บทที่ 2
การสำรวจเอกสาร

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ชีววิทยาปลากะพงขาว

ปลากะพงขาว *Lates calcarifer* ซึ่งลักษณะโดยทั่ว ๆ ไปของปลากะพงขาว มีลักษณะลำตัวค่อนข้างยาวและหนาแบนข้างเล็กน้อย บริเวณไหล่จะโค้งมน ส่วนตัวจะลาดชันและเว้า ส่วนของขากรรไกรล่างยื่นยาวกว่าขากรรไกรบนเล็กน้อย ปากกว้าง ขอบปากบนเป็นแผ่นใหญ่ แยกเป็นแนวตอนต้น และ ตอนท้ายอย่างชัดเจน บริเวณส่วนปากจะยืดหดได้บ้าง ช่องปากเฉียงลงด้านล่างเล็กน้อย มีฟันเล็กละเอียดบนขากรรไกรบนและล่างและที่เพดานปาก ตาของปลาชนิดนี้มีขนาดกลาง ไม่มีเยื่อที่เป็นไขมันหุ้ม แผ่นปิดเหงือกมีขนาดใหญ่ มีขอบหลังเป็นหนามแหลม 4 ซี่ และเรียงต่อด้วยซี่เล็ก ๆ จัดตามแนวหลัง ด้านบนส่วนหัว และบนแผ่นเหงือก มีเกล็ดขนาดต่าง ๆ กัน เกล็ดบริเวณลำตัวค่อนข้างใหญ่ ด้านหลังมีสีเทาเงินหรือเขียวปนเทา ส่วนท้องมีสีเงินแกมเหลือง บริเวณด้านข้างของลำตัวมีสีเงิน ครีบหลัง ครีบก้น ครีบหาง จะมีสีเทาปนดำบาง ๆ มีครีบหลัง 2 ตอน ตอนแรกอยู่ตรงตำแหน่งของครีบท้อง มีก้านครีบแข็ง ที่แหลมคมขนาดใหญ่ 7-8 ก้าน เชื่อมต่อกันด้วยเยื่อบาง ๆ ครีบหลังตอนที่ 2 แยกจากตอนแรกอย่างเห็นได้ชัด มีก้านครีบแข็ง 1 ก้าน ก้านครีบอ่อนมีปลายแตกแขนงมี 10-11 ก้าน ครีบหูและครีบอกยาว ไม่ถึงรูก้น ครีบก้นมีตำแหน่งใกล้เคียงกับครีมหลังตอนที่2 ซึ่งประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 3 ก้าน ก้านครีบอ่อน 7-8 ก้าน ข้อหางสั้น ครีบหางค่อนข้างกลมเส้นข้างตัวโค้งไปตามแนวสันหลังมีเกล็ดบนเส้นข้างตัว 52-64 เกล็ด

ปลากะพงขาวเป็นปลาน้ำกร่อยขนาดใหญ่ สามารถเจริญเติบโตได้ดีในน้ำกร่อยและน้ำจืด จัดได้ว่าเป็นปลาประเภท 2 น้ำ คือ ในช่วงชีวิตของปลากะพงขาวจะมีการเคลื่อนย้ายไปมาระหว่างแหล่งน้ำจืด และ น้ำเค็ม ปลากะพงขาวขนาดใหญ่จะอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่ไม่ห่างไกลออกไปจากฝั่งมากนัก พบมากบริเวณปากแม่น้ำลำคลอง ปากทะเลสาบและปากอ่าวบริเวณที่เป็นป่าชายเลน ที่มีน้ำเค็มท่วมถึง โดยจะพบอยู่ทั่ว ๆ ไปในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ นับตั้งแต่พม่า ไทย มาเลเซีย เวียดนาม และแถบชายฝั่งทะเลของจีน ก็พบปลาชนิดนี้เช่นเดียวกัน สำหรับประเทศไทยนั้น สามารถพบปลากะพงขาว ตามชายฝั่งทะเลโดยเฉพาะบริเวณปากแม่น้ำใหญ่ ๆ ที่มีทางออกติดต่อกับทะเลที่มีป่าชายเลนขึ้นปกคลุมทางจังหวัดตราด จันทบุรี ฉะเชิงเทรา สมุทรปราการ สมุทรสงคราม เป็นต้น ปลากะพงขาวจะผสมพันธุ์และวางไข่ในน้ำทะเลที่มีความเค็มประมาณ 28-32 ppt ในทะเลที่มีความลึก หลังจากนั้นไข่จะถูกพัดพาเข้าสู่บริเวณชายฝั่งและฟักออกเป็นตัว ลูกปลากะพงขาวที่ฟักออกเป็นตัว จะดำรงชีวิตในน้ำกร่อยและในน้ำจืดจนมีอายุได้ 2-3 ปี มีขนาด 3-5 กิโลกรัมจะเคลื่อนตัวออกสู่ทะเลเพื่อทำการผสมพันธุ์วางไข่ต่อไป (บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2544)

ปลากะพงขาวเป็นปลาที่สังเกตเพศได้ยาก แต่ก็สามารถสังเกตเพศได้จากลักษณะภายนอกของตัวปลา โดยปลาเพศผู้จะมีลักษณะลำตัวยาวเรียวกว่าเพศเมีย ลำตัวมีส่วนลึกที่น้อยกว่าปลาเพศเมีย และ มีน้ำหนักตัวน้อยกว่าปลาเพศเมียที่มีขนาดลำตัวยาวเท่ากัน ในปลาเพศเมียนั้น เมื่อถึงฤดูวางไข่ในช่วงเดือน พฤษภาคม-กันยายน ส่วนท้องจะอวบเปล่ง สังเกตได้ชัดเจน เมื่อเวลาเอามือคลำที่ท้องจะมีไข่ไหลออกมา พ่อแม่พันธุ์ปลากะพงขาวในปัจจุบันได้มาจากปลากะพงขาวที่เลี้ยงในกระชัง หรือในบ่อดิน โดยเจ้าของฟาร์มส่วนใหญ่จะทำการคัดเลือกปลาที่มีลักษณะที่ดี แล้วนำมาขุนด้วยอาหารที่เหมาะสมภายในโรงเพาะฟักอีกช่วงเวลาหนึ่ง โดยพ่อพันธุ์ปลากะพงขาวที่เหมาะสมมักมีขนาดประมาณ 3-3.5 กิโลกรัม และแม่พันธุ์ปลากะพงขาวมักมีขนาด 4 กิโลกรัมขึ้นไป (รูปที่ 1 - 4)

2. ชีววิทยาของน้ำเชื้อสัตว์น้ำ

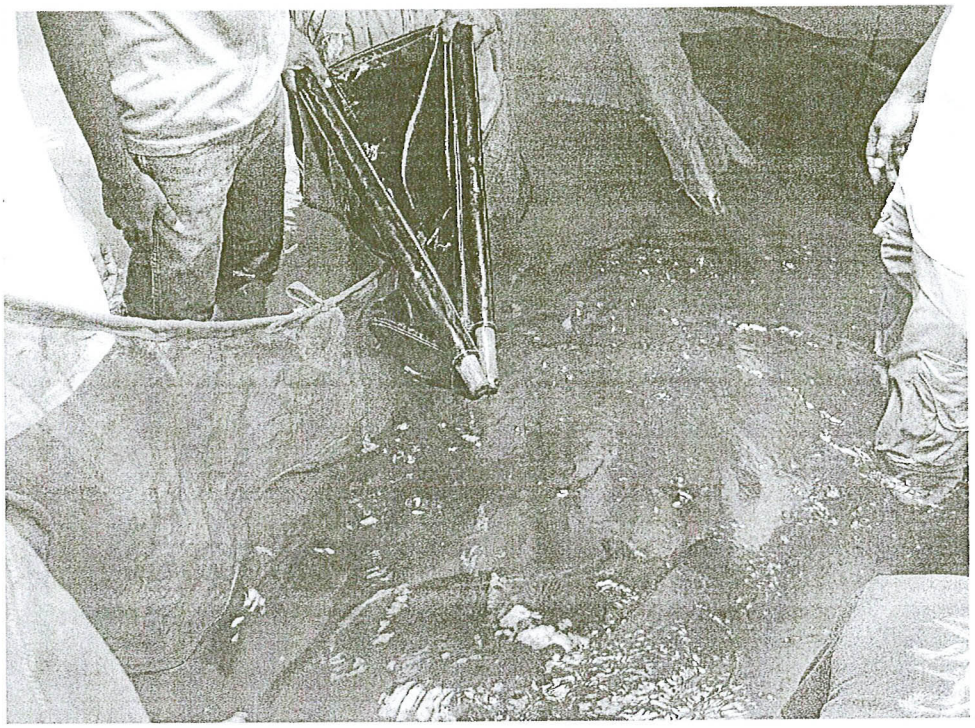
เซลล์สเปิร์มของปลามีความแตกต่างจากสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆตรงที่ไม่มีส่วนของอะโครโซม (acrosome) ที่ใช้ในการย่อยผิวไข่ ทั้งนี้เป็นเพราะไข่ปลามีช่องไมโครไพล์ (micropyle) ซึ่งเป็นทางผ่านของสเปิร์มอยู่แล้ว ทำให้สเปิร์มสามารถว่ายเข้าไปผสมกับนิวเคลียสของไข่โดยผ่านช่องไมโครไพล์ ได้ ดังนั้นอะโครโซมจึงไม่จำเป็นสำหรับไข่ปลาในระหว่างการปฏิสนธิ สเปิร์มของปลาจะประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

1. ส่วนหัว (head) มีความแตกต่างกันไปตามชนิดของปลาโดยในส่วนหัวจะมีนิวเคลียสที่มี ดีเอ็นเอ (DNA) เป็นสารพันธุกรรมเพื่อปฏิสนธิกับนิวเคลียสของไข่ นอกจากนี้อาจพบอะโครโซม ซึ่งแต่เดิมเรียกว่า อพิคอล บอดี้ (apical body) อยู่ภายในส่วนหัวโดยอะโครโซมเปลี่ยนแปลงมาจากกอลจิ บอดี้ (golgi body) สเปิร์มของปลากระดูกแข็งส่วนมากไม่มีอะโครโซม เช่น ปลาดุก ปลากะพงขาว ปลาแซลมอน ปลาไน เป็นต้น แต่ปลาบางชนิดมีอะโครโซม เช่น ปลา herring เป็นต้น

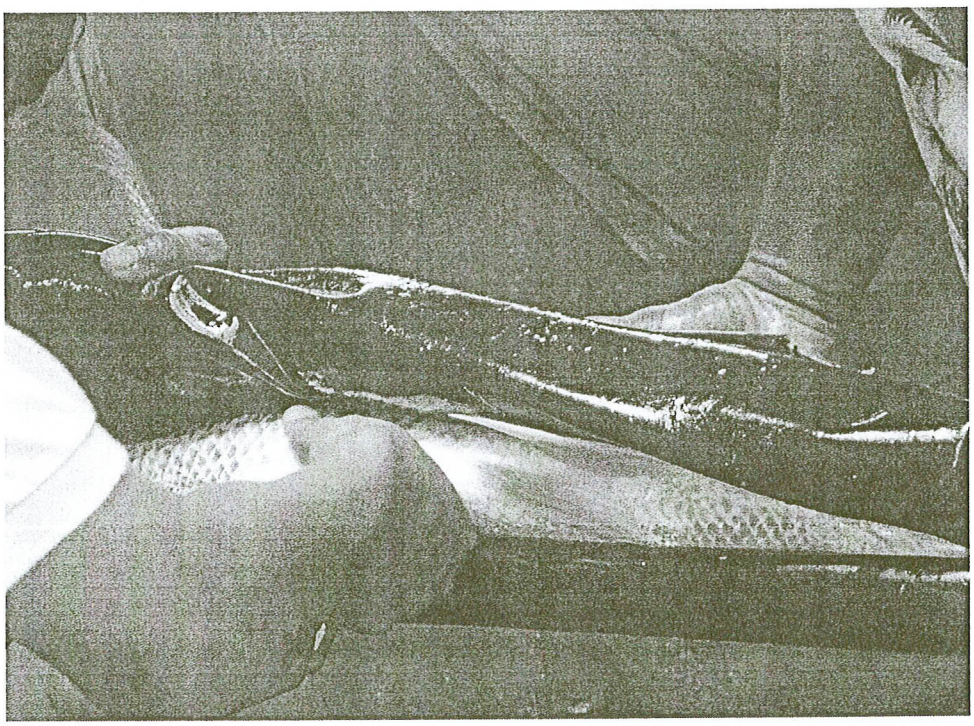
2. ส่วนกลาง (middle piece) เป็นส่วนที่อยู่ติดกับส่วนหัวโดยจะมีไมโทคอนเดรีย (mitochondria) จำนวนมากที่ให้พลังงานแก่สเปิร์มในการเคลื่อนที่

3. ส่วนหาง (tail) เป็นส่วนที่มีลักษณะยาวและในส่วนหางจะมีไฟบริล (fibril) อยู่ทั้งหมด 11 คู่ อยู่ตรงกลาง 2 คู่ และอยู่โดยรอบ 9 คู่ในปลาบางชนิดเช่น ปลาแซลมอน ปลาเทร้า ปลาเพรซ ปลาเพิช เป็นต้น พบว่า บริเวณปลายหางสเปิร์มจะเล็กลงเรียกว่า end piece

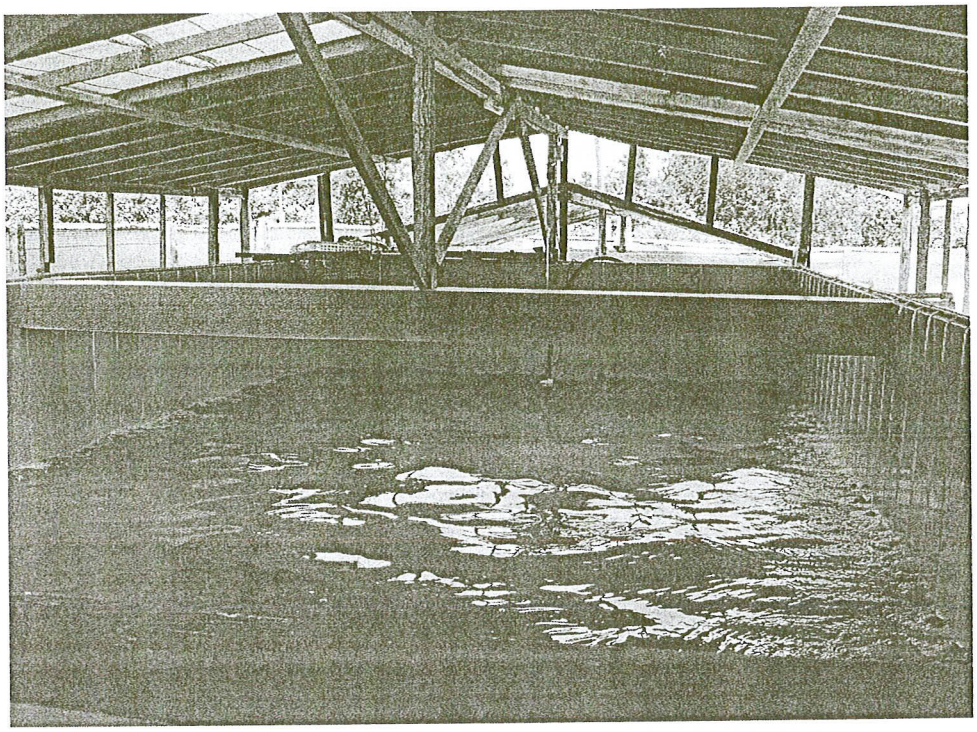
ปลากระดูกแข็งส่วนมากจะมีสเปิร์มที่มีส่วนหัวเป็นรูปทรงกลม (spherical) หรือทรงรี (ovate หรือ acorn-shape) โดยส่วนหัวมีขนาดประมาณ 2-3 ไมโครเมตรและความยาวสเปิร์มจากหัวจนถึงปลายหางแตกต่างกันไป ส่วนกลางมีขนาดเล็กและส่วนใหญ่มีหางจำนวน 1 หาง (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)



รูปที่ 1 ลักษณะพ่อแม่พันธุ์ปลากะพงขาว



รูปที่ 2 การประเมินแม่พันธุ์ปลากะพงขาวก่อนการเพาะพันธุ์



รูปที่ 3 พ่อแม่พันธุ์ปลากะพงขาวที่เลี้ยงขุนภายในโรงเพาะฟัก

รูปที่ 4 การตรวจสภาพความพร้อมของพ่อพันธุ์ปลากะพงขาว

เซลล์สเปิร์มจะไม่เคลื่อนที่เมื่อยังอยู่ในตัวปลาหรือเมื่อรีดน้ำเชื้อสดออกมาใหม่ๆ แต่เซลล์สเปิร์มจะมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว เมื่อน้ำเชื้อถูกกระตุ้นด้วยสารละลายที่เหมาะสม เช่นน้ำเชื้อผสมกับน้ำภายนอกขณะที่พ่อแม่พันธุ์ปลาผสมพันธุ์วางไข่ตามธรรมชาติ หรือเมื่อนำเอาหยดเล็กๆ ของน้ำเชื้อผสมกับหยดน้ำบนแผ่นกระจกสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ก็จะพบว่าเซลล์สเปิร์มถูกกระตุ้นให้มีการเคลื่อนที่อย่างรุนแรง อันเป็นผลเนื่องมาจากการเจือจาง แต่การเคลื่อนที่ดังกล่าวจะสิ้นสุดลงอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาประมาณไม่เกิน 1 นาทีสำหรับน้ำเชื้อปลาน้ำจืด หรืออาจใช้เวลาหลายชั่วโมงสำหรับน้ำเชื้อปลาทะเล ดังนั้นการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อปลาโดยใช้อัตราการเคลื่อนที่เป็นหลักจึงต้องกระทำภายในทันทีทันใดที่น้ำเชื้อปลาผสมกับสารละลายบนกระจกสไลด์ ดังนั้นการเก็บรักษาน้ำเชื้อให้มีชีวิตอยู่ได้นานเมื่อเจือจางน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำยาเจือจาง (extender) ใดๆ ก็ตาม น้ำยาชนิดนั้นจะต้องไม่กระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวสเปิร์ม เพราะถ้าสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่แล้วแม้ว่าจะเก็บรักษาแช่เย็น หรือแช่แข็งดีเพียงใดก็ตาม ก็ไม่สามารถกระตุ้นให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ขึ้นมาได้อีกเพื่อผสมกับไข่ในภายหลัง

Alavi et al. (2007) ศึกษาผลของ K^+ และ Ca^{2+}ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา *Perca fluviatilis* พบว่า Ca^{2+} มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยความเข้มข้นที่ 2.5 mM มีผลทำให้เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่และอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเพิ่มขึ้น และเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ Ca^{2+} เท่ากับ 5.0 mM เมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่ 2.5 mM ส่วน K^+ พบว่าความเข้มข้นของ K^+ ที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มโดยสเปิร์มจะเริ่มเคลื่อนที่เมื่อความเข้มข้นของ K^+ เท่ากับ 40 mM และจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อความเข้มข้นของ K^+ เท่ากับ 80 mM สรุปได้ว่าอัตราการเจือจางของ K^+ และ Ca^{2+} มีผลต่อการเลื่อนที่ ความเร็วในการเคลื่อนที่และเปอร์เซนต์สเปิร์มที่เคลื่อนที่

Alavi and Cosson (2005) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่และการรอดชีวิตของสเปิร์มพบว่าระยะเวลาในการเคลื่อนที่ การปฏิสนธิ และอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มขึ้นอยู่กับการกระตุ้นด้วยอุณหภูมิ เพราะประสิทธิภาพของสเปิร์มปลามีอยู่อย่างจำกัด อัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิในสารละลายเพิ่มขึ้น ซึ่งจะทำให้ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสั้นลง และเมื่อลดอุณหภูมิมีผลทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่ช้าลงและระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มนานขึ้น โดยศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของปลา *Siberian sturgeon* พบว่าระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม จะเคลื่อนที่ลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 10 องศาเซลเซียส จนถึง 17.5 องศาเซลเซียส และปลาฉลามปากเป็ด (*Polyodon spathula*) สามารถเคลื่อนที่ได้ 4 นาที แต่มีเพียง 1-5 เปอร์เซนต์เท่านั้นที่สามารถเคลื่อนที่ได้ถึง 6 นาที ที่ 10-12 องศาเซลเซียส

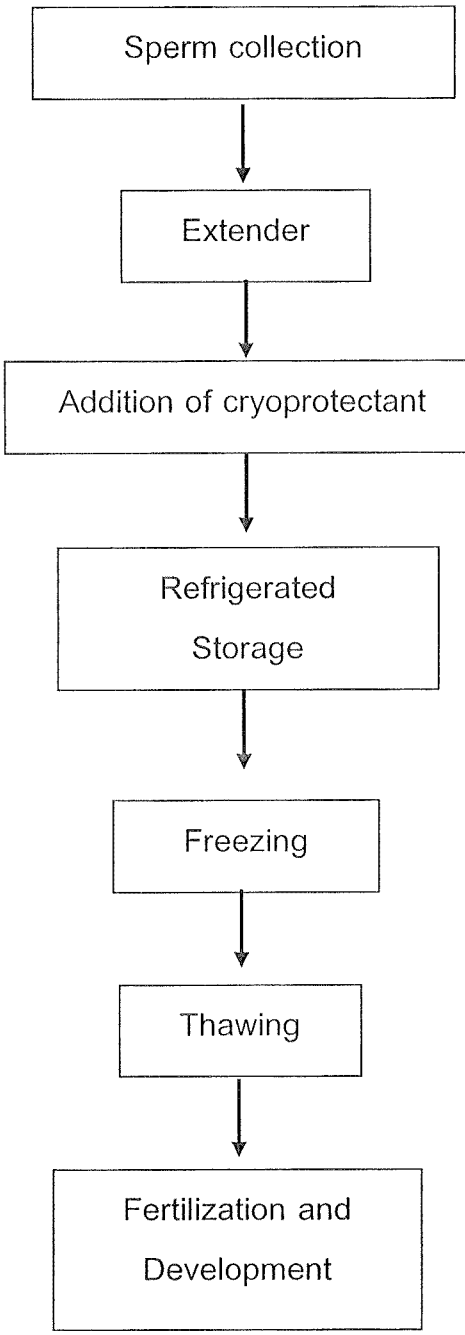
3. การแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำ

การเก็บรักษาสเปิร์ม หรือน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง เป็นการเก็บเซลล์แช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ – 196 องศาเซลเซียส ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีนี้มีความเกี่ยวข้องกับตัวแปรจำนวนมากได้แก่ การเลือกน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดี (sperm collection) การเลือกใช้สูตรน้ำยา (extender) ที่เหมาะสมในเก็บรักษาน้ำเชื้อ ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสม (cryoprotectant) ระยะที่เหมาะสมให้เซลล์ปรับตัวก่อนการแช่แข็ง (equilibration time) การลดอุณหภูมิ (freezing) และการละลายเซลล์แช่แข็ง (thawing) เพื่อนำกลับมาใช้ประโยชน์ (รูปที่ 5) ซึ่งถ้ามีการปฏิบัติและเลือกใช้ตัวแปรเหล่านี้อย่างถูกต้องเหมาะสมกับน้ำเชื้อปลาแต่ละชนิด ก็สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาได้นานหลายสิบปี เมื่อจะนำมาใช้ก็นำออกมาละลายด้วยวิธีการและอุณหภูมิที่เหมาะสม แล้วนำไปผสมเทียมกับไข่ ก็จะทำให้การเพาะฟักผสมเทียมมีประสิทธิภาพสูงไม่ต่างจากการใช้น้ำเชื้อสดถ้าสามารถ optimize ตัวแปรต่างๆที่เกี่ยวข้องได้อย่างเหมาะสม ดังนั้นตลอดเวลาที่ผ่านมาประมาณ 30 กว่าปี จึงมีผู้ศึกษาทดลองพัฒนาวิธีการเก็บน้ำเชื้อปลาหลายๆชนิด ให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด แม้ว่างานวิจัยส่วนมากได้ศึกษาในปลาน้ำจืด โดยในประเทศไทยมีการศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาทะเลน้อยมากเช่น

เกรียงศักดิ์ แม่งอำพัน (2545) ได้ศึกษาการผลิตและการปรับปรุงพันธุ์ปลาจากน้ำเชื้อแช่แข็งในปลา Brown trout ปลาไน ปลาบึก ปลาเทพา ปลากระโห้ และปลาดุกรัสเซีย ผลการศึกษาปรากฏว่า สารประกอบที่เหมาะสมในการเก็บอสุจิแช่แข็งที่ให้อัตราการผสมดีที่สุดของปลา Brown trout ประกอบด้วย NaCl 750 mg Glucross 5,400 mg และ DMSO 10% ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ให้อัตราการผสมระหว่าง 33-59% การแช่แข็งในรูปเม็ดใช้ได้สะดวกและอัตราการผสมดีกว่าในรูปหลอดฟาง การละลายเพื่อการผสมเทียมไม่ควรเกิน 10 วินาที 2)ปลาไน สารประกอบที่มีความเข้มข้นมากกว่า 1,200 mOsm/kg มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่และอัตราการผสมของน้ำเชื้อ 3) ปลาบึก การใช้ DMSO ในการแช่แข็งไม่ควรเกิน 10% อัตราน้ำเชื้อต่อสารประกอบควรใช้ 1:3 4) ปลาเทพา สารประกอบที่เหมาะสมประกอบด้วย NaCl 750 mg , KCl 100 mg , Glucross 100 mg และ DMSO 10% ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร 5) ปลากระโห้ อัตราการลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งควรอยู่ระหว่าง 10-15 องศาเซลเซียส ต่อนาที ความเข้มข้นของน้ำเชื้ออยู่ระหว่าง 250-300 mOsm/kg 6) ปลาดุกรัสเซีย ระดับการเคลื่อนที่ของอสุจิสดเคลื่อนที่ได้นานที่สุด 45 วินาที

นลินี มารคแมน และคณะ (2526) ได้ทำการเก็บน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี lecithin และ mannitol เป็นองค์ประกอบ ปรากฏว่าประสบความล้มเหลว

Gwo et al. (1991) ได้ศึกษาการเก็บน้ำเชื้อปลา Atlantic croaker แบบแช่แข็ง พบว่า sperm extender ที่ประกอบด้วย เกลือแกง กลูโคส และ ซูโครส สามารถใช้เจือจางน้ำเชื้อขณะทำการแช่แข็งโดยมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ sperm extender ชนิดอื่นๆที่มีความสลับซับซ้อนหรือมีสารเคมี-



รูปที่ 5 ขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา

หมายเหตุ: การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาทุกชนิดใช้หลักการเช่นเดียวกันตามรูปที่ 5 แต่อาจมีความแตกต่างในรายละเอียดของการเลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์ ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ อัตราการลดอุณหภูมิและอัตราการละลายแตกต่างกันไปตามปลาแต่ละชนิด

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 20 ก.พ. 2555
244044

หลายชนิดเป็นองค์ประกอบ และยังพบว่าอัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็งตั้งแต่ -10 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง –150 องศาเซลเซียส/นาที ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิขณะนำมาผสมกับไข่

เสน่ห์ และคณะ (2536) รายงานการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งปลาบึกในสารละลายที่มี 125 มิลลิโมล $NaHCO_3$, 250 มิลลิโมล Sucrose, 9.75 มิลลิโมล Glutathione และ 8 เปอร์เซ็นต์ Dimethysulfuoxide (DMSO) อัตราการปฏิสนธิของอสุจิในหลอดฟางฆ่าเชื้อ 67 เปอร์เซ็นต์ ไม่ฆ่าเชื้อมีอัตราปฏิสนธิ 11 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอัตราปฏิสนธิเฉลี่ย 31 เปอร์เซ็นต์

Rana and McAndrew (1989) รายงานการทำน้ำเชื้อปลานิลแช่แข็งโดยเจือจางน้ำเชื้อในสารละลาย Ringer ที่มี methanol เป็น cryoprotactant ที่ระดับต่างๆกัน ในหลอดฟางขนาด 0.5 ml. พบว่า การใช้ methanol 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลดีที่สุดในการปกป้องเซลล์ และการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งในอัตราที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 5 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 50 องศาเซลเซียส/นาที ก่อนเก็บในไนโตรเจนเหลว ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ

Conget et al. (1996) ใช้ cryoprotectant ต่างๆชนิด ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา rainbow trout แบบแช่แข็ง พบว่า การใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) ร่วมกับ sucrose ให้ผลดีที่สุดในการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยระยะเวลาที่เจือจางน้ำเชื้อใน cryoprotectant ก่อนทำการแช่แข็งไม่ควรเกิน 10 นาที และการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งอย่างรวดเร็ว (30 องศาเซลเซียส/นาที) มีผลทำให้สเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวที่สูงกว่าการลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ (1 องศาเซลเซียส/นาที และ 10 องศาเซลเซียส/นาที)

Tiersch et al. (1994) ได้นำน้ำเชื้อปลา channel catfish มาแช่แข็งโดยผสม cryoprotectant ต่างๆชนิด และ Hank's balanced salt solution ลงไปในน้ำเชื้อ พบว่า methanol ให้ผลดีที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยที่สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ และมีความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่เทียบเท่ากับการใช้น้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ๆ

Richardson et al. (1999) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตาเดียว (*Pleuronectes ferrugineus*) โดยใช้หลอดฟางที่มีขนาดต่างกัน 2 ขนาด คือ 0.25 มิลลิลิตร และ 1.7 มิลลิลิตร พบว่าอัตราการปฏิสนธิเมื่อนำน้ำเชื้อสดเทียบกับน้ำเชื้อที่ถูกเก็บไว้ในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร และ หลอดฟางขนาด 1.7 มิลลิลิตร มีค่าเป็น 59 เปอร์เซ็นต์ 54 เปอร์เซ็นต์และ 64 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และอัตราการฟักเมื่อเทียบกับน้ำเชื้อสด มีค่าเป็น 52 เปอร์เซ็นต์ 42 เปอร์เซ็นต์และ 36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ Zhang et al. (2003) ได้ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตาเดียว (*Paralichthys olivaceus*) ด้วย extender 6 สูตร คือ NaCl, KCl, CaCl, MgCl, $MgSO_4$ และ $NaHCO_3$ และใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด คือ DMSO, Glycerol และ methanol ในอัตราส่วนน้ำเชื้อ:น้ำยา เท่ากับ 1:2 โดยอัตราการลดอุณหภูมิที่สุดท้ายนั้นแตกต่างกันคือ -15, -40, -80, -110 และ -160 องศาเซลเซียสต่อนาที แล้วเก็บในไนโตรเจนเหลวนาน 5 นาที เมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่ 28 องศาเซลเซียส พบว่า glycerol ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ การปฏิสนธิ และการเพาะฟักดีที่สุด

Glogowski et al. (2002) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา sturgeon (*Acipenser baeri,* Brandt) แบบแช่แข็ง ด้วยน้ำยา 3 สูตร คือ tris-sucrose-KCl, tris-NaCl และ tris-sucrose และผสมด้วย methanol 10% โดยใช้หลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยใช้อัตราส่วนน้ำเชื้อ:น้ำยาเท่ากับ 1:1 พบว่าสารบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการแช่แข็ง คือ tris-sucrose-KCl และ tris-NaCl โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 3.5 องศาเซลเซียสต่อนาที และลดอุณหภูมิมาถึงอุณหภูมิสุดท้ายที่ -15 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำมาละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 6 วินาที โดยตรวจพบว่าให้อัตราการฟักสูงเมื่อเทียบกับ น้ำเชื้อสด

Ji et al. (2004) ทำการแช่แข็งสเปิร์มของปลากะพง (*Lateolabrax japonicus*) โดยนำสเปิร์มที่เจือจางใน Modified Plaice Ringer Solution (MPRS) เติม 10% DMSO ผสมให้เข้ากัน แล้วนำมาวางไว้เหนือผิวหน้าของไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร นาน 10 นาที พบว่า สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ 68.3% และสเปิร์มที่แช่ไนโตรเจนเหลวนาน 3 วัน มีอัตราการปฏิสนธิ 84.8% และอัตราการฟัก 70.1% ในขณะที่สเปิร์มที่แช่ไนโตรเจนเหลวนาน 1 ปี มีอัตราการปฏิสนธิ 83.5% และการฟัก 90% ตามลำดับ

Vuthiphandchai et al. (2009a) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*) ด้วยการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆกันได้แก่ DMSO, propylene glycol, ethylene glycol, ethanol และ methanol โดยเจือจางน้ำเชื้อในสารละลาย Ringer solution ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที แล้วลดอุณหภูมิมาถึงอุณหภูมิสุดท้ายที่ -40 หรือ -80°C ด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5, -10 หรือ -12°C/นาที ก่อนนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวพบว่า การใช้ 10% DMSO ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงแดงในอัตราการลดอุณหภูมิ -10°C/นาทีมาถึงที่อุณหภูมิสุดท้าย -80°C ให้ค่าเปอร์เซนต์สเปิร์มที่เคลื่อนที่ และเปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตมีค่าสูงสุดเท่ากับ 91.1% และ 92.7% ตามลำดับ

การลดอุณหภูมิ (freezing) ซึ่งเป็นขั้นตอนหนึ่งของการแช่แข็ง มีผลทำให้ของเหลวที่อยู่รอบ ๆ เซลล์ และภายในเซลล์ค่อย ๆ แข็งตัว ในขณะที่ทำการลดอุณหภูมิ ของเหลวภายนอกเซลล์จะเป็นน้ำแข็งก่อนของเหลวภายในเซลล์ ทำให้ความเข้มข้นของตัวถูกละลายภายนอกเซลล์สูงกว่าภายในเซลล์ จึงทำให้น้ำแพร่ออกจากเซลล์เพื่อปรับสมดุล ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิช้าเกินไปจะทำให้เซลล์ต้องปรับตัวนานเกินไป ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อเซลล์เพราะมีการสูญเสียน้ำและความเข้มข้นของสารละลายสูงเกินไปอาจทำให้ตกผลึก ดังนั้นการเหนี่ยวนำให้เกิดผลึกน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว (seeding) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำมากเกินไป ทำได้โดยใช้ปากคีบที่เย็นจัดที่แช่ในไนโตรเจนเหลว (-196ºC) มากรีดหลอดน้ำเชื้อที่ลดอุณหภูมิลงถึงประมาณ -5 หรือ -7ºC ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิเร็วเกินไปจะทำให้น้ำไหลออกจากเซลล์เร็วเกินไปอาจทำให้เซลล์เหี่ยว และเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ทิ่มแทงเซลล์และเยื่อหุ้มออการ์แนลล์ทำให้เซลล์ได้รับอันตรายได้ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) ดังนั้นจะเห็นว่าอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมมีความสำคัญต่อการ

รอดชีวิตของเซลล์ อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้นคือ อัตราการลดอุณหภูมิที่พอเหมาะเพื่อให้น้ำถูกดึงออกจากเซลล์อย่างต่อเนื่องจะป้องกันการเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ หรือเกิดขึ้นได้น้อย (Seidel, 1984)

การเพิ่มอุณหภูมิ (thawing) เป็นสิ่งจำเป็นของขั้นตอนที่นำเซลล์ที่แช่แข็งมาใช้ประโยชน์อีกครั้ง ซึ่งขณะทำการละลายเซลล์ โดยการเพิ่มอุณหภูมิ เกล็ดน้ำแข็งที่อยู่ภายนอกเซลล์จะละลายก่อน น้ำจากภายนอกเซลล์ย่อมจะแพร่เข้าสู่ภายในเซลล์ และขนาดของเซลล์จะเพิ่มขึ้นหลังการละลาย ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิไม่เหมาะสม อาจทำให้เซลล์ปรับสภาพไม่ทันหรืออาจทำให้เซลล์แตกได้ และประสบความล้มเหลวจากการแช่แข็ง (Wayman and Tiersch, 2000)

4. สารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant)

สารไครโอโพรเทคแทนท์มีความจำเป็นในการแช่แข็งเซลล์ทุกชนิด เพราะทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เกิดเกล็ดน้ำแข็ง (ice crystal) ภายในเซลล์ในระหว่างการลดอุณหภูมิที่ต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส ซึ่งน้ำจะแข็งตัว แต่การเลือกใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้งในประเด็นของชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสมจะทำให้ไม่เกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ขณะทำการลดอุณหภูมิ ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดเมื่อนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลลเซียสต่อไป ดังนั้นสารไครโอโพรเทคแทนท์ จึงเป็นสารเคมีที่ป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อเสียหายในระหว่างการแช่แข็ง ซึ่งไครโอโพรเทคแทนท์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

4.1) สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ (intracellular cryoprotectant) ได้แก่ dimethylsulfoxide (DMSO), glycerol, methanol, ethanol propylene glycol และ 1-2 propanediol เป็นต้น สารเคมีเหล่านี้มีความสามารถในการซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายไม่ให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งขณะแช่แข็ง ซึ่งความสามารถในการซึมเข้าเร็วหรือช้าก็ขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของสาร (molecular weight) ความเข้มข้น ระยะเวลา และอุณหภูมิขณะทำการใส่สารสารไครโอโพรเทคแทนท์เข้าไปในเซลล์ที่ต้องการแช่แข็ง โดยทั่วไปหากพิจารณาถึงความสามารถในการแพร่เข้าสู่ภายในเซลล์จะพบว่า alcohol มีอัตราการแพร่เข้าสู่เซลล์เร็วที่สุด เนื่องจากมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดอื่นๆ ดังนั้นการพัฒนา protocol แช่แข็งน้ำเชื้อจึงต้องเริ่มจากการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์นั้นๆก่อนการพัฒนา protocol การแช่แข็งต่อไป

ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งโดยทั่วไปนิยมใช้ DMSO, glycerol และ ethylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ คิดเป็น 98, 50 และ 29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Tiersch, 2000) โดยที่ glycerol เป็นสารเคมีชนิดแรกที่นำมาใช้เพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าว การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็ง มักจะพบว่า DMSO ให้ผลการเก็บรักษาดีที่สุด เช่นการทดลองของ Vuthiphandchai et al. (2009a);

4.2) สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ (extracellular cryoprotectant) ได้แก่ sucrose, polyvinyl pyrrolidone(PVP), hydroxylethyl starch (HES), dextrans, albumin และ polyethylene glycol เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้ไม่สามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ เนื่องจากมีขนาดใหญ่ โดยน้ำหนักโมเลกุลจะสูง แต่สามารถนำมาใช้ร่วมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ในการแช่แข็งเซลล์ เพื่อเป็นตัวปรับแรงดันออสโมติก และทำหน้าที่เป็นไครโอโพรเทคแทนท์ร่วมกัน เช่น การทดลองของ Ciereszko and Dabrowski (1996) ในปลา rainbow trout (*Oncoryhnchus mykiss*) พบว่าการใช้ sucrose ร่วมกับ DMSO เป็นไครโอโพรเทคแทนท์ให้ผลดีที่สุด โดยมีอัตราการฟักตัวอ่อนถึงระยะ eye stage สูงถึง 90%

การใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 2 ชนิดร่วมกันนั้นให้ผลดีกว่าที่จะใช้สารตัวใดตัวหนึ่งในสัตว์บางชนิด โดยจะช่วยให้เกิดการดึงน้ำจากเซลล์อย่างค่อยเป็นค่อยไป เป็นการลดปัญหาอันตรายที่อาจเกิดเนื่องจากการเปลี่ยนความดันออสโมซิส เนื่องจากน้ำถูกดึงออกจากเซลล์หรือเข้าสู่เซลล์เร็วเกินไป เช่นในรายงานการแช่แข็งปลา rainbow trout พบว่า การใช้ DMSO กับ Sucrose ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 30°C/ นาที ให้ผลดีกว่าการใช้ DMSO อย่างเดียว (Conget et al., 1996) นอกจากการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 2 ชนิดร่วมกันได้ผลดีในสัตว์ขนาดเล็ก และสัตว์ขนาดใหญ่ เช่น โคนมก็มีความก้าวหน้าในการใช้สาร 2 ชนิดร่วมกัน ซึ่งการแช่แข็ง ตัวอ่อนโคนมพัฒนาไปมาก มีการปรับใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ร่วมกันหลายชนิดเช่น ในปัจจุบันมีสารป้องกันการแข็งตัวที่เรียกว่า vitrified solution ซึ่งสารนี้ประกอบด้วยสารป้องกันการแข็งตัวหลายชนิด (มนต์ชัย ดวงจินดา และคณะ, 1995) การพัฒนาหาชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ได้มีการปรับเปลี่ยนเพื่อให้ได้สารที่เหมาะสม และสารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิดก็ยังมีความเป็นพิษแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด และในแต่ละระยะการพัฒนาก็สามารถทนต่อความเป็นพิษต่างกันดังรายงานของ Newton and Subramonium (1996) ได้รายงานว่า ตัวอ่อนกุ้งตระกูล penaeid ในระยะ nauplii ทนต่อสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเข้มข้นสูงเมื่อเทียบกับระยะ morula

อย่างไรก็ตาม กลไกการทำงานของสารไครโอโพรเทคแทนท์เหล่านี้ในการปกป้องเซลล์ยังมีการศึกษาน้อยมาก เนื่องจากสารเคมีเหล่านี้มีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ต่างกัน และต้องศึกษาดูในระดับเซลล์ แต่ก็เป็นที่เข้าใจกันดีว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์เหล่านี้มีผลต่อคุณสมบัติของของเหลวทั้งภายในและภายนอกเซลล์ คือ มีผลต่อแรงดันไอ (vapor pressure) และจุดเยือกแข็ง (freezing point) และช่วยปรับแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ของของเหลวภายในและภายนอกเซลล์ ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าว จะช่วยให้เซลล์รอดชีวิตภายหลังการแช่แข็งได้ เพราะสารไครโอโพรเทคแทนท์ช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ และป้องกันไม่ให้เซลล์มีขนาดเซลล์ที่ลดลงมากเกินไป (cell injury) อันเนื่องจากน้ำที่สูญเสียออกนอกเซลล์ระหว่างการลดอุณหภูมิ ซึ่งจะไม่ทำให้เซลล์มีค่าแรงดันออสโมติกที่สูงจนเกินไป (solute effect)

กลไกที่สารไครโอโพรเทคแทนท์สามารถป้องกันอันตรายให้แก่เซลล์ได้ เนื่องจากสารไครโอโพรเทคแทนท์มีคุณสมบัติโดยสรุปดังนี้

1. สามารถป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ โดยทำให้ของเหลวแข็งตัวช้าลงและทำให้น้ำในเซลล์มีน้อยลง

2. ป้องกันการลดขนาดของเซลล์ โดยสารไครโอโพรเทคแทนท์แพร่เข้าสู่เซลล์ไปแทนที่น้ำในเซลล์ที่แพร่ออกจากเซลล์ เพราะความแตกต่างของแรงดันออสโมติกที่เปลี่ยนไป เนื่องจากการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายนอกเซลล์ก่อนที่ของเหลวภายในเซลล์จะแข็งตัว

3. ช่วยป้องกันอันตรายเนื่องจากความไม่สมดุลของเกลือแร่และอิเล็กโตรไลท์

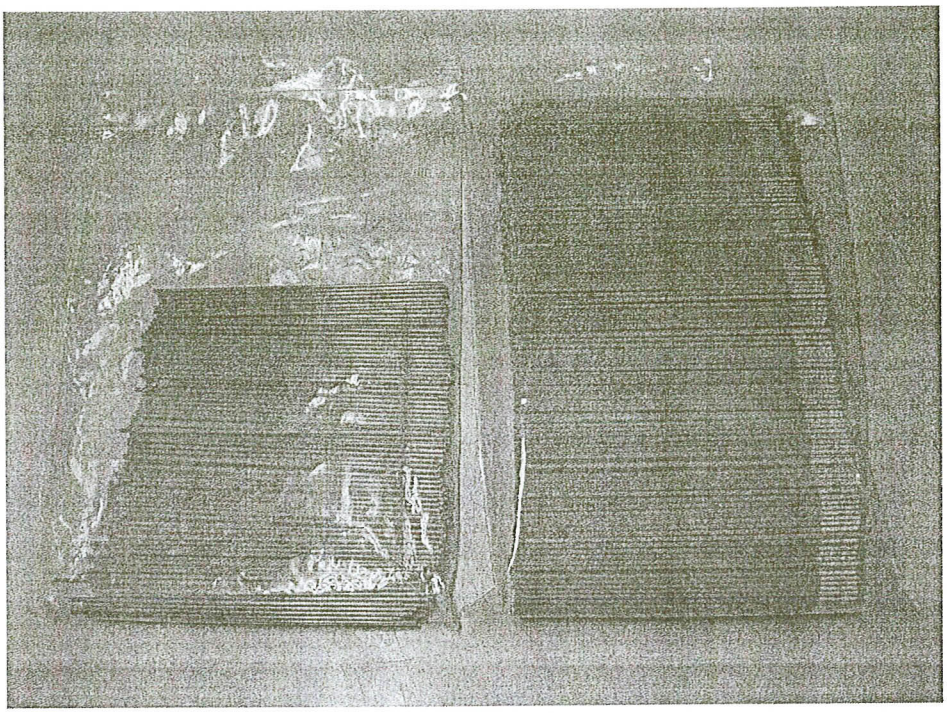
4. ช่วยคงไว้ซึ่งคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

โดยทั่วไปช่วงเวลาหลังจากการผสมน้ำเชื้อกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ก่อนทำการแช่แข็ง (equilibration time) ในสมัยแรกๆนิยมนำหลอดบรรจุน้ำเชื้อที่ผสมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์เก็บไว้ในตู้เย็นระยะหนึ่ง ซึ่งจะแตกต่างกันไปในปลาแต่ละชนิดทั้งในการเลือกใช้อุณหภูมิและระยะเวลานานเท่าใดในการแช่เย็นก่อนทำการแช่แข็ง การทดลองส่วนใหญ่มักจะแสดงถึงความสัมพันธ์ของ equilibration time กับระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ และอุณหภูมิขณะให้เซลล์ปรับตัวก่อนเริ่มการแช่แข็ง การแช่แข็งเซลล์ หรือน้ำเชื้อในขณะที่ปล่อยให้เซลล์ หรือน้ำเชื้อปรับตัวอยู่นั้นก็จำเป็นต้องลำเลียงเซลล์ หรือน้ำเชื้อมาใส่ในภาชนะที่เหมาะสม ซึ่งชนิดและขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อมีหลายขนาดเช่น 0.25 มิลลิลิตร 0.5 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิลิตร เป็นต้น สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสามารถใช้หลอดที่มีความจุอย่างน้อย 0.25 มิลลิลิตรขึ้นไป เพราะต้องนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปผสมกับไข่ปลาจำนวนมากภายหลังการละลาย จึงต้องให้มีจำนวนอสุจิมากพอต่อการผสม ภาชนะที่ใช้บรรจุน้ำเชื้อปลาที่ต้องการแช่แข็งมีอยู่หลายแบบ ได้แก่ หลอดฟาง (French straw) หลอดฉีดยา (ampoule) และหลอดไครโอไวออล (cryovial) เป็นต้น ซึ่งหลอดแต่ละชนิดมีข้อดี ข้อเสียแตกต่างกันไป ผู้ใช้สามารถเลือกใช้ตามความเหมาะสมของชนิดของน้ำเชื้อที่จะทำการเก็บ และวัตถุประสงค์ในการจัดเก็บว่าจะเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อการเพาะขยายพันธุ์ปลา หรือการอนุรักษ์พันธุ์ปลาที่หาได้ยาก ใกล้สูญพันธุ์ หรือจัดเก็บรักษาน้ำเชื้อในลักษณะของธนาคารน้ำเชื้อ (sperm bank) เป็นต้น

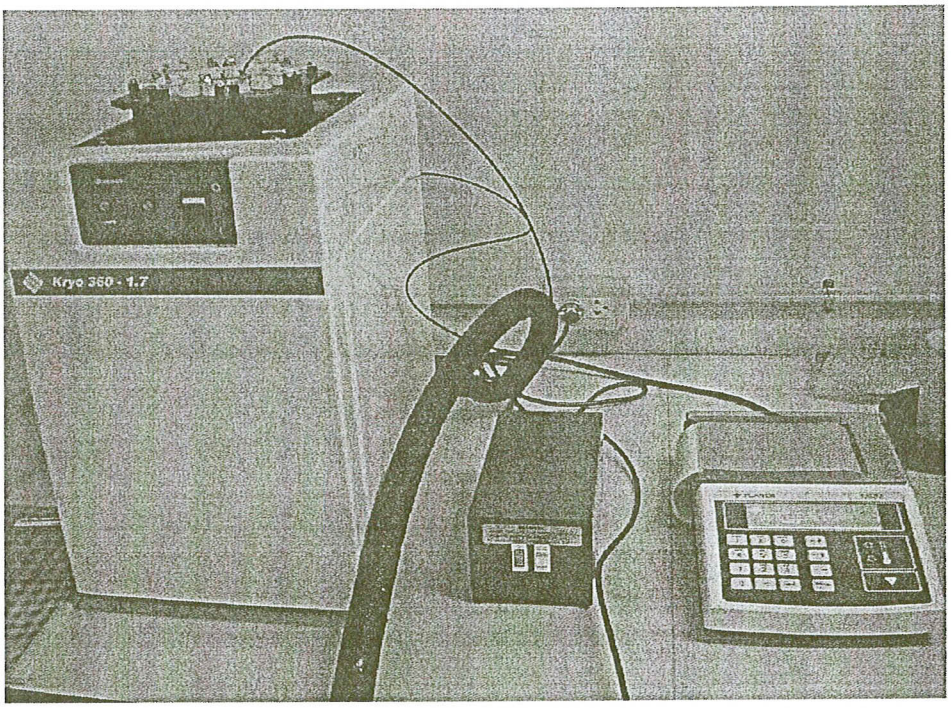
การเก็บน้ำเชื้อในระยะแรกนิยมเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งในรูปแบบน้ำเชื้อที่เป็นเม็ด (pellet) โดยดูดน้ำเชื้อปลาที่ต้องการแช่แข็งที่ขณะนี้ได้เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (extended milt) มาผสมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ในอัตราส่วนที่เหมาะสม แล้วปล่อยพักไว้ช่วงเวลาหนึ่ง แล้วหยดลงบนน้ำแข็งแห้ง (dry ice) ที่มีอุณหภูมิ -79 องศาเซลเซียส ที่ได้เจาะเป็นรูให้มีขนาดตามที่ต้องการ แล้วปล่อยไว้บนน้ำแข็งแห้งจนน้ำเชื้อแข็งตัว หลังจากนั้นนำไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสต่อไป (Ciereszko et al. 2000) อย่างไรก็ตามการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในลักษณะ

เป็นเม็ดไม่ได้รับความนิยมเท่าที่ควร เนื่องจากการเก็บรักษาในลักษณะเป็นเม็ดมีความยุ่งยากในการเก็บรักษา และการนำมาละลายเพื่อใช้ประโยชน์ในภายหลัง และการลดอุณหภูมิก็ไม่สามารถควบคุมให้เร็ว หรือช้าได้ตามที่ต้องการเพราะใช้น้ำแข็งแห้งที่เย็นจัดในการทำให้น้ำเชื้อที่อยู่ด้านในแข็งตัวเท่านั้น ดังนั้นการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในระยะต่อมาจึงได้มีการแช่แข็งในภาชนะขนาดต่างๆกัน (รูปที่ 6) และแช่แข็งด้วยเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer; รูปที่ 7) เพื่อทำให้การจัดเก็บและการประยุกต์ของน้ำเชื้อที่อยู่ในภาชนะมีความสะดวกขึ้นและสามารถเลือกใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดปลา

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาแม้ว่าจะมีประโยชน์หลายประการ เช่นช่วยทำให้มีน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีคุณภาพดีถูกเก็บรักษาเอาไว้เพื่อนำมาผสมเทียมในภายหลัง ช่วยลดพื้นที่การเลี้ยงพ่อพันธุ์ในโรงเพาะฟัก ช่วยในการอนุรักษ์สายพันธุ์ปลาบางชนิดโดยนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาผสมเทียมกับแม่ปลาในภายหลัง ช่วยต่อยอดงานวิจัยด้านพันธุกรรมปลา โดยสามารถนำน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ปลาที่ได้มีการคัดเลือกหรือปรับปรุงพันธุ์เอาไว้มาใช้เพาะพันธุ์ในภายหลัง ช่วยทำให้การลำเลียงน้ำเชื้อระหว่างฟาร์มปลาในประเทศ หรือต่างประเทศมีความสะดวกขึ้น ช่วยส่งเสริมการจัดตั้งธนาคารน้ำเชื้อสำหรับปลาบางชนิดที่ใกล้สูญพันธุ์ หรือหาได้ยาก และช่วยทำให้ยีน (gene) ของสัตว์น้ำบางชนิดที่มีความสำคัญสามารถเก็บรักษาเอาไว้เป็นเวลานานๆทั้งเพื่อประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์น้ำ อย่างไรก็ตามการทำเทคโนโลยีดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ก็ต้องพิจารณาความคุ้มทุน หรือพิจารณาว่าเป็นเทคโนโลยีที่เหมาะสมสำหรับผู้ประกอบการหรือไม่ เช่น ผู้ประกอบการขนาดใหญ่อาจมีความสามารถในการจัดซื้อเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติที่มีราคาแพงมาแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเพื่อประโยชน์เชิงการค้าอย่างคุ้มทุนสำหรับน้ำเชื้อปลาที่มีความต้องการของผู้เพาะพันธุ์สูงได้ เนื่องจากน้ำเชื้อแช่แข็งสามารถนำมาผสมกับไข่ได้มีประสิทธิภาพไม่ต่างจากน้ำเชื้อสด ทำให้การจัดการฟาร์มระหว่างการเพาะพันธุ์ทำได้สะดวกรวดเร็ว แต่ผู้ประกอบการขนาดกลางหรือขนาดเล็กที่มีเงินลงทุนไม่มากคงไม่สามารถซื้อเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติมาใช้ได้ ดังนั้นการพัฒนาการแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำจึงต้องมีการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้ออย่างง่ายๆ ใช้เทคโนโลยีที่ไม่สลับซับซ้อน แต่มีราคาถูกและมีประสิทธิภาพสูง ก็จะทำให้ผู้ประกอบการขนาดกลาง หรือขนาดเล็กสามารถใช้เทคโนโลยีนี้ได้โดยยังคงมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำได้ แนวทางหนึ่งที่สามารถทำได้ในการแช่แข็งอย่างง่ายๆ สามารถทำได้โดยแช่แข็งน้ำเชื้อในไอไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapor) โดยนำหลอดบรรจุน้ำเชื้อมาลดอุณหภูมิเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวภายในถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) หรือภาชนะที่เหมาะสมที่สามารถเทไนโตรเจนเหลวลงไปได้โดยไม่เกิดอันตราย ซึ่งความเย็นของไอไนโตรเจนเหลวจะทำให้น้ำเชื้อค่อยๆแข็งตัว ซึ่งก็สามารถนำไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวได้ต่อไป การแช่แข็งน้ำเชื้ออย่างง่ายๆมีประโยชน์ในด้านต้นทุนการผลิตที่ต่ำ แต่จำเป็นต้องมีการศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องในการแช่แข็งน้ำเชื้อก่อนการนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป



รูปที่ 6 หลอดฟาง (French straw) ที่นิยมใช้แช่แข็งน้ำเชื้อปลา



รูปที่ 7 เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer)

4. สารละลายเอ็กซ์เทนเดอร์ (extender)

สารละลายเอ็กซ์เทนเดอร์ หรือสารละลายบัฟเฟอร์ คือ น้ำยาที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลา (milt) ก่อนการนำน้ำเชื้อปลามาแช่แข็ง โดยที่เป็นสารละลายที่มีความสำคัญในการช่วยคงสภาพความมีชีวิตของเซลล์ในระหว่างการแช่เย็น (Graybill & Horton, 1969) ระยะสั้นๆก่อนการแช่แข็ง จึงเป็นสารละลายที่ช่วยคงสภาพความมีชีวิตของเซลล์สเปิร์มก่อนและระหว่างการแช่แข็ง สารละลายเอ็กซ์เทนเดอร์ ช่วยเจือจางน้ำเชื้อให้มีปริมาณมากขึ้น (extended milt) เพื่อสะดวกในการปฏิบัติการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา ดังนั้นสารละลายเอ็กซ์เทนเดอร์ที่ดีจะต้องไม่ส่งผลกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ เพราะถ้าสเปิร์มถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ก่อนการแช่แข็งน้ำเชื้อ ก็ไม่มีประโยชน์ที่จะนำไปแช่แข็งและเก็บรักษาต่อไป โดยทั่วไปส่วนประกอบทางเคมีของสารละลายเอ็กซ์เทนเดอร์ควรประกอบด้วยอิออน หรือแร่ธาตุชนิดต่างๆที่ใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเลือด (seminal Plasma) และน้ำยาต้องมีค่าแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ใกล้เคียงกับค่าแรงดันออสโมติกของน้ำเลือด อย่างเช่น สัตว์น้ำจืด Extender ที่ใช้ควรมีค่าออสโมลาริตี้ 280-300 mOsmol/kg ส่วนสัตว์น้ำเค็มควรใช้ Extender ที่มีค่าออสโมลาริตี้ 200-300 mOsmol/kg (Wayman and Tiresch, 2000)

การหา extender ที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญในการแช่เย็นและแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำ เนื่องจากสตว์น้ำแต่ละชนิดจะมีค่าออสโมลาลิตี้ในเซลล์และส่วนประกอบของแร่ธาตุในเซลล์ต่างกันจึงต้องเลือกใช้ extender ที่ต่างกันด้วย ดังเช่นในสเปิร์มของปลาและหอยที่สเปิร์มมีการเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้น จึงใช้สาร extender เฉพาะสำหรับแต่ละชนิด เช่น หอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis diversicolor supertexa*) (Gwo et al., 2002) และหอยนางรม (*Crassostrea virginica*) (Paniagua-Chavez and Tiersch, 2001) ใช้ Extender ที่มีชื่อว่า Artificial Seawater อย่างไรก็ตามสเปิร์มของกุ้ง และปูไม่เคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นก็ต้องใช้สาร extender ที่เหมาะสมในการแชแข็งถุงน้ำเชื้อ (spermatophore) เช่นกันเช่น กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ได้มีการศึกษาในเรื่องของ extender พบว่าสารละลาย Ca-Free Saline ไม่มีผลต่อรูปร่างของสเปิร์ม นอกจากนี้ extender ประกอบด้วยสารเคมีที่ทำหน้าที่ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง เป็นแหล่งพลังงาน และสารเคมีบางตัวทำหน้าที่ต้านหรือทำลายพิษจากของเสียที่ขับถ่ายออกมาจากเซลล์ หรือมีส่วนประกอบที่เป็นยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

5. การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลา

โดยทั่วไปสเปิร์มจะไม่เคลื่อนที่เมื่ออยู่ในเซมินอล ฟลูอิด (seminal fluid) แต่จะเคลื่อนที่ปราดเปรียวเมื่ออยู่ในน้ำ โดยที่สเปิร์มของสัตว์น้ำแต่ละชนิดสามารถเคลื่อนที่ได้นานแตกต่างกันไปตามชนิดและสภาพแวดล้อม การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อของสัตว์น้ำ ทำให้ทราบถึงความ

สมบูรณ์เพศของพ่อพันธุ์สัตว์น้ำที่จะนำมาเพาะพันธุ์ว่ามีความเหมาะสมมากน้อยเพียงไร โดยวิธีประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสัตว์น้ำมี 5 วิธีดังนี้ คือ

1. ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ

การประเมินน้ำเชื้อสัตว์น้ำโดยวิธีนี้ทำโดยการรีดน้ำเชื้อออกมาจากสัตว์น้ำ แล้วสังเกตดู สี ความเข้มข้น ปริมาตร และสิ่งเจือปนอื่น ๆ ซึ่งน้ำเชื้อที่ดีควรมี สีขาวขุ่น ไม่มีสิ่งเจือปนไม่ว่าจะเป็นเมือก หรือปัสสาวะ (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

2. การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสามารถพิจารณาได้ในแง่เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ โดยทำการสุ่มนับจำนวนสเปิร์มภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยกำหนดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเป็น 6 ระดับ คือ น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% ตามลำดับ (Vuthiphandchai and Zohar, 1999) การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มด้วยวิธีนี้ แม้ว่าจะมีความเที่ยงตรงไม่เท่าการใช้เครื่องมือตรวจวัดการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม แต่ก็สามารถประเมินได้ดีในระดับหนึ่ง และนิยมใช้ในโรงเพาะฟักทั่วไป เพื่อทดแทนการประเมินที่ใช้เครื่องมือตรวจวัดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่มีราคาแพงมาก

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อวิธีนี้ เป็นวิธีที่ได้ผลเร็วแต่ผลที่ได้ไม่แน่นอนถ้าใช้คนประเมินต่างกัน และยังมีปัญหาว่าสเปิร์มปลาน้ำจืดที่เคลื่อนที่ในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ เช่น ปลา Razorback Sucker สเปิร์มเคลื่อนที่ไม่ถึง 10 วินาที จะทำการประเมินได้ยาก (Wayman and Tiersch, 2000) ส่วนปลาทะเลไม่ค่อยพบกับปัญหาเท่าใด เพราะสเปิร์มเคลื่อนที่ได้นานกว่าสเปิร์มปลาน้ำจืด ทำให้ประเมินได้ง่ายกว่า อย่างไรก็ตามสเปิร์มของพวกครัสเตเชียนหลายชนิด เช่น กุ้งและพวกเดคาปอด (Decapod) อื่น ๆ ไม่มีการเคลื่อนที่ ทำให้การประเมินโดยใช้การเคลื่อนที่กับสัตว์เหล่านี้ จึงไม่สามารถทำได้ (Lezcano, Granja, & Salazar, 2004) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการประเมินน้ำเชื้อโดยดูการเคลื่อนที่ จึงไม่สามารถประเมินกับสเปิร์มสัตว์น้ำทุกชนิด เช่นกุ้งทะเลหลายชนิดนั้นสเปิร์มไม่มีการเคลื่อนที่เมื่อออกมานอกตัว จึงไม่สามารถประเมินจากการเคลื่อนที่ได้ต้องใช้การประเมินโดยวิธีอื่น ซึ่งวิธีหนึ่งที่สามารถประเมินน้ำเชื้อได้คือการย้อมสี

3. การย้อมสีสเปิร์ม

วิธีนี้เป็นการตรวจดูสเปิร์มที่มีชีวิตและสเปิร์มที่ไม่มีชีวิต (Live-dead sperm) โดยวิธีนี้มีหลักการคือ สีพิเศษบางชนิดเมื่อนำมาย้อมน้ำเชื้อแล้ว สเปิร์มที่ตายจะดูดซับสีย้อมเข้าไปในเซลล์ ทำให้ติดสีม่วง ในขณะที่สเปิร์มที่มีชีวิตจะไม่ดูดซึมสีย้อมเข้ามาภายในเซลล์ เนื่องจากสเปิร์มที่มีชีวิตจะมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่ไม่ยอมให้สีย้อมผ่านเข้ามาในเซลล์ได้ ทำให้เซลล์สเปิร์มที่มีชีวิตจึงไม่ติดสีย้อม

โดยทั่วไปสีย้อมที่นิยมใช้คือ สีอิโอซิน (eosin) ผสมกับสีอื่น ๆ ที่นิยมใช้มีอยู่ 2 ชนิด คือ สีอิโอซิน-นิโกรซิน (eosin-nigrosin) และ อิโอซิน- ฟาสท์กรีน (eosin-fast green FCF) นำมาใช้ได้ผลดีสำหรับน้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยาที่ไม่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ สำหรับน้ำยาที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ เช่น มีไข่แดงหรือนมผง ไขมันในน้ำยาจะทำให้เกิดการติดสีที่ไม่สม่ำเสมอ การนับสเปิร์มที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตจะทำได้ไม่ถูกต้อง การย้อมสเปิร์มโดยใช้สี eosin-nigrosin สเปิร์มที่มีชีวิตจะไม่ติดสีย้อม จึงเห็นสเปิร์มเป็นสีขาว ส่วนสเปิร์มที่ตายแล้วจะติดสีย้อม (Fribourgh, 1966)

การประเมินคุณภาพของน้ำเชื้ออีกวิธีหนึ่งคือการตรวจหาความสามารถของน้ำเชื้อในการผสมกับไข่ โดยนำไข่มาปฏิสนธิกับสเปิร์มแล้วดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่มีการปฏิสนธิ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

4. ความหนาแน่นของสเปิร์ม

การประเมินในลักษณะนี้เป็นการนับจำนวนสเปิร์มต่อหน่วยปริมาตร (sperm concentration) ที่มีในน้ำเชื้อสด ที่ได้รวบรวมออกจากพ่อพันธุ์ เพื่อให้ทราบความหนาแน่นของสเปิร์มว่ามีมากน้อยเพียงไร เหมาะสมหรือไม่ที่จะนำพ่อพันธุ์มารีดน้ำเชื้อต่อไป การประเมินทำโดยเจือจางน้ำเชื้อสดด้วยน้ำกลั่น หรือสารละลายที่เหมาะสม ในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำกลั่นแตกต่างกันไปตามชนิดของปลาตั้งแต่ 1:10 ถึง 1:5000 แล้วจึงผสมเข้าด้วยกัน และตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้สเปิร์มหยุดเคลื่อนที่ ใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วใส่อุปกรณ์สำหรับนับเม็ดโลหิตแดง (RBC counting chamber หรือ haemacytometer) ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วนำมานับจำนวนสเปิร์มด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x โดยคำนวณกลับหาความหนาแน่นของสเปิร์ม อย่างไรก็ตามความหนาแน่นของสเปิร์มก็ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ เช่น ฤดูกาล ความเครียด และอาหาร เป็นต้น ซึ่งก็สามารถประเมินได้อย่างคร่าวๆว่าน้ำเชื้อมีคุณภาพดีมากน้อยเพียงไร

5. ความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อวิธีนี้ให้ผลเที่ยงตรงที่สุด ที่สะท้อนให้เห็นถึงคุณภาพสเปิร์มอย่างแท้จริง เพราะสเปิร์มที่มีคุณภาพดี สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ดี อย่างไรก็ตามความสามารถของสเปิร์มในการปฏิสนธิกับไข่นั้นแม้ว่าสเปิร์มจะมีคุณภาพดีเพียงไรถ้าปฏิสนธิกับไข่ที่มีคุณภาพไม่ดี ก็ทำให้อัตราการปฏิสนธิต่ำเช่นกัน นอกจากนี้การปฏิสนธิระหว่างไข่และสเปิร์มใช้เวลานาน เพราะต้องกระตุ้นให้แม่พันธุ์สัตว์น้ำตกไข่ แล้วนำไข่มาผสมเทียมกับสเปิร์ม ซึ่งกว่าไข่จะฟักเป็นลูกสัตว์น้ำวัยอ่อนก็ใช้เวลาหลายชั่วโมง หรือหลายวันขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์น้ำ ทำให้การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อด้วยวิธีนี้ นิยมใช้ประเมินในขั้นสุดท้ายการศึกษา หรือการทดลอง