

การเปรียบเทียบวิธีการแช่แข็งและการทำละลายต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรแช่แข็ง

The comparison of freezing and thawing methods on boar semen quality

ฤทัยพร ราชมัคร¹, เทวินทร์ วงษ์พระลับ^{1,2}, วุฒิไกร บุญคุ้ม^{1,2} และ วิบัตติตา จันทร์กิตติสกุล^{1,2*}

Ruthaiporn Ratchamak¹, Thevin Vongpralub^{1,2}, Wuttigrai Boonkum^{1,2}

and Vibuntita Chankitisakul^{1,2*}

บทคัดย่อ: วัตถุประสงค์ของงานวิจัยครั้งนี้เพื่อเปรียบเทียบวิธีการการแช่แข็งและการทำละลายน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการทำละลาย วิธีนำเชื้อจากสุกร พันธุ์เปียแตรง จำนวน 1 ตัว และพันธุ์ดิวรีอก จำนวน 1 ตัว ตัวละ 2 ซ้ำ ทำการลดอุณหภูมิในกระบวนการแช่แข็งแบบอิงไอน์โตรเจนเหลวที่แตกต่างกัน 2 วิธี ได้แก่ ทรีทเมนต์ที่ 1: -35 °C เป็นเวลา 5 นาที และ -120 °C เป็นเวลา 10 นาที (สูงจากระดับ ไนโตรเจนเหลว 11 และ 5 เซนติเมตร) และทรีทเมนต์ที่ 2: -135 °C เป็นเวลา 20 นาที (สูงจากระดับ ไนโตรเจนเหลว 3 เซนติเมตร) ร่วมกับวิธีการทำละลายน้ำเชื้อ 3 วิธี (60 °C เป็นเวลา 8 วินาที; 42 °C เป็นเวลา 25 วินาที; และ 5 °C เป็นเวลา 5 นาที) ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อด้านการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ การมีชีวิตรอดของอสุจิ และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ หลังการเก็บที่อุณหภูมิ -196 °C และทำการละลายตามวิธีข้างต้น ผลการศึกษาพบว่า สายพันธุ์เปียแตรง มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิสูงกว่าดิวรีอก ($P<0.05$) วิธีการแช่แข็ง ทรีทเมนต์ที่ 1 มีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อด้านการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และการมีชีวิตรอดของอสุจิ สูงกว่าทรีทเมนต์ที่ 2 ($P<0.05$) ส่วน วิธีการทำละลายน้ำเชื้อพบว่า การทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่ระดับอุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 5 นาที และ 60 °C เป็นเวลา 8 วินาที มีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อสูงขึ้นในทุกพารามิเตอร์ที่ทำการศึกษาเมื่อเปรียบเทียบกับที่ระดับ 42 °C เป็นเวลา 25 วินาที ($P<0.05$) อย่างไรก็ตามพบว่าอิทธิพลร่วมระหว่างวิธีการแช่แข็งและการทำละลายให้ผลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จึงสรุปได้ว่า วิธีการแช่แข็งในทรีทเมนต์ที่ 1 ร่วมกับวิธีการทำละลายน้ำเชื้อที่ระดับ 5 °C เป็นเวลา 5 นาที ส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อสุกรภายหลังการแช่แข็งภายหลังการทำละลายดีที่สุด

คำสำคัญ: การแช่แข็ง, การทำละลาย, น้ำเชื้อแช่แข็ง, สุกรพ่อพันธุ์

ABSTRACT: The objective of the present study was to compare effects of different freezing and thawing methods on post-thawed boar semen quality. Semen was collected from two different breeds (Pietrain and Duroc). The freezing methods were treatment 1; -35 °C for 5 min and -120 °C for 10 min (11 and 5 cm. above the liquid nitrogen vapor); Treatment 2; -135 °C for 20 min (3 cm. above the liquid nitrogen vapor) and thawing methods were 60 °C for 8 sec; 42 °C for 25 sec) on sperm progressive motility, sperm viability, and plasma membrane integrity were determined. The results revealed that the progressive motility was higher in

Received May 27, 2018

Accepted July 25, 2018

¹ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002

Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen, 40002

² กลุ่มวิจัยโคนมพ่นร้อน มหาวิทยาลัยขอนแก่น ขอนแก่น 40002

Thermo-tolerance Dairy Cattle Research Group, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002

* Corresponding author: vibuch@kku.ac.th

Pietrain than Duroc ($P < 0.05$). Sperm progressive motility and viability were higher in Treatment 1 compared with Treatment 2 ($P < 0.05$). Semen thawed at at 5 °C for 5 min and 60 °C for 8 sec were higher in every parameters compared to the semen thawed at 42 °C for 25 sec ($P < 0.05$). However there was no interaction effect between freezing and thawing method on post-thawed sperm quality. In conclusion, it could be inferred that the freezing methods in Treatment 1 (-35 °C for 5 min and -120 °C for 10 min) and thawing methods 5 °C for 5 min could be used to maximize boar cryopreserved semen quality.

Keywords: Freezing, Thawing, Semen Cryopreservation, Boar

บทนำ

การเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรแบบแช่แข็ง (boar semen cryopreservation) ส่งผลดีในด้านอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้นและยังสามารถกระจายพันธุ์กรรมได้อย่างรวดเร็ว อีกทั้งยังประหยัดค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงสุกรพ่อพันธุ์ อย่างไรก็ตามในด้านคุณภาพพบว่า การใช้น้ำเชื้อสุกรแบบแช่แข็งจะส่งผลกระทบต่อการใช้ตัวสุกรผสมติดตัวและจำนวนลูกต่อครอกน้อย ด้วยเหตุนี้การใช้น้ำเชื้อสุกรแบบแช่แข็งในระดับอุตสาหกรรมจึงมีเพียง 1% (Rodriguez-Gil and Estrada, 2013) เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการใช้น้ำเชื้อแบบแช่เย็นโดยสาเหตุสำคัญซึ่งส่งผลกระทบต่อคุณภาพของสุกซ์โดยตรงมาจากความเสียหายในกระบวนการแช่แข็ง (Rodriguez-Martinez and Wallgren, 2011)

โดยเซลล์อสุจิมิมีชีวิตอยู่ได้ภายใต้การลดอุณหภูมิให้ต่ำสุดที่ระดับอุณหภูมิ -196 °C ซึ่งกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อจะประกอบไปด้วย 3 ระยะ ได้แก่ 1) การลดอุณหภูมิจาก 37 °C ซึ่งเท่ากับอุณหภูมิร่างกายของสัตว์ไปเป็น 15 °C 2) การลดอุณหภูมิจาก 15 °C ไปเป็น 5 °C และ 3) การอ้งไอน์ของไนโตรเจนเหลว ก่อนที่จะจุ่มหลอดน้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 °C อันเป็นการหยุดกระบวนการเกิดเมแทบอลิซึม และช่วยเก็บรักษาน้ำเชื้อได้เป็นระยะเวลานาน (Fraser et al., 2014)

ทั้งนี้พบว่าอัตราการลดอุณหภูมิในช่วงการอ้งไอน์ของไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -135 °C (freezing rate) มีความสำคัญต่อการมีชีวิตอยู่ของอสุจิก (Muldrew and McGann, 1994; Gao and Critser, 2000) หากอัตราการลดอุณหภูมิช้าจะทำให้ภายในเซลล์เกิดการไหลออกจากเซลล์ได้มากขึ้นและจะส่งผลทำให้ความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์มีปริมาณสูงขึ้น ผลที่ตามมาจะเกิดภาวะการคายน้ำ (dehydrate) และเกิด

การก่อตัวของผลึกน้ำแข็งภายนอกเซลล์ (extracellular ice crystal) แต่หากอัตราการลดอุณหภูมิลดลงเร็ว น้ำภายในเซลล์จะไม่สามารถไหลออกจากเซลล์ได้สมบูรณ์ส่งผลให้เกิดการแข็งตัวของของเหลวภายในเซลล์ก่อตัวเป็นผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ (intracellular ice crystal) การเกิดผลึกน้ำแข็งจะนำไปสู่การเกิดความเสียหายต่อโครงสร้างและเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อความสมบูรณ์ของตัวอสุจิก (Yeste, 2016) อย่างไรก็ตามเซลล์แต่ละชนิดมี freezing rate ที่เหมาะสมแตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะเซลล์ สารป้องกันการแข็งตัว ความเข้มข้นของสารป้องกันการแข็งตัวและบรรจุภัณฑ์ของน้ำเชื้อ เป็นต้น

นอกจากกระบวนการแช่แข็งแล้ว ในกระบวนการทำละลายน้ำเชื้อจากการแช่แข็งยังเป็นที่อีกกระบวนการที่มีความสำคัญและส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อ (Yeste, 2015) โดยหลังจากอสุจิกถูกแช่แข็งเมื่อถูกกระตุ้นด้วยอุณหภูมิเพื่อการทำละลาย การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่เหมาะสมจะนำไปสู่ความสำเร็จในการทำละลายได้เช่นกัน แม้ว่าที่ผ่านมาจะมีรายงานวิจัยในสุกรซึ่งใช้วิธีการลดอุณหภูมิในขณะแช่แข็งโดยใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้ออ้งไอน์โดยห่างจากระดับไนโตรเจนเหลว 3 เซนติเมตรหรือที่อุณหภูมิ -135 °C เป็นเวลา 20 นาที (อัตราการลดอุณหภูมิ -7 °C ต่อนาที) และทำละลายที่อุณหภูมิ 40-70 °C เป็นเวลา 8-25 วินาที (Chanapiwat et al., 2010; Okazaki and Shimada, 2012; Tomas et al., 2014;) แต่ผลลัพธ์ด้านคุณภาพน้ำเชื้อยังไม่ดีเท่าที่ควร

การพิจารณาเลือกกระบวนการทางเลือก (ทั้งกระบวนการแช่แข็งและการทำละลาย) เพื่อประยุกต์ใช้ในการเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อสุกรจึงเป็นโจทย์วิจัยสำคัญสำหรับงานวิจัยครั้งนี้ ซึ่งพบว่ามีรายงานวิจัยในสัตว์ปีก (Vongpralub et al., 2011; Chuaychu-noo et al., 2017) โดยใช้วิธีการลด

อุณหภูมิ 2 ขั้นตอนโดยการใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้ออังไธเย็นและเว้นระยะห่างจากไนโตรเจนเหลว 11 และ 3 เซนติเมตร ตามลำดับ ก่อนจุ่มแช่แข็งลงในไนโตรเจนเหลว และทำละลายที่อุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งผลการศึกษาค้นคว้าคุณภาพน้ำเชื้อไก่ในด้านอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ มีค่าสูงถึง ร้อยละ 58-60% ซึ่งผู้วิจัยเห็นว่าวิธีการดังกล่าวอาจมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาประยุกต์ใช้กับการแช่แข็งน้ำเชื้อพันธุ์สุกรได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิในกระบวนการแช่แข็งที่แตกต่างกันร่วมกับวิธีการทำละลายน้ำเชื้อสุกรต่อคุณภาพน้ำเชื้อในด้าน การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ การมีชีวิตรอดของอสุจิ และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อให้เป็นประโยชน์ในการนำไปสู่การพัฒนาและการปรับปรุงคุณภาพการทำน้ำเชื้อสุกรแบบแช่แข็งต่อไปในอนาคต

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดลอง

สุกรพ่อพันธุ์อายุ 3 ปี พันธุ์ครีโอล จำนวน 1 ตัว และพันธุ์เปียวแดง จำนวน 1 ตัว จากฟาร์มสุกรภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น เป็นพ่อพันธุ์ที่กำลังใช้งานสัปดาห์ ละ 1-2 ครั้ง มีสุขภาพสมบูรณ์แข็งแรง เลี้ยงด้วยระบบโรงเรือนแบบเปิด ถูกนำมาฉีดเก็บน้ำเชื้อด้วยวิธีการใช้มือบีบปลายลิ้งค์ (glove hand technique) โดยเก็บน้ำเชื้อในส่วนที่มีลักษณะข้นขึ้น (sperm-rich portion) (เทวินทร์, 2542) โดยภายหลังการตรวจคุณภาพเบื้องต้น อสุจิจะต้องมีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิมากกว่า 70% และมีความเข้มข้นมากกว่า 200×10^6 ตัว/มิลลิลิตร จึงจะสามารถนำตัวอย่างน้ำเชื้อไปทดลองในกระบวนการต่อไป

กระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อและการวางแผนงานทดลอง

แผนการทดลองที่ใช้คือ 2x3 factorial experiment in RCBD โดยกำหนดให้ศึกษาปัจจัยที่ 1 คือวิธีการแช่แข็งแบ่งเป็น 2 วิธี ทรีทเมนต์ที่ 1 (a1) และทรีทเมนต์ที่ 2 (a2) และปัจจัยที่ 2 คือวิธีการทำละลายน้ำเชื้อแบ่งเป็น 3 ระดับ คือ 60 °C เป็นเวลา

8 วินาที (b1); 42 °C เป็นเวลา 25 วินาที (b2) และ 5 °C เป็นเวลา 5 นาที (b3) และจัดพันธุ์สุกรเป็นบล็อก ทำการทดลองโดยการฉีดเก็บน้ำเชื้อพ่อพันธุ์จำนวน 2 ตัว

น้ำเชื้อสุกรภายหลังการฉีดเก็บรายตัวจะถูกนำมาตรวจหาการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ โดยเริ่มต้นจากการนำน้ำเชื้อสดที่รีดได้มาเจือจางกับน้ำยาเจือจาง Extender I (Modena extender; D-glucose 2.75 g., Tri-sodium citrate 0.69 g., Sodium hydrogen carbonate 0.10 g., EDTA disodium salt 0.235 g., Tris (Methylamine) 0.565 g., Citric acid 0.29 g., Penicillin 0.06 g., Streptomycin 0.10 g.) ที่อุณหภูมิ 37 °C ในอัตราส่วน 1:1 และบ่มที่อุณหภูมิ 15 °C เป็นเวลา 120 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว $800 \times g$ ที่อุณหภูมิ 15 °C เป็นเวลา 10 นาที นำของเหลวใส (supernatant) ที่ให้เหลือเพียงอสุจิที่ตกตะกอนอยู่ด้านล่าง (sperm pellet) แล้วจึงนำมาผสมกับน้ำยาเจือจาง Extender II (11% lactose(20 %) + egg yolk(80%)) โดยปรับความเข้มข้นให้ได้ตัวอสุจิ 1.5×10^9 ตัว/มิลลิลิตร นำมาเก็บที่อุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 90 นาที แล้วจึงเจือจางด้วยน้ำยาเจือจาง Extender III (1.5 % glycerol(final concentration 0.75%), 9 % Equex(final concentration 4.5%), 89.5 % Extender II) ปรับความเข้มข้นตัวอสุจิเป็น 1×10^9 ตัว/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 30 นาที (Chanapiwat et al. 2014) แล้วทำการบรรจุน้ำเชื้อลงในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5 ml และนำเข้าสู่ขั้นตอนการแช่แข็งโดยใช้กล่องโฟมและตะแกรงวางน้ำเชื้อเหนือไนโตรเจนเหลว (เทไนโตรเจนเหลวลงในกล่องโฟม 8 เซนติเมตรก่อนวางตะแกรงน้ำเชื้อ) โดยวิธีการแช่แข็ง เป็นปัจจัยที่ 1 แบ่งออกเป็น 2 วิธี ได้แก่

ทรีทเมนต์ที่ 1: ลดอุณหภูมิ 2 ระยะ ในกล่องโฟมโดยนำหลอดบรรจุน้ำเชื้อวางบนตะแกรงสูงห่างจากระดับไนโตรเจนเหลว 11 เซนติเมตร เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นลดระดับหลอดบรรจุน้ำเชื้อโดยการเลื่อนตะแกรงลงมาให้ห่างจากระดับไนโตรเจนเหลว 5 เซนติเมตร เป็นเวลา 10 นาที จึงจุ่มหลอดน้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลวและเก็บที่อุณหภูมิ -196 °C (Vongpralub et al., 2011)

ทรีทเมนต์ที่ 2: ลดอุณหภูมิในกล่องโฟม

โดยนำหลอดที่บรรจุน้ำเชื้อวางสูงห่างจากระดับไนโตรเจนเหลว 3 เซนติเมตร เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงแช่แข็งโดยจุ่มหลอดน้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลวและเก็บที่อุณหภูมิ -196°C (Chanapiwat et al., 2010)

วิธีการทำละลายน้ำเชื้อ เป็นปัจจัยที่ 2 แบ่งออกเป็น 3 วิธี โดยการทำละลายที่อุณหภูมิในเวลาที่แตกต่างกัน ได้แก่ 60°C เป็นเวลา 8 วินาที; 42°C เป็นเวลา 25 วินาที และ 5°C เป็นเวลา 5 นาที ตามวิธีการของ Okazaki and Shimada (2012); Dai et al. (2009) และ Chuaychu-noo et al. (2017) ตามลำดับ ภายหลังการทำละลายอุณหภูมิน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำน้ำเชื้อไปประเมินคุณภาพภายหลังการแช่แข็งและการทำละลาย

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง การตรวจการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของ อสุจิ (Sperm Progressive Motility)

การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิประเมินโดยการหยดน้ำเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ ปริมาตร 3-5 μl . จากนั้นปิดด้วยแผ่นปิดกระจกสไลด์ ทำการส่องภาย

ใต้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus รุ่น CH30, Tokyo, Japan) โดยใช้กำลังขยาย 400 เท่า นับตัวที่เคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าจำนวน 300 ตัว และประเมินเป็นร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (เทวินทร์, 2542)

การมีชีวิตรอดของอสุจิ (Sperm Viability)

การมีชีวิตรอดของอสุจิประเมินโดยใช้สีย้อม Eosin - Nigrosin (1% eosin, 5% nigrosin ในสารละลาย 2.9% sodium citrate) หยดน้ำเชื้อ 5 μl . และหยดสีย้อม Eosin - Nigrosin 10 μl . ลงบนแผ่นสไลด์ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นสเมียร์และทำให้แห้งอย่างรวดเร็ว นำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus รุ่น CH30, Tokyo, Japan) กำลังขยาย 400 เท่า ประเมินโดยพิจารณาอสุจิที่มีชีวิตจะไม่ติดสีย้อม eosin - nigrosin เนื่องจากสี eosin ไม่สามารถผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ และอสุจิไม่มีชีวิตจะติดสีชมพูจากการย้อมสี eosin - nigrosin นับอสุจิจำนวน 300 ตัว และประเมินร้อยละของการมีชีวิตรอดของอสุจิ (เทวินทร์, 2542)

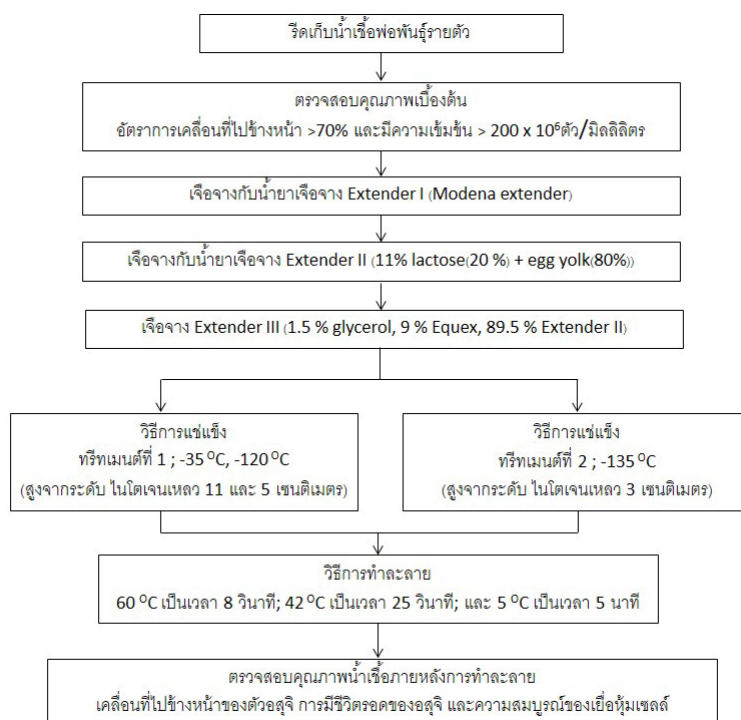


Figure 1 shows the experimental design

ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิ (Sperm Plasma Membrane Integrity)

ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิ ประเมินโดยใช้วิธีการ Hypo-osmotic swelling test (HOS test) โดยใช้ Host solution I (0.735 g. sodium citrate + 1.351 g. fructose+ 100 ml. DI water (ที่มี แรงดันออสโมติก 150 มิลลิออสโมลต่อลิตร)) 950 μ l. ผสมกับน้ำเชื้อ 50 μ l. บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็น เวลา 30 นาที จากนั้นเติม Host solution II (1 ml. Host solution I: 6.4 ml. 37% formaldehyde) 500 μ l. กับส่วนแรกที่ยังไม่ (Host solution I+น้ำเชื้อ) 500 μ l. (Jeyendran et al., 1984) ตรวจนับภายใต้ กล้องจุลทรรศน์ (Olympus รุ่น CH30, Tokyo, Japan) กำลังขยาย 400 เท่าโดยจะประเมินอสุจิโดย นับจำนวนอสุจิที่หางม้วนงอ ซึ่งจะแสดงถึงหุ้มเซลล์ที่ สมบูรณ์ของอสุจิ และประเมินร้อยละความสมบูรณ์ ของเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิ (Marko et al., 2008)

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SAS v. 9.0 โดยให้ชุดคำสั่ง Proc ANOVA และเปรียบเทียบ ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละปัจจัย และ ปัจจัยร่วมด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ตามวิธีการของ Steel and Torrie (1980) สำหรับสมการทางสถิติที่ใช้แสดงดังนี้

$$y_{ijk} = \mu + \rho_i + \alpha_j + \beta_k + \alpha\beta_{jk} + e_{ijk}$$

เมื่อ y_{ijk} = ค่าสังเกตของการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ การมีชีวิตรอดของอสุจิ และความ สมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์

μ = ค่าเฉลี่ยของข้อมูลค่าสังเกตในแต่ละพารามิเตอร์ที่ศึกษา

ρ_i = ปัจจัยเนื่องจากวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อ

α_j = ปัจจัยเนื่องจากวิธีการทำละลายน้ำเชื้อ

β_k = ปัจจัยเนื่องจากพันธุ์ของพ่อสุกร

$\alpha\beta_{jk}$ = ปัจจัยร่วมเนื่องจากวิธีการแช่แข็ง น้ำเชื้อร่วมกับวิธีการทำละลายน้ำเชื้อ

e_{ijk} = ค่าความคลาดเคลื่อนทางทดลอง

The different letter are significantly at $P < 0.05$

ผลการศึกษา

ผลการตรวจคุณภาพเบื้องต้นน้ำเชื้อสด ก่อนการเก็บรักษาในพ็อพพันธุ์สุกรดูโรคและเปียแตรง พบว่า พันธุ์ดูโรคมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ เฉลี่ย 77.5 % และความเข้มข้นของอสุจิเฉลี่ย 295×10^6 ตัว/มิลลิลิตร ส่วนพันธุ์เปียแตรง มีการ เคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิเฉลี่ย 80 % และความเข้มข้น ของอสุจิเฉลี่ย 286×10^6 ตัว/มิลลิลิตร ดังแสดงใน Table 1

ผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อในการ เปรียบเทียบระหว่างวิธีการแช่แข็ง ร่วมกับวิธีการทำ ละลายน้ำเชื้อ พบว่า ภายหลังการทำละลายน้ำเชื้อ พ็อพพันธุ์เปียแตรงมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ สูงกว่าพ็อพพันธุ์ดูโรค ($P < 0.05$) แต่ในส่วนของการ รอดชีวิต และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ ให้ผล ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังแสดงใน Table 2 และเมื่อพิจารณาอิทธิพลร่วม ระหว่างวิธีการแช่แข็งและวิธีการทำละลาย พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ซึ่งเมื่อพิจารณาแยกแต่ละปัจจัย ได้แก่ ปัจจัยเนื่องจากวิธีการแช่แข็ง พบว่า ทรีทเมนต์ที่ 1 มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิและอัตราการ รอดชีวิตของอสุจิ สูงกว่าทรีทเมนต์ที่ 2 ($P < 0.05$) แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติในส่วนของคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ ($P > 0.05$) สำหรับผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ ในส่วนของคุณสมบัติเนื่องจากวิธีการทำละลาย พบว่า การทำละลายที่อุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 5 นาที มีผล ต่อการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิที่สูงกว่า การทำ ละลายที่ 60 °C เป็นเวลา 8 วินาที และ 42 °C เป็น เวลา 25 วินาที ($P < 0.05$) ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ในส่วนของ การมีชีวิตรอดของอสุจิและความ สมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ การทำละลายที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 8 วินาที และ 5 °C เป็นเวลา 5 นาที พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีค่าสูงกว่าการทำละลายที่อุณหภูมิ 42 °C เป็นเวลา 25 วินาที ($P < 0.05$) ดังแสดงใน Table 2

Table 1 Fresh semen quality after ejaculation in boar

Boar	Progressive motility (%)	Concentration (sperm/ml.)
Duroc	77.5	295×10 ⁶
Pietrain	80	286 ×10 ⁶

Table 2 Effects of different freezing rates and thawing temperatures on sperm progressive motility, sperm viability and sperm plasma membrane integrity of frozen/thawed boar sperm

Parameters	Progressive Motility (%)	Viability (%)	Plasma membrane integrity (%)
Breeds (Block)			
Duroc (n=12)	14.22±0.79 ^b	16.92±0.85	27.22±2.11
Pietrain (n=12)	15.52±0.64 ^a	17.25±0.90	27.17±2.54
P-value	0.0402	0.6911	0.9865
Freezing methods (Factor A)			
Treatment 1	15.92±0.83 ^a	18.45±0.56 ^a	27.50±1.91
Treatment 2	13.83±0.47 ^b	15.72±0.93 ^b	26.89±2.70
P-value	0.0068	0.0186	0.9865
Thawing methods (Factor B)			
60 °C, 8 sec	14.83±0.32 ^b	18.96±0.29 ^a	28.58±0.77 ^a
42 °C, 25 sec	12.67±0.43 ^c	14.04±0.73 ^b	18.75±0.54 ^b
5 °C, 5 min	17.11±1.48 ^a	18.25±1.01 ^a	34.25±1.8 ^a
P-value	0.0017	0.0079	0.0227
Freezing*Thawing methods (Interaction between factor A x B)			
(Treatment1*60°C, 8sec)	15.33±0.33	19.59±0.23	29.50±0.81
(Treatment1*42°C, 25sec)	13.17±0.40	16.25±0.10	20.50±1.22
(Treatment1*5°C, 5min)	19.15±0.10	19.50±0.54	32.50±1.76
(Treatment2*60°C, 8sec)	14.34±0.34	18.33±0.61	27.67±2.37
(Treatment2*42°C, 25sec)	12.17±0.06	11.83±0.06	17.00±0.74
(Treatment2*5°C 5min)	14.98±0.53	17.00±0.27	36.00±0.20
P-value	0.0569	0.3426	0.6838

^{a,b,c,d} Means±SE within column within parameter followed by the different letter are significantly at P<0.05 by DMRT (n=12)

วิจารณ์ผลงานทดลอง

ความแตกต่างระหว่างพันธุ์ของพ่อสุกรเริ่มแสดงจากคุณภาพน้ำเชื้อสด โดยจากการศึกษาของ Tierz et al. (2008) ได้รายงานถึงคุณภาพน้ำเชื้อสดที่แตกต่างระหว่างพันธุ์ โดยพันธุ์เปียตรงมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของอสุจิที่ต่ำกว่าพันธุ์ดุริอก ซึ่งเป็นปัจจัยเริ่มต้นที่นำไปสู่คุณภาพภาย

หลังการแช่แข็งและทำละลาย ความทนได้ของอสุจิภายหลังจากแช่แข็งและทำละลายมีความแตกต่างทั้งในส่วนของพันธุ์และความแตกต่างรายตัว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Waterhouse et al. (2006) ที่เปรียบเทียบความแตกต่างความทนได้ภายหลังจากแช่แข็งของอสุจิ พบว่า พ่อพันธุ์ดุริอกมีความทนได้ภายหลังจากแช่แข็งที่ต่ำกว่าเมื่อมีการศึกษาของ Yeste (2016) ได้แสดงให้เห็นว่าพันธุ์ของสุกรไม่ส่งผลกระทบต่อ

คุณภาพน้ำเชื้อ แม้ว่าอสุจิที่มีความสามารถทนความเย็นได้ดีจะได้แก่ พอสสุกรสายพันธุ์ ลาร์จไวท์, แลนด์เรซ และ ดูริค อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้ให้ผลการศึกษาที่ไม่สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้าโดยพบว่า พันธุ์เป็ดแดงมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิที่สูงกว่าพอสสุกรพันธุ์ดูริค ผลดังกล่าวมีความเป็นไปได้สูงที่จะเกิดจากความแตกต่างของสักรายตัวที่มีความเฉพาะตัวทางระบบสืบพันธุ์ที่ส่งผลต่อการแสดงออกด้านคุณภาพน้ำเชื้อ (Schulze et al., 2014) และรวมถึงในกระบวนการคัดกรองและวัดเก็บน้ำเชื้อเบื้องต้นอาจเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่นำมาสู่ผลการทดลองที่มีความแตกต่างกันของพอสสุกรแต่ละตัว (Tierz et al., 2008)

การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่อยู่ในช่วง -15°C ถึง -60°C ของขั้นตอนการแช่แข็ง เป็นช่วงที่ทำให้เกิดอันตรายต่ออสุจิ ซึ่งมีการศึกษาอัตราการแช่แข็ง เป็นการลดอุณหภูมิในช่วง 5°C ถึง -196°C ต่อหน่วยเวลา ทั้งในด้านของอัตราการแช่แข็งที่รวดเร็ว (faster freezing rate) และ อัตราการแช่แข็งที่ช้า (slow freezing rate) เพื่อที่จะพยายามปรับปรุงคุณภาพอสุจิภายหลังการทำละลายให้ดีขึ้น (Fazano, 1986) จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า ทรีทเมนต์ที่ 1 ทำให้น้ำเชื้อหลังการแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และ การมีชีวิตรอดของอสุจิที่ดีกว่า โดยเป็นการลดอุณหภูมิ 2 ระดับโดยการอิงไธเยน ก่อนที่จะจุ่มน้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลวที่ -196°C ทั้งนี้วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ค่อยๆลดอุณหภูมิให้อสุจิปรับตัวในระดับแรก ที่อุณหภูมิ -35°C เป็นเวลา 5 นาที ก่อนที่จะลดไปที่ระดับ -135°C มีรายงานว่า การปรับเปลี่ยนอุณหภูมิดังกล่าวช่วยในการลดความเสียหายที่เกิดขึ้นในช่วง -15°C ถึง -60°C ที่เป็นอันตรายต่ออสุจิ (Vongpralub et al., 2011) โดยการที่ค่อยๆลดอุณหภูมิในกระบวนการแช่แข็งจะทำให้ภายในเซลล์ของอสุจิไหลออกจากเซลล์ได้อย่างสมบูรณ์ ช่วยลดการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์อสุจิที่สามารถซึมแทงเซลล์เสียหายให้ลดลงได้ (Yeste, 2016)

อัตราการทำละลาย เป็นการเปลี่ยนแปลงเซลล์ที่ถูกเก็บในสภาพของแข็งที่อยู่ในน้ำยาเจือจางที่แข็งตัว ให้สามารถกลับคืนสภาพเหมือนก่อนการเกิดผลึกน้ำแข็ง โดยอัตราในการทำละลายมี

การใช้อุณหภูมิที่ $2-3^{\circ}\text{C}$ ถึง $75-80^{\circ}\text{C}$ โดยจะสัมพันธ์กับการลดอุณหภูมิเพื่อการแช่แข็งที่เหมาะสมกับตัวอสุจิ (Vongpralub, 2016) การทำละลายน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งในช่วงระหว่างอุณหภูมิ -15°C ถึง -60°C จะอยู่ในระยะวิกฤติที่เรียกว่า ความเครียดเนื่องจากการอุ่นละลาย (Warm shock) ทำให้เป็นอันตรายและก่อให้เกิดความเสียหายให้แก่อสุจิ (Bamba and Cran, 1988) และจากการศึกษาของ Athurupana et al. (2015) ได้รายงานว่าการทำละลายอสุจิที่อุณหภูมิที่สูงและรวดเร็ว ที่อุณหภูมิ 60°C , 70°C และ 80°C เป็นเวลา 10, 8 และ 6 วินาที ตามลำดับ ส่งผลต่อการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ และการมีชีวิตรอดของอสุจิดีกว่าการทำละลายที่อุณหภูมิ 40°C ทั้งนี้สอดคล้องกับในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การทำละลายที่อุณหภูมิ 70°C เป็นเวลา 8 วินาที ให้ผลดีต่อคุณภาพน้ำเชื้อมากกว่าอุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 20 วินาที (Tomas et al., 2014) และสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้เช่นกันที่พบว่า การทำละลายที่อุณหภูมิสูง 60°C เป็นเวลา 8 วินาที ให้ผลดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ 42°C เป็นเวลา 25 วินาที อย่างไรก็ตามเนื่องจากยังไม่เคยมีรายงานการทำละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 5 นาที มาก่อนในน้ำเชื้อสุกร การศึกษานี้จึงเป็นการรายงานครั้งแรกและพบว่า การทำละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 5°C เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ต่ำลงจากที่เคยมีรายงานในการทำละลายสุกรร่วมกับการใช้เวลานานขึ้น ส่งผลต่อการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิดีขึ้นกว่าเดิม เนื่องจากมีรายงานว่า อัตราการทำละลายที่ต่ำลงจะส่งผลทำให้การปรับสมดุลความเข้มข้นของสารละลายและการจัดการน้ำภายในเซลล์มีความสมดุลต่อระยะเวลาการทำละลายและเหมาะสมกับเซลล์อสุจิ (Wiest and Steponkus, 1979; Mazur and Cole, 1985) นำไปสู่คุณภาพภายหลังการทำละลายที่ดีขึ้น

ในส่วนของผู้วิจัยที่มีการเลือกนำวิธีการแช่แข็งและการทำละลายของที่ใช้ในไม่มาร่วมในการศึกษาครั้งนี้ เพราะ เมื่อผ่านกระบวนการแช่แข็งและทำละลายตามวิธีการที่อ้างอิง คุณภาพของน้ำเชื้อภายหลังการทำละลายมีการมีชีวิตรอดของอสุจิและการเคลื่อนที่ของอสุจิสูง (Chuaychu-noo et al., 2017) และเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิมีองค์ประกอบ

ของไขมันที่แตกต่างกันแต่ละชนิด โดยมีสัดส่วนของ คอเลสเทอรอล:ฟอสโฟลิปิดในสุกร (0.26) เมื่อเทียบกับ สัตว์ปีก, ม้า และวัว (0.30, 0.36, 0.45 ตามลำดับ) (Parks and Lynch, 1992) ซึ่งนับว่ามีความใกล้เคียงกันเมื่อเปรียบเทียบกับในชนิดอื่น ซึ่งจากข้อมูลที่มีการศึกษาหากเลือกใช้วิธีการแช่แข็งของไข่มาศึกษาพร้อมเพื่อเปรียบเทียบกับวิธีการมาตรฐานของการแช่แข็งสุกร น่าจะเป็นแนวทางใหม่ที่ดีสำหรับการพัฒนาการแช่แข็งน้ำเชื้อสุกร อีกทั้งยังวางแผนการทดลองแบบ factorial เพื่อที่จะทดสอบวิธีการแช่แข็งให้เหมาะสมกับวิธีการทำละลาย ซึ่งจากผลการศึกษาที่เป็นไปตามสมมติฐานที่วิธีการแช่แข็งและทำละลายของไข่เมื่อนำมาประยุกต์ใช้ในสุกรนั้นให้ผลที่ดี

การศึกษาในครั้งนี้เป็นเพียงการทดสอบวิธีการแช่แข็งและการทำละลาย ซึ่งความเสียหายจากการแช่แข็งยังมีอีกหลายปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการทำละลาย อาทิ การเกิดความเครียดเนื่องจากความเย็น (cold shock) (Gilmore et al., 1996) การเกิดอนุมูลอิสระกลุ่มออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) เนื่องจากการเกิดลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (lipid peroxidation) (Pena et al., 2003; Roca et al., 2005; Kim et al., 2010) ส่งผลกระทบต่อความสมบูรณ์ของตัวสุจิ ทำให้คุณภาพภายหลังการแช่แข็งและทำละลายยังน้อยกว่าในการศึกษาอื่นๆ (Chanapiwat et al., 2012; Chanapiwat and Kaeoket, 2015) ซึ่งในการศึกษาต่อไปในอนาคตเพื่อปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งโดยการเติมสารในกลุ่มสารต้านอนุมูลอิสระ (Kaeoket et al., 2008; Amidi et al. 2016) น่าจะเป็นแนวทางในการช่วยปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งให้ดียิ่งขึ้นได้

สรุปและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่า วิธีการแช่แข็งและวิธีการทำละลายน้ำเชื้อมีความสำคัญต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งโดยพบว่าวิธีการแช่แข็งแบบ 2 ระยะ ร่วมกับวิธีการทำละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 5 °C เป็นเวลา 5 นาที ส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการทำละลายดีที่สุด อย่างไรก็ตาม การศึกษาในครั้งนี้เป็นเพียงการศึกษากระบวนการ

แช่แข็งและการทำละลาย ดังนั้นคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการทำละลายอาจยังไม่ดีเพียงพอต่อการนำไปใช้ผสมเทียมจริงได้ การปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็งและการทำละลายโดยการเติมสารป้องกันการเกิดอนุมูลอิสระน่าจะช่วยให้คุณภาพน้ำเชื้อดียิ่งขึ้นต่อไป

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนวิจัยสำหรับคณาจารย์บัณฑิตศึกษาเพื่อให้สามารถรับนักศึกษาที่มีความสามารถและศักยภาพสูงเข้าศึกษาในหลักสูตรและทำวิจัยในสาขาที่อาจารย์มีความเชี่ยวชาญ มหาวิทยาลัยขอนแก่น และ กลุ่มวิจัยโคนมพ่นร้อนมหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้การสนับสนุนทุนวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- เทวินทร์ วงษ์พระลับ. 2542. การสืบพันธุ์ในสัตว์เลี้ยง Reproductive in domestic animals. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.
- Amidi. F., A. Pazhohan, M.S. Nashtaei, M. Khodarahmian, and S. Nekoonam. 2016. The role of antioxidants in sperm freezing: a review. Cell. Tissue Bank. 17:745-756.
- Athurupana, R., S. Ioki and H. Funahashi. 2015. Rapid thawing and stabilizing procedure improve postthaw survival and in vitro penetrability of boar spermatozoa cryopreserved with a glycerol-free trehalose-based extender. Theriogenology. 84:940-947.
- Bamba, K., and D.G. Cran. 1988. Further studies on rapid dilution and warming of boar semen. J. Reprod. Fertil. 82:509-518.
- Chanapiwat, P., K. Kaeoket and P. Tummaruk. 2012. Cryopreservation of boar semen by egg yolk-based extenders containing lactose or fructose is better than sorbitol. J. Vet. Med. Sci. 74(3): 351-354.

- Chanapiwat, P., E.O. Olanratmanee., K. Kaeoket and P. Tummaruk. 2014. Conception rate and litter size in multiparous sows after intrauterine insemination using frozen-thawed boar semen in a commercial swine herd in thailand. *J. Vet. Med. Sci.* 76: 1347–1351.
- Chanapiwat, P. and K. Kaeoket. 2015. Breed of boar influences the optimal concentration of gamma-oryzanol needed for semen cryopreservation. *Reprod. Domest. Anim.* 50: 221–226.
- Chuaychu-Noo. N., P. Thananurak, V. Chankitisakul, and T. Vongpralub. 2017. Supplementing rooster sperm with cholesterol-loaded-cyclodextrin improves fertility after cryopreservation. *Cryobiology.* 74:8-12.
- Dai, J. J., C. F. Wu, D. F. Zhang, F. Z. Yin, T. Y. Zhang, D. Liu, H. L. Wu, L. L. Li, S. T. Yang and L. Wang. 2009. Some Factors Affecting Freezing of Boar Semen in 5 ml Maxi-straws. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 22:507 – 515.
- Fazano, F.A.T., 1986. ZurKryokonservierung von Ebersperma verschiedene Verfahren zur Samenbehandlung und unterschiedliche Konfektionierungsmethoden unter besonderer Berücksichtigung der Einfriergeschwindigkeit. Thesis, Hannover Veterinary College.
- Fraser, L., L. Zasiadczyk, and J. Strzezek, 2010. Interactions of egg yolk lipoprotein fraction with boar spermatozoa assessed with a fluorescent membrane probe. *Folia. Histochem. Cytobiol.* 48:292-298.
- Gilmore, J.A., D. Junying, T. Jun, A.T. Peter, and J.K. Crister. 1996. Osmotic properties of boar spermatozoa and their relevance to cryopreservation. *J. Reprod. Fertil.* 107:87-95.
- Gao, D., and J.K. Critser. 2000. Mechanisms of cryoinjury in living cells. *ILAR. J.* 41:96-187.
- Kaeoket, K., K.Tantiparinyakul, W. Kladkaew, P. Chanapiwat, and M. Techakumphu 2008. Effect of different antioxidants on quality of cryopreserved boar semen in different breeds. *Thai J. Agri. Sci.* 41:1-9.
- Marko S., T. Dobranic, S. Kruslin, M. Cergolj, M. Karadjole, N. Prvanovic, and J. Grizelj. 2008. The use of the hypoosmotic swelling test and supravital staining in evaluation of sperm quality in boars. *Vet. Arh.* 78:279-287.
- Mazur, P., and K.W.Cole. 1985. Influence of cell concentration on the contribution of unfrozen fraction and salt concentration to the survival of slowly frozen human erythrocytes. *Cryobiology.* 22:509-536.
- Muldrew, K., and L.E. McGann. 1994. The osmotic rupture hypothesis of intracellular freezing injury. *Biophys. J.* 66:532-541.
- Okazaki, T., and M. Shimada. 2012. New strategies of boar sperm cryopreservation development of novel freezing and thawing methods with a focus on the roles of seminal plasma. *Anim. Sci. J.* 83:623-629.
- Parks, J.E. and D.V. 1992. Lynch. Lipid composition and thermotropic phase behavior of boar, bull, stallion, and rooster sperm membranes. *Cryobiology.* 29: 255-266.
- Rodriguez-Gil, J.E., and E. Estrada. 2013. Artificial insemination in boar reproduction. In:zBonet S, Casas I, Holt WV, Yeste M(eds), *Boar Reproduction.* Springer, Berlin.
- Rodriguez-Martinez, H., and M. Wallgren. 2011. Advances in boar semen cryopreservation. *Vet. Med. Inter.* 2011:1-5.

- Schulze, M., D. Waberski, S. Buder, K. Rudiger, and M. Beyerbach. 2014. Influences on semen traits used for selection of young AI boars. *Anim. Reprod. Sci.* 148:164-170.
- Steel, R.G.D., and J.H. Torrie. 1980. Principle and procedures of statistics: A Biometrical Approach. 2nd Ed. McGraw Hill Book Co., New York.
- Tierz, A., A. M. Kawecka, A. Pietruszka, E. Jacyno, R. Czarnecki, and M. Kamyczek. 2008. Quality of semen of young boars of the breeds Pietrain and Duroc and their reciprocal crosses. *Dummerstorf.* 51:42-54.
- Tomas, C., J. Gomez-Fernandez, E. Gomez-Izquierdo, and E. de Mercado. 2014. Effect of the holding time at 15°C prior to cryopreservation, the thawing rate and the post-thaw incubation temperature on the boar sperm quality after cryopreservation. *Anim. Reprod. Sci.* 144:115-121.
- Vongpralub, T. 2016. Semen storage and artificial insemination in poultry. Khon Kaen University, Khon Kaen.
- Vongpralub, T., A. Utha, J. Pongpeng, P. Sonseeda, and W. Yindee. 2011. A comparison of simple vapour method and programmable freezer on motility and fertility of frozen Thai native frozen semen. Proceeding of The 3th international conference on sustainable animal agriculture for developing countries, July 26-29, 2011, Nakhon Ratchasima, Thailand.
- Waterhouse, K.E., P.O. Hofmo, A. Tverdal, and R.R. Miller Jr. 2006. Within and between breed differences in freezing tolerance and plasma membrane fatty acid composition of boar sperm. *Reproduction.* 131:887-894.
- Wiest, S.C., and P.L. Steponkus. 1979. The osmometric behavior of human erythrocytes. *Cryobiology.* 16:101-104.
- Yeste, M. 2015. Recent advances in boar sperm cryopreservation: state of the art and current perspectives. *Reprod. Domest. Anim.* 50:71-79.
- Yeste, M. 2016. Sperm cryopreservation update: cryodamage, markers, and factors affecting the sperm freezability in pigs. *Theriogenology.* 85:47-56.