

การเปรียบเทียบชนิดของไข่แดงที่ต่างกันและระดับกลีเซอรอล ในสูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโค

Comparison of different egg yolk types and glycerol concentrations in semen extender on frozen semen quality in bull

แสง สิวีสัก^{1,2}, สมจิตร กันชาพรหม¹ และ จิรัชติ ธรรมศิริ^{1*}

Saeng Sivisack^{1,2}, Somchit Guntaprom¹ and Jiratti Thammasiri^{1*}

บทคัดย่อ: วัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบชนิดของไข่แดงที่แตกต่างกันและระดับกลีเซอรอลในสูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโค ใช้ไข่แดงโคชาร์โรลส์ 3 ตัว รีดสปีดอาทิตย์แล้วทำการรวมน้ำเชื้อ แบ่งออกเป็น 6 ทรีตเมนต์โดยมี 3 กลุ่มตามระดับของกลีเซอรอล (Glycerol) ที่ใช้ในสูตรน้ำยาเจือจางได้แก่ กลุ่มที่ 1 (Glycerol 4%) กลุ่มที่ 2 (Glycerol 6%) และกลุ่มที่ 3 (Glycerol 8%) และทุกกลุ่มไข่ไข่แดงที่แตกต่างกัน 2 ชนิดคือ 1 ไข่แดงจากไข่ไก่ และ 2 ไข่แดงจากไข่เป็ด ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มที่ใช้ไข่แดงของไก่และกลีเซอรอลที่ระดับ 8% ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งในโคหลังละลายส่งผลต่อร้อยละของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อสุจิมิชีวิต และความสมบูรณ์ของโครโมโซมที่สูงกว่า ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ใช้ไข่แดงของไข่ไก่ร่วมกับระดับกลีเซอรอล 4 และ 6% และพบว่า สูงกว่ากลุ่มที่ใช้ไข่แดงจากไข่เป็ดร่วมกับระดับกลีเซอรอล 4 และ 8% แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบความสอดคล้องกันระหว่างผลของวิธีเคลื่อนที่ของอสุจิลักษณะและค่าสัมประสิทธิ์การเคลื่อนที่ความยาวและพื้นที่ส่วนหัวของอสุจิ

คำสำคัญ: ไข่แดง, กลีเซอรอล, คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง, น้ำยาเจือจาง, โค

ABSTRACT: The objective of the present study was to compare the effect of different egg yolk types and glycerol concentrations in semen extender on frozen-thawed semen qualities in bull. The semen was collected from Charolais bull breeders (once a week). The pooled semen was divided into 6 treatments 3 groups of glycerol concentrations which were group 1 (4% glycerol), group 2 (6% glycerol) and group 3 (8% glycerol) each groups was supplemented with two types of egg yolk (chicken and duck). The percentage of progressive motility, sperm viability and acrosomal integrity in semen extender supplemented with chicken egg yolk and 8% of glycerol were significantly greater than those supplemented with chicken and duck egg yolk with (4 and 6%) and (4, 6 and 8%) of glycerol respectively. However, no consistent between motile parameters, motile velocity, elongation and area of sperm was observed.

Keywords: Egg Yolk, Glycerol, Quality of frozen semen, Extender, Bulls

¹ สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ อำเภอมือง จังหวัดกาฬสินธุ์ 46000

Department of Animal Production Technology, Faculty of Agro-Industrial Technology, Kalasin University, Kalasin 46000, Thailand

² สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ วิทยาลัยการศึกษาระดับปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัดสกลนคร สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว (สปป. ลาว)

Department of Animal Production Technology, Savannakhet university of Agriculture and Forestry, Savannakhet, Laos

* Corresponding author: jiratti.th@gmail.com

บทนำ

กลีเซอรอลเป็นสารที่นิยมนำมาเป็นส่วนประกอบของสูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งเนื่องจากช่วยป้องกันอันตรายที่เกิดกับตัวอสุจิขณะแช่แข็งได้โดยลดความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ และลดการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์โดยการเข้าไปแทนที่น้ำในเซลล์ (Curry, 2000) จากสภาวะของเหลวที่เยื่อหุ้มเซลล์ มีการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารรอบๆ เยื่อหุ้มเซลล์ และองค์ประกอบของไขมันเยื่อหุ้มเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง (Shannon and Vishwanath, 1995) เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิที่ได้รับความเสียหายจากการแช่แข็งได้แก่ เยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มอะโครโซมและไมโทคอนเดรีย (Thomas et al., 1998) โดยการเสียหายของอะโครโซมอาจไม่ทำให้อสุจิตาย แต่ไม่สามารถปฏิสนธิได้ ทำให้อัตราการผสมติดต่ำ (Januskaukaset et al., 2003) ดังนั้นระดับกลีเซอรอลที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งที่ต้องให้ความสำคัญในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การใช้กลีเซอรอลช่วยลดความเสียหายอันเกิดจากการแช่แข็งน้ำเชื้อในสูตรน้ำยาเจือจาง tris-based egg yolk พร้อมทั้งยังส่งผลให้ค่าการเคลื่อนที่ ความสมบูรณ์ของอะโครโซม และสามารถนำไปใช้ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งได้หลากหลายรูปแบบ (Crespilho et al., 2008)

ไข่แดงเป็นส่วนประกอบของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อเพื่อช่วยป้องกันอันตรายที่เกิดกับตัวอสุจิแช่แข็ง มีส่วนประกอบที่เป็นเลซิธินและไลโปโปรตีน มีคุณสมบัติป้องกันการช็อคเนื่องจากความเย็น (cold shock) นอกจากนั้นยังเป็นแหล่งพลังงานสำรองสำหรับเมตาโบลิซึมของอสุจิในขณะที่อยู่ในทางเดินระบบสืบพันธุ์เพศเมีย (Bearden and Fuquay 1992) ทั้งนี้ไข่แดงในสัตว์ปีกแต่ละ ชนิดมีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน (Vassilia et al., 2011) และป้องกันความเสียหายแก่อสุจิจากการแช่แข็งแตกต่างกันไป โดย จตุพร และ อภิชัย (2552) รายงานว่าไข่แดงจากไข่เป็ดและไข่นกกระทา ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิโคภายหลังการ

แช่แข็งดีกว่าไข่แดงของไก่ การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการใช้ไข่แดงมีผลดีต่อการป้องกันความเสียหายแก่อสุจิในสภาพอุณหภูมิต่ำ และมีประสิทธิภาพที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิดของสัตว์ปีก (เทวินทร์ และคณะ, 2558) และ การศึกษาที่ผ่านมาส่วนใหญ่ทำการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งโดยผู้ทำการทดลองภายใต้กล้องจุลทรรศน์ หรือใช้การตรวจประเมินด้วย Computer-assisted sperm analysis (CASA) หรืออย่างใดอย่างหนึ่ง ยังไม่มีการศึกษาผลของการใช้ไข่แดงจากสัตว์ปีกต่างชนิดกันและตรวจประเมินคุณภาพทั้งสองรูปแบบในการทดลองเดียว

ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการทดลองนี้ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของไข่แดงของไข่ไก่ และไข่เป็ด ในสูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังการทำละลายในโค โดยการประเมินคุณภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์และประเมินด้วยเครื่อง CASA

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดลอง

วิธีการศึกษาในงานทดลองครั้งนี้ผ่านการพิจารณาโดยคณะกรรมการจริยารบารวมและมาตรฐานการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์ (Reference No. มกส. 019/2559) ใช้โคเนื้อพันธุ์ชาร์โรเลส์เพศผู้ในการรีดน้ำเชื้อจำนวน 3 ตัว ที่มีอายุ 4 - 6 ปี มีระดับคะแนนร่างกาย 3-4 มีน้ำหนัก 700 - 1,200 กิโลกรัม ผ่านการตรวจโรคทางระบบสืบพันธุ์ได้แก่โรคแท้งติดต่อ (brucellosis) และปลอดจากโรคดังกล่าว สถานที่ทำการทดลองที่อำเภอเขียงยืน จังหวัดมหาสารคาม โคที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีการเลี้ยงและการจัดการควบคุมดูแลการให้อาหารและให้น้ำในแต่ละวันโดยมีขั้นตอนในการเลี้ยงจะแบ่งระยะเวลาออกดังนี้ ตอนเช้าเวลา 06.00 - 09.30 น. ให้อาหารชั้นระดับโปรตีน 12% เสริมด้วยหญ้าสด ระยะเวลา 09.30 - 15.00 น. ให้โค

ได้ตีมน้ำและนอนหลับพักผ่อนในคอก ตอนบ่ายระยะเวลา 15.00 -18.00 น. ใช้อาหารข้นโคอีกครึ่ง และเสริมด้วยหญ้าสด สำหรับการรีดเก็บน้ำเชื้อโคทำการรีดเก็บน้ำเชื้อ 3 ตัวๆ ละ 3 ครั้ง ห่างกัน 1 สัปดาห์รีดเก็บช่วงเวลา 06.00 - 9.00 น.

ขั้นตอนกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อโค

ทำการเตรียมอุปกรณ์ช่องคลอดเทียม (Artificial Vagina, AV) ทุกครั้ง นำช่องคลอดเทียมเติมน้ำอุณหภูมิประมาณ 42-45 °C แล้วอัดอากาศเข้าไปปรับความดันก่อนใช้งาน และหล่อลื่นด้วยเจล ทำการรีดน้ำเชื้อโดยใช้ช่องคลอดเทียมอุณหภูมิประมาณ 40-42 °C ขณะที่พ่อพันธุ์ขึ้นขี่ตัวล่อให้ตั้งพ่อพันธุ์ลงและให้ขึ้นป็นใหม่ 2-3 ครั้ง เพื่อให้พ่อพันธุ์เกิดความกำหนดแล้วทำการรีดเก็บน้ำเชื้ออุ่นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อในอ่างควบคุมอุณหภูมิ หรือน้ำอุ่นในปิกเกอร์ให้ได้ในระดับ 37 °C วิธีการประเมินตรวจคุณภาพน้ำเชื้อทำได้โดยนำน้ำเชื้อไปตรวจประเมินคุณภาพให้เร็วที่สุดภายในห้องปฏิบัติการโดยการตรวจคุณภาพเบื้องต้น คือร้อยละของการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า (motility) ร้อยละของอสุจิมีชีวิต (live-dead) ร้อยละของอสุจิมีสรูปร่างปกติ (morphology) และ ความเข้มข้นของอสุจิ (concentration) น้ำเชื้อที่ใช้ผลิตเป็นน้ำเชื้อแช่แข็งต้องมีการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าอย่างน้อย 75% และทำการเจือจางน้ำเชื้อโดยสูตรน้ำยาเจือจางพื้นฐาน (Tris 3.02 g, Citric 1.65 g, Fructose 1.25 g, Egg yolk 20 ml, Glycerol 4-8 ml, Distill Water 65-69 ml; รวม 100 ml) โดยแบ่งออกเป็น 6 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 (ใช้ไข่แดงของไก่ และ ระดับกลีเซอรอล 4%) กลุ่มที่ 2 (ใช้ไข่แดงของไก่ และ ระดับกลีเซอรอล 6%) กลุ่มที่ 3 (ใช้ไข่แดงของไก่ และ ระดับกลีเซอรอล 8%) กลุ่มที่ 4 (ใช้ไข่แดงของเป็ด และ ระดับกลีเซอรอล 4 %) กลุ่มที่ 5 (ใช้ไข่แดงของเป็ด และ ระดับกลีเซอรอล 6%) กลุ่มที่ 6 (ใช้ไข่แดงของเป็ด และ ระดับกลีเซอรอล 8 %) ผสมในน้ำยาเจือจาง จากนั้นทำการบรรจุน้ำเชื้อใส่ในหลอดน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตรที่ความเข้มข้น 20

ล้านตัวต่อมิลลิลิตรและทำการลดอุณหภูมิ จาก 37 °C จนกระทั่งถึง 4 °C ในเครื่องควบคุมอุณหภูมิเป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำหลอดน้ำเชื้อมาลดอุณหภูมิ -120 °C เป็นเวลา 10 นาที โดยใช้วิธีการการอ้งไอน์โตรเจนเหลว ซึ่งให้ระดับตะแกรงที่รองหลอดน้ำเชื้อ สูงจากระดับไอน์โตรเจน 4 เซนติเมตร การเก็บหลอดบรรจุน้ำเชื้อเก็บไว้ในถังไอน์โตรเจนที่อุณหภูมิ -196 °C

การตรวจประเมินคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการทำละลาย

การตรวจประเมินด้วยเครื่อง HT CASA II animal Breeder II version 12.0 (Hamilton-Thorne) ได้ทำการสุ่มและเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อที่ทำการรีดจำนวน 3 ตัวๆ ละ 3 ครั้ง ทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังทำการละลายโดยได้ทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อโคในวันที่ 14 หลังการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยประเมิน 1) ผลต่อวิถีการเคลื่อนที่ของอสุจิ 2) ผลต่อลักษณะและค่าสัมประสิทธิ์การเคลื่อนที่ 3) ความยาวและพื้นที่ส่วนหัวของอสุจิ และการตรวจประเมินร้อยละของอสุจิมีสชีวิต และความสมบูรณ์ของอะโคโซม ทำการตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ได้แก่ 1) ร้อยละของอสุจิที่เคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้า โดยการอุ่นน้ำเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที หยดน้ำเชื้อบนแผ่น slide ที่อุณหภูมิ 37 °C ประเมินการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า โดยนับอสุจิ ครั้งละ 20 ตัว แยกเป็นกลุ่มที่เคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า และกลุ่มที่ไม่เคลื่อนและเคลื่อนที่แบบไม่ตรง สุ่มนับหลายพื้นที่จนครบ 300 ตัว คำนวณเป็นร้อยละ 2) การประเมินร้อยละของอสุจิมีสชีวิต ดำเนินการโดย หยดน้ำเชื้อเจือจางในหลอดทดลองขนาดจุ 5 มิลลิลิตร จำนวน 1 หยด และหยดสี nigrosin-eosin 2 หยด (nigrosin 5 กรัม และ eosin 1 กรัม ในสารละลาย Na-citrate 100 มิลลิลิตร) จุ่มในน้ำอุ่น 37°C เป็นเวลา 3 นาที ดูส่วนผสมหยดลงบน slide ที่สะอาด จากนั้นทำการ smear เป่าให้แห้งด้วยอุปกรณ์เป่าลมร้อน ประเมินร้อยละของอสุจิที่ไม่ติดสี (อสุจิมีสชีวิต) จำนวน 2 slide แต่ละ slide ไม่ต่ำกว่า

200 ตัว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X 3) การประเมินความสมบูรณ์ของอะโครโซมใช้ slide เดียวกับในข้อ 2 ทำการประเมินภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000X อสุจิมี่ชีวิตที่มีขอบอะโครโซมปกติ จะไม่ติดสี และขอบอะโครโซมบริเวณหัวจะเรียบไม่มี รอยร่นบุบสลาย ตามวิธีการของ เทวินทร์ และคณะ (2558)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองทั้งหมดมาวิเคราะห์ ความแปรปรวนแบบ Analysis of Variance (ANOVA) และทดสอบหาอิทธิพลเนื่องจากปัจจัยที่เกิดจากชนิด ของไข่แดง ทำการวิเคราะห์โดยใช้ GLM procedure of SAS (2001) และการทดสอบความแตกต่างระหว่าง

กลุ่มทดลองโดยใช้ Duncan's New Multiple Range Test (Steel et al., 1997)

ผลการศึกษา

ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อสุจิที่มีชีวิตและความสมบูรณ์ของอะโครโซม

ผลการศึกษาพบว่าค่าร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าในกลุ่มที่เสริมไข่แดงของไข่ไก่ร่วมกับ 8% กลีเซอรอลมีค่ามากที่สุด รองมาคือ กลุ่มที่ 1 (ไข่ไก่ + กลีเซอรอล 4%) และ 4 (ไข่เป็ด + กลีเซอรอล 4%) และมี ร้อยละที่ลดลงในกลุ่มที่ 5 (ไข่เป็ด + กลีเซอรอล 6%) และ 6 (ไข่เป็ด + กลีเซอรอล 8%) ตามลำดับ (Table 1)

Table 1 Effect of chicken and duck egg yolk and glycerol concentrations in extender on sperm motion characteristic of post thaw bull semen (mean $\pm$ SEM)

Parameters (%)	20 % egg yolk (chicken)			20 % egg yolk (duck)		
	4% Glycerol	6% Glycerol	8% Glycerol	4% Glycerol	6% Glycerol	8% Glycerol
Progressive motility	14.60 $\pm$ 0.006 ^b	10.30 $\pm$ 0.002 ^c	17.90 $\pm$ 0.004 ^a	14.60 $\pm$ 0.004 ^b	5.50 $\pm$ 0.005 ^d	3.40 $\pm$ 0.005 ^e
Viability	32.67 $\pm$ 2.60 ^c	41.00 $\pm$ 4.73 ^{bc}	55.67 $\pm$ 1.45 ^a	29.67 $\pm$ 3.44 ^c	38.67 $\pm$ 5.46 ^c	49.67 $\pm$ 3.84 ^{ab}
Acrosomal integrity	27.00 $\pm$ 2.31 ^c	31.00 $\pm$ 1.15 ^c	59.67 $\pm$ 4.98 ^a	45.67 $\pm$ 3.84 ^b	49.67 $\pm$ 3.84 ^{ab}	56.67 $\pm$ 2.60 ^a

a, b, c, d, e Within a row, means with different superscripts differ (P<0.05)

สูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของไข่ไก่และไข่เป็ดร่วมกับกลีเซอรอลที่ระดับ 8% ส่งผลให้ค่าร้อยละของอสุจิที่มีชีวิตมีค่ามากกว่า (P<0.05) เมื่อเทียบกับกลุ่มสูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของไข่ไก่ร่วมกับกลีเซอรอลที่ระดับ 4% และไข่เป็ดร่วมกับกลีเซอรอลที่ระดับ 4 และ 6% แต่เมื่อเทียบไข่เป็ดร่วมกับกลีเซอรอลที่ระดับ 8% ไม่พบความแตกต่างกับเมื่อเทียบกับไข่ไก่ร่วมกับกลีเซอรอลที่ระดับ 6% ในขณะที่ค่าความสมบูรณ์ของอะโครโซมพบว่ากลุ่มที่ใช้ไข่แดงของไข่ไก่และไข่แดงของไข่เป็ดร่วมกับกลีเซอรอล 8% มีค่าร้อยละความสมบูรณ์ของอะโครโซม (P<0.05) สูงกว่ากลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 1)

ความเร็วในการเคลื่อนที่

ผลการศึกษาในกลุ่มที่เสริมไข่แดงของไข่ไก่ร่วมกับกลีเซอรอลที่ระดับ 8% และไข่แดงของไข่เป็ดร่วมกับกลีเซอรอลที่ระดับ 8% ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อพบว่า มีวิธีการเคลื่อนที่แบบเฉลี่ย (Motile VAP, Average path velocity) วิถีเคลื่อนที่แบบตรง (Motile VSL, Straight-line velocity) และวิธีการเคลื่อนที่แบบโค้ง (Motile VCL, Curvilinear velocity) สูงกว่าในกลุ่มอื่นที่เสริมด้วยไข่แดงของไข่ไก่ร่วมกับกลีเซอรอลที่ระดับ 4 และ 8 % และกลุ่มที่เสริมด้วยไข่แดงของไข่เป็ดร่วมกับกลีเซอรอลที่ระดับ 4 และ 6% อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ทางสถิติ (Table 2)

Table 2 Effect of chicken and duck egg yolk and glycerol concentrations in extender on sperm motile velocity of post thaw bull semen (mean $\pm$ SEM)

Parameters	20 % egg yolk (chicken)			20 % egg yolk (duck)		
	4% Glycerol	6% Glycerol	8% Glycerol	4% Glycerol	6% Glycerol	8% Glycerol
VAP	32.85 $\pm$ 0.31 ^c	39.18 $\pm$ 0.21 ^a	15.98 $\pm$ 0.07 ^d	32.85 $\pm$ 0.38 ^c	35.64 $\pm$ 0.39 ^b	38.67 $\pm$ 0.21 ^a
VSL	28.16 $\pm$ 0.38 ^c	33.96 $\pm$ 0.32 ^a	12.58 $\pm$ 0.41 ^d	28.16 $\pm$ 0.38 ^c	31.38 $\pm$ 0.51 ^b	33.08 $\pm$ 0.41 ^a
VCL	58.22 $\pm$ 0.36 ^c	70.2 $\pm$ 0.58 ^a	29.67 $\pm$ 0.41 ^d	58.22 $\pm$ 0.57 ^c	66.41 $\pm$ 0.39 ^b	70.38 $\pm$ 0.50 ^a

a, b, c Within a row, means with different superscripts differ ($P < 0.05$).

VAP (μ m/s): velocity average path, VSL (μ m/s): velocity straight line, VCL (μ m/s): velocity curved line

ลักษณะและค่าสัมประสิทธิ์การเคลื่อนที่

ความกว้างด้านข้างของหัวในการเคลื่อนที่ Motile ALH (amplitude of lateral head displacement) พบว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงของไข่เป็ดร่วมกับกลีเซอรอล

เซอรอลที่ระดับ 4% ดีกว่าระดับ 6 และ 8% และในไข่ไก่ร่วมกับกลีเซอรอล ทั้ง 3 ระดับ แต่กลีเซอรอลระดับ 4 และ 6% ร่วมกับสูตรที่มีไข่แดงของไข่เป็ดและไข่ไก่ ไม่มีความแตกต่างกัน ($P < 0.05$)

Table 3 Effect of chicken and duck egg yolk and glycerol concentrations in extender on sperm motile parameters of post thaw bull semen (mean $\pm$ SEM)

Parameters	20 % egg yolk (chicken)			20 % egg yolk (duck)		
	4% Glycerol	6% Glycerol	8% Glycerol	4% Glycerol	6% Glycerol	8% Glycerol
ALH	3.42 $\pm$ 0.24 ^b	3.46 $\pm$ 0.29 ^b	2.02 $\pm$ 0.02 ^c	9.15 $\pm$ 0.32 ^a	4.05 $\pm$ 0.28 ^b	3.79 $\pm$ 0.09 ^b
BCF	9.15 $\pm$ 0.09 ^d	15.03 $\pm$ 0.32 ^b	12.44 $\pm$ 0.23 ^c	9.15 $\pm$ 0.10 ^d	16.39 $\pm$ 0.17 ^a	9.55 $\pm$ 0.20 ^d
STR	19.4 $\pm$ 0.37 ^a	19.32 $\pm$ 0.29 ^a	13.62 $\pm$ 0.39 ^b	19.44 $\pm$ 0.48 ^a	19.78 $\pm$ 0.14 ^a	19.96 $\pm$ 0.07 ^a
LIN	20.63 $\pm$ 0.39 ^a	18.55 $\pm$ 0.20 ^b	16.61 $\pm$ 0.19 ^d	20.63 $\pm$ 0.23 ^a	10.41 $\pm$ 0.24 ^e	17.36 $\pm$ 0.18 ^c

a, b, c, d, e Within a row, means with different superscripts differ ($P < 0.05$).

ALH (μ m): amplitude of lateral head displacement, BCF (Hz): beat cross frequency, STR (%): straightness coefficient line, LIN (%): linearity coefficient

ส่วนลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิพบว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงของไข่เป็ดร่วมกับกลีเซอรอลระดับ 6% เป็นองค์ประกอบมีค่าลักษณะ BCF มีหน่วยเป็น Hz (ลักษณะความถี่ที่หัวตัวอสุจิส่ายไปมาในขณะที่เคลื่อนที่) สูงกว่าอสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่แดงของไข่เป็ดร่วมกับกลีเซอรอลระดับ 4 และ 8% และไข่ไก่ร่วมกับกลีเซอรอลทั้ง 3 ระดับ (Table 3)

ความยาวและพื้นที่ส่วนหัว

ความยาวและพื้นที่ส่วนหัวภายหลังละลายของอสุจิพบว่าจากการเสริมไข่แดงของไข่ไก่ร่วมกับกลีเซอรอล 4% และการเสริมไข่แดงเปิดร่วมกับกลีเซอรอล 4% ดีกว่าการเสริมไข่แดงของไข่เป็ดและไข่ไก่ร่วมกับกลีเซอรอลที่ 6 และ 8% อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (Table 4)

Table 4 Effect of chicken and duck egg yolk and glycerol concentrations in extender on motile elongation and area of sperm of post thaw bull semen (mean $\pm$ SEM)

Parameters	20 % egg yolk (chicken)			20 % egg yolk (duck)		
	4% Glycerol	6% Glycerol	8% Glycerol	4% Glycerol	6% Glycerol	8% Glycerol
Motile elongation	0.22 $\pm$ 0.003 ^a	0.17 $\pm$ 0.002 ^d	0.11 $\pm$ 0.002 ^e	0.22 $\pm$ 0.002 ^a	0.19 $\pm$ 0.002 ^b	0.18 $\pm$ 0.002 ^c
Motile area	6.96 $\pm$ 0.030 ^a	5.81 $\pm$ 0.120 ^c	3.21 $\pm$ 0.080 ^d	6.96 $\pm$ 0.030 ^a	6.07 $\pm$ 0.010 ^b	5.62 $\pm$ 0.160 ^c

a, b, c, d, e Within a row, means with different superscripts differ (P<0.05).

วิจารณ์

จากงานทดลองที่พบว่าในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของไก่ร่วมกับกลีเซอรอลที่ระดับ 8% มีค่าร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูงที่สุด และมีค่าสูงกว่าในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของเป็ดร่วมกับกลีเซอรอลในทุกระดับซึ่งแตกต่างจากการศึกษาของ El-Shamaa et al. (2008) ที่รายงานว่า เมื่อพิจารณาการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของน้ำเชื้อแช่แข็งหลังละลายแล้วเห็นว่าในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีการใช้ไข่แดงเป็ดมีร้อยละการเคลื่อนที่ของหัวสูงกว่าการใช้ไข่แดงของไก่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งสามระดับคือ 10 15 และ 20% และการทดลองของ Bathgate et al. (2006) ที่รายงานว่า น้ำเชื้อสุกรที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง egg yolk tris ที่มีไข่แดงของไข่เป็ดและไข่นกกระทาเป็นองค์ประกอบมีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิสูงกว่าน้ำเชื้อสุกรที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ egg yolk tris ที่มีไข่แดงของไข่ไก่ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเกิดจากมีความแปรปรวนในเรื่ององค์ประกอบไข่ ชนิด สายพันธุ์ และอาหารที่เลี้ยง ต่างเป็นปัจจัยที่ทำให้ องค์ประกอบของไข่สัตว์ปีกชนิดต่างๆ มีความแตกต่างกัน (Scheideler et al., 1998) ทั้งนี้เนื่องจาก องค์ประกอบของไข่ ได้แก่ cholesterol, fatty acids และ phospholipids ล้วนแล้วแต่มีหน้าที่ปกป้องเซลล์อสุจิจากความเย็น และเมื่อมีการเปลี่ยนระดับของกลีเซอรอลจึงส่งผลให้ระดับความสามารถในการปกป้องตัวอสุจิได้ในระดับที่แตกต่างกัน (เทวินทร์ และคณะ,

2558)

จตุพร อภิชัย (2009) ที่ได้รายงานไว้ว่า ภายหลังจาก ทำละลาย ความสมบูรณ์ของอะโครโซมของตัวอสุจิในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของเป็ด มีความสมบูรณ์มากกว่าตัวอสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่ไก่เป็นองค์ประกอบ แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าภายหลังจากละลายในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของไก่ร่วมกับกลีเซอรอลที่ระดับ 8% มีความสมบูรณ์ของอะโครโซมไม่แตกต่างกันที่ตัวอสุจิในน้ำยาเจือจางที่มีไข่เป็ดเป็นองค์ประกอบร่วมกับกลีเซอรอลที่ระดับ 6 และ 8% แต่ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงของไก่ร่วมกับกลีเซอรอลที่ระดับ 4 และ 6% มีความสมบูรณ์ของอะโครโซมต่ำที่สุด ซึ่งอาจเนื่องจากมีความแปรปรวนในเรื่ององค์ประกอบไข่ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ชนิด สายพันธุ์ และอาหารที่เลี้ยง ต่างเป็นปัจจัยที่ทำให้ องค์ประกอบของไข่สัตว์ปีกชนิดต่างๆ มีความแตกต่างกัน (Scheideler et al., 1998)

ซึ่งสอดคล้องกับ Papa et al. (2015) รายงานว่า น้ำเชื้อแช่แข็งที่มีส่วนผสมของไข่แดงและกลีเซอรอล จะส่งผลให้ค่า VCL สูงกว่ากลุ่มที่ไม่มีกลีเซอรอล แต่อย่างไรก็ตาม ค่าที่ได้โดยการใช้โปรแกรมในการวิเคราะห์พบว่าให้ผลที่มีความแม่นยำและรวดเร็ว (Rijsselaere et al., 2005) แต่ควรวิเคราะห์ร่วมกับวิธีดั้งเดิมที่ประเมินผลด้วยกล้องจุลทรรศน์เนื่องจากค่า VAP และ VCL ที่ได้จากการคำนวณอาจลดลงภายหลังผ่านไปหนึ่งชั่วโมงหลังทำละลาย Tretipskul et al. (2010) ทำให้ค่าที่ได้ อาจไม่มีความถูกต้องเพียงพอ

นอกเหนือจากนั้น Peña et al. (2003) ได้กล่าวถึงกระบวนการที่ทำให้สpermพร้อมปฏิสนธิ (capacitation) ภายหลังการทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งส่งผลให้ค่า VCL และ ALH ลดลงซึ่งไม่เกี่ยวข้องกันโดยตรงกับอิทธิพลเนื่องมาจากชนิดของไข่แดงและระดับของกรีเซอรอลกระบวนการที่ทำให้สpermพร้อมปฏิสนธิ (capacitation) ภายหลังการทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งส่งผลให้ค่า LIN เพิ่มขึ้น ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกันโดยตรงกับอิทธิพลเนื่องมาจากชนิดของไข่แดงและระดับของกรีเซอรอล (Peña et al., 2003) รายงานถึงค่าของ sperm velocities (VAP VSL และ VCL) ที่ลดลงส่งผลต่อค่าการเคลื่อนที่ของอสุจิที่ลดลงและร้อยละอสุจิที่เคลื่อนที่ผิดปกติที่มากขึ้นและส่งผลต่อการผสมติดครั้งแรกที่ต่ำ Ban et al. (1999) รายงานถึงค่า VCL และ ALH

กวินท์ และคณะ (2556) ได้รายงานไว้ว่า ถ้าหากหัวของเซลล์อสุจิมีความยาวมากจะทำให้ค่าคะแนนการเคลื่อนที่แบบกลุ่ม สูง แต่ถ้าหัวของเซลล์อสุจิ มีความยาวน้อยจะทำให้ค่าคะแนนการเคลื่อนที่แบบกลุ่มต่ำ สอดคล้องกับความสัมพันธ์ เชิงบวกระหว่างการเคลื่อนที่แบบกลุ่มกับ elongation ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้รูปร่าง (shape) ของเซลล์อสุจิ ในมิติแบบกลมรี หรือ elongated head ทั้งนี้เนื่องจากอสุจิที่มีรูปร่างกลมรีหรือกลมค่อนข้างยาว จะมีความต้านทานในการเคลื่อนที่ต่ำ ทำให้อสุจิมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าได้ดีกว่า อสุจิที่มีความยาวส่วนหัวน้อยกว่า

สรุป

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าการสุตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโคที่มีส่วนผสมของไข่แดงของไก่ร่วมกับกลีเซอรอลที่ระดับ 8% ส่งผลดีต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง ภายหลังการทำละลายเมื่อประเมินจากค่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ร้อยละของอสุจิมีชีวิตและความสมบูรณ์ของอะโครโซม แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่พบความสัมพันธ์กันระหว่างผลของวิถีเคลื่อนที่ของอสุจิ

ลักษณะและค่าสัมประสิทธิ์การเคลื่อนที่ความยาวและพื้นที่ส่วนหัวของอสุจิ

เอกสารอ้างอิง

- กวินท์ คำปาละ, นิภา นาดีนพร้อม และประมวล เดิมสมบัติถาวร. 2556. ความสัมพันธ์ของขนาดเซลล์อสุจิกับการเคลื่อนที่แบบกลุ่มในน้ำเชื้อสุกร. วิทยาศาสตร์เกษตร. 44: 363-366.
- จิตพร พงษ์เพ็ง และ อภิชัย พูนชัย. 2552. การเปรียบเทียบน้ำยาเจือจาง Egg yolk tris ที่มีไข่แดงนกกระทา ไก่ และเป็ดเป็น องค์ประกอบต่อคุณภาพ น้ำเชื้อแช่แข็งโค. วารสารเทคโนโลยีเพื่อการผลิตสัตว์. 4: 32-43.
- เทวินทร์ วงษ์พระลับ, พชร ธานนรักษ์, นริศรา สวรูป, ชัยพร สิทธิเกษมกิจ และพิริยชัย เชื้อวงษ์บุญ. 2558. ผลของไข่แดงจากสัตว์ปีกต่างชนิดต่อคุณภาพน้ำเชื้อของสุกรที่เก็บรักษาในสภาพอุณหภูมิ 5 °C. เกษตร. 43: 195-201.
- Bathgate, R., W.M. Maxwell, and G. Evans. 2006. Studies on the effect of supplementing boar semen cryopreservation media with different avian egg yolk types on in vitro post-thaw sperm quality. Reprod. Domest. Anim. 41: 68-73.
- Bearden, H.J., and J.W. Fuquay. 1992. Applied animal reproduction. 3th ed. prentice-Hall, inc., New jersey.
- Crespilho, A.C., F.O. Papa, J.A. Dell'Aqua Jr, F. Zahn, A. Martins Jr., and G.H.M. Araujo. 2008. Effect of glycerol concentration on the motility and viability of cooled-stored ram semen. Reprod. Dom. Anim. 43:73-74.
- Curry, M. R. 2000. Cryopreservation of sperm from domestic livestock. Rev. Reprod. 5: 46-52.
- El-Shamaa, I., E. El-Shenawy, A. Hussein, M. El-Sherbieny, and M. El-Sharawy. 2008. A comparison of duck and chicken egg yolk for cryopreservation of Egyptian buffalo bull spermatozoa. Austra. Vet. J. 85: 232 - 235.
- Januskauskas, A., A. Johannisson, and H. Rodriguez Martinez. 2003. Subtle changes in cryopreserved bull semen in relation with Sperm viability, chromatin structure and field fertility. Theriogenology. 60: 743-758.
- Papa, P.M., M.D. Rosiara, N.G. Priscilla, R.J. Cassio P.F. Camila, O.P. Frederico, P.V. Felipe, A.A. Marco, M.C. André, and J.A.J. Dell'Aqua. 2015. Effect of glycerol on the viability and fertility of cooled bovine semen. Theriogenology. 83: 107-113.

- Peña, F.J., A. Johannisson, M. Wallgren, and H. Rodríguez-Martínez. 2003. Assessment of fresh and frozen-thawed boar semen using an annexin-v assay: a new method of evaluating sperm membrane integrity. *Theriogenology*. 60: 677 - 689.
- Rijsselaere, T., A.V. Soom, S. Tanghe, M. Coryn, D. Maes, and A.D. Kruif. 2005. New techniques for the assessment of canine semen quality: A review. *Theriogenology*. 64: 706 - 719.
- SAS. 2001. SAS System (Release 8.2). SAS Institute Inc., Cary, NC.
- Shannon, P., and R. Vishwanath. 1995. The effect of optimal and suboptimal concentration of sperm on the fertility of fresh and frozen bovine semen and a theoretical model to explain the fertility difference. *Anim. Reprod. Sci.* 39: 110.
- Steel, R. G. D., J. H. Torrie, and D. A. Dickey. 1997. Principles and procedures of statistics a biometrical approach. 666 p
- Tretipskul, C., K. Buranaamnuay, S. Koonjaenak, P. Tummaruk, and M. Techakumphu. 2010. The Use of Computer-Assisted Sperm Analysis for Discriminating Series of Motility Pattern of Frozen-thawed Boar Semen Thai J. Vet. Med. 40: 25 - 30.
- Thomas, C.A., D.I. Garmer, J.M. deJarnette, and C.E. Marshall. 1998. Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol. Reprod.* 58: 786-793.
- Vassilia, J.S., F. Irini, and S. Miniadis-Meimaroglou. 2011. Lipid, fatty acid and carotenoid content of edible egg yolks from avian species: A comparative study. *Food. Chem.* 124: 971 - 977.