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

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวและปลาดุกอุย แบบแช่เย็นและแบบแช่แข็งเพื่อการผสมเทียม

Development of short-term chilled storage and cryopreservation techniques of common silver barb and Gunther's walking catfish spermatozoa for artificial insemination

โดย

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[1]
สุบัณฑิต นิ่มรัตน์[2]

เริ่มบริ...
27 ส.ค. 2552 BK 0087000 2548 - 7 เม.ย. 2555
249304

[1]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
[2]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวและปลาดุกอุยแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็งเพื่อการผสมเทียม สำเร็จเรียบร้อยลงได้ โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2547 จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ข้าพเจ้าขอขอบคุณ คุณศิริพร คชรัตน์ ที่ได้ช่วยดูแลปลาทดลองและวิเคราะห์ข้อมูล ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้โรงเพาะฟัก และอุปกรณ์ต่างๆระหว่างการศึกษาวิจัย และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ให้ทุนสนับสนุนวิจัยทำให้การวิจัยบรรลุวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย

กรกฎาคม 2548

บทคัดย่อ

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus*) และปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) แบบแช่เย็นโดยการนำเอาน้ำเชื้อสดมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ภายใน tissue culture flask ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร และเก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซียลเซียส ปรากฏว่าสารละลาย Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) มีความเหมาะสมในการแช่เย็นน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ Hank's balanced salt solution (HBSS), Cortland solution, Extender 7 และ Extender 13 เนื่องจากสามารถยืดระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เย็นได้นานกว่าสารละลายบัฟเฟอร์สูตรอื่นๆ โดยการเจือจางน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวใน Ca-F HBSS สามารถเจือจางได้มากที่สุดเพียง 1:2 โดยปริมาตรเท่านั้น เนื่องจากการใช้อัตราเจือจางที่สูงขึ้นทำให้ระยะเวลาที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้สั้นลง การแช่เย็นน้ำเชื้อปลาดุกอุยพบว่าสารละลาย HBSS ให้ผลการเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ Extender 7, Extender 13 และ Cortland solution โดยไม่พบความแตกต่างของอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อใน HBSS ในอัตราส่วนตั้งแต่ 1 :1 , 1:2 และ 1: 4

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว และปลาดุกอุยแบบแช่แข็งได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ตอน คือ ตอนที่ 1 ทดสอบความเป็นพิษของสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ และตอนที่ 2 การแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยเครื่องมือ controlled-rate programmable freezer การทดสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวทำโดยนำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวมาเจือจางในสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆได้แก่ Dimethylsulfoxide (DMSO), acetamide, methanol, formamide, sucrose, propylene glycol, glycerol, ethanol และ ethylene glycol โดยที่แต่ละชนิดใช้ความเข้มข้นสุดท้าย 4 ระดับ (5%, 10%, 15% และ 20%) ทำการทดสอบใน tissue culture flask ที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$C พบว่า methanol, sucrose และ DMSO มีความเป็นพิษต่อน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในระดับที่ต่ำ ในขณะที่การทดสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อน้ำเชื้อปลาดุกอุยพบว่า propylene glycol, glycerol และ formamide มีความเป็นพิษต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับ acetamide และ ethylene glycol การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในน้ำยาสูตร Ca-F HBSS โดยใช้ DMSO ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ การลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว(10^{0}C/นาที), ระดับการลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง (5^{0}C/นาที) และระดับการลดอุณหภูมิอย่างช้า(3^{0}C/นาที) พบว่าการใช้ DMSO 10% ที่ระดับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (10^{0}C/นาที) มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายดีที่สุด และสามารถปฏิสนธิกับไข่ปลาตะเพียนขาวได้ไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อ

สดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ C - F HBSS และใช้สารไครโอโพรเทคแทนต์ที่มีความเป็นพิษน้อย 3 ตัว (propylene glycol, glycerol และ formamide) ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ (5%, 10%, 15% และ 20%) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับคือ อัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (10°C/นาที), อัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง (5°C/นาที) และอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า (3°C/นาที) พบว่าการใช้ propylene glycol 15% ที่อัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายดีที่สุด และสามารถปฏิสนธิกับไข่ปลาดุกอุยได้ไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

Abstract

Short - term chilled storage of common silver barb (*Puntius gonionotus*) and catfish (*Clarias macrocephalus*) semen was investigated by diluting freshly collected semen in different kinds of sperm extender at a ratio of 1:1 by volume in tissue culture flasks before storage at temperature of 0-4 °C. Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) was the most suitable sperm extender for chilled storage of *P. gonionotus* semen, compared to the use of Hank's balanced salt solution (HBSS), Cortland solution, Extender 7 and Extender 13. A maximum dilution ratio of *P. gonionotus* semen in Ca-F HBSS was 1:2 by volume since the use of higher dilution ratio significantly declined the successful period of sperm motility before loss of motility. In order to chilled storage of *C. macrocephalus* semen, HBSS was shown to be the appropriate sperm extender, compared to Extender 7, Extender 13 and Cortland solution. In addition, there was no significant difference in successful storage period of *C. macrocephalus* sperm samples diluted with HBSS at 1:1, 1:2 or 1:4.

Cryopreservation of *P. gonionotus* and *C.. macrocephalus* semen was studied based on evaluation on the toxicity of cryoprotectants on sperm motility and development of cryopreservation protocol. Semen of *P. gonionotus* was diluted with different cryoprotectants namely, dimethylsulfoxide (DMSO), acetamide, methanol, formamide, sucrose, propylene glycol, glycerol, ethanol and ethylene glycol at four concentration levels (5%, 10%, 15% and 20%). Methanol, sucrose and DMSO were less toxic to *P. gonionotus* semen. On the other hand, propylene glycol, glycerol and formamide were less toxic to *C. macrocephalus* semen, compared to the use of acetamide and ethylene glycol. Cryopresrvation of *P. gonionotus* semen was accomplished by diluting semen in Ca-F HBSS and DMSO at the final concentrations of 5%, 10%, 15% and 20%. Diluted semen was cryopreserved at three freezing rates, namely slow (3^0C/min), medium (5^0C/min) and fast (10^0C/min) freezing rate using programmable controlled-rate freezer. Results showed that *P. gonionotus* semen cryopreserved with 10% DMSO at 10^0C/min resulted in the highest percentage of sperm motility and were capable of fertilizing eggs similar to the fresh semen. Similarly, *C. macrocephalus* semen was diluted with propylene glycol, glycerol and formamide to get final concentrations of 5, 10, 15 and 20% using Ca-F HBSS as extender. They were frozen using different freezing rate, fast (10°C/min), medium (5°C/min) and slow (3°C/min) freezing rate. Result showed that *C. macrocephalus* semen samples cryopreserved with 15% propylene glycol using the fast freezing rate had the highest sperm motility after thawing, and were capable of fertilizing eggs similar to the fresh semen.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ.....i

Abstract.....ii

กิตติกรรมประกาศ.....iii

สารบัญ.....iv

สารบัญภาพ.....v

บทที่

1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย 1

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ.....4

3. ประโยชน์ที่ได้รับ.....5

4. นิยามศัพท์เฉพาะ.....5

5. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....5

6. วิธีดำเนินการ.....8

7. ผลการศึกษา.....13

8. อภิปรายและสรุปผลการทดลอง.....44

9. เอกสารอ้างอิง.....48

10. ภาคผนวก.....50

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ถูกเก็บรักษาในน้ำยา 5 สูตร ในการทดลองครั้งที่ 1 (ช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่).....14

2 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ถูกเก็บรักษาในน้ำยา 5 สูตร ในการทดลองครั้งที่ 2 (ช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์วางไข่).....15

3 เปอร์เซนต์สเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่มีชีวิต หลังจากถูกเก็บรักษาในน้ำยา 5 สูตร.....15

4 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ถูกเก็บรักษาในน้ำยาCalcium-free Hank's balanced salt solution ในอัตราส่วนต่าง ๆ (ช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์วางไข่).....16

5 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ถูกเก็บรักษาในน้ำยา Calcium-free Hank's balanced salt solution ในอัตราส่วนต่าง ๆ (ช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์วางไข่).....16

6 เปอร์เซนต์สเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่มีชีวิต หลังจากถูกเก็บรักษาในน้ำยา Calcium-free Hank's balanced salt solution ในอัตราส่วนต่าง ๆ.....17

7 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยที่ถูกเก็บรักษาในน้ำยา 4 สูตร ในการทดลองครั้งที่ 1 (ช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์วางไข่).....18

8 เปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตของปลาดุกอุยที่ถูกเก็บรักษาในน้ำยา 4 สูตร ในการทดลองครั้งที่ 1 (ช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์วางไข่).....18

9 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยที่ถูกเก็บรักษาในน้ำยา 4 สูตร ในการทดลองครั้งที่ 2 (ช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่).....19

10 เปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตของปลาดุกอุยที่ถูกเก็บรักษาในน้ำยา 4 สูตร ในการทดลองครั้งที่ 2 (ช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่).....19

11 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยในน้ำยา HBSS ที่อัตราส่วนต่างๆ ในช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์วางไข่.....20

12 เปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตของปลาดุกอุยในน้ำยา HBSS ที่อัตราส่วนต่างๆ ในช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์วางไข่.....20

13 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังจากเจือจางใน DMSO ที่ความเข้มข้น และเวลาต่างๆกัน.....22

ภาพที่ หน้า

14 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังจากเจือจางใน acetamide ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน.....22
15 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังจากเจือจางใน methanol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน.....24
16 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังจากเจือจางใน formamide ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน.....24
17 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังจากเจือจางใน sucrose ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน.....25
18 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังจากเจือจางใน propylene glycol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน.....25
19 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังจากเจือจางใน glycerol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน.....27
20 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังจากเจือจางใน ethanol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน.....27
21 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังจากเจือจางใน ethylene glycol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน.....28
22 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยหลังจากเจือจางใน propylene glycol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน.....30
23 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยหลังจากเจือจางใน formamide ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน.....30
24 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยหลังจากเจือจางใน glycerol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน.....31
25 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยหลังจากเจือจางใน acetamide ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน.....31
26 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยหลังจากเจือจางใน ethylene glycol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน.....32
27 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังการแช่แข็งในสารละลาย DMSO เมื่อหยุดอุณหภูมิที่ 2 องศาเซลเซียสนาน 0.5 นาที.....34

ภาพที่ หน้า

28 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังการแช่แข็ง
ในสารละลาย DMSO เมื่อหยุดอุณหภูมิที่ 0 องศาเซลเซียสนาน 0.5 นาที.....35
29 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังการแช่แข็ง
ในสารละลาย DMSO เมื่อหยุดอุณหภูมิที่ -2 องศาเซลเซียสนาน 0.5 นาที.....36
30 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังการแช่แข็ง
ในสารละลาย DMSO เมื่อหยุดอุณหภูมิที่ -4 องศาเซลเซียสนาน 0.5 นาที.....37
31 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังการแช่แข็ง
ในสารละลาย DMSO เมื่อหยุดอุณหภูมิที่ 2 องศาเซลเซียสนาน 2 นาที.....38
32 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังการแช่แข็ง
ในสารละลาย DMSO เมื่อหยุดอุณหภูมิที่ 0 องศาเซลเซียสนาน 2 นาที.....39
33 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังการแช่แข็ง
ในสารละลาย DMSO เมื่อหยุดอุณหภูมิที่ -2 องศาเซลเซียสนาน 2 นาที.....40
34 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังการแช่แข็ง
ในสารละลาย DMSO เมื่อหยุดอุณหภูมิที่ -4 องศาเซลเซียสนาน 2 นาที.....41
35 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยหลังการแช่แข็งในสารละลาย
propylene glycol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ20% ในอัตราส่วน 1:1.....43
36 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยหลังการแช่แข็งในสารละลาย
glycerol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ20% ในอัตราส่วน 1:1.....43

1. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในปัจจุบันเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทยมีความเจริญก้าวหน้าอยู่ในแนวหน้าของโลก ไม่ว่าจะเป็นเทคนิคการเพาะพันธุ์ การอนุบาล และการเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดต่างๆได้มีการพัฒนามาอย่างต่อเนื่องและยาวนาน อย่างไรก็ตามปัญหาหนึ่งที่มักเกิดขึ้นอยู่เสมอในระหว่างการเพาะพันธุ์ปลาก็คือ พ่อแม่พันธุ์ปลาที่ใช้เพาะพันธุ์มีความสมบูรณ์เพศไม่พร้อมกัน ทำให้เกิดปัญหาในด้านการจัดการในโรงเพาะฟัก เช่น ในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (spawning season) พ่อพันธุ์จะมีปริมาณน้ำเชื้อลดลง ซึ่งแม้ว่าสามารถกระตุ้นได้โดยการฉีดฮอร์โมนให้ปลาสร้างน้ำเชื้อแต่กลับพบว่าแม่พันธุ์มีไข่แก่น้อยมาก ทำให้การเพาะพันธุ์ไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร เพราะโดยทั่วไปแล้วช่วงระยะเวลาที่พ่อพันธุ์สมบูรณ์เพศมักจะเกิดก่อน แต่จะยาวนานกว่าช่วงระยะเวลาที่แม่พันธุ์สมบูรณ์เพศ นอกจากนี้ในบางครั้งช่วงระยะเวลาที่สามารถรีดน้ำเชื้อได้ (sperm availability) ก็ไม่สัมพันธ์กับช่วงระยะเวลาที่แม่พันธุ์ตกไข่ (egg availability) ซึ่งก็อาจเกิดจากพ่อพันธุ์ถูกรีดน้ำเชื้อบ่อยครั้งจนไม่สามารถผลิตน้ำเชื้อได้ทัน หรือเกิดจากความแปรปรวนของปลาแต่ละตัว (individual variation) ที่ผลิตน้ำเชื้อได้ต่างกัน ทำให้ยุ่งยากในการจัดการในระหว่างการผสมเทียมในโรงเพาะฟักเป็นอย่างมาก อีกทั้งการใช้น้ำเชื้อปลาที่รีดออกมาใหม่ๆ (freshly collected milt) เพื่อการผสมเทียมนั้นก็มีข้อจำกัดตรงที่จะต้องใช้ผสมเทียมทันทีไม่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้นาน เพราะคุณภาพน้ำเชื้อลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ผสมไม่ติด ดังนั้นการเพาะพันธุ์ปลาโดยการผสมเทียมจำเป็นต้องมีการพัฒนาเทคนิควิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพื่อให้มีน้ำเชื้อพร้อมอยู่ตลอดเวลาเพื่อการผสมเทียม และสามารถใช้ได้สะดวกรวดเร็วตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

โดยทั่วไปการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพื่อยืดระยะเวลาการเก็บที่สเปิร์มสามารถปฏิสนธิกับไข่ได้สามารถเก็บได้ใน 2 ลักษณะได้แก่ การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เย็นในระยะเวลาสั้น (chilled storage of milt) โดยเก็บรักษาในถังน้ำแข็งหรือในตู้เย็นที่อุณหภูมิสูงกว่า 0 องศาเซลเซียสเล็กน้อย (0-4 องศาเซลเซียส) ส่วนอีกวิธีหนึ่งเป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในระยะเวลายาว (cryopreservation of milt) โดยการแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ - 196 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้เป็นปี ข้อดีของการเก็บน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่ำทำให้ง่ายแก่การจัดการขณะผสมไข่กับน้ำเชื้อในระหว่างการผสมเทียม เพราะน้ำเชื้อจะถูกเตรียมและเก็บรักษาไว้ก่อนซึ่งจะนำมาใช้ได้ทันที ทำให้การผสมเทียมทำได้สะดวกและรวดเร็วขึ้นโดยเฉพาะในกรณีที่แม่พันธุ์ตกไข่ไม่พร้อมกันก็สามารถใช้น้ำเชื้อแช่เย็น นำมาผสมกับไข่ได้ทันที โดยไม่ต้องรีดเอาน้ำเชื้อหลายครั้ง ซึ่งจะทำให้ปลาเครียดและอาจเป็นโรคได้ง่าย นอกจากนี้พ่อพันธุ์ก็ไม่จำเป็นที่จะต้องเก็บไว้ในโรงเพาะพักเช่นเดียวกับแม่พันธุ์ขณะผสมเทียม เนื่องจากน้ำเชื้อสามารถเก็บแช่เย็นไว้ได้ อีกทั้งการลำเลียงน้ำเชื้อแช่เย็นทำได้สะดวกกว่าการลำเลียงพ่อพันธุ์ การเก็บน้ำเชื้อแบบแช่เย็น ยังเป็นแนวทางหนึ่งที่มีประโยชน์เป็นอย่างมากต่อการผสมเทียมปลาบางชนิดเช่นปลาดุกซึ่งไม่สามารถรีดน้ำเชื้อได้ เพราะการผสมเทียมปลาที่ไม่สามารถรีดน้ำเชื้อได้นั้นจำเป็นต้องฆ่าปลา และ

ผ่าเอาถุงอัณฑะมาบดขยี้เพื่อให้ได้น้ำเชื้อไปผสมกับไข่ น้ำเชื้อที่เหลือใช้จะไม่สามารถเก็บไปใช้ได้ในภายหลัง เพราะสเปิร์มเมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำจะเคลื่อนที่เร็วมาก และจะหยุดการเคลื่อนที่ภายใน 1 นาทีเท่านั้น แต่ถ้าได้เก็บน้ำเชื้อแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิต่ำโดยเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมก็สามารถยืดระยะเวลาที่สเปิร์มสามารถปฏิสนธิกับไข่ ออกไปได้นานขึ้นหลายสัปดาห์ และทำให้น้ำเชื้อถูกใช้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่มีการสูญเสีย

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งทำโดยการนำเอาน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (sperm extender) พร้อมกับใส่สารที่ป้องกันไม่ให้เซลล์เป็นอันตรายในระหว่างการแช่แข็ง (cryoprotectant) แล้วจึงเอาไปบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อพร้อมกับลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ก่อนที่จะเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ซึ่งสามารถรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อปลาได้เป็นเวลานานเป็นปี สำหรับในประเทศไทยการศึกษาการเก็บน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งยังมีอยู่น้อยมากเมื่อเทียบกับในต่างประเทศ เนื่องจากปลาส่วนใหญ่มีน้ำเชื้อที่สมบูรณ์ดีตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และหาได้ง่ายทำให้ไม่นิยมเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งเอาไว้ใช้ในอนาคตแม้ว่าปัญหาการขาดแคลนน้ำเชื้อปลายังมักพบอยู่บ่อยครั้งในระหว่างการเพาะพันธุ์ปลา การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งยังมีบทบาทสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์ปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเพื่อผลิตปลาที่โตเร็ว หรือทนทานต่อโรคให้มากขึ้นเพราะสามารถควบคุมช่วงเวลาการผสมเทียมหรือการผสมข้ามพันธุ์ปลาชนิดต่างๆได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้การลำเลียงน้ำเชื้อแช่แข็งไปใช้ในการผสมเทียมก็ทำได้สะดวกกว่าการลำเลียงพ่อพันธุ์ โดยสามารถขนส่งไปภายในประเทศและระหว่างประเทศได้ง่าย และยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการเก็บรักษาพันธุกรรมของธนาคารยีน (gene bank) หรือป้องกันการสูญเสียพ่อพันธุ์ปลาที่มีความสำคัญทางพันธุกรรม และยังอาจใช้เป็นแนวทางของการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาตัวอ่อนของลูกปลาต่อไปในอนาคต อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งมีแนวโน้มที่จะมีความสำคัญอย่างมากต่อการอนุรักษ์ปลาที่หาได้ยาก ใกล้สูญพันธุ์ หรือปลาที่มีการกลายเพศซึ่งเพศผู้และเพศเมียจะพัฒนาถึงวัยเจริญพันธุ์ไม่พร้อมกัน นอกจากนี้ในบางครั้งการจับพ่อแม่พันธุ์ปลาจากแหล่งผสมพันธุ์วางไข่ก็ได้ปลาเพศผู้และเพศเมียไม่พร้อมกันซึ่งก่อให้เกิดปัญหาในด้านการจัดการ เช่น ตัวเมียที่จับได้ก่อนมีไข่ที่ไม่สมบูรณ์ต้องใช้ฮอร์โมนฉีดกระตุ้นซึ่งต้องขังตัวผู้ไว้หลายวันทำให้พ่อปลาช้ำและตายได้

ปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus*) และปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) เป็นปลาน้ำจืดพื้นบ้านของไทยที่คนไทยรู้จักกันดี และมีการเลี้ยงอย่างแพร่หลายทั่วประเทศ ปลาเหล่านี้แต่เดิมสามารถพบได้ง่ายตามธรรมชาติแต่ในปัจจุบันแหล่งน้ำต่างๆได้เปลี่ยนสภาพไปจากเดิม เนื่องจากการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของพลเมือง ทำให้ปริมาณปลาในแหล่งน้ำต่างๆลดลง และไม่สามารถเพิ่มปริมาณให้มีมากได้เพียงพอแก่ความต้องการ การเพาะพันธุ์ปลาดังกล่าวก็ได้ประสบผลสำเร็จเป็นอย่างดีทั้งการเพาะพันธุ์

โดยการผสมเทียมและการเพาะพันธุ์เลียนแบบธรรมชาติ ปลาตะเพียนขาวนับได้ว่าเป็นปลาเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่นิยมในการบริโภค เพราะเลี้ยงง่าย โตเร็ว รสดี หากประกอบอาหารด้วยวิธีที่เหมาะสมก็จะลดปัญหาเรื่องก้างลงได้ ด้วยเหตุผลดังกล่าวราคาของปลาเนื้อจึงค่อนข้างดีและสม่ำเสมอเมื่อเทียบกับต้นทุน ราคาซื้อขายในท้องตลาดจะอยู่ประมาณ 21 – 48 บาท (กรมประมง , 2543) ปลาดุกอุยเป็นปลาที่ได้รับความนิยมในการบริโภคสูงเมื่อเปรียบเทียบกับปลาดุกชนิดอื่นๆ เช่นดุกด้าน ดุกเทศ ดุกลำพัน เป็นต้น เนื่องจากเป็นปลาที่มีรสชาติดี เนื้อนุ่มอร่อย และยังเป็นปลาที่มีราคาจำหน่ายสูงกว่าปลาดุกชนิดอื่น ๆ (วิทย์ และคณะ, 2525) จึงมีการเพาะขยายพันธุ์ปลาดุกอุยกันอย่างกว้างขวาง แต่เนื่องจากปลาดุกเป็นปลาที่ไม่สามารถรีดน้ำเชื้อโดยการกดบริเวณส่วนท้องเหมือนปลาชนิดอื่น ๆ ได้ เพราะอัณฑะปลาดุกจะอยู่ลึกลงไปในช่องท้องใต้ระบบทางเดินอาหาร ทำให้การเพาะขยายพันธุ์จึงต้องมีการผ่าท้องปลาดุกเพศผู้ เพื่อเอาอัณฑะมาขยี้เอาน้ำเชื้อออกมาใช้ผสมเทียมกับไข่ ดังนั้นการใช้น้ำเชื้อที่ได้มาจากการผ่าท้องปลาแต่ละครั้งจึงควรใช้ให้คุ้มค่าที่สุด เพราะน้ำเชื้อที่เหลือใช้จะมีชีวิตอยู่ได้นานไม่เกิน 1 นาที ทำให้เกิดการสูญเสียน้ำเชื้อ ดังนั้นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยใช้น้ำเชื้อให้มีประสิทธิภาพจำเป็นต้องเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา

ในปัจจุบันการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็งในต่างประเทศนิยมทำในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและใกล้สูญพันธุ์ทั้งปลาน้ำจืด และปลาทะเล เช่น ปลากระพงขาว ปลา salmon ปลา channel catfish ปลา sea bream และปลา Atlantic croaker เป็นต้น น้ำเชื้อแช่เย็นนิยมเก็บรักษาใน tissue culture flasks แต่น้ำเชื้อแช่แข็งนิยมเก็บรักษาในหลอดฟาง (straw) การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่เย็นทำได้ 2 วิธีได้แก่ การเก็บโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (undiluted milt) และ การเก็บโดยเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (diluted milt) โดยทั่วไปแล้วการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ทำได้ง่ายและไม่สลับซับซ้อนเหมือนกับการเก็บน้ำเชื้อแช่เย็นเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ อย่างไรก็ตามระยะเวลาที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นั้นมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับเทคนิคการเก็บรักษา และชนิดของปลาซึ่งอาจจะเก็บได้ตั้งแต่ 2-3 ชั่วโมง จนถึง 2-3 เดือน (Scott และ Baynes,1980) ปัจจัยที่มีผลต่อระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เย็นที่ไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์เท่าที่รายงานมา ได้แก่การให้ออกซิเจนสมทบ (Stoss และคณะ, 1987) ส่วนการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ จะมีความยุ่งยากกว่าเพราะจำเป็นต้องใช้ตัวละลายที่เหมาะสมที่ไม่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ระหว่างการเก็บแช่เย็น แต่การเก็บโดยวิธีนี้ก็สามารถควบคุมการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่อาจเกิดขึ้นในน้ำเชื้อระหว่างการแช่เย็นได้ดีกว่า การเก็บน้ำเชื้อโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (Stoss, 1983) การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานเป็นปี เมื่อต้องการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในการผสมเทียมก็นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อมาละลายโดยการเพิ่มอุณหภูมิ ดังนั้นความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ และชนิดสาร cryoprotectants ที่เหมาะสม (Rana และ McAndrew, 1989) อัตราการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็ง (freezing)

และการเพิ่มอุณหภูมิขณะละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (Scott และ Baynes, 1980) นอกจากนี้ความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อปลาที่เกิดขึ้นในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และ เทคนิคของการทำน้ำเชื้อปลาแช่แข็ง ก็มีผลทำให้ความสำเร็จของการทำน้ำเชื้อแช่แข็งแต่ละครั้งแตกต่างกันไป โดยทั่วไปน้ำเชื้อของปลา (milt) ประกอบด้วยสเปิร์ม (sperm) และของเหลวที่หล่อเลี้ยง (seminal fluid) โดยที่สเปิร์มจะไม่เคลื่อนที่ขณะอยู่ในถุงอัณฑะ หรือของเหลวที่หล่อเลี้ยง แต่จะมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วมากเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสภาพแวดล้อมภายนอก และจะหยุดเคลื่อนที่ภายใน 1 นาทีหลังจากถูกกระตุ้น กลไกที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาน้ำจืดพบว่าสารละลายที่มีค่า osmolarity ต่ำกว่า (hypotonicity) ระดับที่พบใน seminal fluid จะกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ แต่ในปลาทะเลนั้นสารละลายที่มีค่า osmolarlity สูงขึ้น (hypertonicity) จะกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ (Morisawa และคณะ, 1983) ดังนั้นการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ จึงมีความสำคัญมากเพราะทำให้สเปิร์มไม่ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ขณะอยู่ในระหว่างการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง

ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวและปลาดุกอุยทั้งแบบแช่เย็น และแบบแช่แข็งเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการจัดการการเพาะพันธุ์ปลาให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เนื่องจากทำให้การเพาะพันธุ์มีความสะดวกขึ้น ไม่ต้องขังพ่อพันธุ์ไว้ในโรงเพาะฟัก ทำให้ลดการใช้พื้นที่ภายในโรงเพาะฟัก แต่การที่จะประสบความสำเร็จในการพัฒนาเทคโนโลยีเหล่านี้จำเป็นต้องสามารถควบคุมปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องให้ได้ เช่น ความสมบูรณ์ของน้ำเชื้อสดที่ใช้ทำน้ำเชื้อแช่แข็ง และกระบวนการในการทำน้ำเชื้อแช่เย็น และแช่แข็ง ได้แก่ ส่วนประกอบของน้ำยาที่ใช้ในการเก็บรักษาที่เหมาะสม อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา ระยะเวลาที่ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ อัตราการลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็ง และเทคนิคต่าง ๆ ก่อนการแช่แข็งและขณะการเก็บรักษา ตลอดจนวิธีการนำไปใช้ผสมเทียมกับไข่

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ

2.1ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยาบัฟเฟอร์สูตรต่าง ๆใช้เจือจางน้ำเชื้อ (sperm extender) และปัจจัยชนิดต่างๆที่มีผลต่อระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว และปลาดุกอุยแบบแช่เย็น

2.2. ศึกษาชนิดของไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectants) ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวและปลาดุกอุยแบบแช่แข็ง

2.3 เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว และปลาดุกอุยแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็ง

3. ประโยชน์ที่ได้รับ

3.1 ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว และปลาดุกอุยแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็ง ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการพัฒนางานวิจัยเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาชนิดอื่นๆที่หาได้ยากหรือใกล้สูญพันธ์ต่อไปในอนาคต

3.2 ทำให้ทราบถึงชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว และปลาดุกอุยและไครโอโพรเทคแทนท์ที่ควรใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง ทำให้การเพาะพันธุ์ปลามีความสะดวกขึ้น

3.3ได้พัฒนาเทคโนโลยีการเก็บน้ำเชื้อปลาแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็งเพื่อการผสมเทียมปลาโดยสามารถเก็บน้ำเชื้อปลาได้ในระยะเวลาที่นานขึ้นเพื่อใช้ประโยชน์สูงสุดในการผสมเทียมปลา ซึ่งสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีนี้ไปยังนักวิชาการประมง และเกษตรกรผู้เพาะพันธุ์ปลา

4. นิยามศัพท์เฉพาะ

1. cryopreservation : การเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ ได้แก่ การเก็บรักษาเซลล์ไข่ น้ำเชื้อตัวผู้ ตัวอ่อน หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิตโดยผ่านขบวนการแช่แข็ง แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส
2. cryoprotectant : สารป้องกันมิให้เซลล์เป็นอันตรายในขบวนการแช่แข็ง
3. extender : น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อเพื่อการเก็บรักษาแบบแช่เย็นหรือแช่แข็ง
4. freezing : ขบวนการลดอุณหภูมิในการแช่แข็ง
5. thawing : ขบวนการเพิ่มอุณหภูมิหรือการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง
6. equilibration time : ระยะเวลาภายหลังผสมน้ำเชื้อกับน้ำยาที่มีส่วนผสมของสารไครโอโพรเทคแทนท์
7. chilled storage of milt : การเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส

5. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่เย็นขึ้นอยู่กับการควบคุมไม่ให้สเปิร์มที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (sperm extender) ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ขณะเก็บรักษา เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีโดยทั่วไปแล้วว่าน้ำเชื้อของปลาน้ำจืดเมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำ จะเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วและหยุดเคลื่อนที่ภายในเวลาประมาณ 1 นาที ดังนั้นการเลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์ต้องมีความเหมาะสมเพราะอาจมีผลกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ได้ ซึ่งนั่นหมายถึงความล้มเหลวในการเก็บรักษาน้ำเชื้อเพราะ สเปิร์มไม่

สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ นอกจากนี้ปัจจัยชนิดต่างๆที่มีผลต่อระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อก็จะต้องศึกษาให้ทราบแน่ชัดว่าปลาชนิดใดต้องการปัจจัยอะไรเฉพาะบ้างหรือไม่เพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อให้คงคุณภาพนานที่สุด กรอบแนวความคิดของโครงการได้มุ่งศึกษาเกี่ยวกับการเลือกสารละลายบัฟเฟอร์ ใช้ที่เหมาะสม การใส่ออกซิเจนสมทบและยาปฏิชีวนะในการเก็บรักษาดังที่ปรากฏในงานวิจัยเหล่านี้

Morisawa และคณะ (1983) ได้ศึกษาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มของปลาน้ำจืดหลายชนิดเช่น ปลาไน ปลาดุก พบว่า osmotic pressure ที่มีค่าลดลงจะมีผลในการกระตุ้นทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่มากขึ้น Bates และคณะ (1996) ก็ได้เสนอว่า osmolarity ที่มีค่าลดลงจะมีผลในการกระตุ้นให้สเปิร์มของปลา channel catfish เคลื่อนที่เช่นกัน ซึ่งอาจเป็นลักษณะปกติที่เกิดขึ้นใน Superorder Ostariophysii ในการทางตรงกันข้ามสเปิร์มของปลาทะเลจะเคลื่อนที่มากขึ้น เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารละลายที่มีค่า osmotic pressure สูงกว่าระดับที่พบใน seminal fluid ฉะนั้นการที่จะเก็บน้ำเชื้อแช่เย็นได้นานจึงควรเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า osmolarity เท่ากับระดับที่พบใน seminal fluid เพราะจะช่วยป้องกันมิให้สเปิร์มถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ได้ เนื่องจากเมื่อสเปิร์มเริ่มเคลื่อนที่ จะมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วมาก และจะหยุดเคลื่อนที่ภายในเวลาประมาณ 1 นาทีเท่านั้น

Stoss และคณะ (1987) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา rainbow trout แช่เย็นโดยไม่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ พบว่า ความสูงของน้ำเชื้อที่เก็บไม่ควรเกิน 5-6 มิลลิเมตร ขณะเก็บแช่เย็น เพื่อให้สเปิร์มได้มีอากาศถ่ายเทอย่างเพียงพอ

DiLauro และคณะ (1994) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Atlantic sturgeon แช่เย็นโดยไม่เจือจางสารละลายบัฟเฟอร์ ไว้บนน้ำแข็ง และให้ออกซิเจนสมทบทุกวันพบว่า น้ำเชื้อสามารถเก็บได้เป็นระยะเวลา 5 วัน โดยที่คุณภาพของสเปิร์มไม่เปลี่ยนแปลง

Satterfield และ Flickinger (1995) ได้นำน้ำเชื้อปลา Walleye จำนวน 8 ml มาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน น้ำเชื้อ : สารละลายบัฟเฟอร์ 1:2 ภายในกล่องแซนวิส (Plastic Rubbermaid sandwich container) ขนาด 11.4 x 10.8 ซม. แล้วจึงเก็บแช่เย็นในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศา เซลเซียส พร้อมทั้งอัดออกซิเจนสมทบทุกวัน ปรากฏว่า น้ำเชื้อแช่เย็นที่เก็บไว้นาน 5 วัน สามารถปฏิสนธิไข่ปลาได้ดี มีอัตราการปฏิสนธิเท่ากับการใช้น้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ๆ

Christensen และ Tiersch (1996) ได้นำน้ำเชื้อปลา Channel catfish มาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ Hank's balanced salt solution แล้วเก็บในภาชนะต่างๆกัน ที่อุณหภูมิ 4 องศา เซลเซียส ทั้งในสภาพให้ออกซิเจน และไม่ให้ออกซิเจนสมทบ ปรากฏว่า น้ำเชื้อที่เก็บในถุงพลาสติก Zip-loc ที่ให้ออกซิเจนสมทบ สามารถเก็บรักษาได้ในระยะเวลาที่นานกว่าน้ำเชื้อที่เก็บโดยไม่ให้ออกซิเจนสมทบ

สำหรับงานวิจัยด้านการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งมีหลักการทำงานที่คล้ายกันแต่ความสำเร็จที่ได้ส่วนมากแล้วมีความแตกต่างกันไปในปลาแต่ละชนิดทั้งในแง่ของชนิดและความเข้มข้นของ

cryoprotectants ที่ใช้ อัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็ง และ อัตราการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ดังนั้นการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว และปลาดุกอุยจึงต้องเริ่มจากการนำเอาสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับปลาแต่ละชนิดซึ่งไม่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่มาเจือจางน้ำเชื้อ แล้วจึงนำไปผสมด้วย cryoprtectants ชนิดต่างๆ ที่เวลาต่างๆกันเพื่อดูความเป็นพิษของ cryoprotectants ที่อาจมีต่อสเปิร์ม จากนั้นจึงใช้อัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็ง และ อัตราการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อละลายน้ำเชื้อที่แตกต่างกันโดยมีสมมติฐานว่าความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว และปลาดุกอุยขึ้นอยู่กับการเลือกใช้ชนิดและระดับของ 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 หรือมีสารเคมีหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ และยังพบว่าอัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็งตั้งแต่ –10 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง –150 องศาเซลเซียส/นาที ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิขณะนำมาผสมกับไข่

Rana และ McAndrew (1989) รายงานการทำน้ำเชื้อปลานิลแช่แข็งโดยเจือจางน้ำเชื้อในสารละลาย Ringer ที่มี methanol เป็น cryoprotactant ที่ระดับต่างๆกัน ในหลอดฟางขนาด 0.5 ml. พบว่า การใช้ 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

6. วิธีดำเนินการ

6.1 การรวบรวมน้ำเชื้อและประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

พ่อพันธุ์ปลาตะเพียนขาว และปลาดุกอุยได้ถูกรวบรวมและลำเลียงจากบริเวณ จังหวัดชลบุรี และฉะเชิงเทรามายังโรงเพาะฟักของภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ปลาได้ถูกชั่งน้ำหนัก วัดความยาว ก่อนที่จะนำน้ำเชื้อออกมาเพื่อประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อ การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อจะพิจารณาจาก parameter ที่สำคัญ ได้แก่การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (sperm motility) ที่วัดออกมาเป็นเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (percentage of motile sperm) ปลาตะเพียนขาวถูกสลบด้วยยาสลบแล้วเช็ดบริเวณช่องท้องให้แห้งสนิท จากนั้นจึงออกแรงกดบริเวณช่องท้องเบาๆ เพื่อรวบรวมตัวอย่างน้ำเชื้อ (ประมาณ 1-2 มิลลิลิตรจากปลาแต่ละตัว) ไปประเมินคุณภาพน้ำเชื้อทันทีในห้องปฏิบัติการ แต่ปลาดุกอุยจะถูกผ่าท้องเอาอัณฑะออกมาเพื่อรวบรวมน้ำเชื้อ แล้วล้างถุงอัณฑะปลาดุกอุยให้สะอาดด้วย 0.85% NaCl โดยพยายามล้างเอาเลือดที่ติดรอบถุงอัณฑะออกไป และนำถุงอัณฑะปลาดุกอุยวางบนจานแก้วที่แห้งและอยู่บนน้ำแข็ง จากนั้นตัดถุงอัณฑะที่บริเวณปลายแล้ว รีดเอาแต่น้ำเชื้อออกมา

น้ำเชื้อที่ใช้ในการศึกษาจะถูกรวบรวมจากตัวผู้หลายตัว (pooled milt samples) ประมาณ 3-6 ตัว เพื่อลดความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อ (individual variation) น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีเท่านั้นที่จะถูกนำมาใช้ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งโดยต้องเป็นน้ำเชื้อที่มีลักษณะขาวขุ่น และไม่มีเมือก หรือ เลือดปน และจะต้องมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่สูง (มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์) เท่านั้น น้ำเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จะไม่นำมาใช้ในการทดลองเพื่อให้มั่นใจว่าขณะเริ่มการทดลองน้ำเชื้อปลามีคุณภาพที่ดีพอ พ่อพันธุ์ที่มีน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดี ผ่านหลักเกณฑ์ที่วางไว้ ก็จะถูกรวบรวมน้ำเชื้อเพื่อนำไปทำน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยการใช้หลอด syringe รวบรวมน้ำเชื้อไปใส่ใน tissue culture flask แล้วจึงเก็บไว้บนน้ำแข็ง หรือเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆเพื่อรักษาคุณภาพสเปิร์มไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลง น้ำเชื้อเหล่านี้จะถูกเก็บไว้บนน้ำแข็งอย่างมากไม่เกิน 1 ชั่วโมงในระหว่างขั้นตอนการทำน้ำเชื้อแช่เย็นและแช่แข็ง

การประเมินสเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว และปลาดุกอุยที่ถูกเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆทำโดยการนำเอาน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง (5 μl) มาย้อมสีด้วยสารละลาย eosin-nigrosin (5 μl) ตามวิธีการของ Fribourgh (1966) แล้วจึงสุ่มนับจำนวนสเปิร์มที่มีชีวิตซึ่งจะไม่ติดสีย้อม (viable sperm) และจำนวนสเปิร์มที่ตายซึ่งจะติดสีย้อม (dead sperm) โดยสุ่มนับไม่ต่ำกว่า 250 ตัว/สไลด์ และนับ 3 ซ้ำต่อชุดการทดลอง โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า แล้วจึงคำนวณกลับหาเปอร์เซนต์ของสเปิร์มที่มีชีวิต

เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (percentage of motile sperm) ประเมินจาก จำนวณสเปิร์มที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าอย่างรวดเร็วเมื่อถูกกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl โดยแบ่งระดับที่สเปิร์มเคลื่อนที่ไว้ 6 ระดับ คือ สเปิร์มที่เคลื่อนที่ได้ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% (Vuthiphandchai and Zohar, 1999)

6.2 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว และปลาดุกอุยแบบแช่เย็น

น้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวจะรวบรวมจากตัวผู้หลายตัว (pooled samples) เพื่อให้ได้น้ำเชื้อ 6-8 ml (3 ซ้ำ/ชุดการทดลอง) น้ำเชื้อจะถูกดูดด้วย syringe ก่อนนำไปเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ 5 ชนิดได้แก่ cortland solution, Hank's balanced salt solution (HBSS), calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS หรือ Ca-F), extender 7 และ extender 13 ในอัตราส่วน 1:1 โดยนำน้ำเชื้อสดปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ใน tissue culture flask ขนาด 75 มิลลิลิตรแล้วใส่สารละลายบัฟเฟอร์ลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเบาๆ แล้วนำไปเก็บในที่ควบคุมอุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง สำหรับกลุ่มควบคุมใช้น้ำเชื้อที่รีดออกมาใหม่ๆ โดยเก็บใน tissue culture flask ที่ควบคุมอุณหภูมิ 0-2 องศาเซลเซียสเช่นกัน การสุ่มตัวอย่างน้ำเชื้อของทุกชุดการทดลองจะทำทุกวันๆละ 1 ครั้งเพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม จนกระทั่งสเปิร์มหยุดเคลื่อนที่ เพื่อทราบช่วงระยะเวลาที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อก่อนที่สเปิร์มจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำ การทดลองในช่วงต่อมานำน้ำเชื้อมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุดในอัตราส่วน 1:1, 1:2 หรือ 1:4 เปรียบเทียบกับการแช่เย็นน้ำเชื้อสดดังที่ได้กล่าวมาแล้ว ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เย็นทราบจากการพิจารณาสารละลายบัฟเฟอร์ที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้นานที่สุดก่อนที่การเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะลดลงหรือหยุดเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วย 0.4 % NaCl

น้ำเชื้อปลาดุกอุยรวบรวมจากปลา 10-15 ตัว (pooled milt samples) โดยเอาอัณฑะปลาออกมาแล้วใช้กรรไกรตัดอัณฑะเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วนำไปขยี้บนผ้าขาวบางให้ได้น้ำเชื้อออกมา การนำน้ำเชื้อมาเจือจางทำเช่นเดียวกับปลาตะเพียนขาว โดยนำน้ำเชื้อมาเจือจางด้วยการเลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 4 ชนิดได้แก่ HBSS, extender 7, extender 13 และ Cortland solution ในอัตราส่วน 1: 1 แล้วนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-2 องศาเซลเซียส จึงประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่เวลาต่างๆกันหลังการแช่เย็น การทดลองในช่วงต่อมานำน้ำเชื้อมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุดในอัตราส่วน 1:1, 1:2 หรือ 1:4 เปรียบเทียบกับการแช่เย็นน้ำเชื้อสด

6.3 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว และปลาดุกอุยแบบแช่แข็ง

6.3.1 ศึกษาความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทราบความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่เหมาะสมก่อนที่จะนำไปใช้ในการทำน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง การทดลองเริ่มจากนำน้ำเชื้อของปลาตะเพียนขาวมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม (ทราบจากการทดลองข้อ 6.2) โดยใช้น้ำเชื้อที่รวบรวมมา 5 มิลลิลิตรเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ภายใน tissue culture flask ขนาด 75 cm^3 ในขณะเดียวกัน cryoprotectant ชนิดต่างๆ จะถูกเตรียมขึ้นมาด้วยการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมเป็นตัวทำละลายแล้วผสมเข้ากับน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางในอัตราส่วน 1:1 เช่นกันเพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของ cryoprotectant ตามที่ต้องการ ในแต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำโดยใช้น้ำเชื้อเจือจาง 0.5 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ 0.5 มิลลิลิตร และทดลองที่อุณหภูมิห้อง

cryoprotectant ที่ใช้ทดสอบกับน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวได้แก่ DMSO, acetamide, methanol, formamide, sucrose, propylene glycol, glycerol, ethanol และ ethylene glycol สำหรับ cryoprotectant แต่ละชนิดถูกผสมไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางเพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 5%, 10%, 15% และ 20% การเช็คเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่เคลื่อนที่ในการทดลองนี้จะทำในระยะเวลาต่างๆกันหลังจากใส่ cryoprotectant ลงไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มกับกลุ่มควบคุมซึ่งใช้น้ำเชื้อที่เจือจางด้วย 0.9%NaCl

การประเมินความเป็นพิษของ cryoprotectant ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยทำโดยใช้สาร cryoprotectant ชนิดต่างๆได้แก่ propylene glycol, glycerol, formamide, acetamide และ ethylene glycol น้ำเชื้อปลาดุกอุยถูกเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมและสารไครโอโพรเทคแทนท์ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5%, 10%, 15% และ 20% ใน tissue culture flask ที่อุณหภูมิห้อง แล้วประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ระยะเวลาต่างๆกัน

6.3.2 ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา

การผลิตน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว และปลาดุกอุยแบบแช่แข็งสำหรับแต่ละชุดการทดลองที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิต่างกันเริ่มจากการนำเอาน้ำเชื้อของปลาแต่ละชนิดมาประมาณ 2 มิลลิลิตรมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม (C-F HBSS) ในอัตราส่วน 1:1 แล้วนำน้ำเชื้อเจือจางไปเจือจางต่อในสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในอัตราส่วน 1:1 แล้วปล่อยน้ำเชื้อเจือจางไว้ 10 นาที เพื่อให้เกิดสภาพสมดุลย์ของสารละลาย (equilibrium) ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ก่อนที่จะถูกรวบรวมไว้ในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรเพื่อนำไปแช่แข็งต่อไป การแช่แข็งน้ำเชื้อใช้เครื่องมือ controlled-rate programmable freezer (model CL-3000 ของ CryoLogic ประเทศออสเตรเลีย)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวใช้ DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ด้วยการใช้ Ca-F HBSS เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ โดยแบ่งชุดการทดลองในลักษณะ Factorial experimental design กล่าวคือ ใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลาย DMSO เป็น 5%, 10%, 15%, และ 20% และใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 อัตราได้แก่ 3, 5 และ 10 องศาเซลเซียส/นาที การลดอุณหภูมิเริ่มจากอุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย –20 องศาเซลเซียสก่อนนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว แต่ในขณะที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิแตกต่างกันนั้นจะมีการควบคุมให้อุณหภูมิหยุดคงที่ๆ 2, 0, -2 และ –4 องศาเซลเซียสนาน 0.5 หรือ 2 นาที (holding temperature) ก่อนที่จะลดอุณหภูมิต่อไป และเมื่อลดอุณหภูมิถึงอุณหภูมิสุดท้าย –20 องศาเซลเซียสก็ควบคุมให้หยุดคงที่นาน 0.5 หรือ 2 นาทีเช่นกันก่อนให้อุณหภูมิลดต่อไปในลักษณะของ free fall แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวทันทีโดยทดลอง 3 ซ้ำ

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยใช้ propylene glycol, glycerol และ formamide ซึ่งมีความเป็นพิษต่ำเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ด้วยการใช้ Ca-F HBSS เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ โดยแบ่งชุดการทดลองในลักษณะ Factorial experimental design กล่าวคือใช้ความเข้มข้นสุดท้ายของสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิดเป็น 5%, 10%, 15%, และ 20% และใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 อัตราได้แก่ 3, 5 และ 10 องศาเซลเซียส/นาที การลดอุณหภูมิเริ่มจากอุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย –40 องศาเซลเซียสก่อนนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว แต่ในขณะที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิแตกต่างกันนั้นจะมีการควบคุมให้อุณหภูมิหยุดที่ๆอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสนาน 0.5 นาที (holding temperature) ก่อนที่จะลดอุณหภูมิต่อไป และเมื่อลดอุณหภูมิถึงอุณหภูมิสุดท้าย –40 องศาเซลเซียสก็ควบคุมให้หยุดที่อุณหภูมินี้นาน 0.5 นาทีก่อนให้อุณหภูมิลดต่อไปในลักษณะของ free fall แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวทันที

น้ำเชื้อปลาแช่แข็งที่ได้เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวอย่างน้อย 2 ชั่วโมงถูกนำมาประสิทธิภาพการแช่แข็งโดยนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลาย (thawing) ด้วยการเพิ่มอุณหภูมิอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส นานประมาณ 5 วินาทีจนน้ำเชื้อละลาย (thawing) แล้วจึงนำไปเช็คเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยการตัดหลอดฟางเพื่อนำน้ำเชื้อออกมาใช้เข็มเขี่ยที่สะอาดเขี่ยน้ำเชื้อแตะลงบน slide ปิดด้วย cover slide ที่หยดน้ำเกลือ 0.4% ไว้เพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่และรีบประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่าภายในเวลาไม่เกิน 1 นาที

6.3.3 ศึกษาการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง

ฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่ในปลาตะเพียนขาว และปลาดุกอุยเพศเมียโดยใช้ฮอร์โมน Lutenizing Hormone Releasing Hormone analogue (LHRHa) (มีชื่อทางการค้าว่า Suprefect) ในอัตรา 20-30 μg/kg ร่วมกับ Domperidone (มีชื่อทางการค้าว่า Motilium) ในอัตรา 5 mg/kg การรวบรวมไข่ทำโดยนำแม่พันธุ์ปลาตะเพียนขาวและแม่พันธุ์ปลาดุกอุยที่มีการตกไข่และพร้อมผสมพันธุ์วางไข่ จำนวน 1-2 ตัวมารีดไข่ใส่ในจานแก้วที่วางบนน้ำแข็ง ภายหลังจากฉีดฮอร์โมนไปนาน 10-12 ชั่วโมง จากนั้นใช้กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตรที่ตัดปลาย ดูดไข่แล้วนำไปใส่ในจานแก้วอีกใบประมาณ 0.2 ml (มีจำนวนไข่ประมาณ 200ใบ/จานแก้ว) การผสมเทียมทำโดยนำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว หรือน้ำเชื้อดุกอุยที่แช่แข็งในไนโตรเจนเหลวไว้ประมาณ 2 ชั่วโมงมาละลายที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที แล้วตัดหลอดฟางออกแล้วเทน้ำเชื้อที่ละลายลงไปบนไข่ในจานแก้วที่ดูดไข่มา 0.2 ml โดยใช้ 1 หลอดฟางต่อหนึ่งจานแก้ว และผสมให้น้ำเชื้อและไข่เข้ากันดี แล้วเทน้ำท่วมไข่เล็กน้อยพร้อมกับผสมให้ไข่กับน้ำเชื้อเข้ากันอย่างดี จากนั้นทำการล้างไข่ด้วยน้ำ 2 ครั้งแล้วปล่อยให้ไข่ปลาดุกอุยพัฒนาในจานแก้วโดยให้น้ำท่วมไข่ตลอดเวลา แต่ไข่ปลาตะเพียนขาวได้ย้ายมาใส่ในปีกเกอร์ขนาด 1 ลิตรและให้ออกซิเจนเบาๆเพื่อให้ไข่ลอยไปมาในภาชนะ การผสมเทียมได้ทำ 4 ซ้ำ แต่สำหรับกลุ่มควบคุมใช้น้ำเชื้อสดจำนวนประมาณ 100 μl ในการปฏิสนธิกับไข่ในจานแก้ว ในระหว่างการประเมินอัตราการปฏิสนธิเปลี่ยนถ่ายน้ำในจานแก้ว หรือปีกเกอร์ทุกๆ 1-2 ชั่วโมง นำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศ์กำลังขยาย 10 เท่าเพื่อดูว่าไข่มีการปฏิสนธิหรือไม่ โดยสุ่มนับจำนวนไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ (ระยะบลาสตูลาร์) เปรียบเทียบกับการปฏิสนธิที่ใช้น้ำเชื้อสด

7. ผลการศึกษา

การทดลองสามารถแบ่งออกได้เป็น 6 ตอน คือ

7.1 การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่เย็น

7.2 การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่เย็น

7.3 การศึกษาความเข้มข้นของ cryoprotectants ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว

7.4 การศึกษาความเข้มข้นของ cryoprotectants ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย

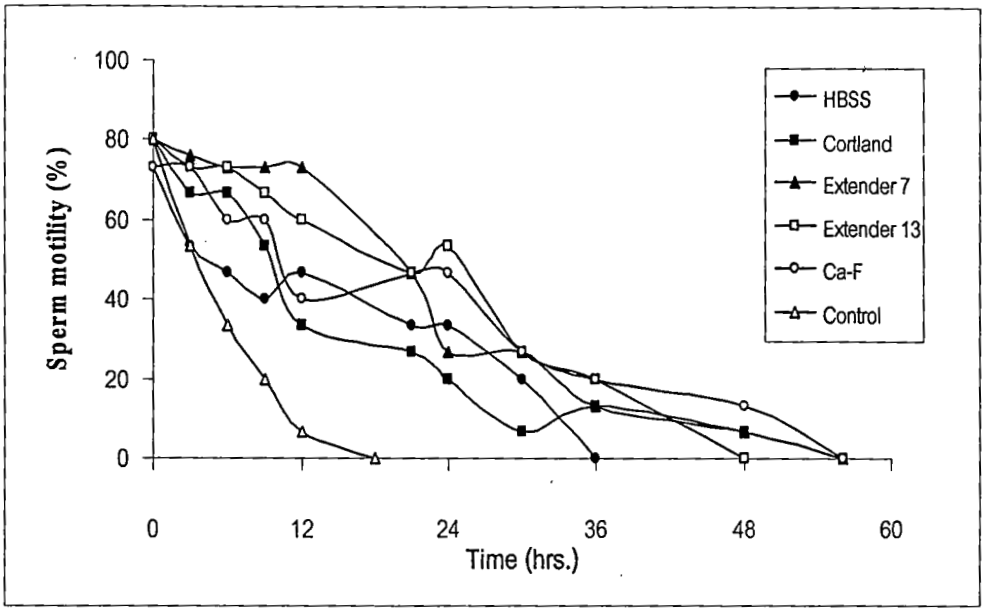
7.5 การศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว

7.6 การศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย

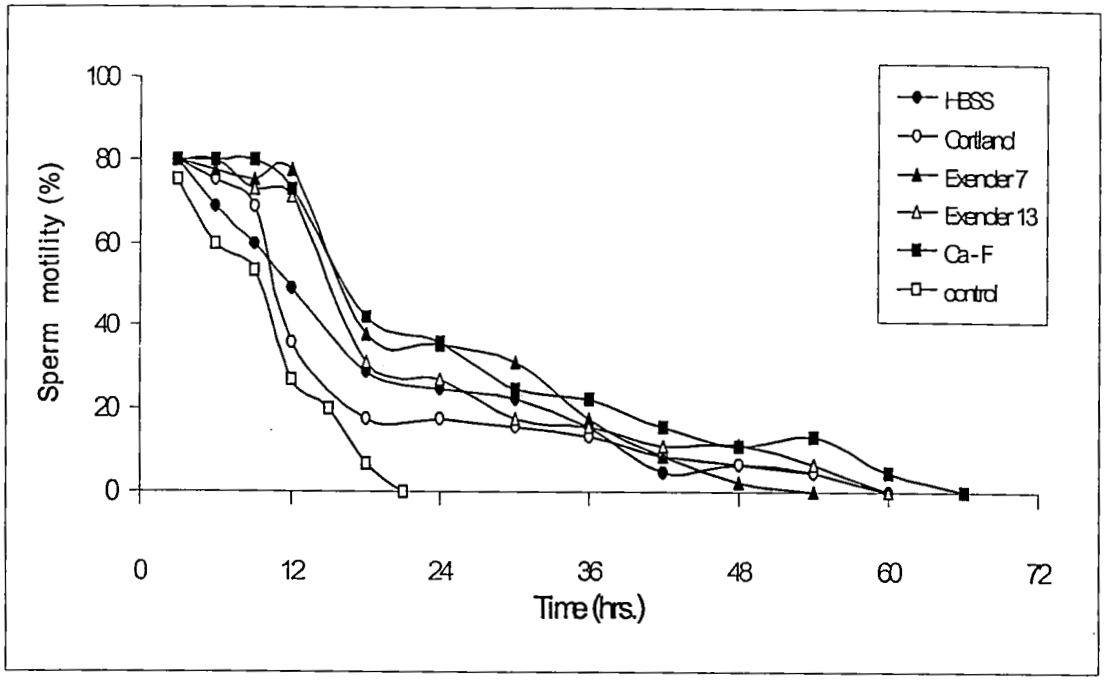
7.1 การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่เย็น

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่เย็นได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ตอนโดยในตอนแรก ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อในน้ำยาบัฟเฟอร์ (sperm extender) 5 สูตร คือ Hank's balanced salt solution (HBSS), Cortland, Extender 7, Extender 13 และ Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F) ด้วยอัตราส่วน 1:1 โดยเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง (diluted milt) ไว้ใน tissue culture flask ที่อุณหภูมิ 0 – 2 องศาเซลเซียส พบว่าน้ำยาสูตรที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวคือ Ca-F ซึ่งสามารถเก็บรักษาสเปิร์มได้นานสูงสุด 66 ชั่วโมง (ภาพที่ 1 และ 2) ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองอื่นๆ แต่น้ำเชื้อที่ไม่มีการผสมน้ำยา (กลุ่มควบคุม หรือ undiluted milt) สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้เพียง 21 ชั่วโมงเท่านั้นโดยที่สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ที่เวลาดังกล่าว สำหรับการย้อมสีเพื่อหาเปอร์เซนต์ของสเปิร์มที่มีชีวิตโดยทำการย้อมสีตั้งแต่วันแรกที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อจนสเปิร์มไม่เคลื่อนที่ และทำการย้อมต่อไป พบว่า ในวันที่ 3 ของการเก็บรักษาสเปิร์มสดที่ไม่ผสมน้ำยา(control) มีเปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิต 94 เปอร์เซ็นต์ และในวันที่ 4 สเปิร์มที่เก็บรักษาในน้ำยา HBSS , Cortland , Extender 7 , Extender 13 และ Ca-F มีเปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิต 86 , 55 , 94 , 98 และ 71 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ($P>0.05$) (ภาพที่ 3) ในตอนที่ 2 ได้นำน้ำยาสูตร Ca-F มาทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อ โดยเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่างน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 1:1 , 1:2 และ 1:4 พบว่า ในอัตราส่วน 1:1 และ 1:2 สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานใกล้เคียงกันคือ 60 ชั่วโมง ซึ่งไม่ความแตกต่างกันในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ระหว่างการเจือจางในอัตราส่วนต่างๆกัน (ภาพที่ 4 และภาพที่ 5) สำหรับการทดลองย้อมสีเพื่อดูเปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตในการทดลองหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อของปลาตะเพียนขาว พบว่าในวันที่ 3 สเปิร์มสดที่ไม่ผสมน้ำยา(control) มีเปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิต 92 เปอร์เซ็นต์ และในวันที่ 4 สเปิร์มที่เก็บรักษาในน้ำยา Ca-F ที่อัตราส่วน 1:1

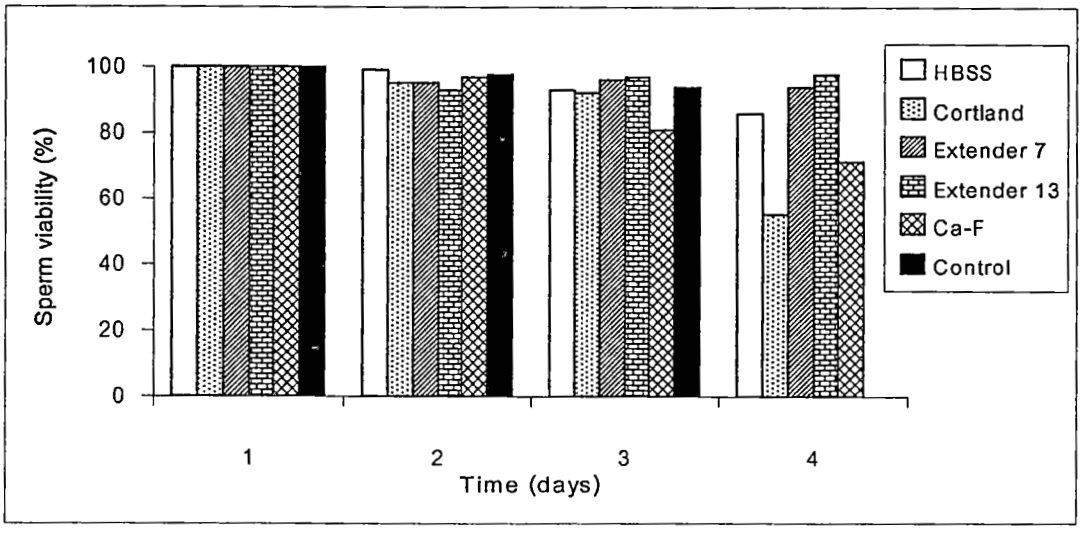
, 1:2 , 1:4 มีเปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิต 96 , 93 และ 91 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันในทางสถิติ ($P>0.05$) ตามลำดับ (ภาพที่ 6)



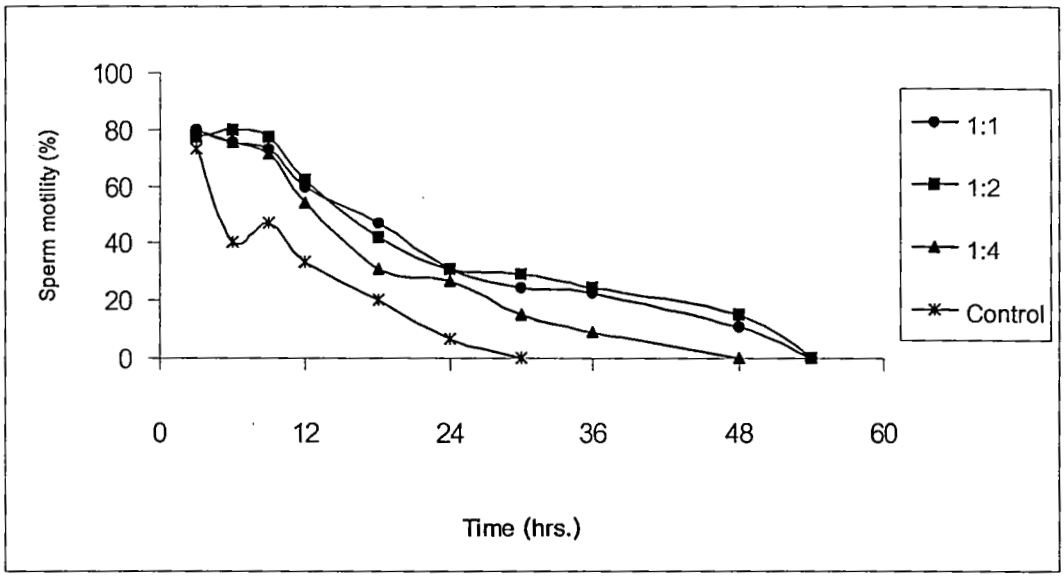
ภาพที่ 1 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ถูกเก็บรักษาในน้ำยา 5 สูตร ในการทดลองครั้งที่ 1 (ช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่)



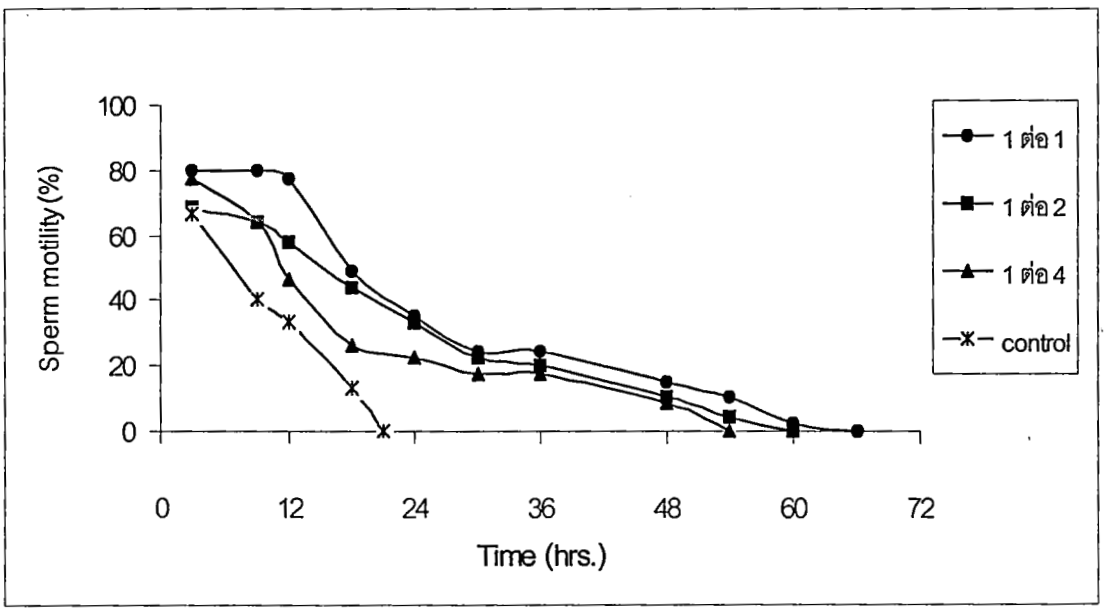
ภาพที่ 2 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ถูกเก็บรักษาในน้ำยา 5 สูตร ในการทดลองครั้งที่ 2 (ช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์วางไข่)



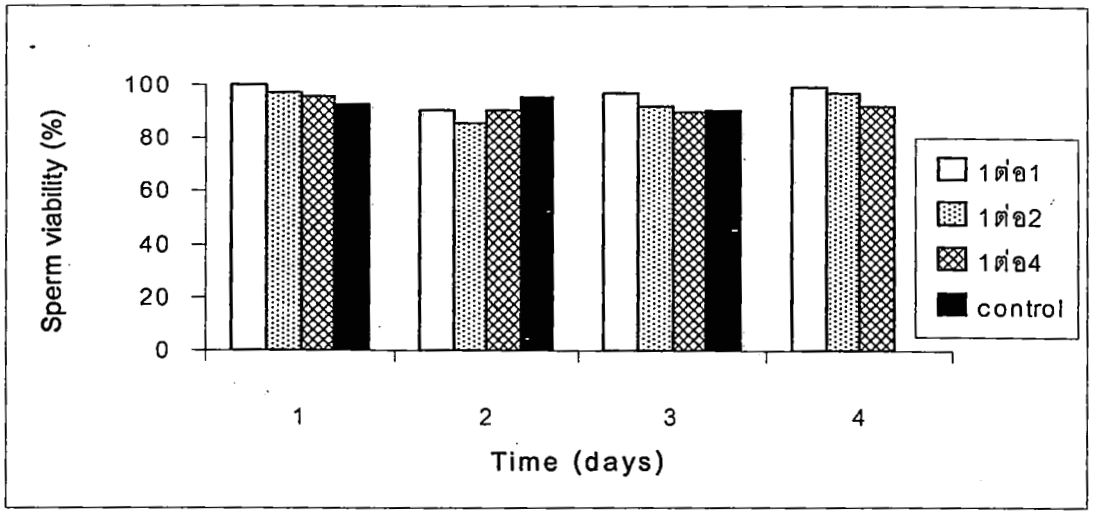
ภาพที่ 3 เปอร์เซนต์สเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่มีชีวิต หลังจากถูกเก็บรักษาในน้ำยา 5 สูตร



ภาพที่ 4 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ถูกเก็บรักษาในน้ำยา Calcium-free Hank's balanced salt solution ในอัตราส่วนต่าง ๆ (ช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์วางไข่)



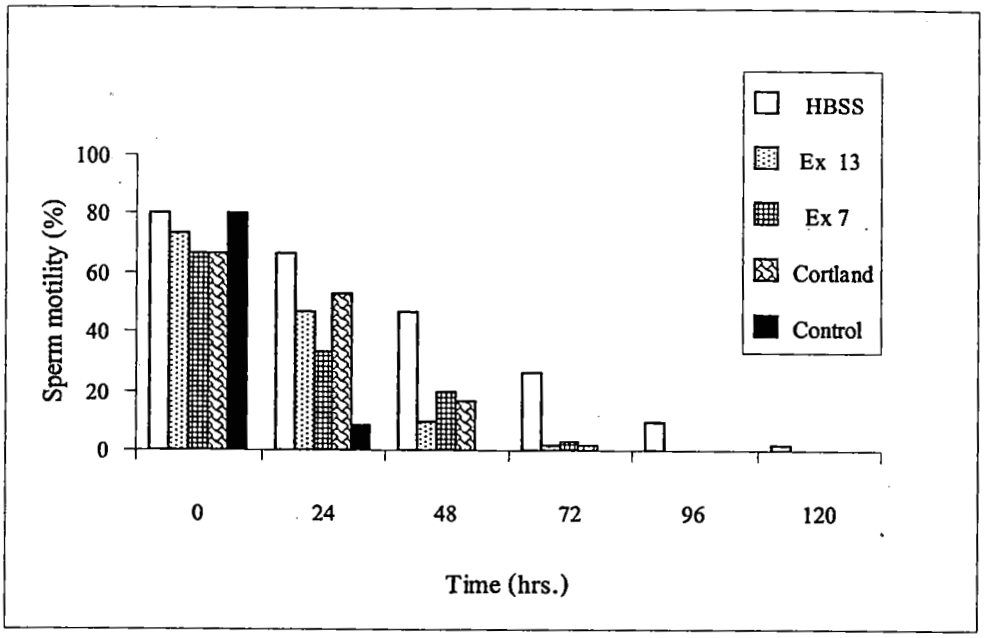
ภาพที่ 5 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ถูกเก็บรักษาในน้ำยา Calcium-free Hank's balanced salt solution ในอัตราส่วนต่าง ๆ (ช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์วางไข่)



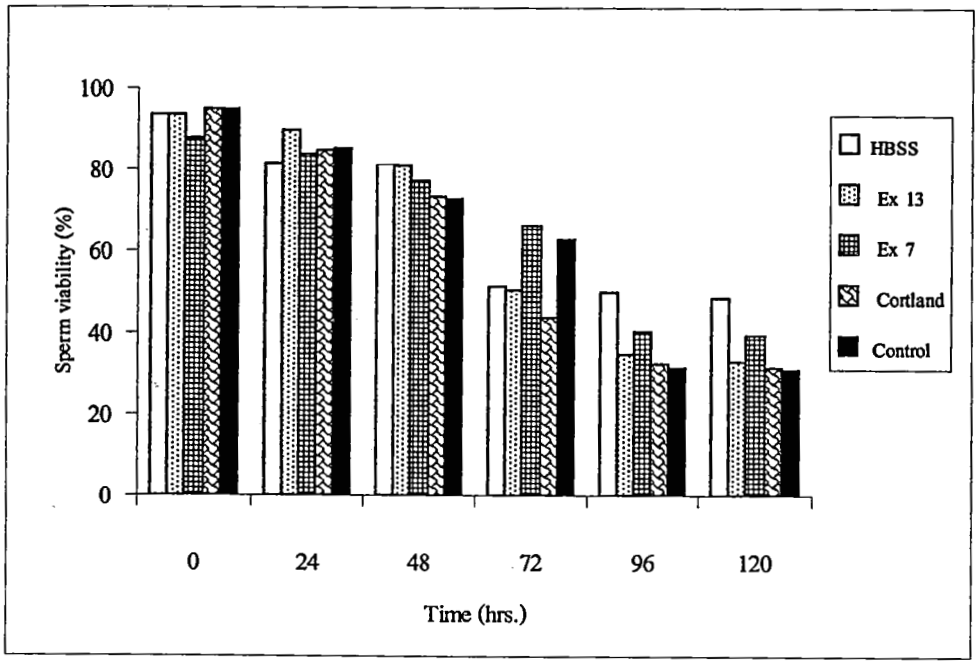
ภาพที่ 6 เปอร์เซนต์สเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่มีชีวิต หลังจากถูกเก็บรักษาในน้ำยา Calcium-free Hank's balanced salt solution ในอัตราส่วนต่าง ๆ

7.2 การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่เย็น

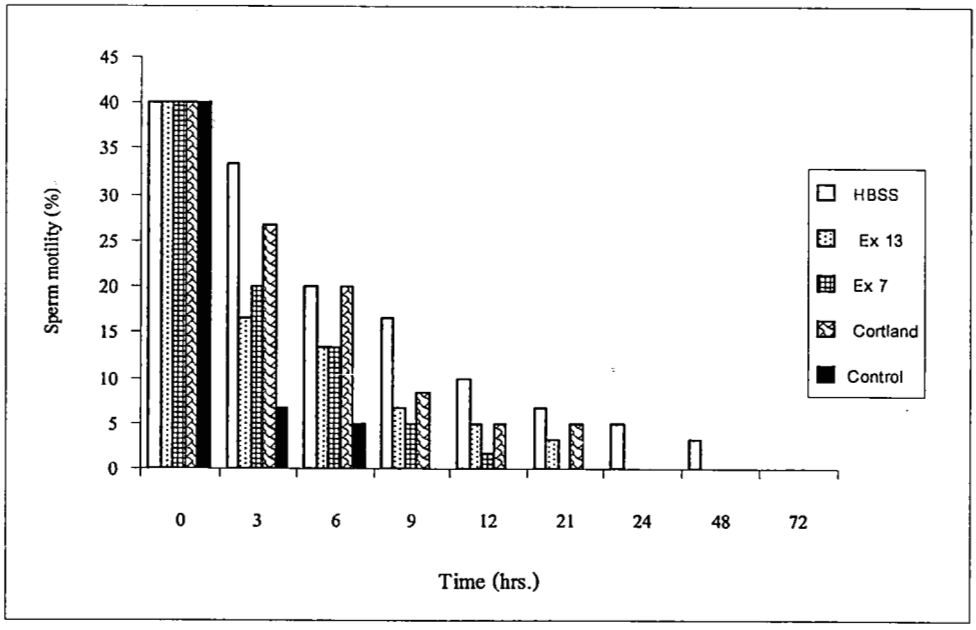
การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่เย็นในน้ำยาสูตรต่าง ๆ ได้แก่ น้ำยาสูตร HBSS Extender 13 , Extender 7 และ Cortland ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำยาแต่ละสูตรมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยน้ำยาสูตร HBSS ให้ผลการเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ดีที่สุด ส่วนเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตในน้ำยาแต่ละสูตรมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ภาพที่ 7-10) และในการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่เย็นโดยเจือจางในน้ำยาสูตร HBSS อัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อน้ำยาสูตร HBSS 1 :1 , 1:2 และ 1: 4 พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำยา HBSS ในอัตราส่วนต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ภาพที่ 11 และภาพที่ 12)



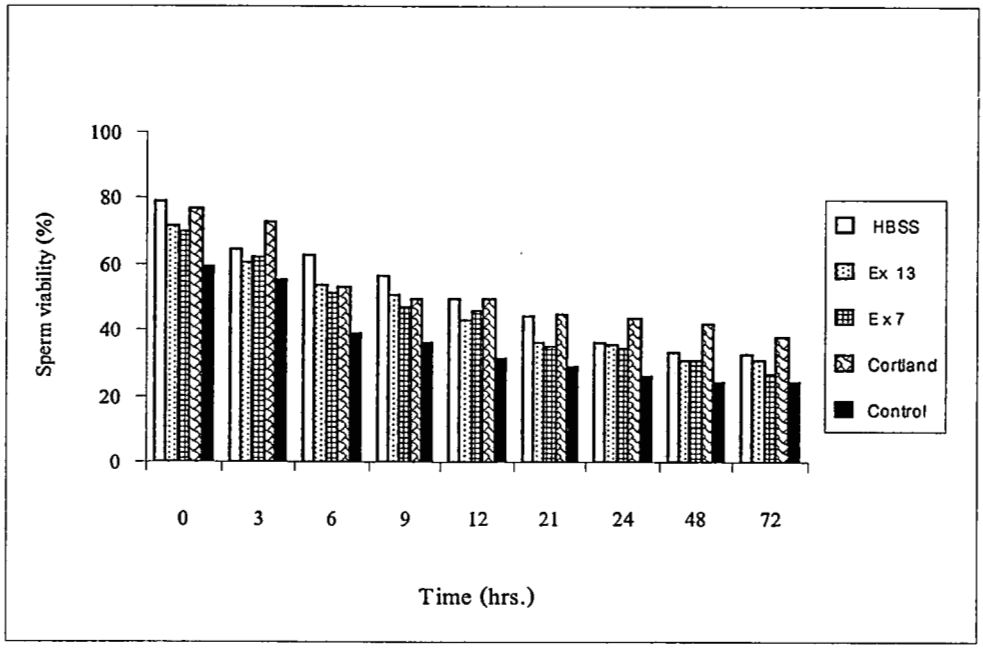
ภาพที่ 7 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยที่ถูกเก็บรักษาในน้ำยา 4 สูตร ใน การทดลองครั้งที่ 1 (ช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์วางไข่)



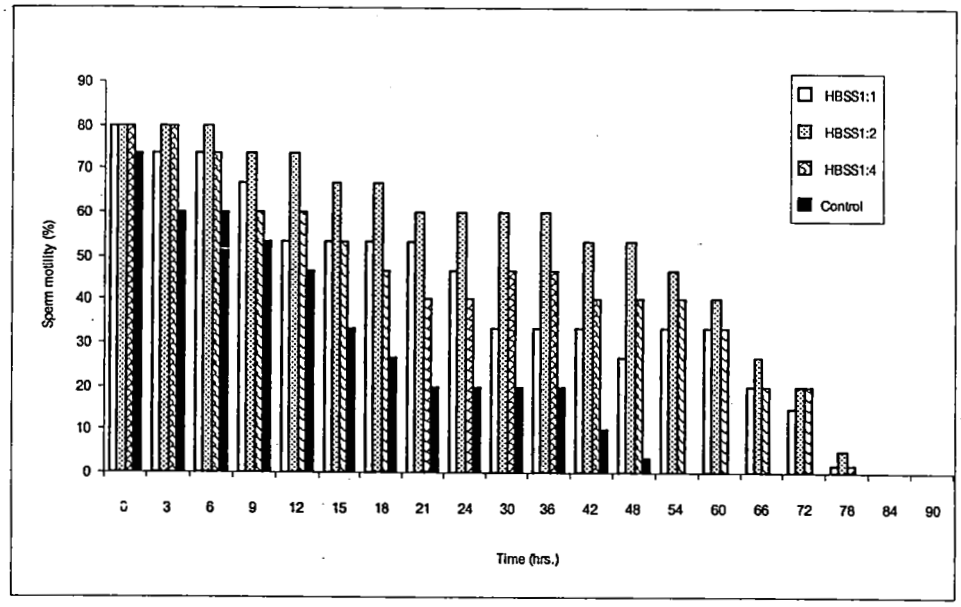
ภาพที่ 8 เปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตของปลาดุกอุยที่ถูกเก็บรักษาในน้ำยา 4 สูตร ใน การทดลองครั้งที่ 1 (ช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์วางไข่)



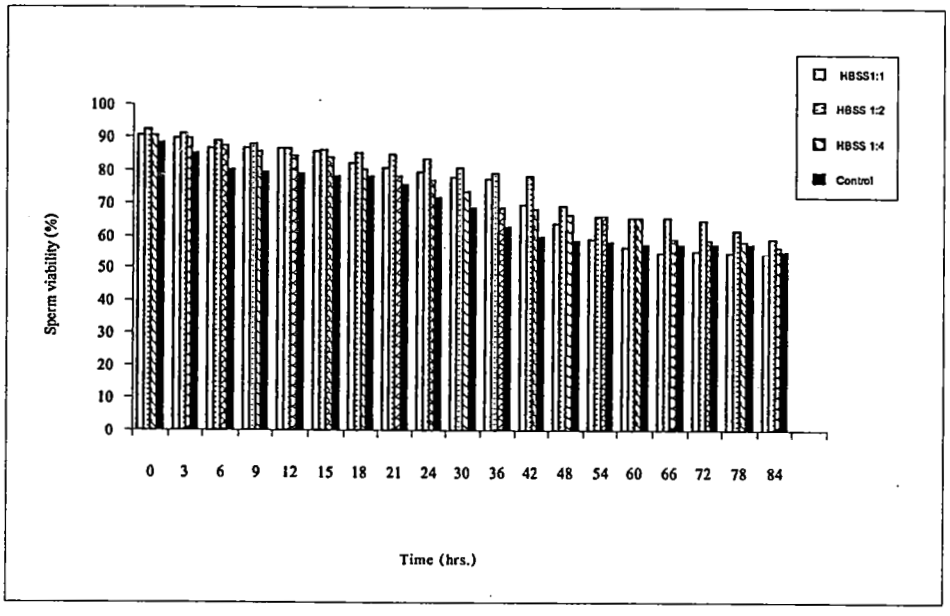
ภาพที่ 9 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยที่ถูกเก็บรักษาในน้ำยา 4 สูตร ใน การทดลองครั้งที่ 2 (ช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่)



ภาพที่ 10 เปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตของปลาดุกอุยที่ถูกเก็บรักษาในน้ำยา 4 สูตร ใน การทดลองครั้งที่ 2 (ช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่)



ภาพที่ 11 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยในน้ำยา HBSS ที่อัตราส่วนต่างๆ ในช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์วางไข่



ภาพที่ 12 เปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตของปลาดุกอุยในน้ำยา HBSS ที่อัตราส่วนต่างๆ ในช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์วางไข่

7.3 การศึกษาความเข้มข้นของ cryoprotectants ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทราบความเข้มข้นของ cryoprotectants ที่เหมาะสมก่อนที่จะนำไปใช้ในการทำน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง โดยทดสอบความเป็นพิษของสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ 9ชนิด คือ DMSO, acetamide, methanol, formamide, sucrose, propylene glycol, glycerol, ethanol และ ethylene glycol โดยที่แต่ละชนิดใช้ความเข้มข้น 4 ระดับ (5%, 10%, 15% และ 20%) โดยใช้ Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) เป็นตัวทำละลาย และใช้อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์เท่ากับ 1:1 โดยเก็บไว้ใน tissue culture flask ที่อุณหภูมิ 25 ^{0}C พบว่าสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่เป็นพิษต่ำได้แก่ DMSO, methanol, sucrose และ propylene glycol โดยที่ acetamide มีพิษปานกลางในขณะที่ formamide, glycerol, ethanol และ ethylene glycol มีความเป็นพิษมาก (ภาพที่ 13-21)

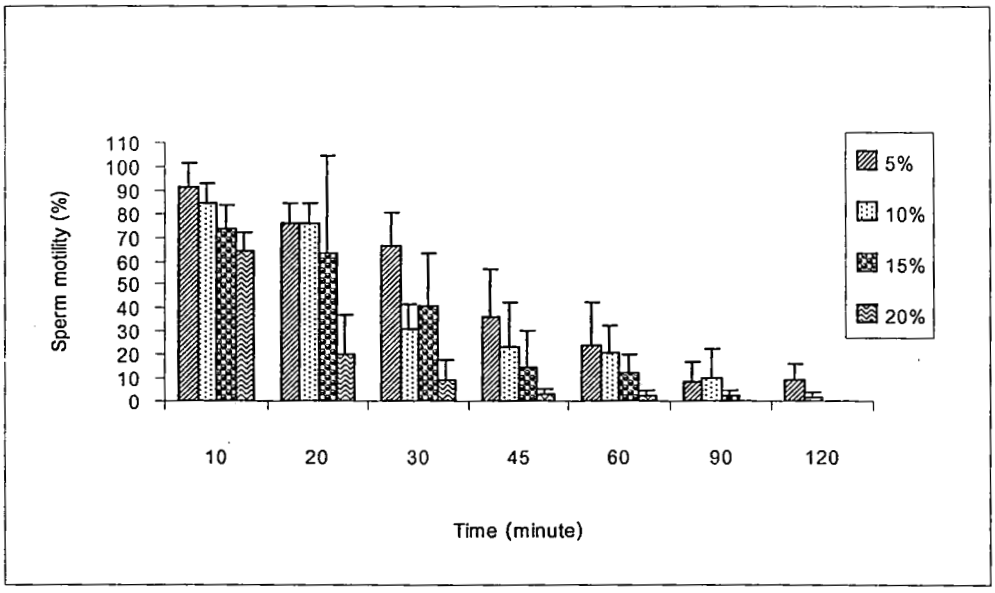
จากการทดลองประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว ซึ่งเก็บรักษาไว้ในสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ ที่ 4 ความเข้มข้น ทั้งหมด 9 ชนิด ที่อุณหภูมิห้อง ทำการประเมินการเคลื่อนที่ได้ผลดังนี้

7.3.1 <u>DMSO</u>

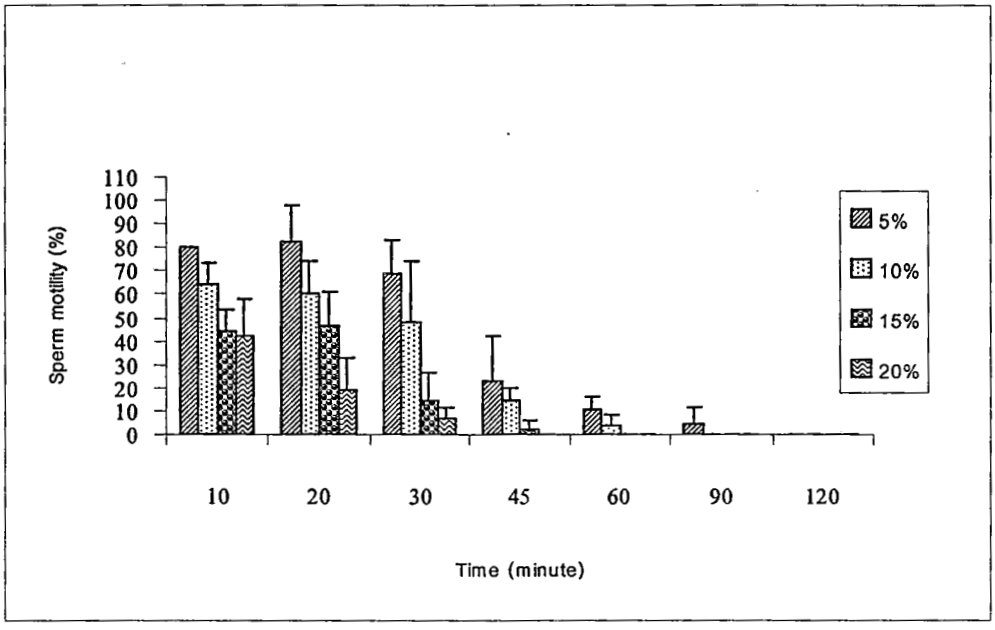
จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสด (freshly collected milt) พบว่า มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่ใน DMSO 20% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 90 นาที, DMSO 15% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 120 นาทีในขณะที่การใช้ DMSO 5% และ 10% ยังคงมีเคลื่อนที่เมื่อเวลา 120 นาที (ภาพที่ 13) จากการทดลองทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO 5% ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ กับ DMSO 10% และ 15% ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ DMSO 20% ($P\leq0.05$)

7.3.2 <u>Acetamide</u>

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสด (freshly collected milt) พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% การทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่ใน acetamide 20% พบว่าจะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 45 นาที , acetamide 15% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 60 นาที, acetamide 10% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 90 นาที และที่ acetamide 5% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 20 นาที (ภาพที่ 14) จากการทดลองทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย acetamide 5% ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับ acetamide10% ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ acetamide 15%, 20% ($P\leq0.05$)



ภาพที่ 13 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังจากเจือจางใน DMSO ที่ความเข้มข้น และเวลาต่างๆกัน



ภาพที่ 14 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังจากเจือจางใน acetamide ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน

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

7.3.3 Methanol

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสดพบว่า มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 88.67% ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่ใน Methanol 5%, 10%, 15% และ 20% ยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 120 นาที (ภาพที่ 15) จากการทดลองทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Methanol ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$)

7.3.4 Formamide

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสดพบว่า มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 88.67% ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่ใน Formamide 10%,15% และ 20% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 10 นาที แต่ที่ Formamide 5% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 20 นาที (ภาพที่ 16) จากการทดลองทางสถิติ พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย Formamide ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$)

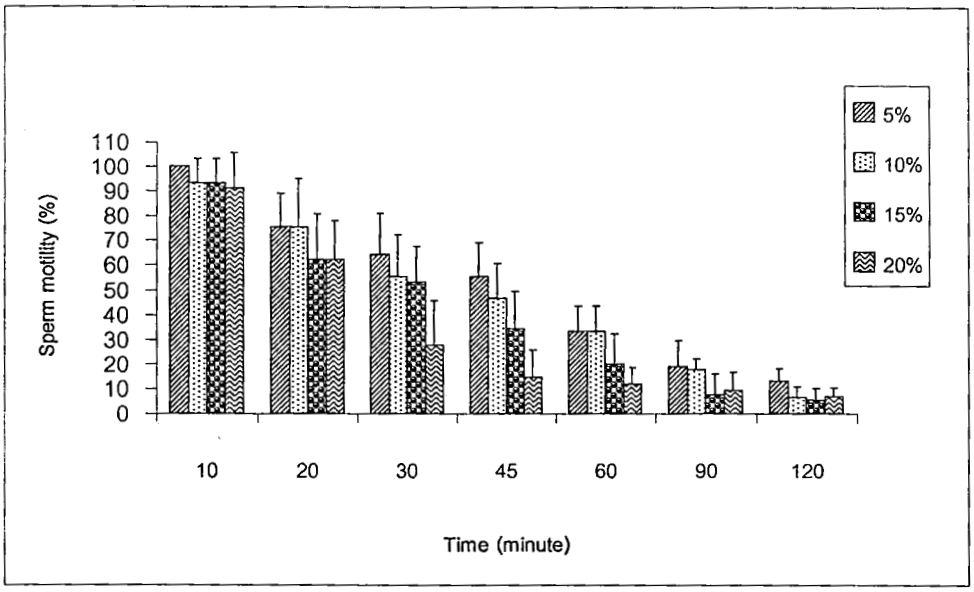
7.3.5 Sucrose

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสดพบว่า มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 88.67% ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่ใน sucrose 5%, 10%, 15% และ 20% ยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 120 นาที (ภาพที่ 17) จากการทดลองทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย sucrose ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$)

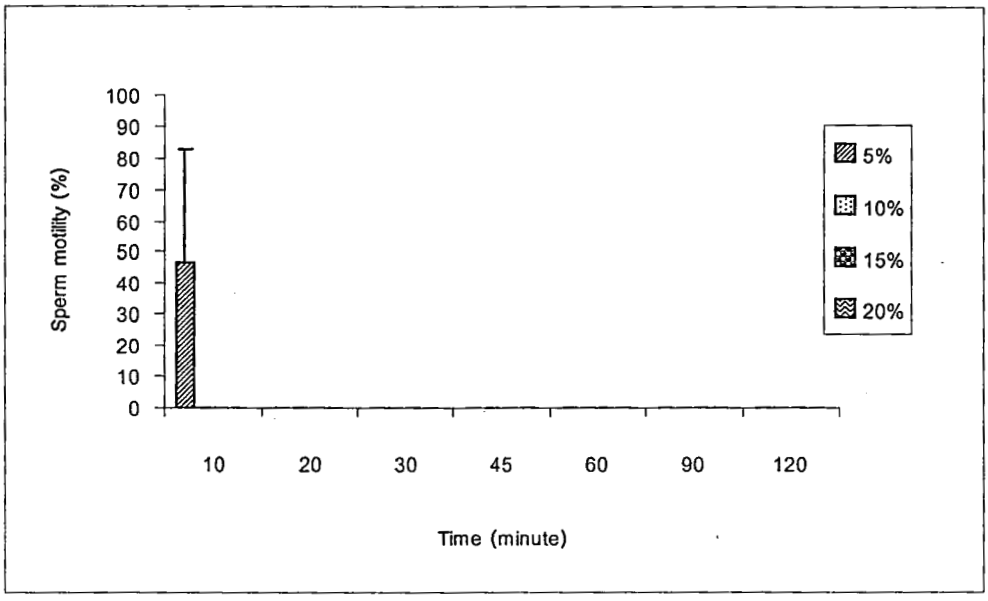
7.3.6 Propylene glycol

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสดพบว่า มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่ใน Propylene glycol 20%จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 10 นาที Propylene glycol 15% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 60 นาที และ Propylene glycol 10% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 90 นาที Propylene glycol 5% ยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 120 นาที (ภาพที่ 18) จากการทดลองทางสถิติ พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย Propylene glycol 5% ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับ Propylene glycol 10% และ 15% ($P > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ Propylene glycol 20% ($P \leq 0.05$)

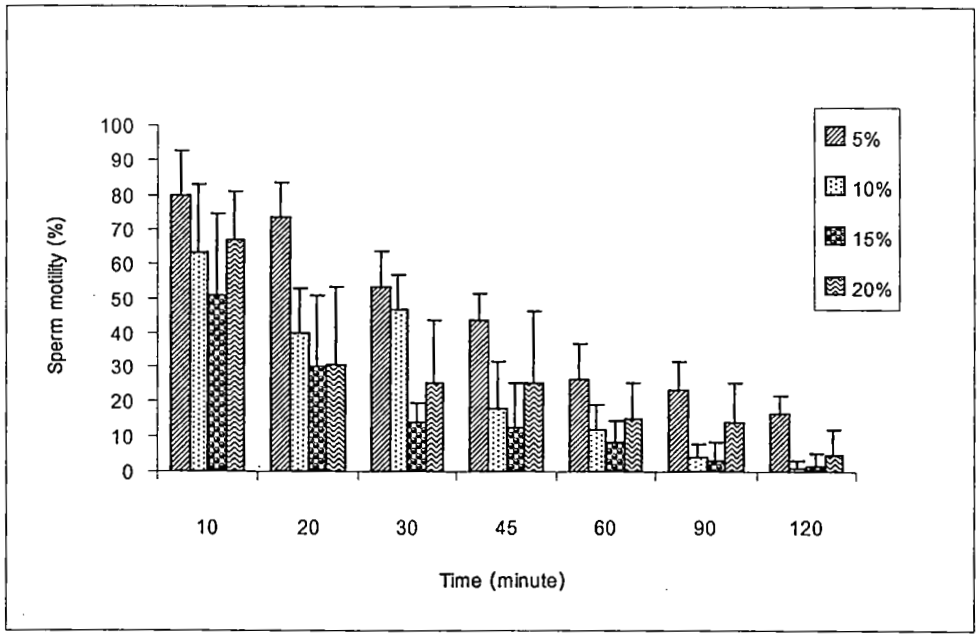
ว๗ว
๒๘๗ ก
ด.๖
249304



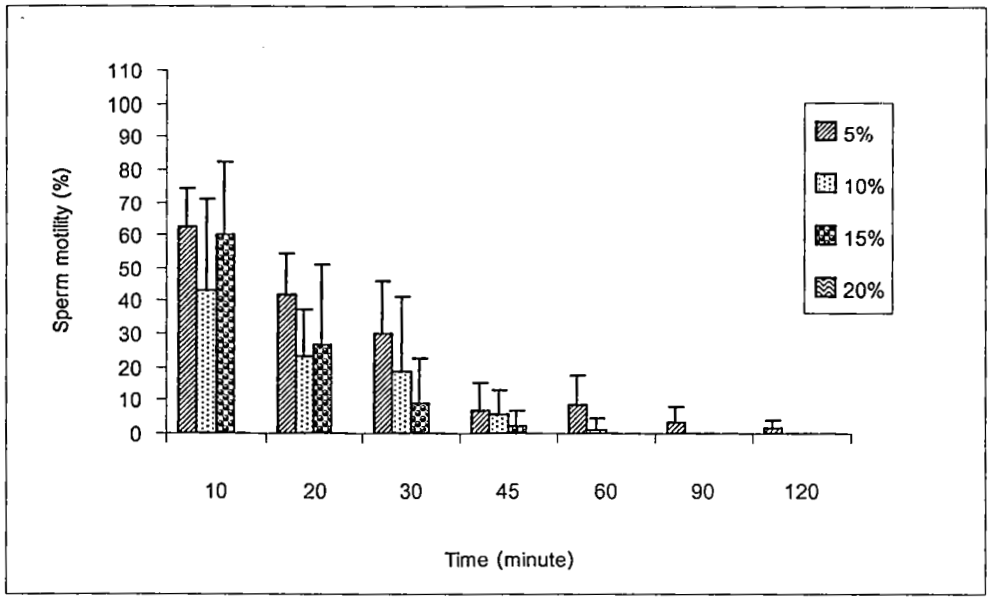
ภาพที่ 15 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังจากเจือจางใน methanol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน



ภาพที่ 16 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังจากเจือจางใน formamide ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน



ภาพที่ 17 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังจากเจือจางใน sucrose ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน



ภาพที่ 18 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังจากเจือจางใน propylene glycol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน

7.3.7 Glycerol

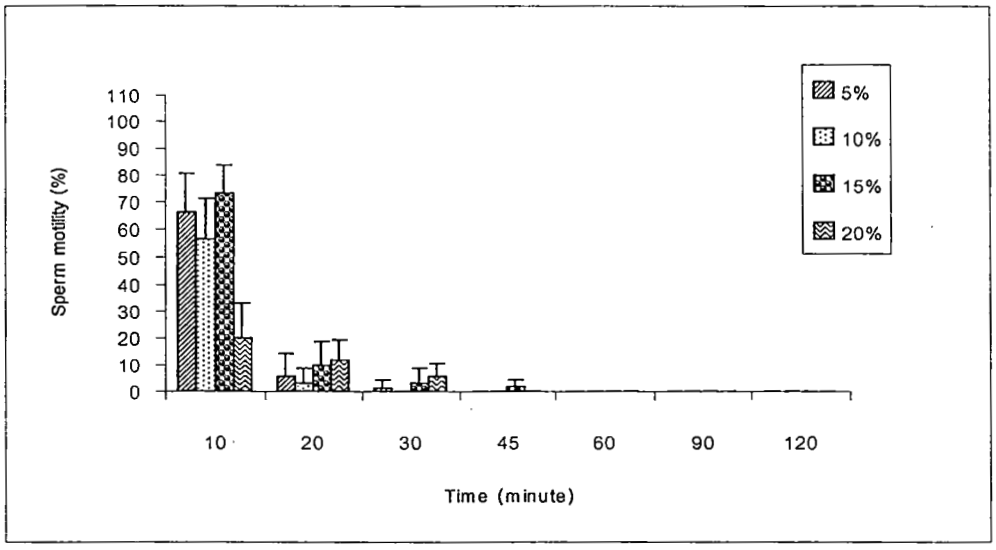
จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสดพบว่า มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 73.33% ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่ใน glycerol 10% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 30 นาที , glycerol 5% และ 20% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 45 นาที และ glycerol 15% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 60 นาที (ภาพที่ 19) จากการทดลองทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย glycerol ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

7.3.8 Ethanol

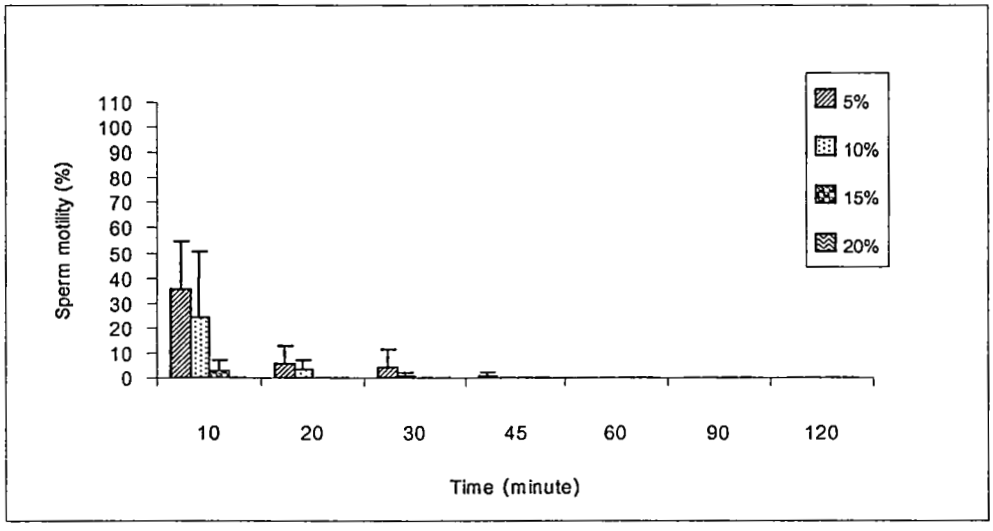
จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสดพบว่า มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 80% ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่ใน Ethyl alcohol 20% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 10 นาที, Ethyl alcohol 15% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 20 นาที, Ethyl alcohol 10% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 45 นาที และ Ethyl alcohol 5% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 60 นาที (ภาพที่ 20) จากการทดลองทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Ethyl alcohol ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

7.3.9 Ethylene glycol

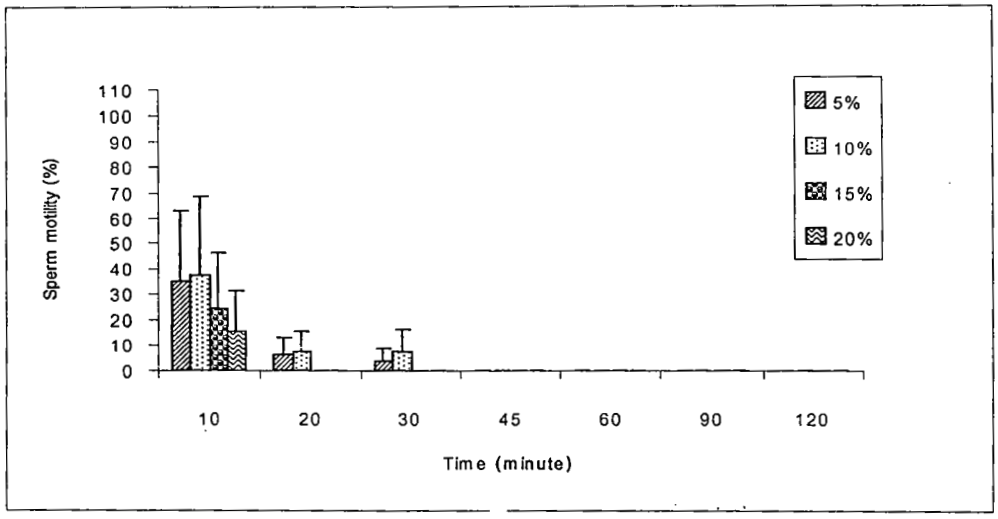
จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสดพบว่า มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 53.33% ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่ใน Ethylene glycol 15% และ 20% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 20 นาที, Ethylene glycol 5% และ 10% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 45 นาที (ภาพที่ 21) จากการทดลองทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Ethylene glycol ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)



ภาพที่ 19 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังจากเจือจางใน glycerol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน



ภาพที่ 20 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังจากเจือจางใน ethanol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน



ภาพที่ 21 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังจากเจือจางใน ethylene glycol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน

7.4 การศึกษาความเข้มข้นของ cryoprotectants ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย

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 propylene glycol, glycerol, formamide, acetamide และ ethylene glycol ได้ถูกเตรียมขึ้นมาจำนวน 4 ml ให้มีความเข้มข้น 10%, 20%, 30% และ 40% โดยละลายใน C-F HBSS แล้วจึงนำไปเจือจางน้ำเชื้อที่ได้ถูกเจือจางไว้ก่อนหน้านี้ ทำให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ cryoprotectants ที่ได้คือ 5%, 10%, 15% และ 20% ตามลำดับ การเช็คเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่เคลื่อนที่ในการทดลองนี้จะทำในระยะเวลาต่างๆกัน ตั้งแต่ 0,30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที หลังจากใส่ cryoprotectants ลงไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง โดยทำการประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มโดยการกระตุ้นด้วย 0.4%NaCl พบว่าสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่เป็นพิษต่ำได้แก่ propylene glycol, glycerol, formamide ในขณะที่ acetamide และ ethylene glycol มีความเป็นพิษมาก (ภาพที่ 22-26)

จากการทดลองประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลาดุกอุย ซึ่งเก็บรักษาไว้ ในสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ ที่ 4 ความเข้มข้น ทั้งหมด 5 ชนิด ที่อุณหภูมิห้อง ทำการประเมินการเคลื่อนที่ได้ผลดังนี้

7.4.1 Propylene glycol

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด (freshly collected milt) พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 60% ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่ใน สารละลายPropylene glycol ทั้ง 4 ความเข้มข้นคือ 5%, 10%, 15% และ 20% ยังมีการเคลื่อนที่ที่ระยะเวลา 180 นาที (ภาพที่ 22) และความเข้มข้นของสารละลาย Propylene glycol ไม่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

7.4.2 Formamide

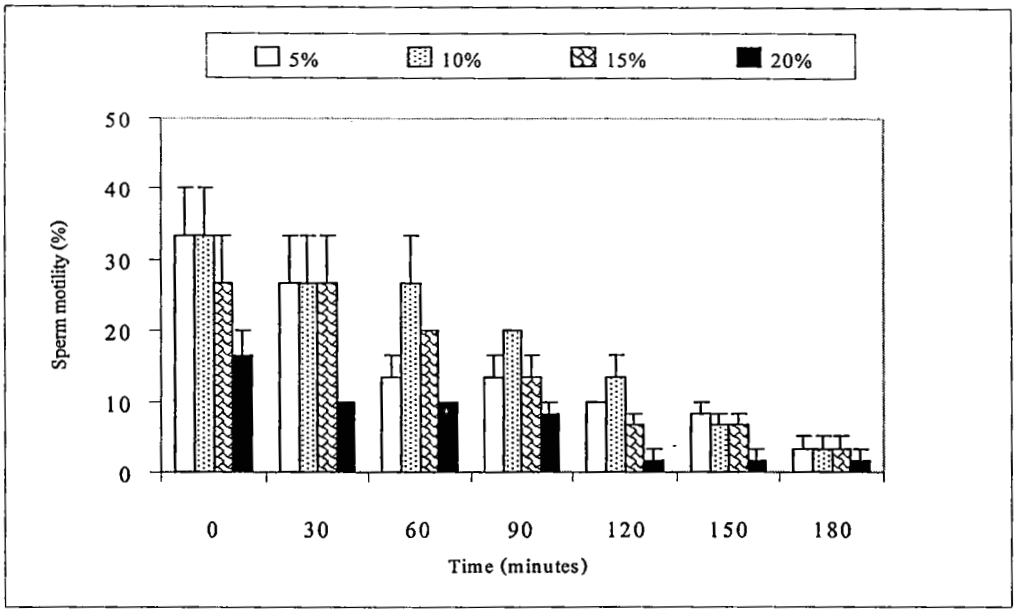
จากการประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดพบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 60 % ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่ในสารละลาย Formamide ความเข้มข้น 20% จะหยุดการเคลื่อนที่ที่เวลา 150 นาที สารละลาย Formamide ความเข้มข้น 5%, 10% และ 15% ยังมีการเคลื่อนที่ที่เวลา 180 นาที (ภาพที่ 23) โดยที่ความเข้มข้นของสารละลาย Formamide 5%ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับสารละลาย Formamide10% และ 15% (P>0.05) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับสารละลาย Formamide 20% (P<0.05)

7.4.3 Glycerol

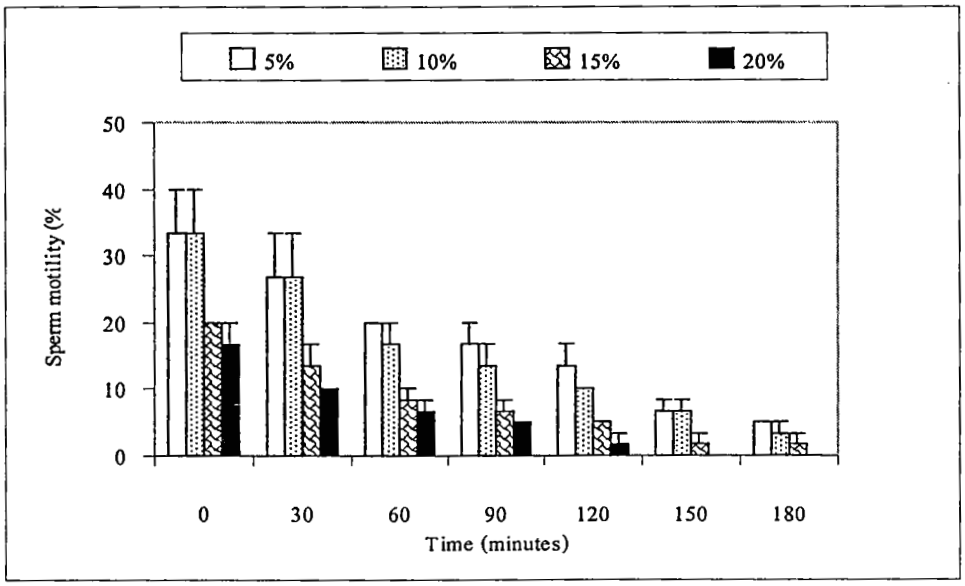
จากการประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดพบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 60 % ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่ในสารละลาย Glycerol ความเข้มข้น 20% จะหยุดการเคลื่อนที่ที่เวลา 150 นาที ความเข้มข้น 5%, 10% และ15% หยุดการเคลื่อนที่ที่เวลา 180 นาที (ภาพที่ 24) โดยที่ความเข้มข้นของสารละลาย Glycerol ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

7.4.4 Acetamide

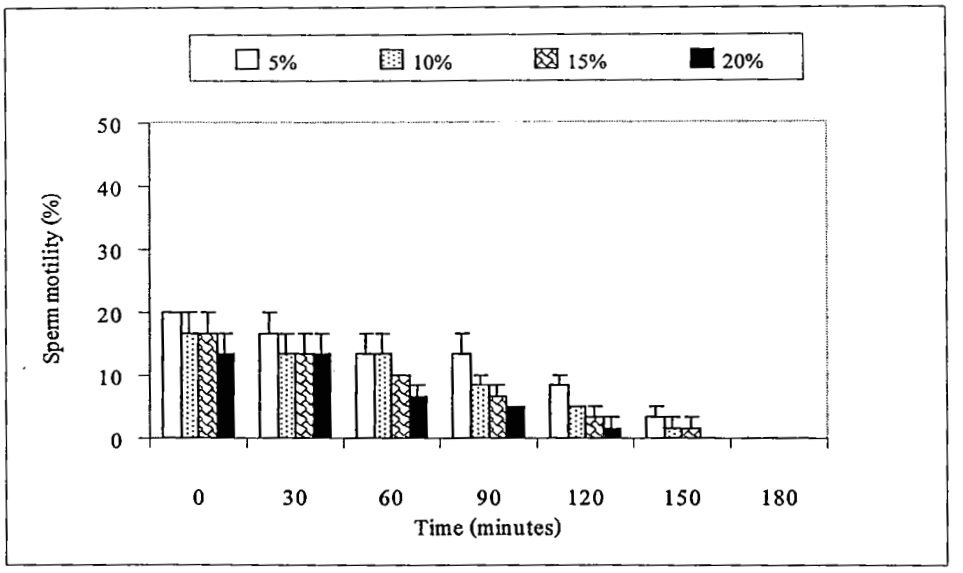
จากการประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดพบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 60% ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่ในสารละลาย Acetamide ความเข้มข้น 5%, 10%,15% และ 20% จะหยุดการเคลื่อนที่ที่เวลา 150 นาที (ภาพที่ 25) โดยที่ความเข้มข้นของสารละลาย Acetamideไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)



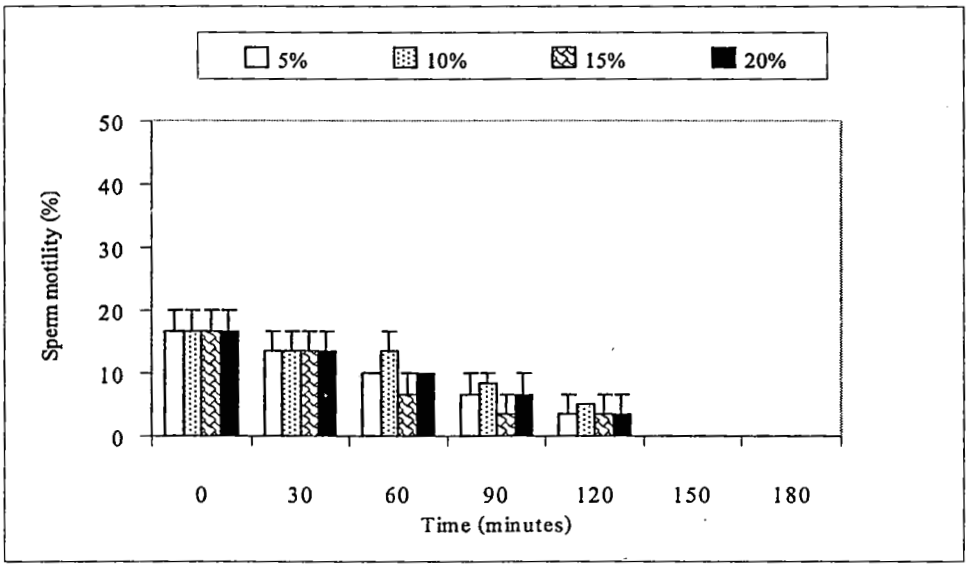
ภาพที่ 22 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยหลังจากเจือจางใน propylene glycol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน



ภาพที่ 23 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยหลังจากเจือจางใน formamide ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน



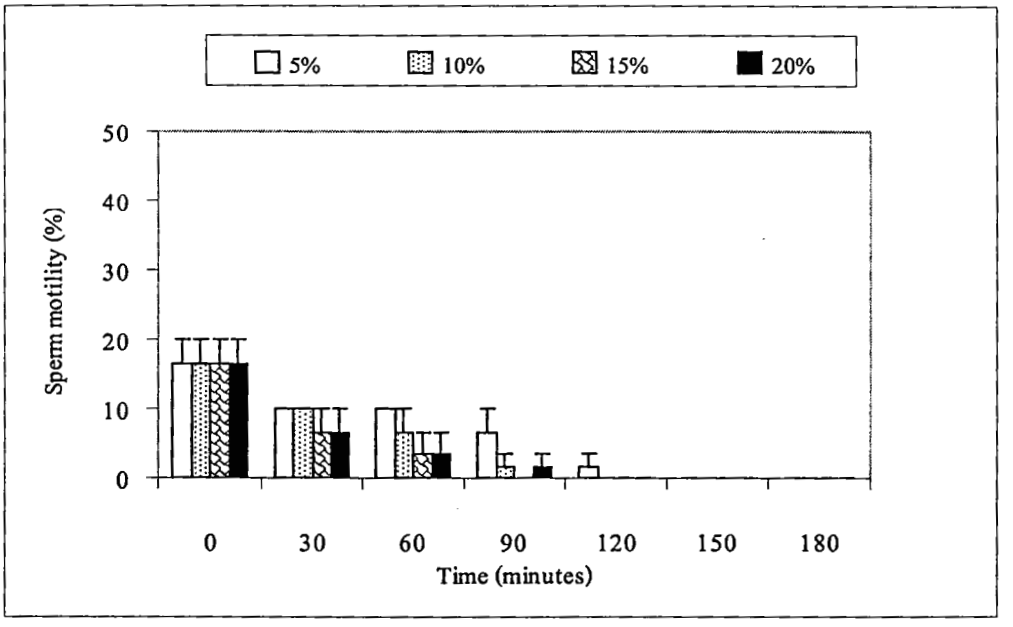
ภาพที่ 24 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยหลังจากเจือจางใน glycerol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน



ภาพที่ 25 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยหลังจากเจือจางใน acetamide ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน

7.4.5 Ethylene glycol

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดพบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 60% ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่ใน Ethylene glycol ความเข้มข้น 15% จะหยุดการเคลื่อนที่ที่เวลา 90 นาที ความเข้มข้น 10% และ 20%หยุดการเคลื่อนที่ที่เวลา 120 นาที ความเข้มข้น 5% หยุดการเคลื่อนที่ที่เวลา 150 นาที (ภาพที่ 26) โดยที่ความเข้มข้นของสารละลาย Ethylene glycol ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)



ภาพที่ 26 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยหลังจากเจือจางใน ethylene glycol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน

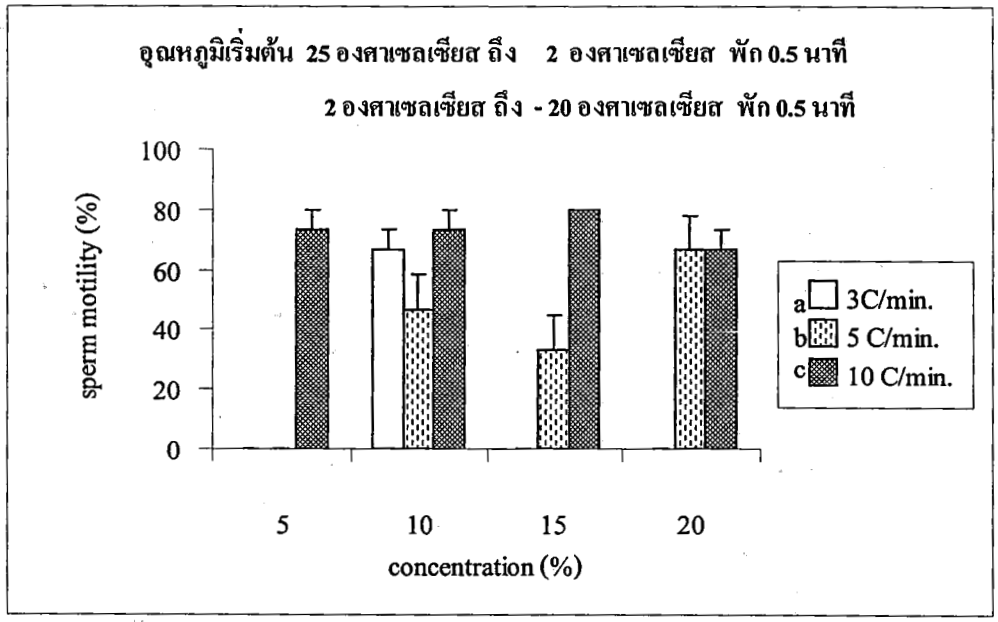
7.5 การศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็งในแต่ละชุดการทดลองทำโดยการรวบรวมเอาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว 3-6 ตัว (pooled milt) โดยน้ำเชื้อถูกนำมาเจือจางในสารละลาย C-F HBSS ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร แล้วจึงผสม cryoprotectants ได้แก่ DMSO ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5%, 10%, 15% และ 20% แล้วปล่อยไว้ 10 นาที เพื่อให้เกิดสภาพสมดุลย์ของสารละลาย (equilibrium) ก่อนที่น้ำเชื้อจะถูกรวบรวมไว้ในหลอดฟาง (straws) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร การทดลองของแต่ละชุดการทดลองได้ใช้ straw 3 หลอด (replications) และน้ำเชื้อได้ถูกแช่แข็ง (freezing) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับได้แก่ อัตราการลดอุณหภูมิที่ช้า (3 $^{\circ}$C/นาที) อัตราการลดอุณหภูมิที่ปานกลาง (5 $^{\circ}$C/นาที) และอัตราการลดอุณหภูมิที่รวดเร็ว (10 $^{\circ}$C/นาที) และกำหนดอุณหภูมิเริ่มต้นเท่ากัน (initial temperature) คือ 25°C และอุณหภูมิสุดท้ายเท่ากัน (final temperature) คือ -20°C แต่พักเซลล์ไว้ในระยะเวลานานต่างกัน (holding) ที่อุณหภูมิ 2, 0, -2 และ -4°C โดยแต่ละอุณหภูมิจะพักเซลล์ไว้นาน 0.5 และ 2 นาที ก่อนที่จะให้ free fall และอยู่ในอุณหภูมิ -196°C ทันที น้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ได้แช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลวระยะเวลาหนึ่งและได้ถูกนำมาเพิ่มอุณหภูมิอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 70-80°C จนน้ำเชื้อแช่แข็งละลายเป็นของเหลว (thawing) และนำไปประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของ สเปิร์มทันที

7.5.1 อุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง 2 องศาเซลเซียส พัก 0.5 นาที

2 องศาเซลเซียส ถึง –20 องศาเซลเซียส พัก 0.5 นาที

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งในน้ำยาสูตร Ca-F HBSS และสารละลาย DMSO 5% ที่ระดับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม, DMSO 10% มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ และ DMSO 15% และ 20% มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่ระดับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลางและที่ระดับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเมื่อถูกกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl (ภาพที่ 27) จากการทดลองทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO 10% มีความแตกต่างทางสถิติกับสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 15% และ 20% ($P<0.05$) และสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 15% และ 20% ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) และอัตราการลดอุณหภูมิมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

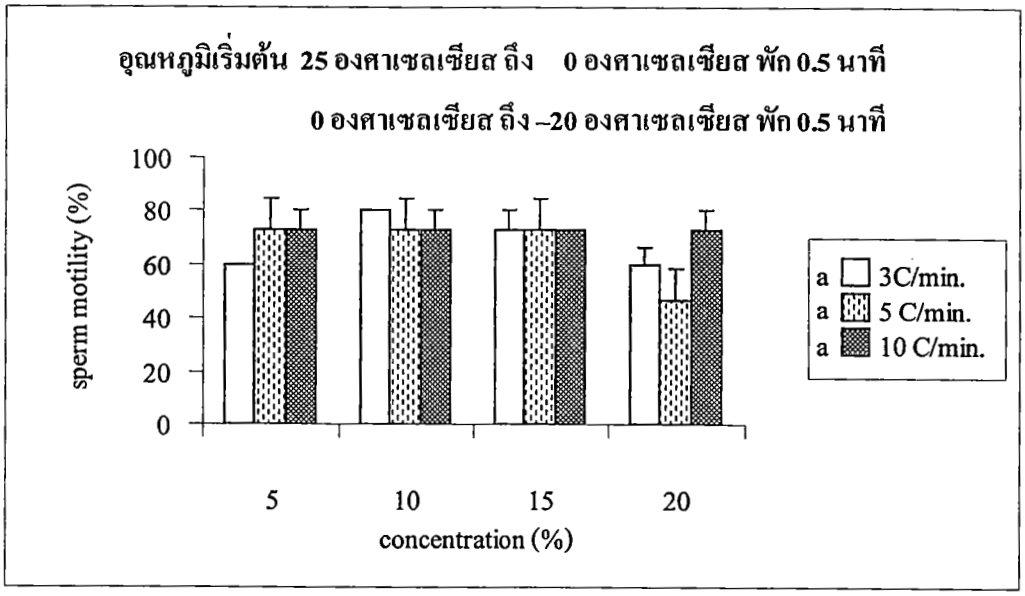


ภาพที่ 27 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังการแช่แข็งในสารละลาย DMSO เมื่อหยุดอุณหภูมิที่ 2 องศาเซลเซียสนาน 0.5 นาที

7.5.2 อุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง 0 องศาเซลเซียส พัก 0.5 นาที
0 องศาเซลเซียส ถึง –20 องศาเซลเซียส พัก 0.5 นาที

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งในน้ำยาสูตร Ca-F HBSS และสารละลาย DMSO 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่าในทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl (ภาพที่28) จากการทดลองทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO 5%, 10% และ 15% ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างทางสถิติกับสารละลาย DMSO 20% อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และอัตราการลดอุณหภูมิไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

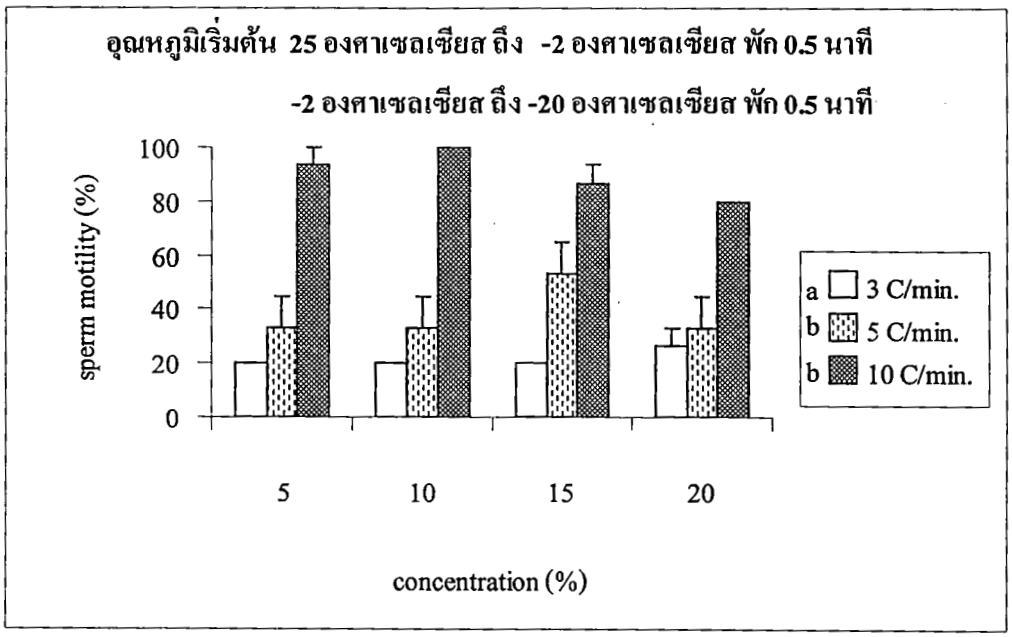
น้ำเชื้อที่ได้เก็บแช่แข็งในชุดการทดลองนี้ที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10^{0}C/นาทีเมื่อนำมาละลายแล้วนำไปผสมเทียมกับไข่ปลาตะเพียนขาวสามารถปฏิสนธิไข่ได้ 77.2±4.3% ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) จากการใช้น้ำเชื้อสดที่สามารถปฏิสนธิไข่ได้ 82±4.3%



ภาพที่ 28 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังการแช่แข็งในสารละลาย DMSO เมื่อหยุดอุณหภูมิที่ 0 องศาเซลเซียสนาน 0.5 นาที

7.5.3 อุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -2 องศาเซลเซียส พัก 0.5 นาที
-2 องศาเซลเซียส ถึง –20 องศาเซลเซียส พัก 0.5 นาที

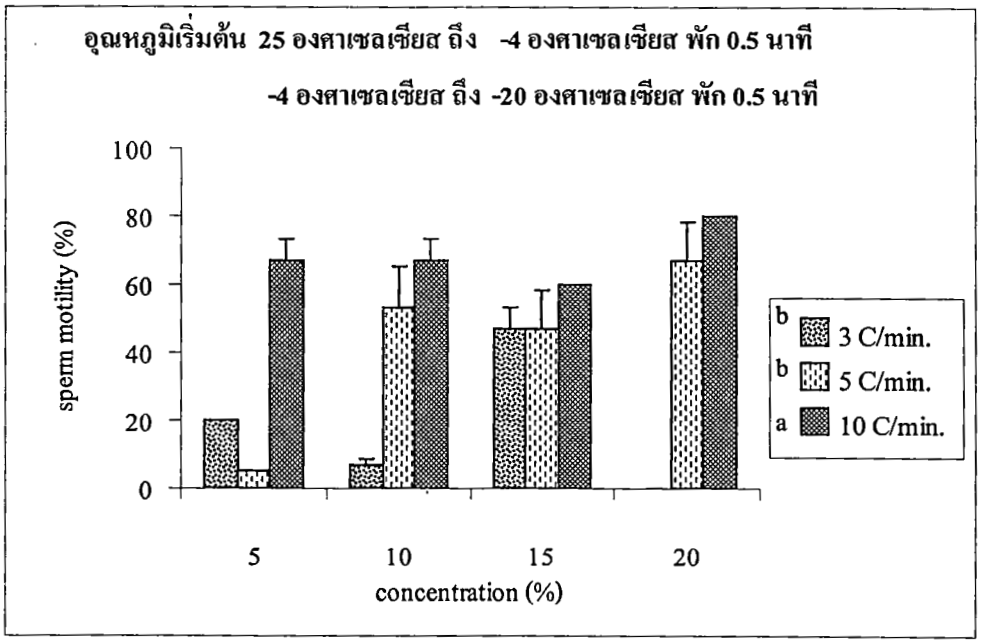
จากการประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งในน้ำยาสูตร Ca-F HBSS สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด รองลงมาคืออัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง และอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้าตามลำดับ (ภาพที่ 29) จากการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO 5%, 10%, 15% และ 20% ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)และอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วมีความแตกต่างกันทางสถิติกับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้าและอย่างปานกลาง ($P<0.05$)



ภาพที่ 29 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังการแช่แข็งในสารละลาย DMSO เมื่อหยุดอุณหภูมิที่ -2 องศาเซลเซียสนาน 0.5 นาที

7.5.4 อุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -4 องศาเซลเซียส พัก 0.5 นาที
-4 องศาเซลเซียส ถึง –20 องศาเซลเซียส พัก 0.5 นาที

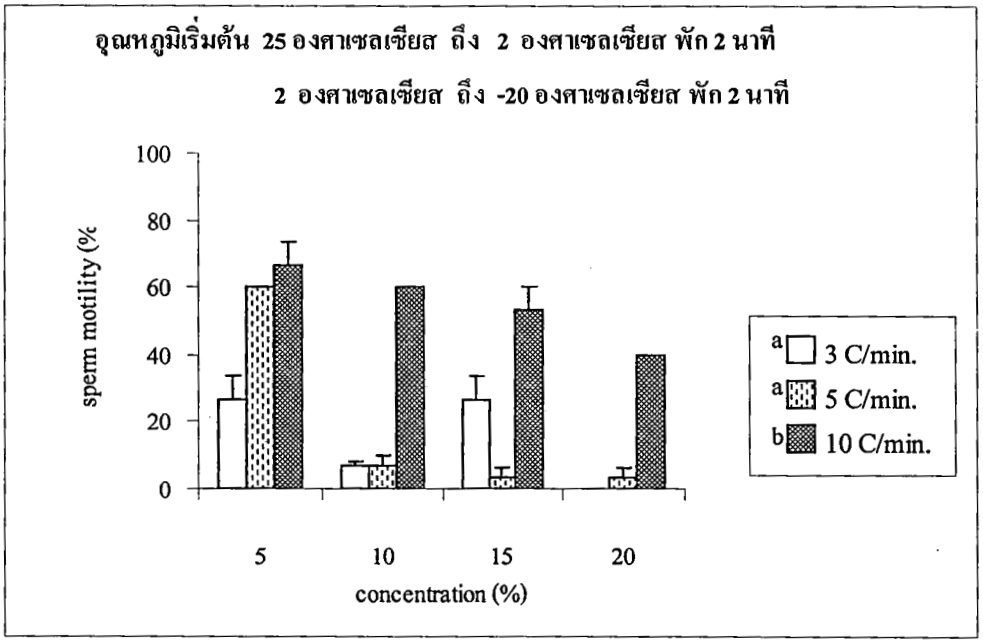
จากการประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งในน้ำยาสูตร Ca-F HBSS สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วจะมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl ดีที่สุด รองลงมาคือ อัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง และอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า (ภาพที่ 30) จากการทดลองทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO 15% และ 20% ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างทางสถิติกับสารละลาย DMSO 5% และ 10% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วมีความแตกต่างกันทางสถิติ กับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้าและอย่างปานกลางอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)



ภาพที่ 30 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังการแช่แข็งในสารละลาย DMSO เมื่อหยุดอุณหภูมิที่ -4 องศาเซลเซียสนาน 0.5 นาที

7.5.5 อุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง 2 องศาเซลเซียส พัก 2 นาที
2 องศาเซลเซียส ถึง –20 องศาเซลเซียส พัก 2 นาที

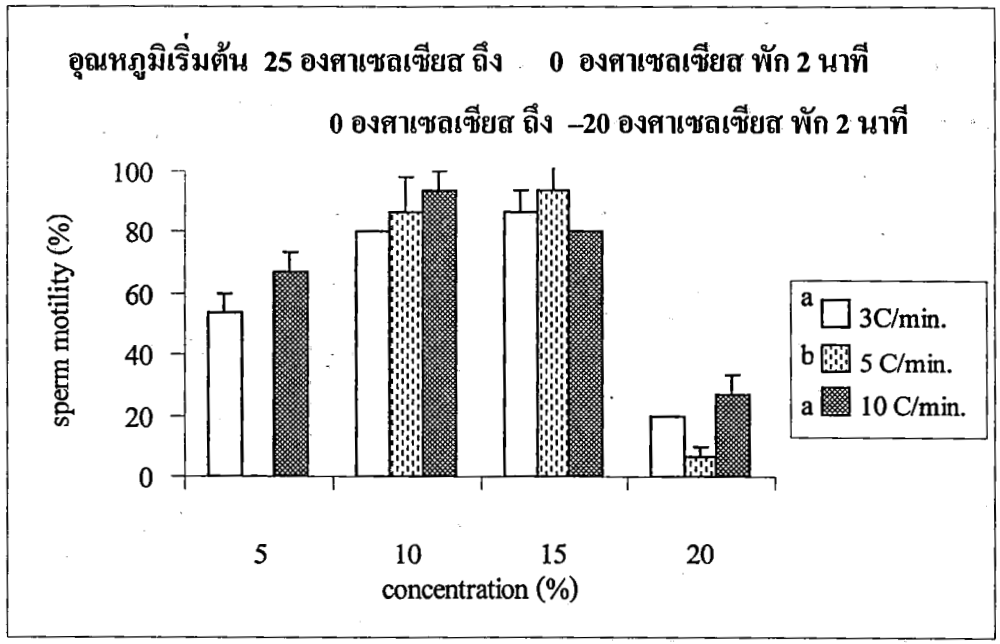
จากการประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด (freshly collected milt) พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งในน้ำยาสูตร Ca-F HBSS และสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วมีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีผลดีที่สุด เมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl แม้ว่าภาพรวมโดยทั่วไปของการลดอุณหภูมิอย่างช้าและอย่างปานกลางจะมีผลทำให้สเปิร์ม มีการเคลื่อนที่น้อยมาก (ภาพที่ 31) จากการทดสอบทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO 10% และ15% ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างทางสถิติกับสารละลาย DMSO 5% และ 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้าและอุณหภูมิอย่างปานกลางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างทางสถิติกับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ($P<0.05$)



ภาพที่ 31 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังการแช่แข็งในสารละลาย DMSO เมื่อหยุดอุณหภูมิที่ 2 องศาเซลเซียสนาน 2 นาที

7.5.6 อุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง 0 องศาเซลเซียส พัก 2 นาที
0 องศาเซลเซียส ถึง –20 องศาเซลเซียส พัก 2 นาที

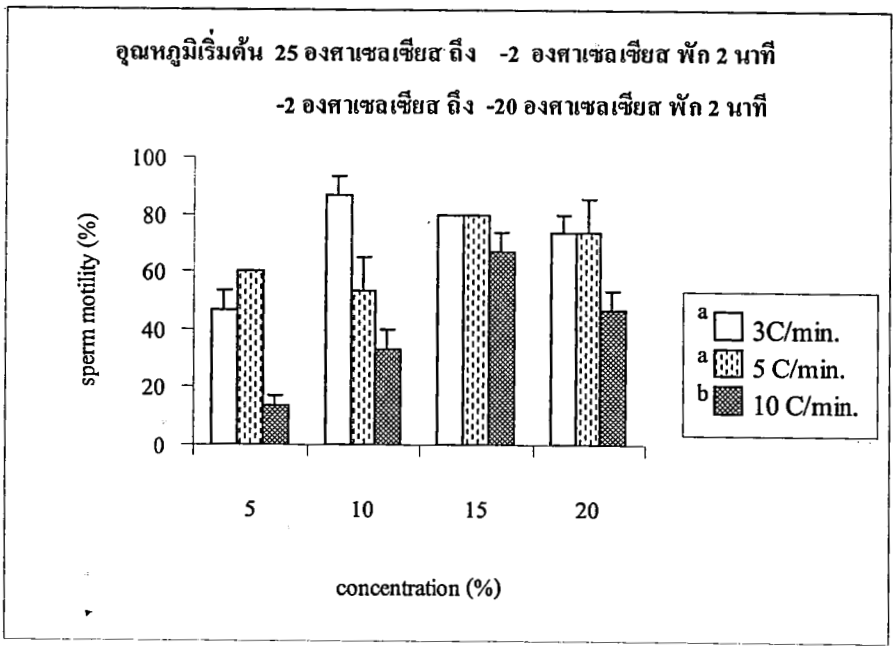
จากการประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งในน้ำยาสูตร Ca-F HBSS และสารละลาย DMSO 10% และ15% ในทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิมีการเคลื่อนที่ของ สเปิร์มดีที่สุดในขณะที่การใช้ DMSO 5% และ 20% พบว่ามีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มน้อยมาก (ภาพที่ 32) จากการทดสอบทางสถิติ พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย DMSO 10% และ 15% ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างทางสถิติกับสารละลาย DMSO 5% และ 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้าและอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลางอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)



ภาพที่ 32 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังการแช่แข็งในสารละลาย DMSO เมื่อหยุดอุณหภูมิที่ 0 องศาเซลเซียสนาน 2 นาที

7.5.7 อุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -2 องศาเซลเซียส พัก 2 นาที
-2 องศาเซลเซียส ถึง –20 องศาเซลเซียส พัก 2 นาที

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งในน้ำยาสูตร Ca-F HBSS และสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้าและอัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลางมีผลทำให้มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีกว่าการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl (ภาพที่ 33) จากการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO 10%, 15% และ 20% ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างทางสถิติกับสารละลาย DMSO 5% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้าและอัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่ความแตกต่างกันทางสถิติกับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

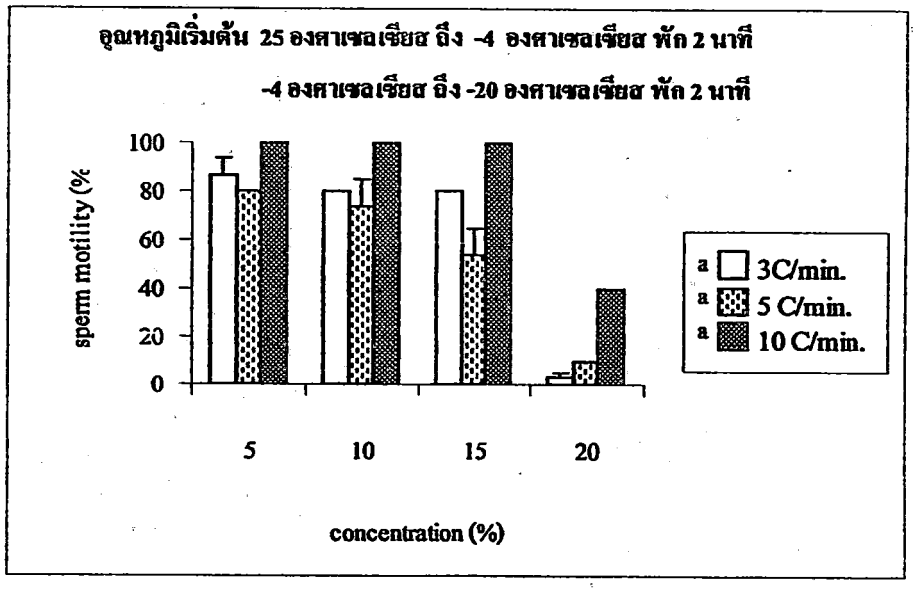


ภาพที่ 33 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังการแช่แข็งในสารละลาย DMSO เมื่อหยุดอุณหภูมิที่ -2 องศาเซลเซียสนาน 2 นาที

7.5.8 อุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง -4 องศาเซลเซียส พัก 2 นาที
-4 องศาเซลเซียส ถึง –20 องศาเซลเซียส พัก 2 นาที

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งในน้ำยาสูตร Ca-F HBSS และสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10% และ 15% พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิทุกระดับนั้นมีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้น DMSO 20% จะมีการเคลื่อนที่น้อยมาก (ภาพที่ 34) จากการทดสอบทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO 5%, 10% และ 15% ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างทางสถิติกับสารละลาย DMSO 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และในทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

น้ำเชื้อที่ได้เก็บแช่แข็งในชุดการทดลองนี้ที่ลดอุณหภูมิด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 10^{0}C/นาทีเมื่อนำมาละลายแล้วนำไปผสมเทียมกับไข่ปลาตะเพียนขาวสามารถปฏิสนธิไข่ได้ 80.8$\pm$3.8% ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) จากการใช้น้ำเชื้อสดที่สามารถปฏิสนธิไข่ได้ 85.2$\pm$4.1%



ภาพที่ 34 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังการแช่แข็งในสารละลาย DMSO เมื่อหยุดอุณหภูมิที่ -4 องศาเซลเซียสนาน 2 นาที

7.6 การศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย

การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็งในแต่ละชุดการทดลองทำโดยการรวบรวมเอาน้ำเชื้อปลาดุกอุย 10-15 ตัว (pooled milt) เพื่อให้ได้น้ำเชื้อปริมาตรรวมอย่างน้อย 5 มิลลิลิตร น้ำเชื้อถูกนำมาเจือจางในสารละลาย C-F HBSS ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร แล้วจึงผสม cryoprotectants ได้แก่ propylene glycol, glycerol, formamide ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันเพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5%, 10%, 15% และ 20% แล้วปล่อยไว้ 10 นาที เพื่อให้เกิดสภาพสมดุลย์ของสารละลาย (equilibrium) ก่อนที่น้ำเชื้อจะถูกรวบรวมไว้ในหลอดฟาง (straws) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร การทดลองของแต่ละชุดการทดลองได้ใช้ straw 3 หลอด (replications) ทำการแช่แข็งในช่วงฤดูผสมพันธ์วางไข่ การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยทำโดยนำหลอดฟางเหล่านี้มาแช่แข็ง (freezing) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับได้แก่ อัตราการลดอุณหภูมิที่ช้า (slow freezing rate ที่ 3 $^{\circ}$C/นาที จากอุณหภูมิ 25°C จนเป็น –40°C ก่อนที่จะ free fall และอยู่ในอุณหภูมิ –196°C ทันที) อัตราการลดอุณหภูมิปานกลาง (medium freezing rate ที่ 5 $^{\circ}$C/นาที จากอุณหภูมิ 25°C จนเป็น –40°C ก่อนที่จะfree fall และอยู่ในอุณหภูมิ –196°C ทันที) และ อัตราการลดอุณหภูมิที่รวดเร็ว (fast freezing rate ที่ 10 $^{\circ}$C/นาที จากอุณหภูมิ 25°C จนเป็น –40°C ก่อนที่จะfree fall และอยู่ในอุณหภูมิ –196°C ทันที) น้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งที่ได้เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวระยะเวลาหนึ่งและได้ถูกนำมาเพิ่มอุณหภูมิอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water

bath) ที่ 70-80°C จนน้ำเชื้อแช่แข็งละลายเป็นของเหลว (thawing) และนำไปประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของ สเปิร์มทันที

7.6.1 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วย Propylene glycol

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ100% แต่เมื่อนำน้ำเชื้อมาแช่แข็งโดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิทั้ง 3 อัตราพบว่า ในทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิดังที่กล่าวมาแล้ว สเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl มีค่าเฉลี่ยตั้งแต่ 13.33% - 53.33% (ภาพที่ 35) จากการทดลองทางสถิติพบว่าความเข้มข้นของสารละลาย Propylene glycol 15 %ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับสารละลาย Propylene glycol 20% ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับสารละลาย Propylene glycol 5% และ 20% ($P<0.05$) ในการแช่แข็งน้ำเชื้อ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงสุดคือ 53.33%หลังการแช่แข็งโดยใช้ Propylene glycol และอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว

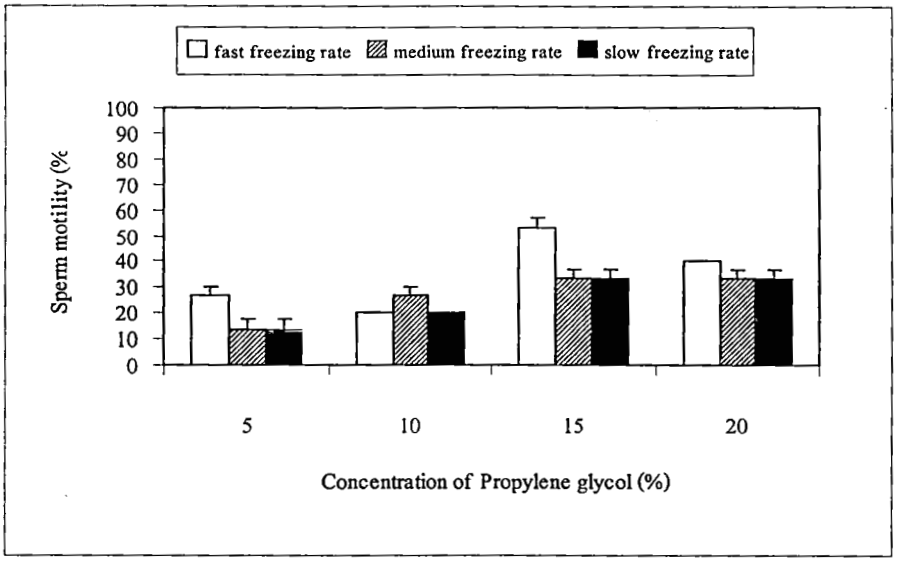
น้ำเชื้อปลาดุกอุยที่ได้เก็บแช่แข็งในชุดการทดลองนี้ที่ลดอุณหภูมิด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 10°C/นาทีเมื่อนำมาละลายแล้วนำไปผสมเทียมกับไข่ปลาดุกอุยสามารถปฏิสนธิไข่ได้ 84.8±3.5% ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) จากการใช้น้ำเชื้อสดที่สามารถปฏิสนธิไข่ได้ 87.2±2.9%

7.6.2 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วย Glycerol

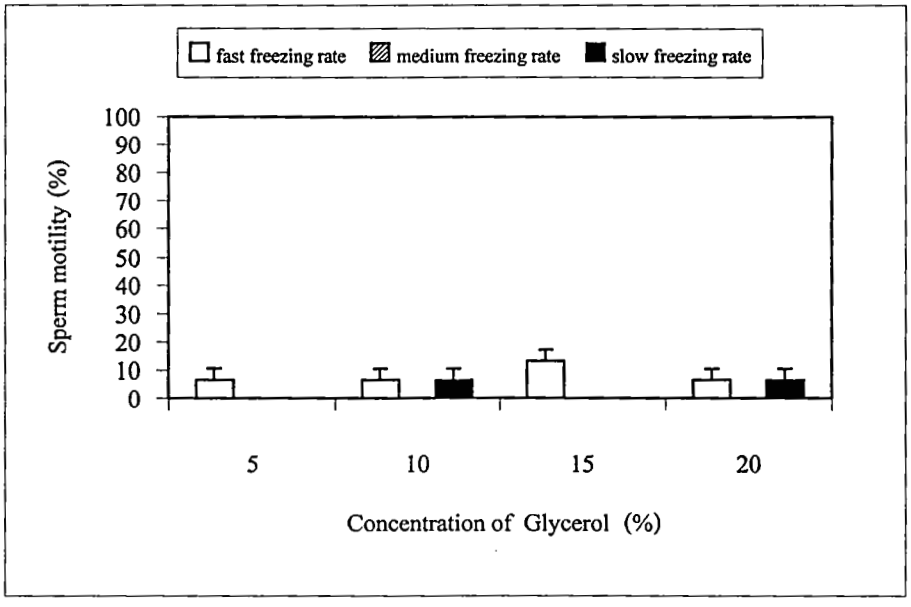
จากการประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดพบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% แต่เมื่อนำน้ำเชื้อมาแช่แข็งโดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิทั้ง 3 อัตราพบว่าที่อัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ทุกความเข้มข้นเมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl มีค่าไม่เกิน15% ที่อัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลางไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในทุกความเข้มข้น และที่อัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้าที่ความเข้มข้น 10% และ 20%มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl มีค่าไม่เกิน10% (ภาพที่ 36) จากการทดลองทางสถิติพบว่าความเข้มข้นของสารละลาย Glycerol ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

7.6.3 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วย Formamide

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดพบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ100% แต่เมื่อนำน้ำเชื้อมาแช่แข็งโดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิทั้ง 3 อัตราพบว่า ในทุกอัตราการลดอุณหภูมิไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเลย เมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl แสดงว่า Formamide ไม่สามารถนำมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย



ภาพที่ 35 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยหลังการแช่แข็งในสารละลาย Propylene glycol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ20% ในอัตราส่วน 1:1



ภาพที่ 36 แสดงเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยหลังการแช่แข็งในสารละลาย Glycerol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ20% ในอัตราส่วน 1:1

8. อภิปราย และสรุปผลการทดลอง

จากการทดลองเพื่อหาสูตรน้ำยาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่เย็น พบว่าน้ำยาCalcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวได้ดีที่สุด เนื่องจากเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงช้าที่สุดและหยุดเคลื่อนที่ที่ 66 ชั่วโมง สำหรับน้ำยาสูตร อื่น ๆ นั้นเวลาที่สเปิร์มหยุดเคลื่อนจะอยู่ในช่วง 48 ถึง 60 ชั่วโมง และในช่วง 24 ชั่วโมงแรกเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงเร็วกว่าสเปิร์มที่เก็บในน้ำยา Ca-F HBSS มาก ผลจากการย้อมสีสเปิร์มที่มีชีวิต พบว่าในวันที่ 4 ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อเปอร์เซนต์ของสเปิร์มที่มีชีวิตที่เก็บรักษาไว้ในน้ำยา Cortland มีค่าต่ำที่สุดคือ คือ 55 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซนต์ของสเปิร์มที่มีชีวิตในน้ำยา Ca-F HBSS มีค่า 71 เปอร์เซ็นต์ แต่ในสูตร HBSS , Extender 7 และ Extender 13 เปอร์เซนต์ของ สเปิร์มที่มีชีวิตโดยทั่วไปจะมีค่ามากกว่า 85 เปอร์เซนต์ขึ้นไป การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำยาทั้ง 5 สูตรมีแนวโน้มว่าสามารถรักษาให้สเปิร์มให้สามารถเคลื่อนที่แม้ว่าถูกรีดออกมาจากปลานานกว่า 48 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเพราะว่าสูตรน้ำยาต่าง ๆ มีองค์ประกอบทางเคมีและค่าออสโมลาลิตี้ (osmolarity) ใกล้เคียงกับของเหลวในอัณฑะของปลา จึงทำให้สเปิร์มมีชีวิตอยู่ได้ในช่วงเวลาหนึ่ง แต่อย่างไรก็ตามน้ำยา Ca-F HBSS เป็นน้ำยาที่ทำให้สเปิร์มมีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ได้ดีและเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุดคือ 66 ชั่วโมง ทัศนีย์ และคณะ(2532) ได้ทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5 –10 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 53 ชั่วโมง โดย Extender ที่ใช้คือ 0.85 %NaCl + 7.5 % milk powder พบว่าอัตราการเคลื่อนที่อยู่ในระดับ 3 และสเปิร์มที่เคลื่อนที่มีอยู่ 50 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการทดลองในครั้งนี้น้ำยาสูตร HBSS, Cortland, Extender 7 และ Extender 13 แม้ว่าจะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ในระยะเวลาที่ใกล้เคียงกับสูตรน้ำยา Ca-F HBSS แต่เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ในช่วงแรกจะต่ำกว่า ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแคลเซียมที่ผสมอยู่ในน้ำยามีผลต่อสเปิร์ม อาจทำให้คุณภาพสเปิร์มด้อยลง เนื่องจากแคลเซียมอาจไปกระตุ้นสเปิร์ม แต่การเตรียมน้ำยาสูตร Ca-F HBSS ไม่มีการใส่แคลเซียมลงไป ทำให้คุณภาพการเก็บรักษาจึงดีกว่า ดังนั้นการเลือกสูตรน้ำยาที่เหมาะสมจึงควรเลือกน้ำยาที่ทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่ หรือมีชีวิตอยู่ได้นานรวมทั้งมีการเคลื่อนที่แข็งแรงปราดเปรียว (Stoss, 1983; Brown and Mims, 1995)

ในการทดลองต่อมาได้นำน้ำยาบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS มาเจือจางน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในอัตราส่วนระหว่างน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 1:1 , 1:2 และ 1:4 ผลที่ได้พบว่า เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่และระยะเวลาที่สามารถเก็บรักษาสเปิร์มก่อนที่สเปิร์มจะหยุดเคลื่อนที่ในน้ำยาอัตราส่วน 1:1 และ 1:2 มีค่าใกล้เคียงกันคือประมาณ 60 ชั่วโมง ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับน้ำยาที่อัตราส่วน 1:4 ที่เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่และเวลาที่สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่ต่ำกว่าน้ำยาในสองอัตราส่วนแรก และจากผลการทดลองการย้อมสีเพื่อหาเปอร์เซนต์ของสเปิร์มที่มีชีวิตนั้น ในทั้ง 3 อัตราส่วนมีเปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตโดยรวมมากว่า 90 เปอร์เซนต์ที่ระยะเวลา 4 วัน การเจือจางน้ำเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ด้วยการใช้อัตราส่วนการเจือจาง

ที่สูงขึ้นมีผลทำให้ค่าแรงดันออสโมติคลดลง จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ระยะเวลาการเก็บแช่เย็นลดลงเมื่อเจือจางน้ำเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ เช่น Bates *et al.* (1996) รายงานว่าน้ำเชื้อปลาดุกอเมริกัน (*Ictalurus punctatus*) ที่เจือจางในน้ำยา HBSS จะมีผลทำให้ค่าแรงดันออสโมติคของสารละลายลดลง 10 mosmol/kg

จากผลการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่เย็นในน้ำยาสูตรต่าง ๆ ได้แก่ น้ำยาสูตร HBSS , Extender 13, Extender 7 และ Cortland ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส พบว่าการทดลองทั้ง 3 ครั้ง เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำยาแต่ละสูตรมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และจากผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่าน้ำยาสูตร HBSS ให้ผลในการเก็บรักษาดีที่สุด โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มประกอบกับเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต อย่างไรก็ตามการเปรียบเทียบระหว่างการทดลองทั้ง 3 ครั้ง จะพบว่า การทดลองครั้งแรก น้ำยาสูตร HBSS สามารถเก็บได้นานถึง 120 ชั่วโมง ในขณะที่ในการทดลองครั้งที่ 2 นั้น น้ำยาสูตร HBSS สามารถเก็บรักษาได้นานที่สุดเพียงแค่ 48 ชั่วโมง ซึ่งผลการทดลองทั้ง 2 ครั้งนี้แตกต่างกันมาก ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจาก ในการทดลองครั้งแรกนั้นใช้ปลาดุกอุยเพศผู้ที่สมบูรณ์เพศ มีสุขภาพแข็งแรง และอยู่ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ส่วนในการทดลองครั้งที่ 2 นั้นปลาดุกอุยเพศผู้ที่ใช้เป็นปลาที่ป่วยและยังพักปลาเป็นเวลานาน ทำให้การทดลองเลื่อนไปถึงปลายเดือนตุลาคม ซึ่งเป็นช่วงปลายของฤดูผสมพันธุ์วางไข่แล้ว จึงอาจจะส่งผลให้คุณภาพของสเปิร์มมีความแข็งแรงแตกต่างกันด้วย ส่วนการทดลองครั้งที่ 3 นั้นเริ่มทดลองในเดือนกุมภาพันธ์ซึ่งเป็นช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์วางไข่ พบว่าน้ำยาสูตร HBSS สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุดเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งจะเห็นได้ว่าระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อในการทดลองครั้งที่ 3 นี้ มีค่าน้อยกว่าระยะเวลาในการทดลองครั้งที่ 1 จึงสามารถกล่าวได้ว่าฤดูกาลผสมพันธุ์วางไข่มีผลต่อความแข็งแรงของสเปิร์มทำให้ระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อลดลงในช่วงในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยในน้ำยาสูตรต่างๆ (diluted milt) ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ(antibiotic) สามารถเก็บรักษาไว้ได้นานกว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อสดที่ไม่มีการเจือจาง (undiluted milt) โดยที่น้ำเชื้อที่เก็บในน้ำยาที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ(antibiotic) ให้ผลการเก็บน้ำเชื้อได้นานถึง 120 ชั่วโมง ในขณะที่การเก็บน้ำเชื้อสดสามารถเก็บได้นานที่สุดเพียง 24 ชั่วโมง ซึ่งการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Christensen และ Tiersch (1996) ที่รายงานว่าการเก็บน้ำเชื้อของปลาดุก channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ในน้ำยาที่มีการเติมยาปฏิชีวนะนั้นสามารถเก็บน้ำเชื้อไว้ได้นานกว่าการเก็บน้ำเชื้อในน้ำยาที่ไม่มีการเติมยาปฏิชีวนะหรือการเก็บน้ำเชื้อสด

การศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่เย็นโดยการเจือจางน้ำเชื้อในน้ำยาสูตร HBSS ด้วยอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา เป็น 1ต่อ1, 1ต่อ2 และ1ต่อ4 พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนทีและเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาที่ใช้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P> 0.05$) ผลการทดลองนี้ตรงข้ามกับการทดลองของ นิศา (2539) ซึ่งได้รายงานว่า

อัตราส่วนที่เหมาะสมในการเก็บน้ำเชื้อปลาดุกอุย คือ อัตราส่วน 1ต่อ 6โดยใช้น้ำยาสูตร Modified Cortland ที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้เป็นเวลา 3 วัน อุทัยรัตน์ (2526) รายงานว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus*) คือ อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 5 ต่อ 3 ส่วน นลินี (2527) ใช้อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา 1ต่อ 3 ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว ในขณะที่ Hulata และ Rothbard (1979) ใช้อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 5ต่อ 3 ในการเก็บน้ำเชื้อปลาไน (*Cyprinus carpio*)

จากการทดลองเพื่อหาชนิดของสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็งนั้น สารละลาย methanol และ sucrose มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มน้อยที่สุด เนื่องจากยังมีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในเวลา 120 นาที ในทุกๆความเข้มข้น เช่นเดียวกับ DMSO ที่มีความเป็นพิษน้อยแม้ว่าสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่เมื่อแช่ใน DMSO 15% หรือ 20% นาน 20 นาที สารละลาย Formamide จะมีความเป็นพิษต่อสเปิร์มมากที่สุด เนื่องจากเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 0 ในเวลาเพียง 10 นาทีเท่านั้น จากการเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ความเข้มข้น 5% จะมีความเป็นพิษต่อสเปิร์มน้อยที่สุด โดยยังมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในเวลา 120 นาที ในสารละลาย methanol, DMSO, sucrose และ propylene glycol เท่ากับ 13.33%, 9.44%, 16.67% และ 2.50% ตามลำดับ แต่ที่ความเข้มข้น 20% จะมีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 0 โดยใช้เวลาเพียง 10 นาที ในสารละลาย Formamide, Propylene glycol, Ethyl alcohol ดังนั้นสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ ที่มีพิษต่อสเปิร์มปลาตะเพียนขาวน้อยที่สุดคือ methanol , DMSO และ sucrose

จากการทดลองเพื่อหาชนิดของสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็งนั้น สารละลาย Propylene glycol มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มน้อยที่สุด เนื่องจากยังมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ระยะเวลา 180 นาที และสารละลาย Ethylene glycol มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มมากที่สุด เนื่องจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ในทุกระดับความเข้มข้นมีค่าค่อนข้างน้อย และหยุดการเคลื่อนที่ในระยะเวลาที่รวดเร็วกว่าสารตัวอื่น จากการเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ในการทดลองเพื่อหาชนิดของสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็งพบว่า propylene glycol, glycerol และ formamide มีความเป็นพิษต่ำ

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวและปลาดุกอุยในทุกชุดการทดลองให้ผลการทดลองที่เหมือนกันตรงที่ เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ทุกชนิดมีแนวโน้มที่มีค่าลดลงเมื่อเวลาและความเข้มข้นเพิ่มขึ้น เหมือนกับการทดลองในปลาดุกอเมริกัน *(Ictalurus punctatus*; Tiersch *et al.*, 1994) และปลาบรีม *(Sparus aurata*; Fabbrocini *et al.*, 2000) เป็นต้น จากการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทค

แทนท์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆเพื่อเป็นเกณฑ์ในการเลือกชนิด และระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์และระยะสมดุลย์ (equilibration time) เพื่อใช้ในขั้นตอนแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวหรือปลาดุกอุยต่อไป โดยในการทดลองการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็งได้เลือกใช้น้ำยาสูตร Ca-F HBSS และใช้ DMSO เป็นสารละลายไครโอโพรเทคแทนต์ พบว่า การแช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO 10% ที่ระดับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (10 องศาเซลเซียส/นาที)โดยใช้ขั้นตอนลดอุณหภูมิจาก อุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง 0 องศาเซลเซียส พัก 0.5 นาที และลดอุณหภูมิจาก 0 องศาเซลเซียส ถึง -20 องศาเซลเซียส พัก 0.5 นาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดเท่ากับ 73.33% สอดคล้องกับผลการทดลองการแช่แข็งน้ำเชื้อของปลาเทโพ (ศิริพร และคณะ 2548) กฤษณ์และคณะ (2530) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็ง โดยใช้ glycerol หรือ DMSO เป็นไครโอโพรเทคแทนท์ที่ความเข้มข้น 2 –8 % ที่อุณหภูมิ –196 ^{0}C ใช้น้ำยา Ringer's solution ที่ปรับ pH เป็น 7.4 โดยทำการเก็บไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 90 นาที ก่อนทำการลดอุณหภูมิ ด้วยการหย่อนน้ำเชื้อลงในถังไนโตรเจนเหลว ที่มีแต่ไอไนโตรเจน เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลวที่ –196 ^{0}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาตรวจคุณภาพ พบว่า เปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตเมื่อใช้ glycerol ระดับ 4% ให้ผลดีที่สุด 53.5 $\pm$ 4.5 และเมื่อใช้ DMSO ระดับ 2, 4, 8% ให้ผลดีเป็นที่น่าพอใจคือ 55.0 $\pm$ 1.5, 63 $\pm$ 3.0 และ 51.0 $\pm$ 11.6% ตามลำดับ นลินี มารคแมน (2527) ได้ทำการเก็บน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็ง พบว่า การใช้ 8% DMSO และ 12% DMSO มีผลทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่เท่ากับ 32.4% และ 23.52% ตามลำดับ โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า (3 °C/นาที)

จากการทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็งในน้ำยาสูตร C-F HBSS และสารละลายไครโอโพรเทคแทนต์ พบว่า สารละลาย Propylene glycol ความเข้มข้น15%ที่ระดับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (10 °C/นาที) มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดเท่ากับ 53.33%รองลงมาคือ สารละลาย Propylene glycol ความเข้มข้น 20%ที่ระดับการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 40% และสารละลาย Formamide ความเข้มข้นทั้ง 4 ระดับ (5%, 10%, 15% และ20%) ทุกอัตราลดอุณหภูมิไม่เหมาะในการนำมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย เนื่องจาก สเปิร์มปลาดุกอุยไม่เคลื่อนที่เลยหลังการละลาย

9. เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. 2543. เอกสารฉบับที่ 7 /2543. สถิติผลผลิตการเลี้ยงสัตว์น้ำจืดประจำปี 2540.

กฤษณ์ มงคลปัญญาและคณะ. 2530. การศึกษาเบื้องต้นการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพื่อประโยชน์ในการผสมเทียม.

นลินี มารคแมน. 2527. การศึกษาเบื้องต้นกรรมวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , กรุงเทพฯ

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

นิศา ไชยรักษ์. 2539. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยโดยวิธีการแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาดุษฎีบัณฑิต , มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ทัศนีย์ ภูมิพัฒน์และคณะ. 2532. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวและปลาสวาย. เอกสารวิชาการฉบับที่ 101. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ, กรุงเทพฯ. 11 หน้า.

ศิริพร คชรัตน์, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2548. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพแบบแช่แข็ง. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 43 ระหว่างวันที่ 1-4 กุมภาพันธ์ 2548 ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพ. หน้า 82-89.

วิทย์ ธารชลานุกิจ , เวียง เชื้อโพธิหัก , ประวิทย์ สุรนีรนาถ และ อุทัยรัตน์ ณ นคร . 2525. การเพาะเลี้ยงปลาดุกอุย . ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ , คณะประมง , มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ , กรุงเทพฯ.

อุทัยรัตน์ ณ นคร . 2526. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว *Puntius gonionotus* Bleeker ในเวลาสั้นๆ. วารสารเกษตรศาสตร์ 17 (2):53-57

Bates, M.C., Wayman, W.R. and Tiersch, T.R., 1996. Effect of osmotic pressure on the activation and storage of channel catfish sperm. Transaction of American Fishishery Society 125: 798-802.

Brown, G.G. and Mims, S.D., 1995. Storage, transportation, and fertility of undiluted and diluted paddlefish milt. Progressive Fish Cultturist 57: 64-69.

Christensen, J.M. and Tiersch, T.R. 1996. Refrigerated storage of channel catfish sperm. Journal of the World Aquaculture Society 27: 340-346.

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.

DiLauro, M.N., Krise, W.F., Hendrix, M.A. and Baker, S.E. 1994. Short-term cold storage of Atlantic sturgeon sperm. The Progressive Fish-Culturist 56: 143-144.

Fabbrocini, A., Lavadera, S.L. and Rispoli, S. and Sansone, G. 2000. Cryopreservation of seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. Cryobiology 40: 46-53.

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

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

Hulata, G . and Rothbard, S. 1979. Cold Storage of carp semen for short period. Aquaculture 16: 267-269.

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.

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

Satterfield, J.R. and Flickinger, S.A. 1995. Factors influencing storage potential of preserved Walleye semen. The Progressive Fish-Culturist 57: 175-181.

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.

Stoss, J., 1983. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: W.S. Hoar, D.J. Randall and E.M. Donalson (Editors). Fish Physiology. vol.9, part B. Academic Press, Orlando. pp. 305-350.

Stoss, J., Geries, L. and Holtz, W. 1987. The role of spermatozoa depth in storing chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen under oxygen. Aquaculture 61: 275-279.

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.

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.

ภาคผนวก

การเตรียมสูตรน้ำยา (sperm extender)

ทำการชั่งสารเคมีดังตารางที่ 1 เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วคนสารให้ละลายเทลงขวดสีชา และนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น ซึ่งสามารถเก็บไว้ได้นาน 1 สัปดาห์

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของสูตรน้ำยา (sperm extender) 5 สูตร(กรัม) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร

สารเคมี	Extender				
	HBSS	Modified Cortland	7	13	Ca – F
NaCl	1.6	0.376	1.156	1.752	1.778
KCl	0.08	1.44	0.5115	-	0.088
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.032	0.046	0.0205	-	-
$Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$	0.024	0.082	-	-	0.026
KH_2PO_4	0.012	-	-	-	0.014
$NaHCO_3$	0.07	0.2	0.0470	-	0.078
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.04	0.046	-	-	0.044
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	-	-	-	-	-
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$	-	-	0.0440	-	-
Glucose	0.2	0.2	-	-	0.222
Pyruvate	-	-	1.20	-	-
Citric acid	-	-	0.020	-	-
HEPES buffer	-	-	0.476	-	-
pH	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6

ใส่ยาปฏิชีวนะ (antibiotic) penicillin – streptomycin (Lot No. 1074528, GIBCOBRL, USA) 500 ไมโครลิตรต่อน้ำยา 100 มิลลิลิตร เมื่อผสมน้ำยาแล้วการปรับ pH โดยใช้สารละลาย KOH และ HCl ผสมลงในน้ำยา