

ผลของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Schramm ต่อสมรรถภาพการสืบพันธุ์ในพ่อพันธุ์ไก่สกุล *Gallus* หลังผ่าน
กระบวนการละลายแช่แข็ง

Effects of Schramm Diluent Post-Thaw Semen Quality and Reproductive Performance of *Gallus*
Roosters Following Cryopreservation

ประภาพร บุสรินทร์

Prapaphon Boodsarin

ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

บทคัดย่อ

สารละลายเจือจางน้ำเชื้อมีบทบาทสำคัญต่อประสิทธิภาพของกระบวนการแช่แข็งและการละลายแช่แข็งน้ำเชื้อไก่ ซึ่งส่งผลต่อความมีชีวิต การเคลื่อนไหว และความสามารถในการปฏิสนธิของอสุจิ สัมมนาฉบับนี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Schramm ต่อสมรรถภาพการสืบพันธุ์ในพ่อพันธุ์ไก่สกุล *Gallus* หลังผ่านกระบวนการละลายแช่แข็ง โดยทบทวนงานวิจัยที่เกี่ยวข้องจำนวน 3 ฉบับ ในช่วงปี ค.ศ. 2017-2022 ผลการศึกษาพบว่า สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Schramm ช่วยคงคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลายแช่แข็งได้ดี โดยเฉพาะเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวรวม (MOT) ซึ่งให้ผลสอดคล้องกันในหลายการศึกษา นอกจากนี้ พบว่าเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวไปข้างหน้า (PMOT) ยังไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจน สรุปได้ว่า สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Schramm ช่วยรักษาคุณภาพน้ำเชื้อไก่หลังการละลายแช่แข็งได้ดี เหมาะสำหรับใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง การเก็บพันธุ์กรรมพ่อพันธุ์ช่วยอนุรักษ์พันธุ์กรรมในไก่สกุล *Gallus*

คำสำคัญ: สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Schramm น้ำเชื้อแช่แข็ง ไก่สกุล *Gallus* สมรรถภาพการสืบพันธุ์ สารป้องกันผลึกน้ำแข็งบนตัวอสุจิ

บทนำ

ไก่ในสกุล *Gallus* โดยเฉพาะไก่พื้นเมืองและไก่ป่า (*Gallus gallus*) ถือเป็นสัตว์ที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อความหลากหลายทางชีวภาพ และการพัฒนาการปรับปรุงพันธุ์สัตว์ปีกในอนาคต (Tixier-Boichard et al., 2009; FAO, 2012) ไก่พื้นเมืองมีลักษณะเด่นด้านความสามารถในการปรับตัวต่อสภาพแวดล้อม ความทนทานต่อโรค และเป็นแหล่งยีนสำคัญ อย่างไรก็ตามการขยายตัวของระบบการผลิตเชิงอุตสาหกรรมและการเลี้ยงไก่สายพันธุ์การค้าต่างประเทศ ส่งผลให้บทบาทความสำคัญของไก่พื้นเมืองและไก่ป่าไ้ด้อยู่ในการเลี้ยงเพื่อเป็นแหล่งโปรตีนให้กับครัวเรือนลดลง ในส่วนของไก่พื้นเมืองตลาดขายปลีกผลิตภัณฑ์เนื้อไก่พื้นเมืองภายในประเทศค่อนข้างจำกัดตามตลาดนัดชุมชนและห้างสรรพสินค้าบางแห่งมีตลาดส่งออกไปยังต่างประเทศที่ไม่ว่างขวางนัก ส่วนไก่ป่าก็มีการเลี้ยงที่จำกัดเฉพาะกลุ่มคนที่นิยมชมชอบสำหรับไก่ป่าไ้ด้อยู่และไก่ต่อ (Mekchay et al., 2014) การอนุรักษ์พันธุ์กรรมไก่สกุล *Gallus* จึงจำเป็นต้องอาศัยทั้งการอนุรักษ์ในถิ่นกำเนิด และการอนุรักษ์นอกถิ่นกำเนิด โดยเฉพาะการเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์ (gamete) เช่น น้ำเชื้อ ซึ่งเป็นแนวทางที่ได้รับการยอมรับในระดับสากลสำหรับการอนุรักษ์ทรัพยากรพันธุกรรมสัตว์ (FAO, 2012)

การผสมเทียมในไก่ (artificial insemination; AI) เป็นเทคโนโลยีชีวภาพด้านการสืบพันธุ์ที่มีบทบาททั้งในเชิงการผลิตและการอนุรักษ์พันธุ์กรรม โดยน้ำเชื้อพ่อพันธุ์จะถูกเก็บด้วยวิธีการนวดบริเวณหลังและช่องท้อง (dorso-abdominal massage) และนำไปฉีดจางกับสารละลายเจือจางน้ำเชื้อและใช้ผสมเทียมกับแม่พันธุ์โดยตรง (Lake & Stewart, 1978; Wishart, 1989) แต่น้ำเชื้อไก่นั้นยังมีข้อจำกัดสำคัญคือไม่สามารถเก็บรักษาในสภาพของเหลวได้เป็นเวลานาน เนื่องจากสเปิร์มของสัตว์ปีกมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความดันออสโมติก ส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อลดลงอย่างรวดเร็วภายในเวลาไม่กี่ชั่วโมงหลังการเก็บ (Bakst et al., 1994) ด้วยข้อจำกัดดังกล่าว การแช่แข็งน้ำเชื้อ (cryopreservation) จึงถูกพัฒนาขึ้นเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา น้ำเชื้อและสนับสนุนการอนุรักษ์พันธุ์กรรมในระยะยาว สเปิร์มของไก่มีโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวในสัดส่วนสูง ทำให้ไวต่อความเสียหายจากกระบวนการแช่แข็งและละลายแช่แข็ง โดยเฉพาะความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์และไมโทคอนเดรีย ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการเคลื่อนไหว ความมีชีวิต และความสามารถในการปฏิสนธิของอสุจิ (Blesbois & Brillard, 2007)

สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ (semen extender) จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ของการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่ โดยมีหน้าที่รักษาสสมดุลของสภาพแวดล้อมรอบเซลล์อสุจิ ควบคุมค่า pH และความดันออสโมติก รวมถึงเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการดำรงชีวิตของสเปิร์ม (Wishart, 1989) สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Schramm ประกอบด้วยสารบัฟเฟอร์ เช่น sodium glutamate และ potassium acetate ซึ่งช่วยควบคุมสมดุลค่า pH และความดันออสโมติกของสภาพแวดล้อมรอบเซลล์อสุจิ รวมทั้งมีน้ำตาล เช่น glucose ทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงาน และมีสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (cryoprotectant) เช่น N,N-dimethylformamide (DMF) ซึ่งเป็นสารแบบแทรกซึมเข้าสู่เซลล์ ช่วยลดความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์และโครงสร้างภายในอสุจิระหว่างกระบวนการแช่แข็งและละลายแช่แข็ง เป็นหนึ่งในสารละลายที่ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่ ช่วยรักษาความคงตัวของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ลดความเครียดจากการเปลี่ยนแปลงของออสโมติก และช่วยชะลอการเกิดกระบวนการเสื่อมคุณภาพของน้ำเชื้อในระหว่างการแช่แข็งและการละลายแช่แข็ง (Blesbois &

Brillard, 2007) นอกจากนี้การเติมสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งหรือสาร cryoprotectant เช่น N,N-dimethylformamide (DMF) มีบทบาทต่อการรักษาคุณภาพน้ำเชื้อไก่ DMF เป็นสาร cryoprotectant แบบแทรกซึมเข้าเซลล์ (penetrating cryoprotectant) ที่สามารถลดการก่อตัวของผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์อสุจิ ช่วยป้องกันการแตกของเยื่อหุ้มเซลล์ และลดความเสียหายของโครงสร้างภายในเซลล์ระหว่างกระบวนการแช่แข็ง (Blesbois et al., 2008; Partyka et al., 2012) มีรายงานว่าการใช้สารละลาย Schramm ร่วมกับ DMF สามารถช่วยรักษาการเคลื่อนไหว ความมีชีวิต และความสามารถในการปฏิสนธิของอสุจิไก่พื้นเมืองหลังการละลายแช่แข็งได้ดีกว่าสาร cryoprotectant บางชนิด ส่งผลให้มีศักยภาพสูงในการประยุกต์ใช้เพื่อการผสมเทียมและการอนุรักษ์พันธุกรรมไก่สกุล Gallus ในระยะยาว (Blesbois et al., 2008; Thananurak et al., 2016)

ดังนั้นสัมมนาฉบับนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลของสารละลายเจ็องน้ำเชื้อ Schramm ต่อสมรรถภาพการสืบพันธุ์ในพ่อพันธุ์ไก่สกุล Gallus หลังผ่านกระบวนการละลายแช่แข็ง

ผลของสารละลาย Schramm ต่อเปอร์เซ็นต์อสุจิที่เคลื่อนไหวรวม (Total motile sperm)

Thananurak et al. (2017) เปรียบเทียบผลของสารละลายเจ็องน้ำเชื้อ Schramm ต่อสมรรถภาพการสืบพันธุ์ในพ่อพันธุ์ไก่สกุล Gallus หลังผ่านกระบวนการละลายแช่แข็ง ไก่พ่อพันธุ์สายพันธุ์ประดู่หางดำ อายุ 10 เดือน และไก่แม่พันธุ์สายพันธุ์พื้นเมือง อายุ 10 เดือน พบว่า สารละลาย Schramm ต่อค่าเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวรวม (MOT) เท่ากับ $54.83 \pm 2.19\%$ (Table 1) เช่นเดียวกับกับ สินีนาฏ และคณะ (2565) เปรียบเทียบผลของสารละลายเจ็องน้ำเชื้อ Schramm ต่อสมรรถภาพการสืบพันธุ์ในพ่อพันธุ์ไก่สกุล Gallus หลังผ่านกระบวนการละลายแช่แข็ง ไก่พ่อพันธุ์ สายพันธุ์ไก่ป่าตุ่มหูขาว ที่อายุ 1 ปี และ ไก่ไข่มุกผสมพันธุ์โบราณสีบราวน์ อายุ 24 สัปดาห์ พบว่า สารละลาย Schramm ให้ค่าเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวรวมเท่ากับ $54.83 \pm 0.52\%$ (Table 1) ซึ่งผลการทดลองทั้ง 2 ฉบับที่กล่าวมาขัดแย้งกับ Polsang et al. (2022) เปรียบเทียบผลของสารละลายเจ็องน้ำเชื้อ Schramm ต่อสมรรถภาพการสืบพันธุ์ในพ่อพันธุ์ไก่สกุล Gallus หลังผ่านกระบวนการละลายแช่แข็ง ไก่พ่อพันธุ์ สายพันธุ์ไก่ป่าแดง อายุ 1 ปี และ ไก่ไข่มุกผสม อายุ 24 สัปดาห์ พบว่า สารละลายเจ็องน้ำเชื้อ Schramm ต่อค่าเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวรวม (MOT) เท่ากับ $64.33 \pm 1.16\%$ (Table 1) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า Thananurak et al. (2017) และ สินีนาฏ และคณะ (2565) เป็นไปในทิศทางเดียวกัน สารละลายเจ็องน้ำเชื้อ Schramm ต่อค่าเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวรวม (MOT) หลังการละลายแช่แข็ง อยู่ที่ประมาณ 54–55% อาจเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบของสารละลายที่ช่วยรักษาสมดุลออสโมติกและค่า pH ภายในตัวอสุจิ รวมถึงการมีแหล่งพลังงานจำพวกน้ำตาลที่สามารถใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของไมโทคอนเดรีย ซึ่งช่วยสนับสนุนการเคลื่อนไหวของอสุจิหลังการละลายแช่แข็ง

ผลของสารละลาย Schramm ต่อเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวไปข้างหน้า (Progressive motile sperm)

Thananurak et al. (2017) พบว่า สารละลาย Schramm ต่อเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวไปข้างหน้า (PMOT) เท่ากับ $37.17 \pm 3.09\%$ (Table 1) สีนีนาฏ และคณะ (2565) พบว่า สารละลาย Schramm ต่อเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวไปข้างหน้า (PMOT) เท่ากับ $24.50 \pm 0.79\%$ (Table 1) Polsang et al. (2022) พบว่า สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Schramm ให้ค่าเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวไปข้างหน้าเท่ากับ 28.00% (Table 1) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ผลของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Schramm ต่อเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวไปข้างหน้า ยังไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจน เนื่องจากผลการศึกษาทั้ง 3 ฉบับให้ค่าที่แตกต่างกัน และไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกัน อย่างไรก็ตาม เป็นไปได้ว่าสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Schramm อาจจะช่วยรักษาสภาพแวดล้อมของเซลล์อสุจิให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมและช่วยในการฟื้นตัวของอสุจิหลังละลายแช่แข็งได้ระดับหนึ่งแต่อาจจะไม่เพียงพอที่จะสนับสนุนโครงสร้าง flagellar ที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหวเชิงทิศทางของอสุจิ

Table 1 Effects of extenders and cryoprotectant concentrations on motility (%) of post-thaw Thai red junglefowl spermatozoa

Extenders	Parameter					
	MOT (%)	PMOT (%)	MOT (%)	PMOT (%)	MOT (%)	PMOT (%)
Schramm	54.83 ± 2.19^b	37.17 ± 3.09^b	54.83 ± 0.52^b	23.25 ± 0.58^{ab}	64.33 ± 1.16^a	28.00 ± 0.10
LTRJFE	-	-	31.67 ± 0.58^d	21.00 ± 0.83^b	-	-
TRJFE	68.58 ± 1.13^a	49.17 ± 0.81^a	61.08 ± 0.48^a	24.50 ± 0.79^a	-	-
HTRJFE	-	-	37.83 ± 0.66^c	37.83 ± 0.66^c	-	-
RFE	67.42 ± 0.75^a	45.25 ± 0.65^a	-	-	-	-
SH1	49.92 ± 2.26^c	34.83 ± 1.587^b	-	-	-	-
EK	-	-	-	-	63.67 ± 1.44^a	28.50 ± 1.46
PVP	-	-	-	-	51.17 ± 1.15^b	27.00 ± 1.58
Pr > F	<0.001	<0.001	<0.001	0.0232	<0.001	> 0.05
References	1		2		3	

^{a-c} superscript letters within columns indicate significant differences ($P < 0.05$).

MOT = Total motile sperm, PMOT = Progressive motile sperm

Remarks: 1= Thananurak et al. (2017), 2= สีนีนาฏ และคณะ (2565), 3= Polsang et al. (2022)

สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Schramm ต่ออัตราการผสมติด (Fertility rate, %)

Thananurak et al. (2017) พบว่า สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Schramm ต่ออัตราการผสมติด (Fertility rate, %) เท่ากับ $59.05 \pm 0.63\%$ (Table 2) เช่นเดียวกันกับ สีนีนาฏ และคณะ (2565) พบว่า สารละลาย Schramm ต่ออัตราการผสมติด (Fertility rate, %) เท่ากับ $54.83 \pm 0.68\%$ (Table 2) ซึ่งผลการทดลองทั้ง 2 ฉบับที่กล่าวมา ชัดแย้งกับ Polsang et al. (2022) พบว่า สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Schramm ต่ออัตราการผสมติด (Fertility rate, %) เท่ากับ $91.21 \pm 2.20\%$ (Table 2) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Schramm ในการให้ผลด้านอัตราการผสมติดที่สูง อาจเกี่ยวข้องกับการรักษาความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์สุจิและโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการปฏิสนธิคือ อะโครโซม ซึ่งมีเอนไซม์อะโครซินเพื่อย่อยชั้น perivitelline layer ของไข่ รวมถึงการใช้พลังงานของอสุจิในช่วงที่อสุจิเคลื่อนที่ในระบบสืบพันธุ์เพศเมียเพื่อไปปฏิสนธิ

Table 2 Fertility Rate and Reproductive Performance Following Artificial Insemination with Gallus Semen Stored in Different Extenders.

Extenders	Parameter					
	Fertility rate (%)	Total number of eggs	Fertility rate (%)	Total number of eggs	Fertility rate (%)	Total number of eggs
Schramm	59.05 ± 0.63^a	225	54.83 ± 0.68^a	218	91.21 ± 2.20^a	321
LTRJFE	-	-	31.02 ± 2.17^b	204	-	-
TRJFE	60.97 ± 0.72^a	224	57.00 ± 0.70^a	212	-	-
HTRJFE	-	-	32.90 ± 1.74^b	211	-	-
RFE	40.00 ± 2.68^b	228	-	-	-	-
SH1	42.69 ± 4.90^b	228	-	-	-	-
EK	-	-	-	-	85.40 ± 1.35^a	320
PVP	-	-	-	-	66.71 ± 2.34^b	315
Pr > F	<0.001		<0.001		<0.001	
References	1		2		3	

^{a-c} superscript letters within columns indicate significant differences ($P < 0.05$).

Remarks: 1= Thananurak et al. (2017), 2= สีนีนาฏ และคณะ (2565), 3= Polsang et al. (2022)

สรุป

จากการทบทวนงานวิจัย 3 ฉบับ โดยประกอบสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Schramm LTRJFE TRJFE HTRJFE RFE SH1 EK PVP พบว่า สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ Schramm สามารถรักษาคุณภาพน้ำเชื้อไก่หลังการละลายแช่แข็งได้ โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์สุจิเคลื่อนไหวรวม (MOT) อยู่ในระดับดี ขณะที่ค่าเปอร์เซ็นต์สุจิเคลื่อนไหวไปข้างหน้า (PMOT) ยังไม่สามารถสรุปได้ และอัตราการผสมติด (fertility rate) อยู่ในระดับที่ดี ประสิทธิภาพดังกล่าวสัมพันธ์กับองค์ประกอบของสารละลายที่ช่วยควบคุมสมดุล pH และความดันออสโมติก เป็นแหล่งพลังงาน และมีสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งซึ่งช่วยลดความเสียหายของโครงสร้างอสุจิระหว่างกระบวนการแช่แข็ง-ละลายแช่แข็ง ดังนั้น สารละลาย Schramm จึงเหมาะสมสำหรับใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อไก่เพื่อการผสมเทียมและการอนุรักษ์พันธุกรรม ทั้งนี้ ควรพิจารณาปัจจัยด้านสายพันธุ์และขั้นตอนการทดลองร่วมด้วย

เอกสารอ้างอิง

- สินีนานู พลแสง, พงศ์เทพ พลแสง, สุวิทย์ อินฉายา, สจี กัณฑ์หาเรียง และ เทวินทร์ วงษ์พระลับ. 2565. “ผลของออสโมแลลิตีของน้ำยาเจือจางการแช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังการทำละลายและการผสมติดของน้ำเชื้อไก่ป่าคุ้มครองขาว”. *วารสารวิชาการสถาบันการอาชีวศึกษาเกษตร*. 6(2): 94-105.
- Bakst, M.R., J.P. Wishart and D. Brillard. 1994. “Oviductal sperm selection, transport, and storage in poultry”. *Poultry Science Reviews*. 5: 117–143.
- Blesbois, E. and J.P. Brillard. 2007. “Specific features of in vivo and in vitro sperm storage in birds”. *Animal*. 1(10): 1472–1481.
- Blesbois, E., I. Grasseau and F. Seigneurin. 2008. “Membrane fluidity and cryopreservation of fowl spermatozoa”. *Cryobiology*. 57: 135–141.
- Mekchay, S., T. Supakankul, A. Assawamakin, C. Wilantho and S. Chareanchim. 2014. “Population structure of four Thai indigenous chicken breeds”. *BMC Genetics*. 15: 40.
- Partyka, A., E. Nizanski and W. Lukaszewicz. 2012. “Evaluation of fresh and frozen–thawed fowl semen by flow cytometry”. *Theriogenology*. 77: 593–605.
- Polsang, S., P. Thananurak, P. Polsang, S. Inchayad, S. Ponchunchoovong, J. Chapanya, S. Kunhareang and T. Vongpralub. 2022. “Effects of Extenders and Cryoprotectants on Cryopreservation of Thai Red Junglefowl (*Gallus gallus gallus*) Spermatozoa”. *Cryobiology*. 106: 48-54.

- Thananurak, P., S. Polsang, S. Inchayad and T. Vongpralub. 2016. "Cryopreservation of Thai native chicken semen using dimethylformamide as cryoprotectant". **Agriculture and Natural Resources**. 50: 188–193.
- Thananurak, P., N. Chuaychu-noo and T. Vongpralub. 2017. "Freezability and fertility of Thai native chicken semen in different diluents". **The Thai Journal of Veterinary Medicine**. 47(4): 551-556.
- Tixier-Boichard, M., F. Bordas and X. Rognon. 2009. "Characterisation and monitoring of poultry genetic resources". **World's Poultry Science Journal**. 65: 272–285.