รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีที่ 1

โครงการวิจัย การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนเพื่อการจัดตั้งธนาคารน้ำเชื้อ
Sperm cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) for setting up of sperm bank

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย
สุบัณฑิต นิ่มรัตน์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2558A10802288
สัญญาเลขที่ 64/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนเพื่อการจัดตั้งธนาคารน้ำเชื้อ
Sperm cryopreservation of common carp (*Cyprinus carpio*) for setting up of sperm bank

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[1]
สุบัณฑิต นิ่มรัตน์[2]

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

พฤษภาคม 2559

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนเพื่อการจัดตั้งธนาคารน้ำเชื้อ สำเร็จเรียบร้อยลงได้ โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 64/2558

บทคัดย่อ

งานวิจัยเรื่อง การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนเพื่อการจัดตั้งธนาคารน้ำเชื้อ ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มปลาไน ผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน ผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนที่ผ่านการแช่แข็ง โดยในการทดลองศึกษาคุณภาพสเปิร์มได้นำพ่อพันธุ์ปลาไนมาตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มเดือนละครั้งในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ การศึกษาผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน โดยการรวบรวมน้ำเชื้อออกจากพ่อพันธุ์ปลาไนมาเจือจางในสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ 9 ชนิด (dimethyl sulfoxide; DMSO, ethylene glycol, propylene glycerol, acetamide, sucrose, glycerol, formamide, ethanol และ methanol) ที่ 4 ระดับความเข้มข้น (5, 10, 15 และ 20%) เป็นระยะเวลาต่างๆกัน (10-180 นาที) แล้วประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ระยะเวลาต่างๆกัน และการศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนผ่านการแช่แข็ง ทำโดยนำน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ปลาไนมาใส่ในสารไครโอโพรเทคแทนท์แล้วนำไปลดอุณหภูมิด้วยอัตราการลดอุณหภูมิรูปแบบต่างกันแล้วนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวและประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย ผลการศึกษาพบว่าคุณภาพสเปิร์มของน้ำเชื้อสดที่รวบรวมออกมาจากปลาไนมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ โดยความหนาแน่นของสเปิร์มมีค่าสูงขึ้นในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนขึ้นอยู่กับ ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ รวมทั้งระยะเวลาที่สเปิร์มเจือจางอยู่ในสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษต่ำต่อสเปิร์มปลาไนได้แก่ DMSO, ethylene glycol, propylene glycol, sucrose, ethanol และ methanol น้ำเชื้อปลาไนที่แช่แข็งด้วยการใช้ DMSO ให้ผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายดีที่สุดมีค่าสูงประมาณ 80% ซึ่งจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนต่อไปเพื่อให้สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อให้ได้ในระยะเวลาที่นานขึ้น

คำสำคัญ: น้ำเชื้อ; ปลาไน; การแช่แข็ง; ไนโตรเจนเหลว

ABSTRACT

Studies on change in sperm quality, effects of cryoprotectants on sperm motility and effects of cooling rates on post-thawed sperm motility of common carp (*Cyprinus carpio*) were accomplished. Male broodstocks were collected monthly for the semen during the spawning season for evaluation on the change in sperm quality. Evaluation of effects of cryoprotectants on sperm motility was performed by diluting extended semen into nine cryoprotectant solutions, namely dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol, propylene glycerol, acetamide, sucrose, glycerol, formamide, ethanol and methanol with four concentration levels (5, 10, 15 and 20%) at various time (10-180 min.) before evaluation of percentage of sperm motility. Assessment on the effects of cooling rates on post-thawed sperm motility was done by diluting semen into cryoprotectants prior to freezing with different cooling protocols and storage in liquid nitrogen. Sperm quality of fresh semen changed during the spawning season with increased sperm concentration towards the end of the spawning season. Cryoprotectant toxicity depended on type and concentration of cryoprotectants and exposure time. DMSO, ethylene glycol, propylene glycol, sucrose, ethanol and methanol elicited low toxicity on sperm motility. Semen of *C. carpio* frozen with DMSO had the highest post-thawed sperm motility about 80%. Further investigation on development of freezing techniques of semen to allow longer storage period is required.

Keywords: Semen; Common carp; Cryopreservation; Liquid nitrogen

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทคัดย่อ	ii
Abstract	iii
สารบัญ	iv
สารบัญตาราง	v
สารบัญรูป	vi
บทที่	
1 บทนำ	1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
3 วิธีดำเนินงานวิจัย	10
4 ผลการทดลอง	18
5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	32
เอกสารอ้างอิง	34
ผลผลิต (Output)	38
ประวัติคณะผู้วิจัย	39

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อปลาไนในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่.....	18
2	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	19
3	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย ethylene glycol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	20
4	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย propylene glycol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	21
5	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย acetamide ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	22
6	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย sucrose ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	23
7	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย glycerol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	24
8	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย formamide ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	25
9	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย ethanol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	26
10	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย methanol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	27
11	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนหลังการแช่แข็งและเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วย Ca-F HBSS และ DMSO ที่อัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน.....	29
12	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนหลังการแช่แข็งและเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วย Ca-F HBSS และ Propylene glycol ที่อัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน.....	30
13	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนหลังการแช่แข็งและเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วย Ca-F HBSS และ Ethylene glycol ที่อัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน.....	31

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	พ่อพันธุ์ปลาไน.....	12
2	การรวบรวมพ่อพันธุ์ปลาไนมาใช้ในการทดลอง.....	12
3	การรีดน้ำเชื้อปลาไนมาใช้ในการทดลอง.....	13
4	น้ำเชื้อปลาไนที่รวบรวมมาใช้ในการทดลอง.....	13
5	หลอดฟางสำหรับใช้ในการทดลองแช่แข็ง.....	16
6	การปิดปลายหลอดฟาง.....	16
7	ลักษณะของหลอดฟางที่ปิดปลายหลอดก่อนการแช่แข็ง.....	17
8	เครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ.....	17

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย

ปลาไน (*Cyprinus carpio*) เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งเป็นที่นิยมเพาะเลี้ยงและบริโภคทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศทั่วโลก เป็นปลาที่อยู่ในครอบครัว Cyprinidae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cyprinus carpio* และมีชื่อสามัญว่า Common carp รูปร่างลักษณะคล้ายปลาตะเพียน มีเกล็ดกลมใหญ่ทั่วตัว นอกจากส่วนหัวไม่มีเกล็ดปากเล็กไม่มีฟัน ริมฝีปากหนาและมีหนวดสี่เส้น ครีบหลังเป็นครีบเดี่ยวยาวส่วนสีของปลาไนโดยมากมักจะเป็นสีเงินปนเทาบางทีก็เหลืองอ่อน บางตัวจะเป็นสีทองตลอดตัว ปลาไนเป็นปลาที่เพาะเลี้ยงง่าย โตเร็ว ทนทานต่อสภาพแวดล้อม กินอาหารได้เกือบทุกชนิดและเจริญเติบโตได้ดี ในแหล่งน้ำจืดต่าง ๆ ในปัจจุบันการเพาะขยายพันธุ์ปลาไนในประเทศไทยมีลักษณะเช่นเดียวกับการเพาะขยายพันธุ์ปลาชนิดอื่นๆอีกหลายชนิด ที่สามารถทำได้ในระดับเชิงพาณิชย์ แต่ในบางช่วงเวลาพ่อพันธุ์ปลาไนมีปริมาณน้ำเชื้อลดลง (expressible milt) ในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ในขณะที่แม่พันธุ์ปลาไนมีไข่แก่ ทำให้การเพาะพันธุ์ปลาไนไม่ว่าจะเป็นวิธีการเพาะพันธุ์แบบเลียนแบบธรรมชาติ หรือวิธีการเพาะพันธุ์แบบผสมเทียม ไม่สามารถทำการผลิตลูกพันธุ์ปลาไนอย่างมีประสิทธิภาพได้เต็มที่ ทำให้จำเป็นต้องศึกษาหาวิธีการเพาะขยายพันธุ์ปลาไนให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อน้ำเชื้อปลาปลาไนเป็นปัจจัยจำกัด (limiting factor) ต่อการผลิต (Vuthiphandchai et al., 2014) การศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มปลาไนในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่จึงเป็นสิ่งจำเป็นเบื้องต้นเพื่อทราบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มเพื่อการบริหารจัดการการเพาะพันธุ์ปลาไน เพราะปัญหาคุณภาพน้ำเชื้อปลาส่งผลต่อการผลิตลูกปลาโดยตรง (Ochokwu et al., 2015) อย่างไรก็ตามปัญหาหนึ่งที่ส่งผลต่อการเพาะขยายพันธุ์ปลาไนก็ยังมีความเกี่ยวข้องกับการผสมเลือดชิด (inbreeding) เนื่องจากการนำพันธุ์ปลาไนเข้ามาเลี้ยงในประเทศไทยในระยะแรกมีจำนวนไม่มากนัก ทำให้มีโอกาสเกิดการผสมของปลาในครอบครัวที่มีสายเลือดชิดกันได้มาก ทำให้ในปัจจุบันได้มีการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ปลาไนให้ได้สายพันธุ์ที่ดีโตเร็ว มีลักษณะตามที่ต้องการโดยทำการคัดเลือกสายพันธุ์ปลาไนให้ได้สายพันธุ์ที่ดีและเมื่อได้สายพันธุ์ที่ดีแล้วจึงจำเป็นต้องเก็บรักษาสายพันธุ์ที่ดีนั้นไว้เพื่อที่จะนำไปเพาะขยายพันธุ์เพื่อประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยง ซึ่งแนวทางหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงในการแก้ไขปัญหา และสามารถประยุกต์ใช้ได้ทันที คือ นำน้ำเชื้อปลาไนที่มีคุณภาพดีเหล่านั้นมาแช่แข็งและเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (cryopreservation) เพื่อนำมาใช้ในภายหลังด้วยการผสมเทียมกับไข่ปลาไน (Boonthai et al., 2016) ซึ่งแนวทางเช่นนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับปลาแฟนซีคาร์พ (fancy carp) ซึ่งเป็นปลาสวยงามที่มีราคาแพง แต่ยังคงมีปัญหาการขาดแคลนพ่อพันธุ์คุณภาพดีบางสายพันธุ์ในการผสมให้ได้ลูกปลาลักษณะที่ต้องการ อย่างไรก็ตามการพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนจำเป็นต้องทราบข้อมูลพื้นฐานของชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน ซึ่งสารดังกล่าวมีความจำเป็นที่ต้องใช้ในระหว่างกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อ (cryopreservation) เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดเกล็ดน้ำแข็ง (ice crystal) ระหว่างการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็ง เพราะการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ อย่างไม่เหมาะสมจะทำให้เซลล์ได้รับบาดเจ็บและตายในที่สุด (cell injury) (Vuthiphandchai et al., 2014) ดังนั้นการศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มปลาไน จึงเป็น

สิ่งจำเป็นเพื่อจำเป็นเพื่อทราบข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเพื่อได้ข้อมูลที่จำเป็นสำหรับการพัฒนากระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนต่อไป

ในประเทศไทยการศึกษาเกี่ยวกับการเก็บน้ำเชื้อสัตว์น้ำแบบแช่แข็งยังมีอยู่น้อยมากเมื่อเทียบกับการศึกษาในต่างประเทศ เนื่องจากสัตว์น้ำส่วนใหญ่ที่พบในประเทศไทยมักจะมีน้ำเชื้อที่สมบูรณ์ดีตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่และหาได้ง่ายจึงทำให้ผู้เพาะพันธุ์สัตว์น้ำไม่นิยมเก็บน้ำเชื้อสัตว์น้ำแช่แข็งเอาไว้ใช้ในอนาคต แต่ในความจริงแล้วปัญหาการขาดแคลนน้ำเชื้อของสัตว์น้ำยังคงมักพบอยู่บ่อยครั้งในระหว่างการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำหลายๆชนิดโดยเฉพาะการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำต่างชนิดกัน (hybridization) ซึ่งอาจมีช่วงเวลาที่ไข่และสเปิร์มอาจสมบูรณ์เพศไม่พร้อมกัน การเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำแช่แข็งมีแนวโน้มที่จะมีความสำคัญอย่างมากต่อการเพาะขยายพันธุ์สัตว์น้ำ โดยเฉพาะปลาเพศผู้ที่ต้องผ่าท้องเอาอัณฑะมาใช้ผสมเทียมเช่นปลาดุกรวมทั้งพันธุ์ปลาที่หาได้ยาก ใกล้สูญพันธุ์ หรือปลาที่มีการกลายเพศซึ่งเพศผู้และเพศเมียจะพัฒนาถึงวัยเจริญพันธุ์ไม่พร้อมกัน นอกจากนี้ในบางครั้งการจับพ่อแม่พันธุ์ปลาจากแหล่งผสมพันธุ์วางไข่ก็ได้ปลาเพศผู้และเพศเมียไม่พร้อมกันซึ่งก่อให้เกิดปัญหาในด้านการจัดการในโรงเพาะฟักระหว่างการเพาะพันธุ์ เช่น ตัวเมียที่จับได้ก่อนมีไข่ที่ไม่สมบูรณ์ต้องใช้ฮอร์โมนฉีดกระตุ้นซึ่งต้องขังตัวผู้ไว้หลายวันทำให้พ่อพันธุ์ปลาอาจช้ำและตายได้ หรือบ่อยครั้งที่เคลื่อนย้ายพ่อพันธุ์จากบ่อดินมาไว้ในโรงเพาะฟักก็ทำให้พ่อพันธุ์มีน้ำเชื้อน้อยลง (expressible milt) การเก็บน้ำเชื้อสัตว์น้ำแช่แข็งยังมีบทบาทสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์ปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเพื่อผลิตปลาที่โตเร็วหรือทนทานต่อโรคให้มากขึ้นเพราะสามารถควบคุมช่วงเวลาการผสมเทียมหรือการผสมข้ามพันธุ์ปลาชนิดต่างๆได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้การลำเลียงน้ำเชื้อสัตว์น้ำแช่แข็งไปใช้ในการผสมเทียมก็ทำได้สะดวกกว่าการลำเลียงพ่อพันธุ์ โดยสามารถขนส่งไปภายในประเทศและระหว่างประเทศได้ง่าย และยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการเก็บรักษาพันธุกรรมของธนาคารยีน (gene bank) และการเก็บรักษาตัวอ่อนของลูกปลาต่อไป อย่างไรก็ตามแม้ว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำแบบแช่แข็งจะมีความสำคัญต่อการพัฒนาด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ แต่การศึกษาด้านการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำแบบแช่แข็งในประเทศไทยยังมีค่อนข้างน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยทางด้านอื่นๆของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งมีการพัฒนาอย่างมากเทียบเท่าในต่างประเทศ การเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำแบบแช่แข็งกล่าวโดยสรุปทำโดยการนำเอาน้ำเชื้อสัตว์น้ำที่มีคุณภาพดีมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (sperm extender) พร้อมกับใส่สารที่ป้องกันไม่ให้เซลล์เป็นอันตรายในระหว่างการแช่แข็งซึ่งเรียกว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) แล้วจึงเอาไปบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อพร้อมกับลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ก่อนที่จะเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ซึ่งสามารถรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อสัตว์น้ำได้เป็นเวลานานเป็นปี (Nimrat and Vuthiphandchai, 2008)

ประโยชน์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแบบแช่แข็งสามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์และใช้ในการเพาะขยายพันธุ์ปลาในตระกูลเดียวกัน เช่น ปลาแฟนซีคาร์พ (Fancy carp) หรือที่เรียกกันว่าปลาไนแฟนซี ซึ่งเกิดจากการผ่าเหล่า (Mutation) กลายพันธุ์เป็นปลาไนสีแดง ทำให้ชาวญี่ปุ่นนี้สนใจปลาชนิดนี้มากขึ้น การเพาะขยายพันธุ์ปลาชนิดนี้ค่อยๆขยายตัวแพร่หลายเพิ่มมากขึ้น และจากการคัดเลือกปลาคาร์พที่มีลักษณะเด่นของแต่ละตัวมาผสมพันธุ์ทำให้เกิดปลาสายพันธุ์ใหม่ที่มีสีแดงและสีขาวสมบูรณ์ ซึ่งเป็นปลาสวยงามที่มีมูลค่าสูง วงการการเลี้ยงปลาแฟนซีคาร์พนั้นจึงเป็นที่กว้างขวาง และเป็นที่นิยมแพร่หลายไปทั่วโลก ไม่ใช่แค่ในประเทศต้นกำเนิดอย่างญี่ปุ่นและแถบเอเชียเท่านั้น ที่สำคัญ แฟนซีคาร์พ ได้กลายเป็นสัญลักษณ์แทนความหมายบางอย่าง

มากกว่าจะเป็นเพียงแค่ปลาสวยงาม การเลี้ยงคาร์พแฟนซี ตอนนี้กลายเป็นสัตว์เศรษฐกิจตัวใหม่ มูลค่าส่งออกมากกว่าหลักพันล้านบาทไปแล้ว ส่วนหนึ่งมาจากความต้องการปลาสวยงามในตลาดโลก มีคนนิยมเลี้ยงกันมากในปัจจุบันชนิดหนึ่ง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมันเลี้ยงง่าย โตไว อีกทั้งยังมีสีสันสวยงาม และเป็นปลาที่มีอายุยืนที่สุดในโลก หากเรามีพ่อแม่พันธุ์ที่ดี หรือเรียกว่า สายพันธุ์นิ่ง คือพ่อแม่พันธุ์หน้าตาเป็นอย่างไร ลูกที่ออกมามักจะได้แบบนั้นเป็นส่วนใหญ่ หากมีการนำประโยชน์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อมาใช้ก็จะเป็นประโยชน์ในการเก็บรักษาสายพันธุ์ที่ดี หรือสายพันธุ์นิ่งแล้ว เพื่อนำไปใช้ปรับปรุงพันธุ์ก็จะเป็นประโยชน์ต่อการเพาะขยายพันธุ์ปลา แฟนซีคาร์พ (Fancy carp) ซึ่งถ้าสามารถพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนได้สำเร็จอย่างมีประสิทธิภาพ ก็สามารถนำเอาเทคโนโลยีไปใช้กับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาแฟนซีคาร์พได้ทันที เพราะปัญหาการขาดแคลนน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีในปลาแฟนซีคาร์พก็มีเหมือนที่พบในปลาไน และเป็นปลาในครอบครัวเดียวกัน

ในปัจจุบันการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในต่างประเทศนิยมทำในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและใกล้สูญพันธุ์ทั้งปลาน้ำจืด และปลาทะเล เช่น ปลาไน (Linhart et al., 2000) ปลา salmon ปลา striped bass (He and Woods, 2003) ปลา sea bream (Fabbrocini et al., 2000) และปลา Atlantic croaker (Gwo and Arnold, 1992) เป็นต้น น้ำเชื้อแช่แข็งนิยมเก็บรักษาในหลอดฟาง (straw) และสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานเป็นปีเมื่อต้องการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในการผสมเทียมก็สามารถนำหลอด บรรจุน้ำเชื้อมาละลายโดยการเพิ่มอุณหภูมิ ดังนั้นความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ และชนิดสาร cryoprotectants ที่เหมาะสม (Rana and McAndrew, 1989) อัตราการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็ง (freezing) และการเพิ่มอุณหภูมิขณะละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (Scott and Baynes, 1980; Vuthiphandchai et al., 2014) นอกจากนี้ความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อปลาที่เกิดขึ้นในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และ เทคนิคของการทำน้ำเชื้อปลาแช่แข็ง ก็มีผลทำให้ความสำเร็จของการทำน้ำเชื้อแช่แข็งแต่ละครั้งแตกต่างกันไป โดยทั่วไปน้ำเชื้อของปลา (milt) ประกอบด้วย สเปิร์มมาโทซัว (spermatozoa) และของเหลวที่หล่อเลี้ยง (seminal fluid) โดยที่สเปิร์มจะไม่เคลื่อนที่ขณะอยู่ในถุงอัณฑะ หรือของเหลวที่หล่อเลี้ยง แต่จะมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วมากเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสภาพแวดล้อมภายนอก และจะหยุดเคลื่อนที่ภายใน 1 นาทีหลังจากถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ (Vuthiphandchai et al., 2009b) กลไกที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาน้ำจืดพบว่าสารละลายที่มีค่า osmolarity ต่ำกว่า (hypotonicity) ระดับที่พบใน seminal fluid จะกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ แต่ในปลาทะเลนั้นสารละลายที่มีค่า osmolarlity สูงขึ้น (hypertonicity) จะกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ (Morisawa et al., 1983) ดังนั้นการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาจึงมีความสำคัญมากเพราะทำให้สเปิร์มไม่ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ขณะอยู่ในระหว่างการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง เพราะถ้าสเปิร์มมีการเคลื่อนที่ก่อนจะถูกแช่แข็ง ก็จะมีผลทำให้ประสบความล้มเหลวในการแช่แข็งทันที

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแบบแช่แข็ง

2. ศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่มีต่อการมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนที่ผ่านการแช่แข็ง

3. ศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาที่มีต่อการมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน
4. เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแบบแช่แข็งในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อ

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแบบแช่แข็งโดยเริ่มจากการศึกษาความเป็นพิษ (toxicity) ของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ว่าสารชนิดใด หรือความเข้มข้นใดมีความเหมาะสมในการคัดเลือกมาใช้เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์สำหรับแช่แข็ง

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป ทฤษฎีและ/หรือแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในงานวิจัย

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแบบแช่แข็งมีหลักการทำงาน เริ่มจากการใช้เซลล์สเปิร์มที่มีคุณภาพสูงให้อยู่ในสภาวะสมดุล (equilibration) ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ได้ใส่สารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เกิดเกล็ดน้ำแข็ง (ice crystal) ภายในเซลล์ จากนั้นทำการลดอุณหภูมิให้ต่ำลงเพื่อแช่แข็งเซลล์ด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม แล้วเก็บน้ำเชื้อเหล่านั้นในไนโตรเจนเหลว ซึ่งเมื่อต้องการใช้ก็นำมาเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้เซลล์ที่แข็งตัวละลายกลับเข้าสู่สภาพเดิมก่อนแช่แข็ง

การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน เพื่อการเพาะพันธุ์เชิงพาณิชย์จำเป็นต้องมีข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับความสามารถในการทนต่อสารไครโอโพรเทคแทนท์ เพราะสารชนิดนี้จำเป็นต้องใส่ไปในระหว่างการแช่แข็งเพื่อป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในเซลล์ระหว่างการลดอุณหภูมิ และสารไครโอโพรเทคแทนท์จะทำให้เซลล์ตายถ้าใช้ในปริมาณที่ไม่เหมาะสม ตัวแปรที่ทำให้การแช่แข็งประสบความสำเร็จจำเป็นต้องสามารถพัฒนาทุกขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับการแช่แข็งให้เหมาะสมสำหรับเซลล์ชนิดนั้นๆ เริ่มตั้งแต่ ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ อัตราการลดอุณหภูมิ อัตราการละลาย และรวมทั้งขั้นตอนอื่นๆที่เกี่ยวข้องให้มีความเหมาะสมในทุกตัวแปรที่เกี่ยวข้อง เพราะถ้าไม่สามารถ optimize ในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งให้เหมาะสม ก็จะทำให้การแช่แข็งประสบความล้มเหลวทันที

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่นำมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน

2. ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งด้วยการพัฒนาเทคโนโลยีที่มีราคาถูกเพื่อทดแทนการใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติเพื่อให้เกษตรกร หรือผู้ประกอบการขนาดเล็กหรือขนาดกลางสมารถนำไปใช้ในฟาร์มเพื่อเพิ่ม หรือควบคุมผลผลิตได้ทันที ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการเก็บรักษาสายพันธุ์ที่ดีของพ่อพันธุ์ปลาไนเพื่อการเพาะพันธุ์ต่อไป และยังเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนางานวิจัยแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาชนิดอื่นๆที่หาได้ยากหรือใกล้สูญพันธ์ต่อไปในอนาคต

3. ทราบเทคโนโลยีการแช่แข็งและการเก็บรักษาน้ำเชื้อของปลาไนเพื่อนำมาใช้ผสมเทียม โดยสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ในระยะเวลาที่นานเป็นปีเพื่อใช้ประโยชน์สูงสุดในการผสมเทียมกับแม่พันธุ์ได้ในช่วงเวลาที่ต้องการ ซึ่งสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีนี้ไปยังนักวิชาการประมง และเกษตรกรผู้เพาะพันธุ์สัตว์น้ำต่อไป

4. ทราบรูปแบบการจัดการที่เหมาะสมในการจัดเก็บรักษษน้ำเชื้อที่ดีไว้ในลักษณะ sperm bank หรือ DNA bank ซึ่งเป็นองค์ความรู้ที่จำเป็นสำหรับงานวิจัยด้านพันธุกรรมสัตว์น้ำ ด้าน toxicity หรือ molecular biology ได้ต่อไป

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ชีววิทยาปลาไน

ปลาไน (*Cyprinus carpio*) เป็นปลาน้ำจืดที่อยู่ในครอบครัวเดียวกันกับปลาตะเพียน ซึ่งเป็นปลาที่เลี้ยงมากและรู้จักกันอย่างแพร่หลายทั่วโลก และเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งในประเทศไทย ปลาไนมีลำตัวกลม หัวกลม ปากเล็ก ไม่มีฟัน มีหนวดสี่เส้น ลำตัวเป็นสีเงินปนเทา บางตัวมีสีเหลืองอ่อนและสีทอง พบอยู่ทั่วไปในแหล่งน้ำจืดธรรมชาติ สามารถปรับตัวให้เข้ากับธรรมชาติได้ดี โดยเพศผู้มีลำตัวเรียวยาวกว่า เพศเมียลำตัวกว้างกว่าถ้าอายุเท่ากัน ในช่วงการผสมพันธุ์วางไข่ สามารถแยกความแตกต่างเพศได้ง่ายขึ้น โดยปลาเพศผู้มีตุ่มสาก (pearl organ) ขึ้นบริเวณแก้ม (operculum) ครีบหูและลำตัว กดบริเวณท้องจะมีน้ำเชื้อ (semen) ไหลออกมา แต่เพศเมียไม่มีตุ่มสาก ทำให้ลื่นกว่าเมื่อลูบตัวปลา โดยจะมีท้องขยายใหญ่ขึ้นอย่างชัดเจน

ปลาไนจัดเป็นปลาที่กินอาหารได้ทั้งพืชและสัตว์ (omnivorous) และเริ่มเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เมื่ออายุได้ประมาณ 6-8 เดือน สำหรับปลาที่เลี้ยงในเขตร้อน ปลาไนสามารถวางไข่ได้ตลอดปีโดยมีไข่ปลาเป็นแบบประเภทไข่จมติด เช่นติดกับสาหร่าย พรรณไม้น้ำอื่นๆ มีสีเหลืองเข้ม ไข่ฟักออกเป็นตัวลูกปลาวัยอ่อนภายในเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ในระยะแรกลูกปลาเกาะติดกับพรรณไม้น้ำและไม่กินอาหาร แต่เมื่อถุงไข่แดงยุบซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน ลูกปลาจึงเริ่มกินอาหารและว่ายน้ำหาอาหาร ลูกปลาจะเปลี่ยนแปลงรูปร่างจนเหมือนปลาโตเต็มวัยเมื่ออายุได้ 15 วัน แม่ปลาขนาด 1 กิโลกรัม จะให้ไข่ประมาณ 100,000 ฟอง และแม่ปลาขนาด 7 กิโลกรัม จะให้ไข่ประมาณ 2,000,000 ฟอง (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538)

2. น้ำเชื้อและสเปิร์มของสัตว์น้ำ

โดยทั่วไปสเปิร์มของสัตว์น้ำประกอบด้วยส่วนหัว (head) ส่วนกลาง (mid piece) และส่วนหาง (tail) ส่วนหัวของสเปิร์มมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของสัตว์น้ำโดยในส่วนหัวมีนิวเคลียสที่มีดีเอ็นเอ (DNA) เป็นสารพันธุกรรม ทำหน้าที่ปฏิสนธิกับนิวเคลียสของไข่ ส่วนกลางของสเปิร์มเป็นส่วนที่อยู่ติดกับส่วนหัวโดยจะมีไมโคคอนเดรีย (mitochondria) จำนวนมากเป็นองค์ประกอบที่ให้พลังงานแก่สเปิร์มในการเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้น ส่วนหางของสเปิร์มเป็นส่วนที่มีลักษณะยาวและในส่วนหางจะมีไฟบริล (fibril) อยู่ทั้งหมด 11 คู่ อยู่ตรงกลาง 2 คู่ และอยู่โดยรอบ 9 คู่

สเปิร์มของปลาส่วนมากไม่มีอะโครโซม (acrosome) ที่บริเวณส่วนหัวสเปิร์มดังเช่นที่พบในเปิร์มของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไป ยกเว้นปลาบางชนิดเช่นปลา herring ที่สเปิร์มมีอะโครโซม เนื่องจากไข่ปลาส่วนมากมีช่องที่เรียกว่าช่องไมโครไพล์ (micropyle) ซึ่งเป็นทางผ่านเข้าของสเปิร์มเข้าไปปฏิสนธิกับไข่ ทำให้ไม่มีความจำเป็นที่มีอะโครโซมเพื่อใช้ย่อยผิวไข่ระหว่างการปฏิสนธิเหมือนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม อย่างไรก็ตามน้ำเชื้อของปลา (milt หรือ semen) ประกอบด้วย สเปิร์ม (sperm) และของเหลวที่หล่อเลี้ยง (seminal fluid) ซึ่งสเปิร์มจะไม่เคลื่อนที่เมื่ออยู่ในถุงอัณฑะ (testis) หรือของเหลวที่หล่อเลี้ยง แต่สเปิร์มของปลาจะมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วเมื่อถูกกระตุ้นด้วย

สภาพแวดล้อมภายนอก และจะหยุดเคลื่อนที่ภายในเวลาประมาณ 1 นาทีหลังจากถูกกระตุ้นสำหรับสเปิร์มปลาน้ำจืด กลไกที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาน้ำจืด พบว่าสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติก (osmolality หรือ osmotic pressure) ต่ำกว่าระดับที่พบใน seminal fluid (hypotonicity) จะกระตุ้นให้สเปิร์มปลาน้ำจืดเคลื่อนที่ แต่ในทางตรงกันข้ามสเปิร์มของปลาทะเลมีการเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกสูงขึ้นมากกว่าระดับที่พบใน seminal fluid (hypertonicity) (Morisawa et al., 1983) ดังนั้นการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ จึงมีความสำคัญมาก เพราะจะทำให้สเปิร์มไม่ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ขณะอยู่ในระหว่างการเจือจางน้ำเชื้อก่อนการนำไปใช้ประโยชน์หรือการแช่แข็ง ดังนั้นสเปิร์มของปลาเมื่อสเปิร์มยังอยู่ในตัวปลาหรือเมื่อรีดน้ำเชื้อสดออกมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ สเปิร์มของปลาจะยังไม่มีการเคลื่อนที่ (immotile) แต่เมื่อน้ำเชื้อปลาผสมกับน้ำภายนอกขณะที่ผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ หรือเมื่อนำน้ำเชื้อผสมกับหยดน้ำบนแผ่นกระจกสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะพบว่าสเปิร์มจะถูกกระตุ้นให้มีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วอันเป็นผลเนื่องมาจากการเจือจางทำให้มีการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติก การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาน้ำจืดเมื่อถูกกระตุ้นจะสิ้นสุดลงอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาประมาณ 1 นาที ดังนั้นการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อปลาโดยใช้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่จึงต้องรีบทำภายในทันทีที่น้ำเชื้อปลาผสมกับน้ำบนกระจกสไลด์

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อของปลาสามารถทำได้หลายวิธี แต่วิธีหนึ่งที่ทำอย่างแพร่หลายคือการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เนื่องจากทำได้ง่าย สะดวกรวดเร็ว แม้ว่าการประเมินด้วยสายตา (subjective estimation) ที่ให้ความเที่ยงตรงต่ำกว่าการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มด้วยการใช้เครื่องมือวัดการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (computer-assisted sperm analysis; CASA) ซึ่งมีความถูกต้องและเที่ยงตรงสูง (objective estimation) การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสามารถใช้ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลาได้ในทั้งสภาพน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยที่การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อสด (fresh milt) ของสัตว์น้ำ ต้องทำการเจือจางน้ำเชื้อให้มีจำนวนสเปิร์มไม่หนาแน่นแล้วนำไปนับจำนวนสเปิร์มใน hemacytometer เช่นเจือจางน้ำเชื้อสดประมาณ 1,000 5,000 หรือ 10,000 เท่าเป็นต้นขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของสเปิร์มของปลาที่แตกต่างกัน การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มของน้ำเชื้อปลาที่แช่แข็งสามารถใช้หลักการประเมินเช่นเดียวกับที่ใช้ในน้ำเชื้อสด เพียงแต่ใช้สารละลายที่เหมาะสม และกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ในอัตราการเจือจางที่เหมาะสมเช่นกัน (Vuthiphandchai et al., 2009a)

3. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา จัดเป็นเทคโนโลยีชีวภาพแขนงหนึ่งที่มีการนำมาใช้ในการบริหารจัดการเพาะพันธุ์ปลาเพื่อประโยชน์ทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์สัตว์น้ำ โดยการศึกษาด้านนี้ส่วนใหญ่นิยมศึกษาในต่างประเทศ ทั้งในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและใกล้สูญพันธุ์ทั้งปลาน้ำจืด และปลาทะเล เช่น ปลากระพงขาว ปลา salmon ปลา channel catfish ปลา sea bream และปลา Atlantic croaker ปลา sea bass เป็นต้น โยทั่วไปน้ำเชื้อปลาเมื่อถูกแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิอย่างเหมาะสม (freezing rate) ก็สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อในถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสได้นานเป็นปี เมื่อต้องการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในการผสมเทียมกับไข่ปลา ก็นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อมาละลายโดยการเพิ่มอุณหภูมิ (thawing) แล้วนำน้ำเชื้อที่ถูกละลายไปผสมเทียมกับไข่ (Vuthiphandchai et al., 2009a) ดังนั้นความสำเร็จของการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาขึ้นอยู่กับ

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายอย่างเช่น ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ และชนิดสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectants) (Rana and McAndrew, 1989) อัตราการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็ง และการเพิ่มอุณหภูมิขณะละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (Scott and Baynes, 1980) นอกจากนี้ความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อปลาที่เกิดขึ้นในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และ เทคนิคของการแช่แข็งน้ำเชื้อ ก็มีผลทำให้ความสำเร็จของการแช่แข็งน้ำเชื้อแต่ละครั้งแตกต่างกันไป (กฤษณ์, 2536)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา เมื่อได้พัฒนา protocol การแช่แข็งน้ำเชื้อที่เกี่ยวข้องกับตัวแปรต่างๆ แล้ว เมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลานาน ก็สามารถพัฒนาเป็นธนาคารน้ำเชื้อเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ได้ การศึกษาวิจัยแช่แข็งเชื้อปลาหลายๆชนิดพอสรุปได้ดังนี้

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

เสน่ห์ และคณะ (2536) รายงานการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งปลาบึกในสารละลายที่มี 125 มิลลิโมล $NaHCO_3$, 250 มิลลิโมล Sucrose, 9.75 มิลลิโมล Glutathione และ 8 เปอร์เซ็นต์ Dimethysulfuoxide (DMSO) อัตราการปฏิสนธิของอสุจิในหลอดฟางฆ่าเชื้อ 67 เปอร์เซ็นต์ ไม่ฆ่าเชื้อมีอัตราปฏิสนธิ 11 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอัตราปฏิสนธิเฉลี่ย 31 เปอร์เซ็นต์

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน (2545) ได้ศึกษาการผลิตและการปรับปรุงพันธุ์ปลาจากน้ำเชื้อแช่แข็งในปลา Brown trout ปลาไน ปลาบึก ปลาเทพา ปลากระโห้ และปลาดุกรัสเซีย ผลการศึกษาปรากฏว่า สารประกอบที่เหมาะสมในการเก็บอสุจิแช่แข็งที่ให้อัตราการผสมดีที่สุดของปลา Brown trout ประกอบด้วย NaCl 750 mg Glucross 5,400 mg และ DMSO 10% ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ให้อัตราการผสมระหว่าง 33-59% การแช่แข็งในรูปเม็ดใช้ได้สะดวกและอัตราการผสมดีกว่าในรูปหลอดฟาง การละลายเพื่อการผสมเทียมไม่ควรเกิน 10 วินาที 2)ปลาไน สารประกอบที่มีความเข้มข้นมากกว่า 1,200 mOsm/kg มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่และอัตราการผสมของน้ำเชื้อ 3) ปลาบึก การใช้ DMSO ในการแช่แข็งไม่ควรเกิน 10% อัตราน้ำเชื้อต่อสารประกอบควรใช้ 1:3 4) ปลาเทพา สารประกอบที่เหมาะสมประกอบด้วย NaCl 750 mg , KCl 100 mg , Glucross 100 mg และ DMSO 10% ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร 5) ปลากระโห้ อัตราการลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งควรอยู่ระหว่าง 10-15 องศาเซลเซียส ต่อนาที ความเข้มข้นของน้ำเชื้ออยู่ระหว่าง 250-300 mOsm/kg 6) ปลาดุกรัสเซีย ระดับการเคลื่อนที่ของอสุจิสดเคลื่อนที่ได้นานที่สุด 45 วินาที

Conget et al. (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)

Gwo et al. (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 and 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

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

Vuthiphandchai et al. (2009a) ได้พัฒนาวิธีการการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*) ด้วยการใช้สาร cryoprotectants 10 ชนิดที่ 4 ระดับความเข้มข้น โดยลดอุณหภูมิแตกต่างกัน 2 รูปแบบด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ พบว่า น้ำเชื้อปลากะพงแดงที่อยู่ในสภาวะสมดุล (equilibration period) ใน dimethylsulfoxide 10% นาน 10 นาทีเมื่อลดอุณหภูมิในอัตรา 10 องศาเซลเซียส/นาทีจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียสจนถึง -80 องศาเซลเซียสแล้วใส่ในไนโตรเจนเหลวจะมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (post-thaw sperm motility) และการมีชีวิตของสเปิร์ม (post-thaw sperm viability) มีค่าสูงสุด (>90%) หลังการละลายน้ำเชื้อ (thawing) และน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่แช่แข็งเหล่านี้สามารถปฏิสนธิกับไข่ปลากะพงแดงให้ค่าปฏิสนธิมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติกลุ่มควบคุมที่ใช้น้ำเชื้อสด

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

กล่องโฟม (Styrofoam box)
บีกเกอร์ขนาดต่างๆ
ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 250 และ 500 มิลลิลิตร
ไมโครปิเปตขนาดต่างๆ
ตะเกียงแอลกอฮอล์
เข็มเขี่ย
กระดาษกรอง
เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer)
เครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ (Controlled-rate programmable freezer)
กล้องจุลทรรศน์
Hemacytometer
ถังเก็บไนโตรเจนเหลวขนาดใหญ่ (liquid nitrogen dewar)
ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ
ตู้ autoclave
ตู้อบเครื่องแก้ว (hot air oven)
Glass micropipette ขนาด 5,10 และ 100 ไมโครลิตร
หลอดฟาง (French straw) 0.25 มิลลิลิตร
Canister
Canes
Goblets
Vial tubes
racks
Tissue culture flasks
Thermocouple probe thermometer (K-type, HI 91530K, Hanna Instruments Inc.)
Water bath
Eppendorf tubes
ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)
พ่อพันธุ์ปลาไน
สารเคมีประเภทต่างๆที่ใช้ในการแช่แข็ง และการย้อมสี

วิธีดำเนินการวิจัย

1. <u>การรวบรวมน้ำเชื้อปลาไน</u>

พ่อพันธุ์ปลาไนถูกรวบรวมและลำเลียงจากฟาร์มเพาะพันธุ์ปลาในจังหวัดชลบุรีและศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดชลบุรี มายังโรงเพาะฟักของภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (รูปที่ 1 และรูปที่ 2) การลำเลียงพ่อพันธุ์ปลาไนที่สมบูรณ์เพศได้ลำเลียงในถุงพลาสติกที่อัดออกซิเจนโดยใส่เกลือแกงเพื่อลดความเครียดระหว่างการลำเลียงประมาณ 1 ชั่วโมง พ่อพันธุ์ทั้งหมดที่ลำเลียงมาถูกนำมาพักไว้ในโรงเพาะฟัก โดยใส่ยาเหลืองและฟอร์มาลินระยะเวลาประมาณ 30 นาทีเพื่อป้องกันพยาธิที่อาจติดมาระหว่างลำเลียง จากนั้นย้ายพ่อพันธุ์ปลาไนมาไว้ในบ่อซิเมนต์ขนาด 10 ตัน จำนวน 15 ตัวต่อบ่อ รวม 2 บ่อ เพื่อให้ปลาปรับตัวกับสภาพแวดล้อมใหม่ จากนั้นทำการเลี้ยงขุนพ่อพันธุ์ปลาในบ่อด้วยอาหารเม็ดที่มีโปรตีน 35% วันละ 2 ครั้ง เวลาเช้าและเย็น ในอัตรา 3% น้ำหนักตัว/วันตลอดระยะเวลาการวิจัย การดูแลสุขภาพปลาไน ได้มีการดูแลอย่างสม่ำเสมอทุกวัน โดยมีการดูดถ่ายตะกอนในบ่อทุกๆ 2 วันและเปลี่ยนถ่ายน้ำในบ่อประมาณ 30-40% ทุกๆ 5-7 วัน และมีการให้อากาศผ่านหัวทรายอย่างเพียงพอและตรวจวัดคุณภาพน้ำในบ่อทดลอง พ่อพันธุ์ปลาไนที่มีความสมบูรณ์เพศ มีลักษณะภายนอกปกติ ไม่มีเชื้อโรคและพาราไซต์ผ่านหลักเกณฑ์ที่กำหนดไว้ถูกรวบรวมไปเลี้ยงขุนในบ่อเพื่อการรวบรวมน้ำเชื้อมาแช่แข็งต่อไป

การรวบรวมน้ำเชื้อปลาไนได้ทำหลังจากปลาปรับตัวเป็นเวลา 7 วัน เริ่มจากจับปลาออกมาด้วยสวิง แล้วนำมาแช่ในยาสลบ (phenoxyethanol) 10 ppm ประมาณ 5 นาที เพื่อไม่ให้ปลาเครียดระหว่างการรีดน้ำเชื้อ นำปลามาชั่งน้ำหนัก วัดความยาว แล้วเช็ดบริเวณลำตัวปลาให้แห้งสนิทก่อนที่ทำการรีดน้ำเชื้อออกมาเพื่อประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อ การรีดน้ำเชื้อปลาแต่ละตัวทำโดยหงายท้องปลาขึ้น ใช้นิ้วมือกดบริเวณท้องเบาๆแล้วรีดลงมาตั้งแต่บริเวณครีบอก (pectoral fin) มาถึงบริเวณช่องเพศ (urogenital papillae) ได้น้ำเชื้อ (semen) สีขาวขุ่นออกมา (รูปที่ 3) รวบรวมน้ำเชื้อไปใส่ในภาชนะแล้วจึงเก็บรักษาไว้บนน้ำแข็งเพื่อรักษาคุณภาพน้ำเชื้อก่อนการใช้ในการทดลอง (รูปที่ 4) ในการทดลองแต่ละครั้งจะทำการรีดน้ำเชื้อปลาแต่ละตัวแล้วนำน้ำเชื้อของปลาแต่ละตัวมารามกันเป็นน้ำเชื้อรวม (pooled semen) ของพ่อพันธุ์ปลาหลายตัวสำหรับแต่ละชุดการทดลองเพื่อลดความแปรปรวนคุณภาพน้ำเชื้อปลาแต่ละตัว (individual variation) ที่อาจส่งผลต่อการทดลอง ในระหว่างการรวบรวมน้ำเชื้อ ทำการลดการปนเปื้อนของปัสสาวะที่จะมากับน้ำเชื้อขณะรีดโดยกดเบาๆโดยรอบบริเวณช่องเพศปลา เพื่อรีดเอาปัสสาวะออกจากตัวปลาให้ได้ปริมาณมากที่สุด (clearance of urinary bladder) เมื่อเห็นว่าไม่มีปัสสาวะออกมาแล้ว จึงทำการรีดน้ำเชื้อ โดยกดส่วนท้องตั้งแต่บริเวณครีบอกมายังช่องเพศตามที่กล่าวมาแล้ว การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อพิจารณาจาก parameter ที่สำคัญ ได้แก่การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (sperm motility) ความหนาแน่นของสเปิร์ม (sperm density) การมีชีวิตของสเปิร์ม (sperm viability) และ แรงดันออสโมซิสของน้ำเชื้อ (osmolality) น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีเท่านั้นถูกนำมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อ โดยต้องเป็นน้ำเชื้อที่มีลักษณะขาวขุ่น และไม่มีเมือก หรือ เลือดปน และต้องมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่สูง (มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์) โดยน้ำเชื้อเหล่านี้ถูกเก็บไว้บนน้ำแข็งอย่างมากไม่เกิน 30 นาทีในระหว่างขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อ น้ำเชื้อรวมที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ไม่ได้นำมาใช้ในการทดลองเพื่อให้มั่นใจว่าขณะเริ่มการทดลองน้ำเชื้อปลามีคุณภาพที่ดีพอ ในกรณีที่พ่อพันธุ์ปลาไนมีน้ำเชื้อน้อยไม่เพียงพอแก่การทดลองในบางช่วงของฤดูกาล ทำการฉีดพ่อพันธุ์ปลาด้วยฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นการสร้างน้ำเชื้อ โดยฉีดด้วย suprefact (gonadotropin-

รูปที่ 1 พ่อพันธุ์ปลาไน

รูปที่ 2 การรวบรวมพ่อพันธุ์ปลาไนมาใช้ในการทดลอง

รูปที่ 3 การรีดน้ำเชื้อปลาไนมาใช้ในการทดลอง

รูปที่ 4 น้ำเชื้อปลาไนที่รวบรวมมาใช้ในการทดลอง

releasing hormone analogue; GnRHa) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักปลา ร่วมกับ motillium (dopamine antagonist) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักปลาเพื่อกระตุ้นให้ปลามีน้ำเชื้อในปริมาณที่มากขึ้น โดยรีดน้ำเชื้อหลังฉีดฮอร์โมนประมาณ 12 ชั่วโมง

2. <u>การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลาไน</u>

ความหนาแน่นของสเปิร์มปลาไน ถูกประเมินโดยการเจือจางน้ำเชื้อ (10 ไมโครลิตร) ด้วย 0.9% saline โดยเจือจาง 5,000 เท่า ผสมให้เข้ากันใน vial ด้วยการใช้ vortexer แล้วจึงนำน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางไปหยดบน hemacytometer และ นับจำนวนสเปิร์มที่พบโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า แล้วจึงคำนวณกลับหาความหนาแน่นของสเปิร์ม การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มทำโดยการหยดตัวอย่างน้ำเชื้อ (5 ไมโครลิตร) ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาดแล้วจึงหยด 0.4% NaCl ลงไป 100 ไมโครลิตร พร้อมกับปิดด้วย cover glass เบาๆอย่างรวดเร็วเพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่แล้วจึงประเมินเปอร์เซนต์ที่สเปิร์มเคลื่อนที่ทันทีให้เสร็จภายใน 15 วินาที โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า 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) การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มทำ 3 ซ้ำ โดยการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในแต่ละสไลด์ได้สุ่มประเมิน 3 จุดในเวลาไม่เกิน 15 วินาที ทำให้มีจำนวนซ้ำย่อยรวม 9 ซ้ำ (pseudoreplicates) การมีชีวิตของสเปิร์มที่มีชีวิตเช็คโดยการนำเอาน้ำเชื้อ (5 ไมโครลิตร) มาย้อมสีด้วยสารละลาย eosin-nigrosin (5 ไมโครลิตร) แล้วจึงสุ่มนับจำนวนสเปิร์มที่มีชีวิตซึ่งจะไม่ติดสีย้อมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า โดยสเปิร์มที่ตายจะติดสีม่วง แล้วจึงคำนวณกลับหาเปอร์เซนต์ของสเปิร์มที่มีชีวิต (percentage of viable sperm; Fribourgh, 1966) สำหรับการประเมินแรงดันออสโมซิสของน้ำเชื้อ ทำโดยนำน้ำเชื้อมา centrifuge ด้วยความเร็วสูงเพื่อแยก seminal fluid ออกจากสเปิร์ม จากนั้นนำ seminal fluid ปริมาตร 10 ไมโครลิตรมาวัด osmolarity โดยการใช้เครื่อง osmometer การประเมินความหนาแน่นของสเปิร์ม การมีชีวิตของสเปิร์ม และแรงดันออสโมซิสของน้ำเชื้อได้ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3. <u>การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแบบแช่แข็ง</u>

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทราบชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมก่อนที่จะนำไปใช้ในการทำน้ำเชื้อแบบแช่แข็งโดยการประเมินความเป็นพิษ (toxicity test) ของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม การทดลองเริ่มจากนำน้ำเชื้อปลาไนที่รวบรวมมาใหม่ (freshly collected semen) มาเจือจางในสารละลาย Ca-F HBSS (calcium free Hank's balanced salt solution) ซึ่งเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้เป็นส่วนผสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่ไม่มีเกล็ด (Mongkonpunya et al. 1995) โดยที่ Ca-F HBSS จะไม่มีผลกระตุ้นให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่แต่จะไปเจือจางน้ำเชื้อโดยที่สเปิร์มยังคงมีคุณภาพไม่เปลี่ยนแปลง ในขณะเดียวกันสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ 9 ชนิดที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์และภายในเซลล์ ถูกเตรียมขึ้นมาที่ความเข้มข้นต่างๆโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS เช่นกัน แล้วจึงผสมเข้ากับ

น้ำเชื้อที่ถูกเจือจางไว้ก่อนหน้านี้เพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของสารไครโอโพรเทคแทนท์ตามที่ต้องการ

สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol, propylene glycerol, acetamide, sucrose, glycerol, formamide, ethanol และ methanol โดยสารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิดถูกผสมไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS (extended milt) เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) ของสารไครโอโพรเทคแทนท์ตามที่กำหนดเป็นเป็น 5%, 10%, 15% และ 20% โดยใช้อัตราส่วนของน้ำเชื้อที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (extended milt) : สารไครโอโพรเทคแทนท์ เท่ากับ 1:1 ภายใน tissue culture flask ขนาด 25 มิลลิลิตร การประเมินเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่เคลื่อนที่ในการทดลองนี้ได้ทำในระยะเวลาต่างๆกันหลังจากใส่สารไครโอโพรเทคแทนท์ลงไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง เริ่มตั้งแต่เวลา 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มกับกลุ่มควบคุมซึ่งใช้น้ำเชื้อสดของปลาไนที่เจือจางด้วย 0.4% NaCl การประเมินความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อสเปิร์ม ทำการทดลอง 6 ซ้ำที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) การทดลองในขั้นตอนนี้ทำให้ทราบว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดใด และความเข้มข้นช่วงใดที่เป็นพิษหรือทำให้สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่หรือเคลื่อนที่ลดลง ทำให้สามารถพิจารณาเลือกเฉพาะสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เป็นพิษน้อยมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อต่อไป

3. <u>การศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนที่ผ่านการแช่แข็ง</u>

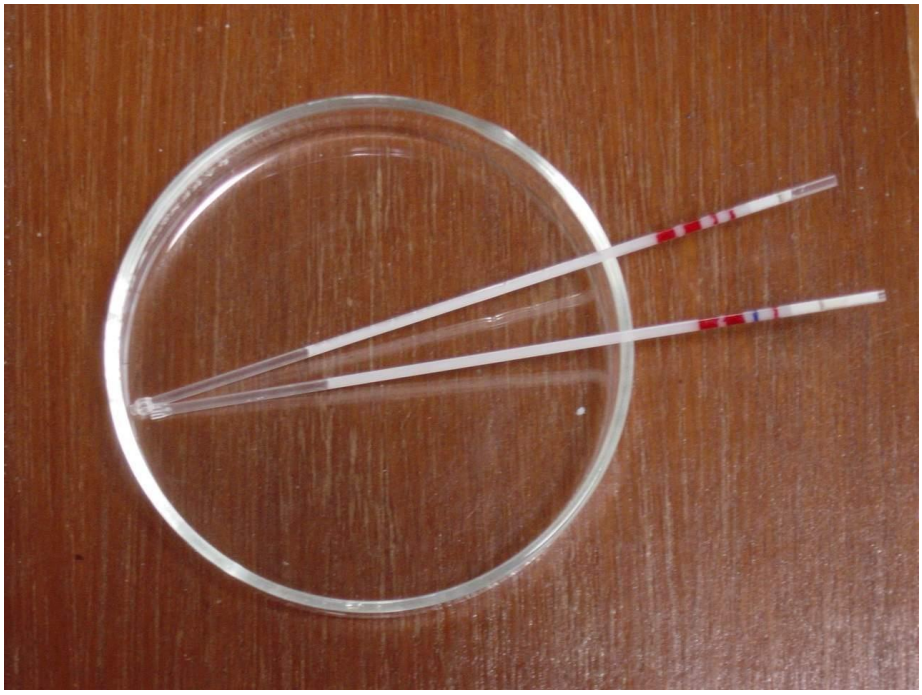
การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนเริ่มจากการนำเอาน้ำเชื้อปลาไนที่รวบรวมมาจากปลาหลายตัว (pooled milt) มาเจือจางในสารละลาย Ca-F HBSS แล้วจึงผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดที่ได้คัดเลือกมาจากข้อ 2 ในระดับความเข้มข้นสุดท้ายที่แตกต่างกันตั้งแต่ 5%, 10%, 15% และ 20% แล้วปล่อยไว้ให้น้ำเชื้อที่ถูกเจือจางอยู่ในภาวะสมดุลย์ (equilibration period) ที่อุณหภูมิห้องก่อนที่จะถูกรวบรวมน้ำเชื้อเหล่านั้นใส่ในหลอดฟาง (straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร (รูปที่ 5) ทำการปิดปลายหลอดฟางให้แน่นด้วยความร้อน (รูปที่ 6 และรูปที่ 7) ปล่อยทิ้งไว้นาน 10 นาที จึงนำหลอดฟางไปลดอุณหภูมิในเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer; รูปที่ 8) ทำการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -20 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5 และ 8 องศาเซลเซียส/นาที แล้วนำหลอดฟางไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวนาน 1 และ 7 วัน เมื่อครบกำหนดการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวจึงนำหลอดฟางมาแช่ใน warter bath อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน5 วินาที ทำการตัดหลอดฟางเพื่อประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย (post-thawed sperm motility) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

4. <u>การวิเคราะห์ทางสถิติ</u>

ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม การมีชีวิตของสเปิร์ม ความหนาแน่นของสเปิร์ม ความดันออสโมติกน้ำเชื้อ ในแต่ละชุดการทดลองถูกนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน (standard deviation) และถูกนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีการ Analysis of variance (two-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองด้วย Duncan’s new multiple range test โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS

รูปที่ 5 หลอดฟางสำหรับใช้ในการทดลองแช่แข็ง

รูปที่ 6 การปิดปลายหลอดฟาง



รูปที่ 7 ลักษณะของหลอดฟางที่ปิดปลายหลอดก่อนการแช่แข็ง

รูปที่ 8 เครื่องแช่แข็งอัตโนมัติ

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การทดลองสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ตอน คือ

1. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มปลาไน
2. ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มปลาไน
3. การศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนที่ผ่านการแช่แข็ง

1. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มปลาไน

น้ำเชื้อสดที่รวบรวมมาใหม่ๆ (freshly collected milt) ของปลาไนที่นำมาใช้ในการศึกษา มีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อดังแสดงในตารางที่ 1 โดยแรงดันออสโมติกของน้ำเชื้อ (osmolality) มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 269.8-290.2 mOsm/kg เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าระหว่าง 86.7-100% ในขณะที่เปอร์เซนต์การมีชีวิตของสเปิร์มมีค่าเฉลี่ยประมาณ 91.2-97.2% และความหนาแน่นของสเปิร์มมีเฉลี่ยระหว่าง 0.9 $x10^9$ ตัว/ซีซี -5.5 $x10^9$ ตัว/ซีซี

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อปลาไนในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

เดือน	แรงดันออสโมติกของน้ำเชื้อ (mOsm/kg)	การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (%)	การมีชีวิตของสเปิร์ม (%)	ความหนาแน่นของสเปิร์ม ($x10^9$ ตัว/ซีซี)
พฤศจิกายน	285.3±1.6 ^{a}	100±0 ^{a}	95.6±1.3 ^{a}	4.9±0.6 ^{a}
ธันวาคม	284.9±2.9 ^{a}	100±0 ^{a}	94.7±1.4 ^{a}	5.5±0.7 ^{a}
มกราคม	290.2±1.8 ^{a}	100±0 ^{a}	97.2±0.9 ^{a}	3.3±0.8 ^{b}
กุมภาพันธ์	274.9±2.6 ^{b}	100±0 ^{a}	96.3±0.7 ^{a}	2.1±0.7 ^{bc}
มีนาคม	269.8±2.2 ^{b}	100±0 ^{a}	93.8±0.5 ^{a}	1.8±0.6 ^{c}
เมษายน	275.6±1.4 ^{b}	86.7±2.7 ^{b}	91.2±1.3 ^{a}	1.4±0.5 ^{c}
พฤษภาคม	281.8±1.5 ^{ab}	100±0 ^{a}	94.8±1.5 ^{a}	3.9±0.8 ^{ab}
มิถุนายน	269.8±2.2 ^{b}	100±0 ^{a}	95.8±1.8 ^{a}	4.1±1.2^{ab}

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

2. ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มปลาไน

2.1 DMSO

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อสด (freshly collected milt) มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 100% น้ำเชื้อปลาไนที่เจือจางใน Ca-F HBSS เมื่อนำมาใส่สารละลาย DMSO ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5, 10, 15 และ 20% นำไปทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่เวลาต่างๆกัน พบว่า ในทุกความเข้มข้น สเปิร์มปลาไนยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที โดยเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที สเปิร์มมีการเคลื่อนที่มากกว่า 97% (ตารางที่ 2)

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า

- สารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)
- เวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนกับสารละลาย DMSO มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน

เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (%)			
	5	10	15	20
น้ำเชื้อสด	100±0 $^{a.3}$	100±0 $^{a.2}$	100±0 $^{a.4}$	100±0 $^{a.4}$
0	100±0 $^{a.3}$	100±0 $^{a.2}$	100±0 $^{a.4}$	97.8±2.2 $^{a.4}$
10	100±0 $^{a.3}$	100±0 $^{a.2}$	100±0 $^{a.4}$	97.8±2.2 $^{a.4}$
20	100±0 $^{a.3}$	100±0 $^{a.2}$	100±0 $^{a.4}$	97.8±2.2 $^{a.4}$
30	100±0 $^{a.3}$	100±0 $^{a.2}$	97.8±2.2 $^{a.43}$	95.6±2.2 $^{a.4}$
60	100±0 $^{a.3}$	97.8±2.2 $^{b.2}$	97.8±2.2 $^{ab.43}$	93.3±1.1 $^{b.4}$
90	97.8±2.2 $^{a.32}$	97.8±2.2 $^{a.2}$	97.8±2.2 $^{a.43}$	91.1±2.2 $^{a.4}$
120	97.8±2.2 $^{a.32}$	97.8±4.4 $^{a.2}$	93.3±1.1 $^{a.32}$	75.6±2.2 $^{b.3}$
150	93.3±3.9 $^{a.21}$	95.6±2.2 $^{a.2}$	91.1±2.2 $^{a.21}$	51.1±2.2 $^{b.2}$
180	91.1±2.2 $^{a.1}$	88.9±2.2 $^{a.1}$	86.7±3.9 $^{a.1}$	44.5±2.2 $^{b.1}$

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

2.2 Ethylene glycol

การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 100% ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนที่ผสมในสารละลาย ethylene glycol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่า ในทุกความเข้มข้น สเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที โดยเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที สเปิร์มมีการเคลื่อนที่มากกว่า 77% (ตารางที่ 3)

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า

- สารละลาย ethylene glycol ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

- เวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนกับสารละลาย ethylene glycol มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย ethylene glycol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน

เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (%)			
	5	10	15	20
น้ำเชื้อสด	100±0 $^{a.4}$	100±0 $^{a.4}$	100±0 $^{a.8}$	100±0 $^{a.5}$
0	100±0 $^{a.4}$	100±0 $^{a.4}$	97.8±2.2 $^{a.8}$	97.8±2.2 $^{a.5}$
10	100±0 $^{a.4}$	95.6±2.2 $^{a.4}$	77.8±2.2 $^{b.7}$	77.8±2.2 $^{b.4}$
20	97.8±2.2 $^{a.4}$	93.3±0 $^{a.4}$	77.8±2.2 $^{b.6}$	75.6±2.2 $^{b.4}$
30	95.6±2.2 $^{a.43}$	93.3±0 $^{a.4}$	62.2±2.2 $^{b.5}$	57.8±2.2 $^{b.3}$
60	95.6±2.2 $^{a.43}$	82.2±2.2 $^{b.3}$	57.8±2.2 $^{c.5}$	48.9±2.2 $^{d.2}$
90	88.9±2.2 $^{a.32}$	77.8±5.9 $^{a.3}$	48.9±3.9 $^{b.4}$	33.3±3.9 $^{c.1}$
120	86.7±3.9 $^{a.32}$	53.3±3.9 $^{b.2}$	42.2±2.2 $^{c.3}$	31.1±2.2 $^{d.1}$
150	66.7±3.9 $^{a.1}$	48.9±2.2 $^{b.21}$	35.6±2.2 $^{c.2}$	28.9±2.2 $^{c.1}$
180	60±0 $^{a.1}$	42.2±2.2 $^{b.1}$	28.9±2.2 $^{c.1}$	28.9±2.2 $^{c.1}$

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

2.3 Propylene glycol

การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่า ปลาไนมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 100% ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนที่ผสมในสารละลาย propylene glycol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่า ในทุกความเข้มข้น สเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที โดยเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที สเปิร์มมีการเคลื่อนที่มากกว่า 97% (ตารางที่ 4)

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า

- สารละลาย propylene glycol ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

- เวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนกับสารละลาย propylene glycol มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย propylene glycol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน

เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (%)			
	5	10	15	20
น้ำเชื้อสด	100±0 $^{a.4}$	100±0 $^{a.4}$	100±0 $^{a.4}$	100±0 $^{a.4}$
0	100±0 $^{a.4}$	100±0 $^{a.4}$	100±0 $^{a.4}$	100±0 $^{a.4}$
10	100±0 $^{a.4}$	100±0 $^{a.4}$	97.8±2.2 $^{a.4}$	97.8±2.2 $^{a.4}$
20	100±0 $^{a.4}$	97.8±2.2 $^{a.43}$	97.8±2.2 $^{a.4}$	97.8±2.2 $^{a.4}$
30	100±0 $^{a.4}$	97.8±2.2 $^{a.43}$	97.8±2.2 $^{a.4}$	97.8±2.2 $^{a.4}$
60	77.8±2.2 $^{b.3}$	95.6±2.2 $^{a.43}$	91.1±2.2 $^{a.3}$	97.8±2.2 $^{a.4}$
90	71.1±2.2 $^{c.2}$	93.3±1.1 $^{ab.43}$	88.9±2.2 $^{b.3}$	95.6±2.2 $^{a.4}$
120	71.1±2.2 $^{b.2}$	86.7±3.9 $^{a.3}$	86.7±1.1 $^{a.32}$	75.6±2.2 $^{b.3}$
150	46.7±0 $^{b.1}$	73.3±3.9 $^{a.2}$	82.2±2.2 $^{a.2}$	51.1±2.2 $^{b.2}$
180	44.5±2.2 $^{b.1}$	35.6±1.1 $^{c.1}$	77.8±2.2 $^{a.1}$	44.5±2.2 $^{b.1}$

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

2.4 Acetamide

การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่า ปลาไนมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 100% ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ผสมในสารละลาย acetamide ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่า ในทุกความเข้มข้น สเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที โดยเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที สเปิร์มในทุกชุดการทดลองมีการเคลื่อนที่มากกว่า 42% แต่ acetamide ความเข้มข้น 15% และ 20% มีผลทำให้สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่หลังการเจือจางนาน 60 นาทีขึ้นไป (ตารางที่ 5)

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า

- สารละลาย acetamide ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

- เวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนกับสารละลาย acetamide มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย acetamide ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน

เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (%)			
	5	10	15	20
น้ำเชื้อสด	100±0 $^{a.2}$	100±0 $^{a.7}$	100±0 $^{a.5}$	100±0 $^{a.4}$
0	100±0 $^{a.2}$	100±0 $^{a.7}$	100±0 $^{a.5}$	100±0 $^{a.4}$
10	100±0 $^{a.2}$	97.8±2.2 $^{a.76}$	68.9±2.2 $^{b.4}$	42.2±2.2 $^{c.3}$
20	97.8±2.2 $^{a.2}$	93.3±1.1 $^{a.65}$	55.5±2.2 $^{b.3}$	24.5±2.2 $^{c.2}$
30	95.6±2.2 $^{a.21}$	91.1±2.2 $^{a.54}$	24.5±4.4 $^{b.2}$	2.2±2.2 $^{c.1}$
60	95.6±2.2 $^{a.21}$	86.7±1.1 $^{b.43}$	0 $^{c.1}$	0 $^{c.1}$
90	95.6±2.2 $^{a.21}$	86.7±1.1 $^{b.43}$	0 $^{c.1}$	0 $^{c.1}$
120	95.6±2.2 $^{a.21}$	82.2±2.2 $^{b.32}$	0 $^{c.1}$	0 $^{c.1}$
150	91.1±2.2 $^{a.1}$	80±0 $^{b.2}$	0 $^{c.1}$	0 $^{c.1}$
180	91.1±2.2 $^{a.1}$	64.4±4.4 $^{b.1}$	0 $^{c.1}$	0 $^{c.1}$

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

2.5 Sucrose

การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่า ปลาไนมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 100% ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ผสมในสารละลาย sucrose ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่า ที่ความเข้มข้น 5% และ 10% สเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที โดยเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที สเปิร์มมีการเคลื่อนที่มากกว่า 91% แต่ในความเข้มข้น 15% สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 180 นาที ส่วนความเข้มข้น 20% สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 150 นาที (ตารางที่ 6)

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า

- สารละลาย sucrose ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

- เวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนกับสารละลาย sucrose มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย sucrose ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน

เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (%)			
	5	10	15	20
น้ำเชื้อสด	100±0 $^{a.2}$	100±0 $^{a.5}$	100±0 $^{a.4}$	100±0 $^{a.5}$
0	100±0 $^{a.2}$	100±0 $^{a.5}$	100±0 $^{a.4}$	95.6±2.2 $^{b.5}$
10	100±0 $^{a.2}$	100±0 $^{a.5}$	100±0 $^{a.4}$	91.1±2.2 $^{b.5}$
20	100±0 $^{a.2}$	100±0 $^{a.5}$	97.8±2.2 $^{a.4}$	82.2±2.2 $^{b.4}$
30	95.6±2.2 $^{a.2}$	93.3±3.9 $^{a.54}$	95.6±2.2 $^{a.4}$	75.6±2.2 $^{b.4}$
60	95.6±2.2 $^{a.2}$	88.9±2.2 $^{a.4}$	68.9±5.9 $^{b.3}$	44.5±2.2 $^{c.3}$
90	93.3±3.9 $^{a.2}$	88.9±2.2 $^{a.4}$	33.3±3.9 $^{b.2}$	13.3±3.9 $^{c.2}$
120	88.9±2.2 $^{a.2}$	55.6±4.4 $^{b.3}$	26.7±1.1 $^{c.2}$	6.7±3.9 $^{d.21}$
150	68.9±8.9 $^{a.1}$	42.2±2.2 $^{b.2}$	2.2±2.2 $^{c.1}$	0 $^{c.1}$
180	66.7±6.7 $^{a.1}$	26.7±6.7 $^{b.1}$	0 $^{c.1}$	0 $^{c.1}$

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

2.6 Glycerol

การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่า ปลาไนมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 100% ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ผสมในสารละลาย glycerol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่า ในทุกความเข้มข้นสเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที โดยเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที สเปิร์มในทุกชุดการทดลองมีการเคลื่อนที่ระหว่าง 24.4-44.2% และการใช้ glycerol ที่ความเข้มข้น 5% และ 10% มีผลทำให้สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่หลังการเจือจางผ่านไป 120 นาที และ 90 นาทีตามลำดับ ในขณะที่การใช้ glycerol ที่ความเข้มข้น 15% และ 20% มีผลทำให้สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่หลังการเจือจางผ่านไปพียง 60 นาทีเท่านั้น (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย glycerol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน

เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (%)			
	5	10	15	20
น้ำเชื้อสด	100±0 $^{a.5}$	100±0 $^{a.7}$	100±0 $^{a.6}$	100±0 $^{a.56}$
0	100±0 $^{a.5}$	95.5±2.2 $^{a.6}$	91.7±2.2 $^{ab.5}$	86.7±2.2 $^{b.5}$
10	35.5±2.2 $^{b.4}$	44.2±2.2 $^{a.5}$	35.5±2.2 $^{b.4}$	24.4±2.2 $^{c.4}$
20	28.7±2.2 $^{a.3}$	31.1±2.2 $^{a.4}$	24.4±2.2 $^{ab.3}$	15.5±2.2 $^{c.3}$
30	24.4±2.2 $^{a.3}$	24.4±2.2 $^{a.3}$	15.7±3.8 $^{b.2}$	8.8±2.2 $^{c.2}$
60	17.8±2.2 $^{a.2}$	8.8±3.8 $^{b.2}$	0 $^{c.1}$	0 $^{c.1}$
90	16.7±2.2 $^{a.2}$	0 $^{b.1}$	0 $^{b.1}$	0 $^{b.1}$
120	0 $^{a.1}$	0 $^{a.1}$	0 $^{a.1}$	0 $^{a.1}$
150	0 $^{a.1}$	0 $^{a.1}$	0 $^{a.1}$	0 $^{a.1}$
180	0 $^{a.1}$	0 $^{a.1}$	0 $^{a.1}$	0 $^{a.1}$

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

2.7 Formamide

การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่า ปลาไนมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 100% ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ผสมในสารละลาย formamide ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่า ในทุกความเข้มข้นสเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที โดยเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที สเปิร์มในทุกชุดการทดลองมีการเคลื่อนที่ระหว่าง 20-44.4% และการใช้ formamide ที่ความเข้มข้น 5% มีผลทำให้สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่หลังการเจือจางผ่านไป 120 นาที ในขณะที่ formamide ที่ความเข้มข้น 10, 15% และ 20% มีผลทำให้สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่หลังการเจือจางผ่านไปพียง 60 นาทีเท่านั้น (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย formamide ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน

เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (%)			
	5	10	15	20
น้ำเชื้อสด	100±0 $^{a.6}$	100±0 $^{a.5}$	100±0 $^{a.5}$	100±0 $^{a.5}$
0	92.5±2.2 $^{a.5}$	86.7±2.2 $^{a.4}$	91.7±2.2 $^{a.4}$	76.7±2.2 $^{b.4}$
10	44.4±2.2 $^{a.4}$	33.3±3.9 $^{b.3}$	35.5±2.2 $^{b.3}$	20±3.8 $^{c.3}$
20	26.7±3.8 $^{a.3}$	8.8±2.2 $^{c.2}$	15.7±2.2 $^{b.2}$	17.8±2.2 $^{b.3}$
30	33.3±3.9 $^{a.3}$	8.8±2.2 $^{b.2}$	8.7±2.2 $^{b.2}$	8.8±2.2 $^{b.2}$
60	11.1±2.2 $^{a.2}$	0 $^{b.1}$	0 $^{b.1}$	0 $^{b.1}$
90	8.8±2.2 $^{a.2}$	0 $^{b.1}$	0 $^{b.1}$	0 $^{b.1}$
120	0 $^{a.1}$	0 $^{a.1}$	0 $^{a.1}$	0 $^{a.1}$
150	0 $^{a.1}$	0 $^{a.1}$	0 $^{a.1}$	0 $^{a.1}$
180	0 $^{a.1}$	0 $^{a.1}$	0 $^{a.1}$	0 $^{a.1}$

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

2.8 Ethanol

การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่า ปลาไนมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 100% ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ผสมในสารละลาย ethanol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่า พบว่า ในทุกความเข้มข้นเมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที สเปิร์มยังคงมีการเคลื่อนที่ โดยเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที สเปิร์มมีการเคลื่อนที่มากกว่า 80% (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย ethanol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน

เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (%)			
	5	10	15	20
น้ำเชื้อสด	100±0 a.5	100±0 a.6	100±0 a.6	100±0 a.8
0	100±0 a.5	95.5±2.2 a.65	82.2±2.2 b.54	86.7±2.2 b.7
10	100±0 a.5	91.1±2.2 b.5	82.2±2.2 c.54	80±0 c.56
20	95.5±2.2 a.4	80±0 b.4	80±0 b.54	82.2±2.2 b.6
30	84.4±2.2 a.3	80±0 a.4	75.5±2.2 b.4	75.6±2.2 b.5
60	80±0 a.2	71.1±2.2 b.32	64.4±2.2 c.3	62.2±2.2 c.43
90	77.8±2.2 a.2	64.4±2.2 b.21	67.7±2.2 b.3	60±0 b.43
120	77.8±2.2 a.2	60±0 b.1	53.7±1.8 c.21	53.3±3.8 c.32
150	77.1±2.2 a.2	60±0 b.1	53.7±1.8 c.21	46.7±3.8 d.2
180	60±0 a.1	56.7±1.9 b.1	46.7±2.9 c.1	32.7±3.8 d.1

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

2.9 Methanol

การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่า ปลาไนมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 100% ผลการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ผสมในสารละลาย methanol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่า พบว่า ในทุกความเข้มข้นเมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที สเปิร์มยังคงมีการเคลื่อนที่ โดยเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที สเปิร์มในทุกชุดการทดลองมีการเคลื่อนที่มากกว่า 82.2% (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย methanol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน

เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (%)			
	5	10	15	20
น้ำเชื้อสด	100±0 $^{a.5}$	100±0 $^{a.6}$	100±0 $^{a.7}$	100±0 $^{a.6}$
0	100±0 $^{a.5}$	95.5±2.2 $^{a.6}$	95.5±2.2 $^{a.7}$	86.7±2.2 $^{b.5}$
10	91.1±2.2 $^{a.54}$	86.7±3.8 $^{ab.5}$	82.2±2.2 $^{b.6}$	91.3±3.8 $^{a.5}$
20	86.7±2.2 $^{a.4}$	80±0 $^{b.4}$	84.4±2.2 $^{a.6}$	57.8±2.2 $^{c.4}$
30	84.5±2.2 $^{a.4}$	77.8±2.2 $^{b.4}$	73.3±2.2 $^{b.5}$	46.7±2.2 $^{c.3}$
60	86.7±2.2 $^{a.4}$	64.5±2.2 $^{b.32}$	57.8±2.2 $^{c.4}$	35.5±2.2 $^{d.2}$
90	73.3±2.7 $^{a.3}$	62.2±2.2 $^{b.2}$	48.9±2.2 $^{c.32}$	22.2±2.2 $^{d.1}$
120	68.9±2.2 $^{a.2}$	60±0 $^{b.2}$	44.7±1.8 $^{c.2}$	24.4±2.2 $^{d.1}$
150	62.2±2.2 $^{a.1}$	60±0 $^{b.2}$	40±0 $^{c.1}$	20±1.9 $^{d.1}$
180	62.2±2.2 $^{a.1}$	53.3±1.9 $^{b.1}$	36.7±2.9 $^{c.1}$	16.7±2.8 $^{d.1}$

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

3. การศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนที่ผ่านการแช่แข็ง

น้ำเชื้อสดปลาไนที่นำมาใช้ในการแช่แข็งก่อนการแช่แข็งด้วยการเจือจางใน Ca-F HBSS และสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด (DMSO, propylene glycol และ ethylene glycol) มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 100%

น้ำเชื้อปลาไนที่แช่แข็งด้วย Ca-F HBSS และ DMSO 5%, 10%, 15%, และ 20% เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน พบว่าสเปิร์มหลังการละลายในทุกชุดการทดลองมีการเคลื่อนที่ 100% แต่เมื่อเวลาการเก็บรักษาผ่านไป 7 วัน การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เหลือค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 82.2-88.9% (ตารางที่ 11)

น้ำเชื้อปลาไนที่แช่แข็งด้วย Ca-F HBSS และ Propylene glycol 5%, 10%, 15%, และ 20% เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน สเปิร์มหลังการละลายในทุกชุดการทดลองมีการเคลื่อนที่ 100% แต่มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน โดยชุดการทดลองที่แช่แข็งด้วย Propylene glycol 15% และใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส/นาที ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่หลังการละลายสูงสุด (68.9%) (ตารางที่ 12)

น้ำเชื้อปลาไนที่แช่แข็งด้วย Ca-F HBSS และ Ethylene glycol 5%, 10%, 15%, และ 20% เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน สเปิร์มหลังการละลายในทุกชุดการทดลองมีการเคลื่อนที่ 100% เช่นกัน และมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน โดยชุดการทดลองที่แช่แข็งด้วย Ethylene glycol ระหว่าง 5-15% และใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส/นาที ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่หลังการละลายสูงสุด (53.3-57.8%) (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนหลังการแช่แข็งและเก็บรักษาใน ไนโตรเจนเหลวด้วย Ca-F HBSS และ DMSO ที่อัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน

วันที่	อัตราลดอุณหภูมิ	DMSO (%)			
		5	10	15	20
น้ำเชื้อสด		100 ± 0^{a,1}	100 ± 0^{a,1}	100 ± 0^{a,1}	100 ± 0^{a,1}
1	8	100 ± 0^{a,1}	100 ± 0^{a,1}	100 ± 0^{a,1}	100 ± 0^{a,1}
1	5	100 ± 0^{a,1}	100 ± 0^{a,1}	100 ± 0^{a,1}	100 ± 0^{a,1}
1	3	100 ± 0^{a,1}	100 ± 0^{a,1}	100 ± 0^{a,1}	100 ± 0^{a,1}
7	8	82.2 ± 3.9^{a,2}	84.4 ± 3.9^{a,2}	84.4 ± 7.7^{a,2}	82.2 ± 3.9^{a,2}
7	5	82.2 ± 3.9^{a,2}	82.2 ± 3.9^{a,2}	88.9 ±3 .9^{a,2}	82.2 ± 3.9^{a,2}
7	3	82.2 ± 3.9^{a,2}	84.4 ± 7.7^{a,2}	88.9 ± 3.9^{a,2}	84.4 ± 3.9^{a,2}

ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)
ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนหลังการแช่แข็งและเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วย Ca-F HBSS และ Propylene glycol ที่อัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน

วันที่	อัตราลดอุณหภูมิ	DMSO (%)			
		5	10	15	20
น้ำเชื้อสด		$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$
1	8	$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$
1	5	$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$
1	3	$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$
7	8	$57.8 \pm 3.9^{a,3}$	$51.3 \pm 6.7^{a,3}$	$55.6 \pm 3.9^{a,3}$	$57.8 \pm 3.9^{a,2}$
7	5	$0^{c,4}$	$0^{c,4}$	$22.2 \pm 3.9^{b,4}$	$48.9 \pm 3.9^{a,3}$
7	3	$64.4 \pm 3.9^{a,2}$	$66.7 \pm 6.7^{a,2}$	$68.9 \pm 3.9^{a,2}$	$64.4 \pm 7.7^{a,2}$

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

ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนหลังการแช่แข็งและเก็บรักษาใน ไนโตรเจนเหลวด้วย Ca-F HBSS และ Ethylene glycol ที่อัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน

วันที่	อัตราลดอุณหภูมิ	Ethylene glycol (%)			
		5	10	15	20
น้ำเชื้อสด		$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$
1	8	$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$
1	5	$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$
1	3	$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$
7	8	$57.8 \pm 3.9^{a,2}$	$53.3 \pm 6.7^{a,2}$	$57.8 \pm 3.9^{a,2}$	$0^{b,3}$
7	5	$0^{c,3}$	$22.2 \pm 3.9^{b,3}$	$26.7 \pm 6.7^{b,4}$	$46.7 \pm 6.7^{a,2}$
7	3	$60 \pm 0^{a,2}$	$60 \pm 0^{a,2}$	$46.7 \pm 0^{b,3}$	$60 \pm 0^{a,2}$

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

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

5.1 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มปลาไน

คุณภาพสเปิร์มปลาไนที่รวบรวมมาศึกษามีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์ม โดยสเปิร์มยังคงมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและการมีชีวิตของสเปิร์มที่มีค่าสูงตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ยกเว้นเดือนเมษายนที่สเปิร์มเคลื่อนที่ลดลงเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยในพ่อพันธุ์ปลาหลายชนิดที่สเปิร์มยังคงมีการเคลื่อนที่และการมีชีวิตสูงในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่เช่น ปลา Yamu *Brycon siebenthalae* (Eigenmann) (Cruz-Casallas et al., 2005) ปลาไหล spiny eel *Mastacembelus mastacembelus* (Sahinoz et al., 2007) ค่าแรงดันออสโมติกของน้ำเชื้อมีค่าใกล้เคียงกับที่พบในปลาดุกอุยตามที่รายงานโดย Tan-Fermin et al. (1999) และ Vuthiphandchai et al. (2009b) ค่าความหนาแน่นของสเปิร์มปลาไนมีค่าลดลงในเดือนมกราคมและสูงขึ้นอีกครั้งในเดือนพฤษภาคม ซึ่งเกี่ยวข้องกับการพัฒนาการสร้างสเปิร์ม (spermatogenesis) เนื่องจากปลาไนผสมพันธุ์วางไข่ตามฤดูกาล ทำให้ปลามีสเปิร์มจำนวนน้อยในช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และมีจำนวนสเปิร์มเพิ่มขึ้นตามระยะการพัฒนา แต่ในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ จำนวนสเปิร์มลดลง จึงทำให้ความหนาแน่นสเปิร์มสูงขึ้น ซึ่งลักษณะเช่นนี้เหมือนกับการทดลองในปลาดุกอุย (Vuthiphandchai et al., 2009b) ทำให้โดยภาพรวมคุณภาพสเปิร์มปลาไนลดลงในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (Rouxel et al., 2008; Sahinoz et al., 2007)

5.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มปลาไน

การศึกษาผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มแสดงให้เห็นว่า DMSO, ethylene glycol, propylene glycol, sucrose, ethanol และ methanol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ควรนำมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนไป เนื่องจาก การใช้สารละลายสารไครโอโพรเทคแทนท์เหล่านี้ทั้ง 4 ความเข้มข้น ที่ระยะเวลา 10 นาที มีผลทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่เฉลี่ยมากกว่า 80% ซึ่งเหมาะสมต่อการนำไปลดอุณหภูมิแช่แข็งต่อไป อย่างไรก็ตาม acetamide, glycerol และ formamide เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษสูงต่อน้ำเชื้อปลาไน ไม่ควรนำไปใช้แช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนเนื่องจากการใช้สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 3 ชนิดนี้มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงอย่างรวดเร็ว โดยทั่วไป DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่นิยมนำมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลายชนิด เช่น ปลากะพงแดง (Vuthiphandchai et al., 2009a) ปลาบึก (Mongkonpunya et al., 1995) ปลาตะเพียนขาว (Vuthiphandchai et al., 2014) เป็นต้น สาร propylene glycol มีความเป็นพิษต่ำและมีความเหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน (Horváth and Urbanyi, 2000) และน้ำเชื้อปลาตาเดียว (winter flounder) มากกว่าการใช้ DMSO และ glycerol (Rideout et al., 2003) แต่ ethanol มีความเหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อกดเหลือง เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ (Muchlisin et al., 2004) ในขณะที่ sucrose พบว่ามีความเหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาบางชนิด เช่นปลาสลิด (Abinawanto et al., 2012) เนื่องจากความเป็นพิษต่อสเปิร์มต่ำ

5.3 การศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนที่ผ่านการแช่แข็ง

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนด้วย DMSO, propylene glycol และ ethylene glycol พบว่า DMSO สามารถแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนได้ดีกว่า propylene glycol และ ethylene glycol ซึ่งเป็นการลดอุณหภูมิมาที่ -20 องศาเซลเซียสก่อนนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวแล้วจึงละลายน้ำเชื้อ ซึ่งการวิจัยการพัฒนา protocol การแช่แข็งน้ำเชื้อมาที่อุณหภูมิสุดท้ายที่ลดต่ำลงมากขึ้นก่อนการแช่ในไนโตรเจนเหลว เช่น ใช้อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวที่มี -196 องศาเซลเซียส เป็นต้น จะมีผลทำให้ผลการทดลองเปลี่ยนแปลงอย่างใดหรือไม่ เพราะในระหว่างการลดอุณหภูมิให้ต่ำลงนั้น เซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์โดยน้ำจะไหลออกจากเซลล์ ซึ่งสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมนอกจากลดการไหลของน้ำแล้วยังช่วยลดการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง (ice crystal) ในเซลล์ ซึ่งรูปแบบการใช้อัตราการลดอุณหภูมิต่างกันร่วมกับการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆกันเพื่อแช่แข็งเซลล์ ล้วนส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ ซึ่งจะได้รายงานผลในโอกาสต่อไป เพราะการพัฒนา protocol การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาให้สามารถเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวได้นานเป็นปีต้อง optimize ตัวแปรทั้งหมดที่เกี่ยวข้องเพื่อให้ได้คุณภาพสเปิร์มที่ดีหลังการละลายสำหรับการจัดตั้งธนาคารน้ำเชื้อต่อไป โดยการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาไนเมื่อเก็บไว้ 7 วันมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่าเก็บไว้ 1 วัน สะท้อนให้เห็นว่า protocol การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนยังไม่นิ่งพอ โดยทั่วไปแล้ว DMSO จัดเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่นิยมนำมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลายชนิด เช่น ปลากะพงแดง (Vuthiphandchai et al., 2009a) ปลาบึก (Mongkonpunya et al., 1995) ปลาตะเพียนขาว (Vuthiphandchai et al., 2014) เป็นต้น การใช้สาร propylene glycol แช่แข็งน้ำเชื้อปลาก็มีรายงานว่า สารชนิดนี้มีความเป็นพิษต่ำและมีความเหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลายชนิด เช่นปลาดุกอัฟริกัน (Horváth and Urbanyi, 2000) และน้ำเชื้อปลาตาเดียว (winter flounder) (Rideout et al., 2003) แต่สำหรับ ethanol ก็มีรายงานว่ามีความเหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อกดเหลือง เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ (Muchlisin et al., 2004) ในขณะที่ sucrose พบว่ามีความเหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาบางชนิด เช่นปลาสลิด (Abinawanto et al., 2012) เนื่องจากความเป็นพิษต่อสเปิร์มต่ำ

สรุปผลการทดลอง

1. คุณภาพสเปิร์มของปลาไนมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ โดยความหนาแน่นของสเปิร์มมีค่าสูงขึ้นในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่

2. DMSO, ethylene glycol, propylene glycol, sucrose, ethanol และ methanol จัดเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษต่ำต่อสเปิร์มปลาไนต่ำ

3. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนด้วย DMSO และอัตราการลดอุณหภูมิ 3-8 องศาเซลเซียส/นาที ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูง

เอกสารอ้างอิง

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

กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง หลักการ/วิธีการ/ประโยชน์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 128 หน้า.

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

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

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

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

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2536. การเพาะพันธุ์ปลา. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. 194 หน้า.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2538. การเพาะขยายพันธุ์ปลา. พิมพ์ครั้งที่4. รั้วเขียว. กรุงเทพ

Abinawanto, A., Nurman, K. and Lestari, R. 2012. The effect if sucrose on sperm quality of *Osphronemus goramy* two days post-crypreservation. International Journal of Aquatic Science 3: 23-28.

Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Nimrat, S. and Vuthiphandchai, V. 2016. Effect of antibiotic supplementation on the quality of cryopreserved fish sperm of silver barb (*Barbodes gonionotus*): Sperm motility and viability, bacterial quality and fertilization. Animal Reproduction Science 166: 36-46.

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.

Cruz-Casallas, P.E., Lombo-Rodriguez, D.A. and Velasco-Santamaria, Y.M. 2005. Milt quality and spermatozoa morphology of captive *Brycon siebenthalae* (Eigenmann) broodstock. Aquaculture Research 36: 682-686.

Fabbrocini, A., Lavendera, S.L., 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. The Progressive Fish-Culturist 28: 227-230.

Gwo, J.C. and Arnold, C.R. 1992. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa: evaluation of morphological changes. The journal of experimental zoology 264: 444-453.

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

He, S. and Woods III, L.C. 2003. Effects of glycine and alanine on short-term storage and cryopreservation of striped bass (*Morone saxatilis*) spermatozoa. Ceyobiology 46: 17-25.

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

Linhart, O., Rodina, M. and Cosson, J. 2000. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. Cryobiology 41: 241-250.

Mongkonpunya, K., Chairak, N., Pupipat, T. and Tiersch, T.R. 1995. Cryopreservation of mekhong giant catfish sperm. Asian Fisheries Science8: 211-221.

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.

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

Newton, S.S. and Subramoniam, T. 1996. Cryoprotectant toxicity in penaeid prawn embryos. Cryobiology 33: 172-177.

Nimrat, S. and Vuthiphandchai, V. 2008. Role of bacteria in the chilled storage and cryopreservation of sperm in aquatic animals: A review. In: Schwartz, S.H. (Ed.), Aquaculture Research Trends. Nova Science Publishers, Inc. New York, USA. pp. 149-184.

Ochokwu, I. J., Apollos, T.G and Oshoke, J.O. 2015. Effect of egg and sperm quality in successful fish breeding. IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS) 8: 48-57.

Palleroni, N.J. 1984. Family I. Pseudomonadaceae Winsloe, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1917, 555AL, Pages 141-199 in N.R. Krieg and J.G. Holt editors. Bergey's manual of systematic bacteriology, volume I. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, Maryland, USA.

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

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

Rouxel, C., Suquet, M., Cosson, J., Severe, A., Quemener, L. and Fauvel, C. 2008. Changes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) sperm quality during the spawning season. Aquaculture Research 39: 434-440.

Sahinoz, E., Aral, F. and Dogu, Z. 2007. Changes in Mesopotamian spiny eel, *Mastacembelus mastacembelus* (Bank & Solender in Russell, 1794) (Mastacembelidae) milt quality during a spawning season. Theriogenology 67: 848-854.

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.

Schleifer, 1986. Section 12. Gram-positive cocci. Page 999-1103. in Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. editors. Bergey's manual of systematic bacteriology, volume II. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, Maryland, USA.

Sneath, P.H.A.1986. Section 13. Endospore-forming gram-positive rods and cocci. Page 1104-1207. in Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. editors. Bergey's manual of systematic bacteriology, volume II. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, Maryland, USA.,

Tan-Fermin, J.D., Miura, T., Adachi, S. and Yamauchi, K. 1999. Seminal plasma composition, sperm motility, and milt dilution in the Asian catfish *Clarias macrocephalus*. Aquaculture, 171: 323–338

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.

Vuthiphandchai, V., Chomphuthawach, S. and Nimrat, S. 2009a. Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. Theriogenology 72(1):129-138.

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

Vuthiphandchai, V., Wilairattanadilok, K., Chomphuthawach, S., Sooksawat, T. and Nimrat, S. 2014. Sperm cryopreservation of silver barb (*Barbodes gonionotus*):

cryoprotectants, cooling rate and storage time of sperm quality. Aquaculture Research. Doi:10.1111/are.12396.

ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่และหน้า)

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, นิภาพร เงินเจือ และ สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. 2558. ผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มปลาไน (*Cyprinus carpio*). การประชุมวิชาการระดับชาติ “นเรศวรวิจัย” ครั้งที่ 11 วันที่ 22-24 กรกฎาคม 2558 ณ อาคารเฉลิมพระเกียรติ 72 พรรษา บรมราชินีนาถ มหาวิทยาลัยนเรศวร จ.พิษณุโลก

2. การจดสิทธิบัตร

-

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

-

4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

ผลงานวิจัยเรื่องนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการประยุกต์ใช้กับโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่เพาะพันธุ์ปลาเศรษฐกิจชนิดต่างๆที่อยู่ในครอบครัวเดียวกับปลาไน ทำให้ผู้ประกอบการมีทางเลือกในการเพาะพันธุ์ปลาด้วยการใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง นอกเหนือไปจากการใช้น้ำเชื้อสดเท่านั้น

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย	รองศาสตราจารย์ ดร. วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย
ประวัติการศึกษา	Ph.D. (Marine Estuarine and Environmental Science), University of Maryland, College Park, MD, USA
	M.Sc. (Aquaculture) Asian Institute of Technology
	วท.บ. (ประมง) เกียรตินิยม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
หน่วยงานที่สังกัด	ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
	ต. แสนสุข อ.เมือง จ. ชลบุรี 20131
ผู้ร่วมโครงวิจัย	รองศาสตราจารย์ ดร. สุบัณฑิต นิ่มรัตน์
ประวัติการศึกษา	Ph.D. (Environmental Sciences), Rutgers, the state University of New Jersey, USA
	วท.ม. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยมหิดล
	วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
หน่วยงานที่สังกัด	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
	ต. แสนสุข อ.เมือง จ. ชลบุรี 20131