ผลของรูปแบบการเก็บรักษาน้ำเชื้อเจือจางรูปแบบเหลว และรูปแบบวุ้นร่วมกับการเสริมกลูตาไธโอนต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 17 องศาเซลเซียส

Effect of Semen Preservation Storage at 17 °C between Liquid and Solid Forms combined with Glutathione Supplementation on Boar Semen Quality

ธีรภัทร แก้วกัณหา[1], วิบัณฑิตา จันทร์กิติสกุล[1,2], วุฒิไกร บุญคุ้ม[1,2] และ เทวินทร์ วงษ์พระลับ[1,2*]

Theerapat Kheawkanha[1], Vibuntita Chankitisakul[1,2], Wuttigrai Boonkum[1,2] and Thevin Vongpralub[1,2*]

บทคัดย่อ: การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปรียบเทียบผลของรูปแบบการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรเจือจางแบบเหลว (ไม่เสริมเจลาติน) และแบบวุ้น (เสริมเจลาติน 1.5 %(w/v)) ร่วมกับการเสริมกลูตาไธโอน 4 ระดับ (0, 0.1, 1 และ 5 mM) ต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรเจือจางเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 17 ^{O}C ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 10 วัน โดยทำการตรวจประเมินคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการเก็บรักษา 1, 4, 7 และ 10 วัน ผลการทดลองพบว่า ภายหลังการเก็บรักษาในวันที่ 1, 4, 7 และ 10 การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบวุ้นรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อได้ดีกว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบเหลว โดยมีอัตราการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ และไมโตคอนเดรียสภาพปกติสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)แต่ไม่แตกต่างกันในด้านอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า (P>0.05) ในวันที่ 10 ของการเก็บรักษาพบว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อเจือจางทั้งสองรูปแบบร่วมกับการเสริมกลูตาไธโอน พบว่าที่ความเข้มข้น 1 และ 5 mM มีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญกว่ากลุ่มที่เสริมระดับ 0.1 และ 0 mM (P<0.05) ส่วนการเก็บรักษาในวันที่ 7 และ 10 พบว่าการเสริมกลูตาไธโอนที่ระดับ 1 mM มีค่าเฉลี่ยของอัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์ของอะโครโซม และไมโตรคอนเดรียสมบูรณ์สูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่เสริมระดับ 0.1 และ 5 mM (P>0.05) ดังนั้นการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบวุ้นสามารถเพิ่มคุณภาพอัตราการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ และไมโตคอนเดรียสภาพปกติ มากกว่ากลุ่มที่เก็บรักษาน้ำเชื้อแบบเหลว อย่างไรก็ตามระดับการเสริมกลูตาไธโอนที่ดีที่สุดร่วมกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อทั้งสองรูปแบบ คือ 1 mM

คำสำคัญ: คุณภาพน้ำเชื้อ, กลูตาไธโอน, เจลาติน, สุกร

ABSTRACT: The aim of this study was to compare two forms of semen preservation, liquid (absence of gelatin)and solid (presence of 1.5% gelatin (w/v)) combined with different concentrations of glutathione supplementation at 4 levels (0, 0.1, 1 and 5 mM) on boar semen quality during storage at 17 ^{O}C for 10 days. Semen samples were evaluated on Days 1, 4, 7 and 10 after storage. The results showed that after storage on Days 1, 4, 7 and 10, percentages of sperm viability, acrosome integrity, and mitochondrial function of solid semen were significantly higher than

Received July 3, 2018
Accepted September 20, 2018

[1] สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002
Department of Animal Science, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen province 40002
[2] กลุ่มวิจัยโคนมทนร้อน มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น 40002
Thermo-tolerance Dairy Cattle Research Group, Khon Kaen University, Khon Kaen province 40002
* Corresponding author: vthevi@kku.ac.th

liquid semen. However, there was no effect on sperm progressive motility (P>0.05). On Day 10, both forms of sperm preservation combined with glutathione at concentration of 1 and 5 mM had higher sperm progressive motility than 0. 1 and 0 mM groups (P<0.05). On Days 7 and 10 of storage, the highest percentages of sperm viability, acrosome integrity, and mitochondrial function in 1 mM of glutathione was found compared with 0 mM but did not differ with 0.1 and 5 mM of glutathione supplementation (P>0.05). Conclusions, solid semen preservation could increase efficiency of percentages of sperm viability, acrosome integrity, and mitochondrial function more than liquid semen preservation group. The best level of glutathione supplementation combined with both forms of semen preservation was 1 mM.
Keywords: Semen quality, glutathione, gelatin, boar

บทนำ

เทคโนโลยีการผสมเทียม (Artificial Insemination) มีบทบาทสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์ และระบบการผลิตสุกรในระบบฟาร์มสมัยใหม่ โดยส่วนใหญ่การผลิตสุกรจะใช้การผสมเทียมมากกว่าผสมตามธรรมชาติ โดยเฉพาะในประเทศที่พัฒนาแล้วมีการผสมพันธุ์แม่สุกรด้วยการผสมเทียมมากถึง 75-80 % (Shinde and Gupta, 2016) โดยเป็นน้ำเชื้อเจือจางในประเทศที่พัฒนาแล้วมีการผสมพันธุ์แม่สุกรด้วยการผสมเทียมมากถึง 75-80 % (Shinde and Gupta, 2016) โดยเป็นน้ำเชื้อเจือจางแบบแช่เย็นในการผสมเทียมมากถึง 99 % (Rodriguez-Gil and Estrada, 2013) น้ำเชื้อเจือจางอาจนำไปผสมเทียม หรือเก็บรักษาแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 15-20 ^{O}C ก่อนนำไปใช้ผสมเทียมสุกร (Riesenbech, 2011) สำหรับน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทตามระยะเวลาในการเก็บรักษา ได้แก่ ระยะสั้น (short - term) และระยะยาว (long - term) (Frydrychová et al., 2010) อย่างไรก็ตามพบว่าข้อจำกัดของการใช้น้ำเชื้อเจือจางแบบแช่เย็น คือมีระยะเวลาการเก็บรักษาสั้น เป็นผลให้อสุจิเสื่อมสภาพอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิของสุกรประกอบด้วยกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (Polyunsaturated fatty acids; PUFA) ปริมาณสูงจึงมีความไวต่อการเกิดความเสื่อมของเยื่อหุ้มเซลล์เนื่องจากสารอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species; ROS) (Awda et al., 2009) และเมื่ออสุจิถูกเก็บรักษาในรูปแบบเหลว อสุจิสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระก่อให้เกิดการใช้พลังงานผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึม ก่อให้เกิดกระบวนการสร้างสารอนุมูลอิสระซึ่งเป็นอันตรายต่อตัวอสุจิ (Nagya et al., 2002; Gadea, 2003) จึงเป็นข้อจำกัดในการขนส่งน้ำเชื้อไปยังที่ห่างไกลที่ใช้เวลายาวนาน ทำให้การใช้ประโยชน์ของพ่อพันธุ์ที่มีสายพันธุกรรมที่ดีลดลง

การศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการใช้น้ำยาเจือจางที่เพิ่มความหนืดโดยการเสริมเจลาตินส่งผลดีต่ออัตราการเคลื่อนที่ อัตราการรอดชีวิต และอัตราการผสมติดในสัตว์หลายชนิด (Nagya et al., 2002; Yániz et al., 2005; Salvador et al., 2006; Corcini et al., 2011) โดยที่อุณหภูมิห้องสารละลายเจลาตินจะอยู่ในรูปของเหลว แต่เมื่อถูกเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 ˚C ความหนืดของสารละลายจะเพิ่มขึ้น และสารละลายเจือจางน้ำเชื้อจะเปลี่ยนเปลี่ยนสภาพเป็นของกึ่งแข็ง (Resseguie, 1981) ส่งผลดีต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อเนื่องจากความหนืดของสารละลายอาจจะไปขัดขวางการเคลื่อนที่ส่งผลให้ความต้องการในการเผาผลาญพลังงานของอสุจิเพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ลดลง และหลีกเลี่ยงการตกตะกอนของอสุจิขณะเก็บรักษา ซึ่งช่วยลดการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมภายในน้ำยาเจือจางทำให้เซลล์อสุจิไม่ได้รับความเสียหาย (Nagya et al., 2002) ระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อสารต้านอนุมูลอิสระในน้ำยาเจือจางมีบทบาทสำคัญต่อการป้องกันอันตรายที่เกิดขึ้นจาก ROS (Funahashi and Sano, 2005) พบว่าการใช้กลูตาไธโอนซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในกลุ่มไธออล ที่พบในน้ำเชื้อสัตว์และมีคุณสมบัติหลายประการ ได้แก่ ป้องกันสภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) (Gadea, 2003) ป้องกันการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation จาก ROS ในกระบวนการเก็บรักษาอสุจิในหลอดทดลอง (Bilodeau et al., 2001) เมื่ออสุจิสุกรที่ถูกเก็บรักษาในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีการเสริม กลูตาไธโอนส่งผลดีต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการเก็บรักษา (Funahashi and Sano, 2005; Zhang et al., 2012; Vongpralub et al., 2016) และแม้ว่าจะมีรายงานวิจัยเรื่องการเสริมกลูตาไธโอนในน้ำยาเจือจางเพื่อ

รักษาคุณภาพน้ำเชื้อเจือจางแบบแช่เย็นมาบ้าง แต่พบว่ายังไม่มีรายงานวิจัยในเรื่องของการเสริมกลูตาไธโอนร่วมกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อเจือจางแบบวุ้นมาก่อน ซึ่งเป็นไปได้ว่าจะส่งผลดีต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรยิ่งขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการเสริมกลูตาไธโอนร่วมกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อเจือจางแบบแช่เย็น เนื่องจากน้ำเชื้อเจือจางแบบวุ้นอาจจะขัดขวางการเคลื่อนที่อสุจิ และหลีกเลี่ยงการตกตะกอนของอสุจิขณะทำการเก็บรักษา ทำให้เซลล์อสุจิไม่ได้รับความเสียหายขณะเก็บรักษา ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อระหว่างวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เหลว และแบบวุ้นร่วมกับการเสริมกลูตาไธโอนที่อุณหภูมิ 17 ^{O}C ภายหลังการเก็บรักษาเวลา 10 วัน ซึ่งอาจเป็นแนวทางที่สามารถปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการเก็บรักษาให้มีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น เป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรระดับครัวเรือนที่อยู่ระยะห่างไกล และฟาร์มสุกรขนาดเล็กที่ไม่มีตู้เก็บรักษาน้ำเชื้อที่ควบคุมภูมิในอนาคตต่อไป

วิธีการศึกษา

สัตว์ทดลอง

ตัวอย่างน้ำเชื้อได้รับจากศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สุกร บริษัท เบทาโกร จำกัด จังหวัดขอนแก่น ประเทศไทย การทดลองใช้สุกรพ่อพันธ์ทางการค้าอายุระหว่าง 1-2 ปี จำนวน 8 ตัว ถูกเลี้ยงแบบแยกคอกรายตัวในโรงเรือนระบบปิด โดยสุกรได้รับน้ำแบบเต็มที่จากเครื่องให้น้ำอัตโนมัติ และได้รับอาหารตามความต้องการในการให้ผลผลิตผลิตน้ำเชื้อ ทั้งนี้สุกรมีความสมบูรณ์พันธุ์ สุขภาพแข็งแรง และถูกใช้สำหรับการผสมเทียมในงานประจำวัน

น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ

สารเคมีทั้งหมดของการศึกษาครั้งนี้ถูกจัดซื้อจาก Sigma-Aldrich ซึ่งน้ำยาเจือจางสูตร Butsehwiller ประกอบด้วย กลูโคส 35.00 g., โซเดียมซิเตรต 6.90 g., EDTA 2.25 g., โซเดียมไบคาร์บอเนต 1.00 g., BSA 3.00 g., Tris 5.60 g., กรดซิตริก 3.15 g., แอลซิเตอีน 0.05 g., พิโนมัยซิน 1.00 g/L (ไม่มีส่วนประกอบของเจลาติน และ กลูตาไธโอน) ถูกนำมาใช้เป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อพื้นฐาน สำหรับน้ำยาเจือจางสูตร Butsehwiller กลุ่มที่เสริมเจลาติน 1.5 % ถูกเตรียมที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C ภายหลังการทำละลายน้ำยาเจือจางและเจลาตินเป็นเนื้อเดียวกัน บรรจุใส่หลอดทดลองขนาด 50 ml. และปิดผลึกหลอด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 ^{O}C และทำการอุ่นน้ำยาเจือจางที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนการใช้งาน

การรีดน้ำเชื้อ และการเตรียมสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ

ภายหลังการรีดเก็บน้ำเชื้อด้วยวิธีการบีบนวด การบีบนวดบริเวณปลายลึงค์ (Gloved hand technique) และเก็บน้ำเชื้อเฉพาะน้ำเชื้อส่วนที่มีอสุจิมาก (sperm rich fraction) (Vongpralub et al., 2016) ตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นด้วยโปรแกรมตรวจนับ Motility Concentration CASA dynamic swine sperm (Pornchai intertrade Part., Ltd., Thailand) คัดเลือกน้ำเชื้อที่มีอัตราการเคลื่อนที่มากกว่า 80 % มาใช้ในการทดลอง

ทำการเตรียมน้ำยาเจือจางเชื้อสองแบบคือ 1) สูตร Butsehwiller ที่มีการเสริมเจลาติน 1.5 % ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เคยมีรายงานการใช้ และให้ผลการทดลองที่มีประสิทธิภาพในแกะ (Yániz et al., 2005) แพะ (Salvador et al., 2006) และสุกร (Corcini et al., 2011) และ 2) สูตรที่ไม่มีเจลาติน นอกจากนี้ยังมีการเสริมกลูตาไธโอนในระดับที่แตกต่างกัน คือ 0, 0.1, 1 และ 5 mM โดยอัตราส่วนน้ำเชื้อสด (Fresh semen) ต่อน้ำยาเจือจางในแต่ละทรีทเมนต์เท่ากับ 1:1 ในหลอดทดลองขนาด 50 ml. ที่อุณหภูมิ 35°C จากนั้นทำการเก็บน้ำเชื้อที่อุณหภูมิห้องในกล่องทึบแสงเพื่อนำกลับมาตรวจประเมินความเข้มข้นของน้ำเชื้อที่ห้องปฏิบัติการภายในเวลา 1 ชั่วโมง ภายหลังจากตรวจวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำเชื้อทำการเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางสูตร Butsehwiller ที่มีการเสริมเจลาติน และไม่มีเจลาตินร่วมกับการเสริมกลูตาไธโอนในระดับที่ต่างกัน ภายหลังการเจือจางมีความเข้มข้นของอสุจิที่ 3 x 10^{7} sperm/ml. แต่ละกลุ่มถูกนำไปใส่ในหลอดทดลอง ขนาด 15 ml. ปริมาตรหลอดละ 5 ml. จำนวน 4 ตัวอย่างย่อย ทำการเก็บรักษาหลอดน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 17 ^{O}C เพื่อใช้ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อในวันที่ 1, 4, 7 และ 10 ของการเก็บรักษา (**Figure 1**)

แก่นเกษตร 47 (2) : 225-234 (2562). /doi: 10.14456/kaj.2019.26

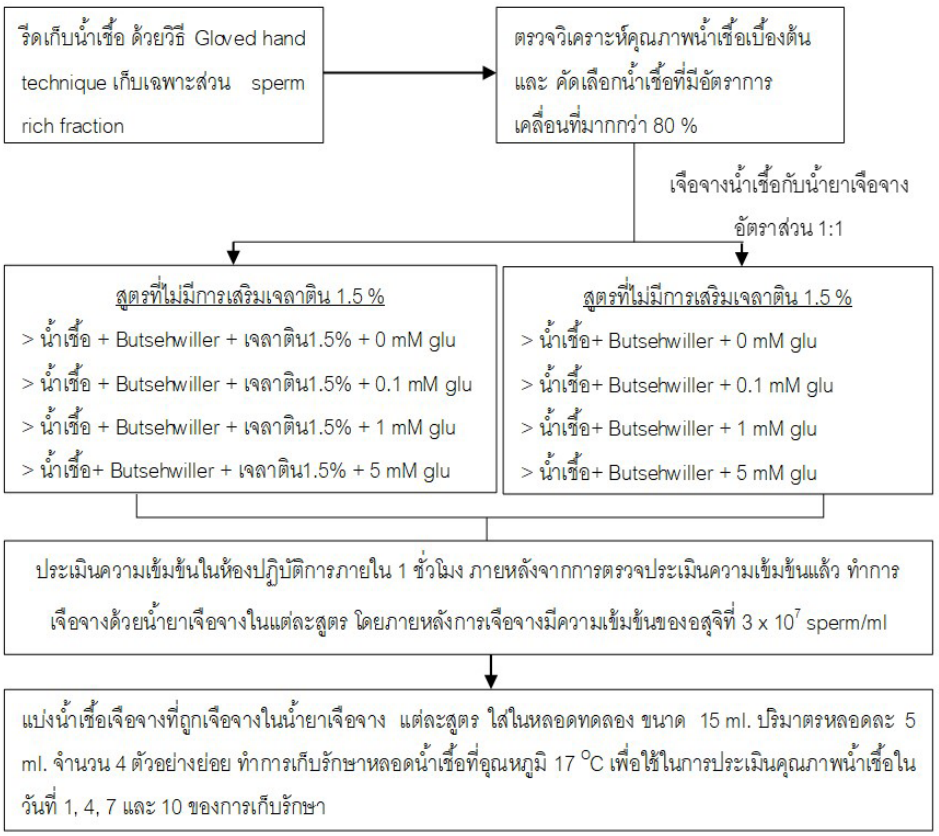

Figure 1 Experimental method.

แผนการทดลอง และการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การศึกษาครั้งนี้มีปัจจัยที่สนใจศึกษาทั้งหมด 3 ปัจจัยได้แก่ ปัจจัยที่ 1 รูปแบบการเก็บรักษาน้ำเชื้อมี 2 รูปแบบ คือ รูปแบบเหลว และรูปแบบวุ้น ปัจจัยที่ 2 ปริมาณของกลูตาไธโอนที่ใช้ในน้ำเชื้อมี 4 ระดับ (0, 0.1, 1, 5 mM) และปัจจัยที่ 3 ระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อมี 4 ระดับ (วันที่ 1, 4, 7, 10) โดยดูข้อมูลอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ และไมโตคอนเดรียสภาพปกติ ถูกวิเคราะห์ภายใต้แผนการทดลอง Split-plot ที่จัด main plot แบบ 2 x 4 factorial in CRD และจัด sub plot เป็น time factor (Steel and Torrie, 1980) ด้วยวิธี General Linear Model (GLM) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละปัจจัยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS 9.0

การตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการเก็บรักษา

ตัวอย่างน้ำเชื้อเจือจางปริมาตรหลอดละ 5 ml. จากแต่ละทรีทเมนต์ ถูกนำมาตรวจวิเคราะห์การทดลองในวันที่ 1, 4, 7 และ 10 ภายหลังการเก็บรักษา โดยก่อนตรวจวิเคราะห์จะนำน้ำเชื้อมาอุ่นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที

การตรวจวิเคราะห์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ

การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิประเมินโดยการหยดน้ำเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ปริมาตร 3-5 µl. จากนั้นปิดด้วยแผ่นปิดกระจกสไลด์ ทำการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Olympus รุ่น CH30, Tokyo, Japan) โดยใช้กำลังขยาย 400 เท่า นับตัวที่เคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้าจำนวน 300 ตัว และประเมินเป็นร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ

การประเมินอัตราการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ และไมโตคอนเดรียสภาพปกติ

การตรวจประเมินอัตราการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ และไมโตคอนเดรียสภาพปกติด้วยการย้อมด้วยสารเรืองแสง (Fluorescent multiple staining; FMS) ซึ่งมีการดัดแปลงจากวิธีการของ Vongpralub et al. (2016) โดยนำน้ำเชื้อมาอุ่นที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C เวลา 30 นาที ก่อนย้อมสี จากนั้นเตรียมตัวอย่างน้ำเชื้อตัวอย่างละ 150 µl. ใส่หลอดทดลองขนาด 1.5 ml. ผสมกับ Propidium iodide (PI) ปริมาตร 2 µl. fluorescein isothiocyanate-conjugated with Arachis hypogaea agglutinin from peanut (FITC-PNA) ปริมาตร 5 µl. และ 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolyy-carbocyanine iodide (JC-1) ปริมาตร 2 µl. บ่มในความชื้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ตรวจประเมินด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดเรืองแสง (fluorescent microscope in triple fitter; Inverted microscope with micromanipulartor Olympus IX71) ที่กำลังขยาย 400 เท่า นับอสุจิทั้งหมดจำนวน 300 ตัว/ตัวอย่าง ซึ่งหลักการย้อมสีสารเรืองแสงนั้นอาศัยหลักการซึมผ่านของสารเรืองแสงเข้าสู่เซลล์อสุจิ โดยจัดกลุ่มอสุจิที่ส่วนหัวไม่ติดสี และมีไมโตรคอนเดรียสีส้มอมแดงเป็นกลุ่มอสุจิมีชีวิตอะโครโซมสมบูรณ์ และไมโตรคอนเดรียมีพลังงานสูง

ผลการศึกษา

การทดลองเพื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของรูปแบบการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เหลว และแบบวุ้นร่วมกับการเสริมกลูตาไธโอนต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 17 ^{O}C ภายหลังการเก็บรักษาเวลา 10 วัน ใช้ตัวอย่างน้ำเชื้อสดจากสุกรพ่อพันธุ์จำนวน 8 ตัว มีปริมาตรน้ำเชื้อสดเฉลี่ยเท่ากับ 276.75±73.26 ml. ความเข้มข้นของอสุจิเท่ากับ 343.75±53.88 x 106 sperm/ml. จำนวนอสุจิที่เคลื่อนที่รวมเท่ากับ 96.00± 2.00 % และค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเชื้อเท่ากับ 7.47±0.18

Table 1 Physiochemical parameters of fresh semen after ejaculation

Fresh semen parameters (n=8)			
Volume (ml)	Sperm concentration (10^6sperm/ml)	Total sperm motility (%)	pH
276.75 ± 73.26	343.75 ± 53.88	96.00 ± 2.00	7.47 ±0.18

การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนคุณภาพของอสุจิเจือจางที่ทำการเก็บรักษาแบบเหลว และแบบวุ้นร่วมกับการเสริมกลูตาไธโอนต่อคุณภาพน้ำเชื้อสุกรที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 17 ˚C ภายหลังการเก็บรักษาเวลา 10 วัน ในด้านอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิพบว่า การเสริมกลูตาไธโอนในระดับที่แตกต่างกัน (P<0.05) และระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการเก็บรักษาทั้งสองรูปแบบ (P<0.05) แต่อย่างไรก็ตามรูปแบบการเก็บรักษาน้ำเชื้อเจือจางไม่ส่งผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (P>0.05) ขณะที่ในด้านอัตราการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ และไมโตคอนเดรียสภาพปกติ พบว่าการเสริมกลูตาไธโอนในระดับที่แตกต่างกัน (P<0.05) และระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ (P<0.05) รวมทั้งรูปแบบการเก็บรักษาน้ำเชื้อรูปแบบเหลว และรูปแบบวุ้นส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการเก็บรักษาทั้งสองรูปแบบ (P>0.05) ดังแสดงใน **Table 2**

การศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบการเก็บรักษาน้ำเชื้อสุกรเจือจางระหว่างการเก็บรักษาแบบวุ้นและการเก็บรักษาแบบเหลว พบว่ารูปแบบการเก็บรักษาน้ำเชื้อทั้งสองรูปแบบไม่ส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อเจือจางในด้านอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ (P>0.05) แต่ส่งผลต่ออัตราการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ และไมโตคอนเดรียสภาพปกติภายหลังการเก็บรักษาในวันที่ 1, 4, 7 และ 10 ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อเจือจางสุกรแบบวุ้นนั้นส่งผลให้อัตราการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิที่มีอะโครโซม

 แก่นเกษตร 47 (2) : 225-234 (2562). /doi: 10.14456/kaj.2019.26

Table 2 Summary of analysis of variance for progressive motility and sperm viability, acrosome integrity, and mitochondrial function of different sperm preservation model between liquid semen and solid semen combined with various glutathione concentrations and stored for 10 days after cooling storage at 17 ^{O}C

Source of variation	Level of significance Progressive motility (P-value)	Level of significance Viability, Acrosome integrity, and Mitochondrial function (P-value)
Preservation model (Pre)	0.2780	0.0309
Glutathione (Glu)	0.0006	0.0002
Day of storage (Day)	<.0001	<.0001
Pre x Glu	0.9996	0.6607
Pre x Day	0.4406	0.8219
Glu x Day	0.0180	<.0001
Pre x Glu x Day	0.9978	0.6477

สมบูรณ์ และไมโตคอนเดรียสภาพปกติสูงกว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อเจือจางแบบเหลวในทุกวันที่ทำการตรวจประเมินคุณภาพ (P<0.05) ดังแสดงใน Table 3

การศึกษาเปรียบเทียบรูปแบบการเก็บรักษาน้ำเชื้อร่วมกับการเสริมกลูตาไธโอน พบว่ากลุ่มที่เสริมกลูตาไธโอนที่ระดับ 1 และ 5 mM มีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้ามากกว่ากลุ่มที่เสริมกลูตาไธโอนที่ระดับ 0.1 และ 0 mM (P>0.05) ในวันที่ 10 ของการเก็บรักษาทั้งแบบเหลว และแบบวุ้น ขณะที่ในวันที่ 7 และ 10 ของการเก็บรักษาทั้งสองรูปแบบพบว่ากลุ่มที่เสริมกลูตาไธโอนที่ระดับ 1 mM มีค่าเฉลี่ยของอัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์ของ อะโครโซม และไมโตรคอนเดรียสมบูรณ์สูงที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่เสริมกลูตาไธโอนที่ระดับ 0.1 และ 5 mM (P<0.05) นอกจากนี้พบว่าระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อยังส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อที่ลดลงภายหลังการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น (P>0.05) ดังแสดงใน Table 3

วิจารณ์

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบวุ้นดีกว่าการเก็บรักษาแบบเหลวโดยพบว่าส่งผลดีต่ออัตราการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ และไมโตคอนเดรียสภาพปกติ เมื่อเสริมกลูตาไธโอนร่วมกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อเจือจางทั้งสองรูปแบบพบว่าที่การเสริมระดับ 1 mM รักษาคุณภาพน้ำเชื้อได้ดีที่สุด โดยมีแนวโน้มส่งผลดีต่ออัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของอสุจิ อัตราการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ และไมโตคอนเดรียสภาพปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าระยะเวลาการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้นทำให้อสุจิเกิดความเสียหายเพิ่มขึ้น

ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อเจือจางแบบวุ้นพบว่าไม่ส่งผลอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า แต่ส่งผลดีต่ออัตราการมีชีวิต ความสมบูรณ์ของ อะโครโซม และไมโตรคอนเดรียสมบูรณ์ที่เก็บรักษาในวันที่ 1, 4, 7 และ 10 เมื่อเทียบกับกลุ่มที่เก็บรักษาน้ำเชื้อแบบเหลว เนื่องจากเจลาตินมีคุณสมบัติเป็น Collagen hydrolyzate สามารถละลายน้ำได้ สารละลาย เจลาตินจะอยู่ในรูปของเหลวที่อุณหภูมิห้อง เมื่อถูกเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 ^{O}C ความหนืดของสารละลายจะเพิ่มขึ้น และเปลี่ยนแปลงสภาพเป็นของกึ่งแข็ง (Resseguie, 1981) เมื่ออสุจิถูกเก็บรักษาในน้ำยาเจือจางที่มีการเสริมเจลาตินขณะการเก็บรักษาภายใต้อุณหภูมิ 17 ^{O}C ความหนืดของสารละลายอาจจะขัดขวางการเคลื่อนที่ของอสุจิส่งผลให้ความต้องการในการเผาผลาญพลังงานของอสุจิเพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ลดลง และหลีกเลี่ยงการตกตะกอนของอสุจิขณะทำการเก็บรักษาซึ่งช่วยลดการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมภายในน้ำยาเจือจาง ทำให้เซลล์อสุจิไม่ได้รับความเสียหาย

Table 3 Effect of different sperm preservation model between liquid semen and solid semen combined with glutathione at various concentrations on progressive motility and viability, acrosome integrity, and mitochondrial function percentage of boar sperm at Day 1, 4, 7 and 10 after cooling at 17 ^{O}C

Parameters	Day of storage	Treatments							
		(-) Gelatin				(+) Gelatin			
		Concentration of Glutathione (Mm)				Concentration of Glutathione (Mm)			
		0	0.1	1	5	0	0.1	1	5
Progressive motility (%)	1	83.87 ± 0.91^{A}	84.58 ± 1.58^{A}	85.07 ± 0.63^{A}	81.97 ± 1.86^{A}	85.07 ± 0.68^{A}	86.20±1.15^{A}	85.28 ± 1.93^{A}	84.38 ± 0.90^{A}
	4	80.69 ± 1.16^{B}	81.30 ± 1.44^{B}	81.19 ± 1.08^{B}	81.11 ± 1.19^{A}	80.02 ± 1.08^{B}	81.16±1.34^{B}	81.36 ± 0.97^{B}	80.81 ± 0.60^{B}
	7	73.77 ± 0.96^{C}	74.86 ± 0.92^{C}	76.06 ± 1.08^{C}	75.59 ± 1.08^{B}	73.46 ± 0.97^{C}	74.64±1.08^{C}	76.49 ± 1.28^{C}	75.69 ± 0.85^{C}
	10	61.88 ± 1.65^{bD}	65.07 ± 1.13^{abD}	68.13 ± 0.89^{aD}	68.07 ± 2.07^{aC}	63.02 ± 1.37^{bD}	65.48±0.84a^{bD}	69.17 ± 0.73^{aD}	68.38 ± 1.65^{aD}
Viability, Acrosome integrity, and Mitochondrial function (%)	1	81.27 ± 1.67^{A*}	83.08 ± 1.81^{A*}	81.05 ± 2.92^{A*}	81.18 ± 1.27^{A*}	84.41 ± 0.89^{A**}	82.44±1.70^{A**}	84.963 ± 1.21^{A**}	83.95 ± 1.09^{A**}
	4	74.76 ± 0.92^{B*}	77.88 ± 2.13^{B*}	80.09 ± 1.59^{A*}	78.22 ± 1.51^{B*}	76.17 ± 1.35^{B**}	79.94±1.02^{A**}	79.94 ± 2.20^{B**}	77.94 ± 2.06^{B**}
	7	66.07 ± 2.08^{bC*}	66.13 ± 4.41^{bC*}	73.91 ± 1.46 ^{abB*}	72.91 ± 2.16^{abC*}	69.36 ± 3.28 ^{abC**}	72.02±2.49^{abB**}	76.07 ± 1.14^{aC**}	71.76 ± 1.89^{abC**}
	10	52.81 ± 3.37^{cD*}	68.49 ± 2.31^{aD*}	68.51 ± 2.18^{aC*}	68.96 ± 1.57^{aD*}	60.42 ± 1.58^{bD**}	68.60 ± 2.99^{aB**}	70.38 ± 1.97^{aD**}	69.00 ± 0.77^{aD**}
P-value		---------- >0.05 ----------							

*,** Different super script within row indicated a highly significant difference (P<0.05), ± Standard error of mean (SEM)

$^{a, b, c}$ Different super script within row indicated a highly significant difference (P<0.05), ± Standard error of mean (SEM)

$^{A, B, C, D}$ Different super script within column indicated a highly significant difference (P<0.05), ± Standard error of mean (SEM)

(Nagya et al., 2002) สอดคล้องกับงานทดลองที่ผ่านมาในสัตว์ชนิดอื่น (Yániz et al, 2005; Salvador et al., 2006; Corcinai et al., 2011) ในทางตรงกันข้ามการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบเหลวนั้นอสุจิสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างอิสระก่อให้เกิดการใช้พลังงานผ่านกระบวนการเมตาบอลิซึมเกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระ (Gadea, 2003) เมื่อผ่านกระบวนการเก็บรักษาจะเกิดการตกตะกอนของอสุจิ ส่งผลให้ความเป็นกรด-ด่างในน้ำยาเจือจางเปลี่ยนแปลง และมีการเพิ่มขึ้นของสารพิษที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึม (Nagya et al., 2002) ส่งผลให้อสุจิเกิดความเสียหายขณะทำการเก็บรักษา นอกจากนี้ยังมีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงกระบวนการตายภายในเซลล์อสุจิ (apoptotic-like changes) เช่น เกิดการเสื่อมของเยื่อหุ้มไมโตรคอนเดรีย และการเปลี่ยนแปลงของ phosphatidylserine จากภายในออกสู่ภายนอกของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิลดลง ซึ่งการเสื่อมของเยื่อหุ้มไมโตรคอนเดรียมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมากของอสุจิที่ผิดปกติ และการลดลงของอัตราการผสมติด (Anaya et al., 2013)

อสุจิสามารถเกิดความเสียหายเนื่องจากกระบวนการออกซิเดชัน (oxidation damage) มีสาเหตุมาจากการสร้าง ROS โดยเซลล์อสุจิระหว่างการเก็บรักษาได้แก่ superoxide anion radical, hydrogen peroxide radical และ lipid hydroperoxide เป็นสาเหตุที่ทำให้คุณภาพของอสุจิลดลง (Alvarez and Storey, 2005) จากการศึกษาก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่าเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิสุกรประกอบด้วย PUFA ปริมาณสูงจึงมีความไวต่อการเกิดความเสื่อมของเยื่อหุ้มเซลล์เนื่องจากสารอนุมูลอิสระ ROS (Awda et al., 2009) ดังนั้นอนุมูลอิสระจำเป็นต้องถูกกำจัดโดยการเติมสารต้านอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อเจือจางทั้งสองรูปแบบร่วมกับการเสริมกลูตาไธโอนที่ระดับ 1 และ 5 mM ส่งผลดีต่ออัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของการเก็บรักษาในวันที่ 10 และเมื่อเสริมที่ระดับ 1 mM ทำให้อัตราการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ และไมโตคอนเดรียสภาพปกติสูงที่สุด เนื่องจากกลูตาไธโอนเป็นสารต้านอนุมูลอิสระกลุ่มไธออลพบในน้ำเชื้อมีบทบาทในการป้องกันภายในเซลล์อสุจิจากสภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) (Gadea, 2003) ป้องกันการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation จาก ROS ในกระบวนการเก็บรักษาอสุจิในหลอดทดลอง (Bilodeau et al., 2001) ช่วยป้องอสุจิไม่ให้เกิดความเสียหายขณะทำการเก็บรักษา สอดคล้องกับการทดลองที่ผ่านมาโดย Joaquin et al. (2015) พบว่าการเสริมกลูตาไธโอนที่ระดับ 1 และ 5 mM ลงในน้ำยาเจือจางแช่แข็งน้ำเชื้อสุกรช่วยให้ลดการเกิด capacitation จึงส่งผลดีต่อไมโตคอนเดรียของอสุจิในขณะเก็บรักษา Zhang et al. (2012) รายงานว่าการเสริมกลูตาไธโอนในน้ำยาเจือจางแบบแช่เย็นที่ระดับ 1, 5 และ 10 mM ส่งผลดีต่อความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตรอดของอสุจิ และ Vongpralub et al. (2016) พบว่าการเสริมกลูตาไธโอนที่ระดับ 0.1, 1และ 5 mM ช่วยปรับปรุงให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิดีขึ้น และถึงแม้ว่าในการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการเสริมกลูตาไธโอน 0.1, 1 และ 5 mM ส่งผลดีต่ออัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าและอัตราการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ และไมโตคอนเดรียสภาพปกติที่ไม่แตกต่างกัน แต่พบว่าที่ระดับการเสริมที่ 1 mM ส่งผลให้ค่าเฉลี่ยในแต่ละค่าสังเกตสูงที่สุด

ภายหลังการเก็บรักษาน้ำเชื้อเจือจางทั้งสองรูปแบบ ร่วมกับการเสริมกลูตาไธโอนที่เก็บรักษาเป็นเวลา 10 วัน พบว่าคุณภาพของน้ำเชื้อลดลงภายหลังการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ การแตกหักของโครมาตินเพิ่มขึ้น และมีการทำงานของอะโครซินลดลง (Yeste, 2017) แต่การศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบวุ้นร่วมกับการเสริมกลูตาไธโอนที่ระดับ 1 mM สามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ยาวนานขึ้น ซึ่งอาจเกิดจากบทบาทหน้าที่ที่ต่างกันของเจลาติน และกลูตาไธโอนที่ส่งผลต่ออสุจิขณะเก็บรักษา โดยในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อมีการลดอุณหภูมิจากน้ำเชื้อเจือจางไปที่มีอุณหภูมิประมาณ 28-25 ^{o}C ไปยังอุณหภูมิที่ทำการเก็บรักษาที่ 17 ^{o}C ก่อให้เกิดความเครียดทางกายวิภาค และทางเคมีบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ทำให้อัตราการมีชีวิต และอัตราในการผสมติดลดต่ำลง (Gadea et al., 2005) ความเครียดเนื่องจากความเย็นของอสุจิเกี่ยวกับ oxidative stress โดยการสร้าง ROS (Johnson et al., 2000) การเสริมกลูตาไธโอนลงในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสุกรทำให้ความเสียหายของอสุจิลดลง เนื่องจากกลูตาไธโอนมีบทบาทในการป้องกันภายในเซลล์อสุจิจาก oxidative stress (Gadea,

2003) ลำดับต่อมาเมื่ออุณหภูมิในการเก็บรักษาลดต่ำกว่า 20 ^{O}C สารละลายเจลาตินจะเปลี่ยนสถานะเป็นสารกึ่งแข็ง อาจช่วยลดความเสียหายจากสารพิษที่ได้รับจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของอสุจิ และค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายไม่เปลี่ยนแปลง (Nagya et al., 2002; Gadea, 2003)

โดยสรุปการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อเจือจางรูปแบบวุ้นดีกว่าแบบเหลวโดยส่งผลดีต่อคุณภาพน้ำเชื้อในด้านอัตราการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ และไมโตคอนเดรียสภาพปกติ ภายหลังการเก็บรักษาภายระยะเวลา 10 วัน เมื่อทำการเก็บรักษาทั้งสองรูปแบบร่วมกับการเสริมกลูตาไธโอน พบว่าที่ระดับการเสริม 1 mM นั้นดีที่สุด โดยส่งผลดีต่ออัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า อัตราการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิที่มีอะโครโซมสมบูรณ์ และไมโตคอนเดรียสภาพปกติ อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นเพียงความแตกต่างของรูปแบบการเก็บรักษาน้ำเชื้อร่วมกับการเสริมกลูตาไธโอนในห้องปฏิบัติการเท่านั้น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบรูปแบบการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่แตกต่างกันร่วมกับการเสริมกลูตาไธโอนไปใช้ในงานผสมเทียมเพื่อทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการเก็บรักษา รวมทั้งเพื่อใช้ในการตัดสินใจเลือกใช้วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อเจือจางร่วมกับการเสริมกลูตาไธโอนที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ผสมเทียมในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรระดับครัวเรือนที่อยู่ระยะห่างไกลและฟาร์มสุกรขนาดเล็กต่อไป

คำขอบคุณ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย (สกว.) ที่สนับสนุนทุนวิจัยภายใต้โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก.) รุ่น 18 ระดับปริญญาเอก ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อพันธ์สุกร บริษัท เบทาโกร จำกัด อ. กระนวน จ. ขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างน้ำเชื้อสุกร กลุ่มวิจัยโคนมทนร้อน มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่สนับสนุนสารเคมีบางส่วนในการวิจัย และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ สาขาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่เอื้อเฟื้อที่เอื้อเฟื้ออนุเคราะห์สถานที่ในการทำงานวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Alvarez, J. G., and B. T. Storey. 2005. Differential incorporation of fatty acids into and peroxidative loss of fatty acids from phospholipids of human spermatozoa. Mol. Reprod. Dev. 42:334-346.

Anaya, M. C. G., F. J. Francisco, J. M. Guerrero, L. J. G. Marín, and J. Gil. 2013. Increasing Extender Viscosity Improves the Quality of Cooled Boar Semen. J. Agr. Sci. 6:12-22.

Awda, G. J., B. M. Mackenize, and M. M. Buhr. 2009. Reactive oxygen species and boar sperm function. Biol. Reprod. 81:553-561.

Bilodeau, J. F., S. Blancette , C. Gagnon, and M. A. Sirad. 2001. Thiols prevent H2O2 – mediated loss of sperm motility in cryopreserved bull semen. Theriogenology. 56:275-286.

Corcini, C. D., F. Moreira, R. Pigozzo, A. S. Varela, N. U. Torres, and T. Lucia. 2011. Semen quality and reproductive performance after artificial insemination with boar sperm stored in a gelatin-supplemented extender. Livest. Sci. 138:289-292.

Frydrychová, S., J. Cerovsky, A. Lustykova, and M. Rozkot. 2010. Effects of long - term liquid commercial semen extender and storage time on the membrane quality of boar semen. Czech J. Anim. Sci. 55: 160-166.

Funahashi, H., and T. Sano. 2005. Select antioxidants improve the function of extended boar semen stored at 10 ˚C. Theriogenology. 63:1605-1616.

Gadea, J. 2003. Review: Semen extenders used in the artificial insemination of swine. Span J. Agric. Res. 1:17-27.

Gadea, J., F. García-Vazquez, C. Matás, J.C. Gardón, S. Cánovas, and D. Gumbao. 2005. Cooling and freezing of boar spermatozoa: supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. J. Androl. 26:396-404.

Joaquin, G., F. G. Vazquez, C. Mats, J. C. Groden, S. Canovas, and D. Gumbao. 2015. Cooling and freezing of boar spermatozoa: Supplementation of the freezing media with reduced glutathione preserves sperm function. J. Androl. 26:396-404.

Johnson, L. A., K. F. Weitz, P. Fisher, and W. M. C. Maxwell. 2000. Storage of boar semen. Anim. Reprod. Sci. 62:143-172.

Nagya, Z. S., G. Y. Sinkovics, and A. Kovács. 2002. Viability and acrosome integrity of rabbit spermatozoa processed in a gelatin-supplemented extender. Anim. Reprod. Sci. 70:283-286.

Resseguie, W. D., B. L. Hughes, J. E. Jones, and R. J. Thurston. 1981. An evaluation of gelatin as a diluent component for storage of chicken semen. Poult. Sci. 60:469-476.

Riesenbech, A.2011. Review on international trade with boar semen. Reprod. Domest. Anim. 41:1-3.

Rodriguez-Gil, J. E., and E. Estrada. 2013. Artificial insemination in boar reproduction. Boar Reproduction. Springer, Berlin, Heidelberg.

Salvador, I., J. Ya´niz, M. P. Viudes-de-Castro, E. A. Go´mez, and M. A. Silvestre. 2006. Effect of solid storage on caprine semen conservation at 5 °C. Theriogenology. 66:974-981.

Shinde, P. K., and S. K. Gupta. 2016. Scientific artificial insemination in swine. Asian J. Animal Sci. 11:60-64

Steel, R. G. D., and J. H. Torrie. 1980. Principle and procedures of statistics: A Biomaterial Approach 2nd. McGraw Hill Book Co, New York.

Vongpralub, T., P. Thananurak, C. Sittikasamkit, P. Chuawongboon, M. Duangjinda, W. Boonkum, and V. Chankitisakul. 2016. Comparison of Effects of Different Antioxidants Supplemented to Long-term Extender on Boar Semen Quality Following Storage at 17ºC. Thai J. Vet. Med. 46:119-126.

Yániz, J., J. L. Martí, M. A. Silvestre, J. Folch, P. Santolaria, J. L. Alabart, and F. López-Gatius. 2005. Effects of solid storage of sheep spermatozoa at 15ºC on their survival and penetrating capacity. Theriogenology. 64:1844-1851.

Yeste, M. 2017. State-of-the-art of boar sperm preservation in liquid and frozen state. Anim. Reprod.14:69-81.

Zhang, W., K. Yi, C. Chen, X. Hou, and X. Zhou. 2012. Application of antioxidant and centrifugation for cryopreservation of boar spermatozoa. Anim. Reprod. Sci. 132: 123-128