การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกโดยวิธีแช่แข็ง

Cryopreservation of Julien's Golden Carp (*Probarbus jullieni*) Spermatozoa

พลชาติ ผิวเณร สมนึก คงทรัตน์ พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข และ ศรีรัตน์ สอดศุข
Ponlachart Pewnane Somnuek Kongtarattana Panom K. Sodsuk and Srirat Sodsuk
สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ
Aquatic Animal Genetics Research and Development Institute

บทคัดย่อ

ทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สก (*Probarbus jullieni*) โดยวิธีแช่แข็ง ด้วยประเด็นศึกษาพร้อมผลที่ได้สรุปดังนี้ (1) ประสิทธิภาพของน้ำยา (extender) 4 สูตร คือ Modified fish Ringer's solution (MFR), Modified Zhang and Liu (MZL), Milk powder glucose solution (MPG) และ 5% glucose ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะสั้นนาน 120 ชม. (5 วัน) พบว่า น้ำยา MZL และ MPG ที่อัตราเจือจาง 1:2 และ 1:1 ตามลำดับ มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกแบบระยะสั้น (2) ระดับการเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลายี่สกในน้ำยากลุ่มมีประจุคือ 0.9% NaCl และ MZL และน้ำยาไม่มีประจุคือ glucose ที่มีระดับออสโมลาริตีแตกต่างกัน พบว่าระดับออสโมลาริตีเป็นอิทธิพลหลักในการกระตุ้นการเคลื่อนไหวของสเปิร์ม โดยน้ำยาทั้ง 3 สูตรแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวและระดับออสโมลาริตีแบบผกผัน (3) ผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด คือ เมธานอล, DMSO และกลีเซอรอล ที่ความเข้มข้น 2–20% ต่อปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ที่เวลา 0–120 นาที พบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 3 ชนิดเพิ่มขึ้น จะส่งผลให้ปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวลดลง โดยเมธานอลมีพิษต่อสเปิร์มปลายี่สกต่ำกว่า DMSO และกลีเซอรอล ในทุกระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่เก็บ (4) น้ำยาเจือจางและวิธีการลดอุณหภูมิแบบต่างๆ หลังจากแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกเก็บไว้นาน 14 วัน เมื่อนำมาละลายพบว่า การใช้น้ำยา MZL และ 5% glucose และใช้อัตราลดอุณหภูมิ 5.04 °C/นาที ให้ปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวของน้ำเชื้อที่ละลายสูงสุด (5) ประสิทธิภาพของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งในการผสมเทียม โดยทำการผสมเทียมไข่ปลายี่สกด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษานาน 720 วัน และน้ำเชื้อสด ซึ่งเจือจางด้วยน้ำยาสูตรและอัตราเจือจางเดียวกัน ปรากฏว่าน้ำเชื้อสดมีอัตราปฏิสนธิและอัตราฟักเป็น 86.11±1.52 และ 59.33±15.53% ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีอัตราปฏิสนธิและอัตราฟักเป็น 40.79±1.84 และ 20.00±7.21% ตามลำดับ ผลที่ได้บ่งบอกว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกจากการศึกษาครั้งนี้ควรมีการปรับวิธีการและองค์ประกอบบางประการเพื่อให้การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกมีประสิทธิภาพสูงขึ้น

คำสำคัญ: ปลายี่สก น้ำเชื้อ สเปิร์ม การเก็บรักษาโดยแช่แข็ง

ABSTRACT

Cryopreservation of Julien’s barb (*Probarbus jullieni* Sauvage, 1880) (Roberts, 1992) spermatozoa was carried out with number of studies and results. (1) efficiencies of four extender solutions, Modified fish Ringer’s solution (MFR), Modified Zhang and Liu (MZL), Milk powder glucose solution (MPG) and 5% glucose were studied in 1:1, 1:2 and 1:4 semen:extender dilution ratio. Using short storage method of 120 hrs. (5 days), MZL and MPG at 1:2 and 1:1 dilution ratio were found to be highest efficiency. (2) Effect of of ion (MZL and 0.9% NaCl) and ion–deficient extender (glucose) on sperm motility was studied. Osmolarity level of all extenders was found to be main effect to sperm motility, and found inverse relationship between sperm motility and osmolarity. (3) The effect of 3 cryoprotectants, methanol, DMSO and glycerol to sperm motility and duration was studied. Sperm were exposed to each cryoprotectant at 2–20% (v/v) concentration for ฯ 0–120 minutes. Sperm motility and duration were found to be decresed when cryoprotectant concentration was increased. In every concentration and storage time, methanol was found to be lesser toxic to sperm than the DMSO and glycerol do. (4) effect of extenders and cooling rate form 3 freezing methods to post–thawed sperm motility and duration was studied. Used of MZL or 5% glucose as extender and used cooling rate at 5.04 °C/min by liquid nitrogen vapor in styrofoam box gave highest post–thawed sperm motility and duration. (5) Efficiency of cryopreserved sperm in the artificial breeding was studied. Julien’s barb eggs were inseminated with the 720 days cryopreserved and fresh sperm. Fertilization and hatching rate of fresh sperm (86.11±1.52 and 59.33±15.53%) were found to be higher than the cryopreserved sperm (40.79±1.84 and 20.00±7.21%). Result form the studied indicated cryopreservation procedure of Julien’s barb should be optimized for better result.

Keywords: Julien’s barb, *Probarbus jullieni*, sperm, cryopreservation

คำนำ

ปลายี่สก (*Probarbus jullieni* Sauvage, 1880) (Roberts, 1992) เป็นปลาพื้นเมืองของไทย มีลักษณะภายนอกคล้ายปลากระโห้ (*Catlocaprio siamensis*) แต่ปลายี่สกมีลำตัวเพรียวยาวกว่า หัวและเกล็ดเล็กกว่า บริเวณข้างลำตัวมีแถบสีดำพาดไปตลอดความยาวลำตัวจำนวน 7 แถบ (เฉิดฉัน และคณะ, 2538) ปัจจุบันปลายี่สกในธรรมชาติมีจำนวนลดน้อยลง เนื่องจากถิ่นที่อยู่อาศัยถูกทำลายและสิ่งแวดล้อมเสื่อมโทรมลง โดยอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศว่าด้วยสัตว์ป่าและพืชพรรณที่ใกล้สูญพันธุ์ (International Union for Conservation of Nature, IUCN) ได้จัดให้ปลายี่สกอยู่ในสถานะเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (threatened species) การอนุรักษ์ปลายี่สกแนวทางหนึ่งคือการดำรงพันธุ์ปลายี่สกโดยรวบรวมเชื้อพันธุ์ปลายี่สกจากแหล่ง

ต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นจากธรรมชาติและจากแหล่งเพาะเลี้ยงมาเก็บรักษาไว้แบบภายนอกถิ่นอาศัย (*Ex–situ* preservation) ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีแช่แข็ง เพราะเป็นวิธีที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกไว้เป็นระยะเวลาหลายปีโดยเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว

การเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีแช่แข็งจำเป็นต้องมีขั้นตอนการปฏิบัติที่ถูกต้องและเหมาะสมกับปลาแต่ละชนิด โดยจะต้องมีการศึกษาตามประเด็นดังนี้ (1) สูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ (extender solution) และอัตราเจือจางที่สามารถรักษาสเปิร์มปลาให้อยู่ในสภาพหยุดนิ่ง (quiescent stage) และคงสภาพสเปิร์ม (viability) ไว้ในระยะเวลานาน สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะสั้น (2) ปัจจัยหลักที่กระตุ้นให้สเปิร์มปลาเคลื่อนไหวและระดับออสโมลาริตี (osmolarity) ที่เริ่มกระตุ้นการเคลื่อนไหวและมีการเคลื่อนไหวสูงสุด ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการเลือกสูตรน้ำยาเจือจางและการกระตุ้นการเคลื่อนไหวสเปิร์มปลายี่สกเพื่อผสมเทียม (3) ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ซึ่งเป็นสารที่ช่วยปกป้องสเปิร์มจากกระบวนการแช่แข็ง โดยมีพิษต่อสเปิร์มต่ำและมีประสิทธิภาพในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา (4) น้ำยาเจือจางและวิธีการลดอุณหภูมิ รวมทั้งอัตราลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา เพื่อให้สเปิร์มที่ถูกแช่แข็งมีอัตรารอดสูงสุดเมื่อนำมาละลาย และ (5) การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งโดยการผสมเทียมเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด เพื่อเป็นการยืนยันว่าน้ำเชื้อปลาที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งยังคงมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตรต่างๆ ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สก
2. ศึกษาระดับการเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลายี่สกในน้ำยากลุ่มมีประจุและน้ำยาไม่มีประจุ ที่มีระดับออสโมลาริตีแตกต่างกัน
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารไครโอโพรแทคแทนท์ชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกโดยวิธีแช่แข็ง
4. เพื่อศึกษาอัตราและวิธีการลดอุณหภูมิในขั้นตอนแช่แข็ง อัตราและวิธีการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง เพื่อใช้ในการผสมเทียม

วิธีดำเนินการ

ใช้พ่อแม่พันธุ์ปลายี่สกที่เลี้ยงไว้ในบ่อดินของศูนย์และสถานีประมงน้ำจืด หรือจับจากธรรมชาติในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ เก็บน้ำเชื้อปลายี่สกจากปลาที่สมบูรณ์เพศโดยทำให้ปลาสลบ ใช้ผ้าเช็ดบริเวณส่วนท้องและช่องเพศจนแห้ง รีดน้ำเชื้อโดยใช้มือรีดที่บริเวณส่วนท้อง นำน้ำเชื้อสดที่ได้จากปลาแต่ละตัวไปประเมินประสิทธิภาพโดยวัดความหนาแน่นสเปิร์ม ปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ระดับออสโมลาริตีของน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม (seminal plasma) โดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ กฤษณ์ (2536) และ พลชาติ และคณะ (2547) และรีดไข่ปลายี่สกโดยวิธีฉีดฮอร์โมนกระตุ้น โดยใช้แม่ปลาของศูนย์ฯ และสถานีประมง หรือแม่ปลาจากธรรมชาติในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ นำน้ำเชื้อเชื้อและไข่ปลามาทดลองตามวัตถุประสงค์ดังต่อไปนี้

1. ประสิทธิภาพของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตรต่าง ๆ ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกแบบระยะสั้น

นำน้ำเชื้อสดผสมกับน้ำยา 4 สูตร คือ

- Modified fish Ringer's solution (MFR) (111.23 mM NaCl, 40.24 mM KCl, 2.04 mM $CaCl_2$, 2.38 mM $NaHCO_3$)
- Modified Zhang and Liu solution (MZL) (51.34 mM NaCl, 5.95 mM $NaHCO_3$, 222 mM Glucose)
- Milk powder glucose solution (MPG) (10% (w/v) Skimmed milk powder, 4% (w/v) Glucose)
- 5% Glucose solution (5% (w/v) glucose)

ผสมน้ำยาและน้ำเชื้อ 3 อัตราเจือจาง (น้ำเชื้อ : น้ำยา) คือ 1:1, 1:2 และ 1:4 และผสมยาปฏิชีวนะ penicillin และ streptomycin เข้มข้น 50 IU/มล. และ 0.05 มก./มล. ตามลำดับ นำไปเก็บรักษา ณ อุณหภูมิ 4 °C ทำการตรวจสอบปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวตามวิธีการของกฤษณ์ (2536) หลังผสมน้ำยา (0 ชม.) และทุกๆ 24 ชม. จนกระทั่งสเปิร์มทุกหลอดไม่มีการเคลื่อนไหว โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคตอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบรูณ์ (factorial in completely randomized design) (Baynes and Scott, 1987 อ้างตาม กฤษณ์, 2536)

2. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวและระดับออสโมลาริติ ของน้ำยากลุ่มมีและไม่มีประจุ

2.1 ศึกษาจุดที่สเปิร์มเริ่มมีการเคลื่อนไหว (threshold activation) และมีการเคลื่อนไหวสูงสุด (complete activation) ในน้ำยากลุ่มมีประจุ คือ 0.9% NaCl และ MZL และน้ำยากลุ่มไม่มีประจุ คือ สารละลายกลูโคส โดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (Sokal and Rohlf, 1968; อนันต์ชัย, 2539)

2.2 ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวกับระดับออสโมลาริตีของน้ำยา 2 กลุ่ม โดยสร้างกราฟความสัมพันธ์เชิงเส้น (general curves) เปรียบเทียบปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวที่ระดับออสโมลาริตีต่างๆ ระหว่างน้ำยา 2 กลุ่มโดยใช้วิธีรีเกรสชั่น (regression) และทดสอบความแตกต่างของปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวกับระดับออสโมลาริตี โดยใช้ t–test (สุชาดา และจลีพร, 2534)

2.3 ศึกษาอิทธิพลจากไอออนต่อการเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลายี่สก โดยนำความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวกับระดับออสโมลาริตีมาวิเคราะห์ด้วยวิธีรีเกรสชั่น (สุชาดา และจลีพร, 2534)

3. ผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่าง ๆ ที่มีผลต่อประสิทธิภาพน้ำเชื้อปลายี่สก

เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาและผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด คือ ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ 10% (dimethylsulfoxide, DMSO) เมธานอล และกลีเซอรอล ให้มีความเข้มข้น 2–20% แล้วตรวจสอบปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์ม ณ เวลา 0–120 นาที โดยวางแผนการทดลองแบบ 3×5 แฟคตอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบรูณ์ (3×5 factorial in completely randomized design) (Baynes and Scott, 1987 อ้างตาม กฤษณ์, 2536)

4. วิธีการแช่แข็งและอัตราลดอุณหภูมิแบบต่างๆ ในขั้นตอนแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สก

เจือจางน้ำเชื้อ ด้วยน้ำยาเจือจางสูตรต่างๆ และผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ ในอัตราเจือจางและความเข้มข้นซึ่งวิเคราะห์แล้วว่าเหมาะสมที่สุดจากการทดลองที่ 4.1 และ 4.3 ดูดสารละลายน้ำเชื้อปริมาตร 0.5 มล. ใส่ในหลอดสำหรับแช่แข็ง (straws) ปล่อยให้สเปิร์มปรับตัวกับสารละลาย (equilibration period) ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที แล้วจึงนำไปลดอุณหภูมิตามกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อโดยใช้วิธีลดอุณหภูมิ 3 แบบ คือ

- แบบที่ 1 ลดอุณหภูมิด้วยเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (programmable freezer) อัตราลดอุณหภูมิ 4.55 °C/นาที
- แบบที่ 2 ลดอุณหภูมิโดยใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม อัตราลดอุณหภูมิ 5.04 °C/นาที
- แบบที่ 3 ลดอุณหภูมิโดยใช้ไอไนโตรเจนเหลวในถังเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็ง อัตราลดอุณหภูมิ 5.76 °C/นาที

ดำเนินการแช่แข็งน้ำเชื้อจนอุณหภูมิตัวอย่างอยู่ในช่วง –60 ถึง –80 °C แล้วจึงในไปเก็บในไนโตรเจนเหลว (-196 °C)นำหลอดตัวอย่างแช่แข็งจากการทดลองลดอุณหภูมิทั้ง 3 วิธีที่เก็บรักษาไว้นาน 1–365 วันไปละลายแล้วตรวจสอบปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว โดยวางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลในการทดลองแบบสุ่มสมบรูณ์ (factorial in completely randomized design) (Baynes and Scott, 1987 อ้างตาม กฤษณ์, 2536) (อนันต์ชัย, 2539)

5. ประสิทธิภาพของน้ำเชื้อปลายี่สกที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งในการผสมเทียม

นำน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บไว้นาน 365 วันขึ้นไปมาละลายและนำไปผสมเทียมกับไข่ปลายี่สกโดยเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดที่ผสมด้วยน้ำยาสูตรเดียวกันในอัตราเจือจางและปริมาตรที่เท่ากัน ประเมินอัตราปฏิสนธิ อัตราฟัก และคำนวณอัตราส่วนจำนวนสเปิร์มที่ยังมีชีวิตต่อไข่ 1 ฟอง จากการใช้น้ำเชื้อ 2 แบบ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบรูณ์ (completely randomized design) (อนันต์ชัย, 2539)

ผลการทดลอง

ประสิทธิภาพของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตรต่างๆ ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกแบบระยะสั้น

จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า อิทธิพลจากสูตรน้ำยา อัตราเจือจาง และอิทธิพลร่วม มีผลต่อปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) ทั้ง 6 ช่วงเวลาที่ตรวจสอบ ปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวในน้ำยาสูตรและอัตราที่แตกต่างกันแสดงดังตารางที่ 1 และ เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 120 ชม. (5 วัน) พบว่ามีเฉพาะน้ำยา MZL ที่อัตราเจือจาง 1:2 และน้ำยา MPG ที่อัตราเจือจาง 1:1 ยังคงมีสเปิร์มที่รอดชีวิต โดยมีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว 8.56±5.11 และ 16.17±3.17 % ตามลำดับ และมีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว 22.00±1.00 และ 32.67±2.08 วินาที ตามลำดับ ส่วนน้ำยาสูตรและอัตราเจือจางอื่นนอกเหนือจากนี้พบว่าสเปิร์มตายทั้งหมด (0.00%)

ตารางที่ 1 ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) ของน้ำเชื้อปลายี่สกที่เจือจางด้วยน้ำยา Modified fish's Ringer (MFR), Modified Zhang and Liu (MZL), Milk Powder Glucose (MPG) และ 5% glucose (GLU) ที่อัตราเจือจาง 1, 3 และ 5 เท่า ซึ่งเก็บรักษาแบบระยะสั้นระหว่างเวลา 0–120 ชม. (5 วัน)

สูตรน้ำยา/อัตราเจือจาง	0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	120 ชม.
MFR/1 เท่า	97.64 ± 1.50^{Aa}	39.07 ± 2.46^{Aa}	0.00 ± 0.00^{B}	–	–	–
MFR/3 เท่า	98.82 ± 0.47^{Ab}	82.06 ± 0.79^{Ab}	34.11 ± 3.45^{B}	10.04 ± 2.70^{B}	0.00 ± 0.00^{A}	–
MFR/5 เท่า	97.85 ± 2.29^{Ac}	62.99 ± 8.19^{Ac}	51.66 ± 4.21^{B}	28.49 ± 3.07^{B}	12.60 ± 3.57^{A}	0.00 ± 0.00^{B}
MZL/1 เท่า	97.62 ± 0.83^{Ba}	82.93 ± 3.15^{Aa}	68.22 ± 11.62^{Aa}	54.66 ± 5.34^{Aa}	0.00 ± 0.00^{A}	–
MZL/3 เท่า	85.08 ± 2.08^{Bb}	56.50 ± 3.18^{Ab}	28.76 ± 5.69^{Ab}	25.04 ± 4.03^{Ab}	7.29 ± 2.83^{A}	8.56 ± 5.11^{A}
MZL/5 เท่า	90.91 ± 7.54^{Bc}	36.35 ± 6.69^{Ac}	12.21 ± 3.10^{Ab}	7.84 ± 0.33^{Ab}	6.41 ± 3.57^{A}	0.00±0.00
MPG/1 เท่า	68.71 ± 5.28^{Da}	70.42 ± 5.10^{Ba}	36.37 ± 4.79^{Ca}	21.29 ± 3.51^{Ca}	15.94 ± 0.42^{A}	16.17 ± 3.17^{A}
MPG/3 เท่า	13.10 ± 6.18^{Db}	12.42 ± 1.07^{Bb}	6.35 ± 4.63^{Cb}	0.00 ± 0.00^{Cb}	–	–
MPG/5 เท่า	2.42 ± 0.70^{Dc}	0.00 ± 0.00^{Bc}	–	–	–	–
GLU/1 เท่า	96.39 ± 2.23^{Ca}	60.75 ± 11.86^{Ba}	65.87 ± 2.82^{Ba}	20.04 ± 2.20^{Ca}	1.81 ± 0.82^{B}	0.00 ± 0.00^{B}
GLU/3 เท่า	65.45 ± 9.04^{Cb}	21.69 ± 4.21^{Bb}	7.72 ± 3.08^{Bb}	0.00 ± 0.00^{Cb}	–	–
GLU/5 เท่า	9.14 ± 3.58^{Cc}	4.55 ± 2.09^{Bc}	0.00 ± 0.00^{B}	–	–	–

ตารางที่ 2 ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) ของน้ำเชื้อปลายี่สกที่เจือจางด้วยน้ำยา Modified fish's Ringer (MFR), Modified Zhang and Liu (MZL), Milk Powder Glucose (MPG) และ 5% glucose (GLU) ที่อัตราเจือจาง 1, 3 และ 5 เท่า ซึ่งเก็บรักษาแบบระยะสั้นระหว่างเวลา 0–120 ชม. (5 วัน)

สูตรน้ำยา/อัตราเจือจาง	0 ชม.	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.	96 ชม.	120 ชม.
MFR/1 เท่า	53.00 ± 2.65^{Db}	31.00 ± 1.73^{Ba}	0.00 ± 0.00^{Da}	–	–	–
MFR/3 เท่า	48.67 ± 2.08^{Da}	53.00 ± 3.00^{Bb}	27.00 ± 2.00^{Db}	17.67 ± 0.58^{Bc}	0.00 ± 0.00^{C}	–
MFR/5 เท่า	41.67 ± 2.08^{Dc}	55.00 ± 1.00^{Bc}	37.33 ± 2.31^{Dc}	32.33 ± 2.08^{Bb}	18.67 ± 0.58^{C}	0.00 ± 0.00^{C}
MZL/1 เท่า	70.67 ± 3.06^{Bb}	73.00 ± 2.00^{Aa}	41.67 ± 2.08^{Aa}	40.00 ± 2.00^{Aa}	0.00 ± 0.00^{A}	–
MZL/3 เท่า	89.00 ± 1.73^{Ba}	88.33 ± 1.53^{Ab}	78.67 ± 3.06^{Ab}	36.33 ± 3.21^{Ac}	21.67 ± 2.89^{A}	22.00 ± 1.00^{B}
MZL/5 เท่า	91.67 ± 3.06^{Bc}	99.00 ± 2.65^{Ac}	55.67 ± 4.16^{Ac}	39.33 ± 0.58^{Ab}	17.33 ± 1.15^{A}	0.00 ± 0.00^{B}
MPG/1 เท่า	88.33 ± 2.08^{Cb}	100.67 ± 8.33^{Ba}	86.00 ± 3.61^{Ba}	49.67 ± 3.79^{Ba}	23.00 ± 2.00^{B}	32.67 ± 2.08^{A}
MPG/3 เท่า	94.67 ± 2.08^{Ca}	31.33 ± 1.53^{Bb}	27.67 ± 3.06^{Bb}	0.00 ± 0.00^{Bc}	–	–
MPG/5 เท่า	33.00 ± 1.00^{Cc}	0.00 ± 0.00^{Bc}	–	–	–	–
GLU/1 เท่า	95.67 ± 2.08^{Ab}	125.00 ± 8.19^{Aa}	70.33 ± 4.51^{Ca}	22.00 ± 1.73^{Ca}	13.00 ± 1.00^{D}	0.00 ± 0.00^{C}
GLU/3 เท่า	110.00 ± 3.61^{Aa}	94.67 ± 2.08^{Ab}	32.33 ± 2.31^{Cb}	0.00 ± 0.00^{Cc}	–	–
GLU/5 เท่า	110.00 ± 3.61^{Ac}	41.33 ± 3.51^{Ac}	0.00 ± 0.00^{Cc}	–	–	–

หมายเหตุ: อักษรตัวพิมพ์ใหญ่และเล็กในแนวนอนที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ของสูตรน้ำยาและอัตรา เจือจางที่แตกต่างกัน ตามลำดับ

2. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวและระดับออสโมลาริตีของน้ำยากลุ่มมีและไม่มีประจุ

2.1 วิเคราะห์ระดับออสโมลาริตีที่จุดเริ่มกระตุ้นการเคลื่อนไหวและจุดกระตุ้นการเคลื่อนไหวสูงสุดของน้ำยากลุ่มมีประจุสูตรต่างๆ เปรียบเทียบกับน้ำยากลุ่มไม่มีประจุ จากการผสมน้ำเชื้อปลายี่สกในสารละลายกลุ่มไม่มีประจุ คือกลูโคส และกลุ่มมีประจุ คือ 0.9% NaCl และ MZL ผลแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ระดับออสโมลาริตี (mOsmol/kg) และปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) ณ จุดเริ่มกระตุ้นการเคลื่อนไหวและจุดกระตุ้นการเคลื่อนไหวสูงสุดของน้ำเชื้อปลายี่สกในน้ำยากลุ่มมีและไม่มีประจุ

น้ำยา	จุดเริ่มกระตุ้นการเคลื่อนไหว		จุดกระตุ้นการเคลื่อนไหวสูงสุด	
	ออสโมราลิตี (mOsmol/kg)	ปริมาณสเปริ์ม ที่เคลื่อนไหว (%)	ออสโมราลิตี (mOsmol/kg)	ปริมาณสเปริ์ม ที่เคลื่อนไหว (%)
กลูโคส	265.67 ± 4.04^{a}	23.95 ± 1.97^{a}	244.33 ± 1.53^{b}	75.68 ± 5.82^{a}
0.9% NaCl	258.00 ± 0.00^{a}	27.31 ± 10.55^{a}	210.00 ± 2.00^{c}	73.36 ± 3.05^{a}
MZL	271.33 ± 8.74^{a}	26.53 ± 4.04^{a}	261.33 ± 6.81^{a}	75.98 ± 2.28^{a}

หมายเหตุ: อักษรกำกับในแนวตั้งแถวเดียวกันต่างกัน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) ระหว่างน้ำยา 3 สูตร

จากการวิเคราะห์สถิติพบว่า ณ จุดเริ่มกระตุ้นการเคลื่อนไหว น้ำยากลูโคส, 0.9% NaCl และ MZL มีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวและระดับออสโมลาริตี ณ จุด นี้ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ณ จุดกระตุ้นการเคลื่อนไหวสูงสุด น้ำยากลูโคส, 0.9% NaCl และ MZL มีปริมาณสเปริ์มที่เคลื่อนไหว ณ จุดนี้ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่มีระดับออสโมลาริตีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) โดยน้ำยา MZL มีระดับออสโมลาริตี ณ จุดนี้สูงสุด รองลงมาคือน้ำยากลูโคส และต่ำสุดคือ 0.9% NaCl

2.2 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวกับระดับออสโมลาริตีของน้ำยากลุ่มมีและไม่มีประจุ เมื่อนำระดับออสโมลาริตีและปริมาณสเปริ์มที่เคลื่อนไหวมาสร้างกราฟเส้นตรงและวิเคราะห์โดยวิธีรีเกรสชั่น จากผลการทดลองที่ 2.1 พบว่าระดับออสโมลาริตีและปริมาณสเปริ์มเคลื่อนไหวมีความสัมพันธ์แบบผกผัน กล่าวคือ เมื่อระดับออสโมลาริตีลดลงส่งผลให้ปริมาณ สเปริ์มเคลื่อนไหวเพิ่มขึ้น แต่เมื่อระดับออสโมลาริตีลดลงถึงจุดกระตุ้นการเคลื่อนไหวสูงสุดจะส่งผลให้ปริมาณสเปริ์มเคลื่อนไหวเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว

2.3 อิทธิพลจากไอออนต่อการเคลื่อนไหวของสเปิร์ม ผลการวิเคราะห์ ได้สมการแสดงสัมพันธ์ระหว่าง log ของระดับออสโมลาริตี (X) และค่า log ของปริมาณสเปริ์มที่เคลื่อนไหว (Y) ของน้ำยากลูโคสมีสมการเป็น $\log Y = -4.12\log X+11.50$ ($r^2 = 0.6531$), น้ำยา 0.9% NaCl มีสมการเป็น $\log Y = -3.94\log X + 11.02$ ($r^2 = 0.6118$) และน้ำยา MZL มีสมการเป็น $\log Y = -2.49\log X+7.75$ ($r^2 = 0.3945$) เมื่อวิเคราะห์ความเป็นเส้นตรงและความชันของเส้นกราฟระหว่างน้ำยาแต่ละคู่จนครบทุกคู่ พบว่าความเป็นเส้นตรงและความชันของเส้นกราฟในน้ำยาทุกคู่ที่เปรียบเทียบไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$)

3. ผลของสารไครโอโพรแทคแทนท์ชนิดต่าง ๆ ต่อประสิทธิภาพของน้ำเชื้อปลายี่สก

จากการวิเคราะห์สถิติพบว่าอิทธิพลของชนิดสาร ความเข้มข้น และอิทธิพลร่วม มีผลต่อปริมาณและระยะเวลาที่สเปริม์เคลื่อนไหวอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) ทั้ง 3 ช่วงเวลาที่ตรวจสอบ ปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวในสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันแสดงดังตารางที่ 4 พบว่าเมธานอลมีพิษต่อสเปิร์มน้อยที่สุดโดยมีสเปิร์มเหลือรอดในทุกความเข้มข้น ขณะที่ DMSO และ glycerol เป็นพิษกับสเปิร์มมากกว่า โดย DMSO เข้มข้น 15 และ 20 % และ กลีเซอรอลเข้มข้น 10, 15 และ 20% ส่งผลให้สเปิร์มตายทั้งหมด ที่ระยะเวลา 120 นาที และพบว่า เมธานอลเข้มข้น 2% และ 5% ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน มีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวสูงสุด (60.33±6.03 และ 62.33±4.73 วินาที ตามลำดับ)

ตารางที่ 4 ปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวในสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด (เมธานอล DMSO และกลีเซอรอล) ที่ความเข้มข้น 2, 5, 10, 15 และ 20% ที่ระยะเวลา 0, 30 และ 120 นาที

ไครโอโพรเทคแทนท์ (ความเข้มข้น)	ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%)			ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที)		
	0 นาที	30 นาที	120 นาที	0 นาที	30 นาที	120 นาที
ไม่ผสม (0%)	94.24±1.53	93.94±1.81	91.99±4.76	66.00±5.00	64.67±3.21	62.33±3.21
เมธานอล (2%)	97.01±1.63^{Aa}	90.09±2.87^{Aa}	93.88±3.37^{Aa}	65.00±2.65^{Aa}	63.33±2.08^{Aa}	60.33±6.03^{Aa}
เมธานอล (5%)	98.51±0.14^{Ab}	95.54±2.04^{Aa}	94.22±0.97^{Ab}	64.67±6.11^{Ab}	59.33±2.08^{Ab}	62.33±4.73^{Aa}
เมธานอล (10%)	98.28±0.77^{Ac}	96.16±2.11^{Ab}	92.88±2.96^{Ac}	67.67±10.02^{Ab}	60.00±6.24^{Ac}	50.33±8.02^{Ab}
เมธานอล (15%)	91.31±3.25^{Ad}	89.50±1.59^{Ac}	87.78±2.48^{Acd}	55.67±6.11^{Ac}	57.00±4.36^{Ad}	53.33±9.07^{Ab}
เมธานอล (20%)	93.96±1.59^{Ae}	86.27±2.39^{Ac}	78.98±1.12^{Ad}	49.00±4.36^{Ac}	50.00±2.65^{Ae}	49.67±9.61^{Ab}
DMSO (2%)	93.53±4.73^{Ba}	81.89±7.38^{Ba}	66.99±10.15^{B}	60.33±6.03^{Ba}	42.00±3.61^{Ba}	54.67±3.51^{B}
DMSO (5%)	96.00±1.28^{Bb}	83.53±3.90^{Ba}	74.83±4.19^{B}	52.33±3.21^{Bb}	39.00±4.36^{Bb}	52.00±6.56^{B}
DMSO (10%)	79.92±2.06^{Bc}	16.58±9.58^{Bb}	8.17±2.95^{B}	50.33±6.51^{Bb}	18.67±4.16^{Bc}	10.33±3.51^{B}
DMSO (15%)	39.10±7.53^{Bd}	6.84±0.51^{Bc}	0.00±0.00^{B}	42.00±1.73^{Bc}	12.00±3.61^{Bd}	0.00±0.00^{B}
DMSO (20%)	17.55±7.61^{Be}	0.00±0.00^{Bc}	–	46.33±4.04^{Bc}	0.00±0.00^{Be}	–
กลีเซอรอล (2%)	97.37±1.52^{Ca}	92.05±2.31^{B}	75.92±12.88^{C}	65.67±4.51^{Ca}	40.67±3.51^{C}	44.00±2.00^{C}
กลีเซอรอล (5%)	78.33±2.74^{Cb}	74.32±4.56^{B}	51.13±11.68^{C}	36.00±4.36^{Cb}	24.00±3.00^{C}	30.33±6.03^{C}
กลีเซอรอล (10%)	16.72±8.77^{Cc}	9.09±9.09^{B}	0.00±0.00^{C}	20.33±6.03^{Cb}	8.00±4.00^{C}	0.00±0.00^{C}
กลีเซอรอล (15%)	0.00±0.00^{Cd}	–	–	0.00±0.00^{Cc}	–	–
กลีเซอรอล (20%)	0.00±0.00^{Ce}	–	–	0.00±0.00^{Cc}	–	–

หมายเหตุ: อักษรตัวพิมพ์ใหญ่และเล็กที่กำกับในแนวตั้งแถวเดียวกันที่ต่างกัน แสดงว่าค่าที่ถูกกำกับในแถวเดียวกันนั้นมีความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) ในระหว่างชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ต่างกันและระหว่างระดับความเข้มข้นที่ต่างกันในสารแต่ละชนิด ตามลำดับ)

4. วิธีการแช่แข็งและอัตราการลดอุณหภูมิ ในขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สก

ทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อยี่สกโดยใช้น้ำยา 3 สูตร คือ MPG, MZL และ 5% glucose ผสมน้ำเชื้อที่อัตราเจือจาง 1:2 และผสมเมธานอลเข้มข้น 10% ซึ่งเป็นความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่อยู่ในช่วงเหมาะสมสำหรับแช่แข็งน้ำเชื้อปลาทั่วไป (McAndrew *et al.*, 1995) นำน้ำเชื้อแช่แข็งจากการทดลองแช่แข็ง

น้ำเชื้อด้วยน้ำยา 3 สูตร และใช้อัตราลดอุณหภูมิ 3 แบบ ที่เก็บรักษานาน 14 วันมาละลายและตรวจสอบปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวของน้ำเชื้อก่อนแช่แข็งในระยะสิ้นสุดการปรับตัว (equilibration) และน้ำเชื้อที่ละลาย จากการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สก โดยใช้น้ำยา Modified Zhang and Liu (MZL), Milk powder glucose (MPG) และ 5% glucose (GLU) และอัตราลดอุณหภูมิ 3 อัตรา (4.55, 5.04 และ 5.76 °C/นาที) จากวิธีลดอุณหภูมิ 3 แบบ

น้ำยาเจือจาง	อัตราลดณหภูมิ (°C/นาที)	ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%)	ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที)
MZL	equilibration	87.50	92.00
	4.55	18.01 ± 6.45^{Ab}	30.00 ± 1.41^{Bb}
	5.04	52.74 ± 7.98^{Aa}	33.00 ± 0.00^{Ba}
	5.76	7.83 ± 0.32^{Ab}	19.50 ± 0.71^{Bb}
MPG	equilibration	81.82	87.00
	4.55	3.77 ± 2.19^{Bb}	22.00 ± 4.24^{Bb}
	5.04	27.62 ± 2.92^{Ba}	38.50 ± 3.54^{Ba}
	5.76	3.27 ± 3.03^{Bb}	30.00 ± 5.66^{Bb}
GLU	equilibration	85.93	76.00
	4.55	4.67 ± 3.22^{Bb}	35.50 ± 2.12^{Ab}
	5.04	45.46 ± 5.40^{Ba}	43.50 ± 2.12^{Aa}
	5.76	2.48 ± 2.04^{Bb}	26.50 ± 2.12^{Ab}

หมายเหตุ: อักษรตัวพิมพ์ใหญ่และเล็กที่กำกับในแนวตั้งแถวเดียวกันต่างกัน แสดงว่าค่าที่ถูกกำกับในแถวเดียวกันนั้นมีความ แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในระหว่างสูตรน้ำยาและระหว่างอัตราลดอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์สถิติพบว่า สูตรน้ำยาเจือจางและอัตราลดอุณหภูมิ มีผลต่อปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวของน้ำเชื้อที่ละลายอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) แต่อิทธิพลร่วมไม่มีผลต่อปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว ($p>0.05$) และพบว่าอิทธิพลของสูตรน้ำยา อัตราลดอุณหภูมิ และอิทธิพลร่วม มีผลต่อระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) จากตารางที่ 6 พบว่า การแช่แข็งด้วยน้ำยา MZL และ 5% glucose ที่ใช้อัตราลดอุณหภูมิ 5.04 °C/นาที ให้ปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวของน้ำเชื้อที่ละลายสูงสุด ตามลำดับ ส่วนน้ำยาทั้ง 3 สูตรที่ใช้อัตราลดอุณหภูมิ 4.55 และ 5.76 °C/นาที นั้นให้ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไวต่ำสุด

5. ประสิทธิภาพของน้ำเชื้อปลายี่สกที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งในการผสมเทียม

ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้น้ำยา MZL และผสมเมธานอล 10% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ แช่แข็งโดยใช้วิธีลดอุณหภูมิแบบที่ 2 (ใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม) อัตราลดอุณหภูมิ 5.04 °C/นาที ที่เก็บรักษานาน

720 วัน (1 ปี 11 เดือน) นำน้ำเชื้อดังกล่าวที่ละลายไปผสมเทียมกับไข่ปลายี่สกโดยเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดที่ผสมด้วยน้ำยาและอัตราเจือจางเดียวกัน โดยใช้สารละลายน้ำเชื้อปริมาตร 0.15 มล. ผสมกับไข่ปริมาณ 2.80±0.73 กรัม หรือ 848.00±32.57 ฟอง

อัตราปฏิสนธิและอัตราฟักของน้ำเชื้อแช่แข็งและน้ำเชื้อสดแสดงในตารางที่ 3 จากการทดลองพบว่าน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งและน้ำเชื้อสดมีอัตราปฏิสนธิแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p<0.01$) และมีอัตราฟักแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งมีอัตราปฏิสนธิ 40.79±1.84 % และอัตราฟัก 20.00±7.21 % ซึ่งทั้ง 2 อัตรามีค่าต่ำกว่าน้ำเชื้อสดซึ่งมีอัตราปฏิสนธิ 86.11±1.52 % และอัตราฟัก 59.33±15.53 %

ตารางที่ 7 ความหนาแน่น ปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว และอัตราส่วนจำนวนสเปิร์มที่มีชีวิตต่อไข่ 1 ฟอง ที่ใช้ผสมเทียมของน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง

	ความหนาแน่นสเปิร์ม (เซลล์/มล.)	ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%)	ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที)	อัตราส่วน สเปิร์มที่มีชีวิตต่อไข่ 1 ฟอง	อัตราปฏิสนธิ (%)	อัตราฟัก (%)
น้ำเชื้อสด	1.42×10^{9}	97.95	51.67	16.40×10^{5}	86.11 ± 1.52^{a}	59.33 ± 15.53^{a}
น้ำเชื้อแช่แข็ง	0.74×10^{9}	49.08	33.33	4.28×10^{5}	40.79 ± 1.84^{b}	20.00 ± 7.21^{b}

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษกำกับในแนวตั้งแถวเดียวกันต่างกัน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) ระหว่างค่าที่ถูกกำกับในแถวเดียวกันนั้น

วิจารณ์ผลการศึกษา

จากการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยา 4 สูตร ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกแบบระยะสั้น พบว่าน้ำยา MZL และ MPG ที่อัตราเจือจาง 1:2 และ 1:1 ตามลำดับ สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกได้นานที่สุด 120 ชม. (5 วัน) ในขณะที่น้ำยาสูตรอื่นๆ ที่ใช้อัตราเจือจางแตกต่างไปจากนี้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกในระยะเวลาสั้นกว่า (1–4 วัน) น้ำยา MZL นั้นประกอบด้วยเกลือ NaCl, $NaHCO_3$ และน้ำตาลกลูโคส ขณะที่น้ำยา MPG ประกอบไปด้วยหางนม (skimmed milk powder) และน้ำตาลกลูโคส จะเห็นว่าน้ำยาทั้งสองสูตรนี้มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบเหมือนกัน ซึ่งน้ำตาลกลูโคสนั้นสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองของสเปิร์มปลาได้ ทั้งนี้เป็นเพราะสเปิร์มของปลาสามารถใช้สารภายนอกเซลล์ในขบวนการเผาผลาญพลังงานได้ (De W. Kruger *et al*., 1984) ในกรณีที่มีการเก็บน้ำเชื้อไว้ใช้ในระยะยาวซึ่งอาจทำให้ให้แหล่งพลังงานภายในสเปิร์มหมดไป จึงทำให้น้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยา 2 สูตรนี้ยังคงมีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว และยังมีระยะเวลาที่เคลื่อนไหวนานกว่าในน้ำยา MFR ซึ่งไม่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาน้ำยา 5% Glucose ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบเช่นกัน จะเห็นว่าที่ระยะเวลา 0 ชม. (หลังผสมน้ำยาทันที) ให้ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวสูงสุด แต่กลับให้ผลในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกได้ต่ำกว่าน้ำยาอีก 2 สูตรข้างต้น สิ่งเหล่านี้บ่งบอกถึงองค์ประกอบอื่นๆ ที่จำเป็นสำหรับการเก็บรักษาสเปิร์มปลายี่สกนอกเหนือจากน้ำตาลกลูโคส โดยน้ำยา MZL มีเกลือ NaCl และ $NaHCO_3$ ซึ่งสามารถเป็นระบบบัฟเฟอร์ (buffer) ป้องกันการเปลี่ยนแปลงของ pH ซึ่งส่งผลเสียต่อสเปิร์ม และน้ำยา MPG มีโปรตีนที่อยู่ในหางนม ซึ่ง

ทำหน้าที่เป็นสารคงสภาพเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane stabilizer) ให้กับเซลล์สเปิร์ม (Chereguini *et. al.*, 1997) อย่างไรก็ตาม น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อยังมีความเฉพาะเจาะจงกับชนิดของปลา โดยน้ำยา MPG นั้นแม้ว่าจะใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกได้ดีแต่กลับไม่เหมาะสมสำหรับน้ำเชื้อปลาบึก โดยพบว่าเมื่อใช้ MPG เจือจางน้ำเชื้อปลาบึกกลับทำให้สเปิร์มตายทั้งหมดเมื่อเก็บนาน 24 ชม. (พลชาติ และคณะ, 2550)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวและระดับออสโมลาริตีของน้ำยากลุ่มไม่มีประจุคือสารละลายกลูโคส และกลุ่มมีประจุคือ 0.9% NaCl และ MZL พบว่าปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับระดับออสโมลาริตีของน้ำยาทั้ง 2 กลุ่ม กล่าวคือเมื่อระดับออสโมลาริตีลดลงส่งผลให้ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นสิ่งสะท้อนให้เห็นว่าออสโมลาริตีมีบทบาทสำคัญต่อการเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลากระดูกแข็ง (Morisawa and Susuki, 1980) เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว ณ จุด threshold activation และ complete activation ของน้ำยาทั้ง 2 กลุ่ม และระดับออสโมลาริตี ณ จุด threshold activation ไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่น้ำยา 2 กลุ่มมีระดับออสโมลาริตี ณ จุด complete activation แตกต่างกัน ($p<0.01$) โดยน้ำยา MZL มีระดับออสโมลาริตี ณ จุดนี้สูงสุด (261.33±6.81) รองลงมาคือน้ำยากลูโคส (244.33±1.53) และต่ำสุดคือ 0.9% NaCl (210.00±2.00) จะเห็นว่าน้ำยา MZL และกลูโคสมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบเหมือนกัน สิ่งนี้บ่งบอกถึงอิทพิพลของกลูโคสมีผลให้ออสโมลาริตี ณ จุด complete activation เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ไอออน HCO_3^+ ที่เป็นองค์ประกอบของ $NaHCO_3$ ในน้ำยา MZL มีส่วนทำให้จุด complete activation เพิ่มขึ้นจนอาจทำให้ระดับออสโมลาริตี ณ จุดนี้ของน้ำยา MZL สูงสุด อิทธิพลจาก HCO_3^+ นั้นอาจมีผลต่อการเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลายี่สก โดย Ohta *et. al.* (1997) รายงานว่าการเพิ่มปริมาณ HCO_3^+ ในสารละลายน้ำเชื้อมีผลในการหน่วงการเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลา Japanese Eel (*Anguilla japonica*) อย่างไรก็ตาม ออสโมลาริตียังถือว่าเป็นปัจจัยหลักต่อการเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลายี่สก การศึกษาในครั้งนี้ไม่สามารถสรุปผลอย่างชัดเจนได้ว่ากลูโคสและ HCO_3^+ มีบทบาทในต่อการเคลื่อนไหวของสเปิร์มปลายี่สก ซึ่งจะต้องมีการวางแผนการทดลองโดยเฉพาะเจาะจงต่อไป

จากการศึกษาผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด คือ เมธานอล, DMSO และกลีเซอรอล ซึ่งเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์กลุ่มที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ (penetrative cryoprotectant) มีการใช้อย่างแพร่หลายในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา และเป็นสารที่มีพิษกับสเปิร์ม (McAndrew *et al.*, 1995) ซึ่งจากการทดลองจะเห็นว่าเมื่อความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 3 ชนิดเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวลดลง โดยเฉพาะ กลีเซอรอลซึ่งมีความเป็นพิษต่อสเปิร์มปลายี่สกสูงสุด โดยจะเห็นว่ากลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 15–20% หลังจากผสมทันที (0 นาที) มีผลให้มีปริมาณสเปิร์มปลายี่สกตายทั้งหมด (0.00 %) ไครโอโพรเทคแทนท์นั้นแม้ว่าจะพิษต่อสเปิร์มแต่จำเป็นต้องเติมลงในสารละลายน้ำเชื้อที่จะแช่แข็ง เนื่องจากเป็นสารที่ช่วยป้องกันความเสียหายให้กับสเปิร์มในกระบวนการแช่แข็ง โดยเมื่อพิจารณาที่ความเข้มข้นที่ใช้กันโดยทั่วไปในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาคือที่ 10% (McAndrew *et al.*, 1995) และมีระยะเวลาให้สเปิร์มปรับตัวกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ (equilibration) คือที่ 30 นาที จะเห็นว่าที่ความเข้มข้นดังกล่าวนั้นเมธานอลมีพิษต่อสเปิร์มปลายี่สกต่ำที่สุด โดยมีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว 96.16±2.11 % ขณะที่ DMSO และกลีเซอรอลซึ่ง

ให้ผลไม่แตกต่างกันนั้นมีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวเพียง 16.58±9.58 และ 9.09±9.09 % ตามลำดับ เมธานอลเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีประสิทธิภาพในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาม้าลาย (*Danio rerio*), ปลา Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) และปลา Pikeminnow (*Ptychocheilus lucius*) (Tiersch *et al*., 1994, 2004) ดังนั้นในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกจะเลือกใช้เมธานอลเป็นไครโอโพรเทคแทนท์ต่อไป

จากการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกโดยใช้น้ำยาเจือจาง 3 สูตร และใช้วิธีลดอุณหภูมิ 3 แบบ โดยผสมเมธานอลเข้มข้น 10% (v/v) เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ พบว่าการใช้น้ำยา MZL และใช้วิธีลดอุณหภูมิแบบที่ 2 (ใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม, –5.04 °C/นาที) ให้ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวสูงที่สุด (52.74±7.98 %) ในขณะที่น้ำยา 5% Glucose ที่ใช้วิธีลดอุณหภูมิแบบที่ 2 ให้ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวสูงสุด (43.50±2.12 วินาที) แต่ให้ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวต่ำกว่าน้ำยา MZL (45.46±5.40 %) น้ำยา MZL นั้นเป็นน้ำยาที่ประยุกต์มาจากสูตรน้ำยาของ Zhang and Liu (1991) และ AkÇay *et al*. (2004) ซึ่งใช้แช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนซึ่งเป็นปลาในกลุ่ม cryprinid เช่นเดียวกับปลายี่สกได้ผลเป็นอย่างดี และการใช้อัตราลดอุณหภูมิในช่วง 5 °C/นาที ซึ่งถือว่าเป็นอัตราลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ นั้นมีผลให้น้ำเชื้อที่ละลายมีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวสูงสุด อัตราลดอุณหภูมิดังกล่าวนี้มีรายงานว่าใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย (นิศา, 2539), ปลาไนและปลาหมอ (พลชาติ และพนม, 2546), ปลานิล (พลชาติ และคณะ, 2547) จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าหากใช้วิธีลดอุณหภูมิแบบใดก็ตาม ควรมีการปรับให้ได้อัตราลดอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 5 °C/นาที สำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สก

จากการทดลองผสมเทียมปลายี่สกโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บนาน 720 วัน (1 ปี 11 เดือน) เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดที่เจือจางด้วยน้ำยาสูตรและอัตราเจือจางเดียวกัน พบว่าอัตราปฏิสนธิและอัตราฟักของน้ำเชื้อแช่แข็งต่ำกว่าน้ำเชื้อสด แสดงให้เห็นว่าน้ำเชื้อปลายี่สกที่เก็บแช่แข็งไว้นานมากกว่า 1 ปีในการทดลองนี้มีประสิทธิภาพในการผสมเทียมต่ำกว่าน้ำเชื้อสด ผลที่ได้บ่งบอกว่ากระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกโดยวิธีแช่แข็งในการศึกษานี้ยังมีสิ่งที่ต้องปรับปรุงบางประการเช่น คุณภาพของน้ำเชื้อ การใช้น้ำยาเจือจางและสารไครโอโพรเทคแทนท์ และวิธีการลดอุณหภูมิ ซึ่งยังคงต้องปรับเพื่อให้ได้วิธีการที่ดีที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สก อย่างไรก็ตาม หากพิจารณาจากอัตราส่วนสเปิร์มมีชีวิตต่อไข่ 1 ฟอง (ตารางที่ 8) จะเห็นว่าน้ำเชื้อสด (16.40×10^5 เซลล์/ฟอง) มีสัดส่วนสูงกว่าน้ำเชื้อที่ละลาย (4.28×10^5 เซลล์/ฟอง) ถึง 3.83 เท่า ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาอัตราส่วนสเปิร์ม/ไข่ ที่เหมาะสมในการผสมเทียมปลายี่สกก่อนเพื่อนำมาวิเคราะห์ว่าอัตราส่วนสเปิร์ม/ไข่ระหว่างน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อที่ละลายมีความเหมาะสมหรือไม่

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

จากการทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกโดยวิธีแช่แข็งในครั้งนี้สรุปผลและข้อเสนอแนะดังต่อไปนี้

1. เก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกแบบระยะสั้นได้นานอย่างน้อย 5 วัน โดยเจือจางน้ำเชื้อปลายี่สกในอัตรา 1:1 หรือ 1:2 ด้วยน้ำยา MZL และผสมยาปฏิชีวนะ penicillin และ streptomycin เข้มข้น 50 IU/มล. และ 0.05 มก./มล. ตามลำดับ

2. เก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกแบบระยะยาวโดยวิธีแช่แข็ง โดยเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยา MZL และผสมเมธานอลเข้มข้น 10% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ โดยใช้อัตราเจือจาง 1:2 บรรจุสารละลายน้ำเชื้อใส่หลอดแช่แข็ง (straw) ปล่อยให้สเปิร์มปรับตัว (equilibration) นาน 20 นาที แล้วจึงนำไปแช่แข็งโดยใช้อัตราลดอุณหภูมิ 5 °C/นาที จนกระทั่งอุณหภูมิตัวอย่างอยู่ในช่วง –60 ถึง –80 °C จึงน้ำหลอดแช่ลงเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวในถังเก็บตัวอย่างต่อไป
3. ควรมีการศึกษากระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกต่อไปเพื่อปรับสภาวะการแช่แข็งให้น้ำเชื้อที่ละลายมีอัตรารอดและมีประสิทธิภาพในการผสมเทียมเพิ่มขึ้น และควรมีการศึกษาอัตราส่วนสเปิร์ม/ไข่ ที่เหมาะสมสำหรับการผสมเทียม

เอกสารอ้างอิง

กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง หลักการ/วิธีการ/ประโยชน์. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 127 น.

เฉิดฉัน อมาตยกุล, คีรี กออนันตกูล, ชาญชัย แสนศรีมหาชัย, สุรางค์ สุมโนจิตราภรณ์, ประดิษฐ์ ศรีภัทรประสิทธิ์, เรณู ว่องส่งสาร, ชุติพงศ์ ว่องส่งสาร, จิรชัย จันทนะ, เดชา รอดระรัง และ นพนันท์ อยู่รอง. 2538. ปลายี่สก. กองประมง น้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 51 หน้า.

พลชาติ ผิวเณร, พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข และศิริรัตน์ สอดศุข. 2550. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึกโดยวิธีแช่แข็ง. น. 113–114 **ใน** บทคัดย่อ การประชุมวิชาการประมง ประจำปี 2550. กรมประมงและศูนย์พัฒนาการประมงแห่งเอเชียตะวันออกเฉียงใต้.

พลชาติ ผิวเณร และพนม กระจ่างพจน์ สอดศุข. 2546. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำในรูปน้ำเชื้อแช่แข็ง. เอกสารเผยแพร่ ฉบับที่ 1/2546. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ, กรมประมง. 75 น.

พลชาติ ผิวเณร, คงภพ อำพลศักดิ์, ถาวร จีนหมิก และชมพูนุช มรรคทรัพย์. 2547. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานิลโดยวิธีแช่แข็ง. เอกสารวิชาการฉบับที่ 6/2547. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ, กรมประมง. 39 น.

นิศา ไชยรักษ์. 2539. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยโดยวิธีแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา). ภาควิชาสัตววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 97 น.

สุชาดา กีระนันทน์ และจลีพร โกลากุล. 2534. คู่มือการใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SAS กับการวิเคราะห์ข้อมูล เล่ม 2. ภาควิชาสถิติ, คณะพาณิชยศาสตร์และการบัญชี, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 390 น.

อนันต์ชัย เขื่อนธรรม. 2539. หลักการวางแผนการทดลอง. ภาควิชาสถิติ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 348 น.

AkÇay, E., Y. Bozkurt, S. SeÇer and N. Tekin. 2004. Cryopreservation of mirror carp semen. Turk J. Vet. Anim. Sci. 28: 837–843.

Chereguini, O., R.M. Cal, C. Dreanno, B.O. de Baulny, M. Suquet and G. Maisse. 1997. Short–term storage and cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) sperm. Aquat. Living Resour. 10: 251–255.

De W. Kruger, J.C., G.L. Smit, J.H.J. Van Vuren and J.T. Ferreira. 1984. Some chemical and physical characteristics of the semen of Cyprinus carpio L. and *Oreochromis mossambicus* (Peter). J. Fish Biol. 24: 263–272.

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 Publication. London. P. 295–335.

Morisawa, M. and K. Suzuki. 1980. Osmolarity and Potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. Science. 210: 1145–1147.

Ohta, H., K. Ikeda and T. Izawa. 1997. Increases in concentrations of Potassium and bicarbonate ions promote acquisition of motility *in vitro* by Japanese Eel spermatozoa. The J. of Exper. Zool. 277: 171–180.

Roberts, T.R., 1992. revision of the southeast Asian cyprinid fish genus *Probarbus*, with two new species threatened by proposed construction of dams on the Mekong river. Ichthyol. Explor. Freshwat. 3: 37–48.

Sokal, R.R. and F.J. Rohlf. 1968. Biometry. The Principles and Practice of Statistic in Biology Research. W.H. Freeman Co., San Francisco, U.S.A. 775 p.

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.

Tiersch, T.R., C.R. Figiel Jr. and W.R. Wayman. 2004. Cryopreservation of sperm from the endangered Colorado Pikeminnow. North American Journal of Aquaculture 66: 8–14.

Zhang, X., Y. Liu. 1991. Study of cryopreservation of fish spermatozoa, 1. Methods of freezing and thawing. Acta. Sci. Nat. Univ. Norm. Hunanensis 15: 59–63.