รหัสโครงการ SUT3-303-44-24-14

รายงานการวิจัย

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

(Cryopreservation of Striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* sperm)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร. สมร พรชื่นชูวงศ์

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2544-2545

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2547

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2544-2545 ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้เชี่ยวชาญด้าน Cryobiology, Dr. Amrit Bart จากสถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (AIT) ที่ให้คำแนะนำในงานวิจัย พร้อมทั้งสนับสนุนเครื่องมือในห้องปฏิบัติการ และขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์พื้นที่และอุปกรณ์สำหรับการวิจัย ตลอดจนเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทุกท่าน ที่ได้มีส่วนช่วยให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ผู้วิจัย

ตุลาคม 2547

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็งโดยใช้สาร cryoprotectant (dimethyl sulfoxide-DMSO, dimethyl acetamide-DMA, methanol-MeOH, and ethylene glycol-EG) สาร extenders (Calcium- Free Hanks' Balanced Salt Solution-C-F HBSS, Hanks' Balanced Salt Solution-HBSS and Sodium Chloride-NaCl) และอัตราการลดอุณหภูมิที่ one-step freezing rate (10 $^{\circ}$C/min) และ Two-step freezing rates (4 $^{\circ}$C/min จาก 3 $^{\circ}$C ถึง -4 $^{\circ}$C และ 11°C/min จาก -4 $^{\circ}$C ถึง -80°C) ซึ่งใช้ French straw ขนาด 250 µl เป็นตัวเก็บรักษาน้ำเชื้อ โดยใช้ Freezer control (CL 863) และ Cryogenesis Version 4 เป็นตัวควบคุมการลดอุณหภูมิระหว่างขบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวาย นำน้ำเชื้อปลาเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (-196°C) นาน 2 สัปดาห์ จากนั้นนำน้ำเชื้อปลาแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิห้องเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสาร cryoprotectants, extenders และอัตราการลดอุณหภูมิที่ one-step และ two-step ที่มีต่ออัตราการปฏิสนธิ การเคลื่อนที่ และ การมีชีวิตรอด ของน้ำเชื้อปลาแช่แข็ง ผลการศึกษาพบว่าอัตราการปฏิสนธิสูงสุด 41% (81% ของน้ำเชื้อสด) เมื่อใช้ DMSO (12%) + 0.9% NaCl ที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ one-step รองลงมาคือ อัตราการปฏิสนธิ 30% (51% ของน้ำเชื้อสด) เมื่อใช้ DMA (10%) + C-F HBSS ส่วนเมื่อทดสอบด้วย MeOH (5%)+ 0.9% NaCl ให้อัตราการปฏิสนธิสูงสุดเพียง 18% (38% ของน้ำเชื้อสด) และเมื่อทดสอบด้วย EG (10%)+ C-F HBSS ให้อัตราการปฏิสนธิเพียงแค่ 8% (12% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งต่ำที่สุดในกลุ่มสาร cryoprotectant ที่ใช้ในการศึกษา นอกจากนี้พบว่าไม่มีความแตกต่างของสาร extender ทั้ง 3 ชนิด (C-F HBSS, 0.9% NaCl และ HBSS) เมื่อทดสอบด้วยสาร cryoprotectant แต่ละชนิด และพบว่าความเข้มข้นของสาร cryoprotectant แต่ละชนิด และอัตราการลดอุณหภูมิที่ one-step และ Two-step ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ การเคลื่อนที่ และ การมีชีวิตรอด อย่างไรก็ตามในการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า อัตราการลดอุณหภูมิที่ one-step โดยใช้ DMSO หรือ DMA เป็นสาร cryoprotectant และ C-F HBSS หรือ 0.9% NaCl เป็นสาร extender มีความเหมาะสมที่จะใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้กับกลุ่ม *Pangasius* ชนิดอื่นๆ

นำผลการศึกษาที่ให้อัตราการปฏิสนธิ สูงสุดในแต่ละ Treatment ของการทดลองที่ 1 (DMSO (12%) + 0.9% NaCl, DMA (10%) + C-F HBSS และ MeOH (5%)+ 0.9% NaCl) มาศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมที่สามารถเก็บน้ำเชื้อก่อนขบวนการแช่แข็ง ณ ระยะเวลาต่าง (5, 10, 20 และ 40 นาที) และขณะเดียวกันนำน้ำเชื้อที่เก็บในระยะเวลาต่างๆ ดังกล่าว ไปศึกษาการถูกทำลายของเซลล์อสุจิโดยใช้ SEM จากการศึกษาพบว่า ระยะเวลาที่ 5 ถึง40 นาที สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายก่อนการแช่แข็งได้ เมื่อทดสอบด้วย DMSO หรือ DMA อย่างไรก็ตามเวลาที่เพิ่มขึ้นเป็น 40 นาที ไม่เหมาะสมเมื่อ

ทดสอบด้วย MeOH และเมื่อศึกษาเซลล์อสุจิถูกทำลายโดยใช้ SEM พบว่า เมื่อทดสอบด้วย MeOH สภาพเซลล์อสุจิถูกทำลาย (ส่วนหัวแยกออกจากส่วนหาง) มากกว่าเมื่อใช้ DMSO หรือ DMA

ABSTRACT

This present study examined the feasibility of cryopreservation of striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* sperm. Two studies were carried out: (1) the effects of extenders, cryoprotectants and freezing rates on fertilization, motility and viability of *P. hypophthalmus* sperm, (2) the effects of equilibration time (5, 10, 20 and 40 min) on fertilization, motility and viability rates, and (3) the use of Scanning Electron Microscope (SEM) to evaluate the cryodamage at different time (5, 10, 20 and 40 min). Effects of four cryoprotectants (dimethyl sulfoxide-DMSO, dimethyl acetamide-DMA, methanol-MeOH, and ethylene glycol-EG), three extenders (Calcium-Free Hanks' Balanced Salt Solution-C-F HBSS, Hanks' Balanced Salt Solution-HBSS and Sodium Chloride-NaCl), and two different freezing procedures (one-step and two-step) on the cryopreservation of striped catfish (*P. hypophthalmus*) sperm were investigated. Sperm were frozen using a controlled-rate freezer in 250 μL straws and stored for two weeks in a liquid nitrogen container. They were then airthawed at room temperature, and fertilization, motility and viability were assessed. The highest fertilization rate 41% (81% of control) was achieved with the combination of 12% DMSO and 0.9% NaCl using a one-step freezing procedure (10 ^{o}C min^{-1}). Dimethyl acetamide (DMA) resulted in a higher fertilization rate (30% or 51% of the control) than MeOH (18% or 38% of the control) or EG (8% or 12% of the control). In addition, the three extenders used did not affect fertilization rates after cryopreservation with each cryoprotectant. Fertilization, motility and viability rates were not significantly different among the three cryoprotectant concentrations and between one-step and two-step freezing procedures. However, fertilization rates of cryopreserved sperm were significantly lower than those of the controls. There was no correlation among fertilization, motility and viability rates. The results of this study indicated that high fertilization rates of striped catfish eggs can be achieved using cryopreserved sperm when frozen at 10 ^{o}C min^{-1} in DMSO or DMA with either 0.9% NaCl or C-F HBSS.

The highest fertilization rates from three cryoprotectants in the first study (12% DMSO+ 0.9% NaCl, 10% DMA+ C-F HBSS and 5% MeOH+ 0.9% NaCl) were used to assess the equilibration time at various times (5, 10, 20 and 40 min) on fertilization, motility and viability rates and also assessed the physical damage using SEM. Sperm samples from 5 successive steps fresh sperm and frozen sperm at various times (5, 10, 20 and 40 min) were evaluated. The equilibration

time during 5 to 40 min can be used to storage sperm before cryopreservation process when using DMSO or DMA treatment. However, with MeOH treatment a longer time storage at 40 min resulted in low fertilization rate. Ruptured plasma membranes and the loss of flagellum were commonly found in frozen sperm. Frequency of physically damaged spermatozoa diluted with the combination of 0.9% NaCl and 5% MeOH appeared to be higher than the other treatments (DMSO or DMA).

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อ	ข
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ฌ
บทที่ 1 บทนำ	
• ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	2
• วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
• ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	
• อุปกรณ์	4
• วิธีการศึกษา	6
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผลการวิจัย	
• ผลของระดับความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant สาร Extender และ Freezing rate ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง	19
• ผลของระยะเวลาที่เหมาะสม (Equilibration time) ที่ 5, 10, 20 และ 40 นาที ของสาร Cryoprotectant แต่ละชนิด ที่มีผลต่อน้ำเชื้อปลาสวายก่อนทำการแช่แข็ง และศึกษาการทำลายของเซลล์อสุจิ ณ ระยะเวลาต่างๆ ดังกล่าวโดยใช้ SEM	30
• ผลของระยะเวลาที่เหมาะสม (Equilibration time) ที่ 5, 10, 20 และ 40 นาที ของสาร Cryoprotectant แต่ละชนิด ที่มีผลต่อน้ำเชื้อปลาสวายก่อนทำการแช่แข็ง	30
• การศึกษาการถูกทำลายของเซลล์อสุจิ ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้ SEM	33
บทที่ 4 สรุป อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	37
• ผลของสาร Cryoprotectant สาร Extender และ Freezing rate	37
• ระยะเวลาที่เหมาะสม (Equilibration time) ของสาร Cryoprotectant แต่ละชนิดที่มีผลต่อน้ำเชื้อปลาก่อนการแช่แข็ง และศึกษาเซลล์อสุจิถูกทำลาย ณ เวลาต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 นาที)	38
• ข้อเสนอแนะ	38
บรรณานุกรม	39
ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย	42

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	หลักเกณฑ์การสังเกตเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ	7
ตารางที่ 2	ส่วนประกอบของสีย้อม eosin-nigrosin dye	13
ตารางที่ 3	ส่วนประกอบทางเคมี (g/L) และค่าออสโมลาลิตีของสาร Extender ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลาสวาย	15
ตารางที่ 4	ระดับความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant แต่ละชนิดที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง	15
ตารางที่ 5	แผนการทดลองการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง แบบ 3×3×2 Factorial design in RCD (Randomized completely design) ซึ่งประกอบด้วย 9 replications ต่อทรีทเมนต์	16
ตารางที่ 6	แผนการทดลอง ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสม (Equilibration time) ที่ 5, 10, 20 และ 40 นาที ของสาร Cryoprotectant แต่ละชนิด ที่มีผลต่อน้ำเชื้อปลาสวายก่อนทำการแช่แข็ง โดยใช้ อัตราการลดอุณหภูมิ ที่ 10 °C/min ซึ่งประกอบด้วย 9 replications ต่อทรีทเมนต์	18
ตารางที่ 7	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ในสาร Extender ทั้ง 3 ชนิด (HBSS, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับ สาร DMSO ที่ความเข้มข้น 8, 10 และ 12% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ One-step และ Two-step freezing rates	22
ตารางที่ 8	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ในสาร Extender ทั้ง 3 ชนิด (HBSS, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับ สาร DMA ที่ความเข้มข้น 8, 10 และ 12% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ One-step และ Two-step freezing rates	24
ตารางที่ 9	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ในสาร Extender ทั้ง 3 ชนิด (HBSS, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับ สาร MeOH ที่ความเข้มข้น 5, 8 และ 10% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ One-step และ Two-step freezing rates	26

สารบัญตาราง (ต่อ)

		หน้า
ตารางที่ 10	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ในสาร Extender ทั้ง 3 ชนิด (HBSS, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับ สาร EG ที่ความเข้มข้น 8, 10 และ 12% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ One-step และ Two-step freezing rates	28
ตารางที่ 11	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ที่เก็บรักษาในสาร 12%DMSO+ 0.9%NaCl ที่ระยะเวลา 5, 10, 20 และ 40 นาที	31
ตารางที่ 12	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ที่เก็บรักษาในสาร 10%DMA+ C-F HBSS ที่ระยะเวลา 5, 10, 20 และ 40 นาที	32
ตารางที่ 13	ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ที่เก็บรักษาในสาร 5%MeOH+ 0.9% NaCl ที่ระยะเวลา 5, 10, 20 และ 40 นาที	33

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	แผนภาพแสดงกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง	9
ภาพที่ 2 ก	ชุดควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่าง กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งโดยใช้ Freezer control (CL 863) ร่วมกับ Cryogenesis version 4 for windows	10
ภาพที่ 2 ข	แสดงการทำงานของชุดควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่าง กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งโดยมี PC with cryogenesis 4 (software) เชื่อมต่อกับ Freezer control (CL 863) และ Freezer control จะเป็นตัวควบคุมอุณหภูมิใน Cryochamber	11
ภาพที่ 3	กระชังไนล่อน (ก) และ Tank สำหรับฟักไข่ปลา (ข)	12
ภาพที่ 4	น้ำเชื้อมีชีวิตมีลักษณะสีขาว (ก) และน้ำเชื้อตายจะติดสีม่วงเข้ม (ข) เมื่อย้อมด้วยสี eosin-nigrosin	14
ภาพที่ 5	สภาพของเซลล์อสุจิเมื่อเก็บรักษาใน 12%DMSO+ 0.9%NaCl ที่ระยะเวลาต่าง ๆ 5, 10, 20 และ 40 นาที	34
ภาพที่ 6	สภาพของเซลล์อสุจิเมื่อเก็บรักษาใน 10%DMA+ C-F HBSS ที่ระยะเวลาต่าง ๆ 5, 10, 20 และ 40 นาที	35
ภาพที่ 7	สภาพของเซลล์อสุจิเมื่อเก็บรักษาใน 5%MeOH+ 0.9% NaCl ที่ระยะเวลาต่าง ๆ 5, 10, 20 และ 40 นาที	36

บทที่ 1

บทนำ

เนื่องจากในปัจจุบันผู้บริโภคได้ตระหนักถึงชนิดของสารอาหารที่บริโภคเพื่อลดค่าคอเลสเตอรอลในเลือด พบว่าโปรตีนจากเนื้อปลาและผลิตภัณฑ์ปลาเป็นที่นิยมรับประทานกันทั่วไปโดยเฉพาะในผู้สูงอายุ จึงทำให้ธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดโดยเฉพาะปลาน้ำจืดได้มีการพัฒนาระบบการเลี้ยงมาอย่างต่อเนื่อง ไม่ว่าจะเป็นทางด้านการจัดการ และด้านการปรับปรุงพันธุ์ แต่ก็ยังประสบปัญหาแหล่งที่อยู่อาศัยของสัตว์น้ำเสื่อมโทรมอันเนื่องมาจากผลกระทบของสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และการเกิดมลพิษในแหล่งน้ำซึ่งจะเป็นอันตรายต่อปลาโดยตรง จึงทำให้ปริมาณปลาลดลง โดยเฉพาะปลาในสกุล *Pangasius* เช่นปลาบึก (*Pangasius* gigas) ปลาเทโพ (*P. larnaudii*) และปลาเทพา (*P. sanitwongsei*) (สำนักงานคณะกรรมการพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ, 2539) จึงทำให้มีการนำเข้าปลาเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับเนื้อหมู และเนื้อไก่ ตั้งแต่ปี 1975 (Safina, 1995) ซึ่งเป็นการชี้ให้เห็นว่าปริมาณการผลิตยังไม่เพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภค และคาดว่าความต้องการผลิตภัณฑ์ประมงตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000 จะอยู่ในช่วง 120 - 130 ล้านตัน ซึ่งสูงกว่าปริมาณที่ผลิตได้ 30 -40%

ด้วยเหตุนี้การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็งจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งซึ่งจะแก้ปัญหาต่าง ๆ ที่กล่าวมาข้างต้นได้ เพราะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อในสภาพแช่แข็ง อีกทั้งยังช่วยชะลอการเพาะเลี้ยงในช่วงที่สภาพแวดล้อมไม่เหมาะ สามารถแก้ปัญหาในปลาที่ใกล้จะสูญพันธุ์ (Endangered species) หรือใช้โปรแกรมการผสมพันธุ์ปลา เช่น androgenesis (Thorrard et al., 2000) และผลิตปลาข้ามสายพันธุ์ (Hybridize species) เช่น Bart et al. (1998) ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งของ blue catfish, *Ictalurus furcatus* ผสมกับไข่ของ Channel catfish, *I. punctatus* โดยใช้ 10% DMSO เป็นสารป้องกันการทำลายน้ำเชื้อในขั้นตอนการแช่แข็ง นอกจากนี้ประโยชน์ของน้ำเชื้อแช่แข็งยังมีความสะดวกในการขนย้ายเมื่อเทียบกับปลามีชีวิต และสามารถแก้ปัญหาสำหรับปลาที่ไข่และน้ำเชื้อสุกไม่พร้อมกันเช่น *P. boucourti* (Khanh, 1999)

ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งพบว่ามีการศึกษามากกว่า 30 ชนิด ทั้งในปลาน้ำจืดและน้ำเค็ม (Rana, 1995 ; Leung and Jaemison, 1991 ; Scott and Baynes, 1980) แต่ส่วนใหญ่แล้วเป็นการศึกษาในปลาน้ำเค็มที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ สำหรับปลาน้ำจืดนั้นยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร ซึ่ง Bart and Dunham (1996), Stein and Bayrle (1978) ได้ศึกษาในปลา blue catfish และ common carp พบว่าประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งมีเพียง 32% และ 0% ตามลำดับ Pahdi and Mandal (1995) พบว่า 0.6% NaCl และ 10% glycerol สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อของ Asian freshwater catfish, *Heteropnuester fossilis and Clarias batrachus* สำหรับบ้านเราการศึกษาของ

นิศา (2539) พบว่าน้ำเกลือสูตร 0.85% in Phosphate buffer มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุก *Clarias* sp. ที่อุณหภูมิตู้เย็น 0 -6 °C ได้ดีกว่าน้ำยาสูตรอื่น ๆ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ ทัศนีย์และคณะ (2532) ซึ่งพบว่าการใช้ 0.85% NaCl ร่วมกับนมผง 7.5% และ 10% สามารถเก็บน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวและปลาสวายในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5 - 10 °C ได้ผลดีพอสมควร

สำหรับปลาในกลุ่ม *Pangasius*, Mongkonpunya และคณะ (1992) ใช้ "S16" ซึ่งประกอบด้วย 8.55% sucrose และใช้ 8% DMSO เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึก, *P. gigas* ซึ่งพบอัตราการปฏิสนธิ 53-57% เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด 76-80% และ 3 ปีต่อมา Mongkonpunya และคณะ พบว่าอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาบึกไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อใช้ BCB และ C-F HBSS เป็นสาร extender นอกจากนี้ Hambananda and Mongkonpunya (1996a) พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของ น้ำเชื้อปลาสวายไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) เมื่อใช้ C-F HBSS และ 0.85% NaCl เป็นสาร extenders และ Withler (1982) ใช้ 10% DMSO ร่วมกับ 189M และ 251 เป็นสาร extender เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย ซึ่งพบอัตราการปฏิสนธิแค่ 1% เท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งในสกุล *Pangasius* นอกจากนี้ผลวิจัยที่เป็นบวกเท่านั้นที่มีการตีพิมพ์ (Rana, 1995) ด้วยเหตุนี้โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในสกุล *Pangasius* โดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ปลาสวายเป็นตัวอย่างในการศึกษา ทั้งนี้เนื่องจากเป็นปลาที่สามารถหาได้ง่ายเมื่อเทียบกับ *Pangasius* ชนิดอื่นๆ และวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาที่ได้นี้จะนำไปประยุกต์ใช้กับปลาในกลุ่ม *Pangasius* ชนิดอื่นๆต่อไป พร้อมกันนี้ในการวิจัยได้มีการนำเทคโนโลยีคือ Freezer control (CL 863) และโปรแกรมการแช่แข็ง (Cryogenesis version 4) มาใช้เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการปฏิสนธิของน้ำเชื้อ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จะช่วยพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดและนำไปสู่การเพิ่มผลิตภัณฑ์ประมง ซึ่งจะเป็นการพัฒนาอุตสาหกรรมเกษตรด้านการประมงของประเทศไทยในอนาคตได้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสาร Cryoprotectants ชนิดต่าง ๆ ที่มีผลในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสาร Extenders ชนิดต่าง ๆ ที่มีผลในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย
3. เพื่อศึกษาความเหมาะสมของอุณหภูมิ ในขั้นตอนของการแช่แข็ง(Freezing rates)
4. เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสม (Equilibration time) ของสาร Cryoprotectants แต่ละชนิดที่มีผลต่อน้ำเชื้อปลาก่อนการแช่แข็ง และศึกษาการถูกทำลายของน้ำเชื้อแช่แข็งที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้ SEM

5. เพื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบสูตรของสาร Cryoprotectant สาร Extender และ freezing rate ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายทำให้ทราบระยะเวลาที่เหมาะสมของสาร Cryoprotectant แต่ละชนิดที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ก่อนการแช่แข็ง

บทที่ 2

วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย (*Pangasius hypophthalmus*) โดยวิธีการแช่แข็งมีระเบียบการ ดำเนินการวิจัยศึกษาทั้งในภาคสนามและในห้องปฏิบัติการ ในส่วนของห้องปฏิบัติการใช้ห้องปฏิบัติการของสถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (Asian Institute of Technology, AIT) ห้องปฏิบัติการสรีรและกายวิภาคสัตว์ อาคารเครื่องมือ 3 ห้องปฏิบัติการกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน อาคารเครื่องมือ 1 และภาคสนามใช้ฟาร์ม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เป็นสถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย โดยใช้วัสดุ-อุปกรณ์หลัก และสารเคมี พร้อมทั้งวิธีการศึกษา ดังนี้

1.อุปกรณ์

อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยประกอบด้วย

1.1 วัสดุและครุภัณฑ์

1) หลอดแช่แข็ง (French straws) ขนาด 0.25 ml
2) กระติกน้ำแข็ง
3) Heated haemostat
4) Slides และ cover slides
5) Bunsen light
6) กรรไกร และเข็มเขี่ย
7) Beakers (ขนาด 25, 50, 150, 250และ 500 ml)
8) กระบอกฉีดยาและเข็มฉีดยา
9) โกร่งบดฮอร์โมน
10) กระชังผ้าไนลอนขนาด 15× 20 cm
11) Glass Petri dish
12) Micro pipettes (ขนาด 10, 100, 200 และ 1000 ul)
13) Small and large pipettes tips
14) Liquid nitrogen containers dewar 20 XT (Taylor- Wharton U.S.A)
15) LN_2 storage with dispenser
16) Cryobath
17) Cryochamber
18) Cryocane
19) Cryo gloves

20) Digital thermometer (range –80 to 400 C)

21) Freeze control (CL 863)

22) Compound and Stereo microscope

23) Computer and Software operating manual (cryogenesis version 4 for windows)

24) ตู้เย็นปรับอุณหภูมิ 0-6 องศาเซลเซียส

25) สไลด์นับเม็ดโลหิต (Haemacytometer)

26) pH meter

27) กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope หรือ SEM; model JEOL, JSM 6400)

28) เทปสองหน้าขนาดบางสำหรับติดตัวอย่างบนสตับ (stub)

29) สตับ (stub)

30) เครื่องทำให้แห้งที่จุดวิกฤติ (Critical Point Dryer, CPD) รุ่น Samdri- PvT-3B

31) เครื่องฉาบทอง (Ion sputter) รุ่น JFC-1100 E

32) ฟิล์มถ่ายรูปขาวดำ VP 120 ใช้กับ SEM

33) Vortex mixer

1.2 สารเคมี

1.2.1 สารเคมีสำหรับศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

1) น้ำกลั่น

2) ไนโตรเจนเหลว

3) Glucose ($C_6H_{12}O_6$)

4) Sodium chloride (NaCl)

5) Potasium chloride (KCl)

6) Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)

7) Potasium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)

8) Calcium chloride dihydrate ($CaCl_2.2H_2O$)

9) Magnesium sulphate heptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$)

10) Disodium hydrogen phosphate heptahydrate ($Na_2HPO_4.7H_2O$)

11) Methanol

12) Dimethyl sulfoxide (DMSO)

13) Dimethyl acetamide (DMA)

14) Ethylene glycol (EG)

15) Luteinizing hormone releasing hormone analog (LHRHa; Suprefact)

16) Domperidone (Motilium)

17) Eosin B

18) Nigrosin

19) Sodium citrate dihydrate

1.2.2 สารเคมีสำหรับเตรียมตัวอย่างน้ำเชื้อปลาแช่แข็ง เพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด

1. กลูตารัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) 3% และออสเมียมเตตระออกไซด์ (osmium tetraoxide) 1% สำหรับ fix น้ำเชื้อปลา
2. เอทานอล 30%, 50%, 70%, 90%, 95 และ 100% สำหรับดีไฮเดรทตัวอย่าง
3. สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer solution) สำหรับล้างตัวอย่าง
4. ทองสำหรับฉาบผิวตัวอย่าง

2. วิธีการศึกษา

2.1 ภาคสนาม

2.1.1 การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลาสวาย นำพ่อแม่พันธุ์ปลาสวายน้ำหนักเฉลี่ย 3 กิโลกรัม/ตัว ยาวประมาณ 50 cm เลี้ยงไว้ในบ่อดินที่ความหนาแน่น 5-10 Kg/m^2 ให้อาหาร 1 เปอร์เซ็นต์/น้ำหนักตัว วันละ 1 ครั้ง โดยเป็นอาหารเม็ดลอยน้ำ (อาหารปลาดุกใหญ่, 9912) ซึ่งมีโปรตีน 30% เลี้ยงเป็นเวลา 5 เดือน ก่อนมาทำการทดลอง

2.1.2 เมื่อถึงฤดูผสมพันธุ์ ก่อนทำการทดลองนั้นต้องคัดพ่อแม่พันธุ์ปลาสวายจากบ่อดินมาพักไว้ในกระชังขนาด 2×8 m โดยแยกเป็นกระชังเพศผู้และเพศเมีย ก่อนทำการฉีดฮอร์โมนนำพ่อแม่พันธุ์ในกระชังมาใส่ในกระชังไนลอนขนาด 1 m^2 โดยแยกเพศผู้และเพศเมีย และต้องงดอาหารอย่างน้อยเป็นเวลา 6-12 ชม.

2.1.3 การกระตุ้นการพัฒนาของอสุจิและการพัฒนาของไข่ โดยการฉีดฮอร์โมน พ่อแม่พันธุ์ปลาสวายที่นำมาฉีดฮอร์โมนต้องเป็นปลาที่แข็งแรง ไม่เป็นโรค ซึ่งพ่อแม่พันธุ์ปลาควรมีลักษณะดังนี้

1) ปลาสวายเพศผู้ ลักษณะส่วนท้องเรียบไม่นูน พื้นท้องแข็งกว่าตัวเมีย ลักษณะช่องเพศเป็นรูปวงรี แคบเล็กสีแดงอ่อน และเมื่อใช้มือบีบที่ช่องเพศเบา ๆ จะมีน้ำเชื้อสีขาวไหลออกมาเห็นได้ชัดเจน
2) ปลาสวายเพศเมีย ลักษณะส่วนท้องอูมเป่ง กลม นูนออกเห็นได้ชัด พื้นท้องนิ่มมาก ลักษณะช่องเพศเป็นรูปวงรี กว้างใหญ่กว่าเพศผู้ นอกจากนี้ช่องเพศยังบวมเป่งมีสีแดงเข้ม

2.1.4 วิธีการฉีดฮอร์โมนใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ (LHRHa, Suprefact) ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์ Domperidone (Motilium) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

1) ปลาสวายเพศผู้ ใช้ Suprefact 30 ug/Kg ร่วมกับ Motilium 5 mg/Kg หลังจากนั้น 6-8 ช. ม. ทำการรีดน้ำเชื้อโดยใช้หลอดฉีดยา (ขนาด 5 ml) ดูดน้ำเชื้อ ในการรีดน้ำเชื้อใช้ผ้าขนหนูสะอาดเช็ดตัวปลาให้แห้ง และใช้กระดาษทิชชูซับบริเวณติ่งเพศ (Urogenital pore) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากน้ำ เลือด ปัสสาวะ และของเสียอื่น ๆ
2) ปลาสวายเพศเมีย ในปลาเพศเมียนั้นจะทำการฉีดฮอร์โมน 2 เข็ม ซึ่งเข็มแรกฉีดเพื่อกระตุ้นการพัฒนาของไข่ โดยใช้ Suprefact 10 ug/Kg ร่วมกับ Motilium 5 mg/Kg หลังจากนั้น 10 ชม. จึงฉีดเข็มที่ 2 เพื่อกระตุ้นการตกไข่ โดยใช้ Suprefact 30 ug/Kg ร่วมกับ Motilium 5 mg/Kg จากนั้น 6-8 ช.ม. ทำการรีดไข่ ก่อนรีดไข่ใช้ผ้าขนหนูที่สะอาดทำความสะอาดตัวปลาและใช้กระดาษทิชชู ซับบริเวณติ่งเพศ แล้วใช้ภาชนะที่แห้งและสะอาดรองรับไข่ (กาละมังพลาสติก) เพื่อนำไปทดสอบการปฏิสนธิ

2.2 ในห้องปฏิบัติการ

2.2.1 การศึกษาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ

นำน้ำเชื้อที่รีดได้มาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ เพื่อดูเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิน้ำเชื้อที่จะนำไปเก็บรักษาน้ำเชื้อต้องมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไม่น้อยกว่า 50% การศึกษาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิทำได้โดยการหยดน้ำกลั่น 1หยด (20 ul) ลงบนสไลด์ และหยดน้ำเชื้อ 1 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วสังเกตการเคลื่อนที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40×) โดยเกณฑ์การเคลื่อนที่ของอสุจิ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 หลักเกณฑ์การสังเกตเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ

หลักเกณฑ์	หมายเลข	% การเคลื่อนที่
อสุจิทุกตัวเคลื่อนที่	4	100
อสุจิส่วนใหญ่เคลื่อนที่ (3/4)	3	75
อสุจิบางตัวเคลื่อนที่ (2/4)	2	50
อสุจิส่วนใหญ่ไม่เคลื่อนที่ มีเพียงเล็กน้อยที่เคลื่อนที่ (1/4)	1	25
อสุจิไม่มีการเคลื่อนที่	0	-

ดัดแปลงมาจาก: Guest (1973)

2.2.2 การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อ (จำนวนอสุจิต่อหนึ่งมิลลิลิตร)

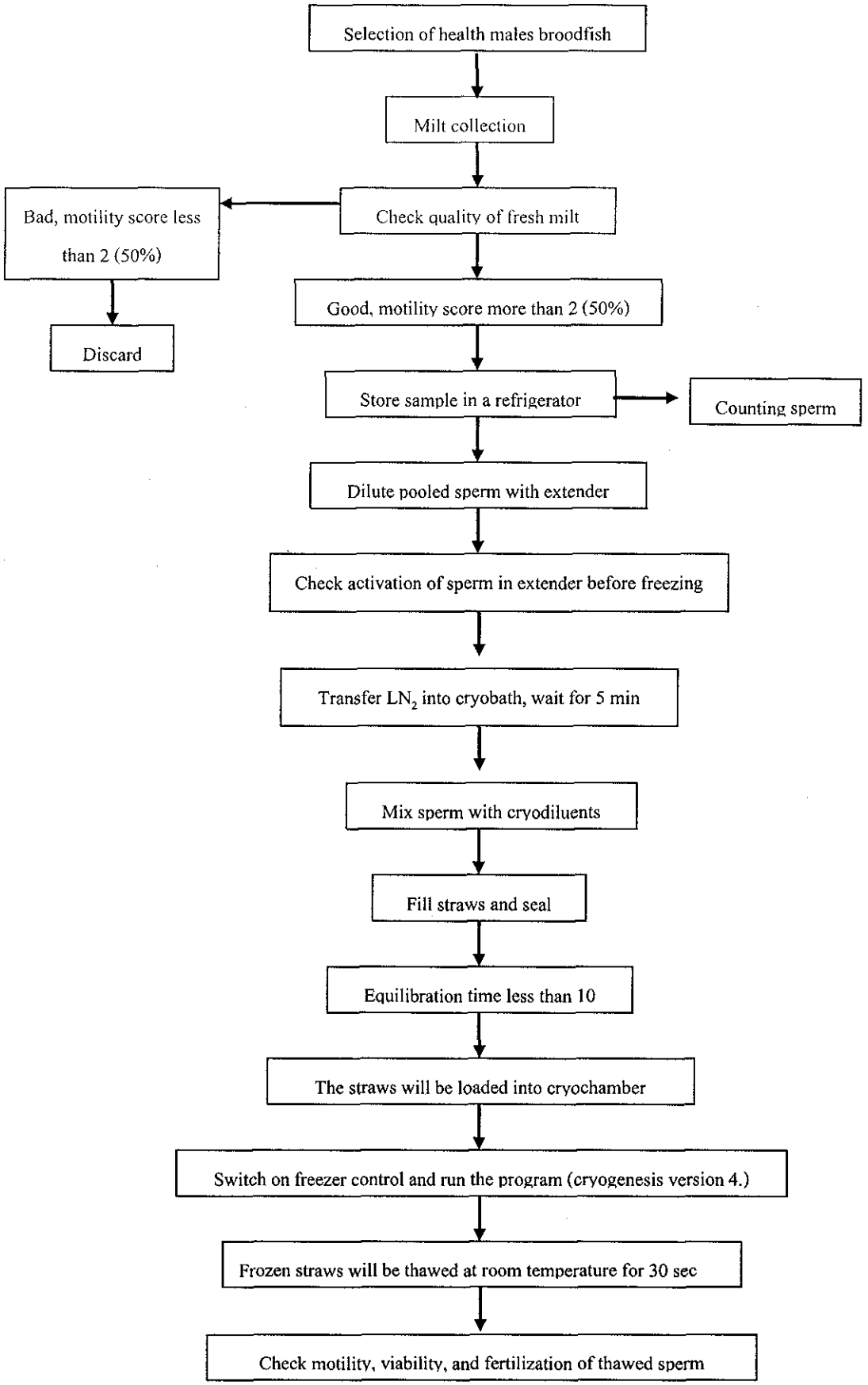
การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อ ทำได้โดยเจือจางน้ำเชื้อสดด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1: 2000 เท่า แล้วนับจำนวนอสุจิ โดยใช้สไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (Hemacytometer counting chamber) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40×) นับจำนวนอสุจิจากช่องมุม

บน-ล่างทั้ง 4 มุม และช่องตรงกลาง รวม 5 ช่อง แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนอสุจิที่นับได้ต่อ 1 ml ดังนี้

จำนวนอสุจิ / มิลลิลิตร = (รวมจำนวนอสุจิที่นับได้ทั้ง 5 บริเวณ / 5)×dilution rate×25×10^4

2.2.3 ขั้นตอนและวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา

นำน้ำเชื้อที่ผ่านการตรวจคุณภาพจากข้อ 2.2.1 (เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่) มาเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง มีขั้นตอนและระเบียบวิธีการวิจัยดังแสดงในแผนภาพที่ 1.



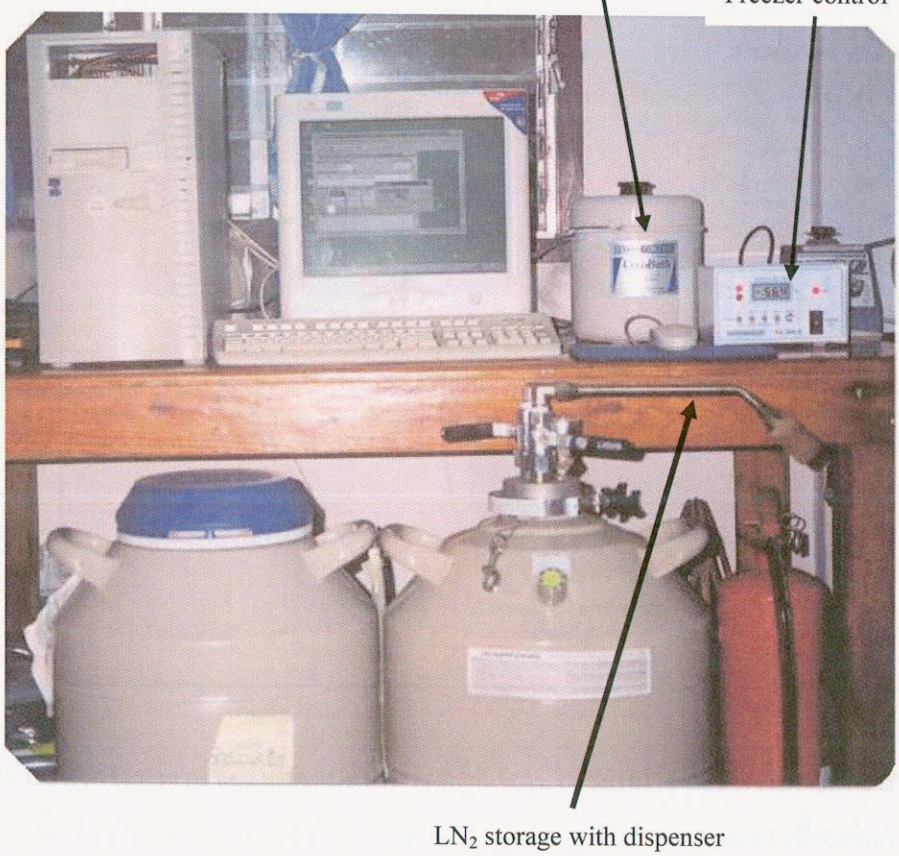
ภาพที่ 1. แผนภาพแสดงกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

2.2.4 Freezing instrumentation

ในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่เย็น ใช้ Freezer control (CL 863), cryobath, cryochamber และ Cryognisis version 4 for windows (Cryologic, Pty Ltd., Australia 1998 and 1999) เป็นตัวช่วยในการควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่างการแช่เย็น (ภาพที่ 2 ก) โดยการศึกษาใช้อัตราการลดอุณหภูมิ ดังนี้

- One-step freezing procedure โดยการลดอุณหภูมิที่ 10 °C/min
- Two-step freezing procedure โดยการลดอุณหภูมิที่ 4 °C/min จาก 3 °C ถึง -4 °C และ 11°C/min จาก -4 °C ถึง -80°C

ก



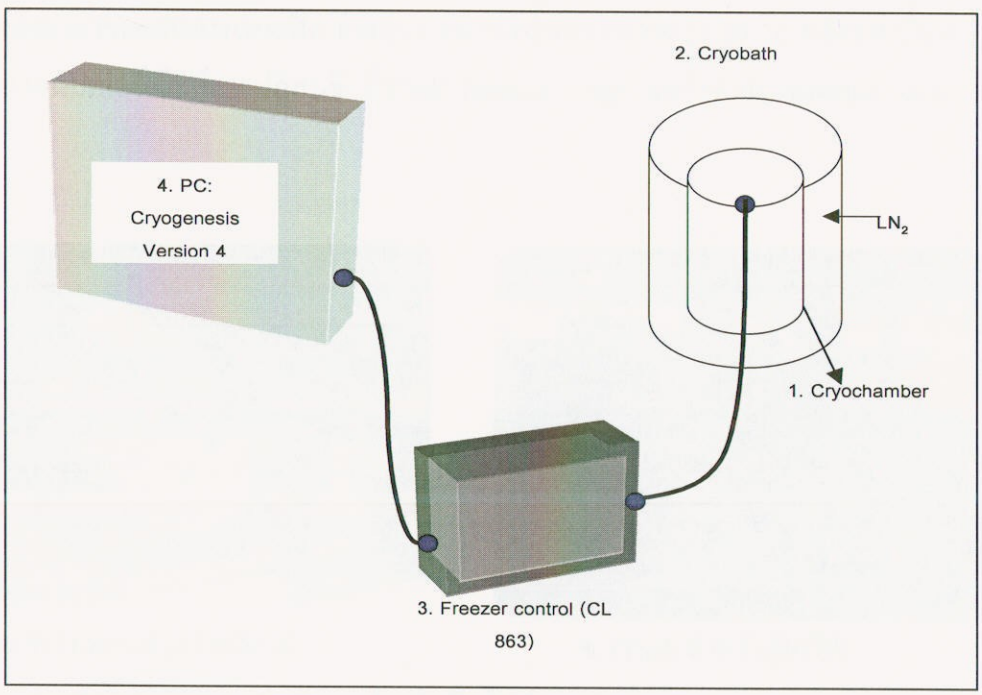
ภาพที่ 2 ก. ชุดควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่าง กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่เย็น โดยใช้ Freezer control (CL 863) ร่วมกับ Cryogenesis version 4 for windows

ขั้นตอนการเตรียม Freezer control และ คอมพิวเตอร์เพื่อควบคุมการลดอุณหภูมิ มีขั้นตอนดังนี้

1) นำ Cryobath ใส่ไนโตรเจนเหลว (LN_2) สูงประมาณ 15 cm ใส่ Cryochamber ลงใน Cryobath แล้วปิดฝา โดยที่ Cryochamber จะต่อกับ Freezer control (CL 863) และ Freezer control ต่อกับคอมพิวเตอร์อีกทีเพื่อควบคุมการทำงาน ดังแสดงใน ภาพที่2 ข

2) เลือกช่วงอุณหภูมิที่ต้องการ โดยใช้เมนู EXECUTE จากโปรแกรม Cryogenesis

3) นำตัวอย่างน้ำเชื้อที่ Load ใส่ French straws เรียบร้อยแล้วใส่ใน Cryochamber และรอให้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ทำงาน จนอุณหภูมิที่ Freezer control (CL 863) ถึง -80 °C จึงนำเอาตัวอย่างน้ำเชื้อออกจาก Cryochamber แล้วไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196 °C) จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การเคลื่อนที่ และการมีชีวิตของอสุจิต่อไป



ภาพที่ 2 ข. แสดงการทำงานของชุดควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่าง กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งโดยมี PC with cryogenesis 4 (software) เชื่อมต่อกับ Freezer control (CL 863) และ Freezer control จะเป็นตัวควบคุมอุณหภูมิใน Cryochamber

2.2.5 การศึกษาเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1) รีดไข่ปลาสวายหลังจากการฉีดฮอร์โมนเข็มที่สองมาแล้ว 6-8 ช.ม. ซึ่งไข่ปลาที่ดีมีลักษณะสีเหลืองนวลและโปร่งแสง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-1.2 mm

2) ใช้ไมโครปิเปตดูดไข่ 100 ul (ประมาณ 200 ฟอง) ใส่จานแก้ว (Glass petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 cm

3) ดูดน้ำเชื้อสด 30 ul (ตัวควบคุม) และน้ำเชื้อแช่เย็น 220 ul ลงไปผสมกับไข่ (มีอสุจิประมาณ 6.9×10^6 ตัวต่อไข่ 1 ฟอง)โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำต่อทรีทเมนต์

4) ใช้ขนไก่คนไข่และน้ำเชื้อให้เข้ากัน หลังจากนั้นค่อย ๆ เติมน้ำสำหรับการเพาะฟักลงไปประมาณ 25 ml ทิ้งไว้ 3 นาที แล้วล้างน้ำเชื้อส่วนเกินและเมือกออก

5) นำจานแก้วใส่ลงในกระชังเพาะฟักขนาด 15×20 cm (ภาพที่ 3 ก) ที่มีการให้อากาศในน้ำตลอดเวลาขณะทำการเพาะฟัก ช่วงอุณหภูมิของน้ำอยู่ระหว่าง 25-29 °C หลังจากนั้น 4 ช.ม. ทำการตรวจนับเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ ที่ระยะ blastula stage จนถึงระยะ gastrula stage (ชั่วโมงที่ 7)

ก. (กระชังไนล่อนสำหรับฟักไข่)

ข. (Tank สำหรับฟักไข่)

ภาพที่ 3. กระชังไนล่อน (ก) และ Tank สำหรับฟักไข่ปลา (ข)

2.2.6 การศึกษาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (Viability)

การศึกษาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต ทำได้โดยวิธีการย้อมสี dye, eosin-nigrosin (ส่วนประกอบสีย้อมแสดงในตารางที่ 2 และวิธีการเตรียมสีย้อมดังนี้

ตารางที่ 2. ส่วนประกอบของสีย้อม eosin-nigrosin dye

ส่วนประกอบสารเคมี	ปริมาณ
Eosin B	1 (g)
Nigrosin	5 (g)
Sodium citrate dihydrate	1.5 (g)
Distilled water	100 (ml)

ที่มา: Hambananda (1996)

วิธีการเตรียมสีย้อมสำหรับดูตัวเป็นตัวตายสามารถเตรียมได้ดังนี้

ชั่ง Eosin B 1 กรัม, Nigrosin 5 กรัม, Sodium citrate dihydrate 1.5 กรัม ใส่ใน Bigger และเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ต้องให้ความร้อนขณะเตรียมสารเพราะสารจะไม่ละลาย เมื่อสารละลายเข้ากันดีแล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองจนไม่มีตะกอนเหลืออยู่ แล้วนำสีย้อมที่ได้เก็บไว้ในขวดสีชาโดยเก็บที่อุณหภูมิห้อง

ขั้นตอนการศึกษาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตมีขั้นตอนดังนี้

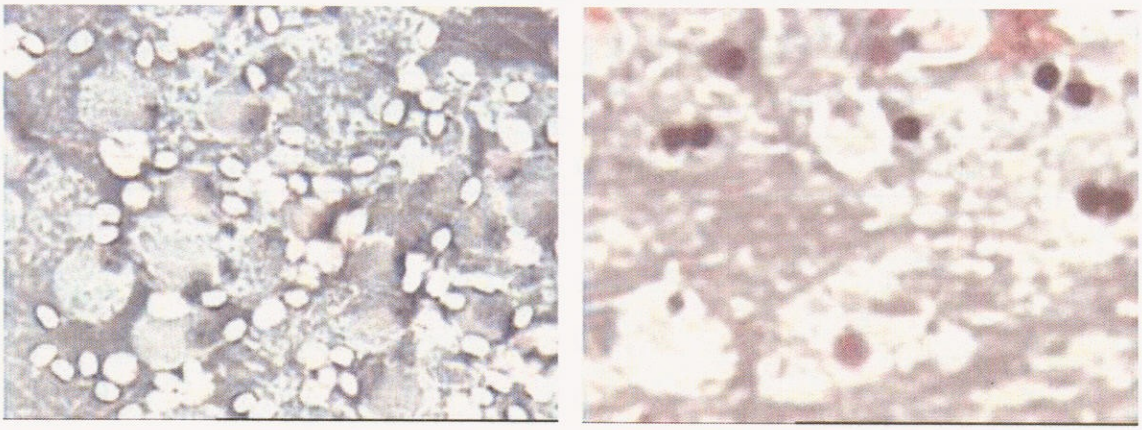
1. หยดสาร Eosin-Nigrosin dye ลงบนแผ่นสไลด์ 1หยด (20 μL) แล้วหยดน้ำเชื้อแช่แข็งของแต่ละกลุ่มการทดลองลงข้างๆสีย้อมประมาณ 5 μL

2. ใช้เข็มเขี่ย Smear น้ำเชื้อกับสีย้อมให้เข้ากันจากนั้นใช้แผ่นสไลด์อีกแผ่นหนึ่งเกลี่ยน้ำเชื้อให้กระจายบางๆ โดยเกลี่ยเพียงครั้งเดียว

3. นำแผ่นสไลด์ที่เกลี่ยแล้วไปผ่านเปลวไฟประมาณ 1-2 ครั้งให้น้ำเชื้อแห้ง

4. หยดน้ำยาทาเล็บลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยดแล้วปิดด้วย Cover slide แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

5. นับจำนวนเซลล์ตัวเป็นและตัวตายโดยการสุ่มนับ 5 บริเวณๆ ละ 20 เซลล์ โดยที่เซลล์ตัวเป็นจะมีลักษณะสีขาวไม่ติดสีย้อม ส่วนตัวตายจะติดสีย้อมเป็นสีชมพูแดงหรือสีม่วง (ภาพที่ 4)



ก. (100X) ข. (100X)

ภาพที่ 4. น้ำเชื้อมีชีวิตมีลักษณะสีขาว (ก) และน้ำเชื้อตายจะติดสีม่วงเข้ม (ข) เมื่อย้อมด้วยสี eosin-nigrosin

การทดลองที่ 1. ศึกษาระดับความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant สาร Extenders และ Freezing rates ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

ขั้นตอนการทดลอง

1. นำน้ำเชื้อสดที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ จากข้อ 2.2.1 (เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่) มาเจือจางด้วยสาร Extender แต่ละชนิด (HBSS, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ส่วนประกอบสาร Extender แต่ละชนิด แสดงในตารางที่ 3 ในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อสาร Extender เท่ากับ 1:3 หลังจากนั้นเติมสาร Cryoprotectant แต่ละชนิด (DMA, DMSO, EG หรือ MeOH) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังตารางที่ 4

2. ดูดน้ำเชื้อปริมาณ 230 µL ใส่หลอดแช่แข็ง (French straw ขนาด 250 µL) โดยใช้ไมโครปิเปต แล้วปิดหลอดแช่แข็งโดยใช้ Heated haemostat ซึ่งหลังจากที่เติมสาร Cryoprotectant จะเริ่มจับเวลาจนถึงการนำหลอดแช่แข็งใส่ลงใน Cryochamber ใช้เวลาประมาณ 8-10 นาที

3. นำ Straws ใส่ลงใน Cryochamber ปิดฝาตั้งอุณหภูมิที่ต้องการดังนี้

• One-step freezing procedure โดยการลดอุณหภูมิ 10 $^{\circ}$C/min

•Two-step freezing procedures โดยการลดอุณหภูมิที่ 4 $^{\circ}$C/min จาก 3 $^{\circ}$C ถึง -4 $^{\circ}$C และ 11°C/min จาก -4 $^{\circ}$C ถึง -80°C จากนั้นรอให้คอมพิวเตอร์และ Freezer control (CL 863) ทำงานจนอุณหภูมิที่ Freezer control (CL 863) ถึง -80°C จึงนำ Straws ออกจาก Cryochamber แล้วไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C ซึ่งน้ำเชื้อแช่แข็งนี้จะนำไปทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การเคลื่อนที่ และการมีชีวิตของอสุจิต่อไป

ตารางที่ 3. ส่วนประกอบทางเคมี (g/L) และค่าออสโมลาลิตีของสาร Extender ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลาสวาย

ส่วนประกอบสารเคมี (g)	สาร Extender		
	HBSS	C-F HBSS	0.9% NaCl
$CaCl_2.2H_2O$	0.16	-	-
NaCl	8	8.89	9
KCl	0.4	0.44	-
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	0.22	-
$Na_2HPO_4.7H_2O$	0.12	0.13	-
KH_2PO_4	0.06	0.07	-
$NaHCO_3$	0.35	0.39	-
Glucose	1.00	1.11	-
น้ำกลั่น	1000	1000	1000
$Mosmol.Kg^{-1}$	286	320	-
Reference	Mongkonpunya et al., 1995	Mongkonpunya et al., 1995	Mongkonpunya et al., 1995

ตารางที่ 4. ระดับความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant แต่ละชนิดที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

สาร Cryoprotectant	ความเข้มข้น (%)
Dimethyl acetamide (DMA)	8, 10 และ 12
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	8, 10 และ 12
Ethylene glycol (EG)	8, 10 และ 12
Methanol (MeOH)	5, 8 และ 10

2. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ใช้แผนการทดลองแบบ 3×3×2 Factorial design in RCD (Randomized completely design) เปรียบเทียบสาร Extender 3 ชนิด (HBSS, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ระดับความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant (8, 10, 12% สำหรับสาร DMA, DMSO, EG และ 5, 8, 10% สำหรับสาร MeOH) และอัตราการลดอุณหภูมิที่ One-step freezing rate (10 °C/min) และ Two-step freezing rates 4 °C/min จาก 3 °C ถึง -4 °C และ 11°C/min

จาก -4 °C ถึง -80°C (แผนการทดลองแสดงในตารางที่ 5) วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance, two way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยวิธี Turkey' test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 10.1 for Windows (Kinnear and Gray, 2000)

ตารางที่ 5 แผนการทดลองการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง แบบ 3×3×2 Factorial design in RCD (Randomized completely design) ซึ่งประกอบด้วย 9 replications ต่อทรีทเมนต์

อัตราการลดอุณหภูมิ	Extender	Cryoprotectant	Treatment
One-step	HBSS	8% DMA	1
	HBSS	10% DMA	2
	HBSS	12% DMA	3
	C-F HBSS	8% DMA	4
	C-F HBSS	10% DMA	5
	C-F HBSS	12% DMA	6
	0.9% NaCl	8% DMA	7
	0.9% NaCl	10% DMA	8
	0.9% NaCl	12% DMA	9
Two-steps	HBSS	8% DMA	10
	HBSS	10% DMA	11
	HBSS	12% DMA	12
	C-F HBSS	8% DMA	13
	C-F HBSS	10% DMA	14
	C-F HBSS	12% DMA	15
	0.9% NaCl	8% DMA	16
	0.9% NaCl	10% DMA	17
	0.9% NaCl	12% DMA	18
Control			19

การทดลองที่ 2. ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสม (Equilibration time) ที่ 5, 10, 20 และ 40 นาที ของสาร Cryoprotectant แต่ละชนิด ที่มีผลต่อน้ำเชื้อปลาสวายก่อนทำการแช่แข็ง และศึกษาการถูกทำลายของน้ำเชื้อแช่แข็งที่ระยะเวลาต่างๆ ดังกล่าวโดยใช้ SEM

การทดลองนี้เป็นการทดลองต่อเนื่องจากการทดลองที่ 1 โดยเลือกสาร Cryoprotectant กับ Extender แต่ละชนิดที่ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุด คือ 12% DMSO+ 0.9% NaCl, 10% DMA+ C-F HBSS และ 5% MeOH+ 0.9% NaCl ซึ่งในการทดลองนี้ไม่ใช้สาร EG เป็นสาร Cryoprotectant เพราะให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิต่ำมาก ดังนั้นจึงนำสาร Cryoprotectant และ Extender แต่ละชนิดที่กล่าวมา โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ One-step procedure (10 $^{\circ}$C/min) มาทดสอบ Equilibration time ที่ 5, 10, 20 และ 40 นาที ตามลำดับ (แผนการทดลองแสดงในตารางที่ 6) และศึกษาการถูกทำลายของน้ำเชื้อแช่แข็งที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้ SEM ซึ่งมีลำดับขั้นการทดลองดังนี้

ขั้นตอนการทดลอง

1. นำน้ำเชื้อสดที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ (อัตราการเคลื่อนที่มากกว่า 50%) มาเจือจางกับสาร Extender (0.9% NaCl หรือ C-F HBSS) ในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อสาร Extender เท่ากับ 1: 3 หลังจากนั้นเติมสาร Cryoprotectant แต่ละชนิดซึ่งมีความเข้มข้นดังนี้ 12% DMSO, 10% DMA และ 5% MeOH

2. ดูดน้ำเชื้อปริมาตร 230 µL ใส่หลอด French straw ขนาด 250 µL โดยใช้ไมโครปิเปต แล้วปิดStraws โดยใช้ Heated haemostat ซึ่งหลังจากที่เติมสาร Cryoprotectant จะเริ่มจับเวลาจนถึงการนำ Straws ใส่ลงใน Cryochamber โดยกำหนด Equilibration time ที่ 5, 10, 20 และ 40 นาที สำหรับสาร Cryoprotectant แต่ละชนิด

3. นำ Straws ใส่ลงใน Cryochamber ปิดฝาเซตอัตราการลดอุณหภูมิ ที่ 10 $^{\circ}$C/min จากนั้นรอให้คอมพิวเตอร์และ Freezer control ทำงานจนอุณหภูมิที่ Freezer control ถึง -80°C ซึ่งใช้เวลาประมาณ 11 นาที จึงนำ Straws ออกจาก Cryochamber แล้วไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 $^{\circ}$C ซึ่งน้ำเชื้อแช่แข็งนี้จะนำไปทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การเคลื่อนที่ และการมีชีวิตของอสุจิต่อไป เพื่อดูผลของ Equilibration time ที่ 5, 10, 20 และ 40 นาที

4. ตรวจสอบน้ำเชื้อแช่แข็งถูกทำลายที่ระยะเวลาต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 นาที) โดยใช้ SEM ซึ่งวิธีการศึกษาดัดแปลงจาก Hampananda (1996)

ตารางที่ 6. แผนการทดลอง ศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสม (Equilibration time) ที่ 5, 10, 20 และ 40 นาที ของสาร Cryoprotectant แต่ละชนิด ที่มีผลต่อน้ำเชื้อปลาสวายก่อนทำการแช่แข็ง โดยใช้ อัตราการลดอุณหภูมิ ที่ 10 $^{\circ}$C/min ซึ่งประกอบด้วย 9 replications ต่อทรีทเมนต์

Equilibration time (min)	Cryoprotectant + Extender	Treatment
5	12% DMSO + 0.9% NaCl	1
	10% DMA + C-F HBSS	2
	5% MeOH + 0.9% NaCl	3
10	12% DMSO + 0.9% NaCl	1
	10% DMA + C-F HBSS	2
	5% MeOH + 0.9% NaCl	3
20	12% DMSO + 0.9% NaCl	1
	10% DMA + C-F HBSS	2
	5% MeOH + 0.9% NaCl	3
40	12% DMSO + 0.9% NaCl	1
	10% DMA + C-F HBSS	2
	5% MeOH + 0.9% NaCl	3
		4 น้ำเชื้อสด

2. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลของระยะเวลาที่เหมาะสม (Equilibration time) ที่ 5, 10, 20 และ 40 นาที ของสาร Cryoprotectant ในแต่ละ treatment โดยใช้ วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA ดังแผนการทดลองในตารางที่ 6 และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยวิธี Duncan' test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 10.1 for Windows (Kinnear and Gray, 2000)

บทที่ 3

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล และสรุปผลการวิจัย

1. ผลของระดับความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant สาร Extender และ Freezing rate ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการทดลองการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ DMSO เป็นสาร Cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้น 8, 10 และ 12% ร่วมกับสาร Extender 3 ชนิด (HBSS, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ One-step freezing rate (10 $^{\circ}$C/min) และ Two-step freezing rates (4 $^{\circ}$C/min จาก 3 ถึง -4°C และ 11 $^{\circ}$C/min จาก -4 ถึง -80 $^{\circ}$C) พบว่าเมื่อใช้ 12% DMSO+0.9% NaCl ที่ One-step และ มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดเท่ากับ 40.77$\pm$1.65% (81% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิที่ One-step และ Two-step freezing rates ในแต่ละความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant (8, 10 และ 12%) และสาร Extender ทั้ง 3 ชนิด ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) (ตารางที่ 7) นอกจากนี้ยังไม่มีความแตกต่างกับน้ำเชื้อสด เมื่อทดสอบการมีชีวิต พบว่าใน 10% DMSO+HBSS ที่ One-step มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 35.77$\pm$1.98% (48% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งในสาร Extender ทั้ง 3 ชนิด ที่ One-step กับ Two-step มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แต่เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตต่ำแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับน้ำเชื้อสด ($p<0.05$) เมื่อทดสอบการเคลื่อนที่ของอสุจิ พบว่าใน 12% DMSO+C-F HBSS ที่ One-step มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงสุดเท่ากับ 58.68$\pm$10.00% (66% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งในแต่ละความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant (8, 10 และ 12%) และสาร Extender ทั้ง 3 ชนิด ที่ One-step กับ Two-step มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แต่เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ต่ำแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับน้ำเชื้อสด ($p<0.05$) (ตารางที่ 7)

จากการทดลองการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ DMA เป็นสาร Cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้น 8, 10 และ 12% ร่วมกับสาร Extender 3 ชนิด (HBSS, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ One-step (10 $^{\circ}$C/min) และ Two-step (4 $^{\circ}$C/min จาก 3 ถึง -4°C และ 11 $^{\circ}$C/min จาก -4 ถึง -80 $^{\circ}$C) พบว่าเมื่อใช้ 10%DMA+C-F HBSS ที่ One-step มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดเท่ากับ 29.66$\pm$0.55% (51% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งในแต่ละความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant (8, 10 และ 12%) และสาร Extender ทั้ง 3 ชนิด ที่ One-step กับ Two-step มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แต่มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิต่ำและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับน้ำเชื้อสด ($p<0.05$) เมื่อทดสอบการมีชีวิต พบว่าใน 12%DMA+0.9% NaCl ที่ One-step มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 52.88$\pm$13.52% (64% ของน้ำเชื้อสด) และพบว่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตระหว่างสาร HBSS กับ C-F HBSS และ C-F

HBSS กับ 0.9% NaCl ไม่มีความแตกต่าง แต่เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตระหว่างสาร HBSS กับ 0.9% NaCl มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) ซึ่งสาร Extender ทั้ง 3 ชนิด มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตต่ำและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อสด ($p<0.05$) เมื่อทดสอบการเคลื่อนที่ของอสุจิ พบว่าใน 10%DMA+0.9% NaCl ที่ One-step มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงสุดเท่ากับ 41.32±5.00% (47% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งในแต่ละความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant (8, 10 และ 12%) และสาร Extender ทั้ง 3 ชนิด ที่ One-step กับ Two-step มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แต่เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ต่ำและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับน้ำเชื้อสด ($p<0.05$) (ตารางที่ 8)

จากการทดลองการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ MeOH เป็นสาร Cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้น 5, 8 และ 10% ร่วมกับสาร Extender 3 ชนิด (HBSS, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ one-step (10 $^{\circ}$C/min) และ two-step (4 $^{\circ}$C/min จาก 3 ถึง -4°C และ 11 $^{\circ}$C/min จาก -4 ถึง -80 $^{\circ}$C) พบว่าเมื่อใช้ 5%MeOH+ 0.9%NaCl ที่ one-step มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดเท่ากับ 17.49±0.65% (38% ของน้ำเชื้อสด) เมื่อทดสอบการมีชีวิต พบว่าใน 10%MeOH+HBSS ที่ One-step มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 48.26±4.59% (94% ของน้ำเชื้อสด) และเมื่อทดสอบการเคลื่อนที่ของอสุจิ พบว่าใน 5%MeOH+0.9%NaCl ที่ One-step มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงสุดเท่ากับ 25.00±0.00% (33% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของอสุจิ ในแต่ละความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant (5, 8 และ 10%) และสาร Extender ทั้ง 3 ชนิด ที่ One-step กับ Two-step ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แต่มีเปอร์เซ็นต์ต่ำและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อสด ($p<0.05$) (ตารางที่ 9)

จากการทดลองการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ EG เป็นสาร Cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้น 8, 10 และ 12% ร่วมกับสาร Extender 3 ชนิด (HBSS, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ One-step (10 $^{\circ}$C/min) และ Two-step (4 $^{\circ}$C/min จาก 3 ถึง -4°C และ 11 $^{\circ}$C/min จาก -4 ถึง -80 $^{\circ}$C) พบว่าเมื่อใช้ 10%EG+ C-F HBSS ที่ one-step มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดเท่ากับ 8.15±1.27% (12% ของน้ำเชื้อสด) เมื่อทดสอบการมีชีวิต พบว่าใน 10%EG+HBSS ที่ One-step มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 45.26±8.36% (63% ของน้ำเชื้อสด) และเมื่อทดสอบการเคลื่อนที่ของอสุจิ พบว่าใน 12%EG+ 0.9%NaCl ที่ One-step มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงสุดเท่ากับ 32.90±5.00% (37% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของอสุจิ ในแต่ละความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant (8, 10 และ 12%) และสาร Extender ทั้ง 3 ชนิด ที่ One-step กับ Two-step ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

($p>0.05$) แต่มีเปอร์เซ็นต์ต่ำและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับน้ำเชื้อสด ($p<0.05$) (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 7. ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ในสาร Extender ทั้ง 3 ชนิด (HBSS, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับ สาร DMSO ที่ความเข้มข้น 8, 10 และ 12% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ One-step และ Two-step freezing rates

การลดอุณหภูมิ	สาร Extender	สาร DMSO (%)	การปฏิสนธิ (%)	การมีชีวิต (%)	การเคลื่อนที่ (%)
1-step	HBSS	8	26.02±3.83	34.50±19.55	17.86±13.23
			(51.44)	(45.93)	(20.23)
		10	28.49±0.74	35.77±1.98	25.00±0.00
			(56.33)	(47.62)	(28.31)
		12	18.34±0.71	10.90±2.38	32.90±5.00
			(36.26)	(14.51)	(37.26)
	C-F HBSS	8	33.13±6.67	31.77±10.70	41.32±5.00
			(65.50)	(42.30)	(46.68)
		10	27.10±1.02	29.33±9.60	50.00±8.66
			(53.58)	(39.05)	(56.63)
		12	39.14±3.76	12.62±2.93	58.68±10.00
			(77.38)	(16.80)	(66.46)
	0.9% NaCl	8	29.14±1.04	31.89±14.80	41.32±5.00
			(57.61)	(42.46)	(46.80)
		10	37.94±2.05	19.45±1.09	75.00±0.00
			(75.01)	(25.90)	(84.94)
		12	40.77±1.65	21.04±1.95	41.32±5.00
			(80.60)	(28.01)	(46.80)
2- Step	HBSS	8	14.36±2.13	37.58±2.52	41.32±5.00
			(28.39)	(50.03)	(46.80)
		10	16.26±4.49	14.34±2.75	17.86±13.23
			(32.15)	(19.09)	(20.23)
		12	13.71±1.00	15.20±2.66	32.90±5.00
			(27.11)	(20.24)	(37.26)
	C-F HBSS	8	23.5±8.04	18.48±7.04	32.90±5.00
			(46.46)	(24.60)	(37.26)
		10	21.64±3.25	6.73±1.39	41.32±5.00
			(30.21)	(8.96)	(46.80)
		12	16.28±1.01	12.40±2.40	50.00±0.00
			(32.19)	(16.51)	(56.63)
	0.9% NaCl	8	13.98±1.69	24.68±3.13	32.90±5.00
			(27.64)	(32.86)	(37.26)
		10	19.24±1.15	8.98±0.58	25.00±15.00
			(38.04)	(11.96)	(28.31)
		12	24.79±3.43	11.9±3.06	25.00±0.00
			(49.01)	(15.84)	(28.31)
น้ำเชื้อสด			50.58±3.75	75.11±1.92	88.30±10.00

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด (% of control)
ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์ที่แสดงในตารางในแต่ละความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant (8, 10 และ 12%) สาร Extender ทั้ง 3 ชนิด ที่ One-step และ Two-step ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) และค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิที่ One-step ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ กับน้ำเชื้อสด ($p>0.05$)

ตารางที่ 8. ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ในสาร Extender ทั้ง 3 ชนิด (HBSS, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับ สาร DMA ที่ความเข้มข้น 8, 10 และ 12% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ One-step และ Two-step freezing rates

การลดอุณหภูมิ	สาร Extender	สาร DMA (%)	การปฏิสนธิ (%)	การมีชีวิต (%)	การเคลื่อนที่ (%)
1-step	HBSS	8	19.71±1.81^{b}	5.63±0.81^{c}	25.00±0.00^{b}
			(33.85)	(6.80)	(28.31)
		10	14.34±1.91^{b}	7.30±1.92^{c}	11.70±10.00^{b}
			(24.63)	(8.82)	(13.25)
		12	17.24±1.20^{b}	28.93±1.66^{c}	32.90±5.00^{b}
			(29.61)	(34.94)	(37.26)
	C-F HBSS	8	9.66±0.43^{b}	27.53±13.32^{bc}	32.90±5.00^{b}
			(16.59)	(33.25)	(37.26)
		10	29.66±0.55^{b}	36.65±3.17^{bc}	32.90±5.00^{b}
			(50.94)	(44.26)	(37.26)
		12	12.99±0.65^{b}	43.54±3.43^{bc}	25.00±0.00^{b}
			(22.31)	(52.58)	(28.31)
	0.9% NaCl	8	12.62±0.49^{b}	20.41±2.70^{b}	11.70±10.00^{b}
			(21.68)	(24.65)	(13.25)
		10	10.63±2.48^{b}	45.90±16.00^{b}	41.32±5.00^{b}
			(18.26)	(55.43)	(46.80)
		12	21.87±13.86^{b}	52.88±13.52^{b}	11.70±10.00^{b}
			(37.56)	(63.86)	(13.25)
2- Step	HBSS	8	12.8±4.59^{b}	23.76±5.14^{c}	11.70±10.00
			(21.99)	(28.70)	(13.25)
		10	16.67±1.65^{b}	5.98±0.59^{c}	11.70±10.00^{b}
			(28.63)	(7.22)	(13.25)
		12	10.63±0.31^{b}	24.28±14.86^{c}	11.70±10.00^{b}
			(18.26)	(29.32)	(13.25)
	C-F HBSS	8	17.61±2.07^{b}	24.23±4.78^{bc}	41.32±5.00^{b}
			(30.25)	(29.26)	(46.80)
		10	16.36±1.54^{b}	21.71±4.57^{bc}	25.00±17.32^{b}
			(28.10)	(26.22)	(28.31)
		12	15.13±2.22^{b}	18.13±0.97^{bc}	25.00±0.00^{b}
			(25.99)	(21.90)	(28.31)
	0.9% NaCl	8	17.34±1.12^{b}	31.33±0.37^{b}	32.90±5.00^{b}
			(29.78)	(37.84)	(37.26)
		10	10.32±3.61^{b}	37.26±2.40^{b}	32.90±5.00^{b}
			(17.73)	(45.00)	(37.26)
		12	17.87±1.49^{b}	46.15±2.15^{b}	32.90±5.00^{b}
			(30.69)	(55.74)	(37.26)
น้ำเชื้อสด			58.22±2.15^{a}	82.80±1.80^{a}	88.30±10.00^{a}

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด (% of control)
ตัวอักษร a, b และ c ในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 9. ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ในสาร Extender ทั้ง 3 ชนิด (HBSS, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับ สาร MeOH ที่ความเข้มข้น 5, 8 และ 10% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ One-step และ Two-step freezing rates

การลดอุณหภูมิ	สาร Extender	สาร MeOH (%)	การปฏิสนธิ (%)	การมีชีวิต (%)	การเคลื่อนที่ (%)
1-step	HBSS	5	4.68±1.29[b]	5.98±0.70[b]	11.70±10.00[b]
			(10.10)	(11.70)	(15.60)
		8	7.04±8.77[b]	18.92±2.95[b]	11.70±10.00[b]
			(15.20)	(37.03)	(15.60)
		10	11.13±3.41[b]	48.26±4.59[b]	11.70±10.00[b]
			(24.03)	(94.44)	(15.60)
	C-F HBSS	5	6.33±4.78[b]	17.05±1.65[b]	11.70±10.00[b]
			(13.67)	(33.37)	(15.60)
		8	6.16±1.18[b]	26.43±3.70[b]	11.70±10.00[b]
			(13.30)	(51.72)	(15.60)
		10	8.72±8.01[b]	35.73±2.34[b]	11.70±10.00[b]
			(18.83)	(69.92)	(15.60)
	0.9% NaCl	5	17.49±0.65[b]	34.07±2.36[b]	25.00±0.00[b]
			(37.76)	(66.67)	(33.33)
		8	7.32±1.86[b]	15.56±4.44[b]	11.70±10.00[b]
			(15.80)	(30.45)	(15.60)
		10	4.75±3.08[b]	12.36±1.77[b]	3.02±10.00[b]
			(10.25)	(24.19)	(4.03)
2- Step	HBSS	5	3.97±0.68[b]	11.80±2.07[b]	11.70±10.00[b]
			(8.57)	(23.09)	(15.60)
		8	6.92±3.27[b]	17.78±2.37[b]	3.02±10.00[b]
			(14.94)	(34.79)	(4.03)
		10	3.84±2.21[b]	21.08±4.09[b]	3.02±10.00[b]
			(8.29)	(41.25)	(4.03)
	C-F HBSS	5	4.21±5.92[b]	16.63±4.23[b]	11.70±10.00[b]
			(9.09)	(32.54)	(15.60)
		8	4.85±3.42[b]	8.84±1.76[b]	3.02±10.00[b]
			(10.47)	(17.30)	(4.03)
		10	3.57±1.88[b]	16.71±2.70[b]	11.70±10.00[b]
			(7.71)	(32.70)	(15.6)
	0.9% NaCl	5	8.95±0.50[b]	16.63±5.86[b]	11.70±10.00[b]
			(19.32)	(32.54)	(15.6)
		8	4.68±1.29[b]	9.84±2.15[b]	11.70±10.00[b]
			(10.10)	(19.26)	(15.6)
		10	7.02±3.55[b]	22.21±3.80[b]	11.70±10.00[b]
			(15.16)	(43.46)	(15.6)
น้ำเชื้อสด			46.32±1.18[a]	51.10±2.53[a]	75.00±0.00[a]

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด (% of control)

ตัวอักษร a และ b ในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 10. ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ในสาร Extender ทั้ง 3 ชนิด (HBSS, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับ สาร EG ที่ความเข้มข้น 8, 10 และ 12% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ One-step และ Two-step freezing rates

การลดอุณหภูมิ	สาร Extender	สาร EG (%)	การปฏิสนธิ (%)	การมีชีวิต (%)	การเคลื่อนที่ (%)
1-step	HBSS	8	6.11±2.92[b]	13.43±9.79[b]	25.00±0.00[b]
			(9.17)	(18.73)	(28.31)
		10	3.47±0.76[b]	45.26±8.36[b]	25.00±0.00[b]
			(5.21)	(63.12)	(28.31)
		12	3.85±2.62[b]	14.92±6.94[b]	11.70±10.00[b]
			(5.78)	(20.81)	(13.25)
	C-F HBSS	8	4.06±3.78[b]	5.09±1.17[b]	25.00±0.00[b]
			(6.10)	(7.10)	(28.31)
		10	8.15±1.27[b]	29.33±9.60[b]	25.00±0.00[b]
			(12.24)	(40.91)	(28.31)
		12	4.66±1.80[b]	28.93±10.92[b]	11.70±10.00[b]
			(7.00)	(40.35)	(13.25)
	0.9% NaCl	8	5.21±2.58[b]	31.89±14.80[b]	25.00±0.00[b]
			(7.82)	(44.48)	(28.31)
		10	3.47±1.50[b]	14.73±9.77[b]	25.00±0.00[b]
			(5.21)	(20.54)	(28.31)
		12	7.87±1.96[b]	6.46±2.01[b]	32.90±5.00[b]
			(11.82)	(9.01)	(37.26)
2- Step	HBSS	8	1.76±0.36[b]	37.40±10.82[b]	11.70±10.00[b]
			(2.64)	(52.16)	(13.25)
		10	2.36±0.84[b]	10.91±1.33[b]	25.00±0.00[b]
			(3.54)	(15.22)	(28.31)
		12	5.11±1.33[b]	42.11±13.62[b]	25.00±0.00[b]
			(7.67)	(58.73)	(28.31)
	C-F HBSS	8	3.99±0.86[b]	29.27±0.45[b]	25.00±0.00[b]
			(5.99)	(40.82)	(28.31)
		10	6.60±0.13[b]	15.81±2.19[b]	25.00±0.00[b]
			(9.91)	(22.05)	(28.31)
		12	2.43±2.06[b]	21.72±2.83[b]	11.70±10.00[b]
			(3.65)	(30.29)	(13.25)
	0.9% NaCl	8	1.31±1.46[b]	21.74±6.02[b]	11.70±10.00[b]
			(1.97)	(30.32)	(13.25)
		10	0.91±1.23[b]	8.12±1.68[b]	3.02±10.00[b]
			(1.37)	(11.32)	(3.42)
		12	1.06±1.12[b]	13.08±5.39[b]	11.70±10.00[b]
			(1.59)	(18.24)	(13.25)
น้ำเชื้อสด			66.61±2.26[a]	71.70±1.07[a]	88.30±10.00[a]

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด (% of control)

ตัวอักษร a และ b ในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

2. ผลของระยะเวลาที่เหมาะสม (Equilibration time) ที่ 5, 10, 20 และ 40 นาที ของสาร Cryoprotectant แต่ละชนิด ที่มีผลต่อน้ำเชื้อปลาสวายก่อนทำการแช่แข็ง และศึกษาการถูกทำลายของเซลล์อสุจิ ณ ระยะเวลาต่างๆ ดังกล่าวโดยใช้ SEM

2.1 ผลของระยะเวลาที่เหมาะสม (Equilibration time) ที่ 5, 10, 20 และ 40 นาที ของสาร Cryoprotectant แต่ละชนิด ที่มีผลต่อน้ำเชื้อปลาสวายก่อนทำการแช่แข็ง

จากการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายในสาร 12%DMSO+ 0.9% NaCl ที่ระยะเวลา 5, 10, 20, และ 40 นาที พบว่าที่เวลา 20 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดเท่ากับ 43.68±1.73% (64% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) กับเวลาที่ 5, 10 และ 40 นาที แต่มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิต่ำและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับน้ำเชื้อสด ($p<0.05$) สำหรับเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ พบว่าที่เวลา 5 และ 10 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากันคือ 58.68±5.00% (66% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ กับเวลาที่ 20 และ 40 นาที ($p<0.05$) และในแต่ละระยะเวลามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ต่ำและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับน้ำเชื้อสด ($p<0.05$) ส่วนเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต พบว่าที่เวลา 5 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 27.53±5.72% (35% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) กับเวลาที่ 10, 20 และ 40 นาที แต่มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตต่ำและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับน้ำเชื้อสด ($p<0.05$) (ตารางที่ 11)

จากการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายในสาร 10%DMA+ C-F HBSS ที่ระยะเวลา 5, 10, 20, และ 40 นาที พบว่าที่เวลา 40 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดเท่ากับ 60.00±0.43% (88% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) กับเวลาที่ 5, 10 และ 20 นาที และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิในแต่ระยะเวลาไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับน้ำเชื้อสด ($p<0.05$) สำหรับเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ พบว่าที่เวลา 10 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงสุดเท่ากับ 67.10±5.00% (76% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่แตกต่างกับเวลาที่ 5 หรือ 20 นาที และไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด แต่แตกต่างกับเวลาที่ 40 นาที ที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ต่ำสุดเท่ากับ 25.00±0.00% (28% ของน้ำเชื้อสด) ในส่วนเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต พบว่าที่เวลา 40 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 29.92±3.28% (38% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งสูงกว่าที่เวลา 5, 10, และ 20 นาที และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับน้ำเชื้อสด ($p<0.05$) (ตารางที่ 12)

จากการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายในสาร 5%MeOH+ 0.9%NaCl ที่ระยะเวลา 5, 10, 20, และ 40 นาที พบว่าที่เวลา 10 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดเท่ากับ 61.54±5.59% (90% ของน้ำเชื้อสด)ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ กับเวลาที่ 5 และ 20 นาที และไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด

($p<0.05$) สำหรับเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ พบว่าที่เวลา 5 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงสุดเท่ากับ 32.90±5.00% (37% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกับเวลาที่ 10, 20 และ 40 นาที แต่มีความแตกต่างกับน้ำเชื้อสด ($p<0.05$) ส่วนเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต พบว่าที่เวลา 20 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 9.43±2.89% (12% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับเวลาที่ 5, 10 และ 40 นาที ($p>0.05$) และแต่ระยะเวลามีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตต่ำแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับน้ำเชื้อสด (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 11. ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ที่เก็บรักษาในสาร 12%DMSO+ 0.9%NaCl ที่ระยะเวลา 5, 10, 20 และ 40 นาที

สาร Cryoprotectant + Extender	ระยะเวลา	การปฏิสนธิ (%)	การเคลื่อนที่ (%)	การมีชีวิต (%)
12%DMSO+ 0.9%NaCl	5	36.15±2.95^{b}	58.68±5.00^{b}	27.53±5.72^{b}
		(53.06)	(66.46)	(34.71)
	10	34.30±3.91^{b}	58.68±5.00^{b}	19.34±3.72^{b}
		(50.35)	(66.46)	(24.38)
	20	43.68±1.73^{b}	25.00±0.00^{c}	18.36±2.86^{b}
		(64.11)	(28.31)	(23.14)
	40	26.16±5.39^{b}	25.00±0.00^{c}	16.58±1.45^{b}
		(38.39)	(28.31)	(20.90)
น้ำเชื้อสด (Control)		68.13±3.32^{a}	88.30±10.00^{a}	79.33±3.01^{a}

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด (% of control)

ตัวอักษร a, b และ c ในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 12. ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ที่เก็บรักษาในสาร 10%DMA+ C-F HBSS ที่ระยะเวลา 5, 10, 20 และ 40 นาที

สาร Cryoprotectant + Extender	ระยะเวลา	การปฏิสนธิ (%)	การเคลื่อนที่ (%)	การมีชีวิต (%)
10%DMA + C-F HBSS	5	57.05±1.13^{a}	50.00±8.66^{bc}	11.71±2.55^{c}
		(83.73)	(56.63)	(14.76)
	10	44.03±8.16^{a}	67.10±5.00^{ab}	15.99±0.39^{c}
		(64.62)	(75.99)	(20.16)
	20	57.51±8.19^{a}	32.90±5.00^{bc}	13.08±1.38^{c}
		(84.41)	(37.26)	(16.48)
	40	60.00±0.43^{a}	25.00±0.00^{c}	29.92±3.28^{b}
		(88.07)	(28.31)	(37.71)
น้ำเชื้อสด (Control)		68.13±3.32^{a}	88.30±10.00^{a}	79.33±3.01^{a}

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด (% of control)

ตัวอักษร a, b และ c ในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 13. ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ที่เก็บรักษาในสาร 5%MeOH+ 0.9% NaCl ที่ระยะเวลา 5, 10, 20 และ 40 นาที

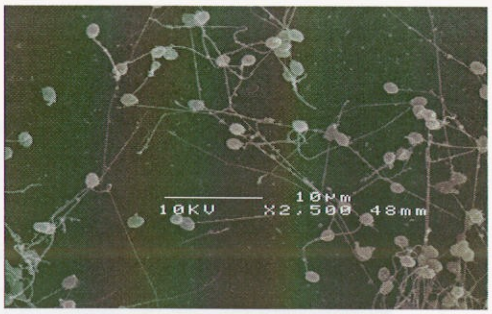
สาร Cryoprotectant + Extender	ระยะเวลา	การปฏิสนธิ (%)	การเคลื่อนที่ (%)	การมีชีวิต (%)
5% MeOH + 0.9%NaCl	5	46.41 ± 2.10^{abc}	32.90 ± 5.00^{b}	5.65 ± 0.54^{b}
		(68.12)	(37.26)	(7.12)
	10	61.54 ± 5.59^{ab}	25.00 ± 0.00^{b}	6.87 ± 1.54^{b}
		(90.32)	(28.31)	(8.67)
	20	39.01 ± 4.21^{bc}	25.00 ± 0.00^{b}	9.43 ± 2.89^{b}
		(57.25)	(28.31)	(11.88)
	40	32.70 ± 2.52^{c}	11.70 ± 10.00^{b}	5.80 ± 0.72^{b}
		(48.00)	(13.25)	(7.32)
น้ำเชื้อสด (Control)		68.13 ± 3.32^{a}	88.30 ± 10.00^{a}	79.33 ± 3.01^{a}

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด (% of control)

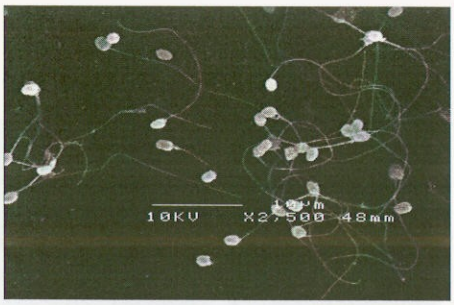
ตัวอักษร a, b และ c ในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

2.2 การศึกษาการถูกทำลายของเซลล์อสุจิ ที่ระยะเวลาต่างๆ โดยใช้ SEM

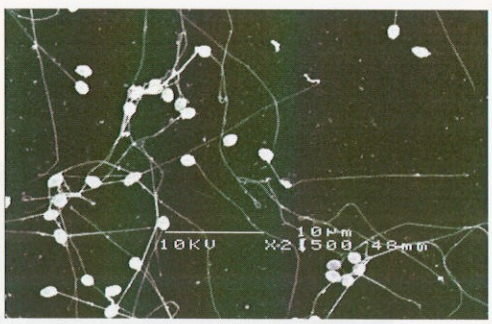
จากการนำน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งที่เก็บรักษาในสาร 12%DMSO+ 0.9%NaCl, 10%DMA+ C-F HBSS และ 5%MeOH+ 0.9%NaCl ณ ระยะเวลาต่าง ๆ กันที่ 5, 10, 20 และ 40 นาที มาศึกษาเซลล์อสุจิถูกทำลายโดยใช้ SEM ได้ผลสรุปดังนี้ การเก็บรักษาน้ำเชื้อใน 12%DMSO+ 0.9%NaCl ณ ระยะเวลาต่างๆ พบว่าลักษณะของอสุจิส่วนใหญ่อยู่ในสภาพปรกติ คือส่วนหัวไม่ได้แยกออกจากส่วนหาง ดังแสดงในภาพที่ 5 ซึ่งให้ผลการทดลองในลักษณะเดียวกันกับเมื่อใช้ 10%DMA+ C-F HBSS ดังแสดงในภาพที่ 6



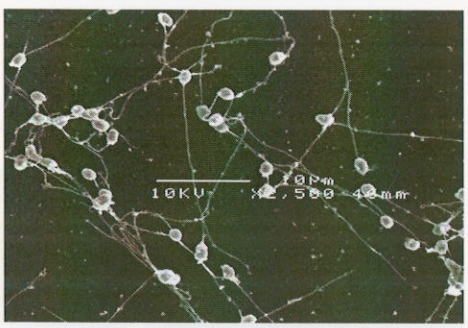
5 นาที



10 นาที

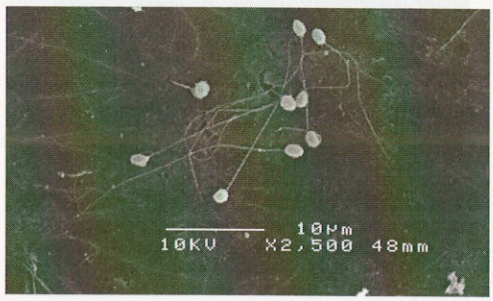


20 นาที

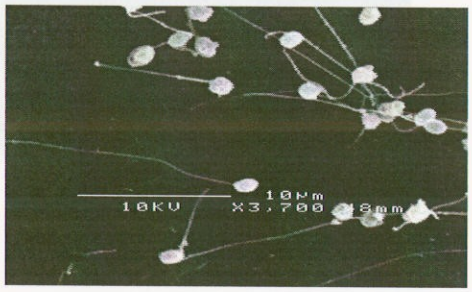


40 นาที

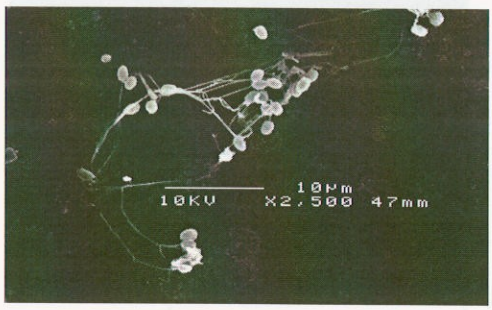
ภาพที่ 5. สภาพของเซลล์อสุจิเมื่อเก็บรักษาใน 12%DMSO+ 0.9%NaCl ที่ระยะเวลาต่าง ๆ 5, 10, 20 และ 40 นาที



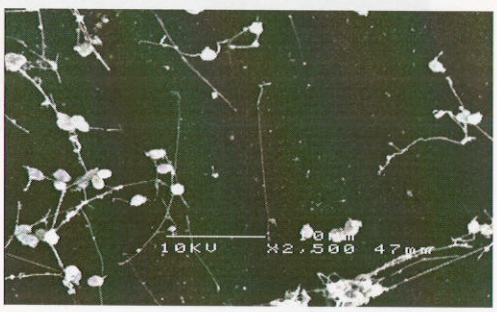
5นาที



10 นาที



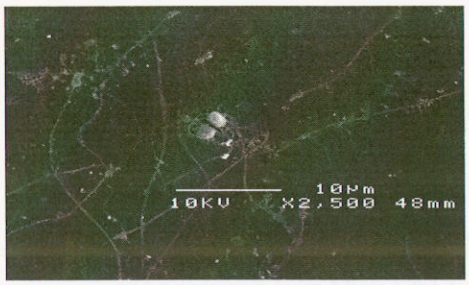
2 0 นาที



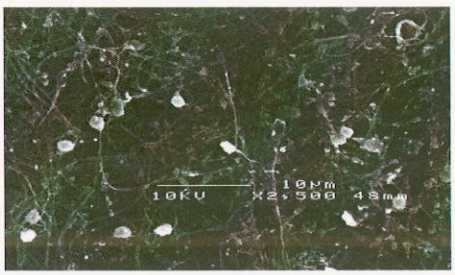
4 0 นาที

ภาพที่ 6. สภาพของเซลล์อสุจิเมื่อเก็บรักษาใน 10%DMA+ C-F HBSS ที่ระยะเวลาต่าง ๆ 5, 10, 20 และ 40 นาที

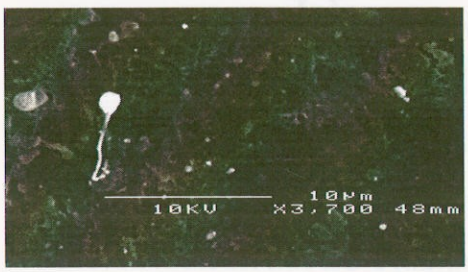
อย่างไรก็ตามตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งปลาที่เก็บรักษาใน 5%MeOH+ 0.9%NaCl ในระยะเวลาต่าง ๆ กันที่ 5, 10, 20 และ 40 นาที พบว่าที่ระยะเวลา 5, 10 และ 20 นาที ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ แต่ที่เวลา 10 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุด (ตารางที่ 13) จากการตรวจดูสภาพเซลล์อสุจิโดยใช้ SEM พบว่าที่ระยะเวลา 5, 10 และ 20 นาที ลักษณะของอสุจิส่วนใหญ่อยู่ในสภาพปรกติ คือ ส่วนหัวติดอยู่กับส่วนหาง แต่จะมีลักษณะพิเศษซึ่งไม่พบเมื่อทดสอบด้วย DMSO หรือ DMA คือ คือมีลักษณะคล้ายกลุ่มเจล (gel mass) เกิดขึ้น โดยจะเห็นได้ชัดที่ระยะเวลา 40 นาที ดังแสดงในภาพที่ 7



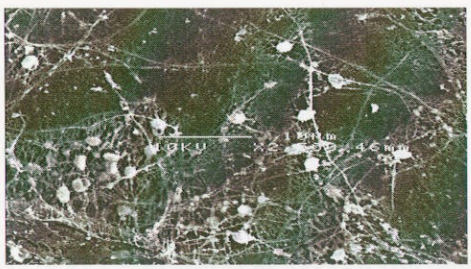
5 นาที



10 นาที



20 นาที



40 นาที

ภาพที่ 7. สภาพของเซลล์อสุจิเมื่อเก็บรักษาใน 5%MeOH+ 0.9% NaCl ที่ระยะเวลาต่าง ๆ 5, 10, 20 และ 40

5 นาที

10 นาที

บทที่ 4

สรุป อภิปรายผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

1. ผลของสาร Cryoprotectant สาร Extender และ Freezing rate

จากการทดลองเมื่อใช้สาร DMSO (12%) เป็นสาร Cryoprotectant และ 0.9% NaCl เป็นสาร extender ที่ one- step freezing rate พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดเป็น 41% (81% ของน้ำเชื้อสด) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ สาร Cryoprotectant ชนิดอื่นๆ (DMA, MeOH และ EG) อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้ให้ผลแตกต่างกันกับรายงานของ Withler (1982) ที่ใช้ 12% DMSO เช่นกัน แต่ให้มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิเพียง 1% เท่านั้น ผลที่ต่างกันอาจมาจากสาร extender ที่ Withler ใช้ซึ่งได้พัฒนาขึ้นสำหรับ Pacific salmon อาจไม่เหมาะสมกับปลาสวาย

จากการศึกษาพบว่าเมื่อใช้สาร DMA (10%)+ C-F HBSS จะให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงกว่าเมื่อใช้สาร MeOH และ EG ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Wayman *et al.* (1998); Horvath and Urbanyi (2000) ที่ทำการทดลองศึกษาในปลาดุกยักษ์, *C. gariepinus* พบว่าเมื่อใช้สาร DMA หรือ DMSO เป็นสาร Cryoprotectant จะให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$)

เมื่อใช้สาร MeOH เป็นสาร Cryoprotectant พบว่า MeOH (5%)+ 0.9% NaCl จะให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงที่สุด (38% ของน้ำเชื้อสด) อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ความเข้มข้นสูงขึ้น 8 และ 10% ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การมีชีวิต และการเคลื่อนที่ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bart et al. (1998) ที่ไม่ประสบความสำเร็จกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งปลา Blue catfish (*Ictalurus furcatus*) เมื่อใช้ MeOH เป็นสาร Cryoprotectant และจากการรายงานของ Monkonpunya et al. (1995) พบว่าที่ 14% MeOH มีอันตรายต่อ *P. gigas* มีผลทำให้อสุจิไม่มีการเคลื่อนที่ และในการศึกษาครั้งนี้ไม่ประสบผลสำเร็จในการใช้ สาร EG เป็นสาร Cryoprotectant ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากระดับความเข้มข้นที่ใช้สูงเกินไป (8, 10 และ 12%) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Horvath and Urbanyi (2000)) ที่ทดลองใช้สาร EG (5%) ในปลาดุกยักษ์, *C. gariepinus* แล้วพบว่ามีอัตราการเคลื่อนที่ต่ำ ส่วนรายงานการทดลองของ Linhart et al. (1993) นั้นพบว่าสาร EG นั้นมีอันตรายต่อเซลล์ของอสุจิในปลา European catfish (*Silurus glanis*) เช่นเดียวกัน

ถึงแม้ว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างการลดอุณหภูมิที่ใช้ One-step freezing rate และ Two-Step freezing rates ในระหว่างขบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวาย แต่อย่างไรก็ตาม One-step freezing rate ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การเคลื่อนที่ และ การมีชีวิต ที่สูงกว่า Two-step freezing rates

2. ระยะเวลาที่เหมาะสม (Equilibration time) ของสาร Cryoprotectant แต่ละชนิดที่มีผลต่อน้ำเชื้อปลาก่อนการแช่แข็ง และศึกษาเซลล์อสุจิถูกทำลาย ณ เวลาต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 นาที)

จากการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสม (Equilibration time) ของสาร Cryoprotectant แต่ละชนิด (DMSO, DMA และ MeOH) ที่มีผลต่อน้ำเชื้อปลาก่อนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา ณ เวลาต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 นาที) สามารถสรุปได้ดังนี้ สำหรับสาร DMSO หรือ DMA พบว่าช่วงเวลาที่ 5-40 นาที ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ส่วน MeOH พบว่า Equilibration time ที่ 10 นาที ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุด แต่ก็ไม่มีความแตกต่างกับ เวลาที่ 5 และ 20 นาที ส่วนเวลาที่ 40 นาทีนั้นให้ผลการทดลองต่ำสุด และเมื่อศึกษาการถูกทำลายของเซลล์อสุจิ ณ ระยะเวลาต่างๆ ดังกล่าว โดยใช้ SEM พบว่าเมื่อทดสอบด้วย DMSO หรือ DMA ณ เวลา 5-40 นาทีนั้นลักษณะเซลล์อสุจิส่วนใหญ่อยู่ในสภาพปรกติ (ส่วนหัวไม่ได้แยกออกจากส่วนหาง) อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบด้วย MeOH ณ เวลาที่เพิ่มขึ้น (40 นาที) จะพบเซลล์อสุจิถูกทำลาย (ส่วนหัวแยกออกจากส่วนหาง) และมีลักษณะคล้ายกลุ่มเจลเกิดขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1. ผู้วิจัยเห็นว่า DMSO (12%)+0.9% NaCl ที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ One-step (10°C/min) มีความเหมาะสมที่จะใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย และควรจะนำสารนี้ไปประยุกต์ใช้กับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งชนิดอื่นๆ ในตระกูลเดียวกันกับปลาสวาย เช่น ปลาเทโพ ปลาเทพา และปลาบึกต่อไป

2. จากการศึกษาพบว่า เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การมีชีวิต และการเคลื่อนที่ไม่มีความสัมพันธ์กัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเทคนิคการศึกษาเปอร์เซ็นต์ การมีชีวิต และการเคลื่อนที่นั้นใช้ตัวอย่างเพียงเล็กน้อย (1 ul) ซึ่งอาจไม่ใช่เป็นตัวแทนทั้งหมด ด้วยเหตุนี้ในการศึกษาครั้งต่อไป ควรจะศึกษาเปอร์เซ็นต์ การฟัก (hatching rate) และเปอร์เซ็นต์การรอด (Survival rate) เพิ่มเติม

3. จากการศึกษาพบว่า อัตราการปฏิสนธิจะสูงหรือต่ำ นอกจากจะขึ้นอยู่กับคุณภาพของน้ำเชื้อแล้ว ยังพบว่าคุณภาพของไข่ปลาเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ ที่ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิมีอัตราที่สูง ซึ่งคุณภาพของไข่ที่ดีในปลาสวายนั้นควรมีลักษณะโปร่งแสง สีเหลืองนวล และมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.8-1 mm

บรรณานุกรม

นิศา ไชยรักษ์. 2533. การอนุรักษ์น้ำเชื้อปลาดุกอุยโดยวิธีแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 142 หน้า.

สำนักงานสถิติแห่งชาติ (2539). สมุดสถิติรายปีประเทศไทย 2539 (ฉบับย่อ). โรงพิมพ์ดอกเบี้ย หน้า 32.

Bart, A.N. and Dunham, R.A. (1996). Effects of sperm concentration and egg number on fertilization efficiency with channel catfish, *Ictalurus punctatus* eggs and blue catfish, *Ictalurus furcatus*, spermatozoa. *Theriogenology*. 45(3): 673-682.

Bart, A.N., Wolfe, D.F., and Dunham, R.A. (1998). Effects of cryoprotectants, sperm density and straw size on cryopreservation of blue catfish, *Ictalurus furcatus* Transactions of the African Fisheries Society. 127(5):819-824.

Cryologic Pty Ltd. (1998). Cryogenesis Version 4. For Windows. Software operating manual.Victoria, Australia. 8 pp.

Cryologic Pty Ltd. (1999). Freezer control model – 863 operating manual. Victoria, Australia. 11 pp.

Guest, W.C. 1973. Spermatology and sperm preservation of Channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Master thesis. School of Forestry and wildlife management. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical college. 92 pp.

Hambananda, A. 1996. Cryopreservation of milt of striped catfish, *Pangasius sutchi* Fowler. Doctoral thesis, Biological Science, Kasetsart University. Bangkok: Thailand. 251 pp.

Hambananda,A. and Mongkonpunya, K. (1996a). Cryopreservation of milt of striped catfish, *Pangasius sutchi*. Proceeding of the 34 th Kasetsart university annual conference, pp. 320-328. Kasetsert university press: Bangkok: Thailand.

Horvath, 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.

Khanh, P.V., Tuan, N., Hao, N.V., Jeney, Z., Trong,T.Q., and Thanh, N.M. (1999). Review of biology and breeding of some indigenous fish species in the Mekong delta of Vietnam. Cai Be. Tien Giang. Vietnam. 32 pp.

Kinnear P. R. and Gray C. D. (2000). SPSS for windows made simple. Release 10. Department of Psychology, University of Aberdeen. United Kingdom: Psychology Press Ltd.

Leung, L.K.P., and Jaemison, B.G.M. (1991). Live preservation of fish gametes. (Ed.) Jaemison, BGM In: fish Evolution and systematics: Evidence from spermatozoa. pp. 245-269. Cambridge: University Press. London.

Linhart, O., Billard, R., and Proteau, J.P. (1993). Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis* L.) Spermatozoa. Aquaculture. 115(3-4):347-359

Mongkonpunya, K., Chairak, N., Pupipat, T., and Tiersch, T.R. (1995). Cryopreservation of sperm of the Mekong giant catfish. Metro Manila, Asian fisheries science. 8(3-4):211-221.

Mongkonpunya, K., Pupipat, T., Pholprasith, S., Chantasut, M, Rittaporn, R., Pimolboot, S., Wiwatcharakoses, S., and Chaengkij, M. (1992). Cryopreservation of sperm of the Mekong giant catfish, *Pangasinodon gigas* Chevey. Aquaculture and Schistosomiasis. August 6-10. pp. 56-60. Proceedings of a network meeting held in Manila: Phillipines.

Pahdi, B.K., and Mandal, R.K. (1995). Cryopreservation of spermatozoa of two Asian freshwater catfish, *Heteropneustes fosslis* and *Clarias bratrachus*. Journal of Aquaculture in the Tropics. 10(1):2328.

Rana, K.J. (1995). Cryopreservation of fish spermatozoa. In: Cryopreservation andFreezing-Drying protocols. Edited by Day, J.G., and McLellan, M.R. 254 pp. New Jersey: Humana press.

Rana, K. (1995). Preservation of gametes. (Eds) Bromage, N.R., and Roberts, R.J. In: Broods tock Management and Egg and Larval Quality. P. 53-75 . University Press: Cambridge.

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.

Safina, C. (1995). The world's imperiled fish. Scientific American. 273(5):46-53.

Stein, H., and Bayrle H. (1978). Cryopreservation of the sperm of some freshwater teleost. Annales Biologie Animale Biochimie et Biophysique. 18:1073-1076.

Thorgaard, G.H., Pual, A., Wheeler., and Robert D.F. (2000). Utilization of androgenesis for strain recovery from cryopreserved sperm. In: cryopreservation in aquatic species. Tiersch, T.R., and P.M., Mazik, Editors. World aquaculture society. pp. 305-309. Baton Rouge: Lousiana.

Wayman, W.R., and Tiersch, T.R. (1998). On-site cryopreservation with Nitrogen- vapor

shipping dewars. Book of abstracts, The international Trienial conference and exposition of the world aquaculture society, Aquaculture, 98_ February 15-19. 574 pp. Bally: Las vagus.

Withler, F.C. (1982). Cryopreservation of spermatozoa of some freshwater fishes cultured in South and Southeast Asia. Aquaculture. 26:395-398.

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ: (ภาษาไทย) อ.ดร. สมร พรชื่นชูวงศ์

(ภาษาอังกฤษ) Dr. Samorn Ponchunchoovong

2. รหัสประจำตัว: 42400131

3. ตำแหน่งปัจจุบัน: อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4. สถานที่ติดต่อ:

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
อำเภอเมือง จ.นครราชสีมา 30000
Tel: (044) 224377-8
Fax: (044) 224150
E-mail: samorn@ccs.sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา:

Degree	***Institution***	***Year***	***Country***
B.Sc. (Biology)	Prince of Songkhla University	1992	Thailand
M.Sc. (Zoology)	Chulalongkorn University	1995	Thailand
Ph.D (Aquaculture)	Asian Institute of Technology	2003	Thailand

6. สาขาวิชาการที่ชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา):

- อนุกรมวิธานของโปรโตซัว
- อนุกรมวิธานของหอยน้ำจืด กุ้งน้ำจืด ปูน้ำจืด แมลง ปลาน้ำจืด และ กบ - เขียด ที่เป็นอาหาร ของประชาชนในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทย
- Biodiversity of animals
- Cryopreservation of fish sperm
- Aquaculture (seed production, fish nutrition and fish disease)

7. ประสบการณ์วิจัย:

7.1 งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว

งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว มี 3 เรื่อง (โดยเป็นหัวหน้าโครงการทั้ง 3 เรื่อง) ซึ่ง 2 เรื่อง ได้รับการตีพิมพ์เรียบร้อยแล้ว และอีก 2 เรื่องอยู่ระหว่างการดำเนินการ (ดังเอกสารแนบ)

สมร ขวัญทอง. 2540. การกระจายของแมลงกินได้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทย. วารสารเทคโนโลยีสุรนารี 4: 211-217.

สมร ขวัญทอง และ สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2545 ศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของปูนาในสกุล *Esanthelphusa*, ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส 50 หน้า

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

Kwantong S. and Bart, A. N. Fertilization efficiency of cryopreserved sperm from striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage). Theriogenology (Submitted)

Samorn Kwantong and Sureelak Rodtong. 2004. Species identification of Thai rice-field crab using stereomicroscopy and scanning electron microscopy. 8 th Asia- Pacific conference on electron microscopy (8APEM). June 7-14, 2004. Kanazawa, Japan. P. 83.

Sureelak Rodtong and Samorn Kwantong. 2004. scanning electron microscopy and nucleic acid technique aid the identification and diversity study of Thai rice-field crab. 8 th Asia- Pacific conference on electron microscopy (8APEM). June 7-14, 2004. Kanazawa, Japan. P. 122.

Samorn Kwantong and Bart, A. N. 2004. Cryoperservation of striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* sperm. International symposium on animal and plant production for food and environmental security. August 9-11, 2004, Chaophya park hotel, Bangkok. Thailand. P. 105-109.

7.2 งานวิจัยที่กำลังดำเนินการ มี 1 เรื่อง

1.Cryogenic preservation of threatened Pangasiid catfishes in Thailand. (เป็นผู้ร่วมวิจัย รับผิดชอบโครงการวิจัย 30%)