

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาแบ่งออกเป็น 4 หัวข้อได้แก่

1. อนุกรมวิธานและชีววิทยาบางประการของปลาสวาย
 2. ระบบสืบพันธุ์ของปลาเพศผู้และอสุจิ
 3. การเก็บรวบรวมและการเก็บรักษาน้ำเชื้อ
 4. การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ
1. อนุกรมวิธานและชีววิทยาบางประการของปลาสวาย

ปลาสวาย เป็นปลาน้ำจืดชนิดไม่มีเกล็ดที่มีขนาดใหญ่ชนิดหนึ่ง มีความยาวถึง 163 เซนติเมตร จากที่พบในแม่น้ำเจ้าพระยา (Smith, 1945 อ้างถึงใน สมปอง หิรัญวัฒน์, 2523) เป็นปลาที่สามารถเลี้ยงให้เจริญเติบโตได้ดีทั้งในบ่อและในกระชัง กินอาหารได้เกือบทุกชนิด จึงเป็นปลาที่นิยมเลี้ยงอย่างมาก ทำให้ปริมาณปลาสวายเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (สมปอง หิรัญวัฒน์, 2523)

ปลาสวายมีชื่อสามัญว่า Striped catfish ชื่อวิทยาศาสตร์ *Pangasianodon hypophthalmus* มีการจำแนกทางอนุกรมวิธานดังนี้

Phylum Vertebrata

Class Pisces

Subclass Teleostomi

Order Cypriniformes (Ostariophysi)

Suborder Siluroidei (Nematogathi)

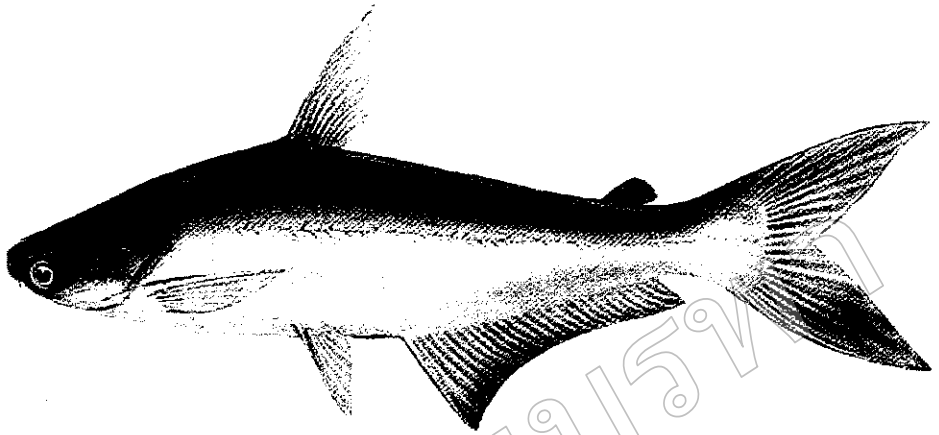
Family Pangasiidae

Genus *Pangasianodon*

Species *Pangasianodon hypophthalmus*

สกุล *Pangasianodon* มีลักษณะสำคัญคือ มีฟันซึ่งลดรูปลงเมื่อปลา มีขนาดใหญ่ ก้านครีบท้องมีจำนวน 8-10 อัน และอุ้งลมมีตอนเดียว พบ 2 ชนิดคือ *P. gigas* (ปลานิล) และ *P. hypophthalmus* (ปลาสวาย) จากการศึกษาทางกายวิภาค พบ 20 ลักษณะสำคัญ เช่น ลักษณะของ กระโหลก ขากรรไกร กระดูกสันหลังตอนต้น อุ้งลม เป็นต้น สามารถนำมาวิเคราะห์และจำแนกในเชิงวิวัฒนาการ พบว่าทั้ง 23 ชนิดนั้น จำแนกได้เป็น 5 สกุล คือ *Helicophagus*, *Pteropangasius*, *Neopangasius*, *Pangasianodon* และ *Pangasius* จากเดิมที่เคยรวมเป็น 2 สกุลโดยโรเบิร์ตและ วิทยานนท์ (Roberts & Vidthayan, 1991 อ้างถึงใน ขวสิทธิ์ วิทยานนท์, 2536)

ปลาสวายมีรูปร่างค่อนข้างเรียวยาว (elongate) ส่วนหัวค่อนข้างกว้างแต่ไม่แบนมาก ปากต่ำ (inferior) ตาขนาดเล็กมีขนาด 2 คู่ คือที่ขากรรไกรบน 1 คู่ และขากรรไกรล่างอีก 1 คู่ เส้นข้างตัวเป็นลักษณะเส้นที่สมบูรณ์ มีความยาวของลำตัว (total length) ประมาณ 4 เท่าครึ่งของความยาวส่วนหัว ความยาวมาตรฐาน (standard length) ประมาณเกือบ 4 เท่าครึ่งของความกว้าง ลำตัว ครีบหลัง (dorsal fin) มีก้านครีบแข็ง 1 ก้าน และก้านแขนง 6 ก้าน และก้านครีบแข็งมีลักษณะเป็นฟันเลื่อย (serrate) และมีครีบไขมัน (adipose fin) อยู่ระหว่างครีบหลังและครีบท้อง ครีบก้น (anal fin) มีก้านแข็ง 4 ก้านและก้านแขนง 30-32 ก้าน ครีบท้อง (pectoral fin) มีก้านแข็ง 1 ก้าน และก้านแขนง 8 ก้าน ลักษณะที่สำคัญภายในเช่น มีซี่เหงือก (gill raker) 20 ซี่ มีฟันซี่เล็ก ๆ เรียงเป็น แถวบนขากรรไกรทั้งสองคู่ และมีฟันบนเพดาน (vomerine teeth) เรียงเป็น 2 แถว เป็นต้น ปลาสวายตัวเต็มวัยจะมีลำตัวสีเทาบริเวณด้านหลัง และมีสีขาวขจัดบริเวณตั้งแต่ด้านข้างของลำตัว จากส่วนหน้าถึงโคนหาง ขนานไปกับเส้นข้างตัวทั้งด้านบนและด้านล่าง ทำให้แลดูสวยงามมาก (ภาพที่ 1) อนึ่งปลาสวายขนาดเล็กมีลักษณะต่าง ๆ ที่คล้ายคลึงกันมากกับปลาทูและ ปลาสลิดทำให้ยากแก่การจำแนก (สมปอง หิรัญวัฒน์, 2523) การเลี้ยงปลาสวายในบ่อดิน จะใช้เวลาเลี้ยงประมาณ 8-12 เดือน จะได้ปลาขนาด 1-1.5 กิโลกรัม ซึ่งเป็นขนาดที่ตลาดต้องการ ให้ผลผลิตต่อไร่ประมาณ 4-6 ตัน ทั้งนี้แล้วแต่ความอุดมสมบูรณ์ของอาหาร การเลี้ยงปลาสวายใน บ่อดิน โดยเฉพาะที่เลี้ยงอย่างหนาแน่นหรือเลี้ยงร่วมกับหมูหรือไก่ มักมีกลิ่นโคลนติดมาด้วย สามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้โดยการเปลี่ยนถ่ายน้ำที่ใช้เลี้ยงติดต่อกันระยะหนึ่งก่อนการจับ หรือ เมื่อถ่ายเทน้ำแล้วก็ให้อาหารประเภทปลายข้าวคั่วผสมรำก่อนจับจำหน่าย 2-3 วัน จะทำให้ปลา มีกลิ่นดีขึ้น (คเชนทร เกลิมวัฒน์, ม.ป.ป.)



ภาพที่ 1 ปลาสวาย (Striped catfish) *Pangasianodon hypophthalmus* (สม โภชน์ อังคะทวีวัฒน์ และคณะ, 2540)

2. ระบบสืบพันธุ์ของปลาเทศผู้และอสุจิ

ลักษณะภายในของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลากระดุกแข็งส่วนใหญ่ตัวผู้จะมีอวัยวะเป็น พูยาว 2 พู อยู่ภายในช่องท้องด้านบน อวัยวะของปลาสวาย ปลาเทพา และปลาสวายแม่น้ำโขงมี ลักษณะภายนอกเหมือนกับอวัยวะของปลาบึกทุกประการ ยกเว้นขนาดและน้ำหนัก เมื่อยังไม่ถึงวัย เจริญพันธุ์มีลักษณะเป็นพูขนาดเล็ก 2 พู ไม่แตกเป็นแขนงหรือเป็นพูย่อยที่แตกแขนงออกคล้ายนิ้ว มือ แต่เมื่อแช่อยู่ในฟอร์มาลิน 10% จะเห็นเป็นเส้นที่แตกแขนงย่อยยาวออกไปตลอดเส้น ขบวนการสร้างอสุจิของอวัยวะเป็นแบบโลบูลาร์ (lobular) กลไกควบคุมการปล่อยน้ำเชื้อควบคุม โดยระบบประสาท หรือระบบประสาทร่วมกับระบบต่อมไร้ท่อ และทำงานร่วมกันแบบรีเฟลกซ์ (neuroendocrine reflex) ซึ่งเป็นระบบที่ช่วยปรับจังหวะการปล่อยน้ำเชื้อให้พร้อมกับการปล่อยไข่ ของตัวเมีย (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

การพัฒนากการสร้างอสุจิของปลา มี 2 ขั้นตอนคือ

2.1 สเปิร์มาโทเจเนซิส (spermatogenesis) เป็นขั้นตอนการเพิ่มจำนวนของอสุจิ โดยการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) ทำให้มีจำนวนสเปิร์มาโตโกเนีย (spermatogonia) มากมายและพัฒนาไปเป็นไพรมารี สเปิร์มาโตไซต์ (primary spermatocyte) จากนั้นจะแบ่งเซลล์ แบบไมโอซิส (meiosis) 2 ครั้ง ได้ เซ็กกันดารี สเปิร์มาโตไซต์ (secondary spermatocyte) และได้สเปิร์มาทิด (spermatid) ในที่สุด

2.2 สเปิร์มมิเอชัน (spermiation) เป็นขั้นที่ spermatid มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น สเปิร์มาโตซัว (spermatozoa) ซึ่งจะมีหางและพร้อมที่จะมีการปฏิสนธิกับไข่ได้ (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

น้ำเชื้อปลาที่อยู่ในอัมพาตที่รีดออกมาสด ๆ และสะอาดจะมีสีขาวคล้ายนํ้านม ข้นเหนียว และมีกลิ่นคาว ถ้าน้ำเชื้อมีสิ่งเจือปน เช่น เลือด ปัสสาวะ อุจจาระ หรือนํ้า เป็นน้ำเชื้อที่มีคุณภาพไม่ดีไม่เหมาะแก่การเก็บรักษา และเมื่อนํ้าเชื้อสดไปผสมกับไข่ก็อาจเป็นเหตุให้มีอัตรา การผสมและฟักออกเป็นตัวต่ำกว่าน้ำเชื้อที่สะอาด ปริมาณของน้ำเชื้อที่รีดได้จากปลาตัวหนึ่งในแต่ละครั้ง ความหนาแน่นของตัวอสุจิ จะมีความผันแปรไปตามฤดูกาลและช่วงเวลาในฤดูผสมพันธุ์

น้ำเชื้อปลาถ้านํ้ามาปั่นแยก (centrifuge) จะแยกได้ 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นเซลล์ อสุจิ (spermatozoa) และส่วนที่เป็นของเหลว (seminal plasma) เช่นเดียวกับน้ำเชื้อสัตว์เลี้ยงลูกด้วย นม เช่น โค กระบือ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) และในส่วนของ seminal plasma ซึ่งเป็น องค์ประกอบทางเคมีและฟิสิกส์ของของเหลวในน้ำเชื้อนี้เอง ที่มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาสูตร นํ้ายาสำหรับแช่แข็งน้ำเชื้อปลา องค์ประกอบทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำเชื้อปลาแต่ละกลุ่ม ต้องใช้ สารเคมีที่เมื่อเจือจางน้ำเชื้อแล้วให้อ่อนที่เหมาะสม มีออสโมลาลิตี (osmolality) ใกล้เคียงกับ ของเหลวในน้ำเชื้อปลา เพื่อป้องกันการเคลื่อนไหวของอสุจิก่อนถูกกระตุ้น (Ciereszko et al., 2000)

ตัวอสุจิของปลาแต่ละชนิดจะมีรูปร่างลักษณะแตกต่างกันแต่ทุกชนิดจะมี ส่วนประกอบที่เหมือนกัน 3 ส่วนคือ 1) ส่วนหัว (head) ประกอบด้วย nucleus 2) ลำตัว (body หรือ midpiece) ประกอบด้วยเซนโตรโซม (centrosome) และไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ซึ่งเป็นแหล่ง ให้พลังงาน และ 3) ส่วนหาง (tail) ทำหน้าที่โบกพัดเพื่อการเคลื่อนไหว (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538) อสุจิจะไม่เคลื่อนไหวเมื่ออยู่ใน seminal fluid แต่จะเคลื่อนไหวได้ดีเมื่ออยู่ในน้ำและสารละลายที่มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับสารละลายภายในตัวอสุจิ ปลานํ้าจืดส่วนมากจะเคลื่อนไหวได้นาน 2-3 นาที ซึ่งเป็นเวลาอันสั้นจึงนํ้าเชื้อปลานํ้าจืดมาใส่นํ้าเกลือ 0.6%-0.7% (physiological solution) เพื่อให้มีการเคลื่อนไหวที่นานขึ้น (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

3. การเก็บรวบรวมและการเก็บรักษานํ้าเชื้อ

3.1 การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อตัวผู้ พอสรุปได้ 3 วิธี คือ

3.1.1 รีดโดยตรงจากตัวปลา โดยกดเบา ๆ ตรงส่วนท้อง น้ำเชื้อจะไหลออกมา เช่น ปลาตะเพียน ปลาสวาย เป็นต้น

3.1.2 โดยใช้เข็มฉีดยาดูดจากช่องเปิดของนํ้าเชื้อ (urogenital pore) เช่น ปลานํ้าจืด

3.1.3 โดยการผ่าท้อง เพื่อนำอวัยวะ (testis) ไปพบคนแยกเอาน้ำเชื้อออกไปผสมเทียม ซึ่งมีกฏปฏิบัติกับปลาซึ่งมีน้ำเชื่อน้อย หรือไม่สามารถรีดน้ำเชื้อได้ เช่น ปลาตุ๊ก (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538)

3.2 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา

วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา มี 2 แบบ เช่นเดียวกันกับวิธีการรักษาน้ำเชื้อในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ เก็บน้ำเชื้อสดไว้ในระยะเวลาอันสั้นในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส กับอีกวิธีหนึ่งเป็นการเก็บแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

3.2.1 การเก็บรักษาในช่วงเวลาสั้น (short-term storage) การเก็บรักษาน้ำเชื้อวิธีนี้สามารถเก็บได้ทั้งสภาพเข้มข้นหรือเจือจางด้วยน้ำยา (extender) ที่เหมาะสม ภายใต้อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส น้ำเชื้อโดยทั่วไปเมื่อรีดได้ภาชนะที่แห้งแล้วสามารถเก็บรักษาไว้ได้ชั่วระยะเวลาหนึ่ง ที่มีผู้ศึกษาไว้ทั้งในและต่างประเทศที่สามารถรวบรวมได้ มีดังนี้

สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ (2519) ได้ทดลองเก็บน้ำเชื้อปลาสร้อย โดยวิทยากรชาวแคนาดา ชื่อ Mr. Fred Withler ทดลองเก็บน้ำเชื้อปลาสร้อย และปลาช่อนเทศ (*Labeo rohita* (Hamilton)) ในตู้เย็นหรือถ้ำน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 7-8 องศาเซลเซียส พบว่าตัวอสุจิมีชีวิตอยู่ได้นาน 24 ชั่วโมง และยังทำการทดลองเก็บน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว ปลาไน ปลาสร้อย และปลาช่อนเทศ ไว้ในถ้ำน้ำแข็งเป็นเวลานาน 5.5, 25, 18 และ 22 ชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อนำมาทดสอบการผสมกับไข่สดของปลาชนิดเดียวกัน ผลปรากฏว่ามีเพียงน้ำเชื้อปลาสร้อยชนิดเดียวเท่านั้นที่สามารถผสมกับไข่ได้

การเก็บน้ำเชื้อปลาทุ โดยเก็บอวัยวะของปลาที่เช็ดให้แห้ง ใส่กล่องพลาสติกป้องกันน้ำเข้า แช่ในถ้ำน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส พบว่าอสุจิมีชีวิตอยู่ประมาณ 10 % หลังจากเก็บไว้นาน 100 ชั่วโมง (Dhebtaranon & Boonprakob, 1971 อ้างถึงใน นลินี มารคแมน, 2527)

จากการศึกษาเรื่องชีวเคมีของของเหลวภายในอสุจิ (seminal plasma) และตัวอสุจิ (spermatozoa) ทำให้มีการคิดแปลงวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยการเจือจางน้ำเชื้อด้วยเกลือหรือสารเคมีที่ให้ปริมาณและความเข้มข้นของออสโมนต่าง ๆ ใกล้เคียงกับน้ำในร่างกายปลา (body fluid) Lockwood (1961 อ้างถึงใน นลินี มารคแมน, 2527) ได้เตรียม physiological saline เรียกว่า "Fish Ringer" สำหรับใช้ในปลาหลายชนิด เช่น ปลาไหลไฟฟ้า (*Electrophorus electricus*) และปลา cutthroat trout (*Salmo clarki*) ต่อมา มีการปรับปรุง physiological saline สำหรับใช้ในปลาน้ำจืด เรียกว่า "Cortland salt solution" (Phillips et al., 1957 อ้างถึงใน นลินี มารคแมน, 2527)

นลินี มารคแมน และคณะ (2526) เมื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Pantius gonionotus*) โดยเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ใช้น้ำยา 5 สูตร ได้แก่ Ringer's solution, NaCl-KHCO₃, sucrose-KHCO₃, minimal medium สำหรับเลี้ยงยีสต์ และ sodium metabisulfite มีอัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 1 : 3 หลังจากเก็บนาน 96 ชั่วโมง พบว่า น้ำยาทุกสูตรให้เปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิมิชีวิต อัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักออกเป็นตัวระหว่าง 20-68%, 1.6-23.7% และ 0-0.25% ตามลำดับ น้ำยาที่ให้เปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิมิชีวิตสูงสุด ได้แก่ sucrose-KHCO₃ (68%) และให้อัตราการปฏิสนธิสูงสุดด้วย (23.7%) แต่อัตราการฟักเป็นศูนย์

อุทัยรัตน์ ฉนวน (2526) ทดลองเก็บน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในตู้เย็น เช่นเดียวกัน โดยเก็บในสภาพเข้มข้น และเจือจางด้วยน้ำยา อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา 5 : 3 เก็บรักษาน้ำเชื้อนาน 24 และ 72 ชั่วโมง จึงนำมาผสมกับไข่สด พบว่า น้ำเชื้อที่เก็บรักษาในสภาพเข้มข้นมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ 73.14% และ 18.25% ตามลำดับ ส่วนน้ำเชื้อที่เก็บรักษาใน Ringer's solution มีอัตราการปฏิสนธิ 80.64% และ 38.68% ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าใน rinsing solution ที่ให้อัตราการปฏิสนธิ 60.17% และ 3.71% ตามลำดับ

นลินี มารคแมน (2527) ทดลองเก็บน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว โดยใช้น้ำยาเจือจาง 16 สูตร ในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 1 ต่อ 3 เก็บในตู้เย็นที่ 5-10 องศาเซลเซียส นาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าน้ำยาสูตรที่ 16 ซึ่งประกอบด้วย KHCO₃ 125 mM, sucrose 250 mM กับ reduced glutathion 95 mM ให้ผลดีกว่าน้ำยาสูตรอื่น คือมีเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิก่อนไหวเป็น 76%, 71% และ 67% ตามลำดับเวลาการเก็บ

ทัศนีย์ ภูพิพัฒน์ และคณะ (2529) นำน้ำยาสูตรเดียวกันนี้ มาเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพา (*Pangasius sanithwongsei*) ในตู้เย็น (0-5 องศาเซลเซียส) นาน 24 ชั่วโมงแล้วนำมาผสมกับไข่สด ให้อัตราการฟักเป็นตัวถึง 92% เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการผสมติดของน้ำเชื้อสดเท่ากับ 23.5%

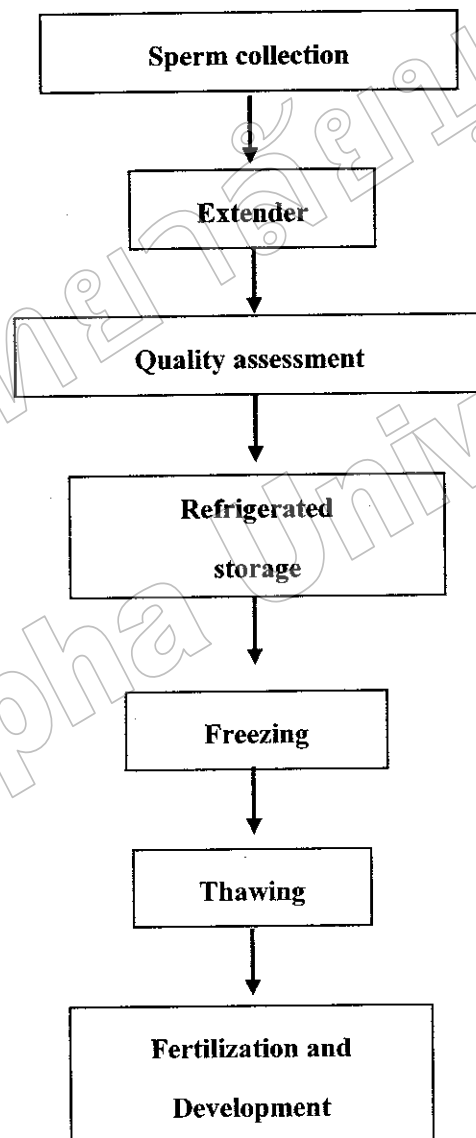
ทัศนีย์ ภูพิพัฒน์ (2532) ทำการเก็บน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว ในน้ำยา 2 สูตร คือ 0.85% NaCl + 7.5% milk powder และ 0.85% NaCl + 10% milk powder อัตราส่วนน้ำยาต่อน้ำเชื้อเป็น 3 : 1 เก็บไว้ในหลอดทดลอง (test-tube) ที่อุณหภูมิ 5-10 องศาเซลเซียส ในตู้เย็นนาน 53 ชั่วโมง พบว่าน้ำเชื้อในน้ำยาสูตรที่ 1 มี motility rate = 3, motile sperm = 50% และอัตราการผสมเท่ากับ 40.57% น้ำเชื้อในน้ำยาสูตรที่ 2 มี motility rate = 2, motile sperm = 40% และอัตราการผสมเท่ากับ 4.8% ส่วนน้ำเชื้อสดมีอัตราการผสมเท่ากับ 43.85% และสำหรับน้ำเชื้อปลาสร้อย ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยน้ำยาสูตรดังกล่าวและมีส่วนผสมของ methanol ร่วมด้วย เมื่อครบ 72 ชั่วโมง

น้ำเชื้อที่เก็บในน้ำยาสูตรที่ 1 มี motility rate = 5-6, motile sperm = 60% ในสูตรที่ 2 มี motility rate = 5-6, motile sperm = 50% และภายหลังการเก็บนาน 7 วันน้ำเชื้อที่เก็บในน้ำยาทั้ง 2 สูตรมี motility rate = 3-4, motile sperm = 40% แต่เมื่อนำมาทดสอบอัตราการผสมกับไข่สด เพอร์เซ็นต์การฟักเท่ากับศูนย์ทั้ง 2 สูตร ขณะที่น้ำเชื้อสดเท่ากับ 15.13% ทั้งนี้อาจมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในน้ำเชื้อที่เก็บในน้ำยาดังกล่าว

อนงกรณ์ หัมพานนท์ & กฤษณ์ มงคลปัญญา (2538 ข) ทดลองเก็บน้ำเชื้อปลาชเวตในตู้เย็น 0-6 องศาเซลเซียส ในการทดลองที่ 1 ใช้น้ำยาในกลุ่ม bicarbonate หรือ modified bicarbonate buffer, น้ำเกลือ (0.8% NaCl) frog Ringer's solution (FRS) และ calcium-free Hanks' balance salt solution (C-F HBSS) รวม 8 สูตร การทดลองที่ 2 ใช้น้ำยา 15 สูตร ซึ่งได้จากการปรับแรงดันออสโมติก และ pH ของน้ำยาจากการทดลองที่ 1 ให้มีแรงดันออสโมติกประมาณ 300 mOsm และ pH เท่ากับ 7.0 จำนวน 10 สูตร และที่คัดเลือกจากการทดลองที่ 1 อีก 5 สูตร แล้วนำน้ำเชื้อที่เก็บรักษาตรวจดูเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวและอัตราการปฏิสนธิ การทดลองที่ 1 พบว่า ภายหลัง 6, 78 และ 150 ชั่วโมง ใน 0.8% NaCl (268 mOsm / kg, pH 6.0) น้ำเชื้อมีคุณภาพดีที่สุดคือ มีอสุจิเคลื่อนไหว 76.7%, 26.7% และ 2.0% และมีอัตราการปฏิสนธิ 68.0%, 51.7% และ 27.1% ตามลำดับ ในการทดลองที่ 2 น้ำยาที่ปรับสูตรแล้วสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ดีกว่าน้ำยาที่ไม่ปรับสูตร และพบว่า 0.85% NaCl (282 mOsm/kg, pH 7.0) เก็บรักษาน้ำเชื้อได้ดีที่สุด ภายหลัง 78 และ 150 ชั่วโมง มีอสุจิเคลื่อนไหว 70.0% และ 36.7% และอัตราการปฏิสนธิ 59.1% และ 45.7% ตามลำดับ สรุปว่าน้ำยาที่ใช้ได้ประหยัดและเตรียมง่าย คือ น้ำเกลือ 0.85% โดยเก็บได้นานถึง 6 วัน ยังมีอัตราการปฏิสนธิ 46% และจากการวิเคราะห์ผลการทดลองพบว่า น้ำยาเจือจางกลุ่มที่มี NaCl เป็นองค์ประกอบ สามารถรักษาระดับอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิและอัตราการปฏิสนธิสูงกว่ากลุ่ม bicarbonate หรือ modified bicarbonate buffer ดังนั้นฐานว่าน่าจะเป็นเพราะความเป็นพิษของ potassium ion ในสูตรน้ำยาที่มี KHCO_3 และ KCl อย่างไรก็ตามข้ออื่น ๆ อาจมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อได้เช่นกัน การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไน ในระยะสั้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิและอัตราการผสมกับไข่จะสูงในวันที่ 1 และ 2 และจะลดลงเรื่อย ๆ จนเป็นศูนย์ หลังจากเก็บรักษา 6-8 วัน แต่เมื่อเติมสารปฏิชีวนะ (50 $\mu\text{g}/\text{mg}$ streptomycin + 50 IU bipennicillin) ในน้ำยา พบว่าในการเก็บรักษา 8 วัน อสุจิยังมีการเคลื่อนไหว 100% เมื่อเก็บรักษานานถึง 16 วัน ยังมีอัตราการผสมถึง 20% (Saad et al., 1988)

นิตา ไชยรักษ์ (2539) ทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาอุกอุยที่เจือจาง(1:6) ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 0-6 องศาเซลเซียส นาน 3 และ 6 วัน พบว่าน้ำยา 0.85% NaCl (282 mOsm /kg, pH 7.0) และ modified cortland's # 1 (292 mOsm/kg, pH 7.0) สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ดี

3.2.2 การเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน (long-term storage) โดยการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง (cryopreservation) มีประโยชน์ดังได้กล่าวไว้ในบทนำ รายละเอียดและขั้นตอนการเก็บน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งมีขั้นตอนดังนี้



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง (Tiersch, 2000)

3.2.2.1 การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อปลาสวาย (sperm collection) เพื่อใช้ในการผสมเทียมหรือเพื่อการเก็บรักษาแบบแช่แข็งนั้นไม่มีปัญหาเรื่องความพร้อมของพ่อพันธุ์ อย่างไรก็ตามหากต้องการปริมาณน้ำเชื้อมาก ๆ จากปลาเพียงไม่กี่ตัว อาจจำเป็นต้องมีการฉีดฮอร์โมนกระตุ้น วิธีการเพาะพันธุ์ปลาสวายมีผู้ศึกษาและตีพิมพ์เผยแพร่ไว้มากมาย เช่น อุทัยรัตน์ ณ นคร(2538) และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2536) เป็นต้น

สำหรับการรีดน้ำเชื้อ โดยทั่วไปนิยมรีดด้วยมือ โดยใช้มือบีบหรือกดรีดส่วนท้องของปลา สำหรับภาชนะที่ใช้รองรับน้ำเชื้อต้องสะอาดและแห้งให้แห้ง และควรเป็นภาชนะที่มีขีดบอกปริมาตรเพื่อสะดวกในการอ่านและบันทึกปริมาตรทันทีภายหลังจากการรีดน้ำเชื้อแล้ว (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

3.2.2.2 น้ำยาที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลา (extender) มีผู้คิดสูตรน้ำยาที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลาไว้มากมาย ส่วนประกอบทางเคมีของน้ำยาเหล่านี้มีคุณสมบัติที่สำคัญ คือมีคุณสมบัติเป็น isotonic กับน้ำเชื้อ มี buffer เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งเกิดจาก metabolite ของตัวอสุจิ มีอาหาร (nutrient) เพื่อเป็นแหล่งพลังงาน และอ็อกซิเจนบางตัวทำหน้าที่ต้านหรือทำลายพิษจากของเสียที่ขับถ่ายออกมาจากเซลล์ หรือมียาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ และมี protective agent เพื่อป้องกันความเสียหายของเซลล์อสุจิในขบวนการแช่แข็งและการทำละลาย (Bearden & Fuquary 1980 อ้างถึงใน นลินี มารคมณ, 2527) หากสามารถคิดสูตรของน้ำยาเจือจางได้เหมาะสมดังกล่าวแล้ว จะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาได้นานหลายเดือน เช่น extender ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) และปลา yellow perch (*Perca flavescens*) (Billard, 1986, 1992; Ciereszko et al., 1998 อ้างถึงใน Ciereszko et al., 2000)

3.2.2.3 การเก็บรักษาแบบแช่เย็น (refrigerated storage หรือ short-term storage) ตัวอย่างน้ำเชื้อที่ใช้ในการทดลองต้องได้รับการรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในน้ำแข็งหรือตู้เย็นและควบคุมไม่ให้น้ำเชื้อแข็งตัว โดยผสมน้ำเชื้อกับ extender ในอัตราส่วนต่าง ๆ และบรรจุลงในภาชนะ ภาชนะที่บรรจุน้ำเชื้อควรมีลักษณะที่เป็นภาชนะทรงตัน มีฝาปิด และมีออกซิเจนเพียงพอต่อตัวอสุจิขณะทำการเก็บรักษาและทำการตรวจสอบดูไม่ให้น้ำเชื้อนอนกัน อันเป็นสาเหตุให้เซลล์ที่อยู่ข้างล่างไม่ได้รับออกซิเจนอย่างพอเพียง จึงต้องทำการเขย่าเบา ๆ ทุกวัน (Wayman & Tiersch, 2000)

3.2.2.4 การแช่แข็ง (freezing) ภายหลังจากการตรวจสอบด้วยวิธีการเก็บรักษาแบบแช่เย็นแล้ว ก็จะเข้าสู่การทำน้ำเชื้อแช่แข็ง ซึ่งมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายปัจจัย ดังนี้

3.2.2.4.1 สารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) เป็นสารเคมีที่ป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อเสียหายในระหว่างการแช่แข็งและการทำให้ละลาย (freezing and thawing) เนื่องจากการแข็งตัวของน้ำภายในและภายนอกเซลล์ ทำให้เสียคุณสมบัติ permeability ของเยื่อหุ้มเซลล์ ความเป็นกรด-ด่างจะเปลี่ยนแปลงไป คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของไครโอโพรเทคแทนท์จะต้องมีคุณสมบัติในการละลายน้ำและความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 คือ ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ (permeating cryoprotectant) ได้แก่ DMSO, glycerol, methanol, ethanol propylene glycol และ 1-2 propanediol เป็นต้น สารเคมีเหล่านี้จำเป็นต้องซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายไม่ให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งขณะแช่แข็งหากพิจารณาถึงความสามารถในการแพร่เข้าสู่ภายในเซลล์ alcohol มีอัตราการแพร่สูงสุด รองลงมาได้แก่ DMSO และ glycerol ตามลำดับสารเหล่านี้มีข้อเสียประการหนึ่งคือ เป็นพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ (เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, 2541) ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งโดยทั่วไปนิยมใช้ DMSO, glycerol และ ethylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ คิดเป็น 98, 50 และ 29 เปอร์เซ็นต์ของรายงาน ตามลำดับ (Tiersch, 2000) โดยที่ glycerol เป็นสารเคมีชนิดแรกที่น่ามาใช้เพื่อวัตถุประสงค์ดังกล่าว การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็ง พบว่า DMSO ให้ผลการเก็บรักษาดีที่สุด เช่นการทดลองของ นลินี มารคแมน (2527), Mongkonpunya et al., (2000) และ นิสา ไชยรักษ์ (2539) และระดับความเข้มข้นของที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 8-12% (นิสา ไชยรักษ์, 2539) อย่างไรก็ตามการใช้แอลกอฮอล์ เช่น methanol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์เป็นเรื่องที่น่าสนใจอย่างยิ่ง เพราะเป็นสารเคมีที่หาง่ายและราคาถูก การทดลองใช้แอลกอฮอล์ร่วมกับนมผง (15%) เพียงอย่างเดียว นำมาใช้ในการแช่แข็งทำให้น่าสนใจอย่างยิ่ง (Harvey & Kelly, 1988) และกลุ่มที่ 2 คือ ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ (nonpermeating cryoprotectant) ได้แก่ polyvinyl pyrrolidone (PVP), hydroxyethyl starch (HES), dextrans, albumin และ polyethylene glycol เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้ไม่ได้ผ่านเข้าสู่เซลล์ แต่จะใช้ร่วมกับ permeating cryoprotectant เพื่อเป็นตัวปรับแรงดันออสโมติก และทำหน้าที่เป็นไครโอโพรเทคแทนท์ร่วมกัน เช่น การทดลองของเชียร์สโกและดาบrowski (Ciereszko & Dabrowski, 1966) ในปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) พบว่าการใช้ sucrose ร่วมกับ DMSO เป็นไครโอโพรเทคแทนท์ให้ผลดีที่สุด โดยมีอัตราการฟักถึงระยะ eyestage สูงถึง 90% อย่างไรก็ตาม กลไกการทำงานของสารเหล่านี้ก็ไม่สามารถอธิบายได้ชัดเจน เพราะสารเคมีเหล่านี้มีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ต่างกัน หากพิจารณาถึงอัตราการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ พบว่าซูโครสไม่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แต่กลูโคสแพร่ผ่านได้ ส่วนแอลกอฮอล์ผ่านได้เร็วกว่า DMSO และ glycerol ตามลำดับ แต่ก็เป็นที่เข้าใจกันดีว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์เหล่านี้มีผลต่อคุณสมบัติของของเหลวทั้งภายในและภายนอกเซลล์ คือ มีผลต่อแรงดันไอ (vapor pressure) จุดเยือกแข็ง (freezing point) และปรับแรงดันออสโมติกของ

ของเหลวภายในและภายนอกเซลล์ ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าว จะช่วยให้เซลล์รอดชีวิตภายหลังการแช่แข็งได้เพราะป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ ป้องกันการลดขนาดของเซลล์ ป้องกันอันตรายอื่นเนื่องมาจากความไม่สมดุลของเกลือแร่และอิเล็กโทรไลต์ คงไว้ซึ่งคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

3.2.2.4.2 ช่วงเวลาหลังจากการผสมน้ำเชื้อกับสารป้องกันอันตรายของเซลล์ (protective agent) จากขบวนการแช่แข็งก่อนทำการแช่แข็ง (equilibration time) ในสมัยแรก ๆ ของการทดลองแนะนำว่าต้องนำหลอดบรรจุน้ำเชื้อกับ protective agent เก็บไว้ในตู้เย็นระยะหนึ่ง ซึ่งจะแตกต่างกันในแต่ละการทดลอง การทดลองส่วนใหญ่มักจะแสดงถึงความสัมพันธ์ของ equilibration time กับระดับความเข้มข้นของ glycerol เมื่อบรรจุน้ำเชื้อในหลอดเก็บน้ำเชื้อขนาด 0.5 มิลลิลิตร บางการทดลองกล่าวว่า equilibration time ในช่วงสั้นให้ผลการทดลองที่ดี บางการทดลองกับให้ผลที่ตรงกันข้าม แต่ส่วนใหญ่อ้างว่าขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่สำคัญในการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง (Ott & Horton, 1971) เป็นรายแรกที่ยกเลิกวิธีการดังกล่าว เมื่อใช้ DMSO แทนการใช้ glycerol เนื่องจาก DMSO แพร่เข้าสู่เซลล์ได้อย่างรวดเร็ว แต่ก็มีบางการทดลองยังนิยมให้มี equilibration time อยู่ ได้แก่ อนงคณ์ หัมพานนท์ & กฤษณ์ มงคลปัญญา (2538 ก) หลังจากการผสมน้ำเชื้อแล้ว นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นนาน 20 นาที ก่อนการลดอุณหภูมิ

3.2.2.4.3 ชนิดและขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อ มีหลายขนาดได้แก่ 0.25 มิลลิลิตร, 0.5 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิลิตร สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาควรใช้หลอดที่มีความจุอย่างน้อย 0.5 มิลลิลิตร ขึ้นไปเพราะต้องผสมกับไข่ปลาจำนวนมากภายหลังการละลายจึงต้องให้มีจำนวนอสุจิมากพอต่อการผสม มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดพอที่จะทำให้น้ำเชื้อได้รับการลดอุณหภูมิที่สม่ำเสมอหลอดบรรจุน้ำเชื้อนั้นมีหลายแบบ ได้แก่ หลอดฟาง (French straw) หลอดฉีดยา (ampoule) และหลอดไครโอ (cryotube) เป็นต้น ซึ่งหลอดแต่ละชนิดมีข้อดี ข้อเสียแตกต่างกันไป ผู้ใช้จึงต้องเลือกใช้ตามความเหมาะสมกับชนิดของน้ำเชื้อที่จะทำการเก็บ และวิธีการเก็บรักษา (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) นอกจากนี้บางคนใช้การเก็บน้ำเชื้อในรูปแบบ เม็ด (pellet) โดยใช้ไมโครปิเปต ดูดน้ำเชื้อที่ผสมกับ protective agent 0.2 มิลลิลิตร แล้วหยดลงบนน้ำแข็งแห้ง (dry ice) อุณหภูมิ -79 องศาเซลเซียส ที่เจาะเป็นรูทิ้งไว้จนแข็ง หลังจากนั้นนำไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส พบว่าการเก็บอสุจิแช่แข็งในรูปแบบเม็ดทำได้สะดวกและมีแนวโน้มให้อัตราการผสมดีกว่าการเก็บในหลอดพลาสติก (เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, 2541) น้ำเชื้อแช่แข็งของปลา rainbow trout โดยเก็บรักษาในรูปของ pellet ขนาด 0.1 มิลลิลิตร และนำ pellet นี้ใส่ลงในภาชนะพลาสติก (plastic vial) ก่อนจุ่มลงในไนโตรเจนเหลว (Ciereszko et al., 2000)

3.2.2.5 อัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) สำหรับอัตราการลดอุณหภูมิเพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง ยังมีความเชื่อและรายงานที่ขัดแย้งกันอยู่แต่ก็เป็นรายงานจากการทดลองในปลาต่างชนิดกันและมีวิธีการทดลองต่างกัน ปัจจัยที่สำคัญอันหนึ่งที่มีผลต่ออัตราการลดอุณหภูมิ คือ การเลือกใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อ ซึ่งมีคุณสมบัติด้วยกันหลายชนิดและหลายขนาด ได้แก่ หลอดฟาง (straw) หลอดยาฉีด (ampoule) ซึ่งมีความจุหลายขนาดได้แก่ 0.25 มิลลิลิตร 0.5 มิลลิลิตร 1 มิลลิลิตร เป็นต้น ซึ่งหลอดขนาดความจุมากหรือขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางขนาดใหญ่ เมื่อนำมาปรับใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาจะได้น้ำเชื้อที่มีการผสมดำนานขึ้นฐานว่าเกิดจากความไม่สม่ำเสมอในการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งและการเพิ่มอุณหภูมิขณะทำการละลายน้ำเชื้อหรือตัวอสุจิที่อยู่รอบ ๆ ผิวของภาชนะจะสัมผัสกับการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ขณะที่ตัวอย่างที่อยู่กลางหลอดจะมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิช้ากว่าทำให้คุณภาพน้ำเชื้อโดยรวมด้อยลง ในขณะที่ทำการลดอุณหภูมินั้น ไครโอโพรแทกแทนที่จะมีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งในการป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้นคืออัตราการลดอุณหภูมิที่จะป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์หรือให้น้อยที่สุด และอัตราการลดอุณหภูมิดังกล่าวจะต้องเป็นอัตราที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์อันเนื่องมาจากการสูญเสียน้ำและการแตกหักของสารเคมีที่เป็นตัวถูกละลายภายในเซลล์ อันตรายที่เกิดจากการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ขณะทำการแช่แข็งคือการสูญเสียน้ำ น่าจะเกิดขึ้นขณะทำการลดอุณหภูมิจาก -15 องศาเซลเซียส ถึง -50 องศาเซลเซียส เพราะหลังจากนั้นเราสามารถจุ่มหลอดบรรจุตัวอย่างลงสู่ถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสได้ทันที นอกจากนี้เทคนิคในการลดอุณหภูมิแบบสองขั้นตอน (two-step freezing) คือ ขั้นแรกลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิห้องหรือผู้เย็นลงสู่อุณหภูมิของไนโตรเจนเหลวที่เราต้องการ (ประมาณ -50 องศาเซลเซียส ถึง -120 องศาเซลเซียส) และขั้นที่ 2 ลดอุณหภูมิไปสู่อุณหภูมิของไนโตรเจนเหลวและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมินั้น (-196 องศาเซลเซียส) ซึ่งพบว่าได้ผลดีเช่นกัน (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

ปัจจุบันมีอุปกรณ์ที่ใช้ในการลดอุณหภูมิเพื่อเก็บรักษาแบบแช่แข็งที่ใช้คอมพิวเตอร์ควบคุมการลดอุณหภูมิ เช่น computerized presetting freezing unit และ programmed freezing unit เป็นต้น แต่อุปกรณ์นี้มีราคาแพงมากและเหมาะสมกับใช้ในการทดลองเท่านั้น อัตราการลดอุณหภูมิต่ำ ๆ จะมีผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิและมีผลต่ออัตราการปฏิสนธิกับไข่ลดลงเล็กน้อย (Blaxter, 1953; Sneed & Clemens, 1956; Truscott & Idler, 1969 อ้างถึงใน นลินี มาร์คแมน, 2527) อัตราการลดอุณหภูมิต่ำอย่างรวดเร็วให้ผลดีกว่าการลดอุณหภูมิต่ำ ๆ เพราะจะทำให้สpermatozoa มีอัตราการรอดสูงขึ้น (Mounib et al., 1968; Mounib, 1978; Graybill & Horton, 1969; Ott & Horton, 1971a, 1971b; Stein, 1975 cited in Horton & Ott, 1976) น้ำเชื้อ

แช่แข็งของปลากลุ่ม salmon ที่เก็บรักษาในรูป pellet ที่มีขนาดปริมาตร 50-200 ไมโครลิตร (μ l) พบว่ามีอัตราการฟักที่สูงทั้ง ๆ ที่มีอัตราการลดอุณหภูมิแตกต่างกัน (50.3-29.9 องศาเซลเซียส/นาทีก) (Ohta et al., 1995)

3.2.2.5 อัตราการละลาย (thawing rate) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายน้ำแข็งขึ้นกับอัตราการแช่แข็ง ความเข้มข้นของไครโอโพรเทคแทนท์ องค์ประกอบของน้ำยาที่ใช้เจือจาง และ equilibration time โดยทั่วไปจะทำการละลายน้ำแข็งโดยแช่น้ำที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส หรือทำการละลายโดยการอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 32-38 องศาเซลเซียส (Bearden & Fuguan, 1980; Mounib, 1978; Horton & Ott, 1976; Sorensen, 1979 อ้างถึงใน นลินี มารคแมน, 2527) การเปรียบเทียบอัตราการเพิ่มอุณหภูมิที่ 0 องศาเซลเซียส/15 นาที, 5 องศาเซลเซียส/90 วินาที, 10 องศาเซลเซียส/30 วินาที และ 30 องศาเซลเซียส/15 วินาที พบว่ามีเพียงการทดลองที่ 0 องศาเซลเซียส/15 นาที ให้ผลการทดลองไม่ดี ส่วนการทดลองอื่นให้ผลเช่นเดียวกัน (Wheeler & Thorgaard, 1991) จะเห็นได้ว่าตลอดเวลาที่ผ่านมามีประมาณ 30 กว่าปี มีผู้ศึกษาพัฒนาวิธีการเก็บแช่แข็งน้ำแข็งปลาชนิดต่าง ๆ ให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด ได้แก่การทดลองของออกต์และฮอร์ตตัน (Ott & Horton, 1971) ทำการทดลองเก็บน้ำแข็งปลา chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) และ coho salmon (*O. kisutch*) แบบแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ด้วยน้ำยาที่มีส่วนผสมของ mannitol และใช้ DMSO เข้มข้น 8% ภายหลังจากการเก็บแช่แข็งนาน 7 วัน นำน้ำแข็งออกมาละลายผสมกับไข่สดให้อัตราการปฏิสนธิ 38 และ 79 % ต่อมามีการพัฒนาสูตรน้ำยาในการเก็บรักษาแบบแช่แข็งในปลา salmon และ cod (*salmo salar* และ *Gadus morhua*) ซึ่งน้ำยาดังกล่าวประกอบด้วย KHCO_3 , sucrose และ reduced glutathione และใช้ 12.5% DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ สามารถเก็บรักษาน้ำแข็งได้ดี คือ มีอัตราการปฏิสนธิเป็น 80% และ 59% ในปลา salmon และ cod ตามลำดับ (Mounib, 1978)

นลินี มารคแมน (2527) ทดลองเก็บน้ำแข็งปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus* Bleeker) โดยใช้ KHCO_3 125 mM, sucrose 250 mM กับ reduced glutathione 9.75 mM ร่วมกับ DMSO 8% หรือ 12% ภายหลังจากแช่แข็งนาน 2, 3 และ 18 วัน พบว่าวิธีการแช่แข็งที่ใช้ในการทดลองนี้ ไม่ก่อให้เกิดความแตกต่างของคุณภาพน้ำแข็งปลา แต่มีแนวโน้มว่าวิธีการลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ ให้ผลดีกว่าการลดอุณหภูมิตั้งแต่เร็วและน้ำแข็งที่เก็บใน 8% DMSO มีเปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวสูงกว่าน้ำแข็งที่เก็บใน 12% DMSO กล่าวคือ เปอร์เซ็นต์อสุจิมีชีวิตเท่ากับ 29.9% และ 21.55% ส่วนเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวเท่ากับ 32.4% และ 23.52% สำหรับ 8% DMSO และ 12% DMSO ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการเติม caffeine

0.5 mM ในอัตรา caffeine 1 ส่วน ค่อน้ำเชื้อ 1 ส่วน ภายหลังการละลายหลังการเก็บ 24 ชั่วโมงมีผลให้ตัวอสุจิมิ motility rate เพิ่มขึ้น

ทัศนีย์ ภูพิพัฒน์ และคณะ (2529) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพา (*Pangasius sanithwongsei* Smith) และปลาบึก (*Pangasianodon gigas* Chevry) ด้วยน้ำยา 5 สูตร โดยเก็บไว้ในหลอดฟาง ผลการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อปลาเทพาแช่แข็ง 5 วัน น้ำเชื้อที่เก็บในน้ำยาสูตรที่ 1 ซึ่งมีส่วนผสมของ 125 mM KHCO_3 , 250 mM sucrose, 9.75 mM glutathione และ DMSO 8% ให้คุณภาพน้ำเชื้อดีที่สุด โดยมีอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิ 70% และอัตราการผสม (ภายหลังการเก็บ 24 ชั่วโมง) ของน้ำยาสูตรที่ 1 ซึ่งไม่มี DMSO พบว่าอัตราการฟักสูงถึง 92% ส่วนผลการทดลองน้ำเชื้อแช่แข็งปลาบึก ด้วยน้ำยาสูตรที่ 1 เพื่อเปรียบเทียบวิธีการลดอุณหภูมิโดยวิธีแช่หลอดฟางในไอไนโตรเจน กับวิธีบรรจุหลอดฟางในหลอดแก้วก่อนแช่ในไอไนโตรเจน พบว่าทั้ง 2 วิธีมีอัตราการฟักออกมาเป็นตัวสูงถึง 31% ทั้ง 2 วิธี

อนงค์ หัมพานนท์ & กฤษณ์ มงคลปัญญา (2538 ก) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสาวยในอัตราส่วนน้ำเชื้อค่อน้ำยา เท่ากับ 1:3 ในน้ำเกลือ 0.85% NaCl หรือ calcium-free Hanks' balanced salt solution (C-F HBSS) ซึ่งมี DMSO 8, 10 หรือ 12% และเก็บไว้ในตู้เย็นนาน 20 นาที ก่อนการลดอุณหภูมิ -10, -20, หรือ -30 องศาเซลเซียส/นาที ถึง -80 องศาเซลเซียส แล้วเก็บในไนโตรเจนเหลว 7 วัน เมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่ 50 หรือ 70 องศาเซลเซียส พบว่าทั้ง 2 สูตรน้ำยามีเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวและอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน

นিকা ไชยรักษ์ (2539) เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาอุกอุยที่เจือจาง 1:6 ด้วยน้ำยาสูตรต่าง ๆ พบว่าน้ำยาสูตร 0.85% NaCl (282 mOsm/kg, pH 7.0) และ modified cortland's # 1 (MC # 1-2, 292 mOsm/kg pH 7.0) สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ดี

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน (2541) ผลการศึกษาการผลิตและปรับปรุงพันธุ์ปลาจากน้ำเชื้อแช่แข็งในปลา brown trout ปลาไน ปลาบึก ปลาเทพา ปลากะโห้ และปลาดุกรัสเซีย ผลการศึกษา 1) ปลา brown trout สารประกอบที่เหมาะสมในการเก็บอสุจิแช่แข็งที่ให้อัตราการผสมดีที่สุด ประกอบด้วย NaCl 750 mg, glucose 5,400 mg และ DMSO 10% ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ให้อัตราการผสม 33-59% การแช่แข็งในรูปแบบนี้ใช้ได้สะดวกและอัตราการผสมดีกว่าในรูปแบบหลอดฟาง การละลายเพื่อการผสมเทียมไม่ควรเกิน 10 วินาที 2) ปลาไน สารประกอบที่มีความเข้มข้นมากกว่า 1,200 mOsm/kg มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่และอัตราการผสมของน้ำเชื้อ 3) ปลาบึก การใช้ DMSO ในการแช่แข็งไม่ควรเกิน 10% อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารประกอบควรเป็น 1:2 และ 4) ปลาเทพา สารประกอบที่เหมาะสมประกอบด้วย NaCl 750 mg, KCl 38 mg, glucose 100 mg และ DMSO 10% ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

4. การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลา สามารถบอกความสมบูรณ์ของน้ำเชื้อที่จะนำมาเพาะพันธุ์ โดยมีวิธีการประเมิน 5 วิธีดังนี้

4.1 ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ ควรสังเกตทันทีหลังจากรีดน้ำเชื้อออกมา โดยดูสี ความเข้มข้น ปริมาตร และสิ่งเจือปนอื่น ๆ น้ำเชื้อที่ดีควรมีสีขาวขุ่น และไม่มีสิ่งอื่นเจือปน (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

4.2 การนับจำนวนอสุจิต่อหน่วยปริมาตร (sperm concentration) ปฏิบัติเฉพาะน้ำเชื้อสด เพื่อให้ทราบจำนวนอสุจีก่อนดำเนินการในเรื่องอื่น ๆ ต่อไป โดยเจือจางน้ำเชื้อสดด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1 ต่อ 9 เขย่าและตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาทีเพื่อให้อสุจิตาย เขย่าให้ทั่ว ใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วใส่อุปกรณ์สำหรับนับเม็ดโลหิตแดง (RBC counting chamber หรือ haemocytometer) ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วนำมานับจำนวนอสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400x (อนงคณ หัมพานนท์ & กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2538 ข)

4.3 การตรวจเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว (percentage of motile sperm) มีวิธีการทำดังนี้

4.3.1 หยดน้ำเชื้อหนึ่งหยดลงบนสไลด์ ใกล้กับหยดน้ำ แล้วใช้กระจกปิดสไลด์ ปิดกระจายน้ำเชื้อ

4.3.2 สังเกตตรงกลางน้ำเชื้อเพื่อดูคลื่นที่เกิดจากการว่ายน้ำของอสุจิและการเคลื่อนไหวของอสุจิ

4.3.3 กำหนดอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิเป็นระบบตัวเลข 0-5 ดังนี้

0 = ไม่มีการเคลื่อนไหว

1 = (poor) มีการเคลื่อนไหวน้อยกว่า 30% และเคลื่อนไหวช้า

2 = (fair) อสุจิ 20-30% เคลื่อนไหวแข็งแรงแต่ไม่สังเกตเห็นคลื่น

3 = (good) อสุจิ 50-70% เคลื่อนไหวแข็งแรงและสังเกตเห็นชัด

4 = (very good) อสุจิ 70-80% เคลื่อนไหวแข็งแรงและมีคลื่นน้อยกว่า 5%

5 = (excellent) อสุจิ 80% ขึ้นไป เคลื่อนไหวอย่างรวดเร็วและมีคลื่นรวมชัดเจน

(วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536) แต่การทดลองของเกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน (2540) ทำการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลา brown trout ภายใต้น้ำกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100x โดยดูการเคลื่อนที่ของอสุจิทั้งหมด และระยะเวลาการเคลื่อนที่เมื่ออสุจิถูกกับน้ำ โดยแบ่งเกณฑ์การประเมินออกเป็น 10 ระดับ ดังนี้

ระดับที่	ปริมาณอสุจิเคลื่อนที่
1	0 < 10 %
2	10 < 20 %
3	20 < 30 %
4	30 < 40 %
5	40 < 50 %
6	50 < 60 %
7	60 < 70 %
8	70 < 80 %
9	80 < 90 %
10	90 < 100 %

การใช้เกณฑ์การตรวจเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อของบางการทดลอง กลับมีเปอร์เซ็นต์การผสมติดไม่สอดคล้องกับเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหว เช่น กลาวด์ (Cloud, 2000) อ้างถึงผลการทดลองในปลาสเตอร์เจียนของตนเองซึ่งไม่ได้ตีพิมพ์ ว่าในการทดลองนั้นมีเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหวสูงเกิน 50% แต่ไม่มีการผสมติดเลย ดังนั้นจึงควรใช้วิธีการประเมินอื่นร่วมด้วย

4.4 การย้อมสีตัวเป็นตัวยาย (live-dead stain) เพื่อหาเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตและอสุจิที่ผิดปกติ (percentage of viable and abnormal sperm) ในการย้อมสี ตัวเป็น-ตัวยาย ของน้ำเชื้อปลา ไม่พบว่ามีผู้ทำการทดลองมาก่อน อย่างไรก็ตามมีการปรับปรุงเทคนิคการย้อมและสีย้อมตามวิธีที่ใช้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (นลินี มารคแมน, 2527) ที่นิยมใช้คือ eosin-nigrosin โดยที่ eosin เป็นสีพิเศษที่ไม่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของอสุจิที่มีชีวิต แต่สามารถผ่านเข้าไปในอสุจิที่ตายแล้วให้เห็นเป็นสีชมพูหรือม่วง ส่วน nigrosin จะทำให้ background ดิบดำเข้ม จึงทำให้สามารถเห็นอสุจิที่มีชีวิต ซึ่งไม่ติดสีได้ชัดเจน (Sorensen, 1979; Bearden & Fuguay, 1980 อ้างถึงใน นลินี มารคแมน, 2527)

4.5 การตรวจสอบอัตราการปฏิสนธิ (fertilization ability) โดยการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์ผสมติด โดยผสมน้ำเชื้อกับไข่สด วิธีนี้จะให้ผลแน่นอนและแม่นยำกว่าการตรวจคุณภาพวิธีอื่น แต่ต้องใช้เวลา (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538) และเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อปลา แข่งขันกันแพร่หลาย ในบางการทดลองที่ไม่สามารถหาไข่ปลาชนิดเดียวกันมาทำการทดสอบน้ำเชื้อได้ อาจใช้ไข่ปลาจากแม่ปลาชนิดอื่นมาทำการผสม เพื่อดูอัตราการผสมติดได้ แต่ผลที่ได้อาจแตกต่างหรือไม่แตกต่างกับการผสมด้วยไข่จากปลาชนิดเดียวกัน เช่น การทดลองของ

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน (2540) ใช้ไข่ปลาสวายผสมกับน้ำเชื้อปลาบึกแช่แข็งเนื่องจากไม่สามารถหาแม่ปลาบึกได้ อาจทำให้มีอัตราการผสมลดลง

โดยทั่วไปการเพาะพันธุ์ปลา นิยมหาอัตราการปฏิสนธิ เมื่อไข่ปลาพัฒนาถึงระยะบลาสโตพอร์ปิด เพราะสามารถทราบความแตกต่างของไข่ดีและไข่เสียได้ชัดเจน ไข่เสียจะกลายเป็นสีขาวขุ่น (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

ทดสอบอัตราส่วนที่เหมาะสมของน้ำเชื้อกับไข่ของปลา channel catfish อัตราส่วนที่เหมาะสม คือ 1.25×10^5 ต่อไข่ 1 ฟอง (Bart & Dunham, 1996)

สำหรับปลานิลควรใช้อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อไข่เท่ากับ $1.40 \times 10^5:1$ ต่อการฟักไข่ครั้งละ 500 ฟอง มีอัตราการปฏิสนธิ 93% (Rana & McAndrew, 1987)

อนงค์ หัมพานนท์ & กฤษณ์ มงคลปัญญา (2538 ข) น้ำเชื้อสดของปลาสวายมีจำนวนอสุจิ 7.6×10^{10} ตัว/มิลลิลิตร อัตราส่วนน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งต่อไข่ปลาคูงูเท่ากับ 9.5×10^6 ตัวต่อ 1 ฟอง