

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การทดลองสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 ตอน คือ

1. การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าอื้อในสภาพต่างๆ
2. การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อที่อุณหภูมิต่ำโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์
3. การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อที่อุณหภูมิต่ำโดยเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์
4. ผลของความเข้มข้นของสารโคริโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าอื้อ
5. การศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อ

1. การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าอื้อในสภาพต่างๆ

การประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อ พบว่าพ่อพันธุ์ หอยที่ใช้ทดลองมีลักษณะสมบูรณ์เพศ มี gonad สีขาวขุ่น มีเปลือกที่มีลักษณะ สมบูรณ์ เปลือกสีเขียวเข้ม ความกว้างของเปลือกประมาณ 3.5 เซนติเมตรขึ้นไป น้ำหนักเฉลี่ยของหอยเป่าอื้อ (N=78) เท่ากับ 7.92 กรัม มีความหนาแน่นของสเปิร์ม (N = 25) เฉลี่ยเท่ากับ 3.18×10^{12} ตัวต่อมิลลิลิตร

น้ำเชื้อหอยเป่าอื้อ ที่รวบรวม ออกมาแล้ว เก็บรักษาในสภาพสด และ ในสภาพเจือจางในน้ำทะเล ตรวจสอบดูการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า น้ำเชื้อสดที่เก็บไว้ในถังน้ำแข็ง ที่อุณหภูมิ 0- 4 องศาเซลเซียส มีระยะเวลาในการเก็บ รักษาไว้ได้ประมาณ 1 8 ชั่วโมง ก่อนที่สเปิร์มจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วยน้ำทะเล แต่น้ำเชื้อสดที่เก็บแช่เย็นนานกว่า 6 ชั่วโมง มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่า 50% ในขณะที่ น้ำเชื้อสดที่เจือจางในน้ำทะเล สามารถเก็บรักษาได้เพียงประมาณ 8 ชั่วโมงเท่านั้น เพราะสเปิร์มหยุดเคลื่อนที่ (ตารางที่ 1)

2. การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อที่อุณหภูมิต่ำโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์

การเก็บรักษาน้ำเชื้อ หอยเป่าอื้อ ที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียสได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2 และ 3 ซึ่งการเก็บรักษาโดยไม่ให้ออกซิเจนสมทบ พบว่าการ ใช้ถุงพลาสติก ziplock สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด 36 ชั่วโมงก่อนที่สเปิร์มจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วยน้ำ ทะเล ในขณะที่น้ำเชื้อหอยเป่าอื้อที่เก็บรักษาใน culture flask และ beaker สามารถเก็บรักษาได้เพียง 12 ชั่วโมงก่อนที่สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ (ตารางที่ 2) สำหรับการเก็บแช่เย็น โดยให้ออกซิเจนสมทบ ปรากฏว่า การให้ออกซิเจนสมทบช่วยให้การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อได้นานขึ้น โดยการ ใช้ culture flask และถุงพลาสติก ziplock สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 48 ชั่วโมงก่อนที่สเปิร์มจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วยน้ำทะเล แต่น้ำเชื้อที่เก็บรักษาใน beaker สามารถเก็บรักษาได้นานเพียง 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าฮื้อในสภาพต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	Sperm Motility (%)	
	สเปิร์มสด	สเปิร์มสด + น้ำทะเล
0	93.3 ± 6.7^a	93.3 ± 6.7^a
2	73.3 ± 6.7^b	80 ± 0^b
4	66.7 ± 6.7^{bc}	40 ± 0^c
6	46.7 ± 6.7^d	16.7 ± 3.3^d
8	33.3 ± 6.7^e	0
10	26.7 ± 6.7^e	0
12	20 ± 0^e	0
14	13.3 ± 3.3^f	0
16	8.3 ± 6.7^f	0
18	0	0

หมายเหตุ: ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันบนแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าฮื้อที่เก็บแช่เย็นโดยไม่ให้ออกซิเจนสมทบ

ชั่วโมง	ภาชนะที่บรรจุ (ไม่ให้ออกซิเจนสมทบ)		
	Culture flask	Beaker	Plastic ziplock
0	93.3 ± 6.7 ^a	91.5 ± 3.9 ^a	93.3 ± 6.7 ^a
6	76.9 ± 3.3 ^b	46.3 ± 4.5 ^b	86.5 ± 3.3 ^a
12	26.7 ± 2.9 ^c	16.7 ± 3.8 ^c	56.7 ± 2.9 ^b
24	-	-	43.9 ± 5.7 ^c
36	-	-	23.3 ± 4.5 ^d
48	-	-	-
60	-	-	-
72	-	-	-

หมายเหตุ: ตัวอักษร superscript ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าฮื้อที่เก็บแช่เย็นโดยให้ออกซิเจนสมทบ

ชั่วโมง	ภาชนะที่บรรจุ (ไม่ให้ออกซิเจนสมทบ)		
	Culture flask	Beaker	Plastic ziplock
0	93.3 ± 2.9 ^a	89.7 ± 3.8 ^a	91.5 ± 4.5 ^a
6	76.7 ± 5.9 ^b	72.4 ± 4.8 ^b	82.2 ± 5.8 ^a
12	52.5 ± 3.5 ^c	32.3 ± 3.5 ^c	66.7 ± 3.8 ^b
24	38.4 ± 5.9 ^d	13.7 ± 4.6 ^d	56.4 ± 4.3 ^c
36	26.9 ± 2.9 ^e	-	38.5 ± 3.9 ^d
48	8.7 ± 2.2 ^f	-	21.7 ± 5.1 ^e
60	-	-	-
72	-	-	-

หมายเหตุ: ตัวอักษร superscript ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างทางสถิติ (P<0.05)

3. การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อที่อุณหภูมิต่ำโดยเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์

3.1 การศึกษาผลของ osmotic pressure ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

สเปิร์มหอยเป่าฮื้อเมื่อกระตุ้นด้วย NaCl และ KCl ที่มีค่าความดันออสโมติกต่ำ ไม่มีการเคลื่อนที่ แต่สเปิร์มเริ่มเคลื่อนที่เมื่อ ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายที่มีค่า แรงดันออสโมติกเพิ่มขึ้น 200 mM (KCl) และ 300 mM (NaCl) และยังคงเคลื่อนที่ประมาณ 80-100% เมื่อถูกกระตุ้นด้วยค่าแรงดันออสโมติกที่สูงขึ้นระหว่าง 700-800 mM (ตารางที่ 4)

จากการทดสอบทางสถิติ พบว่า การใช้ KCl 200 mM และ NaCl 200 mM ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับ KCl 300 และ 400 mM และ NaCl 300 และ 400 mM ($P > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับ KCl และ NaCl 500, 600, 700, 800 mM ($P < 0.05$) และชนิดของสารละลายทั้งสอง (KCl และ NaCl) ไม่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$)

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าฮื้อเมื่อกระตุ้นด้วย NaCl และ KCl

Molarity (mM)	สาร Electrolyte	
	KCl	NaCl
0	0	0
25	0	0
50	0	0
100	0	0
150	0	0
200	$5.2 \pm 1.4^{a,1}$	0
300	$2.1 \pm 1.1^{a,1}$	$26.7 \pm 3.8^{a,1}$
400	$33.3 \pm 3.8^{a,1}$	$40.3 \pm 1.2^{a,1}$
500	$66.7 \pm 3.8^{a,1}$	$46.7 \pm 3.8^{a,1}$
600	$66.7 \pm 3.8^{a,2}$	$60.3 \pm 1.5^{a,2}$
700	$80.2 \pm 1.2^{a,2}$	$73.3 \pm 3.8^{a,2}$
800	$80.7 \pm 1.8^{a,2}$	$96.3 \pm 1.1^{a,3}$

ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

สเปิร์มหอยเป่าฮื้อเมื่อกระตุ้นด้วย glucose และ mannitol ที่มีค่าความดันออสโมติกต่ำ ไม่มีการเคลื่อนที่ แต่เริ่มเคลื่อนที่เมื่อแรงดันออสโมติกเพิ่มขึ้น 600 mM (glucose) และ 400 mM (mannitol) และเคลื่อนที่เพิ่มขึ้น มากกว่า 80% เมื่อกระตุ้นด้วย glucose และ mannitol ที่มีค่าแรงดันออสโมติกเพิ่มขึ้นเป็น 1600 mM (ตารางที่ 5)

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า ระดับแรงดันออสโมติกต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) และสารละลายทั้งสอง (glucose และ mannitol) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

ตารางที่ 5 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าฮื้อเมื่อกระตุ้นด้วย glucose และ mannitol

Molarity (mM)	สาร Non-Electrolyte	
	Glucose	Mannitol
0	0	0
50	0	0
100	0	0
200	0	0
300	0	0
400	0	$6.7 \pm 0.9^{a,1}$
600	$26.7 \pm 3.4^{a,1}$	$26.7 \pm 3.8^{a,1}$
800	$46.7 \pm 3.8^{a,1}$	$40.5 \pm 1.1^{a,1}$
1000	$66.7 \pm 2.9^{a,1}$	$60.4 \pm 1.3^{a,1}$
1200	$66.7 \pm 1.8^{a,1}$	$66.7 \pm 3.8^{a,1}$
1400	$73.3 \pm 3.7^{a,1}$	$73.3 \pm 3.8^{a,1}$
1600	$86.7 \pm 3.4^{a,1}$	$86.7 \pm 3.8^{a,1}$

ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

3.2 การศึกษาชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อ

การแช่เย็นน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อด้วย artificial seawater, Ringer solution และ calcium free saline (Ca-F saline) พบว่า น้ำเชื้อหอยเป่าอื้อที่เก็บแช่เย็นใน Ca-F Saline สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุดที่ 30 ชั่วโมง รองลงมาคือ Ringer solution เก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 18 ชั่วโมง และน้ำยาสูตร artificial seawater เก็บรักษาน้ำเชื้อได้ 2 ชั่วโมง (ตารางที่ 6)

การศึกษาคผลของอัตราส่วนที่เหมาะสมด้วยการเจือจางน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อใน Ca-F saline ที่อัตราส่วน = 1:1, 1:2 และ 1:4 ได้แสดงไว้ในตารางที่ 7 การเจือจางน้ำเชื้อในอัตราส่วน 1:1 และ 1:2 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 30 ชั่วโมง แต่น้ำเชื้อที่เจือจางในอัตราส่วน 1:4 เก็บรักษาได้ 18 ชั่วโมง

ตารางที่ 6 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าอื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ

ชั่วโมง	ชนิดสารละลายบัฟเฟอร์		
	Artificial seawater	Ringer solution	Ca-F saline
0	86.7 ± 4.2^a	89.7 ± 2.9^a	90.5 ± 3.7^a
6	13.3 ± 2.7^b	52.3 ± 3.2^b	84.5 ± 2.8^a
12	0	13.3 ± 3.5^c	62.4 ± 3.9^b
18	0	6.7 ± 2.9^d	43.9 ± 5.7^c
24	0	0	23.5 ± 4.5^d
30	0	0	13.3 ± 3.8^e
36	0	0	0

ตัวอักษร superscript ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 7 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าอื้อเจือจางใน Ca-F saline ที่อัตราส่วนต่างๆ

ชั่วโมง	อัตราส่วนการเจือจาง		
	1 : 1	1 : 2	1 : 4
0	86.7 ± 3.5^a	93.3 ± 6.7^a	87.4 ± 2.9^a
6	73.7 ± 6.7^a	82.3 ± 4.2^a	64.6 ± 4.1^b
12	53.3 ± 3.7^b	43.3 ± 3.5^b	22.5 ± 5.9^c
18	46.7 ± 6.7^b	33.5 ± 4.9^{bc}	11.5 ± 4.7^d
24	13.3 ± 3.3^c	26.7 ± 4.7^c	0
30	6.7 ± 3.3^c	6.7 ± 2.9^d	0
36	0	0	0

ตัวอักษร superscript ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

4. การพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อแบบแช่แข็ง

4.1 ศึกษาความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าอื้อ

จากการทดลองศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ทั้ง 6 ชนิด คือ DMSO, propylene glycol, acetamide, methanol, ethanol และ ethylene glycol ที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยสารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิดทดลองกับน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อที่ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 5 , 10, 15 และ 20 % ที่อุณหภูมิห้อง และทำการประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในระยะเวลาต่าง ๆ กัน คือ 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 และ 240 นาทีหลังการใส่สารไครโอโพรเทคแทนท์ ได้ผลการทดลองดังนี้

4.1.1 การทดสอบความเป็นพิษของสาร dimethylsulfoxide (DMSO) ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20%

การประเมินผลคุณภาพน้ำเชื้อสดของหอยเป่าอื้อ พบว่า สเปิร์ม ของน้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $93.3 \pm 6.7\%$ แต่เมื่อนำสเปิร์มสดมาผสมเจือจางในสารละลาย DMSO พบว่า ที่ความเข้มข้น 5 % สเปิร์มยังสามารถเคลื่อนที่ได้ โดยมีค่าเฉลี่ยใน 4 ความเข้มข้นเท่ากับ 76.7% และเมื่อเวลาผ่านไป 240 นาที สเปิร์มที่อยู่ใน 5% DMSO มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่า 10% ส่วนที่ความเข้มข้น 10 และ 15% สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ เมื่อเวลาผ่านไป 150 นาที และ 120 นาทีตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นที่ 20 % สเปิร์มสามารถเคลื่อนที่ได้ เมื่อเวลาผ่านไปไม่เกิน 15 นาทีเท่านั้น อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มใน DMSO ที่ความเข้มข้น 5 หรือ 10% เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาทียังคงมีค่าเฉลี่ยไม่ต่ำกว่า 73% (ตารางที่ 8)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า สารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 5 % ไม่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ สารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 10 % ($P > 0.05$) แต่สารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 10 % มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารละลาย DMSO 15 % และ 20% ($P < 0.05$)

ระยะเวลากับความเข้มข้นของสารละลาย DMSO มีผลร่วมกันทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เนื่องจากระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นของส่งผลให้สาร DMSO ที่ทุกความเข้มข้นทำให้เกิดความเป็นพิษภายในเซลล์ โดยทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าลดลง

4.1.2 การทดสอบความเป็นพิษของสาร Propylene glycol (PG) ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20%

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสดของหอยเป่าอื้อก่อนเริ่มทำการทดลอง พบว่า สเปิร์ม ของน้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูง มี ค่าเฉลี่ยเท่ากับ $93.3 \pm 6.7\%$ เมื่อนำ น้ำเชื้อหอยเป่าอื้อมาผสมในสารละลาย propylene glycol พบว่าที่ความเข้มข้น 5 % สเปิร์มมีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้ตลอดระยะเวลาทดสอบ สเปิร์มที่อยู่ใน 10 % PG สามารถเคลื่อนที่อยู่ได้เมื่อเวลาผ่านไปไม่เกิน 90 นาทีเท่านั้น และที่ความเข้มข้น 15% PG สเปิร์มสามารถเคลื่อนที่อยู่ได้เมื่อเวลาผ่านไปไม่เกิน 15 นาทีเท่านั้น ในขณะที่ความเข้มข้น 20% เมื่อเวลาผ่านไป 15 นาที สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ (ตารางที่ 9)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย propylene glycol ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 % ไม่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และ ความเข้มข้นกับระยะเวลา มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.1.3 การทดสอบความเป็นพิษของสาร Acetamide ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20%

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อของหอยเป่าอื้อก่อนเริ่มทำการทดลอง พบว่า สเปิร์ม ของน้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 86.7 ± 6.7 % เมื่อนำ น้ำเชื้อสดผสมในสารละลาย Acetamide พบว่า น้ำเชื้อที่เจือจางในสารละลาย Acetamide ที่ความเข้มข้น 5% สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ได้ไม่เกิน 5% เมื่อเวลาผ่านไป 240 นาที ส่วนที่ความเข้มข้น 10 % สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 120 นาที ส่วนที่ความเข้มข้น 15 % สเปิร์มสามารถเคลื่อนที่อยู่ได้ 15 นาที ก่อนจะหยุดเคลื่อนที่ ส่วนที่ความเข้มข้น 20 % เมื่อนำสเปิร์มสดมาผสมในสารละลาย Acetamide สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ลดลงทันที เหลือเพียงประมาณ 10% และสเปิร์มไม่มีการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 15 นาที (ตารางที่ 10)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Acetamide ทุก ๆ ความเข้มข้นไม่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อเป่าอื้อ กับความเข้มข้นของสารละลาย Acetamide มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.1.4 การทดสอบความเป็นพิษของสาร Methanol ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20%

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสดของหอยเป่าอื้อก่อนเริ่มทำการทดลอง พบว่า น้ำเชื้อ สดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 93.33 ± 6.67 % เมื่อนำสเปิร์มมาผสมกับสารละลาย Methanol พบว่า ที่ความเข้มข้น 5 และ 10% เมื่อเวลาผ่านไป 240 นาที สเปิร์มยังสามารถเคลื่อนที่ได้ มีค่าสูงระหว่าง 33.3-56.3% แต่ในขณะที่ความเข้มข้นที่ 15 และ 20 % เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ลดต่ำลงเหลืออยู่ระหว่าง 5-16.7% และสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่หลังจากเวลาผ่านไป 60 นาที อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มใน methanol ความเข้มข้น 5 หรือ 10% เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที ยังคงมีค่าเฉลี่ยไม่ต่ำกว่า 73% (ตารางที่ 11)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า สารละลาย Methanol ที่ความเข้มข้น 5% ไม่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้น 10 % ($P > 0.05$) แต่ความเข้มข้น 10 % มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้น 15% และ 20% ($P < 0.05$) ระยะเวลากับความเข้มข้นมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ที่ความเข้มข้น 5 % และ 10% ไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าฮื้อหลังจากเจือจางในสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน

เวลา (นาทีก)	ความเข้มข้น (%)			
	5	10	15	20
0	76.7 ± 3.3 ^{a,1}	76.7 ± 3.3 ^{a,1}	76.7 ± 3.3 ^{a,1}	76.7 ± 2.9 ^{a,1}
15	76.7 ± 3.3 ^{a,1}	76.7 ± 3.3 ^{a,1}	60 ± 0 ^{ab,1}	20 ± 0 ^{b,2}
30	76.7 ± 3.3 ^{a,1}	73.3 ± 6.7 ^{ab,1}	53.3 ± 6.7 ^{ab,2}	0
60	53.3 ± 6.7 ^{ab,1}	33.3 ± 6.7 ^{b,2}	16.7 ± 3.3 ^{c,3}	0
90	46.7 ± 6.7 ^{ab,1}	20 ± 0 ^{c,2}	6.7 ± 3.3 ^{c,3}	0
120	40 ± 0 ^{b,1}	10 ± 0 ^{c,2}	0	0
150	40 ± 0 ^{b,1}	0	0	0
180	33.3 ± 6.7 ^{bc,1}	0	0	0
210	16.7 ± 3.3 ^{c,1}	0	0	0
240	6.7 ± 3.3 ^{c,1}	0	0	0

ตัวอักษร superscript ที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง แสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตัวเลข superscript ที่ต่างกันตามแนวนอน แสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าฮื้อหลังจากเจือจางในสารละลาย Propylene glycol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน

เวลา (นาทีก)	ความเข้มข้น (%)			
	5	10	15	20
0	60 ± 0 ^{a,1}	46.7 ± 6.7 ^{a,1}	16.7 ± 3.3 ^{a,2}	13.3 ± 6.7 ^{a,2}
15	46.7 ± 6.7 ^{ab,1}	40 ± 0 ^{ab,1}	6.7 ± 3.3 ^{b,2}	0
30	40 ± 0 ^{ab,1}	26.7 ± 3.3 ^{ab,1}	0	0
60	33.3 ± 6.7 ^{ab,1}	20 ± 0 ^{b,1}	0	0
90	33.3 ± 6.7 ^{ab,1}	10 ± 0 ^{c,2}	0	0
120	26.7 ± 6.7 ^{ab,1}	0	0	0
150	20 ± 0 ^{b,1}	0	0	0
180	16.7 ± 3.3 ^{b,1}	0	0	0
210	6.7 ± 3.3 ^{c,1}	0	0	0
240	3.3 ± 3.3 ^{c,1}	0	0	0

ตัวอักษร superscript ที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง แสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตัวเลข superscript ที่ต่างกันตามแนวนอน แสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าฮื้อหลังจากเจือจางในสารละลาย Acetamide ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน

เวลา (นาทื)	ความเข้มข้น (%)			
	5	10	15	20
0	60 ± 0 ^{a,1}	46.7 ± 6.7 ^{a,2}	16.7 ± 3.3 ^{a,3}	13.3 ± 6.7 ^{a,3}
15	46.7 ± 6.7 ^{ab,1}	40 ± 0 ^{ab,1}	6.7 ± 3.3 ^{b,2}	0
30	40 ± 0 ^{ab,1}	16.7 ± 3.3 ^{c,2}	0	0
60	33.3 ± 6.7 ^{b,1}	20 ± 0 ^{c,2}	0	0
90	33.3 ± 6.7 ^{b,1}	10 ± 0 ^{c,2}	0	0
120	26.7 ± 6.7 ^{bc,1}	0	0	0
150	20 ± 0 ^{bc,1}	0	0	0
180	16.7 ± 3.3 ^{bc,13}	0	0	0
210	6.7 ± 3.3 ^{c,1}	0	0	0
240	3.3 ± 3.3 ^{c,1}	0	0	0

ตัวอักษร superscript ที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง แสดงความแตกต่างกันทางสถิติ (P < 0.05)

ตัวเลข superscript ที่ต่างกันตามแนวนอน แสดงความแตกต่างกันทางสถิติ (P < 0.05)

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าฮื้อหลังจากเจือจางในสารละลาย Methanol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน

เวลา (นาทื)	ความเข้มข้น (%)			
	5	10	15	20
0	80 ± 0 ^{a,1}	80 ± 0 ^{a,1}	73.3 ± 6.7 ^{a,1}	53.3 ± 6.7 ^{a,1}
15	80 ± 0 ^{a,1}	80 ± 0 ^{a,1}	33.3 ± 6.7 ^{b,2}	16.67 ± 3.4 ^{b,2}
30	73.3 ± 6.7 ^{a,1}	73.3 ± 6.7 ^{ab,1}	16.7 ± 3.3 ^{c,2}	5 ± 2.9 ^{c,2}
60	73.3 ± 6.7 ^{ab,1}	73.3 ± 6.7 ^{ab,1}	0	0
90	73.3 ± 6.7 ^{ab,1}	73.3 ± 6.7 ^{ab,1}	0	0
120	73.3 ± 6.7 ^{ab,1}	66.7 ± 6.7 ^{ab,1}	0	0
150	66.7 ± 6.7 ^{ab,1}	53.3 ± 6.7 ^{c,1}	0	0
180	66.7 ± 6.7 ^{ab,1}	46.7 ± 6.7 ^{c,2}	0	0
210	53.3 ± 6.7 ^{c,1}	40 ± 0 ^{c,2}	0	0
240	56.3 ± 6.7 ^{c,1}	33.3 ± 6.7 ^{c,2}	0	0

ตัวอักษร superscript ที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง แสดงความแตกต่างกันทางสถิติ (P < 0.05)

ตัวเลข superscript ที่ต่างกันตามแนวนอน แสดงความแตกต่างกันทางสถิติ (P < 0.05)

4.1.5 การทดสอบความเป็นพิษของสาร Ethanol ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20%

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสดของหอยเปาฮื้อ (*Haliotis asinina*) ก่อนเริ่มทำการทดลองมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าเท่ากับ 86.7 ± 6.7 % เมื่อนำน้ำเชื้อสดผสมในสารละลาย Ethanol ที่ความเข้มข้น 5 % เมื่อเวลาผ่านไป 240 นาที สเปิร์มยังคงสามารถเคลื่อนที่ได้ 13.3 ± 3.3 % ส่วนที่ความเข้มข้น 10 % เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ และ การใช้ ethanol ที่ความเข้มข้น 15 และ 20 % เมื่อนำน้ำเชื้อสดใส่ในสารละลาย ethanol ที่ความเข้มข้นดังกล่าว สเปิร์มไม่มีการเคลื่อนที่หลังการเจือจางใน ethanol (ตารางที่ 12)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย ethanol 5% มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีการเคลื่อนที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับ ethanol 10% ($P < 0.05$) และ การใช้ ethanol 10% มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ ethanol ที่ความเข้มข้น 15 และ 20 % ($P < 0.05$) ความเข้มข้นกับระยะเวลามีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.1.6 การทดสอบความเป็นพิษของสาร Ethylene glycol ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20%

การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดของหอยเปาฮื้อ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ 93.3 ± 6.7 % การทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่ใน ethylene glycol 5, 10, 15 และ 20% พบว่า สเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่ระหว่าง 3.3 – 60% เมื่อเวลาผ่านไป 240 นาที โดยน้ำเชื้อที่เจือจางด้วย 5% และ 10% ethylene glycol ยังคงมีการเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มสูงกว่า 50% เมื่อเวลาผ่านไป 240 นาที อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มใน ethylene glycol ความเข้มข้น 5 หรือ 10% เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที ยังคงมีค่าเฉลี่ยไม่ต่ำกว่า 73% (ตารางที่ 13)

การทดสอบทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย ethylene glycol 5% ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ กับ ethylene glycol ที่ความเข้มข้น 10% ($P > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับ ethylene glycol ที่ความเข้มข้น 15 และ 20% ($P < 0.05$) เวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อในสารละลาย ethylene glycol ไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าอื้อหลังจากเจือจางในสารละลาย Ethanol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน

เวลา (นาทีก)	ความเข้มข้น (%)			
	5	10	15	20
0	73.3 ± 3.7 ^{a,1}	60 ± 0 ^{a,2}	0	0
15	73.3 ± 6.7 ^{a,1}	16.7 ± 3.3 ^{b,2}	0	0
30	66.7 ± 6.7 ^{ab,1}	3.3 ± 3.3 ^{c,2}	0	0
60	66.7 ± 6.7 ^{ab,1}	0	0	0
90	66.7 ± 6.7 ^{ab,1}	0	0	0
120	60 ± 0 ^{b,1}	0	0	0
150	53.3 ± 6.7 ^{b,1}	0	0	0
180	40 ± 0 ^{bc,1}	0	0	0
210	33.3 ± 0 ^{c,1}	0	0	0
240	13.3 ± 3.3 ^{c,1}	0	0	0

ตัวอักษร superscript ที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันทางสถิติ (P < 0.05)

ตัวเลข superscript ที่ต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างกันทางสถิติ (P < 0.05)

ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าอื้อหลังจากเจือจางในสารละลาย Ethylene glycol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน

เวลา (นาทีก)	ความเข้มข้น (%)			
	5	10	15	20
0	80 ± 0 ^{a,1}	73.3 ± 6.7 ^{a,1}	66.7 ± 6.7 ^{b,1}	53.3 ± 6.7 ^{c,1}
15	73.3 ± 6.7 ^{a,1}	73.3 ± 6.7 ^{a,1}	60 ± 0 ^{b,1}	33.3 ± 6.7 ^{c,1}
30	73.3 ± 6.7 ^{a,1}	73.3 ± 6.7 ^{a,1}	46.7 ± 6.7 ^{b,1}	26.7 ± 6.7 ^{c,1}
60	73.3 ± 6.7 ^{a,1}	66.7 ± 6.7 ^{a,1}	40 ± 0 ^{b,1}	20 ± 0 ^{c,1}
90	73.3 ± 6.7 ^{a,1}	66.7 ± 6.7 ^{a,1}	33.3 ± 6.7 ^{b,1}	26.7 ± 6.7 ^{c,1}
120	66.7 ± 6.7 ^{a,1}	66.7 ± 6.7 ^{a,1}	26.7 ± 6.7 ^{b,1}	16.7 ± 3.3 ^{c,1}
150	66.7 ± 6.7 ^{a,1}	66.7 ± 6.7 ^{a,1}	26.7 ± 6.7 ^{b,1}	8.3 ± 1.7 ^{c,1}
180	66.7 ± 6.7 ^{a,1}	60 ± 0 ^{a,1}	20 ± 0 ^{b,1}	6.7 ± 1.7 ^{c,1}
210	66.7 ± 6.7 ^{a,1}	53.3 ± 6.7 ^{a,1}	20 ± 0 ^{b,1}	5 ± 0 ^{c,1}
240	60 ± 0 ^{a,1}	46.7 ± 6.7 ^{a,1}	20 ± 0 ^{b,1}	3.3 ± 1.7 ^{c,1}

ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P > 0.05)

ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P > 0.05)

4.2 การศึกษาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าฮือ

4.2.1 การแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าฮือด้วย DMSO

การแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าฮือด้วยการใช้น้ำยาสูตร Artificial seawater (ASW) ร่วมกับ สารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 % โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิแตกต่างกันคือ 2.5, 5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาที่ เริ่มทำการแช่แข็งจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียสจนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียสและ -80 องศาเซลเซียส พักไว้ 5 นาที่ แล้วนำน้ำเชื้อมาละลายได้ผลการทดลองดังนี้

4.2.1.1 การแช่แข็งมาที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส

น้ำเชื้อสด (freshly collected semen) มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเฉลี่ยเท่ากับ 93.33% น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วย สารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 5 % เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 2.5, 5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาที่ จากอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสจนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลัง การละลายที่อุณหภูมิเท่ากับ $16.7 \pm 3.3\%$, $6.7 \pm 3.3\%$, $53.3 \pm 6.7\%$, $66.7 \pm 6.7\%$ และ 0% ตามลำดับ (ตารางที่ 14)

น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 10 % เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 2.5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาที่ จากอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของมีค่าเท่ากับ $6.7 \pm 3.3\%$, $3.3 \pm 3.3\%$, $53.3 \pm 6.7\%$, $20 \pm 0\%$ และ 0% ตามลำดับ (ตารางที่ 14)

น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 15 % เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 2.5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาที่ จากอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของมีค่าเท่ากับ 0%, 0%, $3.3 \pm 3.3\%$, $6.7 \pm 3.3\%$ และ 0% ตามลำดับ (ตารางที่ 14)

น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 20% เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 2.5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาที่ จากอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส สเปิร์มไม่มีการเคลื่อนที่หลังการละลาย (ตารางที่ 14)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 5% จะมีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ 10%, 15% และ 20 % ($P < 0.05$) ส่วนสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 10 % มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 15 % และ 20% ($P < 0.05$) แต่ในทางตรงข้าม สารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 15 และ 20 % ไม่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของอัตราการลดอุณหภูมิตุกระดับ พบว่า มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาที่ และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาที่ ไม่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แตกต่างกันอย่างมีนัยทางสถิติ ($P > 0.05$) จากข้อมูลทางสถิติพบว่า อัตราการลดอุณหภูมิที่ 7.5 องศาเซลเซียส/นาที่ มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด รองลงมาคือการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10, 2.5, 5 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาที่ ตามลำดับ (ตารางที่ 14)

4.2.1.1 การแช่แข็งมาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

น้ำเชื้อสดหอยเป่าอื้อก่อนนำการแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 93.3 % น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 5 % เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาทิจากอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสจนถึงอุณหภูมิต่ำสุดที่ -80 องศาเซลเซียส มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายที่อุณหภูมิเท่ากับ $40 \pm 0\%$, $20 \pm 0\%$, $73.3 \pm 6.7\%$ และ $33.3 \pm 6.7\%$ ตามลำดับ (ตารางที่ 15)

น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 10% เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาทิจากอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิต่ำสุดที่ -80 องศาเซลเซียส มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของมีค่าเท่ากับ $20 \pm 0\%$, $3.3 \pm 3.3\%$, $60 \pm 0\%$ และ 0% ตามลำดับ (ตารางที่ 15)

น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 15% เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาทิจากอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิต่ำสุดที่ -80 องศาเซลเซียส มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของมีค่าเท่ากับ $20 \pm 6.7\%$, 0% , $40 \pm 0\%$ และ 0% ตามลำดับ (ตารางที่ 15)

น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 20% เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาทิจากอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิต่ำสุดที่ -80 องศาเซลเซียส มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของมีค่าเท่ากับ 0% , 0% , $26.7 \pm 6.7\%$ และ 0% ตามลำดับ (ตารางที่ 15)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO ทุกระดับความเข้มข้นมีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การใช้ อัตราการลดอุณหภูมิที่ 5, 7.5 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาทิจาไม่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีผลแตกต่างกันอย่างมีนัยทางสถิติกับอัตราการลดอุณหภูมิ 5 และ 10 องศาเซลเซียส/นาทิจา ($P < 0.05$) (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 14 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าฮื้อที่แช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นและอัตราการลดอุณหภูมิต่างๆจนถึงอุณหภูมิต่ำ (-40 องศาเซลเซียส)

ความเข้มข้นของ DMSO (%)	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย				
	2.5 องศาเซลเซียส/นาที่	5 องศาเซลเซียส/นาที่	7.5 องศาเซลเซียส/นาที่	10 องศาเซลเซียส/นาที่	12.5 องศาเซลเซียส/นาที่
5	$16.7 \pm 3.3^{a,2}$	$6.7 \pm 3.3^{a,3}$	$53.3 \pm 6.7^{a,1}$	$66.7 \pm 6.7^{a,1}$	0
10	$6.7 \pm 3.3^{b,3}$	$3.3 \pm 3.3^{b,3}$	$53.3 \pm 6.7^{a,1}$	$20 \pm 0^{b,2}$	0
15	0	0	$3.3 \pm 3.3^{b,2}$	$6.7 \pm 3.3^{c,1}$	0
20	0	0	0	0	0

ตัวอักษร superscript ที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตัวเลข superscript ที่ต่างกันตามแนวนอน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าฮื้อที่แช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นและอัตราการลดอุณหภูมิต่างๆจนถึงอุณหภูมิต่ำ (-80 องศาเซลเซียส)

ความเข้มข้นของ DMSO (%)	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย			
	5 องศาเซลเซียส/นาที่	7.5 องศาเซลเซียส/นาที่	10 องศาเซลเซียส/นาที่	12.5 องศาเซลเซียส/นาที่
5	$40 \pm 0^{a,2}$	$20 \pm 0^{a,3}$	$73.3 \pm 6.7^{a,1}$	$33.3 \pm 6.7^{a,2}$
10	$20 \pm 0^{b,2}$	$3.3 \pm 3.3^{b,3}$	$60 \pm 0^{b,1}$	0
15	$20 \pm 6.7^{b,2}$	0	$40 \pm 0^{c,1}$	0
20	0	0	$26.7 \pm 6.7^{c,1}$	0

ตัวอักษร superscript ที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตัวเลข superscript ที่ต่างกันตามแนวนอน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของสถิติ ($P < 0.05$)

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

5.1 การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าฮื้อในสภาพต่างๆ

จากการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อ โดยผ่าตัดเอา gonad หอยออกมา แล้วแยกน้ำเชื้อออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำน้ำเชื้อสดแช่ในน้ำแข็ง ส่วนที่ 2 นำน้ำเชื้อสดผสมในน้ำทะเลนำไปแช่ในน้ำแข็ง (0-4 องศาเซลเซียส) แล้วทำการเช็คดูเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (sperm motility) ที่เวลาผ่านไป 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 และ 18 ชั่วโมง พบว่า สเปิร์มสดมีการเคลื่อนที่ได้มากกว่า สเปิร์มที่ผสมในน้ำทะเล ซึ่งถ้าเลือก น้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อ มาใช้ในการแช่แข็ง ต่อไปควรเลือกน้ำเชื้อสดมาใช้ทดลองในการแช่แข็ง เนื่องจากน้ำเชื้อสดที่เก็บแช่เย็นนาน 4 ชั่วโมงยังคงมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูง แม้ว่าเมื่อเก็บแช่เย็นไว้นานเกิน 6 ชั่วโมงขึ้นไป การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดต่ำลงอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามการนำน้ำเชื้อสดมาแช่เย็นในลักษณะเช่นนี้ อาจมีผลทำให้มีการระเหย หรือ ทำให้น้ำเชื้อแห้งเร็วขึ้น เพราะต้องตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเป็นระยะๆ อยู่เสมอ รวมทั้งน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อ ที่มีปริมาณจำกัดยังต้องสัมผัสกับอากาศตลอดเวลา ซึ่งอาจมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อที่อาจลดต่ำลง ทำให้เก็บรักษาน้ำเชื้อได้ไม่นานเท่าที่ควร สำหรับการนำน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อที่อยู่ในน้ำทะเลมาใช้ประโยชน์แช่แข็ง ควรนำน้ำเชื้อที่พอพันธุ์หอยเป่าฮื้อปล่อยออกมาในน้ำทะเลไม่เกิน 2 ชั่วโมง เนื่องจาก ในช่วงเวลาดังกล่าว สเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่สูงเมื่อนำเอาน้ำเชื้อสดออกมาแล้วเจือจางด้วยน้ำทะเล แต่น้ำเชื้อที่หอยปล่อยออกมาในน้ำทะเลถ้าปล่อยไว้นานเกิน 4 ชั่วโมง กลับพบว่าสเปิร์มมีการเคลื่อนที่ลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ไม่เหมาะสมในการนำไปแช่แข็งต่อไป

Suquet et al. (2010) ศึกษาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมแปซิฟิกที่มีโครโมโซม 4n (tetraploid Pacific oyster sperm) เมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำทะเลพบว่า สเปิร์มหอย 4n สามารถเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นได้นานกว่า 20 ชั่วโมง แต่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ต่ำกว่าสเปิร์มหอย 2n แสดงให้เห็นว่าคุณภาพสเปิร์มหอย 4n ต่ำกว่าคุณภาพสเปิร์มหอย 2n เนื่องจากระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอย 4n ตั้งแต่ถูกกระตุ้นจนหยุดเคลื่อนที่จะใช้เวลาสั้นกว่าที่พบในหอย 2n แม้ว่าระดับพลังงานในสเปิร์มหอย 4n (intracellular ATP concentration) มีค่าสูงกว่าที่พบในสเปิร์มหอย 2n แสดงให้เห็นว่าการหยุดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอย 4n ไม่เกี่ยวข้องกับระดับ ATP ในสเปิร์มเนื่องจาก ATP ยังมีค่าสูงอยู่ แต่การหยุดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอย 4n เกี่ยวข้องโดยตรงกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างสเปิร์มหอย 4n (morphological alteration) ที่ทำให้สเปิร์มไม่เคลื่อนที่ และสเปิร์มมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างมากหลังจากเวลากระตุ้นผ่านไป 24 ชั่วโมง

จากข้อมูลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อสดของชุดการทดลองนำน้ำเชื้อสดไปเก็บรักษาแล้วเมื่อนำไปกระตุ้นด้วยน้ำทะเล และข้อมูลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในชุดการทดลองนำน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อแล้วเจือจางในทะเลแล้วเก็บรักษา สามารถนำข้อมูลที่ได้มาบริหารจัดการการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่เย็น และการแช่แข็ง เพราะว่าการนำน้ำเชื้อสดออกจากตัวหอยส่งผลทำให้หอยบาดเจ็บและตายได้ ซึ่งควรหลีกเลี่ยงในการใช้พอพันธุ์ที่หาได้ยาก และที่มีค่าเหล่านี้เพื่อให้ใช้เป็นพอพันธุ์ได้นาน อย่างไรก็ตามในความเป็นจริงแล้วในระหว่างการเพาะพันธุ์หอยเป่าฮื้อ พบว่าหอยเพศผู้จะปล่อยน้ำเชื้อจำนวนมากออกมาในน้ำทะเล ซึ่งแม้ว่าเมื่อตกน้ำเชื้อไปผสมกับไข่ที่อยู่คนละบ่อในระหว่างการผสมเทียมแล้ว ก็ยังมีน้ำเชื้ออีกมากที่เหลืออยู่และไม่ได้ใช้ประโยชน์ โดยมีการปล่อยทิ้งไป โดยเปล่า

ประโยชน์ ดังนั้นจากข้อมูลที่ทราบว่า น้ำเชื้อที่หอยที่ปล่อยออกมาในน้ำทะเลไม่เกิน 2 ชั่วโมง ยังคงมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูง จึงควรที่จะทำการนำน้ำเชื้อเหล่านี้มากรองเพื่อให้ได้สเปิร์มที่เข้มข้น แล้วนำไปแช่แข็งทันที เพื่อทำให้น้ำเชื้อที่ต้องปล่อยทิ้งเหล่านี้ไม่สูญเสียไปโดยเปล่าประโยชน์ แต่สามารถนำไปแช่แข็งแล้วนำมาใช้ประโยชน์ได้ในภายหลัง

5.2 การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าฮือที่อุณหภูมิต่ำโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์

การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าฮือ ที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส โดยไม่ใช้ออกซิเจนสมทบ พบว่าการใช้ถุงพลาสติก ziplock สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด เปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ สาเหตุที่เป็นเช่นนั้นน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับพื้นที่ผิวของถุง ziplock ที่มีมากกว่า culture flask และ beaker ทำให้สามารถบรรจุอากาศได้มากกว่า และอีกทั้งถุง ziplock สามารถปิดได้ ทำให้น้ำเชื้อไม่ระเหย หรืออาจจะหายไปได้ยากกว่าเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อที่เก็บในภาชนะ culture flask และ beaker การให้ออกซิเจนสมทบในระหว่างการแช่เย็นน้ำเชื้อสด ทำให้สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ให้ออกซิเจนสมทบ โดยชุดการทดลองที่เก็บรักษาน้ำเชื้อในถุง ziplock มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกับชุดการทดลองที่ใช้ culture flask แสดงว่าการแช่เย็นน้ำเชื้อสดหอยเป่าฮือในสภาพให้ออกซิเจนสมทบ ทำได้ทั้งในถุง ziplock และ culture flask แต่ควรทำใน culture flask เนื่องจากมีความสะดวกในการใช้มากกว่าถุง ziplock การศึกษาในอนาคตควรพัฒนาวิธีการที่ทำให้การเก็บรักษาน้ำเชื้อสดหอยเป่าฮือด้วยวิธีการแช่เย็น ให้สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อที่มีคุณภาพได้นานขึ้น

Christensen and Tiersch (1996) ได้ทำการศึกษากการเก็บรักษาน้ำเชื้อของปลา channel catfish โดยการแช่เย็นน้ำเชื้อในน้ำยาสุตร HBSS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า น้ำเชื้อที่เจือจางใน HBSS (diluted milt) สามารถเก็บไว้ได้นานกว่าการนำ testis ทั้งชิ้นไปแช่ใน HBSS (intact testis) โดยได้ศึกษาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อ 4 วิธี ดังนี้ 1). เก็บ testis ทั้งชิ้น (intact testis) 2). เก็บน้ำเชื้อแบบมีการให้และไม่ให้ออกซิเจนสมทบ 3). เก็บน้ำเชื้อในสุตรน้ำยาที่มียาปฏิชีวนะ หรือไม่มียาปฏิชีวนะ 4). เก็บน้ำเชื้อในสุตรน้ำยาที่มี methanol หรือไม่มี methanol ผสมอยู่ 5). เก็บน้ำเชื้อในสุตรน้ำยาที่มี glucose และ methanol หรือ ไม่มี glucose และ methanol ผสมอยู่ โดยผลการทดลองในครั้งนี้พบว่า น้ำเชื้อที่เจือจางในสุตรน้ำยา HBSS ทำให้สเปิร์มยังคงมีการเคลื่อนที่นานถึง 9 วัน (diluted milt) ซึ่งนานกว่าการเก็บแบบ intact testis ในสุตรน้ำยา HBSS ซึ่งเก็บได้เพียง 2 วันเท่านั้น

5.3 การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าฮือที่อุณหภูมิต่ำโดยเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์

การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าฮือ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารละลาย NaCl และ KCl มีค่าสูงประมาณ 80-100% เมื่อถูกกระตุ้นด้วยค่าแรงดันออสโมติกที่สูงขึ้นระหว่าง 700-800 mM และสเปิร์มยังคงมีการเคลื่อนที่มากกว่า 80% เมื่อถูกกระตุ้นด้วย glucose และ mannitol ที่ระดับ 1600 mM แสดงให้เห็นว่า สเปิร์มหอยเป่าฮือมีการเคลื่อนที่ได้มากขึ้น เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสาร electrolyte และสาร electrolyte ที่มีค่าแรงดันออสโมติกสูงขึ้น

การแช่เย็นน้ำเชื้อหอยเป่าฮือในสารละลาย calcium free saline (Ca-F saline) ให้ผลการเก็บรักษาดีกว่าแช่ในสารละลาย artificial seawater และ Ringer solution แสดงว่า Ca-F saline เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการแช่เย็นน้ำเชื้อหอยเป่าฮือ การเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำที่

อุณหภูมิระหว่าง 0-4 องศาเซลเซียส ในน้ำเชื้อหอยยังไม่มีรายงานการศึกษา ซึ่งอาจเนื่องมาจากความนิยมในการศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป็นส่วนใหญ่ ที่เก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานกว่า อย่างไรก็ตามการแช่เย็นน้ำเชื้อในสโตร์น้ำเท่าที่มีการรายงาน เป็นการศึกษาในน้ำเชื้อปลาเป็นส่วนใหญ่ การเจือจางน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อด้วย Ca-F saline อย่างมากที่สุดไม่ควรเจือจางเกินอัตราส่วน 1 : 2 เพราะการเจือจางในอัตราส่วน 1 : 1 และ 1 : 2 ให้ผลการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ไม่ต่างกัน แต่การเจือจางในอัตรา 1 : 4 ทำให้การเก็บรักษาได้สั้นลง ซึ่งอัตราการเจือจางน้ำเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในสโตร์น้ำหลายชนิดมีค่าแตกต่างกันไป เช่น อัตราส่วน 1:5 สำหรับน้ำเชื้อปลาตุ๊กอัฟริกกัน (Mansour et al. 2004) อัตราส่วน 1:3 สำหรับน้ำเชื้อปลา Atlantic cod และน้ำเชื้อปลา haddock (DeGraaf and Berlinsky, 2004) และอัตราส่วน 1:3 สำหรับน้ำเชื้อปลา sturgeon (Park and Chapman, 2005)

ระยะเวลาที่น้ำเชื้อหอยเป่าอื้อเจือจางในสารละลาย Ca-F saline ยังขึ้นอยู่กับตัวแปรอื่นๆ เช่น ความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อระหว่างตัวหอย เทคนิคการแช่เย็น การใช้ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม เป็นต้น ซึ่งการศึกษาต่อไปในอนาคตควรจะได้มีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับตัวแปรเหล่านี้ ด้วยเหตุที่พ่อพันธุ์หอยเป่าอื้อมีขนาดเล็ก และน้ำเชื้อที่ได้จากการรีดหอยแต่ละตัวมีปริมาณน้อย ทำให้ใช้เวลารวบรวมน้ำเชื้อนานกว่าจะได้น้ำเชื้อปริมาณมากพอสำหรับการทดลอง ทำให้น้ำเชื้อบางส่วนอาจมีการระเหย (evaporation) ระหว่างการรวบรวม มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ ทำให้ระยะเวลาเก็บรักษาได้สั้นลง

5.4 ผลของความเข้มข้นของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าอื้อ

DMSO, methanol และ ethylene glycol เป็นสารโครีโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษต่ำต่อน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อ เนื่องจาก เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่อยู่ในความเข้มข้น 5 หรือ 10% ยังคงมีค่าเฉลี่ยสูงไม่ต่ำกว่า 73% โดยที่ Propylene glycol, Acetamide และ Ethanol มีความเป็นพิษสูง การศึกษาความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ 5 ชนิดต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าอื้อ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม มีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาสัมผัสสารนานขึ้น และความเข้มข้นของสารโครีโอโพรเทคแทนท์สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในสโตร์น้ำหลายชนิดเช่น turbot (Dreanno et al., 1997), Arctic charr (Richardson et al., 2000) และ common snook (Tiersch et al., 2004)

Gwo et al. (2002) ทดสอบ ความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ 8 ชนิด (DMSO, dimethyl acetamide, ethylene glycol, propylene glycol, butylene glycol, polyethylene glycol, glycerol และ methanol) ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าอื้อพันธุ์เล็ก (*Halotis diversicolor supertexta*) โดยนำน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อพันธุ์เล็กมาเจือจางใน artificial seawater ที่มีสารโครีโอโพรเทคแทนท์ความเข้มข้นระหว่าง 5-25 % และประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที ก่อนแช่แข็ง พบว่า สารโครีโอโพรเทคแทนท์ที่เป็นพิษน้อยที่สุดคือ 10% DMSO

Vuthiphandchai et al. (2005) ศึกษาความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ 9 ชนิด ได้แก่ methanol, ethanol, ethylene glycol, propylene glycol, dimethyl sulfoxide (DMSO), acetamide, formamide, glycerol and sucrose ตัวอ่อนกุ้งกุลาดำระยะเริ่มต้น ระยะกลางและระยะท้ายของการพัฒนา โดยนำตัวอ่อนเหล่านั้นแช่ในสาร โครีโอโพรเทคแทนท์ความเข้มข้น

5, 10, 15 และ 20% นาน 10 หรือ 20 นาทีแล้วนำไปฟักในน้ำทะเลให้เป็นตัวอ่อน พบว่าความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ขึ้นอยู่กับ ระยะการพัฒนาระยะของตัวอ่อน ชนิดและความเข้มข้นของ สารโครีโอโพรเทคแทนท์ และระยะเวลาสัมผัสสาร โดยตัวอ่อนระยะท้ายของการพัฒนาที่มีความทนต่อสารโครีโอโพรเทคแทนท์มากที่สุด อีกทั้ง DMSO, acetamide, glycerol และ sucrose จัดเป็นสารโครีโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษต่ำเปรียบเทียบกับสารโครีโอโพรเทคแทนท์ชนิดอื่นๆ

Vuthiphandchai et al. (2007) ศึกษาความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ 5 ชนิด (DMSO, ethylene glycol, propylene glycol, formamide และ methanol) ต่อการมีชีวิตของสเปิร์มกึ่งกุลาดำ โดยนำถุงน้ำเชื้อกึ่งกุลาดำมาแช่ในสารละลาย calcium-free saline (Ca-F saline) ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% พบว่า DMSO มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มต่ำที่สุด

ความเหมาะสมในการใช้สารโครีโอโพรเทคแทนท์เพื่อนำมาใช้แช่แข็ง สามารถประเมินจากความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ต่อเซลล์ที่แช่แข็ง โดยสัตว์น้ำแต่ละชนิดมีความสามารถในการทนต่อความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์แตกต่างกัน เช่น methanol มีความเป็นพิษต่ำต่อสเปิร์มปลา Arctic charr (Mansour et al., 2006) และ bagrid catfish (Muchlisin et al., 2004) Propylene glycol มีความเป็นพิษต่ำต่อสเปิร์มปลา African catfish (Horváth and Urbanyi) และ winter flounder (Rideout et al., 2003) Ethylene glycol มีความเป็นพิษต่ำต่อสเปิร์มปลากะพงขาว (Sansone et al., 2002) ปลาดุกออฟริกัน (Viveiros et al., 2000) และปลาแซลมอน (Lahnsteiner et al., 1997) Dimethylacetamide เป็นสารโครีโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษต่ำซึ่งสามารถนำไปแช่แข็งน้ำเชื้อปลา rainbow trout (McNiven et al., 1993), common snook (Tiersch, et al., 2004), and Arctic charr (Richardson et al., 2000, Mansour et al., 2006)

Ieropoli et al. (2004) ทดสอบความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ 4 ชนิด (DMSO, ethylene glycol, propylene glycol และ glycerol) ความเข้มข้น 5-15% ต่อน้ำเชื้อหอยนางรมแปซิฟิก (*Crassostrea gigas*) โดยให้น้ำเชื้ออยู่ในสารโครีโอโพรเทคแทนท์นานถึง 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง (26 องศาเซลเซียส) และประเมินความสามารถในการปฏิสนธิและการพัฒนาของตัวอ่อนมาที่ระยะ D larval stage พบว่า 5% DMSO, 10% ethylene glycol และ 15% propylene glycol มีความเหมาะสมในการที่จะคัดเลือกไปใช้แช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมต่อไปเพราะมีความเป็นพิษต่อสเปิร์มต่ำ

5.5 การศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าฮือ

การแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าฮือด้วย DMSO มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียสให้ค่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูงสุด (66.7%) เมื่อใช้ 5% DMSO และใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาที่ อีกทั้งเมื่อแช่แข็งด้วย DMSO มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียสให้ค่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูงสุด (73.3%) เมื่อใช้ 5 %DMSO และใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาที่ แสดงว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าฮือด้วยการใช้ 5% DMSO และใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาที่มีความเหมาะสมในการนำไปใช้ โดยการแช่แข็งมาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสแล้วนำน้ำเชื้อไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลวจะให้ค่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูงสุด

ปัจจัยที่มีผลต่อการประสบความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อ ขึ้นอยู่กับตัวแปรที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแช่แข็งต้องมีความเหมาะสม เช่น คุณภาพน้ำเชื้อต้องดี ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนต์ต้องเหมาะสม รวมทั้งการพิจารณาเลือกใช้อัตราการลดอุณหภูมิหรือการละลายที่ไม่ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ที่แช่แข็ง โดยทั่วไปการแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำหลายชนิดมักพบว่า DMSO สามารถแช่แข็งน้ำเชื้อได้ดี เนื่องจากคุณสมบัติในการปกป้องเซลล์หรือการป้องกันไม่ให้เกิดเกล็ดน้ำแข็ง (ice crystal) ดังเช่นการวิจัยในผลงานวิจัยต่อไปนี้

Suquet et al. (1998) แช่แข็งน้ำเชื้อปลา turbot (*Psetta maxima*) ด้วยการใส่ 10% DMSO ร่วมกับ 10% BSA แล้วเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลว 9 เดือน พบว่า น้ำเชื้อแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าระหว่าง 60-90%

Gwo et al. (2002) แช่แข็ง น้ำเชื้อหอยเปาฮัลลิค (*Halotis diversicolor supertexta*) ด้วยการนำน้ำเชื้อหอยเจือจางใน artificial seawater ที่มี 10% DMSO ปลอ่ยไว้ 60 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และบรรจุน้ำเชื้อในหลอด cryotube และลดอุณหภูมิในอัตรา 3.5 ถึง 20 องศาเซลเซียส/นาที่ มาที่อุณหภูมิสุดท้ายแตกต่างกัน (0, -30, -60, -90 และ -120 องศาเซลเซียส) ก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่า การเลือกใช้ อัตราการลดอุณหภูมิที่ 12 หรือ 15 องศาเซลเซียส/นาที่ มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม หลังการละลาย (post-thawed sperm motility) มีค่าที่ดีที่สุดแม้ว่ามีค่าต่ำกว่าน้ำเชื้อสด จึงต้องการน้ำเชื้อแช่แข็งในปริมาณมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดเพื่อผสมกับไข่ให้มีประสิทธิภาพการผสมเท่ากัน

Vuthiphandchai et al. (2007) แช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำด้วยการใช้ 5% DMSO และลดอุณหภูมิด้วยอัตรา 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 และ 16 องศาเซลเซียส/นาที่ มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -30 หรือ -80 องศาเซลเซียสก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว พบว่า การแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส/นาที่ จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส ให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงสุด

Vuthiphandchai et al. (2009) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงแดง โดยนำน้ำเชื้อมาเจือจางใน Ringer solution เติมสารไครโอโพรเทคแทนต์ DMSO 5% หรือ 10%, propylene glycol 5% หรือ 10%, ethylene glycol 5% หรือ 10%, ethanol 5% และ methanol 5% นำไปแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5, 10 และ 12 องศาเซลเซียส/นาที่ มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 หรือ -80 องศาเซลเซียสก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว ปรากฏว่า น้ำเชื้อปลากะพงแดงที่แช่แข็งด้วย 10% DMSO ลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาที่ มาที่ -80 องศาเซลเซียสมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและการมีชีวิตของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงสุดเท่ากับ 91.1% และ 92.7% ตามลำดับ

พลชาติ ผิวฉน และพนม กระจ่างพจน์ สอดสุข (2546) ทำการแช่แข็ง น้ำเชื้อปลาหมอไทยด้วยการใช้น้ำยาสูตร Carp #1 ที่มี 10 % DMSO เป็นองค์ประกอบ โดยเจือจางน้ำเชื้อในน้ำยาในอัตราส่วน 1:5 ปลอ่ยให้น้ำเชื้ออยู่ในภาวะสมดุลที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนการแช่แข็งในอัตราการลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาที่ ปรากฏว่าสเปิร์มมีการเคลื่อนที่หลังการละลายประมาณ 60% และมีประสิทธิภาพการปฏิสนธิไข่ใกล้เคียงกับการใช้น้ำเชื้อสด

อย่างไรก็ตาม การแช่แข็งในสัตว์น้ำหลายชนิดก็มีรายงานถึงประสิทธิภาพของสารไครโอโพรเทคแทนต์ตัวอื่นนอกเหนือไปจาก DMSO ในการแช่แข็งเซลล์ให้ผลดี เนื่องจากความแตกต่างของชนิดสัตว์น้ำ และชนิดของเซลล์ที่แช่แข็ง ดังที่พบในงานวิจัยต่อไปนี้

Rana and McAndrew (1989) แช่แข็งน้ำเชื้อปลานิล (*Oreochromis* spp.) ในหลอดฟาง 0.5 มิลลิลิตร ด้วยการใช้ยาน้ำยา Fish Ringer solution ที่มี 12.5% methanol เป็นสารโคริโอโพรเทคแทนท์ โดยทำการเจือจางน้ำเชื้อใน Fish Ringer solution ในอัตราส่วน 1 :1, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10 และ 1:20 พบว่า การแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิระหว่าง 5- 50 องศาเซลเซียส/นาที่ที่อัตราส่วนการเจือจางต่างกัน ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการปฏิสนธิกับไข่ปลานิล และให้ค่าอัตราการฟักระหว่าง 86.2-98.6% แต่การแช่แข็งในหลอด cryotube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรด้วย 12.5% methanol เมื่อเก็บไว้นาน 13 เดือนมีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อแปรปรวนมาก และสามารถปฏิสนธิไข่ได้ไม่ขึ้นกับระยะเวลาเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวมีค่าระหว่าง 38.7-93.4%

Poncet et al. (2003) ทำการแช่แข็งเซลล์ Hemocyte ของหอยเป่าฮือ (*Haliotis tuberculata*) โดยใช้สารโคริโอโพรเทคแทนท์ 5 รูปแบบ (20% DMSO, 20% glycerol, 20% ethylene glycol, 12% DMSO+12% glycerol และ 8% DMSO+8% glycerol+8% ethylene glycol) โดยนำเซลล์ Hemocyte มาเจือจางในสารละลาย Alsever ที่เติม anticoagulant แล้วใส่สารโคริโอโพรเทคแทนท์ ปั่นไว้ 20 นาทีและลดอุณหภูมิด้วยอัตราการลดอุณหภูมิต่างกันมาที่ -90 องศาเซลเซียสก่อนเก็บในไนโตรเจนเหลว ปรากฏว่า การใช้ 10% glycerol ให้ผลดีที่สุดในการแช่แข็งและอัตราการลดอุณหภูมิต่ำ (1 องศาเซลเซียส/นาที่) ให้ผลดีกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิต่ำอย่างรวดเร็ว (3 และ 9 องศาเซลเซียส/นาที่) ซึ่งเมื่อนำ Hemocyte มาเลี้ยงต่ออีก 2 วันแล้วประเมินการรอดชีวิตของเซลล์จากการวิเคราะห์ DNA และ โปรตีน พบว่ามีค่าเท่ากับ 83 % และ 78% ตามลำดับ รวมทั้ง metabolic activity จากการประเมิน MTT reduction assay ก็ยังมีค่าสูงถึง 96% แม้ว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ผ่านไป 6 วันการรอดชีวิตของเซลล์จะลดต่ำลง

Ieropoli et al. (2004) แช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรม (*Crassostrea gigas*) ด้วยการใช้ DMSO, ethylene glycol และ propylene glycol ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15 % พบว่า น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยการใช้ 10% ethylene glycol เป็นสารโคริโอโพรเทคแทนท์ โดยเมื่อให้อยู่ในระยะเวลาสมดุล 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง (26 องศาเซลเซียส) แล้วลดอุณหภูมิต่ำด้วยอัตรา 6 องศาเซลเซียส/นาที่ในระหว่างการแช่แข็งน้ำเชื้อ มีผลทำให้สามารถปฏิสนธิไข่และพัฒนาไปที่ระยะ D larval stage มีค่าไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้น้ำเชื้อสดผสมกับไข่ เมื่อเปรียบเทียบกับแช่แข็งด้วยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 11, 16 หรือ 21 องศาเซลเซียส/นาที่

Fabbrocini et al. (2000) แช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea bream (*Sparus aurata*) ที่เจือจางด้วย 1 % NaCl ที่มีสารโคริโอโพรเทคแทนท์ 10 % ethylene glycol, 10% propylene glycol หรือ 5% DMSO ด้วยอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา เท่ากับ 1 :6 ทำการแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 10 และ 15 องศาเซลเซียส/นาที่ มาที่อุณหภูมิต่ำสุดที่ -150 องศาเซลเซียสก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว พบว่า น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วย 5% DMSO และลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาที่ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนของสเปิร์มหลังการละลายดีที่สุด

สรุปผลการทดลอง

1. น้ำเชื้อสดของหอยเป่าฮื้อที่เก็บแช่เย็นนาน 4 ชั่วโมงยังคงมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูง แต่ น้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อที่อยู่ในน้ำทะเลมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงในระยะ 2 ชั่วโมงแรกเท่านั้น
2. การให้ออกซิเจนสมทบในระหว่างการแช่เย็นน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อ ทำให้การเก็บรักษาน้ำเชื้อ ได้นานกว่าไม่ใช้ออกซิเจนสมทบ โดย culture flask มีความเหมาะสมในการแช่เย็นน้ำเชื้อหอย เป่าฮื้อ
3. การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าฮื้อ ถูกควบคุมโดยแรงดันออสโมติกที่มีค่าสูงขึ้น
4. Calcium-free saline (Ca-F saline) เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการแช่เย็น น้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อ ในอัตราส่วนของน้ำเชื้อ : Ca-F saline ไม่เกิน 1 : 2
5. DMSO, methanol และ ethylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็น พิษต่อน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อ
6. น้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อที่แช่แข็งด้วยการใช้ 5% DMSO และอัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศา เซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสก่อนนำไปเก็บในไนโตรเจนเหลว มีการเคลื่อนที่ของ สเปิร์มหลังการละลายสูงสุด

เอกสารอ้างอิง

- กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง หลักการ/วิธีการ/ประโยชน์ . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 128 หน้า.
- สิทธิศักดิ์ เหมืองสิน. 2545. หอยเป๋าฮื้อสัตว์น้ำเศรษฐกิจตัวใหม่ของไทย. การสัมมนา Abalone Seedling And Management (for Abalone Promotion in Future). 31 มค. - 1 กพ. 45 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- คเชนทร เฉลิมวัฒน์. 2544. การเพาะเลี้ยงหอย : ภาควิชาวาริชศาสตร์ ; คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ; ชลบุรี : หน้า 211-228.
- บุญรัตน์ ประทุมชาติ. 2540. การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. ชลบุรี. หน้า 479-520.
- พลชาติ ผิวเณร และ พนม กระจ่างพจน์สอดสุข. 2546. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำในรูปน้ำเชื้อแช่แข็ง. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ. กรุงเทพฯ. 52 หน้า
- อนุวัฒน์ นทีวัฒนา และจอห์น ฮิลลิแบร์ก. 2529 . การสำรวจชนิดของหอยโข่งทะเลบริเวณเกาะภูเก็ตและความเป็นไปได้ของการเพาะเลี้ยงหอยโข่งทะเลในประเทศไทย. วารสารการประมง. 39 (2). หน้า 177.
- ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งประจวบคีรีขันธ์. 2543. การเพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อ. กรมประมง. 44 หน้า
- ธานินทร์ สิงห์ไกรวรรณ และมาซาโนริ ไดอิ . 2536. การทดลองเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อพันธุ์พื้นเมืองของไทย. ศูนย์พัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยฝั่งตะวันออก กองประมงทะเล กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. พิมพ์ครั้งที่ 1.
- Choi,Y.H and Chang, Y.J. 2004 The influence of cooling rate,developmental stage,and the addition of sugar on the cryopreservation of larvae of the pearl oyster *Pinctada fucada martensii*. Cryobiology 46: 190-193.
- Christensen, J.M. and Tiersch, T.R. 1996. Refrigerated storage of channel catfish sperm. Journal of the World Aquaculture Society 27: 340-346.
- DeGraaf, J.D., Berlinsky, D.L., 2004. Cryogenic and refrigerated storage of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) spermatozoa. Aquaculture 234: 527-540.
- Dreanno, C., Suquet, M., Quemener, L., Cosson, J., Fierville, F., Normant, Y., Billard, R. 1997. Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. Theriogenology 48: 589-603.
- Dong, Q., Eudeline, B., Huang, C., Allen, S.K. and Tiersch, T.R. 2005. Commercial-scale sperm cryopreservation of diploid and tetraploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Cryobiology 50: 1-16.
- Fabbrocini, A., Lavendera, S.L., Rispoli, S. and Sansone, G. 2000. Cryopreservation of seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. Cryobiology 40: 46-53.
- Gwo, J.C. 1995. Cryopreservation of oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. Theriogenology 43: 1163-1174.

- Gwo, J.C., Chen, Cuan-Wen and Cheng, Hsien-Yu. 2002. Semen cryopreservation of small abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*). *Theriogenology* 58: 1563-1578.
- Horváth, A. and Urbanyi, B. 2000. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved of African catfish sperm, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *Aquaculture Research* 31: 317-324.
- Ieropoli, S., Masullo, P., Santo, M. and Sansone, G. 2004. Effects of extender composition, cooling rate and freezing on the fertilization viability of spermatozoa of the Pacific oysters, (*Crassostrea gigas*). *Cryobiology* 49: 250-257.
- Jarayabhand, P. and Paphavasit, N. 1996. A review of the culture of tropical abalone with special reference to Thailand. *Aquaculture* 140: 159-168.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T. and Patzner, R.A. 1997. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquaculture Research* 28: 471-479.
- Mansour, N., Lahnsteiner, F. and Berger, B., 2004. Characterization of the testicular semen of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), and its short-term storage. *Aquaculture Research* 35: 232-244.
- Mansour, N., Richardson, G.F. and McNiven, M.A. 2006. Effect of extender composition and freezing rate on post-thaw motility and fertility of Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.), spermatozoa. *Aquaculture Research* 37: 862-868.
- McNiven, M.A., Gallant, R.K. and Richardson, G.F. 1993. Dimethyl-acetamide as cryoprotectant for rainbow trout spermatozoa. *Theriogenology* 40: 943-948.
- Morisawa, M. 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zool. Science* 2: 605-615.
- Muchlisin, Z.A., Hashim, R. and Chong, A.S.C. 2004. Preliminary study on the cryopreservation of tropical bagrid catfish (*Mystus nemurus*) spermatozoa; the effect of extender and cryoprotectant on the motility after short-term storage. *Theriogenology* 62: 25-34.
- Oakes, F.R. and Ponte, R.D. 1996. The abalone market: opportunities for cultured abalone. *Aquaculture* 140: 187-195.
- Palleroni, N.J. 1984. Family I. Pseudomonadaceae Winsloe, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1917, 555AL, Pages 141-199 in N.R. Krieg and J.G. Holt editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, volume I. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, Maryland, USA.
- Paniagua-Chavez, C.G., Buchanan, J.T. and Tiersch, T.R. 1998. Effect of extender solutions and dilution on motility and fertilizing ability of eastern oyster sperm. *Journal of Shellfish Research* 17, 231-237.

- Paniagua-Chavez, C.G. Buchanan, J.T., Supan, J.E. and Tiersch, T.R. 2000. Cryopreservation of sperm and larvae of the eastern oyster In: Cryopreservation in Aquatic Species. Tiersch, T.R. and Mazik, P.M. Editors. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. Pp. 230-239.
- Park, C. and Chapman, F.A. 2005. An extender solution for the short-term storage of sturgeon semen. *North American Journal of Aquaculture* 67: 52-57.
- Poncet, J.M., Serpentine, A., Boucaud-Comoy, E., Lebel, J.M. 2003. Influence of cryoprotective agent and cooling rate on frozen and thawed hemocytes from the Mollusk *Haliotis tuberculata*. *Cryobiology* 47: 184-189.
- Rana, K.J. and McAndrew, B.J. 1989. The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. *Aquaculture* 76: 335-345.
- Renard, P. 1991. Cooling and freezing tolerances in embryos of the Pacific Oyster, *Crassostrea gigas*. Methanol and Sucrose effects. *Aquaculture* 92: 43-57.
- Richardson, G.F., Miller, T.L. and McNiven, M.A. 2000. Cryopreservation of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L), semen in various extenders and in three sizes of straw. *Aquaculture Research* 31: 307-315.
- Rideout, R.M., Litvak, M.K., Trippel, E.A. 2003. The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents. *Aquaculture Research* 34: 653-659.
- Sansone, G., Fabbrocini, A., Ieropoli, S., Langellotti, A.L., Occidente, M. and Matassino, D. 2002. Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) spermatozoa after thawing. *Cryobiology* 44: 229-239.
- Suquet, M., Dreanno, C., Petton, B., Normant, Y., Omnes, M.H. and Billard, R. 1998. Long-time effects of the cryopreservation of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa. *Aquatic Living Resources* 11: 45-48.
- Suquet, M., Labbe, V., Brizard, R., Donval, A., Le Coz, J.R., Quere, C. and Haffray, P. 2010. Changes in motility, ATP content, morphology and fertilisation capacity during the movement phase of triploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) sperm. *Theriogenology* 74(1): 111-117.
- Tiersch, T.R., Wayman, W.R., Skapura, D.P., Neidig, C.L. and Grier, H.J. 2004. Transport and cryopreservation of sperm of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). *Aquaculture Research* 35: 278-288.
- Viveiros, A.T.M., So, N. and Komen, J. 2000. Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*: cryoprotectants, freezing rates and sperm : egg dilution ratio. *Theriogenology* 54: 1395-1408.

- Vuthipandchai, V., Chomphuthawach, S. and Nimrat, S. 2009. Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. *Theriogenology* 72: 129-138.
- Vuthipandchai, V., Nimrat, S., Kotcharat, S. and Bart, A.N. 2007. Development of a cryopreservation protocol for long-term storage of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophores. *Theriogenology* 68: 1192-1199.
- Vuthipandchai, V., Pengpun, B. and Nimrat, S. 2005. Effect of cryoprotectant toxicity and temperature sensitivity on the embryos of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture* 246: 275-284.