RESEARCH ARTICLE

The Effect of Storage Period on Semen Quality and Fertility of Thai Native Chicken Frozen Semen

Pronjit Sonseeda[1,2], Thevin Vongpralub[1,2*], Bunyut Laopaiboon[1]

Abstract

Objective—The objective of this study was to investigate the effect of storage time of native chicken frozen semen for 7 days and for a year on semen quality and fertility.

Materials and Methods—Thirty-six Thai native cocks were housed under natural environmental conditions, and semen were collected routinely twice a week, using the massage method. Semen sample were cooled down to 5 ˚C and diluents plus DMF was added (6% DMF of total volume when the sperm concentration was 1,200 x 10^6/ml). Semen was loaded into 0.5 ml straws and frozen by simple vapour method; straws were frozen by locate above liquid nitrogen (in styroform box) at -35 ˚C for 10 min and located at -135 ˚C for 5 min then plunged into liquid nitrogen. Straw were thawed in cold water (5 ˚C). The motility characteristics were examined by computer-assisted semen analyser (CASA). Fertility test of frozen semen was carried on by inseminated to layer hens. The experiments of Paired T-test were conducted with 13 replications.

Results—Semen was evaluated for percentage of total motility, percentage of progressive motile, percentage of rapid cell, percentage of medium cell, percentage of slow cell, and percentage of static cell. The storage time were 7 day and 1 year did not significantly affect on semen quality (P>0.05). The fertility and hatching rate of 7 day storage were 69.63% and 74.61%, and 1 year storage were 66.16% and 71.15% respectively. The storage time were 7 day and 1 year did not significantly affect on fertility and hatching rate (P>0.05).

Conclusion—The effect of storage period (7 day and 1 year) of frozen semen at -196 ˚C did not significantly affect on semen quality and fertility in Thai native chicken.

KKU Vet J. 2013;23(1):129-137. http://vmj.kku.ac.th/

Keywords: Indigenous chicken; Cryopreserve semen; Storage time; Fertility rate

[1]Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kean Unversity, Khon Kean, Thailand 40002

[2]Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok 10900, Thailand and Agricultural Biotechnology Research Center for Sustainable Economy, KhonKaen University, KhonKaen 40002

[*]**Corresponding author** E-mail: Vthevi@kku.ac.th

ผลของระยะเวลาในการเก็บรักษา ต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่พื้นเมืองไทย

พรจิต สอนสีดา[1,2], เทวินทร์ วงษ์พระลับ[1,2*], บัญญัติ เหล่าไพบูลย์[1]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง เป็นระยะเวลา 7 วัน และ 1 ปี ต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดของไก่พื้นเมืองไทย

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ ใช้พ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองไทย จำนวนทั้งสิ้น 36 ตัว เลี้ยงในโรงเรือนแบบเปิดภายใต้สภาวะแวดล้อมตามธรรมชาติ ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อสัปดาห์ละ 2 ครั้งเป็นประจำ โดยในแต่ละซ้ำรวมน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ (pool semen) เจือจางด้วยน้ำยาสูตร Schramm ลดอุณหภูมิไปที่ 5 °C เติมน้ำยาที่มี Dimethyl fromamine (DMF) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 6% และมีความเข้มข้นของอสุจิประมาณ 1,200 x 10^6/มล. บรรจุน้ำเชื้อในหลอดขนาด 0.5 มล. ดำเนินการแช่แข็งด้วยวิธีการแบบง่ายโดยใช้กล่องโฟมและอังไอไนโตรเจนเหลว (simple vapour method) อังไอไนโตรเจนที่บริเวณอุณหภูมิ -35 °C นาน 12 นาที และอุณหภูมิ -135 °C นาน 5 นาทีหลังจากนั้นทำการจุ่มลงไนโตรเจนเหลวแล้วนำไปเก็บรักษา ละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 5 °C แล้วนำมาศึกษาคุณลักษณะของการเคลื่อนที่ของอสุจิด้วยเครื่อง Computer-assisted semen analysis (CASA) และประเมินอัตราการผสมติดด้วยการผสมเทียมให้กับแม่ไก่ทางการค้า วิเคราะห์ผลการทดลองแบบ Paired T-test ทำการศึกษาจำนวน 13 ซ้ำ

ผลการศึกษา การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่อง CASA โดยอัตราการเคลื่อนที (% total motile), ร้อยละอสุจิที่เคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้า (% progressive motile) ร้อยละของอสุจิที่เคลื่อนที่เร็ว (% rapid cell), อสุจิที่เคลื่อนที่เร็วปานกลาง (%medium cell), อสุจิที่เคลื่อนที่ช้า (% slow cell) และอสุจิที่ไม่เคลื่อนที่ (% static cell) ในกลุ่มที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 7 วัน และ 1 ปี ไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ (P>0.05) ส่วนผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อต่ออัตราการผสมติดและฟักออก พบว่าไม่มีความแตกทางสถิติในเรื่องอัตราการผสมติดและการฟักออกเช่นกัน โดยในกลุ่มที่เก็บรักษาน้ำเชื้อที่ 7 วันมีอัตราการผสมติดและฟักออกเท่ากับร้อยละ 69.63 และ 74.61 และสำหรับกลุ่มที่เก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งเป็นระยะเวลา 1 ปี มีอัตราการผสมติดและฟักออกเท่ากับร้อยละ 66.16 และ 71.15 ตามลำดับ (P>0.05)

ข้อสรุป พบว่าระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไก่พื้นเมืองไทยที่ 7 วัน และ 1 ปี ไม่มีความแตกต่างกันในเรื่องของคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

Keywords: ไก่พื้นเมือง น้ำเชื้อแช่แข็ง ระยะเวลาในการเก็บรักษา อัตราการผสมติด

[1]ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น ประเทศไทย 40002
[2]ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรสำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กรุงเทพฯ 10900 และศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002
*__ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ__ E-mail: Vthevi@kku.ac.th

บทนำ

พันธุ์ของสัตว์ปีกในท้องถิ่นต่างๆ ของโลกได้มีการสูญพันธุ์ไปแล้วประมาณ 9 % [1] ดังนั้นการอนุรักษ์พันธุกรรมจึงเป็นสิ่งสำคัญซึ่งควรทำอย่างเร่งด่วนเพื่อรักษาความหลากหลายทางพันธุกรรมไว้ การทำน้ำเชื้อแบบแช่แข็งซึ่งวิธีการที่เป็นไปได้จริงที่สุดในการอนุรักษ์พันธุกรรมของสัตว์ปีกในขณะนี้ แต่ในปัจจุบันอัตราการผสมติดจาการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแบบแช่แข็งยังไม่เป็นที่น่าพอใจ [2] เนื่องจากอสุจิของสัตว์ปีกนั้นมีความไวต่อความเสียหายจากกระบวนการแช่แข็งและการทำละลาย [3] โดยกระบวนการแช่แข็งนั้นก่อความเสียหายต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ของเหลวที่อยู่ภายในเซลล์และเอนไซม์ต่างๆ องค์ประกอบของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ กระบวนการเมตาบอลึซึ่มของเซลล์อสุจิ ปริมาณ ATP [4-5] และสารพันธุกรรมที่อยู่ภายในเซลล์อีกด้วย [6]

นอกจากผลเสียในกระบวนการแช่แข็งแล้วยังมีผลกระทบในเรื่องอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อคุณภาพน้ำเชื้อ โดยน้ำเชื้อแบบแช่แข็งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 °C, -70 °C และ -196 °C พบว่าอุณหภูมิของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งไว้ที่ -70 °C และ -196 °C มีผลดีต่อคุณภาพน้ำเชื้อมากกว่ากลุ่มที่เก็บรักษาไว้ที่ -20 °C [7] โดย Watson (1995) [8] รายงานว่าน้ำเชื้อแบบแช่แข็งส่วนใหญ่มีทั้งเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -79 °C ในน้ำแข็งแห้ง และเก็บรักษาไว้ที่ -196 °C ในไนโตรเจนเหลว ซึ่ง Mazur (1980) [9] รายงานว่าน้ำเชื้อแบบแช่แข็งอาจสามารถรักษาสภาพของสารพันธุกรรมได้ยาวนาน 3000 ปีเมื่อเก็บไว้ในน้ำแข็งแห้ง และ 10,000 ปีในไนโตรเจนเหลว ก่อนที่สารพันธุกรรมจะเสื่อสลายไป แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษา Macpherson (1954) [10] รายงานว่าผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในโคที่อุณหภูมิ -79 °C พบว่าเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลายาวนาน 15 เดือนให้อัตราการผสมติดต่ำกว่าในน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษา 1-3 วันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เช่นเดียวกับการศึกษาใน Harald Trummer et al. (1998) [11] รายงานว่าน้ำเชื้อแช่แข็งของมนุษย์เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -70 °C และ -196 °C พบว่าการเก็บรักษา 7 วันให้คุณภาพน้ำเชื้อสูงกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 เดือนในทั้งสองอุณหภูมิอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ดังนั้นจากการการศึกษาข้างต้นจะเห็นได้ว่าระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งนั้นมีผลต่ออัตราการติดไม่มากก็น้อย แต่การศึกษาเรื่องดังกล่าวในไก่พื้นเมืองยังขาดข้อมูล ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของไก่

พื้นเมืองต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติด

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

ใช้พ่อพันธุ์ไก่พื้นเมืองไทยจำนวนรวม 36 ตัว แยกเลี้ยงพ่อพันธุ์ในกรงขังเดี่ยว และในการทดลองทดสอบอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแช่แข็งใช้แม่พันธุ์ไก่ไข่ทางการค้ามีอัตราการไข่อยู่ที่ร้อยละ 80 ขึ้นไป รวมทั้งสิ้นจำนวน 156 ตัว โดยทำการผสมเทียมกลุ่มละ 78 ตัว ดำเนินการเลี้ยงดูภายใต้โรงเรือนแบบเปิดภายใต้มาตราฐานฟาร์ม ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

น้ำยาเจือจาง

น้ำยาเจือจางที่ใช้คือสูตร Schramm โดยมีองค์ประกอบทางเคมี(ใช้ผลิตภัณฑ์ของ Sigma) ในน้ำ 1 ลิตรดังนี้ Magnesium acetate 0.70 กรัม, Sodium glutamate 28.50 กรัม, Glucose 5.00 กรัม, Inositol 2.50 กรัม, และ Potassium acetate 5.00 กรัม [12]

การรีดน้ำเชื้อและการลดอุณหภูมิของน้ำเชื้อ

ทำการรีดโดยบีบก้นและเก็บน้ำเชื้อทันที รองเก็บน้ำเชื้อด้วยหลอดที่สะอาดขนาด 1.5 ml ซึ่งจะมีน้ำยาเจือจางอยู่ 200 µl แช่น้ำเย็นที่อุณหภูมิ 20 °C ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ bright microscope น้ำเชื้อที่ปนเปื้อนและเคลื่อนที่ต่ำกว่าร้อยละ 80 จะไม่นำมาศึกษา รวบรวมน้ำเชื้อแต่ละพ่อพันธุ์ในหลอดเดียวกัน (pooled semen) เติมน้ำยาเจือจางอีกให้ได้สัดส่วน 1:3 (น้ำเชื้อ : น้ำยา)

การแช่แข็งและการทำละลายน้ำเชื้อ

ดำเนินการแช่แข็งตามวิธีการที่อ้างโดย Vongpralub et al., (2011) [13] ภายใต้อุปกรณ์แบบง่ายวิธีการโดยสังเขปคือ ภายหลังการเจือจางน้ำเชื้อลดอุณหภูมิไปที่ 5°C โดยใช้เวลาประมาณ 1 ชั่วโมง เตรียมน้ำยาที่มีส่วนผสม dimethylformamide (DMF) โดยคำนวณองค์ประกอบเป็นร้อยละ 6 ของปริมาตรสุดท้ายทั้งหมดที่ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อ เจือจางส่วนสุดท้ายเป็น 1: 4 (น้ำเชื้อ : น้ำยา) บรรจุน้ำเชื้อเจือจางในหลอด straw ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ปิดปลายหลอดด้วยผง polyvinyl alcohol บ่มหลอดน้ำเชื้อเจือจางที่อุณหภูมิ 5 °C นาน 15 นาที จากนั้นเช็ดหลอดบรรจุน้ำเชื้อให้แห้งโดยใช้เวลาให้สั้นที่สุดเพื่อป้องกันการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิ นำหลอดน้ำเชื้อวางบนตะแกรงในกล่องโฟมเหนือไนโตรเจนเหลวบริเวณที่มีอุณหภูมิประมาณ -35 °C เป็นเวลานาน 12 นาที ลดอุณหภูมิลงมาที่ระดับ -135 °C นาน 5 นาที ก่อนจุ่มหลอดฟางบรรจุน้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลว สำหรับการทำละลายน้ำเชื้อ นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อออกจากถังไนโตรเจนเหลว จุ่มลงในน้ำเย็นอุณหภูมิ 2–5 °C นาน 5 นาที นำไปประเมินคุณภาพน้ำเชื้อและผสมเทียมต่อไป

การประเมินคุณภาพอสุจิ

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อโดยใช้เครื่อง Computer-Assisteds Sperm Analyser ด้วยระบบเครื่องของ CASA; GTM-IVOS รุ่น 12.3 D Hammilton- Thorne Bioscience, MA, USA โดยหยดตัวอย่างลงบนแผ่นสไลด์ตัวอย่างละ 3 µl โดยตั้งค่าอุ่นสไลด์ที่ 25 °C โดยแต่ละตัวอย่างจะวัดค่าของร้อยละการเคลื่อนที่ทั้งหมด, ร้อยละการเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า, ร้อยละอสุจิเคลื่อนที่เร็ว, ร้อยละอสุจิเคลื่อนที่ปานกลาง, ร้อยละอสุจิเคลื่อนที่ช้า, และร้อยละอสุจิไม่เคลื่อนที่ ดำเนินการประเมินคุณภาพ ณ ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งพ่อพันธุ์ลำพญากลาง กรมปศุสัตว์

การประเมินอัตราการผสมติด

การประเมินอัตราการผสมติดด้วยการผสมเทียมนั้น ดำเนินตามวิธีการผสมเทียม โดยใช้ไซริงค์ขนาด 1 มิลลิลิตรที่ถอดปลายเข็มฉีดยาออกแล้ว ดูดบรรจุน้ำเชื้อ 0.4 มิลลิลิตร ผสมเทียมโดยการสอดไซริงค์ความลึกประมาณ 4 ซม. ดำเนินการผสมเทียมในช่วงบ่ายประมาณ 15.00 น. ทำการการเก็บไข่ ในวันที่ 2 – 8 หลังผสมเทียมให้แม่ไก่ไข่ นำไข่เข้าฟักเมื่อเข้าฟักครบ 7 วันทำการส่องไข่เพื่อประเมินดูอัตราการผสมติด และประเมินอัตราการฟักออกเมื่อมีอายุเข้าฟักที่ 22 วัน

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การศึกษาในครั้งนี้ทำการทดสอบความแตกต่างระหว่างระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งที่อุณหภูมิ -196 °C เปรียบเทียบสองระยะเวลาในการเก็บรักษาคือ เก็บรักษาเป็นเวลา 7 วัน และ 1 ปี ต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติด ทำการศึกษาวิเคราะห์ค่าทางสถิติแบบ pair t-test โดยทำการแช่แข็งน้ำเชื้อจำนวนทั้งสิ้น 13 ซ้ำเพื่อนำไปใช้ในการตรวจคุณภาพและประเมินอัตราการผสมติด

ผลการทดลอง

จากการทดลองผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งที่ทำการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 ปี ต่อคุณภาพน้ำเชื้อซึ่งทำการประเมินด้วยเครื่อง CASA พบว่าระยะเวลาในการเก็บรักษาไม่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ โดยในน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 7 วันภายหลังการละลายมีอัตราการเคลื่อนที่ทั้งหมด (%total motile) เท่ากับ 54.87 ส่วนในน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 ปีมีอัตราการเคลื่อนที่ทั้งหมดเท่ากับ 56.13 ส่วนร้อยละของอสุจิที่เคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้า (%progressive motile) ในกลุ่มที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 7 วัน และ 1 ปีเท่ากับร้อยละ 25.51 และ 27.35 ตามลำดับ และในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเปรียบเทียบลักษณะในการเคลื่อนที่ของความเร็วอสุจิออกเป็น 4 ประเภทได้แก่อสุจิที่เคลื่อนที่เร็ว ปานกลาง ช้า และไม่เคลื่อนที่ พบว่าระยะเวลาในการเก็บรักษาไม่มีผลต่อความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิทั้ง 4 แบบเช่นกัน สำหรับร้อยละของอสุจิที่เคลื่อนที่เร็ว (%rapid cell), อสุจิที่เคลื่อนที่เร็วปานกลาง

(%medium cell), อสุจิที่เคลื่อนที่ช้า (%slow cell) และอสุจิที่ไม่เคลื่อนที่ (%static cell) ในกลุ่มที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 7 วัน เท่ากับร้อยละ 44.76, 9.43, 14.9, และ 30.33 และในกลุ่มระยะเวลาในการเก็บรักษา 1 ปีเท่ากับร้อยละ 46.15, 9.79, 14.56, และ 29.7 ตามลำดับ (**Table 1**)

Table 1. The Effect of Storage Time (7 Day and 1 Year) on Post-thaw Motility of Thai Native Chicken Frozen Semen Quality

Storage period (13 replication)	Total motile (%)	Progressive motile (%)	Rapid cell (%)	Medium cell (%)	Slow cell (%)	Static cell (%)
7 day	54.87	25.51	44.76	9.43	14.9	30.33
1 year	56.13	27.35	46.15	9.79	14.56	29.7
P-value	0.5392	0.4118	0.6166	0.7782	0.8422	0.7001

จากการศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งเป็นระยะเวลา 7 วัน เปรียบเทียบกับการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 ปี ต่ออัตราการผสมติดและการฟักออก ภายหลังการนำน้ำเชื้อแบบแช่แข็งผสมเทียมให้กับแม่ไก่ทางการค้า พบว่าระยะเวลาของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งผลต่อไม่มีความแตกในเรื่องอัตราการผสมติดและการฟักออก โดยในกลุ่มที่เก็บรักษาน้ำเชื้อที่ 7 วันมีอัตราการผสมติดและฟักออกเท่ากับร้อยละ 69.63 และ 74.61 และสำหรับกลุ่มที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 ปี มีอัตราการผสมติดและฟักออกเท่ากับร้อยละ 66.16 และ 71.15 ตามลำดับ ดังแสดงใน **Table 2**

Table 2. The Effect of Storage Time (7 Day and 1 Year) on Frozen Semen of Thai Native Chicken on Fertility and Hatching Rate

Storage period (13 replication)	Number of egg set	% Fertility	% Hatching of fertile eggs
7 day	430	69.63	74.61
1 year	421	66.16	71.15
P-value	-	0.2578	0.2577

วิจารณ์

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งไม่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติด สอดคล้องกับการศึกษาในน้ำเชื้อแพะพบว่าเมื่อทำการเก็บรักษา

น้ำเชื้อแบบแช่แข็งเป็นระยะเวลา 1 ปีพบว่าไม่มีความแตกต่างของคุณภาพน้ำเชื้อกับกลุ่มที่เก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นระยะเวลา 1, 30, และ 90 วัน [14] และการศึกษาของ Feldschuh et al. (2005) [15] ทำการศึกษาในน้ำเชื้อของมนุษย์เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 28 ปีพบว่ายังคงสามารถให้กำเนิดบุตรได้ ส่วนการศึกษาในน้ำเชื้อแช่แข็งของไก่พันธุ์ไวท์เลกฮอร์น (White Leghorn) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -196 °C เป็นระยะเวลานาน 9 ปี พบว่ายังคงสามารถให้อัตราการผสมติดเท่ากับ 46.8 [16] ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากความเสื่อมสลายของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -196 °°C เกิดขึ้นได้แบบช้าๆ จึงทำให้การศึกษาในครั้งนี้ไม่มีความแตกต่างกันในเรื่องอัตราการผสมติดและคุณภาพน้ำเชื้อเมื่อทำการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 ปี

โดย Watson (1995) [7] รายงานว่าน้ำเชื้อแบบแช่แข็งส่วนใหญ่มีทั้งเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -79 °C ในน้ำแข็งแห้ง และเก็บรักษาไว้ที่ -196 °C ในไนโตรเจนเหลว ซึ่ง Mazur (1980) [9] รายงานว่าหากเก็บไว้ในน้ำแข็งแห้งสามารถคงสภาพสารพันธุกรรมได้ประมาณ 3000 ปี และในไนโตรเจนเหลวประมาณ 10,000 ปีก่อนที่สารพันธุกรรมจะเสื่อสลายไป แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาแม้จะเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำยังเกิดความเสื่อมสลายตามกาลเวลาที่เก็บรักษา และเมื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ -79 °C เกิดความเสื่อมสลายต่อสารพันธุกรรมได้เร็วกว่าการเก็บที่อุณหภูมิ -196 °C ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากที่อุณหภูมิต่ำกว่า -130 °C ลงมาเซลล์จะมีการ metabolism ที่น้อยมากหรือเกือบคงที่และเซลล์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมินี้จึงเกิดความเสื่อมสลายได้น้อยมาก [17] ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงพบว่าไม่มีความแตกต่างในเรื่องของคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการผสมติด ต่างจากการศึกษาของ Rahman et al. 2011 [18]ได้ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในมนุษย์ที่อุณหภูมิ -85 °°C และ -196 °C เก็บรักษาน้ำเชื้อยาวนานเป็นเวลา 7 วัน และ 30 วัน พบว่าระยะเวลาของการเก็บรักษาไม่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อและความสมบูรณ์ของ DNA ทั้งนี้อาจเนื่องมากจากการเก็บรักษาน้ำเชื้อนั้นเก็บไว้เพียง 1 เดือนซึ่งเป็นช่วงระยะเวลาที่สั้นการเสื่อมสลายของเซลล์ยังเกิดไม่มากจึงทำให้ไม่เห็นความแตกต่างในการศึกษานี้ การศึกษาใน Harald Trummer et al. (1998) [11] ได้ทำการศึกษาพบว่าในน้ำเชื้อแช่แข็งของมนุษย์ที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิเป็นระยะเวลา 7 วันพบว่าให้มีคุณภาพน้ำเชื้อที่ดีกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 3 เดือนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งนี้เนื่องมาจากการศึกษาดังกล่าวได้ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิสูงกว่าการศึกษานี้ทำให้เกิดอัตราการ metabolism ของเซลล์ได้สูงกว่าจึงทำให้เกิดการเสื่อมของคุณภาพน้ำเชื้อที่เร็วกว่าในการศึกษาครั้งนี้

แม้การศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการแช่แข็งตามวิธีการ simple vapour method [13] ซึ่งเป็นวิธีการแช่แข็งแบบง่ายโดยใช้เพียงกล่องโฟมและการอังไอไนโตรเจนเหลวเท่านั้น ซึ่งเป็นวิธีการที่ง่ายและประหยัดต้นทุนในการผลิตเมื่อเทียบกับการใช้โปรแกรมอัตโนมัติในการแช่แข็ง แต่พบว่าให้อัตราการผสมติดดี สอดคล้องกับรายงานของ Vongpralub et al. (2011) [13] และในการศึกษานี้ทำการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นระยะเวลา 1 ปี ยังพบว่าไม่มีความแตกต่างกันในเรื่องของคุณภาพน้ำเชื้อ

และอัตราการผสมติดกับการเก็บรักษา 7 วันนอกจากนี้แล้วอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อแบบแช่แข็งยังสูงกว่ามาตรฐานขั้นต่ำซึ่งยอมรับที่ร้อยละ ภายใต้การผสมเทียม 2 ครั้ง/สัปดาห์ [19] แสดงให้เห็นว่าวิธีการดังกล่าวสามารถนำไปใช้แช่แข็งน้ำเชื้อในไก่พื้นเมืองไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากการศึกษาผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งที่ทำการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 7 วัน และ 1 ปี พบว่าระยะเวลาของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งไม่มีผลต่อความแตกในเรื่องคุณภาพน้ำเชื้อ อัตราการผสมติดและการฟักออก

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่ง จากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตรเพื่อเศรษฐกิจที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น คณะวิจัยใคร่ขอขอบคุณโครงการพัฒนาศูนย์เครือข่ายวิจัยและพัฒนาด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์(ไก่พื้นเมือง) ที่อนุเคราะห์เงินสนับสนุนและพ่อพันธุ์ไก่พื้นเมือง และภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่นที่ได้เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำวิจัย และแม่พันธุ์ไก่ไข่ทางการค้าเพื่อใช้ในการทดสอบอัตราการผสมติด

เอกสารอ้างอิง

1. Hoffman I. The global plan of action for animal genetic resources and the conservation of poultry genetic resources. *World's Poult Sci J*. 2009;65:286-297.
2. Wishart GJ. Semen quality and semen storage. In: Hocking PM, editor. *Textbook of biology of breeding poultry*. Abingdon: CAB international. 2009. p. 151-178.
3. Hammerstedt RH, Graham JK. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology*. 1992;29:26–38.
4. Blesbois E, Grasseau I, Seigneurin F. Membrane fluidity and ability to survive cryopreservation in domestic bird spermatozoa. *Reproduction.* 2005;129:371–378.
5. Long JA, Guthrie HD. Validation of a rapid, large-scale assay to quantify ATP concentration in spermatozoa. *Theriogenology.* 2006;65:1620-1630.
6. Gliozzi TM, Zaniboni L, Cerolini S. DNA fragmentation in chicken spermatozoa during cryopreservation. *Theriogenology*. 2011;75:1613–1622.
7. Pironcheva GL, Miteva K, Vaisberg C, Russev G. Influence of freezing at different temperatures on the transcription activity of buffalo sperm chromatin. *Cytobios.* 1995; 83:207-210.
8. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post thawing function. *Reprod Fertil Dev*. 1995;7:871–891.
9. Mazur P. Fundamental aspects of the freezing of cells with emphasis on mammalian ova and embryos. Proc. 9th Int. *Congr Anim Reprod AI Madrid*. 1980; 1: 99–114.

10. Macpherson JW. The effect of storage time on frozen bovine semen. *Can J Comp Med*. 1954;18:323-325.
11. Trummer H, Tucker K, Young C, Kaula N, Meacham RB. Effect of storage temperature on sperm cryopreservation. *Fertil Steril*. 1998;70:1162-1164.
12. Chalah T, Seigneurin F, Blesbois E, Brillard JP. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology*. 1999;39:185–191.
13. Vongpralub T, Utha A, Pongpeng J, Sonseeda P, Yindee W. A comparison of simple vapour method and programmable freezer on motility and fertility of frozen Thai native chicken semen. SAADC 2011 strategies and challenges for sustainable animal agriculture-crop systems, Volume III: full papers. Proceedings of the 3rd International Conference on sustainable animal agriculture for developing countries, Nakhon Ratchasima, Thailand, 26-29 July, 2011; p. 649-652.
14. Batista M, Nin T, Alamo D, Castro N, Santana M, Gonzalez F, et al. Successful artificial insemination using semen frozen and stored by an ultrafreezer in the Majorera goat breed. *Theriogenology*. 2009;71:1307–1315.
15. Feldschuh J, Brassel J, Durso N, Levine A. 2009. Successful sperm storage for 28 years. [revised 2005 Oct 1; cited 2013 Feb 1]. Available from: http://www.fertilehope.org/resources/news_detail.cfm?NID=175.
16. Watanabe M, Terada T. Fertility of frozen fowl semen stored for long term (9 years). J *Facul Appl Biol Sci Hiroshima Univ.* 1980;19:154-159.
17. Stroud B. Consequences of mishandling frozen semen and embryos. *Proceedings Applied Reproductive Strategies in Beef Cattle*. December 3-4, Sioux Falls, SD. 2012.
18. Rahman AR, Ng SP, Leong CF, Rahimah MD. Comparison between mechanical freezer and conventional freezing using liquid nitrogen in normozoospermia. *Singap Med J.* 2011;52:734-737.
19. Blesbois, E. Current status in avian semen cryopreservation. *World's Poult Sci J.* 2007;63;213-222.