รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

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

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย
สุบัณฑิต นิ่มรัตน์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2559A10802031
สัญญาเลขที่ 57/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

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

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[1]
สุบัณฑิต นิ่มรัตน์[2]

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

ธันวาคม 2559

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนเพื่อการจัดตั้งธนาคาร น้ำเชื้อ สำเร็จเรียบร้อยลงได้ โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัย จากงบประมาณเงินรายได้ จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 57/2559

บทคัดย่อ

งานวิจัยเรื่อง การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนเพื่อการจัดตั้งธนาคาร น้ำเชื้อ ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์ม ปลาไน ผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน ผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของ สเปิร์มปลาไนที่ผ่านการแช่แข็ง โดยในการทดลองศึกษาคุณภาพสเปิร์มได้นำพ่อพันธุ์ปลาไนมาตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มเดือนละครั้งในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ การศึกษาผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน โดย การรวบรวมน้ำเชื้อออกจากพ่อพันธุ์ปลาไนมาเจือจางในสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ 9 ชนิด (dimethyl sulfoxide ; DMSO, ethylene glycol, propylene glycerol, acetamide, sucrose, glycerol, formamide, ethanol และ methanol) ที่ 4 ระดับความเข้มข้น (5, 10, 15 และ 20%) เป็นระยะเวลาต่างๆกัน (10-180 นาที) แล้วประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ระยะเวลาต่างๆกัน และการศึกษา ผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของ สเปิร์ม ปลาไนผ่านการแช่แข็ง ทำโดยนำน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ปลาไนมาใส่ในสารไครโอโพรเทคแทนท์แล้วนำไปลดอุณหภูมิด้วยอัตราการลดอุณหภูมิรูปแบบต่างกันแล้วนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวและประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย ผลการศึกษาพบว่าคุณภาพสเปิร์มของน้ำเชื้อสด ที่รวบรวมออกมาจาก ปลาไนมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ โดยความหนาแน่นของสเปิร์ม มีค่าสูงขึ้นในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ปลาไน ขึ้นอยู่กับ ชนิดและ ระดับ ความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ รวมทั้ง ระยะเวลาที่สเปิร์ม เจือจาง อยู่ในสาร ละลาย ไครโอโพรเทคแทนท์ สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษต่ำต่อสเปิร์มปลาไนได้แก่ DMSO, ethylene glycol, propylene glycol, sucrose, ethanol และ methanol น้ำเชื้อปลาไนที่แช่แข็งด้วย DMSO โดยการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ หรือแช่แข็งด้วย DMSO ในไอไนโตรเจนเหลวภายในกล่องโฟม ต่างก็ให้ผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสด แม้ว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงเล็กน้อยระหว่างการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนในปริมาณที่มากขึ้นในหลอด Cryotube มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกับการแช่แข็งด้วยหลอดฟาง การศึกษาความสามารถในการปฏิสนธิไข่ปลาไนด้วยน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งในชุดการทดลองต่างๆ พบว่าน้ำเชื้อปลาไนที่แช่แข็งหลังการละลายสามารถปฏิสนธิไข่ปลาไนได้ค่าเฉลี่ย 35.8-63.4% ซึ่งมีค่าต่ำกว่าน้ำเชื้อสด (69.3-74.5%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

คำสำคัญ: น้ำเชื้อ; ปลาไน; การแช่แข็ง; ไนโตรเจนเหลว; การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

ABSTRACT

Studies on change in sperm quality, effects of cryoprotectants on sperm motility and effects of cooling rates on post-thawed sperm motility of common carp (*Cyprinus carpio*) were accomplished. Male broodstocks were collected monthly for the semen during the spawning season for evaluation on the change in sperm quality. Evaluation of effects of cryoprotectants on sperm motility was performed by diluting extended semen into nine cryoprotectant solutions, namely dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol, propylene glycerol, acetamide, sucrose, glycerol, formamide, ethanol and methanol with four concentration levels (5, 10, 15 and 20%) at various time (10-180 min.) before evaluation of percentage of sperm motility. Assessment on the effects of cooling rates on post-thawed sperm motility was done by diluting semen into cryoprotectants prior to freezing with different cooling protocols and storage in liquid nitrogen. Sperm quality of fresh semen changed during the spawning season with increased sperm concentration towards the end of the spawning season. Cryoprotectant toxicity depended on type and concentration of cryoprotectants and exposure time. DMSO, ethylene glycol, propylene glycol, sucrose, ethanol and methanol elicited low toxicity on sperm motility. Semen of *C. carpio* diluted with DMSO and frozen by using either controlled-rate programmable freezer or liquid nitrogen vapor resulted in post-thawed sperm motility, comparable with fresh semen despite a slight decline of sperm motility during the cryostorage. Cryopreservation of *C. carpio* sperm in the cryotubes showed a comparable efficiency with that of French straw. Fertilization study demonstrated that post-thawed *C. carpio* sperm in the treatments were able to fertilize eggs with average fertilization rates of 35.8-63.4%, significantly lower ($P<0.05$) than those of fresh sperm (69.3-74.5%).

Keywords: Semen; Common carp; Cryopreservation; Liquid nitrogen; Sperm motility

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		i
บทคัดย่อ		ii
Abstract		iii
สารบัญ		iv
สารบัญตาราง		v
สารบัญรูป		vi
บทที่		
1	บทนำ	1
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
3	วิธีดำเนินงานวิจัย	11
4	ผลการทดลอง	22
5	อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	40
เอกสารอ้างอิง		46
ผลผลิต (Output)		51
ประวัติคณะผู้วิจัย		52

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อปลาไนในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่.....	22
2	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	23
3	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย ethylene glycol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	24
4	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย propylene glycol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	25
5	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย acetamide ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	26
6	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย sucrose ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	27
7	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย glycerol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	28
8	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย formamide ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	29
9	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย ethanol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	30
10	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย methanol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	31
11	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนหลังการแช่แข็งและเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วย Ca-F HBSS และ DMSO ที่อัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน.....	33
12	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนหลังการแช่แข็งและเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วย Ca-F HBSS และ Propylene glycol ที่อัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน.....	34
13	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนหลังการแช่แข็งและเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วย Ca-F HBSS และ Ethylene glycol ที่อัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน.....	35
14	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนที่แช่แข็งด้วยการใช้ Ca-F HBSS และ 10% DMSO ที่อุณหภูมิสุดท้ายและอัตราการลดอุณหภูมิต่างๆกัน.....	
15	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน หลังการแช่แข็งในไอไนโตรเจนเหลว ด้วยการใช้ DMSO ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2, 4 และ 6 เซนติเมตร.....	

ตารางที่ **หน้า**

16 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนหลังการแช่แข็งในปริมาณต่างกัน.. 38

17 อัตราการปฏิสนธิไข่ปลาไนที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งด้วย DMSO ความเข้มข้นต่างๆกันด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ..... 39

18 อัตราการปฏิสนธิไข่ปลาไนที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งด้วย DMSO ความเข้มข้นต่างๆกันที่แช่แข็งในกล่องโฟมด้วยไอไนโตรเจนเหลว..... 39

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	พ่อพันธุ์ปลาไน	13
2	การรวบรวมพ่อพันธุ์ปลาไนมาใช้ในการทดลอง	13
3	การรีดน้ำเชื้อปลาไนมาใช้ในการทดลอง	14
4	น้ำเชื้อปลาไนที่รวบรวมมาใช้ในการทดลอง	14
5	หลอดฟางสำหรับใช้ในการทดลองแช่แข็ง	20
6	การปิดปลายหลอดฟาง	20
7	ลักษณะของหลอดฟางที่ปิดปลายหลอดก่อนการแช่แข็ง	21
8	เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ	21

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย

ปลาไน (*Cyprinus carpio*) เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีความสำคัญชนิดหนึ่งเป็นที่นิยมเพาะเลี้ยงและบริโภคทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศทั่วโลก เป็นปลาที่อยู่ในครอบครัว Cyprinidae มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cyprinus carpio* และมีชื่อสามัญว่า Common carp รูปร่างลักษณะคล้ายปลาตะเพียน มีเกล็ดกลมใหญ่ทั่วตัว นอกจากส่วนหัวไม่มีเกล็ดปากเล็กไม่มีฟัน ริมฝีปากหนาและมีหนวดสี่เส้น ครีบหลังเป็นครีบเดี่ยวยาวส่วนสีของปลาไนโดยมากมักจะเป็นสีเงินปนเทาบางทีก็เหลืองอ่อน บางตัวจะเป็นสีทองตลอดตัว ปลาไนเป็นปลาที่เพาะเลี้ยงง่าย โตเร็ว ทนทานต่อสภาพแวดล้อม กินอาหารได้เกือบทุกชนิดและเจริญเติบโตได้ดี ในแหล่งน้ำจืดต่าง ๆ ในปัจจุบันการเพาะขยายพันธุ์ปลาไนในประเทศไทยมีลักษณะเช่นเดียวกับการเพาะขยายพันธุ์ปลาชนิดอื่นๆอีกหลายชนิด ที่สามารถทำได้ในระดับเชิงพาณิชย์ แต่ในบางช่วงเวลาพ่อพันธุ์ปลาไนมีปริมาณน้ำเชื้อลดลง (expressible milt) ในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ในขณะที่แม่พันธุ์ปลาไนมีไข่แก่ ทำให้การเพาะพันธุ์ปลาไนไม่ว่าจะเป็นวิธีการเพาะพันธุ์แบบเลียนแบบธรรมชาติ หรือวิธีการเพาะพันธุ์แบบผสมเทียม ไม่สามารถทำการผลิตลูกพันธุ์ปลาไนอย่างมีประสิทธิภาพได้เต็มที่ ทำให้จำเป็นต้องศึกษาหาวิธีการเพาะขยายพันธุ์ปลาไนให้มีประสิทธิภาพมากขึ้นเมื่อน้ำเชื้อปลาปลาไนเป็นปัจจัยจำกัด (limiting factor) ต่อการผลิต (Vuthiphandchai et al., 2015) การศึกษาเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มปลาไนในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่จึงเป็นสิ่งจำเป็นเบื้องต้นเพื่อทราบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มเพื่อการบริหารจัดการการเพาะพันธุ์ปลาไน เพราะปัญหาคุณภาพน้ำเชื้อปลาส่งผลต่อการผลิตลูกปลาโดยตรง (Ochokwu et al., 2015) อย่างไรก็ตามปัญหาหนึ่งที่ส่งผลต่อการเพาะขยายพันธุ์ปลาไนก็ยังมีความเกี่ยวข้องกับการผสมเลือดชิด (inbreeding) เนื่องจากการนำพันธุ์ปลาไนเข้ามาเลี้ยงในประเทศไทย ในระยะแรกมีจำนวนไม่มากนัก ทำให้มีโอกาสเกิดการผสมของปลาในครอบครัวที่มีสายเลือดชิดกัน ได้มาก ทำให้ในปัจจุบัน ได้มีการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ปลาไนให้ได้สายพันธุ์ที่ดีโตเร็ว มีลักษณะตามที่ต้องการโดยทำการคัดเลือกสายพันธุ์ปลาไนให้ได้สายพันธุ์ที่ดีและเมื่อได้สายพันธุ์ที่ดีแล้วจึงจำเป็นต้องเก็บรักษาสายพันธุ์ที่ดีนั้นไว้เพื่อที่จะนำไปเพาะขยายพันธุ์เพื่อประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยง ซึ่งแนวทางหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงในการแก้ไขปัญหา และสามารถประยุกต์ใช้ได้ทันที คือ นำน้ำเชื้อปลาไนที่ มีคุณภาพดีเหล่านั้นมาแช่แข็ง และเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (cryopreservation) เพื่อนำมาใช้ในภายหลังด้วยการผสมเทียมกับไข่ปลาไน ซึ่งแนวทางเช่นนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับปลาแฟนซีคาร์พ (fancy carp) ซึ่งเป็นปลาสวยงามที่มีราคาแพง แต่ยังคงมีปัญหาการขาดแคลนพ่อพันธุ์ คุณภาพดี บางสายพันธุ์ในการผสมให้ได้ลูกปลาลักษณะที่ต้องการ อย่างไรก็ตามการพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อ ปลาไนจำเป็นต้องทราบข้อมูลพื้นฐานของชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน ซึ่งสารดังกล่าวมีความจำ เป็นที่ต้องใช้ในระหว่างกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อ (cryopreservation) เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดเกล็ดน้ำแข็ง (ice crystal) ระหว่างการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็ง เพราะ การใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ อย่างไม่เหมาะสม จะทำให้เซลล์ได้รับบาดเจ็บและตายในที่สุด (cell injury) (Vuthiphandchai et al., 2015) ดังนั้นการศึกษาผลของ ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มปลาไน จึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อจำเป็นเพื่อทราบ

ข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเพื่อ ได้ข้อมูลที่จำเป็นสำหรับการพัฒนากระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนต่อไป

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

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

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

ในปัจจุบันการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในต่างประเทศนิยมทำในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและใกล้สูญพันธุ์ทั้งปลาน้ำจืด และปลาทะเล เช่น ปลาตะเพียนขาว (Vuthiphandchai et al., 2015) ปลาไน (Linhart et al., 2000) ปลา salmon ปลา striped bass (He and Woods, 2003) ปลากะรัง (*Epinephelus septemfasciatus*; Tian et al., 2013) ปลา sea bream (Fabbrocini et al., 2000) และปลา Atlantic croaker (Gwo and Arnold, 1992) เป็นต้น น้ำเชื้อแช่แข็งนิยมเก็บรักษาในหลอดฟาง (straw) และสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานเป็นปีเมื่อต้องการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในการผสมเทียมก็สามารถนำหลอด บรรจุน้ำเชื้อมาละลายโดยการเพิ่มอุณหภูมิ ดังนั้นความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ และชนิดสาร cryoprotectants ที่เหมาะสม (Rana and McAndrew, 1989) อัตราการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็ง (freezing) และการเพิ่มอุณหภูมิขณะละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (Scott and Baynes, 1980; Vuthiphandchai et al., 2015) นอกจากนี้วิธีการรวบรวมน้ำเชื้อ การปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อ ความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อปลาที่เกิดขึ้นในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และ เทคนิคของการทำน้ำเชื้อปลาแช่แข็ง ล้วนต่างก็มีผลทำให้ความสำเร็จของการทำน้ำเชื้อแช่แข็งแต่ละครั้งแตกต่างกันไป (Boonthai et al., 2016d; Boonthai et al., 2016d) โดยทั่วไปน้ำเชื้อของปลา (milt) ประกอบด้วย สเปิร์มมาโทซัว (spermatozoa) และของเหลวที่หล่อเลี้ยง (seminal fluid) โดยที่สเปิร์มจะไม่เคลื่อนที่ขณะอยู่ในถุงอัณฑะ หรือของเหลวที่หล่อเลี้ยง แต่จะมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วมากเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสภาพแวดล้อมภายนอก และจะหยุดเคลื่อนที่ภายใน 1 นาทีหลังจากถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ (Vuthiphandchai et al., 2009b) กลไกที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาน้ำจืดพบว่าสารละลายที่มีค่า osmolarity ต่ำกว่า (hypotonicity) ระดับที่พบใน seminal fluid จะกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ แต่ในปลาทะเลนั้นสารละลายที่มีค่า osmolarlity สูงขึ้น (hypertonicity) จะกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ (Morisawa et al., 1983) ดังนั้นการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาจึงมีความสำคัญมากเพราะทำให้สเปิร์มไม่ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ขณะอยู่ในระหว่างการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง เพราะถ้าสเปิร์มมีการเคลื่อนที่ก่อนจะถูกแช่แข็ง ก็จะมีผลทำให้ประสบความล้มเหลวในการแช่แข็งทันที

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแบบแช่แข็ง

2. ศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่มีต่อการมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของ สเปิร์มปลาไน ที่ผ่านการแช่แข็ง

3. ศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาที่มีต่อการมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน

4. เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแบบแช่แข็งในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อ

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแบบแช่แข็งโดย เริ่มจาก การศึกษาความเป็นพิษ (toxicity) ของ สารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ว่าสารชนิดใด หรือความเข้มข้นใดมีความเหมาะสมในการคัดเลือกมาใช้เป็น สารไครโอโพรเทคแทนท์ สำหรับแช่แข็ง นอกจากนี้ยังมีการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่แตกต่างกันในการแช่แข็งโดยมุ่งพัฒนา protocols โดยการทำ seeding เพื่อทดสอบผลที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป ทฤษฎีและ/หรือแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในงานวิจัย

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแบบแช่แข็งมีหลักการ วิจัย เริ่มจากการใช้น้ำเชื้อปลาไนที่มีคุณภาพสูงให้อยู่ในสภาวะสมดุล (equilibration) ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ได้ใส่สารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เกิดเกล็ดน้ำแข็ง (ice crystal) ภายในเซลล์ จากนั้นทำการลดอุณหภูมิให้ต่ำลง (freezing) เพื่อแช่แข็งเซลล์ด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม แล้วเก็บน้ำเชื้อเหล่านั้นในไนโตรเจนเหลว ซึ่งเมื่อต้องการใช้ก็นำมาเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้เซลล์ที่แข็งตัวละลาย (thawing) กลับเข้าสู่สภาพเดิมก่อนแช่แข็ง ดังนั้นการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนจึงต้องเริ่มจากการนำเอาสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมซึ่งต้องไม่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่มาเจือจางน้ำเชื้อ แล้วจึงนำ น้ำเชื้อปลาไนที่ถูกเจือจาง (extended semen) ไปผสมด้วย สารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprtectants) ชนิดต่างๆ ที่เวลาต่างๆ กันเพื่อดูความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่อาจมีต่อสเปิร์ม ก่อนการเริ่มต้นลดอุณหภูมิ จากนั้นจึง ลดอุณหภูมิน้ำเชื้อให้ต่ำลงเพื่อให้น้ำเชื้อแข็งตัว (frozen semen) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็ง ที่เหมาะสม จึงนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส และเมื่อต้องการนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้มาใช้ประโยชน์ ก็นำมาละลาย ให้กลับสู่สภาพเดิมด้วยการเพิ่มอุณหภูมิด้วยการเลือกใช้ อัตราการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อละลายน้ำเชื้อ (thawing rate) ที่เหมาะสม (Vuthiphandchai et al., 2015) โดยมีสมมติฐานว่าความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน สามารถทำได้ เพียงแต่ต้อง optimize ตัวแปรต่างๆที่กล่าวมาให้เหมาะสม เพื่อให้เซลล์มีชีวิตรอด โดยเฉพาะการพัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสม มีราคาถูก และประยุกต์ใช้ได้ ต้องทำให้มั่นใจว่าเกษตรกร หรือผู้ประกอบการสามารถนำเอาเทคโนโลยีที่เหมาะสมไปประยุกต์ใช้ได้ทันที

การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน เพื่อการเพาะพันธุ์เชิงพาณิชย์จำเป็นต้องมีข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับความสามารถในการทนต่อสาร ไครโอโพรเทคแทนท์ เพราะสารชนิดนี้จำเป็นต้องใส่ไปในระหว่างการแช่แข็งเพื่อป้องกันการเกิด ผลึกน้ำแข็ง (ice crystal) ในเซลล์ระหว่างการลดอุณหภูมิ ซึ่งสารไครโอโพรเทคแทนท์จะทำให้เซลล์ตายถ้าใช้ในปริมาณที่ไม่เหมาะสม ตัวแปรที่ทำให้การแช่แข็งประสบความสำเร็จจำเป็นต้องสามารถพัฒนาทุกขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับการแช่แข็งให้เหมาะสมสำหรับเซลล์ชนิดนั้นๆ เริ่มตั้งแต่ ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ อัตราการลดอุณหภูมิ อัตราการละลาย และรวมทั้งขั้นตอนอื่นๆที่เกี่ยวข้องให้มีความเหมาะสมในทุก

ตัวแปรที่เกี่ยวข้อง เพราะถ้าไม่สามารถ optimize ในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งให้เหมาะสม ก็จะทำให้การแช่แข็งประสบความล้มเหลวทันที

การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อ ที่มีราคาถูกในถังโฟม (styrofoam box) หรือในถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) ต่างก็ใช้หลักการและขั้นตอนการแช่แข็งเช่นเดียวกับ การแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยเครื่องมือแช่แข็ง น้ำเชื้ออัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer) ที่มีราคาหลายแสนบาท หรือ หลายล้านบาท (ขึ้นอยู่กับบริษัทผู้ผลิ ต) เพียงแต่ว่าการลดอุณหภูมิ เพื่อการแช่แข็งน้ำเชื้อในถังโฟม หรือถังไนโตรเจนเหลวจะต้องวางตัวอย่างน้ำเชื้อปลาที่ต้องการแช่แข็งเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen surface) ที่ความสูง และเวลา ที่เหมาะสม เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวเพื่อให้น้ำเชื้อแข็งตัว (frozen) ในไอไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapor) ตามที่ต้องการ (Vuthiphandchai et al., 2015) ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งอย่างง่ายในถังโฟมหรือถังไนโตรเจนเหลวจึงสามารถทำได้ โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง แต่มี impact สูงต่อเกษตรกร หรือผู้ประกอบการที่จะนำไปใช้ผสมเทียมกับไข่ในภายหลัง ทันที แม้ว่า การแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติจะมีต้นทุนที่สูงแต่ก็มีความเที่ยงตรง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่นำมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน

2. ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งด้วยการพัฒนาเทคโนโลยีที่มีราคาถูกเพื่อทดแทนการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติเพื่อให้เกษตรกร หรือผู้ประกอบการขนาดเล็ก หรือขนาดกลางสมารถนำไปใช้ในฟาร์มเพื่อเพิ่ม หรือควบคุมผลผลิตได้ทันที ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการเก็บรักษาสายพันธุ์ที่ดีของพ่อพันธุ์ ปลาไนเพื่อการเพาะพันธุ์ต่อไป และยังเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนางานวิจัยแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาชนิดอื่นๆที่หาได้ยากหรือใกล้สูญพันธ์ต่อไปในอนาคต

3. ทราบเทคโนโลยีการแช่แข็งและการเก็บรักษาน้ำเชื้อของปลาไนเพื่อนำมาใช้ผสมเทียม โดยสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ในระยะเวลาที่นานเป็นปีเพื่อใช้ประโยชน์สูงสุดในการผสมเทียมกับแม่พันธุ์ได้ในช่วงเวลาที่ต้องการ ซึ่งสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีนี้ไปยังนักวิชาการประมง และเกษตรกรผู้เพาะพันธุ์สัตว์น้ำต่อไป

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

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ชีววิทยาปลาไน

ปลาไน (*Cyprinus carpio*) เป็นปลาน้ำจืดที่อยู่ใน ครอบครัวเดียวกันกับปลาตะเพียน ซึ่งเป็นปลาที่เลี้ยงมากและรู้จักกันอย่างแพร่หลายทั่วโลก และเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งในประเทศไทย ปลาไนมีลำตัวกลม หัวกลม ปากเล็ก ไม่มีฟัน มีหนวดสี่เส้น ลำตัวเป็นสีเงินปนเทา บางตัวมีสีเหลืองอ่อนและสีทอง พบอยู่ทั่วไปใน แหล่งน้ำจืดธรรมชาติ สามารถ ปรับตัวให้เข้ากับธรรมชาติได้ดี โดยเพศผู้มีลำตัวเรียวยาวกว่า เพศเมียลำตัวกว้าง กว่าถ้าอายุเท่ากัน ใน ช่วงการผสมพันธุ์วางไข่ สามารถแยกความแตกต่างเพศได้ง่ายขึ้น โดย ปลาเพศผู้มีตุ่มสาก (pearl organ) ขึ้นบริเวณแก้ม (operculum) ครีบหูและลำตัว กดบริเวณท้องจะมีน้ำเชื้อ (semen) ไหลออกมา แต่เพศเมียไม่มีตุ่มสาก ทำให้ลื่นกว่าเมื่อลูบตัวปลา โดยจะมีท้องขยายใหญ่ขึ้นอย่างชัดเจน

ปลาไนจัดเป็นปลาที่กินอาหารได้ทั้ง พืชและสัตว์ (omnivorous) และเริ่มเข้าสู่วัย เจริญพันธุ์เมื่ออายุได้ประมาณ 6-8 เดือน สำหรับปลาที่เลี้ยงในเขตร้อน ปลาไนสามารถ วางไข่ได้ตลอดปีโดยมีไข่ปลาเป็นแบบประเภทไข่ จมติด เช่นติดกับสาหร่าย พรรณไม้น้ำอื่นๆ มีสีเหลืองเข้ม ไข่ฟักออกเป็นตัวลูกปลาวัยอ่อนภายในเวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ในระยะแรกลูกปลาเกาะติดกับพรรณไม้น้ำและไม่กินอาหาร แต่เมื่อถุงไข่แดงยุบซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 2-3 วัน ลูกปลาจึงเริ่มกินอาหารและว่ายน้ำ หาอาหาร ลูกปลาจะเปลี่ยนแปลงรูปร่างจนเหมือนปลาโตเต็มวัยเมื่ออายุได้ 15 วัน แม่ปลาขนาด 1 กิโลกรัม จะให้ไข่ประมาณ 100,000 ฟอง และแม่ปลาขนาด 7 กิโลกรัม จะให้ไข่ประมาณ 2,000,000 ฟอง (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538)

2. น้ำเชื้อและสเปิร์มของสัตว์น้ำ

โดยทั่วไปสเปิร์มของสัตว์ น้ำประกอบด้วยส่วนหัว (head) ส่วนกลาง (mid piece) และส่วนหาง (tail) ส่วนหัวของสเปิร์มมีความแตกต่างกันไปตามชนิดของสัตว์น้ำโดยในส่วนหัวมีนิวเคลียสที่มีดีเอ็นเอ (DNA) เป็นสารพันธุกรรม ทำหน้าที่ปฏิสนธิกับนิวเคลียสของไข่ ส่วนกลางของสเปิร์มเป็นส่วนที่อยู่ติดกับส่วนหัวโดยจะมีไมโ คคอนเดรีย (mitochondria) จำนวนมากเป็นองค์ประกอบ ที่ให้พลังงานแก่สเปิร์มในการเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้น ส่วนหางของสเปิร์มเป็นส่วนที่มีลักษณะยาวและในส่วนหางจะมีไฟบริล (fibril) อยู่ทั้งหมด 11 คู่ อยู่ตรงกลาง 2 คู่ และอยู่โดยรอบ 9 คู่

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

สภาพแวดล้อมภายนอก และจะหยุดเคลื่อนที่ภายใน เวลาประมาณ 1 นาทีหลังจากถูกกระตุ้นสำหรับสเปิร์มปลาน้ำจืด กลไกที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาน้ำจืด พบว่าสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติก (osmolality หรือ osmotic pressure) ต่ำกว่าระดับที่พบใน seminal fluid (hypotonicity) จะกระตุ้นให้สเปิร์ม ปลาน้ำจืดเคลื่อนที่ แต่ในทางตรงกันข้ามสเปิร์มของปลาทะเลมีการเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกสูงขึ้นมากกว่าระดับที่พบใน seminal fluid (hypertonicity) (Morisawa et al., 1983; Bobe and Labbe, 2010) ดังนั้นการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ จึงมีความสำคัญมาก เพราะจะทำให้สเปิร์มไม่ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ขณะอยู่ในระหว่างการเจือจางน้ำเชื้อ ก่อนการนำไปใช้ประโยชน์หรือการแช่แข็ง ดังนั้นสเปิร์มของปลาเมื่อสเปิร์มยังอยู่ในตัวปลาหรือเมื่อรีดน้ำเชื้อสดออกมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ สเปิร์มของปลาจะ ยังไม่มีการเคลื่อนที่ (immotile) แต่เมื่อน้ำเชื้อปลาผสมกับน้ำภายนอกขณะที่ผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ หรือเมื่อนำน้ำเชื้อผสมกับหยดน้ำบนแผ่นกระจกสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะพบว่าสเปิร์มจะถูกกระตุ้นให้มีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วอันเป็นผลเนื่องมาจากการเจือจางทำให้มีการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติก การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาน้ำจืดเมื่อถูกกระตุ้นจะสิ้นสุดลงอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาประมาณ 1 นาที ดังนั้นการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อปลาโดยใช้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่จึงต้องรีบทำภายในทันทีที่น้ำเชื้อปลาผสมกับน้ำบนกระจกสไลด์

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

3. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา จัดเป็นเทคโนโลยีชีวภาพแขงหนึ่งที่มีการนำมาใช้ในการบริหารจัดการเพาะพันธุ์ปลาเพื่อประโยชน์ทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์สัตว์น้ำ โดยก ารศึกษาด้านนี้ส่วนใหญ่นิยมศึกษาในต่างประเทศ ทั้งในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและใกล้สูญพันธุ์ทั้งปลาน้ำจืด และปลาทะเล เช่น ปลากะพงขาว ปลา salmon ปลา channel catfish ปลา sea bream และปลา Atlantic croaker ปลา sea bass เป็นต้น โดยทั่วไปน้ำเชื้อปลาเมื่อถูกแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิอย่างเหมาะสม (freezing rate) ก็สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อในถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ได้นานเป็นปี เมื่อต้องการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในการผสมเทียมกับไข่ปลา ก็นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อมาละลายโดยการเพิ่มอุณหภูมิ (thawing) แล้วนำน้ำเชื้อที่ถูกละลายไปผสมเทียมกับไข่ (Vuthiphandch ai et al., 2009a) ดังนั้นความสำเร็จของการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาขึ้นอยู่กับ

ปัจจัยที่เกี่ยวข้อง หลายอย่างเช่น ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ และชนิดสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectants) (Rana and McAndrew, 1989) อัตราการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็ง และการเพิ่มอุณหภูมิขณะละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (Scott and Baynes, 1980) นอกจากนี้ความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อปลาที่เกิดขึ้นในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ การปนเปื้อนของแบคทีเรียและการใช้ยาปฏิชีวนะในนน้ำเชื้อแช่แข็ง รวมทั้ง เทคนิคของการแช่แข็งน้ำเชื้อ ต่างก็มีผลทำให้ความสำเร็จของการแช่แข็งน้ำเชื้อแต่ละครั้งแตกต่างกันไป (Boonthai et al., 2016a; Boonthai et al., 2016b; กฤษณ์, 2536)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา เมื่อได้พัฒนา protocol การแช่แข็งน้ำเชื้อที่เกี่ยวข้องกับตัวแปรต่างๆ แล้ว เมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลานาน ก็สามารถพัฒนาเป็นธนาคารน้ำเชื้อเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ได้ การศึกษาวิจัยแช่แข็งเชื้อปลาหลายๆชนิดพอสรุปได้ดังนี้

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

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

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

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

Gwo et al. (1991) ได้ศึกษาการเก็บน้ำเชื้อปลา Atlantic croaker แบบแช่แข็ง พบว่า sperm extender ที่ประกอบด้วย เกลือแกง กลูโคส และ ซูโครส สามารถใช้เจือจางน้ำเชื้อขณะทำการแช่แข็ง โดยมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ sperm extender ชนิดอื่นๆ ที่มีความสลับซับซ้อน หรือ

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

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

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

Glogowski et al. (2002) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา sturgeon (*Acipenser baeri,* Brandt) แบบแช่แข็ง ด้วยน้ำยา 3 สูตร คือ tris-sucrose-KCl, tris-NaCl และ tris-sucrose และผสมด้วย methanol 10% โดยใช้หลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยใช้อัตราส่วนน้ำเชื้อ :น้ำยา เท่ากับ 1:1 พบว่าสารบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการแช่แข็ง คือ tris-sucrose-KCl และ tris-NaCl โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 3.5 องศาเซลเซียสต่อนาที และลดอุณหภูมิมาถึงอุณหภูมิสุดท้ายที่ -15 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมาละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 6 วินาที โดยตรวจพบว่าให้อัตราการฟักสูงเมื่อเทียบกับ น้ำเชื้อสด

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

Horvath et al. (2010) พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา paddlefish (*Polyodon spathula*) ด้วยการประเมินความเป็นไปได้ในการใช้หลอดฟางขนาดใหญ่ 5 มิลลิลิตร (minitube) แช่แข็งน้ำเชื้อ (บรจุน้ำเชื้อ 2.5 มิลลิลิตร) พร้อมกับการใช้ methanol ระดับ 5% และ 10% แช่แข็งนาน 5 หรือ 7 นาทีในไอไนโตรเจนเหลว พบว่า การใช้ 5% methanol แช่แข็งน้ำเชื้อปลาชนิดนี้นาน 5 นาที มีผลทำให้อัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักมีค่าสูงสุดเท่ากับ 48±5% และ 47±10% แต่ค่าเหล่านี้ก็มีค่าต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสดผสมเทียมไข่ที่ได้ค่าอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักมีค่าสูงสุดเท่ากับ 77±6% และ 66±13% ตามลำดับ การศึกษาผลของจำนวนสเปิร์มต่อไข่ที่มีต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสด พบว่า จำนวนสเปิร์มที่เหมาะสมในการปฏิสนธิไข่ (sperm to egg ratio) มีค่าระหว่าง 1.379×10^6 ถึง 2.758×10^6 และมีความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการปฏิสนธิ และ sperm to egg ratio ในลักษณะของ $Y = -13X^2 + 55.90X + 38.44$ ($r^2 = 0.823$) แต่เมื่อใช้น้ำเชื้อแช่แข็งผสมเทียมกับไข่ ให้ค่าความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการปฏิสนธิ และ sperm to egg ratio เท่ากับ Y =

22.51X + 23.26 (r^2 = 0.75) โดยจำนวนสเปิร์มที่เหมาะสมในการปฏิสนธิไข่ (sperm to egg ratio) มีค่าสูงขึ้นค่อนข้างมาก นอกจากนี้อัตราการฟักของลูกปลาที่ได้จากการใช้น้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อแช่แข็งใน 3 ลักษณะ (1, 2 หรือ 3 หลอด) มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ และน้ำเชื้อแช่แข็งยังให้ค่าความสัมพันธ์ระหว่าง sperm to egg ratio และอัตราการฟักเท่ากับ Y = 29.65X^2 + 119.2X – 51.04 (r^2 = 0.837) แสดงให้เห็นว่า การใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในการผสมเทียมไข่ของปลา paddlefish ต้องเพิ่มจำนวนสเปิร์มในการปฏิสนธิไข่ให้มากขึ้น เพื่อทำให้ค่าอัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักไม่แตกต่างกับการใช้น้ำเชื้อสด ซึ่งอาจทำโดยเพิ่มปริมาณน้ำเชื้อแช่แข็งประมาณ 30% ขึ้นไปหรืออาจพัฒนางานวิจัยต่อไปเพื่อทำให้สเปิร์มที่มีชีวิต (sperm viability) หลังการละลายในหลอดฟางมีค่าเพิ่มสูงขึ้น

Yavas and Bozkurt (2011) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเฉาฮื้อ (*Ctenophalyngodon idella*) ในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว แล้วนำน้ำเชื้อแช่แข็งออกมาศึกษาผลของอัตราการละลายที่มีต่อคุณภาพสเปิร์มหลังการละลาย โดยนำหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 30, 35, 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10, 20, 30 วินาที ปรากฏว่า สเปิร์มมีการเคลื่อนที่สูงสุดหลังการละลาย ในชุดการทดลองที่ ละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 วินาที ในขณะที่การศึกษาละลายน้ำเชื้อปลา Atlantic halibut ที่แช่แข็ง พบว่าอัตราการละลายที่เหมาะสม น้ำเชื้อปลา Atlantic halibut ที่แช่แข็งมีค่าอยู่ในช่วงกว้าง คือ 10-40 องศาเซลเซียส/นาที (Bolla et al., 1987)

Boonthai et al. (2016c) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*) ด้วยการใช้เครื่องมือ แช่แข็งน้ำเชื้อ อัตโนมัติด้วยการเจือจางน้ำเชื้อใน Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) และ DMSO แล้วศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียระหว่างการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวว่าเกิดจากแหล่งใด หรือขั้นตอนใด มากที่สุดด้วยการใช้ aseptic technique โดยตรวจวัดปริมาณแบคทีเรียชนิดต่างๆใน animal origin และ non-animal origin ได้แก่ ครีบหาง น้ำเลี้ยงปลา น้ำเชื้อปลา ปัสสาวะ ขี้ปลา ไนโตรเจนเหลว ผิวหลอดฟาง อากาศที่หมุนเวียนในห้องปฏิบัติการ และถุงมือ ทั้ง ก่อนและหลังการแช่แข็ง ปรากฏว่าพบ แบคทีเรีย *Aeromonas punctata* subsp. caviae มีการปนเปื้อนมากที่สุดใน ครีบหาง ถุงมือ และน้ำเชื้อปลาก่อนการแช่แข็ง และยังพบว่า *Bacillus safensis* and *Bacillus* sp. ยังสามารถมีชีวิตรอดในถังไนโตรเจนเหลว ซึ่งการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาโดยใช้ aeptic technique มีประสิทธิภาพสูงในการลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อแช่แข็ง และเป็นประโยชน์ต่อการจัดตั้งธนาคารน้ำเชื้อปลา

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

กล่องโฟม (Styrofoam box)

บีกเกอร์ขนาดต่างๆ

ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 250 และ 500 มิลลิลิตร

ไมโครปิเปตขนาดต่างๆ

ตะเกียงแอลกอฮอล์

เข็มเขี่ย

กระดาษกรอง

เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง

เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer)

เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (Controlled-rate programmable freezer)

กล้องจุลทรรศน์

Haemacytometer

ถังเก็บไนโตรเจนเหลวขนาดใหญ่ (liquid nitrogen dewar)

ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ

ตู้อบเครื่องแก้ว (hot air oven)

Glass micropipette ขนาด 5,10 และ 100 ไมโครลิตร

หลอดฟาง (French straw) 0.25 มิลลิลิตร

Canister

Canes

Goblets

Vial tubes

racks

Tissue culture flasks

Thermocouple probe thermometer (K-type, HI 91530K, Hanna Instruments Inc.)

Water bath

Eppendorf tubes

ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)

พ่อพันธุ์ปลาไน

สารเคมีประเภทต่างๆที่ใช้ใน การแช่แข็ง และการย้อมสี

วิธีดำเนินการวิจัย

1. <u>การรวบรวมน้ำเชื้อปลาไน</u>

พ่อพันธุ์ปลาไนถูกรวบรวมและลำเลียงจาก ฟาร์มเพาะพันธุ์ปลาในจังหวัดชลบุรีและศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดชลบุรี มายังโรงเพาะฟักของภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (รูปที่ 1 และรูปที่ 2) การลำเลียง พ่อพันธุ์ปลาไน ที่สมบูรณ์เพศได้ลำเลียงในถุงพลาสติกที่อัดออกซิเจนโดยใส่เกลือแกงเพื่อลดความเครียดระหว่างการลำเลียงประมาณ 1 ชั่วโมง พ่อพันธุ์ทั้งหมดที่ลำเลียงมาถูกนำมาพักไว้ในโรงเพาะฟัก โดยใส่ยาเหลืองและฟอร์มาลินระยะเวลาประมาณ 30 นาทีเพื่อป้องกันพยาธิที่อาจติดมาระหว่างลำเลียง จากนั้นย้ายพ่อพันธุ์ปลาไนมาไว้ในบ่อซิเมนต์ขนาด 10 ตัน จำนวน 15 ตัวต่อบ่อ รวม 2 บ่อ เพื่อให้ปลาปรับตัวกับสภาพแวดล้อมใหม่ จากนั้นทำการเลี้ยงขุนพ่อพันธุ์ปลาในบ่อด้วยอาหารเม็ดที่มีโปรตีน 35% วันละ 2 ครั้ง เวลาเช้าและเย็น ในอัตรา 3% น้ำหนักตัว/วันตลอดระยะเวลาการขุนพ่อพันธุ์ การดูแลสุขภาพปลาไน ได้มีการดูแลอย่างสม่ำเสมอทุกวัน โดยมีการดูดถ่ายตะกอนในบ่อทุกๆ 2 วันและเปลี่ยนถ่ายน้ำในบ่อประมาณ 30-40% ทุกๆ 5-7 วัน และมีการให้อากาศผ่านหัวทรายอย่างเพียงพอและตรวจวัดคุณภาพน้ำในบ่อทดลอง พ่อพันธุ์ปลาไนที่มี ความสมบูรณ์เพศ มีลักษณะภายนอกปกติ ไม่มีเชื้อโรคและพาราไซด์ ผ่านหลักเกณฑ์ที่กำหนดไว้ถูกรวบรวมไปเลี้ยงขุนในบ่อเพื่อการรวบรวมน้ำเชื้อมาแช่แข็งต่อไป

การรวบรวมน้ำเชื้อปลาไนได้ทำหลังจากปลาปรับตัวเป็นเวลา 7 วัน เริ่มจากจับพ่อพันธุ์ ปลาออกมาด้วยสวิง แล้วนำมาแช่ในยาสลบ (phenoxyethanol) 10 ppm ประมาณ 5 นาที เพื่อไม่ให้ปลาเครียดระหว่างการรีดน้ำเชื้อ นำปลามาชั่งน้ำหนัก วัดความยาว แล้วเช็ดบริเวณลำตัวปลาให้แห้งสนิทก่อนที่ทำการรีดน้ำเชื้อออกมาเพื่อประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อ การรีดน้ำเชื้อปลาแต่ละตัวทำโดยหงายท้องปลาขึ้น ใช้นิ้วมือกดบริเวณท้องเบาๆแล้วรีดลงมาตั้งแต่บริเวณครีบอก (pectoral fin) มาถึงบริเวณช่องเพศ (urogenital papillae) ได้น้ำเชื้อ (semen) สีขาวขุ่นออกมา (รูปที่ 3) รวบรวมน้ำเชื้อไปใส่ในภาชนะแล้วจึงเก็บรักษาไว้บนน้ำแข็งเพื่อรักษาคุณภาพ น้ำเชื้อก่อนการใช้ในการทดลอง (รูปที่ 4) ในการทดลองแต่ละครั้งจะทำการรีดน้ำเชื้อปลาแต่ละตัวแล้วนำน้ำเชื้อของปลาแต่ละตัวมารามกันเป็นน้ำเชื้อรวม (pooled semen) ของพ่อพันธุ์ปลาหลายตัวสำหรับแต่ละชุดการทดลองเพื่อลดความแปรปรวนคุณภาพน้ำเชื้อปลาแต่ละตัว (individual variation) ที่อาจส่งผลต่อการทดลอง ในระหว่างการรวบรวมน้ำเชื้ อ ทำการลดการปนเปื้อนของปัสสาวะที่จะมากับน้ำเชื้อขณะรีด โดยกดเบาๆโดยรอบบริเวณช่องเพศปลา เพื่อ รีดเอา ปัสสาวะออก จากตัวปลา ให้ได้ ปริมาณ ที่ต้องการ (clearance of urinary bladder) เมื่อเห็นว่าไม่มีปัสสาวะออกมาแล้ว จึงทำการรีดน้ำเชื้อ โดยกดส่วนท้องตั้งแต่บริเวณครีบอกมายังช่องเพศตามที่กล่าวมาแล้ว การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อพิจารณาจาก parameter ที่สำคัญ ได้แก่การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (sperm motility) ความหนาแน่นของสเปิร์ม (sperm density) การมีชีวิตของสเปิร์ม (sperm viability) และ แรงดันออสโมซิสของน้ำเชื้อ (osmola lity) น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีเท่านั้นถูกนำมาใช้ในกา รแช่แข็ง น้ำเชื้อ โดยต้องเป็นน้ำเชื้อที่มีลักษณะขาวขุ่น และไม่มีเมือก หรือ เลือดปน และต้องมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่สูง (มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์) โดยน้ำเชื้อเหล่านี้ถูกเก็บไว้บนน้ำแข็งอย่างมากไม่เกิน 30 นาทีในระหว่างขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อ น้ำเชื้อรวมที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ไม่ได้นำมาใช้ในการทดลองเพื่อให้มั่นใจว่าขณะเริ่มการทดลองน้ำเชื้อปลามีคุณภาพที่ดีพอ ในกรณีที่พ่อพันธุ์ปลาไนมีน้ำเชื้อน้อยไม่เพียงพอแก่การทดลองในบางช่วงของฤดูกาล ทำการ ฉีดพ่อพันธุ์ปลาด้วยฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นการสร้างน้ำเชื้อ โดยฉีดด้วย suprefact (gonadotropin-

รูปที่ 1 พ่อพันธุ์ปลาไน

รูปที่ 2 การรวบรวมพ่อพันธุ์ปลาไนมาใช้ในการทดลอง

รูปที่ 3 การรีดน้ำเชื้อปลาไนมาใช้ในการทดลอง

รูปที่ 4 น้ำเชื้อปลาไนที่รวบรวมมาใช้ในการทดลอง

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

2. <u>การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลาไน</u>

ความหนาแน่นของสเปิร์มปลาไน ถูกประเมินโดยการเจือจางน้ำเชื้อ (10 ไมโครลิตร) ด้วย 0.9% NaCl โดยเจือจาง 5,000 เท่า ผสมให้เข้ากันใน vial ด้วยการใช้ vortexer แล้วจึงนำน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางไปหยดบน h aemacytometer และ นับจำนวนสเปิร์มที่พบโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า แล้วจึงคำนวณกลับหาความหนาแน่นของสเปิร์ม การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มทำโดยการหยดตัวอย่างน้ำเชื้อ (5 ไมโครลิตร) ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาดแล้วจึงหยด 0.4% NaCl ลงไป 100 ไมโครลิตร พร้อมกับปิดด้วย cover glass เบาๆอย่างรวดเร็วเพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่แล้วจึงประเมินเปอร์เซ็นต์ที่สเปิร์มเคลื่อนที่ทันทีให้เสร็จภายใน 15 วินาที โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (percentage of motile sperm) ประเมินจาก จำนวณสเปิร์มที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าอย่างรวดเร็วเมื่อถูกกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl โดยแบ่งระดับที่สเปิร์มเคลื่อนที่ไว้ 6 ระดับ คือ สเปิร์มที่เคลื่อนที่ได้ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% (Vuthiphandchai and Zohar, 1999) การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มทำ 3 ซ้ำต่อชุดการทดลอง โดยการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในแต่ละสไลด์ยังได้สุ่มประเมิน 3 จุดในเวลาไม่เกิน 15 วินาที ทำให้มีจำนวนซ้ำย่อยรวม 9 ซ้ำ (pseudoreplicates) การมีชีวิตของสเปิร์มที่มีชีวิตเช็คโดยการนำเอาน้ำเชื้อ (5 ไมโครลิตร) มาย้อมสีด้วยสารละลาย eosin-nigrosin (5 ไมโครลิตร) แล้วจึงสุ่มนับจำนวน สเปิร์มที่มีชีวิตซึ่งจะไม่ติดสีย้อมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า โดยสเปิร์มที่ตายจะติดสีม่วง แล้วจึงคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่มีชีวิต (percentage of viable sperm; Fribourgh, 1966) สำหรับการ ประเมินแรงดันออสโมซิสของน้ำเชื้อ ทำโดยนำน้ำเชื้อมา centrifuge ด้วยความเร็วสูงเพื่อแยก seminal fluid ออกจากสเปิร์ม จากนั้นนำ seminal fluid ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาวัด osmolarity โดยการใช้เครื่อง osmometer การประเมิน ความหนาแน่นของสเปิร์ม การมีชีวิตของสเปิร์ม และแรงดันออสโมซิสของน้ำเชื้อ ได้ทำการทดลอง 3 ซ้ำ อย่างไรก็ตามพ่อพันธุ์ปลาไนที่เลี้ยงขุนได้ถูกรวบรวมน้ำเชื้อเดือนละครั้งเพื่อประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสดของปลาไนเพื่อทราบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อปลาไน

3. <u>การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของ สารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแบบแช่แข็ง</u>

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทราบชนิดและความเข้มข้นของ สารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่เหมาะสมก่อนที่จะนำไปใช้ในการทำน้ำเชื้อแบบแช่แข็งโดยการประเมินความเป็นพิษ (toxicity test) ของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม การทดลองเริ่มจากนำน้ำเชื้อปลาไนที่รวบรวมมาใหม่ (freshly collected semen) มาเจือจางในสารละลาย Ca-F HBSS (calcium free Hank's balanced salt solution) ซึ่งเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้เป็นส่วนผสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่ไม่มีเกล็ด (Mongkonpunya et al. 1995) โดยที่ Ca-F HBSS จะไม่มีผลกระตุ้นให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่แต่จะไปเจือจางน้ำเชื้อโดยที่สเปิร์มยังคงมีคุณภาพไม่เปลี่ยนแปลง ใน

ขณะเดียวกันสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ 9 ชนิดที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์และภายในเซลล์ ถูกเตรียมขึ้นมาที่ความเข้มข้นต่างๆโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS เช่นกัน แล้วจึงผสมเข้ากับน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางไว้ก่อนหน้านี้เพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของ สารไครโอโพรเทคแทนท์ตามที่ต้องการ

สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol, propylene glycerol, acetamide, sucrose, glycerol, formamide, ethanol และ methanol โด ยสารไครโอโพรเทคแทนท์ แต่ละชนิดถูกผสมไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS (extended milt) เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration s) ของสารไครโอโพรเทคแทนท์ตามที่กำหนดเป็น 5%, 10%, 15% และ 20% โดยใช้อัตราส่วนของน้ำเชื้อ ที่เจือจางใน สารละลายบัฟเฟอร์ (extended milt) : สารไครโอโพรเทคแทนท์ เท่ากับ 1:1 ภายใน tissue culture flask ขนาด 25 มิลลิลิตร การประเมินเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่เคลื่อนที่ในการทดลองนี้ได้ทำในระยะเวลาต่างๆกันหลังจากใส่สารไครโอโพรเทคแทนท์ลงไปในน้ำเชื้อปลาไนที่ถูกเจือจาง เริ่มตั้งแต่เวลา 0, 10, 20, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที โดยเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มกับกลุ่มควบคุม ซึ่งใช้น้ำเชื้อ สดของปลาไน ที่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ด้วย 0.4% NaCl การประเมินความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ มีต่อการเคลื่อนที่ของ สเปิร์ม ทำการทดลอง 6 ซ้ำที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) การทดลองในขั้นตอนนี้ทำให้ทราบว่า สารไครโอโพรเทคแทนท์ ชนิดใด และความเข้มข้นช่วงใดที่เป็นพิษหรือทำให้สเปิร์ม หยุดเคลื่อนที่หรือเคลื่อนที่ลดลง ทำให้สามารถพิจารณาเลือกเฉพาะ สารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่เป็นพิษน้อยมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อต่อไป

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

การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน เริ่มจากการนำเอาน้ำเชื้อปลาไนที่รวบรวมมาจากปลาหลายตัว (pooled milt) มาเจือจางในสารละลาย Ca-F HBSS แล้วจึงผสม สารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดที่เหมาะสม (DMSO, propylene glycol และ ethylene glycol) ในระดับความเข้มข้นสุดท้ายที่แตกต่างกันตั้งแต่ 5%, 10%, 15% และ 2 0% แล้วปล่อยไว้ให้ น้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง อยู่ในภาวะสมดุลย์ (equilibration period) ที่อุณหภูมิห้องก่อนที่จะถูกรวบรวม น้ำเชื้อเหล่านั้นใส่ ในหลอดฟาง (straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร (รูปที่ 5) ทำการปิดปลายหลอดฟางให้แน่นด้วยความร้อน (รูปที่ 6 และรูปที่ 7) ปล่อยทิ้งไว้นาน 10 นาที จึงนำหลอดฟางไปลดอุณหภูมิใน เครื่อง มือแช่แข็ง น้ำเชื้ออัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer; รูปที่ 8) ทำการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -20 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5 และ 8 องศาเซลเซียส /นาที แล้วนำหลอดฟางไปใส่ใน Goblet เพื่อนำไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวนาน 1 และ 7 วัน เมื่อครบกำหนดการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวจึงนำหลอดฟางออกมาละลายโดยนำมาแช่ใน water bath อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที ทำการตัดหลอดฟางเพื่อประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย (post-thawed sperm motility) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อชุดการทดลอง

5. การพัฒนา protocol เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน

5.1 ผลของอุณหภูมิสุดท้ายที่มีต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน

การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนมาที่อุณหภูมิสุดท้ายต่างกัน ทำโดยนำน้ำเชื้อสดปลาไนมาเจือจางใน Ca-F HBSS แล้วเติม DMSO ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10% ดูดน้ำเชื้อที่เจือจาง (extended semen) ใส่ในหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วทำการแช่แข็งลดอุณหภูมิน้ำเชื้อจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -20, -40 และ -80 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5 และ 8 องศาเซลเซียส/นาที แล้วนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวนาน 2 วัน นำหลอดฟางออกมาละลายที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที ทำการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย โดยทดลอง 3 ซ้ำต่อชุดการทดลอง

5.2 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนอย่างง่ายในกล่องโฟม

การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนอย่างง่ายในกล่องโฟม ทำ โดยนำน้ำเชื้อสดที่รวบรวมจากปลาไนหลายตัว (pooled milt; n=8) มาเจือจางใน Ca-F HBSS และ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5, 10, 15 และ 20% จากนั้นดูดน้ำเชื้อปลาไนใส่ในหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 10 นาทีเพื่อให้อยู่ในสภาวะสมดุล (equilibration time) แล้วนำหลอดฟางที่มีน้ำเชื้อ ของชุดการทดลองเหล่านี้มาแช่แข็งโดยการลดอุณหภูมิภาย ในไอไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapor) ที่บรรจุในกล่องโฟม (styrofoam box) การแช่แข็งน้ำเชื้อเริ่มจากเติมไนโตรเจนเหลวลงไปในกล่องโฟมให้สูงจากพื้นกล่องประมาณ 5 เซนติเมตรแล้วปิดฝากล่องโฟม 5 นาทีเพื่อปรับอุณหภูมิในกล่องโฟมให้คงที่ จึงนำหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อเมื่อครบระยะเวลาสมดุลที่กำหนดมาวางที่ ระดับความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen surface) ต่างๆกัน (2, 4 และ 6 เซนติเมตรเหนือระดับผิวหน้าไนโตรเจนเหลว) เป็นเวลา นาน 10 นาที จึงนำหลอดฟางทั้งหมดในทุกชุดการทดลองแช่ลงในถังไนโตรเจนเหลวเพื่อเก็บรักษานาน 1, 7 และ 14 วันจึงทำการละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที และประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย โดยทดลอง 3 ซ้ำต่อชุดการทดลอง

5.3 การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนปริมาณมาก

น้ำเชื้อปลาไนที่รีดออกมาจากพ่อพันธุ์หลายตัว (กลุ่มควบคุม) ได้ถูกนำมาเจือจางด้วย Ca-F HBSS และ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10% แล้วบรรจุน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง ในหลอดฟางขนาด 0.25 และ 0.5 มิลลิลิตร และหลอด Cryotube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปล่อยให้อยู่ในสภาวะสมดุล 10 นาที แล้วนำไปแช่แข็งด้วย การใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้อ อัตโนมัติ โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส/นาที เริ่มจากอุณหภูมิห้องถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส แล้วนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว นาน 2-3 วันจึงทำการละลายน้ำเชื้อเพื่อประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม หลังการละลายที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาทีสำหรับหลอดฟาง และนาน 30 วินาทีสำหรับหลอด Cryotube ในขณะเดียวกันน้ำเชื้อปลาไนได้ถูกแช่แข็งด้วยวิธีที่กล่าวมาข้างต้นแต่มีการเหนี่ยวนำน้ำเชื้อให้แข็งตัวรวดเร็วในระยะเวลาสั้นๆ (seeding) ที่อุณหภูมิต่างๆกันเช่น - 10, -15 และ -20 องศาเซลเซียส การทำ seeding น้ำเชื้อ ปลาไนได้ทำโดย manual seeding ด้วยการนำเอา forcep ไปแช่ในไนโตรเจนเหลวแล้วนำมาแตะ ตลอดความยาว บนหลอดฟาง หรือ cryotube

ประมาณ 2-3 วินาทีเพื่อให้น้ำเชื้อแข็งตัวอย่างรวดเร็วที่สุด ตามอุณหภูมิที่กำหนดแล้วลดอุณหภูมิตามโปรแกรมที่กำหนดต่อไป ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อชุดการทดลอง

6. <u>การประเมินความสามารถของน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งในการปฏิสนธิกับไข่</u> (fertilization capacity)

การประเมินอัตราการปฏิสนธิ (fertilization rate) ของไข่เมื่อผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง ทำโดยการนำเอาไข่ปลาไน จากแม่พันธุ์ปลาไนที่ถูกฉีดฮอร์โมนกระตุ้น ประมาณ 5 00 ใบใส่ลงไปในภาชนะพลาสติก (petri dish) แล้วจึงเอาน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็ง ที่ละลาย (thawing) ใส่ลงไปผสมกับไข่ทันที พร้อมกับเติมน้ำจืดที่สะอาดลงไป และใช้ขนไก่ช่วยผสมให้น้ำเชื้อเข้ากับไข่อย่างรวดเร็ว จากนั้นล้างไข่ และเมือกออกโดยการเปลี่ยนน้ำ 2 ครั้งแล้วปล่อยให้ไข่พัฒนาต่อไป เพื่อให้ไข่พัฒนาต่อไป โดยนำไข่ที่ปฏิสนธิไปโรยเป็นชั้นบางๆบนอวนมุ้งไนลอนภายในบ่อซิเมนต์ที่มีระบบน้ำเข้าออกตลอดเวลา ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อชุดการทดลอง

การกระตุ้นให้แม่ปลาไนตกไข่ทำโดยการฉีดฮอร์โมน สังเคราะห์ Gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRHa) และ dopamine antagonist ปริมาณ 15 ไมโครกรัม/กิโลกรัม และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ แล้วพักแม่ปลาไนไว้ประมาณ 7-8 ชั่วโมง จึงรีดไข่ออกมาและเช็คคุณภาพไข่ก่อนการผสมเทียมโดยดูจากลักษณะรูปร่างและความสุกของ เม็ดไข่ โดยใช้ไข่ที่มีคุณภาพดีเท่านั้น (มีลักษณะกลม และไม่หนืดหรือเหลวเกินไป) จากแม่ปลา 2-3 ตัวในการผสมเทียมกับน้ำเชื้อปลาไนที่รีดออกมาใหม่ๆ (ชุดควบคุม) และน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็ง (ชุดทดลอง) สำหรับจำนวนสเปิร์มที่ใช้ผสมกับไข่ ใช้ในปริมาณที่เหมาะสมเท่ากับ 10^5 สเปิร์มต่อไข่ 1 ใบ โดย ปริมาณน้ำเชื้อที่ใช้คำนวณจากความหนาแน่นของน้ำเชื้อแช่แข็งก่อนผสมเทียมว่าต้องใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปริมาณเท่าใดในการผสมกับไข่ 500 ใบที่รีดมาจากแม่ปลา 2-3 ตัว เปรียบเทียบกับปริมาณปริมาณน้ำเชื้อสดที่ต้องใช้ในการปฏิสนธิไข่ บนพื้นฐานของการใช้จำนวนสเปิร์มต่อไข่ (sperm to egg ratio) ในที่ปริมาณเท่ากัน (10^5 : 1) น้ำเชื้อสดที่ใช้ผสมเทียมรีดออกมาจากพ่อพันธุ์หลายตัวขณะทำการผสมเทียม แต่น้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ในการผสมเทียมได้มาจากการนำน้ำเชื้อปลาไนจำนวนหลายตัวที่รีดออกมาใหม่ๆมาเจือจางใน Ca-F HBSS แล้วเติม DMSO ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5, 10, 15 และ 20% แล้วนำน้ำเชื้อมาใส่ในหลอดฟางขนาด 250 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาทีแล้วลดอุณหภูมิด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer) จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -20 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาที แล้วนำหลอดฟางที่มีน้ำเชื้อแช่แข็งไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวนาน 3-4 วันจึงนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลาย (thawing) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาทีแล้วนำไปผสมเทียมกับไข่ปลาไนตามที่กล่าวมาแล้ว โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

สำหรับการน้ำเชื้อปลาไนที่แช่แข็งด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวที่นำมาผสมเทียมกับไข่ ทำในระยะต่อมาเมื่อทราบวิธีการแช่แข็งที่เหมาะสม โดยนำน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์หลายตัวมาเจือจางใน Ca-F HBSS ที่มี DMSO ความเข้มข้นสุดท้าย 5, 10, 15 และ 20% เช่นกันแล้วบรรจุน้ำเชื้อเข้าไปในหลอดฟางขนาด 250 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที จึงลดอุณหภูมิด้วยการแช่แข็งที่ระดับความสูง 6 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 10 นาทีก่อนการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว 3-4 วันจึงนำออกมาละลายและนำไปผสมเทียมกับไข่ปลาไนตามวิธีการที่กล่าวมาแล้วเช่นกัน ทำทดลอง 3 ซ้ำ

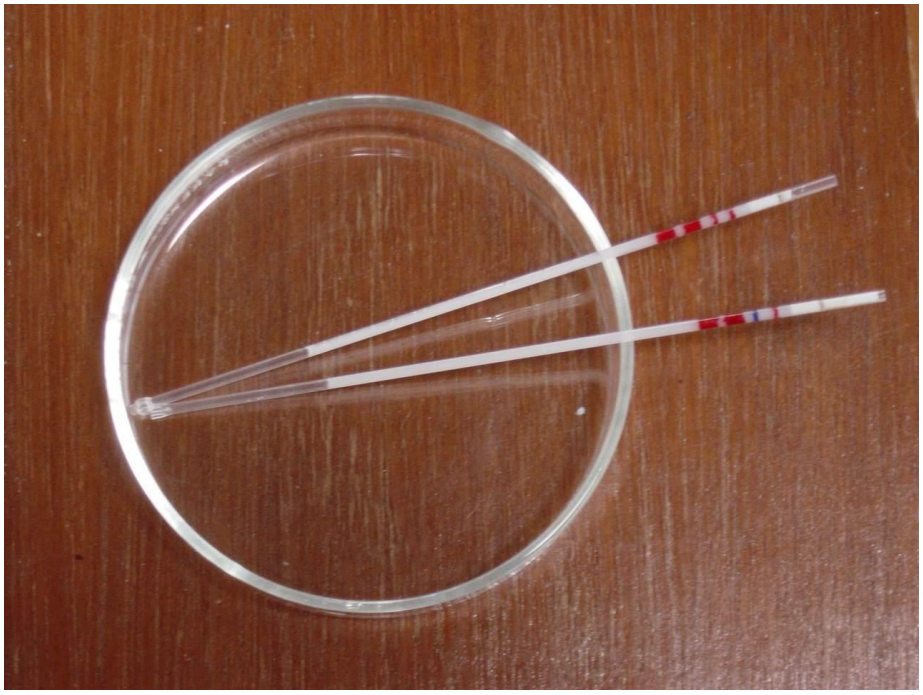
การประเมินอัตราการปฏิสนธิของไข่ในชุดทดลองและชุดควบคุม ทำเมื่อไข่ปลาไนพัฒนาเข้าสู่ระยะ gastrula stage ซึ่งประมาณ 7-9 ชั่วโมงหลังการผสมเทียม โดยคำนวณจากจำนวนไข่ที่พัฒนาถึงระยะ gastrula ต่อจำนวนไข่ทั้งหมดที่สุ่มประเมินแล้วคูณด้วย 100 และทำ 6 ซ้ำต่อชุดการทดลอง สำหรับกลุ่มควบคุมใช้น้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ๆ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่ต่ำกว่า 80% ในการผสมกับไข่

7. <u>การวิเคราะห์ทางสถิติ</u>

ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของ สเปิร์ม การมีชีวิตของสเปิร์ม ความหนาแน่นของสเปิร์ม ความดันออสโมติกน้ำเชื้ อ และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไข่ ในแต่ละชุดการทดลองถูก นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตราฐาน (standard deviation) และถูกนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีการ Analysis of variance (two-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองด้วย Duncan’s new multiple range test โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS

รูปที่ 5 หลอดฟางสำหรับใช้ในการทดลองแช่แข็ง

รูปที่ 6 การปิดปลายหลอดฟาง



รูปที่ 7 ลักษณะของหลอดฟางที่ปิดปลายหลอดก่อนการแช่แข็ง

รูปที่ 8 เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การทดลองสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 ตอน คือ

1. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มปลาไน
2. ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มปลาไน
3. การศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนที่ผ่านการแช่แข็ง
4. การพัฒนา protocol เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน
5. การประเมินความสามารถของน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งในการปฏิสนธิกับไข่

1. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มปลาไน

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

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อปลาไนในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

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

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

2. ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มปลาไน

2.1 DMSO

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

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า

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

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

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

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

2.2 Ethylene glycol

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

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า

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

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

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

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

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

2.3 Propylene glycol

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

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า

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

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

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

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

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

2.4 Acetamide

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

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า

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

- เวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนกับสารละลาย acetamide มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

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

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

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

2.5 Sucrose

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

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า

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

- เวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนกับสารละลาย sucrose มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

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

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

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

2.6 Glycerol

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

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

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

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

2.7 Formamide

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

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

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

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

2.8 Ethanol

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

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

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

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

2.9 Methanol

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

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

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

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)
ตัวเลขที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

3. การศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนที่ผ่านการแช่แข็ง

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

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

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

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

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนหลังการแช่แข็งและเก็บรักษาใน ไนโตรเจนเหลวด้วย Ca-F HBSS และ DMSO ที่อัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน

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

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

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนหลังการแช่แข็งและเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วย Ca-F HBSS และ Propylene glycol ที่อัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน

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

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

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

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

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

4. การพัฒนา protocol เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน

4.1 ผลของอุณหภูมิสุดท้ายที่มีต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนมาที่อุณหภูมิสุดท้ายและอัตราการลดอุณหภูมิต่างกันมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -20 องศาเซลเซียสเมื่อแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5 และ 8 องศาเซลเซียส/นาที พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าระหว่าง 67.8-82.4% แต่การใช้อุณหภูมิสุดท้ายที่ -40 หรือ -80 องศาเซลเซียส ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนมีส่วนทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงขึ้น โดยเมื่อแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5 และ 8 องศาเซลเซียส/นาที พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงขึ้น (86.7-91.5%) (ตารางที่ 14)

4.2 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนอย่างง่ายในกล่องโฟม

น้ำเชื้อสด (freshly collected milt) ที่รวบรวมมาจากปลาไนหลายตัวรวมกัน มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 100% แต่เมื่อนำน้ำเชื้อสดที่เจือจางใน Ca-F HBSS มาแช่แข็งด้วยการใช้ DMSO ที่ระดับ 4 ความเข้มข้นในไอไนโตรเจนเหลวที่ความสูงต่างๆกัน เป็นเวลานาน 10 นาที พบว่า การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนด้วยความเข้มข้นของ DMSO ต่างกันและที่ความสูงเหนือผิวหน้าไอไนโตรเจนเหลวต่างกัน มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย โดยเมื่อการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวผ่านไป 1 วัน ชุดการทดลองที่แช่แข็งด้วย DMSO 10% และ 15% ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร ยังคงมีสเปิร์มเคลื่อนที่หลังการละลาย (post-thawed sperm motility) เท่ากับ 100% ซึ่งมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 15) น้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ 7 วันในชุดการทดลองแช่แข็งด้วย DMSO 10% และ 15% ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร ก็ยังคงมีสเปิร์มเคลื่อนที่หลังการละลาย (88.9-95.6%) สูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$; ตารางที่ 15) ในทำนองเดียวกันเมื่อทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนในถังไนโตรเจนเหลวผ่านไป 14 วัน ชุดการทดลองที่แช่แข็งด้วย DMSO 10% ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร ก็ยังคงมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดคือ 97.8% รองลงมาชุดการทดลองที่แช่แข็งด้วย DMSO 15% ที่ความสูง 6 เซนติเมตร มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 80% ซึ่งยังคงมีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่นๆ ($P<0.05$) โดยที่ชุดการทดลองที่แช่แข็งที่ระดับ 2 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว สเปิร์มไม่มีการเคลื่อนที่หลังการละลาย (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 14 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนที่แช่แข็งด้วยการใช้ Ca-F HBSS และ 10% DMSO ที่อุณหภูมิสุดท้ายและอัตราการลดอุณหภูมิต่างๆกัน

อุณหภูมิสุดท้าย (องศาเซลเซียส)	อัตราการลดอุณหภูมิ (องศาเซลเซียส/นาที)	การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (%)
-20	3	78.7 ± 3.9^{a}
	5	82.4 ± 3.5^{ab}
	8	67.8 ± 6.2^{a}
-40	3	86.7 ± 2.2^{b}
	5	91.5 ± 4.1^{b}
	8	86.7 ± 3.9^{b}
-80	3	88.9 ± 3.9^{b}
	5	91.5 ± 4.1^{b}
	8	88.9 ± 6.7^{b}

ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน หลังการแช่แข็งใน ไอไนโตรเจนเหลวด้วยการใช้ DMSO ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2, 4 และ 6 เซนติเมตร

เวลา (วัน)	ความสูง (ซม.)	ความเข้มข้นของ DMSO			
		5%	10%	15%	20%
1	2	$53.3 \pm 0^{a,3}$	$46.7 \pm 0^{b,4}$	$48.9 \pm 2.2^{b,6}$	$8.9 \pm 2.2^{c,4}$
	4	$37.8 \pm 2.2^{c,4}$	$77.8 \pm 2.2^{a,2}$	$73.3 \pm 0^{a,4}$	$53.3 \pm 3.9^{b,2}$
	6	$71.1 \pm 4.4^{b,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$	$100 \pm 0^{a,1}$	$77.8 \pm 2.2^{b,1}$
7	2	$53.3 \pm 0^{a,3}$	$42.2 \pm 2.2^{b,4}$	$53.3 \pm 0^{a,5}$	$4.4 \pm 2.2^{c,4}$
	4	$33.3 \pm 0^{d,5}$	$62.2 \pm 2.2^{b,3}$	$75.6 \pm 2.2^{a,4}$	$44.4 \pm 2.2^{c,3}$
	6	$66.7 \pm 0^{d,1}$	$95.6 \pm 2.2^{a,1}$	$88.9 \pm 2.2^{b,2}$	$80 \pm 0^{c,1}$
14	2	$0^{a,6}$	$0^{a,5}$	$0^{a,8}$	$0^{a,5}$
	4	$20 \pm 0^{c,6}$	$40 \pm 0^{b,4}$	$60 \pm 0^{a,5}$	$40 \pm 0^{b,3}$
	6	$60 \pm 0^{c,2}$	$97.8 \pm 2.2^{a,1}$	$80 \pm 0^{b,3}$	$77.8 \pm 2.2^{b,1}$

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

4.3 <u>การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนปริมาณมาก</u>

น้ำเชื้อปลาไนที่แช่แข็งในปริมาณต่างๆกันของกลุ่มควบคุมใน หลอดฟางขนาด 0.25 และ 0.5 มิลลิลิตร และหลอด Cryotube 1.5 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติเมื่อนำมาละลายอุณหภูมิที่กำหนดไว้ พบว่า การเคลื่อนที่ของสเปิร์มใน หลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร และ0.5 มิลลิลิตร มีการเคลื่อนที่ 79.5±3.9% และ 81.7±3.5% ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) กับหลอด Cryotube (78.9 ± 6.7%; $P<0.05$) น้ำเชื้อปลาไนที่ seeding มาที่อุณหภูมิ -10, -15 หรือ -20 องศาเซลเซียสไม่ว่าจะแช่แข็งในหลอดฟางหรือหลอด Cryotube มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเฉลี่ยระหว่าง 75.2-83.6% ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) กับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนหลังการแช่แข็งในปริมาณต่างกัน

ชนิดของภาชนะเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (%)
หลอดฟาง 0.25 mL	79.5 ± 3.9[a]
หลอดฟาง 0.5 mL	81.7 ± 3.5[a]
หลอด cryotube 1.5 mL	78.9 ± 6.7[b]
หลอดฟาง 0.25 mL + seeding -10°C	75.2 ± 2.2[a]
หลอดฟาง 0.5 mL + seeding -10°C	82.5 ± 3.2[a]
หลอด cryotube 1.5 mL + seeding -10°C	78.5 ± 5.7[a]
หลอดฟาง 0.25 mL + seeding -15°C	83.2 ± 2.4[a]
หลอดฟาง 0.5 mL + seeding -15°C	77.8 ± 2.2[a]
หลอด cryotube 1.5 mL + seeding -15°C	81.5 ± 3.5[a]
หลอดฟาง 0.25 mL + seeding -20°C	83.6 ± 3.2[a]
หลอดฟาง 0.5 mL + seeding -20°C	75.2 ± 3.5[a]
หลอด cryotube 1.5 mL + seeding -20°C	77.8 ± 2.2[a]

ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

5. ความสามารถของน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งในการปฏิสนธิกับไข่

น้ำเชื้อสดปลาไนปฏิสนธิไข่ปลาไนได้ 69.3% ซึ่งมีประสิทธิภาพในการปฏิสนธิสูงกว่าการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งที่มีค่าเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิต่ำกว่าทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยน้ำเชื้อปลาไนที่แช่แข็งด้วย DMSO 5-15% สามารถปฏิสนธิไข่ปลาไนได้ค่าเฉลี่ยระหว่าง 51.3-59.7% แต่น้ำเชื้อแช่แข็งด้วย 20% DMSO ปฏิสนธิไข่ได้เพียง 40.2% ซึ่งมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 17)

ตารางที่ 17 อัตราการปฏิสนธิไข่ปลาไนที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งด้วย DMSO ความเข้มข้นต่างๆกันด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ

ชุดการทดลอง	เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ
น้ำเชื้อสด	69.3 ± 4.1^{a}
น้ำเชื้อแช่แข็งด้วย 5% DMSO	55.1 ± 3.5^{b}
น้ำเชื้อแช่แข็งด้วย10% DMSO	59.7 ± 2.8^{b}
น้ำเชื้อแช่แข็งด้วย 15% DMSO	51.3 ± 4.1^{b}
น้ำเชื้อแช่แข็งด้วย 20% DMSO	40.2 ± 4.1^{c}

ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

น้ำเชื้อปลาไนที่แช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลวเมื่อใช้ 5% DMSO ปฏิสนธิไข่ได้ประมาณ 63.4% มีค่าไม่แตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) กับน้ำเชื้อแช่แข็งในชุดการทดลอง 10% DMSO และ 15% DMSO ที่ได้ค่าปฏิสนธิเฉลี่ยระหว่าง 49.3-56.5% แต่น้ำเชื้อแช่แข็งทั้ง 3 ชุดการทดลองนี้มีค่าอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าชุดการทดลองที่ใช้ 20% DMSO อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ซึ่งปฏิสนธิไข่ได้เพียง 35.8% อย่างไรก็ตามน้ำเชื้อที่แช่แข็งในไอไนโตรเจนเหลวทั้ง 4 ชุดการทดลองนี้มีประสิทธิภาพในการปฏิสนธิไข่ต่ำกว่าน้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งน้ำเชื้อสดสามารถปฏิสนธิไข่ได้ 74.5% (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 อัตราการปฏิสนธิไข่ปลาไนที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งด้วย DMSO ความเข้มข้นต่างๆกันที่แช่แข็งในกล่องโฟมด้วยไอไนโตรเจนเหลว

ชุดการทดลอง	เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ
น้ำเชื้อสด	74.5 ± 3.4^{a}
น้ำเชื้อแช่แข็งด้วย 5% DMSO	63.4 ± 2.9^{b}
น้ำเชื้อแช่แข็งด้วย10% DMSO	56.5 ± 6.7^{b}
น้ำเชื้อแช่แข็งด้วย 15% DMSO	49.3 ± 5.8^{bc}
น้ำเชื้อแช่แข็งด้วย 20% DMSO	35.8 ± 4.7^{d}

ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

5.1 การเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มปลาไน

คุณภาพสเปิร์มปลาไนที่รวบรวมมาศึกษามีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์ม โดยสเปิร์มยังคงมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและการมีชีวิตของสเปิร์มที่มีค่าสูงตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ยกเว้นเดือนเมษายนที่สเปิร์มเคลื่อนที่ลดลงเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยในพ่อพันธุ์ปลาหลายชนิดที่สเปิร์มยังคงมีการเคลื่อนที่และการมีชีวิตสูงในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่เช่น ปลา Yamu *Brycon siebenthalae* (Eigenmann) (Cruz-Casallas et al., 2005) ปลาไหล spiny eel *Mastacembelus mastacembelus* (Sahinoz et al., 2007) ค่าแรงดันออสโมติกของน้ำเชื้อมีค่าใกล้เคียงกับที่พบในปลาดุกอุยตามที่รายงานโดย Tan-Fermin et al. (1999) และ Vuthiphandchai et al. (2009b) ค่าความหนาแน่นของสเปิร์มปลาไนมีค่าลดลงในเดือนมกราคมและสูงขึ้นอีกครั้งในเดือนพฤษภาคม ซึ่งเกี่ยวข้องกับการพัฒนาการสร้างสเปิร์ม (spermatogenesis) เนื่องจากปลาไนผสมพันธุ์วางไข่ตามฤดูกาล ทำให้ปลามีสเปิร์มจำนวนน้อยในช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และมีจำนวนสเปิร์มเพิ่มขึ้นตามระยะการพัฒนา แต่ในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ จำนวนสเปิร์มลดลง จึงทำให้ความหนาแน่นสเปิร์มสูงขึ้น ซึ่งลักษณะเช่นนี้เหมือนกับการทดลองในปลาดุกอุย (Vuthiphandchai et al., 2009b) ทำให้โดยภาพรวมคุณภาพสเปิร์มปลาไนลดลงในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (Rouxel et al., 2008; Sahinoz et al., 2007) การเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มของปลาหลายชนิดในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ เป็นสิ่งที่มักเกิดอยู่เสมอในปลาที่ผสมพันธุ์วางไข่ตามฤดูกาล (seasonal spawner) สอดคล้องกับผลงานวิจัยในปลาหลายชนิด เช่น ปลา rainbow trout *Salmo gairdneri* (Munkittrick and Moccia, 1987), Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* (Methven and Crim 1991), ปลา Yamu *Brycon siebenthalae* (Eigenmann) (Cruz-Casallas et al., 2005) และปลา Atlantic cod *Gadus morhua* L. (Rouxel et al., 2008)

5.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มปลาไน

การศึกษาผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มแสดงให้เห็นว่า DMSO, ethylene glycol, propylene glycol, sucrose, ethanol และ methanol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ควรนำมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน เนื่องจาก น้ำเชื้อที่เจือจางด้วย การใช้สารละลายสารไครโอโพรเทคแทนท์เหล่านี้ทั้ง 4 ความเข้มข้น ที่ระยะเวลา 10 นาที ล้วนต่างก็มีผลทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่เฉลี่ยมากกว่า 80% ซึ่งเหมาะสมต่อการนำ เอาสารไครโอโพรเทคแทนท์เหล่านี้ทั้ง 4 ความเข้มข้นไปแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน ต่อไป อย่างไรก็ตาม acetamide, glycerol และ formamide เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษสูงต่อน้ำเชื้อปลาไน ไม่ควรนำไปใช้แช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน เนื่องจากการใช้สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 3 ชนิดนี้มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงอย่างรวดเร็วภายในเวลา 10 นาที โดยทั่วไป DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่นิยมนำมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลายชนิด เช่น ปลากะพงแดง (Vuthiphandchai et al., 2009a) ปลาบึก (Mongkonpunya et al., 1995) ปลาตะเพียนขาว (Vuthiphandchai et al., 2015) เป็นต้น สาร propylene glycol มีความเป็นพิษต่ำและมีความเหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน (Horváth and Urbanyi, 2000) และน้ำเชื้อปลาตาเดียว (winter flounder) มากกว่าการใช้ DMSO

และ glycerol (Rideout et al., 2003) แต่ ethanol มีความเหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อกดเหลือง เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ (Muchlisin et al., 2004) ในขณะที่ sucrose พบว่ามีความเหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาบางชนิด เช่นปลาสลิด (Abinawanto et al., 2012) เนื่องจากความเป็นพิษต่อสเปิร์มต่ำ นอกจากนี้การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา mahseer (*Tor khudree*) ด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ ยังพบว่า DMSO แช่แข็งน้ำเชื้อได้ผลดีที่สุด โดย propylene glycol และ methanol ให้ผลในการปกป้องน้ำเชื้อรองลงมา (Basavaraja and Hegde, 2004)

Fabbrocini et al. (2000) ได้ทำการศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea bream *(Sparus aurata)* เมื่อนำน้ำเชื้อมาเจือจางด้วย 1 % NaCl และ สารไครโอโพรเทคแทนท์ 10 % ethylene glycol, 10% propylene glycol หรือ 5% DMSO แล้วทำการแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 10 และ 15 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -150 องศาเซลเซียส ก่อนแช่ในถังไนโตรเจนเหลว พบว่า น้ำเชื้อปลา Sea bream ที่แช่แข็งด้วย 5% DMSO และอัตราลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาที มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงสุด

Vuthiphandchai et al. (2005) ทำการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ 9 ชนิด (methanol, ethanol, ethylene glycol, propylene glycol, dimethyl sulfoxide; DMSO, acetamide, formamide, glycerol และ sucrose) ที่มีต่อตัวอ่อนกุ้งกุลาดำระยะต่างๆของการพัฒนา (embryonic development) โดยนำตัวอ่อนเหล่านั้นแช่ในสาร ไครโอโพรเทคแทนท์เหล่านั้นที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% นาน 10 หรือ 20 นาทีแล้วนำไปฟักในน้ำทะเลเพื่อให้เป็นตัวอ่อนฟักเป็นลูกกุ้งต่อไป พบว่า ความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ขึ้นอยู่กับระยะการพัฒนาของตัวอ่อน ชนิดและความเข้มข้นของ สารไครโอโพรเทคแทนท์ และระยะเวลาที่ตัวอ่อนสัมผัสสารไครโอโพรเทคแทนท์ โดยตัวอ่อนระยะท้ายของการพัฒนา (gastrula stage) มีความทนต่อสารไครโอโพรเทคแทนท์มากที่สุด และ DMSO, acetamide, glycerol และ sucrose เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์มีความเป็นพิษต่ำต่อต้วอ่อนกุ้งกุลาดำเปรียบเทียบสารสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดอื่นๆ

Vuthiphandchai et al. (2007) ศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 5 ชนิด (DMSO, ethylene glycol, propylene glycol, formamide และ methanol) ที่มีต่อการมีชีวิตของสเปิร์มกุ้งกุลาดำ โดยนำถุงน้ำเชื้อ (spermatophore) กุ้งกุลาดำมาแช่ในสารละลาย calcium-free saline (Ca-F saline) ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% พบว่า DMSO มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มต่ำที่สุด จึงมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ

5.3 การศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนที่ผ่านการแช่แข็งและการพัฒนา protocol เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อ

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนด้วย DMSO, propylene glycol และ ethylene glycol พบว่า DMSO สามารถแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนได้ดีกว่า propylene glycol และ ethylene glycol ซึ่งเป็นการลดอุณหภูมิมาที่ -20 องศาเซลเซียสก่อนนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวแล้วจึงละลายน้ำเชื้อ ซึ่งการวิจัยการพัฒนา protocol การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนเมื่อใช้ DMSO ด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 หรือ -80 องศาเซลเซียสก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงกว่าการใช้อุณหภูมิสุดท้าย -20 องศาเซลเซียสก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว เพราะในระหว่างการลดอุณหภูมิให้ต่ำลงถึงอุณหภูมิสุดท้าย -40 หรือ -80 องศา

เซลเซียส ซึ่งน่าจะเป็นอุณหภูมิสุดท้ายที่เหมาะสม (optimal final temperature) เซลล์สเปิร์มจะแข็งตัวแล้วก่อนนำไปใส่ในไนโตรเจนเหลว ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิภายในเซลล์ไม่มากเมื่ออยู่ในไนโตรเจนเหลว สเปิร์มจึงมีการเคลื่อนที่สูงกว่า แต่น้ำเชื้อปลาไนที่แช่แข็งมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -20 องศาเซลเซียสก่อนนำไปใส่ในไนโตรเจนเหลว อาจเป็นไปได้ว่าเซลล์สเปิร์มอาจไม่แข็งตัวเต็มที่ หรือน้ำยังไหลออกจากเซลล์ไม่เสร็จสิ้น (complete dehydration) และเมื่อนำเซลล์สเปิร์มที่อยู่ที่อุณหภูมิสุดท้าย -20 องศาเซลเซียสมาใส่ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็ง (intracellular ice formation) บางส่วนในเซลล์สเปิร์มขณะลดอุณหภูมิ ทำให้เซลล์อาจได้รับอันตราย (cell injury) มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ลดลง อีกทั้งถ้านำเซลล์ในสภาพเช่นนี้มาละลาย (thawing) ในภายหลังจะทำให้ผลึกน้ำแข็งมีขนาดใหญ่ขึ้นขณะละลาย (recrystallization) โดยเฉพาะถ้าใช้อัตราการละลายที่ช้า จึงเป็นเหตุผลที่ทำให้น้ำเชื้อปลาไนที่แช่แข็งมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -20 องศาเซลเซียสก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลง (Viveiros et al. 2000)

โดยทั่วไปสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งนอกจากช่วยลดการไหลออกของน้ำจากเซลล์แล้วยังช่วยลดการเกิดผลึกน้ำแข็ง (ice crystal) ในเซลล์ ซึ่งรูปแบบการใช้อัตราการลดอุณหภูมิต่างกันร่วมกับการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดที่เหมาะสมเพื่อแช่แข็งเซลล์ จะส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ ซึ่งการพัฒนา protocol การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาให้สามารถเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวได้นานเป็นปีต้อง optimize ตัวแปรทั้งหมดที่เกี่ยวข้องเพื่อให้ได้คุณภาพสเปิร์มที่ดีหลังการละลายสำหรับการจัดตั้งธนาคารน้ำเชื้อต่อไป โดยการศึกษาในครั้งนี้ปรากฏว่าน้ำเชื้อของปลาไนที่แช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติเมื่อใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิดและเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว 7 วันมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาไว้ 1 วัน แสดงให้เห็นว่า protocol การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนด้วยไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิดที่ลดอุณหภูมิมาที่อุณหภูมิสุดท้ายมาที่ -20 องศาเซลเซียสก่อนนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวที่มี -196 องศาเซลเซียส อาจทำให้เซลล์สเปิร์มแข็งตัวไม่มากก่อนนำไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลวตามที่กล่าวมาแล้ว จึงทำให้เซลล์สเปิร์มเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว และมีผลทำให้น้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว 7 วันมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลง แต่เมื่อทำการลดอุณหภูมิมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 หรือ -80 องศาเซลเซียสก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงกว่าการใช้อุณหภูมิสุดท้าย -20 องศาเซลเซียส แสดงว่าการเลือกใช้อุณหภูมิสุดท้ายก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายตามที่กล่าวมาแล้ว อย่างไรก็ตามการมีชีวิตรอดของเซลล์จากการแช่แข็งยังมีความเกี่ยวข้องระหว่างการเลือกใช้อัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) และอุณหภูมิสุดท้าย (final temperature) ก่อนแช่เซลล์ในไนโตรเจนเหลว เช่น การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส /นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -50 องศาเซลเซียส ก่อนใส่ไนโตรเจนเหลว เมื่อนำมาละลาย สามารถปฏิสนธิไข่และให้อัตราการฟักของลูกปลา ไม่แตกต่างกับการใช้น้ำเชื้อสดในการผสมเทียมกับไข่ แต่น้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันที่แช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 2 หรือ 10 องศาเซลเซียส /นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -50 องศาเซลเซียส เช่นกัน กลับมีผลทำให้ได้อัตราการฟักที่ต่ำกว่า (Viveiros et al. 2000) ซึ่งถ้าเลือกใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ต่างกันในการแช่แข็ง ก็จะทำให้มีอุณหภูมิสุดท้ายที่เหมาะสมต่างกันก่อนแช่เซลล์ในไนโตรเจนเหลวต่างกัน เช่นน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันจะมีชีวิตรอดสูงหลังการละลาย เมื่อนำน้ำเชื้อไปแช่แข็งที่อัตราการลดอุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส หรือแช่แข็งที่อัตราการลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -45 ถึง -50 องศาเซลเซียส

หรือแช่แข็งที่อัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -55 องศาเซลเซียส ต่างก็ทำให้สเปิร์มแช่แข็งมีชีวิตรอดสูงหลังการละลายเช่นกันแม้ว่าใช้อุณหภูมิสุดท้ายต่างกัน (Viveiros et al. 2000)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนในกล่องโฟมด้วยไอไนโตรเจนเหลวเมื่อเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวนาน 1, 7 และ 14 วัน มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงเล็กน้อยตามระยะเวลาการเก็บรักษา แสดงว่า อาจมีปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มระหว่างการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว เช่นอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิภายในถังไนโตรเจนเหลวระหว่างการนำตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวออกมาประเมินคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลาย เพราะการนำเอาหลอดฟางที่แช่แข็งออกจาก Goblet จะใช้ระยะเวลาสั้นๆในการนำตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งออกมา ซึ่งเมื่อเอาตัวอย่างออกหลายครั้ง ทำให้หลอดฟางมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิน้ำเชื้อในหลอดฟางสูงขึ้นเล็กน้อย ซึ่งการสุ่มตัวอย่างน้ำเชื้อออกมาแบบนี้ทำให้น้ำเชื้อแช่แข็งบางส่วนที่ยังอยู่ใน Goblet เมื่อนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวอีกครั้งหนึ่ง จะมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ลดต่ำลงอีก จึงอาจทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าลดลงระหว่างการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวเมื่อเวลาผ่านไปอันเนื่องจากอุณหภูมิเก็บรักษาไม่คงที่ เช่น สเปิร์มกุ้งกุลาดำแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว มีการมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มลดลง หลังจากการเก็บรักษาผ่านไป 60 วัน (Vuthiphandchai et al., 2007) สอดคล้องกับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา mahseer (*Tor khudree*) ที่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ในอัตราส่วนระหว่าง 1:10 ถึง 1:20 ที่มี DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์เมื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวผ่านไป 10 และ 70 วัน พบว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าลดลงเหลืออยู่ระหว่าง 80-81 และ 43-67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อสดที่มีค่ามากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์แม้ว่าระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่แตกต่างกันตามระยะเวลาการเก็บรักษา (Basavaraja and Hegde, 2004)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนด้วยไอไนโตรเจนเหลวในชุดการทดลองที่แช่แข็งด้วย DMSO 10% และ 15% ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด โดยเมื่อเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว 14 วัน ยังคงมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูง (80-97.8%) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ สอดคล้องกับผลการศึกษาในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลายชนิดที่สามารถใช้ไอไนโตรเจนเหลวแช่แข็ง เช่น ปลาเฉา (Bozkurt et al., 2011) ปลาดุกอัฟริกัน (Kamaruding et al. 2012) และปลากะรัง (Tian et al., 2013) เป็นต้น

Kenneth et al. (2004) พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงแดง โดยใช้ Ca-F HBSS เป็น sperm extender และใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด (Dimethyl acetamide; DMA, DMSO และ methanol) ที่ระดับความเข้มข้น 5% และ 10% ทำการลดอุณหภูมิ ในไอไนโตรเจนเหลว โดยการนำหลอดฟางวางแนวนอนบน rack และนำไปเก็บ ไว้ในถังไนโตรเจนเหลว พบว่า การใช้สารละลาย 10% DMSO ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงแดงในไอไนโตรเจนเหลว มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงสุดเท่ากับ 71%

Ji et al. (2004) พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea perch (*Lateolabrax japonicus*) ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 3 ชนิด (modified plaice Ringer solution; MPRS, D-15 และ modified Mounib's medium; MMM) ที่มี DMSO 3 ระดับความเข้มข้น (6%, 10% และ 14%) ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea perch ในไอไนโตรเจนเหลว ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2, 6 และ

13 เซนติเมตร เป็นเวลา 10 นาที และที่ผิวหน้าไนโตรเจนเหลว อีก 5 นาที จึงนำไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว พบว่า การใช้สารละลาย 10% DMSO ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea perch ในไอไนโตรเจนเหลว ที่ระดับความสูงเหนือผิวหน้าสารไนโต รเจนเหลว 6 เซนติเมตร มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม มีค่าสูงสุด (73.3±5.7%) โดยที่ระดับความสูง 13 และ 2 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 48.3±2.9% และ 41.7±10.6% ตามลำดับ

Mansour et al. (2006) ได้ทำการพัฒนาวิธีการ แช่แข็งน้ำเชื้อปลา Arctic char ด้วยการใช้สารละลาย glucose ที่ผสมกับ 10% methanol ในการเจือจางน้ำเชื้อ แล้วนำน้ำเชื้อเหล่านั้นมาลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็งที่ความสูง 6 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว พบว่า สเปิร์มมีการเคลื่อนที่สูงสุดหลังการละลาย เมื่อเปรียบเทียบกับการแช่แข็งที่ความสูง 5 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนในปริมาณมากขึ้นทั้งในการแช่แข็งด้วย หลอดฟางขนาด 0.25 และ 0.5 มิลลิลิตร และหลอด Cryotube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ภายในเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติไม่ว่าจะ seeding ที่อุณหภูมิเท่าใดก็ตาม ยังคงมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย (post-thawed sperm motility) ไม่ต่างกับกลุ่มควบคุม แสดงว่า seeding ไม่มีผลต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนหลังการละลาย และการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนสามารถแช่แข็งในปริมาณมากในหลอด Cryotube ได้มีประสิทธิภาพเทียบเท่าการแช่แข็งด้วยหลอดฟางที่มีขนาดเล็กกว่า สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจาก protocol การแช่แข็งที่เกี่ยวข้องมีความเหมาะสมทั้งในเรื่องของชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ และชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ รวมทั้งอัตราการละลายน้ำเชื้อและการแช่แข็งมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียสก่อนการเก็บรักษาน้ำเชื้อในถังไนโตรเจนเหลว น่าจะมีส่วนช่วยทำให้น้ำเชื้อถูกแช่แข็งอย่างเหมาะสม ไม่ได้รับอันตรายจากการบาดเจ็บของเซลล์ (cell injury) ขณะแช่แข็ง ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ดีหลังการละลาย การแช่แข็งน้ำเชื้อ ปลาไนในปริมาณที่มากขึ้นแล้วสเปิร์มหลังการละลายยังคงมีการเคลื่อนที่ที่ดี เป็นประโยชน์ต่อการเพาะพันธุ์ปลาเชิงพาณิชย์ แต่ผลการวิจัยที่ได้เกิดจากการพัฒนา protocol การแช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ ซึ่งควรมีการวิจัยเพิ่มเติมเพื่อให้สามารถแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนในปริมาณที่มากขึ้นภายในกล่องโฟมด้วยไอไนโตรเจนเหลว เพื่อให้ได้เทคโนโลยีเพื่อการประยุกต์ใช้ที่มีต้นทุนการผลิตต่ำลง

5.4 ความสามารถของน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งในการปฏิสนธิกับไข่

ผลการศึกษาการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า น้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งสามารถปฏิสนธิไข่ปลาไนได้ดี ไม่ว่าจะเป็นน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ หรือแช่แข็งในกล่องโฟมด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวแม้ว่าอัตราการปฏิสนธิของชุดการทดลองที่แช่แข็งด้วยการใช้เครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ และแช่แข็งในกล่องโฟมด้วยไอโตรเจนเหลว ต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสด สาเหตุดังกล่าวอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับ ความเป็นพิษ (toxicity) ของ DMSO ที่อาจมีต่อไข่ เนื่องจากในระหว่างการผสมเทียมเมื่อเทน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งที่ละลายใหม่ๆลงบนไข่ปลาไน ทำให้ไข่ปลาไนสัมผัสกับ DMSO ในระยะเวลาหนึ่งขณะผสม เทียม ทำให้ DMSO อาจมีพิษต่อไข่ ส่งผลทำให้คุณภาพไข่ลดลงขณะผสมเทียม จึงมีอัตราการปฏิสนธิต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสด (กลุ่มควบคุม) ซึ่งแนวทางในการแก้ปัญหาดังกล่าวสามารถทำได้โดยการนำน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งมาผสมเทียมกับไข่ปลา ไนด้วยวิธีผสมเทียมแบบเปียก (wet method) เพราะในการผสมเทียมด้วยวิธีนี้ ไข่ปลาไนจะถูกรีดลงไปในภาชนะที่มีน้ำอยู่

ก่อนแล้วทำการ เทน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งที่ละลายใหม่ๆใส่ลงไปผสมเทียมทันที ทำให้ DMSO ถูกเจือจางด้วยน้ำ และทำให้ไข่ปลาไนสัมผัสกับ DMSO ในความเข้มข้นที่ต่ำลง ซึ่งน่าจะทำให้ประสิทธิภาพการปฏิสนธิกับไข่ปลาดีขึ้น ซึ่งควรมีการวิจัยเพิ่มเติมต่อไป (Horváth et al., 2003) การศึกษาการใช้น้ำเชื้อปลาแช่แข็งในการผสมเทียมกับไข่ปลา แล้วทำ ให้อัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟัก ของไข่ปลา มีค่าลด ต่ำกว่า การใช้ น้ำเชื้อสด ในการผสมเทียม พบในปลาหลายชนิด เช่น ปลาบึก (*Pangasianodon gigas*; Mongkonpunya et al., 1995) ปลาเฉา (*Ctenopharyngodon idella*; Yavas and Bozkurt, 2011) และ ปลา yamú (*Brycon amazonicus*; Velasco-Santamaría et al., 2006) เป็นต้น

Rana and McAndrew (1989) ได้ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลานิล (*Oreochromis* spp.) ในหลอดฟางด้วยการเจือจางน้ำเชื้อด้วย Fish Ringer solution ที่มี 12.5% methanol และแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิระหว่าง 5- 50 องศาเซลเซียส/นาที แล้วทำการละลายน้ำเชื้อมาผสมเทียมกับไข่ปลานิลได้อัตราการปฏิสนธิที่ดี และมีอัตราการฟักไข่ปลาระหว่าง 86.2-98.6% แต่การแช่แข็งปลานิลในหลอด cryotube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรด้วยการใช้ 12.5% methanol เมื่อเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวนาน 13 เดือนมีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลายมีความแปรปรวนมาก สามารถปฏิสนธิไข่ได้ 38.7-93.4%

พลชาติ ผิวเณร และพนม กระจ่างพจน์ สอดศุข (2546) ทำการแช่แข็ง น้ำเชื้อปลาหมอไทยที่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Carp#1 ที่มี 10 % DMSO เป็นองค์ประกอบ โดยเจือจางน้ำเชื้อใน Carp#1 ในอัตราส่วน 1:5 ปล่อยให้น้ำเชื้ออยู่ในภาวะสมดุลที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนการแช่แข็งในอัตราการลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาที ปรากฏว่าสเปิร์มมีการเคลื่อนที่หลังการละลายประมาณ 60% และสามารถปฏิสนธิกับไข่ใกล้เคียงกับการใช้น้ำเชื้อสด

สรุปผลการทดลอง

1. คุณภาพสเปิร์มของปลาไนมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ โดยความหนาแน่นของสเปิร์มมีค่าสูงขึ้นในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่

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

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

4. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนด้วย DMSO โดยแช่แข็งในไอไนโตรเจนเหลวภายในกล่องโฟม 6 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูง

5. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนในปริมาณที่มากขึ้นด้วยการใช้หลอด Cryotube มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างจากการแช่แข็งด้วยการใช้หลอดฟาง

6. ระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย โดยเมื่อระยะเวลาเก็บรักษานานขึ้น ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลง

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

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

พลชาติ ผิวเณร และ พนม กระจ่างพจน์สอดสุข. 2546. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำในรูปน้ำเชื้อแช่แข็ง. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ. กรุงเทพ. 52 หน้า

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

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

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

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

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

Basavaraja, N. and Hegde, S.N. 2004. Cryopreservation of the endangered mahseer (*Tor khudree*) spermatozoa: I. Effect of extender composition, cryoprotectants, dilution ratio, and storage period on post-thaw viability. Cryobiology 49: 149-156.

Bobe, J. and Labbe, C. 2010. Egg and sperm quality in fish. General and Comparative Endocrinology 165: 535-548.

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

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

Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Nimrat, S. and Vuthiphandchai, V. 2016b. Morphological and morphometric evaluation of silver barb, *Barbodes gonionotus* (Bleeker, 1849) sperm supplemented with antibiotics. Journal of Applied Ichthyology 32: 480-485.

Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Sooksawat, T., Vuthiphandchai, V. and Nimrat, S. 2016c. Evaluation of the potential source of bacterial

contamination during cryopreservation process of silver barb (*Barbodes gonionotus*) sperm. Aquaculture Research 47: 2101-2113.

Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Sooksawat, T., Nimrat, S. and Vuthiphandchai, V. 2016d. Semen collection methods affect the bacterial composition of post-thawed semen of silver barb (*Barbodes gonionotus*). Animal Reproduction Science 166: 90-98.

Bozkurt, Y., Yavas, I,, Öğretmen, F., Sivaslıgil, B. and Karaca, F. 2011. Effect of glycerol on fertility of cryopreserved grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) sperm. The Israeli Journal of Aquaculture - Bamidgeh, IIC:63.2011.635, 6 pages.

Conget, P., Fernandez, M., Herrera, G. and Minguell, J.J. 1996. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. Aquaculture 143: 319-329.

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

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

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

Glogowski, J., Kolman, R., Szezepkowski, M., Horvath, A., Urbanyi, B., Sieczynski, P., Rzemieniecki, A., Domagala, J., Demianowicz, W., Kowalski, R., and Ciereszko, A. 2002. Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri,* Brandt) milt cryopreserved with methanol. Aquaculture 211: 367-373.

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.

Horváth, A., Miskolczi, E. and Urbanyi, B. 2003. Cryopreservation of common carp sperm. Aquatic Living Resources 16: 457-460.

Horváth, A., Urbanyi, B., Wang, C., Onders, R.J. and Mims, S. D. 2010. Cryopreservation of paddlefish sperm in 5-mL straws. Journal of Applied Ichthyology 26: 715-719.

Kamaruding, N.A., Embong, W.K.W. and Abdullan, R.B. 2012. Frozen-thawed Sperm Motility Characteristics of African catfish (*Clarias gariepinus*) by using glycerol or DMSO based extender. International Journal of Environmental Science and Development 3(1): 49-55.

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.

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.

Methven D.A. and Crim L.W., 1991. Seasonal changes in spermatocrit, plasma sex steroids and motility of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). In: Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., Rolfe, M.S. (Eds.), Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish, University of East Anglia, Norwich, UK. Fish Symp 91, Sheffield, UK. p.170.

Mongkonpunya, K., Chairak, N., Pupipat, T. and Tiersch, T.R. 1995. Cryopreservation of mekhong giant catfish sperm. Asian Fisheries Science 8: 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.

Munkittrick, K.R. and Moccia, R.D., 1987. Seasonal changes in the quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen: effect of a delay in stripping on spermatocrit, motility, volume and seminal plasma constituents. Aquaculture 64: 147-156.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tian, Y., Qi, W., Jiang, J. Wang, N., Wang, D., Zhai, J., Chen, C. and Chen, S. 2013. Sperm cryopreservation of sex-reversed seven-band grouper, Epinephelus septemfasciatus. Animal Reproduction Science 137: 230-236.

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.

Velasco-Santamaría, Y.M., Medina-Robles, V.M. and Cruz-Casallas, P.E. 2006. Cryopreservation of yamú (*Brycon amazonicus*) sperm for large scale fertilization. quaculture 256: 264-271.

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

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., Pengpun, B. and Nimrat, S. 2005. Effect of cryoprotectant toxicity and temperature sensitivity on the embryos of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture 246: 275-284.

Vuthiphandchai, V., Nimrat, S., Kotcharat, S. and Bart, A.N. 2007. Development of a cryopreservation protocol for long-term storage of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophores. Theriogenology 68: 1192-1199.

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

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

Vuthiphandchai, V., Wilairattanadilok, K., Chomphuthawach, S., Sooksawat, T. and Nimrat, S. 2015. Sperm cryopreservation of silver barb (*Barbodes gonionotus*): cryoprotectants, cooling rate and storage time on sperm quality. Aquaculture Research 46: 2443-2451.

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.

ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่และหน้า)

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

2. วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, นิภาพร เงินเจือ, อมรรัตน์ กิระวานิชย์ และ สุบัณฑิต นิ่มรัตน์. 2559. คุณภาพสเปิร์มและผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มปลาไน. การประชุมสัมนาทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก ครั้งที่ 9 วันที่ 11-13 พฤษภาคม 2558 ณ โรงแรมแกรนด์ จอมเทียน พาเลส พัทยา จ.ชลบุรี จ.ชลบุรี หน้า 503-509.

2. การจดสิทธิบัตร

-

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

-

4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

ผลงานวิจัยเรื่องนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการประยุกต์ใช้กับโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่เพาะพันธุ์ปลาเศรษฐกิจชนิดต่างๆที่อยู่ในครอบครัวเดียวกับปลาไน ทำให้ผู้ประกอบการ มีทางเลือกในการเพาะพันธุ์ปลาด้วยการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งไม่ว่าจะแช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติหรือแช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม นอกเหนือไปจากการใช้น้ำเชื้อสดเท่านั้นในการเพาะพันธุ์

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย
ประวัติการศึกษา Ph.D. (Marine Estuarine and Environmental Science), University of Maryland, College Park, MD, USA
M.Sc. (Aquaculture) Asian Institute of Technology
วท.บ. (ประมง) เกียรตินิยม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ต. แสนสุข อ.เมือง จ. ชลบุรี 20131

ผู้ร่วมโครงวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. สุบัณฑิต นิ่มรัตน์
ประวัติการศึกษา Ph.D. (Environmental Sciences), Rutgers, the state University of New Jersey, USA
วท.ม. (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยมหิดล
วท.บ. (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
หน่วยงานที่สังกัด ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ต. แสนสุข อ.เมือง จ. ชลบุรี 20131