รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

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

นายวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย
นางสุบัณฑิต นิ่มรัตน์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2560A10802089
สัญญาเลขที่ 14/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

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

นายวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[1]
นางสุบัณฑิต นิ่มรัตน์[2]

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

เมษายน 2561

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนเพื่อการจัดตั้งธนาคารน้ำเชื้อ สำเร็จเรียบร้อยลงได้ โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 14/2560 ขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดชลบุรีที่ให้ความอนุเคราะห์พ่อแม่พันธุ์ปลาไนสำหรับการวิจัยครั้งนี้

บทคัดย่อ

งานวิจัยเรื่อง การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนเพื่อการจัดตั้งธนาคารน้ำเชื้อ ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์ม ผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ผลของอัตราการลดอุณหภูมิและอุณหภูมิสุดท้ายที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่แข็งด้วยเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ การแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนปริมาณมาก รวมทั้งศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งที่มีคุณภาพสเปิร์มหลังการละลาย และความสามารถของน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งในการปฏิสนธิกับไข่ พบว่าคุณภาพสเปิร์มของน้ำเชื้อสดมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ โดยความหนาแน่นของสเปิร์มมีค่าสูงขึ้นในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษต่ำต่อสเปิร์มปลาไนได้แก่ dimethylsulfoxide (DMSO), ethylene glycol, propylene glycol, sucrose, ethanol และ methanol น้ำเชื้อปลาไนที่เจือจางด้วย 10% DMSO เมื่อแช่แข็งด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ หรือแช่แข็งด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวภายในกล่องโฟม ต่างก็ให้ผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสด โดยการแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติต้องลดอุณหภูมิมาให้ถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียสก่อนนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนในปริมาณที่มากขึ้นในหลอด Cryotube มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกับการแช่แข็งด้วยหลอดฟาง โดยน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งที่ได้จัดเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อนาน 240 วันยังคงมีคุณภาพสเปิร์มหลังการละลายอยู่ในเกณฑ์ที่ดี การศึกษาความสามารถในการปฏิสนธิไข่ปลาไนด้วยน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งในชุดการทดลองต่างๆ พบว่าน้ำเชื้อปลาไนที่แช่แข็งด้วยหลอดฟางและหลอด Cryotube หลังการละลายสามารถปฏิสนธิไข่ปลาไนได้ค่าเฉลี่ย 35.2-63.4% ซึ่งมีค่าต่ำกว่าน้ำเชื้อสด (69.3-75.1%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนเพื่อการจัดตั้งธนาคารน้ำเชื้อเป็นประโยชน์ต่อการบริหารจัดการสายพันธุ์ปลาที่ดีเพื่อประโยชน์การเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์สัตว์น้ำ

คำสำคัญ: น้ำเชื้อ; ปลาไน; การแช่แข็ง; ไนโตรเจนเหลว; การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

ABSTRACT

The present research project focused on setting up of sperm bank in common carp (*Cyprinus carpio*). Studies were investigated in various aspects including the changes in sperm quality, effects of cryoprotectants on sperm motility, effects of cooling rates and final temperature on post-thawed sperm motility using the programmable freezer, sperm cryopreservation by liquid nitrogen vapor in styrofoam box, development of sperm cryopreservation techniques at large scale, effects of cryostorage on post-thawed sperm quality and fertilization capacity of cryopreserved sperm. Results showed that sperm quality of fresh semen changed during the spawning season with increased sperm concentration at the end of the spawning season. DMSO, ethylene glycol, propylene glycol, sucrose, ethanol and methanol elicited low toxicity on sperm motility. Extended semen diluted with 10% DMSO frozen with either controlled-rate programmable freezer or liquid nitrogen vapor had high post-thawed sperm motility, comparable with fresh semen. Sperm frozen with controlled-rate programmable freezer is required to reach to a final temperature of -80°C prior to plunging into liquid nitrogen. Cryopreservation of *C. carpio* sperm at large scale in the cryotubes showed a comparable efficiency with that of French straw. Cryopreserved sperm stored in liquid nitrogen tank for 240 days had good post-thawed sperm quality. Fertilization studies from various treatments demonstrated that post-thawed sperm frozen in the straws or cryotubes were able to fertilize eggs with average fertilization rates of between 35.2-63.4%, significantly lower ($P<0.05$) than those of fresh sperm (69.3-75.1%). Cryopreservation of common carp sperm as a sperm bank is useful for fish strain management for the benefits of aquaculture and conservation.

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	12
4 ผลการทดลอง	25
5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	47
เอกสารอ้างอิง	59
ผลผลิต (Output)	65
ประวัติคณะผู้วิจัย	66

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อปลาไนในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่.....	25
2	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	26
3	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย ethylene glycol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	27
4	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย propylene glycol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	28
5	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย acetamide ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	29
6	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย sucrose ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	30
7	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย glycerol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	31
8	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย formamide ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	32
9	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย ethanol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	33
10	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน (*C. carpio*) หลังเจือจางในสารละลาย methanol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน.....	34
11	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนหลังการแช่แข็งและเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วย Ca-F HBSS และ DMSO ที่อัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน.....	36
12	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนหลังการแช่แข็งและเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วย Ca-F HBSS และ Propylene glycol ที่อัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน.....	37
13	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนหลังการแช่แข็งและเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วย Ca-F HBSS และ Ethylene glycol ที่อัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน.....	38
14	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนที่แช่แข็งด้วยการใช้ Ca-F HBSS และ 10% DMSO ที่อุณหภูมิสุดท้ายและอัตราการลดอุณหภูมิต่างๆกัน.....	40
15	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน หลังการแช่แข็งในไอไนโตรเจนเหลว ด้วยการใช้ DMSO ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2, 4 และ 6 เซนติเมตร.....	40

ตารางที่ **หน้า**

16 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนหลังการแช่แข็งในปริมาณต่างกันด้วยการใช้เครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ..... 41

17 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนในชุดการทดลองต่างๆหลังจากการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 240 วัน..... 43

18 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาไนในชุดการทดลองต่างๆหลังจากการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 240 วัน..... 44

19 อัตราการปฏิสนธิไข่ปลาไนที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งด้วย DMSO ความเข้มข้นต่างๆกันด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ..... 45

20 อัตราการปฏิสนธิไข่ปลาไนที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งด้วย DMSO ความเข้มข้นต่างๆกันที่แช่แข็งในกล่องโฟมด้วยไอไนโตรเจนเหลว..... 45

21 อัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักของไข่ปลาไนที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งในชุดการทดลองต่างๆกัน..... 46

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	พ่อพันธุ์ปลาไน.....	14
2	การรวบรวมพ่อพันธุ์ปลาไนมาใช้ในการทดลอง.....	14
3	การรีดน้ำเชื้อปลาไนมาใช้ในการทดลอง.....	15
4	น้ำเชื้อปลาไนที่รวบรวมมาใช้ในการทดลอง.....	15
5	หลอดฟางสำหรับใช้ในการทดลองแช่แข็ง.....	23
6	การปิดปลายหลอดฟาง.....	23
7	ลักษณะของหลอดฟางที่ปิดปลายหลอดก่อนการแช่แข็ง.....	24
8	เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ.....	24

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) เนื่องจากการนำพันธุ์ปลาไนเข้ามาเลี้ยงในประเทศไทยในระยะแรกมีจำนวนไม่มากนัก ทำให้มีโอกาสเกิดการผสมของปลาในครอบครัวที่มีสายเลือดชิดกันได้มาก ทำให้ในปัจจุบันได้มีการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ปลาไนให้ได้สายพันธุ์ที่ดีโตเร็ว มีลักษณะตามที่ต้องการโดยทำการคัดเลือกสายพันธุ์ปลาไนให้ได้สายพันธุ์ที่ดีและเมื่อได้สายพันธุ์ที่ดีแล้วจึงจำเป็นต้องเก็บรักษาสายพันธุ์ที่ดีนั้นไว้เพื่อที่จะนำไปเพาะขยายพันธุ์เพื่อประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยง ซึ่งแนวทางหนึ่งที่มีประสิทธิภาพสูงในการแก้ไขปัญหา และสามารถประยุกต์ใช้ได้ทันที คือ นำน้ำเชื้อปลาไนที่มีคุณภาพดีเหล่านั้นมาแช่แข็งและเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (cryopreservation) เพื่อนำมาใช้ในภายหลังด้วยการผสมเทียมกับไข่ปลาไน ซึ่งแนวทางเช่นนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้กับปลาแฟนซีคาร์พ (fancy carp) ซึ่งเป็นปลาสวยงามที่มีราคาแพง แต่ยังคงมีปัญหาการขาดแคลนพ่อพันธุ์คุณภาพดีบางสายพันธุ์ในการผสมให้ได้ลูกปลาลักษณะที่ต้องการ อย่างไรก็ตามการพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนจำเป็นต้องทราบข้อมูลพื้นฐานของชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน ซึ่งสารดังกล่าวมีความจำเป็นที่ต้องใช้ในระหว่างกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อ (cryopreservation) เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดเกล็ดน้ำแข็ง (ice crystal) ระหว่างการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็ง เพราะการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ อย่างไม่เหมาะสมจะทำให้เซลล์ได้รับบาดเจ็บและตายในที่สุด (cell injury) (Vuthiphandchai et al., 2015) ดังนั้นการศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มปลาไน จึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อจำเป็นเพื่อทราบ

ข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเพื่อได้ข้อมูลที่จำเป็นสำหรับการพัฒนากระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนต่อไป

ในประเทศไทยการศึกษาเกี่ยวกับการเก็บน้ำเชื้อสัตว์น้ำแบบแช่แข็งยังมีอยู่น้อยมากเมื่อเทียบกับการศึกษาในต่างประเทศ เนื่องจากสัตว์น้ำส่วนใหญ่ที่พบในประเทศไทยมักจะมีน้ำเชื้อที่สมบูรณ์ดีตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่และหาได้ง่ายจึงทำให้ผู้เพาะพันธุ์สัตว์น้ำไม่นิยมเก็บน้ำเชื้อสัตว์น้ำแช่แข็งเอาไว้ใช้ในอนาคต แต่ในความจริงแล้วปัญหาการขาดแคลนน้ำเชื้อของสัตว์น้ำยังคงมักพบอยู่บ่อยครั้งในระหว่างการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำหลายๆชนิดโดยเฉพาะการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำต่างชนิดกัน (hybridization) ซึ่งอาจมีช่วงเวลาที่ไข่และสเปิร์มอาจสมบูรณ์เพศไม่พร้อมกัน การเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำแช่แข็งมีแนวโน้มที่จะมีความสำคัญอย่างมากต่อการเพาะขยายพันธุ์สัตว์น้ำ โดยเฉพาะปลาเพศผู้ที่ต้องผ่าท้องเอาอัณฑะมาใช้ผสมเทียมเช่นปลาดุกรวมทั้งพันธุ์ปลาที่หาได้ยาก ใกล้สูญพันธุ์ หรือปลาที่มีการกลายเพศซึ่งเพศผู้และเพศเมียจะพัฒนาถึงวัยเจริญพันธุ์ไม่พร้อมกัน นอกจากนี้ในบางครั้งการจับพ่อแม่พันธุ์ปลาจากแหล่งผสมพันธุ์วางไข่ก็ได้ปลาเพศผู้และเพศเมียไม่พร้อมกันซึ่งก่อให้เกิดปัญหาในด้านการจัดการในโรงเพาะฟักระหว่างการเพาะพันธุ์ เช่น ตัวเมียที่จับได้ก่อนมีไข่ที่ไม่สมบูรณ์ต้องใช้ฮอร์โมนฉีดกระตุ้นซึ่งต้องขังตัวผู้ไว้หลายวันทำให้พ่อพันธุ์ปลาอาจช้ำและตายได้ หรือบ่อยครั้งที่เคลื่อนย้ายพ่อพันธุ์จากบ่อดินมาไว้ในโรงเพาะฟักก็ทำให้พ่อพันธุ์มีน้ำเชื้อน้อยลง (expressible milt) การเก็บน้ำเชื้อสัตว์น้ำแช่แข็งยังมีบทบาทสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์ปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเพื่อผลิตปลาที่โตเร็วหรือทนทานต่อโรคให้มากขึ้นเพราะสามารถควบคุมช่วงเวลาการผสมเทียมหรือการผสมข้ามพันธุ์ปลาชนิดต่างๆได้ง่ายขึ้น (Velasco-Santamaría et al. 2006) นอกจากนี้การลำเลียงน้ำเชื้อสัตว์น้ำแช่แข็งไปใช้ในการผสมเทียมก็ทำได้สะดวกกว่าการลำเลียงพ่อพันธุ์ โดยสามารถขนส่งไปภายในประเทศและระหว่างประเทศได้ง่าย และยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการเก็บรักษาพันธุกรรมของธนาคารยีน (gene bank) และการเก็บรักษาตัวอ่อนของลูกปลาต่อไป อย่างไรก็ตามแม้ว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำแบบแช่แข็งจะมีความสำคัญต่อการพัฒนาด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแต่การศึกษาด้านการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำแบบแช่แข็งในประเทศไทยยังมีค่อนข้างน้อยมากเมื่อ เปรียบเทียบกับงานวิจัยทางด้านอื่นๆของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งมีการพัฒนาอย่างมากเทียบเท่าในต่างประเทศ การเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำแบบแช่แข็งกล่าวโดยสรุปทำโดยการนำเอาน้ำเชื้อสัตว์น้ำที่มีคุณภาพดีมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (sperm extender) พร้อมกับใส่สารที่ป้องกันไม่ให้เซลล์เป็นอันตรายในระหว่างการแช่แข็งซึ่งเรียกว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) แล้วจึงเอาไปบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อพร้อมกับลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ก่อนที่จะเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ซึ่งสามารถรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อสัตว์น้ำได้เป็นเวลานานเป็นปี (Nimrat and Vuthiphandchai, 2008)

ประโยชน์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแบบแช่แข็งสามารถนำมาใช้ในการคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์และใช้ในการเพาะขยายพันธุ์ปลาในตระกูลเดียวกัน เช่น ปลาแฟนซีคาร์พ (Fancy carp) หรือที่เรียกกันว่าปลาไนแฟนซี ซึ่งเกิดจากการผ่าเหล่า (Mutation) กลายพันธุ์เป็นปลาไนสีแดงทำให้ชาวญี่ปุ่นนี้สนใจปลาชนิดนี้มากขึ้น การเพาะขยายพันธุ์ปลาชนิดนี้ค่อยๆขยายตัวแพร่หลายเพิ่มมากขึ้น และจากการคัดเลือกปลาคาร์พที่มีลักษณะเด่นของแต่ละตัวมาผสมพันธุ์ทำให้เกิดปลาสายพันธุ์ใหม่ที่มีสีแดงและสีขาวสมบูรณ์ ซึ่งเป็นปลาสวยงามที่มีมูลค่าสูง วงการการเลี้ยงปลาแฟนซีคาร์พนั้นจึงเป็นที่กว้างขวาง และเป็นที่นิยมแพร่หลายไปทั่วโลก ไม่ใช่แค่ในประเทศต้นกำเนิดอย่าง

ญี่ปุ่นและแถบเอเชียเท่านั้น ที่สำคัญ แฟนซีคาร์พ ได้กลายเป็นสัญลักษณ์แทนความหมายบางอย่างมากกว่าจะเป็นเพียงแค่ปลาสวยงาม การเลี้ยงคาร์พแฟนซี ตอนนี้กลายเป็นสัตว์เศรษฐกิจตัวใหม่มูลค่าส่งออกมากกว่าหลักพันล้านบาทไปแล้ว ส่วนหนึ่งมาจากความต้องการปลาสวยงามในตลาดโลกมีคนนิยมเลี้ยงกันมากในปัจจุบันชนิดหนึ่ง 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., 2016c; 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 และการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนที่ผ่านการแช่แข็ง

3. ศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาที่มีต่อการมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน

4. เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแบบแช่แข็งในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อ

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแบบแช่แข็ง โดยเริ่มจากการศึกษาความเป็นพิษ (toxicity) ของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ว่าสารชนิดใด หรือความเข้มข้นใดมีความเหมาะสมในการคัดเลือกมาใช้เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์สำหรับแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน รวมทั้งการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่แตกต่างกันในการแช่แข็งโดยมุ่งพัฒนา protocols เพื่อทดสอบผลที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป ทฤษฎีและ/หรือแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในงานวิจัย

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแบบแช่แข็งมีหลักการวิจัย เริ่มจากการใช้น้ำเชื้อปลาไนที่มีคุณภาพสูงให้อยู่ในสภาวะสมดุล (equilibration) ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่ได้ใส่สารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เกิดเกล็ดน้ำแข็ง (ice crystal) ภายในเซลล์ จากนั้นทำการลดอุณหภูมิให้ต่ำลง (freezing) เพื่อแช่แข็งเซลล์ด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม แล้วเก็บน้ำเชื้อเหล่านั้นในไนโตรเจนเหลว ซึ่งเมื่อต้องการใช้ก็นำมาเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้เซลล์ที่แข็งตัวละลาย (thawing) กลับเข้าสู่สภาพเดิมก่อนแช่แข็ง ดังนั้นการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนจึงต้องเริ่มจากการนำเอาสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมซึ่งต้องไม่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่มาเจือจางน้ำเชื้อ แล้วจึงนำน้ำเชื้อปลาไนที่ถูกเจือจาง (extended semen) ไปผสมด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprtectants) ชนิดต่างๆ ที่เวลาต่างๆ กันเพื่อประเมินความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่อาจมีต่อสเปิร์มก่อนการเริ่มต้นลดอุณหภูมิ จากนั้นจึงลดอุณหภูมิน้ำเชื้อให้ต่ำลงเพื่อให้น้ำเชื้อแข็งตัว (frozen semen) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็งที่เหมาะสม จึงนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) ที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส และเมื่อต้องการนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้มาใช้ประโยชน์ ก็นำมาละลาย ให้กลับสู่สภาพเดิมด้วยการเพิ่มอุณหภูมิด้วยการเลือกใช้อัตราการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อละลายน้ำเชื้อ (thawing rate) ที่เหมาะสม (Vuthiphandchai et al., 2015) โดยมีสมมติฐานว่าความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน สามารถทำได้ เพียงแต่ต้อง optimize ตัวแปรต่างๆที่กล่าวมาให้เหมาะสมเพื่อให้เซลล์มีชีวิตรอด โดยเฉพาะการพัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสม มีราคาถูก และประยุกต์ใช้เพื่อให้เกษตรกร หรือผู้ประกอบการสามารถนำเอาเทคโนโลยีที่เหมาะสมไปประยุกต์ใช้ได้ทันที

การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน เพื่อการเพาะพันธุ์เชิงพาณิชย์จำเป็นต้องมีข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับความสามารถในการทนต่อสารไครโอโพรเทคแทนท์ เพราะสารชนิดนี้จำเป็นต้องใส่ไปในระหว่างการแช่แข็งเพื่อป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (ice crystal) ในเซลล์ระหว่างการลดอุณหภูมิ ซึ่งสารไครโอโพรเทคแทนท์จะทำให้เซลล์ตายถ้าใช้ในปริมาณที่ไม่เหมาะสม

นอกจากนี้ ตัวแปรที่ทำให้การแช่แข็งประสบความสำเร็จจำเป็นต้องสามารถพัฒนาทุกขั้นตอนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแช่แข็งให้เหมาะสมสำหรับเซลล์ชนิดนั้นๆ เริ่มตั้งแต่ ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ อัตราการลดอุณหภูมิ อัตราการละลาย และรวมทั้งขั้นตอนอื่นๆที่เกี่ยวข้องให้มีความเหมาะสมในทุกตัวแปรที่เกี่ยวข้อง เพราะถ้าไม่สามารถ optimize ในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งให้เหมาะสม ก็จะทำให้การแช่แข็งประสบความล้มเหลวทันที (Vuthiphandchai et al., 2009a)

การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่มีราคาถูกในถังโฟม (styrofoam box) หรือในถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) ต่างก็ใช้หลักการและขั้นตอนการแช่แข็งเช่นเดียวกับการแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer) ที่มีราคาหลายแสนบาท หรือหลายล้านบาท (ขึ้นอยู่กับบริษัทผู้ผลิต) เพียงแต่ว่าการลดอุณหภูมิเพื่อการแช่แข็งน้ำเชื้อในถังโฟม หรือถังไนโตรเจนเหลวจะต้องวางตัวอย่างน้ำเชื้อปลาที่ต้องการแช่แข็งไว้เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen surface) ที่ความสูงที่เหมาะสมเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว และใช้เวลาแช่แข็งที่เหมาะสม เพื่อให้น้ำเชื้อแข็งตัว (frozen) ในไอไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapor) ตามที่ต้องการ (Vuthiphandchai et al., 2015) ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาอย่างง่ายในถังโฟม หรือถังไนโตรเจนเหลวจึงสามารถทำได้โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพง ทำให้สามารถประยุกต์ใช้ได้กับภาคการผลิต หรือผู้ประกอบการที่จะนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปใช้ผสมเทียมกับไข่ในภายหลังทันที แม้ว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติจะมีต้นทุนที่สูงแต่ก็มีความเที่ยงตรงกว่าการแช่แข็งอย่างง่ายในกล่องโฟม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมที่ควร นำมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน

2. ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งด้วยการพัฒนาเทคโนโลยีที่มีราคาถูกเพื่อทดแทนการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติเพื่อให้เกษตรกร หรือผู้ประกอบการขนาดเล็ก หรือขนาดกลางสมารถนำไปใช้ในฟาร์มเพื่อเพิ่ม หรือควบคุมผลผลิตได้ทันที ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการเก็บรักษาสายพันธุ์ที่ดีของพ่อพันธุ์ปลาไนเพื่อการเพาะพันธุ์ต่อไป และยังเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนางานวิจัยแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาชนิดอื่นๆที่หาได้ยากหรือใกล้สูญพันธ์ต่อไปในอนาคต

3. ทราบเทคโนโลยีการแช่แข็งและการเก็บรักษาน้ำเชื้อของปลาไนเพื่อนำมาใช้ผสมเทียมโดยสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ในระยะเวลาที่นานเป็นปีเพื่อใช้ประโยชน์สูงสุดในการผสมเทียมกับแม่พันธุ์ได้ในช่วงเวลาที่ต้องการ ซึ่งสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีนี้ไปยังนักวิชาการประมง และเกษตรกรผู้เพาะพันธุ์สัตว์น้ำต่อไป

4. ทราบรูปแบบการจัดการที่เหมาะสมในการจัดเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ดีไว้ในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อ (sperm bank หรือ DNA bank) ซึ่งเป็นองค์ความรู้ที่จำเป็นสำหรับงานวิจัยด้านพันธุกรรมสัตว์น้ำ ด้าน toxicity หรือ molecular biology ได้ต่อไป

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ชีววิทยาปลาไน

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

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

2. น้ำเชื้อและสเปิร์มของสัตว์น้ำ

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

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

สภาพแวดล้อมภายนอก และจะหยุดเคลื่อนที่ภายในเวลาประมาณ 1 นาทีหลังจากถูกกระตุ้นสำหรับสเปิร์มปลาน้ำจืด (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536) กลไกที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาน้ำจืดพบว่าสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติก (osmolality หรือ osmotic pressure) ต่ำกว่าระดับที่พบใน seminal fluid (hypotonicity) จะกระตุ้นให้สเปิร์มปลาน้ำจืดเคลื่อนที่ แต่ในทางตรงกันข้ามสเปิร์มของปลาทะเลมีการเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกสูงขึ้นมากกว่าระดับที่พบใน seminal fluid (hypertonicity) (Morisawa et al., 1983; Bobe and Labbe, 2010) ทำให้การใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ จึงมีความสำคัญมาก เพราะจะทำให้สเปิร์มไม่ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ขณะอยู่ในระหว่างการเจือจางน้ำเชื้อก่อนการนำไปใช้ประโยชน์หรือการแช่แข็ง (Vuthiphandchai et al., 2009b) ดังนั้นสเปิร์มของปลาเมื่อสเปิร์มยังอยู่ในตัวปลาหรือเมื่อรีดน้ำเชื้อสดออกมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ สเปิร์มของปลาจะยังไม่มีการเคลื่อนที่ (immotile) แต่เมื่อน้ำเชื้อปลาผสมกับน้ำภายนอกขณะที่ผสมพันธุ์ตามธรรมชาติหรือเมื่อนำน้ำเชื้อผสมกับหยดน้ำบนแผ่นกระจกสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะพบว่าสเปิร์มจะถูกกระตุ้นให้มีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วอันเป็นผลเนื่องมาจากการเจือจางทำให้มีการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติก โดยทั่วไปการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาน้ำจืดเมื่อถูกกระตุ้นจะสิ้นสุดลงอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาไม่เกิน 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) ของปลาน้ำจืดอย่างง่าย ทำโดยนำน้ำเชื้อปลาในปริมาณเล็กน้อยมาวางบนกระจกสไลด์ แล้วกระตุ้นด้วยสารละลายในปริมาณที่เหมาะสม ปิดกระจกสไลด์แล้วประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มตามเกณฑ์ที่ตั้งไว้ (Vuthiphandchai and Zohar, 1999) หรือประเมินด้วยการใช้เครื่องมือวัดการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (CASA; Kamaruding et al., 2012) สำหรับน้ำเชื้อปลาที่แช่แข็งสามารถใช้หลักการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มได้เช่นเดียวกับน้ำเชื้อสด เพียงแต่ใช้สารละลายที่เหมาะสม และกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ในอัตราการเจือจางที่เหมาะสมเช่นกัน (Vuthiphandchai et al., 2009a)

3. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา จัดเป็นเทคโนโลยีชีวภาพแขนงหนึ่งที่มีการนำมาใช้ในการบริหารจัดการเพาะพันธุ์ปลาเพื่อประโยชน์ทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์สัตว์น้ำ โดยการศึกษาด้านนี้ส่วนใหญ่นิยมศึกษาในต่างประเทศ ทั้งในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและใกล้สูญพันธุ์ทั้งปลาน้ำจืด และปลาทะเล เช่น ปลากะพงขาว ปลา rainbow trout ปลา salmon ปลา channel catfish ปลา sea bream ปลา cod และปลา Atlantic croaker เป็นต้น โดยทั่วไปน้ำเชื้อปลาเมื่อถูกแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิอย่างเหมาะสม (freezing rate) ก็สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อในถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสได้นานเป็นปี เมื่อต้องการใช้น้ำเชื้อปลาแช่แข็งที่เก็บ

รักษาในถังไนโตรเจนเหลวในการผสมเทียมกับไข่ปลา ก็นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อมาละลายโดยการเพิ่มอุณหภูมิในอัตราที่เหมาะสม (thawing rate) แล้วนำน้ำเชื้อที่ถูกละลายไปผสมเทียมกับไข่ (Horváth and Urbanyi, 2000; Vuthiphandchai et al., 2009a) ดังนั้นความสำเร็จของการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาขึ้นอยู่กับปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายอย่างในกระบวนการแช่แข็ง เช่น ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์และชนิดสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectants) (Rana and McAndrew, 1989; Rideout et al., 2003; Basavaraja and Hegde, 2004) อัตราการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็ง และการเพิ่มอุณหภูมิขณะละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (Scott and Baynes, 1980; Mansour et al., 2006; Yavas and Bozkurt, 2011) 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 , Glucose 100 mg และ DMSO 10% ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร 5) ปลากระโห้ อัตราการลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งควรอยู่ระหว่าง 10-15 องศาเซลเซียส ต่อนาที ความเข้มข้นของน้ำเชื้ออยู่ระหว่าง 250-300 mOsm/kg 6) ปลาดุกอัฟริกัน ระดับการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสดเคลื่อนที่ได้นานที่สุด 45 วินาที

Conget et al. (1996) ใช้ cryoprotectant ต่างๆชนิด ในการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา rainbow trout พบว่า การใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) ร่วมกับ sucrose ให้ผลดีที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อ โดยระยะเวลาที่เจือจางน้ำเชื้อใน cryoprotectant ก่อนทำการแช่แข็ง (equilibration time) ไม่ควรเกิน 10 นาที และการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งอย่างรวดเร็ว (30 องศาเซลเซียส/นาที) มีผลทำให้สเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่หลังการละลาย (post-thawed sperm motility) สูงกว่าการลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ (1 องศาเซลเซียส/นาที และ 10 องศาเซลเซียส/นาที)

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

Rana and McAndrew (1989) ได้ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลานิล โดยเจือจางน้ำเชื้อปลานิลในสารละลาย Ringer ที่มี methanol เป็น cryoprotactant ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน แล้วบรรจุน้ำเชื้อในหลอดฟางขนาด 0.5 มิลลิลิตร พบว่า การใช้ methanol 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลดีที่สุดในการปกป้องเซลล์ไม่ให้ได้รับอันตราย และการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งน้ำเชื้อในอัตราที่แตกต่างกัน (freezing rates) ตั้งแต่ 5 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 50 องศาเซลเซียส/นาที ก่อนเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลว พบว่า ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ

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

Glogowski et al. (2002) ได้ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา sturgeon (*Acipenser baeri,* Brandt) ด้วยการนำน้ำเชื้อมาเจือจางในน้ำยา 3 สูตร คือ tris-sucrose-KCl (30 mM Tris, 23.4 mM sucrose, 0.25 mM KCl, pH 8.0), tris-NaCl (10 mM Tris, 25 mM NaCl, pH 8.5) และ tris-sucrose (20 mM Tris, 400 mM sucrose, pH 8.0)และผสมด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ (methanol 10%) และทำการลดอุณหภูมิแช่แข็งน้ำเชื้อในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลว พบว่า สารบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา sturgeon คือ tris-sucrose-KCl และ tris-NaCl โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 3.5 องศาเซลเซียสต่อนาที โดยทำการลดอุณหภูมิมาถึงอุณหภูมิสุดท้ายที่ -15 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำหลอดฟางที่มีน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 6 วินาที พบว่าน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยการใช้ tris-sucrose-KCl และ tris-NaCl สามารถทำให้ไข่ปลาที่ได้รับการปฏิสนธิด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง มีอัตราการฟัก (hatching rates) ไม่แตกต่างกับการใช้น้ำเชื้อสด

Vuthiphandchai et al. (2009a) ได้แช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*) ด้วยการใช้สาร cryoprotectants 10 ชนิดที่ 4 ระดับความเข้มข้น โดยลดอุณหภูมิแตกต่างกัน 2 รูปแบบมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 และ -80 องศาเซลเซียสด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ พบว่า น้ำเชื้อปลากะพงแดงที่อยู่ในสภาวะสมดุล (equilibration period) ใน dimethylsulfoxide 10% นาน 10 นาทีเมื่อลดอุณหภูมิในอัตรา 10 องศาเซลเซียส/นาทีจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียสจนถึง -80 องศาเซลเซียสแล้วเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวจะมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (post-thaw sperm motility) และการมีชีวิตของสเปิร์ม (post-thaw sperm viability) มีค่าสูงสุด (>90%) หลังการละลายน้ำเชื้อ (thawing) และน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่แช่แข็งเหล่านี้สามารถปฏิสนธิกับไข่ปลากะพงแดงให้ค่าอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างทางสถิติกับน้ำเชื้อกลุ่มควบคุมที่ใช้น้ำเชื้อสด

Horvath et al. (2010) พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา paddlefish (*Polyodon spathula*) ในปริมาณมากด้วยการประเมินความเป็นไปได้ในการใช้หลอดฟางขนาดใหญ่ 5 มิลลิลิตร (minitube) แช่แข็งน้ำเชื้อ (บรรจุน้ำเชื้อปริมาณ 2.5 มิลลิลิตร) พร้อมกับการใช้ methanol ระดับ 5% และ 10% แช่แข็งนาน 5 หรือ 7 นาทีในไอไนโตรเจนเหลว พบว่า การใช้ 5% methanol แช่แข็งน้ำเชื้อปลาชนิดนี้ในระยะเวลานาน 5 นาที มีผลทำให้อัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักมีค่าสูงสุดเท่ากับ 48±5% และ 47±10% แต่ค่าเหล่านี้ก็มีค่าต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสดผสมเทียมไข่ซึ่งได้ค่าอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักมีค่าสูงสุดเท่ากับ 77±6% และ 66±13% ตามลำดับ การศึกษาผลของจำนวนสเปิร์มต่อไข่ที่มีต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสด พบว่า จำนวนสเปิร์มที่เหมาะสมในการปฏิสนธิไข่ (sperm to egg ratio) มีค่าระหว่าง 1.379×10^6 ถึง 2.758×10^6 ตัวต่อไข่ 1 ใบ และพบความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการปฏิสนธิ 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) มีค่าสูงขึ้นค่อนข้างมากเมื่อใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง 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 (*Ctenopharyngodon idella*) โดยศึกษาผลของ glycerol ที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการปฏิสนธิ โดยนำน้ำเชื้อมาเจือจางในสารละลายในอัตราส่วน1:3 ใน Kurokura I หรือ Kurokura II ที่มี 10%, 15% หรือ 20% glycerol ใช้หลอดฟางขนาด 0.5 มิลลิลิตร ปล่อยให้อยู่ในสภาวะสมดุลที่ 4 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที แช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลวนาน 10 นาทีแล้วเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว แล้วนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาปฏิสนธิไข่พบว่า น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วย Kurokura I ที่มี 10% glycerol สามารถปฏิสนธิไข่ได้ค่าสูงสุด (95.63±0.52%) เมื่อใช้อัตราส่วนสเปิร์มต่อไข่เท่ากับ 1×10^5:1 นอกจากนี้เมื่อแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเฉาฮื้อด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรเพื่อศึกษาผลของอัตราการละลายที่มีต่อคุณภาพสเปิร์มหลังการละลาย โดยนำหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 30, 35, 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10, 20, 30 วินาที ปรากฏว่า สเปิร์มปลาเฉาฮื้อมีการเคลื่อนที่สูงสุดหลังการละลายในชุดการทดลองที่ละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 วินาที ในขณะที่การศึกษาการละลายน้ำเชื้อปลา Atlantic halibut ที่แช่แข็ง พบว่าอัตราการละลายที่เหมาะสมน้ำเชื้อปลา Atlantic halibut ที่แช่แข็งมีค่าอยู่ในช่วงกว้าง คือ 10-40 องศาเซลเซียส/นาที (Bolla et al., 1987)

Boonthai et al. (2016c) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*) ด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติด้วยการเจือจางน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในสารละลาย Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) และ DMSO แล้วศึกษาการ

ปนเปื้อนของแบคทีเรียระหว่างการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวว่าเกิดจากแหล่งใดหรือขั้นตอนใดมากที่สุดด้วยการใช้ aseptic technique โดยตรวจวัดปริมาณแบคทีเรียชนิดต่างๆใน animal origin และ non-animal origin ได้แก่ ครีบหาง น้ำเลี้ยงปลา น้ำเชื้อปลา ปัสสาวะ ขี้ปลา ไนโตรเจนเหลว ผิวด้านนอกของหลอดฟาง อากาศที่หมุนเวียนในห้องปฏิบัติการ และถุงมือ ทั้งก่อนและหลังการแช่แข็ง ปรากฏว่าพบแบคทีเรีย *Aeromonas punctata* subsp. caviae มีการปนเปื้อนมากที่สุดในครีบหาง ถุงมือ และน้ำเชื้อปลาก่อนการแช่แข็ง และยังพบว่า *Bacillus safensis* and *Bacillus* sp. ยังสามารถมีชีวิตรอดในถังไนโตรเจนเหลว ซึ่งการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาโดยใช้ aeptic technique มีประสิทธิภาพสูงในการลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อแช่แข็ง และเป็นประโยชน์ต่อการจัดตั้งธนาคารน้ำเชื้อปลา

Bozkurt and Yavas (2017) แช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน โดยศึกษาผลของขนาดหลอดบรรจุน้ำเชื้อ (0.25, 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร) และอัตราการละลาย (ละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 10, 20 และ 30 วินาที) ที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลายและอัตราการปฏิสนธิ โดยใช้สารละลาย 75 mM NaCl, 70 mM KCl, 2 mM CaCl2, 1 mM MgSO4 and 20 mM Tris (pH: 8) ที่ผสม 10% methanol ปล่อยให้อยู่สภาวะสมดุลที่ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที และแช่แข็งในไอไนโตรเจนเหลว 10 นาทีจึงนำไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว พบว่า อัตราการปฏิสนธิที่ให้ค่าสูงสุด (68.4±2.5%) ได้จากชุดการทดลองที่แช่แข็งในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตรและละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสนาน 30 วินาทีเมื่อใช้จำนวนสเปิร์มต่อไข่ (sperm to egg ratio) ในอัตราส่วน $1x10^5$:1

Abinawanto (2017) แช่แข็งน้ำเชื้อปลาแรดด้วยการใช้น้ำมันมะพร้าวเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ระดับ 0, 21, 23, 25, 27 และ 29% ผสมร่วมกับ 5% glycerol โดยน้ำเชื้อปลาแรดมาผสมกับสารละลาย (5% glycerol + สารละลาย Ringer + น้ำมันมะพร้าว) ในอัตราส่วน 1:3 ปล่อยในสภาวะสมดุล 4 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที และทำการแช่แข็งและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -34 องศาเซลเซียส นาน 48 นาที ก่อนนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3-5 นาที พบว่า สเปิร์มหลังการละลายมีการเคลื่อนที่และการมีชีวิตสูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยการใช้น้ำมันมะพร้าว 25% ร่วมกับ 5% glycerol มีความเหมาะสมมากที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาแรด เพราะทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ การมีชีวิต และความผิดปกติเท่ากับ 80.4±1.5, 82±1.9 และ 10±1.0% ตามลำดับ

Matthews et al. (2018) พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาม้าลายให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นด้วยการเลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์และสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสม (raffinose, skim milk, methanol และ bicine buffer) และอัตราการแช่แข็งน้ำเชื้อ รวมทั้งการพัฒนาวิธีการผสมเทียมน้ำเชื้อแช่แข็งให้มีการปฏิสนธิดีขึ้น พบว่า สารละลาย E400 สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อบนน้ำแข็งให้มีคุณภาพดีได้นาน 6 ชั่วโมง และสเปิร์มมีการเคลื่อนที่สูงสุดหลังการละลายเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมระหว่าง 10-15 องศาเซลเซียส/นาที

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) ขนาด 0.25 และ 0.5 มิลลิลิตร
หลอด Cryotube ขนาด 1.5 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)
พ่อแม่พันธุ์ปลาไน
สารเคมีประเภทต่างๆที่ใช้ในการแช่แข็ง และการย้อมสี
สารเคมีใช้ศึกษาการผสมเทียมเช่น Suprefact, Motillium

วิธีดำเนินการวิจัย

1. <u>การรวบรวมน้ำเชื้อปลาไน</u>

พ่อพันธุ์ปลาไนถูกรวบรวมและลำเลียงจากฟาร์มเพาะพันธุ์ปลาในจังหวัดชลบุรีและศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดชลบุรี มายังโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (รูปที่ 1 และรูปที่ 2) การลำเลียงพ่อพันธุ์ปลาไนที่สมบูรณ์เพศได้ลำเลียงในถุงพลาสติกที่อัดออกซิเจนโดยใส่เกลือแกงเพื่อลดความเครียดระหว่างการลำเลียงประมาณ 1 ชั่วโมง พ่อพันธุ์ทั้งหมดที่ลำเลียงมาถูกนำมาพักไว้ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยใส่ยาเหลืองและฟอร์มาลินระยะเวลาประมาณ 30 นาทีเพื่อป้องกันพาราไซต์ที่อาจติดมาระหว่างลำเลียง 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 พ่อพันธุ์ปลาไนที่มีความสมบูรณ์เพศ มีลักษณะภายนอกปกติไม่มีเชื้อโรคและพาราไซด์ ผ่านหลักเกณฑ์ที่กำหนดไว้ถูกรวบรวมไปเลี้ยงขุนในบ่อเพื่อการรวบรวมน้ำเชื้อมาแช่แข็งสำหรับแต่ละชุดการทดลองต่อไป

การรวบรวมน้ำเชื้อปลาไนได้ทำหลังจากปลาปรับตัวเป็นเวลา 7 วัน เริ่มจากจับพ่อพันธุ์ปลาออกมาด้วยสวิง แล้วนำมาปลามาแช่ในยาสลบ (phenoxyethanol) 10 ppm ประมาณ 5 นาที เพื่อไม่ให้ปลาเครียดระหว่างการรีดน้ำเชื้อ นำปลามาชั่งน้ำหนัก วัดความยาว แล้วเช็ดบริเวณลำตัวปลาให้แห้งสนิทก่อนที่ทำการรีดน้ำเชื้อออกมาเพื่อประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อ การรีดน้ำเชื้อปลาแต่ละตัวทำโดยใช้น้ำสะอาดล้างบริเวณท้องและเช็ดให้แห้ง หงายท้องปลาขึ้น ใช้นิ้วมือกดบริเวณท้องเบาๆแล้วรีดลงมาตั้งแต่บริเวณครีบอก (pectoral fin) มาถึงบริเวณช่องเพศ (urogenital papillae) ได้น้ำเชื้อ (semen) สีขาวขุ่นออกมา (รูปที่ 3) รวบรวมน้ำเชื้อไปใส่ในภาชนะแล้วจึงเก็บรักษาไว้บนน้ำแข็งเพื่อรักษาคุณภาพน้ำเชื้อก่อนการใช้ในการทดลอง (รูปที่ 4) ในการทดลองแต่ละครั้งจะทำการรีดน้ำเชื้อปลาแต่ละตัวแล้วนำน้ำเชื้อของปลาแต่ละตัวมารามกันเป็นน้ำเชื้อรวม (pooled semen) ของพ่อพันธุ์ปลาหลายตัวสำหรับแต่ละชุดการทดลองเพื่อลดความแปรปรวนคุณภาพน้ำเชื้อปลาแต่ละตัว (individual variation) ที่อาจส่งผลต่อการทดลอง ในระหว่างการรวบรวมน้ำเชื้อ ทำการลดการปนเปื้อนของปัสสาวะที่จะมากับน้ำเชื้อขณะรีด โดยกดเบาๆโดยรอบบริเวณช่องเพศปลา เพื่อรีดเอาปัสสาวะออกจากตัวปลาให้ได้ปริมาณที่ต้องการ (clearance of urinary bladder) เมื่อเห็นว่าไม่มีปัสสาวะออกมาแล้ว จึงทำการรีดน้ำเชื้อ โดยกดส่วนท้องตั้งแต่บริเวณครีบอกมายังช่องเพศตามที่กล่าวมาแล้ว การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อพิจารณาจาก parameter ที่สำคัญ ได้แก่การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (sperm motility) ความหนาแน่นของสเปิร์ม (sperm density) การมีชีวิตของสเปิร์ม (sperm viability) และ แรงดันออสโมซิสของน้ำเชื้อ (osmolality) น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีเท่านั้นถูกนำมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อ โดยต้องเป็นน้ำเชื้อที่มีลักษณะขาวขุ่น และไม่มีเมือก หรือ เลือดปน และต้องมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่สูง (มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์) โดยน้ำเชื้อเหล่านี้ถูกเก็บไว้บนน้ำแข็งอย่างมากไม่เกิน 30 นาทีในระหว่างขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อ น้ำเชื้อรวมที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ไม่ได้นำมาใช้ในการทดลองเพื่อให้มั่นใจว่าขณะเริ่มการทดลองน้ำเชื้อปลามีคุณภาพที่ดีพอ ในกรณีที่พ่อพันธุ์ปลาไนมีน้ำเชื้อน้อยไม่เพียงพอแก่การทดลองใน

รูปที่ 1 พ่อพันธุ์ปลาไน

รูปที่ 2 การรวบรวมพ่อพันธุ์ปลาไนมาใช้ในการทดลอง

รูปที่ 3 การรีดน้ำเชื้อปลาไนมาใช้ในการทดลอง

รูปที่ 4 น้ำเชื้อปลาไนที่รวบรวมมาใช้ในการทดลอง

บางช่วงของฤดูกาล ทำการฉีดพ่อพันธุ์ปลาด้วยฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นการสร้างน้ำเชื้อ โดยฉีดด้วย suprefact (gonadotropin-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 haemacytometer และ นับจำนวนสเปิร์มที่พบโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า แล้วจึงคำนวณกลับหาความหนาแน่นของสเปิร์ม การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มทำโดยการหยดตัวอย่างน้ำเชื้อ (1 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) การประเมินเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่แข็ง ทำการประเมินเช่นเดียวกับการประเมินในสเปิร์มสดทุกอย่าง เพียงแต่นำน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลาย (post-thawed sperm) ในชุดการทดลองต่างๆปริมาณ 4 ไมโครลิตร วางลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาดแล้วจึงหยด 0.4% NaCl ลงไป 100 ไมโครลิตรเพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่แล้วจึงประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 9 ซ้ำย่อยตามที่ได้กล่าวมา

การประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต ทำโดยการนำเอาน้ำเชื้อสด (5 ไมโครลิตร) วางบนกระจกสไลด์ที่สะอาด แล้วหยดสารละลาย eosin-nigrosin (5 ไมโครลิตร) ลงไปพื่อย้อมสี ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน และใช้ cover glass ลากเบาๆทำให้ sperm suspension เป็นชั้นบางๆ แล้วใช้เปลวไฟจากตะเกียง ทำให้ sperm suspension แห้งโดยเร็ว ซึ่งขั้นตอนการย้อมสี จน sperm suspension แห้ง ใช้ระยะเวลาไม่เกิน 10 วินาที แล้วจึงสุ่มนับจำนวนสเปิร์มที่มีชีวิต ซึ่งจะไม่ติดสี ย้อมภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า ภายใต้ immersion oil โดยสเปิร์มที่ตายจะติดสีม่วง และสเปิร์มที่มีชีวิตจะไม่ติดสีย้อม แล้วจึงคำนวณหาเปอร์เซนต์ของสเปิร์มที่มีชีวิต (percentage of viable sperm; Fribourgh, 1966; Vuthiphandchai and Zohar, 1999) โดยทำ 3 ซ้ำ การประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อแช่แข็ง ทำเช่นเดียวกับการประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อสด เพียงแต่นำน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลายปริมาณ 5 ไมโครลิตรมาวางบนกระจกสไลด์แล้ว หยดสารละลาย eosin-nigrosin (5 ไมโครลิตร) ลงไปแล้วทำการผสม และ smear โดยเร็วตามที่กล่าวมาแล้ว จึงทำการประเมิน 3 ซ้ำเช่นกัน

สำหรับการประเมินแรงดันออสโมซิสของน้ำเชื้อ ทำโดยนำน้ำเชื้อมา centrifuge ด้วยความเร็วสูงเพื่อแยก seminal fluid ออกจากสเปิร์ม จากนั้นนำ seminal fluid ปริมาตร 10 ไมโครลิตรมาวัด osmolality โดยการใช้เครื่อง osmometer การประเมินความหนาแน่นของสเปิร์ม การมีชีวิตของสเปิร์ม และแรงดันออสโมซิสของน้ำเชื้อได้ทำการทดลอง 3 ซ้ำ อย่างไรก็ตามพ่อพันธุ์ปลาไนที่เลี้ยงขุนได้ถูกรวบรวมน้ำเชื้อเดือนละครั้งเพื่อประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสดของปลาไนเพื่อทราบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อปลาไน

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

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

สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ dimethyl sulfoxide (DMSO), ethylene glycol, propylene glycerol, acetamide, sucrose, glycerol, formamide, ethanol และ methanol โดยสารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิดถูกผสมไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS (extended milt) เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้าย (final concentrations) ของสารไครโอโพรเทคแทนท์ตามที่กำหนดเป็น 5%, 10%, 15% และ 20% โดยใช้อัตราส่วนของน้ำเชื้อที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (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 ซึ่งใช้น้ำเชื้อสดของปลาไนที่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ด้วย 0.4% NaCl การประเมินความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มทำการทดลอง 6 ซ้ำที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) การทดลองในขั้นตอนนี้ทำให้ทราบว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดใด และความเข้มข้นช่วงใดที่เป็นพิษหรือทำให้สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่หรือเคลื่อนที่ลดลง ทำให้สามารถพิจารณาเลือกเฉพาะสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เป็นพิษน้อยมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อต่อไป

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

การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน เริ่มจากการนำเอาน้ำเชื้อปลาไนที่รวบรวมมาจากปลาหลายตัว (pooled milt) มาเจือจางในสารละลาย Ca-F HBSS แล้วจึงผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดที่เหมาะสม (DMSO, propylene glycol และ ethylene glycol) ในระดับความเข้มข้นสุดท้ายที่แตกต่างกันตั้งแต่ 5%, 10%, 15% และ 20% แล้วปล่อยไว้ให้น้ำเชื้อที่ถูกเจือจางอยู่ในภาวะสมดุลย์ (equilibration period) ที่อุณหภูมิห้องก่อนที่จะถูกรวบรวมน้ำเชื้อเหล่านั้นใส่ในหลอดฟาง (straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร (รูปที่ 5) ทำการปิดปลายหลอดฟางให้แน่นด้วยความร้อน (รูปที่ 6 และรูปที่ 7) ปล่อยทิ้งไว้นาน 10 นาที จึงนำหลอดฟางไปลดอุณหภูมิในเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (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. <u>การพัฒนา protocol เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน</u>

5.1 <u>ผลของอุณหภูมิสุดท้ายที่มีต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน</u>

การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนมาที่อุณหภูมิสุดท้ายต่างกัน ทำโดยนำน้ำเชื้อสดของปลาไนมาเจือจางใน 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 <u>การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนอย่างง่ายในกล่องโฟม</u>

การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนอย่างง่ายในกล่องโฟม ทำโดยนำน้ำเชื้อสดที่รวบรวมจากปลาไนหลายตัว (pooled milt; n=8) มาเจือจางใน Ca-F HBSS และ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5, 10, 15 และ 20% จากนั้นดูดน้ำเชื้อปลาไนใส่ในหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 10 นาทีเพื่อให้อยู่ในสภาวะสมดุล (equilibration time) แล้วนำหลอดฟางที่มีน้ำเชื้อของชุดการทดลองเหล่านี้มาแช่แข็งโดยการลดอุณหภูมิภายในไอไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapor) ที่บรรจุในกล่องโฟม (styrofoam box) การแช่แข็งน้ำเชื้อเริ่มจากเติมไนโตรเจนเหลวลงไปในกล่องโฟมให้สูงจากพื้นกล่องประมาณ 5 เซนติเมตรแล้วปิดฝากล่องโฟม 5 นาทีเพื่อปรับอุณหภูมิในกล่องโฟมให้คงที่ จึงนำหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อเมื่อครบระยะเวลาสมดุลที่กำหนดมาวางที่ระดับความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen surface) ต่างๆกัน (2, 4 และ 6 เซนติเมตรเหนือระดับผิวหน้าไนโตรเจนเหลว) เป็นเวลานาน 10 นาที จึงนำหลอดฟางทั้งหมดในทุกชุดการทดลองแช่ลงในถังไนโตรเจนเหลวเพื่อเก็บรักษานาน 1, 7 และ 14 วันจึงทำการละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 70

องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที และประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย โดยทดลอง 3 ซ้ำต่อชุดการทดลอง

5.3 <u>การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนปริมาณมาก</u>

น้ำเชื้อปลาไนที่รีดออกมาจากพ่อพันธุ์หลายตัว (กลุ่มควบคุม) ได้ถูกแช่แข็งเปรียบเทียบผลของการเหนี่ยวนำน้ำเชื้อให้แข็งตัวอย่างรวดเร็วในระยะเวลาสั้นๆ (seeding) ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยนำน้ำเชื้อสดมาเจือจางด้วย Ca-F HBSS และ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10% แล้วบรรจุน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางในหลอดฟางขนาด 0.25 และ 0.5 มิลลิลิตร และหลอด Cryotube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปล่อยให้อยู่ในสภาวะสมดุล 10 นาที แล้วนำไปแช่แข็งด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส/นาที เริ่มจากอุณหภูมิห้องถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียสโดยไม่มีการ seeding (control groups) แล้วนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวนาน 2 วันจึงทำการละลายน้ำเชื้อเพื่อประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาทีสำหรับหลอดฟางทั้งสองขนาด และนาน 30 วินาทีสำหรับหลอด Cryotube ในขณะเดียวกันน้ำเชื้อปลาไนได้ถูกแช่แข็งด้วยวิธีที่กล่าวมาข้างต้นแต่มีการเหนี่ยวนำน้ำเชื้อให้แข็งตัวรวดเร็วในระยะเวลาสั้นๆ (seeding) ที่อุณหภูมิต่างๆกันเช่น -10, -15 และ -20 องศาเซลเซียส การทำ seeding น้ำเชื้อปลาไนในชุดทดลองเหล่านี้ (treated groups) ได้ทำโดย manual seeding ด้วยการนำเอา forcep ไปแช่ในไนโตรเจนเหลวแล้วนำมาแตะตลอดความยาวบนหลอดฟาง หรือ cryotube ประมาณ 2-3 วินาทีเพื่อให้น้ำเชื้อแข็งตัวอย่างรวดเร็วที่สุดตามอุณหภูมิที่กำหนดและลดอุณหภูมิตามโปรแกรมที่กำหนดต่อไป ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อชุดการทดลอง

การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนปริมาณมากในช่วงต่อมาทำการแช่แข็งด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวภายในกล่องโฟมที่เติมไนโตรเจนเหลวลงไปประมาณ 5 เซนติเมตรแล้วปิดฝากล่องโฟม 5 นาทีเพื่อปรับอุณหภูมิในกล่องโฟมให้คงที่ นำหลอดฟางขนาด 250 และ 500 ไมโครลิตร และหลอด Cryotube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่บรรจุน้ำเชื้อเจือจางด้วย Ca-F HBSS และ 10% DMSO นาน 10 นาทีมาวางที่ระดับความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen surface) 6 เซนติเมตรเหนือระดับผิวหน้าไนโตรเจนเหลว เป็นเวลานาน 10 นาทีสำหรับหลอดฟางทั้งสองขนาดและ 15 นาทีสำหรับหลอด Cryotube แล้วเก็บรักษาน้ำเชื้อในถังไนโตรเจนเหลว 2 วัน ทำการละลายตามวิธีการที่กล่าวมาแล้ว ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อชุดการทดลอง

6. <u>การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนเพื่อศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งที่มีคุณภาพสเปิร์ม</u>

การศึกษาผลของระยะเวลาเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีต่อคุณภาพสเปิร์มทำโดย นำน้ำเชื้อสดของปลาไนที่รีดได้มาเจือจางใน Ca-F HBSS ในอัตราส่วน 1:1 แล้วเติมสารละลาย DMSO ลงไปให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 10% จึงนำไปแช่แข็งด้วยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ หรือการแช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟมภายหลังทราบ protocols การแช่แข็งที่เหมาะสม

ชุดการทดลองทั้งหมดมี 4 ชุดการทดลองคือ ชุดการทดลองที่ 1 (แช่แข็งในหลอดฟาง 250 ไมโครลิตรด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ) ชุดการทดลองที่ 2 (แช่แข็งในหลอดฟาง 250 ไมโครลิตรด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลว) ชุดการทดลองที่ 3 (แช่แข็งในหลอด Cryotube 1.5

มิลลิลิตรด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ) และชุดการทดลองที่ 4 (แช่แข็งในหลอด Cryotube 1.5 มิลลิลิตรด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลว)

การแช่แข็งน้ำเชื้อในหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตรเริ่มจาก ดูดน้ำเชื้อปลาไนที่ถูกเจือจางปริมาณ 200 ไมโครลิตรใส่ในหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตร ปิดปลายหลอดด้วยความร้อน ทิ้งไว้ 10 นาที แล้วทำการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อในหลอดฟางด้วย 2 วิธีได้แก่ การใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer) และการใช้ไอไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapor) ในกล่องโฟม สำหรับการลดอุณหภูมิด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ เริ่มต้นจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาที แล้วนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปเก็บรักษา (cryostorage) ในถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) ตามเวลาที่กำหนดทุกๆ 30 วันจึงนำตัวอย่างหลอดฟางบรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งออกมาละลาย (thawing) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที ทำการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และการมีชีวิตของสเปิร์มหลังการละลาย โดยทดลอง 3 ซ้ำ สำหรับการลดอุณหภูมิด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม ทำโดยแช่แข็งหลอดฟางในไอไนโตรเจนเหลว ที่ระดับความสูงเหนือระดับผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตรภายในกล่องโฟม (styrofoam box) นาน 10 นาที พร้อมกับปิดฝากล่องโฟม โดยเมื่อครบเวลาการแช่แข็งที่กำหนดทุกๆ 30 วัน นำหลอดฟางมาเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว จึงนำหลอดฟางมาทำการละลายเพื่อประเมินคุณภาพสเปิร์มตามวิธีที่ได้กล่าวมาแล้ว อย่างไรก็ตามน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวนานเพียง 2 ชั่วโมงแล้วถูกนำออกมาละลายเพื่อประเมินคุณภาพสเปิร์ม (น้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ 0 วัน)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนปริมาณมากในหลอด Cryotube เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษา ทำโดยนำน้ำเชื้อปลาไนมาเจือจางด้วย Ca-F HBSS และ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10% แล้วบรรจุน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางปริมาณ 1.2 มิลลิลิตรลงไปในหลอด Cryotube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปล่อยทิ้งไว้ 10 นาที ลดอุณหภูมิด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติในอัตรา -5 องศาเซลเซียส/นาที เริ่มจากอุณหภูมิห้องถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว และทำการประเมินคุณภาพสเปิร์มหลังการละลายทุกๆ 30 วันหลังการเก็บรักษา สำหรับการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อในหลอด Cryotube ด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม ทำโดยแช่แข็งหลอด Cryotube ที่ระดับความสูงเหนือระดับผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตรภายในกล่องโฟมนาน 15 นาที พร้อมกับปิดฝากล่องโฟม โดยเมื่อครบเวลาการแช่แข็งที่กำหนดทุกๆ 30 วัน จึงนำหลอด Cryotube มาทำการละลายเพื่อประเมินคุณภาพสเปิร์ม ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาที ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

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

การประเมินอัตราการปฏิสนธิ (fertilization rate) ของไข่ปลาไนเมื่อผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็ง ทำโดยการนำเอาไข่ปลาไนจากแม่พันธุ์ปลาไนที่ถูกฉีดฮอร์โมนกระตุ้นประมาณ 500 ใบใส่ลงไปในภาชนะพลาสติก (petri dish) แล้วจึงเอาน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งที่ละลาย (thawing) ใส่ลงไปผสมกับไข่ทันที พร้อมกับเติมน้ำจืดที่สะอาดลงไป และใช้ขนไก่ช่วยผสมให้น้ำเชื้อเข้ากับไข่อย่างรวดเร็ว จากนั้นล้างไข่ และเมือกออกโดยการเปลี่ยนน้ำ 2 ครั้งแล้วปล่อยให้ไข่พัฒนาต่อไปเพื่อให้ไข่พัฒนา

ต่อไป โดยนำไข่ที่ปฏิสนธิไปโรยเป็นชั้นบางๆบนอวนมุ้งไนลอนภายในบ่อซิเมนต์ที่มีระบบน้ำเข้าออกตลอดเวลา ทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อชุดการทดลอง

การกระตุ้นให้แม่ปลาไนตกไข่ทำโดยการฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์ Gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRHa) และ dopamine antagonist ปริมาณ 15 ไมโครกรัม/กิโลกรัม และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ แล้วพักแม่ปลาไนไว้ประมาณ 7-8 ชั่วโมง จึงรีดไข่ออกมาและเช็คคุณภาพไข่ก่อนการผสมเทียมโดยดูจากลักษณะรูปร่างและความสุกของเม็ดไข่ โดยใช้ไข่ที่มีคุณภาพดีเท่านั้น (มีลักษณะกลม และไม่หนืดหรือเหลวเกินไป) จากแม่ปลา 2-3 ตัวในการผสมเทียมกับน้ำเชื้อปลาไนที่รีดออกมาใหม่ๆ (ชุดควบคุม) และน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็ง (ชุดทดลอง) สำหรับจำนวนสเปิร์มที่ใช้ผสมกับไข่ ใช้ในปริมาณที่เหมาะสมเท่ากับ $1x10^5$ สเปิร์มต่อไข่ 1 ใบ โดยปริมาณน้ำเชื้อที่ใช้คำนวณจากความหนาแน่นของน้ำเชื้อแช่แข็งก่อนผสมเทียมว่าต้องใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปริมาณเท่าใดในการผสมกับไข่ 500 ใบที่รีดมาจากแม่ปลา 2-3 ตัว เปรียบเทียบกับปริมาณปริมาณน้ำเชื้อสดที่ต้องใช้ในการปฏิสนธิไข่ บนพื้นฐานของการใช้จำนวนสเปิร์มต่อไข่ (sperm to egg ratio) ในที่ปริมาณเท่ากัน ($1x10^5$: 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 -80 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาที แล้วนำหลอดฟางที่มีน้ำเชื้อแช่แข็งไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวนาน 3-4 วันจึงนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลาย (thawing) ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาทีแล้วนำไปผสมเทียมกับไข่ปลาไนตามที่กล่าวมาแล้ว โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

สำหรับการน้ำเชื้อปลาไนที่แช่แข็งด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวที่นำมาผสมเทียมกับไข่ ได้ทำในเดือนสิงหาคมปี พ.ศ. 2559 เมื่อทราบวิธีการแช่แข็งที่เหมาะสม 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 วันจึงนำออกมาละลายและนำไปผสมเทียมกับไข่ปลาไนตามวิธีการผสมเทียมแบบแห้งตามที่ได้กล่าวมาแล้วเช่นกัน ทำทดลอง 3 ซ้ำ

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

การประเมินความสามารถในการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาไนที่ได้แช่แข็ง (fertilization rate) ในช่วงเวลาต่อมาได้ทำภายหลังการเก็บรักษาน้ำเชื้อในถังไนโตรเจนเหลวในรูปแบบต่างๆกัน โดยได้ทำการทดลองในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ในเดือนกันยายน-ตุลาคมปี พ.ศ. 2560 โดยมี 5 ชุดการทดลอง คือ ชุดควบคุม (control group) ที่ใช้น้ำเชื้อสด และชุดทดลองอีก 4 ชุด (treated groups) ได้แก่ 1.) น้ำเชื้อแช่แข็งที่บรรจุอยู่ในหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตร ที่ได้จากการแช่แข็งด้วยการใช้

เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ 2.) น้ำเชื้อแช่แข็งที่บรรจุอยู่ในหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตร ที่ได้จากการแช่แข็งด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม 3.) น้ำเชื้อแช่แข็งที่บรรจุอยู่ในหลอด Cryotube ขนาด 1.5 ไมโครลิตร ที่ได้จากการแช่แข็งด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ และ 4.) น้ำเชื้อแช่แข็งที่บรรจุอยู่ในหลอด Cryotube ขนาด 1.5 ไมโครลิตร ที่ได้จากการแช่แข็งด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม โดยน้ำเชื้อแช่แข็งใน 4 ชุดการทดลองนี้เป็นน้ำเชื้อที่ได้เก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวประมาณ 2-3 เดือนจากการศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งที่มีคุณภาพสเปิร์มหลังการละลาย

การผสมเทียมไข่ปลาไนเมื่อผสมกับน้ำเชื้อปลาไนในการทดลองครั้งนี้ใช้วิธีเปียก ทำโดยการนำเอาไข่ปลาไนที่มีคุณภาพดีจากแม่พันธุ์ปลาไนที่ถูกฉีดฮอร์โมน GnRHa และ dopamine antagonist กระตุ้น โดยทำการสุ่มไข่ประมาณ 500 ใบแล้วนำไข่ใส่ลงไปใส่ในจานแก้ว (petri dish) เติมน้ำจืดที่สะอาดลงไปในไข่ แล้วรีบนำน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งที่ละลาย (thawing) ในปริมาณที่เหมาะสมจาก 4 ชุดการทดลองใส่ลงไปในจานแก้วอย่างรวดเร็วทันที ใช้ขนไก่ช่วยผสมให้น้ำเชื้อเข้ากับไข่ประมาณ 1 นาที จากนั้นล้างไข่ และเมือกออกโดยการเปลี่ยนน้ำในจานแก้ว 2 ครั้ง แล้วนำไข่ที่ปฏิสนธิไปโรยเป็นชั้นบางๆบนอวนมุ้งไนลอนภายในบ่อซิเมนต์ที่มีระบบน้ำเข้าออกตลอดเวลาเพื่อให้ไข่พัฒนาต่อไป ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สำหรับน้ำเชื้อสดที่ใช้ได้ใช้น้ำเชื้อสดที่มีคุณภาพดี มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่ต่ำกว่า 80% โดยใช้น้ำเชื้อสดทำการผสมเทียมกับไข่เหมือนกับการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งทุกขั้นตอน เพียงแต่ในทั้ง 5 ชุดการทดลองเหล่านี้ กำหนดจำนวนสเปิร์มในการปฏิสนธิกับไข่ ในปริมาณที่เหมาะสมเท่ากับ $1x10^5$ สเปิร์มต่อไข่ 1 ใบเหมือนกัน โดยปริมาณน้ำเชื้อของน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ในการทดลอง คำนวณจากความหนาแน่นของสเปิร์มและจำนวนสเปิร์มที่ต้องการใช้ เพื่อทราบถึงปริมาณน้ำเชื้อสดหรือน้ำเชื้อแช่แข็งในการปฏิสนธิกับไข่ 500 ใบในจานแก้ว 1 ใบ

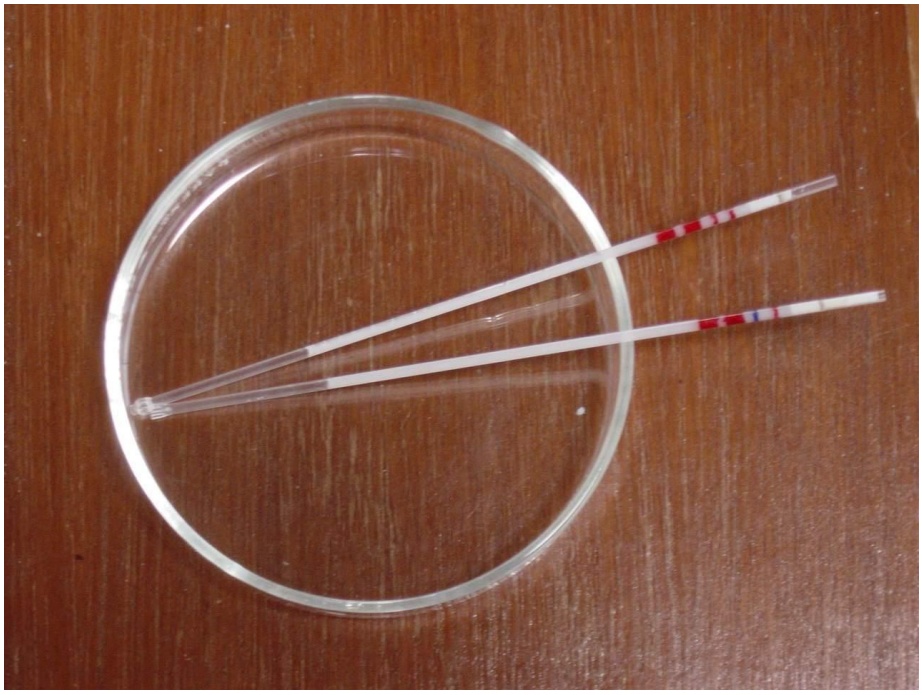
การประเมินอัตราการปฏิสนธิของไข่ในชุดทดลองและชุดควบคุม ทำเมื่อไข่ปลาไนพัฒนาเข้าสู่ระยะ gastrula stage ซึ่งประมาณ 7-8 ชั่วโมงหลังการผสมเทียม โดยคำนวณจากจำนวนไข่ที่พัฒนาถึงระยะ gastrula ต่อจำนวนไข่ทั้งหมดที่สุ่มประเมินแล้วคูณด้วย 100 และทำ 6 ซ้ำต่อชุดการทดลอง การประเมินเปอร์เซ็นต์การฟักของลูกปลา ได้คำนวณจากจำนวนลูกปลาที่ฟักออกมาจากไข่ต่อจำนวนไข่ทั้งหมดที่ใช้แล้วคูณด้วย 100 โดยทำ 3 ซ้ำต่อชุดการทดลอง

8. <u>การวิเคราะห์ทางสถิติ</u>

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

รูปที่ 5 หลอดฟางสำหรับใช้ในการทดลองแช่แข็ง

รูปที่ 6 การปิดปลายหลอดฟาง



รูปที่ 7 ลักษณะของหลอดฟางที่ปิดปลายหลอดก่อนการแช่แข็ง

รูปที่ 8 เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การทดลองสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 ตอนดังนี้

1. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มปลาไน
2. ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มปลาไน
3. การศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนที่ผ่านการแช่แข็ง และการพัฒนา protocol เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน
4. ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งที่มีคุณภาพสเปิร์มหลังการละลาย
5. ความสามารถของน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งในการปฏิสนธิกับไข่

1. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มปลาไน

น้ำเชื้อสดที่รวบรวมมาใหม่ๆ (freshly collected milt) ของปลาไนที่นำมาใช้ในการศึกษา มีการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อดังแสดงในตารางที่ 1 โดยแรงดันออสโมติกของน้ำเชื้อ (osmolality) มีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 269.8-290.2 mOsm/kg เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าระหว่าง 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% น้ำเชื้อปลาไนที่เจือจางใน Ca-F HBSS เมื่อนำมาใส่สารละลาย DMSO ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5, 10, 15 และ 20% นำไปทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่เวลาต่างๆกัน พบว่า ในทุกความเข้มข้น สเปิร์มปลาไนยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที โดยเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที สเปิร์มมีการเคลื่อนที่มากกว่า 97% (ตารางที่ 2)

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า

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

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

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

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

2.2 Ethylene glycol

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

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า

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

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

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

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

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน 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 สเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที โดยเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที สเปิร์มมีการเคลื่อนที่มากกว่า 97% (ตารางที่ 4)

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า

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

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

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

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

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน 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 สเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที โดยเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที สเปิร์มในทุกชุดการทดลองมีการเคลื่อนที่มากกว่า 42% แต่ acetamide ความเข้มข้น 15% และ 20% มีผลทำให้สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่หลังการเจือจางนาน 60 นาทีขึ้นไป (ตารางที่ 5)

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า

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

- เวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนกับสารละลาย acetamide มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

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

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

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน 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% แต่ในความเข้มข้น 15% สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 180 นาที ส่วนความเข้มข้น 20% สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 150 นาที (ตารางที่ 6)

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า

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

- เวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนกับสารละลาย sucrose มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

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

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

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

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

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

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

2.8 Ethanol

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

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

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

ตัวอักษรที่เหมือนกันในแนวนอน 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% จึงนำน้ำเชื้อทุกชุดการทดลองมาแช่แข็งด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับมาจนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -20 องศาเซลเซียสแล้วแช่ลงในไนโตรเจนเหลวทันที

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

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

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

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนหลังการแช่แข็งและเก็บรักษาใน ไนโตรเจนเหลวด้วย Ca-F HBSS และ DMSO ที่อัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน

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

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

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนหลังการแช่แข็งและเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวด้วย Ca-F HBSS และ Propylene glycol ที่อัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน

วันที่	อัตราลดอุณหภูมิ	Propylene glycol (%)			
		5	10	15	20
น้ำเชื้อสด		$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$
1	8	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$
1	5	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$
1	3	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$
7	8	$57.8\pm3.9^{a,3}$	$51.3\pm6.7^{a,3}$	$55.6\pm3.9^{a,3}$	$57.8\pm3.9^{a,2}$
7	5	$0^{c,4}$	$0^{c,4}$	$22.2\pm3.9^{b,4}$	$48.9\pm3.9^{a,3}$
7	3	$64.4\pm3.9^{a,2}$	$66.7\pm6.7^{a,2}$	$68.9\pm3.9^{a,2}$	$64.4\pm7.7^{a,2}$

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		$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$
1	8	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$
1	5	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$
1	3	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$
7	8	$57.8\pm3.9^{a,2}$	$53.3\pm6.7^{a,2}$	$57.8\pm3.9^{a,2}$	$0^{b,3}$
7	5	$0^{c,3}$	$22.2\pm3.9^{b,3}$	$26.7\pm6.7^{b,4}$	$46.7\pm6.7^{a,2}$
7	3	$60\pm0^{a,2}$	$60\pm0^{a,2}$	$46.7\pm0^{b,3}$	$60\pm0^{a,2}$

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

4. การพัฒนา protocol เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน

4.1 ผลของอุณหภูมิสุดท้ายที่มีต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนมาที่อุณหภูมิสุดท้ายและอัตราการลดอุณหภูมิต่างกันมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย โดยการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -20 องศาเซลเซียสเมื่อแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5 และ 8 องศาเซลเซียส/นาที พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าระหว่าง 67.8-82.4% แต่การแช่แข็งเมื่อใช้อุณหภูมิสุดท้ายที่ -40 หรือ -80 องศาเซลเซียส ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน มีส่วนทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงขึ้น โดยเมื่อแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5 และ 8 องศาเซลเซียส/นาที พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงขึ้น (86.7-91.5%) โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) เมื่อใช้อุณหภูมิสุดท้ายที่ -40 หรือ -80 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 14)

4.2 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนอย่างง่ายในกล่องโฟม

น้ำเชื้อสด (freshly collected milt) ที่รวบรวมมาจากปลาไนหลายตัวรวมกัน มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 100% แต่เมื่อนำน้ำเชื้อสดที่เจือจางใน Ca-F HBSS มาแช่แข็งด้วยการใช้ DMSO ที่ระดับ 4 ความเข้มข้นในไอไนโตรเจนเหลวที่ความสูงต่างๆกันเป็นเวลานาน 10 นาทีในหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตร 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 หลังการแช่แข็งในไอไนโตรเจนเหลวด้วยการใช้ 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	$53.3\pm0^{a,3}$	$46.7\pm0^{b,4}$	$48.9\pm2.2^{b,6}$	$8.9\pm2.2^{c,4}$
	4	$37.8\pm2.2^{c,4}$	$77.8\pm2.2^{a,2}$	$73.3\pm0^{a,4}$	$53.3\pm3.9^{b,2}$
	6	$71.1\pm4.4^{b,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$100\pm0^{a,1}$	$77.8\pm2.2^{b,1}$
7	2	$53.3\pm0^{a,3}$	$42.2\pm2.2^{b,4}$	$53.3\pm0^{a,5}$	$4.4\pm2.2^{c,4}$
	4	$33.3\pm0^{d,5}$	$62.2\pm2.2^{b,3}$	$75.6\pm2.2^{a,4}$	$44.4\pm2.2^{c,3}$
	6	$66.7\pm0^{d,1}$	$95.6\pm2.2^{a,1}$	$88.9\pm2.2^{b,2}$	$80\pm0^{c,1}$
14	2	$0^{a,6}$	$0^{a,5}$	$0^{a,8}$	$0^{a,5}$
	4	$20\pm0^{c,6}$	$40\pm0^{b,4}$	$60\pm0^{a,5}$	$40\pm0^{b,3}$
	6	$60\pm0^{c,2}$	$97.8\pm2.2^{a,1}$	$80\pm0^{b,3}$	$77.8\pm2.2^{b,1}$

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

4.3 <u>การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนปริมาณมาก</u>

น้ำเชื้อปลาไนที่แช่แข็งในปริมาณต่างๆกันของกลุ่มควบคุมในหลอดฟางขนาด 0.25 และ 0.5 มิลลิลิตร และหลอด Cryotube 1.5 มิลลิลิตร ด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติเมื่อนำมาละลายอุณหภูมิที่กำหนดไว้ พบว่า การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร และ 0.5 มิลลิลิตร มีการเคลื่อนที่เท่ากับ 79.5±3.9% และ 81.7±3.5% ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) กับหลอด Cryotube (78.9 ± 6.7%; $P<0.05$) น้ำเชื้อปลาไนในชุดการทดลองที่ seeding มาที่อุณหภูมิ -10, -15 หรือ -20 องศาเซลเซียสไม่ว่าจะแช่แข็งในหลอดฟางหรือหลอด Cryotube มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเฉลี่ยระหว่าง 75.2-83.6% ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) กับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 16 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนหลังการแช่แข็งในปริมาณต่างกันด้วยการใช้เครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ

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 ($P>0.05$)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนปริมาณมากด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวที่ระดับความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซ็นติเมตร ไม่ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยน้ำเชื้อที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 250 และ 500 ไมโครลิตรมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายเท่ากับ 76.7±3.9% และ 86.7±4.2 ตามลำดับ และน้ำเชื้อที่แช่แข็งในหลอด Cryotube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายเท่ากับ 78.7±6.7%

5. ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งที่มีคุณภาพสเปิร์มหลังการละลาย

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ๆของปลาไนก่อนทำการแช่แข็ง มีค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเฉลี่ยเท่ากับ 86.7±6.7% แต่เมื่อนำน้ำเชื้อไปแช่แข็งใน 4 ชุดการทดลองไปเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (0 วัน) แล้วนำมาละลาย พบว่า น้ำเชื้อในชุดการทดลองที่ 1 (แช่แข็งในหลอดฟาง 250 ไมโครลิตรด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ) ชุดการทดลองที่ 2 (แช่แข็งในหลอดฟาง 250 ไมโครลิตรด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลว) ชุดการทดลองที่ 3 (แช่แข็งในหลอด Cryotube 1.5 มิลลิลิตร ด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ) และชุดการทดลองที่ 4 (แช่แข็งในหลอด Cryotube 1.5 มิลลิลิตร ด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลว) มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายเฉลี่ยเท่ากับ 85.8±4.1%, 82.8±8.1%, 76.7±3.5% และ 74.7±3.1% ตามลำดับ โดยมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติระหว่างชุดควบคุมและสี่ชุดการทดลอง (P>0.05) (ตารางที่ 17) น้ำเชื้อแช่แข็งทั้ง 4 ชุดการทดลองเมื่อเก็บรักษาไว้นาน 30-120 วันก็ยังคงมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายไม่แตกต่างกัน (P>0.05) มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 62.1-81.8% แต่น้ำเชื้อในชุดการทดลองที่ 3 เมื่อเก็บรักษาไว้นาน 150 วันมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายลดลงเหลือประมาณ 55.8% ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อในชุดการทดลองที่ 4 (53.3±3.9%) แต่มีค่าต่ำกว่าน้ำเชื้อในสองชุดการทดลองแรกที่มีค่าเฉลี่ยประมาณ 69.2-75.6% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) น้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งเมื่อเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวในระยะเวลานาน 240 วันพบว่าน้ำเชื้อในชุดการทดลองที่ 1 และ 2 (แช่แข็งด้วยหลอดฟาง) มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูงกว่า (P<0.05) น้ำเชื้อในชุดการทดลองที่ 3 และ 4 (แช่แข็งด้วยหลอด Cryotube) (ตารางที่ 17)

น้ำเชื้อสดปลาไนก่อนการแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มเท่ากับ 94.7±3.6% ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติ (P>0.05) กับเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มใน 4 ชุดการทดลองที่เก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (0 วัน) ที่มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 89.1-95.1% (ตารางที่ 18) น้ำเชื้อทั้ง 4 ชุดการทดลองเมื่อเก็บรักษาไว้นาน 30-90 วันมีค่าเฉลี่ยการมีชีวิตของสเปิร์มระหว่าง 84.2-96.1 % ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) น้ำเชื้อในชุดการทดลองที่ 3 เมื่อเก็บรักษาไว้นาน 150 วันมีค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มเหลือประมาณ 75.3% แต่ไม่แตกต่างกับ 3 ชุดการทดลองที่เหลือ (P>0.05) น้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งเมื่อเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวในระยะเวลานาน 240 วันในชุดการทดลองที่ 1 และ 2 (แช่แข็งด้วยหลอดฟาง) มีการมีชีวิตของสเปิร์มหลังการละลายไม่แตกต่าง (P>0.05) กับน้ำเชื้อในชุดการทดลองที่ 3 และ 4 (แช่แข็งด้วยหลอด Cryotube) (ตารางที่ 18)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าระยะเวลาที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งไว้ในถังไนโตรเจนเหลวไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่และการมีชีวิตของสเปิร์มหลังการละลาย (P>0.05) แม้ว่าค่าเหล่านั้นลดลงตามระยะเวลาเก็บรักษา

ตารางที่ 17 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนในชุดการทดลองต่างๆหลังจากการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 240 วัน

ระยะเวลาเก็บรักษา (วัน)	ชุดการทดลอง			
	แช่แข็งหลอดฟางด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ	แช่แข็งหลอดฟางด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลว	แช่แข็งหลอด Cryotube ด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ	แช่แข็งหลอด Cryotube ด้วยไอไนโตรเจนเหลว
0	85.8±4.1^{a,1}	82.8±8.1^{a,1}	76.7±3.5^{a,1}	74.7±3.1^{a,1}
30	81.5±3.9^{a,1}	76.7±5.1^{a,1}	79.5±4.1^{a,1}	77.6±3.2^{a,1}
60	73.3±5.4^{a,1}	77.4±2.5^{a,1}	76.4±8.7^{a,1}	72.1±2.3^{a,1}
90	81.8±4.2^{a,1}	75.6±5.1^{a,1}	68.3±4.1^{a,1}	68.8±2.2^{a,1}
120	76.8±2.2^{a,1}	71.7±4.3^{a,1}	62.1±5.9^{ab,1}	64.4±2.2^{ab,1}
150	75.6±5.1^{a,1}	69.2±3.4^{a,1}	55.8±3.9^{b,12}	53.3±3.9^{b,12}
180	73.3±3.9^{a,12}	68.9±4.4^{a,12}	60±3.8^{ab,1}	57.7±5.9^{b,12}
210	68.8±2.2^{a,12}	64.4±5.9^{a,12}	53.3±6.7^{a,12}	51.1±5.9^{ab,12}
240	57.7±5.9^{a,2}	53.3±3.9^{a,2}	44.4±2.2^{b,2}	42.2±4.2^{b,2}

ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันในแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)
ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

ตารางที่ 18 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาไนในชุดการทดลองต่างๆหลังจากการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 240 วัน

ระยะเวลาเก็บรักษา (วัน)	ชุดการทดลอง			
	แช่แข็งหลอดฟางด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ	แช่แข็งหลอดฟางด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลว	แช่แข็งหลอด Cryotube ด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ	แช่แข็งหลอด Cryotube ด้วยไอไนโตรเจนเหลว
0	94.1±2.9^{a,1}	95.1±2.6^{a,1}	89.1±4.7^{a,1}	92.8±2.3^{a,1}
30	95.6±3.2^{a,1}	93.8±4.6^{a,1}	92.6±4.4^{a,1}	86.2±3.5^{ab,1}
60	92.6±3.5^{a,1}	91.7±4.7^{a,1}	88.8±5.7^{a,1}	89.1±4.6^{a,1}
90	96.1±2.7^{a,1}	89.4±5.8^{a,1}	84.2±4.5^{a,1}	91.7±5.3^{a,1}
120	91.5±3.6^{a,1}	86.3±5.1^{ab,1}	78.4±5.2^{ab,1}	87.9±3.7^{ab,1}
150	89.2±4.3^{a,1}	84.8±4.7^{a,1}	75.3±6.2^{ab,1}	81.8±3.2^{ab,1}
180	84.1±3.1^{a,1}	81.8±3.5^{a,1}	79.6±3.6^{a,1}	73.6±2.7^{ab,2}
210	85.6±2.8^{a,1}	79.2±2.3^{a,12}	79.1±4.3^{a,1}	69.2±4.6^{b,2}
240	79.2±2.3^{a,12}	82.2±3.3^{a,1}	77.2±2.9^{a,1}	70.7±3.2^{ab,2}

ตัวอักษร superscriptที่เหมือนกันในแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)
ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

6. ความสามารถของน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งในการปฏิสนธิกับไข่

การทดสอบความสามารถในการปฏิสนธิไข่ของน้ำเชื้อแช่แข็งในช่วงแรก ใช้น้ำเชื้อปลาไนที่บรรจุอยู่ในหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตรที่มี DMSO 4 ระดับความเข้มข้น (5, 10, 15, 20%) แต่แช่แข็งด้วยการใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ หรือแช่แข็งด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม พบว่าน้ำเชื้อสดปลาไนปฏิสนธิไข่ปลาไนได้ 69.3% ซึ่งมีค่าสูงกว่าการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยน้ำเชื้อปลาไนที่แช่แข็งด้วย DMSO 5-15% สามารถปฏิสนธิไข่ปลาไนได้ค่าเฉลี่ยระหว่าง 51.3-59.7% แต่น้ำเชื้อแช่แข็งด้วย 20% DMSO ปฏิสนธิไข่ได้เพียง 40.2% ซึ่งมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 19)

ตารางที่ 19 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 ปฏิสนธิไข่ได้ 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% น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลวทั้ง 4 ชุดการทดลองมีประสิทธิภาพในการปฏิสนธิไข่ต่ำกว่าน้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ซึ่งน้ำเชื้อสดสามารถปฏิสนธิไข่ได้ 74.5% (ตารางที่ 20)

ตารางที่ 20 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 ($P>0.05$)

การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งในการปฏิสนธิไข่ปลาไนด้วยการผสมเทียมแบบเปียก พบว่าน้ำเชื้อสดปลาไนสามารถปฏิสนธิไข่ปลาไนได้ 75.1% ซึ่งมีประสิทธิภาพในการปฏิสนธิสูงกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งของทั้ง 4 ชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยน้ำเชื้อแช่แข็งที่บรรจุอยู่ในหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตร ที่ได้จากการแช่แข็งด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ และจากการแช่แข็งด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม และน้ำเชื้อแช่แข็งที่บรรจุอยู่ในหลอด Cryotube ขนาด 1.5 ไมโครลิตร ที่ได้จากการแช่แข็งด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ และจากการแช่แข็งด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม สามารถปฏิสนธิไข่ปลาไนได้เท่ากับ 61.8, 52.1, 41.8 และ 35.2 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (ตารางที่ 21) ในทำนองเดียวกันอัตราการฟักของลูกปลาที่ได้จากการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสดให้ค่าเฉลี่ย 63.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีค่าสูงกว่าอัตราการฟักของลูกปลาที่ได้มาจาก 4 ชุดทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยชุดการทดลองที่แช่แข็งในหลอดฟางด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ และไอไนโตรเจนเหลวมีค่าเฉลี่ย 50.4 และ 44.7 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ชุดการทดลองที่แช่แข็งในหลอด Cryotube ด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ และไอไนโตรเจนเหลวมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 22.9 และ 17.9 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 21 อัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักของไข่ปลาไนที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งในชุดการทดลองต่างๆกัน

ชุดการทดลอง	เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ	เปอร์เซ็นต์การฟัก
1. น้ำเชื้อสด (control group)	75.1 ± 5.3^{a}	63.6 ± 4.9^{a}
2. การแช่แข็งน้ำเชื้อในหลอดฟางด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ	61.8 ± 4.9^{b}	50.4 ± 5.4^{b}
3. การแช่แข็งน้ำเชื้อในหลอดฟางด้วยไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม	52.1 ± 6.2^{b}	44.7 ± 5.1^{b}
4. การแช่แข็งน้ำเชื้อในหลอด Cryotube ด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ	41.8 ± 7.3^{bc}	22.9 ± 6.5^{c}
5. การแช่แข็งน้ำเชื้อในหลอด Cryotube ด้วยไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม	35.2 ± 5.1^{c}	17.9 ± 4.7^{c}

ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

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) ทำให้โดยภาพรวมคุณภาพสเปิร์มปลาไนของการทดลองนี้มีค่าลดลงในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (Rouxel et al., 2008; Sahinoz et al., 2007) การเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มของปลาหลายชนิดในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ เป็นสิ่งที่มักเกิดอยู่เสมอในปลาที่ผสมพันธุ์วางไข่ตามฤดูกาล (seasonal spawner) เพราะปลาเหล่านี้สร้างน้ำเชื้อในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และน้ำเชื้อจะหมดไปหลังจบฤดูผสมพันธุ์วางไข่ 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) เป็นต้น ดังนั้นการนำน้ำเชื้อปลาไนมาแช่แข็งเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ทางการเพาะเลี้ยงหรือการอนุรักษ์ จึงควรนำน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ เช่น น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูง มาทำการแช่แข็งและเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวต่อไป

5.2 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มปลาไน

การศึกษาผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มแสดงให้เห็นว่า DMSO, ethylene glycol, propylene glycol, sucrose, ethanol และ methanol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ควรนำมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน เนื่องจาก น้ำเชื้อปลาไนที่เจือจางด้วยการใช้สารละลายสารไครโอโพรเทคแทนท์เหล่านี้ที่ 4 ความเข้มข้น (5, 10, 15 และ 20%) ที่ระยะเวลา 10 นาที ล้วนต่างก็มีผลทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่เฉลี่ยสูงมากกว่า 80% ซึ่งเหมาะสมต่อการนำเอาสารไครโอโพรเทคแทนท์เหล่านี้ทั้ง 4 ความเข้มข้นไปแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนต่อไป อย่างไรก็ตาม acetamide, glycerol และ formamide เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษสูงต่อน้ำเชื้อปลาไน จึงไม่ควรนำไปใช้แช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน เนื่องจากการใช้สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 3 ชนิดนี้มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงอย่างรวดเร็วภายในเวลา 10 นาที ซึ่งทำให้หลังการแช่

แข็งด้วยสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 3 นี้ สเปิร์มหลังการละลายก็จะยังคงมีการเคลื่อนที่ต่ำเช่นเดิม

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มปลาไนแม้จะแสดงให้เห็นว่า DMSO, ethylene glycol, propylene glycol, sucrose, ethanol และ methanol จัดเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ควรนำมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน แต่เมื่อได้คัดเลือกเอา DMSO, propylene glycol และ ethylene glycol ไปแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยอัตราการลดอุณหภูมิต่างๆกันมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -20 องศาเซลเซียส พบว่า DMSO มีความเหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนมากกว่า propylene glycol และ ethylene glycol เนื่องจาก DMSO มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย (post-thawed sperm motility) เมื่อเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวผ่านไป 7 วันมีค่าสูงกว่าการใช้ propylene glycol และ ethylene glycol (ตารางที่ 11-13) อย่างไรก็ตามสาเหตุที่น้ำเชื้อปลาไนที่แช่แข็งด้วย DMSO เมื่อเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว 7 วันมีค่าต่ำกว่าน้ำเชื้อที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว 1 วัน (ตารางที่ 11) น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการเลือกใช้อุณหภูมิสุดท้ายที่ -20 องศาเซลเซียสก่อนการนำหลอดฟางแช่ในไนโตรเจนเหลว (plunging) เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิลดต่ำลงมาที่ -20 องศาเซลเซียส น้ำเชื้อภายในหลอดฟางอาจไม่แข็งตัวเต็มที่ทำให้เมื่อนำหลอดฟางไปใส่ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ทำให้เซลล์สเปิร์มอาจเปลี่ยนแปลงแข็งตัวอย่างรวดเร็วจนได้รับบาดเจ็บ (cell injury) ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าลดลงเมื่อเวลาผ่านไป Viveiros et al. (2001) ศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิและอุณหภูมิสุดท้ายก่อนการแช่น้ำเชื้อแช่แข็งลงในไนโตรเจนเหลว (plunging temperatures) โดยทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันด้วยอัตราการลดอุณหภูมิที่ 2, 5 และ 10 องศาเซลเซียส/นาที และทำการลดอุณหภูมิมาที่อุณหภูมิสุดท้ายแตกต่างกัน พบว่าการใช้อุณหภูมิสุดท้ายที่สูงกว่า -30 องศาเซลเซียสก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว ทำให้สเปิร์มตายเกือบหมดหลังการละลาย แต่เมื่อเลือกใช้อุณหภูมิสุดท้ายที่ต่ำกว่า -38 องศาเซลเซียสก่อนการแช่น้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลว กลับมีผลทำให้การมีชีวิตของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงขึ้นเทียบเท่ากับน้ำเชื้อสด แสดงให้เห็นว่าการเลือกใช้อุณหภูมิสุดท้ายที่เหมาะสมก่อนการแช่น้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลว (plunging) มีผลต่อการประสบผลสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อ

โดยทั่วไป DMSO จัดเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่นิยมนำมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลายชนิด เช่น ปลาบึก (Mongkonpunya et al., 1995) ปลา mahseer (*Tor khudree*; Basavaraja and Hegde, 2004) ปลากะพงแดง (Vuthiphandchai et al., 2009a) ปลาตะเพียนขาว (Vuthiphandchai et al., 2015) ปลา longspine scraper (Sahinoz et al., 2018) เป็นต้น สาร propylene glycol มีความเป็นพิษต่ำและพบว่ามีความเหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน (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) พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea bream *(Sparus aurata)* เมื่อนำน้ำเชื้อมาเจือจางด้วย 1% NaCl และสารไครโอโพรเทคแทนท์ 10 % ethylene glycol, 10% propylene glycol หรือ 5% DMSO แล้วทำการแช่แข็งด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 และ 15 องศาเซลเซียส/นาทีมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -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) โดยนำตัวอ่อนเหล่านั้นแช่ในสารไครโอโพรเทคแทนท์เหล่านั้นที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% นาน 10 หรือ 20 นาทีแล้วนำไปฟักต่อในน้ำทะเลเพื่อให้เป็นตัวอ่อนฟักเป็นลูกกุ้งต่อไป พบว่าความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ขึ้นอยู่กับระยะการพัฒนาของตัวอ่อน ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ และระยะเวลาที่ตัวอ่อนสัมผัสสารไครโอโพรเทคแทนท์ โดยตัวอ่อนระยะท้ายของการพัฒนา (gastrula stage) มีความทนต่อสารไครโอโพรเทคแทนท์มากที่สุด และ DMSO, acetamide, glycerol และ sucrose เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์มีความเป็นพิษต่ำต่อตัวอ่อนกุ้งกุลาดำเปรียบเทียบสารสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดอื่นๆ

Kenneth et al. (2004) พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงแดง (*Lutjanus campechanus*) ในหลอดฟางขนาด 500 ไมโครลิตร โดยใช้ Ca-F HBSS เป็น sperm extender และใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด (Dimethyl acetamide; DMA, DMSO และ methanol) ที่ระดับความเข้มข้น 5% และ 10% ทำการลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลวโดยการนำหลอดฟางวางแนวนอนบน rack และนำไปเก็บไว้ใน freezing hamber (-140 องศาเซลเซียส) นาน 8 นาทีจึงเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว พบว่า การใช้สารละลาย 10% DMSO ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงแดงมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย (ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 7 วินาที) มีค่าสูงสุดเท่ากับ 71%

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

Sahinoz et al. (2018) พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา longspine scraper (*Capoeta trutta*) ซึ่งเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งในครอบครัว Cyprinidae โดยนำน้ำเชื้อปลามาแช่แข็งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (350 mM glucose) ที่มีสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่างกัน 3 ชนิด (DMSO, methanol และ methylglycol) ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 10% และปรับให้ pH สารละลายเป็น 7.2, 7.6, 8.0 และ 8.4 รวมทั้งหมด 12 ชุดการทดลอง ดูดน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางใส่ในหลอดฟางขนาด 500 ไมโครลิตร ปล่อยให้อยู่ในสภาวะสมดุลบนน้ำแข็งบดนาน 30 นาที โดยแช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -110 องศาเซลเซียส (liquid nitrogen vapor) ภายในถังไนโตรเจนเหลว แล้วเก็บรักษาไว้นาน 7 วัน ละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที พบว่า DMSO เป็นสารไครโอ

โพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมมากที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา longspine scraper แม้ว่า methanol และ methylglycol จะมีประสิทธิภาพที่ดีในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาชนิดนี้ได้ดีเช่นกัน เนื่องจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย และระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายในชุดการทดลองเหล่านั้นยังคงมีค่าสูง

5.3 การศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนที่ผ่านการแช่แข็งและการพัฒนา protocol เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อ

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนด้วย DMSO, propylene glycol และ ethylene glycol พบว่า DMSO สามารถแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนได้ดีกว่า propylene glycol และ ethylene glycol ซึ่งเป็นการลดอุณหภูมิมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -20 องศาเซลเซียสก่อนนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลายยังไม่คงที่ตามที่ได้กล่าวมาแล้ว ทำให้ในระยะเวลาต่อมาจึงต้องพัฒนาวิธีการเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ protocol การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนให้ดีขึ้น โดยเลือกใช้อุณหภูมิสุดท้ายให้มีค่าต่ำกว่า -20 องศาเซลเซียส โดยเมื่อทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนในหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตรเมื่อใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 10% DMSO ด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ พบว่าการใช้อุณหภูมิสุดท้ายให้มีค่าต่ำลงมาที่ -40 หรือ -80 องศาเซลเซียสก่อนแช่น้ำเชื้อในไนโตรเจนเหลว ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงกว่าการใช้อุณหภูมิสุดท้าย -20 องศาเซลเซียสก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว (ตารางที่ 14) สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากในระหว่างการลดอุณหภูมิให้ต่ำลงถึงอุณหภูมิสุดท้าย -40 หรือ -80 องศาเซลเซียส ซึ่งน่าจะเป็นอุณหภูมิสุดท้ายที่เหมาะสม (optimal final temperature) เซลล์สเปิร์มปลาไนจะแข็งตัวแล้วก่อนนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิภายในเซลล์ไม่มากเมื่ออยู่ในไนโตรเจนเหลว สเปิร์มจึงมีการเคลื่อนที่สูงกว่า แต่น้ำเชื้อปลาไนที่แช่แข็งมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -20 องศาเซลเซียสก่อนนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว อาจเป็นไปได้ว่าเซลล์สเปิร์มอาจยังไม่แข็งตัวเต็มที่ หรือยังมีน้ำยังไหลออกจากเซลล์ไม่เสร็จสิ้น (complete dehydration) และเมื่อนำเซลล์สเปิร์มที่อยู่ที่อุณหภูมิสุดท้าย -20 องศาเซลเซียสมาใส่ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ทำให้เกิดผลึกน้ำแข็ง (intracellular ice formation) บางส่วนในเซลล์สเปิร์มขณะลดอุณหภูมิ ทำให้เซลล์อาจได้รับอันตราย (cell injury) มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ลดลง อีกทั้งถ้านำเซลล์ในสภาพเช่นนี้มาละลาย (thawing) ในภายหลังจะทำให้ผลึกน้ำแข็งมีขนาดใหญ่ขึ้นขณะละลาย (recrystallization) โดยเฉพาะถ้าใช้อัตราการละลายที่ช้า จึงเป็นเหตุผลที่ทำให้น้ำเชื้อปลาไนที่แช่แข็งมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -20 องศาเซลเซียสก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการเลือกใช้อุณหภูมิสุดท้าย -40 และ -80 องศาเซลเซียส (Viveiros et al. 2000)

โดยทั่วไปสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งนอกจากช่วยลดการไหลออกของน้ำจากเซลล์แล้วยังช่วยลดการเกิดผลึกน้ำแข็ง (ice crystal) ในเซลล์ ซึ่งรูปแบบการใช้อัตราการลดอุณหภูมิต่างกันร่วมกับการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดที่เหมาะสมเพื่อแช่แข็งเซลล์ จะส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์ ซึ่งการพัฒนา protocol การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาให้สามารถเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวได้นานเป็นปีต้อง optimize ตัวแปรทั้งหมดที่เกี่ยวข้องเพื่อให้ได้คุณภาพสเปิร์มที่ดีหลังการละลายสำหรับการจัดตั้งธนาคารน้ำเชื้อต่อไป โดยผลการศึกษาแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติเมื่อใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิดและเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว 7 วันมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาไว้ 1 วัน แสดง

ให้เห็นว่า protocol การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนด้วยไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิดที่ลดอุณหภูมิมาที่อุณหภูมิสุดท้ายมาที่ -20 องศาเซลเซียสก่อนนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวที่มี -196 องศาเซลเซียส อาจทำให้เซลล์สเปิร์มแข็งตัวไม่มากก่อนนำไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลวตามที่กล่าวมาแล้ว จึงทำให้เซลล์สเปิร์มเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว และมีผลทำให้น้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว 7 วันมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลง แต่เมื่อทำการลดอุณหภูมิมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 หรือ -80 องศาเซลเซียสก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงกว่าการใช้อุณหภูมิสุดท้าย -20 องศาเซลเซียส แสดงว่าการเลือกใช้อุณหภูมิสุดท้ายก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวมีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงขึ้น ทำให้การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติเพื่อพัฒนาประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อในช่วงต่อมาจึงเลือกใช้อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียสก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว อย่างไรก็ตาม การมีชีวิตรอดของเซลล์หลังการแช่แข็งยังมีความเกี่ยวข้องระหว่างการเลือกใช้อัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) และอุณหภูมิสุดท้าย (final temperature) ก่อนแช่เซลล์ในไนโตรเจนเหลว เช่น การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -50 องศาเซลเซียส แล้วแช่ไนโตรเจนเหลว แต่เมื่อนำน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแช่แข็งออกมาละลาย ก็สามารถปฏิสนธิไข่และให้อัตราการฟักของลูกปลา ไม่แตกต่างกับการใช้น้ำเชื้อสดในการผสมเทียมกับไข่ แต่น้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันที่แช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 2 หรือ 10 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -50 องศาเซลเซียส เช่นกัน กลับมีผลทำให้ได้อัตราการฟักที่ต่ำกว่า (Viveiros et al. 2000) ทำให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของอัตราการลดอุณหภูมิและอุณหภูมิสุดท้ายในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน โดยสามารถเลือกใช้อัตราการลดอุณหภูมิและอุณหภูมิสุดท้ายที่เหมาะสมแตกต่างกันไปในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน เช่น น้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันที่แช่แข็งต่างก็จะมีชีวิตรอดสูงหลังการละลายไม่ว่าจะเป็นการแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส หรือแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -45 ถึง -50 องศาเซลเซียส หรือแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -55 องศาเซลเซียส ต่างก็ทำให้สเปิร์มแช่แข็งมีชีวิตรอดสูงหลังการละลายเช่นกันแม้ว่าใช้อุณหภูมิสุดท้ายต่างกัน (Viveiros et al. 2000)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนในกล่องโฟมด้วยไอไนโตรเจนเหลวเมื่อเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวนาน 1, 7 และ 14 วัน มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงเล็กน้อยตามระยะเวลาการเก็บรักษา (ตารางที่ 15) แสดงว่า อาจมีปัจจัยบางประการที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มระหว่างการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว เช่นอาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิภายในถังไนโตรเจนเหลวระหว่างการนำตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวออกมาประเมินคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลาย เพราะการนำเอาหลอดฟางที่แช่แข็งออกจาก Goblet จะใช้ระยะเวลาสั้นๆในการนำตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งออกมา ซึ่งเมื่อเอาตัวอย่างแช่แข็งออกจากถังไนโตรเจนเหลวหลายๆครั้ง อาจทำให้หลอดฟางมีการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิน้ำเชื้อในหลอดฟางสูงขึ้นเล็กน้อย ซึ่งการสุ่มตัวอย่างน้ำเชื้อออกมาเพื่อประเมินคุณภาพ ทำให้น้ำเชื้อแช่แข็งบางส่วนที่ยังคงอยู่ใน Goblet เมื่อนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวอีกครั้งหนึ่ง จะมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่ลดต่ำลงอีก จึงอาจส่งผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าลดลงระหว่างการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวเมื่อเวลาผ่านไปอันเนื่องจากอุณหภูมิเก็บรักษาอาจไม่คงที่ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา เช่นเดียวกับผลการทดลองของสเปิร์มกุ้งกุลาดำที่ได้แช่แข็งและเก็บรักษาไว้ในถัง

ไนโตรเจนเหลว มีการมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มลดลง หลังจากการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวผ่านไป 60 วัน (Vuthiphandchai et al., 2007) เช่นเดียวกับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา 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 เปอร์เซ็นต์แม้ว่าระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าไม่แตกต่างกันตามระยะเวลาการเก็บรักษา (Basavaraja and Hegde, 2004)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยไอไนโตรเจนเหลว เป็นวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่ทำได้ง่าย มีต้นทุนต่ำ ไม่ต้องใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติที่มีราคาแพง จึงมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ภายในโรงเพาะฟักขนาดเล็กหรือขนาดกลางที่ไม่สามารถลงทุนซื้อเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ โดยน้ำเชื้อปลาไนที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตรด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวภายในกล่องโฟม มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงหลังการละลายเพียงแต่ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนที่ระดับความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซ็นติเมตร นาน 10 นาที เช่นเดียวกับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลายๆชนิด ยกตัวอย่างเช่น

Ji et al. (2004) พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea perch (*Lateolabrax japonicus*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 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 ภายในไอไนโตรเจนเหลว ที่ระดับความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2, 6 และ 13 เซนติเมตร เป็นเวลา 10 นาที และที่ผิวหน้าไนโตรเจนเหลวอีก 5 นาที จึงนำไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว พบว่า การใช้สารละลาย 10% DMSO ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea perch ภายในไอไนโตรเจนเหลวที่ระดับความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าสูงสุด (73.3±5.7%) โดยที่ระดับความสูง 13 และ 2 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 48.3±2.9% และ 41.7±10.6% ตามลำดับ

Mansour et al. (2006) พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Arctic char ด้วยการใช้สารละลาย glucose ที่ผสมกับ 10% methanol ในการเจือจางน้ำเชื้อปลา Arctic char แล้วนำน้ำเชื้อเหล่านั้นมาลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็งที่ความสูง 6 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว พบว่าสเปิร์มมีการเคลื่อนที่สูงสุดหลังการละลาย เมื่อเปรียบเทียบกับการแช่แข็งที่ความสูง 5 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนในปริมาณมากขึ้นทั้งในการแช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 และ 0.5 มิลลิลิตร และหลอด Cryotube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ภายในเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียสไม่ว่าจะ seeding ที่อุณหภูมิเท่าใดก็ตาม ยังคงมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย (post-thawed sperm motility) ไม่ต่างกับกลุ่มควบคุม แสดงว่า seeding ไม่มีผลต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนหลังการละลายในหลอดทั้งสามขนาด อีกทั้งการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนสามารถแช่แข็งในปริมาณมากในหลอด Cryotube ได้มีประสิทธิภาพเทียบเท่าการแช่แข็งด้วยหลอดฟางที่มีขนาดเล็กกว่า สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจาก protocol การแช่แข็งที่เกี่ยวข้องมีความเหมาะสมทั้งในเรื่องของชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ และชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ รวมทั้งอัตราการละลายน้ำเชื้อ ประกอบกับการแช่แข็งน้ำเชื้อมาที่

อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียสก่อนการเก็บรักษาน้ำเชื้อในถังไนโตรเจนเหลว น่าจะมีส่วนช่วยทำให้น้ำเชื้อถูกแช่แข็งอย่างเหมาะสม ไม่ได้รับอันตรายจากการบาดเจ็บของเซลล์ (cell injury) ขณะแช่แข็ง โดยน้ำเชื้อแข็งตัวเต็มที่ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ดีหลังการละลาย การพัฒนาศักยภาพแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนในปริมาณที่มากขึ้นแล้วสเปิร์มหลังการละลายยังคงมีการเคลื่อนที่สูง เป็นประโยชน์ต่อการเพาะพันธุ์ปลาเชิงพาณิชย์และการอนุรักษ์ ซึ่งการพัฒนา protocol การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนในปริมาณที่มากขึ้นภายในกล่องโฟมด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวเพื่อให้ได้เทคโนโลยีสำหรับการประยุกต์ใช้ที่มีต้นทุนการผลิตต่ำลง ก็ยังสามารถแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนเมื่อแช่แข็งที่ระดับความสูง 6 เซ็นติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว ซึ่งการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนทั้งแบบการแช่แข็งด้วยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ และการแช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม เป็นการนำน้ำเชื้อปลาไนมาเจือจางในสารละลาย Ca-F HBSS ร่วมกับการใช้ 10% DMSO ปล่อยให้อยู่ในสภาวะสมดุล 10 นาทีก่อนทำการลดอุณหภูมิแช่แข็ง

5.4 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนที่มีต่อคุณภาพสเปิร์มหลังการละลาย

น้ำเชื้อปลาไนที่แช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ หรือแช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลว มีคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลาย (การเคลื่อนที่และการมีชีวิตของสเปิร์ม) ไม่แตกต่างกันไม่ว่าจะแช่แข็งโดยการใช้หลอดฟางหรือหลอด Cryovial แสดงว่า protocols การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ หรือแช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟมมีความเหมาะสม โดยการแช่แข็งมีผลทำให้เซลล์ที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวหยุดกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีววิทยาและชีวเคมีภายในเซลล์ ทำให้สามารถเก็บรักษาเซลล์แช่แข็งได้นานขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อในธนาคารน้ำเชื้อผ่านไป 240 วัน พบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งในหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตรมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูงกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งในหลอด Cryotube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรแม้ว่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าไม่แตกต่างกัน สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเกี่ยวข้องกับปริมาณน้ำเชื้อที่ถูกแช่แข็งขณะลดอุณหภูมิ เพราะน้ำเชื้อในหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตรจะมีอยู่ในปริมาณ 200 ไมโครลิตร ซึ่งเมื่อทำการแช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ หรือไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟมน่าจะทำให้น้ำเชื้อในหลอดฟางแข็งตัวเต็มที่ก่อนแช่ลงไป (plunging) ในไนโตรเจนเหลว เมื่อเปรียบเทียบกับการแช่แข็งน้ำเชื้อในหลอด Cryotube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีน้ำเชื้อปริมาณมากถึง 1.2 มิลลิลิตรซึ่งเมื่อถูกแช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ หรือไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม อาจทำให้น้ำเชื้อยังแข็งตัวไม่เต็มที่ทั้งหมดขณะแช่ลงไป (plunging) ในไนโตรเจนเหลว อาจทำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ จึงส่งผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายลดลงเมื่อเวลาการเก็บรักษาผ่านไป สำหรับเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มในน้ำเชื้อแช่แข็งในหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตร หรือในหลอด Cryotube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีค่าไม่แตกต่างกัน น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการตรวจประเมินที่ใช้สีย้อมในการแพร่ผ่านเข้าเซลล์สเปิร์มบนหลักการที่ว่าเซลล์ที่ได้รับบาดเจ็บจากการแช่แข็งหรือการละลายที่ไม่เหมาะสม จะทำให้สีย้อมแพร่เข้าสู่เซลล์อย่างรวดเร็วในระยะเวลาสั้นๆ แต่ถ้าเซลล์ไม่ได้รับอันตรายขณะแช่แข็งหรือละลายจะไม่มีสีย้อมเข้าสู่เซลล์ ซึ่งแตกต่างจากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาน้ำจืดที่กระตุ้นด้วยสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกต่ำเพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่นั้นเป็นการปลดปล่อยพลังงานออกมาจากไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ทำให้ microtubule ในบริเวณหางสเปิร์มสั่นด้วยความถี่สูง (Dzyuba et al., 2016) จึงทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่ไปข้างหน้าอย่าง

รวดเร็วเมื่อถูกกระตุ้น ซึ่งในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาอาจทำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์สเปิร์มบริเวณไมโทคอนเดรียได้ง่าย (Liu et al., 2012) จึงเป็นเหตุผลที่ทำให้น้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวยังคงมีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตหลังการละลายมีค่าสูงแม้ว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าลดต่ำลง อย่างไรก็ตามการพัฒนาเทคโนโลยีในการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อของโครงการวิจัยนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้แม้ว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีแนวโน้มลดลงอย่างช้าๆเมื่อเวลาผ่านไป 240 วันแต่เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายในทุกชุดการทดลองก็ยังมีค่ามากกว่า 40% สอดคล้องกับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลายชนิดเช่น Suquet et al. (1998) รายงานการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา turbot (*Psetta maxima*) ที่เจือจางด้วย 10% BSA และ10% DMSO พบว่าน้ำเชื้อที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวนาน 9 เดือนมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงระหว่าง 60-90% ภายหลังการละลายน้ำเชื้อ

การลดลงของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายหลังการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวในลักษณะของธนาคารน้ำเชื้อเมื่อเวลาผ่านไป เป็นปัญหาหนึ่งที่พบบ่อยระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง (Basavaraja and Hegde, 2004) มีความเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัยเช่น การเปิดถังไนโตรเจนเหลวเพื่อนำตัวอย่างแช่แข็งออกมาทำการประเมินคุณภาพสเปิร์มทุกๆเดือน ซึ่งทำให้ตัวอย่างถูกนำเข้าออกจากถังไนโตรเจนเหลวหลายครั้ง โดยเมื่อนำเอา canister หรือ cane ที่บรรจุหลอดฟางและหลอด Cryotubes ออกมาจากถังไนโตรเจนเหลว จะทำให้ตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งบางส่วนมีอุณหภูมิสูงขึ้นเล็กน้อยและเมื่อเอา canister หรือ cane จัดเก็บตามเดิมจะทำให้ตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งอยู่ในอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสเช่นเดิม ดังนั้นการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายเป็นเวลานาหลายเดือน ทำให้ตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิขึ้นลงอยู่บ่อยครั้ง ส่งผลทำให้คุณภาพสเปิร์มไม่คงที่ โดยถ้าอุณหภูมิสูงกว่า -130 องศาเซลเซียสจะทำให้อะตอมหรือโมเลกุลเคลื่อนที่ ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ลดลง (Talwar, 2011) นอกจากนี้แสงก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อคุณภาพสเปิร์ม เนื่องจากตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งที่อยู่ในถังไนโตรเจนเหลวจะอยู่ในที่มืดตลอดเวลา แต่เมื่อนำเอา canister หรือ cane ที่บรรจุหลอดฟางและหลอด Cryotubes ออกมาจากถังไนโตรเจนเหลวจะทำให้น้ำเชื้อแช่แข็งสัมผัสแสงสว่างในห้องปฏิบัติการระหว่างการนำเอาตัวอย่างออกมาประเมิน ซึ่งการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งเป็นเวลาหลายเดือน ทำให้น้ำเชื้อสัมผัสแสงสว่างหลายครั้ง ซึ่งได้มีรายงานว่าแสงสว่าง (radiation) ก็อาจส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็ง (Talwar, 2011) แม้ว่าในทางทฤษฎีสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งได้นานถึง 2,000-32,000 ปี (Ashwood-Smith, 1980)

5.5 ความสามารถของน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งในการปฏิสนธิกับไข่

ผลการศึกษาการผสมเทียมไข่ปลาไรด้วยน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งแสดงให้เห็นว่า น้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งสามารถปฏิสนธิไข่ปลาไนได้ ไม่ว่าจะเป็นน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติหรือแช่แข็งในกล่องโฟมด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวแม้ว่าอัตราการปฏิสนธิของชุดการทดลองที่แช่แข็งด้วยการใช้เครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ หรือแช่แข็งในกล่องโฟมด้วยไอโตรเจนเหลว มีค่าต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสด (ตารางที่ 19-20) สาเหตุดังกล่าวอาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับความเป็นพิษ (toxicity) ของ DMSO ที่อาจมีต่อไข่ เนื่องจากในระหว่างการผสมเทียมวิธีแห้งแบบดัดแปลง (modified dry method) เมื่อเทน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งที่ละลายใหม่ๆลงบนไข่ปลาไน ทำให้ไข่ปลาไนสัมผัสกับ DMSO

โดยตรงในระยะเวลาหนึ่งขณะผสมเทียมก่อนเทน้ำกระตุ้นสเปิร์ม ทำให้ DMSO อาจมีพิษต่อไข่ ส่งผลทำให้คุณภาพไข่ลดลงขณะผสมเทียม จึงมีอัตราการปฏิสนธิต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสด (กลุ่มควบคุม) ซึ่งแนวทางในการพัฒนางานวิจัยต่อมาได้นำน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งมาผสมเทียมกับไข่ปลาไนด้วยวิธีผสมเทียมแบบเปียก (wet method) เพราะในการผสมเทียมด้วยวิธีนี้ ไข่ปลาไนได้ถูกรีดลงไปในภาชนะที่มีน้ำอยู่ก่อนพร้อมกับเทน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งที่ละลายใหม่ๆใส่ลงไปผสมเทียมทันที ทำให้ DMSO ถูกเจือจางด้วยน้ำ และทำให้ไข่ปลาไนสัมผัสกับ DMSO ในความเข้มข้นที่ลดต่ำลง ประกอบกับน้ำเชื้อแช่แข็งในชุดการทดลองเหล่านี้ถูกแช่แข็งด้วยความเข้มข้นที่เหมาะสมของ 10% DMSO ซึ่งน่าจะทำให้ประสิทธิภาพการปฏิสนธิกับไข่ปลาดีขึ้น (Horváth et al., 2003) อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาไนที่ได้แช่แข็งภายในหลอดฟางหรือหลอด Cryotube ด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติหรือไอไนโตรเจนเหลวเมื่อใช้วิธีผสมเทียมแบบเปียก ก็ยังคงมีค่าต่ำกว่าน้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยเฉพาะน้ำเชื้อในหลอด Cryotube ที่แช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม (ตารางที่ 21) แสดงว่าการใช้วิธีการผสมเทียมแห้งแบบดัดแปลง หรือวิธีการผสมเทียมแบบเปียกไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งที่มีต่อไข่ อย่างไรก็ตามน้ำเชื้อแช่แข็งทั้งหมดที่นำมาผสมเทียมไข่ปลาด้วยวิธีผสมเทียมแบบเปียกแม้จะเป็นน้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวช่วงเวลาหนึ่งแต่ก็มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงระหว่างประมาณ 60-80% จึงไม่น่าจะส่งผลต่ออัตราการปฏิสนธิ เพราะสเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่จำนวนมากในการว่ายเข้าไปปฏิสนธิไข่ได้ ซึ่งก็ได้มีรายงานหลายฉบับที่แสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำเชื้อปลาแช่แข็งที่ไม่เคลื่อนที่หลังการละลาย (แต่สั่นอยู่กับที่) ก็ยังคงมีความสามารถในการปฏิสนธิไข่ปลาได้ (Erdahl and Graham, 1987; Warnecke and Pluta, 2003)

การปฏิสนธิของไข่ปลามีความเกี่ยวข้องกับปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิเช่น คุณภาพไข่ คุณภาพน้ำเชื้อ วิธีการผสมเทียม คุณภาพน้ำและการเปลี่ยนถ่ายน้ำ รวมทั้งจำนวนสเปิร์มที่เหมาสมในการปฏิสนธิไข่ เป็นต้น โดยทั่วไปแล้วไข่และสเปิร์มต้องมีคุณภาพดีจึงจะส่งผลให้มีอัตราการปฏิสนธิสูง ซึ่งการใช้น้ำเชื้อสดในการผสมเทียมมักจะทำให้ไข่มีอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าน้ำเชื้อแช่แข็ง เนื่องจากน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลายอาจมีการบาดเจ็บของเซลล์ที่ส่วนใดส่วนหนึ่งจึงส่งผลต่อการปฏิสนธิไข่ สาเหตุหนึ่งที่ทำให้การผสมเทียมไข่ปลาไนด้วยน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งไม่ว่าจะใช้วิธีแห้งแบบดัดแปลงหรือวิธีแบบเปียกมีอัตราการปฏิสนธิต่ำกว่าน้ำเชื้อสด ยังอาจมีความเกี่ยวข้องกับขั้นตอนการผสมเทียม เนื่องจากน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งเมื่อถูกละลายกลับสู่สภาพของเหลวเมื่อเทน้ำเชื้อเหล่านั้นออกจากหลอดฟาง หรือหลอด Cryotube ไปผสมไข่ในจานแก้ว (petri dish) มีลักษณะหนืด ซึ่งเมื่อทำการกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่เพื่อว่ายน้ำไปปฏิสนธิไข่โดยการใช้ขนไก่ช่วยผสมนั้น อาจทำให้ไข่ผสมเข้ากับสเปิร์มได้ไม่ดีเหมือนการใช้น้ำเชื้อสด ซึ่งน้ำเชื้อสดจะละลายระหว่างผสมเทียมในน้ำได้ง่ายกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งในช่วงที่ใช้ขนไก่ช่วยคนผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ประกอบกับการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสด หรือน้ำเชื้อแช่แข็งในการศึกษาครั้งนี้ใช้อัตราส่วนของจำนวนสเปิร์มต่อไข่ (sperm to egg ratio) ที่เท่ากันคือ $1x10^5$ สเปิร์มต่อไข่ 1 ใบ ทำให้โอกาสที่สเปิร์มของน้ำเชื้อสด (fresh sperm) ว่ายเข้าไปผสมไข่ได้จึงดีกว่าสเปิร์มของน้ำเชื้อแช่แข็ง (cryopreserved sperm) เนื่องจากน้ำเชื้อสดกระจายตัวเร็วกว่า อีกทั้งเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อสดที่ใช้ผสมเทียมมีค่าสูงตามปกติ (>80%) และเคลื่อนที่เร็วมาก เมื่อเปรียบเทียบกับเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อแช่แข็ง (ทั้งในหลอดฟางและหลอด Cryotube) ที่มีค่าต่ำกว่าโดยมีค่าประมาณ 60-80% และยังเคลื่อนที่เร็วปานกลาง ต่างก็ส่งผลทำให้อัตราการปฏิสนธิไข่ปลาไนเมื่อใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในทุกชุด

การทดลองจึงมีค่าต่ำกว่าน้ำเชื้อสด การศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาประสิทธิภาพการผสมเทียมของน้ำเชื้อแช่แข็ง จึงควรศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ระหว่างการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายและจำนวนสเปิร์มที่ควรใช้ในการปฏิสนธิไข่ 1 ใบเพื่อทำให้อัตราการปฏิสนธิสูงขึ้นไม่แตกต่างกับการใช้น้ำเชื้อสด เนื่องจากการเพิ่มปริมาณน้ำเชื้อแช่แข็งที่ละลายเพื่อนำไปผสมเทียม เป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์สปิร์มและเพิ่มโอกาสในการปฏิสนธิกับไข่ อย่างไรก็ตามอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในหลอด Cryotube ที่มีค่าต่ำกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งในหลอดฟาง น่าจะมีความเกี่ยวข้องเพิ่มเติมเกี่ยวกับการแช่แข็งน้ำเชื้อปริมาณมากในหลอด Cryotube อาจทำให้น้ำเชื้อยังไม่แข็งตัวเต็มที่ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวตามที่กล่าวมาแล้ว ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อลดลง จึงส่งผลต่ออัตราการปฏิสนธิ นอกจากนี้อัตราการฟักของไข่ที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีค่าต่ำกว่าการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสดก็สะท้อนให้เห็นว่า น้ำเชื้อสดมีประสิทธิภาพในการเพาะพันธุ์ปลาได้ดีกว่าน้ำเชื้อแช่แข็ง แต่ด้วยเหตุผลที่ว่าน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งที่ได้จัดเก็บไว้ในธนาคารน้ำเชื้อยังคงมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ในเกณฑ์สูง จึงเป็นประโยชน์โดยตรงในการนำมาใช้เพาะขยายพันธุ์ปลาไนเพื่อการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์สายพันธุ์ปลาไนที่ดีหรือได้ปรับปรุงสายพันธุ์ไว้แล้ว ซึ่งแม้ว่าอัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักจะต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสด แต่ก็อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้มากกว่าไม่สามารถเพาะขยายพันธุ์ปลาไนนอกฤดูกาลได้เลย

การผสมเทียมกับไข่ปลาด้วยการใช้น้ำเชื้อปลาแช่แข็ง แล้วส่งผลทำให้อัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักของไข่ปลา มีค่าลดลงต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสดในการผสมเทียม ยังมีรายงานวิจัยพบในปลาอื่นๆอีกหลายชนิด 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 แต่ก็ได้มีรายงานการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพของน้ำเชื้อปลาแช่แข็งในการผสมเทียมไข่ปลาไม่แตกต่างกับการใช้น้ำเชื้อสดผสมเทียมไข่ปลา เช่น

พลชาติ ผิวเณร และพนม กระจ่างพจน์ สอดศุข (2546) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหมอไทยที่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Carp#1 และ 10% DMSO โดยทำการเจือจางน้ำเชื้อใน Carp#1 ในอัตราส่วน 1:5 ปล่อยให้น้ำเชื้ออยู่ในสภาวะสมดุลที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยลดอุณหภูมิแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาทีแล้วเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว พบว่าสเปิร์มมีการเคลื่อนที่หลังการละลายประมาณ 60% และสามารถปฏิสนธิกับไข่ใกล้เคียงกับการใช้น้ำเชื้อสด

DeGraaf et al. (2004) แช่แข็งน้ำเชื้อปลา black seabass (*Centropristis striata* L) ซึ่งเป็นปลาที่มีการกลายเพศจากเพศเมียไปเป็นเพศผู้ (protogynous hermaphrodite) โดยนำน้ำเชื้อปลามาเจือจางในสารละลาย modified Mounib's extender (MME) ที่มี 10% DMSO บรรจุใส่หลอดฟางขนาด 500 ไมโครลิตร ปล่อยให้อยู่ในสภาวะสมดุล 3 นาที ทำการแช่แข็งด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาทีมาถึงอุณหภูมิสุดท้าย -150 องศาเซลเซียส จึงเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว พบว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายของน้ำเชื้อแช่แข็งเมื่อเก็บรักษาไว้นาน 90 วันมีค่าไม่แตกต่างจากการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อแช่แข็งสามารถปฏิสนธิไข่ได้ประมาณ 67±4.1% ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) กับอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสด (69±2.4%)

Ding et al. (2009) แช่แข็งน้ำเชื้อปลาแมนดาริน (Mandarin fish; *Siniperca chuatsi*) ด้วยการเจือจางในสารละลาย D-15 ที่มี 10% DMSO ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อในหลอด Cryotube ด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวที่ความสูง 6 เซ็นติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว (อุณหภูมิ -180 องศาเซลเซียส) เป็นเวลานาน 10 นาที และลดอุณหภูมิต่อที่ผิวหน้าไนโตรเจนเหลวอีก 5 นาทีจึงแช่ลงในไนโตรเจนเหลว พบว่าน้ำเชื้อปลาแมนดารินแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้นาน 1 สัปดาห์ และ 1 ปี มีอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักประมาณ 66.1±5.1% และ 54.8±4.4 ตามลำดับเปรียบเทียบกับ 62.9±14.3% และ 52.6±11.2% ตามลำดับ มีค่าไม่แตกต่าง ($P>0.05$) จากการใช้น้ำเชื้อสดในการผสมเทียม (69.4±8.1% และ 59.8±5.3% ตามลำดับ)

Liu et al. (2010) ศึกษาผลของระยะเวลาเก็บรักษาและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ในน้ำเชื้อปลา red seabream (*Pagrus major*) แช่แข็งที่มีต่ออัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟัก โดยนำน้ำเชื้อมาเจือจางด้วย DMSO ความเข้มข้น 12, 15, 18 และ 21% และนำไปแช่แข็งก่อนนำมาใช้ผสมเทียมหลังจากการเก็บรักษาผ่านไป 10, 30, 60 และ 360 วัน พบว่า น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วย DMSO ทั้ง 4 ระดับความเข้มข้นเมื่อเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว < 60 วัน ให้ค่าอัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 98.8±0.8% และ 96.4±1.3% ตามลำดับแต่เมื่อเวลาการเก็บรักษาผ่านไป 360 วัน น้ำเชื้อแช่แข็งทั้ง 4 ระดับความเข้มข้นให้ค่าอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักลดลงอย่างชัดเจน โดยมีค่าระหว่าง 88.6±3.0% ถึง 7.0±1.9% และ 79.4±7.2% ถึง 3.3±0.8% ตามลำดับ และความเข้มข้นของ DMSO มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลาย โดยน้ำเชื้อปลา red seabream ที่แช่แข็งด้วย 15% DMSO มีความเหมาะสมมากที่สุดในการแช่แข็งเพื่อการเก็บรักษาในธนาคารน้ำเชื้อในระยะยาว

สรุปผลการทดลอง

1. คุณภาพสเปิร์มของปลาไนมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ โดยความหนาแน่นของสเปิร์มมีค่าสูงขึ้นในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่

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

3. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนด้วย DMSO โดยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาทีมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียสก่อนการแช่ในไนโตรเจนเหลว ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูง

4. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนด้วย DMSO โดยแช่แข็งในไอไนโตรเจนเหลวภายในกล่องโฟม 6 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูง

5. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนในปริมาณที่มากขึ้นด้วยการใช้หลอด Cryotube มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างจากการแช่แข็งด้วยการใช้หลอดฟาง

6. ระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย โดยเมื่อระยะเวลาเก็บรักษานานขึ้น ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงเล็กน้อย

7. การพัฒนาเทคโนโลยีในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแบบแช่แข็งในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อสามารถทำได้ทั้งด้วยการใช้หลอดฟางและหลอด Cryotube ด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้อ

อัตโนมัติ หรือการแช่แข็งในกล่องโฟมด้วยไอไนโตรเจนเหลว โดยน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลายสามารถปฏิสนธิไข่ได้แม้ว่าอัตราการปฏิสนธิต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสด

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

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

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

Abinawanto, Putri, P.E. 2017. Goramy spermatozoa quality after sub-zero freezing: The role of coconut water as the cryoprotectant. Cell Biology and Development Volume 1, Number 1. E-ISSN: 2580-4499. DOI: 10.13057/cellbioldev/v010101.

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.

Ashwood-Smith, M. J. 1980. Low temperature preservation of cells, tissues and organs. In: Low Temperature Preservation in Medicine and Biology. Edited by M. J. Ashwood-Smith, J. Farrant. pp 19-44.

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.

Bozkurt, Y. and Yavas, I. 2017. Effect of different straw volumes and thawing rates on post-thaw quality and fertilization ability of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. LIMNOFISH-Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research 3(1): 25-31.

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.

DeGraaf, J.D., King, W., Benton, C. and Berlinsky, D.L. 2004. Production and storage of sperm from the black sea bass *Centropristis striata* L. Aquaculture Research 35: 1457-1465.

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

Dzyuba, B., Bondarenko, O., Fedorov, P., Gazo, I., Prokopchuk, G. and Cosson, J. 2016. Energetics of fish spermatozoa: the proven and the possible. Aquaculture doi:10.1016/j. aquaculture.2016.05.038

Erdahl AW, Graham EF. 1987. Fertility of teleost semen as affected by dilution and storage in a seminal plasma-mimicking medium. Aquaculture 60: 311-321.

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.

Ji, X.S., Chen, S.L., Tian, Y.S., Yu, G.C., Sha, Z.X., Xu, M.Y. and Zhang, S.C. 2 0 0 4. Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) spermatozoa and feasibility for production-scale fertilization. Aquaculture 241:517-528.

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.

Kenneth, L. R., Chase, G. H., Edward, J. C., and Tiersch, T.R. 2004. Cryopreservation of sperm of red snapper. Aquaculture 23: 183-194.

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.

Liu, Q.H., Xiao, Z.Z., Xu, S.H., Ma, D.Y., Xiao, Y.S. and Li, J. 2012. Marine fish sperm cryopreservation and quality evaluation. In: Sperm Structure and Function,

Current Frontiers in Cryopreservation, Prof. Igor Katkov (Ed.), ISBN: 978-953-51-0302-8. pp. 239-252.

Liu, Q.H., Chen, Y.K., Xiao, Z.Z., Li, J., Xu, S.H. and Shi, X.U. 2010. Effect of storage time and cryoprotectant concentrations on the fertilization rate and hatching rate of cryopreserved sperm in red seabream (*Pagrus major* Temminck & Schlegel, 1843). Aquaculture Research 41: e89-e95. doi:10.1111/j.1365-2109.2009.02466.x

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.

Matthews, J.L., Murphy, J.M., Carmichael, C., Yang, H., 2, Tiersch, T., Westerfield, M. and Varga, Z.M. 2018. Changes to extender, cryoprotective medium, and In Vitro fertilization improve zebrafish sperm cryopreservation. ZEBRAFISH Volume 00, Number 00, Mary Ann Liebert, Inc. DOI: 10.1089/zeb.2017.1521.

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.

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.

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.

Sahinoz, E., Dogu, Z. and Aral, F. 2018. The Development of optimal cryopreservation media for longspine scraper (*Capoeta trutta*) sperm. Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology, 6(3): 380-386.

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.

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

Talwar, P. 2011. Semen banking and cryobiology. International journal of fertility and fetal medicine 2(2): 51-60.

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. Aquaculture 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.

Viveiros, A.T.M., Lock, E.J., Woelders, H. and Komen, J. 2001. Influence of cooling rates and plunging temperatures in an interrupted slow-freezing procedure for semen of the African catfish, *Clarias gariepinus*. Cryobiology 43: 276-287.

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.

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

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

ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่และหน้า)

1. 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 ทำให้ผู้ประกอบการมีทางเลือกในการเพาะพันธุ์ปลาด้วยการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งไม่ว่าจะแช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติหรือแช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม นอกเหนือไปจากการใช้น้ำเชื้อสดเท่านั้นในการเพาะพันธุ์