

ผลของการใช้เลซิทินจากถั่วเหลืองในสารละลายน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งของแพะ
(Effect of Soybean Lecithin based Extender on Frozen Semen Quality in Goat)

ณัฐธิญาดา จักสาน

Nattiyada Jaksan

ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

บทคัดย่อ

สารละลายเจือจางน้ำเชื้อของสัตว์เลี้ยงส่วนใหญ่ใช้ไข่แดงเป็นส่วนประกอบ เนื่องจากไข่แดงมีไขมันชนิดฟอสโฟไลปิดที่ช่วยป้องกันความเสียหายจากความเย็นของเซลล์อสุจิ อย่างไรก็ตาม น้ำเลี้ยงอสุจิ (seminal plasma) ของน้ำเชื้อแพะมีเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส (phospholipase) ที่ไปย่อยฟอสโฟไลปิดจากไข่แดงแล้วเกิดสาร lysolecithins ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์อสุจิ รวมทั้งไข่แดงมักจะมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ จึงมีความพยายามหาแหล่งฟอสโฟไลปิดจากพืชมาใช้แทนไข่แดง โดยเลซิทินจากถั่วเหลืองน่าจะมีคุณสมบัติดังกล่าว สัมมนาฉบับนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลการใช้เลซิทินจากถั่วเหลืองในสารละลายน้ำเชื้อต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งแพะหลังการละลาย โดยทำการศึกษาจากเอกสารวิชาการจำนวน 3 ฉบับ ตั้งแต่ปี ค.ศ. 2019-2020 ซึ่งใช้เลซิทินจากถั่วเหลืองที่ระดับ 0.5-3% จากการศึกษาพบว่าการใช้เลซิทินจากถั่วเหลืองระดับ 1.5-2% ทำให้การเคลื่อนที่ การมีชีวิต ความสมบูรณ์ของเซลล์เมมเบรนและอะโครโซมของอสุจิไม่แตกต่างจากการใช้ไข่แดง แต่มีค่ามากกว่าการใช้เลซิทิน 3% ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสามารถใช้เลซิทินจากถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบในสารละลายน้ำเชื้อแช่แข็งของแพะได้ที่ระดับ 1.5-2% เนื่องจากส่งผลดีต่อคุณภาพของเซลล์อสุจิ

คำสำคัญ: แพะ เลซิทินจากถั่วเหลือง น้ำเชื้อแช่แข็ง คุณภาพน้ำเชื้อ

บทนำ

สารละลายเจี๊องน้ำเชื้อสำหรับการแช่แข็งอสุจิของสัตว์เลี้ยงในปัจจุบันมีสารละลายหลายชนิด เช่น egg yolk นํ้านม tris-egg yolk หรือ egg yolk-citrate เป็นต้น โดยสารละลายเจี๊องน้ำเชื้อทำหน้าที่เพิ่มปริมาณน้ำเชื้อ เป็นแหล่งพลังงานให้เซลล์อสุจิ และที่สำคัญคือมีคุณสมบัติในการป้องกันความเสียหายของเซลล์อสุจิจากกระบวนการแช่แข็ง โดยนิยมใช้ไข่แดงเป็นส่วนประกอบเนื่องจากมี phospholipid ที่เป็นสารป้องกันการช็อกเนื่องจากความเย็น (cold shock protectants) ซึ่งจะทำหน้าที่เหมือนฟิล์มเคลือบอยู่รอบนอกเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิ ทำให้ลดความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิได้ อย่างไรก็ตามน้ำเชื้อของแพะแตกต่างจากสัตว์เลี้ยงชนิดอื่นเนื่องจากน้ำเลี้ยงอสุจิ (seminal plasma) ที่ขับออกมาจากต่อม Cowper's gland มีเอนไซม์ phospholipase (egg yolk coagulation enzyme) ซึ่งไปย่อยเลซิตินในไข่แดงทำให้ได้กรดไขมันและ lysolecithins และเป็นพิษต่อเซลล์อสุจิและทำให้เกิดการตกตะกอนของสารละลายเจี๊องน้ำเชื้อ ทำให้อสุจิเสียหายหรือตายได้ (Iritani and Nishikawa, 1972 อ้างโดย จิตศักดิ์, 2559) ระดับความรุนแรงของความเป็นพิษที่เกิดจากของเอนไซม์ phospholipase ที่อยู่ในน้ำเลี้ยงอสุจิสำหรับสารละลายเจี๊องน้ำเชื้อที่มีไข่แดงเป็นส่วนประกอบจะแปรผันตามฤดูกาล (Loubser et al., 1983) และพ่อพันธุ์แต่ละตัว (Leboeuf et al., 2000) นอกจากนั้นไข่แดงยังอาจจะมี การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ และเมื่อไม่นานมานี้มีงานวิจัยที่รายงานผลการใช้เลซิตินจากถั่วเหลือง เพื่อทดแทนการใช้ไข่แดง (Phutikanit et al., 2011; Vidal et al., 2013) เพราะในถั่วเหลืองมี phospholipids ชนิด phosphatidyl serine สามารถป้องกันความเสียหายของเซลล์อสุจิจากกระบวนการแช่แข็งได้เช่นกัน (Asmaa et al., 2018) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีข้อสรุปในความสำเร็จของการใช้ รวมถึงระดับที่เหมาะสมของการใช้เลซิตินจากถั่วเหลืองในสารละลายเจี๊องน้ำเชื้อแพะ ดังนั้นสมมติฐานบับนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงคุณภาพของตัวอสุจิเมื่อใช้เลซิตินจากถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบของน้ำยาเจี๊องน้ำเชื้อแช่แข็งของแพะ

การเคลื่อนที่ของอสุจิแพะหลังการละลาย

Salmani et al. (2014) ศึกษาผลของเลซิตินจากถั่วเหลืองในระดับ 0.5, 1, 1.5, 2 และ 2.5% และไข่แดง 15% เป็นกลุ่มควบคุม ต่อคุณภาพอสุจิหลังการละลาย โดยเก็บน้ำเชื้อจากแพะเพศผู้ 4 ตัวและทำการเก็บสองครั้งต่อสัปดาห์ พบว่า การเคลื่อนที่ของอสุจิเมื่อเสริมด้วยไข่แดง 15% มีค่ามากกว่าการเสริมเลซิตินจากถั่วเหลืองในระดับที่ 0.5, 2 และ 2.5% แต่ไม่แตกต่างจากการเสริมเลซิตินจากถั่วเหลืองที่ระดับ 1 และ 1.5% ในขณะที่การเสริมเลซิตินจากถั่วเหลืองที่ระดับ 1, 2 และ 2.5% มีค่าไม่แตกต่างกันแต่มากกว่ากลุ่มที่เสริมเลซิตินที่ระดับ 0.5% (Table 1) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Kalita et al. (2019) ที่ทำการศึกษาประสิทธิภาพของเลซิตินจากถั่วเหลืองในสารละลายน้ำเชื้อเพื่อทดแทนไข่แดง โดยใช้แพะตัวผู้จำนวน 4 ตัว ทำการเก็บน้ำเชื้อ 1-2 ครั้งต่อสัปดาห์ และให้มีสารละลายน้ำเชื้อแช่แข็งประกอบด้วยเลซิตินจากถั่วเหลือง 1% และ 1.5% และไข่แดง 20% พบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งหลังละลายในกลุ่มที่ใช้เลซิติน 1.5% และไข่แดง 20% มีการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่แตกต่างกัน

แต่การใช้เลซิติน 1.5% มีการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้เลซิตินจากถั่วเหลือง 1% (Table 2) ในขณะที่ Sun et al. (2020) ทำการศึกษาคุณภาพของอสุจิหลังการละลายน้ำเชื้อของแพะ ซึ่งใช้เลซิตินจากถั่วเหลืองในระดับที่ 0.5, 1, 2 และ 3% โดยมีไข่แดง 20% เป็นกลุ่มควบคุม และใช้น้ำเชื้อจากแพะพันธุ์ Chongming White อายุ 3-5 ปี จำนวน 8 ตัว พบว่าน้ำอสุจิที่ใช้เลซิตินจากถั่วเหลือง 1.5% มีการเคลื่อนที่ของอสุจิสูงกว่าการใช้ไข่แดง 20% และ การใช้เลซิตินจากถั่วเหลือง 0.5, 1 และ 3% มีการเคลื่อนที่ของอสุจิต่ำที่สุดในขณะที่ใช้เลซิตินจากถั่วเหลือง 1 และ 3% มีการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่แตกต่างกัน (Table 3)

Table 1 Effect of soybean lecithin on the motility, progressive, membrane integrity and viability of frozen-thawed goat sperm in the extender containing different concentration of soybean lecithin

groups	motility(%)	viability(%)	progressive(%)	membrane integrity(%)
Egg yolk 15%	59.8±1.8 ^a	67.2±1.68 ^a	35.4±1.6 ^a	64.9±1.7 ^a
Soy-lecithin 0.5%	31.6±1.8 ^c	51.7±1.68 ^c	18.2±1.6 ^d	49.6±1.7 ^d
Soy-lecithin 1%	55.2±1.8 ^{ab}	62.4±1.68 ^{ab}	30.4±1.6 ^{bc}	61.3±1.7 ^{ab}
Soy-lecithin 1.5%	58.4±1.8 ^a	66.9±1.68 ^{ab}	33.8±1.6 ^{ab}	62.7±1.7 ^{ab}
Soy-lecithin 2%	51.6±1.8 ^b	61.3±1.68 ^b	29.2±1.6 ^{bc}	57.8 ±1.7 ^{bc}
Soy-lecithin 2.5%	49.6±1.8 ^b	54.6±1.68 ^c	25.6±1.6 ^c	53.3±1.7 ^{cd}

^{abcd}denote significant differences (p < 0.05) in the same row.

Source: Salmani et al. (2014)

สำหรับการเคลื่อนที่ของอสุจิ ทั้ง 3 งานทดลองให้ผลเดียวกันเมื่อใช้เลซิตินต่ำกว่า 1.5% อสุจิมีการเคลื่อนที่ต่ำ อาจจะเป็นผลจากฟอสโฟลิปิดในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อมีปริมาณไม่เพียงพอที่จะป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ตัวอสุจิได้รับความเสียหายจากการไหลเข้า-ออกของน้ำและสารละลายอื่นภายในเซลล์ระหว่างการลดอุณหภูมิส่งผลให้อสุจิมีชีวิตรอดต่ำลงและทำให้อสุจิที่ยังมีชีวิตรอดมีการเคลื่อนที่ต่ำลงด้วย (Aboagha and Terada, 2004) และถ้าใช้เลซิตินจากถั่วเหลืองมากกว่า 2% อาจส่งผลให้สารละลายน้ำเชื้อเกิดความหนืดเพิ่มขึ้น เนื่องจาก Watson (1981) พบว่าการใช้เลซิตินที่มีความเข้มข้นสูง ทำให้สารละลายน้ำเชื้อมีความหนืด เป็นอุปสรรคในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ จึงมีผลให้ความเร็วในการเคลื่อนที่ลดลง

การมีชีวิตรอดของอสุจิแพะ

Salmani et al. (2014) พบว่า การมีชีวิตรอดของอสุจิแพะ 15% เป็นส่วนประกอบของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ มีค่ามากกว่าการใช้เลซิตินจากถั่วเหลืองระดับ 0.5, 2 และ 2.5% แต่ไม่แตกต่างจากการใช้เลซิตินจากถั่ว

เหลืองที่ระดับ 1 และ 1.5% ในขณะที่การใช้เลซิตินจากถั่วเหลืองระดับ 1% มีค่ามากกว่าการใช้เลซิตินจากถั่วเหลืองที่ระดับ 0.5% แต่ไม่แตกต่างกับการใช้เลซิตินจากถั่วเหลืองระดับ 1.5 และ 2% และการใช้ เลซิตินจากถั่วเหลืองระดับ 0.5 และ 2.5% ไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ผลการศึกษาของ Kalita et al. (2019) พบว่าการมีชีวิตของอสุจิแพะหลังการละลายเมื่อเสริมด้วยไข่แดง 20% มีค่ามากกว่าการใช้เลซิตินจากถั่วเหลืองระดับ 1.5% และการใช้เลซิตินจากถั่วเหลืองระดับ 1.5% มีค่ามากกว่าการใช้เลซิตินจากถั่วเหลืองระดับ 1% และ Sun et al. (2020) พบว่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของอสุจิแพะหลังการละลายเมื่อใช้ไข่แดง 20% มีค่ามากกว่าการใช้เลซิตินจากถั่วเหลือง 0.5, 1 และ 3% แต่ไม่แตกต่างกับการใช้เลซิตินจากถั่วเหลือง 2% ในขณะที่การใช้เลซิตินจากถั่วเหลือง 1% มีค่ามากกว่าการใช้เลซิตินจากถั่วเหลือง 0.5% แต่ไม่แตกต่างกับการใช้เลซิตินจากถั่วเหลือง 3% (Table 3)

Table 2 Means $\pm$ standard errors of frozen-thawed sperm motility, sperm viability, acrosome integrity, membrane permeability and mitochondrial activity for three groups

Groups	motility(%)	viability(%)	intact acrosome(%)	HOST(%)
Egg yolk 20%	61.20 $\pm$ 0.45 ^a	72.32 $\pm$ 0.47 ^a	68.42 $\pm$ 0.43 ^a	64.35 $\pm$ 0.63 ^a
Soy-lecithin 1%	57.77 $\pm$ 0.54 ^b	65.40 $\pm$ 0.56 ^c	61.30 $\pm$ 0.74 ^c	57.35 $\pm$ 0.50 ^c
Soy-lecithin 1.5%	60.20 $\pm$ 0.45 ^a	67.07 $\pm$ 0.56 ^b	63.80 $\pm$ 0.58 ^b	60.17 $\pm$ 0.46 ^b

^{abc} Means values with different superscript letters differ significantly (P<0.05)

HOST = hypo osmotic swelling test

Source: Kalita et al. (2019)

Table 3 Effects of adding egg yolk (EY) and different concentrations of soybean lecithin (SL) to the primary extender on the post-thaw quality of goat spermatozoa (n=8 goats and n=16 ejaculates)

Groups	motility(%)	viability(%)	membran integrity(%)	acrosome intesrity(%)
Tris + 20% EY	49.21 $\pm$ 0.7 ^b	59.28 $\pm$ 0.75 ^a	45.98 $\pm$ 0.12 ^a	54.07 $\pm$ 0.91 ^a
Tris + 0.5% SL	33.35 $\pm$ 1.5 ^d	37.57 $\pm$ 1.11 ^c	28.96 $\pm$ 0.97 ^d	34.65 $\pm$ 0.49 ^c
Tris + 1% SL	38.35 $\pm$ 0.88 ^c	42.22 $\pm$ 2.03 ^b	34.76 $\pm$ 1.10 ^c	38.31 $\pm$ 1.34 ^b
Tris + 2% SL	52.14 $\pm$ 0.82 ^a	57.44 $\pm$ 2.09 ^a	45.31 $\pm$ 1.36 ^a	52.96 $\pm$ 1.21 ^a
Tris + 3% SL	38.61 $\pm$ 0.64 ^c	43.13 $\pm$ 0.57 ^b	32.3 $\pm$ 0.47 ^c	38.28 $\pm$ 0.42 ^b

^{abc} Means values with different superscript letters differ significantly (P<0.05)

Source: Sun et al. (2020)

จากการศึกษาทั้ง 3 งานวิจัยให้ผลว่าการใช้เลซิดินจากถั่วเหลืองในระดับที่ต่ำกว่า 1.5 และ 2% มีผลทำให้ตัวอสุจิมีชีวิตรอดต่ำกว่าการใช้ไข่แดง เนื่องจากการรักษาสภาพสมดุลภายในและภายนอกเซลล์ในขณะที่ลดอุณหภูมิไปยังจุดเยือกแข็งไม่ดีเท่าที่ควร (Aboagla and Terada, 2004; Jones and Martin, 1973 อ้างโดย จตุพงษ์ และคณะ 2551) ทั้งนี้ Amirat et al (2004). พบว่าถ้าใช้ในปริมาณสูงก็ส่งผลต่อจำนวนมีชีวิตของอสุจิได้ เนื่องจากการเติมเลซิดินในปริมาณสูง ส่งผลให้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อมีความเข้มข้นมาก อาจทำให้ยับยั้งการหายใจของอสุจิได้

ความสมบูรณ์ของเมมเบรนและอะโครโซมของอสุจิแพะ

Salmani et al. (2014) พบว่าความสมบูรณ์ของเซลล์เมมเบรนหลังการละลายเมื่อใช้ไข่แดงในสารละลายน้ำเชื้อที่ระดับ 15% มีค่ามากกว่าการใช้เลซิดินจากถั่วเหลือง 2% แต่ไม่แตกต่างจากการใช้เลซิดินจากถั่วเหลือง 1 และ 1.5% และการใช้เลซิดินจากถั่วเหลือง 1% มีค่ามากกว่าการใช้เลซิดินจากถั่วเหลือง 2.5% แต่ไม่แตกต่างจากการใช้เลซิดินจากถั่วเหลือง 1 และ 1.5% ในขณะที่การใช้เลซิดินจากถั่วเหลือง 2% มีค่ามากกว่าการใช้เลซิดินจากถั่วเหลือง 0.5% แต่ไม่แตกต่างจากการใช้เลซิดินจากถั่วเหลือง 1, 1.5 และ 2.5% การใช้เลซิดินจากถั่วเหลือง 2.5% ไม่แตกต่างกับการใช้เลซิดินจากถั่วเหลือง 0.5% (Table 1) และการศึกษาของ Sun et al. (2020) พบว่าความสมบูรณ์ของเมมเบรนหลังการละลายเมื่อใช้ไข่แดงที่ระดับ 20% มีค่ามากกว่าการใช้เลซิดินจากถั่วเหลือง 1 และ 3% แต่ไม่แตกต่างจากการใช้เลซิดินจากถั่วเหลือง 2% ในขณะที่การใช้เลซิดินจากถั่วเหลืองในสารละลายน้ำเชื้อที่ระดับ 1% มีค่ามากกว่าการใช้เลซิดินจากถั่วเหลือง 0.5% แต่ไม่แตกต่างจากการใช้เลซิดินจากถั่วเหลือง 3%

Kalita et al. (2019) พบว่าความสมบูรณ์ของอะโครโซมหลังการละลายเมื่อเสริมไข่แดง 20% มีค่ามากกว่าการใช้เลซิดินจากถั่วเหลือง 1 และ 1.5% ในขณะที่การใช้เลซิดินจากถั่วเหลือง 1.5% มีค่ามากกว่าการใช้เลซิดินจากถั่วเหลือง 1% จากผลการศึกษาของ Sun et al. (2020) พบว่าความสมบูรณ์ของอะโครโซมหลังการละลายเมื่อใช้ไข่แดง 20% ค่ามากกว่าการใช้เลซิดินจากถั่วเหลือง 0.5, 1 และ 3% ไม่แตกต่างจากการใช้เลซิดินจากถั่วเหลือง 2% ส่วนการใช้เลซิดินจากถั่วเหลือง 1% มีค่ามากกว่าการใช้เลซิดินจากถั่วเหลือง 0.5% แต่ไม่แตกต่างจากการใช้เลซิดินจากถั่วเหลือง 3% (Table 3)

จากการศึกษาของทั้งสามงานวิจัยพบว่าการใช้เลซิดินจากถั่วเหลือง 1.5 และ 2% ให้ผลความสมบูรณ์ของเมมเบรนและอะโครโซมดีที่สุด อาจเนื่องจากถ้าใช้เลซิดินที่น้อยเกินไปทำให้เกิดความเสียหายกับเยื่อหุ้มตัวเซลล์อสุจิและอะโครโซม โดยทำให้ส่วนอะโครโซมและตัวอสุจิได้รับความเสียหายเนื่องจากไม่สามารถป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์อสุจิจากการลดอุณหภูมิต่ำมากและการแช่แข็งได้ อาจจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์อสุจิบางส่วนเสื่อมสภาพลง ส่งผลให้ตัวอสุจิตาย (Love et al., 2005; อ้างโดย จิตศักดิ์ 2559) อย่างไรก็ตามถ้าใช้เลซิดินสูงเกินไป ทำให้สารละลายน้ำเชื้อมีความเข้มข้นสูงขึ้นและความหนืดเพิ่มขึ้น การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง ทำให้ตัวอสุจิตาย (Forouzanfar et al, 2010)

สรุป

การใช้เลซิตินจากถั่วเหลืองในสารละลายน้ำเชื้อแช่แข็งของแพะสามารถใช้ได้ในระดับที่ 1.5-2% เนื่องจากสามารถป้องกันอสุจิไม่ได้รับความเสียหายจากความเย็นในกระบวนการแช่แข็ง และยังรักษาความสมบูรณ์ของผนังเซลล์และอะโครโซม การเคลื่อนที่ และความมีชีวิตของเซลล์อสุจิได้ไม่แตกต่างจากการใช้ไข่แดง ดังนั้นจึงสามารถใช้เลซิตินจากถั่วเหลืองเป็นทางเลือกในการเป็นส่วนประกอบของสารละลายน้ำเชื้อ เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดสารพิษและลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในไข่แดง

เอกสารอ้างอิง

- จตุพร พงษ์เพ็ง, ณรงค์ เลียงเจริญ, มุขตา รัตนภาสกร, ปิยวรรณ สุธรรมานันท์, ธวัชชัย แก้วมาก และ มาลี อภิเมธีธำรง. 2551. “การศึกษาความสมบูรณ์ของอโครโซมของอสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็งแพะที่เจือจาง egg yolk tris ที่มีปริมาณไข่แดงแตกต่างกันด้วยเครื่องฟลูออโรมิเตอร์”. *สัตวแพทยมหาวิทยาลัยนครสวรรค์*. 3(1): 13-20
- จิตศักดิ์ เมืองเขียว. 2559. “การศึกษาของการปั่นแยกเซมินอลพลาสมาและแหล่งของเลซิตินในสารละลายเจือจางต่อคุณภาพน้ำเชื้อแพะแช่แข็ง”. *วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิตมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์*.
- Aboagla, E.M. and Terada, T. 2004. “Effects of egg yolk during the freezing step of cryopreservation on the viability of goat spermatozoa”. *Theriogenology*. 62(6): 1160-1172
- Ashmawy, T. A. M., Sallam, A. A., El-Khale, A. E. A., El-Saidy, B. E. and Gabr, M. G. 2010. “Recovery and fertilization rates of goat spermatozoa as affected by different levels of egg-yolk, dilution rates, freezing method and months of the year”. *Physiology & Reproduction*. 5(1): 283-293.
- Asmaa, A. M., Mohamed S. E., Sayed, T. I., Reda I. E. and Mohamed, I. S. 2018. “Impact of replacing egg yolk with lecithin on quality of pre-freeze and post-thaw buffalo spermatozoa”. *Asian Pacific Journal of Reproduction*. 7(6): 254-260.
- Forouzanfar, M., Sharafi, M., Hosseini, S. M., Ostadhosseini, S., Hajian, M., Hajian, L., Hosseini, P., Abedi, Nili, Rahmani, N. H. R. and Nasr-Esfahani M. H. 2010 “In vitro comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of ram semen”. *Theriogenology*. 73: 480-487.
- Jones, R.C. and Martin, I.C.A. 1973. “The effects of dilution egg yolk and cooling to 5°C in the ultrastructure to ram spermatozoa”. *Journal of reproduction & fertility*. 35: 311-320
- Kalita, M., Sinha S., Deka, B., Biswas, R., Barkalita, L. and Borah, R. 2019. “Efficacy of soy-lecithin f

- or replacing egg yolk in tris extender on quality of frozen buck semen”. **Indian Journal of Animal Sciences.** 89(4): 42
- Leboeuf, B., Restall, B. and Salamon, S. 2000. “Production and storage of goat semen for artificial insemination”. **Animal Reproduction Sci.** 62: 113–141
- Love, A. J., Yun, B. W., Laval, V., Loake, G. J. and Milner, J. L. 2005. “Cauliflower mosaic virus, a compatible pathogen of Arabidopsis, engages three distinct defense-signaling pathway and activates rapid systemic generation of reactive oxygen species”. **Plant Physiol.** 139: 935-948.
- Pearodwong, P., Suwimonterabutr, J., Rungruangsak, J. and Tummaruk, P. 2019 “Comparison of egg yolk-based and soybean lecithin-based extenders for cryopreservation of goat semen”. **veterinarska stanica.** 50(6): 513-540
- Phutikanit, N., Sangkrachang, E., Suwimonterabutr, J. and Singlor, J. 2011 “Effect of sources and concentrations of soybean phosphatidylcholine on diluted goat semen equilibrated at 4 °C”. **Journal of Agricultural Science and Technology A.** 1:1170-1173
- Salimani, H., Towhidi, A., Zhandi, M., Bahreini, M. and Sharafi, M. 2014 “In vitro assessment of soybean lecithin and egg yolk based diluents for cryopreservation of goat semen”. **Cryobiology.** 68: 276-280
- Sun, L., Fan, W., Wu C., Zhang, S., Dai, J. and Zhang, D. 2019. “Effect of substituting different concentrations of soybean lecithin and egg yolk in tris-based extender on goat semen cryopreservation”. **Cryobiology.** 92: 146-150
- Vidal, A. H., Batista, A. M., BentodaSilva, E. C., Gomes, W. A., Pelinca, M. A., Silva, S. V. and Guerra, M. M. P. 2013. “Soybeanlecithin-based extender as an alternative for goat sperm cryopreservation”. **Small Ruminant Research.** 109: 47-51