บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผล

สรุปผลการทดลอง

1. ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงแดงแบบแช่เย็น

จากผลการศึกษาน้ำยาทั้งหมด 3 สูตร คือ Saline Base, Ringer และ Ca-F Salineหลังจากกระตุ้นด้วยน้ำทะเล พบว่า น้ำยาสำหรับเจือจางน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่ทำให้สเปิร์มมีระยะเวลาการเคลื่อนที่นานที่สุด คือ น้ำยา Ringer โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ย เท่ากับ 53.87 ± 2.48 เปอร์เซ็นต์ ส่วนน้ำยาอีก 2 สูตร คือ Saline Base 43.83 ± 2.73 เปอร์เซ็นต์ และ Ca-F Saline 25.88 ± 2.34 เปอร์เซ็นต์ มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงแดงได้ต่ำกว่าน้ำยาสูตร Ringer ตามลำดับ

2. ผลการศึกษาอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยาที่เหมาะสมของปลากะพงแดง

จากการศึกษาโดยใช้อัตราส่วนการเจือจางที่ 4 ระดับการเจือจาง คือ 1: 1, 1: 2, 1: 4 และ 1: 6 พบว่า อัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยาที่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มสูงที่สุด คือ อัตราการเจือจางที่ 1: 1 (53.87 ± 2.48) โดยอัตราส่วนที่ 1: 4, 1: 6 และ 1: 2 มีอัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ยต่ำกว่าตามลำดับ

3. ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีผลต่อน้ำเชื้อปลากะพงแดง

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้งหมด 10 ชนิด คือ DMSO, Glycerol, Propylene Glycol, Formamide, Methanol, Ethylene Glycol, Ethanol, Trehalose, Sucrose และ Acetamide ที่ 4 ระดับความเข้มข้น คือ 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ โดยสเปิร์มที่ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 10 ชนิด แต่ละชนิดจะถูกประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สุดท้ายที่เวลา 180 นาที พบว่า สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยสูงสุด คือ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (28.83 ± 2.23) ซึ่งมีความเป็นพิษต่อสเปิร์มปลากะพงแดงน้อยที่สุด

4. ผลการศึกษาของอัตราการลดอุณหภูมิในขณะทำการแช่แข็งที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะพงแดง

โดยทำการกำหนดระดับอัตราการลดอุณหภูมิที่ 3, 5, 10, และ 12 องศาเซลเซียสต่อนาที โดยอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส และระดับอัตราการลดอุณหภูมิที่ 3, 5, 10, และ 12 องศาเซลเซียสต่อนาที โดยอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -80 องศาเซลเซียส แล้วจึงละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 6 วินาที จากนั้นจึงประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า อัตราการลด

อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที โดยอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -80 และสาร DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ สเปิร์มมีอัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ยสูงสุด (91.06 ± 2.23)

5. ผลการศึกษาการย้อมสีเพื่อดูอัตราการมีชีวิตรอดของสเปิร์มหลังจากการแช่แข็ง

โดยทำการย้อมสีด้วย Eosin และ Nigrosin เพื่อตรวจสอบอัตราการมีชีวิตรอดของสเปิร์มหลังจากเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวนานเป็นระยะเวลา 7 วัน ซึ่งจะทำการย้อมสีเพื่อดูอัตราการมีชีวิตรอดของสเปิร์มที่อัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5, 10, และ 12 องศาเซลเซียสต่อนาที โดยอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส และที่ระดับอัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5, 10, และ 12 องศาเซลเซียสต่อนาที โดยอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -80 องศาเซลเซียส จากการศึกษา พบว่า ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียสต่อนาที โดยอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -80 องศาเซลเซียส และสาร DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ สเปิร์มมีอัตราการมีชีวิตรอดเฉลี่ยสูงที่สุด (77.60 ± 3.16)

อภิปรายผลการทดลอง

1. ประสิทธิภาพของน้ำยาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงแดงแบบแช่เย็น

จากผลการทดลองโดยใช้น้ำยาทั้งหมด 10 สูตร ประกอบด้วย Marine Fish Ringer (MFR), Extender 251 (E251), 0.1 M Sodium Citrate (CT), Calcium Free Hank's Balance Salt Solution (CF-HBSS), Hank's Balance Salt Solution (HBSS), NaCl 0.85%, Cortland, Saline Base, Ringer และ Ca-F Saline ซึ่งหลังจากทำการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยาทั้ง 10 สูตรนี้ พบว่ามีน้ำยา 7 สูตร ที่ทำให้สเปิร์มปลากะพงแดงนั้นไม่พบการเคลื่อนที่ (0 เปอร์เซ็นต์) จึงทำการคัดเลือกน้ำยาที่มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงแดงแบบแช่เย็น ส่วนน้ำยาอีก 3 สูตร คือ Saline Base, Ringer และ Ca-F Saline มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ และจากผลการศึกษาพบว่า น้ำยาสูตร Ringer มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงแดงแบบแช่เย็นโดยดูได้จากผลการทดสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยสูงที่สุด (53.87 ± 2.48) ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยน้ำทะเล ซึ่งสาเหตุที่สำคัญนั้นมาจากการควบคุมและการแลกเปลี่ยนสารเคมีระหว่างภายนอกเซลล์และภายในเซลล์ โดยส่วนประกอบของสารละลายในน้ำยาแต่ละสูตรนั้นจะถูกนำมาวัดหาปริมาณของสารที่ถูกละลายที่ละลายอยู่ในตัวทำละลายหรือค่าออสโมลาลิตี้ (Osmolality) และในสเปิร์มก็เช่นเดียวกัน กล่าวคือ ภายในน้ำเชื้อปลาจะประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นของเหลวและส่วนที่เป็นตัวสเปิร์มซึ่งของเหลวนั้นจะมีชนิดและปริมาณของสารละลายที่แตกต่างกันไป

จากการศึกษาครั้งนี้เมื่อทำการวิเคราะห์ ค่าออสโมลาลิตี้ จากเครื่อง Osmometer ของน้ำยาทั้ง 10 สูตร และน้ำเชื้อปลากะพงแดงมีค่าดังตารางที่ 23

ตารางที่ 23 ค่าออสโมลาลิตี้ของสูตรน้ำยาต่าง ๆ

สูตรน้ำยา	ค่าออสโมลาลิตี้ (mOsmol/kg)
Marine Fish Ringer (MFR)	941
Extender 251 (E251)	878
0.1 M Sodium Citrate (CT)	651
Calcium Free Hank's Balance Salt Solution (CF-HBSS)	317
Hank's Balance Salt Solution (HBSS)	618
0.85% NaCl	342
Cortland	408
Saline Base	250
Ringer	415
Ca-F Saline	525
น้ำเชื้อปลากะพงแดง	421

จากตารางสังเกตเห็นได้ว่าค่าออสโมลาลิตี้ของน้ำยาสูตร Ringer มีค่าต่ำกว่าหรือใกล้เคียงที่สุดกับของเหลวที่อยู่ในน้ำเชื้อปลาและจะพบว่าน้ำยาสูตร Ringer นี้ไม่กระตุ้นให้สเปิร์มปลาเคลื่อนที่หรือเคลื่อนที่ได้น้อยที่สุด เมื่อพิจารณาจะพบว่า ค่าออสโมลาลิตี้ที่อยู่ภายนอกสเปิร์มปลาทะเลที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่สูงกว่าค่าออสโมลาลิตี้ที่อยู่ภายในสเปิร์มปลาทะเล จึงเป็นผลไปกระตุ้นให้สเปิร์มปลาทะเลนั้นเคลื่อนที่ ซึ่งเป็นดัชนีตัวหนึ่งที่บ่งชี้ให้เห็นว่า การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะพงแดงจะถูกควบคุมด้วยค่าของสารถูกละลายที่ละลายอยู่ในตัวทำละลาย (Osmolality) Mongkonpunya et al. (1996) ได้รายงานว่าค่าออสโมลาลิตี้ที่ใช้ในการควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาบึกโดยใช้ C-F HBSS เป็นน้ำยาในการเจือจางน้ำเชื้อโดยค่าที่พบคือ 248 ± 27 mOsm/kg ซึ่งเป็นน้ำยาที่เหมาะสมที่ใช้ในการแช่เย็นน้ำเชื้อซึ่งสามารถควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาบึก อันเนื่องมาจากความเข้มข้นของ K^+ ที่ต่ำกว่าของเหลวในน้ำเชื้อปลา

สำหรับอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อทั้ง 4 อัตราส่วน คือ 1: 1, 1: 2, 1: 4. และ 1: 6 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) และในทางปฏิบัตินั้นจึงจำเป็นต้องเลือกอัตราส่วน 1: 6 เนื่องจากปริมาณน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่รีดได้ในแต่ละครั้งมีปริมาณที่ต่ำมาก อย่างไรก็ตามแม้ว่าอัตราส่วนการเจือจางในครั้งนี้ไม่มีผลต่อน้ำเชื้อ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แต่ก็ไม่ควรใช้อัตราส่วนในการเจือจางที่สูง (กรณีมีปริมาณน้ำเชื้อสดมาก) เนื่องจากปริมาณน้ำยาเจือจางที่มากขึ้นจะมีผลทำให้โอกาสการเกิดเกล็ดน้ำแข็งมากขึ้นในระหว่างการลดอุณหภูมิ

2. ความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีผลต่อน้ำเชื้อปลากะพงแดง

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์โดยที่ชนิดและระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน เพื่อเป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษน้อยที่สุดต่อสเปิร์มปลากะพงแดงในช่วงระยะเวลาหนึ่ง (Equilibration Time) เพื่อให้สารไครโอโพรเทคแทนท์แพร่เข้าสู่เซลล์ (ประมาณ 10 นาที) ก่อนที่จะนำไปสู่ขั้นตอนการแช่แข็งต่อไป พบว่าชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ได้คัดเลือกทั้งหมดจะถูกนำมาทดสอบในขั้นตอนระหว่างการลดอุณหภูมิเพื่อลดความแปรปรวนจากปัจจัยร่วมของชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ คือ DMSO 5% และ 10%, Propylene Glycol 5% และ 10%, Methanol 5%, Ethylene Glycol 5% และ 10% และ Ethanol 5%

สำหรับผลการทดลองที่ได้หลังจากการลดอุณหภูมิ พบว่า การใช้ DMSO 10% มีอัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ยสูงสุด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kenneth et al. (2004) ได้ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงแดง (*Lutjanus campechanus*) แบบแช่แข็ง โดยใช้อัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยา 1: 3 ใช้ Hank's Balance Salt Solution (HBSS) เป็นน้ำยาในการเจือจางน้ำเชื้อ โดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 4 ชนิด คือ DMA, DMSO, Glycerol และ Methanol ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์ พบว่า DMSO 10% ให้อัตราการเคลื่อนที่สูงที่สุด (71 เปอร์เซ็นต์)

ในขณะเดียวกัน Chen et al. (2004) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Sea Perch (*Lateolabrax japonicus*) ซึ่งทำในเชิงการค้า โดยใช้ Extender 3 สูตร คือ MPRS, D-15 และ MMM และสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ คือ DMSO, DMF, Glycerol และ Methanol ที่ระดับความเข้มข้น 6%, 10% และ 14% พบว่า สารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่เหมาะสมในการแช่แข็งประกอบด้วย MPRS และ DMSO 10% และเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 3 วัน และ 1 ปี ซึ่งให้ผลการปฏิสนธิไม่แตกต่างกันเมื่อเทียบกับน้ำเชื้อสดและงานวิจัยของ Tiersch et al. (2004) ซึ่งทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Common Snook (*Centropomus undecimalis*) หรือชาวอเมริกาใต้เรียกว่าปลา Bloch โดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ชนิดและระดับความเข้มข้นต่างกัน คือ DMSO 5% และ 10%, Glycerol 5% และ 10%, Methanol 5% และ 10% พบว่า สารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่เหมาะสมในการแช่แข็งสเปิร์มปลา Common Snook คือ DMSO 10% โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่หลังจากละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เท่ากับ (Mean ± SD) 44 ± 5 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาของ Michael and Tiersch (2004) ได้รายงานว่าชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์และ Equilibration Time ของสเปิร์มปลาแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เช่น การแช่เข็งน้ำเชื้อปลา Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) พบว่า เมื่อใช้ Methanol ที่ระดับความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดย Equilibration Time ที่ระยะเวลา 50 นาที ภายหลังการละลายที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที พบ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ย 48 เปอร์เซ็นต์

3. อัตราการลดอุณหภูมิในขณะทำการแช่แข็งที่มีผลต่อสเปิร์มปลากะพงแดง

จากผลการทดลองที่ 1 ทำให้ทราบถึงน้ำยาเจือจางที่เหมาะสม คือ Ringer จากผลการทดลองที่ 2 ทำให้ทราบถึงชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ คือ DMSO 5% และ 10%, Propylene Glycol 5% และ 10%, Methanol 5%, Ethylene Glycol 5% และ 10% และ Ethanol 5% เพื่อนำผลการทดลองที่ 1 และ 2 เข้าสู่ขั้นตอนอัตราการลดอุณหภูมิ ซึ่งขั้นตอนนี้มีความสำคัญเนื่องจากมีปัจจัยและความแปรปรวนมากระหว่างการแช่แข็ง ผลจากอัตราการลดอุณหภูมิ ภายหลังการละลาย พบว่า DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 5% และ 10% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงกว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ทุกชนิดซึ่งแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน ซึ่งการที่อัตราการรอดของสเปิร์มที่ต่ำมากนั้นสามารถเกิดขึ้นได้หลายปัจจัยในระหว่างการแช่แข็ง อาทิเช่น อัตราการลดอุณหภูมิที่ช้าหรือเร็วเกินไปจากการรายงานของ Sansone et al. (2002) ได้ทำการทดสอบอัตราการลดอุณหภูมิที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา Sea Bass โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10, 12, 15 และ 24 องศาเซลเซียสต่อนาที พบว่า อัตราการลดอุณหภูมิที่ 15 องศาเซลเซียสต่อนาที ให้อัตราการเคลื่อนที่สูงสุด

การใช้อัตราการลดอุณหภูมิช้าหรือเร็วนั้นมีผลทำให้น้ำสามารถซึมเข้า-ออกจากเซลล์ได้ เป็นผลให้เกิดเซลล์เหี่ยว (Plasmolysis) และเซลล์แตก (Plasmoptysis) ส่วนการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในระหว่างการแช่แข็งก็เป็นผลทำให้เซลล์ถูกทิ่มแทงจากเกล็ดน้ำแข็งได้ อีกปัจจัยหนึ่งคือการใช้อุณหภูมิสุดท้ายของการแช่แข็ง (Final Temperature) Huang et al. (2004) ได้ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Green Swordtail (*Xiphophorus helleri*) แบบแช่แข็งโดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 15 องศาเซลเซียส และใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 35 องศาเซลเซียสต่อนาที ซึ่งอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -80 องศาเซลเซียสโดยพบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ประมาณ 79 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาครั้งนี้บางครั้งพบน้ำเชื้อที่นำมาละลายภายหลังการแช่แข็งมีลักษณะรวมตัวกันเป็นก้อนซึ่งสาเหตุน่าจะมาจากขั้นตอนระหว่างการลดอุณหภูมิ เนื่องจากพบว่าระหว่างขั้นตอนการลดอุณหภูมิจะทำให้น้ำภายในเซลล์ซึมออกภายนอกเซลล์ และสังเกตเห็นได้ว่าน้ำและน้ำเชื้อแบ่งชั้นกัน น้ำเชื้อจึงมีลักษณะเป็นวุ้นและมีผลทำให้ลักษณะทางกายภาพนั้นเปลี่ยนแปลง เช่น เซลล์มีขนาดเล็กลงหรือมีรูปร่างผิดไปจากเดิม การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเคมี เช่น ปริมาณความเข้มข้นของสารละลายและความเป็นกรด-เบสภายในเซลล์นั้นสูงขึ้นจึงเป็นผลให้ความเป็นพิษภายในเซลล์นั้นสูงขึ้นตามไปด้วย ซึ่งพบปัญหาเช่นเดียวกับการทดลองของ Mongkonpunya et al.

(1996) ได้ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากลุ่ม Pangasiidae โดยใช้ Propylene Glycol 5% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ภายหลังการละลายพบว่าน้ำเชื้อมีลักษณะเป็นวุ้น (Gel) และเมื่อใช้ Propylene Glycol ที่ระดับความเข้มข้นสูง ๆ ทำให้น้ำเชื้อไม่มีลักษณะเป็นวุ้น นอกจากนี้ Dong et al. (2007) ได้ทำการศึกษาความหนาแน่นของสเปิร์มที่ใช้ในการแช่แข็งสเปิร์มหอย (*Crassostrea gigas*) และได้รายงานว่าการที่สเปิร์มรวมตัวกันเป็นก้อน (Sperm Agglutination) ภายหลังการละลาย พบว่าเกิดขึ้นได้จากหลายปัจจัย ได้แก่ ความหนาแน่นของสเปิร์มที่ใช้ในการแช่แข็งมีปริมาณมากกว่า 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ก่ารใช้อัตราการลดอุณหภูมิและอัตราการละลายที่ช้ามากเกินไป และอีกปัจจัยหนึ่งคือ ปริมาณความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ต่ำเกินไป ล้วนแต่ทำให้สเปิร์มนั้นเกิดการรวมตัวกันเป็นก้อน

อย่างไรก็ตามการย้อมสีด้วย Eosin-Nigrosin จึงเป็นวิธีหนึ่งที่ทำให้ทราบอัตราการมีชีวิตรอดของสเปิร์มหลังจากการแช่แข็ง จากผลการย้อมสี พบว่า อัตราการมีชีวิตรอดของสเปิร์มหลังการแช่แข็งไม่มีความแตกต่างกันแต่จะขัดแย้งกับผลของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่อย่างเห็นได้ชัดเจน เนื่องจากระหว่างการแช่แข็งนั้นบริเวณส่วนหางของสเปิร์มอาจถูกทิ่มแทงด้วยเกล็ดน้ำแข็ง ซึ่งเป็นเหตุที่ทำให้สเปิร์มนั้นไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ในขณะเดียวกันจึงไม่พบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มภายหลังการแช่แข็งเมื่อนำไปตรวจดูการเคลื่อนที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาการเพิ่ม–ลดอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อปลากะพงแดงแบบแช่แข็ง รวมถึงการศึกษาการนำน้ำเชื้อปลากะพงแดงแช่แข็งไปใช้ในการผสมเทียม เพื่อศึกษาอัตราการเพาะฟัก และอัตรารอดต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University