บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปลาดุกลำพัน (*Clarias nieuhofii*) เป็นปลาน้ำจืดในสกุลเดียวกับปลาดุกที่นิยมเลี้ยงกันโดยทั่วไป เช่นปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ปลาดุกด้าน (*Clarias batrachus*) และปลาดุกอัฟริกัน (*Clarias gariepinus*) แต่มีรสชาติดีและมีราคาแพงกว่าปลาดุกชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ ลำตัวมีสีและลายที่สวยงามคือ ลำตัวมีสีน้ำตาลแดง ข้างลำตัวมีจุดสีขาว เรียงเป็นแถวตามขวางประมาณ 13–14 แถว จึงมีการเลี้ยงเป็นปลาสวยงามอีกด้วย ทำให้มีการจับในอัตราสูง ประกอบกับปลาดุกลำพันเป็นปลาที่อาศัยอยู่ในที่ที่มีลักษณะค่อนข้างจำเพาะคืออาศัยอยู่บริเวณป่าพรุทางภาคใต้ และภาคตะวันออกของประเทศไทย ซึ่งพื้นที่มีสภาพน้ำขัง สภาพน้ำเป็นกรด ปัจจุบันระบบนิเวศป่าพรุเปลี่ยนแปลงไปประชากรของสิ่งมีชีวิตรวมทั้งประชากรของปลาดุกลำพันที่อาศัยอยู่ในบริเวณนั้นมีจำนวนลดลงมากจนถูกจัดเป็นปลาที่มีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ (vulnerable) (สำนักนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม, 2540) สาขาวิทยาศาสตร์การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ประสบความสำเร็จในการเพาะพันธุ์ปลาดุกลำพัน และเล็งเห็นว่าปลาดุกลำพัน เป็นปลาอีกชนิดหนึ่งที่สามารถเพาะพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์เพื่อส่งเสริมให้เกษตรกรเลี้ยงเพื่อการบริโภคและเลี้ยงเป็นปลาสวยงามเชิงพาณิชย์ได้ แต่ปัญหาอย่างหนึ่งในการเพาะพันธุ์ปลาดุกลำพันคือ ปริมาณพ่อแม่พันธุ์มีอยู่อย่างจำกัด การจับพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติบางครั้งเพศผู้และเพศเมียมีการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ไม่พร้อมกัน ไม่สามารถนำมาผสมเทียมได้ และการผสมเทียมปลาดุกลำพัน ต้องฆ่าตัวผู้เนื่องจากไม่สามารถรีดน้ำเชื้อออกมาได้เหมือนปลาชนิดอื่น การผสมเทียมปลาดุกลำพันแต่ละครั้งเมื่อฆ่าปลาเพศผู้ หากมีน้ำเชื้อเหลือก็ต้องทิ้งหรือมีการใช้น้ำเชื้อเกินความจำเป็น จากข้อจำกัดดังกล่าว หากไม่มีวิธีการจัดการการเพาะพันธุ์ที่เหมาะสมหรือมีการใช้ประโยชน์จากพ่อแม่พันธุ์ไม่คุ้มค่า อาจส่งผลให้ปลาดุกลำพันสูญพันธุ์ได้ การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเป็นวิธีการหนึ่งที่ สามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ ทำให้การเพาะพันธุ์ปลามีความสะดวกและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น สามารถนำน้ำเชื้อมาใช้เพาะพันธุ์ได้ทันทีเมื่อปลาเพศเมียมีไข่แก่ ลดการตายของปลาเพศผู้จากการเพาะพันธุ์ในแต่ละครั้งและใช้น้ำเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด ประหยัดค่าขนส่งลำเลียงปลาเพศผู้จากแหล่งธรรมชาติ ประหยัดพื้นที่ แรงงานและค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงปลาเพศผู้ และสามารถนำน้ำเชื้อมาใช้ในการผสมข้ามสายพันธุ์ และแก้ปัญหาในปลาที่ใกล้สูญพันธุ์ได้ การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสามารถทำได้โดย วิธีการแช่เย็น (chilled storage) คือเก็บน้ำเชื้อปลาในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ (extender) ซึ่งเป็นน้ำยาที่ช่วยคงสภาพความมีชีวิตของเซลล์และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0 – 4 ^{o}C สามารถยืดอายุน้ำเชื้อได้ 7 – 10 วัน หรือวิธีการแช่แข็ง (cryopreservation) โดยนำน้ำเชื้อมาเติมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ และเติมสารปกป้องเซลล์ (cryoprotectant) ซึ่งเป็นสารที่ป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อเสียหายในระหว่างการแช่แข็ง และนำไปเก็บในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 ^{o}C วิธีการนี้สามารถเก็บน้ำเชื้อได้นานเป็นปี น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ

แต่ละสูตรจะมีความเหมาะสมกับน้ำเชื้อของปลาต่างชนิดกัน น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสมควรมีค่าออสโมลาลิตี (osmolality) ใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเชื้อปลา (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

ดังนั้นการวิจัยเพื่อหาสูตร น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกลำพัน จึงเป็นสิ่งสำคัญและมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เนื่องจากยังไม่มีการศึกษามาก่อน หากสามารถทดลองหา น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตรที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกลำพันได้สำเร็จ ทำให้การใช้ประโยชน์จากน้ำเชื้อปลาดุกลำพันให้คุ้มค่าที่สุด มีความสะดวกในการเพาะขยายพันธุ์มากขึ้น สามารถเพิ่มผลผลิตลูกพันธุ์ปลาดุกลำพันให้เพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภค และอนุรักษ์ปลาดุกลำพันไม่ให้สูญพันธุ์ไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1. เพื่อทดลองหาสูตรน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกลำพันโดยวิธีการแช่เย็นและวิธีการแช่แข็ง

1.2.2. เพื่อศึกษาอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกลำพันโดยวิธีการแช่เย็นและวิธีการแช่แข็ง

1.2.3. เพื่อเปรียบเทียบ อัตราการปฏิสนธิ อัตราการฟักไข่ปลาดุกลำพันจากการใช้น้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็ง

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ลักษณะด้านอนุกรมวิธานของปลาดุกลำพัน

ปลาดุกลำพันเป็นปลาไม่มีเกล็ด อยู่ในครอบครัวเดียวกับปลาดุกทั่วไป แต่แตกต่างที่ครีบหลัง ครีบหางและครีบก้นเชื่อมต่อกัน ขณะที่ปลาดุกทั่วไปครีบหลังดังกล่าวแยกออกจากกันชัดเจน ในประเทศไทย มีรายงานพบ 1 สกุล (genus) จำนวน 2 ชนิด (species) คือ *Prophagorus nieuhofii* (Cur & Val.) และ *P. catarectus* (Fowler) โดยที่ปลาในสกุลนี้ จะมีครีบหลัง ครีบก้น และครีบหาง ติดต่อกันเป็นพืด โดยที่ตรงปลายของครีบไม่แยกออกจากกัน และปลา 2 ชนิดนี้แตกต่างกันที่ *Prophagorus nieuhofii* จะมีครีบหลัง ครีบก้น และครีบหาง ติดต่อกัน แต่ตอนปลายของครีบทั้ง 3 แยกออกจากกันอย่างเห็นได้ชัด ความลึกของลำตัวประมาณ 1ใน 8.0–9.3 เท่าของความยาวมาตรฐาน ครีบหลังมีก้านครีบ 87–106 ก้าน ครีบก้นมี 69–95 ก้าน ฟันที่กระดูกส่วนกลางเพดานปากเป็นแถบโค้ง แต่บริเวณตรงกึ่งกลางของแถบยื่นยาวออกไปทางด้านหลัง พบที่จังหวัดพัทลุง และที่อำเภอหลังสวนจังหวัดชุมพร ในขณะที่ *P. catarectus* มีความลึกของลำตัว 6.5 เท่าของความยาวมาตรฐานและมีก้านครีบหลัง 54–67 ก้าน ก้านครีบก้น 51–54 ก้าน ฟันที่กระดูกส่วนกลางเพดานปากเป็นแถบโค้ง พบที่จังหวัดนครศรีธรรมราช (โสภา อารีรัตน์, 2513)

Tuegels (1986); Rainboth (1996); Lim and Ng (1999) เสนอว่าปลาดุกสกุล *Prophagorus* น่าจะเป็นปลาที่อยู่ในสกุล *Clarias* เนื่องจากลักษณะการติดกันของครีบหลัง ครีบก้น และครีบหาง ที่ใช้ในการจำแนกเป็นลักษณะที่ไม่แน่นอน โดยอาจเกิดจากปลายหางที่ได้รับความเสียหายจากการกัดกันเอง หรือจากสิ่งแวดล้อม จึงได้จัดปลาดุกลำพัน *Prophagorus nieuhofii* เป็นปลาชนิดเดียวกับ *Clarias nieuhofii* และจัด *Prophagoru catarectus* เป็นปลาชนิดเดียวกับ *Clarias catarectus*

2.2 ชีววิทยาของปลาดุกลำพัน

2.2.1 ลักษณะทั่วไป

ปลาดุกลำพันเป็นปลาน้ำจืดไม่มีเกล็ด รูปร่างยาวเรียว มีความยาวประมาณ 20–50 ซม. ลำตัวด้านข้างแบน หัวเล็กสั้นทู่ มีหนวดยาว 4 คู่ อยู่บริเวณหน้า 2 คู่ และใต้คาง 2 คู่ ตามีขนาดเล็ก ครีบหูเล็ก มีก้านครีบอันหน้าเป็นหนามแหลมที่เรียกกันว่า เงี่ยง ครีบท้องเล็กและอยู่ใกล้กับครีบก้นครีบหลังและครีบก้นใหญ่ยาวเกือบเท่าความยาวลำตัว ครีบหางเล็กอยู่ชิดกับครีบหลังและครีบก้น ครีบท้องเล็ก ตัวสีคล้ำอมน้ำตาลแดง ข้างลำตัวมีจุดสีขาวเรียงเป็นแถวตามขวางประมาณ 13–20 แถว (Fig. 2.1) อาศัยอยู่ในบริเวณป่าพรุที่รกทึบมีกระแสน้ำไหลเอื่อยๆ หรือเป็นแอ่งน้ำค่อนข้างนิ่งที่เป็นกรดและมีสีชามักอยู่ตามพื้นท้องน้ำที่เป็นดินโคลน มีซากวัชพืชหรือใบไม้ทับถม นอกจากนี้มักพบปลาดุกลำพันหลบซ่อนและหาอาหารในบริเวณป่าเสม็ด ดงสาคู หลุมพี กระจูด กระจูดหนูหรือหญ้าทรงกระเทียม หญ้าคมบาง และ

ป่ากก ฯลฯ พบเฉพาะในภาคใต้ตั้งแต่จังหวัดชุมพรลงไป และภาคตะวันออกตั้งแต่จังหวัดจันทบุรี และยังพบในมาเลเซียถึงบอร์เนียว มีพฤติกรรมชอบรวมกลุ่มกันเป็นฝูง

Fig. 2.1 General characteristics of *Clarias nieuhofii*

2.2.2 อาหารและนิสัยการกินอาหาร

ปลาดุกลำพันเป็นปลากินเนื้อที่เน่าเปื่อยเพราะพบไส้เดือน ลูกปลาและเศษเนื้อที่เน่าแล้วอยู่ในกระเพาะอาหาร สำหรับปลาดุกลำพันที่เลี้ยงในบ่อ สามารถปรับตัวกินอาหาร พวกปลาเป็ดผสมรำละเอียดและปลาป่นตลอดจนสามารถกินอาหารเม็ดได้ด้วย

2.2.3 ลักษณะไข่ ความดกไข่และฤดูกาลวางไข่

ไข่ปลาดุกลำพันมีลักษณะกลม สีน้ำตาลใส เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร จมน้ำและติดยึดกับวัตถุต่างๆ ในน้ำ แม่ปลาขนาดน้ำหนัก 400–600 กรัม มีความดกของไข่อยู่ในช่วง 4,300 – 6,500 ฟอง โดยมีฤดูกาลวางไข่ราวเดือนสิงหาคม – เดือนตุลาคมของทุกปี

2.2.4 การเพาะพันธุ์ปลาดุกลำพันและวิวัฒนาการของลูกปลาวัยอ่อน

ปลาดุกลำพัน สามารถเพาะขยายพันธุ์ได้โดยวิธีผสมเทียม เช่นเดียวกับปลาดุกอุย โดยการฉีดฮอร์โมนบูเซอริลิน (buserelin) 5 ไมโครกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม ร่วมกับดอมเพอริโดน (domperidone) 10 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม หลังจากนั้น 6 ชั่วโมง ฉีดเข็มที่ 2 ด้วยบูเซอริลิน 30 ไมโครกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม ร่วมกับดอมเพอริโดน 10 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม และรีดไข่ปลา หลังจากฉีดฮอร์โมนเข็มที่ 2 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง และตัดอัณฑะออกเพื่อนำน้ำเชื้อมาผสมเทียมแบบแห้ง (Kiriratnikom *et al.*, 2007) ไข่ปลาดุกลำพันที่ได้รับการผสมมีลักษณะกลมใส มองเห็นชั้นเพอริไวเทลลีน (perivitelline space) ชัดเจน ถุงไข่แดง (yolk) มีปริมาตรเกือบเต็มปริมาตรของไข่ ที่อุณหภูมิน้ำ 26.5 – 27.5 ^{0}C ไซโกตเริ่มมีการแบ่งเซลล์ และพัฒนาเข้าสู่ระยะมอรูลา (morular) ระยะบลาสตูลา (blastula) ระยะแกสตรูลา

(gastrula) ในเวลา 3 ชั่วโมง 15 นาที 4 ชั่วโมง 40 นาที 11 ชั่วโมง 10 นาที ตามลำดับ และฟักออกเป็นตัวภายในเวลา 33 ชั่วโมง 15 นาทีหลังจากการปฏิสนธิ (กฤษณะ เรืองคล้ายและคณะ, 2552)

2.3 วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา

ปัจจุบันได้มีการศึกษาและทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อในปลาหลายชนิด และได้มีการพัฒนาวิธีการเก็บ จนสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้เป็นเวลานาน โดยทั่วไปการเก็บรักษาน้ำเชื้อสามารถทำได้โดยการแช่เย็นและการแช่แข็ง

2.3.1 การเก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็น เป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อในตู้เย็นหรือถังน้ำแข็ง ที่อุณหภูมิ 0 – 4 ^{o}C สามารถเก็บได้ในสภาพน้ำเชื้อเข้มข้นหรือเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ (extender) ที่เหมาะสมกับน้ำเชื้อของสัตว์น้ำแต่ละชนิด น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสมจะไปควบคุมไม่ให้ตัวอสุจิเคลื่อนที่ขณะเก็บรักษา นอกจากนี้การเก็บรักษาน้ำเชื้อในที่อุณหภูมิต่ำจะลดอัตราเมตาบอลิซึม (metabolic) และลดปริมาณของเสียที่เกิดจากขบวนการเมตาบอลิซึมจึงทำให้มีชีวิตได้นานกว่าน้ำเชื้อที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (Omitogun *et al.*, 2012)

2.3.2 การเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีแช่แข็ง เป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อในที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งโดยเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ เพื่อช่วยคงสภาพความมีชีวิตของเซลล์ และเติมสารปกป้องเซลล์ (cryoprotectant) เพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อเสียหายในระหว่างการแช่แข็งและการทำให้ละลาย (freezing and thawing) หลังจากนั้นนำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วไปบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อ นำไปลดอุณหภูมิ แล้วเก็บในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 ^{o}C วิธีการนี้สามารถเก็บน้ำเชื้อได้นานหลายพันปี (Tsai and Lin, 2012) โดยมีอัตราการผสมไข่และอัตราการรอดใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสด

2.4 ขั้นตอนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา

2.4.1 ขั้นตอนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่เย็น

2.4.1.1 การเตรียมพ่อพันธุ์ที่จะเก็บน้ำเชื้อ

พ่อพันธุ์ที่จะนำมาเก็บน้ำเชื้อ ควรอยู่ในวัยเจริญพันธุ์ และควรฉีดฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นการพัฒนาของอสุจิ ชนิดและปริมาณฮอร์โมนที่ใช้ขึ้นอยู่กับชนิดของปลา การเตรียมพ่อพันธุ์ปลาดุกอุย โดยฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์ (gonadotropin-releasing hormone analogue, D-Trp6-GnRHa) ในอัตรา 10 ไมโครกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม ฉีดร่วมกับ dopamine antagonist ในอัตรา 5 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม (Vuthiphandchai *et al*., 2009)

2.4.1.2 การรวบรวมน้ำเชื้อ ซึ่งสามารถรีดจากเพศผู้ได้โดยตรง หรือโดยการผ่าท้องเพื่อเอาอัณฑะออกมาแล้วขยี้เอานำเชื้อออกมา เช่นการรวบรวมน้ำเชื้อปลาดุก

2.4.1.3 เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ

2.4.1.4 นำไปแช่เย็น

2.4.2 ขั้นตอนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง

2.4.2.1 การเตรียมพ่อพันธุ์ที่จะเก็บน้ำเชื้อและการรวบรวมน้ำเชื้อ มีวิธีการเช่นเดียวกับการเตรียมพ่อพันธุ์ที่จะเก็บน้ำเชื้อและการรวบรวมน้ำเชื้อสำหรับการแช่เย็น

2.4.2.2 การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ หลังจากรวบรวมน้ำเชื้อมาได้ ก่อนที่จะนำไปเก็บรักษาต้องประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อก่อน วิธีการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อของปลาสามารถทำได้ หลายวิธี เช่น

1) การประเมินลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ โดยสังเกตสี ความเข้มข้น ปริมาตร และสิ่งเจือปนอื่นๆ น้ำเชื้อที่ดีควรมีสีขาวขุ่น ไม่มีสิ่งเจือปน (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

2) ประเมินการเคลื่อนที่ของอสุจิ พิจารณาได้ในแง่เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิทำการสุ่มนับจำนวนอสุจิภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยกำหนดการเคลื่อนที่ของอสุจิเป็น 6 ระดับ คือ น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ของอสุจิท่ากับ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ100% ตามลำดับ (Vuthiphandchai and Zohar,1999) การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อวิธีนี้ เป็นวิธีที่ได้ผลเร็วแต่ผลที่ได้ไม่แน่นอน

3) การย้อมสีอสุจิ เป็นการตรวจดูอสุจิที่มีชีวิตและอสุจิที่ไม่มีชีวิต วิธีนี้มีหลักการคือ สีพิเศษบางชนิด เมื่อนำมาย้อมแล้ว อสุจิที่ตายจะดูดซับสีหรือติดสีม่วง ในขณะที่อสุจิมีชีวิตจะไม่ดูดซึมสีหรือไม่ติดสีย้อม อันเนื่องมาจากความสามารถของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ยอมให้สีผ่านเข้ามาในเซลล์ได้ ส่วนเซลล์ที่มีชีวิตจะมีกลไกป้องกันไม่ให้สีผ่านเข้าในเยื่อหุ้มเซลล์ได้ เซลล์ที่มีชีวิตจึงไม่ติดสีย้อม โดยทั่วไปนิยมใช้สีอิโอซิน (eosin) ผสมกับสีอื่นๆ ที่นิยมใช้มีอยู่ 2 ชนิด คือ สีอิโอซิน–นิโครซิน (eosin–nigrosin) และอิโอซิน–ฟาสท์กรีน (eosin–fast green) นำมาใช้ได้ผลดีสำหรับน้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยาที่ไม่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ สำหรับน้ำยาที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ เช่น มีไข่แดงหรือนมผง ไขมันในน้ำยาจะทำให้เกิดการติดสีที่ไม่สม่ำเสมอการนับอสุจิที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตจะทำได้ไม่ถูกต้อง

2.4.2.3 เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ และสารปกป้องเซลล์ โดยนำน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ มาละลายในสารปกป้องเซลล์ ก่อนแล้วจึงค่อยนำไปผสมกับน้ำเชื้อ โดยการใส่สารปกป้องเซลล์ลงไปในน้ำเชื้ออย่างช้าๆ และที่อุณหภูมิต่ำ (Wayman and Tiersch, 2000) เพื่อช่วยให้เซลล์ค่อยๆ ปรับสภาพสารปกป้องเซลล์ ที่จะใช้ในการแช่แข็ง ควรเป็นน้ำยาที่เตรียมขึ้นมาใหม่ หรือถ้าจะเตรียมไว้ล่วงหน้าควรเติมยาปฏิชีวนะและเก็บไว้ในตู้เย็น อย่างไรก็ตามไม่ควรเตรียมล่วงหน้านานกว่า 1–2 วัน

2.4.2.4 ทิ้งระยะให้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อและสารปกป้องเซลล์ซึมเข้าไปในเซลล์ (equilibration time) เป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญต่อความสำเร็จในการแช่แข็ง ถ้าปล่อยให้สารปกป้องเซลล์ ผสมกับน้ำเชื้อนานเกินไปจะมีผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ แต่ถ้าน้ำเชื้อผสมอยู่ในสารปกป้องเซลล์ น้อยเกินไปอาจจะซึมเข้าเซลล์ไม่ทั่วถึงเมื่อนำเซลล์ไปแช่แข็งจึงเกิดความล้มเหลวได้ ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้เวลา 15 – 30 นาที ขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารปกป้องเซลล์ที่ใช้ (Tiersch, 2000)

2.4.2.5 นำสารละลายน้ำเชื้อบรรจุในหลอดที่ใช้ในการเก็บน้ำเชื้อ

2.4.2.6 นำหลอดที่บรรจุน้ำเชื้อไปลดอุณหภูมิ โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม ซึ่งสามารถทำได้โดยเติมไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม นำหลอดน้ำเชื้อมาวางเหนือไนโตเจนเหลวสูง 3-4 เซนติเมตร เป็นเวลา 5–10 นาที หลังจากนั้นจึงใส่หลอดน้ำเชื้อลงในไนโตรเจนเหลว (Chew and Zulkafli, 2012) หรือใช้เครื่องควบคุมอุณหภูมิอัตโนมัติและตั้งโปรแกรมลดอุณหภูมิตามต้องการ เช่นตั้งอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 5 °C และลดอุณหภูมิลงที่ –80 °C ที่อัตรา 5 °C ต่อนาที หลังจากนั้นลดอุณหภูมิที่ลดลงอีก เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงใส่หลอดตัวอย่างลงในไนโตรเจนเหลว (Hu *et al*., 2014)

2.4.2.7 นำหลอดที่บรรจุน้ำเชื้อไปแช่ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ –196 °C

2.4.2.8 การละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง เมื่อต้องการนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาใช้ในการผสมเทียม ให้นำน้ำเชื้อมาแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิเหมาะสมซึ่งจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์น้ำ ชนิดของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ สารปกป้องเซลล์ ชนิดและขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อ เช่น น้ำเชื้อที่บรรจุในหลอดโพลีเอทธิลีน (PE straw) ขนาด 0.25, 0.5 หรือ 1.2 มิลลิลิตร ส่วนมากจะละลายหลอดน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 4–6, 6–8 หรือ 12–15 วินาที ตามลำดับ ส่วนน้ำเชื้อที่บรรจุในหลอดไครโอ (cryo–vial) ขนาด 5 มิลลิลิตร จะละลายหลอดน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 40 °C นาน 5 นาที (Chew and Zulkafli, 2012)

2.4.2.9 การประเมินประสิทธิภาพของน้ำเชื้อภายหลังการเก็บรักษา ซึ่งความสำเร็จภายหลังการทดลองสามารถประเมินจากประสิทธิภาพของอสุจิในด้านต่างๆ ดังนี้

1) ประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ ซึ่งมีวิธีการเช่นเดียวกับการประเมินการเคลื่อนที่ของอสุจิก่อนที่จะนำไปแช่เย็นหรือแช่แข็ง โดยทำการสุ่มนับจำนวนอสุจิภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ผลการทดลองส่วนใหญ่พบว่าน้ำเชื้อแช่เย็นและน้ำเชื้อแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง เช่น Anuar and Chan (2000) พบว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกด้าน (*Clarias batrachus*) ที่อุณหภูมิ 10 °C มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงจาก 80% เหลือ 59% และ 38% หลังจาก 20, 40 และ 120 นาทีตามลำดับ

2) ประเมินเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิต โดยการย้อมสีอสุจิ มีวิธีการเช่นเดียวกับการประเมินอสุจิก่อนที่จะนำไปแข็ง

3) ประเมินอัตราการปฏิสนธิ เป็นการตรวจหาความสามารถของน้ำเชื้อในการผสมกับไข่ โดยนำไข่มาปฏิสนธิกับอสุจิแล้วดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่มีการปฏิสนธิ ซึ่งจะมีความสามารถแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของปลา ชนิดของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ระยะเวลาในการเก็บรักษา เช่นน้ำเชื้อปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ที่เก็บรักษาโดยวิธีการแช่เย็นเป็นเวลา 2 วัน มีอัตราการปฏิสนธิไม่ต่างกับการใช้น้ำเชื้อสด แต่อัตราการปฏิสนธิจะลดลงเมื่อใช้น้ำเชื้อที่เก็บรักษาเป็นเวลา 4 และ 6 วัน

(Vuthiphandchai *et al.*, 2009) นอกจากนี้ยังพบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิมีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (Ohta *et al.*, 1995) แต่ในปลา rainbow trout พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิเท่ากับ 0 แต่มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ 67.9% (Ciereszko *et al.*, 1999)

4) ประเมินอัตราการฟัก ซึ่งอัตราการฟักของปลาที่ผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นและโดยวิธีแช่แข็ง จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของปลา ชนิดของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ระยะเวลาในการเก็บรักษา เช่นอัตราฟักของปลาดุกอัฟริกันที่ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด โดยน้ำเชื้อสด มีอัตราการฟัก 82.25 % และน้ำเชื้อแช่แข็งมีอัตราการฟัก 78.9 % (Oteme *et al.*, 1996) อัตราการฟักของปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ที่ใช้น้ำเชื้อที่แช่เย็นเป็นเวลา 2 วัน มีอัตราการฟัก ไม่ต่างกับการใช้น้ำเชื้อสด แต่อัตราการฟักจะลดลงเมื่อใช้น้ำเชื้อที่เก็บรักษาเป็นเวลา 4 และ 6 วัน (Vuthiphandchai *et al.*,2009) อัตราการฟักของปลาดุกอัฟริกันที่ใช้ น้ำเชื้อแช่แข็งมีอัตราฟักต่ำกว่าน้ำเชื้อสด (Omitogun *et al.*, 2012)

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ

การเก็บรักษาน้ำเชื้อจะประสบผลสำเร็จหรือไม่ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ หลายประการ เช่น

2.5.1 คุณภาพของน้ำเชื้อ น้ำเชื้อที่จะนำมาใช้ในการเก็บรักษาต้องมีคุณภาพที่ดี ควรเก็บจากปลาที่สมบูรณ์ และอยู่ในช่วงผสมพันธุ์วางไข่ นอกจากนี้ไม่ควรมีการปนเปื้อนของปัสสาวะ (พลชาติ ผิวเณร และคณะ, 2547) หรือปนเปื้อนเลือด หรือเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆ ในกรณีการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อปลาดุก

2.5.2 สูตรน้ำยา การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาทั้งแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็ง ส่วนใหญ่จะเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ (extender) และเติมสารปกป้องเซลล์ (cryoprotectant) ที่นิยมใช้มีดังต่อไปนี้

2.5.2.1 น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ (extender) ประกอบด้วยสารเคมีที่ทำหน้าที่ควบคุมความเป็นกรด- ด่าง (pH) เป็นแหล่งพลังงานและสารเคมีบางตัวทำหน้าที่ต้านหรือทำลายพิษจากของเสียที่ขับถ่ายออกมาจากเซลล์ หรือมีส่วนประกอบที่เป็นยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่นิยมนำมาใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลามีหลายชนิด แต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาแตกต่างกัน ดังต่อไปนี้

1) สารละลายริงเจอร์ (ringer solution) ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 7.5 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.2 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 0.20 กรัม และโซเดียมไฮโดรเจนไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) 0.20 กรัม ละลายในน้ำ 1 ลิตร เป็นสารละลายที่นิยมนำมาใช้เจือจางน้ำเชื้อปลาน้ำจืด (Muchlisin, 2005)

2) Hank’s balanced salt solution (HBSS) ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ (NaCl)

0.8000 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.0400 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$) 0.0120 กรัมโซเดียมไฮโดรเจนไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) 0.0350 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.0060 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.0200 กรัม กลูโครส 0.1000 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) 0.0160 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร pH 7.6 ใช้ได้ผลดีกับน้ำเชื้อปลา red drum, *Sciaenops ocellatus* (Wayman *et al*., 1998)

3) สารละลาย Calcium Free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) ประกอบด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.8890 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.0440 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$) 0.0130 กรัม โซเดียมไฮโดรเจนไบคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) 0.0390 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.0070 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) 0.0220 กรัม กลูโครส 0.1110 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร pH 7.6 ให้ผลดีในการเจือจางน้ำเชื้อปลาดุกอุย (Vuthiphandchai *et al*., 2009)

4) ไตรโซเดียม ซิเตรท (trisodium citrate) ประกอบด้วยไตรโซเดียม ซิเตรท 2.9 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร ใช้ได้ผลดีในการเจือจางน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน (*Clarias gariepinus*) (Adeyemo *et al*., 2007)

นอกจากนี้ปัจจุบันมีการศึกษานำสารจากธรรมชาติ เช่น น้ำอ้อย (sugarcane water) น้ำนมถั่วเหลือง (soybean milk) และน้ำมะพร้าว (coconut water) มาใช้เป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา เช่น Muchlisin *et al*. (2010) ทดลองใช้ น้ำมะพร้าว น้ำอ้อย และน้ำนมถั่วเหลือง (soybean milk) เจือจางน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน (*Clarias gariepinus*) ในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแตกต่างกัน 3 อัตราคือ 1:20, 1:30 และ 1:40 เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C และนำมาผสมกับไข่หลังจากเก็บน้ำเชื้อเป็นเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับการใช้สารละลายริงเจอร์ (ringer solution) ซึ่งเป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ที่เป็นสารเคมี ที่นิยมใช้ทั่วไปและให้ผลดี ผลการศึกษาพบว่าอัตราปฏิสนธิและอัตรารอดลดลงเมื่ออัตราส่วนเจือจางเพิ่มขึ้น ไข่ที่ผสมกับน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำมะพร้าวในอัตราส่วน 1:20 และไข่ที่ผสมกับน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำนมถั่วเหลืองอัตราส่วน 1:20 มีอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักสูงที่สุดเมื่อเทียบกับน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ จากธรรมชาติชนิดอื่นและในอัตราส่วนอื่นๆ แต่มีอัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักต่ำกว่า ไข่ที่ผสมกับน้ำเชื้อที่เจือจางด้วย สารละลายริงเจอร์

น้ำมะพร้าว เป็นสารจากธรรมชาติที่นำมาใช้เป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแพะโดยวิธีแช่เย็น เป็นครั้งแรกในปี ค.ศ. 1987 น้ำมะพร้าวมีองค์ประกอบต่างๆ ดัง Table 2.1 และจากการนำน้ำมะพร้าวร่วมกับไดเมธิลซัล ฟอกไซด์ 10% มาเจือจางน้ำเชื้อปลา *Brycon orbignyanus* และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4–6 ^{o}C พบว่าหลังจากเก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นเวลา 1 วันมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิเท่ากับ 7 ± 6 % และลดลงเหลือ 0% หลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 2 วันและจากการนำน้ำมะพร้าวร่วมกับไดเมธิลซัลฟอกไซด์ 10%และไข่แดง 5% มา เจือจางน้ำเชื้อปลา *Brycon orbignyanus* และแช่แข็งที่อุณหภูมิ –196 ^{o}C พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิเท่ากับ 10 ± 8 % (Maria *et al*., 2006a) นอกจากนี้นักวิจัยจาก

ประเทศบราซิลได้พัฒนาน้ำมะพร้าวให้อยู่ในรูปเป็นผง ซึ่งประกอบไปด้วย กรดอะมิโน วิตามิน คาร์โบไฮเดรต ฮอร์โมนจากพืช (phytohormones) และ กรดไขมันอิ่มตัว ที่ได้มาตรฐานและคงที่ และได้มีการทดลองใช้เป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา *Brycon orbignyanus, Leporinus obtusidens* และ *Prochilodus lineatus* พบว่าน้ำเชื้อของปลาทั้ง 3 ชนิดที่เจือจางด้วยน้ำมะพร้าวผง กับเมธิลไกลคอล 10% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยามาตรฐาน (Viveiros *et al*., 2008)

Table 2.1 Chemical composition of coconut water (Yong *et al*., 2009)

Coconut type	**young**	**mature**
Proximates	(g/100g)	(g/100g)
Water	94.18	94.45
Dry	5.82	5.55
Protein	0.12	0.52
Total lipid (fat)	0.07	0.15
Ash	0.87	0.47
Carbohydrate, by difference	4.76	4.41
Sugars	(g/100g)	(g/100g)
Total	5.23	3.42
Sucrose	0.06	0.51
Glucose	2.61	1.48
Fructose	2.55	1.43
Inorganic ions	(mg/100g)	mg/100g)
Calcium, Ca	27.35	31.64
Iron, Fe	0.02	0.02
Magnesium, Mg	6.40	9.44
Phosphorus, P	4.66	12.77
Potassium, K	203.70	257.52
Sodium, Na	1.75	16.10
Zinc, Zn	0.07	0.02
Vitamins	(mg /100 dm^3)	(mg /100 dm^3)
Vitamin C, total ascorbic acid	7.41	7.08

2.5.2.2 สารปกป้องเซลล์ (cryoprotectant) เป็นสารเคมีที่ป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อเสียหายในระหว่างการแช่แข็ง (freezing) เนื่องจากการแข็งตัวของน้ำภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียคุณสมบัติ สารปกป้องเซลล์จำแนกออกเป็น 2 พวก คือ พวกที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์และพวกออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ ดังนี้

1) สารปกป้องเซลล์ที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ (permeating cryoprotectants) ได้แก่ ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO) กลีเซอรอล (glycerol) เมธานอล (methanol) เอธานอล (ethanol) พรอพไพรลีน ไกลคอล (propylene glycol) และ เอทธิลีน ไกลคอล (ethylene glycol, EG) ฯลฯ สารเคมีเหล่านี้จำเป็นต้องซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายไม่ให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งและป้องกันอันตรายได้ดีในระดับที่มีความเข้มข้นค่อนข้างสูง (1–4 M) ขณะแช่แข็งหากพิจารณาถึงความสามารถในการแพร่เข้าสู่ภายในเซลล์ แอลกอฮอล์มีอัตราการแพร่สูงสุด รองลงมาได้แก่ ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ และ กลีเซอรอล ตามลำดับ สารเหล่านี้มีข้อเสียประการหนึ่งคือ เป็นพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ

2) สารปกป้องเซลล์ ที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ (non - permeating cryoprotectants) ได้แก่ นมผง ไข่แดง โพลิไวนิล ไพโรลิโดน (polyvinyl pyrolidone, PVP), ไฮดรอกซีเอธิลิน สตราช (hydroxyethyl starch, HES) เดร็กเทรน (detrain) อัลบลูมิน (albumin) โพลิเอธิลลีน ไกลคอล (polyethylene glycol) และน้ำตาลต่างๆ เช่น ซูโครส (sucrose) และกลูโครส (glucose) ฯลฯ สารเคมีกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่นอกเซลล์และใช้ได้ผลดีที่ความเข้มข้นต่ำกว่าพวกแรก (0.01–0.2M) และเป็นพิษน้อยกว่า

สารปกป้องเซลล์แต่ละชนิดและแต่ละความเข้มข้นเหมาะสมกับปลาชนิดหนึ่งแต่อาจไม่เหมาะสมกับปลาอีกชนิดหนึ่ง เช่น กลีเซอรอล มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา European catfish (*Silarus glanis*) มากกว่าไดเมธิลซัล ฟอกไซด์ และ เอทธิลีน ไกลคอล (Linhart *et al.*, 1993) แต่ Marian and Krasznai (1987) พบว่าไดเมธิลซัล ฟอกไซด์มีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้เอทธิลีนไกลคอลในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา European catfish (*Silurus glanis* L.) และไดเมธิลซัล ฟอกไซด์มีประสิทธิภาพมากกว่าพรอพไพรลีน ไกลคอล ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา yellowtail founder (*Pleuronectes ferrugineus*) (Richardson *et al.,* 1995) ส่วน เมทธานอล 10% เหมาะกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Japanese bitterling (*Tanakia tanago*) (Ohta *et al.,* 2001), bagrid catfish (*Pseudobagrus ichikawai*) (Muchlisin and Muhammadar, 2002), European catfish (*Silurus glanis* L.) (Ogier de Baulny *et al*., 1999) และปลาดุกอัฟริกัน (Viveiros *et al.,* 2000) เมทธานอล 5% เหมาะสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานิล (Chao, 1991) เมทธิลไกลคอล (methylglycol) เหมาะกับปลา *Brycon nattereri, Brycon orbignyanus, Leporinus obtusidens* และ *Prochilodus lineatus* มากกว่าไดเมธิลซัล ฟอกไซด์ (Viveiros and Godinho, 2009)

นอกจากนี้ยังพบว่าสารปกป้องเซลล์ ที่ระดับความเข้มข้นหนึ่งอาจเหมาะสมกับปลาชนิดหนึ่ง แต่อาจไม่เหมาะสมกับปลาอีกชนิดหนึ่ง เช่น ไดเมธิลซัล ฟอกไซด์ 10% ใช้ได้ผลดีกับน้ำเชื้อปลา milkfish (*Chanos chanos*) (Chao, 1991), Artic charr (*Salvelinus alpinus*) (Richardson *et al*., 2000b) และ spotted sea trout (*Cynoscion nebulosus*) (Wayman *et al*., 1996) ส่วนไดเมธิลซัล ฟอกไซด์ 12% ใช้ได้ผลดีกับน้ำเชื้อปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) (Gallant *et al.*,1993) ในขณะที่ไดเมธิล อะซิทาไมด์ (dimethyl-acetamide, DMA) 10% มีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้ ไดเมธิลซัล ฟอกไซด์ 10% ในปลา rainbow trout (*Ochorhynchus mykiss*) (McNiven *et al*.,1993; และ Richardson, *et al*., 2000a) และปลาดุกอัฟริกัน (*Clarias gariepinus*) (Horvath and Urbanyi, 2000)

ดังนั้นการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็ง จะต้องเลือกใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อและสารปกป้องเซลล์ ให้เหมาะสมกับชนิดของสัตว์น้ำ โดยพิจารณาจากสิ่งต่างๆ ดังนี้

1) องค์ประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยา องค์ประกอบของอิออนในน้ำยา เช่นความเข้มข้นของโซเดียม (Na^+) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการทำงานของน้ำยา ดังนั้นสูตรน้ำยาชนิดต่างๆ ที่ควรนำมาใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา ควรจะประกอบด้วยสารเคมีที่เมื่อละลายน้ำเชื้อแล้วให้อิออนชนิดที่เหมาะสม

2) ค่าความเป็นกรด–ด่าง (pH) ของน้ำยา pH มีผลต่อศักยภาพในการปฏิสนธิของอสุจิ (Ingermann *et al*., 2002) เนื่องจากความเป็นกรด-ด่าง เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเคลื่อนที่ของแฟลกเจลลา (flagella) pH ที่เหมาะสมสำหรับการปฏิสนธิของน้ำเชื้ออยู่ระหว่าง 7.2 – 8.2 ขึ้นอยู่กับชนิดของปลา เช่น pH ที่เหมาะสมสำหรับการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาน้ำเค็มมีค่าระหว่าง 7.2 – 7.5 (Williot *et al*., 2000) ส่วน pH ที่เหมาะสมสำหรับการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาดุกอุย *Clarias macrocephalus* (Gunther) คือ 8 (Tan-Fermin *et al*., 1999)

3) ค่าออสโมลาลิตี (osmolality) สูตรน้ำยาที่ใช้ในการรักษาน้ำเชื้อปลาควรมีค่าออสโมลาลิตีใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเชื้อปลา ทั้งนี้เพื่อป้องกันการกระตุ้นการเคลื่อนไหวหรือการใช้พลังงานของตัวอสุจิ ตลอดจนการรักษาให้ตัวอสุจิคงรูปและมีอัตราการรอดอยู่ตลอดเวลาที่เก็บรักษา (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) สูตรน้ำยาที่ใช้ในการรักษาน้ำเชื้อปลาน้ำจืด ควรมีค่าออสโมลาลิตี 200–300 mOsmol/kg (Wayman and Tiersch, 2000)

2.5.3 อัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อน้ำยาเจือจาง (dilution ratio) จะมีความเหมาะสมแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของปลาและสูตรของน้ำยาเจือจาง เช่น น้ำเชื้อปลานิลที่เจือจางด้วยน้ำยาสูตรต่างๆ 4 สูตร คือ modified fish ringer' s solution, 0.85% NaCl in PBS, bicarbonate buffer–2 (BCB) และ modified frog ringer–2 (FRS) และอัตราเจือจางต่างกัน 3 ระดับคือ 1:3, 1:5 และ 1:9 และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4–6 ^{o}C พบว่าอัตราเจือจาง ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ เมื่อเก็บรักษาที่ 144 ชั่วโมง แต่พบว่าสูตรน้ำยาต่างกัน มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิต่างกัน (พลชาติ ผิวเณร และคณะ, 2547) ส่วนน้ำเชื้อปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ที่เจือจางด้วย Ca–F HBSS ในอัตรา 1:1, 1:2 หรือ 1:4 และเก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็น พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิไม่แตกต่างกัน และสามารถเก็บรักษาได้

นานกว่าน้ำเชื้อ ที่เจือจางในอัตรา 1:9 (Vuthiphandchai *et al.*, 2009) ส่วนน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน (*Clarias gariepinus*) ที่เจือจางด้วยน้ำยา 5 ชนิดคือ extender 7, extender 13, Hank's balanced salt solution (HBSS), Calcium Free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) และ Modified Cortland ภายใน tissue culture flasks ในอัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:3 โดยปริมาตร พบว่าอัตราส่วนเจือจางน้ำเชื้อต่อสารละลายบัฟเฟอร์ไม่มีผลต่อระยะเวลาการเก็บรักษา (ศิริพร คชรัตน์ และคณะ, 2550) เช่นเดียวกับ Omitogun *et al.* (2012) ที่รายงานว่าน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน ที่เจือจางด้วยน้ำยาในอัตรา 1:1 และ 1:40 และเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็ง มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การฟัก ไม่แตกต่างกัน แต่การเจือจางน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันด้วยน้ำมะพร้าวในอัตรา 1:20, 1:30 และ 1:40 และเก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็น พบว่า น้ำเชื้อที่เจือจางในอัตรา 1:20 มีความเหมาะสมมากกว่าที่อัตรา 1:30 และ 1:40 (Muchlisin *et al*., 2010) ส่วนน้ำเชื้อปลา Atlantic cod, *Gadus morhua* และปลา haddock, *Melanogrammus aeglefinus* ที่เจือจางด้วยน้ำยา Mounib ดัดแปลง (modified Mounib) ในอัตรา 1:1, 1:2, 1:3, 1:5 และ 1:10 พบว่าหลังจากแช่เย็นเป็นเวลา 10 วัน น้ำเชื้อปลาทั้ง 2 ชนิดที่เจือจางอัตรา 1:3 มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิสูงที่สุดและหลังจากแช่เย็นเป็นเวลา 20 วันน้ำเชื้อที่เจือจางในอัตรา 1:1, 1:5 และ 1:10 มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิต่ำกว่าน้ำเชื้อที่เจือจางในอัตรา 1:2 และ 1:3 ส่วนการแช่แข็งพบว่าน้ำเชื้อที่เจือจางด้วย Modified Mounib และ 10% DMSO ในอัตรา 1:3 มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิสูงกว่าน้ำเชื้อที่เจือจางในอัตรา 1:1 (DeGraaf and Berlinsky, 2004) ส่วนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา whitefish ที่เจือจางด้วยน้ำยาในอัตรา 1:1, 1:3 และ 3:1 มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิไม่แตกต่างกัน (Ciereszko *et al.*, 2013)

2.5.4 ส่วนประกอบของน้ำเชื้อ

นอกจากปลาต่างชนิดกันจะมีส่วนประกอบของน้ำเชื้อต่างกันแล้วยังพบว่าปลาชนิดเดียวกันที่เลี้ยงด้วยสภาวะที่ต่างกันยังมีส่วนประกอบของน้ำเชื้อที่ต่างกันด้วย เช่น Viveiros and Godinho (2009) พบว่าน้ำเชื้อของปลาที่รวบรวมมาจากธรรมชาติจะมีส่วนประกอบของน้ำเชื้อต่างกับน้ำเชื้อปลาที่รวบรวมมาจากโรงเพาะฟัก หรือน้ำเชื้อปลาที่รวบรวมมาจากโรงเพาะฟักต่างกัน ซึ่งเลี้ยงในสภาวะที่แตกต่างกัน อาจมีผลต่อการตอบสนองต่อน้ำยาที่แตกต่างกัน

2.5.5 ชนิดและขนาดของหลอดบรรจุ

หลอดที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งมีหลายแบบได้แก่ หลอดฟาง (straw) หลอดฉีดยา (ampule) หลอดไครโอ (cryotube) หลอดบรรจุน้ำเชื้อทั้ง 3 แบบนี้มีความจุหลายขนาดแตกต่างกัน ซึ่งหลอดแต่ละชนิดมีทั้งข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน ผู้ใช้จึงควรเลือกให้เหมาะสมกับชนิดและขนาดของหลอดบรรจุ หรือวิธีการนำไปใช้ให้เหมาะสมกับชนิดของน้ำเชื้อที่จะทำการเก็บและวิธีการเก็บรักษา (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

2.5.6 อัตราการลดอุณหภูมิ

การลดอุณหภูมิ คือการทำให้ของเหลวที่อยู่รอบๆ เซลล์และภายในเซลล์ค่อยๆ แข็งตัว ในขณะที่ทำการลดอุณหภูมิ ของเหลวภายนอกเซลล์จะเป็นน้ำแข็งก่อนของเหลวภายในเซลล์ ทำให้ความเข้มข้นของตัวถูกละลายภายนอกเซลล์สูงกว่าภายในเซลล์ จึงทำให้น้ำแพร่ออกจากเซลล์เพื่อปรับสมดุล ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิช้าเกินไปจะทำให้เซลล์ต้องปรับตัวนานเกินไปซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อเซลล์เพราะมีการสูญเสียน้ำและความเข้มข้นของสารละลายสูงเกินไปอาจทำให้ตกผลึก ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิเร็วเกินไปจะทำให้น้ำไหลออกจากเซลล์เร็วเกินไปอาจทำให้เซลล์เหี่ยว และเกิดเกร็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ทิ่มแทงเซลล์และเนื้อเยื่อออแกนแนลล์ทำให้เซลล์ได้รับอันตรายได้ อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดขึ้นอยู่กับลักษณะและความเข้มข้นของสารปกป้องเซลล์ที่ใช้ (Muchlisin, 2005)

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จากการศึกษาจากเอกสารพบว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาทั้งแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็งได้มีการทดลองและประสบความสำเร็จในปลาหลายชนิด แต่ละชนิดใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อและสารปกป้องเซลล์ที่แตกต่างกัน และพบว่าหลังจากการแช่เย็นหรือแช่แข็ง มีเปอร์เซ็นต์กาเคลื่อนที่ของอสุจิ เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตและอัตราการปฏิสนธิ แตกต่างกัน ดัง Table 2.2 และ Table 2.3

Table 2.2 Composition of the extenders successfully used for refrigerated storage of fish sperm

Species	Extender	Motility (%)	Fertility (%)	Hatchability (%)	References
Clarias macrocephalus	0.8% NaCl ปรับแรงดันออสโมติก (280mOsmol/kg)	8.89±1.11	-	45.17±13.30	นิศา ไชยรักษ์ และกฤษณ์ มงคลปัญญา (2538)
Ictalurus punctatus	Buffer solution	-	-	-	Christensen and Tiersch (1996)
Gadus morhua	Modified Mounib's extender	42±4.5	-	-	DeGraaf and Berlinsky (2004)
Melanogrammus aeglefinus	Modified Mounib's extender	52± 2.2	-	-	DeGraaf and Berlinsky (2004)

Table 2.2 Cont.

Species	Extender	Motility (%)	Fertility (%)	Hatchability (%)	References
Brycon orbignyanus	154 mM NaCl +10% DMSO	30 ± 20	-	-	Maria *et al.* (2006a)
Brycon orbignyanus	Saad	40 ±10	-	-	Maria *et al.* (2006b)
Clarias macrocephalus	Ca–F HBSS	-	80.1±3.6	71.1±3.4	Vuthiphandchai *et al.* (2009)
Clarias macrocephalus	Ca–F HBSS	44.8	52.4	-	Vuthiphandchai *et al.*(2009)
Clarias macrocephalus	Ca–F HBSS	13.3	18.5	-	Vuthiphandchai *et al.* (2009)
Clarias gariepinus	RPMI	37.62	-	-	Omitogun *et al.* (2012)
Oncorhynchus mykiss	glucose	64.4±5.27	94.3 ± 0.58	-	Sahin *et al.* (2013)

Table 2.3 Composition of the extenders and cryoprotectant successfully used for sperm cryopreservation in fish

Species	Extenders and cryoprotectant	Motility (%)	Fertility (%)	Hatchability (%)	References
Heterobranchus longifilis Valencienes, 1840	80 % Mounib' solution + 5% DMSO + 5 % Glycerol and 10 % hen Egg yolk	20 – 30	-	83.4	Oteme *et al.* (1996)
Clarias gariepinus	6% Fructose + $NaHCO_3$-CO_2 +10% dimethylacetamide	-	86.8 ± 3.1	67.1 ± 11.9	Horvath and Urbanyi (2000)

Table 2.3 Cont.

Species	Extenders and cryoprotectant	Motility (%)	Fertility (%)	Hatchability (%)	Reference
Oreochromis niloticus	Modified fish Ringer's +5% DMSO	-	40.30 - 88.47	19.96-84.73	พลชาติ ผิวเณร และคณะ (2547)
Gadus morhua	Modified Mounib's extender + 10% DMSO	66±2.1	69±3.8	-	DeGraaf and Berlinsky (2004)
Melanogrammus aeglefinus	Modified Mounib's extender + 10% DMSO	53±2.1	53±4.6	-	DeGraaf and Berlinsky (2004)
Brycon orbignyanus	154 mM NaCl +10%methylglycol +5% egg yolk	66 ± 9	-	-	Maria *et al.* (2006a)
Brycon orbignyanus	BTS™	68±8	-	66±20	Maria *et al.* (2006b)
Prochilodus lineatus	Powder coconut water + methylglycol	85 ±12	48±12	-	Viveiros *et al.* (2010)
Heteropneustes fossilis (Bloch)	M-HBSS + 10% DMSO	-	-	49.06	Lal *et al.* (2009)
Clarias batrachus Linn.	HBSS + 10% DMSO	-	-	62.1	Lal *et al.* (2009)
Clarias gariepinus	Ca-FHBSS	55	30	35	Omitogun *et al.* (2012)