แก่นเกษตร 40 ฉบับพิเศษ : 37-41 (2555). KHON KAEN AGR. J. 40 SUPPLMENT : 37-41 (2012).

การประยุกต์ใช้ Phosphate buffered saline สำหรับการเจือจางน้ำเชื้อสดของแพะพื้นเมืองไทย

Application of phosphate buffered saline for fresh semen of Thai-native goat

วิไลวรรณ ขันธุแสง[1], ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์[1*], ทศพล มูลมณี[1], จิรัฐติ ธรรมศิริ[1], ศรุติวงศ์ บุญคง[1] และ วินัย ใจขาน[1]

Vilaivan Khanthusaeng[1], Chainarong Navanukraw[1*], Tossapol Moonmanee[1], Jiratti Thammasiri[1], Saruttiwong Boonkong[1] and Winai Jaikan[1]

บทคัดย่อ: วัตถุประสงค์เพื่อประยุกต์ใช้ Phosphate buffered saline (PBS) สำหรับการเจือจางน้ำเชื้อสดของแพะพื้นเมืองไทยและลดต้นทุนการผลิตแพะ โดยรีดเก็บน้ำเชื้อจากแพะพ่อพันธุ์พื้นเมืองไทยจำนวน 2 ตัว มีอายุประมาณ 3 ปี น้ำหนักตัวประมาณ 30-40 กิโลกรัม ตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อแล้วรวมน้ำเชื้อก่อนแบ่งออกเป็นสองส่วน จากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ 2 สูตร คือ Egg Yolk Tris (EYT) และ Phosphate buffered saline (PBS) ที่อัตราส่วน 1:2, 1:3, 1:4 และ 1:5 พบว่าการเจือจางน้ำเชื้อสดแพะด้วยน้ำยาเจือจาง EYT และ PBS ในอัตราส่วน 1:2 1:3 1:4 และ 1:5 ต่อการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ความเข้มข้นของตัวอสุจิ ความเป็นกรด-ด่างและค่าความดันออสโมซิสของสารละลายของน้ำเชื้อไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่อย่างไรก็ตามการเจือจางน้ำเชื้อสดด้วย PBS ในอัตราส่วน 1:2 มีเปอร์เซ็นต์ของตัวอสุจิตายน้อยกว่า EYT ($P<0.05$) และการเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางทั้งสองชนิด (EYT และ PBS) พบว่าที่อัตราส่วน 1:5 มีความเข้มข้นของอสุจิลดลง ดังนั้นการเจือจางน้ำเชื้อสดด้วย PBS ไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อสดแพะและมีราคาถูกกว่าสามารถใช้ทดแทนน้ำยาเจือจาง EYT ได้ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในสัตว์เกี่ยวกับการเจือจางน้ำเชื้อด้วย PBS ต่ออัตราการผสมติดภายหลังการผสมทียม

คำสำคัญ: คุณภาพน้ำเชื้อ, การเจือจางน้ำเชื้อ, น้ำเชื้อสด, แพะพื้นเมืองไทย

Abstract: The aim of the study was to apply phosphate buffered saline (PBS) for fresh semen of Thai-native goat and to reduce costs of goat production. Semen was collected from two male Thai-native goats with the average age and body weight of 3 years and 30-40 kg. After quality testing, semen was pooled and divided into two parts. Semen was diluted with two different diluents: Egg Yolk Tris (EYT) and Phosphate buffered saline (PBS) at the ratio of 1:2, 1:3, 1:4 and 1:5, respectively. Sperm motility, sperm concentration, pH and osmolality in EYT and PBS at the ratio of 1:2, 1:3, 1:4 and 1:5 were not significant different ($P>0.05$). However, dead spermatozoa of fresh semen diluted with PBS at the ratio of 1:2 was reduced significantly ($P<0.05$) compared with the EYT, and sperm concentration in both diluents (EYT and PBS) at the ratio of 1:5 was decreased. Therefore, fresh semen diluted

[1] ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ. ขอนแก่น 40002

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002, Thailand

*Corresponding author E-mail: chanav@kku.ac.th

with PBS had no detrimental effect on quality of fresh goat semen, lower cost and could be used as the EYT replacement. However, semen diluted with PBS needs to be further in vivo studied on conception rate after AI.

Keywords: Semen quality, Semen dilution, Fresh semen, Thai-native goat

บทนำ

แพะพื้นเมืองไทยเป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องที่ให้ผลผลิตเนื้อสัตว์คุณภาพดี และเป็นที่นิยมของผู้บริโภค ด้วยคุณสมบัติที่ดีในแง่ของความสามารถในการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะโรคพยาธิ และการจัดการนอกจากนี้ยังสามารถกินอาหารได้หลากหลายชนิด การผลิตน้ำเชื้อของสัตว์ คุณภาพน้ำเชื้อที่ใช้ในการผสมเทียมนั้นเป็นปัจจัยสำคัญประการหนึ่งที่มีผลต่ออัตราการผสมติด การทราบความสมบูรณ์พันธุ์ (fertility) ของน้ำเชื้อก่อนนำไปใช้ผสมเทียมย่อมก่อให้เกิดประโยชน์อย่างมาก การพัฒนาความรู้ของเกษตรกร ในด้านการพัฒนาคุณภาพน้ำเชื้อสดในแพะพื้นเมืองไทย ซึ่งเป็นแนวทางที่จะสามารถที่ใช้ในการเพิ่มอัตราการผสมติด และยังสามรถเก็บรักษาน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ที่มีพันธุกรรมที่ดีไว้ได้

อัตราการรอดชีวิตของอสุจิในช่วงเวลาต่างๆ ภายหลังจากที่ได้ทำการเจือจางน้ำเชื้อแล้วจะผันแปรไปตามคุณสมบัติและคุณภาพของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อด้วย (Lebouef et al., 2003) ซึ่งมีงานวิจัยที่ได้ศึกษาการใช้นมและไข่แดงมาเป็นส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อ แต่พบว่าเกิดปฏิกิริยาระหว่างโปรตีนในสารเจือจางน้ำเชื้อดังกล่าวกับน้ำเชื้อแพะส่งผลให้เกิดการตายของอสุจิจำนวนมาก (Mara et al., 2007) เนื่องจากการใช้ Egg Yolk Tris (EYT) เป็นสารละลายเจือจางน้ำเชื้อสดของแพะ มีความเหมือนและแตกต่างไปจากน้ำเชื้อของสัตว์เศรษฐกิจชนิดอื่นๆ เพราะในแพะมีต่อม Bulbourethral gland จะขับสาร BUS (Bulbourethral gland secretion) เรียกว่า egg yolk coagulating enzyme หรือ phospholipase A ออกมาเป็นส่วนประกอบของน้ำเลี้ยงตัวอสุจิในน้ำเชื้อด้วย เมื่อทำปฏิกิริยาทางเคมีกับไข่แดงได้สารที่เป็นพิษต่อตัวอสุจิ คือ lysophospholipids เช่น lysolecithins (Ritar and Salamon,1982) ทำให้ตัวอสุจิเสียหายหรืออสุจิตายได้ (Pellicer-Rubio and Combarnous, 1998; Leboeuf et al., 2000) และส่งผลกระทบต่ออัตราการผสมติด ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้เพื่อประยุกต์ใช้ Phosphate buffered saline (PBS) สำหรับการเจือจางน้ำเชื้อสดของแพะพื้นเมืองไทยและลดต้นทุนการผลิตแพะ

วิธีการศึกษา

วิธีการศึกษาในครั้งนี้ผ่านการพิจารณาโดยคณะกรรมการจรรยาบรรณและมาตรฐานการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (Reference No. 0514.1.12.2/67) และได้ดำเนินการดังนี้ ใช้พ่อพันธุ์แพะพันธุ์พื้นเมืองไทย จำนวน 3 ตัว (พ่อพันธุ์แพะ 1 ตัว ทำการผ่าตัดท่อนำน้ำเชื้อ เพื่อใช้ในการตรวจสอบการเป็นสัดในแพะเพศเมีย และพ่อพันธุ์แพะอีก 2 ตัว ไม่มีการตัดท่อนำน้ำเชื้อ ใช้ในการรีดน้ำเชื้อ) อายุประมาณ 3 ปี มีน้ำหนักระหว่าง 30-40 กิโลกรัม มีสุขภาพร่างกายแข็งแรงสมบูรณ์ สามารถรีดน้ำเชื้อได้ และใช้แพะพื้นเมืองไทยเพศเมีย จำนวน 6 ตัว อายุประมาณ 8-10 เดือน น้ำหนักตัวเฉลี่ย 17±0.3 กิโลกรัม คะแนนสภาพของร่างกาย 2.5-3.0 แพะทุกตัวถูกเลี้ยงในโรงเรือนเปิด พื้นคอนกรีต ให้หญ้าสด เป็นแหล่ง

อาหารหยาบโดยให้กินอย่างเต็มที่ จัดเตรียมน้ำสะอาดและก้อนแร่ธาตุเพื่อให้แพะเลียกินได้ตลอดเวลา

พ่อพันธุ์แพะทั้ง 2 ตัว จะรีดเก็บน้ำเชื้อติดต่อกัน 7 สัปดาห์ สัปดาห์ละ 2 ครั้ง ในการรีดน้ำเชื้อจะต้องใช้แพะตัวเมียที่เป็นสัดเป็นตัวล่อ โดยการเหนี่ยวนำให้แพะตัวเมียเป็นสัดในวันที่จะรีดน้ำเชื้อ ในการรีดเก็บน้ำเชื้อจะใช้อุปกรณ์การรีดเก็บน้ำเชื้อโยนีเทียม (Artificial Vagina, AV) เมื่อเสร็จแล้วนำน้ำเชื้อที่รีดได้ไปห้องปฏิบัติการ เพื่อทำการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อแพะเบื้องต้น ตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อแล้วรวมน้ำเชื้อก่อนแบ่งออกเป็นสองส่วน หลังจากนั้นเจือจางน้ำเชื้อสดแพะด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ 2 สูตรคือ Egg Yolk Tris (EYT) และ Phosphate buffered saline (PBS) ที่อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ 1:2 1:3 1:4 และ 1:5 เมื่อเติมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อเรียบร้อยแล้วนำหลอดทดลองที่มีน้ำเชื้อใส่ในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส โดยมีน้ำเป็นตัวหล่อเลี้ยงอยู่ภายนอก แล้วนำไปวิเคราะห์อัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ จำนวนอสุจิตัวเป็น-ตัวตาย ความเข้มข้นของอสุจิ ความเป็นกรด-ด่าง และความดันออสโมซิสของสารละลายของน้ำเชื้อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยาเจือจางทั้งสองสูตร ทำการเจือจางน้ำเชื้อในแต่ละอัตราส่วนจำนวน 6 ซ้ำ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน Analysis of Variance (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ 2×4 factorial in CRD โดยใช้โปรแกรม SAS (SAS, 2001) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้ Duncan's new multiple range test (Steel et al., 1997) และแสดงข้อมูลโดยใช้ ค่าเฉลี่ย±SEM

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จาก Table 1 พบว่า การเจือจางน้ำเชื้อสดแพะด้วยน้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris (EYT) และ Phosphate buffered saline (PBS) ไม่ส่งผลทำให้การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิและความเข้มข้นของตัวอสุจิแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่เมื่อพิจารณาการเจือจางน้ำเชื้อสดด้วยน้ำยาเจือจางทั้งสองชนิด (EYT และ PBS) ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน พบว่าในอัตราส่วน 1:5 มีความเข้มข้นของอสุจิน้อยกว่าอัตราส่วน 1:2 1:3 และ 1:4

การเจือจางน้ำเชื้อแพะด้วยน้ำยาเจือจาง EYT และ PBS ในอัตราส่วนการเจือจาง 1:2 1:3 1:4 และ 1:5 ต่อเปอร์เซ็นต์อสุจิตัวเป็น-ตัวตาย พบว่าการเจือจางน้ำเชื้อสดด้วย PBS ในอัตราส่วน 1:2 มีเปอร์เซ็นต์อสุจิตัวตายน้อยกว่า (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับการเจือจางน้ำเชื้อสดด้วย EYT (Table 2) อย่างไรก็ตามการเจือจางน้ำเชื้อแพะด้วยน้ำยาเจือจาง EYT และ PBS ที่อัตราส่วนการเจือจาง 1:3 1:4 และ 1:5 ต่อเปอร์เซ็นต์อสุจิตัวเป็น-ตัวตายไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

จาก Table 3 พบว่าความเป็นกรด-ด่างและค่าความดันออสโมซิสของสารละลายของน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง EYT และ PBS ในอัตราส่วนการเจือจางที่ 1:2 1:3 1:4 และ 1:5 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) โดยปกติน้ำเชื้อสดของแพะจะมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ระหว่าง 6.8-7.8 (Lebouef et al., 2003)

จากการทดลองเจือจางน้ำเชื้อสดแพะด้วยน้ำยาเจือจาง Egg Yolk Tris (EYT) และ Phosphate buffered saline (PBS) ในอัตราส่วน 1:2 1:3 1:4 และ 1:5 ต่อการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ความเข้มข้นของตัวอสุจิ ความเป็นกรด-ด่างและค่าความดันออสโมซิสของสารละลายของน้ำเชื้อไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นชนิดของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อสดแพะ แต่อย่างไรก็ตามการเจือจางน้ำเชื้อสดด้วย PBS ในอัตราส่วน 1:2 มีเปอร์เซ็นต์ของตัวอสุจิตายน้อยกว่า EYT และการเจือจางน้ำเชื้อสดด้วยน้ำยาเจือจางทั้ง

สองชนิด (EYT และ PBS) ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน พบว่าในอัตราส่วน 1:5 มีความเข้มข้นของอสุจิลดลง อย่างไรก็ตามจากการทดลองของ ประพันธ์ศักดิ์ และคณะ (2552) พบว่าการเจือจางน้ำเชื้อสดของแพะพื้นเมืองไทยที่อัตราส่วน 1:3 ส่งผลให้ความเข้มข้นของอสุจิลดลง ดังนั้นจากข้อมูลดังกล่าวจึงเป็นแนวทางสำหรับการนำ PBS ไปใช้เป็นน้ำยาเจือจางนำเชื้อสดของแพะต่อไป

สรุป

การเจือจางน้ำเชื้อสดด้วย PBS ไม่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อสดแพะ สามารถใช้ทดแทนน้ำยาเจือจาง EYT ได้ และการเจือจางน้ำเชื้อสดด้วย PBS สามารถเจือจางได้ทั้งในอัตราส่วน 1:2, 1:3, 1:4 และ 1:5 แต่การเจือจางในอัตราส่วน 1:2 มีเปอร์เซ็นต์ของตัวอสุจิตายลดลง นอกจากนี้แล้วเมื่อพิจารณาถึงต้นทุนการผลิตของสารทั้งสองชนิดพบว่า PBS มีราคาถูกกว่า EYT ซึ่งช่วยลดต้นทุนการผลิตแพะได้ แต่อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในสัตว์เกี่ยวกับการเจือจางน้ำเชื้อด้วย PBS ต่ออัตราการผสมติดภายหลังการผสมเทียม

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณทุนการศึกษาโครงการวิจัย มหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ มหาวิทยาลัยขอนแก่น คลัสเตอร์สหสาขาบูรณาการและสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ที่ให้ทุนอุดหนุนในการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

ประพันธ์ศักดิ์ ฉวีราช ไชยณรงค์ นาวานุเคราะห์ จิรัฐติ ธรรมศิริ อภิรดี สวรรค์นคร ปนัดดา สุทธิโส และ ทศพล มูลมณี. 2552. การเจือจางน้ำเชื้อแพะโดยการเสริมสารสกัดจากว่านหางจระเข้และการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ประจำปี พ.ศ. 2552.

Leboeuf, B., B. Restall, and S. Salomon. 2000. Production and storagen of goat semen for artificial insemination. Anim. Reprod. Sci. 62:113-141.

Lebouef, B., P. Guillouet, F. Batellier, D. Bernelas, J. L. Bonne, Y. Forgerit, G. Renaud, and M. Magistrini. 2003. Effect of phosphocaseinate on the in vitro preservation of fresh semen. Theriogenology. 60:867-877.

Mara, L., M. Dattena, S. Pilichi, D. Sanna, A. Branca, and P. Cappai. 2007. Effect of different diluents on goat semen fertility. Anim. Reprod. Sci. 102:152-157.

Pellicer-Rubio, M.T., and Y. Combarnous. 1998. Deterioration of goat spermatozoa in skimmed milk-baed extenders as a result of oleic acid released by the bulbourethrallipase BUSgp 60. J. Reprod. Fertil. 112:95–105.

Ritar, A.J., and S. Salamon. 1982. Effects of seminal plasma and of its removal and egg yolk in the diluents on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat Aust. J. Biol. Sci. 35:305-312.

SAS. 2001. SAS/STAT: User guide for the international database. SAS Inst., Cary NC.

Steel, R. G. D., J. H. Torrie, and D.A. Dickey. 1997. Principles and procedures of statistics a biometrical approach. 666 pp.

Table 1. Effects of Egg Yolk Tris and Phosphate buffered saline on sperm motility and sperm concentration of fresh Thai native goat semen

Diluents	Sperm motility				sperm concentration (10^6 spermatozoa/ml)			
	1:2	1:3	1:4	1:5	1:2	1:3	1:4	1:5
Egg Yolk Tris	3.5±0.3	3.8±0.3	4.3±0.3	4.5±0.3	549±4.9	519±6.8	514±4.1	482±2.0
Phosphate buffered saline	4.0±0.5	3.7±0.3	3.9±0.4	4.2±0.2	538±6.9	524±5.3	521±3.6	476±8.5

Table 2. Effects of Egg Yolk Tris and Phosphate buffered saline on percentage of live and dead sperm of fresh Thai native goat semen

Diluents	Live sperm (%)				Dead sperm (%)			
	1:2	1:3	1:4	1:5	1:2	1:3	1:4	1:5
Egg Yolk Tris	90.0±2.5	95.5±5.0	96.0±1.5	94.0±4.0	10.0±0.6[a]	4.5±0.5	4.0±1.0	6.0±0.6
Phosphate buffered saline	95.0±2.0	95.0±1.5	95.0±0.3	94.5±1.9	5.0±0.9[b]	5.0±1.5	5.0±1.0	5.5±0.6

[a, b.] Within a column, means with different superscripts differ ($P<0.05$), Values are mean ±SEM

Table 3. Effects of Egg Yolk Tris and Phosphate buffered saline on pH and Osmolality of fresh Thai native goat semen

Diluents	pH				Osmolality			
	1:2	1:3	1:4	1:5	1:2	1:3	1:4	1:5
Egg Yolk Tris	7.25±0.06	7.20±0.02	7.25±0.06	7.30±0.02	370.5±1.2	370.0±1.4	372.7±1.0	374.0±1.5
Phosphate buffered saline	7.30±0.02	7.25±0.02	7.27±0.02	7.25±0.04	370.0±1.2	372.0±1.0	372.5±1.2	373.5±1.4