รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การพัฒนาศักยภาพในการจัดเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกไทย เพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์

Development of cryopreservation technology for seven-stripped carp (*Probarbus jullieni*) sperm for aquaculture and conservation

โดย

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[1]

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์[2]

[1]**ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์**

[2]**ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์**

มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๗

มหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาศักยภาพในการจัดเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกไทยเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์ ได้ศึกษาศึกษาชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกไทยแบบแช่แข็ง โดยได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ 4 ชนิด (dimethylsulfoxide; DMSO, ethylene glycol, propylene glycol และ sucrose) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 4 ระดับ (5%, 10%, 15% และ 20%) ที่เวลา 10, 20, 30, 60, 90, 120 และ 150 นาที และศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (-1, -3, -5 และ -7 องศาเซลเซียส/นาที) ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยที่ผ่านการแช่แข็ง ได้ผลการทดลองพบว่า DMSO มีความเป็นพิษน้อยที่สุด รองลงมา คือ ethylene glycol และ propylene glycol ตามลำดับ โดย sucrose มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มมากที่สุด การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยด้วยสารละลาย Ca-F HBSS ร่วมกับ DMSO, ethylene glycol และ propylene glycol แล้วนำมาเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว (อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส) ปรากฏว่า DMSO มีความเหมาะสมมากที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทย โดยการแช่แข็งด้วยการใช้ 10% DMSO และลดอุณหภูมิในอัตรา 5 องศาเซลเซียส/นาที หรือลดอุณหภูมิในอัตรา 7 องศาเซลเซียส/นาที ทำให้เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย (post-thaw sperm motility) มีค่าเฉลี่ยสูงไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ extender 7 ร่วมกับ DMSO, methanol และ propylene glycol) พบว่า การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส ให้ผลการทดลองดีกว่าการใช้อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส โดยเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายที่มีค่าสูงสุดได้จากชุดการทดลองที่ใช้สารละลาย 20% DMSO และลดอุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส การพัฒนาแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยด้วยไอไนโตรเจนเหลว สามารถทำได้ด้วยการแช่แข็งที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 4-6 เซ็นติเมตร โดยให้น้ำเชื้อปลายี่สกไทยสัมผัสไอไนโตรเจนเหลว 10 นาที น้ำเชื้อปลายี่สกไทยแช่แข็งที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 1 เดือนมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและศักยภาพในการปฏิสนธิไข่ปลายี่สกไทย ไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด สามารถนำมาใช้ประโยชน์เพื่อการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์ปลายี่สกไทยได้ต่อไป

Abstract

Development of cryopreservation technology for seven-stripped carp (*Probarbus jullieni*) sperm for aquaculture and conservation was investigated to generate baseline information of cryoprotectant toxicity on sperm motility and develop suitable freezing protocol. Four cryoprotectants (dimethylsulfoxide; DMSO, ethylene glycol, propylene glycol and sucrose) were selected to dilute milt at four final concentrations (5, 10, 15 and 20%). After exposure on milt for 10, 20, 30, 60, 90, 120 and 150 min., DMSO was shown to be the least toxic to sperm motility. Ethylene glycol and propylene glycol were more toxic to sperm motility while sucrose was the most toxic cryoprotectant. Freezing of milt with DMSO, ethylene glycol or propylene glycol using various freezing rates (-1, -3, -5 and -7^{o}C/min) was found that DMSO was the most appropriate cryoprotectant for cryopreservation of milt. Milt cryopreserved with 10% DMSO and frozen at the rate of -5 or -7^{o}C/min resulted in the highest post-thaw sperm motility comparable to those of fresh milt. Milt diluted with extender 7 were frozen with DMSO, methanol or propylene glycol to final temperatures -40 or -80^{o}C prior to plunging in liquid nitrogen. Highest post-thawed sperm motility was obtained from a treatment with 20% DMSO and freezing rate of -3^{o}C/min to -80^{o}C before storage in liquid nitrogen. Development of freezing of milt in liquid nitrogen vapor was successful by freezing 4-6 cm above liquid nitrogen surface for 10 min. Cryopreserved milt kept in liquid nitrogen for a month had comparable sperm motility and fertilization capacity with fresh milt, indicating the benefit of frozen milt of *P. jullieni* for use in aquaculture and conservation.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาศักยภาพในการจัดเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกไทยเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์ สำเร็จเรียบร้อยลงได้ โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๕-๒๕๕๗ จากโครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา โดยรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ฉบับนี้ เป็นผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ คุณภาพสเปิร์มของน้ำเชื้อปลายี่สกไทย ความเหมาะสมของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้แช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทย และการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยในลักษณะต่างๆเพื่อให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่หลังการละลาย ข้าพเจ้าขอขอบคุณ คุณเกรียงไกร เชี่ยวเอี่ยมวัฒนา และคุณสุเมธ ชมพูธวัช ที่ช่วยในการทดลอง และการวิเคราะห์สถิติ รวมทั้งศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดกาญจนบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์น้ำเชื้อพ่อพันธุ์ปลายี่สกไทยสำหรับการทดลอง และภาควิชาวาริชศาสตร์ และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ ระหว่างการศึกษาวิจัย ทำให้การวิจัยดำเนินการไปได้ตามวัตถุประสงค์ของโครงการ

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์

มีนาคม ๒๕๕๘

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ii

บทคัดย่อ..... iii

Abstract..... iv

สารบัญ..... v

สารบัญตาราง..... vi

สารบัญรูป..... vii

บทที่

1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย..... 1

2 การสำรวจเอกสาร..... 5

3 วิธีดำเนินการทดลอง..... 11

4 ผลการทดลอง..... 22

5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง..... 38

เอกสารอ้างอิง 47

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณภาพน้ำเชื้อปลายี่สกไทยในช่วงระหว่างเดือนตุลาคมและธันวาคม.....	22
2	เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยในสารละลาย DMSO.....	23
3	เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยในสารละลาย ethylene glycol.....	24
4	เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยในสารละลาย propylene glycol.....	25
5	เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยในสารละลาย sucrose.....	26
6	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยที่แช่แข็งใน DMS0 ที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส.....	27
7	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยที่แช่แข็งใน ethylene glycol ที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส.....	28
8	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยที่แช่แข็งใน propylene glycol ที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส.....	29
9	เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยที่แช่แข็งด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์และอัตราการลดอุณหภูมิต่างกันที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส...	31
10	เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยที่แช่แข็งด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์และอัตราการลดอุณหภูมิต่างกันที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส...	33
11	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยหลังการแช่แข็งในถังโฟมที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวต่างๆกัน.....	35
12	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยหลังการแช่แข็งในปริมาณต่างกัน.....	36
13	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยแช่แข็งที่เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวนาน 6 เดือน.....	37

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	พ่อพันธุ์ปลายี่สกไทย.....	13
2	การรวบรวมพ่อพันธุ์ปลายี่สกไทยมาใช้ในการทดลอง.....	13
3	การฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการสร้างน้ำเชื้อปลายี่สกไทย.....	14
4	การรีดน้ำเชื้อปลายี่สกไทย.....	14
5	การรวบรวมน้ำเชื้อใสในหลอดฟาง.....	20
6	การปิดหลอดฟางก่อนการแช่แข็ง.....	20
7	การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยด้วยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ.....	21
8	การตัดหลอดฟางเพื่อประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยหลังแช่แข็ง.....	21

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย

ปลายี่สกไทย จัดเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งของไทยที่หาได้ยากในธรรมชาติ และอยู่ในสภาวะเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ไปจากธรรมชาติ เป็นปลาน้ำจืดมีเกล็ดขนาดใหญ่ของไทย รองจากปลากะโห้ มีขนาด 80-100 เซนติเมตร เคยมีรายงานพบปลายี่สกไทยที่จังหวัดกาญจนบุรีขนาดใหญ่ยาว 1.35 เมตรน้ำหนัก 40 กิโลกรัม ปลาชนิดนี้หากินอยู่ระดับกลางน้ำและพื้นท้องน้ำ กินพืชในน้ำเป็นอาหารหลัก เช่น ตะไคร่น้ำ และพืชน้ำ แต่อาจกินลูกกุ้ง ลูกหอย ลูกปู และไรน้ำด้วย ในปัจจุบันแหล่งที่มีปลายี่สกไทยมากที่สุด คือ แม่น้ำโขงบริเวณจังหวัดหนองคาย และจังหวัดนครพนม รองลงมาได้แก่แม่น้ำน่าน จังหวัดอุตรดิตถ์ ส่วนที่แม่น้ำแคว จังหวัดกาญจนบุรี แม่น้ำแม่กลอง จังหวัดราชบุรี แม่น้ำป่าสัก จังหวัดลพบุรี แทบจะไม่มีปลายี่สกเหลืออยู่เลย ปลายี่สกไทยที่จับได้จากธรรมชาติมีปริมาณลดลง เนื่องจากแหล่งน้ำอันเป็นที่อยู่อาศัยของสัตว์น้ำเสื่อมโทรมไปตามธรรมชาติและความเจริญของบ้านเมือง เช่น การสร้างเขื่อนกั้นน้ำ การสร้างถนน การสร้างโรงงานอุตสาหกรรม และการปล่อยของเสียลงในแม่น้ำลำคลอง ทำให้เกิดน้ำเสีย เป็นอันตรายต่อพันธุ์สัตว์น้ำ จนทำให้ในขณะนี้ปลายี่สกไทยจัดเป็นปลาที่ใกล้สูญพันธุ์ตามบัญชีของ IUCN Red list (IUCN, 1990)

ปลายี่สกไทยจัดเป็นปลาที่อยู่ในครอบครัว Cyprinidae เช่นเดียวกับ ปลาตะเพียน ปลาตะโกก ปลากะโห้ ปลานวลจันทร์น้ำจืด และปลาสร้อย มีราคาสูงมาก โดยในแต่ละบริเวณเรียกชื่อปลายี่สกไทยแตกต่างกันออกไปตามถิ่นที่อยู่อาศัย เช่น ที่แม่น้ำโขงจังหวัดหนองคาย เรียก "ปลาเอิน" หรือ "ปลาเอนคางหมู" ในท้องที่บางแห่งเรียกปลาชนิดนี้ว่า "ปลายี่สกทอง" "กะสก" หรือ "อีสก" บริเวณแม่น้ำน่าน เรียกว่า "ปลาชะเอิน" และที่จังหวัดเชียงราย เรียกว่า "ปลาเสือ" ปลายี่สกไทยมีลักษณะเด่นของปลาที่เป็นเอกลักษณ์ไทยและมีลักษณะสวยงาม คือ สีของลำตัวเป็นสีเหลืองนวล ลำตัวค่อนข้างกลมและยาว บริเวณด้านข้างมีแถบสีดำข้างละ 7 แถบ พาดไปตามความยาวของลำตัว ทำให้มีชื่อสามัญว่า seven-stripped carp และมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Probarbus jullieni* ปลายี่สกไทยมีหนังหนา เนื้อเหลือง ละเอียดอ่อน นิ่ม รสหวาน ประกอบอาหารได้หลายอย่าง เช่น ต้มยำแกงเหลือง ทอดมัน เป็นต้น

การเพาะขยายพันธุ์ปลายี่สกไทยประสบความสำเร็จในการผสมเทียมปลายี่สกไทยเมื่อปี พ.ศ.2517 โดยสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดหนองคาย โดยใช้พ่อแม่พันธุ์ที่รวบรวมจากแม่น้ำโขง และเมื่อเดือนมกราคม 2533 สถานีฯ สามารถใช้พ่อแม่พันธุ์ปลายี่สกไทยที่เลี้ยงในบ่อดินมาทำการเพาะพันธุ์ประสบผลสำเร็จเป็นครั้งแรกด้วยการฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์ (suprefact) ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์ (motillium) และในปัจจุบันก็ยังมีการเพาะพันธุ์ปลาชนิดนี้ที่สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดเลย สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดมุกดาหาร และล่าสุดก็สามารถเพาะพันธุ์โดยใช้พ่อแม่พันธุ์ปลายี่สกไทยที่เลี้ยงในบ่อซีเมนต์ในปี พ.ศ. 2552 โดยสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดราชบุรี (สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด 2553) อย่างไรก็ตามในแหล่งน้ำธรรมชาติ เช่นแม่น้ำโขง ปลายี่สกไทยวางไข่ในฤดูหนาว เริ่มตั้งแต่ปลายเดือนธันวาคมถึงเดือนกุมภาพันธ์ของทุกปี โดยจะอยู่รวมกันเป็นฝูงใหญ่ ๆ ฝูงละ 30 - 40 ตัว บริเวณที่วางไข่อยู่ท้ายเกาะกลางน้ำ และไข่ปลายี่สกไทยเป็นไข่ประเภทจมติดกับวัตถุ มีสีเหลือง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร แม่ปลาหนัก 14 กิโลกรัม รังไข่หนัก 2.4 กิโลกรัม มีไข่ประมาณ 500,000 ฟอง ไข่ฟักเป็นตัวภายใน 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิน้ำ 23 องศาเซลเซียส

การเลี้ยงปลายี่สกไทยสามารถหาพันธุ์ปลาที่จะเลี้ยงได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ หรือซื้อพันธุ์ปลาจากหน่วยราชการของกรมประมง ซึ่งได้ลูกปลาจากการผสมเทียมในแต่ละปี แต่ในขณะนี้ปริมาณการผลิตลูกปลายี่สกไทยไม่เพียงพอกับความต้องการของผู้เลี้ยง ประกอบกับปริมาณปลาในแหล่งน้ำธรรมชาติมีน้อยลงอย่างมากจนเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ จึงควรที่จะมีการส่งเสริมทั้งด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และการอนุรักษ์สัตว์น้ำเพื่อให้ปลาชนิดนี้ยังคงอยู่ เพื่อให้มีผู้สนใจเลี้ยงปลายี่สกไทยให้มากขึ้น และเป็นประโยชน์ต่อผู้ประกอบการต่อไปเพื่อทดแทนการจับจากธรรมชาติ ซึ่งนับวันจะมีจำนวนน้อยลงทุกที รวมทั้งการเพาะพันธุ์ปลายี่สกไทยคืนถิ่นเสริมแห่งน้ำธรรมชาติก็สามารถช่วยอนุรักษ์พันธุ์ปลาชนิดนี้ไว้ก่อนที่จะสูญพันธุ์ไปจากประเทศไทย

แนวทางที่เหมาะสมในการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์ปลายี่สกไทย สามารถทำได้โดยการนำน้ำเชื้อปลายี่สกไทยมาแช่แข็ง แล้วจัดเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส) ในลักษณะของธนาคารน้ำเชื้อ (sperm bank) ซึ่งสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีได้นานเป็นปีๆโดยที่คุณภาพสเปิร์มยังดีเหมือนน้ำเชื้อสด ซึ่งเมื่อใดก็ตามที่แม่พันธุ์ปลายี่สกไทยมีความพร้อม มีไข่แก่และมีการตกไข่ ก็สามารถนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีอยู่ในธนาคารน้ำเชื้อมาผสมเทียมกับไข่ได้ลูกปลายี่สกไทยที่ต้องการ ด้วยเหตุที่พ่อแม่พันธุ์ปลายี่สกไทยก็ค่อนข้างหาได้ยากมากขึ้นทุกวันจากแหล่งน้ำธรรมชาติ อีกทั้งในระหว่างการเพาะพันธุ์ปลาชนิดนี้ก็จะมีปัญหามากในประเด็นที่มักจะได้พ่อแม่พันธุ์ที่จับได้จากธรรมชาติที่มีไข่แก่ หรือน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีไม่พร้อมกัน ทำให้การเพาะพันธุ์ไม่ประสบผลสำเร็จ เพราะมีแต่ไข่ หรือน้ำเชื้ออย่างเดียวเท่านั้น อีกทั้งก็ยังพบบ่อยครั้งว่าพ่อพันธุ์หรือแม่พันธุ์ที่จับได้ก็อาจตายระหว่างการจับ หรือลำเลียงปลา ทำให้การเพาะพันธุ์ปลาใกล้บริเวณใกล้แหล่งผสมพันธุ์วางไข่ทำได้ยาก อย่างไรก็ตามแม้ว่าการเลี้ยงขุนพ่อแม่พันธุ์ปลายี่สกไทยในบ่อดินจะได้มีการดำเนินการในสถานีประมงน้ำจืด แต่ก็ยังจำกัดอยู่ในบางพื้นที่เท่านั้น ซึ่งการเลี้ยงขุนปลายี่สกไทยให้เป็นพ่อแม่พันธุ์ที่ดีนั้นต้องใช้เวลาเลี้ยงหลายปี และมีโอกาสที่พ่อแม่พันธุ์จะมีโอกาสติดโรค หรือตายลงไปบางส่วนจากโรคระบาด หรืออุบัติเหตุต่างๆ ซึ่งถ้าเมื่อใดพ่อพันธุ์ปลายี่สกไทยที่เลี้ยงขุนภายในฟาร์มเริ่มมี หรือผลิตน้ำเชื้อได้แล้วก็ควรที่จะรีดน้ำเชื้อบางส่วนออกจากพ่อพันธุ์ปลาแล้วรีบนำมาแช่แข็ง แล้วจัดเก็บรักษาไว้ในธนาคารน้ำเชื้อทันที เพราะโดยทั่วไปแล้วในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ พ่อพันธุ์ปลาสามารถสร้างน้ำเชื้อได้ตลอดเวลา เมื่อน้ำเชื้อบางส่วนถูกรีดออกไป ก็สามารถสร้างขึ้นมาทดแทนใหม่ได้ทันทีในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (Jackson and Sullivan, 1995; Shangguan and Crim, 1995; Mylonas et al., 1997) และก็มีรายงานวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าพ่อพันธุ์ปลาหลายชนิดที่มีน้ำเชื้อจำนวนมาก แต่ไม่ได้นำพ่อพันธุ์ปลาตัวนั้นมาเพาะพันธุ์ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ก็จะทำให้น้ำเชื้อหมดหายไปจากตัวพ่อพันธุ์ปลาในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์ทันที เช่น ปลา trout ปลา turbot ปลา seabass (Büyükhatipoglu and Holtz, 1984; Zohar et al., 1984; Suquet et al., 1992) ดังนั้นในขณะที่พ่อพันธุ์ปลายี่สกไทยในฟาร์มมีน้ำเชื้อ ก็ควรรีดน้ำเชื้อมาแช่แข็งเอาไว้ เพื่อสามารถผสมเทียมกับไข่ปลายี่สกไทยเมื่อใดก็ได้ที่มีแม่ปลายี่สกไทยที่มีความพร้อม มีไข่แก่ หรือจัดหาแม่พันธุ์ที่เหมาะสมได้ในขณะที่อาจไม่มีพ่อพันธุ์ที่เหมาะสม ก็สามารถใช้น้ำเชื้อปลายี่สกไทยแช่แข็งที่มีอยู่มาผสมเทียม ทำให้สามารถใช้น้ำเชื้อปลายี่สกไทยได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

ในประเทศไทยการศึกษาเกี่ยวกับการเก็บน้ำเชื้อสัตว์น้ำแบบแช่แข็งยังมีอยู่น้อยมากเมื่อเทียบกับการศึกษาในต่างประเทศ เนื่องจากสัตว์น้ำส่วนใหญ่ที่พบในประเทศไทยมักจะมีน้ำเชื้อที่สมบูรณ์ดีตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และหาได้ง่ายจึงทำให้ผู้เพาะพันธุ์สัตว์น้ำไม่นิยมเก็บน้ำเชื้อสัตว์น้ำแช่

การเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำแบบแช่แข็งจะมีความสำคัญต่อการพัฒนาด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ แต่การศึกษาด้านการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำแบบแช่แข็งในประเทศไทยยังมีค่อนข้างน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยทางด้านอื่นๆของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งมีการพัฒนาอย่างมากเทียบเท่าในต่างประเทศ การเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำแบบแช่แข็งกล่าวโดยสรุปทำโดยการนำเอาน้ำเชื้อสัตว์น้ำที่มีคุณภาพดีมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (sperm extender) พร้อมกับใส่สารที่ป้องกันไม่ให้เซลล์เป็นอันตรายในระหว่างการแช่แข็งซึ่งเรียกว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์(cryoprotectant) แล้วจึงเอาไปบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อพร้อมกับลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ก่อนที่จะเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ซึ่งสามารถรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อสัตว์น้ำได้เป็นเวลานานเป็นปีๆ อย่างไรก็ตามในขณะนี้ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานถึงการแช่แข็งน้ำเชื้อยี่สกไทย และด้วยเหตุที่ปลายี่สกไทย เป็นสัตว์น้ำของไทยที่หาได้ยาก ใกล้สูญพันธุ์ และยังเป็นปลาที่มีลักษณะพิเศษเป็นเอกลักษณ์ของไทย ซึ่งจำเป็นต้องมีการวิจัยแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยเพื่อการเพาะเลี้ยง และการอนุรักษ์ เพื่อให้การเลี้ยงปลาชนิดนี้มีความยั่งยืน และเพื่อป้องกันไม่ให้สูญพันธุ์ไปจากประเทศไทย จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาเทคนิควิจัยเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ปลายี่สกไทยให้เกิดประโยชน์สูงสุด ดังนั้นโครงการวิจัยเรื่องนี้จึงได้มุ่งพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยเพื่อให้มีน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีคุณภาพดีที่สามารถเก็บรักษาไว้ไว้ได้นานเป็นปี และสามารถผสมเทียมกับไข่ได้เพื่อประโยชน์การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์ต่อไป

วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

1. ศึกษาชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกไทยแบบแช่แข็ง

2. ศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยที่ผ่านการแช่แข็ง

3. ศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยที่เก็บรักษาแช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลว

4. เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกไทยแบบแช่แข็งเพื่อประโยชน์การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และการอนุรักษ์

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกไทยแบบแช่แข็ง ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการพัฒนางานวิจัยเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาน้ำจืดชนิดอื่นๆที่อยู่ในครอบครัวเดียวกับปลายี่สกไทยต่อไปในอนาคต เช่นปลานวลจันทร์น้ำจืด เป็นต้น

2. ทำให้ทราบถึงชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทย ทำให้การเพาะพันธุ์ปลายี่สกไทยมีความสะดวกขึ้นและใช้เซลล์สเปิร์มอย่างมีประสิทธิภาพ

3. ได้พัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกไทยแบบแช่แข็งเพื่อการผสมเทียมไข่ปลายี่สกไทย โดยสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกไทยได้ในระยะเวลาที่นานขึ้นเป็นปีเพื่อใช้ประโยชน์สูงสุดในการผสมเทียมปลายี่สกไทย การอนุรักษ์พันธุ์ปลาที่เป็นเอกลักษณ์ของไทย รวมทั้งเป็นการเพิ่มศักยภาพในการปรับปรุงพันธุ์ หรือการคัดเลือกพันธุ์ โดยการเก็บน้ำเชื้อที่ดีไว้ในลักษณะ sperm bank ซึ่งสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีนี้ไปยังนักวิชาการประมง และเกษตรกรผู้เพาะพันธุ์ปลายี่สกไทย หรือปลาชนิดอื่นๆต่อไป

หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ได้แก่ ภาควิชาวาริชศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา และโครงการบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และ หน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการเพาะขยายพันธุ์ปลายี่สกไทย เช่น กรมประมง ซึ่งมีสถานีประมงน้ำจืด/ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดทั่วประเทศ ที่สามารถนำผลงานวิจัยที่ได้ไปประยุกต์ใช้ได้ทั้งในด้านการเพาะพันธุ์ และการอนุรักษ์พันธุ์ปลายี่สกไทยที่ยังคงมีอยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติของประเทศให้คงไว้ไม่ให้สูญพันธุ์ โดยข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้ยังสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเพิ่มเติมและงานวิจัยทั้งในระดับปริญญาโทและปริญญาเอกทางด้านวาริชศาสตร์ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และวิทยาศาสตรชีวภาพของมหาวิทยาลัยบูรพาต่อไปในอนาคต รวมทั้งสามารถใช้เป็น database งานวิจัยของกลุ่มวิจัยการเก็บรักษาน้ำเชื้อของสัตว์น้ำเพื่อการอนุรักษ์ และการผสมเทียมของมหาวิทยาลัยบูรพา

บทที่ 2
การสำรวจเอกสาร

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ชีววิทยาปลายี่สกไทย

ปลายี่สกไทย มีชื่อเรียกแตกต่างออกไปตามท้องถิ่นต่าง ๆ เช่น เอิน สะเอิน หรือ เอินตาแดง ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ หรือยี่สกทอง หรือ อีสก หรือ กะสก ในแถบแม่น้ำน่าน และที่จังหวัดเชียงรายเรียกว่า ปลาเสือ เป็นต้น ปลายี่สกไทยมีชื่อสามัญว่า seven-stripped carp มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Probarbus jullieni* จัดอยู่ในวงศ์ปลาตะเพียน (Cyprinidae) เป็นปลาน้ำจืดขนาดใหญ่ หัวค่อนข้างโต สีของลำตัวเป็นสีเหลืองนวล ลำตัวค่อนข้างกลมและยาว มีหนวดสั้นที่ขากรรไกรบน 1 คู่ ปากเล็กยืดหดได้ อยู่คล้อยลงมาใต้ส่วนหัว สีของลำตัวเหลือง มีแถบสีดำ 7 แถบพาดไปตามความยาวของลำตัว เวลากินอาหารทำปากยืดหดได้ เยื่อม่านตาเป็นสีแดงเรื่อ ๆ ครีบหลัง ครีบหู ครีบท้อง ครีบก้นมีสีชมพูแทรกอยู่ กับพื้นครีบ ซึ่งเป็นสีเทาอ่อน หางค่อนข้างใหญ่และเว้าลึก

ปลายี่สกไทยเป็นปลาที่อยู่ในครอบครัว Cyprinidae เช่นเดียวกับ ปลาตะเพียน ปลาตะโกก ปลากะโห้ ปลานวลจันทร์น้ำจืด และปลาสร้อย มีราคาสูงมาก เมื่อเทียบกับจำพวกปลาน้ำจืดที่มีอยู่ในประเทศไทย ราคากิโลกรัมละ 80-100 บาท ปลายี่สกไทยมีหนังหนา เนื้อเหลือง ละเอียดอ่อน นิ่ม รสหวาน ประกอบอาหารได้หลายอย่าง เช่น ต้มยำ ต้มเค็ม แกงเหลือง ทอดมัน ทอดฟู นึ่ง รมควัน เจี๋ยน นึ่งกับเครื่องปรุงแบบจีน และชุบแป้งทอด (สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, 2553)

การพัฒนาทางเพศของปลาในฤดูผสมพันธุ์วางไข่พบว่า ปลาตัวผู้จะเปลี่ยนสีลำตัวเป็นสีคล้ำอมม่วงและมีตุ่มสิว (pearl organ) ขึ้นบริเวณข้างแก้มและครีบอก ในแม่น้ำโขงปลายี่สกไทยผสมพันธุ์วางไข่ในฤดูหนาวระหว่างเดือนธันวาคมถึงกุมภาพันธ์ของทุกปี โดยอยู่รวมกันเป็นฝูงใหญ่ ๆ ฝูงละ 30 - 40 ตัว บริเวณที่วางไข่อยู่ท้ายเกาะกลางน้ำ ขนาดใหญ่ที่สุดเท่าที่พบมีความยาว 1 เมตร และมีน้ำหนักถึง 40 กิโลกรัม แต่ปลาส่วนใหญ่ที่จับได้มักมีความยาวประมาณ 60-90 เซนติเมตร น้ำหนัก 6-18 กิโลกรัม พบตามแหล่งน้ำใหญ่ของภาคกลาง ภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น แม่น้ำโขง แม่น้ำน่าน แม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำท่าจีน แม่น้ำแม่กลอง การกินอาหารตามธรรมชาติของปลายี่สกไทยพบว่า ปลากินหอย ปู พืชน้ำ ตะไคร่น้ำ ไรน้ำ และสัตว์หน้าดิน ไข่ปลายี่สกไทยมีลักษณะเป็นไข่จมติดกับวัตถุ มีสีเหลือง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร แม่ปลาหนัก 14 กิโลกรัม รังไข่หนัก 2.4 กิโลกรัม มีไข่ประมาณ 500,000 ฟอง ไข่ฟักเป็นตัวภายใน 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิน้ำ 23 องศาเซลเซียส (สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, 2553)

2. ชีววิทยาของน้ำเชื้อสัตว์น้ำ

น้ำเชื้อ (semen) ของสัตว์น้ำประกอบด้วยเซลล์สเปิร์ม (spermatozoa) และน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม (seminal fluid) เหมือนที่พบในสัตว์ทั่วไป น้ำเชื้อปลามีชื่อเฉพาะที่เรียกว่า milt ซึ่งปลาสร้างขึ้นมาและเก็บไว้ในอัณฑะ (testis) อย่างไรก็ตามสเปิร์มของปลามีความแตกต่างจากสเปิร์มของสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆตรงที่สเปิร์มของปลาไม่มีอะโครโซม (acrosome) ที่บริเวณหัวสเปิร์มเพื่อใช้ในการย่อยผิวไข่ เนื่องจาก ไข่ปลามีช่องไมโครไพล์ (micropyle) ซึ่งเป็นทางผ่านของสเปิร์มอยู่

สเปิร์มของปลาประกอบด้วยส่วนต่างๆ 3 ส่วนได้แก่ 1.) ส่วนหัว (head) มีขนาดและรูปร่างแตกต่างกันไปตามชนิดของปลา โดยในส่วนหัวมีนิวเคลียส (nucleus) ที่มี ดีเอ็นเอ (DNA) เป็นสารพันธุกรรมเพื่อปฏิสนธิกับนิวเคลียสของไข่ สเปิร์มของปลากระดูกแข็งส่วนมากไม่มีอะโครโซมตามที่กล่าวมาแล้ว เช่น ปลาดุก ปลากะพงขาว ปลาแซลมอน ปลาไน เป็นต้น แต่ปลาบางชนิดเท่านั้นมีอะโครโซม เช่น ปลา herring เป็นต้น 2.) ส่วนกลาง (middle piece) เป็นส่วนของสเปิร์มที่อยู่ติดกับส่วนหัวโดยจะมีไมโทคอนเดรีย (mitochondria) จำนวนมาก ทำหน้าที่ให้พลังงานแก่สเปิร์มในระหว่างการเคลื่อนที่ และ 3.) ส่วนหาง (tail) เป็นส่วนที่มีลักษณะยาว และในส่วนหางจะมีไฟบริล (fibril) อยู่ทั้งหมด 11 คู่ อยู่ตรงกลาง 2 คู่ และอยู่โดยรอบ 9 คู่ใน ปลาบางชนิดเช่น ปลาแซลมอน ปลาเทร้า ปลาเพรช ปลาเพิช เป็นต้น พบว่า บริเวณปลายหางสเปิร์มจะเล็กลงเรียกว่า end piece

ปลากระดูกแข็งส่วนมากมีสเปิร์มที่มีส่วนหัวเป็นรูปทรงกลม (spherical) หรือทรงรี (ovate หรือ acorn-shape) โดยส่วนหัวมีขนาดประมาณ 2-3 ไมโครเมตรและความยาวสเปิร์มจากหัวจนถึงปลายหางแตกต่างกันไป ส่วนกลางมีขนาดเล็ก และส่วนใหญ่มีหางจำนวน 1 หาง (วีรพงศ์, 2536)

3. การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา

น้ำเชื้อปลาขณะที่ยังอยู่ในตัวปลา สเปิร์มจะไม่เคลื่อนที่ (immotile) แต่เมื่อปลาเพศผู้ปล่อยน้ำเชื้อออกมาในน้ำขณะผสมพันธุ์วางไข่ สเปิร์มจะเคลื่อนที่ทันทีเพื่อปฏิสนธิกับไข่ ดังนั้นเซลล์สเปิร์มของปลาจะไม่เคลื่อนที่เมื่อยังอยู่ในตัวปลาหรือเมื่อรีดน้ำเชื้อสดออกมาใหม่ๆ แต่เซลล์สเปิร์มจะมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว เมื่อน้ำเชื้อถูกกระตุ้นด้วยสารละลายที่เหมาะสม เช่นน้ำเชื้อปลาผสมกับน้ำภายนอกขณะที่พ่อแม่พันธุ์ปลาผสมพันธุ์วางไข่ตามธรรมชาติ หรือเมื่อนำเอาหยดเล็กๆ ของน้ำเชื้อผสมกับหยดน้ำบนแผ่นกระจกสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะทำให้เซลล์สเปิร์มถูกกระตุ้นให้มีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว อันเป็นผลเนื่องมาจากน้ำเชื้อถูกกระตุ้นขณะเจือจาง ซึ่งทำให้ค่าแรงดันออสโมติกเปลี่ยนไป อย่างไรก็ตามการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาน้ำจืดเมื่อถูกกระตุ้นจะสิ้นสุดลงอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาไม่เกิน 1 นาที หรืออาจใช้เวลาหลายชั่วโมงสำหรับน้ำเชื้อปลาทะเลเมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำทะเลให้เคลื่อนที่และหยุดเคลื่อนที่ กลไกที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาน้ำจืดพบว่าระดับค่าแรงดันออสโมติกที่ต่ำกว่าระดับที่พบในน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม (seminal fluid) เป็นปัจจัยหลักที่ทำให้สเปิร์มปลาน้ำจืดเคลื่อนที่ (hypo-osmolality) แต่กลไกที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาทะเลนั้น ระดับค่าแรงดันออสโมติกที่สูงกว่าระดับที่พบในน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม (seminal fluid) เป็นปัจจัยหลักที่ทำให้สเปิร์มปลาทะเลเคลื่อนที่ (hyper-osmolality) (Morisawa et al., 1983) ดังนั้นการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อปลาโดยใช้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เป็นหลัก จึงต้องกระทำภายในทันทีทันใดที่น้ำเชื้อปลาผสมกับสารละลายบนกระจกสไลด์

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม นิยมใช้ในการพิจารณาถึงคุณภาพน้ำเชื้อปลา เนื่องจากทำได้รวดเร็ว และสะท้อนถึงคุณภาพสเปิร์มได้ดี แม้ว่าการประเมินด้วยการคาดคะเน เป็นระดับการเคลื่อนที่แตกต่างกัน (subjective estimation) จะให้ความเที่ยงตรงต่ำกว่าการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มด้วยการใช้เครื่องมือวิเคราะห์คุณภาพสเปิร์ม (computer-assisted sperm analysis;

การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาขึ้นอยู่กับปัจจัยที่มากระตุ้นจำนวนมาก เช่น ชนิดของแร่ธาตุที่มากระตุ้น และอุณหภูมิน้ำที่กระตุ้น เป็นต้น ดังการทดลองต่อไปนี้

Alavi et al. (2007) ศึกษาผลของ K^+ และ Ca^{2+}ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา *Perca fluviatilis* พบว่า Ca^{2+} มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยความเข้มข้นที่ 2.5 mM มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเพิ่มขึ้น และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ Ca^{2+} เท่ากับ 5.0 mM เมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่ 2.5 mM ส่วน K^+ พบว่าความเข้มข้นของ K^+ ที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มโดยสเปิร์มจะเริ่มเคลื่อนที่เมื่อความเข้มข้นของ K^+ เท่ากับ 40 mM และจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อความเข้มข้นของ K^+ เท่ากับ 80 mM สรุปได้ว่าอัตราการเจือจางของ K^+ และ Ca^{2+} มีผลต่อการเลื่อนที่ ความเร็วในการเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่เคลื่อนที่

Alavi and Cosson (2005) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่และการรอดชีวิตของสเปิร์มพบว่าระยะเวลาในการเคลื่อนที่ การปฏิสนธิ และอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มขึ้นอยู่กับการกระตุ้นด้วยอุณหภูมิ เพราะประสิทธิภาพของสเปิร์มปลามีอยู่อย่างจำกัด อัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิในสารละลายเพิ่มขึ้น ซึ่งจะทำให้ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสั้นลง และเมื่อลดอุณหภูมิมีผลทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่ช้าลงและระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มนานขึ้น โดยศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา *Siberian sturgeon* พบว่าระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม จะเคลื่อนที่ลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 10 องศาเซลเซียส จนถึง 17.5 องศาเซลเซียส และปลาฉลามปากเป็ด (*Polyodon spathula*) สามารถเคลื่อนที่ได้ 4 นาที แต่มีเพียง 1-5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่สามารถเคลื่อนที่ได้ถึง 6 นาที ที่ 10-12 องศาเซลเซียส

4. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา

การเก็บรักษาสเปิร์ม หรือน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง เป็นการเก็บเซลล์สเปิร์ม หรือน้ำเชื้อแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีนี้มีความเกี่ยวข้องกับตัวแปรต่อไปนี้ได้แก่ การเลือกใช้สูตรน้ำยาที่เหมาะสมที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อ (sperm extender) ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant; สารที่ช่วยป้องกันการเสียหายของเซลล์ในกระบวนการแช่แข็ง) ระยะสมดุล (equilibration time; ช่วงเวลาหลังจากผสมน้ำเชื้อกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ก่อนทำการแช่แข็ง) และอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน (2545) ได้ศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ปลาจากน้ำเชื้อแช่แข็งในปลา Brown trout ปลาไน ปลาบึก ปลาเทพา ปลากระโห้ และปลาดุกรัสเซีย ผลการศึกษาปรากฏว่า สารละลายที่เหมาะสมในการเก็บอสุจิแช่แข็งที่ให้อัตราการผสมดีที่สุดของปลา Brown trout ประกอบด้วย NaCl 750 mg Glucose 5,400 mg และ DMSO 10% ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ให้อัตราการผสมระหว่าง 33-59% การแช่แข็งน้ำเชื้อในรูปเม็ดใช้ได้สะดวกและอัตราการผสมดีกว่าในรูปหลอดฟาง การละลายเพื่อการผสมเทียมไม่ควรเกิน 10 วินาที 2) ปลาไน สารประกอบที่มีความเข้มข้นมากกว่า 1,200 mOsm/kg มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่และอัตราการผสมของน้ำเชื้อ 3) ปลาบึก การใช้ DMSO ในการแช่แข็งไม่ควรเกิน 10% อัตราน้ำเชื้อต่อสารประกอบควรใช้ 1:3 4) ปลาเทพา สารละลายที่เหมาะสมประกอบด้วย NaCl 750 mg , KCl 100 mg , Glucose 100 mg และ DMSO 10% ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร 5) ปลากระโห้ อัตราการลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งควรอยู่ระหว่าง 10-15 องศาเซลเซียส ต่อนาที แรงดันออสโมติกของน้ำเชื้ออยู่ระหว่าง 250-300 mOsm/kg 6) ปลาดุกรัสเซีย ระดับการเคลื่อนที่ของอสุจิเคลื่อนที่ได้นานที่สุด 45 วินาทีเมื่อถูกกระตุ้น

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

ทัศนีย์ ภูพิพัฒน์ และคณะ (2529) แช่แข็งน้ำเชื้อปลาบึกแบบโดยใช้ 8%DMSO ด้วยวิธีการแช่แข็งในไอไนโตรเจนเหลวนาน 15 นาที นำมาเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวนาน 4 เดือน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายเท่ากับ 60%

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

Yavas and Bozkurt (2011) ได้แช่แข็งน้ำเชื้อปลาเฉาฮื้อในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร แล้วนำมาละลายที่อุณหภูมิ 30, 35, 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10, 20, 30 วินาที ปรากฏว่าสเปิร์มมีการเคลื่อนที่สูงสุดหลังการละลายเมื่อละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 วินาที

Vuthiphandchai et al. (2009a) ได้พัฒนาวิธีการการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*) ด้วยการใช้สาร cryoprotectants 10 ชนิดที่ 4 ระดับความเข้มข้นโดยลดอุณหภูมิแตกต่างกัน 2 รูปแบบด้วยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ พบว่า น้ำเชื้อปลากะพงแดงที่อยู่ในสภาวะสมดุล (equilibration period) ใน dimethylsulfoxide 10% นาน 10

Irawan et al. (2010) ศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ สารไครโอโพรเทคแทนท์และวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน ด้วยการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 6 ชนิด และสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด ด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาทีก่อนเก็บในไนโตนเจนเหลว พบว่าน้ำเชื้อที่เจือจางด้วย common carp sperm extender (CCSE2) และ DMSO มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด และยังพบว่าการแช่แข็งน้ำเชื้ออย่างง่าย โดยนำน้ำเชื้อมาแช่แข็งเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2 เซนติเมตร นาน 10 นาทีมีผลทำให้สเปิร์มยังคงมีการเคลื่อนที่สูงกว่า 90%หลังการละลาย (post-thaw sperm motility)

Linhart et al. (2000) ได้แช่แข็งน้ำเชื้อของปลาไนโดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส/นาที จาก 4 องศาเซลเซียส ถึง -9 องศาเซลเซียส แล้วใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 11 องศาเซลเซียส/นาที จาก -9 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลวนาน 1 สัปดาห์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งมีความแตกต่างกันโดยน้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 78 ± 18% และน้ำเชื้อแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 69 ± 14%

Suquet et al. (1998) ได้แช่แข็งน้ำเชื้อปลา turbot (*Psetta maxima*) โดยใช้ 10% DMSO ร่วมกับ 10% BSA แล้วเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว 9 เดือน พบว่า น้ำเชื้อแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายอยู่ในช่วง 60 - 90%

Conget et al. (1996) ใช้สาร cryoprotectant ชนิดต่างๆในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา rainbow trout พบว่า การใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) ร่วมกับ sucrose ให้ผลดีที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อ โดยระยะเวลาที่เจือจางน้ำเชื้อใน cryoprotectant ก่อนทำการแช่แข็งไม่ควรเกิน 10 นาที และการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งอย่างรวดเร็ว (30 องศาเซลเซียส/นาที) มีผลทำให้สเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงกว่าการลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ (1 องศาเซลเซียส/นาที และ 10 องศาเซลเซียส/นาที)

Tiersch et al. (1994) ได้นำน้ำเชื้อปลา channel catfish มาแช่แข็งโดยผสมสาร cryoprotectant ต่างๆชนิด โดยใช้สารละลาย Hank's balanced salt solution ลงไปเจือจางน้ำเชื้อ พบว่า methanol ให้ผลดีที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อโดยสเปิร์มมีการเคลื่อนที่ และมีความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่เทียบเท่ากับการใช้น้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ๆมาผสมเทียม

Gwo et al. (1991) ได้แช่แข็งน้ำเชื้อปลา Atlantic croaker พบว่า sperm extender ที่ประกอบด้วย เกลือแกง กลูโคส และ ซูโครส สามารถใช้เจือจางน้ำเชื้อขณะทำการแช่แข็ง โดยมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ sperm extender ชนิดอื่นๆ ที่มีความสลับซับซ้อน หรือมีสารเคมีหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ และยังพบว่าอัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็งตั้งแต่ -10 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง -150 องศาเซลเซียส/นาที ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิขณะนำมาผสมเทียมกับไข่

Rana and McAndrew (1989) รายงานการแช่แข็งน้ำเชื้อปลานิลโดยเจือจางน้ำเชื้อในสารละลาย Ringer ที่มี methanol เป็น cryoprotactant ที่ระดับต่างๆกัน แล้วบรรจุน้ำเชื้อใน

Bolla et al. (1987) ศึกษาผลของอัตราการเพิ่มอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งของปลา Atlantic halibut ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่าอัตราการละลายที่เหมาะสมน้ำเชื้อปลา Atlantic halibut มีค่าอยู่ในช่วงกว้าง คือ 10-40 องศาเซลเซียส/นาที

บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

บีกเกอร์ขนาดต่างๆ
ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 250 และ 500 มิลลิลิตร
ไมโครปิเปตขนาดต่างๆ
กระดาษกรอง
เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer)
เครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (Controlled-rate programmable freezer)
กล้องจุลทรรศน์
Osmometer
Hemacytometer
ถังเก็บไนโตรเจนเหลวขนาดใหญ่ (dewar)
ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ
ตู้ autoclave
ตู้อบเครื่องแก้ว (hot air oven)
Glass micropipette ขนาด 5,10 และ 100 ไมโครลิตร
French Straw 0.25 และ 0.5 มิลลิลิตร
Cryovial 1.5 มิลลิลิตร
Canister
canes
Vial tubes
rack
Tissue culture flasks
Thermocouple probe thermometer (K-type, HI 91530K, Hanna Instruments Inc.)
ไนโตรเจนเหลว
พ่อพันธุ์ปลายี่สกไทย
สารเคมีประเภทต่างๆที่ใช้ในการแช่แข็ง และการย้อมสี

วิธีดำเนินการทดลอง

1. <u>การรวบรวมพ่อพันธุ์ปลายี่สกไทยและการรวบรวมน้ำเชื้อ</u>

พ่อพันธุ์ปลายี่สกไทย (รูปที่ 1) ถูกรวบรวมจากบ่อดินในฟาร์มเลี้ยง (รูปที่ 2) โดยอดอาหารก่อนการรวบรวมพ่อพันธุ์ปลาเป็นเวลา 1 วัน พ่อพันธุ์ปลาถูกรวบรวมโดยการลากอวนในตอนเช้า แล้วคัดเลือกเฉพาะพ่อพันธุ์ที่มีน้ำเชื้อไหลออกมา (spermiation) ขณะกดรีดเบาๆบริเวณท้อง (hand stripping) มาใช้ในการทดลอง พ่อพันธุ์ที่ได้คัดเลือกถูกลำเลียงนำมาพักไว้ในบ่อภายในโรงเพาะฟัก เพื่อให้ปลาปรับตัวก่อนการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นด้วย suprefact (gonadotropin-releasing hormone analogue; GnRHa) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักปลา และ motillium (dopamine antagonist) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักปลาเพื่อกระตุ้นให้ปลามีน้ำเชื้อในปริมาณที่มากขึ้น (รูปที่ 3) การรีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ปลาได้ทำหลังการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นผ่านไปประมาณ 6 ชั่วโมง โดยนำพ่อพันธุ์ปลามาล้างรอบบริเวณท้องให้สะอาดด้วยน้ำจืด เช็ดท้องให้แห้ง แล้วกดบริเวณรอบๆช่องเพศ (urogenital pore) เพื่อให้ปัสสาวะออกมามากที่สุดก่อนการรวบรวมน้ำเชื้อ (รูปที่ 4)

การรวบรวมน้ำเชื้อ ทำโดยจับพ่อพันธุ์ปลา จากนั้นใช้มือกดบริเวณรอบๆช่องเพศ เพื่อสังเกตุว่ามีปัสสาวะ (urine) ออกมาปนเปื้อนพร้อมน้ำเชื้อ (milt) หรือไม่ เนื่องจากปัสสาวะกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ ทำให้เมื่อนำน้ำเชื้อปลามาแช่แข็งจะประสบความล้มเหลวทันที เพราะน้ำเชื้อมีคุณภาพต่ำตั้งแต่เริ่มการทดลอง ซึ่งปัสสาวะสามารถกระตุ้นสเปิร์มให้เคลื่อนที่ ทำให้สเปิร์มไม่มีพลังงานเหลืออยู่ ทำให้สเปิร์มที่ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่เมื่อนำมาแช่แข็ง (freezing) จะไม่เคลื่อนที่หลังการละลาย (thawing) แม้ว่าจะมี protocol การแช่แข็งน้ำเชื้อที่ดีเพียงใด ดังนั้นในระหว่างการรวบรวมน้ำเชื้อปลายี่สกทย ถ้าเห็นว่ามีปัสสาวะไหลออกมากดรอบๆช่องเพศ ทำการรีดปัสสาวะออกให้ได้มากที่สุด (clearance of urinary bladder) แล้วจึงค่อยรวบรวมน้ำเชื้อปลาด้วยการรีดท้องปลา ตั้งแต่ใต้บริเวณครีบอกมาจนถึงช่องเพศปลา เพื่อให้ได้น้ำเชื้อในปริมาณที่มากพอกับชุดการทดลองต่างๆ น้ำเชื้อที่ไหลออกมาทางช่องเพศปลาแต่ละตัวถูกรวบรวมเข้าไปในหลอดฉีดยา (syringe) ขนาด 5 มิลลิลิตรที่สะอาด แล้วนำไปประเมินคุณภาพสเปิร์ม ซึ่งถ้ามีคุณภาพเหมาะสม ทำการเทน้ำเชื้อของปลารวมกันภายในจานเลี้ยงเชื้อ (petri disc) ที่สะอาดที่วางบนน้ำแข็ง (crushed ice) ทำให้ได้น้ำเชื้อจากปลาหลายตัวรวมกัน (pooled milt) เพื่อลดความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อ (individual variation of sperm quality) ซึ่งนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อปลาพิจารณาจาก parameter ที่สำคัญ ได้แก่การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (sperm motility) การมีชีวิตของสเปิร์ม (sperm viability) ความหนาแน่นของสเปิร์ม (sperm density) และความดันออสโมติกของน้ำเชื้อ (sperm osmolality) น้ำเชื้อที่คุณภาพดีของปลาแต่ละตัวที่นำมาใช้ในการทดลอง ต้องเป็นน้ำเชื้อที่มีลักษณะขาวขุ่น และไม่มีเมือก หรือ เลือดปน และมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่สูง (มากกว่า 80เปอร์เซ็นต์) น้ำเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ไม่นำมาใช้ในการทดลอง เพื่อให้มั่นใจว่าขณะเริ่มการทดลองน้ำเชื้อปลามีคุณภาพที่ดีพอที่จะนำไปพัฒนาวิธีการแช่แข็งต่อไป พ่อพันธุ์ปลายี่สกไทยที่มีน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดี ผ่านหลักเกณฑ์ที่กำหนดไว้ ถูกรวบรวมและวางไว้บนน้ำแข็งอย่างมากไม่เกิน 20 นาทีก่อนเริ่มการทดลองเพื่อศึกษาผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่สเปิร์ม หรือการแช่แข็งน้ำเชื้อในทุกชุดการทดลองต่อไป

รูปที่ 1 พ่อพันธุ์ปลายี่สกไทย

รูปที่ 2 การรวบรวมพ่อพันธุ์ปลายี่สกไทยมาใช้ในการทดลอง

รูปที่ 3 การฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการสร้างน้ำเชื้อปลายี่สกไทย

รูปที่ 4 การรีดน้ำเชื้อปลายี่สกไทย

2. <u>การประเมินคุณภาพสเปิร์มในน้ำเชื้อปลายี่สกไทย</u>

ความหนาแน่นของสเปิร์มประเมินโดยการเจือจางน้ำเชื้อสด (10 ไมโครลิตร) ด้วย 0.9% saline โดยเจือจาง 5,000 เท่า ผสมให้เข้ากันใน vial ด้วยการใช้ vortexer แล้วจึงนำน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางไปหยดบน hemacytometer และ นับจำนวนสเปิร์มที่พบโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า แล้วจึงคำนวณกลับหาความหนาแน่นของสเปิร์มโดยทำ 3 ซ้ำ

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มทำโดยการหยดตัวอย่างน้ำเชื้อสด (1 ไมโครลิตร) ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาดแล้วจึงหยดน้ำกลั่นลงไป 100 ไมโครลิตร พร้อมกับปิดด้วย cover glass เบาๆ อย่างรวดเร็วเพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่แล้วจึงประเมินเปอร์เซ็นต์ที่สเปิร์มเคลื่อนที่ทันทีให้เสร็จภายใน 15 วินาที โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า แต่น้ำเชื้อสดที่ถูกเจือจางด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ได้ทำการประเมินโดยดูดสารละลายเหล่านั้นออกมา 20 ไมโครลิตรแล้วกระตุ้นด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 80 ไมโครลิตร การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งในทุกชุดการทดลอง ทำโดยการแช่หลอดฟางในน้ำอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเพื่อให้น้ำเชื้อละลาย (thawing) แล้วตัดหลอดฟาง นำน้ำเชื้อที่ละลาย 20 ไมโครลิตรออกมากระตุ้นด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 80 ไมโครลิตรเพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเหล่านี้บนกระจกสไลด์ทำ 3 ซ้ำ โดยในแต่ละสไลด์ประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอีก 3 ซ้ำย่อยให้เสร็จภายในเวลาไม่เกิน 15 วินาทีหลังจากสเปิร์มถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ (รวม 9 ซ้ำย่อย) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (percentage of motile sperm) ประเมินจากจำนวณสเปิร์มที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าอย่างรวดเร็วเมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำกลั่น โดยประเมินแบบ subjective estimation แบ่งระดับที่สเปิร์มเคลื่อนที่ไว้ 6 ระดับ คือ สเปิร์มที่เคลื่อนที่ได้ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% (Vuthiphandchai and Zohar, 1999)

การประเมินสเปิร์มที่มีชีวิตทำโดยนำเอาน้ำเชื้อ (5 ไมโครลิตร) มาย้อมสีด้วยสารละลาย eosin-nigrosin (5 ไมโครลิตร) แล้วจึงสุ่มนับสเปิร์มทั้งหมด โดยสเปิร์มที่มีชีวิตจะไม่ติดสีย้อมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า แล้วจึงคำนวณกลับหาเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่มีชีวิต (Fribourgh, 1966) โดยทำ 3 ซ้ำ สำหรับการวัดความดันออสโมติกน้ำเชื้อ (osmolality) ทำโดยนำน้ำเชื้อปลายี่สกไทยมา centrifuge ด้วยความเร็วสูง x5000g นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อแยก seminal fluid ออกจากสเปิร์ม จากนั้นนำ seminal fluid ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาวัด osmolality โดยการใช้เครื่อง osmometer โดยวัด 3 ซ้ำ การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเหล่านี้ ทำโดยทำการศึกษาประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสดของปลายี่สกไทยที่เลี้ยงในบ่อดิน ในช่วงเดือนตุลาคม พฤศจิกายน และธันวาคม พ.ศ. 2555 ซึ่งเป็นช่วงที่พ่อพันธุ์มีน้ำเชื้อ โดยรีดน้ำเชื้อออกมาเพื่อประเมินคุณภาพสเปิร์มได้แก่ การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม การมีชีวิตของสเปิร์ม ความหนาแน่นของสเปิร์ม และ ความดันออสโมติกน้ำเชื้อ ตามวิธีการที่กล่าวมาแล้ว

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและการมีชีวิตของสเปิร์มให้เสร็จภายใน 15 นาทีหลังการรวบรวมน้ำเชื้อ และประเมินความหนาแน่นของสเปิร์มและความดันออสโมติกน้ำเชื้อได้ทำเสร็จสิ้นภายใน 24 ชั่วโมงหลังการรวบรวมน้ำเชื้อ

3. <u>การพัฒนาวิธีการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกไทย</u>

3.1 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกไทยแบบแช่แข็ง

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทราบชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ที่เหมาะสมก่อนที่จะนำไปแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทย โดยการประเมินความเป็นพิษ (toxicity test) ของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม การทดลองเริ่มจากนำน้ำเชื้อปลายี่สกไทยที่รวบรวมมาใหม่ (freshly collected milt) มาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS (calcium free hank's balanced salt solution) ซึ่งเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้เป็นส่วนผสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลายชนิด (Mongkonpunya et al., 1995) โดยที่ Ca-F HBSS ไม่มีผลกระตุ้นให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่แต่จะไปเจือจางน้ำเชื้อโดยที่สเปิร์มยังคงมีคุณภาพไม่เปลี่ยนแปลง การเจือจางน้ำเชื้อปลายี่สกไทยทำใน tissue culture flask ขนาด 25 มิลลิลิตรโดยใช้อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารละลาย Ca-F HBSS เท่ากับ 1 ต่อ 1 ในขณะเดียวกันสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆได้ถูกเตรียมขึ้นมาโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS เป็นตัวทำละลาย แล้วจึงผสมเข้ากับน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางไว้ก่อนหน้านี้ (extended milt) เพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของสารไครโอโพรเทคแทนท์ตามที่ต้องการ และประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่เวลาต่างๆกันจนกระทั่งสเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วยน้ำกลั่น สูตรของ Ca-F HBSS ประกอบด้วย NaCl 0.8890 กรัม, KCl 0.0440 กรัม, $Na_2HPO_4.2H_2O$ 0.0130 กรัม, $NaHCO_3$ 0.0390 กรัม, KH_2PO_4 0.0070 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 0.0220 กรัม, Glucose 0.1110 กรัม ละลายในสารละลาย 100 มิลลิลิตรที่ pH 7.6

สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ได้แก่ ethylene glycol, propylene glycerol, dimethyl sulfoxide (DMSO) และ sucrose สารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิดถูกผสมไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) ของสารไครโอโพรเทคแทนท์เป็น 5%, 10%, 15% และ 20% ตามที่กล่าวมาแล้ว การประเมินเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่เคลื่อนที่ในการทดลองนี้ได้ทำในระยะเวลาต่างๆกันหลังจากใส่ สารไครโอโพรเทคแทนท์ลงไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง ตั้งแต่เวลา 10, 20, 30, 60, 90, 120 และ 150 นาที โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มกับกลุ่มควบคุมซึ่งใช้น้ำเชื้อที่เจือจางด้วย Ca-F HBSS เท่านั้น (ไม่มีสารไครโอโพรแทคแทนท์) โดยนำน้ำเชื้อที่เจือจางสารไครโอโพรเทคแทนท์ 20 ไมโครลิตรมากระตุ้นด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 80 ไมโครลิตร ตามวิธีการที่กล่าวมาแล้ว การประเมินความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มนี้ ทำการทดลอง 6 ซ้ำที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) การทดลองในขั้นตอนนี้ทำให้ทราบว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดใด และความเข้มข้นช่วงใดที่เป็นพิษ หรือทำให้สเปิร์มไม่เคลื่อนที่ ทำให้สามารถพิจารณาเลือกเฉพาะสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เป็นพิษน้อยมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อต่อไป

3.2 ศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยที่ผ่านการแช่แข็ง

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทย ทำโดยการนำเอาน้ำเชื้อยี่สกไทยมาเจือจางในสารละลาย Ca-F HBSS ในอัตราส่วน 1:1 แล้วจึงผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดที่เหมาะสมที่ได้คัดเลือกจากผลการทดลองข้อที่ 3.1 (DMSO, ethylene glycol และ propylene glycol) ในระดับความเข้มข้นสุดท้ายที่แตกต่างกันตั้งแต่ 5%, 10%, 15% และ 20% แล้วปล่อยไว้ให้อยู่ในภาวะสมดุล (equilibration period) นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ก่อนที่น้ำเชื้อถูกรวบรวมไว้ในหลอดฟาง (French straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร (รูปที่ 5) แล้วปิดปลายหลอดให้แน่น (รูปที่ 6)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยทำโดยนำหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรที่มีน้ำเชื้อเหล่านี้มาแช่แข็งในเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer) โดยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ต่างๆกันตั้งแต่ -1, -3, -5 และ -7 องศาเซลเซียส/นาที เพื่อประเมินประสิทธิภาพระหว่างการลดอุณหภูมิแช่แข็งโดยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (รูปที่ 7) น้ำเชื้อปลายี่สกไทยที่ลดอุณหภูมิเมื่อต่ำลงถึง -40 องศาเซลเซียส ถูกนำมาเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวซึ่งมีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสทันที จากนั้นน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว 7-10 วันได้ถูกนำมาละลาย (thawing) ด้วยการนำหลอดฟางมาเพิ่มอุณหภูมิอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนน้ำเชื้อละลายหมด (เปลี่ยนสภาพจากของแข็งกลับเป็นของเหลวตามเดิม) แล้วจึงตัดหลอดฟางนำน้ำเชื้อที่ละลายไปประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (รูปที่ 8) ตามวิธีการที่กล่าวมาแล้ว การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยได้ทำการทดลอง 6 ซ้ำ

3.3 ศึกษาการพัฒนา protocol เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทย

3.3.1 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยด้วย Extender 7 และไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยในการทดลองนี้ได้นำข้อมูลที่ได้จากข้อ 3.2 มาพัฒนาเพิ่มประสิทธิภาพการแช่แข็งด้วยการเปลี่ยนชนิดสารละลายบัฟเฟอร์และสารไครโอโพรเทคแทนท์บางชนิดเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทย เริ่มจากการนำเอาน้ำเชื้อปลายี่สกไทยที่รีดออกมาเจือจางในสารละลาย extender 7 ในอัตราส่วน 1:1 แล้วจึงผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด (dimethylsulfoxide; DMSO, methanol และ propylene glycol) ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้ายที่แตกต่างกันตั้งแต่ 5%, 10%, 15% และ 20% แล้วปล่อยไว้ให้อยู่ในภาวะสมดุล 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง ทำการรวบรวมน้ำเชื้อใส่ในหลอดฟาง ขนาด 0.25 มิลลิลิตร

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยทำโดยนำหลอดฟาง ที่มีน้ำเชื้อเหล่านี้มาลดอุณหภูมิด้วยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยทำการลดอุณหภูมิแบบ one-step freezing ด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ต่างๆกันตั้งแต่ -3, -5 และ -8 องศาเซลเซียส/นาที จากอุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ไปจนถึงอุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส และ -80 องศาเซลเซียส เพื่อประเมินผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ และอัตราการลดอุณหภูมิต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อ โดยทำการทดลอง 6 ซ้ำ

น้ำเชื้อปลายี่สกไทยที่แช่แข็งในชุดการทดลองเหล่านี้ ถูกนำมาเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวซึ่งมีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส นาน 5-7 วัน ถูกนำมาเพิ่มอุณหภูมิอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิประมาณ 70 องศาเซลเซียส จนน้ำเชื้อละลาย แล้วจึงนำไปประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว

3.4 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยอย่างง่าย

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยอย่างง่าย ทำโดยนำเอาน้ำเชื้อปลายี่สกไทยที่มีคุณภาพดีมาเจือจางในสารละลาย Ca-F HBSS ในอัตราส่วน 1:1 แล้วจึงผสม DMSO ในระดับความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10% แล้วปล่อยไว้ให้อยู่ในภาวะสมดุล (equilibration period) นาน 10 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการรวบรวมน้ำเชื้อใส่ในหลอดฟาง (straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตรเพื่อแช่แข็งต่อไป

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทย ทำโดยนำหลอดฟางที่มีน้ำเชื้อและ DMSO มาอบในไอของไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapor) ภายในถังโฟม (styrofoam box) เริ่มจากเทไนโตรเจนเหลวสูงประมาณ 1 นิ้วลงไปในถังโฟมแล้วนำลวดตาข่าย มาวางให้ได้ความสูงตามที่ต้องการเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen surface) ได้แก่ 2, 4 และ 6 เซ็นติเมตร จากนั้นนำหลอดฟางที่ต้องการแช่แข็งมาวางที่ความสูงที่กำหนดเป็นเวลา 10 นาที โดยวางหลอดฟางไว้บนลวดตาข่ายที่สร้างขึ้นมา แล้วให้หลอดฟางสัมผัสไอไนโตรเจนเหลว ตามระดับความสูง และระยะเวลาที่กำหนดไว้ แล้วนำหลอดฟางที่แช่แข็งไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว 7 วัน จึงทำการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย (post-thawed sperm motilty) โดยการทดลองทำ 6 ซ้ำ เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด

3.5 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยในปริมาณต่างกัน

น้ำเชื้อปลายี่สกไทยที่มีคุณภาพดีได้ถูกนำมาแช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 และ 0.5 มิลลิลิตร และหลอดไครโอไวออล (cryovial) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร โดยรวบรวมน้ำเชื้อสดของปลายี่สกไทยมาเจือจางในสารละลาย Ca-F HBSS ในอัตราส่วน 1:1 แล้วผสม DMSO ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10% แล้วนำไปแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส/นาทีด้วยการใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ เริ่มจากอุณหภูมิห้องถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวนาน 5 วันจึงทำการละลายน้ำเชื้อเพื่อประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย ทำการทดลอง 6 ซ้ำ

3.6 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกไทยแช่แข็งต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

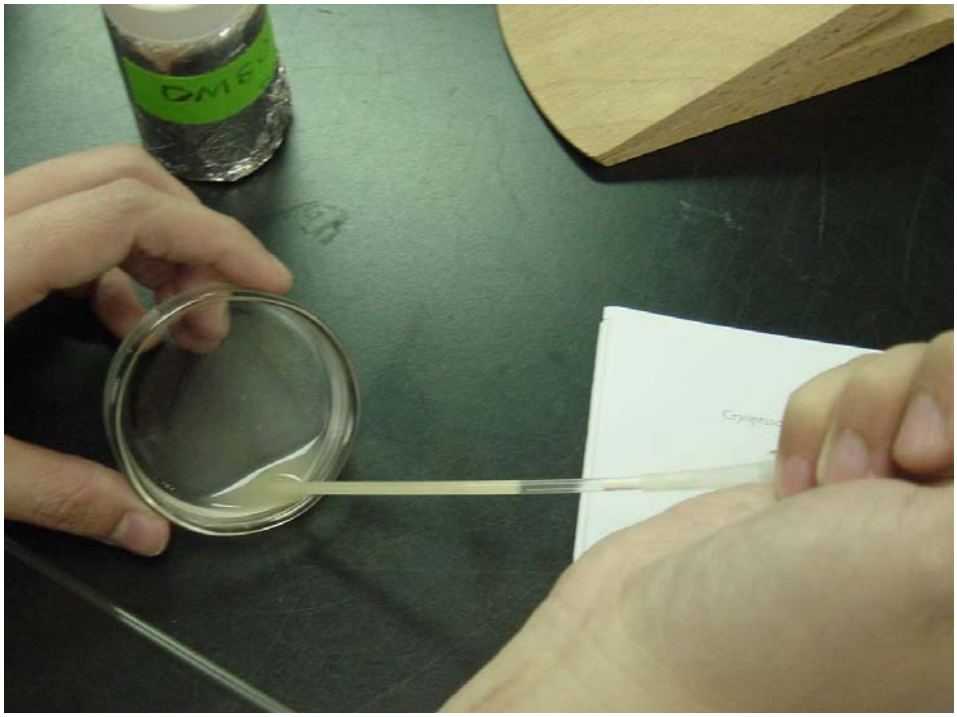
น้ำเชื้อปลายี่สกไทยที่มีคุณภาพดีจากพ่อพันธุ์หลายตัวถูกนำมาแช่แข็งโดยใช้ protocol ที่เหมาะสม โดยน้ำเชื้อปลายี่สกไทยถูกนำมาเจือจางด้วยสารละลาย Ca-F HBSS และ 10% DMSO และบรรจุในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร นาน 10 นาที จึงทำการแช่แข็งไว้ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส/นาทีด้วยการใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ เริ่มจากอุณหภูมิห้องถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส จึงนำมาเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลานาน 6 เดือน โดยประมาณการเคลื่อนที่ของสเปิร์มทุกๆเดือนเพื่อทราบผลของระยะเวลาการเก็บรักษาที่อาจมีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ผ่านการแช่แข็ง เปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว 10 นาทีแล้วละลายประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มทันที (0 เดือน) โดยทดลอง 6 ซ้ำ

4. <u>การประเมินความสามารถของน้ำเชื้อแช่แข็งในการปฏิสนธิไข่</u> (fertilization capacity)

การประเมินอัตราการปฏิสนธิ (fertilization rate) ทำโดยการนำเอาไข่ปลายี่สกไทยประมาณ 500 ใบใส่ลงไปใน petridish แล้วเอาน้ำเชื้อปลายี่สกไทยแช่แข็งจากข้อ 3.6 ที่เก็บรักษาไว้ 1 เดือนได้ถูกนำมาละลาย แล้วตัดหลอดฟางนำน้ำเชื้อที่ละลายใส่ลงไปผสมกับไข่ทันที พร้อมกับเติมน้ำจืดที่สะอาดลงไปใน petridish และใช้ขนไก่ช่วยผสมให้น้ำเชื้อเข้ากับไข่อย่างรวดเร็ว จากนั้นล้างไข่ และเมือกออกโดยการเปลี่ยนน้ำ 2 ครั้งแล้วปล่อยให้ไข่พัฒนาต่อไปในโหลแก้วที่มีระบบน้ำผ่านเข้าออกตลอดเวลา การกระตุ้นให้แม่ปลายี่สกไทยตกไข่ทำโดยการฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์ Gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRHa) หรือ Suprefact ในอัตรา 15

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม การมีชีวิตของสเปิร์ม ความหนาแน่นของสเปิร์ม ความดันออสโมติกน้ำเชื้อ และอัตราการปฏิสนธิ ในแต่ละชุดการทดลองถูกนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีการ Analysis of variance (two-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองด้วย Duncan's new multiple range test โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS



รูปที่ 5 การรวบรวมน้ำเชื้อใส่ในหลอดฟาง

รูปที่ 6 การปิดหลอดฟางก่อนการแช่แข็ง

รูปที่ 7 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยด้วยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ

รูปที่ 8 การตัดหลอดฟางเพื่อประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยหลังแช่แข็ง

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การทดลองสามารถแบ่งออกได้เป็น 7 ตอน คือ

1. คุณภาพสเปิร์มของน้ำเชื้อปลายี่สกไทย
2. ผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มปลายี่สกไทย
3. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ และการพัฒนา protocol เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแช่แข็ง
4. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยอย่างง่าย
5. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยในปริมาณต่างกัน
6. ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกไทยแช่แข็งต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม
7. ความสามารถในการปฏิสนธิไข่ของน้ำเชื้อปลายี่สกไทยแช่แข็ง

1. คุณภาพสเปิร์มของน้ำเชื้อปลายี่สกไทย

คุณภาพน้ำเชื้อสดของปลายี่สกไทยที่รวบรวมจำนวน 10 ตัวได้ในการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 1 โดยการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในช่วงระหว่างเดือนตุลาคมและธันวาคม มีค่าเฉลี่ยสูงระหว่าง 88.9-93.3% ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างเดือนที่รวบรวม ในทำนองเดียวกันน้ำเชื้อปลายี่สกไทยมีสเปิร์มที่มีชีวิตสูงมีค่าเฉลี่ย 91.3-96.1% ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ความหนาแน่นของสเปิร์มในเดือนตุลาคมและพฤศจิกายนมีค่าระหว่าง (8.5-9.1)x10^9 ตัว/ซีซี ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) แต่มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเหลือ (7.2±0.6) x10^9 ตัว/ซีซี ในเดือนธันวาคม (P<0.05) และความดันออสโมติกน้ำเชื้ออยู่ระหว่าง 282.6-297.2 mOsm/kg ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 คุณภาพน้ำเชื้อปลายี่สกไทยในช่วงระหว่างเดือนตุลาคมและธันวาคม

เดือน	คุณภาพน้ำเชื้อ			
	การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (%)	การมีชีวิตของสเปิร์ม (%)	ความหนาแน่นของสเปิร์ม (x10^9 ตัว/ซีซี)	ความดันออสโมติกน้ำเชื้อ (mOsm/kg)
ตุลาคม (N=3)	88.9±1.4^a	94.3±2.4^a	8.5±0.3^a	282.6±3.3^a
พฤศจิกายน (N=4)	93.3±3.1^a	91.3±2.8^a	9.1±0.4^a	290.8±2.9^a
ธันวาคม (N=3)	89.1±2.2^a	96.1±1.9^a	7.2±0.6^b	297.2±2.5^{ab}

หมายเหตุ: ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

2. ผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มปลายี่สกไทย

การศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 4 ชนิด คือ dimethylsulfoxide (DMSO), ethylene glycol, propylene glycol และ sucrose โดยแต่ละชนิดได้ทำการทดลองที่ความเข้มข้นสุดท้าย 4 ระดับ (5%, 10 %, 15% และ 20%) ที่เวลา 10, 20, 30, 60, 90, 120 และ 150 นาที ได้ผลการทดลองที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มดังนี้ คือ

2.1 DMSO

น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเฉลี่ยระหว่าง 88.6-94.8% น้ำเชื้อที่เจือจางใน DMSO มีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่เคลื่อนที่สูงมากกว่า 80% ขึ้นไป ในทุกความเข้มข้นที่ใช้เมื่อเวลานานไม่เกิน 90 นาที (ตารางที่ 2)

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า

- ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO 5%, 10% และ 15% ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับความเข้มข้นที่ 20% ($P<0.05$) (ตารางที่ 2)

- เวลาที่ใช้ในการทดสอบน้ำเชื้อปลายี่สกไทยกับสารละลาย DMSO ที่ 0 นาที ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับเวลา 10, 20, 30, 60, 90 นาที ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกับเวลาที่ 120 และ 150 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยในสารละลาย DMSO

ระยะเวลา (นาที)	ชุดควบคุม	ความเข้มข้นของ DMSO			
		5%	10%	15%	20%
0	$92.5\pm2.4^{a,1}$	$94.8\pm1.3^{a,1}$	$93.5\pm1.4^{a,1}$	$93.5\pm1.4^{a,1}$	$94.8\pm1.3^{a,1}$
10	$94.8\pm1.3^{a,1}$	$93.5\pm1.4^{a,1}$	$93.5\pm1.4^{a,1}$	$93.3\pm3.1^{a,1}$	$93.3\pm3.9^{a,1}$
20	$93.3\pm3.1^{a,1}$	$94.8\pm1.3^{a,1}$	$94.8\pm1.3^{a,1}$	$93.3\pm3.1^{a,1}$	$82.2\pm3.8^{b,12}$
30	$91.8\pm3.2^{a,1}$	$93.3\pm3.1^{a,1}$	$94.8\pm1.3^{a,1}$	$89.1\pm1.5^{a,1}$	$81.7\pm2.5^{b,2}$
60	$93.3\pm3.1^{a,1}$	$90.4\pm1.6^{a,1}$	$93.3\pm3.1^{a,1}$	$84.4\pm2.2^{ab,2}$	$79.8\pm3.2^{b,2}$
90	$93.3\pm3.1^{a,1}$	$91.8\pm3.2^{a,1}$	$89.1\pm1.5^{a,1}$	$82.2\pm2.8^{ab,2}$	$81.7\pm1.2^{b,2}$
120	$91.8\pm3.2^{a,1}$	$83.9\pm1.9^{b,2}$	$81.2\pm3.8^{b,2}$	$77.8\pm3.9^{c,2}$	$64.4\pm2.8^{d,3}$
150	$88.6\pm1.9^{a,1}$	$84.4\pm2.2^{a,2}$	$82.2\pm2.2^{a,2}$	$68.9\pm3.3^{b,3}$	$53.3\pm4.2^{c,3}$

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างความเข้มข้น
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างเวลา

2.2 Ethylene glycol

น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเฉลี่ยระหว่าง 88.9-97.7% น้ำเชื้อที่เจือจางใน ethylene glycol มีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่เคลื่อนที่สูงมากกว่า 80% ขึ้นไป ในทุกความเข้มข้นที่ใช้เมื่อเวลานานไม่เกิน 30 นาที (ตารางที่ 3)

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า

- ความเข้มข้นของสารละลาย ethylene glycol 5%, 10% และ 15% ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับความเข้มข้นที่ 20% ($P<0.05$) (ตารางที่ 3)

- เวลาที่ใช้ในการทดสอบน้ำเชื้อปลายี่สกไทยกับสารละลาย ethylene glycol ที่ 0 นาที ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับเวลา 10, 20, 30 นาที ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกับเวลาที่ 60, 90, 120 และ 150 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยในสารละลาย ethylene glycol

ระยะเวลา (นาที)	ชุดควบคุม	ความเข้มข้นของ ethylene glycol			
		5%	10%	15%	20%
0	$93.5\pm1.4^{a,1}$	$94.8\pm1.3^{a,1}$	$94.8\pm1.3^{a,1}$	$96.7\pm2.3^{a,1}$	$96.7\pm3.3^{a,1}$
10	$95.5\pm2.2^{a,1}$	$91.1\pm3.3^{a,1}$	$88.9\pm3.3^{a,1}$	$93.3\pm3.1^{a,1}$	$90.8\pm2.2^{a,1}$
20	$97.7\pm2.2^{a,1}$	$93.3\pm3.8^{a,1}$	$88.9\pm3.3^{a,1}$	$89.1\pm1.5^{a,1}$	$81.7\pm1.7^{ab,2}$
30	$93.3\pm3.8^{a,1}$	$91.1\pm2.2^{a,1}$	$86.7\pm3.1^{a,1}$	$86.7\pm3.1^{a,1}$	$77.1\pm2.5^{b,2}$
60	$91.1\pm2.2^{a,1}$	$93.5\pm1.4^{a,1}$	$83.9\pm1.9^{a,1}$	$83.7\pm2.9^{a,1}$	$62.7\pm2.8^{v,3}$
90	$95.5\pm2.2^{a,1}$	$86.7\pm3.1^{ab,12}$	$77.1\pm2.5^{b,2}$	$73.7\pm2.2^{b,2}$	$53.3\pm2.8^{c,4}$
120	$93.3\pm3.1^{a,1}$	$81.7\pm1.7^{b,2}$	$75.6\pm2.9^{b,2}$	$64.4\pm2.8^{c,3}$	$44.4\pm2.8^{d,5}$
150	$88.9\pm2.2^{a,1}$	$75.6\pm4.1^{b,2}$	$63.7\pm2.9^{c,3}$	$53.3\pm2.8^{d,4}$	$32.6\pm4.1^{e,6}$

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างความเข้มข้น
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างเวลา

2.3 <u>Propylene glycol</u>

น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเฉลี่ยระหว่าง 88.6-94.8% น้ำเชื้อที่เจือจางใน propylene glycol มีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่เคลื่อนที่สูงมากกว่า 80% ขึ้นไป ในทุกความเข้มข้นที่ใช้เมื่อเวลานานไม่เกิน 20 นาที (ตารางที่ 4)

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า

- ความเข้มข้นของสารละลาย propylene glycol 5% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่แตกต่างกันจนถึงนาทีที่ 90 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และไม่แตกต่างกับความเข้มข้นที่ 10%, 15% และ 20% จนถึงนาทีที่ 30 แต่เมื่อเวลาผ่านไป 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ความเข้มข้น 5% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด (ตารางที่ 4)

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า

- ความเข้มข้นของสารละลาย propylene glycol 5%, 10% และ 15% ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับความเข้มข้นที่ 20% ($P<0.05$) (ตารางที่ 4)

- เวลาที่ใช้ในการทดสอบน้ำเชื้อปลายี่สกไทยกับสารละลาย propylene glycol ที่ 0 นาที ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับเวลา 10, 20 นาที ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกับเวลาที่ 30, 60, 90, 120 และ 150 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยในสารละลาย propylene glycol

ระยะเวลา (นาที)	ชุดควบคุม	ความเข้มข้นของ propylene glycol			
		5%	10%	15%	20%
0	$92.5\pm2.4^{a,1}$	$93.3\pm3.1^{a,1}$	$93.3\pm3.8^{a,1}$	$93.3\pm4.2^{a,1}$	$96.7\pm3.3^{a,1}$
10	$94.8\pm1.3^{a,1}$	$89.1\pm1.5^{a,1}$	$95.5\pm2.2^{a,1}$	$93.3\pm3.9^{a,1}$	$93.3\pm3.9^{a,1}$
20	$93.3\pm3.1^{a,1}$	$86.7\pm3.1^{a,1}$	$93.3\pm3.1^{a,1}$	$83.3\pm3.3^{a,1}$	$86.7\pm2.9^{a,1}$
30	$91.8\pm3.2^{a,1}$	$86.3\pm3.3^{b,1}$	$96.7\pm3.3^{a,1}$	$84.4\pm2.2^{b,1}$	$66.7\pm3.3^{c,2}$
60	$93.3\pm3.1^{a,1}$	$83.7\pm1.7^{b,1}$	$86.7\pm2.2^{b,1}$	$73.3\pm4.2^{c,2}$	$56.7\pm3.3^{d,3}$
90	$93.3\pm3.1^{a,1}$	$81.7\pm1.7^{b,1}$	$82.2\pm2.2^{b,2}$	$66.7\pm4.2^{c,2}$	$53.3\pm2.8^{d,3}$
120	$91.8\pm2.2^{a,1}$	$83.7\pm2.9^{b,1}$	$76.7\pm2.9^{b,2}$	$63.3\pm3.3^{c,23}$	$44.4\pm2.8^{d,4}$
150	$88.6\pm1.9^{a,1}$	$84.4\pm2.2^{a,1}$	$73.3\pm2.2^{b,2}$	$56.7\pm3.3^{c,3}$	$23.7\pm2.9^{d,5}$

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างความเข้มข้น
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างเวลา

2.4 Sucrose

น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเฉลี่ยระหว่าง 86.7-95.5% น้ำเชื้อที่เจือจางใน sucrose ในทุกความเข้มข้นมีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่เคลื่อนที่ต่ำกว่า 80% ที่ใช้เมื่อเวลานานเกิน 10 นาที (ตารางที่ 5)

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า

- ความเข้มข้นของสารละลาย sucrose 5% และ 15% ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับความเข้มข้นที่ 15% และ 20% ($P<0.05$) (ตารางที่ 5)

- เวลาที่ใช้ในการทดสอบน้ำเชื้อปลายี่สกไทยกับสารละลาย sucrose ที่ 0 นาที มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับเวลา 10, 20, 30, 60, 90, 120 และ 150 นาที ($P<0.05$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยในสารละลาย sucrose

ระยะเวลา (นาที)	ชุดควบคุม	ความเข้มข้นของ sucrose			
		5%	10%	15%	20%
0	$95.5\pm2.2^{a,1}$	$93.3\pm6.7^{a,1}$	$94.8\pm1.3^{a,1}$	$95.5\pm2.2^{a,1}$	$93.3\pm3.8^{a,1}$
10	$93.3\pm3.1^{a,1}$	$77.8\pm2.2^{b,2}$	$73.3\pm2.8^{b,23}$	$63.3\pm1.9^{c,2}$	$26.7\pm6.7^{d,2}$
20	$86.7\pm3.3^{a,1}$	$64.4\pm2.2^{b,2}$	$64.5\pm2.2^{b,3}$	$48.9\pm2.2^{c,3}$	$26.7\pm6.7^{d.2}$
30	$93.3\pm6.7^{a,1}$	$57.8\pm2.2^{b,2}$	$62.2\pm2.2^{bc,3}$	$44.4\pm2.2^{c,3}$	$16.7\pm3.3^{d,3}$
60	$91.8\pm2.2^{a,1}$	$61.8\pm3.8^{b,2}$	$57.8\pm2.2^{c,3}$	$26.7\pm3.8^{c,4}$	0
90	$88.6\pm1.9^{a,1}$	$22.2\pm2.2^{c,3}$	$35.5\pm2.2^{b,4}$	$13.3\pm3.3^{c,5}$	0
120	$93.3\pm6.7^{a,1}$	$24.4\pm2.2^{c,3}$	$13.3\pm3.3^{c,5}$	0	0
150	$92.5\pm2.4^{a,1}$	0	0	0	0

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างความเข้มข้น
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างเวลา

3. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติและการพัฒนา protocol เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแช่แข็ง

3.1 <u>การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยด้วย DMSO ที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส</u>

การประเมินการเคลื่อนที่สเปิร์มของน้ำเชื้อสดของปลายี่สกไทย พบว่า น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 86.7±3.3% น้ำเชื้อปลายี่สกไทยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย (post-thaw sperm motility) มีค่าสูงสุด (>80%) ในชุดการทดลองที่นำน้ำเชื้อมาเจือจางในสารละลาย 10% DMSO และลดอุณหภูมิในอัตรา 5 องศาเซลเซียส/นาที หรือ 7 องศาเซลเซียส/นาที (ตารางที่ 6)

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO 5%, 10, 15 และ 20% มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และอัตราการลดอุณหภูมิที่ 5 องศาเซลเซียส/นาที และ 7 องศาเซลเซียส/นาที ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยที่แช่แข็งใน DMSO ที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส

อัตราการลดอุณหภูมิ (°C/นาที)	ความเข้มข้น (%)			
	5	10	15	20
1	5.2 ± 1.1 ^{a,2}	11.7 ± 3.2 ^{a,3}	13.3 ± 3.7 ^{a,2}	6.7 ± 1.3 ^{a,2}
3	23.7 ± 2.9 ^{c,1}	45.2 ± 2.1 ^{b,2}	55.6 ± 2.7 ^{a,1}	6.3 ± 2.9 ^{d,2}
5	26.7 ± 2.2 ^{c,1}	86.7 ± 2.9 ^{a,1}	65.1 ± 2.9 ^{b,1}	13.3 ± 3.9 ^{d,2}
7	24.4 ± 2.2 ^{c,1}	80.4 ± 3.2 ^{a,1}	62.2 ± 2.2 ^{b,1}	32.6 ± 4.1 ^{c,1}

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

3.2 <u>การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยด้วย ethylene glycol ที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส</u>

การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่า น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 86.7±6.7% เมื่อรวบรวมมาใหม่ๆ การทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยที่แช่แข็งในสารละลาย ethylene glycol ในทุกความเข้มข้น และทุกอัตราการลดอุณหภูมิพบว่า สเปิร์มที่แช่แข็งหลังการละลายมีการเคลื่อนที่ต่ำกว่า 30% แม้ว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงสุด (26.7±3.1%) จะเกิดขึ้นเมื่อแช่แข็งด้วยความเข้มข้น 15% และแช่แข็งในอัตราการลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาที (ตารางที่ 7)

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย ethylene glycol 5%, 10, 15 และ 20% ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) และอัตราการลดอุณหภูมิที่ 1 องศาเซลเซียส/นาที, 3 องศาเซลเซียส/นาที, 5 องศาเซลเซียส/นาที และ 7 องศาเซลเซียส/นาที ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยที่แช่แข็งใน ethylene glycol ที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส

อัตราการลดอุณหภูมิ (°C/นาที)	ความเข้มข้น (%)			
	5	10	15	20
1	8.3 ± 2.7 ^{a,1}	11.1 ± 6.1 ^{a,1}	15.5 ± 2.2 ^{a,2}	11.1 ± 2.2 ^{a,12}
3	13.3 ± 2.9 ^{a,1}	15.6 ± 5.1 ^{a,1}	13.3 ± 4.2 ^{a,2}	22.2 ± 2.1 ^{a,1}
5	22.2 ± 3.8 ^{a,1}	13.3 ± 5.8 ^{a,1}	26.7 ± 3.1 ^{a,1}	18.5 ± 4.4 ^{a,1}
7	17.8 ± 2.1 ^{a,1}	17.8 ± 2.1 ^{a,1}	6.6 ± 3.1 ^{a,2}	13.3 ± 3.1 ^{a,1}

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

3.3 <u>การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยด้วย propylene glycol ที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส</u>

การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่า น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เท่ากับ 92.7±2.3% เมื่อรวบรวมมาใหม่ๆ การทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยที่แช่แข็งในสารละลาย propylene glycol ในทุกความเข้มข้น และทุกอัตราการลดอุณหภูมิพบว่าสเปิร์มที่แช่แข็งหลังการละลายมีการเคลื่อนที่ต่ำกว่า 30% โดยการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงสุด (27.5±1.9%) เกิดขึ้นเมื่อแช่แข็งด้วยความเข้มข้น 10% และแช่แข็งในอัตราการลดอุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส/นาที หรือแช่แข็งด้วยความเข้มข้น 15% และแช่แข็งในอัตราการลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาที (ตารางที่ 8)

จากการทดลองทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย propylene glycol ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และอัตราการลดอุณหภูมิ 1, 3, 5 และ 7 องศาเซลเซียส/นาที มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยที่แช่แข็งใน propylene glycol ที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส

อัตราการลดอุณหภูมิ (°C/นาที)	ความเข้มข้น (%)			
	5	10	15	20
-1	11.1 ± 2.2 ^{a,1}	17.7 ± 3.1 ^{a,2}	17.4 ± 1.4 ^{a,2}	8.8 ± 2.2 ^{a,1}
-3	8.8 ± 2.2 ^{b,1}	27.5 ± 1.9 ^{a,1}	20.7 ± 0.9 ^{a,2}	13.3 ± 3.9 ^{b,1}
-5	4.4 ± 2.2 ^{c,12}	17.4 ± 1.4 ^{b,2}	27.5 ± 1.9 ^{a,1}	0
-7	15.5 ± 2.2 ^{b,1}	21.6 ± 1.8 ^{a,2}	8.8 ± 2.2 ^{c,3}	0

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

3.4 <u>การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยด้วย Extender 7 และสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ</u>

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยด้วยการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด (DMSO, methanol และ propylene glycol) ที่ 4 ความเข้มข้นสุดท้าย (5, 10, 15, 20%) ด้วยการลดอุณหภูมิ 3 อัตรา (3, 5 และ 8 องศาเซลเซียส/นาที) มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 9) มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย (post-thaw sperm motility) มีค่าต่ำกว่าการแช่แข็งมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 10)

ชนิดสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย โดย DMSO ให้ผลการแช่แข็งที่ดีกว่า methanol และ propylene glycol อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (ตารางที่ 9 และ ตารางที่ 10) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูงสุด (60.6±9.8%) ได้จากชุดการทดลองที่ใช้สารละลาย 20% DMSO และลดอุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส ในขณะที่การใช้สารละลาย 5% DMSO และลดอุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ 44.4±13.3% (ตารางที่ 10)

การใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5 และ 8 องศาเซลเซียส/นาที ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส และ -80 องศาเซลเซียส ให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยที่แช่แข็งด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์และอัตราการลดอุณหภูมิต่างกันที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิสุดท้าย (°C)	อัตราการลดอุณหภูมิ (°C/min)	สารไครโอโพรเทคแทนท์ (%)	การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (%)
-40	3	DMSO 5%	0
		DMSO 10%	0
		DMSO 15%	0
		DMSO 20%	8.8±4.4
	3	Methanol 5%	0
		Methanol 10%	0
		Methanol 15%	0
		Methanol 20%	0
	3	Propylene glycol 5%	0
		Propylene glycol 10%	0
		Propylene glycol 15%	0
		Propylene glycol 20%	10.5±8.8
-40	5	DMSO 5%	0
		DMSO 10%	0
		DMSO 15%	0
		DMSO 20%	0
	5	Methanol 5%	0
		Methanol 10%	0
		Methanol 15%	0
		Methanol 20%	0
	5	Propylene glycol 5%	0
		Propylene glycol 10%	0
		Propylene glycol 15%	0
		Propylene glycol 20%	0

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยที่แช่แข็งด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์และอัตราการลดอุณหภูมิต่างกันที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส (ต่อ)

อุณหภูมิสุดท้าย (°C)	อัตราการลดอุณหภูมิ (°C/min)	สารไครโอโพรเทคแทนท์ (%)	การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (%)
-40	8	DMSO 5%	0
		DMSO 10%	15.5±8.8
		DMSO 15%	0
		DMSO 20%	0
	8	Methanol 5%	0
		Methanol 10%	0
		Methanol 15%	0
		Methanol 20%	0
	8	Propylene glycol 5%	0
		Propylene glycol 10%	0
		Propylene glycol 15%	0
		Propylene glycol 20%	0

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยที่แช่แข็งด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์และอัตราการลดอุณหภูมิต่างกันที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิสุดท้าย (°C)	อัตราการลดอุณหภูมิ (°C/min)	สารไครโอโพรเทคแทนท์ (%)	การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (%)
-80	3	DMSO 5%	44.4±13.3
		DMSO 10%	15.6±8.5
		DMSO 15%	26.7±9.7
		DMSO 20%	60.6±9.8
	3	Methanol 5%	6.7±3.9
		Methanol 10%	0
		Methanol 15%	0
		Methanol 20%	27.4±8.9
	3	Propylene glycol 5%	0
		Propylene glycol 10%	0
		Propylene glycol 15%	6.7±2.3
		Propylene glycol 20%	8.3±5.9
-80	5	DMSO 5%	0
		DMSO 10%	16.7±6.7
		DMSO 15%	46.7±6.7
		DMSO 20%	23.7±14.5
	5	Methanol 5%	13.3±6.7
		Methanol 10%	0
		Methanol 15%	0
		Methanol 20%	0
	5	Propylene glycol 5%	0
		Propylene glycol 10%	0
		Propylene glycol 15%	0
		Propylene glycol 20%	0

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยที่แช่แข็งด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์และอัตราการลดอุณหภูมิต่างกันที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส (ต่อ)

อุณหภูมิสุดท้าย (°C)	อัตราการลดอุณหภูมิ (°C/min)	สารไครโอโพรเทคแทนท์ (%)	การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (%)
-80	8	DMSO 5%	0
		DMSO 10%	16.7±6.7
		DMSO 15%	24.5±7.7
		DMSO 20%	28.9±5.9
	8	Methanol 5%	0
		Methanol 10%	0
		Methanol 15%	0
		Methanol 20%	0
	8	Propylene glycol 5%	0
		Propylene glycol 10%	6.7±2.3
		Propylene glycol 15%	0
		Propylene glycol 20%	0

4. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยอย่างง่าย

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยด้วยไอไนโตรเจนเหลวที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวระดับต่างๆกันนาน 10 นาที พบว่าน้ำเชื้อปลายี่สกไทยที่แช่แข็งด้วย DMSO ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 4 เซ็นติเมตร มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 65.6±4.3% ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกับการแช่แข็งที่ความสูง 6 เซ็นติเมตร (76.2±5.1%) ในขณะที่น้ำเชื้อปลายี่สกไทยที่แช่แข็งที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2 เซ็นติเมตร มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำที่สุดเท่ากับ 33.9±5.4% (ตารางที่ 11) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดที่สเปิร์มเคลื่อนที่ 81.5±3.4%

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยหลังการแช่แข็งในถังโฟมที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวต่างๆกัน

ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว (ซม.)	เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (%)
2	33.9±5.4[b]
4	65.6±4.3[a]
6	76.2±5.1[a]

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

5. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยในปริมาณต่างกัน

น้ำเชื้อปลายี่สกไทยที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 และ 0.5 มิลลิลิตร และหลอด cryovial 1.5 มิลลิลิตร ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิที่ 5 องศาเซลเซียส/นาทีเมื่อนำมาละลาย พบว่า การแช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ให้ผลแช่แข็งน้ำเชื้อมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกับการใช้หลอดฟางขนาด 0.5 มิลลิลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าเฉลี่ยประมาณ 80% เท่ากัน (ตารางที่ 12) สำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยด้วยหลอด cryovial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายเหลือเพียง 23.3%

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยหลังการแช่แข็งในปริมาณต่างกัน

ชนิดของภาชนะเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง	เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (%)
หลอดฟาง 0.25 มิลลิลิตร	82.6±4.8[a]
หลอดฟาง 0.5 มิลลิลิตร	78.7±4.6[a]
หลอด cryovial 1.5 มิลลิลิตร	23.3±6.7[b]

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

6. ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกไทยแช่แข็งต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

น้ำเชื้อปลายี่สกไทยที่แช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 10 นาที (เดือนที่ 0) ถูกนำมาละลายมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 76.7±3.9% ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติ (P>0.05) กับการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อสดที่มีค่า 86.7±4.2% และน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 1 เดือนที่สเปิร์มมีการเคลื่อนที่หลังการละลายเท่ากับ 71.5±4.4% (ตารางที่ 13) น้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บไว้นาน 2 เดือน มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายลดลง (P<0.05) เหลือ 56.7±3.5% และในเดือนที่ 3-6 มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 8.9-47.2%

ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกไทยแช่แข็งที่เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวนาน 6 เดือน

ระยะเวลาเก็บรักษา (เดือน)	การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (%)
น้ำเชื้อสด	86.7±4.2[a]
0	76.7±3.9[a]
1	71.5±4.4[a]
2	56.7±3.5[b]
3	47.2±5.3[b]
4	26.7±4.8[c]
5	16.5±3.8[cd]
6	8.9±4.4[d]

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

7. ความสามารถในการปฏิสนธิไข่ของน้ำเชื้อปลายี่สกไทยแช่แข็ง

ความสามารถของน้ำเชื้อปลายี่สกไทยแช่แข็งที่มีต่อไข่ปลายี่สกไทย พบว่า น้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวนาน 1 เดือนสามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ 57.2±4.8% ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติ (P>0.05) กับน้ำเชื้อสดสามารถที่ปฏิสนธิกับไข่ได้ 65.4±5.6%

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

อภิปรายผลการทดลอง

5.1 คุณภาพน้ำเชื้อปลายี่สกไทย

คุณภาพสเปิร์มปลายี่สกไทยมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ โดยความหนาแน่นของสเปิร์มมีค่าลดลงในเดือนธันวาคม สอดคล้องกับผลงานวิจัยในปลาหลายชนิดที่ความหนาแน่นของสเปิร์มลดลงช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ เช่น Striped bass (Vuthiphandchai and Zohar, 1999) และ Atlantic cod (Rouxel et al., 2008) เป็นต้น เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์ม และความดันออสโมติกของน้ำเชื้อปลายี่สกไทยในการศึกษาครั้งนี้มีค่าไม่เปลี่ยนแปลงในช่วงที่ทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ แสดงให้เห็นว่าพ่อพันธุ์ปลายี่สกไทยที่รวบรวมมาจากบ่อเลี้ยง มีคุณภาพสเปิร์มสเปิร์มที่คงที่เมื่อเวลาผ่านไป น้ำเชื้อสดของพ่อพันธุ์ปลายี่สกไทยมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มสูงมากกว่า 80% เช่นเดียวกับการศึกษาในปลาหลายชนิด เช่น ปลาไน (*Cyprinus carpio*; Kruger et al., 1984) ปลา smallmouth yellowfish (*Barbus aeneus*; Vlok and Vuren, 1988) เป็นต้น และน้ำเชื้อสดปลายี่สกไทยมีสเปิร์มที่เคลื่อนที่สูงมากเช่นกันเหมือนที่พบในปลาหลายชนิด (Suquet et al., 1994; Mylonas et al., 1997; Vuthiphandchai et al., 2009b)

5.2 ผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มปลายี่สกไทย

การทดสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มปลายี่สกไทย พบว่า DMSO มีความเป็นพิษน้อยที่สุด รองลงมา คือ ethylene glycol และ propylene glycol ตามลำดับ โดย sucrose มีความเป็นพิษมากที่สุด เนื่องจากมีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วต่ำกว่า 80% ในเวลาเพียง 10 นาทีเท่านั้น ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสาร DMSO, ethylene glycol และ propylene glycol มีความเหมาะสมในการนำไปแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยต่อไป ซึ่งระยะเวลาสมดุลที่ปล่อยให้น้ำเชื้ออยู่ในสารไครโอโพรเทคแทนท์ได้นานสูงสุดเท่าไรก็ขึ้นอยู่กับที่ความเข้มข้นใช้ระหว่างการแช่แข็งต้องไม่ทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่ากว่าค่าที่ต้องการ เช่น จากข้อมูลในตารางที่ 2 น้ำเชื้อปลายี่สกไทยที่อยู่ในสารละลาย DMSO ความเข้มข้นสุดท้าย 5, 10, 15 หรือ 20% นานไม่เกิน 20 นาทีพบว่า สเปิร์มมีการเคลื่อนที่มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ในทุกความเข้มข้น ดังนั้นนักวิจัยสามารถนำข้อมูลเหล่านี้ไปประกอบการตัดสินใจขณะแช่แข็งน้ำเชื้อว่า ช่วงเวลาสมดุลระหว่างใส่สารไครโอโพรเทคแทนท์ความเข้มข้นที่กำหนดลงไปในน้ำเชื้อก่อนลดอุณหภูมิแช่แข็งน้ำเชื้อ (equilibration time) ว่าควรใช้เวลานานเท่าใดเพื่อให้มั่นใจก่อนการแช่แข็งว่าสเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่สูงก่อนการลดอุณหภูมิแช่แข็ง เพราะว่าถ้าหลังการแช่แข็งแล้วสเปิร์มเคลื่อนที่ต่ำก็สามารถสรุปได้ว่าเป็นเพราะปัจจัยอื่น เช่น อัตราการลดอุณหภูมิ หรืออัตราการละลายที่ไม่เหมาะสม เป็นต้น ที่ทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่ต่ำ ไม่ใช่เป็นเพราะว่าสเปิร์มขณะก่อนเริ่มแช่แข็งมีการเคลื่อนที่ต่ำ จากหลักการและเหตุผลดังกล่าวจึงชี้ให้เห็นว่าน้ำเชื้อปลายี่สกไทยที่อยู่ในสารละลาย 20% DMSO นานถึง 30 นาทีที่อุณหภูมิห้องก่อนที่จะลดอุณหภูมิไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เนื่องจากสเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่มากกว่า 80%

น้ำเชื้อปลายี่สกไทยที่เจือจางในสารละลาย ethylene glycol และ propylene glycol ยังคงมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงมากกว่า 80% ขึ้นไป ในทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบตั้งแต่ 5-20% เมื่อเวลานานไม่เกิน 30 นาที และ 20 นาทีตามลำดับ ก็แสดงให้เห็นความเป็นพิษของ ethylene glycol และ propylene glycol ที่มีต่อสเปิร์มปลายี่สกไทยอยู่ในเกณฑ์ต่ำเช่นเดียวกับ DMSO จึงมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยต่อไป สำหรับน้ำเชื้อที่เจือจางในสารละลาย sucrose ในทุกความเข้มข้นมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่า 80% เมื่อเวลานานเกิน 10 นาที จึงมีความเป็นพิษสูงกว่า และไม่ได้ถูกเลือกนำมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาต่อไปตามที่กล่าวมาแล้ว

การศึกษาผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มปลายี่สกไทยในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของศิริพร คชรัตน์ (2545) ที่ใช้สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ 9 ชนิด ทดสอบกับน้ำเชื้อปลาเทโพ พบว่าสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษน้อยที่สุดต่อน้ำเชื้อปลาเทโพ คือ 10% DMSO และ 10% propylene glycol โดยน้ำเชื้อยังคงมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที โดยทั่วไป DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่นิยมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลายชนิด เช่น ปลาไน (Irawan et al., 2010) ปลากะพงแดง (Vuthiphandchai et al., 2009a) ปลาบึก (Mongkonpunya et al., 1995) ปลาดุกยุโรป (Linhart et al., 1993) เป็นต้น สาร propylene glycol มีความเหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน (Horváth and Urbanyi, 2000) แต่การศึกษาในน้ำเชื้อปลาตาเดียว พบว่า propylene glycol มีความเหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตาเดียว มากกว่า DMSO และ glycerol (Rideout et al., 2003)

5.3 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ

5.3.1 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลายี่สกไทยที่ผ่านการแช่แข็ง

การแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติเพื่อศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มปลายี่สกไทย โดยการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด ได้แก่ DMSO, ethylene glycol และ propylene glycol มาแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยด้วยอัตราการลดอุณหภูมิต่างๆกัน มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส พบว่า DMSO เท่านั้นที่เหมาะสมในการแช่แข็ง เพราะทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย (post-thaw sperm motility) มีค่าสูงมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์เมื่อนำน้ำเชื้อมาเจือจางในสารละลาย 10% DMSO และลดอุณหภูมิในอัตรา 5 องศาเซลเซียส/นาที หรือลดอุณหภูมิในอัตรา 7 องศาเซลเซียส/นาที การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยด้วย ethylene glycol และ propylene glycol ให้ผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเฉลี่ยหลังการละลายในทุกความเข้มข้นและอัตราการลดอุณหภูมิมีค่าต่ำกว่า 30% จึงไม่เหมาะสมในการนำสารทั้ง 2 ชนิดนี้มาแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยถ้าใช้ Ca-F HBSS ในการเจือจางน้ำเชื้อ

ชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาโดยทั่วไปมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับ ชนิดปลาและ protocol ที่ใช้แช่แข็งน้ำเชื้อ โดยมักพบว่า DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาน้ำจืดหลายชนิด เช่น ปลาดุกยุโรป (Linhart et al., 1993) ปลาบึก (Mongkonpunya et al., 1995) ปลาสวาย (Kwantong and Bart, 2003) ปลาเทโพ (Kwantong and Bart, 2006) ปลาไน (Irawan et al., 2010) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม DMSO ก็ไม่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาบางชนิด เช่น ปลา Arctic char

Sansone et al. (2002) ได้พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาวยุโรป (*Dicentrarchus labrax*) โดยการประเมินความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อสเปิร์มที่อุณหภูมิห้อง พบว่า DMSO 5% และ 7%, ethylene glycol 7% และ 10% และ propylene glycol 7% และ 10% มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำสุด ซึ่งเมื่อนำสารเหล่านี้ไปแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาว พบว่าการใช้ ethylene glycol 10% ให้ผลดีที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อ โดยน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เจือจางด้วย ethylene glycol 10% แล้วปล่อยให้อยู่ในสภาวะสมดุลที่อุณหภูมิ 0-2 องศาเซลเซียสนาน 6 ชั่วโมงแล้วลดอุณหภูมิด้วยอัตรา -15 องศาเซลเซียส/นาที ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย (post-thaw sperm motility) มีค่าไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด

Leung (1987) แช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ด้วย DMSO, glycerol

Mongkonpunya et al. (1995) แช่แข็งน้ำเชื้อปลาบึก โดยทำการเจือจางน้ำเชื้อปลาบึก (*Pangasianadon gigas Chevey*) ในน้ำยา calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) ที่มี DMSO หรือ methanol ที่ระดับ 5% หรือ 14% พบว่าการใช้ 5% DMSO ทำให้สเปิร์มปลาบึกมีการเคลื่อนที่ประมาณ 50% ในขณะที่ 14% DMSO และ 14% methanol ไม่ทำให้สปิร์มเคลื่อนที่

5.3.2 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทย ด้วย Extender 7

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ extender 7 และสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด (DMSO, methanol และ propylene glycol) พบว่า การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียสก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ให้ผลการทดลองดีกว่าการใช้อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียสแล้วเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เพราะการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงกว่า ผลการทดลองที่ได้ยังคงยืนยันว่า DMSO ให้ผลการแช่แข็งที่ดีกว่า methanol และ propylene glycol เมื่อใช้สารละลาย Extender 7 ในการเจือจางน้ำเชื้อปลายี่สกไทยเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อ โดยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายที่มีค่าสูงสุด (60.6±9.8%) ได้จากชุดการทดลองที่ใช้สารละลาย 20% DMSO และลดอุณหภูมิ 3 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5 และ 8 องศาเซลเซียส/นาที ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส หรือที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส ให้ผลการทดลองที่ไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าช่วงระดับอัตราการลดอุณหภูมิ 3-8 องศาเซลเซียส/นาที ไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย

การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย (post-thawed sperm motility) ของน้ำเชื้อปลาที่แช่แข็ง มีความสำคัญต่อการพัฒนาวิธีการแช่แข็ง ซึ่งในการพัฒนา protocol น้ำเชื้อปลาชนิดใดๆก็

การพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยที่มีประสิทธิภาพด้วยการทดลองบูรณาการปัจจัยที่มีผลต่อการแช่แข็ง เช่น การเลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่แตกต่างกันในการแช่แข็ง การเลือกใช้อุณหภูมิสุดท้ายที่แตกต่างกันในการแช่แข็งในการทดลองพัฒนา protocol การแช่แข็งที่มีประสิทธิภาพ แสดงให้เห็นว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยสามารถทำได้โดยใช้สารละลาย Extender 7 ร่วมกับ DMSO นอกเหนือไปจากสารละลาย Ca-F HBSS ร่วมกับ DMSO ที่ให้ผลการทดลองที่ดีเช่นกันตามที่กล่าวมาแล้วเหมือนกับการทดลองในปลาชนิดอื่น Kwantong and Bart (2003) ได้ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวาย (*Pangasius hypophthalmus*) ด้วยการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 4 ชนิด (methanol, DMSO, dimethyl acetamide; DMA และ ethylene glycol; EG) ร่วมกับการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 3 ชนิด (Ca-F HBSS, HBSS and sodium chloride, NaCl) และลดอุณหภูมิใน 2 ลักษณะ (one- and two-step) พบว่า อัตราการปฏิสนธิมีค่าสูงสุดเมื่อแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายด้วย 12% DMSO โดยใช้ 0.9% NaCl และลดอุณหภูมิ one-step ในอัตรา -10 องศาเซลเซียส/นาที และการใช้สารละลายบัฟเฟอร์แต่ละชนิดในการแช่แข็งน้ำเชื้อไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของไข่ปลา รวมทั้งยังพบว่าอัตราการปฏิสนธิของไข่ปลาสวายที่มีค่าสูงยังสามารถได้มาจากการผสมเทียมไข่ปลากด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส/นาทีเมื่อใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ DMSO หรือ DMA และสารละลายบัฟเฟอร์ 0.9% NaCl หรือ Ca-F HBSS นอกจากนี้ Gwo et al. (1991) ได้ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Atlantic croaker และรายงานว่า sperm extender ที่ประกอบด้วย เกลือแกง กลูโคส และ ซูโครส สามารถใช้เจือจางน้ำเชื้อขณะทำการแช่แข็ง โดยมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ sperm extender ชนิดอื่นๆ ที่มีความสลับซับซ้อน หรือมีสารเคมีหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ และยังพบว่าอัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็งตั้งแต่ -10 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง -150 องศาเซลเซียส/นาที ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิขณะนำมาผสมกับไข่ ด้วยเหตุที่ Routray et al. (2007) รายงานว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่นิยมนำมาแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลายชนิดได้แก่ DMSO, methanol และ propylene glycol ดังนั้นในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยจึงได้นำ methanol มาทดสอบประสิทธิภาพการแช่แข็งด้วยการใช้สารละลาย

โดยทั่วไปการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาให้ประสบผลสำเร็จยังมีความเกี่ยวข้องกับตัวแปรที่เกี่ยวข้องอื่นๆ เช่น คุณภาพสเปิร์ม ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ อัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลาย เป็นต้น ซึ่งการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลายชนิดก็มีรายงานว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาให้ประสบผลสำเร็จอาจสามารถเลือกใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ได้มากกว่า 1 ตัว เช่น ปลากะพงแดง (Vuthiphandchai et al., 2009a) ปลากดคัง (Muchlisin et al., 2004) และ ปลา common snook (Tiersch et al., 2004) Nahiduzzaman et al. (2011) รายงานว่า การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Puntius sarana*) ให้ประสบผลสำเร็จสามารถทำได้ด้วยการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 10% DMSO หรือ 10% methanol ซึ่งต่างให้ค่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงเช่นกัน

สาเหตุที่การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่หลังการละลายสูงกว่า (post-thawed sperm motility) การแช่แข็งมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส เนื่องจากการลดอุณหภูมิมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส ทำให้น้ำเชื้อแข็งตัวเต็มที่ ซึ่งเมื่อนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ทำให้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ เปรียบเทียบกับการลดอุณหภูมิมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส อาจทำให้น้ำเชื้อยังไม่แข็งตัว ซึ่งเมื่อนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวทันที อาจทำให้มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว หรือเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ ทำให้สเปิร์มได้รับอันตราย ไม่เคลื่อนที่ หรือตายได้ Viveiros et al. (2000) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกเทศ (*Clarias gariepinus*) โดยนำน้ำเชื้อเจือจางใน Ginzburg fish ringer และใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ DMSO และ methanol (ความเข้มข้น 5-25%) และแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 2, 5 และ 10 องศาเซลเซียส/นาที ไปที่อุณหภูมิสุดท้ายต่างกันที่ -25, -30, -35, -40, -45, -50, -55, -60, -65 และ -70 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 1-3 สัปดาห์ พบว่า methanol ให้ผลการแช่แข็งที่ดีกว่า DMSO และ การเลือกใช้อุณหภูมิสุดท้ายก่อนนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวมีความสัมพันธ์กับอัตราการลดอุณหภูมิ เช่น อุณหภูมิสุดท้ายที่เหมาะสมก่อนการนำน้ำเชื้อไปแช่ในไนโตรเจนเหลวเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -2 องศาเซลเซียส/นาที คือ -40 องศาเซลเซียส และที่อัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส/นาที ควรลดอุณหภูมิสุดท้ายมาที่ -45 หรือ -50 องศาเซลเซียส และที่อัตราการลดอุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส/นาที ควรลดอุณหภูมิสุดท้ายมาที่ -55 องศาเซลเซียสก่อนนำน้ำเชื้อไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวต่อไป

5.4 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยอย่างง่าย

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยด้วยไอไนโตรเจนเหลวที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 4 เซ็นติเมตร และ 6 เซ็นติเมตร มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด แสดงให้เห็นว่า การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยด้วยไอไนโตรเจนเหลว สามารถทำได้ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 4-6 เซ็นติเมตรโดยให้น้ำเชื้อปลายี่สกไทยสัมผัสไอไนโตรเจนเหลว 10 นาที การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาอย่างง่ายในถังโฟมด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลว ทำได้ง่าย ไม่ต้องใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติที่มีราคาแพง จึงเป็นเทคโนโลยีที่มีราคาถูก เหมาะสำหรับผู้ประกอบการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำที่ต้องการนำเอาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลามาใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและ

Irawan et al. (2010) แช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนด้วยสารละลาย common carp sperm extenders (CCSE) 6 สูตรด้วย DMSO, methanol และ propylene glycol ความเข้มข้น 10% และแช่แข็งด้วยอัตราลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาที พบว่าน้ำเชื้อที่เจือจางด้วย CCSE 2 และ DMSO ให้ประสิทธิภาพการแช่แข็งสูงสุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด และเมื่อนำน้ำเชื้อปลาไนมาแช่แข็งในไอไนโตรเจนเหลว 2 เซ็นติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวนาน 10 นาที มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อปลาไนที่แช่แข็งด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ

Ji et al. (2004) แช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea perch (*Lateolabrax japonicus*) โดยการใช้สารละลาย Extender 3 ชนิดคือ modified plaice Ringer solution (MPRS), D-15 และ modified Mounib's medium (MMM) เพื่อเจือจางน้ำเชื้อ แล้วใส่สารไครโอโพรแทคแทนท์ DMSO ความเข้มข้น 6%, 10% และ 14% ทำการแช่แข็งที่ระดับความสูง 2, 6 และ 13 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 10 นาที จึงนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่า การแช่แข็งน้ำเชื้อด้วย 10% DMSO ที่ความสูงเหนือผิวหน้าสารไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่หลังการละลายสูงที่สุด ในขณะที่การแช่แข็งที่ระดับความสูง 2 เซนติเมตร มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าต่ำสุด

5.5 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยในปริมาณต่างกัน

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 และ 0.5 มิลลิลิตร ให้ผลดีกว่าการแช่แข็งด้วยหลอด cryovial 1.5 มิลลิลิตร แสดงว่า การแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกไทยสามารถทำได้ผลดีด้วยการใช้หลอดฟางขนาด 0.25 และ 0.5 มิลลิลิตร เพราะมีการเคลื่อนที่สเปิร์มหลังการละลายสูงถึง 80% สาเหตุที่ทำให้การแช่แข็งในหลอด cryovial ให้ผลไม่ดี (มีการเคลื่อนที่สเปิร์มเพียงประมาณ 20%) น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับความหนาของหลอด cryovial ทำให้การแพร่กระจายของความเย็นเข้าไปภายในหลอด cryovial ต่ำกว่าหลอดฟางที่มีขนาดบางกว่ามาก ส่งผลให้อุณหภูมิของน้ำเชื้อที่แช่แข็งในหลอด cryovial ลดช้ากว่าน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยหลอดฟาง อีกทั้งปริมาณน้ำเชื้อที่มากกว่าในหลอด cryovial ยังมีผลโดยตรงที่ต้องการเวลาที่มากขึ้นเพื่อทำให้น้ำเชื้อทั้งหมดแข็งตัวเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อในหลอดฟางที่มีปริมาณน้อย ซึ่งจะแข็งตัวได้เร็วกว่าในระยะเวลาที่ไม่นานนัก ดังนั้นเมื่อนำน้ำเชื้อในหลอด cryovial ไปแช่แข็งจึงทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมากในขณะที่น้ำเชื้อในหลอดฟางมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิน้อยกว่า จึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้น้ำเชื้อแช่แข็งในหลอดฟางประสบความสำเร็จได้ดีกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งใน cryovial เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากัน (Lahnsteiner et al., 1997)

การแช่แข็งน้ำเชื้อในปริมาณที่มากขึ้นแม้ว่าจะมีประโยชน์ในการนำไปใช้ประโยชน์เพาะพันธุ์ปลาเชิงพาณิชย์ได้ดี แต่ผลการวิจัยที่ได้มีค่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายต่ำ ซึ่งการพัฒนางานวิจัยแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยปริมาณมากควรเลือกใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่สูงขึ้น รวมทั้งพัฒนาวิธีการแช่แข็งด้วยวิธีอื่นๆเช่น ลดอุณหภูมิ 2 หรือ 3 ขั้น (two- or three-steps freezing)

5.6 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกไทยแช่แข็งต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

น้ำเชื้อปลายี่สกไทยที่แช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 2 เดือน มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายลดลงเหลือประมาณ 50% เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดที่สเปิร์มมีการเคลื่อนที่สูงมาก คาดว่ามีสาเหตุมาจากปัจจัยสภาพแวดล้อมเช่น การนำตัวอย่างแช่แข็งออกจากถังไนโตรเจนเหลวมาประเมินคุณภาพ อาจทำให้อุณหภูมิของหลอดฟางเปลี่ยนแปลงก่อนการละลาย โดยเฉพาะถ้ามีตัวอย่างแช่แข็งจำนวนมากเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว จะใช้เวลานานขึ้นในการนำเอาตัวอย่างที่ต้องการออกมาประเมินคุณภาพ เพราะหลอดฟางต้องเก็บรักษาใน goblet ที่นำไปเก็บใน canister โดยใน canister แต่ละอันจะมี goblet 2 ชั้นซึ่งในแต่ละชั้นจะมีหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งเก็บรักษาเอาไว้ อีกทั้งถังไนโตรเจนเหลวยังมีน้ำเชื้อสัตว์น้ำอื่นๆที่เก็บแช่แข็งอยู่รวมกันเป็นจำนวนมาก ทำให้มีการเปิดถังไนโตรเจนเหลวอยู่บ่อยครั้งในแต่ละเดือน อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำเชื้อแช่แข็งขณะเก็บรักษาไม่คงที่ตามที่ควรเป็น ดังนั้นถ้ามีการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งนานขึ้นเมื่อสุ่มตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งออกมาประเมินคุณภาพในแต่ละเดือน ก็อาจทำให้คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลายลดต่ำลง โดยเฉพาะการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในเดือนที่ 3-6 มีค่าเฉลี่ยลดลงต่ำกว่า 10% ในทำนองเดียวกัน Vuthiphandchai et al. (2007) ได้แช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำและเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว 60 วันจึงพบการลดลงของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มกุ้งกุลาดำหลังการละลายอย่างมีนัยสำคัญ โดยทั่วไปแล้วความสำเร็จในการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยประการ เช่น อัตราการลดอุณหภูมิ, อัตราการละลาย, ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ และสูตรของน้ำยาที่เหมาะสมที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อ รวมทั้งความสมบูรณ์ของน้ำเชื้อปลาแต่ละชนิด และสภาพแวดล้อมที่เกี่ยวข้องในระหว่างการเก็บรักษาซึ่งต้องมีความเหมาะสมตามที่กล่าวมาแล้ว (Tiersch et al., 1994; Vuthiphandchai et al., 2009a; Yavas and Bozkurt, 2011.) อย่างไรก็ตามการแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำและเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวในระยะเวลานานก็ได้มีงานวิจัยที่รายงานความสำเร็จของการแช่แข็งเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลานาน เช่น

ทัศนีย์ ภูพิพัฒน์และคณะ (2529) ได้แช่แข็งน้ำเชื้อปลาบึกโดยใช้น้ำยาสูตรที่ 1 และ 8%DMSO โดยลดอุณหภูมิด้วยวิธีการแช่ในไอไนโตรเจนเหลวนาน 15 นาที จากนั้นนำมาแช่ไว้ในถังไนโตรเจนเหลวนาน 4 เดือน พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าเท่ากับ 60%

พลชาติ ผิวเณร และ พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข (2546) แช่แข็งน้ำเชื้อปลานิลโดยใช้น้ำยา modified Cortland และใช้ 10%DMSO เจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยา 1:5 โดยลดอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ถึง -60 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ที่ -60 องศาเซลเซียส นาน 2 วินาทีก่อนแช่ลงใน

Suquet et al.(1998) ได้แช่แข็งน้ำเชื้อปลา turbot (*Psetta maxima*) ด้วยการใช้ 10% DMSO ร่วมกับ 10% BSA พบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวนาน 9 เดือนมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงระหว่าง 60 - 90% ภายหลังการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

5.7 ความสามารถในการปฏิสนธิไข่ของน้ำเชื้อปลายี่สกไทยแช่แข็ง

ประสิทธิภาพของน้ำเชื้อปลายี่สกไทยแช่แข็งนาน 1 เดือนในการปฏิสนธิไข่ปลายี่สกไทยไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ๆแล้วนำไปผสมเทียม แสดงให้เห็นถึง ความเป็นไปได้ในการนำน้ำเชื้อปลายี่สกไทยแช่แข็งมาใช้ประโยชน์ทั้งในด้านการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์ สอดคล้องกับผลการวิจัยในปลาหลายชนิด เช่น Ott and Horton (1971) ได้แช่แข็งน้ำเชื้อปลา chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytstha*) และ coho salmon (*O. kisutch*) ด้วย DMSO ความเข้มข้น 8% และเมื่อเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวนาน 7 วัน สามารถปฏิสนธิไข่ได้ 79% Ding et al. (2009) ได้แช่แข็งน้ำเชื้อปลาแมนดาริน (Mandarin fish; *Siniperca chuatsi*) ด้วย DMSO ความเข้มข้น 10% แล้วเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว พบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้นาน 1 สัปดาห์ และ 1 ปี สามารถปฏิสนธิไข่ปลาได้ประมาณ 66% และ 54% ตามลำดับไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด อย่างไรก็ตาม กฤษณ์ มงคลปัญญา (2536) แช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวายที่เจือจางในสารละลาย 0.85% NaCl หรือ Ca-F HBSS ร่วมกับ DMSO ความเข้มข้น 8, 10 หรือ 12% ด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -10, -20 หรือ -30 องศาเซลเซียสต่อนาที พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าไม่แตกต่างกันระหว่างสารละลายทั้งสองชนิดแต่แปรปรวนไปตามอัตราการลดอุณหภูมิและเมื่อนำน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งไปผสมเทียมกับไข่ปลาสวายด้วยการใช้อัตราส่วนของสเปิร์มต่อไข่แตกต่างกันได้อัตราการปฏิสนธิต่ำ เนื่องจากการใช้จำนวนสเปิร์มที่เหมาะสมในการปฏิสนธิกับไข่อาจน้อยไป การเพิ่มปริมาณน้ำเชื้อแช่แข็งที่ละลายเพื่อนำไปผสมเทียม ซึ่งเป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์สปิร์มในการปฏิสนธิกับไข่เมื่อสเปิร์มเคลื่อนที่ต่ำ สามารถทำให้อัตราการปฏิสนธิเพิ่มสูงได้ เนื่องจากการปฏิสนธิไข่ปลาแต่ละชนิดต่างก็ต้องการจำนวนสเปิร์มที่เหมาะสมในการปฏิสนธิไข่ 1 ใบเช่น ปลา channel catfish คือ 1.25×10^5 ตัวต่อไข่ 1 ใบ (Bart and Dunham, 1994) ปลานิล 1.40×10^5 ตัวต่อไข่ 1 ใบ (Rana and McAndrew, 1989) เป็นต้น

อย่างไรก็ตามการศึกษาการผสมเทียมไข่ปลายี่สกไทยด้วยน้ำเชื้อปลายี่สกไทยแช่แข็งที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวในระยะเวลานานขึ้นหลายๆเดือน ควรได้มีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป โดยเฉพาะในประเด็นของความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และจำนวนสเปิร์มที่ใช้ในการปฏิสนธิไข่ ที่มีต่ออัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟัก เนื่องจากผลการวิจัยครั้งนี้ได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งในการปฏิสนธิไข่ไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด และผลงานวิจัยที่มีการศึกษาน้ำเชื้อแช่แข็งในปลาหลายชนิดที่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายต่ำ ก็สามารถปฏิสนธิไข่ได้ จึงแสดงให้เห็นว่าปัจจัยการปฏิสนธิไข่ปลาถูกควบคุมโดยการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและจำนวนสเปิร์มที่ใช้ อย่างไรก็ตามแม้ว่าการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ประเมินอัตราการฟัก ก็มีความเป็นไปได้ว่าลูกปลาน่าจะฟักออกมาได้ไม่ต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด ซึ่งควรมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป โดยเฉพาะการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อให้ได้ปริมาณมากและสามารถปฏิสนธิไข่ได้อัตราการฟักที่ดีต่อไป การประเมินอัตราการปฏิสนธิไข่ปลาที่ระยะ gastrula เป็นที่ยอมรับว่าสะท้อนอัตราการปฏิสนธิได้ดี เพราะในขณะนี้ตัว

สรุปผลการทดลอง

1. คุณภาพสเปิร์มปลายี่สกไทยมีการเปลี่ยนแปลงน้อยระหว่างการสุ่มตรวจ โดยความหนาแน่นของสเปิร์มมีค่าลดลงในเดือนธันวาคม

2. DMSO มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มปลายี่สกไทยน้อยที่สุด

3. น้ำเชื้อปลายี่สกไทยสามารถแช่แข็งและเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ด้วยการนำน้ำเชื้อมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS และแช่แข็งด้วยการใช้ 10% DMSO และลดอุณหภูมิในอัตรา 5 องศาเซลเซียส/นาที หรือลดอุณหภูมิในอัตรา 7 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส แล้วเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

4. น้ำเชื้อปลายี่สกไทยสามารถแช่แข็งด้วยการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ extender 7 ร่วมกับ 20% DMSO และลดอุณหภูมิที่อัตรา 3 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส แล้วเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

5. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกไทยด้วยไอไนโตรเจนเหลว สามารถทำได้ด้วยการใช้หลอดฟางมาแช่แข็งที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 4-6 เซ็นติเมตร โดยให้น้ำเชื้อปลายี่สกไทยสัมผัสไอไนโตรเจนเหลว 10 นาทีก่อนการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว

6. น้ำเชื้อปลายี่สกไทยแช่แข็งที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 1 เดือนมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และศักยภาพในการปฏิสนธิไข่ปลายี่สกไทย ไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด สามารถนำมาใช้ประโยชน์เพื่อการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์ปลายี่สกไทยได้ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง หลักการ/วิธีการ/ประโยชน์. กรุงเทพ:มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

ทัศนีย์ ภูพิพัฒน์,บุญนำ สุขทิศ,สุริยา ทานสุทัศน์ และเพียงใจ แก้วจรูญ. 2529.การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพาและปลาบึก.เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 66. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ

พลชาติ ผิวเณร และ พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข. 2546. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำในรูปน้ำเชื้อแช่แข็ง. ปทุมธานี: สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง.

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

สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด. 2553. การจัดทำองค์ความรู้ (Knowledge Management) เรื่อง การเพาะและอนุบาลปลายี่สก. กรมประมง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 41 หน้า

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

Bart, A.N. and Dunham, R.A. 1996. Effect of sperm concentration and number on fertilization efficiency with channel catfish (*Ictalurus punctatus*) egg and blue catfish (*I. furcatus*) spermatozoa. Theriogenology. 45: 673-682.

Bolla, S., Holmeljord, I. And Refstie, T. 1987. Cryologic preservation of Atlantic salmon sperm. Aquaculture 65:371-374.

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

Cabrita, E., Robles, V., Alvarez, R. and Herra´ez, M.P. 2001. Cryopreservation of rainbow trout sperm in large volume straws: application to large scale fertilization. Aquaculture 201: 301-314.

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.

Ding, S., Ge, J., Hao C., Zhang, M., Yan, W., Xu, Z., Pan, J., Chen, S., Tian, Y. and Huang, Y. 2009. Long-term cryopreservation of sperm from Mandarin fish *Siniperca chuatsi*. Animal Reproduction Science 113: 229-235.

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

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.

IUCN. 1990. 1990 IUCN Red List of Threatened Animals. IUCN. Gland, Switzerland and Cambridge. UK.

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

Jackson, L.F. and Sullivan, C.V. 1995. Reproduction of white perch: The annual gametogenic cycle. Transactions of the American Fisheries Society 124: 563-577.

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

Kruger, J.C.De W., G.L. Smit, J.H.J.Van. Vuren and J.T. Ferreira. 1984. Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* L. and *Oreochromis mossambicus* (Peters). Journal of Fish Biology 24: 263-272.

Kwantong, S. and Bart, A.N. 2003. Effect of cryoprotectants, extenders and freezing rates on the fertilization rate of frozen striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), sperm. Aquaculture Research 34: 887-893.

Kwantong, S. and Bart, A.N. 2006. Cryopreservation of black ear catfish, *Pangasius larnaudii*, (Bocourt) sperm. Aquaculture Research 37: 955-957.

Lahnsteiner, F., Weismann, T. and Patzner. R.A. 1997. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. Aquaculture Research 28: 471-479.

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

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.

Leung, L.K.P. 1987. Cryopreservation of spermatozoa of the barramundi, *Lates calcarifer* (Teleostei: Centropomidae). Aquaculture 64(3): 243-247.

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

Mongkonpunya, K., Chairak, N., Pupipat, T. and Tiersch, T.R. 1995. Cryopreservation of 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.

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

Nahiduzzaman M., Hassan M.M., Khanam U.H., Mamuna S.N.A., Hossain M.A.R. and Tiersch T.R. 2011. Sperm cryopreservation of the critically endangered olive barb (Sarpunti) *Puntius sarana* (Hasemenon, 1822). Cryobiology 62: 62-67.

Ohta, H., Kawamura, K., Unuma, T. and Takegoshi Y. 2001. Cryopreservation of the sperm of the Japanese bitterling. Journal of Fish Biology 58: 670-681.

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.

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.

Routray, P., Verma, D.K., Sarkar, S.K. and Sarangi, N. 2007. Recent advances in carp seed production and milt cryopreservation. Fish Physiology and Biochemistry 33: 413-427.

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.

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

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

Shangguan, B. and Crim, L.W. 1995. The effect of stripping frequency on sperm quantity and quality in winter flounder (*Pleuronectus americanus* Walbaum). In: Proceeding of the fifth international symposium on the reproductive physiology of fish. Edited by F.W. Goetz and P. Thomas. Texas, U.S.A. pp. 142.

Suquet, M.ม Dreanno, C., Petton, B., Normant, Y., Omnes, M.H. and Billard, R. 1998. Long-time effects of the cryopreservation of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa. Aquatic Living Resources 11:45-48.

Suquet, M., Omnes, M.H., Normant, Y. and Fauvel, C. 1992. Influence of photoperiod, frequency of stripping and presence of females on sperm output in turbot, *Scophtalmus maximus* L. Aquaculture and Fisheries Management 23: 217-225.

Suquet, M., Billard, R., Cosson, J., Dorange, G., Chauvaud, L., Mugnier, C. and Fauvel, C. 1994. Sperm features in turbot (*Scophthalmus maximus*): a comparison with other freshwater and marine fish species. Aquatic Living Resources 7: 283-294.

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

Tiersch, T.R., Wayman, W.R., Skapura, D.P., Neidig. C.L. and Grier, H.J. 2004. Transport and cryopreservation of sperm of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). Aquaculture Research 35: 278-288.

Viveiros, A.T.M., So, N. And Komen, J. 2000. Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*: cryoprotectants, freezing rates and sperm : egg dilution ratio. Theriogenology 54: 1395-1408.

Vlok, W. and Vuren, J.H.J.Van. 1988. Physical composition of the semen of *Barbus aeneus*, the smallmouth yellowfish (Cyprinidae). Comparative Biochemistry and Physiology 90A: 387-389.

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

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

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

Warnecke, D. and Pluta, H-J. 2003. Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm using dimethyl-acetamide as the main cryoprotectant. Aquaculture 215: 167-185.

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

Zohar, Y., Billard, R. and Weil, C. 1984. La reproduction de la daurade (*Sparus aurata*) et du bar (*Dicentrarchus labrux*): Connaissance du cycle sexuel et control de la gamétogenèse et de la ponte. In: L'Aquaculture du Bar et des Sparidés. Edited by G. Barnabé and R. Billard. INRA publications, Paris, pp. 3-24.