สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การแยกเพศอสุจิของสุกรโดยการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

SWINE SPERM SEXING BY PERCOLL DENSITY GRADIENT CENTRIFUGATION

T132470

กรวิการ์ อินทร์ฤทธิ์

KORNWIKA INTHARIT

กพ.
ก182ก
2556

เลขหมู่..........
เลขทะเบียน 132470
วัน,เดือน,ปี 18 ก.ค. 2557

.b 12607654
.i..........

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสัตวศาสตร์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2556

KMITL-2013-AG-M-031-151

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SWINE SPERM SEXING BY PERCOLL DENSITY GRADIENT CENTRIFUGATION

KORNWIKA INTHARIT

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN ANIMAL SCIENCE

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2013

KMITL-2013-AG-M-031-151

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

COPYRIGHT 2013

FACULTY OF AGRICULTURAL TECHNOLOGY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแยกเพศอสุจิของสุกรโดยการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน
นักศึกษา	กรวิการ์ อินทร์ฤทธิ์
รหัสประจำตัว	52640503
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	สัตวศาสตร์
พ.ศ.	2556
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. รณชัย สิทธิไกรพงษ์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ.ดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาการแยกเพศอสุจิของสุกรโดยการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยรีดเก็บน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์จำนวน 4 ตัว และสุกรพ่อพันธุ์แลนด์เรซจำนวน 4 ตัว นำมาปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นสารละลายเพอร์คอลล์ระดับความเข้มข้น 0% (น้ำเชื้อสด), 20%, 35%, 50%, 65% และ 80% วิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ และจำแนกอสุจิ X โดยวิธีการย้อมด้วยสีเรืองแสง quinacrine นำน้ำเชื้อที่ได้ไปผสมเทียมแม่สุกรจำนวน 3 กลุ่มๆ ละ 24 แม่ โดยใช้น้ำเชื้อที่ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์, กลุ่มน้ำเชื้อจากชั้นความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีอสุจิ X มาก และกลุ่มน้ำเชื้อจากชั้นความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีอสุจิ Y มาก ตามลำดับ โดยใช้น้ำเชื้อพ่อสุกรลาร์จไวท์ผสมกับแม่สุกรพันธุ์แลนด์เรซ และน้ำเชื้อพ่อสุกรแลนด์เรซผสมกับแม่สุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ เพื่อผลิตลูกผสมสองสายพันธุ์ พบว่า พันธุ์ของพ่อสุกรให้ผลแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ต่อลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อในลักษณะของความเข้มข้นของตัวอสุจิ, กรด-ด่าง และเปอร์เซ็นต์ลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติ แต่มีผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) ต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของตัวอสุจิ และเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต โดยน้ำเชื้อจากพ่อสุกรพันธุ์แลนด์เรซจะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า และเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตสูงกว่าพ่อสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ ($p<0.01$) ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ คือ ระดับ 0% (น้ำเชื้อสด), 20%, 35%, 50%, 65% และ 80% ให้ผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) ต่อลักษณะความเข้มข้นของตัวอสุจิ, กรด-ด่าง, เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า, เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์ลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติ อิทธิพลร่วมระหว่างพันธุ์ และระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของตัวอสุจิ และเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) โดยน้ำเชื้อจากพ่อสุกรพันธุ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลาร์จไวท์ และพ่อสุกรพันธุ์แลนด์เรซที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงในระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ระดับ 80% จะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของอสุจิสูงที่สุด (85.00%) และน้ำเชื้อพ่อสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ที่ปั่นเหวี่ยงในสารละลายเพอร์คอลล์ระดับ 20% จะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าต่ำที่สุด (24.06%) อิทธิพลของพันธุ์พ่อสุกรต่อปริมาณเปอร์เซ็นต์อสุจิ Y และอสุจิ X ในน้ำเชื้อ ให้ผลแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์มีผลต่อปริมาณเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิ X และอสุจิ Y แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) โดยที่ความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ระดับ 50% จะมีปริมาณเปอร์เซ็นต์อสุจิ Y สูงสุด (69.04%) และความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับ 80% จะมีปริมาณเปอร์เซ็นต์อสุจิ X สูงสุด (68.49%) อิทธิพลร่วมระหว่างพันธุ์กับระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ ไม่มีอิทธิพลร่วมต่อปริมาณเปอร์เซ็นต์อสุจิ Y และอสุจิ X ในน้ำเชื้อพ่อสุกร ($p>0.05$) แม่สุกรที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง (น้ำเชื้อสด) จะให้ลูกสุกรแรกคลอดที่มีค่าสัดส่วนทางเพศแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ให้ปริมาณลูกเพศเมียเท่ากับเพศผู้) ในขณะที่แม่สุกรที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับ 50% ให้ปริมาณลูกเพศผู้มากกว่าเพศเมียในสัดส่วน 66.79:33.21 ในขณะที่น้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับ 80% ให้ปริมาณลูกเพศเมียมากกว่าเพศผู้ในสัดส่วน 67.24:32.76 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Swine Sperm Sexing by Percoll Density Gradient Centrifugation
Student	Miss Kornwika Intharit
Student ID.	52640503
Degree	Master of Science
Programe	Animal Science
Year	2013
Thesis Advisor	Assoc. Prof.Ronachai Sitthigripong
Thesis Co-advisor	Assist.Prof.Kanya Jirajaroenrat

ABSTRACT

The research was aimed to evaluate the swine sperm sexing by percoll density gradient centrifugation. Fresh semen samples were collected from four boars of each Large White and Landrace breeds. Sperm quality was evaluated before and after sperm processing. Semen sample was overlayered on the discontinuous gradients of 0% (fresh semen), 20%, 35%, 50%, 65%, and 80% Percoll® solutions. After centrifugation, X-bearing spermatozoa was identified by quinacrine staining technique. For artificial insemination (AI), three groups of sows (24 sows each group) were inseminated using fresh semen or non percoll density gradient centrifugation, percoll density gradient level of the highest X spermatozoa or percoll density gradient level of the highest Y spermatozoa, respectively. The Large White boars were crossbred with Landrace sows, whereas the Landrace boars were crossbred with Large White sows. The breeds showed no significant effect ($p>0.05$) on sperm concentration, pH and sperm abnormality percentage but it had a highly significant effect ($p<0.01$) on progressive motility sperm and living sperm percentages. Landrace boar had a highly significant effect ($p<0.01$) on progressive motility sperm and living sperm percentages than Large White boar. The concentration in each layer of percoll gradient had a highly significant difference ($p<0.01$) in sperm concentration, pH, progressive motility sperm, living sperm and abnormality sperm percentages. Furthermore, highly significant interaction effect ($p<0.01$) between breed and Percoll density gradient levels were found in progressive motility sperm and living sperm percentages. Large White and Landrace boar semens form the percoll concentration of 80% showed the highest progressive motility sperm (85.00%) whereas the Large White boar semen from the percoll concentration of 20% had the lowest progressive motility sperm (24.06%). Breed had no significant effect ($p>0.05$) on Y and X

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

spermatozoa concentrations in boar semen. The highest concentrations ($p<0.01$) of Y and X spermatozoa in boar semen were found at 50% and 80% layers of percoll density gradient (69.04% and 68.49%, respectively). Furthermore, no significant interaction effect ($p>0.05$) was found on Y and X spermatozoa concentration. Using of fresh semen or non percoll density gradient centrifugation offspring had no significant effect ($p>0.05$) on female and male ratio. Using the 50% layer of percoll gave more male offsprings than female (66.79:33.21) whereas using the 80% layer of percoll gave more female offsprings than male (67.24:32.76), with a highly significant different ($p<0.01$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนสำเร็จสมบรูณ์ได้ด้วยดีนี้ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ รศ.ดร. รณชัย สิทธิไกรพงษ์ และ ผศ.ดร. กัญญา จิระเจริญรัตน์ ที่ได้กรุณาแนะนำแนวทาง ช่วยชี้แนะให้คำปรึกษา และแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการทำวิทยานิพนธ์ ทำให้ข้าพเจ้าสามารถดำเนินงานได้อย่างถูกต้อง และแก้ไขปัญหาที่เกิดขึ้นได้สำเร็จลุล่วงตามเป้าหมายที่วางไว้

ขอขอบพระคุณอาจารย์สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยี-การเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังที่สนับสนุนเครื่องมืออุปกรณ์และสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้ และประสิทธิ์ประสาทวิชาการให้กับข้าพเจ้า

ขอขอบคุณกองทุนสนับสนุนโดยความร่วมมือระหว่างสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) และบริษัทเบทาโกรไฮบริด อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด ที่ให้การสนับสนุนโอกาสในการศึกษาวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณศูนย์ความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรสำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

ขอขอบคุณพี่ เพื่อนนักศึกษาปริญญาโท น้องๆ นักศึกษาปริญญาตรี หลักสูตรสัตวศาสตร์ทุกคน และบุคคลต่างๆที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ช่วยเหลือในการปฏิบัติงาน คอยอำนวยความสะดวกในทุกๆเรื่อง และให้กำลังใจเสมอ ซึ่งทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้า ที่เป็นกำลังใจ และให้การสนับสนุนในทุกๆ เรื่อง ทำให้สามารถทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

คุณค่า และประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแด่ทุกท่านที่สามารถนำไปใช้ให้เกิดประโยชน์ได้ต่อไป

กรวิการ์ อินทร์ฤทธิ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ....III

กิตติกรรมประกาศ....V

สารบัญ....VI

สารบัญตาราง....IX

สารบัญภาพ....X

บทที่ 1 บทนำ....1

1.1 ความสำคัญและที่มา....1

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา....2

1.3 สถานที่ดำเนินการ....2

1.4 ขั้นตอนการศึกษา....2

1.5 ระยะเวลาของการศึกษา....3

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ....3

บทที่ 2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง....4

2.1 ข้อมูลทั่วไปของน้ำเชื้อ....4

2.2 การกำหนดเพศของสิ่งมีชีวิต....6

2.3 ความแตกต่างของอสุจิ X และอสุจิ Y....7

2.3.1 ความแตกต่างด้านรูปร่าง....7

2.3.2 ความแตกต่างของความหนาแน่นของปริมาณ DNA และอัตราการตกตะกอน....7

2.3.3 ความแตกต่างของลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ....8

2.3.4 ความแตกต่างของประจุบนตัวอสุจิ....8

2.3.5 การติดสี Quinacrine fluorochromes....8

2.3.6 ความแตกต่างของประจุบนตัวอสุจิ....8

2.3.6 ความเป็นกรด-ด่าง....8

2.3.7 แอนติเจนบนผิวตัวอสุจิ....8

2.4 วิธีการคัดแยกเพศสัตว์....9

2.4.1 การคัดแยกเพศโดยอสุจิผ่านคอลัมน์สารละลาย....9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4.2 Flow cytometer....10

2.4.3 Lamina flow....11

2.4.4 Free-Flow Electrophoresis....11

2.5 เพอร์คอลล์....11

2.6 การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ....12

2.6.1 การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิมีชีวิต....13

2.6.2 ความเข้มข้นของน้ำเชื้อ....14

2.6.3 รายละเอียดความแตกต่างของรูปร่างเซลล์อสุจิ....15

2.7 การเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์....16

2.8 การแยกอสุจิ X และอสุจิ Y โดยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน....19

2.9 การตรวจสอบการคัดแยกอสุจิ X และอสุจิ Y....20

บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย....22

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา....22

3.2 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ....23

3.3 การแยกเพศอสุจิ โดยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่าง....23

3.4 การวิเคราะห์อสุจิ Y ด้วยการย้อมสี Quinacrine....24

3.5 การผสมเทียม....25

3.6 การเลี้ยงดูแม่สุกรอุ้มท้อง....25

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ....25

3.8 การบันทึกข้อมูล....28

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล....29

4.1 คุณภาพน้ำเชื้อของสุกรพ่อพันธุ์....29

4.2 คุณภาพน้ำเชื้อของพ่อสุกรภายหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์....29

4.3 ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ของตัวอสุจิ X และตัวอสุจิ Y....38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4 ประสิทธิภาพในการปฏิสนธิของน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน....41

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ....46

5.1 สรุปผลการทดลอง....46

5.2 ข้อเสนอแนะ....47

บรรณานุกรม....48

ภาคผนวก....54

ภาคผนวก ก การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ....55

ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี....57

ภาคผนวก ค ขั้นตอนการปฏิบัติงาน....60

ประวัติผู้เขียน....66

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 แสดงลักษณะและส่วนประกอบทางเคมีของน้ำเชื้อพ่อสุกร..5
3.1 ปริมาตรของเพอร์คอลล์และปริมาตรของสารละลาย NSRTC4 ที่ใช้ในการเจือจาง เพอร์คอลล์ให้มีจำนวนระดับความเข้มข้น 6 ระดับ..24
3.2 แสดงส่วนประกอบของสารละลายเจือจางมาตรฐาน NSRTC4..25
4.1 ตารางแสดงคุณภาพน้ำเชื้อก่อนการปั่นเหวี่ยงของสุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์และสุกรพ่อพันธุ์ แลนด์เรซ..29
4.2 ลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อหลังจากการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้น แตกต่างกันของสุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์และสุกรพ่อพันธุ์แลนด์เรซ..35
4.3 อิทธิพลร่วมระหว่างพันธุ์และระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิหลังจากการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้น แตกต่างกันของของสุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ และสุกรพ่อพันธุ์แลนด์เรซ..36
4.4 อิทธิพลร่วมระหว่างพันธุ์และระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ต่อ เปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิ มีชีวิตหลังจากการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน ของสุกรสายพันธุ์ลาร์จไวท์ และแลนด์เรซ..37
4.5 ปริมาณเปอร์เซ็นต์ของอสุจิ Y และอสุจิ X จากการย้อมสี Quinacrine หลังการปั่นการเหวี่ยง ผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันของสุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ และสุกรพ่อพันธุ์แลนด์เรซ..40
4.6 ลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ของตัวอสุจิที่ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง (น้ำเชื้อสด) และผ่านการปั่นเหวี่ยง ผ่านชั้นระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับ 50% (อสุจิ Y) และ 80 % (อสุจิ X) ของสุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ และแลนด์เรซ..43
4.7 ปริมาณเพศลูกสุกรเพศเมีย และเพศผู้จากการผสมน้ำเชื้อที่ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง (น้ำเชื้อสด) และ ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับ 50% (อสุจิ Y) และ 80 % (อสุจิ X) ของสุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ และแลนด์เรซ..44
4.8 จำนวนลูกสุกรเพศเมีย และเพศผู้แรกคลอดทั้งหมดที่เกิดจากการผสมน้ำเชื้อที่ไม่ผ่านการ (น้ำเชื้อสด) ปั่นเหวี่ยง และผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นระดับความเข้มข้นสารละลาย เพอร์คอลล์ที่ ระดับ 50% (อสุจิ Y) และ 80 % (อสุจิ X) ของสุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ และแลนด์เรซ..45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 ภาพตัดขวาง seminiferous tubules ของลูกอัณฑะ 4

2.2 อนุภาคเพอร์คอลล์ (A) เมื่อละลายอยู่ในน้ำมีขนาด 35 นาโนเมตร (B) คือ อนุภาคเพอร์คอลล์ ละลายในสารที่แตกตัวได้ไอออนสูง (higher ionic strength) จะมีขนาด 30 นาโนเมตร..................12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์หากสามารถกำหนดเพศของลูกที่เกิดมาได้จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการผลิต ซึ่งก็ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของผู้เลี้ยงว่าต้องการลูกที่เกิดมาเป็นเพศผู้ หรือเพศเมีย เช่น ในการผลิตโคนมมีความต้องการลูกเพศเมียเพื่อที่จะให้น้ำนมได้ หรือในการผลิตสุกรระดับฝูง Great Grand Parents (GGP) เรามีความต้องการลูกสุกรทั้งเพศผู้และเพศเมียในอัตราส่วนที่เท่ากัน เพื่อใช้ในการคัดเลือกเข้าทดแทน ส่วนฝูงสุกรในระดับฝูง Grand Parents (GP) เป็นการผสมพันธุ์แท้เพื่อผลิตลูกผสมสองสาย ดังนั้นจึงมีความต้องการลูกที่เกิดมาเป็นเพศเมีย นอกจากนี้ยังสามารถลดค่าใช้จ่ายในการตอนสุกรเพศผู้ และคุณภาพซากสุกรเพศเมียจะดีกว่าเพศผู้ตอน

ในการคัดแยกเพศสุกรสามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ว่ามีความต้องการเพศผู้หรือเพศเมีย เช่น Sephadex gel filtration (Adimoelja. 1987) , Flow cytometer (Johnson. 1995), Albumin gradient (Ericsson. 1973), Density gradient centifugation (Kaneko *et al.* 1983) เป็นต้น ซึ่งจะอาศัยพื้นฐานความแตกต่างของอสุจิ X และอสุจิ Y (Bjorndahl and Barratt. 2002) เช่น ความแตกต่างด้านรูปร่าง (Bahr. 1971) ความแตกต่างของความหนาแน่นของปริมาณ DNA และอัตราการตกตะกอน (Mohri *et al.* 1987) ความแตกต่างของลักษณะการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Ericsson. 1973) ความแตกต่างของประจุบนตัวอสุจิ (Mohri *et al.* 1987) การติดสี Quinacrine fluorochromes (Barlow and Vosa. 1970) ความเป็นกรด-ด่าง (Kaneko *et al.* 1983) และแอนติเจนบนผิวตัวอสุจิ (Gledhill. 1988) เป็นต้น การคัดแยกเพศโดยอสุจิผ่านคอลัมน์สารละลายอาศัยความแตกต่างของรอบการปั่นเหวี่ยงโดยให้น้ำเชื้อผ่านคอลัมน์ของสารละลาย เช่น Albumin หรือ เพอร์คอลล์ อสุจิจะผ่านชั้นสารละลายเหล่านี้ เคลื่อนที่แบบ migration ผ่านความเข้มข้นของสารละลายชั้นต่างๆ ภายในคอลัมน์ที่ใช้แยกตามวิธีการและขั้นตอนของสารละลายแต่ละชนิด (Bjorndahl and Barratt. 2002) มีรายงานการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นเพอร์คอลล์ (Density gradient centrifugation) เป็นอีกวิธีหนึ่งในการนำมาใช้เพื่อแยกอสุจิ โดยสารเพอร์คอลล์ที่ใช้เป็นอนุภาคซิลิกาที่อยู่ในลักษณะคอลลอยด์เคลือบด้วยสาร polyvinyl pyrollidone (Iwasaki *et al.* 1988) สารละลายเพอร์คอลล์เหมาะที่จะใช้ในการปั่นเหวี่ยง เนื่องจากมีคุณสมบัติที่สามารถเพิ่มความหนาแน่น แต่ไม่มีการเพิ่มแรงดันออสโมซิส และไม่เป็นอันตรายต่ออสุจิ (Mohri *et al.* 1987) ไม่เป็นพิษต่อตัวอสุจิ ใช้เวลาในการคัดแยกเพศน้อย และสามารถนำไปใช้กับสัตว์ชนิดอื่นๆ เช่นสุกร (Grant *et al.* 1994) โค (Parrih *et al.* 1995) กระบือ (Mehmood *et al.* 2009) ปลาคาร์พ (Li *et al.* 2010) รวมถึงมนุษย์ด้วย (Hyne *et al.* 1986) การตรวจยืนยันผลการแยกตัวอสุจิ Y และอสุจิ X ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุกร โดยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน สามารถทำได้หลายวิธี เช่น จำนวนลูกแรกเกิด (Sex of offspring) การตรวจสอบ DNA (Winsor *et al.* 1993) การตรวจสอบโครโมโซมอสุจิ (Ueda and Yanagimachi. 1987) การเรืองแสง (Quinacrine staining) อสุจิ Y เกิดการเรืองแสงเป็นจุดกลม เรียกว่า F-body ภายในนิวเคลียสของโซมาติกเซลล์โดยจุดเรืองแสงที่ปรากฏจะมีขนาด 0.25 ไมโครเมตร (Barlow and Vosa. 1970) และจากการศึกษาของ กรกนก พรหมเทพ (2552) ตรวจสอบอสุจิ Y ในโคนมโดยการเรืองแสง (Quinacrine staining) พบว่าเกิดจุด F-body ของอสุจิ Y ซึ่งสามารถใช้ในการแยกอสุจิ Y และ อสุจิ X ออกจากกันได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ เลือกใช้วิธีการย้อมสี Qrinacrine เนื่องจากขั้นตอนไม่ซับซ้อน และง่ายต่อการปฏิบัติ ได้ ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงได้จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาการแยกเพศอสุจิของสุกรโดยการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาไปสู่การแยกเพศอสุจิเพื่อการผสมเทียมในอุตสาหกรรมสุกรต่อไป

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อสุกร ก่อน และหลังจากการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

1.2.2 เพื่อศึกษาระดับชั้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่เหมาะสมในการแยกอสุจิ X และ Y ออกจากกัน

1.2.3 เพื่อศึกษาความสมบูรณ์พันธุ์ของอสุจิ ภายหลังการผสมเทียมแม่สุกรหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

1.2.4 เพื่อเปรียบเทียบสัดส่วนเพศของลูกสุกรแรกคลอด จากการผสมเทียม ด้วยน้ำเชื้อก่อนการปั่นเหวี่ยงกับหลังการปั่นเหวี่ยงที่มีอสุจิ X และอสุจิ Y มาก

1.3 สถานที่ดำเนินการ

1.3.1 ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพด้านการสืบพันธุ์สัตว์ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

1.3.2 ห้องปฏิบัติการ เทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

1.3.3 ฟาร์มสุกรบริษัทเบทาโกรโฮบริดอินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด ต. หนองน้ำแดง อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ขั้นตอนการศึกษา

1.4.1 ศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อของสุกร ก่อนและหลังจากการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

1.4.2 ศึกษาระดับชั้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่เหมาะสมในการแยกอสุจิ X และ Y ออกจากกัน

1.4.3 ศึกษาเปรียบเทียบสัดส่วนเพศของลูกสุกรแรกคลอดจากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อกลุ่มก่อนการปั่นเหวี่ยงกับหลังการปั่นเหวี่ยงที่มีอสุจิ X และอสุจิ Y มาก

1.5 ระยะเวลาการศึกษา

ใช้เวลาในการดำเนินการวิจัย และสรุปผลเป็นระยะเวลา 12 เดือน

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ทราบถึงคุณภาพน้ำเชื้อของสุกร ก่อน และหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

1.6.2 ทราบถึงปริมาณเปอร์เซ็นต์ของตัวอสุจิ X และตัวอสุจิ Y ก่อนการปั่นเหวี่ยง และหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

1.6.3 ทราบถึงระดับชั้นสารละลายเพอร์คอลล์ ที่เหมาะสมในการแยกอสุจิ X และอสุจิ Y ของน้ำเชื้อสุกรออกจากกัน

1.6.4 ทราบถึงความสมบูรณ์พันธุ์ของอสุจิ และปริมาณเพศของลูกสุกรจากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง (น้ำเชื้อสด) และผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีอสุจิ Y มาก และ อสุจิ X มาก

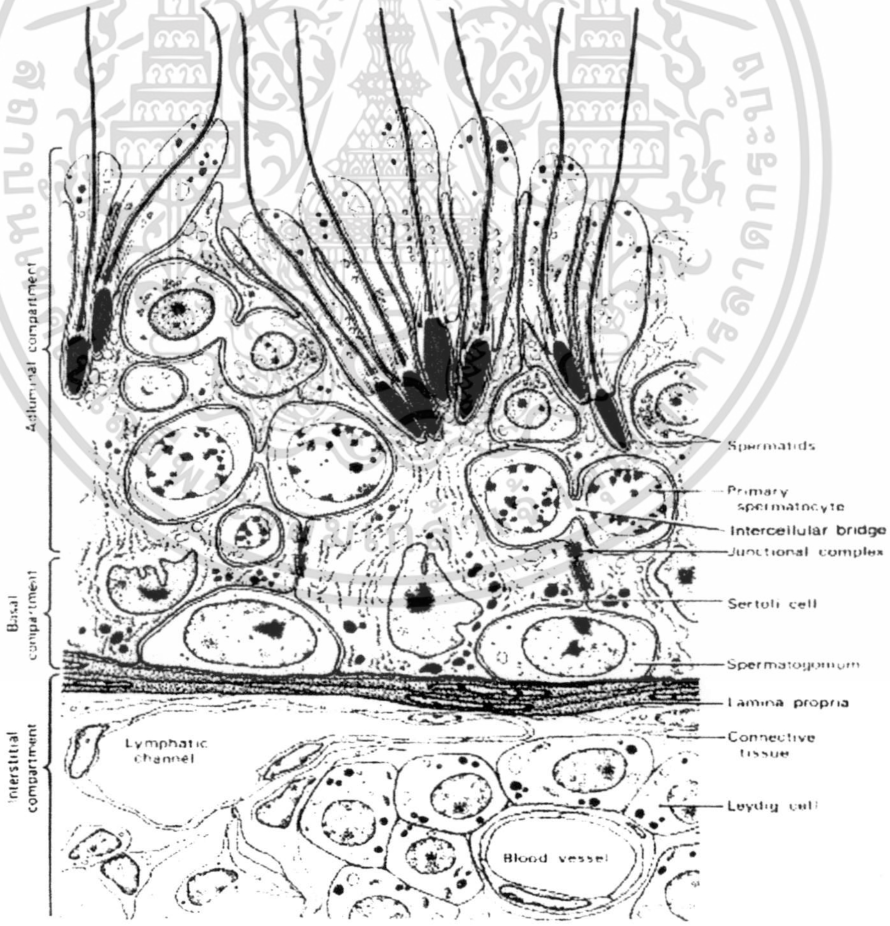
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ข้อมูลทั่วไปของน้ำเชื้อ

น้ำเชื้อประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนตัวอสุจิ และส่วนของน้ำกาม (Bearden and Fuquay. 1997) ตัวอสุจิในน้ำเชื้อผลิตมาจาก seminiferous tubules ของลูกอัณฑะ (Hafez and Hafez. 2000) น้ำกามสร้างจากต่อมสืบพันธุ์ต่างๆ (accessory gland) คือ Prostate gland 50-75% Vesicular glands 15-20% Bulbourethral glands 10-25% และอีกประมาณ 2-5% จาก epididymis และ vas deferens น้ำกามประกอบไปด้วยบัฟเฟอร์ และสารอาหารเลี้ยงอสุจิ ซึ่งมีความสำคัญต่อการผสมติดของอสุจิ ในโค และหนู น้ำกาม จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างค่อนไปทาง กรด ส่วนสุกร และม้า จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างไปทางด่าง มีแรงดันออสโมติกคล้ายกับเลือด (Bearden and Fuquay. 1997)



ภาพที่ 1.1 ภาพตัดขวาง seminiferous tubules ของลูกอัณฑะ (Senger. 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์อสุจิประกอบด้วย 2 ส่วนใหญ่ คือ ส่วนหัว และส่วนหาง ซึ่งส่วนหางจะถูกแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ mid-piece, main-piece และ end-piece โครงสร้างในส่วนหางจะมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ และ metabolism ส่วนโครงสร้างหัวของอสุจิมีหน้าที่เกี่ยวกับการปฏิสนธิกับไข่ (Bearden and Fuquay. 1997)

ตารางที่ 2.1 แสดงลักษณะและส่วนประกอบทางเคมีของน้ำเชื้อพ่อสุกร

ส่วนประกอบ	ค่าเฉลี่ย
Ejaculate volume (ml)	150-500
Sperm concentration (million/ml)	200-300
Sperm/ejaculate (billion)	30-60
Motile sperm (%)	50-80
Morphologically normal sperm (%)	70-90
Protein (g/100 ml)	3.7
pH	7.3-7.8
Fructose*	9
Glyceryl phosphoryl choline*	110-240
Citric acid*	173
Inositol*	380-630
Sorbitol*	6-18
Ergothioneine*	17
Sodium*	587
Potassium*	197
Calcium*	6
Magnesium*	5-14
Chloride*	260-430

ที่มา Hafez and Hafez (2000)

*คำนวณส่วนประกอบทางเคมี mg/100 ml.

น้ำกาม ทำหน้าที่แขวนลอย และกระตุ้นให้อสุจิเคลื่อนที่เพื่อนำอสุจิจากระบบสืบพันธุ์เพศผู้ไปยังระบบสืบพันธุ์เพศเมีย และเป็นแหล่งพลังงานเพื่อเลี้ยงตัวอสุจิ (Gerner and Hafes. 1993) สารที่เป็นส่วนประกอบของน้ำกามมีหน้าที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1) inorganic ions ประกอบด้วย โซเดียมและคลอไรด์เป็นส่วนใหญ่ แคลเซียม แมกนีเซียม และโปแทส เซียม มีหน้าที่รักษาแรงดันออสโมติกที่เหมาะสม เพื่อให้ตัวอสุจิมีชีวิตอยู่ได้

2) inorganic ions และ organic ions ได้แก่ ไบคาร์บอเนต มีหน้าที่รักษาสภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH)

3) น้ำตาลฟรุกโตส ซอบิทอล และ glyceryl phosphogleceryl choline (GPC) มีหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานของตัวอสุจิ

4) สารอินทรีย์อื่นๆ เช่น inositol กรดซิติก และ ergothionine เป็นต้น (Bearden and Fuquay. 1997)

นอกจากนี้ยังพบสารป้องกันอันตรายจากเชื้อจุลินทรีย์ (antimicrobial) และ immunoglobulin คือ IgA สามารถเพิ่มระดับของฮอร์โมน androgens, estrogens, prostaglandins, FSH, LH และฮอร์โมนอื่นๆ ได้ และจากการทดลอง พบว่า อสุจิที่ได้จากส่วนของ cauda epididymis ที่ไม่มีน้ำกามผสมอยู่ก็สามารถผสมกับไข่ได้ (Amann and Lutwak-mann. 1981)

2.2 การกำหนดเพศของสิ่งมีชีวิต

การกำหนดเพศในสิ่งมีชีวิตมีความแตกต่างกันไป เช่น บางชนิดอาจถูกกำหนดโดยสิ่งแวดล้อม บางชนิดอาจถูกกำหนดโดยยีน หรือโครโมโซม ปลาบางชนิดในขณะเล็กอยู่จะแสดงความเป็นเพศผู้แต่เมื่อขนาดใหญ่ขึ้นจะกลายเป็นเพศเมีย หรือแม้แต่ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมยังมีความหลากหลายในการที่โครโมโซมเป็นตัวกำหนดในรูปแบบต่างๆ กัน (อมรา คัมภิรานนท์. 2546)

อมรา คัมภิรานนท์ (2546) กล่าวถึงสัตว์ที่มีโครโมโซมเป็นตัวกำหนดเพศ แบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ

1) แบบ heterogametic male คือ เพศผู้มีการสร้างอสุจิได้ 2 แบบ เนื่องจากโครโมโซมเพศ แต่เพศเมียจะมีการสร้างไข่ได้แบบเดียว homogametic female แบ่งได้เป็น 2 กรณี คือ ระบบ XX/XO (XX เพศเมีย/ XO เพศผู้) ตัวอย่างที่พบได้แก่ แมลงใน Order Hemiptera (แมลงปีกแข็ง) และ Order Orthoptera (พวกตั๊กแตน และแมลงสาบ) ระบบ XX/XY (XX เพศเมีย/ XY เพศผู้) พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมทั้งมนุษย์ด้วย และแมลง Order Diptera

2) แบบ heterogametic female เพศเมียมีการสร้างไข่ได้ 2 แบบ เนื่องจากโครโมโซมเพศ แต่เพศผู้จะมีการสร้างอสุจิได้แบบเดียว แบ่งเป็น 2 กรณี คือ XX/XO (XO เพศเมีย/ XX เพศผู้) บางกรณีเขียน ZO/ZZ ตัวอย่างที่พบ นก ปลา ผีเสื้อบางชนิด ระบบ XO/XX (XO เพศเมีย/ XX เพศผู้) บางกรณีเขียน ZW/ZZ ตัวอย่างที่พบ เป็ด ไก่ ผีเสื้อกลางคืน

ทฤษฎีการกำหนดเพศของสัตว์เพศใดเพศหนึ่งจะมีโอกาสในการเกิดอย่างละเท่าๆ กันประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ (Bearden and Fuquay. 1997; Guttenbach *et al.* 1997) การแสดงออกของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะทางเพศจะขึ้นอยู่กับการควบคุมของยีนหลายชุดที่ทำงานร่วมกัน ซึ่งยีนนั้นๆ จะอยู่บนโครโมโซม X และโครโมโซม Y ยีนที่ควบคุมลักษณะเพศผู้ คือ ยีน TDF (testis-determining factor gene) มีตำแหน่งอยู่บนแขนข้างสั้นของโครโมโซม Y และจะพบได้ที่ pseudo-autosomal เท่านั้น (Short. 1982) ยีน TDF เป็นตัวเริ่มต้นในการกำหนดเพศของตัวอ่อน (sex determination) ก่อให้เกิดอัณฑะ และเริ่มขบวนการหลั่งฮอร์โมนชักนำให้มีการพัฒนาลักษณะของเพศผู้ หน้าที่ของยีน TDF จะเปลี่ยนแปลง undifferentiate stroma ให้กลายเป็น sertori cell (somatic differentiation) นอกจากนี้ยีนตัวอื่นๆ ที่อยู่บนโครโมโซม Y และโครโมโซม X จะควบคุมการเปลี่ยนแปลงของ germ cell ให้กลายเป็นเซลล์สืบพันธุ์ (germ cell differentiation) ซึ่งภายหลังจากการกำหนดเพศเกิดขึ้นตัวอ่อนจะมีการพัฒนารูปร่างสรีระ และพฤติกรรมที่แตกต่างไปตามลักษณะของเพศที่ถูกกำหนดขึ้น (Graves and Short. 1990)

2.3 ความแตกต่างของอสุจิ X และอสุจิ Y

การกำหนดเพศทางธรรมชาติถูกกำหนดขึ้นโดยชนิดของอสุจิ X และอสุจิ Y การคัดแยกเพศก่อนการปฏิสนธิ พัฒนาขึ้นโดยอาศัยพื้นฐานความแตกต่างเฉพาะตัวของอสุจิ X และอสุจิ Y (Bjorndahl and Barratt. 2002)

2.3.1 ความแตกต่างด้านรูปร่าง

รูปร่างของตัวอสุจิมีลักษณะคล้ายใบพายโดยอสุจิ X ของมนุษย์เมื่อมองจากด้านบนเส้นขอบข้างมีลักษณะเหมือนลิ่ม ส่วนอสุจิ Y จะเป็นท่อนทรงกลมยอดแหลม (Bahr. 1971) ขนาดของอสุจิ X โดยเฉลี่ยของส่วนหัวถึงคอ และหางจะมีขนาดใหญ่ และมีความยาวมากกว่าอสุจิ Y (Cui. 1997) เมื่อนำความยาวหารด้วยความกว้างของส่วนหัวอสุจิ X และอสุจิ Y พบว่ามีค่าประมาณ 1.6 และ 1.7 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (Mohri *et al.* 1987)

2.3.2 ความแตกต่างของความหนาแน่นของปริมาณ DNA และอัตราการตกตะกอน

ในมนุษย์ปริมาณ DNA และโปรตีนภายในนิวเคลียสของอสุจิ X จะมากกว่าอสุจิ Y อยู่ประมาณ 2-4 เปอร์เซ็นต์ ทำให้อสุจิ X มีน้ำหนักมากกว่าอสุจิ Y และอสุจิ X ของมนุษย์ และโคจะมีสัดส่วนของน้ำหนักมากกว่าอสุจิ Y ใกล้เคียงกันคือประมาณ 3-4 เปอร์เซ็นต์ (Mohri *et al.* 1987) ส่วนอสุจิ X ในสุกร พบว่าน้ำหนักมากกว่าอสุจิ Y มีประมาณ 3.7 เปอร์เซ็นต์ (Johson and Clark. 1988) เนื่องจากปริมาณ DNA และโครโมโซม X มีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซม Y ทำให้ อสุจิ X อสุจิ Y มีความแตกต่างกันในด้านน้ำหนัก รูปร่างอสุจิ และความแตกต่างของความเร็วของการแยกส่วนในการตกตะกอน (Mohri *et al.* 1987)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 ความแตกต่างของลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ

ขนาด และน้ำหนักของอสุจิ X ที่มากกว่าทำให้อสุจิ Y เคลื่อนที่ได้เร็วกว่าอสุจิ X (Ericsson. 1973) และส่วนคอและหางของอสุจิ X มีน้ำหนักมากกว่าอสุจิ Y (Cui. 1997) อสุจิ X ในโค และแกะจะมีความสามารถในการเคลื่อนที่ช้ากว่ากว่าอสุจิ Y ประมาณ 20 และ 30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

2.3.4 ความแตกต่างของประจุบนตัวอสุจิ

ผนังเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิ X จะมีประจุลบมากกว่าอสุจิ Y (Kaneko *et al.* 1983) เนื่องจากมีพื้นที่ผิวส่วนหัวมากกว่าอสุจิ Y ประมาณ 7 เปอร์เซ็นต์ จึงทำให้ผลรวมประจุลบมีมากกว่า (Mohri *et al.* 1987) ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิ X เป็น glycoprotein จำพวก sialic acid และ sulphate ซึ่งมีมากกว่าอสุจิ Y เมื่อผ่านกระบวนการ electrophoresis ทำให้อสุจิ X เคลื่อนที่เข้าหาขั้วบวก และอสุจิ Y จะเคลื่อนที่เข้าหาขั้วลบ (Ishijima *et al.* 1992)

2.3.5 การติดสี Quinacrine fluorochromes

เมื่อย้อมสีด้วย Quinacrine hydrochloride อสุจิ Y เกิดการเรืองแสงเป็นจุดกลม เรียกว่า F-body ภายในนิวเคลียสของโซมาติกเซลล์โดยจุดเรืองแสงที่ปรากฏจะมีขนาด 0.25 ไมโครเมตร (Barlow and Vosa. 1970) เทคนิคนี้สามารถตรวจสอบได้เฉพาะกับโครโมโซม Y ของอสุจิมนุษย์ และลิงกอลิล่า (Pearson *et al.* 1971) การตรวจสอบอสุจิในสัตว์เลี้ยงอื่นๆ พบว่าเกิดจุด F-body เพียง 5-40 เปอร์เซ็นต์ (Ogawa *et al.* 1988) เพราะ F-body ที่ย้อมตัวอสุจิ Y บางตัวไม่ติดสี และมีบางส่วนที่ไม่ใช่อสุจิ Y แต่สามารถเกิดลักษณะ F-body ทำให้ไม่สามารถแยกความแตกต่างของชนิดอสุจิในสัตว์ได้ (Beatty. 1977) จากการทดลองในสุกร พบว่าอสุจิจะแสดงลักษณะ F-body ในช่วง 39.7 ถึง 55.1 เปอร์เซ็นต์ (เฉลี่ย 48.98± 5.6 เปอร์เซ็นต์) ส่วนอสุจิที่อยู่ส่วนล่างของหลอดแสดงลักษณะ F-bodyในช่วง 7.6 ถึง 13.7 เปอร์เซ็นต์ (Othani *et al.* 1988) และจากการศึกษาของกรกนก พรหมเทพ (2552) ตรวจสอบอสุจิในโมนุษย์มพบว่าเกิดจุด F-body 49.75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสามารถใช้ในการแยกอสุจิ Y และ X ได้

2.3.6 ความเป็นกรด-ด่าง

Kaneko *et al.* (1983) กล่าวว่าอสุจิ X จะทนต่อสภาพความเป็นกรดได้ดีกว่าอสุจิ Y ส่วนอสุจิ Y ทนต่อสภาพความเป็นด่างได้ดีกว่าอสุจิ X ขณะเดียวกัน ความสามารถในการทนทานต่อสภาพความเป็นกรด-ด่าง อาจเป็นผลเนื่องมาจากความแตกต่างของประจุที่บนตัวอสุจิแต่ละชนิด

2.3.7 แอนติเจนบนผิวตัวอสุจิ

ความแตกต่างอสุจิ X และ Y ผนังเซลล์ของอสุจิ Y (sperm plasma membrane) สามารถพบ Y-linked histocompatibility antigen (H-Y antigen) บนส่วนของโซมาติกเซลล์ของเพศชาย ซึ่ง H-Y antigen เกี่ยวข้องกับการควบคุมยีนของโครโมโซม Y ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจากการทดลองในหนูเพศเมีย พบว่าไม่สามารถยอมรับการปลูกถ่ายผิวหนังจากหนูเพศผู้ถึงแม้ว่าหนูเพศผู้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ลงในเว็บไซต์เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใช้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นั้นจะคลอดออกมาเพศเดียวกัน แต่กลับยอมรับผิวหนังที่ได้จากเพศเมียด้วยกันเท่านั้น (Gledhill. 1988)

2.4 วิธีการคัดแยกเพศสัตว์

จากความแตกต่างระหว่างอสุจิ X และอสุจิ Y ทำให้มีการพัฒนาเทคนิคการแยกอสุจิก่อนนำมาปฏิสนธิ เพื่อนำอสุจิไปใช้ผสมเทียม สามารถทำได้ 2 วิธีหลักคือ วิธีแรกให้อสุจิเคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์สารละลาย (sperm selection by gradient) (Bjorndahl and Barratt. 2002) และวิธีที่สองอสุจิเคลื่อนที่ผ่านเครื่อง flow cytometer (Johnson. 1995) นอกจากนี้ยังมีวิธีการอื่นๆ เช่น การผ่านกระบวนการ electrophoresis (Kaneko *et al.* 1984) เป็นต้น

2.4.1 การคัดแยกเพศโดยอสุจิผ่านคอลัมน์สารละลาย

การคัดแยกเพศโดยอสุจิผ่านคอลัมน์สารละลายอาศัยความแตกต่างของ รอบการปั่นเหวี่ยงโดยให้น้ำเชื้อผ่านคอลัมน์ของสารละลายเช่น Albumin หรือ PercollTM อสุจิจะผ่านชั้นสารละลายเหล่านี้ อสุจิจะเคลื่อนที่แบบ migration ผ่านความเข้มข้นของสารละลายชั้นต่างๆ ภายในคอลัมน์ที่ใช้แยกตามวิธีการ และขั้นตอนของสารละลายแต่ละชนิด (Bjorndahl and Barratt. 2002)

Albumin gradient

อสุจิที่เคลื่อนที่ผ่านชั้นโบวายซีรั่มอัลบูมินที่มีความเข้มข้นต่างๆกัน พบว่าอสุจิ Y จะเคลื่อนที่ได้เร็วกว่าอสุจิ X ทำให้มีจำนวนอสุจิ Y จะเคลื่อนที่ลงสู่ส่วนล่างของชั้นโบวายซีรั่มอัลบูมิน หลังจากตรวจสอบการย้อมอสุจิที่ผ่านชั้นสารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมินด้วย quinacrine dihydrochoride dye โดยพบว่าที่ชั้นล่างสุดของสารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมินจะเกิดการเรืองแสงของอสุจิ Y ถึง 85 เปอร์เซ็นต์ (Ericsson *et al.* 1973) อย่างไรก็ตามพบว่าอสุจิที่ผ่านการแยกโดยวิธีนี้ อสุจิ Y ลดลง จาก 49.8 เปอร์เซ็นต์ เป็น 42.8 เปอร์เซ็นต์ (Brandriff *et al.* 1986) ในขณะที่ Ueda and Yanagimachi (1987) พบว่าอสุจิที่ผ่านการแยกโดยวิธีนี้ อสุจิ Y เพิ่มขึ้น จาก 43.1 เปอร์เซ็นต์ เป็น 47.3 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามได้มีการทดลองยืนยันผลของการใช้สารละลายโบวายซีรั่มอัลบูมินเพื่อเพิ่มสัดส่วนของอสุจิ Y ในมนุษย์โดยให้ผลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Rose and Wong. 1998)

Sephadex gel filtration

อาศัยหลักการแยกโมเลกุลใหญ่ (อสุจิ X) ออกจากโมเลกุลเล็ก (อสุจิ Y) ด้วยวิธี gel filtration chromatography โดยโมเลกุลเล็กสามารถผ่านลูกปัดเจลเข้าไปแล้วถูกจับไว้ภายในคอลัมน์ ส่วนโมเลกุลใหญ่จะสามารถผ่านรูเม็ดวุ้นได้ จึงแทรกตัวผ่านตาข่ายวุ้นลงไปก่อน (อนันต์ ศรีขาว. 2535) สามารถแยกอสุจิ X ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ จากการตรวจสอบด้วย F-body หลังจากน้ำเชื้อผ่านคอลัมน์ SephadeX G-50 (Adimoelja. 1987) อย่างไรก็ตามขนาดของอสุจิ X และอสุจิ Y แตกต่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กันน้อยมากการแยกกันของอสุจิทั้งสองชนิดอาจไม่ใช่เพียงแต่ขนาดของอสุจิเท่านั้น แต่อาจเนื่องมาจากการดูดซึมของอนุภาควุ้นต่ออสุจิ Y มากกว่าอสุจิ X (Batzofin. 1987)

Density gradient centifugation

อาศัยความแตกต่างระหว่างน้ำหนักของอสุจิโดยใช้แรงเหวี่ยงจากเครื่องมือทำการปั่นแยกอสุจิโดยอสุจิ X ซึ่งมีน้ำหนักมากกว่าอสุจิ Y จะสามารถตกลงสู่ก้นหลอดได้เร็วกว่าอสุจิ Y (อนันต์ ศรีขาว. 2535) สารตัวกลางที่ใช้แยกอสุจิ เช่น เพอร์คอลล์ และ Ficoll หรือ SephadeX (Bjorndahl and Barratt. 2002) หรือซูโครส (Rhode *et al.* 1975) การใช้สารละลายต่างความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ เพื่อนำมาใช้คัดแยกเพศในมนุษย์ พบว่า สามารถแยกสัดส่วนของอสุจิ X ให้เพิ่มมากขึ้น โดยแยกอสุจิได้จากส่วนของก้นหลอดของสารละลาย และแสดงลักษณะการติดสีย้อม F-body เพียง 27.7 ±3.4 เปอร์เซ็นต์ (Kaneko *et al.* 1983) และการทดลองของ Morhi *et al.* (1987) พบว่า ติดสีย้อม F-body 23.3 ±6.3 เปอร์เซ็นต์ แต่การทดลองของ Totsukawa *et al.* (1988) รายงานว่าอสุจิที่ส่วนล่างของหลอดที่ผ่านการแยกโดยเพอร์คอลล์ แสดง F-body 43-44 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่ามีอสุจิ X อยู่ประมาณ 55-56 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่อนข้างจะใกล้เคียงกันมาก และพบว่าการใช้วิธีปั่นแยกและไม่ปั่นแยกให้อสุจิผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ ทำการตรวจสอบ DNA ของอสุจิที่ส่วนล่างของก้นหลอดซึ่งให้ผลแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ Iwasaki *et al.* (1988) รายงานว่าเมื่อนำน้ำเชื้อโคมาปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์แล้วนำไปผสมเทียมในแม่โค และตรวจเพศของตัวอ่อนระยะ blastocyste โดยวิธี chromosome analysis ให้สัดส่วนของลูกโคเพศเมีย และเพศผู้แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Upreti *et al.* (1988) อสุจิโคที่ปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ พบว่าค่าสัดส่วนเพศมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากตรวจสอบการคัดแยกอสุจิด้วยวิธี flow cytometer แต่ในสุกรพบว่าน้ำเชื้อสุกรที่ผ่านสารละลาย เพอร์คอลล์ ปั่นแยกอสุจิ พบว่า กลับเพิ่มสัดส่วน ลูกเพศผู้มากขึ้น (ประมวล แซ่โค้ว. 2540)

2.4.2 Flow cytometer

หลักการของเครื่องนี้คือปริมาณ DNA ที่มีความแตกต่างกันระหว่างอสุจิ X และอสุจิ Y เมื่อให้แสงเลเซอร์ส่องผ่านอสุจิทั้งสองชนิดจะเกิดหักเห และมุมกระเจิงที่แตกต่างกันโดยมีคอมพิวเตอร์ประมวลผลการกระเจิงของแสงที่ตกกระทบกับตะกอนแขวนลอยอสุจิ ทำให้สามารถแยกอสุจิ X ออกจากอสุจิ Y (Johnson. 1995) ในสัตว์เลี้ยงพบว่าความแตกต่างของ DNA ที่เป็นองค์ประกอบของอสุจิ X และอสุจิ Y จะมีค่าประมาณ 3.5-4.5 เปอร์เซ็นต์ (Johnson and Clark. 1988) การคัดแยกอสุจิด้วยวิธีนี้สามารถแยกชนิดของอสุจิ X ได้เฉลี่ย 92.7±1.6 เปอร์เซ็นต์ อสุจิ Y เฉลี่ย 91.2±2.6 เปอร์เซ็นต์ Johnson (1991, 1992) พบว่าเมื่อนำกลุ่มอสุจิ X ที่ผ่านการคัดแยกมาผสมเทียมในแม่สุกร ได้ลูกเพศเมียแรกคลอดคิดเป็น 74 เปอร์เซ็นต์ และเพศผู้ 26 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขณะเดียวกันนำกลุ่มอสุจิ Y ทำการผสมเทียมได้ลูกแรกคลอดเพศผู้ 68 เปอร์เซ็นต์ และเพศเมีย 32 เปอร์เซ็นต์

การแยกอสุจิด้วยวิธีการนี้ อสุจิต้องผ่านแสงเลเซอร์ และผ่านสารเคมี ซึ่งอาจทำให้เกิดความผิดปกติของ DNA (mutation) ของอสุจิเป็นผลให้อัตราการผสมติดต่ำลง (McEvoy. 1992) อีกทั้งไม่สามารถนำวิธีการนี้มาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ได้ เนื่องจากใช้อัตราในการคัดแยกอสุจินาน 350,000 ตัวต่อชั่วโมง และอัตราการตายของตัวอ่อนสูงอาจเป็นเพราะ fluorochrome ที่ติดอยู่ที่ DNA ของอสุจิ และเครื่องคัดแยกอสุจิ Flow cytrometer มีราคาค่อนข้างสูง (Bearden and Fuquay. 1997 ; Johnson. 1995) อย่างไรก็ตามหากนำวิธีนี้มาใช้ร่วมกับเทคนิคการปฏิสนธิภายนอกตัวสัตว์ (*in vitro*) หรือการย้ายฝากตัวอ่อน (Embryo transfer) จะให้ผลตอบแทนที่คุ้มค่ามากกว่า (Johnson. 1995)

2.4.3 Lamina flow

การแยกตัวอสุจิ X และอสุจิ Y ด้วยวิธี Lamina flow นี้อาศัยหลักการที่ตัวอสุจิ X และตัวอสุจิ Y เคลื่อนที่แตกต่างกันในของเหลวที่กำลังไหล ที่มีอัตราการไหลเปลี่ยนไปแบบพาราโบลา โดยที่รูปแบบการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ X จะมีรูปแบบการเคลื่อนที่ตรงกว่าตัวอสุจิ Y เมื่ออยู่ในของเหลวที่กำลังไหลจึงสามารถแยกส่วนกลุ่มที่เคลื่อนที่ตรง หรือ ตัวอสุจิ X ออกมาได้ (อนันต์ ศรีขาว. 2535.) และจากการศึกษาของ Sarker *et al.* (1984) พบว่าสามาถแยกตัวอสุจิ Y เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ และตัวอสุจิ X ได้ 78-80 เปอร์เซ็นต์

2.4.4 Free-Flow Electrophoresis

การแยกเพศอสุจิด้วยวิธี Free-Flow Electrophoresis อาศัยหลักการความแตกต่างของประจุบนเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิ โดยตัวอสุจิ X ที่มีประจุลบมากกว่าจะเข้าหาขั้วบวก (Anode) และตรงกันข้ามตัวอสุจิ Y ที่มีประจุบวกมากกว่าจะเข้าหาขั้วลบ (Cathode) (Kaneko *et al.* 1984) จากการศึกษาของ Mohri *et al.* (1987) พบว่าสามารถแยกตัวอสุจิ X ได้ประมาณ 64 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Ishijima *et al.* (1992) รายงานถึงผลสำเร็จของการแยกอสุจิด้วยวิธีนี้ในน้ำเชื้อของมนุษย์จากการตรวจสอบโดยเทคนิค Polymerase Chain Reaction

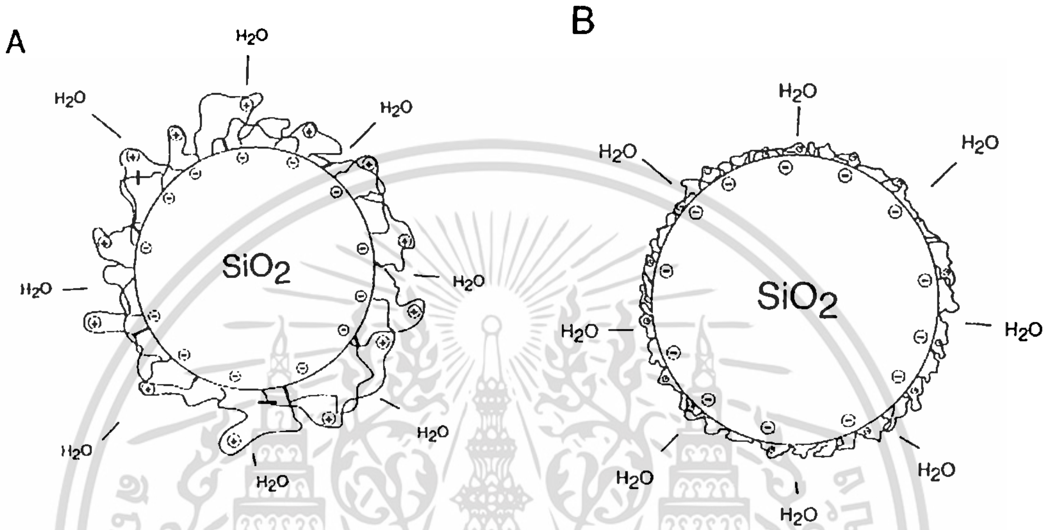
2.5 เพอร์คอลล์

เพอร์คอลล์ (percoll) เป็นอนุภาคซิลิกาที่อยู่ในลักษณะคอลลอยด์เคลือบด้วยสาร polyvinyl pyrollidone (Iwasaki *et al.* 1988) มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 15-34 นาโนเมตร (Pickering *et al.* 1989) มีความหนาแน่นสูงที่สุดที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เท่ากับ 1.30 กรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร (Wilson and Walker. 1994) มีแรงดันออสโมซิส เท่ากับ 275-285 มิลลิออสโมลต่อกิโลกรัม มีความหนาแน่นเท่ากับ 1.123±0.003 (Avery and Grave. 1995) สารละลายเพอร์คอลล์เหมาะที่จะใช้ในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปั่นเหวี่ยง เนื่องจากมีคุณสมบัติที่สามารถเพิ่มความหนาแน่น แต่ไม่มีการเพิ่มแรงดันออสโมซิส และไม่เป็นอันตรายต่ออสุจิ (Mohri *et al.* 1987)

ผลของเพอร์คอลล์ที่อาจก่อให้เกิดการอักเสบในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย จากการทดลองในหนู พบว่าไม่ก่อให้เกิดการอักเสบ เพราะ polyvinyl pyrollidone ที่ห่อหุ้มอนุภาคซิลิกาเป็นตัวป้องกันการอักเสบได้ (Pickering *et al.* 1989)



ภาพที่ 2.2 อนุภาคเพอร์คอลล์ (A) เมื่อละลายอยู่ในน้ำมีขนาด 35 นาโนเมตร (B) คือ อนุภาคเพอร์คอลล์ละลายในสารที่แตกตัวได้ไอออนสูง (higher ionic strength) จะมีขนาด 30 นาโนเมตร (Pertoft. 2000)

2.6 การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

Baracaldo and Ward (2008) กล่าวถึงเหตุผลที่ต้องควบคุมคุณภาพน้ำเชื้อจากพ่อสุกร เพื่อเป็นการเตรียมน้ำเชื้อ สำหรับการผสมเทียมในสุกรนางและสุกรสาว ซึ่ง

1) ไม่พบการแพร่กระจายของสิ่งมีชีวิต หรือเชื้อโรค
2) อายุในการจัดเก็บที่สูงที่สุด
3) ความสมบูรณ์ที่สูงที่สุด

เพื่อให้เกิดความมั่นใจในลักษณะที่ได้กล่าวมานี้ ในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อของ Boar stud ควรจะมีการยืนยันความถูกต้อง โดยให้ทำเป็นงานประจำ ซึ่งสามารถเลือกการควบคุมคุณภาพจากภายใน Boar stud เอง หรือเลือกใช้บริการจากองค์กรอื่นๆ (Baracaldo and Ward. 2008) ลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อที่จำเป็นต้องทำการประเมินมีดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1 การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิมีชีวิต

การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (Motility) จะแสดงค่าออกมาเป็นร้อยละของตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ หรือมีชีวิต การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิจะบ่งบอกถึงความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อสุกร ถ้าหากน้ำเชื้อของพ่อสุกรมีตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าได้มาก และแข็งแรง ในแง่ของการผสมเทียมพ่อสุกรตัวนั้นเหมาะที่จะนำมาใช้งาน

ศรีสุวรรณ ชมชัย (2541) กล่าวถึงการตรวจการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิที่มีชีวิต แบ่งเป็น 2 แบบ

2.6.1.1 การตรวจการเคลื่อนที่แบบกลุ่ม (Mass movement หรือ Wave motion) ส่วนใหญ่จะใช้สำหรับตรวจน้ำเชื้อสดที่รีดเก็บน้ำเชื้อมาใหม่ วิธีนี้สามารถดูการเคลื่อนที่ได้หยาบๆ เพราะตัวอสุจิที่ตายแล้วก็สามารถเคลื่อนที่ได้ โดยแรงการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิที่มีชีวิตจะพาไปซึ่งแบ่งการเคลื่อนที่เป็น 6 แบบ

1) ระดับ 0 ตาย อสุจิทั้งหมดตายไม่มีการเคลื่อนที่

2) ระดับ 1 เลว พบอสุจิพลิกตัวกลับไปมาอยู่กับที่ และมีแนวโน้มจะไม่เคลื่อนที่เลย อัตราเคลื่อนที่ต่ำกว่าร้อยละ 10

3) ระดับ 2 พอใช้ ไม่มีการเคลื่อนที่ให้เห็นมีการเคลื่อนที่ของอสุจิไปข้างหน้าเล็กน้อย ในระดับนี้อสุจิเคลื่อนที่ร้อยละ 20-40

4) ระดับ 3 ดี มองเห็นตัวอสุจิเกาะกันเป็นกลุ่มมากขึ้น แต่ยังมีอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้ามาก มีการเคลื่อนที่ให้เห็นเล็กน้อยสามารถสังเกตเห็นการเคลื่อนที่อสุจิรายตัวได้ ในระดับนี้อสุจิมีการเคลื่อนที่ร้อยละ 45-65

5) ระดับ 4 ดีมาก มีคลื่นของการเคลื่อนที่ให้เห็น แต่ไม่รุนแรงเหมือนในระดับ 5 และมองเห็นตัวอสุจิที่เกาะกันเป็นกลุ่มๆ ได้บ้างในระดับนี้จะมีอสุจิเคลื่อนที่ได้ร้อยละ 70-85

6) ระดับ 5 ดีเลิศ น้ำเชื้อมีความเข้มข้นสูง มีคลื่นการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วเห็นได้ชัด คลื่นที่มองเห็นคล้ายกลุ่มเมฆ การเคลื่อนที่ของอสุจิรายตัว ไม่สามารถสังเกตเห็นได้ ในระดับนี้ตัวอสุจิมีการเคลื่อนที่ร้อยละ 90

2.6.1.2 การเคลื่อนที่รายตัว (Individual movement) ใช้สำหรับตรวจการเคลื่อนที่อสุจิที่เจือจางแล้ว ในกรณีของน้ำเชื้อพ่อสุกรที่ความเข้มข้นต่ำสามารถตรวจการเคลื่อนที่รายตัวได้ การเคลื่อนที่รายตัวสามารถจำแนกได้คือ

1) การเคลื่อนที่แบบพุ่งไปข้างหน้า (Progressive movement) ปกติแล้วน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีจะต้องมีอสุจิการเคลื่อนที่แบบพุ่งไปข้างหน้าเป็นจำนวนมาก การตรวจการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิที่พุ่งไปข้างหน้ามีความสำคัญที่สุดในการทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อสุกร เพราะว่าจะมีความสัมพันธ์อย่างสูงกับจำนวนอสุจิมีชีวิตที่ผสมเทียมให้กับแม่สุกร การตรวจการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เคลื่อนที่รายตัวนี้จะอ่านค่าการเคลื่อนที่เป็นเลขจำนวนเต็มมีอัตราการเคลื่อนที่เป็นร้อยละ เช่น 40, 50, 60, 70 เป็นต้น การดูการเคลื่อนที่รายตัวสังเกตจากการเคลื่อนที่รายตัวอย่างรวดเร็วทีละ 10 ตัว โดยดูว่า ใน 10 ตัวที่ เห็นนั้นเคลื่อนที่กี่ตัว และมีกี่ตัวที่ไม่เคลื่อนที่ แล้วก็เลื่อนดูในตำแหน่งอื่นๆ ต่อจนครบ 100 ตัว แล้วคิดเป็นร้อยละของตัวอสุจิที่เคลื่อนที่

2) การเคลื่อนที่แบบหมุนวนเป็นวงกลม หรือการเคลื่อนที่กลับหลัง การเคลื่อนที่แบบนี้อาจเกิดจากความผิดปกติส่วนหางของอสุจิ หรืออาจเกิดจากอุณหภูมิต่ำลงอย่างรวดเร็วทันทีทันใด หรือน้ำเชื้อนั้นมีน้ำปะปนอยู่ นอกจากนี้แรงดันออสโมติกของสารละลายน้ำเชื้อต่ำเนื่องมาจากความผิดพลาดในการเตรียมเคมีก็เป็นสาเหตุให้อสุจิการเคลื่อนที่แบบหมุนวนเป็นวงกลม หรือการเคลื่อนที่กลับหลังได้ บางครั้งจะพบว่าอสุจิมีการสั่น (Vibrating or rocking movement) ซึ่งจะพบในตัวอสุจิที่มีอายุมาก

3) การเคลื่อนที่อยู่กับที่ (Non-movement) จะพบตัวอสุจิอยู่กับที่แต่มีการกระดิกของหางอาจจะเกิดเนื่องจากตัวอสุจิได้รับอุณหภูมิเย็นเกินไป หรือเป็นอสุจิที่กำลังตาย

4) อสุจิไม่เคลื่อนที่เลย (Dead sperm) อสุจิทุกตัวตายหมด

Baracaldo and Ward (2008) กล่าวว่าในปัจจุบันได้มีการใช้ระบบคอมพิวเตอร์มาช่วยในการวิเคราะห์อสุจิ (Computer Assisted System Analysis; CASA) เช่น Sperm Vision ระบบของ CASA ประกอบไปด้วยกล้องถ่ายรูปที่เชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์ ซึ่งวางด้านบนของกล้องจุลทรรศ์สามตาเพื่อใช้ในการประเมินตัวอย่างน้ำเชื้อ กล้องถ่ายรูปสามารถถ่ายรูปตัวอย่างต่อเนื่องได้ 30 รูปอย่างรวดเร็วใช้เวลารูปละ 0.5 วินาที คอมพิวเตอร์สามารถเห็นอสุจิเป็นรายตัว ขนาดของหัวอสุจิและวิเคราะห์รูปแบบการเคลื่อนที่ของอสุจิได้ ในการประเมินค่าการเคลื่อนที่ของอสุจิต่อหนึ่งตัวอย่างควรจะประเมินค่า 7 อาณาเขตเพื่อความแม่นยำ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิยอมรับอย่างน้อยที่สุด คือ 70% หากเซลล์อสุจิมีการเคลื่อนที่แบบไปข้างหน้าจะเรียกว่า "Progressive motility"

2.6.2 ความเข้มข้นของน้ำเชื้อ

ศรีสุวรรณ ชมชัย (2541) กล่าวว่าความเข้มข้นของน้ำเชื้อพ่อสุกรจะแตกต่างกันออกไป แม้แต่พ่อสุกรตัวเดียวกันน้ำเชื้อที่รีดได้ในแต่ละครั้งก็อาจจะแตกต่างกันออกไปได้ ความเข้มข้นของอสุจิที่รีดได้นั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น พันธุ์ อายุ น้ำหนัก สุขภาพ ความชำนาญและเทคนิคของมนุษย์รีดน้ำเชื้อ เป็นต้น โดยทั่วไปความเข้มข้นของน้ำเชื้อพ่อสุกรเฉลี่ยอยู่ที่ 200-300 ล้านตัว/มิลลิลิตร หากพบว่าพ่อสุกรมีความเข้มข้นของน้ำเชื้อต่ำกว่านี้ แสดงว่าพ่อสุกรอาจจะอายุน้อยเกินไป รีดน้ำเชื้อถี่เกินไป หรืออาจจะเป็นหมันได้

Baracaldo and Ward (2008) กล่าวว่า เนื่องจากความเข้มข้นของเซลล์อสุจิในน้ำเชื้อจะสูงมากจึงมีความจำเป็นต้องเจือจางน้ำเชื้อจากตัวอย่างก่อน ควรรู้ระดับของการเจือจางเพื่อลดความเข้มข้นอสุจิ และทำให้สามารถมองเห็นเซลล์อสุจิเป็นรายตัวซึ่งสามารถนับความเข้มข้นของเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อสุจิต่อมิลลิลิตร ประเมินจากการนำอสุจิที่เจือจางในสารละลายใส่ลงไปในช่องของ Haemocytometer และทำการนับเซลล์อสุจิเป็นรายตัวจากกล้องจุลทรรศน์ ในการคำนวณทางคณิตศาสตร์จะต้องรู้สูตรที่ใช้ในการเจือจาง และนับเซลล์อสุจิ เทคนิคเหล่านี้ได้รับการพิจารณาจาก Gold Standard ในการคำนวณความเข้มข้นของเซลล์อสุจิต่อมิลลิลิตรในสารละลาย ความเข้มข้นต่อมิลลิลิตรที่ได้จาก Haemocytometer นำไปคูณกับปริมาตรทั้งหมดที่ได้ และจัดเตรียมจำนวนรวมอสุจิที่จะใช้ต่อโดส

ทางเลือกอื่นที่สามารถช่วยในการเตรียมขั้นตอนนี้ คือ ใช้ระบบของ CASA Sperm Vision สามารถคำนวณความเข้มข้นอสุจิต่อมิลลิลิตรได้ เมื่อมีการประเมินการเคลื่อนที่ของอสุจิแล้ว ในรายงานสุดท้ายของ CASA จะสามารถวิเคราะห์จำนวนรวมของเซลล์อสุจิต่อโด๊สในน้ำเชื้อได้ ประโยชน์ที่ดีมากของระบบ CASA Sperm Vision คือ สามารถใช้ร่วมกันกับ Haemocytometer ในการคำนวณหาความเข้มข้นอสุจิ และคอมพิวเตอร์สามารถจับภาพเซลล์อสุจิเป็นรายตัว เพื่อใช้ในการคำนวณของคอมพิวเตอร์ (Baracaldo and Ward. 2008)

2.6.3 รายระเอียดความแตกต่างของรูปร่างเซลล์อสุจิ

หากเกิดความสงสัยความสมบูรณ์พันธุ์ของระบบสืบพันธุ์ในพ่อสุกร สามารถประเมินรายละเอียดของรูปร่างเซลล์อสุจิ โดยหยดน้ำเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ ให้หยด Glutaraldehyde ลงไปเล็กน้อยจะทำให้เซลล์อสุจิไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ หลังจากนั้นใช้แผ่นปิดสไลด์วางปิดบนหยดน้ำเชื้อ ทำการประเมินรายละเอียดความแตกต่างของรูปร่างเซลล์อสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า โดยใช้ Immersion oil และส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด Phase contrast หรือ Different interference contrast (DIC) ก็ได้ในการประเมิน ทางเลือกอื่นในการประเมินรายละเอียดความแตกต่างของรูปร่างเซลล์อสุจิ คือ การย้อมสีอสุจิด้วยสีย้อม Eosin-Nigrosin ประเมินด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่าโดยใช้ Immersion oil และใช้แสงจ้า หรือ Phase contrast ก็ได้ในการประเมิน เซลล์อสุจิอย่างน้อย 100 เซลล์ ต่อหนึ่งตัวอย่างของการจำแนกประเภทรูปร่างอสุจิ (Baracaldo and Ward. 2008)

พื้นฐานในการจำแนกความแตกต่างรูปร่างของเซลล์อสุจิ คือ เซลล์อสุจิปกติ, ความผิดปกติของส่วนหัว, ความผิดปกติของส่วนหาง และหยดน้ำ อย่างไรก็ตามสามารถจัดแบ่งประเภทให้กว้างอีก เช่น ความผิดปกติของ Acrosome ส่วนหัวแยกออกจากส่วนหาง, ความผิดปกติบริเวณกลางหาง หยดน้ำที่โคนหาง หยดน้ำบริเวณปลายหาง เซลล์ Teratoid และอื่นๆ ที่พบ เป็นต้น (Baracaldo and Ward. 2008)โดยทั่วไปอสุจิที่มีลักษณะผิดปกติควรอยู่ในช่วง 8-10 เปอร์เซ็นต์ จะไม่กระทบต่ออัตราการผสมติด แต่หากว่ามีเปอร์เซ็นต์อสุจิผิดปกติมากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ ต่อการหลั่งน้ำเชื้อหนึ่งครั้งจะมีผลให้อัตราผสมติดลดลง (Bearden and Fuquay. 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 การเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์

การปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อที่ผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เป็นวิธีหนึ่งในการเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อของมนุษย์ในเพศชายที่มีปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ เช่น การมีความเข้มข้นของตัวอสุจิต่ำ หรือการมีน้ำเชื้อที่ตัวอสุจิเคลื่อนที่ได้ต่ำ น้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายของเพอร์คอลล์อสุจิจะมีการเคลื่อนที่ที่ดีขึ้น ตัวอสุจิผิดปกติลดลง ทำให้ประสิทธิภาพอสุจิสามารถผสมกับไข่ได้เพิ่มขึ้น โดยพบว่าเมื่อปั่นน้ำเชื้อผ่านสารละลายของเพอร์คอลล์ตั้งแต่ 35-100 เปอร์เซ็นต์ 6 ระดับความเข้มข้น ปั่นที่ 400 xg นาน 15 นาที พบว่าอสุจิหลังการปั่นเหวี่ยงจะมีตัวเคลื่อนที่ได้เพิ่มขึ้นจาก 35 เปอร์เซ็นต์ เป็น 45 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วของการเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นจาก 32 ไมโครเมตรต่อวินาที เป็น 49 ไมโครเมตรต่อวินาที ตัวอสุจิผิดปกติลดลงจาก 81 เปอร์เซ็นต์ เป็น 76 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการผสมติดเพิ่มขึ้นจาก 6 เปอร์เซ็นต์ เป็น 27 เปอร์เซ็นต์ (Hyne *et al.* 1986)

Kaneko *et al.* (1986) รายงานการปั่นเหวี่ยงอสุจิของมนุษย์ในเพศชายที่มีปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ โดยได้ปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ 4 ระดับ ตั้งแต่ 40-80 เปอร์เซ็นต์ ปั่นที่ 600 xg นาน 30 นาที พบว่าอสุจิมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเพิ่มขึ้นจาก 64±1.5 เป็น 93±4.1 เปอร์เซ็นต์ อสุจิมีชีวิตเพิ่มขึ้นจาก 70±1.2 เป็น 92±3.2 เปอร์เซ็นต์ และอสุจิผิดปกติลดลงจาก 24±9.3 เป็น 5.2±1.4 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีรายงานอื่นๆ พบว่าการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน จะได้อสุจิส่วนล่างของหลอดมีคุณภาพสูงขึ้น (Mohri *et al.* 1987 ; Kaneko *et al.* 1987 ; McClure *et al.* 1989) เนื่องจากการปั่นเหวี่ยงจะเป็นการช่วยกำจัดสิ่งแปลกปลอมปนในน้ำเชื้อ เช่น เศษเซลล์ (Bollendorf *et al.* 1994) อสุจิที่ตาย แบคทีเรีย ซากเศษเซลล์ที่ตายแล้ว และคัดเลือกเอาตัวอสุจิออกจากน้ำเชื้อ โดยอาศัยการเคลื่อนที่ของอสุจิ และลักษณะรูปพรรณสัณฐาน ซึ่งทำให้อสุจิที่อยู่ส่วนล่างของหลอดมีการเคลื่อนที่ได้สูงขึ้น และทำให้อสุจิที่มีรูปร่างปกติสูงขึ้นไปด้วย (Arcidiacono *et al.* 1983 ; Kaneko *et al.* 1986 ; Pickering *et al.* 1989)

Grant *et al.* (1994) ศึกษาน้ำเชื้อสุกรที่ปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ 2 ระดับความเข้มข้น 40 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ปั่นที่ 300 xg เป็นเวลา 35 นาที เปรียบเทียบกับการปั่นเหวี่ยงที่ไม่มีชั้นต่างระดับของสารลายเพอร์คอลล์ ปั่นที่ 250 xg เป็นเวลา 4 นาที พบว่าอสุจิที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์จะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิสูงกว่าการปั่นเหวี่ยงที่ไม่มีชั้นสารละลายเพอร์คอลล์ เท่ากับ 52±8 เปอร์เซ็นต์ และ 77.5±3.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน มีอสุจิที่เคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว (rapid motility) สูงกว่าการปั่นเหวี่ยงที่ไม่มีชั้นสารละลายเพอร์คอลล์ โดยมีค่าเฉลี่ย 77.7±3.5 เปอร์เซ็นต์ และ 39.5±4.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.001$) และมีความเร็วของอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูงกว่าโดยมีค่าเฉลี่ย 83.3±5.7 ไมโครเมตร

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ต่อวินาที เปรียบเทียบกับการปั่นเหวี่ยงที่ไม่มีชั้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีค่าเฉลี่ย 27.5±0.6 ไมโครเมตรต่อวินาที แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.001$) นอกจากนี้ยังพบว่าหากนำอสุจิที่ปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันผสมภายนอกตัวสัตว์จะมีอัตราการแบ่งเซลล์ (cleavage rate) เฉลี่ย 60.3 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าการปั่นเหวี่ยงที่ไม่มีชั้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีอัตราการแบ่งเซลล์ เฉลี่ย 11.6 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.0001$) และการที่มีอัตราการผสมติดดีขึ้นเนื่องจากการเคลื่อนที่ของอสุจิดีขึ้นทำให้โอกาสในการผสมติดสูงขึ้น รวมถึงความแข็งแรงของการเคลื่อนที่ที่ส่วนหัวของอสุจิมากขึ้น จะช่วยทำให้อสุจิมีประสิทธิภาพในการปฏิสนธิสูงขึ้น

Parrish *et al.* (1995) รายงานการเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อของโค โดยนำน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อโคที่ผ่านการอุ่น มาทำการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันที่ระดับ 40 และ 90 เปอร์เซ็นต์ และปั่นเหวี่ยงที่ 700 xg นานเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำน้ำเชื้อบริเวณด้านล่างหลอดมาตรวจการเคลื่อนที่ของอสุจิ เปรียบเทียบกับอสุจิที่ได้จากการแยกน้ำอสุจิโดยวิธี swim-up พบว่า น้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่อสุจิเฉลี่ย 40±4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการแยกน้ำเชื้อโดยวิธี swim-up มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่อสุจิเฉลี่ย 9±1 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และเปรียบเทียบความสามารถในการปฏิสนธิอสุจิภายนอกตัวสัตว์ ของอสุจิที่แยกได้จากทั้ง 2 วิธี พบว่าอสุจิที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันมีอัตราการเจาะไข่ เฉลี่ย 52±8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะน้อยกว่าการแยกน้ำอสุจิโดยวิธี swim-up ที่มีอัตราการเจาะไข่ เฉลี่ย 74±5 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

สอดคล้องกับงานทดลองของ Avery and Greve (1995) ศึกษาอัตราการเกิดของตัวอ่อนในระยะเริ่มต้นจากการผสมภายนอกตัวสัตว์ของไข่ที่ผสมโดยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการอุ่น เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้น 55 และ 90 เปอร์เซ็นต์ และน้ำเชื้อที่ผ่านการล้างโดยไม่ผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ พบว่าตัวอ่อนระยะ cleavage (อายุ 2 วัน) ของน้ำเชื้อที่ผ่านการล้างแบบธรรมดามีอัตราการเกิดตัวอ่อนเท่ากับ 73 เปอร์เซ็นต์ ส่วนน้ำเชื้อที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ มีอัตราการเกิดตัวอ่อนเท่ากับ 33 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

สารละลายเพอร์คอลล์ไม่ส่งผลต่ออัตราการเจาะ เนื่องจากการทดลองเติมสารละลายเพอร์คอลล์ลงใน fertilization medium ที่ระดับต่างๆ กัน พบว่าไม่ได้ทำให้อัตราการเจาะไข่ของอสุจิลดลง (Parrish *et al.* 1995) แต่อาจจะเกิดจากสาร polyvinyl pyrollidone ที่ไม่มีการเคลือบอนุภาคซิลิกาในสารละลายเพอร์คอลล์ จะมีถึง 1-2 เปอร์เซ็นต์ polyvinyl pyrollidone จะไปเคลือบตัวอสุจิจะไม่มีผลกระทบต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิ แต่จะทำให้ความสามารถในการเจาะไข่ลดน้อยลง นอกจากนี้ยังพบว่าอสุจิมนุษย์ที่อยู่ในสารละลาย polyvinyl pyrollidone เข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษา เท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

132470

มากกว่า 10 นาที จะทำให้อสุจิตาย และความเข้มข้น polyvinyl pyrollidone 0.01 เปอร์เซ็นต์ จะทำให้การเคลื่อนที่ของอสุจิเพิ่มขึ้นชั่วคราว (Avery and Greve. 1995) อย่างไรก็ตามการลดลงของความสามารถในการเจาะไข่สามารถแก้ไขได้โดยการเพิ่มจำนวนอสุจิที่ใช้ในการปฏิสนธิ (Parrish *et al.* 1995)

นอกจากนี้ กรกนก พรหมเทพ (2552) ศึกษาน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โคที่ปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้น 65 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ปั่นที่ 250 xg เป็นเวลา 20 นาที พบว่า อสุจิจะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูงกว่าก่อนการปั่นเหวี่ยง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) และพบว่าอสุจิที่มีลักษณะผิดปกติ (46.07%) ของน้ำเชื้อก่อนการปั่นเหวี่ยงสูงกว่าน้ำเชื้อภายหลังการปั่นเหวี่ยงทุกระดับชั้นของสารละลายเพอร์คอลล์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

จากการศึกษาของ Resende *et al.* (2009) นำน้ำเชื้อโคแช่แข็งที่ผ่านการอุ่นมาปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ 500 xg เป็นเวลา15 นาที ที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อก่อนและหลังการปั่นเหวี่ยง พบว่าก่อนการปั่นเหวี่ยงอสุจิมีการเคลื่อนที่ 70 เปอร์เซ็นต์ และหลังจากการปั่นเหวี่ยงอสุจิมีการเคลื่อนที่ 73 เปอร์เซ็นต์ พบว่าดีขึ้น และจากการย้อมสีอสุจิด้วยสีย้อม Trypan blue-Giemsa ก่อนและหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ พบว่าหลังการปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลายเพอร์คอลล์จะมีเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตที่มีอะโครโซม 19 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบกับก่อนการปั่นเหวี่ยงมีค่า 10 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$) เปอร์เซ็นต์อสุจิตายที่ไม่มีอะโครโซมก่อนปั่นเหวี่ยงมีค่าเท่ากับ 35เปอร์เซ็นต์ หลังการปั่นเหวี่ยงมีค่าเท่ากับ 16 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$) ดังนั้นการปั่นเหวี่ยงอสุจิด้วยสารละลายเพอร์คออล์จะเป็นการเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้ออสุจิให้ดีขึ้น

จากการศึกษาของ Machado *et al.* (2009) โดยการนำน้ำเชื้อโคแช่แข็งที่ผ่านการอุ่นมาปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลายเพอร์คอลล์ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม (ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง), กลุ่มการทดลองที่ 1 ปั่นเหวี่ยงที่ 700 xg เป็นเวลา 20 นาทีใช้ความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 45 เปอร์เซ็นต์และ 90 เปอร์เซ็นต์ ใช้ centrifuge tubes 2 มิลลิลิตร กลุ่มการทดลองที่ 2 ปั่นเหวี่ยงที่ 700 xg เป็นเวลา 20 นาทีใช้ความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 45 เปอร์เซ็นต์และ 90 เปอร์เซ็นต์ ใช้ centrifuge tubes 400 มิลลิลิตร กลุ่มการทดลองที่ 3 ปั่นเหวี่ยงที่ 500 xg เป็นเวลา 5 นาที ใช้ความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 45 เปอร์เซ็นต์และ 90 เปอร์เซ็นต์ ใช้ centrifuge tubes 400 มิลลิลิตร พบว่าหลังการปั่นเหวี่ยงเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่อสุจิในกลุ่มการทดลองที่1, 2 และ 3 เท่ากับ 76.3±3.1, 77.9±3.8, 74.6±4.0 เมื่อเปรียบเทียบกับก่อนการปั่นเหวี่ยงเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่อสุจิเท่ากับ 41.3±3.6 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เปอร์เซ็นต์อสุจิปกติ พบว่ากลุ่มการทดลองที่ 2 และ 3 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) จากกลุ่มควบคุม มีค่าเท่ากับ 89.2±2.1, 88.6 ±2.4 และ83.8±2.3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาของ Mehmood *et al.* (2009) นำน้ำเชื้อกระบือแช่แข็งที่ผ่านการอุ่นมาปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลายเพอร์คอลล์ 700 xg เป็นเวลา 15 นาทีใช้ความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 45 เปอร์เซ็นต์ และ 90 เปอร์เซ็นต์ พบว่าก่อนการปั่นเหวี่ยงอสุจิมีการเคลื่อนที่ 38.5±4.9 เปอร์เซ็นต์ และหลังจากการปั่นเหวี่ยงอสุจิมีการเคลื่อนที่ 63.1±9.0 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

จากการศึกษาของ Li *et al.* (2010) นำน้ำเชื้อปลาคาร์พ อายุ 5 ปี น้ำหนักประมาณ 4-5 กิโลกรัมที่ผ่านการแช่แข็งที่ผ่านการอุ่นมาปั่นเหวี่ยงด้วยสารละลายเพอร์คอลล์ 300 xg เป็นเวลา 10 นาที ใช้ความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 45 เปอร์เซ็นต์และ 90 เปอร์เซ็นต์ พบว่าก่อนการปั่นเหวี่ยงอสุจิมีการเคลื่อนที่ 23.36±2.98 เปอร์เซ็นต์ และหลังจากการปั่นเหวี่ยงอสุจิมีการเคลื่อนที่ 65.81±5.19 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และหลังจากการปั่นเหวี่ยงอสุจิมีเปอร์เซ็นต์ปกติเพิ่มขึ้นจาก 57.92±4.65 เปอร์เซ็นต์ เป็น 83.66±4.38 เปอร์เซ็นต์ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

2.8 การแยกอสุจิ X และอสุจิ Y โดยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

อาศัยหลักการของแรงเหวี่ยงจากการปั่นจะทำให้อสุจิ X ที่หนักกว่าจะตกลงสู่ส่วนล่างของหลอดได้เร็วกว่าอสุจิ Y ที่มีน้ำหนักเบากว่า หากให้อสุจิตกผ่านไปในสารละลายต่างระดับความหนาแน่นที่เพิ่มขึ้นทีละน้อยประสิทธิภาพของการแยกอสุจิก็จะเพิ่มขึ้นตามลำดับ (อนันต์ ศรีขาว. 2535)

Kaneko *et al.* (1983) ศึกษาการปั่นเหวี่ยงอสุจิของมนุษย์ผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ระดับความเข้มข้น โดยมีความเข้มข้นตั้งแต่ 43-84 เปอร์เซ็นต์ ที่ 250 xg นาน 20 นาที พบว่าอสุจิส่วนล่างของหลอดแสดงลักษณะ F-body จากการย้อมสี Quinacrine 27.4± 3.4 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่อสุจิลดลงเล็กน้อย

นอกจากนี้ Kaneko *et al.* (1984) ศึกษาการปั่นเหวี่ยงอสุจิของมนุษย์ผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน คือ 6, 8, 10 และ 12 ระดับความเข้มข้น พบว่ายิ่งจำนวนชั้นต่างระดับความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น การแยกอสุจิ X ก็จะมีประสิทธิภาพมากขึ้น ปริมาณอสุจิด้านล่างของหลอดขึ้นอยู่กับจำนวนรอบของการปั่นเหวี่ยง และระยะเวลาในการปั่นเหวี่ยง จากการทดลองพบว่าสภาพที่ดีที่สุดในการแยกอสุจิ X คือ จำนวนชั้นต่างระดับความเข้มข้น 12 ระดับโดยมีความเข้มข้นตั้งแต่ 25-80 เปอร์เซ็นต์ ปั่นที่ 250 xg นาน 30 นาที จะทำให้ได้อสุจิส่วนล่างของหลอดประมาณ 94 เปอร์เซ็นต์ ที่ไม่แสดงลักษณะ F-body จากการย้อมสี Quinacrine อสุจิที่ได้ยังคงมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้า 96 เปอร์เซ็นต์ จากการที่พบอสุจิ X ส่วนล่างของหลอดมากกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อสุจิ Y แสดงว่าอสุจิ X มีการตกตะกอนและมีความสามารถในการผ่านความตึงผิวได้ดีกว่าอสุจิ Y อาจเนื่องจากความแตกต่างของรูปร่างที่ส่วนหัวของอสุจิของน้ำหนักโครโมโซมอาจทำให้แรงโน้มถ่วงที่กระทำต่ออสุจิ X และอสุจิ Y ต่างกันออกไป ทำให้มีผลต่อความต้านทานในการเคลื่อนผ่านแรงตึงผิวของเพอร์คอลล์ในระหว่างการตกตะกอนของอสุจิ

จาการศึกษาของ Othani *et al.* (1988) ในน้ำเชื้อสุกรโดยทำการปั่นเหวี่ยงแยกอสุจิผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 7 ระดับความเข้มข้น จะตรวจสอบอสุจิที่กลางหลอดโดยใช้วิธี F-body จากการย้อมสี Quinacrine พบว่าอสุจิจะแสดงลักษณะ F-body ในช่วง 39.7 ถึง 55.1 เปอร์เซ็นต์ (เฉลี่ย 48.98± 5.6 เปอร์เซ็นต์) ส่วนอสุจิที่อยู่ส่วนล่างของหลอด แสดงลักษณะ F-bodyในช่วง 7.6 ถึง 13.7 เปอร์เซ็นต์ (เฉลี่ย 10.1± 2.1 เปอร์เซ็นต์) นอกจากนี้ยังพบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการปั่นเหวี่ยงไม่แตกต่างกับก่อนการปั่นเหวี่ยง

ประมวล แซ่โค้ว (2542) ศึกษาการแยกเพศในน้ำเชื้อสุกรที่ผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 3, 5 และ 8 ชั้น ปั่นที่ 100 xg นาน 10 นาทีและนำอสุจิส่วนล่างหลอดไปผสมเทียมกับสุกรเพศเมีย พบว่าลูกที่เกิดมามี เปอร์เซ็นต์ลูกเพศผู้เท่ากับ 51.61 63.49 และ 66.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และนอกจากนี้ยังพบว่าภายหลังการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ 5 และ 8 ชั้น นำอสุจิส่วนล่างหลอดไปตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อพบว่าสามารถลดเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติได้ ($p<0.01$) ซึ่งหากต้องการได้อสุจิ X ด้านล่างหลอดควรเพิ่มความเร็วในการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์

กรกนก พรหมเทพ (2552) ศึกษาการแยกเพศในน้ำเชื้อโคผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 7 ชั้น ปั่นที่ 250 xg นาน 20 นาที และนำน้ำเชื้อที่ปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ 65-75 เปอร์เซ็นต์ ที่มีอสุจิ X มาก (จากการตรวจสอบโดยการย้อมสี Quinacrine นำไปผสมเทียม พบว่าได้ลูกโคเพศเมีย 71.43 เปอร์เซ็นต์)

2.9 การตรวจสอบการคัดแยกอสุจิ X และอสุจิ Y

การตรวจสอบเพื่อเป็นการยืนยันว่าอสุจิที่ทำการแยกได้โดยวิธีต่างๆ นั้นมีจำนวนและสัดส่วนของอสุจิ X และอสุจิ Y ประสบผลสำเร็จตามที่ต้องการหรือไม่มีวิธีการตรวจสอบดังนี้

2.9.1 จำนวนลูกแรกเกิด (Sex of offspring)

เป็นการตรวจประสิทธิภาพการคัดแยกอสุจิในทางอ้อม โดยนับจำนวนลูกที่เกิดว่ามีสัดส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย อสุจิที่แยกได้นำไปผสมเทียมเพื่อดูเพศลูกเมื่อแรกคลอด วิธีนี้สามารถใช้ตรวจสอบความสมบูรณ์พันธุ์ จำนวนลูกมีชีวิต และประสิทธิภาพในการคัดแยกชนิดอสุจิแต่ละวิธี แต่เนื่องจากต้องรอให้แม่สัตว์ตั้งท้องจนกระทั่งคลอด เพื่อเก็บข้อมูลสัดส่วนเพศให้มีจำนวนมากพอมาใช้วิเคราะห์ในทางสถิติ จึงสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น (Winsor *et al.* 1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.9.2 การเรืองแสง (Quinacrine staining)

เป็นการย้อมอสุจิด้วยสารเรืองแสง Quinacrine เพื่อการตรวจสอบเฉพาะอสุจิ Y เท่านั้นซึ่งสามารถแยกได้ดีกับอสุจิของมนุษย์ (Barlow and Vosa. 1970) และจากการศึกษาของ กรกนก พรหมเทพ (2552) พบว่าย้อมอสุจิโคด้วยสารเรืองแสง Quinacrine สามารถแยกอสุจิ Y ของโคได้

2.9.3 การตรวจสอบโครโมโซมอสุจิ (Sperm karyotype analysis)

การวิเคราะห์รูปแบบการเรียงตัวของโครโมโซมโดยการให้อสุจิเจาะผ่าน zona free hamster egg หลังเจาะผ่านแล้วโครโมโซมจะเริ่มคลายตัว และเข้าสู่การแบ่งเซลล์ระยะ Metaphase นำโครโมโซมที่แบ่งตัวในระยะนี้มาวิเคราะห์ว่าเป็นโครโมโซม X หรือโครโมโซม Y แต่วิธีการค่อนข้างซับซ้อนจึงต้องมีความละเอียดในขั้นตอนการตรวจสอบ (Ueda and Yanagimachi. 1987) เป็นการตรวจสอบที่ต้องใช้ตัวอย่างจำนวนมากกว่า 250 ตัวอย่างเพื่อกำจัดค่าความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้น จากขั้นตอนสุ่มการปฏิสนธิของอสุจิ X และอสุจิ Y (Amann. 1989) วิธีนี้ใช้เวลามากและมีข้อจำกัดของตัวอย่างในการวิเคราะห์ ทำให้การเก็บข้อมูลได้จำนวนน้อย แต่มีความแม่นยำสูงกว่าการตรวจสอบด้วยสี Quinacrine (Winsor *et al.* 1993)

2.9.4 Flow Cytometer

อสุจิจะถูกย้อมด้วย DNA-specific fluorescent เช่น Hoechst33342 ซึ่งเป็น bisbenzimideจะทำปฏิกิริยาเข้าจับกับเบส adenine-thymine ที่สาย DNA อสุจิที่ถูกย้อมด้วยสี เมื่อผ่านเครื่อง flow cytometer จะถูกกระตุ้นด้วยแสงเลเซอร์ แล้วทำการประมวลผลจากแสงที่ตกกระทบกับอสุจิ จากลักษณะเรืองแสงที่แตกต่างกันออกไประหว่างอสุจิ X และอสุจิ Y ตามปริมาณ DNA จึงสามารถแยกอสุจิ X และอสุจิ Y ออกจากกันได้ (Johnson and Clark. 1988) เป็นการตรวจสอบที่ให้ผลรวดเร็ว และแม่นยำสูง (Johnson. 1995)

2.9.5 H-Y Antibodies

อสุจิ Y มี H-Y Antigen บนผนังเซลล์มากกว่า และมีปริมาณ DNA น้อยกว่าอสุจิ X โดยใช้ antibody ชนิดที่ 1 ซึ่งมีความจำเพาะต่อ H-Y Antigen ของอสุจิ Y จากนั้นใช้ antibody ชนิดที่ 2 ซึ่งจำเพาะกับ antibody ชนิดที่ 1 จับทำให้สามารถนับอสุจิ Y ได้จากการนับอสุจิที่ติดสารเรืองแสง fluorescent จึงสามารถแยกอสุจิ X ออกจากอสุจิ Y ได้ (อนันต์ ศรีขาว. 2535)

2.9.6 การตรวจสอบ DNA

ต้องทราบลำดับเบสบางส่วนบนโครโมโซม Y ซึ่งสามารถนำมาตรวจสอบด้วยวิธี polymerase chain reaction (PCR) หรือการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง (Fluorescence In Situ Hybridization; FISH) (Winsor *et al.* 1993) จากการตรวจสอบชนิดของอสุจิในมนุษย์ (Han *et al.* 1993) สุกร (Kawarasaki *et al.* 1995) เป็นอีกหนึ่งวิธีที่สามารถตรวจสอบชนิดของอสุจิที่มีความแม่นยำสูงและใช้เวลาน้อย (McEvoy. 1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยแบ่งเป็น 3 ขั้นตอนได้แก่

1) ศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อของสุกรก่อน และหลังจากการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

2) ศึกษาระดับชั้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่เหมาะสมในการแยกตัวอสุจิ X และตัวอสุจิ Y ออกจากกัน

3) ศึกษาประสิทธิภาพในการปฏิสนธิของอสุจิที่ผ่านการแยกตัวอสุจิ X และตัวอสุจิ Y โดยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ที่เหมาะสมโดยการผสมเทียมกับแม่สุกรที่แสดงอาการเป็นสัด

3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

3.3.1 สุกรพ่อพันธุ์ จำนวน 8 ตัว (สุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์จำนวน 4 ตัว และสุกรพ่อพันธุ์แลนด์เรซจำนวน 4 ตัว) อายุประมาณ 1.5 ปี อาศัยอยู่ในโรงเรือนระบบ Evaporative cooling system ควบคุมอุณหภูมิโรงเรือน 24-28 องศาเซลเซียส อาหารเลี้ยงสุกรพ่อพันธุ์ ใช้สูตรอาหารทางการค้าจากบริษัทเบทาโกร จำกัด มหาชน ให้อาหารสุกรพ่อพันธุ์วันละ 2 ครั้ง หลังจากรีดน้ำเชื้อ ให้ตัวละ 1.0-1.2 กิโลกรัม/ตัว/ครั้ง และคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อ คือ ความเป็นกรด-ด่างของน้ำเชื้อ, ความเข้มข้นของตัวอสุจิ, เปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนที่ไปข้างหน้า, ลักษณะความผิดปกติของรูปร่างอสุจิ ใกล้เคียงกัน รีดเก็บน้ำเชื้อพ่อพันธุ์โดยระยะห่างการรีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์แต่ละตัว คือ 5 วัน รีดเก็บน้ำเชื้อครั้งละ 1 เวลา คือ ช่วงเวลาประมาณ 6.00 น. ใช้วิธีการรีดน้ำเชื้อด้วยมือสวมถุงมือยางสำหรับรีดน้ำเชื้อโดยเฉพาะ

3.3.2 สุกรแม่พันธุ์ที่ผ่านการคลอดลูกมาแล้ว 2-5 ครอก, จำนวนวันหย่านมถึงผสม 3-6 วัน และเลือกสุกรแม่พันธุ์ที่มีการประวัติการคลอดลูกเพศเมียเท่ากับเพศผู้ จำนวน 72 ตัว (สุกรแม่พันธุ์ลาร์จไวท์จำนวน 36 ตัว และสุกรแม่พันธุ์แลนด์เรซจำนวน 36 ตัว) อาศัยอยู่ในโรงเรือนระบบ Evaporative cooling System ควบคุมอุณหภูมิโรงเรือน 24-28 องศาเซลเซียส อาหารเลี้ยงสุกรแม่พันธุ์ ใช้สูตรอาหารทางการค้าจากบริษัทเบทาโกร จำกัด มหาชน ให้อาหารสุกรแม่พันธุ์ วันละ 1 ครั้ง เวลาประมาณ 6.30 น. ให้ตัวละ 1.0-1.5 กิโลกรัม/ตัว/ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ

น้ำเชื้อที่รีดได้ภายหลังจากการรีดเก็บจากสุกรพ่อพันธุ์ก่อน และหลังกระบวนการปั่นเหวี่ยงผ่านระดับชั้นสารละลายเพอร์คอลล์แต่ละระดับ ทุกครั้งของการรีดน้ำเชื้อ จะตรวจคุณภาพน้ำเชื้อทุกครั้งการรีดน้ำเชื้อ ตามวิธีของ ศรีสุวรรณ ชมชัย (2541) ดังนี้

3.2.1 ตรวจความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำเชื้อ

ตรวจสอบโดยใช้เครื่องวัด pH meter รุ่น SENZ-PH-PRO

3.2.1 จำนวนอสุจิมีชีวิต

ตรวจสอบการนับจำนวนอสุจิตาย จากน้ำเชื้อที่ผ่านการย้อมสีด้วยสีย้อมนิโกรซิน-อีโอซิน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ รุ่น E200 (Nikon) กำลังขยาย 400 เท่า ทำการนับจำนวนอสุจิทั้งหมด 200 ตัว จากนั้นจึงคิดเป็นเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต

3.2.3 เปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนที่ไปข้างหน้า

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า โดยดูอสุจิแต่ละตัวหลังจากปิดกระจกสไลด์ ประเมินค่าของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า โดยการตรวจการเคลื่อนที่รายตัวนี้จะอ่านค่าการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเป็นเลขจำนวนเต็มมีอัตราการเคลื่อนที่เป็นร้อยละ เช่น 40, 50, 60, 70 เป็นต้น การดูการเคลื่อนที่ไปข้างหน้ารายตัวสังเกตจากการเคลื่อนที่รายตัวอย่างรวดเร็วทีละ 10 ตัว โดยดูว่า ใน 10 ตัวที่ เห็นนั้นเคลื่อนที่ไปข้างหน้ากี่ตัว และมีกี่ตัวที่ไม่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า แล้วเลื่อนดูในตำแหน่งอื่นๆ จนครบ 100 ตัว และคิดเป็นร้อยละของตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า

3.2.4 ลักษณะความผิดปกติของรูปร่างอสุจิ

ตรวจสอบด้วยการนับจำนวนของอสุจิที่มีลักษณะรูปร่างผิดปกติ จากน้ำเชื้อที่ผ่านการย้อมสี Eosin-Nigrosin ประเมินภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า โดยนับจำนวนอสุจิทั้งหมด 200 ตัว จากนั้นจึงคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของอสุจิที่มีลักษณะรูปร่างผิดปกติ

3.2.5 ความเข้มข้นน้ำเชื้อ

ตรวจวัดโดยใช้เครื่อง Photometer รุ่น SpermaCue

3.3 การแยกเพศอสุจิโดยวิธีการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

การเตรียมชั้นของสารละลายต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ โดยเพอร์คอลล์จะถูกเจือจางด้วยสารละลายน้ำเชื้อ NSRTC4 (National Swine Research and Training Center 4) (ศรีสุวรรณ ชมชัย. 2542) เพื่อให้มีความเข้มข้น จำนวน 6 ระดับ คือ 0% (น้ำเชื้อสด), 20%, 35%, 50%, 65% และ 80% แสดงในตารางที่ 3.1 จากนั้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ จะถูกนำมาวางเรียงเป็นชั้นในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร โดยส่วนล่างจะมีความเข้มข้นสูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรียงตามลำดับความเข้มข้นมากไปน้อยระดับความเข้มข้นชั้นละ 5 มิลลิลิตร และวางน้ำเชื้อไว้ชั้นบนสุดปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 2000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นใช้ไปเปตดูดน้ำยาส่วนบนทิ้งไป นำส่วนที่เป็นตะกอนทุกๆ ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ ใส่ในหลอดทดลองหลอดใหม่นำไปวิเคราะห์หาอสุจิ Y ด้วยวิธี Quinacrine staining (กรกนก พรหมเทพ. 2552 ดัดแปลงจาก Asher. 1991)

ตารางที่ 3.1 แสดงปริมาตรของเพอร์คอลล์และปริมาตรของสารละลาย NSRTC4 ที่ใช้ในการเจือจางเพอร์คอลล์ให้มีจำนวนระดับความเข้มข้น 6 ระดับ

ความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ (เปอร์เซ็นต์)	เพอร์คอลล์ (มิลลิลิตร)	สารละลาย (มิลลิลิตร)	ปริมาตรรวม (มิลลิลิตร)
80	4.00	1.00	5
65	3.25	1.75	5
50	2.50	2.50	5
35	1.75	3.25	5
20	1.00	4.00	5
0 (น้ำเชื้อสด)	0.00	0.00	5
ปริมาตรรวม			30

3.4 การวิเคราะห์อสุจิ Y ด้วยการย้อมสี Quinacrine

โดยใช้ปิเปตดูดอสุจิแต่ละชั้นใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตรเจือจางด้วยสารละลายทริสบัฟเฟอร์นำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยง 2000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการปั่นล้าง 2 ครั้ง ใช้ปิเปตดูดสารละลายทิ้งไป แล้วหยดตะกอน 1 หยดบนสไลด์กระจายตะกอนบนสไลด์ให้สม่ำเสมอทิ้งสไลด์ให้แห้งสนิท 24 ชั่วโมง นำสไลด์ที่แห้งล้างด้วย cranoy's fixative โดยวิธีการจุ่มและทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำสไลด์ที่แห้งใส่ในสารละลาย Trypsin 2% ที่อุณหภูมิ 37 °C ทำการย้อมสไลด์ที่แห้งโดยการใส่ลงใน coplin jar ที่มีสี Quinacrine mustard นำสไลด์มาล้างด้วยน้ำกลั่น 3 นาที จากนั้นทิ้งสไลด์ให้แห้งแล้วหยดบัฟเฟอร์ 1 หยด ปิดด้วยกระจกแล้วนำสไลด์ไปส่องตรวจหาปริมาณอสุจิที่มี F-body ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ (กรกนก พรหมเทพ. 2552. ดัดแปลงจาก Asher. 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การผสมเทียม

นำน้ำเชื้อจากพ่อสุกรตัวเดียวกันที่ไม่ผ่านการแยกตัวอสุจิ และน้ำเชื้อที่มีตัวอสุจิ X และอสุจิ Y ที่มาก จากระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอออล์ที่เหมาะสมจากข้อ 3.4 ไปเจือจางด้วยสารละลายน้ำเชื้อ NSRTC4 ให้ได้ความเข้มข้นอสุจิจำนวน 3,000 ล้านตัวต่อโด๊ส นำไปผสมเทียมกับแม่สุกรที่เป็นสัดปกติหลังหย่านม 3-6 วัน หลังจากแม่สุกรยืนนิ่งประมาณ 12 ชั่วโมง โดยทำการผสมเทียมจำนวน 2 ครั้ง ซึ่งระยะเวลาจากการผสมครั้งที่ 1 ห่างจากการผสมครั้งที่ 2 ประมาณ 8-12 ชั่วโมง ทำการผสมเทียมแม่สุกร แบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มน้ำเชื้อที่ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ จำนวน 24 แม่ , กลุ่มน้ำเชื้อจากชั้นความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีอสุจิ X มาก จำนวน 24 แม่ และกลุ่มน้ำเชื้อจากชั้นความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่มีอสุจิ Y มาก จำนวน 24 แม่ โดยใช้น้ำเชื้อพ่อสุกรลาร์จไวท์ผสมกับแม่สุกรพันธุ์แลนด์เรซ และน้ำเชื้อพ่อสุกรแลนด์เรซผสมกับแม่สุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ เพื่อผลิตลูกผสมสองสายพันธุ์

ตารางที่ 3.2 แสดงส่วนประกอบของสารละลายเจือจางมาตรฐาน NSRTC4

ส่วนประกอบ	ปริมาณ (กรัม)
Glucose	30
EDTA	3.7
Citric acid	3.0
Tris	5.0
Tri – Soduim Citrate	4.4
Soduim Hydrogen carbonate	1.2
Potassium Chloride	0.3
Neomycin Sulphate	1.0
เติมน้ำกลั่นให้ครบ (มิลลิลิตร)	1,000

3.6 การเลี้ยงดูแม่สุกรอุ้มท้อง

การเลี้ยงดูแม่สุกรอุ้มท้อง ภายหลังที่ได้รับการผสมเทียมแม่สุกรทุกตัวจะอยู่ในซองแม่สุกรอุ้มท้องในโรงเรือนระบบ Evaporative cooling system และจะย้ายเข้าโรงเรือนคลอดโรงเรือนระบบ Evaporative cooling systemควบคุมอุณหภูมิโรงเรือน 24-28 องศาเซลเซียส ก่อนคลอดประมาณ 7 วันเพื่อให้แม่สุกรปรับตัวกับซองคลอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

แบ่งการวิเคราะห์ข้อมูลออกเป็น 3 ตอน ดังนี้

ตอนที่ 1

ศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อสุกรก่อน และหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยศึกษาลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อ คือ ความเข้มข้นน้ำเชื้อ, กรด-ด่าง, เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ, เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์ลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติ

วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ตามวิธีการจัดกลุ่มการทดลองแบบ 2x6 factorial arrangement in randomized complete block design (RCBD) มี 2 ปัจจัย คือ สายพันธุ์สุกร คือ สุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ และสุกรพันธุ์แลนด์เรซ และระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 6 ระดับ คือ ระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 0% (น้ำเชื้อสด), 20%, 35%, 50%, 65% และ 80% ให้ความแตกต่างของพ่อสุกรแต่ละตัวเป็นบล็อค และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยวิธี Duncan's New Multiple-Range Test ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป

แบบหุ่นทางสถิติที่ใช้ในการศึกษาอิทธิพลของแต่ละปัจจัย ดังนี้

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A_j + B_k + AB_{jk} + e_{ijk}$$

Y_{ijk} = ลักษณะที่ศึกษา ได้แก่ pH เปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนที่ไปข้างหน้า เปอร์เซ็นต์อสุจิตัวมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์ลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติ

μ = ค่าเฉลี่ยทั้งหมดของค่าสังเกตที่ต้องการศึกษา

T_i = อิทธิพลของบล็อก ที่ i คือ พ่อพันธุ์แต่ละตัว

A_j = อิทธิพลของสายพันธุ์สุกรพ่อพันธุ์ j, j=1-2 (1 คือ สุกรพ่อพันธุ์พันธุ์ลาร์จไวท์, 2 คือ สุกรพ่อพันธุ์พันธุ์แลนด์เรซ

B_k = ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ระดับที่ k, k = 1-6 (1 คือ คุณภาพน้ำเชื้อของพ่อสุกรก่อนปั่น 0%, 2 คือ 20%, 3 คือ 35%, 4 คือ 50%, 5 คือ 65%, 6 คือ 80%)

AB_{jk} = อิทธิพลร่วมของสายพันธุ์สุกรพ่อพันธุ์ที่ j และระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ k

e_{ijk} = ความคลาดเคลื่อนทั้งหมดของการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตอนที่ 2

วิเคราะห์ปริมาณเปอร์เซ็นต์ของอสุจิ Y และอสุจิ X ในน้ำเชื้อสุกรก่อน และหลังปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน และตรวจสอบปริมาณเปอร์เซ็นต์ของอสุจิ X และY ด้วยการย้อมสี Qrinacrine

วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ตามวิธีการจัดกลุ่มการทดลองแบบ 2x6 factorial arrangement in randomized complete block design (RCBD) มี 2 ปัจจัย คือ สายพันธุ์สุกร คือ สุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ และสุกรพันธุ์แลนด์เรซ และระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 6 ระดับ คือ ระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 0% (น้ำเชื้อสด), 20%, 35%, 50%, 65% และ 80% ให้ความแตกต่างของพ่อสุกรแต่ละตัวเป็นบล็อค และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยวิธี Duncan's New Multiple-Range Test ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป

แบบหุ่นทางสถิติที่ใช้ในการศึกษาอิทธิพลของแต่ละปัจจัย ดังนี้

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + A_j + B_k + AB_{jk} + e_{ijk}$$

Y_{ijk} = ลักษณะที่ศึกษา ปริมาณเปอร์เซ็นต์ของอสุจิ Y และอสุจิ X ในน้ำเชื้อ

μ = ค่าเฉลี่ยทั้งหมดของค่าสังเกตที่ต้องการศึกษา

T_i = อิทธิพลของบล็อก ที่ i คือ พ่อพันธุ์แต่ละตัว

A_j = อิทธิพลของสายพันธุ์สุกรพ่อพันธุ์ j, j=1-2 (1 คือ สุกรพ่อพันธุ์พันธุ์ลาร์จไวท์, 2 คือ สุกรพ่อพันธุ์พันธุ์แลนด์เรซ

B_k = ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ระดับที่ k, k = 1-6 (1 คือ คุณภาพน้ำเชื้อของพ่อสุกรก่อนปั่น 0%, 2 คือ 20%, 3 คือ 35%, 4 คือ 50%, 5 คือ 65%, 6 คือ 80%)

AB_{jk} = อิทธิพลร่วมของสายพันธุ์สุกรพ่อพันธุ์ที่ j และระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ k

e_{ijk} = ความคลาดเคลื่อนทั้งหมดของการทดลอง

ตอนที่ 3

เลือกชั้นระดับสารละลายของเพอร์คอลล์ที่มีอสุจิ Y และอสุจิ X ที่มาก และน้ำเชื้อสดก่อนการปั่นเหวี่ยงจากพ่อสุกรตัวเดียวกันไปผสมเทียมกับแม่สุกร โดยพ่อสุกรหนึ่งตัวจะนำเอาน้ำเชื้อจากชั้นที่มีอสุจิ Y ผสมกับแม่พันธุ์ 3 ตัว น้ำเชื้อจากชั้นที่มีอสุจิ X ผสมกับแม่พันธุ์ 3 ตัว และน้ำเชื้อสดก่อนการปั่นเหวี่ยงผสมกับแม่พันธุ์ 3 ตัว เพื่อบันทึกสัดส่วนเพศของลูกสุกรแรกเกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปรียบเทียบสัดส่วนเพศของลูกแรกคลอดกับค่าทางทฤษฎี (1:1) โดยใช้ไค-สแควร์ ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป

3.8 การบันทึกข้อมูล

3.8.1 คุณภาพน้ำเชื้อ

การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อก่อน และหลังปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยใช้น้ำเชื้อจากพ่อสุกรพันธุ์ แลนด์เรซ จำนวน 4 ตัว และพ่อสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ จำนวน 4 ตัว ทำการบันทึกข้อมูล ความเข้มข้นของน้ำเชื้อ การเคลื่อนไหวหมู่ของอสุจิ เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต เปอร์เซ็นต์อสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า และเปอร์เซ็นต์ลักษณะความผิดปกติของอสุจิ

3.8.2 เปรียบเทียบปริมาณอสุจิ X และอสุจิ Y

การตรวจนับปริมาณระหว่างอสุจิ X และอสุจิ Y คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ในน้ำเชื้อทั้งก่อนและหลังปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันด้วยการย้อมสี Quinacrine

3.8.3 ความสมบูรณ์พันธุ์ของอสุจิ

บันทึกข้อมูลความสมบูรณ์พันธุ์ของอสุจิได้แก่ อัตราการผสมติด จำนวนแม่สุกรที่คลอด จำนวนลูกแรกคลอดเฉลี่ยต่อครอก จำนวนลูกแรกคลอดมีชีวิต และน้ำหนักแรกคลอดเฉลี่ยต่อตัว

3.8.4 สัดส่วนเพศแรกคลอด

ตรวจนับจำนวนลูกและจำนวนเพศหลังคลอด คำนวณหาสัดส่วนทางเพศโดยคำนวณจากจำนวนลูกเพศผู้หารด้วยจำนวนลูกเพศเมียต่อครอก

$$\text{สัดส่วนเพศของลูกแรกคลอด} = \frac{\text{จำนวนลูกเพศผู้}}{\text{จำนวนลูกเพศเมีย}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 คุณภาพน้ำเชื้อของสุกรพ่อพันธุ์

จากการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อของสุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ และแลนด์เรซก่อนทำการทดลอง จากฟาร์มสุกร บริษัทเบทาโกรโฮบริดอินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด ต. หนองน้ำแดง อ. ปากช่อง จ. นครราชสีมา เมื่อนำน้ำเชื้อที่รีดได้ไปวิเคราะห์ เพื่อการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อ คือ ความเข้มข้นน้ำเชื้อ, กรด-ด่าง, เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ, เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต และ เปอร์เซ็นต์ลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติของสุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ และสุกรพ่อพันธุ์แลนด์เรซ ก่อนการทดลอง พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงคุณภาพน้ำเชื้อก่อนการปั่นเหวี่ยงของสุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์และสุกรพ่อพันธุ์แลนด์เรซ (LSMean±SE)

ลักษณะน้ำเชื้อที่ศึกษา	ลาร์จไวท์	แลนด์เรซ	ค่า P-value
ความเข้มข้นน้ำเชื้อ (ล้านตัว/มิลลิลิตร)	327.54±44.57	315.65±18.33	0.6092
กรด-ด่าง	7.12±0.03	7.21±0.03	0.2444
%การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ	80.93±1.19	81.56±1.57	0.6638
%อสุจิมีชีวิต	82.43±1.91	84.56±1.29	0.1795
%ลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติ	11.14±0.70	11.26±1.32	0.9100

4.2 คุณภาพน้ำเชื้อของพ่อสุกรภายหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์

คุณภาพน้ำเชื้อของพ่อสุกรภายหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับชั้นแตกต่างกัน 6 ระดับ ได้ผลการศึกษา แสดงในตารางที่ 4.2 ดังนี้

4.2.1 ความเข้มข้นของน้ำเชื้อ

การศึกษาพบว่าสายพันธุ์พ่อสุกรมีผลแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ต่อลักษณะของความเข้มข้นน้ำเชื้อ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 สุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ และสุกรพ่อพันธุ์แลนด์เรซ มีความเข้มข้นน้ำเชื้อใกล้เคียงกันคือ คือ 315.25 และ 300.81 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร สายพันธุ์พ่อสุกรแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติต่อลักษณะของความเข้มข้นน้ำเชื้อเนื่องจากลักษณะของความเข้มข้นน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ และสุกรพ่อพันธุ์แลนด์เรซก่อนการทดลองแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ตารางที่ 4.1) และเนื่องจากการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับชั้นแตกต่างกัน เป็นการช่วยกำจัดสิ่งแปลกปลอม

เอกสารนี้... เพื่อการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปนในน้ำเชื้อ เช่น เศษเซลล์ (Bollendorf *et al.* 1994) อสุจิที่ตาย แบคทีเรีย ซากเศษเซลล์ที่ตายแล้ว ซึ่งทำให้อสุจิที่อยู่ส่วนล่างของหลอดมีการเคลื่อนที่ได้สูงขึ้น และทำให้อสุจิที่มีรูปร่างปกติสูงขึ้นไปด้วย (Arcidiacono *et al.* 1983 ; Kaneko *et al.* 1986 ; Pickering *et al.* 1989) ดังนั้นจึงไม่ส่งผลต่อความเข้มข้นน้ำเชื้อของพ่อสุกรหลังการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับชั้นแตกต่างกัน

ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ พบว่าความเข้มข้นน้ำเชื้อในทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ คือ ระดับ 0% (น้ำเชื้อสด), 20%, 35%, 50%, 65% และ 80% แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) ความเข้มข้นน้ำเชื้อจากการปั่นเหวี่ยงผ่านระดับชั้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน จะพบที่ระดับชั้น 80% มากที่สุด คือ 539.05 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร รองลงมา คือ ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ 50% คือ 431.24 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร และพบน้อยที่สุด คือระดับชั้น 20% คือ 92.40 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร

อิทธิพลร่วมระหว่างสายพันธุ์กับระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ต่อความเข้มข้นน้ำเชื้อแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จากการศึกษาลักษณะของความเข้มข้นน้ำเชื้อแสดงว่าน้ำเชื้อภายหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์บางระดับชั้นความเข้มข้นจะมีปริมาณตัวอสุจิลดลงอาจเนื่องมาจากแรงการปั่นเหวี่ยงจะทำให้ตัวอสุจิต้องตกตะกอนผ่านหลายชั้นตามระดับของความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์มีผลให้ตัวอสุจิที่มีน้ำหนักแตกต่างกันตามหลักทางสรีระวิทยาระหว่างตัวอสุจิ X และตัวอสุจิ Y ทำให้ตัวอสุจิที่มีน้ำหนักมาก และมีความสมบูรณ์จะตกลงสู่ด้านล่างของระดับความเข้มข้น (ระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 80%) และทำให้ระดับความเข้มข้นด้านบนมีปริมาณตัวอสุจิลดลงภายหลังการปั่นเหวี่ยง (ระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 20% และ 35%) สอดคล้องกับรายงานของ Iwasaki *et al.* (1988) ที่กล่าวว่าน้ำเชื้อโคภายหลังจากการปั่นเหวี่ยงผ่านระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์จะมีความหนาแน่นของตัวอสุจิลดลง และสอดคล้องกับรายงานของ กรกนก พรหมเทพ (2552) ที่ศึกษาการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อโมนุษย์ผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน พบว่าน้ำเชื้อที่ระดับชั้นความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 65-70% มีปริมาณตัวอสุจิ 413.93 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร สูงกว่าความเข้มข้นน้ำเชื้อในระดับชั้นความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 50% และ 60% (138.86 และ 144.14 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

4.2.2 ความเป็นกรด-ด่างของน้ำเชื้อ

จากการทดลอง พบว่าสายพันธุ์พ่อสุกรแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ต่อลักษณะความเป็นกรด-ด่างของน้ำเชื้อ สุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ และสุกรพ่อพันธุ์แลนด์เรซ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเชื้อใกล้เคียงกันคือ 7.03 และ 7.04 เนื่องจากค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเชื้อสุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ และสุกรพ่อพันธุ์แลนด์เรซก่อนการปั่นเหวี่ยงไม่แตกต่างกันและเนื่องจากการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับชั้นแตกต่างกัน เป็นการช่วยกำจัดสิ่งแปลกปลอมปนในน้ำเชื้อ เช่น เศษเซลล์ (Bollendorf *et al.* 1994) อสุจิที่ตาย แบคทีเรีย ซากเศษเซลล์ที่ตายแล้วซึ่งทำให้อสุจิที่อยู่ส่วนล่างของหลอดมีการเคลื่อนที่ได้สูงขึ้น และทำให้อสุจิที่มีรูปร่างปกติสูงขึ้นไปด้วย (Pickering *et al.* 1989) ดังนั้นจึงไม่ส่งผลต่อค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเชื้อของพ่อสุกรหลังการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับชั้นแตกต่างกัน

ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่าง ในทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ คือ ระดับ 0% (น้ำเชื้อสด), 20%, 35%, 50%, 65% และ 80% % มีค่าเท่ากับ 7.19, 7.10, 7.05, 7.01, 6.96 และ 6.93 ตามลำดับ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) ส่วนอิทธิพลร่วมระหว่างสายพันธุ์กับระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ต่อความเป็นกรด-ด่างของน้ำเชื้อแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

น้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงมีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น เนื่องจากต้องใช้เวลาในการปั่นเหวี่ยง และเวลาในการดูดน้ำเชื้อแต่ละระดับสารละลายเพอร์คอลล์ โดยช่วงเวลาดังกล่าวอสุจิ จะใช้องค์ประกอบพวก กลูโคส ฟรุคโตส และซอลบิตอล เป็นแหล่งพลังงาน ซึ่งสุดท้ายจะได้กรดแลคติก คาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ ซึ่งจะทำให้น้ำเชื้อมีความเป็นกรดมากขึ้น นอกจากนี้น้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงต้องใช้เวลาในการปั่นเหวี่ยง และเวลาในการศึกษาแต่ละส่วนของน้ำเชื้อต้องใช้เวลาดูดน้ำเชื้อส่วนบนออกและนำน้ำเชื้อส่วนชั้นที่ต้องการไปตรวจวิเคราะห์ ช่วงเวลาที่ใช้ไปนั้นทำให้อสุจิในน้ำเชื้อมีการเผาผลาญอาหารมีการหายใจเพิ่มขึ้น และมีการผลิตกรดแลกติค (Bearden and Fuquay. 1997)

โดยปกติค่าความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำเชื้อพ่อสุกรจะอยู่ระหว่าง 6.8-7.8 ถ้าหากน้ำเชื้อมีความเป็นกรด-ด่างต่ำจะทำให้การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิช้าลง (Bearden and Fuquay. 1997) และจากการทดลองค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเชื้อในทุกระดับชั้นความเข้มข้มของสารละลายเพอร์คอลล์ มีค่าเฉลี่ยตั้งแต่ 6.93-7.21 ซึ่งอยู่ในช่วงที่ไม่เป็นอันตรายต่อตัวอสุจิ

4.2.3 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ

สายพันธุ์พ่อสุกรแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) ต่อลักษณะเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ โดยน้ำเชื้อพ่อสุกรพันธุ์แลนด์เรซจะมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าสูงกว่าน้ำเชื้อพ่อสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ (68.96% และ 63.96% ตามลำดับ) ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิในทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ คือ ระดับ 0% (น้ำเชื้อสด), 20%, 35%, 50%, 65% และ 80%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) โดยน้ำเชื้อที่อยู่ระดับความเข้มข้น 80% จะมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าตัวของอสุจิสูงที่สุดในขณะที่น้ำเชื้อระดับความเข้มข้น 20% จะมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิต่ำที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 4.2 โดยผลของปฏิกริยาร่วมระหว่างสายพันธุ์และระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ ที่มีผลต่อลักษณะการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิ ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ 80% ของสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ และสุกรพันธุ์แลนด์เรซ มีค่าสูงที่สุด คือ ร้อยละ 85.00 และ 85.00 ตามลำดับ ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ 20% ของสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์มีค่าต่ำที่สุด คือ ร้อยละ 24.06 ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อที่ใช้ในการผสมเทียมเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิมีความสำคัญ เพราะจะสัมพันธ์กับความสมบูรณ์พันธุ์ของตัวสัตว์ (Bearden and Fuquay. 1997) จากการศึกษาพบว่า น้ำเชื้อหลังปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้น 65% และ 80% จะมีค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดก่อนการปั่นเหวี่ยง แต่จะมีค่าสูงกว่าน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงที่ระดับชั้น 20%, 35% และ 50% ตามลำดับ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) ทั้งนี้เนื่องจากการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันอสุจิจะถูกกรองลงสู่ส่วนล่างของหลอดทดลองจะขึ้นอยู่กับความสามารถในการเคลื่อนที่ของอสุจิด้วยส่วนหนึ่ง นอกเหนือจากความแรงของการปั่นเหวี่ยง

น้ำเชื้อหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้น 80% , 65% และน้ำเชื้อสดก่อนการปั่นเหวี่ยง มีค่าสูงกว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิหลังการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับ 35% และ 20% เนื่องจากการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์เป็นวิธีการทำความสะอาดน้ำเชื้ออย่างหนึ่ง ซึ่งน้ำเชื้อจะถูกกรองเอาส่วนที่เป็นแป้ง อสุจิที่ตาย เศษเซลล์ตาย รวมทั้งเชื้อแบคทีเรียบางชนิดออก ซึ่งจะพบเซลล์เหล่านี้อยู่ที่ผิวของชั้นความเข้มข้นที่น้อย (Arcidiacono *et al.* 1983 ; Kaneko *et al.* 1986 ; Pickering *et al.* 1989) คือ สารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับ 35% และ 20%

4.2.4 ตัวอสุจิมีชีวิต

สายพันธุ์พ่อสุกรแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) ต่อลักษณะเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิมีชีวิต โดยน้ำเชื้อพ่อสุกรพันธุ์แลนด์เรซจะมีปริมาณตัวอสุจิมีชีวิตเฉลี่ยสูงกว่าน้ำเชื้อพ่อสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์มีผลต่อลักษณะเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิมีชีวิตในทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ คือ ระดับ 0% (น้ำเชื้อสด), 20%, 35%, 50%, 65% และ 80% แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(p<0.01) ส่วนอิทธิพลร่วมระหว่างสายพันธุ์กับระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ มีอิทธิพลต่อเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) ดังแสดงในตารางที่ 4.4 พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ 80% ของสุกรพันธุ์แลนด์เรซมีค่าสูงที่สุด คือ ร้อยละ 88.00 แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) กับสุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ 80% คือ ร้อยละ 87.25 ในขณะที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ 20% ของสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ มีค่าต่ำที่สุด คือ ร้อยละ 25.87 แสดงว่าการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2000 รอบต่อนาที ไม่มีผลทำให้ตัวอสุจิตาย

นอกจากนี้มีรายงานการทดลอง รายงานว่า อสุจิที่ส่วนล่างของหลอดทดลอง หลังการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ มีเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตเพิ่มขึ้น ทั้งในอสุจิมนุษย์ (Mohri *et al.* 1987; McClure *et al.* 1989) สุกร (Grant *et al.* 1994) และโค (Parrish *et al.* 1995) เนื่องจากการปั่นเหวี่ยงจะเป็นการช่วยกำจัดสิ่งแปลกปลอมปนในน้ำเชื้อ เช่น เศษเซลล์ (Bollendorf *et al.* 1994) อสุจิที่ตาย แบคทีเรีย ซากเศษเซลล์ที่ตายแล้ว และคัดเลือกเอาตัวอสุจิออกจากน้ำเชื้อ โดยอาศัยการเคลื่อนที่ของอสุจิ และลักษณะรูปพรรณสัณฐาน ซึ่งทำให้อสุจิที่อยู่ส่วนล่างของหลอดมีการเคลื่อนที่ได้สูงขึ้น และทำให้อสุจิที่มีรูปร่างปกติสูงขึ้นไปด้วย (Arcidiacono *et al.* 1983 ; Kaneko *et al.* 1986 ; Pickering *et al.* 1989)

4.2.5 ลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติ

สายพันธุ์พ่อสุกรแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ต่อลักษณะความผิดปกติของรูปร่างตัวอสุจิ ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ พบว่า ลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติในทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ คือ ระดับ 0% (น้ำเชื้อสด), 20%, 35%, 50%, 65% และ 80% แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01) โดยที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ 65% และ 80% จะพบลักษณะความผิดปกติของรูปร่างตัวอสุจิน้อยที่สุด เนื่องจากการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์แต่ละชั้น จะเป็นการช่วยกำจัดสิ่งแปลกปลอมปนในน้ำเชื้อ อสุจิที่ตาย โดยอาศัยการเคลื่อนที่ของอสุจิ และลักษณะรูปพรรณสัณฐาน ซึ่งทำให้อสุจิที่อยู่ส่วนล่างของหลอดมีการเคลื่อนที่ได้สูงขึ้น และทำให้อสุจิที่มีรูปร่างปกติสูงขึ้นไปด้วย ส่วนอิทธิพลร่วมระหว่างสายพันธุ์กับระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ต่อลักษณะความผิดปกติของรูปร่างตัวอสุจิแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (p>0.05) ดังแสดงในตารางที่ 4.2

จากข้อมูลพบว่าชั้นที่มีความเข้มข้นมากที่สุดจะพบลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติน้อยที่สุด สอดคล้องกับการศึกษาของ Kaneko *et al.* (1986) ที่รายงานการปั่นเหวี่ยงอสุจิของมนุษย์ในเพศชายที่มีปัญหาความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ โดยได้ปั่นเหวี่ยงผ่านสาระลายเพอร์คอลล์ 4 ระดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตั้งแต่ 40-80 เปอร์เซ็นต์ ปั่นที่ 600 xg นาน 30 นาที พบว่าอสุจิมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเพิ่มขึ้นจาก 64±1.5 เป็น 93±4.1 เปอร์เซ็นต์ อสุจิมีชีวิตเพิ่มขึ้นจาก 70±1.2 เป็น 92±3.2 เปอร์เซ็นต์ และอสุจิผิดปกติลดลงจาก 24±9.3 เป็น 5.2±1.4 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังมีรายงานอื่นๆ พบว่าการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน จะได้อสุจิส่วนล่างของหลอดมีคุณภาพสูงขึ้น (Mohri *et al.* 1987; Kaneko *et al.* 1987; McClure *et al.* 1989)

ความผิดปกติของตัวอสุจิ เกิดขึ้นได้ตั้งแต่กระบวนการสร้างจนกระทั่งออกสู่ภายนอกร่างกาย ซึ่งความผิดปกตินี้แบ่งออกตามระยะเวลาของการผิดปกติ 2 ระยะ คือ 1) ความผิดปกติขั้นปฐมภูมิ (Primary abnormalities) ความผิดปกตินี้จะเกิดขึ้นที่บริเวณลูกอัณฑะ เช่น มีความผิดปกติในกระบวนการสร้างอสุจิ และระหว่างการเคลื่อนย้ายภายในระบบท่อ ซึ่งแบ่งการเกิดความผิดปกติออกเป็น ความผิดปกติส่วนหัว ความผิดปกติบริเวณส่วนกลาง และความผิดปกติบริเวณส่วนหาง 2) ความผิดปกติขั้นทุตยภูมิ (Secondary abnormalities) ความผิดปกตินี้จะเกิดขึ้นภายในระบบท่อภายหลังอสุจิออกมา seminiferous tube เช่น หัวและหางหลุดออกจากกัน มีหยดน้ำที่หาง หางพับงอ และ อะโครโซมเกาะที่หัวอย่างหลวมๆ เป็นต้น (Bearden and Fuquay. 1997) ทั้งนี้เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของตัวอสุจิในน้ำเชื้อสดจะมีค่าประมาณร้อยละ 20 หรือหากน้ำเชื้อชุดนั้นมีเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของตัวอสุจิมากกว่า ร้อยละ 25 ไม่ควรนำน้ำเชื้อชุดนั้นมาผสม เพราะจะมีผลต่ออัตราการผสมติดของสุกร (ศรีสุวรรณ ชมชัย. 2541) แสดงว่าการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2000 รอบต่อนาทีไม่ส่งผลต่อความผิดปกติของตัวอสุจิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อก่อน และหลังจากการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันของสุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ และสุกรพ่อพันธุ์แลนด์เรซ (LSMean± SE)

ลักษณะน้ำเชื้อที่ศึกษา	สายพันธุ์ (B)		กลุ่มทดลอง (C) ระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์						ค่า P-value		
	ลาร์จไวท์	แลนด์เรซ	0%*	20%	35%	50%	65%	80%	B	C	B*C
ความเข้มข้นน้ำเชื้อ (ล้านตัว/มิลลิลิตร)	315.25±171.99	300.81±159.58	308.03 ± 32.52^{d}	92.40 ± 9.64^{e}	123.21 ± 13.08^{e}	431.24 ± 45.69^{b}	354.24 ± 37.46^{c}	539.05 ± 57.26^{a}	0.1350	<.0001	0.9861
กรด-ด่าง	7.03±0.10	7.04±0.10	7.19 ± 0.03^{a}	7.10 ± 0.01^{b}	7.05 ± 0.01^{c}	7.01 ± 0.01^{d}	6.96 ± 0.01^{e}	6.93 ± 0.01^{f}	0.3355	0.0004	0.9912
%การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ	63.96±24.53	68.96±19.66	81.25 ± 1.33^{b}	29.06 ± 5.77^{e}	45.31 ± 9.15^{d}	74.84 ± 3.68^{c}	83.28 ± 1.75^{ab}	85.00 ± 0.00^{a}	<.0001	<.0001	<.0001
%อสุจิมีชีวิต	65.63±24.64	71.35±19.48	83.50 ± 1.89^{b}	31.72 ± 6.64^{e}	46.65 ± 9.41^{d}	76.87 ± 4.07^{c}	84.59 ± 1.29^{ab}	87.62 ± 0.86^{a}	<.0001	<.0001	<.0001
%ลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติ	8.42±1.45	8.23±1.15	11.21 ± 0.98^{a}	8.46 ± 0.83^{b}	8.08 ± 0.52^{bc}	7.65 ± 0.31^{cd}	7.33 ± 0.03^{d}	7.24 ± 0.87^{d}	0.2864	<.0001	0.7827

[a,b,c,d,e,f] ตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในแถวเดียวกันมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

* ระดับความเข้มข้นเพอร์คอลล์ 0% คือ น้ำเชื้อสด ก่อนการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์

ตารางที่ 4.3 อิทธิพลร่วมระหว่างพันธุ์และระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิก่อน และหลังจากการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันของของสุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ และสุกรพ่อพันธุ์แลนด์เรซ (LSMean± SE)

สายพันธุ์	ระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์						
	0%*	20%	35%	50%	65%	80%	เฉลี่ย
ลาร์จไวท์	80.93±1.19[a]	24.06±2.13[f]	38.43±8.31[d]	73.12±4.14[b]	82.18±1.87[a]	85.00±0.00[a]	63.96±24.53
แลนด์เรซ	81.56±1.57[a]	34.06±2.57[c]	52.18±0.62[c]	76.56±2.57[b]	84.37±0.72[a]	85.00±0.00[a]	68.96±19.66
เฉลี่ย	81.25±1.33	29.06±5.77	45.31±9.15	74.84±3.68	83.28±1.75	85.00±0.00	66.46±22.14

[a,b,c,d,c,f] ตัวอักษรที่แตกต่างกันทั้งในแถว และคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

* ระดับความเข้มข้นเพอร์คอลล์ 0% คือ น้ำเชื้อสด ก่อนการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์

ตารางที่ 4.4 อิทธิพลร่วมระหว่างพันธุ์และระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ต่อเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิมีชีวิต ก่อนและหลังจากการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันของสุกรสายพันธุ์ลาร์จไวท์ และแลนด์เรซ (LSMean± SE)

สายพันธุ์	ระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์						
	0%*	20%	35%	50%	65%	80%	เฉลี่ย
ลาร์จไวท์	82.43±1.91^{bc}	25.87±2.65^{g}	39.81±8.90^{f}	74.50±3.94^{d}	83.93±1.40^{ab}	87.25±0.79^{a}	65.63±24.64
แลนด์เรซ	84.56±1.29^{ab}	37.56±2.24^{f}	53.50±1.65^{c}	79.25±2.85^{c}	85.25±0.88^{ab}	88.00±0.86^{a}	71.35±19.48
เฉลี่ย	83.50±1.89	31.72±6.64	46.65±9.41	76.87±4.07	84.59±1.29	87.62±0.86	68.49±21.16

^{a,b,c,d,c,f,g} ตัวอักษรที่แตกต่างกันทั้งในแถว และคอลัมน์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$)

*ระดับความเข้มข้นเพอร์คอลล์ 0% คือ น้ำเชื้อสด ก่อนการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์

4.3 ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์ของตัวอสุจิ X และตัวอสุจิ Y

การวิเคราะห์หาปริมาณอสุจิ Y โดยวิธีการ Quinacrine staining ซึ่งจะแสดงจุด F-body ของตัวอสุจิ Y จากระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ คือระดับ 0% (น้ำเชื้อสด), 20%, 35%, 50%, 65% และ 80% พบจุด F-body ของตัวอสุจิ Y เท่ากับ 51.09, 55.25, 52.36, 69.04, 48.82 และ 31.51 ตามลำดับ พบว่า สายพันธุ์พ่อสุกร คือ สุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ และสุกรพันธุ์แลนด์เรซแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ต่อปริมาณเปอร์เซ็นต์อสุจิ Y และ X ในน้ำเชื้อหลังจากการย้อมสี Quinacrine ดังแสดงในตารางที่ 4.5 สุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ และสุกรพ่อพันธุ์แลนด์เรซ มีปริมาณเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิ Y ใกล้เคียงกัน คือ 51.13% และ 51.56% และปริมาณเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิ X ใกล้เคียงกัน คือ 48.44% และ 48.87% ตามลำดับ

ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ พบว่า ปริมาณเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิ Y ในทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ คือระดับ 0% (น้ำเชื้อสด), 20%, 35%, 50%, 65% และ 80% แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) มีค่าเท่ากับ 51.09%, 55.25%, 52.36%, 69.04%, 48.82% และ 31.51% ตามลำดับ โดยที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ 50% จะมีปริมาณอสุจิ Y สูงที่สุด คือ 69.04% และปริมาณเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิ X ในทุกระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ คือระดับ 0% (น้ำเชื้อสด), 20%, 35%, 50%, 65% และ 80% แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) กล่าวคือมีค่า 48.91%, 44.75%, 46.64%, 30.96%, 51.18% และ 68.49% ตามลำดับ โดยที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ 80% จะมีปริมาณอสุจิ X สูงที่สุด คือ 68.49% ส่วนอิทธิพลร่วมระหว่างสายพันธุ์กับระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ ไม่มีอิทธิพลต่อปริมาณอสุจิ Y และ X ในน้ำเชื้อพ่อสุกร แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

สอดคล้องกับการศึกษาของ Morhi *et al.* (1987) คัดแยกตัวอสุจิ Y และอสุจิ X ในมนุษย์ โดยการปั่นเหวี่ยงผ่านระดับชั้นความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 12 ชั้น ตั้งแต่ระดับชั้นที่ 25-85 เปอร์เซ็นต์โดยใส่อสุจิไว้ชั้นบนสุดของหลอดทดลองหลังจากการปั่นเหวี่ยงนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเปอร์เซ็นต์อสุจิ Y โดยการย้อมสี Quinacrine พบว่าด้านล่างของหลอดทดลองพบอสุจิ X ประมาณ 94 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองพบว่าหากเพิ่มจำนวนชั้นให้มากขึ้น การคัดแยกตัวอสุจิ X ก็จะดีขึ้นด้วย

นอกจากนี้ Othani *et al.* (1987) ศึกษาคัดแยกตัวอสุจิ Y และอสุจิ X ในสุกรโดยการปั่นเหวี่ยงผ่านระดับชั้นความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 7 ชั้น วิเคราะห์หาปริมาณเปอร์เซ็นต์อสุจิ Y โดยการย้อมสี Quinacrine พบว่าส่วนกลางของหลอดทดลองแสดงลักษณะ F-body ในช่วง 39.7 ถึง 55.1 เปอร์เซ็นต์ และด้านล่างของหลอดทดลองพบแสดงลักษณะ F-body 7.6 ถึง 13.7 เปอร์เซ็นต์ แสดงว่าปริมาณอสุจิ X ด้านล่างหลอดทดลองมากกว่าอสุจิ Y และกรกนก พรหมเทพ (2552) ทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การปั่นเหวี่ยงคัดแยกตัวอสุจิ Y และอสุจิ X ในโค โดยการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน และทำการวิเคราะห์อสุจิ Y โดยการย้อมสี Quinacrine พบว่าระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ 50% จะมีอสุจิ Y จำนวนสูงที่สุด รองมาคือน้ำเชื้อในระดับชั้น 60%, 65-70% และ 75-80% ตามลำดับ (60.64%, 58.57%, 39.25% และ 23.79% ตามลำดับ) หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งว่า ปริมาณอสุจิ X จะมากขึ้น ($p<0.01$) ตามลำดับชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ที่เพิ่มขึ้นทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากน้ำหนักอสุจิ X ที่มากกว่าอสุจิ Y เมื่อทำการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์แล้วอสุจิ X ที่มีน้ำหนักมากกว่าอสุจิ Y จึงตกลงสู่ด้านล่างหลอดทดลอง (อนันต์ ศรีขาว. 2535)

ประสิทธิภาพของการแยกอสุจิ X และ อสุจิ Y ด้วยการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความหน่าแน่นของตัวกลาง ระดับชั้นของความเข้มข้นของสารตัวกลาง และแรงของการปั่นเหวี่ยง (Anderson and Byskov. 1997) นอกจากนี้ Wilson and Walker (1994) รายงานว่าความเร็วของการตกตะกอนในการปั่นเหวี่ยงขึ้นอยู่กับ ความหนาแน่น รูปร่าง ขนาด น้ำหนัก การเคลื่อนที่ของอนุภาคที่ต้องการจะปั่นแยก และความหนืดของสารตัวกลางที่ใช้ในการปั่นแยก เนื่องจากอสุจิ X มีน้ำหนักมากกว่าอสุจิ Y ซึ่งมีความแตกต่างของ DNA 2-4 เปอร์เซ็นต์ (Moruzzi. 1979) ดังนั้นด้วยหลักการเหล่านี้ ทำให้การศึกษาครั้งนี้ อสุจิ X จะตกลงสู่ด้านล่างของหลอดทดลองหลังจากการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ คือ ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ 80% เป็นจำนวนมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ปริมาณเปอร์เซ็นต์ของอสุจิ Y และอสุจิ X จากการย้อมสี Quinacrine ก่อน และหลังการปั่นการเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันของสุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ และสุกรพ่อพันธุ์แลนด์เรซ (LSMean± SE)

ลักษณะน้ำเชื้อที่ศึกษา	สายพันธุ์ (B)		กลุ่มทดลอง (C)						ค่า P-Value		
			ระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์								
	ลาร์จไวท์	แลนด์เรซ	0%*	20%	35%	50%	65%	80%	B	C	B*C
% ของอสุจิ Y	51.13±11.38	51.56±11.25	51.09±2.72[d]	55.25±1.02[b]	52.36±0.11[c]	69.04±0.64[a]	48.82±0.17[c]	31.51±0.41[f]	0.1965	<.0001	0.0762
% ของอสุจิ X	48.44±11.25	48.87±11.38	48.91±2.72[c]	44.75±1.02[e]	47.64±0.11[d]	30.96±0.64[f]	51.18±0.17[b]	68.49±0.40[a]	0.1965	<.0001	0.0762

[a,b,c,d,e,f] ตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (p<0.01)

* ระดับความเข้มข้นเพอร์คอลล์ 0% คือ น้ำเชื้อสด ก่อนการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์

4.4 ประสิทธิภาพในการปฏิสนธิของน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน

4.4.1 อัตราการผสมติด และอัตราการเข้าคลอด

เลือกน้ำเชื้อที่ระดับชั้นที่มีตัวอสุจิ X มาก (ระดับชั้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่ 80%) และตัวอสุจิ Y มาก (ระดับชั้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่ 50%) จากระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ นำไปเจือจางด้วยสารละลายน้ำเชื้อ NSRTC4 ให้ได้ความเข้มข้นอสุจิจำนวน 3,000 ล้านตัวต่อโด๊ส นำไปผสมเทียมกับแม่สุกรเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดของพ่อสุกรตัวเดียวกัน พบว่าอัตราการผสมติด ของน้ำเชื้อที่ไม่ได้ผ่านการปั่นเหวี่ยง (น้ำเชื้อสด) น้ำเชื้อระดับชั้นที่มีตัวอสุจิ Y และน้ำเชื้อระดับชั้นที่มีตัวอสุจิ X มาก คือ ร้อยละ 95.80, 95.80 และ 100 ตามลำดับ แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) และอัตราการเข้าคลอดของน้ำเชื้อที่ไม่ได้ผ่านการปั่นเหวี่ยง (น้ำเชื้อสด) น้ำเชื้อระดับชั้นที่มีตัวอสุจิ Y มาก และ น้ำเชื้อระดับชั้นที่มีตัวอสุจิ X มาก คือ ร้อยละ 95.80, 95.80 และ 100 ตามลำดับ แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงในตารางที่ 4.6 นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการผสมติด และอัตราการเข้าคลอดเท่ากัน แสดงว่าแม่สุกรที่ผสมไม่มีการแท้งเกิดขึ้นในระหว่างการตั้งท้อง แสดงให้เห็นว่าการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อผ่านชั้นระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับ 50% (อสุจิ Y) และ 80 % (อสุจิ X) จะไม่ส่งผล หรือเป็นอันตรายต่อกระบวนการตั้งท้อง และการพัฒนาของตัวอ่อนในระหว่างการตั้งท้อง เนื่องจากการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับชั้นแตกต่างกัน เป็นการช่วยกำจัดสิ่งแปลกปลอมปนในน้ำเชื้อ เช่น เศษเซลล์ (Bollendorf *et al.* 1994) อสุจิที่ตาย แบคทีเรีย ซากเศษเซลล์ที่ตายแล้วซึ่งทำให้อสุจิที่อยู่ส่วนล่างของหลอดมีการเคลื่อนที่ได้สูงขึ้น และทำให้อสุจิที่มีรูปร่างปกติสูงขึ้นไปด้วย (Arcidiacono *et al.* 1983) สอดคล้องกับรายงานของ ประมวล แซ่โค้ว (2542) ที่ทำการผสมน้ำเชื้อสุกรที่ไม่ผ่าน และผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่จำนวนระดับความเข้มข้น 3, 5 และ 8 ระดับ พบว่าอัตราการผสมติด และอัตราการเข้าคลอดเท่ากัน แสดงว่าการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อผ่านชั้นระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์จะไม่มีผล หรือเป็นอันตรายต่อกระบวนการตั้งท้อง และการพัฒนาของตัวอ่อนในระหว่างการตั้งท้อง

4.4.2 จำนวนวันในการอุ้มท้อง

จำนวนวันในการอุ้มท้องของแม่สุกรที่ทำการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่ไม่ได้ผ่านการปั่นเหวี่ยง (น้ำเชื้อสด), น้ำเชื้อระดับชั้นที่มีตัวอสุจิ Y มาก และ น้ำเชื้อระดับชั้นที่มีตัวอสุจิ X มาก พบว่า มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 116.13, 115.83 และ 115.50 วัน ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงในตารางที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองแสดงว่า ตัวอสุจิของน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้น 50% และ 80% หลังจากปฏิสนธิกับไข่แล้ว ตัวอ่อนจะมีการพัฒนาและเติบโตเป็นปกติ ตลอดจนการตั้งท้องแม่สุกร และระยะเวลาการอุ้มท้องของแม่สุกรค่าเฉลี่ย 114±3 วัน อยู่ในเกณฑ์ปกติ สอดคล้องกับรายงานของ ประมวล แซ่โค้ว (2542) ที่ทำการผสมน้ำเชื้อสุกรที่ไม่ผ่าน และผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่จำนวนระดับความเข้มข้น 3, 5 และ 8 ระดับ พบว่าตัวอสุจิของน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ หลังจากปฏิสนธิกับไข่แล้ว ตัวอ่อนจะมีการพัฒนา และเติบโตเป็นปกติ ไม่มีผลหรือเป็นอันตรายต่อกระบวนการตั้งท้องโดยระยะเวลาการอุ้มท้องของแม่สุกรค่าเฉลี่ย 114±3 วัน

การพัฒนาของตัวอ่อนในระหว่างการตั้งท้อง และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบกับการศึกษาในน้ำเชื้อโคที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์แล้วนำไปปฏิสนธิกับไข่ พบว่าตัวอ่อนมีการพัฒนาและเจริญเติบโตปกติ (Avery and Greve. 1995; Parrih *et al.* 1995; กรกนก พรหมเทพ. 2552) ซึ่งหากมีปัจจัยที่ทำให้เกิดการยับยั้ง หรือกระตุ้นการพัฒนาและเจริญเติบโตของตัวอ่อนจะทำให้ระยะเวลาการอุ้มท้องของแม่สุกรช้ากว่าหรือเร็วกว่าค่าเฉลี่ย 114±3 วัน (Hafez and Hafez. 2000) ซึ่งจากการทดลองแสดงว่าการผสมเทียมแม่สุกรด้วยน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ไม่มีผลในการยับยั้งหรือกระตุ้นการพัฒนา และการเจริญเติบโตของตัวอ่อนแต่อย่างใด

4.4.3 จำนวนลูกแรกคลอดเฉลี่ยต่อครอก

จำนวนลูกแรกคลอดเฉลี่ยต่อครอกของแม่สุกรที่เกิดจากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่ไม่ได้ผ่านการปั่นเหวี่ยง (น้ำเชื้อสด), น้ำเชื้อระดับชั้นที่มีตัวอสุจิ Y มาก และ น้ำเชื้อระดับชั้นที่มีตัวอสุจิ X มาก พบว่า มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 11.96, 12.65 และ 12.38 ตัว/ครอก ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 4.6 ซึ่งแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จากการทดลองแสดงว่า การปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ไม่ส่งผลต่อความสามารถในการปฏิสนธิของตัวอสุจิ และไม่มีผลต่อการพัฒนาของตัวอ่อน เนื่องจากการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับชั้นแตกต่างกัน เป็นการช่วยกำจัดสิ่งแปลกปลอมปนในน้ำเชื้อ เช่น เศษเซลล์ (Bollendorf *et al.* 1994) อสุจิที่ตาย แบคทีเรีย ซากเศษเซลล์ที่ตายแล้ว (Arcidiacono *et al.* 1983) ดังนั้นจึงไม่ส่งผลกระทบต่อตัวอสุจิเมื่อผ่านการปั่นเหวี่ยงน้ำเชื้อผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับชั้นแตกต่างกันสอดคล้องกับรายงานของ ประมวล แซ่โค้ว (2542) ที่ทำการผสมน้ำเชื้อสุกรที่ไม่ผ่าน และผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่จำนวนระดับความเข้มข้น 3, 5 และ 8 ระดับ พบว่าจำนวนลูกแรกคลอดเฉลี่ยต่อครอกของแม่สุกรที่เกิดจากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ไม่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตามจำนวนลูกแรกคลอดเฉลี่ยต่อครอก นอกจากจะขึ้นอยู่กับอัตราการปฏิสนธิของไข่และอสุจิแล้ว ยังขึ้นอยู่กับอัตราการตกไข่ของแม่สุกร อัตราการตายของตัวอ่อนในมดลูก และคุณภาพการผสมเทียมอีกด้วย (Gordon. 1997)

4.4.4 น้ำหนักลูกแรกคลอดเฉลี่ยต่อตัว

น้ำหนักลูกแรกคลอดเฉลี่ยต่อตัวที่ทำการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่ไม่ได้ผ่านการปั่นเหวี่ยง (น้ำเชื้อสด), น้ำเชื้อระดับชั้นที่มีตัวอสุจิ Y มาก และ น้ำเชื้อระดับชั้นที่มีตัวอสุจิ X มาก พบว่า มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.57, 1.57 และ 1.48 กิโลกรัม/ตัว ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 4.6 ซึ่งแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จากการทดลองแสดงว่า น้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ไม่ส่งผลต่อน้ำหนักลูกแรกคลอดเฉลี่ยต่อตัว สอดคล้องกับรายงานของ ประมวล แซ่โค้ว (2542) ที่ทำการผสมน้ำเชื้อสุกรที่ไม่ผ่าน และผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่จำนวนระดับความเข้มข้น 3, 5 และ 8 ระดับ พบว่า น้ำหนักลูกแรกคลอดเฉลี่ยต่อตัวที่เกิดจากแม่สุกรที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ไม่มีผลทำให้ลูกสุกรที่เกิดอ่อนแอ

ตารางที่ 4.6 ลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ของตัวอสุจิที่ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง (น้ำเชื้อสด) และผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับ 50% (อสุจิ Y มาก) และ 80 % (อสุจิ X มาก) ของสุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ และแลนด์เรซ

ลักษณะความสมบูรณ์พันธุ์ของอสุจิ	น้ำเชื้อสด	ระดับชั้น 50%	ระดับชั้น 80%	P-value
จำนวนแม่สุกรที่ผสม (ตัว)	24	24	24	
จำนวนแม่สุกรที่ผสมติด (ตัว)	23	23	24	
อัตราการผสมติด (เปอร์เซ็นต์)	95.80	95.80	100.00	0.5486
จำนวนแม่สุกรที่เข้าคลอด	23	23	24	
อัตราการเข้าคลอด (เปอร์เซ็นต์)	95.80	95.80	100.00	0.5486
จำนวนวันในการอุ้มท้อง (วัน)	116.13	115.83	115.50	0.4151
จำนวนลูกแรกคลอดเฉลี่ยต่อครอก (ตัว)	11.96	12.65	12.38	0.6547
น้ำหนักลูกแรกคลอดเฉลี่ยต่อตัว (ก.ก.)	1.57	1.57	1.48	0.2874

4.4.5 ปริมาณเพศลูกสุกร

จากการผสมน้ำเชื้อที่ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง (น้ำเชื้อสด) และหลังจากการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับ 50% (อสุจิ Y มาก) และ 80 % (อสุจิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

X มาก) ของสุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ และแลนด์เรซ พบว่าลูกที่เกิดมาให้เปอร์เซ็นต์ลูกเพศเมีย เท่ากับร้อยละ 48.87, 33.21 และ 67.24 ตามลำดับ และให้เปอร์เซ็นต์ลูกเพศผู้ เท่ากับร้อยละ 51.13, 66.79 และ 32.76 ตามลำดับ แสดงในตารางที่ 4.7

ตารางที่ 4.7 ปริมาณเพศลูกสุกรเพศเมีย และเพศผู้จากการผสมน้ำเชื้อที่ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง (น้ำเชื้อสด) และผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับ 50% (อสุจิ Y มาก) และ 80 % (อสุจิ X มาก) ของสุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ และแลนด์เรซ

ปริมาณเพศลูกสุกร	น้ำเชื้อสด	ระดับชั้น 50%	ระดับชั้น 80%
% ลูกเพศเมีย	48.55	32.71	67.75
% ลูกเพศผู้	51.45	67.29	32.25
สัดส่วนเพศ เมีย:ผู้	0.94	0.49	2.06
สัดส่วนเพศ ผู้:เมีย	1.06	2.06	0.48

ผลจากการวิเคราะห์ ไค-สแควร์ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเพศลูกสุกรแรกเกิดแตกต่างจากทางทฤษฎีของสุกรพ่อพันธุ์ทั้งสองสายพันธุ์ พบว่าแม่สุกรที่ผสมน้ำเชื้อที่ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง (น้ำเชื้อสด) จะมีค่าปริมาณเพศลูกสุกรทั้งเพศผู้และเพศเมียแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยมีค่าไค-สแควร์เท่ากับ 0.7130 (ให้ปริมาณลูกเพศเมียเท่ากับเพศผู้) ในขณะที่แม่สุกรที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับ 50% (อสุจิ Y มาก) จะมีค่าปริมาณเพศลูกสุกรแตกต่างจากทางทฤษฎี (1:1) โดยให้ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) ซึ่งมีค่าไค-สแควร์เท่ากับ <0.0001 กล่าวคือ ให้ปริมาณลูกเพศผู้มากกว่าเพศเมีย ในขณะที่แม่สุกรที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับ 80% (อสุจิ X มาก) จะมีปริมาณเพศลูกสุกรแตกต่างจากทางทฤษฎี โดยให้ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) ซึ่งมีค่าไค-สแควร์เท่ากับ <0.0001 กล่าวคือ ให้ปริมาณลูกเพศเมียมากกว่าเพศผู้ ดังแสดงในตารางที่ 4.8

นอกจากนี้พบว่าเพศของลูกสุกรจากการผสมเทียม มีความสอดคล้องกับผลการตรวจหาปริมาณเปอร์เซ็นต์ของอสุจิ Y และอสุจิ X จากการย้อมสี Quinacrine หลังการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้น 0%, 50% และ 80% ของสุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ และสุกรพ่อพันธุ์แลนด์เรซ ดังที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 4.2 และยังสอดคล้องกับรายงานต่างๆ ที่รายงานถึงผลการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ ซึ่งน้ำเชื้อส่วนล่างของหลอดจะมีปริมาณอสุจิ X มากกว่าอสุจิ Y ทั้งในน้ำเชื้อ มนุษย์ (Kaneko *et al.* 1984) และในสุกร (Othani *et al.* 1988) แต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขัดแย้งกับรายงานของประมวล แซ่โค้ว (2540) ที่รายงานว่าน้ำเชื้อสุกรที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงสารละลายเพอร์คอลล์ ปั่นแยกอสุจิในชั้นล่างสุด พบว่า กลับเพิ่มสัดส่วน ลูกเพศผู้มากขึ้นอาจเนื่องมาจากรอบที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงต่ำเกินไป นอกจากนี้ กรกนก พรหมเทพ (2552) ศึกษาการแยกเพศในน้ำเชื้อโคผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 7 ชั้น ปั่นที่ 250 xg นาน 20 นาที และนำน้ำเชื้อที่ปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์ 65-75 เปอร์เซ็นต์ ที่มีอสุจิ X มาก (จากการตรวจสอบโดยการย้อมสี Quinacrine) นำไปผสมเทียมกับแม่โค พบว่าได้ลูกโคเพศเมีย 71.43 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.8 จำนวนลูกสุกรเพศเมีย และเพศผู้แรกคลอดทั้งหมดที่เกิดจากการผสมน้ำเชื้อที่ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง (น้ำเชื้อสด) และผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่ ระดับ50% (อสุจิ Y มาก) และ 80 % (อสุจิ X มาก) ของสุกรพ่อพันธุ์ลาร์จไวท์ และแลนด์เรซ

ชนิดน้ำเชื้อ และระดับชั้นความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์	เพศของลูก	จำนวนลูกที่เกิด (ตัว)	ค่าคาดคะเน (ตัว)	ค่าไค-สแควร์
น้ำเชื้อสด	เมีย	130	133	0.7130
	ผู้	136	133	
ระดับชั้น 50%	เมีย	93	140	<0.0001
	ผู้	187	140	
ระดับชั้น 80%	เมีย	195	145	<0.0001
	ผู้	95	145	

เนื่องจากแรงเหวี่ยงจากการปั่นจะทำให้อสุจิ X ที่หนักกว่าจะตกลงสู่ส่วนล่างของหลอดได้เร็วกว่าอสุจิ Y ที่มีน้ำหนักเบากว่า (อนันต์ ศรีขาว. 2535) นอกจากนี้การที่พบอสุจิ X ในส่วนล่างของหลอดมากกว่าอสุจิ Y แสดงว่าอสุจิ X มีการตกตะกอนและมีความสามารถในการผ่านความตึงผิวได้ดีกว่าอสุจิ Y อาจเนื่องจากความแตกต่างของรูปร่าง และน้ำหนักของโครโมโซมที่ส่วนหัวของอสุจิอาจทำให้แรงโน้มถ่วงที่กระทำต่ออสุจิ X และอสุจิ Y ต่างกันออกไป ทำให้มีผลต่อความต้านทานในการเคลื่อนผ่านแรงตึงผิวของเพอร์คอลล์ในระหว่างการตกตะกอนของอสุจิทำให้อสุจิ X อยู่ด้านล่างของหลอดทดลอง และอสุจิ Y อยู่ด้านบนอสุจิ X (Kaneko *et al.* 1984) นอกจากนี้ ยังพบว่ายิ่งจำนวนชั้นต่างระดับความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น การแยกอสุจิ X ก็จะมีประสิทธิภาพมากขึ้น และปริมาณอสุจิด้านล่างของหลอดขึ้นอยู่กับจำนวนรอบของการปั่นเหวี่ยงและระยะเวลาในการปั่นเหวี่ยงที่เหมาะสมด้วย (Kaneko *et al.* 1984; อนันต์ ศรีขาว. 2535)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

การศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อของสุกรก่อน และหลังจากการปั่นเหวี่ยงผ่านสารละลายเพอร์คอลล์ที่ ระดับชั้นความเข้มข้นแตกต่างกัน 5 ระดับ การศึกษาระดับชั้นความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่เหมาะสมในการแยกตัวอสุจิ X และตัวอสุจิ Y และการศึกษาประสิทธิภาพในการปฏิสนธิของอสุจิที่ผ่านการแยกตัวอสุจิ X และตัวอสุจิ Y สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

พันธุ์ของพ่อสุกร ไม่มีผลต่อลักษณะคุณภาพน้ำเชื้อในลักษณะของความเข้มข้นของตัวอสุจิ, กรด-ด่าง และเปอร์เซ็นต์ลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปรกติ แต่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของตัวอสุจิ และเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต โดยน้ำเชื้อจากพ่อสุกรพันธุ์แลนด์เรซจะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า และเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตสูงกว่า พ่อสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ โดยน้ำเชื้อจากพ่อสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ และพ่อสุกรพันธุ์แลนด์เรซที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงในระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ระดับ 80% จะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของอสุจิสูงที่สุด และน้ำเชื้อพ่อสุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ที่ปั่นเหวี่ยงในสารละลายเพอร์คอลล์ระดับ 20% จะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าต่ำที่สุด

ระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ คือ ระดับ 0% (น้ำเชื้อสด), 20%, 35%, 50%, 65% และ 80% มีผลต่อลักษณะความเข้มข้นของตัวอสุจิ, กรด-ด่าง, เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้า, เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์ลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปรกติ อิทธิพลร่วมระหว่างพันธุ์และระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ ไม่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นของตัวอสุจิ, กรด-ด่าง และเปอร์เซ็นต์ลักษณะอสุจิที่มีรูปร่างผิดปรกติแต่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แบบตรงไปข้างหน้าของอสุจิ และเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต

พันธุ์พ่อสุกร คือ สุกรพันธุ์ลาร์จไวท์ และแลนด์เรซ ไม่มีผลต่อปริมาณเปอร์เซ็นต์อสุจิ Y และ X ในน้ำเชื้อหลังจากการย้อมสี Quinacrine ผลของระดับความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ต่อปริมาณเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิ X และอสุจิ Y พบว่าความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับ 50% จะมีปริมาณเปอร์เซ็นต์อสุจิ Y สูงสุด และความเข้มข้นของสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับ80% จะมีปริมาณเปอร์เซ็นต์อสุจิ X สูงสุด ส่วนอิทธิพลร่วมระหว่างพันธุ์กับระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ ไม่มีอิทธิพลร่วมต่อปริมาณเปอร์เซ็นต์อสุจิ Y และอสุจิ X ในน้ำเชื้อพ่อสุกร

แม่สุกรที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่ไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง (น้ำเชื้อสด) จะให้ลูกสุกรแรกคลอดที่มีค่าสัดส่วนทางเพศให้ปริมาณลูกเพศเมียเท่ากับเพศผู้ ในขณะที่แม่สุกรที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับ 50% จะมีค่าสัดส่วนทางเพศให้ปริมาณลูกเพศผู้มากว่าเพศเมีย และแม่สุกรที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่ผ่านการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นระดับความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ที่ระดับ 80% จะมีค่าสัดส่วนทางเพศ ให้สัดส่วนลูกเพศเมียมากกว่าเพศผู้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเปรียบเทียบจำนวนการวางระดับชั้นของความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์เพื่อให้ได้ชั้นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด และได้เพศของตัวอสุจิที่ต้องการปริมาณมากที่สุด
2. ควรศึกษารอบที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงความเข้มข้นสารละลายเพอร์คอลล์ให้มากกว่านี้ เพื่อที่จะได้จำนวนรอบที่เหมาะสมที่สุดในการปั่นเหวี่ยงแยกจำนวนตัวอสุจิ X และตัวอสุจิ Y
3. ควรใช้เทคนิคที่มีความแม่นยำยิ่งขึ้นในการตรวจสอบตัวอสุจิ X และตัวอสุจิ Y เช่นการติดฉลากด้วยสารเรืองแสง หรือเทคนิคทางชีวโมเลกุลอื่นๆ เช่น พีซีอาร์ เป็นต้น
4. ควรศึกษาเพิ่มเติมในสุกรพันธุ์อื่นๆ เช่น ดูร็อค เพียเทรน เป็นต้น ว่าจะสามารถจำแนกเพศตัวอสุจิ ได้หรือไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กรกนก พรหมเทพ. 2552. "ประสิทธิภาพการปฏิสนธิของอสุจิโคที่ผ่านการแยกเพศโดยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์". วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพทางการเกษตร บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ.

ประมวล แซ่โค้ว. 2542. "คุณภาพและศักยภาพการกำหนดเพศลูกสุกรของน้ำเชื้อหลังผ่านการแยกอสุจิเอ็กซ์-วาย โดยการปั่นเหวี่ยงผ่านชั้นต่างระดับความเข้มข้นของเพอร์คอลล์". วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาสัตวศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศรีสุวรรณ ชมชัย. 2542. **คู่มือปฏิบัติการผสมเทียมในสุกร.** กรุงเทพฯ : สัตว์เศรษฐกิจแมกกาซีน.

อนันต์ ศรีขาว. 2535. "วิธีการคัดแยกอสุจิ X และ Y ในปศุสัตว์ก้าวหน้าไปถึงไหน". หน้า. 1-25. ใน **การประชุมสัมมนาเชิงปฏิบัติการ เรื่อง X- and Y-Chromsome bearing sperm separation prospective.** กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อมรา คัมภิรานนท์. 2546. **พันธุศาสตร์เซลล์.** พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Adimoelja, A. 1987. "Sephadex gel for sex preselection". pp. 491-499. In. Mohri, H. **New Horizon in Sperm Cell Research.** Gordon and Breach Sci. Publ, New York.

Amann, R.P. 1989. "Treatment of sperm to predetermine sex". **Theriogenology.** 31 : 49-60.

Amann, T. and Lutwak-mann, C. 1981. **Male Reproductive Fungtion and Semen.** Springer-Verlag, new York.

Anderson, C.Y. and Byskov, A.G. 1997. "Enhanced separation of X and Y bearing sperm cells by a combine density gradient centrifugation evaluated by fluorescence in situ hybridization of the Y-chromosome". **Acta. Obstet. Gynecol. Scand.** 76:131-134

Arcidiacono, A., Wait, A.C. and Balerna, M. 1983. "The use of percoll gradient for the prepatation of subpopulations of human spermatozoa". **Int. J. Androl.** 6 : 433-445.

Asher, P. 1991. "The separation of human spermatozoa into X or Y chromosome rich fractions and quinacrine staining for advanced light microscopy". **Micron and Microscopica Acta.** 22(3) : 300.

Avery, B. and Greve, T. 1995. "Impact of percoll on Bovine spermatozoa Used for *in vitro* insemination". **Theriogenology.** 44 : 871-878.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Baracaldo, M. and Ward, J. 2008. "Quality control of extended boar semen". **London Swine Conference – Facing the New Reality 1-2 April** : 195-206.

Bahr, G.F. 1971. "Separation of X- and Y- bearing spermatozoa by gravity : A reconsideration". pp. 8-37 In a Symposium : Sex Ration at Birth Prospects for control. **Amer. Soc. Anim. Sci.**

Barlow, P. and Vosa, C.G. 1970. "The Y chromosome in human spermatozoa". **Nature** . 226(249) : 961-962.

Batzofin, H.J. 1987. "X Y sperm separation for sex selection". **Urol. Clin. Nor. Amer.** 14(3) : 1432-1436.

Beatty, R.A. 1977. "F-bodies as Y-Chromosome markers in mature human sperm heads : a quantitative approach". **Cytogenetic and Cell Genet.** 18 : 33-49.

Bearden, H. J. and Fuquay, J.W. 1997 . **Applied Animal Reproduction.** 4 th ed. New Jersey : Prentice Hall, Inc.

Bjorndahl, L. and Baratt, C.R.L. 2002. "Sex selection. A survey of laboratory methods and clinical results". Assisted Conception Unit, Birmingham Women's Hospital, and Reproductive Biology and Genetics Group, University of Birmingham, United Kingdom.

Bollendorf, A., Check, J.H., Katsoff, D. and Lurie, D. 1994. "Comprarison of direct swim-up, mini – percoll, and sephadex G10 separation procedures". **Arch. Androl.** 32 : 157-162.

Brandriff, B.F., Gordon, L.A., Haendel, S., Singer, S., Moore, D.H. and Gledhill, B.L. 1986. "Sex chromosome ratio determined by karyotypic analysis in albumin-isolate human sperm". **Fertil. Sterl.** 46 : 678-690.

Cui, K.H. 1997. "Size differences between human X and Y spermatozoa and prefertilization diagnosis". **Mol. Hum. Reprod.** 23 : 11-20.

Ericsson, R. J., Langevin, C.N. and Nishino, M. 1973. "Isolation of fractions rich in human Y sperm". **Nature.** 246(5433) : 421-424.

Garner, D.L.and Hafes, E.S.E. 1993. Spermatozoa Seminal plasma. In E.S.E.Hasfes (ed). **Reproduction in Farm Animals,** 6th ed, Lea and Eebiger. Philadelphia.

Gledhill, B.L. 1988. "Selection and separation of X- and Y- chromosome-bearing mammalian sperm". **Gamete Res.** 20(3) : 377-395.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Grant, S.A., Long, S.E. and Parkinson, T.J. 1994. "Fertilizability and structural properties of boar spermatozoa prepared by percoll gradient centrifugation". **J. Reprod. Fertil.** 100 : 477-483.

Graves, J.A.M. and Short, R.V. 1990. "Y- and X-sperm Which Determine Sex". **Reprod. Fertil. Dev.** 2 : 729-735.

Gordon, I. 1997. **Controlled Reproduction in Pig**. Cap Internation. New York. 247 p.

Guttenbach, M., Michelmann, H.W., Engel, B., Schimid, W. and Schimid, M. 1997. "Segregation of sex chromosomes into sperm nuclei in a man with 47, XXY klinefelter' s karyotype ; a fish analysis". **Hum. Genet.** 99 : 474-477.

Hafez, B. and Hafez, E.S.E. 2000. **Reproduction in Farm Animal.** 7 th ed. United States of America.Lippincott : Williams & Wilkins.

Han, T.L., Ford, S.P., Webb, G.C., Flaherty, S., Correl, A. and Mettews, C.D. 1993. "Stimultanous detecttion of X – and Y- bearing human sperm by doulble fluorescence in situ hybridization". **Mol. Reprod. Dev.** 34 : 308-313.

Hyne, R.V., Stojanoff, A., Clarke, G.N., Lopata, A. and Johnston, W.I.H. 1986. "Pregancy from in vitro fertilization of human eggs after separatiom of motile spermatozoa by gradient centrifugation". **Fertil. Steril.** 45 (1) : 93-96.

Ishijima, S.E., Okunu, M., Nahori, Y., Seki, S., Nagafuchi, S., Kaneko, S. and Mohri, H. 1992. "Dentification of X – and Y- Chromosome bearing sperm separate by free-flow electrophotoresis Using Y-specific polymerase chain reaction". **Biomed. Res.** 13 : 221-224.

Iwasaki, S., Shioya, Y., Masuda, H., Hanada, A. and Nakahara, T. 1988. 'Sex ratio of early embryo fertilizd in vitro with spermatozoa separated by percoll'. **Theriogenology.** 30 (6) : 1191-1198.

Johnson, L. A. 1991. "Sex preselection in swine: altered sex ratios on offspring following surgical insemination of flow sorted X- and Y-bearing sperm". **Reprod. Domes. Ani.** 26 : 309-314.

Johnson, L. A. 1992. "Racent progress in preselection of swine for sex". **Pig New and Inform. 13**. (2) : 63-65.

Johnson, L. A. 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Johnson L.A. and Clark, R.N. 1988. “Flow sorting of X and Y chromosome beraing mammalian sperm : activate and pronuclear development of sorted bull, boar and ram sperm microinjected into population”. **Gamete. Res.** 21 : 335-343.

Kaneko, S., Yamaguchi, J., Kobayashi, T. and Iizuka, R. 1983. “Separation of human X and Y bearing sperm using percoll density gradient centrifugation”. **Fertil. Steril.** 40(5) : 661-665.

Kaneko, S., Oshio, S., Kobayashi, T. Mohri, H. and Iizuka, R. 1984. “Selective isolation of human X- bearing sperm by differential velocity sedimentation in percoll density gradient. **Biomed. Res.** 5(2) : 194-197.

Kaneko, S., Kobanawa, K., Kobayashi, T., Mohri, H. and Iizuka, R. 1986. “Purification of human sperm by a discontionuous percoll density gradient with an innercolum”. **Bio. Reprod.** 35 : 1059-1063.

Kaneko, S., Sato, H., Kobanawa, K., Oshio, S., Kobayashi, T. and Iizuka, R. 1987. “Continuous-step density gradient discontionuous for the selective contration of progressively motile sperm for insemination with husband’s semen”. **Arch. Andro.** 19 : 75-84.

Kawarasaki, T., Kohsaka, T., Sone, M., Yoshida, M. and Bamba, K. 1995. “Detection of Y bearing procine spermatozoa by in situ hybridization using digoxgenin-labeted, procine male-specific DNA probe produced by polymerase chain reaction”. **Mol. Reprod. Dev.** 40 : 455-459.

Li, P., Dzyuba, B., Hulak, M., Rodina, M., Boryshpoletsa, S., Li, Z.H.and Linharta, O. 2010. “Percoll gradient separation of cryopreserved common carp spermatozoa to obtain a fraction with higher motility velocity and membrane integrity”. **Theriogenology.** 74 : 1356–1361.

Machado, G.M., Carvalho, J.O., Filho, E.S., Caixeta, E.S., Franco, M.M., Rumpf, R. and Dode M.A.N. 2009. “Effect of Percoll volume, duration and force of centrifugation, on in vitro production and sex ratio of bovine embryos”. **Theriogenology.** 71 : 1289-1297.

McCluer, R.D., Nunes, L. and Tom, R. 1989. “Semen manipulation : improve sperm recovery and function with a two layer percoll gradient”. **Fertil. Steril.** 51(5) : 874-877.

McEvoy, J.D. 1992. “Alteration of the sex ration”. **Anim. Breed Abstr.** 60 : 97-111.

Mehmood, A., Anwar, M. and Saqlan Naqvi, S.M. 2009. “Motility acrosome integrity membrane integrity and oocyte cleavage rate of sperm separated by swim-up or Percoll gradient method from frozen–thawed buffalo semen”. **Anim. Reprod. Sci.** 111 : 141–148.

เอกสารนี้เป็น ... ชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mohri. H., Oshio, S., Kaneko, S., Kobayawshi, T. and Lizuka, R. 1987. "Separation characterization of mammalian X- and Y- bearing sperm, pp. 469-481". In Mohri, H. **New Horizon in sperm cell research.** Baston : Gordon and Breach Sci. Publ.

Moruzzi, J.F. 1979. "Selection and mammalian species for the separation of X and Y chromosome-bearing spermatozoa". **J. Reprod. Fertil.** 57:319-328.

Ogawa, S., Yamakawa, H., Yamanoi, J., Kano, S., Takeshima, T., Tauchi, K. and Nagashima, H. 1988. "Are fluorescent bodies of Y- spermatozoa detectable in common with mammalian species". **Theriogenology.** 29 : 1083-1089.

Othani, S., Yamagawa, H., Nishida, S., Matsumoto, T., Nagashima, H., Konou, Y. and Ogawa, S. 1988. "Application of F-body test and percoll density gradient centrifugation in separation boar X- and Y- bearing spermatozoa". **Jap. J. Anim. Repord.** 34(1) : 31-38.

Parrish, J.J., Krogenaes, A. and Parrish, J.L.S. 1995. "Effect of bovine sperm separation by either swim-up or percoll method on success of *in vitro* fertilization and early embryonic development". **Theriogenology.** 44 : 859-869.

Pearson, P.L., Boblow, W., Vosa, C.C. and Barlow, P. 1971. "Quinacrine fluorescence in mammalian chromosomes". **Nature.** 231 : 326-329.

Pertoft, H. 2000. "Fraction of cell and subcellular particles with percoll". **J. Biochem. Biophys. Method.** 44 : 1-30.

Pickering, S.J., Braude, T.P., Bolton, V.N. and Gresham, G.A.G. 1989. "Are human spermatozoa separated on percoll density gradient safe for therapeutic use". **Fertil. Steril.** 51 : 1024-1029.

Resende, M.V., Bezerra, M.B., Perecin, F., Almeida, A.O., Lucio, A.C. and Lima, V.F.M.H. 2009. "Sepration of X-bearing bovine sperm by centrifugation in continuous percoll and optipper density gradient : Effect in sperm viability and in vitro embryo production". **Anim. Brasileira.** 10 : 581-587.

Rohde, W., Porstman, T., Prehn, S. and Dorner, G. 1975. "Gravitational pattern of the Y- bearing human spermatozoa in density gradient centrifugation". **J. Repro. Fertil.** 42 : 587-591.

Rose G.A. and Wong A. 1998. "Experiences in Hong Kong with the theory and practice of the albumin column method of sperm separation for sex selection". **Human. Reprod.** 13 : 146-149.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sarker, S., Jolly, D.J., Firedman, T. and Jones, O.W. 1984. "Physiology of X and Y human sperm". **Differentiation.** 27 : 120-125.

Senger. P.L. 1999. **Pathway to pregnancy and parturition.** 1st ed. Washington : Current Conception, Inc.

Short. R.V. 1982. "Sex determination and and differentiation". pp. 70-113. In Austin, C. R. and Short, R.V. **Embyonic and Fetal Development.** Cambridge : Cambride Univ. Press.

Totsukawa, K., Kayada, T., Oshawa, Y., Ueno, H., Suto, S. and Togashi, M. 1988. "Separation of boar spermatozoa using percoll density gradient centrifugation and detection of corpuscle- like fluorescent bodyies". **Jap. J. Anim. Reprod.** 25(3) : 147-152. (Abstr.)

Ueda, K. and Yanagimachi, R. 1987. "Sperm chromosome analysis as a new system to test human X- and Y-sperm separation". **Gamete. Res.** 17(3) : 221-228.

Upreti, G.C., Riches, P.C. and Johnson, L. A. 1988. "Attempted Sexing of bovine spermatozoa by fraction on a percoll density gradient". **Gamete. Res.** 20 : 83-92.

Wilson, K. and Walker, J.M. 1994. **Principles and Techniques of Practical Biochemistry.** London : Cmabridgge University.

Winsor, D.P., Evans, G. and White. I.G. 1993. "Sex predetermination by separation of X and Y chromosome – bearing sperm : A review". **Reprod. Fertil. Dev.** 5 : 155-171.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

1. ความเข้มข้นน้ำเชื้อ ตรวจวัดโดยใช้เครื่อง Photometer SpermaCue โดย

1) เปิดเครื่อง หน้าจอจะขึ้นคำว่า SP ดึงแท่นวาง micro cuvette สีดำ ด้านขวามือข้างเครื่องออกมาช้าๆจนลงล๊อก สังเกตุจากหน้าจอเครื่อง จะมีคำว่า " Ready " คือ เครื่องพร้อมใช้งาน

2) นำตัวควบคุมค่ามาตรฐานสีแดง (Control cuvette) มาเช็ดทำความสะอาดพื้นผิวส่วนที่เป็นกระจกให้สะอาดแล้ววางบนแท่นสีดำใส่ micro cuvette ดันที่วาง micro cuvette เข้าไปในเครื่อง Spermacue รอเครื่องอ่านค่า ค่าที่อ่านได้ควรอยู่ระหว่างค่าที่กำหนดไม่เกิน ± 5

3) นำ micro cuvette ที่จะใช้งานใส่เข้าไปในเครื่อง SpermaCue ค่าที่อ่านได้ต้องเท่ากับศูนย์ ถ้าไม่เท่ากับศูนย์ให้ นำน้ำกลั่นฉีดล้างใช้กระดาษทิชชูซับให้แห้ง และอ่านค่าอีกครั้งจนอ่านค่าได้เท่ากับศูนย์ แล้วใช้ดรอปเปอร์ดูดน้ำเชื้อในบีกเกอร์บริเวณส่วนกลางแล้วหยดใส่ในช่องของ micro cuvette จนเต็ม ระวังไม่ให้ มีฟองอากาศ ใช้กระดาษทิชชูซับน้ำเชื้อที่ติดอยู่ด้านนอก เพื่อให้ค่าที่อ่านได้ถูกต้อง นำ micro cuvette ที่บรรจุน้ำเชื้อ วางบนแท่นสีดำใส่ micro cuvette ดันที่วาง micro cuvetteใส่เข้าไปในเครื่อง Spermacue หน้าจอจะมีคำว่า " Measuring " หลังจากนั้นจะมีตัวเลขบนหน้าจอ อ่านค่าที่ได้มีหน่วยเป็น 10^6 (ล้านตัว) ต่อ มิลลิลิตร

2. ลักษณะความผิดปกติของรูปร่างอสุจิ

2.1 วิธีการเตรียมสีย้อม

ประกอบด้วยสีอีโอซิน 1 กรัม นิโกรซิน 5 กรัม โซเดียมซิเตรท 3 กรัมและน้ำ กลั่น 100 มิลลิลิตร

1. ละลายสีอิโอซิน 1 กรัม ในน้ำ 50 มิลลิลิตร

2. ละลายสีนิโกรซิน 5 กรัม และโซเดียมซิเตรท 3 กรัม ในน้ำอุ่น 50 มิลลิลิตร พร้อมกับคนให้สีนิโกรซินละลายจนหมด สีนิโกรซินนี้ละลายยากในน้ำธรรมดาจึงต้องละลายในน้ำอุ่นหรือน้ำร้อน

3. นำสีอีโอซิน โซเดียมซิเตรท และสีนิโกรซินที่ละลายเรียบ แล้วนำมาเทรวมกัน แล้วคนส่วนผสมให้เข้ากัน

4. นำส่วนผสมที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรองอย่างน้อยที่สุด 1 ครั้ง เพื่อจะได้ส่วนผสมที่เป็นน้ำจริง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 วิธีการย้อมสี

1. นำสีที่จะใช้ย้อมมาอุ่นที่ เครื่องวอร์มสไลด์ หรือ water bath ที่อุณหภูมิ 33-37 องศาเซลเซียส

2. เตรียมสไลด์ที่ล้างและเช็ดให้สะอาดไว้ 2 แผ่น แผ่นสไลด์จะต้องล้างให้สะอาด ไม่เช่นนั้นจะทำให้สีที่ย้อมไม่ติด หรือถ้าติดก็จะขาดหายเป็นช่วงๆ

3. ใช้ดรอปเปอร์ดูดส่วนผสมของสีย้อมที่อุ่นไว้แล้ว หยดลงในหลอดทดลองประมาณ 5-6 หยด

4. ใช้ดรอปเปอร์อีกอันหนึ่งดูดน้ำเชื้อของพ่อสุกรที่ยังไม่ได้เจือจาง หรือที่รีดมาใหม่ๆใส่ลงไปในหลอดทดลองที่มีสีย้อมอยู่แล้ว จำนวน 1 หยด ถ้าหากน้ำเชื้อมีความเข้มข้นมาก แต่ถ้าหากน้ำเชื้อมีความเข้มข้นน้อย หรือมีสีใสอาจจะใช้ 3-4 หยด จะทำให้มีตัวอสุจิมากขึ้น และหาตัวอสุจิที่จะนับได้สะดวก ข้อควรระวังในการหยดน้ำเชื้อลงบนสีย้อม คือ จะต้องพยายามให้อุณหภูมิของสีย้อมเท่ากับอุณหภูมิของน้ำเชื้อเสมอ

5. เขย่าส่วนผสมให้เข้ากันดี อาจจะทิ้งไว้สัก 1 นาที นำมาใช้ย้อมเลยก็ได้

6. ใช้ดรอปเปอร์ดูดส่วนผสมของสีกับน้ำเชื้อจากหลอดทดลองหยดลงบนแผ่นสไลด์ที่เตรียมไว้โดยให้ห่าง จากปลายข้างใดข้างหนึ่งประมาณ 25 มิลลิเมตร ไว้สำหรับเขียน, เบอร์สุกร, วัน, เดือน, ปีที่รีดน้ำเชื้อ

7. ใช้ปลายข้างหนึ่งของสไลด์อันที่ 2 ปิดทับลงบนหยดของส่วนผสมของสี และน้ำเชื้อที่อยู่บนสไลด์อันแรกโดยให้ทำมุมประมาณ 30-40 องศา แล้วลากสไลด์อันที่ 2 ไปบนสไลด์อันที่ 1 จนได้ฟิล์มสีที่บางๆ

8. ทำให้ฟิล์มสีบางๆบนแผ่นสไลด์อันที่ 1 นั้นแห้งเร็วที่สุดอาจจะแกว่งให้ถูกกับอากาศ เสร็จแล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ว่าเห็นตัวเชื้อได้ชัดเจนหรือเปล่า ถ้าหากได้ฟิล์มที่หนาอาจจะเนื่องมาจากหยดส่วนผสมน้ำเชื้อ และสีย้อมลงไปบนแผ่นสไลด์มากเกินไปจะทำให้การดูภาพลำบากควรจะทำใหม่

9. เมื่อย้อมสีตัวอสุจิติดสไลด์ แล้วนำมาตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1) กล้องจุลทรรศน์ stereo microscope
2) กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์
3) Pasteur pipette
4) เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ
5) ตู้เย็น 17 องศาเซลเซียส
6) ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส
7) ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส
8) Hot Air Oven
9) Water Bath
10) เครื่องปั่นสารละลาย
11) กระติกเทอร์มอสรีดน้ำเชื้อ
12) กระดาษกรองรีดน้ำเชื้อ
13) แผ่นยางรองรีดน้ำเชื้อ
14) ถุงพลาสติกขนาด 9x5 นิ้ว
15) กระดาษทิชชู
16) เทอร์โมมิเตอร์แท่งแก้วขนาด 100 องศาเซลเซียส
17) Photometer SpermaCue
18) pH meter
19) บีกเกอร์
20) coplin jar
21) หลอดใส่น้ำเชื้อ
22) เดือยหัวโฟมผสมเทียม
23) สี Eosin 1%
24) สี Nigrosin 10%
25) เครื่องอุ่นสไลด์
26) Conical tube ขนาด 10 ml
27) Conical tube ขนาด 50 ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

28) แผ่นกรองที่มีขนาด Pore size เท่ากับ 0.2 µm.

29) สไลด์ และ coverglass

30) ยาทาเล็บ

31) เครื่องชั่งดิจิตอลทศนิยม 2 ตำแหน่ง

32) กระบอกตวง

2. สารเคมีที่ใช้ในการแยกเพศอสุจิ

Percoll®

คุณสมบัติทางกายภาพ

Composition	silica sol with nondialyzable polyvinyl lpyrrolidone (PVP) coaxing
Density	1.130±0.005 g/ml.
Conductivity	1.0 mS/cm.

Quinacrine staining

1) Quinacrine mustard 2.5 mg

2) Macllvaine's buffer 50 mg

Macllvaine's buffer เตรียมจาก ทำเป็น 2 Solution

1. Solution A 0.1M Citric Acid (Citric Acid 21.015 g / น้ำกลั่น 1,000 ml)

2. Solution B 0.2 M Sodium dihydrogen orthophosphate (NaH_2PO_4 14.196 g / น้ำกลั่น 500 ml)

3. ตวง Solution B 453.7 ml ลงในขวดขนาด 1 ลิตร

4. ตวง Solution A 86.3 ml ลงในขวดข้อที่ 3

5. จากนั้นปรับให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

วิธีการเตรียม

1. ชั่ง Quinacrine mustard ตามปริมาณที่กำหนดใส่ใน coplin jar
2. ตวง Macllvaine's buffer 50 ml ลงใน coplin jar ข้อที่ 1
3. เก็บในที่มืด และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ต้องใช้วันต่อวัน)

Trypsin (Sigma)

1. แบ่งใส่ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส
2. ก่อนใช้ให้นำมาอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cranoy's fixation

1) Absolute methanol

2) Acetic acid

วิธีการเตรียม

1. ตวง Absolute methanol ลงในกระบอกตวง	30 ml
2. ตวง Acetic acid ลงในกระบอกตวงข้อที่ 1	10 ml

3. จากนั้นนำไปเขย่าให้เข้ากัน เทใส่ coplin jar ปิดฝาแล้วแช่ตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

PBS (-)

1) NaCl	10 g
2) KCl	0.25000 g
3) NaH_2PO_4	1.4400 g
4) KH_2PO_4	0.2500 g
5) Ultra pure water	1 L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

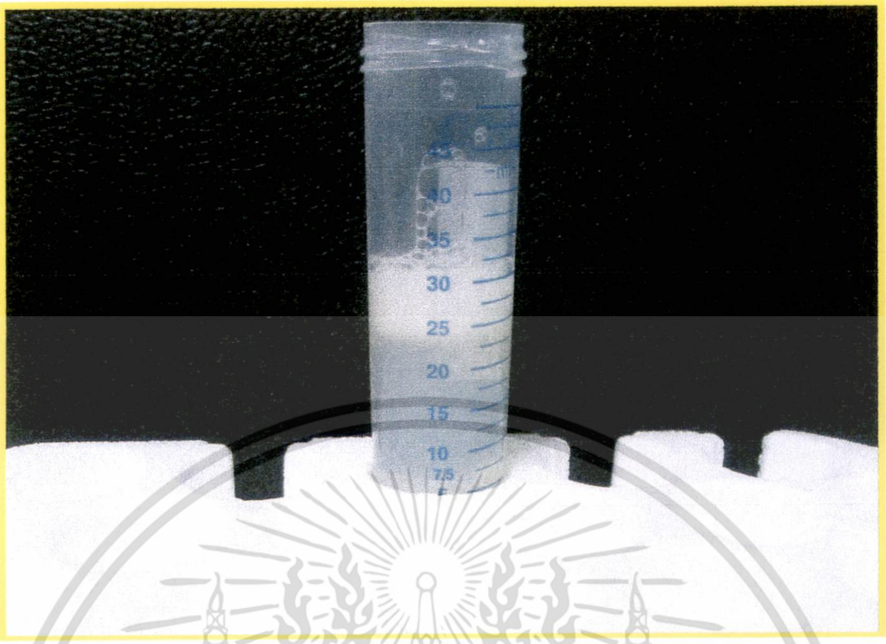
การปฏิบัติงาน

1. ระดับชั้นของความเข้มข้นข้นของสารลายเพอร์คอลล์

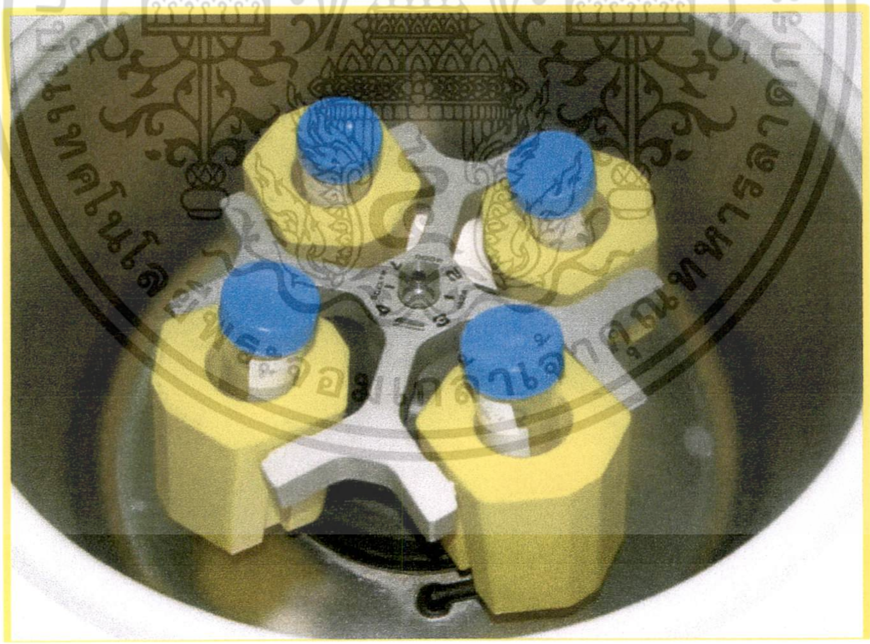
ภาพผนวกที่ ค 1 สารเพอร์คอลล์ก่อนการเจือจาง

ภาพผนวกที่ ค 2 วางชั้นสารเพอร์คอลล์ชั้นละ 5 มล. จากความเข้มข้นมากที่สุดไปหาน้อยที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

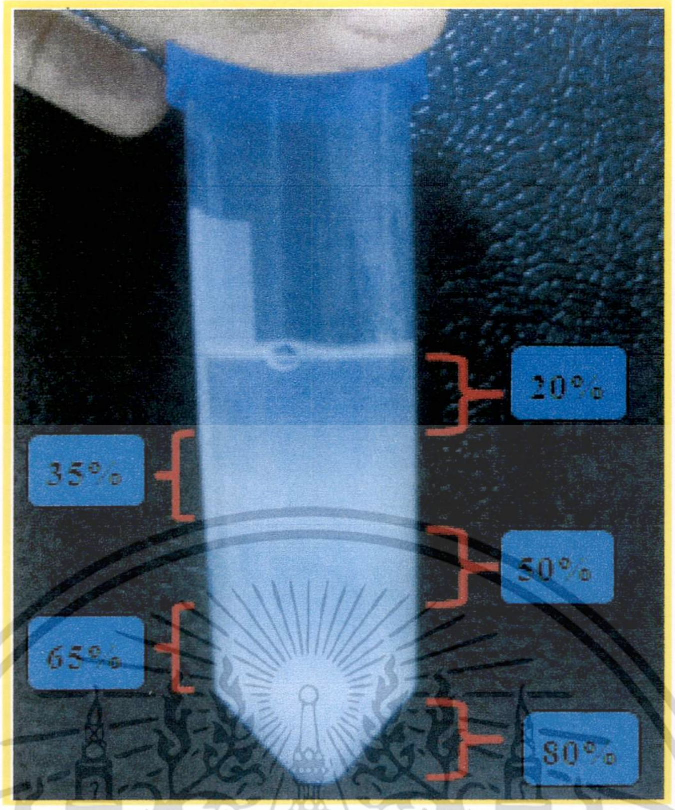


ภาพผนวกที่ ค 3 วางน้ำเชื้อปริมาณ 5 มล. ชั้นบนสุด



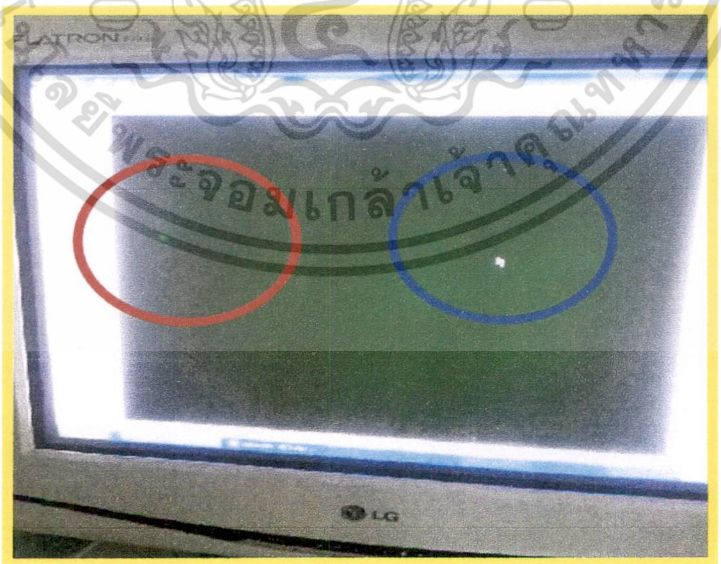
ภาพผนวกที่ ค 4 ปั่นโดยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ 2000 รอบ 20 นาที และควบคุมอุณหภูมิที่ 18 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ ค 5 ระดับชั้นสารละลายเพอร์คออล์ และน้ำเชื้อหลังการปั่นเหวี่ยง

2. การวิเคราะห์อสุจิ Y ด้วยการย้อมสี Quinacrine



ภาพผนวกที่ ค 6 อสุจิ Y ที่มี F-body (เรืองแสง) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การผสมเทียมแม่สุกร

ภาพผนวกที่ ค 7 อาบน้ำสุกรแม่พันธุ์ก่อนผสมเทียมและทิ้งไว้ให้แห้งก่อนการผสมเทียม

ภาพผนวกที่ ค 8 ใช้สารหล่อลื่นเดือยโฟมก่อนการผสมเทียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ ค 9 สอดเดือยโฟมผสมเทียมทแยงมุม 45 องศา กับอวัยวะเพศ

ภาพผนวกที่ ค 10 สอดเดือยโฟมผสมเทียมเข้าสู่มดลูกจนสุดเดือยผสมเทียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ ค 11 นำหลอดน้ำเชื้อสอดใส่ในเดือยผสมเทียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวกรวิการ์ อินทร์ฤทธิ์
วัน เดือน ปีเกิด	3 มีนาคม พ.ศ. 2526
ที่อยู่	139 ม. 14 ต. สันทราย อ. ฝาง จ. เชียงใหม่ 10130
ประวัติการศึกษา	2544 มัธยมศึกษาตอนปลายโรงเรียน ฝางชนูปถัมภ์ 2548 หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาสัตวบาล คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน 2556 หลักสูตรสัตวศาสตร์ สาขาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผลงานทางวิชาการ	ผลงานตีพิมพ์ "Semen Quality after Percoll Density Gradient Centrifugation of Large White and Landrace Boars" วารสารเกษตรพระจอมเกล้า ปีที่ 31 ฉบับที่ 2 พ.ศ. 2556.
ทุนวิจัยที่ได้รับ	กองทุนสนับสนุนโดยความร่วมมือระหว่างสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) และบริษัทเบทาโกรไฮบริด อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้