ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ทางทะเล)

ปริญญา

วิทยาศาสตร์ทางทะเล — **สาขา**

วิทยาศาสตร์ทางทะเล — **ภาควิชา**

เรื่อง ประสิทธิภาพในการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งของปลากะรังหงส์, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828)

Efficient cryopreservation of Humpback Grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828) spermatozoa

นามผู้วิจัย นายนิพนธ์ เสนอินทร์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุริยัน ธัญกิจจานุกิจ, Dr. Scient.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

(อาจารย์เรณู ยาชิโร, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุนันท์ ภัทรจินดา, M. BC.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... **เดือน** ..... **พ.ศ.** .....

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ประสิทธิภาพในการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งของปลากะรังหงส์, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828)

Efficient cryopreservation of Humpback Grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828) spermatozoa

โดย

นายนิพนธ์ เสนอินทร์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ทางทะเล)
พ.ศ. 2552

นิพนธ์ เสนอินทร์ 2552: ประสิทธิภาพในการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งของปลากะรังหงส์, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828) ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ทางทะเล) สาขาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุริยัน ธัญกิจจานุกิจ, Dr. Scient. 93 หน้า

ทดลองเก็บน้ำเชื้อปลากะรังหงส์, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828) ด้วยน้ำยา extender 5 สูตร คือ Marine Fish Ringer, Extender 251, Extender 189, 0.1 M Sodium Citrate และ NaCl 0.9 % เพื่อหาสูตรน้ำยาที่เหมาะสมมาศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังหงส์แบบแช่แข็ง โดยตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (Motility) และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (Viability) พบว่า น้ำยา extender ทั้ง 5 สูตรสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังหงส์แบบแช่เย็นได้อย่างมีประสิทธิภาพ คือ สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่และไม่มีชีวิตที่เวลา 216 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบที่เวลา 60 ชั่วโมงหลังการเก็บแช่เย็น (0-4 ° C) พบว่าชนิดของน้ำยา extender และอัตราการเจือจางน้ำเชื้อต่อสูตรน้ำยา (1:1, 1:4 และ 1:9) มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) การทดสอบความเป็นพิษของสาร cryoprotectant 5 ชนิด คือ Dimethyl acetamide (DMA), Dimethyl sulfoxide (DMSO), Methanol, Glycerol และ Trehalose ที่ระดับความเข้มข้น 5%, 10% และ 15% มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยพบว่า DMSO 5% ทำหน้าที่เป็นสาร cryoprotectant ดีที่สุด การทดสอบการฟักของไข่ปลากะรังหงส์เปรียบเทียบน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งโดยใช้ 5% ของ DMA และ DMSO เป็นสาร cryoprotectant พบว่า น้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ DMSO 5% ทำหน้าที่เป็นสาร cryoprotectant มีประสิทธิภาพสูงที่สุดและมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับน้ำเชื้อสด แต่จะมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ DMA 5%

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Nipon Sean-in 2009: Efficient cryopreservation of Humpback Grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828) spermatozoa. Master of Science (Marine Science), Major Field: Marine Science, Department of Marine Science. Thesis Advisor: Assistant Professor Suriyan Tunkijjanukij, Dr. Scient. 93 pages.

Chilled storage of Humpback grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828) sperm cells with 5 extenders were investigated to find the most suitable type of extender for its cryopreservation. Five extenders; Marine Fish Ringer (MFR), Extender 251 (E 251), Extender 189 (E 189), 0.1 M Sodium Citrate (CT) and 0.9% NaCl (NaCl) were tested. They proved to be appropriate extenders to use since no sperm motilled and sperm still alive at 216 h (60 h after chilled storage). There was also no significant difference ($p>0.05$) in sperm motility when sperm was diluted with extender at 1:1, 1:4 and 1:9. Toxicity to sperm cells was studied with 5 different cryoprotectant i.e. Dimethyl acetamide (DMA), Dimethyl sulfoxide (DMSO), Methanol, Glycerol and Trehalose at 5%, 10% and 15% concentrations. The results showed significant difference ($p<0.05$) of sperm motility at 5% DMSO was the best cryoprotectant. The hatching rates of the Humpback grouper eggs from fresh and cryopreserved sperm in 5% DMA and DMSO were significant difference ($p>0.05$). The hatching rates of eggs from cryopreserved sperm in 5% DMSO was high. There was not significantly differences ($p<0.05$) between fresh sperm and 5% of DMSO cryopreserved sperm but significant difference ($p<0.05$) with 5% of DMA cryopreserved sperm.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

กราบขอบพระคุณ ผศ. ดร. สุริยัน ธัญกิจจานุกิจ ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. เรณู ยาชิโร กรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้าวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ กราบขอบพระคุณ ดร. สมร พรชื่นชูวงศ์ คุณทวีสิน พืชสิน ที่กรุณาให้คำแนะนำและการค้นคว้าวิจัยแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สวพ) บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยแก่ข้าพเจ้า

กราบขอบพระคุณ ผอ. ดร. เรณู ยาชิโร ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์ ขอขอบคุณ พี่ๆ และน้องๆ ของศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งระยองทุกคนที่ให้ความช่วยเหลืองานวิจัยจนบรรลุผลสำเร็จด้วยดี

สุดท้าย กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ซึ่งให้การสนับสนุนและให้คำปรึกษารวมทั้งเป็นกำลังใจในการศึกษาเสมอมา

นิพนธ์ เสนอินทร์

เมษายน 2552

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ	(8)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	24
อุปกรณ์	24
วิธีการ	25
ผลและวิจารณ์	31
ผล	31
วิจารณ์	55
สรุปและข้อเสนอแนะ	60
สรุป	60
ข้อเสนอแนะ	61
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	62
ภาคผนวก	70
ภาคผนวก ก ตารางการวิเคราะห์ผลทดลองทางสถิติ	71
ภาคผนวก ข ภาพผลการทดลอง	82
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	93

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ชนิดของน้ำยา extender ที่มีคุณภาพสูงสุดในการเก็บน้ำเชื้อปลาน้ำจืด	11
2	ชนิดของน้ำยา extender ที่มีคุณภาพสูงสุดในการเก็บน้ำเชื้อปลาทะเล	11
3	ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่มีคุณภาพสูงสุดในการเก็บน้ำเชื้อปลาน้ำจืด	16
4	ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่มีคุณภาพสูงสุดในการเก็บน้ำเชื้อปลาทะเล	16
5	ส่วนผสมน้ำยา extender ของปลากะรังหงส์	26
6	หลักเกณฑ์การสังเกตเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่	27
7	ส่วนประกอบของสีย้อม Eosin-nigrosin	27
8	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (viability), เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (motility)	31
9	ค่าออสโมลาลิตี้ (osmolality) ของน้ำยา extender สูตรต่าง ๆ	32
10	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา extender 5 ชนิด	33
11	คะแนนการเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ซึ่งแปลงค่ามาจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา extender 5 ชนิด	34
12	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา extender 5 ชนิด	35
13	คะแนนเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา extender 5 ชนิด	36
14	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา MFR ที่อัตราส่วนต่าง ๆกัน	38
15	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา MFR ที่อัตราส่วนต่าง ๆกัน	39
16	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา E 251 ที่อัตราส่วนต่าง ๆกัน	40

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
17	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา E 251 ที่อัตราส่วนต่าง ๆกัน	41
18	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา E 189 ที่อัตราส่วนต่าง ๆกัน	42
19	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา E 189 ที่อัตราส่วนต่าง ๆกัน	43
20	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา 0.1 M CT ที่อัตราส่วนต่าง ๆกัน	44
21	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา 0.1 M CT ที่อัตราส่วนต่าง ๆกัน	45
22	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา NaCl 0.9% ที่อัตราส่วนต่าง ๆกัน	46
23	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา NaCl 0.9% ที่อัตราส่วนต่าง ๆกัน	47
24	คะแนนการเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งด้วยสาร cryoprotectant 5 ชนิด	50
25	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งด้วยสาร cryoprotectant 5 ชนิด	51
26	คะแนนเคลื่อนที่เฉลี่ย เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มในสารcryoprotectant 5 ชนิด ที่ 3 ระดับความเข้มข้น	52
27	เปอร์เซ็นต์การฟักไข่ปลากะรังหงส์ของน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งโดยใช้ 5% ของ DMA และ DMSO เป็นสาร cryoprotectant	54
28	ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การฟักไข่ปลากะรังหงส์	54

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ก1	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะรังหงส์แช่เย็นที่เวลา 60 นาที	72
ก2	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังหงส์แช่เย็นที่เวลา 60 นาที	72
ก3	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะรังหงส์หลังจากแช่แข็ง	73
ก4	ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์ โดยการทำ Kruskal-Wallis	73
ก5	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังหงส์หลังจากแช่แข็ง	74
ก6	ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังหงส์หลังจากแช่แข็ง (นำค่าเฉลี่ยของทุกทรีตเมนต์ไปเปรียบเทียบด้วยวิธี one way ANOVA)	78
ก7	ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังหงส์หลังจากแช่แข็งด้วยความเข้มข้นของสาร cryoprptectant ต่างกัน 3 ระดับ	78
ก8	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังหงส์หลังจากแช่แข็ง (เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีตเมนต์ด้วยวิธี one way ANOVA)	79
ก9	ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังหงส์หลังจากแช่แข็ง (เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีตเมนต์ด้วยวิธี one way ANOVA)	80
ก10	ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การฟักไข่ปลากะรังหงส์ที่ผสมเทียมปลาโดยการใช้สเปิร์มต่าง ๆ (เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีตเมนต์ด้วยวิธี one way ANOVA)	81
ก11	ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การฟักไข่ปลากะรังหงส์ที่ผสมเทียมปลาโดยการใช้สเปิร์มต่าง ๆ (เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีตเมนต์ด้วยวิธี one way ANOVA)	81

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะภายนอกของปลากะรังหงส์	4
2	กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง	17
3	คะแนนการเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ซึ่งแปลงค่ามาจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา extender 5 ชนิด	33
4	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา extender 5 ชนิด	35
5	คะแนนการเคลื่อนที่เฉลี่ยของเสปิร์มปลากะรังหงส์ซึ่งแปลงค่ามาจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา MFR	38
6	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา MFR	39
7	คะแนนการเคลื่อนที่เฉลี่ยของเสปิร์มปลากะรังหงส์ซึ่งแปลงค่ามาจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา E 251	40
8	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา E 251	41
9	คะแนนการเคลื่อนที่เฉลี่ยของเสปิร์มปลากะรังหงส์ซึ่งแปลงค่ามาจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา E 189	42
10	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา E 189	43
11	คะแนนการเคลื่อนที่เฉลี่ยของเสปิร์มปลากะรังหงส์ซึ่งแปลงค่ามาจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา 0.1 M CT	44
12	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา 0.1 M CT	45
13	คะแนนการเคลื่อนที่เฉลี่ยของเสปิร์มปลากะรังหงส์ซึ่งแปลงค่ามาจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา NaCl 0.9%	46

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
14	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา NaCl 0.9%	47
15	คะแนนการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะรังหงส์ในสาร cryoprotectant 5 ชนิด ที่ 3 ระดับความเข้มข้น	50
16	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังหงส์ในสาร cryoprotectant 5 ชนิด ที่ 3 ระดับความเข้มข้น	51

ภาพผนวกที่

ข1	เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)	83
ข2	เครื่องวัด osmolality (Osmometer) 1	83
ข3	เครื่องวัด osmolality (Osmometer) 2	84
ข4	เครื่องลดอุณหภูมิแบบภาคสนาม (Programmable Freezing Control)	84
ข5	อุปกรณ์นับเซลล์สเปิร์ม (Makler 's counting chamber)	85
ข6	หลอดเก็บน้ำเชื้อ (French straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร	85
ข7	การเก็บน้ำเชื้อปลากะรังหงส์	86
ข8	ละลายน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำยา extender	86
ข9	การเตรียมสาร cryoprotectant	87
ข10	ผสมน้ำเชื้อกับสาร cryoprotectant	87
ข11	บรรจุตัวอย่างลงในหลอด (straw) แล้วปิดหลอด	88
ข12	นำหลอด (straw) มาใส่ใน cryochamber ที่ต่ออยู่กับ Freezer control	88
ข13	ลดอุณหภูมิด้วย program crygenesis 4 (จนถึง – 80 องศาเซลเซียส)	89
ข14	นำหลอด (Straws) ออกไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว	89
ข15	ถังไนโตรเจนเหลว (อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส)	90
ข16	นำหลอด (Straw) มาละลายที่อุณหภูมิห้อง (Thawing)	90

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
ข17	นำน้ำเชื้อมาดูการเคลื่อนที่ (motility rate) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง	91
ข18	สเปิร์มปลากะรังหงส์	91
ข19	วิธีการย้อมสีสเปิร์มปลาเพื่อดูเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (viability rates)	92
ข20	การติดสีของสเปิร์ม	92

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

Extender	=	น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อเพื่อเก็บรักษาแบบแช่เย็นหรือแช่แข็ง
Cryoprotectant	=	สารป้องกันเซลล์ระหว่างลดอุณหภูมิในกระบวนการแช่แข็ง
Equilibration time	=	ระยะเวลาภายหลังผสมน้ำเชื้อกับน้ำยาที่มีส่วนผสมของสารไครโอโพรเทคแทนท์ก่อนการลดอุณหภูมิ
Thawing rate	=	อัตราการเพิ่มอุณหภูมิหรือการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง
Freezing rate	=	อัตราการลดอุณหภูมิในการแช่แข็ง
Cryopreservation	=	การเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ ได้แก่ การเก็บรักษาเซลล์ไข่ น้ำเชื้อตัวผู้ ตัวอ่อน หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิตโดยผ่านขบวนการแช่แข็ง แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

ประสิทธิภาพในการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งของปลากะรังหงส์, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828)

Efficient cryopreservation of Humpback Grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828) spermatozoa

คำนำ

ปลากะรังเป็นปลาที่มีรสชาติดีและมีราคาแพงซึ่งเขตการปกครองพิเศษฮ่องกง และประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนเป็นประเทศที่รับประทานปลากะรังมีชีวิตมากที่สุดโดยในปี 2541 เขตการปกครองพิเศษฮ่องกงนำเข้าปลากะรังมีชีวิตทั้งหมดประมาณ 6,500 ตัน ส่วนประเทศสาธารณรัฐประชาชนจีนนำเข้าประมาณ 2,000 ตัน (Rimmer *et al*., 2004) โดยเฉพาะปลากะรังหงส์เป็นปลาที่ตลาดมีความต้องการสูงแต่ปริมาณมีไม่เพียงพอทำให้ปลาชนิดนี้มีราคาแพงมาก และปลาที่ส่งออกส่วนใหญ่เป็นปลาที่จับได้จากธรรมชาติ ในสภาพปัจจุบันพันธุ์ปลากะรังหงส์แทบจะหาไม่พบในแหล่งน้ำตามธรรมชาติของประเทศไทย ถึงแม้ว่ากรมประมงจะสามารถเพาะพันธุ์ปลาชนิดนี้ได้สำเร็จ แต่ปริมาณลูกพันธุ์ปลาที่เพาะได้ยังมีจำนวนน้อย เนื่องจากปัญหาที่เกิดจากของพ่อแม่พันธุ์ โดยเฉพาะความไม่สมบูรณ์เพศของพ่อพันธุ์ ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญมากสำหรับการเพาะเลี้ยงปลาทะเล ในการเพาะพันธุ์และอนุบาลปลากะรังหงส์ยังมีอุปสรรคสำคัญหลายประการที่ทำให้ประสิทธิผลของการเพาะฟักไข่ปลาและการอนุบาลยังไม่สมบูรณ์ ปัจจัยที่สำคัญและมีผลอย่างมากต่อความสำเร็จในการเพาะพันธุ์ปลา คือ การได้มาซึ่งพ่อแม่พันธุ์ที่สมบูรณ์แข็งแรง พ่อแม่พันธุ์ปลากะรังต้องใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงนานอย่างน้อย 3-5 ปี อีกทั้งใช้งบประมาณการเลี้ยงดูมาก โดยส่วนใหญ่ปลากะรังเป็นปลาที่จะเปลี่ยนเพศเมื่อถึงขนาดที่เหมาะสมหรืออายุครบ ทำให้เกิดปัญหาตัวเมียมีไข่ ตัวผู้ไม่มีน้ำเชื้อ หรือตัวผู้น้ำเชื้อสมบูรณ์พร้อมที่จะผสมพันธุ์ แต่ตัวเมียไข่ยังไม่พัฒนาถึงระยะที่จะผสมพันธุ์ ทำให้เสียโอกาสในการเพาะพันธุ์ ปลากะรังหลายชนิด (*Epinephelus* spp.) ที่มีการเพาะเลี้ยงกันอยู่ส่วนใหญ่เป็นปลาที่มีการเปลี่ยนเพศ คือ เปลี่ยนจากเพศเมียเป็นเพศผู้ (protogynous hermaphrodite) เมื่อมีอายุหรือขนาดเริ่มถึงวัยเจริญพันธุ์ปลาจะเป็นเพศเมียก่อน จนกระทั่งเวลาผ่านไปสักระยะหนึ่งเมื่อปลามีอายุมากขึ้นหรือขนาดใหญ่ขึ้นก็จะเปลี่ยนเป็นเพศผู้ (เรณู, 2541) จากรายงานของ Tridjoko (2002) พบว่าปลากะรังหงส์ที่จับได้จากธรรมชาติที่มีความ

ยาวต่ำกว่า 50 เซนติเมตร จะเป็นเพศเมียจะเริ่มเปลี่ยนเพศเมื่อมีความยาว 50-55 เซนติเมตรและจะเป็นเพศผู้เมื่อมีความยาวมากกว่า 55 เซนติเมตร

จากการศึกษาของ เรณูและคณะ (2536) พบว่าปลากะรัง, *Epinephelus malabaricus* เริ่มสร้างรังไข่เมื่อมีอายุ 15 เดือนและ 89.5% ทำหน้าที่เป็นเพศเมีย 3.5% เป็นปลาที่กำลังเปลี่ยนเพศหรือเป็นกะเทย และ 7.0% เป็นปลาเพศผู้ (functional male) จากผลการศึกษาดังกล่าวนี้เห็นได้ชัดว่าในระยะเริ่มเจริญพันธุ์สัดส่วนของปลาเพศผู้มีจำนวนน้อยกว่าปลาเพศเมียมาก

ดังนั้น การศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลามี 2 แบบ คือ การแช่เย็นหรือการเก็บรักษาในระยะเวลาสั้น 2-4 วัน ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส และการเก็บรักษาในระยะยาวโดยวิธีแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส หากมีการดูแลคอยเติมไนโตรเจนเหลวอย่างสม่ำเสมอจะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้ตลอดกาล (กฤษณ์, 2536) และหากสามารถพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บน้ำเชื้อในปลากะรังหงส์เป็นผลสำเร็จก็จะช่วยในการเพาะพันธุ์ปลาชนิดนี้ซึ่งจะแก้ปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นได้อีกทั้งสามารถประยุกต์ใช้เทคนิคนี้กับปลาทะเลชนิดอื่น ๆได้ต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาชนิดของน้ำยาเก็บรักษาน้ำเชื้อหรือน้ำยาเอกซ์เทนเดอร์ (extender) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังหงส์

2. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารรักษาเซลล์ในสภาวะแช่แข็งหรือสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังหงส์

3. ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การฟักไข่ของปลากะรังหงส์

การตรวจเอกสาร

การจำแนกทางอนุกรมวิธาน

ปลากะรังหงส์ หรือกะรังหน้างอน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828) (FAO Species identification sheet, 1983) มีชื่อภาษาอังกฤษว่า Humpback grouper, Mouse grouper, Baramundi cod

การจำแนกปลากะรังหงส์ ตามหลักอนุกรมวิธานได้ดังนี้

Phylum Chordata

Class Osteichthyes

Order Perciformes

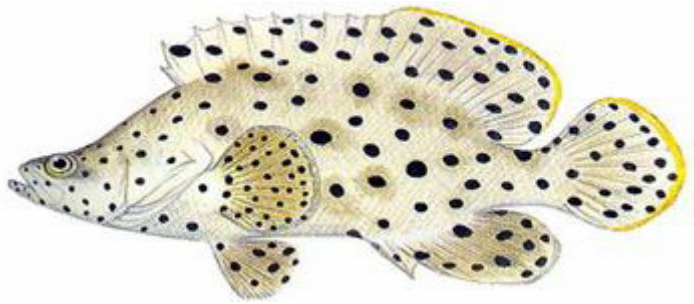
Family Surranidae

Subfamily *Epinephelinae*

Genus *Cromileptes*

Specie *altivelis*

ลักษณะภายนอก ลำตัวแบน หัวเล็ก ครีบยาวปลายมนลำตัวและครีบมีจุดสีดำประอยู่ทั่วไป พื้นตัวขาวมีจุดดำประทั่วตัว (Polkadot) (ภาพที่ 1) ขนาดใหญ่สุด 70 เซนติเมตร หนัก 4.8 กิโลกรัม



ภาพที่ 1 ลักษณะภายนอกปลากะรังหงส์, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828)

ปลากะรังหงส์ชนิดนี้มีลำตัวป้อม และแบนข้างมาก หัวแบนข้างและงอนขึ้น บริเวณหน้าครีบหลังโค้งนูน นัยน์ตามีขนาดปานกลาง ปากกว้างเฉียงขึ้น มุมปากอยู่นัยน์ตา ขากรรไกรบนและล่างใหญ่ มีฟันซี่เล็กละเอียด กระดูกเพดานมีฟันซี่เล็ก ๆ ขอบกระดูกแก้มอันกลางขอบมีซี่ปลายแหลม 3 อัน ครีบหลังมีฐานยาวมีก้านครีบเดี่ยวเป็นซี่แข็งปลายแหลม 9 อัน และก้านครีบแขนง

17-19 อัน จุดเริ่มต้นของครีบหลังอยู่เหนือช่องเหงือก ครีบอกค่อนข้างยาวปลายมน ครีบท้องอยู่ใต้ครีบอก มีก้านครีบเดี่ยวที่เป็นซี่แข็งปลายแหลม 3 อัน ครีบหางมีปลายกลมมน เกล็ดเล็กละเอียด สีลำตัวมีสีพื้นเป็นสีน้ำตาลอ่อนอมเขียวจาง ๆ มีจุดดำบนหัว ลำตัว และครีบทุกครีบ (สมโภชน์, 2547)

แหล่งที่อยู่อาศัยและการแพร่กระจาย เป็นปลาที่อาศัยอยู่ในแนวปะการังทางตะวันตกเฉียงเหนือของออสเตรเลีย บริเวณ Great barrier reef ตลอดบริเวณชายฝั่งเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ชายฝั่งอินโดแปซิฟิคตะวันตก จากตอนใต้ของญี่ปุ่น และไต้หวันถึงอินโดนีเซีย โดยปลาขนาดเล็กพบในบริเวณความลึก 0.5-5 เมตร ส่วนปลาตัวเต็มวัยจะพบในความลึก 40-60 เมตร จัดเป็นประเภทปลากินเนื้อโดยกินปลาขนาดเล็กและสัตว์พวกกุ้ง ปู เป็นปลาที่เปลี่ยนเพศได้เอง โดยเมื่อปลามีขนาดเล็กจะเป็นเพศเมียและเมื่อมีน้ำหนักมากกว่า 2 กิโลกรัมหรือความยาว 50 เซนติเมตรจะเริ่มเปลี่ยนเพศและจะเป็นเพศผู้เมื่อมีความยาวมากกว่า 55 เซนติเมตร (Tridjoko, 2002) ปลากะรังหงส์สามารถเป็นได้ทั้งปลาสวยงามและปลาบริโภค

การเพาะและอนุบาล ปลากะรังหงส์มีการเพาะเลี้ยงกันมากตั้งแต่ปี 2542 ในเกาะบาหลี ประเทศอินโดนีเซีย (เรณู, 2547) สำหรับในประเทศไทยนั้น ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง มีการเพาะพันธุ์ตั้งแต่ปี 2547 โดยใช้พ่อพันธุ์ขนาด 0.9-3.0 กิโลกรัม ความยาว 38.0-59.0 เซนติเมตร แม่พันธุ์ขนาด 2.6-3.0 กิโลกรัม ความยาว 49.0-53.0 เซนติเมตร ให้ปลาวางไข่และผสมเองตามธรรมชาติ ปลาจะวางไข่เวลา 22.00- 02.00 น. ในช่วงทั้งข้างขึ้นและข้างแรม ไข่เป็นไข่ลอยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 800-900 ไมครอน อัตราการฟักประมาณ 36-51 เปอร์เซ็นต์ ใช้เวลาฟักออกเป็นตัว 19-22 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิน้ำ 27-30 องศาเซลเซียส ส่วนการอนุบาลนั้น เมื่อลูกปลาอายุ 3-7 วัน ให้กินโรติเฟอร์ขนาดเล็ก (s-type rotifer) ความหนาแน่น 2-3 ตัว/มิลลิลิตร ลูกปลาอายุ 8-20 วันให้กินโรติเฟอร์ขนาดปกติ อายุ 15- 25 วันให้อาร์ทีเมียแรกฟัก อายุ 26 วันให้อาร์ทีเมียตัวเต็มวัย ปลาข้างเหลืองสับ และอาหารสำเร็จรูป โดยใช้เวลาในการอนุบาล 40-62 วันจะได้ลูกปลาที่มีลักษณะเหมือนตัวเต็มวัย มีขนาดลำตัวยาว 0.43 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 0.9 กรัม (เรณู และคณะ, 2548)

ลักษณะอัณฑะและการสร้างสเปิร์มของปลา

อุทัยรัตน์ (2531) ได้กล่าวไว้ว่า ปลากระดูกแข็งส่วนใหญ่อัณฑะจะมีลักษณะเป็นพูยาว

2 พู อยู่ภายในช่องท้องติดกับผนังช่องท้องด้านบน ลักษณะภายนอกของอัณฑะของปลามีความแตกต่างกันมากทั้งรูปร่างและขนาดซึ่งขึ้นอยู่กับระยะการเจริญเติบโต และยังสัมพันธ์กับฤดูกาลด้วย ลักษณะอัณฑะของปลาที่แตกต่างกัน เช่น ปลาดุกอุยมีอัณฑะเป็นพูยาว 2 พู และแตกแขนงคล้ายนิ้วมือ อัณฑะของปลาดุกด้านมีลักษณะคล้ายคลึงกัน แต่ไม่แตกแขนง ปลาช่อนมีอัณฑะเป็นพูสั้น ๆ และทั้งสองพูมีขนาดไม่เท่ากัน ส่วนลักษณะภายในอัณฑะมีระบบท่อสร้างสเปิร์ม (seminiferous tubule) และกระบวนการสร้างเซลล์สเปิร์ม (spermatogenesis pattern) จะมีความแตกต่างกันไปตามกลุ่มชนิดของปลา แต่มีส่วนที่เป็นโครงสร้างหลักเหมือนกัน คือ อัณฑะแต่ละข้างประกอบด้วยท่อที่ทำหน้าที่สร้างสเปิร์มเป็นหน่วยเล็กที่สุดและเป็นท่อปลายตัน สเปิร์มที่สร้างจากท่อดังกล่าวนี้จะถูกขับเคลื่อนเข้าสู่ท่อน้ำเชื้อขนาดเล็ก คือ วาสเอฟเฟเรนส์ (vas efferens) จำนวนมากมาย แล้วมารวมกันเป็นท่อใหญ่ขึ้นเรียกว่า วาสเดเฟเรนส์ (vas deferens) ซึ่งจะไปเชื่อมรวมกับ วาสเดเฟเรนส์ (vas deferens) ของอัณฑะอีกข้างหนึ่งเป็นท่อสั้น ๆ เปิดออกสู่ช่องขับถ่ายน้ำเชื้อและของเสียจากไต (urogenital pore) สเปิร์มของปลาต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่น ๆ ตรงที่ไม่มีส่วนของ acrosome ทั้งนี้เพราะไข่ปลามี micropyle ซึ่งเป็นทางผ่านของสเปิร์มอยู่แล้ว การพัฒนาการสร้างสเปิร์มของปลามี 2 ขั้นตอน คือ

1 สเปิร์มมาโทเจเนซีส (spermatogenesis) เป็นขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของสเปิร์มโดยการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) ทำให้มีจำนวนสเปิร์มมาโตโกเนีย (spermatogonia) มากมายและพัฒนาไปเป็นไพรมารี สเปิร์มมาโตไซต์ (primary spermatocyte) จากนั้นจะแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (miosis) 2 ครั้ง ได้ เซ็คกันดารี สเปิร์มมาโทไซต์ (secondary spermatocyte) และได้สเปิร์มมาทิด (spermatid) ในที่สุด

2 สเปิร์มมิเอชัน (spermiation) เป็นขั้นที่ spermatid มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นสเปิร์มมาโตซัว (spermatozoa) ซึ่งจะมีหางและพร้อมที่จะมีการปฏิสนธิกับไข่ได้ (วีรพงศ์, 2536)

ลักษณะรูปร่างของสเปิร์ม

สเปิร์มของปลามีขนาดเล็กมาก เนื่องจากไม่มีอาหารสะสม มีลักษณะขุ่นขาว คล้ายน้ำนม ที่เรียกว่า milt ซึ่งจะถูกปล่อยออกมาในขณะปลาเพศเมียวางไข่ สเปิร์มสามารถเคลื่อนที่โดยอาศัยการโบกพัดของหาง อายุของสเปิร์มขึ้นอยู่กับชนิดของปลา สเปิร์มแบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ

1. ส่วนหัว (head) เป็นส่วนของนิวเคลียสที่มีโครโมโซมเพียง 1 ชุด และส่วนของนิวเคลียสจะมี cytoplasm หุ้มอยู่บาง ๆ รูปร่างของหัวอาจมีลักษณะเป็นรูปไข่ หยัก หรือเป็นแท่งรี ๆก็ได้ ขึ้นกับชนิดของปลา ส่วนใหญ่จะพบเป็นรูปกลม

2. ส่วนกลาง (middle piece) เป็นส่วนที่ใช้เชื่อมระหว่างส่วนหัวกับส่วนหาง มีระยะสั้นมาก รูปร่างต่างกันออกไปตามแต่ชนิดของปลา ประกอบด้วยส่วนแกนกลางของหางและล้อมรอบด้วย cytoplasm ซึ่งภายในจะมี mitochondria และ centriole อยู่ เป็นส่วนที่เก็บฮอร์โมน

3. ส่วนหาง (tail) เป็นเส้นขนขนาดเล็กมาก และยาว จะประกอบด้วยเซลล์ที่เรียงกันเป็นวงรอบ ๆแกนกลาง ซึ่งล้อมรอบด้วย plasma membrane ซึ่งส่วนใหญ่จะมี microtubule เป็นแกนกลาง 1 คู่และมี microtubule เรียงอยู่รอบ ๆอีก 9 คู่ ทำหน้าที่โบกพัดช่วยในการเคลื่อนที่ (อภิชาติ, 2546)

ปลากระดูกแข็งส่วนมากจะมีสเปิร์มที่มีส่วนหัวเป็นรูปทรงกลม (spherical) หรือ ทรงรี (ovate) โดยส่วนหัวมีขนาดประมาณ 2-3 ไมโครเมตร และความยาวของสเปิร์มจากหัวจนถึงปลายหางประมาณ 40-60 ไมโครเมตร ส่วนกลางมีขนาดเล็ก และส่วนใหญ่มีหาง 1 หาง (วีรพงศ์, 2536) น้ำเชื้อปลาที่รีดออกมาสด ๆและสะอาด จะมีสีขาวคล้ายน้ำนมแต่ข้นเหนียวและมีกลิ่นคาวจัด ถ้านำไปตรวจสอบดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เซลล์สเปิร์มของปลาทั่วไปจะยังไม่มีการเคลื่อนที่ (immotile) แต่เมื่อน้ำเชื้อปลาผสมกับน้ำ ขณะที่อยู่ในแหล่งผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ หรือเมื่อนำน้ำหยดลงบนแผ่นกระจกสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะพบว่าเซลล์สเปิร์มถูกกระตุ้นให้มีการเคลื่อนที่อย่างรุนแรงอันเป็นผลมาจากการเจือจาง (diluent effect) แต่การเคลื่อนที่ดังกล่าวจะสิ้นสุดลงอย่างรวดเร็วภายในเวลาประมาณไม่เกิน 1 นาที (กฤษณ์, 2536) ดังนั้นการประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์สเปิร์มภายใต้กล้องจุลทรรศน์จึงต้องทำอย่างรวดเร็ว ส่วนน้ำเชื้อที่มีสิ่งอื่นเจือปน เช่น เลือด ปัสสาวะ อุจจาระ หรือ น้ำ เป็นน้ำเชื้อที่มีคุณภาพไม่ดีไม่เหมาะแก่การเก็บรักษาและเมื่อนำน้ำเชื้อสดมาผสมกับไข่ ก็อาจเป็นเหตุทำให้มีอัตราการผสมและฟักออกเป็นตัวต่ำกว่าน้ำเชื้อที่สะอาด ปริมาตรของน้ำเชื้อที่รีดได้จากปลาตัวหนึ่งในแต่ละครั้ง ความหนาแน่นของเซลล์สเปิร์มจะมีความผันแปรไปตามฤดูกาล และช่วงระยะเวลาในการผสมพันธุ์

การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อปลา

การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อปลาตัวผู้สรุปได้ 3 วิธี (อุทัยรัตน์, 2538) คือ

1. รีดโดยตรงจากตัวปลา โดยกดเบา ๆ ตรงส่วนท้อง น้ำเชื้อจะไหลออกมา
2. ใช้เข็มฉีดยาดูดจากช่องเปิดของน้ำเชื้อ (urogenital pore)
3. โดยการผ่าท้อง เพื่อนำเอาอัณฑะ (testis) ไปบดแยกเอาน้ำเชื้อออกไปผสมเทียม ซึ่งมักปฏิบัติกับปลาซึ่งมีน้ำเชื้อน้อย หรือไม่สามารถรีดน้ำเชื้อได้

วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา

น้ำเชื้อปลาถ้านำมาปั่นแยก (centrifuge) จะแยกได้ 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นเซลล์สเปิร์ม (spermatozoa) และเป็นของเหลว (seminal fluid) เช่นเดียวกับน้ำเชื้อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม องค์ประกอบทางเคมีและฟิสิกส์ของของเหลวในน้ำเชื้อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีการศึกษากันอย่างละเอียด แต่ในปลามีการศึกษาค่อนข้างจำกัด ข้อมูลในเรื่องนี้มีความสำคัญยิ่งต่อการพัฒนาสูตรน้ำยาสำหรับเก็บแช่แข็งเซลล์สเปิร์มปลาเพราะองค์ประกอบทางเคมีและฟิสิกส์ของของเหลวในน้ำเชื้อปลาแต่ละชนิดย่อมแตกต่างกัน ดังนั้นการเตรียมน้ำยา extender ที่เหมาะสมกับน้ำเชื้อปลาแต่ละกลุ่ม ต้องใช้สารเคมีที่เมื่อละลายน้ำเชื้อแล้วให้อิออนชนิดที่เหมาะสมและน้ำยานั้นควรมี osmolality ใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเชื้อปลาเพื่อป้องกันการกระตุ้นการเคลื่อนไหวหรือการใช้พลังงานของสเปิร์ม ตลอดจนการรักษาสเปิร์มให้คงรูป และมีชีวิตอยู่รอดตลอดเวลาที่ทำการเก็บรักษา (กฤษณ์, 2536)

วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาที่นิยมทำกันมี 2 วิธี คือ การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะสั้น (Short-term storage) เป็นการเก็บในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 0 องศาเซลเซียส เล็กน้อย โดยสารสำคัญที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้น คือ น้ำยา extender ซึ่งเป็นสารที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อก่อนการเก็บรักษาเพื่อไม่ให้น้ำเชื้อมีความเข้มข้นมากเกินไป อีกทั้งมีบทบาทในการลดการเคลื่อนที่และการใช้พลังงานของเซลล์เสปิร์ม และอีกวิธีหนึ่ง คือ การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะยาว (long-term storage) ซึ่งต้องอาศัยน้ำยา extender สาร cryoprotectant และ อัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rates) ที่เหมาะสม จากนั้นนำน้ำเชื้อที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งเก็บในถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

1. การเก็บน้ำเชื้อแบบระยะสั้น เป็นการเก็บรักษาในตู้เย็นหรือถังน้ำแข็งอุณหภูมิสูงกว่า 0 องศาเซลเซียสเล็กน้อย ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีนี้สามารถเก็บได้ทั้งสภาพเข้มข้น หรือเจือจางด้วยสารละลายที่มีความเหมาะสม ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาชนิดต่าง ๆ ที่มีผู้ศึกษาไว้ทั้งในและต่างประเทศ (ตารางที่ 1,2) เช่น จากการศึกษาของ นลินี และคณะ (2526) ในปลาตะเพียนขาว, *Puntius gonionotus* โดยเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ใช้น้ำยา extenders 5 สูตร ได้แก่ Ringer' s solution, NaCl-$KHCO_3$, sucrose-$KHCO_3$, minimal medium สำหรับเลี้ยงยีสต์ และ sodium metabisulfite มีอัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 1 ต่อ 3 หลังจากการเก็บรักษานาน 96 ชั่วโมง พบว่าน้ำยา extender ทุกสูตรให้เปอร์เซ็นต์เซลล์สเปิร์มมีชีวิต อัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักออกเป็นตัวอยู่ระหว่าง 20-68%, 1.6-23.7% และ 0-0.251% ตามลำดับ น้ำยา extender ที่ให้เปอร์เซ็นต์เซลล์สเปิร์มมีชีวิตสูงสุด (68%) ได้แก่ sucrose-$KHCO_3$ และขณะเดียวกันก็ให้อัตราการปฏิสนธิสูงสุด (23.7%) ด้วย แต่อัตราการฟักออกเป็นตัวมีค่าเป็นศูนย์ (0%)

นอกจากนี้อุทัยรัตน์ (2526) ก็ทดลองเก็บน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว, *Puntius gonionotus* ในตู้เย็นเช่นเดียวกัน โดยเก็บในสภาพเข้มข้นและเจือจางด้วยน้ำยา extender เป็น 5 ต่อ 3 เก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นเวลานาน 24 และ 72 ชั่วโมง จึงนำมาผสมกับไข่สดพบว่าน้ำเชื้อที่เก็บรักษาในสภาพเข้มข้นมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ 73.14% และ 18.25% ตามลำดับ ส่วนน้ำเชื้อที่เก็บรักษาใน Rinsing solution ที่ให้อัตราการปฏิสนธิเป็น 60.17% และ 3.17% ตามลำดับ

นลินี (2527) ทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว, *Puntius gonionotus* เช่นเดียวกัน โดยศึกษาน้ำยา extender 16 สูตร อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 1 ต่อ 3 เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 5-10 องศาเซลเซียส นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ผลจากการศึกษาพบว่าน้ำยา extenders สูตรที่ 16 ซึ่งประกอบด้วย $KHCO_3$ 125 mM, Sucrose 250 mM และ reduced glutathione 9.75 mM ให้ผลดีกว่าน้ำยา extender สูตรอื่น ๆ คือ มีเปอร์เซ็นต์เซลล์สเปิร์มเคลื่อนที่เป็น 76%, 71% และ 67% ตามลำดับของระยะเวลาที่เก็บรักษาและในน้ำยา extender สูตรเดียวกัน (สูตรที่ 16) Hulata and Rothbard (1979) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไน, *Cyprinus carpio* แบบระยะสั้น โดยใช้ rinsing solution ซึ่งประกอบด้วย 0.3% Urea และ 0.4% NaCl เป็นน้ำยา extender เก็บที่อุณหภูมิ 0 ถึง 4 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 45 ชั่วโมง โดยมีอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด และใช้น้ำยาเดียวกันนี้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาทอง, *Carassius auratus* พบว่าสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 3 – 5 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 30 วัน

Withler (1982) ทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อในสภาพเข้มข้นเช่นเดียวกันโดยศึกษาปลายี่สกเทศ *Labeo rohita* ปลาไน, *Cyprinus carpio* ปลาตะเพียนขาว, *Puntius gonionotus* และปลาสวาย, *Pangasianodon hypopthalmus* โดยบรรจุน้ำเชื้อในหลอดฉีดยาพลาสติกเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-9 องศาเซลเซียส ผลจากการศึกษาพบว่า น้ำเชื้อปลายี่สกเทศหลังจากการเก็บนาน 23 นาที นำมาผสมกับไข่ได้อัตราการปฏิสนธิ 92% ปลาไนหลังจากการเก็บรักษานาน 75, 100 และ 210 นาที มีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มเคลื่อนที่ 100% แต่เมื่อเก็บรักษานาน 24 ชั่วโมงมีสเปิร์มเคลื่อนที่เพียง 2% ในปลาตะเพียนขาวเก็บนาน 5 ชั่วโมง 30 นาที มีสเปิร์มเคลื่อนที่ 15% และปลาสวายหลังจากการเก็บรักษานาน 10, 50 และ 80 นาที มีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มเคลื่อนที่ 100% แต่เมื่อเก็บรักษานาน 18 ชั่วโมง และ 3-5 วัน มีสเปิร์มเคลื่อนที่ 10% และ 0% ตามลำดับ

ในทำนองเดียวกัน Saad *et al* (1988) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไน, *Cyprinus carpio* ในระยะสั้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและอัตราการผสมกับไข่จะสูงในวันที่ 1 และ 2 และจะลดลงเรื่อย ๆจนเป็น 0 หลังจากเก็บรักษานาน 6-8 วัน แต่เมื่อเติมสารปฏิชีวนะ(50 μg/ml streptomycin + 50 IU bipenicillin) ในน้ำยา extender พบว่าในการเก็บรักษา 8 วัน สเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่ 100% เมื่อเก็บรักษานานถึง 16 วันก็ยังมีการผสมกับไข่ถึง 20%

ศิริพร และคณะ (2550) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกเทศ, *Clarias gariepinus* แบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส โดยศึกษาในสารละลายบัฟเฟอร์ 5 ชนิดภายใน tissue culture flasks ในอัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:3 โดยปริมาตรและประเมินประสิทธิภาพการเก็บรักษาในช่วงเวลาต่าง ๆของฤดูผสมพันธุ์วางไข่ พบว่าสารละลายบัฟเฟอร์ 7 และ Ca-F HBSS มีความเหมาะสมมากที่สุดในการแช่เย็นน้ำเชื้อปลาดุกเทศ เนื่องจากสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด 144 ชั่วโมง ก่อนที่สเปิร์มจะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl ระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (extender milt) ลดลงในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ โดยน้ำเชื้อที่รวบรวมในช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์วางไข่ สามารถเก็บรักษาได้นานกว่าน้ำเชื้อที่เก็บรักษาในช่วงกลางฤดูหรือปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และการใช้อัตราส่วนเจือจางน้ำเชื้อต่อสารละลายบัฟเฟอร์ไม่มีผลต่อระยะเวลาการเก็บรักษา จากข้อมูลจะเห็นได้ว่าชนิดของน้ำยา extender ที่เหมาะสมนั้นนอกจากจะสามารถยืดเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้นแล้ว ยังสามารถใช้เจือจางเพื่อเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อได้อีกด้วย จึงน่าจะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาและประยุกต์ใช้กับปลากะรังหงส์ต่อไป

ตารางที่ 1 ชนิดของน้ำยา extender ที่มีคุณภาพสูงสุดในการเก็บน้ำเชื้อปลาน้ำจืด

ชนิดปลา (species)	น้ำยา extender	เอกสารอ้างอิง
ปลาตะเพียนขาว, *Puntius gonionotus*	ซูโครส-$KHCO_3$	นลินี และคณะ, 2526ปลา
ตะเพียนขาว, *Puntius gonionotus*	ซูโครส-$KHCO_3$	อุทัยรัตน์, 2526
ปลาตะเพียนขาว, *Puntius gonionotus*	$KHCO_3$ 12 mM+ ซูโครส 250 mM + glutathione 9.75 mM	นลินี, 2527
ปลาตะเพียนขาว, *Puntius gonionotus*	rinsing solution (urea 0.3% + NaCl 0.4%)	Hulata and Rothbard, 1979
ปลาไน, *Cyprinus carpio* และ ปลาทอง, *Carassius auratus*	rinsing solution (urea 0.3% + NaCl 0.4%)	Hulata and Rothbard, 1979
ปลาดุกเทศ, *Clarias gariepinus*	สารละลายบัฟเฟอร์ 7 และ Ca-F HBSS	ศิริพร และคณะ, 2550
ปลาดุกเทศ, *Clarias gariepinus*	กลูโคส 50%	Steyn *et al*., 1985
ปลาบึก, *Pangasianodon gigas*	ซูโครส + $KHCO_3$+ reduced glutathione	Mongkonpunya *et al*., 1992
ปลาบึก, *Pangasianodon gigas*	CF-HBSS, NaCl 0.9%	พลชาติ และคณะ, 2550

ตารางที่ 2 ชนิดของน้ำยา extender ที่มีคุณภาพสูงสุดในการเก็บน้ำเชื้อปลาทะเล

ชนิดปลา (species)	น้ำยา extender	เอกสารอ้างอิง
ปลาหมอทะเล, *Epinephelus lanceolatus*	MFR, CT+กลูโคส 1-2%	เรณู และคณะ, 2542
ปลาแซลมอน, *Salmon salar* และ ปลาคอด, *Gadus morhua*	ซูโครส + $KHCO_3$ + reduced glutathione	Mounib, 1978
ปลา turbot, *Scophthalmus maximus*	MMM	Dreanno *et al*., 1997
ปลา sturgeon, *Acipenser baeri*	tris-sucrose-KCl, tris-NaCl	Glogowski *et al*., 2002
ปลา seaperch, *Lateolabrax japonicus*	MPRH	Ji *et al*., 2004

2. การเก็บรักษาแบบระยะยาว เป็นการเก็บแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีนี้ถ้ามีการเลือกใช้น้ำยาที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant (สารที่ช่วยป้องกันความเสียหายของเซลล์ในกระบวนการแช่แข็ง) ระยะ equilibration time (ช่วงเวลาหลังจากการผสมกับน้ำเชื้อกับสาร cryoprotectant ก่อนทำการแช่แข็ง) และอัตราการลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็ง ถ้ามีการปฏิบัติและเลือกใช้อย่างถูกต้องเหมาะสมกับน้ำเชื้อปลาแต่ละชนิด สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาได้นานหลายสิบปี เมื่อจะใช้ก็นำออกมาละลายด้วยวิธีการและอุณหภูมิที่เหมาะสม ทำให้ได้ผลการเพาะฟักผสมเทียมที่มีประสิทธิภาพสูงไม่ต่างจากน้ำเชื้อสด ดังนั้นตลอดเวลาที่ผ่านมา 30 กว่าปีจึงมีผู้ศึกษาทดลองพัฒนาวิธีการเก็บแช่แข็งน้ำเชื้อปลาชนิดต่าง ๆ ให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด (ตารางที่ 3,4) เช่น จากการพัฒนาวิธีการของ Mounib *et al*. (1968) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในปลา Atlantic cod, *Gadus morhua* โดยใช้อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 1 ต่อ 3 ภายหลังการเก็บรักษานาน 60 วัน นำมาผสมกับไข่สดได้อัตราการปฏิสนธิ 36% เมื่อเปรียบเทียบกับการผสมด้วยน้ำเชื้อสดและไข่สดซึ่งได้ 79%

Ott and Horton (1971) ทดลองเก็บน้ำเชื้อปลา Chinook salmon, *Oncorhynchuh tshawytscha* และปลา coho salmon, *O. kisutch* แบบแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ด้วยน้ำยาที่มีส่วนผสมของ manitol และใช้ DMSO (dimethyl sulfoxide) เข้มข้น 8% ภายหลังการเก็บแช่แข็งนาน 7 วันนำน้ำเชื้อออกมาละลายผสมกับไข่สดให้อัตราการปฏิสนธิ 38% และ 79% ต่อมา Mounibb (1978) ได้พัฒนาสูตรน้ำยาในการเก็บรักษาแบบแช่แข็งในปลาแซลมอนและปลาคอด (*Salmon salar* และ *Gadus morhua*) ซึ่งน้ำยา extender ดังกล่าวประกอบด้วย $KHCO_3$, sucrose และ reduced glutathione และใช้ 12.5% DMSO เป็นสาร cryoprotectant สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ดี คือ มีอัตราปฏิสนธิเป็น 80% และ 59% ในปลาแซลมอนและคอดตามลำดับ

จากการเก็บรักษาเบื้องต้นของ Steyn *et al*.(1985) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกเทศ *Clarias gariepinus* แบบแช่แข็งในสารละลายต่าง ๆ ได้ผลเป็นที่น่าพอใจ คือ น้ำเชื้อที่เก็บในสารละลาย 50% glucose มีสาร cryoprotectant เป็น 5% glycerol ระยะ equibration time 60 นาที อัตราการลดอุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสต่อนาที หลังจากการเก็บนาน 1, 30 และ 60 วัน ภายหลังการละลายที่อุณหภูมิน้ำ 25 องศาเซลเซียส สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ 40% 20% และ 20 % ตามลำดับเวลาที่รักษา

สองปีต่อมา Steyn and Van Vuren (1987) ได้ทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกเทศ, *Clarias gariepinus* แบบแช่แข็งอีก โดยใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองในปี ค.ศ. 1985 ผลจากการเก็บรักษาน้ำเชื้อนาน 14 วัน พบว่าน้ำเชื้อที่เก็บในสารละลายที่มีส่วนผสมของ 11% glycerol ระยะ equilibration time 20 นาที อัตราการลดอุณหภูมิ 11 องศาเซลเซียสต่อนาที ภายหลังการละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ผสมกับไข่สดให้อัตราการฟักเป็นตัวสูงสุด 51.2%

Mongkonpunya *et al*. (1992) ได้ทดลองเก็บน้ำเชื้อปลาบึก, *Pangasianodon gigas* (Chevey) แบบแช่แข็ง ในน้ำยาประกอบด้วย $KHCO_3$ sucrose และ reduced glutathione (1.25, 8.55 และ 0.3 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ) ใช้อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 1 ต่อ 3 และใช้ 8% DMSO ทำการลดอุณหภูมิโดยแขวนในถังไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส นาน 2, 360 และ 540 วัน นำมาละลายที่อุณหภูมิน้ำ 70-80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำไปทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อ โดยดูอัตราการผสมกับไข่สดของปลาบึก ปลาสวายแม่น้ำโขง, *Pangasius conchophilus* และปลาสวาย, *Pangasianodon hypopthalmus* ตามลำดับเวลาในการเก็บรักษา ให้ผลการทดลองเป็น 67.7 $\pm$ 7.1, 67.7 $\pm$ 0.8 และ 34.7 $\pm$ 5.7% ตามลำดับ

Linhart *et al*. (1993) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา European catfish, *Silurus glanis* L. ในสารละลายที่ประกอบด้วย NaCl 200 mM, Tris 30 mM, pH 7 ใช้สาร cryoprotectant เป็น 12% และ 15% glycerol ทำการลดอุณหภูมิของน้ำเชื้อซึ่งเก็บในรูปของ pellets เหนือไนโตรเจนเหลว (-80 ถึง -85 องศาเซลเซียส) นาน 10 นาที ก่อนจะเก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) และนำออกมาละลายที่อุณหภูมิน้ำ 36 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที ให้อัตราการผสมกับไข่เฉลี่ย 45.2% และอัตราการฟักเป็นตัวเป็น 70.6 % และเมื่อเปรียบเทียบความสมบูรณ์ของลูกปลาที่ได้จากน้ำเชื้อเก็บแช่แข็งก็ไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด

เรณู และคณะ (2542) ทำการเก็บน้ำเชื้อปลาหมอทะเล, *Epinephelus lanceolatus* ในภาวะแช่แข็งในถังไนโตรเจน (-196 องศาเซลเซียส) โดยใช้น้ำยา extender สูตรต่าง ๆ คือ น้ำยาริงเกอร์สำหรับปลาทะเล (MFR), สารละลายโซเดียมซิเทรท 0.1 โมลา (CT), น้ำยาสูตร 251(E 251) และน้ำยาสูตร 189 (E 189) ผลการทดลองแสดงว่าเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มเซลล์ที่มีชีวิตในน้ำยาที่มีส่วนผสม MFR, CT เติมกลูโคส 1-2 % และ DMSO 10 % มีเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตมากกว่า 90% ในเวลา 43 วันและพบว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงเมื่อเก็บไว้นาน

พลชาติและคณะ (2550) ทดลองเก็บน้ำเชื้อปลาบึก, *Pangasianodon gigas* โดยวิธีแช่เย็น ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยา extenders เจือจาง 3 สูตร คือ CF-HBSS, 0.9% NaCl และ MPG ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึกแบบระยะสั้นนาน 192 ชั่วโมง (8 วัน) พบว่าน้ำยา CF-HBSS, 0.9% NaCl ในอัตราเจือจาง 5 เท่ามีประสิทธิภาพดีกว่าในอัตราเจือจาง 3 และ 10 เท่า ส่วนน้ำยา MPG ในทุกอัตราเจือจางส่งผลให้สเปิร์มปลาบึกตายทั้งหมดเมื่อเก็บนาน 48 ชั่วโมง ประสิทธิภาพของสาร cryoprotectant 2 ชนิด คือ DMSO และเมธานอลที่ความเข้มข้น 2-25% ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึกแบบระยะสั้นนาน 0-120 นาที พบว่าเมื่อความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ทั้ง 2 ชนิดเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนที่ลดลง โดยเมธานอลมีพิษต่อสเปิร์มปลาบึกต่ำกว่า DMSO ในทุกระดับความเข้มข้นและระยะเวลาเก็บน้ำยา extender เจือจาง พบว่าการใช้น้ำยากลูโคส 5% และ ฟรุกโตส 6% ให้ผลไม่แตกต่างกันในการแช่เย็นน้ำเชื้อปลาบึก แต่ให้ผลดีกว่าน้ำยา CF-HBSS ทั้งในปริมาณสเปิร์มและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนที่ ส่วนการลดอุณหภูมิด้วยวิธีการ 3 แบบ คือ แบบที่ 1 ให้สัมผัสไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม อัตราลด -4.62 องศาเซลเซียสต่อวินาที แบบที่ 2 สัมผัสไอไนโตรเจนเหลวในถังเก็บ อัตราลด -12.06 องศาเซลเซียสต่อวินาที และแบบที่ 3 ใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ อัตราลด -3.8 องศาเซลเซียสต่อวินาที ปรากฏว่าทั้ง 3 แบบให้ผลในด้านปริมาณสเปิร์มไม่แตกต่างกัน แต่แบบที่ 1 และ 3 มีผลให้สเปิร์มเคลื่อนที่นานกว่าแบบที่ 2 และเมื่อนำน้ำเชื้อปลาบึกซึ่งผ่านการลดอุณหภูมิด้วยวิธีในแบบที่ 3 และเก็บรักษานาน 2-343 วันมาละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 8 วินาที ปรากฏว่าไม่มีความแตกต่างทั้งปริมาณสเปิร์มและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนที่ ประสิทธิภาพของน้ำเชื้อปลาบึกที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นในการผสมเทียม โดยทำการผสมเทียมไข่ปลาบึกด้วยน้ำเชื้อที่แช่เย็นนาน 377 วันและน้ำเชื้อสดซึ่งผ่านการเจือจางด้วยน้ำยาและอัตราเจือจางเดียวกัน แต่ให้อัตราส่วนของสเปิร์มมีชีวิตต่อไข่ 1 ใบในการผสม ในปริมาณ 1.48×10^5 และ 5.37×10^5 เซลล์ ตามลำดับ ปรากฏว่าน้ำเชื้อ 2 แบบให้ผลไม่แตกต่างกัน

Ji *et al*. (2004) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา sea perch, *Lateolabrax japonicus* ด้วยน้ำยา extender 3 สูตร คือ MPRS, D-15 และ MMM ในอัตราส่วนน้ำเชื้อ:น้ำยา เท่ากับ 1:1 โดยใช้หลอดฟางขนาด 1.8 มิลลิลิตร และสาร cryoprotectant ที่ใช้ คือ DMSO, DMF, Glycerol และ methanol ที่ระดับความเข้มข้น 6 %, 10% และ 14% พบว่าสารประกอบที่เหมาะสมในการแช่เย็น ประกอบด้วย MPRS และ 10% DMSO และเก็บไว้ได้นาน 3 วัน และ 1 ปี ซึ่งให้ผลการปฏิสนธิไม่แตกต่างกันเมื่อเทียบกับน้ำเชื้อสด

Richardson *et al*. (1999) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตาเดียว, *Paralichthys olivaceus* โดยใช้หลอดฟางที่มีขนาดต่างกัน 2 ขนาด คือ 0.25 มิลลิลิตร และ 1.7 มิลลิลิตร พบว่าอัตราการปฏิสนธิเมื่อเทียบกับน้ำเชื้อสด ได้เป็น 59%, 54% 64% ตามลำดับ และอัตราการเพาะฟักเมื่อเทียบกับน้ำเชื้อสด ได้เป็น 52%, 42% และ 36% ตามลำดับ

Zhang *et al*. (2003) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตาเดียว, *Paralichthys olivaceus* ด้วยน้ำยา extenders 6 สูตร คือ น้ำยา NaCl, KCl, CaCl, MgCl, $MgSO_4$ และ $NaHCO_3$ และใช้สาร cryoprotectant 3 ชนิด คือ DMSO, Glycerol และ methanol ในอัตราส่วนน้ำเชื้อ:น้ำยา เท่ากับ 1:2 โดยอัตราการลดอุณหภูมิที่สุดท้ายนั้นแตกต่างกัน คือ -15, -40, -80, -110 และ -160 แล้วเก็บในไนโตรเจนเหลวนาน 5 นาที เมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่ 28 องศาเซลเซียส พบว่า Glycerol ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ การปฏิสนธิ และการเพาะฟักดีที่สุด

Glogowski *et al*. (2002) ทำการศึกษาเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา sturgeon*, Acipenser baeri* แบบแช่แข็งด้วยน้ำยา extender 3 สูตร คือ tris-sucrose-KCl, tris-NaCl และ tris-sucrose และผสมด้วย 10% methanol โดยใช้หลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ใช้อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา เท่ากับ 1:1 พบว่าสารที่เหมาะสมในการแช่แข็ง คือ tris-sucrose-KCl และ tris-NaCl โดยที่นำมาละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 6 วินาที พบว่าให้อัตราการเพาะฟักสูงที่สุดเมื่อเทียบกับน้ำเชื้อสด

Dreanno *et al*. (1997) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา turbot, *Scophthalmus maximus* ด้วยน้ำยา extenders 4 สูตร คือ MMM, ASL1, ASL2 และ MRM และใช้สาร cryoprotectant 4 ชนิด คือ DMSO, Glycerol, Ethylene glycol และ methanol ที่ระดับความเข้มข้น 5%, 10% และ 15% ในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 1:2 พบว่า MMM เป็นน้ำยา extender ที่ดีที่สุด และสาร cryoprotectant ที่ดีที่สุด คือ 10% DMSO

นอกจากนี้การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งเป็นทางเลือกหนึ่งที่ช่วยแก้ปัญหาในปลาที่ใกล้จะสูญพันธุ์ (Endangered species) หรือใช้ในโปรแกรมการผสมพันธุ์ปลา เช่น androgenesis (Thorgaard *et al*., 2000) และผลิตปลาข้ามสายพันธุ์ (Hybridize species) ได้ เช่น การใช้น้ำเชื้อแช่แข็งของ blue catfish, *Ictalurus furcatus* ผสมกับไข่ของ Channel catfish, *Ictalurus punctatus* โดย Bart *et al*. (1998) นอกจากนี้ยังสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน ลดพื้นที่การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ สามารถขนส่งได้ง่ายเมื่อเทียบกับปลามีชีวิต (Piironen, 1993 ; Chereguini *et al*., 2001)

และสามารถแก้ปัญหาสำหรับปลาที่ไข่และน้ำเชื้อสุกไม่พร้อมกัน เช่น ปลาเผาะหรือปลาโมง, *Pangasius bocourti* (Kwantong, 2003) อย่างไรก็ตามวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลามีค่าใช้จ่ายในการดำเนินงาน และค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษา จึงควรใช้น้ำเชื้อปลาแช่แข็งให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด

ตารางที่ 3 ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่มีคุณภาพสูงสุดในการเก็บน้ำเชื้อปลาน้ำจืด

ชนิดปลา (species)	สาร cryoprotectant	เอกสารอ้างอิง
ปลาดุกเทศ, *Clarias gariepinus*	glycerol 5%	Steyn *et al*., 1985
ปลาดุกเทศ, *Clarias gariepinus*	glycerol 5%	Steyn and Van Vuren, 1987
ปลาบึก, *Pangasianodon gigas*	DMSO 8%	Mongkonpunya *et al*., 1992
ปลา European catfish, *Silurus glanis*	glycerol 12% และ 15%	Linhart *et al*., 1993

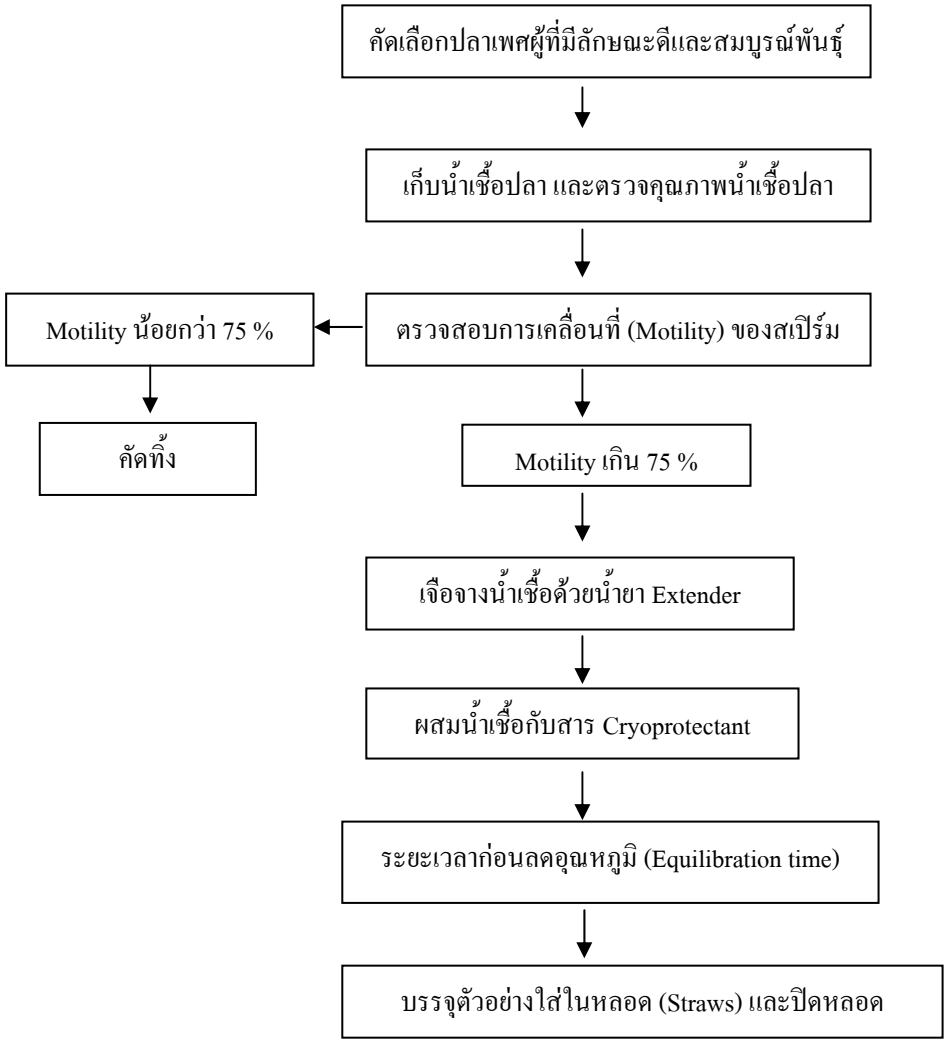
ตารางที่ 4 ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่มีคุณภาพสูงสุดในการเก็บน้ำเชื้อปลาทะเล

ชนิดปลา (species)	สาร cryoprotectant	เอกสารอ้างอิง
ปลาหมอทะเล, *Epinephelus lanceolatus*	DMSO 10%	เรณู และคณะ, 2542
ปลา chainook salmon, *Oncorhynchuh tshawytscha* และปลา coho salmon, *O. kisutch*	DMSO 8%, manitol 8%	Ott and Horton, 1971
ปลาแซลมอน, *Salmon salar* และ ปลาคอด, *Gadus morhua*	DMSO 12.5%	Mounib, 1978
ปลา turbot, *Scophthalmus maximus*	DMSO 10%	Dreanno *et al*., 1997
ปลา sturgeon, *Acipenser baeri*	methanol 10%	Glogowski *et al*., 2002
ปลาตาเดียว, *Paralichthys olivaceus*	glycerol	Zhang *et al*., 2003
ปลา seaperch, *Lateolabrax japonicus*	DMSO 10%	Ji *et al*., 2004

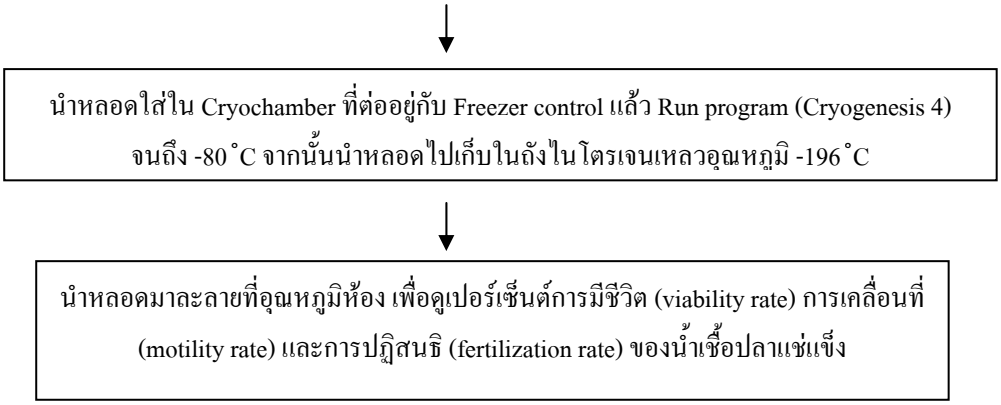
การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง

การเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นระยะเวลานานโดยวิธีแช่แข็ง มีการศึกษามาเป็นเวลานานส่วนใหญ่เน้นไปที่ปลาที่สำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น ปลากลุ่ม Salmonids Cyprinids และกลุ่ม catfish แบ่งได้เป็นกลุ่มปลาน้ำจืด 49 เปอร์เซ็นต์ ปลาทะเล 31 เปอร์เซ็นต์ ปลาน้ำกร่อย 7 เปอร์เซ็นต์ และปลาที่อพยพระหว่างน้ำจืดกับน้ำทะเล 13 เปอร์เซ็นต์ (Tiersch, 2000)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็งมีขั้นตอนและรายละเอียดดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2 กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง



ภาพที่ 2 (ต่อ)

(**ที่มา**: ดัดแปลงจาก Kwantong, 2003)

1. การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อปลา (sperm collection) สำหรับการรีดน้ำเชื้อ โดยทั่วไปนิยมรีดด้วยมือ โดยใช้มือบีบหรือกด รีดส่วนท้องของปลา สำหรับภาชนะที่ใช้รองรับน้ำเชื้อต้องสะอาดและเช็ดให้แห้ง และควรเป็นภาชนะที่มีขีดบอกปริมาตรเพื่อสะดวกในการอ่านและบันทึกปริมาตรทันทีภายหลังจากการรีดน้ำเชื้อแล้ว (กฤษณ์, 2536)

2. น้ำยาที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลา (extender) มีผู้คิดสูตรน้ำยาที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลาไว้มากมาย ซึ่งคุณสมบัติที่สำคัญของน้ำยาเหล่านี้ คือ มีคุณสมบัติเป็น isotonic กับ น้ำเชื้อ มีบัฟเฟอร์ (buffer) เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งเกิดจาก metabolite ของตัวสเปิร์ม มีอาหาร (nutrient) เพื่อเป็นแหล่งพลังงาน และอิออนบางตัวทำหน้าที่ต้านหรือทำลายพิษจากของเสียที่ขับถ่ายออกมาจากเซลล์ หรือมียาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และมี protective Agent เพื่อป้องกันความเสียหายของเซลล์สเปิร์มในกระบวนการแช่แข็ง (นลินี, 2527)

3. การเก็บแบบแช่เย็น (refrigerated storage) น้ำเชื้อที่ใช้ทดลองต้องได้รับการรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียส ในน้ำแข็งหรือตู้เย็นและควบคุมไม่ให้น้ำเชื้อแข็งตัว โดยผสมน้ำเชื้อกับ extender ในอัตราส่วนต่าง ๆ และบรรจุลงในภาชนะ ภาชนะที่บรรจุน้ำเชื้อควรมีลักษณะที่เป็นภาชนะทรงตื้น มีฝาปิด และมีออกซิเจนเพียงพอต่อตัวสเปิร์มขณะทำการเก็บรักษา และทำการตรวจสอบดูไม่ให้น้ำเชื้อตกตะกอน อันเป็นสาเหตุให้เซลล์ที่อยู่ข้างล่างไม่ได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอ จึงต้องเขย่าเบา ๆ ทุกวัน (Wayman and Tiersch, 2000)

4. การแช่แข็ง (Freezing) ภายหลังผ่านการตรวจสอบด้วยวิธีการเก็บรักษาแบบแช่เย็นแล้ว ก็จะเข้าสู่ทำการเก็บน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง ซึ่งมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายปัจจัยดังนี้

4.1 สารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) เป็นสารเคมีที่ป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อเสียหายในระหว่างการแช่แข็งโดยมีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ จะต้องมีคุณสมบัติในการละลายน้ำ และมีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1) Permeating cryoprotectant ได้แก่ DMSO, glycerol, methanol และ 1-2 propanediol โดยที่ glycerol มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิตน้อยที่สุด แต่มีความสามารถในการแพร่ผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ช้า ในการปรับสมดุลของออสโมลาลิตี้ต้องใช้เวลามาก แต่พบว่า glycerol สามารถป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์ของหนูได้ดีกว่า DMSO ส่วน methanol สามารถผ่านเข้าเซลล์ได้ดีมากแต่มีความเป็นพิษต่อเซลล์มาก สำหรับ DMSO สามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ปานกลาง และมีความเป็นพิษอยู่ระหว่าง glycerol และ methanol glycerol จึงเป็นที่นิยมใช้เป็น cryoprotectant ในกลุ่มนี้ Linhart *et al*. (1993) ได้รายงานการใช้ glycerol เป็น cryoprotectant ในการทำแช่แข็งปลา European catfish, *Silurus glanis* L. พบว่ามีอัตราการฟักสูงกว่าการทดลองที่ใช้ DMSO ทั้งนี้ระดับความเข้มข้นของ glycerol ที่เหมาะสมจะต้องอยู่ในระดับที่เซลล์สามารถทนทานได้ โดยที่ความเป็นพิษจะเพิ่มขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นเพิ่มขึ้นและการเติมสารเคมีบางตัวลงไปช่วยทำให้ความเป็นพิษลดลง อย่างไรก็ตามงานวิจัยหลายเรื่องนิยมใช้ DMSO เป็น cryoprotectant เนื่องจากแพร่ผ่านเข้าเซลล์ได้รวดเร็ว และสามารถลดความเป็นพิษได้ที่อุณหภูมิต่ำ ๆ

2) Nonpermeating cryoprotectant ได้แก่ sucrose polymer เช่น dextrin, hydroxyethyl, starch, polyvinylpyrrolidone (PVP) และ proteins (เช่น egg yolk, serum, skim milk, และ antifreezed protein) ซึ่งสารเหล่านี้ไม่ได้ผ่านเข้าสู่เซลล์ แต่จะใช้ร่วมกับ permeating cryoprotectant เพื่อเป็นตัวปรับแรงดันออสโมติกและทำหน้าที่เป็น cryprotectant ร่วมกับ permeating cryprotectant การทดลองของ Ciereszko and Dabrowski (1996) ในปลา rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* พบว่าการใช้ซูโครสร่วมกับ DMSO เป็นน้ำยา extender ให้ผลดีที่สุดโดยมีอัตราการฟักถึงระยะ eye stage ถึง 90% อย่างไรก็ตามกลไกการทำงานของสารเหล่านี้ก็ไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน เพราะสารเคมีเหล่านี้มีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ต่างกัน หากพิจารณาถึงอัตราการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์พบว่าซูโครสไม่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ แต่กลูโคสแพร่ผ่านได้

ส่วนแอลกอฮอล์ผ่านได้เร็วกว่า DMSO และ glycerol ตามลำดับ แต่ก็เป็นที่เข้าใจกันดีว่าสาร cryoprotectant เหล่านี้มีคุณสมบัติของน้ำยาและของเหลวภายในเซลล์ คือ มีผลต่อแรงดันไอ (vapor pressure) จุดเยือกแข็ง (freezing point) และช่วยปรับแรงดันออสโมติกของของเหลวภายในและภายนอกเซลล์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติดังกล่าวจะช่วยให้เซลล์รอดชีวิตภายหลังการแช่แข็งได้เพราะป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ การลดขนาดของเซลล์ ป้องกันอันตรายอันเนื่องมาจากความไม่สมดุลของเกลือแร่และอิเล็กโทรไลท์ และคงไว้ซึ่งคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มอวัยวะ (organalle)

4.2 ช่วงเวลาหลังจากการผสมน้ำเชื้อกับสารป้องกันอันตรายของเซลล์ปรับตัวก่อนทำการแช่แข็ง (Equilibration time) ในสมัยแรก ๆของการศึกษาเรื่องนี้มีข้อปฏิบัติที่แนะนำกันไว้ว่าจะต้องนำหลอดบรรจุน้ำเชื้อที่เติมน้ำยารักษาน้ำเชื้อแล้วไว้ในตู้เย็นระยะหนึ่ง เรียกระยะเวลานี้ว่า Equilibration time ก่อนทำการลดอุณหภูมิและเก็บแช่แข็งต่อไป Ott and Horton (1971) เป็นรายแรกที่ยกเลิกวิธีการดังกล่าวเมื่อใช้ DMSO แทนการใช้ glycerol เนื่องจาก DMSO แพร่เข้าไปในเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว แต่ก็มีบางการทดลองยังนิยมให้มี Equilibration time อยู่

5. อัตราการลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็ง (Freezing rate) สำหรับอัตราการลดอุณหภูมิเพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง ยังมีความเชื่อและรายงานที่ขัดแย้งกันอยู่ แต่ก็เป็นรายงานจากการทดลองในปลาต่างชนิดกันและมีวิธีการทดลองต่างกัน

ปัจจัยที่สำคัญอันหนึ่งที่มีผลต่ออัตราการลดอุณหภูมิ คือ การเลือกใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อซึ่งมีคุณสมบัติด้วยกันหลายชนิดและหลายขนาด ได้แก่ หลอดฟาง (straw) หลอดแอมพู (ampoule) ซึ่งมีความจุหลายขนาดได้แก่ 0.25 มิลลิลิตร, 0.5 มิลลิลิตร, 1 มิลลิลิตร เป็นต้น ซึ่งหลอดขนาดความจุมากหรือขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่ เมื่อนำมาปรับใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาจะได้น้ำเชื้อที่มีการผสมต่ำ สันนิษฐานว่าเกิดจากความไม่สม่ำเสมอในการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งและการเพิ่มอุณหภูมิขณะทำการละลายน้ำเชื้อหรือเซลล์สเปิร์มที่อยู่รอบ ๆผิวของภาชนะ จะสัมผัสกับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ขณะที่ตัวอย่างที่อยู่กลางหลอดจะมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิช้ากว่า ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อโดยรวมด้อยลงไป ดังนั้นจะต้องทำการทดลองแบบแช่แข็งด้วย

ในขณะทำการลดอุณหภูมินั้น cryoprotectant จะมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในการป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้น คือ อัตราการลดอุณหภูมิที่จะป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์หรือให้เกิดน้อยที่สุด และอัตราการลดอุณหภูมิดังกล่าวจะต้องเป็นอัตราที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์อันเนื่องมาจากการสูญเสียน้ำ และการตกผลึกของสารเคมีที่เป็นตัวถูกละลายภายในเซลล์ การมีชีวิตรอดของเซลล์ภายหลังการแช่แข็ง

อันตรายที่เกิดจากการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ขณะทำการแช่แข็ง คือ การสูญเสียน้ำ น่าจะเกิดขึ้นขณะทำการลดอุณหภูมิจาก -15 องศาเซลเซียส ถึง -50 องศาเซลเซียส เพราะหลังจากนั้นเราสามารถจุ่มหลอดบรรจุตัวอย่างลงสู่ถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสได้ทันที นอกจากนี้เทคนิคในการลดอุณหภูมิแบบสองขั้นตอน (two- step freezing) คือ ขั้นแรกลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิห้องหรือตู้เย็นลงสู่อุณหภูมิของไอไนโตรเจนเหลวที่เราต้องการ (ประมาณ -50 องศาเซลเซียส ถึง -120 องศาเซลเซียส) และขั้นที่ 2 ลดอุณหภูมิจากไอไนโตรเจนเหลวไปสู่อุณหภูมิของไนโตรเจนเหลวและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมินั้น (-196 องศาเซลเซียส) ซึ่งพบว่าได้ผลดีเช่นกัน

ปัจจุบันมีอุปกรณ์ที่ใช้ในการลดอุณหภูมิเพื่อเก็บรักษาแบบแช่แข็งที่ใช้คอมพิวเตอร์ควบคุมการลดอุณหภูมิ เช่น Computerized Presetting Freezing Unit (CPFU) และ Programmed Freezing Unit (PFU) เป็นต้น แต่อุปกรณ์นี้มีราคาแพงมาก และเหมาะกับใช้ในการทดลองเท่านั้น อัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ จะมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและมีผลต่ออัตราการปฏิสนธิกับไข่ลดลงเล็กน้อย (นลินี, 2527) อัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วให้ผลดีกว่าการลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ เพราะจะทำให้สเปิร์มมีอัตราการรอดสูงขึ้น (พัชรี, 2546)

6. อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ (Thawing rate)

ในการทดลองยุคแรก ๆ มีการละลายน้ำเชื้อโดยการอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิห้อง ต่อมาภายหลังทราบว่าอัตราการเพิ่มอุณหภูมิก็มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ และมีการทดสอบการเพิ่มอุณหภูมิที่เหมาะสมกับน้ำเชื้อปลาหลายชนิดได้แก่ Whithler and Thorgaard (1991) เปรียบเทียบอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส /15 นาที, 5 องศาเซลเซียส /90 วินาที, 10 องศาเซลเซียส /30 วินาที, 30 องศาเซลเซียส /15 วินาที พบว่ามีเพียงการทดลองที่ 0 องศาเซลเซียส /15 นาทีให้ผลการทดลองที่ไม่ดี ส่วนการทดลองอื่นให้ผลเช่นเดียวกัน การเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ขณะทำการ

เพิ่มอุณหภูมิจะเหมือนกับในขั้นตอนการลดอุณหภูมิแต่มีลำดับสวนทางกัน ดังนั้นในทางทฤษฎี อัตราการเพิ่มอุณหภูมิจึงน่าจะเท่ากับอัตราการลดอุณหภูมิ อย่างไรก็ตามอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วหรือที่ระดับอุณหภูมิสูงจะป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์ได้ดีกว่า

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อแบ่งเป็น 2 วิธี คือ

1) เป็นการตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ ได้แก่

- การนับจำนวนเซลล์สเปิร์มต่อหน่วยปริมาตร (sperm concentration) ปฏิบัติเฉพาะน้ำเชื้อสดเพื่อให้ทราบจำนวนสเปิร์มก่อนดำเนินการในเรื่องอื่น ๆต่อไป โดยเจือจางน้ำเชื้อสดด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1 ต่อ 9 เขย่าและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่ เขย่าให้ทั่วใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วใส่อุปกรณ์สำหรับนับเม็ดเลือดแดง (RBC counting chamber หรือ haemacytometer) ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วนำมานับจำนวนสเปิร์มด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X (อนงคณ์ และ กฤษณ์, 2538) หรืออาจใช้อุปกรณ์ที่ออกแบบขึ้นมาเพื่อใช้นับสเปิร์มโดยเฉพาะของเมเคลอร์ (Makler counting chamber) (Macler, 1980 อ้างตาม กฤษณ์, 2536) แต่อุปกรณ์ที่ออกแบบพิเศษตามตัวอย่างที่ยกมานี้ราคาแพงกว่าอุปกรณ์สำหรับนับเม็ดเลือดแดง

- การตรวจเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีการเคลื่อนที่ (percentage of motile sperm) เป็นการตรวจสอบน้ำเชื้อก่อนหรือหลังการเก็บรักษา โดยหยดน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร (μl) ลงบนสไลด์หยดน้ำเชื้อประมาณ 1 ไมโครลิตร (~1 μl) ลงบนสไลด์ใกล้หยดน้ำใช้เข็มเขี่ยหรือปลายไม้จิ้มฟันเกลี่ยน้ำให้มาแตะกับหยดของตัวอย่างน้ำเชื้อ สิ่งที่จะเห็นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ขณะที่ตัวอย่างและน้ำกำลังผสมปนกันคือการเคลื่อนที่ 2 ลักษณะ คือ การไหลของสเปิร์มไปตามการไหลของของเหลว และการเคลื่อนที่ของสเปิร์มแบบเป็นกลุ่มก้อน ประเมินสเปิร์มที่เคลื่อนที่เป็นเปอร์เซ็นต์ ทำโดยสุ่มดูสเปิร์มในกล้องจุลทรรศน์ โดยกำหนดอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเป็นระบบตัวเลข 0-5 (วีรพงศ์, 2536) ดังนี้

0 = ไม่มีการเคลื่อนที่, 1 = เคลื่อนที่ 20 %, 2 = เคลื่อนที่ 40 %
3 = เคลื่อนที่ 60 %, 4 = เคลื่อนที่ 80 %, 5 = เคลื่อนที่ 100 %

แต่การทดลองของ เกรียงศักดิ์ (2540) ทำการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X โดยดูการเคลื่อนที่ของสเปิร์มทั้งหมด และระยะเวลาการเคลื่อนที่เมื่อสเปิร์มถูกกับน้ำ โดยแบ่งเกณฑ์การประเมินออกเป็น 10 ระดับ ดังนี้

ระดับที่	ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนที่
1	0 < 10 %
2	10 < 20 %
3	20 < 30 %
4	30 < 40 %
5	40 < 50 %
6	50 < 60 %
7	60 < 70 %
8	70 < 80 %
9	80 < 90 %
10	90 < 100 %

- การย้อมสีตัวเป็นตัวตาย (live-dead stain) เพื่อหาเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตและสเปิร์มที่ผิดปกติ โดยใช้สี erosin-nigrosin การเตรียมสไลด์โดยการหยดตัวอย่างน้ำเชื้อลงบนสไลด์อุ่น ๆ หยดสีลง 1-2 หยด คนให้เข้ากันอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันไม่ให้น้ำเชื้อที่ยังมีชีวิตอยู่ตายเสียก่อน นำสไลด์อีกแผ่นหนึ่งมาแตะเบา ๆ บนหยดน้ำเชื้อผสมสีแล้วลากเบา ๆ เพื่อให้ตัวอย่างที่จะตรวจกระจายออกบาง ๆทำสไลด์ให้แห้งโดยใช้ลมร้อนเป่าหรือลนด้วยเปลวไฟเมื่อนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X ให้หยด emulsion oil ลงไป 1-2 หยด จะเห็นน้ำเชื้อตัวผู้ที่มีชีวิตมีลักษณะใสไม่ติดสี ส่วนที่ตายจะติดสีสามารถนับและคำนวณเปอร์เซ็นต์น้ำเชื้อตัวที่มีชีวิตได้

2) เป็นการตรวจสอบหาความสามารถของน้ำเชื้อในการผสมกับไข่ โดยเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด ซึ่งเป็นวิธีการทดสอบที่ดีที่สุด ในการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งแล้ว ซึ่งเทคนิคในการผสมไข่กับน้ำเชื้อต่อจำนวนไข่ ตลอดจนการจัดการและดูแลภายหลังการผสมล้วนมีผลต่ออัตราการฟักทั้งสิ้น

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1 วัสดุอุปกรณ์ในโรงเพาะฟัก

-บ่อพ่อแม่พันธุ์ปลากะรังหงส์ขนาด 15 ตัน จำนวน 2 บ่อ

-เครื่องให้อากาศและอุปกรณ์ให้อากาศ

-ยาสลบควินาดีน (Quinaldine)

-ไมโครชิพ, เครื่องอ่านไมโครชิพ

2 อุปกรณ์ในการบันทึกภาพและเครื่องมือในห้องปฏิบัติการ

-กล้องจุลทรรศน์กำลังสูง

-เครื่องชั่งน้ำหนักแบบดิจิตอล 4 ตำแหน่ง

-กล้องถ่ายภาพดิจิตอล

-ถังไนโตรเจนเหลว

-หลอดเก็บน้ำเชื้อ (French straw)

-สไลด์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer)

-เครื่องวัดพีเอช (pH-meter)

-ไมโครไปเปต (micropipette)

-เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

-เครื่องวัด Osmolality (osmometer)

-กระจกสไลด์และกระจกปิด

3 สารเคมี

-สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมน้ำยา extender

-สารเคมีที่ใช้เป็นสาร cryoprotectant

-น้ำกลั่น

-NaOH และ HCl

-ฮอร์โมน (Suprefact, HCG)

วิธีการ

วางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล

ดำเนินการวิจัยแบ่งเป็น 3 ขั้นตอนหลัก ๆ คือ การทดลองที่ 1 ศึกษาชนิดและอัตราส่วนของน้ำยาเอกซ์แทนเดอร์ (extender) ที่มีผลต่อการเก็บน้ำเชื้อปลากะรังหงส์ การทดลองที่ 2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant)ที่มีผลต่อการเก็บน้ำเชื้อปลากะรังหงส์ การทดลองที่ 3 ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การฟักไข่ของปลากะรังหงส์ โดยศึกษาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (% Motility) เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (% Viability) ของสเปิร์ม วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่วิเคราะห์โดยใช้ Non-parametric test เนื่องจากค่าที่นำมาวิเคราะห์ความแตกต่างนั้นเป็นค่าเฉลี่ยของตัวอย่างที่ไม่ได้มาจาก Normal population หรือ Population variance ที่เป็น Heterogeneous แปลงค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตที่ได้เป็นค่า Arcine เนื่องจากค่าที่ได้มีความแปรปรวนต่างกันมาก แล้ววิเคราะห์โดยใช้วิธีแฟคทอเรียล (Factorial) ศึกษาทั้งปัจจัยเดียวและอิทธิพลร่วมของสองปัจจัย ดูความแตกต่างระหว่างชุดทดลอง (treatment) โดยใช้ Duncan's Multiple Range Test (DMRT)

การทดลองที่ 1 ศึกษาชนิดและอัตราส่วนการเจือจางของน้ำยาเอกซ์แทนเดอร์ (extender) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังหงส์

1. เตรียมปลากะรังหงส์, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828) เพศผู้ที่สมบูรณ์เพศและติดเครื่องหมายด้วยไมโครชิพ (microchip) มาแล้ว เป็นปลาที่เลี้ยงที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง กรมประมง จำนวน 25 ตัว คัดเลือกปลาเมื่อวันที่ 25 ธันวาคม 2550 พบว่าปลามีน้ำเชื้อทั้งหมด 6 ตัว

2. เตรียมน้ำเชื้อ เลือกปลาเพศผู้ที่สมบูรณ์มาวางยาสลบด้วย Quinaldine 5 ppm เช็ดเมือกและน้ำบริเวณท้องปลาให้แห้ง ใช้มือกดที่บริเวณท้องรีดเบา ๆลงมาทางช่องเพศจะมีน้ำเชื้อสีขาวขุ่นไหลออกมา ใช้บีกเกอร์ที่สะอาดผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วรองรับน้ำเชื้อ ระวังอย่าให้น้ำทะเลหรือของเสียในตัวปลา เช่น ปัสสาวะหรืออุจจาระปะปนมากับน้ำเชื้อที่รีดออกมา แบ่งน้ำเชื้อที่ได้นำไปปั่นแยกส่วนด้วยเครื่องปั่นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที ดูด

เฉพาะส่วนใส (seminal fluid) ข้างบน เพื่อนำไปวัดค่า osmolality พร้อมกับน้ำยา extender ทั้ง 5 สูตรด้วยเครื่อง Osmometer น้ำเชื้อส่วนที่เหลือสุ่มตัวอย่างนำมาตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ

3. เตรียมน้ำยา extender 5 สูตร คือ Marine Fish Ringer (MFR), Extender 251 (E 251), Extender 189 (E 189), 0.1 M Sodium Citrate (CT) และ น้ำเกลือ (NaCl) 0.9 % นำไปวัดค่า osmolality

การเตรียมน้ำยา extender

เตรียมน้ำยาที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อของปลากะรังหงส์โดยใช้สูตรต่าง ๆที่ผู้ใช้ได้ผลมาแล้ว (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ส่วนผสมน้ำยา extender ของปลากะรังหงส์ในการศึกษาครั้งนี้ (กรัม/ลิตร)

ชนิดของน้ำยา/ ส่วนประกอบ	MFR[1]	E 251[2]	E 189[3]	CT[4]	NaCl 0.9%
NaCl	13.5	7.65	6.57	-	9
KCl	0.60	-	-	-	-
$CaCl_2$	0.25	-	-	-	-
$MgCl_2$	0.35	-	-	-	-
$NaHCO_3$	0.2	4.50	4.50	-	-
Glucose	0.2	-	-	-	-
Fructose	-		4.50	-	-
Mannitol	-	-	4.50	-	-
Soy lecithin	-	13.5	6.57	-	-
Sodium citrate	-	-		29.41	-

หมายเหตุ อ้างอิงจาก 1. Chao (1982,1991) 2. และ 3. Withler and Lim (1982) 4. Gwo *et al.* (1992)

4. ศึกษาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (Motility) ของสเปิร์ม โดยการหยดน้ำกลั่น 1 หยด (20 µl) และหยดน้ำเชื้อ 1 หยด (1µl) ลงบนสไลด์ ผสมให้เข้ากันแล้วสังเกตการเคลื่อนที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40X) ภายในระยะเวลา 30 วินาที ทำการทดลอง 5 ซ้ำ โดยเกณฑ์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 หลักเกณฑ์การสังเกตเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

ระดับที่	% การเคลื่อนที่
1	0 < 10 %
2	10 < 20 %
3	20 < 30 %
4	30 < 40 %
5	40 < 50 %
6	50 < 60 %
7	60 < 70 %
8	70 < 80 %
9	80 < 90 %
10	90 < 100 %

ที่มา: เกรียงศักดิ์ (2540)

5. ศึกษาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (Viability) โดยวิธีการย้อมสี Eosin-Nigrosin ซึ่งมีส่วนประกอบแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบของสีย้อม Eosin-nigrosin

ส่วนประกอบสารเคมี	ปริมาณ
Eosin Y disodium	1 กรัม
Nigrosin water soluble	5 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการศึกษาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตมีดังนี้

- หยดสี Eosin-Nigrosin ลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด (5 µl) แล้วหยดน้ำเชื้อลงข้าง ๆ สีย้อมประมาณ 1 ไมโครลิตร(µl)

- ใช้เข็มผสมน้ำเชื้อกับสีย้อมให้เข้ากัน จากนั้นใช้แผ่นสไลด์อีกแผ่นหนึ่งเกลี่ยน้ำเชื้อให้กระจายบางๆ โดยลากไปทางใดทางหนึ่งเพียงครั้งเดียว (Smear)

- นำแผ่นสไลด์ที่เกลี่ยแล้วไปผ่านเปลวไฟประมาณ 1- 2 ครั้งให้น้ำเชื้อแห้ง

- หยดน้ำยาทาเล็บลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด ปิดด้วย Cover slide แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X

- นับจำนวนเซลล์ตัวเป็นตัวตาย โดยการสุ่มนับ 5 บริเวณ ๆละ 20 เซลล์ เซลล์ตัวเป็นจะมีสีขาวไม่ติดสีย้อม ส่วนตัวตายจะติดสีย้อมเป็นสีชมพูแดงหรือสีม่วง

6. การศึกษาความเข้มข้นของสเปิร์มในน้ำเชื้อ (sperm concentration) ด้วยการนับจำนวนสเปิร์มต่อหน่วยปริมาตร โดยเจือจางน้ำเชื้อสดด้วยน้ำเกลือหรือน้ำทะเลในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำเกลือเท่ากับ 1 ต่อ 1,000, 1 ต่อ 1,500 และ 1 ต่อ 2,000 เขย่าและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ เขย่าให้ทั่วใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วใส่อุปกรณ์สำหรับนับเม็ดโลหิตทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วนำมานับจำนวนเซลล์สเปิร์มด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X หรือนับจำนวนเซลล์สเปิร์มด้วยอุปกรณ์การนับ คือ Makler counting chamber ของ Sefi-Medical Instruments โดยดูดน้ำเชื้อปลามา 5 ไมโครลิตรหยดลงบนกึ่งกลางของตัวเครื่องปิดด้วยแผ่นแก้วของตัวเครื่องเอง โดยจุดเครื่องหมายของแผ่นแก้วจะตรงกับเครื่องหมายของตัวเครื่องจะสังเกตเห็นเป็นสีรุ้ง แสดงว่ามีการกระจายของเซลล์สเปิร์มในความลึก 10 ไมครอน (ระวังอย่าให้มีอากาศ) ดูด้วยกล้องนับจำนวนทั้งเคลื่อนที่ได้และเคลื่อนที่ไม่ได้ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 20X ใน 10 ช่องของตัวเครื่อง จำนวนที่นับได้จะเท่ากับความเข้มข้นเป็นจำนวนล้านต่อหนึ่งมิลลิลิตร (X 10^{6})

7. ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำยา extender สูตรต่าง ๆที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ โดยเลือกอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาในอัตรา 1: 1 นำไปทดสอบการเคลื่อนที่ (ตามวิธีในข้อ 4) และศึกษาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตและการใช้ได้ของสเปิร์มด้วยการย้อมสี Eosin-Nigrosin ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ตามวิธีในข้อ 5)

8. ทดสอบอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยา extenderโดยใช้อัตราส่วน 1:1, 1:4 และ 1:9 โดยเจือจางสเปิร์มในน้ำยา extender ทั้ง 5 สูตรทดลอง ประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตและการใช้ได้ของสเปิร์มที่เวลา 60 ชั่วโมงหลังจากแช่เย็น (0-4 องศาเซลเซียส)

การทดลองที่ 2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังหงส์

ดำเนินการได้เมื่อได้ผลจากการทดลองที่ 1 ใช้น้ำยา extender ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อซึ่งผสมกับน้ำเชื้อปลากะรังหงส์ในอัตราส่วน 1: 9

1. เตรียมสารละลายที่ใช้เป็นสาร cryoprotectant 5 ชนิด คือ DMA, DMSO, MeOH, Glycerol และ Trehalose แต่ละชนิดใช้ความเข้มข้นสุดท้าย 3 ระดับ คือ 5%, 10% และ 15% มีวิธีการเตรียมดังนี้

เจือจางสาร cryoprotectant ดังกล่าวในน้ำยา extender ที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 1 แบ่งน้ำยา extender เจือจางออกเป็น 2 ส่วนเท่า ๆกัน ส่วนหนึ่งนำมาเจือจางในน้ำยา extender สูตรที่เหมาะสมโดยไม่ผสมสาร cryoprotectant (ส่วน A) แต่อีกส่วนหนึ่งเจือจางน้ำยาสูตรที่เหมาะสมในสาร cryoprotectant ที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ(ส่วน B) เมื่อจะเจือจางน้ำเชื้อให้ใช้น้ำยา extender ส่วนแรกผสมกับน้ำเชื้อ เขย่าให้เข้ากันแล้วเติมน้ำยา extender ส่วนที่ผสมสาร cryoprotectant เขย่าให้เข้ากันแล้วเก็บไว้ในถังน้ำแข็ง เมื่อนำน้ำยาในส่วน A รวมกับน้ำยาส่วน B จะทำให้ความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ลดลงครึ่งหนึ่งและจะได้ความเข้มข้นสุดท้าย (Final Concentration) ตามต้องการตัวอย่างเช่น ถ้าต้องการความเข้มข้นสุดท้าย 5% ก็เตรียมน้ำยาส่วน B 10% เมื่อผสม A และ B แล้วจะได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5%

2. ลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็ง โดยใช้เครื่องควบคุมการลดอุณหภูมิ เมื่อน้ำเชื้อได้ถูกเจือจางด้วยสาร cryoprotectant ตามต้องการแล้วบรรจุน้ำเชื้อ (จากข้อที่ 1) ลงในหลอดเก็บน้ำเชื้อที่ทำเครื่องหมายไว้ก่อนแล้วหลอดละ 480 ไมโครลิตร บีบปลายหลอดที่เปิดอยู่ให้ปิดสนิทด้วยปากคีบลนไฟ แล้วนำหลอดบรรจุน้ำเชื้อไปลดอุณหภูมิด้วยการลดอุณหภูมิในอัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -80 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำไปลงแช่ในถังไนโตรเจนเหลวซึ่งมีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

3. ละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ภายหลังการเก็บน้ำเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งออกมาละลายที่อุณหภูมิประมาณ 37 องศาเซลเซียสใน water bath นาน 10 วินาที แล้วนำน้ำเชื้อส่วนหนึ่งไปตรวจสอบดูการเคลื่อนที่ตามวิธีของ เกรียงศักดิ์ (2540) ดังกล่าวข้างต้น

การทดลองที่ 3 ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การฟักไข่ของปลากะรังหงส์

ดำเนินการได้เมื่อได้ผลจากการทดลองที่ 2 ใช้สาร cryoprotectant ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ได้ผสมกับน้ำเชื้อปลากะรังหงส์

1. เตรียมน้ำเชื้อสด โดยการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นให้ปลาเพศผู้แล้วรีดน้ำเชื้อเพื่อนำไปเจือจางกับน้ำยา extender ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ได้ผสมกับน้ำเชื้อปลากะรังหงส์ในอัตราส่วน 1: 9

2. เตรียมสารละลายที่ใช้เป็นสาร cryoprotectant 5 ชนิด คือ DMA, DMSO, MeOH, Glycerol และ Trehalose แต่ละชนิดใช้ความเข้มข้นสุดท้าย 3 ระดับ คือ 5%, 10% และ 15% โดยเลือกชนิด และความเข้มข้นที่ดีที่สุดที่ทำให้สเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และมีชีวิตสูงสุด

3. เตรียมไข่ปลาสำหรับการผสมเทียม โดยฉีดฮอร์โมนกระตุ้นให้แม่ปลาวางไข่ เมื่อแม่ปลาไข่แก่แล้ว รีดไข่เพื่อผสมเทียม สุ่มดูดไข่ปลาประมาณ 300 ไมโครลิตร นับจำนวนไข่ทั้งหมด

4. ฟักไข่ สุ่มดูดไข่ปลา 300 ไมโครลิตร นำไปผสมเทียมในจานเลี้ยงเชื้อ (plate) โดยเปรียบเทียบระหว่างน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง นำไข่ปลาที่ได้ไปฟักในถังฟักไข่ที่เตรียมไว้ เมื่อปลาฟักออกเป็นตัว สุ่มนับลูกปลาที่ฟักออกเป็นตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 4X

ผลและวิจารณ์

ผล

การทดลองที่ 1 ศึกษาชนิดและอัตราส่วนการเจือจางของน้ำยาเอกซ์แทนเดอร์ (extender) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังหงส์

1. ศึกษาชนิดของน้ำยา extender ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังหงส์

1. เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต, เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และความเข้มข้นของน้ำเชื้อ เก็บน้ำเชื้อมาศึกษาความเข้มข้นของเซลล์สเปิร์มปลากะรังหงส์ 6 ตัวอย่าง มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 7.3-8.4 x 10^9 เซลล์ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 75-100 % และเมื่อนำไปย้อมสี Eosin-Nigrosin เพื่อดูเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตพบว่ามีค่าเฉลี่ย 77-98% (ตารางที่ 8

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (Viability), เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (Motility) ของสเปิร์มปลากะรังหงส์

ปลากะรังหงส์ (เลขที่รหัส)	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่
137975191A	98	75
137912521A	80	100
122639483A	97	100
137967114A	84	100
123212631A	88	100
115323621A	77	100

2. ค่าออสโมลาลิตี้ (osmolality) ของ สูตรน้ำยา extender ต่าง ๆ

จากการศึกษาครั้งนี้เมื่อทำการวิเคราะห์ ค่า osmolality จากเครื่อง Osmometer ของน้ำยา extender 5 สูตรและน้ำเชื้อปลากะรังหงส์มีค่าดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ค่า osmolality ของน้ำเชื้อปลากะรังหงส์และในน้ำยา extender ชนิดต่าง ๆ

สูตรน้ำยา extender	ค่าออสโมลาลิตี้ (ค่าเฉลี่ย) (mOsmol/kg)
Marine Fish Ringer (MFR)	438
Extender 251 (E 251)	329
Extender 189 (E 189)	295
0.1 M Sodium Citrate (CT)	228
NaCl 0.9 %	274
น้ำเชื้อปลากะรังหงส์	320

3. ประสิทธิภาพของน้ำยา extender สูตรต่าง ๆที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส โดยการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังหงส์แบบแช่เย็นด้วยน้ำยา extender 5 สูตร เมื่อนำมาตรวจวัดเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่พบว่า สเปิร์มที่ผสมด้วยน้ำยา extender ทั้ง 5 สูตรจะหยุดการเคลื่อนที่ ที่เวลา 216 ชั่วโมง หลังจากแช่เย็น 60 ชั่วโมง พบว่า

สเปิร์มที่เจือจางด้วยน้ำยา MFR มีการเคลื่อนที่เฉลี่ย (Mean $\pm$ SD) 71.11 $\pm$ 9.28% การมีชีวิตของสเปิร์มเฉลี่ย 67.44 $\pm$ 3.07%

สเปิร์มที่เจือจางด้วยน้ำยา E 251 มีการเคลื่อนที่เฉลี่ย (Mean $\pm$ SD) 46.67 $\pm$ 13.23% การมีชีวิตของสเปิร์มเฉลี่ย 69.22 $\pm$ 4.89%

สเปิร์มที่เจือจางด้วยน้ำยา E 189 มีการเคลื่อนที่เฉลี่ย (Mean $\pm$ SD) 57.78 $\pm$ 13.94% การมีชีวิตของสเปิร์มเฉลี่ย 68.11 $\pm$ 3.33%

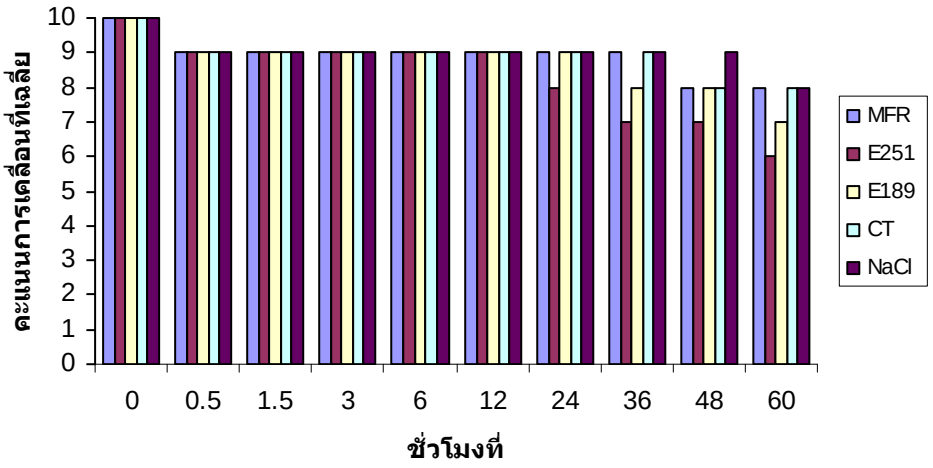
สเปิร์มที่เจือจางในน้ำยา 0.1 M CT มีการเคลื่อนที่เฉลี่ย (Mean $\pm$ SD) 70.00 $\pm$ 12.25% การมีชีวิตของสเปิร์มเฉลี่ย 66.11 $\pm$ 4.04%

สเปิร์มที่เจือจางด้วยน้ำยา NaCl 0.9% มีการเคลื่อนที่เฉลี่ย (Mean $\pm$ SD) 72.22 $\pm$ 9.72% การมีชีวิตของสเปิร์มเฉลี่ย 69.22 $\pm$ 2.95%

ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยและการมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มในน้ำยา extender แต่ละสูตรมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ($p>0.05$) (ภาพที่ 3 และ 4) ตารางที่ 10 – 13

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา extender 5 ชนิด

ชั่วโมง	น้ำยา Extenders				
	MFR	E 251	E 189	0.1 M CT	NaCl 0.9%
0	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
0.5	88.89 ± 3.33	87.78 ± 4.41	88.89 ± 3.33	87.78 ± 4.41	88.89 ± 3.33
1.5	87.78 ± 4.41	86.67 ± 5.00	88.89 ± 3.33	87.78 ± 4.41	88.89 ± 3.33
3	86.67 ± 5.00	86.67 ± 5.00	88.89 ± 3.33	87.78 ± 4.41	88.89 ± 3.33
6	86.67 ± 5.00	85.56 ± 5.27	88.89 ± 3.33	87.78 ± 4.41	88.89 ± 3.33
12	86.67 ± 5.00	84.44 ± 5.27	85.56 ± 7.26	86.67 ± 7.07	88.89 ± 3.33
24	83.33± 5.00	75.56 ± 5.27	82.22 ± 6.67	84.44 ± 10.14	87.78 ± 4.41
36	81.11 ± 7.82	68.89 ± 6.01	78.89 ± 7.82	82.22 ± 9.72	85.56 ± 5.27
48	73.33 ± 8.66	62.22 ± 6.67	70.00 ± 14.14	77.78 ± 9.72	81.11 ± 9.28
60	71.11 ± 9.28	46.67 ± 13.23	57.78 ± 13.94	70.00 ± 12.25	72.22 ± 9.72



ภาพที่ 3 คะแนนการเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ซึ่งแปลงค่ามาจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา extender 5 ชนิด

ตารางที่ 11 คะแนนการเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ซึ่งแปลงค่ามาจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา extender 5 ชนิด

ชั่วโมง	น้ำยา Extender				
	MFR	E 251	E 189	0.1 M CT	NaCl 0.9%
0	10.00 ± 0.00^{a}	10.00 ± 0.00^{a}	10.00 ± 0.00^{a}	10.00 ± 0.00^{a}	10.00 ± 0.00^{a}
0.5	8.89 ± 0.33^{a}	8.78 ± 0.44^{a}	8.89 ± 0.33^{a}	8.78 ± 0.44^{a}	8.89 ± 0.33^{a}
1.5	8.78 ± 0.44^{a}	8.67 ± 0.50^{a}	8.89 ± 0.33^{a}	8.78 ± 0.44^{a}	8.89 ± 0.33^{a}
3	8.67 ± 0.50^{a}	8.67 ± 0.50^{a}	8.89 ± 0.33^{a}	8.78 ± 0.44^{a}	8.89 ± 0.33^{a}
6	8.67 ± 0.50^{a}	8.56 ± 0.53^{a}	8.89 ± 0.33^{a}	8.78 ± 0.44^{a}	8.89 ± 0.33^{a}
12	8.67 ± 0.50^{a}	8.44 ± 0.53^{a}	8.56 ± 0.73^{a}	8.67 ± 0.71^{a}	8.89 ± 0.33^{a}
24	8.33 ± 0.50^{a}	7.55 ± 0.53^{a}	8.22 ± 0.67^{a}	8.44 ± 1.01^{a}	8.78 ± 0.44^{a}
36	8.11 ± 0.78^{a}	6.89 ± 0.60^{a}	7.89 ± 0.78^{a}	8.22 ± 0.97^{a}	8.56 ± 0.53^{a}
48	7.33 ± 0.87^{a}	6.22 ± 0.67^{a}	7.00 ± 1.41^{a}	7.78 ± 0.97^{a}	8.11 ± 0.93^{a}
60	7.11 ± 0.93^{a}	4.67 ± 1.32^{a}	5.78 ± 1.39^{a}	7.00 ± 1.22^{a}	7.22 ± 0.97^{a}

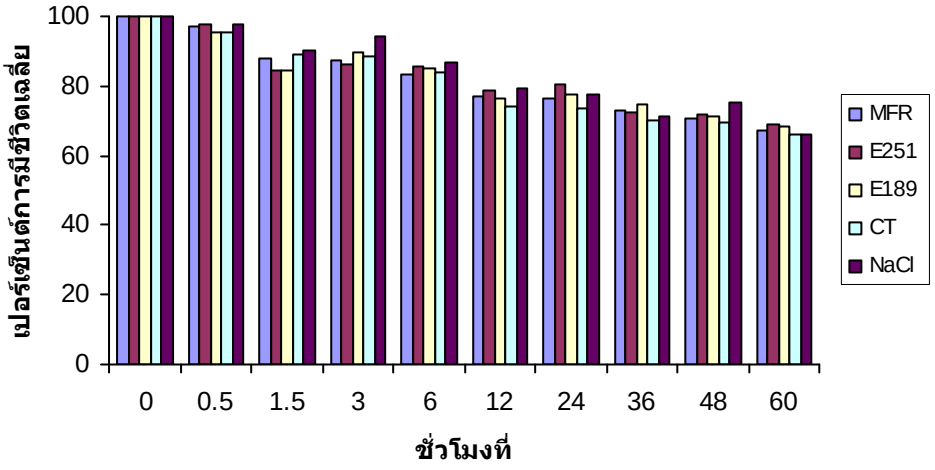
หมายเหตุ 1.ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับเหมือนกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีไม่นัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2.กำหนดอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สเปิร์มเป็นระบบตัวเลข 1-10 ดังนี้

1 = เคลื่อนที่ 0 <10 %, 2 = เคลื่อนที่ 10 < 20 %, 3 = เคลื่อนที่ 20 < 30 %,
4 = เคลื่อนที่ 30 < 40 % 5 = เคลื่อนที่ 40 < 50 % 6 = เคลื่อนที่ 50 < 60 %,
7 = เคลื่อนที่ 60 < 70 %, 8 = เคลื่อนที่ 70 < 80 %, 9 = เคลื่อนที่ 80 < 90 %,
10 = เคลื่อนที่ 90 < 100 %

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา extender 5 ชนิด

ชั่วโมง	น้ำยา Extender				
	MFR	E 251	E 189	0.1 M CT	NaCl 0.9%
0	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00	100.00 ± 0.00
0.5	97.22 ± 1.79	97.44 ± 1.59	95.22 ± 2.28	95.56 ± 1.67	97.67 ± 1.41
1.5	88.11 ± 2.67	84.56 ± 5.34	84.44 ± 4.36	89.00 ± 4.00	90.22 ± 4.21
3	87.44 ± 6.09	86.11 ± 4.59	89.44 ± 5.57	88.67 ± 6.65	94.44 ± 2.24
6	83.11 ± 4.99	85.67 ± 5.07	84.78 ± 4.29	83.89 ± 5.42	86.56 ± 2.79
12	76.78 ± 5.61	79.00 ± 5.63	76.22 ± 6.78	74.22 ± 8.50	79.44 ± 7.02
24	76.33± 6.20	80.56 ± 4.10	77.56 ± 5.83	73.78 ± 11.68	77.67 ± 5.96
36	73.11 ± 3.44	72.22 ± 6.85	74.67 ± 3.08	70.22 ± 6.10	71.00 ± 6.00
48	70.78 ± 4.35	71.67 ± 2.87	71.22 ± 2.68	69.67 ± 3.71	75.22 ± 3.07
60	67.44 ± 3.09	69.22 ± 4.89	68.11 ± 3.33	66.11 ± 4.04	69.22 ± 2.95



ภาพที่ 4 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา extender 5 ชนิด

ตารางที่ 13 คะแนนเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ซึ่งแปลงค่ามาจากเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา extender 5 ชนิด

ชั่วโมง	น้ำยา Extender				
	MFR	E 251	E 189	0.1 M CT	NaCl 0.9%
0	1.00 ± 0.00^{a}	1.00 ± 0.00^{a}	1.00 ± 0.00^{a}	1.00 ± 0.00^{a}	1.00 ± 0.00^{a}
0.5	0.97 ± 0.02^{a}	0.97 ± 0.02^{a}	0.95 ± 0.02^{a}	0.96 ± 0.02^{a}	0.98 ± 0.01^{a}
1.5	0.88 ± 0.03^{a}	0.85 ± 0.05^{a}	0.84 ± 0.04^{a}	0.88 ± 0.44^{a}	0.90 ± 0.04^{a}
3	0.87 ± 0.06^{a}	0.86 ± 0.05^{a}	0.89 ± 0.06^{a}	0.89 ± 0.04^{a}	0.94 ± 0.02^{a}
6	0.83 ± 0.05^{a}	0.86 ± 0.05^{a}	0.85 ± 0.04^{a}	0.89 ± 0.07^{a}	0.87 ± 0.03^{a}
12	0.77 ± 0.06^{a}	0.75 ± 0.11^{a}	0.76 ± 0.07^{a}	0.84 ± 0.05^{a}	0.79 ± 0.07^{a}
24	0.76 ± 0.06^{a}	0.81 ± 0.04^{a}	0.78 ± 0.06^{a}	0.74 ± 0.08^{a}	0.78 ± 0.06^{a}
36	0.73 ± 0.03^{a}	0.72 ± 0.07^{a}	0.75 ± 0.03^{a}	0.70 ± 0.06^{a}	0.71 ± 0.06^{a}
48	0.71 ± 0.04^{a}	0.72 ± 0.03^{a}	0.71 ± 0.03^{a}	0.70 ± 0.04^{a}	0.75 ± 0.03^{a}
60	0.67 ± 0.03^{a}	0.69 ± 0.05^{a}	0.68 ± 0.03^{a}	0.66 ± 0.04^{a}	0.69 ± 0.03^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับเหมือนกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2. ศึกษาอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยา extender ที่เหมาะสมของการเก็บรักษาน้ำเชื้อ

จากผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ย การมีชีวิตเฉลี่ยของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นโดยอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยา extender 1:1, 1:4 และ 1:9 โดยสเปิร์มที่เจือจางในน้ำยา extender ทั้ง 5 สูตรทดลอง สเปิร์มเคลื่อนที่และมีชีวิตได้นานถึง 216 ชั่วโมงทำการประเมินที่เวลา 60 ชั่วโมง พบว่า

สเปิร์มที่เจือจางด้วยน้ำยา MFR มีการเคลื่อนที่เฉลี่ย (Mean $\pm$ SD) 63.33 $\pm$ 5.77%, 76.67 $\pm$ 5.77% และ 73.33 $\pm$ 11.55% การมีชีวิตของสเปิร์มเฉลี่ย 65.33 $\pm$ 4.04%, 68.67 $\pm$ 1.15% และ 68.33 $\pm$ 3.21%

สเปิร์มที่เจือจางด้วยน้ำยา E 251 มีการเคลื่อนที่เฉลี่ย (Mean ± SD) 63.33 ± 5.77%, 40.00 ± 0.00% และ 36.67 ± 5.77% การมีชีวิตของสเปิร์มเฉลี่ย 66.67 ± 2.31%, 72.33 ± 0.58% และ 68.67 ± 8.08

สเปิร์มที่เจือจางด้วยน้ำยา E 189 มีการเคลื่อนที่เฉลี่ย (Mean ± SD) 70.00 ± 10.00%, 56.67 ± 5.77% และ 46.67 ± 15.28% การมีชีวิตของสเปิร์มเฉลี่ย 68.67 ± 1.53%, 68.67 ± 2.89% และ 67.00 ± 5.57%

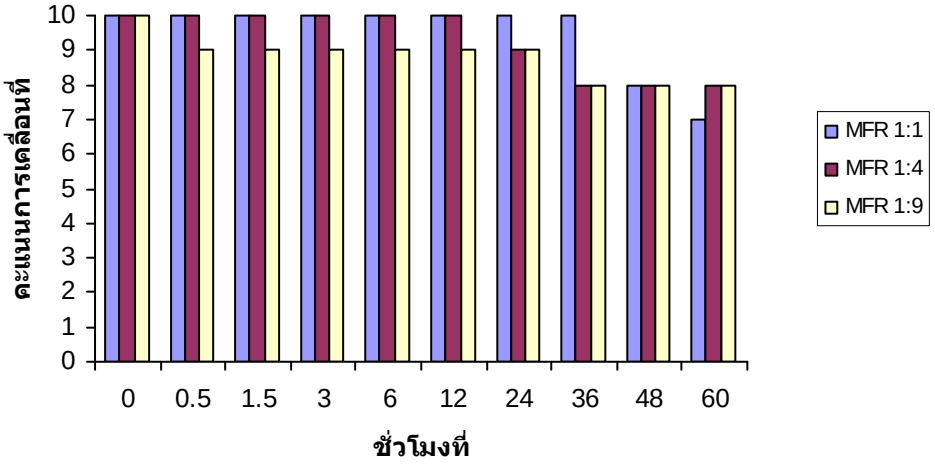
สเปิร์มที่เจือจางด้วยน้ำยา 0.1 M CT มีการเคลื่อนที่เฉลี่ย (Mean ± SD) 80.00 ± 10.00%, 73.33 ± 5.77% และ 56.67 ± 5.77% การมีชีวิตของสเปิร์มเฉลี่ย 68.67 ± 4.93%, 67.33 ± 1.15% และ 62.33 ± 2.52%

สเปิร์มที่เจือจางด้วยน้ำยา NaCl 0.9% มีการเคลื่อนที่เฉลี่ย (Mean ± SD) 66.67 ± 15.28%, 80.00 ± 0.00% และ 70.00 ± 0.00% การมีชีวิตของสเปิร์มเฉลี่ย 66.33 ± 2.89%, 69.67 ± 1.53% และ 71.67 ± 1.53% (ภาพที่ 5 -14) (ตารางที่ 14 -23)

ตารางที่ 14 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา MFR ที่อัตราส่วนต่าง ๆ กัน

ชั่วโมง	อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา MFR		
	1:1	1:4	1:9
0	100.00 ± 0.00^{a}	100.00 ± 0.00^{a}	100.00 ± 0.00^{a}
0.5	90.00 ± 0.00^{a}	90.00 ± 0.00^{a}	86.67 ± 5.77^{a}
1.5	90.00 ± 0.00^{a}	90.00 ± 0.00^{a}	83.33 ± 5.77^{a}
3	90.00 ± 0.00^{a}	90.00 ± 0.00^{a}	80.00 ± 0.00^{a}
6	90.00 ± 0.00^{a}	90.00 ± 0.00^{a}	80.00 ± 0.00^{a}
12	90.00 ± 0.00^{a}	90.00 ± 0.00^{a}	80.00 ± 0.00^{a}
24	90.00 ± 0.00^{a}	80.00 ± 0.00^{a}	80.00 ± 0.00^{a}
36	90.00 ± 0.00^{a}	76.67 ± 5.77^{a}	76.67 ± 5.77^{a}
48	70.00 ± 10.00^{a}	76.67 ± 5.77^{a}	73.33 ± 11.55^{a}
60	63.33 ± 5.77^{a}	76.67 ± 5.77^{a}	73.33 ± 11.55^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับเหมือนกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

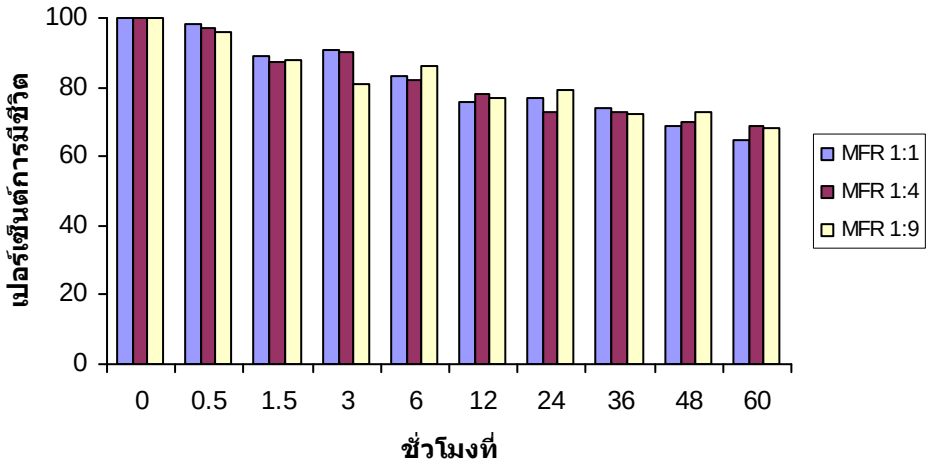


ภาพที่ 5 คะแนนการเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ซึ่งแปลงค่ามาจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา MFR

ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา MFR ที่อัตราส่วนต่าง ๆ กัน

ชั่วโมง	อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา MFR		
	1:1	1:4	1:9
0	100.00 ± 0.00^{a}	100.00 ± 0.00^{a}	100.00 ± 0.00^{a}
0.5	98.00 ± 1.00^{a}	97.33 ± 0.58^{a}	96.33 ± 3.05^{a}
1.5	89.33 ± 2.08^{a}	86.67 ± 3.79^{a}	88.33 ± 2.08^{a}
3	91.33 ± 3.05^{a}	90.00 ± 6.08^{a}	81.00 ± 2.65^{a}
6	85.67 ± 4.93^{a}	81.67 ± 7.51^{a}	82.00 ± 2.00^{a}
12	76.00 ± 8.00^{a}	77.67 ± 5.13^{a}	77.67 ± 5.77^{a}
24	77.00 ± 5.29^{a}	73.00 ± 9.54^{a}	79.00 ± 2.65^{a}
36	73.67 ± 3.05^{a}	73.33 ± 3.51^{a}	72.33 ± 4.93^{a}
48	69.33 ± 7.78^{a}	70.33 ± 2.08^{a}	72.67 ± 1.52^{a}
60	65.33 ± 4.04^{a}	68.67 ± 1.15^{a}	68.33 ± 3.21^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับเหมือนกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

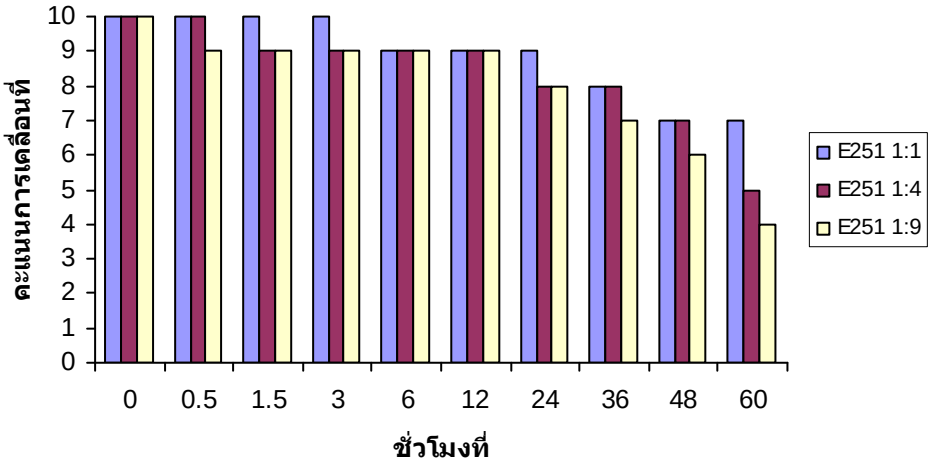


ภาพที่ 6 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา MFR

ตารางที่ 16 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา E 251 ที่อัตราส่วนต่าง ๆ กัน

ชั่วโมง	อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา E 251		
	1:1	1:4	1:9
0	100.00 ± 0.00^{a}	100.00 ± 0.00^{a}	100.00 ± 0.00^{a}
0.5	90.00 ± 0.00^{a}	90.00 ± 0.00^{a}	83.33 ± 5.77^{a}
1.5	90.00 ± 0.00^{a}	86.67 ± 5.77^{a}	83.33 ± 5.77^{a}
3	90.00 ± 0.00^{a}	86.67 ± 5.77^{a}	83.33 ± 5.77^{a}
6	86.67 ± 5.77^{a}	86.67 ± 5.77^{a}	83.33 ± 5.77^{a}
12	83.33 ± 5.77^{a}	86.67 ± 5.77^{a}	83.33 ± 5.77^{a}
24	80.00 ± 0.00^{a}	76.67 ± 5.77^{a}	70.00 ± 0.00^{a}
36	73.33 ± 5.77^{a}	70.00 ± 0.00^{a}	63.33 ± 5.77^{a}
48	66.67 ± 5.77^{a}	63.33 ± 5.77^{a}	56.67 ± 5.77^{a}
60	63.33 ± 5.77^{a}	40.00 ± 0.00^{a}	36.67 ± 5.77^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับเหมือนกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

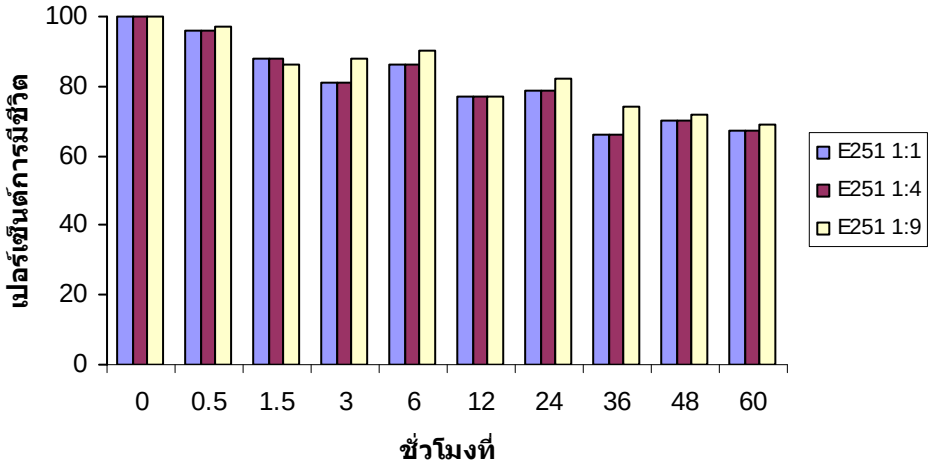


ภาพที่ 7 คะแนนการเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ซึ่งแปลงค่ามาจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา E 251

ตารางที่ 17 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา E 251 ที่อัตราส่วนต่าง ๆ กัน

ชั่วโมง	อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา E 251		
	1:1	1:4	1:9
0	100.00 ± 0.00 [a]	100.00 ± 0.00 [a]	100.00 ± 0.00 [a]
0.5	96.33 ± 1.53 [a]	98.67 ± 1.15 [a]	97.33 ± 1.53 [a]
1.5	87.33 ± 1.15 [a]	80.67 ± 6.51 [a]	85.67± 5.86 [a]
3	83.00 ± 5.57 [a]	87.67 ± 3.79 [a]	87.67 ± 4.16 [a]
6	82.67 ± 5.51 [a]	88.67 ± 4.62 [a]	85.67 ± 4.93 [a]
12	78.33 ± 7.64 [a]	81.33 ± 7.09 [a]	77.33 ± 2.31 [a]
24	80.00 ± 3.00 [a]	79.67 ± 7.02 [a]	82.00 ± 2.00 [a]
36	65.67 ± 6.81 [a]	77.33 ± 5.69 [a]	73.67 ± 1.53 [a]
48	70.33± 0.58 [a]	72.67 ± 4.04 [a]	72.00± 3.46 [a]
60	66.67 ± 2.31 [a]	72.33 ± 0.58 [a]	68.67 ± 8.08 [a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับเหมือนกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

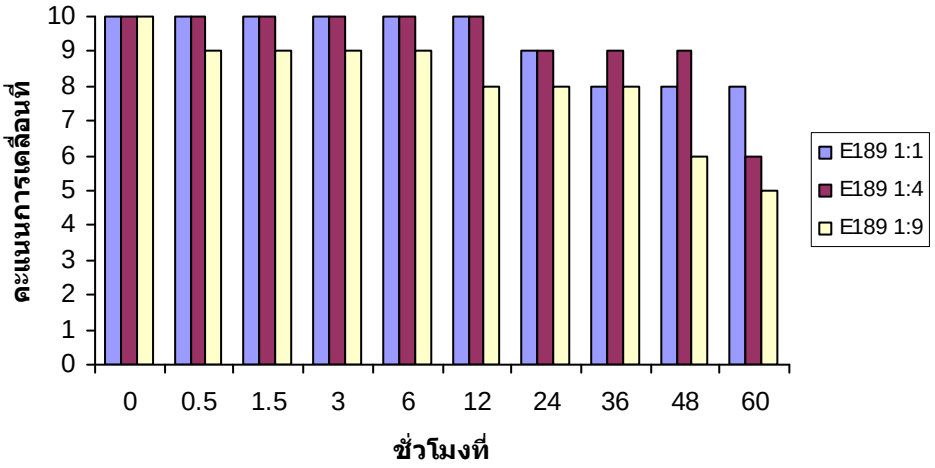


ภาพที่ 8 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา E 251

ตารางที่ 18 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา E 189 ที่อัตราส่วนต่าง ๆ กัน

ชั่วโมง	อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา E 189		
	1:1	1:4	1:9
0	100.00 ± 0.00^{a}	100.00 ± 0.00^{a}	100.00 ± 0.00^{a}
0.5	90.00 ± 0.00^{a}	90.00 ± 0.00^{a}	86.67 ± 5.77^{a}
1.5	90.00 ± 0.00^{a}	90.00 ± 0.00^{a}	86.67 ± 5.77^{a}
3	90.00 ± 0.00^{a}	90.00 ± 0.00^{a}	86.67 ± 5.77^{a}
6	90.00 ± 0.00^{a}	90.00 ± 0.00^{a}	86.67 ± 5.77^{a}
12	90.00 ± 0.00^{a}	90.00 ± 0.00^{a}	76.67 ± 5.77^{a}
24	83.33 ± 5.77^{a}	86.67 ± 5.77^{a}	76.67 ± 5.77^{a}
36	76.67 ± 5.77^{a}	86.67 ± 5.77^{a}	73.33 ± 5.77^{a}
48	76.67 ± 5.77^{a}	80.00 ± 0.00^{a}	53.33 ± 5.77^{a}
60	70.00 ± 0.00^{a}	56.67 ± 5.77^{a}	46.67 ± 15.28^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับเหมือนกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

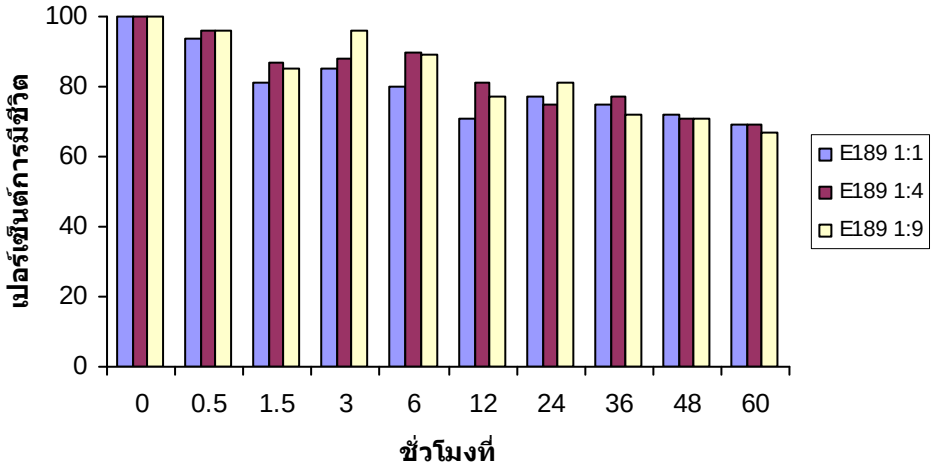


ภาพที่ 9 คะแนนการเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ซึ่งแปลงค่ามาจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา E 189

ตารางที่ 19 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา E 189 ที่อัตราส่วนต่าง ๆ กัน

ชั่วโมง	อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา E 189		
	1:1	1:4	1:9
0	100.00 ± 0.00 [a]	100.00 ± 0.00 [a]	100.00 ± 0.00 [a]
0.5	94.00 ± 2.00 [a]	96.00 ± 2.65 [a]	95.67 ± 2.52 [a]
1.5	81.33 ± 1.15 [a]	87.33 ± 5.03 [a]	84.67 ± 4.73 [a]
3	84.67 ± 4.16 [a]	88.00 ± 3.00 [a]	95.67 ± 1.53 [a]
6	80.00 ± 1.73 [a]	86.67 ± 4.04 [a]	87.67 ± 1.53 [a]
12	71.00 ± 6.25 [a]	80.67 ± 4.04 [a]	77.00 ± 7.54 [a]
24	77.33 ± 1.15 [a]	74.67 ± 9.29 [a]	80.67 ± 4.62 [a]
36	75.00 ± 1.00 [a]	77.33 ± 1.53 [a]	71.67 ± 3.21 [a]
48	72.33 ± 0.58 [a]	70.67 ± 5.03 [a]	70.67 ± 0.58 [a]
60	68.67 ± 1.53 [a]	68.67 ± 2.89 [a]	67.00 ± 5.57 [a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับเหมือนกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

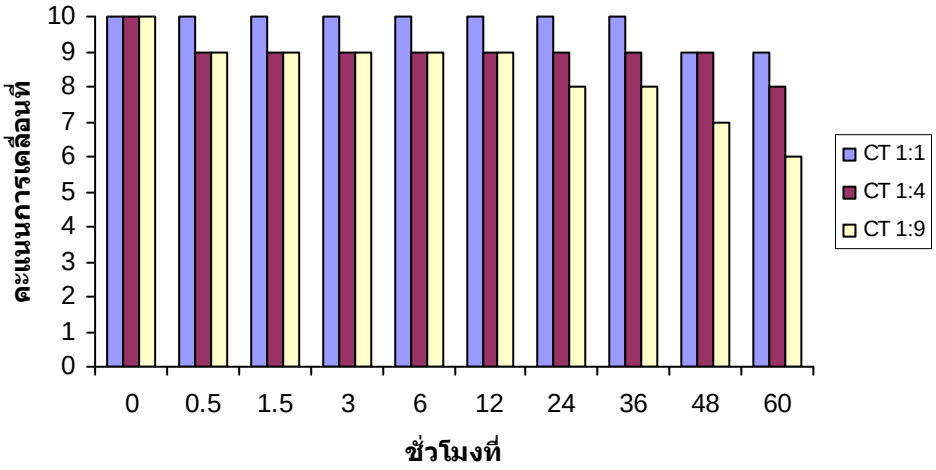


ภาพที่ 10 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา E 189

ตารางที่ 20 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา 0.1M CT ที่อัตราส่วนต่าง ๆ กัน

ชั่วโมง	อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา 0.1M CT		
	1:1	1:4	1:9
0	100.00 ± 0.00^{a}	100.00 ± 0.00^{a}	100.00 ± 0.00^{a}
0.5	90.00 ± 0.00^{a}	86.67 ± 5.77^{a}	86.67 ± 5.77^{a}
1.5	90.00 ± 0.00^{a}	86.67 ± 5.77^{a}	86.67 ± 5.77^{a}
3	90.00 ± 0.00^{a}	86.67 ± 5.77^{a}	86.67 ± 5.77^{a}
6	90.00 ± 0.00^{a}	86.67 ± 5.77^{a}	86.67 ± 5.77^{a}
12	90.00 ± 0.00^{a}	86.67 ± 5.77^{a}	83.33 ± 11.57^{a}
24	90.00 ± 0.00^{a}	86.67 ± 5.77^{a}	76.67 ± 15.28^{a}
36	90.00 ± 0.00^{a}	83.33 ± 5.77^{a}	73.33 ± 11.55^{a}
48	86.00 ± 5.77^{a}	80.00 ± 0.00^{a}	66.67 ± 5.77^{a}
60	80.00 ± 10.00^{a}	73.33 ± 5.77^{a}	56.67 ± 5.77^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับเหมือนกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

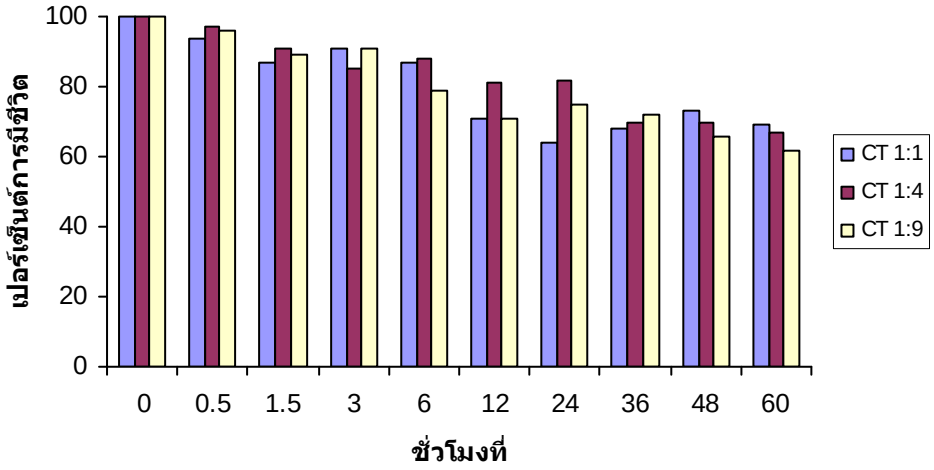


ภาพที่ 11 คะแนนการเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ซึ่งแปลงค่ามาจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา 0.1 M CT

ตารางที่ 21 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา 0.1M CT ที่อัตราส่วนต่าง ๆ กัน

ชั่วโมง	อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา 0.1M CT		
	1:1	1:4	1:9
0	100.00 ± 0.00 [a]	100.00 ± 0.00 [a]	100.00 ± 0.00 [a]
0.5	94.00 ± 1.00 [a]	97.00 ± 1.00 [a]	95.67 ± 1.53 [a]
1.5	87.00 ± 4.58 [a]	91.33 ± 2.52 [a]	88.67 ± 4.73 [a]
3	90.67 ± 8.50 [a]	84.67 ± 8.14 [a]	90.67 ± 1.53 [a]
6	86.33 ± 3.79 [a]	86.67 ± 1.15 [a]	78.67 ± 6.35 [a]
12	71.00 ± 11.79 [b]	81.00 ± 6.08 [a]	70.67± 3.05 [a]
24	64.33 ± 17.67 [c]	81.67 ± 0.58 [a]	75.33 ± 1.53 [a]
36	68.33 ± 2.08 [a]	70.33 ± 11.55 [a]	72.00 ± 1.00 [a]
48	73.00 ± 1.00 [a]	70.33 ± 1.53 [a]	65.67 ± 3.21 [a]
60	68.67 ± 4.93 [a]	67.33 ± 1.15 [a]	62.33 ± 2.52 [a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับเหมือนกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

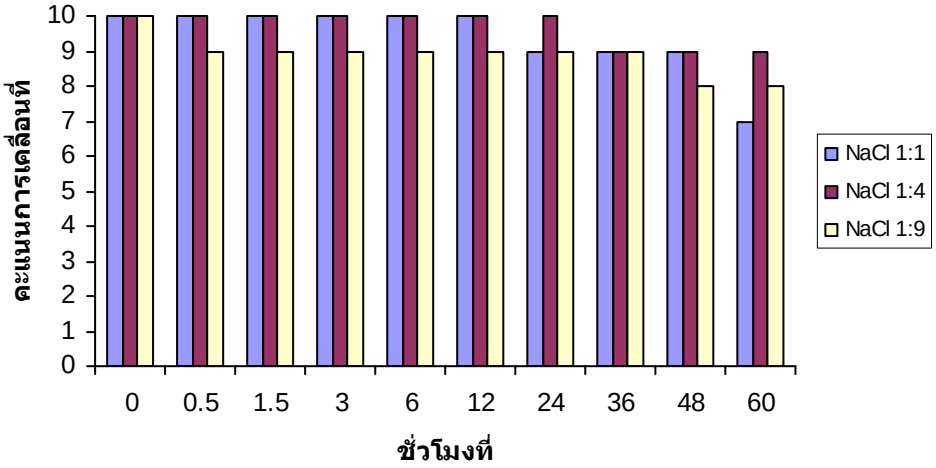


ภาพที่ 12 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา 0.1 M CT

ตารางที่ 22 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา NaCl 0.9% ที่อัตราส่วนต่าง ๆ กัน

ชั่วโมง	อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา NaCl 0.9%		
	1:1	1:4	1:9
0	100.00 ± 0.00^{a}	100.00 ± 0.00^{a}	100.00 ± 0.00^{a}
0.5	90.00 ± 0.00^{a}	90.00 ± 0.00^{a}	86.67 ± 5.77^{a}
1.5	90.00 ± 0.00^{a}	90.00 ± 0.00^{a}	86.67 ± 5.77^{a}
3	90.00 ± 0.00^{a}	90.00 ± 0.00^{a}	86.67 ± 5.77^{a}
6	90.00 ± 0.00^{a}	90.00 ± 0.00^{a}	86.67 ± 5.77^{a}
12	90.00 ± 0.00^{a}	90.00 ± 0.00^{a}	86.67 ± 5.77^{a}
24	86.67 ± 5.77^{a}	90.00 ± 0.00^{a}	86.67 ± 5.77^{a}
36	86.67 ± 5.77^{a}	86.67 ± 5.77^{a}	83.33 ± 5.77^{a}
48	83.33 ± 11.55^{a}	83.33 ± 5.77^{a}	76.67 ± 11.55^{a}
60	66.67 ± 15.28^{a}	80.00 ± 0.00^{a}	70.00 ± 0.00^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับเหมือนกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

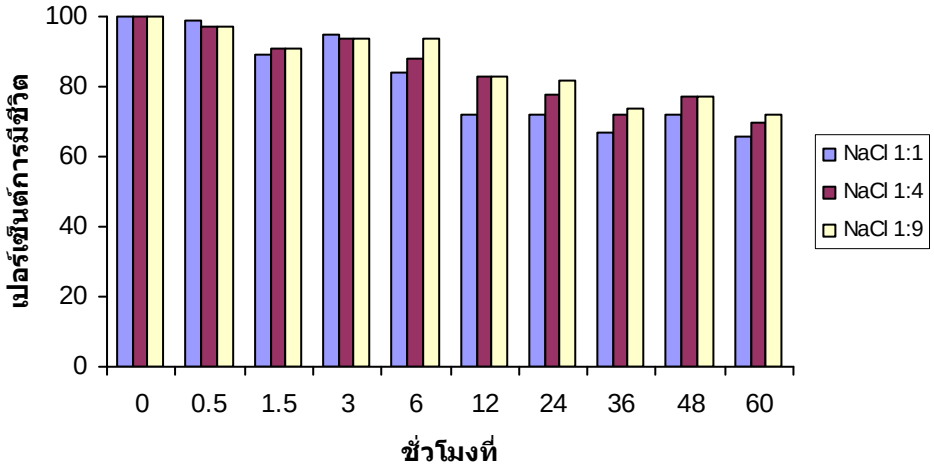


ภาพที่ 13 คะแนนการเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ซึ่งแปลงค่ามาจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา NaCl 0.9%

ตารางที่ 23 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา NaCl 0.9% ที่อัตราส่วนต่าง ๆ กัน

ชั่วโมง	อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา NaCl 0.9%		
	1:1	1:4	1:9
0	100.00 ± 0.00 [a]	100.00 ± 0.00 [a]	100.00 ± 0.00 [a]
0.5	99.00 ± 1.00 [a]	97.00 ± 1.73 [a]	97.00 ± 0.00 [a]
1.5	86.67 ± 4.51 [a]	90.67 ± 2.08 [a]	91.33 ± 6.35 [a]
3	95.33 ± 0.58 [a]	94.33 ± 2.89 [a]	93.67 ± 3.05 [a]
6	84.33 ± 2.89 [a]	87.33 ± 2.08 [a]	88.00 ± 2.65 [a]
12	72.33 ± 7.51 [a]	83.33 ± 4.93 [a]	82.67 ± 1.53 [a]
24	72.33 ± 2.08 [a]	78.33 ± 7.77 [a]	82.33 ± 1.15 [a]
36	67.00 ± 3.46 [a]	72.33 ± 6.66 [a]	73.67 ± 7.09 [a]
48	71.66 ± 1.15 [a]	77.00 ± 2.65 [a]	77.00 ± 1.00 [a]
60	66.33 ±2.89 [a]	69.67 ± 1.53 [a]	71.67 ± 1.53 [a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับเหมือนกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 14 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยน้ำยา NaCl 0.9%

การทดลองที่ 2 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังหงส์

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสาร cryoprotectant ทั้ง 5 ชนิด คือ DMA, DMSO Methanol, Glycerol และ Trehalose ที่ 3 ระดับความเข้มข้น คือ 5%, 10% และ 15% โดยน้ำเชื้อนั้นถูกเจือจางในน้ำยา NaCl 0.9% (ได้จากการทดลองที่ 1) ประเมินการเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มหลังจากการละลาย (thawing)

1. การทดสอบความเป็นพิษของน้ำยา DMA ที่ระดับความเข้มข้น 5%, 10% และ 15% คะแนนการเคลื่อนที่เฉลี่ย (Mean $\pm$ SE) เป็น 8.00 $\pm$ 0.00%, 8.00 $\pm$ 0.00% และ 0.00 $\pm$ 0.00% พบว่าน้ำยา DMA ระดับความเข้มข้น 5% และ10% การเคลื่อนที่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับระดับความเข้มข้น 15% (ภาพที่ 15, ตารางที่ 24) เซลล์มีชีวิตเฉลี่ยที่ระดับความเข้มข้น 5%, 10% และ 15% (Mean $\pm$ SE) เป็น 75.00 $\pm$ 1.81%, 73.25 $\pm$ 2.05% และ 75.63 $\pm$ 2.45% น้ำยา DMA ระดับความเข้มข้น 5%, 10% และ15% การมีชีวิตเฉลี่ยของเซลล์มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ภาพที่ 16, ตารางที่ 25)

2. การทดสอบความเป็นพิษของน้ำยา DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 5%, 10% และ 15% คะแนนการเคลื่อนที่เฉลี่ย (Mean $\pm$ SE) เป็น 8.00 $\pm$ 0.00%, 8.00 $\pm$ 0.00% และ 5.63 $\pm$ 0.18% พบว่า น้ำยา DMSO ระดับความเข้มข้น 5% และ 10% การเคลื่อนที่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับระดับความเข้มข้น15% (ภาพที่ 15, ตารางที่ 24) เซลล์มีชีวิตเฉลี่ยที่ระดับความเข้มข้น 5%, 10% และ 15% (Mean $\pm$ SE) เป็น 76.88 $\pm$ 0.99%, 74.38 $\pm$ 0.84% และ 57.88 $\pm$ 1.75% น้ำยา DMSO ระดับความเข้มข้น 5% และ10% การมีชีวิตเฉลี่ยของเซลล์มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับระดับความเข้มข้น 15% (ภาพที่ 16, ตารางที่ 25)

3. การทดสอบความเป็นพิษของน้ำยา MeOH ที่ระดับความเข้มข้น 5%, 10% และ 15% คะแนนการเคลื่อนที่เฉลี่ย (Mean $\pm$ SE) เป็น 6.75 $\pm$ 0.16%, 6.25 $\pm$ 0.16% และ 1.25 $\pm$ 0.16% พบว่า น้ำยา MeOH ระดับความเข้มข้น 5% และ 10% การเคลื่อนที่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มี

นัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับระดับความเข้มข้น15% (ภาพที่ 15, ตารางที่ 24) เซลล์มีชีวิตเฉลี่ยที่ระดับความเข้มข้น 5%, 10% และ 15% (Mean $\pm$ SE) เป็น 69.00 $\pm$ 2.60%, 66.83 $\pm$ 1.29% และ 61.38 $\pm$ 1.32% น้ำยา MeOH ระดับความเข้มข้น 5%, 10% และ15% การมีชีวิตเฉลี่ยของเซลล์มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ภาพที่ 16, ตารางที่ 25)

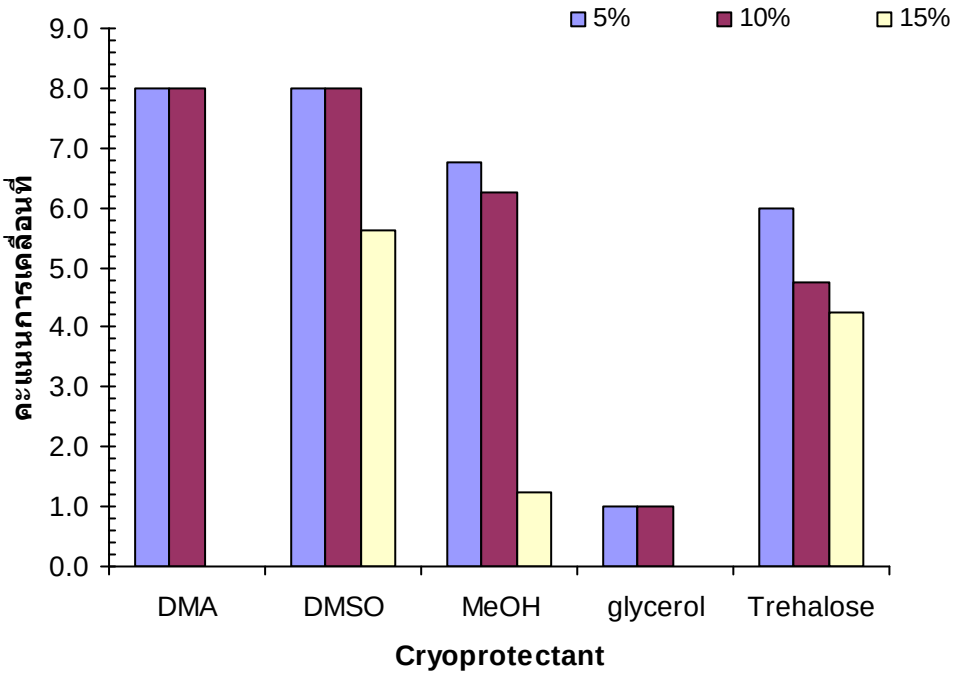
4. การทดสอบความเป็นพิษของน้ำยา Glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 5%, 10% และ 15% คะแนนการเคลื่อนที่เฉลี่ย (Mean $\pm$ SE) เป็น 1.00 $\pm$ 0.00%, 1.00 $\pm$ 0.00% และ 0.00 $\pm$ 0.00% พบว่าน้ำยา Glycerol ระดับความเข้มข้น 5% และ10% การเคลื่อนที่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับระดับความเข้มข้น 15% (ภาพที่ 15, ตารางที่ 24) เซลล์มีชีวิตเฉลี่ยที่ระดับความเข้มข้น 5%, 10% และ15% (Mean $\pm$ SE) เป็น 34.75 $\pm$ 2.14%, 26.88 $\pm$ 1.04% และ 25.88 $\pm$ 0.83% น้ำยา Glycerol ระดับความเข้มข้น 10% และ15% การมีชีวิตเฉลี่ยของเซลล์มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับระดับความเข้มข้น 5% (ภาพที่ 16, ตารางที่ 25)

5. การทดสอบความเป็นพิษของน้ำยา Trehalose ที่ระดับความเข้มข้น 5%, 10% และ 15% คะแนนการเคลื่อนที่เฉลี่ย (Mean $\pm$ SE) เป็น 6.00 $\pm$ 0.00%, 4.75 $\pm$ 0.31% และ 4.25 $\pm$ 0.16% พบว่าน้ำยา Trehalose ระดับความเข้มข้น 5% และ 10% การเคลื่อนที่มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับระดับความเข้มข้น 15% (ภาพที่ 15, ตารางที่ 24) เซลล์มีชีวิตเฉลี่ยที่ระดับความเข้มข้น 5%, 10% และ 15% (Mean $\pm$ SE) เป็น 41.25 $\pm$ 3.97%, 42.88 $\pm$ 1.67% และ 33.13 $\pm$ 1.88% น้ำยา Trehalose ระดับความเข้มข้น 5%, 10% และ 15% การมีชีวิตเฉลี่ยของเซลล์มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (ภาพที่ 16, ตารางที่ 25)

ตารางที่ 24 คะแนนการเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งด้วยสาร cryoprotectant 5 ชนิด

ชนิดของสาร (Cryoprotectant)	ระดับความเข้มข้น 5%	10%	15%
DMA	8.00 ± 0.00^{a}	8.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{b}
DMSO	8.00 ± 0.00^{a}	8.00 ± 0.00^{a}	5.63 ± 0.18^{b}
MeOH	6.75 ± 0.16^{a}	6.25 ± 0.16^{a}	5.63 ± 0.16^{a}
Glycerol	1.00 ± 0.00^{a}	1.00 ± 0.00^{a}	0.00 ± 0.00^{b}
Trehalose	6.00 ± 0.00^{a}	4.75 ± 0.31^{a}	4.25 ± 0.16^{a}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

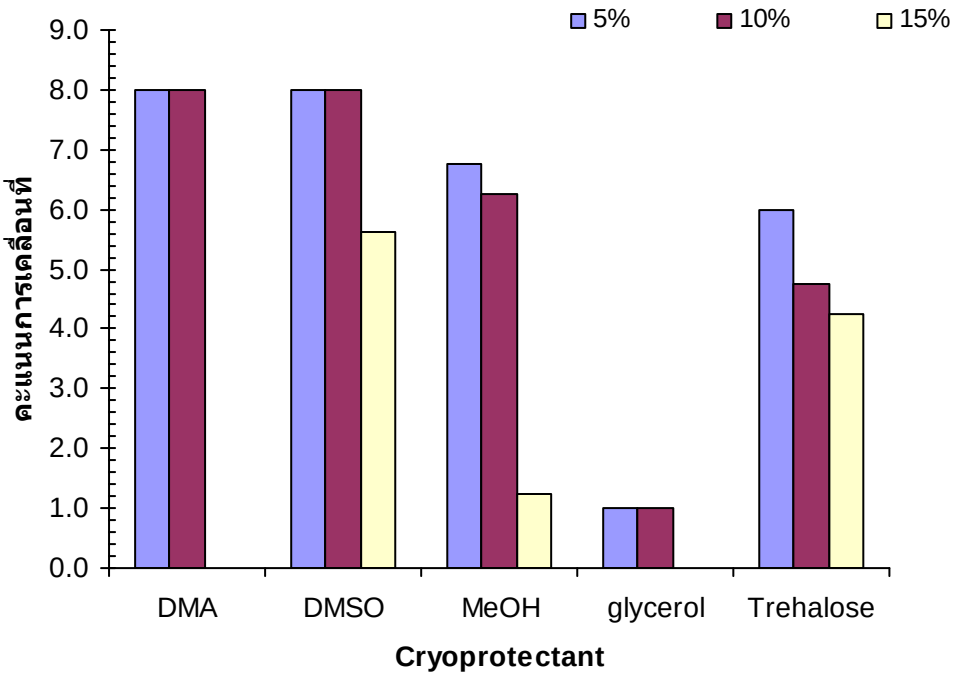


ภาพที่ 15 คะแนนการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะรังหงส์ในสาร cryoprotectant 5 ชนิด ที่ 3 ระดับความเข้มข้น

ตารางที่ 25 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มปลากะรังหงส์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งด้วยสาร cryoprotectant 5 ชนิด

ชนิดของสาร (Cryoprotectant)	ระดับความเข้มข้น 5%	10%	15%
DMA	75.00 ± 1.81[a]	73.25 ± 2.05[a]	75.63 ± 2.45[a]
DMSO	76.88 ± 0.99[a]	74.38 ± 0.84[a]	57.88 ± 1.75[b]
MeOH	69.00 ± 2.60[a]	66.83 ± 1.29[a]	61.38± 1.32[a]
Glycerol	34.75 ± 2.14[a]	26.88 ± 1.04[b]	25.88 ± 0.83[b]
Trehalose	41.25 ± 3.97[a]	42.88 ± 1.67[a]	33.13 ± 1.88[a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่16 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังหงส์ในสาร cryoprotectant 5 ชนิด ที่ 3 ระดับความเข้มข้น

การศึกษาการเคลื่อนที่และการมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังหงส์

เมื่อพิจารณาที่ปัจจัยเดียว คือ ชนิดของสาร cryoprotectant จะเห็นว่าการเลือกใช้ DMSO ทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และการมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังหงส์ภายหลังการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งสูงที่สุด และสูงกว่าการใช้ DMA MeOH Trehalose และ Glycerol ตามลำดับ

การเลือกใช้สาร cryoprotectant 5 ชนิดนี้ พบว่าการเลือกใช้ที่ระดับความเข้มข้น 5%ให้ผลการทดลองดีที่สุดแต่ไม่แตกต่างกับ 10%

การเลือกใช้ DMA, DMSO, MeOH, Glycerol และ Trehalose ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ (5%, 10% และ 15%) มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และการมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังหงส์มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดย การใช้ DMSO 5% ทำหน้าที่เป็นสาร cryoprotectant ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังหงส์ให้ผลดีที่สุดรองลงมาคือ DMA 15% DMA 5% DMSO 10% DMA 10% และ MeOH 5% (ภาพที่ 15 และ 16, ตารางที่ 26-28)

ตารางที่ 26 คะแนนเคลื่อนที่เฉลี่ย เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มในสาร cryoprotectant 5 ชนิด ที่ 3 ระดับความเข้มข้น

ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant	คะแนนการเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์ม (Mean $\pm$ SE)	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์ม (Mean $\pm$ SE)
DMA 5%	8.00 $\pm$ 0.00	75.00 $\pm$ 1.81
DMA 10%	8.00 $\pm$ 0.00	73.25 $\pm$ 2.05
DMA 15%	0.00 $\pm$ 0.00	75.63 $\pm$ 2.45
DMSO 5%	8.00 $\pm$ 0.00	76.88 $\pm$ 0.99
DMSO 10%	8.00 $\pm$ 0.00	74.38 $\pm$ 0.84
DMSO 15%	5.63 $\pm$ 0.18	57.88 $\pm$ 1.75
MeOH 5%	6.75 $\pm$ 0.16	69.00 $\pm$ 2.60
MeOH 10%	6.25 $\pm$ 0.16	66.83 $\pm$ 1.29
MeOH 15%	1.25 $\pm$ 0.16	61.38 $\pm$ 1.32
Glycerol 5%	1.00 $\pm$ 0.00	34.75 $\pm$ 2.14

ตารางที่ 26 (ต่อ)

ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant	คะแนนการเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์ม (Mean ± SE)	เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์ม (Mean ± SE)
Glycerol 10%	1.00 ± 0.00	26.88 ± 1.04
Glycerol 15%	0.00 ± 0.00	25.88 ± 0.83
Trehalose 5%	6.00 ± 0.00	41.25 ± 3.97
Trehalose 10%	4.75 ± 0.31	42.88 ± 1.67
Trehalose 15%	4.25 ± 0.16	33.13 ± 1.88

หมายเหตุ: กำหนดอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์สเปิร์มเป็นระบบตัวเลข 1-10 ดังนี้

1 = เคลื่อนที่ 0 <10 %, 2 = เคลื่อนที่ 10 < 20 %, 3 = เคลื่อนที่ 20 < 30 %,
4 = เคลื่อนที่ 30 < 40 % 5 = เคลื่อนที่ 40 < 50 % 6 = เคลื่อนที่ 50 < 60 %,
7 = เคลื่อนที่ 60 < 70 %, 8 = เคลื่อนที่ 70 < 80 %, 9 = เคลื่อนที่ 80 < 90 %,
10 = เคลื่อนที่ 90 < 100 %

การทดลองที่ 3 ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การฟักไข่ปลากะรังหงส์

ใช้แม่ปลากะรังหงส์มีไข่ที่พร้อมเหนี่ยวนำให้ไข่แก่และมีการตกไข่โดยการฉีดฮอร์โมน puberogen จำนวน 2 เข็ม ๆ แรกใช้ 100 IU/น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และเข็มที่ 2 ห่างจากเข็มแรก 24 ชั่วโมง ใช้ 200 IU/น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม สามารถรีดไข่ปลาได้ภายใน 77 ชั่วโมง ผลจากการสุ่มนับไข่ 300 ไมโครลิตรมีค่าเฉลี่ย 450 ฟอง นำไข่ที่ได้ไปทดสอบกับน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งโดยใช้ 5% ของ DMA และ DMSO ซึ่งมีสเปิร์ม 7.6 X 10^9 เซลล์ หลังจากฟักไข่ 24 ชั่วโมง สุ่มนับเปอร์เซ็นต์การฟัก พบว่าไข่ที่ผสมน้ำเชื้อสดมีค่า 16.30%, 15.13%, 12.56% และ 15.49% ไข่ที่ผสมน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ DMA 5% เป็นสาร cryoprotectant มีค่า 5.26%, 5.44%, 6.94% และ 8.76% ไข่ที่ผสมน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ DMSO 5% เป็นสาร cryoprotectant มีค่า 13.94%, 18.18% และ 17.46% ตามลำดับ (ตารางที่ 23 และ 24)

ตารางที่ 27 เปอร์เซ็นต์การฟักไข่ปลากะรังหงส์ที่ผสมกับน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งโดยใช้ 5% ของ DMA และ DMSO เป็นสาร cryoprotectant

ชนิด/cryoprotectant	ซ้ำที่	% การฟักไข่
น้ำเชื้อสด	1	16.30
	2	15.13
	3	12.56
	4	15.49
น้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้	1	5.26
DMA 5%	2	5.44
	3	6.94
	4	8.76
น้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้	1	13.94
DMSO 5%	2	18.18
	3	17.46

ตารางที่ 28 ผลการวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การฟักไข่ปลากะรังหงส์

ชนิด/cryoprotectant	ค่าเฉลี่ย (% การฟักไข่)
น้ำเชื้อสด	14.87 ± 0.02^{a}
น้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ DMA 5%	6.60 ± 0.02^{b}
น้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ DMSO 5%	16.53 ± 0.02^{a}

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกันที่มีอักษรกำกับแตกต่างกัน แสดงว่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

วิจารณ์

การทดลองที่ 1 ชนิดและอัตราส่วนการเจือจางของน้ำยา extender ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังหงส์

จากการศึกษาโดยการทดสอบการเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มหลังจากการเก็บแบบแช่เย็นในน้ำยา extender 5 ชนิด คือ NaCl 0.9 %, E 189, MFR, E 251 และ 0.1 M CT พบว่า 60 ชั่วโมงแรกการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่เก็บรักษาในน้ำยา extenders ทั้ง 5 ชนิด ให้ผลไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) โดยที่ค่า Osmolality ของน้ำยา extender 5 ชนิด ดังกล่าวข้างต้นมีค่าเท่ากับ 274, 295, 438, 329 และ 228 mOsm/kg ตามลำดับ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับของเหลวที่อยู่ในน้ำเชื้อปลากะรังหงส์ คือ 320 mOsm/kg เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ สุเมธ (2550) ที่ทดลองประสิทธิภาพของน้ำยา extender 10 สูตร คือ Marine Fish Ringer (MFR), Extender 251(E 251), 0.1 M Sodium Citrate (CT), Calcium Free Hank's Balance Salt Solution (CF-HBSS), Hank's Balance Salt Solution (HBSS), NaCl 0.85 %, Cortland, Saline Base, Ringer และ Ca-F Saline ซึ่งมีค่า Osmolality 941, 878, 651, 317, 618, 342, 408, 250, 415, 525 mOsm/kg และของเหลวในน้ำเชื้อปลากะพงแดง, *Lutjanus argentimaculatus* มีค่า Osmolality 421 mOsm/kg พบว่าน้ำยา extender 3 สูตร คือน้ำยา Saline Base, Ringer และน้ำยา Ca-F Saline มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงแดงแบบแช่เย็น ซึ่งจะเห็นได้ว่าน้ำยา extender 3 สูตรมีค่า Osmolality ใกล้เคียงกับน้ำเชื้อปลากะพงแดงโดยเฉพาะน้ำยา Ringer มีค่ารักษาระดับเกลือแร่ในของเหลว การแลกเปลี่ยนเกิดขึ้นน้อยมากและยังคงรักษาสภาพเซลล์ได้ดีที่สุดแม้ถูกนำไปแช่เย็น ช่วยสมดุลและรวมถึงการเคลื่อนที่ด้วย แสดงให้เห็นว่า Osmolality ของน้ำยา extender มีผลต่อการมีชีวิตและใช้ได้ของเซลล์สเปิร์มหลังจากนำไปผ่านกระบวนการแช่เย็น ผลการศึกษาในต่างประเทศเช่นเดียวกัน ปลา yellowfin sea bream, *Acanthopagrus latus* (Gwo, 1994) และใน black grouper, *Epinephelus malabaricus* (Gwo, 1993)

ค่า Osmolality เป็นสิ่งสำคัญในการเสริมการเคลื่อนที่ของเซลล์สเปิร์ม ดังนั้นค่า Osmolality จึงเป็นดัชนีตัวหนึ่งที่บ่งชี้ให้เห็นว่า การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา เมื่อพิจารณาจะพบว่าค่า Osmolality ที่อยู่ภายนอกสเปิร์มปลาทะเลที่มีค่า Osmolality สูงกว่าค่า Osmolality ภายในสเปิร์มปลาทะเล จึงเป็นผลให้สเปิร์มปลาทะเลนั้นเคลื่อนที่และเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับการค้นพบของ Morisawa and Suzuki, (1980); Oda and Morisawa (1993) ที่กล่าวไว้ว่าความดันออสโมติก

(osmotic pressure) เป็นปัจจัยหลักในการควบคุมการเคลื่อนที่ของเซลล์สเปิร์มของปลาตั้งแต่เริ่มเคลื่อนที่ ปรากฏการณ์ภาวะ Isotonic อธิบายได้ว่าจะเป็นสิ่งหนึ่งที่เป็นการป้องกันการเคลื่อนที่ของเซลล์สเปิร์มก่อนที่จะนำไปแช่แข็ง ซึ่งจะช่วยลดปัญหาการสูญเสียพลังงานของเซลล์สเปิร์มหลังจากการละลาย

ผลจากการศึกษาอัตราส่วนการเจือจางโดยใช้น้ำยา extender ต่อน้ำเชื้อ 1:1, 1:4 และ 1:9 โดยที่สเปิร์มที่เจือจางในน้ำยา extender ทั้ง 5 สูตรทดลอง สเปิร์มเคลื่อนที่และมีชีวิตให้ผลไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ($P>0.05$) ดังนั้นในทางปฏิบัติจึงจำเป็นต้องเลือกอัตราส่วน 1:9 เนื่องจากปริมาณน้ำเชื้อปลากะรังหงส์ที่รีดได้ในแต่ละครั้งมีปริมาณที่น้อย แม้ว่าอัตราการเจือจางจะไม่มีผลต่อน้ำเชื้อ ถ้าน้ำยาเจือจางนั้นประกอบด้วยอิออนและแรงดันออสโมติกที่เหมาะสม แต่ไม่ควรเจือจางมากเพราะจะทำให้สิ้นเปลืองภาชนะบรรจุและที่เก็บน้ำเชื้อ อีกทั้งหากปริมาณน้ำยาเจือจางที่มากขึ้นจะมีผลทำให้เกิดโอกาสการเกิดเกล็ดน้ำแข็งมากขึ้นในระหว่างการลดอุณหภูมิ (สุเมธ , 2550) อัตราการเจือจางควรจะเป็น 1:1 ถึง 1:9 (กฤษณ์, 2536)

จากการทดลองเป็นที่น่าสังเกตว่าถึงแม้ชนิดและอัตราส่วนการเจือจางน้ำยา extender ต่อน้ำเชื้อทั้ง 5 สูตรทดลองจะให้ผลการเคลื่อนที่และการมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังหงส์ไม่แตกต่างกันแต่มีน้ำเชื้อปลาที่เจือจางใน E 189 และ E 251 สเปิร์มจะจับตัวเป็นเมือกข้น อาจเกิดจากน้ำยา extender ดังกล่าวมีส่วนผสมที่มี Soy lecithin อยู่ด้วยทำให้ประสิทธิภาพการเคลื่อนที่ต่ำกว่าน้ำยา extender ชนิดอื่น ๆ เช่นเดียวกับการทดลองในปลาหมอทะเล, *Epinephelus lanceolatus* ที่เจือจางน้ำเชื้อใน E 189 และ E 251 พบว่าให้จำนวนเซลล์มีชีวิตและการเคลื่อนไหวต่ำกว่า MFR และ CT (เรณู และคณะ, 2542) สำหรับน้ำเชื้อปลากะรังหงส์นั้นจำนวนสเปิร์ม เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่มีความแตกต่างกันแล้วแต่ขนาด อายุ ความสมบูรณ์ และสิ่งแวดล้อมของพ่อพันธุ์ขณะเก็บน้ำเชื้อ การมีชีวิตและการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังจากเจือจางในน้ำยา extender ประสิทธิภาพก็ลดลงตามระยะเวลาในการเก็บซึ่งเป็นไปตามการศึกษาที่ผ่านมา (เรณู และคณะ, 2542; Guest *et al*, 1976) แนวโน้มการเก็บแบบแช่เย็นในน้ำยา extender 5 ชนิด คือ NaCl 0.9 %, E 189, MFR, E 251 และ 0.1 M CT พบว่า หลังจาก 60 ชั่วโมงการเคลื่อนที่ และการมีชีวิตของสเปิร์มที่เก็บรักษาในน้ำยา extender ทั้ง 5 ชนิด ให้ผลมีความแตกต่างกันและพบว่าสเปิร์มที่เก็บรักษาใน NaCl 0.9 % มีประสิทธิภาพสูงที่สุด

การทดลองที่ 2 ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังหงส์

เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะรังหงส์หลังจากเก็บรักษาน้ำเชื้อในสาร cryoprotectant ทั้งหมด 5 ชนิด คือ DMA, DMSO, MeOH, Glycerol และ Trehalose ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 5%, 10% และ 15% โดยสเปิร์มที่ผสมสาร cryoprotectant ทั้ง 5 ชนิดถูกประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่หลังจากการละลาย (thawing) ผลจากการทดลองพบว่า DMA และ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 5% และ 10%ให้อัตราการเคลื่อนที่สูง จากการศึกษาคุณสมบัติของสาร cryoprotectant ที่ดี คือ จะต้องมีคุณสมบัติในการละลายน้ำ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ และช่วยปรับแรงดันออสโมติกของของเหลวภายในและภายนอกเซลล์ โดยที่ชนิดและระดับความเข้มข้นแตกต่างกันเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะรังหงส์ก็แตกต่างกัน เกณฑ์ในการคัดเลือกสาร cryoprotectant คือ จะเลือกสาร cryoprotectant ที่มีความเป็นพิษน้อยที่สุดและทำให้สเปิร์มปลากะรังหงส์เคลื่อนที่นานและมากที่สุด ซึ่งจากการทดลองในครั้งนี้พบว่า DMA และ DMSO มีความเป็นพิษน้อยกว่า MaOH, Glycerol และ Trehalose และจากการสังเกตพบว่าน้ำเชื้อที่ผสมสาร Glycerol และ Trehalose หลังจากการละลายสเปิร์มจะจับตัวกันเป็นก้อนทำให้เคลื่อนที่ได้น้อย

ในการเลือกใช้ DMA, DMSO, MeOH, Glycerol และ Trehalose ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ (5%, 10% และ 15%) มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะรังหงส์มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยการใช้ DMA และ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 5% และ 10% ทำหน้าที่เป็นสาร cryoprotectant ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังหงส์ให้ผลดี ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ว่าสาร cryoprotectant หรือสารป้องกันเซลล์ DMSO และกลีเซอรอลเข้มข้นสูงถึง 20%(v/v) จะกระตุ้นการสร้าง DNA (Ashwood-Smith, 1980) สาร cryoprotectant โดยทั่วไปที่ความเข้มข้นและอุณหภูมิสูงจะเป็นพิษต่อเซลล์เนื่องจากทำให้โปรตีนเปลี่ยนสภาพ (denature) ดังนั้นจึงเป็นอันตรายต่อเซลล์ที่ไม่อยู่ในสภาพแช่แข็ง (Chao, 1996)

ผลการย้อมสีเพื่อดูอัตราการมีชีวิตรอดของสเปิร์มหลังการแช่แข็ง ทำการย้อมสีด้วย Eosin และ Nigrosin เพื่อตรวจสอบอัตราการมีชีวิตรอดของสเปิร์ม โดยใช้การลดอุณหภูมิแบบ 2 ขั้นตอน (two–step) อัตราการลดอุณหภูมิ (-10) องศาเซลเซียสต่อนาที อุณหภูมิสุดท้ายเป็น (-80) องศาเซลเซียส ใช้ Equilibration time 10-30 นาทีหลังจากเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวนานเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า การใช้สาร cryoprotectant ต่างชนิดกัน ส่งผลให้สเปิร์ม

ของปลากะรังหงส์ภายหลังการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อพิจารณาที่ปัจจัยเดียว คือ ชนิดของสาร cryoprotectant จะเห็นว่าการเลือกใช้ DMSO ทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังหงส์ภายหลังการเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งสูงที่สุดและสูงกว่า การใช้ DMA MaOH Trehalose และ Glycerol ตามลำดับ การเลือกใช้สาร cryoprotectant 5 ชนิดนี้ พบว่าการเลือกใช้ที่ระดับความเข้มข้น 5% ให้การทดลองดีที่สุดแต่ไม่แตกต่างกับ 10% (อาจกล่าวได้ว่าการใช้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำดีกว่าที่ระดับความเข้มข้นสูง ๆ) สรุปการเลือกใช้ DMA, DMSO, MaOH, Glycerol และ Trehalose ที่ระดับความเข้มข้นต่างกัน 3 ระดับ (5%, 10% และ 15%) มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังหงส์มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยการใช้ DMSO 5% ทำหน้าที่เป็นสาร cryoprotectant ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังหงส์ให้ผลดีที่สุดรองลงมาคือ DMA 15% DMA 5% DMSO 10% DMA 10%และ MeOH 5% (การเปรียบเทียบระหว่างคู่อื่น ๆ สามารถอ่านได้จากตารางที่ 22) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ว่าน้ำยา extender ที่ดีที่สุดสำหรับการเจือจางน้ำเชื้อปลาทะเล คือ น้ำเกลือ (Saline) และสารประกอบประเภทน้ำตาล (sugar solutions) ส่วน DMSO ทำหน้าที่เป็นสาร cryoprotectant ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาทะเลให้ผลดีที่สุด อย่างไรก็ตาม DMSO จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์สูงขึ้นตามระดับความเข้มข้น (Suquet *et al*, 2000) เช่นเดียวกับการทดลองในปลา Atlantic croaker, *Micropogonias undulatus* (Gwo *et al*, 1991) ปลา Barramundi, *Lates calcarifer* (Leung, 1987) ปลา Black grouper, *Epinephelus malabaricus* (Gwo, 1993) ปลากะรัง, *Epinephelus tauvina* (Withler and Lim, 1982)

การทดลองที่ 3 ผลจากการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การฟักไข่ของปลากะรังหงส์

จากการทดสอบอัตราการฟักของไข่ปลากะรังหงส์ เปรียบเทียบระหว่างน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยใช้ NaCl 0.9 % เป็นน้ำยา extender และใช้ 5% ของ DMA และ DMSO เป็นสาร cryoprotectant ลดอุณหภูมิแบบ 2 ขั้นตอน (two–step) อัตราการลดอุณหภูมิที่ (-10) องศาเซลเซียสต่อนาที อุณหภูมิสุดท้ายเป็น (-80) องศาเซลเซียส ใช้ Equilibration time 20 นาที หลังจากเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวนานเป็นระยะเวลา 52 ชั่วโมง นำน้ำเชื้อมาทำการละลายที่อุณหภูมิ 32 ° C นาน 20 วินาที หลังจากฟักไข่เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า การใช้น้ำเชื้อต่างชนิดกันส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การฟักไข่ของปลากะรังหงส์มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) โดยการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ DMSO 5% ทำหน้าที่เป็นสาร

cryoprotectant มีเปอร์เซ็นต์การฟักไข่สูงที่สุด และมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับน้ำเชื้อสดแต่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ DMA 5% เป็นสาร cryoprotectant

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การทดลองที่ 1 การศึกษาชนิดและอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยา extender ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังหงส์แบบแช่เย็น

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังหงส์แบบแช่เย็น จากผลการศึกษาน้ำยา extender ทั้งหมด 5 สูตร คือน้ำยา MFR, E 251, E 189, 0.1 M CT และน้ำยา NaCl 0.9% หลังจากกระตุ้นด้วยน้ำทะเล พบว่าน้ำยา extender สำหรับเจือจางน้ำเชื้อปลากะรังหงส์ทั้ง 5 สูตรมีระยะเวลาในการเคลื่อนที่และมีชีวิตนานที่สุด 216 ชั่วโมง ประเมินสเปิร์มหลังจากการแช่เย็นที่เวลา 60 นาที พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มที่สูงมี 3 สูตร คือ น้ำยา NaCl 0.9%, MFR และ E 189 เท่ากับ 72.22 $\pm$ 9.72% (Mean $\pm$ SD) การมีชีวิตเฉลี่ยของเซลล์สเปิร์มสูงที่สุด คือ น้ำยา NaCl 0.9% เท่ากับ 69.22 $\pm$ 2.95% (Mean $\pm$ SD)

ผลการศึกษาอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยา extender ที่เหมาะสมของปลากะรังหงส์จากการศึกษาโดยใช้อัตราส่วนการเจือจาง 3 ระดับการเจือจาง คือ 1:1, 1:4 และ 1:9 ประเมินสเปิร์มหลังจากการแช่เย็นใน NaCl 0.9% ที่เวลา 60 นาที พบว่าอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยา extender ที่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มสูงที่สุด คือ อัตราการเจือจางที่ 1:4 (80.00 $\pm$ 0.00%) (Mean $\pm$ SD) โดยอัตราส่วนที่ 1:1 และ 1:9 มีอัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ยต่ำกว่าตามลำดับ การมีชีวิตเฉลี่ยของสเปิร์มสูงที่สุด คือ อัตราเจือจางที่ 1: 9 (71.67 $\pm$ 1.53%) (Mean $\pm$ SD)

การทดลองที่ 2 การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังหงส์

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารcryoprotectant 5 ชนิด คือ DMA, DMSO, Methanol Glycerol และ Trehalose 3 ระดับความเข้มข้น คือ 5%, 10% และ 15% โดยสเปิร์มที่ผสมสาร cryoprotectant ทั้ง 5 ชนิด แต่ละชนิดถูกประเมินการเคลื่อนที่หลังจากการละลาย (ประมาณ 5 นาที) พบว่า คะแนนการเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มที่สูง คือ 5% และ 10% ของ DMA และ DMSO (8.00 $\pm$

0.00%) (Mean $\pm$ SE) การมีชีวิตเฉลี่ยของเซลล์สเปิร์มสูงที่สุด คือ DMSO 5% (76.88 $\pm$ 0.99%) (Mean $\pm$ SE)

การทดลองที่ 3 ผลจากการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การฟักไข่ปลากะรังหงส์

จากการศึกษาอัตราการฟักของไข่ปลากะรังหงส์ เปรียบเทียบระหว่างน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟักไข่สูงที่สุด คือ น้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ DMSO 5% ทำหน้าที่เป็นสาร cryoprotectant (16.53 $\pm$ 2.27%) รองลงมา คือ น้ำเชื้อสด (14.87 $\pm$ 1.62%) และน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ DMA 5% ทำหน้าที่เป็นสาร cryoprotectant (6.60 $\pm$ 1.63%) (Mean $\pm$ SD)

ข้อเสนอแนะ

ควรศึกษาการเพิ่ม-ลดอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อปลากะรังหงส์แบบแช่แข็งรวมถึงการศึกษาการนำน้ำเชื้อไปใช้ในการผสมเทียม อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างไข่ต่อน้ำเชื้อ เพื่อศึกษาอัตราการเพาะฟัก และอัตรารอดต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. **การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง หลักการ/วิธีการ/ประโยชน์**. ฝ่ายโรงพิมพ์สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน, กรุงเทพฯ.

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน. 2540. คุณภาพของอสุจิสดและอัตราการผสมของไข่ปลาไนยุโรปโดยน้ำเชื้อแช่แข็ง. **วารสารการประมง**, 50(1): 47-54.

นลินี มารคแมน. 2527. **การศึกษาเบื้องต้นกรรมวิธีในการเก็บน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็ง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นลินี มารคแมน, กฤษณ์ มงคลปัญญา, อุทัยรัตน์ ณ นคร และ ประวิทย์ สุรนีรนาถ. 2526. ความล้มเหลวในความพยายามเก็บน้ำเชื้อปลาเพื่อประโยชน์ในการผสมเทียม, น. 55-73. *ใน* **รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 21 สาขาประมง**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พัชรี มงคลวัย. 2546. **การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็ง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยบูรพา.

พลชาติ ผิวเณร, พนม กระจ่างพจน์ สอดสุข และ ศรีรัตน์ สอดสุข. 2550. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึกโดยวิธีแช่แข็ง, น. 113-114. *ใน* **บทคัดย่อการประชุมวิชาการประมง ประจำปี 2550 ระหว่างวันที่ 3-5 กรกฎาคม 2550**. กรมประมงและศูนย์พัฒนาการประมงแห่งเอเชียตะวันออกเฉียงใต้, กรุงเทพฯ.

เรณู ยาชิโร. 2541. การเปลี่ยนเพศของปลา. **วารสารการประมง**, 51(5): 421-423.

_____. 2547. การเพาะเลี้ยงปลากะรังหน้างอน *Cromileptes altivelis* ที่เกาะบาหลี, น. 12. *ใน* **สัมมนาวิชาการด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ประจำปี 2547**. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง, กรุงเทพฯ.

เรณู ยาชิโร, เจนจิตต์ คงกำเนิด, วิชัย วัฒนกุล และ นิเวศน์ เรืองพานิช. 2536. การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบสืบพันธุ์ในปลากะรัง *Epinephelus malabaricus*. **เอกสารวิชาการฉบับที่ 14/2536**. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสงขลา, กรมประมง.

เรณู ยาชิโร, นิพนธ์ เสนอินทร์ และ สมพิศ แย้มเกษม. 2548. การเพาะพันธุ์ปลากะรังหงส์ *Cromileptes altivelis* โดยให้วางไข่ตามธรรมชาติ. **เอกสารวิชาการฉบับที่ 51/2551**. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง, กรมประมง.

เรณู ยาชิโร วิชัย วัฒนกุล เจนจิตต์ คงกำเนิด และ สรณัฏฐ์ ศิริสวย. 2542. การเก็บน้ำเชื้อปลาหมอทะเลโดยวิธีแช่แข็ง. **เอกสารวิชาการฉบับที่ 12/2542**. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง.

วีรพงศ์ วุฒิพันธ์ชัย. 2536. **การเพาะพันธุ์ปลา**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, โอ เอส พริ้นติ้ง เฮ้าส์ กรุงเทพฯ.

ศิริพร คชรัตน์, จุฑามาศ พบสุข, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และ วีระพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2550. การรักษาน้ำเชื้อปลาดุกเทศ (*Clarias gariepinus*) แบบแช่เย็น, น. 448-456. *ใน* **รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 45 สาขาประมง**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุเมธ ชมพูธวัช. 2550. **การเก็บน้ำเชื้อปลากะพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*) ด้วยวิธีการแช่แข็ง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยบูรพา.

สมโภชน์ อัคคะทวีวัฒน์. 2547. **การจำแนกชนิดสัตว์น้ำที่เป็นอาหารปลอดภัย (Food Safety)**. โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด, กรุงเทพฯ.

อนงคณ์ หัมพานนท์ และ กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2538. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายในตู้เย็น. น. 329-338, *ใน* **รายงานการประชุมวิชาการครั้งที่ 34 สาขาประมง**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2526. การรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในช่วงเวลาสั้น. **ว. เกษตรศาสตร์** (วิทย์) 17(2): 53-57.

_____. 2531. **การเพาะขยายพันธุ์ปลา**. บริษัท ศ. วงษ์ไพบูลย์, กรุงเทพฯ.

_____. 2538. **การเพาะขยายพันธุ์ปลา**. พิมพ์ครั้งที่ 3. สหมิตรพริ้นติ้ง, กรุงเทพฯ.

อภิชาติ เติมวิชชากร. 2546. **ลูกปลาน้ำจืดวัยอ่อน**. พิมพ์ครั้งที่ 1. บริษัท พี. เอ. ลีฟวิ่ง จำกัด, กรุงเทพฯ.

Ashwood – Smith, M. J. 1980. Low temperature preservation of cell, tissues and organs, pp. 19-43. *In* M. J. Ashwood-Smith and J. Farrant eds. **Low Temperature Preservation in Medicine and Biology**. Pitman Medica., Turbridge Wells, UK.

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

Chao, N.H. 1982. New approaches for cryopreservation of sperm of grey mullet, *Mugil cephalus*, pp. 132-133. *In* C.J.J.Richter and H.J.T. Goos Eds. **Proc. Int. Symp. Reprod**. Physiol. Fish., Wageningen, The Netherlands, 2-6 Aug. 1962. Pudoc. Wageningen.

_____. 1991. Fish Sperm Preservation in Taiwan : Technology Advancement and Extension Efforts. **Bull. Inst. Zool., Academia Sinica**, 16: 263-283 .

_____. 1996. Cryopreservation of Finfish and Shellfish Sperms. **J.Taiwan Fish. Res**, 4(2): 157-170.

Chereguini, O., I., Banda, I., Rasines and A., Fernandez. 2001. Larval growth of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) produced with fresh and cryopreserved sperm. **Aquaculture Research**, 32: 33 -143.

Ciereszko, A. and K., Dabrowski. 1996. Effect of sucrose – DMSO extender supplemented with pentoxifylline or blood plasma on fertilizing ability of cryopreserved rainbow trout spermatozoa. **The Progressive Fish - Culturist**, 58: 43 -145.

Dreanno, C., M., Suquet, L., Quemener, J., Cosson, F., Ferville, Y., Normant and R., Billard. 1997. Cryopreservation of Turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. **Theriogenology**, 48: 589-603.

FAO Species identification sheet. 1983. Serranidae. Subfamilies Epinephelinae and Serranninae. แหล่งที่มา: http://www.google.co.th/search?hl=th&lr=&q=%22EPINEPHELINI%22+%22Subfamily+EPINEPHELINAE%, 22 พฤษภาคม 2552

Glogowski, J. R., M., Kolman, A., Szezepkowski, B., Horvath, P., Urbanyi, A., Sieuzynski, J., Rzemieniccki, W., Domagala, R., Demainowicz, Kowalski and A., Ciereszko. 2002. Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandi) milt cryopreserved with methanol. **Aquaculture**, 211: 367-373.

Guest, W. C., J.W., Avault and J.D., Roussel. 1976. A Spermatology study of channel catfish *Ictalurus punctatus.* **Transactions of the American Fisheries Society**,105 (33): 463-468.

Gwo, J.C. 1993. Cryopreservation of black grouper (*Epinephelus malabaricus*) spermatozoa. **Theriogenology**, 39: 1331-1342.

Gwo, J.C. 1994. Cryopreservation of yellowfin seabream (*A*canthopagrus *latus*) spermatozoa teleost, Perciformes, Sparidae. **Theriogenology**, 41: 989 -1004.

Gwo, J. C., H., Kuurokura and R., Hirano. 1992. Cryopreservation of spermatozoa from Rainbow Trout, Common Carp, and Marine Puffer. **Nippon Suisai Gakkaishi**, 59 (5): 777-782.

Gwo, J.C., K., Strawn, M.T., Longnecker and C. R., Arnold. 1991. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. **Aquaculture,** 94: 355-375.

Hulata, G. and S., Rothbard. 1979. Cold storage of carp semen for short periods. **Aquaculture**, 16: 267-269.

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

Kwantong, S. 2003. **Cryopreservation of striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* sperm**. Doctoral thesis, Asian Institute of Technology.

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

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

Mongkonpunya, K., T., Pupipat, S., Pholprasith, M., Chatasut, R., Ritraporn, S., Pimolboot, S., Wiwatcharakoses and M.,Chaengkij. 1992. Cryopreservation of sperm of the Mekong giant catfish, *Pangasianodon gigas* Chevey, pp. 56-60. *In* **NRC Report on Aquaculture and Schistosomiasis: Proceedings of a network meeting held in Manila, Philippines, August 6-10, 1991**. National Academy Press, Washington, D.C.

Morisawa, M. and K., Suzuki. 1980. Osmolarity and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleost. **Science**, 210: 1145 – 1147.

Mounib, M.S. 1978. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. **Journal Reprod. Fertil**, 53: 13 -18.

Mounib, M.S., P.C., Hwang and D.R., Idler. 1968. Cryogenic preservation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) sperm. **Journal Fish. Res. Bd. Canada**, 25: 2623-2632.

Oda, S. and M., Morisawa. 1993. Rises of intracellular Ca^{++} Initiation of sperm motility by hyperosmolality in marine teleosts. **Cell Motility and Cytoskeleton**, 25: 171-178.

Ott, A. G. and H. F., Horton. 1971. Fertilization of Chinook and Coho salmon eggs with cryopreserved sperm. **Journal Fish. Res. Bd. Canada**, 28: 745-749.

Piironen, J. 1993. Cryopreservation of sperm from brown trout (*Salmo trutta morpha lacustris*) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L). **Aquaculture**, 116: 275-285.

Richardson, G.F., E.W., Connie, W.C., Laurenece and Z., Yao. 1999. Cryopreservation of yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) semen in large straws. **Aquaculture**, 174: 89-94.

Rimmer, M.A., S., Mcbrid and K.C., Williams. 2004. **Advances in Grouper Aquaculture Canberra**. ACIAR Monograph 110. 137 pp.

Saad, A., R., Billard, M.C., Theron and M.G., Holledbeeq. 1988. Short-tem preservation of carp *(Cyprinus carpio)* sperm. **Aquaculture**, 71: 133-150.

Steyn, G.J. and J.H.C., Van Vuren. 1987. The fertilizing capacity of cryopreserved sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) sperm. **Aquaculture**, 63: 187-193.

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

Suquet, M., C., Dreanno, C., Fauvel, J., Cosson and R., Billard. 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish. **Aquaculture Research**, 31(3): 231 - 243.

Thorgaard, G.H., A., Paul, Wheeler and D.F., Robert. 2000. Utilization of androgenesis for strain recovery from cryopreserved sperm, pp. 305-309. *In* T. R. Tiersch and P. M. Mazik eds. ***Cryopreservation in Aquatic Species***. Baton Rouge, Louisiana. World Aquaculture Society.

Tiersch, T.R. 2000. Introduction, pp 19-26. *In* T. R. Tiersch and P. M. Mazik eds. **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge, Louisiana. World Aquaculture Society.

Tridjoko. 2002. **Sex and maturation manipulation on grouper broodstock , *Cromileptes altivelis*.** Training manual, Research Institute of Mariculture, Gondol Research Institute for Mariculture, Bali, Indonesia. 14 p.

Wayman, W.R. and T.R., Tiersch. 2000. Research methods for cryopreservation of sperm, pp. 264-275. *In* T. R. Tiersch and P. M. Mazik eds. **Cryopreservation in aquatic species**. Baton Rouge, Louisiana. World Aquaculture Society.

Withler, F.C. 1982. Cryopreserveation of spermatozoa of some freshwater fishes culture in South and Southeast Asia. **Aquaculture,** 26: 395-398.

Withler, F.C. and L.C., Lim. 1982. Preliminary observations of chilled and deep-frozen storage of grouper *Epinephelus tauvina* sperm. **Aquaculture**, 27: 389-392.

Withler, P. A. and G. H., Thorgaard. 1991. Cryopreservation of Rainbow trout semen in large straws. **Aquaculture**, No. 93: 95 -100

Zhang, Y.Z., S.C., Zhang, X.Z., Liu, Y.Y., Xu, C.I., Wang, M.S., Sawant, J., Li and S.L., Chen. 2003. Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus)* spermatozoa. **Theriogenology**, 48: 589-603.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ตารางการวิเคราะห์ผลทดลองทางสถิติ

ตารางผนวกที่ ก1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะรังหงส์แช่เย็นที่เวลา 60 นาที

Motility	N	Mean rank	test statistics	treatment
3	2	18.50	Chi-Square	7.656
4	5	14.00	df	6
5	4	29.75	Asymp. Sig	0.264
6	11	18.09		
7	11	27.91		
8	11	24.64		
9	1	32.00		
Total	45			

หมายเหตุ a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: motility

ตารางผนวกที่ ก2 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังหงส์แช่เย็นที่เวลา 60 นาที

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	0.024 (a)	14	0.002	1.291	0.269
Intercept	20.890	1	20.890	1561.209	0.000
ETD	0.008	4	0.002	1.422	0.251
Dilute	0.003	2	0.002	1.216	0.311
ETD*Dilute	0.013	8	0.002	1.216	0.311
Error	0.040	30	0.001		
Total	20.954	45			
Corrected Total	0.064	44			

หมายเหตุ a R Squared = .376 (Adjusted R Squared = .085)

ตารางผนวกที่ ก3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะรังหงส์หลังจากแช่แข็ง

Motility	N	Mean rank	test statistics	treatment
0	16	100.50	Chi-Square	57.92
1	22	56.86	df	7
2	2	100.50	Asymp. Sig	3.916E-10
4	10	84.50		
5	7	89.07		
6	23	51.80		
7	8	30.50		
8	32	40.50		
Total	120			

หมายเหตุ a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: motility

ตารางผนวกที่ ก4 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างทรีตเมนต์ โดยการทำ Kruskal-Wallis:multiple comparisons

Comparisons	d	SE = d/SEp	Table Q 0.05, 15	Statistical
1 VS 2	0.00	0.000	3.494	NS
1 VS 3	96.00	21.077	3.494	S
1 VS 4	0.00	0.000	3.494	NS
1 VS 5	0.00	0.000	3.494	NS
1 VS 6	41.13	9.029	3.494	S
1 VS 7	23.88	5.242	3.494	S
1 VS 8	31.63	6.943	3.494	S
1 VS 9	74.00	16.247	3.494	S
1 VS 10	77.00	16.905	3.494	S

ตารางผนวกที่ ก4 (ต่อ)

Comparisons	d	SE = d/SEp	Table Q 0.05, 15	Statistical
1 VS 11	77.00	16.905	3.494	S
1 VS 12	96.00	21.077	3.494	S
1 VS 13	35.50	7.794	3.494	S
1 VS 14	-53.50	-11.746	3.494	S
1 VS 15	56.88	12.487	3.494	S
2 VS 3	96.00	21.077	3.494	S
2 VS 4	0.00	0.000	3.494	NS
2 VS 5	0.00	0.000	3.494	NS
2 VS 6	41.13	9.029	3.494	S
2 VS 7	23.88	5.242	3.494	S
2 VS 8	31.63	6.943	3.494	S
2 VS 9	74.00	16.247	3.494	S
2 VS 10	77.00	16.905	3.494	S
2 VS 11	77.00	16.905	3.494	S
2 VS 12	96.00	21.077	3.494	S
2 VS 13	35.50	7.794	3.494	S
2 VS 14	51.00	11.197	3.494	S
2 VS 15	56.88	12.487	3.494	S
3 VS 4	-96.00	-21.077	3.494	S
3 VS 5	-96.00	-21.077	3.494	S
3 VS 6	-54.88	-12.048	3.494	S
3 VS 7	-72.13	-15.835	3.494	S
3 VS 8	-64.38	-14.133	3.494	S
3 VS 9	-22.00	-4.830	3.494	S
3 VS 10	-19.00	-4.171	3.494	S
3 VS 11	-19.00	-4.171	3.494	S
3 VS 12	0.00	0.000	3.494	NS

ตารางผนวกที่ ก4 (ต่อ)

Comparisons	d	SE = d/SEp	Table Q 0.05, 15	Statistical
3 VS 13	-60.50	-13.283	3.494	S
3 VS 14	-45.00	-9.880	3.494	S
3 VS 15	-39.13	-8.590	3.494	S
4 VS 5	0.00	0.000	3.494	NS
4 VS 6	41.13	9.029	3.494	S
4 VS 7	23.88	5.242	3.494	S
4 VS 8	31.63	6.943	3.494	S
4 VS 9	74.00	16.247	3.494	S
4 VS 10	77.00	16.905	3.494	S
4 VS 11	77.00	16.905	3.494	S
4 VS 12	96.00	21.077	3.494	S
4 VS 13	35.50	7.794	3.494	S
4 VS 14	51.00	11.197	3.494	S
4 VS 15	56.88	12.487	3.494	S
5 VS 6	41.13	9.029	3.494	S
5 VS 7	23.88	5.242	3.494	S
5 VS 8	31.63	6.943	3.494	S
5 VS 9	74.00	16.247	3.494	S
5 VS 10	77.00	16.905	3.494	S
5 VS 11	77.00	16.905	3.494	S
5 VS 12	77.00	16.905	3.494	S
5 VS 13	77.00	16.905	3.494	S
5 VS 14	77.00	16.905	3.494	S
5 VS 15	77.00	16.905	3.494	S
6 VS 7	-17.25	-3.787	3.494	S
6 VS 8	-9.50	-2.086	3.494	NS
6 VS 9	32.88	7.218	3.494	S

ตารางผนวกที่ ก4 (ต่อ)

Comparisons	d	SE = d/SEp	Table Q 0.05, 15	Statistical
6 VS 10	35.88	7.876	3.494	S
6 VS 11	35.88	7.876	3.494	S
6 VS 12	54.88	12.048	3.494	S
6 VS 13	35.88	7.876	3.494	S
6 VS 14	9.88	2.168	3.494	NS
6 VS 15	15.75	3.458	3.494	NS
7 VS 8	7.75	1.701	3.494	NS
7 VS 9	50.13	11.005	3.494	S
7 VS 10	53.13	11.663	3.494	S
7 VS 11	53.13	11.663	3.494	S
7 VS 12	72.13	15.835	3.494	S
7 VS 13	11.63	2.552	3.494	NS
7 VS 14	27.13	5.955	3.494	S
7 VS 15	33.00	7.245	3.494	S
8 VS 9	42.38	9.303	3.494	S
8 VS 10	45.38	9.962	3.494	S
8 VS 11	45.38	9.962	3.494	S
8 VS 12	64.38	14.133	3.494	S
8 VS 13	3.88	0.851	3.494	NS
8 VS 14	19.38	4.254	3.494	S
8 VS 15	25.25	5.544	3.494	S
9 VS 10	3.00	0.659	3.494	NS
9 VS 11	3.00	0.659	3.494	NS
9 VS 12	22.00	4.830	3.494	S
9 VS 13	-38.50	-8.453	3.494	S
9 VS 14	-23.00	-5.050	3.494	S
9 VS 15	-17.13	-3.760	3.494	S

ตารางผนวกที่ ก 4 (ต่อ)

Comparisons	d	SE = d/SEp	Table Q 0.05, 15	Statistical
10 VS 11	0.00	0.000	3.494	NS
10 VS 12	19.00	4.171	3.494	S
10 VS 13	-41.50	-9.111	3.494	S
10 VS 14	-26.00	-5.708	3.494	S
10 VS 15	-20.13	-4.418	3.494	S
11 VS 12	19.00	4.171	3.494	S
11 VS 13	-41.50	-9.111	3.494	S
11 VS 14	-26.00	-5.708	3.494	S
11 VS 15	-20.13	-4.418	3.494	S
12 VS 13	-60.50	-13.283	3.494	S
12 VS 14	-45.00	-9.880	3.494	S
12 VS 15	-39.13	-8.590	3.494	S
13 VS 14	15.50	3.403	3.494	NS
13 VS 15	21.38	4.693	3.494	S
14 VS 15	5.88	1.290	3.494	NS

หมายเหตุ a 1 = DMA 5%, 2 = DMA 10%, 3 = DMA 15%, 4 = DMSO 5%, 5 = DMSO 10%, 6 = DMSO 15%, 7 = Methanol 5%, 8 = Methanol 10%, 9 = Methanol 15%, 10 = Glycerol 5%, 11 = Glycerol 5%, 12 = Glycerol 15%, 13 = Trehalose 5%, 14 = Trehalose 10%, 15 = Trehalose 15%,

b NS = nonsignificant, S = significant

ตารางผนวกที่ ก5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังหงส์หลังจากแช่แข็ง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	6.189	14	0.442	85.554	0.000
Intercept	44.371	1	44.371	8587.365	0.000
CRYO	5.729	4	1.432	277.172	0.000
CONC	0.245	2	0.123	23.731	0.000
CRYO*CONC	0.248	8	0.031	6.010	0.000
Error	0.543	105	0.005		
Total	51.481	120			
Corrected Total	6.731	119			

หมายเหตุ a R Squared = .919 (Adjusted R Squared = .909)

ตารางผนวกที่ ก6 ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังหงส์หลังจากแช่แข็ง (นำค่าเฉลี่ยของทุกทรีตเมนต์ไปเปรียบเทียบด้วยวิธี one way ANOVA)

	Cryoprotectant	N	Subset for alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Tukey HSD	Glycerol	26	0.3142			
	Trehalose	22		0.3923		
	MeOH	24			0.7283	
	DMSO	24			0.7785	
	DMA	24				0.8467
	Sig.		1.0000	1.0000	0.1190	1.0000

หมายเหตุ Means for groups in homogeneous subsets are displayed.Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = .005.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 23.933.

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

c Alpha = .05

ตารางผนวกที่ ก7 ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังหงส์หลังจากแช่แข็งด้วยความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant ต่างกัน 3 ระดับ

	Concentration	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Tukey HSD	15%	40	0.549	
	10%	40		0.628
	5%	40		0.656
	Sig.		1.000	0.191

หมายเหตุ Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = .005

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 40.000

b Alpha = .05

ตารางผนวกที่ ก8 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังหงส์หลังจากแช่แข็ง (เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีตเมนต์ด้วยวิธี one way ANOVA)

	Sum of Squares	df	Mean of Square	F	Sig.
Between groups	6.2096	14	0.4435	89.2776	1.2943E-51
Within group	0.5217	105	0.0050		
Total	6.7313	119			

ตารางผนวกที่ ก9 ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลากะรังหงส์หลังจากแช่แข็ง (เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีตเมนต์ด้วยวิธี one way ANOVA)

	Cryoprotectant	N	Subset for alpha = 0.05				
			1	2	3	4	5
Tukey HSD	Glycerol 15%	8	0.2619				
	Glycerol 10%	8	0.2724				
	Trehalose 15%	8	0.3383	0.3383			
	Glycerol 5%	8	0.3556	0.3556			
	Trehalose 5%	8		0.4281			
	Trehalose 10%	8		0.4436			
	DMSO 15%	8			0.6184		
	MeOH 15%	8			0.6618	0.6618	
	MeOH 10%	8				0.7571	0.7571
	MeOH 5%	8				0.7659	0.7659
	DMA 10%	8					0.8256
	DMSO 10%	8					0.8391
	DMA 5%	8					0.8511
	DMA 15%	8					0.8633
	DMSO 5%	8					0.8779
	Sig.		0.3439	0.1751	0.9958	0.1897	0.0572

หมายเหตุ Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000

ตารางผนวกที่ ก10 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนเปอร์เซ็นต์การฟักไข่ของปลากะรังหงส์ที่ผสมเทียมปลาโดยการใช้สเปิร์มต่าง ๆ (เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีตเมนต์ด้วยวิธี one way ANOVA)

	Sum of Squares	df	Mean of Square	F	Sig.
Between groups	209.971	2	104.986	32.240	0.000
Within group	26.051	8	3.256		
Total	236.022	10			

ตารางผนวกที่ ก11 ผลการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การฟักไข่ของปลากะรังหงส์ที่ผสมเทียมปลาโดยการใช้สเปิร์มต่าง ๆ (เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างทรีตเมนต์ด้วยวิธี one way ANOVA)

	Treatment	N	Subset for alpha = 0.05	
			1	2
Tukey HSD	DMA 5%	4	6.6000	
	น้ำเชื้อสด	4		14.8700
	DMSO 5%	3		16.5267
	Sig.		1.000	0.469

หมายเหตุ Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.600

b The group sizes are unequal. The harmonic mean of the group sizes is used. Type I error levels are not guaranteed.

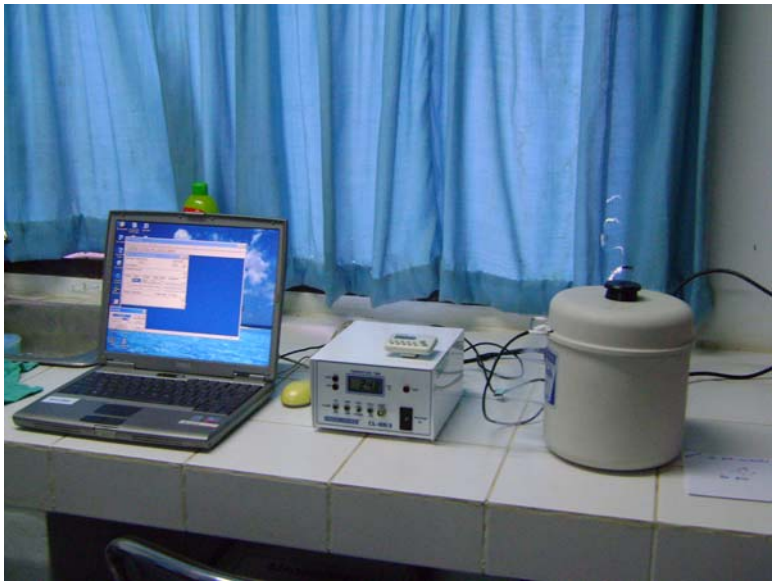
ภาคผนวก ข

ภาพผลการทดลอง

ภาพผนวกที่ ข1 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

ภาพผนวกที่ ข2 เครื่องวัด osmolality (Osmometer) 1

ภาพผนวกที่ ข3 เครื่องวัด osmolality (Osmometer) 2



ภาพผนวกที่ ข4 เครื่องลดอุณหภูมิแบบภาคสนาม (Programmable Freezing Control)

ภาพผนวกที่ ข5 อุปกรณ์นับเซลล์สเปิร์ม (Makler ' s counting chamber)

ภาพผนวกที่ ข6 หลอดฟาง (French straw) ขนาด 0.25 มิลลิเมตร

ภาพผนวกที่ ข7 การเก็บน้ำเชื้อปลากะรังหงส์

ภาพผนวกที่ ข8 ละลายน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำยา extender

ภาพผนวกที่ ข9 การเตรียมสาร cryoprotectant

ภาพผนวกที่ ข10 ผสมน้ำเชื้อกับสาร cryoprotectant

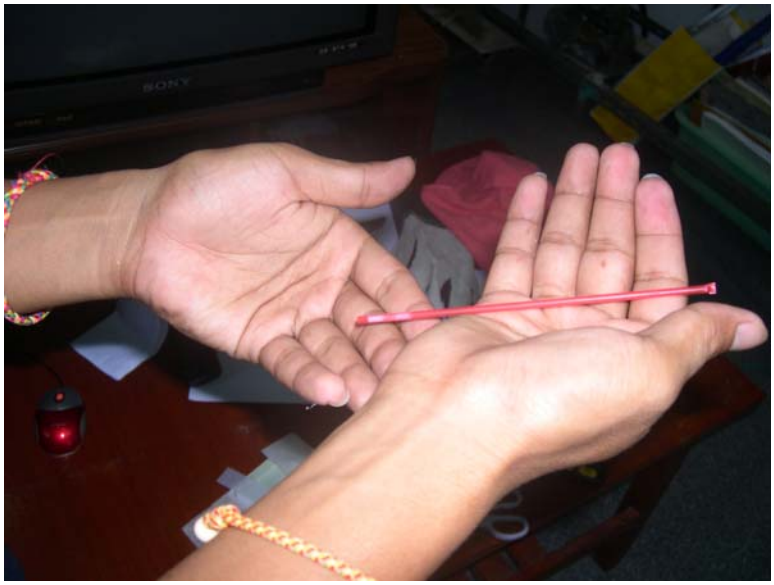
ภาพผนวกที่ ข11 บรรจุตัวอย่างลงในหลอด (Straw) แล้วปิดหลอด

ภาพผนวกที่ ข12 นำหลอดมาใส่ใน cryochamber ที่ต่ออยู่กับ Freezer control

ภาพผนวกที่ ข13 ลดอุณหภูมิด้วย program cryogenesis 4 (จนถึง – 80 องศาเซลเซียส)

ภาพผนวกที่ ข14 นำหลอดออกไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว

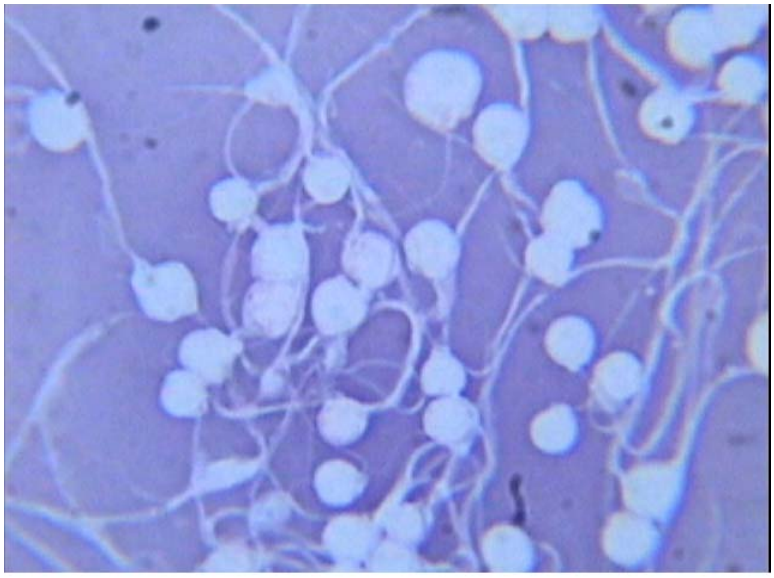
ภาพผนวกที่ ข15 ถังไนโตรเจนเหลว (อุณหภูมิ – 196 องศาเซลเซียส)



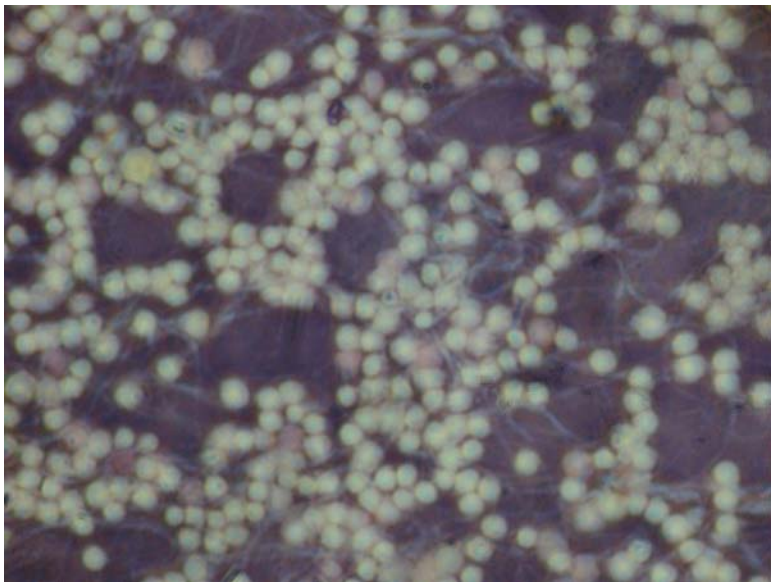
ภาพผนวกที่ ข16 นำหลอด (straw) มาละลายที่อุณหภูมิห้อง (Thawing)

ภาพผนวกที่ ข17 นำน้ำเชื้อปลามาดูการเคลื่อนที่ (motility rate) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง

ภาพผนวกที่ ข18 วิธีการย้อมสีสปิร์มปลาเพื่อดูเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (viability rates)



ภาพผนวกที่ ข19 สเปิร์มปลากะรังหงส์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X ต่อเข้าคอมพิวเตอร์แบบพกพาผ่านโปรแกรม Motic Image plus version 2.0 ML



ภาพผนวกที่ ข20 การติดสีของสเปิร์ม (สเปิร์มตัวเป็นย้อมไม่ติดสี สเปิร์มตัวตายย้อมติดสีม่วงอมชมพู) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X ถ่ายรูปด้วยกล้อง Digital Camera Model E 4300

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายนิพนธ์ เสนอินทร์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 20 สิงหาคม 2517
สถานที่เกิด	พัทลุง
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ประมง) สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล (พ.ศ. 2540)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	นักวิชาการประมงชำนาญการ
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	ผลงานวิชาการดีเด่นประจำปี 2547 สาขาการวิจัยด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง