รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อปลา ด้วยน้ำแข็งแห้งสำหรับใช้ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

Development of fish sperm cryopreservation program using dry ice for the hatchery

นายวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย
นางสุบัณฑิต นิ่มรัตน์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2560A10802087
สัญญาเลขที่ 101/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อปลา ด้วยน้ำแข็งแห้งสำหรับใช้ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
Development of fish sperm cryopreservation program using dry ice for the hatchery

นายวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[1]
นางสุบัณฑิต นิ่มรัตน์[2]

[1]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
[2]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

เมษายน 2561

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง การพัฒนาเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้งสำหรับใช้ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ สำเร็จเรียบร้อยลงได้ โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 101/2560 ขอขอบคุณ คุณอมรรัตน์ กิระวานิชย์ ที่ช่วยในการดูแลปลาทดลองและแช่แข็งน้ำเชื้อปลา

บทคัดย่อ

งานวิจัยเรื่อง การพัฒนาเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้งสำหรับใช้ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ได้ศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ สารไครโอโพรเทคแทนท์ อัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลายที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง โดยนำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวมาผสมกับน้ำยาบัฟเฟอร์ และสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ และพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งก่อนนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวแล้วนำมาทำการละลาย พบว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรด้วยการใช้สารละลาย Calcium-free Hank's Balanced Salt Solution (Ca-F HBSS) ร่วมกับ 10% DMSO โดยการนำหลอดฟางแช่ลงในน้ำแข็งแห้งบดละเอียดโดยตรง มีผลทำให้คุณภาพสเปิร์มหลังการละลายต่ำกว่าน้ำเชื้อสด แต่การแช่แข็งน้ำเชื้อในหลอดฟางที่ใช้วัสดุห่อหุ้มโดยเฉพาะการนำหลอดสายไฟฟ้ามาหุ้มหลอดฟางเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยน้ำแข็งแห้ง ได้น้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลายมีคุณภาพไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด โดยระยะเวลาการแช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำแข็งแห้งตั้งแต่ 10-30 นาทีไม่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลาย และการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำให้น้ำเชื้อหลังการละลายมีคุณภาพดี การใช้น้ำแข็งแห้งเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อปลาทำได้ง่าย และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

คำสำคัญ: น้ำแข็งแห้ง; การแช่แข็ง; น้ำเชื้อ; สเปิร์มมาโทซัว; คุณภาพสเปิร์ม; การผสมเทียม

ABSTRACT

The research project entitled “Development of fish sperm cryopreservation program using dry ice for the hatchery” was aimed to investigate the effects of extenders, cryoprotectants, cooling rates and thawing rates on sperm quality of fish sperm frozen by dry ice. Fish sperm were diluted with various extenders and cryoprotectants and sperm cryopreservation protocols were developed based on freezing with dry ice prior to cryostorage. Sperm diluted with Calcium-free Hank’s Balanced Salt Solution (Ca-F HBSS) and 10% dimethylsulfoxide (DMSO) in 0.25 mL French straws and frozen with crushed dry ice had post-thawed sperm quality lower than that of fresh milt. Post-thawed sperm diluted in French straws surrounded by power cable prior to frozen by dry ice had sperm quality comparable with that of fresh milt. Duration of freezing sperm in dry ice between 10-30 min was not affected on post-thawed sperm quality. Thawing of sperm at 30^{o}C resulted in good post-thawed sperm quality. Freezing of fish sperm by dried ice is easy to perform and can be applied in aquaculture.

Keywords: Dry ice; Cryopreservation; Semen; Spermatozoa; Sperm quality; Artificial insemination

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		i
บทคัดย่อ		ii
Abstract		iii
สารบัญ		iv
สารบัญตาราง		v
สารบัญรูป		vi
บทที่		
1	บทนำ	1
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	9
3	วิธีดำเนินงานวิจัย	21
4	ผลการทดลอง	33
5	อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	43
เอกสารอ้างอิง		46
ผลผลิต (Output)		51
ประวัติคณะผู้วิจัย		52

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว (%) หลังการแช่แข็งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์และสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆในน้ำแข็งแห้งนาน 10 นาที	34
2	การมีชีวิตของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว (%) หลังการแช่แข็งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์และสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆในน้ำแข็งแห้งนาน 10 นาที	36
3	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้าด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาการแช่แข็งและอุณหภูมิการละลายต่างกัน.....	38
4	ระยะเวลาการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้าด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาการแช่แข็งและอุณหภูมิการละลายต่างกัน.....	38
5	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางห่อหุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคนด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาการแช่แข็งและอุณหภูมิการละลายต่างกัน.....	40
6	ระยะเวลาการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางห่อหุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคนด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาการแช่แข็งและอุณหภูมิการละลายต่างกัน.....	40
7	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางห่อหุ้มด้วยหลอด Centrifuge tube ด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาการแช่แข็งและอุณหภูมิการละลายต่างกัน.....	42
8	ระยะเวลาการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางห่อหุ้มด้วยหลอด Centrifuge tube ด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาการแช่แข็งและอุณหภูมิการละลายต่างกัน.....	42

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	การบรรจุหลอดฟางที่มีน้ำเชื้ออยู่ภายในเข้าไปในภาชนะ 3 ลักษณะเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อปลา loach ในน้ำแข็งแห้งที่บดเป็นผง.....	20
2	พ่อพันธุ์ปลาตะเพียนขาว.....	28
3	พ่อพันธุ์ปลาตะเพียนขาวก่อนทำการสลบ.....	28
4	การรวบรวมน้ำเชื้อปลาเพื่อใช้ในการทดลอง.....	29
5	หลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรที่ใช้ในการทดลอง.....	29
6	การปิดปลายหลอดฟาง.....	30
7	ลักษณะปลายหลอดหลอดฟางหลังการปิดปลายหลอด.....	30
8	น้ำแข็งแห้งที่ใช้ในการทดลอง.....	31
9	การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้งโดยปิดฝากล่องโฟม.....	31
10	สายไฟฟ้าที่นำมาหุ้มหลอดฟาง.....	32
11	การปิดปลายหลอดสายไฟฟ้าด้วยกาวซิลิโคน.....	32

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทยมีความก้าวหน้าอยู่ในระดับโลก มีการส่งออกสัตว์น้ำหลายชนิดไปจำหน่ายในตลาดต่างประเทศทั้งในยุโรป และอเมริกา รวมทั้งมีการบริโภคสัตว์น้ำในประเทศอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสภาพอากาศที่ร้อนของประเทศไทย ทำให้สัตว์น้ำหลายชนิดโตเร็ว อีกทั้งการส่งเสริมจากหน่วยงานภาครัฐที่เกี่ยงข้องในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และความเชี่ยวชาญด้านทักษะการเพาะเลี้ยงของเกษตรกร และผู้ประกอบการ ทำให้การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทยมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องจนเป็นอุตสาหกรรมการเกษตรหลักชนิดหนึ่งที่สามารถนำรายได้เข้าประเทศจำนวนมาก โดยมีผลผลิตสัตว์น้ำสูงโดยเฉพาะการเลี้ยงในระบบพัฒนา อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทยยังมีค่อนข้างจำกัด ทำให้เสียโอกาสในการแข่งขันของประเทศ เนื่องจากเป็นที่ทราบโดยทั่วไปแล้วว่าการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จะช่วยทำให้คุณภาพ และผลผลิตสัตว์น้ำดีขึ้น และยังอาจช่วยลดต้นทุนการผลิตสัตว์น้ำได้ถ้าเลือกใช้เทคโนโลยีชีวภาพอย่างเหมาะสม (appropriate technology) ในการแก้ไขปัญหาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ด้วยเหตุที่การเพาะพันธุ์ปลาน้ำจืดบางชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในประเทศไทย ยังมีปัญหาเกี่ยวกับการขาดแคลนน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดี หรือพ่อพันธุ์ไม่มีน้ำเชื้อในบางช่วงของฤดูกาลเพาะพันธุ์ปลา ทำให้ไม่สามารถเพาะพันธุ์ปลาได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงมีความจำเป็นในการวิจัยเชิงรุกเพื่อการจัดเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาที่มีคุณภาพดีเอาด้วยเทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อนำน้ำเชื้อปลาที่มีคุณภาพดีมาใช้ประโยชน์ในภายหลังเมื่อไม่สามารถจัดหาพ่อพันธุ์คุณภาพดีได้

โดยทั่วไปปลาส่วนใหญ่ผสมพันธุ์วางไข่ตามฤดูกาล แต่ก็พบบ่อยครั้งที่พ่อแม่พันธุ์ปลาที่ใช้เพาะพันธุ์มีความสมบูรณ์เพศ (sexual maturation) ไม่พร้อมกัน ทำให้เกิดปัญหาในด้านการจัดการในโรงเพาะฟัก เช่น ในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (spawning season) พ่อพันธุ์ปลามีปริมาณน้ำเชื้อลดลง ซึ่งแม้ว่าสามารถกระตุ้นได้โดยการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นให้ปลาสร้างน้ำเชื้อได้ (spermiation) แต่กลับพบว่าแม่พันธุ์มีไข่แก่น้อยมาก หรือคุณภาพน้ำเชื้อลดลง ทำให้การเพาะพันธุ์ปลาบางชนิดไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร แม้ว่าในปลาหลายชนิดจะพบว่าช่วงระยะเวลาที่พ่อพันธุ์สมบูรณ์เพศมีน้ำเชื้อ (spermiation period) มักจะเกิดก่อนช่วงเวลาที่แม่พันธุ์มีไข่แก่ และยังมีน้ำเชื้อยาวนานกว่าช่วงระยะเวลาที่แม่พันธุ์มีไข่แก่ หรือสุกเต็มที่ (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย 2535; Vuthiphandchai et al., 2009b) นอกจากนี้ในบางครั้งช่วงระยะเวลาที่สามารถรีดน้ำเชื้อได้ (sperm availability) ก็ไม่สัมพันธ์กับช่วงระยะเวลาที่แม่พันธุ์ตกไข่ (egg availability) ซึ่งก็อาจเกิดจากพ่อพันธุ์ปลาถูกรีดน้ำเชื้อบ่อยครั้งจนไม่สามารถผลิตน้ำเชื้อได้ทัน หรืออาจเกิดจากคุณภาพอาหารหรือความแปรปรวนของพ่อพันธุ์ปลาแต่ละตัว (individual variation) ที่ผลิตน้ำเชื้อที่มีคุณภาพต่างกัน ทำให้มีความยุ่งยากในการจัดการในระหว่างการผสมเทียมในโรงเพาะฟักเป็นอย่างมาก (เสน่ห์ ผลประสิทธิ์ และคณะ 2536; Büyükhatipoglu and Holtz, 1984) อีกทั้งการใช้น้ำเชื้อปลาที่รีดออกมาใหม่ๆ (freshly collected milt) เพื่อการผสมเทียมกับไข่นั้นก็มีข้อจำกัดตรงที่จะต้องใช้น้ำเชื้อผสมเทียมกับไข่ทันที ไม่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้นานเป็นชั่วโมง เพราะคุณภาพน้ำเชื้อปลาลดลงอย่างรวดเร็วหลังรีดออกนอกตัวปลา ทำให้อัตราการปฏิสนธิต่ำหรือผสมไม่ติด อีกทั้ง

การจับพ่อพันธุ์ปลา หรือการรีดน้ำเชื้อปลาบ่อยครั้ง ทำให้พ่อพันธุ์มีบาดแผลที่ท้องจากการรีดน้ำเชื้อถ้าใช้บ่อยครั้ง ซึ่งส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อปลาลดลง ส่งผลต่อการผลิตลูกปลา (Irawan et al., 2010) นอกจากนี้ปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจบางชนิด เช่นปลากะพงขาว ก็มีการกลายเพศ (sex reversal) เมื่อเจริญเติบโตขึ้น และในปลาบางชนิดในระหว่างการเพาะพันธุ์ปลาบางชนิด เช่นปลาดุกอุยและปลาดุกเทศ ต้องมีการผ่าเอาถุงน้ำเชื้อ (testis) เพื่อขยี้เอาน้ำเชื้อออกมาผสมเทียมกับไข่ รวมทั้งสภาพความเครียด (stress) ของพ่อพันธุ์ปลาที่ถูกกักขังในโรงเพาะฟัก (hatchery) เมื่อถูกนำออกจากบ่อพ่อพันธุ์ปลามาพักระยะเวลาสั้นๆในโรงเพาะฟัก ก็ยังมีผลโดยตรงทำให้ต่อมใต้สมองหลั่งฮอรโมน gonadotropin II (GtH II) น้อยลง (Mylonas et al., 1997) ส่งผลทำให้ปริมาณน้ำเชื้อที่รีดได้ลดลงอย่างรวดเร็ว (expressible milt) ในระยะเวลาสั้นๆ ทำให้การจัดการระหว่างการเพาะพันธุ์ปลาเหล่านี้อาจประสบปัญหา จึงมีความจำเป็นที่ต้องมีการวางแผนบริหารจัดการในการควบคุมให้น้ำเชื้อปลามีคุณภาพคงที่เพื่อนำมาใช้ผสมเทียมในโรงเพาะฟัก

โดยภาพรวมแม้ว่าปัญหาการเพาะพันธุ์ปลาในประเทศไทยซึ่งอยู่ในประเทศเขตร้อน จะไม่รุนแรงเหมือนกับปลาที่อาศัยอยู่ในประเทศเขตหนาว เนื่องจากอุณหภูมิของน้ำที่สูงกว่า ทำให้ปลาที่อยู่ในประเทศเขตร้อนมีการพัฒนาสร้างไข่ (oogenesis) และการสร้างน้ำเชื้อ (spermiation) ที่เร็วขึ้น อันเป็นผลจากระดับเมตะบอลิซึม (metabolism) ที่สูงของปลาที่อยู่ในประเทศเขตร้อน ทำให้การพัฒนาระบบสืบพันธุ์เกิดได้เร็วกว่า และใช้ระยะเวลาที่สั้นกว่าในการเลี้ยงขุนให้พ่อแม่พันธุ์ปลามีความสมบูรณ์เพศ (sexual maturation) (Vuthiphandchai and Zohar, 1999) อย่างไรก็ตาม ปัญหาคุณภาพน้ำเชื้อปลาหลายชนิดก็ยังมีความเกี่ยวข้องปริมาณ และคุณภาพน้ำเชื้อที่ลดลง (decline in sperm quality and quantity) ของปลาบางชนิดที่รีดได้ในประเทศไทย ซึ่งก็ยังเป็นปัญหาหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อภาคการผลิตในโรงเพาะฟักทั้งของภาคเอกชน และภาคราชการที่เกี่ยวข้อง โดยเฉพาะในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (late spawning season) ของปลาน้ำจืดบางชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจจะประสบปัญหาการเพาะพันธุ์อย่างมาก เนื่องจากขาดแคลนน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดี ทำให้มีผลต่อการเพาะพันธุ์ปลา ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาจากพ่อพันธุ์ที่มีน้ำเชื้อคุณภาพดี หรือพ่อพันธุ์ที่ได้ปรับปรุงสายพันธุ์ไว้แล้วนำน้ำเชื้อมาแช่แข็งเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ภายหลังจึงเป็นประโยชน์โดยตรงภาคการผลิต เช่นในช่วงเวลาที่พ่อพันธุ์ปลามีน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดี หรือมีปริมาณมาก จึงควรทำการแช่แข็งแล้วเก็บรักษาไว้และนำมาใช้ผสมเทียมเพาะพันธุ์ปลาในภายหลังเมื่อขาดแคลนน้ำเชื้อ แม้ว่าพ่อพันธุ์ปลาน้ำจืดในประเทศไทยอาจจะหาได้ไม่ยาก แต่ปัญหาการขาดแคลนน้ำเชื้อในบางช่วงฤดูกาลส่งผลต่อการผลิตลูกปลาโดยตรง อย่างไรก็ตามการพัฒนางานวิจัยแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในประเทศไทยหรือต่างประเทศมักแช่แข็งด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer) ที่มีราคาแพงหลายแสนบาท (สามารถเคลื่อนย้ายไปภาคสนามได้) หรือหลายล้านบาท (ไม่สามารถเคลื่อนย้ายไปภาคสนามได้) ทำให้ผู้ประกอบการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำขนาดกลางหรือขนาดเล็กมีข้อจำกัดในการลงทุนเพิ่มในต้นทุนการผลิตด้วยการซื้อเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อ ดังนั้นการพัฒนางานวิจัยด้านการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยเทคโนโลยีที่ไม่แพง และไม่สลับซับซ้อน จึงเป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องมีการพัฒนาเทคนิควิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพื่อให้มีน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีพร้อมอยู่ตลอดเวลาในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อ (sperm bank) เพื่อการผสมเทียม และสามารถใช้ได้อย่างสะดวกรวดเร็วตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ โดยถ้าเป็นเทคโนโลยีที่สามารถถ่ายทอดให้ผู้ประกอบการทำได้อย่างง่ายๆ มีราคาถูก และใช้เครื่องมือไม่สลับซับซ้อนในการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา ก็จะสามารถ

ถ่ายทอดเทคโนโลยีดังกล่าวให้ผู้ประกอบการนำไปใช้เพาะพันธุ์ปลาเชิงพาณิชย์ได้มากขึ้นต่อไป เพราะปลาน้ำจืดจัดเป็นสัตว์น้ำชนิดหนึ่งที่มีราคาถูก เมื่อเปรียบเทียบกับราคาปลาในต่างประเทศ ดังนั้นการพัฒนาหารูปแบบเทคโนโลยีชีวภาพมาประยุกต์ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา จึงต้องเป็นเทคโนโลยีที่ถูกใช้สะดวก แต่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อให้มีความคุ้มทุนในการนำเทคโนโลยีชีวภาพที่เหมาะสมมาใช้ในการเพาะพันธุ์ปลาเชิงพาณิชย์ได้ต่อไป

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาที่มีคุณภาพเป็นระยะเวลานานๆให้ได้ผลดีนั้น สามารถทำได้โดยการแช่แข็งน้ำเชื้อ (semen cryopreservation) ซึ่งเป็นเทคโนโลยีชีวภาพแขนงหนึ่งที่นำมาประยุกต์ใช้เพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ปลาหลายชนิดในต่างประเทศ แต่ในประเทศไทยเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อ ยังมีการประยุกต์ใช้ในวงจำกัด เนื่องจากเทคโนโลยีมีราคาสูง มีความสลับซับซ้อน และต้องใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer) ที่มีราคาแพงตั้งแต่สามแสนบาทจนถึงหลายล้านบาท ประกอบกับความเชื่อที่ว่าสามารถหาพ่อพันธุ์ปลาที่มีน้ำเชื้อได้ตลอดช่วงการเพาะพันธุ์ ทั้งที่จริงแล้วการขาดแคลนพ่อพันธุ์ปลาน้ำจืดบางชนิดที่มีน้ำเชื้อคุณภาพดีในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ยังคงเป็นปัญหาหลักที่ส่งผลกระทบต่อการเพาะพันธุ์ปลาบางชนิด (เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน 2545) โดยทั่วไปแล้วการแช่แข็งน้ำเชื้อทำโดยนำเอาน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (sperm extender) พร้อมกับใส่สารที่ป้องกันไม่ให้เซลล์เป็นอันตรายในระหว่างการแช่แข็งซึ่งเรียกว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) แล้วจึงเอาไปบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อพร้อมกับลดอุณหภูมิ (freezing) อย่างเป็นระบบให้ถึงอุณหภูมิสุดท้ายที่ต้องการด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติก่อนที่จะเก็บรักษา (cryostorage) ไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ซึ่งสามารถรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อปลาได้เป็นเวลานานเป็นปีๆ และเมื่อต้องการนำน้ำเชื้อปลาที่ได้แช่แข็งมาใช้ประโยชน์ก็ละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (thawing) ที่อุณหภูมิที่เหมาะสม แล้วประเมินคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลาย (post-thawed sperm quality) (Vuthiphandchai et al. 2009)

เทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อในขณะนี้ได้มีการใช้อย่างแพร่หลายทั่วโลก เช่นในผู้ชายที่มีปัญหามีบุตรยาก หรือป่วยเป็นโรคร้ายแรงแต่ต้องการมีบุตร จึงมีการนำน้ำเชื้อไปแช่แข็งแล้วนำมาผสมเทียมกับไข่ในภายหลัง สำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์ในประเทศไทยมีการทำอย่างแพร่หลายในสัตว์จำพวกวัว ซึ่งการเพาะขยายพันธุ์วัวในประเทศไทยของเกษตรกรผู้เลี้ยง ต่างก็ใช้น้ำเชื้อวัวแช่แข็งที่ได้จากกรมปศุสัตว์มาผสมเทียมเป็นวิธีมาตราฐาน ในขณะที่การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในประเทศไทยยังมีการศึกษาวิจัยไม่แพร่หลาย ซึ่งสาเหตุหลักส่วนหนึ่ง เกิดจากการแช่แข็งน้ำเชื้อเป็นเทคโนโลยีที่สลับซับซ้อน มีความเกี่ยวข้องกับการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ ซึ่งมีราคาแพง ทำให้ผู้ประกอบการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำขนาดเล็ก หรือขนาดกลางมีข้อจำกัดในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาแม้ว่าจะมีความต้องการใช้น้ำเชื้อปลาแช่แข็งเพื่อการเพาะพันธุ์ และการอนุรักษ์ โดยเฉพาะในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจบางชนิด แต่ถ้ามีการวิจัยเชิงรุกในการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยเทคโนโลยีที่มีราคาถูก แต่มีประสิทธิภาพสูงด้วยการนำแหล่งความเย็นอื่นที่มีราคาถูกเช่น น้ำแข็งแห้ง (dry ice) มาใช้ในการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งก็จะทำให้การแช่แข็งน้ำเชื้อปลามีความสะดวกขึ้น เพราะสามารถจัดหาน้ำแข็งแห้งได้ในทุกจังหวัดของประเทศไทย ในขณะที่ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) หาได้เฉพาะในจังหวัดที่มีอุตสาหกรรมขนาดใหญ่เท่านั้น ดังนั้นแนวความคิดการนำเอาน้ำแข็งแห้งมาแช่แข็งน้ำเชื้อปลา จึงเป็นประโยชน์ต่อผู้ประกอบการเพาะพันธุ์ปลาทุกภาคส่วนทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็ก เพราะสามารถแช่แข็งน้ำเชื้อปลาได้ในทุกบริเวณทั้งภายในหรือภายนอก

ฟาร์ม และยังทำให้ประเทศไทยมีเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา ด้วยเหตุที่การวิจัยแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยมีความจำเป็นเพื่อประโยชน์ด้านการเพาะเลี้ยง และการอนุรักษ์ แต่การพัฒนางานวิจัยด้านนี้ของประเทศไทย ได้เริ่มมีการพัฒนางานวิจัยด้านดังกล่าวด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งทำให้การนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปใช้ประโยชน์ยังทำไม่ได้เต็มที่ เพราะมีความเกี่ยวข้องกับ ความสลับซับซ้อนของเทคโนโลยี ต้นทุนที่สูงของเทคโนโลยี ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง อีกทั้งความนิยมของผู้ประกอบการในการใช้น้ำเชื้อสดของปลาในระหว่างการเพาะพันธุ์ปลา รวมทั้งราคาปลาที่มีราคาถูกกว่าราคาเนื้อวัวหรือเนื้ออื่นๆโดยภาพรวม จึงทำให้การนำเอาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลามาประยุกต์ใช้ในการเพาะพันธุ์ปลาจึงมียังมีน้อย และจำกัดอยู่ในสถานศึกษา บริษัทเอกชนขนาดใหญ่ และกรมประมงเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นการพัฒนาศักยภาพการประยุกต์ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งไปใช้เพาะพันธุ์ปลาให้เป็นที่ยอมรับอย่างแพร่หลายจึงต้องพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้ออย่างง่ายๆ ไม่สลับซับซ้อน มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำ เพื่อให้มีการนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปใช้ประโยชน์ให้มากขึ้นในการเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งในการแช่แข็งน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ตามที่กล่าวมาแล้ว

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง (dry ice) มีหลักการ และวิธีการแช่แข็งเหมือนกับการแช่แข็งด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติทุกประการ เริ่มตั้งแต่ การรวบรวมน้ำเชื้อ การเจือจางน้ำเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ (sperm extender) และสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) การบรรจุน้ำเชื้อในหลอดบรรจุน้ำเชื้อ หรือหลอดฟาง (French straw) การลดอุณหภูมิ (freezing) และการละลาย (thawing) เพียงแต่มีความแตกต่างในการเลือกใช้แหล่งลดอุณหภูมิ (source of cooling) ที่เป็นน้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส) หรือไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) เท่านั้น (-196 องศาเซลเซียส) การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาชนิดใดก็ตาม ต้องมีการพัฒนาวิธีการแช่แข็งที่เหมาะสม ต้องทราบว่าตัวแปรเหล่านั้นที่มีความเหมาะสม ต้องใช้สภาพการทดลองที่เหมาะสมอย่างไร (optimized protocols) ในปัจจุบันการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้งในต่างประเทศ ได้เริ่มมีการศึกษาในหลายประเทศ แต่ยังไม่เคยมีรายงาน หรือผลงานวิจัยตีพิมพ์เผยแพร่การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้งในประเทศไทย สำหรับในประเทศไทยการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติได้มีการตีพิมพ์ผลงานวิจัยโดยนักวิจัยจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (Irawan et al., 2010; Vuthiphandchai et al., 2009) และยังไม่มีรายงานการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาท้องถิ่นด้วยน้ำแข็งแห้งในประเทศไทย โดยหลักการทั่วไปการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ จะใช้ไนโตรเจนเหลวเป็นแหล่งความเย็นในการทำให้อุณหภูมิลดลงได้เร็ว หรือช้าตามที่ต้องการโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์เป็นตัวกำหนด อย่างไรก็ตามการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง จะใช้น้ำแข็งแห้งเป็นแหล่งความเย็นในการทำให้อุณหภูมิลดต่ำลงได้เร็ว หรือช้าได้เช่นกัน แต่ต้องมีการพัฒนารูปแบบการลดอุณหภูมิให้เหมาะสม เพราะแม้ว่าน้ำแข็งแห้งเป็นแหล่งอุณหภูมิที่ไม่เย็นมากเท่าไนโตรเจนเหลว แต่ก็สามารถนำมาแช่แข็งน้ำเชื้อปลาให้มีอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมได้เช่นกัน ดังนั้นถ้าสามารถแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้ง แล้วมีประสิทธิภาพเทียบเทียบเท่าการแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว ก็จะเป็นการพัฒนาต่อยอดงานวิจัยที่ได้เทคโนโลยีที่มีราคาถูก มีความสะดวก และไม่สลับซับซ้อน ซึ่งสามารถนำไปใช้เชิงพาณิชย์ได้ทันที และเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศ

น้ำแข็งแห้งเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่แข็งตัว ที่ได้ผ่านกรรมวิธีการผลิต โดยนำก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มาผ่านการอัดและลดอุณหภูมิลงภายใต้ความดันสูงจนได้ออกมาเป็น

คาร์บอนไดออกไซด์เหลวจากนั้นก็ต้องทำการลดความดันลงอย่างรวดเร็ว จนกลายเป็นของแข็งไปในที่สุดน้ำแข็งแห้งมีความเย็นที่อุณหภูมิ -79 องศาเซลเซียส น้ำแข็งแห้ง (น้ำแข็งแห้งราคา 30 บาท/กิโลกรัม) มีราคาถูกกว่าไนโตรเจนเหลว (ราคาไนโตรเจนเหลว 60 บาท/กิโลกรัม) ทำให้ช่วยลดต้นทุนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาได้ดี เพราะการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้ง และเก็บรักษาน้ำเชื้อที่แช่แข็งไว้ในน้ำแข็งแห้งต่อไปเป็นเวลานาน ใช้น้ำแข็งแห้งในปริมาณที่ไม่มาก อันเนื่องจากน้ำแข็งแห้งมีการระเหยตัวช้า ทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำ ในขณะที่การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยไนโตรเจนเหลว ต้องใช้ไนโตรเจนเหลวในปริมาณที่มากทั้งในระหว่างการแช่แข็ง และการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งต่อไป เนื่องจากไนโตรเจนเหลวมีการระเหยตัวที่เร็วมากระหว่างการแช่แข็ง และจำเป็นต้องเติมไนโตรเจนเหลวลงในถังไนโตรเจนเหลวบ่อยครั้งระหว่างการเก็บรักษา ทำให้มีต้นทุนการผลิตที่สูงกว่าการใช้น้ำแข็งแห้ง อีกทั้งการใช้น้ำแข็งแห้งในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายังมีความปลอดภัยสูงกว่าไนโตรเจนเหลว เพราะอุณหภูมิน้ำแข็งแห้งไม่เย็นจัดเหมือนไนโตรเจนเหลว และน้ำแข็งแห้งเป็นของแข็ง ลำเลียงไปที่ต่างๆได้ง่ายมาก ไม่มีอันตรายมากเท่าไนโตรเจนเหลวที่อาจกระเด็นทำอันตรายแก่ร่างกาย การลำเลียงไนโตรเจนเหลวที่เป็นของเหลวมีอันตรายมาก เพราะนอกจากต้องมีถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) ใส่ไนโตรเจนเหลวแล้ว ยังต้องระวังอันตรายจากอุบัติเหตุระหว่างการลำเลียงทางรถยนต์ที่ถังไนโตรเจนเหลวอาจพลิกคว่ำ ซึ่งจะอันตรายมาก นอกจากนี้น้ำแข็งแห้งได้มีการนำไปใช้ประโยชน์ในการวิจัยทางการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหารและถนอมอาหาร การแช่เย็นผัก หรือสินค้าเกษตรอื่นๆ ที่จำเป็นต้องขนส่งในระยะทางที่ไกลๆอย่างแพร่หลาย เนื่องจากน้ำแข็งแห้งระเหิดเป็นไอ ซึ่งต่างจากน้ำแข็งที่ละลายเป็นน้ำ ที่สร้างความเสียหายกับสินค้าอาหาร และสินค้าเกษตรได้มากกว่า ด้วยเหตุที่น้ำแข็งแห้งให้ความเย็นคงที่ มีน้ำหนักเบาเมื่อเทียบกับตัวนำความเย็นอื่นๆ และมีราคาไม่แพง จึงทำให้น้ำแข็งแห้งได้รับความนิยมในการเก็บรักษาอาหารหลายชนิด เพียงแต่ต้องระวังอันตรายจากความเย็นที่ถูกน้ำแข็งกัด และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระเหิดออกมา ทำให้ต้องมีการถ่ายเทอากาศที่ดี เช่นเดียวกับต้องระวังอันตรายจากก๊าซไนโตรเจนที่ระเหยออกมาจากไนโตรเจนเหลวที่ต้องมีการถ่ายเทอากาศที่ดีเช่นกันในระหว่างการแช่แข็งน้ำเชื้อ

ดังนั้นการพัฒนาหารูปแบบเทคโนโลยีชีวภาพมาประยุกต์ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา จึงต้องเป็นเทคโนโลยีที่ถูก ใช้สะดวก แต่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อให้มีความคุ้มทุนในการนำเทคโนโลยีชีวภาพที่เหมาะสมมาใช้ในการเพาะพันธุ์ปลา ด้วยเหตุที่การพัฒนางานวิจัยแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในประเทศไทยได้มีการพัฒนางานวิจัยโดยนักวิจัยจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ในลักษณะวิจัยเชิงลึก วิจัยเชิงประยุกต์ และวิจัยเชิงถ่ายทอดเทคโนโลยีเชิงพาณิชย์ให้แก่ผู้ประกอบการอย่างเป็นระบบด้วยการบูรณาการองค์ความรู้ด้านเคมี ชีวเคมี จุลชีววิทยา วาริชศาสตร์ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยได้วิจัยแช่แข็งและแช่เย็นน้ำเชื้อสัตว์น้ำหลายชนิดเพื่อการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์ มีบทความวิจัยที่ตีพิมพ์ทั้งในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ และระดับชาติ มาอย่างต่อเนื่องตลอดในระยะเวลาประมาณ ๑๓ ปีที่ผ่านมา โดยงานวิจัยเหล่านั้นได้แช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำด้วยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งการต่อยอดงานวิจัยด้วยการใช้แหล่งความเย็นที่มีราคาถูกด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งเพื่อทดแทนการใช้ไนโตรเจนเหลวที่มีราคาแพง และยังหาได้ยากกว่า จะช่วยทำให้การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในประเทศไทย มีความสะดวกขึ้นในการประยุกต์ใช้ ไม่สลับซับซ้อน และมีต้นทุนการผลิตที่ไม่สูง เป็นประโยชน์ต่อการเพาะพันธุ์ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพราะผู้ประกอบการทุกภาคส่วนสามารถเอาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งไปใช้ได้ง่ายขึ้น และใช้ได้อย่างแพร่หลายทั่วประเทศในทุกพื้นที่ที่การเพาะพันธุ์ปลาประสบปัญหาคุณภาพน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ อีกทั้งการถ่ายทอดเทคโนโลยีการแช่

แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้งก็ทำได้ง่าย สามารถทำได้ทันที มีความปลอดภัยสูง และสามารถส่งเสริมการใช้ประโยชน์ได้มากขึ้นในสัตว์น้ำชนิดอื่นๆได้ต่อไป นอกจากนี้น้ำเชื้อปลาแช่แข็งที่ได้ยังสามารถเก็บรักษาต่อไปเป็นเวลานานในลักษณะของธนาคารน้ำเชื้อ (sperm bank) โดยที่คุณภาพสเปิร์มยังดีเหมือนน้ำเชื้อสด ซึ่งเมื่อใดก็ตามที่แม่พันธุ์ปลามีความพร้อม มีไข่แก่และมีการตกไข่ ก็สามารถนำน้ำเชื้อปลาแช่แข็งที่มีอยู่ในธนาคารน้ำเชื้อมาผสมเทียมกับไข่ได้ลูกปลาที่ต้องการ ด้วยเหตุที่พ่อพันธุ์ปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจบางชนิด ประสบปัญหาเกี่ยวกับปริมาณ และคุณภาพน้ำเชื้อ ซึ่งน่าจะได้มีเทคนิคที่จะยืดระยะเวลาที่สเปิร์มยังคงมีคุณภาพดีให้ยาวนานขึ้นด้วยการแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง ซึ่งเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อที่มีต้นทุนต่ำ ทำได้ง่าย และไม่สลับซับซ้อน อีกทั้งการพัฒนาวิจัย เพื่อสร้างองค์ความรู้ใหม่สำหรับการใช้ประโยชน์น้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อการเพาะพันธุ์ปลาแก่ผู้ประกอบการ จำเป็นต้องพัฒนาวิธีการแช่แข็งหารูปแบบการแช่แข็งที่สะดวกไม่สลับซับซ้อน แต่มีประสิทธิภาพสูง สามารถแช่แข็งในปริมาณมาก และแช่แข็งด้วยเทคโนโลยีที่มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำและเก็บรักษาน้ำเชื้อคุณภาพดีได้นานเป็นปี ดังนั้นโครงการวิจัยเรื่องนี้จึงได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อต่อยอดการวิจัย โดยอาศัยองค์ความรู้การแช่แข็งน้ำเชื้อที่ได้พัฒนาขึ้นมาก่อนหน้านี้เพื่อมาประยุกต์พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. พัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง
2. ศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ สารไครโอโพรเทคแทนท์ และอัตราการลดอุณหภูมิที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลาที่แช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง
3. ศึกษาผลของอัตราการละลายที่มีต่อที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลาที่แช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง
4. ศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาที่แช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้งที่มีต่อการมีชีวิตการเคลื่อนที่ และความสามารถในการปฏิสนธิของของสเปิร์มหลังการละลาย

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง โดยการศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ และสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อคุณภาพสเปิร์มปลาที่แช่แข็งในน้ำแข็งแห้ง โดยจะมีการแช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำแข็งแห้ง ด้วยการใช้ภาชนะหลายๆรูปแบบ ทำการแช่แข็งที่เวลานานต่างๆกัน หรืออัตราการลดอุณหภูมิต่างๆกันก่อนเก็บรักษาในน้ำแข็งแห้ง หรือเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เพื่อทราบวิธีการที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้ง นอกจากนี้ยังมีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้งเพื่อให้สามารถพัฒนา protocols การแช่แข็งให้มีประสิทธิภาพ โดยการประเมินคุณภาพสเปิร์มหลังการละลาย รวมทั้งยังมีการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ในขั้นตอนท้ายสุดจะศึกษาผลของระยะเวลาที่เก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีต่อคุณภาพสเปิร์มหลังการละลาย และทำการผสมเทียมโดยเช็คอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟัก เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป ทฤษฎีและ/หรือแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในงานวิจัย

น้ำเชื้อหรือเซลล์ใดๆก็ตามเมื่อเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส จะเก็บรักษาได้ 200-32,000 ปี (Ashwood-Smith M.J. 1980) เนื่องจากเมตะบอลิซึม (metabolism) ภายในเซลล์มีค่าเป็นศูนย์ ทำให้สามารถเก็บรักษาเซลล์ได้นานถ้าวิธีการและขั้นตอนการแช่แข็งได้พัฒนาให้เหมาะสม (optimized protocol) การเก็บรักษาน้ำเชื้อ หรือเซลล์ที่อุณหภูมิ -79 องศาเซลเซียส ก็ทำให้ระดับเมตะบอลิซึมภายในเซลล์มีค่าใกล้ศูนย์เช่นกัน ซึ่งการศึกษาด้านชีวโมเลกุล และด้านชีวเคมีต่างก็นิยมเก็บเซลล์ต่างๆที่อุณหภูมิ -79 องศาเซลเซียส จึงควรนำเอามาใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งว่ายังคงมีคุณภาพเช่นเดียวกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสหรือไม่ นอกจากนี้น้ำแข็งแห้งยังเป็นแหล่งความเย็นที่มีราคาถูกกว่าไนโตรเจนเหลว และน้ำแข็งแห้งยังหาได้ง่ายทั่วประเทศ ประกอบกับน้ำแข็งแห้งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการแช่แข็ง (cryopreservation) น้ำเชื้อได้ และสามารถเก็บรักษา (storage) น้ำเชื้อแช่แข็งได้เป็นเวลานาน จึงควรมีการพัฒนางานวิจัยการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้ง เพื่อพัฒนาศักยภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจให้มีความสะดวก ต้นทุนต่ำ และไม่สลับซับซ้อน

ด้วยเหตุที่น้ำแข็งแห้งมีอุณหภูมิ -79 องศาเซลเซียส ดังนั้นการนำหลอดฟาง (French straw) หรือหลอด cryotube ที่มีน้ำเชื้อร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์ และสารไครโอโพรเทคแทนท์อยู่ภายในมาลดอุณหภูมิด้วยการให้หลอดฟาง หรือหลอด cryotube นั้น หลอดทดสอบทั้งหมดต้องอยู่ในน้ำแข็งแห้งบด (crushed dry ice) เพราะจะทำให้น้ำเชื้อที่อยู่ในหลอดฟาง หรือหลอด cryotube แข็งตัว (frozen) ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เร็วมาก ซึ่งจะทำให้สเปิร์มตายได้ ดังนั้นการใช้แหล่งความเย็นของน้ำแข็งแห้งในการแช่แข็ง จึงต้องนำหลอดฟาง หรือหลอด cryotube มาใส่ภาชนะบรรจุที่เหมาะสมอีกที เพื่อให้ความเย็นแพร่เข้ามาในหลอดฟาง หรือหลอด cryotube อย่างเหมาะสม จะทำให้น้ำเชื้อแข็งตัวในอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum freezing rate) และทำให้สเปิร์มที่แช่แข็งด้วยวิธีนี้มีชีวิตรอด และมีการเคลื่อนที่สูงเหมือนน้ำเชื้อสด นอกจากนี้น้ำเชื้อปลาที่แช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง ก็ยังสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในน้ำแข็งแห้งต่อไปได้ในระยะเวลาที่นาน โดยที่คุณภาพสเปิร์มไม่น่าจะแตกต่างกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในไนโตรเจนเหลว ซึ่งเป็นวิธีปกติของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งทั่วไป

น้ำเชื้อแช่แข็งที่อยู่ในหลอดฟาง หรือหลอด cryotube เมื่อนำไปเก็บรักษาต่อในน้ำแข็งแห้ง หรือเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ซึ่งมีอุณหภูมิต่างกัน เมื่อต้องการน้ำเชื้อแช่แข็งเหล่านี้มาใช้ประโยชน์จำเป็นต้องละลายด้วยการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้น้ำเชื้อกลับสู่สภาพของเหลว ดังนั้นการละลายน้ำเชื้อที่อยู่ในหลอดฟาง หรือหลอด cryotube จะใช้อัตราการละลาย (thawing rate) ที่ต่างกัน เนื่องจากขนาดของหลอดฟาง หรือหลอด cryotube และปริมาณน้ำเชื้อที่อยู่ภายในหลอดที่มีความแตกต่างกันเป็นตัวกำหนดอุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายน้ำเชื้อ (optimum thawing rate) ว่าควรเป็นเช่นไร ซึ่งต้องทดลองวิจัยต่อไปเพื่อหาสภาพที่เหมาะสม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้ง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการเพาะพันธุ์ปลา และยังสามารถนำเอาเทคโนโลยีไปถ่ายทอดให้เกษตรกร และผู้ประกอบการได้อย่างง่ายๆ ไม่สลับซับซ้อน มีต้นทุนการผลิตต่ำ แต่มีคุณภาพสูง

2. ทำให้ทราบถึงชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ และสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้ง

3. ได้เทคโนโลยีที่เหมาะสมในการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งเพื่อประโยชน์ในการผสมเทียมไข่ปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาได้ในระยะเวลาที่นานขึ้น เพื่อใช้ประโยชน์ในการผสมเทียมปลา และน้ำเชื้อปลาก็สามารถเก็บรักษาไว้ได้ในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อ (sperm bank) ซึ่งสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีนี้ไปยังนักวิชาการประมงและเกษตรกรผู้เพาะพันธุ์ปลา หรือผู้สนใจได้ต่อไป

4. ได้สร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ ที่เป็นเป็นนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา ที่ทำหน้าที่เป็นผู้ช่วยวิจัยของโครงการ ทำให้ผู้ช่วยวิจัยได้เรียนรู้ และพัฒนาศักยภาพการวิจัยการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา เพื่อนำไปใช้ในการเพาะพันธุ์ปลาของประเทศต่อไป

หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ได้แก่ ภาควิชาวาริชศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา และโครงการบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และ หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการเพาะขยายพันธุ์ปลา เช่น กรมประมง ซึ่งมีสถานีประมงน้ำจืด/ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดทั่วประเทศที่สามารถนำผลงานวิจัยที่ได้ไปประยุกต์ใช้ได้ทั้งในด้านการเพาะพันธุ์ และการอนุรักษ์พันธุ์ปลาที่ยังคงมีอยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติของประเทศให้คงไว้ไม่ให้สูญพันธุ์ และสามารถทำได้ทุกที่ทั้งในฟาร์มและภาคสนาม เพราะสามารถหาน้ำแข็งแห้งมาใช้แช่แข็งน้ำเชื้อปลาได้ในทุกจังหวัดของประเทศไทย ไม่เหมือนกับไนโตรเจนเหลว ที่ต้องสั่งซื้อจากบริษัทอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ที่อยู่ในเขตนิคมอุตสาหกรรมเฉพาะบางจังหวัดเท่านั้น โดยข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้ยังสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเพิ่มเติมและงานวิจัยทั้งในระดับปริญญาโทและปริญญาเอกทางด้านวาริชศาสตร์ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และวิทยาศาสตรชีวภาพของมหาวิทยาลัยบูรพาต่อไปในอนาคต รวมทั้งสามารถใช้เป็น database งานวิจัยของกลุ่มวิจัยการเก็บรักษาน้ำเชื้อของสัตว์น้ำเพื่อการอนุรักษ์ และการผสมเทียมของมหาวิทยาลัยบูรพา และใช้บริหารจัดการการเพาะพันธุ์ปลา และการอนุรักษ์สายพันธุ์ปลาที่หาได้ยากใกล้สูญพันธุ์ในพื้นที่ remote area ได้ทันที โดยไม่ต้องนำน้ำเชื้อมาแช่แข็งในห้องปฏิบัติการ

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ชีววิทยาการสืบพันธุ์ปลาตะเพียนขาว

ปลาตะเพียนขาว (common silver barb) เป็นปลาน้ำจืดในครอบครัว Cyprinidae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Barbodes gonionotus* เป็นปลาท้องถิ่นของประเทศไทย โดยพบปลาตะเพียนขาวกระจายในแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วทุกภูมิภาคในไทยทั้งในแม่น้ำ ลำคลอง หนอง บึง ที่มีกระแสน้ำไหลอ่อนๆ หรือน้ำนิ่ง และยังเป็นปลาที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงและสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ทั้งยังเจริญเติบโตในน้ำกร่อยที่มีความเค็มไม่เกิน 7 ppt อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 25-31 องศาเซลเซียส (นวลมณี พงศ์ธนา และ ทองอยู่ อุดเลิศ, 2547) และปลาตะเพียนขาวมีรสชาติอร่อย จึงมีการเพาะเลี้ยงปลาชนิดนี้กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากเป็นปลาที่เลี้ยงได้ง่ายชนิดหนึ่ง

ปลาตะเพียนขาวมีขนาดปานกลาง ลำตัวแบนข้าง ขอบหลังยกสูงโค้ง หัวเล็ก ปากเล็กริมฝีปากบางจะงอยปากแหลม มีหนวดเส้นเล็กสั้น 2 คู่ ลำตัวบริเวณส่วนหลังมีสีคล้ำ ส่วนท้องสีขาว ครีบหลังมีก้านครีบแข็ง 3 ก้าน โดยก้านครีบแข็งอันสุดท้ายเป็นกระดูกแข็งหยักเป็นฟันเลื่อย ด้านหลังครีบหลังและครีบหางมีสีเทาปนเหลือง ครีบก้นสีเหลืองปนส้มเล็กน้อย ครีบหูสีจางหรือเหลืองอ่อน มีฟันในลำคอเป็นชนิดฟันกัดบด 3 แถว ซี่เหงือกเป็นซี่เล็ก ๆ ทางเดินอาหารไม่มีกระเพาะ ลำไส้ผนังบางยาว 2.0-2.7 เท่าของความยาวลำตัว (ศักดิ์ชัย ชูโชติ, 2530) ลักษณะรูปร่างภายนอกของตัวผู้และตัวเมียมีความคล้ายคลึงกันมาก แต่เมื่อใกล้ฤดูผสมพันธุ์จะสังเกตความแตกต่างเพศได้ง่ายขึ้น โดยเพศเมียจะมีท้องอูมเป่งมากขึ้น และพื้นท้องมีลักษณะนิ่ม เนื่องจากมีไข่ในท้อง และบริเวณช่องเพศขยายใหญ่ขึ้นโดยมีสีแดงอ่อนปลายช่องเพศ โดยถ้าแม่พันธุ์ปลามีไข่มาก ก็จะมีท้องขยายใหญ่มากขึ้น แต่เพศผู้มีพื้นท้องแคบและแข็งกว่าเพศเมีย โดยเมื่อใช้มือกดรีดเบาๆบริเวณหน้าท้องและลำตัวปลาจะมีน้ำเชื้อสีขาว (milt) ไหลออกมาบริเวณช่องเพศ และถ้าใช้เมื่อทำการลูบบริเวณแก้มจะรู้สึกสากมือเล็กน้อยโดยสามารถเริ่มสืบพันธุ์ได้เมื่ออายุ 8 เดือนขึ้นไป ซึ่งบริเวณแก้มที่สากในปลาตะเพียนขาวเพศผู้จะเกิดชัดเจนในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ หรือฤดูฝนอันเป็นผลจากการแสดงออกทางเพศเกี่ยวข้องกับฮอร์โมนเพศบางชนิด (secondary sexual characteristics; วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

การผสมพันธุ์วางไข่ของปลาตะเพียนขาวในธรรมชาติเกิดขึ้นในฤดูฝนช่วงระหว่างเดือนมิถุนายนถึงเดือนตุลาคม โดยสภาพแวดล้อมในช่วงฤดูฝนมีความเหมาะสมในการกระตุ้นให้ปลาตะเพียนขาวมีการผสมพันธุ์วางไข่ เช่นปริมาณฝนที่ตกลงมา อาหารในธรรมชาติ และคุณภาพน้ำที่เหมาะสมเป็นต้น ไข่ปลาตะเพียนขาวมีลักษณะครึ่งจมครึ่งลอย โดยถ้าน้ำนิ่ง ไข่จะจมน้ำแต่เมื่อน้ำไหล ไข่จะลอยตามน้ำ อย่างไรก็ตามปลาตะเพียนขาวในธรรมชาติเริ่มมีน้อยลงอันเป็นผลมาจากการขยายตัวของชุมชน การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม และความต้องการบริโภคที่สูงขึ้น ทำให้มีการเพาะเลี้ยงปลาตะเพียนขาวเพื่อทดแทนปลาตะเพียนขาวในธรรมชาติ โดยทั่วไปการเลี้ยงปลาตะเพียนขาวในประเทศไทยนิยมเลี้ยงในบ่อดิน ใช้เวลาเลี้ยงประมาณ 8 เดือน ปลาจึงเริ่มมีการสร้างไข่และน้ำเชื้อ และปลาตะเพียนขาวเพศเมียมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าปลาตะเพียนขาวเพศผู้เฉลี่ย 20% (นวลมณี พงศ์ธนา และ ทองอยู่ อุดเลิศ, 2547)

การเพาะพันธุ์ปลาตะเพียนขาวในโรงเพาะฟัก สามารถเพาะพันธุ์ได้ทั้งวิธีเลียนแบบธรรมชาติและวิธีผสมเทียม โดยการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่มีขนาดและอายุที่เหมาะสมมาให้ผสมพันธุ์วางไข่ในโรงเพาะฟัก โดยวิธีเลียนแบบธรรมชาติ หรือวิธีผสมเทียม การเพาะพันธุ์ปลาตะเพียนขาวด้วยวิธีเลียนแบบธรรมชาติเริ่มจากจัดระบบบ่อและระบบน้ำให้เหมาะสม แล้วปล่อยพ่อแม่พันธุ์ลงไปพร้อมการให้ฝนเทียมเพื่อให้ผสมพันธุ์วางไข่กันเองในบ่อภายหลังการฉีดฮอร์โมน Suprefact และ Motillium ไปกระตุ้นพ่อแม่พันธุ์ โดยปล่อยพ่อแม่พันธุ์ในบ่อเพาะพันธุ์ในอัตราส่วนแม่ปลา 1 ตัวต่อปลาตัวผู้ 1-2 ตัว บ่อเพาะควรมีพื้นที่ไม่ต่ำกว่า 3 ตารางเมตร ลึกประมาณ 1 เมตร ซึ่งสามารถปล่อยพ่อแม่พันธุ์ได้ประมาณ 3 ตัว แม่ปลาจะวางไข่หลังฉีดฮอร์โมนประมาณ 6-8 ชั่วโมง โดยเมื่อแม่ปลาวางไข่หมดแล้วก็ทำการรวบรวมไข่ปลาไปฟักในกรวยฟัก สำหรับการพาะพันธุ์ปลาตะเพียนขาวด้วยวิธีผสมเทียม ทำโดยรีดไข่ผสมกับน้ำเชื้อในภาชนะที่แห้ง ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันด้วยการใช้ขนไก่ เติมน้ำพอท่วมไข่เพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ ทำการล้างไข่ 2-3 ครั้งจึงนำไข่ไปฟักในอุปกรณ์เพาะฟักต่อไป การเพาะพันธุ์ปลาตะเพียนขาวส่วนใหญ่ทั้งสองวิธีนี้จะทำการฉีดฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นการสร้างไข่หรือน้ำเชื้อ โดยฉีดฮอร์โมน Gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRHa) และ Dopamine antagonist (suprefect) ให้แม่พันธุ์ในอัตราประมาณ 15-20 ไมโครกรัม/กิโลกรัม และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และฉีดพ่อพันธุ์ในอัตรา 10-15 ไมโครกรัม/กิโลกรัม และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมตามลำดับ ซึ่งภายหลังฉีดฮอร์โมนแล้ว ถ้าเพาะพันธุ์ด้วยวิธีเลียนแบบธรรมชาติ ก็ปล่อยพ่อแม่พันธุ์ปลาตะเพียนขาวลงไปในบ่อและรอให้ปลามีการผสมพันธุ์กันเอง แต่ถ้าเพาะพันธุ์ปลาด้วยวิธีผสมเทียม ก็ปล่อยพ่อแม่พันธุ์ปลาตะเพียนขาวไว้ในบ่อประมาณ 6-8 ชั่วโมงจึงทำการรีดไข่แม่ปลาตะเพียนขาวออกมาผสมเทียมกับไข่ การผสมเทียมไข่ปลาตะเพียนขาวส่วนใหญ่ใช้วิธีแห้งแบบดัดแปลง (modified dry method) โดยเช็ดลำตัวแม่พันธุ์ปลาที่พร้อมรีดไข่ให้แห้ง รีดไข่เบาๆลงในภาชนะที่แห้ง รีดน้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ๆจากพ่อพันธุ์ปลาผสมลงไปบนไข่ในปริมาณที่เหมาะสม ใช้ขนไก่คนไข่กับน้ำเชื้อจนเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ทำการเติมน้ำจืดที่สะอาดเล็กน้อยพอท่วมไข่พร้อมกับผสมไข่กับน้ำเชื้อให้เข้ากันด้วยการใช้ขนไก่ประมาณ 1 นาที ทำการล้างไข่ 2-3 ครั้ง จึงนำไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิไปฟักในกรวยฟักไข่ต่อไป (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2535)

2. คุณภาพน้ำเชื้อของปลา

โดยทั่วไปในธรรมชาติปลาผสมพันธุ์วางไข่ภายนอกร่างกาย โดยปลาเพศเมียปล่อยไข่ออกมาแล้วปลาเพศผู้ปล่อยน้ำเชื้อเข้ามาปฏิสนธิ ซึ่งคุณภาพสเปิร์มเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการขยายพันธุ์ของปลา สเปิร์มของปลามีลักษณะเช่นเดียวกับสเปิร์มสัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไปที่ประกอบด้วยส่วนหัว (head) ส่วนกลาง (mid piece) และส่วนหาง (tail) ส่วนหัวของสเปิร์มปลามีรูปร่างแตกต่างกันไปตามชนิดของปลา เช่นทรงกลม ทรงรี หรือรูปหยดน้ำ เป็นต้น โดยในส่วนหัวของสเปิร์มมีนิวเคลียสที่มี ดีเอ็นเอ (DNA) เป็นสารพันธุกรรม ทำหน้าที่ปฏิสนธิกับนิวเคลียสของไข่ ส่วนกลางของสเปิร์มเป็นส่วนที่อยู่ติดกับส่วนหัวมีไมโทคอนเดรีย (mitochondria) จำนวนมากเป็นส่วนประกอบที่ให้พลังงานแก่สเปิร์มในการเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้น ส่วนหางของสเปิร์มเป็นส่วนที่มีลักษณะยาวและในส่วนหางจะมีไฟบริล (fibril) อยู่ทั้งหมด 11 คู่ อยู่ตรงกลาง 2 คู่ และอยู่โดยรอบ 9 คู่มีลักษณะเป็น microtubule ที่ช่วยทำให้หางสเปิร์มสั่นด้วยความถี่สูง (beat frequency) จากการถ่ายทอดพลังงานจากไมโทคอนเดรียเมื่อสเปิร์มถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ ซึ่งการสั่นตัวของ microtubule ในลักษณะเช่นนี้ทำให้ส่วนหางของสเปิร์มปลาเคลื่อนที่ไปมาอย่างรวดเร็ว ทำให้สเปิร์มของปลา

เคลื่อนที่ไปข้างหน้าอย่างรวดเร็ว และเมื่อพลังงานจากไมโทคอนเดรียเริ่มน้อยลง สเปิร์มปลาจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วช้าลง และหยุดเคลื่อนที่เมื่อไม่มีพลังงานจากไมโทคอนเดรีย จึงทำให้สเปิร์มปลาน้ำจืดทั่วไปเคลื่อนที่ได้ในระยะเวลาสั้นๆมักจะไม่เกิน 1 นาทีเมื่อน้ำเชื้อปลาถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2535; Jamieson, 1995)

โดยทั่วไปสเปิร์มของปลาไม่มีอะโครโซม (acrosome) ที่บริเวณส่วนหัวสเปิร์มดังเช่นที่พบในสเปิร์มของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไปที่จำเป็นต้องมีอะโครโซมที่บริเวณปลายของหัวสเปิร์มเพื่อปฏิสนธิกับไข่ด้วยการปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยบริเวณผิวไข่ (cortical reaction) เพื่อที่สเปิร์มจะได้เข้าไปปฏิสนธิกับนิวเคลียสของไข่ สาเหตุที่สเปิร์มปลาไม่มีอะโครโซมเนื่องจาก สเปิร์มปลาจะว่ายน้ำเข้าไปในช่อง micropyle ซึ่งเป็นช่องขนาดเล็กอยู่ด้านบนของไข่ (animal pole) ได้โดยตรงในช่วงการปฏิสนธิ โดยไม่จำเป็นต้องมีการย่อยบริเวณผิวไข่ ทำให้นิวเคลียสของสเปิร์มปฏิสนธิกับนิวเคลียสไข่ได้เป็นตัวอ่อนลูกปลา (fish embryo) อย่างไรก็ตามสเปิร์มของปลาบางชนิดมีอะโครโซมบริเวณปลายหัวสเปิร์มเช่นปลา herring เป็นต้น

น้ำเชื้อของปลา (milt หรือ semen) ประกอบด้วย สเปิร์ม (sperm) และของเหลวที่หล่อเลี้ยงสเปิร์ม (seminal fluid) สเปิร์มของปลาไม่เคลื่อนที่เมื่ออยู่ในถุงอัณฑะ (testis) หรือของเหลวที่หล่อเลี้ยงสเปิร์ม แต่สเปิร์มของปลาจะมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าอย่างรวดเร็วเมื่อถูกกระตุ้นด้วยปัจจัยสภาพแวดล้อมภายนอก โดยสเปิร์มปลาน้ำจืดเมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำจืด สเปิร์มจะเคลื่อนที่และจะหยุดเคลื่อนที่ภายในเวลาประมาณ 1 นาทีตามที่กล่าวมาแล้ว แต่สเปิร์มปลาทะเลเมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำทะเล สเปิร์มจะเคลื่อนที่และจะหยุดเคลื่อนที่ภายในเวลานานหลายนาทีขึ้นอยู่กับชนิดปลาทะเล กลไกที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในปลาหลายๆชนิดขึ้นอยู่กับค่าแรงดันออสโมติกของสารละลาย (osmolality หรือ osmotic pressure) ซึ่งหมายถึงปริมาณของตัวถูกละลาย (solute) ที่ละลายในตัวทำละลาย (solvent) มีหน่วยวัดเป็น mOsm/kg น้ำเชื้อปลาน้ำจืดจะมีการเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกต่ำกว่าระดับที่พบใน seminal fluid (hypotonicity) แต่ในทางตรงกันข้ามสเปิร์มของปลาทะเลมีการเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกสูงมากกว่าระดับที่พบใน seminal fluid (hypertonicity) (Morisawa et al., 1983; Bobe and Labbe, 2010)

Alavi et al. (2007) ทำการประเมินเกี่ยวกับอิทธิพลของ K^+ และ Ca^{2+}ซึ่งเสมือนเป็นตัวถูกละลายที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา European Perch (*Perca fluviatilis*) ซึ่งเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่ง พบว่า Ca^{2+} มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยความเข้มข้นของ Ca^{2+} ที่ระดับ 2.5 mM ทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าสูงขึ้น และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของ Ca^{2+} เท่ากับ 5.0 mM เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่ 2.5 mM ส่วนผลของ K^+ พบว่าความเข้มข้นของ K^+ ที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยสเปิร์มเริ่มเคลื่อนที่เมื่อความเข้มข้นของ K^+ เท่ากับ 40 mM และจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อความเข้มข้นของ K^+ เท่ากับ 80 mM แสดงให้เห็นว่าปริมาณของ K^+ และ Ca^{2+} มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และความเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา European Perch อีกทั้งการใช้สารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกสูงกว่า 200 mOsm/kg เพื่อกระตุ้นสเปิร์มให้เคลื่อนที่จะทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม European Perch มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อใช้สารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกเท่ากับหรือมากกว่า 300 mOsm/kg ในการกระตุ้นสเปิร์ม จะทำให้สเปิร์มหลุดการ

เคลื่อนที่ทันที จากเหตุผลดังกล่าวทำให้การนำสารละลายบัฟเฟอร์มาละลายน้ำเชื้อปลาจึงต้องใช้สารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกเท่ากับระดับที่พบใน seminal fluid เพื่อไม่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ระหว่างการเจือจางน้ำเชื้อสดก่อนการนำน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง (extended milt) ไปใช้ประโยชน์ในการแช่แย็นหรือการแช่แข็ง (Vuthiphandchai et al., 2009b) ดังนั้นสเปิร์มของปลาเมื่อสเปิร์มยังอยู่ในตัวปลา หรือเมื่อทำการรีดน้ำเชื้อสดออกมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ สเปิร์มของปลาจะยังไม่มีการเคลื่อนที่ (immotile) แต่เมื่อน้ำเชื้อปลาผสมกับน้ำภายนอกขณะที่ปลาผสมพันธุ์วางไข่ตามธรรมชาติ หรือเมื่อนำน้ำเชื้อปลามาผสมกับหยดน้ำบนแผ่นกระจกสไลด์ จะทำให้สเปิร์มของปลาถูกกระตุ้นให้มีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วอันเป็นผลเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติกอย่างรวดเร็ว ด้วยเหตุที่การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาน้ำจืดเมื่อถูกกระตุ้นจะสิ้นสุดลงอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาไม่เกิน 1 นาที ดังนั้นการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อปลาโดยการประเมินค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (percentage of sperm motility) จึงต้องรีบทำภายในทันทีที่น้ำเชื้อปลาผสมกับน้ำบนกระจกสไลด์

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อของปลาสามารถทำได้หลายวิธีทั้งทางกายภาพ ชีวภาพและเคมี โดยการประเมินน้ำเชื้อปลามีความจำเป็นเมื่อต้องการนำน้ำเชื้อปลามาใช้ในการเพาะขยายพันธุ์ปลา การประเมินลักษณะทางกายภาพเช่น สีน้ำเชื้อ และความหนืดน้ำเชื้อ สามารถใช้ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อในเบื้องต้น เพราะน้ำเชื้อปลาที่ดีเมื่อรีดออกมาจะมีสีขาว มีความหนืด และไม่มีการปนเปื้อนของปัสสาวะ เลือด เมือก หรือขี้ปลาในน้ำเชื้อที่รีดออกมา ความหนาแน่นของสเปิร์มสามารถประเมินได้จากหลากหลายวิธีเช่น Haemacytometer, spectrophotometer หรือ flow cytometry เป็นต้น การประเมินทางเคมีหรือชีวเคมีของน้ำเชื้อปลาได้เริ่มมีความสำคัญในการตรวจวัดมากขึ้นเพื่อประเมินคุณภาพสเปิร์ม เช่นการตรวจประเมินชนิดและปริมาณของแร่ธาตุ วิตะมิน หรือเอนไซม์บางชนิดที่มีใน seminal plasma เป็นต้น อย่างไรก็ตามการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลาที่นิยมแพร่หลายทั่วโลกนิยมประเมินจากการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม การมีชีวิตของสเปิร์มและความสามารถในการปฏิสนธิไข่ การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจัดเป็นวิธีที่ทำนิยมทำแพร่หลายมากที่สุด เนื่องจากทำได้ง่าย สะดวกรวดเร็ว เห็นการเคลื่อนที่ของสเปิร์มชัดเจนด้วยตา แม้ว่าการประเมินด้วยสายตา (subjective estimation) ที่ให้ความเที่ยงตรงต่ำกว่าการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มด้วยการใช้เครื่องมือวัดการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (computer-assisted sperm analysis; CASA) ซึ่งมีความถูกต้องและเที่ยงตรงสูง (objective estimation) แต่เครื่องมือมีราคาสูงมาก การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสามารถใช้ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลาได้ในทั้งสภาพน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยที่การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อสด (fresh milt) ของปลาน้ำจืดอย่างง่าย ทำโดยนำน้ำเชื้อปลาในปริมาณเล็กน้อยมาวางบนกระจกสไลด์แล้วกระตุ้นด้วยสารละลายในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ ปิดกระจกสไลด์แล้วประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มตามเกณฑ์ที่ตั้งไว้ (Vuthiphandchai and Zohar, 1999) ซึ่งไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูงมากนอกจากกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งสามารถทำได้ในฟาร์มเพาะเลี้ยงทั่วไปโดยไม่ต้องใช้เทคโนโลยีชั้นสูง หรือประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มด้วยการใช้เครื่องมือวัดการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ซึ่งต้องใช้เครื่องมือเฉพาะราคาสูงมากในการวิเคราะห์ แต่ให้ให้ความเที่ยงตรงสูงมากเช่นกัน และสามารถเก็บข้อมูลไว้ในคอมพิวเตอร์ (CASA; Kamaruding et al., 2012) สำหรับน้ำเชื้อปลาที่แช่แข็งสามารถใช้หลักการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มได้เช่นเดียวกับการประเมินคุณภาพสเปิร์มของน้ำเชื้อสด เพียงแต่ใช้สารละลายที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้สเปิร์มปลามีการ

เคลื่อนที่ในอัตราการเจือจางที่เหมาะสมเช่นกัน (Vuthiphandchai et al., 2009a; Vuthiphandchai et al., 2015)

3. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา

การแช่แข็ง (cryopreservation) เป็นวิธีการลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็งเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะที่ต้องการแช่แข็งและทำการเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส (Seidel, 1984) ซึ่งถ้าแช่แข็งอย่างถูกวิธีจะสามารถเก็บรักษาเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะแช่แข็งเหล่านั้นได้เป็นเวลานาน เนื่องจากในสภาวะที่เซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะอยู่ในอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงของขบวนการเมทาบอลิซึม หรือปฏิกิริยาทางเคมีหรือชีวเคมีใดๆ เกิดขึ้นภายในเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะเหล่านั้น ทำให้สามารถเก็บรักษาเซลล์ได้นานหลายสิบปี ซึ่งในทางทฤษฎีแล้วสามารถเก็บรักษาในอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส โดยคุณภาพเซลล์ยังคงเดิมได้นานถึง 2,000-32,000 ปี (Ashwood-Smith, 1980) การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาด้วยการแช่แข็งเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการเพาะพันธุ์ปลาและการอนุรักษ์พันธุ์ปลา เนื่องจากปลาบางชนิดพ่อแม่พันธุ์อาจมีความสมบูรณ์ของไข่และน้ำเชื้อในฤดูผสมพันธุ์ที่ไม่พร้อมกัน หรือปลาบางชนิดมีการกลายเพศ (sex reversal) ก็สามารถนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้มาใช้ผสมเทียม อีกทั้งการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายังมีประโยชน์ในแง่ของการปรับปรุงพันธุ์และการคัดเลือกสายพันธุ์ปลาที่เจริญเติบโตเร็ว มีความต้านทานต่อโรค โดยนำน้ำเชื้อของสายพันธุ์ปลาเหล่านี้มาเก็บรักษาในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อ (sperm bank) และยังสามารถใช้ในการผสมพันธุ์ปลาข้ามชนิดเพื่อให้ได้ปลาลูกผสม

การพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลามีมานานกว่า 60 ปีแล้วและในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาได้มีความสนใจจากหลายภาคส่วนในการประยุกต์ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อการเพาะขยายพันธุ์ปลามากขึ้น โดยเฉพาะในปลาที่มีมูลค่าเศรษฐกิจเชิงพาณิชย์ และปลาบางชนิดที่หาได้ยากใกล้สูญพันธุ์ (endangered species) ประกอบกับการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาให้ทำได้ง่ายขึ้น ไม่สลับซับซ้อน และเป็นเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่มีราคาถูก ก็จะช่วยทำให้มีความสนใจในการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมากขึ้น เนื่องจากการนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาใช้เพาะขยายพันธุ์ปลาสามารถช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงพ่อพันธุ์ปลา โดยน้ำเชื้อจะถูกรีดจากพ่อพันธุ์ปลาและนำมาแช่แข็ง ทำให้ไม่ต้องเสียเวลาเลี้ยงขุนพ่อพันธุ์ปลา และยังสะดวกต่อการขนส่งน้ำเชื้อแช่แข็งระหว่างโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (กฤษณ์ มงคลปัญญา และนิศา ไชยรักษ์, 2539)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา จัดเป็นเทคโนโลยีชีวภาพสาขาหนึ่งที่ช่วยในการเพิ่มผลผลิตหรือประสิทธิภาพการผลิตลูกปลา โดยสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการบริหารจัดการเพาะพันธุ์ปลาทั้งเพื่อประโยชน์ทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์สัตว์น้ำ การศึกษาวิจัยด้านนี้ส่วนใหญ่นิยมศึกษาในต่างประเทศ ทั้งในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและใกล้สูญพันธุ์ทั้งปลาน้ำจืด และปลาทะเล เช่น ปลากะพงขาว ปลากะพงแดง ปลา rainbow trout ปลา salmon ปลา channel catfish ปลา Perch ปลา sea bream ปลา cod และปลา Atlantic croaker เป็นต้น โดยในปัจจุบันได้มีรายงานความสำเร็จเกี่ยวกับการแช่แข็งและการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำทั้วโลกมากกว่า 200 ชนิด (Martínez-Páramo et al., 2017) แต่การศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในประเทศไทยได้มีการศึกษาวิจัยมากขึ้นในระยะประมาณ 10 ปีที่ผ่านมาแม้ว่าการประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์ยังไม่ได้รับความนิยมเท่าที่ควร น้ำเชื้อปลาเมื่อถูกแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิอย่างเหมาะสม (freezing rate) ก็สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสได้นานเป็นปี

เมื่อต้องการใช้น้ำเชื้อปลาแช่แข็งที่เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวสำหรับการผสมเทียมกับไข่ปลา ก็นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อมาละลาย (thawing) โดยการเพิ่มอุณหภูมิในอัตราที่เหมาะสม (thawing rate) แล้วนำน้ำเชื้อปลาที่ถูกละลายไปผสมเทียมกับไข่ (Horváth and Urbanyi, 2000; Vuthiphandchai et al., 2009a) ดังนั้นความสำเร็จของการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาขึ้นอยู่กับปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายอย่างในกระบวนการแช่แข็ง เช่น ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ (Sansone et al., 2002; Irawan et al., 2010) ชนิดสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectants) (Rana and McAndrew, 1989; Rideout et al., 2003; Basavaraja and Hegde, 2004) อัตราการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็ง (Sansone et al., 2002; Vuthiphandchai et al., 2009a) และการเพิ่มอุณหภูมิขณะละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (Scott and Baynes, 1980; Mansour et al., 2006; Yavas and Bozkurt, 2011) นอกจากนี้ความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อปลาที่เกิดขึ้นในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ การปนเปื้อนของแบคทีเรียและการใช้ยาปฏิชีวนะในน้ำเชื้อแช่แข็ง รวมทั้ง เทคนิคของการแช่แข็งน้ำเชื้อ ต่างก็มีผลทำให้ความสำเร็จของการแช่แข็งน้ำเชื้อแตกต่างกันไป (Boonthai et al., 2016a; Boonthai et al., 2016b)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลามีความเกี่ยวข้องกับตัวแปรหลายตัวเริ่มจากการนำน้ำเชื้อคุณภาพดีมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม การเลือกใช้ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ระยะเวลาสมดุล การลดอุณหภูมิแช่แข็ง การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว และการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งมาใช้ประโยชน์ ดังนั้นความสำเร็จในการแช่แข็งและการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาจึงต้องสามารถทราบความเหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแช่แข็งทั้งหมดเพื่อสามารถพัฒนาวิธีการแช่แข็งที่เหมาะสม ยกตัวอย่างเช่น การลดอุณหภูมิแช่แข็งน้ำเชื้อสามารถทำได้หลากหลายรูปแบบทั้งการแช่แข็งด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติซึ่งอาจมีการกำหนด initial temperature หรือ final temperature ที่แตกต่างกัน และลดอุณหภูมิด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ (cooling rate) ที่แตกต่างกัน โดยอาจลดอุณหภูมิ 1 step, 2 step หรือ 3 step ก่อนการแช่ตัวอย่างลงในไนโตรเจนเหลว (plunging) หรือการลดอุณหภูมิแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวก็อาจกำหนดระยะห่างการแช่แข็งเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวที่ระดับความสูงต่างๆกัน ร่วมกับระยะเวลาการให้ตัวอย่างสัมผัสไอไนโตรเจนเหลวต่างๆกันเพื่อจะได้ทราบ protocol ที่เหมาะสมที่สุดในการแช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม หรือในถังไนโตรเจนเหลว เช่นเดียวกับการการลดอุณหภูมิแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยน้ำแข็งแห้ง ซึ่งเป็นแหล่งความเย็นอีกชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาแช่แข็งน้ำเชื้อได้ ก็จำเป็นต้องพัฒนาวิธีการแช่แข็งที่เหมาะสมเพื่อให้น้ำเชื้อแข็งตัวอย่างเหมาะสมและมีชีวิตรอดระหว่างการแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง เป็นต้น การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยหลากหลายรูปแบบการลดอุณหภูมิและนำมาเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ได้มีการวิจัยในปลาหลายชนิดโดยใช้เทคนิคการแช่แข็งที่สำคัญพอสรุปได้ดังนี้

Conget et al. (1996) พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา rainbow trout โดยเริ่มจากการทดสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆกัน (propylene glycol, glycerol, DMSO และ DMSO ร่วมกับ sucrose) ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เมื่อปล่อยทิ้งไว้ 10 นาที หรือ 30 นาที พบว่าระยะเวลาที่น้ำเจือจางอยู่ในสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์นานเกิน 10 นาที ทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่ลดลง โดยชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ทดสอบมีผลต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มปลา rainbow trout น้อยมาก จึงทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา rainbow trout ในหลอดฟางโดยคัดเลือกสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดที่เหมาะสม (glycerol, DMSO หรือ DMSO ร่วมกับ sucrose) มาเจือจางน้ำเชื้อและลดอุณหภูมิด้วยการใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ

อย่างช้า (1 และ10 องศาเซลเซียส/นาที) หรือใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างเร็ว (30 องศาเซลเซียส/นาที) ไปที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียสก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว พบว่า การใช้ DMSO ร่วมกับ sucrose เจือจางน้ำเชื้อ และใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างเร็ว (30 องศาเซลเซียส/นาที) ให้ผลดีที่สุดในการทำให้น้ำเชื้อแช่แข็งมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงสุดหลังการละลาย (ประมาณ 63%) เมื่อเปรียบเทียบกับการลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ (1 องศาเซลเซียส/นาที และ 10 องศาเซลเซียส/นาที) ที่สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ต่ำหลังการละลาย (0-15%)

Gwo et al. (1991) พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) ด้วยการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ สารไครโอโพรเทคแทนท์ ระยะเวลาสมดุล อัตราการลดอุณหภูมิ อัตราการละลายที่แตกต่างกันในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Atlantic croaker พบว่า สารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย เกลือแกง กลูโคส และ ซูโครส สามารถใช้เจือจางน้ำเชื้อปลาขณะทำการแช่แข็ง โดยมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดอื่นๆที่มีความสลับซับซ้อนซึ่งมีสารเคมีหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ โดยน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิตั้งแต่ 10 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 150 องศาเซลเซียส/นาทีไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิไข่ปลาเมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่ละลายมาผสมเทียมกับไข่

Glogowski et al. (2002) พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา sturgeon (*Acipenser baeri,* Brandt) ด้วยการนำน้ำเชื้อมาเจือจางด้วยน้ำยา 3 สูตรได้แก่ 1.) tris-sucrose-KCl (30 mM Tris, 23.4 mM sucrose, 0.25 mM KCl, pH 8.0), 2.) tris-NaCl (10 mM Tris, 25 mM NaCl, pH 8.5) และ 3.) tris-sucrose (20 mM Tris, 400 mM sucrose, pH 8.0) และผสมด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ methanol ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5% บรรจุในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ทำการลดอุณหภูมิแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยวิธีการใช้ไอไนโตรเจนเหลวโดยไม่มีระยะเวลาสมดุล โดยแช่แข็งน้ำเชื้อที่ระดับความสูง 4 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวนาน 3 นาทีจึงนำหลอดฟางมาแช่ในไนโตรเจนเหลว เปรียบเทียบกับวิธีแช่แข็งน้ำเชื้อโดยการใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติลดอุณหภูมิที่อัตรา 3.5 องศาเซลเซียส/นาทีจากอุณหภูมิเริ่มต้น 4 องศาเซลเซียสมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -15 องศาเซลเซียสโดยมีการเหนี่ยวนำให้น้ำเชื้อแข็งตัวอย่างรวดเร็ว (seeding) ที่อุณหภูมิ -7 องศาเซลเซียส และนำหลอดฟางมาวางในน้ำแข็งแห้งอีก 5 นาทีจึงแช่หลอดฟางในถังไนโตรเจนเหลว พบว่า สารบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา sturgeon คือ tris-sucrose-KCl และ tris-NaCl และน้ำเชื้อที่เจือจางในสารละลายดังกล่าวเมื่อนำมาแช่แข็งด้วย protocols การแช่แข็งน้ำเชื้อทั้ง 2 วิธีที่กล่าวมาแล้วได้และเมื่อนำหลอดฟางที่มีน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 6 วินาที ปรากฏว่าน้ำเชื้อแช่แข็งเหล่านั้นที่มีความสามารถในการปฏิสนธิไข่และให้ค่าอัตราการฟักไม่แตกต่างกับการใช้น้ำเชื้อสด

Vuthiphandchai et al. (2009a) พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*) ด้วยเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ เริ่มจากการใช้สาร cryoprotectants 10 ชนิด ที่ 4 ระดับความเข้มข้น โดยทำการลดอุณหภูมิแตกต่างกัน 2 รูปแบบ โดยกำหนดให้อุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 หรือ -80 องศาเซลเซียสก่อนแช่น้ำเชื้อที่แข็งตัวลงไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว การแช่แข็งน้ำเชื้อทำในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยน้ำเชื้อปลากะพงแดงมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมให้อยู่ในสภาวะสมดุลกับ DMSO ความเข้มข้นสุดท้าย 10% นาน 10 นาที นำหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อมาลดอุณหภูมิในอัตรา 10 องศาเซลเซียส/นาทีจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียสจนถึง -40 หรือ -80 องศาเซลเซียสแล้วเก็บ

รักษาในไนโตรเจนเหลวจึงนำมาละลาย พบว่าน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่แช่แข็งด้วย protocol ที่ใช้อุณหภูมิสุดท้ายเป็น -80 องศาเซลเซียสทำให้น้ำเชื้อหลังการละลายมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (post-thaw sperm motility) และการมีชีวิตของสเปิร์ม (post-thaw sperm viability) มีค่าสูงสุด (>90%) โดยน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่แช่แข็งสามารถปฏิสนธิไข่ปลากะพงแดงได้ค่าอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างทางสถิติกับน้ำเชื้อกลุ่มควบคุมที่ใช้น้ำเชื้อสด

Irawan et al. (2010) ศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ สารไครโอโพรเทคแทนท์และวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนด้วยการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 6 ชนิด และสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด (DMSO, methanol และ propylene glycol) ด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาทีจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียสมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียสก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวโดยใช้หลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร พบว่าน้ำเชื้อปลาไนที่เจือจางด้วย common carp sperm extender (CCSE2) และ DMSO มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด อีกทั้งการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนอย่างง่ายด้วยการใช้ CCSE2 และ DMSO โดยนำน้ำเชื้อมาแช่แข็งเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2 เซนติเมตร นาน 10 นาทีมีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีการเคลื่อนที่สูงกว่า 90% และระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มนานที่สุดหลังถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ (105.7±23.1 วินาที)

Boonthai et al. (2016c) แช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*) ด้วยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ เริ่มจากเจือจางน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยสารละลาย Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) และ 10% DMSO นำน้ำเชื้อแช่แข็งมาประเมินการปนเปื้อนของแบคทีเรียระหว่างการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียน โดยตรวจวัดปริมาณแบคทีเรียชนิดต่างๆเปรียบเทียบกับ animal origin และ non-animal origin ได้แก่ ครีบหาง น้ำเลี้ยงปลา น้ำเชื้อปลา ปัสสาวะ ขี้ปลา ไนโตรเจนเหลว ผิวด้านนอกของหลอดฟาง อากาศที่หมุนเวียนในห้องปฏิบัติการ และถุงมือ ทั้งก่อนและหลังการแช่แข็ง พบว่า แบคทีเรีย *Aeromonas punctata* subsp. caviae มีการปนเปื้อนมากที่สุดในบริเวณครีบหาง ถุงมือ และน้ำเชื้อปลาก่อนการแช่แข็ง และยังพบว่า *Bacillus safensis* and *Bacillus* sp. ยังสามารถมีชีวิตรอดในถังไนโตรเจนเหลว ซึ่งการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาโดยใช้ aeptic technique มีประสิทธิภาพสูงในการลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อแช่แข็ง และเป็นประโยชน์ต่อการจัดตั้งธนาคารน้ำเชื้อปลา

Richardson et al. (1999) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อซีกเดียวที่มีชื่อสามัญว่า yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) โดยใช้หลอดฟางที่มีขนาดต่างกัน 2 ขนาด คือ 0.25 มิลลิลิตร และ 1.7 มิลลิลิตร โดยเจือจางน้ำเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี 10% propylene glycol และแช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลว พบว่าอัตราการปฏิสนธิเมื่อนำน้ำเชื้อสดมาผสมกับไข่เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อแช่แข็งที่ถูกเก็บไว้ในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร และหลอดฟางขนาด 1.7 มิลลิลิตร มีค่าเป็น 64.7 เปอร์เซ็นต์ 59.2 เปอร์เซ็นต์และ 54.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และอัตราการฟักเมื่อเทียบกับน้ำเชื้อสด มีค่าเป็น 52 เปอร์เซ็นต์ 42 เปอร์เซ็นต์และ 36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ Zhang et al. (2003) ได้ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาซีกเดียว (*Paralichthys olivaceus*) ด้วย extender 6 สูตร คือ NaCl, KCl, CaCl, MgCl, $MgSO_4$ และ $NaHCO_3$ และใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด คือ DMSO, Glycerol และ methanol ในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา เท่ากับ 1:2 โดยแช่แข็งในไอไนโตรเจนเหลวใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ -15, -40, -80, -110 และ -160 องศาเซลเซียสต่อนาที แล้วเก็บในไนโตรเจนเหลวนาน 5 นาที เมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่ 28

องศาเซลเซียส พบว่าสเปิร์มที่แช่แข็งด้วย DMSO, Glycerol และ methanol มีการเคลื่อนที่หลังการละลายเท่ากับ 60.5±3.6, 79.2±4.5 และ 13.3±4.7% ตามลำดับ และสามารถปฏิสนธิไข่ได้ 67.1±15.1, 76.2±10.0 และ 44.9±22.6% ตามลำดับ และให้ค่าอัตราการฟักเท่ากับ 37.4±8.3, 48.2±25.7 และ 23.4±10.8% ตามลำดับ ซึ่ง glycerol และ DMSO ให้ผลการแช่แข็งดีกว่า methanol โดย glycerol ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม การปฏิสนธิไข่ และเปอร์เซ็นต์การเพาะฟักดีที่สุด

Ji et al. (2004) แช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea perch (*Lateolabrax japonicus*) ด้วยไอไนโตรเจนเหลวโดยศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ (modified plaice Ringer solution; MPRS, D-15 และ modified Mounib's medium (MMM) ชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (DMSO, methanol, dimethylformamide; DMF และ glycerol) และปริมาณน้ำเชื้อแช่แข็ง (0.5, 1.0 และ 1.8 มิลลิลิตร) ที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลาย โดยในช่วงแรกนำน้ำเชื้อมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ทั้งสามชนิดร่วมกับ 10% DMSO ใช้ปริมาณน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง 1 มิลลิลิตรและลดอุณหภูมิเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวที่ระดับความสูง 6 เซนติเมตร เป็นเวลา 10 นาที พบว่า MPRS มีความเหมาะสมมากที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea perch จึงนำน้ำเชื้อปลา Sea perch มาเจือจางต่อใน MPRS ที่มีสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆกัน (DMSO, methanol, DMF และ glycerol) ที่ 3 ระดับความเข้มข้น (6%, 10% และ 14%) นำปริมาณน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง 1 มิลลิลิตรมาทำการลดอุณหภูมิเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวที่ระดับความสูง 6 เซนติเมตร เป็นเวลา 10 นาทีเช่นเดิม พบว่า DMSO ให้ผลการแช่แข็งดีกว่าสารไครโดโพรเทคแทนท์ชนิดอื่นๆโดยการใช้ DMSO ที่ระดับ 6% และ 10% ให้ผลไม่แตกต่างกัน โดยในขั้นตอนสุดท้ายเมื่อแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea perch ปริมาณต่างๆกันภายในหลอด Cryovials 1.8 มิลลิลิตร โดยเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลาย MPRS ที่มี 10% DMSO ก่อนนำน้ำเชื้อในปริมาณต่างกัน (0.5, 1.0 และ 1.8 มิลลิลิตร) มาบรรจุใส่ในหลอด Cryovials ทำการลดอุณหภูมิเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวที่ระดับความสูง 6 เซนติเมตร เป็นเวลา 10 นาที พบว่า การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าไม่แตกต่างกันเมื่อปริมาณน้ำเชื้อที่แช่แข็งเพิ่มขึ้นจาก 0.5 มิลลิลิตรไปเป็น 1.0 มิลลิลิตร โดยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ปริมาณ 1.8 มิลลิลิตร มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายต่ำกว่าน้ำเชื้อที่ถูกแช่แข็งในปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร

Horváth et al. (2010) แช่แข็งน้ำเชื้อปลา paddlefish (*Polyodon spathula*) ในปริมาณมากด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลว โดยเจือจางน้ำเชื้อในสารละลาย modified Tsvetkova's extender ที่ประกอบด้วย 23.4 mM M sucrose, 0.25 mM M KCl, 30 mM M Tris (pH 8.0 ปรับโดย HCl) พร้อมทั้งใส่ methanol ให้ได้ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 5% หรือ 10% ทำการบรรจุน้ำเชื้อลงในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาดใหญ่ 5 มิลลิลิตร (minitube) แช่แข็งน้ำเชื้อโดยทำการลดอุณหภูมิแช่แข็งด้วยการวางหลอด minitube ลงบน polystyrene frame ภายในกล่องโฟมที่ระดับความสูง 3 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวนาน 5 หรือ 7 นาที เก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว และนำมาละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที พบว่า การใช้ 5% methanol แช่แข็งน้ำเชื้อปลา paddlefish ในไอไนโตรเจนเหลวระยะเวลานาน 5 นาที มีผลทำให้น้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลายมีคุณภาพดี โดยให้ค่าอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักมีค่าสูงสุดเท่ากับ 48±5% และ 47±10% แม้ว่ามีค่าต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสดผสมเทียมไข่ซึ่งได้ค่าอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักมีค่าสูงสุดเท่ากับ 77±6% และ 66±13% ตามลำดับ

Yavas and Bozkurt (2011) พัฒนาแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเฉาฮื้อ (*Ctenopharyngodon idella*) ด้วยไอไนโตรเจนเหลว โดยศึกษาผลของอัตราการละลายที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อและการปฏิสนธิ โดยนำน้ำเชื้อปลาเฉามาเจือจางในสารละลาย 350 mM glucose, 30 mM Tris ที่มี 5% glycerol (pH 8.0) ปล่อยให้อยู่ในสภาวะสมดุลที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีภายในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร แช่แข็งในไอไนโตรเจนเหลวภายในกล่องโฟมที่ความสูง 6 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว (-140 องศาเซลเซียส) นาน 10 นาที และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว จึงนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10, 20 และ 30 วินาทีรวมทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง ปรากฏว่าสเปิร์มปลาเฉาฮื้อในชุดการทดลองที่ทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 วินาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูงสุด (83.4±2.1%) และมีค่าเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไข่สูงสุด (85.6±2.8%) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆอีก 8 ชุดการทดลอง แม้ว่าการใช้น้ำเชื้อสดจะมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและมีค่าอัตราการปฏิสนธิที่สูงกว่า (91.6±6.4% และ 94.4±4.3% ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าอัตราการละลายน้ำเชื้อปลาเฉาฮื้อมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและการปฏิสนธิไข่

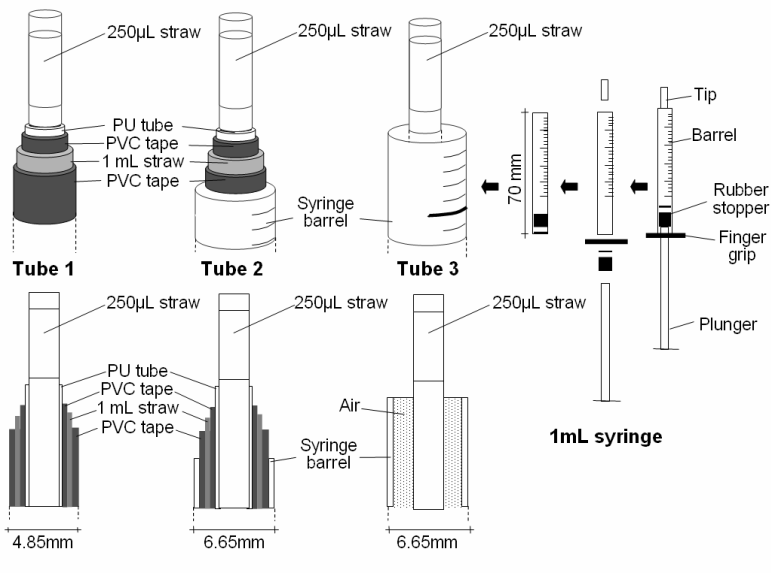
Bozkurt and Yavas (2017) แช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนด้วยไอไนโตรเจนเหลวเพื่อศึกษาผลของขนาดหลอดบรรจุน้ำเชื้อ (0.25, 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร) และอัตราการละลาย (ละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 10, 20 และ 30 วินาที) ที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลายและอัตราการปฏิสนธิ โดยนำน้ำเชื้อปลาไนมาเจือจางด้วยสารละลาย 75 mM NaCl, 70 mM KCl, 2 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgSO_4$ and 20 mM Tris (pH 8) ที่มี 10% methanol ปล่อยให้น้ำเชื้อเจือจางอยู่สภาวะสมดุลที่ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที และแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลว 10 นาทีจึงนำไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว พบว่า อัตราการปฏิสนธิที่ให้ค่าสูงสุด (68.4±2.5%) ได้จากชุดการทดลองที่แช่แข็งในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตรและละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 30 วินาทีเมื่อใช้จำนวนสเปิร์มต่อไข่ (sperm to egg ratio) ในอัตราส่วน $1x10^5$:1 ในการผสมเทียมกับไข่

Muchlisin et al. (2004) พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากดเหลือง (*Mystus nemurus*) ด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งแช่แข็งน้ำเชื้อปลากดเหลือง โดยศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อ (physiological saline, Ringer, saline) และผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (DMSO, ethanol, glycerol หรือ methanol) ที่มีต่อคุณภาพสเปิร์ม โดยเจือจางน้ำเชื้อปลากดเหลืองในสารละลายบัฟเฟอร์ (1:20, 1:30 หรือ 1:40) และสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 4 ชนิด (5, 10, 15 หรือ 20%) โดยการทดลองในช่วงแรกพบว่าสารละลาย Ringer มีความเหมาะสมมากที่สุดในการเจือจางน้ำเชื้อปลากดเหลืองหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -4 หรือ 23 องศาเซลเซียส จึงทำการทดลองในช่วงต่อมาโดยนำน้ำเชื้อปลากดเหลืองมาเจือจางในสารละลาย Ringer ในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อ Ringer เท่ากับ 1:20 แล้วผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 4 ชนิด (DMSO, ethanol, glycerol หรือ methanol) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 4 ระดับต่างกัน บรรจุน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางในหลอด Cryovials ขนาด 5 มิลลิลิตร ปล่อยให้น้ำเชื้ออยู่ในสภาวะสมดุลกับสารไครโอโพรเทคแทนท์บนน้ำแข็งบด (crushed ice) นาน 5 นาที จึงทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากดเหลืองในภาชนะที่มีน้ำแข็งแห้ง (dry ice) นาน 5 นาทีก่อนการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวนาน 15 วัน ทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งโดยละลายหลอด Cryovials ใน water bath อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 5 นาที พบว่า

น้ำเชื้อปลากดเหลืองที่แช่แข็งด้วย 10% Methanol ได้ผลการทดลองดีที่สุดโดยมีอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายเท่ากับ 58% ซึ่งสูงกว่าการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดอื่น ๆที่ทุกความเข้มข้น

Draper and Moens (2009) พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาม้าลาย Zebrafish ในน้ำแข็งแห้ง โดยนำน้ำเชื้อปลาม้าลายมาเจือจางในสูตรน้ำยา Ginsberg Fish Ringers จำนวน 2 สูตร โดยสูตรที่ 1 ใช้น้ำยา Ginsburg Fish Ringers 10 มิลลิลิตร และ powdered skin milk 1.5 มิลลิกรัม ส่วนสูตรที่ 2 น้ำยา Ginsburg Fish Ringers 10 มิลลิลิตร ร่วมกับ powdered skin milk 1.5 มิลลิกรัม และ methanol 1 มิลลิลิตร นำหลอด capillary tube ขนาด 10 ไมโครลิตรมาทำเครื่องหมายปลายด้านหนึ่งให้มีปริมาตร 3.3 ไมโครลิตร (ความยาว 1.67 เซนติเมตร) ทำการเจือจางน้ำเชื้อที่ดูดมา 3.3 ไมโครลิตรในสูตรน้ำยาทั้งสองสูตรให้มีปริมาณ 10 ไมโครลิตร จึงเทน้ำเชื้อออกจากหลอด capillary tube ลงไปในหลอด cryovials ขนาด 2.0 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอด cryovials ขนาด 2.0 มิลลิลิตรใส่ลงไปใน conical tubes ขนาด 15 มิลลิลิตรอีกชั้นหนึ่ง ปิดฝาให้แน่นแล้วนำ conical tubes ไปแช่แข็งในน้ำแข็งแห้งบดละเอียดนาน 20 นาทีจึงนำเอาหลอด cryovials ออกมาเพื่อนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยระยะเวลาระหว่างใส่ methanol จนกระทั่งแช่หลอด cryovials ไม่ควรเกิน 30 วินาที ซึ่งผลการศึกษาในช่วงเวลาเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวนาน 8 ปี (ตั้งแต่ปี 2001-2008) นำมาละลายในอุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส 8-10 วินาที พบว่าสเปิร์มสามารถปฏิสนธิกับไข่มีค่าเฉลี่ย 30% และสามารถปฏิสนธิได้สูงถึง 62% เนื่องจากความแปรปรวนของคุณภาพสเปิร์ม

Yasui et al. (2008) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) ด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง โดยนำน้ำเชื้อมาเจือจาง 7 เท่าในสารละลายที่ประกอบด้วย 63.5mM NaCl, 114mM KCl, 20mM Tris ร่วมกับใช้ 10% methanol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ แล้วบรรจุน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางในหลอดฟาง (French straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร แล้วนำหลอดฟางไปใส่ในภาชนะ 3 ลักษณะที่มีความหนาห่อหุ้มต่างๆกันด้วยการใช้ polyurethane pipe, vinyl adhesive tape และ syringe barrel เป็นตัวปรับให้มีความหนาต่างๆกัน โดยหลอดที่ 1 ใช้ polyurethane pipe, vinyl adhesive (ชั้นที่ 1), cryogenic straw tube, vinyl adhesive (ชั้นที่ 2) หลอดที่ 2 ใช้อุปกรณ์หุ้มเหมือนหลอดที่ 1 แต่เพิ่มหลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และหลอดที่ 3 ใช้หลอดฉีดยาขนาด มิลลิลิตรเพียงอย่างเดียว (รูปที่ 1) จากนั้นทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา loach โดยนำภาชนะเหล่านั้นที่มีหลอดฟางอยู่ภายในไปแช่แข็งในถังน้ำแข็งแห้ง (dry ice) ที่บดให้เป็นผงนาน 2 นาที แล้วนำเอาหลอดฟางไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลวนาน 3 ชั่วโมง จึงนำหลอดฟางออกมาละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที ปรากฏว่า น้ำเชื้อที่อยู่ในหลอดที่ 3 (Tube 3) ซึ่งมีอัตราการลดอุณหภูมิต่ำสุด (33.3±2.1 องศาเซลเซียส/นาที) มีผลทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่หลังการละลายเท่ากับ 72±3% สเปิร์มมีเวลาเคลื่อนที่ 146±12 วินาที และเมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปผสมกับไข่ปลาได้ค่าเปอร์เซนต์การฟัก 29±4% ซึ่งค่าเหล่านี้มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่น้ำเชื้อที่อยู่ในหลอดที่ 1 และหลอดที่ 2 (Tube 1 and 2)



รูปที่ 1 การบรรจุหลอดฟางที่มีน้ำเชื้ออยู่ภายในเข้าไปในภาชนะ 3 ลักษณะเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อปลา loach ในน้ำแข็งแห้งที่บดเป็นผง

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

- สายไฟฟ้า (300V. PVC/PVC 70°C VAF 2 x 1.5 SQ.MM. TABLE 2 THAI YAZAKI (W) TIS 11-2531)
- สายหลอดซิลิโคน (Dura Silicone tube)
- หลอด Centrifuge tube (Nunc ขนาด 15 มิลลิลิตร)
- หลอดฟาง (French straw) ขนาด 250 ไมโครลิตร (IMV Technologies Paillette)
- กล่องโฟม (Styrofoam box)
- บีกเกอร์ขนาดต่างๆ
- ขวดรูปชมพู่ขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปต และ pipette tip
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- เข็มเขี่ย
- ฟอร์เซป (Forcep)
- กระจกสไลด์และ Cover glass
- กระดาษกรอง
- เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer)
- เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (Controlled-rate programmable freezer)
- กล้องจุลทรรศน์
- Haemacytometer
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ (Incubator)
- Glass micropipette ขนาด 5,10 และ 100 ไมโครลิตร
- หลอดฟาง (French straw) ขนาด 250 ไมโครลิตร
- หลอด Cryotube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- Canister
- Aluminium canes
- Goblets
- Vial tubes
- Hot plate
- Thermometer
- Tissue culture flasks
- Thermocouple-probe thermometer (K-type, HI 91530K, Hanna Instruments Inc.)

- Water bath
- Racks
- Eppendorf tubes
- ถังเก็บไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen dewar)
- ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)
- น้ำแข็งแห้ง (dry ice)
- พ่อแม่พันธุ์ปลาตะเพียนขาว
- สารเคมีประเภทต่างๆที่ใช้ในการแช่แข็ง และการย้อมสีน้ำเชื้อปลา

วิธีดำเนินการวิจัย

1. <u>การรวบรวมพ่อพันธุ์ปลา</u>

พ่อพันธุ์ปลาตะเพียนขาว (รูปที่ 2) ได้ถูกรวบรวมจากฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในภาคตะวันออกมายังโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยรวบรวมใส่ถุงพลาสติกอัดออกซิเจนพร้อมใส่ยาเหลืองและเกลือแกงระหว่างการลำเลียงพ่อพันธุ์ปลา เพื่อป้องกันโรคพยาธิที่อาจติดมาจากฟาร์มและป้องกันไม่ให้ปลาเครียด เมื่อเดินทางมาถึงโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์ ทำการย้ายพ่อพันธุ์ปลาตะพียนขาวทั้งหมดลงไว้ในบ่อซิเมนต์ที่สะอาดขนาด 10 ตัน มีออกซิเจนเพียงพอ ให้อาหารเม็ดที่มีโปรตีน 35% วันละ 2 ครั้ง เวลาเช้าและเย็น ในปริมาณ 2-3% น้ำหนักตัว/วันตลอดระยะเวลาการเลี้ยงปลา โดยทำการดูดเศษตะกอนในบ่อทุกๆ 1-2 วัน และเปลี่ยนถ่ายน้ำในบ่อเลี้ยงพ่อพันธุ์ทุกๆ 3-5 วันประมาณ 20-40%

พ่อพันธุ์ปลาที่ได้ทำการปรับสภาพให้ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ถูกชั่งน้ำหนัก วัดความยาว และนำออกมาใส่ในภาชนะ (รูปที่ 3) ก่อนที่จะถูกรีดน้ำเชื้อออกมาเพื่อประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อ ด้วยการสลบพ่อพันธุ์ด้วยยาสลบ (phenoxyethanol) 15 ppm ประมาณ 5 นาที เพื่อไม่ให้ปลาเครียดระหว่างการรีดน้ำเชื้อ ทำการเช็ดบริเวณลำตัวปลาด้วยผ้าสะอาดก่อนที่ทำการรีดน้ำเชื้อออกมาเพื่อประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อ อย่างไรก็ตามก่อนทำการรีดน้ำเชื้อปลา ได้ทำการกดบริเวณรอบๆ ช่องเพศของพ่อพันธุ์เพื่อให้ปัสสาวะทั้งหมดไหลออกมาก่อนการรีดน้ำเชื้อ เนื่องจากถ้ามีปัสสาวะออกมาพร้อมน้ำเชื้อ ก็จะกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว ทำให้เมื่อนำน้ำเชื้อปลามาทดลองแช่แข็งก็จะประสบความล้มเหลว เพราะน้ำเชื้อมีคุณภาพต่ำตั้งแต่เริ่มการทดลองอันเป็นผลมาจากสเปิร์มถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ จึงไม่มีพลังงานเหลืออยู่ในการทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่ได้หลังการกระตุ้น การรีดน้ำเชื้อปลาแต่ละตัวทำโดยกดบริเวณท้องอย่างเบาๆแล้วออกแรงรีดท้องเพียงเล็กน้อยตั้งแต่บริเวณครีบอก (pectoral fin) ลงมาถึงบริเวณช่องเพศ (urogenital papillae) เพื่อให้ได้น้ำเชื้อ (semen) สีขาวขุ่นไหลออกมาบริเวณช่องเพศ (urogenital papillae) ทำการรวบรวมน้ำเชื้อที่ได้จากการรีดปลาแต่ละตัวใส่ในภาชนะจานแก้วที่สะอาด (รูปที่ 4) และเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ได้ไว้บนน้ำแข็งเพื่อรักษาคุณภาพน้ำเชื้อก่อนเริ่มต้นการทดลอง สำหรับพ่อพันธุ์ปลาตะเพียนขาวที่เสร็จสิ้นการรีดน้ำเชื้อ ได้นำไปพักในถังน้ำสะอาดที่มีการให้ออกซิเจนเต็มที่ประมาณ 5 นาที จึงนำกลับไปเลี้ยงขุนในบ่อพ่อพันธุ์ต่อไป

น้ำเชื้อปลาที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้งถูกรวบรวมจากพ่อพันธุ์จำนวนหลายตัว (pooled milt) ประมาณ 8-10 ตัวเพื่อลดความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อ (individual variation) สำหรับการทดลอง โดยในแต่ละชุดการทดลองใช้น้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ๆ (fresh milt) ที่มีคุณภาพดีเท่านั้น โดยเลือกใช้เฉพาะน้ำเชื้อที่มีสีลักษณะขาวขุ่น ไม่มีเมือก เลือด หรือปัสสาวะและขี้ปลาเจือปน และมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่สูงหลังการกระตุ้นให้เคลื่อนที่ (มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์) เท่านั้นจึงนำมาใช้ในการทดลอง น้ำเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ไม่ถูกนำมาใช้ในการทดลองเพื่อให้มั่นใจว่าขณะเริ่มการทดลองน้ำเชื้อปลามีคุณภาพที่ดีพอ

พ่อพันธุ์ปลาที่มีน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีที่ได้ถูกรวบรวมน้ำเชื้อออกมาจากพ่อพันธุ์เพื่อประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อที่สำคัญได้แก่ เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (percent sperm motility) ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนที่ (sperm motile period) เปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิต (percent sperm viability) แรงดันออสโมติก (osmotic pressure หรือ osmolality) และความหนาแน่นของสเปิร์ม (sperm density) น้ำเชื้อสดที่มีคุณภาพดีเท่านั้นถูกนำมาใช้ในการทดลองแช่แข็ง โดยน้ำเชื้อสดที่

รวบรวมได้ถูกนำมาใช้ในการทดลองในเวลาไม่เกิน 15 นาทีหลังการรวบรวมน้ำเชื้อ น้ำเชื้อที่รวบรวมมาในระหว่างการทดลองไม่ว่าจะรวบรวมในช่วงต้นฤดู กลางฤดู หรือปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ได้ถูกประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเพื่อทราบคุณภาพน้ำเชื้อ (baseline information) ก่อนการแช่แข็ง และทราบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อปลาที่อาจมีในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (spawning season)

2. <u>การประเมินคุณภาพสเปิร์มในน้ำเชื้อปลา</u>

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว ทำโดยการหยดตัวอย่างน้ำเชื้อสดที่รีดออกมา (5 ไมโครลิตร) ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาดแล้วหยด 0.4% NaCl ลงไป 100 ไมโครลิตร พร้อมกับปิดด้วย cover glass เบาๆอย่างรวดเร็ว เพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่แล้วทำการประเมินเปอร์เซนต์สเปิร์มที่เคลื่อนที่ทันทีให้เสร็จภายใน 15 วินาที ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ประเมินจากจำนวนสเปิร์มที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าอย่างรวดเร็ว (subjective estimation) เมื่อถูกกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl โดยแบ่งระดับที่สเปิร์มเคลื่อนที่ไว้ 6 ระดับ คือ สเปิร์มที่เคลื่อนไหวได้ 0, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% ตามวิธีการของ Vuthiphandchai and Zohar (1999) โดยทำ 3 ซ้ำ โดยในแต่ละสไลด์ยังได้สุ่มประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอีก 3 จุดในเวลาไม่เกิน 15 วินาทีต่อสไลด์ ทำให้มีจำนวนซ้ำย่อยในการประเมินการเคลื่อนที่สเปิร์มรวม 9 ซ้ำ (pseudoreplicates) การประเมินเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่แข็ง ใช้หลักการประเมินเหมือนน้ำเชื้อสด โดยหยดน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลาย (post-thawed sperm) ในปริมาณ 5 ไมโครลิตร ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาดจึงเติม 0.4% NaCl ลงไปในปริมาณ 100 ไมโครลิตรเพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ และประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 9 ซ้ำย่อยตามที่ได้กล่าวมาแล้ว สำหรับการประเมินเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนที่ (sperm motile period) ไม่ว่าจะเป็นน้ำเชื้อสด หรือน้ำเชื้อแช่แข็ง ทำโดยบันทึกระยะเวลาที่สเปิร์มสด หรือสเปิร์มแช่แข็งหลังการละลายภายหลังการถูกกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl ใช้เวลาว่ายน้ำนานเท่าใดเริ่มตั้งแต่ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ด้วย 0.4% NaCl จนกระทั่งสเปิร์มหยุดเคลื่อนที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า บันทึกเวลาเป็นวินาที โดยทำการประเมิน 3 ซ้ำ

เปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิต ประเมินโดยการนำเอาน้ำเชื้อสด (5 ไมโครลิตร) มาย้อมสีด้วยสารละลาย eosin-nigrosin (5 ไมโครลิตร) บนกระจกสไลด์ตามวิธีการของ Fribourgh (1966) แล้วจึงสุ่มนับจำนวนสเปิร์มที่มีชีวิตซึ่งจะไม่ติดสีย้อม (viable sperm) และจำนวนสเปิร์มที่ตายซึ่งจะติดสีม่วง (dead sperm) โดยสุ่มนับสเปิร์มประมาณ 300 ตัว/สไลด์ และนับ 3 ซ้ำโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า แล้วจึงคำนวณเปอร์เซนต์ของสเปิร์มที่มีชีวิต การประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อแช่แข็ง ได้ทำเช่นเดียวกับการประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อสด โดยเมื่อทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งแล้ว นำน้ำเชื้อหลังการละลายในปริมาณ 5 ไมโครลิตรมาหยดบนกระจกสไลด์ แล้วหยดสารละลาย eosin-nigrosin (5 ไมโครลิตร) ลงไปแล้วทำการผสมให้เข้ากัน และ smear ให้แห้งภายใต้เปลวไฟโดยเร็ว และทำการประเมิน 3 ซ้ำ

แรงดันออสโมติกของน้ำเชื้อสด ประเมินโดยนำน้ำเชื้อสดมาใส่ในหลอด vial แล้วเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง 8,000g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้ semina plasma แยกตัวออกจาก spermatozoa จากนั้นนำ seminal plasma ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ไปวัดค่าแรงดันออสโมติกด้วยเครื่องมือ osmometer เพื่อทราบแรงดันออสโมติกของน้ำเชื้อสดก่อนเริ่มการทดลอง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ความหนาแน่นของสเปิร์ม ประเมินโดยการเจือจางน้ำเชื้อปลา (10 ไมโครลิตร) ด้วย 0.9% NaCl ปริมาณ 5,000 เท่าโดยการผสมให้เข้ากันใน vial ด้วย vortexer แล้วหยดน้ำเชื้อลงใน haemacytometer เพื่อนับจำนวนสเปิร์มที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า จึงคำนวณหาความหนาแน่นของสเปิร์ม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3. <u>การพัฒนาวิธีการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้ง</u>

3.1 ศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ และสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้ง

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทราบอิทธิพลร่วมของสารละลายบัฟเฟอร์ และสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง การทดลองเริ่มจากนำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่รวบรวมมาใหม่ๆ (freshly collected milt) มาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา 3 ชนิดได้แก่ Ca-F HBSS (calcium free hank's balanced salt solution), HBSS และ 0.85% NaCl โดยเจือจางในอัตราส่วนโดยปริมาตรของน้ำเชื้อต่อสารละลายบัฟเฟอร์เท่ากับ 1:1 สารละลาย Ca-F HBSS เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้เป็นส่วนผสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาน้ำจืดหลายชนิด (Mongkonpunya et al., 1995) โดยที่ Ca-F HBSS จะไม่มีผลกระตุ้นให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่แต่จะไปเจือจางน้ำเชื้อโดยที่สเปิร์มยังคงมีคุณภาพไม่เปลี่ยนแปลง สารละลายบัฟเฟอร์ HBSS และ 0.85% NaCl เป็นสารละลายที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาบางชนิด ซึ่งไม่กระตุ้นให้สเปิร์มปลาน้ำจืดเคลื่อนที่เช่นกัน น้ำเชื้อปลาที่ถูกเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์แต่ละชนิด (extended milt) ในบีกเกอร์ (beakers) ได้ถูกเติมสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectants) ชนิดต่างๆ 8 ชนิดที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์และภายในเซลล์ (glycerol, ethylene glycol, propylene glycol, dimethyl sulfoxide; DMSO, sucrose, acetamide, formamide และ ethanol) ลงไปเพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของสารไครโอโพรเทคแทนท์เป็น 5, 10, 15 และ 20% การเจือจางน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ชนิดและสารสารไครโอโพรเทคแทนท์ 8 ชนิดในชุดการทดลองเหล่านี้ได้ทำ 6 ซ้ำที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำการดูดน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง (200 ไมโครลิตร) ในชุดการทดลองเหล่านี้ใส่ในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร (รูปที่ 5) ปิดปลายหลอดฟางให้สนิทด้วยการใช้คีมคีบ (forcep) ลนไฟกดให้แน่น (รูปที่ 6; รูปที่ 7) ปล่อยให้น้ำเชื้ออยู่ในสภาวะสมดุล (equilibration time) นาน 10 นาที (ระยะเวลาระหว่างใส่สารไครโอโพรเทคแทนท์ลงในน้ำเชื้อเจือจางก่อนเริ่มการแช่แข็ง) จึงเริ่มลดอุณหภูมิแช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำแข็งแห้งบดละเอียดทันที

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาทำในกล่องโฟม (styrofoam box) ทำโดยนำน้ำแข็งแห้ง (รูปที่ 8) มาบดให้ละเอียด (crushed dry ice) จึงมาใส่ในกล่องโฟมเกือบเต็มกล่อง จากนั้นนำเอาหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตรที่มีน้ำเชื้อปลาซึ่งได้เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์และสารไครโอโพรเทคแทนท์ของชุดการทดลองต่างๆ ใส่เข้าไปในน้ำแข็งแห้งที่บดละเอียดพร้อมปิดฝากล่องโฟม (รูปที่ 9) โดยกำหนดให้หลอดฟางอยู่ในน้ำแข็งแห้งบดนาน 10 นาทีก่อนนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว แล้วนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้มาละลาย (thawing) โดยนำหลอดฟางออกมาแช่ในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส โดยนำหลอดฟางแช่ 5 วินาที จนกระทั่งน้ำเชื้อละลายแล้วรีบนำหลอดฟางออกมาทันที ตัดปลายหลอดฟางเพื่อประเมินคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลายทันที (post-thawed sperm quality) โดยประเมินเปอร์เซนต์ที่สเปิร์มเคลื่อนที่ และเปอร์เซนต์ที่สเปิร์มมี

ชีวิต เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (น้ำเชื้อสด) ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว สำหรับกลุ่มควบคุม (control group) ใช้น้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ๆแล้วนำมาประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เพื่อเปรียบเทียบกับชุดทดลอง (treated groups) โดยการทดลองทั้งหมดทำ 6 ซ้ำ

การทดลองในขั้นตอนนี้ทำให้ทราบว่าอิทธิพลร่วมของสารละลายบัฟเฟอร์ และสารไครโอโพรเทคแทนท์คู่ใดที่เหมาะสมในการนำมาแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้ง และสเปิร์มในทุกชุดการทดลองมีคุณภาพเปลี่ยนแปลงอย่างไร ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สามารถนำมาใช้ประกอบในการ design protocol ระหว่างการแช่แข็งให้มีประสิทธิภาพสูงต่อไป

3.2 ศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลายที่มีต่อคุณภาพของสเปิร์มปลาที่ผ่านการแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง

การทดลองในข้อ 3.1 สามารถเลือกสารละลายบัฟเฟอร์ และสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมใน protocol การแช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำแข็งแห้ง เพื่อนำมาศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิและอัตราการละลายที่มีต่อคุณภาพของสเปิร์มหลังการละลาย การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้งในประเด็นการเลือกใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม กำหนดให้มีการนำหลอดฟางมาลดอุณหภูมิที่อัตราการลดอุณหภูมิต่างๆกัน โดยการนำหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตรมาบรรจุในวัสดุรูปแบบต่างๆกันให้มีความหนามากขึ้น แล้วนำหลอดฟางที่มีวัสดุห่อหุ้มไปใส่ลงไปในน้ำแข็งแห้งบดเพื่อลดอุณหภูมิแช่แข็งน้ำเชื้อ ในการศึกษาครั้งนี้กำหนดใช้วัสดุห่อหุ้มรูปแบบต่างๆกันเพื่อห่อหุ้มหลอดฟางขณะแช่แข็ง 3 ชุดการทดลองได้แก่ สายไฟฟ้า (300V. PVC/PVC 70°C VAF 2 x 1.5 SQ.MM. TABLE 2 THAI YAZAKI (W) TIS 11-2531), สายหลอดซิลิโคน (Dura Silicone tube ขนาด 5 x 9 มิลลิเมตร) และหลอด Centrifuge tube (Nunc ขนาด 15 มิลลิลิตร) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีวัสดุห่อหุ้ม (แช่แข็งน้ำเชื้อในหลอดฟางตามปกติโดยไม่มีวัสดุห่อหุ้ม)

การเตรียมวัสดุเพื่อห่อหุ้มหลอดฟางเริ่มจากนำสายไฟฟ้าที่มีความหนาของสายไฟฟ้า 0.14 เซนติเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.39 เซนติเมตร (รูปที่ 10) มาทำการดึงเอาสายทองแดงด้านในออกให้หมดด้วยการใช้คีมดึง ตัดสายไฟให้ได้ขนาดความยาว 12.5 เซนติเมตร นำกาวซิลิโคนมาปิดปลายด้านใดด้านหนึ่งของสายไฟฟ้า ได้เป็นหลอดสายไฟฟ้า (รูปที่ 11) จึงนำหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรมาใส่ในช่องของหลอดสายไฟฟ้า ช่องละ 1 หลอดฟาง สำหรับสายหลอดซิลิโคน ทำโดยนำหลอดซิลิโคนมาตัดให้มีความยาว 12.5 เซนติเมตร แล้วนำกาวซิลิโคนไปปิดปลายสายด้านใดด้านหนึ่ง สายหลอดซิลิโคนมีความหนาของสายหลอดซิลิโคน 0.99 ซม. มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.48 เซนติเมตร ซึ่งสามารถนำหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตรมาใส่ในช่องของสายหลอดซิลิโคนจำนวน 3 หลอด การเตรียมหลอด Centrifuge tube ที่มีความยาวของหลอด 15 เซนติเมตรทำโดยเปิดฝาหลอด Centrifuge tube แล้วนำหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตรจำนวน 3 หลอดใส่ลงไปในหลอด Centrifuge tube โดยหลอด Centrifuge tube มีความหนา 0.11 เซนติเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.52 เซนติเมตร

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในการทดลองนี้ เริ่มจากการนำเอาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่มีคุณภาพดีมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ในอัตราส่วนปริมาตร 1:1 ได้เป็นน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง (extended milt) จึงผสม DMSO ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10% ทำการดูดน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางในปริมาตร 80 ไมโครลิตรด้วยไมโครปิเปตใส่เข้าไปในหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตร ปิดปลายหลอดฟางด้วยความร้อน ปล่อยให้อยู่ในสภาวะสมดุลนาน 10 นาทีที่อุณหภูมิห้องก่อนการแช่แข็ง

หลอดฟางทั้งหมดที่มีน้ำเชื้อเจือจางใน Ca-F HBSS และ DMSO ถูกนำมาห่อหุ้มด้วยวัสดุต่างๆ 3 ชุดการทดลอง (treated groups) ที่กล่าวมาแล้วและเมื่อครบระยะเวลาสมดุลตามที่กำหนดจึงเริ่มลดอุณหภูมิแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยน้ำแข็งแห้งทันที สำหรับน้ำเชื้อในกลุ่มควบคุม (control group) ได้นำน้ำเชื้อมาเจือจางด้วย Ca-F HBSS และ 10% DMSO เช่นเดียวกันเพียงแต่ลดอุณหภูมิแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยน้ำแข็งแห้งภายในกล่องโฟมโดยไม่มีวัสดุใดๆมาหุ้มหลอดฟางอีกที การแช่แข็งน้ำเชื้อทำโดยนำหลอดฟางในชุดทดลอง 3 ชุดและชุดควบคุม มาวางในน้ำแข็งแห้งที่บดละเอียดที่อยู่ภายในกล่องโฟมขนาด 20x33.5x25 เซนติเมตร (ใช้น้ำแข็งแห้งบดละเอียด 15 กิโลกรัมหรือประมาณ 3 ใน 4 ส่วนบรรจุอยู่ในกล่องโฟม) การแช่แข็งทำการวางให้หลอดฟางในทุกชุดการทดลองให้อยู่ภายใต้น้ำแข็งแห้งบดละเอียดเป็นเวลานาน 10, 20 หรือ 30 นาทีพร้อมกับการปิดฝากล่องโฟมขณะแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยน้ำแข็งแห้ง เมื่อครบเวลาที่กำหนดในการแช่แข็งจึงนำหลอดฟางในทุกชุดการทดลองไปแช่ในไนโตรเจนเหลว 2-3 วัน

การศึกษาผลของอัตราการละลายน้ำเชื้อที่มีต่อการเคลื่อนที่และการมีชีวิตของสเปิร์มหลังการละลาย ทำโดยน้ำน้ำเชื้อแช่แข็งที่อยู่ในหลอดฟางทุกชุดการทดลองมาทำการละลายใน water bath โดยนำหลอดฟางออกจากวัสดุห่อหุ้มและนำมาละลายในน้ำที่มีอุณหภูมิน้ำแตกต่างกัน โดยใช้ระยะเวลาการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่แต่ละอุณหภูมิตามที่กำหนดไว้โดยการละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 7 ระดับได้แก่ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลา 20, 15, 10, 8, 5, 4 และ 3 วินาทีตามลำดับ ทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลาย (post-thawed sperm quality) โดยประเมินเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของเปิร์ม และระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายตามวิธีการที่กล่าวมา โดยการทดลองทั้งหมดทำ 3 ซ้ำในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ของปลาตะเพียนขาว

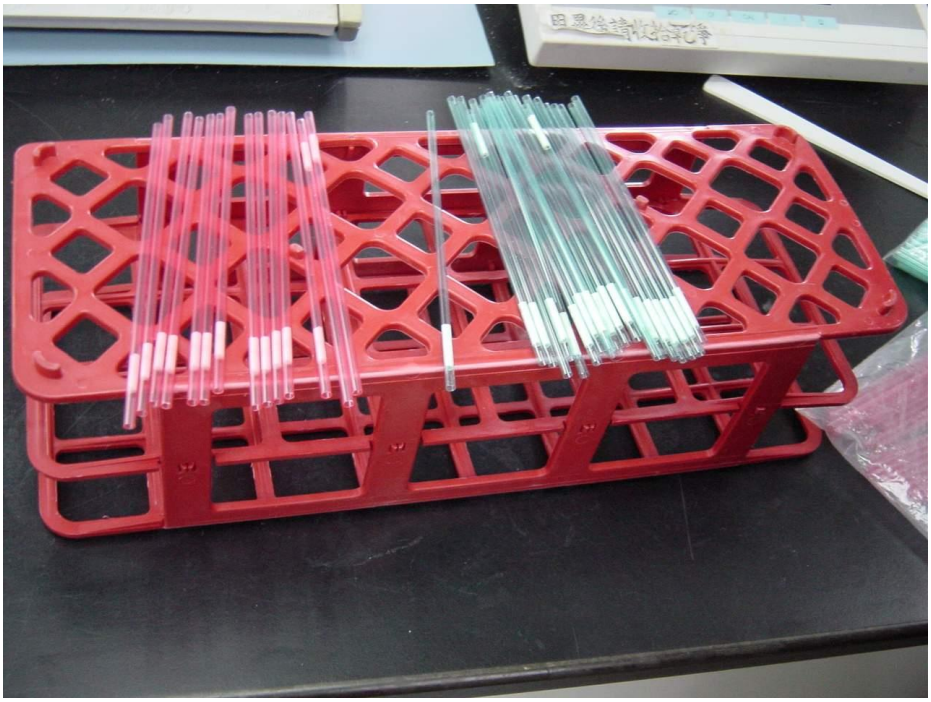
4. <u>การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ</u>

ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์ม ในแต่ละชุดการทดลองถูกนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน (standard deviation) และนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีการ Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองด้วย Duncan’s new multiple range test โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS

รูปที่ 2 พ่อพันธุ์ปลาตะเพียนขาว

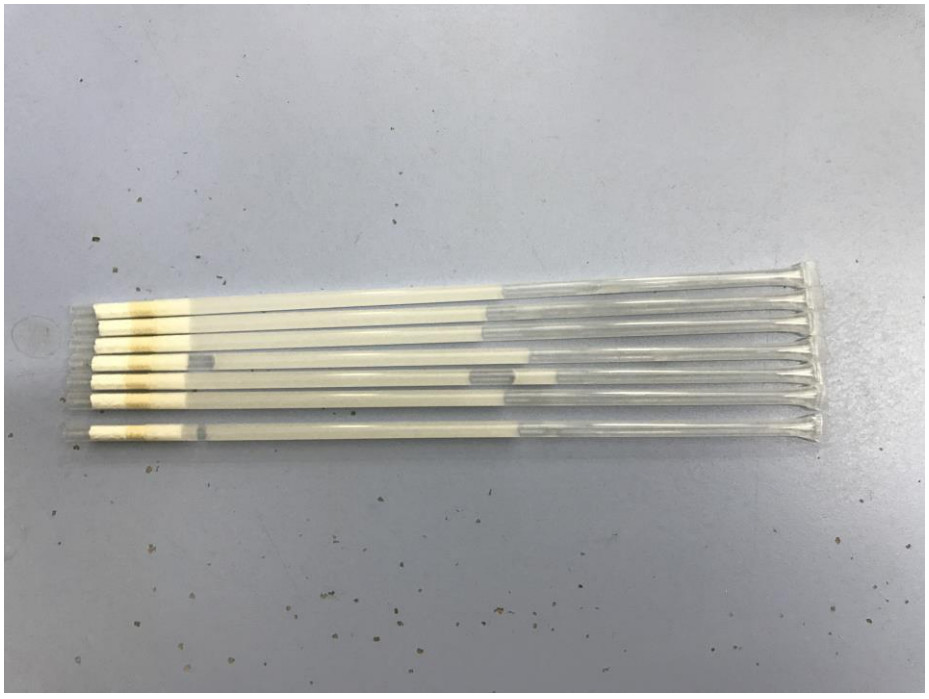
รูปที่ 3 พ่อพันธุ์ปลาตะเพียนขาวก่อนทำการสลบ

รูปที่ 4 การรวบรวมน้ำเชื้อปลาเพื่อใช้ในการทดลอง



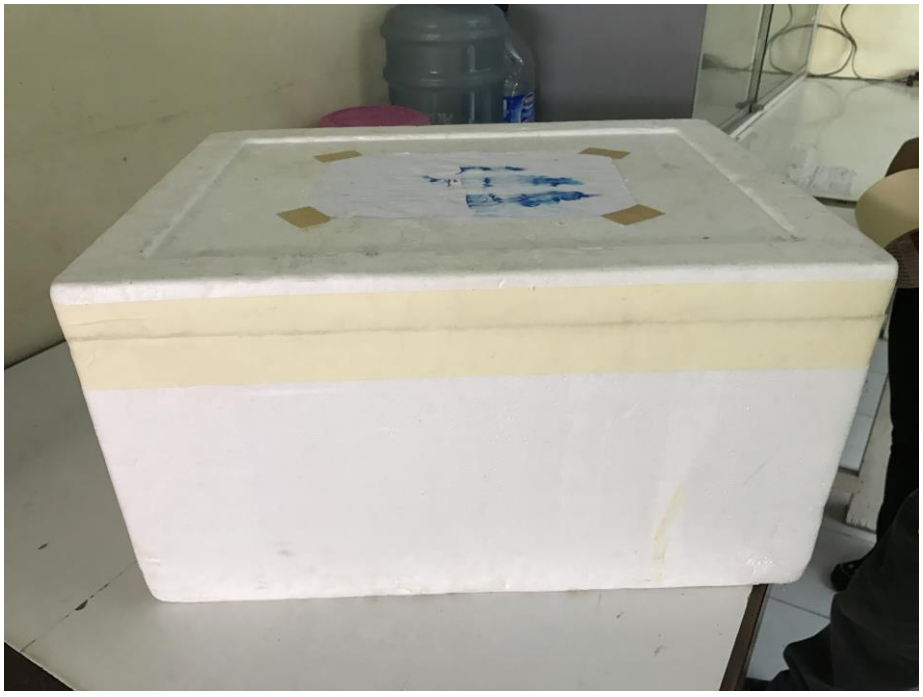
รูปที่ 5 หลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรที่ใช้ในการทดลอง

รูปที่ 6 การปิดปลายหลอดฟาง (หารูปใหม่)



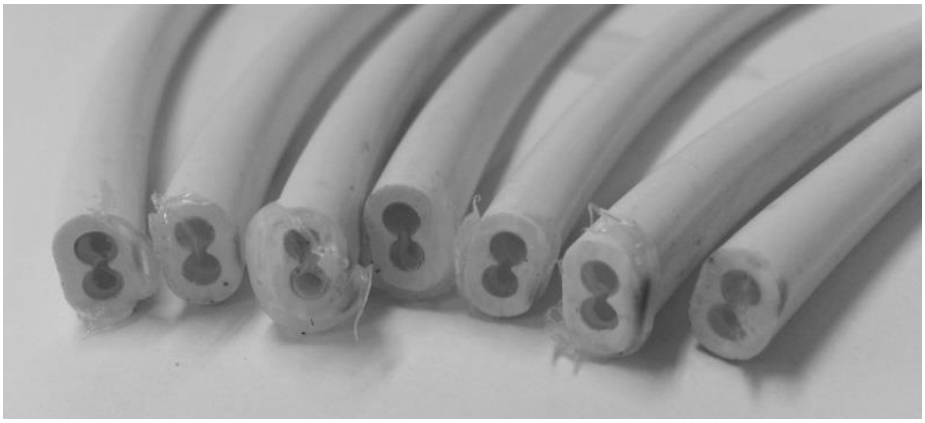
รูปที่ 7 ลักษณะปลายหลอดหลอดฟางหลังการปิดปลายหลอด

รูปที่ 8 น้ำแข็งแห้งที่ใช้ในการทดลอง



รูปที่ 9 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้งโดยปิดฝากล่องโฟม

รูปที่ 10 สายไฟฟ้าที่นำมาหุ้มหลอดฟาง



รูปที่ 11 การปิดปลายหลอดสายไฟฟ้าด้วยกาวซิลิโคน
(ภาพโดยอมรรัตน์ กิระวานิชย์)

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การทดลองสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ตอนดังนี้

1. ผลของสารละลายบัฟเฟอร์และสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยน้ำแข็งแห้ง
2. ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลายที่มีต่อคุณภาพของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ผ่านการแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง

4.1 ผลของสารละลายบัฟเฟอร์ และสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยน้ำแข็งแห้ง

4.1.1 การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย

น้ำเชื้อสดที่นำมาใช้ในการทดลอง (กลุ่มควบคุม) มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มภายหลังการกระตุ้นมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 86.7-100% น้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตรในน้ำแข็งแห้งนาน 10 นาที เมื่อใช้สารละลาย Ca-F HBSS ร่วมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายเฉลี่ยดีที่สุดเท่ากับ 46.7, 53.3, 35.5 และ 33.3% เช่นเดียวกับเมื่อใช้สารละลาย Ca-F HBSS ร่วมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ sucrose ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 55.5, 44.4, 22.2 และ 15.5% แต่การแช่แข็งน้ำเชื้อด้วย Ca-F HBSS ร่วมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดอื่นอีก 6 ชนิดที่ 4 ระดับความเข้มข้นทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่เฉลี่ยระหว่าง 0-26.7% (ตารางที่ 1)

น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยสารละลาย HBSS ร่วมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ DMSO ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายเฉลี่ยดีที่สุดเท่ากับ 42.2, 44.4, 28.9 และ 17.8% เช่นเดียวกับเมื่อใช้สารละลาย HBSS ร่วมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ sucrose ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 46.7, 35.5, 31.1 และ 8.8% ในขณะที่การแช่แข็งน้ำเชื้อด้วย HBSS ร่วมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดอื่นอีก 6 ชนิดที่ 4 ระดับความเข้มข้นทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่สูงสุดเฉลี่ยระหว่าง 2.2-28.8% (ตารางที่ 1)

น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ร่วมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 8 ชนิดที่ 4 ระดับความเข้มข้น (5, 10, 15 และ 20%) โดยภาพรวมมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายที่มีค่าต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS หรือ HBSS โดยชุดการทดลองที่ใช้สารละลาย 0.85% NaCl ร่วมกับ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% ยังคงมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายเฉลี่ยดีที่สุดเท่ากับ 28.9, 28.8, 11.1 และ 15.5% สอดคล้องกับชุดการทดลองที่ใช้สารละลาย 0.85% NaCl ร่วมกับ sucrose ที่ 4 ระดับความเข้มข้นยังทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ดีมีค่า 13.3, 15.5, 28.9 และ 24.4% ตามลำดับ และชุดการทดลองที่ใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์อีก 6 ชนิดที่เหลือทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่สูงสุดมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 2.2-24.5% (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว (%) หลังการแช่แข็งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์และสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆในน้ำแข็งแห้งนาน 10 นาที

ชนิดสารละลายบัฟเฟอร์	ชนิดสารไครโอโพรเทคแทนท์	ความเข้มข้น (%)			
		5	10	15	20
Ca-F HBSS	DMSO	$46.7\pm3.8^{a,12}$	$53.3\pm3.9^{a,1}$	$35.5\pm2.2^{b,1}$	$33.3\pm3.9^{b,1}$
	Glycerol	$13.3\pm3.9^{a,4}$	$8.8\pm2.2^{a,6}$	$0^{b,6}$	$0^{b,5}$
	Propylene glycol	$26.7\pm3.8^{a,3}$	$22.2\pm2.2^{a,45}$	$13.3\pm3.9^{b,3}$	$11.1\pm2.2^{b,34}$
	Ethylene glycol	$22.2\pm2.2^{a,3}$	$17.8\pm2.2^{a,5}$	$4.4\pm2.2^{b,56}$	$0^{c,5}$
	Acetamide	$0^{b,6}$	$11.1\pm2.2^{a,6}$	$0^{b,6}$	$0^{b,5}$
	Formamide	$8.8\pm2.2^{a,5}$	$8.8\pm2.2^{a,6}$	$0^{b,6}$	$0^{b,5}$
	Ethanol	$17.8\pm2.2^{a,34}$	$7.8\pm2.2^{b,6}$	$0^{c,6}$	$0^{c,5}$
	Sucrose	$55.5\pm2.2^{a,1}$	$44.4\pm2.2^{b,2}$	$22.2\pm2.2^{c,2}$	$15.5\pm2.2^{c,3}$
HBSS	DMSO	$42.2\pm2.2^{a,12}$	$44.4\pm2.2^{a,2}$	$28.9\pm4.4^{b,12}$	$17.8\pm2.2^{c,3}$
	Glycerol	$6.7\pm6.7^{a,56}$	$6.7\pm6.7^{a,67}$	$13.3\pm6.7^{a,34}$	$0^{b,5}$
	Propylene glycol	$15.5\pm2.2^{a,4}$	$17.7\pm4.4^{a,56}$	$13.3\pm3.9^{a,3}$	$0^{a,5}$
	Ethylene glycol	$28.8\pm2.2^{a,3}$	$15.5\pm2.2^{b,56}$	$2.2\pm2.2^{c,56}$	$0^{a,5}$
	Acetamide	$6.7\pm6.7^{a,56}$	$6.7\pm6.7^{a,67}$	$0^{a,6}$	$0^{a,5}$
	Formamide	$0^{a,6}$	$0^{a,7}$	$2.2\pm2.2^{a,56}$	$0^{a,5}$
	Ethanol	$11.1\pm2.2^{a,5}$	$15.5\pm2.2^{a,56}$	$0^{c,6}$	$0^{c,5}$
	Sucrose	$46.6\pm6.7^{a,12}$	$35.5\pm2.2^{ab,3}$	$31.1\pm2.2^{b,1}$	$8.8\pm2.2^{c,4}$
0.85% NaCl	DMSO	$28.9\pm4.4^{a,3}$	$28.8\pm2.2^{a,4}$	$11.1\pm2.2^{b,4}$	$15.5\pm2.2^{b,3}$
	Glycerol	$0^{b,6}$	$6.7\pm6.7^{a,67}$	$8.9\pm8.9^{a,56}$	$0^{b,5}$
	Propylene glycol	$11.1\pm2.2^{a,5}$	$24.5\pm2.2^{a,45}$	$22.2\pm2.2^{a,2}$	$8.8\pm2.2^{a,4}$
	Ethylene glycol	$17.8\pm2.2^{a,34}$	$11.1\pm2.2^{a,6}$	$0^{b,6}$	$0^{b,5}$
	Acetamide	$0^{a,6}$	$0^{a,7}$	$6.7\pm6.7^{a,56}$	$0^{a,5}$
	Formamide	$0^{b,6}$	$2.2\pm2.2^{b,67}$	$8.8\pm2.2^{a,45}$	$0^{b,5}$
	Ethanol	$23.3\pm2.9^{a,3}$	$13.3\pm3.9^{b,56}$	$8.8\pm2.2^{b,45}$	$0^{c,5}$
	Sucrose	$13.3\pm3.9^{b,45}$	$15.5\pm2.2^{b,56}$	$28.9\pm4.4^{a,12}$	$24.4\pm2.2^{a,2}$

ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างความเข้มข้น
ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างชนิดของสารบัฟเฟอร์และสารไครโอโพรเทคแทนท์

4.1.2 การมีชีวิตของสเปิร์มหลังการละลาย

เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มในกลุ่มควบคุม (น้ำเชื้อสด) มีค่าเฉลี่ยสูงระหว่าง 94.3-98.6% ในขณะที่การมีชีวิตของสเปิร์มแช่แข็งที่มีค่าสูงสุด พบในชุดทดลอง (treated group) ที่แช่แข็งด้วยสารละลาย Ca-F HBSS ร่วมกับ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 10% ทำให้มีการมีชีวิตของสเปิร์มหลังการละลายเฉลี่ย 69.2% (ตารางที่ 2) โดยทั่วไปการมีชีวิตของสเปิร์มแช่แข็ง (ตารางที่ 2) มีแนวโน้มที่มีค่าสูงกว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มแช่แข็ง (ตารางที่ 1) ในชุดการทดลองเดียวกันหลังจากนำน้ำเชื้อแช่แข็งออกมาละลาย

เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มที่แช่แข็งด้วยการใช้สารละลาย Ca-F HBSS ร่วมกับ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% มีมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 56.8, 69.2, 53.4 และ 42.1% เช่นเดียวกับเมื่อใช้สารละลาย Ca-F HBSS ร่วมกับ sucrose ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% ทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 60.2, 55.5, 31.2 และ 41.4% แต่การแช่แข็งน้ำเชื้อด้วย Ca-F HBSS ร่วมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดอื่นอีก 6 ชนิดที่ 4 ระดับความเข้มข้นทำให้สเปิร์มมีชีวิตมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 0-57.5% (ตารางที่ 1)

เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มที่แช่แข็งด้วยสารละลาย HBSS ร่วมกับ DMSO ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% ยังคงมีค่าสูงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ โดยมีค่าเท่ากับ 62.4, 66.3, 58.5 และ 37.4% เช่นเดียวกับเมื่อใช้สารละลาย HBSS ร่วมกับ sucrose ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% ทำให้การมีชีวิตของสเปิร์มมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 62.5, 55.3, 41.6 และ 28.7% ในขณะที่การมีชีวิตของสเปิร์มที่แช่แข็งด้วย HBSS ร่วมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดอื่นอีก 6 ชนิดที่ 4 ระดับความเข้มข้นมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 6.7-42.3% (ตารางที่ 2)

เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มที่แช่แข็งด้วยสารละลาย 0.85% NaCl ร่วมกับ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% มีค่าฉลี่ยเท่ากับ 33.8, 35.3, 41.3 และ 31.2% สอดคล้องกับชุดการทดลองที่ใช้สารละลาย 0.85% NaCl ร่วมกับ sucrose ที่ 4 ระดับความเข้มข้นยังทำให้สเปิร์มมีชีวิต 31.7, 43.7, 52.2 และ 18.5% ตามลำดับ และชุดการทดลองที่ใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์อีก 6 ชนิดที่เหลือมีผลทำให้สเปิร์มมีชีวิตมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 3.7-43.2% (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การมีชีวิตของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว (%) หลังการแช่แข็งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์และสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆในน้ำแข็งแห้งนาน 10 นาที

ชนิดสารละลายบัฟเฟอร์	ชนิดสารไครโอโพรเทคแทนท์	ความเข้มข้น (%)			
		5	10	15	20
Ca-F HBSS	DMSO	$56.8\pm4.6^{a,1}$	$69.2\pm4.4^{a,1}$	$53.4\pm3.9^{a,12}$	$42.1\pm5.2^{b,1}$
	Glycerol	$10.6\pm2.5^{a,45}$	$12.5\pm3.2^{a,6}$	$15.4\pm4.2^{a,56}$	$0^{b,5}$
	Propylene glycol	$41.4\pm2.9^{b,23}$	$50.2\pm3.1^{a,12}$	$33.3\pm1.9^{c,4}$	$26.6\pm2.7^{d,2}$
	Ethylene glycol	$50.5\pm3.3^{a,12}$	$57.5\pm4.2^{a,1}$	$15.2\pm2.4^{b,56}$	$11.7\pm3.1^{b,34}$
	Acetamide	8.2 ± 3.4^{5}	$23.2\pm3.2^{a,4}$	$11.6\pm3.1^{b,6}$	$12.6\pm2.2^{b,34}$
	Formamide	$11.1\pm3.3^{b,45}$	$25.2\pm3.5^{a,34}$	$3.5\pm1.9^{b,6}$	$5.9\pm2.4^{b,4}$
	Ethanol	$21.9\pm2.5^{b,4}$	$37.2\pm2.7^{a,23}$	$11.2\pm2.4^{c,6}$	$13.6\pm2.9^{c,34}$
	Sucrose	$60.2\pm3.1^{a,1}$	$55.5\pm5.2^{a,1}$	$31.2\pm3.1^{c,4}$	$41.4\pm3.6^{b,1}$
HBSS	DMSO	$62.4\pm3.1^{a,1}$	$66.3\pm3.2^{a,1}$	$58.5\pm3.4^{a,1}$	$37.4\pm3.8^{b,12}$
	Glycerol	$21.2\pm6.7^{a,4}$	$18.1\pm3.7^{a,56}$	$23.3\pm3.2^{a,5}$	$6.7\pm3.7^{b,4}$
	Propylene glycol	$25.1\pm3.2^{a,4}$	$27.1\pm4.1^{a,34}$	$30.1\pm2.2^{a,4}$	$19.3\pm3.3^{a,3}$
	Ethylene glycol	$37.7\pm5.1^{a,23}$	$42.3\pm2.7^{a,2}$	$22.2\pm4.1^{b,1}$	$8.7\pm4.1^{c,45}$
	Acetamide	$12.7\pm3.2^{a,45}$	$9.6\pm4.6^{a,6}$	$11.7\pm3.2^{a,6}$	$13.7\pm3.8^{a,34}$
	Formamide	$9.2\pm4.3^{a,5}$	$13.1\pm2.9^{a,6}$	$12.6\pm3.5^{a,6}$	$16.1\pm3.2^{a,34}$
	Ethanol	$21.2\pm3.2^{b,4}$	$35.6\pm3.4^{a,23}$	$9.4\pm3.2^{c,6}$	$11.7\pm2.4^{c,34}$
	Sucrose	$62.5\pm2.7^{a,1}$	$55.3\pm3.2^{b,1}$	$41.6\pm3.2^{c,3}$	$28.7\pm5.1^{d,2}$
0.85% NaCl	DMSO	$33.8\pm3.3^{a,3}$	$35.3\pm3.6^{a,23}$	$41.3\pm3.8^{a,3}$	$31.2\pm4.6^{ab,2}$
	Glycerol	$14.9\pm4.4^{b,45}$	$25.7\pm5.1^{a,45}$	$33.2\pm4.8^{a,4}$	$12.1\pm3.7^{b,34}$
	Propylene glycol	$21.2\pm3.9^{c,4}$	$43.2\pm3.6^{a,12}$	$42.8\pm4.3^{a,3}$	$29.2\pm3.2^{b,2}$
	Ethylene glycol	$24.3\pm4.2^{b,34}$	$34.5\pm3.1^{a,23}$	$33.8\pm2.7^{a,4}$	$17.7\pm4.1^{b,3}$
	Acetamide	$9.1\pm3.2^{a,5}$	$11.1\pm2.7^{a,6}$	$12.4\pm3.3^{a,6}$	$9.5\pm2.7^{a,45}$
	Formamide	$3.7\pm2.4^{a,5}$	$9.6\pm3.2^{a,6}$	$11.6\pm2.7^{a,6}$	$5.1\pm3.1^{a,45}$
	Ethanol	$13.3\pm5.9^{a,45}$	$16.3\pm3.9^{a,56}$	$15.2\pm4.8^{a,56}$	$13.4\pm3.5^{a,34}$
	Sucrose	$31.7\pm2.7^{c,3}$	$43.7\pm3.7^{b,12}$	$52.2\pm3.4^{a,12}$	$18.5\pm3.4^{d,3}$

ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างความเข้มข้น
ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างชนิดของสารบัฟเฟอร์และสารไครโอโพรเทคแทนท์

4.2 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลายที่มีต่อคุณภาพของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ผ่านการแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง

4.2.1 คุณภาพสเปิร์มแช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้า

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในหลอดฟางด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง โดยใช้หลอดสายไฟฟ้าเป็นวัสดุห่อหุ้มหลอดฟางนาน 10, 20 และ 30 นาที จากนั้นครบเวลาที่กำหนดไว้นำหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อออกมาจากหลอดสายไฟฟ้าที่ห่อหุ้มเพื่อนำหลอดฟางแช่ในไนโตรเจนเหลว แล้วมานำไปละลายหลังการแช่แข็งเพื่อประเมินการเคลื่อนที่สเปิร์มที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ที่เวลาที่ต่างกัน พบว่า น้ำชื้อแช่แข็งทำการละลายที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่การละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิที่ 10, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กันกับทุกอุณหภูมิที่กล่าวมาในข้างต้น ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งน้ำเชื้อนาน 10, 20 และ 30 นาที มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (ตารางที่ 3)

การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้าเมื่อนำมาละลาย พบว่าระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันเมื่อใช้อุณหภูมิละลายต่างกัน โดยการละลายน้ำเชื้อที่ 10, 20, 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันกับการละลายอุณหภูมิที่ 60 และ 70 องศาเซลเซียส ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวนาน 10, 20 และ 30 นาที ไม่มีผลให้ระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้าด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาการแช่แข็งและอุณหภูมิการละลายต่างกัน

การละลายน้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	20	30
10°C /20S	60±4.7^{2,b}	73±3.33 ^{1,a}	62±4.01^{2,b}
20°C /15S	71±3.51^{1,a}	76±2.94^{1,a}	71±3.51^{1,a}
30°C /10S	78±2.22^{1,a}	76±2.94^{1,a}	78±2.22^{1,a}
40°C /8S	73±3.33^{1,a}	76±2.94^{1,a}	73±3.33^{1,a}
50°C /5S	76±2.94^{1,a}	76±2.94^{1,a}	22±7.03^{2,b}
60°C /4S	67±6.67^{12,a}	7±3.33^{2,b}	0±0.00^{4,c}
70°C /3S	9±3.51^{2,a}	7±3.33^{2,a}	9±3.51^{3,a}

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างเวลาแช่แข็ง
ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างการละลาย

ตารางที่ 4 ระยะเวลาการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้าด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาการแช่แข็งและอุณหภูมิการละลายต่างกัน

การละลายน้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	20	30
10°C /20S	100±11.47^{12,a}	103±8.98^{12,a}	98±5.13^{12,a}
20°C /15S	128±12.82^{1,a}	115±13.91^{2,a}	127±16.41^{2,a}
30°C /10S	90±9.52^{12,a}	102±7.75^{12,a}	127±10.11^{12,a}
40°C /8S	109±11.06^{12,a}	112±10.93^{12,a}	107±11.98^{12,a}
50°C /5S	98±11.00^{2,a}	121±10.68^{2,a}	71±20.02^{2,a}
60°C /4S	121±5.03^{1,a}	39±19.84^{3,b}	0±0.00^{4,c}
70°C /3S	51±0.06^{3,a}	28±15.77^{3,a}	56±22.43^{3,a}

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างเวลาแช่แข็ง
ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างการละลาย

4.2.2 คุณภาพสเปิร์มแช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคน

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวไว้ในหลอดฟางที่หุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคนในน้ำแข็งแห้งนาน 10, 20 และ 30 นาที และนำมาเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวก่อนการนำมาละลายที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ใช้อุณหภูมิในการละลาย 10, 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับการละลายที่อุณหภูมิที่ 50 และ 60 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามระยะเวลาในการแช่แข็งน้เชื้อนาน 10, 20 และ 30 นาที ไม่ทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 5)

การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคนหลังจากการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิต่างกันพบว่า การละลายน้ำเชื้อเมื่อใช้อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เปรียบเทียบกับการละลายที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการแช่แข็งน้ำเชื้อนาน 10, 20 และ 30 นาที ไม่มีผลต่อระยะเวลการเคลื่อนของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางห่อหุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคนด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาการแช่แข็งและอุณหภูมิการละลายต่างกัน

การละลายน้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	20	30
10°C /20S	47±8.16^{1,a}	40±3.33^{1,a}	38 ±4.01^{1,a}
20°C /15S	47±4.71^{1,a}	40±4.71^{1,a}	42±2.22^{1,a}
30°C /10S	40±5.77^{1,a}	38±5.21^{1,a}	49±4.84^{1,a}
40°C /8S	44±2.94^{1,a}	42±5.21^{1,a}	36±6.48^{1,a}
50°C /5S	40±3.33^{2,a}	29±3.51^{2,b}	31±4.84^{1,ab}
60°C /4S	31±3.51^{2,a}	27±3.33^{2,a}	22±2.22^{2,a}
70°C /3S	9±3.51^{3,b}	22±2.22^{3,a}	11±3.51^{3,b}

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างเวลาแช่แข็ง
ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างการละลาย

ตารางที่ 6 ระยะเวลาการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางห่อหุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคนด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาการแช่แข็งและอุณหภูมิการละลายต่างกัน

การละลายน้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	20	30
10°C /20S	113±17.85^{1,a}	92±9.65^{1,a}	96±8.78^{1,a}
20°C /15S	85±15.55^{1,a}	80±11.92^{1,a}	88±16.31^{1,a}
30°C /10S	114±17.59^{1,a}	109±10.67^{1,a}	97±11.48^{1,a}
40°C /8S	86±15.11^{1,a}	91±16.77^{1,a}	101±13.34^{1,a}
50°C /5S	78±10.88^{1,a}	106±20.77^{1,a}	83±14.20^{1,a}
60°C /4S	106±12.48^{1,a}	75±12.21^{1,a}	93±14.95^{1,a}
70°C /3S	22±11.59^{2,a}	99±15.39^{2,a}	32±12.14^{2,a}

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างเวลาแช่แข็ง
ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างการละลาย

4.2.3 คุณภาพสเปิร์มแช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอด Centrifuge tube

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง โดยใช้หลอด Centrifuge tube ห่อหุ้มหลอดฟางแช่แข็งนาน 10, 20 และ 30 นาที แล้วนำเอาเฉพาะหลอดฟางไปละลายหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ที่เวลาที่ต่างกัน พบว่าอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยการละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิที่ 10, 20, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส แต่ไม่แตกต่าง ($P>0.05$) กับการใช้อุณหภูมิที่ 10, 20, 40 และ 60 องศาเซลเซีย การแช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำแข็งแห้งด้วยการใช้หลอดฟางที่หุ้มด้วย Centrifuge tube ที่ระยะเวลานาน 20 และ 30 นาที ทำให้สเปิร์มหลังการละลายมีการเคลื่อนที่แตกต่างกับการแช่แข็งที่ระยะเวลา 10 นาทีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 7)

การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอด Centrifuge tube พบว่ามีความแตกต่างกันเมื่อใช้อุณหภูมิในการละลายต่างกัน โดยระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ถูกละลายที่อุณหภูมิที่ 10 และ 20 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกับระยะเวลาในการเคลื่อนของสเปิร์มที่ถูกละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยการละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเมื่อเปรียบเทียบกับการละลายที่อุณหภูมิ 30 และ 60 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างของเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับการละลายที่อุณหภูมิ 50 และ 70 องศาเซลเซียส ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำแข็งแห้งที่ใช้เวลา 10 และ 20 นาที มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับการแช่แข็งนาน 30 นาที (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางห่อหุ้มด้วยหลอด Centrifuge tube ด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาการแช่แข็งและอุณหภูมิการละลายต่างกัน

การละลายน้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	20	30
10°C /20S	27±3.33^{2,a}	36±2.94^{1,a}	29±3.51^{12,a}
20°C /15S	31±3.51^{12,a}	33±4.71^{1,a}	36±4.44^{1,a}
30°C /10S	47±4.71^{1,a}	36±4.44^{1,a}	42±4.01^{1,a}
40°C /8S	40±5.77^{1,a}	22±4.01^{2,b}	29± 3.51^{12,b}
50°C /5S	40±3.33^{1,a}	7±3.33^{3,b}	4±2.93^{3,b}
60°C /4S	31±4.84^{12,a}	22±2.22^{2,b}	27±4.71^{12,ab}
70°C /3S	16±4.44^{3,a}	4±2.94^{3,b}	2±2.22^{3,b}

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างเวลาแช่แข็ง
ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างการละลาย

ตารางที่ 8 ระยะเวลาการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางห่อหุ้มด้วยหลอด Centrifuge tube ด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาการแช่แข็งและอุณหภูมิการละลายต่างกัน

การละลายน้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	20	30
10°C /20S	119±14.54^{1,a}	125±10.13^{1,a}	85±16.82^{1,b}
20°C /15S	105±19.11^{1,a}	113±11.27^{1,a}	115±9.29^{1,a}
30°C /10S	83±13.03^{12,ab}	117±5.54^{1,a}	74±13.38^{12,b}
40°C /8S	107±18.31^{1,a}	68±15.15^{2,ab}	54±9.16^{2,b}
50°C /5S	49±10.64^{3,a}	25±15.93^{3,a}	22±14.42^{3,a}
60°C /4S	106±10.62^{1,a}	104±7.10 ^{1,a}	78±13.27^{12,b}
70°C /3S	27±10.82^{3,a}	12±10.59^{3,a}	12±12.22^{3,a}

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างเวลาแช่แข็ง
ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างการละลาย

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

5.1 ผลของสารละลายบัฟเฟอร์และสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยน้ำแข็งแห้ง

ผลการศึกษาการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตรด้วยการใช้ Ca-F HBSS ร่วมกับ DMSO หรือใช้ Ca-F HBSS ร่วมกับ Sucrose น่าจะมีความเป็นไปได้ในการนำมาพัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสมต่อไปเพื่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง เพราะชุดการทดลองเหล่านี้ ต่างก็มีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลาย (เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์ม) มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ โดยเฉพาะชุดการทดลองที่ใช้ Ca-F HBSS และ 10% DMSOO จึงควรนำมาพัฒนาการแช่แข็งน้ำเชื้อต่อไปเพื่อให้ได้เทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้งให้มีความเหมาะสม ประกอบกับการนำสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้งสองชนิด (DMSO และ Sucrose) ไปแช่แข็งน้ำเชื้อร่วมกับการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ HBSS หรือ 0.85% NaCl ต่างก็ยังคงทำให้คุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลายอยู่ในเกณฑ์เหมาะสม แม้ว่าคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลายมีค่าต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการแช่แข็งน้ำเชื้อด้วย Ca-F HBSS ร่วมกับ DMSO หรือใช้ Ca-F HBSS ร่วมกับ Sucrose แสดงให้เห็นว่า สารไครโอโพรเทคแทนท์ DMSO และ Sucrose มีความเหมาะสมในการนำมาใช้แช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยน้ำแข็งแห้ง

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยน้ำแข็งแห้งในเบื้องต้นแม้จะประสบผลสำเร็จแต่สเปิร์มมีการเคลื่อนที่หลังการละลายค่อนข้างต่ำกว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อสดค่อนข้างมาก รวมทั้งสเปิร์มที่มีชีวิตหลังการแช่แข็งก็มีค่าต่ำกว่าที่พบในน้ำเชื้อสดมากเช่นกัน แสดงว่ายังต้องมีการพัฒนาที่เหมาะสมต่อไปเพื่อให้คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งมีค่าใกล้เคียงกับคุณภาพน้ำเชื้อสด สาเหตุที่ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งในการศึกษาครั้งนี้มีคุณภาพต่ำกว่าคุณภาพน้ำเชื้อสด น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับอัตราการลดอุณหภูมิ (cooling rate) ที่เร็วเกินไป เพราะน้ำเชื้อที่อยู่ในหลอดฟางที่บอบบางเมื่อนำไปใส่ในน้ำแข็งแห้งที่มีอุณหภูมิ -79 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จะทำให้อุณหภูมิของน้ำเชื้อที่อยู่ในหลอดฟางลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้น้ำเชื้อแข็งตัวรวดเร็วเกินไป จึงต้องพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อเพื่อให้สามารถลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งให้มีความเหมาะสม เพื่อให้คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลาย มีคุณภาพไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด แนวทางหนึ่งที่เหมาะสมจำเป็นต้องใช้วัสดุที่เหมาะสมมาห่อหุ้มหลอดฟางทำหน้าที่เสมือนฉนวน เพื่อทำให้การลดอุณหภูมิไม่ลดลงเร็วเกินไป เพราะแหล่งความเย็นที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือน้ำแข็งแห้งที่มีอุณหภูมิคงที่ -79 องศาเซลเซียส ซึ่งไม่สามารถปรับลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งได้เช่นเดียวกับการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (controlled-rated programmable freezer) ที่สามารถปรับเลือกใช้อัตราการลดอุณหภูมิได้ตามต้องการในการแช่แข็ง หรือการแช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลวท่สามารถใช้ความสูงในการแช่แข็งเป็นตัวปรับให้มีการลดอุณหภูมิอย่างเหมาะสม (Ashwood-Smith, 1980; Draper et al., 2009; Sahinoz et al., 2018)

5.2 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลายที่มีต่อคุณภาพของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ผ่านการแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง

การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวให้มีคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลาย (post-thawed sperm quality) ที่ดีขึ้น โดยนำน้ำเชื้อมาเจือจางด้วย Ca-F HBSS และ 10% DMSO แล้วลดอุณหภูมิน้ำเชื้อในชุดทดลอง (treated groups) โดยใช้วัสดุห่อหุ้มหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตร ใน 3 รูปแบบได้แก่ หลอดสายไฟฟ้า สายหลอดซิลิโคน และหลอด Centrifuge tube แล้วทำการแช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำแข็งแห้งบดละเอียดนาน 10, 20 และ 30 นาทีจึงนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวและนำมาละลายใน Water bath ที่อุณหภูมิน้ำแตกต่างกัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่แช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำแข็งแห้งโดยไม่ห่อหุ้มหลอดฟาง (control group) พบว่าชุดการทดลองที่แช่แข็งน้ำเชื้อด้วยการใช้หลอดสายไฟฟ้าหุ้มหลอดฟาง ให้คุณภาพสเปิร์มหลังการละลายดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอีก 2 ชุดการทดลองที่ใช้สายหลอดซิลิโคน หรือหลอด Centrifuge tube โดยน้ำเชื้อแช่แข็งในชุดการทดลองที่ใช้หลอดสายไฟฟ้าห่อหุ้มหลอดฟาง โดยแช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำแข็งแห้ง 10 นาทีและละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 3) มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูง (78±2.2%) ไม่แตกต่างกับชุดควบคุม (แช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำแข็งแห้งโดยไม่ห่อหุ้มหลอดฟาง) ที่มีค่าประมาณ (86.7±6.7%) แสดงให้เห็นว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยน้ำแข็งแห้งให้มีคุณภาพดี ควรนำน้ำเชื้อที่เจือจางมาบรรจุในหลอดฟางขนาด 0.5 มิลลิลิตรที่หุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้าก่อนเริ่มทำการลดอุณหภูมิด้วยน้ำแข็งแห้ง อย่างไรก็ตามสาเหตุที่ทำให้การแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยน้ำแข็งแห้งได้ผลดีเมื่อนำหลอดฟางมาหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้าก่อนการแช่แข็ง อาจมีความเกี่ยวข้องกับหลอดสายไฟฟ้าที่ได้ผลิตมาจาก PVC (Polyvinyl chloride) ที่มีความหนา 0.14 เซนติเมตร สายไฟมีค่าการนำความร้อน 0.19 W/m K (The Engineering Tool Box. 2016) ซึ่งเมื่อใช้ Thermocouple-probe thermometer type K วัดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้าขณะแช่แข็งในน้ำแข็งแห้งก็สามารถคำนวณอัตราการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็ง (Cooling rate) ได้ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -31.8 องศาเซลเซียส/นาที ผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับการทดลองของ Yasui et al. (2008) ที่นำหลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร มาเป็นวัสดุห่อหุ้มหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตรเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อปลา loach (*M. anguillicaudatus*) โดยนำมาลดอุณหภูมิในน้ำแข็งแห้ง 2 นาที ซึ่งสามารถลดอุณหภูมิได้ในอัตรา -33.3±2.09 องศาเซลเซียส/นาที โดยมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา loach มีค่าใกล้เคียงกันกับการเคลื่อนที่สเปิร์มปลาตะเพียนขาวในการทดลองนี้ นอกจากนี้ผลการศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งเป็นแหล่งความเย็นในการลดอุณหภูมิซึ่งนอกจากสามารถใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวให้มีคุณภาพดีหลังการละลาย ยังมีประสิทธิภาพในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวได้ดีเช่นเดียวกับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (Boonthai et al., 2016c) หรือด้วยการใช้วิธีการลดอุณหภูมิด้วยไอไนโตรเจนเหลว (ปฏิญญา อ้นขวัญเมืองและคณะ, 2551) ที่ทำให้น้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งยังคงมีคุณภาพดีหลังการละลาย

การศึกษาผลของการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 7 ระดับ (10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส) ที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลาย พบว่าการละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าลดต่ำลง เมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิอื่นๆที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว โดยทั่วไปการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร เมื่อมีการใช้

อุณหภูมิในการละลายที่ 70 องศาเซลเซียส สามารถประสบความสำเร็จในปลาหลายชนิดเช่น ปลาไน (*Cyprinus carpio*; Irawan et al., 2010) ปลากะพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*; Vuthiphandchai et al., 2009a) เป็นต้น แต่ในการทดลองครั้งนี้กลับได้ผลไม่ดีเมื่อละลายน้ำเชื้อปลาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสในทุกชุดการทดลองที่หุ้มหลอดฟางด้วยหลอดสายไฟฟ้า สายหลอดซิลิโคน หรือหลอด Centrifuge tube แต่ได้ผลดีเมื่อละลายที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส ซึ่งการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้าเมื่อนำมาละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที ทำให้สเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงหลังการละลาย สาเหตุที่ทำให้การละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่ต่ำอาจมีความเกี่ยวข้องกับปริมาณการบรรจุน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ถูกเจือจางลงในหลอดฟาง เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้มีการบรรจุน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ถูกเจือจางลงไปเพียง 0.80 มิลลิลิตร ในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นการใช้น้ำเชื้อในปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆที่มักจะใส่น้ำเชื้อปริมาณมากถึง 0.20 มิลลิลิตร ในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้เมื่อมีการใช้อุณหภูมิละลายน้ำเชื้อที่สูงกับน้ำเชื้อที่มีปริมาณน้อย จึงอาจส่งผลทำให้อุณหภูมิน้ำเชื้อหลังการละลายภายในหลอดฟางมีค่าสูงขึ้นอย่างรวดเร็วหลังการละลาย ทำให้เซลล์สเปิร์มที่อยู่ภายในหลอดฟางได้รับความเสียหายจากความร้อนที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวหลังการละลายในชุดการทดลองที่ใช้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลง ดังนั้นการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรหากมีการบรรจุน้ำเชื้อในปริมาณน้อยกว่า 0.80 มิลลิลิตร จึงควรใช้อุณหภูมิในการละลายที่ต่ำลง เช่น ใช้อุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งระหว่าง 10-60 องศาเซลเซียส เช่นในการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลา loach (*M. anguillicaudatus*) ได้นำน้ำเชื้อปลา loach ที่แช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที (Yasui et al. 2008) หรือการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sturgeon เมื่อใช้หลอดฟางขนาด 0.5 มิลลิลิตร ควรใช้อุณหภูมิเพื่อการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 8 วินาที (Yamaner et al., 2015) หรือการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาช่อนทะเลในหลอดฟาง 0.25 มิลลิลิตรซึ่งได้บรรจุน้ำเชื้อปลาช่อนทะเลลงไป 0.23 มิลลิลิตรควรใช้อุณหภูมิสำหรับการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที (นิพนธ์ เสนอินทร์ และคณะ 2555) และยังสอดคล้องกับการการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งของปลากะรังหงส์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 8 วินาที (เรณู ยาชิโร และนิพนธ์ เสนอินทร์ 2551)

สรุปผลการทดลอง

1. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยน้ำแข็งแห้ง ควรทำโดยนำน้ำเชื้อสดมาเจือจางในสารละลาย Ca-F HBSS ที่มี DMSO ความเข้มข้นสุดท้าย 10% แล้วบรรจุในหลอดฟางขนาด 0.5 มิลลิลิตรที่ใช้หลอดสายไฟฟ้าหุ้มก่อนการแช่แข็งในน้ำแข็งแห้งบดละเอียด

2. ระยะเวลาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในน้ำแข็งแห้งบดละเอียดระหว่าง 10-30 นาที ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย

3. อุณหภูมิที่ใช้ละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว 10-60 องศาเซลเซียส ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย

เอกสารอ้างอิง

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน. 2545. การเก็บน้ำเชื้อปลาแช่แข็ง. วรสารการประมง. 55(1). หน้า 65-69.

กฤษณ์ มงคลปัญญา และนิศา ไชยรักษ์. 2539. สารไครโอโพรเทคแทนท์กับความเป็นพิษต่ออสุจิปลาดุกอุย. วารสารประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34 หน้า 339-345.

ปฏิญญา อ้นขวัญเมือง, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2551. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*) อย่างง่าย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 สาขาประมง หน้า 236-242.

นวลมณี พงศ์ธนา และ ทองอยู่ อุดเลิศ. 2547. การปรับปรุงพันธุ์ปลาตะเพียนขาว ศูนย์วิจัยและทดสอบ พันธุ์สัตว์น้ำปทุมธานี.

นิพนธ์ เสนอินทร์, ธีรวัฒน์ จริตงาม และเรณู ยาชิโร. 2555. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาช่อนทะเล, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) โดยวิธีการแช่แข็ง. เอกสารวิชาการฉบับที่ 35/2555. สฎนักวิจยัและ พฒันาประมงชายฝง่ กรมประมง

เรณู ยาชิโร และนิพนธ์ เสนอินทร์. 2551. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังหงส์, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes,1828) โดยวิธีแช่แข็ง. เอกสารวิชาการฉบับที่ 50/2551. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง.

เสน่ห์ ผลประสิทธิ์, ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล และ กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเพาะขยายพันธุ์ปลาบึก. วารสารการประมง 46(5) : 399-415

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2535. การเพาะพันธุ์ปลา. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. 194 หน้า.

Ashwood-Smith M.J. 1980. Low temperature preservation of cells, tissues and organs. In: *Low Temperature Preservation in Medicine and Biology* (ed. by M.J. Ashwood-Smith & J. Farrant), pp.19-44. Pitman Medical, Tunbridge Wells, UK.

Basavaraja, N. and Hegde, S.N. 2004. Cryopreservation of the endangered mahseer (*Tor khudree*) spermatozoa: I. Effect of extender composition, cryoprotectants, dilution ratio, and storage period on post-thaw viability. Cryobiology 49: 149-156.

Bobe, J. and Labbe, C. 2010. Egg and sperm quality in fish. General and Comparative Endocrinology 165: 535-548.

Alavi, S. M. H., Rodina, M., Policar, T., Kozak, P., Psenicka, M. and Linhart, O., 2007. Semen of *Perca fluviatilis* L.: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. Theriogenology 68: 276-283.

Ashwood-Smith M. J. 1980. Low temperature preservation of cells, tissues and organs. In: Low Temperature Preservation in Medicine and Biology. edited by M. J. Ashwood-Smith and J. Farrant. Pitman Medical, Tunbridge Wells. pp.19-44.

Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Nimrat, S. and Vuthiphandchai, V. 2016a. Effect of antibiotic supplementation on the quality of cryopreserved fish

sperm of silver barb (*Barbodes gonionotus*): Sperm motility and viability, bacterial quality and fertilization. Animal Reproduction Science 166: 36-46.

Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Nimrat, S. and Vuthiphandchai, V. 2016b. Morphological and morphometric evaluation of silver barb, *Barbodes gonionotus* (Bleeker, 1849) sperm supplemented with antibiotics. Journal of Applied Ichthyology 32: 480-485.

Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Sooksawat, T., Vuthiphandchai, V. and Nimrat, S. 2016c. Evaluation of the potential source of bacterial contamination during cryopreservation process of silver barb (*Barbodes gonionotus*) sperm. Aquaculture Research 47: 2101-2113.

Bozkurt, Y. and Yavas, I. 2017. Effect of different straw volumes and thawing rates on post-thaw quality and fertilization ability of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. LIMNOFISH-Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research 3(1): 25-31.

Büyükhatipoglu, S. and Holtz, W. 1984. Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)-Effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. Aquaculture 37: 63-71.

Conget, P., Fernandez, M., Herrera, G. and Minguell, J.J. 1996. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. Aquaculture 143: 319-329.

Draper, B. W., Stout, J., Hernandez, R. and Moens, C. 2009. A High-throughput sperm freezing protocol for zebrafish cryopreservation. *Journal of Visualized Experiments, 29,*1395.

Draper, B.W. and Moens, C.B. 2009. A High-throughput method for zebrafish sperm cryopreservation and in vitro fertilization. JoVE. 29. http: //www.jove.com/ index/Details.stp?ID=1395, doi: 10.3791/1395

Fribourgh, J.H. 1966. The application of a differential staining method to low-temperature studies on goldfish spermatozoa. Progressive Fish Culturist 28: 227-230.

Glogowski, J., Kolman, R., Szezepkowski, M., Horvath, A., Urbanyi, B., Sieczynski, P., Rzemieniecki, A., Domagala, J., Demianowicz, W., Kowalski, R., and Ciereszko, A. 2002. Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri,* Brandt) milt cryopreserved with methanol. Aquaculture 211: 367-373.

Gwo, J.H., Strawn, K., Longnecker, M.T. and Arnold, C.R. 1991. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. Aquaculture 94: 355-375.

Horváth, A. and Urbanyi, B. 2000. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved of African catfish sperm, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). Aquaculture Research 31: 317-324.

Horváth, A., Urbanyi, B., Wang, C., Onders, R.J. and Mims, S. D. 2010. Cryopreservation of paddlefish sperm in 5-mL straws. Journal of Applied Ichthyology 26: 715-719.

Irawan H., Vuthiphandchai, V. and Nimrat, S. 2010. The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. Animal Reproduction science 122: 236-243.

Jamieson, B. G. M. 1991. Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa. With a survey of lophophorate, echinoderm and protochordate sperm and an account of gamete cryopreservation. Cambridge University Press, Cambridge. Xiv. 319 pp. ISBN 0-521-41304-4.

Ji, X.S., Chen, S.L., Tian, Y.S., Yu, G.C., Sha, Z.X., Xu, M.Y. and Zhang, S.C. 2004. Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) spermatozoa and feasibility for production-scale fertilization. Aquaculture 241: 517-528.

Kamaruding, N.A., Embong, W.K.W. and Abdullan, R.B. 2012. Frozen-thawed Sperm Motility Characteristics of African catfish (*Clarias gariepinus*) by using glycerol or DMSO based extender. International Journal of Environmental Science and Development 3(1): 49-55.

Martínez-Páramo, S., Horváth, A., Labbe, C., Zhang, T., Robles, V., Herráez, P., Suquet, M., Ada, S., Viveiros, A., Tiersch, T.R. and Cabrita, E. 2017. Cryobanking of aquatic species. Aquaculture 472: 156-177.

Mansour, N., Richardson, G.F. and McNiven, M.A. 2006. Effect of extender composition and freezing rate on post-thaw motility and fertility of Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.), spermatozoa. Aquaculture Research 37: 862-868.

Mongkonpunya, K., Chairak, N., Pupipat, T. and Tiersch, T.R. 1995. Cryopreservation of Mekong giant catfish sperm. Asian Fisheries Science 8: 211-221.

Muchlisin, Z.A., Hashim, R. and Chong, A.S.C. 2004. Preliminary study on the cryopreservation of tropical bagrid catfish (*Mystus nemurus*) spermatozoa; the effect of extender and cryoprotectant on the motility after short-term storage. Theriogenology 62: 25-34.

Mylonas, C.C., Gissis, A., Magnus, Y. and Zohar, Y., 1997. Hormonal changes in male white bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt quality after treatment with a sustained-release GnRHa delivery system. Aquaculture 153: 301-313.

Rana, K.J. and McAndrew, B.J. 1989. The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. Aquaculture 76: 335-345.

Richardson, G. F., Connie, E. W., Laurence, W. C. and Yao, Z. 1999. Cryopresevation of yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) semen in large straws. Aquaculture 174: 89-94.

Rideout, R.M., Litvak, M.K. and Trippel, E.A. 2003. The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents. Aquaculture Research 34: 653-659.

Sahinoz, E., Dogu, Z. and Aral, F. 2018. The Development of optimal cryopreservation media for longspine scraper (*Capoeta trutta*) sperm. Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology 6(3): 380-386.

Sansone, G., Fabbrocini, A., Ieropoli, S., Langellotti, A.L., Occidente, M. and Matassino, D. 2002. Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) spermatozoa after thawing. Cryobiology 44: 229-239.

Scott, A.P. and Baynes, S.M. 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. Journal of Fish Biology 17: 707-739.

Seidel, G. E. 1984. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: Proceeding no. 70: Bovine embryo transfer workshop. The University of Sydney, Sydney, Australia, 107-114.

The Engineering Tool Box. 2016. Plastics-Thermal Conductivity Coefficients. เขฎถึงได้จาก http://www.engineeringtoolbox.com/thermalconductivity-plastics-d_1786.html วันที่ค้นข้อมูล 7 พฤศจิกายน 2559

Vuthiphandchai, V. and Zohar, Y. 1999. Age-related sperm quality of captive striped bass, *Morone saxatilis*. Journal of the World Aquaculture Society. 30: 65-72.

Vuthiphandchai, V., Chomphuthawach, S. and Nimrat, S. 2009a. Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability and fertilization capacity. Theriogenology 72: 129-138.

Vuthiphandchai, V., Thadsri, I. and Nimrat, S. 2009b. Chilled storage of walking catfish (*Clarias macrocephalus*) semen. Aquaculture 296: 58-64.

Vuthiphandchai, V., Wilairattanadilok, K., Chomphuthawach, S., Sooksawat, T. and Nimrat, S. 2015. Sperm cryopreservation of silver barb (*Barbodes gonionotus*): cryoprotectants, cooling rate and storage time on sperm quality. Aquaculture Research 46: 2443-2451.

Yamaner, G., Ekici, A., Tuncelli, G. and Memis, D. 2015. A brief overview on cryopreservation method of sturgeon sperm. Journal of fisheries & aquatic sciences 30(2): 14-20.

Yasui, G.S., Arias-Rodriguez, L., Fujimoto, T. and Arai, K. 2008. Simple and inexpensive method for cryopreservation of fish sperm combining straw and powdered dry ice. CryoLetters 29 (5): 383-390.

Yavas, I. and Bozkurt, Y. 2011. Effect of different thawing rates on motility and fertilizing capacity of cryopreserved grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) sperm. Biotechnology and Biotechnological Equipment. doi: 10.5504/BBEQ.2011.0018.

Zhang, Y.Z., Zhang, S.C., Liu, X.Z., Xu, Y.Y., Wang, C.L., Sawant, M.S., Li, J. and Chen, S.L2003. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. Theriogenology 60(5): 989-996.

.

ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่และหน้า)

1. อมรรัตน์ กิระวานิชย์, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2560. การพัฒนาเทคนิคแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในหลอดฟางด้วยน้ำแข็งแห้ง. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม. หน้า 607-612.

2. การจดสิทธิบัตร

-

3. ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำเสนอไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป)

-

4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

-