

น้ำเชื้อแช่แข็งแพะ

วิชญ์ ไพศาลรุ่งพนา

สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์

แพะ (goat) เป็นสัตว์เคี้ยวเอื้องขนาดเล็ก อยู่ในวงศ์ Bovidae ตระกูลคาปรา (Capra) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Capra aegagrus hircus* (หรือ *Capra hircus*) แพะกินใบไม้ใบหญ้าเป็นอาหาร กินพืชได้หลากหลายชนิด กินอาหารได้หลายอย่าง ทนทานต่อสภาพแวดล้อม โตเร็ว ขยายพันธุ์ได้เร็ว อายุถึงวัยเจริญพันธุ์เร็วเพียง 4-12 เดือน วงรอบการเป็นสัด 18-23 วัน ระยะเวลาการเป็นสัด 12-36 ชั่วโมง ใช้ระยะเวลาตั้งท้องสั้นเพียง 150 วัน คลอดลูกครั้งละ 1-2 ตัว ให้ลูกเฉลี่ยได้ปีละ 2 ครั้ง ใช้พื้นที่ในการเลี้ยงต่อตัวน้อย ง่ายต่อการเลี้ยงและการจัดการ แพะให้ผลผลิตหลัก คือเนื้อซึ่งมีโปรตีนสูง มีไขมัน และคอเลสเตอรอลต่ำ ให้น้ำนมที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง ทั้งเนื้อและนมแพะสามารถจำหน่ายได้ราคาดี แพะถือได้ว่าเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญ ความนิยมเลี้ยงแพะของเกษตรกร กระจายอยู่ในแทบทุกพื้นที่ของประเทศ

ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมปศุสัตว์ ได้รายงานไว้ในปี 2566 มีเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะทั้งหมด จำนวน 92,862 ราย ซึ่งส่วนใหญ่อยู่ในพื้นที่เขต 9 จำนวน 44,131 ราย (ร้อยละ 47.52) รองลงมา คือ เขต 8 จำนวน 9,504 ราย (ร้อยละ 10.23) เขต 3 จำนวน 9,166 ราย (ร้อยละ 9.87) และเขต 7 จำนวน 8,347 ราย (ร้อยละ 8.99) ตามลำดับ โดยมีการเลี้ยงแพะทั้งหมดจำนวน 1,568,059 ตัว ซึ่งในพื้นที่เขต 7 เลี้ยงแพะมากที่สุด จำนวน 319,549 ตัว (ร้อยละ 20.38) รองลงมา คือ เขต 9 จำนวน 255,919 ตัว (ร้อยละ 16.32) และเขต 3 จำนวน 217,172 ตัว (ร้อยละ 13.85) ตามลำดับ จากแพะทั้งหมด จำนวน 1,568,059 ตัว จำแนกเป็นแพะเนื้อ จำนวน 1,534,178 ตัว (ร้อยละ 97.84) และแพะนม จำนวน 33,881 ตัว (ร้อยละ 2.16) ตามลำดับ แพะเนื้อส่วนใหญ่เลี้ยงในพื้นที่เขต 7 จำนวน 312,379 ตัว (ร้อยละ 20.36) รองลงมา คือ เขต 9 จำนวน 250,977 ตัว (ร้อยละ 16.36) และเขต 3 จำนวน 212,897 ตัว (ร้อยละ 13.88) ตามลำดับ ส่วนแพะนมส่วนใหญ่เลี้ยงในพื้นที่เขต 1 จำนวน 8,109 ตัว (ร้อยละ 23.93) รองลงมา คือ เขต 7 จำนวน 7,170 ตัว (ร้อยละ 21.16) และเขต 9 จำนวน 4,942 ตัว (ร้อยละ 14.59) ตามลำดับ

การเลี้ยงแพะของเกษตรกรมักเป็นการเลี้ยงในคอก เกษตรกรหาอาหารหยาบและอาหารข้นให้แพะกินในคอก รวมถึงมีการปล่อยแพะเดินหากินหาหญ้าในแปลงหญ้าข้างในกรณีที่มีแปลงหญ้า ส่วนการผสมพันธุ์แพะ เกษตรกรมักจะปล่อยให้ผสมพันธุ์กันเองในฝูงตามธรรมชาติ ซึ่งในการเลี้ยงปีแรกๆ การให้ผลผลิตมักจะเกินไปได้ด้วยดี แต่เมื่อเวลาผ่านไป หากเกษตรกรไม่มีการเปลี่ยนพ่อพันธุ์ ปล่อยให้แพะผสมพันธุ์กันเองไปเรื่อยๆ จะเกิดการผสมเลือดชิด เช่น พ่อผสมลูก พี่ผสมน้อง ลูกผสมแม่ เป็นต้น ทำให้ลูกแพะที่เกิดในรุ่นต่อๆ มาอ่อนแอ ขนาดตัวเล็กลง ผลผลิตที่ได้มีการสูญเสียมากขึ้นเรื่อยๆ สมรรถภาพการผลิตในฟาร์มลดลง ซึ่งหลายๆ ฟาร์มเมื่อเริ่มพบปัญหานี้ จะรีบทำการแก้ไขด้วยการแยกแพะเพศผู้และเพศเมียออกจากกัน และใช้การผสมเทียมเป็นหลักในการผสมพันธุ์แพะภายในฟาร์ม

การผสมพันธุ์แพะด้วยการผสมเทียม จะเป็นการนำเอาพันธุ์กรรมดีๆ เข้ามาในฟาร์ม สามารถกระจายพันธุ์กรรมดีๆ ได้อย่างทั่วถึง แก้ไขปัญหาที่เกิดจากการผสมเลือดชิด ผลผลิตที่ได้สูงขึ้น สมรรถภาพการผลิตใน

ฟาร์มสูงขึ้น การผสมเทียมสามารถกล่าวได้ว่าเป็นการเพิ่มความก้าวหน้าของอัตราพันธุ์กรรมได้อย่างรวดเร็วเมื่อใช้น้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ชั้นเยี่ยม และยังสามารถประหยัดงบประมาณของเกษตรกรในการเลี้ยงดูพ่อพันธุ์ รวมถึงสามารถป้องกันโรคติดต่อที่อาจเกิดจากการผสมพันธุ์ได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้วิธีการผสมเทียมแพะก็ไม่ยากเกินความสามารถของเกษตรกร เกษตรกรสามารถทำได้ด้วยตัวเองในฟาร์มของตัวเอง หากได้รับการฝึกอบรมที่ถูกต้อง รวมถึงสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ มีน้ำเชื้อแช่แข็งและเจ้าหน้าที่ผสมเทียมคอยให้บริการอยู่แล้ว การผสมพันธุ์แพะด้วยการผสมเทียมจึงเป็นเรื่องที่ง่ายดาย และสะดวกสบายมากยิ่งขึ้น ส่วนน้ำเชื้อแช่แข็งแพะ ซึ่งสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ผลิตออกมาเพื่อให้บริการผสมเทียมให้กับแม่แพะของเกษตรกร มีหลายสายพันธุ์ เช่น พันธุ์บอร์ (Boer) พันธุ์แองโกลนูเบียน (Anglo-Nubian) พันธุ์ทอกเกนเบอร์ก (Toggenburg) พันธุ์คาราฮารี เรด (Kalahari red) และพันธุ์แดงสุราษฎร์ เป็นต้น



ภาพที่ 1 พ่อพันธุ์บอร์ (Boer)

ที่มา : <https://biotech.dld.go.th/webnew/images/stories/Breeder/Breeder-Ai/Goat/Songkhla/Boer/57M019YLK/57M019YLK.jpg>



ภาพที่ 2 แม่พันธุ์แองโกลนูเบียน (Anglo-Nubian)

ที่มา : https://www.facebook.com/271848136665597/photos/a.272529799930764/273397689843975/?type=3&locale=th_TH



ภาพที่ 3 พ่อพันธุ์ทอกเกนเบอร์ก (Toggenburg)

ที่มา : <https://biotech.dld.go.th/webnew/images/stories/Breeder/Breeder-Ai/Goat/SuratThani/Toggenburg/SRTO60002/SRTO60002.jpg>



ภาพที่ 4 พ่อคาราฮารี เรด (Kalahari red)

ที่มา : <https://biotech.dld.go.th/webnew/images/stories/Breeder/Breeder-Ai/Goat/SuratThani/Kalahari-red/KLR654/KLR654.jpg>

การผสมเทียมแพะในปัจจุบันจะใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง ซึ่งในแต่ละหลอดหรือโด้สของน้ำเชื้อแช่แข็งซึ่งผลิตจากสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ จะมีปริมาตร 0.25 ซีซี มีจำนวนอสุจิในหลอดไม่น้อยกว่า 150 ล้านตัว หลังการละลายน้ำเชื้อด้วยน้ำอุ่นจะต้องเหลืออสุจิมีชีวิตที่สามารถเคลื่อนที่ไปข้างหน้าได้ไม่น้อยกว่าร้อยละ 40

น้ำเชื้อแช่แข็งแพะซึ่งพร้อมให้บริการผสมเทียมแก่แม่แพะของเกษตรกรนั้น ผลิตจากน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์แพะชั้นเลิศ 5 สายพันธุ์ดังกล่าว และมีกระบวนการผลิตโดยย่อ ดังนี้คือ

1. การรีดเก็บน้ำเชื้อ (Semen collection)

การรีดเก็บน้ำเชื้อพ่อพันธุ์แพะ จะใช้โยนีเทียม (Artificial vagina) มีการปรับยางด้านในโยนีเทียมให้ตึงและอุ่นด้วยการเติมน้ำอุ่นอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส รวมถึงหล่อลื่นยางด้านในด้วยสารหล่อลื่น เพื่อให้คล้ายช่องคลอด (Vagina) ของแม่แพะที่กำลังเป็นสัด พ่อพันธุ์แพะก่อนที่จะทำการรีดเก็บน้ำเชื้อ จะต้องมีการตรวจสอบสุขภาพ และทำความสะอาดบริเวณใต้ท้อง รวมถึงรอบอวัยวะสืบพันธุ์ให้สะอาด ตัดขนส่วนเกินให้สั้น ส่วนตัวล่อที่จะให้พ่อพันธุ์ขึ้นทับ จะใช้แม่แพะที่กำลังเป็นสัดมาเป็นตัวล่อ เนื่องจากแม่แพะที่เป็นสัดจะมีกลิ่นที่ทำให้พ่อพันธุ์เกิดความกำหนดยากผสมพันธุ์มากขึ้น และจะส่งผลให้น้ำเชื้อที่รีดได้มีคุณภาพสูงขึ้น การทำให้แม่แพะ

ตัวล่อเป็นสัตว์ได้นั้น มักใช้ฮอร์โมนในการเหนี่ยวนำ เช่น พรอสตาแกลนดิน เอฟ ทู อัลฟา (Prostaglandin F_{2α}) เป็นต้น



ภาพที่ 5 รีดเก็บน้ำเชื้อแพะด้วยโยนีเทียม

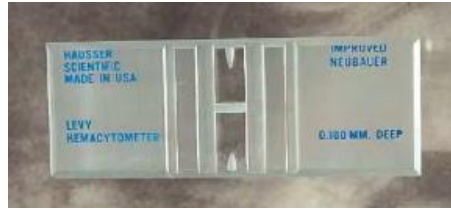
ที่มา : <https://biotech.dld.go.th/webnew/images/Manual/semengoat.pdf>

เมื่อถึงเวลาจะทำการรีดเก็บน้ำเชื้อ เจ้าหน้าที่จะจูงแพะพ่อพันธุ์เข้ามาในลานรีด พ่อพันธุ์จะเดินเข้าหาแม่แพะตัวล่อที่กำลังเป็นสัด เจ้าหน้าที่จะปล่อยให้พ่อพันธุ์แสดงพฤติกรรมเกี้ยวพาราสีตามธรรมชาติ เมื่อพ่อพันธุ์เกิดความกำหนัดสูง จะขึ้นขี่ตัวล่อเพื่อผสมพันธุ์และปล่อยน้ำเชื้อ ผู้รีดจะใช้มือเปียงโคนลึงค์ของพ่อพันธุ์เพื่อให้ปลายลึงค์เฉียงออกด้านข้าง แล้วใช้โยนีเทียมสวมเข้ากับปลายลึงค์ของพ่อพันธุ์ จากนั้นพ่อพันธุ์จะกระแทกและหลั่งน้ำเชื้อออกมา น้ำเชื้อที่รีดได้ จะเห็นเป็นของเหลวสีขาวคล้ายน้ำมัน มีปริมาตร 0.5-2.0 ซีซี ความเข้มข้น 2,000-4,500 ล้านตัว/ซีซี ซึ่งปริมาตรและความเข้มข้นของน้ำเชื้อที่รีดได้ จะต่างกันออกไปในพ่อพันธุ์แต่ละตัว ตามความสมบูรณ์ ความแข็งแรง พันธุ์ และอายุของพ่อพันธุ์ รวมถึงความถี่ในการรีดเก็บน้ำเชื้อ การจะทราบความเข้มข้นของน้ำเชื้อแพะที่รีดออกมาให้แน่นอนได้นั้น ต้องทำการตรวจนับ โดยการตรวจนับอาจใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Spectrophotometer ก็ได้ หรืออาจตรวจนับผ่านทางกล้องจุลทรรศน์บนสไลด์นับเม็ดเลือด (Hemocytometer) ก็ได้



ภาพที่ 6 น้ำเชื้อแพะ

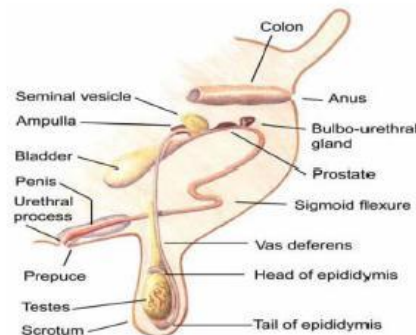
ที่มา : <https://biotech.dld.go.th/webnew/images/Manual/semengoat.pdf>



ภาพที่ 7 สไลด์นับเม็ดเลือด

ที่มา : <https://biotech.dld.go.th/webnew/images/Manual/semengoat.pdf>

น้ำเชื้อแพะที่เห็นเป็นของเหลวสีขาวคล้ายน้ำนมข้น ประกอบด้วย 2 ส่วน ได้แก่ ตัวอสุจิ (Spermatozoa) และ Seminal plasma ตัวอสุจิจะถูกสร้างในท่อ Seminiferous ที่อยู่ในอัณฑะโดยกระบวนการที่เรียกว่า Spermatogenesis หลังจากสร้างเสร็จแล้ว จะถูกเก็บสะสมใน Epididymis ซึ่งใน Epididymis นี้ อสุจิจะมีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงเป็นอสุจิที่สมบูรณ์ พร้อมหลังออกนอกร่างกาย ส่วน Seminal plasma จะถูกสร้างจากต่อมเพศ (Accessory genital glands) ซึ่งอยู่ด้านข้างของท่อทางเดินอสุจิ ต่อมเพศที่สำคัญมี 3 ต่อม ได้แก่ Seminal vesicle, Prostate gland และ Bulbourethral gland ซึ่งต่อมเพศทั้ง 3 ต่อม จะทำหน้าที่สร้างสารส่วนที่เป็นของเหลวหลังปนออกมากับตัวอสุจิ เพื่อเป็นอาหารและเป็นสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมให้แก่ตัวอสุจิ สารที่ขับออกมาจากต่อมเพศจะประกอบด้วย Carbohydrate, Protein, Amino acid, Vitamin, Mineral และ Enzyme รวมเรียกของเหลวที่ปนออกมากับตัวอสุจินี้ว่า Seminal plasma โดยหน้าที่อีกอย่างหนึ่งของ Seminal plasma ที่เห็นคือ เป็นส่วนที่ให้อสุจิลอยตัวอยู่ และเคลื่อนไหวได้ตามธรรมชาติ ในสัตว์ต่างชนิดกัน Seminal plasma จะมีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน และ Seminal plasma จะทำปฏิกิริยา หรือเกิดผลกระทบกับน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ (Extender) และส่งผลต่อตัวอสุจิแตกต่างกันไป



ภาพที่ 8 กายวิภาคระบบสืบพันธุ์แพะเพศผู้

ที่มา : <https://vikaspedia.in/agriculture/livestock/sheep-and-goat-farming/castration-of-ruminants-1>

หลังจากรีดเก็บน้ำเชื้อได้แล้ว จะนำน้ำเชื้อไปตรวจคุณภาพ ตั้งแต่การดูด้วยตา และตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจการเคลื่อนไหว อสุจิเป็น-ตาย และความผิดปกติ รวมถึงตรวจหาความเข้มข้น หากน้ำเชื้อมีคุณภาพดีพอ ก็จะนำไปผลิตเป็นน้ำเชื้อแช่แข็ง เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณน้ำเชื้อให้สามารถนำไปผสมเทียมกับแม่แพะได้มากขึ้น เก็บรักษาไว้ได้นานขึ้น และนำไปใช้ผสมเทียมได้ในทุกๆ พื้นที่ น้ำเชื้อพ่อพันธุ์แพะที่จะนำไปผลิต

เป็นน้ำเชื้อแช่แข็งได้นั้นจะต้องมีความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 1,500 ล้านตัวต่อซีซี มีอัตราการเคลื่อนที่ไม่น้อยกว่า ร้อยละ 70 และมือสุจิที่มีรูปร่างปกติไม่น้อยกว่าร้อยละ 80 ซึ่งในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งแพะ อาจยุ่งยากกว่ากระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งในโค-กระบือเล็กน้อย

2. การเจือจางน้ำเชื้อ

การผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งแพะจะมีการเติมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อลงในน้ำเชื้อ เพื่อให้มีปริมาณมากขึ้น สามารถนำไปผลิตเป็นน้ำเชื้อแช่แข็งได้เป็นจำนวนมาก รวมถึงน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อจะเป็นตัวกลางในการรักษาสมดุลของความเป็นกรดเป็นด่าง (pH buffer) รักษาสมดุลความเข้มข้นของสารละลาย และป้องกันอันตรายของตัวอสุจิจากการแช่เย็นและแช่แข็ง (Cryogenic injury) รวมถึงจะมีการเติมสารต่างๆ ผสมเข้ากับน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ เพื่อป้องกันอันตรายจากการเกิดผลึกน้ำแข็งในเซลล์ของอสุจิ และเติมสารต้านอนุมูลอิสระ เพื่อช่วยให้อสุจิมีชีวิตรอดมากขึ้น สิ่งที่มีอยู่ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อเพื่อป้องกันอันตรายให้กับตัวอสุจิ ได้แก่ ไข่แดง Glycerol และสารต้านอนุมูลอิสระต่างๆ

การใช้ไข่แดงเป็นส่วนประกอบน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งในสัตว์ชนิดต่างๆ นั้น มีมาหลายสิบปีแล้ว มีโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ไข่แดงช่วยเคลือบเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิ ป้องกันอันตรายที่จะเกิดกับตัวอสุจิในการแช่แข็ง ไข่แดงมีส่วนประกอบที่เป็น Lipoprotein และ Lecithin หรือ Phosphatidylcholine มีคุณสมบัติป้องกันการตายของอสุจิเนื่องจากความเย็น (Cold shock) ทำปฏิกิริยากับ Seminal plasma protein ทำให้เซลล์อสุจิคงรูป ไม่เกิด Capacitation ขึ้นในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อ นอกจากนี้ ไข่แดงยังเป็นแหล่งพลังงานสำรองสำหรับ Metabolism ของอสุจิในขณะเดินทางในระบบสืบพันธุ์เพศเมีย โดยทั่วไปจะใช้ไข่แดงประมาณ ร้อยละ 20 ของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ นอกจากไข่แดงแล้ว ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งทั่วไป ยังมีการเติมสารป้องกันการแข็งตัวของน้ำในเซลล์อสุจิ ได้แก่ Glycerol, Dimethyl sulfoxide, Ethylene glycol, Propylene glycol โดยเลือกใช้ชนิดใดชนิดหนึ่ง ใส่ผสมลงไปในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ เพื่อให้ไปแทนที่น้ำในเซลล์ของอสุจิ ป้องกันอันตรายจากการเกิดผลึกน้ำแข็งในเซลล์ สารป้องกันการแข็งตัวของน้ำในเซลล์อสุจิชนิดที่ได้รับความนิยมมากที่สุด น่าจะเป็น Glycerol ซึ่งจะต้องใช้ในปริมาณที่เหมาะสม หากใส่มากเกินไปจะเป็นพิษกับตัวอสุจิ โดยเฉพาะที่ส่วนหางของตัวอสุจิ โดยทั่วไปจึงใช้ Glycerol ประมาณร้อยละ 6-9 ของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ นอกจากนี้ ในกระบวนการแช่แข็ง หรือการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว มักจะทำให้เกิดภาวะ Oxidative stress ทำให้เกิดอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ปัจจุบันนักวิชาการเริ่มมีแนวคิดในการเติมสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น Vitamin C, Vitamin E, Coenzyme Q10 เป็นต้น เพื่อลดอนุมูลอิสระ ช่วยให้หลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งในน้ำอุ่น จะมีอสุจิมีชีวิตรอดมากขึ้น

ในกรณีของแพะนั้น เนื่องจาก Seminal plasma ของแพะต่างจากของโค-กระบือ โดย Bulbourethral gland ของแพะจะสร้างสารที่เรียกว่า Egg yolk coagulation enzyme หรือ Secreted bulbourethra III โดยมีสารที่มีส่วนประกอบคล้าย Phospholipase enzyme หากนำน้ำเชื้อแพะมาผสมกับไข่แดง ระหว่างทำการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส Phospholipase enzyme จะทำการ Hydrolyses กับไข่แดง ซึ่งจะมีผลให้ตัวอสุจิตาย หรือทำให้อสุจิสูญเสียความสมบูรณ์ทางกายภาพ ไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ในระบบสืบพันธุ์ของแม่แพะได้ หรือทำให้เยื่อหุ้มอสุจิ และอโครโซมจะเสียหาย Enzyme ภายในโครโซมจะเสียคุณสมบัติทางชีวเคมี ทำให้ไม่สามารถเจาะผ่านเปลือกไข่ที่อยู่ในท่อไข่ของแม่แพะได้ สำหรับแพะหากจะ

ใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิดที่มีไข่แดง จะต้องลดปริมาณ Seminal plasma ในน้ำเชื้อออกก่อนโดยการปั่นแยก ล้าง Seminal plasma ออก เพื่อลด Phospholipase enzyme หรือใช้ไข่แดงในปริมาณที่เหมาะสม หรือทำการล้าง Electrolyte และไขมันในไข่แดงออกก่อนด้วย Acetone หรืออีกทางเลือกหนึ่งคือ ใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิดที่ไม่มีไข่แดง หรือมีการใช้ Lecithin จากถั่วเหลืองหรือจากเมล็ดทานตะวันทดแทนไข่แดง แต่ในการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งแพะโดยทั่วไป ยังคงใช้ไข่แดงเป็นส่วนประกอบของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ โดยการใช้การปั่นแยก ล้าง Seminal plasma ออก และใช้ไข่แดงในปริมาณที่เหมาะสม

น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสำหรับแพะ มีหลายชนิดให้เลือกใช้ ทั้งแบบที่ต้องเตรียมเองและแบบสำเร็จรูป แบบมีไข่แดงและแบบไม่มีไข่แดง เช่น Tris-egg yolk, Andromed®, MJ-EX2™, Triladyl®, Ovipro®, Biladyl®, Optidyl®, Biociphos®, Biociphos Plus®, Bioexcel® เป็นต้น หากเลือกใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิดที่มีไข่แดงเป็นองค์ประกอบ จะต้องทำการปั่นและล้าง Seminal plasma ในน้ำเชื้อออกก่อนที่จะนำไปผสมกับน้ำยาเจือจาง ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว แต่หากใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อชนิดที่ไม่มีไข่แดง ก็ไม่ต้องปั่นล้าง Seminal plasma ออก สามารถนำน้ำเชื้อผสมเข้ากับน้ำยาเจือจางได้เลย ซึ่งในการผสมน้ำเชื้อกับน้ำยาเจือจาง จะคำนวณสัดส่วนการเติมน้ำยาเจือจางลงน้ำเชื้อ โดยให้แต่ละหลอดน้ำเชื้อปริมาตร 0.25 ซีซี ต้องมีจำนวนอสุจิ หลอดละ 150 ล้านตัว (หากใช้หลอด 0.25 ซีซี น้ำเชื้อหลังจากเติมน้ำยาเจือจางต้องมีความเข้มข้น 600 ล้านตัว/ซีซี) โดยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อและน้ำเชื้อในขณะผสมกันจะต้องมีอุณหภูมิเท่ากัน เพื่อป้องกันตัวอสุจิ Shock จากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ และจะต้องให้ค่อยๆ เติมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อลงในน้ำเชื้อ ไม่ใช่เทน้ำเชื้อลงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ เพื่อป้องกันปัญหาค่า Osmolarity เปลี่ยนแปลงเร็วเกินไป

ค่า Osmolarity ในสารเจือจางน้ำเชื้อ เป็นค่าที่บอกทางอ้อมว่าน้ำจะซึมออกจากเซลล์อสุจิ หรือน้ำจะซึมเข้าในเซลล์อสุจิ หรือเป็นปกติ คือถ้าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อมีค่า Osmolarity สูงกว่าน้ำเชื้อ น้ำจะซึมออกจากเซลล์อสุจิ ทำให้ตัวอสุจิเหี่ยวแฟบและตายในที่สุด แต่ถ้าน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อมีค่า Osmolarity ต่ำเกินไปจะส่งผลให้น้ำจากสารเจือจางน้ำเชื้อจะซึมเข้าเซลล์อสุจิ ทำให้ตัวอสุจิเกิดการบวมน้ำ ทำความเสียหายกับส่วนของโครโมโซมและพื้นผิวเซลล์ในที่สุดตัวอสุจิก็ตาย แต่หากค่า Osmolarity ของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อเท่ากับน้ำเชื้อ น้ำก็จะไม่ซึมออกหรือซึมเข้าเซลล์ตัวอสุจิก็ตายเป็นปกติ นอกจากนี้ค่า Osmolarity ที่ผิดปกติมักพบว่าจะทำให้ส่วนหางของตัวอสุจิแยกออกจากส่วนหัว (Detached head) ทำให้ตัวอสุจิไม่สามารถเข้าปฏิสนธิกับไข่ได้ ซึ่งปรากฏชัดเจนในน้ำเชื้อสุกร แต่ในสัตว์ชนิดอื่นอาจปรากฏไม่ชัดเจนนัก ซึ่งเมื่อเรารู้ถึงผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นแล้ว ในทางปฏิบัติก็ควรเติมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อลงในน้ำเชื้อ ไม่เทน้ำเชื้อลงในน้ำยาเจือจาง และปฏิบัติให้เป็นปกติ ไม่ว่าจะเป็นการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งของสัตว์ชนิดใดก็ตาม นอกจากนี้ค่า Osmolarity ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อมักผิดไปจากปกติได้ เนื่องจากเก็บสารเจือจางน้ำเชื้อไว้นานจนหมดอายุแล้วยังนำมาใช้ ดังนั้น หากสารเจือจางน้ำเชื้อหมดอายุ ควรทิ้ง ไม่ควรนำมาใช้อีก

3. การบ่มน้ำเชื้อ

หลังจากน้ำเชื้อและน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อผสมกันแล้ว คนเบาๆ ด้วยแท่งแก้วที่สะอาด หรือเขย่าเบาๆ เพื่อให้ตัวอสุจิกระจายตัวในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ แล้วค่อยๆ ทำการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิปกติจนอุณหภูมิเหลือ 4 องศาเซลเซียส แล้วทำการบ่มต่อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนครบ 4 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนนี้ น้ำเชื้อของพ่อแพะบางตัวอาจพบว่าตัวอสุจิตายเป็นจำนวนมาก เนื่องจากเกิดภาวะที่เรียกว่า Cold shock ซึ่ง

อาจเป็นความผิดปกติเฉพาะตัวของพ่อพันธุ์ พ่อพันธุ์บางตัวน้ำเชื้อสามารถผ่าน Cold shock ได้ แต่พ่อพันธุ์บางตัวน้ำเชื้อไม่สามารถผ่าน Cold shock ซึ่งหากไม่ผ่านสุดท้ายก็ต้องเอาพ่อพันธุ์ตัวนั้นไปใช้คุมฝูงแทน ซึ่งการที่เราจะทราบว่าน้ำเชื้อสามารถผ่าน Cold shock ได้หรือไม่ ก็ด้วยการนำน้ำเชื้อที่เจือจางและลดอุณหภูมิแล้วนั้นไปตรวจคุณภาพอีกครั้งหนึ่ง โดยน้ำเชื้อที่สามารถนำไปเข้ากระบวนการแช่แข็งได้นั้น จะต้องมียอตราการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนครบ 4 ชั่วโมงแล้ว ไม่น้อยกว่าร้อยละ 70 หากอัตราการเคลื่อนที่น้อยกว่านี้ก็ควรทำลายน้ำเชื้อนั้นทิ้ง

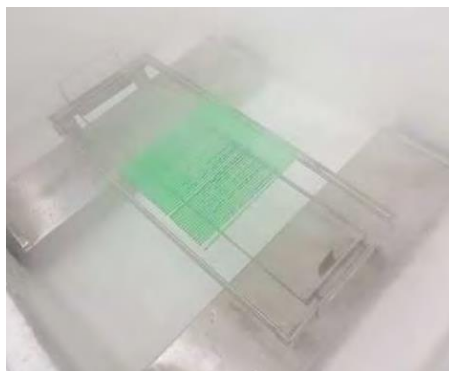
4. การพิมพ์หลอดน้ำเชื้อและบรรจุน้ำเชื้อ

ขณะกำลังบ่มน้ำเชื้อก็ให้ทำการพิมพ์หลอดบรรจุน้ำเชื้อไปด้วยเพื่อไม่ให้เสียเวลา โดยข้างหลอดบรรจุน้ำเชื้อควรพิมพ์ข้อมูลยี่ห้อที่ผลิต พันธุ์แพะ ชื่อหรือหมายเลขพ่อพันธุ์แพะ วันเดือนปีที่ผลิต เป็นต้น และให้ทำการลดอุณหภูมิของหลอดบรรจุน้ำเชื้อให้เท่ากับน้ำเชื้อ คือ 4 องศาเซลเซียสด้วย เพื่อไม่ให้เกิดความแตกต่างของอุณหภูมิของหลอดบรรจุน้ำเชื้อและน้ำเชื้อในขณะบรรจุน้ำเชื้อใส่ในหลอด

หลังจากตรวจคุณภาพน้ำเชื้อหลังบ่มเรียบร้อยแล้ว หากน้ำเชื้อมีคุณภาพดีพอ ก็ทำการบรรจุน้ำเชื้อลงในหลอดในตู้ควบคุมอุณหภูมิ เพื่อให้อุณหภูมิของทั้งน้ำเชื้อและหลอดบรรจุน้ำเชื้อไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง เมื่อบรรจุน้ำเชื้อใส่หลอดแล้ว ทำการปิดปลายหลอด

5. การแช่แข็งน้ำเชื้อ

นำหลอดน้ำเชื้อที่บรรจุน้ำเชื้อและปิดปลายหลอดเรียบร้อยแล้วเรียงบนถาด ซึ่งถาดเรียงหลอดน้ำเชื้อจะผลิตขึ้นมาเพื่อให้หลอดน้ำเชื้อสามารถเรียงเป็นแถวเตี๋ยบนถาด ไม่ทับซ้อนกัน ทำให้แต่ละหลอดสามารถสัมผัสกับไอของไนโตรเจนได้อย่างทั่วถึง ซึ่งหมายความว่าทุกๆ ส่วนของหลอดน้ำเชื้อจะถูกลดอุณหภูมิเท่าๆ กัน พร้อมๆ กัน หลังจากนำหลอดน้ำเชื้อเรียงบนถาดแล้ว จะทำการลดอุณหภูมิต่อไป



ภาพที่ 9 ถาดเรียงหลอดน้ำเชื้อเพื่อลดอุณหภูมิ

ที่มา : <https://biotech.dld.go.th/webnew/images/Manual/semengoat.pdf>

การลดอุณหภูมิ อาจดำเนินการด้วยเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติผ่านการควบคุมด้วยระบบคอมพิวเตอร์ (controlled rate freezer) จะทำการลดอุณหภูมิจาก 4 องศาเซลเซียสจนเหลือ -140 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 7 นาที หรือหากไม่มีเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ ก็สามารถทำการลดอุณหภูมิด้วยการอังไอของไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม โดยจัดให้หลอดน้ำเชื้ออยู่สูงกว่าระดับไนโตรเจนเหลว 3-4 เซนติเมตร เพื่อให้

หลอดน้ำเชื้อสัมผัสกับไอของไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -120 องศาเซลเซียส การอังไอไนโตรเจนเหลวจะลดอุณหภูมิจาก 4 องศาเซลเซียสลงเหลือ -120 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลา 15 นาที จากนั้น นำหลอดน้ำเชื้อทั้งหมดใส่ในกระบอกเก็บน้ำเชื้อ (Goblet) และใส่ใน Canister สุดท้ายก็ทำการแช่หลอดน้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลวซึ่งมีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 10 น้ำเชื้อแช่แข็งแพะ

ที่มา : <https://biotech.dld.go.th/webnew/images/Manual/semengoat.pdf>

6. ผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อในการแช่แข็ง

กระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งในขั้นตอนทั้งหมดนี้ จะส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อ คือจะเกิดปฏิกิริยา Peroxidation ของไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มอโครโซม และ Mitochondria ของอสุจิ จะเกิดผลึกน้ำแข็งในตัวอสุจิ เกิดความเป็นพิษของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อกับตัวอสุจิ แรงดัน Osmotic ของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่เปลี่ยนแปลงจากการลดอุณหภูมิจะมีผลกระทบต่อตัวอสุจิ เซลล์อสุจิเกิดภาวะแห้งน้ำ เกิดการเหี่ยวของเซลล์ หรือเกิดการบวมน้ำ ส่วนหัวของอสุจิหลุดจากหาง ส่งผลทำให้ความสมบูรณ์ของอโครโซมลดลง ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิลดลง ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิตรอดลดลง และอัตราการผสมติดลดลง โดยความผิดปกติทั้งหลายดังกล่าวของตัวอสุจิ ควรเกิดขึ้นไม่เกินร้อยละ 50 โดยหลังการแช่แข็งผ่านไป 24 ชั่วโมง จะต้องทำการสุ่มตรวจคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งในทุก lot ที่ผลิต โดยการนำน้ำเชื้อแช่แข็งบางหลอดมาทำการละลาย แล้วตรวจคุณภาพซ้ำอีกครั้งหนึ่ง การตรวจจะต้องพบว่าอสุจิที่สามารถเคลื่อนที่ไปข้างหน้าได้ไม่น้อยกว่าร้อยละ 40 จึงนำน้ำเชื้อ Lot ดังกล่าวไปใช้ได้ แต่หากการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าน้อยกว่าร้อยละ 40 น้ำเชื้อ Lot นั้นควรทำลายทิ้ง

ในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง มีหลายขั้นตอนที่เป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้การแช่แข็งน้ำเชื้อประสบความสำเร็จ เช่น ความทนทานต่อการลดอุณหภูมิของน้ำเชื้อ ซึ่งน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์บางตัวไม่มีความทนทานคุณภาพของน้ำเชื้อสด ชนิดน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ อัตราการลดอุณหภูมิ ระยะเวลาในการบ่มหรือปรับสมดุลของน้ำเชื้อ ความเร็วในการแช่แข็ง เป็นต้น ซึ่งตัวอสุจิประมาณร้อยละ 40-50 จะเกิดความเสียหายเนื่องจากการแช่แข็ง ซึ่งเป็นความเสียหายที่เป็นปกติอยู่แล้ว มีข้อมูลที่ได้จากการแช่แข็งน้ำเชื้อ ซึ่งนักวิชาการได้สรุปไว้ คือ

1. การลดอุณหภูมิในกระบวนการแช่แข็ง หากทำอย่างช้าๆ ใช้เวลานาน สิ่งที่เกิดขึ้น คือ ขณะลดอุณหภูมิน้ำภายในเซลล์ของอสุจิจะแพร่ผ่านผนังเซลล์ (Osmosis) ออกไปนอกเซลล์ได้มาก ส่งผลให้เซลล์เหี่ยว และหลังจากทำการละลายน้ำเชื้อด้วยน้ำอุ่นแล้ว จะพบว่าเซลล์จะเกิดความเสียหาย ตัวอสุจิจะตาย
2. การลดอุณหภูมิในกระบวนการแช่แข็ง หากทำอย่างรวดเร็ว ใช้เวลาน้อย สิ่งที่เกิดขึ้น คือ ขณะลดอุณหภูมิน้ำภายในเซลล์อสุจิจะแพร่ผ่านผนังเซลล์ออกไปนอกเซลล์ได้น้อย เกิดความสมดุลของสารละลายทั้งภายในและภายนอกเซลล์ เซลล์อสุจิจะเป็นปกติ หลังจากทำการละลายน้ำเชื้อด้วยน้ำอุ่นแล้ว จะพบว่าเซลล์อสุจิจะเกิดความเสียหายน้อย ตัวอสุจิจะมีชีวิตรอดมากขึ้น
3. แม้ว่าอุณหภูมิจะลดลงถึง -5 องศาเซลเซียสแล้ว น้ำภายในเซลล์และสารละลายที่แวดล้อมตัวอสุจิก็ยังไม่เป็นน้ำแข็ง เนื่องจากมีน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ และสาร cryoprotectant จะทำให้จุดเยือกแข็งลดลง
4. แม้ว่าอุณหภูมิจะลดลงถึง -15 องศาเซลเซียสแล้ว พบว่าน้ำภายนอกเซลล์อสุจิเป็นน้ำแข็งแล้ว แต่น้ำภายในเซลล์จะยังไม่เป็นน้ำแข็ง เนื่องจากมีน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ และสาร cryoprotectant
5. อุณหภูมิวิกฤตของน้ำเชื้อแช่แข็งในขณะทำการแช่แข็ง คืออุณหภูมিরะหว่าง -15 ถึง -60 องศาเซลเซียส
6. หากอุณหภูมิต่ำกว่า -130 องศาเซลเซียสแล้ว สภาพภายในเซลล์จะเป็นผลึกที่คงตัว ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงอีก
7. จุดวิกฤตของน้ำเชื้อแช่แข็ง จะเกิด 2 ครั้ง คือ ในการแช่แข็ง และในการละลายน้ำเชื้อในน้ำอุ่นเพื่อนำไปใช้
8. เพื่อลดอันตรายจากการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์อสุจิ และลดการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์มากเกินไป มีความจำเป็นที่จะต้องเติมสาร Cryoprotectant ลงไปในสารเจือจางน้ำเชื้อด้วย สารที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ ได้แก่ Glycerol, Dimethyl sulfoxide, Ethylene glycol, Propylene glycol และสารที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ ได้แก่ Polyvinylpyrrolidone, น้ำตาลซูโครส
9. อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมจากอุณหภูมิ 4 ถึง -15 องศาเซลเซียส แตกต่างกันไปในสัตว์แต่ละชนิด

7. บทสรุป

ในปี 2566 มีเกษตรกรผู้เลี้ยงแพะในประเทศไทย จำนวน 92,862 ราย มีการเลี้ยงแพะทั้งหมดจำนวน 1,568,059 ตัว จำแนกเป็นแพะเนื้อ จำนวน 1,534,178 ตัว และแพะนม จำนวน 33,881 ตัว การผสมพันธุ์แพะส่วนใหญ่ของเกษตรกรจะเป็นการปล่อยให้แพะผสมกันเองภายในฝูง ซึ่งต่อมาเริ่มแสดงให้เห็นถึงปัญหาที่เกิดจากการผสมเลือดชิด คือ ลูกแพะที่เกิดใหม่จะอ่อนแอและมีขนาดเล็กลง สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์ ได้พยายามแก้ไขปัญหาดังกล่าว โดยมีการสร้างพ่อพันธุ์สายพันธุ์แท้จากต่างประเทศด้วยเทคโนโลยีการย้ายฝากตัวอ่อน และสร้างพ่อพันธุ์แพะสายพันธุ์ใหม่ชื่อว่าแดงสุราษฎร์ เพื่อนำมารีดเก็บน้ำเชื้อและผลิตเป็นน้ำเชื้อแช่แข็ง ให้บริการผสมเทียมแม่แพะของเกษตรกร ซึ่งส่งผลให้ปัญหาลูกแพะที่เกิดใหม่อ่อนแอและตัวเล็กลงนั้นเริ่มคลี่คลาย รวมถึงเกษตรกรไม่จำเป็นต้องเลี้ยงแพะเพศผู้เพื่อใช้เป็นพ่อพันธุ์อีกต่อไป เกษตรกรผู้เลี้ยงแพะสามารถใช้บริการผสมเทียมแพะได้จากหน่วยผสมเทียม ของศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพฯ ซึ่งตั้งอยู่ในเขตพื้นที่ต่างๆ ทั่วประเทศ หรือหากเกษตรกรมีความสามารถผสมเทียมแพะเอง

ได้ ก็สามารถรวมเป็นกลุ่ม และขอเบิกน้ำเชื้อแช่แข็งแพะสายพันธุ์ที่ต้องการได้จากหน่วยผสมเทียม หรือ ศูนย์วิจัยการผสมเทียมและเทคโนโลยีชีวภาพฯ เพื่อไปผสมเทียมให้แม่แพะของตนเองและของกลุ่มได้

ส่วนกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งแพะ เนื่องจาก Seminal plasma ของแพะจะทำปฏิกิริยากับไข่แดง ดังนั้นหากใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีไข่แดงเป็นองค์ประกอบ จะต้องทำการปั่นล้างเอา Seminal plasma ทิ้งไปก่อน ซึ่งมีขั้นตอนที่ซับซ้อนยุ่งยากพอสมควร ผู้ผลิตจะต้องตั้งใจและใส่ใจในรายละเอียดของทุกขั้นตอน เพื่อให้ได้น้ำเชื้อที่มีคุณภาพ ซึ่งน้ำเชื้อแช่แข็งจะมีต้นทุนในการผลิตและการเก็บรักษา เช่น ค่าวัสดุที่ใช้ในการผลิต ค่าไนโตรเจนเหลว ค่าอาหารเลี้ยงฟอพันธุ์และตัวล่อ ค่าการจัดการในด้านสุขภาพฟอพันธุ์ เป็นต้น ดังนั้น ในการผลิตควรให้น้ำเชื้อเกิดความเสียหายน้อยที่สุด ส่วนการเก็บรักษา ควรหมั่นเติมไนโตรเจนเหลวในถังเก็บน้ำเชื้อ ไม่ปล่อยให้ไนโตรเจนเหลวแห้ง ซึ่งจะส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อลดลง รวมถึงการแจกจ่ายน้ำเชื้อไปใช้ผสมพันธุ์แม่แพะของเกษตรกร เจ้าหน้าที่ควรตรวจต่อเวลา ควรมีการถ่ายทอดองค์ความรู้ให้กับเกษตรกรในการสังเกตอาการเป็นสัดของแม่แพะ เวลาที่เหมาะสมในการผสมเทียมในแต่ละครั้ง และวิธีการผสมเทียม เพื่อสามารถผสมเทียมได้ในเวลาที่เหมาะสม หรือผสมเทียมได้ด้วยตัวของเกษตรกรเอง และแม่แพะสามารถตั้งท้องและคลอดลูกได้เป็นไปตามตัวชีวิตที่กำหนด เพื่อให้ได้ผลผลิต (Output) ผลลัพธ์ (Outcome) และผลกระทบ (Impact) ตามที่ได้ตั้งไว้

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. 2566. ข้อมูลจำนวนปศุสัตว์ในประเทศไทย ปี 2566. กลุ่มงานสารสนเทศและข้อมูลสถิติ ศูนย์เทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- จตุพร พงษ์เพ็ง และ อภิชัย พูนชัย. 2552. การเปรียบเทียบน้ำยาเจือจาง Egg yolk tris ที่มีไข่แดงนกกระทาไก่และเป็ดเป็นองค์ประกอบต่อคุณภาพ น้ำเชื้อแช่แข็งโค. วารสารเทคโนโลยีเพื่อการปศุสัตว์. 4: 32-43.
- ณรงค์เลี้ยงเจริญ, อนนท์ เทืองสันเทียะ, จตุพร พงษ์เพ็ง และมาลี อภิเมธีธำรง. 2550. การเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งแพะจากการผลิตโดยใช้สารละลายน้ำเชื้อที่มีปริมาณไข่แดง 2.5, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์. สำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์ กรมปศุสัตว์, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.
- รพีพรรณ เอื้อเวชนิชกุล, ณรงค์ เลี้ยงเจริญ และอนนท์ เรืองสันเทียะ. 2548. คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งแพะที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ Biociphos Plus® Bioexcel® และ Egg Yolk Tris. การประชุมวิชาการปศุสัตว์ครั้งที่ 20 ประจำปี 2548 “ ปศุสัตว์ก้าวไกล เกษตรกรไทยก้าวหน้า พัฒนาเศรษฐกิจชาติ”. กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
- Bearden, H.J. and J.W. Fuquay. 1992. Applied animal reproduction.3th ed. prentice-Hall, inc., New jersey.

- Bispo, C. A. S., G. Pugliesi, P. Galvao, M.T. Rodrigues, P.G. Ker, B. Filgueiras and G.R. Carvalho. 2011. Effect of low and high egg yolk concentration in the semen extender for goat semen cryopreservation. *Small Rum. Res.* 100:54-58.
- Buss, E.G. 1993. Cryopreservation of rooster semen. *Poult. sci.* 72:944-954.
- Crespilho, A.C., F.O. Papa, J.A. Dell'Aqua Jr, F. Zahn, A. Martins Jr. and G.H.M. Araujo. 2008. Effect of glycerol concentration on the motility and viability of cooled-stored ram semen. *Reprod. Dom. Anim.* 43:73-74.
- Curry, M. R. 2000. Cryopreservation of sperm from domestic livestock. *Rev. Reprod.* 5: 46-52.
- Hafez, E. S. E. and B. Hafez. 2008. *Reproduction in Farm animals*. 7th ed. phila:Lippicott Williams &wilkin.
- Januskauskas, A., A. Johannisson and H. Rodriguez Martinez. 2003. Subtle changes in cryopreserved bull semen in relation with Sperm viability, chromatin structure and field fertility. *Theriogenology.* 60:743-758.
- Mazur, P. 1984. Freezing of living cells: mechanism and implication. *Am. J. Physio.* 247:125-142.
- Lake, P.E. 1989. Recent progress in poultry reproduction. *World's Poult. Sci.* 45:53-59.
- Ritar, A. J. and S. Salamon. 1982. Effects of seminal plasma and of its removal and of egg yolk in the diluent on the survival of fresh and frozen-thawed spermatozoa of the Angora goat. *Australia Jour Bio Sci.* 35:305-312.
- Schneider, U. and P. Mazur. 1984. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to survival of frozen-thawed embryos. *Therigenology.* 21:68-79.
- Tajima, A. 1995. Effects of cryoprotective agents on the morphology of chicken spermatozoa. In: *Proceedings: First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry*. M.R. Bakst and G. J. Wisharl, editor. *Poult. Sci Association*. Savoy, IL, USA. pp. 287. (ab)
- Thomas, C.A., D.I. Garmer, J.M. de Jarnettle, and C.E. Marshall. 1998. Effect of cryopreservation of bovine sperm organelle function and viability as determined by flow cytometry. *Biol. Rprod.* 58: 786-793.
- Vassilia, J.S., F. Irini and S. Miniadis-Meimaroglou. 2011. Lipid, fatty acid and carotenoid content of edible egg yolks from avian species: A comparative study. *Food. Chem.* 124: 971-977.
- Woelders, H. 1997. Fundamentals and recent development in cryopreservation of bull and boar semen. *Vet Quart.* 19(3):135-138.