การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*)

เพื่อประโยชน์การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ปฏิญญา อ้นขวัญเมือง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรการศึกษามหาบัณฑิต

สาขาวิชาวาริชศาสตร์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา

ธันวาคม 2559

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ ปฏิญญา อ้นขวัญเมือง ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย)

....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุบัณฑิต นิ่มรัตน์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชงโค แซ่ตั้ง)

....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย)

....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุบัณฑิต นิ่มรัตน์)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิน กิ่งทอง)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ของมหาวิทยาลัยบูรพา

....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่.....5.....เดือน......ธันวาคม...................... พ.ศ.2559

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความเมตตาช่วยเหลือจาก รองศาสตราจารย์ ดร.วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รองศาสตราจารย์ ดร.สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำปรึกษา ช่วยเหลือ เคี่ยวเข็ญ ให้ความรู้ และข้อเสนอแนะในการแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนถูกต้อง และสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูง ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชงโค แซ่ตั้ง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตบางพระ และผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่าน ที่กรุณาให้ความรู้ให้คำปรึกษาตรวจแก้ไขและวิจารณ์ผลงาน ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ทุกท่านที่ได้ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ข้าพเจ้า ขอกราบขอบพระคุณพ่อแม่ และเพื่อนกับน้องๆ ทุกท่านที่ช่วยสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์นี้จนสำเร็จ

คุณค่าและประโยชน์จากวิทยานิพนธ์ ขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่ บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษา และประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

ปฏิญญา อ้นขวัญเมือง

54910442: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์วาริชศาสตร์; วท.ม. (วิทยาศาสตร์วาริชศาสตร์)
คำสำคัญ: ปลาดุกอุย/ คุณภาพของสเปิร์ม/ การแช่แข็ง/ การลดอุณหภูมิ/ การละลาย

ปฏิญญา อ้นขวัญเมือง: การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยเพื่อประโยชน์การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Cryopreservation of Thai walking catfish (*Clarias macrocephalus*) semen for the benefit of aquaculture) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, Ph.D., สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ Ph.D. 64 หน้า. ปีพ.ศ. 2559

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) แช่แข็งเพื่อประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงและอนุรักษ์สายพันธุ์ปลาดุกอุย วิธีการวิจัยแบ่งการทดลองเป็น 4 ตอน คือ ตอนที่ 1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในช่วงฤดูผสมพันธุ์ พบว่า เดือนสิงหาคม (ช่วงฤดูฝน) เป็นช่วงที่น้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว มีความสมบูรณ์ที่สุด ตอนที่ 2 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย โดยทดสอบผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 6 ชนิด (Dimethyl sulfoxide; DMSO, Methanol, Glycerol, Sucrose, Ethylene glycol และ Propylene glycol) ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5, 10 และ15% และมีอัตราการลดอุณหภูมิสามระดับคือ -3, -5 และ -8 องศาเซลเซียส/นาที พบว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วยเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (Control rate programmable freezer) โดยสาร DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 10% ร่วมกับสาร Ca-F HBSS ที่ใช้เป็น Sperm extender โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -8 องศาเซลเซียส/นาทีจะให้ผลดีที่สุดในการแช่แข็งโดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ $64 \pm 4.44\%$ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับทุกชุดการทดลอง ตอนที่ 3 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในปริมาณมาก โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างหลอดบรรจุน้ำเชื้อ 3 ขนาดคือ หลอด French straws ขนาด 0.25 มิลลิลิตร และ 0.5 มิลลิลิตร และ Cryotube ขนาด 1.25 มิลลิลิตร ทำการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อด้วยการลดอุณหภูมิโดยใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -8 องศาเซลเซียส/นาที และการลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลวที่เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว (Above liquid nitrogen surface) ในกล่องโฟมที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6, 4 และ 2 เซนติเมตร เป็นเวลานาน 10 นาที โดยใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อทั้ง 3 ขนาดคือ 0.25, 0.5 และ 1.25 มิลลิลิตรปรากฏว่าในความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร มีคุณภาพใกล้เคียงกับน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ ตอนที่ 4 การทดสอบความสามารถการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็ง พบว่าการใช้น้ำเชื้อสดให้ผลดีกว่าการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในการปฏิสนธิกับไข่ปลาดุกอุย การศึกษาในเรื่องของการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยสามารถใช้เป็นข้อมูล

เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีในการแช่แข็งน้ำเชื้อเพื่อการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และอาจช่วยในการอนุรักษ์สายพันธุ์ของปลาดุกอุยพื้นเมืองของไทย

54910441: MAJOR: AQUATIC SCIENCE; M.Sc. (AQUATIC SCIEN CE)

KEYWORDS: *CLARIAS MACROCEPHALUS*/ SPERM QUALITY/ CRYOPRESERVATION/ FREEZING RATE/ THAWING

PATINYA OUNKWANMUANG: CRYOPRESERVATION OF THAI WALKING CATFISH (*CLARIAS MACROCEPHALUS*) SEMEN OF THE BENEFIT OF AQUACULTURE. ADVISORY COMMITTEE: VERAPONG VUTHIPHANDCHAI, Ph.D.,SUBUNTITH NIMRAT Ph.D. 64 P. 2016

The objective of this research was to develop a suitable technology for cryopreservation of Thai walking catfish (*Clarias macrocephalus*) sperm for aquaculture and conversation by dividing into 4 experiments. The first experiment evaluated the change in sperm quality during the spawning season and found sperm with high motility in August (rainy season). The second experiment evaluated the effects of six cryoprotectants (Dimethyl sulfoxide ; DMSO , Methanol, Glycerol, Sucrose, Ethylene glycol and Propylene glycol) at final concentrations of 5, 10 and 15% and 3 three freezing rates at -3, -5 and -8^{0}C/ min on using controlled-rate programmable freezer. The use of freezing rate at -8^{0}C/min and 10% DMSO resulted in the highest post-thawed sperm motility of 64 ± 4.44%, significantly higher ($P<0.05$) than those of other treatments. The third experiment related with large-scale cryopreservation of Thai walking catfish (*Clarias macrocephalus*) semen. Using french straws 0.25 ml. and 0.5 ml. and Cryotube 1.25 ml. Sperm were cryopreserved either controlled with rate programmable freezer -8^{0}C/min and liquid nitrogen vapour in the Styrofoam box at 2, 4 and 6 cm above liquid nitrogen surface for 10 minutes. Sperm frozen with the liquid nitrogen vapour 6 cm above liquid nitrogen surface had sperm quality comparable to those frozen with controlled-rate programmable freezer. The last experiment determined ability of cryopreserved sperm on fertilization success. Fresh sperm had higher the fertilization capacity than cryopreservation sperm. This sperm cryopreservation study on *C. macrocephalus* can be used for further development of sperm cryopreservation program in aquaculture industry and conservation of this indigenous species.

สารบัญ

สารบัญ(ต่อ)

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

สารบัญภาพ

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) เป็นปลาน้ำจืดพื้นเมืองของไทยที่นิยมเลี้ยงและบริโภคกันโดยทั่วไป ปลาดุกอุยเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเนื่องจากเนื้อที่มีรสชาติดีเป็นที่นิยมในการบริโภค และมีราคาจำหน่ายสูง (Srisuvantach & Thangtrongpiros, 1985) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนี้พ่อแม่พันธุ์ปลาดุกอุยในธรรมชาติมีจำนวนลดลง เนื่องจากปัญหาการขยายตัวของชุมชน และคุณภาพสิ่งแวดล้อมในน้ำประกอบกับปลาดุกอุยเป็นปลาที่โตช้าและมีความต้านทานโรคต่ำ ทำให้มีการพัฒนารูปแบบการเลี้ยงโดยการผสมเทียมข้ามสายพันธุ์ระหว่างปลาดุกแอฟริกัน (*Clarias gariepinus*) เพศผู้กับปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) เพศเมีย ทำให้ได้ลูกพันธุ์ที่โตเร็วและมีความต้านทานโรคสูงทำให้ปลาดุกข้ามสายพันธุ์ (บิ๊กอุย) เป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายในการเพาะเลี้ยงส่งผลให้การเพาะเลี้ยงปลาดุกอุยมีปริมาณลดลง โดยที่มากกว่า 80% ของผู้เพาะเลี้ยงปลาดุกในประเทศไทยเป็นปลาดุกข้ามสายพันธุ์ (Na-Nakorn, 1994) ดังนั้นเมื่อมีการหลุดลอดลงสู่แหล่งน้ำของปลาดุกข้ามสายพันธุ์ทำให้เกิดการผสมพันธุ์กับปลาดุกอุยในธรรมชาติ เป็นผลให้สายพันธุ์ของปลาดุกอุยในธรรมชาติลดจำนวนลงจากการปนเปื้อนทางพันธุกรรม (Senanan, Kapuscinski, Na-Nakorn, & Miller, 2004) จากการจำแนกชนิดพันธุ์สัตว์ที่ถูกคุกคามโดยได้พิจารณาสถานภาพตามแนวทางเอกสารของ International Union for Conservation of Nature (IUCN) ในการดำเนินโครงการ The Development of Conservation and Protection Mechanism on Red Data of Thailand ปลาดุกอุยถูกจัดให้อยู่ในสถานภาพมีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ (Vulnerable) คือประสบความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในธรรมชาติในอนาคตอันใกล้ (Vidthayanon, 2005) ทั้งที่เป็นปลาที่พบโดยทั่วไปในไทยเมื่อประมาณ 30-40 ปีที่ผ่านมาดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการที่จะใช้อนุรักษ์สายพันธุ์ และเพิ่มจำนวนประชากรปลาดุกอุยให้มีจำนวนมากขึ้นเพื่อประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์พันธุ์ปลาท้องถิ่นมิให้สูญพันธุ์

วิธีหนึ่งที่จะช่วยในการเพิ่มจำนวนของปลาดุกอุยให้ได้จำนวนมากๆ และรวดเร็วคือการผสมเทียม แต่ในกระบวนการเพาะขยายพันธุ์ปลาดุกอุยนั้นไม่สามารถรีดน้ำเชื้อโดยการกดบริเวณส่วนท้องเหมือนปลาชนิดอื่นได้เพราะอัณฑะปลาดุกอุยอยู่ลึกลงไปในช่องท้องใต้ระบบทางเดินอาหาร ในการเพาะขยายพันธุ์ปลาดุกอุยจำเป็นต้องมีการผ่าท้องปลาดุกอุยเพศผู้ เพื่อเอาถุงน้ำเชื้อ (Testis) มาใช้ในการ

ผสมเทียม ดังนั้นในการเพาะขยายพันธุ์ปลาดุกอุยในแต่ละครั้งจึงควรใช้น้ำเชื้อให้คุ้มค่าที่สุด และอีกวิธีการหนึ่งที่จะช่วยทำให้น้ำเชื้อมีความคุ้มค่าได้ก็คือ การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็งซึ่งจะทำให้น้ำเชื้อคงสภาพพร้อมนำมาผสมเทียมกับไข่ได้ทุกเวลา โดยที่คุณภาพน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ ยังคงใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสด นอกจากนี้อีกปัญหาหนึ่งที่มักจะเกิดอยู่เสมอในระหว่างการเพาะพันธุ์ปลาก็คือ ช่วงระยะเวลาที่สามารถรวบรวมน้ำเชื้อได้จากพ่อพันธุ์ปลาดุกอุยอาจไม่สัมพันธ์กับช่วงระยะเวลาที่แม่พันธุ์ปลาดุกอุยตกไข่ (Egg availability) ที่เป็นผลจากความแปรปรวนของพ่อพันธุ์ปลาเพศผู้แต่ละตัว (Individual variation) ที่ผลิตน้ำเชื้อได้ต่างกัน ทำให้เกิดความยุ่งยากในการจัดการผสมเทียมในโรงเพาะฟักเป็นอย่างมาก (Vuthiphandchai, Thadsri, & Nimrat, 2009) อีกทั้งการใช้น้ำเชื้อปลาที่รวบรวมได้ใหม่ๆ (Freshly collected milt) เพื่อการผสมเทียมนั้นมีข้อจำกัดตรงที่จะต้องใช้ผสมเทียมทันทีไม่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้นาน เพราะคุณภาพน้ำเชื้อสดจะลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ผสมไม่ติด ดังนั้นการเพาะพันธุ์ปลาดุกอุยโดยการผสมเทียมจำเป็นต้องมีการพัฒนาเทคนิควิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพื่อให้มีน้ำเชื้อพร้อมอยู่ตลอดเวลาเพื่อการผสมเทียม และสามารถใช้ได้สะดวกรวดเร็วตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (ศิริพร คชรัตน์, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2548)

การศึกษาพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อของปลาในตระกูล catfish มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายเช่น ปลา Channel catfish *Ictalurus punctatus* (Christensen & Tiersch, 2005) ; African catfish *Clarias gariepinus* (Viveiros, So, & Koman., 2000) ; Mekong giant catfish *Pangasius gigas* (Mongkonpunya, Chairak, Pupipat, & Tiersch., 1995) เป็นต้น ส่วนปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) มีการศึกษาในเรื่องของ Seminal plasma, sperm motility และ Milt dilution (Tan-Fermin, Miura, Adachi, & Yamauchi, 1998) การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น (Vuthiphandchai, Thadsri, & Nimrat, 2009) และการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง (วันชัย แสนคำลือ, 2546 และธรรมศักดิ์ ถาพรพันธ์, 2548) ที่ประสบความสำเร็จในการศึกษาเกี่ยวกับการเลือกใช้ชนิดของสารเคมี,วิธีการแช่แข็ง และการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็ง รวมถึงการศึกษาถึงช่วงระยะเวลาที่น้ำเชื้อมีคุณภาพดีที่สุดในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่เป็นข้อมูลสำคัญที่จำเป็นต้องรู้ก่อนที่จะทำการเก็บรักษาด้วยวิธีการแช่แข็งเพื่อให้ได้ที่น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีที่สุด และมีความเหมาะสมที่จะนำมาทำการเก็บรักษาด้วยการแช่แข็งเพื่อรักษาคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวให้มีคุณภาพที่ดีเป็นระยะเวลานานในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อ อย่างไรก็ตามการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยมีการวิจัยค่อนข้างจำกัด ยังไม่มีงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ อีกทั้งการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในปริมาณมากยังไม่พบผู้ทำการศึกษาทดลอง การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตระกูล Catfish ในปริมาณมากมี

ประโยชน์คือการประยุกต์ใช้ในการเพาะพันธุ์ปลาดุกอุยโดยตรงจึงควรที่จะศึกษาในเรื่องขนาดของหลอดที่ใช้ในการบรรจุน้ำเชื้อปลา โดยมีวิธีการลดอุณหภูมิแบบใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ Control rate programmable freezer เช่นในปลา European catfish (*Silurus glanis*) (Linhart, Rodina, Flajshans, Gela, & Kocour, 2005) และ Blue catfish (*Ictalurus furcatus*) (Hu, Yang, & Tiersch., 2011) และในปลา Yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) (Pan et al., 2008) เป็นต้น ขนาดของหลอดแช่แข็งน้ำเชื้อที่มีขนาดใหญ่และจำนวนของหลอดบรรจุที่มากขึ้นจะช่วยเพิ่มปริมาณน้ำเชื้อแช่แข็งในแต่ละรอบกระบวนการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์พันธุ์ปลาเนื่องจากเป็นที่ทราบโดยทั่วกันแล้วว่า การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อปลาดุกอุยต้องทำการผ่าท้องและถุงน้ำเชื้อ (Testis) ปลาดุกอุยที่มีขนาดเล็กมีขนาดเล็กทำให้ใช้ปลาดุกอุยเป็นจำนวนมากและใช้เวลานานในการเก็บรวบรวมทำให้คุณภาพของน้ำเชื้อลดลงตามระยะเวลา และคุณภาพของน้ำเชื้อจะลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นดังนั้นหากกระบวนการที่ใช้ในการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อมีระยะเวลานานจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพของน้ำเชื้อทำให้ได้น้ำเชื้อที่มีคุณภาพไม่ดีและอาจไม่ประสบความสำเร็จจากการนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปใช้ในการผสมเทียม อีกทั้งปลาดุกอุยเป็นปลาที่หาพ่อแม่พันธุ์ได้ยากบางช่วงเวลาไม่สามารถหาพ่อแม่พันธุ์ที่จะนำมาใช้ในการเพาะพันธุ์และจัดเป็นปลาที่มีราคาแพง และยังมีความเสี่ยงที่จะเกิดความสูญเสียจากการขนส่ง, การเลี้ยง, โรคระบาด และปัจจัยอื่นๆที่นำไปสู่การตายของพ่อแม่พันธุ์ได้ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาถึงวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยในปริมาณมากที่จะช่วยเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งและช่วยลดความเสี่ยงในการสูญเสียพ่อแม่พันธุ์ปลาดุกอุยเพื่อใช้ประโยชน์จากพ่อแม่พันธุ์ให้คุ้มค่ามากที่สุด การแช่แข็งน้ำเชื้อในปริมาณมากยังเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อที่จะนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่จะมีการใช้น้ำเชื้อปลาแช่แข็งในอนาคต การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถช่วยในอนุรักษ์สายพันธุ์ของปลาดุกอุยพื้นเมืองของไทยที่อยู่ในสถานภาพมีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ ที่อาจมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในอนาคต การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยในไนโตรเจนเหลวยังเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถจัดตั้งธนาคารน้ำเชื้อ และเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มจำนวนปลาดุกอุยพื้นเมืองของไทยให้ดำรงอยู่ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ประเมินคุณภาพของสเปิร์มในช่วงต้นฤดู, กลางฤดู และปลายฤดูกาลวางไข่ของปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*)(พฤษภาคมถึงตุลาคม)

2. เปรียบเทียบคุณภาพของสเปิร์มปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) แช่แข็งที่เก็บรักษาในหลอดบรรจุที่มีขนาดแตกต่างกัน (หลอดฟางขนาด 0.25 และ 0.5 มิลลิลิตร และหลอด cryotube ขนาด 1.25 มิลลิลิตร)
3. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของอุปกรณ์ที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อดุกอุย (*C. macrocephalus*) ระหว่างการลดอุณหภูมิแบบการใช้เครื่องแช่แข็งอัตโนมัติและการลดอุณหภูมิเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวภายในกล่องโฟม
4. ประเมินความสามารถในการปฏิสนธิไข่ปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) ของน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่แช่แข็ง

สมมติฐานของการวิจัย

1. คุณภาพน้ำเชื้อปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) ในช่วงต้นฤดู, กลางฤดู และปลายฤดูกาลวางไข่ (พฤษภาคมถึงตุลาคม) มีการเปลี่ยนแปลงในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่
2. คุณภาพน้ำเชื้อปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) แช่แข็งที่เก็บรักษาในหลอดบรรจุที่มีขนาดแตกต่างกัน (หลอดฟางขนาด 0.25 และ 0.5 มิลลิลิตร และหลอด cryotube ขนาด 1.25 มิลลิลิตร) ไม่มีความแตกต่างกัน
3. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) โดยใช้เครื่องแช่แข็งอัตโนมัติมีประสิทธิภาพเทียบท่ากับการแช่แข็งเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวภายในกล่องโฟม
4. น้ำเชื้อปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) แช่แข็งมีประสิทธิภาพในการปฏิสนธิกับไข่ปลาดุกอุยไม่ต่างจากน้ำเชื้อสด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ได้ข้อมูลที่จำเป็นเบื้องต้นในการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*)
2. ทราบวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) เพื่อนำไปใช้ในธนาคารน้ำเชื้อและยังสามารถนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาผสมเทียมกับไข่เป็นประโยชน์ต่อการเพาะพันธุ์และการอนุรักษ์พันธุ์ปลาดุกอุย

3. ทราบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.25 0.5 และ 1.25 มิลลิลิตร ซึ่งมีประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ในปริมาณที่มากขึ้นทั้งต่อภาคการผลิตและการอนุรักษ์

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาการพัฒนาวิธีการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุย โดยประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลาดุกอุยในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และศึกษาการแช่แข็งโดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อการมีชีวิตรอดของน้ำเชื้อปลาดุกอุยโดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ซึ่งจะเน้นศึกษาในด้านการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อให้ได้ปริมานที่มากขึ้นในหลอดขนาดใหญ่ เพื่อนำมาพิจารณาเลือกใช้วิธีการแช่แข็งที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยให้ได้ปริมาณที่มากขึ้น อันเป็นประโยชน์ต่อธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในเชิงพาณิชย์ และการอนุรักษ์

ข้อจำกัดของงานวิจัย

เนื่องจากปลาดุกอุยจัดเป็นปลาที่หาพ่อและแม่พันธุ์ได้ยาก ในบางช่วงเวลาไม่สามารถหาพ่อพันธุ์ที่จะนำมาใช้ในการทดลองและเป็นปลาที่มีราคาแพง ทำให้บางครั้งไม่สามารถจัดหาพ่อแม่พันธุ์ที่นำมาเป็นตัวอย่างในการทดลองได้ตามระยะเวลาที่กำหนดไว้อาจส่งผลต่อการทดลองทำให้ล่าช้า หรือไม่สามารถดำเนินการตามแผนที่วางไว้เพราะเป็นปลาที่ผสมพันธุ์วางไข่ตามฤดูกาล

นิยามศัพท์เฉพาะ

Cryopreservation คือ การแช่แข็งเซลล์สืบพันธุ์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตทั้งพืช และสัตว์ ได้แก่ การแช่แข็งเซลล์ไข่ น้ำเชื้อตัวผู้ ตัวอ่อน หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต โดยผ่านกระบวนการลดอุณหภูมิ แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

Extender คือ สารละลายของเกลือที่ใช้ในการเตรียมน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งซึ่งบางครั้งมีสารอินทรีย์รวมอยู่ด้วยช่วยในการเก็บรักษาเซลล์ให้มีชีวิตรอดระหว่างการลดอุณหภูมิ และยังเป็นสารอาหารแก่เซลล์ ส่วนมาก Extender มีค่า Osmolality ใกล้เคียงกับ Seminal Fluid ของสัตว์ชนิดนั้นจึงทำให้สเปิร์มไม่มีการเคลื่อนที่เมื่อเจอจางในสาร Extender

Cryoprotectant คือ สารเคมีที่ช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง (Ice Crystal) ภายในเซลล์และช่วยชลอการสูญเสียน้ำทำให้เซลล์มีชีวิตรอดในกระบวนการแช่แข็ง

Equilibration Time คือ ระยะเวลาที่เซลล์ปรับตัวกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ก่อนเริ่มทำการแช่แข็ง

Freezing คือ การลดอุณหภูมิทำให้ของเหลวที่อยู่รอบ ๆ เซลล์และภายในเซลล์ค่อยๆแข็งตัว ในขณะที่ทำการลดอุณหภูมิ อัตราการลดอุณหภูมิในอัตราที่เหมาะสมจะทำให้น้ำถูกดึงออกจากเซลล์อย่างต่อเนื่องและจะป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์

Thawing คือ การละลายเซลล์ที่แข็งตัวโดยการเพิ่มอุณหภูมิ ก่อนนำไปใช้ประโยชน์ ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิไม่เหมาะสม อาจทำให้เซลล์ปรับสภาพไม่ทัน น้ำจะไหลออกจากเซลล์มากขึ้น ทำให้เซลล์แตกและประสบความล้มเหลวหลังการแช่แข็ง

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

ปลาดุกอุยชื่อสามัญ Gunther' walking catfish ชื่อวิทยาศาสตร์ *Clarias macrocephalus* Gunther จัดอยู่ในสกุล *Clarias* ซึ่งเป็นปลาไม่มีเกล็ด มีหนวด 4 คู่ ครีบหลังมีก้านครีบอ่อนอยู่จำนวน 68-72 อัน ครีบก้นมีจำนวน 47-52 อัน ฐานของครีบหลังกับครีบก้น ไม่ติดกับครีบหาง ครีบอกมีก้านครีบแข็งข้างละ 1 อัน ลักษณะกลมใหญ่ปลายแหลมเป็นฟันเลื่อย ทั้งด้านในและด้านนอก ลักษณะปลายกะโหลกท้ายทอยมีลักษณะป้านโค้งมน มีความยาวจากกะโหลกท้ายทอยถึงจุดเริ่มต้นของครีบหลัง ประมาณ 5-7 เท่าของความยาวของหัว (ไชยา อุ้ยสูงเนิน, 2532) ปลาดุกมีอวัยวะพิเศษที่ช่วยในการหายใจ เรียกว่า อะโบเรสเซนท์ ออร์แกน (Aborescent organ) ซึ่งมีลักษณะคล้ายพุ่มไม้สีขาว อยู่ในหัวกะโหลก ลำตัวมีสีดำและเหลืองออก ทางสีเหลืองจาง ปลาดุกผสมพันธุ์วางไข่ในช่วงฤดูฝน ระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม (Srisuvantach & Thangtrongpiros, 1985) ลักษณะนิสัยชอบหาอาหารตามหน้าดินเป็นปลาที่กินได้ทั้งพืชและเนื้อ แต่กินเนื้อเป็นหลัก เนื่องจากตาของปลาดุกมีขนาดเล็กมากเมื่อเทียบกับลำตัว ปลาดุกจึงใช้หนวดที่สามารถรับความรู้สึกได้ดีในการหาอาหาร (ไชยา อุ้ยสูงเนิน, 2532)

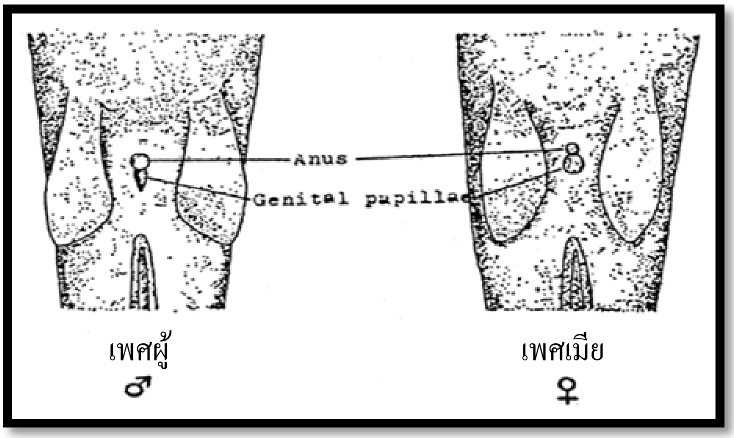
ฤดูกาลผสมพันธุ์วางไข่

ปลาดุกอุยผสมพันธุ์วางไข่ในช่วงฤดูฝน ระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม โดยพ่อแม่พันธุ์ที่ดีควรมีอายุอย่างน้อย 1 ปี หลังจับคู่ผสมพันธุ์ตัวเมียจะทำการขุดโพรงในดินใต้ระดับน้ำประมาณ 20-30 เซนติเมตร กว้างประมาณ 30 เซนติเมตร ลึกประมาณ 5-8 เซนติเมตร เพื่อใช้เป็นที่วางไข่ สำหรับแม่ปลาน้ำหนัก 300-800 กรัม จะวางไข่ครั้งละ 5,000-10,000 ฟอง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.3-1.6 มิลลิเมตร ไข่จะฟักออกเป็นตัวภายใน 20-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิของน้ำ 25-32 องศาเซลเซียส โดยที่พ่อแม่ปลาจะดูแลลูกปลา (Active parental care) ประมาณ 7-10 วันหลังฟัก (Srisuvantach & Thangtrongpiros, 1985)

ความแตกต่างระหว่างเพศ

การแยกเพศของปลาดุกนั้นสังเกตได้ง่ายคือ ตัวผู้จะมีอวัยวะเพศเรียวยาวยื่นออกมาบริเวณใกล้ทวาร ถ้าเป็นตัวเมียอวัยวะเพศจะสั้นกว่าและค่อนข้างกลม และการดูเพศของปลาดุกอุย

ทราบได้ก็ต่อเมื่อปลามีความยาวเกิน 15 เซนติเมตร ขึ้นไป (Srisuvantach & Thangtrongpiros, 1985) (ภาพที่ 1) นอกจากนี้ยังสามารถสังเกตได้ในช่วงฤดูผสมพันธุ์ โดยปลาเพศเมียท้องจะอูมเป่งกว่าปลาเพศผู้ และเมื่อใช้มือกดเบาๆ บริเวณใกล้ช่องเพศ (Urogenital papillae) ก็จะมีไข่ไหลออกมาถ้าแม่พันธุ์มีความสมบูรณ์เพศเต็มที่ (ไชยา อุ้ยสูงเนิน, 2532)



ภาพที่ 1 ลักษณะความแตกต่างระหว่างเพศปลาดุกอุย
ที่มา : Srisuvantach & Thangtrongpiros (1985)

ระบบสืบพันธุ์

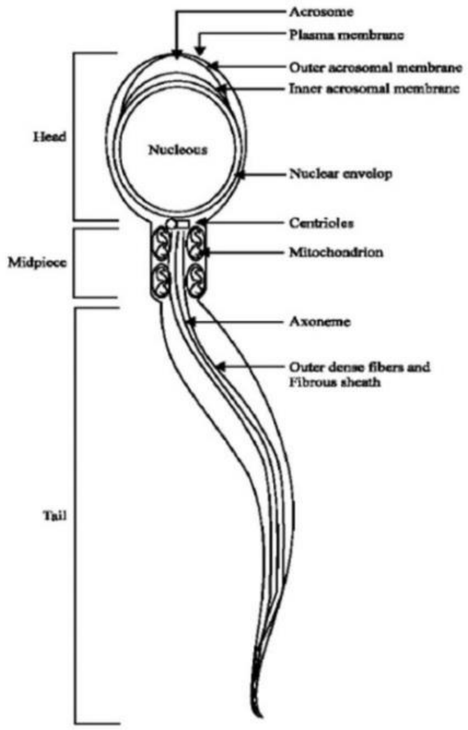
อัณฑะ (Testis) เป็นอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาเพศผู้ มีลักษณะเป็นพูยาว 2 พู เรียงติดอยู่กับผนังช่องท้องด้านบนใกล้ไต และมีเยื่อยึด (Mesorchium) ช่วยยึดอัณฑะให้ติดกับผนังด้านบนบริเวณปลายอัณฑะด้านท้าย (Posterior) เป็นท่อขนาดเล็ก สั้น ไปตามแนวกึ่งกลางตัวไปเปิดออกบริเวณช่องเพศ (Urogenital pore) ทำให้สเปิร์มที่สร้างจากอัณฑะถูกลำเลียงผ่านท่อน้ำเชื้อออกสู่ภายนอกร่างกายร่วมกับปัสสาวะ อัณฑะมีหน้าที่สร้างสเปิร์มและฮอร์โมนเพศในระบบสืบพันธุ์ (Steroid hormone) โครงสร้างของอัณฑะปลากระดูกแข็งเพศผู้ประกอบด้วยเยื่อหุ้มอัณฑะเรียกว่า ทูนิค่า อัลบูจิเนีย (Tunica albuginea) เช่นเดียวกับที่พบในรังไข่ โครงสร้างอัณฑะปลากระดูกแข็งแบ่งออกได้ 2 ชนิด

1. แบบทูบูลา (Tubular type) ลักษณะจะมีช่องว่าง (Lumen) โดยพบในปลาบางชนิด เช่น Cyprinodonts และ guppy เป็นต้น ในระหว่างการพัฒนาการสร้างสเปิร์ม (Spermatogenesis) นั้นสเปิร์มจะค่อย ๆ พัฒนาจากด้านปลาย มายัง วาส เอฟเฟอเร้นซ (Vas efferens) และปล่อยสเปิร์ม (Spermatozoa) ออกจาก วาส เดฟเฟอเร้นซ (Vas deferens)

2. แบบโลบูล (Lobule type) ลักษณะอัณฑะจะมีช่องว่างอยู่ตรงกลาง (Central lumen) ทำหน้าที่ลำเลียงสเปิร์ม (Spermatozoa) ที่ได้พัฒนาการสร้างสเปิร์มวาส เดฟเฟอเร้นซ์ และ ปล่อยออกมานอกตัว (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2535)

ลักษณะรูปร่างสเปิร์ม (The shape of fish sperm)

ปลากระดูกแข็งส่วนมากจะมีสเปิร์มที่มีส่วนหัวเป็นรูปทรงกลม (Spherical) หรือทรงรี (Ovate หรือ Acorn-shaped) ส่วนหัวมีขนาดประมาณ 2-3 ไมโครเมตร และความยาวจากส่วนหัวถึงปลายหางของสเปิร์มประมาณ 40-60 ไมโครเมตร ส่วนกลางมีขนาดเล็กและส่วนใหญ่มี 1 หาง



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะรูปร่างสเปิร์ม (Islam & Akhter, 2011)

ส่วนประกอบของสเปิร์ม

1. ส่วนหัว (Head) ส่วนหัวของสเปิร์มในปลาแต่ละชนิดจะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแตกต่างกัน โดยบรรจุด้วยโครโมโซมขนาดเล็กที่อยู่ในนิวเครียส และในปลาบางสายพันธ์อาจมีส่วนของอะโครโซม (Acrosome) ซึ่งเป็นโครงสร้างของเนื้อเยื่อเล็กๆ ที่อยู่ในด้านหน้าของส่วนหัว

สเปิร์ม ขนาดและรูปร่างของส่วนหัวสเปิร์มจะขึ้นอยู่กับหน้าที่ในการเจาะเข้าไปในช่องไมโครไพน์ (Micropyle) ของไข่ โดยทั่วไปส่วนหัวของสเปิร์มปลาจะมีขนาดเล็ก (2-4 μm) และสัมพันธ์กับขนาดของสเปิร์ม (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2535)

2. ส่วนกลาง (Middle piece) เป็นส่วนที่อยู่ติดกับส่วนหัวโดยจะมีไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) และไมโทคอนเดรียจะมีหางเป็นองค์ประกอบ (Islam & Akhter, 2011) ซึ่งเป็นส่วนที่ให้พลังงานแก่สเปิร์มในการเคลื่อนที่ และมีแอกเซียสฟิลาเมนท์ (Axial filament) เป็นองค์ประกอบ (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2535)

3. ส่วนหาง (Tail) เป็นส่วนที่มีลักษณะยาวโดยพัฒนามาจากแอกเซียสฟิลาเมนท์และในส่วนหางจะมีไฟบริล (Fibril) อยู่ทั้งหมด 11 คู่ อยู่ตรงกลาง 2 คู่ อยู่โดยรอบอีก 9 คู่ ในปลาบางชนิด เช่น ปลาแซลมอน ปลาพิช ปลาเทร้า เป็นต้น พบว่า บริเวณปลายหางสเปิร์มจะเล็กลง เรียกว่า End piece (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2535)

การพัฒนาการสร้างสเปิร์ม (Spermatogenesis)

การสร้างสเปิร์มของปลามีขั้นตอนการพัฒนาประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ

1. สเปอร์มาโทเจเนซิส (Spermatogenesis) จะมีการเพิ่มจำนวนของสเปิร์ม โดยการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (Mitosis) ทำให้มีจำนวนสเปอร์มาโทโกเนีย (Spermatogonia) มากมายและเริ่มพัฒนาไปเป็น ไพมารี สเปอร์มาโทไซต์ (Primary spermatocyte) จากนั้นจะเกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส 2 ครั้ง

1.1 การแบ่งเซลล์ไมโอซิสระยะที่ 1 ทำให้ไพมารีสเปอร์มาโทไซต์กลายเป็นเซ็คคันดารีสเปอร์มาโทไซต์ (Secondary spermatocyte) ที่มีขนาดเล็กลงจำนวน 2 เซลล์

1.2 การแบ่งเซลล์ไมโอซิสระยะที่ 2 ทำให้เซ็คคันดารีสเปอร์มาโทไซต์ (Secondary spermatocyte) กลายเป็นสเปอร์มาทิด (Spermatid)

2. สเปอร์มิเอชัน (Spermiation) หมายถึง การที่สเปอร์มาทิด (Spermatid) แยกตัวหลุดออกมาจากเซอร์โทไลเซลล์ (Sertoli cell)และปล่อยออกไปเป็นสเปอร์มาโทซัว (Spermatozoa) ซึ่งสเปอร์มิเอชันเป็นขั้นตอนที่สเปอร์มาทิดมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นสเปอร์มาโทซัว (Spermatozoa) ซึ่งจะมีหางและพร้อมในการปฏิสนธิกับไข่ (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2535)

จากการทดลองของ Tan-Fermin, Miura, Ueda, Adachi, and Yamauchi (1997) ที่ทำการวัดความแตกต่างของ spermatogenic cell ในปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) ที่เลี้ยงในที่กักขังที่ประเทศฟิลิปปินส์โดยใช้วิธี Cross sections ที่ Testis และ Seminal vesicle พบว่าเปอร์เซ็นต์ Spermatozoa สูงที่สุดในเดือนตุลาคมและลดลงในเดือนธันวาคม-มีนาคม และเพิ่มขึ้นในเดือน

เมษายน-พฤษภาคมหลังจากนั้นจะลดลงอีกในเดือนมิถุนายน-กรกฎาคมและเพิ่มขึ้นอีกครั้งในเดือนสิงหาคม-พฤศจิกายน

สำหรับปลาบางสายพันธุ์เช่นปลา Salmonid (*Oncorhynchus* spp.) สามารถเกิด Spermiation ขึ้นเองของพ่อพันธุ์ที่ถูกเลี้ยงในที่กักขัง ส่วนในปลาอีกหลายสายพันธุ์ไม่สามารถมีการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์เมื่อถูกนำมาเพาะเลี้ยงในที่กักขัง ซึ่งแนวทางในการแก้ไขจำเป็นต้องมีการจัดการสภาพแวดล้อม (เช่น อุณหภูมิ, แสง และ ความเค็ม) หรือการใช้เทคนิคทางฮอร์โมนที่ไปใช้กระตุ้นการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ ในปลา Salmonid มีการประยุกต์ใช้ฮอร์โมนที่นำมาใช้กับพ่อพันธุ์เพื่อให้มี Spermiation เกิดขึ้นก่อนช่วงเวลาปกติ (Donalson, Solor, & Harvey, 2000) รวมทั้งมีการทดลองใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (Gonadotropin) ฉีดให้ปลา Amago salmon ที่ยังไม่มีการผลิตน้ำเชื้อให้สามารถกระตุ้นให้เกิดสเปิร์มมิเอชัน เร็วขึ้นกว่าปกติ 1-2 เดือน (Nagahama, 1994)

ฮอร์โมน Gonadotropin releasing hormones (GnRH) มีผลต่อการกระตุ้นต่อมใต้สมอง (Pituitary gland) ให้มีการสังเคราะห์และการหลั่ง Endogenous gonadotropin(s) และอาจมีบทบาทในการกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนบางชนิดของต่อมใต้สมองหรือหน้าที่อื่นๆ เพราะว่ามีการพบ GnRH ในส่วนอื่นๆ ของร่างกายปลา (Mylonas, Gissis, Magnus, & Zohar, 2010) สำหรับ Gonadotropin releasing hormones analogue (GnRHa) ที่ใช้ในการฉีดให้กับปลาสามารถทำการเปลี่ยนลำดับของกรดอะมิโนบางตัวใน GnRHa ไม่ให้เหมือนกับ GnRH ของธรรมชาติ (Native LHRH) เพื่อให้ GnRHa สามารถทนต่อ Emzymatic degradation ภายในเลือดจะทำให้ฮอร์โมนอยู่ในเลือดนานขึ้นและออกฤทธิ์ได้นานขึ้น (Donalson, Solor, & Harvey, 2000)

คุณสมบัติของสเปิร์มและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำเชื้อปลาดุกอุย

น้ำเชื้อประกอบด้วยตัวสเปิร์มและเซมินอลพลาสม่า (Seminal plasma)ที่เป็นของเหลว องค์ประกอบของเซมินอลพลาสม่าจะประกอบด้วยสิ่งต่างๆที่มีคุณสมบัติในการช่วยให้สเปิร์มสามารถมีชีวิตอยู่ได้และมีหน้าที่ในกระบวนสืบพันธุ์ การศึกษาองค์ประกอบของน้ำเชื้อจะช่วยให้เข้าใจถึงพื้นฐานของกระบวนการทางชีวเคมีที่ทำให้สเปิร์มเกิดการเคลื่อนที่และกระบวนการปฏิสนธิ (Ciereszko, Glogoski, & Dabroski, 2000) ทำให้ทราบปัจจัยต่างๆ ที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา และสามารถปรับใช้ในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นและแช่แข็งน้ำเชื้อปลา โดยทั่วไปความเข้มข้นของสารอินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่วัดได้ในน้ำเชื้อปลามีการแปรปรวนสูงและแตกต่างกันในปลาแต่ละชนิดได้ ซึ่งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเป็นที่ทราบว่าสารอินทรีย์ในน้ำเชื้อเช่น น้ำตาล ตัวอสุจิจะใช้เป็นพลังงาน แต่ในปลาไม่น่าจะมีการใช้พลังงานจากสารอินทรีย์และตัวสเปิร์ม

จะมีอายุอยู่ได้นานไม่เกิน 1 เดือน ตัวสเปิร์มที่เคลื่อนที่คงมีโอกาสใช้พลังงานที่สะสมในเซลล์เท่านั้น (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

คุณสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของน้ำเชื้อปลาดุกอุยเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่ใช้ในการศึกษาในเรื่องของการแช่เย็นและแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย เป็นตัวชี้วัดในการที่จะนำไปสู่การคัดเลือกพ่อพันธุ์ปลาที่ดี รวมทั้งการเลือกสาร Extenders และ Cryoprotectants ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุย การศึกษาในน้ำเชื้อปลาดุกอุยพบว่ามีความหนาแน่นของสเปิร์มเท่ากับ 3.6 ± 0.7 ($\times 10^{10}$/mL) ความหนาแน่นของสเปิร์มบอกถึงคุณภาพของสเปิร์ม โดยเฉพาะถ้าสเปิร์มมีความหนาแน่นสูงโอกาสในการปฏิสนธิกับไข่ก็จะมากตามไปด้วย ค่า pH ในน้ำเชื้อปลาดุกอุยอยู่ที่ 7.6 ± 0.1 และมีค่า Osmolality ประมาณ 297.1 ± 3.7 mOmsm/kg (Vuthiphandchai et. al., 2009) ค่า pH และ Osmolality มีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่และส่งผลต่อการดำรงชีวิตของสเปิร์ม ส่วนองค์ประกอบหลักทางเคมีของน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่มีการศึกษามาพบว่ามีค่า Sodium 164.4 ± 036 mM/L, Potassium 17.8 ± 0.1 mM/L, Calcium 8.4 ± 0.0 mM/L และ Magnesium 1.6 ± 0.0 mM/L (Tan-Fermin, Miura, Adachi, & Yamauchi, 1999)

ปัจจัยที่ทำให้เกิดการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลา

ลักษณะเฉพาะของการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเป็นกระบวนที่เกิดขึ้นในเซลล์สืบพันธุ์ปลาเพศผู้ สเปิร์มเมื่อถูกกระตุ้นจะเคลื่อนที่เข้าไปปฏิสนธิกับเซลล์สืบพันธุ์ของเพศเมียทำให้เกิดการพัฒนาการของตัวอ่อนและฟักออกมาเป็นลูกปลา กระบวนการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะถูกควบคุมโดยปัจจัยภายในและภายนอก อีกทั้งขึ้นอยู่กับโครงสร้างที่พิเศษของหางสเปิร์ม (Sadiqul Islam & Akhter, 2011) โดยทั่วไปสเปิร์มของปลาน้ำกร่อยและน้ำเค็มจะสามารถเคลื่อนที่ในน้ำได้นานกว่าสเปิร์มปลาน้ำจืด อย่างไรก็ตามในปลาน้ำจืดส่วนมากจะสเปิร์มจะเคลื่อนที่ได้เป็นระยะเวลาสั้นๆ และไม่เกิน 30 วินาที (Billard, Cosson, & Crim, 1993)

สเปิร์มของปลาทั้งน้ำจืดและน้ำเค็มจะไม่มีการเคลื่อนที่เมื่ออยู่ในตัวปลาแต่จะเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วเมื่อปล่อยออกนอกตัว สารละลายประเภทที่นำไฟฟ้าและไม่นำไฟฟ้ามีส่วนสำคัญต่อค่า Osmotic pressure ใน Seminal plasma ที่ส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มให้เข้าสู่ท่อนำสเปิร์ม (Billard et al., 1993) การเกิดความเปลี่ยนแปลงทางพิสิกส์จะถูกควบคุมด้วยการทำงานของระบบของฮอร์โมน ที่จะไปควบคุมให้เกิดกระบวนการ Spermatogenesis และ Spermiation (Nagahama, 1994) โดยที่จะมีการสร้าง Seminal plasma ในท่อนำสเปิร์มเพื่อรักษาความมีชีวิตของสเปิร์มและทำให้สเปิร์มไม่เกิดการเคลื่อนที่ ต่อมาเมื่อปลาอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมสเปิร์มจะถูกปล่อยออกจากตัวปลาระหว่างการผสมพันธุ์ จากนั้นไอออนในสิ่งแวดล้อมจะเป็นสาเหตุหลักที่จะส่งผลต่อการ

มีชีวิตและการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเมื่อถูกปล่อยออกจากถุงอัณฑะ จากที่กล่าวมาจะเห็นได้ถึงความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบในเซมินอลพลาสม่า (Seminal plasma) และการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม อย่างไรก็ตามปัจจัยโดยทั่วไปที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ, ค่า pH, อิออน และค่าออสโมลาลิตี้ (Sadiqul Islam & Akhter, 2011)

1. ผลของอุณหภูมิ

ระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ความสามารถในการปฏิสนธิ และความเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของน้ำเชื้อ และอุณหภูมิในบ่อเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ เพราะว่าพลังงานที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีขีดจำกัด เมื่ออุณหภูมิในน้ำที่เพิ่มมากขึ้นสเปิร์มก็มีการจะเคลื่อนที่รวดเร็วขึ้นแต่ระยะเวลาในการเคลื่อนที่จะน้อยลง แต่ในทางตรงกันข้ามหากอุณหภูมิในสารละลายลดลงสเปิร์มจะมีการเคลื่อนที่ยาวนานขึ้นแต่ความเร็วในการเคลื่อนที่จะลดลง (Sadiqul Islam & Akhter, 2011) ยกตัวอย่างเช่น สเปิร์มของปลาไน (Common carp) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จะมีระยะเวลาในการเคลื่อนที่ได้นานกว่าอุณหภูมิที่ 26 และ 30 องศาเซลเซียส (Jezierska & Witeska, 1999) อย่างไรก็ตามในปลา Siberian sturgeon สเปิร์มจะมีระยะเวลาในการเคลื่อนที่สั้นลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 10 เป็น 17.5 องศาเซลเซียส (Williot, Kopeika, & Goncharov, 2000)

2. ผลจากค่า pH

ค่า pH จากทั้งภายในและภายนอกเซลล์ รวมถึงองค์ประกอบอิออนในสารละลายทำหน้าที่ในการกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่และช่วงเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (Billard, Cosson, Perchec, & Linhart, 1995) เป็นไปได้ที่ค่า pH จากภายนอกจะกระตุ้นความเข้มข้นของโปรตอนที่อยู่ภายใน ซึ่งปฏิกิริยาต่อมาตามลำดับจะมีผลต่อเซลล์เมมเบรน และพฤติกรรมในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ในปลาเรนโบว์เทร้าค่า pH ใน Seminal plasma โดยทั่วไปมีค่าอยู่ที่ 7.5 ถึง 8.5 (Boitano & Omoto, 1992) ในปลาคาร์ฟสเปิร์มจะเริ่มมีการเคลื่อนที่เมื่อค่า pH ภายนอกอยู่ที่ 6.0-9.0 และในทางตรงกันข้ามเมื่อค่า pH ของสเปิร์มต่ำกว่าค่า pH ของสภาพแวดล้อมภายนอก 1 หน่วย สเปิร์มจะไม่เกิดการเคลื่อนที่ (Redondo-muller, Cosson, & Cosson, 1991)

3. ผลจากแรงดัน Osmotic ที่ทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่

ค่าแรงดันออสโมติกแบบ Hypo-osmotic และ Hyperosmotic จากสิ่งแวดล้อมเป็นตัวกระตุ้นให้สเปิร์มเกิดการเคลื่อนที่ โดยเฉพาะปลาน้ำจืดสเปิร์มจะเริ่มมีการเคลื่อนที่เมื่อทำการเจือจางด้วยสาร Hypotonic solution และ หยุดการเคลื่อนที่เมื่อถูกเจือจางด้วยสาร Isotonic solution ทั้งกลุ่มที่มีประจุ (Electrolytes) และกลุ่มที่ไม่มีประจุ (Nonelectrolytes) (Morizawa & Suzuki, 1980; Morizawa, Suzuki & Shimizu, 1983; Billard et al., 1995; Sadiqul Islam & Akhter, 2011) สเปิร์มในปลาน้ำจืดจะถูกกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่เมื่อถูกเจือจางด้วยสารละลายที่มีความเข้มข้น

ต่ำกว่าภายในตัวปลา เช่นในปลาน้ำจืดกลุ่ม Cyprinidae (ปลาทอง ปลาคาร์ฟ และปลาไน เป็นต้น) สเปิร์มจะไม่เกิดการเคลื่อนที่เมื่อถูกเจือจางด้วย NaCl, KCL, Manitol หรือ Glucose ที่มีค่าออสโมติกที่เท่ากับใน Seminal plasma (Morisawa, Suzuki, & Shimizu, 1983) ส่วนในปลาทะเลสเปิร์มจะถูกกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงกว่าภายในตัวปลา เช่นในปลา Puffer fish สเปิร์มจะไม่มีการเคลื่อนที่ใน Seminal plasma โดยมีค่า Osmolality อยู่ที่ 300 mOsm kg^{-1} แต่จะมีการเคลื่อนที่เมื่อค่า Osmolality ของสภาพแวดล้อมภายนอกน้ำเชื้อมีค่าเพิ่มสูงขึ้น (1200 mOsm kg^{-1}) (Oda & Morisawa, 1993)

4. ผลจาก Ions

ความเข้มข้นของ K^+ เป็นปัจจัยหลักในการทำให้เกิดแรงดันออสโมติกที่จะทำหน้าที่ในการควบคุมให้เกิดการเคลื่อนที่หรือยับยั้งการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาแซลมอน (Alavi & Cosson., 2006) ซึ่งความเข้มข้นที่สูงของ K^+ ใน Seminal plasma ที่เป็นปัจจัยหลักที่หยุดยั้งการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในท่อนำน้ำเชื้อ (Vas deferens) แต่เมื่อความเข้มข้นของ K^+ ในสิ่งแวดล้อมลดลงจะทำให้ K^+ ซึมออกจากเซลล์ทาง Specific membrane channels จนเกิดกระบวนการ Membrane hyperpolarization ที่จะไปกระตุ้นสเปิร์มให้เกิดการเคลื่อนที่ในปลาแซลมอน (Billard, Cosson, & Christen, 1987; Kho, Tanimoto, Inaba, Oka, & Morisawa, 2001) จากการทดลองของ Krasznai et al. (2000, 2003) พบว่า Potassium channels จะมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และทำให้เกิด Osmotic shock อีกทั้งยังทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลง หรือหยุดการเคลื่อนที่อย่างสมบูรณ์ในปลาไน ส่วนในปลาดุกอุยนั้น K^+ เป็นสารชนิดเดียวที่มีความเข้มข้นใน Seminal plasma สูงกว่า Blood plasma (Tan-Fermin et. al., 1998) ซึ่งปริมาณความเข้มข้นของ K^+ จะมีผลในการยับยั้งหรือกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่ ส่วน Na^+ มีผลต่อค่า Intracellular alkalization ที่สามารถเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วโดย Na^+ ซึ่งการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะถูกกระตุ้นด้วย Alkalization ของ Intracellular medium ในปลา Carp (Tron, Christ, McCarthy, Torsella, & Smith,1995) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Krasznai et al. (1995) พบว่า Sodium channel inhibitors ไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไน แต่ในปลาสเตอร์เจียนนั้นมีการใช้ Na^+ ที่ 10 mM เพื่อกระตุ้นการเคลื่อนที่ของสเปิร์มผลปรากฏว่าสามารถทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่ได้นานถึง 5 นาที และจะไม่มีการเคลื่อนที่เมื่อสาร Na^+ มีความเข้มข้นที่มากกว่า 25 mM ส่วนผลจากสาร Ca^{2+} นั้นสามารถกระตุ้นให้สเปิร์มเกิดการเคลื่อนที่ได้ในปลาหลายชนิดเช่นในปลากลุ่ม Cyprinids (Sadiqul Islam & Akhter, 2011) โดยเฉพาะมีการทดลองใช้สาร Verapamin ซึ่งทำหน้าที่ในการยับยั้ง Ca^{2+} channel ก็สามารถหยุดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไนเมื่อถูกกระตุ้นได้เช่นกันถึงแม้ว่าสเปิร์มจะถูกเก็บในสารละลายที่มีการเติม $CaCl_2$ เข้าไปเล็กน้อย (Krasznai et al., 2000) อีกทั้งมีการศึกษาในเรื่องของ Ion channel

และ Membrane potential ที่ทำให้สเปิร์มปลาไน เกิดการเคลื่อนที่ พบว่าเมื่อเซลล์สเปิร์มหยุดนิ่งใน Seminal plasma ตัว Spermatozoa จะเกิด Depolarization state เมื่อสเปิร์มเกิดการเคลื่อนที่จาก Hypotonic shock สาร K^+ และ Na^+ ภายในตัวสเปิร์มจะมีค่าลดลงและเมื่อวัดค่า Membrane potential พบว่าเกิด Hyperpolarizes อย่างรวดเร็ว แต่ค่า Ca^{2+} กลับมีการเพิ่มมากขึ้น (Krasznai et al., 2003) ดังนั้นจึงเห็นได้ว่า Membrane hyperpolarization เป็นสิ่งแรกที่เกิดขึ้นโดยจะทำให้ Ca^{2+} ไหลเข้าสู่เซลล์และทำให้สเปิร์มเริ่มเกิดการเคลื่อนที่ (Krasznai et al., 2000)

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

การมีชีวิตของสเปิร์มเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในเรื่องของความสำเร็จในการผลิตสัตว์น้ำ การวัดคุณภาพของสเปิร์มโดยทั่วไปจะดูอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และอัตราการปฏิสนธิกับไข่ น้ำเชื้อที่มีคุณภาพต่ำอาจเกิดจากผลของพันธุกรรม อาหารที่กิน และความเครียดจากสิ่งแวดลอม (ความเป็นพิษ, คุณภาพน้ำ และความหนาแน่น) หรือโรค การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเป็นกระบวนการเริ่มต้นที่ขาดไม่ได้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อเพื่อผลิตลูกพันธุ์จำนวนมาก (Honeyfield & Krise, 2000) การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลาเบื้องต้นสามารถบอกความสมบูรณ์เพศของพ่อพันธุ์ที่จะนำมาเพาะพันธุ์ได้ดี โดยวิธีประเมินมี 3 วิธีดังนี้

1. ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ ควรสังเกตทันทีหลังจากทำการรีดน้ำเชื้อออกมาโดยสังเกต สี ความเข้มข้น ปริมาตร และสิ่งเจือปนอื่น ๆ น้ำเชื้อที่ดีควรมีสีขาวขุ่น และไม่ควรมีสิ่งเจือปนวิธีนี้เป็นการประเมินเบื้องต้น ควรทำการประเมินควบคู่กับวิธีที่ 2 หรือ 3 บางครั้งน้ำเชื้อที่ขาวขุ่นอาจมีคุณภาพไม่ดี (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

2. การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เป็นการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสามารถพิจารณาได้ทั้งในแง่เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มทำโดยสุ่มนับสเปิร์มในกล้องจุลทรรศน์ เช่น สุ่มนับ 10 ตัว นับดูตัวที่เคลื่อนที่มีอย่างละเท่าไหร่แล้วทำจนครบ 100 ตัว ก็จะได้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่หรือประเมินการเคลื่อนที่เป็น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ (Vuthiphanchai, Thadsri & Nimrat, 2009)

3. การย้อมดูตัวเป็นตัวตาย วิธีนี้ต้องอาศัยกล้องจุลทรรศน์ โดยมีหลักว่า สเปิร์มที่ตายจะติดสีย้อม มีข้อดีที่สามารถรู้ความสมบูรณ์ของสเปิร์มที่มีชีวิตได้แน่นอนและสามารถทำควบคู่กับวิธีที่ 2 ก็จะเสริมผลในการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อดีขึ้น เนื่องจากการประเมิณการเคลื่อนที่อย่างเดียวอาจผิดพลาดได้ เช่น สเปิร์มที่เคลื่อนที่อย่างปราดเปรียว อาจทำให้ตัวตายที่อยู่ใกล้เคลื่อนที่ตามไปด้วย (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2535) ขั้นตอนการย้อมสีมีดังนี้

3.1 หยดสีย้อม 1 หยดบนสไลด์

3.2 หยดน้ำเชื้อ 1 หยดผสมสีย้อมแล้วคนเข้ากันอย่างราดเร็วแล้วใช้ Cover glass ปิด (Vuthiphanchai, Thadsri, & Nimrat, 2009)

3.3 นับสเปิร์มที่ติดสี และไม่ติดสีเพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ตัวเป็นและตัวตาย

4. การประเมินความสามารถของน้ำเชื้อในการผสมกับไข่ การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อเป็นเพียงการประมาณการอย่างคร่าวๆ ซึ่งอาจไม่สัมพันธ์กับความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่ ดังนั้นในปลาที่มีการผสมภายนอกร่างกาย การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อที่เชื่อถือได้ก็ต้องนำน้ำเชื้อปลาไปผสมเทียมกับไข่ที่รีดออกมา (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อปลา

การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อปลามี 3 วิธี

1. รีดออกจากตัวปลาโดยตรง โดยกดเบา ๆ ตรงส่วนท้อง น้ำเชื้อปลาจะไหลออกมา เช่น ปลาตะเพียนขาว ปลาสวาย เป็นต้น

2. ใช้กระบอกฉีดยาดูด โดยดูดออกจากช่องเปิดของน้ำเชื้อ (Urogenital pore) เช่น ปลาบึก

3. โดยการผ่าท้อง เพื่อนำอัณฑะ (Testis) ไปบดแยกเอาน้ำเชื้อออกไปผสมเทียม ซึ่งมักปฏิบัติกับปลาที่มีน้ำเชื้อน้อยหรือไม่สามารถรีดน้ำเชื้อได้ เช่น ปลาดุก (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538)

การแช่แข็ง (Cryopreservation)

การแช่แข็งคือ กระบวนการทางชีววิทยาโดยวิธีการลดอุณหภูมิให้ต่ำลงกว่าจุดเยือกแข็งของ เมล็ดพันธุ์, สายพันธุ์ และอาหารที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส ซึ่งผลิตผลทางชีววิทยาที่สามารถเก็บรักษาไว้ได้โดยวิธีการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสเช่น ตัวอ่อนของมนุษย์ เซลล์สืบพันธุ์ รังไข่ เนื้อเยื่อของมนุษย์ และอวัยวะต่างๆ (Mandumpal, 2011) กระบวนการแช่แข็งเป็นสิ่งสำคัญโดยเฉพาะการฟื้นฟูสายพันธุ์สิ่งมีชีวิตที่มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ให้กลับมาสมบูรณ์ดังเดิม (Singhal & Shrivastava, 2004) ในกระบวนการแช่แข็งที่ใช้นั้นจะต้องป้องกันสิ่งที่นำมาแช่แข็งจากปัญหาการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง และการสูญเสียน้ำที่เป็นผลจากกระบวนการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถทำอันตรายกับเซลล์ให้เกิดการสูญเสียได้ (Wolfe & Bryant, 1999) โดยทั่วไปเซลล์ประกอบด้วย น้ำ ออร์แกเนลล์ สารละลายเกลือ น้ำตาล โปรตีนและลิปิด โดยเซลล์จะมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่าน ยอมให้โมเลกุลเล็กๆ ผ่านรวมทั้งน้ำเข้าออกได้ แต่โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่จะไม่สามารถที่จะแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์

ไปได้ โดยธรรมชาติแล้วน้ำมีแนวโน้มจะเคลื่อนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อคงความเข้มข้นภายในและภายนอกเซลล์ให้มีความเข้มข้นเท่ากัน ความเข้มข้นของตัวถูกละลายนี้สามารถวัดออกมาในลักษณะของ Osmolality ในเซลล์ทั่วๆ ไปมีค่า Osmolality อยู่ที่ 280-300 mOsm Kg_{-1} สำหรับปลาน้ำจืด และ 200-300 mOsm Kg_{-1} สำหรับปลาทะเล (Wayman & Tiersch, 2000) จากองค์ประกอบของเซลล์นี้เมื่อทำการแช่แข็งลดอุณหภูมิลงต่ำจนถึง 0 องศาเซลเซียส ของเหลวที่อยู่รอบเซลล์และภายในเซลล์จะยังไม่แข็งตัว เนื่องจากภายในเซลล์และภายนอกเซลล์มีลักษณะเป็นสารละลาย จึงทำให้มีจุดเยือกแข็งต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิลดลงไปเรื่อยๆ ของเหลวรอบๆ เซลล์มีความเข้มข้นสูงขึ้นเนื่องจากการมีจับตัวเป็นน้ำแข็งของโมเลกุลน้ำก่อนของเหลวภายในเซลล์ทำให้เกิดแรงดัน Osmotic ที่จะส่งผลให้น้ำภายในเซลล์ไหลออกนอกเซลล์เพื่อปรับสมดุลให้สารละลายทั้งสองด้านมีความเข้มข้นเท่ากัน ทำให้เกิดการหดตัวของเซลล์ และของเหลวภายในเซลล์จะมีความเข้มข้นสูงจนเป็นอันตรายต่อเซลล์ได้ ผลเสียที่เกิดขึ้นดังกล่าวมีมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับขนาดของพื้นที่ผิวและสภาพการยอมให้น้ำผ่านเข้าออกได้ของผนังเซลล์ ตามหลักการแช่แข็งนั้น นอกจากนี้การเหนี่ยวนำให้เกิดการแข็งตัว (Seeding) และการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมจะสามารถลดผลเสียดังกล่าวได้ เนื่องจากการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วทำให้น้ำภายในเซลล์ไหลออกจากเซลล์ไม่ทัน อย่างไรก็ตามการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเกินไปจะทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็ง (Ice crystallization) ขึ้นภายในเซลล์ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์เช่นกัน (Denniston, Michelet, & Godke, 2000) แต่ถ้าลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ ในระหว่างขบวนการแช่แข็งจะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็ง ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เซลล์ถูกทำลาย (Mazur, Seki, Pinn, Keinhans, & Edashing, 2005) โดยการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เมื่ออยู่ ณ อุณหภูมิต่างๆ มีดังนี้ ช่วงอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ถึง -40 องศาเซลเซียส จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ความเข้มข้นของสารละลาย และปริมาตรของเซลล์ ส่วนช่วงอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ถึง -130 องศาเซลเซียส จะทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในและภายนอกเซลล์ (Denniston, Michelet, & Godke, 2000) จึงเห็นได้ว่าเซลล์ที่ทำการแช่แข็งได้รับผลกระทบที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมากมาย ดังนั้นวิธีการแช่แข็งที่เหมาะสมจึงเป็นสิ่งจำเป็นต่อการมีชีวิตของเซลล์

สารละลายบัฟเฟอร์ (Extenders)

สาร Extenders เป็นสารละลายที่ช่วยคงสภาพความมีชีวิตของเซลล์ระหว่างการแช่แข็ง ทำให้เก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานกว่าปกติ และช่วยในการเจือจางน้ำเชื้อให้ได้ปริมาณมากขึ้นเพื่อสะดวกในการใช้งาน (Wayman & Tiersch, 2000) ซึ่งสาร Extenders นี้เป็นสารละลายที่มีคุณสมบัติ และองค์ประกอบคล้ายคลึงกับน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์มเป็นสารที่เกิดจากการนำสารต่าง ๆ ที่มีคุณสมบัติช่วย

ในการมีชีวิตรอดของสเปิร์ม (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 1993) สาร Extenders ที่ใช้จะต้องประกอบด้วยอิออนต่างๆ เช่นเดียวกับที่ปรากฏในน้ำเลือด และควรมีค่า Osmotic pressure และ Osmolality เท่ากับ Seminal plasma ของสิ่งมีชีวิตนั้นเพื่อไม่ให้สเปิร์มเคลื่อนที่ เช่น ปลาน้ำจืดสาร Extenders ที่ใช้ควรมีค่าออสโมลาริตี้เท่ากับ 280-300 mOsmo/kg ส่วนปลาทะเลควรใช้สาร Extendersที่มีค่าออสโมลาริตี้เท่ากับ 200-300 mOsmo/kg (Wayman & Tiersch, 2000)

สารไครโอโพรเทคแทนท์ (Cryoprotectants)

สารไครโอโพรเทคแทนท์ (Cryoprotectant) เป็นสารป้องกันเซลล์ถูกทำลายในระหว่างกระบวนการแช่แข็งและกระบวนการละลาย (Akcay, Bozkurt, Secer, & Teki, 2004) ซึ่งสารไครโอโพรเทคแทนท์ แต่ละชนิดจะต้องมีความเข้มข้นและระย ะเวลา (Equilibration time) ที่เหมาะสมสำหรับการแช่แข็ง สารไครโอโพรเทคแทนท์จะช่วยรักษาความมีชีวิตของเซลล์เมื่ออุณหภูมิลดต่ำลงโดยป้องกันความเสียหายจากการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง (Ice crystal) สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ดีจะมีคุณสมบัติในการละลายน้ำและมีความเป็นพิษกับเซลล์ต่ำ ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทตามความสามารถในการซึมผ่านเข้าสู่เซลล์คือ ชนิดที่สามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ (Intracellular cryoprotectant) และชนิดที่ไม่สามาถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ (Extracellular cryoprotectant) โดยสารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก เช่น Glycerol, DMSO, Propylene glycol และ Ethylene glycol สามารถจัดเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ประเภทที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์เนื่องจากสามารถซึมผ่านเข้าสู่เนื้อเยื่อของเซลล์และผ่านออกจากเซลล์ได้ ส่วนสารที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่เช่น Sucrose (และ Carbohydrates ชนิดอื่นๆ) และโปรตีน จัดเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ประเภทที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ เนื่องจากไม่สามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ (Denniston, Michelet, & Godke, 2000)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาโดยทั่วไปนิยมใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ กลุ่มออกฤทธิ์ภายในเซลล์ เช่น DMSO, Glycerol และ Ethylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ คิดเป็น 98, 50 และ 29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Tiersch, 2000) อย่างไรก็ตามในการแช่แข็งเซลล์ และเนื้อเยื่อ, เซลล์สืบพันธุ์และตัวอ่อน สามารถใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ มากกว่าหนึ่งชนิดที่ประสบความสำเร็จ (Merino et al. 2011) ในการทดลองของ Andreev, Sadikova, Gakhova, Pashovkin, and Tikhomirov (2009) ที่ทำการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Rainbow trout และ Russian sturgeon โดยใช้สาร Sucrose 10% และ Sucrose 5% + Mannitol 5% ได้อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด และมีอัตราการ Fertilization สูงอีกทั้งยังมีขนาดของเกล็ดน้ำแข็งขนาดเล็กมาก อย่างไรก็ตามเมื่อไม่นานมานี้มีรายงานเกี่ยวกับความประสบความสำเร็จโดยการไม่ใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ ในการแช่แข็งสเปิร์มปลา Rainbow trout โดยใช้สาร Cortland® medium + 1% ของ Bovine serum albumin + 40% ของ Seminal plasma + 0.125M Sucrose นำมาแช่แข็งโดยการใช้เทคนิค Vtrification ให้ผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มมากกว่า 80% (Merino et al. 2011) เนื่องจากสารไครโพรเทคแทนต์เป็นสารที่มีความเป็นพิษสูงเมื่อนำไปใช้ในกระบวนการแช่แข็งจึงต้องมีความสัมพันธ์กันอย่างเหมาะสมของระยะเวลาสมดุล และความเข้มข้นของสารละลาย (Denniston, Michelet, & Godke, 2000)

อัตราการลดอุณหภูมิ (Cooling Rate)

ความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไม่เพียงแต่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสมของสาร Cryoprotectant และสาร Extender เท่านั้นแต่ยังขึ้นอยู่กับอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในระหว่างขบวนการแช่แข็งด้วย (Mazur, 1977) อัตราการลดอุณหภูมิคือการเปลี่ยนแปลงอัตราความเย็นต่อนาทีที่ทำให้ของเหลวที่อยู่รอบๆ เซลล์ และภายในเซลล์ค่อยๆ แข็งตัวในขณะที่ทำการแช่แข็ง ของเหลวภายนอกเซลล์จะเป็นน้ำแข็งก่อนของเหลวภายในเซลล์ ทำให้ความเข้มข้นของตัวถูกละลายภายนอกสูงกว่าภายในเซลล์ จึงทำให้น้ำแพร่ออกจากเซลล์เพื่อปรับสมดุล ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิเร็วเกินไปจะทำให้น้ำไหลออกจากเซลล์เร็วเกินไปอาจทำให้เซลล์เหี่ยวและเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ จะทำให้เซลล์เกิดอันตรายได้ หากอัตราการลดอุณหภูมิช้าเกินไปจะทำให้เซลล์ต้องปรับตัวนานเกินไป ซึ่งจะเป็นอันตรายต่อเซลล์ เพราะเซลล์จะเกิดการสูญเสียน้ำจาก Osmotic pressure ความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์ที่สูงมากเกินไป และอาจเกิดการเหนี่ยวนำให้เกิดผลึกน้ำแข็งที่จะส่งผลต่อสภาพความสมบูรณ์ของเนื้อเยื่อเซลล์ สิ่งนี้แสดงให้เห็นว่าการซึมผ่านของน้ำที่เซลล์เมมเบรน เกี่ยวกับความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและระยะเวลาการลดอุณหภูมิ (Denniston, Michelet, & Godke, 2000) รวมถึงความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant และ Equilibration time (Leibo, 1989) โดยอัตราการลดอุณหภูมิแบบช้าทั่วไปจะอยู่ในช่วง -0.1 ถึง -0.5 องศาเซลเซียส/นาที (Rall & Polge, 1984) ส่วนการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วจะอยู่ในช่วง -10 ถึง -20 องศาเซลเซียส/นาที ดังนั้นจะเห็นว่าอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้นมีความสำคัญต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ และสามารถป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์หรือเกิดขึ้นได้น้อย ทำให้เซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งมีสภาพที่สมบูรณ์ และสามารถคงสภาพความมีชีวิตของเซลล์ (Denniston, Michelet, & Godke, 2000)

อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ (Thawing Rate)

การเพิ่มอุณหภูมิเป็นการละลายเซลล์ที่แข็งตัวไปให้กลับไปสู่สภาพเดิมก่อนการแช่แข็งและสามารถใช้ประโยชน์ได้อีกครั้งโดยทั่วไปขณะทำการละลายเกล็ดน้ำแข็งที่อยู่นอกเซลล์จะ

ละลายก่อนทำให้น้ำจากภายนอกเซลล์ย่อมแพร่เข้าสู่ภายในเซลล์ และขนาดของเซลล์จะเพิ่มขึ้นหลังการละลายอาจทำให้เซลล์ปรับสภาพไม่ทันหรือ อาจทำให้เซลล์แตกได้และประสบความล้มเหลวจากการแช่แข็ง (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) เมื่อนำตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งออกมาจากถังไนโตรเจนเหลวและอุณหภูมิมีการเพิ่มสูงขึ้น เกล็ดน้ำแข็งที่อยู่ภายนอกเซลล์จะเริ่มละลาย น้ำจากภายนอกเซลล์ย่อมจะแพร่เข้าสู่ภายในเซลล์อย่างรวดเร็วเพื่อทำการลดความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์ การไหลกลับของน้ำเข้าสู่เซลล์จะเกิดขึ้นจากอัตราการละลาย และเสร็จสิ้นในช่วงระยะเวลาสั้นๆ หลังจากตัวอย่างละลายทั้งหมด เมื่อเซลล์ถูกแช่แข็งโดยมีการลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ (-0.1 ถึง -0.5 องศาเซลเซียส/นาที) และนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (Rall & Polge, 1984) หรือการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (-30 ถึง -40 องศาเซลเซียส) โดยทั่วไปจะมีน้ำเพียงปริมาณที่น้อยคงเหลืออยู่ภายในเซลล์ เมื่อทำการแช่แข็งและแช่ลงในไนโตรเจนเหลวน้ำจะกลายเป็นเกล็ดน้ำแข็งขนาดเล็ก เกล็ดน้ำแข็งขนาดเล็กจะช่วยลดความเสียหายของ Cell membrane และ Organelle เมื่อทำการเพิ่มอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (>1000 องศาเซลเซียส/นาที) กระบวนการที่น้ำซึมกลับเข้าสู่เซลล์จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและเป็นเวลาสั้นๆจะทำให้เซลล์มีอัตราการรอดสูงอย่างไรก็ตาม ถ้าตัวอย่างถูกเพิ่มอุณหภูมิอย่างช้าๆ เกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์อาจเกิดมีขนาดใหญ่ขึ้น และกลับไปเป็นผลึกแก้วระหว่างกระบวนการเพิ่มอุณหภูมิที่จะเพิ่มความเสียหายของ Cell membrane และ Organelles ต่างๆ (Denniston, Michelet, & Godke, 2000) ตัวอย่างเช่นการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง Christensen and Tiersch (2005) ละลายน้ำเชื้อปลา Channel catfish ใน Water bath ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 วินาที

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาแช่เย็นและการแช่แข็งน้ำเชื้อในปลาตระกูล Catfish มีการศึกษากันอย่างแพร่หลายเช่นปลา Channel catfish *Ictalurus punctatus* (Christensen & Tiersch, 2005) ; African catfish *Clarias gariepinus* (Viveiros, So, & Koman, 2000) ; Mekong giant catfish *Pangasius gigas* (Mongkonpunya et al., 1995) ฯลฯ ส่วนปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) มีการศึกษาในเรื่องของ Seminal plasma, Sperm motility และ Milt dilution (Tan-Fermin, Miura, Ueda, Adachi, & Yamauchi, 1997) การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น ส่วนเรื่องการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งมีการศึกษาโดย วันชัย แสนคำลือ (2546) และธรรมศักดิ์ ถาพรพันธ์ (2548) ที่ประสบความสำเร็จในการศึกษาเรื่องของสารเคมี วิธีการแช่แข็ง และการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งกับไข่ ซึ่งเป็นการแช่แข็งน้ำเชื้อในหลอด 0.25 ml โดนใช้ 10% DMSO ร่วมกับสารละลาย Extender คือ Ca-F HBSS ผลที่ได้คือสเปิร์มมีอัตราการเคลื่อนที่ประมาณ 60% ไม่ต่างกัน

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตระกูล Catfish ในปริมาณมาก จะศึกษาในเรื่องของขนาดและจำนวนของหลอดที่ใช้ในการบรรจุน้ำเชื้อปลา โดยมีวิธีการลดอุณหภูมิแบบใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ Control rate programmable freezer เช่นในปลา European catfish (*Silurus glanis*) (Linhart, Rodina, Flajshans, Gela & Kocour, 2005) และ Blue catfish (*Ictalurus furcatus*) (Hu, Yang, & Tiersch, 2011) และการแช่แข็งแบบเหนือไอไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapour) ในปลา Yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) (Pan et al., 2008) โดยมีตัวอย่างสารละลาย Extenders และสาร Cryoprotectnats รวมถึงขนาดของหลอดที่ใช้ในการทดลองแช่แข็ง (ตารางที่ 1)

การแช่แข็งน้ำเชื้อในปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) มีรายงานที่ประสบความสำเร็จคือการทดลองในหลอด Straws ขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยใช้สาร 10% DMSO ร่วมกับสารละลาย Extender ที่ใช้คือ Ca-F HBSS โดยทำการลดอุณหภูมิโดยใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติที่มีอัตราลดอุณหภูมิอยู่ที่ -3 และ -5 องศาเซลเซียส/นาที (วันชัย แสนคำลือ, 2546 และธรรมศักดิ์ ถาพรพันธ์, 2548) แต่จากตารางที่ 1 จะเห็นว่ามีการใช้สารละลาย Extenders ที่หลากหลายดังนั้นสามารถเลือกสารที่สนใจนำมาใช้ในการทดลองได้หลายชนิดขึ้นอยู่กับความเหมาะสมในแต่ละสายพันธุ์ของปลา ส่วนสาร Cryoprotectants ที่ประสบความสำเร็จในการแช่แข็งจะมีเพียงสองสารที่ใช้คือสาร Methanol และ DMSO โดยมีความเข้มข้นของสารที่ 10% ทั้งคู่ ไม่ว่าจะมีการใช้กับน้ำเชื้อในปริมาณน้อยขนาด 0.25 มล. ไปจนถึงแช่แข็งน้ำเชื้อในปริมาณมากถึง 4 มิลลิลิตร ส่วนอัตราการลดอุณหภูมิจะทำการลดอุณหภูมิโดยใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ และมีการใช้วิธีลดอุณหภูมิแบบวางเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวเช่นในปลา Yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) (Pan et al. 2008) และปลาดุกด้าน Walking catfish (*Clarias batrachus*) (Lal et. al., 2009) ที่ใช้วิธีลดอุณหภูมิแบบเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวที่ 6 เซนติเมตร นาน 10 นาที ทั้งสองการทดลอง

ส่วนการลดอุณหภูมิโดยใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติทำการลดอุณหภูมิจะมีการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ -5 องศาเซลเซียส/นาที จากอุณหภูมิตั้งต้นไปจนสิ้นสุดอุณหภูมิที่ -40 องศาเซลเซียสจากนั้นจะนำไปเก็บไว้ในสารไนโตรเจนเหลวต่อไป ยกเว้นการทดลองของ Linhart, Rodina, Flajshans, Gela, and Kocour, (2005) ในปลา European catfish (*Silurus glanis*) ที่ทำการเก็บน้ำเชื้อโดยใช้หลอด Cryotubes ขนาดใหญ่โดยมีขนาดหลอดที่ 1, 2 และ 4 มิลลิลิตร โดยจะใช้อัตราการลดอุณหภูมิโดยมีอุณหภูมิเริ่มต้นที่ +4 องศาเซลเซียส และการลดอุณหภูมิจาก +4 ถึง -9 องศาเซลเซียส จะใช้อัตราลดอุณหภูมิอยู่ที่ -4 องศาเซลเซียส/นาที จากนั้นจะทำการลดอุณหภูมิจาก -9 ถึง -80 องศาเซลเซียส โดยจะมีอัตราการลดอุณหภูมิที่ใช้คือ -11 องศาเซลเซียส/นาที และพักไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส นาน 6 นาที จากนั้นนำลงสู่ถังไนโตรเจนเหลว ดังนั้นจะเห็นได้ว่ามีการเลือกใช้วิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อที่หลากหลายซึ่งจะต้องทำการทดลองให้เหมาะสมต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุก

อุย (*C. macrocephalus*) ที่จะสามารถทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อในปริมาณมากและต้นทุนต่ำที่สุด เพื่อจะช่วยเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้ออีกทั้งยังช่วยลดความเสี่ยงในการสูญเสียพ่อแม่พันธุ์ปลาดุกอุยเพื่อใช้ประโยชน์จากพ่อแม่พันธุ์ให้คุ้มค่ามากที่สุด

ตารางที่ 1 ตัวอย่างสาร Extenders และสาร Cryoprotectants รวมทั้งขนาดหลอดที่ใช้ในการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อของปลาตระกูล Catfish

ชนิดปลา	**สาร Extenders**	**สาร Cryoprotectants**	**ขนาดหลอด**	**งานวิจัย**
Clarias macrocephlus	Ca-F HBSS	DMSO 10%	0.25 ml. Straws	Sankomlue, (2003)
Clarias gariepinus	Ringer	Methanol 10%	1 ml. Vials	Viveiros, So, & Koman, (2000)
Clarias batrachus	HBSS	DMSO 10%	0.25 ml. Straws	Lal et. al., (2009)
Silurus glanis	Immobilization solution	DMSO 10%	1, 2 and 4 ml. Cryotubes	Linhart et. al., (2005)
Pelteobagrus fulvidraco	Ringer	Methanol 10%	2 ml. Cryotubes	Pan et. al., (2008)
Ictalurus furcatus	HBSS300	Methanol 10%	0.5 ml. Straws	Hu, Yang, & Tiersch , (2011)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

สถานที่ทำการทดลอง โรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

สัตว์ทดลอง

พ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ปลาดุกอุยจากฟาร์มคุณวีระ ตันเจริญ 84/3 ม.4 ต.บางเกลือ อ.บางประกง จ.ฉะเชิงเทรา 24130

อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

1. จานแก้ว (Petri dish)
2. ถังน้ำแข็ง
3. ขวดแก้วฝาสีฟ้า ขนาด 250 มิลลิลิตร
4. หลอดฟาง (Fernch straw) ขนาด 0.25 และ 0.5 มิลลิลิตร (Imv Technologies Paillette)
5. หลอด Cryotube ขนาด 1.25 มิลลิลิตร (Thermo scientific nunc cryotube vials)
6. ปากคีบ
7. บีกเกอร์
8. Tissue culture flask
9. ตะเกียงแอลกอฮอล์
10. ไม้ขีดไฟ
11. ไมโครปิเปตขนาด 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
12. ถังเก็บไนโตรเจนเหลว
13. กรรไกร
14. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
15. Water bath
16. แท่งแก้วคนสาร

17. กระดาษชั่งสาร
18. กระบอกตวงขนาด 10 และ 100 มิลลิลิตร
19. pH meter (Horiba, D-21, Japan)
20. Osmometer (model 5520, Wescor, Logan, UT, USA)
21. Hemacytometer (BOECO, Hamburg, Germany)
22. เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ Control rate programmable freezer (Cryologic Pty, ltd รุ่น CL3000)

อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

1. Slide และ Cover slide
2. กล้องจุลทรรศน์
3. เข็มเขี่ย
4. น้ำกลั่น
5. นาฬิกาจับเวลา

อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบสเปิร์มที่มีชีวิต

1. Slide
2. กล้องจุลทรรศน์
3. ตะเกียงแอลกอฮอล์
4. กรรไกร
5. ไม้ขีดไฟ
6. สีย้อม Eosin และ Nigrosin

สารเคมี

1. สารละลายบัฟเฟอร์ (extender) 1 ชนิด คือ Calcium - free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) NaCl 0.8890 g, KCl 0.0440 g, Na_2HPO_4-$2H_2O$ 0.0130 g, $NaHCO_3$ 0.0390 g, KH_2PO_4 0.0070 g, $MgSO_4$-$7H_2O$ 0.0220 g, Glucose 0.1110 g, น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ 7.6 (Vuthiphandchai et al., 2009)

2. สารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) 6 ชนิด คือ Dimethyl sulfoxide, Methanol, Glycerol, Sucrose, Ethylene glycol และ Propylene glycol โดยใช้ที่ระดับความเข้มข้น 5%, 10% และ 15%
3. สีย้อมสเปิร์ม 0.5% Eosin และ 10% Nigrosin
4. ยาสลบปลา (Clove oil ผสมกับ 95% แอลกอฮอล์ อัตราส่วน 2:10)

1. การเตรียมตัวอย่างพ่อพันธุ์ปลาดุกอุยก่อนการทดลอง

คัดเลือกปลาดุกอุยเพศผู้ที่สมบูรณ์เพศ (น้ำหนัก 260-350 กรัม/ตัว) ที่ทำการจับโดยการลากอวนจากบ่อเลี้ยงปลาดุกอุยจังหวัดฉะเชิงเทรา ทำการลำเลียงในถังลำเลียงปลาดุกอุยพร้อมกับใส่ยาเหลือง (Acriflavine) และเกลือแกงเพื่อป้องกันการติดเชื้อในอัตรา 1 ส่วนในล้านส่วน (ppm) และ 1 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากนั้นนำปลามาพักไว้เป็นเวลา 5-7 วันเพื่อให้ปลาปรับตัวในบ่อน้ำจืดสี่เหลี่ยมขนาด 5 ตัน ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ทำการให้อาหารที่มีโปรตีน 40 เปอร์เซ็นต์ โดยให้อาหาร 2 ครั้งต่อ 1 วัน แต่ทำการงดอาหาร 2 วันก่อนทำการทดลอง

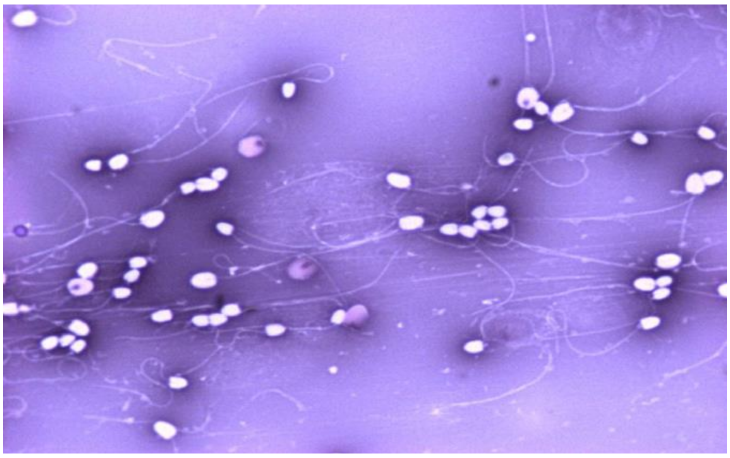
นำปลามาชั่งน้ำหนัก เพื่อคำนวณฮอร์โมนที่ใช้ในการฉีดฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นการพัฒนาของอสุจิในถุงอัณฑะ โดยใช้ฮอร์โมน Gonadotropin-Releasing Homone analogue (D-Trp6-GnRHa; Sigma Chemical Crop., St Louis, MO USA) ร่วมกับ Domperidone มีชื่อทางการค้าว่า “Motillium” จากนั้นทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาณโดสที่ใช้ในอัตรา 15 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม และ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับ (Vuthiphandchai et al., 2009) จากนั้นทำการพักปลาไว้ 8 ชั่วโมงหลังจากทำการฉีดฮอร์โมน การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อโดยทำการสลบปลาด้วย Clove oil ผสมกับ 95% แอลกอฮอล์ อัตราส่วน 2:10 ที่ความเข้มข้นของสาร 100 มิลลิกรัมต่อลิตร เพื่อหยุดการหยุดการเคลื่อนที่ของปลา หลังจากนั้นทำการผ่าบริเวณหน้าท้องปลาเพื่อเอาถุงอัณฑะออกมาล้างด้วยสารละลาย NaCl 0.85 เปอร์เซ็นต์ ให้สะอาด ควรระวังไม่ให้น้ำเชื้อมีสิ่งอื่นปะปนมาเช่น น้ำเลือด นำถุงอัณฑะที่ได้มาใส่จานแก้ว (Petri dish) ที่วางบนน้ำแข็งทำการตัดถุงอัณฑะให้แตกแล้วใช้มีดผ่าตัดกดเบาๆ เพื่อให้น้ำเชื้อออกจากถุงอัณฑะ กรองเอาน้ำเชื้อด้วยผ้าขาวบาง นำน้ำเชื้อที่ได้ใส่ใน Tissue culture flask วางบนน้ำแข็งเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อ

หลังจากทำการรวบรวมน้ำเชื้อสดปลาดุกอุยจะทำการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อภายใต้อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 25 องศาเซลเซียส) ด้วยวิธีการดังนี้

1. การประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (% Sperm motility) โดยหยดน้ำเชื้อประมาณ 5 ไมโครลิตร ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาดพร้อมกับปิดด้วย Cover glass ที่หยด 0.4 เปอร์เซ็นต์ NaCl เพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่และนำไปส่องดูเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า ภายในระยะเวลาไม่เกิน 1 นาที ประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 6 ระดับ คือ น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Vuthiphandchai et al., 2009) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ และในแต่ละสไลด์ทำการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสามบริเวณในเวลาประมาณ 20 วินาที เพื่อให้ได้ซ้ำเทียม (pseudoreplicate) รวม 9 ซ้ำ

2. การประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (% Sperm viability) โดยการนำเอาน้ำเชื้อ 5 ไมโครลิตร มาย้อมสีด้วย Eosin-Nigrosin 5 ไมโครลิตร ตามวิธีการของ Vuthiphandchai et al. (2009) แล้วนำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า ทำการสุ่มนับจำนวนสเปิร์มที่มีชีวิตซึ่งจะไม่ติดสีย้อม (ภาพที่ 3) แล้วจึงคำนวณกลับหาเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่มีชีวิต โดยทำการทดลอง 9 ซ้ำ



ภาพที่ 3 อสุจิมีชีวิตของปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) จะมีลักษณะสีขาวและอสุจิตัวที่ตายจะติดสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้ม เมื่อย้อมด้วยสี Eosin-nigrosin ส่องภายใต้กล้อง Compound microscope กำลังขยาย 100 เท่า

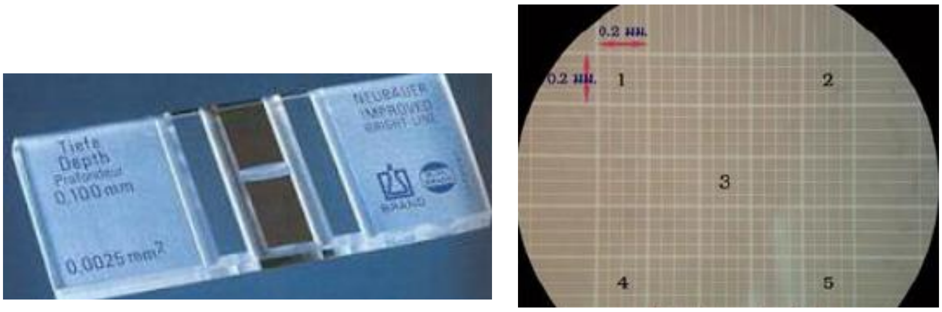
3. การประเมินเปอร์เซ็นต์ความหนาแน่นของสเปิร์ม (% Sperm density) ประเมินโดยการเจือจางน้ำเชื้อ 10 ไมโครลิตร ด้วยน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เท่ากับเจือจาง 500 เท่า (Dilution rate 1: 500) โดยผสมให้เข้ากันใน Eppendorf Tube แล้วนำน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางไปหยดบน Hemacytometer

(BOECO, Hamburg, Germany) นำไปส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า นับจำนวนอสุจิจากมุมบน-ล่างทั้ง 4 มุม และช่องตรงกลาง รวม 5 ช่อง ดังแสดงในภาพที่ 4 โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนอสุจิที่นับได้ต่อ 1 มิลลิลิตร ดังนี้

จำนวนอสุจิ/มิลลิลิตร = (รวมจำนวนอสุจิที่นับได้ทั้ง 5 บริเวณ/5) $\times$ 25 $\times$ dilution rate $\times 10^4$

4. การหาค่าแรงดันออสโมซิสของน้ำเชื้อ (Osmolality) โดยการนำน้ำเชื้อมา Centrifuge ที่ความเร็ว 8000$\times$g ในระยะเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อแยก Seminal plasma ออกจากสเปิร์ม แล้วนำ Seminal plasma มาวัดค่า Osmolality โดยใช้เครื่องมือ Osmometer (model 5520, Wescor, Logan, UT, USA) โดยทำการทดลอง 9 ซ้ำ

5. การวัดค่า pH ใน Seminal plasma โดยใช้ pH meter (Horiba, D-21, Japan) (Vuthiphandchai et al., 2009) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ



(ก) (ข)

ภาพที่ 4 (ก) สไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (Hemocytometer) (ข) ภาพแสดงตำแหน่งที่นับจำนวนอสุจิทั้ง 5 บริเวณ (1, 2, 3, 4 และ 5)

3. การดำเนินการทดลอง

การทดลองที่ 1 การประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อปลาดุกอุยในฤดูผสมพันธุ์

พ่อพันธุ์ปลาดุกอุยจะถูกสุ่ม 15 ตัว ทุกเดือนจากบ่อเลี้ยงในฤดูผสมพันธุ์ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงตุลาคม ทำการรวบรวมน้ำเชื้อสดโดยการวางยาสลบด้วย Clove oil เมื่อปลาหยุดการเคลื่อนที่จึงทำการผ่าบริเวณหน้าท้องปลาเพื่อเอาถุงอัณฑะออกมา และทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อสดบนน้ำแข็งก่อนเริ่มทำการตรวจสอบคุณภาพของน้ำเชื้อ (% Sperm motility, % Sperm viability, Sperm density, Osmolality และ pH) จากนั้นนำผลที่ได้ไปใช้ประกอบการทดลองที่ 2 ต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (% Sperm motilility), เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (% Sperm viability), ความหนาแน่นของสเปิร์ม (Sperm density), ค่า Osmolality และ pH ในแต่ละชุดการทดลองมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติ ด้วยวิธี One way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลอง ด้วย Duncan's new multiple range test โดยใช้โปรแกรม SPSS โดยข้อมูลนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเฉลี่ยความแปรปรวน (SE)

การทดลองที่ 2 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย

1. นำน้ำเชื้อปลาดุกอุยในเดือนที่มีคุณภาพดีที่สุดจากการทดลองคุณภาพของน้ำเชื้อในฤดูผสมพันธุ์ ที่ได้มาเจือจางด้วยสาร Extender สูตร Ca-F HBSS โดยใช้อัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 1:1 นำน้ำเชื้อเจือจางน้ำยา Ca-F HBSS ผสมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ 6 ชนิด คือ Dimethyl sulfoxide, Methanol, Glycerol, Sucrose, Ethylene glycol และ Propylene glycol อัตราส่วน 1:1 ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย (Final concentrations) 5, 10 และ 15 % ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ดูดสารละลาย 0.2 มิลลิลิตร ใส่หลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ปิดหลอดฟางด้วยคีมลนไฟ ปล่อยให้น้ำเชื้ออยู่ในภาวะสมดุล (Equilibration time) เป็นเวลา 10 นาที ก่อนทำการแช่แข็ง

2. ทำการลดอุณหภูมิด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ Control rate programmable freezer (Cryologic Pty Ltd รุ่น CL3000) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -8 องศาเซลเซียส/นาที (วันชัย แสนคำลือ, 2546 และธรรมศักดิ์ ถาพรพันธุ์, 2548)

   - จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง 0 องศาเซลเซียส พัก 0.5 นาที
   - จากอุณหภูมิสุดท้าย 0 องศาเซลเซียส ถึง -40 องศาเซลเซียส พัก 0.5 นาที

3. หลังจากทำการลดอุณหภูมิเสร็จนำหลอดฟางไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) นาน 1 วัน

4. ทำการประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (% Sperm motility) หลังการละลายในอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที โดยทำการทดลอง 9 ซ้ำ นำน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งที่สารไครโอโพรเทคแทนท์ทำให้ผลสเปิร์มเคลื่อนที่หลังการละลายดีที่สุดไปใช้ในการทดลองที่ 3 ต่อไป

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (% Sperm motility) ในแต่ละชุดการทดลองมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติ ด้วยวิธี Two way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และ

เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลอง ด้วย Duncan's new multiple range test โดยใช้โปรแกรม SPSS โดยข้อมูลนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเฉลี่ยความแปรปรวน (SE)

การทดลองที่ 3 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในปริมาณมาก

1. นำผลที่ได้จากการทดลองในข้อ 2 มาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อในปริมาณมากโดยใช้หลอด French straws ขนาด 0.25 มิลลิลิตร และ 0.5 มิลลิลิตร และ Cryotube ขนาด 1.25 มิลลิลิตร ในการบรรจุสารละลายน้ำเชื้อทำการลดอุณหภูมิโดยใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ Control rate programmable freezer โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -8 องศาเซลเซียส/นาทีหลังจากทำการลดอุณหภูมิเสร็จนำหลอดฟางไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส)

2. ทำการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อด้วยการลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลวที่เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว (Above liquid nitrogen surface) ในกล่องโฟมขนาด 17×32×20 เซนติเมตร ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2, 4 และ 6 เซนติเมตร เป็นเวลานาน 10 นาที หลังจากทำการลดอุณหภูมิเสร็จนำหลอดฟางไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส)

3. เมื่อระยะเวลาผ่านไป 1 สัปดาห์ ทำการเปรียบเทียบคุณภาพของน้ำเชื้อ % Sperm motility หลังการละลายในอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ในแต่ละขนาดของหลอดบรรจุที่ใช้อุปกรณ์ในการลดอุณหภูมิที่แตกต่างกัน โดยทำการทดลอง 9 ซ้ำ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (% Sperm motility) ในแต่ละชุดการทดลองมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติ ด้วยวิธี Two way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลอง ด้วย Duncan's new multiple range test โดยใช้โปรแกรม SPSSโดยข้อมูลนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเฉลี่ยความแปรปรวน (SE)

การทดลองที่ 4 การทดสอบความสามารถการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็ง

1. นำผลที่ได้จากการทดลองที่ 3 มาประเมินความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่ปลาโดยพิจารณาอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักของไข่ที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่ผ่านการแช่แข็งมาเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด โดยฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่กับแม่พันธุ์ปลาดุกอุย (น้ำหนัก 300-350 กรัม/ตัว) ที่สมบูรณ์เพศ โดยการใช้ฮอร์โมน Gonadotropin Releszing Homone analogue (GnRHa) ในอัตรา 20 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ร่วมกับ Domperidone ในอัตรา 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พักไว้ในบ่อสี่เหลี่ยมขนาด 3 ตัน ที่อุณหภูมิ 27-29 องศาเซลเซียส ก่อนทำการรีดไข่

2. หลังจากทำการฉีดฮอร์โมนประมาณ 9 ชั่วโมง นำปลาแม่พันธุ์จำนวน 4-6 ตัว มารีดไข่โดยไข่ที่ดีเท่านั้นจะมีลักษณะกลมและเป็นสีน้ำตาลไม่เหลวจนเกินไปและไม่จับตัวกันเป็นก้อน ไข่ที่มีคุณภาพดีทำการผสมเทียมกับน้ำเชื้อแช่แข็งและน้ำเชื้อสดในอัตราสเปิร์มต่อไข่ (Sperm to

egg ratio) ที่ 0.5×10^6:1 โดยใช้ไข่ประมาณ 600 ฟอง (1 มล.) ต่อ 1 Petridish ทำการผสมแบบกึ่งเปียก (Modified wet method)โดยใช้ 0.4 % NaCl ในปริมาณ 5 ml เติมลงไปในไข่ที่ทำการผสมกับน้ำเชื้อเพื่อกระตุ้นการเคลื่อนที่ของสเปิร์มโดยใส่ลงไปภายในระยะเวลา 10 วินาทีหลังจากนำน้ำเชื้อใส่ลงไปผสมกับไข่และทำการหมุน Petridish เบาๆให้น้ำเชื้อและไข่ผสมกัน เมื่อเวลาผ่านไป 1 นาที ทำการเติมน้ำให้เต็ม Petridish และดูดออกเพื่อทำความสะอาดไข่และล้างไข่เพื่อให้สารเคมีออกไปประมาณ 3-4 ครั้ง จากนั้นทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) การผสมเทียมในแต่ละชุดการทดลองทำการทดลอง 9 ซ้ำ

3. ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำสะอาดใน Petridish ภายใน 15 นาทีแรกทุก 5 นาที จากนั้นทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำสะอาดทุกครึ่งชั่วโมง จนกว่าไข่จะมีการปฏิสนธิ โดยทำการสุ่มเลือกไข่จำนวน 200 ฟองมาประเมินระยะการพัฒนาของไข่จากการส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จนถึงระยะ Gastrula stage นำข้อมูลจำนวนไข่ที่ปฏิสนธิที่ได้มาทำการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (% Fertilization rate) และเปอร์เซ็นต์การฟัก (% Hatching rate) (Vuthiphandchai et al., 2009)

โดยเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิประเมินจาก $\dfrac{\text{จำนวนไข่ที่ปฏิสนธิ}}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}} \times 100$

และเปอร์เซ็นต์การฟักประเมินจาก $\dfrac{\text{จำนวนลูกปลาที่ฟัก}}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}} \times 100$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (% Fertilization rate) และเปอร์เซ็นต์การฟัก (% Hatching rate) ในแต่ละชุดการทดลองมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติ ด้วยวิธี One way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในแต่ละชุดการทดลอง ด้วย Duncan’s new multiple range test โดยใช้โปรแกรม SPSS โดยข้อมูลนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเฉลี่ยความแปรปรวน (SE)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

จากการดำเนินการทดลองการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย(*C. macrocephalus*) เพื่อประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ผลดังนี้

ผลการทดลองที่ 1 การประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อในฤดูผสมพันธุ์

ในประเมินคุณภาพของสเปิร์มในช่วงต้นฤดู, กลางฤดู และปลายฤดูกาลผสมพันธุ์ของปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) (เดือนพฤษภาคมจนถึงเดือนตุลาคม) (Srisuvantach & Thangtrongpiros, 1985) ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของน้ำเชื้อพบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (%) ปลาดุกอุยในช่วงกลางฤดูกาลมีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดอยู่ในช่วงกลางฤดูกาลผสมพันธุ์ (เดือนกรกฎาคมและสิงหาคม) โดยมีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 75.56±2.94 และ 80.00±0.00 ตามลำดับ แต่ในเดือนกันยายนที่เริ่มเข้าสู่ช่วงปลายฤดูกาลผสมพันธุ์ก็มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 73.33±3.33 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) กับช่วงกลางฤดูกาลผสมพันธุ์ หลังจากผ่านเดือนกันยายนเข้าสู่เดือนตุลาคมเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มก็จะน้อยลงจนมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) กับช่วงกลางของฤดูกาลผสมพันธุ์ (เดือนกรกฎาคมและสิงหาคม) ส่วนในช่วงเริ่มต้นของฤดูกาลผสมพันธุ์นั้นเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มก็จะน้อยกว่าช่วงกลางของฤดูกาลเหมือนกันกับในเดือนตุลาคม (ตารางที่ 2) ในส่วนของเปอร์เซนต์สเปิร์มมีชีวิตในเดือน มิถุนายน, กรกฎาคม, สิงหาคม และตุลาคม จะมีเปอร์เซนต์สเปิร์มมีชีวิตสูงที่สุดซึ่งรองลงมาเป็นเดือนพฤษภาคมและเดือนกันยายน สำหรับค่า Osmolality ในน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์มจะพบว่าในเดือนสิงหาคมและตุลาคมจะมีค่า Osmolality สูงที่สุดคือ 327.44±3.81 และ 322.67±1.77 mOsm/kg ตามลำดับ จากตารางที่ 2 จะเห็นได้ว่าช่วงกลางและปลายของฤดูกาลผสมพันธุ์มีค่า Osmolality ไม่ต่างกันมากนักโดยมีค่าสูงกว่า 300 mOsm/kg ทั้งหมดแต่จะต่างกับช่วงต้นของฤดูกาลผสมพันธุ์ (พฤษภาคมและมิถุนายน) ที่มีค่า Osmolality ต่ำกว่า 300 mOsm/kg ทั้งสองเดือน (ตารางที่ 2) ส่วนค่าความหนาแน่นของสเปิร์มในเดือนสิงหาคมจะมีค่าสูงที่สุด 3.43×10^{9} /mL. รองลงมาจะเป็นอีกสามเดือนที่เหลือในช่วงกลางและปลายฤดูการผสมพันธุ์ (กรกฎาคม, กันยายน และตุลาคม) ส่วนในช่วงต้นของฤดูกาลผสมพันธุ์ (พฤษภาคมและมิถุนายน) มีค่าความหนาแน่นของสเปิร์มต่ำที่สุดโดยมีค่าต่ำกว่า 2.5×10^{9}/mL. ส่วนค่า pH นั้นจะพบค่าที่อยู่ในช่วงระหว่าง 6.5-7.0 จากผลการประเมินเบื้องต้นจะเห็นได้ว่าในเดือนสิงหาคมจะเป็นช่วงที่น้ำเชื้อมีความสมบูรณ์ที่สุด

และช่วงกลางฤดูกาลกับช่วงปลายฤดูกาลผสมพันธุ์คุณภาพของน้ำเชื้อจะไม่แตกต่างกันมากนัก ส่วนช่วงต้นฤดูกาลน้ำเชื้อจะมีคุณภาพต่ำที่สุดโดยจะเห็นได้จากค่าผลของการประเมินในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ข้อมูลการเปลี่ยนแปลงของคุณภาพน้ำเชื้อสด *C. macrocephalus* ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

เดือน	การเคลื่อนที่สเปิร์ม (%)	สเปิร์มมีชีวิต (%)	Osmolality (mOsm/kg)	ความหนาแน่นของสเปิร์ม ($\times 10^9$/mL.)	pH
พ.ค.	60.00 ± 0.00^{3}	77.59 ± 4.05^{2}	276.33 ± 3.19^{5}	2.45×10	7.0
มิ.ย.	$66.67\pm3.33^{2,3}$	$84.37\pm2.44^{1,2}$	289.78 ± 1.97^{4}	2.46×10	6.5
ก.ค.	75.56 ± 2.94^{1}	$84.26\pm2.77^{1,2}$	310.22 ± 3.08^{3}	2.96×10	7.0
ส.ค.	80.00 ± 0.00^{1}	88.04 ± 2.45^{1}	327.44 ± 3.81^{1}	3.43×10	7.0
ก.ย.	$73.33\pm3.33^{1,2}$	76.26 ± 2.97^{2}	$317.78\pm2.55^{2,3}$	2.81×10	7.0
ต.ค.	$66.67\pm3.33^{2,3}$	$81.19\pm2.17^{1,2}$	$322.67\pm1.77^{1,2}$	2.90×10	6.5

หมายเหตุ: ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ผลการทดลองที่ 2 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย

จากการศึกษาผลของการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย *C. macrocephalus* การแช่แข็งสเปิร์มปลาด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ (Control rate programmable freezer) โดยใช้สาร 6 ชนิดคือ Dimethyl sulfoxide, Methanol, Glycerol, Sucrose, Ethylene glycol และ Propylene glycol อัตราส่วน 1:1 ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย (Final concentrations) 5, 10 และ 15 % บรรจุในหลอด French straws ขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยน้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 80% ผลการทดลองที่อัตราการลดอุณหภูมิ -8 องศาเซลเซียส/นาที และอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้สาร DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 10% ให้ผลดีที่สุดโดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 64.44 ± 4.44 รองลงมาคือสาร Methanol ที่ระดับความเข้มข้น 15% และ 10% โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 48.89 ± 3.51 และ 31.11 ± 3.51 ตามลำดับโดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนในชุดการทดลองที่เหลือของสาร DMSO และ Methanol นั้นจะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ที่ต่ำกว่า 30% ส่วนการทดลองโดยใช้สาร Ethylene glycol

พบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ระดับความเข้มข้น 5% เพียงระดับเดียวและเคลื่อนที่ต่ำเพียง 11.11± 4.01% เท่านั้น และไม่พบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในสาร Propylene glycol, Glycerol และ Sucrose ที่ทุกระดับความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดลอง (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม *C. macrocephalus* แบบแช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -8 องศาเซลเซียส/นาที และอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส

ชนิดของสาร ไครโอโพรเทคแทนท์	ความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์		
	5%	10%	15%
DMSO	$28.89 \pm 3.51^{b,1}$	$64.44 \pm 4.44^{a,1}$	$22.22 \pm 4.01^{b,2}$
Propylene glycol	$0^{a,3}$	$0^{a,3}$	$0^{a,3}$
Ethylene glycol	$11.11 \pm 4.01^{a,2}$	$0^{b,3}$	$0^{b,3}$
Methanol	$17.78 \pm 3.51^{c,2}$	$31.11 \pm 3.51^{b,2}$	$48.89 \pm 3.51^{a,1}$
Glycerol	$0^{a,3}$	$0^{a,3}$	$0^{a,3}$
Sucrose	$0^{a,3}$	$0^{a,3}$	$0^{a,3}$

หมายเหตุ: ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ผลของการแช่แข็งสเปิร์มปลา *C. macrocephalus* ด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส/นาที และอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส พบว่าสาร Methanol ที่ระดับความเข้มข้น 15% และสาร DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 10% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดเท่ากับ 44.44 ± 2.94% และ 40.00 ± 4.71% ตามลำดับโดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) และไม่พบการเคลื่อนที่ในการใช้สาร Glycerol และ Sucrose ที่ทุกระดับความเข้มข้นของสาร ส่วนในชุดการทดลองที่เหลือจะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ต่ำกว่า 30% (ตารางที่ 4)

ส่วนผลของการแช่แข็งสเปิร์มปลา *C. macrocephalus* ด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3 องศาเซลเซียส/นาที และอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส

พบว่าสาร Methanol ที่ระดับความเข้มข้น 15% และสาร DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 10% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดเท่ากับ 53.33± 4.71% และ 44.44 ± 4.44% ตามลำดับโดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ของสาร DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 10% กับสาร DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 15 % ที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 40.00 ± 4.71% และไม่พบการเคลื่อนที่ในการใช้สาร Glycerol ที่ทุกระดับความเข้มข้นของสารและสาร Sucrose ที่ระดับความเข้มข้นของสาร 5% ส่วนในชุดการทดลองที่เหลือจะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ต่ำกว่า 30% (ตารางที่ 5)

สรุปได้ว่าในการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย *C. macrocephalus* พบว่าการแช่แข็งสเปิร์มปลาด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -8 องศาเซลเซียส/นาที และอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้สาร DMSO ระดับความเข้มข้น 10% ให้ผลดีที่สุดโดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 64.44 ± 4.44% โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กับทุกชุดการทดลอง จึงนำไปใช้ในการทดลองที่ 3 ต่อไป

ตารางที่ 4 ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม *C. macrocephalus* แบบแช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส/นาที และอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส

ชนิดของสาร ไครโอโพรเทคแทนท์	ความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์		
	5%	10%	15%
DMSO	$26.67 \pm 3.33^{b,1}$	$40.00 \pm 4.71^{a,1}$	$28.89 \pm 3.57^{b,2}$
Propylene glycol	$6.67 \pm 3.33^{a,3}$	$6.67 \pm 3.33^{a,3}$	$13.33 \pm 3.33^{a,3}$
Ethylene glycol	$13.33 \pm 3.33^{ab,2}$	$8.89 \pm 3.51^{b,3}$	$22.22 \pm 4.01^{a,2}$
Methanol	$6.67 \pm 3.33^{c,3}$	$28.89 \pm 3.51^{b,2}$	$44.44 \pm 2.94^{a,1}$
Glycerol	$0^{a,3}$	$0^{a,3}$	$0^{a,4}$
Sucrose	$0^{a,3}$	$0^{a,3}$	$0^{a,4}$

หมายเหตุ: ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 5 ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม *C. macrocephalus* แบบแช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3 องศาเซลเซียส/นาที และอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส

ชนิดของสาร ไครโอโพรเทคแทนท์	ความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์		
	5%	10%	15%
DMSO	$20.00 \pm 3.33^{b,12}$	$44.44 \pm 4.44^{a,1}$	$40.00 \pm 4.71^{a,2}$
Propylene glycol	$6.67 \pm 3.33^{b,3}$	$15.56 \pm 2.94^{a,3}$	$17.71 \pm 2.22^{a,3}$
Ethylene glycol	$8.89 \pm 3.33^{b,3}$	$13.33 \pm 3.51^{b,3}$	$26.67 \pm 3.33^{a,3}$
Methanol	$28.89 \pm 3.51^{b,1}$	$28.89 \pm 3.51^{b,2}$	$53.33 \pm 4.71^{a,1}$
Glycerol	$0^{a,3}$	$0^{a,4}$	$0^{a,4}$
Sucrose	$0^{a,3}$	$6.67 \pm 3.33^{a,4}$	$8.89 \pm 3.51^{a,4}$

หมายเหตุ: ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ผลการทดลองที่ 3 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในปริมาณมาก

เมื่อได้ผลการทดลองที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 จึงนำมาทำการวิจัยต่อโดยใช้การแช่แข็งโดยหลอดบรรจุน้ำเชื้อ 3 ขนาดคือหลอด French straws ขนาด 0.25 มิลลิลิตร และ 0.5 มิลลิลิตร และ Cryotube ขนาด 1.25 มิลลิลิตร เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติอัตโนมัติและมีการปรับใช้การลดอุณหภูมิน้ำเชื้อด้วยการลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลวที่เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว (Above liquid nitrogen surface) ในกล่องโฟมเพื่อศึกษาถึงการแช่แข็งน้ำเชื้อในปริมาณมาก จากการทดลองโดยใช้เครื่องแช่แข็งอัตโนมัติอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -8, -5 และ -3 องศาเซลเซียส/นาที โดยที่น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 71.11%พบว่าการลดอุณหภูมิที่ระดับการลดอุณหภูมิ -8 องศาเซลเซียส/นาทีในหลอดบรรจุน้ำเชื้อทั้งสามขนาดคือ 0.25, 0.5 และ 1.25 มิลลิลิตร และการลดอุณหภูมิที่ระดับการลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาทีในหลอดขนาด 0.25มิลลิลิตร ได้ผลดีไม่ต่างกัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 35.56 ± 2.94, 26.67 ± 3.33, 31.11 ± 3.51 และ 28.89 ± 3.51% ตามลำดับโดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P> 0.05$) ส่วนชุดการทดลองที่เหลือนั้นจะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ต่ำกว่า 20% ทั้งหมดและมีความ

แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองข้างต้นที่กล่าวไป ซึ่งสามารถจะเห็นได้จากค่าผลของการประเมินในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม *C. macrocephalus* แบบแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -8, -5 และ -3 องศาเซลเซียส/นาที และมีอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส โดยใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อ 3 ขนาด

อัตราการลดอุณหภูมิ	ขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อ (มิลลิลิตร)		
	0.25	0.5	1.25
-8 องศาเซลเซียส/นาที	$35.56 \pm 2.94^{a,1}$	$26.67 \pm 3.33^{a,1}$	$31.11 \pm 3.51^{a,1}$
-5 องศาเซลเซียส/นาที	$28.89 \pm 3.51^{a,1}$	$13.33 \pm 2.36^{b,2}$	$17.78 \pm 1.47^{b,2}$
-3 องศาเซลเซียส/นาที	$8.89 \pm 2.61^{b,2}$	$7.78 \pm 2.78^{b,2}$	$16.67 \pm 1.67^{a,2}$

หมายเหตุ: ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

การแช่แข็งโดยการลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลวที่เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวภายในกล่องโฟมที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6, 4 และ 2 เซนติเมตร เป็นเวลานาน 10 นาที โดยใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อทั้งสาม 3 คือ 0.25, 0.5 และ 1.25 มิลลิลิตร โดยที่น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 77.78% ปรากฏว่าในความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร ในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.25 และ 1.25 มิลลิลิตร ได้ผลดีที่สุดโดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 48.89 ± 3.51 และ $44.44 \pm 2.94\%$ ตามลำดับโดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับทุกชุดการทดลอง รองลงมาคือความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร ในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5 มิลลิลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ $24.44 \pm 2.94\%$ ส่วนทุกชุดการทดลองที่เหลือจะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ต่ำกว่า 20% (ตารางที่ 7)

จากการทดลองทั้งการใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติอัตโนมัติและการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อด้วยการลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลวที่เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟมนั้นพบว่าวิธีการลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลวที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร เป็น

ระยะเวลานาน 10 นาที ร่วมกับสาร Ca-F HBSS ในอัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 1:1 ร่วมกับ DMSO ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 10% นั้นให้ผลดีที่สุดจึงตัดสินใจนำมาใช้ในการทดลองที่ 4 ต่อไป

ตารางที่ 7 ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม *C. macrocephalus* แบบแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลวที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6, 4 และ 2 เซนติเมตร เป็นเวลานาน 10 นาที โดยใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อ 3 ขนาด

ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว	ขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อ (มิลลิลิตร)		
	0.25	0.5	1.25
6 เซนติเมตร	$48.89 \pm 3.51^{a,1}$	$24.44 \pm 2.94^{b,1}$	$44.44 \pm 2.94^{a,1}$
4 เซนติเมตร	$6.77 \pm 2.36^{b,2}$	$7.78 \pm 1.47^{b,2}$	$14.44 \pm 1.76^{a,2}$
2 เซนติเมตร	$0^{a,2}$	$0^{a,2}$	$7.78 \pm 1.47^{a,2}$

หมายเหตุ: ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ผลการทดลองที่ 4 การทดสอบความสามารถการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็ง

การทดลองความสามารถการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งได้นำผลการทดลองในการทดลองที่ 3 มาใช้โดยนำวิธีการลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลวที่เหนือไอไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร เป็นระยะเวลานาน 10 นาที ร่วมกับสาร Ca-F HBSS ในอัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 1:1 ร่วมกับ DMSO ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 10% มาทำการทดลองกับหลอดบรรจุน้ำเชื้อทั้งสามขนาดคือ 0.25, 0.5 และ 1.25 มิลลิลิตร เพื่อทดสอบความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่และทำการเปรียบเทียบคุณภาพกับน้ำเชื้อสด โดยที่น้ำเชื้อสดมีความหนาแน่นของสเปิร์มเท่ากับ 2.86×10^9/มิลลิลิตร โดยผลที่ได้พบว่าน้ำเชื้อสดให้ผลการทดลองที่ดีกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ (เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม, เปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิต, เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ และเปอร์เซ็นต์การฟัก) โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับทุกชุดการทดลอง (ตารางที่ 8) ส่วนการเปรียบเทียบระหว่างขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อ 3 ขนาดพบว่า ที่หลอดขนาด 0.25 มิลลิลิตรให้ผลการทดลองที่ดีที่สุด ถึงแม้ว่าจะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะไม่มี

ความแตกต่างทางสถิติ (P>0.05) กับหลอดขนาด 1.25 มิลลิลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 36.56 ± 2.94 และ 31.11 ± 3.51 ตามลำดับ จากนั้นเมื่อทำการประเมินคุณภาพในเรื่องของ เปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิต, เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ และเปอร์เซ็นต์การฟัก นั้นหลอดขนาด 0.25 มิลลิลิตร จะให้ผลการทดลองที่ดีกว่าทั้งหมด ส่วนในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5 และ 1.25 มิลลิลิตร จะมีความแตกต่างกันเพียงการประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ส่วนในการประเมินคุณภาพเรื่องอื่นๆนั้นไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม, เปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิต, เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ และเปอร์เซ็นต์การฟัก ของสเปิร์มปลา *C. macrocephalus* แบบแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลวที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตรเป็นเวลานาน 10 นาที โดยใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อ 3 ขนาดทำการเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด

ขนาดหลอดบรรจุน้ำเชื้อ (มิลลิลิตร)	ข้อมูล			
	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิต	เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ	เปอร์เซ็นต์การฟัก
น้ำเชื้อสด	75.56 ± 2.94^{1}	81.33 ± 3.19^{1}	80.78 ± 2.06^{1}	61.33 ± 2.24^{1}
0.25	36.56 ± 2.94^{2}	66.15 ± 2.07^{2}	66.44 ± 3.45^{2}	39.00 ± 2.22^{2}
0.5	22.22 ± 2.22^{3}	51.33 ± 0.78^{3}	52.67 ± 2.41^{3}	27.78 ± 3.09^{3}
1.25	31.11 ± 3.51^{2}	53.48 ± 2.11^{3}	54.33 ± 2.19^{3}	24.89 ± 3.24^{3}

หมายเหตุ: ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผล

สรุปผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 การประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อในฤดูผสมพันธุ์

จากการทดลองศึกษาคุณภาพของน้ำเชื้อในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (เดือนพฤษภาคมจนถึงเดือนตุลาคม) (Srisuvantach & Thangtrongpiros, 1985) เป็นการศึกษาข้อมูลเบื้องต้น เพื่อความเข้าใจที่ง่ายขึ้น จึงแบ่งช่วงระยะเวลาของฤดูกาลผสมพันธุ์วางไข่ออกเป็น 3 ช่วงระยะเวลาคือ ช่วงต้นฤดูกาล (พฤษภาคม-มิถุนายน), กลางฤดูกาล (กรกฎาคม-สิงหาคม) และปลายฤดูกาล (กันยายน-ตุลาคม) เมื่อทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อในเรื่องของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มพบว่าในช่วงกลางฤดูกาลจะให้ผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดโดยเฉพาะในเดือนสิงหาคม และช่วงปลายฤดูกาลสเปิร์มจะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ดีกว่าช่วงต้นฤดูกาล ส่วนเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตจะดีสุดในเดือนสิงหาคนแต่จะไม่ต่างกันมากทั้งฤดูกาล และสิ่งที่จะเห็นความแตกต่างได้ชัดคือการทดลองในเรื่องของค่าออสโมลาริตี้และความหนาแน่นของสเปิร์มที่พบว่าจะดีที่สุดในเดือนสิงหาคมและรองลงมาจะเป็นเดือนที่เหลือในช่วงกลางฤดูกาลและปลายฤดูกาล ส่วนช่วงต้นฤดูกาลจะมีค่าต่ำที่สุด ซึ่งผลที่ได้จะคล้ายกับการทดลองของ Vuthiphanchai, Thadsri and Nimrat, (2009) ที่ทำการทดลองในปลา *C. macrocephalus* ที่ช่วงกลางฤดูกาลน้ำเชื้อจะมีคุณภาพดีที่สุดในเดือนสิงหาคม แต่จากการทดลองของ Tan-Fermin, Miura, Ueda, Adachi and Yamauchi, (1997)ที่ทำการทดลองในปลา Asian catfish (*C. macrocephalus*) ที่เลี้ยงในที่กักขังที่ประเทศฟิลิปปินส์พบว่าเดือนที่มีระดับเปอร์เซ็นต์ Spermatozoa ใน Testis และ Seminal vesicle สูงที่สุดคือเดือนตุลาคมแต่จะเริ่มเพิ่มมากขึ้นในช่วงเดือนสิงหาคม-กันยายน และพบว่าฮอร์โมน 11-KT (11-ketotestosterone) และ T (Testosterone) จะเพิ่มมากขึ้นในช่วงต้นของฤดูกาล ส่วนฮอร์โมน DHP (17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one) จะมีค่าที่ต่ำในช่วงต้นฤดูกาลผสมพันธุ์แต่จะเพิ่มขึ้นสูงเมื่อถึงช่วงที่ปลามีความสมบูรณ์เพศมากที่สุดซึ่งจะเป็นช่วงที่เปอร์เซ็นต์ของ Spermatozoa ใน Testis ของปลา *C. macrocephalus* มีมากที่สุด ความเข้มข้นที่สูงขึ้นของฮอร์โมน 11-KT นั้นมีบทบาทในการควบคุมให้เกิดกระบวนการ spermatogenesis (Zohar, 1989) ที่จะส่งผลต่อการพัฒนาของ Testis และต่อเนื่องไปในทุก Stages ของกระบวนการสร้างสเปิร์ม (Schulz et al., 2010) จากการทดลองในปลา European perch (Alavi et al., 2010) พบว่า Sperm volume จะมีค่าต่ำลงเมื่อฮอร์โมน 11-KT และ T มีค่าสูงที่สุดและ Sperm volume จะสูงขึ้นเมื่อฮอร์โมน 11-KT และ T มีค่าลดลง และฮอร์โมน DHP

มีค่าสูงขึ้น ซึ่งการลดลงของฮอร์โมน 11-KT และ T จะเกิดขึ้นเมื่อสเปิร์มพัฒนาถึงระยะ Spermiation (Zohar, 1989) โดยที่ฮอร์โมน DHP จะเพิ่มขึ้นและจะมีผลทำให้ Spermatozoa เพิ่มขึ้นตามไปด้วย (Tan-Fermin et al., 1996) จากเหตุผลข้างต้นจะเห็นได้ว่าช่วงต้นฤดูกาลนั้นจะเป็นช่วงที่มีการเริ่มกระบวนการสร้างสเปิร์มเป็นหลักที่จะถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนทำให้จำนวน Spermatozoa น้อยเนื่องจากระดับฮอร์โมน DHP ต่ำจึงมีผลให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่น้อยกว่าช่วงกลางและปลายของฤดูกาลผสมพันธุ์ อีกทั้งฮอร์โมน DHP ยังทำให้เกิด Sperm maturation ที่จะกระตุ้นให้ค่า pH ใน Sperm duct สูงขึ้นซึ่งจะส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับ Intracellular cAMP ซึ่งมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (Alavi et al., 2010) อย่างไรก็ตามผลของค่าออสโมลาริตี้และความหนาแน่นของสเปิร์มนั้นนอกจากจะมีผลที่เหมือนกันกับการทดลองของ Vuthiphandchai, Thadsri, and Nimrat, (2009) แล้วยังมีผลการทดลองคล้ายกันในปลาชนิดอื่นๆ เช่นปลา Winter flounder (*Pleuronectes americanus*) (Shangguan & Crim, 1999), European perch (*Perca fluviatilis*) (Alavi et al., 2010), Atlantic cod (*Gadus morhua*) (Rouxel et al., 2008; Butts, Litvak, & Tripple, 2010) แต่มีผลตรงข้ามกับการทดลองในปลาหลายชนิดเช่นในปลา Common barbell (*Barbus barbus*) (Alavi et al., 2007) ที่พบว่าความหนาแน่นของสเปิร์มและคุณภาพของสเปิร์มจะสูงในช่วงต้นฤดูกาลแล้วค่อยต่ำลงไปในช่วงกลางฤดูกาลจากนั้นต่ำสุดในปลายฤดูกาลแต่ค่าออสโมลาริตี้กลับไม่ต่างกัน โดยเฉพาะในปลา Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) (Babiak, Ottesen, Rudolfsen, & Johnsen, 2006) ที่มีค่าออสโมลาริตี้ต่ำในช่วงต้นฤดูกาลแต่กลับสูงขึ้นเรื่อยๆ ในช่วงกลางฤดูกาลจนถึงสูงสุดในช่วงปลายฤดูกาลทั้งปลาที่จับจากธรรมชาติและปลาที่เลี้ยงในที่กักขัง ซึ่งค่าที่ได้จะเหมือนกับค่าความหนาแน่นของสเปิร์มปลาที่จับจากธรรมชาติ แต่ปลาที่เลี้ยงในที่กักขังค่าความหนาแน่นของสเปิร์มจะคล้ายกับการทดลองนี้ที่ช่วงต้นฤดูกาลจะน้อยกว่าช่วงกลางฤดูกาลและลดลงเล็กน้อยในช่วงปลายฤดูกาลซึ่งอาจสรุปไว้ว่าน่าจะมาจากผลของ Photoperiod ทำให้เห็นได้ว่ามีปัจจัยต่างๆที่จะเข้ามาเกี่ยวข้องกับคุณภาพของน้ำเชื้อปลาเช่น photoperiods, สภาพอากาศ, อาหารที่ให้, ลักษณะทางฟิสิกส์และเคมีของน้ำ เป็นต้น (Vizziano, Fostier, Loir, & Lefac, 2008) จากการทดลองในปลา Atlantic cod (*Gadus morhua*) (Butts, Litvak, & Tripple, 2010) ที่ได้ศึกษาองค์ประกอบใน seminal plasma โดยวัดความเข้มข้นของสาร K^+, Na^+ และ Ca^{2+} ก็พบว่าสาร Na^+ มีความเข้มข้นขึ้นในช่วงกลางฤดูกาลแต่อีกสารอีกสองชนิดไม่พบความแตกต่าง แต่ในปลา European perch (*Perca fluviatilis*) (Alavi et al., 2010) กลับพบว่าสาร Na^+ และ Ca^{2+} มีความเข้มข้นขึ้นในช่วงกลางฤดูกาลเหมือนกันแต่ K กลับไม่แตกต่างกัน จึงเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นที่เพิ่มมากขึ้นของสาร Na^+ และ Ca^{2+} จะมีผลทำให้ค่าออสโมลาริตี้ในน้ำเชื้อปลาสูงขึ้นในช่วงกลางฤดูกาล ซึ่ง

ค่าออสโมลาริตี้ที่ต่ำในช่วงต้นฤดูกาลจะทำให้ปริมาณน้ำเชื้อเพิ่มขึ้นจากกระบวนการ hydration (Shangguan & Crim, 1999) แต่ความหนาแน่นสเปิร์มอาจจะลดลง ในเรื่องความหนาแน่นของสเปิร์มนั้นเป็นที่รู้กันว่ายิ่งสเปิร์มมีความหนาแน่นสูงโอกาสในการปฏิสนธิกับไข่ก็จะมากขึ้นตามไปด้วยซึ่งจะได้ผลที่แม่นยำในปลาที่รีดน้ำเชื้อออก แต่ในปลาที่ทำการผ่าท้องเพื่อเก็บถุงน้ำเชื้อควรนำข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และระดับเปอร์เซ็นต์ของ Spermatozoa มาประกอบด้วยเพื่อความถูกต้องของระดับคุณภาพน้ำเชื้อ ส่วนในเรื่องผลของค่า pH จากการทดลองของ Tan-Fermin, Miura, Adachi and Yamauchi, (1997) ในปลา Asian catfish (*C. macrocephalus*) โดยการใช้ ASP solution ที่มีค่า pH ต่างกันกระตุ้นการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปรากฏว่า ค่า pH ที่ระดับ 6.4-9.0 สเปิร์มยังมีระดับการเคลื่อนที่สูงอยู่จึงสามารถสรุปได้ว่าในปลา *C. macrocephalus* ค่า pH ไม่น่าจะเป็นปัจจัยหลักที่กระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย

การทดลองที่ 2 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย

ในส่วนของการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยนั้นพบว่าการแช่แข็งสเปิร์มปลาด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -8 องศาเซลเซียส/นาที และอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส พบว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วยการใช้สาร DMSO ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 10 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลดีที่สุดรองลงมาคือสาร Methanol ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 15 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3 องศาเซลเซียส/นาทีและอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส ในการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในตระกูล catfish นั้นสาร DMSO และ Methanol สามารถประสบความสำเร็จและนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย (ตารางที่ 1) ซึ่งสาร DMSO นั้นเป็นสาร Ambivalent character คือมีลักษณะเป็นกลุ่ม hydrophobic (methyl group) (Kiyohara, Perron, & Desnoyers, 1975) และกลุ่ม hydrophilic (sulfinyl group) ที่จะช่วยในการทำปฏิกิริยากับน้ำ (Cabral, Luzar, Teixeira, & Bellisent-Funel, 2000) โดย DMSO จะสามารถขัดขวางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของน้ำ (Rao & Singh, 1992) และมีความสามารถในการซึมผ่านเนื้อเยื่อสูง (Mandumpal, 2011) อย่างไรก็ตามความสำเร็จในการใช้สาร DMSO นั้นขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร DMSO เนื่องจากเป็นที่รู้กันว่าสาร DMSO นั้นเป็นสารที่มีความเป็นพิษ (Spindler, Wolkers, & Glasmacher, 2011) ที่ใช้เข้มข้นที่เหมาะสมหากใช้ในความเข้มข้นที่ต่ำเกินไปอาจทำให้เซลล์เกิดเหี่ยวจากการสูญเสียน้ำและเกิดความเข้มข้นจากสารละลายที่สามารถทำอันตรายกับเซลล์ได้ แต่หากใช้สาร DMSO ในความเข้มข้นที่สูงเกินไปจะทำให้เกิดความเสียหายกับโครงสร้างของผนังเซลล์ (Gurtovenko & Anwar, 2007) จึงมีความเป็นไปได้ที่คุณสมบัติของสาร DMSO ในความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ใช้ใน

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยสามารถป้องกันความเสียหายของเซลล์สเปิร์มจากการแช่แข็งนั้นอยู่ที่ระดับความเข้มข้น 10% นอกจากนี้ในการลดอุณหภูมิเพื่อการแช่แข็งอัตราการลดอุณหภูมิก็จะมีความสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์เมื่อได้ชนิดของสารละลายและความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้วการลดอุณหภูมิด้วยอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมก็จะมีผลต่อความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อ โดยการลดอุณหภูมิที่ช้าเกินไปในระหว่างขบวนการแช่แข็งจะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็ง (ice crystal) ที่เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เซลล์ถูกทำลาย และเกิดอันตรายกับเซลล์จากความเข้มข้นของสารละลาย (Mazur, Seki, Pinn, Keinhans, & Edashing, 2005) ซึ่งสามารถช่วยได้จากการลดอุณหภูมิที่เร็วขึ้นโดยจะทำให้น้ำภายในเซลล์ไหลออกจากเซลล์ไม่ทันและลดการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายนอกเซลล์ (Denniston, Michelet, & Godke, 2000) สอดคล้องกับการทดลองครั้งนี้ที่ใช้เครื่องเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติอัตโนมัติ Control rate programmable freezer (Cryologic Pty, ltd รุ่น CL3000) ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -8 องศาเซลเซียส/นาที และอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส ทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูงขึ้นจึงเหมาะสมกว่าอัตราการลดอุณหภูมิที่ -3 และ -5 องศาเซลเซียส/นาที ในการแช่แข็งร่วมกับสาร DMSO

สาร Methanol เป็นอีกสารหนึ่งที่นิยมนำมาใช้แช่แข็งในปลาตระกูล catfish เช่น African catfish *Clarias gariepinus* (Viveiros, So, & Koman, 2000), Yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) (Pan et al. 2008), Blue catfish (*Ictalurus furcatus*) (Hu, Yang & Tiersch, 2011) เป็นต้น สาร Methanol จัดเป็นสารจำพวก Monohydric alcohol ซึ่งคุณสมบัติของ alcohols จะทำให้การเกิด Glassy matrix ช้าลงเมื่ออุณหภูมิลดต่ำลง (Hofer, Hallbrucker, Mayer, & Johari, 1989) ซึ่งช่วยยับยั้งความเสียหายจากเกล็ดน้ำแข็งในขณะทำการแช่แข็งได้ ถึงแม้การจับตัวกันระหว่างสาร Methanol กับน้ำจะมีความแข็งแรงและมีค่าช่วงชีวิตที่ยาว (Mandumpal, 2011) แต่ลักษณะพฤติกรรมที่ชอบรวมตัวกันเองของสาร Methanol เมื่อผสมกับน้ำ (Noskov, Kiselev, Kolker, & Rode, 2001) ที่อาจมีผลต่อคุณสมบัติของ Hydrogen bonds อันนำไปสู่ความสูญเสียคุณสมบัติในการจับตัวกับโมเลกุลของน้ำทำให้ไม่สามารถป้องกันการเกิด Nucleation และเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กได้ (Mandumpal, 2011) ซึ่งจะลดความสามารถของสาร Methanol เมื่อนำมาใช้ในกระบวนการแช่แข็ง จากการทดลองครั้งนี้เห็นได้ว่าสาร Methanol ที่ความเข้มข้นต่ำจะได้ผลไม่ดีเท่าที่ความเข้มข้นสูงกว่า แต่ความเข้มข้นที่สูงเกินไปก็อาจจะเสี่ยงต่ออันตรายของเซลล์จากความเข้มข้นของสารละลาย ส่วนสารอีกสี่ชนิดที่ใช้ในการทดลองไม่มีสารไหนที่ได้ผลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เกินกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะในสาร Glycerol ที่ไม่พบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเลยถึงแม้ว่าจะเป็นสารที่มีความสามารถในการลดความแข็งแรงของ Hydrogen bone ในการจับตัวกันระหว่างโมเลกุล

ของน้ำ (Dashnau, Nucci, Sharp, & Vanderkooi, 2006) สาร Glycerol เมื่อนำมาทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาจะได้ผลดีในปลา Summer whiting (*Sillago ciliata*) (Young, Capra & Blackshaw, 1992) แต่อาจไม่ได้ผลในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) อีกทั้งในปลา Yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) (Pan et al. 2008) ก็มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไม่ถึง 10 เปอร์เซ็นต์เช่นกัน

การทดลองที่ 3 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในปริมาณมาก

จากการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในปริมาณมากโดยเปรียบเทียบระหว่างหลอดบรรจุน้ำเชื้อ 3 ขนาดคือหลอด French straws ขนาด 0.25 มิลลิลิตร และ 0.5 มิลลิลิตร และ Cryotube ขนาด 1.25 มิลลิลิตร ทำการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อด้วยการลดอุณหภูมิโดยใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ (Control rate programmable freezer) และวิธีการลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลวที่เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว (Above liquid nitrogen surface) ในกล่องโฟม พบว่าการใช้หลอดขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่ความสูง 6 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวนาน 10 นาทีได้ผลดีที่สุด ซึ่งเหมือนกับการทดลองของ รัชดาภรณ์ อินทเกสร, (2556) ที่ทำการแช่แข็งหลอดบรรจุน้ำเชื้อที่เหมือนกันทั้งสามขนาดกับการทดลองนี้แต่จะทำการทดลองในปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*) และได้ผลดีเช่นเดียวกับในการทดลองในปลา Yellow catfish (*P. fulvidraco*) (Pan et al. 2008) ที่มีการทดลองโดยใช้หลอด Cryotubes ขนาด 2 มิลลิลิตร ร่วมกับสาร Methanol 10 เปอร์เซ็นต์ และอีกการทดลองที่ใช้หลอด French straws ขนาด 0.25 มิลลิลิตร ร่วมกับสาร DMSO ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 10 เปอร์เซ็นต์ ในปลาดุกด้าน Walking catfish (*Clarias batrachus*) (Lal et. al., 2009) ที่ประสบความสำเร็จในการใช้วิธีการลดอุณหภูมิแบบเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว สำหรับวิธีการลดอุณหภูมิแบบเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวนั้นเมื่อทำการลดอุณหภูมิจะทำให้อุณหภูมิมีการลดลงอย่างรวดเร็วและมีอุณหภูมิสุดท้ายต่ำกว่าการใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติอัตโนมัติ (Ji et al., 2004) จากที่ข้อมูลในข้างต้นเป็นไปได้ที่การใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3 และ -5 องศาเซลเซียส/นาที น่าจะเป็นการลดอุณหภูมิแบบที่ช้าเกินไปเนื่องจากขณะที่ทำการลดอุณหภูมิของเหลวภายนอกเซลล์จะกลายเป็นน้ำแข็งก่อนของเหลวภายในเซลล์และเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายนอกเซลล์ (Acker & Mcgann, 2003) เมื่อของเหลวภายนอกเซลล์กลายเป็นน้ำแข็งทำให้ความเข้มข้นของตัวถูกละลายภายนอกต่ำกว่าภายในเซลล์ จึงทำให้น้ำแพร่ออกจากเซลล์เพื่อปรับสมดุล (Denniston, Michelet, & Godke, 2000) และเกิดอันตรายกับเซลล์จากความเข้มข้นของสารละลาย (Mazur, Seki, Pinn, Keinhans, & Edashing, 2005) แต่การลด

อุณหภูมิที่ -8 องศาเซลเซียส/นาที แม้ว่าจะได้ผลที่ดีกว่า แต่เนื่องจากข้อจำกัดของเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ Control rate programmable freezer (Cryologic Pty, ltd รุ่น CL3000) ที่มีอัตราการลดอุณหภูมิที่สูงสุดที่ -8 องศาเซลเซียส/นาที อาจจะใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา *C. macrocephalus* ได้ไม่ดีเท่าวิธีการลดอุณหภูมิแบบเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวที่ความสูง 6 เซนติเมตร นาน 10 นาที ซึ่งเป็นระดับความสูงที่ให้อัตราการลดอุณหภูมิที่ดีที่สุด ส่วนการลดอุณหภูมิที่เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวที่ความสูง 4 และ 2 เซนติเมตร น่าจะเป็นระดับความสูงที่ทำให้อัตราการลดอุณหภูมิที่รวดเร็วเกินไป เนื่องจากผลจากการลดอุณหภูมิที่รวดเร็วเกินไปจะทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ (Steponkus, 1996) และจะทำให้น้ำไหลออกจากเซลล์ช้าเกินไปอาจทำให้ความเข้มข้นภายในเซลล์สูงขึ้นจะทำให้เซลล์เกิดอันตรายได้ (Denniston, Michelet, & Godke, 2000) แต่หากจะทำการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วต้องมีการเพิ่มความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ให้มากขึ้นและลดระยะเวลาสมดุล (Equilibration time) ให้น้อยลง (Cuevas-Uribe, Leibo, Daly, & Tiersch, 2011) ในเรื่องขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อพบว่าหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.25 และ 1.25 มิลลิลิตร คุณภาพของน้ำเชื้อจะไม่มีความแตกต่างกันในเรื่องเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแต่จะมีความแตกต่างกันกับหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5 มิลลิลิตร ในการทดลองในปลา European catfish (Linhart, Rodina, Flajshans, Gela, & Kocour, 2005) ซึ่งใช้อัตราการลดการลดอุณหภูมิ -4°C/ min ตั้งแต่อุณหภูมิ 4°C จนถึงอุณหภูมิ -9°C และ ramp ต่อมาใช้อัตราการลดการลดอุณหภูมิ -11°C/ min ตั้งแต่อุณหภูมิ -9°C จนถึงอุณหภูมิ -80°C โดยใช้ปริมาณน้ำเชื้อแช่แข็งที่ 1, 2 และ 4 มิลลิลิตรไม่พบความแตกต่างกันของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (46.7, 36.5 และ 51.1% ตามลำดับ) แต่ในปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*) (รัชดาภรณ์ อินทเกสร, 2556) หลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตรได้ผลการทดลองดีที่สุดและหลอดขนาด 0.5 มิลลิลิตร จะได้ผลดีกว่าหลอดขนาด 1.25 มิลลิลิตร เมื่อทำการลดอุณหภูมิแบบเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวที่ความสูง 6 เซนติเมตร นาน 10 นาที ซึ่งได้ผลการทดลองคล้ายกันในปลา Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) (Christensen & Tiersch, 2005) ที่หลอดขนาดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตรได้ผลดีกว่าหลอดขนาด 0.5 มิลลิลิตร เป็นไปได้ว่าหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5 มิลลิลิตร ที่ใช้มีความบางและใสกว่าหลอดชนิดอื่นๆ จึงมีโอกาสได้รับความร้อนระหว่างกระบวนการบรรจุและการปิดหลอดอาจจะทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยในหลอดขนาด 0.5 มิลลิลิตร ลดลงต่ำกว่าหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาดอื่นๆ

การทดลองที่ 4 การทดสอบความสามารถการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็ง

จากผลการทดลองเปรียบเทียบความสามารถการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งกับน้ำเชื้อสด พบว่าการใช้น้ำเชื้อสดให้ผลดีกว่าการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในการปฏิสนธิกับไข่ปลาดุกอุย ซึ่งเป็นเรื่องปกติที่สามารถพบได้ในการทดลองเปรียบเทียบคุณภาพระหว่างน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งในการปฏิสนธิปลา catfish หลายๆ ชนิดเช่น Yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) (Pan et al. 2008), Blue catfish (*Ictalurus furcatus*) (Hu, Yang, & Tiersch, 2011) European catfish (Linhart, Rodina, Flajshans, Gela, & Kocour, 2005) หรือแม้กระทั่งการทดลองในปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) (ธรรมศักดิ์ ถาพรพันธุ์, 2548) เนื่องมาจากความอ่อนแอของสเปิร์มที่อาจได้รับความเสียหายจากการแช่แข็ง ซึ่งคุณภาพของสเปิร์มแช่แข็งหลังการละลายจะลดลงจากความเสียหายของ Cell membrane, Mitochondrial และการสูญเสียพลังงาน ATP (Cabrita, Robles, Alvarez, & Herraez, 2005) อีกทั้งจากการศึกษาคุณภาพของสเปิร์มแช่แข็งทาง Genetic พบว่าความ Genes ของสเปิร์มอาจมีการเปลี่ยนแปลงของสารพันธุกรรมหลังจากทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (Watson, 1995; Holt, 2000) แต่เมื่อสังเกตถึงคุณภาพน้ำเชื้อในการทดลองในหลอดขนาดต่างๆ แล้วจะพบว่าหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตร ถึงแม้ว่าจะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไม่ต่างกับหลอด 1.25 มิลลิลิตร แต่เมื่อทำการทดลองผสมเทียมกับไข่จะให้ผลเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การฟักที่ดีกว่าหลอดขนาด 0.5 และ 1.25 มิลลิลิตร และมีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตที่สูงกว่า เป็นไปได้ว่าผลจากความเป็นพิษของสาร DMSO ในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาดที่ใหญ่จะลดคุณภาพของสเปิร์มและไข่ของปลาดุกอุย

สรุปและข้อเสนอแนะ

การใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาดใหญ่เป็นปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา ขนาดของหลอดแช่แข็งน้ำเชื้อที่มีขนาดใหญ่และจำนวนของหลอดบรรจุที่มากขึ้นจะช่วยเพิ่มปริมาณน้ำเชื้อแช่แข็งในแต่ละรอบกระบวนการแช่แข็งและการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง (Linhart, Rodina, Flajshans, Gela, & Kocour, 2005) การลดอุณหภูมิน้ำเชื้อด้วยวิธีการลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลวที่เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว (Above liquid nitrogen surface) ในกล่องโฟมที่ความสูง 6 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวนาน 10 นาที โดยเจือจางน้ำเชื้อด้วยสาร Extender สูตร Ca-F HBSS โดยใช้อัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 1:1 ร่วมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ DMSO ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 10 เปอร์เซ็นต์ จะได้ผลดีที่สุด ซึ่งวิธีการใช้กล่องโฟมทำ

การลดอุณหภูมิจะช่วยลดต้นทุนการแช่แข็ง เป็นวิธีการลดอุณหภูมิที่ง่ายไม่ซับซ้อนใช้ระยะเวลาไม่นานก็สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ในปริมาณมาก อีกทั้งยังไม่ต้องเป็นผู้ที่มีความชำนาญในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆอีกด้วย (ปฏิญญา อ้นขวัญเมือง, 2551) อย่างไรก็ตามในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อมีการใช้สารเคมี, ระดับอัตราการลดอุณหภูมิและเพิ่มอุณหภูมิที่แตกต่างกันไปในแต่ละชนิดของปลาแม้ว่าจะมีวิธีการที่แตกต่างกันแต่มีจุดมุ่งหมายเดียวกันคือการพัฒนาไปสู่วิธีการแช่แข็งในระดับที่สามารถทำเป็นอุตสาหกรรมการแช่แข็งน้ำเชื้อและรักษาสายพันธุ์ของปลา (Hu, Yang, & Tiersch, 2011) การศึกษาในเรื่องของการแช่แข็งน้ำเชื้อในปริมาณมากยังสามารถใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่จะพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อที่จะนำไปสู่อุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่จะมีการใช้น้ำเชื้อปลาแช่แข็งในการเพาะพันธุ์ปลาในอนาคต (รัชดาภรณ์ อินทเกสร, 2556) การพัฒนาเทคโนโลยีในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถช่วยในอนุรักษ์สายพันธุ์ของปลาดุกอุยพื้นเมืองของไทยที่อยู่ในสถานภาพมีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์และเป็นประโยชน์ต่อการเพิ่มจำนวนปลาดุกอุยพื้นเมืองของไทยให้ดำรงอยู่ต่อไป

บรรณานุกรม

กฤษณ์ มงคลปัญญา. (2536). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งหลักการ/วิธีการ/ประโยชน์*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 128 หน้า.

ไชยา อุ้ยสูงเนิน. (2532). *การเลี้ยงปลาดุก*. กรุงเทพ, พรสาสน์. 71 หน้า.

ธรรมศักดิ์ ถาพรพันธุ์ (2548). *การศึกษาผลของระยะเวลาที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลาดุกอุย (Clarisa Macrocephalus) ที่แช่แข็งด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

ปฏิญญา อ้นขวัญเมือง (2549). *การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวอย่างง่าย*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

รัชดาภรณ์ อินทเกสร. (2556). *การพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว*. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2535). *การเพาะพันธุ์ปลา*. กรุงเทพฯ, โอเดียลสโตร์. 194 หน้า.

วันชัย แสนคำลือ. (2546). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุย* (*Clarias macrocephalus*) *โดยวิธีแช่แข็งด้วย ไดเมทธิล ซัลฟอกไซด์ เมทธานอล เอธานอล ซูโครส และ ทีฮาโรส*. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

ศิริพร คชรัตน์, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2548). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ* (*Pangasius larnaudii*) *แบบแช่แข็ง*. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 43 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เล่มที่ 4 สาขาประมง สาขาการจัดการทรัพยากรสิ่งแวดล้อม.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. (2538). *การเพาะขยายพันธุ์ปลา*. (พิมพ์ครั้งที่ 4). กรุงเทพฯ, รั้วเขียว

Acker, J.P., & McGann, L.E. (2003). Protective effect of intracellular ice during freezing?, *Cryobiology*, 46, 197-202.

Akcay, E., Bozkurt, Y., Secer, S., & Tekin, N. (2004). Cryopreservation of mirror carp (*Cyprinus carpio*) semen. *Research Article*, 28, 837-843.

Alavi, S.M.H., & Cosson, J. (2006). Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: a review. *Cell Biology International Journal*, 30(1) , 1-14.

Alavi, S.M.H., Rodina, M., Hatef, A., Stejskal, V., Policar, T., Hamackova, J., & Linhart, O. (2010). Sperm motility and monthly variations of semen characteristics in *Perca fluviatilis* (Teleostei: Percidae), *Czech J. Anim. Sci*., 55(4), 174-182.

Andreev, A.A., Sadikova, D.G., Gakhova, E.N., Pashovkin, T.N., & Tikhomirov A.M. (2009). Congelation of Cryoprotective Solutions and Cryopreservation of fish sperm. *Cell Biophysics*, 54(5), 612-616.

Babiak, I., Ottesen, O., Rudolfsen, G., & Johnsen, S. (2006). Quantitative characteristics of Atlantic halibut, Hippo-glossus hippoglossusL., semen throughout the reproductive season. *Theriogenology* 65, 1587-1604.

Billard, R., Cosson, J., & Crim, L.W. (1993). Motility of fresh and aged halibut sperm. *Aquatic Living Resources*, 6, 67–75.

Billard R., Cosson, M.P., & Christen, R. (1987). Some recent data on the biology on trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. Proceedings of the third international symposium on reproductive physiology of fish. *Marine Sciences Research Laboratory*, Memorial University of Newfoundland, St John's, NF, Canada, 187-190.

Billard, R., Cosson, J., Perchec, G., & Linhart, O. (1995). Biology of sperm and artificial reproduction in carp. *Aquaculture*, 124, 95-112.

Boitano, S., & Omoto C.K. (1991). Membrane hyperpolalization activates trout sperm without and increase in intracellular pH. *Journal of Cell Science*, 98, 343-382.

Brown, G.G., & Mims, S.D. (1995). Storage, transportation, and fertility of undiluted and diluted paddlefish semen, *The progressive Fish-Cultureist*, 57, 64–69.

Butts, I.A.E., Litvak , M.K., & Trippel, E.A. (2010) Seasonal variations in seminal plasma and sperm characteristics of wild-caught and cultivated Atlantic cod, Gadus morhua, *Theriogenology*, 73, 873-885.

Christensen, J.M., & Tiersch, T.R. (2005). Cryopreservation of Channel catfish sprem: effects of cryoprotectant exposure time, cooling rate, thawing condition, and male-to-male variation. *Theriogenology*, 63, 2103-2112.

Ciereszko, A., Glogoski, J., & Dabroski, K. (2000). Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In *Cryopreservation in Aquatic Species*, Tiersch, T.R., & P.M. Mazik, Ediors, World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, 20-48.

Cabral, J.T., Luzar, A., Teixeira, J., & Bellisent-Funel, M. (2000). Single-particle dynamics in dimethyl-sulfoxide/water eutectic mixture by neutron scattering. *Journal of Chemical Physics*, 113, 8736-8745.

Cuevas-Uribe, R., Leibo, S.P., Daly, J., & Tiersch, T.R. (2011). Production of channel catfish with sperm cryopreserved by rapid non-equilibrium cooling. *Cryobiology*, 63, 186-197.

Dashnau, J.L., Nucci, N.V., Sharp, K.A., & Vanderkooi, J.M. (2006), Hydrogen Bonding and the Cryoprotective Properties of Glycerol/Water Mixtures. *Journal of Physical Chemistry B*, 110, 13670-13677.

Denniston, R.S., Michelet, S., & Godke, R.A. (2000). Principle of cryopreservation. In *Cryopreservation in Aquatic Species*, Tiersch, T.R. and Mazik, P.M., Editor. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Lusiana, 56-74.

Donalson, E.M., Solor, I.I., & Harvey, B. (2000). Induced ovulation and spermiation, and factor Influencing Gamete Quality. In *Cryopreservation in Aquatic Species*, Tiersch, T.R., & P.M., Mazik, Editor. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Lusiana, 13-19.

Gurtovenko, A.A., & Anwar, J. (2007). Ion transport through chemically induced pores in protein-free phospholipid membranes. *Journal of Physical Chemistry B*, 111: 13379-13382.

Hofer, K., Hallbrucker, A., Mayer, E., & Johari, G. P. (1989). Vitrified dilute aqueous-solutions. 3. Plasticization of waters H-bonded network and the glass-transition temperatures minimum. *Journal of Physical Chemistry*. 93, 4674-4677.

Holt, W.V. (2000). Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology*, 53, 47-58.

Honeyfield, D.C., & Krise, W. F. (2000). Measurement of Milt Quality and Factors Affecting Viability of Fish Spermatozoa In C*ryopreservation in Aquatic Species*, Tiersch, T.R., & P.M., Mazik, Editor. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Lusiana, 49-58.

Hu, E., Yang, H., & Tiersch T. R. (2011). High-throughput cryopreservation of spermatozoa of blue catfish (*Ictalurus furcatus*): Establishment of an approach for commercial-scale processing. *Cryobiology*, 62, 74-82.

Islam, M. S., & Akhter, T. (2011) Tale of Fish Sperm and Factors Affecting Sperm Motility: A Review. *Advances in Life Sciences*, 1(1), 11-19.

Jezierska, B., & Witeska, M. (1999) The effect of time and temperature on motility of spermatozoa of common and grass carp. *Elec J Polish Agricult Univers*, 2, 1-8.

Ji, X.S., Chen, S.L., Tian, Y.S., Yu,G.C., Sha, Z.X., Xu, M.Y., & Zhang, S.C. (2004). Cryopreservation of sea perch *(Lateolabrax Japonicus)* spermatozoa and Feasibility for production-scale fertilization. *Aquaculture*, 241, 517-528.

Kiyohara, O., Perron, G. & Desnoyers, J.E. (1975). Volumes and Heat capacities of Dimethylsulfoxide, Acetone, and Acetamide in Water and of some Electrolytes in these mixed Aqueous Solvents. *Canadian Journal of Chemistry*, 53, 3263-3268.

Krasznai, Z., Marian, T., Balkay, L., Gaspe,r R.J., & Tron, L. (1995). Potassium channels regulate hypo-osmotic shock-induced motility of Common Carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Aquaculture*, 129, 123-128.

Krasznai, Z., Marian, T., Izumi, H., Damjanovich, S., Balkay, L., & Tron, L. (2000). Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca^{2+} channels leading to Ca^{2+} influx and initiation of sperm motility in the common carp. *Biophysics Journal*, 97, 2052-2067.

Krasznai, Z., Morisawa, M., Morisawa, S., Krasznai, Z.T., Tron, L., & Marian, T. (2003). Role of ion channels and membrane potential in the initiation of carp sperm motility. *Aquatic Living Resources*, 16, 445-449.

Kho, K.H., Tanimoto, S., Inaba, K., Oka, Y., & Morisawa, M. (2001) Transmembrane cell signaling for the initiation of trout sperm motility: roles of ion channels and membrane hyperpolarization for cyclic AMP synthesis. *Zoological Science*, 18, 919-928.

Lal, K.K., Barman, A.S., Punia, P., Kharp, K., Mohinder, V., Lal, B., Gopalakrishnan, A., Sah, R.S., & Lakra, W. (2009) Effect of extender composition on sperm cryopreservation of asian catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch) and *Clarias batrachus* (Linnaeus). *Asian Fisheries Science*, 22, 137-142.

Leibo, S.P. (1989). Equilibrium and nonequilibrium cryopreservation of embryos. *Theriogenology*, 31(1), 85-93.

Linhart, O., Rodina, M., Flajshans, M., Gela, D., & Kocour, M. (2005). Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* sperm : Sperm motility, viability, and hatching success of embryos. *Cryobiology*, 51, 250-261.

Na-Nakorn, U. (1999). Genetic factors in fish production: a case study of the catfish Clarias. In: Mustafa, S. (Ed.), Genetics in sustainable fisheries management, *Fishing News Books*, Malden. MA, 175-187.

Nagahama,Y. (1994). Endocrine regulation of gametogenesis in fish. *The International Journal Developmental Biology*, 38, 217-229.

Noskov, S.Y., Kiselev, M.G., Kolker, A.M., & Rode, B.M. (2001). Structure of methanol-methanol associates in dilute methanol-water mixtures from molecular dynamics simulation. *Journal of Molecular Liquids*, 91, 157-165.

Mandumpal, J.B. (2011). *The Molecular mechanism of solvent cryoprotection*. Doctoral dissertation, Curtin University of technology, Australia.

Mazur, P. (1997). The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. *Cryobiology*, 14, 251-272

Mazur, P., Seki, S., Pinn, I.L., Keinhans, F.W., & Edashing, K. (2005). Extra and intracellular ice formation in mouse oocytes. *Cryobiology*, 51, 29-35.

Merino, O., Risopatron, J., Sanchez, R., Isachenko, E., Figueroa, E., Valdebenito, I., & Isachenko, V. (2011). Fish (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa cryoprotectant-free vitification: stability of mitrocondrion as criterion of effectiveness. *Animal Reproduction science*, 124, 125-131.

Mongkonpunya, K., Chairak, N., Pupipat, T., & Tiersch, T.R. (1995). Cryopreservation of Mekong giant catfish sperm. *Asian Fish Science,* 8, 211–221.

Morisawa, M., & Suzuki, K. (1980). Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. *Science Journal*, 210, 1145-1147.

Morisawa, M., Suzuki, K., & Shimizu, H. (1983). Effect of osmolality and potassium on motility of spermatozoa form fresh-water cyprinid fishs. *Journal of Experimental Biology*. 107, 95-103.

Mylonas, C.C., Gissis, A., Magnus, Y., & Zohar, Y. (1997). Hormonal changes in male white bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt quality after treatment with a sustained-release GnRHa delivery system. *Aquaculture*, 153, 301-313.

Na-Nakorn, U., Kamonrat, W., & Ngamisiri, T. (2004). Genetic diversity of walking catfish, *Clarias macrocephalus*, in Thailand and evidence of genetic introgression form introduced farmed *Clarias gariepinus*. *Aquculture*, 240, 145-163.

Oda, S., & Morisawa, M. (1993) Rises of intracellular Ca^{2+} and pH mediate the initiation of sperm motility by hyperosmolallity in marine teleost. *Journal of Cell Science*, 108, 1175-1181.

Pan, J., Ding, S., Ge, J., Yan, W., Hao, C., Chen, J., & Huang, Y. (2008). Development of cryopreservation for maintaining yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* sperm. *Aquaculture*, 279, 173–176.

Rall, W.F., & Polge, C. (1984) Effect of warming rate on mouse embryos frozen and thawed in glycerol. *Journal of Reproduction and Fertility*, 70, 292-293.

Rao, B.G., & Singh, U.C. (1992). A free energy perturbation study of solvation in methanol and dimethyl sulfoxide. *Journal of American Chemical Society,* 112, 3803-3811.

Redondo-Muller, C., Cosson, M. P., & Cosson, J. (1991). In vitro maturation of potential for movement of carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa. *Molecular Reproduction and Development*, 29, 259-207.

Sadiqul Islam, M., & Akhter, T. (2011) Tale of Fish Sperm and Factors Affecting Sperm Motility : A Review. *Advances in Life Sciences*, 1(1), 11-19.

Sananan, W., Kapuscinski, A.R., Na-Nakorn, U., & Miller, L.M. (2004). Genetic impects of catfish farming (*C. macrocephalus* x *C. gariepinus*) on native catfish population in central Thailand. *Aquculture*, 235, 167-184.

Schulz, R.W., De Franca. L.R., Lareyre, J.J., LeGac. F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R.H., & Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. General and Comparative Endocrinology, 165, 390-411.

Shangguan, B., & Crim, L.W. (1999), Seasonal variation in sperm production and sperm quality in male winter founder, *Pleuronectes americanus*: the effects of hypophysectomy, pituitary replacement therapy, and GnRH-a treatment. *Marine Biology*. 134, 19-27.

Singhal, P.K., & Shrivastava, P. (2004). *Challenges in sustainable development*, New Delhi Anmol Publications PVT. LTD.

Spindler, R ., Wolkers, W.F., & Glasmacher, B. (2011). Dimethyl sulfoxide and ethylene glycol promote membrane phase change during cryopreservation. *CryoLetters*, 32, 148-151.

Srisuvantach, V., & Thangtrongpiros, M. (1985). Induced breeding and larval rearing of *Clarias macrocephalus* In FAO Aquaculture Practices. Planing and Extension in Thailand September, 1985, form http://www.fao.org/docrep/field/003AC231E/AC231E03.htm.

Steponkus, P.L. (1984). Role of Plasma Membrane in Freezing Injury and Cold Acclimation. *Annual reviews of plant Physiology*, 35, 543-584.

Tan-Fermin, J. D., Miura, T., Ueda, H., Adachi, S. & Yamauchi, K. (1997). Testicular Histology and Serum Steroid Hormone Profiles in Hatchery-bred Catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther) during an Annual Reproductive Cycle. *Fisheries Science*, 63(5), 681-686 .

Tan-Fermin, J. D., Miura, T., Adachi, S., & Yamauchi, K. (1999). Seminal plasma composition sperm motility, and milt dilution in the Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Gunter). *Aquaculture*, 171, 323-338.

Tiersch, T.R., & Mazik, P.M. (2000). Cryopreservation in aquatic species. *World Aquaculture society*, Boton Rouge, Louisana, USA.

Toth, G.P., Christ, S.A., McCarthy, H.W., Torsella, J.A., & Smith, M.K., (1995). Computerassisted motion analysis of sperm from the common carp. *Journal of Fish Biology*, 47, 986-1003.

Vidthayanon, C. 2005. *Thailand Red Data* : *Fishes.* Office of Natural Resourcesand Environmental Policy and Planning, Bangkok, Thailand, 108.

Viveiros, A. T. M., So, N., & Koman, J. (2000) Sperm cryopreservation of African catfish *Clark garieninus* : cryoprotectants, freezing rate and sperm : egg dilution ratio. *Theriogenology*, 54, 1395-l 408.

Vizziano, D., Fostier, A., Loir, M., & Lefac, F. (2008). *Testis development, its hormonal regulation and spermiation induction in teleost fish*. In: Alavi, S.M.H., Cosson, J.J., Coward, K., Rafiee, R. (eds.): Fish Spermatology, Alpha Science Ltd. Oxford. UK.

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

Watson, P.F. (1995). Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function, *Reproduction Fertility and Development*, 7, 871-891.

Wayman, W.R., & Tiersch, T.R. (2000). Research methods for cryopreservation of sperm In Cryopreservation in aquatic species, *World Aquaculture Society*, 264-275.

Williot, P., Kopeika, E. F., & Goncharov B.F. (2000) Influence of testis state, temperature and delay in semen collection on spermatozoa motility in the culture Siberian sturgeon (*Acipenser baeri* Brandt). *Aquaculture*, 189, 53-61.

Wolf, J., & Bryant, G. (1999). Feezing, drying and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryobiology*, 39, 103-129.

Young, J.A., Capra, M.F., & Blackshaw, A.W., (1992). Cryopreservation of summer whiting (*Sillago ciliate*) spermatozoa. *Aquaculture*,102, 155-160.

Zohar, Y. (1989). *Fish reproduction: its physiology and artificial manipulation* in Fish culture in Warm Systems: Problems and Trends. Edited by M. Shib. And S. Sarig, CRC Press, Florida. 65-119.

ภาคผนวก

ตารางที่ 9 ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อสดปลาดุกอุย *C. macrocephalus* ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

เดือน	*N*	*Mean* ± SE
พฤษภาคม	9	60.00 ± 0.00
มิถุนายน	9	66.67 ± 3.33
กรกฎาคม	9	75.56 ± 2.94
สิงหาคม	9	80.00 ± 0.00
กันยายน	9	73.33 ± 3.33
ตุลาคม	9	66.67 ± 3.33

ตารางที่ 10 ข้อมูลเปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตในน้ำเชื้อสดปลาดุกอุย *C. macrocephalus* ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

เดือน	*N*	*Mean* ± SE
พฤษภาคม	9	77.59 ± 4.05
มิถุนายน	9	84.37 ± 2.44
กรกฎาคม	9	84.26 ± 2.77
สิงหาคม	9	88.04 ± 2.45
กันยายน	9	76.26 ± 2.97
ตุลาคม	9	81.19 ± 2.17

ตารางที่ 11 ข้อมูลค่า Osmolality ของ Seminal plasma ในน้ำเชื้อสดปลาดุกอุย *C. macrocephalus* ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

เดือน	*N*	*Mean* ± SE
พฤษภาคม	9	276.33 ± 3.19
มิถุนายน	9	289.78 ± 1.97
กรกฎาคม	9	310.22 ± 3.08
สิงหาคม	9	327.44 ± 3.81
กันยายน	9	317.78 ± 2.55
ตุลาคม	9	322.67 ± 1.77

ตารางที่ 12 ข้อมูลค่าความหนาแน่นของสเปิร์มในน้ำเชื้อสดปลาดุกอุย *C. macrocephalus* ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

เดือน	*N*	*Mean*
พฤษภาคม	3	2.45×10
มิถุนายน	3	2.46×10
กรกฎาคม	3	2.96×10
สิงหาคม	3	3.43×10
กันยายน	3	2.81×10
ตุลาคม	3	2.90×10

ตารางที่ 13 ข้อมูลค่า pH ของ Seminal plasma ในน้ำเชื้อสดปลาดุกอุย *C. macrocephalus* ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

เดือน	*N*	*Mean* ± SE
พฤษภาคม	3	7.0 ± 0
มิถุนายน	3	6.5 ± 0
กรกฎาคม	3	7.0 ± 0
สิงหาคม	3	7.0 ± 0
กันยายน	3	7.0 ± 0
ตุลาคม	3	6.5 ± 0

ตารางที่ 14 ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม *C. macrocephalus* แบบแช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -8 องศาเซลเซียส/นาที และอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส

Cryoprotectant	Concentration (%)	Mean	*N*	Std. Error
DMSO	5	28.89	9	3.51
	10	64.44	9	4.44
	15	22.22	9	4.01
Propylene glycol	5	0	9	0
	10	0	9	0
	15	0	9	0
Ethylene glycol	5	11.11	9	4.01
	10	0	9	0
	15	0	9	0
Methanol	5	17.78	9	3.51
	10	31.11	9	3.51
	15	48.89	9	3.51
Glycerol	5	0	9	0
	10	0	9	0
	15	0	9	0
Sucrose	5	0	9	0
	10	0	9	0
	15	0	9	0

ตารางที่ 15 ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม *C. macrocephalus* แบบแช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส/นาที และอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส

Cryoprotectant	Concentration (%)	Mean	*N*	Std. Error
DMSO	5	26.67	9	3.33
	10	40.00	9	4.71
	15	28.89	9	3.57
Propylene glycol	5	6.67	9	3.33
	10	6.67	9	3.33
	15	13.33	9	3.33
Ethylene glycol	5	13.33	9	3.33
	10	8.89	9	3.51
	15	22.22	9	4.01
Methanol	5	6.67	9	3.33
	10	28.89	9	3.51
	15	44.44	9	2.94
Glycerol	5	0	9	0
	10	0	9	0
	15	0	9	0
Sucrose	5	0	9	0
	10	0	9	0
	15	0	9	0

ตารางที่ 16 ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม *C. macrocephalus* แบบแช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3 องศาเซลเซียส/นาที และอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส

Cryoprotectant	Concentration (%)	Mean	*N*	Std. Error
DMSO	5	20.00	9	3.33
	10	44.44	9	4.44
	15	40.00	9	4.71
Propylene glycol	5	6.67	9	3.33
	10	15.56	9	2.94
	15	17.71	9	2.22
Ethylene glycol	5	8.89	9	3.33
	10	13.33	9	3.51
	15	26.67	9	3.33
Methanol	5	28.89	9	3.51
	10	28.89	9	3.51
	15	53.33	9	4.71
Glycerol	5	0	9	0
	10	0	9	0
	15	0	9	0
Sucrose	5	0	9	0
	10	6.67	9	3.33
	15	8.89	9	3.51

ตารางที่ 17 ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม *C. macrocephalus* แบบแช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -8, -5 และ -3 องศาเซลเซียส/นาที และมีอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส โดยใช้สาร DMSO 10% และมีหลอดบรรจุน้ำเชื้อ 3 ขนาด

Storage devices	Freezing rate (^{0}C/min)	Mean	*N*	Std. Error
French straws 0.25 ml	-8	35.56	9	2.94
	-5	28.89	9	3.51
	-3	8.89	9	2.61
French straws 0.5 ml	-8	26.67	9	3.33
	-5	13.33	9	2.36
	-3	7.78	9	2.78
Cryotube ขนาด 1.25 ml	-8	31.11	9	3.51
	-5	17.78	9	1.47
	-3	16.67	9	1.67

ตารางที่ 18 ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม *C. macrocephalus* แบบแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลวที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6, 4 และ 2 เซนติเมตร เป็นเวลานาน 10 นาที โดยใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อ 3 ขนาด

Storage devices	Above liquid nitrogen surface	Mean	*N*	Std. Error
French straws 0.25 ml	6 cm	48.89	9	3.51
	4 cm	24.44	9	2.94
	2 cm	44.44	9	2.94
French straws 0.5 ml	6 cm	6.77	9	2.36
	4 cm	7.78	9	1.47
	2 cm	14.44	9	1.76

ตารางที่ 18 (ต่อ)

Storage devices	Above liquid nitrogen surface	Mean	*N*	Std. Error
Cryotube ขนาด 1.25 ml	6 cm	0	9	0
	4 cm	0	9	0
	2 cm	7.78	9	1.47

ตารางที่ 19 ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา *C. macrocephalus* แบบแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลวที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตรเป็นเวลานาน 10 นาที โดยใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อ 3 ขนาดทำการเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด

ขนาดหลอดบรรจุน้ำเชื้อ	*N*	*Mean* ± SE
น้ำเชื้อสด	9	75.56 ± 2.94
0.25	9	36.56 ± 2.94
0.5	9	22.22 ± 2.22
1.25	9	31.11 ± 3.51

ตารางที่ 20 ข้อมูลเปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตของสเปิร์มปลา *C. macrocephalus* แบบแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลวที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตรเป็นเวลานาน 10 นาที โดยใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อ 3 ขนาดทำการเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด

ขนาดหลอดบรรจุน้ำเชื้อ	*N*	*Mean* ± SE
น้ำเชื้อสด	9	81.33 ± 3.19
0.25	9	66.15± 2.07
0.5	9	51.33± 0.78
1.25	9	53.48± 2.11

ตารางที่ 21 ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของสเปิร์มปลา *C. macrocephalus* แบบแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลวที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตรเป็นเวลานาน 10 นาที โดยใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อ 3 ขนาดทำการเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด

ขนาดหลอดบรรจุน้ำเชื้อ	*N*	*Mean* ± SE
น้ำเชื้อสด	9	80.78 ± 2.06
0.25	9	66.44± 3.45
0.5	9	52.67± 2.41
1.25	9	54.33± 2.19

ตารางที่ 22 ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การฟักของสเปิร์มปลา *C. macrocephalus* แบบแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลวที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตรเป็นเวลานาน 10 นาที โดยใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อ 3 ขนาดทำการเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด

ขนาดหลอดบรรจุน้ำเชื้อ	*N*	*Mean* ± SE
น้ำเชื้อสด	9	61.33 ± 2.24
0.25	9	39.00 ± 2.22
0.5	9	27.78 ± 3.09
1.25	9	24.89 ± 3.24