การคัดแยกเพศจากอสุจิของแพะด้วยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์

Goat Sperm Sexing by Percoll Density Gradient Centrifugation

วิศิษฐ ทองเที่ยง

Visid Thongtaeng

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
A Thesis Submitted in Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Animal Science
Prince of Songkla University
2563

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

การคัดแยกเพศจากอสุจิของแพะด้วยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์

Goat Sperm Sexing by Percoll Density Gradient Centrifugation

วิศิษฐ ทองเที่ยง

Visid Thongtaeng

วิทยานิพนธ์นี้สำหรับการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
A Thesis Submitted in Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Animal Science
Prince of Songkla University
2563
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดแยกเพศจากอสุจิของแพะด้วยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์
ผู้เขียน นายวิศิษฐ ทองเที่ยง
สาขาวิชา สัตวศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....
(ดร.ธัญจิรา เทพรัตน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม (ถ้ามี)

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลณสรรค์ สายขุน)

.....
(สัตวแพทย์หญิง ดร.คคนางค์ บูรณะอำนวย)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รณชัย สิทธิไกรพงษ์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไชยวรรณ วัฒนจันทร์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลณสรรค์ สายขุน)

.....กรรมการ
(สัตวแพทย์หญิง ดร.คคนางค์ บูรณะอำนวย)

.....กรรมการ
(ดร.ธัญจิรา เทพรัตน์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำหรับการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาสัตวศาสตร์

.....
(ศาสตราจารย์ ดร.ดำรงศักดิ์ ฟ้ารุ่งสาง)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ .....
(ดร.ธัญจิรา เทพรัตน์)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ .....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลณสรรค์ สายขุน)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ .....
(สัตวแพทย์หญิง ดร.คคนางค์ บูรณะอำนวย)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ลงชื่อ .....
(นายวิศิษฐ ทองเที่ยง)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ .....
(นายวิศิษฐ ทองเที่ยง)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดแยกเพศจากอสุจิของแพะด้วยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์
ผู้เขียน นายวิศิษฐ ทองเที่ยง
สาขาวิชา สัตวศาสตร์
ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาคุณภาพอสุจิหลังการทำละลาย และเพื่อศึกษาสัดส่วนเพศลูกแพะจากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งแยกเพศอสุจิที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกันในแพะ โดยแบ่งออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกันต่อคุณภาพอสุจิแพะหลังการทำละลาย โดยรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์บอร์จำนวน 3 ตัว อายุ 3-5 ปี รีดเก็บน้ำเชื้อเป็นเวลา 3 สัปดาห์ติดต่อกัน จากนั้นนำน้ำเชื้อที่รีดได้มาตรวจประเมินคุณภาพโดยน้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าไม่ต่ำกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 2,000 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร มารวมกันแล้วแบ่งน้ำเชื้อออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม น้ำเชื้อถูกนำไปผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งโดยไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลายเพอร์คอลล์ ส่วนที่ 2 เป็นกลุ่มทดลอง น้ำเชื้อถูกนำไปปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์จำนวน 7 ชั้น (40, 45, 50, 65, 70, 80, และ 90 เปอร์เซ็นต์) และนำน้ำเชื้อจาก 2 ชั้นล่างสุดไปผลิตน้ำแช่แข็ง ทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อหลังละลายด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์คุณภาพอสุจิในชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, และ 6 หลังละลาย

ผลการศึกษาพบว่า อิทธิพลร่วมระหว่างการปั่นเหวี่ยงและเวลาของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) สำหรับค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ ค่าความเร็วในการเคลื่อนที่ (VAP, VSL และ VCL) ค่าลักษณะการเคลื่อนที่ (ALH, BCF, STR และ LIN) ไม่พบอิทธิพลร่วมระหว่างการปั่นเหวี่ยงและเวลา ($P>0.05$) และอิทธิพลของการปั่นเหวี่ยงไม่มีผลต่อค่าต่างๆ จึงสรุปว่า การปั่นเหวี่ยงอสุจิแพะด้วยสารละลายเพอร์คอลล์ไม่ส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็งหลังละลาย จึงสามารถนำน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ไปผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งได้ และอาจนำไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาการคัดแยกเพศจากเซลล์อสุจิแพะด้วยสารละลายเพอร์คอลล์ต่อไป

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการคัดแยกเพศอสุจิด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกันต่อสัดส่วนเพศลูก

แพะ แม่แพะทดลองจำนวน 90 ตัว มีน้ำหนักประมาณ 25-30 กิโลกรัม มีค่าคะแนนร่างกายอยู่ในช่วง 3-3.5 (คะแนน 1-5) เป็นแม่แพะท้องที่ 1 หรือมากกว่า ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม เพื่อฉีดน้ำเชื้อผสมเทียม โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม จำนวน 46 ตัว ได้รับการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ไม่ผ่านการแยกเพศ ส่วนกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มทดลอง จำนวน 44 ตัว ได้รับการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งแยกเพศอสุจิที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ โดยการฉีดน้ำเชื้อหลังแม่แพะแสดงอาการเป็นสัดยืนนิ่ง 12-24 ชั่วโมง และผสมซ้ำอีกครั้งให้กับแม่แพะที่ยังเป็นสัดยืนนิ่ง โดยฉีดห่างจากครั้งแรก 12 ชั่วโมง แม่แพะที่ได้รับการฉีดน้ำเชื้อ 1 และ 2 ครั้ง มีจำนวน 75 และ 15 ตัว ตามลำดับ ใน 1 หลอดน้ำเชื้อมีจำนวนอสุจิ 150 ล้านตัวหลอด และตรวจการตั้งท้องแม่แพะด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ 45-60 วันหลังผสม หลังจากนั้นเมื่อแม่แพะคลอดจึงตรวจสอบเพศลูกแพะ

ผลการทดลองพบว่า อัตราการผสมติดของแม่แพะกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีค่าเท่ากับ 78.26 และ 70.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สัดส่วนเพศของลูกแพะของทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.0172$) โดยพบว่า สัดส่วนลูกแพะเพศเมียและเพศผู้ของกลุ่มทดลองมีค่าเท่ากับ 70.45 และ 29.55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 45.65 และ 54.35 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่า เทคนิคการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกัน สามารถนำมาใช้ในการคัดแยกเพศอสุจิและเพิ่มปริมาณสัดส่วนลูกแพะเพศเมียได้

Thesis Title	Goat Sperm Sexing by Percoll Density Gradient Centrifugation
Author	Mr. Visid Thongtaeng
Major Program	Animal Science
Academic Year	2562

ABSTRACT

The objectives of this study were to investigate the post-thawed semen quality and sex ratio of kids with sperm sexed by Percoll density gradient centrifugation in goat. The study was divided into 2 experiments which were:

Experiment 1: effect of Percoll density gradient centrifugation on post-thawed sperm quality

The semen was collected from three mature Boer bucks, 3-5 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^{o}C.

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 (VAP, VSL and VCL) and kinetic movement (ALH, BCF, STR and LIN) 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. From this study it could be concluded that the centrifugation using Percoll density gradient had no effect on post-thawed semen quality in goat. In addition, Percoll density gradient technique could be applied for goat sperm sexing. The benefit of this study

could be used for frozen sexing sperm production, using percoll density gradient centrifugation, in goat.

Experiment 2: effect of insemination with sexed sperm by Percoll density gradient centrifugation on sex ratio of kids

A total of 90 does (first-parity or greater) were used in this study. The body weight of does was between 25-30 kilograms. Does were in 3-3.5 body condition score (score 1-5). The experimental does were divided into 2 groups of control (n = 46) and treatment (n = 44). The does in control group were inseminated with frozen unsexed sperm whereas in the treatment group were inseminated with frozen sexed sperm by Percoll density gradient centrifugation. The does were inseminated with frozen-thawed semen (150 million sperm per dose) at 12-24 h after the onset of estrus once or twice (12 h interval). Mostly does (n=75) were received one insemination and another 15 doses were two at 12 h interval. Conception was determined by trans-rectal ultrasonography at about 45-60 days after insemination and the sex of kids were detected at kidding.

The results showed that the conception rate of does was 78.26 and 70.45 % in control and experimental group, respectively. The sex ratio of kids was significantly different between two groups ($P<0.0172$). The percentage of female and male kids in control group was 70.45 and 29.55, respectively, whereas in treatment group was 45.65 and 54.35, respectively. In conclusion, the Percoll density gradient centrifugation could be used for sperm sexing in goat to increase female kid.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความรัก ความเมตตากรุณา และความช่วยเหลืออันไม่มีที่สิ้นสุดจากบุคคลซึ่งทำให้ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งใจและขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้

บิดามารดา ครูอาจารย์ ที่ให้โอกาสผู้วิจัยได้ศึกษาเล่าเรียน จนมีโอกาสได้ศึกษาในระดับปริญญาโท

อาจารย์ ดร.ธัญจิรา เทพรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก สัตวแพทย์หญิง ดร.คคนางค์ บูรณะอำนวย และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กุลณสรรค์ สายขุน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือ แก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จ

รองศาสตราจารย์ ดร.รณชัย สิทธิไกรพงษ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ไชยวรรณ วัฒนจันทร์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิสอบวิทยานิพนธ์ ที่ตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณยิ่งขึ้น

ดร.มงคล เทพรัตน์ ที่ช่วยเหลือในการวิเคราะห์ข้อมูลทางด้านสถิติ

อาจารย์กรกนก พรหมเทพ ที่ช่วยสอนเทคนิคพื้นฐานการทดลองนี้ และให้คำปรึกษาตลอดงานวิจัย

สาขาวิชานวัตกรรมการผลิตสัตว์และการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการในการเตรียมสารละลาย และการวิจัยในขั้นตอนต่าง ๆ จนวิทยานิพนธ์สำเร็จลุล่วง

ศูนย์วิจัยและพัฒนาสัตว์เอื้องขนาดเล็ก คณะทรัพยากรธรรมชาต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ตำบลคลองหอยโข่ง อำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา

นายสัตวแพทย์ กิตติศักดิ์ แสงสกุล ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสงขลา สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ และคณะเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสงขลา ที่ให้ความช่วยเหลือทางห้องปฏิบัติการจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วง

นายสัตวแพทย์สุรจิต วิชชุวรรณ ปศุสัตว์จังหวัดตรัง ผู้บังคับบัญชาที่อนุมัติให้ลาเพื่อมาเตรียมความพร้อมและสอบปกป้องวิทยานิพนธ์

นายศักรินทร์ สมัยสง ฟาร์มแพะประคองฟาร์ม อำเภอร่อนพิบูลย์ จังหวัดนครศรีธรรมราช และเจ้าหน้าที่ผสมเทียมสำนักงานปศุสัตว์จังหวัดตรัง กลุ่มเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะในพื้นที่จังหวัดตรัง ที่ช่วยในการผสมเทียมและให้ความอนุเคราะห์แพะในการทดลองวิจัย จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วง

เพื่อนพ้องน้องพี่ และผู้ให้ความช่วยเหลือที่มิได้เอ่ยนาม จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วง ขอให้ คุณงามความดีในครั้งนี้จงกลับคืนไปสู่ทุกท่าน ให้ประสบแต่ความสุขความเจริญยิ่งๆ ขึ้นไป

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2

ขอขอบพระคุณมา ณ โอกาส นี้

วิศิษฐ ทองเที่ยง

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อ		(5)
Abstract		(7)
กิตติกรรมประกาศ		(9)
สารบัญ		(10)
รายการตาราง		(11)
รายการภาพประกอบ		(12)
รายการภาพประกอบภาคผนวก ก		(13)
สัญลักษณ์คำย่อ และตัวย่อ		(14)
บทที่ 1	บทนำ	1
	บทนำต้นเรื่อง	1
	การตรวจเอกสาร	3
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	15
บทที่ 2	วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	16
	วัสดุ และอุปกรณ์	16
	วิธีการทดลอง	18
บทที่ 3	ผลการศึกษา	25
บทที่ 4	วิจารณ์	32
บทที่ 5	สรุป และข้อเสนอแนะ	37
เอกสารอ้างอิง		39
ภาคผนวก		49
	ภาคผนวก ก	50
	ภาคผนวก ข	53
ประวัติผู้เขียน		54

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	Effect of Percoll Density Gradient Centrifugation on percentage of sperm X, female embryos and new born female	12
2	Effect of centrifugation using Percoll density gradient on post-thawed spermatozoa motility	27
3	Effect of centrifugation using Percoll density gradient on post-thawed spermatozoa velocity	28
4	Effect of centrifugation using Percoll density gradient on post-thawed spermatozoa kinetic movement	29
5	Sex ratio of kids obtained after artificial insemination with or without sperm sexed by Percoll density gradient centrifugation	31

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	The percentage of post-thawed motility and progressive motility of sperm with and without centrifugation using Percoll density gradient	30

รายการภาพประกอบภาคผนวก ก

ภาพที่		หน้า
1	การรีดเก็บน้ำเชื้อโดยการใช้ช่องคลอดเทียม (Artificial vaginal method, AV)	43
2	การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์คุณภาพอสุจิ (Computer Assisted Semen Analysis; CASA) รุ่น Hamilton Thorne CEROS II	43
3	การวางชั้นสารละลายเพอร์คอลล์ 40, 45, 50, 65, 70, 80, และ 90 เปอร์เซ็นต์ (V/V)	44
4	การตกตะกอนของอสุจิหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกัน 7 ระดับ (40, 45, 50, 65, 70, 80, และ 90 เปอร์เซ็นต์ (V/V)) โดยเซลล์อสุจิจะตกลงมาอยู่ในชั้นเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้น 80-90 เปอร์เซ็นต์	44
5	แสดงลักษณะท่าทางการผสมเทียมแพะ	45
6	การตรวจการตั้งท้องแม่แพะด้วยเครื่องอัลตราซาวด์	45

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

ALH	=	Amplitude of lateral head displacement (ความกว้างของส่วนหัวของตัวอสุจิที่ส่ายไปมา)
AV	=	Artificial vaginal method (การรีดเก็บน้ำเชื้อโดยการใช้ช่องคลอดเทียม)
BCF	=	Beat cross frequency (ความถี่ของการส่ายส่วนหัวของตัวอสุจิ)
BSA	=	Bovine Serum Albumin
CASA	=	Computer Assisted Semen Analysis (เครื่องตรวจวิเคราะห์คุณภาพอสุจิ)
LIN	=	Linearity (อัตราส่วนความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีตรงต่อความเร็วเฉลี่ยของการเคลื่อนที่วิถีโค้งมี)
PCR	=	Polymerase Chain Reaction
PVP	=	Polyvinylpyrrolidone (โพลีไวนิลไพโรลิโดน)
SAS	=	Statistical Analysis System
STR	=	Straightness (ความตรงในการเคลื่อนที่ ซึ่งคำนวณจากอัตราส่วนความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีตรงต่อความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่คูณด้วยร้อย)
VAP	=	Average path velocity (ความเร็วในการเคลื่อนที่เฉลี่ยจากระยะทางจริงใน 1 วินาที)
VCL	=	Curvilinear velocity (ความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีโค้งเป็นการคำนวณแนวโน้มของการเคลื่อนที่เฉลี่ยใน 1 วินาที)
VSL	=	Straight-line velocity (ความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีตรง เป็นการคำนวณจากจุดหนึ่งไปยังอีกจุดหนึ่งในแนวเส้นตรงในช่วงระยะเวลา 1 วินาที)

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันภาครัฐ โดยกรมปศุสัตว์ ได้ส่งเสริมเทคโนโลยีชีวภาพที่นำไปใช้ในฟาร์มเกษตรกร อย่างต่อเนื่องและหลายวิธีเพื่อให้เกษตรกรได้รับเทคโนโลยีใหม่ๆไปใช้ประโยชน์ในการพัฒนาสายพันธุ์แพะและสร้างความเข้มแข็งทางการผลิต เช่น การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง การผสมเทียม การย้ายฝากตัวอ่อน เป็นต้น ซึ่งความต้องการเทคโนโลยีเหล่านี้มีเพิ่มมากขึ้นอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้ด้วยความต้องการพัฒนาสายพันธุ์แพะในฟาร์มของตนเองที่สามารถสร้างมูลค่าเพิ่มได้มากกว่าการผลิตเป็นแพะขุนโดยทั่วไป ซึ่งแพะพ่อแม่พันธุ์แท้ที่ตลาดต้องการอาจมีราคาสูง จากรายงานของนิรุจน์ และพิสมัย (2562) รายงานราคาจำหน่ายแพะพ่อพันธุ์ราคาเฉลี่ย 15,000 บาท/ตัว แม่พันธุ์ราคา 5,500 บาท/ตัว พ่อพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งอาจมีราคาสูงถึงตัวละ 1 แสน บาท ถึงแม้ว่าพ่อแม่พันธุ์จะมีราคาแพงแต่เกษตรกรก็ยังพยายามที่จะนำเข้ามาเลี้ยงในฟาร์มของตัวเองเพื่อใช้เป็นพ่อคุมฝูงแม่พันธุ์ ซึ่งเมื่อคำนวณความคุ้มค่าจากราคาพ่อพันธุ์ที่คุมฝูงแม่พันธุ์แท้ ตามสัดส่วนพ่อพันธุ์ 1 ตัว ต่อแม่พันธุ์ 20-30 ตัว (ลักษณ์ และทัสนันท์, 2561) และใช้ประโยชน์เพียงระยะเวลาไม่เกิน 2 ปี ภายหลังใช้งานแล้วก็จำหน่ายต่อให้ฟาร์มอื่นๆ ก็มีความคุ้มค่ากับราคาที่ค่อนข้างสูง หรือมีการแลกเปลี่ยนพ่อพันธุ์ระหว่างฟาร์มพัฒนาพันธุ์ก็จะมีความคุ้มค่ามากไปอีก ทั้งนี้อยู่ที่การจัดการการผสมของเกษตรกรเอง นอกจากนี้การนำเข้าแพะพ่อแม่พันธุ์ดีในราคาที่สูงก็อาจถูกนำไปใช้ประโยชน์ในเทคโนโลยีชีวภาพด้านอื่นๆ เช่น นำเข้าพ่อพันธุ์ดีเพื่อมาผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งจำหน่ายให้กับเกษตรกรรายอื่นๆ เมื่อผลิตน้ำเชื้อจนเป็นที่น่าพอใจแล้วค่อยนำไปเป็นพ่อพันธุ์คุมฝูง หรือนำเข้าฝูงแม่พันธุ์เพื่อเป็นแม่พื้นฐานภายในฟาร์มผลิตแพะพันธุ์แท้สายเลือดสูง หรือผลิตลูกพันธุ์ดีเพื่อเป็นพ่อพันธุ์ไปผลิตน้ำเชื้อ หรือนำเข้าแม่พันธุ์มาผลิตตัวอ่อน เป็นต้น จึงจะเห็นได้ว่า การผลิตแพะในปัจจุบันของประเทศไทยไม่ได้อยู่ที่แพะขุนเพียงอย่างเดียว ยังมีฟาร์มขนาดใหญ่ที่ต้องการผลิตแพะพันธุ์ดี ต้องการพันธุกรรมแพะพันธุ์ดีเพื่อกระจายให้ฟาร์มขนาดกลางและขนาดเล็กนำไปเป็นพ่อพันธุ์คุมฝูงเพื่อการผลิตแพะขุน ซึ่งเป็นปลายทางของห่วงโซ่การผลิตแพะเนื้อ ความต้องการแพะพ่อแม่พันธุ์ดีเป็นจำนวนมาก ทำให้ฟาร์มขนาดใหญ่ต้องพยายามพัฒนาสายพันธุ์ของตนเอง และต้องนำเทคโนโลยีชีวภาพที่ทันสมัยมาพัฒนาพันธุ์ เพราะหากนำเข้าจากต่างประเทศเพียงอย่างเดียวก็จะมีต้นทุนการผลิตสูง นอกจากนั้น การนำเข้าแพะพันธุ์ดีจากต่างประเทศโดยไม่มีการปรับปรุงพันธุ์แพะภายในประเทศก็จะมีอุปสรรคในเรื่องการจัดการ เนื่องจากแพะที่นำเข้ามาไม่ทนต่อสภาพอากาศและโรคประจำถิ่น เกษตรกรโดยทั่วไปจึง

พยายามลดต้นทุนโดยการนำเทคโนโลยีชีวภาพด้านต่างๆ มาใช้ เช่น การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง และการย้ายฝากตัวอ่อน เป็นต้น ถึงแม้เทคโนโลยีเหล่านี้จะไม่สามารถทำเองได้แต่ก็มีภาครัฐที่คอยให้ความช่วยเหลือ

ฟาร์มแพะโดยส่วนใหญ่ในปัจจุบัน ต้องการแพะเพศเมียเพื่อใช้เป็นแม่พื้นฐาน เนื่องจากหากไม่มีฐานแม่พันธุ์ก็จะผลิตลูกแพะไม่ได้ กระแสความต้องการแพะเพศเมียในปัจจุบันจึงเกิดขึ้นอย่างมาก ยิ่งมีการส่งเสริมให้มีการเลี้ยงแพะ แพะเพศเมียก็จำเป็นต้องนำมาใช้เป็นแม่พื้นฐานภายในฝูงมากขึ้น ส่วนแพะเพศผู้หากหายากก็ยังพอมีน้ำเชื้อแช่แข็งที่จะนำไปผสมเทียมได้ ความต้องการที่จะได้แพะเพศเมียจึงต้องมีการศึกษาค้นคว้าหาวิธีการผลิตแพะเพศเมียให้ได้จำนวนมากๆ ตามความต้องการ ขณะเดียวกันจากนโยบายภาครัฐในปัจจุบันก็มีการย้ายฝากตัวอ่อนแพะ ความต้องการแพะเพศเมียเป็นแม่ตัวให้ (Donor) ที่ดีเพื่อผลิตตัวอ่อนและนำไปย้ายฝากให้กับแม่แพะตัวรับ (Recipient) ของเกษตรกรจึงมีเพิ่มมากขึ้น การมีแม่ตัวให้จำนวนมากจะสามารถผลิตตัวอ่อนได้จำนวนมากๆ ซึ่งจะมีคุณประโยชน์ต่อการผลิตแพะและการกระจายพันธุ์แพะพันธุ์ดีอย่างรวดเร็ว อีกประเด็นการผลิตนมแพะต้องการแพะเพศเมียเพื่อเป็นแม่รีดนมที่ดีการมีแม่แพะนมจำนวนมากก็จะผลิตน้ำนมได้จำนวนมากเช่นกัน ในการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูงก็อาจต้องการแพะเพศเมียเพื่อผลิตไข่ (Oocyte) การมีแพะเพศเมียจำนวนมากพอจะสามารถผลิตไข่ (Oocyte) เพื่อการนำไปผสมในหลอดทดลอง (In Vitro Fertilization) เป็นตัวอ่อนหลอดแก้ว อาจนำไปใช้ในงานวิจัยอื่นๆหรือหากเป็นตัวอ่อนแพะพันธุ์ดีก็อาจนำไปย้ายฝาก (Embryo transfers) ให้กับแม่แพะตัวรับ (Recipient) ของเกษตรกรก็จะได้ลูกเกิดที่ต้องการจำนวนมากตามไปด้วย จะเห็นว่าหากสามารถกำหนดเพศลูกแพะให้เป็นตัวเมียได้ก็จะตอบสนองความต้องการของเกษตรกรซึ่งจะทำให้มีความรวดเร็วในการพัฒนาพันธุ์แพะไม่ว่าจะเป็นแพะเนื้อหรือแพะนมและเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาอาชีพการเลี้ยงแพะสามารถพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศได้เป็นอย่างดี

โดยทั่วไปการกำหนดเพศของลูกแพะนั้นเป็นการกำหนดเพศตามธรรมชาติขึ้นอยู่กับตัวอสุจิที่เข้ามาผสมกับไข่ว่าเป็นอสุจิที่มีโครโมโซม X หรือโครโมโซม Y ซึ่งได้มีรายงานว่าเพศของลูกแพะมีสัดส่วนเป็นลูกแพะเพศผู้ประมาณ 54.7 - 57.7 เปอร์เซ็นต์ และลูกแพะเพศเมียประมาณ 42.3 - 45.3 เปอร์เซ็นต์ และพบว่ามีปัจจัยทางด้านอื่นๆ ในการกำหนดเพศลูกแพะตามธรรมชาติด้วย เช่น ฤดูกาลและปีที่ผสมพันธุ์ อายุของแม่ และการให้ลูกแฝด ซึ่งมีผลต่อสัดส่วนเพศของลูกทั้งสิ้น (Kharkar *et al.*, 2017; Kumar *et al*., 2001; Polak *et al*., 2015; Soundararajan and Sivakumar, 2011)

การศึกษาการคัดแยกเซลล์อสุจิในปัจจุบันนั้นมีการทำในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดและหลายวิธีการทำให้สัดส่วนลูกเพศผู้ต่อเพศเมียแตกต่างไปจากการกำหนดเพศตามธรรมชาติและสามารถคัดแยกเพศลูกสัตว์ได้ตามที่ต้องการหรืออาจจะไม่ได้ตามที่ต้องการ แต่ก็ยังมีความพยายามที่จะศึกษาในเรื่องนี้เนื่องจากมีความคุ้มค่าและช่วยลดระยะเวลาการผลิตลูกสัตว์ตามที่ต้องการ กล่าวคือ การกำหนดเพศลูกเองโดยธรรมชาติและได้เพศที่ไม่ต้องการนั้นเสียเวลาและค่าใช้จ่ายการ

เลี้ยงดูไม่คุ้มค่า อย่างไรก็ตามเทคนิคการกำหนดเพศนั้นมีบางเทคนิคที่ประสบความสำเร็จอย่างมาก เช่น Flow Cytometer/cell sorter โดยสามารถกำหนดเพศได้ในอัตราที่สูง (Bathgate et al., 2013; Parrilla *et al.,* 2004) แต่เกษตรกรหลายรายก็ไม่สามารถเข้าถึงเทคโนโลยีนี้ได้เนื่องจากเครื่องมือมีราคาที่สูงมาก การศึกษาการคัดแยกเพศโดยวิธีการอื่นๆ จึงเกิดขึ้นหลายวิธีการคัดแยกเพศอสุจิที่น่าสนใจอีกวิธีการหนึ่งคือ การคัดแยกเพศอสุจิด้วยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกันเป็นวิธีการที่นิยมนำมาแยกเพศอสุจิในโค (Hossepian *et al*., 2015; Lucio *et al*., 2012; Malik *et al*., 2013; Promthep *et al.*, 2016; Wolf *et al*., 2008;) และพบมีรายงานในคน (Wang *et al*., 1994) และสัตว์หลายชนิด เช่น แกะและกระต่าย (Hussein, 2014; Ferreira *et al*., 2017) เพราะมีต้นทุนที่ต่ำและเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ แต่รายงานเกี่ยวกับการแยกเพศอสุจิแพะด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ยังให้ผลไม่เป็นที่น่าพอใจ (Ferreira et al., 2017) อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าการคัดแยกเพศอสุจิแพะด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลาย เพอร์คอลล์โดยนักวิจัยที่ผ่านมาจะไม่ประสบความสำเร็จ ผู้วิจัยก็ยังสนใจเนื่องจากมีต้นทุนที่ต่ำและไม่ยุ่งยากเหมือนวิธีการอื่นๆ อีกทั้งไม่ต้องมีเครื่องมือที่ทันสมัยและยังไม่มีรายงานการศึกษาในประเทศไทย

ดังนั้นการคัดแยกเพศอสุจิแพะด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์จึงเป็นเรื่องที่ควรศึกษาเพื่อนำผลการทดลองไปใช้ในฟาร์มหรือห้องปฏิบัติการระดับภูมิภาคที่มีความต้องใช้อสุจิเพศเมียและต้องการผลิตแพะเพศเมียเป็นแม่พันธุ์พื้นฐานหรือแม่พันธุ์ดีเพื่อเป็นการพัฒนาการเลี้ยงแพะในประเทศไทย เป็นการส่งเสริมอาชีพเกษตรกรและเป็นการพัฒนาเศรษฐกิจฐานรากของประเทศ สามารถแข่งขันในตลาดโลกได้

การตรวจเอกสาร

การกำหนดเพศตามธรรมชาติ

ในธรรมชาติลูกสัตว์ที่เกิดมามักพบว่ามีสัดส่วนลูกเพศผู้และเพศเมียในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 50:50 ซึ่งการกำหนดเพศนั้น ถูกกำหนดโดยตัวอสุจิ เนื่องจากอสุจิแต่ละตัวมีโครโมโซมเพศเพียงชนิดเดียว กล่าวคือ โครโมโซม Y (Y- chromosome) หรือโครโมโซม X (X-chromosome) อย่างใดอย่างหนึ่งเท่านั้น ส่วนเซลล์ไข่จะมีโครโมโซม X เท่านั้น ดังนั้น หากอสุจิที่มีโครโมโซม Y ผสมกับเซลล์ไข่ จะได้ตัวอ่อนเป็นเพศผู้ (XY) และหากอสุจิที่มีโครโมโซม X ผสมกับเซลล์ไข่ จะได้ตัวอ่อนเป็นเพศเมีย (XX) (Wilhelm *et al*., 2007)

สำหรับในแพะนั้น มีรายงานว่า เพศของลูกแพะมีสัดส่วนเป็นลูกแพะเพศผู้ประมาณ 54.7 - 57.7 เปอร์เซ็นต์ และเพศเมียประมาณ 42.3 - 45.3 เปอร์เซ็นต์ และพบว่ามีปัจจัยทางด้าน

ฤดูกาลและปีที่ผสมพันธุ์ อายุของแม่ และการให้ลูกแฝด มีผลต่อสัดส่วนเพศของลูกแพะ (Kharkar *et al*., 2017; Kumar *et al*., 2001; Polak *et al*., 2015; Soundararajan and Sivakumar, 2011)

Kharkar *et al.* (2017) ศึกษาสัดส่วนส่วนเพศลูกแพะพันธุ์ออสมาดามาดีจำนวน 182 ตัว ในปี ค.ศ. 2011-2016 พบว่าได้สัดส่วนลูกแพะเพศผู้ต่อเพศเมีย 56.59 และ 53.41 % ซึ่งสัดส่วนของลูกแพะเพศผู้จะสูงในเดือน พฤศจิกายน ถึง เมษายน ของปีถัดไป และสัดส่วนลูกแพะเพศเมียจะสูงในเดือนมิถุนายน ถึง เดือนตุลาคม ซึ่งสัดส่วนเพศของลูกแพะมีความสัมพันธ์กับปีและฤดูกาลอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) Polak *et al.* (2015) รายงานข้อมูลการผลิตแพะในสาธารณะรัฐเชคโดยการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ ช่วงปี ค.ศ.1992-2004 พบว่าสัดส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียในลูกแพะเท่ากับ 0.568 จากข้อมูลลูกเกิดแพะจำนวน 59,335 ตัว จำนวน 30,633 ครอก จากจำนวนแม่แพะ 11,644 ตัว Bushara *et al.* (2013) รายงานสัดส่วนเพศลูกแพะจากข้อมูลลูกเกิด 62 ตัว พบว่า ได้ลูกเพศผู้ 32 ตัว เพศเมีย 30 ตัว จากการศึกษาของ Abecia *et al*. (2016) ในลูกแพะที่เกิดจำนวน 5,671 ตัว ในปี ค.ศ. 2002-2007 พบว่าสัดส่วนเพศลูกเพศผู้ต่อเพศเมียมีค่าเท่ากับ 0.5 และไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) Cote *et at.* (2001) รายงานสัดส่วนลูกเกิดแพะว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) จากจำนวนลูกแพะเพศผู้ 75 ตัว และ เพศเมีย 85 ตัว Gorecki *et al*. (2003) รายงานลูกแพะที่เกิดในประเทศโปแลนด์ จำนวนลูก 527 ตัว จากทั้งหมด 268 ครอก ว่าสัดส่วนลูกแพะเพศเมียมีค่าเท่ากับ 55.8 % และลูกแพะเพศผู้ 45.2% ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) สัดส่วนเพศลูกแพะจากการผสมเทียม

ความแตกต่างของอสุจิ X และ Y

ความแตกต่างด้าน DNA ขนาด น้ำหนักและความเร็ว

ความแตกต่างส่วนประกอบ DNA ของอสุจิ X และ Y พบว่า ของอสุจิ Y มีน้อยกว่าอสุจิ X (Yadav *et al*., 2017) จากการศึกษาของ Prasad *et al.* (2017) รายงานว่าความแตกต่างขององค์ประกอบ DNA แตกต่างกัน 3.5-4.2 เปอรเซ็นต ขนาดของอสุจิ X มีขนาดใหญ่กว่าอสุจิ Y ทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิ Y เร็วกว่าอสุจิ X จากรายงานของ Cui (1997) รายงานความแตกต่างของอสุจิ X และอสุจิ Y ของคน ว่ามีความแตกต่างกันทางด้านโครโมโซมทั้งชนิดและจำนวนของยีนส์และแตกต่างกันทั้งทางโครงสร้างและหน้าที่ นอกจากนี้พื้นที่ส่วนหัวและความยาวส่วนคอและหางของอสุจิ X ใหญ่และยาวกว่าอสุจิ Y และจากรายงานของ Ali *et al.* (1990) พบว่าอสุจิ X และอสุจิ Y ของโคมีน้ำหนักตางกันประมาณ 3.82 - 4.18 เปอรเซ็นต

ความแตกต่างกันทางด้านประจุไฟฟ้า

ความแตกต่างกันทางด้านประจุไฟฟ้า พบว่าอสุจิ X จะมีประจุไฟฟ้าลบบนพื้นผิวที่มากกว่าอสุจิ Y ซึ่งประจุไฟฟ้าลบเกิดจากสารไกลโคโปรตีนพวก Sialic acid ซึ่งสามารถแยกอสุจิด้วยวิธี Electrophoresis ได้ ทำให้อสุจิ X วิ่งเข้าหาขั้วบวก ในขณะที่อสุจิ Y วิ่งเข้าหาขั้วลบ (Kaneko *et al*., 1984 อ้างโดย ฉัตรชัย, 2015) ขณะเดียวกันน้ำหนักของอสุจิ X ที่หนักกว่าก็มีส่วนช่วยให้เซลล์อสุจิตกลงเร็วกว่าอสุจิ Y ที่มีน้ำหนักเบา โดยอาศัยเครื่อง Free-flow electrophoresis ที่มีขั้วบวก-ลบเป็นตัวคอยเหนี่ยวนำ ดึงและผลักให้อสุจิ X และอสุจิ Y แยกห่างออกจากกันไปยังคนละขั้วไฟฟ้า พบว่า 83-89 เปอร์เซ็นต์ของอสุจิคนที่พบที่ขั้วลบจะแสดงลักษณะ F-body ออกมาในเปอร์เซ็นต์สูง (Mohri *et al*., 1987 อ้างโดย ฉัตรชัย, 2015)

ความแตกต่างกันทางด้าน H-Y antigen

ความแตกต่างกันทางด้าน H-Y antigen ที่ผิวเซลล์อสุจิ Y มี H-Y antigen ผิวเซลล์ของอสุจิ Y มีความจำเพาะต่อโปรตีน ซึ่ง H-Y antigen จะพบในเซลล์ของเพศผู้ และ F-body มีแขนยาวบนวายโครโมโซม (Johnson *et al.,* 1995)

วิธีการคัดแยกเพศจากเซลล์อสุจิ

วิธีการที่จะนำมาใช้ในการคัดแยกเพศจากเซลล์อสุจิในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมนั้นมีหลายวิธี ดังนี้

Flow cytometer/ cell sorter

วิธีการคัดแยกเซลล์อสุจิ Flow cytometer/ cell sorter เป็นวิธีการแยกเพศจากเซลล์อสุจิได้บริสุทธิ์มากที่สุด โดยใช้หลักการย้อมสี DNA และใช้แสงเลเซอร์ส่งผ่านและส่งสัญญาณไปยังตัวประมวลผล ซึ่งประสบความสำเร็จในการคัดแยกทั้งเซลล์อสุจิคนและสัตว์ เช่น สุกร และแพะ (Bathgate *et al.,* 2013; Parrilla *et al.,* 2004) จากรายงานของ Alexander *et al.* (2010) กล่าวว่าเทคนิคนี้เหมาะสำหรับฟาร์มขนาดใหญ่เชิงพาณิชย์เนื่องจากมีต้นทุนที่สูงโดยใช้หลักการขององค์ประกอบ DNA ในทางกายภาพที่โครโมโซม X มีปริมาณมากกว่า โครโมโซม Y อยู่ประมาณ 3% ความแตกต่างนี้สามารถตรวจพบได้จากเทคนิค Fluorescent Activated Cell Sorting technique (FACS) Yadav *et al.* (2017) รายงานว่า การตรวจจับอสุจิด้วยวิธีการนี้เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบทางสรีรวิทยาและรูปร่างของอสุจิและยังมีประสิทธิภาพของเซลล์อสุจิสูง Talokar *et al.* (2019) รายงาน

ว่า การคัดแยกเพศด้วยวิธีนี้มีประสิทธิภาพมากที่สุดถึง 80-90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งวิธีการนี้ไม่ทำให้รูปร่างของอสุจิเปลี่ยนไป วิธีการนี้สามารถผลิตลูกโคเพศเมียได้มากและได้ปริมาณน้ำนมมาก และลดปัจจัยเรื่องการคลอดยาก เพิ่มประสิทธิภาพในการคัดเลือกพันธุ์ และประสิทธิภาพการย้ายฝากตัวอ่อน และการปฏิสนธิตัวอ่อนในหลอดแก้ว การคัดแยกเพศเซลล์อสุจิช่วยให้ฝูงโคนมขยายตัวขึ้นจากการที่มีลูกตัวเมียเพิ่มขึ้น ดังนั้น ในฟาร์มโคนมจึงมีความต้องการการคัดแยกเพศจากเซลล์อสุจิมากขึ้นในอนาคตอันใกล้นี้ Prasad *et al.* (2017) รายงานว่าวิธีการคัดแยกเซลล์อสุจิ Flow cytometer/ cell sorter มีการพัฒนาให้คัดแยกได้เร็ว 11 ล้านเซลล์อสุจิต่อชั่วโมงและคงประสิทธิภาพในการคัดแยกที่ระดับ 90 เปอร์เซ็นต์ การคัดแยกด้วยวิธีนี้ประสบความสำเร็จโดยไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิและอัตราการผสมติด การพัฒนาอุปกรณ์สามารถเพิ่มอัตราการคัดแยกให้เซลล์อสุจิบริสุทธิ์ได้

Immunological method

เป็นวิธีการแยกเซลล์อสุจิทางวิทยาภูมิคุ้มกันโดยการใช้แอนติบอดี โดย H-Y antigen ที่อยู่บนพื้นผิวเซลล์อสุจิ Y และใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ H-Y antigen มาจับ หลังจากนั้นจึงใช้คุณสมบัติการติดเรืองแสงฟลูออร์เรสเซนต์ของเซลล์อสุจิแยกอสุจิ Y ออกมา วิธีการนี้ประสบความสำเร็จในการนำมาคัดแยกเพศจากเซลล์อสุจิโดยสามารถผลิตตัวอ่อนเพศเมียได้สูงกว่าเพศผู้ในหลอดทดลอง (Rattanasuk, 2011 ; Yadav *et al*., 2017)

Ali *et al.* (1990) รายงานการคัดแยกเซลล์อสุจิโคโดยใช้แอนติบอดีต่ออสุจิ Y พบว่า ในกลุ่มที่คัดแยกสามารถคัดแยกเซลล์อสุจิ Y ได้สัดส่วน Y ต่อ X มีค่าเท่ากับ 76 : 24, 88 : 12 และ 77 : 23 และสามารถคัดแยกเซลล์อสุจิ X ได้สัดส่วน Y ต่อ X มีค่าเท่ากับ 26 : 74, 35 : 65 และ 23 : 77 และกลุ่มที่ไม่คัดแยกได้สัดส่วน Y ต่อ X เท่ากับ 50:50 รายงานของ Sang *et al.* (2010) ศึกษาการคัดแยกเพศอสุจิโคโดยใช้หลักการวิทยาภูมิคุ้มกัน พบว่า สามารถคัดแยกเพศอสุจิโคได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้ภูมิคุ้มกันของกระต่าย sex-specific antibodies (SSAb) ซึ่งมีโปรตีนที่จำเพาะ (30-kDa protein) ใช้คัดแยกเพศอสุจิได้ทั้ง Xและ Y จากรายงานของ Soleymani *et al.* (2019) รายงานการคัดแยกเซลล์อสุจิแพะเพศผู้โดยใช้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อ SRY ยีนส์ พบว่าสามารถแยกเซลล์อสุจิได้อย่างมีประสิทธิภาพ

Albumin gradient

การคัดแยกเซลล์อสุจิด้วยชั้นอัลบูมินโดยการเทอสุจิลงบนชั้นของอัลบูมินที่มีความเข้มข้นต่างกัน รายงานโดย Hadi and Al-Timimi (2013) ศึกษาการคัดแยกด้วย Bovine serum albumin เพื่อจะแยกอสุจิ Y ซึ่งอสุจิ Y จะเคลื่อนที่ลงไปสู่ส่วนล่างของหลอดเนื่องจากว่ายเร็วกว่าและมีขนาดเล็กกว่าเซลล์อสุจิ X ซึ่งประสบความสำเร็จในการคัดแยกเพศอสุจิในสัตว์ เช่น แกะ

รายงานของ Kim *et al.* (1984) พบว่าการคัดแยกเซลล์อสุจิด้วยชั้นอัลบูมินมีประสิทธิภาพในการคัดแยกอสุจิ Y เนื่องจากอสุจิ Y มีขนาดเล็กและเคลื่อนที่ได้เร็วแต่ไม่สามารถแยกน้ำเชื้อได้หากมีปริมาตรน้อย

Hadi and Al-Timimi (2013) ทำการคัดแยกเซลล์อสุจิแกะด้วยชั้นอัลบูมิน โดยการเทอสุจิลงบนชั้นของอัลบูมินที่มีความเข้มข้นต่างกัน โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 แบบ นำน้ำเชื้อที่ผ่านคัดแยกไปผลิตตัวอ่อนและทดสอบเพศด้วยปฏิกิริยา PCR พบว่าทั้ง 4 การทดลองให้ผลเป็นที่น่าพอใจ คือ สามารถคัดแยกอสุจิ Y ต่อ อสุจิ X ได้ 72.7:27.2; 54.5:45.4; 81.8:18.1 และ 63.6:36.3 เปอร์เซ็นต์

Polymerase chain reaction (PCR)

การคัดแยกเพศด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส รายงานโดย Tavares *et al.* (2016) ศึกษาการคัดแยกเพศตัวอ่อนโค พบว่า ให้ผลถึง 100 เปอร์เซนต์ แต่วิธีนี้มีค่าใช้จ่ายของไพรเมอร์และผู้ทำต้องมีทักษะในเรื่องการตัดตัวอ่อน (biopsy) จากรายงานของ Choi *et al.* (2009) พบว่า วิธีการคัดแยกเพศน้ำเชื้อสุกรเพศผู้ด้วยวิธีปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสสามารถใช้คัดแยกได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้ ไพร์เมอร์ที่จำเพาะต่อ SRY ยีนส์ บนโครโมโซมวายของอสุจิ รายงานของ Khamlor *et al.* 2014 รายงานการคัดแยกเซลล์อสุจิโดยใช้เทคนิค PCR พบว่าสามารถใช้คัดแยกเซลล์อสุจิได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยใช้หลักการของไพร์เมอร์ที่ความจำเพาะต่อโครโมโซม X และ Y คือ bovine proteolipid protein (PLP) gene และวาย sex-determining region Y (SRY) สามารถแยกเซลล์อสุจิX และ Y ได้ 97 เปอร์เซ็นต์ และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Percoll density gradient centrifugation

เป็นวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกัน (Percoll density gradient centrifugation) เป็นการคัดแยกเซลล์อสุจิโดยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้น เพอร์คอลล์ที่มีระดับความเข้มข้นระดับต่างๆ ภายหลังปั่นแยกเซลล์อสุจิ X จะตกตะกอนลงมาอยู่ด้านล่างของหลอด เนื่องจากเซลล์อสุจิ X มีน้ำหนักที่มากกว่าเซลล์อสุจิ Y การคัดแยกเพศจากเซลล์อสุจิด้วยวิธีนี้ประสบความสำเร็จทั้งในการแยกเซลล์อสุจิคนและสัตว์หลายชนิด เช่น โค กระต่าย และแกะ รวมทั้งการได้ตัวอ่อนเพศเมียและลูกสัตว์เพศเมียที่สูงกว่าเพศผู้ด้วย (Ferreira *et al.,* 2017; Hossepian *et al.,* 2015; Hussein, 2014; Lucio *et al.,* 2012; Malik *et al.,* 2013; Promthep *et al.,* 2016; Wang *et al.,* 1994; Wolf *et al.,* 2008)

ข้อมูลทั่วไปของเพอร์คอลล์

เพอร์คอลล์ ประกอบด้วยเม็ดซิลิกาคอลลอยด์ขนาด 15-30 นาโนเมตร ซึ่งถูกเคลือบโดย โพลีไวนิลไพโรลิโดน (Polyvinylpyrrolidone, PVP) เพอร์คอลล์มีค่าออสโมลาลิตีต่ำและไม่เป็นพิษต่อเซลล์และองค์ประกอบต่างๆ นำมาใช้ประโยชน์ในการคัดแยกเซลล์เม็ดเลือด เซลล์ตับ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ เซลล์แบคทีเรีย และองค์ประกอบเซลล์ (Pertoft, 2000)

ผลของการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกันต่อคุณภาพอสุจิ สัดส่วนเพศของตัวอ่อนและลูกเกิด

ผลของการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกันต่อคุณภาพอสุจิ สัดส่วนเพศของตัวอ่อนและลูกเกิด มีรายงานที่ศึกษาในโคเป็นส่วนใหญ่ ดังนี้

Resende *et al*. (2011) เปรียบเทียบการคัดแยกอสุจิ X ระหว่างการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์กับสารละลาย OptiPrep โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งจากโคเพศผู้พันธุ์กีย์และเจอร์ซี่อย่างละ 2 ตัว ในการวางชั้นสารละลาย 10 ชั้น และนำไปปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายทั้งสองตัวหลังจากนั้นนำอสุจิที่ผ่านการคัดแยกเพศไปผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้ว ตรวจสอบสัดส่วนเพศตัวอ่อนโดยเทคนิค PCR ผลการทดลอง พบว่า เปอร์เซ็นต์ของตัวอ่อนเพศเมียที่คัดแยกเพศโดยการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ และ OptiPrep มีค่าเท่ากับ 62.0 และ 47.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

Hossepian *et al.* (2015) พบว่า การคัดแยกเพศอสุจิโคผ่านชั้นสารละลายเพอร์คอลล์และ OptiPrep โดยศึกษาในโคเพศผู้จำนวน 10 ตัว จาก 3 สายพันธุ์ ได้แก่ พันธุ์โฮสไตน์ (2 ตัว) พันธุ์กีย์ (4 ตัว) และพันธุ์เรดแองกัส (4 ตัว) อายุ 4-8 ปี ใช้ระดับชั้นของสารละลายเพอร์คอลล์กับ Optiprep 3 ชั้น โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม หลังจากทำการปฏิสนธิในหลอดทดลอง พบว่า ค่าเฉลี่ยอัตราการแบ่งตัวของตัวอ่อนจากกลุ่มที่ใช้อสุจิที่ไม่ได้คัดแยกเพศ (81.3 เปอร์เซ็นต์) มีค่าสูงกว่าที่คัดแยกเพศ (75.5 เปอร์เซ็นต์) แต่ค่าเฉลี่ยตัวอ่อนเพศเมียของกลุ่มที่ใช้อสุจิที่ผ่านการคัดแยกเพศ (72.3±10.4 เปอร์เซ็นต์) มีค่าสูงกว่าที่ไม่ได้คัดแยกเพศ (48.2±4.4 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบอัตราการตั้งท้องจากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่ผ่านการคัดแยกเพศด้วยสารละลายเพอร์คอลล์กับไม่ได้คัดแยกเพศ พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งอัตราการตั้งท้องของแม่โคที่ได้รับน้ำเชื้อที่ผ่านการคัดแยกเพศพันธุ์กีย์มีค่าต่ำสุด (61.3 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเทียบกับพันธุ์เรดแองกัส (75.9 เปอร์เซ็นต์) และโฮสไตน์ (77.4เปอร์เซ็นต์) และพบว่า ลูกเพศเมียที่ได้จากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่คัดแยกเพศมีค่าสูงกว่าที่ไม่ได้คัดแยกเพศ ซึ่งสัดส่วนลูกเพศเมียที่ได้จากกการการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อไม่ได้คัดแยกเพศต่อคัดแยกเพศในพันธุ์กีย์มีค่าเท่ากับ 47.6 ต่อ 68.4 เปอร์เซ็นต์ ในพันธุ์โฮสไตน์เท่ากับ 50.0 ต่อ 70.8 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์เรดแองกัสเท่ากับ 52.2 ต่อ 68.1

เปอร์เซ็นต์ ได้สัดส่วนลูกเพศเมียแตกต่างจากกลุ่มทดลองที่ไม่คัดแยกอสุจิ 68.1-70.8 เปอร์เซ็นต์ สำหรับอัตราการตั้งท้องจากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่ไม่ได้ผ่านการคัดแยกเพศกับคัดแยกเพศด้วยสารละลาย OptiPrep พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละพันธุ์ ซึ่งอัตราการตั้งท้องในน้ำเชื้อที่ผ่านการคัดแยกเพศพันธุ์กีย์มีค่าต่ำสุด (59.5 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเทียบกับพันธุ์เรดแองกัส (87.7 เปอร์เซ็นต์) และโฮสไตน์ (80.0 เปอร์เซ็นต์) แต่สัดส่วนลูกเพศเมียหลังจากคัดแยกเพศของทั้ง 3 พันธุ์ มีค่าแตกต่างกับที่ไม่ได้คัดแยกเพศอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าสัดส่วนลูกเพศเมียที่ไม่ได้คัดแยกเพศต่อคัดแยกเพศในแต่ละพันธุ์ ดังนี้พันธุ์กีย์เท่ากับ 53.9 ต่อ 81.8 เปอร์เซ็นต์ พันธุ์โฮสไตน์ 57.5 ต่อ 70.8 เปอร์เซ็นต์ และพันธุ์เรดแองกัส 52.6 ต่อ 72.2 เปอร์เซ็นต์

Lucio et al. (2012) ทำการคัดแยกเพศอสุจิโค จากโคพันธุ์เจอร์บราซิลเลี่ยน จำนวน 2 ตัว และโคพันธุ์เจอซี่จำนวน 2 ตัว ด้วยวิธีการ Modified swim up วิธีการผ่านชั้นต่างระดับสารละลายเพอร์คอลล์ และวิธีการ Modified swim up ร่วมกับสารละลายเพอร์คอลล์ แล้วตรวจสอบสัดส่วนเพศจากตัวอ่อน พบว่า ในกลุ่มควบคุม ได้สัดส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียเท่ากับ 54.8 และ 45.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในกลุ่ม Modified swim up ได้สัดส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย 38.2 และ 61.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลดับ ในกลุ่มที่ใช้สารละลายเพอร์คอลล์ได้สัดส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย 40.6 และ 59.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในกลุ่ม Modified swim up ร่วมกับสารละลายเพอร์คอลล์ ได้สัดส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย 39.4 และ 60.6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Promthep *et al.* (2016) ทำการคัดแยกเพศอสุจิในโคนม โดยการใช้สารละลายเพอร์คอลล์ 7 ชั้น คือ 80, 75, 70, 65, 60, 50 และ 40 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สามารถแยกอสุจิที่มีโครโมโซม X ได้ 60.75 เปอร์เซ็นต์ ที่ชั้น 65-70 เปอร์เซ็นต์ และคุณภาพน้ำเชื้อไม่แตกต่างจากชั้น 75-80 เปอร์เซ็นต์ ที่ชั้นนี้สามารถคัดแยกอสุจิได้ 76.21 เปอร์เซ็นต์ และหลังจากนำอสุจิที่แยกเพศแล้วไปผสมเทียมได้อัตราผสมติดที่ 40 เปอร์เซ็นต์ และได้สัดส่วนลูกเกิดเพศเมียเท่ากับ 71.43 เปอร์เซ็นต์ (30/42) จากการประเมินคุณภาพอสุจิในชั้น 75-80 เปอร์เซ็นต์ ที่มีเปอร์เซ็นต์อสุจิ X สูงสุดกลับพบว่า มีค่าการเคลื่อนที่ของอสุจิต่ำ แต่อสุจิส่วนใหญ่ที่พบอยู่ในชั้น 65-70 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูงเท่ากับ 95.86 ปอร์เซ็นต์ จึงได้นำน้ำเชื้อในชั้นนี้ไปทำน้ำเชื้อแช่แข็ง แล้วนำไปทำการปฏิสนธิในหลอดทดลองสำหรับใช้ถ่ายฝากตัวอ่อนและทำการผสมเทียม ผลการทดลองพบว่า จากจำนวนแม่โคที่ทำการถ่ายฝากตัวอ่อนทั้งหมด 69 ตัว มีแม่โคตั้งท้อง 28 ตัว (48.58 เปอร์เซ็นต์) ให้ลูกเพศผู้ต่อเพศเมียเท่ากับ 9 ต่อ 19 ตัว (32.15 ต่อ 67.86 เปอร์เซ็นต์) ส่วนจำนวนแม่โคที่ทำการผสมเทียมทั้งหมด 150 ตัว มีแม่โคตั้งท้อง 60 ตัว (40 เปอร์เซ็นต์) ให้ลูกเพศผู้ต่อเพศเมียเท่ากับ 12 ต่อ 30 ตัว (28.57 ต่อ 71.43 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเปรียบเทียบกับแม่โคที่ทำการผสมด้วยน้ำเชื้อที่ไม่ได้คัดแยกเพศอสุจิจำนวน 128 ตัว มีแม่โคตั้งท้อง 59 ตัว (46.09 เปอร์เซ็นต์) ให้ลูกเพศผู้ต่อเพศเมียเท่ากับ 29 ต่อ 30 ตัว (49.15 ต่อ 50.85 เปอร์เซ็นต์)

ธานี และคณะ (2542) ทำการคัดแยกเพศอสุจิโคด้วยการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ต่างระดับ 3 ชั้น (40, 60 และ 90 เปอร์เซ็นต์) ปั่นเหวี่ยง 350 x g เป็นเวลา 20 นาที

จากนั้นนำไปตรวจสอบสัดส่วนเพศ โดยใช้วิธีในการตรวจสอบ 2 วิธี ดังนี้ การนำไปผสมเทียมกับแม่โคของเกษตรกรในพื้นที่อำเภอพนมสารคราม จังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 520 ตัว พบว่า แม่โคมีการผสมติดจำนวน 472 ตัว ได้ลูกเพศเมีย 364 ตัว (77.12 เปอร์เซ็นต์) และลูกเพศผู้ 108 ตัว (31 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อนำนำเชื้อที่ได้จากการแยกเพศอสุจิไปทำการปฏิสนธิในหลอดทดลอง พบว่า ได้ตัวอ่อนเพศเมีย 69 เปอร์เซ็นต์

Buranaamnuay *et al.* (2015) ทำการปั่นเหวี่ยงแยกเพศอสุจิของโคพันธุ์โฮสไตน์ฟรีเชี่ยน ผ่านสารละลาย 3 ชนิดๆ ละ 8 ระดับ ได้แก่ PureSperm (40, 50, 60, 70, 75, 80, 85 และ 90 เปอร์เซ็นต์) OptiPrep (10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 และ 45 เปอร์เซ็นต์) และเพอร์คอลล์ (40, 50, 60, 70, 75, 80, 85 และ 90 เปอร์เซ็นต์) โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในการวางชั้นและนำไปปั่นเหวี่ยง และนำอสุจิที่ผ่านการคัดแยกเพศไปทำการผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้ว และใช้เทคนิค PCR ในการวิเคราะห์หาอัตราส่วนเพศของอสุจิหลังจากปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลาย ผลการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์ของตัวอ่อนเพศเมียที่ได้จากการใช้อสุจิที่ผ่านการคัดแยกเพศโดยการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์มีค่าต่ำสุด (54.3 เปอร์เซ็นต์) เมื่อเทียบกับ PureSperm (61.6 เปอร์เซ็นต์) และ OptiPrep (61.0 เปอร์เซ็นต์) และเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อไม่ได้คัดแยกเพศ (58.5 เปอร์เซ็นต์) พบว่า ไม่มีความแตกต่างกัน

Malik *et al.* (2013) รายงานว่า การแยกเพศอสุจิโคด้วยวิธี swim up วิธีปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ (45-90) และวิธี swim-up using TALP medium ได้ผลอสุจิ X เท่ากับ 58.33, 44.33 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สำหรับการศึกษาผลของการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกันต่อคุณภาพอสุจิ สัดส่วนเพศของตัวอ่อนและลูกเกิดในสุกร มีรายงานดังนี้

กรวิการ์ และคณะ (2531) ศึกษาการนำน้ำเชื้อสุกรพันธุ์มาปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกัน 6 ระดับ คือ ระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 0 (น้ำเชื้อสด), 20 , 35, 50, 65 และ 80 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์มีผลต่อความเข้มข้นของตัวอสุจิ กรด-ด่าง เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของตัวอสุจิ เปอร์เซ็นต์ลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติ และเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต ในทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ ($P<0.01$) ส่วนอิทธิพลร่วมระหว่างพันธุ์กับระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ พบว่า มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของตัวอสุจิ และเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต ($P<0.01$)

Noguchi *et al.* (2013) ศึกษาผลของการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อสุกรผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกัน 2 ระดับ คือ 50 และ 80 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ในกลุ่มที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลายเพอร์คอลล์มีค่าอัตราการเคลื่อนที่และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูงขึ้นภายหลังการปั่นเหวี่ยงเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง คือ มีค่าอัตราการ

เคลื่อนที่ 55.2 และ 92.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และค่าอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า 12.5 และ 51.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และค่าความสมบูรณ์ของอะโครโซมมีค่าสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการปั่นเหวี่ยง คือ ในกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 37.2 และในกลุ่มทดลองมีค่า 65.9 เปอร์เซ็นต์ ทำให้สัดส่วนการเจาะไข่อ่อนของอสุจิเพื่อผลิตเป็นตัวอ่อนระยะต่างๆ แตกต่างจากกลุ่มทดลองอย่างชัดเจน คือ ในกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 30.3 และในกลุ่มทดลองมีค่าเท่ากับ 54.6 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ มีรายงานการคัดแยกเพศจากอสุจิด้วยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกันในสัตว์อื่นๆ ดังนี้

มีรายงานในกระต่ายโดยการศึกษาเปรียบเทียบการนำอสุจิของกระต่ายพันธุ์นิวซีแลนด์ไวท์ ไปปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้น 45-90 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบกับการนำอสุจิไปผ่านวิธี swim up พบว่า เมื่อนำอสุจิที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้นข้นเพอร์คอลล์ 67.5 เปอร์เซ็นต์ ไปผสมกับแม่กระต่ายทำให้ได้ลูกกระต่ายเพศเมียต่อเพศผู้เท่ากับ 65.8 และ 34.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในวิธี swim up ได้ลูกกระต่าย เพศเมียต่อเพศผู้เท่ากับ 25 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Hussein, 2014)

รายงานการศึกษาในสัตว์เคี้ยงเอื้องขนาดเล็กโดย Ferreira *et al.* (2017) ศึกษาการนำอสุจิแกะ 4 ตัว และ แพะ 4 ตัว ที่รีดเก็บน้ำเชื้อด้วยไฟฟ้ามาปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ และตรวจสอบสัดส่วนเพศด้วยวิธี PCR พบว่า ในแกะได้สัดส่วนอสุจิ X มากกว่า Y ส่วนในแพะมีค่าใกล้เคียงกัน

มีรายงานในคนที่รายงานโดย Wang *et al.* (1994) ที่ทำการศึกษาการคัดแยกเพศอสุจิด้วยเพอร์คอลล์ 12 ชั้น (25-80 เปอร์ซ็นต์) พบว่า สามารถใช้แยกอสุจิได้โดยมีอัตราส่วนของอสุจิที่มีโครโมโซม X : Y เท่ากับ 55.1 : 41.1 (1.35)

ผลการศึกษาการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกันต่อสัดส่วนอสุจิ X เพศของตัวอ่อนและลูกเกิดในสัตว์ชนิดต่างๆ สามารถสรุปแสดงดังตารางที่ 1

Table 1 Effect of Percoll Density Gradient Centrifugation on percentage of sperm X, female embryos and new born female

Year	Animal	Parameters	Percentage	References
1994	Human	sperm X	55.1	Wang *et al*. (1994)
2011	Cattle	Female calves	62	Resende *et al*. (2011)
2013	Cattle	sperm X	44.33	Malik *et al*. (2013)
2012	Cattle	Female embryo	59.4	Lucio *et al*. (2012)
2014	Rabbit	Female kids	65.8	Hussein (2014)
2015	Cattle	Female embryo	54.3	Buranaamnuay *et al*. (2015)
2015	Cattle	Female calves	68.1-70.8	Hossepian *et al*. (2015)
		sperm X	60.75	
2016	Cattle	Female calves	71.43	Promthep *et al*. (2016)
2017	Sheep	sperm X	X>Y	Ferreira *et al*. (2017)
	Goat	sperm X	X=Y	

การผสมเทียมในแพะ

การผสมเทียมแพะ เป็นเทคนิคการเก็บน้ำเชื้อจากแพะเพศผู้มาปล่อยในช่องอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียโดยผ่านกระบวนการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ ซึ่งสามารถแบ่งผสมได้หลายครั้งหากได้น้ำเชื้อที่มีปริมาณมาก โดยน้ำเชื้อจะมีการเตรียมสารละลายและน้ำยาเลี้ยงน้ำเชื้อที่มีความใกล้เคียงตามธรรมชาติอย่างดี ในแต่ละหลอดต้องมีจำนวนอสุจิอย่างน้อย 20 ล้านตัวต่อโด๊ส และมีอสุจิตัวเป็นไม่น้อยกว่า 8 ล้านตัวต่อโด๊ส (Tsuma *et al.,* 2015)

การผสมเทียมแพะ ต้องทำการผสมให้สอดคล้องกับเวลาในการตกไข่ โดยการสังเกตอาการเป็นสัดซึ่งโดยทั่วไปต้องผสมก่อนการตกไข่ Stewart and Shipley (2014) รายงานว่าแพะแสดงอาการเป็นสัดยืนนิ่งโดยเฉลี่ย 36 ชั่วโมง หรืออยู่ในช่วง 24-48 ชั่วโมง การตกไข่เกิดขึ้นได้ตั้งแต่ 9-72 ชั่วโมง แต่โดยทั่วไปจะตกไข่อยู่ในช่วงใกล้หมดการเป็นสัด จึงควรสังเกตอาการเป็นสัดอย่างน้อยวันละ 2 ครั้ง วิธีการผสมเทียมแพะ โดยทั่วไปเป็นการฉีดผสมด้วยการปล่อยน้ำเชื้อในตำแหน่งคอมดลูก (Cervical artificial insemination) โดยใช้ speculum ถ่างอวัยวะเพศเมีย แล้วใช้ไปเปตหรือปืนผสมเทียมสอดเข้าไปในคอมดลูกโดยให้เข้าไปให้ได้ลึกที่สุดเท่าที่จะทำได้โดยไม่ใช้แรงดัน ซึ่งส่วนใหญ่จะสามารถสอดเข้าไปได้ลึกประมาณ 5-12 มิลลิเมตร โดยมีคำแนะนำให้สอดอุปกรณ์ผสมเทียมลึกไม่เกิน 38 มิลลิเมตร เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดอันตรายต่อคอมดลูก ภายหลังการปล่อยน้ำเชื้อต้องไม่มีการไหลย้อนกลับของน้ำเชื้อ ซึ่งเทคนิคนี้สามารถใช้ได้ทั้งน้ำเชื้อแช่เย็นและแช่แข็ง (Faigl *et al*., 2012) ช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผสมเทียมแพะ ให้สังเกตจากช่วงเวลาที่แม่แพะตัวนั้นมักจะแสดงการเป็นสัด ถ้าแม่แพะมีช่วงการเป็นสัดยาวประมาณ 24 ชั่วโมง ให้ผสมเทียมทันทีที่

พบอาการเป็นสัด ในแม่แพะที่มีช่วงอาการเป็นสัดยาวประมาณ 36 ชั่วโมง ให้ผสมเทียมภายใน 12 ชั่วโมงของการเป็นสัด ในแม่แพะที่มีช่วงการเป็นสัดยาวประมาณ 48 ชั่วโมง ให้ผสมเทียม 24 ชั่วโมงหลังเป็นสัด ในแม่แพะที่มีช่วงอาการเป็นสัดยาวประมาณ 72 ชั่วโมง ให้ผสมเทียม 48 ชั่วโมงหลังเป็นสัด และให้ผสมเทียม 2 (หรือ 3) ครั้ง ห่างกัน 12 ชั่วโมง ถ้าแม่แพะยังแสดงอาการเป็นสัด (Allison and Hagevoort. 2009)

อัตราการผสมติดจากการผสมเทียมให้กับแม่แพะที่เป็นสัดแบบธรรมชาติ รายงานโดย Andrabi *et al*. (2018) ซึ่งทำการเปรียบเทียบอัตราผสมติดจากการผสมเทียมแพะด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งหลังจากแพะแสดงอาการเป็นสัดยืนนิ่ง 12 ชั่วโมง ในพันธุ์บีเทิล และพันธุ์แจทเทิล พบว่าให้ผลอัตราผสมติดที่ไม่แตกต่างกัน คือ 50 เปอร์เซ็นต์ (7/14) และ 34 เปอร์เซ็นต์ (10/29) ตามลำดับ Dovenski *et al.* (1997) ผสมเทียมแพะด้วยวิธีผ่านคอมดลูกให้อัตราผสมติดได้ถึง 67.48 เปอร์เซ็นต์

อย่างไรก็ตาม เวลาที่ใช้ในการผสมเทียมมีผลต่ออัตราการตั้งท้อง Faigl *et al*. (2012) รายงานว่า การผสมเทียมที่ใช้เวลาน้อยประมาณ 20 วินาที เปรียบเทียบกับการผสมเทียมที่ใช้เวลา 60 วินาที โดยปล่อยน้ำเชื้อในคอมดลูกหรือหน้าคอมดลูก พบว่า กลุ่มที่ใช้เวลาน้อยให้ผลอัตราการตั้งท้องสูงกว่าทั้งวิธีที่ปล่อยน้ำเชื้อที่หน้าคอมดลูก (60.9 และ 15.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) หรือปล่อยในคอมดลูก (61.0 และ 50.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) โดยความลึกของการปล่อยน้ำเชื้อในคอมดลูกไม่มีผล

นอกจากนี้ ในการผสมเทียมแพะนั้นมีการเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้ฮอร์โมน ซึ่งจะทำการฉีดน้ำเชื้อที่เวลา 55 ชั่วโมง หลังถอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Faigl *et al*., 2012) หรือประมาณ 45 ชั่วโมงหลังถอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนในการผสมครั้งเดียว หรือในการผสมสองครั้ง ให้ทำการผสมในชั่วโมงที่ 30 และ 48 หลังถอดฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน (Cseh *et al*., 2012) การผสมเทียมด้วยวิธีนี้ควรใช้น้ำเชื้อ $200x10^6$ ตัว ในปริมาตร 0.2 ซีซี (Cseh *et al*., 2012; Faigl *et al*., 2012; Sohnrey and Holtz, 2005)

Houdeau *et al.* (2008) ทำการผสมเทียมระยะสั้นโดยใช้ fluorogestone acetate intravaginal sponges (FGA, 40 mg) ฝังไว้ในช่องคลอดระยะ 11 วัน ร่วมกับการใช้ฮอร์โมน cloprostenol ปริมาณ 50 mg และ eCG ขนาด 250 IU ฉีดก่อนถอดฮอร์โมน fluorogestone acetate intravaginal sponge ที่เวลา 48 ± 2 ชั่วโมง และ ผสมเทียมชั่วโมงที่ 45 หลังถอดฮอร์โมนพบว่า ให้อัตราผสมติดที่ 52.9 - 68.8 เปอร์เซ็นต์

Arrebola *et al*. (2012) ทำการผสมเทียมให้กับแม่แพะ 3,941 ตัว และเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอดและผสมเทียมแบบกำหนดเวลาประมาณชั่วโมงที่ 46 หลังถอดฮอร์โมน ตรวจการตั้งท้องที่ 42-46 วัน หลังผสม ด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ พบว่ามีอัตราการการผสมติดเท่ากับ 48.7 เปอร์เซ็นต์

ในประเทศไทยมีรายงานการศึกษาการผสมเทียมแพะ ดังนี้

มาลี และคณะ (2556) ศึกษาเปรียบเทียบการผสมเทียมครั้งเดียวกับสองครั้งโดยการผสมเทียมแพะโปรแกรมระยะสั้น 5 วัน แบบกำหนดเวลาโดยการเหนี่ยวการเป็นสัดโดยใช้ CIDR® ในแพะที่เลี้ยงในพื้นที่ภาคใต้ เปรียบเทียบการผสมเทียมครั้งเดียวและสองครั้งชั่วโมงที่ 49 และ 73 หลังถอด CIDR® พบว่า ให้ผลไม่แตกต่างกัน คือ ผลอัตราการตั้งท้อง 28.9 เปอร์เซ็นต์ (22/76) และ 34.2 เปอร์เซ็นต์ (26/76) ตามลำดับ

นิวัตน์ และคณะ (2550) ทำการผสมเทียมแบบกำหนดเวลาในแพะนมสองครั้งชั่วโมงที่ 48 และ 72 โดยใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด CIDR-G ร่วมกับพีเอ็มเอสจี 150 IU ร่วมกับฮอร์โมน Prostaglandin F_2 alpha รายงานอัตราการผสมติด 52 เปอร์เซ็นต์ (21/40)

พีระพงษ์ และคณะ (2552) เหนี่ยวนำการเป็นสัดแพะโดยใช้ฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด CIDR-G ร่วมกับฮอร์โมน PMSG (Pregnant mare gonadotropin) และผสมเทียมแพะพันธุ์ซาเนนด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ความเข้มข้น 200 ล้านตัวต่อโด๊ส สองครั้งได้ผลอัตราการผสมติด 47-50 เปอร์เซ็นต์

พีระพงษ์ และสาโรช (2553) ศึกษาผลของใช้ CIDR-G และ Chornogest ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมในแพะซาเนนด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีความเข้มข้น 200 ล้านตัวต่อโด๊ส พบว่ามีอัตราการผสมติดเท่ากับร้อยละ 39.9-43.1

วิศิษฐ และคณะ (2561) เปรียบการผสมเทียมแพะแบบกำหนดเวลาครั้งเดียวและสองครั้งโดยผสมครั้งเดียวชั่วโมงที่ 48 และสองครั้งชั่วโมงที่ 48 และ 72 และเหนี่ยวนำการเป็นสัดแพะโดยใช้โปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด CIDR-G ร่วมกับ PMSG ตามวิธีของ นิวัตน์ และคณะ (2550) รายงานผลอัตราผสมติดที่ 50 เปอร์เซ็นต์ และไม่มีความแตกต่างกัน

พีรศักดิ์ (2548) ทำการเหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้โปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด CIDR-G และผสมเทียมเพียงครั้งเดียว ชั่วโมงที่ 43-45 ได้อัตราการผสมติด 60-65 เปอร์เซ็นต์

ความสำเร็จของการผสมเทียมแพะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ประกอบด้วย ปัจจัยของสภาพแวดล้อม ได้แก่ การจัดการฟาร์ม วัน เดือน ปี ที่ทำผสมเทียม ปัจจัยของเทคนิคการทำผสมเทียม ได้แก่ โปรแกรมเหนี่ยวนำการเป็นสัด น้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์แต่ละตัว เทคนิคการเจือจางน้ำเชื้อ เทคนิคการสอดปืนผสมเทียม และปัจจัยของความพร้อมของแม่แพะ ได้แก่ ความสมบูรณ์ร่างกาย ลำดับท้อง ช่วงห่างจากคลอดถึงผสมเทียม ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ในแต่ละพื้นที่อาจจะพบแตกต่างกันไป (Mellado *et al*., 2004; Nunesa and Salgueiro, 2011; Salvador *et al*., 2005) นอกจากนี้ จิต

ศักดิ์ และคณะ 2561 รายงานว่า ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จของการผสมเทียมแพะด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง ได้แก่ เวลา สถานะแม่แพะ พ่อพันธุ์แพะ อาการเป็นสัด ความลึกของสอดปืนฉีดน้ำเชื้อ เป็นต้น

Arrebola *et al*. (2012) ทำการศึกษาถึงปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผสมเทียมแพะพันธุ์ฟลอริดา จากการวิเคราะห์ข้อมูลการผสมเทียมย้อนหลัง 7 ปี พบว่า ปัจจัยทางด้านปี และฤดูกาล พ่อพันธุ์ ตำแหน่งที่ปล่อยน้ำเชื้อ มีผลต่ออัตราผสมติด

Arrebola *et al*. (2015) รายงานว่า ปัจจัยทางด้านการจัดการฟาร์มมีผลต่ออัตราการผสมติด รวมทั้งอุณหภูมิความชื้น ช่วงแสงและปริมาณน้ำฝน การวางแผนการผสมเทียมในฟาร์มต้องใช้ข้อมูลพยากรณ์อุณหภูมิ การผสมเทียมจึงจะประสบความสำเร็จ

Mellado *et al*. (2004) ทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการผสมติดและการให้ลูกในแพะโดยศึกษาจากค่าคะแนนร่างกาย 1-5 ลำดับการให้นม ลำดับท้อง การงอกเขา ค่าเลือดและสารภายในเลือด โดยศึกษาจากแม่แพะที่ปลอดโรคแท้งติดต่อ 374 ตัว พบว่า ค่าคะแนนร่างกายไม่มีผลต่ออัตราการผสมติด แม่แพะที่มีค่ากลูโคสในเลือดมากกว่า 60 มิลลิกรัม ต่อ 100 ซีซี มีค่าอัตราการผสมติดสูงกว่ากลุ่มที่มีค่ากลูโคสต่ำกว่า แม่แพะท้องแรกจะมีอัตราผสมติดที่ต่ำกว่าแม่แพะตั้งแต่ท้องสองขึ้นไป และค่าองค์ประกอบเลือดอื่นๆ มีผลต่ออัตราผสมติด เช่น ค่ายูเรียในเลือด ระดับแมกนีเซียมและแคลเซียมในเลือด จึงสรุปว่าค่าพลังงานในร่างกายที่ต่ำ ค่าระดับกลูโคสที่ต่ำ มีผลอัตราการผสมติด

Salvandor *et al*. (2005) รายงานว่า ปัจจัยทางด้านฟาร์ม และความลึกของการปล่อยน้ำเชื้อมีผลต่ออัตราการตั้งท้องในแพะพันธุ์ Murciano-Granadina ในช่วงนอกฤดูผสมพันธุ์ ในขณะที่ ปัจจัยทางด้านพ่อพันธุ์และเจ้าหน้าที่ผสมเทียมไม่มีผล

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกันต่อคุณภาพอสุจิแพะหลังการทำละลายเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม
2. เพื่อศึกษาผลของการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการคัดแยกเพศอสุจิด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกันต่อสัดส่วนเพศลูกแพะเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

งานวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาและเห็นชอบจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ของสถาบัน มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เลขที่ 6/2020 เมื่อวันที่ 3 กุมภาพันธ์ 2563

วัสดุ และอุปกรณ์

1. วัสดุ และอุปกรณ์สำหรับรีดเก็บน้ำเชื้อ

พ่อแพะพันธุ์บอร์
แม่แพะสำหรับใช้เป็นตัวล่อเพื่อรีดเก็บน้ำเชื้อ
หลอดทดลอง ขนาด 15 มิลลิลิตร
ช่องคลอดเทียมสำหรับรีดน้ำเชื้อแพะ (Artificial vagina)
เทอร์โมมิเตอร์
กระติกน้ำร้อน
บีกเกอร์
ซองบังคับแพะ
ถุงมือยางตรวจโรค
เจลหล่อลื่น
กระดาษชำระ
สำลีแอลกอฮอล์
ปากกาเขียนหลอด
ตะกร้าใส่อุปกรณ์
เสื้อกาวด์ยาวสำหรับผู้ปฏิบัติงานรีดน้ำเชื้อ
รองเท้าบูท

2. วัสดุ อุปกรณ์ และเครื่องมือสำหรับตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อและผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง

เครื่องวิเคราะห์คุณภาพอสุจิ (Computer Assisted Semen Analysis; CASA)
กล้องจุลทรรศน์
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)

ตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
ถังไนโตรเจนเหลว
สไลด์นับเม็ดเลือด (Hemocytometer)
แผ่นสไลด์และกระจกปิดสไลด์
หลอดทดลอง ขนาด 15 มิลลิลิตร
ไมโครปิเปต (Micropipette)
ทิป (Tip)
อ่างน้ำวนควบคุมอุณหภูมิ
บีกเกอร์
มีด/กรรไกร
พาราฟิล์ม (Parafilm)
ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Rack)
หลอดบรรจุน้ำเชื้อ ขนาด 0.25 มิลลิลิตร (French ministraws)
กล่องโฟม
ปากกาเขียนหลอดน้ำเชื้อ
สารละลายเพอร์คอลล์ (GE Healthcare™)
สารละลายเลกเตท
One step™ extender (Continental Plastic Corp, USA.)
สารละลายเจือจางน้ำเชื้อสูตร Tris-egg yolk (รายละเอียดสารลายและวิธีการเตรียม แสดงไว้ในภาคผนวก ข)

3. วัสดุ และอุปกรณ์สำหรับผสมเทียมแพะ

ปืนผสมเทียมแพะ
ถังไนโตรเจนเหลวบรรจุน้ำเชื้อแช่แข็ง
เครื่องถ่างอวัยวะเพศ (Vaginal speculum)
ซองผสมเทียมแพะ
กระติกเทอร์มอส
พลาสติกชีท
เจลหล่อลื่น
ถุงมือยาง
กระดาษทิชชู
กรรไกร
หลอดไฟฉายส่องสว่าง
ปากคีบ
สำลีแอลกอฮอล์

สมุดบันทึกผสมเทียม

4. วัสดุและอุปกรณ์การตรวจท้องแพะ

เครื่องอัลตราซาวด์ AGROSCAN รุ่น L พร้อมหัวสแกนแบบ Linear Rectal
ถุงมือตรวจโรคสัตว์
กระดาษชำระ
เจลล่อลื่น

วิธีการทดลอง

การศึกษาการคัดแยกเพศจากอสุจิของแพะด้วยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ ได้ทำการแบ่งเป็น 2 การทดลอง ดังนี้

การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกันต่อคุณภาพอสุจิแพะหลังการทำละลาย

วัตถุประสงค์

- เพื่อศึกษาผลของการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกันต่ออัตราการเคลื่อนที่ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วในการเคลื่อนที่ และลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังการทำละลายเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม
- เพื่อศึกษาผลของเวลาที่บ่มน้ำเชื้อหลังการทำละลายของน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกันต่ออัตราการเคลื่อนที่ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วในการเคลื่อนที่ และลักษณะการเคลื่อนที่เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

แพะทดลอง การรีดเก็บน้ำเชื้อ และการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

คัดเลือกพ่อแพะพันธุ์บอร์จำนวน 3 ตัว อายุ 3-5 ปี ที่มีสุขภาพแข็งแรงผ่านการตรวจโรคติดต่อทางระบบสืบพันธุ์ เลี้ยงภายใต้การจัดการเดียวกัน โดยให้อาหารข้นวันละ 500 กรัม และอาหารหยาบแบบเต็มที่ตลอดวัน ทำการเก็บน้ำเชื้อด้วยวิธี Artificial vaginal method (แสดงดังภาพที่ 1 ในภาคผนวก ก) ทุกสัปดาห์ๆ ละครั้ง เป็นเวลา 3 สัปดาห์ติดต่อกัน นำน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้มาตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ (แสดงดังภาพที่ 2 ในภาคผนวก ก) ด้วยเครื่องตรวจวิคราะห์คุณภาพอสุจิ

(Computer Assisted Semen Analysis; CASA) รุ่น Hamilton Thorne CEROS II และวิเคราะห์ค่าการเคลื่อนที่ ดังนี้

การเคลื่อนที่ของอสุจิ (Spermatozoa motility, %) ได้แก่

- การเคลื่อนที่ทั้งหมด (total motility)
- การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility)

ความเร็วในการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Spermatozoa velocity) ได้แก่

- Average path velocity, VAP (μm/s) คือ ความเร็วในการเคลื่อนที่เฉลี่ยจากระยะทางจริงใน 1 วินาที
- Straight-line velocity, VSL (μm/s) คือ ความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีตรง เป็นการคำนวณจากจุดหนึ่งไปยังอีกจุดหนึ่งในแนวเส้นตรงในช่วงระยะเวลา 1 วินาที
- Curvilinear velocity, VCL (μm/s) คือ ความเร็วในการเคลื่อนที่วิถีโค้ง เป็นการคำนวณแนวโน้มของการเคลื่อนที่เฉลี่ยใน 1 วินาที

ลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Spermatozoa kinetic movement) ได้แก่

- Amplitude of lateral head displacement, ALH (μm) คือ ความกว้างของส่วนหัวของตัวอสุจิที่ส่ายไปมา
- Beat cross frequency, BCF (Hz) คือ ความถี่ของการส่ายส่วนหัวของตัวอสุจิ
- Straightness, STR (%) คือ ความตรงในการเคลื่อนที่ ซึ่งคำนวณจากอัตราส่วนความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีตรงต่อความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่คูณด้วยร้อย
- Linearity, LIN (%) คือ อัตราส่วนความเร็วของการเคลื่อนที่ในวิถีตรงต่อความเร็วเฉลี่ยของการเคลื่อนที่วิถีโค้งมี

ทำการนับความเข้มข้นของอสุจิโดยใช้สไลด์นับเม็ดเลือด Hemocytometer ทำการเจือจางน้ำเชื้อในอัตราการเจือจาง 1:200 นับจำนวนตัวอสุจิโดยหยดน้ำเชื้อลงบนสไลด์นับเม็ดเลือดปิดทับด้วยแผ่นกระจก บางที่มาพร้อมสไลด์นับเม็ดเลือด ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 นาทีเพื่อให้ตัวอสุจิหยุดลอย นับตัวอสุจิในตารางของสไลด์นับเม็ดเลือดผ่านกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย x400 นับตัวอสุจิในสี่เหลี่ยมจัตุรัสที่มีกรอบเป็นเส้นคู่ขนาน 5 ช่อง (ภายในแต่ละ 5 ช่อง มีสี่เหลี่ยมเล็ก 16 ช่อง) โดยนับช่องที่มุม 4 ช่องและช่องกลาง 1 ช่อง เมื่อนับจำนวนตัวอสุจิใน 5 ช่องรวมกันแล้ว คำนวณความเข้มข้นของตัวอสุจิต่อมิลลิลิตร (รพีพรรณ, 2552)

น้ำเชื้อที่นำไปใช้ในการทดลองเป็นน้ำเชื้อผ่านการคัดแยกคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น โดยกำหนดให้มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าไม่ต่ำกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ และความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 2,000 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร

นำน้ำเชื้อแพะที่ผ่านการตรวจคุณภาพเบื้องต้นจากพ่อแพะแต่ละตัวมาเทรวมกันแล้วแบ่งเป็น 2 ส่วนเท่าๆ กัน กลุ่มแรกเป็นกลุ่มควบคุมไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง กลุ่มที่สองเป็นกลุ่มทดลองนำไปปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ 7 ชั้น

วิธีการเตรียมและการวางชั้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 7 ระดับ

ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ในชั้นต่างๆ ที่ใช้ในการทดลองนี้ ได้ถูกดัดแปลงจาก Promthep *et al.* (2016) และการทดลองวางชั้นก่อนการทดลองจริง (Preliminary) โดยทดลองทำการวางชั้นแต่ละชั้นและวางน้ำเชื้อไว้ชั้นบนสุด หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง สังเกตลักษณะการเคลื่อนตัวลงมาในระดับชั้นต่างๆ ของน้ำเชื้อ ลักษณะน้ำเชื้อที่ลงมาสู่ด้านล่างจะต้องมีการลงอย่างเป็นชั้นๆ ไม่มีการแตกชั้นของน้ำเชื้อ (แสดงดังภาพที่ 3 ในภาคผนวก ก) จากผลที่ได้จากการทดลองเบื้องต้นนี้ ทำให้ได้ระดับสารละลายเพอร์คอลล์ให้มีความเข้มข้น 7 ระดับ คือ 40, 45, 50, 65, 70, 80, และ 90 เปอร์เซ็นต์ (V/V)

การเตรียมสารละลายเพอร์คอลล์ ให้มีความเข้มข้น 7 ระดับ คือ 40, 45, 50, 65, 70, 80, และ 90 เปอร์เซ็นต์ (V/V) โดยการนำน้ำยาเพอร์คอลล์ปริมาตร 90 มิลลิลิตร มาเจือจางกับสารละลาย Ringer's Lactate solution ความเข้มข้น 10 เท่า (วิธีการเตรียมสารละลายแสดงไว้ในภาคผนวก ข) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน (สารละลาย A) หลังจากนั้น นำมาเจือจางกับสารละลาย Ringer's Lactate solution ที่มี Bovine Serum Albumin (BSA) 5 เปอร์เซ็นต์ (สารละลาย B) ตามระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้

ความเข้มข้นที่ระดับ 40 เปอร์เซ็นต์ เตรียมสารละลายในหลอดพลาสติก ขนาด 15 มิลลิลิตร ให้ได้ปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร โดยทำการเติมสารละลาย A ปริมาตร 4 มิลลิลิตร และสารละลาย B ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน

ความเข้มข้นที่ระดับ 45 เปอร์เซ็นต์ เตรียมสารละลายในหลอดพลาสติก ขนาด 15 มิลลิลิตร ให้ได้ปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร โดยทำการเติมสารละลาย A ปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร และสารละลาย B ปริมาตร 5.5 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน

ความเข้มข้นที่ระดับ 50 เปอร์เซ็นต์ เตรียมสารละลายในหลอดพลาสติก ขนาด 15 มิลลิลิตร ให้ได้ปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร โดยทำการเติมสารละลาย A ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และสารละลาย B ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน

ความเข้มข้นที่ระดับ 65 เปอร์เซ็นต์ เตรียมสารละลายในหลอดพลาสติก ขนาด 15 มิลลิลิตร ให้ได้ปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร โดยทำการเติมสารละลาย A ปริมาตร 6.5 มิลลิลิตร และสารละลาย B ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน

ความเข้มข้นที่ระดับ 70 เปอร์เซ็นต์ เตรียมสารละลายในหลอดพลาสติก ขนาด 15 มิลลิลิตร ให้ได้ปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร โดยทำการเติมสารละลาย A ปริมาตร 70 มิลลิลิตร และสารละลาย B ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน

ความเข้มข้นที่ระดับ 80 เปอร์เซ็นต์ เตรียมสารละลายในหลอดพลาสติก ขนาด 15 มิลลิลิตร ให้ได้ปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร โดยทำการเติมสารละลาย A ปริมาตร 8 มิลลิลิตร และสารละลาย B ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน

ความเข้มข้นที่ระดับ 90 เปอร์เซ็นต์ เตรียมสารละลายในหลอดพลาสติก ขนาด 15 มิลลิลิตร ให้ได้ปริมาตรรวม 10 มิลลิลิตร โดยทำการเติมสารละลาย A ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และสารละลาย B ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน

วางชั้นเพอร์คอลล์ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร โดยเอียงหลอดประมาณ 30 องศา ดูดสารละลายเพอร์คอลล์ความเข้มข้นระดับต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ด้วยทิปพลาสติก (เปลี่ยนทิปทุกครั้งในแต่ละความเข้มข้นเพื่อป้องกันความผิดพลาดของความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ในชั้นที่จะวางต่อมา) วางชั้นเพอร์คอลล์ไม่ให้แตกชั้นเนื่องจากการแตกชั้นจะไม่สามารถใช้แยกน้ำเชื้อได้ ตรวจเช็คการวางชั้นด้วยการเอียงหลอดซ้ายขวาเล็กน้อยในที่ไม่มีแสงจ้าเกินไปเพื่อดูว่ามีการรวมชั้นของเพอร์คอลล์หรือไม่ การรวมชั้นของเพอร์คอลล์จะไม่สามารถนำมาทดลองได้ วางชั้นสารละลายเพอร์คอลล์ปริมาตรชั้นละ 1 มิลลิลิตร โดยให้เรียงจากความเข้มข้นมากที่สุด คือ ชั้นที่มีความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ (V/V) อยู่ล่างสุดของหลอดทดลองแล้ววางชั้นต่อไปจนครบ 7 ชั้น ซึ่งในหลอดทดลองจะมีการจัดเรียงชั้นสารละลายเพอร์คอลล์ คือ 40, 45, 50, 65, 70, 80, และ 90 เปอร์เซ็นต์ (V/V) จากบนลงล่างเมื่อวางชั้นเพอร์คอลล์พร้อมแล้วจึงส่งสัญญาณให้ผู้รีดน้ำเชื้อ นำแพะเข้าซองพร้อมรีด

การปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน

นำน้ำเชื้อส่วนที่สองซึ่งเป็นกลุ่มทดลอง วางบนชั้นสูงสุดของหลอดทดลองที่มีสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 7 ระดับ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 300 g เป็นเวลา 15 นาที ภายหลังการปั่นเหวี่ยงสังเกตการเคลื่อนตัวลงของน้ำเชื้อจนถึงชั้นล่างสุด น้ำเชื้อที่ใช้ได้จะต้องเคลื่อนที่ลงมาโดยไม่มีการแตกชั้น เคลื่อนลงมาเป็นชั้นๆ อย่างเห็นได้ชัด น้ำเชื้อจะลงมาตกตะกอนอยู่บริเวณชั้นที่มีความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 80-90 เปอร์เซ็นต์ (แสดงดังภาพที่ 4 ในภาคผนวก ก) น้ำเชื้อที่ไม่สามารถแยกได้จะมีลักษณะ เช่น น้ำเชื้อลงมาเป็นก้อนส่วนกลางของหลอด น้ำเชื้อลงมาเป็นก้อนด้านข้างหลอด มีการแตกชั้นหรือรวมชั้นของสารละลายเพอร์คอลล์

หลังการปั่นเหวี่ยง ทำการดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง แล้วนำสารละลายชั้นที่มีระดับความเข้มข้น 80 และ 90 ปอร์เซ็นต์ ที่มีน้ำเชื้อแพะตกตะกอนแยกชั้นลงมาไปแยกสารละลายเพอร์คอลล์และเซมินอลพลาสมาออกจากน้ำเชื้อ โดยการเติมสารละลายน้ำเชื้อ Tris-egg yolk extender (วิธีการเตรียมสารละลายแสดงไว้ในภาคผนวก ข) ลงไปให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำปั่นเหวี่ยง

ที่ ความเร็ว 300 g เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้น ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง แล้วนำน้ำเชื้อส่วนที่ตกตะกอนก้นหลอดไปผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง

กระบวนการผลิตน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง

นำน้ำเชื้อทั้ง 2 ส่วน ได้แก่ น้ำเชื้อส่วนที่ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง (ทำการปั่นล้างเซมินอล พลาสมาออกก่อน) และส่วนที่ปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ของชั้นที่มีความเข้มข้น 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ไปผ่านกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยทำการเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจาง Tris-egg yolk ให้มีความเข้มข้น 600 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร (150 ล้านตัวต่อโด๊ส) จากนั้นนำไปบ่มในตู้เย็นที่ควบคุมอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง บรรจุน้ำเชื้อลงในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ทำการแช่แข็งด้วยการอังหลอดบรรจุน้ำเชื้อเหนือไอไนโตรเจนเหลว 3-4 เซนติเมตร ในกล่องโฟม ซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ -120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 13 นาที และเก็บรักษาไว้ภายใต้ระดับไนโตรเจนเหลวในถังเก็บน้ำเชื้อที่อุณหภูมิประมาณ –196 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อหลังละลายทั้ง 2 กลุ่ม ด้วยเครื่อง CASA ในชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, และ 6 หลังละลาย บันทึกข้อมูลและนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลลักษณะคุณภาพอสุจิหลังการทำละลายในชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5, และ 6 มาวิเคราะห์สถิติโดยใช้ General Linear Model โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS) ดังสมการ

$$y_{iljl} = \mu + \tau_i + \iota_j + pk + \tau\iota_{ij} + \varepsilon_{ijkl}$$

เมื่อ

$\boldsymbol{y_{iljl}}$ = ค่าสังเกต

$\boldsymbol{\mu}$ = ค่าเฉลี่ย

$\boldsymbol{\tau_i}$ = อิทธิพลของทรีทเมนต์ เมื่อ $\boldsymbol{i = 1, 2}$

$\boldsymbol{\iota_j}$ = อิทธิพลของเวลาที่อุ่นน้ำเชื้อ เมื่อ $\boldsymbol{j = 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6}$

$\boldsymbol{P_k}$ = อิทธิพลของชุดน้ำเชื้อ เมื่อ $\mathbf{k=1, 2, 3}$

$\boldsymbol{\tau\iota_{ij}}$ = อิทธิพลร่วมระหว่างทรีทเมนต์และเวลาในการอุ่นน้ำเชื้อ

$\boldsymbol{\varepsilon_{ijkl}}$ = ความคลาดเคลื่อน

การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการคัดแยกเพศอสุจิด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกันต่อสัดส่วนเพศลูกแพะ

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการคัดแยกเพศอสุจิด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกันต่อสัดส่วนเพศลูกแพะ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

แม่แพะทดลอง

คัดเลือกแม่แพะพันธุ์ลูกผสมของเกษตรกรจำนวน 90 ตัว ที่เลี้ยงในพื้นที่จังหวัดตรังและนครศรีธรรมราช โดยคัดเลือกแม่แพะจากฟาร์มที่มีการเลี้ยงแพะจำนวน 10-20 แม่ขึ้นไป แพะทดลองมีน้ำหนักประมาณ 25-30 กิโลกรัม มีคะแนนร่างกายอยู่ในช่วง 3-3.5 (คะแนน 1-5) เป็นแม่แพะท้องที่ 1 หรือมากกว่า มีสุขภาพแข็งแรง มีการจัดการเลี้ยงดูแบบขังและปล่อยในทุ่งหญ้า มีการเสริมอาหารข้นโปรตีนไม่ต่ำกว่า 12 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 0.2-0.5 กิโลกรัมต่อตัวต่อวัน ทำการแบ่งแม่แพะในแต่ละฟาร์มที่ถูกคัดเลือกออกเป็น 2 กลุ่ม เพื่อฉีดน้ำเชื้อผสมเทียม โดยกลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม (Control) จำนวน 46 ตัว ได้รับการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ไม่แยกเพศ ส่วนกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มทดลอง (Treatment) จำนวน 44 ตัว ได้รับการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่แยกเพศอสุจิที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์

การผสมเทียม

ทำการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งให้กับแม่แพะทดลองทุกตัว โดยการฉีดน้ำเชื้อที่ตำแหน่งคอมดลูก (Cervical artificial insemination) ภายหลังแม่แพะแสดงอาการเป็นสัด ยืนนิ่ง 12-24 ชั่วโมง หากแพะยังแสดงอาการเป็นสัดให้ผสมซ้ำครั้งที่สองหลังจากครั้งแรก 12 ชั่วโมง (แม่แพะที่ได้รับการฉีดน้ำเชื้อผสมเทียม 1 ครั้ง มีจำนวน 75 ตัว และแม่แพะที่ได้รับการฉีดน้ำเชื้อผสมเทียม 2 ครั้ง มีจำนวน 15 ตัว) ซึ่งวิธีการผสมเทียมมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

การเตรียมน้ำเชื้อก่อนผสมเทียม

คีบหลอดน้ำเชื้อที่ต้องการออกจากถังสนาม แล้วทำการละลายน้ำเชื้อโดยใส่ลงในกระติกเทอร์มอสที่มีน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 35-37 °C ทันที นานเป็นเวลา 30 วินาที และใช้เวลาตั้งแต่คีบหลอดน้ำเชื้อจนถึงแช่ลงในน้ำอุ่นไม่เกินกว่า 3 วินาที เมื่อละลายน้ำเชื้อในน้ำอุ่นครบ 30 วินาทีแล้ว ใช้ปากคีบคีบหลอดน้ำเชื้อขึ้นมาเช็ดหลอดน้ำเชื้อด้วยกระดาษทิชชูให้แห้งไม่ให้เหลือน้ำติดข้างหลอด สะบัดหลอดน้ำเชื้อให้ฟองอากาศไปอยู่ด้านที่ตีบ และตัดด้านที่ตีบโดยตัดระหว่างฟองอากาศ สอด

หลอดน้ำเชื้อด้านที่ตัดเข้าไปในพลาสติกชีท และดันต่อเข้าไปจนสุด หลอดน้ำเชื้อจะล็อกกับจุกสีเขียวในพลาสติกชีท ดึงก้านปืนออกมาจากตัวปืนประมาณ 1 คืบแล้วสวมพลาสติกชีทที่มีหลอดน้ำเชื้ออยู่ภายในครอบปืนฉีดน้ำเชื้อ ดันตัวปืนไปจนสุดพลาสติกชีท ใช้วงแหวนล็อคพลาสติกชีทให้ติดตัวปืนและล็อคให้แน่น

เทคนิคการผสมเทียมแพะ

เทคนิคการผสมเทียมแพะ ตามวิธีของ บรรจง (2554) โดยให้ผู้ช่วยทำการจับแม่แพะ ยกส่วนท้ายสูงขึ้นให้ขาหลังลอยจากพื้น ล้างบริเวณอวัยวะเพศด้วยสบู่และน้ำสะอาด เช็ดให้แห้ง ใช้เครื่องถ่างอวัยวะเพศถ่างช่องคลอด โดยการหยดสารหล่อลื่นแล้วสอดเข้าในช่องคลอด ดันลึกขึ้นด้านบนเล็กน้อย ใช้ไฟฉายส่องตรวจจนเห็นปากมดลูกอยู่ปลายสุด สอดปืนฉีดน้ำเชื้อที่เตรียมไว้แล้วผ่านปากมดลูก ปล่อยน้ำเชื้อในคอมดลูก แล้วดึงปืนฉีดน้ำเชื้อออกมา พยุงก้นแม่แพะให้อยู่ในท่ายกท้ายสูง 2-3 นาที แล้วจึงปล่อยแม่แพะ (แสดงดังภาพที่ 5 ในภาคผนวก ก)

ทำการตรวจการตั้งท้องด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ 45-60 วัน หลังผสมเทียม โดยประกอบอุปกรณ์เครื่องอุลตราซาวด์ส่วนของตัวเครื่อง สายเคเบิล และ Probe เข้าด้วยกัน แล้วทำการปรับเครื่องไปที่ B- mode เลือกใช้ความถี่ 7.5 MH ให้ผู้ช่วยจับแม่แพะให้อยู่ในท่ายืน ใช้นิ้วชี้และนิ้วกลางมือข้างที่ไม่ถนัดล้วงมูลแพะออกมาให้มากที่สุด ทาเจลที่ Probe แล้วสอดเข้าทางทวารหนักเบา ๆ ค่อย ๆ สอดจนสังกตเห็นถุงปัสสาวะปรากฏบนหน้าจอภาพ ให้สังเกตบริเวณด้านหน้าและล่างของถุงปัสสาวะ ถ้าแม่แพะตั้งท้องจะตรวจพบลักษณะเป็นโพรง หรือลักษณะของถุงน้ำคร่ำหรือตัวอ่อน กดปุ่มบันทึกภาพที่ตัวเครื่องเมื่อพบลักษณะของการตั้งท้อง ถ้าแม่แพะไม่ท้องจะตรวจพบการเคลื่อนตัวของลำไส้ เมื่อตรวจเสร็จแล้วให้ทำการถอย Probe ออกมา ทำความสะอาด ถอดแยกส่วนประกอบ และชาร์ตแบตเตอรี่ เพื่อเก็บไว้ใช้ครั้งต่อไป (แสดงเทคนิคการตรวจการตั้งท้องด้วยเครื่องอัลตราซาวด์ดังภาพที่ 6 ในภาคผนวก ก) หลังจากนั้นเมื่อแม่แพะคลอดจึงตรวจสอบเพศลูกแพะ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลเพศของลูกแพะแรกเกิดถูกนำมาคำนวณสัดส่วนเพศของลูกแรกเกิดเปรียบเทียบกับจำนวนแพะทดลองทั้งหมด ข้อมูลที่ได้วิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองด้วยวิธีไคสแควร์ (Chi-square) ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Statistical Analysis System (SAS)

บทที่ 3

ผลการศึกษา

ผลของการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกันต่อคุณภาพอสุจิแพะหลังการทำละลาย

จากการศึกษาผลของการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ต่อคุณภาพอสุจิหลังละลายที่ชั่วโมงต่างๆ (0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6) พบว่า อิทธิพลร่วมระหว่างการปั่นเหวี่ยงและเวลามีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.01$) ต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ ($P<0.01$) สำหรับค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ ค่าความเร็วในการเคลื่อนที่ (VAP, VSLและ VCL) ค่าลักษณะการเคลื่อนที่ (ALH, STR และ LIN) อิทธิพลร่วมระหว่างการปั่นเหวี่ยงและเวลาไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และอิทธิพลของการปั่นเหวี่ยงมีผลต่อค่าต่างๆ เหล่านี้อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.01$) (Table 2-4) เมื่อพิจารณาแนวโน้มคุณภาพน้ำเชื้อหลังละลายจากชั่วโมงที่ 0 ถึง 6 พบว่า ค่าการเคลื่อนที่และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิของกลุ่มที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์มีค่าลดลงอย่างช้าๆ และลดลงน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง (Figure 1)

จากผลการทดลองที่แสดงดัง Table 2 พบว่า อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิในน้ำเชื้อสดมีค่าเท่ากับ 73.4 และ 71.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่หลังนำมาแช่เย็นด้วยตู้ควบคุมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ก่อนทำการแช่แข็ง พบว่าค่าอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิมีค่าเพิ่มขึ้นทั้งสองกลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม มีค่าเท่ากับ 89.53 และ 85.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และกลุ่มทดลอง มีค่า 90.70 และ 84.90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังทำละลายที่ชั่วโมง 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 พบว่า กลุ่มควบคุมมีค่าอัตราการเคลื่อนที่ เท่ากับ 52.77, 61.25, 52.57, 43, 33.53, 27.33 และ 16.57 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเท่ากับ 49.83, 52.87, 50.27, 39.93, 31.02, 24.58 และ 15.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนกลุ่มทดลองมีค่าอัตราการเคลื่อนที่เท่ากับ 72.93, 69.75, 77.16, 68.04, 77.79, 70.26 และ 66.38 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ อัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเท่ากับ 68.66, 67.95, 72.31, 62.11, 66.79, 64.78 และ 53.56 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ค่าความเร็วในการเคลื่อนที่ที่แสดงดัง Table 3 พบว่า ค่า VAP ของน้ำเชื้อสดมีค่า 159.63 µm/s และก่อนการแช่แข็งน้ำเชื้อในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีค่า 90.83 และ 87.33 µm/s ตามลำดับ ค่า VAP ของน้ำเชื้อหลังละลายชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ของกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 94.07, 67.43, 75.28, 63.41, 59.13 ,42.69 และ 49.76 µm/s ตามลำดับ และกลุ่มทดลองมีค่าเท่ากับ 71.92, 81.67, 75.79, 79.67, 62.27, 64.61 และ 56.7 µm/s ตามลำดับ ค่า

ความเร็วในการเคลื่อนที่ VSL ของน้ำเชื้อสดมีค่า 148.03 μm/s และก่อนการแช่แข็งน้ำเชื้อในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีค่า 68.94 และ 73.12 μm/s ตามลำดับ ค่า VSL ของน้ำเชื้อหลังละลายชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ของกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 76.87, 55.28, 62.38, 53.21,50.19, 36.88 และ 42.71 μm/s ตามลำดับ และกลุ่มทดลองมีค่า 68.68, 62.63, 66.65, 52.68, 55.2 และ 51.58 μm/s ตามลำดับ ค่าความเร็วในการเคลื่อนที่ VCL ของน้ำเชื้อสดมีค่า 184.35 และก่อนการแช่แข็งน้ำเชื้อในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีค่า 172.81 และ 128.05 μm/s ตามลำดับ ค่า VCL ของน้ำเชื้อหลังละลายชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ของกลุ่มควบคุมมีค่า 147.65, 104.26, 115.66, 97.1, 94.31, 68.03 และ 80.44 μm/s ตามลำดับ และกลุ่มทดลองมีค่า 111.27, 123.27, 114.12, 114.94, 91.76, 94.66 และ 70.51 μm/s ตามลำดับ

ค่าลักษณะการเคลื่อนที่ที่แสดงดัง Table 4 พบว่า ค่า ALH ของน้ำเชื้อสดมีค่าเท่ากับ 4.78 μm และก่อนการแช่แข็งน้ำเชื้อในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีค่า 8.96 และ 6.53 μm ตามลำดับ ค่า ALH ของน้ำเชื้อหลังละลายชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ของกลุ่มควบคุมมีค่า 6.85, 5.21, 5.64, 4.82, 5.36, 3.81 และ 4.61 μm ตามลำดับ และกลุ่มทดลองมีค่า 5.34, 5.23, 5.34, 5.42, 4.15, 4.27 และ 3.32 μm ตามลำดับ ค่าลักษณะการเคลื่อนที่ BCF ของน้ำเชื้อสดมีค่าเท่ากับ 36.65 μm และก่อนการแช่แข็งน้ำเชื้อในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีค่า 22.93 และ 23.72 Hz ตามลำดับ ค่า BCF ของน้ำเชื้อหลังละลายชั่วโมง 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ของกลุ่มควบคุมมีค่า 24.37, 24.14, 24.8, 23.43, 23.6, 24.63 และ 20 Hz ตามลำดับ และกลุ่มทดลองมีค่า 25.51, 20.61, 25, 25.32, 26.41, 26.6 และ 28.4 Hz ตามลำดับ ค่าลักษณะการเคลื่อนที่ STR ของน้ำเชื้อสดมีค่าเท่ากับ 91.75 เปอร์เซ็นต์ และก่อนการแช่แข็งน้ำเชื้อในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีค่า 71.77 และ 82.69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ค่า STR ของน้ำเชื้อหลังละลายชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ของกลุ่มควบคุมมีค่า 82.05, 83.25, 83.16, 84.95, 84.86, 87.2 และ 70.09 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และกลุ่มทดลองมีค่า 82.8, 72.23, 83.32, 82.27, 84.64, 85.03 และ 94.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ค่า LIN ของน้ำเชื้อสดมีค่าเท่ากับ 80.35 เปอร์เซ็นต์ และก่อนการแช่แข็งน้ำเชื้อในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีค่า 36.71 และ 57.64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ค่า LIN ของน้ำเชื้อหลังละลายชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ของกลุ่มควบคุมมีค่า 53.97, 55.33, 57.58, 55.19, 59.16, 45.33 และ 56.05 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ กลุ่มทดลองมีค่า 54.88, 57.52, 58.05, 58.62, 60.01, 72.65 และ 56.39 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Table 2 Effect of centrifugation using Percoll density gradient on post-thawed spermatozoa motility

Parameters	Fresh semen	Before freeze	Post-thawed sperm quality 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 (%)	71.3									NS	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	

** Significant differences (P<0.01); NS= No significant differences (P>0.05)

Table 3 Effect of centrifugation using Percoll density gradient on post-thawed spermatozoa velocity

Parameters	Fresh semen	Before freeze	Post-thawed sperm quality at							Treatment	Treatment*Time
			0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h		
VAP (µm/s)	159.63									NS	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	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	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	

NS= No significant differences (P>0.05); VAP=Average path velocity (µm/s), VSL=Straight-line velocity (µm/s), VCL=Curvilinear velocity (µm/s)

Table 4 Effect of centrifugation using Percoll density gradient on post-thawed spermatozoa kinetic movement

Parameters	Fresh semen	Before freeze	Post-thawed sperm quality at							Treatment	Treatment*Time
			0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h	6 h		
ALH (μm)	4.78									NS	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	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	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	83.6	
LIN (%)	80.35									NS	NS
Control		36.71	53.97	55.09	55.33	57.58	55.19	59.16	45.33	56.05	
Centrifugation		57.64	54.88	49.23	57.52	58.05	58.62	60.01	72.65	56.39	

NS= No significant differences (P>0.05); ALH= Amplitude of lateral head displacement (μm), BCF=Beat cross frequency (Hz) STR=Straightness (%) LIN=Linearity (%)

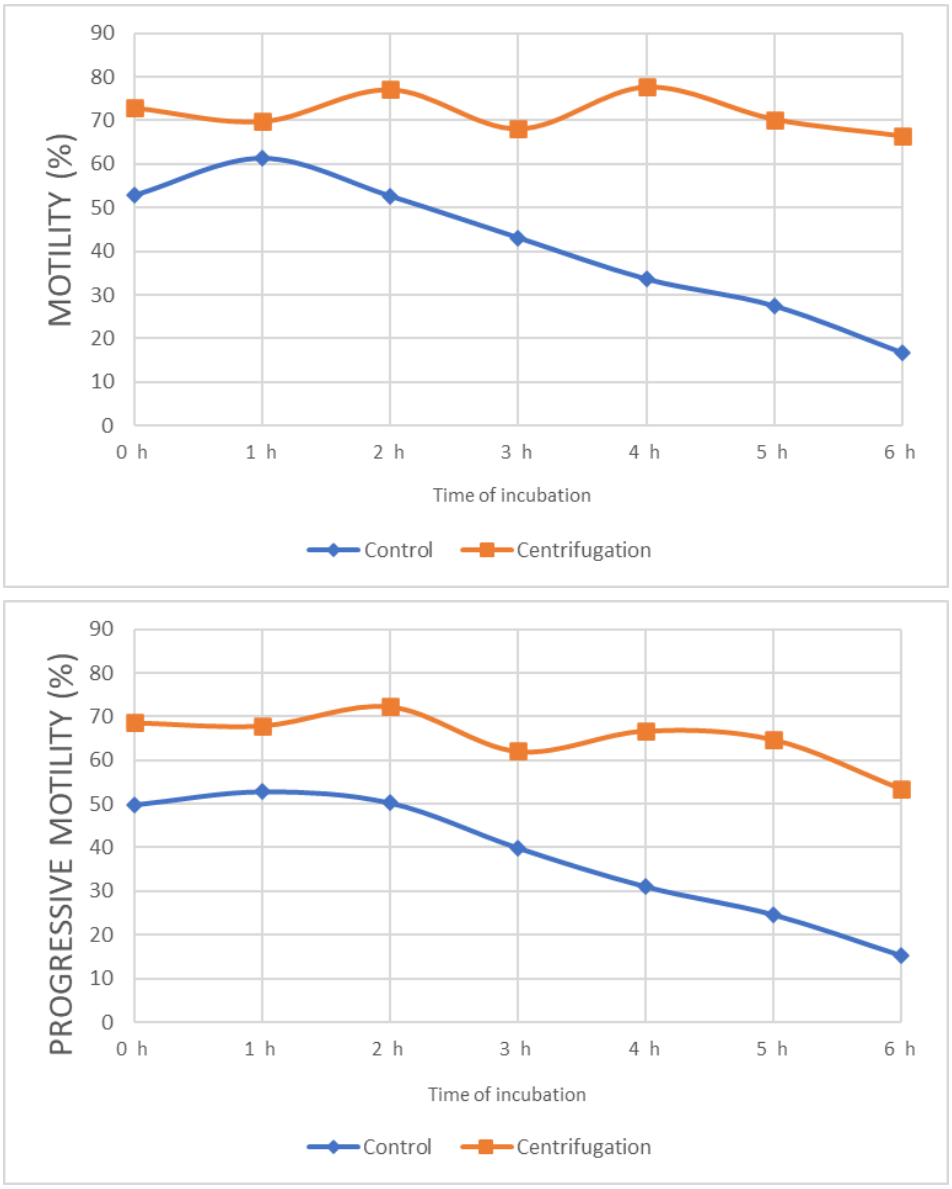

Figure 1 The percentage of post-thawed motility and progressive motility of sperm with and without centrifugation using Percoll density gradient

จากผลการทดลองดัง Figure 1 แสดงคุณภาพอสุจิหลังละลายจากชั่วโมงที่ 0 ถึง 6 พบว่า ค่าการเคลื่อนที่และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของกลุ่มควบคุมชั่วโมงที่ 0 ถึง 1 มีค่าเพิ่มขึ้น หลังจากนั้นมีค่าลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 6 สำหรับค่าการเคลื่อนที่และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิของกลุ่มทดลองในช่วง 2 ชั่วโมงแรกมีค่าค่อนข้างสม่ำเสมอและลดลงอย่างช้าๆ จนถึงชั่วโมงที่ 6 และลดลงน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลของการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการคัดแยกเพศอสุจิด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกันต่อสัดส่วนเพศลูกแพะ

ภายหลังการผสมเทียมให้กับแม่แพะด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ไม่ผ่านการแยกเพศ (กลุ่มควบคุม) และที่ผ่านการแยกเพศอสุจิโดยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกัน (กลุ่มทดลอง) พบว่า อัตราการผสมติดมีค่าเท่ากับ 78.26 (36/46) และ 70.45 (31 /44) เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ในกลุ่มควบคุมมีจำนวนลูกแพะทั้งหมด 46 ตัว (จากแม่แพะที่คลอดลูกในกลุ่มควบคุมจำนวน 36 ตัว) แบ่งเป็นลูกแพะเพศเมีย 21 ตัว และลูกแพะเพศผู้ 25 ตัว ส่วนในกลุ่มทดลองมีจำนวนลูกแพะทั้งหมด 44 ตัว (จากแม่แพะที่คลอดลูกในกลุ่มควบคุมจำนวน 31 ตัว) แบ่งเป็นลูกแพะเพศเมีย 31 ตัว และลูกแพะเพศผู้ 13 ตัว สัดส่วนเพศของลูกแพะของทั้งสองกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.0172$) (Table 5) โดยพบว่า สัดส่วนลูกแพะเพศเมียและเพศผู้ของกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 45.65 และ 54.35 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มทดลองมีค่าเท่ากับ 70.45 และ 29.55 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Table 5 Sex ratio of kids obtained after artificial insemination with or without sperm sexed by Percoll density gradient centrifugation

Group	No. inseminated does	No. pregnant does	Total kid born	No. female kids	No. male kids
Unsexed sperm	46	36 (78.26%)	46	21 (45.65%)	25 (54.35%)
Sexed sperm	44	31 (70.45%)	44	31 (70.45%)	13 (29.55%)
Total	**90**	**67**	**90**		

Chi-square P= 0.0172

บทที่ 4

วิจารณ์

ผลของการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกันต่อคุณภาพอสุจิแพะหลังการทำละลาย

จากผลการศึกษาการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ต่อคุณภาพอสุจิหลังละลาย ที่พบอิทธิพลร่วมระหว่างอิทธิพลการปั่นเหวี่ยงและเวลาในการบ่มน้ำเชื้อที่ชั่วโมงต่างๆ (0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6) อธิบายได้ว่า

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการปั่นเหวี่ยงอสุจิแพะด้วยสารละลายเพอร์คอลล์ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็งมีคุณภาพไม่แตกต่างจากการไม่ปั่นเหวี่ยง โดยทำให้การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วในการเคลื่อนที่ (VAP, VSL และ VCL) และลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ (ALH, STR และ LIN) ไม่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงถึงอสุจิมีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้ดีภายหลังการปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลายเพอร์คอลล์

คุณภาพอสุจิแพะหลังการทำละลายภายหลังการแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว ในน้ำเชื้อกลุ่มที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลายเพอร์คอลล์มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ได้ตามเกณฑ์การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งของกรมปศุสัตว์ คือ อัตราการเคลื่อนที่ไม่ต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์

คุณภาพน้ำเชื้อแพะหลังละลายจากการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่า ให้ผลไปในทางเดียวกันกับที่มีรายงานในสัตว์ชนิดอื่นๆ Batista *et al*. (2011) ทำการศึกษาการปั่นเหวี่ยงอสุจิแพะด้วยสารละลายเพอร์คอลล์แล้วตรวจคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง พบว่า มีค่าอัตราการเคลื่อนที่เท่ากับ 61.2±7.5 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้น กรวิการ์ และคณะ (2531) ศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อสุกรภายหลังการปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลายเพอร์คอลล์ พบว่า ที่ชั้นเพอร์คอลล์ระดับความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชั้นอื่นๆ คือ มีค่าเท่ากับ 87.62 และ 85 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ Noguchi *et al*. (2013) ทำการเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อสุกรระหว่างกลุ่มที่ไม่ปั่นเหวี่ยงกับกลุ่มที่ปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลายเพอร์คอลล์ พบว่า ในกลุ่มที่ปั่นเหวี่ยงมีคุณภาพน้ำเชื้อดีขึ้น คือ มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ปั่นเหวี่ยง Samardzija *et al*. (2006) นำน้ำเชื้อโคไปปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลายเพอร์คอลล์ พบว่า ภายหลังการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อมีค่าอัตราการเคลื่อนที่เท่ากับ 63±4.3 เปอร์เซ็นต์ Promthep และคณะ (2016) ทำการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อโคนมโดยการใช้สารละลายเพอร์คอลล์ 7 ชั้น พบว่า ภายหลังการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อที่ชั้นต่างระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ 65-70 เปอร์เซ็นต์ คุณภาพน้ำเชื้อมีค่าสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด คือ มีค่าอัตราการเคลื่อนที่ไป

ข้างหน้าเท่ากับ 95.86 และ 92.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า จากการศึกษาของนักวิจัยหลายๆ ท่าน และในหลากหลายชนิดสัตว์ คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการปั่นเหวี่ยงของสารละลายเพอร์คอลล์ดีขึ้น

นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาแนวโน้มคุณภาพน้ำเชื้อหลังละลายจากชั่วโมงที่ 0 ถึง 6 พบว่า ค่าการเคลื่อนที่และการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิของกลุ่มที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์มีค่าลดลงอย่างช้าๆ และลดลงน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง แสดงให้เห็นว่า น้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลายเพอร์คอลล์มีคุณภาพดีกว่าการผลิตน้ำเชื้อในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นการผลิตน้ำเชื้อโดยทั่วไป การศึกษาในลักษณะนี้อาจจะมีประโยชน์ในการนำไปปรับปรุงวิธีการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต เพราะแสดงว่าน้ำเชื้อที่ผ่านกระบวนการนี้อยู่ได้ยาวนานกว่าปกติ ในการปฏิบัติงานผสมเทียมหากน้ำเชื้ออยู่ได้ยาวนานภายหลังการผสมเทียมซึ่งน้ำเชื้อต้องอยู่ในช่องคลอดก็สามารถเพิ่มอัตราผสมติดได้

การที่คุณภาพน้ำเชื้อหลังละลายของกลุ่มที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลายเพอร์คอลล์มีคุณภาพดีกว่ากลุ่มควบคุม น่าจะเนื่องมาจาก ในสารละลายเพอร์คอลล์ที่นำมาใช้มีส่วนประกอบของ Bovine Serum Albumin (BSA) Sarıözkan *et al*. (2013) รายงานว่า BSA สามารถปกป้องความเสียหายของอสุจิกระต่ายแช่แข็งและปกป้องผิวของอสุจิจากปฏิกิริยาออกซิแดนส์ โดยทำให้ค่าความผิดปกติของอะโครโซมภายหลังละลายชั่วโมงที่ 72 มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม และมีค่า HOST test ที่ชั่วโมง 48 และ 72 มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม และมีผลทำให้ค่าความเสียหายของอสุจิชั่วโมงที่ 48 และ 72 มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

Gokce *et al*. (2017) ศึกษาผลของระดับ BSA ที่แตกต่างกันในสารละลาย soybean-lecithin ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแกะ ผลการศึกษาพบว่า การเสริม BSA ที่ความเข้มข้น 5, 7.5 และ 10 mg/ml มีผลทำให้ค่าคุณภาพน้ำเชื้อดีขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยค่าคุณภาพน้ำเชื้อดีขึ้นที่ระดับ BSA 5 และ 7.5 mg/ml และความเข้มข้น BSA ที่ระเบ 10 mg/ml คุณภาพน้ำเชื้อมีแนวโน้มลดลง

Mahdi *et al*. (2019) รายงานว่า การเสริม BSA ที่ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ในมีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อมีค่าอัตราการเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นและมีผลต่อความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มตัวอสุจิและลดการตายของอสุจิและลดความเสียหายของไมโตคอนเดรียภายหลังละลายน้ำเชื้อ แต่ที่ความเข้มข้น 7.5 เปร์เซ็นต์ และกลุ่มควบคุมคุณภาพน้ำเชื้อมีค่าไม่แตกต่างกัน

Akhter *et al*. (2014) รายงานว่า การสริม BSA มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อกระบือหลังละลาย โดยไปมีผลทำให้ ค่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ เยื่อหุ้มเซลส์ ค่าลักษณะการเคลื่อนที่ ความเสียหายของ DNA ในชั่วโมงที่ 0, 2 และ 4 หลังละลาย ดีขึ้น

Perumal *et al*. (2014) ทำการทดลองเพื่อศึกษาผลของ BSA ต่อคุณภาพน้ำเชื้อพ่อโคหลังละลาย พบว่า BSA มีผลทำให้เปอร์เซนต์การตายของตัวอสุจิ ความผิดปกติของตัวอสุจิและ

ความผิดปกติของอะโครโซมในชั่วโมงต่างๆ ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ความเข้มข้น BSA ที่ 5 mg/ml สามารถทำให้คุณภาพน้ำเชื้อดีกว่าที่ความเข้มข้น 10 และ 20 mg/ml ภายหลังการแช่แข็งที่ 30 ชั่วโมง

นอกจากนี้ อิทธิพลของการปั่นเหวี่ยงแยกเซมินอลพลาสมายังมีผลทำให้คุณภาพอสุจิดีขึ้นด้วย Daramola (2017) ทำการศึกษาผลของการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อแพะและแยกเซมินอลพลาสมาออก โดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 500g จำนวน 1, 2 และ 3 ครั้ง และเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อกับกลุ่มควบคุม พบว่า ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อดีขึ้น เปอร์เซ็นต์อะโครโซมและกระบวนการ capacitation ดีขึ้น โดยพบว่า คุณภาพน้ำเชื้อจะเพิ่มขึ้นตามจำนวนการปั่นล้าง การปั่นล้างมากครั้งยิ่งทำให้คุณภาพน้ำเชื้อดีมากขึ้น

ภูเบศวร์ และคณะ (2555) รายงานว่า อสุจิที่ผ่านการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที มีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ความเร็วเฉลี่ยในการเคลื่อนที่ ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวตรง ความเร็วการเคลื่อนที่ในแนวโค้ง และอสุจิมีชีวิตสูงกว่าอสุจิที่ผ่านการปั่นด้วยความเร็ว 500 รอบต่อนาที นอกจากนี้ ยังพบอิทธิพลร่วมระหว่างการปั่นโดยใช้ความเร็ว 1500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 3 นาที ส่งผลดีต่อลักษณะการเคลื่อนที่ทั้งหมด และอสุจิมีชีวิต การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยความเร็วสูงและใช้เวลาน้อยส่งผลดีทั้งลักษณะการเคลื่อนที่และตัวอสุจิมีชีวิตในน้ำเชื้อที่ผ่านกระบวนการแช่แข็ง

วรพงษ์ และจรรยาพร (2560) ทำการศึกษาผลของวิธีการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาด้วยสารละลายเพอร์คอลล์ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกร แบ่งน้ำเชื้อออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม ปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยไม่เติมสารละลายเพอร์คอลล์ กลุ่มที่ 2 เติมสารละลายเพอร์คอลล์ ชั้นเดียวที่ 80 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มที่ 3 ใช้สารละลายเพอร์คอลล์สองชั้น ชั้นที่ 1 ความเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ และชั้นที่ 2 ความเข้มข้น 45 เปอร์เซ็นต์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่า การปั่นแยกเซมินอลพลาสมาโดยใช้สารละลายเพอร์คอลล์ทั้งแบบชั้นเดียวและแบบสองชั้นมีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรดีกว่าการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาแบบไม่ใช้สารละลายเพอร์คอลล์ โดยคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรภายหลังการละลายจากการปั่นแยกด้วยสารละลายเพอร์คอลล์แบบสองชั้นดีกว่าการปั่นแยกด้วยสารละลายเพอร์คอลล์แบบชั้นเดียว

ผลของการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการคัดแยกเพศอสุจิด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกันต่อสัดส่วนเพศลูกแพะ

อัตราการผสมติดจากการผสมเทียมในการทดลองนี้มีค่าเท่ากับ 78.26 และ 70.21 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ตามลำดับ ซึ่งอัตราผสมติดมีค่าค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานอื่นๆ ที่มีการศึกษาในแพะ จากรายงานของ Andrabi *et al*. (2018) ที่เปรียบเทียบอัตราผสมติดจากการผสมเทียมแพะด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งหลังจากแพะแสดงอาการเป็นสัดยืนนิ่ง 12 ชั่วโมง พันธุ์บีเทิลและพันธุ์แจทเทิล พบว่า ให้อัตราผสมติดที่ไม่แตกต่างกัน คือ 50 เปอร์เซ็นต์ (7/14) และ 34 เปอร์เซ็นต์ (10/29) ตามลำดับ จากรายงานของ นิวัตน์ และคณะ (2550) ซึ่งทำการเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะพันธุ์ซาเนน ด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด (CIDR-G) ร่วมกับ $PGF_2\alpha$ และ PMSG และผสมเทียมแบบกำหนดเวลาด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีความเข้มข้น 200 ล้านตัวต่อโด๊ส ในชั่วโมงที่ 48 และชั่วโมงที่ 72 พบว่า มีอัตราการผสมติดที่ร้อยละ 52 พีระพงษ์ และสาโรช (2553) ศึกษาผลของใช้ (CIDR-G) และ Chornogest ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมในแพะซาเนนด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีความเข้มข้น 200 ล้านตัวต่อโด๊ส พบว่า มีอัตราการผสมติดร้อยละ 39.9-43.1 และมาลี และคณะ (2556) ทำการเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วยฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด (CIDR-G) และผสมเทียมแพะระยะ 5 วัน ชั่วโมงที่ 49 และ 73 รายงานอัตราผสมติดเท่ากับ 28.9-34.2 เปอร์เซนต์ รายงานของ วิศิษฐ และคณะ (2561) เปรียบการผสมเทียมแพะครั้งเดียวและสองครั้ง และเหนี่ยวนำการเป็นสัดแพะโดยใช้โปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด (CIDR-G) ตามวิธีของ นิวัตน์ และคณะ (2550) รายงานผลอัตราผสมติดที่ 50 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลการผสมเทียมแพะครั้งเดียวและสองครั้งไม่มีความแตกต่างกัน พีรศักดิ์ (2548) เหนี่ยวนำการเป็นสัดโดยใช้โปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด (CIDR-G) และผสมเทียมเพียงครั้งเดียว ชั่วโมงที่ 43-45 ได้อัตราการผสมติด 60-65 เปอร์เซ็นต์ จากรายงานของ Houdeau *et al.* (2008) ผสมเทียมระยะสั้นโดยใช้ fluorogestone acetate intravaginal sponges (FGA, 40 mg) ฝังไว้ในช่องคลอดระยะ 11 วัน ร่วมกับการใช้ฮอร์โมน cloprostenol ปริมาณ 50 mg และ eCG ขนาด 250 IU ฉีดก่อนถอดฮอร์โมน fluorogestone acetate intravaginal sponge ที่เวลา 48 ± 2 ชั่วโมง และ ผสมเทียมชั่วโมงที่ 45 หลังถอดฮอร์โมนพบว่าให้อัตราผสมติดที่ 52.9 - 68.8 เปอร์เซ็นต์ รายงานของ Dovenski *et al.* (1997) ผสมเทียมแพะด้วยวิธีผ่านคอมดลูกให้อัตราผสมติดได้ถึง 67.48 เปอร์เซ็นต์

นอกจากนี้ มีรายงานอัตราการผสมติดที่ทำการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่ผ่านการแยกเพศอสุจิในโค จากรายงานของ Promthep และคณะ (2016) ที่ทำการคัดแยกเพศน้ำเชื้อในโคนมโดยการใช้สารละลายเพอร์คอลล์ 7 ชั้น คือ 80, 75, 70, 65, 60, 50 และ 40 เปอร์เซ็นต์ พบว่า สามารถแยกอสุจิ X ได้ 60.75 เปอร์เซ็นต์ ที่ชั้น 65-70 เปอร์เซ็นต์ และหลังจากนำอสุจิที่แยกเพศแล้วไปผสมเทียมได้อัตราผสมติดที่ 40 เปอร์เซ็นต์ Lima และคณะ (2015) ศึกษาการปฏิสนธิของตัวอ่อนโคภายหลังการปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลายเพอร์คอลล์ พบว่า ให้ผลแตกต่างกัน คือ มีอัตราการตั้งท้องที่สูงกว่ากลุ่มที่ไม่ปั่นเหวี่ยง

การทดลองนี้ทำการผสมเทียมให้กับแม่แพะที่เป็นสัดเองตามธรรมชาติและแม่แพะทดลองส่วนใหญ่ได้รับการฉีดน้ำเชื้อผสมเทียมเพียงครั้งเดียว ถึงแม้ว่าตามมาตรฐานของการฉีดน้ำเชื้อผสมเทียมแพะแนะนำให้ผสมเทียม 2-3 ครั้ง ห่างกัน 12 ชั่วโมง แต่ด้วยข้อจำกัดของการปฏิบัติงานในพื้นที่ และการทดลองนี้ใช้แพะทดลองจากฟาร์มเกษตรกรและใช้อาสาสมัครผสมเทียมของกรมปศุสัตว์ ซึ่งการปฏิบัติงานส่วนใหญ่ผสมเทียมเพียงครั้งเดียวเนื่องจากแพะเป็นสัดชัดเจนและไม่เป็นสัดซ้ำอีก 12 ชั่วโมง จากการทดลองนี้มีค่าอัตราการผสมติดค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานอื่นๆ อาจเป็นเพราะ ประสบการณ์ของเจ้าหน้าที่ผสมเทียม เทคนิคการผสมเทียมที่ดี การคัดเลือกแม่พันธุ์ที่ดูจากคะแนนร่างกาย (3-3.5) ซึ่งปัจจัยเหล่านี้มีผลทำให้อัตราผสมติดสูงขึ้น

จากผลการศึกษาครั้งนี้ เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนลูกเพศเมียต่อลูกเพศผู้จากการผสมเทียมให้กับแม่แพะด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ไม่ผ่านการแยกเพศ (กลุ่มควบคุม) และที่ผ่านการแยกเพศอสุจิโดยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกัน (กลุ่มทดลอง) พบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า วิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์สามารถนำมาใช้ในคัดแยกเซลส์อสุจิเพื่อนำไปผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งและนำไปฉีดผสมเทียมให้กับแม่แพะและให้ลูกเพศเมียที่มีอัตราสูงขึ้นกว่าปกติได้ ผลจากการศึกษาครั้งนี้ให้ผลสอดคล้องกับที่มีรายงานการศึกษาในโค Resende *et al*. (2011) ทำการคัดแยกเซลส์อสุจิโคด้วยสารละลายเพอร์คอลล์ แล้วนำไปปฏิสนธิในหลอดทดลอง ได้ตัวอ่อนที่ได้มีอัตราส่วนของเพศเมียสูง 62.0 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับรายงานของ Lima และคณะ (2015) ที่รายงานว่าการคัดแยกเพศอสุจิโคผ่านชั้นสารละลายเพอร์คอลล์และออปติเปป ได้สัดส่วนลูกเพศเมียแตกต่างจากกลุ่มทดลองที่ไม่คัดแยกอสุจิ 68.1-70.8 เปอร์เซ็นต์ และรายงานของ Lucio และคณะ (2012) ที่ทำการแยกเพศอสุจิโคด้วยเพอร์คอลล์แล้วตรวจสัดส่วนเพศจากตัวอ่อน พบว่า มีอัตราส่วนของเพศเมียสูง 59.4 เปอร์เซ็นต์ และจากการศึกษาของ Promthep และคณะ (2016) ที่ทำการคัดแยกเพศน้ำเชื้อในโคนมโดยการใช้สารละลายเพอร์คอลล์ 7 ชั้น คือ 80, 75, 70, 65, 60, 50 และ 40 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถแยกอสุจิ X ได้ 60.75 เปอร์เซ็นต์ ที่ชั้น 65-70 เปอร์เซ็นต์ และหลังจากนำอสุจิที่แยกเพศแล้วไปผสมเทียมได้สัดส่วนลูกเกิดเพศเมีย 71.43 เปอร์เซ็นต์ (30/42) นอกจากนี้ มีรายงานในกระต่าย พบว่า การปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้น 45-90 เปอร์เซ็นต์ ได้ลูกกระต่ายเพศเมียต่อเพศผู้เท่ากับ 65.8 และ 34.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Hussein, 2014) การศึกษาในแกะ พบว่า การปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ ได้สัดส่วนอสุจิ X มากกว่า Y ส่วนในแพะมีค่าใกล้เคียงกัน (Ferreira *et al.*, 2017) มีรายงานในคน พบว่า การคัดแยกเพศอสุจิด้วยสารละลายเพอร์คอลล์ 12 ชั้น (25-80 เปอร์ซ็นต์) สามารถใช้แยกอสุจิได้โดยมีอัตราส่วนของอสุจิที่มีโครโมโซม X : Y เท่ากับ 55.1 : 41.1 (1.35) (Wang *et al.*, 1994)

บทที่ 5

สรุป และข้อเสนอแนะ

สรุป

1. คุณภาพอสุจิแพะหลังการทำละลายที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลายเพอร์คอลล์มีคุณภาพดี การปั่นเหวี่ยงอสุจิแพะด้วยสารละลายเพอร์คอลล์ไม่ทำให้คุณภาพอสุจิหลังการทำละลายแตกต่างจากน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผลิตที่ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง

2. การนำน้ำเชื้อแพะแช่แข็งที่ผ่านการคัดแยกเพศอสุจิด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ไปฉีดผสมเทียมให้กับแม่แพะ มีผลทำให้ได้อัตราผสมติดเป็นที่น่าพอใจ และได้สัดส่วนลูกแพะเพศเมียมากกว่าเพศผู้ แตกต่างจากการฉีดน้ำเชื้อน้ำเชื้อแช่แข็งที่ไม่ผ่านการแยกเพศ

จึงสรุปว่า การคัดแยกเพศอสุจิแพะด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์สามารถนำไปใช้ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งเที่ใช้ในการผสมเทียมเพื่อเพิ่มสัดส่วนลูกแพะเพศเมียได้

ข้อเสนอแนะ

1. การคัดแยกเพศอสุจิแพะด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์สามารถนำไปใช้ในห้องปฏิบัติการของกรมปศุสัตว์หรือฟาร์มเกษตรกร เพื่อเพิ่มผลผลิตลูกแพะเพศเมีย หรือห้องปฏิบัติการที่ต้องการผลิตตัวอ่อนเพศเมียหรือเทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูงต่างๆ ซึ่งจะช่วยพัฒนาการผลิตแพะของไทยและพัฒนาเศรษฐกิจของประเทศ
2. แม้ว่าสารละลายเพอร์คอลล์สามารถนำมาใช้เพื่อช่วยเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อแพะเพื่อผลิตเป็นน้ำเชื้อแช่แข็งได้ แต่ต้นทุนในการนำสารละลายเพอร์คอลล์มาใช้ก็ยังมีราคาที่สูงอยู่ ซึ่งจากการศึกษานี้ มีต้นทุนอยู่ที่ประมาณ 100 บาทต่อการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง 1 โด๊ส (ผลิตน้ำเชื้อ 150 ล้านตัวต่อโด๊ส) อาจจะไม่ใช่วิธีที่เหมาะสมสำหรับการผลิตน้ำเชื้อแพะแช่แข็งโดยทั่วไป แต่อาจพิจารณานำไปปรับใช้กับเทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูง เช่น การผลิตตัวอ่อน การทำตัวอ่อนหลอดแก้ว หรือการคัดแยกเพศจากอสุจิ เป็นต้น

3. ในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งมักพบว่า คุณภาพอสุจิหลังการทำละลายมีค่าอัตราการเคลื่อนที่ไม่ผ่านเกณฑ์การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง คือ อัตราการเคลื่อนที่ต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งต้องทำลายน้ำเชื้อแช่แข็งแพะเหล่านั้นทิ้งเป็นจำนวนมาก ซึ่งในกรณีนี้ทำให้สูญเสียน้ำเชื้อแพะที่อาจเป็นน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะดีเป็นที่ต้องการของเกษตรกร แต่คุณภาพน้ำเชื้อไม่ดีไม่ผ่านเกณฑ์การประเมิน ดังนั้น อาจจะนำวิธีการปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลายเพอร์คอลล์มาใช้ในการผลิตน้ำเชื้อแพะแช่แข็งที่คุณภาพน้ำเชื้อมีข้อมูลไม่ผ่านเกณฑ์มาตรฐาน ก่อนนำไปผลิตเป็นน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อกรองเซลล์อสุจิที่คุณภาพไม่ดีและเซลล์ที่ตายออก อาจจะทำให้ได้คุณภาพน้ำเชื้อที่ดีขึ้นเพื่อนำไปใช้ผสมเทียมได้
4. การศึกษานี้สามารถคัดแยกเซลล์อสุจิ X และนำไปผลิตเป็นน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีคุณภาพดีเพียงพอที่จะนำไปผสมเทียมและสามารถให้ลูกแพะเพศเมียในสัดส่วนที่สูงกว่าเพศผู้ อย่างไรก็ตาม ถ้ามีการศึกษาในลักษณะนี้เพิ่มเติม โดยการปรับความเข้มข้นในแต่ละระดับชั้นของสารละลายเพอร์คอลล์ หรือปรับเปลี่ยนแรงที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยง อาจจะทำให้สัดส่วนแพะเพศเมียเพิ่มขึ้นมากกว่านี้ได้ เพื่อประโยชน์ในการคัดแยกเพศอสุจิที่จะนำไปใช้พัฒนาพันธุ์แพะให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น และวิธีการนี้เป็นการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งคัดแยกเพศที่ไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง และสามารถทำได้ในห้องปฏิบัติการที่ผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งอยู่เป็นประจำ

เอกสารอ้างอิง

กรวิการ์ อินทร์ฤทธิ์ กัญญา จิระเจริญรัตน์ และรณชัย สิทธิไกรพงษ์. 2531. คุณภาพน้ำเชื้อหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ของสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์และแลนด์เรซ. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 31(2) : 58-64.

จิตศักดิ์ เมืองเขียว สุรศักดิ์ เพชรรัตน์ และวิโรจน์ สัมพันธ์พร. 2561. ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จของการผสมเทียมแพะในพื้นที่ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ของประเทศไทย. ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพ. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 9 : 90-100.

ฉัตรชัย จันทร์สมบูรณ์. 2015. เทคนิคการคัดแยก เพศลูกสัตว์ (ออนไลน์). สืบค้นจาก https://www.swinethailand.com/17087632 (เข้าถึงเมื่อ 3 กรกฎาคม 2563)

ธานี วสวานนท์ สมพร ชินสมบูรณ์ และสุวิชา จิตรปฏิมา. 2542. การศึกษาและวิจัยการแยกเพศอสุจิโคด้วยวิธีการปั่นแยกเพื่อผลิตลูกโคเพศเมีย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 37: 211-216.

นิรุจน์ พันธ์ศรี และนางสาวพิสมัย พงษ์วัน. 2562. ปัจจัยที่มีผลต่อการขยายตัวของการเลี้ยงแพะในพื้นที่จังหวัดบุรีรัมย์. (ออนไลน์) เข้าถึงเมื่อ 23 มิถุนายน 2563. http://pvlo-brr.dld.go.th/Data/doc2_28022019.pdf

นิวัตน์ ถาวระ อนนท์ เทือง สันเทียะ และบันลือ กล่ำพูล. 2550. การเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย CIDR-G และ PGF 2α ร่วมกับ PMSG ต่อการผสมติดของแพะพันธุ์ซาแนน. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 2 : 1-7

บรรจง จงรักษ์วัฒนา. 2554. เทคนิคการผสมเทียมแพะ (ออนไลน์). สืบค้นจาก http://pvlo-pni.dld.go.th/webnew/index.php/th/service-menu/information-menu/81-2013-12-08-17-51-32 (เข้าถึงเมื่อ 23 มิถุนายน 2563)

พีระพงษ์ สำราญทรัพย์ สาโรช งามขำ อนนท์ เทืองสันเทียะ และณรงค์ เลี้ยงเจริญ. 2552. ประสิทธิภาพการลดฮอร์โมน PMSG ในการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งแพะ.วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 4 : 16-23.

พีระพงษ์ สำราญทรัพย์ และสาโรช งามขำ. 2553. ผลของฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอดต่อการเหนี่ยวนำการเป็นสัดและอัตราการผสมติดในแพะนม. ประชุมวิชาการสัตวแพทย์ มข. ครั้งที่ 11 ประจำปี 2553 อาเซียนกับโอกาสธุรกิจปศุสัตว์ สัตว์เลี้ยงและสัตวแพทย์ไทย. วันที่ 10-11 มิถุนายน 2553.

พีรศักดิ์ สุทธิโยธิน. 2548. การแชแข็งน้ำเชื้อแพะภาควิชาสัตวศาสตรคณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร. หนา 100-106.

ภูเบศวร์ เศรษฐสุข สุกัญญา รัตนทับทิมทอง ศรีสุวรรณ ชมชัย จักรภพ จันทร์สะอาด และวิศิษฐ ทองเที่ยง .2555. ผลของความเร็วและเวลาในการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาต่อคุณภาพอสุจิในน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง. การประชุมวิชาการแห่งชาติมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9

มาลี อภิเมธีธำรงค์ จักรภพ จันทร์สะอาด บรรจง จงรักษ์วัฒนา วิทยา ขจีรัมย์ อรุณ ชุมแก้ว และณรงค์ เลี้ยงเจริญ. 2556. อัตราการตั้งท้องหลังผสมเทียมแบบกำหนดเวลาในแพะที่เหนี่ยวนำการเป็นสัดแบบโปรแกรมระยะสั้น. ว. วิทย์. กษ. (1, พิเศษ) : 207-210.

รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล. 2552. การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ การจัดการความรู้ กรมปศุสัตว์ (ออนไลน์). สืบค้นจาก http://www.dld.go.th. (เข้าถึงเมื่อ 29 มิถุนายน 2561)

ลักษณ์ เพียซ้าย และทัสนันท์ หงสะพัก. 2561. การปรับปรุงพันธุ์และการจัดการฟาร์มแพะนม. คู่มือองค์ความรู้การจัดการนมแพะ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 7-23.

วรพงษ์ พงษ์ศิริ และจรรยาพร รุ่งเรืองศักดิ์. 2560. ผลของวิธีการปั่นแยก seminal plasma ด้วยสารละลายเพอร์คอลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรภายหลังการละลาย. http://biotech.dld.go.th/webnew/Data/Research/2562/seminal.pdf. (ออนไลน์). ค้นคว้าเมื่อ 21 กันยายน 2563

วิศิษฐ ทองเที่ยง ธวัชชัย โพธิ์คำ จตุพร พงษ์เพ็ง. 2561. ผลของสารละลาย Equex STM และระดับความเข้มข้นของน้ำเชื้อแช่แข็งต่ออัตราการผสมติดในแพะพื้นเมืองลูกผสมในภาคใต้ของประเทศไทย. ว. ชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. 9 : 79-89.

Abecia, J. A., F. Arrébola and C. Palacios. 2016. Offspring sex ratio in sheep, cattle, goats and pigs: influence of season and lunar phase at conception. Biol. Rhythm Res. 1744-4179.

Akhter, S., B. K. Rakha, Iqbal R. and M. S. Ansari. 2014. Effect of Bovine Serum Albumin on Motility, Plasmalemma, Viability and Chromatin Integrity of Buffalo Bull Spermatozoa. Pakistan J. Zool. 46(1) : 115-120

Alexander, B., G. Mastromonaco, King W.A. 2010. Recent Advances in Reproductive Biotechnologies in Sheep and Goat. J. Veterinar. Sci. Technol. 1(101) : 1-8

Ali J. I., F. E. Eldridge, G. C. Koo & B. D. Schanbacher. 1990. Enrichment of Bovine X- and Y-Chromosome Bearing Sperm with Monoclonal H-Y Antibody Fluorescence-Activated Cell Sorter. Archives of Andrology. 24(3) : 235-245.

Allison, C. and G. H. Robert. 2017. Artificial Insemination of Dairy Goats. (online). 2020. https://aces.nmsu.edu/pubs/_d/D704/welcome.html#:~:text=Artificial%20insemination%20(AI)%20involves%20collection,semen%20to%20artificially%20inseminate%20does.

Andrabi, S.M.H., C. Lal, M.S. Haider, M.F.U. Khan and A. Ghaffar. 2018. Artificial Insemination in Beetal and Jattal Goats: Preliminary Results. Artificial Insemination in Goat. 9:177-181.

Arrebola, F. A., Pardo, B., Sanchez, M., Lopez, M. D. and Perez-Marin, C. C. 2012. Factors influencing the success of an artificial insemination program in Florida goats. Span. J. Agric. Res. 10(2) : 338-344.

Arrebola, F. A., Palacios, C., Gil, M. J. and Abecia, J. A. 2015. Management and meteorological factors affect fertility after artificial insemination in Murciano-Granadina goats. Anim. Prod. Sci. 1-21.

Bathgate, R., N. Mace, K. Heasman, G. Evans, W.M. Maxwell and S.P. Graaf. 2013. Birth of kids after artificial insemination with sex-sorted, frozen-thawed goat spermatozoa. REPROD. DOMEST. ANIM. 48(6) : 893-8.

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. Animal reproduction Volume 8:81-84.

Buranaamnuay, K., P. Sangsuwan, C. Changsangfa, T. Faisaikarm and K. Kaeoket. 2015. Influence of discontinuous PureSperm and OptiPrep Gradient Centrifugations on bovine sperm quality and the sex ratio of in vitro produced embryos. CHIANG MAI J. SCI. 42(3) : 637-649.

Bushara, I., O. M. A. Abdelhadi, M. B. Elemam, A. O. Idris, D. M. Mekki, M. M. Ahmed Muna, A. M. Abu Nikhiala and I. Elimam. 2013. Effect of sex of kids and Litter size on Taggar goat Kids performance. Archiva Zootechnica. 16(2) : 5-14.

Choi S. G., M. S. Baea, E. S. Lee, S. O. Kim, B. K. Kim, J. H. Yang, C. E. Jeon, H. H. Kim, Y. J. Hwang, E. S. Lee and D. Y. Kim. 2009. Amplification of Porcine SRY Gene for Sex Determination*. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 22(8) : 1107 – 1112.

Cote, S. D. and F. B. Marco. 2001. Offspring sex ratio in relation to maternal age and social rank in mountain goats (Oreamnos americanus). Behav Ecol Sociobiol. 49:260–265

Cseh, S., V. Faigl and G. Amiridis. 2012. Semen processing and artificial insemination in healh management of small ruminants. Anim. Reprod. Sci. 130 : 187-192.

Cui K. H. 1997. Size differences between human X and Y spermatozoa and prefertilization diagnosis*. Molecular Human Reproduction. 3(1): 61–67.

Daramola, J. O. 2017. Effect of Centrifugation on Motility, Sperm Capacitation and Acrosome Reaction in Soy Bean and Avocado Seed Milk Extenders of Cryopreserved Goat Spermatozoa. Agricultura. Tropica. ET. Subtropica. 50 (1) : 13–18.

Dovenski, T., K. Popovski, V. Petkov, G. Mickovski, L. J. Kocoski, P. Trojacanec and B. Stojanovski. 1997. Comparison of intrauterine and cervical insemination in goats with deep-frozen semen. Croatian veterinary congress. 279-285.

Faigl, V., N. Vass, A. Javor, M. Kulcsar, L. Solti, G. Amiridis and S. Cseh. 2012. Artificial insemination of small ruminants-a review. Acta. Veterinaria. Hungarica. 60 : 115-129.

Ferreira-Silva, J. C., M. Tigre Moura, S.R. Lima Basto, L.R. Sampaio Oliveira, E.L. Eduardo Luiz Cavalcanti Caldas, M.L. Silva Filho and M.A. Lemos Oliveira. 2017. Use of Percoll Density Centrifugation for Sperm Sexing in Small Ruminants. Global Journal of Science Frontier Research. 17(6,1) : 55-59.

Gokce, E., ALÇAY S. and Z. GULP. 2017. Positive effect of BSA supplemented soybean lecithin based extender on liquid storage of ram semen at 5C. Ankara. Üniv. Vet. Fak. Derg. 64 : 313-320.

Gorecki, M.T. and K. Koscinski. 2003. Offspring sex ratio in domestic goat (Capra hircus). Arch. Tierz., Dummerstorf. 46(3) : 277-284.

Hadi, S. and I. H. Al-Timimi. 2013. Separation of X-bearing ovine sperm by centrifugation in discontinuous Ficoll density gradient: effect on gender of In Vitro Produced embryos. J. Vet. Sci. 6(1) : 49-56.

Hossepian, V.F.M.. M.F.D.T. Ramalho., B.C.A. Alves, A.C. Lucio, L.Z. Oliveira, A.C. Moreira Filho and L. C. Carneiro. 2015. Enrichment of bovine semen with x-bearing spermatozoa using Percoll™ and Optiprep® discontinuous gradients. Anim. Vet. Sci. 3(1) : 1-7.

Houdeau, E., V., Furstoss, Y. Forgerit, J. Bonne and B. Leboeuf. 2008. Short-duration insemination with frozen semen increase fertility rate in nulliparous dairy goats.

Hussein, A. M. A. 2014. Effect of sperm selection by percoll and swim up techniques on the sex ratio of rabbit offspring. The Asian Journal of Animal Science 9(1) : 1-6.

Johnson LA. 1995. Sex preselection by flow cytometric separation of X and Y chromosome bearing sperm based on DNA difference: a review. Reprod. Fertil. Dev. 7 : 893–903.

Khamlor, T., P. Pongpiachan, S. Sangsritavong and N. Chokesajjawatee. 2014. Determination of Sperm Sex Ratio in Bovine Semen Using Multiplex Real-time Polymerase Chain Reaction. Asian Australas. J. Anim. Sci. 27(10) : 1411-1416.

Kharkar, K. P., D. S. Raghuwanshi, B. M. Khati and R. S. Lende. 2017. Factors affecting sex ratio in Osmanabadi goat in Vidarbha climatic condition. International Research Journal of Natural and Applied Sciences. 4(1) : 143-149.

Kim, C. H., C. H. Jo and S. O. Chung. 1984. Effect of Isolation by Albumin Density Gradients on Head,s size of Bovine Sperm. Kor. J. Fertil. Sterile. 11(2):1-8.

Kumar, A., A.K.S. Kumar, A. Kumar and B.S. Metha. 2001. Factors Affectings Multiple Birth, Abnaormal Kidding, Litters Size and Sex Ratio in Marwari goats. Indian Journal Animal Research. 35(1) : 59-61.

Lima, V. H., M. F. D. Ramalho, B. C. A. Alves, A. C. Lucio, L. Z. Oliveira, C. A. M. Filho and L. C. Carneiro. 2015. Enrichment of bovine semen with X-bearing spermatozoa using Percoll™ and Optiprep® discontinuous gradients. Anim. Vet. Sci. 3(1) : 1-7.

Lucio, A. C., M. V. Resende, J. A. Dernowseck-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 Brasiliaro de Medicina Veterinaria e Zootecnia 64(3) : 525-532.

Mahdi, S. A. A. W., Mahmood A. F. and R. M. Mahmood. 2019. Effect of diferrence concentrations of bovine serum albumin on some of the frozen sperm charecteristics of the rams. Plant Archives . 19 : 1486-1488.

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. Livestock Science 157(1) : 1-6.

Mellado, M., R. Valdez, L.M. Lara and J.E. Garcıa. 2004. Risk factors involved in conception abortion and kidding rates of goats under extensive conditions. Small Ruminant Research 55 : 191-198.

Noguchi, M., K. Yoshioka, H. Hikono, G. Iwagami, G. Suzuki and K. Kikuchi. 2013. Centrifugation on Percoll density gradient enhances motility, membrane integrity and in vitro fertilizing ability of frozen–thawed boar sperm. 68–75.

Nunesa, J.F. and C. C. M. Salgueiro. 2011. Strategies to improve the reproductive efficiency of goats in Brazil. SMALL RUMINANT RES. 98 : 176-184.

Parrilla, I., J. M. Vazquez, J. M. C. Cuello, M. A. Gil, J. Roca, D. Berardino and E. A. Martınez. 2004. Hoechst 33342 stain and u.v. laser exposure do not induce genotoxic effects in flow-sorted boar spermatozoa. Reproduction. 128(5) : 615–621.

Pertoft, H., 2000. Fractionation of cells and subcellular particles with q Percoll. Journal of Biochemical and Biophysical Methods. 44(1-2) : 1–30.

Perumal, P., A. K. Nahak, K. Vupru, K. khate, Balamurugan T. C. and R. Prakash Krupakaran. 2015. Effect of addition oF bovine serum albumin on the liquid storage (5°C) of Mithun (Bos frontalis) semen. Journal of Cell and Tissue Research Vol. 15(1) : 4795-4800.

Prasad, Ch. S., S. Rangasamy and S. P. Satheshkumar. 2010. Sex Preselection in Domestic Animals - Current status and Future prospects. Veterinary World. 3(7): 346-348.

Promthep, K., S. Satitmanwiwat, N. Kitiyanant, P. Tantiwattanakul, K. Jirajareonrat, R. Sitthigripong and C. Singhapol. 2016. Practical use of percoll density gradient centrifugation on sperm sex determination in commercial dairy farm in Thailand. Indian Journal Animal Research. 50(3) : 310-313.

Polak, J., V. Mares, R. Konrad and D. Frynta. 2015. Offspring sex ratio in domestic goats: Trivers-Willard out of natural selection. Czech Journal of Animal Science. 60(5) : 208–215.

Rattanasuk, S. 2011. Bovine Sperm Sexing By Monoclonal Antibody. Ph.D. Philosophy of Biotechnology. Suranaree University of Technology.

Resende, M. V., A. C. Lucio, A. P. Perini, L. Z. Oliveira, A. O. Almeida, B. C. A. Alves, C. A. Moreira-Filho, I. W. Santos and V. F. M. Hossepian de Lima. 2011. Comparative validation using quantitative real-time PCR (qPCR) and conventional PCR of bovine semen centrifuged in continuous density gradient. Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria Zootecnia. 63(3) : 544-551.

Salvador, I., M. P. Viudes-de-Castro, J. Bernacer, E. A. Gomez and M. A. Silvestre. 2005. Factors affecting pregnancy rate in artificial insemination with frozen semen during non-breeding season in Murciano–Granadina goats: a field assay. Repro. Dom. Anim. 40 : 526-529.

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.

Sang, P., W. C. Yang, L. Han, A. X. Liang, G. H. Hua, J. J. Xiong, L. J. Huo and L. G. Yang. 2010. An immunological method to screen sex-specific proteins of bovine sperm. https://doi.org/10.3168/jds.2010-3350. 6 July 2020 (online)

Sarıözkan S., G. Türk, F. Cantürk, A. Yay, Eken A. and A. Akçay. 2013. The effect of bovine serum albumin and fetal calf serum on sperm quality, DNA fragmentation and lipid peroxidation of the liquid stored rabbit semen. Cryobiology. 67 : 1-6.

Sohnrey B. and W. Holtz. 2005. Technical Note: Transcervical deep cornual insemination of goats. J. Anim Sci. 83 : 1543-1548.

Soleymani, B., S. Parvaneh and A. Mostafaie. 2019. Goat Polyclonal Antibody Against the Sex Determining Region Y to Separate X- and Y-Chromosome Bearing Spermatozoa. Reports of Biochemistry & Molecular Biology. 8(3) : 334.

Soundararajan, C. and T. Sivakumar. 2011. Factors affecting birth weight of Kanni kids and sex ratio of Boer x Kanni crossbred Goats. Taminadu Journal Veterinary and Animal Sciences 7(3) : 144-149.

Stewart, J. A. and C. F. Shipley. 2014. Puberty and Estrus in Goats. https://www.merckvetmanual.com/management-and-nutrition/management-of-reproduction-goats/puberty-and-estrus-in-goats. (online) 18 July 2020.

Talokar Amol J., B. Rajalaxmi, A. S. Laishram and M. Ajoy. 2019. Sexed Semen: A Boon for Indian Dairy Farming. Research and Reviews: Journal of Dairy Science and Technology. ISSN: 2319-3409 (Online). 6(1) : 1-7.

Tavares, K.C.S., I.S. Carneiro, D.B. Rios, C. Feltrin, A.K.C. Ribeiro, S. Gaudêncio-Neto, L.T. Martins, L.H. Aguiar, C.R. Lazzarotto, C.E.M. Calderón, F.E.M. Lopes, L.P.R.

Teixeira, M. Bertolini and L.R. Bertolini. 2016. A fast and simple method for the polymerase chain reaction-based sexing of livestock embryos. Genetics and Molecular Research. 15 (1) : 1-11.

Tsuma, V. T., M.S. Khan, A.M. Okeyo and M.N.M. Ibrahim. 2015. A training manual on artificial insemination in goats. 1-18.

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. Human Reproduction. 9(7) : 1265-1270.

Wilhelm, D., S. Palmer and P. Koopman. 2007. Sex determination and gonadal development in mammals. Physiology Review. 87 : 1-28.

Wolf, C.A., K.E. Brass, M.I.B. Rubin, S.E. Pozzobon, F.D. Mozzaquatro and F.D. De La Corte. 2008. The effect of sperm selection by percoll or swim-up on the sex ratio of in vitro produced bovine embryos. Animal Reproductive. 5 : 110-115.

Yadav, S. K., D. K. Gangwar, J. Singh, C. K. Tikadar, V. V. Khanna, S. Saini, S. Dholpuria, P. Palta, R. S. Manik, M. K. Singh and S. K. Singla. 2017. An immunological approach of sperm sexing and different methods for identification of X- and Y-chromosome bearing sperm. Veterinary World. 10(5) : 498–504.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ภาพประกอบการทำการทดลอง

ภาพที่ 1 การรีดเก็บน้ำเชื้อโดยการใช้ช่องคลอดเทียม (Artificial vaginal, AV)
ที่มา: ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสงขลา
สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

ก **ข**

ภาพที่ 2 การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์คุณภาพอสุจิ (Computer Assisted Semen Analysis; CASA) รุ่น Hamilton Thorne CEROS II

ภาพที่ 3 การวางชั้นสารละลายเพอร์คอลล์ 40, 45, 50, 65, 70, 80, และ 90 เปอร์เซ็นต์ (V/V)

ภาพที่ 4 การตกตะกอนของอสุจิหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างกัน 7 ระดับ (40, 45, 50, 65, 70, 80, และ 90 เปอร์เซ็นต์ (V/V)) โดยเซลล์อสุจิจะตกลงมาอยู่ในชั้นเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้น 80-90 เปอร์เซ็นต์

ภาพที่ 5 แสดงลักษณะท่าทางการผสมเทียมแพะ
ที่มา: ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสงขลา
สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

ภาพที่ 6 การตรวจการตั้งท้องแม่แพะด้วยเครื่องอัลตราซาวด์
ที่มา: ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสงขลา
สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการเตรียมสารละลาย

การเตรียมสารละลาย Ringer's lactate solution ความเข้มข้น10 เท่า (10X)

การเตรียมสารละลาย Ringer's lactate solution ความเข้มข้น10 เท่า มีส่วนประกอบและขั้นตอนการเตรียมดังนี้

Composition	Concentration(mg/100ml)	10X
NaCl	600	6g
KCl	40	0.4g
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	27	0.27g
$NaC_3H_5O_3$	312	3.12g
Osmolarity (mOsm/L)	277	
pH	5.0-7	

1. ทำการชั่งสาร NaCl ปริมาณ 6 g, KCl ปริมาณ 0.4 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ ปริมาณ 0.27 g และ $NaC_3H_5O_3$ ปริมาณ 3.12 g
2. จากนั้นทำละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร
3. ก่อนนำสารละลาย Ringer's lactate solution ไปใช้ ให้ทำการเติม Na_2HCO_3 ปริมาณ 0.21g ลงในสารละลาย 10X Ringer's lactate solution ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากันแล้วกรองออกด้วยกระดาษกรอง

การเตรียมสารละลายน้ำเชื้อ Tris-egg yolk extender

สารละลายน้ำเชื้อ Tris-egg yolk extender เตรียมจากสารละลายสำเร็จรูป One step™ extender ประกอบด้วย Tris 24.2 กรัม Citric acid 13.8 กรัม Fructose 10.0 กรัม Glyceral 70 มิลลิลิตร และ Revese Osmosis Deionized Sterile water ปริมาตร 340 มิลลิลิตร เมื่อจะนำไปใช้ให้ตวง One step™ extender มาปริมตร 34 มิลลิลิตร เติมไข่แดง 20 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 46 มิลลิลิตร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายวิศิษฐ ทองเที่ยง
รหัสประจำตัวนักศึกษา 5910620010
วุฒิการศึกษา ปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
ม.6	โรงเรียนพัทลุงจังหวัดพัทลุง	2538
ปริญญาตรี	สัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต	2544

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก สถานวิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพการเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 2

ตำแหน่งและสถานที่ทำงาน

1. ตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ สหกรณ์โคนมพัทลุง ปี 2544-2548
2. ตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ 4 สำนักสุขศาสตร์สัตว์และสุขอนามัยที่ 9 กรมปศุสัตว์ ปี 2549-2552
3. ตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพสงขลา กรมปศุสัตว์ ปี 2553-2561
4. ตำแหน่ง นายสัตวแพทย์ชำนาญการพิเศษ กลุ่มพัฒนาสุขภาพสัตว์ สำนักงานปศุสัตว์จังหวัดตรัง กรมปศุสัตว์ ปี 2562-ปัจจุบัน

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

วิศิษฐ ทองเที่ยง อรุณ ชุมแก้ว วิทยา ขจีรัมย์ กฤษณ์ วีระวงศ์. 2556. เปรียบเทียบอัตราผสมติดระหว่างการผสมเทียมครั้งเดียวกับสองครั้งแบบกำหนดเวลาหลังเหนี่ยวนำการเป็นสัดในแพะพื้นเมืองลูกผสมในภาคใต้ของไทย. 2556. ระบบสารสนเทศ (ข้อมูลวิชาการ) สำนักงานปศุสัตว์ เขต 9 จ.สงขลา กรมปศุสัตว์.

วิศิษฐ ทองเที่ยง และ จำลอง วรศรี . ผลของวัคซีนปากเท้าเปื่อยต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งแพะพันธุ์บอร์ในภาคใต้ของไทย. เอกสารเผยแพร่งานประชุมวิชาการปศุสัตว์ ประจำปี 2559. หน้า 175-183.

วิศิษฐ ทองเที่ยง ธวัชชัย โพธิ์คำและจตุพร พงษ์เพ็ง. 2556 .การใช้ equex stm ในน้ำยาสำเร็จรูปเจือจางน้ำเชื้อไข่แดงเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อแพะ. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ . ปีที่ 8 ฉบับที่ 1 พฤศจิกายน 2556. หน้า 42-48.

วิศิษฐ ทองเที่ยง ธวัชชัย โพธิ์คำและจตุพร พงษ์เพ็ง. 2561. ผลของสารละลาย Equex STM และระดับความเข้มข้นของน้ำเชื้อแช่แข็งต่ออัตราการผสมติดในแพะพื้นเมืองลูกผสมในภาคใต้ของประเทศไทย. วารสารเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์. ปีที่ 9 ฉบับพิเศษ. หน้า 79-89.

วิศิษฐ ทองเที่ยง กิตติศักดิ์ แสงสกุล กุลสรรค์ สายขุน คคนางค์ บูรณะอำนวย และ ธัญจิรา เทพรัตน์. 2562. ผลของการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับของสารละลายเพอร์คอลล์ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะ แช่แข็งหลังละลาย. แก่นเกษตร 47 ฉบับพิเศษ 2 . หน้า 263-568.

จักรภพ จันทร์สะอาด วิศิษฐ ทองเที่ยง วิทยา ขจีรัมย์ อรุณ ชุมแก้ว. เปรียบเทียบวิธีเหนี่ยวนำการเป็นสัดด้วย Ovsynch และโปรเจสเตอโรนชนิดสอดช่องคลอด โดยผสมเทียมแบบกำหนดเวลาในแพะพื้นเมืองลูกผสมในภาคใต้ของประเทศไทย. เอกสารเผยแพร่งานประชุมวิชาการปศุสัตว์ ประจำปี 2559. หน้า 216-225.