

การพัฒนาน้ำยาแช่แข็งน้ำเชื้อโคเพื่อทดแทนไข่แดง

Development MJEx-3 in bull semen extenders for egg yolk replacement

สิทธิโชค นาคมนี¹, กฤดา ชูเกียรติศิริ¹, วาที คงบรรทัด² และ วิวัฒน์ พัฒนาวงศ์^{1*}

Sittichok Nakmanee¹, Krida Chukiatsiri¹, Watee Kongbuntad² and Wiwat Pattanawong^{1*}

บทคัดย่อ: การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาน้ำยาแช่แข็งน้ำเชื้อโค (MJ Extender – 3: MJEx-3) เพื่อทดแทนการใช้ไข่แดงในน้ำยาสำหรับแช่แข็งน้ำเชื้อโค วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยทดสอบในน้ำเชื้อพ่อโค 3 พันธุ์ได้แก่ พันธุ์แองกัส พันธุ์ชาร์โลเล่ และพันธุ์ทรอปิคอล แบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มควบคุม (Egg Yolk: Control) และกลุ่มน้ำยา MJEx-3 แทนไข่แดง (MJEx-3) น้ำเชื้อที่รีดเก็บได้นำไปเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 20 ล้านตัวต่อหลอดน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศา เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำมาแช่แข็งด้วยตู้ Freezer โดยลดอุณหภูมิตามโปรแกรมที่ตั้งค่าไว้ จากนั้นทำการเก็บรักษาลงในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ทำการละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่อง Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) ที่เวลาก่อนแช่แข็ง ที่ 0, 24, 48, 72 ชั่วโมง 1 สัปดาห์ และ 1 เดือนหลังแช่แข็ง ผลการศึกษพบว่า การเคลื่อนที่ของอสุจิ การตายของอสุจิ และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ลักษณะการเคลื่อนที่ของ DCL และ VCL ในกลุ่ม MJEx-3 มีมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ในลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าในกลุ่ม MJEx-3 มี Proximal Droplet และ Distal Droplet สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P<0.05$) ซึ่งจากผลการศึกษาการพัฒนาน้ำยาแช่แข็งน้ำเชื้อโค (MJEx-3) สามารถทดแทนการใช้ไข่แดงในน้ำยาสำหรับแช่แข็งน้ำเชื้อโคได้โดยไม่ส่งผลกระทบต่อ การเคลื่อนที่ของอสุจิ การตายของอสุจิ และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ

คำสำคัญ: น้ำยาแช่แข็งน้ำเชื้อ, น้ำเชื้อแช่แข็ง, พ่อพันธุ์โค

ABSTRACT: The objectives of this study was to develop MJ Extender-3 (MJEx-3) in bull semen extenders for egg yolk replacement. Experimental design was randomized completely block design (RCBD). Semen ejaculates were collected from three breed bulls: Angus, Charolais and Tropical Holstein. The experimental group was divided into 2 groups: control group (Egg Yolk: Control) and MJEx-3 liquid group instead of egg yolk (MJEx-3). Semen ejaculates were concentration of 20x106 sperm per straw (2.5 ml) and were maintained under a refrigerated environment (4 °C) for 4 hours. Then freeze with the Freezer cabinet to reduce the temperature according to the program. Storage semen ejaculates in liquid nitrogen at -196 °C, dissolved semen at 37 °C for 30 s. Sperm quality were determined by Computer Assisted Semen Analyzer (CASA) for before freezing, 0, 24, 48, 72 hr., 1 week and 1 month after freezing. Results showed that motile, static and progressive were no significant

¹ คณะสัตวศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่

Faculty of Animal Science and Technology, Maejo University, Chiang Mai, Thailand

² คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่

Faculty of Science, Maejo University, Chiang Mai, Thailand

* Corresponding author: wpattanawong@gmail.com

difference ($P>0.05$). Progressive DCL and Progressive VCL of MJEx-3 group were higher than the control group ($P<0.05$). But morphology of MJEx-3 group had proximal droplet and distal droplet were high than the control group ($P<0.05$). According to the study of the development of bull's semen extender (MJEx-3), it can replace the egg yolks in bull's semen extender without effect on sperm motility, sperm static and sperm progressive.

Keywords: Extender, Semen cryopreservation, Bull's semen

บทนำ

ในปัจจุบันการทำอาชีพการเลี้ยงโคในประเทศไทยมีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นทุกปี (กรมปศุสัตว์, 2555) และเพื่อตอบสนองความต้องการที่เพิ่มมากขึ้นในปัจจุบันจึงได้มีการนำเทคโนโลยีการผสมเทียม (Artificial insemination: AI) เข้ามาช่วยในการควบคุมพันธุ์กรรมโคให้มีประสิทธิภาพและผลผลิตมากขึ้น การผสมเทียมนั้นจะต้องใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในการผสมเทียม ซึ่งก่อนจะใช้ผสมเทียมนั้นจะต้องมีการรีดน้ำเชื้อและผ่านกระบวนการตรวจคุณภาพ เจือจางและทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยการแช่แข็ง และในการเจือจางน้ำเชื้อจะต้องอาศัยน้ำยาสำหรับแช่แข็งน้ำเชื้อที่ประกอบไปด้วยส่วนต่าง ๆ ที่มีหน้าที่แตกต่างกันสามารถแบ่งออกเป็น 5 ส่วนที่สำคัญคือ ส่วนที่เป็นแหล่งพลังงานให้สุจิ ได้แก่ ส่วนที่เป็นน้ำตาล (Glucose, Fructose) ส่วนที่เป็นบัฟเฟอร์ (Tris, Citric acid) ส่วนที่ป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็งที่ได้จาก Glycerol และส่วนที่ป้องกันปฏิกิริยา Cold Shock ในน้ำเชื้อ ได้แก่ ไข่แดงหรือไขมันและส่วนที่เป็นยาปฏิชีวนะ (Forouzanfar et al., 2010; Layek et al., 2016; บัญชา, 2545) โดยส่วนที่มีหน้าที่ในการป้องกันปฏิกิริยา Cold Shock ของน้ำเชื้อ ยังคงเป็นปัญหาที่พบในปัจจุบันเนื่องจากการใช้ไข่แดงหรือไขมันแทนในส่วนนี้ยังไม่สามารถควบคุมปริมาณและสัดส่วนให้มีความสม่ำเสมอได้ตามที่ต้องการ อาจพบการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ที่ไม่เป็นประโยชน์ต่อสุจิ (Bousseau et al., 1998; Gamal et al., 2016) และในบางประเทศยังคงมีการไม่อนุญาตให้นำน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของไข่แดงหรือไขมันเข้าประเทศ ทำให้สูญเสียโอกาสทางการค้า จึงได้มีการศึกษาเพื่อหาสารที่มีผลต่อการลดปฏิกิริยา Cold Shock ในไข่แดง พบว่าเป็นสารสกัดธรรมชาติที่เป็นส่วนประกอบฟอสฟอรัสกับกรด

ไขมัน (Phospholipid) บางชนิด เช่น Stearic, Oleic และ Palmitic เป็นส่วนประกอบสำคัญที่จำเป็นกับเยื่อหุ้มเซลล์ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทุกชนิด (Oke et al., 2010) มีหน้าที่ทำให้โครงสร้างของเซลล์มีความเสถียร (Khalifa et al., 2014) ในปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยต่างๆ ที่หาแหล่งของสารสกัดจากธรรมชาติเพื่อเป็นทางเลือกในการทดแทนไข่แดงในน้ำยาสำหรับแช่แข็งน้ำเชื้อโค และทางคณะผู้วิจัยจึงได้พัฒนาสูตรน้ำยาแช่แข็งน้ำเชื้อโค MJEx-3 ซึ่งใช้สาร Phospholipid ที่สกัดจากธรรมชาติซึ่งมีหน้าที่ในการช่วยลดปฏิกิริยา Cold Shock เช่นเดียวกับไข่แดง จึงเป็นที่มาในการเปรียบเทียบการใช้เพื่อทดแทนน้ำยาแช่แข็งน้ำเชื้อที่มีส่วนประกอบของไข่แดงเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อโค

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design, RCBD) โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มการทดลองคือ กลุ่มที่ใช้ไข่แดง (Egg Yolk: Control) และกลุ่มสูตรน้ำยาแช่แข็งน้ำเชื้อโค MJEx-3 (MJEx-3) โดยมีบล็อกคือ พันธุ์โคได้แก่ ฟอโคพันธุ์ชาร์โลเล่ (Charolais) พันธุ์แองกัส (Angus) และพันธุ์ทรอปิคอล (Tropical Holstein) อย่างละ 3 ตัว

การเก็บรวบรวมข้อมูล

น้ำเชื้อโคเนื้อได้จากการรีดเก็บจากฟอโคพันธุ์ชาร์โลเล่ (Charolais) 3 ตัว และพันธุ์แองกัส (Angus) 3 ตัว น้ำเชื้อโคเนื้อได้จากการรีดเก็บจากฟอโคพันธุ์ทรอปิคอล (Tropical Holstein) จำนวน 3 ตัว หลังจากรีดน้ำเชื้อทำการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นโดยตรวจวัดปริมาตร ความขุ่น สี กลิ่น จุลทรรศน์เพื่อตรวจให้คะแนนการเคลื่อนที่หมุน

และนำไปตรวจหาความเข้มข้นด้วยเครื่อง Spectrophotometer จากนั้นคำนวณและใส่น้ำยาสำหรับแช่แข็งน้ำเชื้อตามปริมาณที่คำนวณได้ หลังจากเจือจางน้ำเชื้อแล้วนำมาบรรจุใส่หลอดน้ำเชื้อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และนำไปเข้าตู้ Freezer เพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อ โดยจะลดอุณหภูมิจาก 4 องศาเซลเซียส ไปจนถึง -140 องศาเซลเซียส ตามโปรแกรมมาตรฐานที่ตู้ Freezer กำหนด จากนั้นนำน้ำเชื้อที่แช่แข็งเสร็จจากตู้ Freezer แล้วลงไนโตรเจนเหลว และทำการเก็บลงในถังน้ำเชื้อ ทำการประเมินน้ำเชื้อด้วยวิธีการละลายน้ำเชื้อโดยการนำมาอุ่นในน้ำสะอาดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที ตัดหลอดน้ำเชื้อใส่ในหลอดทดลองที่ควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บข้อมูลวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่อง Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) ที่เวลา ก่อนแช่แข็ง หลังแช่แข็ง 0 ชั่วโมง 24 ชั่วโมง 48 ชั่วโมง 72 ชั่วโมง 1 สัปดาห์ และ 1 เดือน

การวิเคราะห์ข้อมูล

แผนการวิเคราะห์ข้อมูลแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) ข้อมูลทั้งหมดทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) โปรแกรม SAS University Edition ใช้วิธีการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ $P < 0.05$

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลจากการใช้น้ำยาแช่แข็งน้ำเชื้อโค MJEx-3 เปรียบเทียบกับน้ำยาแช่แข็งน้ำเชื้อที่มีไข่แดง พบว่าในกลุ่มของ MJEx-3 มีค่าการตายของอสุจิ (Static) และการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Motile) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) (Table 1) สอดคล้องกับ Forouzanfar et al. (2009) ที่ทำการศึกษาในน้ำเชื้อแกะพบว่ามีความตายของอสุจิ

และค่าการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ใช้ไข่แดง ($51.9 \pm 4.8\%$) และกลุ่มใช้เลซิติน ($51.8 \pm 2.9\%$) แต่ขัดแย้งกับการศึกษาของ Gamal et al. (2016) ที่พบว่าค่าการเคลื่อนที่ของอสุจิในกลุ่มที่ใช้เลซิตินจากถั่วเหลืองความเข้มข้นที่ 1% ($56.00 \pm 1.00\%$) มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ใช้ไข่แดงเป็นส่วนใหญ่ประกอบในน้ำยาสำหรับแช่แข็งน้ำเชื้อโค ($41.00 \pm 1.00\%$) และจากการรายงานของ Crespilho et al. (2012) ที่ทำการศึกษาในน้ำเชื้อโคพบว่าค่าการเคลื่อนที่ของอสุจิในกลุ่มที่ใช้เลซิติน ($31.43 \pm 3.87\%$) มีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่ใช้ไข่แดง ($58.52 \pm 2.98\%$) ในกลุ่มของ MJEx-3 มีค่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (Progressive) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ซึ่งขัดแย้งกับการรายงานของ Khumran et al. (2015) ที่พบว่าค่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิในกลุ่มที่ใช้เลซิตินมี ($30.80 \pm 0.80\%$) ค่ามากกว่ากลุ่มที่ใช้ไข่แดง ($27.60 \pm 0.70\%$) ในส่วนของลักษณะการเคลื่อนที่พบว่าการเคลื่อนที่เป็นเส้นตรง (DCL) และความเร็วในการเคลื่อนที่เป็นเส้นโค้ง (VCL) ในกลุ่มของ MJEx-3 มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) สอดคล้องกับการศึกษาของ Crespilho et al. (2012) ที่พบว่า ค่าความเร็วในการเคลื่อนที่เป็นเส้นโค้งในกลุ่มที่ใช้เลซิติน ($139.73 \pm 5.49\%$) มีแนวโน้มมากกว่ากลุ่มควบคุมที่ใช้ไข่แดง ($136.80 \pm 5.50\%$)

ในทางด้านสัณฐานวิทยาพบว่าอสุจิที่มีหางคด (Bent tail) ในกลุ่ม MJEx-3 มากกว่ากลุ่มควบคุมในช่วงเวลาการวิเคราะห์ที่ก่อนจะแช่แข็งและหลังแช่แข็ง 24 ชั่วโมง ($P < 0.05$) (Table 2) ร้อยละของอสุจิที่มีหางขดกลม (Coiled tail) พบว่ากลุ่ม MJEx-3 มีน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ร้อยละของอสุจิที่มีลำตัวคด (Distal Midpiece Reflex: DMR) ในช่วงเวลาการวิเคราะห์หลังจากการแช่แข็ง 0 ชั่วโมง พบว่าในกลุ่ม MJEx-3 มีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อย่างไรก็ตามร้อยละของอสุจิที่มีหยดน้ำเกาะติดที่ลำตัว (Proximal Droplet) และหาง (Distal Droplet) ในกลุ่มของ MJEx-3 มีร้อยละมากกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$)

Table 1 Effects of egg yolk compare with MJEx-3 on quality of bull semen

Period		Freezing		24 hr.	48 hr.	72 hr.	1 week	1 month
		Before	After					
Static (%)	Control	20.07±8.44	42.68±10.55	41.33±10.94	37.36±10.65	32.24±4.51	38.89±10.20	43.83±7.14
	MJEx-3	30.30±6.54	37.32±13.35	42.50±13.80	44.69±7.31	39.55±10.14	40.65±14.40	45.59±9.57
Progressive (%)	Control	47.83±14.79	29.69±9.44	35.06±8.41	37.98±7.90	42.95±6.62	38.66±9.80	33.90±4.92
	MJEx-3	39.4±12.42	39.32±9.76	39.66±10.54	36.97±7.85	42.04±10.43	40.57±11.16	36.92±7.86
Motile (%)	Control	79.90 ^a ±8.48	57.32±10.55	58.66±10.94	66.03 ^a ±5.43	67.67±4.50	61.10±10.20	56.16±7.14
	MJEx-3	65.94 ^b ±11.56	62.67±13.35	57.49±13.80	55.37 ^b ±7.22	60.44±10.14	59.34±14.40	53.40±9.57
Progressive DSL (Microns)	Control	22.34±4.57	20.64±3.67	20.44±3.37	21.67±3.10	19.85±3.36	21.57±2.50	22.54±2.99
	MJEx-3	26.66±5.93	22.75±3.50	23.61±3.21	24.27±4.25	23.87±2.85	23.27±3.20	25.17±3.29
Progressive DCL (Microns)	Control	48.53 ^b ±7.76	46.02±7.14	44.45±6.50	46.25±5.21	42.45 ^b ±7.86	48.24 ^b ±4.21	48.24 ^b ±4.21
	MJEx-3	61.89 ^a ±8.15	51.49±5.56	51.36±8.45	53.66±5.07	52.28 ^a ±5.33	56.65 ^a ±5.12	56.65 ^a ±5.12
Progressive VSL (Microns/sec)	Control	59.85±9.49	54.67 ^b ±7.73	57.96±5.64	58.17±4.22	58.26±6.92	57.98±6.55	57.19±5.48
	MJEx-3	62.36±10.06	64.58 ^a ±5.44	62.33±7.51	63.36±8.08	62.76±5.99	62.61±3.58	66.96±8.13
Progressive VCL (Microns/sec)	Control	134.68 ^a ±19.07	124.01±19.37	128.12±12.28	125.96±10.76	123.20±14.91	126.78 ^b ±14.83	124.69±9.73
	MJEx-3	158.63 ^a ±16.69	147.89±11.49	138.76±22.07	141.91±12.23	141.55±10.64	139.81 ^a ±14.35	151.36±10.84
Motile DSL (Microns)	Control	17.91±4.96	15.36±2.98	15.54±2.57	16.26±2.26	15.74±3.30	17.02±2.74	17.21±2.55
	MJEx-3	18.59±5.28	17.45±2.84	18.91±3.40	19.42±3.85	19.31±3.17	18.63±1.77	20.56±3.41
Motile DCL (Microns)	Control	49.24 ^b ±8.14	43.98±8.36	40.87±5.75	42.40 ^b ±5.40	39.67 ^b ±8.32	44.26 ^b ±6.72	44.11 ^b ±4.36
	MJEx-3	58.78 ^a ±8.37	49.76±5.69	49.88±8.90	51.40 ^a ±5.43	51.14 ^a ±5.23	50.84 ^a ±5.10	55.20 ^a ±5.27
Motile VSL (Microns/sec)	Control	47.06±10.93	40.30±7.56	43.94±5.34	43.98±4.75	45.73±7.46	45.35 ^b ±6.77	44.02±5.45
	MJEx-3	48.37±11.65	50.02±5.95	51.06±7.35	51.31±8.72	51.56±6.29	51.06 ^a ±3.68	55.89±8.95
Motile VCL (Microns/sec)	Control	126.53 ^b ±21.18	111.56 ^b ±21.28	114.19±12.17	111.26 ^b ±11.69	112.15±17.00	114.70 ^b ±16.52	102.97 ^b ±7.57
	MJEx-3	148.18 ^a ±18.41	136.67 ^a ±12.10	137.50±31.30	132.21 ^a ±14.01	131.14±12.43	134.49 ^a ±10.60	143.62 ^a ±10.94

^{a,b} Mean followed by different letters are significantly different (P≤0.05)

Control: Egg Yolk, MJEx-3: MJEx-3 group

Table 2 Effects of egg yolk compare with MJEx-3 on morphology of bull semen

Period	Before Freezing	After Freezing	24 hr.	48 hr.	72 hr.	1 week	1 month
Bent Tail (%)	Control	11.10 ^b ±4.75	9.60±1.66	18.45 ^b ±2.98	10.15±2.32	7.99±3.53	12.06±4.26
	MJEx-3	24.35 ^a ±8.65	12.93±4.19	22.40 ^a ±6.08	13.25±4.02	12.73±2.81	15.86±4.47
Coiled Tail (%)	Control	1.83±0.91	0.55±0.24	0.78 ^a ±0.34	0.47±0.24	0.78±0.46	0.61±0.22
	MJEx-3	1.33±0.48	0.32±0.29	0.64 ^b ±0.53	0.48±0.24	0.52±0.66	0.57±0.21
DMR (%)	Control	0.94±0.97	1.40 ^a ±0.52	0.95±0.62	1.03±0.37	0.79±0.30	1.01±0.61
	MJEx-3	1.64±1.06	0.98 ^b ±0.54	0.89±0.53	1.34±0.57	1.04±0.46	1.11±0.78
Distal Droplet (%)	Control	1.55 ^b ±1.19	2.01±0.51	4.43±2.83	2.75±1.94	1.73±1.00	2.93 ^b ±1.22
	MJEx-3	5.26 ^a ±2.1	3.78±1.7	6.49±5.38	3.84±1.35	3.66±3.06	5.15 ^a ±2.19
Proximal Droplet (%)	Control	0.55 ^b ±0.51	0.68 ^b ±0.17	2.07 ^b ±1.64	0.88±0.85	0.72 ^b ±0.36	1.23 ^b ±0.49
	MJEx-3	2.44 ^a ±1.01	1.64 ^a ±0.70	5.73 ^a ±6.46	1.59±0.48	1.48 ^a ±1.25	2.41 ^a ±0.85

^{a,b} Mean followed by different letters are significantly different ($P \leq 0.05$)

Control: Egg Yolk, MJEx-3: MJEx-3 group

สรุปผลการทดลอง

การพัฒนาถ่าย MJEx-3 สามารถใช้ทดแทนการใช้ไข่แดงในน้ำยาสำหรับแช่แข็งน้ำเชื้อโคได้ ไม่ส่งผลกระทบต่อเคลื่อนที่ของอสุจิ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิและการตายของอสุจิ แต่จะส่งผลกระทบต่อสัณฐานวิทยาของอสุจิทำให้อสุจิมีการหางคด มีหยดน้ำเกาะติดที่ลำตัวและหางมากกว่าการใช้ไข่แดงในน้ำยาสำหรับแช่แข็งน้ำเชื้อโค อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่จะดำเนินการต่อไปเนื่องคือการทดสอบคุณสมบัติของอสุจิในการทำ IVF และการผสมเทียมในภาคสนาม

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ศูนย์วิจัยและผลิตน้ำเชื้อโครงการหลวงอินทนนท์และเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องที่ได้ให้การสนับสนุนสถานที่ในการทดลองสัตว์ทดลอง การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ และรวบรวมข้อมูลมาใช้ในการวิเคราะห์ผลทำให้การวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี อันเนื่องจากการพัฒนาน้ำยาแช่แข็งน้ำเชื้อโค (MJEx-3) อยู่ในขั้นตอนจากการจัดทำเป็นความลับทางการค้ากับทางภาคเอกชนจึงไม่สามารถเปิดเผยสูตรได้

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. 2555. การจัดทำยุทธศาสตร์โคเนื้อ. กรุงเทพฯ: พงศพิศาลธรรม. 2545. เอกสารประกอบการสอนวิชา การผสมเทียม. มหาวิทยาลัยแม่โจ้. เชียงใหม่.
- Bousseau, S., J.P. Beillard, Le Marquant, B. Guienne, B. Guérin, A. Camus and M. Lechat. 1998. Comparison of bacteriological qualities of various egg yolk sources and the in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or lecithin based diluents. *Theriogenology*. 50:699-706.
- Crespilho, A.M., M. F. Sá Filho, J.A. Dell'Aqua, M. Nichi, G.A. Monteiro, B.R. Avanzi and F.O. Papa. 2012. Comparison of in vitro and in vivo fertilizing potential of bovine semen frozen in egg yolk or new lecithin based extenders. *Livest. Sci.* 149:1-6.
- Forouzanfar, M., M. Sharafi, S.M. Hosseini, S. Ostadhosseini, M. Hajian, L. Hosseini and M.H. Nasr-Esfahani. 2010. In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen. *Theriogenology*. 73:480-487.
- Gamal, A., W.S. El-Nattat, R.I. El-Sheshtawy and A.M.A. El-Maaty. 2016. Substitution of egg yolk with different concentrations of soybean lecithin in tris-based extender during bulls' semen preservability. *Asian. Pac. J. Reprod.* 5:514-518.
- Khalifa, E.I. and M.A.M. Abdel-Hafez. 2014. Effect of soybean lecithin-base semen extender on freezability and fertility of Rahmani ram spermatozoa. *Egyptian Journal of Sheep and Goat Sciences*. 9:59-66.
- Khumran, A.M., N. Yimer, Y. Rosnina, M.O. Ariff, H. Wahid, K. Asmatullah, M. Ebrahimi and K. Sarsaifi. 2015. Butylated hydroxytoluene can reduce oxidative stress and improve quality of frozen-thawed bull semen processed in lecithin and egg yolk based extenders. *Anim. Rep. Sci.* 163:128-134.
- Layek, S.S., T.K. Mohanty, A. Kumaresan and J.E. Parks. 2016. Cryopreservation of bull semen: Evolution from egg yolk based to soybean based extenders. *Anim. Rep. Sci.* 172:1-9.
- Oke, M., J.K. Jacob and G. Paliyath. 2010. Effect of soy lecithin in enhancing fruit juice/sauce quality. *Food. Res. Int.* 43:232-240.