บทที่ 4

ชนิดของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ และสารรักษาสภาพที่เหมาะสม

การใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อโดยปกติแล้วมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เพิ่มความสามารถของการปฏิสนธิให้แก่น้ำเชื้อปลา และยืดระยะเวลาที่อสุจิเคลื่อนไหวให้มีระยะเวลานานออกไป ซึ่งโดยปกติแล้วอสุจิจะมีการเคลื่นไหวได้ดีเพียง 2-3 นาที เท่านั้น (Scott และ Baynes, 1980) ในด้านชนิดของน้ำยาเจืองจางพบว่าน้ำยาเจือจางในแต่ละสูตรจะให้ผลดีกับน้ำเชื้อปลาเพียงไม่กี่ชนิดทั้งนี้สันนิฐานได้ว่ามาจากองค์ประกอบต่างๆ ที่มีอยู่ในน้ำยาเจือจางนั้น กฤษณ์ มงคลปัญญา, (2536) ได้รายงานว่าในบางครั้งการพัฒนาสูตรน้ำยาอาจไม่ได้อาศัยทฤษฎีหรือการทดลอง แต่ได้จากการลองผิดลองถูก อย่าไรก็ตามอาจจะสามารถที่พัฒนาสูตรน้ำยาโดยอาศัยหลักเกณฑ์ดังต่อไปนี้

ก) สูตรน้ำยาจะต้องประกอบด้วยอิออนต่างๆ ที่ใกล้เคียงกับในน้ำเลือดปลา และทำให้มีแรงดันออสโมติกที่ใกล้เคียงกับน้ำเลือดปลาที่สุด

ข) น้ำยาดังกล่าวส่วนมากจะต้องประกอบด้วยสารเคมีที่ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง เป็นแหล่งพลังงาน และสามารถทำหน้าที่ต้านหรือทำลายสารพิษจากของเสียที่ขับออกมาจากเซลล์

ค) โดยทั่วไปแล้วจะเป็นสูตรน้ำยาที่ปรับปรุงมาจากน้ำยาที่ใช้หล่อเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดปลา (Cortland salt solution) หรือ กบ (Ringer's solution)

ง) ในกรณีที่มีการแช่เยือกแข็งน้ำเชื้อปลาจะต้องมีการผสมสารรักษาสภาพชนิดใดชนิดหนึ่ง หรืออาจใช้หลายชนิดรวมกัน เพื่อป้องกันการเสียสภาพของอสุจิภายหลังการละลาย

ในการทดลองนี้จะศึกษาถึงชนิดของน้ำยาเจือจาง และสารรักษาสภาพที่ให้ผลในการรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งภายหลังจากการเก็บเป็นระยะเวลานาน โดยคุณภาพของน้ำเชื้อจะใช้อัตราการเคลื่อนไหว ระดับการเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตเป็นเกณฑ์ในการพิจารณา

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การเตรียมน้ำยาในการเจือจางน้ำเชื้อ

ในการทดลองนี้ใช้น้ำยาเจือจาง 5 ชนิด ซึ่งเป็นสารละลายที่มีส่วนผสมของสารอนินทรีย์ บัฟเฟอร์ และยาปฏิชีวนะ โดยรายระเอียดส่วนผสมดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ตารางแสดงปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ (g / L.)

	Modified Cortland[1]	Alsever's[1]	Marine Fish Ringer[2]	Buffer Solution[3]	Normalsaline with Glucose[4]
NaCl	1.88 g	4.0 g	13.5 g	0.297 g	
KCl	7.20 g		0.6 g	0.322 g	
$CaCl_2$	0.23 g		0.265 g	0.0077 g	
$MgSo_4$	0.23 g			0.003 g	
Sodium citrate		8.0 g			
$NaHCO_3$	1.00 g		0.2 g		
NaH_2PO_4	0.41 g				
Glucose	1.0 g	20.5 g			0.006 g
Taps*				0.365 g	
Caps*				0.332 g	
Penicilin G	125 IU/ml.				
Streptomycin	125 ng./ml.				
Sovent	*Distilled water* 1000 ml.				*Normalsaline* 1000 ml.
pH	7.0			7.5-8.2	7.0

* Taps (Tris [Hydroxy-methyl] methylaminopropane sulphonic acid)

* Caps (3 [Cyclohexylamino]-1-propanesulphonic acid)

[1] Scott and Baynes (1980)

[2] Po Leung (1987)

[3] Hsien Chao, Chung Chao, Chun Liu and Chiu Liap (1987)

[4] Gwo, Kurokura and Hirano (1993)

2. วิธีการเตรียมตัวอย่างทดลอง

นำตัวอย่างน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่เก็บได้ทั้งหมดผสมรวมกันในหลอดทดลองที่สะอาด และแห้ง แบ่งออกมาละลายกับน้ำยาเจือจางทั้ง 5 สูตร ในอัตราส่วน 1:3 จากนั้นแบ่งน้ำยาในแต่ละสูตรผสมกับสารรักษาสภาพ 2 ชนิด ด้วย DMSO (Dimethyl-sulfoxide) 10% โดยปริมาตร (V/V) และ Glycerol 20% โดยปริมาตร (V/V) ผสมให้เข้ากัน ใช้ระยะเวลาในการบ่ม (Incubation time)ที่อุณหภูมิ 0-4 °C เป็นเวลา 30 นาที ทำการตรวจสอบคุณภาพของน้ำเชื้อก่อนทำการแช่เยือกแข็ง (Scott and Baynes, 1980)

3. วิธีการลดอุณหภูมิ

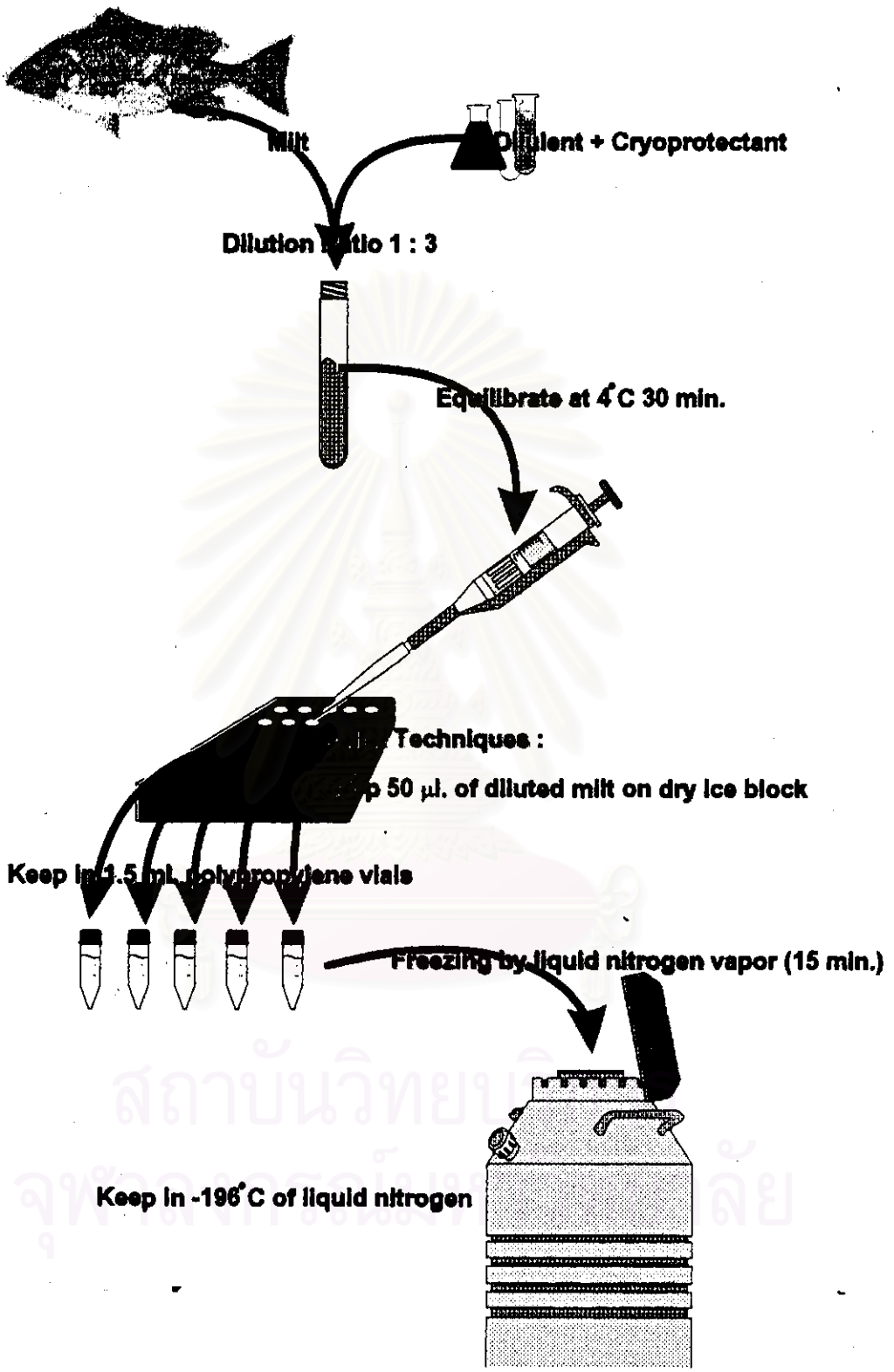
นำตัวอย่างที่ผสมน้ำยาเจือจาง สารรักษาสภาพแล้ว และผ่านการบ่มแล้วมาทำการลดอุณหภูมิ ด้วยกรรมวิธีการทำให้เป็นเกล็ดโดยหยดตัวอย่างน้ำเชื้อลงบนก้อนน้ำแข็งแห้ง (Dry ice) ซึ่งปริมาตรที่ใช้ในการทดลองคือ 50 ไมโครลิตร นำเกล็ดน้ำเชื้อที่ได้เก็บลงในหลอด Polypropylene vial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร (Scott and Baynes, 1980) ทำการลดอุณหภูมิระดับแรกโดยการผ่านไอของไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเก็บรักษาโดยแช่ในไนโตรเจนเหลวเพื่อทำการตรวจสอบคุณภาพต่อไป (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

4. การตรวจสอบคุณภาพของน้ำเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ

นำตัวอย่างเกล็ดน้ำเชื้อที่แช่ในไนโตรเจนเหลวมาทำการละลายที่อุณหภูมิห้องและทำการตรวจหาคุณภาพของน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่เยือกแข็งโดยการตรวจปริมาณอสุจิที่เคลื่อนไหว ประเมินระดับการเคลื่อนที่ และนับตัวอสุจิที่เป็น และตายด้วยการย้อมสี (Live-Dead Stain : LDS) ทำการสุ่มตรวจสอบเป็นระยะๆ จนครบ 6 เดือน

5. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

ใช้โปรแกรมสำเร็จรูป Systat (Wilkinsen, 1986) ในการวิเคราะห์หาค่าความแตกต่างของคุณภาพน้ำเชื้อที่เก็บด้วยน้ำยาเจือจาง และสารรักษาสภาพสูตรต่างๆ เทียบกับคุณภาพของน้ำเชื้อเมื่อเริ่มทดลอง และน้ำเชื้อสด คัดเลือกสูตรน้ำยาที่ให้ผลดีที่สุด 3 สูตร เพื่อทำการทดลองต่อไป



รูปที่ 7 แสดงแผนภาพการทดลองลดอุณหภูมิในการเก็บน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งของปลากะพงแดง

ผลการทดลอง

จากการทดลองเก็บรักษาตัวอย่างน้ำเชื้อปลากะพงแดงด้วยน้ำยาเจือจาง 5 ชนิด ผสมกับสารรักษาสภาพ 2 ชนิด เป็นระยะเวลา 188 วัน โดยทำการตรวจสอบคุณภาพของน้ำเชื้อที่ทำการเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว ณ อุณหภูมิ -196°C ที่เวลา 1, 6, 18, 42, 103, และ 188 วัน พบว่าคุณภาพของน้ำเชื้อจากการตรวจสอบด้วยวิธีประมาณอัตราการเคลื่อนที่เปอร์เซ็นต์อสุจิที่เคลื่อนไหว และเปอร์เซ็นต์ของอสุจิมีชีวิตที่นับได้จากการย้อมสีตัวเป็น-ตัวตาย (Live-Dead Stain : LDS) ในการเก็บรักษาด้วยน้ำยาเจือจาง และสารรักษาสภาพที่แตกต่างกันส่งผลต่ออัตราการลดลงของคุณภาพของน้ำเชื้อในอัตราที่แตกต่างกันด้วย โดยรายงานเปรียบเทียบคุณภาพของน้ำเชื้อที่น้ำยาเจือจางชนิดเดียวกัน แต่ต่างกันที่สารรักษาสภาพเป็นไปดังตารางที่ 7

เมื่อนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ในทางสถิติพบว่าในระหว่างสูตรน้ำยาที่ใช้ในการเจือจางน้ำเชื้อ และในแต่ละซ้ำของการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P = 0.233$ และ 0.880 ตามลำดับ) ในขณะที่ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษามีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแช่เยือกแข็ง ($P < 0.001$) และสารที่ใช้ในการรักษาสภาพทั้งสองชนิดกลับให้ผลที่แตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.001$) ดังตารางที่ 6

ในด้านของคุณภาพน้ำเชื้อที่มีการลดลงตามระยะเวลาที่เปลี่ยนไปโดยเฉพาะค่าอัตราการลดลงของจำนวนอสุจิที่มีชีวิต ซึ่งตรวจสอบได้จากการย้อมสี Live-Dead Stain และสามารถที่จะประเมินอัตราการลดลงของอสุจิที่มีชีวิตได้ในรูปของสมการเส้นตรง

$$Y = a + bX$$

โดยที่ Y = เปอร์เซ็นต์ของอสุจิที่มีชีวิต

X = Natural logarithm ของระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ

a = ค่าคงที่

b = ค่าความชันของกราฟ

ในด้านผลของสารรักษาสภาพในการทดลองครั้งนี้ พบว่าน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งที่ใช้ DMSO เป็นสารรักษาสภาพให้ผลในการรักษาคุณภาพของอสุจิได้ดีกว่าการใช้ Glycerol เป็นสารรักษาสภาพเมื่อพิจารณาจากสมการที่ได้ โดยให้สมการอัตราลดลงของอสุจิที่มีชีวิตรอดเป็น $Y = 46.07 - 9.58X$ ($R^2 = 0.889$) มีระดับการเคลื่อนที่เฉลี่ย อัตราการเคลื่อนไหวเฉลี่ย และเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตที่เวลา 188 วัน เป็น 5.13 ± 3.14, 54 ± 29.47 และ $2.08 \pm 1.38\%$ ตามลำดับ ใน DMSO และอัตราการลดลงของอสุจิที่มีชีวิตเมื่อใช้ Glycerol เป็นสารรักษาสภาพเป็นไปตามสมการ $Y = 38.86 - 9.02X$ ($R^2 = 0.779$) มีระดับการเคลื่อนที่เฉลี่ยเท่ากับ 0.73 ± 0.88, อัตราการเคลื่อนไหวเฉลี่ยเท่ากับ 4 ± 6.32 และเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตเท่ากับ $0.08 \pm 0.10\%$

ตารางที่ 6 แสดงผลทางสถิติ (ANOVA) ที่ได้จากเปอร์เซ็นต์ของอสุจิมีชีวิตที่เวลา 188 วัน

Dependent Variation : LDS, N = 180

Analysis of Variance

Source	Sum-of-Squares	DF	Mean-Squares	F-Ratio	P
Log(Time)	48455.333	1	48455.333	880.965	0.000
Replication	14.049	2	7.0.25	0.128	0.880
Diulent	309.898	4	77.474	1.409	0.233
Cryoprotectant	1372.477	1	1372.477	24.953	0.000
Error	9405.443	171	55.003		

Time = ระยะเวลาในการแช่เยือกแข็ง (วัน)

Replication = จำนวนซ้ำในการทดลอง (3 ซ้ำ)

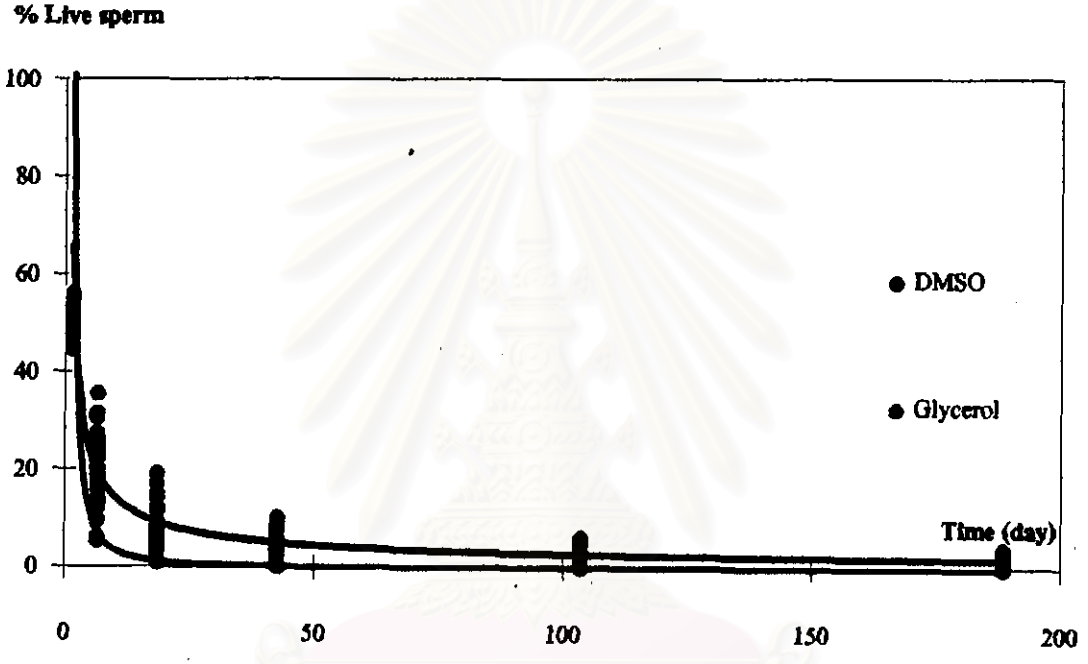
Diulent = น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ได้แก่ Modified Cortland Solution, Marine Fish Ringer Solution, Alsiver's Solution, Buffer Solution, และ Glucose Normal Saline Solution

Cryoprotectant = สารรักษาสภาพ ได้แก่ DMSO และ Glycerol

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์ของอสุจิที่มีชีวิตจากการสุ่มนับตัวอย่างน้ำเชื้อ ณ เวลาต่างๆ เปรียบเทียบระหว่าง DMSO และ Glycerol เป็นสารรักษาสภาพ

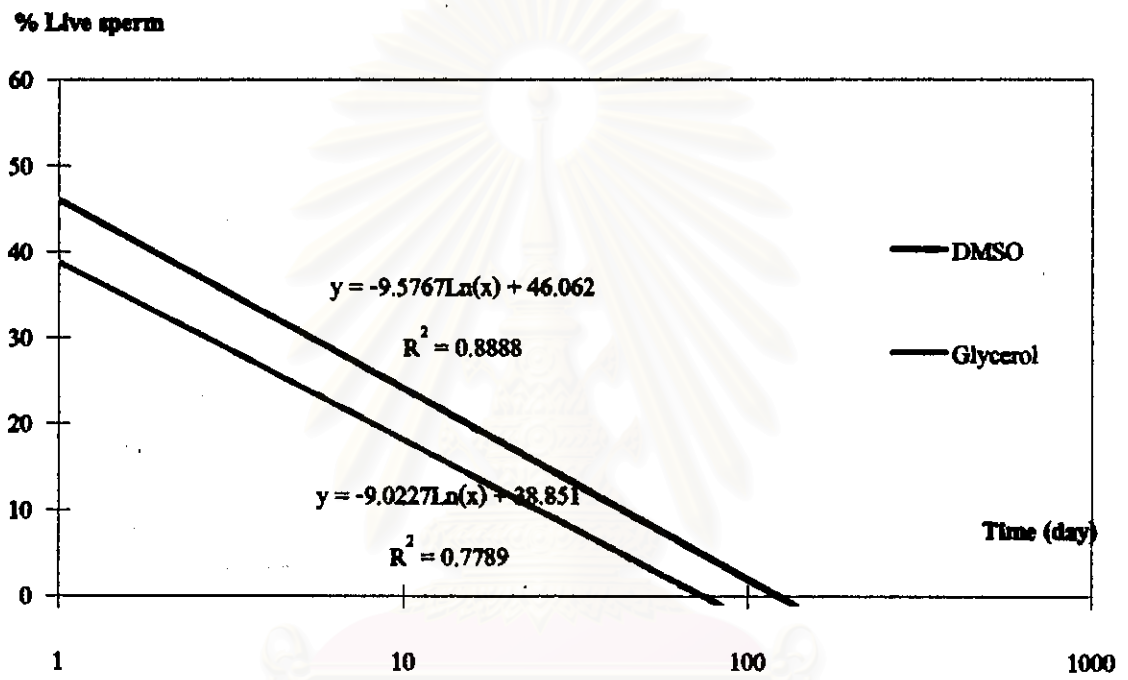
Cryoprotectant		DMSO		Glycerol	
Time (day)	Dilulent	Mean	SD.	Mean	SD.
1	Modified Cortland Sol[n]	53.85	1.48	50.69	1.26
	Marine Fish Ringer Sol[n]	49.65	3.71	49.07	1.24
	Alsever's Sol[n]	52.15	1.28	51.80	3.48
	Buffer Sol[n]	51.23	2.66	47.23	3.11
	Glucose Normal Saline Sol[n]	54.60	0.76	50.93	3.66
6	Modified Cortland Sol[n]	27.55	6.77	17.56	3.37
	Marine Fish Ringer Sol[n]	20.52	3.14	14.35	2.59
	Alsever's Sol[n]	24.32	1.49	12.22	6.12
	Buffer Sol[n]	23.14	4.36	9.64	3.75
	Glucose Normal Saline Sol[n]	30.60	2.70	12.94	2.12
18	Modified Cortland Sol[n]	11.67	4.3	5.61	2.14
	Marine Fish Ringer Sol[n]	8.10	1.56	4.58	0.81
	Alsever's Sol[n]	14.51	1.67	3.68	3.48
	Buffer Sol[n]	7.07	3.78	2.11	0.63
	Glucose Normal Saline Sol[n]	17.14	2.16	1.97	0.92
42	Modified Cortland Sol[n]	5.86	1.2	1.74	0.63
	Marine Fish Ringer Sol[n]	4.24	1.55	0.26	0.22
	Alsever's Sol[n]	7.16	0.94	1.82	0.38
	Buffer Sol[n]	3.71	2.26	0.26	0.21
	Glucose Normal Saline Sol[n]	9.11	0.80	0.18	0.18
103	Modified Cortland Sol[n]	4.05	1.16	0.78	0.17
	Marine Fish Ringer Sol[n]	2.32	0.89	0.07	0.11
	Alsever's Sol[n]	4.82	0.44	0.20	0.06
	Buffer Sol[n]	1.89	1.33	0.01	0.01
	Glucose Normal Saline Sol[n]	5.58	0.52	0.02	0.02
188	Modified Cortland Sol[n]	2.39	0.79	2.25	0.07
	Marine Fish Ringer Sol[n]	0.68	0.31	0.03	0.07
	Alsever's Sol[n]	3.35	0.74	0.07	0.01
	Buffer Sol[n]	0.39	0.39	0.00	0.00
	Glucose Normal Saline Sol[n]	4.01	3.56	0.01	0.01

I17207377x



รูปที่ 8 แสดงอัตราการลดลงของอสุจิที่มีชีวิตที่ระยะเวลาต่าง ๆ เปรียบเทียบระหว่าง DMSO และ Glycerol ในการใช้เป็นน้ำยารักษาสภาพ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 แสดงเส้นสมการของอสุจิที่มีชีวิตที่เวลาต่าง ๆ เมื่อใช้ DMSO และ Glycerol เป็นน้ำยารักษาสภาพ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงแดงโดยวิธีการแช่เยือกแข็ง พบว่าในแต่ละสูตรของน้ำยาเจือจางที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในด้านของคุณภาพน้ำเชื้อที่ตรวจสอบได้หลังการละลาย (P = 0.233) การที่คุณภาพของน้ำเชื้อในน้ำยาเจือจางสูตรต่าง ๆมีคุณภาพที่ไม่ต่างกันมากนัก อาจเป็นผลเนื่องมาจากส่วนประกอบพื้นฐานที่ผสมอยู่ในน้ำยาแต่ละชนิดมีส่วนประกอบที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งจากรายงานของ Scott และ Baynes (1980) ได้รายงานถึงลักษณะทั่วไปของส่วนประกอบในน้ำยาเจือจางว่า โดยปกติแล้วส่วนประกอบพื้นฐานของน้ำยาเจือจางจะอยู่ในรูปของสารละลายเกลือโซเดียม และโปแตสเซียม แต่ในบางครั้งจะพบว่าได้มีการเพิ่มสารประกอบอินทรีย์บางชนิดเข้าไปเพื่อช่วยเพิ่มความสามารถในการกลับมาเคลื่อนไหวอีกครั้งของตัวอสุจิภายหลังการถูกแช่แข็ง ในขณะที่ Truscott และ Idler (1969) ได้รายงานถึงคุณสมบัติของสารละลายน้ำยาเจือจางที่ดีจะต้องไม่มีผลในการเพิ่มอัตราการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ ตามทฤษฎีแล้วเมื่อตัวอสุจิถูกกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนไหวแล้วจะไม่สามารถกลับมาเคลื่อนไหวได้อีกครั้ง

ในส่วนของสารรักษาสภาพพบว่าระหว่างสารรักษาสภาพทั้งสองชนิดที่นำมาทดสอบมีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยในการทดลองครั้งนี้พบว่า DMSO ให้ผลในการรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อได้ดีกว่าการใช้ Glycerol เป็นสารรักษาสภาพ Scott และ Baynes (1980) ได้กล่าวถึงการใช้ Glycerol เป็นสารรักษาสภาพว่าได้มีการใช้กันอย่างแพร่หลายในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมดังนั้นจึงได้มีผู้ประยุกต์มาใช้กับการแช่เยือกแข็งในน้ำเชื้อปลา แต่พบว่าไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควรนัก ซึ่งในหลาย ๆ การทดลองก็ได้รายงานผลเช่นเดียวกัน เช่น Caylor, Biesiot และ Franks (1994) ได้รายงานถึงการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum*) โดยใช้ DMSO และ Glycerol เป็นสารรักษาสภาพพบว่าสูตรน้ำยาที่ใช้ Glycerol เป็นสารรักษาสภาพให้ผลของอัตราการเคลื่อนไหว และอัตราการปฏิสนธิต่ำที่สุด ในด้านของการใช้ DMSO เป็นสารรักษาสภาพจากรายงานของ Ott และ Horton (1971a) ได้รายงานถึงความสำเร็จในการใช้ DMSO เป็นสารรักษาสภาพในการแช่เยือกแข็งน้ำเชื้อปลาแซลมอน และสามารถประสบผลสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่เยือกแข็งหลายชนิด เช่น ปลากะพงขาว (Leung , 1987) Atlantic Halibut (Bolla et.al., 1987) White fish (Piironen, 1987) และในปลาอื่นๆ อีกหลายชนิด สาเหตุของความแตกต่างในการรักษาคุณสมบัติของน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งโดยใช้ DMSO และ Glycerol ได้ถูกรายงานโดย Scott และ Baynes (1980) ว่าการที่สารรักษาสภาพจะมีคุณสมบัติในการรักษาสภาพของตัวอสุจิเท่าใดนั้น ขึ้นอยู่กับความสามารถในการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของสารนั้นๆ โดยอาจ

กล่าวได้ว่า Glycerol เป็นสารที่มีโมเลกุลที่ใหญ่กว่า DMSO จึงทำให้ความสามารถในการแพร่ผ่านเข้าสู่เซลล์น้อยกว่า DMSO ส่งผลให้ความสามารถในการรักษาคุณภาพน้ำเชื้อลดน้อยลงตามไปด้วย อย่างไรก็ตามการทดลองนี้พบว่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของอสุจิในสูตรที่ผสม DMSO เป็นสารรักษาสภาพได้มีการลดลงอย่างรวดเร็วในระยะเวลาต้นๆ ทั้งนี้สันนิฐานได้ว่าอาจเกิดจากความเป็นพิษของ DMSO Komada, Takai, Arii และคณะ (1995) รายงานถึงผลของ DMSO ที่มีต่อการพัฒนาของตัวอ่อนปลา พบว่า DMSO สามารถที่จะทำลายเยื่อบุผิวของไข่ปลาได้ถึงประมาณ 0.13-1.09 X 10^{-4} cm/sec. ที่ความเข้มข้น 4 M ในขณะที่ Scott and Baynes (1980) อ้างถึง Mann (1964) ว่ามีการใช้ Mannitol เป็นสารป้องกันการเกิดพิษในการเก็บน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งในปลาแซลมอน

ทางด้านระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อนั้นจากการทดลองพบว่าน้ำเชื้อมีอัตราการลดลงของคุณภาพที่ตรวจวัดได้ตามระยะเวลาที่เก็บ ในขณะที่รายงานของ Mounib (1978) ได้รายงานถึงการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งของปลาCod และ Salmon ว่าสามารถที่จะเก็บไว้ที่ -196 °C ได้เป็นเวลานานไม่น้อยกว่า 1 ปี ซึ่งการที่คุณภาพของน้ำเชื้อลดลงนั้นอาจเกิดขึ้นจากความผิดพลาดในวิธีการเก็บรักษา และเทคนิคในการลดอุณหภูมิ โดยจากรายงานของกฤษณ์ มงคลปัญญา (2536) ได้กล่าวถึงปัจจัยที่ควบคุมไม่ได้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อคือ คุณภาพของน้ำเชื้อที่ได้มาจากพ่อพันธุ์หลายตัวอาจมีคุณภาพที่ไม่สม่ำเสมอกัน นอกจากนี้เทคนิคในการลดอุณหภูมิยังอาจมีผลกระทบต่อคุณภาพของน้ำเชื้อขณะทำการลดอุณหภูมิอีกด้วย เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้ไม่มีเครื่องมือที่สามารถควบคุมอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิได้อย่างแน่นอน อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยของอสุจิปลากะพงแดงที่มีชีวิตหลังการแช่เยือกแข็งพบว่า น้ำเชื้อที่เจือจางด้วยสูตรน้ำยา Modified Cortland Solution ร่วมกับ 10% DMSO ให้เปอร์เซ็นต์การรอดของอสุจิเท่ากับ 2.39 ± 0.79% คิดเป็น ปริมาณอสุจิเท่ากับ 5 แสนเซลล์ต่อมิลลิลิตร มีอัตราการเคลื่อนไหวเฉลี่ยเท่ากับ 60 ± 10.0 ระดับการเคลื่อนที่เฉลี่ยเท่ากับ 7 ± 0.0, Alsever's Solution ร่วมกับ 10% DMSO ให้อัตรารอดของตัวอสุจิเท่ากับ 3.35 ± 0.74% คิดเป็นปริมาณตัวอสุจิเท่ากับ 7.01 แสนเซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยมีอัตราการเคลื่อนไหวเฉลี่ยเท่ากับ 70 ± 5.77 และมีระดับการเคลื่อนที่เท่ากับ 7 ± 1.0 และ Glucose Normal Saline Solution ร่วมกับ 10% DMSO ให้อัตรารอดของตัวอสุจิเท่ากับ 4.01 ± 3.56% คิดเป็นปริมาณตัวอสุจิเท่ากับ 8.4 แสนเซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยมีอัตราการเคลื่อนไหวเฉลี่ยเท่ากับ 80 ± 5.77 และมีระดับการเคลื่อนที่เท่ากับ 8 ± 0.0 ก็น่าที่จะเพียงพอต่อการเก็บรักษาในแง่ของการเก็บรักษาลักษณะทางพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิตเพื่อการศึกษาต่อไป นอกจากนี้จากรายงานของ Doi และ Singhagriwan (1993) ได้รายงานปริมาณไข่ที่แม่พันธุ์ปลากะพงแดงปล่อยออกมานั้นว่ามีประมาณ 10,000-100,000 ฟองต่อตัวต่อครั้ง ดังนั้นจะเห็นได้ว่าปริมาณอสุจิ

ที่เก็บได้จากการแช่เยือกแข็งมีเพียงพอต่อการปฏิสนธิกับไข่ปลาที่ได้จากแม่ปลากะพงแดง ในการที่จะนำน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งมาใช้นั้นเนื่องจากปริมาณน้ำเชื้อที่ได้มีความหนาแน่นของอสุจิน้อยกว่าที่มีอยู่ในน้ำเชื้อสด ดังนั้นการผสมเทียมด้วยวิธีแห้งจึงเป็นส่วนที่จะเข้ามาช่วยเพิ่มอัตราปฏิสนธิให้สูงขึ้นได้ โดย Scott and Baynes (1980) ได้กล่าวถึงกรรมวิธีผสมเทียมแบบแห้งซึ่งพัฒนาขึ้นโดย Soudakevicz (1874) ว่าสามารถที่จะเพิ่มอัตราการปฏิสนธิให้เพิ่มขึ้นได้ โดยเฉพาะในกรณีของน้ำเชื้อที่มีอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิต่ำ ด้วยการผสมน้ำเชื้อกับไข่ที่อุณหภูมิประมาณ 4-10 °C จากนั้นจึงนำไข่ที่ได้รับการผสมมาล้างน้ำแล้วจึงนำไปฟักต่อไป

จะเห็นได้ว่าจากการทดลองในบทนี้ผลของระยะเวลา และชนิดของสารรักษาสภาพมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การรอดของอสุจิที่เก็บด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง แต่นอกจากปัจจัยดังที่ได้กล่าวมาแล้วเปอร์เซ็นต์การรอดของอสุจิยังอาจขึ้นอยู่กับอัตราการลดและเพิ่มอุณหภูมิ (Scott และ Baynes, 1980) ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาถึงกรรมวิธีที่ถูกต้องในการแช่เยือกแข็ง และการละลายด้วยน้ำเชื้อที่ผสมกับสูตรน้ำยาเจือจาง และสารรักษาสภาพที่ได้จากการทดลองนี้ โดยจะทำการศึกษาในการทดลองต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย