ผลของสาร extenders สาร cryoprotectants และอัตราการลดอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะ (*Pangasius bocourti*) โดยวิธีการแช่แข็ง

นางสาวสุพรรณี ไก่นิล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2553

EFFECT OF EXTENDERS, CRYOPROTECTANTS AND FREEZING RATES ON THE CRYOPRESERVATION OF MEKONG CATFISH, *PANGASIUS BOCOURTI* SPERM

Supannee Kainin

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Animal Production Technology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2010

ผลของสาร extenders สาร cryoprotectants และอัตราการลดอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะ (*Pangasius bocourti*) โดยวิธีการแช่แข็ง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

_____

(รศ. ดร.พงษ์ชาญ ณ ลำปาง)
ประธานกรรมการ

_____

(อ. ดร.สมร พรชื่นชูวงศ์)
กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

_____

(ผศ. น. สพ. ดร.บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์)
กรรมการ

_____

(ผศ. ดร.สุรินทร บุญอนันธนสาร)
กรรมการ

_____

(อ. ดร.อมรรัตน์ โมฬี)
กรรมการ

_____

(อ. ดร.วุฒิ ด่านกิตติกุล)
รักษาการแทนรองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

_____

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)
คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สุพรรณี ไก่นิล : ผลของสาร extenders สาร cryoprotectants และอัตราการลดอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะ (*Pangasius bocourti*) โดยวิธีการแช่แข็ง (EFFECT OF EXTENDERS, CRYOPROTECTANTS AND FREEZING RATES ON THE CRYOPRESERVATION OF MEKONG CATFISH, *Pangasius bocourti* SPERM) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร.สมร พรชื่นชูวงศ์, 75 หน้า.

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบผลของสาร extenders สาร cryoprotectants และอัตราการลดอุณหภูมิที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะ (*Pangasius bocourti*) โดยวิธีการแช่แข็ง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง (1) เพื่อศึกษาผลของสาร extenders และสาร cryoprotectants ต่อเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) (2) ศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ ที่มีผลต่อกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง และ (3) เพื่อผลิตปลาลูกผสม (hybrid species) โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเผาะผสมกับไข่ปลาสวาย

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของสาร extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, Calcium Free Hanks' Balance Salt Solution-C-F HBSS และ 0.9% Sodium chloride-NaCl) ร่วมกับสาร cryoprotectant 4 ชนิด (dimethyl sulfoxide-DMSO, dimethyl acetamide-DMA, methanol-MeOH และ glycerol) ที่ 3 ระดับความเข้มข้น (5, 10 และ 15%) ที่มีผลต่อกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง ใช้ Freezer control (CL 3300) เป็นตัวควบคุมการลดอุณหภูมิ โดยการบรรจุน้ำเชื้อใน straws ขนาด 250 ไมโครลิตร และเก็บรักษาน้ำเชื้อในไนโตรเจนเหลว เป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้นนำน้ำเชื้อมาละลายที่อุณหภูมิห้อง และประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งจากเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต จากการศึกษาพบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดเท่ากับ 75.33±2.50% (93% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้น้ำเชื้อสด ($P>0.05$) การใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (60% หรือ 78% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งสูงกว่าการใช้ MeOH (55% หรือ 74% ของน้ำเชื้อสด) และ glycerol (45% หรือ 63% ของน้ำเชื้อสด) อีกทั้งผลของการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (Correlation) พบว่าเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต มีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน นอกจากนี้พบว่าระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ทั้ง 3 ระดับ (5, 10 และ 15%) มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ ($P<0.05$) ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง

การทดลองที่ 2 ตรวจสอบผลของอัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ (One-step โดยการลดอุณหภูมิที่อัตรา 10 องศาเซลเซียสต่อนาที, Two-steps โดยการลดอุณหภูมิที่อัตรา 4 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก 3 ถึง -4 องศาเซลเซียส ตามด้วย 11 องศาเซลเซียสต่อนาทีจาก -4 องศาเซลเซียสถึง -80 องศาเซลเซียส และ

Three-steps โดยการลดอุณหภูมิที่อัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก 2 ถึง -7 องศาเซลเซียส ตามด้วย 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก -7 องศาเซลเซียส ถึง -30 องศาเซลเซียส และ 2 องศาเซลเซียสต่อนาทีจาก -30 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส) ร่วมกับการใช้ 10% DMSO+C-F HBSS ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง พบว่าที่อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure (10 องศาเซลเซียสต่อนาที) ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (61% หรือ 90% ของน้ำเชื้อสด) และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (65% หรือ 82% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ Two-steps หรือ Three-steps freezing procedures ($P<0.05$)

การทดลองที่ 3 ผลิตปลาลูกผสม (hybrid species) โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเผาะผสมกับไข่ปลาสวาย โดยนำผลการศึกษาที่ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดในแต่ละชนิดของสาร cryoprotectant จากการทดลองที่ 1 (10% DMSO+C-F HBSS, 10% DMA+C-F HBSS, 5% MeOH+0.9% NaCl และ 10% glycerol+Ginzburg fish ringer) ร่วมกับอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure (10 องศาเซลเซียสต่อนาที) เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง นำน้ำเชื้อเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิห้อง และนำมาผสมกับไข่ปลาสวาย ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อจากเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การการฟัก โดยพบว่าการใช้ 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (73% หรือ 93% ของน้ำเชื้อสด) และเปอร์เซ็นต์การฟัก (33% หรือ 71% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งสูงกว่าทรีตเมนต์อื่น ๆ แต่ต่ำกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อสด ($P<0.05$)

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

SUPANNEE KAININ : EFFECT OF EXTENDERS, CRYOPROTECTANTS AND FREEZING RATES ON THE CRYOPRESERVATION OF MEKONG CATFISH, *Pangasius bocourti* SPERM. THESIS ADVISOR : SAMORN PONCHUNCHOOVONG, Ph.D., 75 PP.

EXTENDER/CRYOPROTECTANT/FREEZING RATE/*Pangasius bocourti*/SPERM

The present study aimed to investigate the effect of extenders, cryoprotectants and freezing rates on the cryopreservation of Mekong catfish, *Pangasius bocourti* sperm. Three experiments were carried out : (1) the effect of extenders and cryoprotectants on fertilization, motility and viability of *P. bocourti* sperm, (2) the effect of freezing procedures on the cryopreservation of *P. bocourti* sperm; and (3) the production of hybrid species using frozen sperm from *P. bocourti* fertilized with eggs from *P. hypophthalmus*.

The first experiment was to investigate the effect of three extenders (Ginzburg fish ringer, Calcium Free Hanks' Balance Salt Solution-C-F HBSS and 0.9% Sodium chloride-NaCl) four cryoprotectants (dimethyl sulfoxide-DMSO, dimethyl acetamide-DMA, methanol-MeOH and glycerol) at three concentrations of 5, 10 and 15% on the cryopreservation of *P. bocourti* sperm. Sperm samples were frozen using a controlled-rate freezer (CL 3300) in 250 μL straws and stored for two days in a liquid nitrogen container. They were then thawed at room temperature, and fertilization, motility and viability rates were assessed. The highest fertilization rate of 75.33±2.50% (93% of control) was achieved with a combination of 10% DMSO and C-F HBSS. This was not significantly different from the control (fresh sperm; $P>0.05$). Dimethyl acetamide (DMA) as cryoprotectant had a higher fertilization rate (60% or 78% of the control) than either methanol (55% or 74% of the control) or glycerol (45% or 63% of the control). There were positive correlations between the fertilization, motility and viability rates. In addition, the three concentrations used (5, 10

and 15%) affected fertilization rates after the cryopreservation with each cryoprotectant $P<0.05$.

The second experiment was to investigate the effect of three freezing procedures (one-step, 10°C min^{-1}, two-steps, 4°C min^{-1} from 3 to -4°C followed by 11°C min^{-1} from -4°C to -80°C and three-steps freezing procedures, 5°C min^{-1} from 2 to -7°C, followed by 3°C min^{-1} from -7°C to -30°C and 2°C min^{-1} from -30°C to -80°C) on the cryopreservation of *P. bocourti* sperm. The combination of 10% DMSO and C-F HBSS was used for cryopreservation of *P. bocourti* sperm. A one-step freezing procedure (10°C min^{-1}) yielded a higher fertilization rate 61% or 90% of control and viability rate 65% or 82% of control than that of the two-steps or three-step freezing procedures ($P<0.05$).

The third experiment was to produce hybrid species using frozen sperm from *P. bocourti* to fertilize eggs from *P. hypophthalmus*. The highest fertilization rate in each cryoprotectant from the first experiment (10% DMSO+C-F HBSS, 10% DMA+C-F HBSS, 5% MeOH+0.9% NaCl and 10% glycerol+Ginzburg fish ringer) with the one-step freezing procedure (10°C min^{-1}) were used for cryopreservation of *P. bocourti* sperm. After being stored for two days in a liquid nitrogen container, sperm samples were thawed at room temperature and fertilized with eggs from *P. hypophthalmus*. Fertilization and hatching rates of hybrid species were assessed. The highest fertilization rate was 73% or 93% of control and the hatching rate 33% or 71% of control was achieved with a combination of 10% DMSO and C-F HBSS. These were significantly higher than other treatments, but lower than the control (fresh sperm; $P<0.05$).

School of Animal Production Technology — Student's Signature _____

Academic Year 2010 — Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature_____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลืออย่างดียิ่ง ทั้งด้านวิชาการและด้านการดำเนินงานวิจัย จากบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ได้แก่

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.สมร พรชื่นชูวงศ์ อาจารย์ประจำสาขาเทคโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. บัญชร ลิขิตเดชาโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้โอกาสทางการศึกษา ให้คำแนะนำปรึกษา ช่วยแก้ปัญหา และให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอด รวมทั้งช่วยตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ คุณอรรณพ อิ่มศิลป์ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด หนองคาย คุณสมบัติ สิงห์สี หัวหน้าสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม คุณอุไรวรรณ เปียสูงเนิน คุณสุขสันต์ ปิยะนันท์ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ประจำสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดสกลนคร และศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดยโสธร ทุก ๆ ท่าน ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์พ่อ-แม่พันธุ์ปลา และสถานที่ในการทดลองวิจัย ตลอดจนให้คำแนะนำปรึกษามาโดยตลอด

ขอกราบขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่สนับสนุนทุนวิจัย และบุคคลากรประจำเครื่องมือ 3 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการใช้อุปกรณ์เครื่องมือต่าง ๆ

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้กับบิดา มารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ข้าพเจ้าตลอดมา จนทำให้ประสบความสำเร็จในชีวิต

สุพรรณี ไก่นิล

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย) ..... ก

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ) ..... ค

กิตติกรรมประกาศ ..... จ

สารบัญ ..... ฉ

สารบัญตาราง ..... ฌ

สารบัญรูป ..... ฎ

บทที่

1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการทำวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 3

1.3 สมมุติฐานของงานวิจัย 3

1.4 ขอบเขตของการวิจัย 4

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

2 ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

2.1 ชีววิทยาปลาเผาะ 5

2.2 ชีววิทยาการแช่แข็ง 7

2.3 ผลของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง 7

2.4 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง 13

2.5 การผลิตปลาลูกผสม (ลูกปลาสวายโมง) โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง 18

3 วิธีการดำเนินการวิจัย 20

3.1 วัสดุและอุปกรณ์ 20

3.2 สารเคมี 21

3.3 การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลาเผาะ 22

3.4 การฉีดฮอร์โมนพ่อแม่พันธุ์ปลาเผาะ 22

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5 การศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อปลา 23
3.5.1 การศึกษาคุณลักษณะของน้ำเชื้อและองค์ประกอบของอิออนชนิดต่าง ๆ ในน้ำเชื้อปลาเผาะ 23
3.5.2 การศึกษาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ 24
3.5.3 การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อ 24
3.5.4 การศึกษาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต 25
3.5.5 การศึกษาเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ 27
3.6 การทดลองที่ 1 ศึกษาชนิดของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง 28
3.7 การทดลองที่ 2 ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง 33
3.8 การทดลองที่ 3 การผลิตปลาลูกผสม (hybrid species) โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเผาะผสมกับไข่ปลาสวาย 35
4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล 37
4.1 ผลของคุณลักษณะของน้ำเชื้อและองค์ประกอบของอิออนชนิดต่าง ๆ ในน้ำเชื้อปลาเผาะ 37
4.2 ผลของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่มีผลต่อ การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง 38
4.3 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง 44
4.4 การผลิตปลาลูกผสม (hybrid species) โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเผาะผสมกับไข่ปลาสวาย 46
5 การอภิปรายผล สรุป และข้อเสนอแนะ 48
5.1 ผลของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็งแข็ง 48
5.2 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rates) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง 52

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.3 การผลิตปลาลูกผสม (hybrid species) โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเผาะผสมกับไข่ปลาสวาย 54
5.4 สรุปผลการทดลอง 55
5.5 ข้อเสนอแนะ 55
รายการอ้างอิง 56
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก ตารางวิเคราะห์วาเรียนซ์ 63
ประวัติผู้เขียน 75

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 ค่าอิออน ออสโมลาลิตี้ และค่า pH ของของเหลวในน้ำเชื้อปลา 8

2.2 สาร cryoprotectant และสาร extender ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งในปลากลุ่ม catfish 11

2.3 อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งในกลุ่มปลาทะเล. 14

2.4 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา African catfish โดยวิธีการแช่แข็ง 16

3.1 หลักเกณฑ์การสังเกตเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ 24

3.2 ส่วนประกอบของสีย้อม eosin-nigrosin 25

3.3 ส่วนประกอบทางเคมี ออสโมลาลิตี้ และ pH ของสาร extenders ที่ใช้ในการศึกษา 29

3.4 แผนการทดลองผลของสาร extenders 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants 3 ระดับ (5, 10 และ 15%) 30

3.5 แผนการทดลองผลของอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure (6, 8 และ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที) 34

3.6 แผนการทดลองผลของอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step, Two-steps และ Three-steps freezing procedures โดยใช้สาร 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS 35

3.7 แผนการทดลองการผลิตปลาลูกผสม (hybrid species) โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเผาะผสมกับไข่ปลาสวาย 36

4.1 ปริมาตร ความเข้มข้น ส่วนประกอบอิออน ค่าออสโมลาลิตี้ และค่า pH ในน้ำเชื้อปลาเผาะ 37

4.2 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) ในสาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับการใช้ DMSO เป็นสาร cryoprotectant ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15% 39

4.3 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) ในสาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับการใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15% 40

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.4 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) ในสาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับการใช้ MeOH เป็นสาร cryoprotectant ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15% 41

4.5 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) ในสาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับการใช้ Glycerol เป็นสาร cryoprotectant ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15% 42

4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของชนิดสาร cryoprotectants 43

4.7 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) ที่อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure (6, 8 และ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที) 45

4.8 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) ที่อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step, Two-steps และ Three-steps freezing procedures โดยใช้สาร 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS 46

4.9 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การฟัก เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต ของการผลิตปลาลูกผสม โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเผาะผสมกับไข่ปลาสวาย 47

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1.1 ข้อมูลการนำเข้าเนื้อปลาเผาะแช่แข็ง (Frozen catfish) ในรูป fillet จากประเทศต่าง ๆ ของประเทศสหรัฐอเมริกา 2

2.1 ลักษณะภายนอกของปลาเผาะเพศเมีย (ก) และปลาเผาะเพศผู้ (ข) 6

2.2 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นขณะลดอุณหภูมิในวิธีการแช่แข็งรูปหกเหลี่ยมแสดงขนาดและจำนวนเกล็ดน้ำแข็ง 14

3.1 แสดงการฉีดฮอร์โมนบริเวณใต้ครีบหลังเหนือเส้นข้างลำตัว (ก) และการรีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ปลาเผาะ (ข) 22

3.2 แสดงการตรวจสอบความสมบรูณ์พันธุ์ของแม่พันธุ์โดยการใช้ Flexible Catheter ดูดไข่ (ก) และการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไข่ด้วยเวอร์เนียมิเตอร์ (ข) 23

3.3 แสดงสไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (ก) และบริเวณที่นับจำนวนอสุจิทั้ง 5 บริเวณ (ข) 25

3.4 แสดงอสุจิมีชีวิตมีลักษณะสีขาว และอสุจิตายจะติดสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้ม เมื่อย้อมด้วยสี eosin–nigrosin ภายใต้กล้องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า 26

3.5 แสดงการผูกกระชังผ้าไนลอน (ก) และกระชังผ้าไนลอนสำหรับเพาะฟักไข่ปลาเผาะ (ข) 27

3.6 แผนภาพแสดงกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง 28

3.7 ชุดควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง โดยมี Freezer control (CL 3300) ร่วมกับโปรแกรม Cryogenesis 31

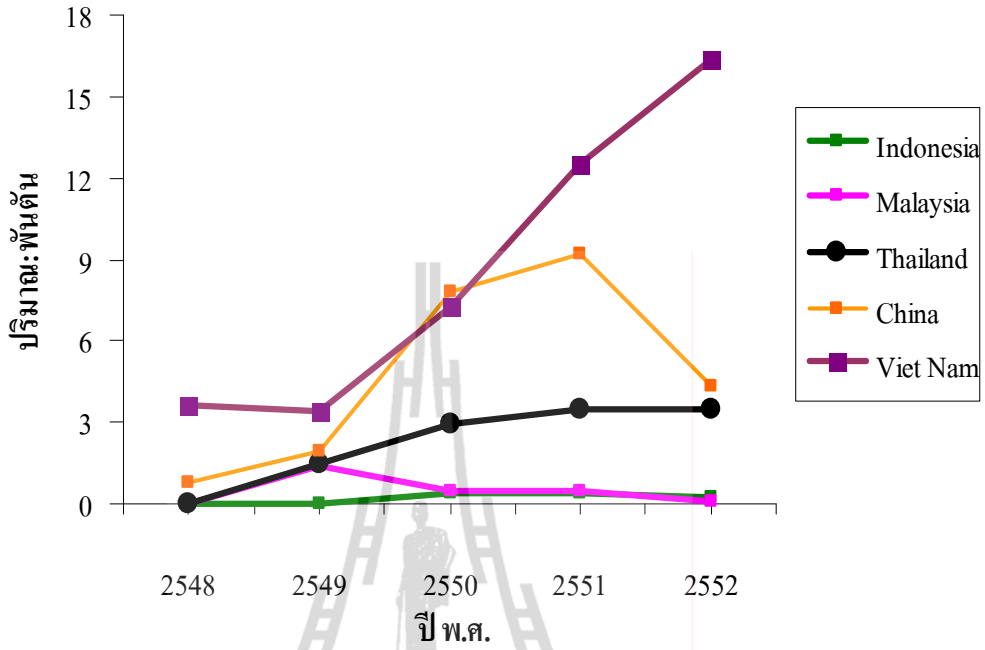
3.8 แสดงการเติมไนโตรเจนเหลวลงใน cryochamber (ก) จากนั้นนำตัวอย่างน้ำเชื้อที่ load ใส่ straw เรียบร้อยแล้วใส่ใน cryochamber (ข) 31

3.9 แสดงอุณหภูมิที่ Freezer control ถึง -80 องศาเซลเซียส (ก) และนำตัวอย่างน้ำเชื้อไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส, ข) 32

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการทำวิจัย

ปัจจุบันประชากรโลกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจาก 6,070.6 ล้านคนในปี 2543 เป็น 7,851.4 ล้านคนในปี 2568 ในขณะที่ประชากรไทยก็มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันจาก 62.2 ล้านคนในปี 2543 เป็น 72.3 ล้านคนในปี 2568 (กระทรวงเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร สำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2547) เมื่อประชากรเพิ่มขึ้นทำให้ความต้องการอาหารเพิ่มขึ้น ปลาจึงเป็นสัตว์น้ำประเภทหนึ่งที่ประชากรโลกมีความต้องการในปริมาณที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากปลาจัดเป็นอาหารโปรตีนที่สามารถทดแทนโปรตีนจากเนื้อสัตว์บกในยามที่ขาดแคลนเนื้อสัตว์บกหรือมีราคาแพง (สุภาพร สุกสีเหลือง, 2542) แต่ในขณะเดียวกันกลับพบว่าปริมาณปลาที่จับได้ในธรรมชาติลดน้อยลง เนื่องมาจากปริมาณการจับมากเกินไป การตื้นเขินของแหล่งน้ำ การทำประมงผิดกฎหมายและการเจริญเติบโตของบ้านเมือง ตลอดจนการขยายตัวทางด้านอุตสาหกรรมทำให้เกิดความเสื่อมโทรมแก่แหล่งน้ำธรรมชาติ (วิฑูรย์ ปัญญากุล, 2547) ดังนั้นการพัฒนาและส่งเสริม การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจึงมีส่วนช่วยเพิ่มปริมาณสัตว์น้ำที่มีแนวโน้มลดลงให้มีปริมาณมากขึ้น ทั้งนี้ไม่เพียงแต่จะได้อาหารไว้ใช้ประโยชน์สำหรับการบริโภคของประชากรภายในประเทศเท่านั้น แต่ยังช่วยให้เกิดงานและอาชีพที่จะผลิตสัตว์น้ำเพื่อการส่งออกไปจำหน่ายในตลาดต่างประเทศ เป็นการลดดุลการค้า และช่วยภาวะเศรษฐกิจของประเทศอีกด้วย (โชคชัย เหลืองธุวปราณีต, 2548) สำหรับปลาเผาะ (*Pangasius bocourti*) ประเทศไทยเริ่มมีการสนับสนุนการเลี้ยงปลาเผาะ ภายใต้การสนับสนุนและร่วมมือจากหน่วยงานต่าง ๆ ทั้งภาครัฐและเอกชน ได้แก่ 1) สถาบันอาหาร 2) กรมประมง 3) สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ และ 4) ภาคเอกชน จัดทำโครงการพัฒนาสัตว์น้ำเศรษฐกิจชนิดใหม่ของไทยเพื่อการส่งออก เพื่อสนับสนุนนโยบายของรัฐบาลในการแก้ไขปัญหาและเพิ่มมูลค่าการส่งออกให้กับประเทศ โดยปลาเผาะเป็นปลาน้ำจืดของไทยมีถิ่นกำเนิดในลุ่มน้ำเจ้าพระยาและลุ่มน้ำโขง เป็นปลาที่ได้รับความนิยมบริโภคในตลาดท้องถิ่นภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ปัจจุบันมีการเลี้ยงกันมากในแถบสามเหลี่ยมปากแม่น้ำโขงของประเทศเวียดนามและเป็นประเทศหลักที่ส่งออกปลาเผาะไปยังประเทศแถบยุโรปและประเทศสหรัฐอเมริกา โดยมีปริมาณการส่งออก 3.6 พันตันในปี 2548 และเพิ่มขึ้นเป็น 16.4 พันตันในปี 2552 สำหรับประเทศไทยเริ่มส่งออกในปี 2549 จำนวน 1.5 พันตัน และเพิ่มขึ้นเป็น 3.5 พันตันในปี 2552 ดังแสดงในภาพที่ 1.1



ภาพที่ 1.1 ข้อมูลการนำเข้าเนื้อปลาเผาะแช่แข็ง (Frozen catfish) ในรูป fillet จากประเทศต่าง ๆ ของประเทศสหรัฐอเมริกา (FAO Globefish, 2010)

สาเหตุที่ปลาเผาะได้รับความนิยมจากผู้บริโภคในแถบยุโรปและประเทศสหรัฐอเมริกาเพราะเนื้อปลามีสีขาวน่ารับประทาน อีกทั้งในอนาคตอาจมีตลาดใหม่เพิ่มขึ้นในประเทศรัสเซียและตลาดเอเชีย ส่งผลให้ปลาเผาะมีมูลค่าเพิ่มมากขึ้น โดยปัจจุบันราคาปลาเผาะส่งออกประเทศสหรัฐอเมริกากิโลกรัมละ 105 บาท ส่วนในประเทศไทยปลาเผาะมีราคา 50 บาทต่อกิโลกรัม ทำให้ธุรกิจการเพาะพันธุ์ปลาเผาะจึงเป็นที่น่าสนใจและเริ่มมีการเลี้ยงปลาเผาะในแม่น้ำโขงแถบจังหวัดหนองคายและแพร่หลายมากขึ้นในแถบอำเภอท่าอุเทน จังหวัดนครพนม และขยายสู่แม่น้ำสงคราม แต่ในการผลิตปลาเผาะก็ยังคงไม่เพียงพอต่อความต้องการ เนื่องมาจากปลาเผาะมีช่วงสืบพันธุ์ไม่ตรงกันระหว่างปลาเพศผู้ (ช่วงเดือนมีนาคมถึงเมษายน) และปลาเพศเมีย (ช่วงเมษายนถึงพฤษภาคม) โดยเพศผู้จะเจริญพันธุ์เร็วกว่าเพศเมีย (เจริญ อุดมการ และ สมบัติ สิงห์สี, 2547) ในสภาพการเลี้ยงที่ผ่านมาเกษตรกรนิยมรวบรวมลูกปลาจากธรรมชาติเพื่อนำมาเลี้ยงในกระชังบริเวณริมฝั่งแม่น้ำโขง แต่ปัจจุบันการรวบรวมลูกปลาทำได้ลำบาก และมีปริมาณไม่เพียงพอกับความต้องการ อีกทั้งแม่ปลาเผาะมีปริมาณไข่น้อย โดยแม่ปลาเผาะขนาดน้ำหนัก 6.3 กิโลกรัม มีความดกไข่เฉลี่ย 45,840 ฟองหรือเฉลี่ย 7,236 ฟองต่อ กิโลกรัม (วรัญญู ขุนเจริญ, โสภิศ ไชยยาว และ สุพัตร์ ศรีพัฒน์, 2549) ด้วยสาเหตุดังกล่าวจึงมีการผลิตปลาลูกผสมสวายโมงขึ้น ซึ่งเป็น พันธุ์ปลาที่เกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างพ่อพันธุ์ปลาเผาะ และแม่พันธุ์ปลาสวาย (*Pangasius-hypophthalmus*) เพื่อแก้ไขปัญหาลูกพันธุ์ไม่เพียงพอ เนื่องจากแม่ปลาสวายสามารถให้ไข่ได้จำนวนมาก โดยแม่ปลาสวายขนาดน้ำหนัก 6 กิโลกรัม มีความดกไข่เฉลี่ย 50,000 ฟองต่อกิโลกรัม (Michael, 2006) เมื่อเทียบกับแม่ปลาเผาะแล้ว แม่ปลาสวายจะมีความดกไข่สูงกว่าประมาณ 6.9 เท่า

ด้วยเหตุนี้การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ซึ่งช่วยแก้ปัญหาดังกล่าวข้างต้นได้ โดยปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแช่แข็งได้แก่ 1) สาร Extender เป็นสารที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อ และยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่และลดการใช้พลังงานของตัวอสุจิ 2) สาร cryoprotectant เป็นสารที่มีหน้าที่ป้องกันเซลล์ถูกทำลายในระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการละลาย ซึ่งสามารถช่วยให้เซลล์รอดชีวิตภายหลังการแช่แข็ง และยังขึ้นอยู่กับ 3) อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในระหว่างขบวนการแช่แข็งด้วย ทั้งนี้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งยังมีประโยชน์ด้านอื่นอีก โดยเฉพาะด้านการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์น้ำ และเป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะช่วยในการผลิตปลาข้ามสายพันธุ์เพื่อประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และในระดับอุตสาหกรรมต่อไป ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง เพื่อหาชนิดของสาร extenders ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectants และอัตราการลดอุณหภูมิ ที่เหมาะสมสำหรับน้ำเชื้อปลาเผาะ และผลิตปลาลูกผสม (hybrid species) โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเผาะผสมกับไข่ปลาสวาย

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาชนิดของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง

1.2.2 เพื่อศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง

1.2.3 เพื่อผลิตปลาลูกผสม (hybrid species) โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเผาะผสมกับไข่ปลาสวาย

1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

1.3.1 ชนิดของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่ใช้ในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งมีผลต่อคุณภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา

1.3.2 อัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่ใช้ในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งมีผลต่อกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง

1.3.3 น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเผาะสามารถนำไปผสมกับไข่ปลาสวายเพื่อผลิตปลาลูกผสม (hybrid species) ได้

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ได้มุ่งเน้นเพื่อศึกษาชนิดของสาร extenders ร่วมกับชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants และอัตราการลดอุณหภูมิ ที่มีผลต่อกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง และสามารถผลิตปลาลูกผสม (hybrid species) โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเผาะผสมกับไข่ปลาสวาย โดยประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (motility) เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (viability) และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (fertilization)

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบถึงเทคนิคและวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็งเพื่อแก้ปัญหาในปลาเพศผู้ที่มีความสมบรูณ์พันธุ์ก่อนปลาเพศเมีย อีกทั้งช่วยพัฒนาธุรกิจการเพาะเลี้ยงปลาเผาะ

1.5.2 สามารถนำเทคนิคและวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะไปประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาชนิดอื่น ๆ ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มปลาที่ใกล้จะสูญพันธุ์

1.5.3 สามารถผลิตปลาลูกผสม (สวายโมง) โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเผาะผสมกับไข่ปลาสวายเพื่อการเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววิทยาปลาเผาะ

ปลาเผาะ (*Pangasius bocourti* Sauvage, 1880) พบกระจายพันธุ์ในเขตประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นจำนวนมาก (เวียดนาม กัมพูชา สาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว เป็นต้น) ในประเทศไทยพบมากในแม่น้ำเจ้าพระยาและแม่น้ำโขง ในแม่น้ำโขงพ่อแม่ปลาจะอพยพขึ้นไปเหนือน้ำเพื่อวางไข่ แหล่งวางไข่อยู่ระหว่างประเทศไทย-ลาว และจะวางไข่ในช่วงต้นฤดูฝน (Rainboth, 1996) ซึ่งในแถบจังหวัดนครพนม มุกดาหาร เรียกว่า ปลาเผาะ จังหวัดหนองคาย อุดรธานี เรียกว่า ปลายาง ภาคกลางเรียกว่า ปลาอ้ายด้อง ภาคเหนือเรียกว่า ปลาโมง โดยพ่อแม่พันธุ์ปลาเผาะในปัจจุบันได้มาจากวิธีรวบรวมปลาเผาะอายุ 1 ปีจากธรรมชาติมาเลี้ยง โดยพ่อแม่ปลาเจริญพันธุ์เมื่ออายุ 4 ปี แม่ปลามีน้ำหนัก เฉลี่ย 6.4 กิโลกรัม ความยาวเฉลี่ย 75 เซนติเมตร และพ่อปลาจะมีน้ำหนัก เฉลี่ย 4.8 กิโลกรัม ความยาวเฉลี่ย 69 เซนติเมตร โดยปกติไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเพศโดยดูจากลักษณะภายนอกได้ แต่ในช่วงฤดูผสมพันธุ์ปลาเผาะเพศเมียจะมีส่วนท้องอูมกว่าปลาเผาะเพศผู้ อีกทั้งปลาเพศผู้จะมีลำตัวที่ยาวเรียวกว่าเพศเมีย (ดังภาพที่ 2.1) ทั้งนี้เพื่อความถูกต้องชัดเจนจึงใช้วิธีรีดดูน้ำเชื้อในปลาเพศผู้ ส่วนปลาเพศเมียนั้นใช้ Flexible Catheter หรือใช้สายยางเล็ก ๆ ดูดไข่เพื่อวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไข่ก่อนฉีดฮอร์โมนกระตุ้น ซึ่งปลาเผาะสามารถจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานได้ดังนี้ (Tyson, 1991)

Phylum Chordata

Class Actinopterygii

Order Siluroidei

Family Pangasiidae

Genus *Pangasius*

Species *Pangasius bocourti*

ก. ปลาเผาะเพศเมีย ข. ปลาเผาะเพศผู้

ภาพที่ 2.1 ลักษณะภายนอกของปลาเผาะเพศเมีย (ก) และปลาเผาะเพศผู้ (ข)

ปลาเผาะเป็นปลาตระกูลเดียวกับปลาสวาย ลักษณะทั่วไปของปลาเผาะ ลำตัวตอนล่างค่อนข้างกลม มีความยาวมาตรฐานมากกว่าความลึกลำตัวประมาณ 3.4-5.2 เท่า ส่วนหัวกลมมน ส่วนท้องไม่มีสัน รูปร่างป้อม ท้องอูม และแบนข้างเล็กน้อย ครีบไขมันเล็ก ส่วนบนของลำตัวจะมีสีดำปนเทาส่วนท้องมีสีขาวอมเหลือง อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำไหลที่มีออกซิเจนที่ละลายน้ำสูง โดยเฉพาะในแม่น้ำโขง จะพบมากในช่วงเดือนมีนาคม ถึง มิถุนายนของทุกปี ไข่ปลาเผาะเป็นไข่ติดจมน้ำ มีลักษณะกลม สีขาวอมเหลือง ปลาวัยอ่อนมีสีเทาเหลือบเหลืองหรือเขียวอ่อน ข้างลำตัวมีแถบคล้ำ ครีบอกมีแต้มสีจาง ปลาตัวเต็มวัยมีสีเทาอมน้ำตาลอ่อนหรือฟ้าอ่อน ท้องสีขาว ครีบหางมีแถบสีคล้ำจาง นอกจากนี้ลักษณะเด่นของปลาเผาะที่แสดงถึงความแตกต่างจากปลาชนิดอื่นในตระกูลเดียวกันนั้น นอกจากส่วนหัวที่กลมมนกว่า และเมื่อลองสัมผัสดูจะพบว่าปลาเผาะมีเมือกเหนียวเป็นจำนวนมากบริเวณลำตัว (วิวัฒน์ ปรารมณ์ และ ชัยศิริ ศิริกุล, 2538; ชวลิต วิทยานนท์, 2544) ปลาเผาะมีช่วงสืบพันธุ์ไม่ตรงกันระหว่างปลาเพศผู้ (ช่วงเดือนมีนาคมถึงเมษายน) และปลาเพศเมีย (ช่วงเมษายนถึงพฤษภาคม) โดยปลาเพศผู้จะเจริญพันธุ์เร็วกว่าเพศเมีย ในสภาพการเลี้ยงที่ผ่านมาเกษตรกรนิยมรวบรวมลูกปลาจากธรรมชาติเพื่อนำมาเลี้ยงในกระชังบริเวณริมฝั่งแม่น้ำโขง แต่ปัจจุบันการรวบรวมลูกปลาทำได้ลำบาก และมีปริมาณไม่เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกร ดังนั้นเพื่อให้การพัฒนาของธุรกิจการเพาะเลี้ยงปลาเผาะซึ่งกำลังเป็นที่นิยมและแพร่หลายมากขึ้นและให้มี

ความต่อเนื่อง จึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีลูกพันธุ์ปลาจำนวนเพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภค ด้วยเหตุนี้เทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะแก้ปัญหาสำหรับปลาชนิดนี้ (ซึ่งมีไข่และน้ำเชื้อสุกไม่พร้อมกัน) เพราะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในสภาพแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวเพื่อรอความอุดมสมบรูณ์ของไข่จากปลาเพศเมีย

2.2 ชีววิทยาการแช่แข็ง

ชีววิทยาการแช่แข็ง (cryobiology) มีความสำคัญและประโยชน์สำหรับการเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์และตัวอ่อน เพื่อการศึกษาวิจัยหรือสำรองไว้เป็นคลังอวัยวะ เพื่อประโยชน์สำหรับการใช้ในอนาคต ส่วนประกอบสำคัญสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งประกอบไปด้วย 1) สาร Extender เป็นสารที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อก่อนการเก็บรักษาเพื่อไม่ให้น้ำเชื้อมีความเข้มข้นมากเกินไป อีกทั้งยังมีบทบาทเป็นแหล่งพลังงานให้กับตัวอสุจิ และช่วยยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่ให้กับตัวอสุจิ 2) สาร Cryoprotectant เป็นสารที่มีหน้าที่ป้องกันเซลล์ถูกทำลายในระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการละลาย ซึ่งสามารถช่วยให้เซลล์รอดชีวิตภายหลังการแช่แข็ง 3) อัตราการลดอุณหภูมิและอัตราการละลาย (Freezing rate and thawing rate) น้ำเชื้อปลาแต่ละชนิดต้องการอัตราการลดอุณหภูมิและอัตราการละลายที่เหมาะสมแตกต่างกันออกไป 4) ชนิดและขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อ (Volume, Size and Type of container) มีหลายแบบได้แก่ แบบหลอดฟาง (French straw) หรือหลอดไครโอ (cryotube) เป็นต้น

2.3 ผลของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง

สาร extender เป็นสารที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อและรักษาคุณสมบัติและการทำงานของเซลล์อสุจิตลอดจนเป็นสารป้องกันอันตรายจากความเย็นและการแช่แข็ง และยังเป็นแหล่งพลังงานให้กับตัวอสุจิ เป็นตัวปรับความเป็นกลางจากขบวนการเมตาบอลิซึมของอสุจิ และช่วยรักษาความดันออสโมติก หลักในการเลือกสาร extender นั้นควรเลือกสารที่มีค่าออสโมลาลิตี้ (Osmolality) ใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเชื้อปลา (seminal fluid) ทั้งนี้เพื่อป้องกันการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อ ปลาแต่ละกลุ่มมีค่าออสโมลาลิตี้แตกต่างกันเช่น 280-300 mOsm kg^{-1} สำหรับกลุ่มปลาน้ำจืด และ 200-300 mOsm kg^{-1} สำหรับปลาน้ำเค็ม (Wayman and Tiersch, 2000) ในการเตรียม extender นอกจากจะมีค่าออสโมลาลิตี้ใกล้เคียงกันแล้วยังต้องมีค่าอิออนต่าง ๆ ใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเชื้อปลาอีกด้วย ตัวอย่าง ค่าอิออน ออสโมลาลิตี้ และค่า pH ที่วัดได้ใน seminal fluid ของปลาบึก (Mekong giant catfish) และปลาสวาย (Striped catfish) ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ค่าอิออน ออสโมลาลิตี้ และค่า pH ของของเหลวในน้ำเชื้อปลา

	Mekong giant catfish		Striped catfish	
	Blood serum	**Seminal plasma**	**Blood serum**	**Seminal plasma**
mOsm kg^{-1}	232±1.7	267±4.5	273±1	264±3
pH	7.5±0.3	8.2±0.8	7.1±0.5	8.3±0.6
Ca^{++} (M)	3.5±3.2	0.78±1.1	ND	ND
K^{+} (M)	ND	ND	0.01±0.01	0.01±0.01
Cl^{-} (M)	0.22	0.76±10.4	0.03±0.03	0.93±0.54
Na^{+} (%)	1.52	0.43±0.06	1.67±0.56	1.51±0.56

ที่มา: Mongkonpunya, pupipat and Tiersch (2000); ND = not detected,

จากการศึกษาที่ผ่านมาชนิดของสาร extender ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลามีความแตกต่างกันไปในแต่ละชนิดปลา จากรายงานการศึกษาของ Kwantong and Bart (2003) ที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งในปลาสวาย (Striped catfish, *Pangasius hypophthalmus*) โดยศึกษาผลของสาร HBSS (Hanks' balanced salt solution), C-F HBSS (Calcium-free Hanks' Balanced Salt Solution) และ 0.9% NaCl (Sodium chloride) ร่วมกับสาร cryoprotectant พบว่าเมื่อใช้สาร extender ทั้ง 3 ชนิด (HBSS, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ แต่ให้ผลต่ำแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้น้ำเชื้อสด ($P<0.05$) ยกเว้นการใช้ร่วมกับ DMSO ที่ความเข้มข้น 8, 10, 12% ให้ผลของอัตราการปฏิสนธิที่ไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด ($P>0.05$) เช่นเดียวกับจากการศึกษาของ Mongkonpunya et al. (2000) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะสั้นในปลาสวาย และปลาบึก (Mekong giant catfish, *Pangasianodon gigas*) ศึกษาผลของสาร BCB (Bicarbonate Buffer), C-F HBSS และ 0.9% NaCl พบว่าในปลาบึก เมื่อใช้ C-F HBSS และ 0.9% NaCl ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน และในปลาสวายเมื่อใช้ C-F HBSS และ 0.9% NaCl มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดเท่ากับ 10±5% และ 27±8% ตามลำดับ และจากการศึกษาของ Kwantong and Bart (2006) ได้นำเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งในปลาสวายไปทดลองและศึกษาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ (Black ear catfish, *Pangasius larnaudii*) ได้ผลการศึกษาเช่นเดียวกับปลาสวายคือการใช้ 10% DMSO ร่วมกับ 0.9% NaCl ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงกว่าการใช้ 10% DMA ร่วมกับ C-F HBSS และ 5% MeOH ร่วมกับ 0.9% NaCl แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และจากการศึกษาของ Viveiros, So, and Komen (2000) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งในปลาดุกยักษ์ (African catfish, *Clarias gariepinus*) โดยใช้ Ginzburg

fish ringer เป็นสาร extender ร่วมกับ 5, 10, 15, 20, 25% DMSO หรือ MeOH พบว่าให้ผลของเปอร์เซ็นต์การฟักไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้น้ำเชื้อสด (P>0.05) เช่นเดียวกับการศึกษา Viveiros, Lock, Woelders, and Komen (2001) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งในปลาชนิดเดียวกัน โดยใช้ Ginzburg fish ringer เป็นสาร extender ร่วมกับ 10% MeOH โดยดูอัตราการลดอุณหภูมิที่ต่างกัน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การฟักไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้น้ำเชื้อสด (P>0.05)

สาร cryoprotectant เป็นสารที่มีหน้าที่ป้องกันเซลล์ถูกทำลายในระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการละลายซึ่งสามารถช่วยให้เซลล์รอดชีวิตภายหลังการแช่แข็งซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ

1) ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ (permeating cryoprotectant) คือ สารเคมีที่จำต้องซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายไม่ให้เกิดขณะแช่แข็งและละลาย ตัวอย่างสารเคมีกลุ่มนี้ ได้แก่ dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol, methanol (MeOH) และ dimethyl acetamine (DMA) เป็นต้น

2) ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ (non-permeating cryoprotectant) คือสารเคมีที่ออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่นอกเซลล์ และใช้ได้ผลดีที่ความเข้มข้นต่ำกว่าพวกแรก (0.01-0.2) ตัวอย่างสารเคมีกลุ่มนี้ได้แก่ sucrose, polymers, starch และ proteins (egg-yolk and skim milk) เป็นต้น (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

ซึ่งสาร cryoprotectant จะมีผลกระทบต่อคุณสมบัติของของเหลวทั้งภายในและภายนอกเซลล์ เมื่อเติมสาร cryoprotectant จะเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเหลวช่วยให้เซลล์รอดชีวิตภายหลังการแช่แข็งได้ เนื่องจาก 1) ป้องกันเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ เนื่องจากการลดอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง ส่งผลให้ของเหลวที่อยู่รอบเซลล์และภายในเซลล์ ทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์และนอกเซลล์ได้ ทำให้เซลล์สูญเสียน้ำจนทำให้ของเหลวภายในเซลล์มีความเข้มข้นสูงจนเป็นอันตรายต่อเซลล์ได้ (ปริมาณน้ำในเซลล์มากเกิดผลึกมากซึ่งเป็นผลเสียต่อเซลล์) 2) ป้องกันการลดขนาดของเซลล์ อันเนื่องมาจากความไม่สมดุลของเกลือแร่และอิเล็คโทรไลท์ เช่น glycerol ช่วยปรับเปลี่ยนความสมดุลของ Na^+ จากภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ โดยการขนส่ง Na^+ เข้าสู่เซลล์ เพราะขณะขนส่ง Na^+เข้าสู่เซลล์ Na^+ สามารถจับกับน้ำ จึงเป็นการนำน้ำเข้าสู่เซลล์ด้วย อีกประการคือการแพร่ของสาร cryoprotectant เข้าสู่เซลล์เป็นการเข้าไปแทนที่น้ำที่แพร่ออกจากเซลล์ 3) ช่วยคงไว้ซึ่งคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มออร์แกลแนลล์ ทั้งนี้สาร cryoprotectant แต่ละชนิดจะต้องมีความเข้มข้นที่เหมาะสมเพื่อที่ออกฤทธิ์และป้องกันเซลล์ถูกทำลาย สาร cryoprotectant หลายชนิด เช่น DMSO, DMA, MeOH และ glycerol ได้มีการใช้และให้ผลดีในปลาหลายชนิด จากการศึกษาของ Babiak, Glogowski, Brzuska, Szumice, and Adamk (1997) ได้ทำการศึกษาเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งในปลาไน (Common carp, *Cyprinus carpio*) โดยใช้สาร 10% DMSO, 10 และ 15% DMA ร่วมกับ extender 12 ชนิด ซึ่งพบว่าเมื่อใช้ 15% DMA ร่วมกับ Kurokura et al. (1984) +10% Yolk และ 10% DMA ร่วมกับ BE2 (BE2 original extender, 85 mM NaCl, 50 mM KCl, 3 mM $CaCl_2$ และ 1 mM $MgCl_2$)+10% Yolk ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้น้ำเชื้อสด (P>0.05) และจากการศึกษาของ Linhart, Rodina, and Cosson (2000) ซึ่งได้ทำการศึกษาในปลาชนิดเดียวกัน ได้ทดลองใช้ 10% DMSO เป็นสาร cryoprotectant โดยใช้ร่วมกับ Kurokura et al.

(1984) extender ซึ่งพบว่าให้เปอร์เซ็นต์การฟักไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้น้ำเชื้อสด (P>0.05) และการศึกษาของ Lahnsteiner, Berger, Horvath, Urbanyi, and Weismann (2000) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Danube bleak (*Chalcalburnus chalcoides*) โดยวิธีการแช่แข็ง ทำการศึกษาสาร cryoprotectant 3 ชนิด คือ DMSO, methanol และ ethylene glycol ในระดับความเข้มข้น 5%, 10% และ 15% ร่วมกับ buffered sperm motility-inhibiting saline (SBMIS ซึ่งประกอบไปด้วย 75 mmol L^{-1} NaCl, 70 mmol L^{-1} KCl, 2 mmol L^{-1} $CaCl_2$, 1 mmol L^{-1} $MgSO_4$ and 20 mmol L^{-1} Tris (pH 8)) พบว่า 10% DMSO มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงสุด (35.2±7.1) แต่ต่ำกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้น้ำเชื้อสด (P<0.05) เช่นเดียวกันกับ Riley, Holladay, Chesney and Tiersch (2004) ได้ทำการศึกษาผลของสาร cryoprotectant 3 ชนิด คือ MeOH, DMA และ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10% ในปลาชนิดเดียวกัน โดยใช้ HBSS (200 mOsm kg^{-1}) เป็นสาร extender พบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงสุด (71%) และจากการศึกษา Tian, Chen, Ji, Zhai, Sun, Chen and Su (2008) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Spotted halibut (*Verasper vaiegatus*) โดยใช้สาร cryoprotectants 6 ชนิด คือ DMSO, ethylene glycol (EG), dimethylformamide (DMF), glycerol, MeOH, และ propylene glycol (PG) ที่ระดับความเข้มข้น 13.3% ร่วมกับ TS-2 (110 mM sucrose, 100 mM $KHCO_3$ และ10 mM Tri Cl) โดยพบว่า DMSO และ propylene glycol ให้เปอร์เซ็นต์การการปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การฟักสูงไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) อีกทั้งจากการศึกษา Lanes et al. (2008) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*) โดยวิธีการแช่แข็ง โดยเปรียบเทียบระหว่างการใช้ 10% DMSO ร่วมกับ sucrose และ 12% glycerol ร่วมกับ saline พบว่าการใช้ 10% DMSO ร่วมกับ sucrose และ 12% glycerol ร่วมกับ saline ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การฟักไม่แตกต่างกันและไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) และจากการศึกษา Huang et al. (2009) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Guppies (*Poecilia reticulate*) และปลา Black mollies (*Poecilia-latipinna*) โดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ glycerol (5, 12 และ 20%), DMSO (5, 10 และ 15%), DMF (2, 5 และ 8%), MeOH (2, 6 และ 10%) และ sucrose (5, 10 และ 15%) ร่วมกับ HBSS พบว่าในปลา Guppies การใช้ 20% glycerol ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงกว่าทรีตเมนต์ชนิดอื่น ๆ และไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) และในปลา Black mollies พบว่าการใช้ 12 และ 20% glycerol ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงกว่าทรีตเมนต์ชนิดอื่น ๆ และไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Lahnsteiner, Mansour, and Weismann (2002) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Burbot (*Lota lota*) โดยวิธีการแช่แข็ง ทำการศึกษาสาร cryoprotectant 3 ชนิด คือ 10% MeOH, 5% glycerol และ 10% DMSO เมื่อใช้ร่วมกับ 1.5% glucose+7% egg yolk และใช้สารละลายเพื่อช่วยในการปฏิสนธิ 3 ชนิด คือ 25, 50 mmol L^{-1} NaCl, pH 8.5 และน้ำ พบว่าเมื่อใช้ 10% MeOH ร่วมกับการใช้สารละลายเพื่อช่วยในการปฏิสนธิ 50 mmol L^{-1} NaCl, pH 8.5 หรือ 25 mmol L^{-1} NaCl, pH 8.5 ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้น้ำเชื้อสด (P>0.05) และจากการศึกษา Lahnsteiner, Berger, Horvath, and Urbanyi (2004) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Sterlet

(*Acipenser ruthenus* L.) โดยวิธีการแช่แข็ง ได้ทำการศึกษาสาร cryoprotectant 2 ชนิด คือ DMSO และ MeOH ในระดับความเข้มข้น 7.5% และ 10% เมื่อใช้ร่วมกับ KCl ในสาร extender base ในระดับความเข้มข้น 2 mML^{-1} และ 5 mML^{-1} และการละลายที่ 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เมื่อดูเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ พบว่าเมื่อใช้ 7.5% MeOH ร่วมกับ 5 mML^{-1} ในสาร extender base การละลายที่ 25 องศาเซลเซียส ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุด (32.70±4.4) ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้น้ำเชื้อสด (P>0.05) และจากการศึกษา Mansour, Richardson and McNiven (2006) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Arctic char (*Salvelinus alpines* L.) โดยใช้ DMSO, DMA และ MeOH ที่ระดับความเข้มข้น 10% โดยเปรียบเทียบร่วมกับ extender 2 ชนิด คือ glucose และ Lahnsteiner's พบว่าการใช้ 10% MeOH ร่วมกับ glucose และ 10% DMA ร่วมกับ Lahnsteiner's ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงกว่าการใช้ทรีตเมนต์ชนิดอื่น ๆ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ส่วนในปลากลุ่ม Catfish มีการใช้ชนิดสาร cryoprptectants และระดับความเข้มข้นมีความหลากหลายแตกต่างกันออกไป ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 สาร cryoprotectant และสาร extender ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งในปลากลุ่ม catfish

Catfish species	Cryoprotectant	Extender	Reference
Clarias gariepinus	5% glycerol	5% glucose	Steyn et al., 1985
	11% glycerol	5% glucose	Steyn and Van, 1987
	9% glycerol	4% glucose	Steyn, 1993
	9% glycerol	4% glucose	Van et al., 1993
	10% DMSO	333 mmol L^{-1} fructrose	Urbanyi et al., 1999
Clarias batrachus	10% glycerol	0.6% NaCl	Padhi and Mandal, 1995
Heterobranchus longifilis	5% DMSO+ 5% glycerol + 10% egg yolk	Mounib solution	Oteme et al., 1996

ที่มา: Viveiros et al. (2000)

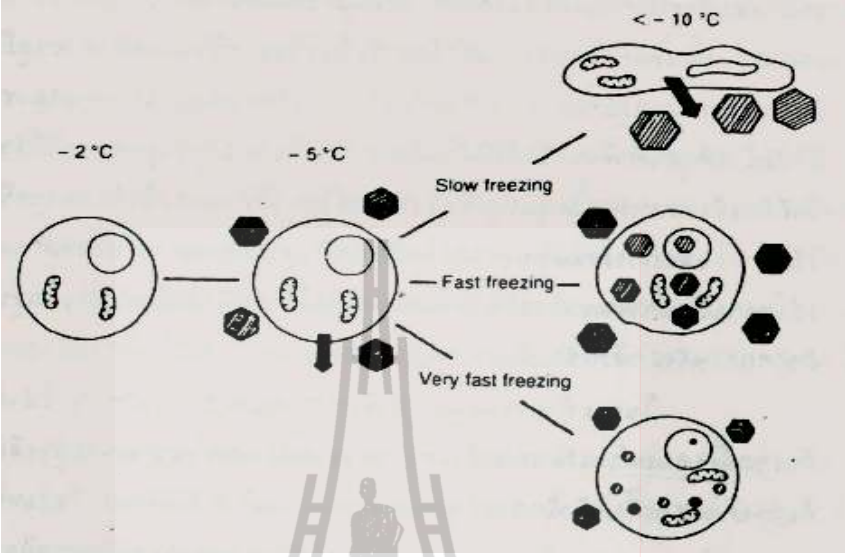
จากการศึกษาของ Lang, Riley, Chandler, and Tiersch (2003) ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งในปลา Blue catfish (*Ictalurus furcatus*) โดยใช้ DMSO (5, 10, 15 และ 20%), MeOH (5, 10, 15, 20 และ 25%), glycerol (5 และ 10%) และ DMA (5, 10 และ 15%) ร่วมกับ HBSS โดยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ถูกประเมินที่ระยะเวลา 0, 15 และ 30 นาที พบว่าเมื่อใช้ 5, 10, 15% MeOH และ 5% DMA หรือ DMSO มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงกว่าทรีตเมนต์อื่น ๆ และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ ที่ระยะเวลา 0, 15 และ 30 นาที ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) เช่นเดียวจากการศึกษาของ Ogier de

Baulny, Lobbe, and Maisse (1999) ที่ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งใน European catfish (*Silurus glanis* L.) โดยใช้สาร DMSO, DMA, glycerol, MeOH และ propylene glycol ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15% พบว่าเมื่อใช้ 10% DMA หรือ 15% DMA ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดอื่น ($P<0.05$) และจากการศึกษาของ Horvath and Urbanyi (2000) ที่ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งในปลาดุกยักษ์โดยใช้ 10% DMSO และ 10% DMA ร่วมกับ 6% Fructose โดยใช้ปริมาตรของน้ำเชื้อที่แตกต่างกัน (100 µL และ 200 µL) และเปรียบเทียบวิธีการผสมเทียมแบบเปียกและแบบแห้ง พบว่าเปอร์เซ็นต์การฟักที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Viveiros et al. (2000) ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในปลาดุกยักษ์ โดยใช้ Ginzburg fish ringer ร่วมกับ DMSO หรือ MeOH ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 15% พบว่าเมื่อใช้ 10% MeOH อัตราการเจือจางน้ำเชื้อ ที่ 1:20 และ 1:200 ให้ผลของเปอร์เซ็นต์การฟักเท่ากับ 60.0% และ 58.3% ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้น้ำเชื้อสด ($P>0.05$) ต่อมา Christensen and Tiersch (1997) ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งในปลากดอเมริกา (Channel catfish, *Ictalurus punctatus*) โดยใช้ HBSS เป็นสาร extender ร่วมกับ สาร DMA และ MeOH ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15% ได้ทำการศึกษาร่วมกับขนาดของ straw ที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง (0.25 ml และ 0.5 ml) พบว่าเมื่อใช้ 5% MeOH ร่วมกับ 0.25 ml straw ให้ผลของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.0001$) จากการใช้ DMA เช่นเดียวจากการศึกษาของ Muchlisin, Hashim, and Chong (2004) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งในปลา Tropical bagrid catfish (*Mystus nemurus*) โดยใช้สาร MeOH, ethanol, glycerol และ DMSO ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15% พบว่าเมื่อใช้ 10% MeOH ร่วมกับ ringer ให้ผลของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงที่สุด (58%) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดอื่น ๆ ($P<0.05$) และจากการศึกษาของ Linhart, Billaed, and Proteau (1993) ที่ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งใน European catfish โดยใช้ 200 mM NaCl, 30 mM tris, pH 7 เป็นสาร extender ร่วมกับสาร glycerol และ DMSO ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 30, 40, 50 พบว่า 10% glycerol ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงที่สุด (36.6%) ซึ่งพบว่าการใช้ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 10-30% ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่อยู่ในช่วง 13-36% และจากนั้นทำการศึกษาต่อโดยการเปรียบเทียบ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 10, 12, 15 และ 20% พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 12% ให้เปอร์เซ็นต์การฟักดีกว่าที่ระดับความเข้มข้น 10, 15 และ 20% และไม่แตกต่างจากการใช้ที่ระดับความเข้มข้น 15% ($P>0.05$) แต่แตกต่างจากการใช้ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 20% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

จากการตรวจสอบเอกสารผลของสาร extenders และสาร cryoprotectants ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง จะเห็นได้ว่าสาร extender ที่นิยมใช้คือ Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl ส่วนสาร cryoprotectant ที่นิยมใช้คือ DMSO, DMA, MeOH และ glycerol อย่างไรก็ตามในปลากลุ่ม catfish ชนิดสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ยังมีความหลากหลายและให้ผลแตกต่างกันออกไปตามชนิดของปลา จึงยังไม่สามารถสรุปได้ว่าสาร extender และสาร cryoprotectant ชนิดใดที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ศึกษาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะ เนื่องจากวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งยังไม่มีการศึกษาสำหรับปลาชนิดนี้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อหาชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะ

2.4 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง

ความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไม่เพียงแต่ขึ้นอยู่กับชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมเท่านั้นแต่ยังขึ้นอยู่กับอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในระหว่างขบวนการแช่แข็งด้วย ในขบวนการแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อปลาเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และการแพร่เข้า-ออกของน้ำระหว่างเซลล์และตัวกลาง โดยพบว่าเมื่อมีการลดอุณหภูมิลงต่ำกว่าจุดเยือกแข็งของของเหลวที่อยู่รอบเซลล์และภายในเซลล์ จะทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์เกิดขึ้นช้ากว่าการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในของเหลวรอบ ๆ เซลล์ เนื่องมาจากตัวถูกละลายในของเหลวรอบ ๆ เซลล์มีความเข้มข้นสูงขึ้นตามปริมาณการเกิดน้ำแข็งในขณะที่ยังไม่เกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ ดังนั้นเซลล์จึงสูญเสียน้ำเพราะความไม่สมดุลของแรงดันออสโมติกและถ้าอัตราการลดอุณหภูมิเป็นไปอย่างช้า ๆ จะทำให้น้ำแพร่ออกจากเซลล์ช้า ๆ หรือเกิด Dehydration ทำให้เซลล์มีขนาดเล็กลงหรือเหี่ยว ซึ่งทำให้เซลล์ตายได้ อีกทั้งถ้าอัตราการลดอุณหภูมิเป็นไปอย่างรวดเร็วจะทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์และเยื่อหุ้มออร์แกเนลส์ถูกทิ่มแทงโดยเกล็ดน้ำแข็ง หรืออาจเกิด Cold shock ได้ ดังแสดงในภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นขณะลดอุณหภูมิในวิธีการแช่แข็งรูปหกเหลี่ยมแสดงขนาดและจำนวนเกล็ดน้ำแข็ง (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

จากที่กล่าวมาแล้วจะเห็นได้ว่าเมื่อทำการแช่แข็งอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้าหรือเร็วต่างก็ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ ดังนั้นอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมจะทำให้ตัวอย่างเซลล์แช่แข็งมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้นได้ แต่อย่างไรก็ตามอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะนี้แตกต่างกันไปตามชนิดเซลล์หรืออาจต่างกันไปตามชนิดสัตว์แม้ว่าจะเป็นเซลล์ชนิดเดียวกัน ซึ่งดังตัวอย่างในกลุ่มปลาทะเลมีอัตราการลดอุณหภูมิที่แตกต่างกันออกไปตามชนิดปลา ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งในกลุ่มปลาทะเล

Species	Freezing rate (°C min^{-1})	Reference
Barramundi	31	Leung, 1987
Cod	5	Mounib et al., 1968
Hirame	8	Tabata and Mizuta, 1997
Seabass	10	Villani and Catena, 1991
Seabass	65	Fauvel et al., 1998
Seabream	10	Barbato et al., 1996
Turbot	99	Dreanno et al., 1997

ที่มา: Suquet, Dreanno, Fauvel, Cosson, and Billard (2000)

ซึ่งจากการศึกษาของ Christensen and Tiersch (2005)ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากดอเมริกา โดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ 5% MeOH ร่วมกับ HBSS ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสต่อนาทีและ 3 องศาเซลเซียสต่อนาทีจาก -4 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่าที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 45 องศาเซลเซียสต่อนาทีมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (33±9%) ต่ำกว่าและแตกต่างจากการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 3 องศาเซลเซียสต่อนาที (83±13%; P<0.002) เช่นเดียวกันจากการศึกษาของ Mongkonpunya, Chairak, Pupipat, and Tiersch (1995) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึกโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ 9% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS หรือ BCB และเปรียบเทียบอัตราการลดอุณหภูมิที่ 12 องศาเซลเซียสต่อนาทีและ 22 องศาเซลเซียสต่อนาที ใช้การลดอุณหภูมิแบบ Liquid nitrogen vapor พบว่าที่อัตราลดอุณหภูมิเดียวกันแต่มีสารเจือจางต่างกัน (C-F HBSS หรือ BCB) มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน (P>0.05) แต่ที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 12 องศาเซลเซียสต่อนาที มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (73.7±7.2%) ซึ่งสูงกว่าที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 22 องศาเซลเซียสต่อนาที (21.4±10.4%; P<0.01) และจากการศึกษาของ Viveiros et al. (2000) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาปลาดุกยักษ์โดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ 10% MeOH ร่วมกับ Ginzburg fish Ringer โดยดูอัตราการลดอุณหภูมิที่ 2, 5 และ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก 5 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิต่างๆ (-25, -30, -35, -40, -45, -50, -55, -60, -65, -70 องศาเซลเซียส) และนำมาเปรียบเทียบที่ Holding time 0, 2 และ 5 นาที ซึ่งพบว่าที่อัตราลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก 5 ถึง -45 และ -50 องศาเซลเซียส และที่อัตราลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก 5 ถึง -55 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์การฟักไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้น้ำเชื้อสด (P>0.05; ตารางที่ 2.4) และต่อมา Viveiros et al. (2001) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาชนิดเดียวกันโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ MeOH (2.47 M) ร่วมกับ Ginzburg fish Ringer (123.2 mM NaCl, 3.75 mM KCl, 3.0 mM CaCl2, 2.65 mM NaHCO3, pH 7.6, 244 mOsm kg^{-1}) โดยดูอัตราการลดอุณหภูมิที่ 2, 5 และ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก -5 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิต่างๆ (-30, -35, -40, -45, -50 องศาเซลเซียส) และ Holding time 0 และ 5 นาที พบว่าที่อัตราลดอุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก -5 ถึง -40 องศาเซลเซียส และที่อัตราลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก -5 ถึง -40 องศาเซลเซียสที่ Holding time 5 นาทีและที่อัตราลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก -5 ถึง -40 และ -45 องศาเซลเซียสที่ Holding time 5 นาที มีเปอร์เซ็นต์การฟักไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้น้ำเชื้อสด (P>0.05) ซึ่งพบว่าที่อัตราลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก -5 ถึง -40 องศาเซลเซียสที่ Holding time 5 นาที เหมาะสำหรับในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกยักษ์ ดังแสดงในตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา African catfish โดยวิธีการแช่แข็ง

Freezing rate (Hatching rate (%))			Endpoints	Hold (min)	Reference
2 °C min^{-1}	5 °C min^{-1}	10 °C min^{-1}	(ºC)		
0^{d}	N	0^{d}	-25		Viveiros et al.,
0^{d}	N	0^{d}	-30		2000
2.7 ± 1.1^{d}	N	0^{d}	-35		
40.7 ± 4.8^{b}	3.9 ± 2.0^{d}	0^{d}	-40		
20.6 ± 10.3^{c}	73.7 ± 7.2^{a}	1.5 ± 2.2^{d}	-45		
11.2 ± 5.3^{cd}	66.2 ± 12.1^{a}	28.7 ± 28.5^{c}	-50	-	
8.3 ± 3.4^{cd}	41.1 ± 14.4^{b}	51.8 ± 9.7^{ab}	-55		
5.6 ± 3.5^{cd}	25.5 ± 18.1^{bc}	38.6 ± 16.1^{bc}	-60		
N	10.3 ± 1.7^{c}	N	-65		
N	N	N	-70		
72.5 ± 7.1^{a}	79.9 ± 15.5^{a}	59.8 ± 10.7	control		
0.0 ± 0.0^{d}	-	-	-30	0	Viveiros et al.,
0.0 ± 0.0^{d}	-	-	-30	5	2001
5.1 ± 16.9^{d}	-	-	-35	0	
25.9 ± 6.4^{c}	-	-	-35	5	
60.9 ± 9.3^{ab}	-	-	-40	0	
26.7 ± 10.0^{c}	-	-	-40	5	
-	0.3 ± 0.8^{d}	-	-35	0	
-	52.4 ± 6.4^{b}	-	-35	5	
-	1.2 ± 1.9^{d}	-	-40	0	
-	80.9 ± 3.4^{a}	-	-40	5	
-	-	1.6 ± 3.9^{d}	-40	0	
-	-	82.9 ± 3.4^{a}	-40	5	
-	-	2.8 ± 2.6^{d}	-45	0	
-	-	80.5 ± 6.9^{a}	-45	5	
-	-	5.2 ± 4.8^{d}	-50	0	
-	-	33.8 ± 8.8^{c}	-50	5	
73.7 ± 1.5^{a}	73.7 ± 1.5^{a}	73.7 ± 1.5^{a}	control		

หมายเหตุ: N= endpoint not tested with a given freezing rate; ตัวอักษร $^{a, b, c, d}$ ในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

และจากการศึกษาของ ศิริพร คชรัตน์, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2548) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10, 5 และ 3 องศาเซลเซียสต่อนาที พบว่าที่ระดับอัตราการลดอุณหภูมิ 10, 5 และ 3 องศาเซลเซียสต่อนาที ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Fabbrocini, Lavadera, Rispoli and Sansone (2000) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งในปลา Seabream (*Sparus aurata*) โดยดูอัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 และ 15 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก 0 องศาเซลเซียสถึง -150 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราลดอุณหภูมิที่ 10 และ 15 องศาเซลเซียสต่อนาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และจากการศึกษา Sansone, Fabbrocini, Ieropoli, Langellotti, Occidente Matassino (2002) ทำการศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิในปลา Sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.)โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10, 12, 15 และ 24 องศาเซลเซียสต่อนาที พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 15 องศาเซลเซียสต่อนาที ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับ 10, 12 และ 24 องศาเซลเซียสต่อนาทีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ต่ำกว่าแตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด ($0.02 <P< 0.05$) อีกทั้งจากการศึกษา Vuthiphandchi, Chomphuthawach and Nimrat (2009) ได้ทำการศึกษาในปลา Red snapper (*Lutjanus-aegentimaculatus*) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 3, 5, 10, และ 12 องศาเซลเซียสต่อนาที อุณหภูมิสุดท้ายที่ -40 และ -80 องศาเซลเซียส พบว่าที่อัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และอุณหภูมิสุดท้ายที่ -80 องศาเซลเซียส ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงกว่าทรีตเมนต์อื่น ๆ และจากการศึกษาของ Huang, Dong and Tiersch (2004) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งในปลา Platyfish (*Xiphophorus couchianus*) โดยดูอัตราการลดอุณหภูมิที่ 5, 25 และ 45 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก 5 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส พบว่าที่อัตราลดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสต่อนาที ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงกว่าอัตราการลดอุณหภูมิที่ 5 องศาเซลเซียสต่อนาที และ 45 องศาเซลเซียสต่อนาที ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เช่นเดียวจากการศึกษาของ Huang, Dong, Walter and Tiersch (2004) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งในปลา Green swordtail (*Xiphophorus helleri*) โดยดูอัตราการลดอุณหภูมิที่ 5, 25 และ 45 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก 5 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส พบว่าที่อัตราลดอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสต่อนาที ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงกว่าอัตราลดอุณหภูมิที่ 5 และ 45 องศาเซลเซียสต่อนาทีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.004$) นอกจากนี้ผลการศึกษาของ Routray, Dash, Dash, Swain, Sarkar and Sarangi (2008) ที่ทำการศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิในปลา Silver barb (*Puntius gonionotus*) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 4, 10, 16 และ 22 องศาเซลเซียสต่อนาที พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 16 องศาเซลเซียสต่อนาที ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงกว่าและแตกต่างจากการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับอื่น ๆ ($P<0.05$) และจากการศึกษาของ Kwontong and Bart (2003) ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งในปลาสวาย โดยเปรียบเทียบระหว่างวิธีการลดอุณหภูมิแบบ One-step โดยการลดอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก 20 ถึง -80 องศาเซลเซียส และ Two-steps โดยการลดอุณหภูมิที่ 4 องศา

เซลเซียสต่อนาที จาก 3 ถึง -4 องศาเซลเซียส และ 11 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก -4 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส พบว่าการลดอุณหภูมิแบบ One-step และ Two-steps มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ซึ่งสอดคล้องจากการศึกษาของ Warnecke and Pluta (2003) ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งในปลาไน เปรียบเทียบอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step โดยการลดอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก 2 ถึง -50 องศาเซลเซียส กับอัตราการลดอุณหภูมิแบบ Three-steps 2 แบบ โดย Three-steps แบบที่ 1 มีอัตราลดอุณหภูมิที่ 5 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก 2 ถึง -7 องศาเซลเซียส และ 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก -7 องศาเซลเซียส ถึง -30 องศาเซลเซียส และ 2 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก -30 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส และ Three-steps แบบที่ 2 มีอัตราลดอุณหภูมิที่ 0.5 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก 2 ถึง -7 องศาเซลเซียส และ 1 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก -7 องศาเซลเซียส ถึง -30 องศาเซลเซียส และ 2 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก -30 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส พบว่าการลดอุณหภูมิแบบ Three-steps แบบที่ 1 มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ทั้งหมดสูงสุด (40±6%) แต่ไม่มีความแตกต่างจากการลดอุณหภูมิแบบ One-step (P>0.05) จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าอัตราการลดอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลามีการเลือกใช้อัตราการลดอุณหภูมินั้นแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดปลา จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าอัตราการลดอุณหภูมิระดับใดที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ศึกษาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพาะ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อหาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพาะ

2.5 การผลิตปลาลูกผสม (ลูกปลาสวายโมง) โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง

ในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง น้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้นอกจากจะสามารถแก้ปัญหาช่วงสืบพันธุ์ไม่ตรงกันระหว่างปลาเพศผู้และปลาเพศเมียในปลาเพาะแล้วยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการผสมข้ามพันธุ์เพื่อให้ได้ปลาสายพันธุ์ใหม่หรือลูกผสมชนิดใหม่ที่มีลักษณะเด่นตามที่ต้องการและเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงการค้า ซึ่งปัจจุบันมีปลาลูกผสมที่เป็นปลาเศรษฐกิจที่รู้จักคือ ลูกผสมบิ๊กอุย ซึ่งเป็นลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่างปลาดุกยักษ์เพศผู้กับปลาดุกอุยเพศเมีย ซึ่งลูกผสมมีเปอร์เซ็นต์การฟักและเปอร์เซ็นต์การรอดสูง อีกทั้งลูกผสมที่ได้มีอัตราการเจริญเติบโตรวดเร็ว ทนทานต่อโรคสูง รสชาติดี มีลักษณะสีเนื้อใกล้เคียงกับปลาดุกอุย และเกษตรได้นำลูกผสมไปเลี้ยงเชิงการค้า และเป็นที่ยอมรับของบริโภคเป็นอย่างดี (สุจินต์ หนูขวัญ, มานพ ตั้งตรงไพโรจน์, กำชัย ลาวัณยวุฒิ และปรัชชัย วีรสิทธิ์, 2533) นอกจากนี้ลูกผสมข้ามพันธุ์ปลานิลที่รู้จักทั่วไปคือ ปลาทับทิม ซึ่งเป็นลูกผสมที่เกิดจากการผสมระหว่างปลาปลานิลและปลาหมอเทศ เป็นปลาที่ได้รับการปรับปรุงสายพันธุ์ให้ดีขึ้น ลักษณะเด่นของปลาทับทิม คือ เนื้อผนังช่องท้องสีขาวสะอาด ต่างจากเนื้อปลาชนิดอื่นโดยทั่วไปจะมีผนังช่องท้องเป็นสีเทาดำ หัวเล็ก สันหนา มีปริมาณเนื้อมากถึง 40% ของน้ำหนัก เติบโตเร็ว เนื้อขาวแน่นละเอียด และมีโภชนาการสูง ปลาทับทิมจึงเป็นปลาซึ่งเกษตรกรผู้มีทุนน้อยสามารถเลี้ยงได้ในเชิงเศรษฐกิจ ผลผลิตเป็นที่ต้องการของตลาด (วิเชียร หวัดสนิท, 2542) อีกทั้งยังมีการผลิตปลาไนลูกผสมโดยผสมสายพันธุ์พื้นเมืองในประเทศไทยกับสายพันธุ์ต่างประเทศ ทำให้ปลาไนลูกผสมที่ได้มีรูปร่างที่มี

เนื้อมากขึ้นคือ ส่วนหัวเล็กลง ความลึกลำตัวมากขึ้น และอัตราการเจริญเติบโตให้ดีขึ้นกว่าสายพันธุ์พื้นเมืองที่ทำการเพาะเลี้ยงกันอยู่เดิม (สุภัทรา อุไรวรรณ์, สุรางค์ สุมโนจิตราภรณ์, วงศ์ปฐม กมลรัตน์ และ พนิดา แก้วฤทธิ์, 2544) ส่วนในปลาเผาะได้มีการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างน้ำเชื้อปลาเผาะผสมกับไข่แม่ปลาสวาย เรียกลูกผสมว่า สวายโมง โดยมีพบว่าองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อปลาสวายโมง มีปริมาณร้อยละของน้ำหนักเปียกของความชื้น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และ เถ้า มีค่า 77.29, 15.21, 3.55, 2.56 และ 1.39% ตามลำดับ โดยมีค่าโปรตีนที่พบในปลาสวายโมงนี้ใกล้เคียงกับปริมาณโปรตีนในปลาน้ำจืดทั่วไป ได้แก่ 14.6% ในปลาสวาย, 16% ในปลาดุกอุย, 17.5% ในปลาช่อน ส่วนปริมาณไขมันในปลาสวายโมงมีปริมาณใกล้เคียงกับปลาช่อน (3.3%) แต่มีปริมาณน้อยกว่าปลาสวาย (16.5%) และปลาดุกอุย (14.7%) โดยธรรมชาติแล้วปลาเผาะเป็นปลาที่มีความดกไข่น้อยคือ มีความดกไข่เฉลี่ย 7,236 ฟองต่อกิโลกรัม (วรัณยู ขุนเจริญ และคณะ, 2549) ทำให้เกิดปัญหาไม่สามารถผลิตลูกพันธุ์ปลาเผาะได้เพียงพอกับความต้องการซึ่งเป็นข้อจำกัดของการผลิตปลาชนิดนี้ในเชิงพาณิชย์ ด้วยเหตุนี้จึงมีการผลิตลูกปลาสวายโมง เพื่อแก้ไขปัญหาผลิตลูกพันธุ์ไม่เพียงพอ เนื่องจากแม่ปลาสวายมีความดกไข่เฉลี่ย 50,000 ฟองต่อกิโลกรัมสูงกว่าแม่ปลาเผาะประมาณ 6.9 เท่า (Michael, 2006) ซึ่งจะสามารถผลิตลูกปลาเนื้อขาวได้เพียงพอกับความต้องการของตลาด ปัจจุบันมีการผลิตลูกปลาสวายโมงในเชิงพาณิชย์กันอย่างกว้างขวางในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและพัฒนาปลาสวายโมงให้เป็นปลาเศรษฐกิจ (สุญาณีพร ตุลยพงศ์รักษ์, ปัทมา ระตะนะอาพร และ จิราพร รุ่งเลิศเกรียงไกร, 2551) และจากรายงานการศึกษาของ Mongkonpunya et al. (1995) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึกโดยวิธีการแช่แข็ง โดยนำเอาน้ำเชื้อปลาบึกแช่แข็งไปผสมพันธุ์กับไข่ปลาดุกอุยเปรียบเทียบกับกลุ่มน้ำเชื้อสดของปลาดุกอุย พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้น้ำเชื้อสด ($P>0.05$) และจากการศึกษาของ เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน (2545) ได้ทำการศึกษาน้ำเชื้อปลาบึกแช่แข็งผสมกับไข่ปลาสวาย ซึ่งลูกผสมจากน้ำเชื้อแช่แข็งปลาบึกกับไข่ปลาสวายมีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่าปลาสวาย และจากการศึกษาของ Bart, Wolfe, and Dunham (1998) โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งของ Blue catfish ผสมกับไข่ของ Channel catfish พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ปฏิสนธิสูงถึง 54% อีกทั้งจากการศึกษาของ Urbanyi, Horvat, and Kovacs (2004) ได้ทำการศึกษาน้ำเชื้อปลา Sterlet (*Acipenser ruthenus*) แช่แข็งผสมกับไข่ปลา Siberian sturgeon (*A. baceri*), Russian sturgeon (*A. gueldenstaedti*), และ European sturgeon (*A. sturio*), โดยใช้ 10% MeOH ร่วมกับ 23.4 mM sucrose, 0.25 mM KCl, 30 mM Tris พบว่าประสบความสำเร็จในการผลิตลูกผสมจากน้ำเชื้อแช่แข็ง ซึ่งน้ำเชื้อปลา Sterlet แช่แข็งผสมกับไข่ปลา Siberian sturgeon มีเปอร์เซ็นต์การฟักสูงถึง 50% และผสมกับไข่ปลาอื่น ๆ มีเปอร์เซ็นต์การฟักในช่วง 17-34% จะเห็นได้ว่าในการผลิตลูกผสมโดยใช้น้ำเชื้อปลาแช่แข็งจะช่วยทำให้ได้ลูกพันธุ์ปลามีจำนวนเพียงพอต่อกับความต้องการของผู้บริโภคและความต้องการของตลาดส่งออก ด้วยเหตุนี้จึงเกิดความสนใจผลิตปลาลูกผสม (ลูกปลาสวายโมง) โดยใช้น้ำเชื้อปลาเผาะแช่แข็งผสมกับไข่ปลาสวายเพื่อเพิ่มปริมาณลูกพันธุ์ปลาให้เพียงพอกับความต้องการของเกษตรผู้เลี้ยงปลา

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะ (*Pangasius bocourti*) โดยวิธีการแช่แข็ง มีระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัยทั้งในภาคสนามและในห้องปฏิบัติการ ในส่วนห้องปฏิบัติการใช้ห้องปฏิบัติการสรีรและกายวิภาคสัตว์ อาคารศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (F3) มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ส่วนภาคสนามใช้สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม เป็นสถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย และทำการทดลองในช่วงเดือน มีนาคม ถึง กันยายน พ.ศ. 2551 และ 2552 โดยมีวัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี พร้อมทั้งวิธีการศึกษาดังนี้

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 ชุดคอมพิวเตอร์

3.1.2 เครื่อง Freezer control (CL 3300)

3.1.3 ถังเก็บไนโตรเจน

3.1.4 ถังจ่ายไนโตรเจน

3.1.5 เครื่อง Osmometer

3.1.6 เครื่องวัด ค่า pH

3.1.7 Compound microscope

3.1.8 Stereo microscope

3.1.9 Micropipetteขนาด 10, 20, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร

3.1.10 Tip ขนาด 10, 20, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร

3.1.11 หลอดพลาสติกขนาด 1.5 และ 5 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิด

3.1.12 Vertex mixer

3.1.13 Straw ขนาด 0.25 มิลลิลิตร

3.1.14 บีกเกอร์ขนาด 25, 50 และ 250 มิลลิลิตร

3.1.15 กระบอกตวง 25 มิลลิลิตร

3.1.16 ขวดสีชาขนาด 30 มิลลิลิตร

3.1.17 ขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตรแท่งแก้วคนสาร

3.1.18 ตะเกียง

3.1.19 กรรไกร

3.1.20 เข็มเขี่ย

3.1.21 สไลด์นับเม็ดเลือด (Haemacytometer)

3.1.22 Slide และ Cover slide

3.1.23 กระดาษเช็ดเลนส์

3.1.24 หลอดหยด

3.1.25 กระชังผ้าไนลอนขนาด 15 X 20 เซนติเมตร

3.1.26 Petri dish

3.1.27 ขนไก่

3.1.28 หลอดฉีดยา และเข็มฉีดยา

3.1.29 โกร่งบดฮอร์โมน

3.1.30 กระติกน้ำแข็ง

3.2 สารเคมี

3.1.31 น้ำกลั่น

3.1.32 น้ำยาเช็ดเลนส์

3.1.33 Oil

3.1.34 น้ำยาเคลือบเล็บ

3.1.35 Ginzburg fish ringer

3.1.36 Calcium Free Hanks' Balance Salt Solution (C-F HBSS)

3.1.37 Glucose ($C_6H_{12}O_6$)

3.1.38 Sodium chloride (NaCl)

3.1.39 Potassium chloride (KCl)

3.1.40 Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)

3.1.41 Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)

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

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

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

3.1.45 Dimethyl sulfoxide (DMSO)

3.1.46 Dimethyl acetamide (DMA)

3.1.47 Methanol (MeOH)

3.1.48 Glycerol

3.1.49 Luteinizing hormone releasing hormone analog (LHRHa; Suprefact)

3.1.50 Domperidone (Motilium)

3.3 การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลาเผาะ

โดยปกติปลาเผาะที่ยังไม่เจริญพันธุ์ไม่สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเพศโดยดูจากลักษณะภายนอกได้ แต่ในช่วงฤดูผสมพันธุ์ปลาเผาะเพศเมียจะมีส่วนท้องอูมกว่าปลาเผาะเพศผู้ อีกทั้งปลาเพศผู้จะมีลำตัวที่ยาวเรียวกว่าเพศเมีย และเมื่อถึงช่วงเจริญพันธุ์ ปลาเผาะเพศผู้ที่สมบูรณ์เต็มที่ เพียงกดเบา ๆ ที่ช่องเพศน้ำเชื้อก็จะไหลออกมา

3.4 การฉีดฮอร์โมนพ่อแม่พันธุ์ปลาเผาะ

นำพ่อแม่พันธุ์ปลาเผาะที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ โดยพ่อพันธุ์มีน้ำหนักเฉลี่ย 3.53±1.39 กิโลกรัม/ตัว และแม่พันธุ์มีน้ำหนักเฉลี่ย 3.72±1.94 กิโลกรัม/ตัว จากบ่อดินมาพักในโรงเพาะฟักของสถานีประมงน้ำจืดนครพนม โดยแยกเพศผู้และเพศเมียเพื่อสะดวกในการฉีดฮอร์โมน ก่อนฉีดฮอร์โมนต้องงดอาหารอย่างน้อย 6–12 ชั่วโมง โดยพ่อพันธุ์ปลาเผาะจะฉีดฮอร์โมนกระตุ้นโดยใช้ฮอร์โมน LHRHa มีชื่อทางการค้าว่า Suprefect ในอัตรา 20 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมร่วมกับ domperidone มีชื่อทางการค้าว่า Motilium ในอัตรา 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมโดยฉีดใต้ครีบหลังเหนือเส้นข้างลำตัว หลังจาก 8-12 ชั่วโมง จึงนำมารีดน้ำเชื้อใส่ลงภาชนะที่สะอาดและควรระวังไม่ให้มีการปนเปื้อนของเลือด ปัสสาวะหรือน้ำ ทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ ดังแสดงในภาพที่ 3.1

ก. ข.

ภาพที่ 3.1 แสดงการฉีดฮอร์โมนบริเวณใต้ครีบหลังเหนือเส้นข้างลำตัว (ก) และการรีดน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ปลาเผาะ (ข)

ส่วนปลาเผาะเพศเมียที่มีความสมบูรณ์ทางเพศสังเกตจากลักษณะภายนอกได้ไม่ชัดเจน จึงตรวจสอบความสมบรูณ์พันธุ์ของแม่พันธุ์โดยการใช้ Flexible Catheter หรือใช้สายยางเล็ก ๆ ดูดไข่ เพื่อนำไข่มาวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไข่ด้วยเวอร์เนียมิเตอร์ ดังแสดงในภาพที่ 3.2 ไข่ที่พร้อมจะฉีดฮอร์โมนควรมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไข่เท่ากับ 1.8-2.0 มิลลิเมตร (Tuan, 1999; เจริญ อุดมการ และ สมบัติ สิงห์สี, 2547) ถ้ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กกว่าขนาดดังกล่าว จะมีการฉีดกระตุ้นไข่ด้วยฮอร์โมน HCG 500 IU ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม จนขนาดไข่มีเส้นผ่านศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 1.8-2.0 มิลลิเมตรขึ้นไป แล้วจึงฉีดฮอร์โมน Suprefect ในอัตรา 20 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ร่วมกับ Motilium ในอัตรา 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม จากนั้นทิ้งไว้ประมาณ 11-12 ชั่วโมง เช็คการตกไข่ โดยการดูดไข่เพื่อดูความใสไข่ จากนั้นนำไปทดสอบการปฏิสนธิต่อไป

ก. ข.

ภาพที่ 3.2 แสดงการตรวจสอบความสมบรูณ์พันธุ์ของแม่พันธุ์โดยการใช้ Flexible Catheter ดูดไข่ (ก) และการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไข่ด้วยเวอร์เนียมิเตอร์ (ข)

3.5 การศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อปลาโดยดูจากลักษณะต่าง ๆ ดังนี้

3.5.1 การศึกษาคุณลักษณะของน้ำเชื้อและองค์ประกอบของอิออนชนิดต่าง ๆ ในน้ำเชื้อปลาเผาะ

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อปลาเผาะโดยใช้มือบีบหรือกดรีดส่วนท้องของปลา สำหรับภาชนะที่ใส่รองรับน้ำเชื้อต้องสะอาดและแห้ง จากนั้นนำมาวัดค่า pH ด้วยเครื่อง Hach pH Meter รุ่น EC 10 (Hach Company, Lovelane, USA) และวัดค่าออสโมลาลิตี้ ด้วยเครื่อง Fiske Associates Osmometer รุ่น 210 (Fiske Associates, Massachusetts, USA) จากนั้นนำน้ำเชื้อที่ได้ใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำเชื้อใส่ลงในหลอดพลาสติกขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไป centrifuged ที่ความเร็วรอบ 10000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดูดของเหลวใสส่วนบนของน้ำเชื้อ เพื่อนำไปตรวจสอบส่วนประกอบ

ของอิออนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ โซเดียม (Na^+), โพแทสเซียม (K^+), แคลเซียม (Ca^{2+}), แมกนีเซียม (Mg^{2+}) และคลอไรด์ (Cl^-) ใน seminal plasma ของน้ำเชื้อ ด้วยเครื่อง Universal high speed centrifuges รุ่น Z 323 K (Hermle Labortechnik, Wehingen, Germany)

3.5.2 การศึกษาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ

นำน้ำเชื้อที่รีดได้สังเกตดูสี และสิ่งเจือปนอื่นๆ น้ำเชื้อที่ดีควรมีสีขาวขุ่น และไม่มีสิ่งเจือปน จากนั้นตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ โดยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิที่จะนำไปเก็บรักษาน้ำเชื้อต้องมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไม่น้อยกว่า 75% การศึกษาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ทำได้โดยการหยดน้ำกลั่น 1 หยด (5 ไมโครลิตร) ลงบนสไลด์ และหยดน้ำเชื้อ 1ไมโครลิตร จากนั้นใช้เข็มเขี่ยน้ำมาแตะกับน้ำเชื้อเพียงเล็กน้อย แล้วสังเกตการณ์เคลื่อนที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า โดยเกณฑ์การเคลื่อนที่ของอสุจิ ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 หลักเกณฑ์การสังเกตเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ

หลักเกณฑ์	คะแนน	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่
อสุจิทุกตัวเคลื่อนที่	4	100
อสุจิส่วนใหญ่เคลื่อนที่ (3/4)	3	75
อสุจิประมาณครึ่งหนึ่งเคลื่อนที่ (2/4)	2	50
อสุจิเพียงบางส่วนหรือเพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่เคลื่อนที่ (1/4)	1	25
อสุจิไม่มีการเคลื่อนที่	0	0

ดัดแปลงมาจาก: Guest (1973)

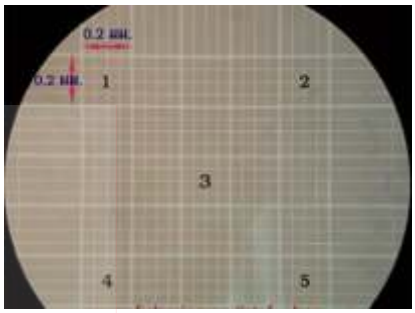
3.5.3 การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อ (จำนวนอสุจิต่อหนึ่งมิลลิลิตร)

การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อ ทำได้โดยการเจือจางน้ำเชื้อสดด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1:1500 แล้วนับจำนวนอสุจิ โดยใช้สไลด์สำหรับนับเม็ดเลือดโลหิต (Hemacytometer counting chamber) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า นับจำนวนอสุจิจากช่องมุมบนและล่างทั้ง 4 มุม และช่องตรงกลางรวม 5 ช่อง (ภาพที่ 3.3) แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนอสุจิที่นับได้ต่อ 1 มิลลิลิตร ดังนี้

จำนวนอสุจิ/มิลลิลิตร= (รวมอสุจิที่นับได้ทั้ง 5 บริเวณ /5) X 25 X dilution rate X 10^4

และมีการจดบันทึกปริมาตรของน้ำเชื้อปลาแต่ละตัว

ก.



ข.

ภาพที่ 3.3 แสดงสไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (ก) และบริเวณที่นับจำนวนอสุจิทั้ง 5 บริเวณ (ข)

3.5.4 การศึกษาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต

การศึกษาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต ทำได้โดยวิธีการย้อมสี eosin-nigrosin ส่วนประกอบสีย้อมดังแสดงในตารางที่ 3.2 และมีวิธีการเตรียมสีย้อมดังนี้

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของสีย้อม eosin-nigrosin

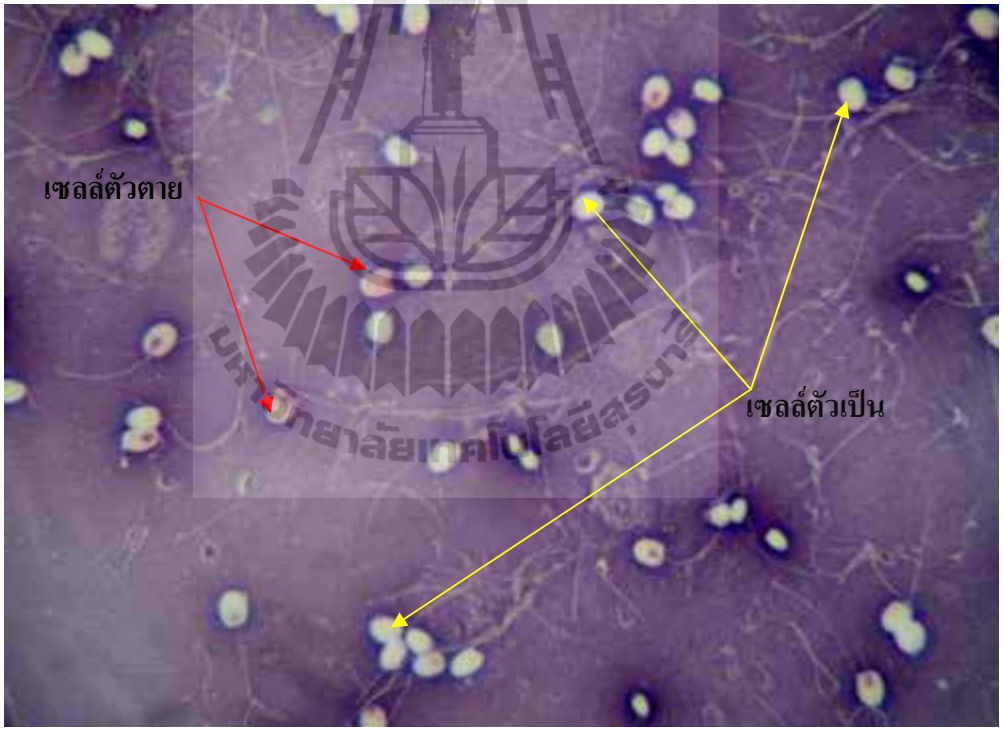
ส่วนประกอบสารเคมี	**ปริมาณ**
eosin B	1 กรัม
nigrosin	5 กรัม
sodium citrate dehydrate	1.5 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียมสีย้อมสำหรับดูตัวเป็นตัวตายสามารถเตรียมได้ดังนี้

ชั่ง eosin B 1 กรัม nigrosin 5 กรัม และsodium citrate dehydrate 1.5 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์และเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ในการเตรียมสารละลายต้องให้ความร้อนขณะเตรียมสารเพราะสารจะไม่ละลาย เมื่อสารละลายเข้ากันดีแล้ว นำไปกรองด้วยกระดาษกรองจนไม่มีตะกอนเหลืออยู่ แล้วนำสีย้อมที่ได้เก็บไว้ในขวดสีชาโดยเก็บที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)

ขั้นตอนการศึกษาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตมีขั้นตอนดังนี้

โดยการหยดสาร eosin-nigrosin dye ลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด (5 ไมโครลิตร) แล้วหยดน้ำเชื้อแช่แข็งลงข้างๆสีย้อมประมาณ 1 ไมโครลิตร ใช้เข็มเขี่ย smear น้ำเชื้อกับสีย้อมให้เข้ากันจากนั้นใช้แผ่นสไลด์อีกแผ่นหนึ่งเกลี่ยน้ำเชื้อให้กระจายบาง ๆ โดยเกลี่ยเพียงครั้งเดียวนำแผ่นสไลด์ที่เกลี่ยแล้วไปผ่านเปลวไฟประมาณ 1-2 ครั้งเพื่อให้สีแห้ง หยดน้ำยาทาเล็บลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยดแล้วปิดด้วย cover slide นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า นับจำนวนเซลล์ตัวเป็นและตัวตายโดยการสุ่มนับ 5 บริเวณ ๆ ละ 20 เซลล์ โดยที่เซลล์ตัวเป็นจะมีลักษณะสีขาวไม่ติดสีย้อม ส่วนตัวตายจะติดสีย้อมเป็นสีชมพูแดงหรือสีม่วง ดังแสดงในภาพที่ 3.4



ภาพที่ 3.4 แสดงอสุจิมีชีวิตมีลักษณะสีขาว และอสุจิตายจะติดสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้ม เมื่อย้อมด้วยสี eosin–nigrosin ภายใต้กล้องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

3.5.5 การศึกษาเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ

การศึกษาเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิเป็นการตรวจความสามารถของอสุจิในน้ำเชื้อแช่แข็งในการปฏิสนธิกับไข่สดเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด นำแม่ปลาเผาะมารีดไข่ใส่ภาชนะที่สะอาดและแห้ง ใช้ไมโครปิเปต ดูดไข่ประมาณ 103±8.0 ฟอง (450 ไมโครลิตร) ใส่จานแก้ว ดูดน้ำเชื้อสด 15 ไมโครลิตร สำหรับเป็นกลุ่มควบคุม และน้ำเชื้อแช่แข็ง 240 ไมโครลิตรลงไปผสมกับไข่ ใช้ขนไก่คนไข่และน้ำเชื้อให้เข้ากัน หลังจากนั้นค่อย ๆ เติมน้ำสำหรับการเพาะฟักลงไป นำจานแก้วใส่ลงในกระชังเพาะฟัก หลังจาก 7-8 ชั่วโมง ทำการตรวจนับเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิที่ระยะ gastrula stage โดยการคำนวณเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิดังนี้

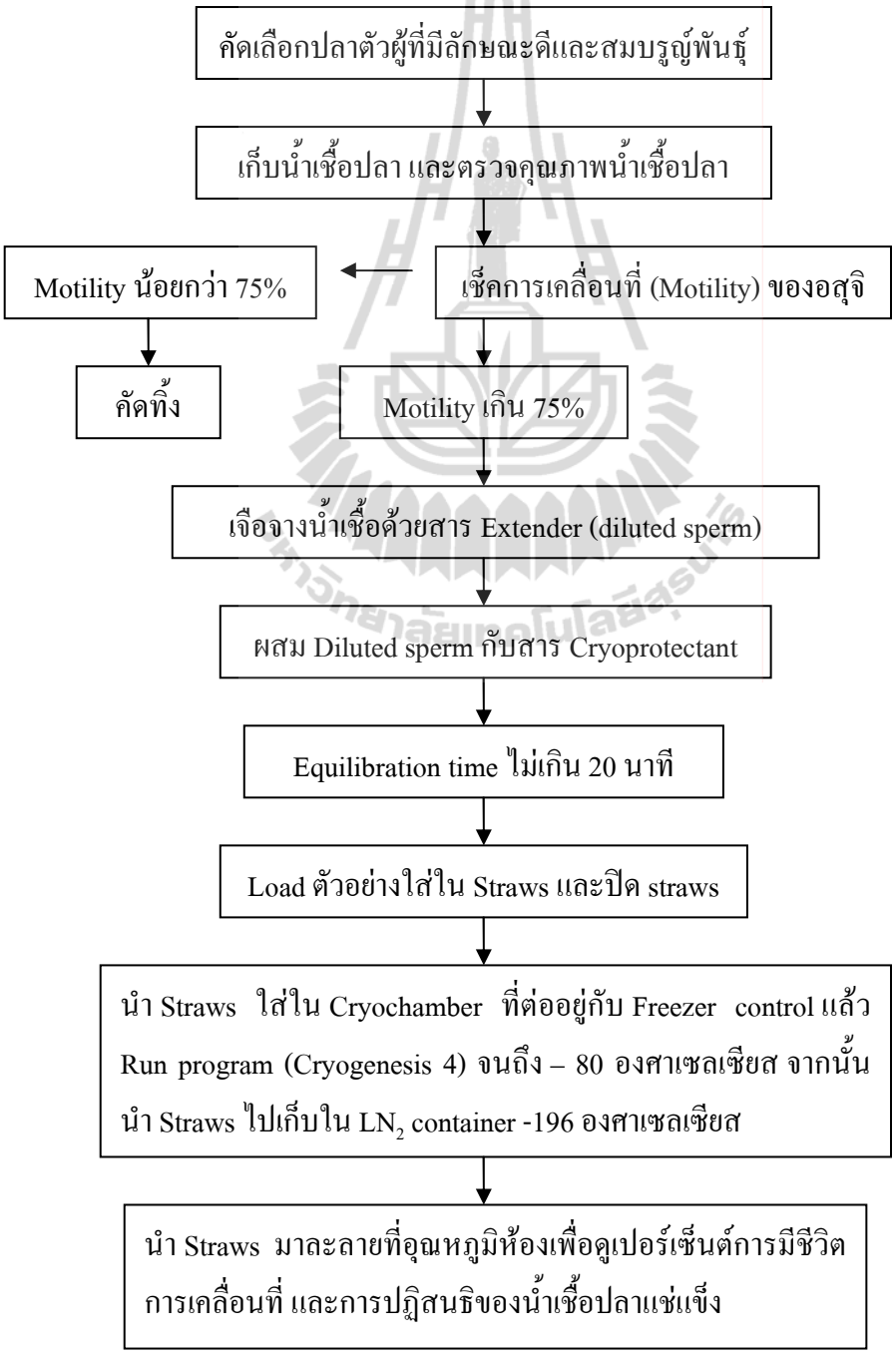
$$\text{เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่เจริญถึงระยะ gastrula stage} \times 100}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}}$$

ก. ข.

ภาพที่ 3.5 แสดงการผูกกระชังผ้าไนลอน (ก) และกระชังผ้าไนลอนสำหรับเพาะฟักไข่ปลาเผาะ (ข)

3.6 การทดลองที่ 1 ศึกษาชนิดของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง

นำน้ำเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงกว่า 75% มาเก็บรักษาน้ำเชื้อ โดยวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง มีขั้นตอนและรายละเอียดดังแสดงในภาพที่ 3.6



ภาพที่ 3.6 แผนภาพแสดงกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง

1. นำน้ำเชื้อสดที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ มาเจือจางด้วยสาร extenders แต่ละชนิด (Ginsburg ringer fish, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อสาร extender เท่ากับ 1:3 โดยส่วนประกอบของสาร extender 3 แต่ละตัวแสดงในตารางที่ 3.3 จากนั้นวัดค่า pH และวัดค่าออสโมลาลิตี้ นำ extender ที่เตรียมแล้วใส่ขวดแก้วที่มีฝาปิดเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นเติมสาร cryoprotectant แต่ละชนิด (DMA, DMSO, MeOH และ Glycerol) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ หลังจากเติมสาร cryoprotectant ให้เริ่มจับเวลาเพื่อให้สารได้ทำปฏิกิริยาไม่น้อยกว่า 10 นาที ดังแผนการทดลองในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบทางเคมี ออสโมลาลิตี้ และ pH ของสาร extenders ที่ใช้ในการศึกษา

ส่วนประกอบสารเคมี	**สูตร สาร extender**		
(กรัม)	**Ginzburg fish ringer**	**C-F HBSS**	**0.9% NaCl**
$CaCl_2.2H_2O$	0.0438	-	-
NaCl	0.71456	2.2225	2.25
KCl	0.02775	0.11	-
$MgSO_4.7H_2O$	-	0.055	-
$Na_2HPO_4.7H_2O$	-	0.0325	-
KH_2PO_4	-	0.0175	-
$NaHCO_3$	0.02226	0.0975	-
Glucose	-	0.2775	-
น้ำกลั่น	250	250	250
Osmolality	249±2.35	298±1.88	277±1.77
pH	7.53±0.36	7.32±0.18	6.58±0.26

ตารางที่ 3.4 แผนการทดลองผลของสาร extenders 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants 3 ระดับ (5, 10 และ 15%)

Treatment	สาร Extender	ความเข้มข้นสาร Cryoprotectants* (%)
1	Ginzburg fish ringer	5
2	Ginzburg fish ringer	10
3	Ginzburg fish ringer	15
4	C-F HBSS	5
5	C-F HBSS	10
6	C-F HBSS	15
7	0.9% NaCl	5
8	0.9% NaCl	10
9	0.9% NaCl	15
10 (Control, น้ำเชื้อสด)		

หมายเหตุ: * สาร cryoprotectant ที่ใช้มี 4 ชนิดคือ DMSO, DMA, MeOH และ Glycerol

2. ดูดสารละลายน้ำเชื้อในข้อ 1. ปริมาตร 240 ไมโครลิตร ใส่หลอดแช่แข็ง (straw ขนาด 250 ไมโครลิตร) โดยใช้ไมโครปิเปต แล้วปิดหลอดแช่แข็งโดยใช้ Heated hemostat

3. ขั้นตอนการ Run program และใช้คอมพิวเตอร์เพื่อควบคุมการลดอุณหภูมิ นำไนโตรเจนเหลว (LN_2) สูงประมาณ 15 เซนติเมตร ใส่ใน Cryobath จากนั้นใส่ Cryochamber ลงใน Cryobath ปิดฝา ต่อสาย Cryochamber เข้ากับ Freezer control (CL 3300) จากนั้นต่อ Freezer control ต่อกับคอมพิวเตอร์อีกที เพื่อควบคุมการทำงาน ดังแสดงในภาพที่ 3.7 จากนั้นเลือกช่วงอุณหภูมิที่ต้องการ โดยใช้เมนู EXCUTE จากโปรแกรม Cryogenesis

ภาพที่ 3.7 ชุดควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งโดยมี Freezer control (CL 3300) ร่วมกับโปรแกรม Cryogenesis

4. นำ Straws ใส่ลงใน Cryochamber ปิดฝา Run program (ภาพที่ 3.8) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที จากนั้นรอให้คอมพิวเตอร์และ Freezer control ทำงาน จนอุณหภูมิที่ Freezer control ถึง -80 องศาเซลเซียส จึงนำเอาตัวอย่างน้ำเชื้อออกจาก cryochamber แล้วนำไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ดังแสดงในภาพที่ 3.9 เป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของอสุจิต่อไป

ก.

ข.

ภาพที่ 3.8 แสดงการเติมไนโตรเจนเหลวลงใน cryochamber (ก) จากนั้นนำตัวอย่างน้ำเชื้อที่ load ใส่ straw เรียบร้อยแล้วใส่ใน cryochamber (ข)

ก. ข.

ภาพที่ 3.9 แสดงอุณหภูมิที่ Freezer control ถึง -80 องศาเซลเซียส (ก) และนำตัวอย่างน้ำเชื้อไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส, ข)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้แผนการทดลองแบบ 3x3 แฟคทอเรียลในการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (3x3 Factorial Experiment in Completely Randomized Design) โดยเปรียบเทียบสาร extenders 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants 3 ระดับ (5, 10 และ 15%) โดยแบ่งเป็น 4 กลุ่มการทดลองย่อยตามชนิดของสาร cryoprotectant (DMSO, DMA, MeOH และ glycerol) โดยมีจำนวน 9 ซ้ำต่อทรีตเมนต์ ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวน นำข้อมูลที่ได้จากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของอสุจิในแต่ละทรีตเมนต์ไป transformed โดยใช้วิธี arcsine transformation จากนั้นเปรียบเทียบผลของสาร extender และระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ในแต่ละทรีตเมนต์โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

3.7 การทดลองที่ 2 ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง

การทดลองนี้เป็นการทดลองต่อเนื่องจากการทดลองที่ 1 โดยเลือกชนิดของสาร cryoprotectant ร่วมกับสาร extender ที่ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดในแต่ละกลุ่มการทดลองย่อยตามชนิดของสาร cryoprotectant ดังนี้ 1) 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS, 2) 10% DMA ร่วมกับ C-F HBSS, 3) 5% MeOH ร่วมกับ 0.9% NaCl และ 4) 10% glycerol ร่วมกับ Ginzburg fish ringer มาศึกษาผลร่วมกับอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure ในอัตราต่าง ๆ (6, 8 และ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที) เพื่อที่จะหาอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step ที่เหมาะสมต่อไป ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1. นำน้ำเชื้อสดที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ มาเจือจางด้วยสาร extenders ที่เลือกจากการทดลองที่ 1 ในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อสาร extender เท่ากับ 1:3 หลังจากนั้นเติมสารcryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยทำการทดลอง 15 ซ้ำต่อทรีตเมนต์ ดังแผนการทดลองในตารางที่ 3.5

2. ดูดสารละลายน้ำเชื้อในข้อ 1. ปริมาตร 240 ไมโครลิตร ใส่หลอดแช่แข็ง (French straw ขนาด 250 ไมโครลิตร) โดยใช้ไมโครปิเปต แล้วปิดหลอดแช่แข็งโดยใช้ Heated hemostat

3. นำ Straws ใส่ลงใน Cryochamber ปิดฝา เลือกอุณหภูมิที่ต้องการศึกษาดังที่กล่าวมาข้างต้น (6, 8 และ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที) จากนั้น Run program จนอุณหภูมิที่ Freezer control ถึง -80 องศาเซลเซียส จึงนำ Straws ออกจาก Cryochamber แล้วไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์มีชีวิตของอสุจิต่อไป

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้แผนการทดลองแบบ 3x4 แฟคทอเรียลในการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (3x4 Factorial Experiment in Completely Randomized Design) ประกอบด้วย 3 อัตราการลดอุณหภูมิที่ 6, 8 และ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และ 4 กลุ่มสาร cryoprotectants (10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS, 10% DMA ร่วมกับ C-F HBSS, 5% MeOH ร่วมกับ 0.9% NaCl และ 10% glycerol ร่วมกับ Ginzburg fish ringer) ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวน นำข้อมูลเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของอสุจิในแต่ละทรีตเมนต์ไป transformed โดยใช้วิธี arcsine transformation จากนั้นเปรียบเทียบผลของอัตราการลดอุณหภูมิในแต่ละทรีตเมนต์ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

ตารางที่ 3.5 แผนการทดลองผลของอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure (6, 8 และ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที)

Treatment	Freezing rate ($°C\ min^{-1}$)	สาร Extender+สาร Cryoprotectant
1	6	C-F HBSS+10% DMSO
2		C-F HBSS+10% DMA
3		0.9% NaCl+ 5% MeOH
4		Ginzburg fish ringer+10% glycerol
5	8	C-F HBSS+10% DMSO
6		C-F HBSS+10% DMA
7		0.9% NaCl+ 5% MeOH
8		Ginzburg fish ringer+10% glycerol
9	10	C-F HBSS+10% DMSO
10		C-F HBSS+10% DMA
11		0.9% NaCl+ 5% MeOH
12		Ginzburg fish ringer+10% glycerol
13 (Control, น้ำเชื้อสด)		

4. เลือก treatment combinations ที่ให้เปอร์เซ็นต์ปฏิสนธิสูงที่สุด (10% DMSO+C-F HBSS) ที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที มาทำการศึกษาต่อ เพื่อเปรียบเทียบอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure (โดยอัตราลดอุณหภูมิที่10 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก 20 ถึง -80 องศาเซลเซียส), Two-steps freezing procedure (โดยการลดอุณหภูมิที่อัตรา 4 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก 3 ถึง -4 องศาเซลเซียส และ 11 องศาเซลเซียสต่อนาทีจาก -4 องศาเซลเซียสถึง -80 องศาเซลเซียส) และแบบ Three-steps freezing procedure (โดยการลดอุณหภูมิที่อัตรา 5 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก 2 ถึง -7 องศาเซลเซียส, 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก -7 องศาเซลเซียส ถึง -30 องศาเซลเซียส และ 2 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก -30 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส) โดยทำการทดลอง 15 ซ้ำต่อทรีตเมนต์ ดังแผนการทดลองในตารางที่ 3.6

ตารางที่ 3.6 แผนการทดลองผลของอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step, Two-steps และ Three-steps freezing procedures โดยใช้สาร 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS

Treatment	Freezing rate
1	One-step
2	Two-steps
3	Three-steps
4 (Control, น้ำเชื้อสด)	

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลของอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step, Two-steps และ Three-steps freezing procedures) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะ โดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวน นำข้อมูลที่ได้จากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไป transformed โดยใช้วิธี arcsine transformation จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS

3.8 การทดลองที่ 3 การผลิตปลาลูกผสม (hybrid species) โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเผาะผสมกับไข่ปลาสวาย

การทดลองนี้เป็นการทดลองต่อเนื่องจากการทดลองที่ 1 โดยเลือกชนิดของสาร cryoprotectant ร่วมกับสาร extender ที่ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดในแต่ละกลุ่มการทดลองย่อยตามชนิดของสาร cryoprotectant ดังนี้ 1) 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS, 2) 10% DMA ร่วมกับ C-F HBSS, 3) 5% MeOH ร่วมกับ 0.9% NaCl และ 4) 10% glycerol ร่วมกับ Ginzburg fish ringer มาศึกษาทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง จากนั้นนำน้ำเชื้อปลาเผาะแบบแช่แข็งมาผสมกับไข่ปลาสวายเพื่อผลิตปลาลูกผสม (hybrid species) โดยแต่ละทรีตเมนต์ใช้ 15 ซ้ำ ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1. นำน้ำเชื้อสดที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ มาเจือจางด้วยสาร extenders ที่เลือกจากการทดลองที่ 1 ใช้ในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อสาร extender เท่ากับ 1:3 หลังจากนั้นเติมสาร cryoprotectant ต่าง ๆ ดังแผนการทดลองในตารางที่ 3.7

2. ดูดสารละลายน้ำเชื้อในข้อ 1. ปริมาตร 240 ไมโครลิตร ใส่หลอดแช่แข็ง (straw ขนาด 250 ไมโครลิตร) โดยใช้ไมโครปิเปต แล้วปิดหลอดแช่แข็งโดยใช้ Heated hemostat ซึ่งหลังจากที่เติมสาร cryoprotectant จะเริ่มจับเวลาจนถึงการนำหลอดแช่แข็งใส่ลงใน cryochamber ใช้เวลาไม่น้อยกว่า 10 นาที

3. ขั้นตอนการเตรียม Freezer control และคอมพิวเตอร์เพื่อควบคุมการลดอุณหภูมิ วิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

ตารางที่ 3.7 แผนการทดลองการผลิตปลาลูกผสม (hybrid species) โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเผาะผสมกับไข่ปลาสวาย

Treatment	**สาร Extender+สาร Cryoprotectant**
1	C-F HBSS+10% DMSO
2	C-F HBSS+10% DMA
3	0.9% NaCl+ 5% MeOH
4	Ginzburg fish ringer+10% glycerol
5 (Control,น้ำเชื้อสด)	

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลการผลิตปลาลูกผสม (hybrid species) โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเผาะผสมกับไข่ปลาสวาย โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวน นำข้อมูลที่ได้จากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ และเปอร์เซ็นต์การฟักไป transformed โดยใช้วิธี arcsine transformation จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ผลของคุณลักษณะของน้ำเชื้อและองค์ประกอบของอิออนชนิดต่าง ๆ ในน้ำเชื้อปลาเผาะ

จากการศึกษาพบว่าปลาเผาะมีปริมาตรน้ำเชื้อประมาณ 2.88±1.55 มิลลิลิตร/ตัว โดยมีความเข้มข้นของน้ำเชื้อ $2.35\pm0.22\times10^{10}$ ตัว/มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) 7.59±0.05 มีค่าออสโมลาลิตี้ (Osmolality) 297±3.77 mOsm kg^{-1} และในน้ำเชื้อมีส่วนประกอบของอิออนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ โซเดียม (Na^{+}), โพแทสเซียม (K^{+}), แคลเซียม (Ca^{2+}), แมกนีเซียม (Mg^{2+}) และคลอไรด์ (Cl^{-}) ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาตร ความเข้มข้น ส่วนประกอบอิออน ค่าออสโมลาลิตี้ และค่า pH ในน้ำเชื้อปลาเผาะ

Parameter	***N***	**Minimum**	**Maximum**	**Mean**	**S.D.**
ความยาวปลาเพศผู้ (เซนติเมตร)	58	37	81	59.96	11.59
น้ำหนักปลาเพศผู้ (กิโลกรัม)	58	1.4	6.4	3.53	1.39
ปริมาตรน้ำเชื้อ (มิลลิลิตร)	54	0.4	8	2.88	1.56
ความเข้มข้นน้ำเชื้อ ($\times10^{10}$ ตัว/มิลลิลิตร)	11	1.99	2.74	2.35	0.22
คุณลักษณะของน้ำเชื้อ ใน Seminal plasma					
-โซเดียม (mM)	3	106	117	111	5.57
-โพแทสเซียม (mM)	3	106	116	110.33	5.13
-แคลเซียม (mM)	3	11.7	14.8	13.33	1.56
-แมกนีเซียม (mM)	3	0.53	1.03	0.73	0.26
-คลอไรด์ (mM)	3	0.41	0.66	0.53	0.12
-ออสโมลาลิตี้ (mOsm kg^{-1})	8	292	303	297	3.77
-pH	8	7.52	7.66	7.59	0.05

4.2 ผลของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการศึกษาผลของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง โดยแบ่งเป็น 4 กลุ่มการทดลองย่อยตามชนิดของสาร cryoprotectant (DMSO, DMA, MeOH และ Glycerol) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15% ร่วมกับสาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียสต่อนาทีและเก็บน้ำเชื้อในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 2 วัน จากนั้นนำน้ำเชื้อมาละลายที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) และประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (motility) เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (viability) และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (fertilization)

จากการศึกษาผลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ พบอิทธิพลร่วม (interaction) ระหว่างสาร extenders และระดับความเข้มข้นสาร cryoprotectants ($P<0.05$) ในแต่ละชนิดสาร cryoprotectant ที่ทำการศึกษา (DMSO, DMA, MeOH และ Glycerol) ซึ่งจากการใช้ DMSO เป็นสาร cryoprotectant พบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดเท่ากับ 75.33±2.50% (93% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อสด ($P>0.05$) เมื่อทดสอบการเคลื่อนที่ของอสุจิ พบว่าเมื่อใช้ 5 และ 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงกว่าทรีตเมนต์อื่น ๆ และเมื่อใช้ 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS ให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุด 60.56±1.73% (69% ของน้ำเชื้อสด) เมื่อเทียบกับทรีตเมนต์อื่น ๆ แต่มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตต่ำและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อสด ($P<0.05$; ตารางที่ 4.2)

จากการใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant พบว่าเมื่อใช้ 10% DMA ร่วมกับ C-F HBSS ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดเท่ากับ 60.11±3.54% (78% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่แตกต่างจากการใช้ 5 และ 10% DMA ร่วมกับ 0.9% NaCl อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และเมื่อใช้ 5 และ 10% DMA ร่วมกับ C-F HBSS ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงกว่าทรีตเมนต์อื่น ๆ และเมื่อใช้ 10% DMA ร่วมกับ C-F HBSS ให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 50.89±1.98% (60% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อสด ($P<0.05$; ตารางที่ 4.3)

จากการใช้ MeOH เป็นสาร cryoprotectant พบว่าเมื่อใช้ 5% MeOH ร่วมกับ 0.9% NaCl ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 54.56±1.11% (74% ของน้ำเชื้อสด), 55.56±5.56% (56% ของน้ำเชื้อสด) และ 50.00±1.85% (60% ของน้ำเชื้อสด) ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อสด ($P<0.05$; ตารางที่ 4.4)

และจากการใช้ glycerol เป็นสาร cryoprotectant พบว่าเมื่อใช้ 10% glycerol ร่วมกับ Ginzburg fish ringer ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 45.00±0.65% (63% ของน้ำเชื้อสด), 50.00±4.17% (50% ของน้ำเชื้อสด) และ 41.33±2.16% (49% ของน้ำเชื้อสด) ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อสด ($P<0.05$; ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.2 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) ในสาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับการใช้ DMSO เป็นสาร cryoprotectant ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15%

สาร Extender	สาร DMSO (%)	Fertilization (%)	Motility (%)	Viability (%)
Ginzburg fish ringer	5	42.67±4.70^{cd} (52.82)	41.67±4.17^{c} (41.67)	26.00±1.47^{e} (29.77)
	10	47.00±4.24^{cd} (58.19)	36.11±4.39^{c} (36.11)	30.22±1.79^{de} (34.61)
	15	35.89±4.25^{d} (44.43)	33.33±4.17^{c} (33.33)	26.00±2.17^{e} (29.77)
C-F HBSS	5	66.44±3.83^{b} (82.26)	61.11±7.35^{b} (61.11)	54.22±2.22^{c} (62.09)
	10	75.33±2.50^{ab} (93.27)	66.67±7.22^{b} (66.67)	60.56±1.73^{b} (69.34)
	15	47.44±5.41^{cd} (58.74)	33.33±4.17^{c} (33.33)	30.67±1.62^{de} (35.12)
0.9%NaCl	5	41.56±5.86^{cd} (51.45)	44.44±3.67^{c} (44.44)	32.56±1.30^{d} (37.28)
	10	51.33±6.27^{c} (63.55)	41.67±4.17^{c} (41.67)	29.67±2.68^{de} (33.97)
	15	42.67±2.58^{cd} (52.82)	33.33±4.17^{c} (33.33)	31.67±1.51^{de} (36.26)
Control		80.78±1.46^{a}	100±0.00^{a}	87.33±1.51^{a}

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขในวงเล็บคือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด (% of control)

ตารางที่ 4.3 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) ในสาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับการใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15%

สาร Extender	สาร DMA (%)	Fertilization (%)	Motility (%)	Viability (%)
Ginzburg fish ringer	5	40.33±1.25^{de} (52.08)	30.56±3.67^{c} (30.56)	23.11±1.99^{ef} (27.37)
	10	44.56±3.34^{cde} (57.57)	33.33±4.17^{c} (33.33)	24.00±1.51^{ef} (28.42)
	15	35.44±2.41^{e} (45.77)	27.78±2.78^{c} (27.78)	24.67±1.52^{ef} (29.21)
C-F HBSS	5	49.56±5.49^{cd} (63.99)	50.00±4.17^{b} (50.00)	40.44±1.97^{c} (47.49)
	10	60.11±3.54^{b} (77.67)	52.78±6.51^{b} (52.78)	50.89±1.98^{b} (60.27)
	15	45.11±3.38^{cde} (58.25)	33.33±4.17^{c} (33.33)	27.33±2.02^{de} (32.27)
0.9%NaCl	5	51.22±1.62^{bc} (66.14)	36.11±4.39^{c} (36.11)	30.78±1.51^{d} (36.45)
	10	53.22±2.09^{bc} (68.73)	36.11±4.39^{c} (36.11)	28.89±1.85^{de} (34.21)
	15	40.00±4.32^{de} (51.65)	30.56±3.67^{c} (30.56)	20.67±1.83^{f} (24.48)
Control		77.44±1.49^{a}	100±0.00^{a}	84.44±2.03^{a}

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขในวงเล็บคือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด (% of control)

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) ในสาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับการใช้ MeOH เป็นสาร Cryoprotectant ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15%

สาร Extender	สาร MeOH (%)	Fertilization (%)	Motility (%)	Viability (%)
Ginzburg fish ringer	5	45.00±1.09^{d} (61.08)	27.78±2.78^{cd} (27.78)	26.11±1.35^{d} (31.08)
	10	40.33±1.40^{e} (54.75)	30.56±3.67^{cd} (30.56)	27.44±1.89^{d} (32.67)
	15	36.78±2.30^{ef} (49.42)	25.00±4.17^{d} (25.00)	25.33±1.47^{d} (30.16)
C-F HBSS	5	45.78±0.46^{d} (62.14)	33.33±4.17^{cd} (33.33)	30.67±1.91^{cd} (36.51)
	10	46.33±0.62^{cd} (62.89)	41.67±4.17^{c} (41.67)	30.67±1.31^{cd} (36.51)
	15	45.11±0.87^{d} (61.23)	30.56±3.67^{cd} (30.56)	26.33±1.59^{d} (31.35)
0.9%NaCl	5	54.56±1.11^{b} (74.05)	55.56±5.56^{b} (55.56)	50.00±1.85^{b} (59.52)
	10	50.00±0.94^{c} (67.87)	41.67±4.17^{c} (41.67)	33.67±1.73^{c} (40.08)
	15	34.11±0.75^{f} (46.30)	25.00±4.17^{d} (25.00)	28.22±2.45^{d} (33.60)
Control		73.67±1.94^{a}	100±0.00^{a}	84.00±1.61^{a}

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขในวงเล็บคือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด (% of control)

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) ในสาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับการใช้ Glycerol เป็นสาร Cryoprotectant ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15%

สาร Extender	สาร Glycerol (%)	Fertilization (%)	Motility (%)	Viability (%)
Ginzburg fish ringer	5	31.78±0.64^{e} (44.55)	36.11±4.39^{bcd} (36.11)	26.44±1.76^{def} (31.27)
	10	45.00±0.65^{b} (63.09)	50.00±4.17^{b} (50.00)	41.33±2.16^{b} (48.88)
	15	42.22±0.62^{c} (59.19)	38.89±4.39^{bc} (38.89)	35.11±1.49^{c} (41.52)
C-F HBSS	5	38.44±0.80^{d} (53.90)	33.33±4.17^{cde} (33.33)	29.56±1.51^{d} (34.95)
	10	37.00±0.83^{d} (51.87)	33.33±4.17^{cde} (33.33)	27.78±1.57^{de} (32.85)
	15	27.22±0.81^{f} (38.16)	25.00±4.17^{de} (25.00)	22.22±1.68^{f} (26.28)
0.9%NaCl	5	36.33±0.87^{d} (50.94)	25.00±4.17^{de} (25.00)	27.33±1.29^{de} (32.32)
	10	30.33±0.60^{e} (42.53)	22.22±2.78^{e} (22.22)	23.78±1.36^{ef} (28.12)
	15	31.11±0.48^{e} (43.62)	22.22±2.78^{e} (22.22)	25.11±1.46^{def} (29.70)
Control		71.33±1.43^{a}	100±0.00^{a}	84.56±1.55^{a}

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขในวงเล็บคือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด (% of control)

เมื่อวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (Correlation) ในแต่ละการทดลองย่อยของสาร cryoprotectant แต่ละชนิด (DMSO, DMA, MeOH หรือ Glycerol) เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ หรือระหว่างเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต หรือระหว่างเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต เมื่อทดสอบที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิมีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ในสาร DMSO มีความสัมพันธ์ในระดับสูง ($r=0.866$, $P<0.05$) เช่นเดียวกับเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิมีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตในสาร MeOH มีความสัมพันธ์ในระดับสูง ($r=0.872$, $P<0.05$) และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่มีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตในสาร glycerol มีความสัมพันธ์ในระดับสูงมาก ($r=0.937$, $P<0.05$) โดยทุกพารามิเตอร์มีความสัมพันธ์กันไปในทิศทางเดียวกัน ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต ของชนิดสาร cryoprotectants

สาร cryoprotectant		**Fertilization**	**Motility**
DMSO	Motility	0.548*	
	Viability	0.705*	0.866*
DMA	Motility	0.638*	
	Viability	0.718*	0.878*
MeOH	Motility	0.813*	
	Viability	0.872*	0.881*
Glycerol	Motility	0.861*	
	Viability	0.937*	0.859*

หมายเหตุ: * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.3 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-steps freezing procedure (6, 8 และ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที) ร่วมกับชนิดสาร cryoprotectant ที่ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุด ดังนี้ 1) 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS, 2) 10% DMA ร่วมกับ C-F HBSS, 3) 5% MeOH ร่วมกับ 0.9% NaCl และ 4) 10% glycerol ร่วมกับ Ginzburg fish ringer จากการทดลองพบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ มีอิทธิพลร่วม (interaction) ระหว่างอัตราการลดอุณหภูมิและสาร cryodiluent ($P<0.05$) โดยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที ร่วมกับ 10% DMSO+ C-F HBSS ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 54.27±1.48% (81% ของน้ำเชื้อสด), 61.67±4.13% (62% ของน้ำเชื้อสด) และ57.60±2.01% (73% ของน้ำเชื้อสด) ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 6 และ 8 องศาเซลเซียสต่อนาที ($P>0.05$) แต่ต่ำกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อสด ($P<0.05$) และพบว่าเมื่อใช้ 10% glycerol ร่วมกับ Ginzburg fish ringer ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 6, 8 และ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที ให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตต่ำกว่าทรีตเมนต์อื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.7 อีกทั้งอัตราการลดอุณหภูมิที่ 6, 8 หรือ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต

จากการศึกษาผลการทดลองเปรียบเทียบการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step (10 องศาเซลเซียสต่อนาที), Two-steps และ Three-steps freezing procedure โดยใช้ 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS พบว่าที่อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 61.47±1.08% (90% ของน้ำเชื้อสด) และ 64.53±1.63% (82% ของน้ำเชื้อสด) ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ Two-steps และ Three-steps ($P<0.05$) และเมื่อทดสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงสุดเท่ากับ 65.00±4.08% (65% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ Two-steps ($P>0.05$) และพบว่าเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อแช่แข็งต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$, ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.7 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) ที่อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure (6, 8 และ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที)

Freezing rate (°C min^{-1})	Cryodiluent	Fertilization (%)	Motility (%)	Viability (%)
6	10% DMSO+C-F HBSS	53.87±2.69^{bc}	56.67±3.83^{b}	57.27±2.06^{b}
		(80.88)	(56.67)	(72.43)
	10% DMA+C-F HBSS	46.47±2.37^{cd}	38.33±3.33^{cde}	49.93±1.74^{c}
		(69.77)	(38.33)	(63.15)
	5% MeOH+0.9% NaCl	42.07±2.19^{def}	33.33±3.15^{cdef}	43.07±2.10^{d}
		(63.16)	(33.33)	(54.47)
	10% glycerol+Ginzburg	34.53±1.38^{fg}	30.00 ±3.62^{ef}	34.73±2.22^{e}
	fish ringer	(51.85)	(30.00)	(43.93)
8	10% DMSO+C-F HBSS	53.13±2.72^{bc}	60.00±4.08^{b}	56.93±2.00^{b}
		(79.78)	(60.00)	(72.00)
	10% DMA+C-F HBSS	45.47±3.00^{d}	41.67±3.15^{cd}	51.00±1.45^{c}
		(68.27)	(41.67)	(64.50)
	5% MeOH+0.9% NaCl	42.20±2.67^{def}	35.00±3.27^{cdef}	43.47±2.01^{d}
		(63.36)	(35.00)	(54.97)
	10% glycerol+Ginzburg	35.47±2.15^{efg}	31.67±3.83^{def}	35.07±1.73^{e}
	fish ringer	(53.25)	(31.67)	(44.53)
10	10% DMSO+C-F HBSS	54.27±1.48^{b}	61.67±4.13^{b}	57.60±2.01^{b}
		(81.48)	(61.67)	(72.85)
	10% DMA+C-F HBSS	45.13±2.97^{d}	45.00±3.62^{c}	50.40±1.62^{c}
		(67.77)	(45.00)	(63.74)
	5% MeOH+0.9% NaCl	42.60±2.30^{de}	36.67±3.33^{cde}	42.60±1.79^{d}
		(63.93)	(36.67)	(53.88)
	10% glycerol+Ginzburg	33.33±1.94^{g}	28.33±5.38^{f}	34.93±1.92^{e}
	fish ringer	(50.05)	(28.33)	(44.18)
Control		66.60±3.47^{a}	100±0.00^{a}	79.07±0.93^{a}

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ตัวเลขในวงเล็บคือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด (% of control)

ตารางที่ 4.8 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) ที่อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step, Two-steps และ Three-steps freezing procedures โดยใช้สาร 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS

Freezing rate	Fertilization (%)	Motility (%)	Viability (%)
One-step	61.47±1.08[b]	65.00±4.08[b]	64.53±1.63[b]
	(90.13)	(65.00)	(82.31)
Two-steps	53.33±3.42[c]	61.67±4.13[bc]	57.53±1.49[c]
	(78.20)	(61.67)	(73.38)
Three-steps	53.27±2.55[c]	55.00±3.62[c]	57.73±1.73[c]
	(78.10)	(55.00)	(73.64)
Control	68.20±1.93[a]	100±0.00[a]	78.40±0.84[a]

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขในวงเล็บคือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด (% of control)

4.4 การผลิตปลาลูกผสม (hybrid species) โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเผาะผสมกับไข่ปลาสวาย

จากการทดลองโดยเลือกสาร cryoprotectant ร่วมกับสาร extender แต่ละชนิดสาร cryoprotectant ที่ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุด ดังนี้ 1) 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS, 2) 10% DMA ร่วมกับ C-F HBSS, 3) 5% MeOH ร่วมกับ 0.9% NaCl และ 4) 10% glycerol ร่วมกับ Ginzburg fish ringer ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง จากนั้นนำน้ำเชื้อปลาเผาะแช่แข็งมาผสมกับไข่ปลาสวายเพื่อผลิตปลาลูกผสม พบว่าการใช้ 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและมีเปอร์เซ็นต์การฟักสูงสุดเท่ากับ 73.47±1.91% (93% ของน้ำเชื้อสด) และ 33.33±3.63% (71% ของน้ำเชื้อสด) ตามลำดับ เช่นเดียวกันเมื่อทดสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต พบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 61.67±5.38% (62% ของน้ำเชื้อสด) และ 49.07±2.29% (57% ของน้ำเชื้อสด) ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าทรีตเมนต์อื่น ๆ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และเมื่อใช้ 10% glycerol ร่วมกับ Ginzburg fish ringer ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิต่ำสุด 43.40±1.89% (55% ของน้ำเชื้อสด) ขณะที่เปอร์เซ็นต์การฟักพบว่าเมื่อใช้ 5% MeOH ร่วมกับ 0.9% NaCl และ 10% glycerol ร่วมกับ Ginzburg fish ringer ให้ผลของเปอร์เซ็นต์การฟักต่ำกว่า 5% ดังแสดงในตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การฟัก เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต ของการผลิตปลาลูกผสม โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเผาะผสมกับไข่ปลาสวาย

Treatment	Fertilization (%)	Hatching (%)	Motility (%)	Viability (%)
10% DMSO+C-F HBSS	73.47±1.91[b]	33.33±3.63[b]	61.67±5.38[b]	49.07±2.29[b]
	(92.61)	(70.73)	(61.67)	(57.46)
10% DMA+C-F HBSS	61.60±1.85[c]	25.13±2.10[c]	46.67±4.13[c]	41.67±1.33[c]
	(77.65)	(53.33)	(46.67)	(48.79)
5% MeOH+0.9% NaCl	49.73±2.20[d]	2.07±1.21[d]	43.33±3.83[c]	35.47±2.20[d]
	(62.69)	(4.39)	(43.33)	(41.53)
10% Glycerol+ Ginzburg	43.40±1.89[e]	0.60±0.41[d]	38.33±4.80[c]	34.00±2.11[d]
fish ringer	(54.71)	(1.27)	(38.33)	(39.81)
Control	79.33±0.99[a]	47.13±1.73[a]	100±0.00[a]	85.40±1.34[a]

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขในวงเล็บคือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด (% of control)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
การอภิปรายผล สรุป และข้อเสนอแนะ

5.1 ผลของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการศึกษาผลของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง พบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO เป็นสาร cryoprotectant ร่วมกับ C-F HBSS ให้ผลเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (75%) ซึ่งสูงกว่าการใช้สาร DMA (60%), MeOH (55%) และ glycerol (45%) และไม่แตกต่างกับการใช้น้ำเชื้อสด ($P>0.05$) เช่นเดียวกันในส่วนเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต พบว่า 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS ให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุด (61%) และในส่วนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ พบว่าที่ 5 และ 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ 64-70% ทั้งนี้สาเหตุที่ 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS ส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อมีคุณภาพดีกว่าสาร cryoprotectant ชนิดอื่น ๆ อาจเนื่องมาจาก C-F HBSS มีค่าออสโมลาลิตี้ (298±1.88 mOsm kg^{-1}) ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำเชื้อปลาเผาะ (297±3.77 mOsm kg^{-1}) เมื่อเทียบกับ 0.9% NaCl (277±1.77 mOsm kg^{-1}) และ Ginzburg fish ringer (249±2.35 mOsm kg^{-1}) เนื่องจากค่าออสโมลาลิตี้ของ extender ที่มีค่าใกล้เคียงกับน้ำเชื้อจะช่วยควบคุมรักษาความดันออสโมติกและรักษาคุณสมบัติและการทำงานของเซลล์อสุจิ อีกทั้ง C-F HBSS ยังมี glucose เป็นส่วนประกอบ ซึ่งไม่มีในส่วนประกอบของ 0.9% NaCl และ Ginzburg fish ringer โดย glucose จะเป็นแหล่งพลังงานให้กับตัวอสุจิ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Yao, Richardson and Crim (1999) ที่ได้ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อในปลา Ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) โดยศึกษาความแตกต่างส่วนประกอบของสาร extender พบว่าสาร extender ที่มีส่วนประกอบของ glucose จะช่วยให้พลังงานให้กับตัวอสุจิทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงกว่า สาร extender ที่ไม่มีส่วนประกอบของ glucose ซึ่งผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Mongkonpunya et al. (1995) ที่ทำการศึกษาในปลาบึก (Mekong giant catfish, *Pangasianodon gigas*) พบว่าเมื่อใช้ 9% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด ($P>0.05$) เช่นเดียวกันกับรายงานของ Harvath and Urbanyi (2000) ที่ทำการศึกษาในปลาดุกยักษ์ (African catfish, *Clarias gariepinus*) พบว่า 10% DMSO มีความเหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง โดยให้ผลเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ และเปอร์เซ็นต์การฟักเฉลี่ยระหว่าง 86.8±3.1% และ 67.1±11.9% ตามลำดับ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ และเปอร์เซ็นต์การฟักดังกล่าว มีค่าสูงกว่าการใช้ MeOH, Ethylene glycol, Propylene glycol และ glycerol เป็นสาร cryoprotectant เช่นเดียวกันกับรายงานของ Kwantong and Bart (2006) ที่ทำการศึกษาในปลาเทโพ (Black ear catfish, *Pangasius larnaudii*) พบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงกว่าการใช้ 10% DMA และ 5% MeOH และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ

Riley et al. (2004) ที่ได้ทำการศึกษาในปลา Red snapper (*Lutjanus campechanus*) พบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้ DMA, MeOH และ glycerol เป็นสาร cryoprotectant รวมถึงการทดลองของ He and Wood (2004) พบว่า DMSO สามารถป้องกันเนื้อเยื่อเมมเบรนและไมโตคอนเดรียและยังช่วยคงไว้ซึ่งคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์จากอันตรายที่เกิดจากผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นในกระบวนแช่แข็งได้ อีกทั้งมีการรายงานว่าการใช้ DMSO เป็นสาร cryoprotectant ประสบความสำเร็จในเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในปลาหลายชนิด เช่น Blue catfish, *Ictalurus furcatus* (Bart et al., 1998); Ocean pout, *Macrozoarces americanus* L. (Yao, Crim, Richardson and Emerson, 2000); Striped catfish, *P. hypophthalmus* (Kwantong and Bart, 2003); European catfish, *Silurus glanis* L. (Linhart et al., 2005) และ European eel, *Anguilla anguilla* (Penaranda, Perez, Gallego, Jover and Asturiano, 2009) เป็นต้น จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าการใช้สาร 10% DMSO เป็นสาร cryoprotectant ร่วมกับ C-F HBSS มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองการใช้ DMA, MeOH และ glycerol เป็นสาร cryoprotectant

ในขณะที่การใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant พบว่าเมื่อใช้ 10% DMA ร่วมกับ C-F HBSS ให้ผลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิให้เปอร์เซ็นต์ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบจากชุดการทดลองการใช้ DMSO เป็นสาร cryoprotectant แต่ให้ผลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิให้เปอร์เซ็นต์สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบจากชุดการทดลองการใช้ MeOH และ glycerol ผลอาจเนื่องมาจากสาร DMA combination ร่วมกับ C-F HBSS ซึ่งให้ผลดีเช่นเดียวกันกับกรณีของสาร DMSO combination ร่วมกับ C-F HBSS โดยทั่วไป DMA จะมีบทบาทในการช่วยรักษาพลังงานในขบวนการเมตาบอลิซึม หรือช่วยกระตุ้นในกระบวนการ ATP ให้กับเซลล์ ซึ่งจากการศึกษาของ Ogier de Baulny et al. (1999); Morris, Berghmans, Zahrieh, Neuberg, Kanki and Look (2003) ได้ศึกษาพบว่าการใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant จะช่วยรักษาพลังงาน หรือช่วยกระตุ้นในกระบวนการ ATP ให้กับเซลล์ เพื่อให้เซลล์มีสภาพคงอยู่หลังจากผ่านกระบวนการแช่แข็งและการละลาย นอกจากนี้การใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant ยังประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในกลุ่มปลา Salmonid (Babiak, Glogowski, Goryczko, Dobosz, Kuzminski, Strzezek and Demianowicz, 2001; Richardson, Miller and McNiven, 2000) และยังประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในปลาไน, *Cyprinus carpio* L. (Akcay, Bozkurt, Secer and Tekin, 2004; Warnecke and Pluta, 2003)

และจากการทดลองโดยใช้ MeOH เป็นสาร cryoprotectant พบว่าเมื่อใช้ 5% MeOH ร่วมกับ 0.9% NaCl ให้ผลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบจากชุดการทดลองการใช้ DMSO และ DMA เป็นสาร cryoprotectant ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในการใช้ระยะเวลา equilibration time (10 นาที) ในการทดลองที่เท่ากัน ทำให้ MeOH ซึ่งมีมวลโมเลกุล (32.04) ต่ำกว่ามวลโมเลกุลของ DMSO (78.13) และ DMA (87.12) จึงทำให้มีอัตราการแพร่เร็วกว่าทำให้สามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้รวดเร็วกว่าสาร cryoprotectant ชนิดอื่น ๆ และนอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อใช้ MeOH ที่ระดับความเข้มข้น 15% ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์การ

ปฏิสนธิต่ำกว่าการใช้ MeOH ที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10% ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Mongkonpunya et al. (1995) ที่ได้ทำการศึกษาในปลาบึก พบว่าระดับความเข้มข้น 14% MeOH มีความเป็นพิษต่อเซลล์อสุจิ ทำให้อสุจิไม่มีการเคลื่อนที่เมื่อเทียบกับที่ระดับความเข้มข้น 5-10% เช่นเดียวกันจากการศึกษาของ Christensen and Tiersch (2005) ที่ได้ทำการศึกษาในปลา Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) พบว่าเมื่อใช้ MeOH ที่ระดับความเข้มข้น 5% ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงกว่าที่ระดับความเข้มข้น 10% และสอดคล้องกับการศึกษาของ Harvath, Wayman, Urbanyi, Ware, Dean and Tiersch (2005); Christensen and Tiersch (1997) พบว่าเมื่อใช้ MeOH ระดับความเข้มข้น 15% มีความเป็นพิษต่ออสุจิมากกว่าการใช้ที่ระดับความเข้มข้น 5% และ 10% อย่างไรก็ตามในบางรายงานพบว่าการใช้ MeOH เป็นสาร cryoprotectant ประสบความสำเร็จในเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในปลาได้หลายชนิด เช่น ปลาดุกยักษ์ (Viveiros et al., 2000; 2001); Burbot, *Lota lota* (Lahnsteiner et al., 2002); Tropical bagrid catfish, *Mystus nemurus* (Muchlisin et al., 2004; Muchlisin and Azizah, 2009); Murray cod, *Marraycullochella peelii peelii* (Daly, Glloway, Bravington, Holland and Ingram, 2008)

ส่วนการใช้ glycerol เป็นสาร cryoprotectant พบว่าเมื่อใช้ 10% glycerol ร่วมกับ Ginzburg fish ringer ให้ผลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองของการใช้ DMSO, DMA และ MeOH เป็นสาร cryoprotectant ซึ่งในการทดลองพบว่าสาร glycerol มีลักษณะเป็นเจลหนืด อาจเกิดจากระยะเวลา (equilibration time) ที่ไม่เหมาะสม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในการใช้ระยะเวลา equilibration time (10 นาที) ที่เท่ากัน ทำให้ glycerol ซึ่งมีมวลโมเลกุล (92.09) มากกว่า DMSO (78.13), DMA (87.12) และ MeOH (32.04) มีอัตราการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ช้ากว่าสาร cryoprotectant ชนิดอื่น ๆ จึงเป็นสาเหตุทำให้มีประสิทธิภาพไม่เพียงพอในการป้องกันความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเซลล์ เนื่องจาก equilibration time มีผลต่อการแพร่ของสาร cryoprotectant เข้าสู่เซลล์ ซึ่งการใช้สาร glycerol อาจจะต้องใช้ร่วมกับ equilibration time ที่ระยะเวลานานขึ้นเพื่อให้ glycerol แพร่เข้าสู่เซลล์ได้ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Harvey, Kelley and Smith (1982) ได้กล่าวว่าการใช้สาร glycerol เป็นสาร cryoprotectant จะประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งจะต้องใช้ระยะ equilibration time ที่ระยะเวลามากกว่า 20 นาที และจากการศึกษาของ Conget, Fernandez, Herrera and Minguell (1996); Tekin, Secer, Akcay, Bozkurt and Kayam (2007) พบว่า glycerol มีความเป็นพิษต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในกลุ่ม Salmonid อย่างไรก็ตามบางรายงานพบว่าเมื่อใช้สาร glycerol เป็นสาร cryoprotectant ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง เช่นในปลาดุกยักษ์ (Steyn, 1993; Steyn and Van Vuren, 1987), European catfish (Linhart et al., 1993) และในปลา Platyfish, *Xiphophorus couchianus* (Huang et al., 2004) เป็นต้น ถึงแม้ว่าการใช้ glycerol เป็นสาร cryoprotectant จะให้ผลเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (27-45%) ต่ำกว่าการใช้ DMSO (35-75%), DMA (35-60%) และ MeOH (34-55%) แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าการศึกษาการใช้ glycerol เป็นสาร cryoprotectant ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะครั้งนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกในปลากลุ่ม Pangasiid

ซึ่งในการศึกษาครั้งต่อไป หากต้องการใช้สาร glycerol เป็นสาร cryoprotectant ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา จึงควรพิจารณาถึง equilibration time ประกอบด้วย

จากผลการศึกษาชนิดของสาร cryoprotectant (DMSO, DMA, MeOH และ glycerol) พบว่าผลของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ จะขึ้นอยู่กับ combination ระหว่างชนิดของสาร cryoprotectant และชนิดของสาร extender เช่น DMSO และ DMA ใช้ร่วมกับ C-F HBSS, MeOH ร่วมกับ 0.9% NaCl และ glycerol ร่วมกับ Ginzburg fish ringer อีกทั้งยังขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 15% มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่ระดับความเข้มข้นที่ 5% และ 10% นอกจากนี้ในการเลือกชนิดของสาร extender เพื่อใช้ในการศึกษากระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งนั้น ควรพิจารณาสาร extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้และค่าพีเอชที่ใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเชื้อปลาชนิดนั้น ๆ อีกทั้งส่วนประกอบของอิออนต่าง ๆ เช่น Na^+, K^+, Ca^{2+} ต่างมีผลต่อน้ำเชื้ออีกด้วย เมื่อพิจารณาผลจากการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (Correlation) ในจากการศึกษาผลของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่มีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และยังมีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ อีกทั้งเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตมีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ โดยทุกพารามิเตอร์มีความสัมพันธ์กันไปในทิศทางเดียวกัน เช่นในสาร DMSO มีความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตในระดับสูง ($r=0.878$, $P<0.05$) หรือ ในสาร glycerol มีความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิในระดับสูงมาก ($r=0.937$, $P<0.01$) เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องตามรายงานของ Rurangwa, Volckaert, Huyskens, Kime and Ollevier (2001) ที่ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกยักษ์โดยวิธีการแช่แข็ง พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่มีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การฟัก และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตมีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การฟัก ($r=0.83$, $P<0.001$) นอกจากนี้จากการรวบรวมเอกสารงานวิจัยของ Muchlisin (2005) ได้รายงานว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่มีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ โดยเมื่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงจะส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงตามไปด้วย ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าจากการทดลองเมื่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงก็จะส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงตามไปด้วยเช่นกัน ซึ่งจะเห็นได้ว่าความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็งนั้น ส่วนที่สำคัญนอกจากจะขึ้นอยู่กับ combination ร่วมกันระหว่างสาร cryoprotectant และสาร extender แล้วยังขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant อีกทั้งในการเลือกใช้สาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ยังขึ้นอยู่กับชนิดของปลา เนื่องจากเซลล์อสุจิของปลาแต่ละชนิด มีรูปร่างลักษณะและขนาด ตลอดจนโครงสร้างของส่วนประกอบต่าง ๆ เช่น ฟอสโฟลิพิด โปรตีน และไขมัน มีความแตกต่างกัน จึงทำให้ประสิทธิภาพของสารแต่ละชนิดมีอัตราการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แตกต่างกันออกไปด้วย

5.2 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rates) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง

ความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไม่เพียงแต่ขึ้นอยู่กับชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมเท่านั้นแต่ยังขึ้นอยู่กับอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในระหว่างขบวนการแช่แข็งด้วย โดยจากการวิเคราะห์ข้อมูลผลของอัตราการลดอุณหภูมิในครั้งนี้พบว่า อัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับ 6, 8 และ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต โดยพบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS ร่วมกับอัตราการลดอุณภูมิที่ 10 องศาเซลเซียสต่อนาทีให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 54, 62 และ 58% ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 6 และ 8 องศาเซลเซียสต่อนาที ($P>0.05$) ซึ่งผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องจากการศึกษาของ ศิริพร คชรัตน์ และคณะ (2548) ที่ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในปลาเทโพ โดยใช้ DMSO ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% ในระดับอัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5 และ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที ให้ผลเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิที่ไม่แตกต่างกัน ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก และจากการศึกษาของ Viveiros et al. (2001) ที่ได้ทำการศึกษาในปลาดุกยักษ์ โดยทำการลดอุณหภูมิที่ 3 ระดับ คือ 2, 5 และ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที พบว่าที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที ให้เปอร์เซ็นต์การฟักสูงสุดเท่ากับ 86.2±5.7% ซึ่งผลของเปอร์เซ็นต์การฟักไม่มีความแตกต่างจากการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 5 องศาเซลเซียสต่อนาที แต่ให้ผลที่สูงกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 2 องศาเซลเซียสต่อนาที ($P<0.05$) และจากการศึกษาของ Yang, Carmichael, Varga and Tiersch (2007) ที่ได้ทำการศึกษาในปลา Zebrafish (*Danio rerio*) โดยพบว่าอัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (35%) สูงกว่าอัตราการลดอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียสต่อนาที จะเห็นได้ว่าในการปฏิบัติการกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งเวลามีส่วนสำคัญต่อเซลล์ หากช้าหรือเร็วต่างก็ส่งผลให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ได้ อีกทั้งยังคำนึงเวลาในการทำงานและเวลาที่อัตราการระเหยของไนโตรเจน โดยที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 6 องศาเซลเซียสต่อนาที จะใช้เวลาในการrun program ประมาณ 17 นาที และที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 8 องศาเซลเซียสต่อนาที จะใช้เวลาประมาณ 13 นาที ส่วนที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที จะใช้เวลาประมาณ 10 นาที ซึ่งน้อยกว่าที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 6 และ 8 องศาเซลเซียสต่อนาที ทำให้สามารถประหยัดเวลา อีกทั้งประหยัดไนโตรเจนเหลว ซึ่งจะเป็นการลดต้นทุนในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง

นอกจากนี้ได้มีทำการทดลองเพื่อศึกษาเปรียบเทียบอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure (10 องศาเซลเซียสต่อนาที), Two-steps freezing procedure (อัตราลดอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก 3 ถึง -4 องศาเซลเซียส และ 11 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก -4 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส) และ Three-steps freezing procedure (อัตราลดอุณหภูมิที่ 5 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก 2

องศาเซลเซียส ถึง -7 องศาเซลเซียส และ 3 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก -7 องศาเซลเซียส ถึง -30 องศาเซลเซียส และ 2 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก -30 องศาเซลเซียสถึง -80 องศาเซลเซียส) พบว่าอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ Two-steps และ Three-steps ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Dokpong, Ponchunchoovong, Imsin, Piasoongnoen and Singhae (2009) ที่ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด (Small Scale Mud Carp, *Cirrhinus microlepis*) พบว่าที่อัตราการลดอุณภูมิแบบ One-step (10 องศาเซลเซียสต่อนาที) ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงสุดเท่ากับ 47.82±0.82% และ 51.50±0.98% ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ Two-steps ($P>0.05$) และในการศึกษาครั้งนี้พบว่าที่อัตราการลดอุณหภูมิแบบ Three-steps ให้ผลเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตต่ำกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากระยะเวลาในขบวนการแช่แข็งแบบ One-step จะใช้เวลาในการ run program ระหว่างขบวนการแช่แข็งประมาณ 10 นาที น้อยกว่าอัตราการลดอุณหภูมิแบบ Three-steps ที่ใช้เวลา 37 นาที ซึ่งเป็นไปได้ว่าหากมีการลดอุณภูมิเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ จะใช้เวลานานเกินไป ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ เนื่องจากเซลล์สูญเสียน้ำและทำให้เซลล์เหี่ยว (dehydration) อีกทั้งของเหลวภายในเซลล์มีความเข้มข้นสูงขึ้น จนเป็นพิษต่อเซลล์อสุจิจึงอาจเป็นสาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ส่งผลทำให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตต่ำ ในขณะที่อัตราการลดอุณหภูมิแบบ Two-steps ให้ผลเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตไม่ต่างจากการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ Three-steps แต่ให้ผลต่ำกว่าแบบ One-step อาจเกิดจากที่อัตราการลดอุณหภูมิแบบ Two-steps มีอัตราลดอุณหภูมิที่เริ่มต้นช้าเกินไป (ลดอุณหภูมิที่อัตรา 4 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก 3 ถึง -4 องศาเซลเซียส ตามด้วย 11 องศาเซลเซียสต่อนาทีจาก -4 องศาเซลเซียสถึง -80 องศาเซลเซียส) จึงเป็นสาเหตุทำให้คุณภาพน้ำเชื้อมีคุณภาพต่ำเช่นกับกรณีการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ Three-steps ซึ่งสอดคล้องจากการศึกษาของ Routray et al. (2008) ได้ทำการศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิในปลา Silver barb (*Puntius gonionotus*) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 4, 10, 16 และ 22 องศาเซลเซียสต่อนาที พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียสต่อนาที ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิต่ำกว่าและแตกต่างจากการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับอื่น ๆ ($P<0.05$) และจากการศึกษาของ Kwantong and Bart (2003) ได้ทำการศึกษาในปลาสวาย (Striped catfish, *Pangasius hypophthalmus*) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step (10 องศาเซลเซียสต่อนาที) และแบบ Two-steps พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่อย่างไรก็ตาม การลดอุณหภูมิแบบ One-step ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงกว่าการลดอุณหภูมิแบบ Two-steps และจากศึกษา Warnecke and Pluta (2003) ทำการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิในปลาไน โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ One-step และ Three-steps พบว่าการลดอุณหภูมิแบบ Three-steps มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงสุด (40±6%) แต่ไม่มีความแตกต่างจากการลดอุณหภูมิแบบ One-step ($P>0.05$) จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าการลดอุณหภูมิอย่างช้าหรือเร็วมีผลต่อความเสียหายของเซลล์ ดังนั้นความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา

โดยวิธีแช่แข็งไม่เพียงแต่ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของสาร extender และชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant เท่านั้น แต่ยังขึ้นอยู่กับอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในระหว่างกระบวนการแช่แข็งอีกด้วย อีกทั้งยังขึ้นอยู่กับชนิดของปลา

5.3 การผลิตปลาลูกผสม (hybrid species) โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเพาะผสมกับไข่ปลาสวาย

การผลิตลูกปลาสวายโมง ซึ่งเกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างพ่อพันธุ์ปลาเพาะและแม่พันธุ์ปลาสวาย โดยใช้น้ำเชื้อปลาเพาะแช่แข็งเพื่อแก้ไขปัญหาลูกพันธุ์ปลาเพาะไม่เพียงพอ จากการทดลองพบว่าการใช้ 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS ที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียสต่อนาทีให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและมีเปอร์เซ็นต์การฟักสูงสุดเท่ากับ 73 หรือ 93% ของน้ำเชื้อสด และ 33% (71% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งสูงกว่าทรีตเมนต์อื่น ๆ แต่ต่ำกว่าน้ำเชื้อสด ($P<0.05$) แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงกว่า 50% ซึ่งถือว่าประสบความสำเร็จน่าจะนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตปลาลูกผสม (สวายโมง) ได้จริง เพื่อแก้ปัญหาการผลิตลูกพันธุ์ปลาเพาะที่ไม่เพียงพอแก่เกษตรกรที่เพาะเลี้ยงปลา เนื่องมากจากปลาสวายมีความดกไข่เฉลี่ย 52,882 ฟองต่อกิโลกรัม ส่วนในปลาเพาะมีความดกไข่เฉลี่ย 9,688 ฟองต่อกิโลกรัม จะเห็นได้ว่าปลาสวายมีความดกไข่มากกว่าปลาเพาะประมาณ 5.5 เท่า ซึ่งจะสามารถผลิตลูกปลาเนื้อขาวได้เพียงพอกับความต้องการของตลาดและผู้บริโภค จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการผลิตปลาลูกผสมระหว่างน้ำเชื้อแช่แข็งปลาเพาะกับไข่ปลาสวายมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (73%) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิระหว่างน้ำเชื้อสดปลาเพาะกับไข่ปลาเพาะ (79%) ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ในการผลิตเชิงการค้าได้ นอกจากนี้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของปลาลูกผสมโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเพาะผสมกับไข่ปลาสวายยังมีค่าใกล้เคียงตามรายงานของ วรัณยู ขุนเจริญ และคณะ (2549) ได้ทำการศึกษาการเพาะพันธุ์ปลาเพาะ รุ่นF1 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การฟักอยู่ระหว่าง 56-73% และ 55-60% ตามลำดับ และสอดคล้องจากการศึกษาของเจริญ อุดมการ และสมบัติ สิงห์สี (2547) ที่ศึกษาการเพาะพันธุ์ปลาเพาะ โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การฟักอยู่ระหว่าง 68-95% และ 65-87% ตามลำดับ และใกล้เคียงปลาชนิดอื่นในวงศ์เดียวกัน เช่น เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การฟักในการเพาะพันธุ์ปลาเทโพ มีค่าระหว่าง 63-98% และ 31-97% ตามลำดับ (สมศักดิ์ รุ่งทองใบสุรีย์, สมเกียรติ พงษ์ศิริจันทร์, และบุญเลิศ ลบถม, 2548) และจากการรายงานของ Tarnchalanukit (1985) ได้ทำการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างปลาบึกกับปลาดุกอุยและปลาดุกด้าน โดยพบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อปลาบึกผสมกับไข่ปลาดุกอุยและปลาดุกด้านให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิเท่ากับ 73% และ 68% ตามลำดับและเปอร์เซ็นต์การฟัก 11% และ 19% ตามลำดับ และเมื่อใช้ไข่ปลาบึกผสมกับน้ำเชื้อกับไข่ปลาดุกอุยและปลาดุกด้านมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงเท่ากับ 97% และ 91% ตามลำดับ และเปอร์เซ็นต์การฟัก 23% และ 11% ตามลำดับ และจากการศึกษา Mongkonpunya et al. (1995) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึกโดยวิธีการแช่แข็งผสมกับไข่ปลาดุก พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิเฉลี่ย 65% ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้น้ำเชื้อสด ($P>0.05$) และจากการศึกษาของ Mengumphan, Whangchai and Amornlerdpison

(2010) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึกโดยวิธีการแช่แข็งผสมกับไข่ปลาสวาย โดยดูเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิที่ระยะเวลาในการเก็บรักษาที่ 14 วัน และ 1 ปี พบว่าที่ระยะเวลาในการเก็บรักษาที่ 14 วัน ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ 36.2% และที่ระยะเวลาในการเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 1 ปี ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ 30.9% ซึ่งต่ำกว่าน้ำเชื้อสดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และจากการศึกษาของ Urbanyi et al. (2004) ได้ทำการศึกษาน้ำเชื้อปลา Sterlet (*Acipenser ruthenus*) แช่แข็งผสมกับไข่ปลาในกลุ่ม Sturgeon พบว่าประสบความสำเร็จในการผลิตลูกผสมจากน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยให้เปอร์เซ็นต์การฟักเฉลี่ย 17-50% จะเห็นได้ว่าในการผลิตลูกผสมโดยใช้น้ำเชื้อปลาเพาะแช่แข็งผสมกับไข่ปลาสวายจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตปลาลูกผสมในปลาเศรษฐกิจตัวอื่น ๆ ได้

5.4 สรุปผลการทดลอง

5.4.1 จากการทดลองผลของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพาะ (*Pangasius bocourti*) โดยวิธีการแช่แข็ง พบว่าผลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ มีอิทธิพลร่วม (interaction) ระหว่างสาร extenders และระดับความเข้มข้นสาร cryoprotectants ในแต่ละชนิดสาร cryoprotectant ที่ทำการศึกษา (DMSO, DMA, MeOH และ glycerol) โดย C-F HBSS ร่วมกับ 10% DMSO มีความเหมาะสมต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพาะโดยวิธีการแช่แข็ง ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ 75% ซึ่งไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด (81%) และให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ 67% (67% ของน้ำเชื้อสด) และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต 61% (69% ของน้ำเชื้อสด)

5.4.2 อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing rate (10 องศาเซลเซียสต่อนาที) มีความเหมาะสมต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพาะโดยวิธีการแช่แข็ง

5.4.3 สามารถใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเพาะผสมกับไข่ปลาสวายเพื่อผลิตปลาลูกผสม (สวายโมง) โดยให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ 73% หรือ 93% ของน้ำเชื้อสด และเปอร์เซ็นต์การฟัก 33% หรือ 71% ของน้ำเชื้อสด

5.5 ข้อเสนอแนะ

5.5.1 ผู้วิจัยเห็นว่าในระหว่างขบวนการนับเพื่อตรวจเช็คเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิระยะไข่ควรใช้ความรวดเร็วในการนับ และควรนำขึ้นมานับที่ละทรีตเมนต์ เนื่องจากถ้าใช้เวลามากเกินไปจะส่งผลต่อการพัฒนาของไข่ได้

5.5.2 จากการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (Correlation) จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นการมีชีวิต มีความสัมพันธ์กันไปในทิศทางเดียวกัน ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปควรเลือกศึกษาเพียงเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ เนื่องจากการศึกษาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตต้องใช้เวลานานในการศึกษา อีกทั้งจะช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิจัยได้อีกด้วย

รายการอ้างอิง

กฤษณ์ มงคลปัญญา. (2536). **การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง**. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไปคณะวิทยาศาสตร์: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กระทรวงเทคโนโลยีสารสนเทศและการสื่อสาร สำนักงานสถิติแห่งชาติ. (2547). **โครงสร้างประชากรโลกและประชากรไทย พ.ศ. 2543-2568** [ออนไลท์]. ได้จาก http://service.nso.go.th/nso/nsopublish/themes/population.html

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน. (2545). **การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็ง**. วารสารการประมง ปีที่ 55 (1): 65-69.

เจริญ อุดมการ และ สมบัติ สิงห์สี. (2547). **ผลของฮอร์โมนและต่อมใต้สมองต่อการตกไข่ปลาโมง**.เอกสารวิชาการฉบับที่ 25/2547. สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ชวลิต วิทยานนท์. (2544). **ปลาน้ำจืดไทย**. กรุงเทพ: สำนักพิมพ์นานมีบุ๊คส์.

โชคชัย เหลืองธุวปราณีต. (2548). **หลักการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ**. แผนกวิชาเทคโนโลยีการประมงคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี: มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วรัณยู ขุนเจริญ โสภิศ ไชยยาว และ สุพัตร์ ศรีพัฒน์. (2549). **การเพาะพันธุ์ปลาโมง รุ่น F1**. เอกสารวิชาการฉบับที่ 69/2549. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

วิฑูรย์ ปัญญากุล. (2547). **ปลาหายไปไหน? สาเหตุและผลกระทบจากการทำประมงเกินขีดจำกัด.** กรุงเทพ: มูลนิธิสายใยแผ่นดิน.

วิเชียร หวัดสนิท. (2542). **การเลี้ยงปลาทับทิม**. กรุงเทพ: สำนักพิมพ์หนังสือเกษตรชุมชน.

วิวัฒน์ ปรารมภ์ และ ชัยศิริ ศิริกุล. (2538). **การศึกษาชีวิทยาบางประการของปลาโมง**. เอกสารวิชาการฉบับที่ 22/2538. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ศิริพร คชรัตน์ สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2548). การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) แบบแช่แข็ง. **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43** (หน้า 82-89). กรุงเทพ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุจินต์ หนูขวัญ มานพ ตั้งตรงไพโรจน์ กำชัย ลาวัณยวุฒิ และ ปรัชชัย วีรสิทธิ์. (2533). การผสมข้ามสายพันธุ์ระหว่างปลาดุกอุยและปลาดุกเทศ.**การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 28** (หน้า 533-568). กรุงเทพ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุญาณีพร ตุลยพงศ์รักษ์ ปัทมา ระตะนะอาพร และ จิราพร รุ่งเลิศเกรียงไกร. (2551). การเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยาของปลาสวายโมงที่เก็บรักษาในน้ำแข็ง. **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46** (หน้า 228-235). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุภัทรา อุไรวรรณ์ สุรางค์ สุมโนจิตราภรณ์ วงศ์ปฐม กมลรัตน์ และ พนิดา แก้วฤทธิ์. (2544). ผลของการผสมข้ามและการผสมเหนี่ยวนำ สายพันธุ์ที่มีต่อการเจริญเติบโตและรูปร่างของปลาไน. **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39** (หน้า 153-162). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุภาพร สุกสีเหลือง. (2550). **มีนวิทยา**. กรุงเทพฯ: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพฯ.

สมศักดิ์ รุ่งทองใบสุรีย์ สมเกียรติ พงษ์ศิริจันทร์ และ บุญเลิศ ลบถม. (2548). **การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์และการเพาะพันธุ์ปลาเทโพ.** สารวิชาการประมงฉบับที่ 1. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Akcay, E., Bozkurt, Y., Secer, S., and Tekin, N. (2004). Cryopreservation of Mirror Carp Semen. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences**. 28: 837-843.

Babiak, I., Glogowski, J., Brzuska, E., Szumiec, J., and Adamk, J. (1997). Cryopreservation of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L. **Aquaculture research**. 28: 567-571.

Babiak, I., Glogowski, J., Goryczko, K., Dobosz, S., Kuzminski, H., Strzezek, J., and Demianowicz, W. (2001). Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. **Theriogenology**. 56: 177-192.

Bart, A. N., Wolfe, D. F., and Dunham, R. A. (1998). Cryopreservation of Blue catfish spermatozoa and subsequent fertilization of Channel catfish eggs. **American Fisheries society**. 27: 819-824.

Christensen, J. M., and Tiersch, T. R. (1997). Cryopreservation of channel catfish spermatozoa: effect of cryoprotectant, straw size, and formulation of extender. **Thenogenology**. 47:639-645.

Christensen, J. M., and Tiersch T. R. (2005). Cryopreservation of channel catfish spermatozoa: effects of cryoprotectant exposure time, cooling rate, thawing conditions, and male-to-male variation. **Thenogenology**. 63: 2103-2112.

Conget, P., Fernandez, M., Herrera, G., and Minguell, J. J. (1996). Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. **Aquaculture**. 143: 319-329.

Daly, J., Glloway, D., Bravington, W., Holland, M., and Ingram, B. (2008). Cryopreservation of sperm from Murray cod, *Maccullochella peelii peelii*. **Aquaculture**. 285: 117-122.

Dokpong, D., Ponchunchoovong, S., Imsin, A., Piasoongnoen, U., and Singhae, S. (2009). The effect of freezing rates on the cryopreservation of Small Scale Mud Carp, *Cirrhinus microlepis* (Sauvage, 1878) sperm. **Second international conference on sustainable animal agriculture for developing coutries** (pp 268-270). 8-11 November, Corus Hotel, Kuala Lumpur, Malaysia.

Fabbrocini, A., Lavadera, S. L., Rispoli, S., and Sansone, G. (2000). Cryopreservation of Seabream (*Sparus aurata*) Spermatozoa. **Cryobiology**. 40: 46-53.

FAO GLOBEFISH. (2010). **Imports Frozen Pangasius: USA**. [On-line]. Available: http://www.globefish.org /groundfish-march-2010-us.html.

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

Harvey, B., Kelley, R. N., and Smith, M.J. (1982). Cryopreservation of zebra fish spermatozoa using methanol. **Journal of Zoology**. 60: 1867-1870.

He, S., and Wood, L. C. (2004). Effect of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitrochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. **Cryobiology**. 48: 254-262.

Horvath, A., and Urbanyi, B. (2000). The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm. **Aquaculture Research**. 31: 317-324.

Horvath, A., Wayman, W. R., Urbanyi, B., Ware, K. M., Dean, J. C., and Tiersch, T. R. (2005). The relationship of the cryoprotectnts methanol and dimethyl sulfoxide and hyperosmotic extenders on sperm cryopreservation of two North-American sturgeon species. **Aquaculture**. 247: 243-251.

Huang, C., Dong, Q., and Tiersch, T. R. (2004). Sperm cryopreservation of a live-bearing fish, the platyfish *Xiphophorus couchianus*. **Theriogenology**. 62: 971-989.

Huang, C., Dong, Q, Walter, R. B., and Tiersch, T. R. (2004). Initial studies on sperm cryopreservation of a live-bearing fish, the green swordtail *Xiphophorus helleri*. **Theriogenology**. 62: 179-194.

Huang, C., Sun, C., Su, X., Zhao, X., Miao, M., Liu, Y., and Dong, Q. (2009). Sperm cryopreservation in guppies and black mollies-A generalized freezing protocol for livebearers in Poeciliidae. **Cryobiology**. 59: 351-356.

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

Kwantong, S., and Bart, A. N. (2006). SHORT COMMUNICATION Cryopreservation of black ear catfish, *Pangasius larnaudii*, (Bocourt) sperm. **Aquaculture Research**. 37: 955-957.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Horvath, A., and Urbanyi, B. (2004). Studies on the semen biology and sperm cryopreservation in the sterlet, *Acipnser ruthenus* L. **Aquaculture Research**. 35: 519-528.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Horvath, A., Urbanyi, B., and Weismann, T. (2000). Cryopreservation of spermatozoa in Cyprinid fishes. **Theriogenology**. 54: 1477-1498.

Lahnsteiner, F., Mansour, N. and Weismann, T. (2002). The cryopreservation of spermatozoa of the burbot, *Lota lota* (Gadidae, Teleostei). **Cryobiology**. 45: 195-203.

Lanes, C. F. C., Okamoto, M., Cavalcanti, P. V., Collares, T., Campos, V. F., Deschamps, J. C., Robaldo, R. B., Marins,L. F., and Sampaio, L. A. (2008). Cryopreservation of Brazilian flounder (*Paralichthys orbignyanus*) sperm. **Aquaculture**. 275: 361-365.

Lang, R. P., Riley, K. L., Chandler, J. E., and Tiersch, T. R. (2003). The use of dairy protocols for sperm cryopreservation of blue catfish *Ictalurus furcatus*. **Journal of the World Aquaculture Society**. 34: 66-75.

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

Linhart, O., Rodina, M., and Cosson, J. (2000). Cryopreservation of sperm in common crap *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. **Cryobiology**. 41: 241-250.

Linhart, O., Rodina, M., Flajshans, M., Gela, D., and Kocour, M. (2005). Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* sperm: sperm motility, viability and hatching success of embryos. **Cryobiology**. 51: 250-61.

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.

Mengumphan, K., Whangchai, N., and Amornlerdpison, D. (2010). Effects of extender type, sperm volume, cryoprotectant concentration, cryopreservation and time duration on motility, survival and fertilisation rates of Mekong giant catfish sperm. **Maejo International Journal of Science and Technology**. 4: 417-427.

Michael, V. M. (2006). **Aquaculture of Tilapia and Pangasius; A Comparative Assessment**. [On-line]. Available: http://caribefish.com/portal/index.php.html.

Mongkonpunya, K., Chairak, N., Pupipat, T., and Tiersch, T. R. (1995). Cryopreservation of Mekong Giant Catfish Sperm. **Asian Fisheries Science**. 8: 211-221.

Mongkonpunya, K., Pupipat, T., and Tiersch, T. R. (2000). **Cryopreservation of Sperm of Asian Catfishes Including the Endangered Mekong Giant Catfish In: cryopreservation in aquatic species**. Tiersch, T. R., and Mazik, P. M. (Eds.). World aquaculture society, Baton Rouge, Lousiana.

Morris, J. P., Berghmans, S., Zahrieh, D., Neuberg, D. S., Kanki, J. P., and Look, A. T. (2003). Zebrafis h sperm cryopreservation with N, N-dimethylacetamide. **BioTechniques**. 35: 956-968.

Muchlisin, Z. A. (2005). Current status of extenders and cryoprotectants on fish spermatozoa cryopreservation. **Biodiversitas**. 60: 66-69.

Muchlisin, Z. A., and Azizah. M. N. S. (2009). Influence of cryoprotectants on abnormality and motility of baung (*Mystus nemurus*) spermatozoa after long-term cryopreservation. **Cryobiology**. 58: 166-169.

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.

Ogier de Baulny, B. O., Labbe, C., and Maisse, G. (1999). Membrane Integrity, Mitochondrial Activity, ATP Content, and Motility of the European Catfish (*Silurus glanis*) Testicular Spermatozoa after Freezing with Different Cryoprotectants. **Cryobiology**. 39: 177-184.

Penaranda, D. S., Perez, L., Gallego, V., Jover, M., and Asturiano, J. F. (2009). Improvement of European-eel sperm cryopreservation methode by preventing spermatozoa movement activation caused by cryoprotectants. **Cryobiology**. 59: 119-126.

Rainboth, W. J. (1996). **Fishes of the Cambodian Mekong**. FAO Species Identification Field Guide for Fishery Purposes. FAO, Rome.

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.

Riley, K., Holladay, C. G., Chesney, E. J., and Tiersch, T. R. (2004). Cryopreservation of sperm of red snapper (*Lutjanus campechanus*). **Aquaculture Research**. 238: 183-194.

Routray, P., Dash, S. N., Dash, C., Swain, P., Sarkar, S. K., and Sarangi, N. (2008). Cryopreservation of silver barb *Puntius gonionotus* (Bleeker) spermatozoa: effect of extender composition, cryoprotective agents and freezing rate on their postthawing fertilization ability. **Aquaculture Research**. 39: 1597-1605.

Rurangwa, E., Volckaert, F. A. M., Huyskens, I. G., Kime, I. D. E., and Ollevier, F. (2001). Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). **Theriogenology**. 55: 751-769.

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

Steyn, G. J. (1993). The effect of freezing rate on the survival of cryopreseved African Sharptooth Catfish (*Clarias gariepinus*) spermatozoa. **Cryobiology**. 30: 581-590.

Steyn, G. J., and Van Vuren, J. H. J. (1987). The fertilizing Capacity of Cryopreserved Sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) sperm. **Aquaculture**. 63: 187-194.

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

Takin, N., Secer, S., Akcay, E., Bozkurt, Y., and Kayam, S. (2007). Effects of glycerol additions on post-thaw fertility of frozen rainbow trout sperm, with an amphasis on interaction between extender and cryoprotectant. **Journal of Applied Ichthyology**. 23: 60-63.

Tarnchalanukit, W., (1985). **Experimental hybridization between Catfishes of the families Clariidae and Pangasidae in Thailand**. Kasetsart University Fishery research Bulletin number 16. Bankok, Thailand.

Tian, Y. S., Chen, S. L., Ji, X. S., Zhai, J. M., Sun, L. J., Chen, C. and Su, P. Z. (2008). Cryopreservation of spotted halibut (*Verasper variegatus*) sperm. **Aquaculture**. 284: 268-271.

Tuan, N. (1999). **Induced breeding on *Pangasius bocourti* Sauvage**, 1880. Research institute for aquaculture No. 2 (RIA.2). Vietnam.

Tyson, R. R. (1991). Systematic revision of the asian catfish family Pangasiidae, with biological observation and descriptions of three new species. **Proceedings of the Acedemy of Natural Sciences** (pp 97-144). Philadelphia.

Urbanyi, B., Horvath, A., and Kovacs, B. (2004). Successful hybridization of *Acipenser* species using cryopreserved sperm. **Aquaculture International**. 12: 47-56.

Viveiros, A. T. M., Lock, E. J., Woelders, H., and Komen, J. (2001). Influence of Cooling Rates and Plunging Temperatures in an Interrupted Slow-Freezing Procedure for Semen of the African Catfish, *Clarias gariepinus*. **Cryobiology**. 43: 276-287.

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-l408.

Vuthiphandchai, 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.

Warnecke, D., and Pluta, H. J. (2003). Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm using dimethyl-acetamide as the main cryoprotectant. **Aquaculture Research**. 215: 167-185.

Wayman, W. R., and Tiersch, T. R. (2000). **Research methods for cryopreservation of sperm In: cryopreservation in aquatic species**. Tiersch, T. R., and Mazik, P. M. (Eds.). World aquaculture society, Baton Rouge, Lousiana.

Yang, H., Carmichael, C., Varga, Z. M., and Tiersch, T. R. (2007). Development of a simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish *Danio rerio*. **Theriogenology**. 54: 1395-1408.

Yao, Z., Crim, L. W., Richardson, G. F. and Emerson, C. J. (2000). Motility, fertility and ultrastructural changes of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm after cryopreservation. **Aquaculture**. 181: 361-375.

Yao, Z., Richardson, G. F., and Crim, L. W. (1999). A diluent for prolonged motility of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm. **Aquaculture**. 174: 183-193.

ภาคผนวก ก

ตารางวิเคราะห์วาเรียนซ์

ภาคผนวก ก ตารางวิเคราะห์วาเรียนซ์

ตารางที่ ก.1 การวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของสาร extenders และระดับความเข้มข้นของสาร DMSO

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	7247.932	9	805.326	12.987	.000
Within Groups (ค่าความคลาดเคลื่อน)	4960.917	80	62.011		
Total	12208.849	89			

หมายเหตุ: Treatment คือ สาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับ DMSO ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15%

ตารางที่ ก.2 การวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสาร extenders และระดับความเข้มข้นของสาร DMSO

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	23790.000	9	2643.333	28.009	.000
Within Groups (ค่าความคลาดเคลื่อน)	7550.000	80	94.375		
Total	31340.000	89			

หมายเหตุ: Treatment คือ สาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับ DMSO ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15%

ตารางที่ ก.3 การวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสาร extenders และระดับความเข้มข้นของสาร DMSO

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	12812.338	9	1423.593	101.130	.000
Within Groups (ค่าความคลาดเคลื่อน)	1126.145	80	14.077		
Total	13938.482	89			

หมายเหตุ: Treatment คือ สาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับ DMSO ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15%

ตารางที่ ก.4 การวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของสาร extenders และระดับความเข้มข้นของสาร DMA

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	4329.746	9	481.083	15.037	.000
Within Groups (ค่าความคลาดเคลื่อน)	2559.503	80	31.994		
Total	6889.249	89			

หมายเหตุ: Treatment คือ สาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับ DMA ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15%

ตารางที่ ก.5 การวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสาร extenders และระดับความเข้มข้นของสาร DMA

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	24710.000	9	2745.556	50.493	.000
Within Groups (ค่าความคลาดเคลื่อน)	4350.000	80	54.375		
Total	29060.000	89			

หมายเหตุ: Treatment คือ สาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับ DMA ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15%

ตารางที่ ก.6 การวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสาร extenders และระดับความเข้มข้นของสาร DMA

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	12026.802	9	1336.311	96.287	.000
Within Groups (ค่าความคลาดเคลื่อน)	1110.270	80	13.878		
Total	13137.071	89			

หมายเหตุ: Treatment คือ สาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับ DMA ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15%

ตารางที่ ก.7 การวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของสาร extenders และระดับความเข้มข้นของสาร MeOH

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	3476.138	9	386.238	71.753	.000
Within Groups (ค่าความคลาดเคลื่อน)	430.627	80	5.383		
Total	3906.765	89			

หมายเหตุ: Treatment คือ สาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับ MeOH ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15%

ตารางที่ ก.8 การวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสาร extenders และระดับความเข้มข้นของสาร MeOH

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	27162.500	9	3018.056	45.989	.000
Within Groups (ค่าความคลาดเคลื่อน)	5250.000	80	65.625		
Total	32412.500	89			

หมายเหตุ: Treatment คือ สาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับ MeOH ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15%

ตารางที่ ก.9 การวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสาร extenders และระดับความเข้มข้นของสาร MeOH

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	10359.907	9	1151.101	100.450	.000
Within Groups (ค่าความคลาดเคลื่อน)	916.755	80	11.459		
Total	11276.663	89			

หมายเหตุ: Treatment คือ สาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับ MeOH ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15%

ตารางที่ ก.10 การวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของสาร extenders และระดับความเข้มข้นของสาร Glycerol

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	4504.866	9	500.541	211.978	.000
Within Groups (ค่าความคลาดเคลื่อน)	188.903	80	2.361		
Total	4693.769	89			

หมายเหตุ: Treatment คือ สาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับ Glycerol ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15%

ตารางที่ ก.11 การวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสาร extenders และระดับความเข้มข้นของสาร Glycerol

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	28860.000	9	3206.667	41.713	.000
Within Groups (ค่าความคลาดเคลื่อน)	6150.000	80	76.875		
Total	35010.000	89			

หมายเหตุ: Treatment คือ สาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับ Glycerol ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15%

ตารางที่ ก.12 การวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสาร extenders และระดับความเข้มข้นของสาร Glycerol

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	10834.630	9	1203.848	120.111	.000
Within Groups (ค่าความคลาดเคลื่อน)	801.824	80	10.023		
Total	11636.453	89			

หมายเหตุ: Treatment คือ สาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับ Glycerol ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15%

ตารางที่ ก.13 การวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	5588.604	12	465.717	13.980	.000
Within Groups (ค่าความคลาดเคลื่อน)	6062.859	182	33.312		
Total	11651.463	194			

หมายเหตุ: Treatment คือ อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure (6, 8 และ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที) ร่วมกับ (1) 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS, (2) 10% DMA ร่วมกับ C-F HBSS, (3) 5% MeOH ร่วมกับ 0.9% NaCl และ (4) 10% glycerol ร่วมกับ Ginzburg fish ringer

ตารางที่ ก.14 การวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	44836.154	12	3736.346	41.138	.000
Within Groups (ค่าความคลาดเคลื่อน)	16530.000	182	90.824		
Total	61366.154	194			

หมายเหตุ: Treatment คือ อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure (6, 8 และ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที) ร่วมกับ (1) 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS, (2) 10% DMA ร่วมกับ C-F HBSS, (3) 5% MeOH ร่วมกับ 0.9% NaCl และ (4) 10% glycerol ร่วมกับ Ginzburg fish ringer

ตารางที่ ก.15 การวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	9816.004	12	818.000	46.267	.000
Within Groups (ค่าความคลาดเคลื่อน)	3217.787	182	17.680		
Total	13033.790	194			

หมายเหตุ: Treatment คือ อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure (6, 8 และ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที) ร่วมกับ (1) 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS, (2) 10% DMA ร่วมกับ C-F HBSS, (3) 5% MeOH ร่วมกับ 0.9% NaCl และ (4) 10% glycerol ร่วมกับ Ginzburg fish ringer

ตารางที่ ก.16 การวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของอัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	837.286	3	279.095	8.769	.000
Within Groups (ค่าความคลาดเคลื่อน)	1782.338	56	31.827		
Total	2619.624	59			

หมายเหตุ: Treatment คือ อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step, Two-steps และ Three-steps freezing procedures ร่วมกับ 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS

ตารางที่ ก.17 การวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอัตราการลดอุณหภูมิต่าง ๆ

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	16901.250	3	5633.750	72.030	.000
Within Groups (ค่าความคลาดเคลื่อน)	4380.000	56	78.214		
Total	21281.250	59			

หมายเหตุ: Treatment คือ อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step, Two-steps และ Three-steps freezing procedures ร่วมกับ 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS

ตารางที่ ก.18 การวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของอัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	1676.066	3	558.689	48.670	.000
Within Groups (ค่าความคลาดเคลื่อน)	642.824	56	11.479		
Total	2318.890	59			

หมายเหตุ: Treatment คือ อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step, Two-steps และ Three-steps freezing procedures ร่วมกับ 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS

ตารางที่ ก.19 การวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของการผลิตปลาลูกผสม โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเผาะผสมกับไข่ปลาสวาย

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	5144.588	4	1286.147	68.512	.000
Within Groups (ค่าความคลาดเคลื่อน)	1314.090	70	18.773		
Total	6458.678	74			

หมายเหตุ: Treatment คือ (1) 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS, (2) 10% DMA ร่วมกับ C-F HBSS, (3) 5% MeOH ร่วมกับ 0.9% NaCl และ (4) 10% glycerol ร่วมกับ Ginzburg fish ringer

ตารางที่ ก.20 การวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การฟักของการผลิตปลาลูกผสม โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเผาะผสมกับไข่ปลาสวาย

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	21187.006	4	5296.752	133.396	.000
Within Groups (ค่าความคลาดเคลื่อน)	2779.481	70	39.707		
Total	23966.488	74			

หมายเหตุ: Treatment คือ (1) 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS, (2) 10% DMA ร่วมกับ C-F HBSS, (3) 5% MeOH ร่วมกับ 0.9% NaCl และ (4) 10% glycerol ร่วมกับ Ginzburg fish ringer

ตารางที่ ก.21 การวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของการผลิตปลาลูกผสม โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเผาะผสมกับไข่ปลาสวาย

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	28032.000	4	7008.000	60.339	.000
Within Groups (ค่าความคลาดเคลื่อน)	8130.000	70	116.143		
Total	36162.000	74			

หมายเหตุ: Treatment คือ (1) 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS, (2) 10% DMA ร่วมกับ C-F HBSS, (3) 5% MeOH ร่วมกับ 0.9% NaCl และ (4) 10% glycerol ร่วมกับ Ginzburg fish ringer

ตารางที่ ก.22 การวิเคราะห์วาเรียนซ์เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของการผลิตปลาลูกผสม โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งปลาเผาะผสมกับไข่ปลาสวาย

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	10627.054	4	2656.764	127.349	.000
Within Groups (ค่าความคลาดเคลื่อน)	1460.343	70	20.862		
Total	12087.397	74			

หมายเหตุ: Treatment คือ (1) 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS, (2) 10% DMA ร่วมกับ C-F HBSS, (3) 5% MeOH ร่วมกับ 0.9% NaCl และ (4) 10% glycerol ร่วมกับ Ginzburg fish ringer

ประวัติผู้เขียน

นางสาวสุพรรณี ไก่นิล เกิดเมื่อวันที่ 17 ธันวาคม พ.ศ. 2527 เริ่มศึกษาชั้นประถมที่โรงเรียนวัดยางหัก ชั้นประถมศึกษาปีที่ 1-6 อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 1-3 ที่โรงเรียนธีรศาสตร์ อำเภอบ้านโป่ง จังหวัดราชบุรี ชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 4-6 ที่โรงเรียนนวมินทราชินูทิศสวนกุหลาบวิทยาลัยปทุมธานี อำเภอลำลูกกา จังหวัดปทุมธานี และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา เมื่อปี พ.ศ.2549 จากนั้นศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปี พ.ศ. 2550 นอกจากนี้ระหว่างการศึกษาได้มีโอกาสเข้าร่วมการประชุมและนำเสนอผลงานวิจัย : Second international conference on sustainable animal agriculture for developing countries (SAADC 2009) ในหัวเรื่อง Successful hybridization of *Pangasius* species using cryopreserved sperm ณ ประเทศมาเลเซีย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี