บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

อภิปรายผลการทดลอง

5.1 คุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงขาว

คุณภาพสเปิร์มปลากะพงขาวมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ โดยความหนาแน่นของสเปิร์มมีค่าสูงสุดในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่และลดลงในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ สอดคล้องกับผลงานวิจัยในปลาหลายชนิด เช่น Striped bass (Vuthiphandchai and Zohar, 1999) และ Atlantic cod (Rouxel et al., 2008) เป็นต้น อย่างไรก็ตามแม้ปลากะพงขาวจะมีการเปลี่ยนเพศ (sex reversal) โดยเมื่อปลาเจริญเติบโตมากขึ้น หรืออายุมากขึ้นจะเปลี่ยนจากเพศผู้ไปเป็นเพศเมีย และในการศึกษาครั้งนี้แม้ว่าจะมีปลาเพศเมียจำนวนมากปนมากับปลาเพศผู้ขณะรวบรวมพันธุ์ปลาก็ตาม แต่ในการทดลองทั้งหมดก็เลือกเฉพาะปลาเพศผู้ที่มีน้ำเชื้อเท่านั้น ซึ่งแม้ว่าพ่อพันธุ์ปลาที่รวบรวมมาได้นี้จะมีอายุแตกต่างกัน แต่การประเมินความหนาแน่นของสเปิร์มก็มีค่าสูงสุดในช่วงกลางฤดูผสมพันธุ์วางไข่ แสดงว่าความหนาแน่นของสเปิร์มเป็นดัชนีที่ใช้ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงขาวได้ในระดับหนึ่ง การศึกษาคุณภาพสเปิร์มในปลาทะเลบางชนิดที่เลี้ยงในสภาพแวดล้อมเดียวกันทุกอย่างแต่เป็นพ่อพันธุ์ปลาที่อายุต่างกันก็จะพบว่าอายุพ่อพันธุ์ปลามีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ เช่น Vuthiphandchai and Zohar (1999) ได้ศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ปลา Striped bass (*Morone saxatilis*) ที่มีอายุ 1, 3 และ 12 ปี พบว่าพ่อพันธุ์ที่มีอายุ 3 ปีมีความหนาแน่นของสเปิร์มสูงกว่าพ่อพันธุ์ที่มีอายุ 1 หรือ 12 ปี Kkodzher (1981) ได้รายงานการเปลี่ยนแปลงความหนาแน่นของสเปิร์มปลา Baikul Omul (*Coregonus autumnalis migratorius*) โดยพ่อพันธุ์ปลาอายุ 7 ปีมีสเปิร์มจำนวน 4.13 ± 0.57 x 10^6/มิลลิลิตร และค่อยๆเพิ่มขึ้นเป็น 8.5 ± 0.4 x 10^6/มิลลิลิตร ในพ่อพันธุ์อายุ 11 ปี หลังจากนั้นความหนาแน่นของสเปิร์มลดลงเหลือ 6.9 ± 1.2 x 10^6/มิลลิลิตร ในปีที่ 13

เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่และการมีชีวิตของสเปิร์มปลากะพงขาวในการศึกษาครั้งนี้มีค่าไม่เปลี่ยนแปลงในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ แสดงให้เห็นว่าพ่อพันธุ์ปลากะพงขาวที่รวบรวมมาจากธรรมชาติ มีสเปิร์มที่มีการเคลื่อนที่สูงเมื่อกระตุ้นด้วยน้ำทะเล และยังมีชีวิตที่สามารถปฏิสนธิไข่ ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ของปลาชนิดนี้ในธรรมชาติมีช่วงเวลานานหลายเดือน การศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อสดของพ่อพันธุ์ปลาหลายชนิดก็พบว่าน้ำเชื้อสดของพ่อพันธุ์ปลาส่วนมากมีเปอร์เซนต์การมีชีวิตของสเปิร์มมากกว่า 90% ดังเช่นรายงานที่พบในปลาไน (*Cyprinus carpio*; Kruger et al., 1984) ปลา smallmouth yellowfish (*Barbus aeneus*; Vlok and Vuren, 1988) น้ำเชื้อสดของปลาที่รวบรวมออกมาในปลาหลายชนิดส่วนมากก็มีการเคลื่อนที่

ของสเปิร์มสูงเช่นกัน (Suquet et al., 1994; Mylonas et al., 1997; Vuthiphandchai et al., 2009b) นอกจากนี้ Buyukhatipoglu and Holtz (1984) ได้รายงานว่าพ่อพันธุ์ปลา trout ที่อายุ 2 ปี และ 3 ปี ต่างก็มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่แตกต่างกัน การศึกษาความสัมพันธ์ของการผสมพันธุ์วางไข่ของปลาในธรรมชาติกับคุณภาพน้ำเชื้อก็แสดงให้เห็นว่า ในปลาบางชนิดเช่น ปลาไน ที่มีสเปิร์มที่มีชีวิตสูงกว่า 90% และมีความหนาแน่นของสเปิร์มที่สูงเป็นปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องในการทำให้ปลาไนผสมพันธุ์วางไข่ในแหล่งน้ำไหล (rapidly moving water) ในขณะที่ปลาหมอเทศที่มีน้ำเชื้อที่มีความหนาแน่นของสเปิร์มต่ำ และยังมีสเปิร์มที่มีชีวิตต่ำเช่นกัน (71.8%) ทำให้ปลาหมอเทศผสมพันธุ์วางไข่ในแหล่งน้ำนิ่ง หรือน้ำที่ไหลเบาๆ (slow moving water) (Kruger et al., 1984)

5.2 ผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ และรูปแบบการแช่แข็งต่อสเปิร์มปลากะพงขาว

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ พบว่า propylene glycol มีความเป็นพิษน้อยที่สุด รองลงมา คือ DMSO, methanol, ethanol และ acetamide ที่มีความเหมาะสมในการใช้เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวแบบแช่แข็งต่อไป ซึ่งมีความสอดคล้องเคียงกับ ศิริพร คชรัตน์ (2545) ที่ได้ทำการเก็บน้ำเชื้อปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) แบบแช่แข็งโดยใช้สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ 9 ชนิด พบว่าสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษน้อยที่สุดต่อน้ำเชื้อปลาเทโพ คือ 10% DMSO และ 10% propylene glycol โดยน้ำเชื้อมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 180 นาที นอกจากนี้ Lezcano et.al (2004) ที่ทำการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่มีผลต่อน้ำเชื้อกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ผสมในน้ำทะเลที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อ พบว่า Ethylene glycol และ Methanol มีความเป็นพิษต่อเซลล์มาก โดย DMSO มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มกุ้งขาวน้อยที่สุด การศึกษาผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มทำให้ทราบว่าชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการนำไปแช่แข็งน้ำเชื้อปลาต่อไป ซึ่งปลาแต่ละชนิดจะมีการตอบสนองต่อสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดเดียวกันไม่เหมือนกัน และสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มต่ำ (ทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่ได้มาก) ก็ไม่จำเป็นว่าจะให้ผลการแช่แข็งที่ดี (ทำให้สเปิร์มหลังการแช่แข็งมีการเคลื่อนที่มาก)

การทดสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลากะพงขาวในการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่า propylene glycol, DMSO, methanol, ethanol และ acetamide น่าจะมีความเหมาะสมในนำมาแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาว แต่เมื่อนำสารไครโอโพรเทคแทนท์เหล่านั้นมาแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาวกลับปรากฏว่า methanol, ethanol และ acetamide มีประสิทธิภาพต่ำในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาว เพราะสเปิร์มหลังการละลาย (post-thaw sperm motility) มีการเคลื่อนที่น้อยมาก หรือไม่เคลื่อนที่เลย ในขณะที่ propylene glycol และ DMSO มีประสิทธิภาพสูงในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาว เนื่องจากให้ค่าเปอร์เซนต์การ

เคลื่อนที่หลังการละลายมากถึง 80% แต่การทดสอบเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ตัวในขั้นสุดท้าย (propylene glycol, acetamide และ DMSO) ที่มีต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาวก็สามารถสรุปได้ว่าสารละลาย DMSO มีความเหมาะสมมากที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาว เพราะสเปิร์มมีการเคลื่อนที่หลังการละลาย (post-thaw sperm motility) สูงกว่า propylene glycol และ acetamide จึงได้นำ DMSO มาพัฒนาต่อด้วยการแช่แข็งน้ำเชื้ออย่างง่ายในถังโฟม และการแช่แข็งน้ำเชื้อในปริมาณต่างๆกัน โดยทั่วไปชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลามีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดปลาและ protocol ที่ใช้ แต่ DMSO มักพบว่าเป็นสารที่เหมาะสมที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลายชนิด เช่น ปลากะพงแดง (Vuthiphandchai et al., 2009a) ปลา turbot (Dreanno et al., 1997) ปลาบึก (Mongkonpunya et al., 1995) ปลาดุกยุโรป (Linhart et al., 1993) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม DMSO ก็ไม่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาบางชนิด (Mansour et al., 2006) สำหรับ methanol จัดเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Arctic char (Mansour et al., 2006, ปลาดุกเทศ (Viveiros et al., 2000) และ ปลา salmon (Lahnsteiner et al., 1997) เป็นต้น ในขณะที่ ethanol ใช้ได้ดีในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากดเหลือง (Muchlisin et al., 2004) และ Trehalose ใช้ได้ผลดีในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเก๋า *Epinephelus moara* (Miyaki et al., 2005) และหอยนางรม *Pinctada margaritifera* L. (Lyons et al., 2005) อย่างไรก็ตาม Rideout et al. (2003) ได้รายงานการแช่น้ำเชื้อปลาตาเดียว (winter flounder) ว่า propylene glycol ให้ผลการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดีกว่าการใช้ DMSO และ glycerol นอกจากนี้การแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาว (*Dicentrarchus labrax*) ซึ่งเป็นปลากะพงขาวชนิดอื่นๆ ซึ่งเป็นคนละชนิดกับปลากะพงขาวที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ (*Lates calcarifer*) ก็ปรากฏว่าสาร DMSO ให้ผลที่ดีในการแช่แข็งน้ำเชื้อเช่นกันดังนี้

Sansone et al. (2002) ได้พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาว (*Dicentrarchus labrax*) โดยเริ่มจากการประเมินความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อสเปิร์มที่อุณหภูมิห้อง และพบว่า dimethyl sulfoxide (Me2SO) 5% และ 7%, ethylene glycol (EG) 7% และ 10% และ propylene glycol (PG) 7% และ 10% มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำสุด ซึ่งเมื่อนำไปแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาวกลับพบว่า การใช้ EG 10% ให้ผลดีที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อจึงนำความเข้มข้นนี้ไปพัฒนากระบวนการแช่แข็งต่อด้วยหลากหลายวิธีจนทราบว่าน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เจือจางด้วย 10% EG แล้วปล่อยให้อยู่ในสภาวะสมดุลที่อุณหภูมิ 0-2 องศาเซลเซียสนาน 6 ชั่วโมงแล้วลดอุณหภูมิด้วยอัตรา -15 องศาเซลเซียส/นาที ให้ค่าเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย (post-thaw sperm motility) ไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด

Palmer et al. (1993) ได้ผสมเทียมไข่ปลากะพงขาวด้วยน้ำเชื้อปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ที่แช่แข็งที่ทำโดยนำน้ำเชื้อเจือจางใน 5%DMSO หรือ 10% glycerol ปรากฏว่า น้ำเชื้อที่ละลายออกมาสามารถเคลื่อนที่ในน้ำทะเลได้ 4 นาที โดยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ DMSO สเปิร์มเคลื่อนที่

ทันทีเมื่อกระตุ้นด้วยน้ำทะเล แต่น้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ glycerol การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเมื่อกระตุ้นด้วยน้ำทะเลยังไม่เกิดขึ้นทันที แต่จะช้าไป 1 นาที การผสมเทียมเริ่มจากนำไข่ผสมกับน้ำเชื้อแล้วเติมน้ำทะเลลงไป โดยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้ DMSO ให้ค่าอัตราการฟักของไข่เฉลี่ยเท่ากับ 84.1% ไม่แตกต่างทางสถิติกับน้ำเชื้อสดที่เจือจางใน (Ringer's solution) ที่ให้ค่าอัตราการฟักของไข่เฉลี่ยเท่ากับ 80.7% แต่น้ำเชื้อแช่แข็งด้วย glycerol ให้ค่าอัตราการฟักของไข่เฉลี่ยเท่ากับ 60.9% นอกจากนี้การผสมเทียมแบบเปียกที่นำเอาน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วย glycerol มากระตุ้นด้วยน้ำทะเล 30 วินาที แล้วนำไปผสมกับไข่ก็ไม่ทำให้ค่าอัตราการฟักของไข่เพิ่มมากขึ้น อีกทั้งไข่ปลาที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วย glycerol ก็มีการตายในขณะฟักไข่มากกว่าการใช้น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วย DMSO การแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่ใช้ DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 90 วันเมื่อนำไปผสมกับไข่ปลาด้วยปริมาณน้ำเชื้อต่อไข่เท่ากับ 1:100 (v/v) ก็ให้ค่าอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักที่ดี และลูกปลาไม่มีลักษณะอาการที่ผิดปกติหลังจากอนุบาลผ่านไป 29 วันหลังฟักออกจากไข่

Leung (1987) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ด้วย dimethylsulphoxide (DMSO), glycerol and methanol โดยเจือจางน้ำเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์เท่ากับ 1:4 (v:v) พบว่า การใช้ 5% DMSO ร่วมกับ 15% milk powder หรือ 20% egg yolk ให้ค่าเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย 70-100% เช่นเดียวกับ glycerol ที่ให้ผลการแช่แข็งที่ดีเช่นกันเมื่อใช้ 20% glycerol ร่วมกับ 15% milk powder ในขณะที่ methanol ไม่ให้ผลที่ดีในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาว

Fabbrocini et al. (2000) ที่ได้ทำการทดลองน้ำเชื้อปลา Sea bream (*Sparus aurata*) โดยใช้น้ำยาสูตร 1% NaCl ใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ คือ 10% Ethylene glycol 10% Propylene glycol และ 5% DMSO โดยใช้อัตราการเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยาเท่ากับ 1:6 ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10^0C/นาที และ 15^0C/นาที ถึง -150^0C/นาที จากนั้นนำไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลว (-196^0C) แล้วนำมาละลายพบว่า สารละลาย 5% DMSO ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10^0C/นาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อดีที่สุด

ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ และช่วงระยะเวลาสมดุล (equilibration time) มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาแต่ละชนิดแตกต่างกันแม้ว่าการศึกษาในปลากะพงขาวครั้งนี้จะเลือกใช้ช่วงระยะเวลาสมดุล 10 นาทีในทุกชุดการทดลอง ซึ่งเป็นค่าที่ optimize มาก่อนแล้ว การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลายๆชนิดจะเลือกใช้ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ แตกต่างกันไป เช่น การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกเทศ (*Clarias gariepinus*) พบว่าเมื่อใช้ glycerol ในการแช่แข็งน้ำเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 5% ระยะ equilibration time นาน 60 นาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่หลังการละลายประมาณ 40% (Steyne et al., 1985) Steyne and Vuren (1987) ใช้ glycerol ระดับความเข้มข้น 11% และระยะ equilibration time นาน

20 นาที พบว่าสเปิร์มภายหลังการละลายมีเปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัว 51.2% ซึ่งมีค่าซึ่งสูงกว่าการใช้ DMSO และ methanol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ นอกจากนี้การทดลองของ Linhart et al. (1993) ที่ใช้ glycerol ระดับความเข้มข้น 10% และระยะ equilibration time 20 นาที ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา European catfish (*Silurus glanis* L.) พบว่ามีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าเพียง 15% อย่างไรก็ตาม Mongkonpunya et al. (2000) เจือจางน้ำเชื้อปลาบึก (*Pangasianadon gigas Chevey*)ในน้ำยาเจือจาง calcium-free Hank's balanced salt solution ที่มี DMSO หรือ methanol ที่ระดับ 5% หรือ 14% พบว่าการใช้ 5% DMSO ทำให้สเปิร์มปลาบึกมีการเคลื่อนที่ประมาณ 50% ในขณะที่ 14% DMSO และ 14% methanol ไม่ทำให้สปิร์มเคลื่อนที่ ซึ่งจะเห็นได้ว่าผลการทดลองที่ผ่านมามีความหลากหลายของวิธีการวิจัยและผลการวิจัยเป็นอย่างมาก

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาวอย่างง่ายในถังโฟมสามารถทำได้เช่นเดียวกับการใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ โดยที่ประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งเหล่านั้นมีคุณภาพเหมือนกับน้ำเชื้อสด ซึ่งน้ำเชื้อแช่แข็งเหล่านี้ยังสามารถควบคุมช่วงเวลาการผสมเทียมได้ง่ายขึ้น แต่การแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาวอย่างง่ายจัดเป็นเทคโนโลยีที่มีราคาถูกและมีคุณภาพสูง ซึ่งเหมาะสำหรับเกษตรกรที่ต้องการลดภาระค่าใช้จ่ายในการใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาว Kenneth et al. (2004) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากระพงแดงแบบแช่แข็งอย่างง่าย โดยมี Ca-F HBSS เป็น sperm extender และใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์คือ DMA, DMSO และ methanol ที่ความเข้มข้น 5% และ 10% ทำการลดอุณหภูมิโดยการนำหลอดฟางวางแนวนอนบน rack จากนั้นจึงนำไปลดอุณหภูมิ ผลการทดลองปรากฏว่า สารละลาย DMSO 10% มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดเท่ากับ 71% Ji et al. (2004) ทำการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea perch (*Lateolabrax japonicus*) ใช้ Extender 3 ชนิดคือ modified plaice Ringer solution (MPRS), D-15 และ modified Mounib's medium (MMM) ใส่สารไครโอโพรแทคแทนต์ คือ DMSO ความเข้มข้น 6%, 10% และ 14% นำไปลดอุณหภูมิใน gauze pocket ขนาด 6×9 ซม. โดยวางไว้สูงเหนือผิวหน้าสารไนโตรเจนเหลวที่ระดับความสูง 2 6 และ 13 เซนติเมตร เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปวางเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 5 นาทีเสร็จแล้วจึงนำไปแช่ในสารไนโตรเจนเหลวต่อไป จากการทดลองพบว่าสารละลาย DMSO 10% ที่ระดับความสูงเหนือผิวหน้าสารไนโตเจนเหลว 6 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงที่สุดเท่ากับ 73.3 $\pm$ 5.7% รองลงมาคือที่ระดับความสูง 13 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 48.3 $\pm$ 2.9% และที่ระดับความสูง 2 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำสุดคือ 41.7 $\pm$ 10.6% ตามลำดับ

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาวในปริมาณต่างกันศึกษาครั้งนี้สามารถแช่แข็งได้ในหลอดไครโอไวออล ขนาด 2 มิลลิลิตร ซึ่งมีประโยชน์ในการนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปใช้ในการผสมเทียมกับไข่ปลาเมื่อใช้หลอดฟางที่มีขนาดเล็กกว่า แต่ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ

ดังนั้นถ้ามีการวิจัยต่อยอดเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาวให้ได้มากกว่า 2 มิลลิลิตร และเป็นการแช่แข็งอย่างง่ายๆในไอไนโตรเจนเหลวก็จะเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้เชิงพาณิชย์ต่อไป เช่น Cabrita et al. (2001) ได้รายงานถึงความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา trout ที่แช่แข็งน้ำเชื้อในปริมาณ 5 มิลลิลิตรแม้ว่าต้องมีการปรับอัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลาย เป็นต้น การพัฒนาเทคโนโลยีในการแช่แข็งน้ำเชื้ออย่างง่ายๆ โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer) ที่มีราคาแพงและสลับซับซ้อนมีส่วนช่วยทำให้มีความสะดวกในการปฏิบัติใช้ในพื้นที่จริง แต่ยังคงมีประสิทธิภาพดีในการแช่แข็งน้ำเชื้อ เนื่องจากเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติมีราคาแพง และไม่สามารถเคลื่อนย้ายออกนอกห้องปฏิบัติการไปทำงานในภาคสนามได้ เพราะเครื่องมีน้ำหนักหนักมาก และยังต้องใช้กระแสไฟฟ้าในการให้เครื่องทำงาน ซึ่งการแช่แข็งน้ำเชื้ออย่างง่ายนี้ยังเป็นการพัฒนาวิธีการแช่แข็งที่มีต้นทุนที่ต่ำ เหมาะที่จะนำไปใช้ในภาคการผลิตที่มีขนาดเล็ก หรือขนาดกลางได้ต่อไป

5.3 ผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงขาว

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงขาวแช่แข็งที่เก็บรักษาในไนถังไตรเจนเหลว 16 วัน ในการปฏิสนธิกับไข่ปลากะพงขาวพบว่า น้ำเชื้อแช่แข็งมีประสิทธิภาพเหมือนกับน้ำเชื้อสด ซึ่งมีความสอดคล้องกับรายงานในการทดลองกับปลาอื่นๆ เช่น Ott and Horton (1971) ได้ทำการเก็บน้ำเชื้อปลา chinook salmon (*Oncomynchus tshawytstha*) และ coho salmon (*O. kisutch*) แบบแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว -196 องศาเซลเซียส ด้วยน้ำยาที่มีส่วนผสมของ mannital และใช้ DMSO ความเข้มข้น 8% โดยภายหลังจากการเก็บแช่แข็งนาน 7 วัน นำน้ำเชื้อออกมาละลายผสมกับไข่สด ให้อัตราการปฏิสนธิ 79% Mounib (1978) ก็ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของปลา salmon และ cod พบว่า การใช้ 12.5% DMSO มีผลให้อัตราการปฏิสนธิเท่ากับ 80% และ 59% ตามลำดับ Warnecke and Pluta (2003) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนโดยใช้ dimethly-acetamide (DMA) เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ระหว่าง 10% - 25% และน้ำยาเก็บรักษาน้ำเชื้อ modified kurokura 's extender 2 โดยเติมน้ำตาลลงไปร่วมด้วย (sucross or trehalose) พบว่าอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักของน้ำเชื้อแช่แข็งมีค่าใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสด

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวนาน 6 เดือนพบว่า เปอร์เซนต์สเปิร์มที่เคลื่อนที่ และเปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตมีค่าไม่เปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา เหมือนกับคุณภาพน้ำเชื้อสด แสดงว่า protocol การแช่แข็งที่ได้มีความเหมาะสมต่อน้ำเชื้อปลากะพงขาว แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยในอนาคตควรมีการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงของปริมาณแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่เก็บในถังไนโตรเจนเหลว เพื่อทราบถึงความปลอดภัยในการจัดตั้งธนาคารน้ำเชื้อปลากะพงขาวต่อไปแม้ว่าการนำน้ำเชื้อปลากะพงขาวมาผสมเทียมจะมีความยุ่งยากในการจับและรีดไข่ปลาก็ตาม เพราะการเพาะพันธุ์ปลากะพงขาวที่ใช้

รูปแบบการเพาะพันธุ์แบบธรรมชาติก็ยังได้ผลดี แต่การวิจัยเชิงรุกแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาวในลักษณะนี้ก็มีประโยชน์ต่อการอนุรักษ์ และโดยเฉพาะการเก็บสายพันธุ์ของพ่อพันธุ์ปลาที่ดีที่ได้ปรับปรุงพันธุ์ หรือนำเข้ามาจากต่างประเทศมาเก็บไว้ในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อ

ทัศนีย์ ภูพิพัฒน์และคณะ (2529) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึกแบบแช่แข็งโดยใช้น้ำยาสูตรที่ 1 และ 8%DMSO โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิด้วยวิธีการแช่ในไอไนโตรเจนเหลวนาน 15 นาที จากนั้นนำมาแช่ไว้ในถังไนโตรเจนเหลวนาน 4 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 60% พลชาติ ผิวเณร และ พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข (2546) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานิลสีบรอนซ์แช่แข็ง โดยใช้น้ำยา modified Cortland และใช้ 10%DMSO เจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยา 1:5 โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ถึง -60 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ที่ -60 องศาเซลเซียส นาน 2 วินาทีแช่ลงในไนโตรเจนเหลวนาน 441 วันมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 41.50 $\pm$ 2.12% นอกจากนี้ Chao et al. (1992) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังแบบแช่แข็งโดยใช้ Ringer เป็น Sperm Extender และใช้ 10% DMSO สามารถเก็บนานเป็นระยะเวลา 3 เดือนมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายดี และยังสอดคล้องกับรายงานของ Suquet et al.(1998) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งปลา turbot (*Psetta maxima*) เป็นระยะเวลา 9 เดือนโดยใช้ 10% DMSO ร่วมกับ 10% BSA พบว่าในระหว่างการเก็บ 9 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ในช่วง 60 - 90% ภายหลังการกระตุ้นที่ 10 และ 60 วินาที

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งเป็นเวลานานๆก็มีรายงานว่ามีการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลาย เช่น Vuthiphandchai et al. (2007) รายงานการลดลงของเปอร์เซนต์การมีชีวิตของสเปิร์มกุ้งกุลาดำอย่างมีนัยสำคัญหลังการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อในไนโตรเจนเหลวผ่านไป 60 วัน โดยทั่วไปความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการด้วยกัน เช่น อัตราการลดอุณหภูมิ, อัตราการละลาย, ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ และสูตรของน้ำยาที่เหมาะสมที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อ รวมทั้งความสมบูรณ์ของน้ำเชื้อปลาแต่ละชนิด และสภาพแวดล้อมที่เกี่ยวข้องในระหว่างการเก็บรักษาซึ่งต้องมีความเหมาะสมด้วย

สรุปผลการทดลอง

น้ำเชื้อปลากะพงขาวสามารถแช่แข็งและเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวให้มีคุณภาพดีด้วยการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Calciun-free Hank's balanced salt solution และสารไครโอโพรเทคแทนท์ DMSO ในปริมาณความเข้มข้น 10% แล้วสามารถแช่แข็งด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาที หรือแช่แข็งอย่างง่ายเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 4 เซนติเมตร โดยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้พัฒนาวิธีการแช่แข็งที่เหมาะสมสามารถเก็บรักษาในปริมาณที่มากถึง 2 มิลลิลิตร และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวได้นาน 6 เดือน โดยที่คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งยังมีคุณภาพดีและมีความเหมาะสมในการจัดตั้งธนาคารน้ำเชื้อปลากะพงขาวต่อไป