

ผลของการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็งหลังละลาย

Effect of centrifugation using Percoll density gradient on post-thawed semen quality in goat

วิศิษฐ์ ทองเที่ยง¹, กิตติศักดิ์ แสงสกุล², กุลสรณ์ สายขุน³, คคนางค์ บุรณะอำนวย³ และ ธัญจิรา เทพรัตน์^{1*}

Visid Thongtaeng¹, Kittisak Sangsakul², Kulnasan Saikhun³, Kakanang Buranaamnuay³ and Thunchira Thepparat^{1*}

บทคัดย่อ: การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็งหลังละลาย โดยผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งจากพ่อพันธุ์จำนวน 3 ตัว อายุ 4-5 ปี รีดเก็บน้ำเชื้อเป็นเวลา 3 สัปดาห์ติดต่อกัน นำน้ำเชื้อที่รีดได้มา ตรวจประเมินคุณภาพ โดยน้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าไม่ต่ำกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 2,000 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร ถูกนำมาเทรวมกันแล้วแบ่งน้ำเชื้อออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม น้ำเชื้อถูกนำไปผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งโดยไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลายเพอร์คอลล์ ส่วนที่ 2 เป็นกลุ่มทดลอง น้ำเชื้อถูกนำไปปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์จำนวน 7 ชั้น (40, 45, 50, 65, 70, 80, และ 90 เปอร์เซ็นต์) และนำน้ำเชื้อจาก 2 ชั้นล่างสุด ไปผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง ทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อหลังละลายด้วยเครื่องตรวจคุณภาพน้ำเชื้ออัตโนมัติ (CASA) ในช่วงเวลาที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, และ 6 หลังละลาย และวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ General Linear Model ผลการศึกษาพบว่า อิทธิพลร่วมระหว่างการปั่นเหวี่ยงและเวลาของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ ของอสุจิมิมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) สำหรับค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ ค่าความเร็วในการเคลื่อนที่ (VAP, VSL และ VCL) ค่าลักษณะการเคลื่อนที่ (ALH, BCF, STR และ LIN) พบว่า อิทธิพลร่วมระหว่างการปั่นเหวี่ยงและเวลาไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และอิทธิพลของการปั่นเหวี่ยงไม่มีผลต่อค่าต่างๆ เหล่านี้ จึงสรุปได้ว่า การปั่นเหวี่ยงอสุจิแพะด้วยสารละลายเพอร์คอลล์ไม่ส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็งหลังละลาย สามารถนำน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ไปผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งได้ ซึ่งอาจนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาการคัดเลือกเพศจากเซลล์อสุจิแพะด้วยสารละลายเพอร์คอลล์ต่อไป

คำสำคัญ: การปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์, น้ำเชื้อแช่แข็งแพะ

¹ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

Department of Animal Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Songkhla 90110

² ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสงขลา อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90110

Songkhla Biotechnology and Artificial Insemination Research Center, Hat Yai, Songkhla 90110

³ กลุ่มวิจัยชีววิทยาระบบสืบพันธุ์ สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม 73170

Reproductive Biology Research Group, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya, Nakhon Pathom, 73170

* Corresponding author: Charuay.t@psu.ac.th

ABSTRACT: The objective of this study was to investigate the effect of centrifugation using Percoll density gradient on post-thawed semen quality in goat. The semen was collected from three mature Boer bucks, 4-5 years of age, once a week for 3 consecutive weeks using artificial vaginal method. Each week, the semen with progressive motility and concentration greater than 70% and 2,000 million sperm per milliliter, respectively, were pooled. The pooled semen was then divided into 2 groups of with or without centrifugation before frozen semen processing. For the centrifugation group, the semen was centrifuged using 7 layer of Percoll density gradient (40, 45, 50, 65, 70, 80 and 90 %). After centrifugation, only semen from 2 layers of 80 and 90 % Percoll were further processed for frozen semen. Post-thawed semen quality was analyzed by CASA at 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 h after incubation at 37°C. The general linear model was used for statistical analysis. The results showed that the interaction between treatment (with or without centrifugation) and times was highly significant difference ($p < 0.01$) for sperm motility whereas the progressive motility, velocity and kinetic movement of sperm were not significant ($p > 0.05$). In addition, the centrifugation using Percoll density gradient did not effect on progressive motility, velocity and kinetic movement of sperm. It can conclude from this study that the centrifugation using Percoll density gradient had no effect on post-thawed semen quality in goat. The benefit of this study will be used for frozen sexing sperm production, using percoll density gradient centrifugation, in goat.

Keywords: Percoll density gradient centrifugation, Goat frozen semen

บทนำ

การเลี้ยงแพะในพื้นที่ภาคใต้มีการเลี้ยงอย่างแพร่หลาย การปรับปรุงพันธุ์แพะด้วยวิธีการผสมเทียมดำเนินการโดยกรมปศุสัตว์ มีการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งจากพ่อพันธุ์นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งลูกที่เกิดจากการผสมเทียมมีได้ทั้งตัวผู้และเมียในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน แต่อย่างไรก็ตาม ความต้องการแพะเพศเมียมีค่อนข้างสูง เนื่องจากในฟาร์มแพะนมของเกษตรกรต้องการแพะเพศเมียเพื่อเป็นแม่รีดนม และฟาร์มพัฒนาสายพันธุ์ต้องการแพะเพศเมียเพื่อผลิตลูกพันธุ์แท้ ฟาร์มของกรมปศุสัตว์เองก็ต้องการผลิตตัวอ่อนให้ได้จำนวนมากเพื่อให้บริการเกษตรกรและสร้างแพะพันธุ์แท้ทั่วประเทศในระยะเวลาอันสั้นด้วยการย้ายฝากตัวอ่อน จึงมีความต้องการแพะเพศเมียเพื่อเป็นแม่ตัวให้ (Donor) ซึ่งไม่จำเป็นต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศ การคัดแยกเพศจากเซลล์อสุจิมีการใช้เทคโนโลยีและวิธีการที่หลากหลายและบางวิธีมีต้นทุนสูง แต่มีวิธีหนึ่งที่มีต้นทุนไม่สูงมากและสามารถดำเนินการได้ในห้องปฏิบัติการน้ำเชื้อทั่วไป คือ การคัดแยกเซลล์อสุจิด้วยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล มีรายงานการนำมาใช้ในการแยกเพศอสุจิในโค

(Hossepien de Lima et al., 2015; Lucio et al., 2012; Malik et al., 2011; Promthep et al., 2016) ในคน (Wang et al., 1994) และสัตว์อื่นๆ เช่น แกะ และกระต่าย (Ferreira-Silva et al., 2017; Hussein, 2014) การคัดแยกเซลล์อสุจิแพะในประเทศยังไม่มี การทำอย่างแพร่หลาย หากนำวิธีการนี้มาปรับใช้อาจสามารถเพิ่มจำนวนแพะเพศเมียได้ อย่างไรก็ตาม หลังจากการคัดแยกเพศจากเซลล์อสุจิแล้วยังต้องมีการนำน้ำเชื้อไปผ่านกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อใช้ในการผสมเทียมและผลิตตัวอ่อน ซึ่งน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงนั้นต้องมีคุณภาพดีพอที่จะสามารถทำการแช่แข็งได้ ไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อที่ไม่ได้ผ่านการแยกเพศ ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการปั่นเหวี่ยงอสุจิแพะผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังละลาย เพื่อเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ศึกษาการคัดแยกเพศจากอสุจิแพะด้วยสารละลายเพอร์คอลลต่อไป

วิธีการศึกษา

น้ำเชื้อที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสงขลา ซึ่งได้จากพ่อแพะพันธุ์

บอร์จำนวน 3 ตัว อายุ 3-5 ปี มีสุขภาพแข็งแรง ผ่านการตรวจโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์ เลี้ยงภายใต้การจัดการเดียวกัน โดยให้อาหารข้นวันละ 500 กรัม และอาหารหยาบแบบเต็มท้องตลอดวัน ทำการเก็บน้ำเชื้อด้วยวิธี Artificial vaginal method ทุกสัปดาห์ ละครั้ง เป็นเวลา 3 สัปดาห์ติดต่อกัน นำน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้จากพ่อพันธุ์แพะมาตรวจดูคุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่องตรวจคุณภาพน้ำเชื้ออัตโนมัติ (Computer Assisted Semen Analysis, CASA) ดังนี้ 1) อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (motility; %) 2) อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (progressive motility; %) 3) ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ (velocity) ได้แก่ ความเร็วในการเคลื่อนที่เฉลี่ยจากระยะทางจริงใน 1 วินาที (Average path velocity, VAP) ความเร็วในการเคลื่อนที่วิธีตรง (Straight-line velocity, VSL) ความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีโค้ง (Curvilinear velocity, VCL) 4) ลักษณะการเคลื่อนที่ (kinetic movement) ได้แก่ ความกว้างของส่วนหัวของตัวอสุจิที่ส่ายไปมา (Amplitude of lateral head displacement, ALH) ความถี่ของการส่ายส่วนหัวของตัวอสุจิ (Beat cross frequency, BCF) ความตรงในการเคลื่อนที่ (Straightness, STR) อัตราส่วนความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิธีตรงต่อความเร็วเฉลี่ยของการเคลื่อนที่วิถีโค้ง (Linearity, LIN) ทำการนับ ความเข้มข้นของอสุจิ โดยใช้ Hemocytometer นำเชื้อที่ผ่านการตรวจคุณภาพเบื้องต้น มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าไม่ต่ำกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 2,000 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร ถูกนำมาเทรวมกันแล้วแบ่งออกเป็นสองส่วนเท่าๆ กัน ส่วนที่ 1 ใช้เป็นกลุ่มควบคุม นำน้ำเชื้อไปผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งโดยไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง ส่วนที่ 2 ใช้เป็นกลุ่มทดลอง นำไปปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลลที่มีมีความเข้มข้นต่างกัน 7 ระดับ คือ 40, 45, 50, 65, 70, 80, และ 90 เปอร์เซ็นต์ (V/V) โดยปั่นที่ความเร็ว 300 g เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นนำน้ำเชื้อชั้นที่ระดับ 80-90 เปอร์เซ็นต์ ไปปั่นล้างเพื่อแยกสารละลายเพอร์คอลลและเซมินอลพลาสมาออกที่ความเร็ว 300 g เป็นเวลา 10 นาที ใช้ไปเปิดดูดูส่วนบนทิ้ง นำน้ำเชื้อที่ได้ไปตรวจคุณภาพด้วยเครื่อง CASA และผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยทำการเจือจาง

น้ำเชื้อทั้งสองกลุ่มด้วยน้ำยาเจือจาง Tris-egg yolk ให้มีความเข้มข้น 600 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร (150 ล้านตัวต่อโดส) จากนั้นนำไปปั่นในตู้เย็นที่ควบคุมอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง บรรจุน้ำเชื้อลงในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ทำการแช่แข็งด้วยการยิงหลอดบรรจุน้ำเชื้อเหนือไอไนโตรเจนเหลว 3-4 เซนติเมตร ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ -120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 นาที และเก็บรักษาไว้ภายใต้ระดับไนโตรเจนเหลวในถังเก็บน้ำเชื้อที่อุณหภูมิประมาณ -196 องศาเซลเซียส โดยเก็บรักษาไว้ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นผสมน้ำเชื้อมากลุ่มละ 2 หลอด ทำการละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อหลังละลายด้วยเครื่อง CASA ในช่วงเวลาที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, และ 6 หลังละลาย ข้อมูลคุณภาพน้ำเชื้อหลังละลายถูกนำมาวิเคราะห์สถิติโดยใช้ General Linear Model ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS) ดังสมการ

$$y_{ijkl} = \mu + \tau_i + l_j + \rho_k + \tau l_{ij} + \varepsilon_{ijkl}$$

y_{ijkl}	=	ค่าสังเกต
μ	=	ค่าเฉลี่ย
τ_i	=	อิทธิพลของทรีทเมนต์ เมื่อ $j=1,2$
l_j	=	อิทธิพลของเวลาที่อุณหภูมิน้ำเชื้อเมื่อ $j=0,1,2,3,4,5,6$
ρ_k	=	อิทธิพลของชุดน้ำเชื้อเมื่อ $k=1,2,3$
τl_{ij}	=	อิทธิพลร่วมระหว่างทรีทเมนต์และเวลาในการอุณหภูมิน้ำเชื้อ
ε_{ijkl}	=	ความคลาดเคลื่อน

ผลการศึกษาและวิจารณ์

จากผลการศึกษาอิทธิพลของการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลลต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังละลายที่ชั่วโมงต่างๆ (0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง) พบว่า อิทธิพลร่วมระหว่างการปั่นเหวี่ยงและเวลามีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) ต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ ($P < 0.01$) สำหรับค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ ค่าความเร็วในการเคลื่อนที่ (VAP,

VSL และ VCL) ค่าลักษณะการเคลื่อนที่ (ALH, BCF, STR และ LIN) อิทธิพลร่วมระหว่างการปั่นเหวี่ยงและเวลาไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และอิทธิพลของการปั่นเหวี่ยงมีผลต่อค่าต่างๆ เหล่านี้โดยไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.01$) (Table 1) เมื่อพิจารณาแนวโน้มคุณภาพน้ำเชื้อหลังละลายจากชั่วโมงที่ 0 ถึง 6 พบว่า ค่าการเคลื่อนที่และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิของกลุ่มที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลลล์มีค่าลดลง อย่างช้าๆ และลดลงน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง (Figure 1)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การปั่นเหวี่ยงอสุจิแพะด้วยสารละลายเพอร์คอลลล์ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็งมีคุณภาพไม่แตกต่างไปจากการไม่ปั่นเหวี่ยง โดยทำให้การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าและความเร็วในการเคลื่อนที่ และลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอสุจิมีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้ดีภายหลังการปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลายเพอร์คอลลล์ ในแพะมีรายงานการศึกษาการปั่นเหวี่ยงอสุจิแพะด้วยสารละลายเพอร์คอลลล์แล้วตรวจคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโดย Batista et al. (2011) โดยพบว่า มีค่าอัตราการเคลื่อนที่เท่ากับ 61.2 ± 7.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความใกล้เคียงกับผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ นอกจากนี้ Noguchi et al. (2013) ทำการเปรียบเทียบ

คุณภาพน้ำเชื้อสุกรระหว่างกลุ่มที่ไม่ปั่นเหวี่ยงกับกลุ่มที่ปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลายเพอร์คอลลล์พบว่าในกลุ่มที่ปั่นเหวี่ยงมีคุณภาพน้ำเชื้อดีขึ้น คือ มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ ความผิดปกติของอะโครโซม และสัดส่วนการปฏิสนธิของตัวอ่อนสูงกว่ากลุ่มที่ไม่ปั่นเหวี่ยง Samardzija et al. (2006) นำน้ำเชื้อโคไปปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลายเพอร์คอลลล์พบว่า ภายหลังการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อมีค่าอัตราการเคลื่อนที่เท่ากับ 63 ± 4.3 เปอร์เซ็นต์ Promthep et al. (2016) ทำการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อโคนมโดยใช้สารละลายเพอร์คอลลล์ 7 ชั้น 40, 50, 60, 65, 70, 75 และ 80 เปอร์เซ็นต์ (v/v) พบว่า ภายหลังการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อที่ชั้นระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลลล์ 65-70 เปอร์เซ็นต์ คุณภาพน้ำเชื้อมีค่าสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด

แม้ว่าสารละลายเพอร์คอลลล์จะสามารถนำมาใช้เพื่อช่วยเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแพะเพื่อผลิตเป็นน้ำเชื้อแช่แข็งได้ แต่ต้นทุนในการนำสารละลายเพอร์คอลลล์มาใช้ก็ยังมีราคาที่สูงอยู่ ซึ่งจากการศึกษานี้พบว่า มีต้นทุนอยู่ที่ประมาณ 100 บาทต่อการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง 1 โดส ซึ่งอาจจะไม่ใช่วิธีที่เหมาะสมในการนำไปใช้ผลิตน้ำเชื้อแพะแช่แข็งโดยทั่วไป แต่อาจพิจารณานำไปปรับใช้กับเทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูง เช่น การผลิตตัวอ่อน การทำตัวอ่อนหลอดแก้ว หรือการคัดแยกเพศจากอสุจิ เป็นต้น

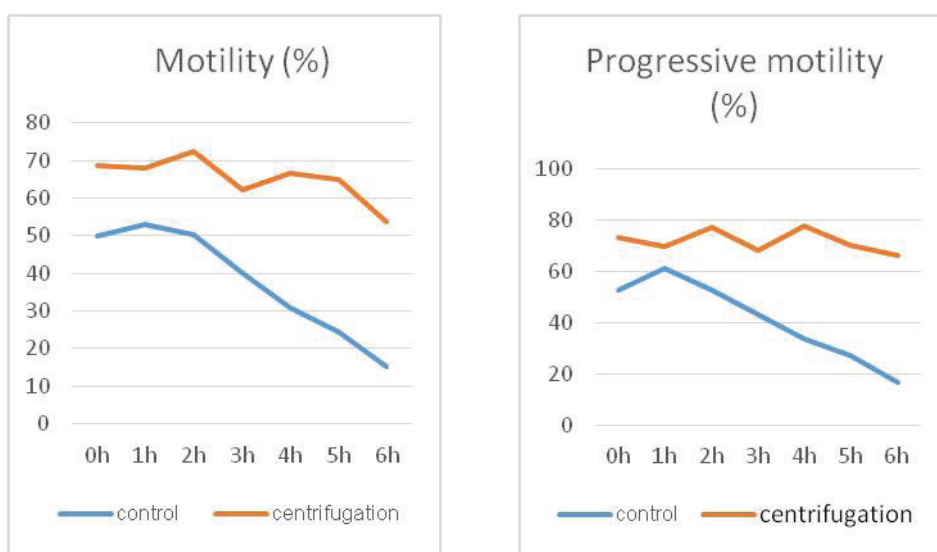


Figure 1 The percentage of post-thawed motility and progressive motility of sperm with and without centrifugation using Percoll density gradient.

Table 1 Effect of centrifugation using Percoll density gradient on post-thawed sperm quality

Parameters	Fresh semen	Before freeze	Post-thawed at						Treatment	Treatment* Time
			0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h	
Motility (%)	73.4									**
Control		89.53	52.77	61.25	52.57	43	33.53	27.33	16.57	61.25
Centrifugation		90.70	72.93	69.75	77.16	68.04	77.79	70.26	66.38	69.75
Progressive motility (%)										NS
Control		85.1	49.83	52.87	50.27	39.93	31.02	24.58	15.18	52.87
Centrifugation		84.9	68.66	67.95	72.31	62.11	66.79	64.78	53.56	67.95
VAP (µm/s)	159.63									NS
Control		90.83	94.07	67.43	75.28	63.41	59.13	42.69	49.76	64.54
Centrifugation		87.33	71.92	81.67	75.79	79.67	62.27	64.61	56.7	70.38
VSL (µm/s)	148.03									NS
Control		68.94	76.87	55.28	62.38	53.21	50.19	36.88	42.71	50.11
Centrifugation		73.12	59.45	68.68	62.63	66.65	52.68	55.2	51.58	59.57
VCL (µm/s)	184.35									NS
Control		172.81	147.65	104.26	115.66	97.1	94.31	68.03	80.44	93.30
Centrifugation		128.05	111.27	123.27	114.12	114.94	91.76	94.66	70.51	101.54
ALH (µm)	4.78									NS
Control		8.96	6.85	5.21	5.64	4.82	5.36	3.81	4.61	4.91
Centrifugation		6.53	5.34	5.23	5.34	5.42	4.15	4.27	3.32	4.62
BCF (Hz)	36.65									NS
Control		22.93	24.37	24.14	24.8	23.43	23.6	24.63	20	23.57
Centrifugation		23.72	25.51	20.61	25	25.32	26.41	26.6	28.4	25.41
STR (%)	91.75									NS
Control		71.77	82.05	83.25	83.16	84.95	84.86	87.2	70.09	82.22
Centrifugation		82.69	82.8	72.23	83.32	82.27	84.64	85.03	94.9	83.60
LIN (%)	80.35									NS
Control		36.71	53.97	55.33	57.58	55.19	59.16	45.33	56.05	
Centrifugation		57.64	54.88	57.52	58.05	58.62	60.01	72.65	56.39	

** Significant differences ($P < 0.01$)NS: No significant differences ($P > 0.05$)

สรุปผลการทดลอง

คุณภาพน้ำเชื้อแพะหลังละลายภายหลังการปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลายเพอร์คอลลีมีคุณภาพดี และสามารถนำไปแช่แข็งได้ การปั่นเหวี่ยงอสุจิแพะด้วยสารละลายเพอร์คอลลีไม่ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อลดลง

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ ได้รับทุนสนับสนุนจาก สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2 และได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างน้ำเชื้อแพะ วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ จากศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสงขลา สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือให้สามารถดำเนินการวิจัยเป็นไปตามวัตถุประสงค์

เอกสารอ้างอิง

- Batista, A.M., S.V. Silva, M.M.P. Gurera, P.L.J. Monteiro Jr, A. Wischral and A.T. Soares. 2011. Comparison of CapriPure and Percoll density gradients for sperm separation of frozen-thawed goat spermatozoa. *Anim. Reprod.* 8 (324):81-84.
- Ferreira, J.C., M. Moura, S.R. Basto, L.R. Oliveira, E.L. Eduardo, M.L. Filho and M.A. Oliveira. 2017. Use of Percoll Density Centrifugation for Sperm Sexing in Small Ruminants. *Global Journal Inc.* 17 (6, 1): 55-59.
- Hossepian, V.F.M., M.F.D.T. Ramalho, B.C.A. Alves, A.C. Lucio, L.Z. Oliveira, A.C. Filho and L.C. Carneiro. 2015. Enrichment of bovine semen with x-bearing spermatozoa using Percoll™ and Optiprep® discontinuous gradients. *Animal and Veterinary Sciences* 3(1):1-7.
- Hussein, A.M.A. 2014. Effect of sperm selection by percoll and swim up techniques on the sex ratio of rabbit offspring. *Asian J. Animal Sci* 9(1):1-6.
- Lucio, A.C., M.V. Resende, J.A. Meirelles, A.P. Perini, L.Z. Oliveira, M.C.V. Miguel, A.S. Carmo, S.Y. Tomita, B.C.A. Alves, F.A.T. Fazano and V.F.M.H. Lima. 2012. Assessment of swim-up and discontinuous density gradient in sperm sex preselection for bovine embryo production. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia.* 64(3):525-532.
- Malik, H.N., D.K. Singhal, A. Mukherjee, N. Bara, S. Kumar, S. Saugandhika, A.K. Mohanty, J.K. Kaushik, S. Bag, B.C. Das., S.K. Bhanja and D. Malakar. 2013. A single blastomere sexing of caprine embryos by simultaneous amplification of sex chromosome-specific sequence of SRY and amelogenin genes. *LIVEST SCI* 157(1):1-6.
- Noguchi, M., K. Yoshioka, K. Kikuchi, G. Iwakami, C. Suzugi and H. Hikono. 2013. Centrifugation on Percoll density gradient enhances motility, membrane integrity and in vitro fertilizing ability of frozen-thawed boar sperm. *Zygote.* 23:68-75.
- Promthep, K., S. Saranya, K. Narisorn, T. Pisit, J. Kanya, S. Ronachai and S. Chatchawan. 2016. Practical use of percoll density gradient centrifugation on sperm sex determination in commercial dairy farm in Thailand. *Indian J. Anim. Res.* 50(3):310-313.
- Samardzija, M., T. Dobrani, M. Karadjole, I. Getz, S. Vince, D. Gracner, N. Macesic and I. Filakovic. 2006. The efficacy of gradient Percoll® on bull sperm separation for in vitro fertilization. *Veterinarski arhiv* 76 (1):37-44.
- Wang, X. H., S. P. Flaherty, N.J. Swann and C.D. Matthews. 1994. Discontinuous Percoll gradients enrich X-bearing human spermatozoa: a study using double-label fluorescence in-situ hybridization. *Hum Repro* 9 (7):1265-1270.