สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การประยุกต์ใช้เทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็ง เพื่อการเพาะขยายพันธุ์

Application of cryopreservation technique on catfish spermatozoa for artificial propagation

โดย

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[1]
สุบัณฑิต นิ่มรัตน์[2]
มานพ กาญจนบุรางกูร[3]

[1]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
[2]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
[3]ภาควิชาประมง สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตบางพระ

ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา

Bu 0104444
- 9 มี.ค. 2552
25153 3
เริ่มบริการ
- 3 มิ.ย. 2552

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) แบบแช่แข็งมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ และศึกษาผลของการแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ อัตราการละลาย และระยะเวลาเก็บรักษาแตกต่างกันที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยได้แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ตอน คือ ตอนที่ 1 ทดสอบความเป็นพิษของสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด ได้แก่ Dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol และ ethanol ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ (5%, 10%, 15% และ 20%) ที่เวลา 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที และใช้อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ เท่ากับ 1:1 พบว่า สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 3 ชนิดมีความเป็นพิษต่อสเปิร์มอยู่ในเกณฑ์ที่ต่ำ เนื่องจาก ยังคงสามารถทำให้ สเปิร์มมีชีวิตอยู่ได้นาน 180 นาที ตอนที่ 2 ได้ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุย แบบแช่แข็ง โดยใช้สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด คือ DMSO, methanol และ ethanol ความเข้มข้น 4 ระดับ (5%, 10%, 15% และ 20%) และอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาต่อสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ เท่ากับ 1:1:1 และใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (10 องศาเซลเซียส ต่อนาที), อัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง (5 องศาเซลเซียส ต่อนาที) และอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า (3 องศาเซลเซียส ต่อนาที) พบว่า น้ำเชื้อปลาดุกอุยที่แช่แข็งด้วย DMSO มีการเคลื่อนที่หลังการละลาย (thawing) ที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 5 วินาที แต่น้ำเชื้อปลาดุกอุยที่แช่แข็งด้วย methanol และ ethanol ไม่เคลื่อนที่หลังการละลาย ตอนที่ 3 ได้นำน้ำเชื้อดุกอุยแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 30, 50 และ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที ไม่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของ สเปิร์มหลังการละลายมีค่าแตกต่างกัน และการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวระหว่าง 0-60 วันก็ไม่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายเช่นกัน ตอนที่ 4 การปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่ผ่านการแช่แข็ง พบว่า การใช้สารละลาย 10% DMSO, และ 5% DMSO ที่ระดับอัตราการลดอุณหภูมิ 3 และ 5 องศาเซลเซียส ต่อนาที ให้เปอร์เซ็นต์อัตราการปฏิสนธิ ต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสดในกลุ่มควบคุม

Abstract

The objective of this study was to evaluate the toxicity effect of cryoprotectants on sperm motility and study the effects of cooling rate, thawing rate and storage period on sperm motility of Gunther's catfish (*Clarias macrocephalus*). In the first experiment, three cryoprotectant solutions (DMSO, methanol and ethanol) were prepared and diluted with catfish milt at four concentration levels (5%, 10%, 15% and 20%) prior to assessment of sperm motility at different time (0, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 minutes) at a dilution ratio of 1:1. The results showed that the three cryoprotectants had low toxicity on sperm motility, since the motility was maintained up to 180 minute before loss of motility.

In the second experiment, catfish milt was cryopreserved with the three cryoprotectants at four levels (5%, 10%, 15% and 20%) using three rate of cooling (slow freezing, medium freezing and fast freezing). The results indicated that only sperm samples cryopreserved with DMSO showed motility, while those cryopreserved with methanol and ethanol did not show sperm motility. There was no significant difference ($P > 0.05$) in sperm motility of frozen samples after using various thawing rate (30, 50 and 70°C for 5 seconds) or storage in liquid nitrogen during 0-60 days. There was no significant difference ($P > 0.05$) in the fertilization rate of catfish eggs after insemination with cryopreserved catfish sperm using 5% and 10% DMSO, although high fertilization rate was observed in the control group (freshly collected milt).

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยเรื่อง การประยุกต์ใช้เทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็งเพื่อการเพาะขยายพันธุ์สำเร็จเรียบร้อยลงได้ตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2546 จากสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา กระทรวงศึกษาธิการ ที่ทำให้การวิจัยดำเนินตาม ข้าพเจ้าขอขอบคุณ คุณวันชัย แสนคำลือ และคุณศิริพร คชรัตน์ ที่ได้ช่วยดูแลปลาทดลอง วิเคราะห์ข้อมูล และประสานงานระหว่างการวิจัย รวมทั้ง ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้โรงเพาะฟัก และอุปกรณ์ต่างๆระหว่างการศึกษาด้วยดีตลอดมา ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย

สิงหาคม 2547

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ.....i

Abstract.....ii

กิตติกรรมประกาศ.....iii

สารบัญ.....iv

สารบัญภาพ.....v

สารบัญตาราง.....vi

บทที่

1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย 1

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....3

3. ประโยชน์ที่ได้รับ.....3

4. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3

5. วิธีดำเนินการทดลอง.....4

6. ผลการศึกษา.....9

7. อภิปรายผลการทดลอง.....19

8. สรุปผลการทดลอง.....23

9. เอกสารอ้างอิง.....24

10. ภาคผนวก.....26

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) หลังจากเจือจางใน DMSO ที่ความเข้มข้น และเวลาต่างๆ กัน.....10

2 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) หลังจากเจือจางใน Methanol ที่ความเข้มข้น และเวลาต่างๆ กัน.....11

3 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) หลังจากเจือจางในEthanol ที่ความเข้มข้น และเวลาต่างๆ กัน.....12

4 แสดงเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) หลังจากการแช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20%.....13

5 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) หลังจากการแช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลายต่างๆกัน.....15

6 เปอร์เซ็นต์อัตราการปฏิสนธิไข่ปลาดุกอุยที่ได้รับการปฏิสนธิ จากน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่ผ่าน การแช่แข็งในสารละลาย DMSO.....18

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) หลังการเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวที่เวลาต่างๆกัน เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า.....16

2 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) หลังการเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวที่เวลาต่างๆกัน เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง.....17

1. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทยมีความเจริญก้าวหน้าอยู่ในแนวหน้าของโลก ไม่ว่าจะเป็นเทคนิคการเพาะพันธุ์ การอนุบาล และการเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดต่างๆได้มีการพัฒนามาอย่างต่อเนื่องและยาวนาน อย่างไรก็ตามปัญหาหนึ่งที่มักเกิดขึ้นอยู่เสมอในระหว่างการเพาะพันธุ์ปลาก็คือ พ่อแม่พันธุ์ปลาที่ใช้เพาะพันธุ์มีความสมบูรณ์เพศไม่พร้อมกัน ทำให้เกิดปัญหาในด้านการจัดการในโรงเพาะฟัก เช่น ในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (spawning season) พ่อพันธุ์จะมีปริมาณน้ำเชื้อลดลง ซึ่งแม้ว่าสามารถกระตุ้นได้โดยการฉีดฮอร์โมนให้ปลาสร้างน้ำเชื้อแต่กลับพบว่าแม่พันธุ์มีไข่แก่น้อยมาก ทำให้การเพาะพันธุ์ไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร เพราะโดยทั่วไปแล้วช่วงระยะเวลาที่พ่อพันธุ์สมบูรณ์เพศ มักจะเกิดก่อน แต่จะยาวนานกว่าช่วงระยะเวลาที่แม่พันธุ์สมบูรณ์เพศ นอกจากนี้ในบางครั้งช่วงระยะเวลาที่สามารถรีดน้ำเชื้อได้ (sperm availability) ก็ไม่สัมพันธ์กับช่วงระยะเวลาที่แม่พันธุ์ตกไข่ (egg availability) ซึ่งก็อาจเกิดจากพ่อพันธุ์ถูกรีดน้ำเชื้อบ่อยครั้งจนไม่สามารถผลิตน้ำเชื้อได้ทัน หรือเกิดจากความแปรปรวนของปลาแต่ละตัว (individual variation) ที่ผลิตน้ำเชื้อได้ต่างกัน ทำให้ยุ่งยากในการจัดการในระหว่างการผสมเทียมในโรงเพาะฟักเป็นอย่างมาก อีกทั้งการใช้น้ำเชื้อปลาที่รีดออกมาใหม่ๆ (freshly collected milt) เพื่อการผสมเทียมนั้นก็มีข้อจำกัดตรงที่จะต้องใช้ผสมเทียมทันที ไม่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้นาน เพราะคุณภาพน้ำเชื้อลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ผสมไม่ติด ดังนั้นการเพาะพันธุ์ปลาโดยการผสมเทียมจำเป็นต้องมีการพัฒนาเทคนิควิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพื่อให้มีน้ำเชื้อที่พร้อมอยู่ตลอดเวลาเพื่อการผสมเทียม และสามารถใช้ได้สะดวกรวดเร็วตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ เมื่อแม่ปลามีความพร้อมในการเพาะขยายพันธุ์

ปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) เป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ชนิดหนึ่งของประเทศไทย เนื่องจากนิยมใช้เป็นแม่พันธุ์สำหรับการผลิตปลาดุกลูกผสม ระหว่างปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) และปลาดุกรัสเซีย (*C. gariepinus*) ซึ่งเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย และ สำหรับการผลิตปลาดุกอุยเพื่อการบริโภค ปลาดุกนับได้ว่าเป็นปลาเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่นิยมในการบริโภค เพราะเลี้ยงง่าย โตเร็ว รสชาติดี เนื้อนุ่มอร่อย และมีการเลี้ยงทั่วประเทศ รวมทั้งจังหวัดในภาคตะวันออก โดยทั่วไปปลาดุกอุยเป็นปลาที่ได้รับความนิยมในการบริโภคสูง และยังเป็นปลาที่มีราคาจำหน่ายสูงกว่าปลาดุกชนิดอื่น ๆ (วิทย์ และคณะ, 2525) เช่นดุกด้าน ดุกเทศ ดุกลำพัน เป็นต้น จึงมีการเพาะขยายพันธุ์ปลาดุกอุยกันอย่างกว้างขวาง มีโรงเพาะฟัก และฟาร์มเลี้ยงปลาดุกจำนวนมากในจังหวัดชลบุรี และ ฉะเชิงเทราที่ผลิตลูกปลาดุก และ เลี้ยงปลาดุกร่วมกับปลาชนิดอื่นๆแบบผสมผสานเพื่อลดต้นทุนการผลิต ปัญหาหนึ่งที่ผู้เพาะพันธุ์ปลาดุกอุยจะพบเสมอทุกครั้งในการเพาะพันธุ์ปลาดุกอุย คือการที่จะต้องผ่าท้องปลาดุกเพศผู้เพื่อนำเอาอัณฑะออกมาขยี้ผสมเทียมกับปลาดุกเพศเมีย เนื่องจากปลาดุกมีผนังท้องที่หนา ไม่สามารถรีด

น้ำเชื้อโดยการกดบริเวณส่วนท้องเหมือนปลาชนิดอื่น ๆ ได้ เพราะตำแหน่งของอัณฑะปลาดุกอยู่ลึกลงไปในช่องท้องใกล้บริเวณกระดูกสันหลัง ทำให้ไม่สามารถรีดน้ำเชื้อออกมาภายนอกตัวได้เหมือนปลาชนิดอื่นๆ จึงมีผลทำให้การเพาะขยายพันธุ์ปลาดุกอุยในแต่ละครั้งจึงจำเป็นต้องฆ่าปลาตัวผู้เพื่อเอาอัณฑะมาขยี้เอาน้ำเชื้อออกมาใช้ผสมเทียมกับไข่ปลาดุก ดังนั้นการใช้น้ำเชื้อที่ได้มาจากการผ่าท้องปลาแต่ละครั้งจึงควรใช้ให้คุ้มค่าที่สุด ถ้ามีน้ำเชื้อเหลือก็ควรมีการเก็บแช่แข็งเอาไว้ใช้ในครั้งต่อไป เนื่องจากน้ำเชื้อที่เหลือใช้จะมีชีวิตอยู่ได้ไม่นาน ถ้าเก็บในตู้เย็นธรรมดาอาจยืดการมีชีวิตได้อย่างมากไม่เกิน 1 วันเท่านั้น จากเหตุผลที่กล่าวมานี้จะเห็นได้ว่าการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็ง สามารถช่วยให้มีการใช้น้ำเชื้ออย่างคุ้มค่า ทำให้สามารถลดการสูญเสียน้ำเชื้อ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการรักษาสายพันธุ์ปลาดุกอุยให้คงอยู่ อีกทั้งการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งนั้นยังช่วยเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์ได้นานเป็นปี ทำให้สะดวกต่อการเพาะพันธุ์ และสามารถเพาะพันธุ์ปลาดุกได้ตลอดปี ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้เพาะและเลี้ยงปลาดุกอุยต่อไปในอนาคต

ในปัจจุบันการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในต่างประเทศนิยมทำในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและใกล้สูญพันธุ์ทั้งปลาน้ำจืด และปลาทะเล เช่น ปลากระพงขาว ปลา salmon ปลา channel catfish ปลา sea bream และปลา Atlantic croaker เป็นต้น การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานเป็นปี เมื่อต้องการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในการผสมเทียมก็นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อมาละลายโดยการเพิ่มอุณหภูมิ ดังนั้นความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ และชนิดสาร cryoprotectants ที่เหมาะสม (Rana และ McAndrew, 1989) อัตราการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็ง (freezing) และการเพิ่มอุณหภูมิขณะละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (Scott และ Baynes, 1980) นอกจากนี้ความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อปลาที่เกิดขึ้นในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และ เทคนิคของการทำน้ำเชื้อปลาแช่แข็ง ก็มีผลทำให้ความสำเร็จของการทำน้ำเชื้อแช่แข็งแต่ละครั้งแตกต่างกันไป โดยทั่วไปน้ำเชื้อของปลา (milt) ประกอบด้วย สเปิร์ม (sperm) และของเหลวที่หล่อเลี้ยง (seminal fluid) โดยที่สเปิร์มปลาน้ำจืดจะไม่เคลื่อนที่ขณะอยู่ในถุงอัณฑะ หรือของเหลวที่หล่อเลี้ยง แต่จะมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วมากเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสภาพแวดล้อมภายนอก และจะหยุดเคลื่อนที่ภายใน 1 นาทีหลังจากถูกกระตุ้น กลไกที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาน้ำจืดพบว่าสารละลายที่มีค่า osmolarity ต่ำกว่า (hypotonicity) ระดับที่พบใน seminal fluid จะกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ แต่ในปลาทะเลนั้นสารละลายที่มีค่า osmolarlity สูงขึ้น (hypertonicity) จะกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ (Morisawa และคณะ, 1983) ดังนั้นการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ จึงมีความสำคัญมาก เพราะทำให้ สเปิร์มไม่ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ขณะอยู่ในระหว่างการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง เพราะถ้าสเปิร์มถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ก่อนที่จะทำการแช่แข็งนั้น ก็จะมีผลทำให้การแช่แข็งน้ำเชื้อประสบความล้มเหลวทันที

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1. ศึกษาวิธีการผลิตน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็งที่มีประสิทธิภาพเพื่อใช้ในการผสมเทียม

2.2. ศึกษาชนิดของไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectants) ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็ง

3. ประโยชน์ที่ได้รับ

3.1 ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็ง

3.2 ทำให้ทราบถึงชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลาดุกอุย และวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง

3.3 ได้พัฒนาเทคโนโลยีการเก็บน้ำเชื้อปลาแช่แข็งเพื่อการผสมเทียมปลาโดยสามารถเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งได้ในระยะเวลาที่นาน และนำมาใช้ได้สะดวก

4. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

งานวิจัยด้านการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งโดยทั่วไปมีขั้นตอนการทำงานที่คล้ายกันในการทดลองในปลาหลายๆชนิด โดยความสำเร็จที่ได้ส่วนมากมีความแตกต่างกันไปในปลาแต่ละชนิดทั้งในแง่ของชนิดและความเข้มข้นของ cryoprotectants ที่ใช้ อัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็ง และ อัตราการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ดังนั้นพัฒนาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยจึงต้องเริ่มจากการนำเอาสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับปลาเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุก ซึ่งจะต้องไม่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่มาเจือจางน้ำเชื้อ แล้วจึงนำไปผสมด้วย cryoprtectants ชนิดต่างๆ ที่เวลาต่างๆกันเพื่อดูความเป็นพิษของ cryoprotectants ที่อาจมีต่อสเปิร์ม จากนั้นจึงใช้อัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็ง และ อัตราการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อละลายน้ำเชื้อที่แตกต่างกันโดยมีสมมติฐานว่าความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยครั้งนี้ขึ้นอยู่กับการเลือกใช้ชนิดและระดับของ cryoprtectants ที่เหมาะสม และ การลดหรือเพิ่มอุณหภูมิอย่างเหมาะสมดังที่ปรากฏในงานวิจัยเหล่านี้

นลินี มารคแมน และคณะ (2526) ได้ทำการเก็บน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี lecithin และ mannitol เป็นองค์ประกอบ ปรากฏว่าประสบความล้มเหลว

Gwo และคณะ (1991) ได้ศึกษาการเก็บน้ำเชื้อปลา Atlantic croaker แบบแช่แข็ง พบว่า sperm extender ที่ประกอบด้วย เกลือแกง กลูโคส และ ซูโครส สามารถใช้เจือจางน้ำเชื้อขณะทำการแช่แข็ง โดยมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ sperm extender ชนิดอื่นๆ ที่มีความสลับซับซ้อน หรือมีสารเคมีหลายชนิด

เป็นองค์ประกอบ และยังพบว่าอัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็งตั้งแต่ –10 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง –150 องศาเซลเซียส/นาที ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิขณะนำมาผสมกับไข่

Rana และ McAndrew (1989) รายงานการทำน้ำเชื้อปลานิลแช่แข็งโดยเจือจางน้ำเชื้อในสารละลาย Ringer ที่มี methanol เป็น cryoprotactant ที่ระดับต่างๆกัน ในหลอดฟางขนาด 0.5 ml. พบว่าการใช้ methanol 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลดีที่สุดในการปกป้องเซลล์ และการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งในอัตราที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 5 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 50 องศาเซลเซียส/นาที ก่อนเก็บในไนโตรเจนเหลว ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ

Conget และคณะ (1996) ใช้ cryoprotectant ต่างๆชนิด ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา rainbow trout แบบแช่แข็ง พบว่า การใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) ร่วมกับ sucrose ให้ผลดีที่สุดในการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยระยะเวลาที่เจือจางน้ำเชื้อใน cryoprotectant ก่อนทำการแช่แข็งไม่ควรเกิน 10 นาที และการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งอย่างรวดเร็ว (30 องศาเซลเซียส/นาที) มีผลทำให้สเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวที่สูงกว่าการลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ (1 องศาเซลเซียส/นาที และ 10 องศาเซลเซียส/นาที)

Tiersch และคณะ (1994) ได้นำน้ำเชื้อปลา channel catfish มาแช่แข็งโดยผสม cryoprotectant ต่างๆชนิด และ Hank's balanced salt solution ลงไปในน้ำเชื้อ พบว่า methanol ให้ผลดีที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยที่สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ และมีความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่เทียบเท่ากับ การใช้น้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ๆ

5. วิธีดำเนินการทดลอง

5.1 <u>การรวบรวมน้ำเชื้อ</u>

พ่อพันธุ์ปลาดุกอุยถูกรวบรวมและลำเลียงจากบริเวณ จังหวัดปทุมธานี มายังโรงเพาะฟักของภาควิชาวารินชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ปลาถูกชั่งน้ำหนัก วัดความยาว ก่อนที่จะถูกรีดน้ำเชื้อออกมาเพื่อประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อโดยประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ปลาดุกอุยเพศผู้ถูกผ่าท้องเอาอัณฑะออกมาเพื่อรวบรวมน้ำเชื้อไปศึกษาความเป็นพิษของสาร cryoprotectants ที่มีต่อการมีชีวิตรอดของสเปิร์ม และการแช่แข็งน้ำเชื้อต่อไป น้ำเชื้อที่ใช้ในการศึกษาถูกรวบรวมจากตัวผู้หลายตัว (pooled milt samples) เพื่อลดความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อ (individual variation) ปลาเพศผู้ที่รวบรวมมาทั้งหมดได้ถูกพักไว้ในโรงเพาะฟักไม่เกิน 3 วันก่อนที่จะผ่าท้องเอาอัณฑะออกมารวบรวมน้ำเชื้อต่อไป น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีเท่านั้นได้ถูกนำมาใช้ในการทดลองโดยต้องเป็นน้ำเชื้อที่มีลักษณะขาวขุ่น และไม่มีเมือก หรือ เลือดปน และมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่สูง (มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์) เท่านั้น น้ำเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ไม่ได้นำมาใช้ใน

การทดลองเพื่อให้มั่นใจว่าขณะเริ่มการทดลองน้ำเชื้อปลามีคุณภาพดีพอ พ่อพันธุ์ที่มีน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีผ่านหลักเกณฑ์ที่วางไว้ได้ถูกรวบรวมน้ำเชื้อเพื่อนำไปศึกษาต่อไปโดยการใช้หลอด syringe ขนาด 1 ซีซี รวบรวมน้ำเชื้อไปใส่ใน tissue culture flask ขนาด 25 ซีซี แล้วจึงเก็บไว้บนน้ำแข็งเพื่อรักษาคุณภาพสเปิร์มไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลง น้ำเชื้อเหล่านี้จะถูกเก็บไว้บนน้ำแข็งอย่างมากไม่เกิน 1 ชั่วโมงในระหว่างขั้นตอนการทำน้ำเชื้อแช่เย็นและแช่แข็ง

ความหนาแน่นของสเปิร์มประเมินโดยการเจือจางน้ำเชื้อ (10 μl) ด้วย 0.9% saline 5,000 เท่า ผสมให้เข้ากันใน vial ด้วยการใช้ vortexer แล้วจึงนำน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางไปหยดบน hemacytometer และนับจำนวนสเปิร์มที่พบโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า แล้วจึงคำนวณกลับหาความหนาแน่นของสเปิร์ม การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มทำโดยการหยดตัวอย่างน้ำเชื้อ (5 μl) ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาดแล้วจึงหยด 0.4% NaCl ลงไป 100 μl พร้อมกับปิดด้วย cover glass เบาๆอย่างรวดเร็ว เพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่แล้วจึงประเมินเปอร์เซนต์ที่สเปิร์มเคลื่อนที่ทันทีให้เสร็จภายใน 15 วินาที โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มประเมินจากจำนวณสเปิร์มที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าอย่างรวดเร็วเมื่อถูกกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl โดยแบ่งระดับที่สเปิร์มเคลื่อนที่ไว้ 6 ระดับ คือ สเปิร์มที่เคลื่อนที่ได้ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100%

5.2 <u>การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็ง</u>

5.2.1 <u>ศึกษาความเข้มข้นของ cryoprotectants ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม</u>

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทราบความเข้มข้นของ cryoprotectants ที่เหมาะสมก่อนที่จะนำไปใช้ในการทำน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง การทดลองเริ่มจากนำน้ำเชื้อของปลาดุกอุยมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม โดยใช้น้ำเชื้อ 2 ml. เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ภายใน tissue culture flask ขนาด 75 cm^3 ในขณะเดียวกัน cryoprotectants ชนิดต่างๆ จะถูกเตรียมขึ้นมาแล้วทำการผสมเข้ากับน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง เพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นของ cryoprotectants ตามที่ต้องการ cryoprotectants ที่ใช้ ได้แก่ dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol และ ethanol ซึ่งจะออกฤทธิ์ภายในเซลล์ป้องกันเซลล์ขณะแช่แข็ง cryoprotectants แต่ละชนิดจะถูกผสมไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางเพื่อให้มีความเข้มข้นเป็น 5%, 10%, 15% และ 20% การเช็คเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่เคลื่อนที่ในการทดลองนี้จะทำในระยะเวลาต่างๆกัน ตั้งแต่ 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที หลังจากใส่ cryoprotectants ลงไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มกับกลุ่มควบคุมซึ่งใช้น้ำเชื้อที่เจือจางด้วย 0.4%NaCl การทดลองในขั้นตอนนี้ทำให้ช่วงต่างๆของฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ทำให้ทราบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ระยะเวลาต่างๆกันก่อนที่จะทำการแช่แข็ง

5.2.2 ศึกษาการทำน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็ง

การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็งในแต่ละชุดการทดลองทำโดยการรวบรวมเอาน้ำเชื้อปลาดุกอุย 10-15 ตัว (pooled milt) เพื่อให้ได้น้ำเชื้อปริมาตรรวมอย่างน้อย 5 มิลลิลิตร น้ำเชื้อถูกนำมาเจือจางในสารละลาย Calcium-free Hank's Balanced Salt Solution (C-F HBSS) ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร แล้วจึงผสม cryoprotectants ได้แก่ DMSO, methanol และ ethanol ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5%, 10%, 15% และ 20% แล้วปล่อยไว้ 10 นาที เพื่อให้เกิดสภาพสมดุลย์ของสารละลาย (equilibrium) ก่อนที่น้ำเชื้อจะถูกรวบรวมไว้ในหลอดฟาง (straws) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร การทดลองของแต่ละชุดการทดลองได้ใช้ straw 6 หลอด (replications) ทำการแช่แข็งในช่วงฤดูผสมพันธ์วางไข่ การทำน้ำเชื้อแช่แข็งทำโดยนำหลอดฟางเหล่านี้มาแช่แข็ง (freezing) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับได้แก่ อัตราการลดอุณหภูมิที่ช้า (3 °C/นาที จากอุณหภูมิ 25°C จนเป็น –40°C ก่อนที่จะอยู่ในอุณหภูมิ –196°C ทันที) อัตราการลดอุณหภูมิปานกลาง (5 °C/นาที จากอุณหภูมิ 25°C จนเป็น –40°C ก่อนที่จะอยู่ในอุณหภูมิ –196°C ทันที) และ อัตราการลดอุณหภูมิที่รวดเร็ว (10 °C/นาที จากอุณหภูมิ 25°C จนเป็น –40°C ก่อนที่จะอยู่ในอุณหภูมิ –196°C ทันที) การลดอุณหภูมิได้ทำใน programmable controlled rate freezer ซึ่งมีความเที่ยงตรงอย่างมากในการลดอุณหภูมิโดยการใช้ไนโตรเจนเหลว น้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวระยะเวลาหนึ่งและได้ถูกนำมาเพิ่มอุณหภูมิอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 70-80°C จนน้ำเชื้อแช่แข็งละลายเป็นของเหลว (thawing) และนำไปประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

5.3 ศึกษาผลของการเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

จากการศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยพบว่า DMSO เป็นสาร cryoprotectant ที่ดีที่สุดสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในขั้นตอนต่อมาจึงได้เลือก DMSO มาแช่แข็งน้ำเชื้ออีกครั้งหนึ่ง แล้วเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196°C) นาน 1 วัน จึงนำหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อออกมาละลายในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิต่างๆกัน 3 ระดับได้แก่ 30, 50 และ 70 องศาเซลเซียส โดยนำหลอดฟางเหล่านั้นมาแช่น้ำนาน 5 วินาทีทำให้น้ำเชื้อที่แข็งตัวละลายเป็นของเหลวดังเดิม จากนั้นตัดปลายหลอดฟางแล้วนำน้ำเชื้อออกมาประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มโดยทำการทดลอง 6 ซ้ำ

5.4 ศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C)

ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในน้ำยาสูตร C-F HBSS ที่มี DMSO ความเข้มข้น 5% และ 10% อัตราส่วน 1:1 โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า (3 °C /นาที) และอัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง (5 °C /นาที) ตามวิธีการที่ได้กล่าวมาก่อนหน้านี้ จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งเหล่านั้นมาเก็บไว้ในถังเก็บไนโตรเจนเหลวเป็นเวลาต่างๆกัน 0, 7, 14, 28, 35 และ 60 วัน เมื่อครบกำหนดเวลาเก็บจึงนำน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่เก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว มาละลายที่อุณหภูมิ 70°C นาน 5 วินาที แล้วประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

5.5 การผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อที่เก็บแช่แข็ง

น้ำเชื้อปลาดุกอุยหลายๆตัวได้ถูกแช่แข็งด้วย DMSO ที่ 5% และ 10% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 °C /นาที และ 5 °C /นาที แล้วนำไปเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว น้ำเชื้อปลาดุกอุยเหล่านั้นได้เก็บแช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลาต่างๆกันไม่เกิน 7 วันแล้วถูกนำออกมาเพิ่มอุณหภูมิอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส จนน้ำเชื้อละลาย (thawing) แล้วจึงนำไปเช็คเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และความสามารถของสเปิร์มในการปฏิสนธิกับไข่

การเช็คอัตราการปฏิสนธิเป็นการตรวจความสามารถของสเปิร์มที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวในการเข้าผสมกับไข่เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดโดยวิธีการผสมแบบแห้ง การกระตุ้นให้แม่ปลาดุกอุยตกไข่ทำโดยคัดเลือกแม่พันธุ์ปลาดุกอุยที่มีลักษณะสมบูรณ์เพศ คือมีท้องอูมเป่ง พื้นท้องนิ่ม ผนังท้องบาง ติ่งเพศสีแดงมาฉีดฮอร์โมน Gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRHa) ที่มีชื่อการค้าว่า Suprefect ในอัตรา 20 µg ร่วมกับ motilium 10 mg ต่อน้ำหนักแม่ปลา 1 kg หลังจากฉีดฮอร์โมน 8-10 ชั่วโมงจึงนำแม่ปลาดุกอุยมารีดไข่ ใส่ภาชนะที่แห้งและสะอาด และเช็คคุณภาพไข่ก่อนการผสมเทียมโดยจะใช้เฉพาะไข่ที่มีคุณภาพดี มีสีน้ำตาลเข้ม และไม่เหลวเกินไปมาปฏิสนธิกับสเปิร์ม การผสมเทียมทำโดยการนำเอาไข่แม่ปลาดุกอุยประมาณ 500 ฟองใส่ลงไปใน petridish โดยใช้หลอดฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร (ml) ตัดปลายหลอดออกให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร (mm) แล้วดูดไข่ 0.4 ml. (~500 ฟอง) แล้วจึงเอาน้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้อุ่นให้ละลายใส่ลงไปผสมกับไข่ทันที พร้อมกับเติมน้ำที่สะอาดลงไปพอท่วมไข่ และใช้ขนไก่ช่วยผสมให้น้ำเชื้อเข้ากับไข่ ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที จากนั้นล้างไข่ และเมือกออกโดยการเปลี่ยนน้ำ 2 ครั้งแล้วปล่อยให้ไข่พัฒนาต่อไปโดยเปลี่ยนถ่ายน้ำใน petridish 60-70% ทุกๆ 2 ชั่วโมง จำนวนสเปิร์มที่ใช้ผสมกับไข่จะใช้ในปริมาณที่เหมาะสมไม่ต่ำกว่า 10^5 สเปิร์มต่อไข่ 1 ฟอง โดยคำนวณจากความหนาแน่นของน้ำเชื้อก่อนผสมว่าต้องใช้น้ำเชื้อที่ละลายในหลอดฟางปริมาณเท่าไร หรือ

น้ำเชื้อสดเท่าไรในการผสมกับไข่ 500 ฟอง การประเมินอัตราการปฏิสนธิจะตรวจสอบเมื่อไข่ปลาดุกอุยได้พัฒนาถึงระยะ gastrula stage เมื่อมี closing of blastopore โดยคำนวณจากจำนวนไข่ที่ปฏิสนธิต่อจำนวนไข่ที่นับทั้งหมดแล้วคูณด้วย 100 และทำ 6 ซ้ำต่อชุดการทดลอง สำหรับกลุ่มควบคุมใช้น้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ๆ จากพ่อพันธุ์ (freshly collected milt) ซึ่งมีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของ สเปิร์มไม่ต่ำกว่า 80% ในการผสมกับไข่

5.6 <u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u>

ข้อมูลระยะเวลานานที่สุด (นาที) ที่น้ำเชื้อสามารถเก็บรักษาไว้ก่อนที่ สเปิร์มจะหยุดเคลื่อนที่ ใน cryoprotectants ของแต่ละชุดการทดลอง หรือถูกเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว รวมทั้งข้อมูลของอัตราปฏิสนธิได้ถูกนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีการ repeated analysis of variance (two-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองด้วย Duncan's new multiple range test โดยใช้โปรแกรม SuperANOVA ของ Abacus concepts, Inc.

6. ผลการศึกษา

การทดลองสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 ส่วนหลักๆ คือ

6.1 การศึกษาความเข้มข้นของ cryoprotectants ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย

6.2 การศึกษาการแช่เข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย

6.3 การศึกษาผลของการเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

6.4 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลว

6.5 การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งในการปฏิสนธิกับไข่ปลาดุกอุย

6.1 ความเข้มข้นของ cryoprotectants ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทราบความเข้มข้นของ cryoprotectants ที่เหมาะสมก่อนที่จะนำไปใช้ในการทำน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง การทดลองเริ่มจากนำน้ำเชื้อของปลาดุกอุย 2 ml มาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ Calcium free Hank's Balanced Salt Solution (C-F HBSS) 2 ml โดยใช้อัตราส่วนของน้ำเชื้อและ C-F HBSS เท่ากับ 1:1 โดยปริมาตร ภายใน tissue culture flask ขนาด 75 cm^3 ในขณะเดียวกัน cryoprotectants ชนิดต่างๆได้แก่ dimethylsulfoxide (DMSO), methanol และ ethanol ได้ถูกเตรียมขึ้นมาจำนวน 4 ml ให้มีความเข้มข้น 10%, 20%, 30% และ 40% โดยละลายใน C-F HBSS แล้วจึงนำไปเจือจางน้ำเชื้อที่ได้ถูกเจือจางไว้ก่อนหน้านี้ ทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ cryoprotectants ที่ได้คือ 5%, 10%, 15% และ 20% ตามลำดับ การเช็คเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่เคลื่อนที่ในการทดลองนี้ได้ตรวจเช็คที่ระยะเวลาต่างๆกัน ตั้งแต่ 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที หลังจากใส่ cryoprotectants ลงไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางโดยทำการประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มโดยการกระตุ้นด้วย 0.4Cl

จากการทดลองประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ซึ่งเก็บรักษาไว้ ในสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ ที่ 4 ความเข้มข้น ทั้งหมด 3 ชนิด ที่อุณหภูมิห้อง ทำการประเมินการเคลื่อนที่ได้ผลดังนี้

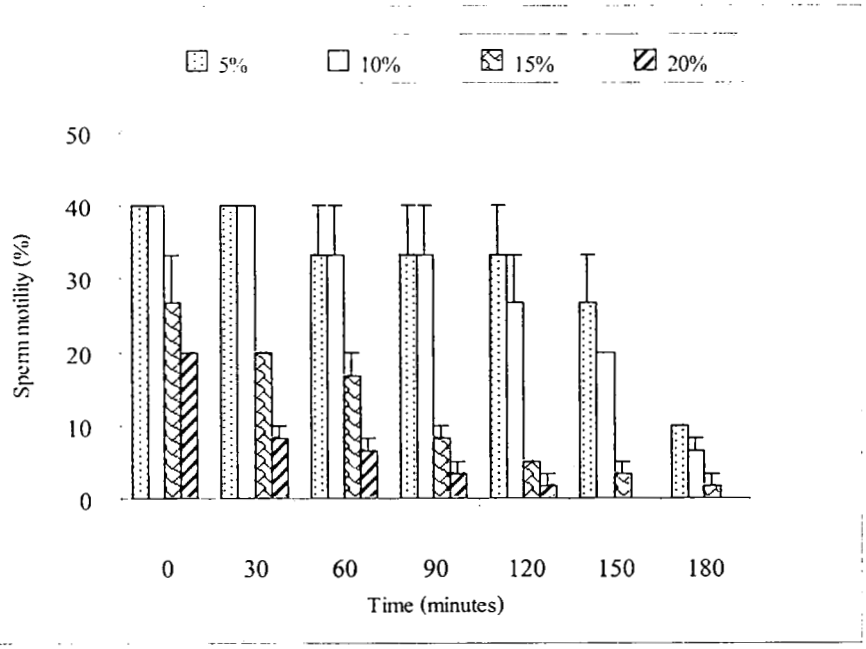
6.1.1 DMSO

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสด (freshly collected milt) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 60% ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่ใน DMSO 20% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 150 นาที ในขณะที่ DMSO 5%, 10% และ15% ยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 180 นาที (ภาพที่ 1)

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า

- ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO 5% ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับ DMSO 10% ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ DMSO 15% และ 20% ($P<0.05$) (ภาพที่ 1)

- เวลา 0 นาที ที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากับสารละลาย DMSO ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับเวลา 30, 60, 90, 120 และ 150 นาที (P>0.05) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับเวลา 180 นาที (P<0.05) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) หลังจากเจือจางใน DMSO ที่ความเข้มข้น และเวลาต่างๆ กัน

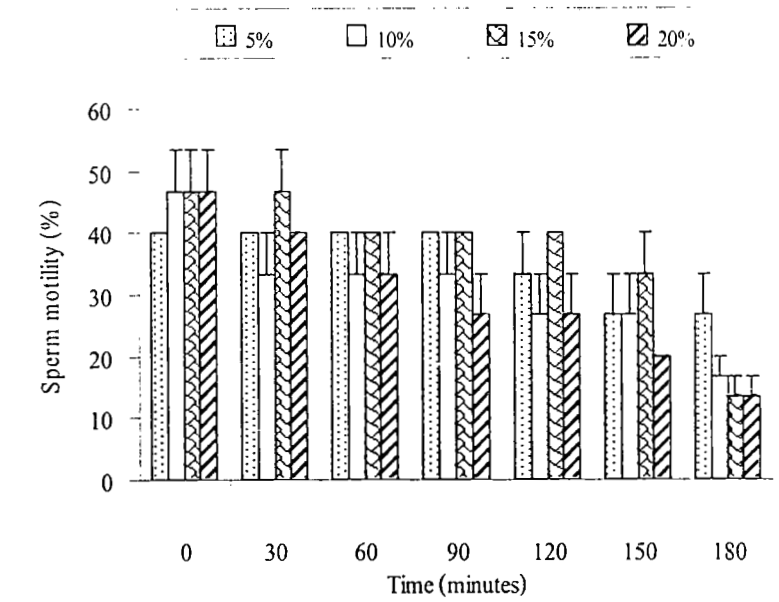
6.1.2 Methanol

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสด (freshly collected milt) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 60% ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่ใน Methanol 5%, 10%, 15% และ 20% ยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 180 นาที (ภาพที่ 2)

จากการทดสอบทางสถิติ พบว่า

- ความเข้มข้นของสารละลาย Methanol ไม่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) (ภาพที่ 2)

- เวลา 0 นาที ที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากับสารละลาย Methanol ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับเวลา 30, 60, 90, 120 และ 150 นาที (P>0.05) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับเวลา 180 นาที (P<0.05) (ภาพที่ 2)



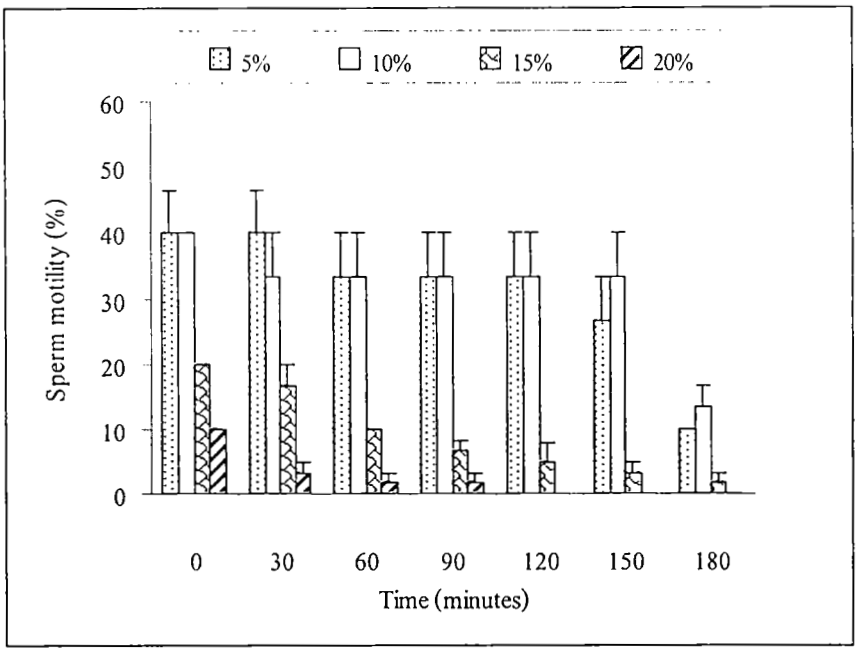
ภาพที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) หลังจากเจือจางใน Methanol ที่ความเข้มข้น และเวลาต่างๆ กัน

6.1.3 Ethanol

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสด (freshly collected milt) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 60% ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่ใน-Ethanol 20% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 120 นาที ในขณะที่ Ethanol 5%,10%และ15% ยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 180 นาที(ภาพที่ 3)

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า

- ความเข้มข้นของสารละลาย Ethanol 5% ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับ Ethanol 10% ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ Ethanol 15% และ 20% ($P<0.05$) (ภาพที่ 3)
- เวลา ที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากับสารละลาย Ethanol ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) หลังจากเจือจางใน Ethanol ที่ความเข้มข้น และเวลาต่างๆ กัน

6.2 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย

จากการทดสอบการประเมินความเป็นพิษของ DMSO, methanol และ ethanol พบว่ามีความเป็นพิษต่ำเช่นกัน จึงได้นำสาร cryoprotectant ทั้ง 3 ชนิดมาแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย โดยเจือจางน้ำเชื้อในสารละลาย C-F HBSS ในอัตราส่วน 1:1 ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5%, 10%, 15% และ 20% แล้วปล่อยไว้ 10 นาที การทำน้ำเชื้อแช่แข็งทำโดยนำหลอดฟางเหล่านี้มาแช่แข็ง (freezing) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับได้แก่ อัตราการลดอุณหภูมิที่ช้า (3 $^{\circ}$C/นาที) อัตราการลดอุณหภูมิปานกลาง (5 $^{\circ}$C/นาที) และอัตราการลดอุณหภูมิที่รวดเร็ว (10 $^{\circ}$C/นาที) น้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวระยะเวลาหนึ่งและได้ถูกนำมาเพิ่มอุณหภูมิอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 70-80°C จนน้ำเชื้อแช่แข็งละลายเป็นของเหลว (thawing) และนำไปประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

6.2.1 <u>การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วย DMSO</u>

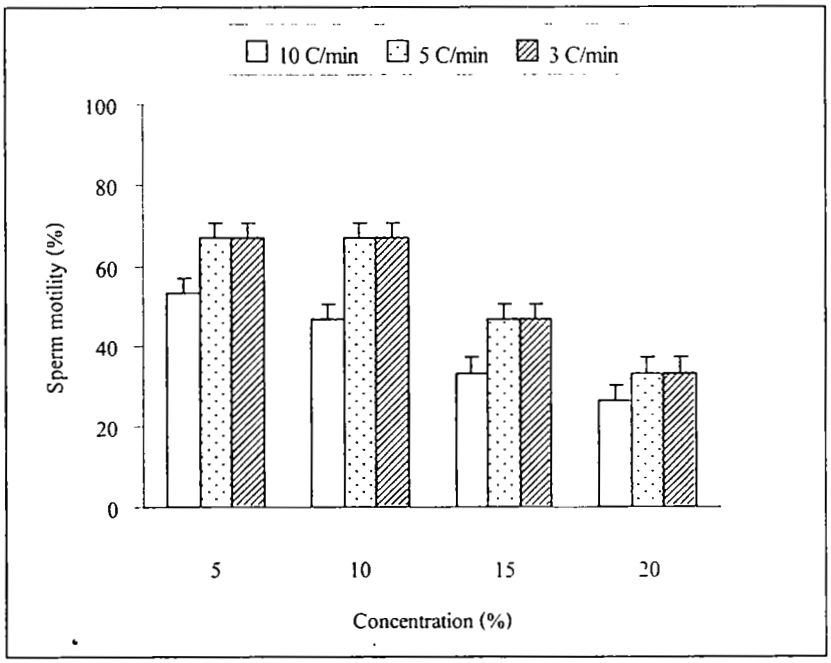
จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสด (freshly collected milt) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% ก่อนทำการแช่แข็ง ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังจากแช่แข็งใน

น้ำยาสูตร C-F HBSS และสารละลาย DMSO (5%, 10%, 15% และ20%) พบว่า ในทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl (ภาพที่ 4)

จากการทดสอบทางสถิติ พบว่า

- ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO ไม่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) (ภาพที่ 4)

- อัตราการลดอุณหภูมิ ไม่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 แสดงเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) หลังจากการแช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20%

6.2.2 <u>การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วย Methanol</u>

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสด (freshly collected milt) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% ก่อนทำการแช่แข็ง ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังจากแช่แข็งในน้ำยาสูตร C-F HBSS และสารละลาย Methanol ความเข้มข้น (5%, 10%, 15% และ20%) พบว่า ในทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ ไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl แม้จะได้ทดลอง

หลายครั้งในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ แสดงให้เห็นว่า Methanol ไม่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็น cryoprotectant ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย

6.2.3 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วย Ethanol

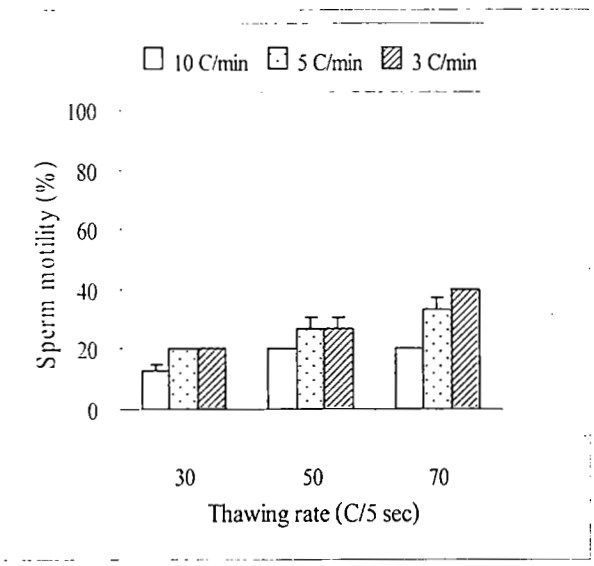
จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสด (freshly collected milt) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% ก่อนทำการแช่แข็ง ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังจากแช่แข็งในน้ำยาสูตร C-F HBSS และสารละลาย Ethanol ความเข้มข้น (5%, 10%, 15% และ20%) พบว่า ในทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ ไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl แม้จะได้ทดลองหลายครั้งในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ แสดงให้เห็นว่า Ethanol ไม่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็น cryoprotectant ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย

6.3 ผลของการเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

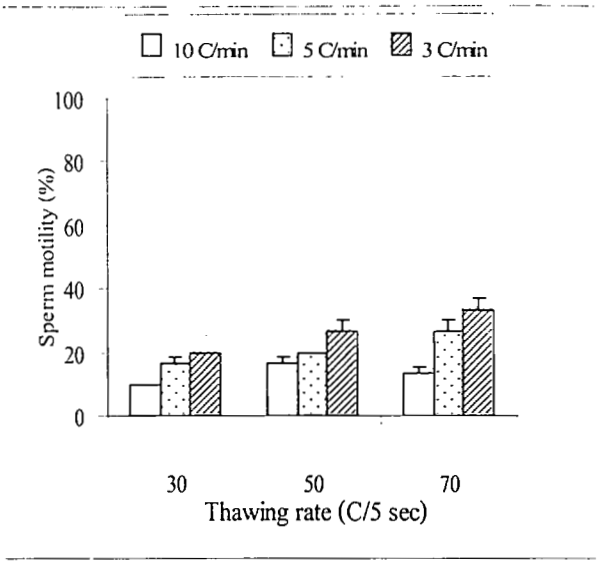
น้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้ผ่านการแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิต่างๆกัน 3 ระดับ เมื่อนำมาละลายโดยแช่ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 30, 50 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าในทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ และทุกระดับอัตราการละลาย มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl (ภาพที่ 5)

จากการทดลองทางสถิติพบว่า

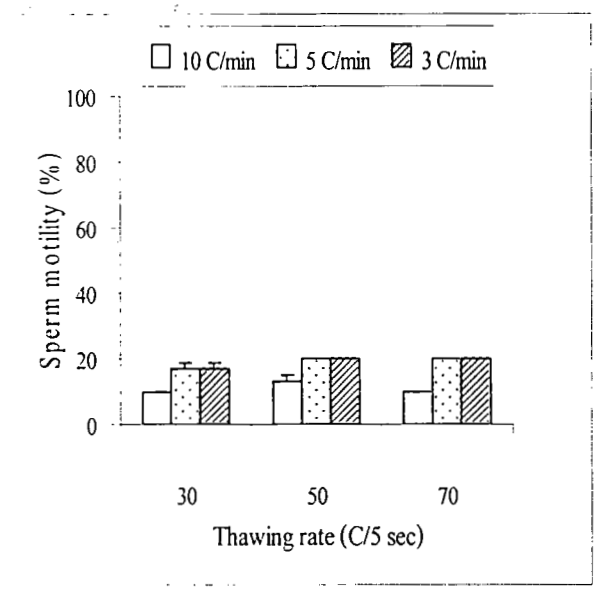
- ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO ไม่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) (ภาพที่ 5)
- อัตราการลดอุณหภูมิ ไม่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) (ภาพที่ 5)
- อัตราการละลาย ไม่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) (ภาพที่ 5)



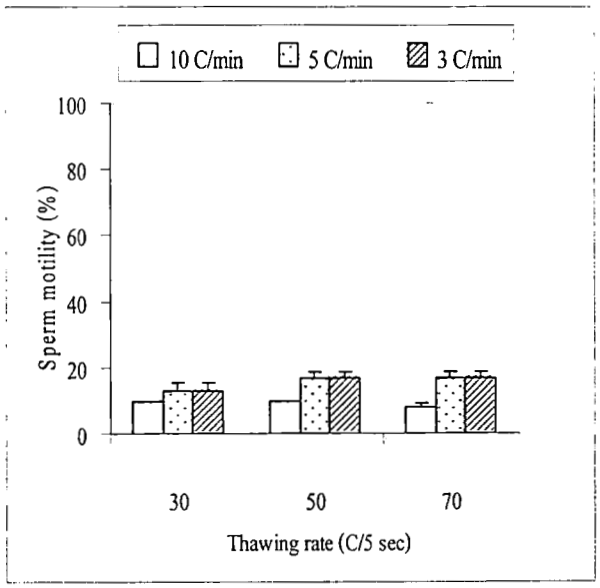
ก. 5 % DMSO



ข. 10 % DMSO



ค. 15 % DMSO



ง. 20 % DMSO

ภาพที่ 5 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) หลังจากการแช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ (3°C/min, 5°C/min, 10°C/min) และอัตราการละลาย (30°C, 50°C, 70°C นาน 5 วินาที)

ก. 5 % DMSO ค. 15 % DMSO

ข. 10 % DMSO ง. 20 % DMSO

6.4 ผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลว

การศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็งโดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า (3 °C/นาที) หลังจากเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) พบว่า น้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้เก็บไว้ 60 วันยังคงมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 46.67% และ 66.67% ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างระยะเวลาเก็บรักษา และความเข้มข้นของ DMSO ที่ใช้ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) หลังการเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวที่เวลาต่างๆกัน เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า (3 °C/นาที)

เวลาเก็บรักษา (วัน)	ความเข้มข้น DMSO (%)	
	5	10
Control	$100.00\pm0.00^{a.1}$	$100.00\pm0.00^{a.1}$
0	$66.67\pm3.85^{b.1}$	$66.67\pm3.85^{b.1}$
[illegible]	$66.67\pm3.85^{b.1}$	$66.67\pm3.85^{b.1}$
14	$46.67\pm3.85^{b.1}$	$66.67\pm3.85^{b.1}$
14	$46.67\pm3.85^{b.1}$	$66.67\pm3.85^{b.1}$
35	$66.67\pm3.85^{b.1}$	$66.67\pm3.85^{b.1}$
60	$46.67\pm3.85^{b.1}$	$66.67\pm3.85^{b.1}$

ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวนอนแสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

การศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็งโดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง (5 °C/นาที) หลังจากเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) พบว่า น้ำเชื้อที่แช่แข็งไว้นาน 60 วันยังคงมีความสามารถในการเคลื่อนที่ เช่นเดียวกับการแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า (3 °C/นาที) การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสด พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% ก่อนทำการแช่แข็ง การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม หลังจากการเก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง เมื่อเวลาผ่านไป 60 วัน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 46.67% และ 66.67% เมื่อใช้ DMSO 5% และ10% ตามลำดับ หลังการกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl (ตารางที่ 2) จากการทดสอบทางสถิติ พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็ง และความเข้มข้นของสารละลาย DMSO ที่ใช้ (5% และ 10%) ต่างก็ไม่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) หลังการเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวที่เวลาต่างๆกัน เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง (5 °C/นาที)

เวลาเก็บรักษา (วัน)	ความเข้มข้น DMSO (%)	
	5	10
Control	$100.00\pm0.00^{a,1}$	$100.00\pm0.00^{a,1}$
0	$66.67\pm3.85^{b,1}$	$66.67\pm3.85^{b,1}$
[illegible]	$53.33\pm3.85^{b,1}$	$66.67\pm3.85^{b,1}$
14	$53.33\pm3.85^{b,1}$	$66.67\pm3.85^{b,1}$
1[illegible]	$66.67\pm3.85^{b,1}$	$66.67\pm3.85^{b,1}$
14	$46.67\pm3.85^{b,1}$	$66.67\pm3.85^{b,1}$
60	$46.67\pm3.85^{b,1}$	$66.67\pm3.85^{b,1}$

ตัวอักษรที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)
ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวนอนแสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

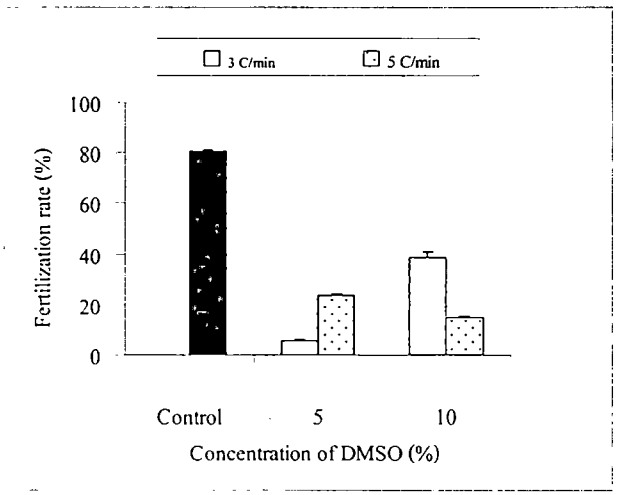
6.5 ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งในการปฏิสนธิกับไข่ปลาดุกอุย

น้ำเชื้อปลาดุกอุยที่ได้เก็บแช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลวได้ถูกนำออกมาเพิ่มอุณหภูมิอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส จนน้ำเชื้อละลาย (thawing) แล้วจึงนำไปเช็คเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และใช้ในการปฏิสนธิกับไข่ปลาดุกอุย

การศึกษาการปฏิสนธิได้ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ DMSO เป็นสาร cryoprotectant เท่านั้นเนื่องจาก ethanol และ methanol ไม่สามารถช่วยให้สเปิร์มของปลาดุกอุยมีชีวิตรอดหลังการแช่แข็ง จากการประเมินอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสด (freshly collected milt) พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิเท่ากับ 80.52% ในขณะที่น้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5% และ 10% และใช้ระดับการลดอุณหภูมิอย่างช้า (3°C/นาที) และระดับการลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง (5°C/นาที) กลับมีค่าอัตราการปฏิสนธิที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 6)

จากการทดลองทางสถิติ พบว่า

- ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO ไม่มีผลทำให้การปฏิสนธิของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)
- อัตราในการลดอุณหภูมิ ไม่มีผลทำให้การปฏิสนธิของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)



ภาพที่ 6 เปอร์เซ็นต์อัตราการปฏิสนธิไข่ปลาดุกอุยที่ได้รับการปฏิสนธิจากน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่ผ่านการแช่แข็งในสารละลาย DMSO

7. อภิปรายผลการทดลอง

จากการทดลองเพื่อหาชนิดของสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ ที่เหมาะสมที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็งนั้นพบว่า พบว่า สารละลาย Methanol, DMSO และ Ethanol มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มอยู่ในเกณฑ์ต่ำ เนื่องจากยังมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เมื่อเวลา 180 นาที สาเหตุที่การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยในสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ มีแนวโน้มลดลง เมื่อเวลาและความเข้มข้นนานขึ้น ซึ่งเกิดจากความเป็นพิษของ สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ ที่มีต่อสเปิร์ม ดังที่ได้รายงานโดย กฤษณ์ มงคลปัญญา (2536)

นิศา ไชยรักษ์ (2539) ได้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยในน้ำยาสูตร 0.85% NaCl และ MC # 1 และ 2 ที่มีส่วนผสมของ Methanol และ DMSO ด้วย แล้วจึงนำมาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ เมื่อครบ 30 นาที พบว่า น้ำยาสูตร 0.85% NaCl อัตราการเคลื่อนที่ 63.30% และ 50% ตามลำดับ น้ำยาสูตร MC # 1 และ 2 มีอัตราการเคลื่อนที่ 63.33% และ 53.30% ตามลำดับ ดังนั้นระยะเวลาภายหลังผสมน้ำเชื้อกับน้ำยา ที่มีส่วนผสมของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ไม่ควรเกิน 30 นาที เพื่อคงไว้ประสิทธิภาพ ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อมากที่สุด เพื่อการแช่แข็ง (equilibration time)

ทัศนีย์ ภูมิทัศน์ (2532) ได้ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย ไว้ในน้ำยา 2 สูตร และมีส่วนผสมของ Methanol ร่วมด้วยมีอัตราส่วนระหว่างน้ำเชื้อต่อน้ำยาเท่ากับ เท่ากับ 3:1 เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5-10 องศาเซลเซียส แล้วนำมาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ เมื่อครบ 72 ชั่วโมง และ 7 วัน พบว่า น้ำยาสูตรที่ 1 มีอัตราการเคลื่อนที่ 60% และ 40% ตามลำดับ และในสูตรที่ 2 มีอัตราการเคลื่อนที่ เท่ากับ 50% และ 40% ตามลำดับ กฤษณ์ มงคลปัญญา (2536) รายงานว่า Methanol จะมีความสามารถแพร่เข้าสู่เซลล์ได้ดี และจะออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายต่อเซลล์ได้ดี เมื่อทำการแช่แข็ง และใช้ในระดับความเข้มข้นค่อนข้างสูง (1-4 M)

Brayton (1986) กล่าวว่า DMSO มีอัตราการแพร่เข้าสู่เซลล์ค่อนข้างสูง เช่น ถ้าใช้ DMSO ทาที่ผิวหนังภายในเวลา 20 นาที จะสามารถตรวจพบ DMSO ในทุกอวัยวะของร่างกาย และภายใน 1 ชั่วโมง จะตรวจพบในกระดูกและฟัน ดังนั้นถ้าใช้ DMSO ป้องกันอันตรายกับอสุจิ ระหว่างกระบวนการแช่แข็ง Equilibration time อยู่ระหว่าง 10-20 นาที ซึ่งเป็นเวลาเพียงพอสำหรับการบรรจุน้ำเชื้อใส่หลอดแช่แข็ง (cryotube) ส่วน Methanol อาจใช้เวลา Equilibration time นานกว่า 0.5- 1 ชั่วโมง ทั้งนี้เพราะเป็นพิษน้อยกว่า DMSO

น้ำเชื้อปลาดุกอุยที่ได้แช่แข็งด้วย Methanol และ Ethanol ในการทดลองครั้งนี้เมื่อนำมาละลายกลับพบว่าไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม แต่น้ำเชื้อที่เจือจางในสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5% และ

10% เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า (3 °C/นาที) และอัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง (5 °C/นาที) มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด มีค่าเท่ากับ 66.67% ซึ่งจากการศึกษาของ นิศา ไชยรักษ์ (2539) ที่ได้แช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยเช่นกัน พบว่าที่อัตราการลดอุณหภูมิ -10 °C/นาที น้ำเชื้อที่เก็บรักษาในน้ำยาที่มีส่วนผสมของ 8, 10 และ 12% DMSO มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการแช่แข็งเฉลี่ย 16.3±2.0%, 16.3±2.0% และ 14.0±2.2% ตามลำดับ และเมื่อเจือจางน้ำยาที่มีส่วนผสมของ 6, 10 และ 14% Methanol มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการแช่แข็งเฉลี่ย 5.3±0.5%, 6.3±0.6% และ 4.5±0.7% ตามลำดับ จากผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นว่า DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็งดีกว่า Methanol เพราะให้เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสปิร์มที่สูงกว่า สำหรับความแตกต่างของการเคลื่อนที่ของสเปิร์มระหว่างการทดลองเหล่านี้ สาเหตุส่วนหนึ่งอาจเนื่องจาก ความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อปลาที่มีความแตกต่างกัน (individual variation) และอัตราการละลายที่ต่างกัน รวมทั้งความแตกต่างของผู้ประเมิน ในการทดลองครั้งนี้พบว่า การลดอุณหภูมิอย่างช้า (-3°C /นาที) และปานกลาง (-5C /นาที) มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการแช่แข็งสูงกว่าการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (-10 °C/นาที) แม้จะไม่มีความแตกต่างทางสถิติก็ตาม

นลินีมารคแมน และคณะ (2526) ได้ทำการเก็บน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus*) แบบแช่แข็งในสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 2-8% ที่อุณหภูมิ -196 °C นาน 48 ชั่วโมง พบว่า 4% DMSO ได้ผลดี มีเปอร์เซ็นต์ อสุจิมีชีวิต 63%

นลินี มารคแมน (2527) ได้ทำการเก็บน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus*) แบบแช่แข็ง พบว่า 8% DMSO และ 12% DMSO มีการเคลื่อนที่เท่ากับ 32.4% และ 23.52% ตามลำดับ โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า (3 °C/นาที)

กฤษณ์ มงคลปัญญา (2536) ได้ทำการเก็บน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus*) แบบแช่แข็งในสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 2-8% ทำการเก็บไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 90 นาที ก่อนทำการลดอุณหภูมิ ทำการลดอุณหภูมิโดยแช่ไอไนโตรเจนเหลวในถังไนโตรเจนเหลว นาน 15 นาที แล้วจึงนำไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลว (-196 °C) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า DMSO 2%, 4% และ 8% มีการเคลื่อนที่ของเปิร์ม เท่ากับ 55.0±1.5%, 63.0±3.0% และ 51.0±11.6% ตามลำดับ

อนงคณ์ และ กฤษณ์ (2539) ในปลาสวาย เมื่อใช้ DMSO ระดับความเข้มข้น 8, 10 และ 12% ให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังการแช่แข็งเฉลี่ย 19-44%

Steyn (1985) การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกเทศ โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 7 °C/นาที มีผลให้มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิสูงสุด

การ ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการละลาย พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสม ในการละลาย คือ 70 °C นาน 5 วินาที ซึ่งน่าจะเหมาะสมกว่าการศึกษาของ นิศา ไชยรักษ์ (2539) ที่ละลายน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งที่อุณหภูมิ 50 °C นาน 50 วินาที และ 70 °C นาน 40 วินาที เนื่องจากมีความสะดวก และรวดเร็วในการละลายน้ำเชื้อ กฤษณ์ มงคลปัญญา (2536) กล่าวว่า การละลายน้ำเชื้อที่แช่แข็งควรทำโดยการนำหลอดน้ำเชื้อออกจากถังไนโตรเจนเหลว นำมาแช่น้ำร้อน 70-80 °C ซึ่งหากใช้หลอดน้ำเชื้อที่ทำจาก Al sheath ควรแช่น้ำร้อนนานไม่เกิน 20 วินาที

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน (2537) ได้ทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง 2 วิธี คือ อสุจิที่เก็บแบบเม็ดใช้ 3 เม็ด จะละลายใน $NaHCO_3$ 1% 10 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 21°C นาน 3 วินาทีและแบบที่เก็บในหลอดพลาสติกจะละลายโดยการแช่หลอดในน้ำที่อุณหภูมิ 30°C นาน 3 วินาทีก่อนและนำใส่ใน $NaHCO_3$ ที่อุณหภูมิ 21 °C

Terrence และคณะ (1994) ทำการละลายน้ำเชื้อปลา Channel Catfish ที่ทำการเก็บแบบแช่แข็งโดยการนำหลอดบรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งมาใส่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 40 °Cเป็นเวลา 7 วินาที

Babiak และGlogowski (1998) ได้ทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งโดยการ นำก้อนน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งมาทำการละลายอย่างรวดเร็วใน 0.7% NaCl 4 ml ที่อุณหภูมิ 30 °C

การทดลองปฏิสนธิไข่ปลาดุกอุยด้วยน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็ง พบว่าสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 10% ในระดับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า มีการปฏิสนธิดีที่สุด เท่ากับ 38.91% ซึ่งจากการทดลองของ Ott และ Horton (1971) ที่ได้ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Chinook salmon (*Oncomynchus tshawytstha*) และ Coho salmon (*O. kisutch*) แบบแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว -196°C ด้วยน้ำยาที่มีส่วนผสมของ Manital และใช้ DMSO ความเข้มข้น 8% ภายหลังจากการแช่แข็งนาน 7 วัน แล้วนำน้ำเชื้อออกมาละลายผสมกับไข่สด ให้อัตราการปฏิสนธิ 38 และ 79% ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการทดลองครั้งนี้

Mounib (1978) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของปลา Salmon และ Cod พบว่า การใช้ 12.5% DMSO ให้ค่าอัตราการปฏิสนธิเท่ากับ 80% และ59% ตามลำดับ

Mongkonpunya และคณะ (1992) รายงานในปลาบึก เมื่อใช้ 8% DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อ และนำน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง มาผสมกับไข่ปลาบึกสด มีอัตราการปฏิสนธิ 33%

BabiakและGlogowsk (1998) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา *Aspius aspius* ในน้ำยา 6 สูตร พบว่า น้ำเชื้อที่ผสมกับน้ำยาสูตร 1, 3 และ5 ให้ผลการปฏิสนธิเท่ากับ 62±4%, 59±5% และ49±4% ตามลำดับ ส่วนน้ำเชื้อที่ผสมกับน้ำยาสูตร 2, 4 และ 6 เท่ากับ 31±4% 27±3% และ 37±2% ตามลำดับ

Congen และคณะ (1996)ได้ทำการศึกษาการเก็บน้ำเชื้อปลา rainbow trout แบบแช่แข็งที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 1 หรือ 10 °C ต่อนาที(ลดอย่างช้า)ไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเลย แต่ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 30 °C ต่อนาที (ลดอย่างรวดเร็ว) น้ำเชื้อที่ผสมด้วย DMSO+Sucrose มีการเคลื่อนที่ถึง 63 % ทั้งขณะที่ทำการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -60 °C และหลังจากทำการแช่แข็งแล้วที่อุณหภูมิ -80 °C

อย่างไรก็ตามหากพิจารณาเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ จะเห็นว่าประสิทธิภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลายยังถือว่าอยู่ในระดับต่ำกว่ากลุ่มควบคุม สาเหตุส่วนหนึ่งอาจเป็นเพราะในขณะทำการทดลองได้ใช้เวลานาน โดยผสมไข่ในกลุ่มควบคุมก่อน และผสมเทียมไข่กับน้ำเชื้อแช่แข็งในภายหลังจึงทำให้ไข่ปลาดุกอุยที่รีดไว้แห้ง จึงอาจทำให้คุณภาพไข่ค่อนข้างต่ำ และเมื่อน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านการละลายมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ที่ต่ำกว่าน้ำเชื้อสด จึงส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งต่ำกว่าน้ำเชื้อสด

โดยทั่วไป DMSO จัดเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่นิยมใช้ในการแช่แข็งเซลล์สูงถึง 98 เปอร์เซ็นต์ของงานวิจัยที่เผยแพร่ และให้ผลในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งที่ดีที่สุด (Tiersch, 2000) เช่น การทดลองของ นลินี มารคแมน (2527), มงคลปัญญาและคณะ (Mongkonpunya *et al.*, 2000) และนิศา ไชยรักษ์ (2539) และโดยระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 8-10 เปอร์เซ็นต์ (นิศา ไชยรักษ์, 2539) นอกจากนี้ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์และระยะเวลาสมดุลย์ (equilibration time) มีผลต่อสเปิร์มปลาแต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกเทศ (*Clarias gariepinus*) พบว่าเมื่อใช้ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 5% ระยะเวลาสมดุลย์ 60 นาที สเปิร์มภายหลังการละลายมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวเฉลี่ย 40% (Steyn *et al.*, 1985) ในช่วงต่อมา (Steyn and Vuren, 1987) ใช้ glycerol ระดับความเข้มข้น 11% และระยะเวลาสมดุลย์ 20 นาที พบว่าสเปิร์มภายหลังการละลายสามารถปฏิสนธิกับไข่ มีเปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัวถึง 51.2% ซึ่งสูงกว่าการใช้ DMSO และ methanol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ในการทดลองเดียวกัน ส่วนในการทดลองของลินฮาร์ตและคณะ(Linhart *et al.*, 1993) เมื่อใช้ glycerol ระดับความเข้มข้น 10% ระยะเวลาสมดุลย์ 20 นาที ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา European catfish (*Silurus glanis* L.) พบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มมีเพียง 15% ในทำนองเดียวกันมงคลปัญญาและคณะ (Mongkonpunya *et al.*, 2000) เจือจางน้ำเชื้อปลาบึก (*Pangasianadon gigas* Chevey)ในน้ำยาเจือจาง calcium-free hank's balanced salt solution ที่มี DMSO หรือ methanol ที่ระดับ 5% หรือ 14% พบว่าการใช้ 5% DMSO ทำให้สเปิร์มของปลาบึกมีอัตราการ

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

เคลื่อนที่มากกว่าหรือเท่ากับ 50% ได้นาน 72 ชั่วโมง ขณะที่การใช้ 5% methanol มีการเคลื่อนที่ลดลงเร็วกว่า คือ มีอัตราการเคลื่อนที่มากกว่าหรือเท่ากับ 50% ได้นาน 48 ชั่วโมง ส่วนที่ระดับ 14% ทั้ง DMSO และ methanol คงอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเป็น 0% ภายใน 20 นาที จะเห็นได้ว่าผลการทดลองที่ผ่านมามีความหลากหลายของวิธีการวิจัยและผลการวิจัยเป็นอย่างมาก

8. สรุปผลการทดลอง

1. จากการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อน้ำเชื้อปลาดุกอุยพบว่า DMSO, ethanol และ methanol มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มปลาดุกอุยอยู่ในเกณฑ์ต่ำ แต่เฉพาะ DMSO มีความเหมาะสมในการนำมาแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย

2. การใช้ DMSO ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่ระดับอัตราการลดอุณหภูมิ -10, -5 และ -3 องศาเซลเซียส/นาที ไม่มีผลทำให้เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกัน หลังจากทำการละลาย (thawing) น้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 70-80°C นาน 5 วินาที

3. การละลายน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่แช่แข็งด้วยอุณหภูมิน้ำ 30, 50 และ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที ไม่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกัน

4. ระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวระหว่าง 0-60 วันไม่มีผลทำให้เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าแตกต่างกัน

5. ความสามารถในการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็ง กับไข่ปลาปลาดุกอุย พบว่า น้ำเชื้อแช่แข็งให้ค่าอัตราปฏิสนธิต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสดผสมกับไข่

ว97.49
2827ก
ค.7
251533

9. เอกสารอ้างอิง

กฤษณ์ มงคลปัญญา. (2536). การรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง : หลักการ/วิธีการ/ประโยชน์. กรุงเทพ ฝ่ายโรงพิมพ์สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน.

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน. (2537). การเพาะขยายพันธุ์ปลาจากน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งในสูตรต่างๆกัน. วารสารการประมง. 47(2). หน้า 509-516.

นลินี มารคแมน. 2527. การศึกษาเบื้องต้นกรรมวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 98 หน้า.

นลินี มารคแมน, กฤษณ์ มงคลปัญญา, อุทัยรัตน์ ณ นคร, และ ประวิทย์ สุรนีรนาถ. 2526. ความล้มเหลวในการพยายามเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพื่อประโยชน์ในการผสมเทียม. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 21สาขาประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิศา ไชยรักษ์. (2539). การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยโดยวิธีแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อนงคณ์ หัมพานนท์, และ กฤษณ์ มงคลปัญญา. (2536). การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีแช่แข็ง. ใน รายงานการประชุมวิชาการครั้งที่ 34 สาขาประมง. (หน้า 320-328). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Babiak, I. and Glogowski, J. 1998. Cryopreservation of dperm from Asp *Aspius aspius*. The Progressive-Fish Culturist 60: 143-145.

Brayton, C.F. 1986. Dimethylsulfoxide (DMSO): A review. Comell Vet. 76: 61-90.

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.

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

Linhart, O., Billard, R., & Proteau, J. P. 1993. Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis* L.) spermatozoa. Aquaculture 115: 347–359.

Mongkonpunya, K., Punpipat, T., Pholprasith, S., Chnatasut, M., Rittaporn, R., Pimolboot, S., Wiwatcharakoses, S. and Chaengkij, M. 1992. Cryopreservation of sperm of the Mekhong giant catfish, *Pangasianodon gigas* Chevy. Pp. 56-60, In: NRC report on aquaculture and Schistosomiasis: Proceedings of a network meeting held in Manila, Philippines, August 6-10, 1991. National Academy Press, Washington, D.C.

Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S. and Yasuda, K. 1983. Effects of osmolarity and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. Journal of Experimental Biology 107: 95-103.

Mounib, M. S. 1978. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. Journal of Reproduction Fertilization 53: 13–18.

Ott, A. G. and Horton, H. F. 1971. Fertilization of chinook and coho salmon eggs with cryopreserved sperm. Journal of Fishery Research Board Canada 28: 745–749.

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

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.

Steyn, G. J., & Van Vuren, J. H. J. 1987. The fertilizing capacity of cryopreserved sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) sperm. Aquaculture, No. 63, 187–193.

Steyn, G. J., Schoonbee, H. J. and Nai – Hsien. Chao. (1985). Preliminary investigation on the cryopreservation of *Clarias garipinus* (Clariidae : Pisces) sperm. Water S. A, 11(1): 15–18.

Tiersch, T.R., Goudie, C.A. and Carmichael, G.I. 1994. Cryopreservation of channel catfish sperm: storage in cryoprotectants, fertilization trials, and growth of channel catfish produced with cryopreserved sperm. Transactions of the American Fisheries Society 123: 580-586.

Tiersch, T. R. and Mazik, P. M. 2000. Cryopreservation in aquatic species. Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society.

ภาคผนวก

การเตรียมน้ำยาสูตร C - F HBSS

ทำการชั่งสารดังกล่าวดังตาราง เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนสารละลายเทลงขวดสีชา และนำไปเก็บในตู้เย็น สามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน 1 สัปดาห์

ภาคผนวกที่ 1 แสดงการเตรียมน้ำยาสูตร C – F HBSS

สาร	น้ำหนัก (g)
NaCl	0.889
KCl	0.044
$Na_2HPO_4.2H_2O$	0.013
$NaHCO_3$	0.089
KH_2PO_4	0.044
$MGSO_4.7H_2O$	0.022
Glucose	0.111
Water (ml)	100
pH	7.6

ใส่ยาปฏิชีวนะ (antibiotic) penicillin – strepomycin 500 ไมโครลิตรต่อน้ำยา 100 มิลลิลิตร เมื่อผสมน้ำยาแล้วปรับ pH ของน้ำยาด้วยเครื่อง pH meter และปรับ pH ของน้ำยาให้เป็น 7.6 ถ้าเป็นกรดปรับโดยเติม NaCl ถ้าเป็นด่างปรับโดยเติม 1N HCl

อัตราการลดอุณหภูมิ

การลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว

อุณหภูมิที่เริ่มทำการทดลอง 25 องศาเซลเซียส

อัตราลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส / นาที จนถึงอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส พักไว้ 0.5 นาที

อัตราลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/ นาที จนถึงอุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส พักไว้ 0.5 นาที

จากนั้นปล่อยให้ลดอุณหภูมิลงอย่างอิสระ

การลดอุณหภูมิอย่างอย่างปานกลาง

อุณหภูมิที่เริ่มทำการทดลอง 25 องศาเซลเซียส

อัตราลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/ นาที จนถึงอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส พักไว้ 0.5 นาที

อัตราลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/ นาที จนถึงอุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส พักไว้ 0.5 นาที

จากนั้นปล่อยให้ลดอุณหภูมิลงอย่างอิสระ

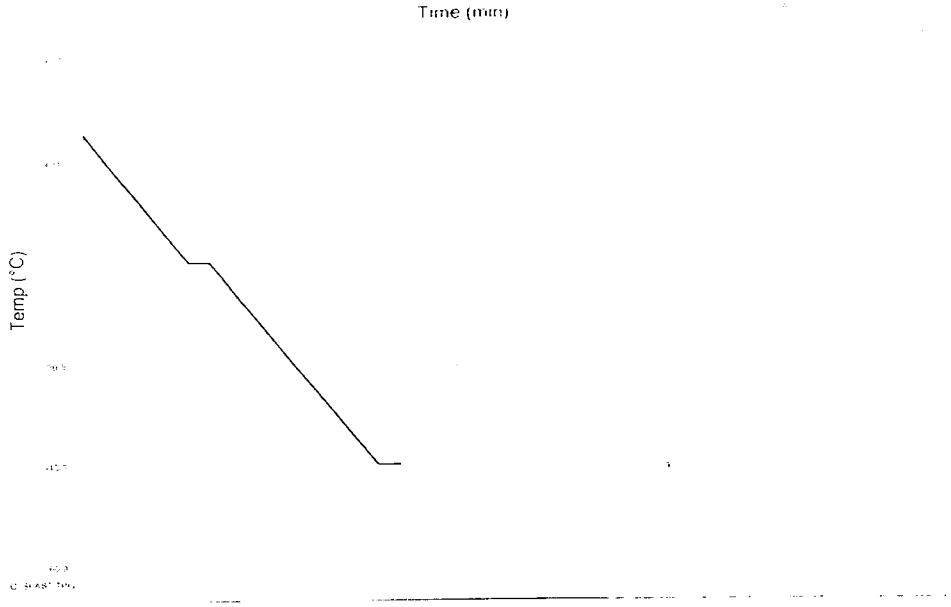
การลดอุณหภูมิอย่างอย่างช้า

อุณหภูมิที่เริ่มทำการทดลอง 25 องศาเซลเซียส

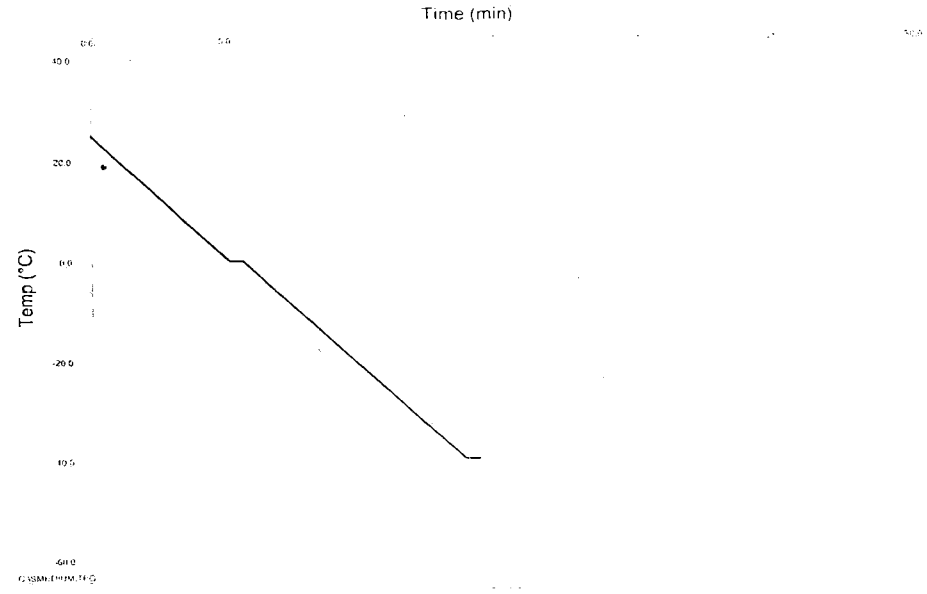
อัตราลดอุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส/ นาที จนถึงอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส พักไว้ 0.5 นาที

อัตราลดอุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส/ นาที จนถึงอุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส พักไว้ 0.5 นาที

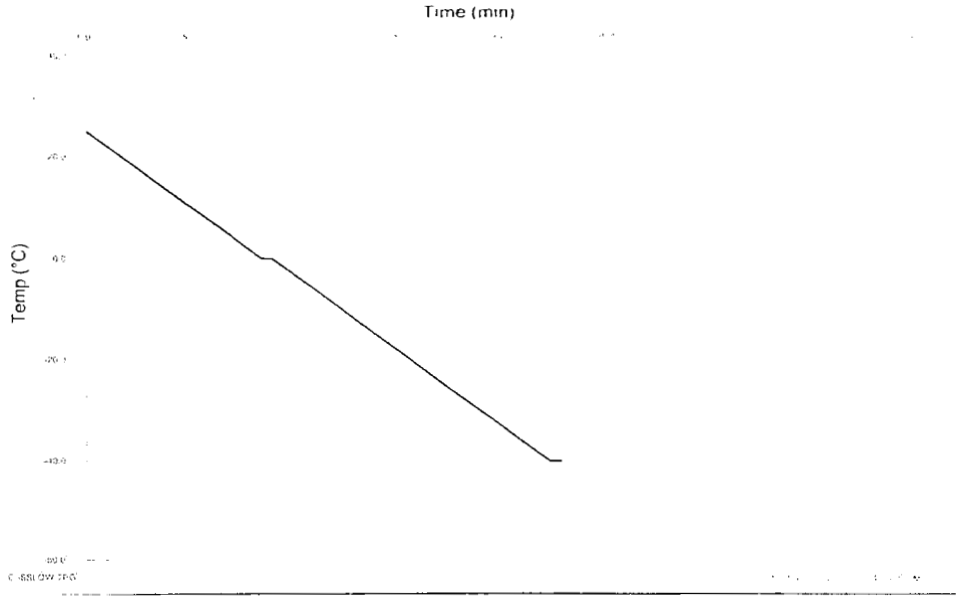
จากนั้นปล่อยให้ลดอุณหภูมิลงอย่างอิสระ



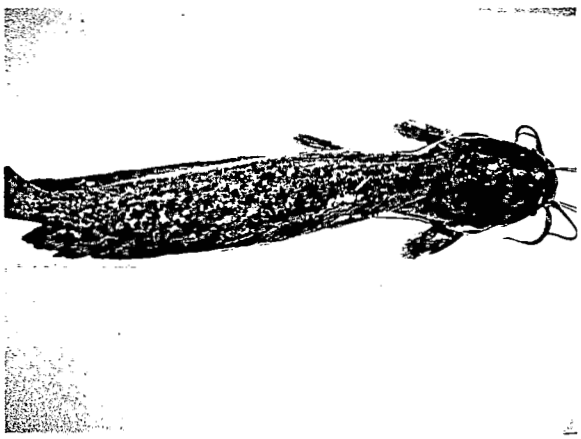
กราฟแสดงอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (10 องศาเซลเซียส / นาที)



กราฟแสดงอัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง (5 องศาเซลเซียส / นาที)

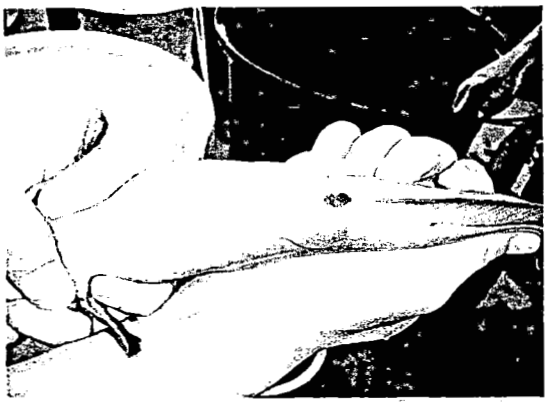


กราฟแสดงอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า (3 องศาเซลเซียส / นาที)

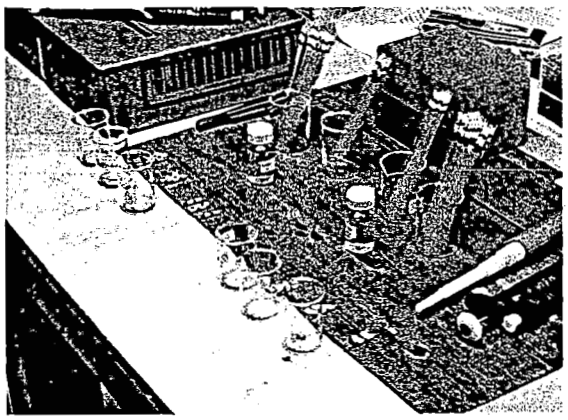


ปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*)

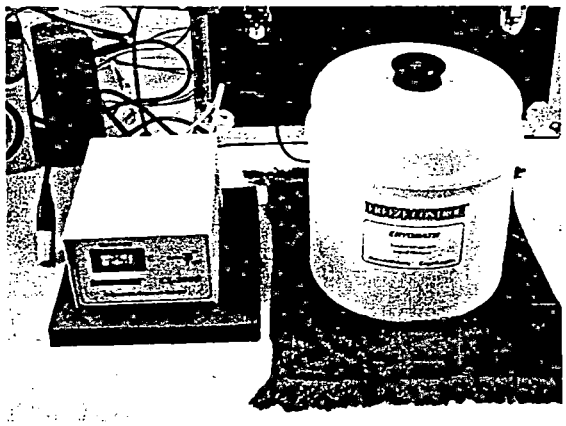
ปลาดุกอุยเพศผู้



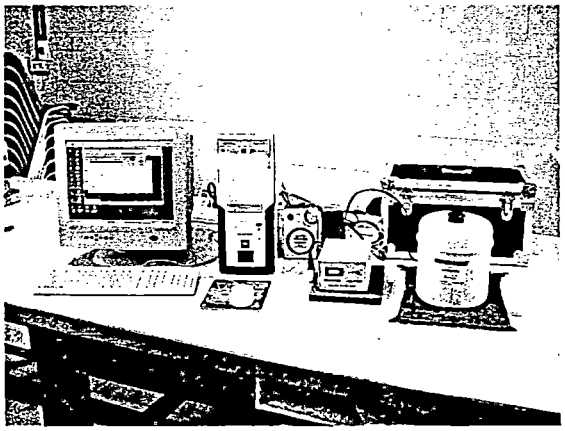
ปลาดุกอุยเพศเมีย



น้ำเชื้อที่เจือจางด้วยสารละลาย C-F HBSS และสารไดโอโพรเทคแทนท์ รอบรรจุในหลอดฟาง (straw)



เครื่องลดอุณหภูมิ Programmable freezing control (Cryologic Pty, ltd) รุ่น CL 3000



การลดอุณหภูมิโดยใช้เครื่อง Computer ควบคุมอัตราการลดอุณหภูมิ

การใส่หลอดฟาง (straw) ที่บรรจุน้ำเชื้อแล้วลงในเครื่องลดอุณหภูมิ