



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

การพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่อุณหภูมิต่ำ
เพื่อการอนุรักษ์และการเพาะเลี้ยง

**Development of low temperature preservation technology of Thai walking catfish
(*Clarias macrocephalus*) semen for conservation and aquaculture**

รองศาสตราจารย์ ดร. วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย
ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี

พฤษภาคม 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

การพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่อุณหภูมิต่ำ
เพื่อการอนุรักษ์และการเพาะเลี้ยง

Development of low temperature preservation technology of Thai walking catfish
(*Clarias macrocephalus*) semen for conservation and aquaculture

รองศาสตราจารย์ ดร. วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย
ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง การพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อการอนุรักษ์และการเพาะเลี้ยง (Development of low temperature preservation technology of Thai walking catfish (*Clarias macrocephalus*) semen for conservation and aquaculture) ได้ดำเนินการเสร็จสิ้นเรียบร้อยแล้ว และมีผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติที่มี impact factor ได้ด้วยการสนับสนุนทุนวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2549 – 2552 ข้าพเจ้าขอขอบคุณ นายอิทธิพันธ์ ทัดศรี ที่ช่วยในการดูแลสัตว์ทดลอง และภาควิชาวชิราภรณ์ และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในการทดลองและการใช้ห้องปฏิบัติการงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย

พฤศจิกายน 2552

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : DBG4980006
ชื่อโครงการ : การพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่อุณหภูมิต่ำเพื่อการอนุรักษ์และการเพาะเลี้ยง
ชื่อนักวิจัย : รองศาสตราจารย์ ดร. วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย
สังกัดภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
E-mail Address : verapong@buu.ac.th
ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่อุณหภูมิต่ำแบบแช่เย็น และแบบแช่แข็งเพื่อประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์พันธุ์ปลาดุกอุย โดยทำการศึกษาแบ่งออกเป็น 11 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกทำการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มปลาดุกอุยในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ จากการศึกษพบว่าคุณภาพสเปิร์มปลาดุกอุยลดลงอย่างเด่นชัดในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ต่อมาในขั้นตอนที่ 2 ผลของแรงดันออสโมติกต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย พบว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยถูกควบคุมโดยค่าระดับแรงดันออสโมติก โดยสเปิร์มจะไม่เคลื่อนที่เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกเท่ากับหรือใกล้เคียงกับน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม และสเปิร์มจะเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารละลายที่มีแรงดันออสโมติกลดลง ในขั้นตอนที่ 3 ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อสดโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ โดยพบว่าการใช้ถุงพลาสติก ziplock สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด และการให้ออกซิเจนสมทบช่วยยืดระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อให้นานขึ้นกว่าไม่ให้ออกซิเจนสมทบ ขั้นตอนที่ 4 ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ ทราบว่าสารละลายบัฟเฟอร์ Calcium-free Hank's Balanced Salt Solution (Ca-F HBSS) มีความเหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส โดยที่อัตราการเจือจางน้ำเชื้อด้วย Ca-F HBSS สามารถเจือจางได้สูงสุด 4 เท่า และน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางด้วย Ca-F HBSS ในช่วงกลางฤดูผสมพันธุ์วางไข่สามารถเก็บรักษาได้นานกว่าน้ำเชื้อที่เก็บรักษาในช่วงต้น หรือปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ขั้นตอน 5 ทำการศึกษาความเป็นพิษของสาร cryoprotectant ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ทราบว่า DMSO ที่ความเข้มข้น 10% มีความเหมาะสมมากที่สุดในการนำมาแช่แข็ง จึงนำ DMSO มาแช่แข็งน้ำเชื้อในขั้นตอนที่ 6 ก็ได้ผลการแช่แข็งที่ดี โดยอัตราการรอดอุณหภูมิที่เหมาะสมขณะแช่แข็งน้ำเชื้อคือ 3 - 10 องศาเซลเซียส/นาที ขั้นตอน 7 ศึกษาความสามารถของน้ำเชื้อแช่แข็งในการปฏิสนธิกับไข่ปลาดุกอุย พบว่าประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งในการปฏิสนธิกับไข่มีค่าไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด (กลุ่มควบคุม) ขั้นตอน 8 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายน้ำเชื้ออยู่ในช่วง 30 ถึง 70 องศาเซลเซียส ขั้นตอน 9 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งที่ได้เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว พบว่าการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวมีค่าลดลงระหว่างการเก็บรักษา ขั้นตอน 10 ศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลาย โดยเก็บน้ำเชื้อในไนโตรเจนเหลวนาน 8 เดือน พบว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มแช่แข็งหลังการละลายมีค่าลดลงเมื่อเก็บรักษานานขึ้น แต่เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิกับไข่และเปอร์เซ็นต์การฟักของไข่มีค่าไม่เปลี่ยนแปลง ในขั้นตอนสุดท้ายพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้ออย่างง่าย ๆ การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยอย่างง่าย ทราบว่าการใช้หลอดฟาง (French straw) แช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยต้องแช่แข็งที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 4 เซนติเมตร ในขณะที่การแช่แข็งในหลอด cryovial สามารถทำได้ที่สูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2 เซนติเมตร

Keywords: ปลาดุกอุย; สเปิร์ม; การแช่เย็น; การแช่แข็ง; การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

Abstract

Project Code : DBG4980006
Project Title : Development of low temperature preservation technology of Thai walking catfish (*Clarias macrocephalus*) semen for conservation and aquaculture
Investigator : Associate Prof. Verapong Vuthiphandchai
Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University
E-mail Address : verapong@buu.ac.th
Project Period : 3 years

This purpose of this research was to develop suitable technology for chilled storage or cryopreservation of Thai walking catfish (*Clarias macrocephalus*) sperm for aquaculture and conservation. Experiment design was divided into 11 steps. The first experiment evaluated changes in sperm quality of walking catfish during the spawning season and found a decrease in sperm quality during the end of spawning season. The second experiment tested the effects of osmotic pressure on sperm motility using different electrolyte and non-electrolytes solutions. Sperm motility of walking catfish was controlled by the level of osmotic pressure; sperm motility was initiated in low osmotic pressure solutions. The third experiment stored undiluted milt at 0-4°C using different containers and found that plastic ziplock bag maintained sperm motility potential longer than other containers. Oxygen supplementation in undiluted milt resulted in longer storage period than a treatment without oxygen supplementation. The fourth experiment was designed to determine appropriate conditions for successful storage of diluted milt at 0-4°C. Calcium-free Hank's Balanced Salt Solution (Ca-F HBSS) was the most suitable extender for storage of walking catfish milt. A maximum dilution ratio of milt to Ca-F HBSS of 1:4 was achieved. Extended milt obtained during the mid of spawning season was superior to that during the beginning or end of spawning season. The fifth experiment found that 10% DMSO was the most suitable combination for freezing of sperm based on toxicity experiment of cryoprotectants. The sixth experiment founded that successful cryopreservation of walking catfish milt was obtained using a controlled-rate programmable freezer at freezing rates of 3-10°C/min. The seven experiments were set to test the fertilization capacity of frozen-thawed catfish milt compared to fresh milt. There was no difference in fertilization capacity between frozen-thawed and fresh milt. The eight experiments were designed to evaluate the effect of thawing temperature on post-thaw sperm motility. Suitable temperature for thawing walking catfish sperm was between 30-70°C. The ninth experiment studied changes in the quantity and quality of bacteria in cryopreserved sperm of walking catfish kept in liquid nitrogen. A decrease in bacterial contamination was evident as storage time was increased. The tenth experiment assessed the effect of storage period of cryopreserved milt on change in sperm quality of frozen-thawed milt. After storage for 8 months, a decrease in post-thaw sperm motility was observed although fertilization capacity and hatching rate of cryopreserved semen on eggs were not affected. In the last experiment, a development of simple cryopreservation for walking catfish milt was initiated. Freezing of walking catfish milt in French straw was successful in liquid nitrogen vapour at 4 cm above the surface of liquid nitrogen while that in cryovial was observed at 2 cm above the surface of liquid nitrogen.

Keywords: Thai walking catfish; Sperm; Chilled storage; Cryopreservation; Aquaculture

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ii
บทคัดย่อ.....	iii
Abstract.....	iv
สารบัญ.....	v
สารบัญตาราง.....	vi
สารบัญรูป.....	vii
บทที่	
1 ความสำคัญที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	16
4 ผลการวิจัย.....	27
5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง.....	48
เอกสารอ้างอิง.....	57
Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.	63
ภาคผนวก.....	65

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณภาพน้ำเชื้อปลาดุกอุย (N = 120) ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ปี พ.ศ. 2549	27
2	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่เก็บแช่เย็นโดยไม่ให้ออกซิเจนสมทบ	30
3	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่เก็บแช่เย็นโดยให้ออกซิเจนสมทบ	30
4	การเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (N = 48) หลังจากแช่เย็นนาน 10 วัน	32
5	ผลของอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อปลาดุกอุย (N = 45) ด้วยสารละลาย Ca-F HBSS เมื่อแช่เย็นนาน 10 วัน	33
6	ผลของฤดูกาลที่มีต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุย (N = 54) ในเดือน พฤษภาคม สิงหาคม และพฤศจิกายน	34
7	ประสิทธิภาพการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่เก็บแช่เย็นที่มีต่อไข่ปลาดุกอุย	35
8	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (<i>Clarias macrocephalus</i>) ภายหลังการละลายเมื่อใช้ DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์	40
9	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (<i>Clarias macrocephalus</i>) ที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวแล้วนำมาละลายด้วยการใช้อัตราการละลายต่าง ๆ กัน	42
10	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Total Heterotroph ในน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่เก็บในไนโตรเจนเหลว	43
11	ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Gram – negative rod ในน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่เก็บในไนโตรเจนเหลว	44
12	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตหลังการละลายของน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่เก็บรักษาแช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลว ระยะเวลาต่าง ๆ กัน	46

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยเมื่ออยู่ในสารละลาย electrolyte ที่มีแรงดันออสโมติกต่างกัน	28
2	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยเมื่ออยู่ในสารละลาย non-electrolyte ที่มีแรงดันออสโมติกต่างกัน	29
3	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (<i>Clarias macrocephalus</i>) หลังจากเจือจางใน DMSO ที่ความเข้มข้น และเวลาต่างๆ กัน	37
4	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (<i>Clarias macrocephalus</i>) หลังจากเจือจางใน Methanol ที่ความเข้มข้น และเวลาต่างๆ กัน	37
5	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (<i>Clarias macrocephalus</i>) หลังจากเจือจางใน Ethanol ที่ความเข้มข้น และเวลาต่างๆ กัน	38
6	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (<i>Clarias macrocephalus</i>) หลังจากเจือจางใน Trehalose ที่ความเข้มข้น และเวลาต่างๆ กัน	39

บทที่ 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในประเทศไทยการศึกษาเกี่ยวกับการเก็บน้ำเชื้อสัตว์น้ำแบบแช่แข็งยังมีอยู่น้อยมากเมื่อเทียบกับการศึกษาในต่างประเทศ เนื่องจากสัตว์น้ำส่วนใหญ่ที่พบในประเทศไทยมักจะมีน้ำเชื้อที่สมบูรณ์ดีตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่และหาได้ง่ายจึงทำให้ผู้เพาะพันธุ์สัตว์น้ำไม่นิยมเก็บน้ำเชื้อสัตว์น้ำแช่แข็งเอาไว้ใช้ในอนาคต แต่ในความจริงแล้วปัญหาการขาดแคลนน้ำเชื้อของสัตว์น้ำยังคงมักพบอยู่บ่อยครั้งในระหว่างการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำหลาย ๆ ชนิดโดยเฉพาะการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำต่างชนิดกัน (hybridization) ซึ่งอาจมีช่วงเวลาที่ไข่และสเปิร์มอาจสมบูรณ์เพศไม่พร้อมกันโดยเฉพาะปลาเพศผู้ที่ต้องผ่าท้องเอาอวัยวะมาใช้ผสมเทียมเช่นปลาดุกรวมทั้งพันธุ์ปลาที่หาได้ยาก ไก่สุญพันธุ์ หรือปลาที่มีการกลายเพศซึ่งเพศผู้และเพศเมียจะพัฒนาถึงวัยเจริญพันธุ์ไม่พร้อมกัน นอกจากนี้ในบางครั้งการจับพ่อแม่พันธุ์ปลาจากแหล่งผสมพันธุ์วางไข่ก็ได้ปลาเพศผู้และเพศเมียไม่พร้อมกันซึ่งก่อให้เกิดปัญหาในด้านการจัดการในโรงเพาะฟักระหว่างการเพาะพันธุ์ เช่น ตัวเมียที่จับได้ก่อนมีไข่ที่ไม่สมบูรณ์ต้องใช้ฮอร์โมนกระตุ้นซึ่งต้องขังตัวผู้ไว้หลายวันทำให้พ่อแม่พันธุ์ปลาอาจช้ำและตายได้ ดังนั้นเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวจึงควรนำน้ำเชื้อออกมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำแล้วจึงนำไปผสมเทียมกับไข่ในภายหลัง เพราะการเก็บรักษาสเปิร์มที่อุณหภูมิต่ำทำได้ง่ายกว่าการเก็บรักษาไข่ที่อุณหภูมิต่ำ การเก็บน้ำเชื้อสัตว์น้ำที่อุณหภูมิต่ำยังมีบทบาทสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์ปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเพื่อผลิตปลาที่โตเร็วหรือทนทานต่อโรคได้เพราะสามารถนำน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีที่ได้เก็บรักษาไว้ไปใช้ในช่วงเวลาที่ต้องการเพื่อผสมเทียมหรือการผสมข้ามพันธุ์ปลาชนิดต่าง ๆ ได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้การลำเลียงน้ำเชื้อสัตว์น้ำที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำไปใช้ในการผสมเทียมก็ทำได้สะดวกกว่าการลำเลียงพ่อแม่พันธุ์ โดยสามารถขนส่งไปภายในประเทศและระหว่างประเทศได้ง่าย และยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการเก็บรักษาพันธุ์กรรมของธนาคารยีน (gene bank) และการเก็บรักษาตัวอ่อนของลูกปลาต่อไป อย่างไรก็ตามแม้ว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำที่อุณหภูมิต่ำจะมีความสำคัญต่อการพัฒนาด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำแต่การศึกษาด้านการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำที่อุณหภูมิต่ำในประเทศไทยยังมีค่อนข้างน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยทางด้านอื่น ๆ ของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งมีการพัฒนาอย่างมากเทียบเท่าในต่างประเทศ

ปลาดุกอูย (*Clarias macrocephalus*) จัดเป็นปลาน้ำจืดพื้นเมืองของไทยที่ได้รับความนิยมในการบริโภคสูง เนื่องจากเป็นปลาที่มีรสชาติดี เนื้อนุ่ม ฟู และเป็นปลาที่มีราคาจำหน่ายค่อนข้างสูง จึงทำให้ปลาดุกอูยเป็นปลาน้ำจืดเศรษฐกิจของไทย ที่ได้มีการเลี้ยงกันในทุกภาคของประเทศ

ไทย แต่ในปัจจุบันปลาดุกอยู่ในธรรมชาติได้ลดน้อยลงไปเป็นอย่างมาก ทำให้มีการเพาะและขยายพันธุ์ปลาดุกมากขึ้นเพื่อผลิตลูกปลาดุกให้เพียงพอต่อความต้องการในการเลี้ยง แต่เนื่องจากปลาดุกเป็นปลาที่ไม่สามารถรีดน้ำเชื้อโดยการกดบริเวณส่วนท้องได้เหมือนปลาชนิดอื่นเพราะอวัยวะของปลาดุกอยู่ลึกลงไปภายในช่องท้อง ทำให้การเพาะพันธุ์จึงจำเป็นต้องฆ่าปลาดุก เพศผู้เพื่อเอาอวัยวะออกมารวบรวมน้ำเชื้อ ซึ่งเป็นปัญหาหลักที่ผู้เพาะพันธุ์ปลาดุกจะต้องพบเสมอทุกครั้งในการเพาะพันธุ์ปลาดุก ดังนั้นการใช้น้ำเชื้อที่ได้มาจากการผ่าท้องปลาดุกแต่ละครั้งจึงควรใช้ให้คุ้มค่าที่สุด หากมีน้ำเชื้อเหลืออยู่ถ้าไม่เก็บรักษาให้ถูกวิธีก็จะทำให้น้ำเชื้อหมดสภาพไม่สามารถนำมาใช้เพาะพันธุ์ได้ เนื่องจากน้ำเชื้อสดของปลาที่รีดหรือรวบรวมออกมาใหม่ๆ (freshly collected milt or undiluted milt) มีคุณภาพลดต่ำลงเร็วมาก และไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ปลาได้ถ้าปล่อยน้ำเชื้อไว้ในระยะเวลาเกิน 30 นาทีขึ้นไปแม้ว่าจะเก็บน้ำเชื้อไว้ในตู้เย็นก็ตาม ดังนั้นการเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ปลาดุกโดยการผสมเทียมจำเป็นต้องมีการพัฒนาเทคโนโลยีวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกเพื่อให้มีน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีพร้อมอยู่ตลอดเวลาเพื่อการผสมเทียม และสามารถใช้ได้สะดวกรวดเร็วตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

โดยทั่วไปการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพื่อยืดระยะเวลาการเก็บรักษาที่สเปิร์มสามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ สามารถทำได้ใน 2 ลักษณะได้แก่ การเก็บรักษาแบบแช่เย็น (chilled storage) และการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง (cryopreservation) ซึ่งเทคโนโลยีดังกล่าวมีประโยชน์ต่อการจัดการฟาร์ม และสามารถเก็บรักษาคุณภาพน้ำเชื้อได้นานขึ้น โดยที่คุณภาพน้ำเชื้อที่เก็บแช่เย็น และเก็บแช่แข็งยังคงเหมือนกับการใช้น้ำเชื้อสดในการผสมเทียมไข่ การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้หลายสัปดาห์ และไม่จำเป็นต้องใช้เทคโนโลยีที่ซับซ้อน เนื่องจากเทคนิคนี้มีราคาถูก ทำได้ง่ายเพียงแค่มียุตู้เย็นธรรมดา และมีสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมก็สามารถนำมาเจือจางและเก็บรักษาน้ำเชื้อ (diluted milt) ที่อุณหภูมิ (0-4°C) ได้แล้ว จึงเหมาะกับโรงเพาะฟักขนาดกลางหรือขนาดเล็กที่สามารถนำเทคโนโลยีราคาถูกไปใช้ได้ทันที ในขณะที่การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (-196°C) มีประโยชน์อย่างมากต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาที่หาได้ยาก หรือใกล้สูญพันธุ์ รวมทั้งสามารถเก็บรักษาในลักษณะ sperm bank ของสายพันธุ์ปลาที่ดีที่ได้ปรับปรุงพันธุ์ เพราะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานเป็นปี การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งทำโดยการนำเอาน้ำเชื้อสัตว์น้ำที่มีคุณภาพดีมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (sperm extender) พร้อมกับใส่สารที่ป้องกันไม่ให้เซลล์เป็นอันตรายในระหว่างการแช่แข็งซึ่งเรียกว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) แล้วจึงเอาไปบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อพร้อมกับหลอดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วก่อนที่จะเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ซึ่งถ้าพัฒนาเทคนิคได้อย่างเหมาะสมจะสามารถรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อสัตว์น้ำได้เป็นเวลานานเป็นปี อย่างไรก็ตามการที่จะประสบผลสำเร็จในการพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่ำดังกล่าว

จำเป็นต้องศึกษาแบบบูรณาการเกี่ยวข้องกับตัวแปรจำนวนมากเช่น คุณภาพของสเปิร์มหรือน้ำเชื้อชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ หรือ cryoprotectants ที่เหมาะสม อัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลาย ซึ่งความสำเร็จในการพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตุ๋นก็ขึ้นอยู่กับว่าสามารถควบคุมตัวแปรเหล่านี้ได้มีประสิทธิภาพเพียงไร และทราบว่าความล้มเหลวที่อาจมีนั้นเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างเซลล์หรือการปนเปื้อนอย่างไรบ้าง

ด้วยเหตุที่การพัฒนาเทคโนโลยีจากองค์ความรู้พื้นฐานสามารถนำไปขยายผลในการประยุกต์ใช้ได้ในเชิงพาณิชย์ ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตุ๋นแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็งจึงควรพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาให้ได้ในปริมาณมาก และเก็บรักษาให้ได้นานที่สุดเพื่อประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยง และการอนุรักษ์ เพราะองค์ความรู้ใหม่ที่คาดว่าจะได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะทำให้ทราบถึงปัจจัยต่างๆ ที่ควบคุมการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่ำให้ประสบความสำเร็จอันส่งผลให้มีการนำเทคนิคการนำเอน้ำเชื้อปลาที่เก็บแช่เย็น หรือเก็บแช่แข็งมาใช้ผสมเทียมกับไข่ปลาเพื่อประโยชน์การเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์ต่อไป นอกจากนี้องค์ความรู้ใหม่ที่คาดว่าจะได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะทำให้ทราบถึงปัจจัยที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเมื่อถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ในน้ำ ซึ่งเป็นตัวแปรหลักในการกำหนดความสำเร็จหรือความล้มเหลวในการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ และทราบถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเซลล์สเปิร์มที่อาจมีขณะเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ นอกจากนี้ปัญหาการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่อาจมีในน้ำเชื้อปลาตุ๋นตั้งแต่แรก หรือมีการปนเปื้อนขณะเก็บรักษาน้ำเชื้อก็ควรจะมีการศึกษาว่าการปนเปื้อนของแบคทีเรียมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อขณะเก็บรักษาอย่างไรบ้าง และควรมีวิธีลดการปนเปื้อนอย่างไรบ้าง โดยเฉพาะน้ำเชื้อที่ได้เก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวถ้าสามารถพัฒนาเทคนิคเก็บรักษาได้นานหลายปี ก็เป็นไปได้ว่าแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดได้ถูกแช่แข็งไปพร้อมกับสเปิร์ม ซึ่งจะมีผลต่อคุณภาพสเปิร์มที่เก็บรักษาหรือไม่ก็เป็นประเด็นที่ควรศึกษา ดังนั้นองค์ความรู้ใหม่ที่คาดว่าจะได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะทำให้ทราบว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตุ๋นในระยะยาวเป็นปีจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียในน้ำเชื้อ หรือมีผลต่อความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่ปลาอย่างไรบ้าง เช่นเป็นไปได้ไหมว่าถ้าสามารถพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตุ๋นได้ก็อาจทำให้แบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนมาตั้งแต่ก่อนแช่แข็งมีจำนวนลดลงขณะเก็บรักษา ซึ่งหมายถึงการแช่แข็งน้ำเชื้ออาจช่วยทำให้แบคทีเรียที่ก่อโรคในปลาตุ๋นลดลงหรือหายไปขณะเก็บแช่แข็ง ทำให้ได้น้ำเชื้อแช่แข็งที่สามารถเก็บได้นานและปลอดโรค ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตุ๋นให้สามารถเก็บได้นานหลายปีนั้นจำเป็นต้องเก็บรักษาน้ำเชื้อคุณภาพดีที่ไม่มีการปนเปื้อนเพื่อประโยชน์ของการเพาะเลี้ยง หรือการอนุรักษ์ต่อไป องค์ความรู้ที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้จะมีผลอย่างมากต่อการความก้าวหน้าทางวิชาการการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาชนิดอื่น ๆ ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ หาได้ยากหรือใกล้สูญพันธุ์ เพราะข้อมูลที่ได้จากการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตุ๋นที่อุณหภูมิต่ำสามารถนำเทคนิควิธีการไปประยุกต์ใช้ได้กับปลาทุกชนิด เพียงแต่อาจต้อง

ปรับเปลี่ยนตัวแปรให้เหมาะสม และจะเป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนาการแช่เย็น หรือแช่แข็งตัวอ่อน หรือไข่ของสัตว์น้ำต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. พัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่อุณหภูมิต่ำแบบแช่เย็น และแบบแช่แข็งเพื่อประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์พันธุ์ปลาดุกอุย
2. ศึกษาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่เย็น (0-4 องศาเซลเซียส) ทั้งในสภาพที่ไม่เจือจางและเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์
3. ศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสูตรน้ำยาบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆที่ใช้แช่เย็นน้ำเชื้อปลาดุกอุย และปัจจัยต่างๆที่มีต่อระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่เย็น
4. ศึกษาชนิดของไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectants) ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็ง
5. ศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rates) และอัตราการละลาย (thawing rate) ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย
6. ศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์ม
7. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งที่ได้เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส)

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

ปลาดุกในสกุล *Clarias* เป็นปลาที่ไม่มีเกล็ด มีหนวด 4 คู่ ครีบหลังมีก้านครีบอก่อนอยู่จำนวน 48-78 อัน ครีบก้นมีจำนวน 41-61 อัน ฐานของครีบหลังและครีบก้นไม่ติดกับครีบกาง ครีบอกมีก้านครีบแข็งข้างละ 1 อัน ลักษณะกลมใหญ่ปลายแหลม ลักษณะปลายกะโหลกท้ายทอยอาจแหลมหรือป้าน ความยาวของกระดูกท้ายทอยและจุดเริ่มต้นของครีบหลังขึ้นอยู่กับชนิดของปลาดุก สำหรับปลาดุกที่จัดอยู่ในสกุลนี้มี 5 ชนิดด้วยกัน คือ

ปลาดุกด้าน	<i>Clarias batrachus</i> (Linnaeus)
ปลาดุกมาเลเซีย	<i>Clarias leiocanthus</i> Bleeker
ปลาดุก	<i>Clarias meladerma</i> Bleeker
ปลามัด	<i>Clarias teysmanni</i> Bleeker
ปลาดุกอูย	<i>Clarias macrocephalus</i> Gunther

ปลาดุกในสกุล *Prophagorus* มีรูปร่างคล้ายปลาดุกในสกุลแรกมาก จะแตกต่างกันที่ตรงครีบหลัง และครีบกางจะติดกัน ปลาดุกในสกุลนี้มี 3 ชนิดด้วยกันคือ

ปลาดุกลำพัน	<i>Prophagorus nieuhhoffii</i>
ปลาดุก	<i>Prophagorus cataractus</i> Fowler
ปลาดุก	<i>Prophagorus</i> sp.



ภาพที่ 1. ลักษณะปลาดุกอูย (*Clarias macrocephalus*)

ปลาดุกอูยมีชื่อสามัญว่า Gunther's walking catfish
มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Clarias macrocephalus* Gunther

Phylum	Chordata
Class	Pisces
Order	Nematognathi
Family	Claridae
Genus	Clarias
Species	Macrocephalus

ลักษณะที่สำคัญของปลาดุกอูย คือเป็นปลาน้ำจืดไม่มีเกล็ด ลำตัวเรียวยาว ด้านข้างแบน หัวแบนลง กะโหลกท้ายทอยป้านและโค้งมน เจริญที่ครีบหู มีฟันเลื่อยด้านนอกและด้านใน ครีบหาง ครีบกัน และครีบหลัง แยกออกจากกัน ครีบหางปลายกลมมน ลำตัวมีสีดำปนเหลือง ท้องสีเหลืองจาง มีอวัยวะพิเศษอยู่ในบริเวณช่องเหงือกมีทรวดทรงคล้ายต้นไม้เล็กๆช่วยในการหายใจ

ปลาดุกอูยชอบอาศัยอยู่ในน้ำที่จืดสนิท และพื้นดินโคลน อาจอยู่ได้ในน้ำกร่อยเล็กน้อย สามารถอยู่ได้ในน้ำที่มีออกซิเจนต่ำ ชอบหาอาหารตามพื้นดิน กินอาหารประเภทเนื้อสัตว์ ปลาที่มีขนาดเล็ก ปลาดุกอูยที่มีขนาด 15 เซนติเมตรขึ้นไปจะเริ่มวางไข่และสร้างน้ำเชื้อซึ่งสามารถผสมพันธุ์ได้ ส่วนใหญ่จะเริ่มผสมพันธุ์วางไข่ในช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนพฤศจิกายน

ชีววิทยาของปลาดุก

ความแตกต่างระหว่างเพศของปลาดุก

การแยกเพศของปลาดุกอูยว่าเป็นเพศผู้หรือเพศเมียนั้น สังเกตได้จากลักษณะเพศที่เห็นได้ง่ายและเด่นชัดคือ เพศผู้บริเวณใกล้กับช่องทวารหนักจะมีอวัยวะเพศ (urogenital papillae) ลักษณะเรียวยาวยื่นออกมา แต่ถ้าเป็นเพศเมียนั้นอวัยวะเพศจะสั้นกว่าและมีรูปร่างค่อนข้างกลม ปลาดุกที่จะสามารถทราบเพศได้นั้นต้องเป็นปลาที่มีขนาดยาวเกิน 15 เซนติเมตรขึ้นไป นอกจากนี้ในช่วงฤดูการวางไข่ส่วนท้องของปลาตัวเมียจะอูมเป่งกว่าปกติและออกมีสีชมพูอ่อนซึ่งเป็นลักษณะที่สังเกตเห็นได้ชัดเจนและถ้าแม่ปลามีไข่สุกสมบูรณ์เต็มที่แล้ว ใช้มือบีบเบาๆที่ท้องของแม่ปลาจะมีไข่ไหลออกมา (วีรพงศ์, 2530)



ภาพที่ 2 ลักษณะความแตกต่างระหว่างเพศของปลาดุกอุย

ฤดูผสมพันธุ์และการวางไข่

ปลาดุกที่อาศัยอยู่ตามธรรมชาตินั้น จะวางไข่ในช่วงฤดูฝนระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงเดือนพฤศจิกายนหลังจากที่ได้จับคู่พร้อมที่จะผสมพันธุ์กันแล้วปลาดตัวเมียจะทำการขุดหลุมหรือโพรงในดิน ไตรัดหน้าประมาณ 20-30 เซนติเมตร เพื่อใช้เป็นที่พักผสมพันธุ์วางไข่ที่วางหรือเกาะติดอยู่กับพื้นกันหลุมหรือโพรง และวางไข่ที่มีสีเหลืองอมน้ำตาล ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมงก็จะฟักเป็นลูกปลาวัยอ่อน (larvae)

อวัยวะสืบพันธุ์ของปลาเพศผู้

อวัยวะเป็นอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ที่สำคัญมาก อวัยวะของปลาที่มีลักษณะเป็นพู 2 พูหรือถุงยาว 2 ถุง เรียงอยู่ติดผนังช่องท้องด้านบนใกล้ไตและมีเยื่อที่เรียกว่า mesorchium ช่วยยึดอวัยวะให้ติดผนังช่องท้องด้านบนบริเวณปลายอวัยวะด้านท้าย (posterior) ทั้ง 2 พูของปลากระดุกแข็งและจะมีท่อน้ำเชื้อ (sperm duct) เป็นท่อนสั้นๆ ไปตามแนวกึ่งกลางตัวไปเปิดออกบริเวณช่องเพศ (urogenital pore) ทำให้สเปิร์มที่สร้างจากถุงอวัยวะถูกลำเลียงผ่านท่อน้ำเชื้อออกสู่ภายนอกร่างกายร่วมกับปัสสาวะ แต่สำหรับปลาบางชนิด เช่น ปลาแซลมอนหรือปลาเทราท์ จะไม่มีท่อน้ำเชื้อทำให้สเปิร์มที่สร้างจากอวัยวะไหลเข้าสู่ช่องว่างภายในลำตัวแล้วจึงไหลออกสู่ภายนอกร่างกาย นอกจากนี้ยังพบว่าขนาดและน้ำหนักของอวัยวะจะมีการเปลี่ยนแปลงไปตามอายุของปลาและฤดูกาล โดยเฉพาะในฤดูผสมพันธุ์จะมีค่า gonadosomatic index หรือ $GSI = \frac{\text{น้ำหนักอวัยวะ}}{\text{น้ำหนักปลา}} \times 100$ สูงสุด (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

ลักษณะรูปร่างของสเปิร์ม

สเปิร์มของปลาต่างจากสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆ เพราะไม่มีส่วนอะโครโซม (acrosome) โดยมีข้อยกเว้นในปลาบางชนิดเท่านั้น ทั้งนี้เป็นเพราะไข่ปลามีช่องที่เรียกว่าไมโครไพล์ (micropyle) ซึ่งเป็นทางผ่านของสเปิร์มเข้าไปปฏิสนธิกับไข่ อะโครโซมจึงไม่จำเป็นสำหรับปลาเหมือนสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สเปิร์มของปลาประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

1. ส่วนหัว (head) มีความแตกต่างกันไปตามชนิดของปลาโดยในส่วนหัวจะมีนิวเคลียสที่มีดีเอ็นเอ (DNA) เป็นสารพันธุกรรมเพื่อปฏิสนธิกับนิวเคลียสของไข่ นอกจากนี้อาจพบ อะโครโซม (acrosome) ซึ่งแต่เดิมเรียกว่า อพิคอล บอดี้ (apical body) อยู่ภายในส่วนหัว

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

3. ส่วนหาง (tail) เป็นส่วนที่มีลักษณะยาวและในส่วนหางจะมีไฟบริล (fibril) อยู่ทั้งหมด 11 คู่ อยู่ตรงกลาง 2 คู่ และอยู่โดยรอบ 9 คู่

ปลาระดับชั้นส่วนมากจะมีสเปิร์มที่มีส่วนหัวเป็นรูปทรงกลม (spherical) หรือทรงรี (ovate หรือ acorn-shape) โดยส่วนหัวมีขนาดประมาณ 2-3 ไมโครเมตรและความยาวสเปิร์มจากหัวจนถึงปลายหางประมาณ 40-60 ไมโครเมตร ส่วนกลางมีขนาดเล็กและส่วนใหญ่มีหางจำนวน 1 หาง (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

คุณลักษณะสำคัญอีกประการหนึ่งของสเปิร์ม เมื่อสเปิร์มยังอยู่ในตัวปลาหรือเมื่อรีดน้ำเชื้อสดออกมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์นั้นตัวสเปิร์มของปลาโดยทั่วไปยังไม่มี การเคลื่อนที่ (immotile) แต่เมื่อน้ำเชื้อปลาผสมกับน้ำขณะที่เหมาะสมตามธรรมชาติ หรือเมื่อนำเอาหยดเล็กๆ ของน้ำเชื้อผสมกับหยดน้ำบนแผ่นกระจกสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะพบว่าสเปิร์มจะถูกกระตุ้นให้มีการเคลื่อนที่อย่างรุนแรงอันเป็นผลเนื่องมาจากการเจือจาง แต่การเคลื่อนที่ดังกล่าวจะสิ้นสุดลงอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาประมาณไม่เกิน 1 นาทีสำหรับน้ำเชื้อปลาน้ำจืด ดังนั้นการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อปลาโดยใช้อัตราการเคลื่อนที่เป็นหลักจึงต้องกระทำภายในทันทีทันใดที่นำเชื้อปลาผสมกับน้ำบนกระจกสไลด์ และเมื่อเจือจางน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำยาเจือจาง (extender) ใดๆ ก็ตาม น้ำยาชนิดนั้นจะต้องไม่กระตุ้นการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ทั้งนี้เพื่อเป็นการเก็บรักษาให้สเปิร์มมีชีวิต และมีความสามารถในการผสมกับไข่ได้ผลใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสด (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

Alavi *et al.* (2007) ศึกษาผลของ K^+ และ Ca^{2+} ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา (*Perca fluviatilis*) พบว่า Ca^{2+} มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ความเข้มข้นที่ 2.5 mM มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเพิ่มขึ้น และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ Ca^{2+} เท่ากับ 5.0

mM เมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่ 2.5 mM ส่วน K^+ พบว่าความเข้มข้นของ K^+ ที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มโดยสเปิร์มจะเริ่มเคลื่อนที่เมื่อความเข้มข้นของ K^+ เท่ากับ 40 mM และจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อความเข้มข้นของ K^+ เท่ากับ 80 mM สรุปได้ว่าอัตราการเจือจางของ K^+ และ Ca^{2+} มีผลต่อการเคลื่อนที่ ความเร็วในการเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่เคลื่อนที่

Alavi และ Cosson (2005) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่และการรอดชีวิตของสเปิร์มพบว่าระยะเวลาในการเคลื่อนที่ การปฏิสนธิ และอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ เพราะประสิทธิภาพของสเปิร์มปลาขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ อัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิในสารละลายเพิ่มขึ้น ซึ่งจะทำให้ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสั้นลง และเมื่อลดอุณหภูมิมีผลทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่ช้าลงและระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มนานขึ้น โดยศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของปลา *Siberian sturgeon* พบว่าระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม จะเคลื่อนที่ลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 10 องศาเซลเซียส จนถึง 17.5 องศาเซลเซียส และปลาลามปากเปิด (*Polyodon spathula*) สามารถเคลื่อนที่ได้ 4 นาที แต่มีเพียง 1-5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่สามารถเคลื่อนที่ได้ถึง 6 นาที ที่ 10-12 องศาเซลเซียส

การแช่เย็นน้ำเชื้อปลา

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิต่ำ (0-4 องศาเซลเซียส) ได้มีการศึกษาอย่างแพร่หลายในต่างประเทศทั้งในยุโรปและสหรัฐอเมริกา โดยนิยมศึกษาในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ หรือปลาที่ใกล้จะสูญพันธุ์บางชนิด เช่น Rainbow trout (Billard, 1981), Channel catfish (Christensen และ Tiersch, 1996), Atlantic sturgeon (DiLauro และคณะ, 1994) และ Paddle fish (Brown และ Mims, 1995) เป็นต้น แต่ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่เย็นเพื่อการผสมเทียมแม้ว่าการพัฒนาด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้มีการใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นทำได้ 2 วิธีได้แก่ การเก็บโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (undiluted milt) และการเก็บโดยเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (diluted milt) โดยทั่วไปแล้วการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (undiluted form) ทำได้ง่ายและไม่สลับซับซ้อนเหมือนกับการเก็บน้ำเชื้อแช่เย็นเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (diluted form) อย่างไรก็ตามระยะเวลาที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นั้นมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับเทคนิคการเก็บรักษา และชนิดของปลาซึ่งอาจจะเก็บได้ตั้งแต่ 2-3 ชั่วโมง จนถึง 2-3 เดือน (Scott และ Baynes, 1980) ปัจจัยที่มีผลต่อระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เย็นที่ไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์เท่าที่รายงานมา ได้แก่การให้ออกซิเจนสมทบ และความสูงของน้ำเชื้อสดขณะเก็บรักษาในภาชนะ (Stoss และคณะ, 1987) ส่วนการเก็บรักษาน้ำเชื้อ

โดยเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (diluted milt) จะมีความยุ่งยากกว่าเพราะจำเป็นต้องใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่ไม่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ระหว่างการเก็บแช่เย็น เนื่องจากสเปิร์มของปลาน้ำจืดทุกชนิดจะเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำจืด หรือเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีแรงดันออสโมติก (osmolarity) ลดต่ำลง ซึ่งในสภาวะเช่นนี้สเปิร์มของปลาน้ำจืดทุกชนิดจะถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว และจะหยุดเคลื่อนที่ภายในเวลาไม่เกิน 1 นาที ดังนั้นการพัฒนาเลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่มีแรงดันออสโมติกเท่ากับ หรือใกล้เคียงกับแรงดันออสโมติกของน้ำเชื้อเพื่อเจือจางน้ำเชื้อมีความจำเป็นมากในการประสบความสำเร็จในการแช่เย็นน้ำเชื้อ เพราะจะทำให้น้ำเชื้อไม่ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ขณะที่เมื่อถูกเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม โดยทั่วไปสเปิร์มของปลาน้ำจืดทุกชนิดเมื่อถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่และหยุดเคลื่อนที่แล้ว จะพบว่าสเปิร์มเหล่านั้นจะไม่สามารถนำมาใช้ผสมเทียมกับไข่ได้เลย เพราะไม่สามารถว่ายน้ำเข้าไปปฏิสนธิในช่อง micropyle ของไข่ได้ ดังนั้นหัวใจสำคัญของการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่ำไม่ว่าจะเก็บน้ำเชื้อแบบแช่เย็น หรือเก็บแบบแช่แข็งที่มีขั้นตอนของการเจือจางน้ำเชื้อในสารละลายอะไรก็ตาม จะต้องใช้สารละลายที่เหมาะสมที่จะไม่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ในขณะที่มีการเจือจางน้ำเชื้อ อย่างไรก็ตามการแช่เย็นน้ำเชื้อโดยวิธีการเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์นี้สามารถควบคุมการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่อาจเกิดขึ้นในน้ำเชื้อระหว่างการแช่เย็นได้ดีกว่าการเก็บน้ำเชื้อโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ จึงทำให้การเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยการเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์สามารถเก็บรักษาได้นานกว่าการเก็บรักษาโดยไม่เจือจาง (น้ำเชื้อสด) (Stoss, 1983)

อย่างไรก็ตามคุณภาพสเปิร์มของปลาอาจมีการเปลี่ยนแปลงได้มากในช่วงที่รวบรวมน้ำเชื้อถ้ามีปัสสาวะออกมาปนกับน้ำเชื้อ ดังเช่นรายงานของ Dreanno *et al.* (1998) ที่ได้ศึกษาคุณภาพของน้ำเชื้อปลา (*Psetta maxima*) เมื่อมีการปนเปื้อนด้วย urine พบว่า urine ที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อมีผลต่อคุณภาพของสเปิร์มปลา (*Psetta maxima*) โดยเปรียบเทียบการปนเปื้อนของน้ำเชื้อโดยวิธีการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อที่แตกต่างกัน 2 วิธี คือ วิธีแรกเก็บโดยการใช้นิรนัย (syringe) ดูดน้ำเชื้อจากช่องเพศของปลาโดยการทำช่องเพศแห้งก่อน วิธีนี้มีผลทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วลดลงจาก 230 ไมโครเมตร/วินาที เป็น 160 ไมโครเมตร/วินาที หลังการกระตุ้น 10 วินาที วิธีที่สองสอดท่อเข้าไปในช่องเพศของปลาแล้วใช้มือกดรีดบริเวณท้องปลามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงจาก 83.4 เปอร์เซ็นต์เป็น 54.2 เปอร์เซ็นต์ หลังการกระตุ้น 10 วินาที นอกจากนี้ยังมีผลต่อการฟักไข่ สเปิร์มที่มีการปนเปื้อนของ urine เมื่อนำไปแช่เย็นจะมีความสามารถในการปฏิสนธิต่ำ

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งที่มีการศึกษาในต่างประเทศนิยมทำในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและใกล้สูญพันธุ์ทั้งปลาน้ำจืด และปลาทะเล เช่น ปลากระพงขาว ปลา

salmon ปลา channel catfish ปลา sea bream และปลา Atlantic croaker เป็นต้น การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานเป็นปี เมื่อต้องการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในการผสมเทียมก็นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อมาละลายโดยการเพิ่มอุณหภูมิ ดังนั้นความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ และชนิดสาร cryoprotectants ที่เหมาะสม (Rana และ McAndrew, 1989) อัตราการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็ง (freezing) และการเพิ่มอุณหภูมิขณะละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (Scott และ Baynes, 1980) นอกจากนี้ความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อปลาที่เกิดขึ้นในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และ เทคนิคของการทำน้ำเชื้อปลาแช่แข็ง ก็มีผลทำให้ความสำเร็จของการทำน้ำเชื้อแช่แข็งแต่ละครั้งแตกต่างกันไป โดยทั่วไปน้ำเชื้อของปลา (milt) ประกอบด้วย สเปิร์ม (sperm) และของเหลวที่หล่อเลี้ยง (seminal fluid) โดยที่สเปิร์มจะไม่เคลื่อนที่ขณะอยู่ในถุงอันทะ หรือของเหลวที่หล่อเลี้ยง แต่จะมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วมากเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสภาพแวดล้อมภายนอก และจะหยุดเคลื่อนที่ภายใน 1 นาทีหลังจากถูกกระตุ้น กลไกที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาน้ำจืดพบว่าสารละลายที่มีค่า osmolarity ต่ำกว่า (hypotonicity) ระดับที่พบใน seminal fluid จะกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ แต่ในปลาทะเลนั้นสารละลายที่มีค่า osmolarity สูงขึ้น (hypertonicity) จะกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ (Morisawa และคณะ, 1983) ดังนั้นการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ จึงมีความสำคัญมากเพราะทำให้สเปิร์มไม่ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ขณะอยู่ในระหว่างการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง เพราะถ้าสเปิร์มถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ก่อนที่จะทำการแช่แข็งนั้น ก็จะมีผลทำให้การแช่แข็งน้ำเชื้อประสบความล้มเหลวทันที

งานวิจัยด้านการแช่เย็นน้ำเชื้อปลาที่มีการศึกษาในต่างประเทศมีประเด็นสำคัญที่มีการศึกษาดังนี้

Morisawa และคณะ (1983) ได้ศึกษาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มของปลาน้ำจืดหลายชนิดเช่น ปลาไน ปลาดุก พบว่า osmotic pressure ที่มีค่าลดลงจะมีผลในการกระตุ้นทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่มากขึ้น Bates และคณะ (1996) ก็ได้เสนอว่า osmolarity ที่มีค่าลดลงจะมีผลในการกระตุ้นให้สเปิร์มของปลา channel catfish เคลื่อนที่เช่นกัน ซึ่งอาจเป็นลักษณะปกติที่เกิดขึ้นใน Superorder Ostariophysii ในการทางตรงกันข้ามสเปิร์มของปลาทะเลจะเคลื่อนที่มากขึ้น เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารละลายที่มีค่า osmotic pressure สูงกว่าระดับที่พบใน seminal fluid ฉะนั้นการที่จะเก็บน้ำเชื้อแช่เย็นได้นานจึงควรเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่า osmolarity เท่ากับระดับที่พบใน seminal fluid เพราะจะช่วยป้องกันมิให้สเปิร์มถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ได้ เนื่องจากเมื่อสเปิร์มเริ่มเคลื่อนที่ จะมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วมาก และจะหยุดเคลื่อนที่ภายในเวลาประมาณ 1 นาทีเท่านั้น

Stoss และคณะ (1987) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา rainbow trout แช่เย็นโดยไม่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ พบว่า ความสูงของน้ำเชื้อที่เก็บไม่ควรเกิน 5-6 มิลลิเมตร ขณะเก็บแช่เย็น เพื่อให้สเปิร์มได้มีอากาศถ่ายเทอย่างเพียงพอ

DiLauro และคณะ (1994) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Atlantic sturgeon แช่เย็นโดยไม่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ไว้บนน้ำแข็ง และให้ออกซิเจนสมทบทุกวันพบว่า น้ำเชื้อสามารถเก็บได้เป็นระยะเวลา 5 วัน โดยที่คุณภาพของสเปิร์มไม่เปลี่ยนแปลง

Satterfield และ Flickinger (1995) ได้นำน้ำเชื้อปลา Walleye จำนวน 8 ml มาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน น้ำเชื้อ : สารละลายบัฟเฟอร์ 1:2 ภายในกล่องแซนวิช (Plastic Rubbermaid sandwich container) ขนาด 11.4 x 10.8 ซม. แล้วจึงเก็บแช่เย็นในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศา เซลเซียส พร้อมทั้งให้ออกซิเจนสมทบทุกวัน ปรากฏว่า น้ำเชื้อแช่เย็นที่เก็บไว้นาน 5 วัน สามารถปฏิสนธิไข่ปลาได้ดี มีอัตราการปฏิสนธิเท่ากับการใช้น้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่

Christensen และ Tiersch (1996) ได้นำน้ำเชื้อปลา Channel catfish มาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ Hank's balanced salt solution แล้วเก็บในภาชนะต่าง ๆ กัน ที่อุณหภูมิ 4 องศา เซลเซียส ทั้งในสภาพให้ออกซิเจน และไม่ให้ออกซิเจนสมทบ ปรากฏว่า น้ำเชื้อที่เก็บในถุงพลาสติก Zip-loc ที่ให้ออกซิเจนสมทบ สามารถเก็บรักษาได้ในระยะเวลานานกว่าน้ำเชื้อที่เก็บโดยไม่ให้ออกซิเจนสมทบ

งานวิจัยด้านการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งโดยทั่วไปมีขั้นตอนการทำงานที่คล้ายกันในการทดลองในปลาหลายชนิด โดยความสำเร็จที่ได้ส่วนมากมีความแตกต่างกันไปในปลาแต่ละชนิดทั้งในแง่ของชนิดและความเข้มข้นของ cryoprotectants ที่ใช้ อัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็ง และ อัตราการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ดังนั้นพัฒนาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอยู่จึงต้องเริ่มจากการนำเอาสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับปลาเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุก ซึ่งจะต้องไม่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่มาจากน้ำเชื้อ แล้วจึงนำไปผสมด้วย cryoprotectants ชนิดต่าง ๆ ที่เวลาต่าง ๆ กันเพื่อดูความเป็นพิษของ cryoprotectants ที่อาจมีต่อสเปิร์ม จากนั้นจึงใช้อัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็ง และ อัตราการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อละลายน้ำเชื้อที่แตกต่างกันโดยมีสมมติฐานว่า ความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอยู่ครั้งนี้ขึ้นอยู่กับทางเลือกใช้ชนิดและระดับของ cryoprotectants ที่เหมาะสม และการลดหรือเพิ่มอุณหภูมิอย่างเหมาะสมดังที่ปรากฏในงานวิจัยเหล่านี้

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

Gwo และคณะ (1991) ได้ศึกษาการเก็บน้ำเชื้อปลา Atlantic croaker แบบแช่แข็ง พบว่า sperm extender ที่ประกอบด้วย กลีเซอรอล กลูโคส และ ซูโครส สามารถใช้เจือจางน้ำเชื้อขณะทำการแช่แข็ง โดยมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ sperm extender ชนิดอื่นๆ ที่มีความสลับซับซ้อน หรือ

มีสารเคมีหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ และยังพบว่าอัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็งตั้งแต่ -10 องศาเซลเซียส/นาที่ จนถึง -150 องศาเซลเซียส/นาที่ ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิขณะนำมาผสมกับไข่

Rana และ McAndrew (1989) รายงานการใช้น้ำเชื้อปลาไนล์แช่แข็งโดยเจือจางน้ำเชื้อในสารละลาย Ringer ที่มี methanol เป็น cryoprotectant ที่ระดับต่างๆกัน ในหลอดฟางขนาด 0.5 ml. พบว่า การใช้ methanol 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลดีที่สุดในการปกป้องเซลล์ และการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งในอัตราที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 5 องศาเซลเซียส/นาที่ จนถึง 50 องศาเซลเซียส/นาที่ ก่อนเก็บในไนโตรเจนเหลว ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ

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

Tiersch และคณะ (1994) ได้นำน้ำเชื้อปลา channel catfish มาแช่แข็งโดยผสม cryoprotectant ต่างๆชนิด และ Hank's balanced salt solution ลงไปในน้ำเชื้อ พบว่า methanol ให้ผลดีที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยที่สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ และมีความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่เทียบเท่ากับ การใช้น้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ๆ

Kurokura (1984) ทดสอบการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนล์โดยวิธีแช่แข็งและทดสอบประสิทธิภาพน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็ง โดยนำไปผสมเทียมกันไข่ โดยทดลองใช้น้ำยา 2 สูตร น้ำยาสูตรแรกมีองค์ประกอบเหมือนน้ำยา Ringer สำหรับรักษาน้ำเชื้อปลาน้ำจืด ส่วนน้ำยาสูตรที่สอง ที่มีระดับโปแตสเซียมสูงกว่าพลาสมาของน้ำเชื้อปลาไนล์ โดยใช้ Dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ทั้งสองสูตร จากการทดลองพบว่า น้ำเชื้อที่เก็บรักษาโดยใช้น้ำยาสูตรแรกสามารถปฏิสนธิกับไข่จนพัฒนาถึงระยะเกิดเลนส์ตา (Eyed stage) 68.6 % เมื่อ เทียบกับน้ำเชื้อสดซึ่งมีอัตราการปฏิสนธิ 83 %

Jenkins และ Tiersch (1997) ได้ทำการศึกษาการเก็บน้ำเชื้อปลา Channel catfish ด้วยวิธีแช่เย็น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตัวอย่างสเปิร์มถูกเก็บไว้ในน้ำยาสูตร HBSS แบบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และในน้ำยาสูตร HBSS แบบที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่า สเปิร์มในน้ำยา HBSS ที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ ไม่เคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง ส่วนสเปิร์มในสูตร HBSS ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว สเปิร์มจะหยุดเคลื่อนไหว ภายใน 10 วัน โดยการเคลื่อนที่จะลดลงตามการเพิ่มขึ้นของจำนวนของแบคทีเรีย

สารไครโอโพรเทคแทนท์

เป็นสารเคมีที่จำเป็นอย่างยิ่งต่อการมีชีวิตของเซลล์ที่นำมาแช่แข็ง เพื่อป้องกันอันตรายเนื่องจากการเกิดเกล็ดน้ำแข็งแก่ตัวเซลล์ โดยทั่วไปสารไครโอโพรเทคแทนท์ (Cryoprotectant) แบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

1. ชนิดที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ (intracellular cryoprotectant) เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol, ethylene glycol, formamide, acetamide สารชนิดนี้สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ โดยที่เมื่อใส่สารป้องกันการแข็งตัวชนิดนี้ก็จะแทรกเข้าไปอยู่ภายในเซลล์ ทำให้น้ำถูกดึงออกจากเซลล์ก่อนนำไปลดอุณหภูมิ ช่วยควบคุมการผันแปรของความเข้มข้นภายในและภายนอกเซลล์ไม่ให้เปลี่ยนแปลงเร็วเกินไป ควบคุมการดึงน้ำออกจากเซลล์ให้เป็นไปอย่างต่อเนื่อง ช่วยเปลี่ยนแปลงรูปร่างและขนาดของเกล็ดน้ำแข็ง (ice crystal) ภายในเซลล์โดยลดเหลี่ยมมุมลง เป็นการลดอันตรายที่จะเกิดกับเซลล์ ช่วยลดอุณหภูมิที่จะเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ให้ต่ำถึง -40 องศาเซลเซียส และป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายด้วยเกล็ดน้ำแข็ง

สารเคมีกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายได้ดีเมื่อใช้ในระดับที่ความเข้มข้นค่อนข้างสูงถ้าพิจารณาถึงความสามารถในการแพร่เข้าสู่ภายในเซลล์แล้ว alcohol มีอัตราการแพร่สูงที่สุดรองลงมา ได้แก่ DMSO และ glycol ตามลำดับ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) สารป้องกันการแข็งตัวชนิดออกฤทธิ์ภายในเซลล์นี้มักเป็นพิษทำลายเซลล์ได้ เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นตัวออกซิไดส์ ดังนั้นควรคำนึงถึงระดับความเข้มข้นที่ใช้และระยะเวลาในการทิ้งเซลล์ให้ถึงสมดุลที่เหมาะสม

2. ชนิดที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ (extracellular cryoprotectant) เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น sucrose, polyvinyl, pyrrolidone (PVP), trehalose, dextrans สารชนิดนี้ไม่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ใช้ได้ดีที่ความเข้มข้นต่ำกว่าชนิดแรกและมีความเป็นพิษน้อยกว่ามีความสามารถในการรักษาสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ให้คงอยู่ได้ภายหลังการแช่แข็ง

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการใช้ไครโอโพรเทคแทนท์ (Cryoprotectant) ทั้ง 2 ชนิด นั้นให้ผลดีกว่าที่จะใช้สารตัวใดตัวหนึ่งในการแช่แข็งน้ำเชื้อของสัตว์บางชนิด โดยจะช่วยให้เกิดการดึงน้ำจากเซลล์อย่างค่อยเป็นค่อยไป เป็นการลดปัญหาอันตรายที่อาจเกิดเนื่องจากความดันออสโมซิส เนื่องจากน้ำถูกดึงออกจากเซลล์หรือเข้าสู่เซลล์เร็วเกินไป (มนต์ชัย ดวงจินดา และ คณะ, 2544)

ในกระบวนการแช่แข็งต้องนำสารละลายบัฟเฟอร์ (extender) มาละลายในสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ก่อนแล้วจึงค่อยนำไปผสมกับน้ำเชื้อหรือตัวอ่อน โดยการใส่สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ควรใส่อย่างช้าๆและที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อช่วยให้เซลล์ค่อยๆปรับสภาพตัวเอง สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่จะใช้ในการแช่แข็งนี้ ควรเป็นน้ำยาที่เตรียมขึ้นมาใหม่ หรือถ้าจะเตรียมไว้ล่วงหน้าควรเตรียมยาปฏิชีวนะและเก็บไว้ในตู้เย็น อย่างไรก็ตามไม่ควร

เตรียมล่วงหน้ามากกว่า 1-2 วัน และเมื่อใส่สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ในน้ำเชื้อแล้วต้องทิ้งระยะเวลาให้สารนี้ซึมเข้าไปอยู่ในเซลล์ (equilibration time) ซึ่ง equilibration time เป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญต่อความสำเร็จในการแช่แข็งเช่นกัน โดยในสัตว์แต่ละชนิด สารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) แต่ละตัว แต่ละความเข้มข้น จะมี equilibration time ที่แตกต่างกัน

ดังนั้นการแช่แข็งต้องมีการทดลองหา equilibration time ที่เหมาะสมด้วย ถ้าปล่อยให้สารไครโอโพรเทคแทนท์ ผสมอยู่กับน้ำเชื่อนานเกินไปจะมีผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ แต่ถ้าน้ำเชื้อผสมอยู่ในสารไครโอโพรเทคแทนท์น้อยเกินไปอาจจะยังซึมเข้าสู่เซลล์ยังไม่ทั่วถึง เมื่อนำเซลล์ไปแช่แข็งจึงเกิดความล้มเหลวได้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

บีกเกอร์

ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 250 และ 500 มิลลิลิตร

ไมโครปิเปต

กระดาษกรอง

เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 ตำแหน่ง

เครื่องชั่งแบบทศนิยม 4 ตำแหน่ง

เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer)

เครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (Controlled-rate programmable freezer)

กล้อง stereo microscope

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

Osmometer

Hemocytometer

ถังเก็บไนโตรเจนเหลวขนาดใหญ่ (dewar)

ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ

ตู้บ่มเชื้อ

ตู้ autoclave

ตู้อบเครื่องแก้ว (hot air oven)

Glass micropipette ขนาด 5,10 และ 100 μ l

French Straw

Cryotubes

Canister

canes

Vial tubes

rack

Tissue culture flasks

Thermocouple probe

โนโตรเจนเหลว

พ่อแม่พันธุ์ปลาดุกอุย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการผสมเทียมไข่ปลา

สารเคมีประเภทต่างๆที่ใช้ในการแช่เย็น การแช่แข็ง การผสมเทียมและการย้อมสี

ระเบียบวิจัย

วิธีการดำเนินงานวิจัยของการศึกษาในครั้งนี้มีดังนี้

1. การรวบรวมน้ำเชื้อ และการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลาดุกอุย

พ่อแม่พันธุ์ปลาดุกอุยถูกทำให้สลบแล้วเช็ดบริเวณช่องท้องให้แห้งสนิทจากนั้นทำการผ่าท้องปลาแล้วเอาอวัยวะออกมาเพื่อรวบรวมน้ำเชื้อ โดยล้างอวัยวะปลาดุกอุยให้สะอาดด้วย 0.85% NaCl เพื่อให้เลือดที่ติดรอบอวัยวะออกไป นำเอาอวัยวะปลาดุกอุยที่สะอาดวางบนจานแก้วที่แห้งและอยู่บนน้ำแข็ง จากนั้นตัดถุงอวัยวะที่บริเวณปลายแล้ว รีดเอาแต่น้ำเชื้อออกมาในลักษณะ aseptic technique

น้ำเชื้อที่ใช้ในการศึกษาแต่ละครั้งถูกรวบรวมจากตัวผู้หลายตัว (pooled milt samples) ประมาณ 5-6 ตัวเพื่อลดความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อ (individual variation) สำหรับการทดลองแต่ละชุด น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีเท่านั้นที่ได้ถูกนำมาใช้ในการทดลอง โดยเป็นน้ำเชื้อที่มีลักษณะขาวขุ่น และไม่มีเมือก หรือ เลือดปน และมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่สูง (มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์) เท่านั้น น้ำเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ไม่ถูกนำมาใช้ในการทดลองเพื่อให้มั่นใจว่าขณะเริ่มการทดลองน้ำเชื้อปลามีคุณภาพที่ดีพอ

พ่อแม่พันธุ์ที่มีน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีถูกรวบรวมน้ำเชื้อออกมาเพื่อประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อที่สำคัญได้แก่ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (percent sperm motility) เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (percent sperm viability) แรงดันออสโมติก (osmotic pressure หรือ osmolality) และความหนาแน่นของสเปิร์ม (sperm density) น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีเท่านั้นถูกนำมาใช้ในการทดลองแช่เย็น และแช่แข็ง โดยน้ำเชื้อที่รวบรวมได้จะถูกนำมาทดลองในเวลาไม่เกิน 15 นาทีหลังการรวบรวม น้ำเชื้อที่รวบรวมมาในระหว่างการทดลองไม่ว่าจะรวบรวมในช่วงต้นฤดู กลางฤดู หรือปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ได้ถูกประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเพื่อทราบ baseline information ก่อนการแช่เย็นหรือการแช่แข็งและทราบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อปลาในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (spawning season)

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มทำโดยการหยดตัวอย่างน้ำเชื้อ (5 μL) ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาดแล้วจึงหยด 0.4% NaCl ลงไป 100 μL พร้อมกับปิดด้วย cover glass เบาๆ อย่างรวดเร็ว เพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่แล้วจึงประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่เคลื่อนที่ทันทีให้เสร็จภายใน 15 วินาที โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า เพอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มประเมินจากสเปิร์มที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าอย่างรวดเร็ว เมื่อถูกกระตุ้นโดยแบ่งระดับที่สเปิร์มเคลื่อนที่ไว้ 6 ระดับ คือ สเปิร์มที่เคลื่อนไหวได้ 0, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% ตามวิธีการของ Vuthiphandchai and Zohar (1999)

จำนวนสเปิร์มที่มีชีวิตเช็คโดยการนำเอาน้ำเชื้อ (5 μL) มาย้อมสีด้วยสารละลาย eosin-nigrosin (5 μL) ตามวิธีการของ Fribourgh (1966) แล้วจึงสุ่มนับจำนวนสเปิร์มที่มีชีวิตซึ่งจะไม่ติดสีย้อม (viable sperm) และจำนวนสเปิร์มที่ตายซึ่งจะติดสีย้อม (dead sperm) โดยสุ่มนับไม่ต่ำกว่า 250 ตัว/สไลด์ และนับ 3 ซ้ำต่อชุดการทดลอง โดยการใช้อุปกรณ์กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า แล้วจึงคำนวณกลับหาเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่มีชีวิต

แรงดันออสโมติกของน้ำเชื้อวัดโดยนำน้ำเชื้อปลาดุกอุยมาใส่ในหลอดแล้วเหวี่ยงด้วยความเร็วสูง 8,000g เพื่อให้ seminal plasma แยกตัวออกจาก spermatozoa จากนั้นนำ seminal plasma จำนวน 10 μL ไปวัดค่าแรงดันออสโมติก (osmolality) ด้วยเครื่องมือ osmometer

ความหนาแน่นของสเปิร์มจะประเมินโดยการเจือจางน้ำเชื้อ (10 μL) ด้วย 0.9% saline 5,000 เท่าโดยการผสมให้เข้ากันใน vial ด้วย vortexer แล้วหยดน้ำเชื้อลงใน hemacytometer เพื่อนับจำนวนสเปิร์มที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า จึงคำนวณกลับหาความหนาแน่นของสเปิร์ม

2. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่เย็น

การพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-4°C และ ปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เย็นทั้งในสภาพที่ไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (undiluted milt) และ เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (diluted milt) เพื่อทราบถึงแนวทางที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เย็นให้นานที่สุด โดยพิจารณา จากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และเปอร์เซ็นต์ปฏิสนธิกับไข่ โดยในการศึกษาด้านนี้ได้แบ่งย่อยออกเป็น 2 ลักษณะได้แก่

2.1 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่เย็นโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (chilled-storage of undiluted milt)

การทดลองมี 4 ชุดการทดลองเพื่อศึกษาถึงผลของลักษณะของภาชนะ และการให้ออกซิเจนที่มีต่อระยะเวลาการเก็บน้ำเชื้อแช่เย็น โดยน้ำเชื้อจะถูกเก็บรักษาไว้ในภาชนะต่างๆกัน 4

ชนิดได้แต่ centrifuge tube ขนาด 15 ml , culture flask ขนาด 75 ml plastic beaker ขนาด 50 ml และถุงพลาสติก Zip loc ขนาด 400 ml ทั้งในสภาพไม่ให้ออกซิเจนและให้ออกซิเจนสมทบ ในกรณีที่ไมให้ออกซิเจนสมทบนั้นน้ำเชื้อจะสัมผัสอากาศที่อยู่ในภาชนะโดยตรง แต่การให้ออกซิเจนสมทบนั้นจะใช้ parafilm ปิด centrifuge tube, culture flask และ plastic beaker หลังจากอัดออกซิเจนสมทบเข้าไป ในขณะที่ถุงพลาสติก Zip loc จะปิดซีปหลังการอัดออกซิเจนบริสุทธิ์

น้ำเชื้อถูกรวบรวมจากตัวผู้หลายตัว (pooled samples) โดยน้ำเชื้อถูกดูดด้วย syringe ก่อนแล้วนำไปเก็บในภาชนะและควบคุมอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง การสุ่มตัวอย่างน้ำเชื้อของทุกชุดการทดลองทำทุกวันๆละ 1 ครั้งเพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม จนกระทั่งสเปิร์มหยุดเคลื่อนที่ เพื่อทราบช่วงระยะเวลาที่นานเท่าใดที่สามารถเก็บรักษา น้ำเชื้อได้ก่อนที่สเปิร์มจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำ ในชุดการทดลองที่ให้ออกซิเจนสมทบจะทำการอัดออกซิเจนบริสุทธิ์ทุกวันทันทีที่เสร็จสิ้นการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

2.2 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่เย็นโดยเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (chilled-storage of diluted milt)

การแช่เย็นน้ำเชื้อปลาดุกอุยโดยการเจือจางในสภาพ diluted milt สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 หัวข้อหลักได้แก่

2.2.1 การศึกษาผลของแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

การศึกษาในขั้นตอนนี้ทำให้ทราบค่าแรงดันออสโมติกที่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ หรือยับยั้งไม่ให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ ซึ่งข้อมูลเหล่านี้มีความจำเป็นที่จะต้องทราบว่าที่ค่าแรงดันออสโมติกเท่าใดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เมื่อเจือจางน้ำเชื้อปลาดุกอุยแล้วจะไม่ทำให้สเปิร์มถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ เพราะจะทำให้การแช่เย็น หรือการแช่แข็งน้ำเชื้อประสบความล้มเหลวตั้งแต่เริ่มการทดลองทันที น้ำเชื้อปลาดุกอุยถูกกระตุ้นด้วยสารละลายต่างชนิดกันซึ่งจะเตรียมให้มีค่า osmolarity ต่างกันเพื่อทดสอบผลของค่าแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเพื่อทราบถึงช่วง osmotic pressure ที่เหมาะสมที่จะใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์

น้ำเชื้อถูกกระตุ้นด้วยสารละลายต่างชนิดกันซึ่งจะเตรียมให้มีค่า osmolarity ต่างกันเพื่อทดสอบผลของ osmotic pressure ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเพื่อทราบถึงช่วง osmotic pressure ที่เหมาะสมที่จะใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ (การทดลองในข้อ 2.2.2) สารละลายต่างๆชนิดกัน ได้แก่ KCl, NaCl, CaCl_2 , glucose และ mannitol ได้ถูกเตรียมขึ้นให้มีค่า osmolarity โดยสารละลาย 3 ตัวแรกถูกเตรียมให้มีค่าระหว่าง 0-250 mM และสารละลาย 2 ตัวหลังถูกเตรียมให้มีค่าระหว่าง 0-500 mM การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ทำโดยหยดน้ำเชื้อ 5 μL ลงบนกระจกสไลด์ แล้วจึงหยดสารละลายต่างชนิดกันเหล่านั้นที่เตรียมขึ้นมาเพื่อทดสอบลงไป

100 μ L แล้วใช้ cover glass กดลงไปเบาๆ แล้วประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่เคลื่อนที่ทันทีด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่าตามเกณฑ์ที่ได้กล่าวมาแล้ว การทดลองนี้จะทำให้ทราบถึงระดับ osmolarity ที่ทำให้สเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงสุด (complete activation point) และไม่เคลื่อนที่ (immotile)

2.2.2 การศึกษาชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์และสภาพที่เหมาะสมที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เย็น

ในการพัฒนาหาชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการแช่เย็นน้ำเชื้อปลาตุ๊กตานั้น สารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ ชนิดถูกเตรียมขึ้นมาเพื่อเจือจางน้ำเชื้อโดย สารละลายบัฟเฟอร์เหล่านี้จะต้องไม่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ในระหว่างการเก็บแช่เย็น และทำการปรับให้มีค่า osmolarity เท่ากับระดับที่พบใน seminal fluid หรือใช้ระดับ osmolarity ที่ได้จากการทดลอง 2.2.1 ซึ่งไม่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ในระหว่างการเก็บแช่เย็น แต่สเปิร์มจะเคลื่อนที่ได้ตามปกติเมื่อนำเอาสเปิร์มออกจาก tissue culture flask มากระตุ้นด้วยน้ำบนกระจกสไลด์ สารละลายบัฟเฟอร์ที่จะใช้ในการทดสอบได้แก่ Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS), Hank's balanced salt solution (HBSS), sperm extender 7, sperm extender 13, modified Cortland solution

น้ำเชื้อของปลาตุ๊กตถูกนำมาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมขึ้นใน tissue culture flask ขนาด 25 ml ในอัตราส่วนของน้ำเชื้อ : สารละลายบัฟเฟอร์ = 1 : 1 แล้วผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวโดยเขย่าเบาๆ จึงนำไปเก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางมาสุ่มประเมินเซนต์เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มทุกวันจนกระทั่งสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วยน้ำ ซึ่งก็จะสามารถทำให้ทราบถึงชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตุ๊กตอ รวมทั้งทราบระยะเวลาที่นานที่สุดที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อก่อนที่สเปิร์มจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วยน้ำ

ในขั้นตอนต่อมาก็จะทำการทดสอบเพื่อทราบถึงอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเจือจางน้ำเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ตัวที่ดีที่สุด โดยใช้วิธีการดังที่ได้กล่าวมาเพียงแต่ใช้อัตราส่วนของน้ำเชื้อ : สารละลายบัฟเฟอร์ = 1:1, 1:2, 1:4, 1:9 และ 1:19 เพื่อทราบอัตราส่วนที่เหมาะสมของน้ำเชื้อต่อสารละลายบัฟเฟอร์ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เย็นให้นานที่สุด โดยทำการทดลองในสภาพเดิม ร่วมกับการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อช่วยในการเก็บรักษา แล้วจึงประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่เก็บไว้ที่ 0-4 องศาเซลเซียส ทุกวันเช่นกัน จนกระทั่งสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วยน้ำ การทดลองเพื่อทดสอบอัตราส่วนที่เหมาะสมของน้ำเชื้อและสารละลายบัฟเฟอร์ใช้น้ำเชื้อของปลาหลายตัว (pooled milt) เพื่อลดความแปรปรวนที่อาจมีในปลาแต่ละตัว โดยจะทดลองทดลองดูผสมพันธุ์วางไข่ หลังจากนั้นเมื่อทราบข้อมูลของอัตราส่วนที่เหมาะสมก็ทดลองเกี่ยวกับผล

ของฤดูกาลต่อประสิทธิภาพการเก็บรักษาน้ำเชื้อ โดยนำเอาน้ำเชื้อในช่วงต้นฤดู กลางฤดู และปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่มาเจือจางในอัตราส่วนที่เหมาะสม แล้วประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเช่นเดียวกัน

การทดสอบความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่ของน้ำเชื้อที่เก็บแช่เย็นทำโดยนำน้ำเชื้อที่เจือจางในสารละลาย Ca-F HBSS ระยะเวลา 2, 4 หรือ 6 วันมาผสมกับไข่ปลาตุ๋น ในเวลาเดียวกันน้ำเชื้อสดได้ถูกนำมาใช้ผสมกับไข่เช่นเดียวกันเป็นกลุ่มควบคุม (control) และทำการประเมินอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟัก

3 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตุ๋นแบบแช่แข็ง

การพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตุ๋นแบบแช่แข็งเริ่มจากการศึกษาจากความเป็นพิษ (toxicity) ของ cryoprotectants ชนิดต่างๆ ว่าสารชนิดใดหรือความเข้มข้นใดที่มีความเป็นพิษน้อยที่สุด และมีความเหมาะสมในการคัดเลือกมาใช้เป็น cryoprotectants สำหรับแช่แข็ง จากนั้นทำการแช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่แตกต่างกันทั้งอุณหภูมิเริ่มต้น และอุณหภูมิสุดท้าย (initital and final temperature) และอุณหภูมิละลาย (thawing temperature) ที่แตกต่างกันโดยมุ่งพัฒนา protocols เพื่อทดสอบผลที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังแช่แข็ง ในขั้นตอนต่อมาศึกษาการพัฒนาเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในภาชนะที่ใหญ่ขึ้น เช่น หลอดฟางขนาด 0.5 มิลลิลิตร หรือ หลอด cryovial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร รวมทั้งการพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งแบบง่าย ๆ โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือควบคุมการลดอุณหภูมิที่มีราคาแพง เช่น แช่แข็งในถังโฟมที่ความสูงต่างกันเป็นต้นเพื่อสะดวกในการประยุกต์ใช้ของผู้ประกอบการ ในขั้นตอนสุดท้ายน้ำเชื้อที่ได้แช่แข็งด้วย protocol ที่เหมาะสมจะถูกไว้ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลานานเป็นปีเพื่อศึกษาผลของระยะเวลาเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์ม และการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียขณะเก็บรักษาโดยจะเก็บน้ำเชื้อปลาตุ๋นแช่แข็งจนถึงปีที่ 3 ของการวิจัย และทำการผสมเทียมกับไข่ปลาตุ๋นเพื่อประเมินผลความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่ของน้ำเชื้อแช่แข็ง (fertilization capacity) ดังมีรายละเอียดดังนี้

3.1 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตุ๋นแบบแช่แข็ง

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทราบชนิดและความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่เหมาะสมก่อนที่จะนำไปใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา โดยการประเมินความเป็นพิษ (toxicity test) ของ cryoprotectant ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเมื่อกระตุ้นด้วยน้ำ การทดลองเริ่มจากนำน้ำเชื้อปลาตุ๋นที่รวบรวมมาใหม่ (freshly collected milt) มาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่ได้จากข้อ 2.2.2 โดยที่สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมนี้ไม่มีผลกระตุ้นให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่

เพียงแต่จะไปเจือจางน้ำเชื้อโดยที่สเปิร์มยังคงมีคุณภาพไม่เปลี่ยนแปลง ในขณะที่เดียวกัน cryoprotectants ชนิดต่าง ๆ 4 ชนิดถูกเตรียมขึ้นมาโดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมชนิดเดียวกันให้มีความเข้มข้น 2 เท่าของที่ต้องการ แล้วจึงผสมสารละลาย cryoprotectant เหล่านี้เข้ากับน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางไว้ก่อนหน้านี้ เพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของ cryoprotectants ตามที่ต้องการ การเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ และสาร cryoprotectants ชนิดต่าง ๆ ในแต่ละชุดการทดลองทำ 4 ซ้ำที่อุณหภูมิห้อง (25°C) โดยใช้อัตราส่วนของน้ำเชื้อ: สารละลายบัฟเฟอร์: cryoprotectants ที่เจือจาง เท่ากับ 1:1:1 ภายใน tissue culture flask ขนาด 25 cm^3 และประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่เวลาต่าง ๆ กันจนกระทั่งสเปิร์มหยุดเคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วยน้ำ cryoprotectants ที่ใช้ได้แก่ dimethylsulfoxide (DMSO), methanol, ethanol และ trehalose โดย cryoprotectant แต่ละชนิดถูกผสมไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม (Ca-F HBSS) เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) ของ cryoprotectants เป็น 5%, 10%, 15% และ 20% การเช็คเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในการทดลองนี้ทำในระยะเวลาต่าง ๆ กันหลังจากใส่ cryoprotectant ลงไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง ตั้งแต่เวลา 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที หรือจนกระทั่งสเปิร์มหยุดเคลื่อนที่

3.2 ศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา ดุกอูที่ผ่านการแช่แข็ง

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอูเริ่มจากการนำเอาน้ำเชื้อมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม (จากข้อ 2.2.2) ในอัตราส่วน 1:1 แล้วจึงผสม cryoprotectant ชนิดต่าง ๆ 4 ชนิดในระดับความเข้มข้นสุดท้ายที่แตกต่างกัน (5, 10, 15, 20%) แล้วปล่อยให้ให้อยู่ในภาวะสมดุลย์ (equilibration period) นาน 10 นาทีที่อุณหภูมิห้องก่อนที่จะถูกรวบรวมไว้ในหลอดฟาง (straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร

การลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งทำโดยใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (Controlled-rate programmable freezer) โดยเครื่องมือนี้จะลดอุณหภูมิให้ต่ำลงตามที่กำหนดไว้ การลดอุณหภูมิทำในลักษณะ one-step freezing จากอุณหภูมิห้อง (25°C) ไปจนถึงอุณหภูมิ -40°C โดยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ต่าง ๆ กันตั้งแต่ $3^{\circ}\text{C}/\text{นาที}$, $5^{\circ}\text{C}/\text{นาที}$ และ $10^{\circ}\text{C}/\text{นาที}$ น้ำเชื้อปลาดุกอูที่แช่แข็งเมื่อลดอุณหภูมิต่ำลงถึง -40°C ก็ถูกนำมาเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวซึ่งมีอุณหภูมิ -196°C ก่อนที่จะถูกนำมาเพิ่มอุณหภูมิอย่างรวดเร็วในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 70°C องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที หรือจนกระทั่งน้ำเชื้อละลาย (thawing) แล้วจึงนำไปเช็คเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และความสามารถของน้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้ละลายในการปฏิสนธิกับไข่ปลาดุกอู

การทดสอบอัตราการละลายที่เหมาะสม (thawing rate) ในการละลายน้ำเชื้อยังมีการศึกษาโดยนำน้ำเชื้อมาเจือจางใน Ca-F HBSS แล้วใส่ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5, 10, 15 และ 20% แล้วแช่แข็งในอัตรา $10^{\circ}\text{C}/\text{นาที่}$ แล้วเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวแล้วจึงนำมาละลายที่อุณหภูมิแตกต่างกันเช่น 30, 50 และ 70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำเชื้อละลายแล้วจึงประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

3.3 ศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษา (storage period) ที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลาดุกอยู่ผ่านการแช่แข็ง

น้ำเชื้อปลาดุกที่มีคุณภาพดีได้ถูกนำมาแช่แข็งโดยใช้ protocol ที่เหมาะสมที่ได้พัฒนาขึ้นมา ซึ่งทราบได้จากการทดลองข้อ 3.2 โดยน้ำเชื้อที่ได้ถูกแช่แข็งไว้ในหลอดฟาง และเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลาต่าง ๆ กันนาน 8 เดือน และถูกนำออกมาละลายเพื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำเชื้อระหว่างเก็บรักษา โดยประเมินจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตทุก ๆ เดือน และประเมินความสามารถในการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งกับไข่ และอัตราการฟักไข่ปลาในเดือนที่ 1, 2, 4 และ 6

น้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวเหล่านี้ได้ถูกผลิตขึ้นมาในปริมาณมากจากน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์หลายตัวที่มีคุณภาพดี น้ำเชื้อถูกละลายและประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มตามระยะเวลาที่กำหนดไว้เพื่อประเมินผลของระยะเวลาการเก็บรักษาที่อาจมีต่อการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็ง สำหรับการประเมินความสามารถในการปฏิสนธิของน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งกับไข่ไม่ได้ทำทุก ๆ เดือน เนื่องจากข้อจำกัดในการหาแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพดี

3.4 ศึกษาการพัฒนา protocol เพื่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอยู่อย่างง่าย

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอยู่อย่างง่ายทำโดยนำหลอดฟาง และหลอด cryovial ที่มีน้ำเชื้อมาอบในโอโซนไนโตรเจนเหลวที่บรรจุในภาชนะที่ระดับความสูงเหนือผิวบนไนโตรเจนเหลวระดับต่าง ๆ กัน (2,4 และ 6 เซนติเมตรเหนือระดับผิวไนโตรเจนเหลว) เป็นเวลา 10 นาที โดยวางหลอดฟางไว้บนหลอดตาข่ายที่สร้างขึ้นมาแล้วจึงนำหลอดฟางไปแช่แข็งในถังอุณหภูมิเยือกที่จะถูกสร้างขึ้นมาและบรรจุไนโตรเจนเหลวลงไปโดยให้หลอดฟางสัมผัสโอโซนไนโตรเจนเหลวตามระดับความสูงที่กำหนดไว้ การแช่แข็งน้ำเชื้อในลักษณะเช่นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีในการแช่แข็งอย่างง่าย ๆ เพื่อเป็นข้อมูลให้ผู้ประกอบการเพาะพันธุ์ปลาสามารถไปทำเองได้เองโดยไม่ต้องใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิ (controlled-rate programmable freezer) ที่มีราคาแพงและสลับซับซ้อนเพื่อความสะดวกในการปฏิบัติใช้ในพื้นที่ยัง

ผลการทดลองที่ได้จากข้อ 3.2 ได้ถูกนำมาใช้ในการพัฒนาหา protocol ที่มีความเหมาะสม เพื่อผลิตน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งอย่างง่าย โดยทำการแช่แข็งน้ำเชื้อในหลอดฟางที่มีขนาด 0.25 มิลลิลิตร และแช่แข็งใน Cryotube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อสามารถแช่แข็งน้ำเชื้อในปริมาณที่มากขึ้นและแช่แข็งอย่างง่าย ๆ การทดลองเหล่านี้ใช้ cryoprotectant ชนิดและความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ การละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันทำในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) โดยนำหลอดฟาง หรือ cryotube ที่แช่แข็งมาแช่ที่อุณหภูมิน้ำ 70°C เป็นเวลา 5 วินาทีหรือจนกระทั่งน้ำเชื้อละลายแล้วนำไปประเมินคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลายต่อไป

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วยการแช่แข็งอย่างง่าย ๆ (simple cryopreservation) ใน Styrofoam box ที่บรรจุไนโตรเจนเหลว ใช้หลักการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในไอของไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapor) เพื่อพัฒนาแนวทางการแช่แข็งด้วยวิธีการที่ไม่สลับซับซ้อนและราคาถูก เพื่อให้สามารถทดแทนการแช่แข็งด้วยการเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติที่มีราคาแพง ได้พัฒนาเทคนิคแช่แข็งอย่างง่าย ๆ โดยนำน้ำเชื้อปลาดุกอุย มาเจือจางด้วยน้ำยาสูตร Ca-F HBSS และ DMSO ความเข้มข้นสุดท้าย 10% แล้วพักไว้ให้อยู่สภาวะสมดุล 10 นาทีก่อนนำไปแช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร หรือหลอดไครโอไวอัล (cryovial) ขนาด 2 มิลลิลิตรที่วางเหนือระดับผิวหน้าไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen surface) ในแนวนอน (horizontal) ที่ความสูง 2, 4 และ 6 เซนติเมตร นาน 10 นาทีใน Styrofoam box ก่อนปล่อยให้หลอดฟาง และหลอดไครโอไวอัลลงไปแช่ในไนโตรเจนเหลว 10 นาที จึงนำน้ำเชื้อแช่แข็งเหล่านั้นไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว แล้วนำมาประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย

3.5 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในน้ำเชื้อที่ได้ผ่านการแช่แข็ง

การทดลองนี้ได้นำเอาน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่ได้เก็บรักษาแช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลานานต่าง ๆ กันออกมาละลายให้กลับสภาพเป็นของเหลว เพื่อการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของชนิด และปริมาณแบคทีเรียในระหว่างการเก็บระยะยาวในลักษณะ sperm bank น้ำเชื้อสดหรือกลุ่มควบคุมจะถูกประเมินการปนเปื้อนของแบคทีเรียขณะเริ่มการทดลองเป็น baseline information โดยประเมินชนิด และปริมาณการปนเปื้อนของแบคทีเรียขณะเริ่มเก็บรักษา การประเมินการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อแช่แข็งทำโดยแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยตามวิธีการที่ได้พัฒนาขึ้นมาด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ แล้วศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Total Heterotroph และแบคทีเรียกลุ่ม Gram Negative Rod ที่พบในน้ำเชื้อก่อน และหลังการแช่แข็ง โดยในแต่ละชุดการทดลองได้ทำการศึกษา ปริมาณแบคทีเรียในน้ำเชื้อสดที่ได้จากตัวปลา น้ำเชื้อปลาก่อนและหลังการแช่แข็ง ทุกๆ 30 วัน เป็นระยะเวลา 90 วัน วัดการเจริญของแบคทีเรียโดยใช้วิธี Plate count technique โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำเชื้อที่ต่างกันคือให้น้ำเชื้อในแต่ละชุดการทดลองมีค่า

เท่ากับ undiluted และทำการเจือจางน้ำเชื้อให้มีความเข้มข้นที่ต่างกันคือ undiluted, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} โดยจะทำความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ในแต่ละชุดการทดลอง

4 การประเมินความสามารถของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ในการปฏิสนธิกับไข่

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลาดุกอยู่ที่ได้แช่เย็น หรือแช่แข็งเอาไว้ในช่วงเวลาต่าง ๆ กันที่มีต่อประสิทธิภาพการปฏิสนธิกับไข่ปลา ทำโดยนำไข่ปลาดุกออกมาผสมเทียบกับน้ำเชื้อที่เก็บแช่เย็น หรือเก็บแช่แข็ง แล้วนำไปฟักไข่ในอุปกรณ์เพาะฟักไข่ปลาต่อไป

การกระตุ้นการตกไข่แม่ปลาดุกทำได้โดยฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่ที่มีชื่อว่า Lutenizing Hormone Releasing Hormone analogue (LHRHa) (มีชื่อทางการค้าว่า Suprefect) ในอัตรา 20-30 µg/kg ร่วมกับ Domperidone (มีชื่อทางการค้าว่า Motilium) ในอัตรา 5 mg/kg แล้วจึงรีดไข่ออกมาและเช็คคุณภาพไข่ก่อนการผสมเทียมโดยดูจากลักษณะรูปร่างและความสุกของไข่ โดยได้ใช้ไข่ที่มีคุณภาพดีเท่านั้นในการผสมเทียม การรวบรวมไข่ทำโดยนำแม่พันธุ์ปลาดุกที่มีการตกไข่ และพร้อมผสมพันธุ์วางไข่ จำนวน 2-3 ตัวมารีดไข่ใส่ในจานแก้วที่วางบนน้ำแข็ง ภายหลังจากฉีดฮอร์โมนไปนาน 10-12 ชั่วโมง จากนั้นใช้กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 1 มิลลิลิตรที่ตัดปลาย ดูดไข่แล้วนำไปใส่ในจานแก้วอีกใบประมาณ 0.2 ml (มีจำนวนไข่ประมาณ 300ใบ/จานแก้ว) การผสมเทียมทำโดยนำน้ำเชื้อปลาดุกได้ที่แช่เย็น หรือแช่แข็งเอาไว้ในไนโตรเจนเหลวในช่วงเวลาต่าง ๆ กันมาประเมินความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่ โดยเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดเป็นกลุ่มควบคุม

น้ำเชื้อปลาดุกได้ที่เก็บแช่เย็น หรือเก็บแช่แข็งไว้ในระยะเวลาต่าง ๆ กันในการทดลองที่เกี่ยวข้องถูกนำมาใช้ หรือละลายที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้เพื่อเข้ากลับสู่สภาพเหลวตามเดิม (เช่นละลายที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที) แล้วตัดหลอดฟางออกแล้วเทน้ำเชื้อที่ละลายลงไปบนไข่ในจานแก้วที่ดูดไข่มา 0.2 ml โดยใช้จำนวนสเปิร์มประมาณ 200,000 ตัวต่อไข่ 1 ใบ การผสมเทียมทำโดยเทน้ำเชื้อเหล่านั้นลงไปในไข่ แล้วเทน้ำท่วมไข่เล็กน้อยพร้อมกับผสมให้ไข่กับน้ำเชื้อเข้าเป็นเนื้อเดียวกันอย่างดีด้วยการใช้ชนไก่ จากนั้นทำการล้างไข่ด้วยน้ำ 2 ครั้งแล้วปล่อยให้ไข่ปลาดุกอยู่ในจานแก้วโดยให้น้ำท่วมไข่ตลอดเวลา และเปลี่ยนน้ำทุกๆ 2-3 ชั่วโมงจนไข่ฟักเป็นลูกปลาวัยอ่อน

การประเมินจำนวนสเปิร์มที่ใช้ผสมกับไข่ทำโดยการใช้ haemocytometer และถ้าใช้น้ำเชื้อแช่แข็งก็คำนวณจากความหนาแน่นของน้ำเชื้อก่อนผสมว่าต้องใช้หลอดฟางกี่หลอดในการผสมกับไข่ 300 ใบ เช่นเดียวกับน้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อสดที่ต้องใช้จำนวนสเปิร์มในการปฏิสนธิกับไข่ 1 ใบเท่ากันเช่นกัน การประเมินอัตราการปฏิสนธิ หรือเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิกับไข่จะประเมินเมื่อไข่ปลาพัฒนาถึงระยะ gastrula stage โดยคำนวณจากจำนวนไข่ที่ปฏิสนธิต่อจำนวนไข่ที่นับทั้งหมดแล้วคูณด้วย 100 และทำ 6 ซ้ำต่อชุดการทดลอง สำหรับกลุ่มควบคุมจะใช้น้ำเชื้อสดที่

รวบรวมมาใหม่ ๆ ซึ่งต้องมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่ต่ำกว่า 80% ในการผสมกับไข่ สำหรับการเปอร์เซ็นต์การฟักของไข่ทำโดยคำนวณจากลูกปลาที่ฟักออกมาเป็นตัวต่อไข่ทั้งหมดที่ทำการผสมเทียม

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลความหนาแน่นสเปิร์ม pH ค่าแรงดันออสโมติก เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และการมีชีวิตของสเปิร์ม เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การฟักในชุดการทดลองต่างๆ ถูกนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีการ analysis of variance (ANOVA) แบบ one-way ANOVA หรือ two-way ANOVA ขึ้นอยู่กับแต่ละชุดการทดลองที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองด้วย Duncan's new multiple range test โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มปลาดุกอยู่ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

คุณภาพน้ำเชื้อสดที่รวบรวมมาใหม่ ๆ มีการเปลี่ยนแปลงในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าเริ่มต้น 66.7% ในเดือนเมษายน และมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ มีค่า 90.4% ในเดือนกันยายน แล้วมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญเหลือ 81.7% ในเดือนพฤศจิกายน ในทำนองเดียวกันความหนาแน่นสเปิร์มมีค่าสูงสุดในช่วงกลางฤดูผสมพันธุ์วางไข่ แล้วลดลงในปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ สำหรับค่า pH ของสเปิร์มมีค่าคงที่ตลอดฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ในขณะที่ค่าแรงดันออสโมติกของน้ำเชื้อมีค่าสูงขึ้นแล้วมีค่าคงที่

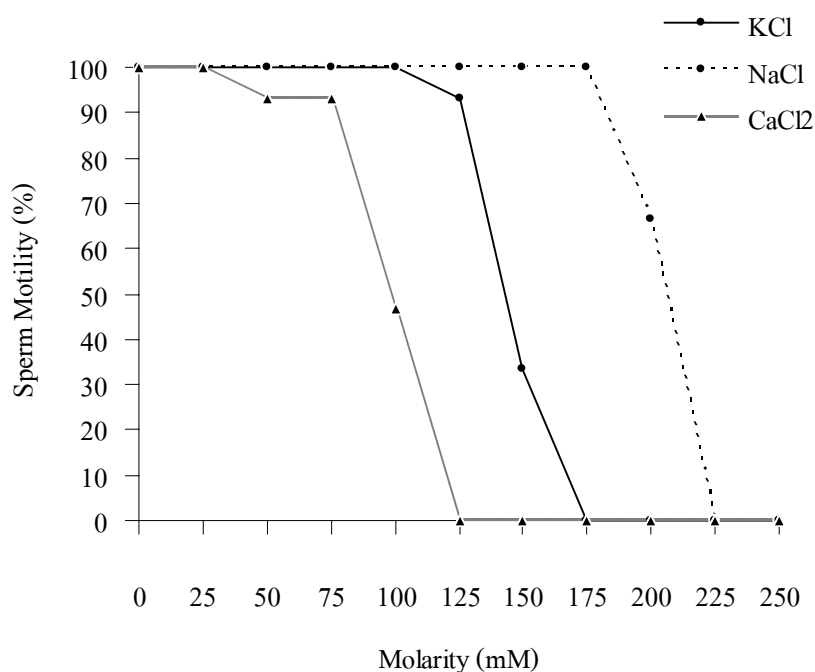
ตารางที่ 1 คุณภาพน้ำเชื้อปลาดุก (N = 120) ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ปี พ.ศ. 2549

เดือน	คุณภาพน้ำเชื้อ			
	Sperm motility	Sperm pH	Sperm density	Sperm osmolality
เมษายน	66.7±4.4 ^a	7.7±0.2 ^a	1.4±0.2 ^a	281.3±2.7 ^a
พฤษภาคม	77.1±2.5 ^b	7.8±0.2 ^a	1.7±0.3 ^a	288.5±3.1 ^a
มิถุนายน	89.1±1.5 ^c	7.7±0.1 ^a	2.5±0.3 ^{ab}	297.1±3.7 ^{ab}
กรกฎาคม	93.5±1.4 ^c	7.6±0.2 ^a	3.3±0.3 ^b	306.2±2.2 ^b
สิงหาคม	94.8±1.3 ^c	7.6±0.1 ^a	3.6±0.7 ^{bc}	329.7±5.8 ^c
กันยายน	90.4±1.6 ^c	7.8±0.2 ^a	2.7±0.4 ^{ab}	324.7±3.5 ^c
ตุลาคม	83.9±1.9 ^b	7.8±0.1 ^a	2.2±0.5 ^{ab}	321.3±3.4 ^c
พฤศจิกายน	81.7±1.7 ^b	7.6±0.1 ^a	1.6±0.2 ^a	324.2±2.8 ^c

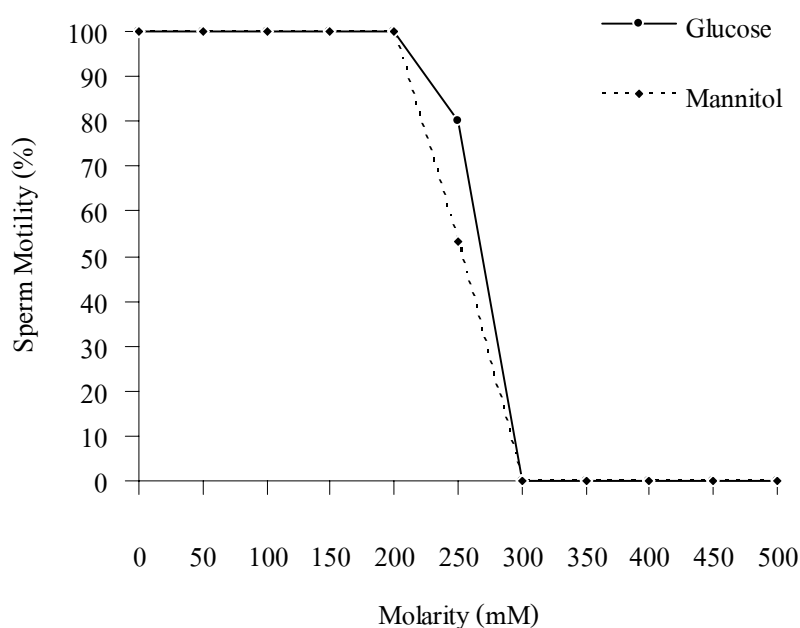
หมายเหตุ: ตัวอักษร superscript ในแนวตั้งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

2. ผลของแรงดันออสโมติกต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตุ๊กอูย

ผลการทดลองการใช้สาร electrolyte (KCl, NaCl และ CaCl_2) และสาร non-electrolyte (glucose และ mannitol) ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตุ๊กอูยได้แสดงไว้ในรูปที่ 1 และ รูปที่ 2 ตามลำดับ โดยทั่วไปการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะมีมากเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกต่ำ โดยสเปิร์มที่อยู่ในสารละลาย KCl, NaCl และ CaCl_2 จะหยุดเคลื่อนที่เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติก 175, 225 และ 125 mM ตามลำดับ สำหรับสเปิร์มที่อยู่ในสารละลาย glucose และ mannitol จะหยุดเคลื่อนที่เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติก 300 mM



รูปที่ 1 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตุ๊กอูยเมื่ออยู่ในสารละลาย electrolyte ที่มีแรงดันออสโมติกต่างกัน



รูปที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอยู่เมื่ออยู่ในสารละลาย non-electrolyte ที่มีแรงดันออสโมติกต่างกัน

3. การเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอายุที่รีดออกมาใหม่ๆ แล้วเก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียสได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2 ซึ่งการใช้ถุงพลาสติก ziplock สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด 36 ชั่วโมงก่อนที่สเปิร์มจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วยน้ำจืดในขณะที่น้ำเชื้อที่เก็บรักษาในภาชนะอื่นๆ อีก 3 ชุดการทดลองสามารถเก็บรักษาได้เพียง 12 ชั่วโมงแล้วหยุดการเคลื่อนที่ (ตารางที่ 2) สำหรับการเก็บแช่เย็นน้ำเชื้อปลาดุกอายุที่เก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียสโดยให้ออกซิเจนสมทบปรากฏว่าสามารถเก็บรักษาได้นานขึ้น โดยถุงพลาสติก ziplock สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด 60 ชั่วโมงก่อนที่สเปิร์มจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วยน้ำจืดในขณะที่น้ำเชื้อที่เก็บรักษาใน Centrifuge tube สามารถเก็บรักษาได้นานเพียง 24 ชั่วโมงแล้วหยุดเคลื่อนที่ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาดุกอยู่ที่เก็บแช่เย็นโดยไม่ให้ออกซิเจนสมทบ

ชั่วโมง	ภาชนะที่บรรจุ (ไม่ให้ออกซิเจนสมทบ)			
	Centrifuge tube 15 mL	Culture flask 75 mL	Beaker 50 mL	Plastic ziplock 400 mL
0	90 $\pm$ 10.2	89 $\pm$ 9.5	88 $\pm$ 6.8	92 $\pm$ 10.5
6	76 $\pm$ 7.4	78 $\pm$ 10.3	70 $\pm$ 5.5	87 $\pm$ 8.8
12	27 $\pm$ 7.3	39 $\pm$ 7.9	38 $\pm$ 8.8	66 $\pm$ 8.8
24	-	-	-	38 $\pm$ 6.9
36	-	-	-	15 $\pm$ 4.5
48	-	-	-	-
60	-	-	-	-
72	-	-	-	-
84	-	-	-	-

ตารางที่ 3 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาดุกอยู่ที่เก็บแช่เย็นโดยให้ออกซิเจนสมทบ

ชั่วโมง	ภาชนะที่บรรจุ (ให้ออกซิเจนสมทบ)			
	Centrifuge tube 15 mL	Culture flask 75 mL	Beaker 50 mL	Plastic ziplock 400 mL
0	87 $\pm$ 7.7	90 $\pm$ 7.5	88 $\pm$ 8.8	91 $\pm$ 5.5
6	78 $\pm$ 9.4	81 $\pm$ 6.4	76 $\pm$ 6.2	84 $\pm$ 6.8
12	47 $\pm$ 7.3	59 $\pm$ 8.6	48 $\pm$ 8.5	76 $\pm$ 8.8
24	14 $\pm$ 7.3	35 $\pm$ 5.3	39 $\pm$ 4.6	53 $\pm$ 8.3
36	-	13 $\pm$ 6.1	24 $\pm$ 5.0	42 $\pm$ 5.6
48	-	-	-	14 $\pm$ 6.1
60	-	-	-	5 $\pm$ 2.50
72	-	-	-	-
84	-	-	-	-

4. การเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์

การศึกษานิตของสารละลายบัฟเฟอร์และสภาพที่เหมาะสมที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่เย็นในน้ำยาสูตรต่าง ๆ ได้แก่ น้ำยาสูตร HBSS, Ca-F HBSS, Extender 7, Extender 13 และ modified Cortland solution ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส พบว่า เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำยาแต่ละสูตรมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และในทุกชุดการทดลองพบว่า เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มก็ยังมีค่าลดลงตามระยะเวลาเก็บรักษาที่นานขึ้น โดยน้ำยาสูตร Ca-F HBSS ให้ผลการเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ดีที่สุด (ตารางที่ 4) น้ำเชื้อสดมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดเหลือเพียง $6.7 \pm 5.8\%$ หลังจากแช่เย็นผ่านไป 1 วันในขณะที่น้ำเชื้อที่เจือจางในชุดการทดลองอื่นๆมีค่าระหว่าง 53.3 ± 5.8 to $75.6 \pm 5.1\%$ น้ำเชื้อที่เจือจางใน Ca-F HBSS และ extender 7 มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังจากแช่เย็น 10 วันมีค่า $11.1 \pm 3.3\%$ และ $1.1 \pm 1.9\%$ ตามลำดับ ในขณะที่น้ำเชื้อที่เจือจางใน HBSS, extender 13 และ modified Cortland solution หยุดเคลื่อนที่หลังการแช่เย็นผ่านไป 8 วัน

ในการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่เย็นโดยเจือจางในน้ำยาสูตร Ca-F HBSS ในอัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อน้ำยาสูตร Ca-F HBSS 1:1 ถึง 1:19 พบว่าการใช้อัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:4 หลังการแช่เย็นผ่านไป 10 วัน ยังคงมีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ระหว่าง $13.3 \pm 3.1\%$ และ $17.8 \pm 2.2\%$ ในขณะที่น้ำเชื้อที่ถูกเจือจางในอัตราส่วน 1:9 และ 1:19 พบว่าสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่หลังการแช่เย็นผ่านไป 8 และ 6 วันตามลำดับ (ตารางที่ 5)

การศึกษามูลของฤดูกาลต่อการแช่เย็นน้ำเชื้อที่เจือจางใน Ca-F HBSS ปรากฏว่าน้ำเชื้อแช่เย็นในเดือนสิงหาคมสามารถเก็บรักษาได้นานที่สุด โดยยังมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม $20 \pm 3.1\%$ ในวันที่ 10 ของการเก็บรักษา ในขณะที่น้ำเชื้อที่เก็บรักษาในเดือนพฤษภาคม และ พฤศจิกายนสามารถเก็บรักษาได้เพียง 9 วันหรือ 7 วันตามลำดับแล้วสเปิร์มก็หยุดเคลื่อนที่ (ตารางที่ 6)

การทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่เย็นในการปฏิสนธิกับไข่ พบว่า น้ำเชื้อที่เจือจางด้วย Ca-F HBSS เป็นเวลา 2 วันสามารถปฏิสนธิไข่ได้ $80.1 \pm 3.6\%$ มีค่าไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด ($85.6 \pm 2.9\%$) (ตารางที่ 7) อย่างไรก็ตามน้ำเชื้อที่เจือจางใน Ca-F HBSS เป็นเวลา 4 และ 6 วันสามารถปฏิสนธิไข่ได้เพียง $52.4 \pm 3.5\%$ และ $18.5 \pm 4.4\%$ ตามลำดับ เปรียบเทียบกับ $78.5 \pm 3.1\%$ และ $74.5 \pm 4.2\%$ สำหรับน้ำเชื้อสด อัตราการฟักของลูกปลามีค่าสูงสุด ($71.6 \pm 3.4\%$) เมื่อใช้น้ำเชื้อที่เจือจางใน Ca-F HBSS นาน 2 วัน และมีค่าต่ำสุด ($4.5 \pm 2.1\%$) หลังจากแช่เย็นผ่านไป 6 วัน ในขณะที่น้ำเชื้อสดให้ค่าเปอร์เซนต์การฟักระหว่าง 67.3 – 72.8% (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 4 การเปลี่ยนแปลงการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (N = 48) หลังจากแช่เย็นนาน 10 วัน

Extenders	Days of storage										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ca-F HBSS	91.1±3.3 ^{a,6}	66.7±6.7 ^{bc,5}	51.1±6.1 ^{ab,4}	48.9±8.4 ^{a,4}	46.7±8.2 ^{a,4}	35.6±5.1 ^{a,3}	24.4±2.8 ^{a,2}	22.2±2.1 ^{a,2}	17.8±2.1 ^{a,1}	13.3±3.1 ^{a,1}	11.1±3.3 ^{a,1}
HBSS	88.9 ±3.3 ^{a,7}	75.6±5.1 ^{a,6}	53.3±5.8 ^{ab,5}	48.9±6.1 ^{a,5}	42.2±3.8 ^{a,4}	22.2±3.8 ^{b,3}	11.1±6.1 ^{bc,2}	2.2±3.9 ^{bc,1}	0	0	0
Extender 7	86.7 ±3.1 ^{a,8}	62.2±3.9 ^{b,7}	55.6±5.1 ^{a,6}	42.2±3.9 ^{a,5}	44.4±2.8 ^{a,5}	26.7±3.1 ^{b,4}	17.8±3.9 ^{ab,3}	8.9±6.1 ^{ab,2}	2.2±3.9 ^{b,1}	1.1±1.9 ^{b,1}	1.1±1.9 ^{b,1}
Extender 13	88.9±3.3 ^{a,6}	64.4±2.8 ^{bc,5}	51.1±6.1 ^{ab,4}	26.7±5.8 ^{b,3}	17.8±2.1 ^{b,2}	15.6±5.1 ^{c,2}	4.4±5.1 ^{cd,1}	1.1±1.9 ^{bc,1}	0	0	0
Modified Cortland	86.7±3.1 ^{a,6}	53.3±5.8 ^{c,5}	44.4±5.1 ^{b,4}	42.2±2.1 ^{a,4}	26.7±5.8 ^{b,3}	15.6±5.1 ^{c,2}	13.3±5.8 ^{ab,2}	4.4±5.1 ^{bc,1}	0	0	0
Control	91.1±3.3 ^{a,3}	6.7±5.8 ^{d,2}	2.2±3.9 ^{c,1}	0	0	0	0	0	0	0	0

Semen was diluted 1:1 with various extenders containing 0.5% penicillin-streptomycin (10,000 units of penicillin/mL; 10,000 ug of streptomycin/mL), stored in tissue culture flasks at 0-4°C during June 2006. Semen samples were daily evaluated for motility. Control referred to undiluted semen that was stored in tissue culture flasks at 4°C.

หมายเหตุ: ตัวอักษร superscript ในแนวดิ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ระหว่างชุดการทดลอง

ตัวเลข superscript ในแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ระหว่างระยะเวลาการเก็บรักษา

ตารางที่ 5 ผลของอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อปลาดุกอุย (N = 45) ด้วยสารละลาย Ca-F HBSS เมื่อแช่เย็นนาน 10 วัน

Dilution	Days of storage										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1:1	93.3±3.1 ^{a,6}	77.8±2.2 ^{a,5}	75.5±2.8 ^{a,5}	64.4±2.8 ^{a,4}	57.8±4.5 ^{a,4}	43.3±3.3 ^{a,3}	40±3.6 ^{a,2}	37.7±3.8 ^{a,2}	22.2±3.8 ^{a,1}	17.7±2.1 ^{a,1}	15.5±2.8 ^{a,1}
1:2	93.3±3.1 ^{a,7}	75.5±2.2 ^{a,6}	73.3±3.1 ^{a,6}	68.9±3.3 ^{a,6}	53.3±4.2 ^{a,5}	44.8±2.8 ^{a,4}	42.2±2.1 ^{a,4}	35.6±3.1 ^{a,3}	24.4±2.8 ^{a,2}	23.3±3.3 ^{a,2}	13.3±3.1 ^{a,1}
1:4	91.1±3.3 ^{a,4}	82.2±3.8 ^{a,4}	77.8±2.2 ^{a,4}	64.4±2.8 ^{a,3}	55.6±4.4 ^{a,2}	48.9±5.9 ^{a,2}	44.4±2.2 ^{a,2}	33.3±3.9 ^{a,1}	26.7±6.7 ^{a,1}	22.2±3.8 ^{a,1}	17.8±2.2 ^{a,1}
1:9	88.9±3.3 ^{a,5}	64.4±2.8 ^{b,4}	44.4±5.1 ^{b,3}	26.7±3.1 ^{b,2}	13.3±4.2 ^{b,1}	17.8±2.2 ^{b,1}	13.3±4.2 ^{b,1}	6.7±3.1 ^{b,1}	0	0	0
1:19	88.9±3.3 ^{a,4}	42.2±2.1 ^{c,3}	43.3±3.3 ^{b,3}	26.7±6.7 ^{b,2}	15.5±2.2 ^{b,1}	11.1±2.2 ^{c,1}	0	0	0	0	0
Control	93.3±3.1 ^{a,3}	17.8±2.2 ^{d,2}	6.6±3.1 ^{c,1}	0	0	0	0	0	0	0	0

Semen was diluted with Ca-F HBSS containing 0.5% penicillin-streptomycin (10,000 units of penicillin/mL; 10,000 ug of streptomycin/mL) at 1:1, 1:2, 1:4, 1:9 and 1:19, stored in tissue culture flasks at 4°C in July 2006. Semen samples were daily evaluated for motility. Control referred to undiluted semen that was stored in tissue culture flasks at 4°C.

หมายเหตุ: ตัวอักษร superscript ในแนวดิ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ระหว่างชุดการทดลอง

ตัวเลข superscript ในแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ระหว่างระยะเวลาการเก็บรักษา

ตารางที่ 6 ผลของฤดูกาลที่มีต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุย (N = 54) ในเดือนพฤษภาคม สิงหาคม และพฤศจิกายน

Storage period	Days of storage										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
May	82.2±2.1 ^{b,7}	84.4±2.8 ^{a,7}	71.1±3.3 ^{ab,6}	62.2±2.1 ^{a,5}	51.1±3.3 ^{ab,4}	37.8±2.1 ^{b,3}	22.2±2.1 ^{b,2}	17.8±2.1 ^{b,2}	6.7±3.1 ^{b,1}	0	0
August	93.3±3.1 ^{a,5}	88.9±3.3 ^{a,5}	77.8±2.1 ^{a,4}	68.9±4.6 ^{a,4}	60±3.1 ^{a,4}	46.7±3.1 ^{a,3}	44.4±2.8 ^{a,3}	31.1±4.6 ^{a,2}	33.3±3.1 ^{a,2}	28.9±3.3 ^{a,2}	20±3.1 ^{a,1}
November	80 ±3.1 ^{b,6}	71.1±3.3 ^{b,5}	68.9±3.3 ^{b,5}	55.6±2.8 ^{ab,4}	44.8±2.8 ^{b,3}	28.9±3.3 ^{c,2}	13.3±3.1 ^{c,1}	0	0	0	0

Semen from different sampling periods was diluted 1:4 with Ca-F HBSS containing 0.5% penicillin-streptomycin (10,000 units of penicillin/mL; 10,000 ug of streptomycin/mL), stored in tissue culture flasks at 4°C, and samples were daily evaluated for motility.

หมายเหตุ: ตัวอักษร superscript ในแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ระหว่างฤดูกาล

ตัวเลข superscript ในแนวนอนมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ระหว่างระยะเวลาการเก็บรักษา

ตารางที่ 7 ประสิทธิภาพการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่เก็บแช่เย็นที่มีต่อไข่ปลาดุกอุย

Storage time (days)	Percent fertilization		Percent hatching	
	Fresh sperm	Chilled sperm	Fresh sperm	Chilled sperm
2	85.6±2.9 ^a	80.1±3.6 ^a	72.8±3.1 ^a	71.6±3.4 ^a
4	78.5±3.1 ^a	52.4±3.5 ^b	67.3±2.4 ^a	32.5±3.8 ^b
6	74.5±4.2 ^a	18.5±4.4 ^c	69.4±3.8 ^a	4.5±2.1 ^c

Fresh sperm refers to freshly collected semen used to fertilize eggs as the control. Extender-preserved sperm after chilled storage for 2, 4 or 6 days at 4°C was used to fertilize eggs. A number of 18 spermiating males were used in the experiment. Values within a column that were superscripted by the same letter were not significantly different ($P>0.05$)

หมายเหตุ: ตัวอักษร superscript ในแนวดิ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ระหว่างระยะเวลาการเก็บรักษา

5. การศึกษาความเป็นพิษของสาร cryoprotectant ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทราบความเข้มข้นของ cryoprotectants ที่เหมาะสมก่อนที่จะนำไปใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอูย การเช็คเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่เคลื่อนที่สำหรับแต่ละชุดการทดลองได้ทำในระยะเวลาต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 0, 30, 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที หลังจากใส่ cryoprotectants ลงไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง โดยทำการประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มโดยการกระตุ้นด้วย 0.4% และได้ผลการทดลองดังนี้

5.1 DMSO

การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าเท่ากับ 60% น้ำเชื้อที่แช่ในสารละลาย DMSO 20% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 150 นาที ในขณะที่การใช้ DMSO 5%, 10% และ 15% สเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 180 นาที (รูปที่ 3)

จากการทดสอบทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO 5% ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับ DMSO 10% ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ DMSO 15% และ 20% ($P<0.05$) และเวลา 0 นาที ที่ใช้ในการเจือจางน้ำเชื้อปลาดุกอูยกับสารละลาย DMSO ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับเวลา 30, 60, 90, 120 และ 150 นาที ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับเวลา 180 นาที ($P<0.05$)

5.2 Methanol

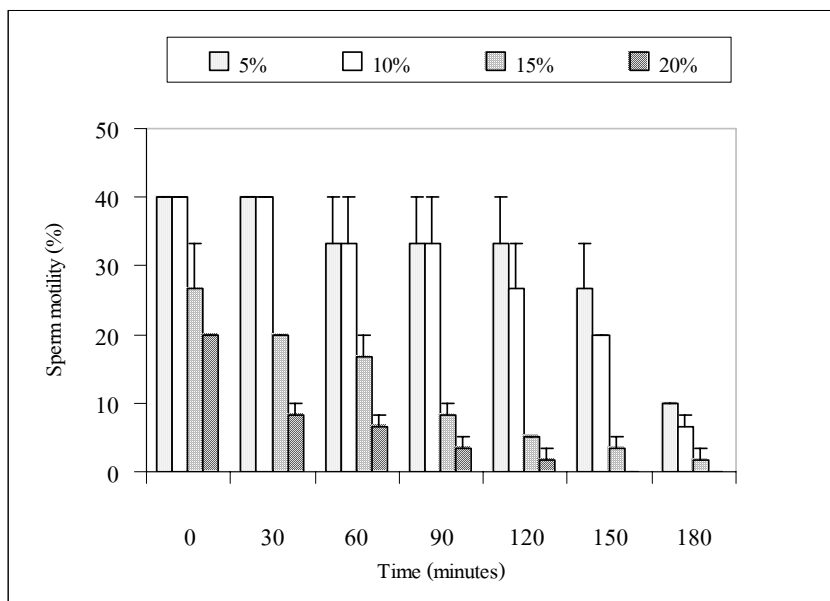
การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่าสเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 60% น้ำเชื้อที่แช่ในสารละลาย Methanol 5%, 10%, 15% และ 20% ยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 180 นาที (รูปที่ 4)

จากการทดสอบทางสถิติ พบว่าความเข้มข้นของสารละลาย Methanol ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) และที่เวลา 0 นาที ที่ใช้ในการเจือจางน้ำเชื้อปลากับสารละลาย Methanol ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับเวลา 30, 60, 90, 120 และ 150 นาที ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับเวลา 180 นาที ($P<0.05$)

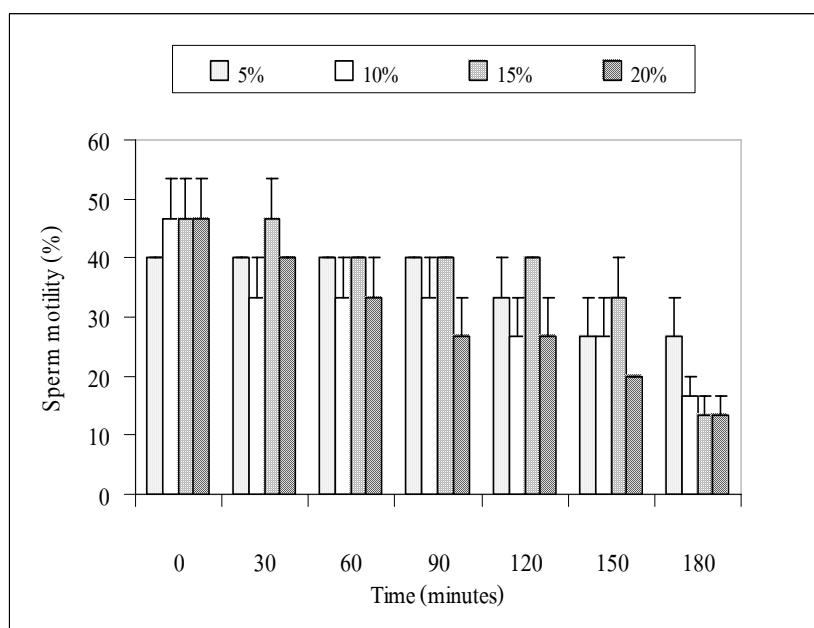
5.3 Ethanol

การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดพบว่า สเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 60% น้ำเชื้อที่แช่ในสารละลาย Ethanol 20% จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 120 นาที ในขณะที่น้ำเชื้อใน Ethanol 5%, 10% และ 15% ยังมีการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 180 นาที (รูปที่ 5)

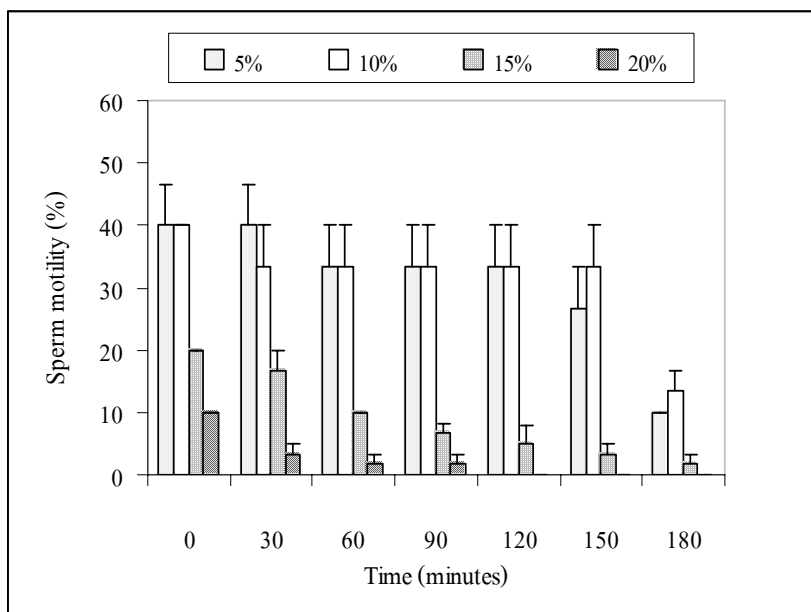
จากการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Ethanol 5% ไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับ Ethanol 10% ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ Ethanol 15% และ 20% ($P<0.05$) และเวลา ที่ใช้ในการเจือจางน้ำเชื้อปลากับสารละลาย Ethanol ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)



รูปที่ 3 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตุกอุย (*Clarias macrocephalus*) หลังจากเจือจางใน DMSO ที่ความเข้มข้น และเวลาต่างๆ กัน



รูปที่ 4 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตุกอุย (*Clarias macrocephalus*) หลังจากเจือจางใน Methanol ที่ความเข้มข้น และเวลาต่างๆ กัน

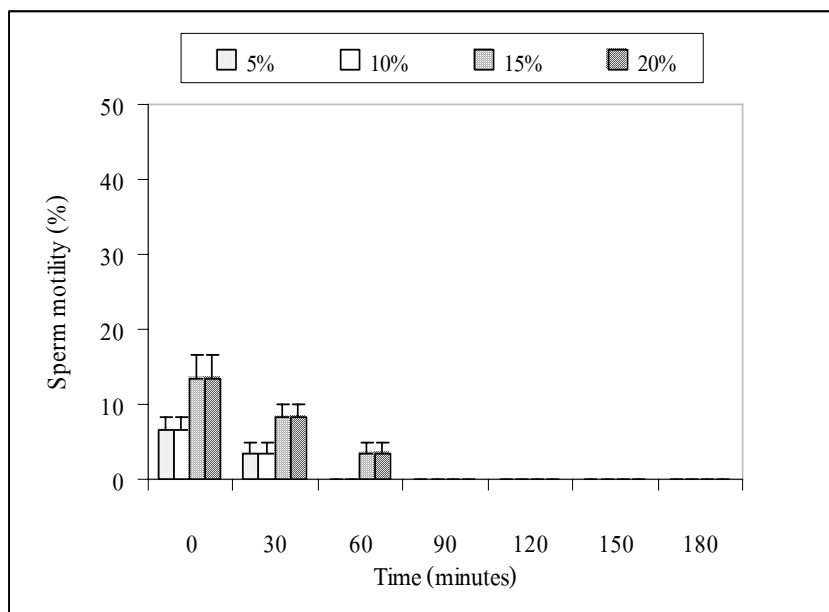


รูปที่ 5 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาอุกอุย (*Clarias macrocephalus*) หลังจากเจือจางใน Ethanol ที่ความเข้มข้น และเวลาต่างๆ กัน

5.4 Trehalose

การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่า มีสเปิร์มมีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 60% ก่อนทำการแช่แข็ง น้ำเชื้อที่แช่ในสารละลาย Trehalose ที่ความเข้มข้น 5% และ 10 % จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่าน 60 นาที ในขณะที่สารละลาย Trehalose ที่ความเข้มข้น 15% และ 20 % จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 90 นาที (รูปที่ 6)

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Trehalose ไม่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) และที่เวลา 0 นาที ที่ใช้ในการเจือจางน้ำเชื้อปลา กับสารละลาย Trehalose ไม่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติ กับเวลา 30 นาที ($P>0.05$) แต่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติกับเวลา 60, 90, 120, 150 และ 180 นาที ($P<0.05$)



รูปที่ 6 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) หลังจากเจือจางใน Trehalose ที่ความเข้มข้น และเวลาต่างๆ กัน

6. การแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยสารละลายไครโอโพรแทคแทนที่ชนิดต่าง ๆ

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วยการใช้สารละลาย Ca-F HBSS และสารไครโอโพรแทคแทนที่ 4 ชนิด เมื่อทำการลดอุณหภูมิด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิต่างๆกัน (3, 5, 10°C/นาที) ได้ผลการทดลองดังนี้

6.1 การแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยสารละลาย dimethylsulfoxide (DMSO)

การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าเท่ากับ 100% ก่อนทำการแช่แข็ง ผลของการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม หลังจากการเก็บรักษาแบบแช่แข็งในน้ำยาสูตร Ca-F HBSS และสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่า ในทุกความเข้มข้น และทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl (ตารางที่ 8)

จากการตรวจสอบทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO ไม่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) (ตารางที่ 8) และอัตราการลดอุณหภูมิ ไม่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาอุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ภายหลังการละลายเมื่อใช้ DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์

ความเข้มข้น (%)	อัตราการลดอุณหภูมิ (°C)		
	รวดเร็ว (10°C/นาที)	ปานกลาง (5°C/นาที)	ช้า (3°C/นาที)
5	53.33±3.85 ^{a,1}	66.67±3.85 ^{a,1}	66.67±3.85 ^{a,1}
10	46.67±3.85 ^{a,1}	66.67±3.85 ^{a,1}	66.67±3.85 ^{a,1}
15	33.33±3.85 ^{a,1}	46.67±3.85 ^{a,1}	46.67±3.85 ^{a,1}
20	26.67±3.85 ^{a,1}	33.33±3.83 ^{a,1}	33.33±3.85 ^{a,1}

ตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวตั้งแสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวนอนแสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

6.2 การแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยสารละลาย ethanol

การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 100% ก่อนทำการแช่แข็ง การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังจากการเก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยสารละลาย Ethanol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่า ในทุกความเข้มข้น และทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ ไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl

6.3 การแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยสารละลาย methanol

การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 100% ก่อนทำการแช่แข็ง การทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังจากการเก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยสารละลาย methanol ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่า ในทุกความเข้มข้น และทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ ไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl

6.4 การแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยสารละลาย trehalose

การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 100% ก่อนทำการแช่แข็ง การทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังจากการเก็บรักษาแบบแช่แข็งด้วยสารละลาย trehalose ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% พบว่า ในทุกความเข้มข้น และทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ ไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl

7. การศึกษาความสามารถของน้ำเชื้อแช่แข็งในการปฏิสนธิกับไข่

น้ำเชื้อปลาดุกอุยได้ถูกแช่แข็งด้วย protocol ที่เหมาะสมด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาที่โดยลดอุณหภูมิจาก 25 องศาเซลเซียส (initial temperature) จนถึงอุณหภูมิต่ำสุดท้าย (final temperature) -40 องศาเซลเซียสแล้วเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 30 และ 60 วัน จึงนำไปผสมเทียมกับไข่ปลาดุกอุยที่รีดออกมาจากแม่ปลาที่ฉีดฮอร์โมนกระตุ้น ปรากฏว่า น้ำเชื้อปลาดุกอุยที่เก็บแช่แข็ง (cryopreserved milt) นาน 30 และ 60 วันสามารถปฏิสนธิกับไข่ปลาดุกอุยได้ $72.5 \pm 6.3\%$ และ $75.2 \pm 3.8\%$ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด (fresh milt) ที่ให้ค่าอัตราปฏิสนธิกับไข่ระหว่าง 76.8-83.5% แสดงว่าความสามารถของน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่แช่แข็งในการปฏิสนธิกับไข่ปลาดุกอุยมีประสิทธิภาพเหมือนกับน้ำเชื้อสด

8. การศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

ด้วยเหตุที่ DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเหมาะสมมากที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย เพราะมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่ามากกว่าการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดอื่นๆ จึงทำการแช่แข็งน้ำเชื้อต่อ และศึกษาว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายน้ำเชื้อควรเป็นเช่นไร จึงได้ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำยาสูตร Ca-F HBSS และสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิต่ำอย่างรวดเร็ว (10 °C/นาที่), อัตราการลดอุณหภูมิต่ำปานกลาง (5 °C/นาที่) และอัตราการลดอุณหภูมิต่ำช้า (3 °C/นาที่) และใช้อัตราการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่ 3 ระดับได้แก่ การละลายน้ำเชื้อที่ 30 °C, 50 °C และ 70 °C นาน 5 วินาที หรือจนกระทั่งน้ำเชื้อละลาย

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสด พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 100% ก่อนทำการแช่แข็ง การทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังจากการเก็บรักษาแบบแช่แข็งแล้ว นำมาละลายที่ 3 ระดับอัตราการละลาย พบว่า ในทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ และทุกระดับอัตราการละลาย มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl (ตารางที่ 9)

จากการตรวจสอบทางสถิติพบว่า

- ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO ไม่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)
- อัตราการลดอุณหภูมิต่ำ ไม่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)
- อัตราการละลาย ไม่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาอุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวแล้วนำมาละลายด้วยการใช้อัตราการละลายต่างๆกัน

ความเข้มข้น (%)	อัตราการละลาย (°C/เวลา)	อัตราการลดอุณหภูมิ (°C/นาที)		
		รวดเร็ว (10°C/นาที)	ปานกลาง (5°C/นาที)	ช้า (3°C/นาที)
5	30	13.33±1.92 ^{a,1,A}	20.00±0.00 ^{a,1,A}	20.00±0.00 ^{a,1,A}
	50	20.00±0.00 ^{a,1,A}	26.67±3.85 ^{a,1,A}	26.67±3.85 ^{a,1,A}
	70	20.00±0.00 ^{a,1,A}	33.33±3.85 ^{a,1,A}	40.00±0.00 ^{a,1,A}
10	30	13.33±1.92 ^{a,1,A}	16.67±1.92 ^{a,1,A}	20.00±0.00 ^{a,1,A}
	50	16.67±1.92 ^{a,1,A}	20.00±0.00 ^{a,1,A}	26.67±3.85 ^{a,1,A}
	70	13.33±1.92 ^{a,1,A}	26.67±3.85 ^{a,1,A}	33.33±3.85 ^{a,1,A}
15	30	10.00±0.00 ^{a,1,A}	16.67±1.92 ^{a,1,A}	16.67±1.92 ^{a,1,A}
	50	13.33±1.92 ^{a,1,A}	20.00±0.00 ^{a,1,A}	20.00±0.00 ^{a,1,A}
	70	10.00±0.00 ^{a,1,A}	20.00±0.00 ^{a,1,A}	20.00±0.00 ^{a,1,A}
20	30	10.00±0.00 ^{a,1,A}	13.33±1.92 ^{a,1,A}	13.33±1.92 ^{a,1,A}
	50	10.00±0.00 ^{a,1,A}	16.67±1.92 ^{a,1,A}	16.67±1.92 ^{a,1,A}
	70	8.33±0.96 ^{a,1,A}	16.67±1.92 ^{a,1,A}	16.67±1.92 ^{a,1,A}

- ตัวอักษรพิมพ์เล็กที่เหมือนกันตามแนวตั้งแสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ของอัตราการละลาย
- ตัวอักษรพิมพ์ใหญ่ที่เหมือนกันตามแนวตั้งแสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ของความเข้มข้น
- ตัวเลขที่เหมือนกันตามแนวนอนแสดงความไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ของอัตราการลดอุณหภูมิ

9. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาตก อุยแช่แข็งที่ได้เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว

ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Total Heterotroph ในน้ำเชื้อสดก่อนการแช่แข็ง และน้ำเชื้อที่เจือจางใน Ca-F HBSS เท่ากับ 300.00 ± 0 CFU/ml ($\times 10^5$) และ 273 ± 46.76 CFU/ml ($\times 10^5$) ตามลำดับ ปริมาณแบคทีเรียในน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็ง กับน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งวันที่ 0 กับน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งวันที่ 30 ปริมาณแบคทีเรีย มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และหลังจากทำการแช่แข็งวันที่ 30, 60 และ 90 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณแบคทีเรียมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 10)

ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Gram – negative rod น้ำเชื้อสด น้ำเชื้อเจือจางก่อนการแช่แข็ง และน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งทันที มีค่าเท่ากับ 30 ± 0 CFU/ml ($\times 10^5$), 4.53 ± 2.93 CFU/ml ($\times 10^5$) และ 0.16 ± 1.55 CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งปริมาณแบคทีเรียในน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็ง น้ำเชื้อหลังการแช่แข็ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และหลังจากทำการแช่แข็งวันที่ 30, 60 และ 90 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) จะเห็นได้ว่าปริมาณแบคทีเรียมีปริมาณลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ดังตารางที่ 11)

ตารางที่ 10 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Total Heterotroph ในน้ำเชื้อปลาตกอุยที่เก็บในไนโตรเจนเหลว

ระยะเวลา	ปริมาณแบคทีเรีย CFU/ml ($\times 10^5$)	
	น้ำเชื้อสด	น้ำเชื้อเจือจางใน Ca-F HBSS
เวลาก่อนแช่แข็ง	$300 \pm 0^{A,1}$	$273 \pm 46.77^{B,1}$
0 วันหลังการแช่แข็ง	-	$271.66 \pm 25.65^{B,2}$
30 วัน	-	$31.67 \pm 3.51^{B,3}$
60 วัน	-	$2.33 \pm 0.61^{B,3}$
90 วัน	-	$0.13 \pm 0.02^{B,3}$

ตัวอักษรที่ต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตัวเลขที่ต่างกันตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 11 ปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Gram – negative rod ในน้ำเชื้อปลาตุ๋นที่เก็บในไนโตรเจนเหลว

ระยะเวลา	ปริมาณแบคทีเรีย CFU/ml ($\times 10^5$)	
	น้ำเชื้อสด	น้ำเชื้อเจือจางใน Ca-F HBSS
เวลาก่อนแช่แข็ง	$30 \pm 0^{A,1}$	$4.53 \pm 2.93^{B,1}$
0 วันหลังการแช่แข็ง	-	$0.16 \pm 0.12^{B,2}$
30 วัน		$0.37 \pm 0.07^{B,2}$
60 วัน		$0.17 \pm 0.11^{B,2}$
90 วัน		$0.31 \pm 0.05^{B,2}$

จากการเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Total heterotrophic bacteria ในอาหาร PCA จากการทดลองมาวิเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวเคมีพบเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus nonaureus*, *Micrococcus* spp., *Flavobacterium* spp. และ *Bacillus* spp. ซึ่งตรวจพบได้แม้ว่าระยะเวลาการแช่แข็งผ่านไปจนถึง 90 วัน ส่วน *Corynebacterium* spp. และ *Micrococcus* spp. พบอยู่บางในบางช่วงเวลาเท่านั้น

จากการเก็บตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Gram negative rod ในอาหาร MacConkey Agar พบเชื้อแบคทีเรีย *Flavobacterium* spp. และ *Aeromonas achromogenes* ตรวจพบได้แม้ระยะเวลาการแช่แข็งผ่านไปจนถึง 90 วัน ส่วน *A. salmonicida* และ *Klebsiella* spp. พบได้อยู่บางในบางช่วงเวลาเท่านั้น

10. การศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อ

การศึกษาค้นคว้าผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตุ๋นแช่แข็งที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อ ทำโดยนำน้ำเชื้อปลาตุ๋นมาเจือจางด้วยน้ำยาสูตร Ca-F HBSS และสารละลาย DMSO ความเข้มข้นสุดท้าย 10% ก่อนถูกดูดเข้ามาในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ปล่อยให้อยู่ในสภาวะสมดุลนาน 10 นาที แล้วทำการแช่แข็งโดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (10 องศาเซลเซียส/นาที) ด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส จนถึง -40 องศาเซลเซียส ก่อนนำหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อไปแช่ในไนโตรเจนเหลว และทำการเก็บรักษาระยะยาวในถังไนโตรเจน (liquid nitrogen dewar) แล้วสุ่มเอาหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อแช่แข็ง (cryopreserved

semen) ออกมาทุกๆเดือน และละลาย (thawing) ใน water bath อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที จึงตัดหลอดฟาง แล้วประเมินคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลาย (thawed semen) ได้แก่ เปอร์เซนต์สเปิร์มที่เคลื่อนที่ เปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิต ความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่ และ อัตราการฟักไข่ปลา ซึ่งได้ผลการทดลองตามที่แสดงในตารางที่ 12 และตารางที่ 13 โดยที่การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแช่แข็งหลังการละลายมีค่าลดลงเมื่อเก็บรักษานานขึ้น แต่เปอร์เซนต์การปฏิสนธิกับไข่ และเปอร์เซนต์การฟักของไข่มีค่าไม่เปลี่ยนแปลง

การศึกษาความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่ปลาอุกอุกกับน้ำเชื้อปลาอุกอุกที่แช่แข็ง ทำโดยนำน้ำเชื้อปลาอุกอุกได้ถูกแช่แข็งด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาทีโดยลดอุณหภูมิจาก 25 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิต่ำสุดที่ -40 องศาเซลเซียสแล้วเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวในระยะเวลาต่าง ๆ กัน จึงนำไปผสมเทียมกับไข่ปลาอุกอุกที่รีดออกมาจากแม่ปลา (pooled eggs) ที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน suprefact (GnRHa) และ motillium (dopamine antagonist)

ผลการวิจัยที่แสดงในตารางที่ 13 แสดงให้เห็นว่าน้ำเชื้อปลาอุกอุกแช่แข็งที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว นาน 1 และ 2 เดือน สามารถปฏิสนธิกับไข่ปลาอุกอุกได้ $72.5 \pm 6.3\%$ และ $75.2 \pm 3.8\%$ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสดที่ให้ค่าอัตราปฏิสนธิกับไข่ระหว่าง 76.8-83.5% ในทำนองเดียวกันน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บไว้ 4 และ 6 เดือน สามารถปฏิสนธิไข่ได้ไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสดมีค่าระหว่าง 82.1 – 88.2%

การประเมินอัตราการปฏิสนธิ พบว่า ไข่ปลาอุกอุกที่ปฏิสนธิด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บไว้นาน 1, 2, 4 และ 6 เดือน มีเปอร์เซนต์การฟักเป็นลูกปลาระหว่าง 61.5 – 68.5% มีค่าไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสดที่มีค่าระหว่าง 63.1 – 76.7% (ตารางที่ 13) แสดงให้เห็นว่าน้ำเชื้อปลาอุกอุกแช่แข็งมีความสามารถในการปฏิสนธิ และให้อัตราการฟักของลูกปลาไม่แตกต่างกับการใช้น้ำเชื้อสดในการปฏิสนธิกับไข่ปลา

11. การศึกษาการพัฒนา protocol เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อ

ผลการวิจัยที่แสดงในตารางที่ 14 แสดงให้เห็นว่าน้ำเชื้อปลาอุกอุกที่แช่แข็งในหลอดฟางที่มีความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 4 เซนติเมตร มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดคือ $86.7 \pm 3.3\%$ ในขณะที่น้ำเชื้อปลาอุกอุกที่แช่แข็งในหลอด cryovial ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2 เซนติเมตร มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดเท่ากับ $76.7 \pm 3.3\%$

ตารางที่ 12 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และเปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตหลังการละลายของน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่เก็บรักษาแช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลวระยะเวลาต่าง ๆ กัน

ระยะเวลาเก็บ รักษาน้ำเชื้อ (เดือน)	เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม หลังการละลาย (Post-thaw sperm motility)		เปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิต หลังการละลาย (Post-thaw sperm viability)	
	น้ำเชื้อสด	น้ำเชื้อแช่แข็ง	น้ำเชื้อสด	น้ำเชื้อแช่แข็ง
0	68.8 ± 2.2 ^a	62.9 ± 4.4 ^a	89.7 ± 4.3 ^a	90.6 ± 3.6 ^a
1	73.3 ± 3.9 ^a	46.7 ± 3.1 ^b	85.8 ± 3.8 ^a	83.4 ± 4.1 ^a
2	75.5 ± 4.1 ^a	48.9 ± 4.4 ^b	91.8 ± 2.9 ^a	88.6 ± 3.6 ^a
3	82.2 ± 2.9 ^a	44.7 ± 3.9 ^b	92.5 ± 3.6 ^a	91.3 ± 1.8 ^a
4	80 ± 3.8 ^a	42.7 ± 2.9 ^b	89.7 ± 2.8 ^a	83.9 ± 3.3 ^a
5	76.7 ± 2.9 ^a	32.2 ± 3.5 ^b	93.1 ± 2.5 ^a	87.3 ± 3.2 ^a
6	82.2 ± 4.2 ^a	35.7 ± 4.1 ^b	92.6 ± 4.2 ^a	82.9 ± 5.1 ^a
7	73.3 ± 3.6 ^a	26.7 ± 3.9 ^b	82.9 ± 2.8 ^a	77.5 ± 2.7 ^a
8	76.7 ± 4.6 ^a	33.3 ± 3.7 ^b	86.8 ± 2.9 ^a	79.7 ± 4.7 ^a

หมายเหตุ: ค่าตัวเลขที่มี superscript ต่างกันในแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ (P < 0.05)

ตารางที่ 13 เปอร์เซนต์การปฏิสนธิ และเปอร์เซนต์การฟักของไข่หลังการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวระยะเวลาต่าง ๆ กัน

ระยะเวลาเก็บ รักษาน้ำเชื้อ (เดือน)	เปอร์เซนต์การปฏิสนธิ (Fertilization percentage)		เปอร์เซนต์การฟัก (Hatching percentage)	
	น้ำเชื้อสด	น้ำเชื้อแช่แข็ง	น้ำเชื้อสด	น้ำเชื้อแช่แข็ง
1	76.8 ± 5.1 ^a	72.5 ± 6.3 ^a	63.1 ± 3.8 ^a	61.5 ± 5.5 ^a
2	83.5 ± 3.7 ^a	75.2 ± 3.8 ^a	70.1 ± 3.8 ^a	68.5 ± 3.5 ^a
4	88.2 ± 3.3 ^a	83.4 ± 3.4 ^a	74.3 ± 3.4 ^a	67.7 ± 3.1 ^a
6	86.4 ± 2.9 ^a	82.1 ± 3.8 ^a	76.7 ± 5.9 ^a	66.9 ± 4.6 ^a

หมายเหตุ: ค่าตัวเลขที่มี superscript ต่างกันในแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ (P < 0.05)

ตารางที่ 14 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอยู่หลังการแช่แข็งใน Styrofoam box ที่
ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2, 4 และ 6 เซนติเมตร

ภาชนะที่แช่แข็ง	ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว		
	2 ซม.	4 ซม.	6 ซม.
หลอดฟาง	$43.5 \pm 4.8^{b,3}$	$86.7 \pm 3.3^{a,1}$	$64.6 \pm 5.4^{a,2}$
หลอด cryovial	$76.7 \pm 3.3^{a,1}$	$55.6 \pm 3.9^{b,2}$	$16.7 \pm 4.2^{b,3}$

หมายเหตุ: ตัวเลข superscript ที่ต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตัวอักษร superscript ที่ต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

คุณภาพสเปิร์มปลาดุกอุยลดลงอย่างเด่นชัดในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยในปลาหลายชนิด เช่น ปลา rainbow trout *Salmo gairdneri* (Munkittrick and Moccia, 1987), Finnish landlocked salmon *Salmo salar m. sebago* (Piironen, 1985), Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* (Methven and Crim 1991), winter flounder *Pleuronectes americanus* (Shangguan and Crim, 1999) และปลา Atlantic cod *Gadus morhua* L. (Rouxel et al., 2008) การเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และความหนาแน่นของสเปิร์มตั้งแต่ช่วงต้นฤดูถึงกลางฤดู แล้วลดลงในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ของปลาดุกอุย ก็ยังพบในปลา Atlantic cod (Rouxel et al., 2008)

การใช้สาร electrolyte (KCl, NaCl และ CaCl_2) และสาร non-electrolyte (glucose และ mannitol) ในการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย แสดงให้เห็นว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มถูกควบคุมโดยค่าแรงดันออสโมติก โดยสเปิร์มปลาดุกอุยจะเคลื่อนที่ได้ดีขึ้น เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกลดต่ำลง และเมื่อสเปิร์มอยู่ในสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกสูงใกล้เคียงหรือเท่ากับที่พบในน้ำเชื้อก็จะหยุดเคลื่อนที่ การศึกษาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา salmon พบว่าถูกควบคุมโดยระดับโพแทสเซียม (K^+) เป็นส่วนใหญ่เช่นเดียวกับปลา sturgeon ในขณะที่สเปิร์มของปลาน้ำจืด และปลาทะเลนั้น การเคลื่อนที่ของสเปิร์มถูกควบคุมโดยค่าระดับแรงดันออสโมติกเป็นส่วนใหญ่ แม้ว่าปัจจัยอื่นๆเช่น ความเข้มข้นของสาร metabolite และแร่ธาตุ (เช่น Ca^{2+} , Mg^{2+}) pH และอุณหภูมิต่างก็มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (Morisawa, 1995)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่รีดออกมาใหม่ๆแล้วเก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียสโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ พบว่าการใช้ถุงพลาสติก ziplock สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด 36 ชั่วโมงก่อนที่สเปิร์มจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วยน้ำจืดในขณะที่น้ำเชื้อที่เก็บรักษาในภาชนะอื่นๆอีก 3 ชุดการทดลองสามารถเก็บรักษาได้เพียง 12 ชั่วโมงแล้วหยุดการเคลื่อนที่ สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากพื้นที่ผิวของ ziplock มีมากกว่าภาชนะประเภทอื่นๆ ทำให้มีอากาศปริมาณมากกว่าขณะเก็บแช่เย็นน้ำเชื้อ ซึ่งผลการทดลองแช่เย็นน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่เก็บรักษาโดยให้ออกซิเจนสมทบก็ปรากฏว่าถุงพลาสติก ziplock ที่ให้อากาศสมทบก็สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานขึ้นถึง 60 ชั่วโมงก่อนที่สเปิร์มจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วยน้ำจืด ผลการทดลองในปลาหลายชนิดก็สนับสนุนสมมุติฐานนี้เช่น Stoss et al. (1987) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา rainbow trout แช่เย็นโดยไม่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์พบว่า ความสูงของน้ำเชื้อที่เก็บไม่ควรเกิน 5-6 มิลลิเมตร ขณะเก็บแช่เย็นเพื่อให้สเปิร์มได้มีอากาศถ่ายเทอย่างเพียงพอ Christensen and Tiersch (1996) ได้นำน้ำเชื้อปลา Channel catfish มาเจือจางในสารละลาย

บัฟเฟอร์ HBSS แล้วเก็บในภาชนะต่าง ๆ กัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทั้งในสภาพให้ออกซิเจน และไม่ให้ออกซิเจนสมทบปรากฏว่าน้ำเชื้อที่เก็บในถุงพลาสติก Zip-loc ที่ให้ออกซิเจนสมทบสามารถเก็บรักษาได้ในระยะเวลาที่นานกว่าน้ำเชื้อที่เก็บโดยไม่ให้ออกซิเจนสมทบ DiLauro et al. (1994) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Atlantic sturgeon ที่แช่เย็นโดยไม่เจือจางสารละลายบัฟเฟอร์ไว้บนน้ำแข็ง และให้ออกซิเจนสมทบทุกวันพบว่า น้ำเชื้อสดสามารถเก็บได้เป็นระยะเวลา 5 วัน โดยที่คุณภาพของสเปิร์มไม่เปลี่ยนแปลง

การแช่เย็นน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ทำให้ทราบว่สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS มีความเหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส สาเหตุส่วนหนึ่งน่าจะเกิดจาก Ca-F HBSS มีค่า osmolality 301 mOsm/kg ซึ่งใกล้เคียงกับ osmolality ของ seminal plasma ซึ่งมีค่า 297 mOsm/kg จึงทำให้สเปิร์มปลาดุกอุยไม่เคลื่อนที่เมื่ออยู่ในสารละลาย Ca-F HBSS (Morisawa, 1985) ความเหมาะสมของ Ca-F HBSS ในการแช่เย็นน้ำเชื้อปลาก็ก็นำมาซึ่งมีรายงานในปลาน้ำจืด *Pangasius gigas* (Mongkonpunya et al., 1995). ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการแช่เย็นน้ำเชื้อที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ขึ้นอยู่กับตัวแปรต่างๆ เช่น ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม อัตราส่วนที่เหมาะสมในการเจือจางน้ำเชื้อ ความแปรปรวนของน้ำเชื้อปลาแต่ละตัว วิธีการรวบรวมน้ำเชื้อ การปนเปื้อนของแบคทีเรีย และสภาพแวดล้อมของการเก็บรักษา เช่น น้ำเชื้อปลา Atlantic cod และ haddock sperm ที่เจือจางอัตราส่วน 1:3 ด้วยสารละลาย modified Mounib's extender ยังคงมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มประมาณ 3% หลังการแช่เย็นผ่านไป 40 และ 38 วันตามลำดับ (DeGraaf and Berlinsky, 2004). อย่างไรก็ตามการแช่เย็นน้ำเชื้อปลาหลายชนิดเป็นเวลานานขึ้นก็มักจะพบว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะมีค่าลดต่ำลง (Chao et al., 1992; Bates et al., 1996).

การลดลงของคุณภาพน้ำเชื้อสดของปลาดุกอุยอย่างรวดเร็วภายใน 1 วันขณะเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส น่าจะมีสาเหตุจากการเกิดสภาพขาดออกซิเจนระหว่างการเก็บรักษา (anaerobic condition) ซึ่งอาจมีการระเหยของน้ำบางส่วนออกจากน้ำเชื้อที่เก็บรักษาเอาไว้ นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของน้ำเชื้อขณะเก็บรักษาก็มีส่วนทำให้คุณภาพสเปิร์มเสื่อมลง (sperm ageing phenomena) ส่งผลให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่มีค่าลดต่ำลง ดังที่มีรายงานไว้ในปลา Atlantic halibut (Billard et al., 1993) ปลา rainbow trout (Lahnsteiner et al., 1997) และ ปลา turbot (Suquet et al., 1998) เป็นต้น. Lahnsteiner et al. (1998) ได้รายงานว่า การเก็บแช่เย็นน้ำเชื้อจะมีส่วนเร่งทำให้เกิดสภาพเซลล์ที่บาดเจ็บ (oxidative damage) ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าลดต่ำลง Harvey and Kelley (1984) รายงานว่าน้ำเชื้อสดของปลาหมอเทศ *Sarotherodon mossambicus* ที่เก็บไว้ที่ 5 องศาเซลเซียส จะเก็บรักษาไว้ได้เพียง 60-120 ชั่วโมงแล้วสเปิร์มหยุดเคลื่อนที่ อย่างไรก็ตามการแช่เย็นน้ำเชื้อ

สดด้วยการใช้ออกซิเจนสมทบใส่เข้าไปในน้ำเชื่อจะช่วยยืดระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อให้นานขึ้นได้ เช่น ปลา rainbow trout (Billard, 1981) เป็นต้น

การใช้อัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:4 ในการเจือจางน้ำเชื้อ แล้วไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า การเจือจางน้ำเชื้อปลาดุกด้วย Ca-F HBSS สามารถทำได้มากถึง 1:4 ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้ก็มีความแตกต่างกับการทดลองอื่นๆ เช่น อัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันสูงสุดเมื่อเจือจางในสารละลายที่ประกอบด้วย 150 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L KCl, 1 mmol/L CaCl₂, 1 mmol/L MgSO₄, 20 mmol/L Tris (pH 8.5) and 0.5% BSA or 0.5% hen egg yolk) และเก็บแช่เย็นคืออัตราส่วน 1:5 (Mansour et al. 2004) ในขณะที่อัตราส่วนที่เหมาะสมในการเจือจางน้ำเชื้อปลา Atlantic cod และปลา haddock (DeGraaf and Berlinsky, 2004) และปลา sturgeon (*Acipenser oxyrinchus desotoi* and *A. brevirostrum*) (Park and Chapman, 2005) คืออัตราส่วน 1:3 นอกจากนี้ Babiak et al. (2006) ได้รายงานว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมของการแช่เย็นน้ำเชื้อปลา Atlantic halibut ที่เจือจางในสารละลาย modified Hanks' balanced salt solution คือ 1:5-1:9 ซึ่งทำให้สเปิร์มมีชีวิตอยู่ได้นานกว่าการใช้อัตราส่วนอื่นๆในการเจือจางน้ำเชื้อ

น้ำเชื้อปลาดุกที่เจือจางด้วย Ca-F HBSS ในช่วงกลางฤดูผสมพันธุ์วางไข่สามารถเก็บรักษาได้นานกว่าน้ำเชื้อที่เก็บรักษาในช่วงต้น หรือปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองในน้ำเชื้อปลา cod (Rouxel et al., 2008) Billard et al. (1977) รายงานว่าน้ำเชื้อปลากะพงขาว (*Dicentrarchus labrax*) ในช่วงต้นฤดูเก็บรักษาได้ 70 ชั่วโมงก่อนที่สเปิร์มจะหยุดเคลื่อนที่ และจะเก็บรักษาได้เพียง 30 นาทีในช่วงกลาง หรือปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ สาเหตุที่น้ำเชื้อปลาดุกของการทดลองครั้งนี้มีค่าลดลงเชื่อว่าการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ซึ่งมีความสอดคล้องกับการลดลงของการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และความหนาแน่นสเปิร์ม Lahnsteiner et al. (2004) รายงานว่าการมีชีวิตของสเปิร์มมีความสัมพันธ์กับบทบาทของน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์มที่ทำหน้าที่ปกป้องสเปิร์ม

ความสามารถของน้ำเชื้อปลาดุกที่เจือจางใน Ca-F HBSS ในการปฏิสนธิกับไข่ปลาดุกอู๋มีค่าลดลงในวันที่ 4 และ 6 มีความสัมพันธ์กับการลดลงของการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่มีค่าเหลือ 44.8% และ 13.3% ตามลำดับ ซึ่งส่งผลให้โอกาสที่สเปิร์มจะปฏิสนธิกับไข่ต่อหน่วยเวลามีค่าลดลงเนื่องจากข้อจำกัดที่สเปิร์มปลาดุกจะเคลื่อนที่ได้ประมาณ 1 นาทีเท่านั้นเมื่อถูกกระตุ้น จึงทำให้ความสามารถในการปฏิสนธิลดลง อย่างไรก็ตามการใช้อัตราส่วนของจำนวนสเปิร์มที่เพิ่มขึ้นในการปฏิสนธิกับไข่ 1 ใบ (sperm to egg ratio) จะช่วยให้ปฏิสนธิได้มากขึ้นเมื่อใช้สเปิร์มที่มีการเคลื่อนที่ต่ำ ดังที่พบในรายงานที่พบในน้ำเชื้อปลาใน (Saad et al., 1988) น้ำเชื้อปลา walleye ที่มีสเปิร์มเคลื่อนที่ประมาณ 40% ให้ค่าอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าน้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่าเมื่อใช้จำนวนสเปิร์มเท่ากัน (Casselman et al., 2006) Saad et al. (1988) ทำการเก็บรักษา

น้ำเชื้อปลาใน ระยะสั้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและอัตราการปฏิสนธิกับไข่จะสูงในวันที่ 1 และ 2 และจะลดลงเรื่อยๆ จนเป็น 0 หลังจากเก็บรักษา 6 - 8 วัน แต่เมื่อเติมสารปฏิชีวนะ (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร streptomycin + 50 IU bipenicillin) ในน้ำยา พบว่าในการเก็บรักษา 8 วัน สเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่ 100% เมื่อเก็บรักษานานถึง 16 วัน ก็ยังมีอัตราการปฏิสนธิกับไข่มีค่าถึง 20 % นอกจากนี้การที่ไข่ปลาถูกอุกยพักเป็นลูกปลาวัยอ่อนได้เมื่อใช้น้ำเชื้อแช่เย็นที่เจือจางใน Ca-F HBSS เป็นสิ่งที่ทำให้มั่นใจในประสิทธิภาพของการใช้เทคโนโลยีแช่เย็นน้ำเชื้อในการผสมเทียมกับไข่

การทดสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยทำให้ทราบว่า DMSO มีความเหมาะสมมากที่สุดในการแช่แข็งที่ความเข้มข้น 10% โดยทั่วไปชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลามีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดปลา แต่ DMSO มักพบว่าเป็นสารที่เหมาะสมที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลายชนิด เช่น ปลากะพงแดง (Vuthiphandchai et al., 2009) ปลา turbot (Dreanno et al., 1997) ปลาบึก (Mongkonpunya et al., 1995) ปลาดุกยุโรป (Linhart et al., 1993) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม DMSO ก็ไม่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาบางชนิด (Mansour et al., 2006) สำหรับ methanol จัดเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Arctic char (Mansour et al., 2006, ปลาดุกเทศ (Viveiros et al., 2000) และ ปลา salmon (Lahnsteiner et al., 1997) เป็นต้น ในขณะที่ ethanol ใช้ได้ดีในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากดเหลือง (Muchlisin et al., 2004) และ Trehalose ใช้ได้ผลดีในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเก๋า *Epinephelus moara* (Miyaki et al., 2005) และหอยนางรม *Pinctada margaritifera* L. (Lyons et al., 2005) อย่างไรก็ตาม Rideout et al. (2003) ได้รายงานการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตาเดียว (winter flounder) ว่า propylene glycol ให้ผลการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดีกว่าการใช้ DMSO และ glycerol

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติให้ผลการทดลองที่เหมือนกับการทดลองอื่นๆ ที่ DMSO ให้ผลดีในการแช่แข็ง เช่น Linhart et al. (2000) ได้แช่แข็งน้ำเชื้อของปลาในโดยนำน้ำเชื้อมาเจือจางกับ Kurokura อัตราส่วน 1:5 และลดอุณหภูมิให้ได้ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำ 10% DMSO เติมลงไปแล้วลดอุณหภูมิจาก 4 องศาเซลเซียส ถึง -9 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราการลด 4 องศาเซลเซียส/นาที่ และจาก -9 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราการลด 11 องศาเซลเซียส/นาที่ พัก 6 นาที ก่อนนำเข้าสู่ถังไนโตรเจนเหลว 1 สัปดาห์ นำหลอด Cryotube มาละลายใน water bath นาน 110 วินาที ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อโดยดูจาก การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อพบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งมีความแตกต่างกันโดยน้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ $78 \pm 18\%$ น้ำเชื้อแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ $69 \pm 14\%$ นอกจากนี้ Conget et al. (1996) ได้ทำการศึกษาการเก็บน้ำเชื้อปลา rainbow trout แบบแช่แข็งที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส/นาที่ เก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 15-30 วัน

พบว่า น้ำเชื้อที่ผสมด้วย DMSO และ sucrose มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ 63% อัตราการลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอยู่ที่ระดับ 3, 5 หรือ 10 องศาเซลเซียส/นาทิจึงไม่แตกต่างกันทางสถิติ แสดงว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกสามารถทำได้ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 3-10 องศาเซลเซียส/นาทิจึงอัตราที่เหมาะสมในการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อปลาแตกต่างกันไปตามชนิดของปลา เช่น อัตราที่เหมาะสมของการลดอุณหภูมิปลา striped bass (Thirumala et al., 2006) ปลา green swordtail (Huang et al., 2004) และปลาเก๋า (black grouper; Gwo, 1993) คือ 14-20, 5-45, 20-154 องศาเซลเซียส/นาทิจึงตามลำดับ การลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งมีความสำคัญเพราะอาจมีผลต่อการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง (ice crystal) และแรงดันออสโมติกในระหว่างการแช่แข็ง ซึ่งต้องเลือกใช้ให้เหมาะสมสำหรับเซลล์แต่ละชนิด

ความสามารถของน้ำเชื้อปลาดุกที่แช่แข็งในการปฏิสนธิกับไข่ปลาดุกมีประสิทธิภาพเหมือนกับน้ำเชื้อสด แสดงว่าคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในการทดลองอื่นๆ เช่น Ott and Horton (1971) ได้ทำการเก็บน้ำเชื้อปลา chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) และ coho salmon (*O. kisutch*) แบบแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว -196 องศาเซลเซียส ด้วยน้ำยาที่มีส่วนผสมของ mannitol และใช้ DMSO ความเข้มข้น 8% โดยภายหลังจากการเก็บแช่แข็งนาน 7 วัน น้ำเชื้อออกมามีผลผสมกับไข่สด ให้อัตราการปฏิสนธิ 79% Mounib (1978) ก็ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งของปลา salmon และ cod พบว่า การใช้ 12.5% DMSO มีผลให้อัตราการปฏิสนธิเท่ากับ 80% และ 59% ตามลำดับ Warnecke and Pluta (2003) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนโดยใช้ dimethyl-acetamide (DMA) เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ โดยใช้ computer-assisted sperm motion analysis (CASA) วิเคราะห์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อ ใช้ความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (dimethyl-acetamide) ระหว่าง 10% - 25% น้ำยาเก็บรักษาน้ำเชื้อ modified kurokura 's extender 2 โดยเติมน้ำตาลลงไปรวมด้วย (sucrose or trehalose) ใช้อัตราลดอุณหภูมิ 3, 6 และ 10 องศาเซลเซียส/นาทิจึงจนถึงอุณหภูมิต่ำสุดที่ -80, -80, -50 ตามลำดับ แล้วนำไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวเมื่อเวลาผ่านไปจึงนำหลอดฟาง (0.25 ml) มาละลายใน water bath อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที เพื่อทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ โดยได้ผลดังนี้คือ 1. เมื่อใช้ modified kurokura 's extender2 (MK2) เติม 200mM trehalose และ 20% DMA และอัตราลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาทิจึงเก็บไว้นาน 6 วัน อัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อ $40 \pm 6\%$ ซึ่งมีค่าประมาณครึ่งหนึ่งของน้ำเชื้อสด ค่าเฉลี่ยความเร็วลดลงจาก น้ำเชื้อสด อัตราการปฏิสนธิ $98 \pm 2\%$ มีอัตราการฟัก $80 \pm 2\%$ ซึ่งมีผลใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสด และมี Swim-up-stage larvae $78 \pm 2\%$ 2. เมื่อใช้ modified kurokura extender 2 (MK2) เติม 200mM sucrose และ 15% DMA อัตราลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

เซส/นาที เมื่อเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวนาน 349 วัน มีอัตราการปฏิสนธิ 99% มีอัตราการฟัก $41 \pm 4\%$ และมี Swim-up-stage larvae $38 \pm 5\%$

การใช้อัตราการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่ 3 ระดับได้แก่ การละลายน้ำเชื้อที่ $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ และ $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ นาน 5 วินาที หรือจนกระทั่งน้ำเชื้อละลายไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย แสดงว่าการละลายน้ำเชื้อปลาดุกอุยสามารถใช้อัตราการละลายช่วงกว้างตั้งแต่ $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ จนถึง $70\text{ }^{\circ}\text{C}$ องศาเซลเซียส ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองการละลายน้ำเชื้อปลา Atlantic halibut ที่พบว่าอัตราการละลายที่เหมาะสมอยู่ในช่วงกว้าง คือ $10\text{--}40\text{ }^{\circ}\text{C}$ องศาเซลเซียส/นาที (Bolla et al., 1987)

การศึกษาเปลี่ยนแปลงปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งที่ได้เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว 90 วัน ด้วยการศึกษาปริมาณแบคทีเรียกลุ่ม Total Heterotrophic bacteria, Gram – negative rod และ presumptive Vibrios ในน้ำเชื้อแช่แข็งเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียกับน้ำเชื้อสดที่รวบรวมใหม่ๆ พบว่าน้ำเชื้อสดมีปริมาณแบคทีเรียปนเปื้อนมากที่สุด ในขณะที่แบคทีเรียในน้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวมีปริมาณแบคทีเรียลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่า protocol การแช่แข็งที่ได้มีความเหมาะสมต่อน้ำเชื้อปลาดุกอุย เพราะสเปิร์มปลาดุกอุยยังมีการเคลื่อนที่ได้ดีหลังการละลาย (post-thaw motility) แต่ protocol ดังกล่าวมีผลให้แบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งมีปริมาณลดลงหลังการแช่แข็งและเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ทำให้มีความปลอดภัยต่อการจัดตั้งธนาคารน้ำเชื้อปลาดุกอุยต่อไป นอกจากนี้ระหว่างการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยก็ไม่พบ presumptive Vibrios ปนเปื้อนหลังจากการเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว สำหรับชนิดของแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถดำรงชีวิตตลอดระยะเวลาเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งนาน 90 วันคือ *Staphylococcus nonaureus* และ *Flavobacterium* spp. ส่วนแบคทีเรียกลุ่ม *Corynebacterium* spp., *Bacillus* spp., *Aeromonas achromogenes*, *A. salmonicida*, และ *A. hydrophila* ตรวจพบเชื้อกลุ่มเหล่านี้ในน้ำเชื้อแช่แข็งตลอดระยะเวลาการเก็บ 90 วัน Bielanski (2002) ได้ทำการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในเซลล์สืบพันธุ์ของมนุษย์ ทั้งไข่ และน้ำเชื้อที่ได้มีการแช่แข็งไว้ 6 – 35 ปี รายงานว่ามีการพบเชื้อ *Corynebacterium xerosis.*, *Proteus vulgaris.*, *Staphylococcus sciuri.*, *Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Ochrobactrum anthropi* เป็นต้น และไม่มีการรายงานพบแบคทีเรียกลุ่ม Presumptive

การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแช่แข็งหลังการละลายมีค่าลดลงเมื่อเก็บรักษานานขึ้น แต่เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิกับไข่ และเปอร์เซ็นต์การฟักของไข่มีค่าไม่เปลี่ยนแปลง แสดงว่าคุณภาพน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด สะท้อนให้เห็นว่า protocol ที่เกี่ยวข้องกับการแช่แข็งและละลายน้ำเชื้อของการทดลองครั้งนี้มีความเหมาะสม โดยทั่วไปการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาที่ได้เป็นระยะเวลาแตกต่างกันอาจเนื่องมาจากการเลือกใช้น้ำยาเก็บรักษาน้ำเชื้อร่วมกับชนิดและ

ความเหมาะสมของการเลือกใช้ความเข้มข้นสารไครโอโพรเทคแทนท์, อัตราการลดอุณหภูมิ, สภาพแวดล้อม และรวมถึงชนิดของตัวปลาที่แตกต่างกัน ดังนั้นในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งจะประสบความสำเร็จได้ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยด้วยกัน เช่น ชนิดของปลา, อัตราการลดอุณหภูมิ, อัตราการละลาย, ชนิดของน้ำยาที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อร่วมกับชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ รวมทั้งความสมบูรณ์ของน้ำเชื้อปลาแต่ละชนิด และสภาพแวดล้อมที่เกี่ยวข้องซึ่งต้องมีความเหมาะสมด้วย ทศนีย์ ภูพิพัฒน์และคณะ(2529) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากบแบบแช่แข็งโดยใช้น้ำยาสูตรที่ 1 และ 8%DMSO โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิด้วยวิธีการแช่ในไนโตรเจนเหลว 15 นาที จากนั้นนำมาแช่ไว้ในถังไนโตรเจนเหลว 4 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 60% พลชาติ ผิวนิ และ พนม กระจ่างพจน์ สอดสุข (2546) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานิลสเปิร์มแช่แข็ง โดยใช้น้ำยา modified Cortland และใช้ 10%DMSO เจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยา 1:5 โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ถึง -60 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ที่ -60 องศาเซลเซียส นาน 2 วินาทีแช่ลงในไนโตรเจนเหลว 441 วันมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ $41.50 \pm 2.12\%$ จากการรายงานของ Chao et al. (1992) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังแบบแช่แข็งโดยใช้ Ringer เป็น Sperm Extender และใช้ 10% DMSO สามารถเก็บนานเป็นระยะเวลา 3 เดือนมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายดี และยังสอดคล้องกับการรายงานของ Suquet et al.(1998) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งปลา turbot (*Psetta maxima*) เป็นระยะเวลา 9 เดือนโดยใช้ 10% DMSO ร่วมกับ 10% BSA พบว่าในระหว่างการเก็บ 9 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ในช่วง 60 - 90% ภายหลังการกระตุ้นที่ 10 และ 60 วินาที

น้ำเชื้อปลาดุกอยู่ที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 4 เซนติเมตร มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด ในขณะที่น้ำเชื้อปลาดุกอยู่ที่แช่แข็งในหลอด cryovial ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2 เซนติเมตร มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด แสดงให้เห็นว่ารูปแบบการลดอุณหภูมิมิมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย ซึ่งสาเหตุที่เป็นเช่นนี้น่าจะเกิดจากขนาดของภาชนะที่ใช้แช่แข็งน้ำเชื้อที่แตกต่างกันต้องการอัตราการลดอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ด้วยเหตุที่หลอดฟางมีขนาดเล็ก การใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ความสูง 4 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวก็มีความเหมาะสมในการลดอุณหภูมิตามที่ต้องการ แต่การใช้หลอด cryovial ที่มีขนาดใหญ่และหนากว่าหลอดฟางค่อนข้างมากจำเป็นต้องลดอุณหภูมิในอัตราที่สูงขึ้นเพื่อให้ น้ำเชื้อที่อยู่ใน cryovial แข็งตัวในเวลาที่ต้องการ ซึ่งการแช่เหนือไนโตรเจนเหลวเพียง 2 เซนติเมตรจะมีความเย็นที่สูงขึ้น ทำให้น้ำเชื้อแช่แข็งได้ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอยู่อย่างง่ายในถังอุณหภูมิเย็นสามารถรักษาคุณภาพน้ำเชื้อได้เช่นเดียวกับการใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ โดยที่ประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งเหล่านั้นมีคุณภาพไม่ด้อยไปกว่าน้ำเชื้อสด ซึ่งน้ำเชื้อแช่แข็งเหล่านั้นยังสามารถควบคุมช่วงเวลาการผสมเทียม และการผสมข้ามพันธุ์

ปลาชนิดต่างๆได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้การลำเลียงน้ำเชื้อแช่แข็งไปใช้ในการผสมเทียมสามารถทำได้สะดวกกว่าลำเลียงพอพันธุ์ และการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอยู่อย่างง่ายเป็นเทคโนโลยีที่มีราคาถูกและมีคุณภาพ ซึ่งเหมาะสำหรับเกษตรกรที่ต้องการลดภาระค่าใช้จ่ายในการใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ

Kenneth et al. (2004) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงแดงแบบแช่แข็งอย่างง่าย โดยมี Ca-F HBSS เป็น sperm extender และใช้สารไครโอโพรเทคแทนต์คือ DMA, DMSO และ methanol ที่ความเข้มข้น 5% และ 10% ทำการลดอุณหภูมิโดยการนำหลอดฟางวางแนวนอนบน rack จากนั้นจึงนำไปลดอุณหภูมิใน freezing chamber ที่อุณหภูมิสุดท้ายเท่ากับ -140 องศาเซลเซียสเมื่อเวลาผ่านไป 3 นาทีอุณหภูมิใน freezing chamber เพิ่มขึ้นจาก -140 เป็น -60 องศาเซลเซียส อุณหภูมิปรับตัวสูงขึ้นเนื่องจากใส่ตัวอย่างลงไป จากนั้นอุณหภูมิปรับลดลง 16 องศาเซลเซียสต่อนาที จนกระทั่งอุณหภูมิปรับลดลงจนถึง -140 องศาเซลเซียส จึงนำไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เมื่อเวลาผ่านไป 8 นาทีผลการทดลองปรากฏว่า สารละลาย DMSO 10% มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดเท่ากับ 71% Ji et al. (2004) ทำการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea perch (*Lateolabrax japonicus*) ใช้ Extender 3 ชนิดคือ modified plaice Ringer solution (MPRS), D-15 และ modified Mounib's medium (MMM) ใส่สารไครโอโพรเทคแทนต์ คือ DMSO ความเข้มข้น 6%, 10% และ 14% นำไปลดอุณหภูมิใน gauze pocket ขนาด 6×9 ซม. โดยวางไว้สูงเหนือผิวหน้าสารไนโตรเจนเหลวที่ระดับความสูง 2 6 และ 13 เซนติเมตร เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปวางเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 5 นาทีเสร็จแล้วจึงนำไปแช่ในสารไนโตรเจนเหลวต่อไป จากการทดลองพบว่าสารละลาย DMSO 10% ที่ระดับความสูงเหนือผิวหน้าสารไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงที่สุดเท่ากับ $73.3 \pm 5.7\%$ รองลงมาคือที่ระดับความสูง 13 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ $48.3 \pm 2.9\%$ และที่ระดับความสูง 2 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำสุดคือ $41.7 \pm 10.6\%$ ตามลำดับ โดยที่ระดับความสูง 6 เซนติเมตรนั้น มีอัตราการลดอุณหภูมิเป็นเส้นตรงจาก 16 ถึง -15 องศาเซลเซียส มีอัตราการลดอุณหภูมิ -31 องศาเซลเซียส/นาที จากนั้นใส่ตัวอย่างสารละลายน้ำเชื้อปลา Sea perch ลงไป อุณหภูมิจะมีการปรับตัวสูงขึ้นเป็นระยะเวลา 65 วินาที โดยอุณหภูมิจะสูงขึ้นจาก -15 องศาเซลเซียส เป็น -12 องศาเซลเซียส จากนั้นอุณหภูมิจะเริ่มปรับตัวลดลงจาก -12 องศาเซลเซียส ถึง -180 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ -18.6 องศาเซลเซียส/นาที

สรุปผลการทดลอง

1. คุณภาพน้ำเชื้อปลาดุกอยู่ลดลงในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ทั้งในน้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์

2. การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอยู่ถูกควบคุมโดยค่าแรงดันออสโมติก โดยสเปิร์มจะเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกต่ำ

3. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอยู่แบบแช่เย็นโดยใช้น้ำยาบัฟเฟอร์ พบว่าน้ำยา Ca-F HBSS มีความเหมาะสมมากที่สุดในการแช่เย็นน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส และการเจือจางน้ำเชื้อสามารถเจือจางน้ำเชื้อ : Ca-F HBSS ได้สูงสุดในอัตรา 1: 4 โดยที่ความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่ และอัตราการฟักมีค่าไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด

4. DMSO ที่ความเข้มข้น 10% มีความเหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอยู่ ซึ่งอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมขณะแช่แข็งน้ำเชื้อคือ 3 - 10 องศาเซลเซียส/นาที และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายน้ำเชื้ออยู่ในช่วง 30 ถึง 70 องศาเซลเซียส

5. การปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาดุกอยู่ที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวมีค่าลดลงระหว่างการเก็บรักษา

6. การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแช่แข็งหลังการละลายมีค่าลดลงเมื่อเก็บรักษานานขึ้น แต่ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิกับไข่ และเปอร์เซ็นต์การฟักของไข่

7. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอยู่อย่างง่าย ถ้าแช่แข็งน้ำเชื้อที่อยู่ในหลอดฟาง (French straw) ต้องแช่แข็งที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 4 เซนติเมตร ในขณะที่การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอยู่ในหลอด cryovial สามารถทำได้ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2 เซนติเมตร

เอกสารอ้างอิง

- กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง หลักการ/วิธีการ/ประโยชน์. กรุงเทพฯ:มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พลชาติ ผิวนธร และ พนม กระจำพจน์ สอดศุข. 2546. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำในรูปน้ำเชื้อแช่แข็ง. ปทุมธานี: สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ กรมประมง.
- ทัศนีย์ ภูมิพัฒน์,บุญนา สุขทิต,สุริยา ทานสุทัศน์ และเพ็ญใจ แก้วจัญญ. 2529.การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพาและปลาบึก.เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 66.สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ
- มนต์ชัย ดวงจินดา, จำเนียร สัตยาพันธุ์, วรรณดา สุจริต และ เทวิน วงพระลัย. 2544. การเก็บรักษาตัวอ่อนโคนมโดยการแช่แข็ง. วารสารขอนแก่นการเกษตร. 3(42), 253-267.
- นลินี มารคแมน, กฤษณ์ มงคลปัญญา, อุทัยรัตน์ ณ นคร, และ ประวิทย์ สุรนิรนาถ. 2526. ความล้มเหลวในการพยายามเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพื่อประโยชน์ในการผสมเทียม. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 21สาขาประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2536. การเพาะพันธุ์ปลา. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. 194 หน้า.
- Alavi, S.M.H. and Cosson, J. 2005. - Sperm motility in fishes: (I) Effects of pH and temperature. Cell Biol. Int., 29: 101-110.
- Alavi, S.H.M., Rodina, M., Policar, T., Kozak, P., Psenicka, M, O. and Linhart, O. 2007. Semen of *Perca fluviatilis* Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilute ratio, ions and osmolality on sperm motility. Theriogenology 68:276-283.
- Babiak, I., Ottesen, O., Rudolfson, G., Johnsen, S., 2006. Chilled storage of semen from Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. I: Optimizing the protocol. Theriogenology 66, 2025-2035.
- Bates, M.C., Wayman, W.R. and Tiersch, T.R., 1996. Effect of osmotic pressure on the activation and storage of channel catfish sperm. Trans. Am. Fish. Soc. 125: 798-802.
- Billard, R. 1981. Short-term preservation of sperm under oxygen atmosphere in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Aquaculture 22: 287-293.
- Billard, R., Dupont, J. and Barnabe, G. 1977. Diminution de la motilite et de la duree de conservation du sperme de *Dicentrarchus labrax* L., (Poisson, teleosteen) pendant la periode de spermiation. Aquaculture 11: 363-367.

- Bielanski A, Bergeron, H., Lau, P.C.K. and Devenish, J. 2003. Microbial contamination of embryos and semen during long term banking in liquid nitrogen. *Cryobiology* 46:146-152.
- Bolla, S., Holmeljord, I. And Refstie, T. 1987. Cryologic preservation of Atlantic salmon sperm. *Aquaculture* 65:371-374.
- Brown, G.G. and Mims, S.D. 1995. Storage, transporation, and fertility of undiluted and diluted paddlefish milt. *The Progressive Fish-Culturist* 57: 64-69.
- Casselman, S.J., Schulte-Hostedde, A.I. and Montgomerie, R., 2006. Sperm quality influences male fertilization success in walleye (*Sander vitreus*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 63: 2119-2125.
- Chao, N.H., Tsai, H.P. and Liao, I.C., 1992. Short- and long-term cryopreservation of sperm and sperm suspension of the grouper, *Epinephelus malabaricus* (Bloch and Schneider). *Asian Fish. Sci.* 5: 103-116.
- Christensen, J.M. and Tiersch, T.R. 1996. Refrigerated storage of channel catfish sperm. *Journal of the World Aquaculture Society* 27: 340-346.
- Conget, P., Fernandez, M., Herrera, G. and Minguell, J.J. 1996. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. *Aquaculture* 143: 319-329.
- DeGraaf, J.D., Berlinsky, D.L., 2004. Cryogenic and refrigerated storage of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) spermatozoa. *Aquaculture* 234: 527–540.
- DiLauro, M.N., Krise, W.F., Hendrix, M.A. and Baker, S.E. 1994. Short-term cold storage of Atlantic sturgeon sperm. *The Progressive Fish-Culturist* 56: 143-144.
- Dreanno, C., Suquet, M., Desbruyeres, E., Cosson, J., Delliou, H.L. and Billard, R. 1998. Effect of urine on semen quality in turbot. *Aquaculture* 169:247-262.
- Dreanno, C., Suquet, M., Quemener, L., Cosson, J., Fierville, F., Normant, Y. and Billard, R. 1997. Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. *Theriogenology* 48:589-603.
- Fribourgh, J.H. 1966. The application of a differential staining method to low-temperature studies on goldfish spermatozoa. *Progressive Fish Culturist* 28: 227-230.
- Gwo, J.C. 1993. Cryopreservation of black grouper (*Epinephelus malabaricus*) spermatozoa. *Theriogenology* 39:1331-1342.

- Gwo, J.H., Strawn, K., Longnecker, M.T. and Arnold, C.R. 1991. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. *Aquaculture* 94: 355-375.
- Harvey, B. and Kelley, R.N., 1984. Chilled storage of *Sarotherodon mossambicus* semen. *Aquaculture* 36: 85-95.
- Huang, C., Dong, Q. and Walter, R.B. and Tiersch, T.R. 2004. Sperm cryopreservation of green swordtail *Xiphophorus helleri*, a fish with internal fertilization. *Cryobiology* 48:295–308.
- Jenkins, A. J. and Tiersch, T.R.. 1997. A preliminary bacteriological study of refrigerated channel catfish sperm. *Journal of the World Aquaculture Society* 28:282-288.
- Ji, X.S., Chen,S.L., Tian, Y.S., Yu, G.C., Sha, Z.X., Xu, M.Y. and Zhang, S.C. 2004. Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) spermatozoa and feasibility for production-scale fertilization. *Aquaculture* 241:517-528.
- Kenneth, L. R., Chase, G. H., Edward, J. C., and Terrence, R. T. 2004. Cryopreservation of sperm of red snapper. *Aquaculture* 23: 183-194.
- Kurokura, H., Hirano, R., Tomita, M., and Iwahashi, M. 1984. Cryopreservation of carp sperm. *Aquaculture* 37: 267–273.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann T. and Patzner R.A., 1998. Determination of sperm quality of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, by sperm motility, seminal plasma parameters, and spermatozoal metabolism. *Aquaculture* 163: 163-181.
- Lahnsteiner, F., Mansour, N. and Berger, B., 2004. Seminal plasma proteins prolong the viability of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. *Theriogenology* 62: 801-808.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T. And Patzner RA. 1997. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. *Aquacult Res.* 28:471-479.
- Linhart, O., Billard, R. and Proteau, J.P. 1993. Cryopreservation of European catfish, *Silurus glanis* L. spermatozoa. *Aquaculture* 115: 347-359.
- Linhart, O., Rodina, M. and Cosson J. 2000. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. *Cryobiology* 41:241-250.

- Lyons, L., Jerry, D.R. and Southgate, P.C. 2005. Cryopreservation of black-lip pearl oyster (*Pinctada margaritifera* L.) spermatozoa: effects of cryoprotectants on spermatozoa motility. *Journal of Shellfish Research* 24(4):1187-1190.
- Mansour, N., Lahnsteiner, F. and Berger, B., 2004. Characterization of the testicular semen of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), and its short-term storage. *Aquacult. Res.* 35: 232-244.
- Mansour, N., Richardson, G.F. and McNiven, M.A. 2006. Effect of extender composition and freezing rate on post-thaw motility and fertility of Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.), spermatozoa. *Aquacult Res* 37:862-868.
- Methven D.A. and Crim L.W., 1991. Seasonal changes in spermatocrit, plasma sex steroids and motility of sperm from Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*). In: Scott, A.P., Sumpter, J.P., Kime, D.E., Rolfe, M.S. (Eds.), *Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish*, University of East Anglia, Norwich, UK. Fish Symp 91, Sheffield, UK. p.170.
- Miyaki, K., Nakano, S., Ohta, H. and Kurokura, H. 2005. Cryopreservation of kelp grouper *Epinephelus moara* sperm using only a trehalose solution. *Fisheries Science* 71: 457–458.
- Mongkonpunya, K., Chairak, N., Pupipat, T. and Tiersch, T.R., 1995. Cryopreservation of Mekong giant catfish sperm. *Asian Fish. Sci.* 8: 211-221.
- Morisawa, M., 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. *Zool. Sci.* 2: 605-615.
- Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S. and Yasuda, K. 1983. Effects of osmolarity and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. *Journal of Experimental Biology* 107: 95-103.
- Mounib, M.S. 1978. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. *Journal of Reproduction Fertilization* 53: 13-18.
- Muchlisin, Z.A., Hashim, R. and 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.

- Munkittrick, K.R. and Moccia, R.D., 1987. Seasonal changes in the quality of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen: effect of a delay in stripping on spermatocrit, motility, volume and seminal plasma constituents. *Aquaculture* 64: 147-156.
- Ott, A.G. and Horton, H.F. 1971. Fertilization of chinook and coho salmon eggs with cryopreserved sperm. *Journal of Fishery Research Board Canada* 28: 745-749.
- Park, C. and Chapman, F.A. 2005. An extender solution for the short-term storage of sturgeon semen. *N. Am. J. Aquacult.* 67: 52-57.
- Piironen, J., 1985. Variation in the properties of milt from the Finnish Landlocked *Salmo* (*Salmo salar m. sebago* Girard) during a spawning season. *Aquaculture* 48, 337-350.
- Rana, K.J. and McAndrew, B.J. 1989. The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. *Aquaculture* 76: 335-345.
- Rideout, R.M., Litvak, M.K. and Trippel, E.A. 2003. The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents. *Aquaculture Research* 34:653-659.
- Rouxel, C., Suquet, M., Cosson, J., Severe, A., Quemener, L., Fauvel, C., 2008. Changes in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) sperm quality during the spawning season. *Aquacult. Res.* 39: 434-440.
- Saad, A., Billard, R., Theron, M.C. and Hollebecq, M.G. 1988. Short-term preservation of carp *Cyprinus caprio* semen. *Aquaculture* 71: 133-150.
- Satterfield, J.R. and Flickinger, S.A. 1995. Factors influencing storage potential of preserved Walleye semen. *The Progressive Fish-Culturist* 57: 175-181.
- Scott, A.P. and Baynes, S.M. 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Journal of Fish Biology* 17: 707-739.
- Shangguan B. and Crim L.W., 1999. Seasonal variation in sperm production and sperm quality in male winter Flounder, *Pleuronectes americanus*: the effects of hypophysectomy, pituitary replacement therapy, and GnRH-a treatment. *Mar. Biol.* 134, 19-27.
- Stoss, J., Gerjes, L. and Holtz, W. 1987. The role of spermatozoa depth in storing chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen under oxygen. *Aquaculture* 61: 275-279.

- Stoss, J. 1983. Fish gamete preservation and spermatozoa physiology. In: W.S. Hoar., D.J. Randall and E.M. Donaldson (Editors), Fish Physiology, Vol. 9, Part B. Academic Press, New York, pp. 306-350.
- Suquet, M., Dreanno, C., Petton, B., Normant, Y., Omnes, M.H. and Billard, R. 1998. Long-time effects of the cryopreservation of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa. Aquat. Living Resour. 11:45-48.
- Thirumala, S., Campbell, W.T., Vicknair, M.R., Tiersch, T.R. and Devireddy, R.V. 2006. Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. Theriogenology 66:964-973.
- Tiersch, T.R., Goudie, C.A. and Carmichael, G.I. 1994. Cryopreservation of channel catfish sperm: storage in cryoprotectants, fertilization trials, and growth of channel catfish produced with cryopreserved sperm. Transactions of the American Fisheries Society 123: 580-586.
- Truscott, B., Idler, D.R., Hoyle, R.J. and Freeman, H.C., 1968. Sub-zero preservation of Atlantic salmon sperm. J. Fish. Res. Board Can. 25, 363-372.
- Viveiros, A.T.M., So, N. and Komen, J. 2000. Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*: cryopreservation, freezing rates and sperm: egg dilution ratio. Theriogenology 54:1395-1408.
- Vuthiphandchai, V. and Zohar, Y. 1999. Age-related sperm quality of captive striped bass, *Morone saxatilis*. Journal of the World Aquaculture Society. 30: 65-72.
- Vuthiphandchai, V., Chomphuthawach, S. and Nimrat, S. 2009. Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability and fertilization capacity. Theriogenology 72: 129-138.
- 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: 167-185.
- Wayman, W.R., Tiersch, T.R. and Thomas R.G., 1998. Refrigerated storage and cryopreservation of sperm of red drum, *Sciaenops ocellatus* L. Aquacult. Res. 29, 267-273.

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

Vuthiphandchai, V., Thadsri, I. and Nimrat, S. 2009. Chilled storage of walking catfish (*Clarias macrocephalus*) semen. *Aquaculture* 296: 58-64.

Vuthiphandchai, V. and Nimrat, S. 2007. Development of the chilled storage and cryopreservation program of sperm of aquatic animals in Thailand. Oral presentation in: International Conference on Recent Trends in Biodiversity and Biotechnology (RTBB), Aurangabad, India, 15-17 November 2007. pp.10.

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

- **เชิงพาณิชย์ (มีการนำไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ/บุคคลทั่วไป)**

ผู้ประกอบการเอกชนที่ทำธุรกิจเพาะพันธุ์ปลาได้มีความสนใจที่จะนำเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยมาประยุกต์ใช้ในการเพาะพันธุ์ปลาดุกอุย เนื่องจากมีความสะดวก และลดความยุ่งยากในการรวบรวมน้ำเชื้อ นอกจากนี้ผู้ประกอบการบางส่วนก็มีความสนใจที่จะเข้ามารับการอบรมการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยเพื่อนำเอาความรู้ไปใช้เพาะพันธุ์ปลา

- **เชิงนโยบาย**

-

- **เชิงสาธารณะ (มีเครือข่ายความร่วมมือ/สร้างกระแสดความสนใจในวงกว้าง)**

การวิจัยแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยก่อให้เกิดความสนใจที่พัฒนาเครือข่ายวิจัย multidisciplinary research ด้านนี้กับนักวิจัยในประเทศจีน เวียดนาม และไต้หวัน

- **เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)**

ผลการวิจัยที่ได้ไปใช้ประกอบการเรียนการสอนและการค้นคว้าวิจัยด้าน วาริชศาสตร์ จุลชีววิทยา การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม วิทยาศาสตร์ชีวภาพ ทั้งในระดับปริญญาตรี ปริญญาโทและปริญญาเอกของมหาวิทยาลัยบูรพา และได้มีการสร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ระดับปริญญาตรี และปริญญาโท โดยการวิจัยการแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำเศรษฐกิจชนิดอื่นๆ

3. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ/หนังสือ

Nimrat, S., Vuthiphandchai, V., 2008. Role of bacteria in the chilled storage and cryopreservation of sperm in aquatic animals: A review. In: Schwartz, S.H. (Ed.), Aquaculture Research Trends. Nova Science Publishers, Inc. New York, USA. pp. 149-184.

ภาคผนวก

บทความผลงานวิจัย

องค์ประกอบทางเคมีของสารละลายบัฟเฟอร์

- Hanks' balanced salt solution (HBSS; NaCl 0.8000 g, KCl 0.0400 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0120 g, NaHCO_3 0.0350 g, KH_2PO_4 0.0060 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0200 g, Glucose 0.1000 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0160 g dissolved in 100 mL water, pH 7.6 (Wayman et al., 1998);
- Calcium Free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS; NaCl 0.8890 g, KCl 0.0440 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0130 g, NaHCO_3 0.0390 g, KH_2PO_4 0.0070 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0220 g, Glucose 0.1110 g dissolved in 100 mL, pH 7.6);
- Extender 7 (NaCl 5.780 g, KCl 2.558 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.103 g, NaHCO_3 0.235 g, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.220 g, Pyruvate 6.0 g, Citric acid 0.100 g, HEPES buffer 2.380 g and 10 mL of KOH (1.27 g/100 mL). These compositions were dissolved in 1,000 mL distilled water and adjusted pH 7.6) (Brown and Mims, 1995);
- extender 13 (NaCl 0.876 g dissolved in 1,000 mL distilled water);
- Modified Cortland solution (NaCl 1.880 g, KCl 7.200 g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.410 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.230 g, NaHCO_3 (sodium bicarbonate) 1.000 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.230 g, Glucose 1.000 g dissolved in 1,000 mL distilled water, pH 7.6) (Truscott et al., 1968).