ผลของสาร Extenders และสาร Cryoprotectants ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

Effect of extenders and cryoprotectants on the fertilization rate of frozen *Pangasius hypophthalmus* sperm

สมร พรชื่นชูวงศ์ [1] สุพรรณ ขันน้ำเที่ยง [2] สุรชัย ภาสดา [2] สุคนธา เลขะพันธ์รัตน์ [3] นิศารัตน์ ปุณณารักษ์ [1] นฤพล สุขุมาสวิน[4]

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

[2] ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดสุรินทร์ อำเภอเมือง จังหวัดสุรินทร์ 32000

[3] สถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (AIT) อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

[4] สำนักประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 10900

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้สาร cryoprotectant 4 ชนิด สาร extender 3 ชนิด และอัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C/min โดยใช้ Freezer control เป็นตัวควบคุมการลดอุณหภูมิ ในระหว่างขบวนการแช่แข็ง นำน้ำเชื้อปลาเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำมาละลายที่อุณหภูมิห้อง เพื่อดูอัตราการปฏิสนธิ พบว่าอัตราการปฏิสนธิสูงสุด 41% เมื่อใช้ DMSO (12%) + 0.9% NaCl และสาร extender ทั้ง 3 ชนิดนั้น ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ เมื่อนำเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย มาประยุกต์ใช้ เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ และปลาบึก ในปลาเทโพ ให้ผลการศึกษาเช่นเดียวกับปลาสวาย แต่สำหรับปลาบึกนั้น พบว่าเมื่อใช้ 10% DMA+C-F HBSS ให้อัตราการปฏิสนธิสูงทั้งในปี 2548 และปี 2549 นอกจากนี้การใช้ modified extender และ 0.9%NaCl เป็นสาร extender ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาสวาย

Abstract

This study examined the cryopreservation of *Pangasius hypophthalmus* sperm. Four cryoprotectants, three extenders at 10 °C min^{-1} freezing rate were investigated. Sperm were frozen using controlled rate freezer and stored in a liquid nitrogen container and then air thawed at room temperature. Fertilization rate was assessed. The highest fertilization rate 41% was achieved with the combination of 10%DMSO and 0.9%NaCl. In addition, the three extenders used did not affect the fertilization rates. Cryopreservation of *P. hypophthalmus* sperm was applied to cryopreserve *P. larnaudii* and *P. gigas* sperm. Similar to *P. hypophthalmus,* consistent high fertilization rates was achieved with 10%DMSO and 0.9%NaCl. However, in *P. gigas* found that higher fertilization rates resulting from 10%DMA and C-F HBSS. Additionally, this study found that modified extender and 0.9%NaCl as extender did not affect the fertilization rates of frozen *P. hypophthalmus* sperm.

คำนำ

ชีววิทยาการแช่แข็ง มีความสำคัญและประโยชน์สำหรับการเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์ เพื่อประโยชน์สำหรับการใช้ในอนาคต ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง พบว่ามีการศึกษามากกว่า 30 ชนิด ทั้งในปลาน้ำจืดและน้ำเค็ม (Rana, 1995) แต่ส่วนใหญ่แล้วเป็นการศึกษาในปลาน้ำเค็มที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ สำหรับปลาน้ำจืดนั้นยังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร องค์ประกอบสำคัญสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งนั้นประกอบด้วย สาร extender สาร cryoprotectant, freezing and thawing rates และยังขึ้นกับภาชะบรรจุน้ำเชื้อ และขนาดของภาชนะ เป็นต้น สำหรับสาร extender เป็นองค์ประกอบที่สำคัญตัวหนึ่ง ซึ่งใช้สำหรับเจือจางน้ำเชื้อปลา อีกทั้งป้องกันไม่ให้อสุจิเคลื่อนที่ หรือลดการใช้พลังงานของตัวอสุจิ และมีชีวิตอยู่รอดตลอดเวลาที่เก็บรักษา ดังนั้นการเลือกชนิดสาร extender นั้นควรจะมีค่าออสโมลาลิตี้ (osmolality) ใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเชื้อปลา (seminal fluid) ปลาแต่ละกลุ่มมีค่าออสโมลาลิตี้แตกต่างกันเช่น 280 - 300 mOsm Kg^{-1} สำหรับกลุ่มปลาน้ำจืด และ 200 - 300 mOsm Kg^{-1} สำหรับปลาน้ำเค็ม (Wayman and Tiersch, 2000) สำหรับปลาในกลุ่ม *Pangasius*, Mongkonpunya et al. (1992) ใช้ “S16” เป็นสาร extender ร่วมกับ 8%DMSO เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึก ซึ่งพบอัตราการปฏิสนธิ 53-57% (76-80% ของน้ำเชื้อสด) และ 3 ปีต่อมา Mongkonpunya และคณะ พบว่าอัตราการปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อปลาบึกไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (P>0.05) เมื่อใช้ BCB และ C-F HBSS เป็นสาร extender นอกจากนี้ Hambananda and Mongkonpunya (1996a) พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อปลาสวายไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (P> 0.05) เมื่อใช้ C-F HBSS และ 0.85% NaCl เป็นสาร extender และ Withler (1982) ใช้ 10% DMSO ร่วมกับ 189M และ 251 เป็นสาร extender เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย ซึ่งพบอัตราการปฏิสนธิแค่ 1% เท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งในสกุล *Pangasius* นอกจากนี้ผลวิจัยที่เป็นบวกเท่านั้นที่มีการตีพิมพ์ ด้วยเหตุนี้ การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในสกุล *Pangasius* โดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ปลาสวายเป็นตัวอย่างในการศึกษา ทั้งนี้เนื่องจากเป็นปลาที่สามารถหาได้ง่ายเมื่อเทียบกับ *Pangasius* ชนิดอื่นๆ และวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาที่ได้นี้ จะนำไปประยุกต์ใช้กับปลาชนิดอื่นๆ ในกลุ่ม *Pangasius* ต่อไป

วิธีการศึกษา

การศึกษาผลของสาร extender ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย (*Pangasius hypophthalmus*) โดยวิธีการแช่แข็ง มีระเบียบการดำเนินการวิจัยทั้งในภาคสนามและในห้องปฏิบัติการดังนี้

ภาคสนาม

การเตรียมพ่อแม่พันธุ์

นำพ่อแม่พันธุ์ปลาสวายน้ำหนักเฉลี่ย 3 กิโลกรัม/ตัว เลี้ยงในบ่อดิน เมื่อถึงฤดูสืบพันธุ์ คัดพ่อแม่พันธุ์ปลาสวายที่สมบูรณ์พันธุ์ จากบ่อดินมาพักไว้ในกระชังขนาด 2×8 ตารางเมตร โดยแยกเป็นกระชังเพศผู้และ

เพศเมีย เพื่อสะดวกในการฉีดฮอร์โมน ก่อนฉีดฮอร์โมน ต้องงดอาหารอย่างน้อย 6-12 ชั่วโมง โดยใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ (LHRHa, Suprefact) ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์ Domperidone (Motilium) ซึ่งมีวิธีการฉีดดังนี้

1) ปลาสวายเพศผู้ ใช้ Suprefact 20 ug/Kg ร่วมกับ Motilium 5 mg/Kg หลังจากนั้น 6-8 ชั่วโมงทำการรีดน้ำเชื้อโดยใช้หลอดฉีดยา (ขนาด 5 ml) ดูดน้ำเชื้อ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากน้ำ เลือด และปัสสาวะ

2) ปลาสวายเพศเมีย ในปลาเพศเมียนั้นจะทำการฉีดฮอร์โมน 2 เข็ม ซึ่งเข็มแรกฉีดเพื่อกระตุ้นการพัฒนาของไข่ โดยใช้ Suprefact 10 ug/Kg ร่วมกับ Motilium 5 mg/Kg หลังจากนั้น 10 ชั่วโมง จึงฉีดเข็มที่ 2 เพื่อกระตุ้นการตกไข่ โดยใช้ Suprefact 30 ug/Kg ร่วมกับ Motilium 5 mg/Kg จากนั้น 6-8 ช.ม. ทำการรีดไข่ เพื่อนำไปทดสอบการปฏิสนธิ

ในห้องปฏิบัติการ

นำน้ำเชื้อที่รีดได้จากภาคสนาม มาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ โดยในการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อ อสุจิต้องมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไม่น้อยกว่า 75% การศึกษาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ ดัดแปลงจาก Guest (1973) จากนั้นนำ น้ำเชื้อที่ตรวจเช็คเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ มาศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็ง ขั้นตอนและระเบียบวิธีการวิจัยตามวิธีของ Kwantong (2003)

การทดลองที่ 1. ศึกษาระดับความเข้มข้นของสาร Cryoprotectants และสาร Extenders ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

มีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

นำน้ำเชื้อสดที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ ไม่น้อยกว่า 75% มาเจือจางด้วยสาร extender 3 ชนิด Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS), Calcium Free Hanks' Balanced Salt Solution (C-F HBSS) และ 0.9% sodium chloride (NaCl) ส่วนประกอบสาร extender แต่ละชนิดดังแสดงในตารางที่ 1 อัตราส่วนเจือจางน้ำเชื้อสดต่อสาร extender เท่ากับ 1:3 หลังจากนั้นเติมสาร cryoprotectant แต่ละชนิด ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ 8, 10 และ 12% สำหรับ dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethyl acetamide (DMA) และ Ethylene glycol (EG) และความเข้มข้น 5, 8 และ 10% สำหรับ methanol (MeOH) โดยเติมในอัตราส่วน 1:1 (diluted milt: cryodiluent) ใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนผสม ปริมาตร 240 ul ใส่หลอด French straw ขนาด 250 ul แล้วปิดหลอดโดยใช้ Heated haemostat จากนั้น นำ Straws load ลงใน Cryochamber การควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่างการแช่แข็ง ใช้ Freezer control (CL 3300) และ Cryogenesis version 4 for windows (Cryologic, Pty Ltd., Australia, 1999) โดยลดอุณหภูมิที่ 10 °C/min เมื่อถึงอุณหภูมิเป้าหมาย (-80 °C) นำ Straws เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว เพื่อนำไปทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิต่อไป

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ใช้แผนการทดลองแบบ 3×3×1 Factorial design in RCD (Randomized completely design) เปรียบเทียบสาร extender 3 ชนิด (HBSS, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant (8, 10, 12% สำหรับสาร DMA, DMSO, EG และ 5, 8, 10% สำหรับสาร MeOH) และอัตรา

การลดอุณหภูมิที่ 10 °C/min วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยวิธี Turkey' test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 10.1 for Windows (Kinnear and Gray, 2000)

การศึกษาเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1. รีดไข่ปลาสวายหลังจากการฉีดฮอร์โมนเข็มที่สองมาแล้ว 6-8 ช.ม. ซึ่งไข่ปลาที่ดีมีลักษณะสีเหลืองนวลและโปร่งแสง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-1.2 mm ใช้ไมโครปิเปตดูดไข่ 100 ul (ประมาณ 200 ฟอง) ใส่จานแก้ว (Glass petri dish)

2. ดูดน้ำเชื้อสด 30 ul (ตัวควบคุม) และน้ำเชื้อแช่แข็ง 240 ul ลงไปผสมกับไข่ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ต่อทรีทเมนต์

3. ใช้ขนไก่คนไข่และน้ำเชื้อให้เข้ากัน หลังจากนั้นค่อยๆ เติมน้ำสำหรับการเพาะฟักลงไป ทิ้งไว้ 3 นาที แล้วล้างน้ำเชื้อส่วนเกินและเมือกออก นำจานแก้วใส่ลงในกระชังเพาะฟักขนาด 15×20 cm ที่มีการให้อากาศในน้ำตลอดเวลา หลังจากนั้น 7 ชั่วโมง ทำการตรวจนับเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ ที่ระยะ gastrula stage

การทดลองที่ 2. ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพและปลาบึกโดยประยุกต์ใช้เทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย

การทดลองนี้ประยุกต์ใช้วิธีการศึกษา การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย โดยการคัดเลือกจากทรีทเมนต์ที่ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุด ในแต่ละชนิดของสาร cryoprotectant ที่ทำการศึกษา คือ 12%DMSO+ 0.9%NaCl, 10%DMA+ C-F HBSS และ 5%MeOH+ 0.9%NaCl ดังรายละเอียดและวิธีการศึกษาดังนี้

การเตรียมพ่อแม่พันธุ์ปลาเทโพและปลาบึก

คัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลาเทโพที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ น้ำหนักเฉลี่ย 2.2 กิโลกรัม/ตัว จากบ่อดินมาพักในโรงเพาะฟักของศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดสุรินทร์ โดยแยกเพศผู้และเพศเมีย ฮอร์โมนสำหรับฉีดปลาเทโพ ใช้ชนิดเดียวกับปลาสวาย ซึ่งมีอัตราการฉีดดังนี้ ปลาเทโพเพศผู้ ใช้ Suprefact 10 ug/Kg ร่วมกับ Motilium 5 mg/Kg หลังจากนั้น 6-8 ช.ม. ทำการรีดน้ำเชื้อ สำหรับปลาเทโพเพศเมีย ทำการฉีดฮอร์โมน 2 เข็ม เข็มแรกใช้ Suprefact 5 ug/Kg ร่วมกับ Motilium 5 mg/Kg หลังจาก 10 ชั่วโมง จึงฉีดเข็มที่ 2 โดยใช้ Suprefact 20 ug/Kg ร่วมกับ Motilium 5 mg/Kg หลังจาก 6-8 ช.ม. ทำการรีดไข่ สำหรับน้ำเชื้อปลาบึกและไข่ปลาบึก ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ได้รับความอนุเคราะห์ จากสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด อำเภอบางไทร จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพและปลาบึก

ในการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพและปลาบึก ใช้ระเบียบวิธีการศึกษาและหลักการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งเช่นเดียวกับปลาสวาย โดยคัดเลือกทรีทเมนต์ที่ให้ผลการปฏิสนธิสูงสุด ในแต่ละชนิดของสาร cryoprotectant ที่ทำการศึกษาในปลาสวาย ดังนี้ 12%DMSO+0.9%NaCl, 10%DMA+C-F HBSS และ 5%MeOH+0.9%NaCl จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็ง และน้ำเชื้อสด ผสมกับไข่ เพื่อหาอัตราการปฏิสนธิ

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ใช้แผนการทดลองแบบ RCD เปรียบเทียบอัตราการปฏิสนธิทั้ง 4 ทรีทเมนต์ โดยใช้ ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยวิธี LSD test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 10.1 for Windows

การทดลองที่ 3. ศึกษาผลของสาร Extenders (0.9% NaCl และ modified extender) ที่มีต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

นำน้ำเชื้อสดที่มีอัตราการเคลื่อนที่ไม่น้อยกว่า 75% มาเจือจางด้วยสาร extenders ทั้ง 2 ชนิด (0.9% NaCl และ modified extender) สาร modified extender ที่นำมาศึกษาในครั้งนี้จะมีค่าออสโมลาลิตี อยู่ระหว่าง 272- 274 mOsm•Kg^{-1} ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเชื้อปลาสวาย (seminal fluid) ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 272 – 278 mOsm•Kg^{-1} สำหรับส่วนประกอบของสาร modified extender นั้นแสดงในตารางที่ 1 อัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อสดต่อสาร extender แต่ละชนิดเท่ากับ 1:3 จากนั้นเติมสาร cryoprotectants แต่ละชนิดดังนี้ (10%DMA, 10%DMSO และ 5%MeOH) สำหรับหลักการ การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย และขั้นตอนการวิจัยใช้หลักการเดียวกับการทดลองที่ 1 ส่วนการวิเคราะห์ผลทางสถิติ ใช้ ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีทเมนต์โดยวิธี Duncan test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05

ตารางที่ 1. ส่วนประกอบทางเคมี (g/L) และค่าออสโมลาลิติของสาร extender ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลาสวาย

ส่วนประกอบสารเคมี (g)	ชนิดสาร extender			
	HBSS	C-F HBSS	0.9% NaCl	Modified Extender
$CaCl_2.2H_2O$	0.16	-	-	0.092
NaCl	8	8.89	9	6.836
KCl	0.4	0.44	-	1.54
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	0.22	-	0.0276
$Na_2HPO_4.7H_2O$	0.12	0.13	-	-
KH_2PO_4	0.06	0.07	-	-
$NaHCO_3$	0.35	0.39	-	0.04
Glucose	1.00	1.11	-	-
น้ำกลั่น	1000	1000	1000	1000
Mosmol.Kg^{-1}	286	320	292	274
Reference	Mongkonpunya *et al.*, 1995		Ponchunchoovong, 2006	

ผลการศึกษา

1. ผลของระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants และสาร extenders ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการทดลองการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ DMSO เป็นสาร cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับสาร extender 3 ชนิด โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 °C/min พบว่าเมื่อใช้ 12%DMSO+0.9%NaCl มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดเท่ากับ 40.77±1.65% (81% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด ($p>0.05$) (ตารางที่ 2)

เมื่อใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant ร่วมกับสาร extender ทั้ง 3 ชนิดนั้น พบว่าเมื่อใช้ 10%DMA+C-F HBSS มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดเท่ากับ 29.66±0.55% (51% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งในแต่ละความเข้มข้นของสาร cryoprotectant และสาร extender ทั้ง 3 ชนิดนั้นมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แต่มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิต่ำและแตกต่างกับน้ำเชื้อสด ($p<0.05$) (ตารางที่ 2)

จากการทดลองโดยใช้ MeOH เป็นสาร cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ร่วมกับสาร extender ทั้ง 3 ชนิดนั้น พบว่าเมื่อใช้ 5%MeOH+0.9%NaCl มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดเท่ากับ 17.49±0.65% (38% ของน้ำเชื้อสด) ในแต่ละความเข้มข้นของสาร cryoprotectant และสาร extender ทั้ง 3 ชนิดนั้น มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่แตกต่าง แต่มีเปอร์เซ็นต์ต่ำและแตกต่าง กับน้ำเชื้อสด ($p<0.05$) สำหรับการใช้ EG เป็นสาร cryoprotectant ร่วมกับสาร extender ทั้ง 3 ชนิดนั้น พบว่าเมื่อใช้ 10%EG+C-F HBSS มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดเท่ากับ 8.15±1.27% (12% ของน้ำเชื้อสด) แต่มีเปอร์เซ็นต์ต่ำและแตกต่าง กับน้ำเชื้อสด ($p<0.05$)

2. ผลการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพและปลาบึกโดยประยุกต์ใช้เทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย

จากการประยุกต์ใช้เทคนิคและวิธีการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย มาศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพและปลาบึกนั้น พบว่าในปลาเทโพเมื่อใช้ 10% DMSO+0.9% NaCl มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดเท่ากับ 48.03±1.30% (70% ของน้ำเชื้อสด) และอัตราการปฏิสนธิต่ำสุด 7.92±3.33% (12% ของน้ำเชื้อสด) เมื่อใช้ 5% MeOH+ 0.9% NaCl อย่างไรก็ตามอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาแช่แข็งต่ำและแตกต่าง กับน้ำเชื้อสด ($p<0.05$) (ตารางที่ 3)

สำหรับในปลาบึกนั้น พบว่าเมื่อใช้ 10% DMA+C-F HBSS ให้อัตราการปฏิสนธิสูงทั้งในปี 2548 และปี 2549 โดยมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เท่ากับ 57.60±1.91% และ 63.60±1.57% (74 และ 82% ของน้ำเชื้อสด) ตามลำดับ อย่างไรก็ตามอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาแช่แข็งต่ำและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อสด ($p<0.05$) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ในสาร extender 3 ชนิด (HBSS, C-F HBSS และ 0.9%NaCl) ร่วมกับ สาร cryoprotectant 4 ชนิด (DMSO, DMA, MeOH และ EG) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C/min ตัวเลขในวงเล็บคือเปอร์เซ็นต์ของตัวควบคุม (น้ำเชื้อสด)

สาร Extender	ความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant (%)	Fertilization (%)			
		DMSO	DMA	EG	MeOH
HBSS	5				4.68±1.29 [b] (10.10)
	8	26.02±3.83 [b] (51.44)	19.71±1.81 [b] (33.85)	6.11±2.92 [b] (9.17)	7.04±8.77 [b] (15.20)
	10	28.49±0.74 [b] (56.33)	14.34±1.91 [b] (24.63)	3.47 ± 0.76 [b] (5.21)	11.13±3.41 [b] (24.03)
	12	18.34±0.71 [b] (36.26)	17.24±1.20 [b] (29.61)	3.85 ± 2.62 [b] (5.78)	
C-F HBSS	5				6.33±4.78 [b] (13.67)
	8	33.13±6.67 [b] (65.50)	9.66±0.43 [b] (16.59)	4.06±3.78 [b] (6.10)	6.16±1.18 [b] (13.30)
	10	27.10±1.02 [b] (53.58)	29.66±0.55 [b] (50.94)	8.15±1.27 [b] (12.24)	8.72±8.01 [b] (18.83)
	12	39.14±3.76 [a] (77.38)	12.99±0.65 [b] (22.31)	4.66±1.80 [b] (7.00)	
0.9% NaCl	5				17.49±0.65 [b] (37.76)
	8	29.14±1.04 [b] (57.61)	12.62±0.49 [b] (21.68)	5.21±2.58 [b] (7.82)	7.32±1.86 [b] (15.80)
	10	37.94±2.05 [a] (75.01)	10.63±2.48 [b] (18.26)	3.47±1.50 [b] (5.21)	4.75±3.08 [b] (10.25)
	12	40.77±1.65 [a] (80.60)	21.87±13.86 [b] (37.56)	7.87±1.96 [b] (11.82)	
Control		50.58±3.75 [a]	58.22±2.15 [a]	66.61±2.26 [a]	46.32±1.18 [a]

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 3. ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาเทโพ (*P. larnaudii)* โดยใช้สาร cryoprotectant 3 ชนิด (DMSO, DMA และ MeOH) ร่วมกับสาร extender 2 ชนิด (0.9%NaCl และ C-F HBSS) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C/min ตัวเลขในวงเล็บคือเปอร์เซ็นต์ของตัวควบคุม (น้ำเชื้อสด)

Treatment	Cryoprotectant + Extender	Fertilization (%)
1	10% DMSO + 0.9% NaCl	48.03±1.30[b] (69.96)
2	10% DMA + C-F HBSS	28.70±1.48[c] (41.80)
3	5% MeOH + 0.9% NaCl	7.92±3.33[d] (11.54)
4	Control	68.65±0.70[a]

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 4. ค่าเฉลี่ย (Mean ± SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาบึก (*P. gigas)* โดยใช้สาร cryoprotectant 3 ชนิด (DMSO, DMA และ MeOH) ร่วมกับสาร extender 2 ชนิด (0.9%NaCl และ C-F HBSS) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C/min ตัวเลขในวงเล็บคือเปอร์เซ็นต์ของตัวควบคุม (น้ำเชื้อสด)

Year	Cryoprotectant + Extender	Fertilization (%)
2548	10%DMSO + 0.9%NaCl	20.00 ± 3.56[d] (25.64)
	10%DMA + C-F HBSS	57.60 ± 1.91[b] (73.85)
	5%MeOH + 0.9%NaCl	21.20 ± 3.76[d] (27.18)
2549	10%DMSO + 0.9%NaCl	19.60 ± 0.81[d] (25.13)
	10%DMA + C-F HBSS	63.60 ± 1.57[b] (81.54)
	5%MeOH + 0.9%NaCl	35.40 ± 1.83[c] (45.38)
	Control	78.00 ± 2.39[a]

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

3. ผลของสาร extender (0.9% NaCl และ modified extender) ที่มีต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการทดลองการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ 0.9%NaCl และ modified extender เป็นสาร extender ร่วมกับสาร cryoprotectant ชนิดต่างๆ นั้นพบว่าเมื่อใช้ 0.9%NaCl ร่วมกับ DMSO (10%) มีอัตราการปฏิสนธิสูงสุดเท่ากับ 54.33±6.01% (91%ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่แตกต่าง จากน้ำเชื้อสด และพบว่าเมื่อเปรียบเทียบการใช้ extender ทั้ง 2 ชนิดในแต่ละทรีทเมนต์ที่ศึกษานี้ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p>0.05) ยกเว้นเมื่อใช้ modified extender ร่วมกับ 5%MeOH (ทรีทเมนต์ที่ 6) มีอัตราการปฏิสนธิต่ำและมีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5. ค่าเฉลี่ย (Mean ± SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus)* ในสาร Extender 2 ชนิด (0.9%NaCl และ modified extender) ร่วมกับสาร cryoprotectant 3 ชนิด โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C/min ตัวเลขในวงเล็บคือเปอร์เซ็นต์ของตัวควบคุม (น้ำเชื้อสด)

Treatment	Extender	Cryoprotectant	Fertilization (%)
1	0.9%NaCl	10%DMSO	54.33 ± 6.01[ab] (90.55)
2	0.9%NaCl	10%DMA	38.00 ± 4.93[bc] (63.33)
3	0.9%NaCl	5%MeOH	39.00 ± 3.15[bc] (65.00)
4	Modified Extender	10%DMSO	41.33 ± 6.17[bc] (68.88)
5	Modified Extender	10%DMA	47.33 ± 2.33[abc] (78.88)
6	Modified Extender	5%MeOH	30.67 ± 8.37[c] (51.12)
7	Control		60.00 ± 3.21[a]

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

วิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลของระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants และสาร extenders ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการทดลองเมื่อใช้สาร DMSO (12%) ร่วมกับ 0.9% NaCl พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดเป็น 41% (81% ของน้ำเชื้อสด) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ สาร cryoprotectant ชนิดอื่นๆ (DMA, MeOH และ EG) อย่างไรก็ตามให้ผลแตกต่างกับรายงานของ Withler (1982) ซึ่งใช้ 12%DMSO เช่นกัน แต่มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิเพียง 1% เท่านั้น ผลที่ต่างกัน อาจเนื่องมาจากชนิดสาร extender ที่ Withler ใช้นั้นได้พัฒนาขึ้นสำหรับ Pacific salmon อาจไม่เหมาะสมกับปลาสวาย เมื่อใช้สาร DMA (10%)+ C-F HBSS จะให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงกว่าเมื่อใช้สาร MeOH และ EG ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Horvath and Urbanyi (2000) ที่ทำการทดลองศึกษาในปลา *C. gariepinus* พบว่าเมื่อใช้สาร DMA หรือ DMSO เป็นสาร cryoprotectant จะให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน (p>0.05) อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้สาร MeOH เป็นสาร cryoprotectant นั้นพบว่า MeOH (5%)+ 0.9% NaCl จะให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงที่สุด (38% ของน้ำเชื้อสด) อย่างไรก็ตาม เมื่อใช้ความเข้มข้นสูงขึ้น 8 และ 10% ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิลดลง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bart *et al*. (1998) ที่ไม่ประสบความสำเร็จกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งปลา Blue catfish (*Ictalurus furcatus*) เมื่อใช้ MeOH เป็นสาร cryoprotectant และจากการรายงานของ Monkonpunya *et al*. (1995) พบว่า 14%MeOH มีอันตรายต่อ *P. gigas* มีผลทำให้อสุจิไม่มีการเคลื่อนที่ และในการศึกษาครั้งนี้ไม่ประสบผลสำเร็จในการใช้ สาร EG เป็นสาร cryoprotectant ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากระดับความเข้มข้นที่ใช้สูงเกินไป (8, 10 และ 12%) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Horvath and Urbanyi (2000) ที่ทดลองใช้สาร EG (5%) ในปลา *C. gariepinus* แล้วพบว่ามีอัตราการเคลื่อนที่ต่ำ

2. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพและปลาบึกโดยประยุกต์ใช้เทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย

จากการประยุกต์ใช้เทคนิคและวิธีการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย มาศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพและปลาบึกนั้น พบว่าในปลาเทโพ ให้ผลการศึกษาในทิศทางเดียวกับปลาสวาย คือเมื่อใช้ 10%DMSO+0.9%NaCl มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดเท่ากับ 48.03±1.30% (70% ของน้ำเชื้อสด) แต่สำหรับปลาบึกนั้น พบว่าเมื่อใช้ 10% DMA+C-F HBSS ให้อัตราการปฏิสนธิสูงทั้งในปี 2548 และปี 2549 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Baulny *et al.* (1999) และ Warnecke and Pluta (2003) ซึ่งพบว่า เมื่อใช้ DMA เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาให้ อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการปฏิสนธิ สูงกว่าการใช้ DMSO, glycerol และ EG แต่สำหรับในปลาบึกนั้น การใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant ยังไม่มีรายงานมาก่อน

3. ผลของสาร extender (0.9% NaCl และ modified extender) ที่มีต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการทดลองเพื่อหาชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็ง พบว่าการใช้ 0.9%NaCl ให้อัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างจากการใช้ modified extender นั้นสอดคล้องกับการศึกษาของ Yao et al.(1999) ที่ใช้หลักการเตรียมสาร extender ที่มีค่าออสโมลาลิตีใกล้เคียงกันกับของเหลวในน้ำเชื้อปลา เก็บรักษาน้ำเชื้อปลา ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) ซึ่งพบว่ามีอัตราการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) อย่างไรก็ตาม Muchlisin et al.(2004) ทำการศึกษาผลของสาร extender 3 ชนิด (physiological saline, Ringer และ 0.7% NaCl) เก็บรักษาน้ำเชื้อปลา bagrid catfish, *Mystus nemurus* แบบระยะสั้น โดยเก็บที่ -4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า Ringer เป็นสาร extender ที่ให้อัตราการเคลื่อนที่สูงสุด (71%) ซึ่งผลที่ได้ไม่แตกต่างจากการใช้ Physiological saline แต่มีความแตกต่างจากการใช้ 0.7%NaCl ($P<0.05$)

สรุปผลการทดลอง

1. พบว่าเมื่อใช้ DMSO (12%)+0.9% NaCl เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายให้อัตราการปฏิสนธิสูงสุดเป็น 41% (81% ของน้ำเชื้อสด) และพบว่าชนิดของสาร extender ทั้ง 3 ชนิดนั้นไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ

2. จากการประยุกต์ใช้เทคนิคและวิธีการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย มาศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพและปลาบึกนั้น พบว่าในปลาเทโพ ให้ผลการศึกษาในทิศทางเดียวกับปลาสวาย แต่สำหรับปลาบึกนั้น พบว่าเมื่อใช้ 10% DMA+C-F HBSS ให้อัตราการปฏิสนธิสูงทั้งในปี 2548 และปี 2549

3. ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้ 0.9%NaCl และ modified extender เป็นสาร extender ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ดังนั้นในขบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย ควรใช้ NaCl เพราะสามารถเตรียมสารได้ง่ายอีกทั้งราคาถูกกว่า เมื่อกับการใช้ modified extender

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุน จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ผู้วิจัยขอขอบคุณ ว่าที่ร้อยตรี สมศักดิ์ เขตสมุทร ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดสุรินทร์ และนายสุจินต์ หนูขวัญ ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด บางไทร ที่ให้ความอนุเคราะห์ น้ำเชื้อ-ไข่ ปลาเทโพ และปลาบึก รวมทั้งขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่และคนงาน ประจำศูนย์วิจัยทั้งสองศูนย์ทุกท่าน ที่มีส่วนช่วยให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Bart, A.N., Wolfe, D.F., and Dunham, R.A. 1998. Effects of cryoprotectants, sperm density and straw size on cryopreservation of blue catfish, *Ictalurus* furcatus. Transactions of the African Fisheries Society. 127(5):819-824.

Baulny, B.O., Labbe, C. and Maisse, G. 1999. Membrane integrity, mitochondria activity, ATP content and motility of the European catfish (*Silurus glanis)* testicular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. Cryobiology. 39(2): 177-184.

Cryologic Pty Ltd. 1999. Freezer control model – 863 operating manual. Victoria, Australia. 1 pp.

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.

Hambananda, A. and Mongkonpunya, K. 1996a. Cryopreservation of milt of striped catfish, *Pangasius sutchi*. Proceeding of the 34th Kasetsart university annual conference, Kasetsart university press: Bangkok: Thailand. 320-328.

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.

Kinnear, P. R. and Gray C. D. 2000. SPSS for windows made simple. Release 10. Department of Psychology, University of Aberdeen. United Kingdom: Psychology Press Ltd.

Kwantong, S. 2003. Cryoperservation of striped catfish, Pangasius hypophthalmus sperm. Dissertation. Asian Institute of Technology. Prathumthani. 65 pp.

Mongkonpunya, K., Chairak, N., Pupipat, T., and Tiersch, T.R. 1995. Cryopreservation of sperm of the Mekong giant catfish. Asian fisheries science. Metro Manila. 8(3-4):211-221

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.

Muchlisin, Z.A., Hashim, R., Chong, A.S.C. 2004. Preliminary study on the cryopreservation of tropical bagrid catfish (*Mystus nemurus*) spermatozoa; the effect of extender and cryoprotectant on the motility after short-term storage. Theriogenology. (62): 25-34.

Rana, K.J. 1995. Cryopreservation of fish spermatozoa. In: Cryopreservation andFreezing- Drying protocols. Edited by Day, J.G., and McLellan, M.R. New Jersey: Humana press. 254 pp.

Warnecke, D., and Pluta, H.J. 2003. Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm using dimethyl acetamide as the main cryoprotectant. Aquaculture. 215 (1-4): 167-185.

Wayman, W.R., and Tiersch, T.R. 2000. Research methods for cryopreservation of sperm In: cryopreservation in aquatic species. Tiersch, T.R., and Mazik, P.M. (Eds.). World aquaculture society. Baton Rouge. Lousiana. 264-275.

Withler, F.C. 1982. Cryopreservation of spermatozoa of some freshwater fishes cultured in South and Southeast Asia. Aquaculture. (26):395-398.

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