

เอกสารวิชาการฉบับที่ ๖/๒๕๔๓



Technical Paper no. 6/2004

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานิลโดยวิธีแช่แข็ง
CRYOPRESERVATION OF NILE TILAPIA
(*Oreochromis niloticus*) SPERMATOOZA

พลชาติ ผิวเณร

Ponlachart Pewnane

คงภพ อัมพลศักดิ์

Kongphop Ampolsak

ธาวร จินหมิก

Thaworn Jeenmik

ชมพูนุช มรรคทรัพย์

Chompunuch Makkasab

สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ

Aquatic Animal Genetics Research
and Development Institute

กรมประมง

Department of Fisheries

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

Ministry of Agriculture and Cooperatives

เอกสารวิชาการฉบับที่ ๖/๒๕๔๓



Technical Paper no. 6/2004

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานิลโดยวิธีแช่แข็ง
CRYOPRESERVATION OF NILE TILAPIA
(*Oreochromis niloticus*) SPERMATOZOA

พลชาติ ผิวเณร	Ponlachart Pewnane
คงภพ อัมพลศักดิ์	Kongphop Ampolsak
ถาวร จินหมิก	Thaworn Jeenmik
ชมพูนุช มรรคทรัพย์	Chompunuch Makkasab

กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์น้ำจืด
สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ

กรมประมง
๒๕๔๓

Inland Fish Bio-Technology Research Group
Aquatic Animal Genetics Research
and Development Institute
Department of Fisheries
2004

รหัสทะเบียนวิจัยเลขที่ 47-0-60-74-6-080

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
ABSTRACT	3
คำนำ	5
วัตถุประสงค์	6
วิธีดำเนินการ	6
วิจารณ์ผลการศึกษา	35
สรุปผลการศึกษา	37
คำขอขอบคุณ	38
เอกสารอ้างอิง	38

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวของน้ำเชื้อปลานิลที่เก็บแบบระยะสั้น นาน 144 ชม. ในน้ำยา 4 สูตร 3 อัตราเจือจาง	15
2 ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวของน้ำเชื้อปลานิลที่เก็บแบบระยะสั้น นาน 144 ชม. ในน้ำยา 4 สูตร 3 อัตราเจือจาง	16
3 ระดับออสโมลาริตีและปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวของปลานิล ณ จุดเริ่มกระตุ้น การเคลื่อนไหวและจุดกระตุ้นการเคลื่อนไหวสูงสุดในน้ำยากลุ่มมีและไม่มีประจุ	18
4 ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวในสารละลายที่ผสมด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด 6 ความเข้มข้น ที่ระยะเวลาต่างๆ	22
5 ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวในสารละลายที่ผสมด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด 6 ความเข้มข้น ที่ระยะเวลาต่างๆ	23
6 ปริมาณและเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ก่อนแช่แข็งและหลังละลายจากการลดอุณหภูมิ ด้วยไนโตรเจนเหลวที่ระยะห่างระหว่างหลอดกับไนโตรเจนเหลว 3 ระดับ	28
7 ปริมาณและเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวก่อนและหลังละลายเมื่อใช้สูตรน้ำยาและอัตรา ลดอุณหภูมิแตกต่างกัน โดยใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ	29
8 อัตราปฏิสนธิและอัตราฟักของไข่ปลานิลที่ผสมด้วยน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง ที่ระยะเวลาเก็บต่างๆ กัน	34

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวกับระดับออสโมลาริตีของน้ำยา 0.85% NaCl เทียบกับน้ำยากลูโคส	18
2 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวกับระดับออสโมลาริตีของน้ำยา MC เทียบกับน้ำยากลูโคส	19
3 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวกับระดับออสโมลาริตีของน้ำยา 0.85% NaCl เทียบกับน้ำยา MC	19
4 ถึงบรรจุใน โตรเจนเหลวและตำแหน่งการวางหลอดน้ำเชื้อ 3 ระดับ	25
5 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาจากหลอดที่วางห่างจากระดับในโตรเจนเหลว ในถึงเก็บ 19.0 ซม.	26
6 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาจากหลอดที่วางห่างจากระดับในโตรเจนเหลว ในถึงเก็บ 14.5 ซม.	26
7 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาจากหลอดที่วางห่างจากระดับในโตรเจนเหลว ในถึงเก็บ 9.5 ซม.	27
8 ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวเริ่มต้นและหลังละลายจากการลดอุณหภูมิด้วยไอในโตรเจนเหลว ที่ระยะห่างระหว่างหลอดกับในโตรเจนเหลว 3 ระดับ	30
9 เวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวเริ่มต้นและหลังละลายจากการลดอุณหภูมิด้วยไอในโตรเจนเหลว ที่ระยะห่างระหว่างหลอดกับในโตรเจนเหลว 3 ระดับ	30
10 อัตรารอดและเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวหลังละลายจากการลดอุณหภูมิด้วยไอในโตรเจนเหลวที่ระยะห่างระหว่างหลอดกับในโตรเจนเหลว 3 ระดับ	31
11 ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวเริ่มต้นและหลังละลายเมื่อใช้น้ำยาเจือจางและอัตราลดอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ด้วยเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ	31
12 อัตรารอดของสเปิร์มหลังการละลายเมื่อใช้น้ำยาเจือจางและอัตราลดอุณหภูมิแตกต่างกัน ด้วยเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ	32
13 เวลาที่สเปิร์มปลานิลเคลื่อนไหวก่อนและหลังละลายเมื่อใช้น้ำยาเจือจางและอัตราลดอุณหภูมิแตกต่างกัน ด้วยเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ	32
14 เวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวหลังการละลายเทียบกับก่อนแช่แข็ง เมื่อใช้น้ำยาเจือจางและอัตราลดอุณหภูมิแตกต่างกัน ด้วยเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ	33

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
15 อัตราปฏิสนธิของไข่ที่ได้รับการผสมด้วยน้ำเชื้อปลานิลสดและแช่แข็งที่เก็บในระยะเวลาต่างๆ	34

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานิลโดยวิธีแช่แข็ง

พลชาติ ผิวเณร* คงภพ อำพลศักดิ์ ถาวร จินหมิก และ ชมพูนุท มรรคทรัพย์

สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ

บทคัดย่อ

ทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานิล (*Orochromis niloticus*) สายพันธุ์ Egypt Marzala โดยวิธีแช่แข็ง จากการศึกษา (1) ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อในการเก็บรักษาแบบระยะสั้นนาน 0–144 ชม. พบว่าน้ำยา 0.85% NaCl in Phosphate Buffer Saline (0.85% NaCl) ให้ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวสูงสุด รองลงมาคือน้ำยา Bicarbonate Buffer (BCB) และ modified fish's Ringer (MC) และต่ำสุดคือน้ำยา Frog Ringer's solution (FRS) โดยน้ำยา BCB ส่งผลให้สเปิร์มเคลื่อนไหวนานที่สุดที่ระยะเวลาเก็บ 0–120 ชม. (2) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวกับระดับออสโมลาริตีของน้ำยากลุ่มมีประจุ (MC และ 0.85% NaCl) และกลุ่มไม่มีประจุ (กลูโคส) ที่เจือจางให้มีความเข้มข้น 0–100% พบว่าน้ำยาทั้ง 2 กลุ่มแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับออสโมลาริตีกับปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวเป็นแบบผกผัน โดยน้ำยากลุ่มมีประจุ ระดับออสโมลาริตีที่เริ่มกระตุ้นการเคลื่อนไหว (threshold) สูงสุด (309.00 ± 3.46 mOsmol/kg) รองลงมาคือ 0.85% NaCl (245.67 ± 5.86 mOsmol/kg) และต่ำสุดคือน้ำยา MC (230.33 ± 5.03 mOsmol/kg) ส่วนน้ำยากลุ่มไม่มีประจุและ MC ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน (210.67 ± 11.50 และ 197.00 ± 5.29 mOsmol/kg ตามลำดับ) มีระดับออสโมลาริตี ณ จุดกระตุ้นการเคลื่อนไหวสูงสุด (complete activation) มากกว่าน้ำยา 0.85% NaCl (172.33 ± 1.53 mOsmol/kg) ผลที่ได้บ่งบอกว่าอออนบางชนิดมีผลต่อการยับยั้งและกระตุ้นการเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลานิล (3) ศึกษาผลของสารไครโอโพรเทกแทนท์ 3 ชนิด คือ DMSO เมธานอล และกลีเซอรอล ที่เจือจางในสารละลายน้ำเชื้อปลานิลที่ความเข้มข้น 7 ระดับ ในระยะเวลา 0–120 นาที พบว่า DMSO และ เมธานอล มีผลให้ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวไม่แตกต่างกันแต่มากกว่ากลีเซอรอล โดยเมธานอลส่งผลให้สเปิร์มเคลื่อนไหวนานที่สุด รองลงมาคือ DMSO และต่ำสุดคือกลีเซอรอล (4) ศึกษาอัตราการคงอุณหภูมิและวิธีการลดอุณหภูมิในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลานิล โดยเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยา MC และใช้ 10% เมธานอลเป็นสารไครโอโพรเทกแทนท์ อัตราเจือจางน้ำเชื้อ : น้ำยาเป็น 1 : 5 บรรจุในหลอดแช่แข็งปริมาตร 1 มล. และปล่อยให้สเปิร์มปรับตัวกับน้ำยาที่อุณหภูมิ 25°C นาน 15 นาที แล้วจึงนำเข้าเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ ตั้งโปรแกรมเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 25°C ลดอุณหภูมิตามอัตราที่ตั้งจนถึง -60°C แล้วจึงนำหลอดแช่แข็งลงในไนโตรเจนเหลว (-196°C) พบว่าอัตราการคงอุณหภูมิ -5 และ -10°C /นาที ส่งผลให้สเปิร์มที่ละลาย (ที่ 37°C นาน 1 นาที) มีอัตราการรอดและระยะเวลาเคลื่อนไหวสูงกว่าที่อัตรา -1°C /นาที โดยน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยา BCB และ MC มีผลให้สเปิร์มที่ละลายมีอัตราการรอดและระยะเวลาเคลื่อนไหวสูงกว่าน้ำยา 0.85% NaCl และจากการใช้วิธีการลดอุณหภูมิโดยใช้ไนโตรเจนเหลวโดยวางหลอดห่างจากระดับไนโตรเจนเหลวใน

ถึงเก็บ (MVE SC 20/15) 3 ระดับ พบว่าที่ระดับ 9.5 และ 14.5 ซม. ซึ่งมีอัตราการลดอุณหภูมิ -11.91 และ -7.86 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ส่งผลให้สเปิร์มที่ละลายมีอัตราการรอดและระยะเวลาเคลื่อนไหวสูงกว่าที่ระดับ 19.0 ซม. (-3.14 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) และจากการนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บนาน 36–426 วันมาผสมเทียมเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดที่เจือจางด้วยน้ำยาสูตรเดียวกันและมีอัตราเจือจางเท่ากัน (น้ำยา MC อัตราเจือจาง 1 : 5) พบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บนาน 36, 41, 86, 415 และ 426 วันให้อัตราปฏิสนธิระหว่าง $72.92 \pm 14.73 - 88.48 \pm 13.81$ % และอัตราฟัระหว่าง $47.49 \pm 4.18 - 70.67 \pm 24.66$ % ซึ่งไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสดที่มีอัตราปฏิสนธิระหว่าง $82.34 \pm 1.32 - 93.80 \pm 5.08$ % และอัตราฟัระหว่าง $55.44 \pm 1.67 - 87.59 \pm 6.68$ % แต่ที่ระยะเวลาเก็บ 55 และ 62 วัน น้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งกลับให้ผลต่ำกว่าน้ำเชื้อสด คาดว่าอาจมีสาเหตุจากการปนเปื้อนของปัสสาวะในน้ำเชื้อปลานิลในระหว่างการเก็บน้ำเชื้อ

คำสำคัญ: ปลานิล น้ำเชื้อ สเปิร์ม การเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็ง

*ผู้รับผิดชอบ: 39 หมู่ 1 ต.คลองห้า อ.คลองหลวง จ.ปทุมธานี 12120 โทร. 0 2577 5058–60

e-mail: nagri_dof@yahoo.com

CRYOPRESERVATION OF NILE TILAPIA (*Oreochromis niloticus*) SPERMATOZOA

Ponlachart Pewnane* Kongphop Ampolsak Thaworn Jeenmik and Chompunuch Makkasab

Aquatic Animal Genetics Research and Development Institute

ABSTRACT

The study aimed to develop the protocol for sperm cryopreservation of *Oreochromis niloticus* Egypt Marzala strain. Four experiments have been conducted. The first experiment was to determine sperm motility in different extenders under short period observations (0 – 144 hr.) at temperature 4 – 5 °C. The results showed that sperms diluted with 0.85 percent NaCl with phosphate buffer (0.85%NaCl) gave the highest sperm motility followed by the following extenders, bicarbonate buffer (BCB), modified fish Ringer (MC) and frog Ringer's solution. The second experiment was to observe the relationship between sperm motility and osmolarity in ionic and non ionic solutions. The ionic solution included 0.85% NaCl and MC, whereas, the non-ionic solution was 0 – 100% concentration of glucose. Negative correlation ($r = -0.81$ to -0.94) of sperm motility and osmolarity were found. The glucose solution gave the highest threshold sperm motility at osmolarity 309 ± 6.46 mOsmol/kg. followed by the 0.85% NaCl (245.67 ± 5.86 mOsmol/kg.) and the MC (230.33 ± 5.03 mOsmol/kg). In addition, the MC gave the highest complete sperm activation at the 210.67 ± 11.50 mOsmol/kg followed by the glucose (197.0 ± 5.29 mOsmol/kg.) and the 0.85% NaCl (230.33 ± 5.03 mOsmol/kg). The third experiment was to determine sperm motility after diluted in 3 cryopreservation solutions namely, Dimethyl sulfoxide (DMSO), Methanol and Glycerol at dilution rate 2, 5, 10, 15, 20 and 25% for the period of 0, 30 and 120 minutes after storage. The results showed that methanol gave the highest sperm motility followed by DMSO and glycerol. The fourth experiment studied freezing rate and cryopreservation protocol of the tilapia sperm. The protocol that used MC extender with 10% methanol ratio sperm per extender at 1:5, and equilibrated at 25 °C for 15 minutes, then frozen the sperm in 1 ml cryotube at -60 °C and put into liquid nitrogen the results showed that the best survival rate and motility was at the reducing temperature of -5 and -10 °C per minute. The reducing temperature protocol by liquid nitrogen vapour showed that at the distance 9.5 and 14.5 cm. above liquid nitrogen surface in MVE SC 20/15 with the reducing temperature rate -11.91 and -7.8 °C / min. gave the sperm survive and motility rate higher than that of 19 cm. (-3.14 °C/min.). Cryopreserved sperm which

have been preserved for 36 – 426 days were used in artificial insemination comparing with fresh milt at the same extender. The result showed that the sperm that have been preserved for 36, 41, 86, 415 and 426 days gave the fertilization rate at 72.92 ± 14.73 to $88.48 \pm 13.81\%$ and the hatching rate 47.49 ± 4.18 to $70.67 \pm 24.66\%$ which were not significant different from those which used the fresh milt. However, at the preserved period of 55 to 62 days gave the low fertilization and the hatching rate than the fresh milt. This may caused by urine contamination.

Key words: Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, milt, semen, spermatozoa, cryopreservation

*Corresponding author: 39 Moo 1 T.Khlongha A.Khlongluang C.Pathumthani 12120 Tel. 0 577 5058

e-mail: nagri_dof@yahoo.com

คำนำ

ปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.) เป็นปลาที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกาใต้ มีการนำเข้ามาในประเทศไทยครั้งแรกโดยสมเด็จพระจักรพรรดิอาากิฮิโตะแห่งประเทศญี่ปุ่นเมื่อครั้งดำรงพระอิสริยยศ มกุฎราชกุมาร ได้ทรงจัดส่งมาทูลเกล้าถวายพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดช จำนวน 50 ตัว ในปี พ.ศ. 2508 ซึ่งต่อมาทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ พระราชทานลูกปลานิลแก่กรมประมงเพื่อดำเนินการเพาะขยายพันธุ์ ปลานิล ดังกล่าวถือเป็นสายพันธุ์แท้ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันทั่วโลก เรียกกันว่าสายพันธุ์จิตรลดา (Chitralada strain) ปลานิลเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว ทนทานต่อโรค สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ความเป็นกรดเป็นด่างและความเค็มในช่วงกว้าง กินอาหารไม่จำกัดประเภท สามารถผสมพันธุ์วางไข่ได้ตลอดปีและแพร่ขยายพันธุ์ได้ง่ายทั้งในที่เลี้ยงและในธรรมชาติ นอกจากนี้เนื้อยังมีรสชาติเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคทั่วโลก จึงทำให้มีการเพาะเลี้ยงปลานิลแบบกึ่งพัฒนา (semi-intensive) และแบบพัฒนา (intensive) เพื่อให้ได้ปลาขนาดใหญ่และผลผลิตสูง (มานพ และคณะ, 2536) อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงปลานิลให้ได้ผลผลิตสูงมักเลี้ยงเฉพาะปลาเพศผู้ เนื่องจากปลาเพศเมียสามารถมีไข่ตั้งแต่อายุ 2 เดือนขึ้นไป จึงสูญเสียพลังงานส่วนหนึ่งไปใช้ในการสร้างไข่และอนุบาลลูกปลา ทำให้ปลาเพศเมียมีอัตราเจริญเติบโตช้ากว่าปลาเพศผู้ในรุ่นเดียวกัน ปัจจุบันมีวิธีแก้ปัญหาดังกล่าวอยู่สองวิธีคือการสร้างพ่อพันธุ์ปลานิลซูเปอร์แมล (supermale หรือ YY-male) ซึ่งเป็นปลาที่ถูกเปลี่ยนโครโมโซมเพศจาก XY เป็น YY แล้วนำไปผสมพันธุ์กับแม่ปลาปกติจะทำให้ได้ลูกปลาเป็นเพศผู้ล้วนซึ่งเรียกว่าปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 2 หรือ Genetically Modified Tilapia (GMT) (นวลฉนิ และ พุทธิรัตน์, 2538) แต่ในทางปฏิบัติกลับพบว่าลูกปลาไม่เป็นเพศผู้ทั้งหมด ทั้งนี้เนื่องจากมีปัจจัยอื่นๆ นอกเหนือจากโครโมโซมเพศในการควบคุมเพศปลานิล และอีกวิธีคือการผลิตลูกปลานิลเพศผู้ล้วนโดยการอนุบาลลูกปลานิลวัยอ่อนด้วยอาหารผสมฮอร์โมนเมทิลเทสโทสเตอโรน (17α - Methyltestosterone หรือ 17α -MT) ซึ่งจะมีผลทำให้ลูกปลากลายเป็นเพศผู้ล้วน แต่เปอร์เซ็นต์เพศผู้ที่ได้จากวิธีการนี้ผันแปรไปตามวิธีการให้ฮอร์โมนและฟาร์มแต่ละแห่ง

แนวทางหนึ่งในการแก้ไขปัญหาข้างต้นคือ การสร้างปลานิลหมันโดยวิธีการควบคุมชุดโครโมโซม(chromosome manipulation) เพื่อแปลงชุดโครโมโซมลูกปลาจากปกติซึ่งเป็นสองชุด (2n) ให้กลายเป็นสี่ชุด (4n) โดยการฉีดไข่หรือสเปิร์มด้วยอุณหภูมิหรือรังสีอัลตราไวโอเลต แล้วเลี้ยงจนเป็นพ่อแม่พันธุ์ เมื่อนำไปผสมกับปลาปกติ (2n) จะได้ลูกปลาที่มีชุดโครโมโซมสามชุด (3n) ซึ่งเป็นหมัน วิธีการข้างต้นต้องปฏิบัติในโรงเพาะฟักและต้องใช้วิธีผสมเทียมเพื่อควบคุมระยะเวลาการปฏิสนธิและขบวนการแบ่งเซลล์ของตัวอ่อน ดังนั้นหากมีการเก็บน้ำเชื้อปลานิลที่ต้องการเก็บไว้ จะช่วยให้การผสมเทียมปลานิลมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานิลยังมีประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ โดยการเก็บน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่ต้องการเก็บไว้ใช้ผสมเทียม การเก็บรักษาสเปิร์มโดยวิธีแช่แข็ง (spermatozoa cryopreservation) เป็นวิธีการเก็บสเปิร์มระยะยาวไว้ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C ถือเป็นการรักษาเชื้อพันธุ์และลักษณะทางพันธุกรรมของสัตว์แต่ละตัวซึ่งมีอยู่ในเชื้อพันธุ์ไว้นอกถิ่นที่อยู่อาศัย

ตามธรรมชาติ (*ex-situ* preservation) เป็นวิธีที่นิยมและใช้ได้ผลกับสัตว์หลายชนิด การเก็บรักษาสเปิร์มโดยวิธีแช่แข็งจะมีการใช้น้ำยา (*extenders*) เจือจางน้ำเชื้อซึ่งผสมสารที่ช่วยป้องกันความเสียหายให้กับเซลล์ระหว่างกระบวนการลดอุณหภูมิ สารเหล่านี้เรียกว่า “ไครโอโพรเทคแทนท์ (*cryoprotectants*)” มีการกำหนดระยะเวลาให้เซลล์ปรับตัวกับสารละลาย (*equilibration*) กำหนดอัตราการลดอุณหภูมิ และลักษณะหลอดที่จะใช้แช่แข็ง ซึ่งถ้ามีการปฏิบัติถูกต้องและเหมาะสมกับสัตว์น้ำแต่ละชนิด จะสามารถเก็บรักษาสเปิร์มได้อย่างยั่งยืน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตรต่างๆ ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานิลระยะสั้น
2. เพื่อศึกษาระดับการเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลานิลในน้ำยาสูตรมีประจุ (*ionic solutions*) และในน้ำยาสูตร ไม่มีประจุ (*ion-deficient solution*) ที่มีระดับออสโมลาริตีแตกต่างกัน
3. เพื่อศึกษาผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (*cryoprotectants*) ที่มีต่อสเปิร์มปลานิล
4. เพื่อศึกษาวิธีการ อัตราและขั้นตอนการลดอุณหภูมิในกระบวนการแช่แข็ง
5. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเชื้อปลานิลที่ผ่านการแช่แข็งด้วยวิธีผสมเทียม

วิธีการดำเนินงาน

1. การเตรียมพ่อแม่พันธุ์ปลานิล

ใช้พ่อแม่พันธุ์ปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.) สายพันธุ์ Egypt Manzala ขนาด 200 – 400 กรัม ซึ่งเป็นปลาที่เพาะเลี้ยง ณ สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ เลี้ยงในตู้กระจกขนาด 75 ลิตร ระบบน้ำหมุนเวียนและให้อากาศตลอดเวลา ตู้ละ 1 ตัว ให้อาหารเม็ดปลาคูชนิดลอยน้ำ โปรตีน 40% ในอัตราวันละ 3% ของ นน. ตัว โดยงดอาหารก่อนรีดน้ำเชื้อและรีดไข่ไม่ต่ำกว่า 24 ชม.

2. การเก็บน้ำเชื้อและรีดไข่

เก็บน้ำเชื้อจากปลาเพศผู้โดยนำมารีดปัสสาวะ ออกจนหมดแล้วรีดน้ำเชื้อโดยใช้มือรีดบริเวณช่วงท้องไปหาตึงเพศ ใช้หลอดคาร์ปิลลารี (*capillary tube*) ช่วยดูดน้ำเชื้อจากปลายตึงเพศลงหลอด *microcentrifuge* ขนาด 1 มล. ซึ่งแช่ในน้ำแข็งและใส่น้ำยา *deactivator* (0.7% NaCl + 0.6% KCl) ซึ่งเป็นน้ำยาที่ป้องกันการกระตุ้นสเปิร์มปลานิลให้เคลื่อนไหวจากการปนเปื้อนโดยปัสสาวะ ปริมาตร 0.1 มล. โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Rana and McAndrew (1989) นำน้ำเชื้อที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 รอบ/นาที นาน 5

นาที่ ค่อยๆ คูดสารละลายส่วนบนออก แล้วจึงเติมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อในปริมาตร = ปริมาตรที่คูดออก - 0.1 มล. ของน้ำยา deactivator อื่นๆ ในกรณีที่จะเก็บน้ำเชื้อสดจะไม่เติมน้ำยา deactivator โดยจะนำน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อที่เจือจาง หรือน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งไปตรวจสอบคุณภาพและความหนาแน่นสเปิร์ม ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

– จำนวนสเปิร์มต่อหน่วยปริมาตร (sperm count) คัดแปลงจากวิธีการของ กฤษณ์ (2536) โดยเจือจางน้ำเชื้อสด 200 เท่าด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 0.85 % (น้ำเชื้อสด 2 μ l + น้ำเกลือ 398 μ l) ใช้ไมโครไปเปิดคูดขึ้นลงเบาๆ เพื่อให้สเปิร์มกระจายในน้ำยาสม่ำเสมอแล้วจึงคูดสารละลายน้ำเชื้อ 20 μ l หยดลงบนสไลด์นับเม็ดโลหิต (haemocytometer) ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ออกแบบมาใช้กับสไลด์นับเม็ดโลหิต กดกระจกปิดสไลด์เลื่อนไปมาเบาๆ เพื่อให้สารละลายน้ำเชื้อส่วนเกินไหลออกจากช่องที่จะนับ ทิ้งไว้เวลาน้อยกว่า 10 นาที เพื่อให้สเปิร์มทุกเซลล์จมลงบนพื้นสไลด์ นับจำนวนเซลล์สเปิร์มภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า โดยนับจำนวนสเปิร์มในช่องใหญ่ซึ่งประกอบด้วยช่องเล็ก 16 ช่อง ทั้ง 4 มุม และนับช่องตรงกลาง 1 ช่อง รวมทั้งสิ้น 5 ช่องใหญ่หรือ 80 ช่องเล็ก นำมาคำนวณหาจำนวนสเปิร์มต่อมิลลิลิตรจากสูตร

$$\text{จำนวนสเปิร์ม/มล.} = \text{จำนวนสเปิร์มรวมจาก 5 ช่องใหญ่} \times \text{อัตราเจือจางน้ำเชื้อ} \times 10,000^a$$

(^a จำนวนช่องทั้งหมดที่นับจำนวนสเปิร์ม $\times$ ค่าสัดส่วนเทียบเท่าปริมาตรน้ำเชื้อที่ 1 ml ซึ่งจะได้เป็นค่าคงที่ = 10,000)

– ปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว คัดแปลงจากวิธีการของ กฤษณ์ (2536) โดยวางสไลด์บนกล้องจุลทรรศน์ หยดน้ำประปา 30 μ l ลงบนสไลด์ คูดตัวอย่างน้ำเชื้อสดประมาณ 2 μ l และลงบนสไลด์ใกล้หยดน้ำ จากนั้นใช้แท่งแก้วขนาดเล็กกลายน้ำมาผสมกับหยดน้ำเชื้อเพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนไหวแล้วมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ทันที พร้อมทั้งเริ่มจับเวลาหน่วยเป็นวินาที บันทึกภาพการเคลื่อนไหวของสเปิร์มโดยใช้กล้องถ่ายรูป นำไฟล์ภาพเคลื่อนไหวที่บันทึกได้ไปนับจำนวนสเปิร์มที่เคลื่อนที่และไม่เคลื่อนที่ทั้งหมดที่เห็น นำมาคำนวณปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ จากสูตร

$$\text{ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว} = (\text{จำนวนสเปิร์มที่เคลื่อนไหว} / \text{จำนวนสเปิร์มทั้งหมด}) \times 100$$

บันทึกเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวโดยนับเวลาตั้งแต่เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำแล้วมองผ่านกล้องจุลทรรศน์จนกระทั่งเห็นสเปิร์มจำนวนประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์หยุดนิ่ง หน่วยเป็นวินาที

– อัตราการปฏิสนธิ (fertilization rate) และอัตราฟัก (hatching rate) จากการผสมเทียม โดยคัดแปลงจากวิธีการของ กฤษณ์ (2536); Rana and McAndrew (1989) นำแม่ปลาที่พร้อมวางไข่โดยสังเกตจากท้องที่ขึ้นออกมาขาวกว่าปกติ ใช้ผ้าสะอาดเช็ดบริเวณท้องและดึงเพศจันเห้ง ริดไข่โดยใช้มือริดบริเวณส่วนท้องไปหาท้องเพศใส่ในถ้วยแก้วที่แห้งและสะอาด แบ่งไข่ที่ริดได้จำนวนเท่าๆ กันใส่จานเพาะเชื้อ (petri dish) คูดน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อเจือจาง หรือน้ำเชื้อแช่แข็งที่นำมาละลายซึ่งทราบปริมาตรและความหนาแน่นของสเปิร์มหยดลงบนไข่ ทำให้น้ำเชื้อกับไข่ผสมทั่วถึงกันโดยส่ายจานเพาะเชื้อเบาๆ เติมน้ำประปาปริมาตร 20 มล. เพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนไหวไปปฏิสนธิกับไข่ ทิ้งไว้เวลานาน 1 นาทีแล้วเติมน้ำประปาปริมาตร 50 มล.

แล้วทิ้งไว้นาน 5 นาที นำไข่ที่ได้รับการผสมไปฟักในกรวยฟักระบบ down dwelling ประเมินเปอร์เซ็นต์ปฏิสนธิโดยนับไข่ดีซึ่งตัวอ่อนพัฒนาถึงระยะ eyed และไข่เสียซึ่งมีสีขาวขุ่นทั้งหมดในแต่ละกรวยฟัก และประเมินเปอร์เซ็นต์ฟักโดยนับลูกปลาตัวอ่อนในระยะที่ 4 จำนวนอัตราปฏิสนธิและอัตราฟัก หน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์จากสูตร

อัตราปฏิสนธิหรือฟัก = จำนวนไข่ดีหรือลูกปลาตัวอ่อนระยะที่ 4 / (จำนวนไข่ดีหรือลูกปลาตัวอ่อน + ไข่เสีย)

3. วิธีการดำเนินงานในแต่ละการศึกษา

3.1 ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตรต่างๆ ในการเก็บน้ำเชื้อปลานิลแบบระยะสั้น

เจือจางน้ำเชื้อปลานิลด้วยน้ำยาเจือจางและนำไปเก็บรักษาแบบระยะสั้นที่อุณหภูมิ 4 °C โดยเปรียบเทียบน้ำยาเจือจาง 4 สูตรคือ

- modified fish Ringer's solution (MC) (Rana and McAndrew, 1989) (6.50 g/l NaCl, 3.00 g/l KCl, 0.30 g/l CaCl₂, 0.20 g/l NaHCO₃, pH 7.9, 275 mOsmol/kg)
- 0.85 % NaCl in Phosphate Buffer Solution (0.85% NaCl) (นิศา, 2539) (8.50 g/l NaCl, 0.36 g/l NaH₂PO₄, pH 7.0, 293 mOsmol/kg)
- bicarbonate buffer – 2 (BCB) (นิศา, 2539) (0.36 g/l NaH₂PO₄, 85 g/l sucrose, 3 g/l reduced glutathione, pH 7.0, 297 mOsmol/kg)
- modified frog Ringer – 2 (FRS) (นิศา, 2539) (8.50 g/l NaCl, 0.16 g/l CaCl₂·2H₂O, 0.20 g/l NaHCO₃, 0.39 g/l MgSO₄·7H₂O, pH 7.0, 296 mOsmol/kg)

เปรียบเทียบอัตราเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยาในแต่ละสูตรน้ำยา 3 ระดับคือ 1:3 1:5 และ 1:9 โดยนำน้ำเชื้อปลานิลที่รีดได้จากปลาแต่ละตัวซึ่งตรวจสอบแล้วว่ามีความปกติในปริมาณเท่ากันมาผสมรวมกันเป็น sperm pool คัดน้ำเชื้อไปผสมกับน้ำยาตามอัตราเจือจางในหลอดทดสอบขนาด 5 มล. หลังจากผสมน้ำเชื้อกับน้ำยาให้เข้ากันดีแล้วใช้แผ่นฟอยล์ปิดฝาหลอดทดสอบเพื่อกันน้ำและช่วยให้อากาศผ่านเข้าออกได้ นำไปเก็บในตู้เย็นซึ่งปรับอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 4 °C นำหลอดออกมาเปิดฝาและแกะกันหลอดให้น้ำเชื้อที่ตกตะกอนและน้ำยาเข้ากันและช่วยเติมออกซิเจนให้น้ำเชื้อวันละ 3 ครั้ง ตรวจสอบประสิทธิภาพน้ำเชื้อที่เก็บรักษาที่ระยะเวลาเก็บ 5 ระยะ คือ 2, 24, 48, 72 และ 96 ชม. โดยตรวจสอบปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวหลังถูกกระตุ้นด้วยน้ำจืด (เปอร์เซ็นต์) ระยะเวลาที่เคลื่อนไหว (วินาที) โดยวางแผนการทดลองแบบ 3×3×5 สปลิทพล็อตในการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (3×3×5 split – plot liked analysis in completely randomized design) (อนันต์ชัย, 2539)

3.2 ศึกษาการเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลานิลในน้ำยากลุ่มมีประจุและ ไม่มีประจุ

ศึกษาการเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลานิลในน้ำยาสองกลุ่ม คือกลุ่มมีประจุ คือน้ำยา MC และน้ำยา 0.85% NaCl และกลุ่มไม่มีประจุ คือสารละลายกลูโคส ตามวิธีการของ นิสา (2539) โดยแบ่งเป็นการทดลองย่อย 2 การทดลองคือ

3.2.1 ศึกษาจุดที่สเปิร์มเริ่มเคลื่อนไหว (threshold activation) และมีการเคลื่อนไหวสูงสุด (complete activation) ของทุกสูตรน้ำยา โดยนำน้ำเชื้อสดจากปลานิล 3 ตัว (3 ชั่วโมง) มาผสมน้ำยาทั้งสองกลุ่มที่ความเข้มข้นจากมากไปหาน้อย โดยเตรียมน้ำยาให้มีความเข้มข้น 11 ระดับ คือ 100 (น้ำยาเข้มข้น) 90 80 70 60 50 40 30 20 10 และ 0 % (น้ำกลั่น) นำน้ำยาแต่ละความเข้มข้นและน้ำหล่อเลี้ยงน้ำเชื้อ (seminal plasma) ซึ่งได้จากการนำน้ำเชื้อสดไปปั่นเหวี่ยงในเครื่องปั่นเหวี่ยง (ultracentrifuge) ที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที นาน 8 นาที ดูดสารละลายส่วนบน ไปวัดระดับออสโมลาริตีด้วยออสโมมิเตอร์ (vapor pressure osmometer) หน่วยเป็น mOsmol/kg ตรวจสอบปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวหลังจากผสมด้วยน้ำยาเริ่มจากความเข้มข้นมากไปหาน้อย เพื่อที่จะดูระดับออสโมลาริตีที่เริ่มกระตุ้นการเคลื่อนไหวของสเปิร์ม (threshold activation) เมื่อตรวจสอบพบว่ามีสเปิร์มไม่เกิน 25% เคลื่อนไหว และระดับออสโมลาริตีที่กระตุ้นการเคลื่อนไหวสูงสุด (complete activation) เมื่อตรวจสอบพบว่ามีสเปิร์มมากกว่า 75% เคลื่อนไหว โดยเปรียบเทียบผลระหว่างน้ำยาทั้งสองสูตรกับน้ำยาที่ไม่มีประจุ เพื่อศึกษาว่าการเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลานิลที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากปัจจัยด้านไอออนหรือออสโมลาริตี โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Completely Block Design) (อนันต์ชัย, 2539)

3.2.2 นำน้ำยาทั้งสองกลุ่มจากการศึกษาที่ 3.2.1 มาเพื่อศึกษา

3.2.2.1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวกับระดับออสโมลาริตี โดยนำค่าความสัมพันธ์ที่ได้มาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ (general curve) ระหว่างเปอร์เซ็นต์ สเปิร์มเคลื่อนไหวกับระดับออสโมลาริตีของแต่ละสูตรน้ำยาทั้งสองกลุ่มที่ความเข้มข้นทั้ง 11 ระดับ

3.2.2.2 อธิพลจากระดับออสโมลาริตีหรือไอออน โดยนำความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวกับระดับออสโมลาริตีมาศึกษาความสัมพันธ์ในรูปสมการเชิงเส้น (linear regression) โดยพิจารณาความเป็นเส้นตรง ความชัน และสัมประสิทธิ์ตัวกำหนด (r^2) รวมทั้งจุด threshold และ complete activation ของน้ำยาทั้งสองกลุ่มมีประจุเปรียบเทียบกับน้ำยาที่ไม่มีประจุ เพื่อดูว่าการเคลื่อนไหวของสเปิร์มเกิดขึ้นจากอิทธิพลของไอออนหรือออสโมลาริตี

3.3 ศึกษาผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อสเปิร์มปลานิล

เตรียมน้ำยาเจือจางสูตรที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานิลระยะสั้น โดยเตรียมน้ำเชื้อและตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อเช่นเดียวกับการศึกษาที่ 3.1 ใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด คือ เมธานอล กลีเซอรอล และไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide, DMSO) เติมลงในสารละลายน้ำเชื้อ จนได้ความเข้มข้นสุดท้าย 7 ระดับ คือ 0, 2, 5, 10, 15, 20 และ 25 % โดยเจือจางสารไครโอโพรเทคแทนท์ในน้ำยาก่อน แล้วจึงเติมน้ำเชื้อตามอัตราส่วนมาผสมแล้วนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4–6 °C เมื่อครบกำหนดเวลา 3 ระยะ คือ 0 (หลังผสมทันที) 30 และ 120 นาที นำออกมาตรวจสอบปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว โดยวางแผนการทดลองแบบ 2×8 สปลิทพล็อตในการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (2×8 split – plot liked analysis in complete randomized design) (อนันต์ชัย, 2539)

3.4 ศึกษาอัตราและวิธีการลดอุณหภูมิในขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลานิล

เจือจางน้ำเชื้อปลานิลด้วยน้ำยาที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการเก็บรักษาแบบระยะสั้นและผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีพิษต่อสเปิร์มปลานิลต่ำสุดจากผลการศึกษาที่ 3.1 และ 3.3 ดูดสารละลายน้ำเชื้อปริมาตร 0.5 มล. ใส่หลอด (cryotube) ทิ้งให้สเปิร์มปรับตัวกับน้ำยา (equilibration) ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 15 นาที แล้วนำไปทดลองดังนี้

3.4.1 เปรียบเทียบอัตราการลดอุณหภูมิในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลานิลโดยใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (programmable freezer) โดยนำหลอดเข้าเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (Kryo 10/16 series) เปรียบเทียบอัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับคือ -1, -5 และ -10 °C/นาที จากอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 25 °C จากนั้นจึงลดอุณหภูมิในแต่ละอัตราจนถึง -60 °C และคง (hold) ไว้ที่ -60 °C นาน 2 นาที แล้วจึงนำหลอดออกจากเครื่องแล้วนำไปแช่ลงในไนโตรเจนเหลว (-196 °C) ในถังเก็บตัวอย่างทันที ตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อที่เก็บไว้นาน 7 วัน โดยนำหลอดในแต่ละแบบการลดอุณหภูมิออกมาละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 37 °C นานจนกระทั่งน้ำเชื้อแช่แข็งละลายหมด (ประมาณ 1 นาที) แล้วนำไปตรวจสอบปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว (%) และระยะเวลาที่เคลื่อนไหว (นาที) นำค่าปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวมาคำนวณหาอัตราการรอด (%) ([ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวหลังการละลาย/ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวก่อนแช่แข็ง]×100) และระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวหลังการละลายเทียบกับก่อนแช่แข็ง (%) ([ระยะเวลาที่ สเปิร์มเคลื่อนไหวหลังการละลาย/ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวก่อนแช่แข็ง]×100) โดยวางแผนการทดลองแบบ 3×3 สปลิทพล็อตในการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (3×3 split – plot liked analysis in completely randomized design) (อนันต์ชัย, 2539)

3.4.2 ศึกษาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลานิลโดยใช้ไอไนโตรเจนเหลว นำหลอดไปแช่ในไอไนโตรเจนเหลวในถังเก็บตัวอย่าง (MVE SC series 20/15) โดยกลัดหลอดติดกับ cane แล้วนำไปวางให้ก้นหลอดอยู่ห่างจากระดับผิวไนโตรเจนเหลวในถังที่ระดับต่างๆ กัน บันทึก

อุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงทุกๆ 2 วินาทีในหลอดขณะแช่ในไอใน ไตรเจนเหลวด้วยเครื่องบันทึกอุณหภูมิอัตโนมัติ (data logger) เพื่อนำไปสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$) กับระยะเวลา (นาทีก) เพื่อคำนวณหาอัตราการลดอุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}/\text{นาทีก}$) จากความชันเส้นกราฟ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design) (อนันต์ชัย, 2539)

3.5 ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเชื้อปลานิลที่ผ่านการแช่แข็งโดยวิธีผสมเทียม

เปรียบเทียบคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งโดยวิธีผสมเทียมเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด โดยนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บในช่วงระยะเวลาต่างๆ มาละลายแล้วนำไปผสมเทียมกับไข่จากแม่ปลานิลที่ตรวจสอบพบว่าพร้อมที่จะไข่ โดยเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดซึ่งใช้น้ำเชื้อรวมจากปลานิล 3–5 ตัวในปริมาณเท่ากันและเจือจางด้วยน้ำยาสูตรและอัตราเจือจางเดียวกับน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (completely randomized design) ในการทดลองผสมเทียมแต่ละครั้ง (อนันต์ชัย, 2539)

4. การวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 วิเคราะห์ประสิทธิภาพของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตรต่างๆ ที่มีผลในการเก็บน้ำเชื้อปลานิลระยะสั้นที่ $4-6^{\circ}\text{C}$ โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอิทธิพลหลัก คือ สูตรน้ำยา อัตราเจือจาง และระยะเวลา และค่าเฉลี่ยของอิทธิพลร่วม เมื่อวิเคราะห์ค่าทดสอบ F ของอิทธิพลหลักและอิทธิพลร่วมนั้นๆ เป็นค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตามลำดับ โดยใช้วิธี Student – Newman – Keuls (SNK) (Baynes and Scott, 1987 อ้างตาม กฤษณ์, 2536)

4.2 วิเคราะห์ระดับการเคลื่อนไหว (activation curve) ของสเปิร์ม ในน้ำยาเจือจางกลุ่มมีประจุและไม่มีประจุ โดยวิเคราะห์ดังนี้

4.2.1 เปรียบเทียบระดับออสโมลาริตี ณ จุด threshold และ complete activation ของค่าเฉลี่ยน้ำยาทั้งสองกลุ่ม (3 สูตร) เมื่อวิเคราะห์ค่าทดสอบ F ของระดับออสโมลาริตี กลุ่มและสูตรน้ำยา และอิทธิพลร่วมนั้นๆ เป็นค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตามลำดับ โดยใช้วิธี Student – Newman – Keuls (SNK) (Baynes and Scott, 1987 อ้างตาม กฤษณ์, 2536)

4.2.2 เปรียบเทียบปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวที่ระดับออสโมลาริตีต่างๆ ระหว่างน้ำยาแต่ละสูตรกับสารละลายกลูโคส 5 % และระหว่างสูตรน้ำยาจนครบทุกคู่ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความถดถอยและสหสัมพันธ์ (regression) ตามวิธีการของ Finney (1964) และอนันต์ชัย (2539) มีลำดับการวิเคราะห์ดังนี้

- นำปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวและระดับออสโมลาริตีของแต่ละสูตรน้ำยาในช่วง $100 - 300 \text{ mOsmol/kg}$ มาสร้างสมการเชิงเส้น (linear regression)

- วิเคราะห์ความเป็นเส้นตรง (linearity) ของเส้นกราฟของน้ำยา 3 สูตร 2 กลุ่ม โดยใช้การทดสอบแบบเอฟ
- นำกราฟสมการเชิงเส้นของแต่ละสูตรน้ำยามาเปรียบเทียบกับกราฟสมการเชิงเส้นของสารละลายกลูโคสและเปรียบเทียบระหว่างสูตรน้ำยาจนครบทุกคู่ โดยวิเคราะห์ความชันของเส้นกราฟแต่ละคู่ โดยใช้การทดสอบแบบเอฟ
- ทดสอบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวและระดับออกซิโมลาริตีที่ทำให้สเปิร์มเริ่มเคลื่อนไหว (threshold activation) และมีการเคลื่อนไหวโดยใช้การทดสอบแบบที (t-test)

4.3 วิเคราะห์ประสิทธิภาพของสารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิดที่มีผลต่อสเปิร์ม โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอทธิพลหลัก คือ ชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ อัตราเจือจาง และระยะเวลา และค่าเฉลี่ยของอทธิพลร่วม เมื่อวิเคราะห์ค่าทดสอบ F ของอทธิพลหลักและอทธิพลร่วม นั้นๆ เป็นค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ตามลำดับ โดยใช้วิธี Student – Newman – Keuls (SNK) (Baynes and Scott, 1987 อ้างตาม กฤษณ์, 2536)

4.4 อัตราลดอุณหภูมิและวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลานิล

4.4.1 เปรียบเทียบอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลานิล โดยใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยวิเคราะห์อัตราการลด และระยะเวลาเคลื่อนไหวของสเปิร์มในน้ำเชื้อแช่แข็งที่นำมาละลาย โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอทธิพลหลักคือ อัตราลดอุณหภูมิ สูตรน้ำยา และอทธิพลร่วม เมื่อวิเคราะห์ค่าทดสอบ F ของอัตราการลดและระยะเวลาเคลื่อนไหวเป็นค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้วิธี Student – Newman – Keuls (SNK) (Baynes and Scott, 1987 อ้างตาม กฤษณ์, 2536)

4.4.2 ศึกษาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลานิลโดยใช้ไนโตรเจนเหลว โดยวิเคราะห์อัตราการลดและระยะเวลาเคลื่อนไหวของสเปิร์มในน้ำเชื้อแช่แข็งที่นำมาละลาย เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอทธิพลหลักคือระยะห่างระหว่างหลอดกับไนโตรเจนเหลว เมื่อวิเคราะห์ค่าทดสอบ F ของอัตราการลดและระยะเวลาเคลื่อนไหวเป็นค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้วิธี Duncan's multiple range test (DMRT) (อนันต์ชัย, 2539)

4.5 ประสิทธิภาพของน้ำเชื้อปลานิลที่ผ่านการแช่แข็งโดยวิธีผสมเทียม

เปรียบเทียบประสิทธิภาพน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งโดยวิธีผสมเทียมเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด โดยวิเคราะห์อัตราปฏิสนธิและอัตราฟักจากการใช้น้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งและน้ำเชื้อสดในการผสมเทียมในแต่ละครั้งของแต่ละช่วงระยะเวลาเก็บ โดยเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของอัตราปฏิสนธิและอัตราฟักเมื่อวิเคราะห์ค่าทดสอบ F ของอัตราปฏิสนธิและอัตราฟักเป็นค่าที่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยใช้วิธี Duncan's multiple range test (DMRT) (อนันต์ชัย, 2539)

ผลการศึกษา

น้ำเชื้อสดที่เก็บจากปลานิลเพศผู้ *O. niloticus* สายพันธุ์ Egypt Manzala จำนวน 10 ตัว พบว่าน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม (seminal plasma) มีระดับออสโมลาริตี $272 - 324 \text{ mOsmol/kg}$ (เฉลี่ย $300.00 \pm 13.82 \text{ mOsmol/kg}$) มีจำนวนสเปิร์ม $4.91 - 18.2 \times 10^8$ เซลล์/มล. (เฉลี่ย $11.93 \pm 5.21 \times 10^8$ เซลล์/มล.) นำน้ำเชื้อปลานิลไปทดลองตามวัตถุประสงค์ต่างๆ ได้ผลการทดลองดังนี้

1. ประสิทธิภาพของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตรต่างๆ ในการเก็บน้ำเชื้อปลานิลระยะสั้น

จากการใช้น้ำยาเจือจาง 4 สูตร คือ bicarbonate buffer - 2 (BCB), modified frog Ringer - 2 (FRS), modified fish Ringer's solution (MC) และ 0.85% NaCl in PBS (NaCl) เจือจางน้ำเชื้อด้วยอัตราเจือจาง 3 ระดับ คือ 1:3, 1:5 และ 1:9 เก็บรักษาน้ำเชื้อปลานิลแบบระยะสั้น เมื่อตรวจสอบปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวในระยะเวลา 0 - 144 ชม. (ตารางที่ 1 และ 2) ได้ผลการศึกษาโดยแบ่งตามระยะเวลาที่เก็บได้เป็นช่วงดังนี้

ระยะเวลาเก็บ 0 - 72 ชม. พบว่าน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยาทั้ง 4 สูตร 3 อัตราเจือจาง มีปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) (ตารางที่ 1) แต่สูตรน้ำยามีผลให้สเปิร์มเคลื่อนไหวในระยะเวลาแตกต่างกัน ($p < 0.05$) โดยน้ำยา BCB ส่งผลให้สเปิร์มเคลื่อนไหวนานที่สุด รองลงมาคือน้ำยา 3 สูตรที่เหลือซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 2)

ระยะเวลาเก็บ 96 ชม. พบว่าสูตรน้ำยามีผลต่อปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ($p < 0.05$) โดยน้ำยา BCB และ NaCl ให้ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวมากที่สุด รองลงมาคือน้ำยา FRS และ MC โดยน้ำยา BCB ยังคงมีผลให้สเปิร์มเคลื่อนไหวนานที่สุด รองลงมาคือน้ำยา NaCl และต่ำสุดคือน้ำยา MC และ FRS ส่วนอัตราเจือจางพบว่ามีผลต่อปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว ($p < 0.05$) แต่ไม่มีผลต่อระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ($p > 0.05$) โดยที่อัตราเจือจาง 1:9 มีผลให้ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวต่ำกว่าที่อัตราเจือจาง 1:3 และ 1:5 ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน

ระยะเวลาเก็บ 120 ชม. พบว่าสูตรน้ำยาและอัตราเจือจางมีผลต่อปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว ($p < 0.05$) (ตารางที่ 1) โดยน้ำยา BCB และ NaCl ให้ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวมากที่สุด รองลงมาคือน้ำยา FRS และ MC และพบว่าอัตราเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาทุกสูตรที่อัตรา 1:3 และ 1:5 ให้ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวมากที่สุด ส่วนที่อัตราเจือจาง 1:9 ให้ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวน้อยที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าสูตรน้ำยามีอิทธิพลต่อระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ($p < 0.05$) ส่วนอัตราเจือจางไม่มีผลต่อระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ($p > 0.05$) (ตารางที่ 2) โดยน้ำยา BCB ยังคงส่งผลให้สเปิร์มเคลื่อนไหวนานที่สุด รองลงมาคือน้ำยา NaCl และต่ำสุดคือน้ำยา MC และ FRS

ระยะเวลาเก็บ 144 ชม. พบว่าสูตรน้ำยามีผลต่อปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว ($p < 0.05$) (ตารางที่ 1) โดยน้ำยา NaCl ให้ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวมากที่สุด ส่วนน้ำยา FRS ให้ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวต่ำสุด ขณะที่น้ำยา BCB และน้ำยา MC ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน ให้ผลก้ำกึ่งระหว่างน้ำยาสองสูตรข้างต้น ส่วนอัตราเจือจางพบว่าไม่มีผลต่อปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว ($p > 0.05$) และพบว่าสูตรน้ำยาและอัตราเจือจางไม่มีผลต่อระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ($p > 0.05$) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) ของน้ำเชื้อปลานิลที่เก็บแบบระยะสั้น นาน 144 ชม. ในน้ำยา 4 สูตร 3 อัตราเจือจาง (อักษรตัวพิมพ์ใหญ่และพิมพ์เล็กกำกับสูตรน้ำยาและอัตราเจือจางตามลำดับ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$))

สูตรน้ำยา (อัตราเจือ จาง)	0 ชม.	2 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	120 ชม.	144 ชม.
BCB (1:3)	^a 97.31±2.94 ^A	^a 95.49±1.60 ^A	^a 72.53±15.89 ^A	^a 80.67±5.94 ^A	^a 82.94±17.59 ^A	^a 72.43±13.12 ^A	^a 80.93±3.88 ^A	^a 36.50±40.46 ^{AB}
BCB (1:5)	^a 99.35±0.92 ^A	^a 97.55±1.77 ^A	^a 91.35±1.63 ^A	^a 79.74±1.20 ^A	^a 88.37±4.90 ^A	^a 83.71±13.39 ^A	^a 81.51±8.48 ^A	^a 19.61±6.79 ^{AB}
BCB (1:9)	^a 92.58±6.07 ^A	^a 94.53±1.63 ^A	^a 91.97±2.12 ^A	^a 70.93±23.54 ^A	^a 94.05±8.42 ^A	^b 68.22±0.05 ^A	^b 65.14±1.22 ^A	^a 37.74±53.37 ^{AB}
FRS (1:3)	^a 92.92±10.02 ^A	^a 89.81±11.46 ^A	^a 81.60±7.92 ^A	^a 78.13±22.10 ^A	^a 75.61±14.91 ^A	^a 54.55±0.64 ^B	^a 42.09±8.46 ^B	^a 2.50±3.54 ^B
FRS (1:5)	^a 98.07±0.59 ^A	^a 89.28±9.92 ^A	^a 79.96±17.88 ^A	^a 88.64±0.54 ^A	^a 74.32±17.46 ^A	^a 44.81±7.34 ^B	^a 31.42±0.93 ^B	^a 10.80±15.27 ^B
FRS (1:9)	^a 87.71±15.90 ^A	^a 80.57±19.01 ^A	^a 90.28±1.79 ^A	^a 59.31±13.17 ^A	^a 45.29±12.10 ^A	^b 32.07±7.34 ^B	^b 12.34±3.98 ^B	^a 4.69±6.63 ^B
MC (1:3)	^a 86.61±10.57 ^A	^a 83.38±7.69 ^A	^a 86.67±1.34 ^A	^a 72.04±25.11 ^A	^a 90.73±3.53 ^A	^a 32.85±8.38 ^B	^a 15.35±2.67 ^B	^a 6.77±9.57 ^{AB}
MC (1:5)	^a 95.30±3.20 ^A	^a 81.17±10.12 ^A	^a 82.29±19.80 ^A	^a 79.57±12.49 ^A	^a 56.20±27.81 ^A	^a 27.94±5.47 ^B	^a 37.38±3.15 ^B	^a 33.73±29.78 ^{AB}
MC (1:9)	^a 93.83±3.72 ^A	^a 89.91±0.18 ^A	^a 92.79±4.36 ^A	^a 47.83±13.68 ^A	^a 59.96±33.06 ^A	^b 34.07±2.32 ^B	^b 26.20±2.55 ^B	^a 8.28±0.49 ^{AB}
NaCl(1:3)	^a 95.33±6.60 ^A	^a 88.45±13.29 ^A	^a 65.86±22.43 ^A	^a 88.34±1.19 ^A	^a 79.44±13.35 ^A	^a 76.33±11.99 ^A	^a 71.01±0.58 ^A	^a 30.38±2.75 ^A
NaCl(1:5)	^a 94.39±7.94 ^A	^a 82.35±12.66 ^A	^a 52.69±44.22 ^A	^a 75.37±6.63 ^A	^a 82.71±2.93 ^A	^a 72.33±9.48 ^A	^a 71.71±4.65 ^A	^a 60.74±6.70 ^A
NaCl(1:9)	^a 97.87±2.16 ^A	^a 83.13±11.85 ^A	^a 79.06±11.07 ^A	^a 71.07±19.70 ^A	^a 90.09±9.14 ^A	^b 72.09±11.96 ^A	^b 63.10±16.18 ^A	^a 68.05±10.78 ^A

ตารางที่ 2 ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) ของน้ำเชื้อปลานิลที่เก็บแบบระยะสั้นนาน 144 ชม. ในน้ำยา 4 สูตร 3 อัตราเจือจาง (อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ และพิมพ์เล็กกำกับสูตรน้ำยาและอัตราเจือจางตามลำดับ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$))

สูตรน้ำยา (อัตราเจือจาง)	0 ชม.	2 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	120 ชม.	144 ชม.
BCB (1:3)	^a 327.5±50.2 ^A	^a 329.5±40.3 ^A	^a 330.0±42.4 ^A	^a 297.0±9.9 ^A	^a 238.5±3.5 ^A	^a 239.0±4.2 ^A	^a 227.5±67.2 ^A	^a 105.0±63.6 ^A
BCB (1:5)	^a 449.5±38.9 ^A	^a 390.0±41.0 ^A	^a 328.5±43.1 ^A	^a 241.5±85.6 ^A	^a 209.0±46.7 ^A	^a 210.5±41.7 ^A	^a 210.0±46.7 ^A	^a 71.5±41.7 ^A
BCB (1:9)	^a 450.±42.4 ^A	^a 359.0±4.2 ^A	^a 327.5±54.5 ^A	^a 238.5±89.8 ^A	^a 238.5±71.4 ^A	^a 210.0±46.7 ^A	^a 209.5±43.1 ^A	^a 28.5±12.0 ^A
FRS (1:3)	^a 297.0±9.9 ^B	^a 270.0±42.4 ^B	^a 237.50±6.36 ^B	^a 209.0±32.5 ^B	^a 177.00±5.66 ^B	^a 119.5±0.7 ^C	^a 100.0±62.2 ^C	^a 35.00±15.6 ^A
FRS (1:5)	^a 299.5±2.1 ^B	^a 265.0±31.1 ^B	^a 270.5±40.3 ^B	^a 180.5±5.0 ^B	^a 154.00±45.3 ^B	^a 93.0±42.4 ^C	^a 97.50±31.8 ^C	^a 60.50±0.71 ^A
FRS (1:9)	^a 305.5±7.8 ^B	^a 240.5±7.8 ^B	^a 238.0±1.4 ^B	^a 147.5±43.1 ^B	^a 115.0±1.4 ^B	^a 93.0±39.6 ^C	^a 58.00±12.7 ^C	^a 39.50±27.6 ^A
MC (1:3)	^a 297.0±9.9 ^B	^a 266.0±52.3 ^B	^a 212.5±41.7 ^B	^a 148.5±47.4 ^B	^a 153.5±43.1 ^B	^a 125.5±2.1 ^C	^a 90.5±41.7 ^C	^a 25.5±6.4 ^A
MC (1:5)	^a 369.0±12.7 ^B	^a 276.5±47.4 ^B	^a 208.5±38.9 ^B	^a 120.5±0.7 ^B	^a 123.0±1.4 ^B	^a 86.5±41.7 ^C	^a 69.5±13.4 ^C	^a 34.0±33.9 ^A
MC (1:9)	^a 328.0±22.6 ^B	^a 242.5±2.1 ^B	^a 206.0±39.6 ^B	^a 152.0±43.8 ^B	^a 117.5±2.1 ^B	^a 121.0±1.4 ^C	^a 142.5±29.0 ^C	^a 58.5±3.5 ^A
NaCl(1:3)	^a 328.5±33.2 ^B	^a 304.0±1.4 ^B	^a 206.5±41.7 ^B	^a 205.0±39.6 ^B	^a 176.0±1.4 ^B	^a 185.5±3.5 ^B	^a 177.0±29.7 ^B	^a 83.5±33.2 ^A
NaCl(1:5)	^a 303.0±5.7 ^B	^a 241.5±3.5 ^B	^a 243.0±1.4 ^B	^a 243.5±0.7 ^B	^a 210.5±41.7 ^B	^a 152.0±41.0 ^B	^a 173.0±75.0 ^B	^a 59.0±1.4 ^A
NaCl(1:9)	^a 302.0±1.4 ^B	^a 273.0±38.2 ^B	^a 209.5±41.7 ^B	^a 146.5±43.1 ^B	^a 151.0±42.2 ^B	^a 121.0±1.4 ^B	^a 127.5±7.8 ^B	^a 44.0±24.0 ^A

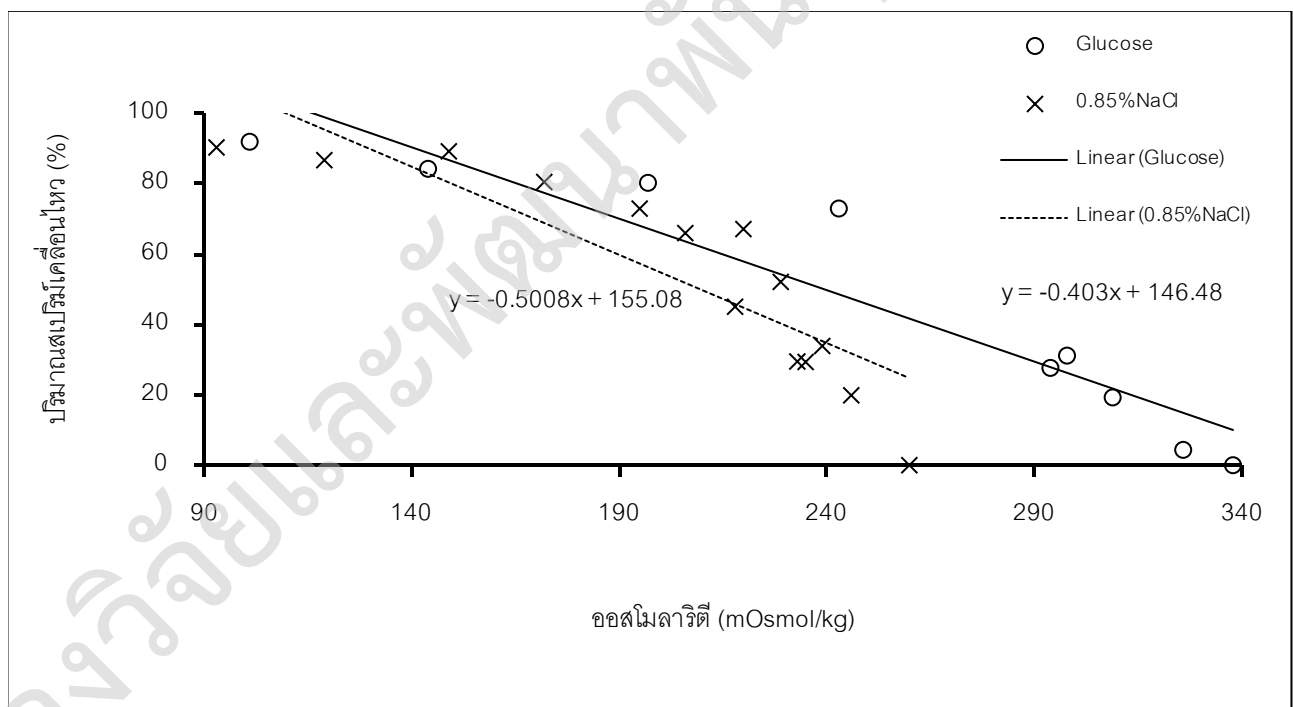
2. ระดับการเคลื่อนไหว (activation curve) ของสเปิร์มในน้ำยาเจือจางกลุ่มมีประจุและไม่มีประจุ

จากการตรวจสอบระดับการเคลื่อนไหวของสเปิร์มในน้ำยา 3 สูตร ที่เจือจาง 11 ระดับ (0 – 100%) เมื่อนำค่าปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวและระดับออสโมลาริตีของน้ำยาที่ความเข้มข้นจากมากไปหาน้อยมาสร้างกราฟ general curve พบว่าทั้ง 3 สูตรน้ำยามีรูปแบบเส้นกราฟเหมือนกันดังภาพที่ 1 – 3 คือ ที่ระดับออสโมลาริตีต่ำมีจำนวนสเปิร์มเคลื่อนไหวมากและลดจำนวนลงเมื่อระดับออสโมลาริตีเพิ่มขึ้นจนถึงจุดๆ หนึ่งที่สเปิร์มทุกตัวไม่มีการเคลื่อนไหวแม้ว่าระดับออสโมลาริตีจะเพิ่มมากกว่าจุดนี้ไปแล้วก็ตาม ความสัมพันธ์ระหว่างระดับออสโมลาริตีกับปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวแสดงในตารางที่ 3 โดย ณ จุดเริ่มกระตุ้นการเคลื่อนไหว (threshold activation) ของน้ำยาเกลือโคส, 0.85% NaCl และ MC พบว่ามีปริมาณ สเปิร์มเคลื่อนไหว 19.25 ± 3.18 , 19.85 ± 2.38 และ 14.96 ± 3.34 % ตามลำดับ และ ณ จุดกระตุ้นการเคลื่อนไหวสูงสุด (complete activation) มีปริมาณ สเปิร์มเคลื่อนไหว 80.18 ± 1.44 , 80.42 ± 4.91 และ 80.51 ± 1.18 % ตามลำดับ โดยปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวเมื่อเปรียบเทียบเป็นคู่ๆ พบว่าสูตรน้ำยา ณ จุดที่เริ่มกระตุ้นการเคลื่อนไหวและมีการเคลื่อนไหวสูงสุดที่เปรียบเทียบทุกคู่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่ระดับออสโมลาริตีที่ 2 จุดกระตุ้นดังกล่าวในน้ำยาแต่ละสูตรมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p < 0.01$) โดย ณ จุดเริ่มกระตุ้นการเคลื่อนไหว พบว่าน้ำยาเกลือโคส มีระดับออสโมลาริตีสูงสุด (309.00 ± 3.46 mOsmol/kg) รองลงมาคือน้ำยา 0.85% NaCl (245.67 ± 5.86 mOsmol/kg) และต่ำสุดคือน้ำยา MC (230.33 ± 5.03 mOsmol/kg) และ ณ จุดกระตุ้นการเคลื่อนไหวสูงสุด พบว่าน้ำยา MC และเกลือโคสมีระดับออสโมลาริตี ณ จุดนี้ไม่แตกต่างกัน (210.67 ± 11.50 และ 197.00 ± 5.29 mOsmol/kg) แต่น้ำยาทั้งสองมีระดับออสโมลาริตีสูงกว่าน้ำยา 0.85% NaCl (172.33 ± 1.53 mOsmol/kg)

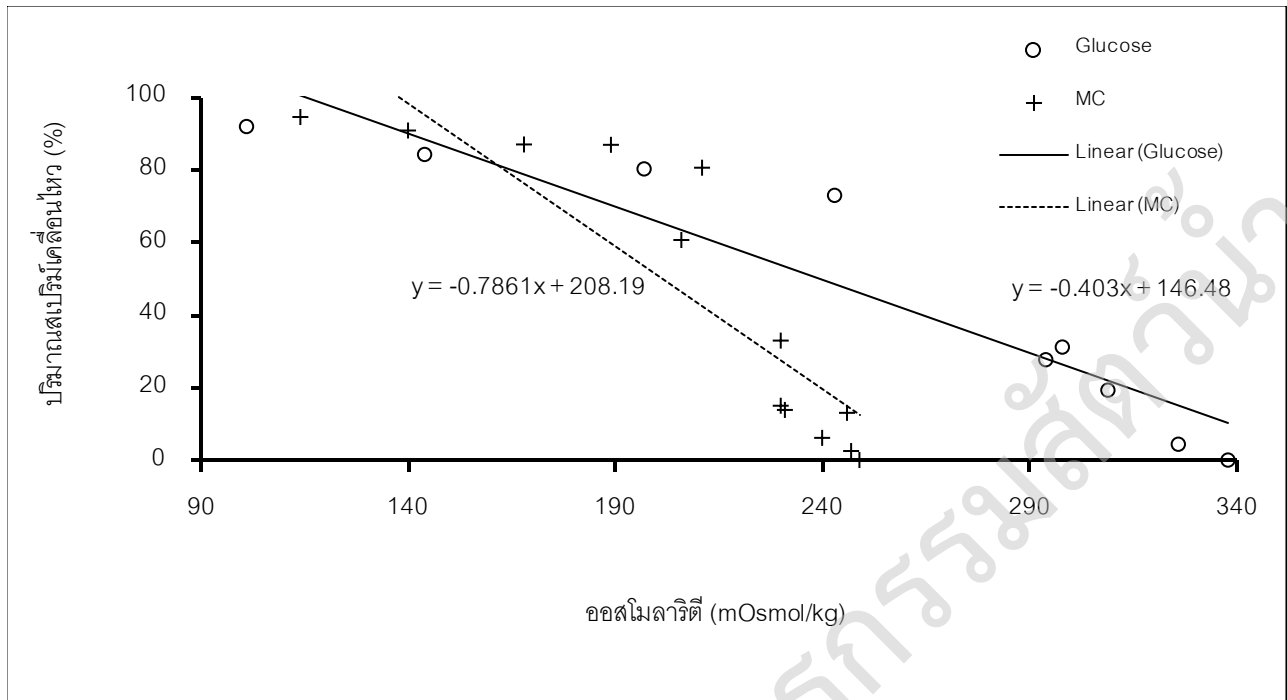
ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว (y) กับระดับออสโมลาริตีของน้ำยาแต่ละสูตร (x) ในรูปสมการเชิงเส้น (ภาพที่ 1, 2 และ 3) พบว่าน้ำยาเกลือโคส, 0.85% NaCl และ MC มีความสัมพันธ์แบบผกผัน โดยมีสมการเชิงเส้น $y = -0.4030x + 146.48$ ($r = -0.94$), $y = -0.5008x + 155.08$ ($r = -0.87$) และ $y = -0.7861x + 208.19$ ($r = -0.81$) ตามลำดับ เมื่อทดสอบความเป็นเส้นตรง (linearity) พบว่าปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวกับระดับออสโมลาริตีมีความสัมพันธ์เป็นแบบเชิงเส้นจริงในน้ำยาทุกสูตร ($p < 0.01$) สำหรับความชันเส้นกราฟเฉลี่ยของสูตรน้ำยา (3 ซ้ำ) พบว่าน้ำยาเกลือโคส, 0.85% NaCl และ MC มีความชัน -0.4032 ± 0.0182 , -0.4983 ± 0.0240 และ -0.7783 ± 0.0527 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความชันเส้นกราฟเป็นคู่ๆ พบว่าน้ำยาเกลือโคสมีความชันน้อยกว่าน้ำยา 0.85% NaCl ($p < 0.01$) และน้ำยา MC ($p < 0.01$) และน้ำยา 0.85% NaCl มีความชันน้อยกว่าน้ำยา MC ($p < 0.01$)

ตารางที่ 3 ระดับออสโมลาริตีและปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวของปลานิล ณ จุดเริ่มกระตุ้นการเคลื่อนไหว และจุดกระตุ้นการเคลื่อนไหวสูงสุดในน้ำยากลุ่มมีและไม่มีประจุ (อักษรกำกับที่ต่างกันในแนวตั้งแถวเดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติของระดับออสโมลาริตีและปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว ($p < 0.05$))

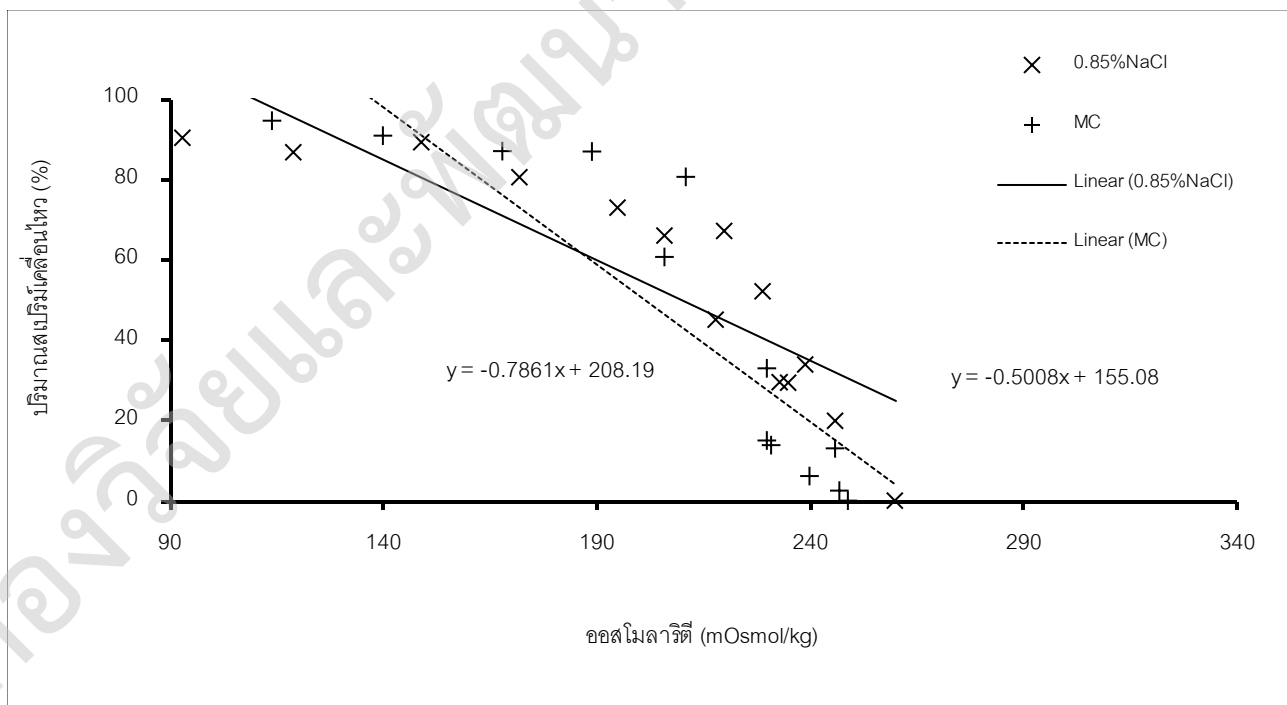
น้ำยา	threshold activation		complete activation	
	ออสโมลาริตี	ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว (%)	ออสโมลาริตี	ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว (%)
	(mOsm/kg)		(mOsm/kg)	
กลูโคส	309.00 ± 3.46^a	19.25 ± 3.18^a	197.00 ± 5.29^a	80.18 ± 1.44^a
0.85% NaCl	245.67 ± 5.86^b	19.85 ± 2.38^a	172.33 ± 1.53^b	80.42 ± 4.91^a
MC	230.33 ± 5.03^c	14.96 ± 3.34^a	210.67 ± 11.50^a	80.51 ± 1.18^a



ภาพที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวกับระดับออสโมลาริตีของน้ำยา 0.85% NaCl เทียบกับน้ำยากลูโคส



ภาพที่ 2 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวกับระดับออสโมลาริตีของน้ำยา MC เทียบกับน้ำยา กลูโคส



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวกับระดับออสโมลาริตีของน้ำยา 0.85% NaCl เทียบกับ น้ำยา MC

ปัจจัยที่กระตุ้นการเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลานิลโดยพิจารณาจากระดับออสโมลาริตีที่เริ่มกระตุ้นการเคลื่อนไหวและกระตุ้นการเคลื่อนไหวสูงสุด ความเป็นเส้นตรงและความชันของเส้นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวกับระดับออสโมลาริตีของน้ำยา กลุ่มมีและไม่มีประจุ พบว่าน้ำยาสองกลุ่มมีความแตกต่างทางสถิติอย่างน้อย 1 ปัจจัย คือ

- น้ำยาเกลือโคสมีระดับออสโมลาริตีที่เริ่มกระตุ้นการเคลื่อนไหวของสเปิร์มสูงกว่าน้ำยา 0.85% NaCl และ MC ซึ่งน้ำยาทั้ง 3 สูตรมีปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว ณ จุดนี้ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 3 แต่น้ำยาเกลือโคสเป็นสารละลายที่มีแต่โมเลกุลน้ำตาลเท่านั้นซึ่งไม่มีประจุ ขณะที่น้ำยาเกลือมีประจุทั้ง 2 สูตรประกอบด้วยไอออนตั้งแต่ 2 ชนิดขึ้นไป ผลที่ได้เป็นสิ่งที่บ่งบอกว่า นอกจากปัจจัยจากออสโมลาริตีแล้วยังมีไอออนบางชนิดมีผลยับยั้งการเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลานิล

- เส้นกราฟ general curve ของน้ำยาเกลือโคสมีความชันต่ำกว่าน้ำยาเกลือมีประจุทั้ง 2 สูตร ($p<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 1 – 3 แสดงว่าน้ำยาเกลือโคสเมื่อมีความเข้มข้นหรือระดับออสโมลาริตีลดลงมีผลให้ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวเพิ่มขึ้นน้อยกว่ากลุ่มน้ำยาที่มีประจุ ผลที่ได้เป็นสิ่งที่บ่งบอกว่า นอกจากปัจจัยจากออสโมลาริตีแล้วยังมี ไอออนบางชนิดมีผลกระตุ้นการเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลานิล

3. ผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อสเปิร์มปลานิล

จากการผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด คือ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เมทานอล และกลีเซอรอลลงในสารละลายน้ำเชื้อปลานิลจนมีความเข้มข้น 7 ระดับ พบว่าสารละลายน้ำเชื้อมีปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวหลังการผสมนาน 0 – 120 นาที ดังตารางที่ 4 และ 5 ตามลำดับ ประสิทธิภาพของสารไครโอโพรเทคแทนท์แบ่งตามระยะเวลาที่ผสม ชนิด และความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ดังนี้

3.1 หลังผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ทันที (0 นาที)

3.2.3 ชนิดสารไครโอโพรเทคแทนท์ พบว่าชนิดสารฯ ส่งผลให้สารละลายน้ำเชื้อมีปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวแตกต่างกัน ($p<0.05$) (ตารางที่ 4) แต่ไม่มีผลต่อระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ($p>0.05$) โดย DMSO และเมทานอล ให้ผลไม่แตกต่างกัน และมีผลให้ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวมากกว่ากลีเซอรอล (ตารางที่ 5)

3.2.4 ความเข้มข้น พบว่าความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์มีผลต่อปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ($p<0.05$) โดยความเข้มข้น 2% ให้ปริมาณสเปิร์ม

เคลื่อนไหวนสูงสุด รองลงมาตามลำดับคือ 15%, 20% และต่ำสุดที่ความเข้มข้น 25 % โดยความเข้มข้น 5% และ 10% ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน ให้ผลก้ำกึ่งระหว่างความเข้มข้น 2% และ 15% (ตารางที่ 4) และที่ความเข้มข้น 2% และ 5% ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน มีผลให้สเปิร์มเคลื่อนไหวยานที่สุด รองลงมาคือ 20% และต่ำสุดที่ความเข้มข้น 25% โดยความเข้มข้น 10% และ 15% ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน ให้ผลก้ำกึ่งระหว่างความเข้มข้น 2%, 5% และ 20% (ตารางที่ 5)

3.2 หลังผสมนาน 30 นาที

- 3.2.1 ชนิดสารไครโอโพรเทคแทนท์ พบว่าชนิดสารฯ ส่งผลให้สารละลายน้ำเชื้อมีปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวแตกต่างกัน ($p < 0.05$) โดย DMSO และเมธานอล ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน ให้ปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวยานมากกว่ากลีเซอรอล (ตารางที่ 4 และ 5)
- 3.2.2 ความเข้มข้น พบว่าความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์มีผลต่อปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ($p < 0.05$) โดยความเข้มข้น 2%, 5%, 10% และ 15% ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน ให้ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวยานมากกว่าที่ความเข้มข้น 20% และ 25% (ตารางที่ 4) และที่ความเข้มข้น 2% มีผลให้สเปิร์มเคลื่อนไหวยานที่สุด รองลงมาคือ 10% และ 20% และต่ำสุดที่ความเข้มข้น 25% โดยที่ความเข้มข้น 5% และ 15% ให้ผลก้ำกึ่งระหว่างความเข้มข้น 2% กับ 10% และ 20% (ตารางที่ 5)

3.3 หลังผสมนาน 120 นาที

- 3.3.1 ชนิดสารไครโอโพรเทคแทนท์ พบว่าชนิดสารฯ ส่งผลให้สารละลายน้ำเชื้อมีปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวแตกต่างกัน ($p < 0.05$) โดย DMSO และเมธานอล ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน ให้ปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวยานมากกว่ากลีเซอรอล (ตารางที่ 4 และ 5)
- 3.3.2 ความเข้มข้น พบว่าความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์มีผลต่อปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ($p < 0.05$) โดยความเข้มข้น 2%, 5%, 10% และ 15% ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน ให้ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวยานสูงสุด และที่ความเข้มข้น 25% ให้ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวยานต่ำสุด โดยที่ความเข้มข้น 20% ให้ผลก้ำกึ่งระหว่างทั้งสองกลุ่ม (ตารางที่ 4) และที่ความเข้มข้น 2%, 5% และ 10% ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน ส่งผลให้สเปิร์มเคลื่อนไหวยานที่สุด รองลงมาคือ 15%, 20% และต่ำสุดที่ความเข้มข้น 25% (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 4 ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) ในสารละลายที่ผสมด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด 6 ความเข้มข้น ที่ระยะเวลาต่างๆ (อักษรตัวพิมพ์ใหญ่และพิมพ์เล็กกำกับชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์และความเข้มข้น ตามลำดับ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$))

สารไครโอโพรเทคแทนท์	หลังผสม (0 นาที)	30 นาที	120 นาที
ไม่ผสมสารฯ (0%)	88.41±8.73	85.35±7.27	83.27±6.17
2% DMSO	^a 86.96±3.69 ^A	^a 72.12±34.73 ^A	^{ab} 71.06±2.71 ^A
5% DMSO	^{ab} 88.80±6.59 ^A	^a 74.33±17.12 ^A	^a 88.90±13.17 ^A
10% DMSO	^{ab} 87.00±4.86 ^A	^a 81.16±9.02 ^A	^{ab} 81.05±3.70 ^A
15% DMSO	^b 85.91±2.46 ^A	^a 84.33±4.02 ^A	^{ab} 79.15±9.98 ^A
20% DMSO	^c 38.39±14.73 ^A	^b 39.77±0.33 ^A	^{bc} 63.29±8.70 ^A
25% DMSO	^d 25.39±5.69 ^A	^b 27.57±13.53 ^A	^c 31.99±1.90 ^A
2% เมทานอล	^a 81.87±8.34 ^A	^a 65.38±1.83 ^A	^{ab} 62.51±4.59 ^A
5% เมทานอล	^{ab} 83.46±6.56 ^A	^a 80.58±6.77 ^A	^a 89.94±9.67 ^A
10% เมทานอล	^{ab} 69.64±12.63 ^A	^a 73.25±6.17 ^A	^{ab} 74.72±5.37 ^A
15% เมทานอล	^b 66.42±11.38 ^A	^a 77.84±4.50 ^A	^{ab} 82.44±6.94 ^A
20% เมทานอล	^c 57.32±7.17 ^A	^b 52.56±15.80 ^A	^{bc} 70.86±16.12 ^A
25% เมทานอล	^d 45.15±11.26 ^A	^b 67.06±14.90 ^A	^c 65.39±24.59 ^A
2% กลีเซอรอล	^a 89.41±4.20 ^B	^a 39.12±18.60 ^B	^{ab} 43.19±21.18 ^B
5% กลีเซอรอล	^{ab} 56.07±18.02 ^B	^a 63.34±7.54 ^B	^a 38.73±7.63 ^B
10% กลีเซอรอล	^{ab} 68.25±10.61 ^B	^a 21.11±8.64 ^B	^{ab} 23.08±8.59 ^B
15% กลีเซอรอล	^b 40.36±28.53 ^B	^a 43.74±6.65 ^B	^{ab} 27.18±17.20 ^B
20% กลีเซอรอล	^c 41.43±8.08 ^B	^b 1.62±2.28 ^B	^{bc} 0.00±0.00 ^B
25% กลีเซอรอล	^d 25.47±0.38 ^B	^b 0.00±0.00 ^B	^c 0.00±0.00 ^B

ตารางที่ 5 ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) ในสารละลายที่ผสมด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด 6 ความเข้มข้น ที่ระยะเวลาต่างๆ (อักษรตัวพิมพ์ใหญ่และพิมพ์เล็กกำกับชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์และความเข้มข้น ตามลำดับ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$))

สารไครโอโพรเทคแทนท์	หลังผสม (0 นาที)	30 นาที	120 นาที
ไม่ผสมสารฯ (0%)	278.50±24.75	214.50±7.78	219.10±48.22
2% DMSO	^a 257.90±36.06 ^A	^a 289.00±57.98 ^A	^a 285.00±32.24 ^A
5% DMSO	^a 386.40±12.73 ^A	^{ab} 310.00±39.60 ^A	^a 399.00±34.79 ^A
10% DMSO	^{ab} 77.10±4.67 ^A	^b 229.80±106.91 ^A	^a 371.70±6.29 ^A
15% DMSO	^{ab} 326.10±77.64 ^A	^{ab} 315.00±31.11 ^A	^b 357.60±42.43 ^A
20% DMSO	^b 229.20±49.21 ^A	^b 196.80±5.94 ^A	^c 221.10±28.43 ^A
25% DMSO	^c 134.10±67.46 ^A	^c 132.90±90.37 ^A	^d 179.70±40.31 ^A
2% เมทานอล	^a 291.00±25.46 ^A	^a 246.70±2.97 ^A	^a 351.90±29.27 ^A
5% เมทานอล	^a 350.40±40.73 ^A	^{ab} 318.20±35.64 ^A	^a 391.30±13.15 ^A
10% เมทานอล	^{ab} 265.60±21.21 ^A	^b 275.70±36.91 ^A	^a 381.30±29.56 ^A
15% เมทานอล	^{ab} 259.50±21.64 ^A	^{ab} 272.70±29.13 ^A	^b 253.10±59.26 ^A
20% เมทานอล	^b 271.40±67.32 ^A	^b 278.00±62.51 ^A	^c 247.10±19.09 ^A
25% เมทานอล	^c 161.70±48.79 ^A	^c 145.00±23.76 ^A	^d 170.10±30.97 ^A
2% กลีเซอรอล	^a 366.50±60.67 ^A	^a 335.30±15.70 ^B	^a 310.20±8.49 ^B
5% กลีเซอรอล	^a 307.10±119.22 ^A	^{ab} 118.20±40.73 ^B	^a 164.70±32.67 ^B
10% กลีเซอรอล	^{ab} 221.90±54.45 ^A	^b 115.80±33.94 ^B	^a 198.60±14.71 ^B
15% กลีเซอรอล	^{ab} 278.60±3.39 ^A	^{ab} 91.50±3.82 ^B	^b 102.60±25.46 ^B
20% กลีเซอรอล	^b 228.90±36.06 ^A	^b 114.30±58.12 ^B	^c 0.00±0.00 ^B
25% กลีเซอรอล	^c 223.20±46.67 ^A	^c 0.00±0.00 ^B	^d 0.00±0.00 ^B

4. อัตราและวิธีการลดอุณหภูมิในขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลานิล

4.1 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลานิล โดยใช้ไอไนโตรเจนเหลว

4.1.1 อัตราลดอุณหภูมิจากไอไนโตรเจนเหลว จากการนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้น้ำยา MC เป็นน้ำยาเจือจางและใช้เมธานอลเข้มข้น 10% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ เจือจางในอัตรา 1 : 5 มาลดอุณหภูมิโดยใช้ไอไนโตรเจนเหลว โดยวางหลอดน้ำเชื้อห่างจากระดับไนโตรเจนเหลวในถังเก็บแตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 19.0, 14.5 และ 9.5 ซม. (ภาพที่ 4) บันทึกอุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงในหลอดที่วางห่างระดับไนโตรเจนเหลวในถังเก็บ 3 ระดับ เมื่อนำมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$) กับระยะเวลา (นาท) เพื่อหาอัตราการลดอุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$) จากความชันของเส้นกราฟ พบว่าที่ระดับ 19.0, 14.5 และ 9.5 ซม. มีอัตราการลดอุณหภูมิเฉลี่ย -3.14 , -7.86 และ -11.91 $^{\circ}\text{C}/\text{นาท}$ ดังภาพที่ 5, 6 และ 7 ตามลำดับ

4.1.2 อัตรารอดตายและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวหลังละลาย เมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 7 วัน มาละลาย และกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนไหว ได้ผลดังตารางที่ 6 และภาพที่ 8, 9 และ 10 โดยพบว่าระยะห่างระหว่างหลอดกับไนโตรเจนเหลว มีผลต่ออัตราการรอดตายและเวลาเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลานิล ($p < 0.05$) โดยที่ระยะห่าง 14.5 และ 9.5 ซม. ส่งผลให้สเปิร์มที่ละลายมีอัตราการรอด 53.18 ± 18.99 % และ 59.29 ± 6.42 % ตามลำดับซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งทั้ง 2 ระยะมีผลให้สเปิร์มมีอัตราการรอดตายมากกว่าที่ระยะห่าง 19.0 ซม. ($24.36 \pm 9.90\%$) และพบว่าที่ระยะห่าง 14.5 ซม. มีผลให้สเปิร์มมีเวลาเคลื่อนไหว 84.44 ± 17.62 % มากกว่าที่ระยะห่าง 19.0 ซม. และ 9.5 ซม. (37.37 ± 11.04 และ 53.48 ± 10.03 % ตามลำดับ) ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ

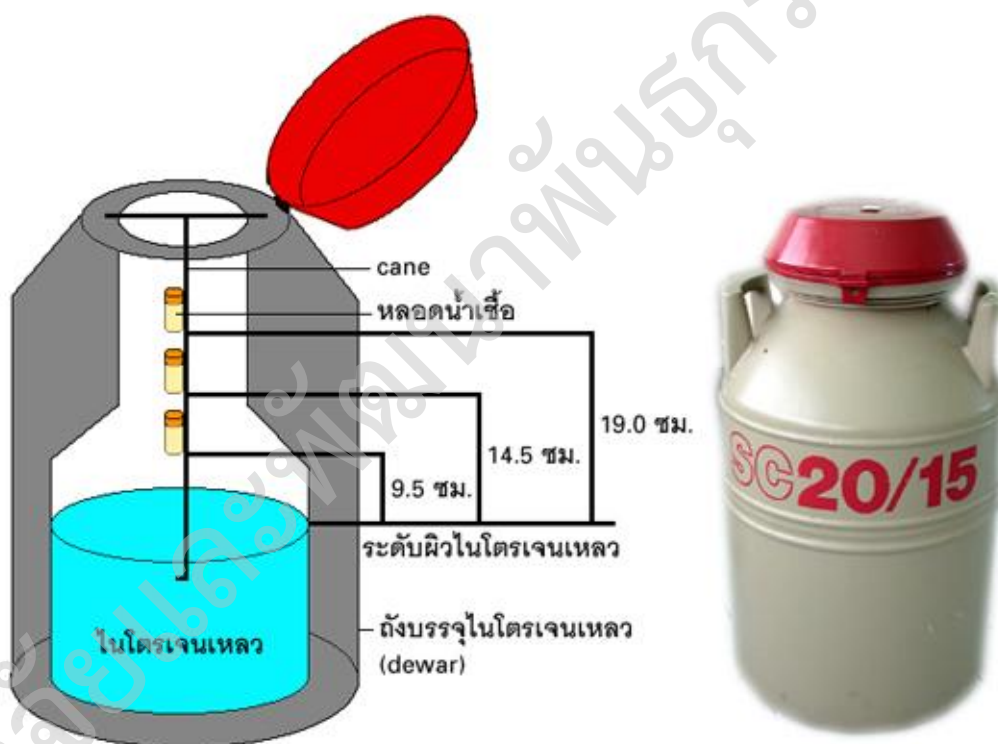
4.2 เปรียบเทียบอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลานิล โดยใช้เครื่องลดอุณหภูมิจากไนโตรเจน

จากการเปรียบเทียบอัตราการลดอุณหภูมิ 3 อัตรา (-1 , -5 และ -10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) และใช้น้ำยาเจือจาง 3 สูตร (BCB, MC และ 0.85% NaCl) โดยใช้เมธานอลเข้มข้น 10% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ และเจือจางน้ำเชื้อในอัตรา 1 : 5 เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 7 วัน เมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายแล้วนำไปกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนไหว ได้ผลดังตารางที่ 7 และภาพที่ 11, 12, 13 และ 14 ผลที่ได้แบ่งตามสูตรน้ำยาและอัตราการลดอุณหภูมิดังนี้

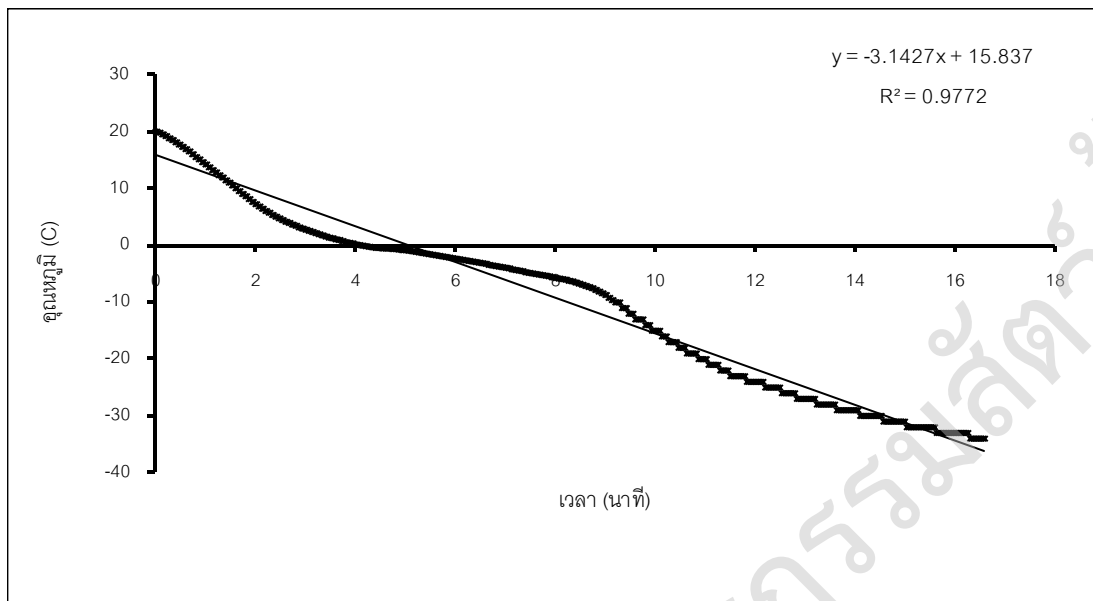
4.2.1 สูตรน้ำยา พบว่ามีผลต่ออัตราการรอดตายและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวหลังละลาย ($p < 0.05$) โดยน้ำยา MC และ BCB ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน ส่งผลให้สเปิร์มหลังละลาย

มีอัตราการรอดสูงกว่าน้ำยา 0.85% NaCl และน้ำยา MC มีผลให้สเปิร์มเคลื่อนไหวยานกว่าน้ำยา BCB และ 0.85% NaCl ซึ่งน้ำยาสองสูตรหลังนี้ให้ผลไม่แตกต่างกัน

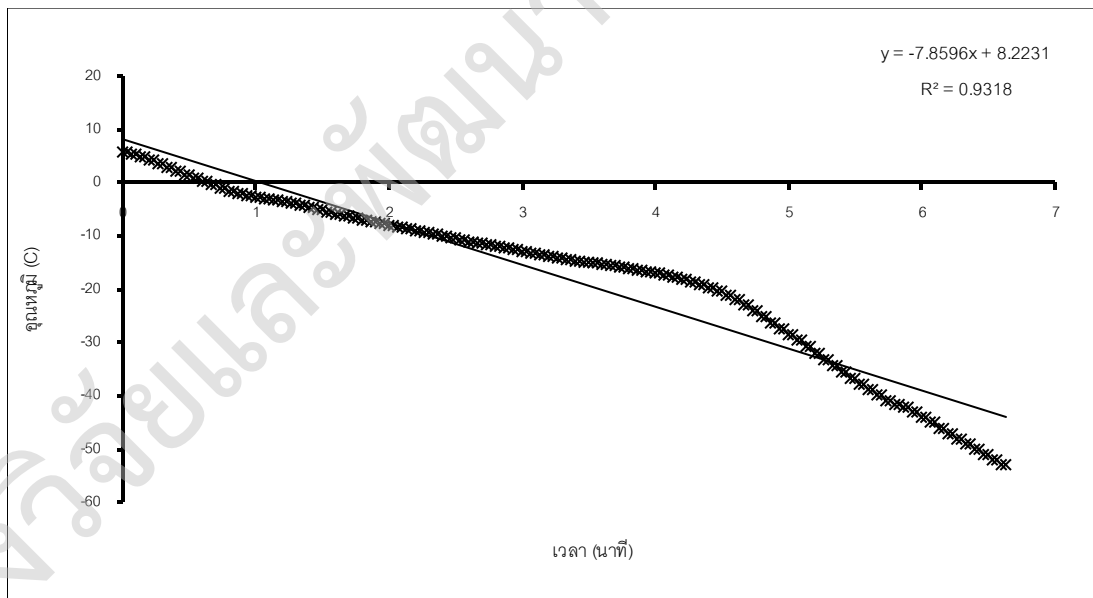
- 4.2.2 อัตราลดอุณหภูมิ พบว่ามีผลต่ออัตราการรอดตายและเวลาเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลานิล ($p < 0.05$) โดยที่อัตราการลดอุณหภูมิ $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ส่งผลให้สเปิร์มมีอัตราการรอดสูงสุด รองลงมาคืออัตรา $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ และต่ำสุดที่อัตรา $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ และพบว่าที่อัตรา -5 และ $-10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ซึ่งให้ผลไม่ต่างกัน มีผลให้สเปิร์มมีเวลาเคลื่อนไหวยานกว่าที่อัตรา $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$



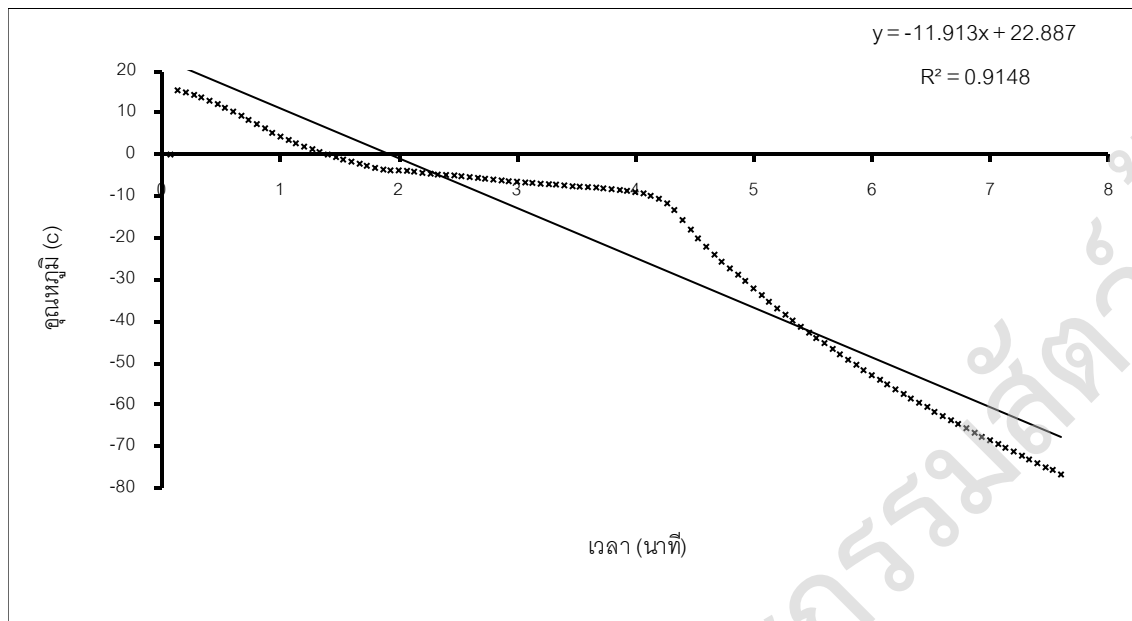
ภาพที่ 4 ถังบรรจุไนโตรเจนเหลวและตำแหน่งการวางหลอดน้ำเชื้อ 3 ระดับ



ภาพที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาจากหลอดที่วางห่างจากระดับในไนโตรเจนเหลวในถังเก็บ 19.0 ซม.



ภาพที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาจากหลอดที่วางห่างจากระดับในไนโตรเจนเหลว ในถังเก็บ 14.5 ซม.



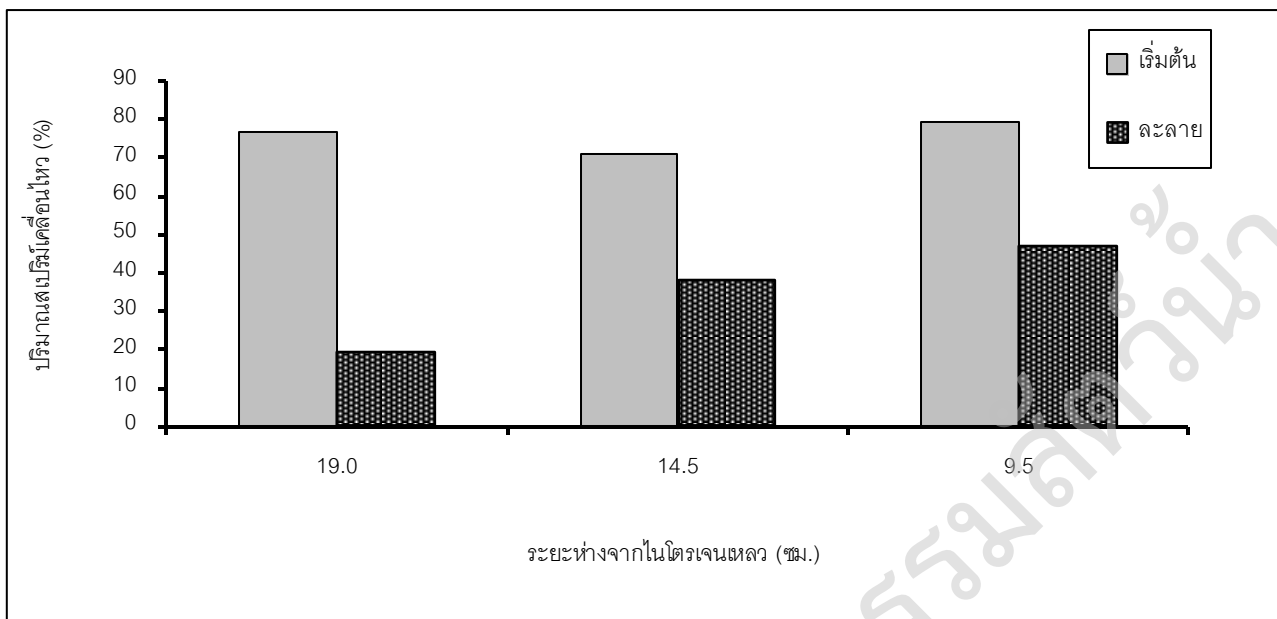
ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและเวลาจากหลอดที่วางห่างจากระดับในไนโตรเจนเหลวในถังเก็บ 9.5 ซม.

ตารางที่ 6 ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว (%) และเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) ก่อนแช่แข็งและหลังละลายจากการลดอุณหภูมิด้วยไอไนโตรเจนเหลวที่ระยะห่างระหว่างหลอดกับไนโตรเจนเหลว 3 ระดับ (อักษรตัวพิมพ์เล็กกำกับระยะห่างระหว่างหลอดกับไนโตรเจนเหลว ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$))

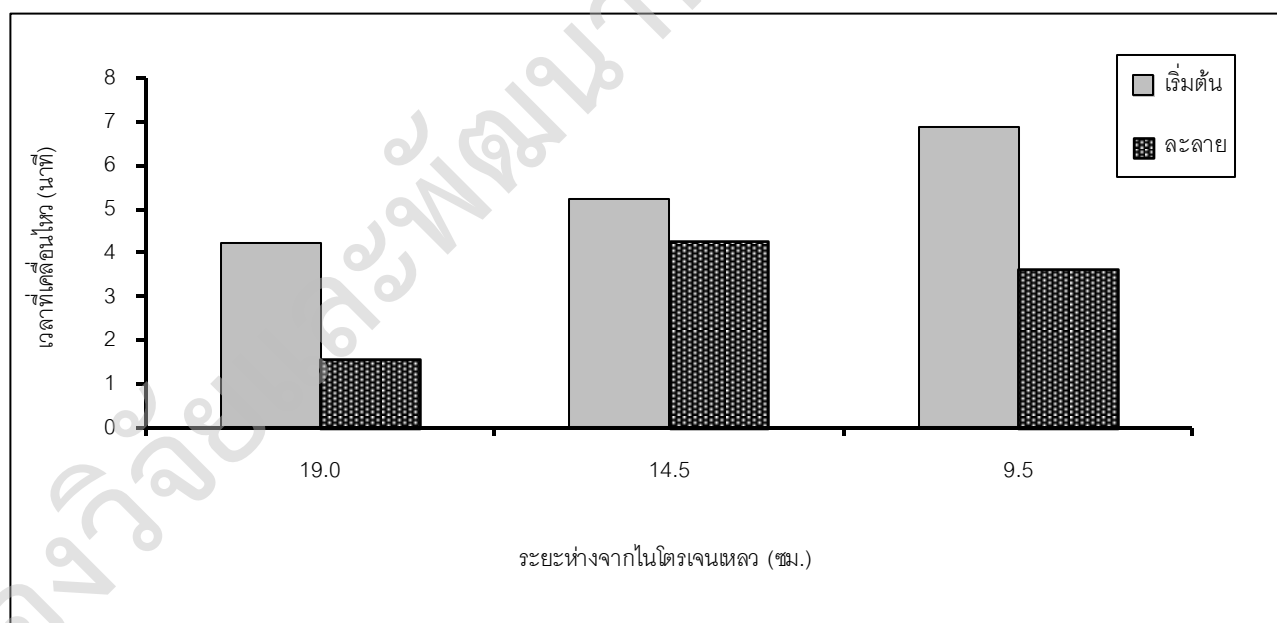
ระยะห่างระหว่างหลอดกับไนโตรเจนเหลว (ซม.)	ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว			เวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว		
	ก่อนแช่แข็ง (%)	หลังละลาย (%)	อัตราการรอด (%)	ก่อนแช่แข็ง (วินาที)	หลังละลาย (วินาที)	เวลาที่เคลื่อนไหว (%)
19.0	76.75±5.53	18.92±8.57	24.36±9.90 ^b	253.80±6.60	94.80±26.40	37.37±11.04 ^b
14.5	71.07±4.65	38.02±14.36	53.18±18.99 ^a	313.80±54.00	258.60±11.40	84.44±17.62 ^a
9.5	79.44±4.90	46.91±2.62	59.29±6.42 ^a	412.20±36.60	217.80±21.00	53.48±10.03 ^b

ตารางที่ 7 ปริมาณและเวลาที่สเปิร์มปลานิลเคลื่อนไหวก่อนและหลังละลายเมื่อใช้สูตรน้ำยาและอัตราการค้อนหุมิแตกต่างกันโดยใช้เครื่องค้อนหุมิอัตโนมัติ (อักษรตัวพิมพ์ใหญ่และพิมพ์เล็กกำกับอัตราการค้อนหุมิและสูตรน้ำยาเรียงตามลำดับ ตัวอักษรที่ต่างกันในแนวตั้งแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$))

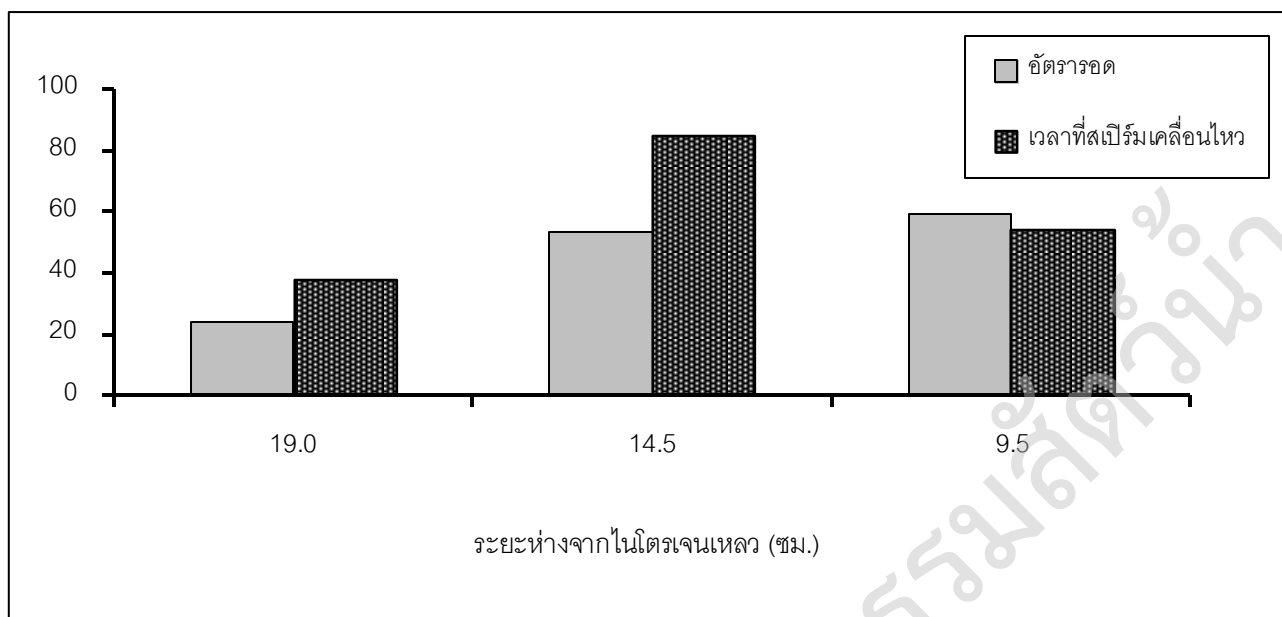
สูตรน้ำยา, อัตราค้อนหุมิ	ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว			เวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว		
	ก่อนแช่แข็ง	หลังละลาย	อัตราการค	ก่อนแช่แข็ง	หลังละลาย	เวลาที่เคลื่อนไหว
	(%)	(%)	(%)	(วินาที)	(วินาที)	(%)
BCB, $-1\text{ }^{\circ}\text{C/min}$	72.42 $\pm$ 3.70	7.62 $\pm$ 3.06	^a 10.69 $\pm$ 4.68 ^C	1,003.20 $\pm$ 46.80	70.80 $\pm$ 9.60	^b 7.07 $\pm$ 0.96 ^B
BCB, $-5\text{ }^{\circ}\text{C/min}$	60.76 $\pm$ 0.35	42.89 $\pm$ 5.04	^a 70.58 $\pm$ 8.07 ^B	947.70 $\pm$ 10.20	250.20 $\pm$ 16.20	^b 26.39 $\pm$ 1.89 ^A
BCB, $-10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$	56.41 $\pm$ 4.05	42.47 $\pm$ 4.95	^a 75.36 $\pm$ 8.46 ^A	1,021.80 $\pm$ 16.20	180.60 $\pm$ 55.20	^b 17.69 $\pm$ 5.57 ^A
MC, $-1\text{ }^{\circ}\text{C/min}$	78.72 $\pm$ 2.97	8.31 $\pm$ 7.63	^a 10.78 $\pm$ 9.85 ^C	993.00 $\pm$ 40.20	186.00 $\pm$ 52.80	^a 18.83 $\pm$ 5.74 ^B
MC, $-5\text{ }^{\circ}\text{C/min}$	63.43 $\pm$ 5.98	47.31 $\pm$ 8.98	^a 75.36 $\pm$ 17.55 ^B	912.60 $\pm$ 50.40	441.60 $\pm$ 53.40	^a 48.42 $\pm$ 5.60 ^A
MC, $-10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$	60.47 $\pm$ 2.95	53.13 $\pm$ 4.20	^a 88.06 $\pm$ 8.77 ^A	986.40 $\pm$ 27.00	485.40 $\pm$ 3.60	^a 49.22 $\pm$ 1.01 ^A
0.85% NaCl, $-1\text{ }^{\circ}\text{C/min}$	56.79 $\pm$ 1.15	0.00 $\pm$ 0.00	^b 0.00 $\pm$ 0.00 ^C	858.60 $\pm$ 27.60	0.00 $\pm$ 0.00	^b 0.00 $\pm$ 0.00 ^B
0.85% NaCl, $-5\text{ }^{\circ}\text{C/min}$	68.45 $\pm$ 2.36	16.81 $\pm$ 7.02	^b 24.42 $\pm$ 9.71 ^B	939.60 $\pm$ 24.60	198.00 $\pm$ 43.80	^b 21.05 $\pm$ 4.52 ^A
0.85% NaCl, $-10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$	64.84 $\pm$ 4.26	34.06 $\pm$ 1.97	^b 52.55 $\pm$ 0.46 ^A	880.80 $\pm$ 74.40	363.00 $\pm$ 1.24	^b 40.99 $\pm$ 5.84 ^A



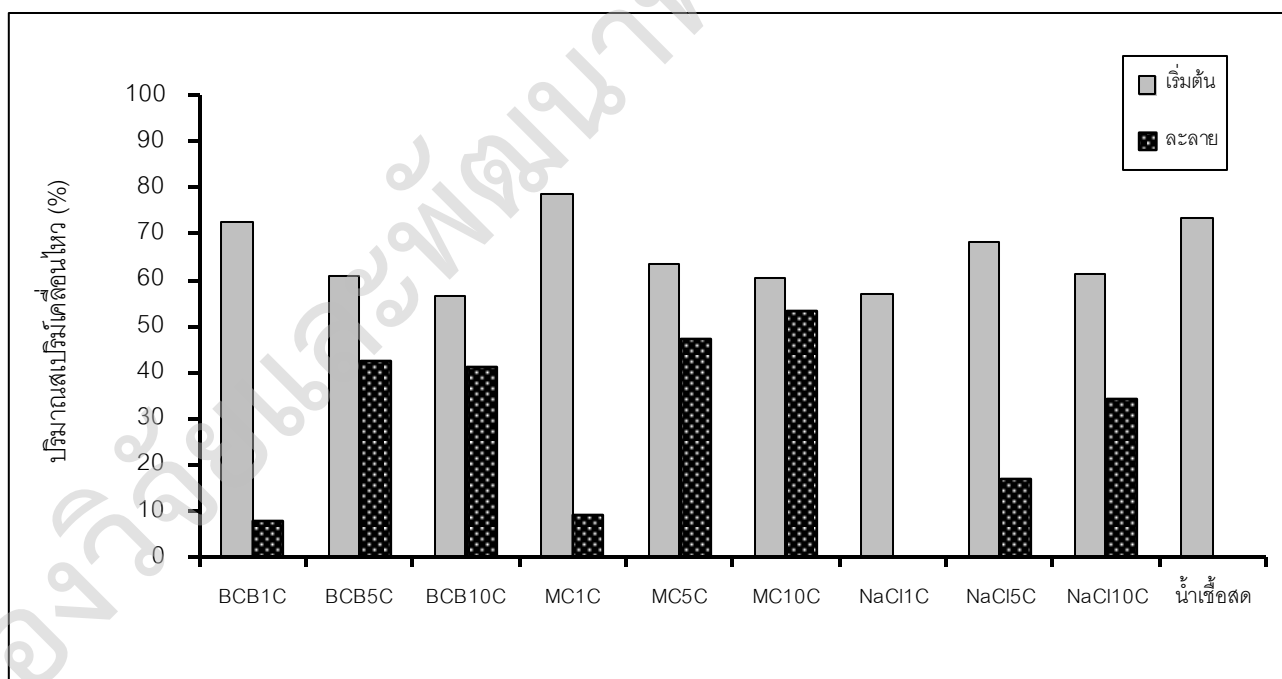
ภาพที่ 8 ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวเริ่มต้นและหลังละลายจากการลดอุณหภูมิด้วยไอไนโตรเจนเหลวที่ระยะห่างระหว่างหลอดกับไนโตรเจนเหลว 3 ระดับ



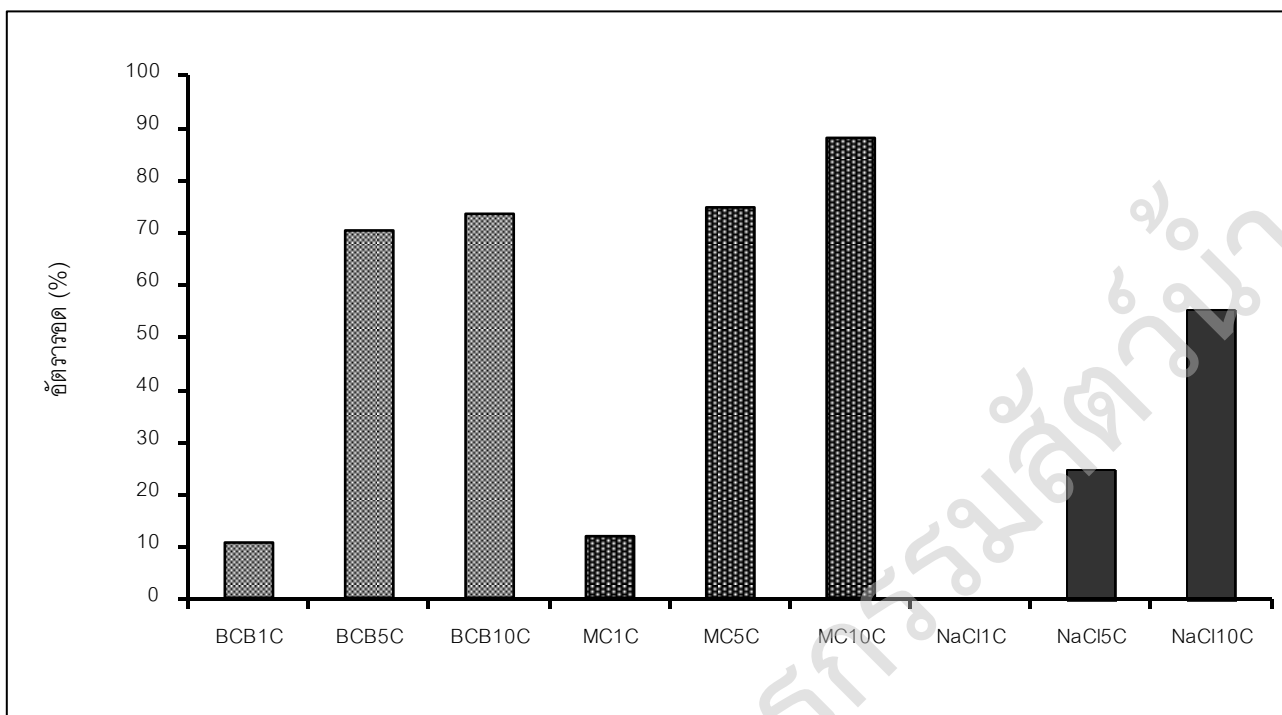
ภาพที่ 9 เวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวเริ่มต้นและหลังละลายจากการลดอุณหภูมิด้วยไอไนโตรเจนเหลวที่ระยะห่างระหว่างหลอดกับไนโตรเจนเหลว 3 ระดับ



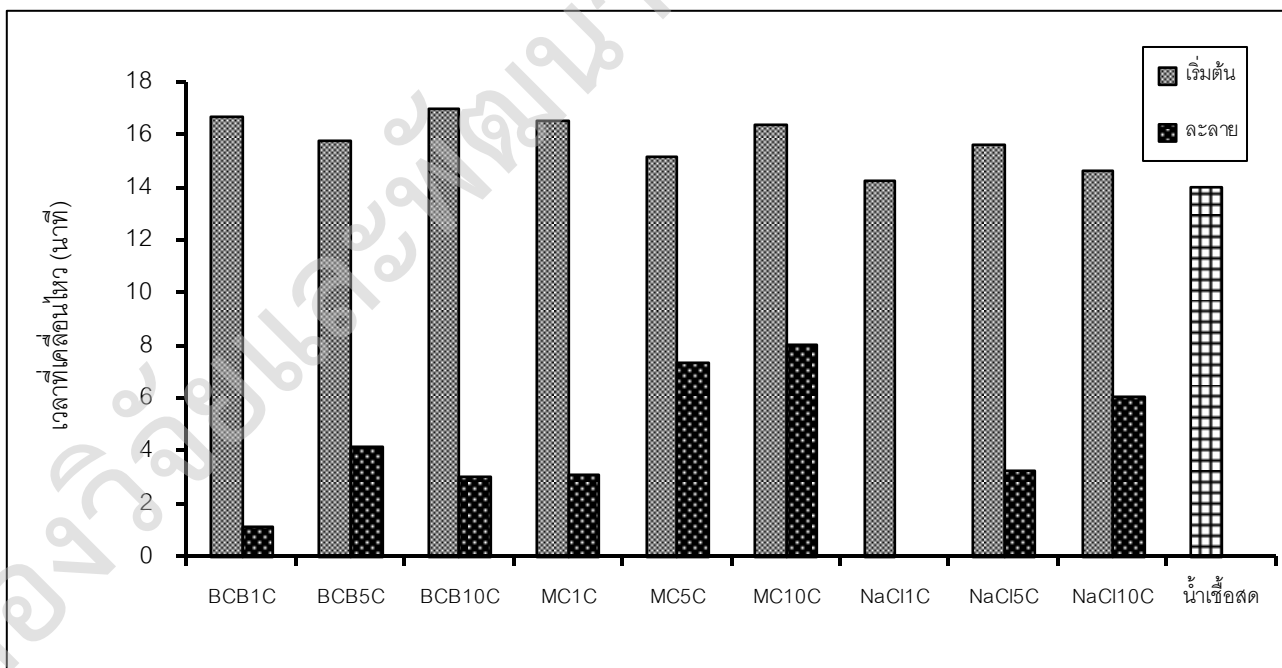
ภาพที่ 10 อัตราดูดและเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (%) หลังละลายจากการลดอุณหภูมิด้วยไอไนโตรเจนเหลวที่ระยะห่างระหว่างหลอดกับไนโตรเจนเหลว 3 ระดับ



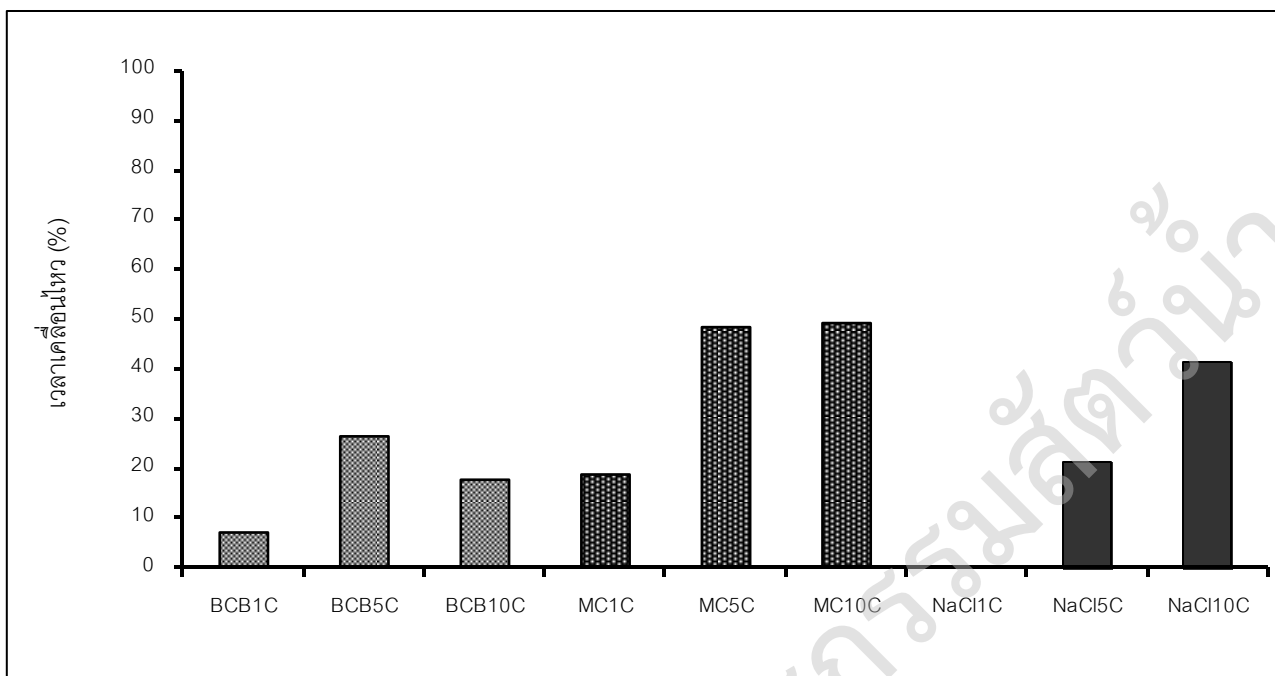
ภาพที่ 11 ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวเริ่มต้นและหลังละลายเมื่อนำยาเจือจางและอัตราลดอุณหภูมิแตกต่างกันด้วยเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ



ภาพที่ 12 อัตรางอกของสเปิร์มหลังการละลายเมื่อใช้น้ำยาเจือจางและอัตราลดอุณหภูมิแตกต่างกัน ด้วยเครื่องลดอุณหภูมิมัลติโนมิตี



ภาพที่ 13 เวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (นาที) ก่อนและหลังละลายเมื่อใช้น้ำยาเจือจางและอัตราลดอุณหภูมิแตกต่างกัน ด้วยเครื่องลดอุณหภูมิมัลติโนมิตี



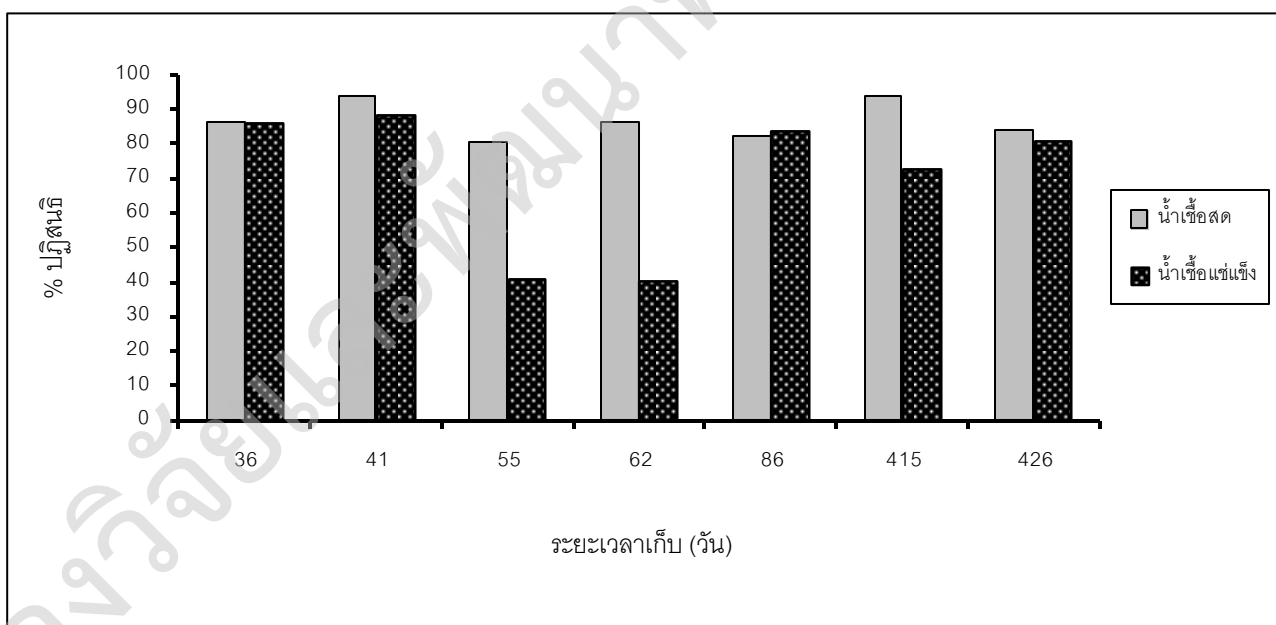
ภาพที่ 14 เวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวหลังการละลายเทียบกับก่อนแช่แข็ง (%) เมื่อน้ำยาเจือจางและอัตราลดอุณหภูมิแตกต่างกัน ด้วยเครื่องลดอุณหภูมิจาก 10 °C/min

5. ประสิทธิภาพน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดโดยวิธีการผสมเทียม

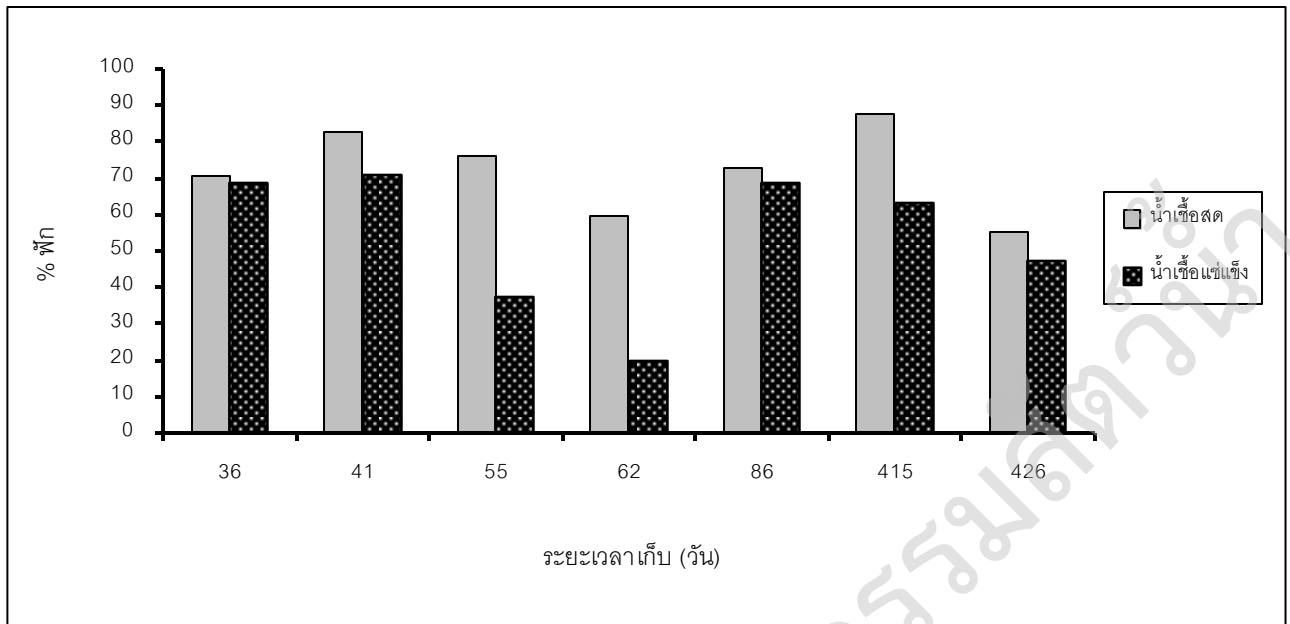
จากการนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้น้ำยา MC เป็นน้ำยาเจือจางและใช้เมธานอลเข้มข้น 10% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนที่ เจือจางในอัตรา 1 : 5 แช่แข็งโดยใช้อัตราลดอุณหภูมิ $-10\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว 36–426 วัน มาละลายแล้วนำไปผสมเทียมกับไข่ปลานิลเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดซึ่งเจือจางด้วยน้ำยา MC ในอัตราส่วนเดียวกัน พบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่ระยะเวลาเก็บนาน 36, 41, 86, 415 และ 426 วัน และน้ำเชื้อสดมีอัตราปฏิสนธิและอัตราฟักไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่น้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บนาน 55 และ 62 วัน พบว่ามีอัตราปฏิสนธิและอัตราฟักต่ำกว่าน้ำเชื้อสด ($p<0.05$) ดังตารางที่ 8 และภาพที่ 15 และ 16

ตารางที่ 8 อัตราปฏิสนธิและอัตราฟักของไข่ปลานิลที่ผสมด้วยน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งที่ระยะเวลาเก็บต่างๆ กัน (อักษรตัวพิมพ์ใหญ่และพิมพ์เล็กกำกับอัตราปฏิสนธิและอัตราฟักตามลำดับ อักษรกำกับที่แตกต่างกันในแนวนอนของกลุ่มเดียวกัน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$))

ระยะเวลาเก็บ (วัน)	อัตราปฏิสนธิ (eyed stage)		อัตราฟัก (ลูกปลาวัยอ่อนระยะ 4)	
	น้ำเชื้อสด (%)	น้ำเชื้อแช่แข็ง (%)	น้ำเชื้อสด (%)	น้ำเชื้อแช่แข็ง (%)
36	86.38 $\pm$ 2.31 ^A	86.12 $\pm$ 7.80 ^A	70.63 $\pm$ 3.40 ^a	68.61 $\pm$ 10.45 ^a
41	93.80 $\pm$ 5.08 ^A	88.48 $\pm$ 13.81 ^A	82.86 $\pm$ 6.34 ^a	70.67 $\pm$ 24.66 ^a
55	80.45 $\pm$ 5.03 ^A	40.75 $\pm$ 4.02 ^B	76.16 $\pm$ 4.31 ^a	37.19 $\pm$ 4.52 ^b
62	86.59 $\pm$ 2.71 ^A	40.30 $\pm$ 12.78 ^B	59.53 $\pm$ 2.84 ^a	19.96 $\pm$ 4.31 ^b
86	82.34 $\pm$ 1.32 ^A	83.67 $\pm$ 1.38 ^A	73.06 $\pm$ 0.46 ^a	68.90 $\pm$ 2.38 ^a
415	93.66 $\pm$ 3.53 ^A	72.92 $\pm$ 14.73 ^A	87.59 $\pm$ 6.68 ^a	62.98 $\pm$ 24.25 ^a
426	84.24 $\pm$ 4.75 ^A	80.63 $\pm$ 12.37 ^A	55.44 $\pm$ 1.67 ^a	47.49 $\pm$ 4.18 ^a



ภาพที่ 15 อัตราปฏิสนธิของไข่ที่ได้รับการผสมด้วยน้ำเชื้อปลานิลสดและแช่แข็งที่เก็บในระยะเวลาต่างๆ



ภาพที่ 16 อัตราฟักของไข่ที่ได้รับการผสมด้วยน้ำเชื้อปลานิลสดและแช่แข็งที่เก็บในระยะเวลาต่างๆ

วิจารณ์ผลการศึกษา

จากการทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อระยะสั้น มีข้อสังเกตว่าน้ำยา BCB และ 0.85% NaCl ให้ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวสูงสุดเมื่อเก็บนาน 96 – 120 ชม. และน้ำยา BCB มีผลให้สเปิร์มปลานิลเคลื่อนไหวนานที่สุดเมื่อเก็บนาน 0 – 120 ชม. สันนิษฐานว่าอาจเกิดจากกลูโคสซึ่งเป็นส่วนผสมในน้ำยา BCB อย่างไรก็ดี ยังไม่มีรายงานว่ากลูโคสส่งผลให้สเปิร์มปลาเคลื่อนไหวนานขึ้น แต่กลูโคสที่ละลายอาจทำให้น้ำยามีความหนืดเพิ่มขึ้น จึงส่งผลให้สเปิร์มเคลื่อนไหวช้าลงแต่นานขึ้น จะเห็นได้ว่าน้ำยาที่ดีที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานิลแบบระยะสั้นคือ 0.85% NaCl in PBS ซึ่งสามารถคงสภาพสเปิร์มปลานิลให้มีปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวเฉลี่ย 47.17% ที่ระยะเวลาเก็บ 144 ชม. ผลที่ได้ใกล้เคียงกับผลการเก็บรักษาน้ำเชื้อระยะสั้นในปลาซิว (อนงค์, 2539) และปลาบึก (Mongkonpanya, 2000) ซึ่งพบว่าสารละลาย NaCl ให้ผลดีที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อระยะสั้น อย่างไรก็ตาม น้ำยา 0.85% NaCl ที่ใช้ในการทดลองเก็บรักษาระยะสั้นในครั้งนี้ใช้ phosphate บัฟเฟอร์เป็นสารละลาย สิ่งนี้อาจบ่งชี้ว่าสเปิร์มปลานิลสามารถเก็บได้ดีในน้ำยาที่มี phosphate เป็นองค์ประกอบมากกว่า bicarbonate บัฟเฟอร์ซึ่งเป็นส่วนประกอบของน้ำยาที่เหลืออีก 3 สูตร ผลที่ได้ขัดแย้งกับรายงานของ Scott and Baynes (1980) ซึ่งพบว่า bicarbonate เป็นบัฟเฟอร์ของสารละลายน้ำเชื้อปลาน้ำจืดที่ดีกว่า Tris และ phosphate

จากการศึกษาพบว่าอิทธิพลจากออสโมลาริตีมีผลต่อการกระตุ้นการเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลานิล ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานที่ว่า การลดระดับออสโมลาริตีหรือการถูกเจือจางด้วยน้ำเป็นตัวกระตุ้นให้สเปิร์ม

ปลานิลเคลื่อนไหวน (Chao *et al.*, 1987) นอกจากนี้ผลที่ได้ยังบ่งบอกว่ามีไอออนบางชนิดจากน้ำยากลุ่มมีประจุมิอิทธิพลต่อการกระตุ้นและยับยั้งการเคลื่อนไหวนของสเปิร์มปลานิล การเคลื่อนไหวนของสเปิร์มปลานิลนั้นยังไม่มีรายงานว่ามีอิทธิพลจากไอออนมีผลในการยับยั้งหรือกระตุ้นการเคลื่อนไหวน แต่มีรายงานในปลาเทราท์ ซึ่งพบว่า K^+ มีอิทธิพลในการยับยั้งการเคลื่อนไหวน (Billard and Cosson, 1992) และอีกจุดหนึ่งที่น่าสนใจคืออิทธิพลจากออกซิโมลาริตีเป็นอิทธิพลหลักต่อการเคลื่อนไหวนของสเปิร์มปลาน้ำจืด แต่ปลานิลนั้นสามารถอาศัยและแพร่พันธุ์ได้ในน้ำความเค็ม 5 – 10 ppt (มานพ และคณะ, 2536) ด้วยความสามารถนี้อาจทำให้ปลานิลมีการปรับตัวให้น้ำเชื่อมีคุณลักษณะบางอย่างสัมพันธ์กับปริมาณไอออนในน้ำเค็ม

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารโคริโพรเทคแทนท์ 3 ชนิดซึ่งเป็นกลุ่มที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์สเปิร์ม (กฤษณ์, 2536) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วสเปิร์มสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดมีความอ่อนไหวต่อโคริโพรเทคแทนท์แตกต่างกัน จะเห็นได้ว่ากลีเซอรอล ซึ่งพบว่าใช้ได้ดีกับปลาคุยกัย (Steyn *et al.*, 1985) แต่กลับเป็นพิษสูงกับสเปิร์มปลานิล ส่วนเมธานอลและ DMSO นั้นมีรายงานว่าเป็นสารโคริโพรเทคแทนท์ที่ใช้ได้ดีกับสเปิร์มปลาน้ำจืดหลายๆ ชนิด (McAndrew *et al.*, 1995) อย่างไรก็ตาม แม้ว่า DMSO และเมธานอลให้ผลต่อปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวนไม่แตกต่างกัน แต่เมธานอลส่งผลให้สเปิร์มปลานิลเคลื่อนไหวนนานกว่า DMSO ($p < 0.05$) และให้ผลในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลานิลดีกว่า DMSO (Chao *et al.*, 1987) นอกจากนี้เมธานอลยังมีโมเลกุลขนาดเล็กกว่า DMSO และกลีเซอรอล จึงทำให้เมธานอลสามารถซึมเข้าสู่เซลล์สเปิร์มได้เร็วกว่า จึงทำให้ใช้เวลาปรับตัว (equilibration) สั้นลง ส่งผลทำให้ความเป็นพิษของเมธานอลต่อสเปิร์มลดลง (Tiersch *et al.* 1994)

จากการแช่แข็งน้ำเชื้อปลานิลโดยใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ พบว่าการใช้อัตราลดอุณหภูมิที่ -5 และ -10 °C/นาทิจำลองให้ผลดีในการแช่แข็ง ซึ่งอัตราดังกล่าวสามารถแช่แข็งน้ำเชื้อปลาน้ำจืดชนิดอื่นได้เป็นอย่างดี (พลชาติ และพนม, 2546) และจากการแช่แข็งน้ำเชื้อปลานิลด้วยไนโตรเจนเหลว นั้น ขั้นตอนที่สำคัญที่สุดคือการเลือกตำแหน่งที่เหมาะสมสำหรับวางหลอดในถังเก็บไนโตรเจนเหลวเพื่อให้ได้อัตราลดอุณหภูมิที่เหมาะสมและปัจจัยอื่นๆ ได้แก่ ขนาดและชนิดของวัสดุที่ทำหลอดบรรจุน้ำเชื้อ (Aoki *et al.*, 1997) ซึ่งจากการทดลองพบว่าที่ระยะห่างระหว่างกันหลอดกับไนโตรเจนเหลว 9.5 และ 14.5 ซม. ส่งผลให้น้ำเชื้อที่ละลายมีอัตราการรอดไม่แตกต่างกัน โดยที่ระดับ 14.5 ซม. นั้นส่งผลให้สเปิร์มมีระยะเวลาเคลื่อนไหวนสูงสุด ($p < 0.05$) โดยเมื่อคำนวณอัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับนี้พบว่าได้อัตราลดอุณหภูมิ -7.86 °C/นาทิจ ซึ่งอยู่ในระดับกำลังระหว่างอัตราการลดอุณหภูมิ -5 และ -10 °C

เป็นที่น่าสนใจว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บนาน 55 และ 62 วันก็นำมาละลายและนำไปทดลองผสมเทียมมีอัตราปฏิสนธิและอัตราฟักต่ำกว่าน้ำเชื้อสด สันนิษฐานว่าเกิดจากการนำน้ำเชื้อแช่แข็งบางหลอดที่มีคุณภาพต่ำมาทดลองซึ่งเป็นความผิดพลาดจากการสุ่มตัวอย่าง (sampling error) โดยปัจจัยหลักที่มีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อที่เก็บแช่แข็ง คือน้ำเชื้อที่เก็บต้องมีคุณภาพดีซึ่งได้จากปลาที่สมบูรณ์ อยู่ในช่วงผสมพันธุ์วางไข่ และไม่มีการปนเปื้อนจากปัสสาวะ ซึ่งปัญหาการปนเปื้อนด้วยปัสสาวะนั้นพบมากในน้ำเชื้อปลานิล เนื่องจากน้ำเชื้อที่รีดได้

มักมีการปนเปื้อนจากปัสสาวะบ่อยครั้ง (Chao *et al.*, 1987) ส่วนน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาในระยะเวลาอื่นๆ เมื่อนำมาใช้ผสมเทียมนั้นไม่มีความแตกต่างจากน้ำเชื้อสด ซึ่งผลการผสมเทียมที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Rana and McAndrew (1989) ซึ่งได้ทดลองเก็บน้ำเชื้อปลานิล ปลาหมอเทศ และ blue tilapia (*Oreochromis aureus*) โดยเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลาย modified fish Ringer ซึ่งเป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตรเดียวกับน้ำยา MC ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ และใช้เมทานอลเข้มข้น 12.5% เป็นสารโครโอโพรเทคแทนที่บรรจุในหลอดแช่แข็ง (cryotube) เก็บแช่ในไนโตรเจนเหลว พบว่าสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานอย่างน้อย 13 เดือน ส่วนอัตราการลดอุณหภูมิที่ 5 °C/นาทีก และ 50 °C/นาทีก และอัตราการเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยาระหว่าง 1 : 2 ถึง 1 : 20 ให้ผลต่อปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวหลังการละลายไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีอัตราการปฏิสนธิกับไข่และอัตราฟักอยู่ในช่วง 86.2 – 98.6% และน้ำเชื้อที่เจือจางในอัตรา 1 : 20 ยังสามารถนำไปใช้ผสมเทียมกับไข่ได้ 500 ฟอง และพบว่าอัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของลูกปลาวัยอ่อนที่อายุ 30 วัน ซึ่งได้จากการใช้น้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งเก็บรักษานาน 12 เดือนไม่แตกต่างจากลูกปลาที่ผสมด้วยน้ำเชื้อสด

ข้อนำสังเกตที่สำคัญประการหนึ่งคือ น้ำยา 0.85% NaCl นั้น แม้จะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานิลแบบระยะสั้นได้ดีที่สุดแตเมื่อนำมาใช้แช่แข็งน้ำเชื้อปลานิลกลับให้ผลต่ำสุด ในขณะที่น้ำยา BCB และ MC กลับให้ผลดีกว่า ผลเช่นนี้เป็นสิ่งบ่งบอกว่า น้ำยาที่เจือจางน้ำเชื้อปลานิลเพื่อเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งควรมีเกลือหลายๆ ชนิดเป็นองค์ประกอบ ซึ่งน้ำยา MC นั้นเป็นน้ำยาที่เหมาะสมสำหรับใช้แช่แข็งน้ำเชื้อปลานิลในระยะยาว (Rana and McAndrew, 1989) แม้ว่าจะให้ผลค่อนข้างต่ำในการเก็บรักษาระยะสั้นก็ตาม

สรุปผลการศึกษา

จากผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลานิลที่ดีที่สุดได้ตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. เจือจางน้ำเชื้อปลานิลด้วยน้ำยา MC ในอัตราเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยา 1:5 ใช้เมทานอลเข้มข้น 10% เป็นสารโครโอโพรเทคแทนที่ บรรจุสารละลายน้ำเชื้อใส่หลอด ปล่อยให้สเปิร์มปรับตัวกับน้ำยา (equilibration) ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 15 นาที
2. นำไปลดอุณหภูมิในอัตรา -5 หรือ -10 °C/นาทีก จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 °C จนถึง -60 °C หรือใช้วิธีแช่แข็งด้วยไนโตรเจน โดยวางหลอดห่างจากระดับไนโตรเจนเหลว 9.0 – 14.5 ซม. นาน 20 นาที (ถึงเก็บ MVE SC 20/15 หากเป็นถึงเก็บจากบริษัทหรือรุ่นอื่นต้องหาระยะห่างที่ได้ อัตราลดอุณหภูมิ -5 ถึง -10 °C/นาทีก) แล้วจึงนำหลอดไปแช่ในไนโตรเจนเหลว (-196 °C)
3. ละลายน้ำเชื้อแช่แข็งโดยนำหลอดออกจากถังเก็บ นำไปแช่ในน้ำปรับอุณหภูมิ 37 °C นาน จนกระทั่งน้ำเชื้อละลายหมด

คำขอบคุณ

โครงการวิจัยนี้ใช้เครื่องมือ อุปกรณ์การวิจัย และงบประมาณส่วนหนึ่งจากโครงการวิจัยและพัฒนา เทคโนโลยีชีวภาพการเกษตร ภายใต้การสนับสนุนงบประมาณจากธนาคารเพื่อการพัฒนาเอเชีย (เอดีบี) ซึ่งได้นำมาจัดตั้งธนาคารเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำ ณ สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ ต. คลองห้า อ. คลองหลวง จ. ปทุมธานี และอีกส่วนหนึ่งจากงบประมาณปกติของกรมประมง รหัสทะเบียนวิจัยเลขที่ 47-0-60-74-6-080

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ ที่ให้การสนับสนุนงานวิจัยด้านนี้และคณะกรรมการวิชาการของสถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ ที่กรุณาตรวจแก้ไขต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

- กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง หลักการ/วิธีการ/ประโยชน์. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 127 หน้า.
- นวลมณี พงศ์ธนา และพุทธรัตน์ เป้าประเสริฐกุล. 2538. การทดลองเลี้ยงปลานิลเพศผู้ GMT. เอกสารวิชาการฉบับที่ 7, สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 9 หน้า.
- นิศา ไชยรักษ์. 2539. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาอุกอุยโดยวิธีแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ). ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 142 หน้า.
- พลชาติ ผิวฉะและพนม กระจำพจน์ สอดสุข. 2546. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำในรูปน้ำเชื้อแช่แข็ง. เอกสารเผยแพร่ ฉบับที่ 1/2546. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ, กรมประมง. 75 หน้า.
- มานพ ตั้งตรงไพโรจน์, ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล, พรรณศรี จริโมภาส, สุจินต์ หนูขวัญ, กำชัย ลาวัณยวุฒิ, วีระ วัชรกรโยธิน และวิมล จันทโรทัย. 2536. การพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลานิล. เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ 23. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด, กรมประมง. 96 หน้า.
- อนงค์ หัมพานนท์. 2539. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาซิวโดยวิธีแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (วิทยาศาสตร์ชีวภาพ). โครงการวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 251 หน้า.
- อนันต์ชัย เขื่อนธรรม. 2539. หลักการวางแผนการทดลอง. ภาควิชาสถิติ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 348 หน้า.
- Aoki, K., M. Okamoto, K. Tatsumi and Y. Ishikawa. 1997. Cryopreservation of Medaka spermatozoa. Zool. Sci. 14: 641-644.

- Baynes, S.M. and A.P. Scott. 1987. Cryopreservation of rainbow trout spermatozoa: the influence of sperm quality and extender composition on post-thaw motility. *Aquaculture* 66: 53-67.
- Billiard, R. and M.P. Cosson. 1992. Some problems related to assessment of sperm motility in freshwater fish. *J. of Exper. Zool.* 261: 122-131.
- Chao, N.H., W.C. Chao, K.C. Liu and I.C. Liao. 1987. The properties of tilapia sperm and its cryopreservation. *J. Fish Biol.* 30: 107-118.
- Finney, D.J. 1964. *Statistical Method in Biological Assay*. Charles Griffin & Company Limited, London. 668 p.
- Mongkonpunya, K., T. Pupipat and T.R. Tiersch. 2000. Cryopreservation of sperm of Asian catfishes including the endangered Mekong giant catfish. **In:** Tiersch, T.R. and P.M. Mazik (eds.) *Cryopreservation in Aquatic Species*. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. p. 114–116.
- Rana, K.J. and B.J. McAndrew. 1989. The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. *Aquaculture* 76: 335-345.
- Scott, A.P. and S.M. Baynes. 1980. A review of biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *J. Fish Biol.* 17: 707-739.
- McAndrew, B.J., K.J. Rana and D.J. Penman. 1995. Conservation and preservation of genetic variation in aquatic organisms. **In:** Muir, J.F. and R.J. Roberts (eds.) *Recent Advances in Aquaculture IV*. Blackwell Scientific Publications. London. p. 295–335.
- Steyn, G.J., J.H.J. Van Vuren, H.J. Schoonbee and N.H. Chao. 1985. Preliminary investigations on the cryopreservation of *Clarias gariepinus* (Clariidae: Pisces) sperm. *Water SA*. 11: 15–18.
- Tiersch, T.R., C.A. Goudie and G.J. Carmichael. 1994. Cryopreservation of channel catfish sperm: storage in cryoprotectants, fertilization trials and growth of channel catfish produced with cryopreserved sperm. *Trans. Am. Fish Soc.* 123: 580-586.