฉพาะที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15 °C และน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อเพื่อให้อสุจิปรับสภาพให้เข้ากับน้ำยาเจือจางและอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงของกระบวนการแช่แข็ง ในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร จำเป็นต้องปรับสมดุลอุณหภูมิ 2 ระดับ คือที่ 15 °C และ 5 °C ซึ่งเป็นช่วงที่อสุจิเกิด cold shock ได้ง่าย โดย Kaeoket et al. (2008) รายงานว่าในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร มีการปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 15 °C เป็นเวลา 120 นาที และที่ 5 °C เป็นเวลา 90 นาที พบว่าน้ำเชื้อภายหลังการละลายมีอัตราการเคลื่อนที่ร้อยละ 17 -25 ส่วน Egerszeg et al. (2014) รายงานการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรพื้นเมืองของฮังการี โดยใช้การปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 15 °C เป็นเวลา 180 นาที และที่ 5 °C นาน 120 นาที พบว่ามีอัตราการเคลื่อนที่ร้อยละ 30-35

ส่วนน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ (extender) เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการละลาย โดยทั่วไปน้ำยาเจือจางที่นิยมใช้ ได้แก่ สารละลายบีทีเอส (BTS® , Beltsville Thawing Solution, Minitüb, Abfüll-und Labortechnik GmbH&Co. KG, Germany) สารละลายโมดิโน (Modena™, Swine Genetics International, Ltd., Iowa, USA) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้เลือกใช้สารละลายโมดิโนที่มีองค์ประกอบหลักๆได้แก่ TRIS BSA และ cysteine ที่เป็นแหล่งพลังงานและมีสารป้องกันอันตรายจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่มีผลต่อการอยู่รอดของอสุจิ โดยเฉพาะการเกิดกระบวนการ lipid peroxidation (LPO) ในขั้นตอนการเจือจางน้ำเชื้อซึ่งจะทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ของอสุจิและปริมาณของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) ของตัวอสุจิลดลง (Stewart, 1996) จึงมีการศึกษาผลของการใช้สารต้านอนุมูลอิสระเสริมในน้ำยาเจือจางเพื่อป้องกันความเสียหายที่เกิดจากกระบวนการดังกล่าว โดยเฉพาะที่เกิดขึ้นกับเยื่อหุ้มเซลล์

L-cysteine เป็นกรดอะมิโนชนิด non-essential amino acid ซึ่งร่างกายสังเคราะห์เองได้ ทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ช่วยลดผลกระทบจากปฏิกิริยา LPO และปฏิกิริยา reaction oxidative stress (ROS) ของเยื่อหุ้มเซลล์โดยเฉพาะในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร ทำให้สามารถช่วยเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรให้สูงขึ้นได้

ดังนั้นจึงทำการศึกษาผลของระยะเวลาปรับสมดุล และการเสริม L-cysteine ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสุกร ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนาเทคนิคการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรให้มีคุณภาพสูงขึ้น สามารถนำไปใช้ในการบริการผสมเทียมแก่เกษตรกรได้อย่างมีประสิทธิภาพต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

พ่อพันธุ์สุกร 3 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์แลนด์เรซ ลาร์จไวท์ และดิวรีค สายพันธุ์ละ 3 ตัว จำนวน 9 ตัว อายุระหว่าง 2-3 ปี เลี้ยงดูภายใต้สภาพแวดล้อมของศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อสุกร จังหวัดราชบุรี สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ โดยน้ำเชื้อสดที่นำมาผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งต้องมีค่าความผิดปกติของอสุจิส่วนหัวและหางไม่เกิน 12% และ 15% ตามลำดับและมีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่ต่ำกว่า 70% (เทวินทร์, 2542)

การวางแผนการทดลอง

น้ำเชื้อสดที่รีดเก็บได้จากพ่อพันธุ์สุกรทุกตัวจะถูกแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอนเพื่อศึกษาปัจจัย ดังนี้

ขั้นตอนการเจือจางน้ำเชื้อ เพื่อศึกษาระยะเวลาปรับสมดุล 2 วิธี

วิธีที่ 1 เจือจางน้ำเชื้อสดด้วยน้ำยาเจือจางที่ 1 (Extender I ; Modena™, Swine Genetics International, Ltd., Iowa, USA) สัดส่วน 1:1 นำน้ำเชื้อที่เจือจางไปปรับระยะเวลาสมดุล อุณหภูมิที่ 15 °C เป็นเวลา 120 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 800 g 15 °C นาน 10 นาที แยกเอาของเหลวส่วนบนทิ้งและเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางที่ 2 (Extender II ; lactose-egg yolk) ประกอบด้วย 80% lactose + 20% egg yolk สัดส่วน 1:1 v/v ให้มีอสุจิเข้มข้น 1.5×10^9 ตัว/มิลลิลิตร จากนั้นนำน้ำเชื้อบ่มต่อที่ตู้เก็บรักษา อุณหภูมิที่ 5°C เป็นเวลา 60 นาที

วิธีที่ 2 เจือจางน้ำเชื้อสดด้วยน้ำยาเจือจางที่ 1 (Extender I ; Modena™, Swine Genetics International, Ltd., Iowa, USA) สัดส่วน 1:1 นำน้ำเชื้อที่เจือจางไปปรับระยะเวลาสมดุล อุณหภูมิที่ 15 °C เป็นเวลา 150 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 800 g 15 °C นาน 10 นาที แยกเอาของเหลวส่วนบนทิ้งและเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางที่ 2 (Extender II ; lactose-egg yolk) ประกอบด้วย 80% lactose + 20% egg yolk สัดส่วน 1:1 v/v ให้มีอสุจิเข้มข้น 1.5×10^9 ตัว/มิลลิลิตร จากนั้นนำน้ำเชื้อบ่มต่อที่ตู้เก็บรักษา อุณหภูมิที่ 5°C เป็นเวลา 90 นาที

ขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อ เพื่อศึกษาปัจจัยการเสริมและไม่เสริม L-cysteine ดังนี้

แบ่งน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่เย็นด้วยวิธีที่ 1 และ 2 แยกออกเป็นสองส่วนเท่าๆ กัน

ส่วนที่ 1 เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางที่ 3 (Extender III) ; lactose-egg yolk ผสมกับ 9% glycerol และ 1.5% Equex-STM (เป็นกลุ่มควบคุม)

ส่วนที่ 2 เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางที่ 3 (Extender III) ; lactose-egg yolk ผสมกับ 9% glycerol และ 1.5% Equex-STM เสริม L-cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 5 mM

จากนั้นบรรจุน้ำเชื้อด้วยหลอดบรรจุขนาด 0.5 มิลลิลิตร นำไปอังไว้เหนือไอน้ำไนโตรเจน 3-4 ซม. อุณหภูมิประมาณ -120 °C นาน 20 นาที และเก็บรักษาไว้ภายใต้ระดับไนโตรเจนเหลวเพื่อตรวจคุณภาพน้ำเชื้อต่อไป (Figure 1)

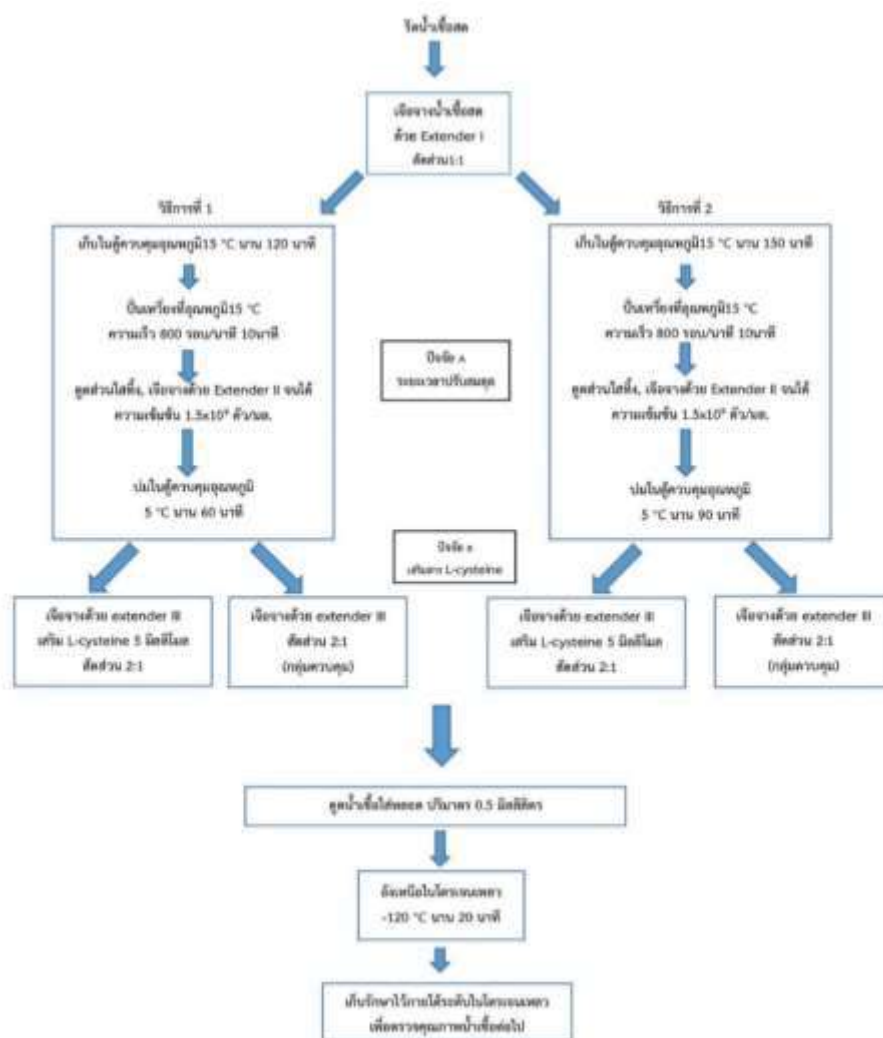


Figure 1 The process of Semen Freezing

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง

ภายหลังการแช่แข็งอย่างน้อย 24 ชั่วโมง ทำการส่มน้ำเชื้อแช่แข็งจากทุกชุดการผลิตจากพ่อพันธุ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ละ 3 หลอด ทำการละลายโดยแช่น้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 38°C นาน 20 วินาที จากนั้นตรวจการเคลื่อนที่ด้วยเครื่อง Computer Assisted Semen Analyzer (CASA) โปรแกรม IVOS motility analyzer version 12.0 (Hamilton-Thorne, Biosciences, MA., USA.) และความสมบูรณ์ของอะโครโซมด้วยการย้อมสี (FITC-PNA) ดังนี้

- 1) อัตราการเคลื่อนที่ (motility; %) และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility; %)
- 2) ความเร็วในการเคลื่อนที่ (velocity) ได้แก่

- Average Path Velocity (VAP; $\mu\text{m/s}$) หมายถึง ความเร็วในการเคลื่อนที่เฉลี่ยจากระยะทางจริง ใน 1 วินาที

- Straight Line Velocity (VSL; $\mu\text{m/s}$) หมายถึง ความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีตรง เป็นการคำนวณ จากจุดหนึ่งไปยังอีกจุดหนึ่งในแนวเส้นตรงในช่วงระยะเวลา 1 วินาที

- Curvilinear Velocity (VCL; $\mu\text{m/s}$) หมายถึง ความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีโค้ง เป็นการคำนวณ แนวโน้มของการเคลื่อนที่เฉลี่ยใน 1 วินาที



3) ลักษณะการเคลื่อนที่ (kinematic movement) ได้แก่

- Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH; μm) หมายถึง ความกว้างของส่วนหัวของอสุจิที่ส่ายไปมา

- Beat Cross Frequency (BCF; Hz) หมายถึง ความถี่ของการส่ายส่วนหัวของอสุจิ

- Straightness (STR; %) หมายถึง ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนระหว่างความเร็วในการเคลื่อนที่วิธีตรงต่อความเร็วในการเคลื่อนที่เฉลี่ย (VSL/VAP)

- Linearity (LIN; %) หมายถึง ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนระหว่างความเร็วในการเคลื่อนที่วิธีตรงต่อความเร็วในการเคลื่อนที่วิธีโค้ง (VSL/VCL)

- Wobble (WOB; %) หมายถึง ค่าเฉลี่ยอัตราส่วนระหว่างความเร็วในการเคลื่อนที่เฉลี่ยจากระยะทางจริงต่อความเร็วในการเคลื่อนที่วิธีโค้ง (VAP/VCL)

4) ความผิดปกติส่วนหางของอสุจิโดยใช้โปรแกรมตรวจความผิดปกติอสุจิด้วยเครื่อง CASA โปรแกรมIVOS motility analyzer version 12.0 (Hamilton-Thorne, Biosciences, MA., USA.)

5) อสุจิมิชีวิต (sperm viability; %) และความสมบูรณ์ของอะโครโซมด้วยเครื่อง flow cytometer (Attune NXT, Thermo Fisher Scientific, USA)

การวิเคราะห์สถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี ANOVA ตามแผนการทดลองแบบ 2x2 factorial ใน Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยใช้ General linear model procedure และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Tukey's procedure (Steel and Torrie, 1981) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป ด้วยโมเดลดังนี้

$$y_{ijk} = \mu + \text{block} + A_i + B_j + AB_{ij} + e_{ijk}$$

เมื่อ y_{ijk} คือ ค่าสังเกตสำหรับอัตราในการเคลื่อนที่ ความเร็วในการเคลื่อนที่ ลักษณะการเคลื่อนที่ อสุจิรูปร่างผิดปกติ และความสมบูรณ์ของอะโครโซม

μ คือ ค่าเฉลี่ยโดยรวม

block คือ สายพันธุ์สุกร

A คือ ปัจจัยของระยะเวลาปรับสมดุล

B คือ ปัจจัยของการเสริม L-cysteine

AB คือ ปัจจัยร่วมของระยะเวลาปรับสมดุลและการเสริม L-cysteine

e คือ ความคลาดเคลื่อน

i คือ จำนวนระดับของปัจจัย A (การปรับระยะสมดุลวิธีที่ 1 โดยปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 15 °C เป็นเวลา 120 นาที และอุณหภูมิที่ 5 °C เป็นเวลา 60 นาที และการปรับระยะสมดุลวิธีที่ 2 โดยปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 15 °C เป็นเวลา 150 นาทีและอุณหภูมิที่ 5 °C เป็นเวลา 90 นาที)

j คือ จำนวนระดับของปัจจัย B (1= กลุ่มควบคุม และ 2= กลุ่มเสริม L-cysteine)

k คือ จำนวนค่าสังเกตของแต่ละทรีทเมนต์รวม

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากผลการวิเคราะห์พบว่าระยะเวลาปรับสมดุล และการเสริม L-cysteine ไม่มีอิทธิพลร่วมกัน ($p>0.05$) ดังนั้นจึงทำการพิจารณาแยกทีละปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลาย ดังนี้

ปัจจัยระยะเวลาปรับสมดุล

ระยะเวลาปรับสมดุลจากการทดลองพบว่ามีความเร็วในการเคลื่อนที่ VAP, VCL และลักษณะการเคลื่อนที่ ALH แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติในส่วนของการเคลื่อนที่ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อสุจิรูปร่างผิดปกติ และความสมบูรณ์ของอะโครโซม ($P>0.05$) (Table 1)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างระยะปรับสมดุลทั้ง 2 วิธีพบว่าระยะเวลาปรับสมดุลวิธีที่ 2 ที่อุณหภูมิ 15°C เป็นเวลา 150 นาที และอุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 90 นาที ให้ค่าความเร็วในการเคลื่อนที่ VAP, VCL และลักษณะการเคลื่อนที่ ALH มีค่าสูงกว่าระยะเวลาปรับสมดุล วิธีที่ 1 ที่อุณหภูมิ 15° เป็นเวลา 120 นาที และอุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 60 นาที

เมื่อพิจารณาคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าอัตราการเคลื่อนที่จากการปรับสมดุลอุณหภูมิทั้ง 2 วิธีมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่าง 41.76 – 47.46 % ซึ่งสูงกว่างานวิจัยที่ผ่านมาในลักษณะเดียวกัน ได้แก่ Kaeoket et al. (2008) รายงานว่าในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรที่ใช้การปรับสมดุลที่อุณหภูมิ 15°C เป็นเวลา 120 นาที และที่อุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 90 นาที พบว่ามีอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งประมาณร้อยละ 17 – 25 ส่วน Egerszeg et al. (2014) รายงานว่าการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรพื้นเมืองของฮังการีที่ใช้การปรับสมดุลที่อุณหภูมิ 15°C เป็นเวลา 180 นาที และที่อุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 120 นาที พบว่ามีอัตราการเคลื่อนที่ร้อยละ 30-35 ซึ่งอาจเกิดจากปัจจัยหลายอย่างในแต่ละขั้นตอนของการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรที่มีรายละเอียดที่ต่างกัน อย่างไรก็ตามผลการศึกษาของสุพาที และคณะ (2554) พบว่าเมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาที่ทำให้เกิดภาวะสมดุลภายหลังการเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางที่ 1 และบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 15°C เป็นระยะเวลา 120 นาที และอุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 30 นาที และ 60 นาที พบว่าคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรไม่แตกต่างกัน แต่ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร ระยะเวลาการปรับสมดุลของอสุจิยังเป็นปัจจัยที่ต้องระวังโดยเฉพาะอุณหภูมิมีการเปลี่ยนแปลงที่อุณหภูมิ 15°C และ 5°C ซึ่งเป็นช่วงที่อสุจิเกิดสภาวะ cold shock ได้ง่ายและยังจำเป็นต้องพิจารณาปัจจัยอื่นร่วมด้วย เช่น วิธีการและขั้นตอนการเติมน้ำยาเจือจางสำหรับการแช่แข็งที่มีกลีเซอรอลเป็นองค์ประกอบ ซึ่งมีแรงดันออสโมติกสูง รวมถึงคุณสมบัติของน้ำเชื้อของพ่อสุกรแต่ละตัวที่อาจส่งผลกระทบต่อความสามารถทนต่อการแช่แข็งได้แตกต่างกัน และส่งผลถึงความผันแปรของคุณภาพน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็ง (Thurston et al., 2002; Holt et al., 2005) อาจกล่าวได้ว่าระยะเวลาปรับสมดุลมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรในส่วนของคุณภาพและลักษณะการเคลื่อนที่ซึ่งเป็นตัวชี้วัดหลักในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งมีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ดีแสดงว่าระยะเวลาปรับสมดุลในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรจึงสามารถกระทำได้ในระยะเวลาหนึ่ง โดยการปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 15°C สามารถใช้เวลาได้ตั้งแต่ 120-150 นาที ในขณะที่การปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 5°C ก็สามารถใช้เวลาได้ระหว่าง 60-90 นาที

Table 1 Parameters of frozen-thawed boar semen from equilibration time

Parameters	Equilibration time	
	Method 1	Method 2
Motility (%)	41.76 ± 15.05	47.46 ± 13.72
Progressive motility (%)	16.79 ± 6.99	19.28 ± 8.31
VAP (µm/s)	90.64 ^b ± 8.58	93.76 ^a ± 9.52
VSL (µm/s)	66.87 ± 8.82	68.66 ± 11.34
VCL (µm/s)	172.94 ^b ± 20.57	178.10 ^a ± 19.82
ALH (µm)	6.91 ^b ± 0.86	7.17 ^a ± 0.95
BCF (Hz)	33.96 ± 2.94	33.42 ± 2.51
STR (%)	73.82 ± 5.29	73.08 ± 5.46
LIN (%)	41.68 ± 5.56	41.18 ± 5.58
LIN (%)	41.68 ± 5.56	41.18 ± 5.58
WOB (%)	54.79 ± 4.51	54.70 ± 4.38
Bent tail (%)	15.56 ± 4.72	14.59 ± 5.50
Coiled tail (%)	1.42 ± 0.89	1.11 ± 0.64
Distal droplet (%)	10.45 ± 5.35	9.41 ± 6.03
Viability (%)	34.29 ± 4.91	33.60 ± 5.07
Acrosomal integrity (%)	44.28 ± 10.87	43.61 ± 11.72

^{ab} Different superscripts within the same row demonstrate significant differences ($P < 0.05$)

ปัจจัยการเสริม L-cysteine

การเสริม L-cysteine มีผลต่อความเร็วในการเคลื่อนที่ VAP และ VCL อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติในส่วนอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อสุจิรูปร่างผิดปกติ และความสมบูรณ์ของอะโครโซม ($P > 0.05$)

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างการเสริมและไม่เสริม L-cysteine พบว่าการเสริม L-cysteine มีค่าความเร็วในการเคลื่อนที่ VAP และ VCL สูงกว่ากลุ่มควบคุม (ไม่เสริมสาร) (Table 2) สอดคล้องกับ Teinthal et al. (2012) ที่รายงานว่า การเสริม L-cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10 mM มีในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Lactose-egg yolk สามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรให้สูงขึ้น และ Malo et al. (2010) ทำการทดลองการเสริม L-cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 10 mM ในน้ำยาเจือจางพบว่าสามารถป้องกันความเสียหายของตัวอสุจิขณะทำการแช่แข็งและสามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งได้

Table 2 Parameters of frozen-thawed boar semen from L-cysteine supplementation

Parameters	L-cysteine supplementation	
	Non L-cysteine (Control)	L-cysteine
Motility (%)	44.42 ± 15.13	43.66 ± 14.15
Progressive motility (%)	17.28 ± 7.66	18.33 ± 7.52
VAP (µm/s)	88.96 ^b ± 9.78	91.64 ^a ± 10.65
VSL (µm/s)	66.35 ± 9.74	66.83 ± 10.37
VCL (µm/s)	166.92 ^b ± 22.99	176.33 ^a ± 23.25
ALH (µm)	6.67 ^b ± 1.02	7.13 ^a ± 1.06
BCF (Hz)	33.95 ± 2.64	33.75 ± 2.74
STR (%)	74.59 ^a ± 5.08	73.05 ^b ± 5.84
LIN (%)	42.80 ^a ± 5.82	40.80 ^b ± 5.72
WOB (%)	55.70 ^a ± 4.90	54.16 ^b ± 4.21
Bent tail (%)	15.30 ± 5.00	15.63 ± 5.75
Coiled tail (%)	1.29 ± 0.84	1.29 ± 0.93
Distal droplet (%)	10.08 ± 5.36	9.95 ± 5.39
Viability (%)	33.99 ± 5.05	34.16 ± 5.10
Acrosomal integrity (%)	43.78 ± 10.91	44.95 ± 11.71

^{ab} Different superscripts within the same row demonstrate significant differences (P<0.05)

โดยทั่วไปน้ำเชื้อสุกรมีคุณลักษณะเฉพาะคือมีปริมาณในการหลังต่อครั้งมากแต่มีความเข้มข้นของอสุจิค่อนข้างต่ำ และมีปริมาณของโคเลสเตอรอลในเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิต่ำกว่าสัตว์ชนิดอื่น (Parks and Lynch, 1992) เมื่อเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งมักเกิดอนุมูลอิสระโดยเฉพาะที่อยู่ในกลุ่ม ROS ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดปฏิกิริยา LPO ได้ง่ายเนื่องจากมีการดื้อไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูง มีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิเกิดความเสียหายและมีการรั่วของไอออนต่างๆ นอกจากทำลายเยื่อหุ้มเซลล์แล้วยังทำให้การทำงานของไมโทคอนเดรียลดต่ำลง (Hu et al., 2009) ซึ่งไมโทคอนเดรียเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญในการเคลื่อนที่ของอสุจิจึงส่งผลให้อสุจิมีอัตราการเคลื่อนที่ต่ำลง Tuncer et al. (2010) รายงานว่าการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระนั้นช่วยให้น้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งมีอัตราการเคลื่อนที่สูงขึ้น ซึ่งเป็นส่วนสำคัญที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการปฏิสนธิของอสุจิ โดย L-cysteine ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสุกรมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระชนิดหนึ่งที่สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา LPO ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิซึ่งเป็นพิษกับอสุจิต่อต้านภาวะ oxidative stress ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของอสุจิสูงขึ้น (Kaeoket et al., 2008; Szczesniak-Fabianczyk et al., 2003) โมเลกุลของกรดอะมิโนสามารถจับกับชั้นฟอสโฟลิปิดของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิได้ดี และช่วยในการลดผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติก (Kundu et al., 2001) ลดการสะสมของกรดแลคติก (Flipse and Almquist, 1956) ป้องกันการเกิดบาดแผลของเยื่อหุ้มอสุจิ (Rudolph and Crowe, 1985) จากผลการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่าการเสริม L-cysteine สามารถเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรในส่วนของคุณภาพ VAP, VCL และลักษณะการเคลื่อนที่ ALH ของอสุจิตีกว่ากลุ่มที่ไม่เสริม L-cysteine ซึ่งเป็นลักษณะที่มีความสัมพันธ์ต่อ

ความสามารถในการเดินทางของอสุจิเพื่อไปยังจุดที่สามารถปฏิสนธิกับไข่ในท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์เพศเมีย (Pizzari and Parker, 2009)

สรุปผลการทดลอง

การปรับระยะสมดุลวิธีที่ 2 โดยนำน้ำเชื้อที่เจือจางไปปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 15 °C เป็นเวลา 150 นาที แล้วนำน้ำเชื้อบ่มต่อที่ตู้เก็บรักษาอุณหภูมิที่ 5 °C เป็นเวลา 90 นาที ด้วยการเสริม L-cysteine ที่ระดับความเข้มข้น 5 mM มีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรในส่วนของความเร็ว VAP, VCL และลักษณะการเคลื่อนที่ ALH ที่ดีที่สุด แต่ไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อสุจิรูปร่างผิดปกติ และความสมบูรณ์ของอะโครโซม

ข้อเสนอแนะ

ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรสามารถนำวิธีการมาปรับใช้เพื่อเป็นทางเลือกในการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรแบบแช่แข็งซึ่งกระทำการได้ในช่วงเวลาหนึ่งโดยเฉพาะวิธีการปรับระยะสมดุลของอสุจิ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระชนิดอื่นในน้ำยาเจือจางที่มีคุณสมบัติช่วยในการปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรได้ และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการนำไปผสมเทียมกับสุกรโดยตรงเพื่อศึกษาอัตราการผสมติด

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ(วช.) คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้อำนวยการศูนย์พัฒนาพันธุ์สุกร และ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อน และเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนที่ให้การช่วยเหลือสามารถดำเนินการวิจัยเป็นไปตามวัตถุประสงค์ พร้อมคุณจตุพร พงษ์เพ็ง ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี และคุณสายันท์ บัวบาน สำนักเทคโนโลยีชีวภาพและการผลิตปศุสัตว์ ที่ให้คำแนะนำตลอดการทดลองจนเสร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- เทวินทร์ วงษ์พระลับ. 2542. การสืบพันธุ์ในสัตว์เลี้ยง. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สมาคมผู้เลี้ยงสุกรแห่งชาติ. 2562. สถานการณ์อุตสาหกรรมสุกรและแนวโน้ม ปี 2562. แหล่งที่มา: <https://www.swinethailand.com>. 20 มีนาคม 2563.
- สุพาที กิจการคำ สุธี รัตนภิรมย์ ปิยวรรณ สุธรรมานันท์ กรไชย กรแก้วรัตน์ ปวีรพรต พูลเพิ่ม และอนุชัย ภิญโญ ภูมิมินทร์. 2554. ผลของการเติมน้ำตาลทรีฮาโลสในสารละลายระหว่างแช่แข็ง ระยะเวลาที่ทำให้เกิดสมดุลและความแตกต่างระหว่างพ่อสุกรต่อคุณภาพของอสุจิหลังอุ่นละลาย, วารสารสัตวแพทย์ ปีที่ 21 ฉบับที่ 2. หน้า 70-83.
- สุรัส ป้อมเมือง. 2549. การวิเคราะห์ต้นทุนและจุดคุ้มทุนของโครงการผลิตลูกสุกของสหกรณ์ผู้เลี้ยงสุกรสระบุรี จำกัด. มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่.
- Egerszeg, I., B. Berger, J. Ratky and F. Fischerleitner. 2014. Improving liquid semen preservation and fertilizing ability of frozen-thawed Mangalica semen with antioxidant treatments. Available source : <http://www.raumberg-gumpenstein.at/cm4/index.php/de/>

- forschung/publikationen/downloadsveranstaltungen/finish/1814-3516-wt-mangalica-samenkonservierung-a-hu/16160-improving-liquid-semen-preservation-and-fertilizing-ability-of-frozen-thawed-mangalica-semen-with-antioxidant-treatments.html, March 17, 2020.
- Flipse, R.J. and J.Q. Almquist. 1956. Diluters for bovine semen. IX. Motility of bovine spermatozoa in milk-glycine and egg yolk-glycine diluents with and without glycerol. Journal series of the pennsylvania agricultural experiment Station, 1690-1696.
- Holt, W.V., A. Medrano, L.M. Thurston and P.F. Watson. 2005. The significance of cooling and animal variability for boar sperm cryopreservation. Cryomicroscope Theriogenology. 63: 370-382.
- Hu, J.H., Q.W. Li, T. Zhang and Z.L. Jiang. 2009. Effect of Gynostemma Pentaphyllum Polysaccharide on boar spermatozoa quality following freezing-thawing. Cryobiology 59: 244-249.
- Kaeoket, K., K. Tantiparinyakul, W. Kladkaew, P. Chanapiwat and M. Techakumphu. 2008. Effect of different antioxidants on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. Thai Journal of Agricultural Science 41(1-2): 1-9.
- Kundu, C.N., K. Das. and G.C. Majumder. 2001. Effect of amino acids on cauda epididymal sperm cryopreservation using a chemically defined model system. Cryobiology 41: 21-27.
- Malo, C., L. Gil, N. Gonzalez, F. Martinez, R. Cano, I. de Blas and E. Espinosa. 2010. Anti-oxidant supplementation improve boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: Comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*) Cryobiology. 61: 142-147.
- Parks, J.E. and D.V. Lynch. 1992. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. Cryobiology. 29: 255-266.
- Pizzari, T. and G.A. Parker. 2009. Sperm competition and sperm phenotype. Sperm biology an evolutionary perspective 6: 207-245.
- Rudolph, A.S., and J.H. Crowe. 1985. Mambrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, trehalose and proline. Cryobiology 22: 367-377.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1981. Principles and Procedures of Statistics. A biometric Approach. McGraw-Hill Book Company, Inc., New York.
- Stewart, D.I. 1996. Glutathione as a treatment for male infertility. J. Reprod Fertil. 1: 6-12.
- Szczesniak-Fabianczyk, B., M. Bochenek, Z. Smorag and F. Ryszka. 2003. Effect of antioxidants added to boar semen extender on the semen survival time and sperm chromatin structure. Reproductive Biology 3(1): 81-87.
- Taylor, J. 1991. Bovine Semen Collection and Processing Techniques. 2nd ed. Canadian Association of Animal Breeders. International Livestock Management Schools. pp. 132.



- Teinthal, P., P. Chanapiwat, S. Manee-in, D. Gronsang and K. Kaeoket. 2012. Assessment of Appropriate L-cysteine Concentration for Boar Semen Cryopreservation by Using Flow Cytometry. *Thai Vet Med.* 42(4): 483-488.
- Thurston, L.M., K. Siggins, A.J. Mileham, P.F. Watson and W.V. Holt. 2002. Identification of amplified restriction fragment length polymorphism markers linked to genes controlling boar sperm viability following cryopreservation. *Biol. Reprod.* 66: 545-554.
- Tuncer, P.B., M.N. Bucak, S. Buyukleblebicity, 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-thawes bull semen. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 9(18): 2365-2370.
- Wagne, H.G. and M. Tibier. 2000. World statistics for artificial insemination in small ruminants and swine. *Proceedings of the 14th International congress on animal reproduction*: p. 77.

ความเข้มข้นของอสุจิในหลอดบรรจุน้ำเชื้อชนิด medium straw และชนิดน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ก่อนการผสมเทียมต่อระยะเวลาการมีชีวิตของอสุจิภายหลังการละลาย

เริงวุฒิ วรวุฒิ^{1/} จรรยาพร รุ่งเรืองศักดิ์^{2/} จุฬฉัตร ชาญปัญญา^{3/}

บทคัดย่อ

การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเข้มข้นของอสุจิในหลอดบรรจุน้ำเชื้อชนิด medium straw และชนิดน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนการผสมเทียมต่อระยะเวลาการมีชีวิตของอสุจิภายหลังการละลาย ในน้ำเชื้อสุกรสายพันธุ์ดอร์ค ลาร์จไวท์ และแลนด์เรซ สายพันธุ์ละ 3 ตัว รวม 9 ตัว จากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุ์สุกร จังหวัดนครราชสีมา การทดลองที่ 1 ศึกษาความเข้มข้นของอสุจิในหลอดบรรจุน้ำเชื้อ รีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ สัปดาห์ละครั้ง ติดต่อกัน 4 สัปดาห์ น้ำเชื้อที่รีดเก็บได้ถูกแบ่งออกเป็น 3 ส่วนเท่าๆ กัน คำนวณให้มีความเข้มข้น ตามกลุ่มทดลอง ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ความเข้มข้นของอสุจิ 0.5×10^9 ตัว/มิลลิลิตร กลุ่มที่ 2 ความเข้มข้นของอสุจิ 1×10^9 ตัว/มิลลิลิตร และกลุ่มที่ 3 ความเข้มข้นของอสุจิ 1.5×10^9 ตัว/มิลลิลิตร บรรจุน้ำเชื้อในหลอดขนาด 0.5 มิลลิลิตร (medium straw) และเข้าสู่กระบวนการแช่แข็ง ภายหลังการแช่แข็งทำการละลายน้ำเชื้อและสุ่มตรวจคุณภาพ น้ำเชื้อด้วยเครื่อง CASA ผลการทดลองพบว่าคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง ภายหลังการละลายในกลุ่มที่ 1 มีอัตราการเคลื่อนที่อสุจิ มากกว่ากลุ่มที่ 2 และ 3 (33.31 ± 10.81 , 31.42 ± 14.36 และ 26.47 ± 9.63 ตามลำดับ) ขณะที่อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าอสุจิของกลุ่มที่ 1 และ 2 ดีกว่ากลุ่มที่ 3 (11.36 ± 6.75 , 10.86 ± 6.43 และ 6.38 ± 6.01 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของชนิด สารละลายเจือจางน้ำเชื้อในก่อนการผสมเทียมต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลายโดยใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Duragen® BTS® และ Modena™ และใช้น้ำเชื้อแช่แข็งจากกลุ่มที่ 1 ของทดลองที่ 1 ซึ่งมีคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งดีว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญ พบว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด Duragen® มีคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรภายหลังการละลายในชั่วโมงที่ 2 สูงกว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด BTS® และ Modena™ ในขณะที่อสุจิมีชีวิตและความสมบูรณ์ของอะโครโซม เมื่อละลายด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Duragen® และ Modena™ มีค่าสูงกว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด BTS®

คำสำคัญ: ความเข้มข้นอสุจิน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร อสุจิมีชีวิต

เลขทะเบียนวิจัย: 61(1)-(60:03)-0208-025

^{1/}ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพราชบุรี อ.โพธาราม จ.ราชบุรี

^{2/}สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ อ.เมือง จ.ปทุมธานี

^{3/}ศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งลำพญากลาง อ.ลำสนธิ จ.ลพบุรี

Spermatozoa concentration in medium straw and extender for artificial insemination on survival time after thawed semen

Roengwut Worawut^{1/} Janyaporn Rungruangsak^{2/} Jullachat Chapanya^{3/}

Abstract

The present experiments aimed to evaluate the effects of sperm concentration on medium-straw frozen-thawed boar semen quality and the effect of different semen extenders on survival time after thawing frozen semen. The semen samples that were used from nine mature boars (3 Duroc boars, 3 Landrace boars and 3 Large white boars) aged between 2 to 3 years old in Swine Research and Development Center in Nakhonratchasima province. For the first experiment which aimed to evaluate the effects of sperm concentration on medium-straw frozen-thawed boar semen quality, the semen samples were collected at one-week interval over a 4-week period, and the diluted semen was divided equally into 3 groups before being loaded into 0.5 medium straws; group 1: the sperm concentration at 0.5×10^9 sperm per dose, group 2: the sperm concentration at 1×10^9 sperm per dose, and group 3: the sperm concentration at 1.5×10^9 sperm per dose. The straws from each group were used to continue the process of frozen-thawed boar semen production. After frozen semen production, the frozen semen samples were sampled for quality evaluation using CASA. The results showed frozen-thawed boar semen quality including motility from group 1 was higher than group 2 and 3 (33.31 ± 10.81 , 31.42 ± 14.36 and 26.47 ± 9.63 , respectively) and progressive motility from group 1 and 2 were higher than group 3 (11.36 ± 6.75 , 10.86 ± 6.43 and 6.38 ± 6.01 respectively) with statistical significance. For the second experiment that aimed to evaluate the effect of different commercial semen extenders; namely Duragen[®], BTS[®] and Modena[™] on frozen semen quality after two hours of thawing. All frozen semen straws in the second experiment, were from group 1 in the first experiment that was significantly better than the other groups. The results showed that Duragen[®] provided better quality of frozen-thawed boar semen at 2 hours after thawing, than BTS[®] and Modena[™] whereas Duragen[®] and Modena[™] provided better sperm viability and acrosomal integrity than BTS[®].

Keywords: Concentration, Boar frozen semen, living sperm

Registered No: 61(1)-(60:03)-0208-025

^{1/}Ratchaburi Artificial Insemination and Biotechnology, Photaram district, Ratchaburi Province

^{2/}Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Muang district, Pathum Thani province

^{3/}Lamphayaklang Frozen Semen Production Center, Lamsonti district, Lopburi province

คำนำ

สุกรเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ให้ลูกเป็นครอก โดยจำนวนลูกต่อครอกเฉลี่ย 10-12 ตัว การผสมเทียมที่ผ่านมาจึงนิยมใช้น้ำเชื้อสดที่เจือจางด้วยสารละลายปริมาณ 80-100 มิลลิลิตร และแต่ละครั้งต้องมีจำนวนอสุจิ 3×10^9 - 4×10^9 ล้านตัว ในขณะที่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นนิยมผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งและใช้จำนวนอสุจิน้อยกว่า เช่น น้ำเชื้อแช่แข็งโคบรจุในหลอดขนาด 0.25 มิลลิลิตร จะมีจำนวนอสุจิประมาณ 20 ล้านตัว ส่วนน้ำเชื้อแช่แข็งแพะและแกะในหลอดขนาด 0.25 มิลลิลิตร จะมีจำนวนอสุจิ 100-200 ล้านตัว ทั้งนี้การผสมเทียมสุกรด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งก็ต้องการปริมาณสารละลายและจำนวนอสุจิสูงกว่าสัตว์อื่น (Buranaamnuy et al., 2010)

ดังนั้นการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรจึงนิยมบรรจุในภาชนะหลายรูปแบบ หรือใช้หลอดบรรจุขนาด 0.5 มิลลิลิตร (medium straw) เพื่อให้แต่ละหลอดสามารถบรรจุจำนวนอสุจิมากที่สุด และใช้จำนวนหลอดน้ำเชื้อน้อยที่สุดในการเทียมแต่ละครั้ง เพื่อให้สะดวกในการใช้งาน และเป็นการประหยัดพื้นที่ในการจัดเก็บ จากรายงานของ Fernando et.al., (2005) พบว่าการบรรจุน้ำเชื้อสุกรที่ระดับความเข้มข้นของอสุจิ 2×10^9 ตัว/มิลลิลิตร ภายหลังการละลายอสุจิมีอัตราการเคลื่อนที่ร้อยละ 37-46 และรายงานของ Tuempong et al., (2006) พบว่าการบรรจุน้ำเชื้อสุกรที่ระดับความเข้มข้น 1×10^9 ตัว/มิลลิลิตร ภายหลังการละลายอสุจิมีอัตราการเคลื่อนที่ถึงร้อยละ 42.8 และเมื่อนำไปใช้ในการผสมเทียม Kaeoket et al., (2005) พบว่าการผสมเทียมสุกรด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีความเข้มข้นของอสุจิ 2×10^9 ตัว/มิลลิลิตร มีอัตราการผสมติดสูงกว่าการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งที่มีความเข้มข้นของอสุจิ 1×10^9 ตัว/มิลลิลิตร

การเตรียมน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรสำหรับการผสมเทียมต้องเจือจางน้ำเชื้อก่อนการผสมเทียมสุกร เพื่อเพิ่มปริมาณให้เพียงพอในการนำพาอสุจิเข้าสู่ระบบสืบพันธุ์เพศเมีย และคงสภาพความสมบูรณ์และมีชีวิตอยู่ของอสุจินานพอ ในการเข้าปฏิสนธิกับไข่ตัวเมีย (Vyt et al., 2007) ซึ่งน้ำยาเจือจางดังกล่าวมีองค์ประกอบของสารที่จำเป็นเพื่อเป็นแหล่งพลังงานให้อสุจิ และที่สำคัญต้องมีแรงดันออสโมติกและค่าความเป็นกรด-ด่าง ใกล้เคียงกับน้ำเชื้อที่ผ่านการปรับสมดุลในขบวนการแช่แข็งมาแล้ว ซึ่งจะมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไปจากน้ำเชื้อสด อีกทั้งต้องไม่เกิดปฏิกิริยาอันเป็นพิษกับของเหลวภายในระบบสืบพันธุ์เพศเมียและเกษตรกรสามารถหาได้ง่าย มีจำหน่ายโดยทั่วไป เช่น IVT[®] BTS[®] KIEV[®] ModenaTM Androhep[®] เป็นต้น

ดังนั้นจึงทำการศึกษาความเข้มข้นของอสุจิในหลอดบรรจุน้ำเชื้อชนิด medium straw ในระดับที่แตกต่างกัน และเปรียบเทียบชนิดน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนการผสมเทียมต่อระยะเวลาการมีชีวิตของอสุจิภายหลังการละลายในชั่วโมงที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

พ่อพันธุ์สุกรสายพันธุ์คร็อก ลาร์จไวท์ และแลนด์เรซ ที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ อายุระหว่าง 2-3 ปี สายพันธุ์ละ 3 ตัว จำนวน 9 ตัว จากศูนย์วิจัยและพัฒนาสุกร จังหวัดนครราชสีมา รีดเก็บน้ำเชื้อโดยใช้เทคนิคการใช้มือบีบขวดที่ปลายอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (gloved hand technique) สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 4 สัปดาห์ติดต่อกัน โดยน้ำเชื้อสดที่นำมาผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งต้องมีค่าความผิดปกติของอสุจิในส่วนหัวและส่วนหางไม่เกิน 12% และ 25% ตามลำดับ และมีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่ต่ำกว่า 70%

การวางแผนการทดลอง

การทดลองที่ 1 การเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของอสุจิในหลอดบรรจุน้ำเชื้อชนิด medium straw

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) กำหนดให้สายพันธุ์พ่อสุกรเป็นบล็อก (block) โดยนำน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สุกรที่รีดเก็บได้เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด Duragen® (Magapor, Spain) อัตราส่วน 1:1 (v/v) บรรจุในหลอดทดลอง และวางในภาชนะที่หล่อด้วยน้ำให้มีระดับเดียวกันกับของเหลวภายในขวด บ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส นาน 120 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 800 x g อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งโดยดัดแปลงจากวิธีของ Buranaamnuay et al., (2009) ด้วยการแยกเอาส่วนของส่วนบนทิ้ง เจือจางด้วย lactose-egg yolk (20% ไข่แดง ในสารละลาย 11% แลคโตส) ให้อสุจิมีความเข้มข้น 1.5×10^9 ตัว/มิลลิลิตร และแช่เย็นที่ 4 °C นาน 120 นาที หลังจากนั้นเจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง LEY ผสมกับ 9% glycerol และ 1.5% Equex-STM ให้มีความเข้มข้นของอสุจิเพื่อนำไปบรรจุในหลอดน้ำเชื้อชนิด medium straw แตกต่างกัน 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ความเข้มข้น 0.5×10^9 ตัว/มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 2 ความเข้มข้น 1.0×10^9 ตัว/มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 3 ความเข้มข้น 1.5×10^9 ตัว/มิลลิลิตร

การบรรจุและการแช่แข็ง

บรรจุน้ำเชื้อด้วยหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปอังไว้เหนือไอโนโตรเจน 3-4 เซนติเมตร อุณหภูมิประมาณ -120 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และเก็บรักษาไว้ภายใต้ระดับไนโตรเจนเหลวเพื่อตรวจคุณภาพน้ำเชื้อต่อไป

การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของอสุจิในหลอดบรรจุน้ำเชื้อชนิด medium straw

ตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลาย ด้วยการตรวจอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (motility) และความผิดปกติของอสุจิ (abnormal morphology) ด้วยเครื่อง CASA (Computer Assisted Sperm Analyzer; IVOS II Motility Analyzer version, Hamilton-Thorne, Biosciences, MA., USA.) และความเข้มข้นของอสุจิด้วย hemocytometer โดยสุ่มน้ำเชื้อแช่แข็งจากทุกชุดการผลิตๆ ละ 3 หลอดต่อพ่อพันธุ์สุกร ละลายน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรด้วยวิธีการอุ่นในน้ำที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 12 วินาที และตัวอย่างบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตลอดการตรวจคุณภาพ ดังต่อไปนี้

1) อัตราการเคลื่อนที่ (motility; %) อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility; %)

2) ความเร็วในการเคลื่อนที่ ได้แก่

- Average Path Velocity (VAP; $\mu\text{m/s}$) หมายถึง ความเร็วในการเคลื่อนที่เฉลี่ยจากระยะทางจริงใน 1 วินาที

- Straight Line Velocity (VSL; $\mu\text{m/s}$) หมายถึง ความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีตรง เป็นการคำนวณจากจุดหนึ่งไปยังอีกจุดหนึ่งในแนวเส้นตรงในช่วงระยะเวลา 1 วินาที

- Curvilinear Velocity (VCL; $\mu\text{m/s}$) หมายถึง ความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีโค้ง เป็นการคำนวณแนวโน้มของการเคลื่อนที่เฉลี่ยใน 1 วินาที

3) ลักษณะการเคลื่อนที่ ได้แก่

- Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH; μm) หมายถึง ความกว้างของส่วนหัวของอสุจิที่ส่ายไปมา
 - Beat Cross Frequency (BCF; Hz) หมายถึง ความถี่ของการส่ายส่วนหัวของอสุจิ
 - Straightness (STR; %) หมายถึง ความตรงในการเคลื่อนที่ ซึ่งคำนวณจากอัตราส่วนความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีตรง (VSL) ต่อความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (VAP) คูณด้วยร้อย
 - Linearity (LIN; %) หมายถึง อัตราส่วนความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีตรงต่อความเร็วเฉลี่ยของการเคลื่อนที่วิถีโค้ง (VCL) คูณด้วยร้อย
 - Wobble (WOB; %) หมายถึง อัตราส่วนความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (VAP) ต่อความเร็วเฉลี่ยของการเคลื่อนที่วิถีโค้ง (VCL) คูณด้วยร้อย
- 4) ความผิดปกติในส่วนหางของอสุจิโดยใช้โปรแกรมตรวจความผิดปกติอสุจิด้วยเครื่อง CASA
- 5) อสุจิมีชีวิตและความสมบูรณ์ของอะโครโซมด้วยเครื่อง flow cytometer (Attune NxT, Thermo Fisher Scientific, USA) ดังนี้
- ความสมบูรณ์ของอะโครโซมโดยย้อมด้วยสี FITC-PNA (Lectin PNA From Arachis hypogaea (peanut), Alexa Fluor™ 488, Thermo Scientific, Kalamazoo, MI, L21409.) และ PI (LIVE/DEAD Sperm Viability Kit ,Molecular Probes) ตามวิธีการของ Nagy et al., (2003) นับจำนวนอสุจิทั้งสิ้น 10,000 ตัวอสุจิ

การทดลองที่ 2 การเปรียบเทียบผลของชนิดของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนผสมเทียม 3 ชนิด

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) กำหนดให้สายพันธุ์พ่อสุกรเป็นบล็อก (block) โดยทำการสุมน้ำเชื้อแช่แข็งจากทุกชุดการผลิต ชุดละ 5 หลอดต่อพ่อพันธุ์สุกร โดยใช้หลอดน้ำเชื้อแช่แข็งจากกลุ่มของความเข้มข้นอสุจิในหลอดบรรจุน้ำเชื้อชนิด medium straw ที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 นำไปละลายน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรด้วยวิธีการอุ่นในน้ำที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 12 วินาที จากนั้นเติมน้ำยาเจือจางในอัตราส่วน น้ำเชื้อแช่แข็งสุกร 1 ส่วน ต่อน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ 10 ส่วน (1:10) โดยมีชนิดของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนผสมเทียม 3 ชนิด ดังนี้

ชนิดที่ 1 คือ BTS®

ชนิดที่ 2 คือ Duragen®

ชนิดที่ 3 คือ Modena™

จากนั้นบ่มตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตลอดการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง ทั้งนี้ การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง ทำการตรวจวิเคราะห์เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วย one-way analysis of variance (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบผลเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's multiple comparison test กำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับร้อยละ 95 ($P < 0.05$) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ R commander version 3.5.2 (R Core Team, 2018)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การเปรียบเทียบความเข้มข้นของอสุจิในหลอดบรรจุน้ำเชื้อชนิด medium straw

Table 1 Semen quality of frozen-thawed boar semen from three different sperm concentrations (mean $\pm$ SD)

Parameters (%)	Treatment		
	0.5x10 ⁹ sperm/dose (N=36)	1x10 ⁹ sperm/dose (N=36)	1.5x10 ⁹ sperm/dose (N=36)
Total motility	33.31 ^a $\pm$ 10.81	31.42 ^b $\pm$ 14.36	26.47 ^b $\pm$ 9.63
Progressive motility	11.36 ^a $\pm$ 6.75	10.86 ^a $\pm$ 6.43	6.38 ^b $\pm$ 6.01
<u>Velocity</u>			
VAP (μ m/s)	82.65 $\pm$ 12.90	80.64 $\pm$ 10.90	79.80 $\pm$ 13.55
VSL (μ m/s)	57.53 $\pm$ 10.96	56.04 $\pm$ 9.97	51.98 $\pm$ 12.51
VCL (μ m/s)	176.70 $\pm$ 25.08	163.12 $\pm$ 24.20	158.03 $\pm$ 31.67
<u>Kinematic movement</u>			
ALH (μ m)	6.70 ^b $\pm$ 1.36	6.90 ^b $\pm$ 1.29	7.73 ^a $\pm$ 1.16
BCF (Hz)	32.14 ^b $\pm$ 3.31	34.38 ^a $\pm$ 3.27	34.16 ^a $\pm$ 3.56
STR (%)	72.83 ^a $\pm$ 6.29	70.66 ^a $\pm$ 5.20	65.54 ^b $\pm$ 9.00
LIN (%)	40.26 ^a $\pm$ 7.39	37.88 ^a $\pm$ 5.20	33.52 ^b $\pm$ 6.71
WOB (%)	53.29 ^a $\pm$ 5.35	51.91 ^b $\pm$ 4.23	49.34 ^b $\pm$ 3.39
<u>Sperm with tail defects</u>			
Bent tail	16.44 $\pm$ 5.38	19.48 $\pm$ 6.21	20.06 $\pm$ 4.63
Coiled tail	2.81 $\pm$ 1.25	2.75 $\pm$ 1.94	2.22 $\pm$ 1.09
Proximal droplet	9.22 ^b $\pm$ 4.11	10.18 ^b $\pm$ 4.17	11.71 ^a $\pm$ 4.36
Distal droplet	9.27 ^b $\pm$ 3.59	8.77 ^b $\pm$ 2.06	10.56 ^a $\pm$ 2.59

^{ab} Different superscripts within the same row demonstrate significant differences (P<0.05)

จากการวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) ผลการวิเคราะห์พบว่า สายพันธุ์สุกร (block) มีอิทธิพลต่อกลุ่มทดลอง (P<0.05) จึงพิจารณาผลของความเข้มข้นของอสุจิต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งภายหลังการทดลองโดยผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรภายหลังการละลายในกลุ่มความเข้มข้น 0.5x10⁹ตัว/มิลลิลิตร จาก Table 1 พบว่าอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่ากลุ่ม 1x10⁹ และ 1.5x10⁹ ตัว/มิลลิลิตรอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในขณะที่อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าในกลุ่มความเข้มข้น 0.5x10⁹ และกลุ่ม 1x10⁹ ตัว/มิลลิลิตร สูงกว่ากลุ่ม 1.5x10⁹ ตัว/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ลักษณะการเคลื่อนที่แบบ ALH และ BCF ของกลุ่มความเข้มข้นของอสุจิ 0.5x10⁹ และ 1x10⁹ ตัว/มิลลิลิตร พบว่าต่ำกว่ากลุ่ม 1.5x10⁹ ตัว/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) สำหรับลักษณะการเคลื่อนที่แบบ STR LIN และ WOB พบว่ากลุ่มความเข้มข้นอสุจิ 0.5x10⁹ และ 1x10⁹ ตัว/มิลลิลิตร พบว่าสูงกว่ากลุ่มความเข้มข้นอสุจิ 1.5x10⁹ ตัว/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรภายหลังการละลายจากทั้ง 3 กลุ่ม พบว่าความผิดปกติแบบ Proximal droplet และ Distal droplet ของกลุ่มความเข้มข้นอสุจิ 0.5x10⁹

และ 1×10^9 ตัว/มิลลิลิตร มีค่าต่ำกว่ากลุ่มความเข้มข้นอสุจิ 1.5×10^9 ตัว/มิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ความเข้มข้นของอสุจิในหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งจำนวนที่น้อยกว่ามีอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าที่สูงกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีความเข้มข้นของอสุจิในหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งจำนวนที่มากกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องจาก จำนวนอสุจิที่มากเกินไปในหลอดน้ำเชื้อที่มีสารละลายจำนวนจำกัดมีความต้องการใช้พลังงานที่มากกว่า ทำให้สารที่จำเป็นในการเคลื่อนที่หรือกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ไม่เพียงพอ รวมถึงการเกิดอนุมูลอิสระจากอสุจิในปริมาณที่มากกว่า ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อเยื่อหุ้มอสุจิทั้งในระหว่างขั้นตอนการปรับสมดุลอสุจิ (equilibration) ขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อ และขั้นตอนการละลายน้ำเชื้อ ดังนั้นการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีอสุจิจำนวนมากต่อหลอดน้ำเชื้อ จึงส่งผลเสียต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลาย นอกจากนี้ การเติมสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (cryoprotectant) ที่เป็นส่วนประกอบอย่างหนึ่งในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อเพื่อช่วยป้องกันอสุจิจากการแช่แข็ง จากการทดลองนี้มีการเติมสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งโดยใช้ glycerol ที่มีความเข้มข้นเท่ากัน ดังนั้น เมื่อมีการเติมอสุจิในจำนวนที่มากกว่าลงในหลอดน้ำเชื้อ จะทำให้มีอัตราส่วนของปริมาณสาร glycerol ที่ทำหน้าที่ cryoprotection ให้แก่อสุจิเป็นอัตราส่วนต่ออสุจิในปริมาณที่น้อยกว่า ทำให้เมื่อเข้าสู่กระบวนการแช่แข็งนั้น หลอดที่มีอสุจิจำนวนที่มากกว่า จึงเกิดความเสียหายต่ออสุจิที่มากกว่า และส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง

ในแนวทางเดียวกันกับการศึกษาความเข้มข้นของอสุจิในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งในสัตว์ชนิดอื่น เช่น จากการศึกษาของ Alvarez et al., (2012) ที่พบว่าเมื่อความเข้มข้นของอสุจิในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งและมีจำนวนที่มาก จะส่งผลเสียต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งและความสมบูรณ์พันธุ์ นอกจากนี้ Nascimento et al., (2008) ที่ทำการศึกษาผลของคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งมาภายหลังการละลายที่มีความเข้มข้นของอสุจิในจำนวนที่แตกต่างกัน พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ ที่ความเข้มข้นของอสุจิประมาณ 2×10^6 ตัวอสุจิต่อหลอดน้ำเชื้อสูงกว่า น้ำเชื้อที่มีความเข้มข้นของอสุจิประมาณ 4×10^6 และ 8×10^6 ตัวอสุจิต่อหลอด โดยที่ความเข้มข้นของอสุจิที่ 8×10^6 ตัวอสุจิต่อหลอดน้ำเชื้อมีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิที่น้อยที่สุด ส่วนการศึกษาน้ำเชื้อแช่แข็งในสุนัขของ Peña and Linde-Forsberg (2000) ที่ศึกษาคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลาย พบว่าการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุนัขที่ระดับความเข้มข้น 200×10^6 ตัวอสุจิ ต่อหลอดน้ำเชื้อ มีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิที่ดีกว่า น้ำเชื้อแช่แข็งสุนัขที่มีระดับความเข้มข้น 400×10^6 ตัวอสุจิต่อหลอดน้ำเชื้อ

การเปรียบเทียบผลของชนิดของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนผสมเทียม

จากการวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) ผลการวิเคราะห์พบว่า สายพันธุ์สุกร (block) มีอิทธิพลต่อกลุ่มทดลอง ($P < 0.05$) จึงพิจารณาผลของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนการผสมเทียมต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังทำการละลาย ตามแผนการทดลอง โดยผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรภายหลังการละลายจากสารละลายเจือจางน้ำเชื้อทั้ง 3 ชนิด (Table 2) ได้แก่ BTS® Duragen® และ Modena™ โดยใช้หลอดน้ำเชื้อแช่แข็งจากกลุ่มของความเข้มข้นอสุจิในหลอดบรรจุน้ำเชื้อชนิด medium straw ที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 คือที่ความเข้มข้น 0.5×10^9 ตัว/มิลลิลิตร โดยผลการศึกษาพบว่า กลุ่มที่ใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อแบบ Duragen® มีอัตราการเคลื่อนที่ที่สูงกว่าใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อแบบ BTS® และ Modena™ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าในกลุ่มที่ใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อแบบ Duragen® และ Modena มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อแบบ BTS® อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ร้อยละของอสุจิมีชีวิตและอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ของกลุ่มที่ใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด



Duragen® และ Modena™ สูงกว่ากลุ่มที่ใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด BTS® ($P < 0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อแบบ Modena™ และแบบ Duragen® ($P > 0.05$)

Table 2 Sperm motility parameters of frozen-thawed boar semen from three different extenders at concentration of 0.5×10^9 sperm per dose (mean $\pm$ SD)

Parameters (%)	Treatment		
	BTS® (N=36)	Duragen® (N=36)	Modena™ (N=36)
Total motility	28.61 ^b $\pm$ 10.05	39.20 ^a $\pm$ 7.02	33.95 ^b $\pm$ 11.86
Progressive motility	8.02 ^b $\pm$ 4.73	12.53 ^a $\pm$ 3.84	12.47 ^a $\pm$ 8.24
<u>Velocity</u>			
VAP ($\mu\text{m/s}$)	79.20 $\pm$ 10.26	80.59 $\pm$ 12.78	82.04 $\pm$ 10.58
VSL ($\mu\text{m/s}$)	52.95 $\pm$ 8.34	56.55 $\pm$ 9.06	58.63 $\pm$ 11.50
VCL ($\mu\text{m/s}$)	161.99 $\pm$ 25.34	156.87 $\pm$ 31.50	168.25 $\pm$ 16.76
<u>Kinematic movement</u>			
ALH (μm)	6.77 $\pm$ 1.52	6.57 $\pm$ 1.53	7.25 $\pm$ 0.73
BCF (Hz)	35.34 $\pm$ 3.38	35.00 $\pm$ 3.41	33.07 $\pm$ 2.74
STR (%)	69.30 $\pm$ 5.31	70.87 $\pm$ 4.77	71.81 $\pm$ 5.30
LIN (%)	37.14 $\pm$ 5.63	39.17 $\pm$ 4.63	37.76 $\pm$ 5.22
WOB (%)	51.79 $\pm$ 4.41	53.71 $\pm$ 4.38	50.86 $\pm$ 3.74
STR (%)	69.30 $\pm$ 5.31	70.87 $\pm$ 4.77	71.81 $\pm$ 5.30
<u>Sperm with tail defects</u>			
Bent	19.96 $\pm$ 7.52	20.18 $\pm$ 4.78	18.56 $\pm$ 5.85
coil	3.40 $\pm$ 2.53	2.03 $\pm$ 0.71	2.62 $\pm$ 1.71
proximal	10.24 $\pm$ 5.22	10.20 $\pm$ 2.99	10.11 $\pm$ 3.90
Distal droplet	8.57 $\pm$ 2.21	9.50 $\pm$ 1.69	8.49 $\pm$ 2.11
<u>Sperm quality</u>			
Sperm viability	43.14 ^b $\pm$ 10.35	59.36 ^a $\pm$ 10.31	56.56 ^a $\pm$ 11.92
Intact acrosome	39.59 ^b $\pm$ 8.60	52.32 ^a $\pm$ 8.06	50.05 ^a $\pm$ 9.74

^{ab} Different superscripts within the same row demonstrate significant differences ($P < 0.05$)

น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อในการทดลองครั้งนี้เป็นน้ำยาเจือจางที่นิยมใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นซึ่งมีจำหน่ายทั่วไปในท้องตลาด ได้แก่ BTS® Modena™ และ Duragen® ซึ่งน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด BTS® เป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่ถูกพัฒนาจาก Pursel and Johnson (1975) โดยมีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำตาลกลูโคส โซเดียมซิเตรท โซเดียมและไฮโดรเจนคาร์บอเนต ซึ่งสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ในระยะสั้นคือประมาณ 3 วัน (short term semen extender) ในขณะที่สารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด Modena® สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 5-7 วัน (long term semen extender) สำหรับสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด Duragen® เป็น

น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ที่ถูกพัฒนาจาก Pursel and Johnson (1975) โดยมีองค์ประกอบหลักเป็นน้ำตาลกลูโคส โซเดียมซิเตรท โซเดียมและไฮโดรเจนคาร์บอเนต ซึ่งสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ในระยะสั้นคือประมาณ 3 วัน (short term semen extender) ในขณะที่สารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด Modena[®] สามารถเก็บรักษา น้ำเชื้อได้นาน 5-7 วัน (long term semen extender) สำหรับสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด Duragen[®] เป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานถึง 10-12 วัน โดยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด Modena[®] มีองค์ประกอบที่แตกต่างจากสารละลาย BTS[®] ได้แก่ bovine serum albumin (BSA) hydroxymethylaminomethane (TRIS) และ cysteine ซึ่งจากการศึกษาของ Sano (2005) พบว่าการเติม GSSG, BSA, Lcysteine และ lycopene ช่วยเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อในช่วงระยะเวลาการแช่เย็นได้ (cold storage) โดย BSA มีหน้าที่ช่วยในการคงแรงดันออสโมติกของสารละลาย และ cysteine มีคุณสมบัติในการ ยับยั้งการเกิด capacitation ของอสุจิ รวมทั้งช่วยรักษาความคงตัวของพลาสมาเมมเบรน (membrane stabilizer) ของตัวอสุจิด้วย (Johnson et al., 2000) รวมถึงองค์ประกอบของสารละลาย Tris ในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด ModenaTM ยังช่วยในการควบคุม pH ของสารละลายไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปตามอุณหภูมิที่ เปลี่ยนไป (Gadea, 2003) นอกจากนี้สารละลาย ModenaTM ยังมีส่วนประกอบของ EDTA ที่สูงกว่าสารละลาย เจือจางน้ำเชื้อชนิด BTS[®] ซึ่ง EDTA เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการ จับกับแคลเซียมในน้ำเชื้อ ช่วยในการป้องกัน ระดับแคลเซียมภายในเซลล์ของอสุจิสูงขึ้น จากกระบวนการแช่แข็ง ซึ่งจะกระตุ้นกระบวนการเกิดกระบวนการ capacitation และทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง (Luconi et al., 2006) จากองค์ประกอบที่มีความ แตกต่างกันจึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้อสุจิที่ทำละลายด้วย สารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด ModenaTM มีร้อยละอสุจิมีชีวิตและความสมบูรณ์ของโครโมโซมที่สูงกว่าเมื่อ ทำละลายด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด BTS[®] สอดคล้อง กับผลการศึกษาของ Chanapiwat et al., (2008) ซึ่งศึกษาคุณภาพของน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งระหว่างกลุ่มที่ใช้ สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ BTS[®] และสารละลายเจือจาง น้ำเชื้อ ModenaTM ในขั้นตอนการลดอุณหภูมิที่ 15 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ไป ข้างหน้าและ ความสมบูรณ์ของอะโครโซม ในกลุ่มสารละลาย ModenaTM มีเปอร์เซ็นต์ที่สูงกว่าสารละลาย BTS[®] อย่างมีนัยสำคัญ แต่อย่างไรก็ตามองค์ประกอบของสารละลายเจือจางชนิด long term extender หลายชนิดไม่ เปิดเผยองค์ประกอบอาจเพราะเหตุผลทางการค้าเช่น Duragen[®] นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Kaeoket et al. (2010) ที่ทำการศึกษาสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแบบ เก็บรักษาน้ำเชื้อยาวนาน 6 ชนิด ได้แก่ Merck-III, Androstar[®] Plus, ModenaTM , NUTRIXcell[®], VITASEM LD, Duragen[®] และ Dofu goldTM โดย เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ซึ่งหลังจากเก็บน้ำเชื้อไว้นาน 8 วัน พบว่า อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของ อสุจิที่ใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิดเก็บรักษาน้ำเชื้อยาวนาน (long term semen extender) ได้แก่ Androstar[®] Plus, ModenaTM และ Duragen[®] สามารถรักษาอัตราการ เคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และ ความสมบูรณ์ของอะโครโซมที่มีประสิทธิภาพได้ถึง ร้อยละ 70 แสดงให้เห็นว่า สารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิดเก็บ รักษาน้ำเชื้อยาวนาน มีส่วนประกอบที่ซับซ้อนและสามารถใช้รักษาคุณภาพของ อสุจิได้ดีกว่าสารละลายเจือจาง น้ำเชื้อชนิดเก็บรักษาน้ำเชื้อสั้น

สรุปผลการทดลอง

ความเข้มข้นของอสุจิในหลอดบรรจุน้ำเชื้อชนิด medium straw ที่ความเข้มข้น 0.5×10^9 มีค่าคุณภาพน้ำเชื้อสูงกว่าที่ความเข้มข้น 1.0×10^9 และ 1.5×10^9 ตัว/มิลลิลิตร โดยมีค่าอัตราการเคลื่อนที่ ดีที่สุด ในขณะที่ชนิดน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนการผสมเทียมชนิด ระยะยาว ยี่ห้อ Duragen[®] เป็นน้ำยาเจือจางที่ เหมาะสมสำหรับการเจือจางน้ำเชื้อก่อนการผสมเทียมเนื่องจากมีผลทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจีก่อนการละลาย ที่สูงกว่าชนิด BTS[®] และ ModenaTM ในขณะที่อสุจิมีชีวิตและความสมบูรณ์ของอะโครโซมเมื่อละลายด้วยน้ำยา เจือจางน้ำเชื้อชนิด Duragen[®] และ ModenaTM มีค่าสูงกว่าใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด BTS[®]

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) คณะผู้วิจัย ขอขอบคุณ ผู้อำนวยการศูนย์พัฒนาพันธุ์สุกร และ ผู้อำนวยการ และเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ที่ให้การช่วยเหลือและสนับสนุนให้สามารถดำเนินการวิจัยเป็นไปตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

- Alvarez, M., J. Tamayo-Canul, E. Anel, J. Boixo, C. Mata-Campuzano, M. Martinez-Pastor and P. de Paz. 2012. Sperm concentration at freezing affects post-thaw quality and fertility of ram semen. *Theriogenology*. 77(6):1111-1118.
- Buranaamnuay, K., P. Tummaruk, J. Singlor, H. Rodriguez-Martinez and M. Techakumphu. 2009. Effects of straw volume and Equex-STM® on boar sperm quality after cryopreservation. *Reproduction in Domestic Animals*. 44(1):69-73.
- Buranaamnuay, K., P. Tummaruk and M. Techakumphu. 2010. Intra-uterine insemination with Low numbers of frozen-thawed boar spermatozoa in spontaneous and induced ovulation sows under field conditions. *Livestock Science*. 131:115-118.
- Chanapiwat, P., K. Kaeoket and P. Tummaruk. 2008. Quality of cryopreserved boar semen after using BTS compared with MODENA extender during the holding time. 46. Kasetsart University annual conference. Thailand.
- Fernando, S., M. Wallgren, S. Nagy, A. Johannisson and H. Rodriguez-Martinez. 2005. Deep freezing of concentrated boar semen for intra-uterine insemination: effect on sperm viability. *Theriogenology*. 63:1320-1333.
- Funahashi, H. and T. Sano. 2005. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10°C. *Theriogenology*. 63(6):1605-1616.
- Johnson, L.A., J.G. Aalbers and H.J.G. Groote. 1988. Artificial insemination of swine: Fecundity of boar semen stored in Beltsville Thawing Solution (BTS), modified Modena (MM), or MR-A and inseminated on one, three and four days after collection. *Zuchthyg*. 23:49-55.
- Kaeoket, K., T. Srisowanna, U. Wichaidit, P. Chanapiwat and S. Manee-in. 2010. Comparative study on six different long-term commercial extenders for fresh boar semen. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*. 40(3):257-263.
- Luconi, M., G. Forti and E. Baldi. 2006. Pathophysiology of sperm motility. *Front Biosci*. 11: 1433-1447.
- Nagy, S., J. Jansen, E.K. Topper and B.M. Gadella. 2003. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. *Biology of Reproduction*. 68(5):1828-1835.
- Nascimento, J., C. Raphael, F. Andrade, A. Alonso, M. Celeghini and R.P. Arruda. 2008. Effects of sperm concentration and straw volume on motion characteristics and plasma, acrosomal, and mitochondrial membranes of equine cryopreserved spermatozoa. *Journal of Equine Veterinary Science*. 28(6):351-358.



- Peña, A. and C. Linde-Forsberg. 2000. Effects of spermatozoal concentration and post-thaw dilution rate on survival after thawing of dog spermatozoa. *Theriogenology*. 54(5):703-718.
- Pursel, V.G. and L.A. Johnson. 1975. Freezing of boar spermatozoa: fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. *Journal of animal science*. 40(1):99-102.
- R Core Team. 2018. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria.
- Tuempong, W., F. Saravia, M. Wallgren, I. Caballero and H. Rodriguez-Martinez. 2006. Fertility after deep intra-uterine artificial insemination of concentrated low-volume boar semen doses. *Theriogenology*. 65:773-787.
- Vyt, P. 2007. Examination and storage of liquid porcine semen. Thesis to obtain the academic degree of Doctor of Veterinary Science (PhD), Faculty of Veterinary Medicine, Ghent University.

ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนโคในประเทศไทย

พิงค์ลานนา ภูษธร^{1/} กอบสุข ทองสอดแสง^{2/}

บทคัดย่อ

เทคโนโลยีการผลิตลูกโคจากการย้ายฝากตัวอ่อนเป็นเทคโนโลยีทางด้านระบบสืบพันธุ์ที่สามารถเพิ่มจำนวนสัตว์พันธุ์ดีเป็นจำนวนมากได้ในเวลาอันรวดเร็ว แต่มีต้นทุนค่าใช้จ่ายในการผลิตที่สูง เพื่อความคุ้มค่าต่อการลงทุน การวางแผนเตรียมความพร้อมในการปฏิบัติงานย้ายฝากตัวอ่อนและควบคุมปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนโคในประเทศไทย โดยใช้วิธีการวิจัยแบบศึกษาข้อมูลย้อนหลัง (retrospective study) จากข้อมูลการย้ายฝากตัวอ่อนของโคตัวรับที่ได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและการย้ายฝากตัวอ่อนแบบ Direct transfer โดยเจ้าหน้าที่กรมปศุสัตว์ ระหว่างปี พ.ศ. 2555-2560 ที่มีผลการตรวจท้อง จำนวน 390 ข้อมูล พบว่าค่าเฉลี่ยของอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนโคในประเทศไทย เท่ากับร้อยละ 28.46 (111/390) เมื่อวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อน ได้แก่ ลำดับท้องของโคตัวรับ (โคสาวหรือโคนาง) สายพันธุ์โคตัวรับ (โคนมหรือโคเนื้อ) เกรดของคอร์ปัสลูเทียม (A, B หรือ C) ชนิดของตัวอ่อน (ตัวอ่อนสดหรือตัวอ่อนแช่แข็ง) และดัชนีอุณหภูมิความชื้นสัมพัทธ์ (Temperature humidity index; THI) เฉลี่ยรายเดือนที่ดำเนินการย้ายฝากตัวอ่อนโค ด้วยสมการถดถอยโลจิสติก (logistic regression analysis) ที่ระดับนัยสำคัญที่ $\alpha=0.05$ พบว่า ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องคือ ลำดับท้องของโคตัวรับ โดยโคสาวมีอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนมากกว่าโคนาง 1.06 ± 0.46 เท่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ขณะที่ปัจจัยอื่น ได้แก่ สายพันธุ์โคตัวรับ เกรดของคอร์ปัสลูเทียม ชนิดของตัวอ่อนและ THI เฉลี่ยรายเดือนที่ดำเนินการย้ายฝากตัวอ่อนโค ไม่มีผลกับอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อน ($P>0.05$)

คำสำคัญ : การย้ายฝากตัวอ่อน โค ปัจจัย ประเทศไทย อัตราการตั้งท้อง

เลขทะเบียนวิชาการ : 63(2)-0208-106

^{1/} ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ จ.นครราชสีมา

^{2/} ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี จ.สระบุรี

Factors affecting the pregnancy rate after transfer bovine embryos to the recipients in Thailand

Pinglanna Kunshorn^{1/} Korbsook Thongsodsaeng^{2/}

Abstract

Bovine embryo transfer is one of the techniques in reproductive biotechnology which has special advantages, especially, helps to increase the excellent genetic numbers in bovine production and shortening the generation interval. But this technique has a high cost of production. Thus, planning for the embryo transfer and affecting factors are very necessary for the best value. The aim of study was to evaluate the effect of factors on the pregnancy rate following bovine embryo transfer to the recipients in Thailand. The research methods used the retrospective study base on 390 data of recipients, that was induced to estrus and direct transferred of bovine embryos by the staff from Department of Livestock Development during 2012-2017 and pregnancy tests were recorded. The percentage of pregnancy rate after embryo transfer (ET) was 28.46 (111/390). Consideration of the factors that affect the pregnancy rate after bovine embryo transfer includes the parity (cow or heifer), breed (dairy or beef), grade of corpus luteum (A, B or C), embryo type (fresh or frozen) and the monthly average temperature humidity index (THI). The statistical analysis was done by logistic regression model (Significance $\alpha = 0.05$). The result showed that the factor affecting the pregnancy rate was the parity. The pregnancy rate of heifers was significantly higher ($P < 0.05$) than that of the cows which was more than 1.06 ± 0.46 time. No differences were found among breed, CL grade, type of embryos and THI factors ($P > 0.05$).

keywords : embryo transfer, cattle, factors, Thailand, pregnancy rate

Registered No.: 63(2)-0208-106

^{1/}Embryo Transfer Biotechnology and Animal Germplasm Research Center. Nakorn Ratchasrima.

^{2/} Saraburi Artificial Insemination and Biotechnology Research Center. Saraburi.

คำนำ

เทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อน เป็นเทคโนโลยีการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์และขยายพันธุ์ โดยการนำตัวอ่อน (embryos) ระยะก่อนการฝังตัวจากแม่ตัวให้ (donors) ไปฝากกับแม่ตัวอีกตัวหนึ่ง ซึ่งเป็นสัตว์ชนิดเดียวกัน (recipients) ให้ตัวอ่อนฝังตัวในมดลูกของแม่ตัวรับ ตั้งท้องและเจริญเติบโตต่อไป ทำให้สามารถคัดเลือกพันธุ์กรรมที่ดีจากทั้งสายพ่อและแม่ได้ สามารถเพิ่มจำนวนสัตว์พันธุ์ดีจำนวนมากได้ในเวลาอันรวดเร็ว สามารถควบคุมป้องกันโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์ได้เป็นอย่างดี

มีรายงานหลายปัจจัยที่ส่งผลต่ออัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนโค เช่น อุณหภูมิ ฤดูกาล ลำดับท้อง และความเครียดจากความร้อน ซึ่งอุณหภูมิที่สูงในฤดูร้อนไม่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนของโคสาวแต่มีผลต่อโคนาง โดยจะทำให้อัตราการตั้งท้องของโคนางลดลง (Ono et al., 2016) และ โคตัวรับที่มีภาวะเครียดจากความร้อน (heat stress) จะมีภาวะความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดลดลง ส่งผลให้การฝังตัวไม่สมบูรณ์และตัวอ่อนตายในระยะแรก (Rani et al., 2018)

ในประเทศไทย โดยกรมปศุสัตว์ ได้นำเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนนี้มาใช้ในการขยายพันธุ์โค ในหลายพื้นที่ทั่วประเทศไทย ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2527 แต่ยังไม่มียางานที่เกี่ยวข้องกับความสำเร็จในการย้ายฝากตัวอ่อนที่เป็นปัจจุบันและสอดคล้องกับสภาวะการเปลี่ยนแปลงภูมิอากาศของโลก จึงควรศึกษาปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนเพื่อนำมาปรับปรุงงานย้ายฝากตัวอ่อนของกรมปศุสัตว์ ความสำเร็จของการย้ายฝากตัวอ่อนให้ได้ลูกโคพันธุ์ดีตามความต้องการ ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนโคในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ข้อมูลการย้ายฝากตัวอ่อนโค

ดำเนินการรวบรวมข้อมูลของโคตัวรับที่ได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและการย้ายฝากตัวอ่อนแบบ Direct transfer ตามคู่มือกระบวนการย้ายฝากตัวอ่อนโค กรมปศุสัตว์ โดยเจ้าหน้าที่กรมปศุสัตว์ ระหว่างปี พ.ศ. 2555-2560 โดยข้อมูลโคที่นำมาวิเคราะห์ ต้องระบุ วัน เดือน ปี และจังหวัดที่ดำเนินการย้ายฝากตัวอ่อน ลำดับท้องของโคตัวรับ สายพันธุ์โคตัวรับ เกรดของคอร์ปัสลูเทียม ชนิดของตัวอ่อนที่ฝาก ผลการตรวจการตั้งท้องจำนวน 390 ข้อมูล

1. ลำดับท้องของโคตัวรับ (parity) แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 โคสาว (Heifer) และกลุ่มที่ 2 โคนาง (Cow)
2. สายพันธุ์โคตัวรับ (breed) แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ สายพันธุ์โคเนื้อและโคนม
กลุ่มที่ 1 สายพันธุ์โคเนื้อ (Beef) ได้แก่ อเมริกันบราห์มัน กำแพงแสน พันเมือง บราห์มันแดง ตากไทยแบล็ค ซาฮิวาล
กลุ่มที่ 2 สายพันธุ์โคนม (Dairy) ได้แก่ โคที่มีสายเลือด Holstein Friesian
3. เกรดคอร์ปัสลูเทียม (CL grade) แบ่งเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่
กลุ่มที่ 1 เกรด A ขนาดคอร์ปัสลูเทียม ใหญ่เกินครึ่งหนึ่งของเนื้อรังไข่
กลุ่มที่ 2 เกรด B ขนาดคอร์ปัสลูเทียม ประมาณครึ่งหนึ่งของเนื้อรังไข่
กลุ่มที่ 3 เกรด C ขนาดคอร์ปัสลูเทียม เล็กกว่าครึ่งหนึ่งของเนื้อรังไข่

4. ชนิดตัวอ่อนที่ฝาก (embryo type) แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 ตัวอ่อนแช่แข็ง (Frozen) และกลุ่มที่ 2 ตัวอ่อนสด (Fresh)
5. ดัชนีอุณหภูมิความชื้นสัมพัทธ์ (temperature humidity index; THI)
คำนวณจากอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส) และความชื้นสัมพัทธ์ (เปอร์เซ็นต์) ตามวิธีของ National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) (1976) โดยอ้างอิงข้อมูลเฉลี่ยของเดือนที่ทำการย้ายฝากตัวอ่อนในพื้นที่จังหวัดที่ทำการย้ายฝากตัวอ่อน
6. ข้อมูลผลตรวจการตั้งท้อง แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ ท้องและไม่ท้อง

ข้อมูลสภาพภูมิอากาศของประเทศไทย

ดำเนินการรวบรวมข้อมูลสภาพภูมิอากาศของประเทศไทยในพื้นที่จังหวัดที่ดำเนินการย้ายฝาก ตัวอ่อนระหว่าง พ.ศ. 2555-2560 จำนวน 13 จังหวัด ได้แก่ เชียงใหม่ กาญจนบุรี ขอนแก่น ชลบุรี ตาก นครราชสีมา นครสวรรค์ ประจวบคีรีขันธ์ พิษณุโลก ราชบุรี ลพบุรี สกลนคร และสระบุรี จากสำนักบริการดิจิทัลอุตุนิยมวิทยา กรมอุตุนิยมวิทยา โดยใช้ข้อมูลของสถานีอุตุนิยมวิทยา อ.เมือง จังหวัดที่ดำเนินการย้ายฝากตัวอ่อนเป็นตัวแทนของข้อมูล ยกเว้น จังหวัดสระบุรีที่ไม่มีสถานีอุตุนิยมวิทยา จึงเลือกใช้ข้อมูลสถานีอุตุนิยมวิทยา อ.ปากช่อง จ. นครราชสีมา ซึ่งเป็นสถานีที่ใกล้ที่สุดแทน นำข้อมูลอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ที่ได้ มาคำนวณหา THI ตามวิธีของ National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) (1976) โดยอ้างอิงข้อมูลเฉลี่ยของเดือนที่ทำการย้ายฝากตัวอ่อนในพื้นที่จังหวัดที่ทำการย้ายฝากตัวอ่อน โดยรูปแบบสมการคำนวณค่า THI เป็นดังนี้

$$THI = (1.8 \times \text{temp} + 32) - (0.55 - 0.0055 \times RH) \times (1.8 \times \text{temp} - 26)$$

THI คือ temperature humidity index

temp คือ อุณหภูมิ (หน่วยเป็นองศาเซลเซียส)

RH คือ ความชื้นสัมพัทธ์ (หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้วิธีการวิจัยแบบศึกษาข้อมูลย้อนหลัง (retrospective study) วิเคราะห์ข้อมูลความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัยกับอัตราการตั้งท้อง ด้วยสมการถดถอยโลจิสติก (logistic regression analysis) ที่ระดับนัยสำคัญ $\alpha = 0.05$ โดยมีตัวแบบ (model) ในการทดสอบ ดังต่อไปนี้

$$\ln(p1/p) = \beta_0 + \beta_1 \text{parity} + \beta_2 \text{CL grade} + \beta_3 \text{embryo type} + \beta_4 \text{breed} + \beta_5 \text{THI} + e$$

เมื่อ

$p1$ = โอกาสการตั้งท้องเมื่อมีปัจจัยที่เลือกมาศึกษา

p = โอกาสการไม่ตั้งท้องเมื่อมีปัจจัยที่เลือกมาศึกษา

β_0 = ค่าคงที่

β_i = สัมประสิทธิ์ของการถดถอยแต่ละปัจจัยแต่ละตัว

Parity = ลำดับท้องของโคตัวรับ ได้แก่ โคสาว (heifer) หรือ โคนาง (cow)

CL grade = เกรดของคอร์ปัสลูเทียม ได้แก่ A, B หรือ C

Embryo type = ชนิดของตัวอ่อน ได้แก่ ตัวอ่อนแช่แข็ง (Frozen) หรือ ตัวอ่อนสด (Fresh)



Breed = สายพันธุ์โคตัวรับ ได้แก่ โคเนื้อ (beef) หรือ โคนม (Dairy)
THI = ดัชนีอุณหภูมิความชื้นสัมพัทธ์ (temperature humidity index; THI) เฉลี่ยรายเดือนที่
ดำเนินการย้ายฝากตัวอ่อนโค
e = ค่าความคาดเคลื่อน

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการวิเคราะห์ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนโคในประเทศไทย ด้วย
สมการถดถอยโลจิสติก ที่ระดับนัยสำคัญที่ $\alpha = 0.05$

Table 1 Significance tests

Factors	DF	Chi-Square	Pr > ChiSq
parity	1	6.40	0.01
CL grade	2	3.47	0.18
embryo type	1	0.02	0.89
breed	1	1.04	0.31
THI	1	0.26	0.61

Factors = ปัจจัยที่ศึกษา
DF = degree of freedom

Table 2 Factors affecting the pregnancy rate after transfer bovine embryos to the recipients in Thailand.

Factors	N	% Pregnant recipient (n)	OR ± SE	CL (95%)	Chi- square	P- value
parity			1.06 ± 0.46	0.15 to 1.96	5.27	0.02
- Heifer	345	30.43 (105)	RC	RC	.	.
- Cow	45	13.33 (6)				
CL grade			0.73 ± 0.43	-0.11 to 1.57	2.94	0.09
- A	79	32.91 (26)	0.62 ± 0.38	-0.13 to 1.36	2.64	0.10
- B	257	29.18 (75)				
- C	54	18.52 (10)	RC	RC	.	.
embryo type			- 0.03 ± 0.24	-0.51 to 0.44	0.02	0.89
Frozen	156	28.21 (44)				
Fresh	234	28.63 (67)	RC	RC	.	.
breed			- 0.25 ± 0.25	-0.74 to 0.23	1.03	0.31
- Beef	146	24.66 (36)				
- Dairy	244	30.74 (75)	RC	RC	.	.
THI			- 0.01 ± 0.02	-0.06 to 0.03	0.27	0.61
Total	390	28.46 (111)				

N = Number of recipients

n = Number of pregnant recipients

% Pregnant recipient = $(n/N) \times 100$

OR $\pm$ SE = odd ratios $\pm$ standard error

CL (95%) = confidence interval 95%

RC = reference class

ค่า OR เป็นตัวบ่งชี้ว่า Factor แต่ละตัว มีผลต่อ n อย่างไรเมื่อเปรียบเทียบกับ RC ที่ 95% CI

ค่า P-value จะถูกนำมาใช้ประเมิน Factor แต่ละตัวที่มีผลต่อตัวอัตราการตั้งท้อง ที่ระดับนัยสำคัญ $\alpha = 0.05$

อัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนโคในประเทศไทย โดยเจ้าหน้าที่กรมปศุสัตว์ ระหว่างปี พ.ศ. 2555-2560 เท่ากับร้อยละ 28.46 (111/390) โดยลำดับท้องของโคตัวรับเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องการย้ายฝากตัวอ่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ปัจจัยอื่นที่นำมาศึกษา ได้แก่ สายพันธุ์โคตัวรับ เกรดของคอร์ปัสลูเทียม ชนิดของตัวอ่อน และ THI ไม่ได้มีผลต่ออัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

เมื่อพิจารณาลำดับท้องของโคตัวรับ พบว่าอัตราการตั้งท้องจากโคสาวและโคนางแตกต่างกัน โดยในช่วงความเชื่อมั่นที่ 95 เปอร์เซนต์ โคสาวมีอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนมากกว่าโคนางถึง 1.06 ± 0.46 เท่า อัตราการตั้งท้องโคสาวเท่ากับร้อยละ 30.43 (105/345) ในขณะที่โคนางเท่ากับร้อยละ 13.33 (6/45) (Table 2) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Ono et al. (2016) จากประเทศญี่ปุ่นที่สนับสนุนว่าการคัดเลือกโคเพื่อนำมาเป็นตัวรับในการย้ายฝากตัวอ่อนนั้น โคสาวมีความเหมาะสมมากกว่าโคนางเนื่องจากโคสาวไม่มีปัญหาโภชนาการ (nutrient stress) และไม่มีภาวะความเครียดช่วงหลังคลอด อีกทั้งยังสอดคล้องกับรายงานของ Estrada-Cortes et al. (2019) ที่พบว่าการใช้ตัวอ่อนแช่แข็งในแม่โคที่มีภาวะมดลูกอักเสบหลังคลอดระยะแรกภายใต้ภาวะความเครียดต่อความร้อนนั้น ทำให้อัตราการตั้งท้องลดลง แต่ในการศึกษารั้งนี้ ผู้เขียนไม่ได้นำประเด็นทางสรีรวิทยาหลังคลอด และค่าคะแนนร่างกาย (body condition score: BCS) ที่เกี่ยวข้องกับภาวะโภชนาการมาพิจารณาร่วมด้วย เนื่องจาก ไม่ทราบข้อมูลระยะการให้ผลผลิต และข้อมูล BCS ของโคตัวรับที่ได้มามีลักษณะไม่กระจายตัว เนื่องจากโคตัวรับที่นำมาศึกษานั้น ได้ถูกคัดเลือกโดยเจ้าหน้าที่กรมปศุสัตว์ให้เหมาะสมสำหรับการปฏิบัติงานตามคู่มือกระบวนการย้ายฝากตัวอ่อนโค กรมปศุสัตว์แล้ว แต่อย่างไรก็ตามก็พบรายงานของ Bridges et al. (2012) ที่สนับสนุนว่า BCS ของโคตัวรับมีความสัมพันธ์กับขนาดของฟอลลิเคิล คอร์ปัสลูเทียม บนรังไข่ และการผลิตฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน แต่ไม่สัมพันธ์กับอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนแต่อย่างใด

เมื่อพิจารณาเกรดของคอร์ปัสลูเทียม แม้ว่าการศึกษารั้งนี้เกรดของคอร์ปัสลูเทียมไม่ได้มีผลต่ออัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่เมื่อพิจารณาค่าร้อยละอัตราการตั้งท้องพบว่าอัตราการตั้งท้องจากโคตัวรับที่มีคอร์ปัสลูเทียม เกรด A มีแนวโน้มดีกว่า เกรด B และ C ตามลำดับ (32.91% 29.18% และ 18.52%) (Table 2) สอดคล้องกับรายงานของศิวัชและคณะ (2555) ที่พบว่าขนาดของคอร์ปัสลูเทียมของแม่โคตัวรับในวันย้ายฝากมีค่าสหสัมพันธ์ทางบวกกับอัตราความสำเร็จในการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อน

เมื่อพิจารณาชนิดของตัวอ่อน จากการศึกษารั้งนี้พบว่าอัตราการตั้งท้องจากการใช้ตัวอ่อนสดและตัวอ่อนแช่แข็งของกรมปศุสัตว์ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ซึ่งขัดแย้งกับรายงานของรังสรรค์ และคณะ (2555) ที่พบว่าอัตราการตั้งท้องและอัตราลูกเกิดของตัวอ่อนแช่แข็งมีค่าต่ำกว่าของตัวอ่อนสด เนื่องจากตัวอ่อนแช่แข็งนั้นมีความไวต่อความเครียดจากความร้อนมากกว่าตัวอ่อนสด จึงเสียหายได้ง่ายกว่า การลดความเครียดจากความร้อนหรือลดความเสียหายของตัวอ่อนระหว่างปฏิบัติงานจึงเป็นสิ่งสำคัญที่มีผลต่อความอยู่รอดของตัวอ่อนและอัตราการตั้งท้อง (Sakatani, 2017) เป็นไปได้ว่าผู้ปฏิบัติงานย้ายฝากตัวอ่อนของกรมปศุสัตว์ที่นำมาศึกษารั้งนี้ล้วนสามารถปฏิบัติงานด้วยเทคนิคที่มีความชำนาญ และมีประสบการณ์สูง ทำให้ผลอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนของโคจากตัวอ่อนสดกับแช่แข็งไม่แตกต่างกัน

สำหรับสายพันธุ์ของโคตัวรับ (โคเนื้อหรือโคที่มีสายเลือดโคนม) พบว่าไม่มีอิทธิพลต่ออัตรา การตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในประเทศไทยของรังสรรค์ และคณะ (2555) ที่รายงานว่าสายพันธุ์โคตัวรับ (โคนมลูกผสมพื้นเมืองพันธุ์บราห์มัน โคเนื้อพันธุ์กำแพงแสน โคนมลูกผสม) ไม่ส่งผลต่ออัตราการตั้งท้องและอัตราการคลอดของโคตัวรับหลังย้ายฝาก ตัวอ่อนโคเนื้อแช่แข็งด้วยวิธี direct transfer

กรณีความเครียดจากความร้อนที่มีผลต่ออัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนโค พบในรายงานของ Julion et al. (2018) ที่สนับสนุนว่าความเครียดต่อความร้อนมีผลต่อความอยู่รอดของตัวอ่อนและอัตราการตั้งท้อง โดยอุณหภูมิที่สูงในระหว่างฤดูร้อนส่งผลให้การพัฒนาของตัวอ่อนล่าช้าความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดลดลง การฝังตัวไม่สมบูรณ์และตัวอ่อนตายในระยะแรก (Rani et al., 2018) แต่อย่างไรก็ตามเนื่องจากในประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้นและมีอุณหภูมิใกล้เคียงกันตลอดทั้งปี การพิจารณาผลกระทบของความเครียดจากความร้อนไม่สามารถพิจารณาจากอุณหภูมิอย่างเดียวได้ ต้องพิจารณาความสัมพันธ์ร่วมด้วยในรูปแบบ THI ซึ่งผลการศึกษานี้ พบว่าค่า THI ที่เพิ่มขึ้น 1 ค่า ไม่ทำให้อัตราการตั้งท้องของโคตัวรับแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

แม้ว่าข้อมูลที่น่ามาศึกษาครั้งนี้ มาจากฐานข้อมูลหน่วยงานราชการ 2 แห่ง ได้แก่ กรมปศุสัตว์ และกรมอุตุนิยมวิทยา ซึ่งมีความน่าเชื่อถือ แต่อย่างไรก็ตาม ก็ยังมีข้อจำกัด เนื่องจากการศึกษาแบบวิเคราะห์ข้อมูลย้อนหลัง จึงไม่ได้มีการออกแบบรูปแบบการเก็บข้อมูลไว้ล่วงหน้า ข้อมูลที่ได้บางส่วนอาจไม่สมบูรณ์ จึงต้องมีการคัดกรองข้อมูลที่ไม่สามารถนำไปใช้ได้ออกไปก่อนขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูล เช่น ข้อมูลโคตัวรับที่ได้รับการย้ายฝากตัวอ่อนแต่การไม่ผลตรวจการตั้งท้อง ทำให้จำนวนข้อมูลที่สามารถนำมาวิเคราะห์ได้ มีจำนวนเพียง 390 ข้อมูล ซึ่งในความเป็นจริง กรมปศุสัตว์ดำเนินการย้ายฝากตัวอ่อนโคที่ได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและการย้ายฝากตัวอ่อนแบบ Direct transfer ระหว่างปี พ.ศ. 2555-2560 มากกว่า 390 ตัว อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ข้อมูลอัตราการตั้งท้องมีโอกาสเคลื่อนจากความเป็นจริง อีกประเด็นหนึ่งที่น่าสนใจ คือ THI ที่นำมาศึกษาครั้งนี้ อาจไม่ใช่ข้อมูลที่แท้จริงของพื้นที่ที่ดำเนินการย้ายฝากตัวอ่อน ณ เวลานั้นๆ เนื่องจากข้อจำกัด คือ ข้อมูลที่ได้มา ไม่ทราบฟาร์มหรือสถานที่ที่ย้ายฝากตัวอ่อนแน่ชัด ทราบเพียงจังหวัดที่ดำเนินการย้ายฝากตัวอ่อน จึงเลือกข้อมูลสถานีอุตุนิยมวิทยา ณ อำเภอเมือง จังหวัดที่ดำเนินการย้ายฝากตัวอ่อนเป็นตัวแทนของข้อมูล ยกเว้นบางจังหวัด เช่น จังหวัดสระบุรี ที่ไม่มีสถานีตรวจอากาศ จึงเลือกใช้ข้อมูลสถานีอุตุนิยมวิทยา อ.ปากช่อง จ.นครราชสีมา ซึ่งเป็นสถานีตรวจอากาศที่ตั้งอยู่ใกล้ที่สุดแทน จึงอาจทำให้ THI มีการคาดเคลื่อนของไปจากความเป็นจริง

สรุป

ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการตั้งท้อง คือ ลำดับท้องของโคตัวรับ โดยโคสาวจะมีอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนมากกว่าโคนาง 1.06 ± 0.46 เท่า แต่ปัจจัยอื่น ได้แก่ สายพันธุ์โคตัวรับ เกรดของ คอร์ปัสยูเทียม ชนิดของตัวอ่อน THI เฉลี่ยรายเดือนที่ดำเนินการย้ายฝากตัวอ่อนโคไม่เกี่ยวข้องกับ อัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อน โดยมีค่าเฉลี่ยของอัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อนโคในประเทศไทย ด้วยวิธี direct transfer ระหว่างปี พ.ศ. 2555 – 2560 เท่ากับร้อยละ 28.46 (111/390)

ข้อเสนอแนะ

ยังมีอีกหลายปัจจัยที่อาจมีผลต่ออัตราการตั้งท้องจากการย้ายฝากตัวอ่อน ซึ่งเป็นประเด็นที่น่าสนใจและควรศึกษาเพิ่มเติม เช่น ความสมบูรณ์ด้านโภชนา ะยะการให้ผลผลิต อายุโคตัวรับและระดับฮอร์โมนพื้นฐาน แต่อย่างไรก็ตามต้องคำนึงถึงความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจด้วย นอกจากนี้การเตรียมความพร้อมโคตัวรับก่อนการ

ปฏิบัติงาน เทคนิคในการปฏิบัติงาน การจัดการโคตัวรับหลังฝากตัวอ่อนและการจัดการฟาร์มก็มีความสำคัญอย่างยิ่ง จึงควรมีการเก็บรวบรวมข้อมูลส่วนนี้เพิ่มเติมเพื่อนำไปศึกษาพัฒนางานย้ายฝากตัวอ่อนต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์อนนท์ เทืองสันเทียะ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์และสำนักบริการดิจิทัลอุตุนิยมวิทยากรมอุตุนิยมวิทยาที่เอื้อเพื่อข้อมูลในการศึกษา ขอขอบคุณ ดร.สายันท์ บัวบาน และคุณสมศักดิ์ เปรมปรีดิ์ กลุ่มวิจัยและประเมินพันธุกรรมสัตว์ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ที่ให้คำแนะนำช่วยเหลือด้านวิเคราะห์ข้อมูลและแปลผลการทดลอง ขอขอบคุณ ดร.มาลี อภิเมธีธำรง ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ กรมปศุสัตว์ ที่ให้คำแนะนำรูปแบบการเขียนต้นฉบับ ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่กรมปศุสัตว์ เจ้าของฟาร์มและผู้เกี่ยวข้องทุกท่านที่มีส่วนร่วมในการดำเนินการย้ายฝากตัวอ่อนโค และสนับสนุนการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- รังสรรค์ พาลพ่าย และ มารินา เกตุทัต-คานส์. 2555. ผลของสายพันธุ์โคตัวรับต่ออัตราการตั้งท้องหลังการย้ายฝากตัวอ่อนโคแช่แข็ง โดยวิธี direct transfer. แหล่งที่มา: http://ird.sut.ac.th/ird_engine/downloadfile.php?id=874, 25 สิงหาคม 2562.
- สาโรช งามขำ วรวิทย์ วราอัศวปติ สายันท์ บัวบาน ณรงค์ เลี้ยงเจริญ มาลี อภิเมธีธำรง กิรติ ธิแจ้ และอนนท์ เทืองสันเทียะ. ม.ป.ป. คู่มือปฏิบัติงานการย้ายฝากตัวอ่อนโค. สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพมหานคร.
- ศิวัช สังข์ศรีทวงษ์ รังสรรค์ พาลพ่าย ชูติ เหล่าธรรมธร และ ภัทรนันท์ อิทธิวรพงศ์. 2555. การทดสอบภาคสนามเพื่อศึกษาอัตราฝากติดจากการย้ายฝากตัวอ่อนแช่แข็งโคนมโคนมซึ่งผลิตโดยกระบวนการปฏิสนธิในอกร่างกาย, น. 191-200. ในรายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.
- Bridges, G. A., S. G. Kruse, B. Funnell and B. Scott. 2012. Effect of change of body condition score of donor and recipient on ovarian function, endocrine status and pregnancy success in beef cows. Biol. Reprod. 87: 472.
- Department of Commerce, NOAA, National Weather Service Central Region, Kansas City. 2019. National Oceanic and Atmospheric Administration (NOAA) (1976). Livestock Hot Weather stress: Operations Manual Letter C-31-76. Available source: <https://scirp.org/reference/referencespapers.aspx?referenceid=1913216>, May 8, 2019.
- Estrada-Cortes, E., W.G. Ortiz, R.C. Chebel, E.A. Jannaman, J.I Moss, C.F. Castro, C.R.A.M. Zolini Staples and P.J Hansen. 2019. Embryo and cow factors affecting pregnancy per embryo transfer for multiple-service, lactating Holstein recipients. Transl. Anim. Sci. 3: 60-65.
- Ono, T., T. Isobe, Y. Morita, L. T.K. Do, M. Taniguchi, M. Takagi and T. Otoi. 2016. Effect of parity and season on pregnancy rates after transfer of embryos to repeat breeder Japanese Black beef cattle. Arch. Anim. 59: 45-49.
- Rani, P., R. Dutt, G. Singh and R.K. Chandolia. 2018. Embryonic mortality in cattle - a review. Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci. 7(7): 1501-1516.



Sakatani, M., 2017. Effect of heat stress on bovine preimplantation embryos produced in vitro. [J. Reprod. Dev.](#) 63(4): 347–352.

ผลของการเปลี่ยนเซมินอลพลาสมา ต่อคุณภาพน้ำเชื้อโคแช่แข็ง

อภิรักษ์ อุทธา^{1/} นิติรัฐ ถิยัง^{2/} สุจิรา ธรรมวัง^{2/} อธิศักดิ์ ศิริบุรี^{3/}

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการเปลี่ยนเซมินอลพลาสมาต่อคุณภาพน้ำเชื้อโคหลังการแช่แข็ง ดำเนินการที่ศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ใช้น้ำเชื้อสดจากพ่อพันธุ์บรรพ์มันจำนวน 3 ตัว อายุระหว่าง 5 – 8 ปีที่มีอัตราการเคลื่อนที่ระหว่าง 40–70% รีดเก็บน้ำเชื้อสัปดาห์ละครั้ง ติดต่อกัน 4 สัปดาห์ แบ่งน้ำเชื้อที่ได้ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ไม่เปลี่ยนเซมินอลพลาสมา (กลุ่มควบคุม) กลุ่มที่ 2 เปลี่ยนเซมินอลพลาสมาที่ได้จากพ่อพันธุ์โคที่มีคุณภาพน้ำเชื้อดี ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่อง CASA จำนวนอสุจิมิชีวิตด้วยการย้อมด้วย Eosin-Nigrosin และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิด้วย HOS test ผลการศึกษาพบว่า การเปลี่ยนเซมินอลพลาสมาไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ ($32.3 \pm 2.9\%$, $41.6 \pm 4.7\%$) ในขณะที่อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ($7.0 \pm 1.1\%$, $14.0 \pm 3.2\%$) จำนวนอสุจิมิชีวิต ($43.7 \pm 3.2\%$, $55.4 \pm 4.9\%$) และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ($37.6 \pm 3.0\%$, $48.8 \pm 4.5\%$) ของกลุ่มที่เปลี่ยนเซมินอลพลาสมามีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ไม่เปลี่ยน ($P < 0.05$)

คำสำคัญ: คุณภาพน้ำเชื้อ โคพ่อพันธุ์ เซมินอลพลาสมา

เลขทะเบียนวิจัย: 63(2)-0208-127

^{1/} ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น

^{2/} ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพเชียงใหม่ อ. เมือง จ. เชียงใหม่

^{3/} ศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ อ. เมือง จ. ขอนแก่น



Effect of substitution of seminal plasma on frozen bull semen

Apirak Utta^{1/} Nitirut Theeyoung^{2/} Sujira Thammawung^{2/} Athisak Siriburi^{3/}

Abstract

The objective of this study was to determine the effects of substitution on improving semen quality of bulls with low post-thawed semen quality. The study was conducted at North Eastern Frozen Semen Production and Research Center, Khon kaen province. Three Brahman bulls, age between 5 - 8 years, with fresh sperm motility between 40 – 70 percent were enrolled into this study. Semen were collected once weekly for 4 weeks. Semen sample from each bull were divided into 2 groups. Group1 seminal plasma was not removed (Control), and group2 substitution of seminal plasma. Seminal plasma for replacement was prepared from bulls that had high sperm quality. Sperm quality were determined by computer assisted semen analyzer (CASA), live sperm (Eosin-Nigrosin staining), and plasma membrane integrity (HOS test) were used to evaluate sperm quality. The result showed that substitution of seminal plasma had no effect on sperm motility (32.3 ± 2.9 , 41.6 ± 4.7) but improved percentages of progressive motility (7.0 ± 1.1 , 14.0 ± 3.2) live sperm (43.7 ± 3.2 , 55.4 ± 4.9) and plasma membrane intact (37.6 ± 3.0 , 48.8 ± 4.5) sperm were improved by seminal plasma replacement. ($P < 0.05$)

Keywords: Semen quality, Bull, Seminal plasma

Registered No: 63(2)-0208-127

^{1/}Chiang Mai Artificial Insemination and Biotechnology Research Center Muang Chiang Mai.

^{2/}Khon Kaen Artificial Insemination and Biotechnology Research Center Muang Khon Kaen.

^{3/}North Eastern Frozen Semen Production and Research Center Muang Khon Kaen.

คำนำ

ในปี 2561 ประเทศไทยมีจำนวนโคเนื้อประมาณ 5.45 ล้านตัว ผู้เลี้ยง 0.8 ล้านครอบครัว และเพิ่มขึ้นในปี 2562 เป็น 5.87 ตัว เป็นโคเพศเมีย 3,819,390 ตัว แบ่งเป็นโคแรกเกิดถึงโคสาว 1,969,110 ตัว และแม่โค 1,850,280 ตัว (กรมปศุสัตว์, 2562) ปัญหาหลักของอุตสาหกรรมโคเนื้อคือ การขาดแคลนแม่โคพันธุ์ดี ที่ให้ผลผลิตสูง เพื่อผลิตโคขุนส่งตลาดเนื้อโคที่มีความต้องการเพิ่มขึ้น เกษตรกรส่วนใหญ่จึงอาศัยการปรับปรุงพันธุ์จากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อโคพันธุ์ดี แทนการใช้พ่อพันธุ์ที่มีมูลค่าค่อนข้างสูง แต่การให้บริการผสมเทียมจากกรมปศุสัตว์ยังมีข้อจำกัดในส่วนของน้ำเชื้อแช่แข็งในพ่อพันธุ์โคบางสายพันธุ์ที่อาจยังมีจำนวนไม่เพียงพอต่อความต้องการ เนื่องจากคุณภาพน้ำเชื้อที่ใช้ในการผลิต ซึ่งปัญหาที่พบบ่อยครั้งคือน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้จากพ่อพันธุ์บางตัวมีคุณภาพต่ำ มีอัตราการเคลื่อนที่ก่อนการแช่แข็งประมาณร้อยละ 40 - 60 เมื่อผ่านกระบวนการแช่แข็ง โดยเฉพาะขั้นตอนการปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 4°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิวิกฤตที่ทำให้เกิด Cold shock ได้ง่าย และก่อความเสียหายให้กับอสุจิส่งผลทำให้อสุจิมีชีวิตภายหลังการแช่แข็งไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานตามประกาศของกรมปศุสัตว์ คือต้องมีอสุจิมีชีวิตไม่ต่ำกว่า 8 ล้านตัวต่อโดส ดังนั้นน้ำเชื้อสดที่รีดเก็บได้จากพ่อพันธุ์โคจึงเป็นสิ่งสำคัญที่จะส่งผลถึงคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง

องค์ประกอบของน้ำเชื้อโค แบ่งออกเป็น 2 ส่วนหลักคือ ส่วนของอสุจิ และส่วนของเหลว ที่เรียกว่า เซมินอลพลาสมา (seminal plasma) ซึ่งประกอบด้วยสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ต่างๆ เช่น ไบคาร์บอเนต ซิเตรท น้ำตาลฟรุคโตส สเปิร์มมีน อิเล็กโทรไลต์ต่างๆ ไขมัน แร่ธาตุ และโปรตีน เป็นต้น (Bearden et al., 2004) โดยองค์ประกอบต่างๆ ในเซมินอลพลาสมามีคุณสมบัติในการรักษาการเมแทบอลิซึมของอสุจิ (sperm metabolism) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ค่าออสโมลาลิตี (osmolarity) รักษาความสมบูรณ์ของผนังเซลล์ของตัวอสุจิ ซึ่งมีความสำคัญในการทำให้อสุจิสามารถมีชีวิตอยู่ได้และทำหน้าที่ในการเคลื่อนที่เข้าไปปฏิสนธิกับไข่ในระบบสืบพันธุ์เพศเมียได้ (Maxwell et al., 2007; Asadpour et al., 2012; Goerick et al., 2015) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าเซมินอลพลาสมา มีองค์ประกอบของฮอร์โมนเพศรวมอยู่ด้วย แต่อาจมีสัดส่วนขององค์ประกอบที่แตกต่างกันไปในพ่อพันธุ์แต่ละตัว หรือแต่ละชนิดของสัตว์ (Juyena and Stelletta, 2012) ซึ่งส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ หรือการรอดของอสุจิภายหลังการแช่แข็ง จากการรายงานของ Sarsaifi et al. (2015) พบว่าน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดี มีองค์ประกอบของโปรตีน Binder of sperm 1 (BSP1), Tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP-2) และ Phospholipase A₂ (PLA₂) ในเซมินอลพลาสมาสูง ในการทดลองของ Patel et al. (2016) ทำการเสริม Heparin binding protein (HBP) ที่แยกออกจากเซมินอลพลาสมาในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ก่อนทำการแช่แข็ง พบว่า ส่งผลให้อัตราการรอดชีวิตของน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริม แต่อย่างไรก็ตามเซมินอลพลาสมาที่ได้จากพ่อพันธุ์บางตัวอาจมีองค์ประกอบแตกต่างกัน (Sarsaifi et al., 2015) ซึ่งอาจส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อที่ผลิตได้เช่นกัน

ดังนั้นจึงทำการศึกษาเปลี่ยนเซมินอลพลาสมาที่ได้จากน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์โคเนื้อที่มีคุณภาพดีแทนเซมินอลพลาสมาของพ่อพันธุ์ที่มีคุณภาพน้ำเชื้อต่ำในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง เพื่อเป็นแนวทางการเพิ่มคุณภาพและปริมาณการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งในพ่อพันธุ์ที่มีพันธุกรรมดีแต่คุณภาพน้ำเชื้อไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐานของกรมปศุสัตว์แต่เป็นที่ต้องการของเกษตรกรสำหรับใช้ผสมเทียมเพื่อการปรับปรุงพันธุ์



อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

โคพ่อพันธุ์บรรพบุรุษจากศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 3 ตัว อายุระหว่าง 5-8 ปี และน้ำเชื้อมีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิในน้ำเชื้อสดอยู่ระหว่าง 40-70% มีอสุจิรูปร่างผิดปกติไม่เกิน 30% และใช้เซมินอลพลาสมาจากพ่อโคพันธุ์จำนวน 4 ตัว อายุระหว่าง 5 - 8 ปี ที่มีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิมากกว่า 70%

การเตรียมเซมินอลพลาสมา

น้ำเชื้อสดจากพ่อโคที่มีคุณภาพน้ำเชื้อดีมาปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 3,000 rpm นาน 10 นาที นำเอาเฉพาะของเหลวส่วนบนมากรองด้วย nylon mesh ขนาด 40 ไมครอน อีกครั้ง เพื่อป้องกันการเจือปนของอสุจิ นำเซมินอลพลาสมาจากพ่อพันธุ์ทุกตัวรวมกัน แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 °C จนถึงเวลาทดลอง

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Randomize Complete Block design (RCBD) รีดเก็บน้ำเชื้อสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ติดต่อกัน 4 สัปดาห์ (4 ซ้ำ) นำน้ำเชื้อพ่อโคพันธุ์ที่มีอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิระหว่าง 40-70% แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ไม่เปลี่ยนเซมินอลพลาสมา (กลุ่มควบคุม)

กลุ่มที่ 2 เปลี่ยนเซมินอลพลาสมา

การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง

เตรียมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ egg-yolk tris buffer ที่มีส่วนประกอบของ Tris buffer (Tris 24.2 กรัม Citric acid 13.4 กรัม และ Fructose 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตรร่วมกับ Glycerol 7% และไข่แดง 20% โดยให้ความเข้มข้นของน้ำเชื้อหลังการเจือจางที่ 96 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร แบ่งน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วตรวจประเมินคุณภาพน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็ง และนำส่วนที่เหลือบรรจุในหลอดขนาด 0.25 มิลลิลิตร จากนั้นลดอุณหภูมิน้ำเชื้อโดยใช้ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และแช่แข็งน้ำเชื้อโดยใช้เครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ ยี่ห้อ IMV (IMV, France) ตรวจประเมินคุณภาพน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งโดยทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 30 วินาที

การตรวจประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

การประเมินลักษณะการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อเพื่อหาอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจีก่อนการแช่แข็งใช้การประเมินด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) ที่กำลังขยาย 100-400 เท่า อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจีก่อนหลังการแช่แข็งใช้เครื่อง Computerized automatic semen analyzer (CASA) รุ่น CEROS II™ Hamilton Thron, USA โดยใช้ค่า

1. อัตราการเคลื่อนที่ (motility; %) และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility; %)
2. ความเร็วในการเคลื่อนที่ (velocity) ได้แก่
 - Average path velocity (VAP; $\mu\text{m/s}$) หมายถึง ความเร็วในการเคลื่อนที่เฉลี่ยจากระยะทางจริงใน 1 วินาที
 - Straight Line Velocity (VSL; $\mu\text{m/s}$) หมายถึง ความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีตรง เป็นการคำนวณจากจุดหนึ่งไปยังอีกจุดหนึ่งในแนวเส้นตรงในช่วงระยะเวลา 1 วินาที
 - Curvilinear Velocity (VCL; $\mu\text{m/s}$) หมายถึงความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีโค้ง เป็นการคำนวณแนวโน้มของการเคลื่อนที่เฉลี่ยใน 1 วินาที
3. ลักษณะการเคลื่อนที่ (kinematic movement) ได้แก่
 - Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH; μm) หมายถึง ความกว้างของส่วนหัวของอสุจิที่ส่ายไปมา
 - Beat Cross Frequency (BCF; Hz) หมายถึง ความถี่ของการส่ายส่วนหัวของอสุจิ
 - Linearity (LIN; %) หมายถึง อัตราส่วนความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีตรงต่อความเร็วเฉลี่ยของการเคลื่อนที่วิถีโค้ง (VCL) คูณด้วยร้อย
4. การประเมินจำนวนอสุจิมิชีวิต (Live sperm; %) โดยการย้อมสี Eosin-Nigrosin (Dott and Foster, 1972)
5. การประเมินความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิ(membrane integrity) ด้วยการใช้สารที่มีความดันออสโมติกต่ำ (hypo-osmotic swelling test; HOS test) (Revell and Mrode, 1994)

การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูล คุณภาพน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็ง คุณภาพน้ำเชื้อหลังการแช่แข็ง ที่ได้ในแต่ละทรีทเมนต์วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย ANOVA และความแตกต่างระหว่างทรีทเมนต์ด้วย T-Test จากโปรแกรมสำเร็จรูป

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการทดลองพบว่า น้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งของพ่อพันธุ์โคในกลุ่มที่ทำการเปลี่ยนและไม่เปลี่ยนเซมินอลพลาสมามีคุณภาพไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยมีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ จำนวนอสุจิมิชีวิต และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิดัง Table 1 ซึ่งน้ำเชื้อทั้งหมดไม่สามารถนำไปใช้ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งได้ เนื่องจากมีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิต่ำกว่า 70% ไม่ผ่านเกณฑ์ของมาตรฐานการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ (รพีพรรณ, 2551)

**Table 1** Effect of substitution of seminal plasma on sperm quality before freezing (means±SE)

Parameter	control	substitution of seminal plasma
Motility (%)	56.3±2.7	60.8±3.8
live sperm (%)	76.6±1.7	77.9±1.8
HOS-test (%)	81.1±0.9	80.1±0.7

น้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งพบว่า การเปลี่ยนเซมินอลพลาสมาไม่ส่งผลต่อ อัตราการเคลื่อนที่ ความเร็วในการเคลื่อนที่ คือ VAP, VSL, VCL, และลักษณะการเคลื่อนที่ LIN, ALH และ BCF ($P>0.05$) แต่มีผลทำให้ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า จำนวนอสุจิมีชีวิต และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิ สูงกว่ากลุ่มที่ไม่เปลี่ยนเซมินอลพลาสมา ($P<0.05$) ดังแสดงใน Table 2 ซึ่งน้ำเชื้อในกลุ่มที่เปลี่ยนเซมินอลพลาสมามีอัตราการเคลื่อนที่ ภายหลังการแช่แข็งตามค่ามาตรฐานตามข้อกำหนดของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ในการผลิตน้ำเชื้อ โคแช่แข็งที่กำหนดให้มีอัตราการเคลื่อนที่ภายหลังการแช่แข็งไม่น้อยกว่าร้อยละ 40 (รพีพรรณ, 2551) และตามประกาศกรมปศุสัตว์ กำหนดให้น้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งโค ต้องมีตัวอสุจิมีชีวิต (motility) ไม่ต่ำกว่า 8 ล้านตัวในหนึ่งโด้ส (กรมปศุสัตว์, 2560) กลุ่มที่ไม่เปลี่ยนเซมินอลพลาสมามีตัวอสุจิมีชีวิตหลังการแช่แข็ง มีตัวอสุจิมีชีวิตประมาณ 6.5 ล้านตัว (ไม่ผ่านเกณฑ์ตามประกาศกรมปศุสัตว์) แต่กลุ่มที่เปลี่ยนเซมินอลพลาสมา มีตัวอสุจิมีชีวิตประมาณ 8.3 ล้านตัว (ผ่านเกณฑ์ตามประกาศกรมปศุสัตว์)

Table 2 Effect of substitution of seminal plasma on sperm quality post-thawing (means±SE)

Parameter	control	substitution of seminal plasma
Motile (%)	32.3±2.9	41.6±4.7
Progressive (%)	7.0 ^a ±1.1	14.0 ^b ±3.2
live sperm (%)	43.7 ^a ±3.2	55.4 ^b ±4.9
HOS-test (%)	37.6 ^a ±3.0	48.8 ^b ±4.5
VAP (µm/s)	54.8±3.5	56.5±3.5
VSL (µm/s)	41.1±2.3	44.4±2.7
VCL (µm/s)	103.2±6.7	104.3±5.5
ALH (Hz)	7.9±1.6	6.2±0.3
BCF (Hz/s)	25.1±2.8	24.4±1.0
LIN (%)	43.8±1.0	45.2±1.6

^{a,b} Different superscripts within the same row demonstrate significant differences $p<0.05$

Taylor (1991) กระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อโคจะสร้างความเสียหายแก่อสุจิในขั้นตอนการการปรับสมดุล และการลดอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งซึ่งจะส่งผลทำให้อสุจิสูญเสียคุณสมบัติบางประการหรือตายได้ โดยความเสียหายดังกล่าวจะเกิดขึ้นประมาณร้อยละ 40-60 ซึ่งจากการทดลองในครั้งนี้พบว่ากลุ่มที่เปลี่ยนเซมินอลพลาสมา มีอัตราการสูญเสียเฉลี่ยประมาณร้อยละ 40 ซึ่งต่ำกว่ากลุ่มไม่เปลี่ยนเซมินอลพลาสมา ในขณะที่อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของกลุ่มที่เปลี่ยนเซมินอลพลาสมา (14.0 ± 3.2) สูงกว่า ($P < 0.05$) กลุ่มไม่เปลี่ยนเซมินอลพลาสมา (7.0 ± 1.1) จำนวนอสุจิมีชีวิตของกลุ่มที่เปลี่ยนเซมินอลพลาสมา (55.4 ± 4.9) สูงกว่า ($P < 0.05$) กลุ่มไม่เปลี่ยนเซมินอลพลาสมา (43.7 ± 3.2) และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ของกลุ่มที่เปลี่ยนเซมินอลพลาสมา (48.8 ± 4.5) สูงกว่า ($P < 0.05$) กลุ่มไม่เปลี่ยนเซมินอลพลาสมา (37.6 ± 3.0) ดังนั้น เมื่อทำการเปลี่ยนเซมินอลพลาสมาจึงทำให้อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการรอดชีวิตและอัตราความสมบูรณ์เยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิ ภายหลังการแช่แข็งดีขึ้น ทั้งนี้อาจเกิดจากองค์ประกอบที่แตกต่างกันของเซมินอลพลาสมาของพ่อพันธุ์แต่ละตัว โดย Sarsaifi et al. (2015) รายงานว่าในเซมินอลพลาสมาในน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีประกอบด้วยโปรตีน Binder of sperm 1 (BSP1), Tissue inhibitor of metalloproteinases 2 (TIMP-2) และ Phospholipase A₂ (PLA₂) ซึ่งโปรตีนดังกล่าวช่วยรักษาสภาพสมดุลของเหลวภายในและภายนอกเซลล์อสุจิได้ดี สามารถลดความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ให้อัตราการรอดชีวิตภายหลังการแช่แข็งของตัวอสุจิเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นผลจากองค์ประกอบอื่นที่มีอยู่ในเซมินอลพลาสมา เช่น ไบคาร์บอเนต ซิเตรท น้ำตาลฟรุคโตส สเปอรฺมีน อิเลคโตรไลต์ต่างๆ ไขมัน และแร่ธาตุ (Bearden et al., 2004) ที่ช่วยในการรักษาการเมตาบอลิซึมของอสุจิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าออสโมลาลิตีที่เหมาะสม และมีผลต่อการมีชีวิตของอสุจิ (Maxwell et al., 2007; Asadpour et al., 2012; Goerick et al., 2015) และเมื่อเติมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ egg-yolk tris buffer ที่ประกอบด้วยสารป้องกันการแข็งตัว การเกิด Cold Shock (egg-yolk) สารปรับความเป็นกรด-ด่าง (Tris, Citric acid) และสารให้พลังงาน (Fructose) ซึ่งเป็นจุดที่มีการเปลี่ยนแปลงค่าออสโมลาลิตีที่มีความแตกต่างเพิ่มขึ้นมากกว่า 10 เท่า เซมินอลพลาสมาที่มีองค์ประกอบที่เหมาะสมจึงมีส่วนสำคัญในการรักษาความสมบูรณ์ของผนังเซลล์และอะโครโซม การเคลื่อนที่ของอสุจิ ความแข็งแรงของอสุจิ และความมีชีวิตของอสุจิ (Vidal et al., 2013)

สรุปผลการทดลอง

ผลการศึกษาสรุปได้ว่าการเปลี่ยนเซมินอลพลาสมาจากโคพ่อพันธุ์ที่มีคุณภาพน้ำเชื้อที่ดี ให้น้ำเชื้อของโคพ่อพันธุ์ที่มีคุณภาพไม่ดี สามารถทำให้อัตราการรอดชีวิต อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิภายหลังการแช่แข็งในโคพ่อพันธุ์ดีขึ้น ซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่สามารถเพิ่มคุณภาพและปริมาณน้ำเชื้อแช่แข็งสำหรับบริการผสมเทียมให้เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกรเพื่อการปรับปรุงพันธุ์โคเนื้อต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2560. ประกาศกรมปศุสัตว์ เรื่อง การรีดเก็บ และผลิตน้ำเชื้อสำหรับผสมพันธุ์สัตว์ พ.ศ. 2560. Available source : file:///C:/Users/acer/Downloads/3_001.PDF . 1 สิงหาคม 2563.
- กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 2562. ข้อมูลเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์และโคเนื้อรายจังหวัด ปีงบประมาณ พ.ศ. 2562. Available source : <http://ict.dld.go.th/webnew/images/>



- stories/stat_web/yearly/2562/country/2---cattle.pdf , 1 สิงหาคม 2563.
- รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล. 2551. คู่มือการปฏิบัติงาน การควบคุมคุณภาพน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ผสมเทียม (Quality control of livestock semen for artificial insemination). ม.ป.ท
- Asadpour, R. 2012. Relationship between mineral composition of seminal plasma and semen quality in various ram breeds. *Acta Scientiae Veterinariae* 40(2): 1027.
- Bearden, H.J., J.W. Fuquay and S.T. Willard. 2004. *Applied Animal Reproduction*. 6th ed. New Pearson Education, Inc., Uppersaddle River, NJ.
- Cancel, A.M., D.A. Chapman and G.J. Killian. 1997. Osteopontin is the 55-kilodalton fertility-associated protein in Holstein bull seminal plasma. *Biol. Biology of Reproduction* 57: 1293-1301.
- Dott, H.M. and G.C. Foster. 1972. A technique for studying the morphology of mammalian spermatozoa which are eosinophilic in a differential live/dead stain. *Journal Reproduction and Fertility* 29:443- 445.
- Garner, D.L. and E.S.E. Hafes. 1993. Spermatozoa Seminal plasma. In: E.S.E.Hafes(ed). *Reproduction in Farm Animals*, 6th ed, Lea and Eebiger. Philadelphia.
- Goericke-Pesch, S., S. Hauck, K. Failing and A. Wehrend. 2015. Effect of seminal plasma vesicular structures in canine frozen-thawed semen. *Theriogenology* 84(9): 1490–1498.
- Juyena, N.S. and C. Stelletta. 2012. Seminal plasma: An essential attribute to spermatozoa. *Journal of Andrology* 33(4): 536-551.
- Lange-Consiglio, A., A. Meucci And F. Cremonesi. 2013. Fluorescence multiple staining and CASA system to assess boar sperm viability and membrane integrity in short and long-term extender. *Open Veterinary Journal* 3(1): 21-35.
- Maxwell, W.M.C, S.P. de Graaf, R-H. Ghaoui and G. Evan. 2007. Seminal plasma effects on sperm handling and female infertility. DOI: 10.5661/RDR-VI-13.
- Moura, A.A., H. Koc., D.A. Chapman and G.J. Killian. 2006. Identification of proteins in the accessory sex gland fluid associated with fertility indexes of dairy bulls: a proteomic approach. *Journal of Andrology* 27: 201-211.
- Odhiambo, J.F. and R.A. Dailey. 2011. Characterization of proteins in cryopreserved and non-cryopreserved seminal plasma of dairy bulls of differing fertility. *Open Journal of Animal Sciences*. 1: 33-40.
- Patel, M., V.K. Gandotra, R.S. Cheema, A.K. Bansal and A Kumar. 2016. Seminal plasma heparin binding proteins improve semen quality by reducing oxidative stress during cryopreservation of cattle bull semen. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences* 29(9): 1247-1255.

- Revell, S.G. and R.A. Mrode. 1994. An osmotic resistance test for bovine semen. *Animal Reproduction Science* 36(1):77-86.
- Sarsaifi, K., J. Vejayan, A.W. Haron, R. Yusoff, H. Hani, M. Rasol., M.A. Omar and A.M. Othman. 2015. Protein profile and functionality of spermatozoa from two semen collection methods in Bali bulls. *Livestock Science* 172: 96–105.
- Taylor, J. 1991. *Bovine Semen Collection and Processing Techniques*. 2nd ed. Canadian Association of Animal Breeders. International Livestock Management Schools. pp. 132.
- Vidal, A.H., A.M. Batista, E.C.B. Silva, W.A. Gomes, M.A. Pelinca, S.V. Silva and M.M.P. Guerra. 2013. Soybean lecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation. *Small Ruminant Research* 109: 47-51.



ผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาโอโอไซต์ในน้ำฟอลลิเคิลต่อการพัฒนาของเอ็มบริโอโค

นิติรัฐ ถิยัง^{1/} อภิรักษ์ อุทธา^{2/} สุจิรา ธรรมวัง^{1/}

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลของระยะเวลาการเก็บรักษาโอโอไซต์นาน 12 18 และ 24 ชั่วโมง ในน้ำฟอลลิเคิลที่ 25 องศาเซลเซียสต่อการพัฒนาของเอ็มบริโอโค รวมถึงติดตามการเจริญของเอ็มบริโอจนถึงระยะที่พัฒนามากกว่าบลาสโตซิสต์ ใช้โอโอไซต์ที่ดูดเก็บจากรังไข่โคจากโรงฆ่าสัตว์ในพื้นที่จังหวัดขอนแก่น คัดเลือกโอโอไซต์ที่มีเซลล์นิวเคลียสล้อมรอบหลายชั้น แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม เก็บในน้ำฟอลลิเคิลที่เตรียมสด และรักษาอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส เมื่อสิ้นสุดเวลาการเก็บในแต่ละกลุ่ม นำมาเข้ากระบวนการเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ ปฏิสนธิ และเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอแบบนอกร่างกาย บันทึกข้อมูลอัตราการพัฒนาของเอ็มบริโอในทุกๆ ระยะ ทดลองจำนวน 4 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลด้วย ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติด้วย Duncan multiple rang test พบว่ากลุ่มที่ใช้ระยะเวลาเก็บรักษาโอโอไซต์ 12 ชั่วโมง ($82.0 \pm 2.6\%$ $78.4 \pm 3.4\%$ และ $46.7 \pm 7.0\%$) และ 18 ชั่วโมง ($77.4 \pm 4.6\%$ $74.0 \pm 5.3\%$ และ $38.7 \pm 6.8\%$) มีอัตราการพัฒนาของเอ็มบริโอสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใช้ระยะเวลาเก็บรักษาโอโอไซต์ 24 ชั่วโมง (63.8% , 59.1% และ 17.6%) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) พบว่ากลุ่มที่ใช้ระยะเวลาเก็บรักษาโอโอไซต์ 12 ชั่วโมง และ 18 ชั่วโมง ($53.4 \pm 4.0\%$ และ $65.9 \pm 5.3\%$) มีอัตราการพัฒนาของเอ็มบริโอในระยะ expanded blastocyst สูงกว่ากลุ่มที่ใช้ระยะเวลาเก็บรักษาโอโอไซต์ 24 ชั่วโมง ($29.2 \pm 10.5\%$) อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) มีเอ็มบริโอจำนวนหนึ่งในกลุ่ม 12 และ 18 ชั่วโมง สามารถพัฒนาต่อไปได้จนถึงระยะ hatched blastocyst ขณะที่กลุ่ม 24 ชั่วโมงหยุดพัฒนาแต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าการเก็บรักษาโอโอไซต์โคในน้ำฟอลลิเคิลอุณหภูมิที่ 25 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้นานถึง 18 ชั่วโมง ในอนาคตยังมีความจำเป็นในการศึกษาโครงสร้างของเอ็มบริโอและการเสริมสารต่าง ๆ สำหรับปรับปรุงคุณภาพของโอโอไซต์ เพื่อให้สามารถเก็บรักษาได้นานยิ่งขึ้น

คำสำคัญ: โค เอ็มบริโอ โอโอไซต์

เลขทะเบียนงานวิชาการ : 63(2)-0208-128

^{1/}ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพเชียงใหม่ อ. เมือง จ. เชียงใหม่

^{2/}ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพขอนแก่น อ. เมือง จ. ขอนแก่น

The effect of oocyte storage time in follicular fluid on bovine embryonic development

Nitirut Theeyoung^{1/} Apirak Utta^{2/} Sujira Thammawung^{1/}

Abstract

The objective of study was to compare the effect of oocyte storage in follicular fluid at 25 degree C for 12, 14 and 18 h on bovine embryonic development in vitro. The development of embryos beyond blastocyst stage was also investigated. Cattle ovaries were collected from a local slaughterhouse in Khon Kaen province. The selected cumulus oocyte complexes (COCs) were randomly divided in to 3 groups, stored in fresh prepared follicular fluid for 12, 18 and 24 h at 25-degree C. At the end of storage period of each group, COCs were matured, fertilized and cultured following the in vitro embryo production (IVP) program. Each experimental group was replicated 4 times. Data were analyzed by ANOVA and statistical differences among means were identified using Duncan's multiple range test (DMRT). No significant differences were found between 12 h ($82.0 \pm 2.6\%$, $78.4 \pm 3.4\%$, and $46.7 \pm 7.0\%$) and 18 h ($77.4 \pm 4.6\%$, $74.0 \pm 5.3\%$ and $38.7 \pm 6.8\%$) storage groups on cleavage, ≥ 4 cells and blastocyst rates, respectively. Storage of bovine oocytes for up to 24 h reduced ($p < 0.05$) the proportion of their developmental competence after processing in vitro fertilization ($63.8 \pm 4.5\%$, $59.1 \pm 5.4\%$ and $17.6 \pm 6.4\%$) for cleavage, ≥ 4 cells and blastocyst stages, respectively). The rate of development to expanded blastocyst was found significantly ($p < 0.05$) higher in 12 h and 18 h groups ($53.4 \pm 4.0\%$ and $65.9 \pm 5.3\%$) compared to 24 h group ($29.2 \pm 10.5\%$). Some embryos in 12 and 18 h groups were continuously developed to hatched blastocyst stage and none for 24 h group, but not significantly different. This study reveals that bovine oocytes can be stored in follicular fluid for up to 18 h at 25-degree C. Further researches are needed for studying structural of embryos and other supplements for improvement the quality of oocytes to extend the storage period.

Keywords: bovine, embryos, oocytes

Registered No: 63(2)-0208-128

^{1/}Chiang Mai Artificial Insemination and Biotechnology Research Center Muang Chiang Mai.

^{2/}Khon Kaen Artificial Insemination and Biotechnology Research Center Muang Khon Kaen.



คำนำ

เทคโนโลยีชีวภาพการผลิตเอ็มบริโอโคนอกร่างกายเริ่มเป็นที่รู้จักแพร่หลายมากขึ้นเพราะเป็นวิธีการขยายพันธุ์โคที่เพิ่มจำนวนได้มากกว่าปกติและต่อเนื่อง (เด่นพงษ์ และคณะ, 2555; Ledda et al., 2001; Pilling et al., 2007) ในแม่โคที่มีแนวโน้มปัญหาทางระบบสืบพันธุ์ที่ไม่สามารถทำให้แม่โคคุมท้องได้ตามปกติ เช่น ปัญหาถุงน้ำในรังไข่ มดลูกอักเสบเป็นหนอง (Faber et al., 2002) และนับวันเทคโนโลยีนี้ยิ่งเป็นที่ต้องการของเกษตรกรในการขยายพันธุ์สัตว์ที่เป็นสัตว์พันธุ์ดีหรือสายพันธุ์หายากหรือสายพันธุ์ที่ควรอนุรักษ์ไว้ แต่ปัจจุบันห้องปฏิบัติการด้านการผลิตเอ็มบริโอโคนอกร่างกายมีจำนวนจำกัด การเคลื่อนย้ายโคมีชีวิตหรือซากโคมายังห้องปฏิบัติการที่อยู่ห่างไกลเป็นสิ่งที่ยากลำบากมีความเสี่ยงต่อตัวสัตว์และความเสี่ยงของโรคระบาด เช่น โรคปากและเท้าเปื่อยที่จะมีผลกระทบต่ออุตสาหกรรมปศุสัตว์เป็นอย่างมาก (เทิดศักดิ์ และคณะ, 2556) การเคลื่อนย้ายเฉพาะโอโอไซต์จากแหล่งเก็บไปยังห้องปฏิบัติการจะช่วยให้การปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่ในพื้นที่สะดวกขึ้นและลดความเสี่ยงของโรคระบาด ควรมีการศึกษาวิธีการเคลื่อนย้ายโอโอไซต์ที่จะสามารถคงสภาพและรักษาคุณภาพของโอโอไซต์เพื่อการผลิตเอ็มบริโอโคนอกร่างกายต่อไป

จากการศึกษาน้ำฟอลลิเคิล (follicular fluid) เป็นส่วนที่สังเคราะห์จากพลาสมาในเลือดมีส่วนประกอบ เช่น amino acids, meiosis activating sterol, hyaluronan, midkine, carotenoids, antioxidants, urea, hormones และอื่นๆ โดยจะเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นตามวงจรการเป็นสัดและส่งผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของโอโอไซต์ (El-Nasser Mohammed et al., 2019) เมื่อระยะเวลาที่ใช้เก็บรักษาโอโอไซต์และอุณหภูมิเพิ่มขึ้นค่าความเป็นกรด-ด่างและน้ำตาลกลูโคสจะมีค่าลดลงเพราะเกิดออกซิเดชันของเซลล์ผิวมูลัส เกิดการสะสมของกรดแลคติกให้สร้างความเสียหายแก่อโอโอไซต์และการตายของเซลล์สืบพันธุ์ การลดออกซิเดชันโดยการลดอุณหภูมิส่งผลให้อัตราการรอดของโอโอไซต์ลดลง ในการศึกษาการเก็บรักษารังไข่หนูพบว่าที่อุณหภูมิ 25-35°C เวลา 2 ชั่วโมงเป็นช่วงเหมาะสมทำให้การพัฒนาและอัตราการรอดของเอ็มบริโอหลังการเพาะเลี้ยงมีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิและระยะเวลาอื่นๆ (Tellado et al., 2014) การเก็บรักษารังไข่หนูที่อุณหภูมิ 25-35°C ยังสามารถยืดเวลาได้ถึง 6 ชั่วโมงที่คงคุณภาพโอโอไซต์ได้ (Wongsrikeao et al., 2005) ส่วนการเก็บรักษาโอโอไซต์โคนน้ำฟอลลิเคิลที่อุณหภูมิห้องส่งผลให้อัตราการรอดของเอ็มบริโอสูงกว่าการเก็บในสารละลายอื่นและยังสามารถเก็บได้ถึง 6 ชั่วโมง (Klump, 2004; Nakao and Nakatsuji, 1992) จากงานทดลองต่างๆ ที่กล่าวมา จะเห็นว่าการเก็บรักษาโอโอไซต์ที่อุณหภูมิห้องที่ 25°C เป็นอุณหภูมิเหมาะสมที่สามารถช่วยรักษาคุณภาพโอโอไซต์ได้ดีที่สุด จากที่กล่าวมาข้างต้นในปัจจุบันห้องปฏิบัติการสำหรับเพาะเลี้ยงโอโอไซต์และผลิตเอ็มบริโอโคนอกร่างกายยังมีน้อย อีกทั้งไม่อยู่ในพื้นที่ที่เป็นแหล่งแม่พันธุ์สัตว์ที่จะเก็บโอโอไซต์ นอกจากนี้ต้องใช้ระยะเวลาในการเดินทางอย่างน้อย 12 ชั่วโมง ในการเคลื่อนย้ายโอโอไซต์มายังห้องปฏิบัติการโดยการทดลองที่ผ่านมายังไม่พบการทดลองเก็บรักษาโอโอไซต์ในระยะเวลาอันยาวนานมากกว่า 12 ชั่วโมง

ดังนั้น การศึกษาค้นคว้ามีวัตถุประสงค์ เพื่อเปรียบเทียบช่วงระยะเวลาการเก็บรักษาโอโอไซต์ในน้ำฟอลลิเคิลที่อุณหภูมิ 25°C ในระยะเวลาแตกต่างกันส่งผลต่อการพัฒนาการของเอ็มบริโอและคุณภาพของเอ็มบริโอภายหลังการเพาะเลี้ยง

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเจาะเก็บโอโอไซต์และน้ำฟอลลิเคิล

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ใช้โอโอไซต์ที่ได้จากรังไข่โคที่โรงฆ่าสัตว์ในเขตจังหวัดขอนแก่น ทำการเจาะดูดโอโอไซต์พร้อมน้ำฟอลลิเคิลจากฟอลลิเคิลที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3-5 มิลลิเมตร โดยใช้เข็มขนาด 18G 1½ นิ้วและไซริงค์ขนาด 5 มิลลิลิตร ที่ได้ลงในหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วนตะกอนเพื่อการเก็บโอโอไซต์ และดูดเอาส่วนใสเพื่อใช้ในการเตรียมน้ำฟอลลิเคิล

การเตรียมน้ำฟอลลิเคิล

ดูดเอาส่วนใสที่ได้จากการเจาะเก็บโอโอไซต์ใสในหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 15 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ความเร็ว 400xG เป็นเวลา 15 นาที ดูดเก็บเอาเฉพาะส่วนน้ำฟอลลิเคิลเก็บในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการเก็บรักษาโอโอไซต์ เตรียมน้ำฟอลลิเคิลทุกครั้งที่จะใช้ในการทดลอง

การเก็บโอโอไซต์

ดูดเอาเฉพาะส่วนตะกอนที่จากการเจาะเก็บโอโอไซต์ ลงในงานพลาสติกกลมปลอดเชื้อ นำไปส่องหาโอโอไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ กำลังขยาย 20 เท่า คัดเลือกเอาเฉพาะโอโอไซต์ที่มีไซโทพลาสซึมสีส้มอำมระและมีเซลล์คิวมูลัสล้อมรอบอย่างน้อย 3 ชั้น แบ่งโอโอไซต์ออกเป็น 3 กลุ่ม เก็บรักษาในน้ำฟอลลิเคิล บรรจุในหลอดน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตร แช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 25°C เก็บตัวอย่างสัปดาห์ละ 1 ครั้งเป็นเวลา 4 สัปดาห์ วางแผนการทดลองแบบ CRD กำหนดให้กลุ่มทดลองเป็นดังนี้

กลุ่มที่ 1 เก็บโอโอไซต์ในน้ำฟอลลิเคิล เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 2 เก็บโอโอไซต์ในน้ำฟอลลิเคิล เป็นระยะเวลา 18 ชั่วโมง

กลุ่มที่ 3 เก็บโอโอไซต์ในน้ำฟอลลิเคิล เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

การเพาะเลี้ยงโอโอไซต์ให้เจริญพร้อมปฏิสนธิ์นอกร่างกาย (in vitro maturation; IVM)

เมื่อครบระยะเวลาเก็บรักษา นำโอโอไซต์มาล้างด้วยน้ำยาชนิด TCM-199 และเพาะเลี้ยงในน้ำยาชนิด TCM-199 เสริมด้วย fetal bovine serum 5% (Invitrogen, USA) และฮอร์โมน FSH (follicle stimulating hormone) 0.025 IU/มิลลิลิตร (Sigma, USA) นำเข้าตูบ่มที่อุณหภูมิ 38.5°C และปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

การปฏิสนธิ์นอกร่างกาย (in vitro fertilization; IVF)

เตรียมน้ำเชื้อโคจากน้ำเชื้อแช่แข็ง นำมาคัดเลือกตัวอสุจิที่แข็งแรงด้วยเทคนิค swim up โดยทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งโดยจุ่มหลอดน้ำเชื้อในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 38°C เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเขย่าหลอดให้แห้งสะอาด ปล่อยน้ำเชื้อลงในกันหลอดทดลองปลอดเชื้อขนาด 5 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำยา Tyrode's Albumin-Lactate-Pyruvate (TALP) ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร นำเข้าตูบ่มที่อุณหภูมิ 38.5°C และปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นระยะเวลา 30 นาที นำเฉพาะของเหลวส่วนบนไปปั่นที่ความเร็วขนาด 200xG เป็นระยะเวลา 10 นาที นำส่วนที่ตกตะกอน (pellet) มาประเมินอัตราการเคลื่อนที่ (motility) และความเข้มข้นของตัวอสุจิ จากนั้นผสมน้ำเชื้อกับน้ำยา TALP-IVF ที่เสริมด้วย bovine serum albumin (BSA) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสาร heparin 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดยให้ปรับความเข้มข้นสุดท้ายมีตัวอสุจิในหลอด



น้ำยา TALP-IVF เท่ากับ 2×10^6 ตัวต่อมิลลิลิตร ปิดทับด้วย mineral oil นำโอโอไซต์ที่ทำการเพาะเลี้ยงจนพร้อมปฏิสนธิมาเลี้ยงในหยดน้ำยา TALP-IVF ที่อุณหภูมิ 38.5°C และปริมาณแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5% นาน 21-23 ชั่วโมง

การเพาะเลี้ยงเอ็มบริโอแบบนอกร่างกาย (in vitro culture; IVC)

นำไข่โกตที่เพาะเลี้ยง 21-23 ชั่วโมงหลังปฏิสนธิมาทำการล้างในน้ำยา synthetic oviductal fluid (SOF) จากนั้นย้ายลงเลี้ยงในน้ำยา SOF เสริมด้วย bovine serum albumin (BSA) 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 38.5°C ปริมาณแก๊สออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์อย่างละ 5% เมื่อเพาะเลี้ยงถึง 72 ชั่วโมงหลังปฏิสนธิ ทำการเปลี่ยนน้ำยาเพาะเลี้ยง บันทึกข้อมูลเปอร์เซ็นต์การพัฒนาของเอ็มบริโอในระยะ cleavage และ ≥ 4 cells โดยคัดเลือกเอาเฉพาะเอ็มบริโอระยะ ≥ 4 cells เพาะเลี้ยงต่อที่อุณหภูมิ 38.5°C ปริมาณแก๊สออกซิเจนและคาร์บอนไดออกไซด์อย่างละ 5% ในวันที่ 6 หลังการปฏิสนธิ ทำการเปลี่ยนน้ำยาเพาะเลี้ยงเป็นน้ำยาชนิด TCM-199 เสริมด้วย FBS 2% ทำการเพาะเลี้ยงจนกระทั่งวันที่ 8 หลังการปฏิสนธิ นำเอ็มบริโอระยะ blastocyst มาจำแนกระยะการเจริญด้วยการแบ่งออกเป็น 4 ระยะ ดังนี้

1. ระยะ Early blastocyst เมื่อเอ็มบริโอพัฒนามาถึงระยะ compact morula จะเริ่มเข้าสู่ช่วงแรกของระยะ blastocyst ความเปลี่ยนแปลงที่พบคือจะเริ่มมีช่องว่างที่เรียกว่า blastocoel
2. ระยะ Blastocyst เป็นระยะถัดมาของเอ็มบริโอ โดยจะเริ่มเห็น blastocoel มากขึ้น มีการแยกส่วนระหว่าง inner cell mass กับ trophoblast ชัดเจนขึ้น
3. ระยะ Expanded blastocyst เป็นระยะที่แยกส่วนของ inner cell mass และ trophoblast ได้เด่นชัด และผนัง zona pellucida เริ่มบางลง
4. ระยะ Hatching หรือ Hatched blastocyst เป็นระยะสุดท้ายของ blastocyst ซึ่งจะมีส่วนของ inner cell mass ที่แตกออกและเซลล์ของเอ็มบริโอสามารถหลุดออกมา

การวิเคราะห์ข้อมูล

เก็บข้อมูล อัตราการการพัฒนาของเอ็มบริโอระยะ cleavage, ≥ 4 cells และ blastocyst นำข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วย ANOVA และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยทางสถิติด้วย Duncan multiple rang test ข้อมูลคุณภาพตัวอ่อนระยะ blastocyst ด้วยการวิเคราะห์ความถี่ (odd ratio)

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการศึกษาช่วงเวลาในการเก็บโอโอไซต์ในน้ำฟอลลิเคิล มีผลต่ออัตราการพัฒนาของเอ็มบริโอในระยะ cleavage, ≥ 4 cell และ blastocyst พบว่าโอโอไซต์ซึ่งเก็บรักษาที่ 12 และ 18 ชั่วโมง มีค่าอัตราการพัฒนาของเอ็มบริโอในระยะ cleavage, ≥ 4 cell และ blastocyst สูงกว่าโอโอไซต์ที่เก็บรักษาในระยะเวลา 24 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ดังแสดงใน Table 1

Table 1. Effect of oocyte storage duration in follicular fluid on bovine embryonic development

Treatment	No. of oocytes	Cleavage (n)	≥ 4 cells (n)	Blastocyst (n)
12 hr.	84	82.0 ^a ±2.6 (69)	78.4 ^a ±3.4 (66)	46.7 ^a ±7.0 (39)
18 hr.	87	77.4 ^a ±4.6 (67)	74.0 ^{a,b} ±5.3 (64)	38.7 ^a ±6.8 (33)
24 hr.	88	63.8 ^b ±4.5 (56)	59.1 ^b ±5.4 (52)	17.6 ^b ±6.4 (15)

^{a, b} Different superscripts within the same column demonstrate significant differences ($p < 0.05$).

Data are from 4 replicates and presented as mean (%) ± SE.

การศึกษานี้พบว่าระยะเวลาการเก็บรักษาโอโอไซต์ที่นานขึ้น ส่งผลทำให้พัฒนาการของเอ็มบริโอต่ำลง โดยการเก็บรักษาโอโอไซต์ในระยะเวลาที่นานขึ้นมีผลต่อการเกิดออกซิเดชันของเซลล์มีการใช้กลูโคสมากขึ้นเกิดการสะสมกรดแลคติกทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงสร้างความเสียหายแก่โอโอไซต์และการตายของเซลล์สืบพันธุ์ ส่งผลให้อัตราการพัฒนาของโอโอไซด์ลดลงซึ่งเป็นปัจจัยหลัก ยังมีปัจจัยอื่นเช่นการเพิ่มขึ้นของระดับ ROS (reactive oxygen species) ที่ส่งผลให้อัตราการพัฒนาของโอโอไซด์ลดลง (Tellado et al., 2014) การเก็บรักษาไข่ของโคนานข้ามคืนที่อุณหภูมิห้อง 15°C - 20°C นำไปสู่ gene expression ลดลง (Somfai et al., 2011) มีการรายงานการเก็บรักษาไข่ของสุกรในระยะเวลา 6 ชั่วโมงถึง 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 15 °C โดยระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นส่งผลต่อการพัฒนาของโอโอไซด์ลดลง (Wongsrikeao et al., 2005)

การเก็บรักษาคุณภาพโอโอไซต์ในการของทดลอง Nakao and Nakatsuji (1992) ได้เก็บรักษาไข่เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 39°C แล้วแบ่งโอโอไซด์เพื่อเพาะเลี้ยง(ควบคุม) และกลุ่มทดลองโดยชะลอการเสื่อมของโอโอไซด์ด้วยการเก็บรักษาในน้ำยา TCM-199 นาน 5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 39°C พบว่าไม่มีผลต่ออัตราการพัฒนาของเอ็มบริโอของทั้งสองกลุ่มโดยที่กลุ่มควบคุมโอโอไซด์สามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอระยะ blastocyst ได้ 15% และกลุ่มทดลองโอโอไซด์สามารถพัฒนาเป็นเอ็มบริโอระยะ blastocyst ได้ 13% ในขณะที่การทดลองของ Klumpp (2004) เก็บรักษาไข่เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง 22°C แล้วแบ่งโอโอไซด์เพื่อเพาะเลี้ยง(ควบคุม) จากนั้นนำโอโอไซด์เก็บรักษาในน้ำฟอสฟอรัส น้ำยา lactate ring solution (LRS) และน้ำฟอสฟอรัสผสมกับ LRS นาน 6 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 22°C พบว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เก็บในน้ำฟอสฟอรัส มีอัตราการพัฒนาเอ็มบริโอสูงกว่ากลุ่มที่เก็บในน้ำฟอสฟอรัสผสมกับ LRS และกลุ่มที่เก็บใน LRS เท่ากับ 26%, 25%, 15% และ 5% ตามลำดับ พบว่าน้ำฟอสฟอรัสสามารถชะลอการเสื่อมของโอโอไซด์ใน 6 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 22°C โดยไม่มีผลต่ออัตราการพัฒนาของเอ็มบริโอ

จากการศึกษาดังกล่าวข้างต้น ใช้ระยะเวลาเก็บโอโอไซด์นานที่สุดเพียง 6 ชั่วโมง ดังนั้นในการศึกษานี้จึงทดลองศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาคุณภาพโอโอไซด์ที่นานขึ้นกว่าการทดลองของ Nakao and Nakatsuji (1992) และ Klumpp (2004) เพื่อให้สอดคล้องกับการปฏิบัติงานจริงในกรณีที่มีความจำเป็นในการเคลื่อนย้ายโอโอไซด์มายังห้องปฏิบัติการที่อยู่ห่างไกลและเพื่อความสะดวกในการปฏิบัติงานของเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ โดยพบว่าการเก็บรักษาโอโอไซด์ในน้ำฟอสฟอรัสสามารถชะลอการเสื่อมของโอโอไซด์ได้นาน 12-18 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ



25°C โดยมีผลต่ออัตราการพัฒนาของเอ็มบริโอสูงกว่าการเก็บรักษาโอโอไซต์นาน 24 ชั่วโมง โดยมีอัตราการพัฒนาในระยะ blastocyst อยู่ที่ $46.7 \pm 7.0\%$, $38.7 \pm 6.8\%$ และ $17.6 \pm 6.4\%$ ตามลำดับ (Table 1) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเก็บโอโอไซต์ในน้ำฟอลลิเคิลระหว่าง 12 ถึง 18 ชั่วโมง ยังคงรักษาคุณภาพของโอโอไซต์ไว้ได้ นับว่าเป็นการทดลองเก็บโอโอไซต์ไว้ได้นานที่สุดเท่าที่มีการรายงาน

Table 2. Effect of oocyte storage time in follicular fluid on bovine embryonic development.

Treatment (n)	% Early Blastocyst (n)	% Blastocyst (n)	% Expanded Blastocyst (n)	% Hatched Blastocyst (n)
12 hr. (39)	16.8 ± 4.5 (6)	22.9 ± 3.7 (9)	53.4 ± 4.0^a (21)	7.0 ± 4.1 (3)
18 hr. (33)	8.1 ± 4.9 (2)	23.7 ± 8.3 (9)	65.9 ± 5.3^a (21)	2.3 ± 2.3 (1)
24 hr. (15)	16.7 ± 9.6 (4)	54.2 ± 15.8 (6)	29.2 ± 10.5^b (5)	0.00 ± 0.00 (0)

^{a, b} Different superscripts within the same column demonstrate significant differences $p < 0.05$.

Data are from 4 replicates and presented as mean (%) $\pm$ SE.

จากผลการศึกษาการพัฒนาของเอ็มบริโอต่อจากระยะ blastocyst พบว่าการเก็บรักษาโอโอไซต์ในน้ำฟอลลิเคิลที่ 12 และ 18 ชั่วโมง มีการพัฒนาของเอ็มบริโอโคสูงกว่าการเก็บรักษาโอโอไซต์ในน้ำฟอลลิเคิลที่ 24 ชั่วโมง การพัฒนาเอ็มบริโอในระยะ Expanded blastocyst เท่ากับ 53.4%, 65.9% และ 29.2% ตามลำดับ ยังมีเอ็มบริโอในกลุ่ม 12-18 ชั่วโมง จำนวนหนึ่งสามารถพัฒนาต่อไปได้ถึงระยะ hatched blastocyst ขณะที่กลุ่ม 24 ชั่วโมงหยุดพัฒนาที่ ระยะ expanded blastocyst แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 2) เอ็มบริโอที่พัฒนาจนถึงระยะ hatched blastocyst นับว่าเป็นเอ็มบริโอที่มีคุณภาพ เมื่อนำไปย้ายฝาก มีโอกาสตั้งท้องสูงกว่าการย้ายฝากเอ็มบริโอ ระยะ expanded blastocyst (Natachandra et al., 2013) ซึ่งการเก็บรักษาโอโอไซต์ที่นานขึ้นมีผลต่อการพัฒนาของโอโอไซด์ลดลง (Wongsrikeao et al., 2005) แล้วยังส่งผลต่อการพัฒนาของเอ็มบริโออีกด้วย น้ำฟอลลิเคิลที่เตรียมจากการศึกษาครั้งนี้ น่าจะมีองค์ประกอบต่างๆ ได้แก่ amino acids, meiosis activating sterol, hyaluronan, midkine, carotenoids, antioxidants, urea, hormones และอื่นๆ ที่ส่งผลดีต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของโอโอไซด์ (El-Nasser Mohammed et al., 2019) อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ ใช้น้ำฟอลลิเคิลที่เตรียมใหม่ในการทดลองทุกครั้ง และไม่ได้ตรวจสอบประกอบของน้ำฟอลลิเคิลทุกครั้งที่เตรียม จึงขาดข้อมูลส่วนประกอบต่างๆ ในน้ำฟอลลิเคิลในแต่ละครั้งที่เตรียม ซึ่งอาจทำให้ผลการทดลองมีความแปรปรวน ดังนั้นควรมีการเตรียมน้ำฟอลลิเคิลใช้ตลอดการทดลองเพื่อลดความแตกต่างในการทดลอง ผลจากการศึกษาครั้งนี้ แสดงว่าเราสามารถเก็บรักษาโอโอไซด์ในน้ำฟอลลิเคิลได้นานถึง 18 ชั่วโมงภายหลังเจาะเก็บก่อนนำมาดำเนินการผลิตตัวอ่อนนอกร่างกาย ซึ่งจะเป็นการช่วยเพิ่มศักยภาพการผลิตตัวอ่อนจากแม่โคที่มีพันธุกรรมดีแต่อยู่ห่างไกลห้องปฏิบัติการ ทำให้การขยายสัตว์พันธุ์ดีด้วยเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนที่ผลิตนอกร่างกาย เป็นไปอย่างกว้างขวางและมีตัวอ่อนเพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกร

สรุปผลการทดลอง

การศึกษานี้สรุปว่าการเก็บรักษาโอโอไซต์โคในน้ำฟอลลิเคิลที่อุณหภูมิ 25°C ที่ระยะเวลา 12 และ 18 ชั่วโมงส่งผลให้อัตราการการพัฒนาเอ็มบริโอระยะ cleavage, ≥ 4 cells และ blastocyst สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้สามารถนำไปพัฒนาเพื่อศึกษาลักษณะทางโครงสร้างของเอ็มบริโอที่เปลี่ยนแปลงของกลุ่มการทดลองต่าง ๆ การศึกษาเกี่ยวกับการเสริมสารต่างๆ หรืออาจนำมาปรับใช้กับการเก็บโอโอไซต์ด้วยวิธี OPU (ovum pick up) เพื่อช่วยรักษาคุณภาพโอโอไซต์ให้นานขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- เด่นพงษ์ สาข้อง เทวินทร์ วงษ์พระลับ สุภร กตเวทิน และ ศักดิ์ศิริ ศิริเสถียร. 2555. การเจาะเก็บโอโอไซด์ด้วยเครื่องคลื่นความถี่สูงในโคพื้นเมืองไทย (*Bos indicus*) และการพัฒนาของโอโอไซด์ที่ผ่านการแช่แข็งแบบวิทริฟิเคชันหลังการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย. The Thai Journal of Veterinary Medicine 42(4): 509-516.
- เทิดศักดิ์ ญาณ สุวิชัย โรจนเสถียร ภาณุวัฒน์ แยมสกุล สมปรียา กองแก้ว ประภาส พงษ์นิ ฉายสุริย์ ศุภาวิไล สมพร พรวิเศษศิริกุล และ ภักดี สุทธิพันธุ์กร. 2556. กรณีศึกษาการระบาดของโรคปากและเท้าเปื่อย ในเขตจังหวัดเชียงใหม่และลำพูน ช่วงปี 2550-2554. เชียงใหม่สัตว์แพทยสาร 11(3): 227-287.
- El-Nasser Mohammed, A., S. Al-Suwaiegh and T. Al-Shaheen. 2019. Effects of follicular fluid components on oocyte maturation and embryo development in vivo and in vitro. Advances in Animal and Veterinary Sciences 7(5):346-355.
- Faber, D.C., J.A. Molina, C.L. Ohlrichs, D.F. Vander Zwaag and L.B. Ferre. 2002. Commercialization of animal biotechnology. Theriogenology 59:125-138.
- Klumpp, A.M. 2004. The effect of holding bovine oocytes in follicular fluid on subsequent fertilization and embryonic development, M.S. Theses, Louisiana state university.
- Ledda, S., G. Leoni, L. Bogliolo and S. Naitana. 2001. Oocyte cryopreservation and ovarian tissue banking. Theriogenology 55(6):1359-1371.
- Nakao, H. and N. Nakatsuji. 1992. Effects of storage conditions of bovine ovaries and oocytes on the success rate of in vitro fertilization and culture. Journal of Reproduction and Development 38(1):11-13.



- Natachandra, M.C., N.C. Nishad, M.n. Nirmalendu and N.M. Bindu. 2013. Transfer of spontaneously hatching or hatched blastocyst yields better pregnancy rates than expanded blastocyst transfer. *Journal of Human Reproductive Sciences*. 6(3):183-188.
- Pilling, D., R. Cardellino, M. Zjalic, B. Rischkowsky, K.A. Tempelman and I. Hoffmann. 2007. The use of reproductive and molecular biotechnology in animal genetic resources management-a global overview. *Animal Genetic Resources Information* 40:1-12.
- Somfai, T., K. Imai, M. Kaneda, S. Akagi, S. Watanabe, S. Haraguchi, E. Mizutani, T.Q. Dang-Nguyen, Y. Inaba, M. Geshi and T. Nagai. 2011. The effect of ovary storage and in vitro maturation on mRNA Levels in bovine oocytes; A possible impact of maternal ATP1A1 on blastocyst development in slaughterhouse-derived oocytes. *Journal of Reproduction and Development* 57(6):723-730.
- Tellado, M.N., G.M. Alvarez, G.C. Dalvit and P.D. Cetica. 2014. The conditions of ovary storage affect the quality of porcine oocytes. *Advances in Reproductive Sciences* 2:57-67.
- Wongsrikao, P., T. Otoi, N.W.k. Karja, B. Agung, M. Nii and T. Nagai. 2005. Effects of ovary storage time and temperature on DNA fragmentation and development of porcine oocytes. *Journal of Reproduction and Development* 51(1):87-97.

ความชุกของการสูญเสียตัวอ่อนระยะแรกในแม่โคนมพันธุ์ทรอปิคอล โฮลสไตน์ที่มีปัญหาสมติดยาก ในเขตพื้นที่จังหวัดสระบุรีและลพบุรี

นันทมนัส สีคง^{1/} สถาปัตย์ อิมโพธิ์^{1/} ธวัชชัย โพธิ์คำ^{2/} จตุพร พงษ์เพ็ง^{2/}

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยนี้ มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาความชุกของการสูญเสียตัวอ่อนในการตั้งท้องระยะวันที่ 1-90 วัน หลังผสมเทียมในโคนมที่มีปัญหาสมติดยากในจังหวัดสระบุรีและลพบุรี โดยได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างซีรัมจากกลุ่ม โคดังกล่าว จำนวนทั้งสิ้น 609 ตัวอย่างในวันที่ 28 ภายหลังการผสมเทียม หลังจากนั้นนำซีรัมไปตรวจวิเคราะห์ระดับ ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Progesterone, P4) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตั้งท้อง (Bovine pregnancy-associated glycoprotein, PAG) พบว่ามีแม่โคท้อง 300 ตัว โดยเมื่อตรวจท้องด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ (หลังผสมเทียม 45-50 วัน) และล้วงตรวจทางทวารหนัก (หลังผสมเทียม 60-90 วัน) พบโคท้องมีจำนวนลดลงเหลือ 202 ตัว คิดเป็นอัตราการสูญเสียการตั้งท้องระยะแรก (หลังผสมเทียม 1-90 วัน) ทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 32.67 (98/300) ซึ่งสามารถแยก ระยะการสูญเสียตัวอ่อนได้เป็น 2 ระยะคือวันที่ 1-27 หลังการผสมเทียม (Early embryonic loss, EEL) จำนวน 31 ตัว และ วันที่ 28-90 หลังการผสมเทียม (Late embryonic loss, LEL and Early fetal mortality, EFM) จำนวน 67 ตัว จากผลดังกล่าวสามารถคำนวณค่าความชุกของการสูญเสียตัวอ่อนระยะแรกในแม่โคนมพันธุ์ทรอปิคอล โฮลสไตน์ที่มีปัญหาสมติดยากในเขตพื้นที่จังหวัดสระบุรีและลพบุรีได้ร้อยละ 16.09 (98/609) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า ปัญหาสมติดยากของโคนม ไม่ได้มีสาเหตุหลักมาจากการสูญเสียตัวอ่อนระยะแรก อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ สาเหตุ และพัฒนาเกี่ยวกับการจัดการปัญหาการสูญเสียตัวอ่อนระยะแรกในอนาคต จะเกิดประโยชน์สูงสุดแก่ เกษตรกรโคนมในประเทศไทย

คำสำคัญ : ความชุก โคนม การสูญเสียตัวอ่อนระยะแรก ปัญหาสมติดยาก

เลขทะเบียนวิจัย : 60(1) - 0208 - 005

1/ สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ ถ.ติวานนท์ ต.บางกะดี อ.เมืองปทุมธานี จ.ปทุมธานี 12000

2/ ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี ต. ทับทิม อ. แก่งคอย จ. สระบุรี 18260



Prevalence of Embryonic Death in Tropical Holstein Cow with Repeat Breeder Problem in Saraburi and Lopburi Provinces, Thailand

Nanmanas Sikong^{1/}, Sathapat Aimpho^{1/}, Thawatchai Pocham^{2/}, Jatuporn Pongpeng^{2/}

Abstract

The study was to determine the prevalence of embryonic death (ED) in repeat breeder located in Saraburi and Lopburi provinces, Thailand. Serum samples of 609 repeat breeder Tropical Holsteins were collected at days 28 after artificial insemination. Progesterone (P4) level and Bovine pregnancy-associated glycoprotein (PAG) was tested. The result showed 300 samples with pregnant positive. Therefore, pregnant cows were confirmed using transrectal ultrasonography at days 45-50 and rectal palpation at days 60-90 after artificial insemination (AI; day 0). The number of pregnant cows were down to 202. Based on the test results, thirty-one cows suffered from early embryonic loss (EEL), and 67 cows suffered from late embryonic loss (LEL) and early fetal mortality (EFM). The overall pregnancy loss rate was 32.67 % (98/300) between days 1 and 90 of pregnancy. In conclusions, the calculated prevalence rate of embryonic death in repeat breeder tropical Holstein in Saraburi and Lopburi provinces was 16.09 % (98/609). Although, this incident was not the main reason of repeat breeders in the area, but it needs further study to give better point of view about the cause of early embryonic death and give the most benefit for improving reproductive management of dairy farm in Thailand.

Keywords: Prevalence, Dairy cow, early embryonic death, repeat breeder problem

Registered No.: 60(1) - 0208 - 005

^{1/} Bureau of Biotechnology in Livestock Production. Bangkadi subdistrict, Amphoe Mueng, Pathumthani Province. 12000

^{2/} Saraburi Artificial Insemination and Biotechnology Research Center. Thapkwang subdistrict, Amphoe Kaengkhroi, Saraburi Province. 18260

คำนำ

แม่โคนมที่มีปัญหาผสมซ้ำ หรือผสมติดยากหมายถึงแม่โคที่ไม่มีการตั้งท้องเมื่อมีการผสมเทียมตั้งแต่ 3 ครั้งขึ้นไป มีสาเหตุหลายประการได้แก่ การสูญเสียตัวอ่อนระยะแรก ฤกษ์น้ำในรังไข่ มดลูกอักเสบ อาหารและการจัดการ แม่โคแสดงการเป็นสัดไม่ชัดเจน รวมถึงปัญหาการจับสัดของเกษตรกร ซึ่งส่งผลต่อการสูญเสียทางเศรษฐกิจต่อเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมเป็นอย่างมากเนื่องจากต้องเลี้ยงโคในขณะที่ไม่ได้รับผลผลิต (Islam et al., 2018) งานวิจัยของ Yusuf et al. (2010) ได้เปรียบเทียบดัชนีประสิทธิภาพระบบสืบพันธุ์ได้แก่ ช่วงห่างการคลอดถึงผสมเทียมติดของแม่โคปกติจะใช้เวลาเฉลี่ย 114 ± 3 วัน แต่ในแม่โคที่มีปัญหาผสมติดยากนั้นใช้เวลาถึง 210 ± 10 วันซึ่งมากกว่าปกติถึง 2 เท่า และจำนวนครั้งที่ผสมเทียมต่อการตั้งท้องของแม่โคปกติจะมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 1.7 ± 0.1 ครั้ง ส่วนแม่โคที่มีปัญหาผสมติดยากจะมีค่าเฉลี่ยถึง 4.7 ± 0.2 ครั้ง อีกทั้งยังมีรอบการให้นมและระยะการให้นมที่น้อยกว่าปกติ จากระบบฐานข้อมูลโคนม สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ในช่วงปีงบประมาณ 2558 (1 ตุลาคม 2557- 30 กันยายน 2558) พบแม่โคที่มีปัญหาผสมติดยากในฟาร์มเกษตรกรทั่วประเทศจำนวน 20,696 ตัวจากแม่โคที่ได้รับการผสมทั้งหมด 105,340 ตัว คิดเป็นร้อยละ 19.65 ส่วนจังหวัดสระบุรีและลพบุรีพบปัญหาดังกล่าวร้อยละ 17.74 (4,630/26,090)

สาเหตุสำคัญที่มีการกล่าวถึงประการหนึ่งคือการสูญเสียตัวอ่อนระยะแรก (embryonic death, ED) ที่มีผลทำให้แม่โคมีวันท้องว่างและระยะห่างระหว่างการคลอดนานกว่าปกติ ส่งผลต่อประสิทธิภาพระบบสืบพันธุ์และผลผลิตที่ลดต่ำลง ลักษณะของปัญหาการสูญเสียตัวอ่อนระยะแรกนี้จะเริ่มจากวันที่ผสมเทียมไปจนถึงวันที่ 27 หลังผสมเทียม (Early embryonic loss, EEL) และวันที่ 28 หลังผสมเทียมไปจนถึงวันที่ 42 หลังผสมเทียม (Late embryonic loss, LEL) ซึ่งเป็นระยะวิกฤตในการฝังตัวของตัวอ่อน (Santos et al., 2004) หากการสูญเสียตัวอ่อนเกิดขึ้นในช่วงนี้ มักจะก่อให้เกิดปัญหาการกลับสัดล่าช้ากว่าปกติ โดยตัวอ่อนที่ตายจะถูกดูดซึมกลับและไม่ปรากฏเป็นตัวลูกแท้งออกมาภายนอกให้เห็น (Lafrance et al., 1989) และมีการนิยามการสูญเสียที่เกิดขึ้นในช่วงวันที่ 42-90 วันหลังผสมเทียมว่า Early fetal mortality (EFM) (Karen et al., 2014) ซึ่งสาเหตุของการสูญเสียตัวอ่อนระยะแรกสามารถเกิดได้จากหลายปัจจัย ได้แก่ ความสมบูรณ์พันธุ์และสุขภาพของโค ความผิดปกติของฮอร์โมน สภาพแวดล้อม อาหารและการจัดการ (Diskin et al., 2011) นอกจากนี้การสูญเสียตัวอ่อนระยะแรกจะไม่สามารถตรวจได้ด้วยวิธีการล้วงตรวจระบบสืบพันธุ์ผ่านทางทวารหนัก หรือ การใช้เครื่องอัลตราซาวด์ จึงจำเป็นต้องยืนยันด้วยวิธีการเจาะเลือดเพื่อตรวจวัดระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Progesterone, P4) และโปรตีนเกี่ยวกับการตั้งท้อง (Bovine pregnancy-associated glycoprotein, PAG) ในวันที่ 28 หลังผสมเทียม หรือในช่วงเวลาที่มีเซลล์ของรกเกิดขึ้นแล้ว (Romano and Larson, 2010; Tefera et al., 2001) โดยถ้ามีการสูญเสียตัวอ่อนตั้งแต่ช่วงนี้ถึงวันที่ 45 หลังผสมเทียมมักมีสาเหตุโน้มนำมาจากปัจจัยภายนอกเช่น เชื้อโรคต่างๆ หรือความร้อน ซึ่งมีผลกระทบโดยตรงต่อตัวอ่อนหรือรก เพราะตัวอ่อนในระยะนี้จะมีการฝังตัวในมดลูกอย่างสมบูรณ์แล้ว ทำให้การสูญเสียตัวอ่อนในระยะหลังจาก 45 วันหลังผสมเทียมของแม่โคมีจำนวนลดลง

ด้วยวิทยาการตรวจท้องแบบผสมเทียมผสมผสานทำให้นักวิจัยสามารถตรวจการตั้งท้องของแม่โค และสำรวจช่วงเวลาของการสูญเสียตัวอ่อนระยะแรกในโคได้ โดย Humblot (2001) ศึกษาการสูญเสียตัวอ่อนในโคทั้งหมด 44 ฟาร์มที่ประเทศฝรั่งเศส พบว่ามีการสูญเสียตัวอ่อนตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 27 หลังการผสมเทียมน้อยละ 31.6 และแม่โคที่การสูญเสียตัวอ่อนหลังจากวันที่ 28-42 หลังการผสมเทียมมีค่าน้อยละ 14.7 ซึ่งคล้ายคลึงกับรายงานของ



Silke et al. (2002) ที่ศึกษาการสูญเสียตัวอ่อนระยะแรก (LEL) ในฝูงแม่โคที่มีผลผลิตสูงในประเทศไอร์แลนด์ พบว่ามีค่าระหว่างร้อยละ 3.2-42.7 โดยแม่โคมีภาวะความเครียดเนื่องจากความร้อนมาเกี่ยวข้องด้วย (Cartmill et al., 2001) ซึ่งทำให้มีการสรุปจากการศึกษาว่า การสูญเสียตัวอ่อนของโคนมในระหว่างวันที่ 30 ถึง 45 หลังผสมเทียม จะอยู่ที่ร้อยละ 0.85 ต่อวัน หรือ ประมาณร้อยละ 12.8 (Beal et al., 1992)

การศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อสำรวจความชุกของการสูญเสียตัวอ่อนระยะแรก ในแม่โคนมพันธุ์ทรอปิคอล โฮลสไตน์ที่มีปัญหาสมติดยากในพื้นที่เขตจังหวัดสระบุรีและลพบุรีสำหรับใช้เป็นองค์ความรู้พื้นฐานให้กับเจ้าหน้าที่ และเกษตรกรในการจัดการปัญหาของการสูญเสียตัวอ่อนระยะแรกหลังจากผสมเทียมต่อไป

วิธีการศึกษา

ประชากรและกลุ่มตัวอย่าง

กลุ่มตัวอย่าง (sample size) ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นแม่โคนมพันธุ์ทรอปิคอล โฮลสไตน์ที่มีปัญหาสมติดยากในฟาร์มเกษตรกรเครือข่ายโครงการผลิตพ่อพันธุ์โคนมทรอปิคอล โฮลสไตน์ในพื้นที่จังหวัดสระบุรีและลพบุรี ที่ได้รับการผสมเทียมในช่วงเดือนธันวาคม 2559 – กันยายน 2561 จำนวน 609 ตัว (มากกว่าที่ได้จากการคำนวณ) ซึ่งเป็นกลุ่มตัวอย่างที่สุ่มมาจากประชากรแม่โคนมพันธุ์ทรอปิคอล โฮลสไตน์ที่มีปัญหาสมติดยากทั้งหมด 4,630 ตัว ผู้วิจัยได้ทำการคำนวณหาขนาดของกลุ่มตัวอย่างจากสูตรของ Yamane (1973) ดังนี้

$$n = \frac{N}{1+N(e)^2}$$

โดยที่ n คือจำนวนตัวอย่าง

N คือจำนวนประชากรแม่โคที่มีปัญหาสมติดยากในจังหวัดลพบุรีและสระบุรี

e คือค่าความคลาดเคลื่อนที่รับได้ (5%)

เมื่อแทนค่า จะได้

$$n = \frac{4,630}{1+4,630(0.05)^2} = 368.19$$

ดังนั้นนักวิจัยจำเป็นต้องเก็บตัวอย่างจำนวนอย่างน้อย 369 ตัวอย่างเพื่อให้มีความน่าเชื่อถือที่ 95% (p value=0.5)

วิธีการทดลอง

1. สำรวจแม่โคนมลำดับท้องที่ 1-8 ที่มีประวัติการผสมเทียมซ้ำมากกว่า 3 ครั้ง และมีวันผสมเทียมอยู่ในช่วงเดือนธันวาคม 2559 – กันยายน 2561 จากกระบบฐานข้อมูลโคนม สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

2. เก็บตัวอย่างเลือดจำนวน 10 มิลลิลิตร ในช่วงวันที่ 28 หลังผสมเทียม 1 ครั้ง ในฟาร์มโคนม พร้อมสัมภาษณ์เหตุผลของการผสมซ้ำมากกว่า 3 ครั้งกับเกษตรกรโดยตรง และจดบันทึกวันที่เก็บตัวอย่างเลือด หมายเลขตัวอย่าง ชื่อโค และ รหัสโค บั่นแยกซีรัมและเก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อรอตรวจทางห้องปฏิบัติการภายใน 1 อาทิตย์หลังเก็บตัวอย่าง

3. การตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ

3.1 การตรวจวิเคราะห์ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน ตามวิธีในคู่มือจากชุดตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนด้วยอิลิซ่าของ EuroProxima (The Netherlands)

3.2 การตรวจวิเคราะห์โปรตีนเกี่ยวกับการตั้งท้องตามวิธีในคู่มือจากชุดตรวจวิเคราะห์ฮอร์โมนเกี่ยวกับการตั้งท้อง (Bovine pregnancy test kit) ของ Idexx (USA)

3.3 การแปลผลทางห้องปฏิบัติการ

แบ่งผลที่ได้ออกเป็น 4 กลุ่มจากผลของการตรวจ PAG/Progesterone ของ Matthew and Nagappan (2003) ดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1 (+/+) ท้อง

กลุ่มที่ 2 (+/-) ท้อง แต่มีการสูญเสียตัวอ่อนระยะแรก

กลุ่มที่ 3 (-/+) ไม่ท้อง และมีคอร์ปัสลูเทียม

กลุ่มที่ 4 (-/-) ไม่ท้อง

4. ติดตามแม่โคที่ได้รับการวินิจฉัยจากผลทางห้องปฏิบัติการว่าท้อง โดยมีระยะตรวจท้องเพื่อยืนยันผลการตั้งท้องดังนี้ 45-50 วันหลังผสมเทียม ทำการตรวจท้องด้วยเครื่องอัลตราซาวด์

60-90 วันหลังผสมเทียม ทำการล้างตรวจท้องผ่านทางทวารหนัก

280 วันหลังผสมเทียม ยืนยันจากวันคลอดจริง

5. บันทึกผลการตรวจในระบบฐานข้อมูลโคนม สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นของตัวอย่างทั้งหมดด้วย สถิติเชิงพรรณนา และ คำนวณค่าจำเพาะ (Specificity) ค่าความไว (Sensitivity) และค่าความชุก (Prevalence) โดยใช้ซอฟต์แวร์การคำนวณทางสถิติของ MEDCALC® (https://www.medcalc.org/calc/diagnostic_test.php, Belgium) ซึ่งมีสูตรคำนวณดังต่อไปนี้

ค่าจำเพาะ (Specificity) = (ผลลบแท้จริง/ผลลบแท้จริง+ผลบวกเทียม) × 100

ค่าความไว (Sensitivity) = (ผลบวกแท้จริง/ผลบวกแท้จริง+ผลลบเทียม) × 100

ค่าความชุก (Prevalence) = (ผลบวกแท้จริง+ผลลบเทียม/ตัวอย่างทั้งหมด) × 100

ผลการทดลองและวิจารณ์

ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

การเก็บตัวอย่างจากโคที่มีประวัติผสมติดยาก มีความแม่นยำสูงโดยใช้ข้อมูลในระบบฐานข้อมูลโคนม สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ และมีการชี้เป้าในการเก็บตัวอย่างเป็นรายสัปดาห์ทำให้ได้ตัวอย่างที่มีวันผสมเทียมกระจายกันอย่างสม่ำเสมอในรอบ 2 ปีที่เก็บตัวอย่าง (Figure 1) เมื่อวิเคราะห์วันผสมเทียมตามฤดูกาล พบว่ามีการผสมเทียมในฤดูร้อนร้อยละ 27.75 ฤดูฝนร้อยละ 35.30 และฤดูหนาวร้อยละ 36.95

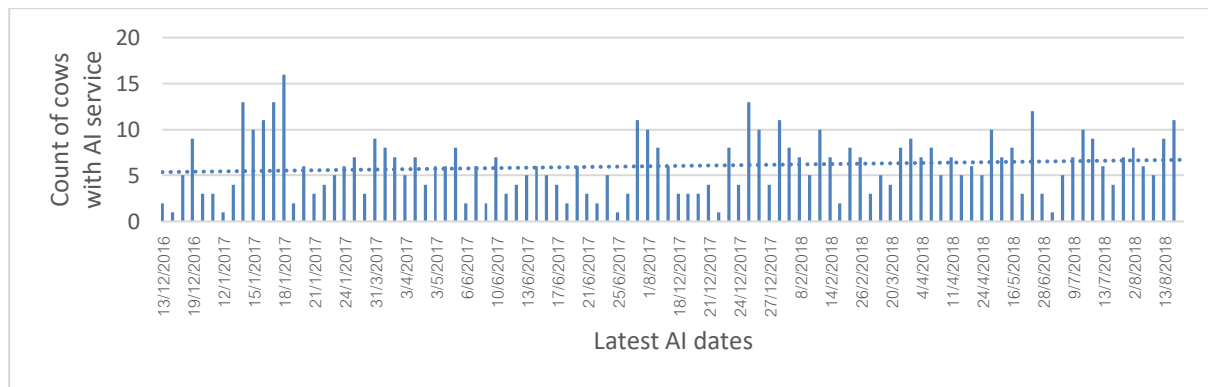


Figure 1 AI service number each day from December 2016 to August 2018

โดยมีข้อมูลทั่วไปเกี่ยวกับอายุ รอบการให้นม ครั้งที่ผสมล่าสุด และ วันที่เก็บตัวอย่างหลังการผสมเทียม (Table 1) เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อแสดงให้เห็นถึงลักษณะทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

Table 1 Data distribution (n=609)

Items	Means	Standard Division
Age of cow (year)	7.22	2.73
Lactation no.	2.37	1.92
Number of AI service	6.16	2.74
Interval time of sample collection (day)	28.14	2.30

การตรวจทางห้องปฏิบัติการ

การตรวจทางห้องปฏิบัติการเพื่อตรวจฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนและฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการตั้งครรภ์ในตัวอย่างซีรัมจำนวน 609 ตัวอย่าง การแปลผลของการสูญเสียตัวอ่อนระยะแรก วันที่ 1-27 หลังผสมเทียม (Table 2) พบแม่โคที่มีภาวะ EEL 103 ตัวอย่างเป็นผลบวกจริง 31 ตัวอย่าง และผลบวกเทียม 72 ตัวอย่าง ส่วนอีก 506 (609-103) ตัวอย่างไม่พบภาวะ EEL ซึ่งเป็นผลลบจริงทั้งหมด ดังนั้นจะสามารถคำนวณค่าจำเพาะ (Specificity) และค่าความไว (Sensitivity) ของการตรวจภาวะ EEL ด้วยวิธีนี้ได้ร้อยละ 87.54 (506/506+72) และร้อยละ 100 (31/31+0) ตามลำดับ

Table 2 Embryonic Death determination at 28 days after AI

Status	PAG/Progesterone	No. of cow	percentage
Pregnant	+/+	197	32.35
Pregnant with embryonic loss	+/-	103	16.91
Total pregnant cows		300	49.26
Non-pregnant with retained corpus luteum	-/+	67	11.00
Non-pregnant	-/-	242	39.74
Total non-pregnant cows		309	50.74
Total		609	100.00

การตรวจฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในซีรัมโค หากต้องการใช้เพื่อตรวจท้องโดยตรงนั้นจำเป็นต้องมีการตรวจเป็นลำดับ (series) ในโคตัวเดิมก่อนและหลังจากผสมเทียมเนื่องจากจำเป็นต้องหาค่าฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนพื้นฐานเฉพาะตัวซึ่งจะมีค่าความเข้มข้นอยู่ระหว่างต่ำจนตรวจหาค่าไม่ได้จนถึง 5.6 ng/ml และใช้ค่าความเข้มข้นที่เปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นจากเดิมเพื่อบ่งชี้ว่าโคท้อง (Henricks, 1972) ดังนั้นการใช้ความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเพียงครั้งเดียวเพื่อตรวจว่าโคท้องจึงไม่สามารถใช้ตรวจท้องได้ แต่เมื่อมีการใช้ผลการตรวจท้องด้วยโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตั้งท้องซึ่งมีความแม่นยำสูงสุดในการตรวจท้อง (Karen et al., 2015) ร่วมกับผลการตรวจฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนโดยกำหนดตรวจในวันที่ 28 หลังผสมเทียม สามารถนำมาวิเคราะห์และแปลผลเพื่อบ่งชี้การเกิดภาวะ EEL ได้ ผู้วิจัยจึงกำหนดค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในเลือดที่ใช้เป็นค่าความเข้มข้นมาตรฐานในการให้ผลบวกหรือลบ (cut off value) ในการศึกษครั้งนี้จากค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนเฉลี่ยของตัวอย่างทั้งหมด (3.49 ± 2.55 ng/ml) โดยถ้ามีค่ามากกว่าหรือเท่ากับ 3.5 ng/ml แปลผลว่าโคท้อง และถ้ามีค่าน้อยกว่า 3.5 ng/ml แปลผลว่าโคไม่ท้อง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Gabor et al. (2007) ที่ให้ผลท้องเมื่อค่าเข้มข้นของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนมากกว่า 4 ng/ml และ ให้ผลสงสัยว่าท้อง เมื่อค่าความเข้มข้นของโปรเจสเตอโรนอยู่ระหว่าง 2-4 ng/ml

ในส่วนของผลไม่ท้อง (Table 2) พบว่ามีจำนวนถึงร้อยละ 50.74 แสดงให้เห็นว่าโคที่มีปัญหาผสมติดยากจะผสมติดยากกว่าโคปกติอยู่ 2 เท่าตั้งแต่เริ่มผสมครั้งที่ 4 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Yusuf et al. (2010) ดังนั้น เจ้าหน้าที่ผสมเทียมจึงควรเช็คประวัติของโคที่จะผสมและตรวจระบบสืบพันธุ์ก่อนการผสมเทียมในโคที่ผสมติดยากเพื่อเป็นการแก้ปัญหาในระบบสืบพันธุ์เบื้องต้น และเพิ่มอัตราการผสมติดในการผสมเทียมครั้งถัดไป

การตรวจท้องด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ การล้วงตรวจทางทวารหนัก และบันทึกผลการคลอด

ผลตรวจการตั้งท้องด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ การล้วงตรวจท้องทางทวารหนัก และการบันทึกผลการคลอด พบว่ามีแม่โคท้องเหลือเพียง 202 ตัวเนื่องจากมีการสูญเสียตัวอ่อนระยะ 1-27 วันหลังผสมเทียมจำนวน 31 ตัว และสูญเสียตัวอ่อนในระยะ 28-90 วันหลังผสมเทียมเพิ่มอีก 67 ตัว คิดเป็นอัตราการสูญเสียการตั้งท้องทั้งหมดในระยะการตั้งท้องวันที่ 1-90 ร้อยละ 32.67 (98/300) ซึ่งอัตราการสูญเสียมีอัตราอยู่ในช่วงเดียวกับงานวิจัยอื่นๆที่ผ่านมาในหลายประเทศ (Szenci et al., 1998; Sartori et al., 2002; Sartori et al., 2006; Gabor et al., 2007) แต่ไม่มีข้อมูลเพียงพอที่จะระบุสาเหตุของการเกิดภาวะการณนี้ และเนื่องด้วยงานวิจัยนี้ศึกษาเฉพาะเจาะจงทำในกลุ่มโคที่มีปัญหาผสมติดยาก ซึ่งเป็นประชากรที่อาจพบปัญหานี้ได้มากกว่ากลุ่มประชากรโคปกติ ทำให้อัตราการสูญเสียการตั้งท้องอยู่ในช่วงที่สูง โดยในส่วนระยะห่างของวันผสมเทียมระหว่างครั้งที่สูญเสียตัวอ่อนกับการผสมเทียมครั้งถัดไปมีค่าเฉลี่ยถึง 78.56 ± 51.52 วัน คิดเป็นประมาณ 4 เท่าของระยะวงรอบการเป็นสัดปกตินั้นสามารถแก้ไขปัญห่าเบื้องต้นได้ด้วยการตรวจท้องด้วยการอัลตราซาวด์หลังจากผสมเทียมไปแล้ว 45-50 วันเพื่อยืนยันผลการตรวจท้องทางห้องปฏิบัติการ เมื่อพบว่าไม่ท้องหรือมีการสูญเสียตัวอ่อน จะได้มีการจัดการระบบสืบพันธุ์ให้พร้อมผสมในรอบการเป็นสัดต่อไป

ความชุกของการสูญเสียตัวอ่อนของแม่โคระยะแรก

เมื่อนำจำนวนครั้งของการผสมเทียมในแม่โคที่มีปัญหาผสมติดยากที่พบในจังหวัดลพบุรี และสระบุรีที่มีการสูญเสียตัวอ่อนระยะแรก (n=98) พบว่าการผสมเทียมตั้งแต่ 4 ครั้งจนถึงสูงสุด 22 ครั้ง (Figure 2) และมีการ



กระจายตัวของรอบการให้นมตั้งแต่รอบที่ 0 ถึงรอบที่ 8 (Figure 3) แต่พบสูงสุดในแม่โคท้องที่ 2 โดยปัญหาส่วนใหญ่ที่พบจากการสัมภาษณ์เกษตรกรโดยตรงคือการจัดการระบบสืบพันธุ์หลังคลอดที่เกษตรกรจำเป็นต้องรอเวลาอย่างน้อย 3 เดือนก่อนการผสมครั้งถัดไปทำให้ไม่ได้ผสมเทียมในรอบการเป็นสัดที่ถูกต้อง ความแม่นยำผสมเทียมในช่วงเวลาที่เหมาะสมหลังจากแม่โคเป็นสัดมีน้อยเนื่องจากให้เจ้าหน้าที่ผสมเทียมให้โคในเวลาที่เหมาะสมที่หรือเจ้าของฟาร์มสะดวกเป็นหลัก มีการผสมโคที่แสดงอาการเป็นสัดต่างเวลา พร้อมๆกัน และความเชื่อของเกษตรกรเรื่องโคสาวที่จะต้องพยายามผสมให้ติด แม้ว่าจะต้องผสมมากกว่า 3 ครั้งก็ตาม โดยไม่ได้ตรวจระบบสืบพันธุ์เพื่อแก้ปัญหาผสมติดยากก่อนการผสมเทียมหลังจากครั้งที่ 4 เป็นต้นไป

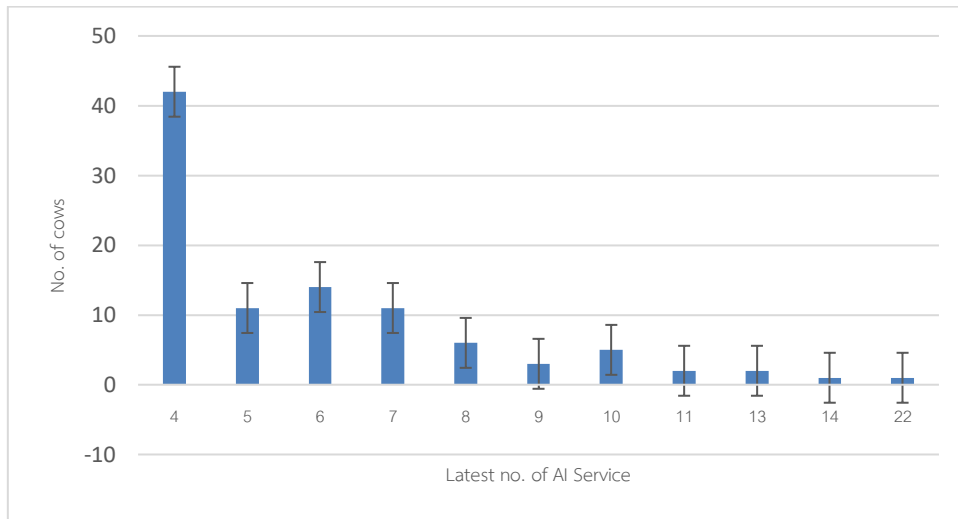


Figure 2 Number of repeat breeder with ED categorizes by latest no. of AI service

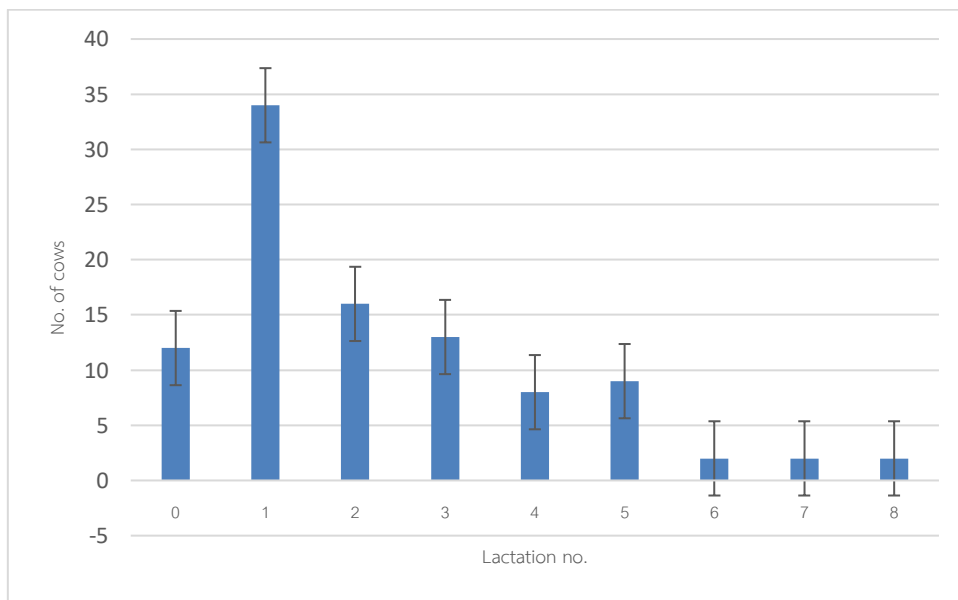


Figure 3 Number of repeat breeder with ED categorizes by lactation no.

ค่าความชุกของการสูญเสียตัวอ่อนระยะแรกในแม่โคนมพันธุ์ทรอปิคอล โฮลสไตน์ที่มีปัญหาผสมติดยากในเขตพื้นที่จังหวัดสระบุรีและลพบุรีคำนวณได้ร้อยละ 16.09 (98/609) ซึ่งสามารถประมาณการจำนวนแม่โคที่มีปัญหาผสมติดยากและการสูญเสียตัวอ่อนระยะแรกในทั้งจังหวัดลพบุรีและสระบุรีในปีงบประมาณ 2562 ได้เป็น

จำนวน 703 ตัว จากประชากรมีปัญหาสมติดยากทั้งหมด 4,370 ตัว (Table 3) โดยแม่โคดังกล่าวมีอายุเฉลี่ยเท่ากับ 6.96 ± 2.71 ปี และระยะห่างของวันผสมระหว่างครั้งที่สูญเสียตัวอ่อนกับครั้งถัดไปเฉลี่ยแล้ว 78.56 ± 51.52 วัน

Table 3 Number of AI cows, repeat breeder and estimated cows with ED in Saraburi and Lopburi Provinces during the past 5 years.

Items	Fiscal year				
	2019	2018	2017	2016	2015
Number of AI cows (n)	19,262	27,727	28,062	33,603	26,090
Repeat breeder	4,370	5,590	5,784	6,777	4,630
Percentage of Repeat breeder	22.69	20.16	20.61	20.17	17.75
Estimated no. of ED cows	703	899	931	1090	745

Source: Department of Livestock Development (2019)

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาความชุกของการสูญเสียตัวอ่อนระยะแรกในแม่โคนมพันธุ์ทรอปิคอล โฮลสไตน์ที่มีปัญหาสมติดยากในพื้นที่จังหวัดสระบุรี และลพบุรี ในช่วงปีงบประมาณ 2560 ถึง 2561 พบแม่โคที่สูญเสียตัวอ่อนระยะแรก 1-27 วันหลังผสมเทียม 31 ตัว แม่โคที่สูญเสียตัวอ่อนระยะ 28-90 วันหลังผสมเทียม 67 ตัว คิดเป็นความชุกของการสูญเสียตัวอ่อนระยะแรกร้อยละ 16.09 (98/609)

ข้อเสนอแนะ

ปัญหาสมติดยากของโคนมในเขตพื้นที่จังหวัดสระบุรีและลพบุรี แม้ไม่ได้มีสาเหตุหลักมาจากการสูญเสียตัวอ่อนระยะแรก และอัตราการสูญเสียจากการศึกษาครั้งนี้จะมีความสูงนัก แต่ก็ยังเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาเชิงวิเคราะห์หรือการศึกษาเชิงทดลองอื่นๆ ต่อไปในอนาคต อีกทั้งสามารถใช้เฝ้าระวัง และหาแนวทางแก้ไขเพื่อลดการสูญเสียตัวอ่อนในระยะแรกได้ เช่น การจัดการสภาพแวดล้อมภายในฟาร์มที่เหมาะสม และลดสาเหตุที่ทำให้เกิดความเครียด ช่วยลดความสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจ ทำให้เกษตรกรมีอาชีพการเลี้ยงโคนมในประเทศไทยได้อย่างยั่งยืน

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณเกษตรกรโคนมในจังหวัดลพบุรีและสระบุรีทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างเจ้าหน้าที่ผสมเทียมศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี ที่อำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง และ ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่าน ในการสนับสนุน และให้ความอนุเคราะห์ช่วยเหลือจนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จ ลุล่วงได้ด้วยดี



เอกสารอ้างอิง

- Beal, W.E., R.C. Perry, and L.R. Corah. 1992. The use of ultrasound in monitoring reproductive physiology of beef cattle. *J. Anim. Sci.* 70: 924–929.
- Cartmill, J.A., S.Z. El-Zarkouny, B.A. Hensley, T.G. Rozell, J.F. Smith and J.S. Stevenson. 2001. An alternative AI breeding protocol for dairy cows exposed to elevated ambient temperatures before or after calving or both. *J. Dairy Sci.* 84:799–806.
- Department of Livestock Development. 2019. iDairy, Dairy cow database system. Bureau of Biotechnology in Livestock Production. Available source: <http://164.115.24.111:8088/iDairy>, August 30, 2019.
- Diskin, M.G., M.H. Parr and D.G. Morris. 2011. Embryo death in cattle: an update. *Reprod. Fertil. Dev.* 24: 244-251.
- Gabor, G, F. Toth, L. Ozsvari, Z. Abonyi-Toth and R.G. Sasser. 2007. Early detection of pregnancy and embryonic loss in dairy cattle by ELISA tests. *Reprod Domest Anim.* 42: 633-6.
- Henricks, D. M, J. F Dickey, J. R. Hill and W. E Jonhston. 1972. Plasma Estrogen and Progesterone Levels after Mating and During Late Pregnancy and Postpartum in Cows. *Endocrinology.* 90(1): 1336–1342.
- Humblot, P. 2001. Use of pregnancy specific proteins and progesterone assays to monitor pregnancy and determine the timing, frequencies and sources of embryonic mortality in ruminants. *Theriogenology.* 56: 1417–1433.
- Islam, M., D. G., M. Habib, M. Ershaduzzaman, M.Y. Ali, M. Kabir, M.S. Akter, M. Aktaruzzaman, M.S. Uddin, S. Rahman and M. Afroz. 2018. Effect of feeding concentrate on the reproductive efficiency of repeat breeder cows at Baghabari milk shed area. *AJMBR.* 4(1), 137-140.
- Karen, A., A.C. Bajcsy, R. Minoia, R. Kovács, N.M. De Sousa, J.F. Beckers, J. Tibold, I. Mádl and O. Szenci. 2014. Relationship of progesterone, bovine pregnancy-associated glycoprotein-1 and nitric oxide with late embryonic and early fetal mortalities in dairy cows. *The Journal of reproduction and development.* 60: 162-167.
- Karen, A., N.M.D. Sousa, J.F. Beckers, Á.C. Bajcsy, J. Tibold, I. Mádl and O. Szenci. 2015. Comparison of a commercial bovine pregnancy-associated glycoprotein ELISA test and a pregnancy-associated glycoprotein radiomimmunoassay test for early pregnancy diagnosis in dairy cattle. *Animal Reproduction Science.* 159: 31-37.
- Lafrance, M., A.K. Goff, P. Guay and D. Harvey. 1989. Failure to maintain luteal function: a possible cause of early embryonic loss in a cow. *Can. J. Vet. Res.* 53: 279-284.

- Matthew C.L. and M. Nagappan. 2003. Compositions and methods for accurate early pregnancy diagnosis. Inventors; Univ Missouri, Monsanto Technology Llc. Available source: <https://patents.google.com/patent/WO2003043524A2/en>, April 2, 2016.
- Romano, J.E. and J.E. Larson. 2010. Accuracy of pregnancy specific protein-B test for early pregnancy diagnosis in dairy cattle. *Theriogenology*. 74: 932-939.
- Santos, J.E., W.W. Thatcher, R.C. Chebel, R.L. Cerri and K.N. Galvao. 2004. The effect of embryonic death rates in cattle on the efficacy of estrus synchronization programs. *Anim. Reprod. Sci.* 82-83: 513-535.
- Sartori, R., R. Sartor-Bergfelt, S.A. Mertens, J.N. Guenther, J.J. Parrish and M.C. Wiltbank. 2002. Fertilization and early embryonic development in heifers and lactating cows in summer and lactating and dry cows in winter. *J Dairy Sci.* 85: 2803-2812.
- Sartori, R., A. Gumen, J.N. Guenther, A.H. Souza, D.Z. Caraviello and M.C. Wiltbank. 2006. Comparison of artificial insemination versus embryo transfer in lactating dairy cows. *Theriogenology*. 65: 1311-21.
- Silke, V., M.G. Diskin, D.A. Kenny, M.P. Boland, P. Dillon, J.F. Mee and J.M. Sreenan. 2002. Extent, pattern and factors associated with late embryonic losses in dairy cows. *Anim. Reprod. Sci.* 71:1-12.
- Szenci, O., J. F. Beckers, P. Humblot, J. Sulon, G. Sasser, M. A. M. Taverne and G. Schekk. 1998. Comparison of ultrasonography, bovine pregnancy-specific protein B and bovine pregnancy-associated glycoprotein 1 tests for pregnancy detection in dairy cows. *Theriogenology*. 50(1), 77-88.
- Tefera, N., N. Jeanguyot, M. Thibier and P. Humblot. 2001. Pregnancy-specific protein B (bPSPB) and progesterone monitoring of post-partum dairy cows with placental retention. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 48: 331-336.
- Yamane, T. 1973. *Statistics: An Introductory Analysis*. 3rd Ed. Harper and Row Publications. New York.
- Yusuf, M., T. Nakao, R.B. Ranasinghe, G. Gautam, S.T. Long, C. Yoshida, K. Koike and A. Hayashi. 2010. Reproductive performance of repeat breeders in dairy herds. *Theriogenology*. 73: 1220-1229.



ผลของ PMSG ร่วมกับโปรเจสเทอโรนชนิดสอดช่องคลอดในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและ ผสมเทียมแบบกำหนดเวลาต่ออัตราการตั้งท้องในกระบือปลัก

กอบสุข ทองสอดแสง^{1/} ธนพล แอมปรัชฌาย์^{2/} ฉัตรชัย สืบคำ^{2/} สุกัญญา ลีทองดี^{3/}

บทคัดย่อ

ปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งที่มีผลต่อประสิทธิภาพการเพิ่มจำนวนประชากรกระบือปลักคือเกษตรกรไม่สามารถจับสัดได้หรือจับสัดยาก การเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมแบบกำหนดเวลาเป็นอีกวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตในกระบือปลัก วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลของ PMSG ร่วมกับโปรเจสเทอโรนชนิดสอดช่องคลอด (CIDR-B®) ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมแบบกำหนดเวลาต่ออัตราการตั้งท้อง โดยคัดเลือกแม่กระบือปลักเพศเมียจำนวน 60 ตัว ในฟาร์มเกษตรกรพื้นที่จังหวัดนครพนม แบ่งกลุ่มออกเป็น 2 กลุ่มๆละ 30 ตัว ได้แก่ กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง กลุ่มควบคุมใช้โปรแกรมเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย CIDR-B® ร่วมกับ PGF_{2α} และกลุ่มทดลองใช้โปรแกรมเหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบเดียวกันและเสริมด้วยฮอร์โมน PMSG ทำการทดลองโดยการสอด CIDR-B® เข้าทางช่องคลอดกระบือในวันเริ่มต้นการทดลองหลังจากนั้น ในวันที่ 11 ถอด CIDR-B® พร้อมฉีด PGF_{2α} ให้กระบือทั้ง 2 กลุ่มและฉีด PMSG เฉพาะในกลุ่มทดลอง ผสมเทียมชั่วโมงที่ 60 และ 72 หลังการถอด CIDR-B® และตรวจการตั้งท้องด้วยการล้วงตรวจร่วมกับใช้เครื่องอัลตราซาวด์หลังจากผสมเทียม 60 วัน ผลการทดลองพบว่าอัตราการเป็นสัดของกระบือกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง คือ 73.33% (22/30) และ 86.60% (26/30) ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในทางกลับกันพบว่าอัตราการตั้งท้องของทั้ง 2 กลุ่มคือ 33.33% (10/30) และ 60.00% (18/30) ตามลำดับ ซึ่งแม่กระบือปลักกลุ่มทดลองมีอัตราการตั้งท้องสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) สรุปผลการทดลองนี้ คือ กระบือปลักสามารถถูกเหนี่ยวนำให้เป็นสัดโดยใช้โปรแกรมเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย CIDR-B® ร่วมกับ PGF_{2α} และสามารถผสมเทียมโดยวิธีกำหนดเวลาได้ ซึ่งการใช้ PMSG ร่วมในโปรแกรมการผสมเทียมสามารถเพิ่มอัตราการตั้งท้องให้สูงกว่ากระบือที่ไม่ได้รับ PMSG ผลการทดลองนี้สามารถใช้เป็นแนวทางการจัดการเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์กระบือปลักต่อไป

คำสำคัญ: กระบือปลัก การเหนี่ยวนำการเป็นสัด ผสมเทียมแบบกำหนดเวลา

เลขทะเบียนผลงานวิชาการ : 63(2)-0208-104

^{1/} ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสระบุรี สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ จ.สระบุรี

^{2/} ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพขอนแก่น สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ จ.ขอนแก่น

^{3/} คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จ.มหาสารคาม

The effect of PMSG with progesterone for synchronization and fixed time AI on pregnancy rate in swamp buffaloes

Korbsook Thongsodsaeng^{1/}, Tanapol Ampratchar^{2/}, Chatchai Suebkom^{2/}, Sukanya Leethongdee^{3/}

Abstract

One of significant problems related on increasing population of swamp buffaloes is an inappropriate estrus detection. Estrus synchronization and fixed time AI have widely been applied for enhancing in term of the productivity. The research objective was to investigate the effect of PMSG with progesterone hormone for estrus synchronization and fixed time AI on pregnancy rate in swamp buffaloes. Sixty females swamp buffaloes were selected from farms in Nakornpanom province which were healthy and had normal reproductive system. Animals were divided into 2 groups as control and experimental groups. The control group was treated with CIDR-B® and PGF_{2α} whereas the experimental group was treated with the same program plus a dose of PMSG injection at Day 11. AI was performed in all animals at day 14th. All buffaloes were pregnant examined by rectal palpation and ultrasonography on 60 days after fixed-time AI. The results indicated that the heat rate in control and experimental groups were 73.33% (22/30) and 86.60% (26/30), respectively which were not significant different ($p>0.05$). In contrast, the pregnancy rate in experimental group (60.00%) was significant different higher than the control group (33.33%) ($P<0.05$). The study showed that estrus synchronization using CIDR-B® with PGF_{2α} and the fixed time AI method could be applied to the AI procedure for the swamp buffalos. The additional PMSG injection could enhance increasing rate of pregnancy in order to manage the production of swamp buffalo.

Keywords: swamp buffalo, estrus synchronization, fixed time Artificial insemination

Registered No.: 63(2)-0208-104

^{1/}Saraburi Artificial Insemination and Biotechnology Research Center. Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Department of Livestock Development, Saraburi.

^{2/}Khon-kaen Artificial Insemination and Biotechnology Research Center. Bureau of Biotechnology in Livestock Production, Department of Livestock Development, Khon-kaen.

^{3/}The Faculty of Veterinary Science, Mahasarakham University, Mahasarakham.



คำนำ

ข้อมูลเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์และกระบือทั้งประเทศ พ.ศ. 2561 รายงานว่า ประเทศไทยมีกระบือเพศผู้จำนวน 338,526 ตัว กระบือเพศเมีย 842,497 ตัว รวมทั้งสิ้นจำนวน 1,181,023 ตัว โดยมีเกษตรกรผู้เลี้ยงกระบือจำนวน 217,539 ราย และมีแนวโน้มที่ปริมาณกระบือจะลดลงอย่างต่อเนื่อง สาเหตุมาจากการใช้เครื่องจักรแทนการใช้แรงงานกระบือ และเกษตรกรที่เลี้ยงกระบือส่วนใหญ่ไม่ได้ให้ความสำคัญกับการผลิตและการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ที่เหมาะสม ส่งผลให้กระบือมีจำนวนที่ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่ามี การบริโภคน้ำกระบือปีละกว่า 200,000 ตัว ในขณะที่มีลูกกระบือเกิดใหม่เพียงปีละประมาณ 150,000 ตัว ส่งผลให้คาดการณ์ว่ากระบือไทยอาจจะสูญพันธุ์ (กรมปศุสัตว์, 2561) นอกจากนี้กระบือปลักมีความสมบูรณ์พันธุ์ช้า (late puberty) เพศเมียแสดงอาการเป็นสัดไม่ชัดเจนหรือเป็นสัดเงียบ (silent heat) ยากต่อการจับสัดและการทำนายเวลาตกไข่ ทำให้กระบือมีช่วงไม่ให้ผลผลิต (non-productive life) ที่ยาวนานเมื่อเปรียบเทียบกับโค อีกทั้งความแตกต่างของสายพันธุ์ ฤดูกาล สภาพอากาศ การให้อาหารและอัตราการเจริญเติบโตต่างก็มีผลต่อการเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ของกระบือ (Barile, 2005) แม้ว่าในเขตอบอุ่นกระบือจะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มสัตว์ที่ผสมพันธุ์ในฤดูกาลที่มีช่วงเวลากลางวันสั้น (short-day breeder) แต่ประเทศแถบเส้นศูนย์สูตรมีช่วงแสงในแต่ละวันยาวเกือบเท่ากันตลอดทั้งปีทำให้กระบือแสดงอาการเป็นสัดและเข้าสู่ช่วงผสมพันธุ์ได้ทั้งปีหากมีการจัดการด้านอาหารที่ดีและเพียงพอ (Campanile et al., 2010)

การเหนี่ยวนำการเป็นสัดเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการช่วยเพิ่มการผสมติดให้ดีขึ้น โดยการกระตุ้นให้สัตว์เป็นสัดพร้อมกัน แล้วทำการผสมเทียมในคราวเดียวกันที่ละหลายๆตัว มีการนำโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดต่างๆที่มีความคล้ายคลึงกับที่ใช้ในโคมาใช้ในกระบือ การเหนี่ยวนำการเป็นสัดสามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วนหลัก (De Rensis and Lopez-Gatius, 2007) คือ การควบคุมระยะลูเตียล (luteal phase) ในวงจรการเป็นสัดโดยการให้ฮอร์โมน prostaglandin ($PGF_{2\alpha}$) (Prasad et al., 1978) หรือการใช้ฮอร์โมน progesterone ชนิดต่างๆ (Naseer et al., 2011) และการควบคุมการเจริญของไข่และการตกไข่โดยใช้ฮอร์โมนต่างๆ เช่น gonadotropin releasing hormone (GnRH), human chorionic gonadotropin (hCG), equine chorionic gonadotropin (eCG) และ estrogen hormone (Estradiol) เป็นต้น

Pregnant Mare Serum Gonadotropin (PMSG) เป็นฮอร์โมนที่ถูกสร้างโดยเซลล์มดลูกของแม่ม้าที่กำลังตั้งท้องระหว่าง 45-120 วัน มีค่าครึ่งชีวิตนานประมาณ 40-125 ชั่วโมง (Techakumphu et al., 2000; Gupta et al., 2001) ทำหน้าที่คล้าย Follicle Stimulating Hormone (FSH) ในการกระตุ้นรังไข่ให้มีการเจริญของกระเปาะไข่และยังมีฤทธิ์ของ Luteinizing hormone (LH) อยู่เล็กน้อยในการกระตุ้นให้ไข่ตก (Techakumphu et al., 2000) เมื่อนำมาเสริมหรือใช้ร่วมกับฮอร์โมนอื่นๆ เช่น $PGF_{2\alpha}$ และ progesterone ชนิดสอดช่องคลอด (CIDR-B[®]) จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของโปรแกรมเหนี่ยวนำการเป็นสัดให้ดีขึ้น (Neglia et al., 2003)

แม้ว่าการเหนี่ยวนำการตกไข่และผสมเทียมแบบกำหนดเวลา นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในโค (Kirkwood and Kauffold, 2015; Gugssa et al., 2016; Hall et al., 2017; Garcia-Ispuerto et al., 2018) และกระบือแม่น้ำ (Pathiraja et al., 1979; Neglia et al., 2016) แต่ยังไม่ค่อยมีการศึกษาในกระบือปลัก (Presicce et al., 2004; Campanile et al., 2005; De Rensis and Lopez-Gatius, 2007; Chaikhun et al.,

2010) ดังนั้นการทดลองในครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและเสริมด้วย PMSG ก่อนการผสมเทียมแบบกำหนดเวลา สำหรับเป็นข้อมูลเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกระบือปลักในประเทศไทย

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

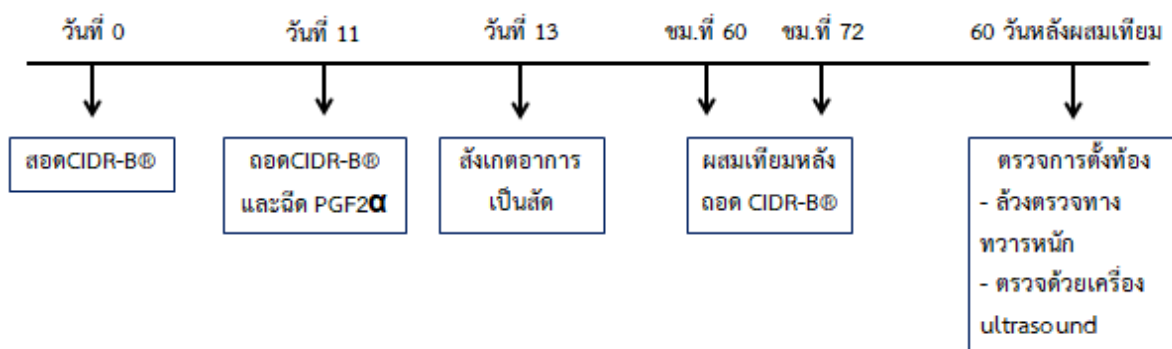
สัตว์ทดลอง

แม่กระบือปลัก จำนวน 60 ตัว ที่เคยมีลูกแล้วอย่างน้อย 1 ตัว สุขภาพแข็งแรงสมบูรณ์ มีคะแนนร่างกายระหว่าง 2.5-3.5 ทำการตรวจระบบสืบพันธุ์แม่กระบือทุกตัว โดยการล้วงตรวจผ่านทางช่องทวารหนัก และใช้เครื่องอัลตราซาวด์ตรวจดูการทำงานของรังไข่ โดยแม่กระบือที่ใช้ในการทดลองไม่มีความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ รังไข่ทำงานปกติ ไม่มีภาวะมดลูกอักเสบหรือไม่มีหนองในโพรงมดลูก

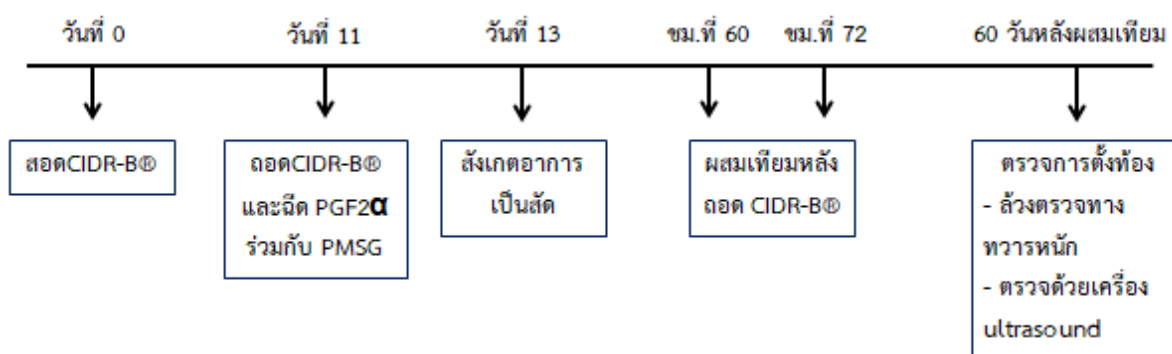
วิธีการทดลอง

แม่กระบือ ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มอย่างสุ่ม กลุ่มละ 30 ตัว เพื่อรับการเหนี่ยวนำการเป็นสัด 2 โปรแกรมดังนี้

กลุ่มที่ 1: กลุ่มควบคุม



กลุ่มที่ 2: กลุ่มทดลอง



รูปที่ 1 : แสดงโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดแต่ละกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (CIDR-B® + PGF2α) แม่กระบือปลักได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดปลดปล่อยช้า (controlled internal drug release device; CIDR-B®) ขนาด 1.38 กรัม สอดทางปากช่องคลอดในวันเริ่มต้นการทดลอง (day 0) เป็นเวลา 11 วัน และในวันที่ 11 ทำการถอด CIDR-B® ออกทำการฉีด PGF2α ขนาด 500 ไมโครกรัม เข้ากล้ามเนื้อ หลังจากนั้นทำการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์กระบือ

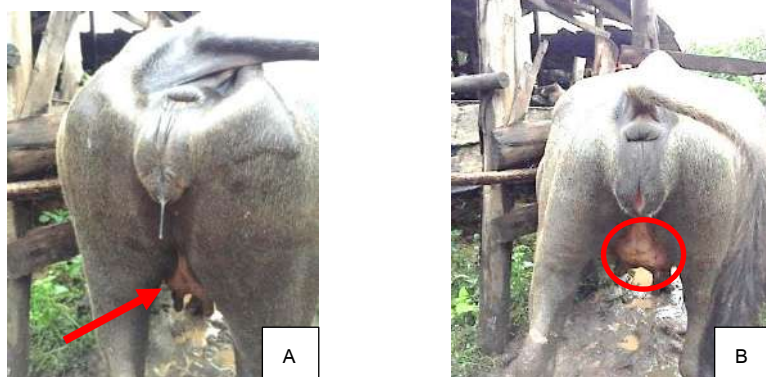
กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดลอง (CIDR-B® + PGF2α + PMSG) แม่กระบือปลักได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้ CIDR-B® ขนาด 1.38 กรัม สอดทางปากช่องคลอดในวันเริ่มต้นการทดลอง (day 0) เป็นเวลา 11 วัน และในวันที่ 11 ทำการถอด CIDR-B® ออกทำการฉีด PGF2α ขนาด 500 ไมโครกรัม และฮอร์โมน PMSG ขนาด 500 IU เข้ากล้ามเนื้อ หลังจากนั้นทำการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์กระบือ

การผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งแบบกำหนดเวลาผสมเทียม

แม่กระบือทุกตัวจะถูกผสมเทียมในเวลาที่กำหนด (Fixed-time artificial insemination) จำนวน 2 ครั้ง ที่ 60 และ 72 ชั่วโมง หลังจากทำการถอด CIDR-B® โดยเจ้าหน้าที่ผู้ผสมเทียมเพียงคนเดียวและใช้น้ำเชื้อพ่อพันธุ์กระบือตัวเดียวกันในชุดการผลิตเดียวกันที่มีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (motility) ไม่น้อยกว่า 60 เปอร์เซ็นต์

การประเมินการเป็นสัดและการตั้งท้อง

ให้เกษตรกรทำการตรวจการเป็นสัดในกระบือหลังการเหนี่ยวนำด้วยโปรแกรมฮอร์โมนทั้ง 2 กลุ่ม โดยสังเกตจากอาการแสดงเป็นสัดดังนี้ อวัยวะเพศบวมแดง แสดงอาการขึ้นขี่ตัวอื่น หรือมีกระบือตัวอื่นขึ้นขี่ พบเมือกบริเวณช่องคลอด ส่งเสียงร้อง หรือไม่กินอาหาร และหลังจากที่ทำการผสมเทียมไปแล้ว 60 วันตรวจการตั้งท้องด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ (imago, France) ที่ความถี่ 7.5 MHz บันทึกข้อมูลและคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์อัตราการเป็นสัดและอัตราการตั้งท้อง



รูปที่ 2 แสดงลักษณะอาการเป็นสัดในกระบือที่ : ภาพ A แสดงเมือกลักษณะขาวขุ่น (mucus) บริเวณช่องคลอด (ศรชี้) และภาพ B แสดงลักษณะบวมแดงของอวัยวะเพศ (ในวงกลม)



รูปที่ 3 : แสดงลักษณะของตัวอ่อนในมดลูกแม่กระปือปลักที่ตั้งท้องเป็นเวลา 60 วัน โดยการตรวจด้วยเครื่องอัลตราซาวด์

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ทางสถิติแบบไคสแควร์ (Chi-Square Test) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป เพื่อเปรียบเทียบอัตราการเป็นสัด และอัตราการตั้งท้อง

ผลการทดลอง

การแสดงผลพฤติกรรมการเป็นสัดหลังจากรับการเหนี่ยวนำ

เมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของพฤติกรรมการเป็นสัดของแม่กระปือปลักในกลุ่มทดลองที่ได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยการใช้ CIDR-B® ร่วมกับการเสริมฮอร์โมน PMSG และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการเสริม PMSG พบว่ากลุ่มที่ได้รับการเสริม PMSG มีการแสดงพฤติกรรมการเป็นสัด 86.60% ส่วนกลุ่มที่ไม่ได้รับ PMSG มีแม่กระปือแสดงพฤติกรรมการเป็นสัด 73.33% แสดงว่าแม่กระปือทั้งสองกลุ่มแสดงพฤติกรรมการเป็นสัดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.197$) (Table 1)

Table 1 Percentage of estrus detection in control and experimental groups after receiving different hormonal treatment programs.

Treatments	n	No. of estrus detection	
		Estrus	No estrus
CIDR-B® + PGF2 α	30	22 (73.33%)	8 (26.67%)
CIDR-B® + PGF2 α +PMSG	30	26 (86.60%)	4 (13.45%)

Note: number in the parenthesis indicated the percentage of estrus/non-estrus animals in each treatment which were not statically significantly different ($p > 0.05$).



อัตราการตั้งท้องหลังจากเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมแบบกำหนดเวลา

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการตั้งท้องของแม่กระบือปลักหลังจากได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยการใช้ฮอร์โมน CIDR-B® ร่วมกับการเสริมฮอร์โมน PMSG และกลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริมฮอร์โมน PMSG พบว่ากลุ่มที่ได้รับการเสริม PMSG มีแม่กระบือที่ตั้งท้อง จำนวน 18 ตัวจากทั้งหมด 30 ตัว โดยคิดอัตราการตั้งท้องเป็น 60.00% ส่วนกลุ่มที่ไม่ได้รับ PMSG มีแม่กระบือที่ตั้งท้อง จำนวน 10 ตัวจากทั้งหมด 30 ตัว โดยคิดเป็นอัตราการตั้งท้อง 33.33 % เห็นได้ว่าแม่กระบือกลุ่มที่ได้รับการเสริม PMSG มีอัตราการตั้งท้องสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการเสริม PMSG อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.035$) (Table 2)

Table 2 Percentage of pregnancy in control and experimental groups after fixed time AI .

Treatments	n	No. of pregnancy	
		Pregnancy	Non-pregnancy
CIDR-B® + PGF2 α	30	10 (33.33%) ^a	20 (66.66%) ^a
CIDR-B® + PGF2 α +PMSG	30	18 (60.00%) ^b	12 (40.00%) ^b

Note: number in the parenthesis indicated the percentage of pregnant/non-pregnant animals in each treatment with different letters in the same column were significant different at ($p < 0.05$).

วิจารณ์ผลการทดลอง

การวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยการใช้ CIDR-B® ซึ่งเป็นฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด การถอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนออกหลังจากสอดไว้ในร่างกายกระบือเป็นระยะเวลา 11 วัน จะทำให้ระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในกระแสเลือดลดลงอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้มีการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลในรังไข่ (De Rensis and Lopez-Gatius, 2007) การเสริมฮอร์โมน PMSG ในวันที่ทำการถอด CIDR-B® จะช่วยให้กระตุ้นการพัฒนาของฟอลลิเคิลในรังไข่ได้ดีขึ้น เนื่องจากฮอร์โมน PMSG มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมน FSH ซึ่งมีหน้าที่ในการพัฒนาการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิล นำไปสู่การแสดงพฤติกรรมการเป็นสัดและเกิดการตกไข่ตามมา

โดยปกติพฤติกรรมการเป็นสัดของแม่กระบือจะมีอวัยวะเพศบวมแดง ปัสสาวะกะปริดกะปรอยบางตัวส่งเสียงร้องมีลักษณะกระวนกระวายไม่กินอาหาร ปั่นตัวอื่น พบว่ามีกระบือตัวอื่นมาดมอวัยวะเพศมีเมือกไหลออกมาจากปากอวัยวะเพศจนกระทั่งมีอาการยืนนิ่งรอรับการผสมพันธุ์ (Warriach et al., 2008; Perera, 2011) ผลจากการทดลองนี้พบว่าแม่กระบือแสดงการเป็นสัดดังที่กล่าวมาทั้งในกลุ่มที่ได้รับการเสริม PMSG และกลุ่มที่ไม่ได้รับ PMSG สำหรับรายงานการวิจัยในสัตว์อื่น อภิชัย พูนชัยและคณะ (2553) พบว่าแพะที่ได้รับการเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดย CIDR-G® ร่วมกับการฉีด PMSG สามารถเหนี่ยวนำการเป็นสัดได้ผลเป็นอย่างดีและมีการตอบสนองทุกตัว ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Romano ในปี 2004 ที่แพะแสดงอาการเป็นสัดทุกตัวเช่นกัน เมื่อฟอลลิเคิลมีการเจริญเพิ่มขนาดขึ้น หมายถึงมีปริมาณฮอร์โมนเอสโตรเจนอยู่ในฟอลลิเคิลจำนวนมากมีผลต่อการควบคุมพฤติกรรม

การเป็นสัดของสัตว์ (Singh et al., 2000) อย่างไรก็ตาม ผลตรวจการตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำการเป็นสัดขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นด้วยเช่น เกษตรกรผู้จับสัตว์มีหลายคน ซึ่งแต่ละคนอาจสังเกตอาการเป็นสัดไม่เหมือนกัน ประกอบกับปัจจัยเรื่องในการเลี้ยง การจัดการรวมไปถึงความเครียด ซึ่งควรมีการศึกษาต่อไปเพื่อหาโปรแกรมการเหนี่ยวนำที่เหมาะสมในพื้นที่ประเทศไทยและใช้ประโยชน์ในการผลิตกระบือปลักต่อไป

จากผลการทดลองพบว่าเมื่อทำการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมตามโปรแกรมที่กำหนด แม่กระบือจากกลุ่มทดลองที่ได้รับ PMSG ขนาด 500 IU ในวันที่ถอด CIDR-B® มีอัตราการตั้งท้องที่ 60.00% ซึ่งสูงกว่าอัตราการตั้งท้องของแม่กระบือกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ PMSG ซึ่งมีอัตราการตั้งท้องที่ 33.33% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.035$) แสดงให้เห็นถึงการเสริม PMSG ในโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดมีผลต่ออัตราการตั้งท้องกระบือ มีรายงานการวิจัยในกระบือแม่น้ำ (Hattab et al., 2000; Rastegarnia et al., 2004) ที่มีการวัดระดับฮอร์โมนในกระแสเลือดเมื่อใช้โปรเจสเตอโรนชนิดฝังใต้ผิวหนัง (norgestomet; CRESTAR®) แต่ไม่ได้ทำการศึกษาถึงอัตราการเป็นสัดและการตั้งท้องแต่อย่างใด สำหรับการทดลองกระบือปลักในประเทศไทยโดยฉัตรชัยและคณะ ในปี 2560 ที่เปรียบเทียบผลของ CRESTAR® และ CIDR-B® โดยไม่มีการเสริมฮอร์โมน PMSG พบว่ามีอัตราการตั้งท้อง ในกลุ่มที่ใช้ CRESTAR® และ CIDR-B® เป็น 36.67% และ 30% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเสริม PMSG ของการทดลองครั้งนี้ที่มีอัตราการตั้งท้อง 33.33 % และเมื่อมีการเสริม PMSG ในโปรแกรมการเหนี่ยวนำการเป็นสัดทำให้อัตราการตั้งท้องของกระบือกลุ่มทดลองสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม การสอด CIDR-B® ในร่างกายกระบือทำให้ระดับของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในร่างกายสูงขึ้นจนยับยั้งการเจริญของฟอลลิเคิลในรังไข่ โดยยับยั้งการหลั่งฮอร์โมน FSH เมื่อถอด CIDR-B® ออกซึ่งในขณะเดียวกัน corpus luteum ที่อยู่ในรังไข่และเป็นแหล่งสร้างโปรเจสเตอโรนปกติจะสลายไปโดยการทำงานของ PGF2 α ทำให้ระดับโปรเจสเตอโรนลดต่ำลง ส่งผลให้ฟอลลิเคิลมีการพัฒนาให้มีขนาดใหญ่ขึ้นเนื่องจากอิทธิพลของฮอร์โมน FSH และ estrogen ทำให้แม่กระบือเป็นสัดและเกิดการตกไข่ด้วยอิทธิพลของฮอร์โมน LH (Fierro et al., 2016) ทั้งนี้มีงานวิจัยที่รายงานการใช้ GnRH ร่วมกับ CIDR-B® ของสุกัญญา ลีทองดีและคณะ, 2559 ที่พบว่ามีอัตราการตั้งท้องของกระบือที่ 46.15% ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างการใช้ PMSG ของการทดลองครั้งนี้ที่มีอัตราการตั้งท้องของกระบือที่ 60.00%

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองในครั้งนี้สรุปว่ากระบือสามารถถูกเหนี่ยวนำให้เป็นสัดโดยใช้ CIDR-B® และตั้งท้องโดยใช้วิธีผสมเทียมแบบกำหนดเวลาได้ และเมื่อมีการเสริมฮอร์โมน PMSG เพื่อการกระตุ้นการเจริญเติบโตของฟอลลิเคิลจะทำให้อัตราการตั้งท้องในกระบือปลักมีอัตราที่เพิ่มขึ้น ซึ่งข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์และเป็นแนวทางในการใช้เทคโนโลยีชีวภาพ เพื่อเพิ่มผลผลิตและขยายพันธุ์ของกระบือปลักต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณนายสัตวแพทย์ณรงค์ เลี้ยงเจริญ ผู้อำนวยการสำนักเทคโนโลยีชีวภาพ การผลิตปศุสัตว์ ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัย ขอขอบคุณนายสัตวแพทย์ภาณุพันธ์ พงษ์เพ็ง ผู้เชี่ยวชาญด้านวิจัยการผสมเทียมและความสมบูรณ์พันธุ์ และ สัตวแพทย์หญิง ดร. สายใจ ชื่นสุข ผู้เชี่ยวชาญด้านยีนและโรคทางพันธุกรรม



สัตว์ ที่เป็นที่ปรึกษาและให้คำแนะนำองค์ความรู้ด้านระบบสืบพันธุ์และการเขียนบทความรายงานการวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพขอนแก่น จังหวัดขอนแก่นและคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคามที่ช่วยเหลือในการให้คำปรึกษาและช่วยเหลือในการลงพื้นที่เป็นอย่างดี ขอขอบคุณเกษตรกรผู้เลี้ยงกระบือปลัก จังหวัดนครพนมที่ให้ความอนุเคราะห์สัตว์ทดลองและให้ความร่วมมือ จนสามารถดำเนินการวิจัยให้เป็นไปตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

- ฉัตรชัย สืบคำ และ กิตติศักดิ์ แสงสกุล. 2559. ผลของโปรเจสตินชนิดสอดช่องคลอดและชนิดฝังใต้ผิวหนังเพื่อผสมเทียมแบบกำหนดเวลาต่อการตั้งท้องในกระบือปลักไทย. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ (ผสมเทียม 60 ปี) :232-233.
- นิวัฒน์ ถาวระ อนนท์ เทื่องสันเทียะ และ บัณลือ กล่ำพูล. 2550. การเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย CIDR-G และ PGF2 α ร่วมกับ PMSG ต่ออัตราการผสมติดของแพะพันธุ์ซาแนน. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ 2(1):1-7.
- สุกัญญา ลีทองดี ธีรภัท คงเหล็กดี ปราณูชลี ทองสี และ อภิญา วงษ์สดชื่น. 2559. ประสิทธิภาพของโปรแกรม Ovsynch หรือ โปรแกรม Progestin ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัด ร่วมกับการกำหนดเวลาผสมเทียม ในกระบือปลัก ณ บ้านดอนสมอ อ.ศรีสงคราม จ.นครพนม, รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์งบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2558 มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. จำนวน 111 หน้า.
- อภิชัย พูนชัย อนนท์ เทื่องสันเทียะ ณรงค์ เลี้ยงเจริญ บัณลือ กล่ำพูล และ มาลี อภิเมธีจำรง. 2553. การเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมแพะด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ 5(1):116-117.
- Barile, V. 2005. Improving reproductive efficiency in female buffaloes. Livestock Production Science. 92:183-194.
- Campanile, G., PS. Baruselli, G. Neglia, D. Vecchio, B. Gasparrini, LU. Gimenes, L. Zicarelli and J. Michael. 2010. Ovarian function in the buffalo and implications for embryo development and assisted reproduction. Anim. Reprod. Sci. 121:1-11.
- Campanile, G., G. Neglia, B. Gasparrini, G. Galiero, A. Prandi, R. Di Palo, J. Michael and L. Zicarelli. 2005. Embryonic mortality in buffaloes synchronized and mated by AI during the seasonal decline in reproductive function. Theriogenology. 63:2334-2340.
- Chaikhun, T., T. Tharasanit, J. Rattanatep, F. De Rensis and M. Techakumphu. 2010. Fertility of swamp buffalo following the synchronization of ovulation by the sequential administration of GnRH and PGF 2 alpha combined with fixed-timed artificial insemination. Theriogenology. 74:1371-1376.

- De Rensis, F. and F. Lopez-Gatius. 2007. Protocols for synchronizing estrus and ovulation in buffalo (*Bubalus bubalis*): a review. *Theriogenology* 67:209-216.
- De Rensis, F., R. Saleri, P. Tummaruk, M. Techakumphu and RN. Kirkwood. 2012. Prostaglandin F2alpha and control of reproduction in female swine: a review. *Theriogenology*. 77:1-11.
- Fierro, S., C. Vinales and J. Olivera-Muzante. 2016. Concentrations of steroid hormones, estrous, ovarian and reproductive responses in sheep estrous synchronized with different prostaglandin-based protocols. *Anim. Reprod. Sci.* 167:74-82.
- Garcia-Ispuerto, I., F. De Rensis, X. Casas, F. Caballero, R. Mur-Novales and F. Lopez-Gatius. 2018. Reproductive performance of lactating dairy cows after inducing ovulation using hCG in a five-day progesterone-based fixed-time AI protocol. *Theriogenology*. 107:175-179.
- Gupta, PS., S. Nandi, BM. Ravindranatha and PV. Sarma. 2001. Effect of commercially available PMSG on maturation, fertilization and embryo development of buffalo oocytes in vitro. *Reprod. Fertil. Dev.* 13:355-360.
- Hall, JB., RK. Kasimanickam, JB. Glaze and MC. Roberts-Lew. 2017. Impact of delayed insemination on pregnancy rates to gender selected semen in a fixed-time AI system. *Theriogenology*. 102:154-161.
- Hattab, SA., AK. Kadoom, R. Palme and E. Bamberg. 2000. Effect of CRESTAR on estrus synchronization and the relationship between fecal and plasma concentrations of progestagens in buffalo cows. *Theriogenology*. 54:1007-1017.
- Kirkwood, RN. and J. Kauffold. 2015. Advances in Breeding Management and Use of Ovulation Induction for Fixed-time AI. *Reprod. Domest. Anim.* 2:85-89.
- Naseer, Z., Ahmad, Singh, J., Ahmad, N. 2011. Fertility following CIDR based synchronization regimens in anoestrous Nili-Ravi buffaloes. *Reprod. Domest. Anim.* 46:814-817.
- Neglia, G., B. Gasparrini, R. Di Palo, C. De Rosa, L. Zicarelli and G. Campanile. 2003. Comparison of pregnancy rates with two estrus synchronization protocols in Italian Mediterranean Buffalo cows. *Theriogenology*. 60:125-133.
- Neglia, G., B. Gasparrini, A. Salzano, D. Vecchio, E. De Carlo, R. Cimmino, A. Balestrieri, MJ. D'Occhio and G. Campanile. 2016. Relationship between the ovarian follicular response at the start of an Ovsynch-TAI program and pregnancy outcome in the Mediterranean river buffalo. *Theriogenology*. 86:2328-2333.
- Pathiraja, N., AS. Abeyratne, BM. Perera and V. Buvanendran. 1979. Fertility in buffaloes after oestrus synchronisation with cloprostenol and fixed time insemination. *Vet. Rec.* 104:279-281.
- Perera, BM. 2011. Reproductive cycles of buffalo. *Anim Reprod Sci* 124:194-199.



- Prasad, A., NK. Bachlaus, R. Arora and RS. Pandey. 1978. Synchronization of oestrus in buffalo-heifers with estrumate & fertility with frozen semen. *Indian J. Exp. Biol.* 16:801-802.
- Rastegarnia, A., A. Niasari-Naslaji, P. Hovareshti, F. Sarhaddi and M. Safaei. 2004. The effect of different doses of gonadorelin on ovarian follicle dynamics in river buffalo (*Bubalus bubalis*). *Theriogenology*. 62:1283-1291.
- Romano, J.E. 2004. Synchronization of estrus using CIDR, FGA or MAP intravaginal pessaries during the breeding season in Nubian goats. *Small. Rumin. Res.* 55(1):15-19.
- Singh, J., AS.Nanda and GP. Adams. 2000. The reproductive pattern and efficiency of female buffaloes. *Anim. Reprod. Sci.* 61:593-604.
- Techakumphu, M., C. Lohachit, W. Tantasuparak, C. Intaramongkol and S. Intaramongkol. 2000. Ovarian responses and oocyte recovery in prepubertal swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) calves after FSH or PMSG treatment. *Theriogenology*. 54:305-312.
- Techakumphu, M., N. Phutikanit, S. Suadsong, T. Bhumibhamon, A. Pita and G. Coygasem. 2000. The effect of GnRH supplement of FSH and PMSG treatments for prepubertal swamp buffalo calves (*Bubalus bubalis*). *J. Vet. Med. Sci.* 62:269-272.
- Warriach, HM., AA. Channa and N. Ahmad. 2008. Effect of oestrus synchronization methods on oestrus behaviour, timing of ovulation and pregnancy rate during the breeding and low breeding seasons in Nili-Ravi buffaloes. *Anim. Reprod. Sci.* 107:62-67.

ผลของชนิดน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรภายหลังการละลาย

จุฬฉัตร ขาปัญญา^{1/} พิงค์ลานนา กุญชร^{2/}

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรภายหลังการละลาย (ทรีทเมนต์) ได้แก่ Duragen® Modena™ Acromax® และ Bets-ville Thawing Solution (BTS®) วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยใช้พ่อพันธุ์สุกรดูร็อก ลาร์จไวท์ และแลนเรช จำนวนพันธุ์ละ 3 ตัว (บล็อก) ริดน้ำเชื้อสัปดาห์ละ 1 ครั้งต่อเนื่องกัน 5 สัปดาห์ น้ำเชื้อแต่ละพ่อที่ริดเก็บได้จะถูกแบ่งออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆ กันเพื่อเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งทั้ง 4 ชนิด ในอัตราส่วน 1 : 1 (v/v) ผลการศึกษาพบว่า คุณภาพน้ำเชื้อสุกรภายหลังการละลายโดยใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็ง Duragen® Modena™ Acromax® และ BTS® มีคุณภาพน้ำเชื้อไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ทั้งอัตราการเคลื่อนที่ มีค่า 42.12 ± 14.08 , 36.76 ± 13.58 , 35.57 ± 15.36 และ 37.14 ± 14.70 % ตามลำดับ อัตราการการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า 14.8 ± 9.42 , 13.01 ± 9.85 , 12.95 ± 10.09 และ 12.87 ± 9.26 % จำนวนอสุจิมิชีวิต 34.40 ± 13.53 , 38.96 ± 11.45 , 37.39 ± 10.34 และ 35.37 ± 10.73 % และความสมบูรณ์ของอะโครโซม 51.44 ± 19.15 , 51.14 ± 23.23 , 53.68 ± 21.54 และ 58.95 ± 17.60 % สรุปว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งทั้ง 4 ชนิด มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรภายหลังการละลายไม่ต่างกัน ดังนั้นจึงอาจพิจารณาเลือกใช้น้ำยาที่มีราคาต่ำที่สุดเพื่อประหยัดงบประมาณในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร หรือตามความสะดวกของผู้ใช้งาน

คำสำคัญ: คุณภาพน้ำเชื้อ น้ำเชื้อสุกร น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ

เลขทะเบียนวิจัย : 60(1)-(60:01)-0208-025

^{1/} ศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์สุกรกลาง ตำบลหนองรี อำเภอลำสนธิ จังหวัดลพบุรี

^{2/} ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ อำเภอบางบาล จังหวัดนครราชสีมา



Effect of Different Extenders on Quality of Frozen-thawed Boar Semen.

Jullachat Chapanya^{1/} Pinglanna Kunshorn^{2/}

Abstract

The objective of the present study was to compare the effect of 4 extenders on the quality of frozen-thawed boar semen. Sperm-rich fraction from nine boars was collected and froze once a week for 5 consecutive weeks. Each sample was accessed weekly for 4 treated groups: Duragen® Modena™ Acromax® and Bets-ville Thawing Solution (BTS®) by 1:1 (v/v). There was no significantly different on post-thawed semen quality between groups (Sperm motility: 42.12±14.08, 36.76± 13.58, 35.57±15.36 and 37.14±14.70 %, Progressive motility : 14.8±9.42, 13.01±9.85, 12.95± 10.09 and 12.87±9.26 %, Sperm viability : 34.40±13.53, 38.96±11.45, 37.39±10.34 and 35.37±10.73 %, Intact acrosome : 51.44±19.15, 51.14±23.23, 53.68±21.54 and 58.95±17.60 %). The results from this study indicated that these 4 extenders made no difference in post-thawed semen quality so it can be subjectively chosen for boar semen production.

Keywords: semen quality, boar semen, semen extender

Registered No. : 60(1)-(60:01)-0208-025

^{1/}Lumphayaklang Frozen Semen Production and Research Center Lamsonthi Lopburi

^{2/} Embryo Transfer Biotechnology and Animal Germplasm Research Center Pakchong
Nakhonratchasima

คำนำ

ปัจจุบันการผสมเทียมสุกรยังคงนิยมใช้น้ำเชื้อในรูปแบบการแช่เย็น ซึ่งมีข้อจำกัดในระยะเวลาการเก็บรักษา ภายหลังมีความพยายามในการปรับปรุงเทคโนโลยีการผสมเทียมด้วยการใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง แต่ยังไม่เป็นที่นิยมเท่าที่ควร เนื่องจากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งมีจำนวนลูกต่อครอกต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสด และมีความผันแปรของคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งค่อนข้างสูง (Wagne and Tibier, 2000)

การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร มีขั้นตอนที่ค่อนข้างซับซ้อนกว่าปศุสัตว์ชนิดอื่น โดยเฉพาะการปรับสมดุลอุณหภูมิของอสุจิ ที่มีอยู่ 2 ช่วง ได้แก่ การปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 15 °C และ 5 °C ซึ่งส่งผลทำให้อสุจิมีโอกาสเกิด cold shock จากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิได้ ส่งผลต่อความสามารถในการแช่แข็งและคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง (Kaeoket et al., 2008) ดังนั้นน้ำยาเจือจางที่ใช้ในแต่ละช่วงต้องมีคุณสมบัติเป็นทั้งแหล่งพลังงานและมีสารป้องกันอันตรายจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่มีผลต่อการอยู่รอดของอสุจิ ลดการเกิดกระบวนการ Lipid Peroxidation (LPO) ในขั้นตอนการเจือจางน้ำเชื้อส่งผลต่อความสามารถในการเคลื่อนที่ของอสุจิ เพื่อเป็นการเตรียมความพร้อมให้กับตัวอสุจีก่อนเข้าสู่กระบวนการแช่แข็ง (Rienprayoon, 2012)

ในขั้นตอนปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 15 °C น้ำยาเจือจางที่ใช้ถือเป็นน้ำยาเจือจางชนิดแรกที่สัมผัสกับน้ำเชื้อที่รีดเก็บมาจากพ่อสุกร ซึ่งมีหน้าที่ในการปรับสมดุลแรงดันออสโมติกและการซึมผ่านสารที่จำเป็นในการปกป้องเซลล์ไม่ให้เป็นอันตรายจากอุณหภูมิลดลงในช่วงเวลา 120 นาทีแรก และจะถูกปั่นแยกน้ำยาส่วนนี้ทิ้งเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของอสุจิในการนำไปคำนวณและเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ และทำการปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 5 °C เพื่อเตรียมความพร้อมก่อนเข้าสู่กระบวนการแช่แข็งต่อไป ซึ่งน้ำยาเจือจางแต่ละชนิดมีความสัมพันธ์กับคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง (Weitze, 1990; Reed, 1990; Althouse, 1997; Johnson, 2000) น้ำยาเจือจางสำหรับในการปรับสมดุลที่ 15 °C มีคุณสมบัติเช่นเดียวกับน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสุกรสำหรับเก็บรักษาในรูปแบบการแช่เย็น ที่มีจำหน่ายทั่วไปในรูปแบบกึ่งสำเร็จรูปหลายชนิด เช่น ชนิด short-term extender สำหรับเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อสดได้นาน 1-3 วัน ได้แก่ Bets-ville Thawing Solution (BT[®]S) และชนิด long-term extender สำหรับเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อสดได้นานมากกว่า 4 วัน ได้แก่ Modena[™] Acromax[®] (Gadea, 2003) และ Duragen[®] เก็บรักษาได้นาน 10 - 12 วัน (Marina et al., 2016)

ดังนั้นจึงศึกษาผลของชนิดน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสุกรสำเร็จรูปที่มีจำหน่ายในท้องตลาด สำหรับใช้ในขั้นตอนการปรับสมดุลอสุจีก่อนการแช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรภายหลังการละลาย

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

พ่อพันธุ์สุกรสายพันธุ์ดิวอี้ดาร์จไวท์ และแลนด์เรซ ที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ อายุระหว่าง 2-3 ปี สายพันธุ์ละ 3 ตัว รวมจำนวน 9 ตัว เลี้ยงที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาสุกร จังหวัดนครราชสีมา รีดเก็บน้ำเชื้อโดยใช้เทคนิคการใช้มือบีบนวดที่ปลายอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (gloved hand technique) สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 สัปดาห์ติดต่อกัน โดยน้ำเชื้อสดสุกรที่นำมาผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งต้องมีค่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่ต่ำกว่า 70% และค่าความผิดปกติของอสุจิในส่วนหัวและส่วนหางไม่เกิน 12% และ 25% ตามลำดับ (Buranaamnuy et al. 2009; Kaeoket et al. 2010)



การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) กำหนดให้สายพันธุ์พ่อสุกรเป็นบล็อก (block) ปัจจัยที่ศึกษา (ทรีทเมนต์) คือชนิดของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็ง (Extender I) ได้แก่ Duragen® Modena™ Acromax® และ Bets-ville Thawing Solution (BTS®) จำนวน 5 ซ้ำ โดยน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สุกรทุกตัว แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มเท่าๆ กัน เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อในอัตราส่วน 1:1 (v/v) ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 เติมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Duragen®
- กลุ่มที่ 2 เติมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Modena™
- กลุ่มที่ 3 เติมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Acromax®
- กลุ่มที่ 4 เติมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Bets-ville Thawing Solution (BTS®)

การเจือจางน้ำเชื้อและการแช่แข็ง

นำน้ำเชื้อที่ผสมกับ Extender I แต่ละทรีทเมนต์วางในภาชนะที่หล่อด้วยน้ำให้มีระดับเดียวกันกับของเหลวภายในขวด บ่มที่อุณหภูมิ 15 °C นาน 120 นาทีเพื่อปรับสมดุล เมื่อครบเวลานำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 800 x g อุณหภูมิ 15 °C นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง (Extender I) นำส่วน pellet ที่ได้มาตรวจนับความเข้มข้นอีกครั้งเพื่อเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางที่ 2 (Extender II) lactose-egg yolk (LEY; 20% ไข่แดง ในสารละลาย 11% lactose) ให้่อสุจิมีความเข้มข้น 1.5×10^9 ตัว/มิลลิลิตร และแช่เย็นที่ 5 °C นาน 90 นาที เมื่อครบเวลาเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางที่ 3 (Extender III) LEY ผสมกับ 9% glycerol และ 1.5% Equex-STM ให้มีความเข้มข้น 1.0×10^9 ตัว/มิลลิลิตร จากนั้นบรรจุน้ำเชื้อด้วยหลอดบรรจุขนาด 0.5 มิลลิลิตร นำไปอ้งไว้เหนือไอไนโตรเจนเหลว 3-4 เซนติเมตร อุณหภูมิประมาณ -120 °C นาน 20 นาที ดัดแปลงจากวิธีของ Buranaamnuay et al. (2009) และเก็บรักษาไว้ภายใต้ระดับไนโตรเจนเหลวเพื่อตรวจคุณภาพน้ำเชื้อต่อไป

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลาย

สุมน้ำเชื้อแช่แข็งจากทุกชุดการผลิต ชุดละ 3 หลอดต่อพ่อพันธุ์สุกร ละลายน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรด้วยวิธีการอุ่นในน้ำอุณหภูมิ 50 °C นาน 12 วินาที และรักษาอุณหภูมิ ตัวอย่างไว้ที่ 37 °C ตลอดการตรวจคุณภาพ ดังนี้

- 1) อัตราการเคลื่อนที่ (motility; %) อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility; %)
- 2) ความเร็วในการเคลื่อนที่ ได้แก่
 - Average Path Velocity (VAP; $\mu\text{m/s}$) หมายถึง ความเร็วในการเคลื่อนที่เฉลี่ยจากระยะทางจริงใน 1 วินาที
 - Straight Line Velocity (VSL; $\mu\text{m/s}$) หมายถึง ความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีตรง เป็นการคำนวณจากจุดหนึ่งไปยังอีกจุดหนึ่งในแนวเส้นตรงในช่วงระยะเวลา 1 วินาที
 - Curvilinear Velocity (VCL; $\mu\text{m/s}$) หมายถึง ความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีโค้ง เป็นการคำนวณแนวโน้มของการเคลื่อนที่เฉลี่ยใน 1 วินาที
- 3) ลักษณะการเคลื่อนที่ ได้แก่
 - Amplitude of Lateral Head Displacement (ALH; μm) หมายถึง ความกว้างของส่วนหัวของอสุจิที่ส่ายไปมา

- Beat Cross Frequency (BCF; Hz) หมายถึง ความถี่ของการส่ายส่วนหัวของอสุจิ
 - Straightness (STR; %) หมายถึง ความตรงในการเคลื่อนที่ ซึ่งคำนวณจากอัตราส่วนความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีตรง (VSL) ต่อความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (VAP) คูณด้วยร้อย
 - Linearity (LIN; %) หมายถึง อัตราส่วนความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีตรงต่อความเร็วเฉลี่ยของการเคลื่อนที่วิถีโค้ง (VCL) คูณด้วยร้อย
 - Wobble (WOB; %) หมายถึง อัตราส่วนความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ (VAP) ต่อความเร็วเฉลี่ยของการเคลื่อนที่วิถีโค้ง (VCL) คูณด้วยร้อย
- 4) ความผิดปกติในส่วนหางของอสุจิโดยใช้โปรแกรมตรวจความผิดปกติอสุจิด้วยเครื่อง CASA
- 5) อสุจิมีชีวิตและความสมบูรณ์ของอะโครโซมด้วยเครื่อง flow cytometer (Attune NxT, Thermo Fisher Scientific, USA) ดังนี้
- ความสมบูรณ์ของอะโครโซมโดยย้อมด้วยสี FITC-PNA (Lectin PNA From Arachis hypogaea (peanut), Alexa Fluor™ 488, Thermo Scientific, Kalamazoo, MI, L21409.) และ PI (LIVE/DEAD Sperm Viability Kit ,Molecular Probes) ตามวิธีการของ Nagy et al. (2003) นับจำนวนอสุจิทั้งสิ้น 10,000 ตัวอสุจิ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลด้วย one-way analysis of variance (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบผลเฉลี่ยด้วยวิธี Tukey's multiple comparison test กำหนดค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับร้อยละ 95 ($P > 0.05$) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ R commander version 3.5.2 (R Core Team, 2018)

ผลการทดลอง

การศึกษาเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อสุกรภายหลังการแช่แข็งที่ใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งทั้ง 4 ชนิด พบว่าสายพันธุ์สุกรไม่มีอิทธิพลต่อปัจจัยการทดลอง โดยคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งจากการเจือจางน้ำเชื้อสำหรับปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 15 °C เป็นเวลา 120 นาทีด้วยน้ำยาเจือจาง Duragen® Modena™ Acromax® และ BTS® มีอัตราการเคลื่อนที่ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Velocity) ได้แก่ VAP VSL และ VCL และลักษณะการเคลื่อนที่ (Kinematic movement) ได้แก่ ALH BCF STR LIN และ WOB มีค่าไม่ต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ดัง Table 1



Table 1 Effect of extender on post-thawed sperm motility, velocity and kinematic movement (mean $\pm$ SD)

Parameters (%)	Extenders			
	Duragen®	Modena™	Acromax®	BTS®
Total motility	42.12 $\pm$ 14.08	36.76 $\pm$ 13.58	35.57 $\pm$ 15.36	37.14 $\pm$ 14.70
Progressive motility	14.8 $\pm$ 9.42	13.01 $\pm$ 9.85	12.95 $\pm$ 10.09	12.87 $\pm$ 9.26
Velocity				
VAP (μ m/s)	80.91 $\pm$ 16.71	79.61 $\pm$ 17.15	76.36 $\pm$ 21.86	75.83 $\pm$ 21.33
VSL (μ m/s)	59.11 $\pm$ 14.50	57.77 $\pm$ 15.21	56.11 $\pm$ 17.72	55.69 $\pm$ 17.16
VCL (μ m/s)	162.90 $\pm$ 38.11	161.28 $\pm$ 35.78	152.78 $\pm$ 46.45	151.83 $\pm$ 44.95
Kinematic movement				
ALH (μ m)	7.03 $\pm$ 1.54	6.92 $\pm$ 1.29	6.70 $\pm$ 1.89	6.58 $\pm$ 1.74
BCF (Hz)	31.23 $\pm$ 1.56	31.52 $\pm$ 2.01	31.65 $\pm$ 2.92	32.24 $\pm$ 3.63
STR (%)	75.26 $\pm$ 6.76	75.14 $\pm$ 6.04	76.14 $\pm$ 7.49	76.76 $\pm$ 6.26
LIN (%)	43.18 $\pm$ 9.23	42.64 $\pm$ 9.35	44.83 $\pm$ 10.84	45.67 $\pm$ 8.68
WOB (%)	54.84 $\pm$ 6.81	54.38 $\pm$ 5.33	56.13 $\pm$ 8.10	56.70 $\pm$ 6.47

เมื่อเปรียบเทียบความผิดปกติส่วนหางของอสุจิภายหลังการแช่แข็ง (Sperm with tail defects) และอสุจิมีชีวิตภายหลังการแช่แข็ง (sperm viability and intact acrosome) พบว่า น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งทั้ง 4 ชนิด ให้ผลไม่ต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ดัง Table 2

Table 2 Effect of extender on post-thawed sperm with tail defects, sperm viability and intact acrosome (mean $\pm$ SD)

Parameters (%)	Extenders			
	Duragen®	Modena™	Acromax®	BTS®
Tail defects				
Bent tail	22.63 $\pm$ 6.89	22.77 $\pm$ 6.54	23.80 $\pm$ 7.21	23.75 $\pm$ 8.90
Coil tail	3.27 $\pm$ 1.60	3.70 $\pm$ 1.56	3.89 $\pm$ 2.18	4.01 $\pm$ 2.37
Proximal droplet	11.95 $\pm$ 4.89	12.15 $\pm$ 4.18	12.69 $\pm$ 4.78	12.64 $\pm$ 4.16
Distal droplet	8.63 $\pm$ 3.48	9.01 $\pm$ 3.49	9.26 $\pm$ 3.13	8.77 $\pm$ 3.24
Viability				
Sperm viability	34.40 $\pm$ 13.53	38.96 $\pm$ 11.45	37.39 $\pm$ 10.34	35.37 $\pm$ 10.73
Intact acrosome	51.44 $\pm$ 19.15	51.14 $\pm$ 23.23	53.68 $\pm$ 21.54	58.95 $\pm$ 17.60

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรภายหลังการละลายโดยใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสำเร็จรูปเป็นสารละลายที่ 1 (Extender I) ก่อนการแช่แข็ง ได้แก่ Duragen® Modena™ Acromax® และ BTS® มีอัตราการเคลื่อนที่ (Motility) การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (Progressive motility) ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Velocity ; VAP, VSL, VCL) ลักษณะการเคลื่อนที่ (Kinematic movement ; ALH, BCF, STR, LIN, WOB) ความผิดปกติที่ส่วนหางของตัวอสุจิ อสุจิมีชีวิต และความสมบูรณ์ของอะโครโซม ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งทั้ง 4 ชนิด ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในขั้นตอนการปรับสมดุลของตัวอสุจิเพื่อการผลิตเป็นน้ำเชื้อแช่แข็ง ต่างไปจากการเก็บรักษาน้ำเชื้อสด คือน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสำเร็จรูปมีโอกาสสัมผัสกับตัวอสุจิเพียงช่วงเวลาสั้น ๆ เท่านั้น โดยในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรนั้น น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสำเร็จรูปมีโอกาสสัมผัสกับอสุจิเพียง 90-120 นาที ในช่วงระยะปรับสมดุลหลังจากนั้นจะปั่นแยกน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อออก สอดคล้องกับ Chumpol et al. (2014) รายงานว่าน้ำเชื้อสุกรสดที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางสำเร็จรูปทั้งระยะสั้นและระยะยาวในช่วง 24 ชั่วโมงแรกไม่พบความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ

การทดลองในครั้งนี้พบว่าชนิดน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อในระยะปรับสมดุลอุณหภูมิไม่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง ในขณะที่ Rienprayoon et al. (2012) รายงานว่าการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรในขั้นตอนการปรับสมดุลของตัวอสุจิด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 15 °C เป็นเวลา 120 นาที ชนิดของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อมีอิทธิพลต่อคุณภาพน้ำเชื้อพอสุกรหลังการทำละลายอย่างมีนัยสำคัญ และ Kaeoket et al. (2011) ทำการศึกษาเปรียบเทียบน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแบบระยะยาวได้แก่ Vitasem Androstar® plus และ Modena™ กับแบบระยะสั้น ได้แก่ BTS® เป็นสารละลายที่ 1 (Extender I) ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร พบว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแบบระยะยาวชนิด Modena™ มีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการละลาย ได้แก่ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และตัวอสุจิมีชีวิต ดีกว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแบบระยะสั้น เช่นเดียวกับ Chanapiwat et al. (2008) ศึกษาการใช้ น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด Modena™ ในขั้นตอนการรักษาสเปิร์มที่ 15 °C นาน 120 นาที พบว่ามีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และตัวอสุจิมีชีวิตภายหลังการละลายดีกว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิด BTS® ในขณะที่น้ำเชื้อสด น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแบบระยะยาว สามารถรักษาสภาพตัวอสุจิให้มีอัตราการเคลื่อนที่ และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ได้ดีกว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแบบอื่น (Marina et al., 2016) อาจเนื่องมาจากน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อระยะยาว เช่น Modena™ มีปริมาณ EDTA เป็นส่วนประกอบอยู่มากกว่าสารละลายเจือจางน้ำเชื้อระยะสั้นชนิด BTS® ซึ่ง EDTA เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการจับกับแคลเซียมในน้ำเชื้อ ช่วยป้องกันการเกิดกระบวนการคาปาซิเตชัน (capacitation) และมีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Luconi et al., 2006) โดยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแบบระยะสั้น ส่วนใหญ่จะมีองค์ประกอบหลักเป็นกลูโคส EDTA โซเดียมซิเตรท โซเดียมคาร์บอเนต โพแทสเซียมคลอไรด์ ในสัดส่วนที่น้อยกว่า (Pursel and Johnson, 1975)

อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษานี้พบว่า น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสำเร็จรูปที่วางจำหน่ายทั่วไปตามท้องตลาดทั้ง 4 ชนิดที่ใช้ในขั้นตอนการปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 15 °C เป็นเวลา 120 นาทีมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการละลายไม่แตกต่างกัน โดยที่ไม่มีอิทธิพลของสายพันธุ์ แต่น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแบบระยะยาวจะมีราคาสูงกว่าแบบระยะสั้น โดยแต่ละชนิดมีราคาประมาณตั้งแต่ 80 – 360 บาท (Table 3) และสามารถเตรียมเป็นน้ำยาเจือ



จางได้ 1,000 มิลลิลิตรเท่ากัน ดังนั้นจึงอาจพิจารณาเลือกใช้น้ำยาที่มีราคาต่ำที่สุดเพื่อประหยัดงบประมาณในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร หรือตามความสะดวกของผู้ใช้งาน

Table 3 Price per unit of commercial extender

Extender	Unit price (Baht)
Duragen®	250
Modena™	360
Acromax®	180
BTS®	80

สรุปผลการทดลอง

น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งในขั้นตอนการปรับสมดุลอุณหภูมิที่ 15 °C ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ Duragen® Modena™ Acromax® และ BTS® มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งหลังการละลาย (อัตราการเคลื่อนที่ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ ลักษณะการเคลื่อนที่ ความผิดปกติส่วนหาง และความสมบูรณ์ของอะโครโซม) ไม่ต่างกัน ($P > 0.05$) ดังนั้นจึงอาจพิจารณาเลือกใช้น้ำยาที่มีราคาต่ำที่สุดเพื่อประหยัดงบประมาณในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร หรือตามความสะดวกของผู้ใช้งาน

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานการวิจัยแห่งชาติที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัย นายกมล ฉวีวรรณ และเจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยและพัฒนาสุกรที่ให้การสนับสนุนสัตว์ทดลองและให้ความช่วยเหลือในการดำเนินการวิจัย ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อนและเซลล์สืบพันธุ์สัตว์ที่ให้การสนับสนุนห้องปฏิบัติการ

เอกสารอ้างอิง

- Althouse G.C. 1997. Comparison of currently used semen extenders in the swine industry. Compent. Cont. Educ. Prac. Vet. 19: 777-782
- Buranaamnuay, K., P. Tummaruk, J. Singlor, H. Rodriguez-Martinez and M. Techakumphu. 2009. Effects of straw volume and Equex-STM® on boar sperm quality after cryopreservation. Reproduction in Domestic Animals. 44(1): 69-73
- Chanapiwat, P., K. Kaeoket, and P. Tummaruk, 2008. Quality of cryopreserved boar semen after using BTS® compared with Modena® extenders during the holding time. Proc. 46th Kasetsart University Annual Conference. : 331-337.
- Chumpol, Y., W. Thongdee and R. Pilachai, 2014. Comparative study on commercial semen extenders and storage times on the quality of boar semen. KHON KAEN AGR. J. 42 SUPPL. 4: 68-72

- Gadea. J. 2003. Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. Spanish Journal of Agricultural Research. 1: 17-27.
- Johnson, L.A., K.F. Weitze, P. Fiser, W.M.C. Maxwell. 2000. Storage of boar semen. Anim Reprod Sci. 62: 143–172.
- Kaeoket, K., K. Tantiparinyakul, W. Kladkaew, P. Chanapiwat and M. Techakumphu. 2008. Effect of different antioxidants on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. Thai Journal of Agricultural Science 41(1-2): 1-9.
- Kaeoket, K., T. Srisowanna, U. Wichaidit, P. Chanapiwat, and S. Manee-in. 2010. Comparative study on six different long term commercial extenders for fresh boar semen. Thai J. Vet. Med. 40(3): 257-263.
- Kaeoket, K., P. Chanapai, P. Junchiyaphoom, and P. Chanapiwat. 2011. The effect of using long term and short term extenders during cooling process on the quality of frozen boar semen. Thai J. Vet. Med. 41(3): 283-288.
- Luconi, M., G. Forti and E. Baldi. 2006. Pathophysiology of sperm motility. Front Biosci. 11: 1433-1447.
- Marina, A.K., G. Tsousis, C.A. Boscós, E.D. Tzika, P.D. Tassis and I.A. Tsakmakidis. 2016. A comparative study of boar semen extenders with different proposed preservation times and their effect on semen quality and fertility. ACTA VET. BRNO. 85: 023-031.
- Nagy, S., J. Jansen, E.K. Topper and B.M. Gadella. 2003. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma- and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. Biology of Reproduction. 68(5): 1828-1835.
- Pursel V.G., L.A. Johnson. 1975. Freezing of boar spermatozoa: Fertilizing capacity with concentrated semen and a new thawing procedure. J. Anim. Sci. 40: 99-102
- Reed H.C.B. 1990. Commercial requirements for an effective fresh semen diluent. Reprod. Dom. Anim. 1: 255-270
- Rienprayoon. C., C. Klangnak, S. Onton, C. Tretipskul and P. Tummaruk. 2012. A comparative study on the efficacy of four semen extenders and thawing by seminal plasma on the quality of frozen thawed boar semen. Thai J Vet Med. 2012. 42(2): 195-200.
- Wagne, H.G. and M. Tibier. 2000. World statistics for artificial insemination in small ruminants and swine. Proceedings of the 14th International congress on animal reproduction: p. 77.
- Weitze K.F. 1990. Long-term storage of extended boar semen. Reprod. Dom. Anim. 1: 231-253