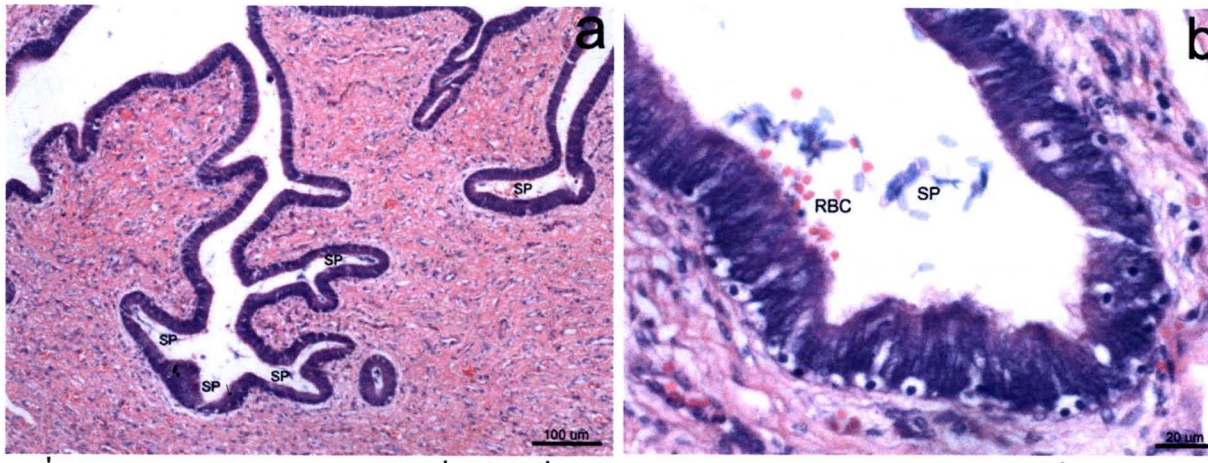
บทที่ 2
การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (Information) ที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันการผสมเทียมได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรทั่วโลก เนื่องจากการผสมเทียมทำให้เกิดการถ่ายทอดพันธุกรรมได้อย่างรวดเร็ว (Einarsson, 1981; Flowers and Esbenshade, 1993: Johnson et al., 2000) อย่างไรก็ดีผลการวิจัยในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาบ่งชี้ว่าการผสมเทียมสุกรแบบที่ใช้ในปัจจุบัน ยังไม่เหมาะสมที่จะใช้กับเชื้ออสุจิสุกรที่มีมูลค่าสูงและมีความอ่อนแอ เช่น น้ำเชื้อพ่อพันธุ์ที่นำเข้าจากต่างประเทศ น้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็ง และน้ำเชื้อที่ผ่านการคัดแยกเพศ การผสมเทียมแบบใหม่จึงได้ถูกพัฒนาขึ้น โดยใช้วิธีการสอดท่อผ่านคอมดลูกเพื่อนำน้ำเชื้อไปปล่อยที่ในตัวมดลูก เรียกว่า "intrauterine insemination" (IUI) หรือสอดผ่านไปจนถึงส่วนต้นของปีกมดลูก เรียกว่า "deep intrauterine insemination" (DIUI) โดยไม่ต้องทำการผ่าตัด (Martninez et al., 2001; Sumransap et al., 2007; Tummaruk et al., 2007)การผสมเทียมสุกรด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งมีการพัฒนาและใช้งานในอุตสาหกรรมการผลิตสุกรอย่างรวดเร็วในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาในสหรัฐอเมริกาและยุโรป (Eriksson, 2000; Roca et al., 2003) การผลิตน้ำเชื้อสุกรแช่แข็งในระดับอุตสาหกรรมในประเทศไทยยังขาดข้อมูลพื้นฐานที่เกี่ยวข้องในกระบวนการผลิต ขั้นตอน และเทคนิคการผลิต ตลอดจนเทคนิคการผสมพันธุ์ อย่างไรก็ดีเกษตรกรยังมีความต้องการนำเข้าน้ำเชื้อพ่อพันธุ์สุกรจากต่างประเทศเพื่อใช้พัฒนาพันธุกรรมของสุกรในประเทศไทยให้มีศักยภาพการผลิตที่ทัดเทียมและสามารถแข่งขันกับต่างประเทศได้

การขนส่งอสุจิ(sperm transport)

โดยปกติการผสมเทียมสุกรแต่ละครั้งจะใช้น้ำเชื้อสดเจือจางที่มีตัวอสุจิ 2,000-5,000 ล้านตัว ในปริมาตร 80–100 มิลลิลิตร และปล่อยน้ำเชื้อภายในคอมดลูกซึ่งมีความยาวประมาณ 15-20 ซม. หลังจากนั้นตัวอสุจิก็เดินทางต่อไปยังตัวมดลูก ซึ่งมีความยาวประมาณ 5 ซม. และต่อไปยังปีกมดลูกซ้าย และขวา ซึ่งแต่ละข้างมีความยาวประมาณ 90-140 ซม.ตัวอสุจิจะเดินทางไปจนถึง บริเวณรอยต่อระหว่างปีกมดลูกกับท่อนำไข่ (uterotubal junction, UTJ) ภายในเวลาไม่กี่นาที บริเวณนี้เรียกว่า sperm reservoir (รูปที่ 1) (Rodriguez-Martinez et al., 2001; Tienthai et al., 2004; Tummaruk and Tienthai, 2010) หน้าที่ของ sperm reservoir คือ เป็นที่คัดกรองตัวอสุจิที่วิ่งผ่านเข้าไปยังท่อนำไข่ ให้มีปริมาณน้อยลง เพื่อป้องกัน การเกิดภาวะ ไข่ถูกผสมโดยอสุจิมากกว่าสองตัว (polyspermia) ช่วยในการทำให้

อสุจิอยู่ในระยะพร้อมปฏิสนธิ (capacitation) และช่วยให้อสุจิมีชีวิตยาวนานขึ้นและป้องกันเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันมิให้ทำลายอสุจิ



รูปที่ 1.1 การกระจายตัวของเซลล์อสุจิที่บริเวณเยื่อบุผนังท่อนำไข่บริเวณ uterotubal junction ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการผสมเทียม SP=เซลล์อสุจิ, RBC=เซลล์เม็ดเลือดแดง (a) 100x (b) 400x ย้อมด้วยสี H&E (ที่มา: Tummaruk and Tienthai, 2010)

อสุจิจะรออยู่ที่บริเวณ UTJ จนกระทั่งเกิดการตกไข่ (Rodriquez-Martinez et al., 2005) หลังจากนั้นอสุจิจะถูกปล่อยให้เข้าไปยังท่อนำไข่มากขึ้น แต่อย่างไรก็ดีอสุจิที่สามารถเดินทางผ่านท่อนำไข่เพื่อเข้าไปผสมกับไข่ได้นั้นมีจำนวนน้อยกว่าจำนวนที่ผสมเข้าไปมาก (ตารางที่ 1.1) Mburu et al. (1996) พบว่า มีจำนวนอสุจิที่บริเวณ UTJ เพียงประมาณ 10,000 -20,000 ตัว และที่บริเวณ ท่อนำไข่ส่วนล่างพบอสุจิ น้อยกว่า 1,000 ตัว ในขณะที่แม่สุกรตกไข่และมีอสุจิเพียงหนึ่งตัวเท่านั้นจะมีโอกาสได้ผสมกับไข่หนึ่งใบ ในการผสมเทียมแบบดั้งเดิม (conventional AI) นั้น อสุจิประมาณ 3,000 ล้านถูกผสม แต่พบว่าประมาณ 25-40% ถูกมดลูกบีบตัวออกมานอกร่างกายหลังจากผสมภายใน 2 ชั่วโมงครึ่ง (Steverink et al., 1998) อสุจิอีกมากกว่า 50% จะถูกเก็บกินโดยเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายภายในมดลูกหลังการผสมเทียมประมาณ 1 ชั่วโมง (Kaoeket et al., 2002; Matthijs et al., 2003) และอสุจิส่วนที่เหลือ จะหลบอยู่ตามซอกหลืบของคอมดลูกหรือตัวมดลูก และบางส่วนจะหลุดเข้าไปในช่องท้อง ดังนั้นจะเหลืออสุจิเพียงไม่ถึง 5% ที่มีความสามารถที่จะผสมได้อยู่ บริเวณ UTJ และ caudal isthmus (Mburu et al., 1996; Kunavongkrit et al., 2003; Tummaruk et al., 2007) (ตารางที่ 1.2)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ตารางที่ 1.1ค่าเฉลี่ยของจำนวนตัวอสุจิทั้งหมดที่ตรวจพบในท่อนำไข่และปีกมดลูกในแม่สุกรหลังการผสมเทียมแบบปกติ (AI) แบบสอดท่อเข้ามดลูก (IUI) และแบบสอดท่อเข้าปีกมดลูก (DIUI) (ที่มา: Sumransap et al., 2007; Tummaruk et al., 2007)

กลุ่ม	จำนวน	1	2	3	4	5	6	7
AI	6	87^{a}	343^{a}	$1,411^{a}$	$142,500^{b}$	$90,000^{c}$	$69,167^{cd}$	$45,000^{d}$
IUI	6	85^{a}	296^{a}	$1,280^{a}$	$131,167^{b}$	$90,000^{c}$	$66,167^{cd}$	$37,250^{ad}$
DIUI	5	25^{a}	76^{a}	284^{a}	$23,500^{b}$	$15,400^{c}$	$9,000^{d}$	$7,000^{d}$

* ส่วนที่ 1.แอมพูล่า 2. อิสธ์มัสส่วนต้น 3. อิสธ์มัสส่วนปลาย 4. ยูทีเจ 5. ปีกมดลูกส่วนต้น 6. ปีกมดลูกส่วนกลาง 7. ปีกมดลูกส่วนปลาย ^{abcd}อักษรต่างกันในแถวแนวนอนมีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่1.2ค่าเฉลี่ยของจำนวนอสุจิและพิสัยที่ตรวจพบในรอยต่อระหว่างมดลูกและท่อนำไข่ (uterotubal junction, UTJ) และ ส่วนอิสมัสของท่อนำไข่ (caudal isthmus)ในแม่สุกรที่ 24 ชั่วโมงหลังผสมพันธุ์ด้วยวิธี artificial insemination (AI), intrauterine insemination (IUI) and deep intra uterine insemination (DIUI)

Group	N	UTJ	Caudal isthmus	Total
AI	5	2276^{a} (36-3829)	20^{a} (0-98)	2296^{a} (36-3927)
IUI	5	716^{a} (141-2260)	13^{a} (0-59)	729^{a} (141-2260)
DIUI	5	22^{b} (0-56)	0^{a}	22^{b} (0-56)

^{ab}One letter in common within column do not differ significantly ($P>0.05$)

การแช่แข็งน้ำเชื้อสุกร (cryopreservation of boar semen)

การผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งสำหรับสุกรกำลังมีการพัฒนาอย่างรวดเร็วในหลายประเทศ ทั้งในยุโรป อเมริกา ออสเตรเลีย และเอเชีย (Eriksson, 2000; Buranaumnuay et al., 2008, 2009; Chanapiwat et al., 2009) วัตถุประสงค์ในการพัฒนาน้ำเชื้อแช่แข็งสำหรับสุกร คือเพื่อเก็บพันธุกรรมของพ่อสุกรที่มีลักษณะดี และสามารถกระจายลักษณะทางพันธุกรรมได้สะดวกและรวดเร็วกว่าน้ำเชื้อสด ลดข้อจำกัดในการขนส่งน้ำเชื้อระหว่างประเทศ อย่างไรก็ดี อสุจิของสุกรหลังผ่านการแช่แข็งและทำละลายค่อนข้างอ่อนแอและมีอัตราการผสมติดต่ำ (Eriksson and Rodriguez-Martinez, 2000) ปัญหาเกิดจากหลายสาเหตุ ได้แก่ อสุจิสุกรมีโครงสร้างของชั้นไขมันที่ผิวเซลต่างจากอสุจิของโคและมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมาก (Johnson et al., 2000) หลอดบรรจุน้ำเชื้อหรือวิธีการบรรจุ

น้ำเชื้อสำหรับการผสมเทียมค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากสุกรต้องผสมเทียมด้วยอสุจิจำนวนมากต่อครั้ง การใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาดใหญ่ (maxi straw ขนาด 5 มล.) ทำให้ความเย็นกระจายไม่ทั่วถึง และทำให้สูญเสียอสุจิหลังทำละลายเป็นจำนวนมาก การใช้หลอดขนาดเล็ก (ขนาด 0.5 มล.) ทำให้การผสมไม่สะดวกและต้องใช้หลายหลอดในการผสมแต่ละครั้ง การบรรจุแบบเม็ดสะดวกแต่การพิมพ์หมายเลขทำได้ยากและมีโอกาสติดเชื้อได้ง่ายทำให้การบรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งยังเป็นเรื่องที่ต้องทำการวิจัยอย่างต่อเนื่องอยู่ Eriksson and Rodriguez-Martinez (2000) พบว่าการใช้หลอดพลาสติกแบน (Flatpack) ได้ผลค่อนข้างดีในการแช่แข็งน้ำเชื้อสุกรในปริมาณมาก นอกจากนี้อัตราเร็วในการแช่แข็งน้ำเชื้อและทำละลายน้ำเชื้อก็มีความสำคัญต่ออัตราการรอดของอสุจิ ถ้าอัตราการแช่แข็งช้าเกินไปจะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งในเซลล์มาก และต้องมีสารป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งกับอสุจิด้วย การแช่แข็งน้ำเชื้อสุกรที่มีอัตราการแช่แข็ง 30 °C/นาที และมี Glycerol 3% ในหลอดขนาด 0.5 มล. (Buranaunnuay et al., 2009) หรือ 50 °C/นาที และมี Glycerol 1.5% (0.2 M) ในหลอดขนาด 0.25 มล.(Woelders and den Besten, 1993) พบว่าได้ผลดี อย่างไรก็ดีการแช่แข็งน้ำเชื้อสุกรในหลอดบรรจุที่มีขนาดใหญ่ขึ้นควรใช้อัตราการแช่แข็งที่ต่ำลงและ Glycerol มากขึ้น (Pursel and Park, 1985) ในกระบวนการแช่แข็งอสุจิสุกรพบว่าจำเป็นต้องมีเวลาในการปรับตัวของอสุจิก่อนแช่แข็ง ควรทิ้งอสุจิที่อุณหภูมิ 15 °C นาน 1-5 ชั่วโมงก่อนทำการลดอุณหภูมิลงต่ำกว่า 15 °C ทั้งนี้เพื่อลดการเกิดปัญหา cold shock ระยะการพักนี้เรียกว่า Holding time (HT) (Eriksson, 2000) เมื่อไม่นานมานี้ Chanapiwat et al. (2009) ว่าการเสริมสารต้านอนุมูลอิสระร่วมกับการใช้ไข่แดงที่อุดมด้วยดีเอชเอ สามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนไหวหลังทำละลายน้ำเชื้อแช่แข็งสุกรอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 1.3)

ตารางที่ 1.3 ค่าเฉลี่ย±SD ของคุณภาพน้ำเชื้อสุกรก่อนและหลังการแช่แข็ง (ที่มา: Chanapiwat et al., 2009)

Sperm parameters	Fresh	Frozen-thawed sperm			
(%)	semen	I	II	III	IV
Motility	86.0±3.4	23.7±7.7[a]	27.3±9.2[ab]	35.3±11.7[b]	36.3±10.6[b]
Viability	85.9±5.4	46.4±13.3[a]	49.0±14.0[a]	51.6±12.8[a]	53.7±12.4[a]
Acrosome integrity	83.7±7.3	31.9±12.1[a]	37.0±12.4[ab]	41.8±15.6[a]b	49.1±12.6[b]
sHost[a]	74.8±8.2	17.4±9.5[a]	18.5±10.1[a]	19.5±8.2[a]	21.8±10.7[a]

[a]sHost = functional integrity of sperm plasma membrane. Values followed by different alphabets within the same row against each parameter were significantly different ($P<0.01$)

การพัฒนาเทคนิคการผสมเทียมเพื่อใช้กับน้ำเชื้อสุกรแช่แข็ง

เนื่องจากตัวอสุจิของสุกรหลังกระบวนการแช่แข็งค่อนข้างอ่อนแอ และการแช่แข็งในปริมาณน้อยมักสะดวกและได้ผลดีกว่า จึงมีความพยายามในการผสมเทียมสุกรด้วยน้ำเชื้อปริมาณน้อยเพื่อการใช้น้ำเชื้อสุกรแช่แข็งอย่างมีประสิทธิภาพ เป็นที่ทราบดีว่าหลังการผสมเทียมสุกรตัวอสุจิต้องถูกขนส่งจากคอมดลูกจนถึงท่อนำไข่ซึ่งมีระยะทางไกล ทำให้ตัวอสุจิมากกว่า 90% สูญเสียจากกระบวนการเก็บกินของเซล (phagocytosis) ก่อนถึงท่อนำไข่ (Mburu et al., 1996; Tummaruk and Tienthai, 2010) นอกจากนี้การแช่แข็งทำให้ตัวอสุจิค่อนข้างอ่อนแอและเกิดกระบวนการคาปาซิเตชั่นค่อนข้างเร็วทำให้ตัวอสุจิตายง่ายกว่าน้ำเชื้อสด (Eriksson and Rodriguez-Martinez, 2000) Martinezet al. (2002) ได้พัฒนาวิธีการผสมเทียมโดยใส่น้ำเชื้อในมดลูกแม่สุกร โดยใช้ท่อที่โค้งงอได้ที่ออกแบบเป็นพิเศษ ยาวประมาณ 180 เซนติเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4 มิลลิเมตร ซึ่งสามารถที่จะสอดผ่านคอมดลูกและไปปล่อยน้ำเชื้อที่ตรงบริเวณส่วนต้นของปีกมดลูก โดยวิธีการนี้สามารถที่จะผสมเทียมสุกรได้โดยใช้น้ำเชื้อที่มีอสุจิเพียง 150 ล้านตัวต่อโด๊ส และได้มีการนำวิธีนี้ไปประยุกต์ใช้กับน้ำเชื้อแช่แข็งและน้ำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกโดยวิธีโฟล์ไซโตเมตทรีแล้ว (Roca et al., 2003; Vazquez et al., 2005; Martinez et al., 2006) (ตารางที่ 1.4)

เนื่องจากตัวอสุจิที่มีอยู่ในน้ำเชื้อแช่แข็งและน้ำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกโดยวิธีโฟล์ไซโตเมตทรีไม่แข็งแรง จึงจำเป็นต้องปล่อยน้ำเชื้อให้ใกล้กับบริเวณที่จะเกิดการปฏิสนธิให้มากที่สุด เพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอสุจิตายก่อนในระหว่างที่เคลื่อนที่จากคอมดลูกมายังท่อนำไข่ จากการศึกษาพบว่าเทคนิค DIUI สามารถผสมและได้จำนวนลูกต่อครอกประมาณ 8-10 ตัว อัตราการผสมติดประมาณ 80% ในระดับฟาร์ม (Martinez et al., 2002, 2006; Roca et al., 2003; Vazquez et al., 2005)

ตารางที่ 1.4ผลผลิตของสุกรหลังการใช้ท่อผสมเทียมชนิดสอดลึกไปยังปีกมดลูก (DIUI) ในการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งในสุกรที่ตกไข่ตามธรรมชาติ

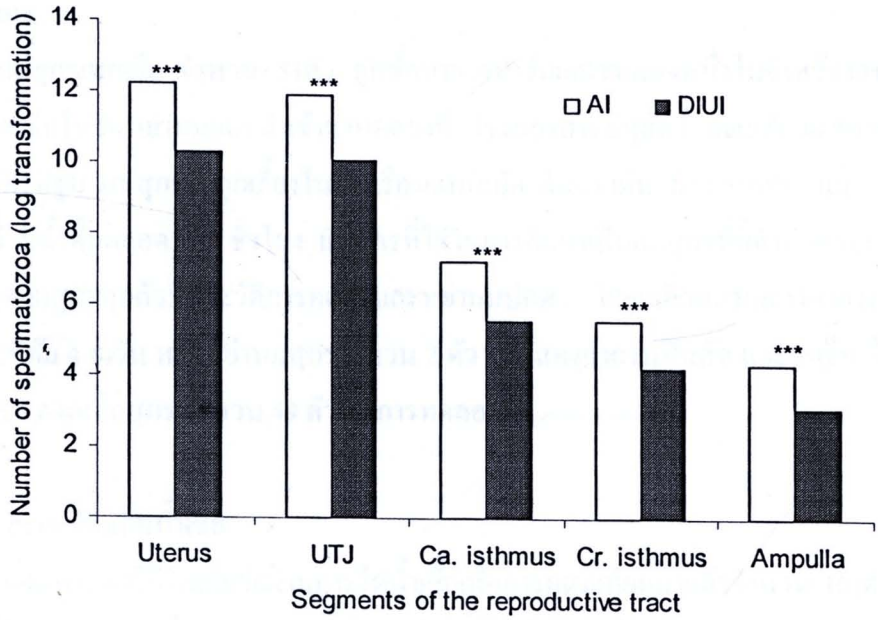
ปริมาณตัวอสุจิ (ล้านตัว)	ปริมาตรน้ำเชื้อ	จำนวนสุกร	อัตราการเข้าคลอด (%)	จำนวนลูกทั้งหมด/ครอก	เอกสารอ้างอิง
1,000	5	40	70.0	9.25	(Roca et al., 2003)
250	5	NA	42.9	7.2	(Bathgate et al., 2003)
1,000	0.5	20	65.0*	6*	(Wongtawan, 2004)

*ตัวเลขที่แสดงเป็นอัตรา การตั้งท้อง และจำนวนตัวอ่อนที่นับได้ในมดลูก; NA=ไม่มีข้อมูล

การผสมเทียมแบบสอดท่อเข้ามดลูก (intra-uterine insemination)

งานวิจัยในด้านการผสมเทียมในสุกร มุ่งที่จะลดจำนวนตัวอสุจิต่อการผสม โดยที่ไม่ส่งผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ วิธีการหนึ่งคือ การลดจำนวนตัวอสุจิต่อโด๊สการผสมโดยปล่อยน้ำเชื้อภายในมดลูก Kruger และคณะ (1999) ได้ทำการทำการผสมเทียมสุกรสาว โดยทำการผ่าตัดและทำการปล่อยน้ำเชื้อ ที่บริเวณใกล้กับช่วงต่อของปีกมดลูกกับท่อนำไข่ (uterotubal junction, UTJ) พบว่าน้ำเชื้อที่มีจำนวนตัวอสุจิ 10 ล้านตัวในปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ก็เพียงพอเมื่อเทียบกับการผสมเทียมตามปกติ เช่นเดียวกันกับในสุกรนาง (Kruger andRath, 2000) อุปกรณ์ในการผสมเทียมต่างๆได้ถูกพัฒนาขึ้น เพื่อใช้ในการนำน้ำเชื้อไปปล่อยที่ในตัวมดลูก Watson and Behan (2002) ศึกษาการใช้ท่อผสมเทียมแบบสอดท่อเข้ามดลูก (IUI) เป็นอุปกรณ์ในการผสมเทียมสุกร พบว่าสามารถที่จะลดจำนวนตัวอสุจิลงเหลือ 1,000 ล้านตัวต่อโด๊ส โดยที่ไม่มีผลต่ออัตราการผสมติด และเป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย ไม่ยุ่งยาก และมีประสิทธิภาพ Martinez et al.(2001) ประสบความสำเร็จในการผสมเทียมสุกร โดยฉีดน้ำเชื้อเข้าไปในปีกมดลูก (DIUI) โดยใช้ท่อเอนโดสโคปสอดผ่านท่อผสมเทียม ผ่านคอมดลูกและปล่อยน้ำเชื้อที่ปีกมดลูกข้างใดข้างหนึ่ง และพบว่าไม่มีความแตกต่างของอัตราการเข้าคลอด ขนาดครอก เมื่อเทียบกับการผสมเทียมตามปกติ ต่อมา Martinez et al.(2002) ได้พัฒนาวิธีการผสมเทียม DIUI โดยนำท่อที่สามารถโค้งงอได้ (flexible catheter) มาใช้แทนท่อ endoscope ที่มีราคาแพง และแตกหักได้ง่าย ซึ่งไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในภาคสนาม จากทดลองพบว่าสามารถที่จะลดความเข้มของน้ำเชื้อลงได้ 20-60 เท่า เมื่อเทียบกับการผสมเทียมแบบเดิม บริเวณที่ปล่อยน้ำเชื้อคือ 1 ใน 3 ของปีกมดลูกทางส่วนต้น ในการศึกษาก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัย (Sumransap et al., 2007) พบว่าการผสมเทียมแบบสอดท่อเข้าตัวมดลูก (IUI) สามารถที่จะทำการสอดท่อผสมเทียมผ่านคอมดลูกได้ในแม่สุกรทุกตัวและไม่พบเลือดที่ปลายท่อผสมเทียม สอดคล้องกับการศึกษาของ Roca et al. (2003) ที่สามารถสอดท่อผ่านคอมดลูกแม่สุกรจำนวน 94.0% และพบเลือดที่ปลายท่อ 1.7% นอกจากนี้ยังพบอีกว่าหลังการผสมเทียมจะสูญเสียตัวอสุจิจากการไหลย้อนกลับของน้ำเชื้อและจะถูกเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเข้ามาเก็บกิน (Matthijs et al., 2003) Mburu et al. (1996) พบว่า ก่อนไข่ตกตัวอสุจิส่วนใหญ่จะเข้าไปอยู่ตรงบริเวณส่วนต่อของท่อนำไข่และปีกมดลูกและส่วนล่างของอิสธ์มัส แต่หลังไข่ตกตัวอสุจิจะเข้าไปอยู่ในส่วนของอิสมัสส่วนบนมากขึ้น ส่วนรอยต่อของท่อนำไข่และปีกมดลูก จะเป็นบริเวณที่สะสมของตัวอสุจิ โดยบริเวณนี้มีสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวยต่อการมีชีวิตของตัวอสุจิ และยังทำหน้าที่ช่วยกรองตัวอสุจิที่จะผ่านเข้าไปในท่อนำไข่ด้วย (Hunter et al., 1981; Tienthai et al., 2004; Tummaruk et al., 2007, 2010; Tummaruk and Tienthai,

2010) ดังนั้นหลังผสมเทียม 24 ชั่วโมง อสุจิส่วนใหญ่จะพบที่ส่วนของรอยต่อระหว่างท่อนำไข่และมดลูก (ตารางที่ 1.2, รูปที่ 1.1-1.2)



รูปที่ 1.2จำนวนอสุจิ (log transformation) ที่ตรวจพบจากส่วนต่างๆ ของท่อทางเดินระบบสืบพันธุ์แม่สุกรหลังการผสมเทียมแบบเดิม (conventional artificial insemination (AI, n=5) และการผสมเทียมแบบ unilateral, deep intra-uterine insemination (DIUI, n=5), UTJ: uterotubal junction, Ca: caudal, Cr: cranial, *** $P<0.001$ (ที่มา: Tummaruk et al., 2007)