

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

การศึกษาผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ ต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งปลาอุกเทศ โดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ จำนวน 3 ชนิด ในสูตรสารที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลาสำหรับแช่แข็ง คือ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เมทานอล (Met) และกลีเซอรอล (Gly) โดยที่สารทั้ง 3 ชนิด ถูกใช้ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 10.0 12.5 และ 15.0 เปอร์เซ็นต์ โดยศึกษาร่วมกับทรีทเมนต์ที่เป็นตัวควบคุม (control treatment) คือน้ำเชื้อสด ซึ่งผลจากการศึกษาเปรียบเทียบโดยใช้การพัฒนาของตัวอ่อนในระยะต่างๆ ได้ผลดังนี้

#### 1. ระยะปฏิสนธิ (fertilized ovum stage)

การพัฒนาของไข่ปลาในระยะปฏิสนธิ (fertilized ovum stage) พบอัตราของไข่ที่สามารถปฏิสนธิกับอสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็ง ในอัตราสูงที่สุดคือกลุ่มที่ใช้สารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการปฏิสนธิสูงถึง 84.22 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือกลุ่มที่ใช้สารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่ระดับ 12.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (82.83 และ 78.71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบสารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ทั้ง 3 ระดับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P>0.05$ ) อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาพบอัตราการปฏิสนธิโดยใช้สารไดเมทิลซัลฟอกไซด์ที่ระดับ 12.5 และ 15 เปอร์เซ็นต์ สูงกว่าการใช้น้ำเชื้อสด (69.70 เปอร์เซ็นต์) เมทานอลที่ระดับ 12.5 และ 15 เปอร์เซ็นต์ (68.19 และ 62.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( $P<0.01$ ) นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการปฏิสนธิเพียง 52.79 เปอร์เซ็นต์ ในกลุ่มที่ใช้สารเมทานอลที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ใช้สารกลีเซอรอลที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์ (53.23 เปอร์เซ็นต์) และมีอัตราการปฏิสนธิในระดับที่ต่ำที่สุดคือใช้สารกลีเซอรอลที่ระดับ 10 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 51.46 และ 48.25 เปอร์เซ็นต์ จากผลการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าสารที่มีความเหมาะสมที่สุดและมีประสิทธิภาพในการพัฒนาของไข่ปลาในระยะปฏิสนธิ คือ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ทั้ง 3 ระดับ รองมาคือน้ำเชื้อสด เมทานอล และ กลีเซอรอล ตามลำดับ (ดังตาราง 4-1)

ตารางที่ 5 ผลการทดลองแต่ละทรีตเมนต์ที่ทำการทดลองแบบ (3 x 3) + 1

| Obs | Trt      | Rep | % Fertilized<br>Ovums | % Early<br>Blastulation | % Late<br>Blastulation | %<br>Gastrulation | % Somite | % Hatching<br>Fry |
|-----|----------|-----|-----------------------|-------------------------|------------------------|-------------------|----------|-------------------|
| 1   | FS       | 1   | 73.61                 | 83.91                   | 73.75                  | 90.12             | 48.28    | 73.02             |
| 2   | DMSO10   | 1   | 81.01                 | 69.23                   | 75.86                  | 80.43             | 75.00    | 72.60             |
| 3   | DMSO12.5 | 1   | 86.11                 | 92.31                   | 76.71                  | 85.00             | 87.04    | 83.61             |
| 4   | DMSO15   | 1   | 84.78                 | 100.00                  | 87.14                  | 72.73             | 75.34    | 86.26             |
| 5   | Meth10   | 1   | 61.43                 | 63.79                   | 42.00                  | 44.90             | 48.10    | 37.66             |
| 6   | Meth12.5 | 1   | 77.05                 | 66.04                   | 58.12                  | 58.93             | 45.53    | 37.93             |
| 7   | Meth15   | 1   | 68.00                 | 66.67                   | 53.41                  | 35.71             | 55.00    | 36.21             |
| 8   | Gly10    | 1   | 51.22                 | 54.17                   | 76.77                  | 56.18             | 42.67    | 34.67             |
| 9   | Gly125   | 1   | 41.30                 | 35.42                   | 63.10                  | 42.55             | 18.18    | 33.33             |
| 10  | Gly15    | 1   | 41.54                 | 49.37                   | 67.82                  | 49.58             | 60.00    | 51.43             |
| 11  | FS       | 2   | 68.42                 | 81.37                   | 61.00                  | 91.18             | 50.00    | 71.43             |
| 12  | DSO10    | 2   | 72.88                 | 87.50                   | 73.61                  | 77.19             | 74.65    | 77.66             |
| 13  | DSO125   | 2   | 78.57                 | 94.87                   | 91.25                  | 82.35             | 86.92    | 76.99             |
| 14  | DSO15    | 2   | 84.29                 | 90.91                   | 89.86                  | 80.82             | 88.31    | 85.44             |
| 15  | Meth10   | 2   | 44.00                 | 68.42                   | 28.17                  | 68.63             | 38.64    | 38.82             |
| 16  | Meth125  | 2   | 65.22                 | 61.54                   | 48.61                  | 35.29             | 49.57    | 40.00             |
| 17  | Meth15   | 2   | 60.00                 | 76.09                   | 44.59                  | 36.84             | 51.19    | 48.21             |
| 18  | Gly10    | 2   | 46.91                 | 69.49                   | 59.65                  | 49.22             | 38.71    | 36.67             |
| 19  | Gly125   | 2   | 48.53                 | 50.00                   | 55.07                  | 30.12             | 65.88    | 54.12             |
| 20  | Gly15    | 2   | 60.00                 | 57.50                   | 70.65                  | 54.55             | 74.47    | 48.94             |
| 21  | FS       | 3   | 67.09                 | 83.33                   | 70.79                  | 78.23             | 48.80    | 69.62             |
| 22  | DSO10    | 3   | 82.26                 | 86.21                   | 81.18                  | 83.05             | 75.82    | 63.41             |
| 23  | DSO125   | 3   | 83.82                 | 84.21                   | 88.73                  | 88.41             | 89.19    | 79.76             |
| 24  | DSO15    | 3   | 83.61                 | 89.19                   | 86.75                  | 89.61             | 88.61    | 78.65             |
| 25  | Meth10   | 3   | 52.94                 | 61.64                   | 55.17                  | 27.91             | 40.00    | 39.45             |
| 26  | Meth12.5 | 3   | 62.30                 | 54.29                   | 50.00                  | 53.33             | 50.41    | 38.60             |
| 27  | Meth15   | 3   | 60.66                 | 74.36                   | 51.28                  | 34.48             | 55.07    | 28.69             |
| 28  | Gly10    | 3   | 56.25                 | 61.29                   | 64.76                  | 39.05             | 43.71    | 36.00             |
| 29  | Gly12.5  | 3   | 54.93                 | 50.82                   | 48.48                  | 25.86             | 88.51    | 77.01             |
| 30  | Gly15    | 3   | 58.43                 | 80.36                   | 77.87                  | 57.00             | 57.50    | 43.04             |



## 2. ระยะแรกของบลาสตูล์ (early blastulation stage)

การพัฒนาตัวอ่อนปลาในระยะแรกของบลาสตูล์พบสูงที่สุดในกลุ่มที่ใช้สารไคเมทิลซัลฟอกไซด์ที่ระดับ 15.0 เปอร์เซ็นต์ (93.36 เปอร์เซ็นต์) รองมาคือที่ระดับ 12.50 เปอร์เซ็นต์ (90.46 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมีการพัฒนาตัวอ่อนปลาสูงกว่าการใช้สารไคเมทิลซัลฟอกไซด์ที่ระดับ 10.0 เปอร์เซ็นต์ การใช้น้ำเชื้อสด (82.87 เปอร์เซ็นต์) อย่างไม่มีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) แต่เมื่อเทียบกับ เมธานอล และกลีเซอรอลทั้ง 3 ระดับที่ศึกษา พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.01$ ) ดังตารางที่ 5

## 3. ระยะสุดท้ายของบลาสตูล์ (late blastulation stage)

การพัฒนาในระยะสุดท้ายของระยะบลาสตูล์ พบว่าอัตราการพัฒนาของตัวอ่อนที่เกิดจากการผสมจากน้ำเชื้อแช่แข็งร่วมกับสารประกอบไคเมทิลซัลฟอกไซด์ 12.5 และ 15 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเท่ากับ 85.56 และ 87.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยจะพบตัวอ่อนระยะสุดท้ายของบลาสตูล์สูงกว่าการใช้น้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อแช่แข็งร่วมกับเมธานอลและกลีเซอรอลในทุกๆ ระดับที่ทำการศึกษามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.01$ ) ซึ่งแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า การใช้สารไคเมทิลซัลฟอกไซด์ในระดับ 15 และ 12.5 เปอร์เซ็นต์ เสริมในน้ำเชื้อแช่แข็งมีประสิทธิภาพดีที่สุดต่อการพัฒนาการของตัวอ่อนระยะสุดท้ายของบลาสตูล์ ซึ่งดีกว่าการใช้น้ำเชื้อสด (68.51 เปอร์เซ็นต์) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.01$ ) ถึงแม้ที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ของสารไคเมทิลซัลฟอกไซด์ จะไม่มีความแตกต่างกับการใช้น้ำเชื้อสด ( $P > 0.05$ ) ก็ตาม แต่เมื่อเปรียบเทียบกันในการศึกษาทั้ง 3 ชนิด จะพบว่าสารไคเมทิลซัลฟอกไซด์มีประสิทธิภาพที่ส่งผลดีต่อการพัฒนาการของตัวอ่อนระยะสุดท้ายของบลาสตูล์สูงกว่าการใช้สารเมธานอลและกลีเซอรอล อย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.01$ ) ดังแสดงในตารางที่ 6

## 4. ระยะแกสตรูล์ (gastrulation stage)

การพัฒนาตัวอ่อนที่ระยะแกสตรูล์ (gastrulation stage) พบตัวอ่อนของปลาที่เกิดจากการผสมกับน้ำเชื้อสดและการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งร่วมกับสารไคเมทิลซัลฟอกไซด์ทั้ง 3 ระดับ สูงที่สุดและมีตัวอ่อนที่ระยะแกสตรูล์มากกว่าการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งร่วมกับสารเมธานอลและกลีเซอรอล มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ และประเด็นหนึ่งที่น่าสนใจคือเมื่อใช้สารเมธานอลและกลีเซอรอลเสริมในน้ำเชื้อแช่แข็งมีการพัฒนาการของตัวอ่อนระยะแกสตรูล์ ต่ำกว่า 50 เปอร์เซ็นต์เกือบทุกระดับที่ทำการศึกษา ยกเว้นในกลีเซอรอลที่ระดับ 15 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่พบตัวอ่อนระยะแกสตรูล์ 53.71 เปอร์เซ็นต์

### 5. ระยะลำตัวเกิดปล้อง (body segment appearance stage) หรือ โซไมต์ (somite stage)

การพัฒนาการของตัวอ่อนระยะลำตัวเกิดปล้อง ผลจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าใช้น้ำเชื้อแช่แข็งร่วมกับสารไคเมทิลซัลฟอกไซด์ทั้ง 3 ระดับคือ 10 12.5 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลในการพัฒนาการของตัวอ่อนระยะลำตัวเกิดปล้องสูงกว่าการเสริมด้วยสารอื่นๆ คือมีค่าของตัวอ่อนระยะลำตัวเกิดปล้องเท่ากับ 75.15 87.71 และ 84.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการใช้น้ำเชื้อสด (49.02 เปอร์เซ็นต์) และการเสริมด้วยสารเมธานอลและกลีเซอรอลทั้ง 3 ระดับ มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( $P < 0.01$ ) ดังตารางที่ 6

### 6. ระยะฟักออกเป็นตัว (hatching stage)

พบตัวอ่อนระยะฟักออกในระดับที่สูง เมื่อมีการใช้น้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งร่วมกับสารไคเมทิลซัลฟอกไซด์ 10 12.5 15 เปอร์เซ็นต์ มีค่าของการฟักออกของตัวอ่อนเท่ากับ 71.38 71.22 80.12 และ 83.45 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกันพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเมธานอล และกลีเซอรอลในน้ำเชื้อแช่แข็งต่อการฟักออกของตัวอ่อนจากข้อมูลจากตาราง 4-1 จะแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าเปอร์เซ็นต์การฟักออกต่ำกว่าการเสริมด้วยสารไคเมทิลซัลฟอกไซด์ทั้ง 3 ระดับ และน้ำเชื้อสด มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ( $P < 0.01$ ) โดยจะพบว่าการเสริมสารไคเมทิลซัลฟอกไซด์ที่ระดับ 12.5 และ 15 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้นที่พบการพัฒนาการตัวอ่อนในระยะฟักออกที่มีเปอร์เซ็นต์มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ แต่การเสริมสารเมธานอลทั้ง 3 ระดับ คือ 10 12.5 และ 15 เปอร์เซ็นต์ มีการฟักออกที่ต่ำมากเพียง 38.64 38.84 และ 37.70 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น