RESEARCH ARTICLE

The Comparison of Frozen-thawed Thamin Eld's Deer (*Cervus eldii thamin*) Sperm Head Morphometric in TRIS and BF5F Extender by Computer Assisted Sperm Analysis (CASA)

Sukuman Rittem[1], Piyawan Suthanmapinanh[2], Worawidh Wajjwalku[2], Sitthawee Thongtipsiridech[2*]

Abstract

Objective—To determine and compare characteristics of frozen-thawed Thamin Eld's deer sperm head morphometry using two different extenders.

Materials and Methods—Semen was collected from sixteen Thamin Eld's deer using electroejaculation. Semen was immediately evaluated for the percentage of progressively motility, volume, pH and sperm concentration. Seven samples were selected based on semen quality and used for cryopreservation with 2 extenders; TRIS and BF5F that contained 5% of glycerol. Semen of each animal was divided to 2 groups. Each part of divided semen was immediately diluted and cryopreserved with different extender. Frozen-thawed spermatozoa were prepared by twice adding 'washing' medium (1% BSA in HAM's F-10) followed by centrifugation for 5 minutes and 3 minutes at 200xg, respectively. The sperm concentration was adjusted to $100x10^6$ sperm/ml by adding washing medium then smeared on cleaned glass slide, fixed with 95% ethanol and stained with Eosin and Polychrome methylene blue. At least 100 spermatozoa from two slides in each sample were analyzed by Computer Assisted Sperm Analysis at 60x magnification.

Results—The average of frozen-thawed sperm morphometric analysis in Tris extender were as followed: length 8.2 µm, width 4.3 µm, the ratio of width/length 51.9%, head area 28.7μm^2 and head perimeter 21.0 µm. The average of frozen-thawed sperm morphometrics analysis in BF5F extender were as followed: length 8.4 µm, width 4.4 µm, the ratio of width/length 52.6%, head area 29.8 μm^2 and head perimeter 21.6 µm.

Conclusion—The significant differences ($P<0.05$) in frozen-thawed sperm head morphometric of Thamin Eld's deer between in TRIS and BF5F extender demonstrated the effects of extender for cryopreservation which might be used as indicators for extender choosing in sperm cryopreservation.

KKU Vet J. 2011;21(1):10-22. http://vmj.kku.ac.th/

Keywords: Sperm morphometric; Eld's deer; Extender; CASA

[1]Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Kamphaeng Saen Campus, Nakhon Pathom, 73140
Center of Excellence on Agricultural Biotechnology: (AG-BIO/PERDO-CHE), Bangkok, Thailand

[2] Faculty of Veterinary Medicine, Kamphaeng Saen Campus, Kasetsart University, Nakhon Pathom, 73140

[*]**Corresponding author** E-mail: fvetnit@ku.ac.th

การเปรียบเทียบขนาดหัวอสุจิละมั่งสายพันธุ์พม่า (*Cervus eldii thamin*) ที่ผ่านการแช่แข็งในสารละลายน้ำเชื้อชนิด TRIS และ BF5F ด้วยระบบคอมพิวเตอร์ (CASA)

สุขุมาล ฤทธิ์เต็ม[1], ปิยวรรณ สุธรรมาภินันท์[2], วรวิทย์ วัชชวัลคุ[2], สิทธวีร์ ทองทิพย์ศิริเดช[2*]

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาขนาดของหัวอสุจิแช่แข็งของละมั่งสายพันธุ์พม่าในสารละลายน้ำเชื้อชนิด TRIS และ BF5F

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ เก็บตัวอย่างนำเชื้อจากละมั่งสายพันธุ์พม่าจำนวน 16 ตัว ด้วยวิธีการกระตุ้นโดยใช้ไฟฟ้า นำน้ำเชื้อมาทดสอบคุณภาพเบื้องต้น คัดเลือกน้ำเชื้อที่คุณภาพตามที่กำหนดเพื่อผ่านกระบวนการแช่แข็ง 7 ตัวอย่าง แบ่งแช่แข็งด้วยสารละลายน้ำเชื้อ 2 ชนิดคือ TRIS และ BF5F หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาอุ่นละลาย ทำความสะอาดโดยเติมน้ำยาทำความสะอาดน้ำเชื้อ (1% BSA in HAM's F-10) แล้วปั่นเหวี่ยง เลือกเก็บส่วนตะกอนแล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้น $100x10^6$ ตัว/มล. นำตัวอย่างที่ได้ smear บนแผ่นกระจกสไลด์สะอาด 2 แผ่น นำไปแช่ในเมธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ แล้วย้อมด้วยสี eosin และ polychrome metyhlene blue แล้ววิเคราะห์ด้วยระบบคอมพิวเตอร์ โดยนับตัวอสุจิจากแต่ละตัวอย่างทั้ง 2 แผ่นกระจกสไลด์ 100 ตัว

ผลการศึกษา ค่าเฉลี่ยความยาวส่วนหัวอสุจิในสารละลายน้ำเชื้อ TRIS 8.2 ไมโครเมตร ในสารละลายน้ำเชื้อ BF5F 8.4 ไมโครเมตร ค่าเฉลี่ยความกว้างหัวอสุจิในสารละลายน้ำเชื้อ TRIS 4.3 ไมโครเมตร ในสารละลายน้ำเชื้อ BF5F 4.4 ไมโครเมตร เปอร์เซ็นต์ความกว้าง/ความยาวของตัวอสุจิในสารละลายน้ำเชื้อ TRIS 51.9 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลายน้ำเชื้อ BF5F 52.6 เปอร์เซ็นต์ ค่าเฉลี่ยพื้นที่ของหัวอสุจิในสารละลายน้ำเชื้อ TRIS 28.7 ตารางไมโครเมตร ในสารละลายน้ำเชื้อ BF5F 29.8 ตารางไมโครเมตร อย่างและค่าเฉลี่ยความยาวรอบหัวอสุจิละมั่งในสารละลายน้ำเชื้อ TRIS 21 ไมโครเมตร ในสารละลายน้ำเชื้อ BF5F 21.6 ไมโครเมตร

ข้อสรุป ขนาดของหัวอสุจิละมั่งที่ผ่านการแช่แข็งด้วยสารละลายน้ำเชื้อ TRIS และ BF5F มีขนาดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อคัดเลือกสารละลายน้ำเชื้อที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อละมั่งให้ได้คุณภาพดีต่อไป

วารสารสัตวแพทยศาสตร์ มข. 2554;21(1):10-22. http://vmj.kku.ac.th/

คำสำคัญ: ขนาดหัวอสุจิ ละมั่ง สารละลายน้ำเชื้อ ระบบคอมพิวเตอร์วิเคราะห์ขนาดหัวอสุจิ

[1]ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จ.นครปฐม 73140
ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว.) สำนักงานคณะกรรมการ อุดมศึกษา

[2]คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ [*]**ผู้เขียนที่ให้การติดต่อ** E-mail: fvetnit@ku.ac.th

บทนำ

ประเทศไทยจัดละมั่งเป็นสัตว์ป่าสงวนตามพระราชบัญญัติสงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า พ.ศ. 2535 มีสถานภาพประชากรอยู่ในระดับเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ตามการจัดสถานภาพของไอยูซีเอ็น (The International Union for Conservation of Nature or ICUN) และถูกจัดอยู่ในบัญชีหมายเลข 1 ตามอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศ ซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้จะสูญพันธุ์ (The Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora or CITES) ปัจจุบันประเทศไทยมีละมั่งอยู่สองสายพันธุ์ ได้แก่ละมั่งพันธุ์ไทย (*Cervus eldii siamensis*) และละมั่งพันธุ์พม่า (*Cervus eldii thamin*) ซึ่งละมั่งทั้งสองพันธุ์ได้สูญพันธุ์ไปจากป่าธรรมชาติของประเทศไทยแล้ว [1] แต่ยังคงเหลือประชากรของละมั่งทั้งสองพันธุ์ในกรงเลี้ยงอยู่ส่วนหนึ่ง สำหรับละมั่งพันธุ์ไทยนั้นอยู่ในภาวะเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์เป็นอย่างยิ่งเนื่องจากมีประชากรรวมกันทั้งประเทศน้อยกว่า 50 ตัวและมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ สำหรับละมั่งพันธุ์พม่ายังคงมีอยู่ในกรงเลี้ยง 824 ตัว ในสวนสัตว์ขององค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์และสถานีเพาะเลี้ยงสัตว์ป่าบางแห่ง ในสังกัดของกรมอุทยานสัตว์ป่าและพันธุ์พืช [2] จึงมีความพยายามในการปล่อยละมั่งพันธุ์พม่าคืนสู่ป่าตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 เพื่อให้ละมั่งยังดำรงอยู่ในธรรมชาติ ณ ปัจจุบันได้มีการดำเนินการปล่อยแล้วในเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าห้วยขาแข้ง จ.อุทัยธานี และเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ จ.พะเยาและอยู่ในระหว่างการติดตามผล [3] แต่เนื่องด้วยจำนวนประชากรในกรงเลี้ยงที่มีอยู่ยังไม่เพียงพอต่อการดำเนินการในระยะยาว ประกอบกับการจัดการเพื่อเพิ่มความหลากหลายทางพันธุกรรม เพื่อเตรียมนำปล่อยสู่ธรรมชาติ จึงมีการพัฒนาเทคโนโลยีการช่วยเหลือทางระบบสืบพันธุ์ (Asissted-reproductive technology) ในละมั่งในประเทศไทยเพื่อประโยชน์ดังกล่าว [4]

การแช่แข็งน้ำเชื้อเพื่อเก็บไว้เป็นธนาคารพันธุกรรมและนำไปใช้ในการผสมเทียมหรือการผลิตตัวอ่อนในหลอดแก้วนั้นเป็นส่วนหนึ่งในกระบวนการช่วยเหลือทางระบบสืบพันธุ์ มีการพัฒนาในสัตว์ป่าหายากชนิดต่าง ๆ เช่น ช้างเอเชีย [5, 6] เสือปลา [7] Iberian red deer [8] bobcat [9] และแพนด้ายักษ์ [10] น้ำเชื้อแช่แข็งสามารถนำมาช่วยในการจัดการประชากรและพัฒนาสายพันธุ์ โดยสามารถขนส่งน้ำเชื้อไปผสมกับแม่พันธุ์ที่ต้องการในพื้นที่ห่างกันได้โดยไม่ต้องขนย้ายสัตว์ พบว่าในละมั่งมีการศึกษาเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์และการแช่แข็งน้ำเชื้อค่อนข้างน้อย ตัวอย่าง เช่น รายงานการศึกษาของ Harnal และคณะ (2001) ที่ศึกษาสารเหนี่ยวนำกระบวนการ capacitation ของตัวอสุจิละมั่งในห้องทดลอง เพื่อพัฒนากระบวนการผสมในห้องทดลอง การศึกษาของ Monfort และคณะ (1993) [11] ที่ทำการทดลองผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อละมั่งที่แช่แข็งด้วยสารละลายน้ำเชื้อชนิด BF5F ได้สำเร็จ แต่พบว่ามีอัตราการตั้งท้องที่ตรวจสอบในวันที่ 90 หลังการผสม เพียงแค่ 9 ตัว จากการผสมเทียมทั้งหมด 20 ตัว โดยคุณภาพของตัวอสุจิแช่แข็งหลังการอุ่นละลาย เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่มีผลต่ออัตราการผสมติด [9, 12,13] ซึ่งพบว่ามีปัจจัยหลายประการที่ส่งผลต่อคุณภาพตัวอสุจิภายหลังการอุ่น

ละลาย ตัวอย่างเช่น สารละลายน้ำเชื้อที่ใช้ในการแช่แข็งก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อคุณภาพตัวอสุจิภายหลังการอุ่นละลาย สำหรับสารละลายน้ำเชื้อชนิด BF5F มีรายงานการทดลองใช้แช่แข็งน้ำเชื้อละมั่ง [11, 14, 15] และสารละลายน้ำเชื้อชนิด TRIS มีรายงานการใช้ในสัตว์เคี้ยวเอื้องและสัตว์ตระกูลกวาง เช่น Sika deer และกวางป่าไทย ซึ่งสามารถใช้แช่แข็งในสัตว์ดังกล่าวได้ดี [16] สารละลายน้ำเชื้อ TRIS จึงน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่อาจนำมาใช้ในกระบวนแช่แข็งละมั่งได้

การแช่แข็งตัวอสุจิจะส่งผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติก [12] เนื่องจากการเติมสารป้องกันความเย็นที่มีค่าแรงดันออสโมติกสูง เช่น กลีเซลรอล หรือ dimethy sulphoxide และการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิระหว่างการแช่แข็งและการอุ่นละลาย อาจส่งผลให้สภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย ความสามารถในการแลกเปลี่ยนน้ำและสารในเซลล์ลดลง ซึ่งสิ่งเหล่านี้อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงขนาดหัวอสุจิภายหลังการแช่แข็ง [12] มีรายงานการศึกษาขนาดหัวของตัวอสุจิมนุษย์พบว่ากลุ่มตัวอสุจิที่มีเปอร์เซ็นต์ขนาดหัวต่ำกว่าค่าเฉลี่ยทั่วไปจะมีอัตราการผสมติดต่ำกว่ากลุ่มตัวอสุจิที่มีเปอร์เซ็นต์ขนาดหัวอยู่ในค่าเฉลี่ยทั่วไป [17] มีรายงานพบว่าส่วนประกอบในสารละลายน้ำเชื้อ กระบวนการแช่แข็งและการอุ่นละลายมีผลต่อค่าแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ โดยสามารถทำให้เซลล์ขยายขนาดขึ้นหรือขนาดเล็กลง [18] มีรายงานการศึกษาผลของสารละลายน้ำเชื้อและกระบวนการแช่แข็งกับขนาดของหัวอสุจิแพะ [19] และม้า [20] พบว่าชนิดของสารละลายน้ำเชื้อมีผลต่อขนาดหัวที่เปลี่ยนแปลงไปสูงกว่ากระบวนการแช่แข็ง ดังนั้นการวัดขนาดหัวของตัวอสุจิด้วยระบบคอมพิวเตอร์ (Computer assisted sperm analysis; CASA) ที่สามารถแสดงความยาว ความกว้าง อัตราส่วนความกว้าง/ความยาวของตัวอสุจิ บ่งชี้รูปร่างหัวของตัวอสุจิ แสดงพื้นที่และความยาวรอบหัวของตัวอสุจิ จึงเป็นวิธีการหนึ่งที่ใช้ตรวจสอบผลจากการเปลี่ยนแปลงขนาดหัวเมื่อผ่านกระบวนการแช่แข็ง นอกจากนี้ขนาดหัวของตัวอสุจิจะใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับสัตว์แต่ละชนิด โดยค่าต่าง ๆ มีความแตกต่างกันตามแต่ละชนิดสัตว์ ดังรายงานขนาดหัวของตัวอสุจิในสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น สุนัข [21] ม้าไทยพื้นเมือง [22] และเลียงผา [23] สำหรับในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาขนาดของหัวอสุจิแช่แข็งของละมั่งสายพันธุ์พม่าในสารละลายน้ำเชื้อชนิด TRIS และ BF5F หลังการอุ่นละลาย

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

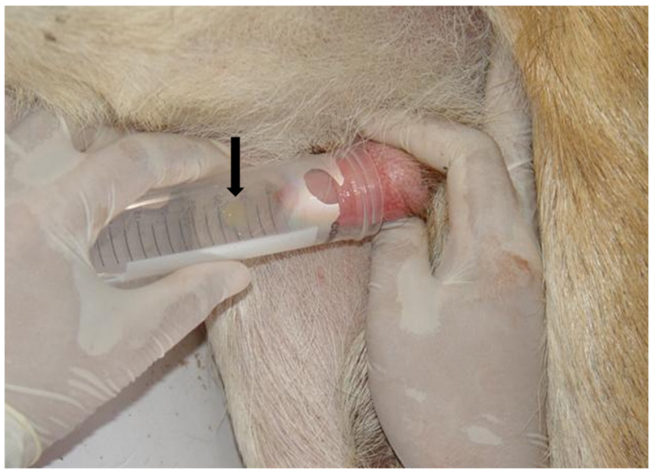
การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อจากละมั่งเพศผู้โตเต็มวัย (อายุมากกว่า 2 ปี) สายพันธุ์พม่าจำนวน 16 ตัว ตัวละ 1 ครั้ง ในช่วงเดือน เมษายน ถึงเดือนกันยายน ณ สถานีเพาะและขยายพันธุ์สัตว์ป่าบางละมุง สวนสัตว์เปิดเขาเขียว สวนสัตว์นครราชสีมา และคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ทำการวางยาสลบละมั่งด้วย Ketamin HCl (Calypsol®; องค์การ

เภสัชกรรม, กรุงเทพ) ขนาด 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และ Xylazine HCl (X-ZINE®; L.B.S. Laboratory Ltd., part, กรุงเทพ) ขนาด 0.5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ และกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อด้วยกระแสไฟฟ้าผ่านทางทวารหนัก (electro-ejaculation) โดยใช้กระแสไฟฟ้าแบบกระแสสลับด้วยความถี่ 60 Hz และใช้ probe (PT Electronics, Boring OR) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร เป็นตัวนำกระแสไฟฟ้ากระตุ้นผ่านทางทวารหนัก ใช้รูปแบบการกระตุ้นทั้งหมด 3 ระดับ ดังนี้ ระดับที่ 1 กระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าระดับ 3, 4 และ 5 โวลท์ ระดับที่ 2 กระตุ้นกระแสไฟฟ้าระดับ 4, 5 และ 6 โวลท์ และระดับที่ 3 กระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าระดับ 5, 6 และ 7 โวลท์ โดยแต่ละระดับจะกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าระดับละ 10 ครั้ง เป็นจำนวนทั้งสิ้น 30 ครั้งต่อระดับการกระตุ้น เมื่อครบแต่ละระดับการกระตุ้น จะพักครั้งละ 5 นาทีจึงเริ่มการกระตุ้นในระดับต่อไป การรองเก็บน้ำเชื้อด้วยหลอดพลาสติกสะอาดขนาด 50 มิลลิลิตร ดังแสดงใน **Figure 1** [11,14]

Figure 1. Collecting Semen from Immobilized Thamin Eld's Deer by Using Electroejaculation

Figure 2. Fresh Semen Characteristic of Eld's Deer Stimulated by Electro-ejaculation Technique



การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น

ทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น ได้แก่ สี ความหนืด สิ่งปนเปื้อน ความเป็นกรด-ด่าง และปริมาตร ดังแสดงใน **Figure 2** สำหรับอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิจะทำการตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาแล้วให้คะแนนโดยผู้ตรวจสอบคนเดียวกันในทุกตัวอย่าง ทำการเลือกใช้น้ำเชื้อที่มีอัตราการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิมากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นตัวอสุจินับโดยใช้ hemocytometer chamber [24] ต้องมากกว่า 700 ล้านตัว/มิลลิลิตร การนับจำนวนตัวเป็น- ตัวตายโดยย้อมสี Eosin 1 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่นผสมกับ Nigrosin 1 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น นับจำนวนตัวอสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยนับทั้งหมด 100 ตัว/ตัวอย่าง

จำนวนตัวอสุจิมีชีวิตต้องมากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ และตรวจนับรูปร่างลักษณะตัวอสุจิโดยการย้อมด้วยสี carbol fuchsin และ eosin นับความผิดปกติจาก ตัวอสุจิ 100 ตัว/ตัวอย่าง (William's Stain) [25]

การแช่แข็งน้ำเชื้อ

นำน้ำเชื้อที่ผ่านคุณภาพตามที่กำหนดมาแบ่งเป็นสองกลุ่มการทดลอง โดยกลุ่มที่ผ่านการแช่แข็งด้วยสารละลายน้ำเชื้อ TRIS (แรงดันออสโมติก 345 มิลลิออสโม/กิโลกรัม ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.13) และกลุ่มที่สองผ่านการแช่แข็งด้วยสารละลายน้ำเชื้อ BF5F (แรงดันออสโมติก 315 มิลลิออสโม/กิโลกรัม ค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.55) ทำการแช่แข็งด้วยวิธีเดียวกันคือ การแช่แข็งแบบ 2-steps [14] โดยแบ่งการเติมสารละลายน้ำเชื้อออกสองส่วนเท่า ๆ กัน โดยปริมาณสารละลายน้ำเชื้อที่ใช้จะคำนวณจากความเข้มข้นสุดท้ายของตัวอสุจิหลังการละลายที่ต้องการให้เท่ากับ 100 ล้านตัว/มิลลิลิตร สารละลายน้ำเชื้อส่วนที่ 1 ไม่เติมสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง (cryoprotectant) และสารละลายน้ำเชื้อส่วนที่ 2 เติมสารป้องกันอันตรายจากการแช่แข็ง โดยใช้กลีเซอรอลเข้มข้น10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีรายงานการใช้สารดังกล่าวในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อละมั่งและสัตว์ตระกูลกวาง [14,11] หลังจากเติมสารละลายน้ำเชื้อส่วนแรก นำน้ำเชื้อไปลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิห้องจนถึง 5 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลา 30 นาที หลังจากนั้นเติมสารละลายน้ำเชื้อส่วนที่ 2 โดยแบ่งเติม 4 ครั้งครั้งละเท่าๆ กัน ห่างกันครั้งละ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส โดยสุดท้ายแล้วความเข้มข้นกลีเซอรอลเหลือเป็น 5 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาบรรจุน้ำเชื้อลงในหลอดพลาสติกขนาด 0.25 มิลลิลิตร นำไปแช่แข็งด้วยวิธีอังไอไนโตรเจนเหลวที่ระดับความสูงเหนือไนโตรเจนเหลว 2.5 เซนติเมตร เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเก็บหลอดพลาสติกที่บรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลวซึ่งบรรจุอยู่ในถังเพื่อรอนำไปทดสอบคุณภาพหลังการแช่แข็ง

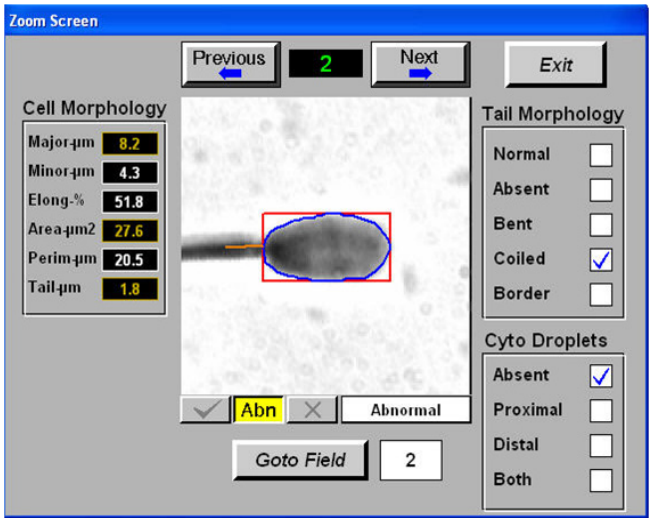
การอุ่นละลายน้ำเชื้อ

นำน้ำเชื้อละมั่งแช่แข็งมาอุ่นละลาย ในน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที ซึ่งเป็นวิธีการที่ดัดแปลงมาจากรายงานของ Soler และคณะ (2003) [26] ที่ใช้อุณหภูมิระดับเดียวกัน แต่ทำการเพิ่มระยะเวลาในการอุ่นละลายมากขึ้น

การตรวจวัดขนาดหัวอสุจิละมั่งที่ผ่านการแช่แข็งและอุ่นละลายด้วยเครื่อง CASA

เตรียมตัวอย่างอสุจิโดยดูดน้ำเชื้อ 500 ไมโครลิตรใส่ Eppendorf แล้วเติมน้ำยาทำความสะอาดน้ำเชื้อ คือ 1% BSA (Sigma, St. Louis, MO)ใน HAM's F-10 (Sigma, St. Louis, MO)500 ไมโครลิตร นำไปปั่นด้วยความเร็ว 200 g เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลานำตะกอนที่ได้เติมน้ำยาทำความสะอาดน้ำเชื้อ 250 ไมโครลิตรนำไปปั่นอีกครั้งด้วยความเร็ว 200 g เป็นเวลา 3 นาที เลือกเก็บส่วนตะกอนนำมาเติมน้ำยาทำความสะอาดน้ำเชื้อ เพื่อเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของตัวอสุจิ 100 ล้านตัว/มล. นำตัวอย่างน้ำเชื้อ smear บนกระจกสไลด์สะอาด 2 แผ่น นำไปแช่ในเมธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 5 นาทีแล้วย้อมด้วยสี eosin และ polychrome metyhlene blue 20 นาทีตามลำดับ นำสไลด์ที่ผ่านการย้อมสีมาล้าง

Figure 3. The Morphometric of Frozen-thaw Spermatozoa of Eld's Deer Evaluated by CASA



น้ำสะอาดเพื่อล้างสีส่วนเกินออก แล้วนำไปวิเคราะห์ขนาดหัวอสุจิด้วยเครื่อง Computer Assisted Sperm Analysis (CASA) รุ่น TOX IVOS version 12.0 (Hamilton Thorne Bio-sciences, Beverly MA, USA) ด้วยโปรแกรมทางการค้า Oval Metrix Version 4.18 โดยนับตัวอสุจิจากตัวอย่างทั้ง 2 แผ่นกระจกสไลด์ 100 ตัว/ตัวอย่าง การวัดขนาดหัวและการตรวจสอบโดยใช้กำลังขยายกล้อง 60 เท่า การนับแบบสุ่มจากตัวอสุจิที่กล้องจับได้และสามารถจับภาพหัวอสุจิได้อย่างสมบูรณ์ โดยนับจากเฉพาะบริเวณที่มีการวัดขนาดหัวหัวอสุจิแบบสมบูรณ์มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงใน **Figure 3**

การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ ($P<0.05$) โดยหาค่าเฉลี่ยของดัชนีบ่งชี้คุณภาพน้ำเชื้อสดภายหลังการกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อของละมั่ง และเปรียบเทียบขนาดหัวของตัวอสุจิภายหลังการอุ่นละลายในสารละลาย TRIS และ BF5F ด้วยวิธี Paired sample T-Test

ผลการศึกษา

จากการกระตุ้นเก็บน้ำเชื้อละมั่งพันธุ์พม่าจำนวน 16 ตัว สามารถเก็บน้ำเชื้อของละมั่งได้ทั้งสิ้น 12 ตัว มีละมั่งจำนวน 4 ตัวจาก 16 ตัวไม่สามารถเก็บน้ำเชื้อได้แม้ได้รับการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าทั้ง 3 ระดับ จากข้อมูลพบว่าละมั่งที่ไม่สามารถเก็บน้ำเชื้อนั้น ทำการรีดเก็บในช่วงเดือนสิงหาคมและกันยายน ซึ่งลักษณะภายนอกของละมั่งทั้งสี่ตัวมีลักษณะที่เหมือนกัน คือ เขาแก่ที่มีลักษณะแข็งและสีเข้ม ที่เกิดขึ้นในฤดูกาลผสมพันธุ์หลุดออกแล้ว

กลุ่มละมั่งที่สามารถกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อได้เมื่อกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า พบว่าน้ำเชื้อมีลักษณะต่างกันตามระดับไฟฟ้าที่ใช้กระตุ้น โดยสามารถแบ่งตามระดับไฟฟ้าที่ใช้กระตุ้นได้ 3 ส่วน ดังนี้ น้ำเชื้อจากระดับการกระตุ้นที่ 1 มีสีขาวขุ่น คล้ายสีน้ำนม ข้น ไม่มีตะกอน พบว่ามีละมั่ง 33.33 เปอร์เซ็นต์ของกลุ่มละมั่งที่เก็บน้ำเชื้อได้ ไม่สามารถหลั่งน้ำเชื้อออกมาในระดับการกระตุ้นนี้ ระดับการกระตุ้นที่ 2 พบน้ำเชื้อสีขาวขุ่นคล้ายสีน้ำนม มีความข้นน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อที่หลั่ง

ในระดับการกระตุ้นที่ 1 พบว่าละมั่งทั้ง 12 ตัวในกลุ่มการทดลองนี้สามารถหลั่งน้ำเชื้อออกมาที่ระดับการกระตุ้นที่ 2 สำหรับน้ำเชื้อที่เก็บได้ในระดับการกระตุ้นที่ 3 มีลักษณะใสและมีความหนืดเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อเทียบกับน้ำเชื้อที่ได้จากการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าระดับอื่น ละมั่ง 12 ตัว สามารถหลั่งน้ำเชื้อที่ระดับการกระตุ้นนี้

จากการวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อสดโดยนำน้ำเชื้อที่ได้จากการกระตุ้นทุกระดับรวมกันแล้วทำการวิเคราะห์ ข้อมูลแสดงใน **Table 1** พบว่าปริมาตรเฉลี่ยของน้ำเชื้อในละมั่งที่ทำการศึกษา คือ

Table 1. Fresh Semen Characteristics of Eld's Deer (Mean ± SEM)

Semen Characteristics	*Cervus eldii thamin* **(n=12)**
Volume (ml)	2.3 ±0.3
pH	7.6±0.2
Concentration ($x10^6$/ml)	1124.4±258.6
Progressive motility (%)	79.2±2.1
Viable sperm (%)	83.8±4.1
Normal Morphology (%)	92.3±1.8

Table 2. Morphometry Characteristics of Eld's Deer Spermatozoa by Using CASA (Mean ± SEM)

Morphometry characteristics	*Cervus eldii thamin* **(n=7)**	
	TRIS	**BF5F**
Length (μM)	8.2±1.5 [a]	8.4±1.4 [b]
Width (μM)	4.3±1.3 [a]	4.4±1.4 [b]
Wildth/Length (%)	51.9±0.2 [a]	52.6±0.1 [b]
Head area (μM^2)	28.7±0.1 [a]	29.8±0.1 [b]
Head perimeter (μM)	21.0±4.4 [a]	21.6±0.3 [b]

[(a)] The value of TRIS groups are significantly different ($p<0.05$) from the value of BF5F groups [(b)].

2.3 มิลลิลิตร ความเป็นกรด-ด่างมีค่า 7.6 ความเข้มข้นเฉลี่ยของตัวอสุจิ คือ 1124.4 ล้านตัว/มิลลิลิตร การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของตัวอสุจิเฉลี่ย 79.2 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์จำนวนตัวอสุจิที่มีชีวิตเฉลี่ย 83.8 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบรูปร่างพบจำนวนตัวอสุจิละมั่งรูปร่างปกติเฉลี่ย 92.3 เปอร์เซ็นต์

จากการวัดขนาดหัวของตัวอสุจิละมั่งแช่แข็งหลังการอุ่นละลายในสารละลายน้ำเชื้อทั้งสองชนิดเปรียบเทียบกัน พบค่าเฉลี่ยความยาวส่วนหัวอสุจิในสารละลายน้ำเชื้อ TRIS เท่ากับ 8.2 ไมโครเมตร ต่ำกว่าในสารละลายน้ำเชื้อ BF5F ที่มีความยาวส่วนหัวอสุจิเท่ากับ 8.4 ไมโครเมตร อย่าง

มีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ค่าเฉลี่ยความกว้างของหัวอสุจิในสารละลายน้ำเชื้อ TRIS เท่ากับ 4.3 ไมโครเมตร ต่ำกว่าในสารละลายน้ำเชื้อ BF5F ที่มีความกว้างส่วนหัวอสุจิเท่ากับ 4.4 ไมโครเมตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในส่วนของเปอร์เซ็นต์ความกว้าง/ความยาวของตัวอสุจิในสารละลายน้ำเชื้อ TRIS เท่ากับ 51.9 เปอร์เซ็นต์ ต่ำกว่าในสารละลายน้ำเชื้อ BF5F ที่มีเปอร์เซ็นต์ความกว้าง/ความยาวของตัวอสุจิเท่ากับ 52.6 เปอร์เซ็นต์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) สำหรับค่าเฉลี่ยพื้นที่ของหัวอสุจิในสารละลายน้ำเชื้อ TRIS เท่ากับ 28.7 ตารางไมโครเมตร ต่ำกว่าในสารละลายน้ำเชื้อ BF5F ที่มีค่าเฉลี่ยพื้นที่ของหัวอสุจิเท่ากับ 29.8 ตารางไมโครเมตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และค่าเฉลี่ยความยาวรอบหัวอสุจิละมั่งในสารละลายน้ำเชื้อ TRIS เท่ากับ 21 ไมโครเมตร ต่ำกว่าในสารละลายน้ำเชื้อ BF5F ที่ค่าเฉลี่ยความยาวรอบหัวอสุจิ เท่ากับ 21.6 ไมโครเมตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (**Table 2**)

วิจารณ์

จากข้อมูลการกระตุ้นเก็บน้ำเชื้อละมั่งทั้งสิ้น 16 ตัว สามารถกระตุ้นเก็บน้ำเชื้อจากละมั่งได้จำนวน 12 ตัวโดยทุกตัวมีเขาลักษณะแข็งสีน้ำตาล และกลุ่มที่ไม่สามารถกระตุ้นเก็บน้ำเชื้อ 4 ตัว โดยทุกตัวในกลุ่มนี้มีการผลัดเขาแก่แล้ว มีรายงานการศึกษาลักษณะน้ำเชื้อของ spotted deer พบว่าลักษณะเขามีความสัมพันธ์กับปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน(testosterone)ในกระแสเลือด คือใน spotted deer ที่มีลักษณะเขาแก่เต็มที่คือ เขามีสีน้ำตาลและแข็ง ปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในกระแสเลือดมีค่าสูงกว่าในละมั่งที่ผลัดเขาแก่แล้วและปริมาตรน้ำเชื้อ ความเข้มข้นของตัวอสุจิ และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่มีค่าสูงที่สุดในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงกรกฎาคมซึ่ง เดือนมีนาคมถึงเดือนพฤษภาคมเป็นช่วงที่ปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในกระแสเลือดสูงที่สุดและลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าต่างระดับมีค่าสอดคล้องกัน คือ น้ำเชื้อส่วนแรกมีสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนม ส่วนที่สองมีลักษณะใส และยังพบว่าคุณภาพน้ำเชื้อมีความสอดคล้องกับช่วงฤดูกาลผสมพันธุ์ซึ่งเป็นผลของช่วงความยาวแสง [27] ซึ่งจากข้อมูลของ pampas deer พบว่าลักษณะเขาที่แข็งของ pampas deer มีความสัมพันธ์กับช่วงฤดูกาล คือ ช่วงเดือน มีนาคม ถึง พฤษภาคม คุณภาพของตัวอสุจิจากการกระตุ้นเก็บพบว่าช่วงเดือนกุมภาพันธ์มีคุณภาพดีปกติ ส่วนช่วงเดือนกรกฎาคมและกันยายน จะมีคุณภาพต่ำ [28] และ ข้อมูล roe deer พบว่ามีช่วงฤดูผสมพันธุ์คือ กลางเดือนกรกฎาคมถึงกลางเดือนสิงหาคม ในการศึกษาพบว่าช่วงเวลาดังกล่าว ปริมาณเทสโทสเตอโรนในซีรั่มและพลาสมามีค่าสูงสอดคล้องกับการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิและเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับต่อมเพศชายมีจำนวนเซลล์ที่มีการทำงานสูงขึ้น [29]

จากรายงานการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อ fallow deer พบว่ามีค่าเฉลี่ยปริมาตรน้ำเชื้อ 2.5 มิลลิลิตร และมีความเข้มข้นเฉลี่ยของตัวอสุจิ >1000 ล้านตัว/มิลลิลิตร แต่จากรายงานดังกล่าวพบว่าในกรณีที่

สามารถกระตุ้นเก็บน้ำเชื้อได้ปริมาตรถึง 4 มิลลิลิตรนั้น อาจมีการปนเปื้อนของปัสสาวะขณะกระตุ้นเก็บน้ำเชื้อ [30] เมื่อเปรียบเทียบข้อมูลในการศึกษานี้กับการรายงานดังกล่าว พบว่ามีตัวอย่างละมั่งที่ทำการกระตุ้นเก็บน้ำเชื้อเพียง 1 ตัวอย่างที่มีปริมาตรน้ำเชื้อ 4.1 มิลลิลิตร โดยตัวอย่างนี้น้ำเชื้อที่ได้มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (8.3) สูงกว่าค่าเฉลี่ย และความเข้มข้นของอสุจิ (6 ล้านตัว/มิลลิลิตร) ต่ำกว่าค่าเฉลี่ย จากข้อมูลข้างต้นอาจกล่าวได้ว่าน้ำเชื้อจากตัวอย่างดังกล่าวเกิดการปนเปื้อนปัสสาวะขณะกระตุ้นเก็บ นอกจากนี้ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไปข้างหน้าของน้ำเชื้อสดละมั่งในการศึกษาครั้งนี้ (79.2%) พบว่าค่าที่ได้สูงกว่าเมื่อเทียบกับน้ำเชื้อสดของ fallow deer (60%) [30] และสูงกว่าเมื่อเทียบกับน้ำเชื้อสดของ spotted deer ที่มีเขาแก่ (66.5%) และใน spotted deer ที่ผ่านการผลัดเขาแก่ (29.9%) [27]

Table 3. Comparison of Thamin Eld's Deer in Different Extender with Animal Sperm Morphometric (Mean ± SEM)

	Length (μM)	**Width (μM)**	**Length/ Width (%)**	**Area (μM^2)**	**Perimeter (μM)**
Thamin eld's deer (TRIS)	8.2±1.5	4.3±1.3	51.9±0.2	28.7±0.1	21.0±4.4
Thamin eld's deer (BF5F)	8.4±1.4	4.4±1.4	52.6±0.1	29.8±0.1	21.6±0.3
Serow [23]	6.0±0.6	4.3±0.3	71.7±8.6	19.8±2.5	17.9±2.1
Thai native crossbred stallions [18]	6.2±0.01	3.09±0.0	34±0.001	15.88±0.03	15.77±0.07
Iberian Red Deer [7]	8.53	4.63	32.56	18.49	30.05
Canine [20]	6.72±0.17	3.89±0.15	58.17±2.56	20.94±1.06	17.70±0.4

ขนาดหัวของตัวอสุจิในสัตว์แต่ละชนิดมีขนาดแตกต่างกันดังค่าที่แสดงใน **Table 3** พบว่าค่าเฉลี่ยความยาว ค่าเฉลี่ยความกว้าง เปอร์เซ็นต์ความกว้าง/ความยาว ค่าเฉลี่ยพื้นที่ของหัวอสุจิ และค่าเฉลี่ยความยาวรอบหัวอสุจิละมั่งทั้งในสารละลายน้ำเชื้อ TRIS และ BF5F มีค่าสูงกว่าในหัวอสุจิแช่แข็งของสุนัข [21] ม้าไทยพื้นเมือง [22] และเลียงผา [23] และมีค่าต่ำกว่าเมื่อเทียบกับ Iberian Red Deer [31] การศึกษาผลของสารละลายน้ำเชื้อและกระบวนการแช่แข็งต่อขนาดของหัวอสุจิแพะ [19] และม้า [20] พบว่าสารละลายน้ำเชื้อมีผลต่อขนาดหัวที่เปลี่ยนแปลงไปสูงกว่าผลจากกระบวนการแช่แข็ง

เมื่อเปรียบเทียบขนาดหัวอสุจิละมั่งหลังการแช่แข็งและอุ่นละลายในสารละลายน้ำเชื้อทั้ง 2 ชนิดในการทดลอง พบว่าขนาดหัวอสุจิละมั่งในสารละลายน้ำเชื้อ TRIS มีขนาดต่ำกว่าในสารละลายน้ำเชื้อ BF5F อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบข้อมูลแรงดันออสโมติกในสารละลายน้ำเชื้อ TRIS พบว่าในสารละลายน้ำเชื้อ TRIS มีค่าแรงดันออสโมติกสูงกว่าในสารละลายน้ำเชื้อ BF5F ซึ่งอาจส่งผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของน้ำในเซลล์อสุจิและสารละลายน้ำเชื้อ และอาจเป็นผลให้ขนาดหัวอสุจิในสารละลายน้ำเชื้อ TRIS มีขนาดต่ำกว่า [12] ซึ่งมีการศึกษาขนาดหัวอสุจิ

แพะพบว่าในสารละลายน้ำเชื้อ TRIS ขนาดหัวอสุจิมีค่าต่ำกว่าในสารละลายน้ำเชื้อ Milk [19] เนื่องจากในรายงานไม่ได้เปรียบเทียบขนาดหัวอสุจิหลังผ่านการแช่แข็งและขนาดหัวอสุจิก่อนการแช่แข็ง และนอกจากนี้ยังไม่มีข้อมูลรายงานขนาดหัวอสุจิละมั่งก่อนการแช่แข็งมาก่อน ทำให้ไม่สามารถสรุปได้ว่าสารละลายชนิดใดที่รักษาสภาพของหัวตัวอสุจิละมั่งได้ดีกว่ากัน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาเพื่อนำมาเปรียบเทียบต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะสัตวแพทยศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสนที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการปฏิบัติงาน และ ขอบคุณกรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่าและพันธุ์พืช และองค์การสวนสัตว์ในพระบรมราชูปถัมภ์ ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างเพื่อการศึกษาครั้งนี้

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำนักพัฒนาบัณฑิตศึกษาและวิจัยด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สบว.)สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ

เอกสารอ้างอิง

1. นริศ ภูมิภาคพันธ์, รองลาภ สุขมาสรวง และสุเมธ กมลนรนาถ. สถานการณ์ของละมั่งพันธุ์ไทยในสถานที่เลี้ยงและการฟื้นฟูสู่ธรรมชาติ. *วารสารสัตว์ป่าเมืองไทย*. 2547; 12(1): 62-94
2. Alvarez M, Garcıa-Macıas V, Martınez-Pastor F, Martınez F, Borragan S, Mata M, Garde J, Anel L and DePazb P. Effects of cryopreservation on head morphometry and its relation with chromatin status in brown bear *(Ursus arctos)* spermatozoa. *Theriogenology*. 2008; 70: 1498–1506.
3. พีรศักดิ์ อมตอาชาชัย, สมเกียรติ ปูกา และสมพร นกทอง. การนำเสนอผลการปฏิบัติการของเขตรักษาพันธุ์สัตว์ป่าเวียงลอ. *รายงานการประชุมประจำเดือนธันวาคม 2551 ครั้งที่ 12 สำนักที่อนุรักษ์ที่ 15*, เชียงราย. 2552: 11-12
4. Pukazhenth BS, Wildt DE. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? *Reprod Fertil Devel*. 2004; 16: 33-46.
5. Thongtip N, Mahasawangku S, Thitaram C, Pongsopavijitr P, Kornkaewrat K, Pinyopummin A, et al. Successful artificial insemination in the Asian elephant *(Elephas maximus)* using chilled and frozen-thawed semen. *Reprod Biol End.* 2009;7(75):1-8.
6. Saragustv J, Hildebrandt TB, Behr B, Knieriem A, Kruse J, Hermes R. Successful cryopreservation of Asian elephant (Elephas maximus) spermatozoa. *Anim Reprod Sci*. 2009;115:255–266.
7. Thiangtum K, Swanson WF, Howard J, Tunwattana W, Tongthainan D, Wichasilpa W, et al. Assessment of basic seminal characteristics, sperm cryopreservation and heterologous *in vitro* fertilization in the fishing cat (*Prionailurus viverrinus*). *Reprod Fertil Devel***.** 2006;18:373-382.
8. Fernandez-Santos MR, Esteso MC, MontoroV, Soler AJ, Garde JJ. Cryopreservation of Iberian red deer *(Cervus elaphus hispanicus)* epididymal spermatozoa: Effects of egg yolk, glycerol and cooling rate. *Theriogenology***.** 2006;66:1931–1942.

9. Ganan N, González R, Sestelo A, Garde JJ, Sanchez I, Aguilar JM, et al. Male reproductive traits, semen cryopreservation, and heterologous in vitro fertilization in the bobcat *(Lynx rufus*). *Theriogenology*. 2009;72(3):341-352.
10. Spindler RE, Huang Y, Howard JG, Wang P, Zhang H, Zhang G, et al. Acrosomal integrity and capacitation are not influenced by sperm cryopreservation in the giant panda. *Reproduction.* 2004;127:547–556.
11. Monfort SL, Asher GW, Wildt DE, Wood TC, Schiewe MC, Williamson LR, et al. Successful intrauterine insemination of Eld's deer *(Cervus eldi thamin)* with frozen-thawed spermatozoa *J Reprod Fert.* 1993;99:459-465.
12. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP. Cryopreservation of Mammalian Sperm: What We Ask Them to Survive. *J Androl.* 1990;11:73-88.
13. Pukazhenth BS, Wildt DE. Which reproductive technologies are most relevant to studying, managing and conserving wildlife? *Reprod Fertil Devel*. 2004;16:33-46.
14. Harnal VK, Spindler R, Monfort SL, Pukazhenthi B, Bird DM, Wildt DE. Sperm capacitation *In vitro* in the Eld's deer. *Theriogenology*. 2001;56:399-413.
15. Siriaroonrat B. 2006. Development of *In vitro* fertilization for the endangered eld's deer (*Cervus eldi thamin*): effect of *In vitro* maturation, fertilization and culture on developmental competence. *Ph.D Thesis.* George Mason University
16. Cheng F, Wu J, Chan JP, Wang J, Fung H, Colenbrander B, et al. The effect of different extenders on post-thaw sperm survival, acrosomal integrity and longevity in cryopreserved semen of Formosan Sika deer and Formosan Sambar deer. *Theriogenology*. 2004;61:1605–1616.
17. Coetzee K, Amanda DV, Kruger TF, Lombard CJ. Clinical value of using an automated sperm morphology analyzer (IVOS). *Fertil Steril***.** 1999;71(2):222-225.
18. Gravance CG, White C, Robertson KR, Champion ZJ, Casey PJ, The effects of cryopreservation on the morphometric dimensions of caprine sperm heads. *Anim Reprod Sci.* 1997;49:37–43.
19. Hidalgo M, Rodrıguez I, Dorado JM. The effect of cryopreservation on sperm head morphometry in Florida male goat related to sperm freezability. *Anim Reprod Sci*. 2007;100;61–72.
20. Arruda RP, Ball BA, Gravance CG, Garcia AR, Liu IKM. Effects of extenders and cryoprotectants on stallion sperm head morphometry. *Theriogenology*. 2002;58:253–256.
21. Rijsselaere T, Soom AV, Hoflack G, Maes D, Kruif A. Automated sperm morphometry and morphology analysis of canine semen by the Hamilton-Thorne analyser. *Theriogenology.* 2004;62:1292-1306.
22. Phetudomsinsuk K, Sirinarumitr K, Laikul A, Pinyopummin A. Morphology and head morphometrics characters of sperm in Thai native crossbred stallions. *Acta Veterinaria Scandinavica.* 2008;50:41-49.
23. Suwanpugdee A, Kornkeawrat K, Saikhun K, Siriaroonrat B, Tipkantha W, Doungsa-ard K, et al. Semen characteristics and sperm morphology of serow *(Capricornis sumatraensis). Theriogenology*. 2009;71:576–585.
24. Anzar M, Kroetsch T, Buhr MM. Comparison of different methods for assessment of sperm concentration and membrane integrity with bull semen. *J Androl.* 2009;*30(6):661-668.*
25. Sekoni VO, Gustafsson BK, Mather EC. Influence of wet fixation, staining techniques, and storage time on bull sperm morphology. *Nord Vet Med.* 1981;33:161-166.

26. Soler AJ, Andre J, Garci A, Maria R, Santos R, Esteso MC, et al. Effects of thawing procedure on postthawed *In vitro* viability and *In vivo* fertility of Red deer epididymal spermatozoa cryopreserved at -196 degrees C. *J Androl*. 2003;24(5):746-756.

27. Umapathy G, Sontakke SD, Reddy A, Shivaji S. Seasonal variations in semen characteristics, semen cryopreservation, estrus synchronization, and successful artificial insemination in the spotted deer (*Axis axis*). *Theriogenology.* 2007;67:1371–1378.

28. Ungerfeld R, González-Pensado S, Bielli A, Villagrán M, Olazabal D, et al. Reproductive biology of the pampas deer (Ozotoceros bezoarticus):a review. *Acta Veterinaria Scandinavica.* 2008;50:1-16.

29. Goeritz F, Quest M, Wagener A, Fassbender M, Broich A, Hildebrandt TB, et al. Seasonal timing of sperm production in roe deer: interrelationship among changes in ejaculate parameters, morphology and function of testis and accessory glands. *Theriogenology.* 2003;59:1487-1502.

30. Gosch B, Fischer K. Seasonal changes of testis volume and sperm quality in adult fallow deer (Dama dama) and their relationship to the antler cycle. *J Reprod Fert.* 1989;85:7-17.

31. Esteso MC, Fernandez-Santos MR, Soler AJ, Montoro V, Martınez- F, Garde JJ. Identification of Sperm-Head Morphometric Subpopulations in Iberian Red Deer Epididymal Sperm Samples. *Reprod Dom Anim*. 2009;44:206–211.