

ผลของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พันธุ์ซิลกี้ ด้วยวิธีการแช่แข็ง

Effect of Diluent on Cryopreservation in Silkei Chicken Semen

ณปัทม ช้วยชูหนู^{1*}, พัชรา ธานานุรักษ์² และ เทวินทร์ วงษ์พระลับ²

Napapach Chuaychu-noo^{1*}, Pachara Thananurak² and Thevin Vongphalub²

บทคัดย่อ: การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตร Schramm สูตร TNCE ต่อคุณภาพของการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พันธุ์ซิลกี้ด้วยวิธีการแช่แข็งทำการเจือจางน้ำเชื้อในอัตรา 1:3 ลดอุณหภูมิไปที่ 5 °C เป็นเวลา 60 นาที โดยใช้ 6% DMF เป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง บรรจุน้ำเชื้อในหลอด straws ขนาด 0.5 มล. มีสเปิร์มประมาณ 500x10⁶/หลอด ดำเนินการแช่แข็งด้วยวิธีการอ้งไอน์โตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -35 °C เวลา 12 นาที และ -135 °C เป็นเวลา 5 นาที เก็บรักษาน้ำเชื้อในไนโตรเจนเหลวจนละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 5 °C นาน 5 นาที ประเมินรูปแบบการเคลื่อนที่ด้วย CASA ประเมินความสมบูรณ์ของอะโครโซมและการทำงานของไมโทคอนเดรีย ด้วยการย้อมสีฟลูออเรสเซนซ์ น้ำเชื้อไก่ซิลกี้กลุ่มที่ใช้น้ำยาเจือจางสูตร TNCE มีการเคลื่อนที่รวม การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความสมบูรณ์ของอะโครโซมและการทำงานของไมโทคอนเดรียสูงกว่ากลุ่มที่เจือด้วยน้ำยาเจือจางสูตร Schramm (P<0.05)

คำสำคัญ: น้ำเชื้อ, สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ, ไก่ซิลกี้, น้ำเชื้อแช่แข็ง

ABSTRACT: The objective of this study was to investigate on Schramm and TNCE diluent in cryopreserved semen quality of Silkie chicken. Semen samples were pooled, dilution semen with twice diluents 1:3 ratio, cooled down to 5 °C for 60 min and diluent which DMF was added (6% DMF of final volume). Semen was loaded into 0.5 ml straws with sperm concentration of 500 x10⁶/straw. Semen straws were placed in stylofoam box containing liquid nitrogen at -35 °C for 12 min. and located at -135 °C for 5 min. Then plunged in to liquid nitrogen. Straws were thawed in cold water at 5°C. Semen quality was determine by CASA and fluorescent straining. The result of experiment showed that TNCE extender was higher sperm motility progressive motility acrosome integrity and mitochondrial function than Schramm extender (P<0.05).

Keywords: semen, semen diluent, silkie chicken, cryopreservation

¹ สาขาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อ.ทุ่งสง จ. นครศรีธรรมราช 80110
Department of Animal science, Faculty of Agricultural, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Thungsong, Nakon Sri Thammrat, Thailand, 80110

² สาขาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002
Department of Animal science, Faculty of Agricultural, Khon Kean University, Khon Kean, 40002, Thailand

* Corresponding author: c.sittikasamkit@gmail.com

บทนำ

ไก่พันธุ์ซิลกี้(Silkie)(*Gallus gallus*) มีถิ่นกำเนิดในประเทศจีน โดย Marco Polo ในศตวรรษที่ 13 ระหว่างการสำรวจทวีปเอเชีย ได้อธิบายไก่ที่มีลักษณะพิเศษขนยาว (Haw, 2006) เป็นไก่ซิลกี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ค่อนข้างแตกต่างจากไก่ทั่วไป มีขนยาวคล้ายผมของมนุษย์ ผิวหนัง เยื่อตา หลอดเลือด งดงาม เป็นสีดำ (Faraco et al., 2001) และมีขนหลายสี แต่จะมีคุณสมบัติเฉพาะ คือ ขนยาว หัวหงอนเป็นมงกุฎ หูสีฟ้ามีขนที่ขา และมีหางนิ้ว ซึ่งแสดงถึงความหลากหลายทางชีวภาพของสัตว์ปีก (Dorshost, 2010) มีการเลี้ยงเป็นไก่พันธุ์ซิลกี้เป็นสัตว์เลี้ยงสวยงาม และเลี้ยงไว้เป็นอาหารโดยเฉพาะในตลาดเอเชียไก่เนื้อดำจัดเป็นอาหารเป็นบำรุงสุขภาพเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคเนื่องจากเนื้อไก่มีสารเมลานิน (melanin) ซึ่งทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และเสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกัน (Tu et al., 2009) ดังนั้นไก่พันธุ์ซิลกี้จึงเป็นไก่ดำสายพันธุ์หนึ่งที่มีความน่าสนใจต่อการเก็บรักษาพันธุกรรมเพื่อรักษาความหลากหลายทางชีวภาพและเพื่อประโยชน์ในการใช้ปรับปรุงพันธุกรรมหรือแม้แต่ค้าขายสายพันธุ์ในอนาคต การเก็บรักษาน้ำเชื้อในรูปน้ำเชื้อแช่แข็งเป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพสูงในการเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้สะดวกต่อการเคลื่อนย้ายแต่อย่างไรก็ตามคุณภาพของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งนั้นขึ้นอยู่กับพันธุกรรมและสภาพแวดล้อมซึ่งเป็นส่วนสำคัญทำให้น้ำเชื้อแบบแช่แข็งของสัตว์ปีกแต่ละสายพันธุ์มีคุณภาพ (Peter et al., 2008) สัณฐานวิทยา และการรอดชีวิตของสุจิที่แตกต่างกัน (Siudzińska and Łukaszewicz, 2008) โดยอสุจิของไก่แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการทนต่อการแช่แข็งต่างกัน (Makhafola et al., 2009) สารละลายเจือจางน้ำเชื้อก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่ออัตราการรอดชีวิตของอสุจิภายหลังการแช่แข็งโดยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตร Schramm และ TNCE เป็นน้ำยาเจือจางที่ให้ผลดีในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองไทย (Thananurak et al., 2016; 2018) แต่อย่างไรก็ตามในไก่พันธุ์ซิลกี้นั้นยังไม่พบรายงานผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีการแช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อของ

ไก่พันธุ์กล่าวดังนั้นในการศึกษารั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของชนิดของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อสูตร TNCE และสูตร Schramm ต่อคุณภาพการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พันธุ์ซิลกี้ที่เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดลองใช้พ่อพันธุ์ไก่ซิลกี้ อายุ 10 เดือน จำนวน 20 ตัว แยกเลี้ยงในกรงขังเดี่ยว ให้อาหารวันละ 100 กรัมต่อตัวต่อวัน มีน้ำสะอาดกินแบบเต็มที่ รีดน้ำเชื้อสัปดาห์ละ 2 ครั้ง โดยวิธีการนวด (ดัดแปลงจาก Burrow and Quin, 1937) ทำประเมินคุณภาพน้ำเชื้อด้วยการวัดปริมาณน้ำเชื้อต่อการรีดความเข้มข้นของสุจิ (โดยใช้อุปกรณ์นับเม็ดเลือด haemocytometer) (เทวินทร์ และยุพิน, 2550) อัตราการรอดชีวิต (การย้อมสี eosin nigrocin) คะแนนการเคลื่อนที่ (1-5 คะแนน) น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่เกิน 85% จะนำไปรวบรวมน้ำเชื้อ (pooled semen) แล้วแบ่งเป็น 2 ส่วนเพื่อเจือจางกับน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ 2 สูตร คือสูตร Schramm (ประกอบด้วย magnesium acetate tetrahydrate, 0.7 น., L-Glutamic acid monosodium salt hydrate 28.5 น., glucose 5 น., myo-Inositol, 2.5 น. และ potassium acetate, 5 น. เติมน้ำกลั่นชนิด double-distilled ปรับให้ได้ปริมาตร 1,000 มล (Schramm, 1991) (pH 7.1 และค่าแรงดันสารละลาย (Osmotic pressure; O.P.) 395 mOsm/kg) และสูตร Thai Native Chicken Extender (TNCE) (ประกอบด้วย magnesium acetate, potassium citrate, potassium acetate, sodium glutamate, sodium acetate, glucose trehalose, cysteine; ข้อมูลยังไม่เผยแพร่) ในอัตรา 1:3 แล้วลดอุณหภูมิน้ำเชื้อไปที่ 5 °C โดยใช้เวลาประมาณ 60 นาที เติมน้ำยาป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง DMF (N, N-Dimethylformamide, sigma: D4551) (v:v) 6% ในสารละลายเจือจางปริมาตรสุดท้าย บรรจุลงในหลอด straw (IMV ref. A201, AAA 414) ขนาด 0.5 มล. ปิดปลายหลอดน้ำเชื้อด้วยผง polyvinyl alcohol (IMV ref. A508) แต่ละหลอดมีจำนวนอสุจิประมาณ 500×10^6 ตัว ทำการแช่

แช่แข็งด้วยวิธีอัสไนโตรเจนเหลวตามวิธีของ เทวินทร์ และยุพิน (2550) ภายหลังจากเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งเป็นเวลา 1 เดือน ทำการประเมินรูปแบบการเคลื่อนที่ด้วย Computer Assisted Sperm Analyser (CASA) ประเมินความสมบูรณ์ของอะโครโซม และการทำงานของไมโทคอนเดรีย ด้วยการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ (fluorescent) ประกอบด้วย fluorescein isothiocyanate conjugated peanut agglutinin (FITC-PNA) (Sigma, L7381) 5, 5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolyl-carbocyanine iodide (JC-1)(Sigma, C50390) และpropidium iodide (PI)(Sigma, 28, 707-5) แล้วตรวจสอบด้วยเครื่อง Flow cytometer (ดัดแปลงจาก Lange-Consiglio et al., 2013) วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (SAS, 1996) เปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละปัจจัยการทดลองด้วยวิธี Duncan's new Multiple Range Test

ผลการศึกษา

ผลการศึกษาการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นของไก่พันธุ์ซิลกี้พบว่าปริมาณน้ำเชื้อเฉลี่ย 225.13 ± 120.20 ไมโครลิตร ต่อครั้งการวัดจำนวนเซลล์อสุจิเฉลี่ย $2,850.25 \pm 250.32 \times 10^6$ เซลล์/มล. การเคลื่อนที่หมู่เฉลี่ย 4.2 ± 0.20 คะแนน อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ย $93.5 \pm 4.50\%$

ผลการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อไก่พันธุ์ซิลกี้ที่เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง พบว่าน้ำเชื้อไก่พันธุ์ซิลกี้ที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางสูตร TNCE มีผลต่อการเพิ่มเปอร์เซ็นต์เคลื่อนที่รวม การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ ความสมบูรณ์ของอะโครโซมและการทำงานของไมโทคอนเดรีย ภายหลังจากอุ่นละลายแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับน้ำยาเจือจางสูตร Schramm (Table 1)

Table 1 Mean ($\pm$ SD) values of motility, progressive motility, acrosome integrity and mitochondrial function with different diluent on Silkei chicken semen at cryopreservation ($\pm$ SE) (N=8)

Diluent	Motility (%)	Progressive motility (%)	Acrosome Integrity (%)	Mitochondrial Function (%)
Schramm	47.20 ± 0.62^b	24.95 ± 0.42^b	33.32 ± 0.84^b	45.06 ± 0.58^b
TNCE	49.79 ± 0.94^a	27.65 ± 0.31^a	36.90 ± 0.41^a	48.53 ± 0.39^a
P-Value	0.02	0.02	0.04	0.05

^{a,b} Means within column with no common superscript differ significantly ($P < 0.05$)

วิจารณ์

การเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีการแช่แข็งนั้นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญเนื่องจากมีส่วนช่วยถนอมคุณภาพน้ำเชื้อ เพิ่มระยะเวลาในการเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อยาวนานเป็นแหล่งพลังงาน มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ มีค่าความดันของสารละลาย และค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม (เทวินทร์ และยุพิน, 2550) จากผลการทดลองน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตร Schramm และสูตร TNCE ต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พันธุ์ซิลกี้ที่เก็บรักษาด้วย

วิธีการแช่แข็ง แสดงให้เห็นว่าน้ำเชื้อสูตร TNCE มีประสิทธิภาพในการรักษาคุณภาพน้ำเชื้อไก่พันธุ์ซิลกี้ได้ดีกว่าน้ำเชื้อสูตร Schramm ทั้งนี้เนื่องจากน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตร TNCE นั้นมีองค์ประกอบของ ทรีฮาโลส ซึ่งน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่เป็นแหล่งสารให้พลังงานกับเซลล์อสุจิและยังมีคุณสมบัติเป็นสารป้องกันความเสียหายจากการแช่แข็ง ซึ่ง Aboagla and Terada (2003) รายงานว่าน้ำตาลทรีฮาโลสช่วยรักษาความสมบูรณ์ของตัวอสุจิได้ดีกว่าน้ำตาลกลูโคสที่เสริมในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อเพื่อเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งนอกจากนั้นการเสริมทรีฮาโลสและ

ซูโครสลงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ มีส่วนช่วยเพิ่มการเคลื่อนที่และความสมบูรณ์ของอะโครโซมของอสุจิสุกรภายหลังการแช่แข็ง (Woelders, 1997) Thananurak et al., (2016) รายงานว่าการเสริมทรีฮาโลส 5 มิลลิโมลในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อมีผลดีต่ออัตราการเคลื่อนที่ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความสมบูรณ์ของอะโครโซม การทำงานของไมโทคอนเดรีย และอัตราการผสมติดของไก่พื้นเมืองประดู่หางดำ นอกจากนี้กรดอะมิโนซิสเทอีนซึ่งเป็นส่วนประกอบในสูตรน้ำยา TNCE มีคุณสมบัติเป็นสารป้องกันอนุมูลอิสระมีส่วนช่วยลดความเสียหายให้กับเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิไก่ที่ผ่านการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง (เทวินทร์ และคณะ, 2555) สอดคล้องกับการศึกษาของ Thananurak et al., (2018) ที่ใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตร TNCE ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่แดงและไก่ชน ซึ่งเป็นไก่พื้นเมืองทางการค้าด้วยวิธีการแช่แข็งนั้น พบว่ามีผลดีต่อการเคลื่อนที่ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความสมบูรณ์ของอะโครโซม และการทำงานของไมโทคอนเดรีย

ปริมาณและคุณภาพน้ำเชื้อไก่นั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ อายุ หรือขึ้นกับพ่อพันธุ์แต่ละตัว (Chuaychu-noo et al., 2017) จากผลการรีดน้ำเชื้อไก่พันธุ์ซิลกี้ซึ่งเป็นไก่ขนาดเล็ก มีปริมาณน้ำเชื้อที่วัดเก็บได้เฉลี่ย (225.13 ± 120.20 ไมโครลิตร/ครั้ง) และความเข้มข้นของอสุจิ ($2,850.25 \times 10^6 \pm 250.32$ เซลล์/มล.) ซึ่งมีปริมาณน้ำเชื้อและความเข้มข้นของอสุจิของไก่ซิลกี้สูงกว่าไก่แจ้ของมาเลเซีย (100 ± 0.10 ไมโครลิตร และ $1,830 \times 10^6 \pm 763.00$ เซลล์/มล) แต่ต่ำกว่าในไก่ป่า (0.33 ± 0.16 มล.) ($4,440 \times 10^6 \pm 905.00$ เซลล์/มล) (Malik et al., 2013) น้ำเชื้อไก่สามารถรีดเก็บได้ประมาณ 100-800 ไมโครลิตร โดยมีจำนวนเซลล์อสุจิเฉลี่ย 5.7×10^9 ล้านเซลล์/มล. (Etches, 1993; Gee, 1995)

สรุป

น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตร TNCE ให้ผลดีต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พันธุ์ซิลกี้ที่เก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็ง สูงกว่าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตร Schramm โดยอสุจิมิเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่รวม การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความสมบูรณ์ของอะโครโซมและการทำงานของไมโทคอนเดรียสูง ($P < 0.05$)

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณศูนย์เครือข่ายวิจัยและปรับปรุงพันธุ์สัตว์ (ไก่พื้นเมือง) ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่สนับสนุนสารเคมีในการศึกษา บริษัท ตะนาวศรีไก่ไทยที่สนับสนุนสัตว์ทดลองและสถานที่ทดลอง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สนับสนุนเครื่องตรวจวิเคราะห์การเคลื่อนที่อสุจิ และขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัยที่สนับสนุนเงินทุนในการทำงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- เทวินทร์ วงษ์พระลับ และ ยุพิน ฝาสุข. 2550. รายการวิจัยฉบับสมบูรณ์ โครงการพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งและการผสมเทียมไก่พื้นเมือง. คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.
- เทวินทร์ วงษ์พระลับ, พรจิต สอนสีดา และบัญญัติ เหล่าไพบูลย์. 2555. ผลของ cysteine และ glutathione ต่อคุณภาพน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองแบบแช่แข็ง. แก่นเกษตร. 40 (พิเศษ 2): 339-342
- Aboagla, E.M.E. and T. Terada. 2003. Trehalose-enhanced fluidity of the goat sperm membrane and its protection during freezing. Biol. Reprod. 69: 1245-1250.

- Burrows, W.H., and J.P. Quinn. 1937. The collection of spermatozoa from the domestic fowl and turkey. *Poult. Sci.* 14: 251-254.
- Chuaychu-noo, N., P. Thananurak, V. Chankitisakul, and T. Vongpralub. 2017. Supplementing rooster sperm with cholesterol-loaded-cyclodextrin improves fertility after cryopreservation. *Cryobiology.* 74: 8-12.
- Dorshorst, B., R. Okimoto, and C. Ashwell. 2010. Genomic regions associated with dermal hyperpigmentation polydactyl and other morphological traits in the Silkie chicken. *J.Hered.* 101: 339-350.
- Etches, R.J. 1996. *Reproduction in poultry.* Centre for Agriculture and Biosciences International Wallingford, UK.
- Faraco, C.D., S.A. Vaz, M.V. Pastor, and C.A. Erickson. 2001. Hyperpigmentation in the Silkie fowl correlates with abnormal migration of fate-restricted melanoblasts and loss of environmental barrier molecules. *DevDyn.* 220: 212-225.
- Gee, G.F. 1995. Artificial insemination and cryopreservation of semen from Non domestic birds. In: M.R. Bakst and G.J. Wishart. *Proc. 1st International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry.* Poultry Science. University of Maryland, College Park.
- Haw, S.G. 2006. *Marco Polo's China: a Venetian in the realm of Kubilai Khan.* Routledge studies in the early history of Asia 3. London (NY):Routledge studies in the early history of Asia 3. London (NY): Routledge.
- Lange-Consiglio, A., A. Meucci, and F. Cremonesi. 2013. Fluorescent multiple staining and CASA system to assess boar sperm viability and membranes integrity in short and long-term extender. *Open J. Vet.* 3: 21-35.
- Makhafola, M.B., K.C. Lehloeny, M.L. Mphaphathi, A. Dinnyes, and T.L. Nedambale. 2009. The effect of breed on the survivability and motility rate of cryopreserved cock semen. *South African J. Anim. Sci.* 39 (sup 1): 242-245.
- Malik, A., A. W. Haron, R. Yosoff, M. Nesa, M. Bakar, and A. Kasim. 2013. Evaluation of the ejaculate quality of the red jungle fowl, domestic chicken and bantam chicken in Malaysia. *Turk J. Anim. Sci.* 37: 564-568.
- Perters, S. O., O.D. Shoyebo, B.M. Illori, M.O. Ozoje, C.O.N. Ikeobi, and O.A. Adebambo. 2008. Semen quality traits of seven strain of chickens raised in the humid tropics. *Int. J. Poult. Sci.* 7: 949-953.
- SAS. 1997. Institute. Inc. *SAS/STAT User's Guide: Version 6.12.4th ed.* SAS Institute Inc., Cary, North Carolina.
- Schramm, G. P. 1991. Eignung verschiedener gefrierschutzstoffe zur kryoprotektion von hahnensperma. *Monatsh. Veterinärmedizin.* 46: 438-440.
- Siudzinska, A., and E. Lukaszewicz. 2008. Effect of semen extenders and storage time on sperm morphology of four chicken breeds. *J. Appl. Poult. Res.* 17: 101-108.
- Thananurak, P., N. Chuaychu-noo, Y. Phasuk, and T. Vongpralub. 2018. Chicken semen cryopreservation: application to commercial breeding programs. *J. App. Anim. Sci.* 11: 66-68.
- Thananurak, P., T. Vongpralub, C. Sittikasamkit, and K. Sakwivatkul. 2016. Optimization of trehalose concentration in semen freezing extender in Thai native chicken semen. *Thai J. Vet. Med.* 46: 287-294.

- Tu Y-G., Y. Sun, Y. Tian, M. Xie, and J. Chen. 2009. Physicochemical characterisation and antioxidant activity of melanin from the muscles of Taihe Black-bone silky fowl (*Gallus gallus domesticus* Brisson). Food Chem. 114: 1345-1350.
- Woelders, H., A. Matthij, and B. Engel. 1997. Effects of trehalose and sucrose, osmolality of the freezing medium and cooling rate on viability and intactness of bull sperm after freezing and thawing. Cryobiology. 35: 93-105.