ผลของ Combination cryoprotectants และอัตราการลดอุณหภูมิที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพโดยวิธีการแช่แข็ง

Effect of combination cryoprotectants and freezing rates on the cryopreservation of *Pangasius larnaudii* sperm

สมร พรชื่นชูวงศ์ [1] สุพรรณ ขันน้ำเที่ยง [2]

[1]สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อ.เมือง จ.นครราชสีมา 30000

[2] ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดสุรินทร์ อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์ 32000

บทคัดย่อ

จากการประยุกต์ใช้เทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายมาศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ โดยศึกษาผลของ Combination cryoprotectants และอัตราการลดอุณหภูมิ ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ โดยใช้ French straw ขนาด 250 µl เป็นภาชนะสำหรับเก็บน้ำเชื้อ และมี Freezer control (CL 3300) ร่วมกับ Cryogenesis Version 4 เป็นตัวควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่างขบวนการแช่แข็ง นำน้ำเชื้อปลาเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (-196 °C) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเชื้อปลาแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิห้อง เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของ Combination cryoprotectants และอัตราการลดอุณหภูมิ ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ ผลการศึกษาพบว่า combination cryoprotectants ในแต่ละชุดการทดลอง ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน แต่ต่ำและแตกต่างจากน้ำเชื้อสด ($P<0.05$) และพบว่าการลดอุณหภูมิที่ 5 °C min^{-1} โดยมี 10% DMSO+ 10% DMA เป็นสาร Cryoprotectant ให้อัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม $P<0.05$)

Abstract

This present study examined the feasibility cryopreservation of *Pangasius larnaudii* by using cryopreservation methods of *Pangasinodon hypophthalmus* sperm. The effects of combination cryoprotectants and freezing rates on the cryopreservation of *P. larnaudii* sperm were investigated. A controlled freezer (CL 3300) and Cryogenesis, version 4 was used to regulate the rate of freezing. Sperm were frozen using French straw (250 µL) and stored for 24 h in a liquid nitrogen container. They were then air thawed at room temperature, and the effects of combination cryoprotectants and freezing rates on cryopreservation of *P. larnaudii* sperm were assessed. The fertilization rates of *P. larnaudii* among three treatments were no significant difference $p>0.05$, but the fertilization rates were lower than the control. Fertilization rate of *P. larnaudii* resulting from 5 °C min^{-1} with the combination cryoprotectants of 10% DMSO + 10% DMA were not significantly different from the control (fresh sperm), $p>0.05$.

คำนำ

ในอดีตงานวิจัยเพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในประเทศไทยยังมีการศึกษากันน้อยมากเนื่องจากการประยุกต์เอาเทคนิคและวิธีการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้กับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมาใช้ ยังปรับวิธีการได้ไม่เหมาะสม (กฤษณ์, 2536) อีกทั้งยังไม่มีความจำเป็นอย่างแท้จริง เนื่องจากในอดีตสภาพแวดล้อมอุดมสมบูรณ์สามารถจับพ่อแม่พันธุ์และรวบรวมลูกปลาได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันประสบปัญหาแหล่งที่อยู่อาศัยของสัตว์น้ำเสื่อมโทรมอันเนื่องมาจากผลกระทบของสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และการเกิดมลพิษในแหล่งน้ำซึ่งจะเป็นอันตรายต่อปลาโดยตรง จึงทำให้ปริมาณปลาลดลง โดยเฉพาะปลาในสกุล *Pangasius* เช่น ปลาบึก ปลาเทโพและปลาเทพา (สำนักงานสำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2539) อีกทั้งปลาในสกุล *Pangasius* บางชนิดมีช่วงสืบพันธุ์ไม่ตรงกันระหว่างเพศผู้และเพศเมีย (เพศผู้เจริญพันธุ์เร็วกว่าเพศเมีย) พบในปลาโมง, *Pangasius bocourti* (Khanh et al., 1999) และปลาบึก, *Pangasinodon gigas* ได้จัดอยู่ในบัญชีปลาหายาก (Mongkonpunya et al., 1992) ด้วยเหตุนี้การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็งจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยทำให้ธุรกิจการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดมีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งสามารถใช้แก้ปัญหาในปลาที่ใกล้จะสูญพันธุ์ (Endangered species) หรือแก้ปัญหาสำหรับปลาที่ไข่และน้ำเชื้อสุกไม่พร้อมกัน ใช้ในการผลิตปลาข้ามสายพันธุ์ นอกจากนี้ประโยชน์ของน้ำเชื้อแช่แข็งยังมีความสะดวกในการขนย้ายมากกว่าเมื่อเทียบกับการขนย้ายปลามีชีวิต

ปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแช่แข็งได้แก่ Freezing-thawing rates, สาร extender (เป็นสารที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อ และลดการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาก่อนกระบวนการแช่แข็ง) ซึ่งควรมีค่าออสโมลาริตี้ใกล้เคียงกับเลือด หรือ seminal fluid ของน้ำเชื้อปลา และสาร cryoprotectant (เป็นสารป้องกันการเซลล์ถูกทำลายในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง) ซึ่งสาร cryoprotectant แต่ละชนิดจะต้องมีความเข้มข้น และระยะเวลา (equilibration time) ที่เหมาะสม เพื่อที่จะออกฤทธิ์และป้องกันการเซลล์ถูกทำลาย (Rana, 1995) โดยกลุ่มของสาร cryoprotectant ที่นำมาใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานั้นอาจอยู่ในรูปของ External cryoprotectants (Proteins, sugars, egg yolk, Phospholipids เป็นต้น), Internal cryoprotectants (dimethyl sulfoxide, DMSO, dimethyl acetamide, DMA and methanol, MeOH และ glycerol เป็นต้น) เพียงชนิดเดียว หรืออาจใช้อาจใช้ทั้งสองกลุ่มรวมกัน(combination cryoprotectants)โดยเฉพาะกลุ่มของ Internal cryoprotectants พบว่ามีการใช้และให้ผลดีในปลาหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีรายงานว่า DMSO เป็นสารที่นิยมใช้ในปลาหลายชนิด แต่อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราการปฏิสนธิประมาณ 50% เท่านั้น (Horvath and Urbanyi, 2000; Urbanyi et al., 1999; Chereguini et al., 2001 and Kwantong and Bart, 2003) งานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพโดยประยุกต์ใช้ combination cryoprotectants ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่แตกต่างกับการใช้น้ำเชื้อสด ($p>0.05$) ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อในปลาสวาย (สมร และสุนัย, 2552) ซึ่งประกอบไปด้วย combination cryoprotectants 3 ทรีตเมนต์ ดังนี้ 1) 10% DMSO + 10% DMA, 2) 10% DMSO + 20% DMA และ 3) 20% DMA + 5% MeOH เนื่องจากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า การใช้ combination cryoprotectants นั้นสามารถลดการถูกทำลายของเซลล์แมมเบรน ที่อาจเกิดมาจาก cold

shock, osmotic stress หรือสามารถป้องกันการเกิด lipid peroxidation, loss of membrane fluidity หรือ stabilization of membrane protein จึงทำให้สามารถเพิ่มอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟัก เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สาร cryoprotectant เพียงชนิดเดียวได้ (Cabrita et al.; 2001; Babiak et al. 2001; Linhart et al. 2005; Mansour et al. 2006) อย่างไรก็ตามการใช้ combination cryoprotectants ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในกลุ่ม Pangasiid ยังไม่มีการศึกษามาก่อน

ความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไม่เพียงแต่ขึ้นอยู่กับชนิดของสาร cryoprotectant และสาร extender เท่านั้นแต่ยังขึ้นอยู่กับอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในระหว่างขบวนการแช่แข็งด้วย (Mazur, 1977) ในขบวนการแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อปลาเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และทางเคมี และการแพร่เข้า-ออกของน้ำระหว่างเซลล์และตัวกลาง พบว่าถ้าลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ ในระหว่างขบวนการแช่แข็งจะทำให้เกิดผลึกของน้ำแข็ง ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เซลล์ถูกทำลาย ในทางกลับกันถ้ามีการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเซลล์อาจจะมีการช๊อค (cold shock) (Lueng in Jamieson, 1991) จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ในขบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา อัตราการลดอุณหภูมิในปลาแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกัน (Tiersch et al., 2004; Linhart et al., 1993 และ Urbanyi et al., 1999) สำหรับในปลากลุ่ม Pangasiid พบว่าการลดอุณหภูมิที่ 5, 12, 22 and 120 °C min^{-1} ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึก โดยมีอัตราการปฏิสนธิเป็น 3, 66, 19 และ 0% ตามลำดับ (Mongkonpunya et al., 1992) นอกจากนี้ Kwantong and Bart (2003) ได้มีการศึกษาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย โดยการลดอุณหภูมิ 10 °C min^{-1} (one step freezing rate) และลดอุณหภูมิที่ two-step freezing rates โดยการลดอุณหภูมิ 4 °C min^{-1} จาก 3 □C ถึง -4 □C และลดอุณหภูมิที่ 11°C min^{-1} จาก -4 °C ถึง -80 °C ซึ่งผลการวิจัยพบว่า การลดอุณหภูมิที่ one step freezing rate ให้ผลการศึกษาดีกว่า two-step freezing rates แต่อย่างไรก็ตามอัตราการปฏิสนธิน้อยกว่า 50% การศึกษาในครั้งนี้จึงมีแนวคิดในการลดอุณหภูมิโดยใช้ one step freezing rate ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ คือ 5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1} เพื่อที่จะหาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปลาเทโพ

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

1. พ่อแม่พันธุ์ปลาสำหรับทดลอง

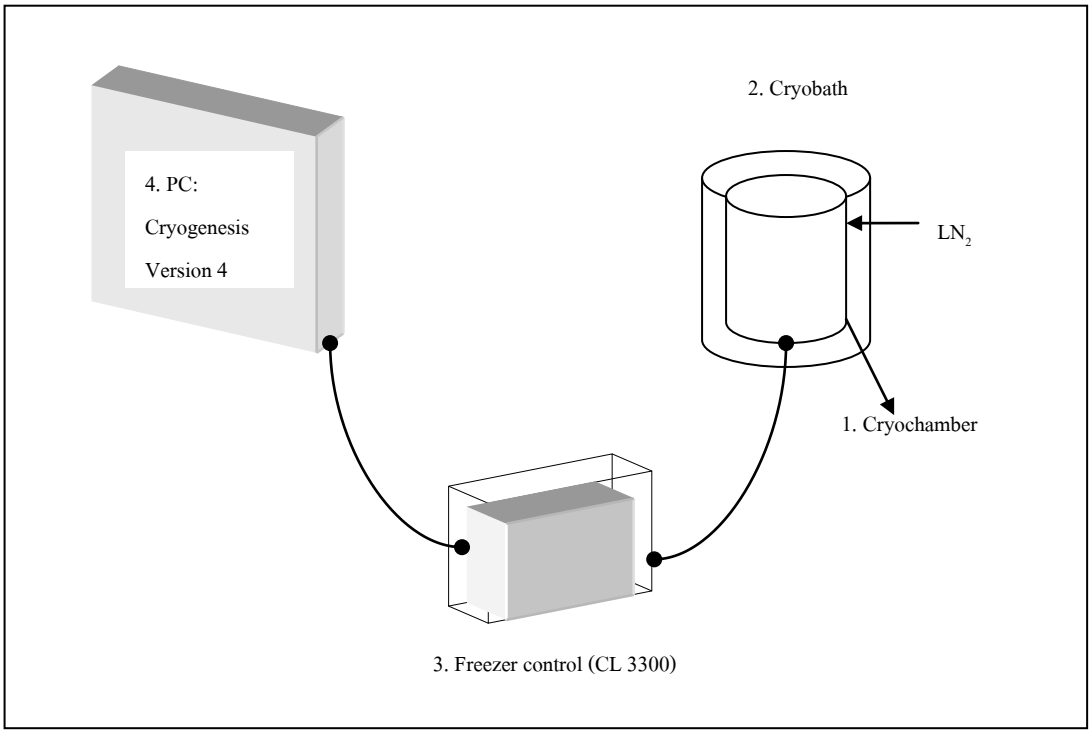
นำพ่อแม่พันธุ์ปลาเทโพที่มีความสมบูรณ์เพศ มีน้ำหนักเฉลี่ย 1.5 กิโลกรัม/ตัวสำหรับปลาเพศผู้ และน้ำหนักเฉลี่ย 2.2 กิโลกรัม/ตัวสำหรับปลาเพศเมีย จากบ่อดินมาพักในบ่อซีเมนต์ของโรงเพาะฟัก ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดสุรินทร์ โดยแยกเพศผู้และเพศเมีย ทั้งนี้เพื่อสะดวกในการฉีดฮอร์โมน ก่อนฉีดฮอร์โมนควรงดอาหารอย่างน้อย 6–12 ชั่วโมง จากนั้นนำพ่อแม่พันธุ์ปลา มาฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์ (LHRHa, Suprefact) ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์, Domperidone (Motilium) โดยใช้ Suprefact 15 μg/kg ร่วมกับ Motilium 5 mg/kg สำหรับพ่อพันธุ์หลังจากนั้น 6-8 ชั่วโมง ทำการรีดน้ำเชื้อโดยใช้หลอดฉีดยา ขนาด 5 มิลลิลิตรดูดน้ำเชื้อ ก่อนการรีดน้ำเชื้อใช้ผ้าขนหนูสะอาดซับตัวปลา และใช้กระดาษทิชชูซับบริเวณติ่งเพศ (Urogenital pore) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากน้ำ เลือด ปัสสาวะ และของเสียอื่น ๆ ส่วนแม่พันธุ์ปลานั้น

นำมาฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์เช่นเดียวกับพ่อพันธุ์ปลา แต่ทำการฉีดฮอร์โมน 2 เข็ม เข็มแรกฉีดเพื่อกระตุ้นการพัฒนาของไข่ โดยใช้ Suprefact 10 μg/kg ร่วมกับ Motilium 5 mg/kg หลังจากนั้น 6 - 8 ชั่วโมง จึงฉีดเข็มที่ 2 เพื่อกระตุ้นการตกไข่ ซึ่งใช้ Suprefact 30 μg/kg ร่วมกับ Motilium 5 mg/kg จากนั้น 8 - 10 ชั่วโมง ทำการรีดไข่ ก่อนรีดไข่ใช้ผ้าขนหนูที่สะอาดทำความสะอาดตัวปลา และใช้กระดาษทิชชูซับบริเวณติ่งเพศ แล้วใช้ภาชนะที่แห้งและสะอาดรองรับไข่ เพื่อนำไปทดสอบการปฏิสนธิต่อไป

2. การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อปลาและวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง

นำน้ำเชื้อที่รีดได้มาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ เพื่อดูเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ ตามวิธีของ Guest (1973) จากนั้นนำน้ำเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงกว่า 75% มาเก็บรักษาโดยวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง ขั้นตอนและระเบียบวิธีการวิจัยตามวิธีของ Kwantong and Bart (2003 และ 2006) ศึกษาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต โดยวิธีการย้อมสี Eosin-Nigrosin โดยอสุจิมีชีวิตจะไม่ติดสีย้อมหรือมีสีขาว ส่วนอสุจิที่ตายจะติดสีม่วง หรือสีชมพูเข้ม ส่วนการศึกษาเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ มีขั้นตอนและระเบียบวิธีการวิจัยตามวิธีของ Kwantong (2003)

โดยใช้ Freezer control (CL 3300) ร่วมกับ Cryogenesis version 4 for windows (Cryologic, Pty Ltd., Australia 1998 and 1999) เป็นตัวช่วยในการควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่างการแช่แข็ง (ดังภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 ชุดควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ Freezer control (CL 3300) ร่วมกับโปรแกรม Cryogenesis

3. ผลของ combination cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ โดยวิธีการแช่แข็ง

มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1) นำน้ำเชื้อสดที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อมาเจือจางด้วย 0.9% NaCl ในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อสาร Extenders เท่ากับ 1: 3 หลังจากนั้นเติมสาร combination cryoprotectants ซึ่งประกอบไปด้วย 1) 10% DMSO + 10% DMA, 2) 10% DMSO + 20% DMA และ 3) 20% DMA + 5% MeOH ในอัตราส่วน diluted milt: combination cryoprotectants เป็น 1: 3 และผสมให้เข้ากัน รอเวลาประมาณ 10 นาที

2) ดูดสารละลายน้ำเชื้อปริมาตร 240 µl ใส่หลอดแช่แข็ง (Straws) โดยใช้ไมโครปิเปต แล้วปิดหลอดแช่แข็งโดยใช้ Heated hemostat

3) นำ Straws ใส่ลงใน Cryochamber แล้ว Run program โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1} จนอุณหภูมิ ถึง -80 °C จึงนำ Straws ออกจาก Cryochamber แล้วนำไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปทดสอบหาอัตราการปฏิสนธิ อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตของอสุจิต่อไป

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผล Combination cryoprotectants ในแต่ละทรีตเมนต์ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan' test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

4. ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ และ combination cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ

การศึกษาถึงผลของอัตราการลดอุณหภูมิ และ combination cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ มีขั้นตอนและระเบียบวิธีวิจัยเช่นเดียวกับวิธีของ สมร และสุนัย 2552 โดยมีแผนการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แผนการทดลองผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) และ combination cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ โดยมี 0.9%NaCl เป็นสาร Extender

Treatment	Freezing rate (°C min^{-1})	Combination cryoprotectants
1	5	10%DMSO + 10%DMA
2		10%DMSO + 20%DMA
3		20%DMA + 5%MeOH
4	10	10%DMSO + 10%DMA
5		10%DMSO + 20%DMA
6		20%DMA + 5%MeOH
7	20	10%DMSO + 10%DMA
8		10%DMSO + 20%DMA
9		20%DMA + 5%MeOH
10	40	10%DMSO + 10%DMA
11		10%DMSO + 20%DMA
12		20%DMA + 5%MeOH
13 Control (น้ำเชื้อสด)		

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพโดยใช้แผนการทดลองแบบ (4×3) Factorial design in CRD (Completely Randomized design) วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan' test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

ผลการวิจัย

1. ผลของ Combination cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ (*P. larnaudii*) โดยวิธีการแช่แข็ง

จากการประยุกต์ใช้เทคนิคและวิธีการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย มาศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ โดยการเลือกทรีตเมนต์ ที่ให้อัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกับกลุ่มน้ำเชื้อสด ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย ซึ่งได้แก่ combination cryoprotectants เหล่านี้ (10% DMSO + 10% DMA, 10% DMSO + 20% DMA และ 20% DMA + 5% MeOH) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1} พบว่ามีอัตราการ

ปฏิสนธิในแต่ละทรีตเมนต์อยู่ในช่วงระหว่าง 50-57% ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (P>0.05) แต่อัตราการปฏิสนธิดังกล่าวต่ำแตกต่างจากน้ำเชื้อสด (P<0.05) (ดังตารางที่ 2)

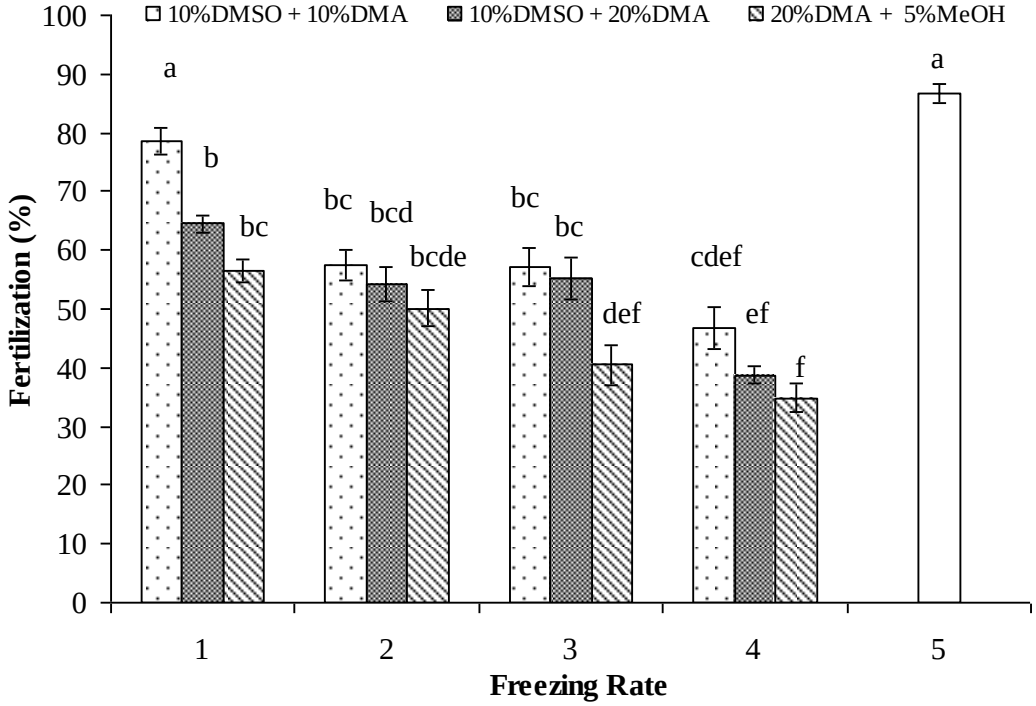
ตารางที่ 2 อัตราการปฏิสนธิ (Mean ± SE) ของน้ำเชื้อปลาเทโพ *(P. larnaudii)* โดยใช้ combination cryoprotectants (DMSO, DMA และ MeOH) และมี 0.9% NaCl เป็นสาร Extender โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1}

Combination cryoprotectants	**การปฏิสนธิ (%)**
10% DMSO + 10% DMA	57.45 ± 2.71[b] (66.25)
10% DMSO + 20% DMA	54.18 ± 2.86[b] (62.48)
20% DMA + 5% MeOH	50.13 ± 3.04[b] (57.81)
Control (น้ำเชื้อสด)	86.71 ± 1.48[a]

หมายเหตุ: อักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)
ตัวเลขในวงเล็บคือเปอร์เซ็นต์ของตัวควบคุม (น้ำเชื้อสด)

2. ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ และ combination cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ *(P. larnaudii)* โดยวิธีการแช่แข็ง

จากการทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) พบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO + 10% DMA ที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 5 °C min^{-1} มีอัตราการปฏิสนธิสูงสุดเท่ากับ 78.52 ± 2.23 (91% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้น้ำเชื้อสด (p>0.05) แต่เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 40 °C min^{-1} ให้อัตราการปฏิสนธิต่ำสุดเท่ากับ 34.82 ± 2.40 หรือ 40% ของน้ำเชื้อสด เมื่อทดสอบด้วย 20% DMA + 5% MeOH ซึ่งต่ำแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้น้ำเชื้อสด (p<0.05) (ดังภาพที่ 2)



1 = 5 °C min^{-1}, 2 = 10 °C min^{-1}, 3 = 20 °C min^{-1}, 4 = 40 °C min^{-1}, 5 = control

ภาพที่ 2 เปอร์เซ็นการปฏิสนธิ (Mean ± SE) ที่ระดับการลดอุณหภูมิต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ (*P. larnaudii*) โดยวิธีการแช่แข็ง

เมื่อทดสอบการมีชีวิต พบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO + 10% DMA ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 20 °C min^{-1} การมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 11.49 ± 3.38% ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) กับอัตราการลดอุณหภูมิที่ 5 และ 10 °C min^{-1} นอกจากนี้อัตราการลดของอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) นั้นมีอัตราการมีชีวิตต่ำแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้น้ำเชื้อสด ($p<0.05$) (ดังตารางที่ 4) และพบว่าอัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ ดังกล่าวนั้นไม่มีผลต่อการอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาเทโพ ($p>0.05$) อีกทั้งอัตราการลดของอุณหภูมิทั้ง 4 ระดับดังกล่าวมีอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อต่ำและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้น้ำเชื้อสด ($p<0.05$) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ย (Mean ± SE) เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาเทโพ *(P. larnaudii)* ที่อัตราการลดอุณหภูมิในระดับต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1})

Freezing rate (°C min^{-1})	Combination cryoprotectants	**การมีชีวิต (%)**	**การเคลื่อนที่ (%)**
5	10%DMSO+10%DMA	9.96 ± 3.86 ^{b}	11.70 ± 10.00 ^{b}
		(15.52)	(11.70)
	10%DMSO+ 20%DMA	2.41 ± 2.11^{cd}	3.02 ± 10.00 ^{b}
		(3.75)	(3.02)
	20%DMA + 5%MeOH	1.01 ± 3.33 ^{d}	3.02 ± 10.00 ^{b}
		(1.57)	(3.02)
10	10%DMSO+ 10%DMA	8.98 ± 0.58^{bc}	3.02 ± 10.00 ^{b}
		(14.00)	(3.02)
	10%DMSO+ 20%DMA	0.65 ± 2.41 ^{d}	3.02 ± 10.00 ^{b}
		(1.01)	(3.02)
	20%DMA + 5%MeOH	1.49 ± 3.77 ^{d}	3.02 ± 10.00 ^{b}
		(2.33)	(3.02)
20	10%DMSO+ 10%DMA	11.49 ± 3.38 ^{b}	17.86 ± 13.23 ^{b}
		(17.90)	(17.86)
	10%DMSO+ 20%DMA	4.42 ± 2.12^{bcd}	3.02 ± 10.00 ^{b}
		(6.88)	(3.02)
	20%DMA + 5%MeOH	0.65 ± 2.41 ^{d}	3.02 ± 10.00 ^{b}
		(1.01)	(3.02)
40	10%DMSO+ 10%DMA	1.30 ± 3.42 ^{d}	3.02 ± 10.00 ^{b}
		(2.03)	(3.02)
	10%DMSO+ 20%DMA	0.45 ± 1.91 ^{d}	3.02 ± 10.00 ^{b}
		(0.69)	(3.02)
	20%DMA + 5%MeOH	1.76 ± 3.91 ^{d}	11.70 ± 10.00 ^{b}
		(2.75)	(11.70)
Control		64.18 ± 3.38 ^{a}	100.00 ± 0.00 ^{a}

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวเลขในวงเล็บคือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด (% of control)

วิจารณ์ผลการวิจัย

1. ผลของ Combination cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ (*P. larnaudii*) โดยวิธีการแช่แข็ง

จากการประยุกต์ใช้เทคนิคและวิธีการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายที่ให้อัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกับกลุ่มน้ำเชื้อสด มาศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพนั้น พบว่า combination cryoprotectants ในแต่ละทรีตเมนต์ นั้นไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาเทโพ แต่ผลการศึกษาดังกล่าวต่ำและแตกต่างจากน้ำเชื้อสด (P<0.05) แต่อย่างไรก็ตามการใช้ Combination cryoprotectants ดังกล่าวให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิในแต่ละทรีตเมนต์อยู่ในช่วง 50-57% ซึ่งใกล้เคียงกับปลาสวายที่มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิในแต่ละทรีตเมนต์อยู่ในช่วง 46-59% ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเมื่อใช้ combination cryoprotectants ร่วมกันนั้นอาจลดการเกิดผลึกน้ำแข็งที่เป็นสาเหตุของการทำลายเซลล์อสุจิ และพบว่าการใช้ combination cryoprotectants รวมกันนั้นสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิให้สูงกว่าการใช้สาร cryoprotectant เพียงชนิดเดียว (10% DMSO, 10% DMA, 5% MeOH) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิอยู่ในช่วง 48-8% ตามลำดับ (Kwantong and Bart, 2006) อีกทั้งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการใช้ external cryoprotectant (Proteins, sugars, egg yolk หรือ Phospholipids) ร่วมกับ internal cryoprotectant นั้นสามารถลดการถูกทำลายของเซลล์แมมเบรน ที่อาจเกิดมาจาก cold shock หรือ osmotic stress นอกจากนี้พบว่าการใช้สาร cryoprotectant สองกลุ่มรวมกันสามารถป้องกันการเกิด lipid peroxidation, loss of membrane fluidity หรือ stabilization of membrane proteins ได้ (Cabrita et al., 2001) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Linhart et al. (2005) ได้ทำการศึกษาการเก็บน้ำเชื้อปลา European catfish (*Silurus glanis*) แบบแช่แข็งพบว่าเมื่อใช้combination cryoprotectants ระหว่าง 6%DMSO+6%propandiole หรือ 4%DMSO+4% propandiole ให้อัตราการฟักสูงไม่แตกต่างกับตัวควบคุม (P>0.05) และอัตราการฟักนี้สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สาร Cryoprotectant เพียงชนิดเดียว (10 และ 12% สำหรับ DMSO หรือ 5, 7.5 และ 10% สำหรับ MeOH) นอกจากนี้ Cabrita et al. (2001) ทำการศึกษาในปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) พบว่าเมื่อใช้ combination cryoprotectants (7%DMSO ร่วมกับ soybean protein complex) เป็นสาร Cryoprotectant นั้นให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าการใช้ 7%DMSO เป็นสาร Cryoprotectant เพียงชนิดเดียว (P<0.05) และการศึกษาของ Mansour et al. (2006) ที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.) พบว่าเมื่อใช้ combination cryoprotectants (7%egg yolk +10%DMA)ให้ผลของอัตราการปฏิสนธิ (48%) ซึ่งสูงกว่า การใช้ DMA ที่เป็นสาร Cryoprotectant เพียงชนิดเดียว (33%) ด้วยเหตุนี้การประยุกต์ใช้วิธีการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายจึงน่าจะมีประโยชน์ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพด้วย หรืออาจนำวิธีการนี้ไปประยุกต์ใช้กับการเก็บน้ำเชื้อปลาชนิดอื่นๆ ที่อยู่ในสกุลเดียวกัน ที่ผ่านมา Kwantong and Bart (2006) ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายมาเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพโดยใช้สาร cryoprotectant เพียงชนิดเดียว (10%DMSO, 10%DMA หรือ 5%MeOH) ซึ่งก็ให้ผลการศึกษาไปในทิศทางเดียวกันกับปลาสวาย

2. ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ และ combination cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ *(P. larnaudii)* โดยวิธีการแช่แข็ง

จากการประยุกต์ใช้เทคนิคและวิธีการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย มาศึกษาผลของการลดอุณหภูมิที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) พบว่าการลดอุณหภูมิที่ 5 ºC min^{-1}โดยมี 10% DMSO+ 10% DMA เป็น combination cryoprotectants ให้ผลของอัตราการปฏิสนธิสูงกว่า และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการลดอุณหภูมิที่ระดับอื่นๆ(10, 20 และ 40 °C min^{-1}) ในส่วนของอัตราการมีชีวิต การใช้ 10% DMSO+ 10% DMA เป็นสาร Cryoprotectant โดยมีอัตราการลดอุณหภูมิที่ 5, 10 และ 20 ºC min^{-1} ให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน และพบว่าการลดอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ ไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ ซึ่งผลที่ได้มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Viveiros et al. (2001) ได้ทำการศึกษาใน *Clarias gariepinus* โดยใช้ Ginzburg fish Ringer + 2.47M MeOH พบว่าที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 ºC min^{-1} ให้อัตราการฟัก 86.2 ± 5.7% ซึ่งผลของอัตราการฟักดังกล่าวไม่มีความแตกต่างจากการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 5 ºC min^{-1} (84.8 ± 3.8%) แต่ให้ผลของอัตราการฟักที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 2 ºC min^{-1} (56.7 ± 18.2%) ($P<0.05$) อย่างไรก็ตามจากผลการศึกษาของ Tiersch et al. (2004) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อของ Colorado pikeminnow *(Ptychocheilus lucius)* โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 4 ºC min^{-1} และ 40 ºC min^{-1} พบว่าการลดอุณหภูมิที่ 40 ºC min^{-1} ให้ผลการเคลื่อนที่สูงกว่า (56%) ในขณะที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 4 ºC min^{-1} ให้ผลการเคลื่อนที่เพียง 14% เมื่อใช้ 5% MeOH + HBSS

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดสุรินทร์ (ว่าที่ร้อยตรี สมศักดิ์ เขตสมุทร) ที่ให้ความอนุเคราะห์พ่อ-แม่พันธุ์ปลาเทโพ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดสุรินทร์ทุกๆ ท่านที่ได้มีส่วนช่วยให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 128 หน้า.

สำนักงานสถิติแห่งชาติ. 2539. สมุดสถิติรายปีประเทศไทย 2539 (ฉบับย่อ). โรงพิมพ์ดอกเบี้ย หน้า 32.

สมร พรชื่นชูวงศ์ และสุนัย พลายมี, 2552. ผลของสาร Cryoprotectants และอัตราการลดอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพและปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง. รายงานการวิจัย. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. 53 หน้า.

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.

Cabrita, E., Anel, L. and Herraéz, M.P. 2001. Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. Theriogenology. (56): 623-635.

Chereguini, O., Banda, I., Rasines, I. and Fernandez, A. 2001. Larval growth of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) produced with fresh and cryopreserved sperm. Aquaculture Research. (32): 133-143.

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. 92 pp.

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

Khanh, P.V., Tuan, N., Hao, N.V., Jeney, Z., Trong,T.Q. and Thanh, N.M. 1999. Review of biology and breeding of some indigenous fish species in the Mekong delta of Vietnam. Cai Be. Tien Giang. Vietnam. 32 pp.

Kwantong, S. 2003. Cryopreservation of striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* sperm. Doctoral thesis. School of Environment, Resources and Development. Asian Institute of Technology, Thailand. 65 pp.

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

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

Leung, L.K.P. 1991. Principles of biological cryopreservation. In: Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa. Jaemison, B.G.M. (Eds.). Cambridge: University Press. London, p. 231-244.

Linhart, O., Billard, R. and Proteau, J.P. 1993. Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis* L.) spermatozoa. Aquaculture. 115(3-4): 347-359.

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): 250–261.

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

Mazur, P. 1977. The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. Cryobiology. (14): 251-272.

Mongkonpunya, K., Pupipat, T., Pholprasith, S., Chantasut, M, Rittaporn, R., Pimolboot, S.,Wiwatcharakoses, S. and Chaengkij, M. 1992. Cryopreservation of sperm of the Mekong giant catfish, *Pangasinodon gigas* Chevey. Aquaculture and Schistosomiasis. Proceedings of a network meeting held in Manila, Phillipines August 6-10, p. 56-60.

Rana, K.J. 1995. Preservation of gamete. In: Broostock management and egg an larval quality. Bromage, N.R., and Roberts, R.J. (Eds.). London: Blackwell Science Ltd., p. 53-76.

Tiersch, T.R., Figiel, C.R.,Wayman, W.R.,Williamson, J.H., Gorman, O.T. and Carmichael, G.J. 2004. Cryopreservation of sperm of the endangered Colorado pikeminnow. North American Journal of Aquaculture. (66): 8-14.

Urbanyi, B., Horvath, A., Varga, Z., Horvath, L., Magyary, I. and Radics, F. 1999. Effect of Extenders on sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). Aquaculture Research. 30(2): 145-151.