เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2549;4(1):11-17.

นิพนธ์ต้นฉบับ

ผลของการยกหลอดน้ำเชื้อขึ้นเหนือระดับไนโตรเจนเหลวต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิโค

สราวุธ ฉายประสาท,[1] วิญญู เบ็ญจกุล,[2] อภิชาติ ชาติเชื้อ,[1] พิชิตดวง เจิมปลั่ง,[1] วีระศักดิ์ ปัญญาพรวิทยา[3]

[1]ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อโคพันธุ์โครงการหลวงอินทนนท์ อ. แม่วาง,
[2]ศูนย์วิจัยการผสมเทียม และเทคโนโลยีชีวภาพ,
[3]สาขาวิชาคลินิกสัตว์เคี้ยวเอื้อง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่

บทคัดย่อ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของจำนวนครั้งที่ใช้ในการยกน้ำเชื้อและเวลาที่ใช้ในการยกน้ำเชื้อต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ โดยนำน้ำเชื้อแช่แข็งจำนวน 90 หลอดจากพ่อพันธุ์โคมาแบ่งออกโดยการสุ่มจำนวน 10 หลอดต่อกลุ่มตามจำนวนครั้งของการยก (No=3, 6 และ 9 ครั้ง) และเวลาที่ใช้ในการยก (T=3, 5 และ 7 วินาที) ในแผนการทดลอง 3 x 3 แฟคทอเรียลในการสุ่มแบบสมบูรณ์ ทำการละลายน้ำเชื้อและประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยโปรแกรม SAS ด้วยคำสั่ง PROC GLM เพื่อหาความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในแต่ละกลุ่ม ผลการศึกษาพบว่าอิทธิพลร่วมระหว่างจำนวนครั้งที่ยกและเวลาที่ยกมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิมีค่าสูงในกลุ่ม No3T3 (ยก 3 ครั้ง ครั้งละ 3 วินาที) No6T3 และ No3T5 ซึ่งมีค่า 50.00±0.00%, 48.83±2.15% และ 49.66±1.26% ตามลำดับ ส่วนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิมีค่าต่ำในกลุ่ม No9T7, No9T5 และ No6T7 ซึ่งมีค่า 28.33±2.39%, 33.80±4.44% และ 33.33±4.01% ตามลำดับ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิต่ำลงเมื่อจำนวนครั้ง และระยะเวลาที่ใช้ในการยกมากขึ้น **เชียงใหม่สัตวแพทยสาร** 2549;4(1):11-17.

คำสำคัญ: จำนวนครั้งการยก ระยะเวลาที่ยก น้ำเชื้อ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ

บทนำ

การผสมเทียมได้ทำให้มีการพัฒนาและเกิดความก้าวหน้าในการเลี้ยงโคนมเป็นอย่างมาก คุณค่าของการผสมเทียม คือ การกระจายพันธุ-

ติดต่อขอสำเนาบทความได้ที่ : สราวุธ ฉายประสาท, ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อโคพันธุ์โครงการหลวงอินทนนท์ อ.แม่วาง จ.เชียงใหม่; E-mail:019927574@gsmadvance.com

ได้รับบทความวันที่ 14 พฤศจิกายน 2548

กรรมที่ดีออกไปได้อย่างกว้างขวาง[1]

ความสำเร็จของการผสมเทียมขึ้นกับปัจจัยหลายประการ ปัจจัยที่มีสำคัญปัจจัยหนึ่ง คือ คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็ง ดังนั้นในกระบวนการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็งจึงมีขั้นตอน และการควบคุมคุณภาพทั้งขั้นตอนการเก็บน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์โค รวมถึงในห้องปฏิบัติการอย่างเป็นระบบ[2] ตั้งแต่กระบวนการตรวจสอบปริมาณความเข้มข้น เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ การเคลื่อนที่หมู่จนกระทั่งกระบวนการละลายน้ำเชื้อและแช่แข็ง[3] หลังจากผ่านขั้นตอนขบวนการแช่แข็ง การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อก่อนนำจ่ายน้ำเชื้อไปตามศูนย์หรือหน่วยผสมเทียม เป็นขั้นตอนที่สำคัญอีกขั้นตอนหนึ่งสำหรับห้องปฏิบัติการในประเทศไทย ภายหลังจากน้ำเชื้อผ่านการแช่แข็งเป็นเวลา 24 ชั่วโมง น้ำเชื้อจะถูกนำมาอุ่นเพื่อตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ หากมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิน้อยกว่า 40% น้ำเชื้อชุดนั้นจะถูกทำลาย ทิ้ง[4] ส่วนน้ำเชื้อที่ผ่านการตรวจสอบดังกล่าวจะ ถูกนำไปใช้ต่อไป

ในการปฏิบัติงานในภาคสนามโดยทั่วไป การออกปฏิบัติงานผสมเทียมแต่ละครั้งเจ้าหน้าที่ผสมเทียมต้องเตรียมอุปกรณ์ต่างๆ สำหรับการใช้แต่ละครั้งเท่านั้น ได้แก่ การเตรียมหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งเฉพาะที่จะผสมเทียมในฟาร์มนั้น แต่จากการปฏิบัติงานจริงพบว่ามีการผสมเทียมหลายฟาร์มในเวลา หรือพื้นที่ใกล้เคียงกัน ทำให้เจ้าหน้าที่ผสมเทียมต้องเตรียมน้ำเชื้อแช่แข็งสำหรับปฏิบัติงานทั้งวันหรือหลายๆ วันเพื่อความสะดวกในการปฏิบัติงาน ทำให้พบว่าภายในถังสนามส่วนใหญ่จะเก็บหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งของพ่อพันธุ์หลายๆ ตัวไว้ด้วยกัน โดยเฉพาะน้ำเชื้อแช่แข็งที่มาจากพ่อพันธุ์สายพันธุ์เดียวกัน หลอดจะสีเหมือนกันทำให้เจ้าหน้าที่ผสมเทียมต้องคีบหลอดออกมาจากถังสนามเพื่อทำการอ่านหมายเลขข้างหลอด รวมถึงการเบิกจ่ายน้ำเชื้อแช่แข็งที่ต้องมีการย้ายหลอดน้ำเชื้อจากถังหนึ่งสู่ถังหนึ่ง เป็นเหตุให้หลอดน้ำเชื้อแช่แข็งสัมผัสกับอุณหภูมิภายนอกบ่อยครั้ง โดยไม่ได้ทำการละลายที่อุณหภูมิเหมาะสมจะทำให้เกิดความเสียหายต่อตัวอสุจิและคุณภาพของน้ำเชื้อหลังจากการละลาย[5] ด้วยเหตุนี้ระยะเวลาที่ใช้การยกแต่ละครั้งและจำนวนครั้งที่ยกนั้นย่อมมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ภายหลังจากการละลายน้ำเชื้อ (sperm progressive motility) ซึ่งค่าดัชนีนี้มีความสัมพันธ์กับความสมบูรณ์พันธุ์เมื่อนำน้ำเชื้อไปใช้ในภาคสนาม[6-9]

ดังนั้นการศึกษาผลกระทบจากปัจจัยดังกล่าวจึงเป็นประโยชน์สำหรับการวางแนวทางการดูแลรักษาและควบคุมคุณภาพน้ำเชื้อในภาคสนาม

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของอิทธิพลร่วมกันของระยะเวลาที่ใช้เมื่อยกน้ำเชื้อและจำนวนครั้งที่ยกน้ำเชื้อออกจากถังบรรจุไนโตรเจนเหลวต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ

อุปกรณ์และวิธีการ

การวางแผนการทดลอง

น้ำเชื้อแช่แข็งบรรจุหลอดจากพ่อโคพันธุ์แท้โฮลสไตน์ ฟรีเซียน ที่รีดเก็บน้ำเชื้อเพื่อทำน้ำเชื้อแช่แข็งของศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อโคพันธุ์ โครงการหลวงอินทนนท์ จังหวัดเชียงใหม่ หมายเลข ITN 019 HF ซึ่งบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.25

ซี.ซี. มีความเข้มข้นของอสุจิภายในหลอด 30 ล้านตัว จำนวน 90 หลอด ผลิตชุดน้ำเชื้อเดียวกัน มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ เท่ากับ 50% ถูกนำมาใช้ในการศึกษา โดยใช้แบบแผนการทดลองแฟคทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (3x3 Factorial in Completely Random Design) ซึ่งมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาอิทธิพลร่วมของเวลาที่ใช้ยกหลอดน้ำเชื้อขึ้นเหนือระดับในหลอดทดลองและจำนวนครั้งการยกต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ โดยเวลาที่ใช้ในการยกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 3 วินาที (T3), 5 วินาที (T5) และ 7 วินาที (T7) วินาที ส่วนการยกแบ่งออกเป็นจำนวน 3 ครั้ง (No3), 6 ครั้ง (No6) และ 9 ครั้ง (No9) ดังนั้นจึงมีกลุ่มทดลองทั้งหมด 9 กลุ่ม ซึ่งได้แก่ T3No3, T3No6, T3No9, T5No3, T5No6, T5No9, T7No3, T7No6 และ T7No9 โดยมีจำนวนซ้ำ (replication) หรือจำนวนน้ำเชื้อในแต่ละกลุ่มเท่ากับ 10 หลอด

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

ทำการละลาย (thawing) น้ำเชื้อแช่แข็งทีละหลอดในกลุ่มทดลองต่างๆ ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ตัดปลายหลอดน้ำเชื้อและหยดน้ำเชื้อ 1 หยดบนสไลด์ปิดด้วยสไลด์บาง (cover slide) นำไปวางบน slide warmer plate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า เพื่อตรวจเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (sperm progressive motility) ภายหลังการละลายโดยผู้ตรวจเพียงคนเดียวที่ได้รับการฝึกปฏิบัติและมีประสบการณ์ในการตรวจเป็นอย่างดี บันทึกค่าที่ได้จากการตรวจ คือ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ

การวิเคราะห์สถิติ

ทดสอบความแปรปรวน (ANOVA) โดยใช้ PROC GLM[10] ในโปรแกรมสำเร็จรูป SAS version 9.00 หากพบว่ามีนัยสำคัญจากการทดสอบ F-test ของ Type III ใช้การทดสอบ Duncan's New Multiple Range Test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มเป็นขั้นตอน ต่อมา กำหนดระดับนัยสำคัญไว้ที่ $\alpha = 0.05$

การทดสอบเขียนตัวแบบ (model) ได้ดังนี้

$$\psi_{i\varphi\tau} = \beta + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijt}$$

เมื่อ

y_{ijk} = ค่าสังเกตที่ *t* ที่ระดับการยกที่ *i* และเวลาที่ใช้ยกที่ *j*

μ = overall mean

α_i = อิทธิพลคงที่ (fixed effect) จากจำนวนการยกที่ *i*

β_j = อิทธิพลคงที่จากเวลาที่ใช้ยกที่ *j*

$(\alpha\beta)_{ij}$ = อิทธิพลร่วมจากจำนวนการยกที่ *i* และเวลาที่ใช้ยกที่ *j*

ε_{ijk} = ค่าความคลาดเคลื่อนแบบสุ่ม (random error) ที่มีคุณสมบัติ NID $(0,O^2)$ [11]

ผลการทดลอง

อิทธิพลร่วมกันระหว่างเวลาที่ยกน้ำเชื้อและจำนวนครั้งที่ยกน้ำเชื้อมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิอย่างมีนัยสำคัญ ($p <$

0.05) และผลการเปรียบเทียบความแตกต่างเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในกลุ่มต่างๆ ได้แสดงในตารางที่ 1 โดยพบว่ากลุ่ม T3No3, T3No6 และ T5No3 เป็นกลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ ในขณะที่ T7No9 เป็นกลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิต่ำที่สุด

ตารางที่ 1. ค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ

Group	Sperm progressive motility (%) (mean±SD)
T3No3	50.00±0.00[a]
T3No6	48.83±2.15[a]
T3No9	41.00±3.05[c]
T5No3	49.66±1.26[a]
T5No6	43.33±3.03[b]
T5No9	33.80±4.44[d]
T7No3	42.16±3.63[cb]
T7No6	33.33±4.01[d]
T7No9	28.33±2.39[e]

[*] Different superscripts within the same column indicate significance (p <0.05)

วิจารณ์

การดูแลรักษาคุณภาพน้ำเชื้อเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการปฏิบัติงานด้านการผสมเทียม เนื่องจากการที่น้ำเชื้อสัมผัสกับอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลง ไม่ว่าจะเป็นการสัมผัสที่อุณหภูมิบริเวณส่วนคอของถังบรรจุไนโตรเจนเหลว หรือสัมผัสกับอุณหภูมิภายนอก มีผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ของน้ำเชื้อ[12]

ในการศึกษานี้ อสุจิยังคงมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในระดับปกติหากใช้เวลาในการยกยกน้ำเชื้อไม่เกิน 3 วินาที ไม่ว่าจะยกจำนวน 3 ครั้งหรือ 6 ครั้ง (T3No3 หรือ T3No6) ส่วนการยกน้ำเชื้อ 5 วินาที 9 ครั้ง (T5No9) และการยกน้ำเชื้อ 7 วินาที 6 ครั้ง (T7No6) จะส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิมีค่าต่ำกว่า 35% และกลุ่มที่ยกหลอดน้ำเชื้อ 7 วินาที จำนวน 9 ครั้ง (T7No9) จะมีคุณภาพน้ำเชื้อต่ำที่สุด ในขณะที่ระดับน้ำเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิประมาณ 40% จะเป็นการยก 3 วินาทีจำนวน 9 ครั้ง(T3No9) การยก 7 วินาทีนาน 3 ครั้ง (T7No3) กลไกที่สามารถนำมาอธิบายผลที่ได้จากการศึกษา คือ กระบวนการเปลี่ยนแปลงของของเหลวภายในเซลล์ของอสุจิ การยกหลอดน้ำเชื้อที่สัมผัสกับอุณหภูมิข้างนอกเป็นเวลานานโดยไม่ได้ทำการละลายด้วยน้ำอุ่นในอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมจะทำให้เกิดขบวนการสร้างผลึกน้ำแข็ง (re-crystallization) ของโมเลกุลของน้ำ ซึ่งผลตามมา คือเยื่อบุเซลล์ของอสุจิจะถูกทำลาย[13] และเมื่อนำหลอดน้ำเชื้อนั้นกลับคืนสู่ถังไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิของหลอดน้ำเชื้อจะเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วส่งผลเกิดความเสียหายของอสุจิอีกครั้งซึ่งเป็นกระบวนการเกิดในลักษณะเดียวกับการเกิดภาวะช็อค เนื่องจากความเย็น (cold shock)[14]

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการยกหลอดน้ำเชื้อในระยะ เวลานานและการยกหลอดน้ำเชื้อขึ้นบ่อยๆ จะเป็นการทำให้คุณภาพน้ำเชื้อลดลง อันจะส่งผลให้ความสำเร็จในการผสมเทียมต่ำลง ผลการศึกษานี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ คือ การวางแนวทางในการปฏิบัติงานสำหรับการย้ายหลอดน้ำเชื้อหรือการยกหลอดน้ำเชื้อในกรณีที่ทำ

การผสมเทียม การยกหลอดน้ำเชื้อควรจะใช้เวลาในการยกไม่เกิน 3 วินาที ซึ่งการยกเพียง 3 วินาทีนี้จะทำให้คุณภาพน้ำเชื้อยังดีอยู่แม้ว่าจะถูกยกถึง 6 ครั้งก็ตาม ดังนั้นเจ้าหน้าที่ผู้ปฏิบัติงานผสมเทียมในภาคสนามหากจำเป็นต้องยกหลอดน้ำเชื้อจำนวนหลายครั้งควรต้องใช้เวลาให้น้อยที่สุดซึ่งในทางปฏิบัติการยกหลอดน้ำเชื้อประมาณ 3 วินาทีจะเหมาะสำหรับการยกเพื่อดูสีหลอดน้ำเชื้อหรือถ่ายน้ำเชื้อจากถังไปสู่อีกถังหนึ่ง แต่ถ้าหากต้องดูหมายเลขเพื่อเลือกน้ำเชื้อสำหรับการผสมเทียมเจ้าหน้าที่ผสมเทียมจะใช้เวลาประมาณ 5 วินาที หรือมากกว่า ซึ่งแม้ว่าจะใช้เวลาดูเพียง 5 วินาที ถ้ายกเกิน 3 ครั้ง คุณภาพน้ำเชื้อก็จะลดลง ดังนั้นการจัดหลอดน้ำเชื้อในถังสนามเพื่อให้ง่ายต่อการค้นหา จึงเป็นสิ่งที่จำเป็นแต่ตามคำแนะนำของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์นั้นแนะนำให้เตรียมน้ำเชื้อให้เพียงพอในการผสมเทียมในแต่ละครั้งจึงจะทำให้เกิดประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามในการยกหลอดน้ำเชื้อขึ้นบ่อยๆ นั้นเจ้าหน้าที่ของสำนักเทคโนโลยีชีวภาพการผลิตปศุสัตว์จำเป็นต้องมีแนวทางในการปฏิบัติด้วย เพราะขั้นตอนการยกน้ำเชื้อแช่แข็งนั้นได้เริ่มมาตั้งแต่ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อที่ทำการส่งน้ำเชื้อแช่แข็งมาที่ศูนย์ผลิตน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ผสมเทียมลำพญากลางเพื่อรวบรวมน้ำเชื้อแช่แข็งทผลิตทั้งหมดจากนั้นนำจ่ายให้ศูนย์ผสมเทียมในแต่ละพื้นที่และนำจ่ายออกสู่ถังเก็บของหน่วยผสมเทียมในพื้นที่ต่างๆ ก่อนจะลงสู่ถังสนามของเจ้าหน้าที่ ผสมเทียมซึ่งจะเห็นว่ามีขั้นตอนต่างๆ ที่ต้องทำการยกน้ำเชื้อแช่แข็งอยู่ทุกขั้นตอน ดังนั้นความสำคัญของระยะเวลาในการยกหลอดน้ำเชื้อแช่แข็ง จึงมีความสำคัญมากต่อคุณภาพของน้ำเชื้อ แช่แข็งในการผสมเทียม นอกจากนี้การดูแลระดับ ไนโตรเจนในถังบรรจุน้ำเชื้อตามศูนย์หรือหน่วยต่างๆ เป็นสิ่งที่จะละเลยไม่ได้[15] แต่อย่างไรก็ตาม ในการศึกษานี้เป็นการศึกษาโดยเน้นในภาคปฏิบัติที่ใช้ได้จริงและมีอุปกรณ์ที่จำกัด ดังนั้นจึง ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิโดยยังไม่ได้ทำการตรวจคุณภาพ ในส่วนอื่นๆ เช่น จำนวนของตัวอสุจิ เปอร์เซ็นต์ ความผิดปกติ หรือความผิดปกติในส่วนรูปร่าง ซึ่งในการศึกษาต่อไปควรได้เพิ่มเติมในส่วนดังกล่าว

การศึกษาในครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นว่าเวลาที่ใช้ในการยกหลอดน้ำเชื้อและจำนวนครั้งที่ยกมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ผลที่ได้จากการศึกษาสามารถนำไปเป็นแนวทางสำหรับการดูแล และจัดการน้ำเชื้อที่บรรจุหลอดแล้ว อันเป็นการรักษาสภาพน้ำเชื้อบรรจุหลอดให้มีคุณภาพดีสำหรับการปฏิบัติการใน ภาคสนาม

เอกสารอ้างอิง

1. Vishwanath R. Artificail insemination : the state of the art. Theriogenology 2003;59:571-84.
2. Rodriguez-Martinez H. Laboratory semen assessment and prediction of fertility:still utopia?. Reprod Dom Anim 2003;38:312-8.
3. Christensen P, Brockhoff PB, Lehn-Jensen H. The Relationship between semen quality and the nonreturn rate of bulls. Reprod Dom Anim 1999;34:503-7
4. ศกร คุณวุฒิฤทธิรณ, กัญจนะ มากวิจิตร, บัณฑิต ธานินทรธราธาร, ศรเทพ ธัมวาสร,

อนันตชัย เขื่อนธรรมการ. ประเมินโคนมเพศผู้เพื่อการผสมเทียมในด้านสมรรถภาพทางการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ ณ ศูนย์วิจัยการผสมเทียมปทุมธานี 1. เปรียบเทียบสมรรถภาพเป็นรายตัว. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36 สาขาสัตว์ 3-5 กุมภาพันธ์ 2541 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพ: 2541. หน้า 58 (บทคัดย่อ)

5. Holt WV, North RD. Effects of temperature and restoration of osmotic equilibrium during thawing on the induction of plasma membrane damage in cryopreserved ram spermatozoa. Biol Reprod 1994;51:414-24.
6. Nadir S, Saacke RG, Bame J, Mullins J, Degelos S. Effect of freezing semen and dosage of sperm on number of accessory sperm, fertility, and embryo quality in artificially inseminated cattle. J Anim Sci 1993;71: 199-204.
7. Correa JR, Pace MM, Zavos PM. Relationships among frozen-thawed sperm characteristics assessed via the routine semen analysis, sperm functional tests and fertility of bulls in an artificial insemination programme. Theriolgenology 1997;48:721–31.
8. Januskauskas A, Johannisson A, Rodriguez-Martinez H. Assessment of sperm quality through fluorometry and sperm chromatin structure assay in relation to field fertility of frozen-thawed semen from Swedish AI bulls. Theriogenology 2001;55:947–61.
9. Verberckmoes S, Van Soom A, de Kruif A.Intrauterine insemination in farm animals and humans. Reprod Dom Anim 2004;39:195-204.
10. SAS. SAS/STAT User's guide in SAS 9.1 .SAS institute, Inc., Cary, NC 2004; p. 5121.
11. Montogomery DC. Design and analysis of experiments. 5th ed. New York: John Wiley, 2001.
12. Nebel RL.Techniques for artificial insemination of cattle with frozen-thawed semen: In: Yongquist RS,editor. Current veterinary therapy in large animal theriogenology. Philadelphia: W.B Saunders, 1991. p. 251-6.
13. Vishwanath R, Shannon P. Storage of bovine semen in liquid and frozen state. Anim Reproduct Sci 2000;62:23–53.
14. Holt WV. Basic aspects of frozen storage of semen. Anim Reprod Sci 2000;62:3–22.
15. บรรจง จงรักษ์วัฒนา พรชัย สุวรรณาภิรมย์ พนม สุขราษฎร์. คุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งโคที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่หน่วยผสมเทียมเขต 9. ใน: ประมวล เรื่อง ประชุมวิชาการปศุสัตว์ ครั้งที่ 15 ประจำปี 2539, 4-6 กันยายน 2539 โรงแรมเอเชีย ราชเทวี กรุงเทพ, 2539; หน้า 208-15.