

## บทที่ 5

### สรุปและอภิปรายผล

#### อภิปรายผลการทดลอง

##### 1. ประสิทธิภาพของน้ำยาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็น

จากผลการทดลองพบว่าน้ำยาสูตร extender 7 มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายได้เป็นระยะเวลานานที่สุด มีการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิสูงที่สุด (5-20 เปอร์เซ็นต์) ภายหลังกระตุ้นด้วยน้ำกลั่น (วันที่ 4 ของการทดลอง) และมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวเฉลี่ยเป็น  $53.47 \pm 6.57$  ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ อนงค์ หัมพานนท์ & กฤษณ์ มงคลปัญญา (2538 ข) รายงานว่า 0.85% NaCl (282 mOsmol/kg., pH 7.0) สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายได้ดีที่สุดเมื่อเก็บรักษานาน 78 และ 150 ชั่วโมง อสุจิมียเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว 70 และ 36.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยทำการทดลองเปรียบเทียบกับน้ำยาในกลุ่ม bicarbonate buffer (BCB) ที่มี sucrose และ reduced glutathione เป็นองค์ประกอบ มีแรงดันออสโมติกสูง และไม่มียาเคลื่อนไหว กับ กลุ่มน้ำเกลือ ซึ่งมี NaCl เป็นองค์ประกอบ และสรุปว่าสาเหตุที่ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อที่เก็บในกลุ่ม BCB ต่ำกว่ากลุ่มน้ำเกลือไม่น่าจะเป็นเพราะ sucrose และแรงดันออสโมติก แต่น่าจะมีสาเหตุมาจากความเป็นพิษของ potassium ion ตามระดับความเข้มข้นและอิออนอื่น ๆ ซึ่งแตกต่างกับการทดลองในครั้งนี้ คือ น้ำยาสูตร extender 7 ก็มี KCl และ KOH เป็นองค์ประกอบสูงประมาณ 15.3 เปอร์เซ็นต์ ของส่วนประกอบทั้งหมด แต่มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ดีกว่าสูตรอื่น ๆ อีก 6 สูตร อย่างมีนัยสำคัญ

และเมื่อพิจารณาส่วนประกอบของน้ำยาในการทดลองนี้ ที่ไม่พบใน extender 7 แต่พบในน้ำยาสูตรอื่นๆ อีก 6 สูตรของการทดลองนี้ ได้แก่  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (พบใน CSS และ MC)  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  กับ  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (พบใน HBSS และ CF-HBSS) และ  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  กับ glucose พบใน CSS, MC, HBSS และ CF-HBSS ทั้งอิออนของ sodium, potassium และ magnesium พบใน seminal plasma และมีความสัมพันธ์กับการควบคุมการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิ (Scott & Baynes, 1980; Billard & Cosson, 1992 cited in Ciereszko et al., 2000) ส่วน glucose ยังไม่ทราบบทบาทที่ชัดเจนในสัตว์จำพวกปลา แต่มีการตรวจพบใน seminal plasma ระหว่างการสังเคราะห์กรดไขมันในขบวนการ spermatogenesis ของ spermatozoa ซึ่งเป็นขบวนการที่ต้องใช้พลังงานมาก (Piirinen & Hyvarinen, 1983; Soengas et al., 1993 cited in Ciereszko et al., 2000)

และส่วนประกอบที่พบในสูตร extender 7 แต่ไม่พบในสูตรน้ำยาอื่นคือ pyruvate, citric acid, HEPES และ KOH ซึ่ง pyruvate เป็นสารอินทรีย์ที่พบใน seminal plasma ของปลา (Gosh, 1985; Linhart, et al., 1991; Billard et al., 1995 a, cited in Ciereszko et al., 2000) และ citric acid ก็พบใน seminal plasma ของปลาน้ำจืด (Baynes et al., 1981, cited in Ciereszko et al., 2000) ความเข้มข้นของ citric acid มีความสัมพันธ์อย่างยิ่งกับความหนาแน่นของน้ำเชื้อปลา (Piironen & Hyvarinen, 1983; Piironen, 1985, cited in Ciereszko et al., 2000) และมีความสัมพันธ์กับ osmolality ของ seminal plasma (Piironen, 1994, cited in Ciereszko et al., 2000) สันนิษฐานว่า citric acid อาจมีความสำคัญเกี่ยวกับการควบคุมการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิปลา เพราะสามารถจับกับไอออนของ calcium, magnesium และ potassium ใน seminal plasma ซึ่งอาจเป็นกลไกสำคัญในการป้องกันการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิ (Scott & Baynes, 1980; Baynes et al., 1981, cited in Ciereszko et al., 2000) และถ้าน้ำยาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อมีค่าออสโมลาลิตีต่ำกว่า seminal plasma จะไปกระตุ้นการเคลื่อนไหวของอสุจิ การศึกษาอสุจิปลาน้ำจืดกลุ่มไซพรีนิคส์ (ปลาทอง, ปลาไน) พบว่าค่าออสโมลาลิตีมีผลในการยับยั้งการเคลื่อนไหวของอสุจิ คือเมื่อลดค่าออสโมลาลิตี มีผลทำให้อสุจิปลาในกลุ่มไซพรีนิคส์เริ่มมีการเคลื่อนไหว อย่างไรก็ตาม การลดค่าออสโมลาลิตี ไม่มีอิทธิพลต่อการกระตุ้นการเคลื่อนไหวของอสุจิปลากลุ่มซัลโมนิคส์ (Morisawa et al., 1983) สำหรับน้ำเชื้อปลาสวายพบว่าใน seminal plasma มีออสโมลาลิตี เท่ากับ 264 mOsmol/kg ดังนั้นออสโมลาลิตีของ extender ที่ใช้เป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อปลาสวายควรมีค่าประมาณ 300 mOsmol/kg จึงจะยับยั้งการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิขณะถูกเจือจางได้ (Mongkonpunya et al., 2000)

กล่าวโดยสรุปคือ น้ำยาสูตร extender 7 มีคุณสมบัติในการเก็บรักษาน้ำเชื้อให้มีคุณภาพดีกว่าน้ำยาในสูตรอื่น ๆ เนื่องจากประกอบด้วยไอออนของธาตุต่าง ๆ ที่เหมาะสม และมีออสโมลาลิตีสูงกว่าในน้ำเชื้อ (ออสโมลาลิตีของน้ำเชื้อและน้ำยา extender 7 เท่ากับ 264 และ 310 mOsmol/kg. ตามลำดับ) สำหรับน้ำยาสูตรอื่น ๆ นั้นมีความสามารถในการเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ใกล้เคียงกัน มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 22-29 เปอร์เซ็นต์

สำหรับอัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อน้ำยาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อทั้ง 3 อัตราส่วนไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ (เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว;  $p>.05$  และเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิต;  $p=.50$ ) แม้ว่าอัตราการเจือจางจะไม่มีผลต่อน้ำเชื้อ ถ้าน้ำยาเจือจางนั้นประกอบด้วยไอออนและแรงดันออสโมติกที่เหมาะสม แต่ก็ไม่ควรเจือจางมากเพราะจะทำให้สั่นเปลี่ยนลักษณะบรรจุและที่เก็บน้ำเชื้อ อัตราการเจือจางควรเป็น 1:1 ถึง 1:9 (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

ส่วนการทดลองของรานาและแมกแอนดรูว์ (Rana & McAndrew, 1989) ทำการเก็บน้ำเชื้อปลานิล (*Oreochromis spp.*) ในน้ำยา fish ringers ที่มี methanol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์

ใช้อัตราเจือจางน้ำเชื้อค่อน้ำยา 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10 และ 1:20 พบว่าภายหลังการแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 5-60 องศาเซลเซียส/นาที่ อสุจิมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวไม่แตกต่างทางสถิติ ( $p>.05$ )

## 2. ประสิทธิภาพของสารไครโอโพรเทคแทนท์

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อเป็นเกณฑ์ในการเลือกชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์และระยะ equilibration time เพื่อใช้ในขั้นตอนแช่แข็ง พบว่า glycerol เป็นพิษต่ออสุจิปลาทรายที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 6-15 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 30 นาที จึงไม่ควรนำ glycerol มาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อ หรือควรใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ และให้มี equilibration time เพียงช่วงสั้น ๆ 1-2 นาที หรือไม่มีเลย ส่วน propylene glycol, DMSO และ sucrose เป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า glycerol ความลำคืบ คือ ภายใน 30 นาที ยังพบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิตั้งแต่ 77-97 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการทดลองครั้งนี้เพื่อเป็นการป้องกันอันตรายกับอสุจิระหว่างกระบวนการแช่แข็ง สะดวกต่อการบรรจุน้ำเชื้อลงหลอด และขั้นตอนในการลดอุณหภูมิ ที่ต้องการลดอุณหภูมิของทุกระดับความเข้มข้นพร้อมกันในคราวเดียวต่อหนึ่งโปรแกรม จึงกำหนดให้มี equilibration time ที่ 10 นาที ซึ่งน่าจะเป็นเวลาที่สารไครโอโพรเทคแทนท์แพร่เข้าสู่เซลล์แล้ว และเพื่อขจัดความแปรปรวนจากปัจจัยร่วมของชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่มีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อ จึงทำการทดสอบกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 4 ชนิด ที่ทุกระดับความเข้มข้นในขั้นตอนการลดอุณหภูมิ

รายงานการวิจัยโดยทั่วไปนิยมใช้ DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ สูงถึง 98 เปอร์เซ็นต์ของงานวิจัยที่เผยแพร่ และให้ผลในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งที่ดีที่สุด (Tiersch, 2000) เช่น การทดลองของ นลินี มารคแมน (2527), มงคลปัญญาและคณะ (Mongkonpunya et al., 2000) และ นิสา ไชยรักษ์ (2539) และระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 8-10 เปอร์เซ็นต์ (นิสา ไชยรักษ์, 2539)

ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์และระยะ equilibration time มีผลต่ออสุจิปลาแต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาคุกเทศ (*Clarias gariepinus*) พบว่าเมื่อใช้ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 5% ระยะ equilibration time 60 นาที อสุจิภายหลังการละลายมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวเฉลี่ย 40% (Steyne et al., 1985) ต่อมา (Steyne & Vuren, 1987) ใช้ glycerol ระดับความเข้มข้น 11% และระยะ equilibration time 20 นาที อสุจิภายหลังการละลายมีเปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัวถึง 51.2% ซึ่งสูงกว่าการใช้ DMSO และ methanol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ในการทดลองเดียวกัน ส่วนในการทดลองของลินฮาร์ดและคณะ

(Linhart et al., 1993) ใช้ glycerol ระดับความเข้มข้น 10% ระยะ equilibration time 20 นาที ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา European catfish (*Silurus glanis* L.) พบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิเพียง 15% มงคลปัญญาและคณะ (Mongkonpunya et al., 2000) เจือจางน้ำเชื้อปลาน้ำจืด (*Pangasianodon gigas* Chevey) ในน้ำยาเจือจาง calcium-free hank's balanced salt solution ที่มี DMSO หรือ methanol ที่ระดับ 5% หรือ 14% พบว่าที่ 5% DMSO อสุจิปลาน้ำจืดมีอัตราการเคลื่อนไหวมากกว่าหรือเท่ากับ 50% ได้นาน 72 ชั่วโมง ขณะที่ 5% methanol มีการเคลื่อนไหวลดลงเร็วกว่า คือ มีอัตราการเคลื่อนไหวมากกว่าหรือเท่ากับ 50% ได้นาน 48 ชั่วโมง ส่วนที่ระดับ 14% ทั้ง DMSO และ methanol คงอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิเป็น 0% ภายใน 20 นาที จะเห็นได้ว่าผลการทดลองที่ผ่านมา มีความหลากหลายของวิธีการวิจัยและผลการวิจัยเป็นอย่างมาก

### 3. การทำน้ำเชื้อปลาตัวแช่แข็ง

จากการทดลองที่ 1 ทำให้ทราบชนิดของน้ำยาเจือจางที่เหมาะสม คือ extender 7 และการทดลองที่ 2 ทำให้ทราบชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ รวมทั้ง equilibration time เพื่อใช้ทำน้ำเชื้อแช่แข็ง จากการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิในขั้นตอนการแช่แข็ง และระดับอุณหภูมิที่ใช้ละลายน้ำเชื้อแช่แข็งพบว่า ภายหลังจากการละลายมีเพียง DMSO ที่ทุกระดับความเข้มข้นและ propylene glycol ที่ 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ สามารถวัดการเคลื่อนไหวของอสุจิได้ ส่วน sucrose ที่ทุกระดับความเข้มข้นและ propylene glycol ที่ 3 และ 6 เปอร์เซ็นต์ มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำเชื้อภายหลังจากการละลาย น้ำเชื้อมีลักษณะแยกเป็น 2 ส่วนๆ หนึ่งเป็นน้ำใส อีกส่วนหนึ่งข้นเหนียว ทำให้ไม่สามารถหาการเคลื่อนไหวของอสุจิได้ เช่นเดียวกับการทดลองของมงคลปัญญาและคณะ (Mongkonpunya et al., 2000) เมื่อใช้ 5% propylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ในการทำน้ำเชื้อปลากลุ่ม Pangasiidae พบว่าภายหลังจากการละลายน้ำเชื้อมีลักษณะเป็นวุ้น (jelled) เป็นที่น่าสังเกตว่า ในการทดลองครั้งนี้ เมื่อใช้ propylene glycol ที่ระดับความเข้มข้นสูงๆ ไม่ทำให้น้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังจากการละลายมีลักษณะเป็นวุ้นเหมือนที่ความเข้มข้นต่ำๆ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวยังไม่ทราบว่าเกิดจากสาเหตุใด

จากการตรวจหาการเคลื่อนที่ของอสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็งที่มี DMSO และ propylene glycol (9, 12, 15%) เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ (การทดลองที่ 3.1) พบว่าอัตราการลดอุณหภูมิทั้ง 3 ระดับ ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ อาจมีสาเหตุมาจากอัตราการลดอุณหภูมิทั้ง 3 ระดับ มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยและเป็นอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ จนไม่มีผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ นิศา ไชยรักษ์ (2539) ที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -10, -20 และ -30 องศาเซลเซียส/นาที พบว่า ที่อัตรา -10 และ -20 องศาเซลเซียส/นาที ในการทำน้ำเชื้อปลาคูอุยแช่แข็งมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังจากการละลายไม่แตกต่างกัน และดีกว่าอัตรา

-30 องศาเซลเซียส/นาทีก สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งทั้ง 3 ระดับ ที่เวลาไม่เกิน 10 วินาที พบว่ามีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อไม่แตกต่างกัน

อย่างไรก็ตามการผสมน้ำเชื้อแช่แข็งกับไข่สดของปลาสวาย พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิภายหลังการละลายไม่มีความสัมพันธ์กับอัตราการฟัก (Mongkonpunya et al., 2000) สำหรับการทดลองนี้จึงทำการผสมไข่สดกับน้ำเชื้อแช่แข็งจากทุกการทดลองที่น้ำเชื้อภายหลังการละลายมีลักษณะไม่เป็นวุ้น ได้แก่การทดลองที่มี DMSO และ propylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ผลการทดลองพบว่า มีเพียง 3% DMSO ที่สามารถผสมกับไข่ได้ส่วนการทดลองอื่นมีเปอร์เซ็นต์การผสมเป็นศูนย์ ซึ่งขัดแย้งกับการทดลองของ อนงค์ หัมพานนท์ & กฤษณ์ มงคลปัญญา (2536 ก) ในการทำน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งโดยเจือจางน้ำเชื้อปลาสวายในน้ำยาเจือจางสูตร 0.85% NaCl หรือ CF-HBSS ซึ่งมี DMSO 8, 10 หรือ 12% ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -10, -20 หรือ -30 องศาเซลเซียส/นาทีก และอุณหภูมิในการละลายที่ 50 หรือ 70 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิและอัตราการปฏิสนธิกับไข่ปลาอุกอุย พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวและอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน ( $p>.05$ ) ระหว่างการใช้น้ำยา 0.85% NaCl หรือ CF-HBSS และอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งทั้งสามระดับ แต่แปรปรวนไปตามอัตราการลดอุณหภูมิอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ อัตราส่วนของไข่ต่ออสุจิที่ใช้ในการผสมเทียมของการทดลองในครั้งนี้ ประมาณ 250 ฟองต่อ  $7.6 \times 10^5$  ตัว หรือ  $3 \times 10^3$  ตัวต่อฟอง (ความหนาแน่นของอสุจิปลาสวายที่มีผู้ศึกษาไว้คือ  $7.6 \times 10^{10}$  ตัว/ml.) ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับการใช้น้ำเชื้อสดจึงอาจมีผลโดยตรงต่อเปอร์เซ็นต์การฟัก การเพิ่มปริมาณของน้ำเชื้อแช่แข็งในการผสมกับไข่สดอาจทำให้มีเปอร์เซ็นต์การฟักที่สูงขึ้น สำหรับอัตราส่วนที่เหมาะสมของเซลล์อสุจิต่อไข่ไม่มีความแตกต่างกันไปตามแต่ชนิดของปลา เช่น ปลา channel catfish คือ  $1.25 \times 10^5$  ตัวต่อไข่ 1 ฟอง (Bart & Dunham, 1996) ปลานิลควรใช้  $1.40 \times 10^5$  ตัวต่อไข่ 550 ฟอง (Rana & McAndrew, 1987) อัตราส่วนน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งต่อไข่ปลาอุกอุยเท่ากับ  $9.5 \times 10^6$  ตัวต่อไข่ 1 ฟอง (อนงค์ หัมพานนท์ & กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2538 ก,ข) เป็นต้น

## สรุปผลการทดลอง

1. น้ำยาสำหรับเจือจางน้ำเชื้อปลาสวายที่ทำให้อสุจิมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวสูงที่สุด ภายหลังการกระตุ้นด้วยน้ำกลั่น คือ สูตร extender 7 ส่วนสูตรอื่น ๆ ได้แก่ frog's ringer solution, modified cortland, hang balance salt solution, 0.85% NaCl, calcium-free hang balance salt solution หรือ cortland salt solution มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายได้ด้อยกว่า สูตร extender 7 ตามลำดับ

2. จากการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ พบว่า glycerol ที่ความเข้มข้น 6-15 เปอร์เซ็นต์ มีความเป็นพิษต่อตัวอสุจิปลาสวายโดยทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวลดลงตามความเข้มข้นที่สูงขึ้นและระยะเวลาที่นานขึ้น จึงไม่ควรใช้เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ส่วน DMSO, propylene glycol และ sucrose ที่ความเข้มข้น 3-15 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 30 นาที มีความเป็นพิษน้อยกว่า glycerol

3. อัตราการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อปลาสวายด้วย freeze control ที่ระดับอุณหภูมิ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียส/นาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>.05$ )

4. การละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ -40, -60 และ -80 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>.05$ )

5. ความสามารถในการผสมของน้ำเชื้อแช่แข็งกับไข่ปลาสวายสดพบว่า การใช้ 3 % DMSO เท่านั้นที่สามารถทำให้ไข่มีการปฏิสนธิและการพัฒนาของไข่จนถึงระยะบลาสโตพอร์ปิด (เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส/นาที และละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส)

6. ชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการทำน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งคือ DMSO และระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ควรอยู่ในช่วง 3-9% เนื่องจากที่ความเข้มข้นในช่วงดังกล่าวพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวสูง จึงควรทำการศึกษาวิธีการปฏิสนธิที่ทำให้กับน้ำเชื้อสามารถเข้าผสมกับไข่ได้เป็นการเพิ่มเติม