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

**รายงานการวิจัย**

**เรื่อง**

# การศึกษาเปรียบเทียบการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพและปลาสวาย แบบแช่แข็ง เพื่อการผสมเทียม

# A comparative study of sperm cryopreservation in the black ear catfish and striped catfish for artificial insemination

โดย

นาย วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย

A00028336
30 มี.ค. 2548
190673

ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# บทคัดย่อ

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) แบบแช่แข็ง ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ตอน คือ ตอนที่ 1 ทดสอบความเป็นพิษของสารละลาย 6 ชนิด คือ DMSO, propylene glycol, glycerol, methanol, sucrose และ ethanol ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ (5%, 10%, 15% และ 20%) ที่เวลา 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 และใช้อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ เท่ากับ 1:1 พบว่า สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่เป็นพิษน้อยที่สุด คือ 10% propylene glycol, 10% DMSO และ 10% methanol สามารถทำให้สเปิร์มมีชีวิตอยู่ได้นานกว่า 180 นาที ตอนที่ 2 ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพแบบแช่แข็ง โดยใช้น้ำยา Calcium-free Hanks' balanced salt solution (C-F HBSS) เป็น sperm extender และใช้สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ ความเข้มข้น 4 ระดับ (5%, 10%, 15% และ 20%) อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาต่อสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ เท่ากับ 1:1:1 ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพแบบแช่แข็ง โดยมีอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (-10 °ซ/นาที) อัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง (-5 °ซ/นาที) และอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า (-3 °ซ/นาที) พบว่า 5% DMSOและ 10% DMSO ที่ระดับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ดีที่สุด เท่ากับ 40% หลังจากทำการละลาย (thawing) น้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 70-80°C นาน 5 วินาที ตอนที่ 3 การปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาเทโพที่ผ่านการแช่แข็ง พบว่า สารละลาย 15%glycerol, 5%DMSO และ 10% glycerol ในระดับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง อัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วและอัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง ตามลำดับ โดยมีเปอร์เซนต์อัตราการปฏิสนธิดีที่สุดเท่ากับ 17.06%, 14.50% และ 13.73% ตามลำดับ

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย (*Pangasius sutchi*) แบบแช่แข็งเริ่มจากการทดสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ทั้ง 4 ชนิด (glycerol, DMSO, propylene glycol และ sucrose) ที่ระดับความเข้มข้น 3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที เพื่อหาระยะเวลาสมดุลย์ (equilibration time) พบว่าที่ระยะเวลา 30 นาทีมีความเหมาะสมสำหรับการนำมาใช้ทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวาย การทดสอบอัตราการลดอุณหภูมิที่ใช้ในการแช่แข็ง 3 ระดับ(-3, -5 และ -10 °ซ/นาที) และอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง 3 ระดับ (40, 60 และ 80 °ซ) ให้ผลการเก็บรักษาไม่แตกต่างกัน เพราะเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเมื่อถูกกระตุ้นมีค่าไม่ต่างกันทางสถิติ($P>0.05$) แต่ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอไพรเทคแทนท์ให้ผลการทดลองที่ต่างกัน คือ DMSO ให้ผลการเก็บรักษาที่ดีที่สุด และระดับความข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่ 9% มีความเหมาะสมกว่าที่ระดับอื่น แต่มีเพียงที่ 3% DMSO เท่านั้นที่มีการปฏิสนธิกับไข่ปลาสวาย (38.67%)


มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

**Abstract**

The objective of this study was to evaluate the toxicity effect of cryoprotectants on sperm motility and study the effect of cooling rate on sperm cryopreservation of black ear catfish (*Pangasius larnaudii*) and striped catfish (*Pangasius sutchi*). In the first experiment, six cryoprotectant solutions (DMSO, propylene glycol, glycerol, methanol, sucrose and ethanol) were prepared and diluted with *P. larnaudii* milt at four concentration levels (5%, 10%, 15% and 20%) prior to assessment of sperm motility at different time (10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 and 180 minutes) at a dilution ratio of 1:1. The results indicated that 10% propylene glycol, 10% DMSO and 10% methanol were the least toxic cryoprotectants, since the motility were maintained up to 180 minute before loss of motility. In the second experiment, *P. larnaudii* milt was cryopreserved using Calcium-free Hanks' balanced salt solution (C-F HBSS) with various cryoprotectant solution concentration (5%, 10%, 15% and 20%) at ratio 1:1:1 respectively. Three rate of cooling (slow freezing, medium freezing and fast freezing) were used during cryopreservation of sample. The results indicated that milt samples cryopreserved with 5%DMSO and 10%DMSO at the fast freezing rate had the highest sperm motility (40%) after thawing at 70-80$^{\circ}$C for 5 second, compared to other treatments. In the third experiment, *P. larnaudii* milt sample cryopreserved with 15% glycerol, 5% DMSO and 10% glycerol at the medium freezing, fast freezing and medium freezing, respectively, resulted in the fertilization rates of 17.06$\pm$1.25%, 14.50$\pm$ 3.37% and 13.73$\pm$0.55%, respectively.

In order to determine the toxicity of cryoprotectants on sperm motility of *P. Sutchi*, milt samplels were diluted with four cryoprotectants; glycerol, dimethyl sulfoxide (DMSO), propylene glycol and sucrose at 3%, 6%, 9%, 12% and 15% and evaluated for toxicity on the percentage of sperm motility at different time periods; 30, 60, 90 and 120 minutes after the beginning of the experiment. The results showed that the suitable equilibration time should not be over 0-30 minutes. Freezing rates for cryopreservation (-3,-5 and -10 $^{\circ}$C/min.) and thawing temperatures (40, 60, 80 $^{\circ}$C) were tested. The results indicated no significant differences (P>0.05) in freezing rates and thawing temperatures. The use of 9% DMSO seemed to be the most suitable cryoprotectant used for cryopreservation of *P. sutchi* milt. Fertilization rates (39%ฑ1.2) was observed only in the treatment using 3% DMSO, compared to the freshly collected milt control(100%).

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง การศึกษาเปรียบเทียบการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ และปลาสวายแบบแช่แข็งเพื่อการผสมเทียม สำเร็จเรียบร้อยลงได้ โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2544 จากสำนักงานสภาวิจัยแห่งชาติ ข้าพเจ้าขอขอบคุณ คุณศิริพร คชรัตน์ และคุณพัชรี มงคลวัย ที่ได้ช่วยดูแลปลาทดลอง และวิเคราะห์ข้อมูล และคุณเกรียงไกร สหัสสานนท์ หัวหน้าสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดลพบุรีที่ให้การอนุเคราะห์พันธุ์ปลาเทโพที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ด้วยดีตลอดมา และภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้โรงเพาะฟัก และอุปกรณ์ต่างๆ ระหว่างการศึกษา

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย

กรกฎาคม 2546

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ.....i

Abstract.....ii

กิตติกรรมประกาศ.....iii

สารบัญ.....iv

สารบัญภาพ.....v

สารบัญตาราง.....vi

บทที่

1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย .....1

2. วัตถุประสงค์ของโครงการ.....4

3. ประโยชน์ที่ได้รับ.....4

4. นิยามศัพท์เฉพาะ.....4

5. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....5

6. วิธีดำเนินการ.....6

6. ผลการศึกษา.....11

7. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....36

8. เอกสารอ้างอิง.....43

9. ภาคผนวก.....46

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# สารบัญภาพ


ภาพที่ หน้า

1 การลดอุณหภูมิในอัตรา -3 องศาเซลเซียส/นาที (โปรแกรมที่ 1).....8

2 การลดอุณหภูมิในอัตรา -5 องศาเซลเซียส/นาที (โปรแกรมที่ 2).....9

3 การลดอุณหภูมิในอัตรา -10 องศาเซลเซียส/นาที (โปรแกรมที่ 3).....9

4 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) หลังจากเจือจางใน DMSO ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน.....13

5 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) หลังจากเจือจางใน propylene glycol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน.....13

6 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) หลังจากเจือจางใน glycerol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน.....14

7 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) หลังจากเจือจางใน methanol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน.....14

8 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) หลังจากเจือจางใน sucrose ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน.....15

9 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) หลังจากเจือจางใน ethanol ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน.....15

10 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มเฉลี่ยภายหลังการผสมน้ำเชื้อในน้ำยา extender 7 ด้วย สารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 4 ชนิด คือ glycerol, DMSO, propylene glycol และ sucrose ที่ระดับความเข้มข้น 0, 3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ทำการตรวจวัดที่เวลานาทีที่ 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที.....17

11 แสดงเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ *Pangasius larnaudii*แช่ใน สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%,10%,15%และ20%ในอัตราส่วน 1:1.....23

12 แสดงเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ *Pangasius larnaudii* แช่ใน สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15%และ20% ในอัตราส่วน 1:1.....24

13 แสดงเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ *Pangasius larnaudii* แช่ใน สารละลาย glycerol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15%และ20% ในอัตราส่วน 1:1.....24


มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

14 แสดงเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ *Pangasius larnaudii* แช่ใน
สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15%และ20% ในอัตราส่วน 1:1.....25
15 แสดงเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ *Pangasius larnaudii* แช่ใน
สารละลายDMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15%และ20% ในอัตราส่วน 1:2.....25
16 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลาสวายแช่แข็ง ในน้ำยาสูตร extender 7
ที่มี DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่ระดับความเข้มข้น 3, 6, 9, 12 และ
15 เปอร์เซ็นต์โดยวัดอัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียส/นาที
ภายหลังการละลาย (ที่อุณหภูมิน้ำ 40, 60 หรือ 80 องศาเซลเซียส).....27
17 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลาสวายแช่แข็งนาน 7 วัน ในน้ำยาสูตร
extender 7 ที่มี glycerol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่ระดับความเข้มข้น
3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยวัดอัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียส
ภายหลังการละลาย (ที่อุณหภูมิน้ำ 40, 60 หรือ 80 องศาเซลเซียส).....28
18 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลาสวายแช่แข็งนาน 7 วัน ในน้ำยาสูตร
extender 7 ที่มี propylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่ระดับความเข้มข้น
3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยวัดอัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียส
ภายหลังการละลาย (ที่อุณหภูมิน้ำ 40, 60 หรือ 80 องศาเซลเซียส).....29
19 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลาสวายแช่แข็งนาน 7 วัน ในน้ำยาสูตร
extender 7 ที่มี sucrose เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่ระดับความเข้มข้น
3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยวัดอัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียส
ภายหลังการละลาย (ที่อุณหภูมิน้ำ 40, 60 หรือ 80 องศาเซลเซียส).....30
20 เปอร์เซนต์อัตราการปฏิสนธิในปลาเทโพที่ได้รับการปฏิสนธิจาก
น้ำเชื้อปลาเทโพที่ผ่านการแช่แข็งในสารละลาย DMSO ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ
และความเข้มข้นแตกต่างกัน.....32
21 เปอร์เซนต์อัตราการปฏิสนธิในปลาเทโพที่ได้รับการปฏิสนธิจาก
น้ำเชื้อปลาเทโพที่ผ่านการแช่แข็งในสารละลาย glycerol ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ
และความเข้มข้นแตกต่างกัน.....32

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มเมื่อทำการตรวจที่เวลา 0, 30, 60, 90และ 120 นาที หลังผสมน้ำเชื้อกับน้ำยา extender 7 ที่มีส่วนผสมของไครโอโพรเทคแทนท์ ทั้ง 4 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 0, 3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์.....18

2 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิในน้ำยาสูตร extender 7 ที่มีส่วนผสมของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (DMSO กับ propylene glycol) ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส/นาที ภายหลังการละลายที่อุณหภูมิน้ำ 60 องศาเซลเซียส.....34

3 เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งกับไข่ปลาสวายสด ในน้ำยาสูตร Extender 7 ที่มีส่วนผสมของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (DMSO กับ propylene glycol) ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียสต่อนาที ภายหลังการละลายที่อุณหภูมิน้ำ 60 องศาเซลเซียส.....35

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

**1. ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย**

ในประเทศไทยการศึกษาการเก็บน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งยังมีอยู่น้อยมากเมื่อเทียบกับในต่างประเทศ เนื่องจากปลาส่วนใหญ่มีน้ำเชื้อที่สมบูรณ์ดีตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และหาได้ง่ายทำให้ไม่นิยมเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งเอาไว้ใช้ในอนาคต อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งมีแนวโน้มที่จะมีความสำคัญอย่างมากต่อการอนุรักษ์ปลาที่หาได้ยาก ใกล้สูญพันธุ์ หรือปลาที่มีการกลายเพศซึ่งเพศผู้และเพศเมียจะพัฒนาถึงวัยเจริญพันธุ์ไม่พร้อมกัน นอกจากนี้ในบางครั้งการจับพ่อแม่พันธุ์ปลาจากแหล่งผสมพันธุ์วางไข่ก็ได้ปลาเพศผู้และเพศเมียไม่พร้อมกันซึ่งก่อให้เกิดปัญหาในด้านการจัดการ เช่น ตัวเมียที่จับได้ก่อนมีไข่ที่ไม่สมบูรณ์ต้องใช้ฮอร์โมนฉีดกระตุ้นซึ่งต้องขังตัวผู้ไว้หลายวันทำให้พ่อปลาช้ำและตายได้ การเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งยังมีบทบาทสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์ปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเพื่อผลิตปลาที่โตเร็ว หรือทนทานต่อโรคให้มากขึ้นเพราะสามารถควบคุมช่วงเวลาการผสมเทียมหรือการผสมข้ามพันธุ์ปลาชนิดต่างๆได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้การลำเลียงน้ำเชื้อแช่แข็งไปใช้ในการผสมเทียมก็ทำได้สะดวกกว่าการลำเลียงพ่อพันธุ์ โดยสามารถขนส่งไปภายในประเทศและระหว่างประเทศได้ง่าย และยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการเก็บรักษาพันธุกรรมของธนาคารยีน (gene bank) และการเก็บรักษาตัวอ่อนของลูกปลาต่อไป แม้ว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งจะมีความสำคัญต่อการพัฒนาด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ แต่การศึกษาด้านการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งในประเทศไทยยังมีค่อนข้างน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยทางด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งมีการพัฒนาอย่างมากเทียบเท่าในต่างประเทศ

ปลาเทโพ (black ear catfish) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pangasius larnaudi* เป็นปลาน้ำจืดไม่มีเกล็ดขนาดใหญ่ มีรูปร่างคล้ายกับปลาสวาย (striped catfish) ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Pangasius sutchi* เพราะเป็นปลาที่อยู่ในสกุลเดียวกัน ปลาเทโพเป็นปลาน้ำจืดชนิดไม่มีเกล็ดขนาดใหญ่ชนิดหนึ่ง พบทั่วไปตามแม่น้ำสายสำคัญ เช่น แม่โขง แม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำมูล และแม่น้ำสาขา เช่น แม่น้ำปิง ตลอดจนอ่างเก็บน้ำขนาดใหญ่ เช่น อ่างเก็บน้ำเขื่อนภูมิพล เขื่อนสิริกิติ์ ฯลฯ เนื่องจากพบได้ทั่วไปจึงเรียกแตกต่างกันในแต่ละท้องถิ่น เช่น ภาคเหนือเรียก ปลาเต๊าะ ภาคตะวันเฉียงเหนือเรียก ปลาหูหมาด หรือปลาปึ้ง

ปลาเทโพเป็นปลาที่มีรสชาติดี มีราคาแพง คนไทยรู้จักนำมาทำอาหารได้หลายชนิดนอกจากรับประทานในรูปปลาสด นำมาแปรรูป เช่น เค็มบักนัด ปลาร้าปลานึ่ง ส้มปลานึ่ง ปัจจุบันปลาเทโพสามารถนำมาเลี้ยงประสบผลสำเร็จเป็นอย่างดี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง การเลี้ยงในกระชัง จึงมีแนวโน้มว่าปลาเทโพสามารถเป็นปลาเศรษฐกิจตัวใหม่ ปัจจุบันมีการเพาะเลี้ยงทั้งการผสมเทียมและการผสมพันธุ์เลียนแบบธรรมชาติ ในอดีตลูกปลาสวายจะถูกรวบรวมจากแหล่งน้ำธรรมชาติเพื่อส่งขายต่อผู้เลี้ยงปลา ทั้งนี้เพราะปลาสวายเป็นปลาที่ไม่แพร่พันธุ์วางไข่ในบ่อหรือในกระชังที่กักขัง จนกระทั่งกรมประมงประสบผล

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สำเร็จในการผสมเทียมปลาสวายในปี 2509 อย่างไรก็ตาม มักขาดแคลนลูกปลาในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนเมษายนของทุกปี เนื่องจากอยู่นอกช่วงฤดูผสมพันธุ์ ทั้งนี้ขึ้นกับสภาพแวดล้อมของแต่ละท้องถิ่นและความช้าเร็วของฤดูฝนในแต่ละปีด้วย (สมปอง หิรัญวัฒน์, 2523) ในขณะที่ปลาสวายทางภาคใต้สามารถผสมพันธุ์วางไข่ได้ตลอดทั้งปี ผู้เลี้ยงปลาสวายบางรายจึงต้องสั่งซื้อลูกพันธุ์ปลาจากทางภาคใต้โดยการลำเลียงขนส่งลูกปลาทางรถยนต์และทางอากาศ (สมโภชน์ อังคะทวีวัฒน์ และคณะ, 2539) เนื่องมาจากแรงจูงใจเรื่องราคาของผลผลิตปลาสวายในช่วงนอกฤดูเก็บเกี่ยวที่อาจมีราคาสูงถึงกิโลกรัมละ 50-70 บาทในบางพื้นที่ เช่น จ. เชียงใหม่ และ จ. ขอนแก่น ( กองเศรษฐกิจการประมง , 2540 ) ดังนั้น หากมีการพัฒนาเทคนิคการเพาะพันธุ์ปลาสวายให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น การนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาใช้ในการเพาะพันธุ์ เพื่อลดต้นทุนในการเลี้ยง จับ และรีดน้ำเชื้อเพื่อการผสมเทียมก็จะสามารถลดต้นทุนทั้งในส่วนของการเพาะพันธุ์ลูกปลา ของผู้เพาะลูกปลาขาย และต้นทุนค่าลูกพันธุ์ปลาของผู้เลี้ยงปลาเนื้อได้

ปลาสวายมักพบเห็นตามแม่น้ำ ลำคลอง นับตั้งแต่ลุ่มน้ำเจ้าพระยาไปถึงจังหวัดนครสวรรค์ และในลำน้ำโขง และก็สามารถเพาะพันธุ์ได้โดยการผสมเทียม ในขณะที่ปลาเทโพ เดิมมีชุกชุมในลุ่มน้ำเจ้าพระยาแต่ในปัจจุบันมีจำนวนน้อยลง หาได้ยากมาก และจับได้บางฤดูกาลเท่านั้น ในปัจจุบันการเพาะพันธุ์ปลาสวายให้แก่เกษตรกรได้ทำที่สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดในภาคกลางไม่กี่แห่ง ในขณะที่การเพาะพันธุ์ปลาเทโพยังมีน้อยมาก และจำกัดในบางสถานีเท่านั้นเนื่องจากพ่อแม่พันธุ์หาได้ยาก การเพาะพันธุ์ปลาทั้งสองชนิดนี้จำเป็นต้องฉีดฮอร์โมนกระตุ้นพ่อแม่พันธุ์ โดยขณะที่แม่พันธุ์ตกไข่ก็จะทำการรีดน้ำเชื้อมาผสมกับไข่ โดยในบางครั้งช่วงระยะเวลาที่สามารถรีดน้ำเชื้อได้ (sperm availability) ก็ไม่สัมพันธ์กับช่วงระยะเวลาที่แม่ปลาตกไข่ (egg availability) ซึ่งก็อาจเกิดจากพ่อพันธุ์ถูกรีดน้ำเชื้อบ่อยจนไม่สามารถผลิตน้ำเชื้อได้ทัน หรือเกิดจากความแปรปรวนของปลาแต่ละตัว (individual variation) ที่ผลิตน้ำเชื้อได้แตกต่างกันทำให้ยุ่งยากในการจัดการระหว่างการผสมเทียมเป็นอันมาก ดังนั้นการใช้น้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ๆเพื่อผสมเทียมจำเป็นต้องมีการพัฒนาการเก็บรักษาเพื่อให้มีใช้อยู่ตลอดเวลา ซึ่งแนวทางในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพและปลาสวายแช่แข็งจะช่วยแก้ปัญหาดังกล่าว และยังช่วยในการอนุรักษ์พันธุ์ปลาไว้ไม่ให้สูญพันธุ์อีกด้วย โดยเฉพาะปลาเทโพซึ่งนับวันจะหาได้ยากขึ้นเรื่อยๆ

ในปัจจุบันการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในต่างประเทศนิยมทำในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและใกล้สูญพันธุ์ทั้งปลาน้ำจืด และปลาทะเล เช่น ปลากระพงขาว ปลา salmon ปลา channel catfish ปลา sea bream และปลา Atlantic croaker เป็นต้น การทำน้ำเชื้อปลาแช่แข็งเริ่มจากการนำเอาน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (sperm extender) พร้อมกับใส่สารที่ป้องกันไม่ให้เซลล์เป็นอันตรายในระหว่างการแช่แข็ง (cryoprotectant) แล้วจึงเอาไปบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อพร้อมกับลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ก่อนที่จะเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ซึ่งสามารถรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อปลาได้เป็นเวลานานเป็นปี เมื่อต้องการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในการผสมเทียมก็นำหลอดบรรจุ

น้ำเชื้อมาละลายโดยการเพิ่มอุณหภูมิ ดังนั้นความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ และสาร cryoprotectant ที่เหมาะสม (Rana และ McAndrew, 1989) อัตราการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็ง (freezing) และการเพิ่มอุณหภูมิขณะละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (Scott และ Baynes, 1980) นอกจากนี้ความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อปลาที่เกิดขึ้นในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และ เทคนิคของการทำน้ำเชื้อปลาแช่แข็ง ก็มีผลทำให้ความสำเร็จของการทำน้ำเชื้อแช่แข็งแต่ละครั้งแตกต่างกันไป โดยทั่วไปแล้วน้ำเชื้อของปลา (milt) ประกอบด้วย สเปิร์ม (sperm) และของเหลวที่หล่อเลี้ยง (seminal fluid) โดยสเปิร์มจะไม่เคลื่อนที่ขณะอยู่ในถุงอัณฑะ และของเหลวที่หล่อเลี้ยง แต่จะมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วมากเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสภาพแวดล้อมภายนอก และจะหยุดเคลื่อนที่ภายใน 1 นาทีหลังจากถูกกระตุ้น โดยในปลาน้ำจืดพบว่าสารละลายที่มีค่า osmolarity ต่ำกว่า (hypotonicity) ระดับที่พบใน seminal fluid จะกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ แต่ในปลาทะเลนั้นสารละลายที่มีค่า osmolarlity สูงขึ้น (hypertonicity) จะกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ (Morisawa และคณะ, 1983) ดังนั้นการใช้สารละลายที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ จึงมีความสำคัญมากเพราะทำให้สเปิร์มไม่ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ขณะอยู่ในระหว่างการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง

นอกจากประโยชน์ดังกล่าวแล้ว ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งยังมีประโยชน์ด้านอื่นอีก โดยเฉพาะด้านการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์น้ำ ในปัจจุบันปลาที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศหลายชนิดเริ่มสูญพันธุ์ เนื่องจากปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม การตื้นเขินของแหล่งน้ำ การทำประมงผิดกฎหมาย และปลาบางชนิดไม่สามารถเพาะขยายพันธุ์ได้ หรือต้องฆ่าพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ปลาเพื่อนำเซลล์สืบพันธุ์มาผสมเทียม บางครั้งไม่สามารถจับตัวผู้และตัวเมียได้พร้อมกัน ขาดพ่อแม่พันธุ์และเสียค่าใช้จ่ายสูงในการขนส่งพ่อแม่พันธุ์ ตัวอย่างเช่น ปลาบึก ปลาเทพา ปลากระโห้ และปลาดุก เป็นต้น ดังนั้นการเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์แบบแช่แข็งจึงมีบทบาทสำคัญและเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยพัฒนาการเพาะขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ปลาลูกผสมชนิดต่าง ๆ และหากสามารถพัฒนาให้การใช้น้ำเชื้อปลาแช่แข็งมีประสิทธิภาพในการผสมได้ใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสด สามารถใช้งานง่าย ราคาถูก และมีปริมาณมากพอจะเป็นประโยชน์ต่อวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอย่างยิ่ง (เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, 2540)

ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายและปลาอื่น ๆ แบบแช่แข็งในอดีตที่ผ่านมา ยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควรเนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความสมบูรณ์ของน้ำเชื้อสดที่ใช้ทำน้ำเชื้อแช่แข็ง และกระบวนการในการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง ได้แก่ ส่วนประกอบของน้ำยาที่ใช้ในการเก็บรักษาที่เหมาะสม อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา ระยะเวลาที่ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ อัตราการลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็ง และเทคนิคต่าง ๆ ก่อนการแช่แข็งและการเก็บรักษาตลอดจนวิธีการนำไปใช้ผสมกับไข่ อันเป็นเหตุให้การนำผลการวิจัยไปใช้ในเชิงพาณิชย์ยังไม่เป็นที่แพร่หลายในปัจจุบัน เมื่อเทียบกับการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น ๆ เช่น โค กระบือ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เป็นต้น และการศึกษาการทำน้ำเชื้อแช่แข็งตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันก็ยังไม่มีบทสรุปที่แน่ชัดถึงการเลือกใช้น้ำยาเจือจาง (extender) ที่มีส่วนผสมเพียงไม่กี่ชนิดหรือหลายชนิดจึงจะเหมาะสมกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อของปลาแต่ละชนิด ดังนั้นการศึกษาในเรื่องนี้จึงเป็นการพัฒนาความรู้เสริมกับนักวิจัยท่านอื่นในการค้นหาคำตอบให้มีความชัดเจนยิ่งขึ้น

**2. วัตถุประสงค์ของโครงการ**

2.1 ศึกษาวิธีการผลิตน้ำเชื้อปลาเทโพ และปลาสวายแบบแช่แข็งเพื่อใช้ในการผสมเทียม

2.2 ศึกษาชนิด และความเข้มข้นไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเทโพ และปลาสวาย

2.3 ศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิในการแช่แข็งที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาเทโพ และปลาสวาย

**3. ประโยชน์ที่ได้รับ**

3.1 ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ และปลาสวายแบบแช่แข็ง ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการวิจัยเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในกลุ่มนี้ต่อไปในอนาคต

3.2 ทำให้ทราบถึงชนิดของไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลาเทโพ และปลาสวายและกรรมวิธีในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง

3.3 ได้พัฒนาเทคโนโลยีการเก็บน้ำเชื้อปลาแช่แข็งเพื่อการผสมเทียมปลาโดยสามารถเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งได้ในระยะเวลาที่นาน และนำมาใช้ได้สะดวก

**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

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

6. equilibration time : ระยะเวลาภายหลังผสมน้ำเชื้อกับน้ำยาที่มีส่วนผสมของสารไครโอโพรเทคแทนท์

**5. ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**

งานวิจัยด้านการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งมีหลักการทำงานที่คล้ายกันแต่ความสำเร็จที่ได้ส่วนมากแล้วมีความแตกต่างกันไปในปลาแต่ละชนิดทั้งในแง่ของชนิดและความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่ใช้ อัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็ง และ อัตราการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

นลินี มารคแมน และคณะ (2526) ได้ทำการเก็บน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี lecithin และ mannitol เป็นองค์ประกอบ ปรากฏว่าประสบความล้มเหลว แต่เมื่อ นลินี มารคแมน (2527) ได้นำสารละลายบัฟเฟอร์ mounib มาเจือจางน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวเพื่อแช่แข็งก็ประสบผลสำเร็จ

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

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

**6. วิธีดำเนินการ**

**6.1 การรวบรวมน้ำเชื้อ**

พ่อพันธุ์ปลาเทโพ และปลาสวายถูกรวบรวมและลำเลียงจากบริเวณแม่น้ำเจ้าพระยา จังหวัดชัยนาท และสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดลพบุรี มายังโรงเพาะฟักของภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ปลาจะถูกชั่งน้ำหนัก วัดความยาว ก่อนที่จะถูกฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน suprefact 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมทิ้งไว้ประมาณ 12 ชั่วโมง จึงรีดน้ำเชื้อออกมาเพื่อประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อ การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อจะพิจารณาจาก parameters ที่สำคัญ ได้แก่การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (sperm motility) ปลาได้ถูกสลบด้วยยาสลบ (phenoxyethanol) แล้วเช็ดบริเวณช่องท้องให้แห้งสนิท จากนั้นจึงออกแรงกดบริเวณช่องท้องเบาๆ เพื่อรวบรวมตัวอย่างน้ำเชื้อ (ประมาณ 0.3 มิลลิลิตร) ไปประเมินคุณภาพน้ำเชื้อทันทีในห้องปฏิบัติการ น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีเท่านั้นที่จะถูกนำมาใช้ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งโดยต้องเป็นน้ำเชื้อที่มีลักษณะขาวขุ่น และไม่มีเมือก หรือ เลือดปน และจะต้องมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่สูง (มากกว่า 75เปอร์เซ็นต์) เท่านั้น น้ำเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ จะไม่นำมาใช้ในการทดลองเพื่อให้มั่นใจว่าขณะเริ่มการทดลองน้ำเชื้อปลามีคุณภาพที่ดีพอ พ่อพันธุ์ที่มีน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดี ผ่านหลักเกณฑ์ที่วางไว้ ก็จะถูกรวบรวมน้ำเชื้อเพื่อนำไปทำน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยการใช้หลอด syringe ขนาด 1 มิลลิลิตรรวบรวมน้ำเชื้อไปใส่ใน tissue culture flask แล้วจึงเก็บไว้บนน้ำแข็งเพื่อรักษาคุณภาพสเปิร์มไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลง น้ำเชื้อเหล่านี้จะถูกเก็บไว้บนน้ำแข็งอย่างมากไม่เกิน 0.5 ชั่วโมงก่อนที่จะนำ มาใช้ในการศึกษาความเป็นพิษของ cryoprotectants ที่มีต่อสเปิร์มหรือนำมาใช้ในขั้นตอนการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มทำโดยการหยดตัวอย่างน้ำเชื้อปลาเทโพและปลาสวาย (5 µl) ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาดแล้วจึงหยด 0.4% NaCl ลงไป 100 µl พร้อมกับปิดด้วย cover glass เบาๆ อย่างรวดเร็ว เพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่แล้วจึงประเมินเปอร์เซนต์ที่สเปิร์มเคลื่อนที่ทันทีให้เสร็จภายใน 15 วินาที โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มประเมินจากจำนวณสเปิร์มที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าอย่างรวดเร็วเมื่อถูกกระตุ้นด้วย0.4% NaCl โดยแบ่งระดับที่สเปิร์มเคลื่อนที่ไว้ 5 ระยะ คือ สเปิร์มที่เคลื่อนที่ได้ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% 100% โดยทำการประเมิน 3 ซ้ำต่อชุดการทดลอง การประเมินสเปิร์มที่มีชีวิตจะเช็คโดยการนำเอาน้ำเชื้อ (5 µl) มาย้อมสีด้วยสารละลาย eosin-nigrosin (5 µl) ตามวิธีการของ Fribourgh (1966) แล้วจึงสุ่มนับจำนวนสเปิร์มที่มีชีวิตซึ่งจะไม่ติดสีย้อม (viable sperm) และจำนวนสเปิร์มที่ตายซึ่งจะติดสีย้อม (dead sperm) โดยสุ่มนับไม่ต่ำกว่า 250 ตัว/สไลด์และนับ3 ซ้ำต่อชุดการทดลอง โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า แล้วจึงคำนวณกลับหาเปอร์เซนต์ของสเปิร์มที่มีชีวิต

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

**6.2 ศึกษาความเข้มข้นของ cryoprotectants ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม**

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทราบความเข้มข้นของ cryoprotectants ที่เหมาะสมก่อนที่จะนำไปใช้ในการทำน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง การทดลองเริ่มจากนำน้ำเชื้อของปลาเทโพ และปลาสวายมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม โดยน้ำเชื้อปลาเทโพถูกนำมาเจือจางในสารละลาย calcium free hanks balanced solution (C-F HBSS) และน้ำเชื้อปลาสวายถูกนำมาเจือจางในสารละลาย extender 7 โดยใช้น้ำเชื้อ 1 ml มาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 1:1 ที่อยู่ภายใน tissue culture flask ขนาด 75 $cm^3$ ซึ่งวางไว้บนถังน้ำแข็ง ในขณะเดียวกัน cryoprotectants ชนิดต่างๆได้ถูกเตรียมขึ้นมาแล้วทำการเช็คค่า osmolarity และผสมเข้ากับน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางก่อนหน้านี้ เพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นของ cryoprotectants ตามที่ต้องการ cryoprotectants ที่จะใช้ ได้แก่ glycerol, propylene glycol, dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol, ethanol ซึ่งจะออกฤทธิ์ภายในเซลล์ป้องกันเซลล์ขณะแช่แข็ง และ sucrose ซึ่งจะออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ป้องกันเซลล์ขณะแช่แข็ง

การพิจารณาการใช้ชนิดและความเข้มข้นของ cryoprotectants ได้จากการทดลองหาช่วงกว้างของความเข้มข้นที่ทำให้สเปร์มตายแล้วจึงนำมาปรับเลือกใช้ค่าทดลองที่เหมาะสมในภายหลัง น้ำเชื้อปลาเทโพได้ถูกนำมาเจือจางใน DMSO, propylene glycol, glycerol, sucrose, methanol และ ethanol ที่ความเข้มข้น 4 ระดับ (5%, 10%, 15% และ 20%) ที่เวลา 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาทีแล้วเช็คเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่เคลื่อนที่ในระยะเวลาต่างๆกัน ในขณะที่น้ำเชื้อปลาสวายถูกนำมาเจือจางใน DMSO, propylene glycol, glycerol และ sucrose แต่ละชนิดใช้ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ และทำการตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวนาทีที่ 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที การทดลองในขั้นตอนนี้ทำให้ทราบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่อยู่ใน cryoprotectants ที่เหมาะสมก่อนที่จะทำการแช่แข็งน้ำเชื้อ

**6.3 ศึกษาการทำน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง**

การทำน้ำเชื้อปลาเทโพและปลาสวายแบบแช่แข็งจะเริ่มจากการรีดเอาน้ำเชื้อปลาที่มีคุณภาพดีปริมาตร 5 ml.มาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ตามข้อ 6.2 ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร แล้วจึงผสม cryoprotectant ต่างๆชนิด ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน แล้วปล่อยไว้ 15 นาที เพื่อให้เกิดสภาพสมดุลย์ของสารละลาย (equilibrium) ก่อนที่จะถูกรวบรวมไว้ในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารละลายบัฟเฟอร์ต่อสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ เท่ากับ 1:1:1 การทำน้ำเชื้อแช่แข็งจะทำโดยการลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็ง ใช้เครื่อง freeze control (model CL3000) ทำการศึกษา 3 โปรแกรม ได้แก่

โปรแกรมที่ 1 ลดอุณหภูมิอัตรา -3 องศาเซลเซียส/นาที (ภาพที่ 1)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

โปรแกรมที่ 2 ลดอุณหภูมิอัตรา -5 องศาเซลเซียส/นาที (ภาพที่ 2)

โปรแกรมที่ 3 ลดอุณหภูมิอัตรา -10 องศาเซลเซียส/นาที (ภาพที่ 3)

ทั้ง 3 โปรแกรม ตั้งการทำงานของเครื่องเป็น 5 section ดังนี้

section 1 ใส่หลอดฟางลงใน freezing unit คอยจนอุณหภูมิของตัวอย่างในหลอดกับช่องใส่หลอดฟาง (freezing chamber) เป็น 25 องศาเซลเซียส

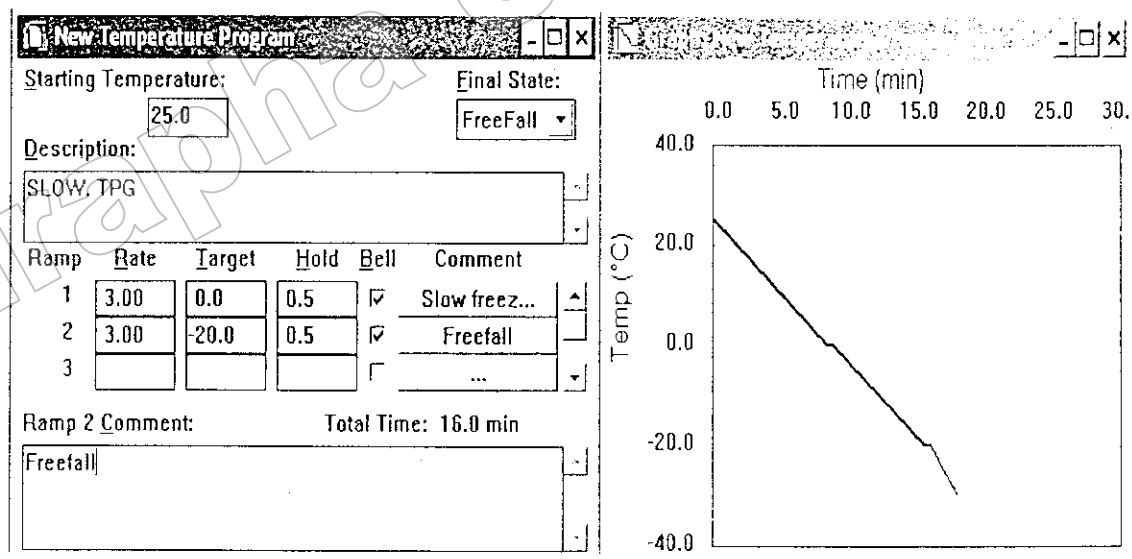
section 2 ลดอุณหภูมิจาก 25 องศาเซลเซียส ถึง 0 องศาเซลเซียส (ตามอัตราการลดอุณหภูมิของแต่ละโปรแกรม) แล้วพักไว้ (hold) 0.5 นาที

section 3 ลดอุณหภูมิจาก 0 องศาเซลเซียส ถึง -20 องศาเซลเซียส (ตามอัตราการลดอุณหภูมิของแต่ละโปรแกรม) แล้วพักไว้ (hold) 0.5 นาที

section 4 ลดอุณหภูมิจาก -20 องศาเซลเซียส ถึง -40 องศาเซลเซียส อย่างอิสระ (free fall)

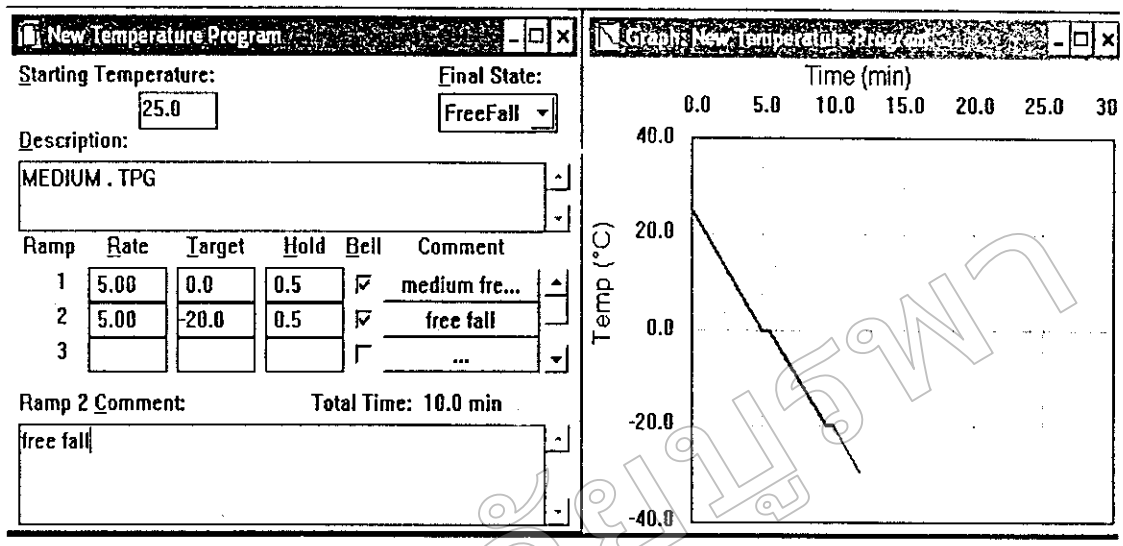
section 5 จบการทำงาน และนำน้ำเชื้อที่แช่แข็งแล้วไปเก็บในไนโตรเจนเหลว

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งน้ำเชื้อแช่แข็งทำโดยนำน้ำเชื้อที่ได้เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวนำมาเพิ่มอุณหภูมิอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่ 30 และ 50°C นาน 20 และ 15 วินาที (สำหรับปลาสวาย) และ 70-80°C นาน 5 วินาที (สำหรับปลาเทโพ) จนน้ำเชื้อละลาย (thawing) แล้วจึงนำไปเช็คเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังจากทำน้ำเชื้อแช่แข็ง และความสามารถของสเปิร์มในการปฏิสนธิกับไข่

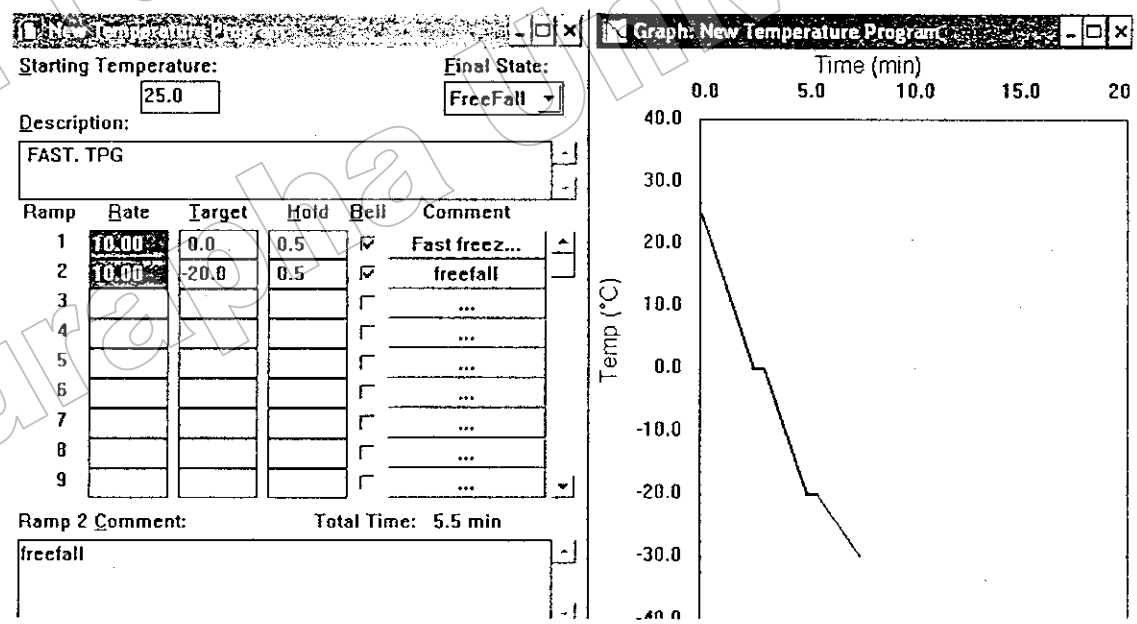



ภาพที่ 1 การลดอุณหภูมิในอัตรา -3 องศาเซลเซียส/นาที (โปรแกรมที่ 1)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University




ภาพที่ 2 การลดอุณหภูมิในอัตรา -5 องศาเซลเซียส/นาที (โปรแกรมที่ 2)




ภาพที่ 3 การลดอุณหภูมิในอัตรา -10 องศาเซลเซียส/นาที (โปรแกรมที่ 3)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

**6.4 การผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง**

การตรวจเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (fertilization rates) เป็นการตรวจความสามารถของอสุจิในน้ำเชื้อที่เก็บรักษาในการเข้าผสมกับไข่สดเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดโดยวิธีการผสมแบบแห้ง การเช็คอัตราการปฏิสนธิทำโดยการนำเอาไข่แม่ปลาเทโพ และปลาสวายประมาณ 300 ฟองใส่ลงไปใน petridish โดยใช้หลอดฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตร (ml) ตัดปลายหลอดออกให้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร (mm) ดูดไข่ 0.2 ml. (~300 ฟอง) แล้วจึงเอาน้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้อุ่นให้ละลายใส่ลงไปผสมกับไข่ทันที พร้อมกับเติมน้ำที่สะอาดลงไป และใช้ขนไก่ช่วยผสมให้น้ำเชื้อเข้ากับไข่ จากนั้นล้างไข่ และเมือกออกโดยการเปลี่ยนน้ำ 2 ครั้งแล้วปล่อยให้ไข่พัฒนาต่อไป การกระตุ้นให้แม่ปลาเทโพตกไข่ทำโดยการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นด้วย suprefact 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม จำนวน 2 เข็ม ฉีดห่างกัน 8 ชั่วโมง จะได้ลักษณะไข่มีสีเหลืองนวล ส่วนการกระตุ้นให้แม่ปลาสวายตกไข่ทำโดยคัดเลือกแม่พันธุ์ปลาสวายที่มีลักษณะสมบูรณ์เพศ คือมีท้องอูม เป่งพื้นท้องนิ่ม ผนังท้องบาง ฉีดฮอร์โมน (Suprefect) ในอัตรา 20 µg ร่วมกับ motilium 5 mg ต่อน้ำหนักปลา 1 kg หลังจากฉีดฮอร์โมน 12-16 ชั่วโมงจึงนำแม่ปลาสวายมารีดไข่ ใส่ภาชนะที่แห้งและสะอาด และเช็คคุณภาพไข่ก่อนการผสมเทียมโดยดูจากลักษณะรูปร่างของไข่เช่นเดียวกับปลาเทโพ จำนวนสเปิร์มที่ใช้ผสมกับไข่ได้ใช้ในปริมาณที่เหมาะสมไม่ต่ำกว่า $10^5$ สเปิร์มต่อไข่ 1 ฟองโดยใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำเชื้อในหลอดฟางปริมาตร 40 µl. ลงไปผสมกับไข่ใน petridisc และคนเบา ๆ ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที ล้างน้ำเชื้อส่วนเกินและเมือกออกแล้วใส่น้ำจากเพาะฟัก แล้ววางไว้ในที่อากาศถ่ายเท เปลี่ยนน้ำทุก ๆ 30 นาที และจึงนับจำนวนไข่ดีไข่เสีย เพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ โดยทำ 6 ซ้ำต่อชุดการทดลอง สำหรับกลุ่มควบคุมจะใช้น้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ๆ ซึ่งมีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่ต่ำกว่า 80% ในการผสมกับไข่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

**7. ผลการศึกษา**

การทดลองสามารถแบ่งออกได้เป็น 6 ตอน คือ

7.1 การศึกษาความเป็นพิษของ cryoprotectants ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปอร์มปลาเทโพ

7.2 การศึกษาความเป็นพิษของ cryoprotectants ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปอร์มปลาสวาย

7.3 การศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเทโพ

7.4 การศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวาย

7.5 การศึกษาความสามารถในการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาเทโพที่ผ่านการแช่แข็ง

7.6 การศึกษาความสามารถในการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาสวายที่ผ่านการแช่แข็ง

***7.1 การศึกษาความเป็นพิษของ cryoprotectants ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปอร์มปลาเทโพ***

จากการทดลองประเมินคุณภาพน้ำเชื้อของปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) ซึ่งเก็บรักษาไว้ในสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่ 4 ความเข้มข้น (5%, 10%, 15% และ 20%) รวมทั้งหมด 6 ชนิดเพื่อหาสาร cryoprotectants ที่เหมาะสมในการใช้แช่แข็งน้ำเชื้อปลาเทโพ โดยทำการประเมินการเคลื่อนไหวได้ผลดังนี้

การทดสอบความเป็นพิษของ DMSO ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20%ในอัตราส่วน1:1 เมื่อนำน้ำเชื้อสดที่แช่ใน DMSO 15% มาทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่าจะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 120 นาที ในขณะที่น้ำเชื้อที่แช่ใน DMSO 5%, 10% และ 20% ยังมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเมื่อเวลา 180 นาที (ภาพที่ 4) จากการทดลองทางสถิติ พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย DMSO 5% ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับ DMSO 10% และ DMSO 20% ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ DMSO 15%($P<0.05$) ผลของเวลาที่ใช้ในการแช่น้ำเชื้อปลาเทโพกับสารละลาย DMSO พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

การทดสอบความเป็นพิษของ propylene glycol ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20%ในอัตราส่วน1:1 เมื่อนำน้ำเชื้อสดมาทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่ใน propylene glycol 20% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 90 นาที แต่การใช้ propylene glycol 5%, 10% และ 15% สเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 180 นาที (ภาพที่ 5) จากการทดลองทางสถิติ พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย propylene glycol 5% ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับ propylene glycol ที่ความเข้มข้น 10% และ 15% ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ propylene glycol ที่ความเข้มข้น 20%($P<0.05$) (ภาพที่ 5) ผลของเวลาที่ใช้ในการแช่น้ำเชื้อปลาเทโพกับสารละลาย propylene glycol พบว่าเวลา 10 นาทีที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากับสารละลาย propylene glycol มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับเวลา 20, 30, 60, 90, 120, 150 และ180 ($P>0.05$) (ภาพที่ 5)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

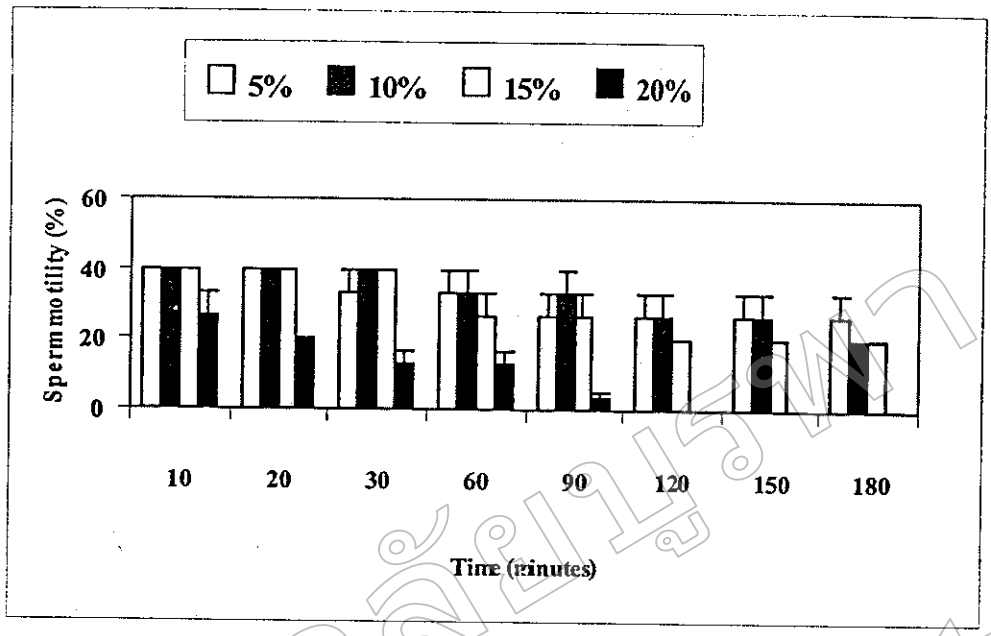
การทดสอบความเป็นพิษของ glycerol ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20%ในอัตราส่วน 1:1 เมื่อนำน้ำเชื้อสดมาทดสอบการเคลื่อนที่ใน glycerol ปรากฏว่าสเปิร์มที่แช่ใน glycerol ความเข้มข้น 10%และ 15% และ 20% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 150 นาที แต่การใช้ glycerol 5% สเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 180 นาที (ภาพที่ 6) จากการทดลองทางสถิติ พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย glycerol 5% ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับ glycerol 10% และ 15%($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ glycerol 20% ($P<0.05$) (ภาพที่ 6) การวิเคราะห์ เวลาที่ใช้ในการแช่น้ำเชื้อปลากับสารละลาย glycerol ก็พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) (ภาพที่ 6)

การทดสอบความเป็นพิษของ methanol ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20%ในอัตราส่วน 1:1 พบว่าสเปิร์มที่แช่ใน Methanol 20% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 30 นาที แต่ Methanol ความเข้มข้น 5% มีผลทำให้สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 120 นาที ในขณะที่ methanol 10% และ 15% สเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 180 นาที (ภาพที่ 7) จากการทดลองทางสถิติ พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย methanol 5% ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับ methanol 20% ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ methanal 10%และ 15%($P<0.05$) (ภาพที่ 7) เวลาที่ใช้ในการแช่น้ำเชื้อปลากับสารละลาย methanol พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) (ภาพที่ 7)

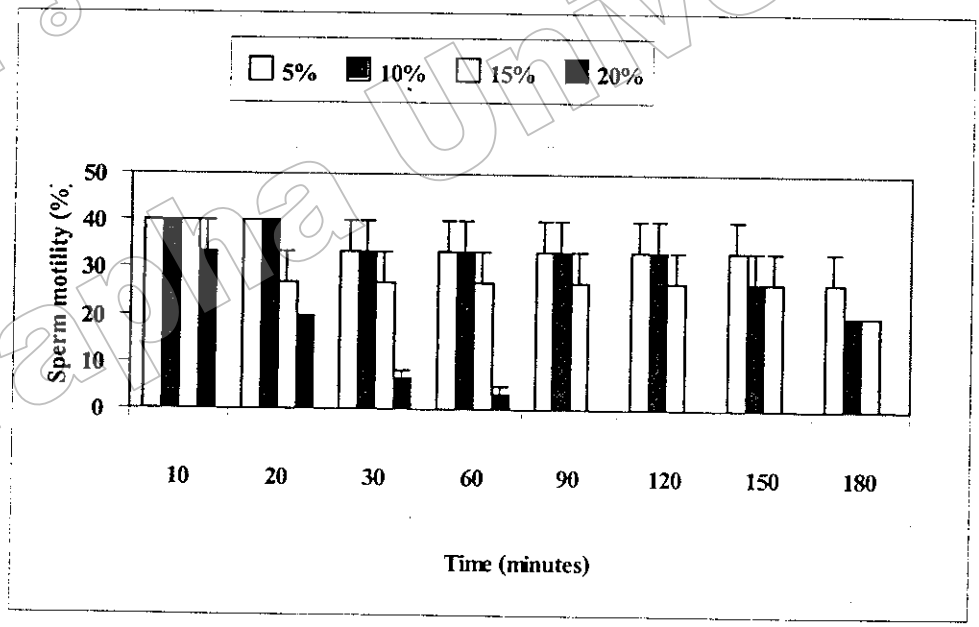
การทดสอบความเป็นพิษของ sucrose ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20%ในอัตราส่วน 1:1 พบว่าสเปิร์มที่แช่ใน sucrose 10% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 20 นาที แต่สเปิร์มที่อยู่ในสารละลาย sucrose 5% , 20% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 60 นาที และ สเปิร์มที่อยู่ใน sucrose 15% ยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 180 นาที (ภาพที่ 8) จากการทดลองทางสถิติ พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย sucrose 5% ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับ sucrose 10% และ20% ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ sucrose 15% ($P<0.05$) (ภาพที่ 8) สำหรับเวลาที่ใช้ในการแช่น้ำเชื้อปลากับสารละลาย Sucrose ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) (ภาพที่ 8)

การทดสอบความเป็นพิษของ ethanol ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20%ในอัตราส่วน1:1 พบว่าสเปิร์มที่แช่ใน ethanol ความเข้มข้น 5% และ 20% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 20 นาที ในขณะที่สเปิร์มที่แช่ใน ethanol 15% และ 10% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 30 นาที และ 150 นาทีตามลำดับ (ภาพที่ 9) จากการทดลองทางสถิติพบว่าความเข้มข้นของสารละลาย ethanol ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) (ภาพที่ 9) เวลาที่ใช้ในการแช่น้ำเชื้อปลากับสารละลาย ethanol ก็ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

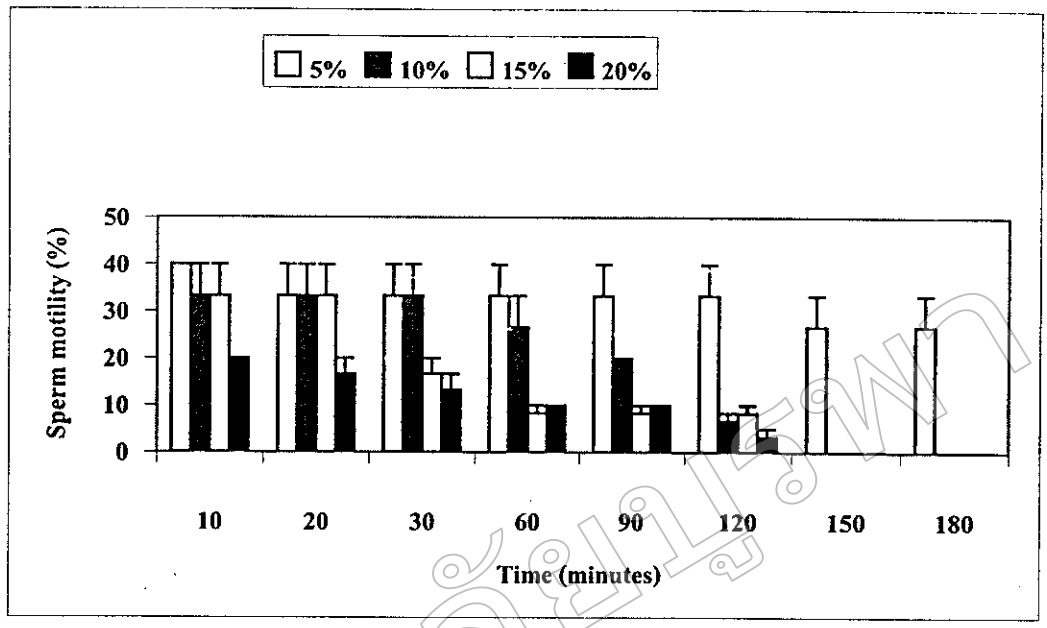



**ภาพที่ 4** เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) หลังจากเจือจางใน DMSO ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน

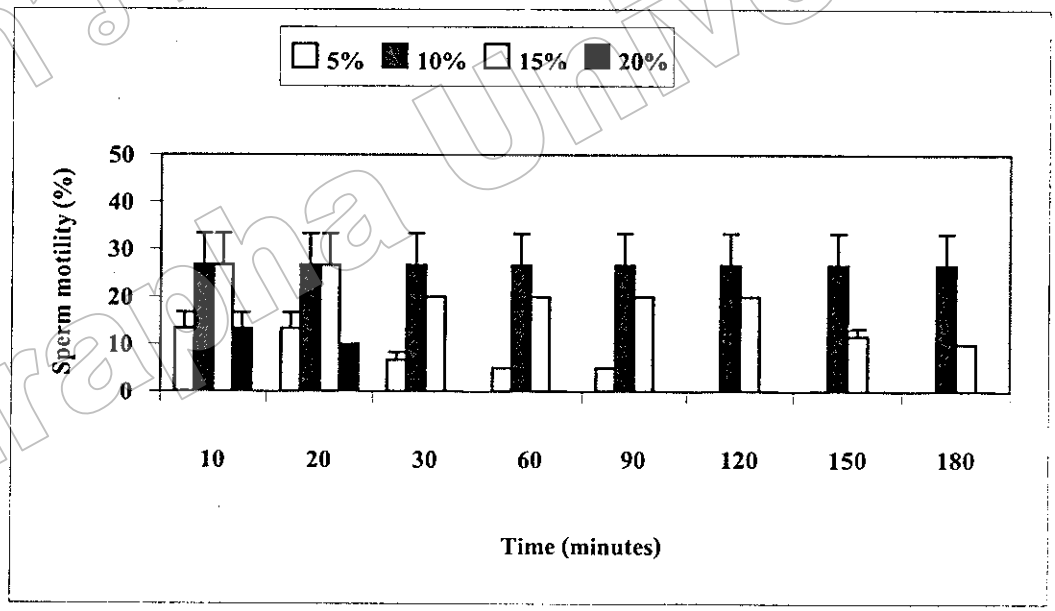



**ภาพที่ 5** เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) หลังจากเจือจางใน Propylene glycol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

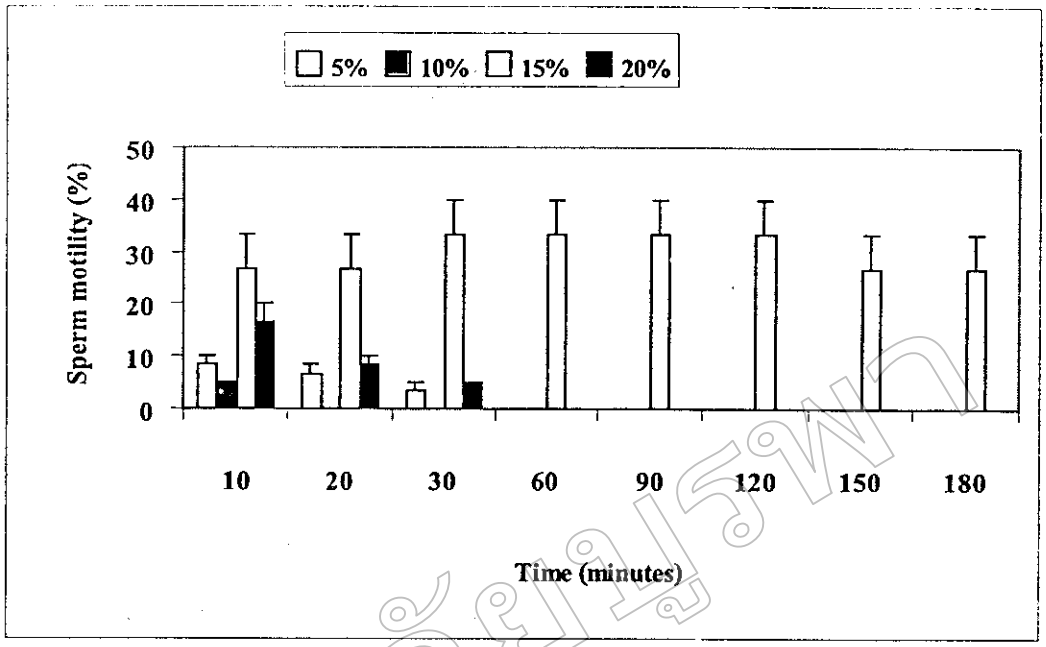



**ภาพที่ 6** เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) หลังจากเจือจางใน glycerol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน

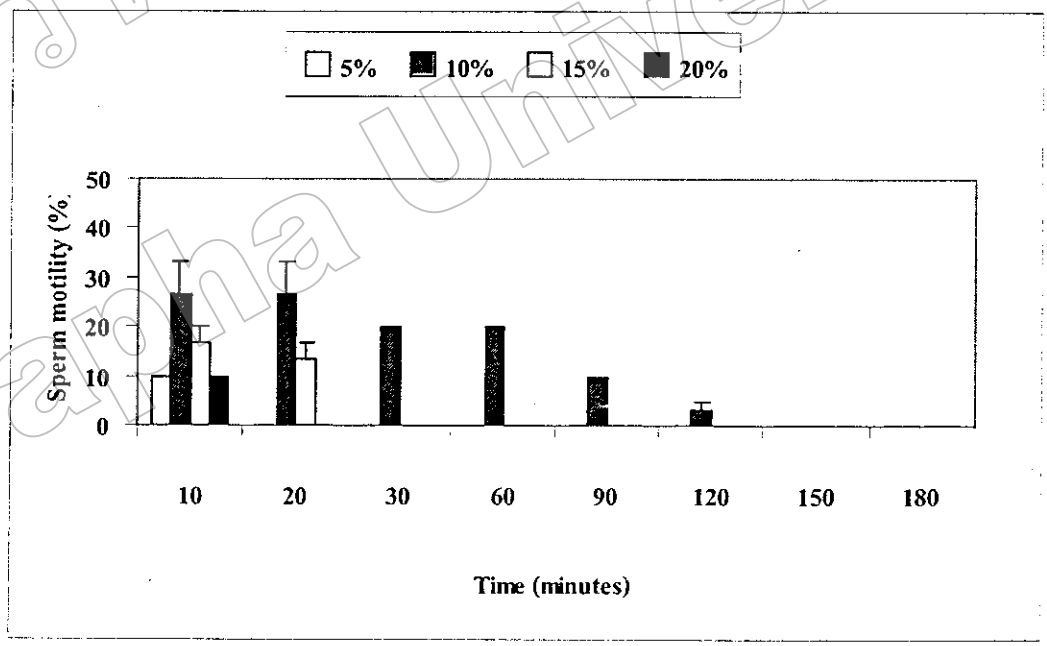



**ภาพที่ 7** เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) หลังจากเจือจางใน methanol ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University




**ภาพที่ 8** เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) หลังจากเจือจางใน sucrose ที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน




**ภาพที่ 9** เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) หลังจากเจือจางใน ethanol ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน

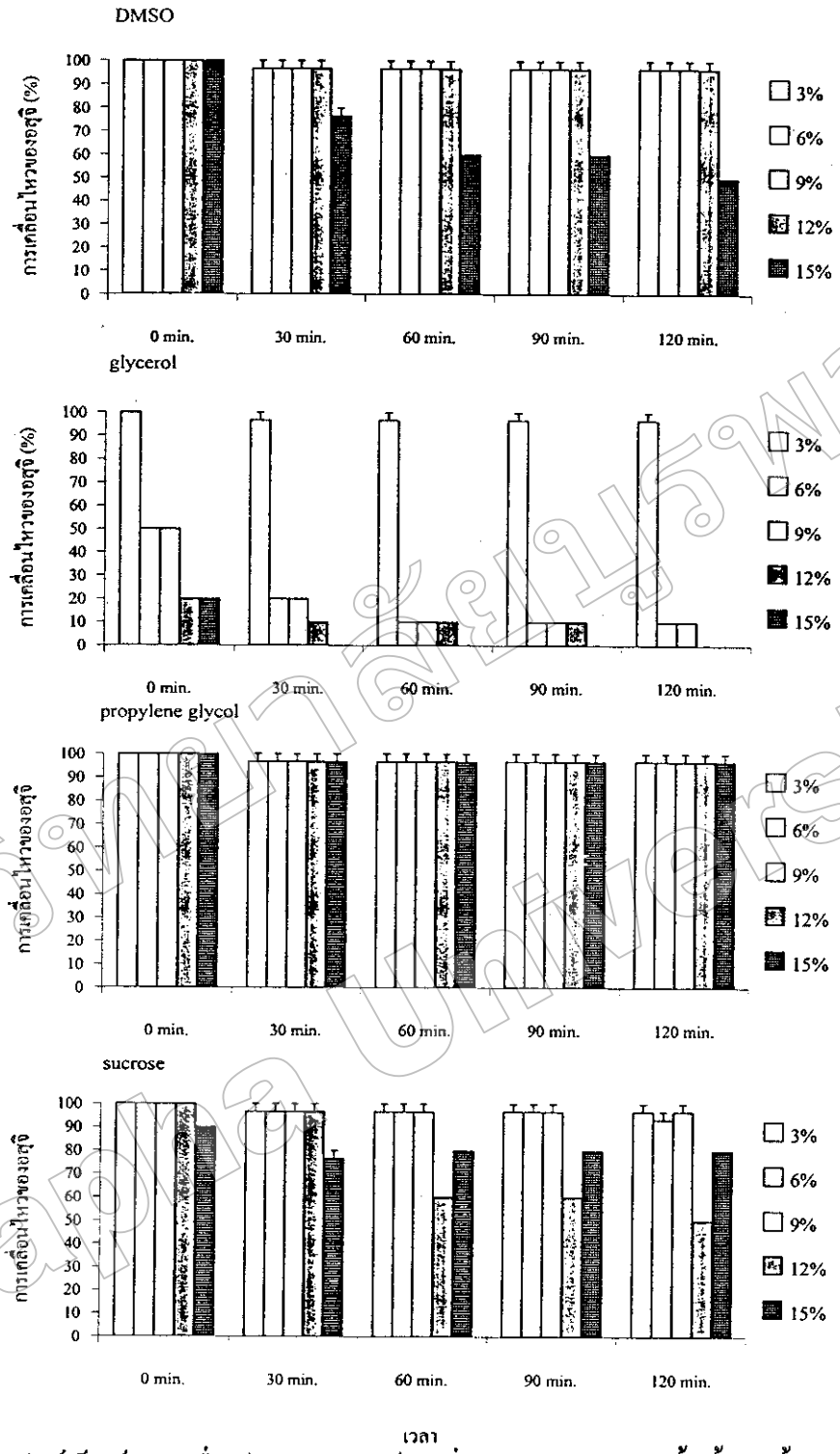
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

*7.2 การศึกษาความเป็นพิษของ cryoprotectants ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปอร์มปลาสวาย*

การทดสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ glycerol, DMSO, propylene glycol และ sucrose ที่ 5 ระดับความเข้มข้นคือ 3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำยา extender 7 และทำการตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มที่เวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาทีหลังการเจือจางน้ำเชื้อ พบว่าความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์และระยะเวลาการแช่ มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแตกต่างกันดังแสดงในภาพที่ 10 และตารางที่ 1 ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติของทุกปัจจัยอย่างมีนัยสำคัญ และพบว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 4 ชนิด ทุกระดับความเข้มข้น ที่เวลา 120 นาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวตั้งแต่ 10-100 เปอร์เซ็นต์ และที่เวลา 0-30 นาที (ยกเว้น glycerol ที่ความเข้มข้น 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์) มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวเป็น 80-100 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในการกำหนดระยะเวลาตั้งแต่ผสมน้ำเชื้อกับไครโอโพรเทคแทนท์ จนกระทั่งเข้าสู่ขั้นตอนการลดอุณหภูมิ (equilibration time) ให้มีความเหมาะสมก่อนที่เซลล์จะถูกทำลายจากความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์จึงควรอยู่ในช่วง 30 นาทีแรกของการผสมน้ำเชื้อกับไครโอโพรเทคแทนท์ สำหรับการทดลองนี้กำหนดให้มี equilibration time เป็น 10 นาที ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นเวลาที่สารไครโอโพรเทคแทนท์สามารถแพร่ผ่านเข้าสู่เซลล์แล้วและไม่ทำอันตรายต่อเซลล์

จากผลการศึกษาความเป็นพิษไม่สามารถสรุปได้ว่าไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดและความเข้มข้นใดมีความเหมาะสมที่สุด และเพื่อหลีกเลี่ยงความแปรปรวนที่อาจเกิดจากปัจจัยร่วมของทั้งสองปัจจัยดังกล่าว ดังนั้นในการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวาย จึงได้ทำการแช่แข็งโดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 4 ชนิด และทั้ง 5 ระดับความเข้มข้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University




ภาพที่ 10 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มเฉลี่ยภายหลังการผสมน้ำเชื้อในน้ำยา extender 7 ด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 4 ชนิด คือ glycerol, DMSO, propylene glycol และ sucrose ที่ระดับความเข้มข้น 0, 3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ทำการตรวจวัดที่เวลานาทีที่ 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มเมื่อทำการตรวจที่เวลา 0, 30, 60, 90 และ 120 นาที หลังผสมน้ำเชื้อกับน้ำยา extender 7 ที่มีส่วนผสมของไครโอโพรเทคแทนท์ ทั้ง 4 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 0, 3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์

| ชนิดสารไครโอโพรเทคแทนท์ | ระดับความเข้มข้นสารไครโอโพรเทคแทนท์ | เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์ม | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 0 นาที | 30 นาที | 60 นาที | 90 นาที | 120 นาที |
| glycerol | 3 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 6 | 50 | 20 | 10 | 10 | 10 |
| | 9 | 50 | 20 | 10 | 10 | 10 |
| | 12 | 20 | 10 | 10 | 10 | 0 |
| | 15 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| DMSO | 3 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 6 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 9 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 12 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 15 | 100 | 80 | 60 | 100 | 50 |
| propylene glycol | 3 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 6 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 9 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 12 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 15 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| sucrose | 3 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 6 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 9 | 100 | 100 | 100 | 100 | 100 |
| | 12 | 100 | 100 | 60 | 60 | 50 |
| | 15 | 90 | 80 | 80 | 80 | 80 |

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

*7.3 การศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเทโพ*

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเทโพได้ใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้งหมด 6 ชนิดมาแช่น้ำเชื้อนาน นาที (equilibration time) นาน 10 นาที แล้วลดอุณหภูมิโดยการใช้เครื่อง freeze control (model CL3000) โดยใช้ 3 โปรแกรมที่ได้กำหนดขึ้นมาได้แก่

โปรแกรมที่ 1 อัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า (ลดอุณหภูมิอัตรา -3 องศาเซลเซียส/นาที)

โปรแกรมที่ 2 อัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง (ลดอุณหภูมิอัตรา -5 องศาเซลเซียส/นาที)

โปรแกรมที่ 3 อัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (ลดอุณหภูมิอัตรา -10 องศาเซลเซียส/นาที)

**การทดลองที่ 7.3.1** ทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำยาสูตร C-F HBSS และสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% อัตราส่วน 1:1 โดยมีอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว อัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลางและอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า

**ทำการทดลอง** การเก็บแช่แข็ง วันที่ 3 มิถุนายน 2545

การละลาย วันที่ 4 มิถุนายน 2545

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสด (กลุ่มควบคุม) พบว่า มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มประมาณ 60% ก่อนทำการแช่แข็ง ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งปรากฏว่าสเปิร์มมีการเคลื่อนที่เมื่อใช้ DMSO 5%และ10% ในทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ โดยมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 2.0%±1.5% และ 11.7%±4.4%) แต่การใช้ DMSO 15%และ20% ไม่มีผลทำให้มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl (ภาพที่ 11) จากการทดลองทางสถิติ พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย DMSO ไม่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) และอัตราในการลดอุณหภูมิก็ไม่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ($P>0.05$)

**การทดลองที่ 7.3.2** ทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพหลังการเก็บแช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำยาสูตร C-F HBSS และสารละลาย sucrose ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% อัตราส่วน 1:1 โดยมีอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว อัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลางและอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า

**ทำการทดลอง** การเก็บแช่แข็ง วันที่ 3 กรกฎาคม 2545

การละลาย วันที่ 14 กรกฎาคม 2545

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสด (กลุ่มควบคุม) พบว่า มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มประมาณ 60% ก่อนทำการแช่แข็ง การทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งในน้ำยา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สูตร C-F HBSS และสารละลาย Sucrose ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่าในทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ ไม่มีผลทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl

**การทดลองที่ 7.3.3** ทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ หลังการแช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำยาสูตร C-F HBSS และสารละลาย Ethanol ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% อัตราส่วน 1:1 โดยมีอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว อัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลางและอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า

**ทำการทดลอง** การเก็บแช่แข็ง วันที่ 3 กรกฎาคม 2545

การละลาย วันที่ 15 กรกฎาคม 2545

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสด พบว่า มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ประมาณ 60% ก่อนทำการแช่แข็ง ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งในน้ำยาสูตร C-F HBSS และสารละลาย Ethanol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่าในทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ ไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl

**การทดลองที่ 7.3.4** ทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำยาสูตร C-F HBSS และสารละลาย propylene glycol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% อัตราส่วน 1:1 โดยมีอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว, อัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลางและอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า

**ทำการทดลอง** การเก็บแช่แข็ง วันที่ 3 กรกฎาคม 2545

การละลาย วันที่ 16 กรกฎาคม 2545

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสด พบว่า มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ประมาณ 60% ก่อนทำการแช่แข็ง ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งในน้ำยาสูตร C-F HBSS และสารละลาย propylene glycol พบว่าในทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ ไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl แม้ว่าการใช้ propylene glycol เฉพาะที่ความเข้มข้น 5% และลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง (-5 องศาเซลเซียส/นาที) เท่านั้นที่ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ประมาณ 1.7%

**การทดลองที่ 7.3.5** ทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำยาสูตร C-F HBSS และสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% อัตราส่วน 1:1 โดยมีอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว อัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลางและอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า

**ทำการทดลอง** การเก็บแช่แข็ง วันที่ 5 กรกฎาคม 2545

การละลาย วันที่ 23 กรกฎาคม 2545

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสด พบว่า มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 60% ก่อนทำการแช่แข็ง ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งในน้ำยาสูตร C-F HBSS และสารละลาย DMSO 5% พบว่าการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเท่านั้นที่สามารถทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ในทุกระดับความเข้มข้นของ DMSO แม้ว่าค่าเฉลี่ยการเคลื่อนที่มีค่าต่ำอยู่ในช่วง 3.3%-5% เท่านั้น (ภาพที่ 12) จากการทดลองทางสถิติ พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย DMSO และอัตราการลดอุณหภูมิไม่มีผลทำให้เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

**การทดลองที่ 7.3.6** ทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำยาสูตร C-F HBSS และสารละลาย Methanol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% อัตราส่วน 1:1 โดยมีอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว, อัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลางและอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า

**ทำการทดลอง** การเก็บแช่แข็ง วันที่ 5 กรกฎาคม 2545

การละลาย วันที่ 23 กรกฎาคม 2545

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสด พบว่า มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ประมาณ 60% ก่อนทำการแช่แข็ง ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งในน้ำยาสูตร C-F HBSS และสารละลาย methanol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่าในทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ ไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังจากละลายน้ำเชื้อและกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl

**การทดลองที่ 7.3.7** ทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำยาสูตร C-F HBSS และสารละลาย DMSO+Sucrose ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% อัตราส่วน 1:1 โดยมีอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว, อัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลางและอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า

**ทำการทดลอง** การเก็บแช่แข็ง วันที่ 5 กรกฎาคม 2545

การละลาย วันที่ 23 กรกฎาคม 2545

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสด พบว่า มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ประมาณ 60% ก่อนทำการแช่แข็ง ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งในน้ำยาสูตร C-F HBSS และสารละลาย DMSO+Sucrose ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% พบว่าในทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ ไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

**การทดลองที่ 7.3.8** ทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพหลังการแช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำยาสูตร C-F HBSS และสารละลาย glycerol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% อัตราส่วน 1:1 โดยมีอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว อัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลางและอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า

**ทำการทดลอง** การเก็บแช่แข็ง วันที่ 21 สิงหาคม 2545

การละลาย วันที่ 22 สิงหาคม 2545

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสด พบว่า มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ประมาณ 60% ก่อนทำการแช่แข็ง ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งในน้ำยาสูตร C-F HBSS และสารละลาย glycerol พบว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วและปานกลางทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่หลังการละลายเมื่อใช้ glycerol ในทุกระดับความเข้มข้น (ภาพที่ 13) การใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลางที่ความเข้มข้น 10% และอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วที่ความเข้มข้น15% ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ประมาณ 33% จากการทดลองทางสถิติ พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย glycerol 5% ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับ glycerol 10%($P>0.05$) ในการแช่แข็งน้ำเชื้อ แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ glycerol 15%และ glycerol 20%($P<0.05$) และอัตราการลดอุณหภูมิก็ไม่มีผลทำให้มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

**การทดลองที่ 7.3.9** ทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ ในการเก็บรักษาแบบแช่แข็งในน้ำยาสูตร C-F HBSS และสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% อัตราส่วน 1:1 โดยมีอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว อัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลางและอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า

**ทำการทดลอง** การเก็บแช่แข็ง วันที่ 21 สิงหาคม 2545

การละลาย วันที่ 23 สิงหาคม 2545

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสด พบว่า มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ประมาณ 60% ก่อนทำการแช่แข็ง ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งในน้ำยาสูตร C-F HBSS และสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่าในทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วที่ความเข้มข้น 5% และ10% ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ประมาณ 40% แต่การลดอุณหภูมิอย่างปานกลางจะได้ผลดีเมื่อใช้ DMSO ความเข้มข้น10% นอกจากนี้การใช้ DMSO ความเข้มข้น 15% และ 20% มีแนวโน้มทำให้เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าลดลง (ภาพที่ 14) จากการทดลองทางสถิติ พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย DMSO ไม่มีผลทำให้เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) อัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลางไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ($P>0.05$) กับอัตราการลดอุณหภูมิ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

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

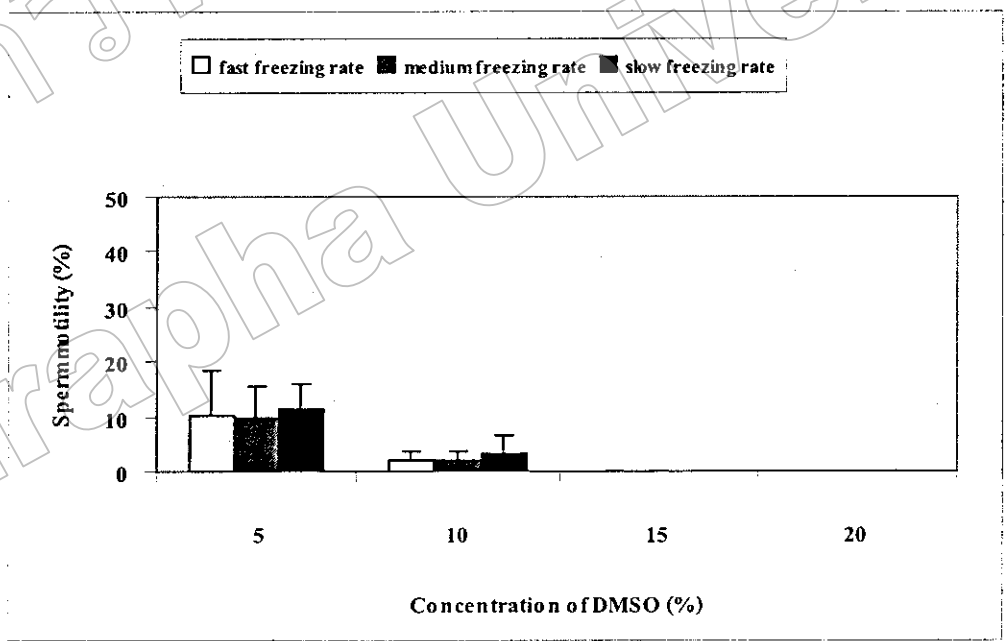

อย่างช้าในการแช่แข็ง แต่อัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วมีความแตกต่างกัน($P<0.05$) กับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้าในการแช่แข็งน้ำเชื้อ

**การทดลองที่ 7.3.10** ทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ ในการเก็บรักษาแบบแช่แข็งในน้ำยาสูตร C-F HBSS และสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% อัตราส่วน 1:2

**ทำการทดลอง** การเก็บแช่แข็ง วันที่ 21 สิงหาคม 2545

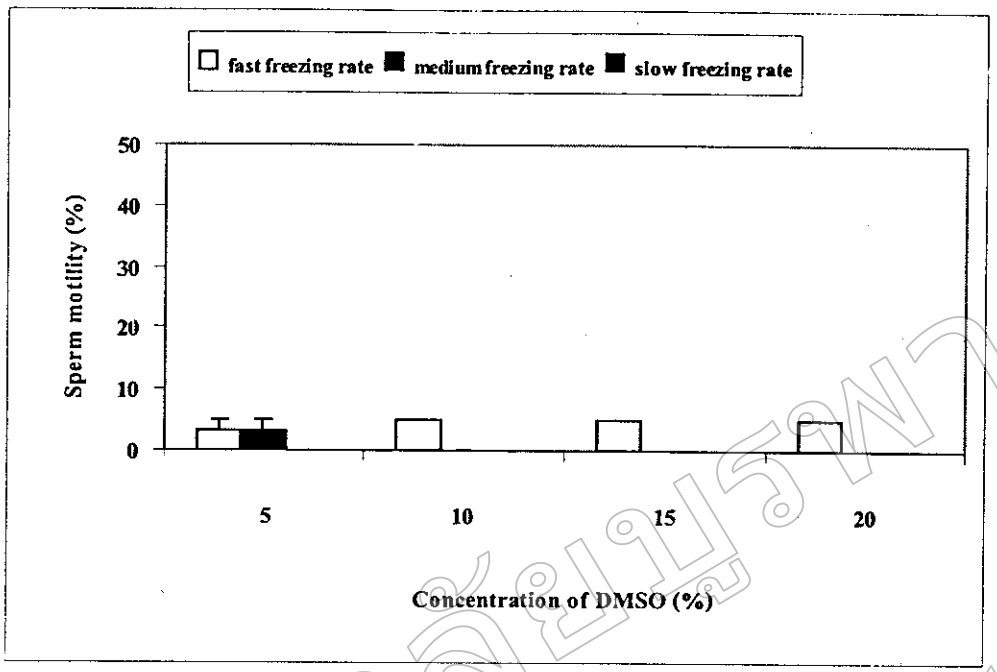
การละลาย วันที่ 24 สิงหาคม 2545

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสด พบว่า มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ประมาณ 60% ก่อนทำการแช่แข็ง ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งในน้ำยาสูตร C-F HBSS และสารละลาย DMSO พบว่าการใช้ DMSO ในทุกระดับความเข้มข้นเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วและปานกลาง มีผลทำให้สปิร์มมีการเคลื่อนที่ในทุกชุดการทดลอง การลดอุณหภูมิอย่างช้าจะทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่เมื่อใช้ DMSO ที่ความเข้มข้น 10%, 15%และ20% (ภาพที่ 15) จากการทดลองทางสถิติ พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย DMSO และอัตราการลดอุณหภูมิไม่มีผลทำให้เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

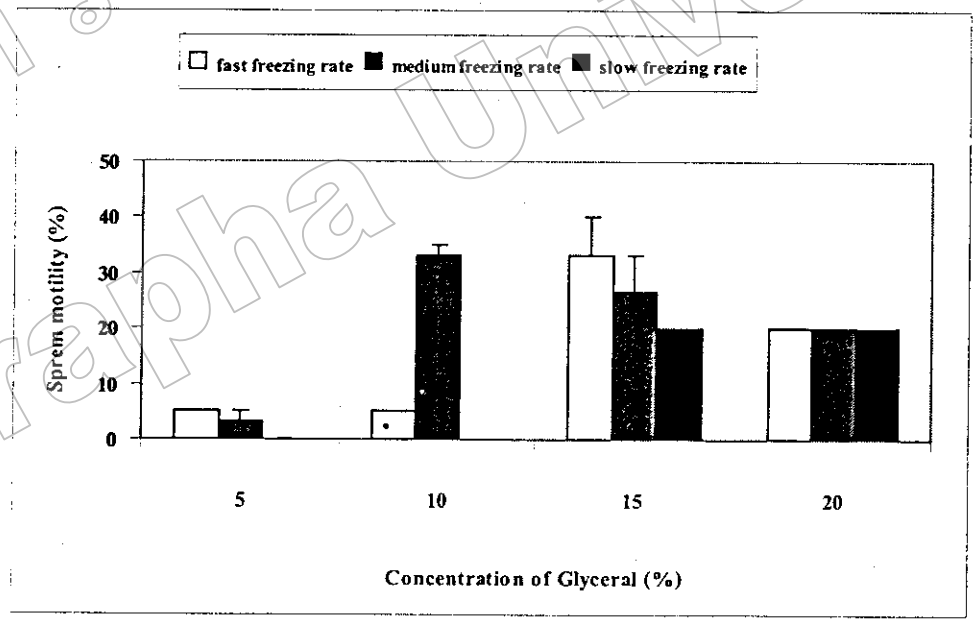



**ภาพที่ 11** แสดงเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ *Pangasius larnaudii* แช่ในสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%,10%,15%และ20%ในอัตราส่วน 1:1

190673

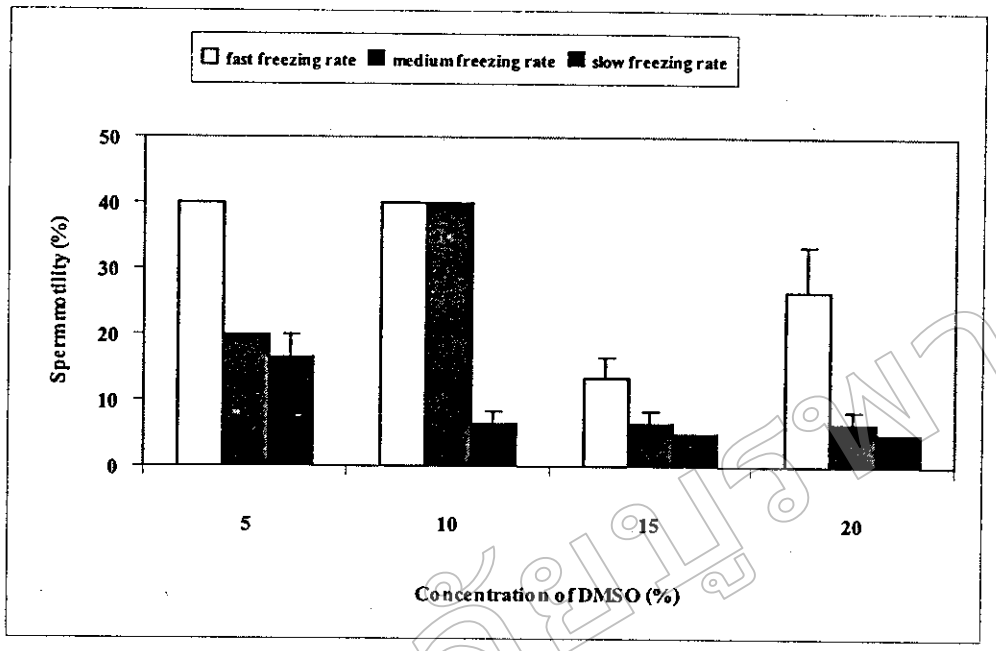



**ภาพที่ 12** แสดงเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ *Pangasius larnaudii* แช่ใน สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15%และ20% ในอัตราส่วน 1:1

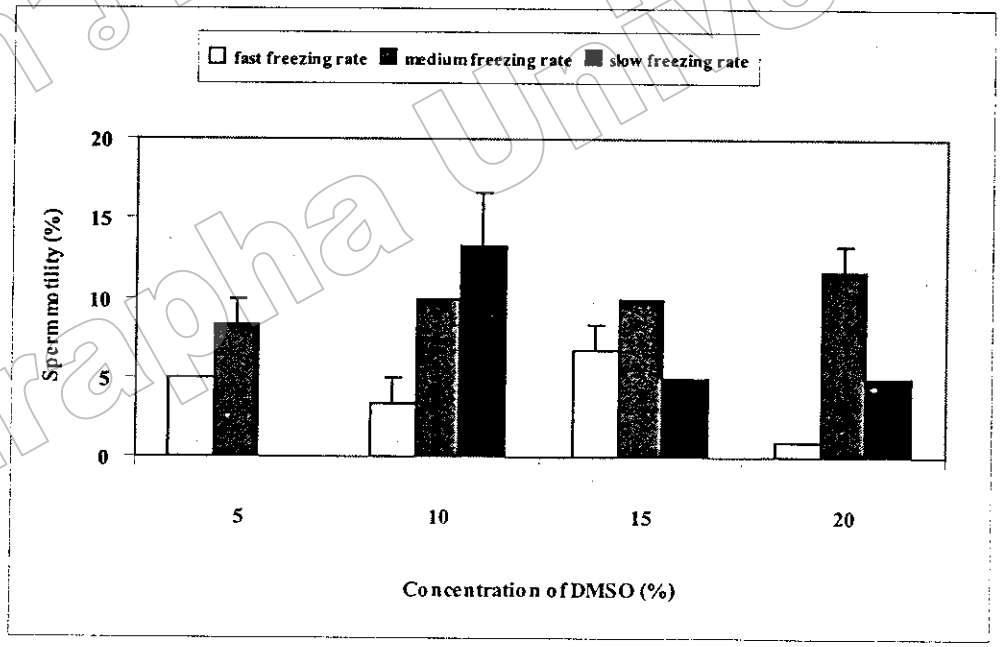



**ภาพที่ 13** แสดงเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ *Pangasius larnaudii* แช่ใน สารละลาย glycerol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15%และ20% ในอัตราส่วน 1:1

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University




**ภาพที่ 14** แสดงเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ *Pangasius larnaudii* แช่ใน สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15%และ20% ในอัตราส่วน 1:1




**ภาพที่ 15** แสดงเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเทโพ *Pangasius larnaudii* แช่ใน สารละลายDMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15%และ20% ในอัตราส่วน 1:2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

*7.4 การศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวาย*

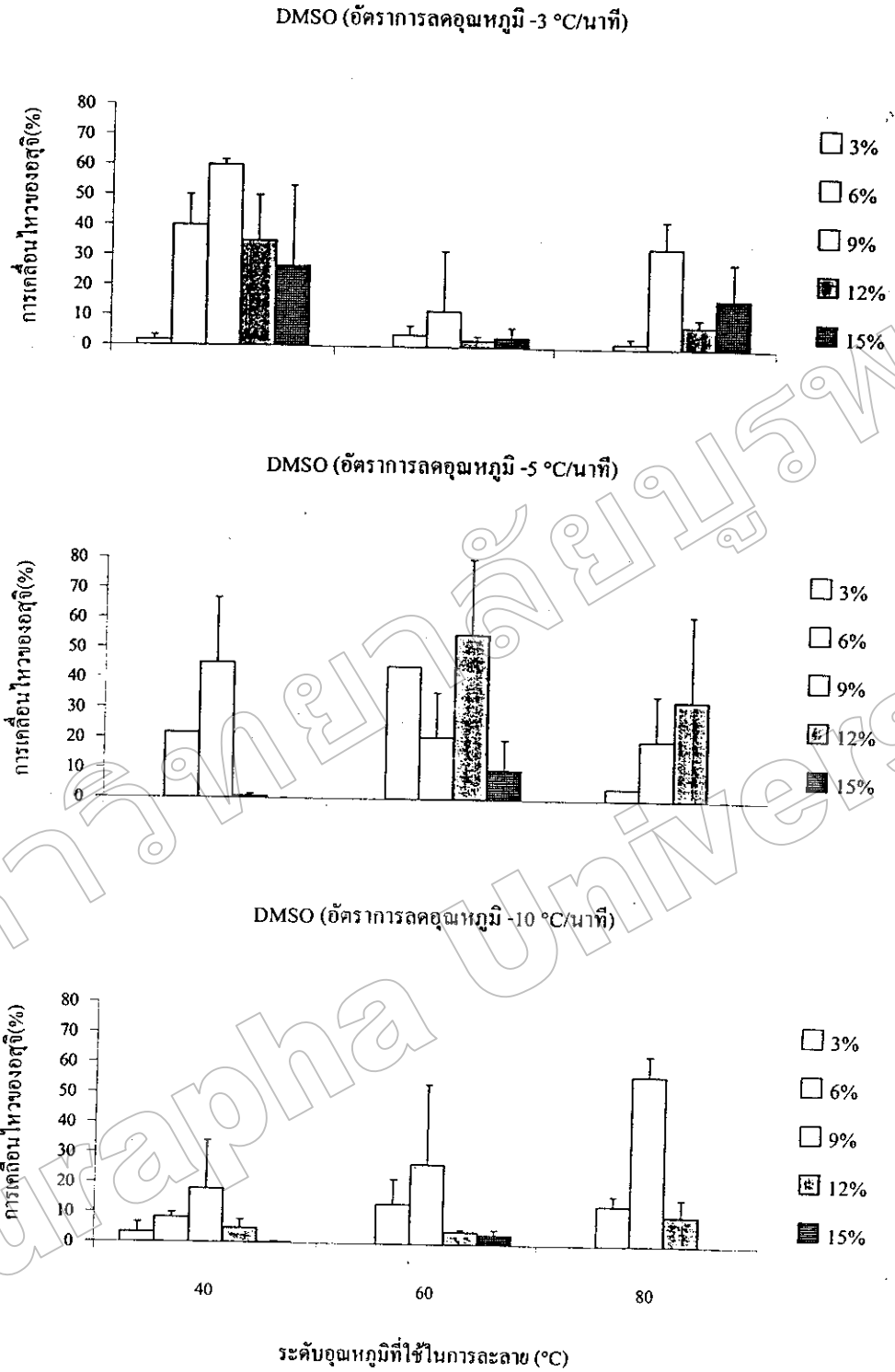
7.4.1 การลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

ทำการลดอุณหภูมิด้วย freeze control (model CL3000) ซึ่งเป็นอุปกรณ์ในการลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งโดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียส/นาที ใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 4 ชนิดได้แก่ glycerol, DMSO, propylene glycol และ sucrose และแต่ละชนิดใช้ความเข้มข้น 3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์เจือจางในน้ำยาสูตร extender 7 การแช่แข็งน้ำเชื้อทำในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ โดยหลังเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งนาน 7 วันก็นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อ (straw) ขึ้นมาทำการละลายในน้ำที่ 3 ระดับอุณหภูมิคือ 40, 60 และ 80 องศาเซลเซียส มีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวดังภาพที่ 16 ถึง ภาพที่ 19 จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$ ภาคผนวกที่ 1) ผลของการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีตเมนต์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มที่มี DMSO และ propylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ เท่ากับ 14.27% ± 2.05% และ10.92% ± 1.84% ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่า glycerol (.07 ± .04) และ sucrose (.24 ±.11) อย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในภาคผนวกที่ 2 และภาคผนวกที่ 3

จากการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวเฉลี่ยของสเปิร์มแช่แข็งที่ผ่านการลดอุณหภูมิด้วยอัตรา -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียส/นาที เท่ากับ 7.89% ± 1.82%, 5.95% ± 1.45% และ 5.01% ± 1.32% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P >.05$ ภาคผนวกที่ 1 และ ภาคผนวกที่ 4)

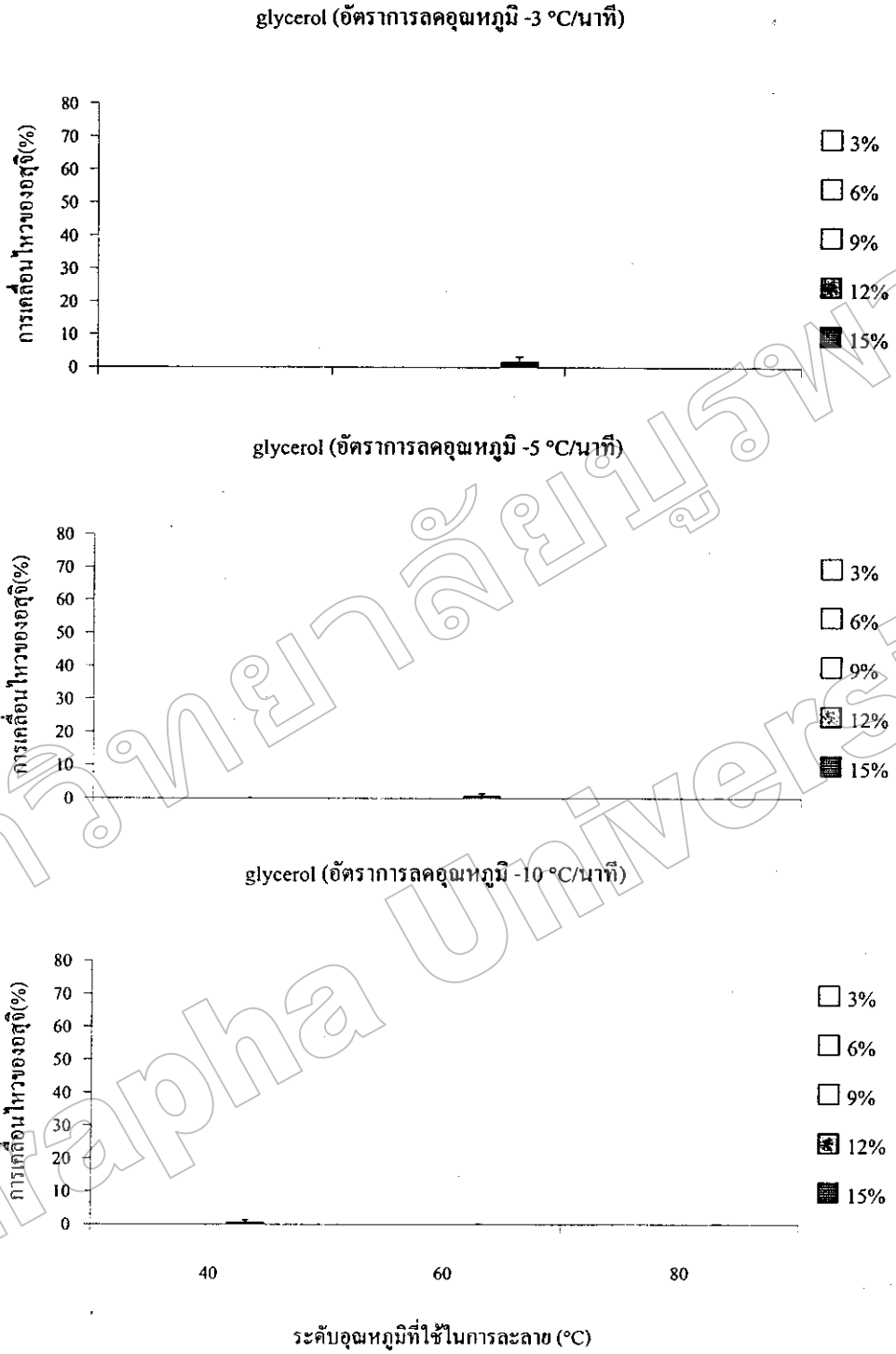
จากการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวเฉลี่ยของสเปิร์มแช่แข็งภายหลังการละลายที่อุณหภูมิน้ำ 40, 60 และ 80 องศาเซลเซียส เท่ากับ 5.83% ± 1.45%, 6.13% ± 1.50% และ 6.84% ± 1.63% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างทางสถิติอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P >.05$ ภาคผนวกที่ 1 และภาคผนวกที่ 5)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



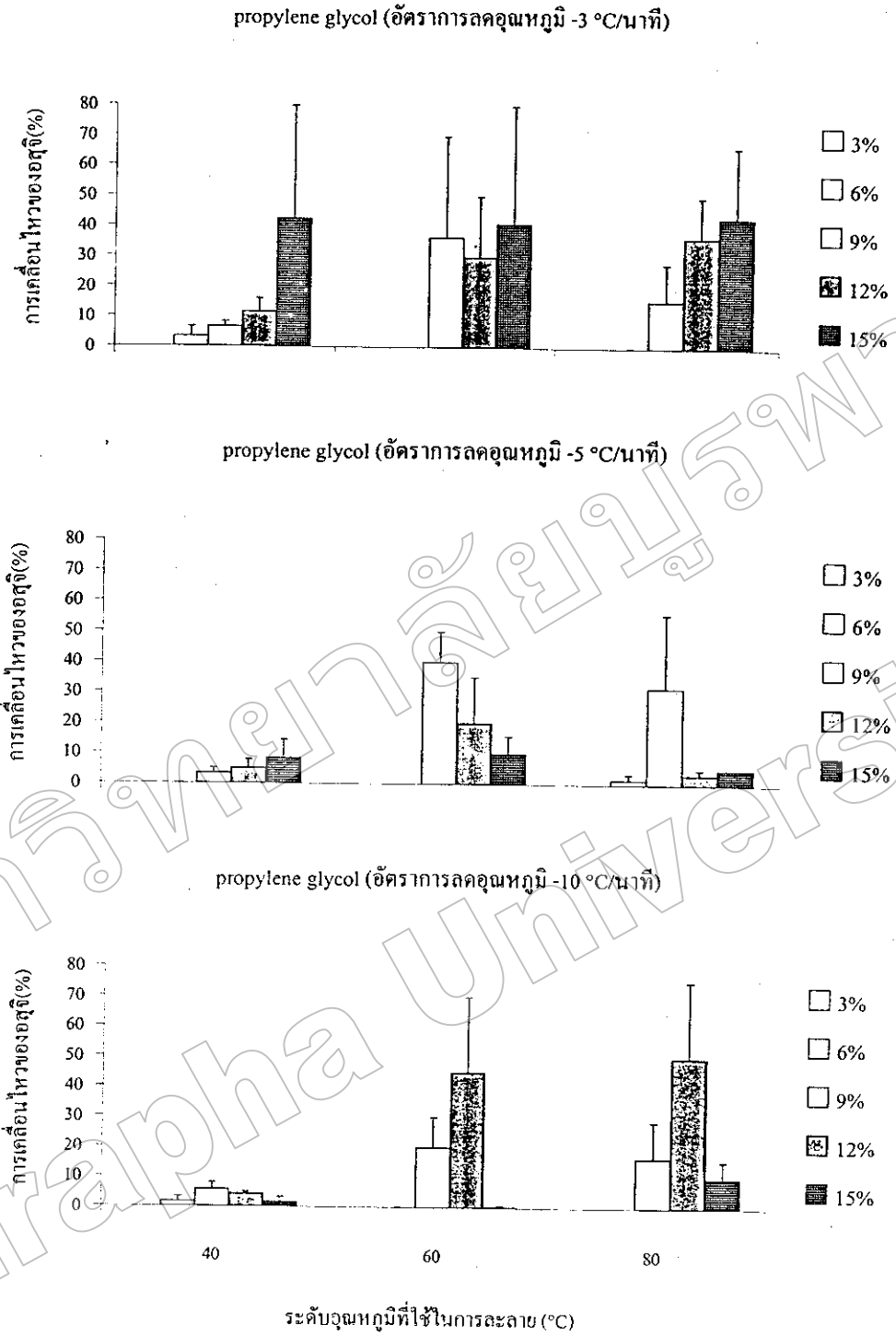

ภาพที่ 16 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลาสวายแช่แข็ง ในน้ำยาสูตร extender 7 ที่มี DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่ระดับความเข้มข้น 3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยวัดอัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียส/นาที ภายหลังการละลาย (ที่อุณหภูมิน้ำ 40, 60 หรือ 80 องศาเซลเซียส)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



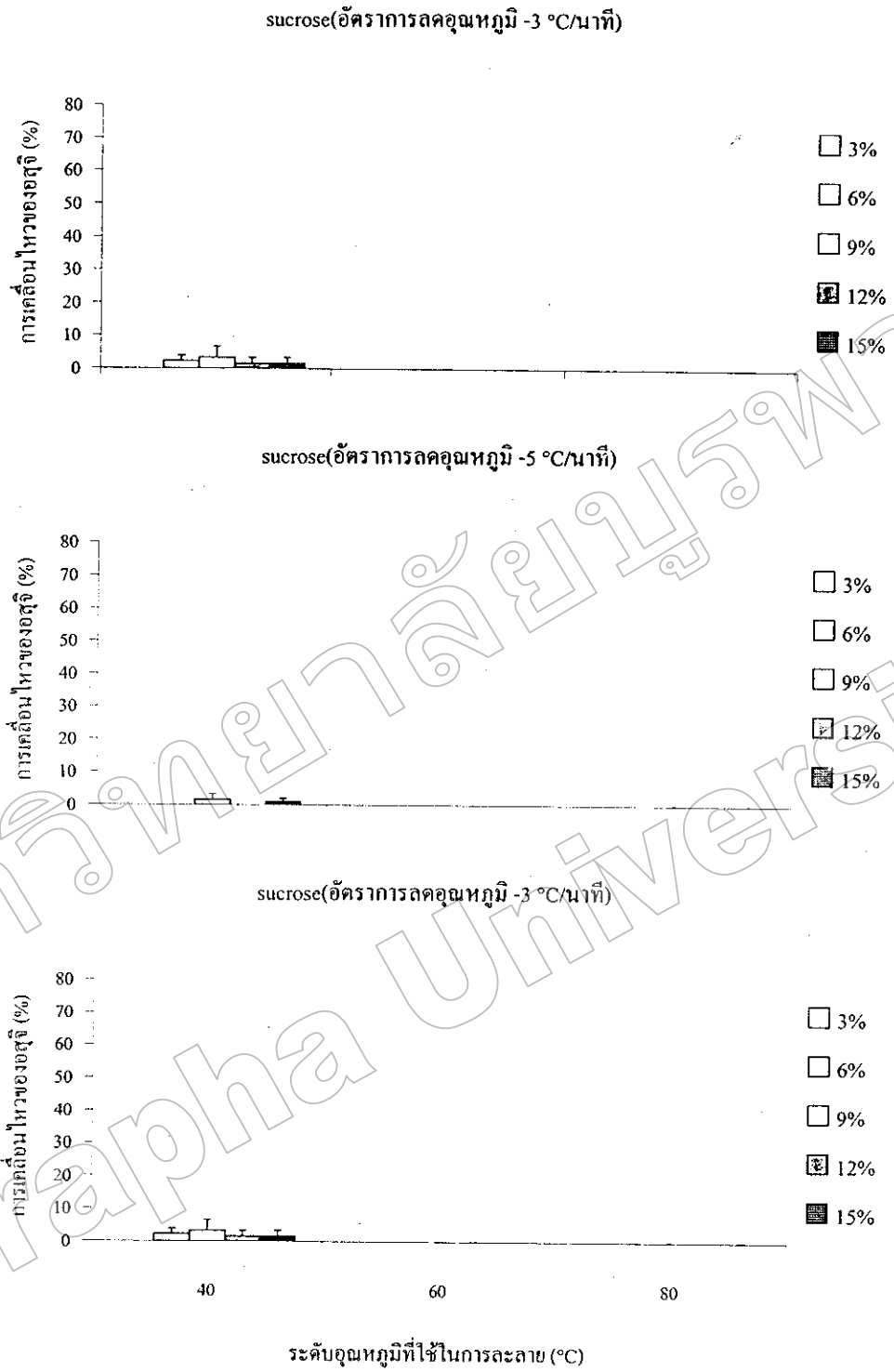

ภาพที่ 17 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลาสวายแช่แข็งนาน 7 วัน ในน้ำยาสูตร extender 7 ที่มี glycerol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่ระดับความเข้มข้น 3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ โดยวัดอัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียส ภายหลังการละลาย (ที่อุณหภูมิน้ำ 40, 60 หรือ 80 องศาเซลเซียส)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University




ภาพที่ 18 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลาสวายแช่แข็งนาน 7 วัน ในน้ำยาสูตร extender 7 ที่มี propylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่ระดับความเข้มข้น 3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยวัดอัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียส ภายหลังการละลาย (ที่อุณหภูมิน้ำ 40, 60 หรือ 80 องศาเซลเซียส)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University




ภาพที่ 19 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลาสวายแช่แข็งนาน 7 วัน ในน้ำยาสูตร extender 7 ที่มี sucrose เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่ระดับความเข้มข้น 3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ โดยวัดอัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียส ภายหลังการละลาย (ที่อุณหภูมิน้ำ 40, 60 หรือ 80 องศาเซลเซียส)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

*7.5 การศึกษาความสามารถในการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาเทโพที่ผ่านการแช่แข็ง*

การศึกษาอัตราการปฏิสนธิของไข่ปลาเทโพได้ใช้น้ำเชื้อปลาเทโพที่ผ่านการแช่แข็งด้วย DMSO และ glycerol เนื่องจากมีความเป็นพิษน้อยต่อสเปิร์ม

**การทดลอง 7.5.1** อัตราปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15%และ 20%

**ทำการทดลอง** การเก็บแช่แข็ง วันที่ 21 สิงหาคม 2545

การปฏิสนธิ วันที่ 27 สิงหาคม 2545

จากการประเมินอัตรา พบว่า น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15%และ20% ในทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้แม้ว่าโดยทั่วไปมีค่าต่ำกว่า 20% จากการตรวจสอบทางสถิติ พบว่าอัตราการปฏิสนธิของไข่เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO 10% ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับ DMSO 15%($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ DMSO 5% และ 20%($P<0.05$) ในขณะที่ DMSO 5%มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ DMSO 20% ($P<0.05$) (ภาพที่ 20) อัตราในการลดอุณหภูมิทั้ง 3 โปรแกรมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) สำหรับการปฏิสนธิของไข่สดกับน้ำเชื้อสด (control) มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิเป็น 82%

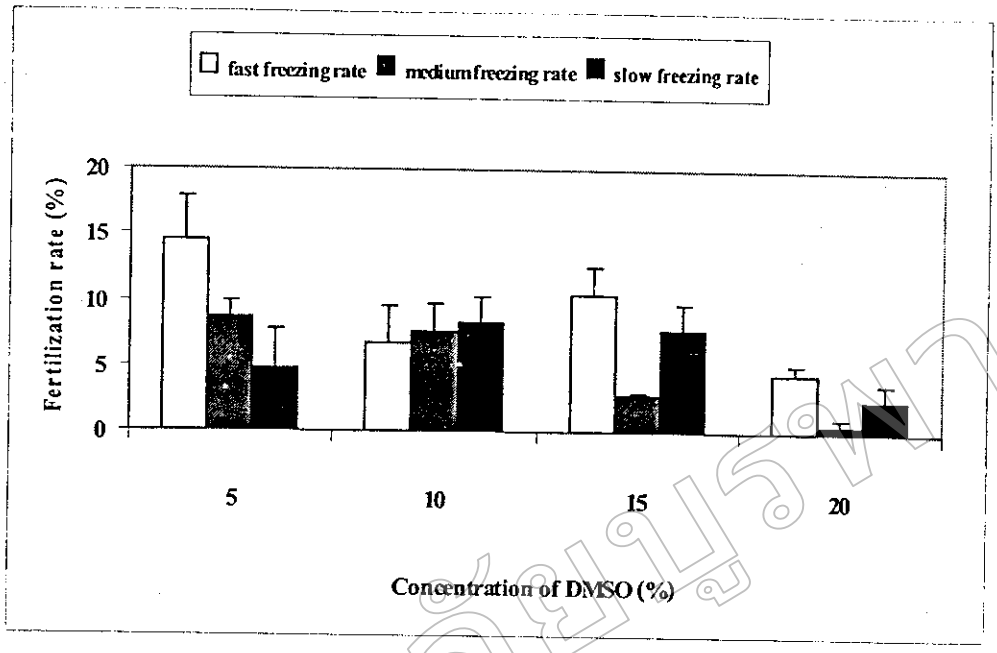
**การทดลอง 7.5.2** ทดสอบอัตราการปฏิสนธิของสารละลาย glycerol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15%และ20%

**ทำการทดลอง** การเก็บแช่แข็ง วันที่ 21 สิงหาคม 2545

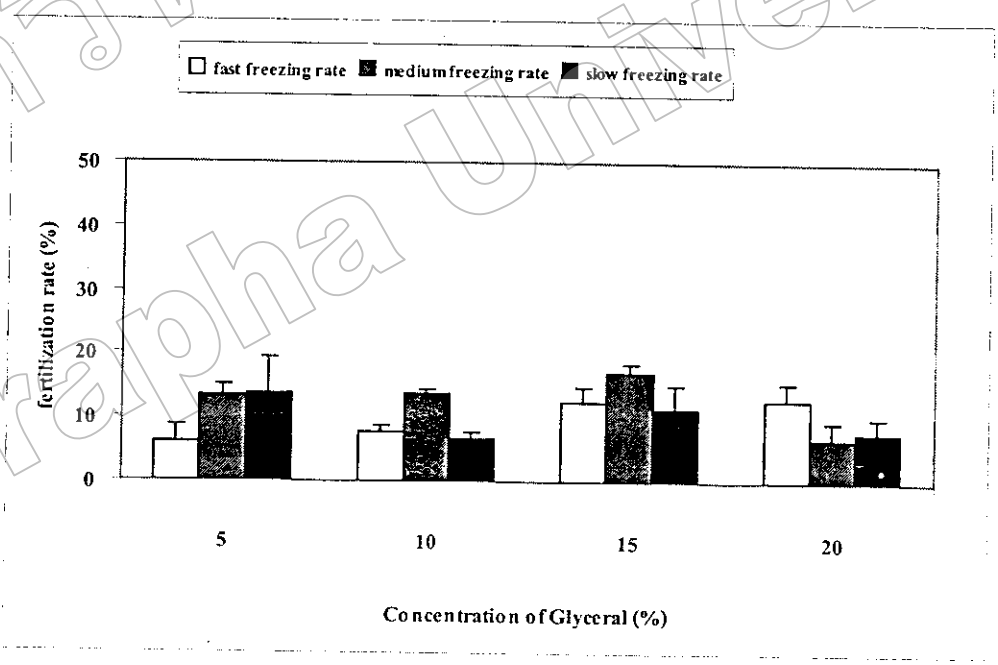
การปฏิสนธิ วันที่ 27 สิงหาคม 2545

จากการประเมิน พบว่า น้ำเชื้อปลาเทโพที่แช่แข็งในสารละลาย glycerol ความเข้มข้น 10%, 15%และ ในทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิสามารถปฏิสนธิไข่ปลาเทโพแม้ว่าจะมีอัตราการปฏิสนธิต่ำกว่า 20% (ภาพที่ 21) จากการตรวจสอบทางสถิติพบว่าความเข้มข้นของสารละลาย glycerol ที่ใช้ตั้งแต่ 5% ถึง 20% และอัตราในการลดอุณหภูมิทั้ง 3 โปรแกรมไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) สำหรับการปฏิสนธิของไข่สดกับน้ำเชื้อสด (control) มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิเป็น 82%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University




**ภาพที่ 20** เปอร์เซนต์อัตราการปฏิสนธิในปลาเทโพที่ได้รับการปฏิสนธิจากน้ำเชื้อปลาเทโพที่ผ่านการแช่แข็งในสารละลาย DMSO ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิและความเข้มข้นแตกต่างกัน




**ภาพที่ 21** เปอร์เซนต์อัตราการปฏิสนธิในปลาเทโพที่ได้รับการปฏิสนธิจากน้ำเชื้อปลาเทโพที่ผ่านการแช่แข็งในสารละลาย glycerol ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิและความเข้มข้นแตกต่างกัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

*7.6 การศึกษาความสามารถในการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาสวายที่ผ่านการแช่แข็ง*

การลดอุณหภูมิก่อนแช่แข็ง ด้วยเครื่อง freeze control ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียส/นาที ให้ผลการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งได้ไม่แตกต่างกัน จึงเลือกอัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส/นาที การละลายน้ำเชื้อแช่แข็งใน water bath ที่อุณหภูมิ 40, 60 และ 80 องศาเซลเซียส ให้ผลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มไม่แตกต่างกันจึงเลือกอุณหภูมิที่ระดับ 60 องศาเซลเซียส แช่นาน 10 วินาที และน้ำยาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งที่ผ่านมาทั้ง DMSO และ propylene glycol ให้ผลการทดลองที่ดีจึงเลือกมาใช้ในการทดสอบการปฏิสนธิ ส่วนสูตรที่ใช้ glycerol และ sucrose เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ทุกระดับความเข้มข้นในการทดลองช่วงแรก พบว่าภายหลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งในทุกการทดลอง น้ำเชื้อจะมีลักษณะทางกายภาพเปลี่ยนแปลงไป คือมีลักษณะแยกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่เป็นน้ำใสกับที่เป็นสีขาวข้นเหนียวคล้ายกาวไม่สามารถตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มได้

การทดสอบการปฏิสนธิไข่ปลาสวายด้วยน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งที่เก็บในน้ำยา extender 7 ที่มี DMSO หรือ propylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ทั้ง 5 ระดับความเข้มข้น คือ 3%, 6%, 9%, 12% และ 15% อัตราการลดอุณหภูมิที่ -5 องศาเซลเซียส/นาที อุณหภูมิที่ใช้ในการละลาย 60 องศาเซลเซียส ผสมกับไข่ปลาสวายสดจำนวนประมาณ 250 ฟอง เปรียบเทียบกับการผสมด้วยน้ำเชื้อสดเข้มข้น จากผลการศึกษาพบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวและเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P < .05$ ภาคผนวกที่ 6 และ 7) โดยที่ 3% DMSO มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว 86.67% $\pm$ 3.33% ที่ 6% และ 9% DMSO มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว 70.00% $\pm$ 11.55% และ 76.67% $\pm$ 6.67% ตามลำดับ (ตารางที่ 2) และมีการปฏิสนธิเพียงที่ 3% DMSO เท่ากับ 38.67% $\pm$ 1.20% ส่วนที่ 3 %และ 6% propylene glycol น้ำเชื้อภายหลังการละลายมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ คือมีลักษณะเป็นวุ้น ไม่สามารถตรวจเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวได้ ส่วนที่ 9%, 12% และ 15% propylene glycol มีเปอร์เซ็นต์ การเคลื่อนไหว 8.33% $\pm$ 1.67% , 6.67% $\pm$ 6.67% และ 0% ตามลำดับ และไม่มีการปฏิสนธิกับไข่เลยในทุกการทดลอง (ตารางที่ 3) สำหรับการปฏิสนธิของไข่สดกับน้ำเชื้อสด (control) มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิเป็น 100 เปอร์เซ็นต์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิในน้ำยาสูตร extender 7 ที่มีส่วนผสมของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (DMSO กับ propylene glycol) ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส/นาที ภายหลังการละลายที่อุณหภูมิน้ำ 60 องศาเซลเซียส

| cryoprotectant | concentration | Mean | Std. Error | N |
|---|---|---|---|---|
| DMSO | 3% | 86.67 | 3.33 | 3 |
| | 6% | 70.00 | 11.55 | 3 |
| | 9% | 76.67 | 6.67 | 3 |
| | 12% | .00 | 0.00 | 3 |
| | 15% | 1.67 | 1.67 | 3 |
| | Total | 47.00 | 10.44 | 15 |
| propylene glycol | 3% | .00 | 0.00 | 3 |
| | 6% | .00 | 0.00 | 3 |
| | 9% | 8.33 | 1.67 | 3 |
| | 12% | 6.67 | 6.67 | 3 |
| | 15% | .00 | 0.00 | 3 |
| | Total | 3.00 | 1.53 | 15 |

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งกับไข่ปลาสวายสด ในน้ำยาสูตร extender 7 ที่มีส่วนผสมของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (DMSO กับ propylene glycol) ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียสต่อนาที ภายหลังการละลายที่อุณหภูมิน้ำ 60 องศาเซลเซียส

| cryoprotectant | concentration | Mean | Std. Error | N |
|---|---|---|---|---|
| DMSO | 3% | 38.67 | 0.69 | 3 |
| | 6% | .00 | 0.00 | 3 |
| | 9% | .00 | 0.00 | 3 |
| | 12% | .00 | 0.00 | 3 |
| | 15% | .00 | 0.00 | 3 |
| | Total | 7.73 | 1.07 | 15 |
| propylene glycol | 3% | .00 | 0.00 | 3 |
| | 6% | .00 | 0.00 | 3 |
| | 9% | .00 | 0.00 | 3 |
| | 12% | .00 | 0.00 | 3 |
| | 15% | .00 | 0.00 | 3 |
| | Total | .00 | 0.00 | 15 |

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

**8. สรุปและอภิปรายผลการทดลอง**

จากการทดลองเพื่อหาชนิดของสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ ที่เหมาะสมที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพแบบแช่แข็งนั้นพบว่า สารละลาย DMSO และ propylene glycol มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มน้อยที่สุด เนื่องจากสเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่เมื่ออยู่ในสารละลายนาน 180 นาที ในขณะที่สารละลาย ethanol มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มมากที่สุด เนื่องจากเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ในทุกระดับความเข้มข้นมีค่าค่อนข้างต่ำและหยุดการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว

จากการเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ พบว่าสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ความเข้มข้น 10% จะมีความเป็นพิษต่อสเปิร์มปานกลางโดยสเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 180 นาที เช่นในสารละลาย propylene glycol, DMSO และ methanol มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 33.33%, 26.67 %และ 26.67% ตามลำดับ แต่ที่ความเข้มข้น 20% จะมีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 0% โดยใช้เวลาเพียง 10 นาที ในสารละลาย ethanol การใช้สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเข้มข้น 5% พบว่ามีความเป็นพิษต่อสเปิร์มปลาเทโพน้อยที่สุดเช่น 5% propylene glycol, 5% DMSO และ 5% methanol ส่วนสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีพิษมากที่สุดคือ 20 % ethanol ดังนั้นเมื่อใช้สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเข้มข้นสูงขึ้นและแช่นานขึ้นจะทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลง

จากการทดลองเก็บน้ำเชื้อปลาเทโพแบบแช่แข็งในน้ำยาสูตร C-F HBSS และสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ พบว่า สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5 % และ10 % ที่ระดับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดเท่ากับ 40 % รองลงมา คือ สารละลาย glycerol ความเข้มข้น 5 %, 10 % ที่ระดับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง ซึ่งมีเปอร์เซ็นการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 33.33 % และสารละลาย propylene glycol ความเข้มข้น 5 % ที่ระดับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลางมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มน้อยมากเท่ากับ 1.67 % ส่วนสารละลาย sucrose กับ DMSO+sucrose ความเข้มข้น 4 ระดับ (5%, 10%, 15%และ20 %) พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 0% เนื่องจากน้ำเชื้อรวมกันเป็นก้อนเหนียว และสารละลาย ethanol กับ methanol ความเข้มข้น 4 ระดับ (5%, 10%, 15%และ 20 %) ในทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ พบว่า ไม่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของ สเปิร์มเมื่อกระตุ้นด้วย 0.4 % NaCl

จากการทดลองการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาเทโพที่ผ่านการแช่แข็ง พบว่าน้ำเชื้อที่แช่ในสารละลาย 15 % glycerol, 5%DMSO และ10 % glycerol ในระดับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง อัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วและอัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง พบว่า มีเปอร์เซ็นต์อัตราการปฏิสนธิดีที่สุดเท่ากับ 17.06 %,14.50 % และ13.73 % ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ในสารทั้งหมด 6 ชนิดคือ DMSO, propylene glycol, glycerol , methanol , sucrose และ ethanol พบว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในสารละลายไครโอโพรเทคแทนต์ มีแนมโน้มมีค่าลดลงเมื่อเวลาและความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ซึ่งน่าจะเกิดจากความเป็นพิษของสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อสเปิร์ม (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้ สารละลาย 10 % propylene glycol , 10% DMSOและ 10% methanol มีผลทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่อยู่ได้นานกว่า 180 นาที ซึ่งเป็นระยะเวลาที่เพียงพอสำหรับในการทำให้น้ำเชื้ออยู่ในภาวะสมดุลเพื่อรอการแช่แข็ง (equilibration time)

จากการทดลองตรวจสอบความเป็นพิษของ methanol พบว่า ยังมีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในเวลา 180 นาที ดังนั้น methanol จึงเหมาะสมในการใช้เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ซึ่งจากการศึกษาของ ทัศนีย์ ภูมิทัศน์ (2532) ได้ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายไว้ในน้ำยา 2 สูตร และมีส่วนผสมของ methanol ร่วมด้วย มีอัตราส่วนระหว่างน้ำเชื้อต่อน้ำยาเท่ากับ 3:1 เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5 – 10 องศาเซลเซียส แล้วนำมาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ เมื่อครบ 72 ชั่วโมงและ 7 วัน พบว่า สูตรที่ 1 มีอัตราการเคลื่อนที่ 60% และ 40% ตามลำดับ และในสูตรที่ 2 มีอัตราการเคลื่อนที่เท่ากับ 50% และ40% ตามลำดับ นอกจากนี้ methanol ยังมีความสามารถในการแพร่เข้าสู่เซลล์ได้ดีและจะออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายต่อเซลล์ได้ดี เมื่อทำการแช่แข็งและใช้ในระดับที่มีความเข้มข้นค่อนข้างสูง (1-4 M) (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

จากการทดลองตรวจสอบความเป็นพิษของ sucrose พบว่า sucrose ยังมีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่เมื่อเวลา 180 นาที เนื่องจาก สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ในกลุ่ม sucrose เป็นน้ำตาลตัวหนึ่งที่นิยมใช้เพราะหาง่ายและราคาไม่แพง ในการทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (นลินี มารคแมน, 2527) ด้วยการแช่แข็งในน้ำยาที่ประกอบด้วย sucrose 250 mM ร่วมกับ DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ช่วยให้อัตราการเคลื่อนไหวและความสามารถในการผสมกับไข่ดีที่สุด นอกจากนั้นในขบวนการแช่แข็งตัวอ่อนของสัตว์นั้น ขณะทำการละลายเพื่อนำไปถ่ายฝาก จำเป็นต้องล้างหรือเจือจางด้วยสารละลายซูโครสเพื่อกำจัดพิษของไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ในการแช่แข็ง

จากการทดลองพบว่า การแช่แข็งน้ำเชื้อโดยใช้สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%และ10% ที่ระดับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว มีค่าเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 40% ซึ่งจากการศึกษาของ นลินี มารคแมนและคณะ (2526) ได้ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus*) แบบแช่แข็งในสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 2-8% ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง พบว่า 4%DMSO ให้ผลดีมีเปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิต 63%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

นลินี มารคแมนและคณะ(2526) ทดลองเก็บน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็ง พบว่า การใช้ 8% DMSOและ12% DMSO มีผลทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนไหวเท่ากับ 32.4%และ23.52%ตามลำดับ โดยการลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ

กฤษณ์ มงคลปัญญา (2530) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็งในสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 2-8% โดยทำการเก็บไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 90 นาทีก่อนทำการลดอุณหภูมิ การลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งทำโดยนำน้ำเชื้อมาแช่ไอไนโตรเจนในถังไนโตรเจนเหลวนาน 15 นาที แล้วจึงนำไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลว-196 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วย DMSO 2%, 4%,8% มีการเคลื่อนที่ 55.0±1.5%, 63±3.0% และ51.0±11.6% ตามลำดับ

ในการทดลองใช้สารละลาย sucrose และ DMSO+ sucrose ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเทโพพบว่ามีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่เท่ากับศูนย์ เนื่องจากน้ำเชื้อรวมกันเป็นก้อน ซึ่งคาดว่าอาจเกิดจากอัตราการลดอุณหภูมิไม่เหมาะสม อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาน้อยเกินไป และอุณหภูมิที่ใช้ละลายไม่เหมาะสม ซึ่งให้ผลตรงข้ามกับการทดลองของ Ciereszko และ Dabrowski (1966) ในปลา rainbow trout (*Oncoryhnchus mykiss*) ที่พบว่า การใช้ sucrose รวมกับ DMSO เป็นไครโอโพรเทคแทนท์ที่ให้ผลดีที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อ โดยมีอัตราการฟักในระยะ eyestage มากถึง 90% นอกจากนี้ Conget (1996) ศึกษาการเก็บน้ำเชื้อปลา rainbow trout แบบแช่แข็ง ก็พบว่า การใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 30°C ต่อนาที (ลดอย่างรวดเร็ว) มีผลทำให้น้ำเชื้อที่ผสมด้วย DMSO+ sucrose มีการเคลื่อนที่ประมาณ 63%

การทดลองใช้สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5% และ 15% ในระดับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว เท่ากับ 14.50% และ10.48% ตามลำดับซึ่งมีค่าน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากอัตราส่วนของสเปิร์มที่ใช้ในการปฏิสนธิกับไข่ (sperm to egg ratio) ยังมีค่าไม่เหมาะสม ทำให้สเปิร์มมีโอกาสที่จะปฏิสนธิกับไข่ได้น้อยลง จากการทดลองของ Ott และ Horton (1971) ที่ได้ทำการเก็บน้ำเชื้อปลา chinook salmon (*Oncomynchus tshawytstha*) และ coho salmon (*O. kisutch*) แบบแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว -196°C ด้วยน้ำยาที่มีส่วนผสมของ mannital และใช้ DMSO ความเข้มข้น 8% โดยภายหลังจากการเก็บแช่แข็งนาน 7 วัน นำน้ำเชื้อออกมาละลายผสมกับไข่สด ให้อัตราการปฏิสนธิ 79% Mounib (1978) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของปลา salmon และ cod พบว่า การใช้ 12.5% DMSO มีผลให้อัตราการปฏิสนธิเท่ากับ 80% และ59% ตามลำดับ Babiak และ Glogowsk (1998) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา *Aspius aspius* ในน้ำยา 6 สูตร พบว่า น้ำเชื้อที่ผสมกับน้ำยาสูตรที่ 1 3 และ5 ให้ผลการปฏิสนธิเท่ากับ 62±4% 59±5% และ49±4% ตามลำดับ ส่วนน้ำเชื้อที่ผสมกับน้ำยาสูตร 2 4 และ 6 เท่ากับ 31±4% 27±3% และ 37±2% ตามลำดับ การทดลองใช้สารละลาย glycerol ความเข้มข้น 15% และ 10% ในระดับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง พบว่า มีเปอร์

เซนต์อัตราการปฏิสนธิดีที่สุด เท่ากับ 17.06% และ13.73% ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Steyn และ Van (1987) ที่ได้ทำการศึกษาอัตราการปฏิสนธิของปลา sharptooth catfish โดยทำการเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว 14 วัน และ 16 เดือน ในการปฏิสนธิกับไข่ โดยใช้สูตรน้ำยา 9 สูตร พบว่าสูตรน้ำยาที่ผสมระหว่าง extender 4 และ 11% glycerol มีอัตราการปฏิสนธิ มีค่าเท่ากับ 41%

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อเป็นเกณฑ์ในการเลือกชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์และระยะสมดุลย์ (equilibration time) เพื่อใช้ในขั้นตอนแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวาย พบว่า glycerol เป็นพิษต่อสเปิร์มปลาสวายที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 6-15 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 30 นาที จึงไม่ควรนำ glycerol มาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวาย หรือควรใช้ในระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ และให้มี equilibration time เพียงช่วงสั้น ๆ 1-2 นาที หรือไม่มีเลย ส่วน propylene glycol, DMSO และ sucrose เป็นพิษต่อเซลล์น้อยกว่า glycerol ตามลำดับ คือ ภายใน 30 นาที ยังพบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มตั้งแต่ 77-97 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการทดลองการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายในครั้งนี้เพื่อเป็นการป้องกันอันตรายแก่สเปิร์มระหว่างกระบวนการแช่แข็ง สะดวกต่อการบรรจุน้ำเชื้อลงหลอดฟาง และขั้นตอนในการลดอุณหภูมิ ที่ต้องการลดอุณหภูมิของทุกระดับความเข้มข้นพร้อมกันในคราวเดียวต่อหนึ่งโปรแกรม จึงกำหนดให้ใช้ equilibration time ที่ 10 นาที ซึ่งน่าจะเป็นเวลาที่สารไครโอโพรเทคแทนท์แพร่เข้าสู่เซลล์แล้ว และเพื่อขจัดความแปรปรวนจากปัจจัยร่วมของชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่มีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อ จึงทำการทดสอบกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 4 ชนิด ที่ทุกระดับความเข้มข้นในขั้นตอนการลดอุณหภูมิ

โดยทั่วไปนิยมใช้ DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่นิยมใช้ในการแช่แข็งเซลล์สูงถึง 98 เปอร์เซ็นต์ของงานวิจัยที่เผยแพร่ และให้ผลในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งที่ดีที่สุด (Tiersch, 2000) เช่น การทดลองของ นลินี มารคแมน (2527), มงคลปัญญาและคณะ (Mongkonpunya *et al.*, 2000) และ นิศา ไชยรักษ์ (2539) และโดยระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 8-10 เปอร์เซ็นต์ (นิศา ไชยรักษ์, 2539) ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์และระยะเวลาสมดุลย์ (equilibration time) มีผลต่อสเปิร์มปลาแต่ละชนิดแตกต่างกัน เช่น การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกเทศ (*Clarias gariepinus*) พบว่าเมื่อใช้ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 5% ระยะเวลาสมดุลย์ 60 นาที สเปิร์มภายหลังการละลายมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวเฉลี่ย 40% (Steyn *et al.*, 1985) ในช่วงต่อมา (Steyn and Vuren, 1987) ใช้ glycerol ระดับความเข้มข้น 11% และระยะเวลาสมดุลย์ 20 นาที พบว่าสเปิร์มภายหลังการละลายสามารถปฏิสนธิกับไข่ มีเปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัวถึง 51.2% ซึ่งสูงกว่าการใช้ DMSO และ methanol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ในการทดลองเดียวกัน ส่วนในการทดลองของลินฮาร์ตและคณะ(Linhart *et al.*, 1993) ใช้ glycerol ระดับความเข้มข้น 10% ระยะเวลาสมดุลย์ 20 นาที ในการแช่แข็ง

น้ำเชื้อปลา European catfish (*Silurus glanis* L.) พบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์มมีเพียง 15% ในทำนองเดียวกันมงคลปัญญาและคณะ (Mongkonpunya *et al.*, 2000) เจือจางน้ำเชื้อปลาบึก (*Pangasianadon gigas* Chevey)ในน้ำยาเจือจาง calcium-free hank's balanced salt solution ที่มี DMSO หรือ methanol ที่ระดับ 5% หรือ 14% พบว่าการใช้ 5% DMSO ทำให้สเปิร์มของปลาบึกมีอัตราการเคลื่อนที่มากกว่าหรือเท่ากับ 50% ได้นาน 72 ชั่วโมง ขณะที่การใช้ 5% methanol มีการเคลื่อนที่ลดลงเร็วกว่า คือมีอัตราการเคลื่อนที่มากกว่าหรือเท่ากับ 50% ได้นาน 48 ชั่วโมง ส่วนที่ระดับ 14% ทั้ง DMSO และ methanol คงอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเป็น 0% ภายใน 20 นาที จะเห็นได้ว่าผลการทดลองที่ผ่านมามีความหลากหลายของวิธีการวิจัยและผลการวิจัยเป็นอย่างมาก

จากการทดลองเกี่ยวกับความเข้มข้นของ cryoprotectants ที่เหมาะสมก่อนที่จะนำไปใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาทำให้ทราบชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ รวมทั้งระยะเวลาสมดุลย์ เพื่อใช้ทำน้ำเชื้อแช่แข็ง จากการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิในขั้นตอนการแช่แข็งและระดับอุณหภูมิที่ใช้ละลายน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาสวายพบว่า ภายหลังการละลาย (thawing) มีเพียง DMSO ที่ทุกระดับความเข้มข้นและ propylene glycol ที่ 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์ที่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มได้ ส่วน sucrose ที่ทุกระดับความเข้มข้นและ propylene glycol ที่ 3 และ 6 เปอร์เซ็นต์ มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำเชื้อภายหลังการละลาย น้ำเชื้อมีลักษณะแยกเป็น 2 ส่วนๆ หนึ่งเป็นน้ำใส อีกส่วนหนึ่งข้นเหนียว ทำให้ไม่สามารถหาการเคลื่อนไหวของอสุจิได้ เช่นเดียวกับการทดลองของมงคลปัญญาและคณะ (Mongkonpunya et al., 2000) เมื่อใช้ 5% propylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ในการทำน้ำเชื้อปลากลุ่ม Pangasiidae พบว่าภายหลังการละลายน้ำเชื้อ มีลักษณะเป็นวุ้น(jelled) เป็นที่น่าสังเกตว่า ในการทดลองครั้งนี้ เมื่อใช้ propylene glycol ที่ระดับความเข้มข้นสูง ๆ ไม่ทำให้น้ำเชื้อแช่แข็งภายหลังการละลายมีลักษณะเป็นวุ้นเหมือนที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวยังไม่ทราบว่าเกิดจากสาเหตุใด

จากการตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อแช่แข็งที่มี DMSO และ propylene glycol (9, 12, 15%) เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ พบว่าอัตราการลดอุณหภูมิทั้ง 3 ระดับ ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของสเปิร์ม ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากอัตราการลดอุณหภูมิทั้ง 3 ระดับ มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยและเป็นอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ จนไม่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ นิศา ไชยรักษ์ (2539) ที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -10, -20 และ -30 องศาเซลเซียส/นาที พบว่า ที่อัตรา -10 และ -20 องศาเซลเซียส/นาที ในการทำน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการละลายไม่แตกต่างกัน และดีกว่าอัตรา -30 องศาเซลเซียส/นาที สำหรับอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งทั้ง 3 ระดับ ที่เวลาไม่เกิน 10 วินาทีของการทดลองครั้งนี้พบว่ามีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อไม่แตกต่างกัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อย่างไรก็ตามการผสมน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งกับไข่สดของปลาสวาย พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มภายหลังการละลายไม่มีความสัมพันธ์กับอัตราการฟัก (Mongkonpunya *et al.*, 2000) สำหรับการทดลองนี้จึงทำการผสมไข่สดกับน้ำเชื้อแช่แข็งจากทุกการทดลองซึ่งน้ำเชื้อภายหลังการละลายมีลักษณะไม่เป็นวุ้น ได้แก่การทดลองที่มี DMSO และ propylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ผลการทดลองพบว่า มีเพียง 3% DMSO ที่สามารถผสมกับไข่ได้ ส่วนการทดลองอื่นมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิเป็นศูนย์ ซึ่งขัดแย้งกับการทดลองของ อนงค์ หัมพานนท์ & กฤษณ์ มงคลปัญญา (2536) ในการทำน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งโดยเจือจางน้ำเชื้อปลาสวายในน้ำยาเจือจาง สูตร 0.85% NaCl หรือ CF-HBSS ซึ่งมี DMSO 8%, 10% หรือ 12% ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -10, -20 หรือ -30 องศาเซลเซียส/นาที และอุณหภูมิในการละลายที่ 50 หรือ 70 องศาเซลเซียส เมื่อตรวจเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและอัตราการปฏิสนธิกับไข่ปลาดุกอุย พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ระหว่างการใช้น้ำยา 0.85% NaCl หรือ CF-HBSS และอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งทั้งสามระดับ แต่แปรปรวนไปตามอัตราการลดอุณหภูมิอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ สำหรับอัตราส่วนของไข่ต่อสเปิร์มที่ใช้ในการผสมเทียมของการทดลองในครั้งนี้ มีค่าประมาณ 250 ฟองต่อ $7.6 \times 10^5$ ตัว หรือ $3 \times 10^3$ ตัวต่อฟอง (ความหนาแน่นของอสุจิปลาสวายที่มีผู้ศึกษาไว้คือ $7.6 \times 10^{10}$ ตัว/ml.) ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่ต่ำมากเมื่อเทียบกับการใช้น้ำเชื้อสด จึงอาจมีผลโดยตรงต่อเปอร์เซ็นต์การฟัก การเพิ่มปริมาณของน้ำเชื้อแช่แข็งในการผสมกับไข่สดอาจทำให้มีเปอร์เซ็นต์การฟักที่สูงขึ้น สำหรับอัตราส่วนที่เหมาะสมของเซลล์สเปิร์มต่อไข่มีความแตกต่างกันไปตามชนิดของปลา เช่น ปลา channel catfish คือ $1.25 \times 10^5$ ตัวต่อไข่ 1 ฟอง (Bart และ Dunham, 1996) ปลานิลควรใช้ $1.4 \times 10^5$ ตัวต่อไข่ 550 ฟอง (Rana และ McAndrew, 1989) อัตราส่วนน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งต่อไข่ปลาดุกอุยเท่ากับ $9.5 \times 10^6$ ตัวต่อไข่ 1 ฟอง (อนงค์ หัมพานนท์ & กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2538) เป็นต้น

*สรุปผลการทดลอง*

1. จากการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อน้ำเชื้อปลาเทโพพบว่า propylene glycol, DMSO และ methanol มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มปลาเทโพน้อยที่สุด และการใช้ DMSO ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเทโพที่ระดับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส/นาที) มีผลทำให้เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าดีที่สุด เท่ากับ 40% หลังจากทำการละลาย (thawing) น้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 70-80°C นาน 5 วินาที

2. จากการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อน้ำเชื้อปลาสวาย พบว่า glycerol ที่ความเข้มข้น 6%-15% มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มปลาสวายโดยทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ลด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ลงตามความเข้มข้นที่สูงขึ้นและระยะเวลาที่นานขึ้น จึงไม่ควรใช้เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ส่วน DMSO, propylene glycol และ sucrose ที่ความเข้มข้น 3%-15% ที่เวลา 30 นาที มีความเป็นพิษน้อยกว่า glycerol

3. อัตราการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อปลาสวายด้วย freeze control ที่ระดับอุณหภูมิ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียส/นาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

4. การละลายน้ำเชื้อปลาสวายที่แช่แข็งด้วยอุณหภูมิน้ำ 40, 60 และ 80 องศาเซลเซียส มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

5. ความสามารถในการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งกับไข่ปลาสวายสดพบว่า การใช้ 3% DMSO เท่านั้นที่สามารถทำให้ไข่มีการปฏิสนธิและมีการพัฒนาของไข่จนถึงระยะบลาสโตพอร์ปิด (เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส/นาที และละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส)

6. ชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการทำน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งคือDMSO และระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ควรอยู่ในช่วง 3%-9% เนื่องจากที่ความเข้มข้นในช่วงดังกล่าวพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

**8. เอกสารอ้างอิง**

กองเศรษฐกิจการประมง. (2540). สถิติผลผลิตการเลี้ยงสัตว์น้ำจืด ประจำปี 2540. เอกสารฉบับที่ 7/2000. กรมประมง.

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

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน. (2540). คุณภาพของอสุจิสดและอัตราการผสมของไข่ปลาไนยุโรปโดยน้ำเชื้อแช่แข็ง. วารสารการประมง, 50(1), 47 – 54.

สมปอง หิรัญวัฒน์. (2523). ชีวประวัติของปลาสวาย. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 3/2523 สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ กองประมงน้ำจืด กรมประมง. กรุงเทพฯ.

สมโภชน์ อังคะทวีวัฒน์, วิชัย ก้องรัตนโกศล, วสันต์ ศรีวัฒนะ, สนธิพันธุ์ ผาสุขดี, และ กาญจนรี พงษ์ฉวี. (2539). การลำเลียงปลาสวายโดยวิธีขนส่งทางอากาศ. วารสารการประมง, 49(6), 515 – 520.

ทัศนีย์ ภูพิพัฒน์. (2532). การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวและปลาสวาย (เอกสารวิชาการฉบับที่ 10). กรุงเทพฯ: สถาบันประมงน้ำจืด กรมประมง.

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

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

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

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

Bart, A. N., & Dunham, R. A. (1996). Effect of sperm concentration and number on fertilization efficiency with channel catfish (Ictalurus punctatus) egg and blue catfish (*I. punctatus*) spermatozoa. The riogenology, No. 45, 673 -- 682.

Ciereszko, A. and Dabrowski, K. (1996). Effect of sucrose – DMSO extender supplemented with pentoxifylline or blood plasma on fertilizing ability of cryopreserved rainbow trout spermatozoa. The Progressive Fish Culturist 58: 143 – 145.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

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.

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.

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

Mongkonpunya, K., Pupipat, T. and Tiersch, T. R. (2000). Cryopreservation for sperm of the Mekong giant catfish. In T. R. Tiersch, & P. M. Mazik (Eds.), Cryopreservation in aquatic species. (pp. 290-291). Baton Rouge, Louisiana: World Aquaculture Society.

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

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

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

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

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

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

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

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

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

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

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวกที่ 1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลาสวายแช่แข็งนาน 7 วัน ในน้ำยาสูตร extender 7 ที่มีส่วนผสมของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ทั้ง 4 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์โดยวัดอัตราการลดอุณหภูมิ (-3, -5 และ -10 องศาเซลเซียส ด้วย programmable freezing unit) ในการทดลองที่ 3.1 ภายหลังการละลาย (ที่อุณหภูมิน้ำ 40, 60 หรือ 80 องศาเซลเซียส)

| Source | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | *P |
|---|---|---|---|---|---|
| corrected model | 88435.209 | 179 | 494.051 | 2.843 | .000 |
| Intercept | 24387.461 | 1 | 24387.461 | 140.348 | .000 |
| Cryoprot | 23768.774 | 3 | 7922.925 | 45.596 | .000 |
| Concentr | 10708.372 | 4 | 2677.093 | 15.406 | .000 |
| Freezing | 1036.255 | 2 | 518.128 | 2.982 | .052 |
| Thawing | 127.182 | 2 | 63.591 | .366 | .694 |
| Cryoprot * concentr | 17654.024 | 12 | 1471.169 | 8.466 | .000 |
| Cryoprot * freezing | 2011.053 | 6 | 335.176 | 1.929 | .075 |
| Concentr * freezing | 2908.708 | 8 | 363.589 | 2.092 | .036 |
| Cryoprot * concentr * freezing | 8543.649 | 24 | 355.985 | 2.049 | .003 |
| Cryoprot * thawing | 2823.930 | 6 | 470.655 | 2.709 | .014 |
| Concentr * thawing | 1612.639 | 8 | 201.580 | 1.160 | .323 |
| Cryoprot * concentr * thawing | 5665.391 | 24 | 236.058 | 1.358 | .124 |
| Freezing * thawing | 2711.664 | 4 | 677.916 | 3.901 | .004 |
| Cryoprot * freezing * thawing | 5546.662 | 12 | 462.222 | 2.660 | .002 |
| Concentr * freezing * thawing | 1338.533 | 16 | 83.658 | .481 | .955 |
| Cryoprot * concentr * freezing * thawing | 8198.428 | 48 | 170.801 | .983 | .509 |
| Error | 60817.667 | 350 | 173.765 | | |
| Total | 170100.000 | 530 | | | |
| Corrected total | 149252.875 | 529 | | | |

R Squared = .593 (Adjusted R Squared = .384)

*P<.05 แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวกที่ 2 การเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิแช่แข็งนาน 7 วัน ในน้ำยาสูตร extender 7 ที่มีส่วนผสมของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ทั้ง 4 ชนิด ภายหลังการละลาย (ที่อุณหภูมิน้ำ 40, 60 หรือ 80 องศาเซลเซียส)

| cryoprotectant | N | mean ±SE |
|---|---|---|
| glycerol | 135 | 0.07 ±0.04 [a] |
| sucrose | 135 | 0.24 ±0.31 [a] |
| propylene glycol | 128 | 10.92 ±1.84 [b] |
| DMSO | 132 | 14.27 ± 2.05 [c] |

หมายเหตุ: ค่าใดที่ตามด้วยตัวอักษรซ้ำกันตัวใดตัวหนึ่งในแนวตั้งของแต่ละค่าในตาราง ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ P=.05

ภาคผนวกที่ 3 การเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิแช่แข็งนาน 7 วัน ในน้ำยาสูตร extender 7 ที่มีส่วนผสมของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ทั้ง 4 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 3, 6, 9, 12 และ 15 เปอร์เซ็นต์

| concentration | N | mean ±SE |
|---|---|---|
| 3% | 108 | 0.14 ±0.10 [a] |
| 6% | 108 | 4.41 ±1.25 [b] |
| 15% | 105 | 5.59 ±1.62 [bc] |
| 12% | 104 | 8.87 ±1.90 [c] |
| 9% | 105 | 12.61 ± 2.23 [d] |

หมายเหตุ: ค่าใดที่ตามด้วยตัวอักษรซ้ำกันตัวใดตัวหนึ่งในแนวตั้งของแต่ละค่าในตาราง ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ P=.05

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวกที่ 4 การเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิแช่แข็งนาน 7 วัน ในน้ำยาสูตร extender 7 ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -10 องศาเซลเซียส/นาที

| freezing rate | N | mean ±SE |
|---|---|---|
| 10(fast) | 178 | 5.01 ±1.08[a] |
| 5(medium) | 177 | 5.95 ±1.27[a] |
| 3 (slow) | 175 | 7.89 ±1.42[a] |

หมายเหตุ: ค่าใดที่ตามด้วยตัวอักษรซ้ำกันตัวใดตัวหนึ่งในแนวตั้งของแต่ละค่าในตาราง ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ P=.05

ภาคผนวกที่ 5 การเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิแช่แข็งนาน 7 วัน ในน้ำยาสูตร extender 7 ที่มีส่วนผสมของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ทั้ง 4 ชนิด ภายหลังการละลาย (ที่อุณหภูมิน้ำ 40, 60 หรือ 80 องศาเซลเซียส)

| thawing rate | N | mean ±SE |
|---|---|---|
| 40 | 178 | 5.83 ±1.20[a] |
| 60 | 172 | 6.13 ±1.28[a] |
| 80 | 180 | 6.84 ±1.31[a] |

หมายเหตุ: ค่าใดที่ตามด้วยตัวอักษรซ้ำกันตัวใดตัวหนึ่งในแนวตั้งของแต่ละค่าในตาราง ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ P=.05

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

190673



ภาคผนวกที่ 6 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิในน้ำยาสูตร extender 7 ที่มีส่วนผสมของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (DMSO และ propylene glycol) ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส/นาที ภายหลังการละลายที่อุณหภูมิน้ำ 60 องศาเซลเซียส

| Source | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | *P |
|---|---|---|---|---|---|
| Corrected Model | 36466.667 | 9 | 4051.852 | 56.537 | .000 |
| Intercept | 18750.000 | 1 | 18750.000 | 261.628 | .000 |
| Cryprote | 14520.000 | 1 | 14520.000 | 202.605 | .000 |
| Concentr | 10775.000 | 4 | 2693.750 | 37.587 | .000 |
| Cryprote * concentr | 11171.667 | 4 | 2792.917 | 38.971 | .000 |
| Error | 1433.333 | 20 | 71.667 | | |
| Total | 56650.000 | 30 | | | |
| Corrected total | 37900.000 | 29 | | | |

R Squared = .962 (Adjusted R Squared = .945)

*P<.05 แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ภาคผนวกที่ 7 เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งกับไข่ปลาสวายสด ในน้ำยาสูตร extender 7 ที่มีส่วนผสมของสารไครโอโพรเทคแทนท์(DMSO และ propylene glycol) ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส/นาที ภายหลังการละลายที่อุณหภูมิน้ำ 60 องศาเซลเซียส

| Source | Type III Sum of Squares | df | Mean Square | F | *P |
|---|---|---|---|---|---|
| Corrected Model | 4036.800 | 9 | 448.533 | 1035.077 | .000 |
| Intercept | 448.533 | 1 | 448.533 | 1035.077 | .000 |
| Cryprote | 448.533 | 1 | 448.533 | 1035.077 | .000 |
| Concentr | 1794.133 | 4 | 448.533 | 1035.077 | .000 |
| Cryprote * concentration | 1794.133 | 4 | 448.533 | 1035.077 | .000 |
| Error | 8.667 | 20 | .433 | | |
| Total | 4494.000 | 30 | | | |
| Corrected total | 4045.467 | 29 | | | |

R Squared = .998 (Adjusted R Squared = .997)

*P<.05 แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University