บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผล

อภิปรายผล

ศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อของปลายี่สกเทศ

การศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อของปลายี่สกเทศจากการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) แบบแช่แข็งปลายี่สกเทศที่นำมาทดลองมีน้ำหนักและความยาวรวมเฉลี่ยเท่ากับ 800±12.47 กรัม และ 11.8±0.74 เซนติเมตร น้ำหนักปลาเป็นส่วนหนึ่งของการบ่งบอกถึงความสมบูรณ์เพศของปลาได้ ซึ่งปลาแต่ละชนิดจะมีขนาดและอายุเมื่อถึงวัยเจริญพันธุ์ที่แตกต่างกันออกไปตามชนิดของปลา เช่น ปลานิลช่วงวัยเจริญพันธุ์มีน้ำหนักปลาประมาณ 80-200 กรัมขึ้นไป มีอายุประมาณ 4-6 เดือนไป และปลาตะเพียนช่วงวัยเจริญพันธุ์มีน้ำหนักปลาประมาณ 200-500 กรัมขึ้นไป มีอายุประมาณ 6-12 เดือนไป เป็นต้น (เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, 2543). สำหรับปลายี่สกเทศช่วงวัยเจริญพันธุ์มีน้ำหนักปลาประมาณ 500-2000 ไปกรัมขึ้น และมีอายุประมาณ 12-24 เดือนไป (อุทัยรัตน์ ณ นครม, 2538) และจากการประเมินคุณภาพน้ำน้ำเชื้อสดของปลายี่สกเทศ พบว่ามีความหนาแน่นของสเปิร์มเฉลี่ย 27.86±0.12 $\times 10^8$ ตัวต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าต่ำกว่าความหนาแน่นของน้ำเชื้อปลาชนิดอื่น ๆ เช่น น้ำเชื้อปลาไน (*Cyprinus carpio L.)* มีค่าความหนาแน่นของสเปิร์มเท่ากับ 15×10^9 ml^{-1} (Lubzens et al., 1997) จากงานวิจัยของ Alavi et al. (2007) พบว่า น้ำเชื้อปลา *Perca fluviatilis* มีค่าความหนาแน่นของสเปิร์มเท่ากับ 29.19×10^9spz ml^{-} น้ำเชื้อปลา *Brycon orbignyanus* มีค่าความหนาแน่นของสเปิร์มเท่ากับ 5.4×10^9cell/ml (Maria et al., 2006) น้ำเชื้อปลา *Paralichthys orbignyanus* มีค่าความหนาแน่นของสเปิร์มเท่ากับ 1.08×10^{10}cells/ml (Lanes et al., 2008) ผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาในปลายี่สกเทศมีค่าต่ำอาจเนื่องมาจากทำการศึกษาความหนาแน่นในช่วงเดือนกรกฎาคม-ตุลาคม ซึ่งเป็นช่วงปลายฤดูของการผสมพันธ์ อาจจะทำให้ค่าความหนาแน่นของสเปิร์มต่ำ นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์มปลายี่สกเทศ (seminal plasma) มีระดับออสโมลาริตีเฉลี่ยเท่ากับ 274.33±2.2 mOsm/kg ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับที่พบในน้ำเชื้อปลา *Perca fluviatilis* มีค่าออสโมลาริตีเฉลี่ยเท่ากับ 298.07±5.09 mOsm/kg (Alavi et al., 2007) ปลา

Maccullochella peelii peelii มีค่าออสโมลาริตีเฉลี่ยเท่ากับ 220.7±6.7 mOsm/kg (Daly et al., 2008) ปลาไน (*Cyprinus carpio L.)* มีค่าออสโมลาริตีเฉลี่ยเท่ากับ 272±6 mOsm/kg (Boryshpolets et al., 2009) ปลา *Piaractus brachypomus* มีค่าออสโมลาริตีเฉลี่ยเท่ากับ 313.3±14.0 mOsm/kg (Nascimentoet et al., 2009) จากรายงานการวิจัยของ Casallas, Robles, and Santamaría (2007) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำเชื้อตามฤดูกาล ระหว่างช่วงต้นฤดู (15 ก.พ.-14 มี.ค.) ช่วงกลาง และปลายฤดู (15 มี.ค.-14 เม.ย. และ 15 เม.ย.-14 พ.ค. ตามลำดับ) ของน้ำเชื้อปลายามู *Brycon amazonicus* พบว่า ความเข้มข้นของน้ำเชื้อในช่วงต้นฤดูวางไข่ ต่ำกว่าในช่วงกลางและช่วงปลายฤดู อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) 4.9±1.5, 8.2±0.8 และ 8.7±0.8×10^6/μL ตามลำดับ และไม่พบความเปลี่ยนแปลงของค่าออสโมลาริตีต้นฤดูวางและในช่วงกลาง แต่ในช่วงปลายฤดูค่าออสโมลาริตีเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.001$) 296.1±2.5, 296.5±6.1 และ 351.5±6.4 mOsm/kg ตามลำดับ แต่จากรายงานการวิจัยของ ศิริพร คชรัตน์, จุฑามาศ พบสุข, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2550) ศึกษาการการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกเทศ (*Clarias gariepinus*) แบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 °C โดยประเมินประสิทธิภาพการเก็บรักษาในช่วงเวลาต่าง ๆ ของฤดูผสมพันธุ์วางไข่ได้แก่ ในช่วงต้นฤดู(มิถุนายน) กลางฤดู (สิงหาคม) และปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (ตุลาคม) พบว่า ระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ ลดลงในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ โดยน้ำเชื้อที่รวบรวมในช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์วางไข่สามารถเก็บรักษาได้นานกว่าน้ำเชื้อที่เก็บรักษาในช่วงกลางฤดู หรือปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่

การศึกษาระดับการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกเทศในสารละลายบัฟเฟอร์สูตรมีประจุและในสารละลายบัฟเฟอร์สูตรไม่มีประจุ ที่มีระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน

จากการศึกษา พบว่า ระดับออสโมลาริตีมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกเทศที่ระดับออสโมลาริตีต่ำมีเปอร์เซ็นต์การสเปิร์มเคลื่อนสูงและสเปิร์มจะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ลดลงเมื่อระดับออสโมลาริตีเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Yang and Tiersch (2009) ได้ศึกษาจุดเริ่มกระตุ้นการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา medaka (*Oryzias latipes*) ในสารละลายบัฟเฟอร์ HBSS ที่ระดับค่าออสโมลาริตีต่างกัน (0-900 mOsm/kg) พบว่า สเปิร์มปลา *Oryzias latipes* เคลื่อนที่สูงเมื่อค่าระดับออสโมลาริตีต่ำ (25-227 mOsm/kg) และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ของสเปิร์มลดลงเมื่อระดับออสโมลาริตีเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกันกับ พลชาติ ผิวเณร และคณะ (2550) ทดสอบระดับการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในบัฟเฟอร์ 3 สูตร คือ กลูโคส, 0.85% NaCl และ MC ที่เจือจาง 11 ระดับ (0-100) ที่ระดับออสโมลาริตีต่ำพบว่ามีมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงและเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สเปิร์มลดลงเมื่อระดับออสโมราลิตีเพิ่มขึ้น จนถึงจุด ๆ หนึ่งที่สเปิร์มทุกตัวไม่มีการเคลื่อนที่ และ Alavi et al. (2007) ศึกษาส่วนประกอบของน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม และทดสอบระดับการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา *Perca fluviatilis* ในสารละลายกลูโคส ที่เจือจาง 3 ระดับ (100-300mM) พบว่า น้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์มปลา *Perca fluviatilis* ประกอบด้วยแร่ธาตุ K^+ 15.02 mM, Na^+ 138.30 mM, Cl 115.00 mM, Ca 2.81 mM และมีค่า Osmolality 255.00 mOsm/kg และมีค่าออสโมลาริตีเฉลี่ยเท่ากับ 298.07±5.09 mOsm/kg จากการทดสอบระดับการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในสารละลายกลูโคสที่ระดับออสโมลาริตี 100 mM พบว่ามีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มเคลื่อนที่สูง ที่ระดับออสโมลาริตี 200 mM สเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ลดลง และที่ระดับออสโมราลิตี 300 mM พบว่า ไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

โดยทั่วไปปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม คือ ค่าออสโมลาริตี (Osmolality), ความเข้มข้นของแร่ธาตุ (Ion Concentration) K^+, Na^+ และ Ca^+, pH และ อุณหภูมิ (Temperature) นอกจากนี้ชนิดของอิออนยังมีอิทธิพลต่อการกระตุ้นและยับยั้งการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ซึ่งจากรายงานการวิจัยพบว่า K^+ ที่มีความเข้มข้นสูง มีหน้าที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาวงศ์ Salmonidae และ Acipenserridae และมีอิทธิพลในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาวงศ์ Cyprinidae ซึ่งสเปิร์มปลาน้ำจืดจะเคลื่อนที่เมื่ออยู่ในระดับค่าออสโมลาริตีต่ำและสเปิร์มปลาน้ำเค็มจะเคลื่อนที่เมื่อเมื่ออยู่ในระดับค่าออสโมลาริตีสูง แสดงให้เห็นว่าค่าออสโมลาริตีและความเข้มข้นของแร่ธาตุมีอิทธิพลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (Alavi et al., 2007) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ที่สเปิร์มปลายี่สกเทศซึ่งเป็นปลาน้ำจืด จะมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในสารละลายที่มีค่าออสโมลาริตีต่ำ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศแบบแช่แข็ง

จากการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศแบบแช่แข็ง โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ DMSO, Methanol, Glycerol, Ethanol, Propylene Glycol และ Ethylene Glycol ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5%, 10%, 15% และ 20% โดยผสมน้ำเชื้อกับสารละลายบัฟเฟอร์และสารไครโอโพรเทคแทนท์ ในอัตราส่วน 1:5:1 อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 25°C จนถึงอุณหภูมิสุดท้ายที่ -40°C/min โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ กัน (-3, -5 และ -10°C/min) แล้วเก็บในถังไนโตรเจนเหลวนาน 7 วัน และนำมาละลายที่อุณหภูมิ 70°C นาน 5 วินาที พบว่า สารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS เจือจางสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 15% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ ศิริพร คชรัตน์ และคณะ (2550) ที่ได้ศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกเทศ 5 ชนิด (Extender 7, Extender 13, HBSS, Ca-F HBSS และ Modified Corland) พบว่า สารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS มีความเหมาะสมที่สุดในการแช่เย็นน้ำเชื้อปลาดุกเทศ ศิริพร คชรัตน์, กมลวรรณ ศุภวิญญู, วีรพงศ์ ปฐมวรชาติ, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธ์ชัย (2549) ได้ทำการศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus*) โดยนำน้ำเชื้อมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS และสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% นาน 10 นาที แล้วทำการแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับ (-3, -5 และ -10°C/min) พบว่า DMSO ทุกระดับความเข้มข้นและอัตราการลดอุณหภูมิ มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ระหว่าง 46.7-80%

จากการแช่แข็งน้ำเชื้อของปลายี่สกเทศโดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 6 ชนิด ได้แก่ DMSO, Methanol, Glycerol, Ethanol, Propylene Glycol และ Ethylene Glycol ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่า สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 15% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -10°C/min มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงสุด รองลงมาคือ สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 15% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3 และ -5°C/min มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม อยู่ระหว่าง 75.55-71.44 หลังการละลายน้ำเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการงานวิจัยของ Akcay, Bozkurt, Secer, and Takin (2002) แช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน (*Cyprinus carpio)* โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Extender เจือจางในสารไครโอโพรเทคแทนท์3 ชนิด คือ 15% DMSO, 15% DMA, 15% glycerol พบว่า

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

15% DMSO มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนของสเปิร์มหลังการละลายดีที่สุด (55%) Nascimento et al. (2009) ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเปคูแดง (*Piaractus brachypomus*) โดยนำสเปิร์มมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ Glucose และ Beltsville Thawing Solution (BTS™) เติม 10% DMSO และ 10% Methylglycol พบว่า การใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Glucose ผสม 10% DMSO มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม หลังการละลาย 52±2.2% และจากรายงานการวิจัยของศิริพร คชรัตน์, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2549) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพแบบแช่แข็ง โดยนำน้ำเชื้อมาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS และใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 6 ชนิดที่ 4 ความเข้มข้น (5%,10%,15% และ 20%) นาน 10 นาที แล้วทำการแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับ (-3, -5 และ -10°C/min) พบว่า 5% DMSO และ 10% DMSO ที่ระดับอัตราการลดอุณหภูมิ -10°C/min มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด และยังมีการแช่แข็งในปลาน้ำจืดอีกหลายชนิดที่ใช้สารละลาย DMSO ในการแช่แข็งน้ำเชื้อ เช่น ปลาไน (*Cyprinus carpio L*; Warnecke & Pluta, 2003) ปลา platyfish (*Xiphophorus couchianus* ; Huang, Dong, & Tiersch, 2003) ปลา catfish (*Silurus glanis*; Linhart et al., 2005) ปลาบึก, ปลาไน, ปลาเทพา, ปลากระโห้ และปลาดุกรัสเซีย (เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, 2545)

นอกจากนี้ยังมีการแช่แข็งน้ำเชื้อในปลาทะเลหลายอีกหลายชนิด เช่น การแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Ringer Solution เจือจางในสารไครโอโพรเทคแทนท์ 5 ชนิด DMSO, Propylene Glycol, Ethylene Glycol (ที่ความเข้มข้น 5% และ 10%) Ethanol และ Methanol (ที่ความเข้มข้น 5%) ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 4 ระดับ (-3, -5,-10 และ -12 °C/min) อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 25°C และอุณหภูมิสุดท้าย -40 และ -80°C พบว่า 10% DMSO ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -10°C/min และอุณหภูมิสุดท้าย -80°C มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด 91.1±2.2 และมีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตเท่ากับ 92.7±2.3 และมีอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด (Vuthiphandchi, Chomphuthawach & Nimrat, 2009) Chen et al. (2004) ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อ turbot (*Scophthalmus maximus*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Extender TS-2 เจือจางในสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด DMSO, DMF และ PG ที่ความเข้มข้น 6%, 10% และ 14% พบว่า 10% DMSO มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด 78.3% และจากรายงานการวิจัยของ Zhang et al. (2003) ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อ flounder (*Paralichthys olivaceus*) โดยใช้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารละลายบัฟเฟอร์ Extender เจือจางในสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด 12% DMSO, 12% Glycerol หรือ 12% Methanol พบว่า 12% DMSO, 12% Glycerol หรือ Methanol เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายเท่ากับ 60.5%, 79.17% และ 13.25% ตามลำดับ

ในส่วนของสารละลาย Methanol พบว่า 10% Methanol ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -10° C/min ของสารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดที่ 42.22±2.2 และ 51.10±0.0 ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับ Horváth, Miskolczi and Urbányi (2003) ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน โดยเจือจางน้ำเชื้อสดกับสารละลายบัฟเฟอร์ Glucose Extender นำมาผสมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ 2 ชนิด 10% DMSO และ 10% Methanol หลังการละลาย พบว่า ที่ 10% Methanol มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด 63±9% Muchlisin and Azizah (2009) ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา catfish (*Mystus nemurus*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Ringer Solution และใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 4 ชนิด DMSO, Ethanol, Methanol และ Glycerol ที่ความเข้มข้น 10% หลังการละลาย พบว่า ที่ 10% Methanol มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด 49.81±2.10 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ 10% Ethanol และ Yasui et al. (2009) ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา (*Misgurnus anguillicaudatus*) โดยใช้น้ำเชื้อสดมาเจือจางสารละลายบัฟเฟอร์ Cyprinid extenders และนำมาผสมกับสารไครโอโพรเทคแทแทนท์ 5 ชนิด DMSO, DMA, Methanol, Ethylene Glycol และ Glycerol ที่ความเข้มข้น 5%,10% และ 15% หลังการละลาย พบว่า สเปิร์มเคลื่อนที่ดีในสารละลาย 10% และ 15% Methanol ในขณะที่สารละลาย Ethylene Glycol พบว่า ที่ความเข้มข้น 20% ในทุกอัตราการลดอุณหภูมิ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มีความแตกต่างกัน (51.11±2.2-62.56±2.2)

ในส่วนของสารละลาย Propylene Glycol และ Ethanol ในทุกความความเข้มข้น และทุกอัตราการลดอุณหภูมิ สเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ต่ำกว่า 50% และสารละลาย Glycerol พบว่า ในทุกความความเข้มข้น และทุกอัตราการลดอุณหภูมิไม่พบการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม จากรายงานการวิจัย Yasui et al. (2009) ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา (*Misgurnus anguillicaudatus*) โดยใช้น้ำเชื้อสดมาเจือจางสารละลาย Cyprinid extenders และนำมาผสมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ 5 ชนิด DMSO, DMA, Methanol, Ethylene Glycol และ Glycerol ที่ความเข้มข้น 5%,10% และ 15% หลังการละลาย พบว่า สเปิร์มไม่เคลื่อนที่ในสารละลาย 15% Glycerol และ 15%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Ethylene Glycol จากรายงานการวิจัย Pan et al. (2008) ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) โดยใช้น้ำเชื้อสดมาเจือจางสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ชนิด (Ringer extender, Kurokura-1 extender and D-15 Extender) และนำมาผสมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด (DMSO, Glycerol and Methanol) ที่ความเข้มข้น 8%, 12.5% และ 10% หลังการละลาย พบว่า สเปิร์มเคลื่อนที่ต่ำในสารละลาย Glycerol

จากการทดลองซ้ำโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด DMSO ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% และ ethylene glycol กับ Methanol ที่ความเข้มข้น 10%, 15% และ 20% และอัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ-10°C/min พบว่า สารละลายบัฟเฟอร์Extender 7 และ Ca-F HBSS เมื่อใช้คู่กับสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 15% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -10°C/min มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนของสเปิร์มดีที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองครั้งที่ 1 ในขณะที่สารละลาย Ethylene Glycol และ Methanol ที่ความเข้มข้น 10%, 15% และ 20% ทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ระหว่าง 11.11±2.2 ถึง 62.22±2.2

การศึกษาระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศแบบแช่แข็ง

จากการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศแบบแช่แข็งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS โดยใช้สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 15% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -10°C/min และทำการลดอุณหภูมิเริ่มต้น 25°C ถึงอุณหภูมิสุดทาย -40°C แล้วนำไปเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 9 เดือน และนำมาประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและสเปิร์มมีชีวิต พบว่า สารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS เมื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศไว้ 8 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ระหว่าง 75.55-80 และเปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตอยู่ระหว่าง 81.11-95.23 หลังจากนั้นในเดือนที่ 9 พบว่าสารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS น้ำเชื้อมีลักษณะทางกายภาพที่เปลี่ยนแปลงไป น้ำเชื้อจับตัวกันเป็นก้อนมีสีขาวขุ่น เมื่อนำมาขยี้ให้แตก และทำการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า ไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และ เมื่อย้อมสีดูสเปิร์มที่มีชีวิต พบว่า ไม่พบการมีชีวิตของสเปิร์ม สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Basavaraja and Hegda (2004) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา mahseer (*Tor khudree)* แช่แข็งด้วย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

น้ำสารละลาย Extender 4 โดยใช้สารละลาย 10% DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 50 วัน เมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลาย พบว่า ไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มซึ่งจากรายงานการวิจัยของ Muchlisin and Azizah (2009) ศึกษารูปร่างน้ำเชื้อปลา baung (*Mystus nemurus)* แช่แข็ง ที่เก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 13 เดือน หลังการละลาย พบว่า เกิดความผิดปกติที่ส่วนหัวของสเปิร์ม ในส่วนของนิวเคลียสและเซลล์ส่วนหางฉีกขาด ในทางตรงกันข้ามจากรายงานการวิจัยของ Chao, Tsai, and Liao (1992) นำน้ำเชื้อปลา grouper (*Epinepherus malabariccus*) ที่เก็บรักษาโดยวิธีการแช่แข็งนาน 1 วัน 17 วัน และ 291 วัน มาผสมเทียม พบว่า น้ำเชื้อแช่แข็งให้อัตราปฏิสนธิ 96.72%, 85.0% และ 79.68% ตามลำดับ พลชาติ ผิวเณร พนม กระจ่างพจน์ และศรีรัตน์ สอดศุข (2547) นำน้ำเชื้อปลาบึก (*Pangasius gigas*) ที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งนาน 343 วัน มาละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 8 วินาที เมื่อนำไปผสมเทียมกับไข่ปลาบึก พบว่า น้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งและน้ำเชื้อสดให้อัตราปฏิสนธิ 35.64±7.76% และ 35.96±15.83% ตามลำดับ และให้อัตราฟัก 94.99±1.22% และ 95.14±1.59% ตามลำดับ โดยอัตราปฏิสนธิและอัตราฟักของน้ำเชื้อแช่แข็งไม่มีความแตกต่างกันกับน้ำเชื้อสด และจากรายงานการวิจัยของ Kurokura, Hirano, Tomato, and Iwahashi (1984) นำน้ำเชื้อปลาไน ที่เก็บรักษาโดยวิธีการแช่แข็งนาน 342 วัน มาผสมเทียม พบว่า น้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งให้อัตราปฏิสนธิ 31%

จากการศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศแบบแช่แข็งในเดือนที่ 9 นั้น น้ำเชื้อจับตัวกันเป็นก้อนมีสีขาวขุ่น อาจมีความเป็นไปได้ที่เกิดจากการที่ไนโตรเจนเหลวในถังหมด หรืออาจเนื่องมาจากการนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและสเปิร์มมีชีวิตในทุก ๆ เดือน ซึ่งต้องมีการเปิดฝาถังไนโตรเจนเหลวเพื่อนำตัวอย่างมาประเมินทุกเดือน อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิภายในถังไนโตรเจนเหลว ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปของคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ศึกษาการพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกเทศโดยการแช่แข็งในกล่องโฟม

นำน้ำเชื้อปลายี่สกเทศมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS และ Extender 7 ในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 1:5 แล้วนำมาเจือจางกับ DMSO ในอัตราส่วน 1:1 ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 15% แล้วดูดสารละลายน้ำเชื้อ 0.5 ml ใส่หลอด cryotube และปล่อยให้อยู่ในภาวะสมดุลในกล่องนาน 10 นาที จากนั้นนำไปลดอุณหภูมิในกล่องโฟมที่สูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนในระดับที่ต่างกัน 3 ระดับ คือ 2, 4 และ 6 เซนติเมตร โดยใช้ระยะเวลาการลดอุณหภูมิในกล่องโฟม 3 ระยะ ได้แก่ 5, 10 และ 15 นาที จากนั้นนำหลอดตัวอย่างมาเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 7 วัน ทำการตรวจสอบคุณภาพของน้ำเชื้อ โดยการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและการมีชีวิตของสเปิร์ม พบว่า สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS วางสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจน 2 เซนติเมตร ทุกระยะเวลาการลดอุณหภูมิ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดี ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ระหว่าง 60.00±0.0 ถึง 80.00±0.0 และมีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตอยู่ระหว่าง 75.22±0.94 ถึง 86.11±0.59 และรองลงมา พบว่า สารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 วางสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจน 2 เซนติเมตร ทุกระยะเวลาการลดอุณหภูมิ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ระหว่าง 60.00±0.0 ถึง 62.22±2.2 และมีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตอยู่ระหว่าง 73.34±1.20 ถึง 74.78±1.89 จากรายงานการวิจัย Ding et al. (2009) ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา *Siniperca chuatsi* โดยใช้น้ำเชื้อสดมาเจือจางสารละลายบัฟเฟอร์ D-15 Extender แล้วแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที และนำมาผสมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด DMSO, Methanol และ Glycerol ที่ความเข้มข้น 8%,10% และ 12% ดูดใส่ Cryotubes 2.0 ml วางสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร นาน 10 นาที จากนั้นแช่หลอดตัวอย่างไว้ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วนำมาละลาย พบว่า ที่ DMSO ที่ความเข้มข้น 8-12% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีเฉลี่ย 83.33-91.00% และ Boryshpolets et al. (2009) ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน (*Cyprinus carpio L.*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Extender นำมาเจือจางกับ 16% Ethylene Glycol ดูดใส่หลอดฟาง 0.5 ml วางสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 3 เซนติเมตร นาน 20 นาที จากนั้นนำหลอดตัวอย่างมาเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำมาละลาย พบว่าสเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ 75%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ในขณะที่สารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS ที่วางสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจน 4 และ 6 เซนติเมตร นาน 5, 10 และ 15 นาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำ

สรุปผลการทดลอง

1. ความเข้มข้นของสารที่มีประจุ และไม่มีประมี ผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกเทศ ที่ความเข้มข้นของสารละลายต่ำมีเปอร์เซ็นต์การสเปิร์มเคลื่อนสูงและสเปิร์มจะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ลดลงเมื่อระดับระดับความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มขึ้น

2. สารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS ที่เจือจางสารละลาย 15% DMSO ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -10°C/min มีความเหมาะสมที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ

3. เมื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศไว้ 8 เดือน สเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่อยู่ระหว่าง 75.55±2.2 -80±0.0 และเปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตอยู่ระหว่าง 81.11±1.17-95.22±0.79

4. การพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกเทศโดยการแช่แข็งในกล่องโฟม สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS วางสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจน 2 เซนติเมตร ทุกระยะเวลาการลดอุณหภูมิ มีความเหมาะสมที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สก

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาการผสมเทียมน้ำเชื้อปลายี่สกเทศแบบแช่แข็ง เพื่อดูการปฏิสนธิของสเปิร์ม

2. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยแช่แข็งให้ได้ปริมาณที่มากขึ้น

3. ควรศึกษาการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพสเปิร์มตลอดช่วงฤดูผสมพันธ์วางไข่ หรือศึกษาการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพสเปิร์มในช่วงต้นฤดู กลางฤดู และปลายฤดูผสมพันธ์วางไข่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University