ผลของชนิดสารละลายเจือจาง อัตราส่วนการเจือจาง ความเร็วในการปั่น และบรรจุภัณฑ์ในการขนส่งต่ออัตราการเคลื่อนที่ และความคงทนต่อเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิในน้ำเชื้อม้าแช่เย็น

Effects of Extender Types, Dilution, Centrifugation and Transport Packaging on the Motility and Plasma Membrane in cooled Equine Semen

มัลลิกา กลั่นบุศย์ (Manlika Klanbut)* ดร.ขนิษฐา เพชรอุดมสินสุข (Dr.Kanittha Phetudomsinsuk)**

บทคัดย่อ

ตัวอย่างน้ำเชื้อม้าจำนวน 14 ตัวอย่าง ถูกนำมาตรวจร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิและร้อยละค่าความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ในชั่วโมงที่ 0, 24, 48, 72และ 120 ภายหลังการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบผลของชนิดสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ อัตราส่วนการเจือจาง ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง และลักษณะการบรรจุน้ำเชื้อในระหว่างการขนส่งต่อคุณภาพน้ำเชื้อม้าที่เก็บรักษาด้วยการแช่เย็น จากการศึกษาพบว่าชนิดของสารสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ อัตราส่วนการเจือจาง และความเร็วในการปั่นเหวี่ยงส่งผลต่อการเคลื่อนที่และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิม้าที่เก็บรักษาด้วยการแช่เย็นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ น้ำเชื้อม้าที่ถูกเจือจางน้ำเชื้อในสารละลายเจือจางชนิด INRA82ที่อัตราส่วน 1 ต่อ 3 และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที มีแนวโน้มให้คุณภาพน้ำเชื้อม้าที่เก็บรักษาด้วยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสดีที่สุด

ABSTRACT

The sixteen equine semen samples were evaluated for percentage of motility and percentage of plasma membrane integrity at 0, 24, 48, 72 and 120 hours after cooled preservation at 5 C. This study aims to compare the effect of extender, dilution ratio, speed of centrifugation and transport packaging on quality of equine cooled semen. The results showed type of extender, dilution ratio and speed of centrifugation significantly effect on motility and plasma membrane integrity. Semen diluted with INRA82 extender at 1:3 ratio and subsequently centrifuged 2000 rpm showed the most impressive semen quality post chilling at 5 C.

คำสำคัญ: ปัจจัย น้ำเชื้อแช่เย็น ม้า

Key Words: Factor, Cooled semen, Equine

** นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาคลินิกศึกษาทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์*

*** อาจารย์ ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิกสัตว์ใหญ่และสัตว์ป่า คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กำแพงแสน*

บทนำ

ในประเทศไทยมีการเลี้ยงม้าหลากหลายสายพันธุ์ โดยวัตถุประสงค์การเลี้ยงขึ้นอยู่กับลักษณะการใช้งาน ทั้งการเลี้ยงไว้เป็นเพื่อน หรือใช้ในการแข่งขันกีฬาประเภทต่างๆ เช่น ศิลปะการบังคับม้า การกระโดดข้ามเครื่องกีดขวาง การขี่ม้ามาราธอน ความนิยมในการเลี้ยงม้าในประเทศเริ่มมีมากยิ่งขึ้น ส่งผลให้มีความต้องการจำนวนม้ามากขึ้น และเพื่อให้ได้ลูกม้าตามความต้องการที่มากขึ้นนั้น จึงมีการพัฒนาเทคนิคการผสมเทียมเพื่อให้ได้ลูกม้าสายพันธุ์ที่ดีตามความต้องการในระยะเวลาอันสั้น น้ำเชื้อที่จะใช้เพื่อการผสมเทียมอาจจะต้องผ่านขบวนการเก็บรักษาด้วยความเย็นหรือการแช่แข็ง เพื่อยืดอายุน้ำเชื้อและช่วยลดการใช้งานของพ่อม้า การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เย็นที่อุณหภูมิต่างกันก็ส่งผลต่ออายุในการเก็บรักษา คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังขั้นตอนการแช่เย็น และอัตราการผสมติด โดยน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่เย็นมักมีคุณภาพน้ำเชื้อที่ดี แต่มีอายุการเก็บรักษาที่สั้นกว่าน้ำเชื้อแช่แข็ง

ขั้นตอนการทำน้ำเชื้อแช่เย็นเริ่มจากการคัดเลือกน้ำเชื้อเริ่มต้นที่ดีมาใช้โดยดูจาก ความเข้มข้นของอสุจิ ร้อยละการเคลื่อนที่และร้อยละอสุจิที่มีชีวิต ตัวอย่างน้ำเชื้อมักถูกนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตัวอสุจิออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ เติมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม บรรจุและลดอุณหภูมิ ปริมาตรน้ำเชื้อปกติในม้ามีค่าตั้งแต่ 30 ถึง 250 มิลลิลิตร (Davies and Mina, 2008) ค่าการเคลื่อนที่ของอสุจิ ต้องไม่น้อยกว่า 70 เปอร์เซ็นต์จึงจัดเป็นน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดี (Bearden *et al.*, 2004) แต่น้ำเชื้อที่เหมาะต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีแช่เย็นและแช่แข็งควรมีค่าการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไม่น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิไปด้านหน้าไม่น้อยกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ (Khlifaoui *et al.*, 2005) ค่าร้อยละของอสุจิที่มีชีวิตไม่น้อยกว่า 60 (Bearden *et al.*, 2004) หรือมีค่าความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (Hos-test) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจตัวอสุจิที่มีชีวิตทางอ้อมไม่น้อยกว่าร้อยละ 60 (Mansour, 2009)

ขบวนการผลิตอสุจิ (Spermatogenesis) ในม้าจะเกิดขึ้นเมื่อม้าเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ จากการศึกษาของ Naden และคณะ ปี 1990 พบว่าม้าเพศผู้ที่เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์สามารถผลิตตัวอสุจิได้ 50 ล้านตัวและมีค่าการผลิตอสุจิต่อวันเท่ากับ 1.1 พัน ล้านตัว หรือมีค่าที่ควรผลิตอสุจิต่อวันได้เท่ากับ 1.7 พันล้านตัว ซึ่งพบในม้าเพศผู้ที่มีช่วงอายุระหว่าง 1 ถึง 3 ปี (Naden *et al.*, 1990; Clay and Clay 1992) แต่คุณภาพน้ำเชื้อจะลดลงเมื่อพ่อม้ามีอายุ 20 ปี (Fukuda *et al.*, 2001; Madill, 2002) มีรายงานของ Janett *et al.*, 2003 กล่าวว่าค่าปริมาตรน้ำเชื้อ จำนวนตัวอสุจิ และค่าการเคลื่อนที่ของอสุจิในน้ำเชื้อสด ในฤดูร้อนมีค่าที่สูงกว่าในฤดูหนาว แต่ความเข้มข้นของอสุจิเป็นไปในทิศทางตรงกันข้าม ค่าความเข้มข้นมีค่าน้อยที่สุดในฤดูร้อนเมื่อเทียบกับฤดูกาลอื่นๆ

มีการศึกษาเพื่อพัฒนาขั้นตอนการทำน้ำเชื้อแช่เย็นให้น้ำเชื้อแช่เย็นที่ผลิตได้คงคุณภาพที่ดีและเก็บรักษาได้นานที่สุด โดยการเปลี่ยนตัวแปรที่ส่งผลต่อคุณภาพในแต่ละขั้นตอนการแช่เย็น ได้แก่ สารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ส่วนประกอบที่สำคัญของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อคือ สารให้พลังงาน บัฟเฟอร์ ยาปฏิชีวนะ ซึ่งมีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดสารละลายเจือจาง เช่นสารที่ทำหน้าที่ให้พลังงานใน สารละลายเจือจางน้ำเชื้อของ Krause และ Grove ปี 1967 มีองค์ประกอบเป็นกลูโคส แล็คโตส และแรฟฟีโนส การใช้ไข่แดง นมเป็นส่วนประกอบเพื่อป้องกันอันตรายจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ เพิ่มความคงทนของเยื่อหุ้มเซลล์และป้องกันการช็อคของอสุจิจากความเย็น (cold shock) (ธีรวัฒน์, 2555) นอกจากนี้ยังพบว่าพ่อม้าแต่ละตัวมีความชอบจำเพาะต่อชนิดสาระลายเจือจางต่างชนิดกัน (Phetudomsinsuk *et al.*, 2008) การผสมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อก่อนการปั่นเหวี่ยงในอัตราส่วนที่เหมาะสมจะช่วยให้อสุจิมีชีวิตอยู่ได้นานมากขึ้น (Aurich, 2008; Love *et al*, 2002; Bozkurt *et al.*, 2007) ความเร็วรอบและระยะเวลาที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิต่างกัน

(Pickett *et al*., 1975; Macpherson, 2001; Loomis, 2006) นอกจากนี้การแช่เย็นในบรรจุภัณฑ์ที่เหมาะสม จะช่วยรักษาอุณหภูมิภายในบรรจุภัณฑ์ให้คงที่ได้แม้ว่าจะมีอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมภายนอกที่สูง (Brinsko *et al*., 1999; Katila *et al*., 1997)

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อเปรียบเทียบผลของชนิดสารละลายเจือจาง อัตราส่วนการเจือจาง ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง และลักษณะการบรรจุน้ำเชื้อในระหว่างการขนส่งในขั้นตอนของการแช่เย็นน้ำเชื้อม้า ต่อการเคลื่อนที่และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิม้าที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

วิธีการวิจัย

ใช้พ่อม้าสายพันธุ์ Holsteiner, Australian Warmblood (Oldenburg), AustralianWarmblood (Dutch Wormblood) ที่มีสุขภาพดี จำนวน 4 ตัว อายุระหว่าง 8 ถึง 15 ปี พ่อม้าทุกตัวถูกเลี้ยงในคอกที่ปูด้วยฟาง มีน้ำและหญ้าแพงโกล่าให้กินตลอดเวลาและได้รับอาหารข้นวันละ 2 มื้อ

การเตรียมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อและการเก็บน้ำเชื้อ

เตรียมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ 2 ชนิด คือ Kenney extender (Kenney *et al*., 1975) และ INRA-82 extender (Magistrini *et al*., 1992) (pH 7-7.2, osmolality 320-350 มิลลิออสโมล) เก็บตัวอย่างน้ำเชื้อโดยให้พ่อม้าขึ้นขี่ตัวล่อซึ่งเป็นแม่ม้าที่กำลังแสดงอาการเป็นสัด และใช้ช่องคลอดเทียมชนิด Modified Colorado สัปดาห์ละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 2 สัปดาห์

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

หลังจากเก็บตัวอย่างแล้ว น้ำเชื้อจะถูกกรองและตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสด ได้แก่ สี ปริมาตร ความเป็นกรดด่าง ร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิ ร้อยละการเคลื่อนที่โดยรวม ร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ ความเข้มข้นของอสุจิและร้อยละอสุจิที่มีชีวิต พารามิเตอร์ที่ทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยความเย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ได้แก่ ร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิ ซึ่งตรวจโดยหยดน้ำเชื้อ 15 ไมโครลิตรลงบนแผ่นสไลด์ที่อุ่นด้วยแผ่นความร้อนอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์นำสไลด์ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า และค่าความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ (hos-test) ตรวจโดยหยดน้ำเชื้อ 10 ไมโครลิตรลงในสารละลายซูโครสที่มีค่าแรงดันสารละลายเท่ากับ 100 มิลลิออสโมล ปริมาตร 100 ไมโครลิตร อุ่นในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า ตรวจนับตัวอสุจิจำนวน 200 ตัว และเทียบเป็นค่าร้อยละความสมบูรณ์ในการทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มอสุจิ อสุจิที่เยื่อหุ้มเซลล์ยังมีความสมบูรณ์จะมีลักษณะของหางบวมและม้วนงอ โดยการตรวจคุณภาพดังกล่าวใช้ผู้ตรวจคนเดียว

การทดลองที่ 1 การทดสอบค่าความเป็นกรดด่างและแรงออสโมติกของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่ขั้นตอนการเตรียมและการเก็บรักษาที่แตกต่างกัน เตรียมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ 2 ชนิด คือ Kenney extender และ INRA-82 extender แบ่งสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่เตรียมได้แต่ละชนิดเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบเป็นเวลา 15 นาที กลุ่มที่ 2 ไม่ต้องผ่านการปั่นเหวี่ยง จากนั้นแบ่งสารละลายเจือจางน้ำเชื้อแต่ละชนิด และแต่ละกลุ่มเป็น 2 ส่วน ลงในหลอดทดลอง ส่วนที่ 1 เก็บรักษาโดยวิธีการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสในตู้เย็น ส่วนที่ 2 เก็บรักษาโดยวิธีการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสในตู้แช่แข็ง ทำการทดสอบค่าความเป็นกรดด่างและค่าแรงดันออสโมติกเป็นระยะเวลา 14 วัน

การทดลองที่ 2 ผลของชนิดสารละลายเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อก่อนและหลังเก็บรักษาด้วยความเย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ทำการอุ่นสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด Kenney และ INRA-82 ที่เตรียมไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แบ่งน้ำเชื้อพ่อม้าแต่ละตัวออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 น้ำเชื้อม้าที่รีดเก็บได้

(เจือจางด้วยน้ำเลี้ยงเชื้ออสุจิของพ่อม้า) กลุ่มที่ 2 น้ำเชื้อม้าเจือจางในสารละลายเจือจางชนิด Kenney ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 และกลุ่มที่ 3 น้ำเชื้อม้าเจือจางในสารละลายเจือจางชนิด INRA-82 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยน้ำเชื้อทั้ง 3 กลุ่ม จะถูกเจือจางจนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 200 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร นำน้ำเชื้อแต่ละกลุ่มเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง จดบันทึก อัตราการเคลื่อนที่และค่าความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ (Hos-test) ของตัวอย่างน้ำเชื้อในแต่ละกลุ่ม

การทดลองที่3 ผลของอัตราส่วนสารละลายเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังเก็บรักษาด้วยความเย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส แบ่งน้ำเชื้อพ่อม้าแต่ละตัวออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 น้ำเชื้อม้าที่รีดเก็บได้ (เจือจางด้วยน้ำเลี้ยงเชื้ออสุจิของพ่อม้า) กลุ่มที่ 2 น้ำเชื้อม้าเจือจางในสารละลายเจือจางชนิด Kenney ในอัตราส่วน 1 ต่อ1 กลุ่มที่ 3 น้ำเชื้อม้าเจือจางในสารละลายเจือจางชนิด Kenney ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 กลุ่มที่ 4 น้ำเชื้อม้าเจือจางในสารละลายเจือจางชนิด INRA-82 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 และ กลุ่มที่ 5 น้ำเชื้อม้าเจือจางในสารละลายเจือจางชนิด INRA-82 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 ส่วน โดยน้ำเชื้อทั้ง 5 กลุ่ม จะถูกเจือจางจนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 200 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร นำน้ำเชื้อแต่ละกลุ่มเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

การทดลองที่ 4 ผลของความเร็วในการปั่นเหวี่ยงต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังการเก็บรักษาด้วยความเย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นำน้ำเชื้อพ่อม้าที่ถูกแบ่งเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3 แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้ กลุ่มที่ 1 ไม่ปั่นเหวี่ยงกลุ่มที่ 2 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และกลุ่มที่ 3 ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนที่เป็นน้ำใสด้านบน (supernatant) ออกหมด และใส่สารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิดเดิมให้ได้ความเข้มข้น 200 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร นำน้ำเชื้อแต่ละกลุ่มเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

การทดลองที่ 5 ผลของลักษณะการบรรจุน้ำเชื้อในระหว่างการขนส่งจากฟาร์มถึงห้องปฏิบัติการ นำน้ำเชื้อพ่อม้าที่ถูกแบ่งเช่นเดียวกับการทดลองที่ 4 แบ่งเป็น 2 ส่วน โดยบรรจุลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ปริมาณหลอดละเท่าๆกัน แยกบรรจุในระหว่างการขนส่งเป็น 2 แบบ คือ แบบที่ 1 ตัวอย่างในหลอดทดลองถูกห่อด้วยหนังสือพิมพ์ใส่ถุงพลาสติกที่ปิดสนิท นำไปใส่กล่องโฟม ซึ่งภายในบรรจุด้วยชั้นน้ำแข็งด้านล่าง ตัวอย่าง และปิดทับด้วยชั้นของน้ำแข็ง แบบที่ 2 ตัวอย่างในหลอดทดลองใส่ถุงพลาสติกที่ปิดสนิท นำไปใส่กล่องโฟม ภายในบรรจุด้วยชั้นน้ำแข็งด้านล่างและด้านบน ระหว่างตัวอย่างและชั้นน้ำแข็งจะถูกขั้นด้วยแผ่นโฟม หนา 1 เซนติเมตร การขนส่งทั้ง 2 รูปแบบใช้ระยะเวลา 2 ชั่วโมง ทำการวัดอุณหภูมิน้ำเชื้อเมื่อถึงห้องปฏิบัติการและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้ Descriptive statistics แสดงค่าเฉลี่ย (Mean±SD) ของคุณภาพน้ำเชื้อม้า ใช้ one way anova ในการเปรียบเทียบตัวแปรอิสระ ได้แก่ ชนิด อัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อ ความเร็วในการปั่นเหวี่ยง และบรรจุภัณฑ์ในการขนส่งน้ำเชื้อ ตัวแปรตามได้แก่ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิและความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์และใช้ GLM procedure ในการหาปัจจัยที่จะมีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อ ทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SAS (SAS Inst. V. 9.0, Cary, NC USA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัย

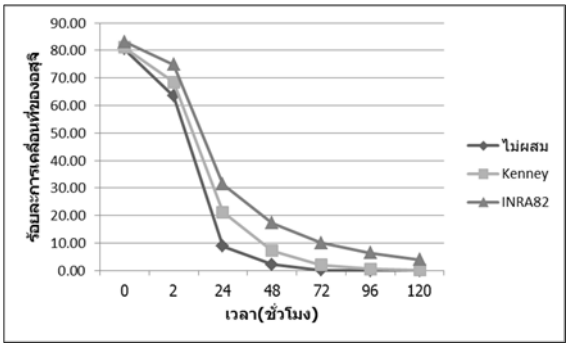
จากการทดลองที่ 1 การทดสอบค่าความเป็นกรดด่างและแรงดันออสโมติกของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่ขั้นตอนการเตรียมและการเก็บรักษา

สารละลายเจือจางที่อุณหภูมิแตกต่างกัน แสดงดังภาพที่ 1 พบว่าสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด Kenney ทั้ง 4 กลุ่ม จะมีค่าความเป็นกรดด่างที่เปลี่ยนไปทางด่างมากยิ่งขึ้น และสูงขึ้นเกินกว่าค่ามาตรฐาน (pH7.2) ในวันที่ 3 ของการเก็บรักษา ในขณะที่สารละลายน้ำเชื้อชนิด INRA-82 ทั้ง 4 กลุ่ม มีค่าความเป็นกรดมากขึ้นในวันที่ 3 ของการเก็บรักษาแต่ค่าความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้นไม่เกินค่ามาตรฐาน ค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด INRA-82 และ Kenney ทั้ง 4 กลุ่ม ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p>0.05) ระหว่างกลุ่มทดลองในวันเดียวกันและไม่มีความแตกต่างกันระหว่างวันที่เก็บรักษา การเปลี่ยนแปลงค่าแรงดันออสโมติกของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด Kenney ทั้ง 4 กลุ่มเมื่อเทียบกับวันแรกที่เตรียมพบว่ามีค่าเพิ่มสูงขึ้นเล็กน้อย ส่วนชนิด INRA-82 มีค่าแรงดันออสโมติกเพิ่มสูงขึ้นชัดเจน แต่ไม่พบความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มทดลองในวันเดียวกันและในระหว่างกลุ่มทดลองในระหว่างวันที่เก็บรักษาทั้งสารละลายเจือจางทั้ง 2 ชนิด

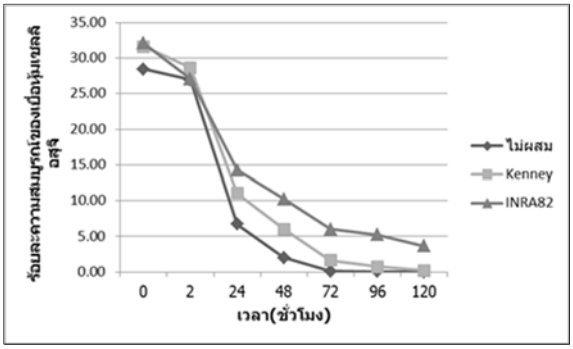
Extender	Centrifuge	Temp ^{O}C	pH			Osmolarity		
			D0	D3	D14	D0	D3	D14
Kenny	Yes	5°C	7.17	7.61	7.54	319.5	328	324
		-20°C	7.17	7.64	7.68	319.5	329	323.5
	No	5°C	7.17	7.72	7.57	319.5	332	321.5
		-20°C	7.17	7.6	7.76	319.5	325	322
INRA82	Yes	5°C	7.14	7.1	7.07	323	343	343
		-20°C	7.14	7.08	7.05	323	350	343
	No	5°C	7.14	7.09	7.04	323	348	346
		-20°C	7.14	7.1	7.03	323	345	344.5

ภาพที่ 1 แสดงค่าความเป็นกรด-ด่างและค่าแรงดันออสโมติกของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด Kenney และ INRA-82 หลังการเตรียมสารละลายและเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 14 วัน

การทดลองที่ 2 ผลของชนิดสารละลายเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อก่อนและหลังการเก็บรักษาด้วยความเย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส โดยดูจากค่าร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิและค่าความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ พบว่าน้ำเชื้อที่ไม่ได้รับการผสมสารละลายเจือจางมีร้อยละการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิลดต่ำลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ภายหลังการรีดเก็บน้ำเชื้อ โดยมีค่าร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิก่อนและหลังการเก็บรักษาที่ 24 ชั่วโมงเท่ากับ 80.53 และ 8.85 ตามลำดับ และมีค่าแตกต่างกับกลุ่มที่เจือจางด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อทั้ง 2 ชนิด อย่างมีนัยสำคัญ ในขณะที่น้ำเชื้อในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด Kenney และ INRA-82 จะมีร้อยละอัตราการเคลื่อนที่น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเก็บรักษาได้ 48 ชั่วโมง และ 96 ชั่วโมงตามลำดับ (ภาพ A) น้ำเชื้อที่เจือจางในสารละลายชนิด INRA-82 ให้ค่าร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิสูงกว่าน้ำเชื้อในสารละลายชนิด Kenney ตลอดช่วงการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) ค่าความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด Kenney และ INRA-82 มีผลไปในแนวเดียวกันกับค่าการเคลื่อนที่ (ภาพ B)

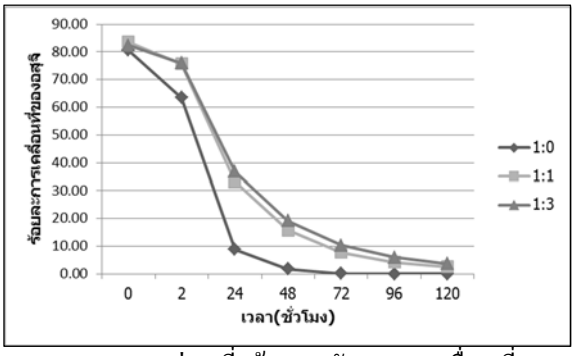


ภาพ A แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิในแต่ละชนิดสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ

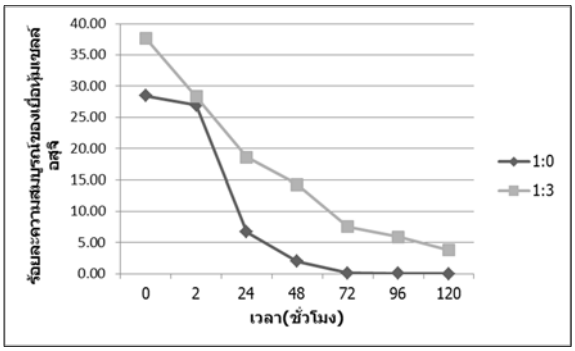


ภาพ B แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิในแต่ละชนิดสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ

การทดลองที่ 3 ผลของอัตราส่วนสารละลายเจือจางน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อก่อนและหลังเก็บรักษาด้วยความเย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส พบว่าน้ำเชื้อที่ไม่ได้รับการเจือจางสารละลายน้ำเชื้อ มีร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิลดต่ำลงกว่ากลุ่มที่ได้รับการเจือจางด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อทั้ง 2 ชนิดที่อัตราส่วน 1 ต่อ 1 และอัตราส่วน 1 ต่อ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 หลังจากเจือจางน้ำเชื้อ (ภาพ C) อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกระหว่างกลุ่มที่ได้รับการเจือจางด้วยอัตราส่วนอัตราส่วน 1 ต่อ 1 และอัตราส่วน 1 ต่อ 3 เช่นเดียวกันกับค่าความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิในกลุ่มที่ไม่ได้รับการผสมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ร้อยละความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิจะลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 หลังการรีดเก็บน้ำเชื้อ (ภาพ D)

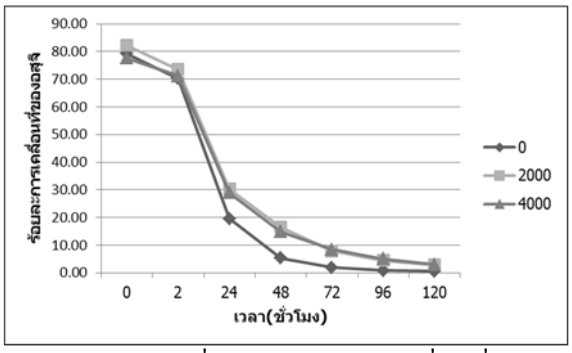


ภาพ C แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิของน้ำเชื้อม้าในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่อัตราส่วนการเจือจาง 1:0, 1:1 และ 1:3

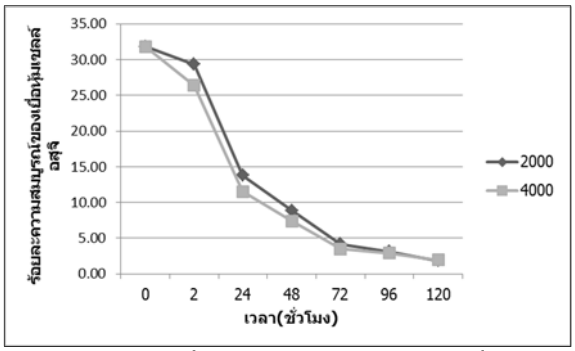


ภาพ D แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของน้ำเชื้อม้าในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ที่อัตราส่วนการเจือจาง 1:0 และ 1:3

การทดลองที่ 4 ผลของความเร็วในการปั่นเหวี่ยงต่อคุณภาพน้ำเชื้อก่อนและหลังการเก็บรักษาด้วยความเย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส น้ำเชื้อในกลุ่มที่ไม่ได้รับการปั่นเหวี่ยง มีค่าการเคลื่อนที่ของอสุจิต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับการปั่นเหวี่ยงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา โดยพบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้รับการปั่นเหวี่ยงกับกลุ่มที่ได้รับการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 และ 4000 รอบในชั่วโมงที่ 24 และ 48 ตามลำดับ (ภาพ E) ขณะที่ค่าการเคลื่อนที่ของอสุจิและค่าความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิในกลุ่มที่ได้รับการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาทีให้ค่าที่สูงกว่ากลุ่ม 4000 รอบ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพ E-F)



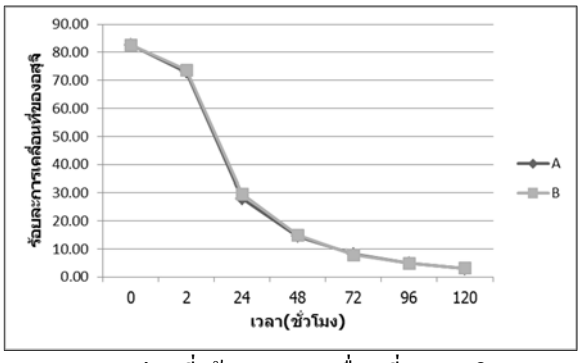
ภาพ E แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิของน้ำเชื้อม้าภายหลังการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 0, 2000 และ 4000 รอบต่อนาที



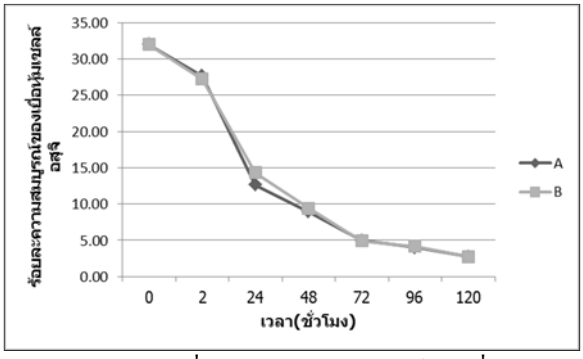
ภาพ F แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของน้ำเชื้อม้าภายหลังการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 และ 4000 รอบต่อนาที

การทดลองที่ 5 ผลของลักษณะการบรรจุน้ำเชื้อในระหว่างการขนส่งจากฟาร์มถึงห้องปฏิบัติการต่อคุณภาพน้ำเชื้อก่อนและหลังเก็บรักษาด้วยความเย็น

อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส พบว่าน้ำเชื้อที่บรรจุด้วยลักษณะการบรรจุที่ต่างกันในระหว่างการขนส่งมีอุณหภูมิต่างกัน โดยบรรจุภัณฑ์แบบใช้หนังสือพิมพ์ (แบบ A) มีอุณหภูมิเมื่อถึงห้องปฏิบัติการเท่ากับ 8.85 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของน้ำเชื้อที่บรรจุแบบมีแผ่นโฟมคั่น(แบบ B) มีอุณหภูมิเท่ากับ 12.07 องศาเซลเซียส เมื่อเปรียบเทียบค่าการเคลื่อนที่ของอสุจิระหว่างบรรจุภัณฑ์ทั้งสองแบบ พบว่าบรรจุภัณฑ์แบบ B มีร้อยละการเคลื่อนที่และความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิที่ดีกว่าแบบ A แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ภาพ G-H)



ภาพ G แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิ ของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ 2 ชนิด



ภาพ H แสดงค่าเฉลี่ยร้อยละความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ 2 ชนิด

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

จากการทดสอบค่าความเป็นกรดด่างและแรงดันออสโมติกของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ พบว่าสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด Kenney มีการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างอย่างรวดเร็วภายใน 3 วันหลังจากการเตรียม ซึ่งแตกต่างกับสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด INRA-82 ที่มีค่าความเป็นกรดด่างและแรงดันออสโมติก อยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดถึง 14 วัน อาจเนื่องมาจากส่วนประกอบในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด INRA-82 ที่มีองค์ประกอบของสารที่ทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ได้แก่ HEPES, โปแตสเซียมซิเตรท, โซเดียมซิเตรท ซึ่งมีจำนวนมากกว่าส่วนประกอบในสารละลายเจือจางชนิด Kenney ที่มีเพียง โซเดียมไบคาร์บอเนต จึงทำให้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด INRA-82 มีการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่างที่ไม่สูงนัก ถึงแม้ว่าสารละลายน้ำเชื้อชนิด INRA-82 จะสามารถเก็บรักษาไว้ได้นานถึง 14 วันโดยที่ค่าความเป็นกรดด่างและแรงดันออสโมติกยังอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดไว้ แต่ควรทำการทดลองใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อม้าแช่เย็นจริง เพื่อดูผลของคุณภาพน้ำเชื้อที่เก็บรักษาต่อไป

สารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด INRA-82 ให้ค่าร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิและค่าความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิที่สูงกว่าสารละลายเจือจางน้ำเชื้อชนิด Kenney อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในช่วงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ซึ่งองค์ประกอบในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงเป็นองค์ประกอบมีไลโปโปรตีน เป็นส่วนที่ช่วยเพิ่มความคงทนของเยื่อหุ้มเซลล์และป้องกันการช็อคจากความเย็นของอสุจิได้ (ธีรวัฒน์, 2555; Amirat *et al.*, 2004) สอดคล้องกับรายงานของ IjazและDucharme, ปี 1995 ที่เปรียบการใช้สารละลายชนิด INRA-82 และ INRA-82 ที่เพิ่มปริมาณไข่แดง เทียบกับสารละลายชนิด Kenney พบว่าค่าการเคลื่อนที่ของอสุจิของสารละลายชนิด INRA-82 ให้ผลที่ดีกว่าชนิด Kenney

อัตราส่วนสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่อัตราส่วน 1 ต่อ 1 และ 1 ต่อ 3 ของสารละลายทั้ง 2 ชนิดให้ผลร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิที่ดีกว่าการไม่ผสมสารละลายเจือจาง ในอัตราส่วนสารละลายเจือจาง 1 ต่อ 3 ให้ค่าการเคลื่อนที่ของอสุจิที่สูงกว่าอัตราส่วน 1 ต่อ 1 แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับรายงานของ Bozkurt และคณะ ปี 2007 ที่

กล่าวว่าอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อต่อสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่ยอมรับและนิยมใช้กันทั่วไปคือที่อัตราส่วน 1 ต่อ 3และอัตราส่วน 1 ต่อ4 หรือในทางปฏิบัติทั่วไปนิยมใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อสดที่อัตราส่วน 1 ต่อ 2 และ 1 ต่อ 4 แต่ทั้งนี้ขึ้นกับความเข้มข้นอสุจิสุดท้ายที่ต้องการ (Davies and Mina, 2008) และอัตราส่วนที่แนะนำในการเจือจางน้ำเชื้อที่น้อยที่สุดคืออัตราส่วน 1 ต่อ 1 (Brinsko and Varner, 1992) อัตราส่วนของสารละลายเจือจางที่เหมาะสมจะส่งผลต่อการมีชีวิตอยู่ของอสุจิ ซึ่งอสุจิต้องใช้พลังงานในการดำรงชีวิตจากสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ และป้องกันการช็อกจากความเย็น

การปั่นเหวี่ยงเป็นขั้นตอนการช่วยกำจัดสิ่งแปลกปลอม ลดการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและลดเวลาสัมผัสน้ำเลี้ยงเชื้ออสุจิ(Bollendorf *et al*., 1994) จึงเป็นการช่วยเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อหลังการเก็บรักษาด้วยความเย็น กลุ่มที่ได้รับการปั่นเหวี่ยงจึงให้ผลการเคลื่อนที่ของอสุจิที่ดีกว่ากลุ่มที่ไม่ปั่นเหวี่ยงโดยความเร็วที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยง 2000 รอบมีแนวโน้มให้ค่าร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับการปั่นเหวี่ยง 4000 รอบต่อนาที ซึ่ง สอดคล้องกับรายงานของ Loomis, 2006 ที่กล่าวว่าการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 รอบเป็นระยะเวลา 20 นาที ซึ่งเป็นความเร็วที่ไม่สูงนัก จะทำให้เกิดการเสียหายกับตัวอสุจิน้อยมาก นอกจากความเร็วรอบที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงแล้ว ระยะเวลาที่ใช้ในการปั่นเหวี่ยงก็ส่งผลต่ออสุจิเช่นเดียวกัน (Pickett *et al*., 1975)

ลักษณะการบรรจุน้ำเชื้อในระหว่างการขนส่งจากฟาร์มถึงห้องปฏิบัติการทั้ง 2 แบบ มีอุณหภูมิในการเก็บรักษาที่ต่างกันแต่ไม่พบความแตกต่างกันทั้งค่าร้อยละการเคลื่อนที่ของอสุจิและความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ อย่างไรก็ตามค่าอุณหภูมิที่แตกต่างกันระหว่างบรรจุภัณฑ์ทั้ง 2 ชนิดให้ผลค่าการเคลื่อนที่ของอสุจิและความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งเป็นไปได้ว่าจำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษาอาจจะยังไม่เพียงพอที่จะแสดงถึงความแตกต่างได้ แต่ผู้ใช้งานสามารถเลือกรูปแบบในการบรรจุภัณฑ์ที่สามารถใช้งานได้ง่ายและสะดวกในการปฏิบัติงานจริง

จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าปัจจัยที่ทำการศึกษา ได้แก่ ชนิดสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ อัตราส่วนการเจือจาง และความเร็วในการปั่นเหวี่ยง ส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิและความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของน้ำเชื้อม้าที่เก็บรักษาในอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าความสัมพันธ์ของปัจจัยกับคุณภาพน้ำเชื้ออยู่ที่ 36 % จากผลการทดลองผู้วิจัยแนะนำให้น้ำเชื้อที่จะเก็บรักษาด้วยความเย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส ควรจะมีการเจือจางด้วยสารละลายน้ำเชื้อ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบต่อนาที เพื่อคงคุณภาพน้ำเชื้อในการเก็บรักษาด้วยความเย็นนานขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความอนุเคราะห์จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และมหาวิทยาลัยมหิดล

เอกสารอ้างอิง

ธีรวัฒน์ ธาราศานิต. (2555). **วิทยาแอนโดร เธนุเวช วิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพทางการสืบพันธุ์ม้า**. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัท เพชรภูมิการพิมพ์ จำกัด, เพชรบุรี.

Amirat, L., D. Tainturier and L. Jeanneau. (2004). Bull semen in vitro fertility after cryopreservation using egg yolk LDL: a comparison with optidyl, a commercial egg yolk extender. **Theriogenology.** (61), 895-907.

Aurich, C. (2008). Recent advances in cooled-semen technology. **AnimReprod Sci.** (107), 268-275.

Bearden, H. Joe, J. W. Fuquay and S. T. Willard. (2004). Applied Animal Reproduction. **6th Ed. Pearson Education**, Inc., Uppersaddle River, NJ.

Brinsko S.P. and D.D. Varner. (1992). Artificial insemination and preservation of semen. **Vet ClinNorth Am Equine Pract.**(8), 205-218.

Brinsko, S.P., K.P. Rowan, D.D. Varner and T.L. Blanchard. (1999). Effects of transport container and ambient storage temperature on motion characteristics of equine spermatozoa. **Theriogenology.** (53), 1641-1655.

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

Bozkurt, T., G. Turk and S. Gur. (2007). The Time-dependent motility and longevity of stallion spermatozoa diluted in different spermatozoa concentrations and extenders during cool-storage. **Revue Med Vet.** (158), 67-72.

Clay, C.M. and J.N. Clay. (1992). Endocrine and testicular changes with season, artificial photoperiod and the peri-pubertal period in stallions. **Veterinary Clinics of North America Equine Practice.** (8), 31-56.

Davies, M. and C.G. Mina. (2008). Equine reproductive physiology, breeding, and stud management. 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge.

Fukada, T., M. Kikuchi, T. Kurotaki, T. Oyamada, H. Yoshikawa and T. Yoshikawa. (2001). Age-related changes in the testes of horses. **Equine Vet J.** (33), 20-25.

Ijaz, A. and R. Ducharme. (1995). Effect of various extenders and taurine on survival of stallion cooled to 5 degrees C. **Theriogenology.** (40), 1039-1050.

Janett, F., R. Thun, S. Bettschen, D. Burger and M. Hassig. (2003). Season changes of semen quality and freezability in Franches-Montagnes stallion. **AnimReprod Sci.** (77), 213-221.

Katila, T., G.B. Combes, D.D. Varner and T.L. Blanchard. (1997). Comparison of three containers used for the transport of cooled stallion semen. **Theriogenology.**(48), 1085-1092.

Kenney, R.M., Bergman, R.V., Cooper, W.L., Morse, G.W., (1975). Minimal contamination techniques for breeding mares: techniques and preliminary findings**. In: Proceedings of the 21st American Association of Equine Practices. 327–336.**

Khlifaoui M., I. Battut, J.F. Brugyas, G. Chatagnon, A.trimeche and D. tainturier. (2005). Effects of glutamine on post-thaw motility of stallion spermatozoa an approach of the mechanism of action at spermatozoa level. **Theriogenology.** (63), 138-149.

Krause D and D. Grove. (1967). Deep freezing of jackass and stallion semen in concentrated pellet form. **J ReprodFertil.** (14), 139-141.

Loomis, P.R. (2006). Advanced methods for handing and preparation of stallion semen. **Vet. Clin.Equine**. (22), 663-676.

Love, C.C., J.A. Thompson, S.P. Brinsko, S.L. RiGBY, T.L. Blanchard and D.D. Varner. (2002). Relationship of seminal plasma level and extender type to sperm motility and DNA integrity. **Theriogenology.**(58), 221-224.

Macpherson, M.L., M.D. Shore, M.H. Fernandez.C.D. Miller, J.A. Thompson, T.L. Blanchard and D.D. Varner. (2001). **Processing factors which influence viability and fertility of cryopreserved equine spermatozoa.** Havemeyer foundation Mono series. (6), 27-29.

Madill, S. (2002). Reproductive considerations: mare and stallion. **Vet Clin North Am Equine Pract.**(18), 591-619**.**

Magistrini, M., Couty, I., Palmer, E., (1992). Interactions between sperm packaging, gas environment, temperature and diluent on fresh stallion sperm survival. **Acta Vet. Scand.**(88) (Suppl.), 97–110.

Mansour, M. (2009). Modification of Hypo-Osmotic Swelling test to evaluate the integrity of stallion sperm plasma membrane. **Global Veterinaria.** (3), 302-307.

Naden, J., R.P. Amann and E.L. Squires. (1990). Testicular growth, hormone concentrations, seminal charactertics and sexual behavior in stallions. **J. Reprod. Fertil.** (88), 167-176.

Pickett, B.W., J.J. Sullivan, W.W. Byers, M.M. Pace and E.E. Remmenga. (1975). Effect of centrifugation and seminal plasma on motility and fertility of stallion and bull spermatozoa. **FertilSteril.** (26), 167-174.

Phetudomsinsuk, K., K. Sirinarumitr, A. Choothesa, P,.Suthanmapinun, K. Kornkaewrat, A. Laikul, S. Amornsak, and A. Pinyopummin. (2009). Freezability of Thai Native Crossbred Horse Semen in Different Extenders. **Thai J. Vet. Med.** 39(2), 105-114.