รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยปริมาณมาก เพื่อการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์

Development of sperm cryopreservation technology of walking catfish (*Clarias macrocephalus*) at large scale for aquaculture and conservation

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย
สุบัณฑิต นิ่มรัตน์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 256101A1080051
สัญญาเลขที่ 38/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยปริมาณมาก เพื่อการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์

Development of sperm cryopreservation technology of walking catfish (*Clarias macrocephalus*) at large scale for aquaculture and conservation

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[1]
สุบัณฑิต นิ่มรัตน์[2]

[1]**ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา**
[2]**ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา**

กุมภาพันธ์ 2562

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยปริมาณมากเพื่อการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์ สำเร็จเรียบร้อยลงได้ โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 38/2561 ขอขอบคุณ คุณปฏิญญา อ้นขวัญเมือง ที่ช่วยในการดูแลปลาทดลองและแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย

บทคัดย่อ

งานวิจัยเรื่อง การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยปริมาณมากเพื่อการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์ ทำการศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วยการใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติเปรียบเทียบกับการแช่แข็งอย่างง่ายในกล่องโฟม เพื่อสามารถแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งให้มีคุณภาพดี เริ่มจากนำน้ำเชื้อปลาดุกอุยคุณภาพดีมาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Calcium-free Hank's Balanced Salt Solution (Ca-F HBSS) ที่ผสมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ 6 ชนิด คือ Dimethyl sulfoxide (DMSO), Methanol, Glycerol, Sucrose, Ethylene glycol และ Propylene ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5, 10 และ 15 % และแช่แข็งน้ำเชื้อในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -8 องศาเซลเซียส/นาที ก่อนการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) พบว่า การแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยการใช้ DMSO ที่ความเข้มข้น 10% และใช้อัตราการลดอุณหภูมิ-8 องศาเซลเซียส/นาที ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูงที่สุด การศึกษาผลของชนิดสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีต่อการแช่แข็ง โดยเจือจางน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วยสารละลาย 3 ชนิด (Ca-F HBSS, 0.9% NaCl และ extender 7) ที่มี 10% DMSO เมื่อนำมาแช่แข็งในหลอด cryovial ขนาด 1.8 มิลลิลิตรด้วยไอไนโตรเจนเหลวที่ระดับความสูง 2, 4 และ 6 เซนติเมตร เป็นเวลา 5, 10 และ 15 นาที พบว่าน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่แช่แข็งด้วย Ca-F HBSS ที่ความสูง 6 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว นาน 10 นาที มีค่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูงกว่าน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยสารละลาย 0.9% หรือ Extender 7 การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วยการใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ และการแช่แข็งอย่างง่ายในกล่องโฟม โดยเจือจางน้ำเชื้อด้วย Ca-F HBSS ที่มี 10% DMSO แล้วนำไปแช่แข็งในหลอด 3 ขนาด (หลอดฟาง 0.25 และ 0.5 มิลลิลิตร และหลอด cryovial 1.25 มิลลิลิตรด้วยรูปแบบการลดอุณหภูมิแตกต่างกัน พบว่า การลดอุณหภูมิที่ระดับการลดอุณหภูมิ -8 องศาเซลเซียส/นาทีเมื่อใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ หรือแช่แข็งความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร นาน 10 นาทีในกล่องโฟม ทำให้น้ำเชื้อในหลอดทั้ง 3 ขนาดหลังการแช่แข็งมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูงกว่ารูปแบบการลดอุณหภูมิอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ยกเว้นน้ำเชื้อในหลอดฟางขนาด 0.5 มิลลิลิตรที่แช่แข็งเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยอย่างง่ายภายในกล่องโฟม ช่วยลดต้นทุนการแช่แข็ง ทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน ใช้ระยะเวลาไม่นาน ซึ่งควรพัฒนาศักยภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อให้ได้ปริมาณมากขึ้นเพื่อประโยชน์ในการประยุกต์ใช้

คำสำคัญ: การแช่แข็ง, น้ำเชื้อ, คุณภาพสเปิร์ม, การผสมเทียม, ปลาดุกอุย

ABSTRACT

The research project entitled “Development of sperm cryopreservation technology of walking catfish (*Clarias macrocephalus*) at large scale for aquaculture and conservation” was aimed to evaluate cryopreservation protocols of *C. macrocephalus* semen that resulted in good post-thawed sperm quality, based on using programmable freezer and Styrofoam box. Semen diluted in Calcium-free Hank’s balanced salt solution (Ca-F HBSS) containing different cryoprotectants (Dimethyl sulfoxide; DMSO, methanol, glycerol, sucrose, ethylene glycol and propylene at final concentrations of 5, 10 and 15 % was frozen in 0.25 mL straws using freezing rates of -3, -5 และ -8°C/min prior to storage in liquid nitrogen tank (-196°C). Highest post-thawed sperm motilities were obtained from semen frozen with 10% DMSO using 8°C/min. Effect of sperm extender on cryopreservation of *C. macrocephalus* semen was evaluated by diluting semen containing Ca-F HBSS, 0.9% NaCl or extender 7 supplemented with 10% DMSO in 1.8 mL cryovials prior to freezing at 2, 4 and 6 cm above the surface of liquid nitrogen (LN_2) for 5, 10 and 15 min. Diluted semen in Ca-F HBSS frozen at 6 cm above LN_2 for 10 min. had higher post-thawed sperm motilities than those frozen with 0.9% NaCl or extender 7. Comparative study of *C. macrocephalus* semen frozen with programmable freezer and Styrofoam box was then performed in 0.25 and 0,5 straws and 1.25 mL cryovials by which semen diluted with Ca-F HBSS and 10% DMSO were frozen with various freezing protocols. Semen frozen in straws and cryovials either using -8°C/min or 6 cm above LN_2 for 10 min. had significantly higher ($P<0.05$) post-thawed sperm motilities than other treatments, except those in 0.5 mL straws at 6 cm above LN_2. Cryopreservation of *C. macrocephalus* semen within Styrofoam box was relatively easy to perform in which larger scale in freezing of semen volume requires further investigation.

Keywords: Cryopreservation, Semen, Sperm quality, Artificial insemination, *Clarias macrocephalus*

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		i
บทคัดย่อ		ii
Abstract		iii
สารบัญ		iv
สารบัญตาราง		v
สารบัญรูป		vi
บทที่		
1	บทนำ	1
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	11
3	วิธีดำเนินงานวิจัย	21
4	ผลการทดลอง	29
5	อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	37
เอกสารอ้างอิง		41
ผลผลิต (Output)		47
ประวัติคณะผู้วิจัย		48

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยที่แช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -8 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส	31
2	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยที่แช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส	31
3	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยที่แช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส	32
4	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยที่แช่แข็งในไอไนโตรเจนเหลวที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวในระยะเวลาต่างๆกันเมื่อใช้ 10% DMSO และสารละลายบัฟเฟอร์ต่างชนิดกัน	34
5	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยที่แช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -8, -5 และ -3 องศาเซลเซียส/นาที และมีอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส โดยใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อ 3 ขนาด	36
6	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยที่แช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลวที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2, 4 หรือ 6 เซนติเมตรโดยใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อ 3 ขนาด	36

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	พ่อพันธุ์ปลาดุกอุย.....	27
2	หลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรที่ใช้ในการทดลอง.....	27
3	เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ.....	28
4	หลอด Cryovial ขนาด 1.8 มิลลิลิตรที่ใช้ในการทดลอง.....	28

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย

เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทยมีความเจริญก้าวหน้าและพัฒนามาอย่างต่อเนื่อง ไม่ว่าจะเป็นเทคนิคการเพาะพันธุ์ การอนุบาล และการเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดต่างๆ ซึ่งได้มีการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในภาคการผลิตหลากหลายรูปแบบ ทำรายได้เข้าประเทศปีละจำนวนมาก อย่างไรก็ตามปัญหาหนึ่งที่มักเกิดขึ้นอยู่เสมอในระหว่างการเพาะพันธุ์ปลาหลายชนิดจำนวนมาก ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการผลิต มักพบว่าพ่อแม่พันธุ์ปลาที่ใช้เพาะพันธุ์มีความสมบูรณ์เพศไม่พร้อมกัน ทำให้เกิดปัญหาในด้านการจัดการเพาะพันธุ์ในโรงเพาะฟัก เช่น ในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (spawning season) พ่อพันธุ์ปลาจะมีปริมาณน้ำเชื้อ (expressible milt) ลดลง ซึ่งแม้ว่าสามารถกระตุ้นการสร้างน้ำเชื้อได้โดยการฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์กระตุ้นให้ปลาสร้างน้ำเชื้อ (spermiation) แต่กลับพบว่าแม่พันธุ์ปลามีไข่แก่น้อยมาก หรือไข่มีคุณภาพต่ำ ทำให้การเพาะพันธุ์ไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร (Nimrat and Vuthiphandchai, 2008) นอกจากนี้ในการเพาะพันธุ์ปลาหลายชนิด มักพบบ่อยครั้งที่ช่วงระยะเวลาที่สามารถรีดน้ำเชื้อหรือรวบรวมได้จากพ่อพันธุ์ปลา (sperm availability) ไม่สัมพันธ์กับช่วงระยะเวลาที่แม่พันธุ์ตกไข่ (egg availability) ซึ่งก็อาจเกิดจากสาเหตุหลายประการ ตั้งแต่พ่อพันธุ์ถูกรีดน้ำเชื้อบ่อยครั้งจนไม่สามารถผลิตน้ำเชื้อได้ทัน หรือเกิดจากสภาพความเครียด (stress) และความแปรปรวนของปลาแต่ละตัว (individual variation) ที่ผลิตน้ำเชื้อได้ต่างกัน ทำให้มีความยุ่งยากในการจัดการในระหว่างการผสมเทียมในโรงเพาะฟักเป็นอย่างมาก โดยอาจต้องใช้พ่อพันธุ์ปลาและแม่พันธุ์ปลาจำนวนมากขึ้นสำหรับการเพาะพันธุ์ (Muchlisin, 2005) อีกทั้งการใช้น้ำเชื้อปลาที่รีดออกมาใหม่ๆ (freshly collected milt) ออกจากพ่อพันธุ์ปลาเพื่อการผสมเทียม (artificial insemination) ก็มีข้อจำกัดตรงที่จะต้องใช้น้ำเชื้อสดเพื่อผสมเทียมกับไข่ทันที ไม่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้นานแม้จะเก็บน้ำเชื้อสดไว้บนน้ำแข็ง เพราะคุณภาพน้ำเชื้อปลาลดลงอย่างรวดเร็วตามระยะเวลาการเก็บรักษา ทำให้ไม่สามารถใช้น้ำเชื้อปลาในการปฏิสนธิไข่ปลาได้ (Vuthiphandchai and Zohar, 1999) อย่างไรก็ตามปัญหาการขาดแคลนน้ำเชื้อปลาที่มีคุณภาพดีเพื่อการเพาะพันธุ์ก็มีระดับความรุนแรงแตกต่างกันไปตามชนิดของปลา และสภาพการเลี้ยง แม้ว่าโดยภาพรวมช่วงระยะเวลาที่ปลามีน้ำเชื้อมักจะครอบคลุมช่วงเวลาที่แม่ปลามีไข่แก่ แต่ก็มีปลาอีกหลายชนิดที่พบว่าการขาดแคลนน้ำเชื้อปลาที่มีคุณภาพดีส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพการผลิตลูกปลา ดังนั้นการเพาะพันธุ์ปลาบางชนิดที่มีปัญหาเกี่ยวกับคุณภาพน้ำเชื้อด้วยการผสมเทียม จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาเทคนิควิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพื่อให้มีน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีพร้อมอยู่ตลอดเวลาเพื่อการผสมเทียมกับไข่ และสามารถใช้ได้สะดวกรวดเร็วครอบคลุมตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่เมื่อแม่ปลามีความพร้อมในการเพาะขยายพันธุ์เพื่อการบริหารจัดการโรงเพาะฟักอย่างมีประสิทธิภาพ แนวทางแก้ปัญหาดังกล่าวแนวทางหนึ่งสามารถทำได้อย่างมีประสิทธิภาพ ด้วยการนำน้ำเชื้อปลามาแช่แข็ง (sperm cryopreservation) ในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส และเก็บไว้ในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อปลา (sperm bank) เพราะสามารถรักษาคุณภาพน้ำเชื้อไว้ได้นานเป็นปี โดยสามารถนำน้ำเชื้อปลาที่เก็บแช่แข็ง (cryostorage) ในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อมาผสมเทียมกับไข่ปลาในภายหลังเมื่อแม่ปลามีความพร้อมในการเพาะพันธุ์ ทำให้สามารถควบคุมผลผลิตได้

ปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) จัดเป็นปลาน้ำจืดพื้นเมืองของไทย (indigenous species) และยังเป็นปลาประจำถิ่นในประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาว กัมพูชา เวียดนาม และมาเลเซีย จัดเป็นปลาไม่มีเกล็ด รูปร่างเรียวยาว มีหนวดที่ริมฝีปาก และยังจัดเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจที่มีรสชาติดี เป็นที่นิยมในการบริโภค และมีราคาจำหน่ายสูงกว่าปลาดุกชนิดอื่น ๆ เช่นดุกด้าน ดุกเทศ ดุกลำพัน เป็นต้น โดยในอดีตประมาณ 30-40 ปีที่ผ่านมามีการเลี้ยงปลาดุกอุยมากบริเวณภาคกลางเช่น ปทุมธานี สมุทรปราการ ชลบุรี เป็นต้น และในอดีตแหล่งพ่อแม่พันธุ์ปลาดุกอุยขนาดใหญ่อยู่บริเวณอำเภอบางบ่อ จังหวัดสมุทรปราการ ซึ่งผู้ประกอบการโรงเพาะฟัก (hatchery) ทั่วประเทศนิยมมาซื้อพ่อแม่พันธุ์ปลาดุกอุยไปเพาะพันธุ์ (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย 2535) แต่ในปัจจุบันนี้ปลาดุกอุยกลับถูกจัดเป็นปลาน้ำจืดที่เริ่มหาได้ยากมากในธรรมชาติ จนถูกจัดให้เป็นปลาที่อยู่ในสภาวะที่หาได้ยากและเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ สาเหตุเนื่องจากแหล่งที่อยู่อาศัยที่เหมาะสมในธรรมชาติ (suitable habitat) มีลดน้อยลงมาก เนื่องจากการขยายตัวของชุมชน ทำให้ประชากรปลาดุกอุยในธรรมชาติหาได้ยากมาก (Vidthayanon and Allen, D.J. 2013) ซึ่งการอนุรักษ์พันธุ์ปลาพื้นเมืองชนิดนี้ให้คงอยู่เป็นประโยชน์โดยตรงทั้งต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์สัตว์น้ำ อีกทั้งความนิยมในการเลี้ยงปลาดุกบิ๊กอุย ซึ่งเป็นปลาลูกผสมระหว่างแม่ปลาดุกอุย กับพ่อปลาดุกเทศ ได้ส่งผลทำให้การเลี้ยงปลาดุกอุยในบ่อดินของประเทศไทยไม่แพร่หลายเหมือนในอดีต แม้ว่าปลาดุกอุยเพศเมียจะถูกนำมาใช้ในการเพาะพันธุ์ปลาดุกบิ๊กอุยก็ตาม รวมทั้งการหลุดรอดของปลาดุกบิ๊กอุยในแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งสามารถปรับตัวและแข่งขันกับปลาท้องถิ่นหลายชนิดในการกินอาหาร (competition) และยังสามารถผสมข้ามพันธุ์กับปลาดุกอุยในธรรมชาติได้ ซึ่งจะส่งผลต่อพันธุกรรมประชากรปลา (genetic introgression) ทำให้ปลาดุกอุยในธรรมชาติอาจสูญพันธุ์ได้ (species extinction) ซึ่งต่างก็ล้วนเป็นปัจจัยที่จะทำให้ปลาดุกอุยในธรรมชาติอยู่ในภาวะถูกคุกคาม (Na-nakorn, 2004) จนทำให้ในปัจจุบันปลาดุกอุยถูกจัดให้อยู่ในสถานภาพมีแนวโน้มอยู่ในภาวะถูกคุกคาม (vulnerable) ใกล้สูญพันธุ์ (near threatened) คือประสบความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในธรรมชาติในอนาคตอันใกล้ ซึ่งสำนักนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม สำนักความหลากหลายทางชีวภาพ ได้จัดทำบัญชีฐานข้อมูลชนิดพันธุ์ที่ถูกคุกคามในประเทศไทยระบุว่าปลาดุกอุยมีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ (Vulnerable; VN) อยู่ในลำดับที่ 39 ของรายชื่อชนิดพันธุ์ปลาในประเทศไทยที่ถูกคุกคาม ในรายงานของ Development of Conservation and Protection Mechanism on Red Data of Thailand Project ที่ได้รับการสนับสนุนจาก UNDP และ International Union for Conservation of Nature (IUCN) (Vidthayanon, 2005)

ด้วยเหตุที่ปลาดุกอุยโตช้าและมีความต้านทานโรคต่ำ ทำให้ภาคการผลิตมีการพัฒนาการผลิตปลาดุกเชิงพาณิชย์ โดยการผสมเทียมข้ามสายพันธุ์ระหว่างปลาดุกเทศ (*Clarias gariepinus*) เพศผู้กับปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) เพศเมีย ทำให้ได้ลูกปลาดุกพันธุ์ผสมที่โตเร็วและมีความต้านทานโรคสูง มีชื่อเรียกว่า ปลาดุกบิ๊กอุย (hybrid catfish) ซึ่งเป็นที่นิยมอย่างแพร่หลายในการเพาะเลี้ยงทั่วประเทศในขณะนี้ตามที่กล่าวมาแล้ว ส่งผลให้การเพาะเลี้ยงปลาดุกอุยเป็นการค้ากลับมีลดลงน้อยมาก ซึ่งในปัจจุบันแหล่งพ่อแม่พันธุ์ปลาดุกอุย กลับไปพบในบางจังหวัดทางภาคอีสานเท่านั้น มิได้พบมากในบริเวณจังหวัดภาคกลางแบบแต่ก่อน โดยที่มากกว่า 90% ของผู้เพาะเลี้ยงปลาดุกในบ่อดินขณะนี้ เป็นปลาดุกลูกผสม หรือปลาดุกบิ๊กอุย (Department of Fisheries, 2011) สถานการณ์ดังกล่าวของปลาดุกอุยอาจส่งผลกระทบต่อการเลี้ยงและการดำรงพันธุ์ของปลาชนิดนี้ ซึ่งเป็นปลาพื้นเมืองของประเทศไทย เพราะในภาคการผลิตผู้ประกอบการสนใจแต่นำแม่พันธุ์ปลาดุกอุย

ไปผสมข้ามพันธุ์กับพ่อพันธุ์ปลาดุกเทศ เพื่อให้ได้ปลาบิ๊กอุยตามที่กล่าวมาแล้ว ทำให้การพัฒนาสายพันธุ์ปลาดุกอุยถูกละเลย แม้ว่ายังคงมีการเลี้ยงปลาดุกอุยในเฉพาะบางพื้นที่ ซึ่งในการเลี้ยงปลาดุกอุยก็มีทั้งเพศผู้และเพศเมียอยู่ตามปกติ แต่ด้วยแม่พันธุ์ปลาดุกอุยที่มีราคาสูงถึงกิโลกรัมละ 250-300 บาท/กิโลกรัม (นิพนธ อุปการัตน และคณะ, 2556) และความต้องการที่มีเฉพาะปลาดุกอุยเพศเมียเท่านั้นเพื่อนำมาใช้ผลิตลูกปลาดุกบิ๊กอุย ทำให้การพัฒนาสายพันธุ์ปลาดุกอุยที่ดีมีน้อยลง เพราะมุ่งแต่เน้นผลิตปลาบิ๊กอุย รวมทั้งยังมีการปล่อยลูกปลาดุกอุยลงในแหล่งน้ำธรรมชาติน้อยลง ไม่เหมือนการปล่อยปลากินพืชหรือปลากินพืชและเนื้อชนิดอื่นๆที่มีมากกว่า ทำให้โอกาสที่ปลาดุกอุยมีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในธรรมชาติเพิ่มมากขึ้น อย่างไรก็ตามโดยทางทฤษฎีแล้วการเลี้ยงขุนพ่อแม่พันธุ์ปลาชนิดใดก็ตามในบ่อดิน (domestigation program) ต่างก็ต้องใช้พ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพดีทั้งสิ้นเพื่อการเพาะขยายพันธุ์ ทำให้ต้องให้ความสำคัญกับพ่อและแม่พันธุ์ปลาเท่าเทียมกัน เพราะถ้าพ่อพันธุ์ปลาไม่ดี ก็จะได้ลูกพันธุ์ปลา (offspring) ซึ่งก็มีทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ไม่ดีออกตามมาด้วยเช่นกัน ซึ่งในอนาคตลูกปลาเหล่านั้นจะต้องถูกเลี้ยงขุนให้กลายเป็นพ่อแม่พันธุ์ (broodstock) ในรุ่นต่อไป และจะเป็นพ่อแม่พันธุ์ที่ไม่ดีเช่นกัน ดังนั้นวัฏจักรการเพาะพันธุ์ปลาดุกอุยจึงต้องพิจารณาในมิติในการบริหารจัดการพ่อพันธุ์ปลาดุกอุยสายพันธุ์ที่ดีให้คงอยู่ เพื่อประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์สัตว์น้ำ มิใช่สนใจแต่นำแม่พันธุ์ปลาดุกอุยไปผสมข้ามพันธุ์กับพ่อพันธุ์ปลาดุกเทศเท่านั้น เพื่อให้อุตสาหกรรมการผลิตปลาดุกของประเทศได้มีการพัฒนาและมีความยั่งยืนเป็นแหล่งอาหารโปรตีนต่อไป

ด้วยเหตุที่ปลาดุกอุยเป็นปลาพื้นเมืองของไทยที่มีราคาสูง มีความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ในธรรมชาติ ประกอบกับในปัจจุบันขนาดของการเลี้ยงปลาดุกอุยเพื่อบริโภคมีค่อนข้างน้อยมาก เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดการเลี้ยงปลาดุกบิ๊กอุย ซึ่งยังต้องใช้แม่ปลาดุกอุยในการผลิตปลาดุกบิ๊กอุย จึงต้องรักษาพันธุกรรมปลาดุกอุยที่ดีให้คงอยู่สำหรับการผลิตปลาดุกบิ๊กอุย โดยผลผลิตของปลาดุกของฟาร์มเลี้ยงสัตว์น้ำจืดทั้งประเทศไทยในปี พ.ศ. 2552 ที่เลี้ยงในบ่อ นา ร่องสวน และกระชัง มีปริมาณรวม 122,999.58 ตัน และมูลค่ารวม 4,959,019.76 บาท เป็นอันดับ 2 รองจากผลผลิตปลานิล (กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง, 2554) อีกทั้งปลาดุกอุยยังคงมีศักยภาพในการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ให้แพร่หลายเหมือนเดิม จึงมีความจำเป็นที่ต้องรักษาสายพันธุ์พ่อพันธุ์ปลาดุกอุยที่ดีให้คงอยู่ เพื่อนำมาใช้ผสมกับแม่พันธุ์ปลาดุกอุย เพื่อให้สายพันธุ์ปลาดุกอุยที่ดีของประเทศไทยยังคงอยู่ มิให้สูญพันธุ์ รวมทั้งเพื่อให้ได้ปลาดุกอุยเพศเมียนำไปใช้เพาะพันธุ์ปลาดุกบิ๊กอุยต่อไป จึงควรพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยให้มีคุณภาพดี เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ภายหลังทั้งการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์สัตว์น้ำ (Nahiduzzaman et al., 2011) แนวทางหนึ่งที่สะดวกและง่ายในการบริหารจัดการสายพันธุ์ปลาดุกอุยให้คงอยู่ เป็นประโยชน์ต่อภาคการผลิต สามารถทำได้โดยการนำน้ำเชื้อ (semen) ของปลาดุกอุยมาแช่แข็งและเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ซึ่งมีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อ (sperm bank) ซึ่งเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อ (semen cryopreservation) จัดเป็นเทคโนโลยีวภาพที่นำมาใช้แช่แข็งน้ำเชื้อของมนุษย์ วัว ม้า และสัตว์อื่นๆอีกหลายชนิดที่หาได้ยากหรือใกล้สูญพันธุ์ และทราบกันโดยทั่วไปแล้วว่าสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อให้มีคุณภาพดีได้เวลาเป็นปี เพียงแต่ต้องพัฒนาเทคโนโลยีให้เหมาะสมสำหรับน้ำเชื้อของสัตว์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป และนำมาใช้ประโยชน์ในภายหลัง ดังนั้นถ้าสามารถพัฒนาเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยได้ เมื่อต้องการนำน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งมาใช้ประโยชน์ก็สามารถทำได้โดยนำมาละลาย (thawing) แล้วนำไปผสมเทียมกับไข่ปลาดุกอุย ซึ่งจะเป็นประโยชน์

โดยตรงทั้งต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ และการอนุรักษ์สายพันธุ์สัตว์น้ำที่ดีมิให้สูญพันธุ์ (Tiersch, 2000) อย่างไรก็ตามการเพาะขยายพันธุ์ปลาดุกอุย หรือปลาดุกชนิดอื่นๆต่างก็ประสบปัญหาที่ไม่สามารถรีดน้ำเชื้อโดยการกดบริเวณส่วนท้องได้เหมือนปลาชนิดอื่นๆ เพราะอัณฑะ (testis) ปลาดุกอุยอยู่ลึกในช่องท้อง จึงจำเป็นต้องมีการผ่าตัดนำเอาอัณฑะปลาดุกอุยเพศผู้ เพื่อเอามาขยี้ให้ได้น้ำเชื้อมาใช้ในการผสมเทียม ดังนั้นในการเพาะขยายพันธุ์ปลาดุกอุยแต่ละครั้งจึงควรใช้น้ำเชื้อให้คุ้มค่าที่สุด ซึ่งการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยจะช่วยสามารถทำให้น้ำเชื้อคงสภาพได้นาน ลดความไม่แน่นอนในการขาดแคลนน้ำเชื้อคุณภาพดี และสามารถนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาผสมเทียมกับไข่ได้ตลอดเวลา โดยที่คุณภาพน้ำเชื้อปลาที่เก็บรักษาไว้ ยังคงมีคุณภาพใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสด (Mongkonpunya et al., 1995)

อย่างไรก็ตามปัญหาหลักที่ผู้เพาะพันธุ์ปลาดุกอุยมักพบเสมอทุกครั้งในการเพาะพันธุ์ปลาดุกอุย คือการที่จะต้องผ่าท้องปลาดุกอุยเพศผู้ เพื่อนำเอาอัณฑะออกมาขยี้ให้ได้น้ำเชื้อเพื่อผสมเทียมกับไข่ปลาดุกเพศเมีย เนื่องจากปลาดุกอุยมีผนังท้องที่หนา ไม่สามารถรีดน้ำเชื้อโดยการกดบริเวณส่วนท้องเหมือนปลาชนิดอื่น ๆ เพราะตำแหน่งของอัณฑะปลาดุกอุยอยู่ลึกในช่องท้องใกล้บริเวณไตและแนวกระดูกสันหลัง ทำให้ไม่สามารถรีดน้ำเชื้อออกมาภายนอกตัวได้เหมือนปลาชนิดอื่นๆ จึงมีผลทำให้การเพาะขยายพันธุ์ปลาดุกอุยจึงจำเป็นต้องผ่าท้องปลาตัวผู้เพื่อเอาอัณฑะ ออกมาใช้ผสมเทียม ดังนั้นการใช้น้ำเชื้อที่ได้มาจากการผ่าท้องปลาปลาดุกอุยแต่ละครั้งจึงควรใช้ให้คุ้มค่าที่สุด ถ้ามีน้ำเชื้อเหลือก็ควรมีการเก็บแช่แข็งเอาไว้ใช้ในครั้งต่อไป เนื่องจากน้ำเชื้อสดที่เหลือใช้จะมีชีวิตอยู่ได้ไม่นาน ถ้าเก็บในตู้เย็นธรรมดาน้ำเชื้อสดของปลาดุกอุยอาจยืดการมีชีวิตได้อย่างมากประมาณ 1 วันเท่านั้น (Vuthiphandchai et al., 2009b) อย่างไรก็ตามการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา จะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อคุณภาพดีได้นานเป็นปี ซึ่งการพัฒนาวิธีการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยจะช่วยทำให้มีการใช้น้ำเชื้อปลาดุกอุยมีความคุ้มค่า ทำให้สามารถลดการสูญเสียน้ำเชื้อ และยังเป็นประโยชน์ต่อการรักษาสายพันธุ์ปลาดุกอุยให้คงอยู่ อีกทั้งการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งยังช่วยเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานเป็นปี ทำให้สะดวกต่อการเพาะพันธุ์ และสามารถเพาะพันธุ์ปลาดุกอุยได้ตลอดปี ได้ลูกปลาดุกอุยเพศเมียไปใช้เป็นแม่พันธุ์ปลาดุกอุยเพื่อผสมข้ามพันธุ์กับพ่อพันธุ์ปลาดุกเทศในภายหลัง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้เพาะและเลี้ยงปลาดุกอุยและปลาดุกบิ๊กอุยต่อไป ด้วยเหตุผลทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นทำให้การเพาะพันธุ์ปลาดุกอุยโดยการผสมเทียมจึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาเทคนิควิธีการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยเพื่อให้มีน้ำเชื้อคุณภาพดีพร้อมอยู่ตลอดเวลาเพื่อการผสมเทียม และสามารถใช้ได้สะดวกรวดเร็วตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่หรือเมื่อแม่พันธุ์ปลามีความพร้อม เพื่อประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และการอนุรักษ์สายพันธุ์ของปลาดุกอุยพื้นเมืองของไทยที่อยู่ในสถานภาพมีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ให้คงอยู่

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) ในประเทศไทยได้มีการพัฒนางานวิจัยที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และประสบความสำเร็จในการแช่แข็งปลาดุกอุย และได้น้ำเชื้อคุณภาพดีหลังการแช่แข็ง แต่ยังไม่ได้มีการพัฒนาต่อยอดงานวิจัยเชิงประยุกต์กับภาคการผลิตให้สามารถนำมาใช้เพาะพันธุ์ปลาดุกอุยเชิงพาณิชย์ สาเหตุส่วนหนึ่งเนื่องจากยังไม่สามารถพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในปริมาณที่มากขึ้นภายในหลอด cryovial ขนาดใหญ่ที่มีประสิทธิภาพได้ โดยปัจจุบันคณะผู้วิจัยสามารถพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยในหลอดฟาง (French straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตรได้แล้ว และได้มีการอบรมเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย และน้ำเชื้อปลาชนิดอื่นๆให้แก่เกษตรกรและผู้สนใจในช่วงเวลาหลายปีที่ผ่านมา เพราะ

บริบทการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาบางชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ สามารถที่จะนำมาใช้ผสมเทียมเชิงพาณิชย์เพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ รวมทั้งการอนุรักษ์สายพันธุ์ปลาที่ดี และยังอาจขายน้ำเชื้อปลาแช่แข็งให้แก่ผู้สนใจได้ (Tiersch, 2008) การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายังเป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงสายพันธุ์ปลาให้มีลักษณะที่ดีเช่น โตเร็ว ทนทานโรค หรือมีลักษณะ (trait) ที่ดีอื่นๆ ใช้เวลานานหลายปีกว่าจะได้สายพันธุ์ปลาที่ดี และต้องลงทุนมาก ซึ่งถ้ามีเหตุการณ์ไม่คาดคิดเช่น โรคระบาด หรือสภาพแวดล้อม/คุณภาพน้ำในบ่อไม่เหมาะสมทำให้ปลาที่ปรับปรุงสายพันธุ์มาแล้วตายโดยไม่คาดคิดก็จะทำให้เกิดความเสียหายอย่างใหญ่หลวง แต่ถ้าได้มีการนำน้ำเชื้อปลาที่ได้ปรับปรุงสายพันธุ์มาแช่แข็งในธนาคารน้ำเชื้อจะทำให้มั่นใจได้ว่ามีน้ำเชื้อคุณภาพดีอยู่ตลอดเวลา อีกทั้งการนำน้ำเชื้อปลามาแช่แข็งเก็บและรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว ยังช่วยลดต้นทุนการเพาะพันธุ์ปลาลงได้โดยตรง เพราะไม่จำเป็นที่จะต้องมีพ่อพันธุ์ปลาจำนวนมากเลี้ยงไว้ในฟาร์มเพื่อการเพาะพันธุ์ เนื่องจากสามารถเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งจำนวนมากได้ในพื้นที่เพียงเล็กน้อยในโรงเพาะฟัก (Cabrita et al., 2010) อย่างไรก็ตามในขณะนี้หน่วยงานภาครัฐยังมีการวิจัยน้ำเชื้อปลาแช่แข็งค่อนข้างจำกัดมาก เพราะเชื่อว่าน้ำเชื้อปลาหลายชนิดไม่ประสบปัญหาเรื่องคุณภาพและปริมาณน้ำเชื้อด้วยเหตุผลที่ว่าน้ำเชื้อสดของปลาส่วนใหญ่หาได้ง่าย ซึ่งประเด็นนี้ต้องพิจารณาให้รอบด้าน เพราะปลาบางชนิดมีปัญหาคุณภาพและปริมาณน้ำเชื้อค่อนข้างมาก จึงต้องมีงานวิจัยเชิงรุกเพื่อให้การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีความยั่งยืน และมีนวัตกรรม หรือองค์ความรู้ใหม่มาใช้ให้เหมาะสมกับบริบทปัญหาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่เปลี่ยนไป อย่างไรก็ตามการใช้หลอดฟาง ซึ่งเป็นขนาดมาตราฐานที่นิยมใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อของมนุษย์และสัตว์บกหลายชนิด รวมทั้งแช่แข็งน้ำเชื้อวัวในประเทศไทย ซึ่งกรมปศุสัตว์ได้ใช้แช่แข็งน้ำเชื้อวัวเพื่อจำหน่ายน้ำเชื้อวัวแช่แข็งให้ผู้ประกอบการนำไปเพาะพันธุ์ผสมเทียมวัวนมหรือวัวเนื้อในขณะนี้นั้น เมื่อนำหลอดฟางที่บรรจุเชื้อปลาแช่แข็งมาใช้ผสมเทียมกับไข่ปลาที่มีจำนวนค่อนข้างมาก เช่นปลาดุกอุย หรือปลาหลายๆชนิดโดยทั่วไปที่มีไข่จำนวนมากในรังไข่ จึงมีความจำเป็นต้องใช้น้ำเชื้อปลาในปริมาณมากขึ้นเพื่อผสมเทียมกับไข่ปลา ดังนั้นการนำเอาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยมาเพาะขยายพันธุ์ จึงต้องสามารถพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยให้ได้ปริมาณที่มากขึ้นในหลอด cryovial หรือหลอดขนาดใหญ่อื่นๆสำหรับการเพาะพันธุ์ปลาดุกอุยเพื่อความคุ้มทุนของต้นทุนการผลิตลูกปลา เพราะสัตว์น้ำหลายชนิดมีไข่จำนวนมาก จึงต้องใช้น้ำเชื้อปริมาณมากขึ้นในขั้นตอนการผสมเทียม ซึ่งแตกต่างจากสัตว์บกที่มีการปฏิสนธิในร่างกาย และยังมีไข่จำนวนน้อยมากระหว่างการตกไข่หรือปฏิสนธิ จึงใช้น้ำเชื้อน้อยกว่าในการผสมเทียม อย่างไรก็ตามสัตว์น้ำหลายชนิดที่มีราคาขายที่ไม่สูงมาก ถ้ามีการนำเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อมาใช้แล้วทำให้ต้นทุนการผลิตสัตว์น้ำเชิงพาณิชย์สูงขึ้น ก็จะไม่เหมาะสม แม้ว่าจะเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์สายพันธุ์สัตว์น้ำชนิดนั้น แต่สำหรับปลาดุกอุยแล้วจัดเป็นสัตว์น้ำที่ต้องให้ความสนใจแช่แข็งน้ำเชื้อเป็นพิเศษ เพราะปลาชนิดนี้มีราคาสูง นิยมบริโภคแต่หาบริโภคได้ยาก มีการเลี้ยงในบริเวณจำกัด มีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ แต่ก็ยังมีความจำเป็นในการนำแม่พันธุ์ปลาดุกอุยไปผลิตปลาบิ๊กอุย ซึ่งมีการเลี้ยงทั่วประเทศ ซึ่งการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในหลอดขนาดเล็กที่เรียกว่า หลอดฟาง (French straw) คณะผู้วิจัยสามารถทำได้แล้ว แต่เป็นการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วยเครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer) ซึ่งมีราคาแพงหลายแสนบาท ทำให้ยังคงมีข้อจำกัดที่การนำไปประยุกต์ใช้ ซึ่งต้องเป็นผู้ประกอบการขนาดใหญ่เท่านั้นซึ่งมีเงินทุนซื้อเครื่องมือชนิดนี้มาใช้แช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย เพราะผู้ประกอบการเพาะพันธุ์ปลาดุกอุย เหมือนกับผู้ประกอบการเพาะพันธุ์ปลาชนิดอื่นๆ ซึ่งเป็นผู้ประกอบการขนาดเล็กหรือขนาดกลางที่มีข้อจำกัดใน

การซื้อเครื่องมือราคาแพง ดังนั้นการพัฒนาต่อยอดโจทย์วิจัยในบริบทใหม่ต้องทำให้ได้ระดับเชิงพาณิชย์ แต่ต้นทุนของเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย ต้องลดลงเพื่อทำให้ผู้ประกอบการขนาดเล็ก หรือขนาดกลาง สามารถนำเอาเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่มีต้นทุนต่ำ แต่มีความสะดวกและมีประสิทธิภาพสูง เพื่อนำน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งมาใช้ผลิตลูกปลาได้ การวิจัยและพัฒนาในระยะนี้จึงต้องเน้นที่ความสะดวกในการบริหารจัดการในฟาร์มที่ต้องใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในปริมาณมากเพื่อสามารถผสมเทียมเชิงพาณิชย์อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งการอนุรักษ์ โดยถ้าสามารถแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยได้ด้วยเทคโนโลยีที่ต้นทุนต่ำ ไม่สลับซับซ้อน เช่น แช่แข็งด้วยกล่องโฟม (styrofoam box) โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ หรือแช่แข็งรูปแบบอื่นใดแล้วยังทำให้น้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งมีคุณภาพน้ำเชื้อไม่แตกต่างกันแม้ว่าจะแช่แข็งในปริมาณมากขึ้นในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อ (sperm bank) ก็จะทำให้การนำน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งไปใช้เพื่อประโยชน์เชิงพาณิชย์มีความเป็นไปได้มากขึ้น เกิดประโยชน์จริง และยังทำให้สามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยอย่างง่ายๆนี้ไปยังผู้ประกอบการฟาร์มเพาะพันธุ์ปลาที่มีขนาดเล็ก หรือขนาดกลางนำไปใช้ได้โดยตรงในทางปฏิบัติ (Irawan et al., 2010; Vuthiphandchai et al., 2009a) ในประเด็นดังกล่าวถ้าสามารถพัฒนาวิธีการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยในปริมาณมากได้ตามที่ต้องการในหลอด cryovial หรือหลอดขนาดใหญ่แล้ว และสามารถนำน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาดุกอุยมาประยุกต์ใช้ในการเพาะพันธุ์ปลาดุกอุยเชิงพาณิชย์ได้อย่างแพร่หลาย ด้วยเทคนิคการแช่แข็งที่ไม่สลับซับซ้อน มีราคาถูก ผู้ประกอบการสามารถทำได้ด้วยตนเอง รวมทั้งยังมีจุดคุ้มทุนต่อภาคการผลิตก็จะเป็นการพัฒนางานวิจัยต่อยอดไปใช้กับภาคการผลิตด้านการเกษตรตามนโยบายของรัฐบาลเรื่องการขับเคลื่อนยุทธศาสตร์ ประเทศไทย 4.0 ได้โดยตรง ก่อให้เกิดอาชีพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่มีความยั่งยืน และรวมทั้งการอนุรักษ์พันธุ์ปลาดุกอุยมิให้สูญพันธุ์ ดังเช่นการวิจัยในต่างประเทศที่มีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกชนิดอื่นๆที่สามารถแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อในปริมาณมากเพื่อการนำไปใช้ประโยชน์ทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และมาตราการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์น้ำ เช่น การศึกษาวิจัยแช่แข็งน้ำเชื้อในปลา blue catfish (*Ictalurus furcatus*; Hu et al., 2011 และปลา red seabream, *Pagrus major* (Liu et al., 2006) ที่มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างเป็นรูปธรรม นอกจากนี้การพัฒนาศักยภาพในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยให้ได้ในปริมาณมากขึ้นในหลอด cryovial หรือหลอดขนาดใหญ่ ยังเป็นประโยชน์ที่จะนำไปสู่การประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาชนิดอื่นๆในปริมาณมากระดับ commercial scale ทั้งที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจหรือหาได้ยากใกล้สูญพันธุ์ต่อไป รวมทั้งยังเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยแช่แข็งน้ำเชื้อปลา zebrafish และ medaka ที่นิยมใช้เป็นสัตว์ทดลองทางยาหรือวิทยาศาสตร์การแพทย์ เพราะเป็นปลาที่มีคุณค่าทางวิทยาศาสตร์ที่ได้ปรับปรุงลักษณะพันธุ์เฉพาะแล้ว (transgenic or cell lines) อย่างไรก็ตามความสำเร็จในการพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยเชิงพาณิชย์จะเกิดขึ้นไม่ได้เลยถ้าน้ำเชื้อแช่แข็งในหลอด cryovial ไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ปลาดุกอุยได้เหมือนกับการใช้น้ำเชื้อสด สาเหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากถ้าพัฒนาวิธีการลดอุณหภูมิและการเพิ่มอุณหภูมิไม่เหมาะสมในกระบวนการแช่แข็งและนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาใช้ประโยชน์ จะทำให้เซลล์สเปิร์มได้รับอันตราย (cell injury) และตายลง หรือมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย (post-thawed sperm motility) หรือการมีชีวิตของสเปิร์มหลังการละลาย (post-thawed sperm viability) ลดต่ำลง จนไม่มีความสามารถในการว่ายน้ำไปปฏิสนธิกับไข่ได้ (Muchlisin, 2005; Liu et al., 2010) ซึ่งการศึกษาเกี่ยวกับ สัดส่วนที่เหมาะสมของจำนวนสเปิร์มต่อไข่ (sperm to egg ratio) และการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (sperm motility) ที่มีต่อการปฏิสนธิของไข่

ปลาดุกอุย จะทราบว่าในการปฏิสนธิไข่ปลาดุกอุย 1 ใบด้วยน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็ง หรือน้ำเชื้อสด อย่างน้อยต้องใช้สเปิร์มกี่ตัว รวมทั้งทราบความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและสัดส่วนของจำนวนสเปิร์มต่อไข่ ที่มีต่ออัตราการปฏิสนธิของไข่ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อภาคการผลิตโดยตรง (Lahnsteiner et al., 2003; Mansour et al., 2005) ซึ่งงานวิจัยเช่นนี้ไม่ได้มีการวิจัยในปลาดุกอุย มาก่อน แต่จำเป็นต้องทราบองค์ความรู้นี้เพื่อการนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปใช้ประโยชน์ ดังนั้นการศึกษาแนวทางการพัฒนารูปแบบการผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งแล้วยังคงได้อัตราการปฏิสนธิ อัตราการฟัก และอัตรารอดของลูกปลาที่ดีจึงต้องพัฒนาวิจัยเพื่อให้นำมาใช้ในการเพาะพันธุ์เชิงพาณิชย์ได้ต่อไป (Vuthiphandchai et al., 2014)

ดังนั้นโครงการวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อความสำเร็จในการพัฒนาวิธีการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งในปริมาณมากในหลอด cryovial หรือหลอดขนาดใหญ่ในลักษณะของธนาคารน้ำเชื้อด้วยเทคโนโลยีการแช่แข็งที่เหมาะสม มีราคาถูก ไม่สลับซับซ้อน แต่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อให้ได้น้ำเชื้อแช่แข็งที่มีคุณภาพดีไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสดเพื่อประโยชน์การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์สัตว์น้ำ รวมทั้งศึกษารูปแบบที่เหมาะสมในการนำน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งไปผสมเทียมกับไข่ปลาให้มีประสิทธิภาพการเพาะฟัก และอัตรารอดสูงไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด เพื่อส่งเสริมสนับสนุนการใช้น้ำเชื้อปลาแช่แข็งเพื่อการเพาะขยายพันธุ์ปลาดุกอุยให้สามารถควบคุมการผลิตเชิงพาณิชย์ และการอนุรักษ์สายพันธุ์ปลาดุกอุย ซึ่งเป็นปลาท้องถิ่นของประเทศที่มีแนวโน้มสูญพันธุ์ มิให้สูญพันธุ์ต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. พัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในปริมาณมากเพื่อประโยชน์เชิงพาณิชย์และการอนุรักษ์
2. ศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลายที่มีต่อที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็ง

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยปริมาณมากในหลอด cryovial หรือหลอดขนาดใหญ่ด้วยเทคโนโลยีการแช่แข็งที่ไม่สลับซับซ้อน แต่มีราคาถูกและมีประสิทธิภาพสูง และศึกษาปัจจัยสำคัญที่ทำให้การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในปริมาณมากประสบผลสำเร็จ ได้แก่อัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลาย โดยใช้องค์ความรู้การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาชนิดอื่นๆที่คณะผู้วิจัยเคยได้พัฒนาและตีพิมพ์ผลงานวิจัยแล้วมาบูรณาการแนวทางที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในปริมาณมาก

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป ทฤษฎีและ/หรือแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในงานวิจัย

การแช่แข็ง (cryopreservation) จัดเป็นเทคโนโลยีชีวภาพแขนงหนึ่ง ที่สามารถเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์ เซลล์ไข่ ตัวอ่อน หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ ที่ได้ถูกลดอุณหภูมิให้ต่ำลงและเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ซึ่งมีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสให้ยังคงมีมีชีวิตอยู่ได้ โดยไม่ได้รับอันตราย โดยภาพรวมแล้วการแช่แข็งเซลล์ หรือเนื้อเยื่อใดๆก็ตามจะต้องมีการใช้สารละลายบัฟเฟอร์เพื่อเจือจางเซลล์ หรือให้เนื้อเยื่อคงตัว และใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์

(cryoprotectant) เพื่อปกป้องเซลล์ หรือเนื้อเยื่อไม่ให้ได้รับอันตรายจากการเกิดผลึกน้ำแข็ง (ice crystal) จากการลดอุณหภูมิ จากนั้นปล่อยให้เซลล์ หรือเนื้อเยื่อปรับตัวในระยะเวลาหนึ่ง (equilibration time) พร้อมบรรจุเซลล์ หรือเนื้อเยื่อในภาชนะบรรจุ เช่น หลอดฟาง หรือ cryovial เพื่อนำไปลดอุณหภูมิให้ต่ำลง (freezing) แล้วนำไปแช่เก็บรักษา (storage) ในถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) และเมื่อต้องการนำเซลล์ หรือเนื้อเยื่อที่ได้แช่แข็งเก็บรักษาเอาไว้มาใช้ประโยชน์ ก็นำเซลล์ หรือเนื้อเยื่อแช่แข็งที่บรรจุในภาชนะเหล่านั้นออกมาจากถังไนโตรเจนเหลว แล้วเพิ่มอุณหภูมิเช่น แช่ในน้ำที่มีอุณหภูมิสูงในระยะเวลาที่เหมาะสม (water bath) เพื่อละลายเซลล์ หรือเนื้อเยื่อให้กลับสู่สภาพเดิมก่อนแช่แข็ง (thawing) จึงนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป (Tiersch, 2000; Nimrat and Vuthiphandchai, 2008)

โดยทั่วไปการแช่แข็ง มีหลักการและขั้นตอนที่เหมือนกันไม่ว่าจะแช่แข็งเซลล์ เนื้อเยื่อ อวัยวะ น้ำเชื้อ ไข่ ตัวอ่อน แบคทีเรีย หรือแพลงตอน ก็ตาม ต่างก็ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญได้แก่ 1. การรวบรวมเซลล์หรือสิ่งที่ต้องการแช่แข็ง (collection) 2. การเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (extender) และสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) 3. การปล่อยให้อยู่ในสภาวะสมดุล (equilibration) 4. การลดอุณหภูมิ (freezing) 5. การเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (cryostorage) 6. การละลาย (thawing) และ 7. การตรวจสอบคุณภาพเซลล์หลังการละลายและการนำไปใช้ประโยชน์ (evaluation of post-thawed cell quality and utilization) ตามที่กล่าวมาแล้ว แต่ด้วยเหตุที่การลดอุณหภูมิแช่แข็งสามารถทำได้ด้วยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer) ซึ่งมีความเที่ยงตรง แต่มีราคาแพงมากและไม่สามารถเคลื่อนย้ายเครื่องมือไปในภาคสนามได้ (Tiersch, 2000; Vuthiphandchai et al., 2009a) แต่การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งด้วยลดการพึ่งพาเครื่องมือราคาแพงนับแสนหรือล้านบาท แต่ยังคงประสิทธิภาพที่ดีของน้ำเชื้อปลาแช่แข็งยังสามารถทำได้ด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapor) ไม่ว่าจะเป็นการลดอุณหภูมิด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapor) ภายในกล่องโฟม (styrofoam box) (Richardson et al., 2000; Horvath et al., 2010) หรือการใช้ไอไนโตรเจนเหลวภายในถังไนโตรเจนเหลว (Tian et al., 2013) ซึ่งแม้จะมีความเที่ยงตรงต่ำกว่าการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ แต่จัดเป็นเทคโนโลยีที่มีราคาถูกกว่ามาก (Cabrita et al., 2010) ซึ่งก็มีรายงานวิจัยว่าแนวทางดังกล่าวสามารถนำมาประยุกต์ใช้แช่แข็งน้ำเชื้อหลายปลาได้อย่างมีประสิทธิภาพทั้งในโรงเพาะฟักและภาคสนาม (Irawan et al., 2010) ถ้าเทคโนโลยีการแช่แข็งด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลว ทำให้ปลาดุกอุยยังคงมีคุณภาพน้ำเชื้อไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด จะทำให้ผู้ประกอบการสามารถที่จะนำเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยไปใช้ประโยชน์มากขึ้น เพราะต้นทุนเทคโนโลยีการแช่แข็งจะลดต่ำลงมาก เมื่อเปรียบเทียบกับการแช่แข็งด้วยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ ในประเด็นที่ผู้ประกอบการจะนำเอาเทคโนโลยีแช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลวไปใช้ประโยชน์นั้น ผู้ประกอบการขนาดเล็ก หรือขนาดกลางจะสามารถลงทุนกับเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อได้เพราะกล่องโฟมมีราคาถูก หรือถังไนโตรเจนเหลวที่มีราคาประมาณ 20,000-30,000 บาท ขึ้นกับขนาดธุรกิจว่าต้องการถังไนโตรเจนเหลวขนาดไหน ดังนั้นกรอบแนวคิดของโครงการวิจัยเรื่องนี้จึงมีสมมุติฐานว่า ถ้าสามารถพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในปริมาณที่มากขึ้นในหลอด cryovial หรือหลอดขนาดใหญ่ด้วยกล่องโฟม หรือถังไนโตรเจนเหลว และสามารถเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีคุณภาพดีในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อเป็นปีๆโดยที่คุณภาพของน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งยังคงที่ หรือเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ จะทำให้มีการนำงานวิจัยนี้ไปใช้ประโยชน์เชิงพาณิชย์และ

การอนุรักษ์ปลาดุกอุยได้อย่างแท้จริง เป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์สายพันธุ์ปลาท้องถิ่นของไทยให้คงอยู่ และยังเป็นจุดเริ่มต้นในการสนับสนุนส่งเสริมในการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อกับสัตว์น้ำชนิดอื่นที่มีปัญหาคุณภาพน้ำเชื้อ หรืออยู่ในภาวะใกล้สูญพันธุ์ต่อไป

ด้านเหตุที่ความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาชนิดใดก็ตาม ขึ้นอยู่กับตัวแปรทุกตัวที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแช่แข็ง และองค์ความรู้เบื้องต้นการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในหลอดฟาง (French straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตรได้ถูกพัฒนาขึ้นมาแล้วโดยคณะนักวิจัยของมหาวิทยาลัยบูรพา แต่ยังไม่มีการศึกษาใดๆทั้งในไทยและต่างประเทศที่ได้พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในปริมาณมากในหลอด cryovial ดังนั้นกรอบแนวคิดของการพัฒนางานวิจัย จึงต้องนำเอาน้ำเชื้อปลาดุกอุยมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (extender) และสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ที่ทราบแล้วว่าสารชนิดใดมีความเหมาะสมในการเจือจาง ซึ่งจะต้องไม่กระตุ้นให้สเปิร์มปลาดุกอุยเคลื่อนที่ขณะถูกเจือจาง แต่ประเด็นสำคัญที่สุดของโจทย์วิจัยคือ เมื่อนำน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางเหล่านั้นมาใส่ใน cryovial ขนาดใหญ่ขึ้น เช่น หลอด cryovial 2 มิลลิลิตร (แช่แข็งน้ำเชื้อได้ปริมาณมากขึ้นในหลอด cryovial) ซึ่งหลอด cryovial ก็มีความหนามากกว่าหลอดฟาง (French straw) ค่อนข้างมาก และยังมีน้ำเชื้อปริมาณมากอยู่ภายในหลอด cryovial จากนั้นจึงทำการลดอุณหภูมิให้ต่ำลงเพื่อให้น้ำเชื้อปริมาณมากแข็งตัวในไอไนโตรเจนเหลวก่อนเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว ดังนั้นความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในครั้งนี้ จึงขึ้นอยู่กับการเลือกใช้ชนิดสารละลายบัฟเฟอร์และสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสม รวมทั้งการเลือกใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum freezing rate) ที่ทำให้น้ำเชื้อแข็งตัวในช่วงเวลาที่เหมาะสม โดยที่สเปิร์มยังคงมีชีวิตอยู่ และเลือกใช้อัตราการละลายที่เหมาะสม (optimum thawing rate) ที่ทำให้น้ำเชื้อละลายด้วยการเพิ่มอุณหภูมิ โดยที่สเปิร์มยังคงมีชีวิตเช่นกัน เพราะความหนาของหลอด cryovial จะทำหน้าที่ขวางกั้น (barrier) ในการถ่ายเทความเย็นและความร้อนได้มากกว่าหลอดฟางที่มีลักษณะบางกว่า ซึ่งต้องวิจัยให้หาสภาพที่เหมาะสมเมื่อใช้หลอด cryovial แช่แข็งน้ำเชื้อให้ได้ ในท้ายสุดการพัฒนางานวิจัยต้องสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยในหลอด cryovial ในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อได้นานเป็นปี และสามารถพัฒนาแนวทางการนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปผสมเทียมกับไข่ให้มีประสิทธิภาพสูง ได้ลูกปลาที่มีคุณภาพดีเพื่อการเพาะพันธุ์เชิงพาณิชย์ และเก็บรักษาน้ำเชื้อสายพันธุ์ปลาดุกอุยให้คงอยู่ต่อไป

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยในปริมาณที่มากขึ้นในธนาคารน้ำเชื้อ ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการพัฒนางานวิจัยการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาชนิดอื่นๆของประเทศไทยที่ประสบปัญหาคุณภาพน้ำเชื้อ หรือปลาหาได้ยากหรือใกล้สูญพันธ์ต่อไปในอนาคต รวมทั้งช่วยในการอนุรักษ์ปลาท้องถิ่นชนิดนี้มิให้สูญพันธุ์
2. ลดจำนวนพ่อพันธุ์ปลาดุกอุยที่เลี้ยงขุนภายในฟาร์มเพื่อการเพาะขยายพันธุ์ และช่วยทำให้ต้นทุนการดูแลพ่อพันธุ์ปลาดุกอุยในฟาร์มลดลง เพราะน้ำเชื้อแช่แข็งปลาดุกอุยได้เก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อเพื่อนำมาใช้ผสมเทียมกับไข่ปลาดุกอุยในภายหลัง
3. ทำให้ผู้ประกอบการเพาะพันธุ์ปลาและนักวิชาการที่เพาะพันธุ์ปลา สามารถนำเอาเทคโนโลยีการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่ได้พัฒนาไปต่อยอดประยุกต์ใช้ในการเพาะพันธุ์ปลาต่อไป เพื่อลดปัญหาการขาดแคลนน้ำเชื้อปลาที่มีคุณภาพในบางช่วงของฤดูกาล โดยไปปรับ protocol แช่แข็งน้ำเชื้อ ซึ่งจะมีส่วนช่วยทำให้การบริหารจัดการเพาะพันธุ์ปลาหลายๆชนิดมีความ

สะดวกและมีประสิทธิภาพมากขึ้น เนื่องจากเป็นทคโนโลยีที่ไม่แพง มีความสะดวก และประยุกต์ใช้ในภาคการผลิตเชิงพาณิชย์ได้โดยตรง

4. ได้พัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งและเก็บน้ำเชื้อปลาดุกอุยเพื่อการผสมเทียมปลา โดยสามารถเก็บน้ำเชื้อปลาดุกอุยในปริมาณที่มากขึ้น และยังสามารถเก็บได้ในระยะเวลาที่นานเป็นปี ทำให้เกิดประโยชน์สูงสุดต่อการผสมเทียมปลาดุกอุย ซึ่งสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีนี้ไปยังนักวิชาการ ประมง และเกษตรกรผู้เพาะพันธุ์ปลาได้ด้วยการจัดการอบรมถ่ายทอดเทคโนโลยีการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยในปริมาณมากเพื่อประโยชน์เชิงพาณิชย์

5. เทคโนโลยีการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่ได้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้แช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ปลาชนิดอื่นๆที่มีคุณค่าสูง หาได้ยาก เช่น พ่อพันธุ์ปลาที่ได้ปรับปรุงพันธุกรรม พ่อพันธุ์ปลาที่มีราคาสูง พ่อพันธุ์ปลาที่มีการกลายเพศ เป็นต้น เพื่อลดการสูญเสียที่อาจเกิดจากพ่อพันธุ์ปลาทั้งหมดตาย หรือติดโรค ซึ่งอาจจะเกิดจากมลภาวะในแหล่งน้ำ สารพิษ การขาดออกซิเจน และไฟดับ เพื่อลดความเสี่ยงที่พ่อพันธุ์ที่มีคุณค่าสูงอาจจะตายกรณีเหตุสุดวิสัย

6. ได้ผลงานวิจัยที่สามารถตีพิมพ์ใน international peer-review journal หรือ national peer-reviewed journal และอาจนำไปสู่การจดอนุสิทธิบัตรหรือสิทธิบัตรในการแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำของประเทศไทย

7. ได้พัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ ที่เป็นนิสิตระดับบัณฑิตศึกษาของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่จะมาเป็นผู้ช่วยวิจัยของโครงการในการร่วมวิจัยกับคณะผู้วิจัยในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ชีววิทยาการสืบพันธุ์ปลาดุกอุย

ปลาดุกอุย (Walking catfish) เป็นปลาน้ำจืดในครอบครัว Clariidae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Clarias macrocephalus* Gunther 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) และยังเป็นปลาท้องถิ่นของประเทศไทยที่เริ่มหาได้ยากขึ้น ปลาดุกอุยมีอวัยวะพิเศษที่ช่วยในการหายใจ เรียกว่า อะโบเรสเซนท์ ออร์แกน (aborescent organ) ซึ่งมีลักษณะคล้ายพุ่มไม้สีขาว อยู่ในหัวกะโหลก ลำตัวมีสีดำและเหลืองออก ทางสีเหลืองจาง ปลาดุกอุยผสมพันธุ์วางไข่ในช่วงฤดูฝนเหมือนปลาน้ำจืดหลายชนิดในเดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม (Srisuvantach and Thangtrongpiros, 1985) พ่อแม่พันธุ์ปลาดุกอุยนำมาใช้เพาะพันธุ์ควรมีอายุอย่างน้อย 1 ปี โดยในธรรมชาติหลังพ่อแม่พันธุ์ปลาดุกอุยจับคู่ผสมพันธุ์วางไข่ แม่พันธุ์จะขุดโพรงในดินใต้ระดับน้ำประมาณ 20-30 เซนติเมตร กว้างประมาณ 30 เซนติเมตร ลึกประมาณ 5-8 เซนติเมตร เพื่อใช้เป็นที่วางไข่ โดยแม่ปลาขนาด 300-800 กรัม จะวางไข่ครั้งละ 5,000-10,000 ฟอง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.3-1.6 มิลลิเมตร ไข่ปลาจะฟักออกเป็นตัวภายใน 20-24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิของน้ำ 25-32 องศาเซลเซียส โดยที่พ่อแม่ปลาจะดูแลลูกปลา (active parental care) ประมาณ 7-10 วันหลังฟัก (Srisuvantach and Thangtrongpiros, 1985)

โดยทั่วไปลักษณะรูปร่างภายนอกของปลาดุกอุยเพศผู้และเพศเมียมีลักษณะคล้ายคลึงกันมาก แต่เมื่อใกล้ฤดูผสมพันธุ์จะสังเกตความแตกต่างเพศได้ง่ายขึ้น โดยเพศเมียจะมีท้องอูมเป่งมากขึ้น และพื้นท้องมีลักษณะนิ่ม เนื่องจากมีไข่ในท้อง และบริเวณช่องเพศขยายใหญ่ขึ้นโดยมีสีแดงอ่อน ปลายช่องเพศ และมีติ่งเพศ (urogenital papillae) ที่มีลักษณะกลม และสีแดงอ่อน โดยถ้าแม่พันธุ์ปลามีไข่มาก จะมีท้องขยายใหญ่มากขึ้น และอูมเป่ง แต่พ่อพันธุ์ปลาดุกอุยเพศผู้ จะมีพื้นท้องแคบและแข็งกว่าเพศเมีย โดยเมื่อใช้มือกดรีดเบาๆบริเวณหน้าท้อง จะไม่มีน้ำเชื้อไหลออกมา แต่ติ่งเพศจะมีลักษณะยาวแหลม และมีสีแดงอ่อน (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2535)

การเพาะพันธุ์ปลาดุกอุยในโรงเพาะฟัก สามารถเพาะขยายพันธุ์ได้ด้วยวิธีการผสมเทียม โดยการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่มีขนาดและอายุที่เหมาะสมมาใช้ในการเพาะพันธุ์ การเพาะพันธุ์ปลาดุกอุยด้วยวิธีการผสมเทียม เริ่มจากจัดระบบบ่อและระบบน้ำให้เหมาะสม แล้วทำการฉีดฮอร์โมน Suprefact (Gonadotropin-releasing hormone analogue; GnRHa) และฮอร์โมน Motillium (Dopamine antagonist) เพื่อกระตุ้นการพัฒนาการของไข่และน้ำเชื้อ โดยฉีดฮอร์โมน suprefect และ Motillium ให้แม่พันธุ์ปลาดุกอุยในอัตราประมาณ 20-25 ไมโครกรัม/กิโลกรัม และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมตามลำดับ และฉีดให้พ่อพันธุ์ปลาดุกอุยในอัตรา 15-20 ไมโครกรัม/กิโลกรัม และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมตามลำดับขึ้นอยู่กับสภาพความสมบูรณ์เพศของพ่อแม่พันธุ์ (sexual

maturation) ซึ่งภายหลังฉีดฮอร์โมนแล้ว ปล่อยพ่อแม่พันธุ์ปลาดุกอุยไว้ในบ่อประมาณ 6-7 ชั่วโมง จึงทำการรีดไข่แม่ปลาดุกอุยออกมาผสมเทียมกับน้ำเชื้อ การผสมเทียมไข่ปลาดุกอุย ทำโดยใช้วิธีแห้งแบบดัดแปลง (modified dry method) โดยเช็ดลำตัวแม่พันธุ์ปลาที่พร้อมรีดไข่ให้แห้ง รีดไข่เบาๆลงในภาชนะที่แห้ง จากนั้นทำการเทน้ำเชื้อที่ได้จากการผ่าท้องเอาอัณฑะ (testis) ออกมาโดยขยี้ในผ้าขาวบางเพื่อให้น้ำเชื้อสดไหลออกมาผสมกับไข่ปลา ใช้ขนไก่คนไข่กับน้ำเชื้อจนเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ทำการเติมน้ำจืดที่สะอาดเล็กน้อยพอท่วมไข่ พร้อมกับผสมไข่กับน้ำเชื้อให้เข้ากันด้วยการใช้ขนไก่ประมาณ 1 นาที ทำการล้างไข่ 2-3 ครั้ง จึงนำไข่ปลาดุกอุยที่ได้รับการปฏิสนธิไปฟักในกรวยฟักไข่ต่อไป (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2535)

2. คุณภาพน้ำเชื้อของปลา และการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

น้ำเชื้อปลาประกอบด้วย สเปิร์ม (spermatozoa) และน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม (seminal plasma) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วสเปิร์มของปลาไม่มีอะโครโซม (acrosome) ที่บริเวณส่วนหัวสเปิร์มดังเช่นที่พบในสเปิร์มของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่จำเป็นต้องมีอะโครโซมที่บริเวณปลายของหัวสเปิร์มเพื่อปฏิสนธิกับไข่ด้วยการปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยบริเวณผิวไข่ (cortical reaction) เพื่อที่สเปิร์มจะได้เข้าไปปฏิสนธิกับนิวเคลียสของไข่ เนื่องจากสเปิร์มของปลาจะว่ายน้ำเข้าไปในช่อง micropyle ซึ่งเป็นช่องขนาดเล็กอยู่ด้านบนของไข่ปลา (animal pole) ได้โดยตรงในช่วงระหว่างการปฏิสนธิ ทำให้ไม่มีความจำเป็นต้องมีอะโครโซมสำหรับการย่อยบริเวณผิวไข่ปลา อย่างไรก็ตามสเปิร์มของปลาบางชนิดมีอะโครโซมบริเวณปลายหัวสเปิร์มเช่นปลา herring เป็นต้น สเปิร์มของปลามีลักษณะเช่นเดียวกับสเปิร์มสัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไปที่ประกอบด้วย 3 ส่วนหลักคือ ส่วนหัว (head) ส่วนกลาง (mid piece) และส่วนหาง (tail) ส่วนหัวของสเปิร์มปลามีรูปร่างแตกต่างกันไปตามชนิดของปลา เช่นทรงกลม ทรงรี หรือรูปหยดน้ำ เป็นต้น โดยในส่วนหัวของสเปิร์มมีนิวเคลียสที่มี ดีเอ็นเอ (DNA) เป็นสารพันธุกรรม ทำหน้าที่ปฏิสนธิกับนิวเคลียสของไข่ ส่วนกลางของสเปิร์มเป็นส่วนที่อยู่ติดกับส่วนหัวมีไมโทคอนเดรีย (mitochondria) จำนวนมากเป็นส่วนประกอบที่ให้พลังงานแก่สเปิร์มในการเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้น ส่วนหางของสเปิร์มเป็นส่วนที่มีลักษณะยาวและในส่วนหางจะมีไฟบริล (fibril) อยู่ทั้งหมด 11 คู่ อยู่ตรงกลาง 2 คู่ และอยู่โดยรอบ 9 คู่มีลักษณะเป็น microtubule ที่ช่วยทำให้หางสเปิร์มสะบัดไปมาด้วยความถี่สูง (beat frequency) จากการถ่ายทอดพลังงานจากไมโทคอนเดรียเมื่อสเปิร์มถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ ซึ่งการสั่นตัวของ microtubule ในลักษณะเช่นนี้ทำให้ส่วนหางของสเปิร์มปลาเคลื่อนที่ และทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่ไปข้างหน้า และเมื่อพลังงานจากไมโทคอนเดรียเริ่มน้อยลง สเปิร์มปลาจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วช้าลง และหยุดเคลื่อนที่เมื่อพลังงานจากไมโทคอนเดรียถูกใช้ไปจนหมด ทำให้สเปิร์มของปลาหยุดการเคลื่อนที่ ซึ่งสเปิร์มปลาน้ำจืดทั่วไปเคลื่อนที่ได้ในระยะเวลาสั้นๆมักจะไม่เกิน 1 นาทีเมื่อน้ำเชื้อปลาถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ แต่สเปิร์มปลาทะเลจะเคลื่อนที่ได้นานกว่าเมื่อถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ด้วยน้ำทะเล (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2535; Jamieson, 1991) กลไกที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในปลา ถูกควบคุมโดยค่าแรงดันออสโมติกของสารละลาย (osmolality หรือ osmotic pressure) ซึ่งหมายถึงปริมาณของตัวถูกละลาย (solute) ที่ละลายในตัวทำละลาย (solvent) มีหน่วยวัดเป็น mOsm/kg หรือ mmole/kg สเปิร์มปลาน้ำจืดจะมีการเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกต่ำกว่าระดับที่พบในน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม (hypotonicity) แต่ในทางตรงกันข้ามสเปิร์มของปลาทะเลมีการเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้น

ด้วยสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกสูงมากกว่าระดับที่พบในน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม (hypertonicity) (Morisawa et al., 1983; Bates et al., 1996)

น้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์มประกอบด้วยแร่ธาตุ น้ำตาล และสารอินทรีย์อื่นๆ ทำหน้าที่ช่วยทำให้สเปิร์มสามารถมีชีวิตอยู่ได้และมีหน้าที่ได้ตามปกติในการปฏิสนธิกับไข่ องค์ประกอบของน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์มในปลาแต่ละชนิด จะมีองค์ประกอบของแร่ธาตุ น้ำตาล และสารอินทรีย์อื่นๆแตกต่างกัน และอาจมีความแตกต่างกันในช่วงฤดูผสมพันธุ์ของปลาเพศผู้แต่ละชนิด ซึ่งองค์ประกอบสารเหล่านี้จะไม่ทำให้สเปิร์มของปลามีการเคลื่อนที่ (immotile) ขณะอยู่ภายในตัวปลา (in vivo) Tan-Fermin et al. (1999) รายงานว่าองค์ประกอบหลักทางเคมีของน้ำเชื้อปลาดุกอุยมีค่า 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 ดังนั้นการนำน้ำเชื้อสดของปลาออกมาเจือจางเพื่อให้ได้น้ำเชื้อปริมาณมากขึ้น (extended milt) จึงต้องเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีแร่ธาตุ น้ำตาล และสารอินทรีย์อื่นๆใกล้เคียงเหมือนกับที่พบในตัวปลา จะทำให้สเปิร์มของปลาไม่ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ขณะนำน้ำเชื้อปลามาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ในภาชนะ (in vitro) เนื่องจากการแช่แข็งน้ำเชื้อปลามีความจำเป็นต้องเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ ซึ่งถ้าสเปิร์มถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ก่อนกระบวนการแช่แข็ง จะทำให้การแช่แข็งน้ำเชื้อประสบความล้มเหลวทันที

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา สามารถประเมินได้อย่างรวดเร็วรวดเร็ว แม้ว่าการประเมินด้วยการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาด้วยการคาดคะเน เป็นระดับเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่แตกต่างกัน (subjective estimation) จะให้ความเที่ยงตรงและความถูกต้องต่ำกว่าการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มด้วยการใช้เครื่องมืออัตโนมัติวัดการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (computer-assisted sperm analysis; CASA) ซึ่งมีความถูกต้องและเที่ยงตรงสูง (objective estimation) การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสามารถใช้ประเมินได้ในน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยที่การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อสดต้องทำการเจือจางมาก เช่น 1,000 5,000 หรือ 10,000 เท่าขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของสเปิร์มของปลาที่แตกต่างกัน สำหรับน้ำเชื้อแช่เย็นที่ต้องการเก็บรักษาน้ำเชื้อให้มีชีวิตอยู่ได้นานเมื่อเจือจางน้ำเชื้อปลาด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (extender) ซึ่งสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดนั้นจะต้องไม่กระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวสเปิร์ม เพราะถ้าสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่แล้วแม้ว่าจะเก็บรักษาแช่เย็นจะดีเพียงใดก็ตาม ก็ไม่สามารถกระตุ้นให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ขึ้นมาได้อีกเพื่อผสมกับไข่ในภายหลัง การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มของน้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็งสามารถใช้หลักการประเมินเช่นเดียวกับที่ใช้ในน้ำเชื้อสด เพียงแต่ใช้สารละลาย หรือน้ำกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ในอัตราการเจือจางที่เหมาะสม

การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาขึ้นอยู่กับปัจจัยที่มากระตุ้นจำนวนมาก เช่น ชนิดของสารละลายที่มากระตุ้น และอุณหภูมิน้ำที่กระตุ้น เป็นต้น ดังการทดลองต่อไปนี้

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

mM สรุปได้ว่าอัตราการเจือจางของ K^+ และ Ca^{2+} มีผลต่อเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และความเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

Alavi and Cosson (2005) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่และการรอดชีวิตของสเปิร์ม พบว่าระยะเวลาในการเคลื่อนที่ การปฏิสนธิ และอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มขึ้นอยู่กับการกระตุ้นด้วยอุณหภูมิ โดยอัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิในสารละลายเพิ่มขึ้น ซึ่งจะทำให้ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสั้นลง และเมื่อลดอุณหภูมิมีผลทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่ช้าลง และระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มนานขึ้น โดยศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของปลา *Siberian sturgeon* พบว่าระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม จะเคลื่อนที่ลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 10 องศาเซลเซียส จนถึง 17.5 องศาเซลเซียส และปลาฉลามปากเป็ด (*Polyodon spathula*) สามารถเคลื่อนที่ได้ 4 นาที แต่มีเพียง 1-5 เปอร์เซนต์เท่านั้นที่สามารถเคลื่อนที่ได้ถึง 6 นาที ที่ 10-12 องศาเซลเซียส

3. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา

สารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) จัดเป็นสารที่จำเป็นต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อเพื่อป้องกันอันตรายเนื่องจากการเกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กภายในเซลล์ (ice crystal) โดยทั่วไปสารไครโอโพรเทคแทนท์ สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ 1. สารชนิดที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ (intracellular cryoprotectant) ซึ่งจะน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ต่ำ จึงแพร่ผ่านเซลล์ได้ เช่น dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol, ethylene glycol, methanol, ethanol, formamide, acetamide เป็นต้น สารประเภทนี้ช่วยควบคุมการผันแปรของความเข้มข้นภายในและภายนอกเซลล์ไม่ให้เปลี่ยนแปลงเร็วเกินไประหว่างการลดอุณหภูมิแช่แข็ง และทำให้รูปร่างและขนาดของผลึกน้ำแข็ง (ice crystal) ภายในเซลล์มีขนาดเล็กลง ช่วยลดอันตรายที่จะเกิดกับเซลล์ ดังนั้นถ้าพิจารณาถึงความสามารถในการแพร่เข้าสู่ภายในเซลล์จากน้ำหนักโมเลกุลแล้ว alcohol มีอัตราการแพร่สูงที่สุด รองลงมา ได้แก่ DMSO และ glycol ตามลำดับ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) 2. สารชนิดที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ (extracellular cryoprotectant) ซึ่งจะมีน้ำหนักโมเลกุลสูง เช่น glucose, sucrose, polyvinyl pyrolidone (PVP), trehalose, dextrans สารชนิดนี้จึงไม่สามารถแพร่ซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ และมีความสามารถในการรักษาสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ให้คงอยู่ได้ภายหลังการแช่แข็งได้เช่นกัน (Tiersch, 2000)

โดยทั่วไปการแช่แข็งน้ำเชื้อปลามีขั้นตอนที่มีความสัมพันธ์กัน เริ่มจากนำสารละลายบัฟเฟอร์ (extender) ที่เหมาะสมมาเจือจางในสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ชนิดที่เหมาะสมก่อนแล้วจึงค่อยนำไปผสมกับน้ำเชื้อปลา โดยการใส่สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีสารไครโอโพรเทคแทนท์ลงไปในน้ำเชื้อปลา ควรใส่อย่างช้าๆและที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อช่วยให้เซลล์สเปิร์มค่อยๆปรับสภาพเมื่ออยู่ในสารเคมี สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่จะใช้ในการแช่แข็ง ควรเป็นสารละลายที่เตรียมขึ้นมาใหม่ก่อนใช้ หรือถ้าจะเตรียมไว้ล่วงหน้าควรเก็บไว้ในตู้เย็นก่อนใช้ไม่เกิน 1-2 วัน ขั้นตอนหนึ่งที่สำคัญของการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา เมื่อใส่สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ในน้ำเชื้อแล้วต้องทิ้งระยะเวลาช่วงหนึ่งให้สารไครโอโพรเทคแทนท์ซึมเข้าไปอยู่ในเซลล์ (equilibration time) ซึ่งช่วงระยะเวลาสมดุล (equilibration time) จัดเป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญต่อความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อเช่นกัน โดยการแช่แข็งน้ำเชื้อในปลาแต่ละชนิด อาจใช้ชนิดหรือความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) และระยะเวลาสมดุลต่างกัน (Cabrita et al., 2010)

โดยทั่วไปน้ำเชื้อปลาที่แช่แข็ง (cryopreserved semen) และเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวอย่างถูกต้อง สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ให้มีคุณภาพคงที่ได้นานเป็นปีๆ โดยทีคุณภาพน้ำเชื้อไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด (fresh semen) เมื่อต้องการใช้น้ำเชื้อปลาแช่แข็งในการผสมเทียมก็สามารถนำหลอดบรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งออกมาละลายโดยการเพิ่มอุณหภูมิ ดังนั้นความสำเร็จของการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาที่ได้แช่แข็ง จึงขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวกับขั้นตอนการแช่แข็งทั้งหมด เช่น ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ ชนิดและระดับของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสม (Rana and McAndrew, 1989) ช่วงระยะสมดุลอัตราการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็ง (freezing) และการเพิ่มอุณหภูมิขณะละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (Scott and Baynes, 1980; Vuthiphandchai et al., 2009a) นอกจากนี้ความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อปลาที่เกิดขึ้นในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ เทคนิคของการทำน้ำเชื้อปลาแช่แข็ง และการละลายน้ำเชื้อต่างก็มีผลทำให้ความสำเร็จของการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในแต่ละครั้งแตกต่างกันไป (Tiersch, 2000; Casselman et al., 2006; Yavas and Bozkurt, 2011) ซึ่งเมื่อจะนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาใช้ประโยชน์ก็นำออกมาละลายด้วยวิธีการใช้อัตราการละลายที่เหมาะสม จึงนำไปผสมเทียมกับไข่ปลา เพื่อให้ไข่ปลามีอัตราการฟักที่ไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสดผสมเทียมกับไข่ปลา ดังนั้นถ้าทุกขั้นตอนที่เกี่ยวข้องมีความเหมาะสม ก็จะทำให้การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาประสบผลสำเร็จ (Vuthiphandchai et al., 2009a)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเพื่อการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์ส่วนใหญ่เป็นการศึกษาวิจัยในต่างประเทศ โดยนิยมแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ หรือใกล้สูญพันธุ์ หรือสายพันธุ์ปลาที่มีคุณค่าสูงที่ได้ปรับปรุงพันธุกรรมแล้ว เช่น ปลากะรัง (*Epinephelus septemfasciatus*; Tian et al., 2013) ปลา channel catfish (*Ictalurus punctatus*; Tiersch et al., 1994) ปลากะพงขาว (*Dicentrarchus labrax*; Fauvel et al., 1998) ปลา red seabream (*Pagrus major*; Liu et al., 2010) ปลา blue catfish (*Ictalurus furcatus*; Hu et al., 2011) ปลา olive barb (*Puntius sarana*; Nahiduzzaman et al., 2011) ปลา Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*; Sarvi et al., 2006) เป็นต้น การแช่แข็งน้ำเชื้อในประเทศไทยเริ่มมีการศึกษามากขึ้นในระยะประมาณ 10 ปีที่ผ่านมา แต่การนำน้ำเชื้อปลาแช่แข็งมาใช้ผสมเทียมยังมีข้อจำกัด เนื่องจากการเพาะพันธุ์ปลาส่วนใหญ่ยังคงนิยมใช้น้ำเชื้อสดในการเพาะขยายพันธุ์ปลา อันเนื่องจากสภาพอากาศที่ร้อนของประเทศไทย ทำให้การพัฒนาการสร้างน้ำเชื้อปลา (spermiation) เกิดขึ้นได้ง่ายกว่าปลาในประเทศเขตหนาว จึงเป็นที่นิยมในการใช้น้ำเชื้อสดในการเพาะพันธุ์ปลาตามที่กล่าวมาแล้ว แม้ว่าปลาบางชนิดยังคงมีปัญหาการขาดแคนน้ำเชื้อที่มีคุณภาพในบางช่วงของฤดูกาล อย่างไรก็ตามงานวิจัยการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในประเทศไทยและในต่างประเทศมีการวิจัยในปลาหลายๆชนิด พอสรุปสาระสำคัญได้ดังนี้

นลินี มารคแมน และคณะ (2526) ได้ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี lecithin และ mannitol เป็นองค์ประกอบ ปรากฏว่า น้ำเชื้อปลาตะเพียนรขาวแช่แข็งหลังการละลายยังมีคุณภาพต่ำ

ทัศนีย์ ภูพิพัฒน์และคณะ (2529) ได้ศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อปลาบึกที่ได้มีการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว โดยเริ่มต้นจากเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ และ 8% dimethylsulfoxide (DMSO) ภายในหลอดฟางโดยใช้วิธีการลดอุณหภูมิด้วยการแช่ในไอไนโตรเจนเหลวนาน 15 นาที

จากนั้นนำมาแช่ไว้ในถังไนโตรเจนเหลวนาน 4 เดือน พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย (post-thawed sperm motility) มีค่าเฉลี่ย 60%

เสน่ห์ และคณะ (2536) รายงานการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาบึกในหลอดฟางด้วยการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย 125 มิลลิโมล $NaHCO_3$, 250 มิลลิโมล Sucrose, 9.75 มิลลิโมล Glutathione และ 8%DMSO พบว่า น้ำเชื้อแช่แข็งของปลาบึกสามารถปฏิสนธิไข่ได้ประมาณ 67%

พลชาติ ผิวเณร และ พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข (2546) ได้ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลานิล โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ modified Cortland และ 10%DMSO ในการเจือจางน้ำเชื้อ และลดอุณหภูมิด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติจากอุณหภูมิเริ่มต้น 20 องศาเซลเซียส ถึง -60 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ที่ -60 องศาเซลเซียส นาน 2 วินาที จึงนำน้ำเชื้อแช่ลงในไนโตรเจนเหลวนาน 441 วัน พบว่า น้ำเชื้อปลานิลแช่แข็งหลังการละลาย มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มประมาณ 41%

Vuthiphandchai et al. (2009a) ศึกษาวิธีการแช่แข็งรักษาน้ำเชื้อปลากะพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*) ด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆกัน 10 ชนิดที่ 4 ระดับความเข้มข้น โดยลดอุณหภูมิด้วยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ พบว่า น้ำเชื้อปลากะพงแดงที่แช่แข็งด้วย 10% DMSO โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาทีจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียสจนถึง -80 องศาเซลเซียสแล้วนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ยังคงมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย (post-thaw sperm motility) และการมีชีวิตของสเปิร์มหลังการละลาย (post-thaw sperm viability) มีค่าสูงสุดมากกว่า 90% เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ

Kurokura (1984) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน (*Cyprinus carpio*) และทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งในการปฏิสนธิกับไข่ปลาไน โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 2 สูตร น้ำยาสูตรแรกมีองค์ประกอบเหมือนน้ำยา Ringer สำหรับรักษาน้ำเชื้อปลาน้ำจืด ส่วนน้ำยาสูตรที่สอง ที่มีระดับดับโปแตสเซียมสูงกว่าพลาสมาของน้ำเชื้อปลาไน โดยใช้ Dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ในทั้งสองสูตร จากการทดลองพบว่า น้ำเชื้อปลาไนที่แช่แข็งและเก็บรักษาโดยใช้น้ำยาสูตรแรกสามารถปฏิสนธิกับไข่จนพัฒนาถึงระยะเกิดเลนส์ตา (Eyed stage) ประมาณ 68.6% เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดซึ่งให้ค่าอัตราการปฏิสนธิเท่ากับ 83%

Rana and McAndrew (1989) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลานิล โดยเจือจางน้ำเชื้อปลานิลในสารละลาย Ringer และใช้ methanol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกันในหลอดฟางขนาด 0.5 มิลลิลิตร พบว่า การใช้ 10% methanol ให้ผลดีที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลานิล และการใช้อัตราการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งในอัตราที่แตกต่างกัน ตั้งแต่ 5 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 50 องศาเซลเซียส/นาที ก่อนการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่า ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของไข่ปลา

Gwo et al. (1991) ได้ศึกษาการแช่แข็งและเก็บน้ำเชื้อปลา Atlantic croaker พบว่าสารละลายบัฟเฟอร์ (sperm extender) ที่ประกอบด้วย เกลือแกง กลูโคส และ ซูโครส สามารถใช้เจือจางน้ำเชื้อปลา Atlantic croaker เพื่อการแช่แข็ง โดยมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดอื่นๆ ที่มีความสลับซับซ้อน หรือมีสารเคมีหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ และยังพบว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็งน้ำเชื้อตั้งแต่ 10 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง 150 องศาเซลเซียส/นาที ไม่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลาย และน้ำเชื้อแช่แข็งที่ละลายสามารถปฏิสนธิไข่ได้เหมือนน้ำเชื้อสด

Conget et al. (1996) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ด้วยการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆก่อนการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว พบว่าการใช้ DMSO ร่วมกับ sucrose ให้ผลดีที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา rainbow trout โดยระยะเวลาสมดุลที่เหมาะสมในขณะที่ปล่อยให้น้ำเชื้อเจือจางน้ำเชื้อในสารไครโอโพรเทคแทนท์ ก่อนทำการลดอุณหภูมิไม่ควรเกิน 10 นาที และการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่รวดเร็ว (30 องศาเซลเซียส/นาที) มีผลทำให้สเปิร์มแช่แข็งหลังการละลาย มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ต่ำ (1 องศาเซลเซียส/นาที และ 10 องศาเซลเซียส/นาที)

Tiersch et al. (1994) ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา channel catfish (*Ictalurus punctatus*) โดยเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลาย Hank's balanced salt solution (HBSS) และสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆก่อนการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว พบว่า methanol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ให้ผลดีที่สุดในการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อ โดยสเปิร์มหลังการละลายยังคงมีการเคลื่อนที่ และมีความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่ ได้ไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด

Fauvel et al (1998) แช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาวยุโรป (*Dicentrarchus labrax*) ที่เจือจางด้วย Mounib extender และ 10% DMSO ในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร หรือหลอด cryovial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วทำการลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลวที่สามารถปรับให้ได้ได้ค่าอัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -65 องศาเซลเซียส/นาที พบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลายมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (sperm motility) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด การนำน้ำเชื้อปลากะพงขาวแช่แข็ง (frozen semen) หรือน้ำเชื้อปลากะพงขาวที่รีดออกมาใหม่ๆ (fresh semen) ไปผสมเทียมกับไข่ปลากะพงขาวปริมาณ 2 มิลลิลิตร (ไข่ประมาณ 2,000 ใบ) ด้วยการใช้จำนวนสเปิร์มต่อไข่ (sperm to egg ratio) เท่ากันที่ระดับ 35,000 สเปิร์มต่อไข่ 1 ใบ พบว่าอัตราการปฏิสนธิของไข่ปลากะพงขาวด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งมีค่าเฉลี่ยทางสถิติต่ำกว่า ($P<0.05$) น้ำเชื้อสด แต่เมื่อใช้จำนวนสเปิร์มมากขึ้นในการปฏิสนธิไข่ 1 ใบที่ระดับ 70,000 หรือ 200,000 สเปิร์มต่อไข่ 1 ใบ กลับพบว่าอัตราการปฏิสนธิของไข่ด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งและน้ำเชื้อสดมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) นอกจากนี้เมื่อทำการผสมเทียมไข่ปลากะพงขาวในระดับโรงเพาะฟัก (scale-up protocol) ตามวัตถุประสงค์การจัดตั้งธนาคารน้ำเชื้อ โดยเมื่อนำไข่ปลากะพงขาวปริมาณมากที่ 50 มิลลิลิตร (ไข่ประมาณ 50,000 ใบ) หรือไข่ปลากะพงขาวปริมาณ 2 มิลลิลิตร (ไข่ประมาณ 2,000 ใบ) มาผสมเทียมกับน้ำเชื้อปลากะพงขาว ไม่ว่าจะเป็นน้ำเชื้อแช่แข็ง หรือน้ำเชื้อสด (Factorial design) ที่ต่างก็กำหนดให้มีการใช้จำนวนสเปิร์มเท่ากันในการปฏิสนธิไข่ 1 ใบ (sperm to egg ratio) ที่ 200,000 สเปิร์มต่อไข่ 1 ใบ กลับพบว่า อัตราการปฏิสนธิ (fertilization rate) ของไข่เมื่อใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง มีค่าเฉลี่ยต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสดผสมเทียมไข่ประมาณ 23.5% สาเหตุที่เป็นเช่นนี้ผู้วิจัยคาดว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับขั้นตอนการผสมเทียมในระดับโรงเพาะฟักที่ต้องใช้เวลามากขึ้นในการละลายน้ำเชื้อเพื่อให้ได้น้ำเชื้อแช่แข็งในปริมาณที่ต้องการ จึงทำให้คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งลดลง

Suquet et al. (1998) ได้ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา turbot (*Psetta maxima*) ภายในหลอดฟางโดยใช้ 10% DMSO ร่วมกับ 10% bovine serum albumin (BSA) และเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 9 เดือน พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย ยังคงมีค่าเฉลี่ยสูงอยู่ในช่วง 60-90% ภายหลังการกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่

Warnecke and Pluta (2003) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน (*Cyprinus carpio*) โดยใช้ dimethly-acetamide (DMA) เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ความเข้มข้นระหว่าง 10-25% หลังจากเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ modified kurokura 's extender 2 ใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับ 3, 6 และ 10 องศาเซลเซียส/นาที จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80 , -80 , -50 องศาเซลเซียสตามลำดับ ก่อนการนำไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (cryostorage) หลังจากนั้นจึงนำหลอดฟาง (0.25 มิลลิลิตร) มาละลายใน water bath อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที เพื่อทำการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ โดยปรากฏว่า น้ำเชื้อแช่แข็งเมื่อใช้ modified kurokura 's extender 2 ที่เติม 200mM trehalose และ 20% DMA และใช้อัตราลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาที เก็บไว้นาน 6วัน มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายประมาณ 40% ซึ่งมีค่าประมาณครึ่งหนึ่งของน้ำเชื้อสด และให้ค่าอัตราการปฏิสนธิสูงประมาณ 98% และให้ค่าอัตราการฟักของไข่ประมาณ 80% ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสด และมีอัตรารอด Swim-up-stage larvae ประมาณ 78% ในขณะที่น้ำเชื้อแช่แข็งอีกชุดการทดลองเมื่อเจือจางน้ำเชื้อใน modified kurokura exender 2 ที่เติม 200mM sucrose และ15% DMA และใช้อัตราลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาที เมื่อเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวนาน 349 วัน ให้ค่าอัตราการปฏิสนธิประมาณ 99% อัตราการฟักของไข่ประมาณ 41% และ Swim-up-stage larva มีค่าเฉลี่ย 38%

Ji et al. (2004) แช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea perch (*Lateolabrax japonicus*) ภายในหลอด cryovial ขนาด 1.8 มิลลิลิตร โดยด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆกัน พบว่า สารละลาย modified plaice Ringer solution (MPRS) ให้ผลการแช่แข็งดีกว่า สารละลาย D-15 และ modified Mounib's medium (MMM) จากนั้นศึกษาชนิดสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการนำไปแช่แข็งน้ำเชื้อโดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 4 ชนิด (DMSO, ethanol, methanol และ demithylformamide) ที่ 3 ความเข้มข้น (6, 10, 14%) พบว่า 10% DMSO มีความเป็นพิษต่ำที่สุด คณะวิจัยนี้จึงได้นำ MPRS และ 10% DMSO ไปใช้แช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea perch ในไอไนโตรเจนเหลวโดยบรรจุน้ำเชื้อ 0.5 และ 1.0 มิลลิลิตรลงไปในหลอด cryovial ขนาด 1.8 มิลลิลิตร พบว่า น้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลายใน 2 ชุดการทดลองนี้มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่แตกต่างกัน ซึ่งเมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปผสมเทียมกับไข่เมื่อใช้ sperm to egg ratio ต่างๆกัน (20,000:1, 40,000:1, 80,000:1, 320,000:1) พบว่า น้ำเชื้อแช่แข็งของปลา Sea perch เมื่อเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 3 วัน หรือ 1 ปี สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสดเมื่อผสมเทียมด้วย sperm to egg ratio ที่แตกต่างกัน 4 ระดับนี้ นอกจากนี้มีรายงานการวิจัยส่วนหนึ่งที่แสดงให้เห็นว่า การใช้อัตราส่วนของจำนวนสเปิร์มที่เพิ่มขึ้นในการปฏิสนธิกับไข่ 1 ใบ (higher sperm to egg ratio) สามารถช่วยให้สเปิร์มปฏิสนธิไข่ได้มากขึ้นเมื่อใช้สเปิร์มที่มีการเคลื่อนที่ต่ำ ดังที่มีการรายงานในน้ำเชื้อปลาไน (Saad et al., 1988) เช่นเดียวกับการศึกษาในน้ำเชื้อปลา walleye พบว่า สเปิร์มที่มีการเคลื่อนที่ประมาณ 40% ให้ค่าอัตราการปฏิสนธิกับไข่สูงกว่าสเปิร์มที่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่าเมื่อใช้จำนวนสเปิร์มต่อไข่เท่ากัน (Casselman et al., 2006)

Ding et al. (2009) พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาแมนดาริน (*Siniperca chuatsi*) ด้วยการศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์และสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย พบว่า ชุดการทดลองที่นำน้ำเชื้อสดมาเจือจางในหลอด cryotube ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ D-15 และ 10% DMSO แล้วนำหลอด cryotube ไปลดอุณหภูมิที่เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen surface) 6 เซ็นติเมตร นาน 10 นาทีและอีก 5 นาทีที่ผิวหน้า

ไนโตรเจนเหลวก่อนแช่ลงไปในไนโตรเจนเหลว แล้วจึงนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 วินาที มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงสุดประมาณ 96% และเมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บในถังไนโตรเจนเหลวนาน 1 สัปดาห์หรือนาน 1 ปีไปผสมเทียมกับไข่ ปรากฏว่าการใช้สัดส่วนของจำนวนสเปิร์มต่อไข่ที่จำนวน 100,000:1 สามารถปฏิสนธิไข่ได้ 66.01±5.14% และ 54.76±4.40% ตามลำดับ มีค่าไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้น้ำเชื้อสด (69.42±8.11%) ในขณะที่อัตราการฟักมีค่า 62.97±14.28%, 52.58±11.17% และ 59.82±5.27% ตามลำดับซึ่งก็ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

Horvath et al. (2010) พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา paddlefish (*Polyodon spathula*) ด้วยการประเมินความเป็นไปได้ในการใช้หลอดฟางขนาดใหญ่ 5 มิลลิลิตร (minitube) แช่แข็งน้ำเชื้อ (บรจุน้ำเชื้อ 2.5 มิลลิลิตร) พร้อมกับการใช้ methanol ระดับ 5% และ 10% แช่แข็งนาน 5 หรือ 7 นาทีในไอไนโตรเจนเหลว พบว่า การใช้ 5% methanol แช่แข็งน้ำเชื้อปลาชนิดนี้นาน 5 นาที มีผลทำให้อัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักมีค่าสูงสุดเท่ากับ 48±5% และ 47±10% แต่ค่าเหล่านี้ก็มีค่าต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสดผสมเทียมไข่ที่ได้ค่าอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักมีค่าสูงสุดเท่ากับ 77±6% และ 66±13% ตามลำดับ การศึกษาผลของจำนวนสเปิร์มต่อไข่ที่มีต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสด พบว่า จำนวนสเปิร์มที่เหมาะสมในการปฏิสนธิไข่ (sperm to egg ratio) มีค่าระหว่าง 1.379×10^6 ถึง 2.758×10^6 และมีความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการปฏิสนธิ และ sperm to egg ratio ในลักษณะของ $Y = -13X^2 + 55.90X + 38.44$ ($r^2 = 0.823$) แต่เมื่อใช้น้ำเชื้อแช่แข็งผสมเทียมกับไข่ ให้ค่าความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการปฏิสนธิ และ sperm to egg ratio เท่ากับ $Y = 22.51X + 23.26$ ($r^2 = 0.75$) โดยจำนวนสเปิร์มที่เหมาะสมในการปฏิสนธิไข่ (sperm to egg ratio) มีค่าสูงขึ้นค่อนข้างมาก นอกจากนี้อัตราการฟักของลูกปลาที่ได้จากการใช้น้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อแช่แข็งใน 3 ลักษณะ (1, 2 หรือ 3 หลอด) มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ และน้ำเชื้อแช่แข็งยังให้ค่าความสัมพันธ์ระหว่าง sperm to egg ratio และอัตราการฟักเท่ากับ $Y = 29.65X^2 + 119.2X - 51.04$ ($r^2 = 0.837$) แสดงให้เห็นว่า การใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในการผสมเทียมไข่ของปลา paddlefish ต้องเพิ่มจำนวนสเปิร์มในการปฏิสนธิไข่ให้มากขึ้น เพื่อทำให้ค่าอัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักไม่แตกต่างกับการใช้น้ำเชื้อสด ซึ่งอาจทำโดยเพิ่มปริมาณน้ำเชื้อแช่แข็งประมาณ 30% ขึ้นไปหรืออาจพัฒนางานวิจัยต่อไปเพื่อทำให้สเปิร์มที่มีชีวิต (sperm viability) หลังการละลายในหลอดฟางมีค่าเพิ่มสูงขึ้น

Yavas and Bozkurt (2011) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเฉาฮื้อ (*Ctenophalyngodon idella*) ในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว แล้วนำน้ำเชื้อแช่แข็งออกมาศึกษาผลของอัตราการละลายที่มีต่อคุณภาพสเปิร์มหลังการละลาย โดยนำหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 30, 35, 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10, 20, 30 วินาที ปรากฏว่า สเปิร์มมีการเคลื่อนที่สูงสุดหลังการละลายในชุดการทดลองที่ละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 วินาที ในขณะที่การศึกษาละลายน้ำเชื้อปลา Atlantic halibut ที่แช่แข็ง พบว่าอัตราการละลายที่เหมาะสมน้ำเชื้อปลา Atlantic halibut ที่แช่แข็งมีค่าอยู่ในช่วงกว้าง คือ 10-40 องศาเซลเซียส/นาที (Bolla et al., 1987)

Boonthai et al. (2014) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*) ด้วยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติด้วยการเจือจางน้ำเชื้อใน Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) และ DMSO แล้วศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียระหว่าง

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวว่าเกิดจากแหล่งใดหรือขั้นตอนใดมากที่สุดด้วยการใช้ aseptic technique โดยตรวจวัดปริมาณแบคทีเรียชนิดต่างๆใน animal origin และ non-animal origin ได้แก่ ครีบหาง น้ำเลี้ยงปลา น้ำเชื้อปลา ปัสสาวะ ขี้ปลา ไนโตรเจนเหลว ผิวหลอดฟาง อากาศที่หมุนเวียนในห้องปฏิบัติการ และถุงมือ ทั้งก่อนและหลังการแช่แข็ง ปรากฏว่าพบแบคทีเรีย *Aeromonas punctata* subsp. caviae มีการปนเปื้อนมากที่สุดในครีบหาง ถุงมือ และน้ำเชื้อปลาก่อนการแช่แข็ง และยังพบว่า *Bacillus safensis* and *Bacillus* sp. ยังสามารถมีชีวิตรอดในถังไนโตรเจนเหลว ซึ่งการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาโดยใช้ aeptic technique มีประสิทธิภาพสูงในการลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อแช่แข็ง และเป็นประโยชน์ต่อการจัดตั้งธนาคารน้ำเชื้อปลา

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

- หลอดฟาง (French straw) ขนาด 0.25 และ 0.5 มิลลิลิตร (IMV Technologies Paillette)
- หลอด Cryovials ขนาด 1.25 และ 1.8 มิลลิลิตร (Thermo scientific nunc cryotube vials)
- Tissue culture flasks
- กล่องโฟม (Styrofoam box)
- บีกเกอร์ขนาดต่างๆ
- ขวดรูปชมพู่ขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิลิตร
- กระบอกตวงขนาด 10 และ 100 มิลลิลิตร
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- เข็มเขี่ย
- ฟอร์เซป (Forcep)
- กระจกสไลด์และ Cover glass
- กระดาษกรอง
- แท่งแก้วคนสาร
- จานแก้ว (Petri dish)
- ถังน้ำแข็ง
- ขวดแก้วฝาสีฟ้า ขนาด 250 มิลลิลิตร
- เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- ไมโครปิเปตขนาด 200 และ 1,000 ไมโครลิตร
- pH meter (Horiba, D-21, Japan)
- Haemacytometer (BOECO, Hamburg, Germany)
- เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (Controlled-rate programmable freezer, Cryologic Pty, ltd รุ่น CL3000)
- กล้องจุลทรรศน์
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ (Incubator)
- Glass micropipette ขนาด 5,10 และ 100 ไมโครลิตร
- Canister
- Aluminium canes
- Goblets
- Vial tubes

- Hot plate
- Thermometer
- Thermocouple-probe thermometer (K-type, HI 91530K, Hanna Instruments Inc.)
- Water bath
- Racks
- ถังเก็บไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen dewar)
- ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)
- สารเคมีประเภทต่างๆที่ใช้ในการแช่แข็ง และการย้อมสีน้ำเชื้อปลา

วิธีดำเนินการวิจัย

1. <u>การจัดการพ่อแม่พันธุ์ปลาดุกอุย</u>

พ่อแม่พันธุ์ปลาดุกอุยที่สมบูรณ์เพศ (รูปที่ 1) ถูกรวบรวมและลำเลียงจากบริเวณแหล่งเลี้ยงในจังหวัดชลบุรี และฉะเชิงเทรา มายังโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา พ่อแม่พันธุ์ถูกลำเลียงในถังที่มีการควบคุมอุณหภูมิน้ำ และใส่เกลือแกงและยาเหลืองป้องกันความเครียดและการติดเชื้อที่อาจมีในพ่อแม่พันธุ์ระหว่างการลำเลียง พ่อแม่พันธุ์ปลาดุกอุยถูกนำมาพักไว้ในบ่อภายในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ประมาณ 7 วันโดยแยกพ่อแม่พันธุ์คนละบ่อ เพื่อให้ปลาดุกอุยปรับตัวก่อนการทดลองพร้อมให้อาหารเม็ด 2-3% น้ำหนักตัว/วัน และเปลี่ยนถ่ายน้ำที่สะอาดในบ่อ 30-40% ทุกๆ 2-3 วัน พ่อพันธุ์ถูกฉีดด้วยฮอร์โมน suprefact (gonadotropin-releasing hormone analogue; GnRHa) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักปลา และ motillium (dopamine antagonist) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักปลา เพื่อกระตุ้นให้พ่อพันธุ์ปลาดุกอุยมีน้ำเชื้อในปริมาณที่มากขึ้น การนำน้ำเชื้อปลาดุกอุยออกมาทดลอง ทำหลังการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นผ่านไปประมาณ 8 ชั่วโมง โดยสลบปลาด้วยน้ำแข็ง ล้างรอบบริเวณท้องให้สะอาดด้วยน้ำจืด เช็ดท้องให้แห้งแล้วทำการรวบรวมน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์หลายตัวแล้วนำมาใช้ทดลองในลักษณะ pooled semen เพื่อลดความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อ (individual variation) สำหรับนำไปใช้ในแต่ละชุดการทดลอง

น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีเท่านั้นที่ผ่านเกณฑ์จะถูกนำมาใช้ในการทดลอง โดยน้ำเชื้อสดที่รวบรวมได้ (freshly collected semen) ต้องมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่สูง (มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์) จึงนำมาใช้ในการทดลอง น้ำเชื้อสดที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ไม่ได้ถูกนำมาใช้ในการทดลองเพื่อให้มั่นใจว่าขณะเริ่มการทดลองน้ำเชื้อปลาดุกอุยมีคุณภาพสเปิร์มที่ดีผ่านเกณฑ์ก่อนเริ่มการทดลอง ไม่เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการแช่แข็ง น้ำเชื้อที่รวบรวมได้จะถูกนำมาใส่ใน petridish ที่สะอาดที่วางไว้บนน้ำแข็งเพื่อรักษาคุณภาพสเปิร์มไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงก่อนการเจือจางน้ำเชื้อ น้ำเชื้อที่รวบรวมได้ถูกเก็บไว้บนน้ำแข็งอย่างมากไม่เกิน 30 นาทีในห้องปฏิบัติการก่อนการแช่แข็ง น้ำเชื้อปลาดุกอุยที่ผ่านเกณฑ์ที่กำหนดถูกเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์และสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสม เพื่อนำไปทดลองในขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อต่อไป

2. <u>การประเมินคุณภาพสเปิร์มของน้ำเชื้อปลาดุกอุย</u>

ลักษณะกายภาพของน้ำเชื้อสด พิจาณาจาก สี ความหนืด และการปนเปื้อนด้วยปัสสาวะ เมือก และเลือด โดยใช้น้ำเชื้อสีขาวขุ่นเท่านั้น ไม่มีการปนเปื้อนของสิ่งสกปรก ความหนาแน่นของสเปิร์มประเมินโดยการเจือจางน้ำเชื้อปลาดุกอุย (10 ไมโครลิตร) ด้วย 0.9% NaCl โดยเจือจาง 5,000 เท่า ผสมให้เข้ากันใน vial ด้วยการใช้ vortexer แล้วจึงนำน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางไปหยดบน hemacytometer และ นับจำนวนสเปิร์มที่พบโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า แล้วจึงคำนวณหาความหนาแน่นของสเปิร์มเป็นจำนวนตัว/มิลลิลิตร โดยทำ 3 ซ้ำ

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ทำโดยการหยดตัวอย่างน้ำเชื้อสด (1 ไมโครลิตร) ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาดแล้วจึงหยดน้ำกลั่นลงไป 100 ไมโครลิตรพร้อมกับปิดด้วย cover glass เบาๆ อย่างรวดเร็วเพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่แล้วจึงประเมินเปอร์เซนต์ที่สเปิร์มเคลื่อนที่ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (percentage of motile

sperm) ประเมินจาก จำนวณสเปิร์มที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าอย่างรวดเร็วเมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำกลั่น โดยแบ่งระดับที่สเปิร์มเคลื่อนที่ไว้ 6 ระดับ (subjective estimation) คือ สเปิร์มที่เคลื่อนที่ได้ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% ตามวิธีการของ Vuthiphandchai and Zohar (1999) และ Vuthiphandchai et al., (2009b) โดยทำการประเมิน 3 ซ้ำ โดยในแต่ละสไลด์ประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอีก 3 ซ้ำย่อยให้เสร็จภายในเวลาไม่เกิน 15 วินาทีหลังจากสเปิร์มถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ (รวม 9 ซ้ำย่อย) สำหรับน้ำเชื้อสดที่ถูกเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ และสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ที่เหมาะสม ทำการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มก่อนการแช่แข็ง โดยดูดสารละลายเหล่านั้นออกมา 20 ไมโครลิตร แล้วกระตุ้นด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 80 ไมโครลิตร ในขณะที่การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็ง (cryopreserved semen) ในทุกชุดการทดลอง ทำโดยการแช่หลอดฟาง หลอด cryovial หรือหลอดขนาดใหญ่ที่มีน้ำเชื้อแช่แข็งอยู่ภายใน ลงไปในน้ำที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อให้น้ำเชื้อแช่แข็งละลาย (thawing) แล้วนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่ละลาย (post-thawed semen) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ออกมาเทลงบนกระจกสไลด์ กระตุ้นด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 80 ไมโครลิตรเพื่อให้สเปิร์มเคลื่อนที่ แล้วประมาณเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มตามที่กล่าวมาแล้ว

3. <u>การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย</u>

การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยเพื่อเปรียบเทียบชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย ทำโดยนำน้ำเชื้อปลาดุกอุยคุณภาพดีมาเจือจางด้วยสาร Extender สูตร Calcium-free Hank's Balanced Salt Solution (Ca-F HBSS; Vuthiphandchai et al., 2009b) โดยใช้อัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 1:1 นำน้ำเชื้อเจือจางน้ำยา Ca-F HBSS ผสมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ 6 ชนิด คือ Dimethyl sulfoxide (DMSO), Methanol, Glycerol, Sucrose, Ethylene glycol และ Propylene glycol อัตราส่วน 1:1 ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย (final concentrations) 5, 10 และ 15 % ผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) ดูดสารละลายน้ำเชื้อ 0.2 มิลลิลิตร ใส่หลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร (รูปที่ 2) ปิดหลอดฟางด้วยคีมลนไฟ ปล่อยให้น้ำเชื้ออยู่ในภาวะสมดุล (Equilibration time) เป็นเวลา 10 นาที ก่อนทำการแช่แข็งด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ Controlled-rate programmable freezer (Cryologic Pty Ltd รุ่น CL3000) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -3, -5 และ -8 องศาเซลเซียส/นาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง 0 องศาเซลเซียส พัก 0.5 นาที และลดอุณหภูมิต่อจากอุณหภูมิสุดท้าย 0 องศาเซลเซียส ถึง -40 องศาเซลเซียส พัก 0.5 นาที (รปที่ 3) จึงนำหลอดฟางไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) นาน 1 วัน ทำการประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายในอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที เปรียบเทียบกับการเคลื่อนที่ของสเปิร์มของน้ำเชื้อสดที่รวบรวมใหม่ๆ (control group) โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ (9 ซ้ำย่อย) นำน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งที่ได้จากชุดการทดลองใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่หลังการละลาย (post-thawed sperm motility) ดีที่สุดไปใช้ในการทดลองต่อไป

4. <u>การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่บรรจุในหลอด cryovial ด้วยไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม</u>

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วยการใช้หลอด cryovial แช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม (styrofoam box) โดยการนำเอาน้ำเชื้อปลาดุกอุยมาเจือจางในชุดการทดลอง (treatments) ซึ่งเป็น Factorial design มี 2 ตัวแปรที่สำคัญคือ 1.) สารละลายบัฟเฟอร์ 3 ชนิดได้แก่ Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS), 0.9% NaCl และ extender 7 (Vuthiphandchai and Zohar, 1999) และ 2). ระดับความสูงและเวลาในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในไอไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapor) ซึ่งการแช่แข็งในครั้งนี้ใช้ 10% DMSO ซึ่งเป็นสารละลายไครโอโพรเทคแทนส์ที่เหมาะสมในการแช่แข็ง สารละลาย 0.9% NaCl และ extender 7 ได้ถูกนำมาเจือจางน้ำเชื้อปลาดุกอุยก่อนแช่แข็ง เนื่องจาก 0.9% NaCl เป็นสารเคมีตัวเดียวที่หาได้ง่าย มีราคาถูก และ extender 7 มีสารเคมีเป็นองค์ประกอบของสูตรในสารละลายบัฟเฟอร์ไม่มากเมื่อเปรียบเทียบกับชนิดสารเคมีที่ละลายอยู่ใน Ca-F HBSS ซึ่งถ้าสารละลายเหล่านี้มีประสิทธิภาพในการแช่แข็งไม่แตกต่างกัน ก็สามารถเลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีราคาถูกมาใช้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการลดต้นทุนเทคโนโลยีให้ต่ำลง

กระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อเริ่มจาก เจือจางน้ำเชื้อปลาดุกอุยในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆทั้ง 3 ชนิดในอัตราส่วน 1:1 แล้วจึงผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดและความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสม (10% DMSO) ที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ลงไปในน้ำเชื้อที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (extended milt) ทำการรวบรวมน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์และ 10% DMSO ปริมาณ 1.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอด cryovial ขนาด 1.8 มิลลิลิตร (รูปที่ 4) ปล่อยให้อยู่ในสภาวะสมดุล (equilibration period) นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) จึงนำหลอด cryovial ที่มีน้ำเชื้อบรรจุอยู่ไปทำการลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็ง (freezing) ด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapor) โดยทำการแช่แข็งที่ระดับความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen surface) ที่อยู่ในกล่องโฟม (styrofoam box) ที่ระดับความสูง 2, 4 และ 6 เซนติเมตร พร้อมกับปิดฝากล่องโฟมให้สนิท เป็นเวลานาน 5, 10 และ 15 นาที แล้วนำหลอด cryovial แช่ลงไปในไนโตรเจนเหลว โดยใช้ forcep จับหลอด cryovial แช่ลงในไนโตรเจนเหลวทันที ทิ้งไว้ 5 นาที จึงนำหลอด cryovial ที่ได้แช่แข็งไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวนาน 7 วัน จึงนำมาประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย (post-thawed sperm motility)

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งของทุกชุดการทดลอง ทำโดยนำหลอด cryovial ออกจากถังไนโตรเจนเหลว แช่ในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนน้ำเชื้อละลาย และทำการประเมินจากเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย (post-thawed sperm motilty) โดยการทดลองทำ 6 ซ้ำ เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด (กลุ่มควบคุม)

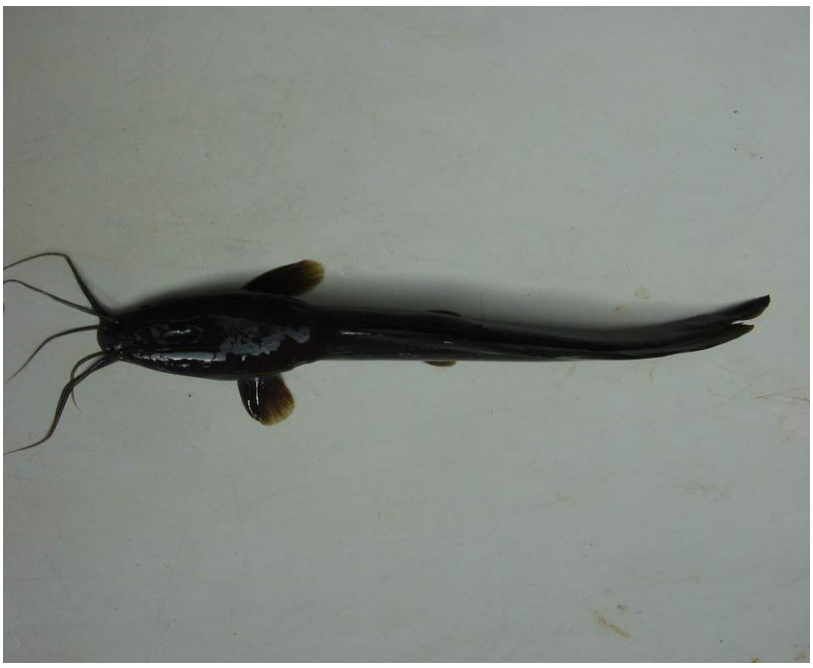
5. <u>การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่บรรจุในหลอด cryovial ด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติเปรียบเทียบกับการแช่แข็งในกล่องโฟม</u>

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ ซึ่งจะมีความเที่ยงตรงของอัตราการลดอุณหภูมิตามที่กำหนด เปรียบเทียบกับการแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม

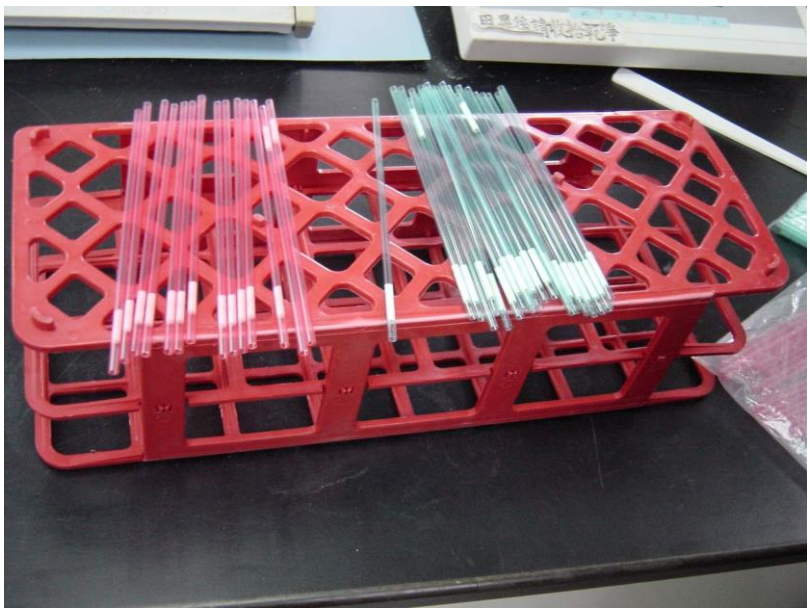
การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติในการทดลองนี้ มีการใช้หลอดฟาง (French straw) ขนาด 0.25 และ 0.5 มิลลิลิตรเพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม (positive control group) น้ำเชื้อปลาดุกอุยถูกเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาสม (Ca-F HBSS) ในอัตราส่วน 1:1 แล้วเจือจางด้วยความเข้มข้นสุดท้าย 10% DMSO แล้วนำไปบรรจุในหลอดฟางทั้ง 2 ขนาดในปริมาณ 0.2 และ 0.4 มิลลิลิตรตามลำดับ ปิดปลายหลอดฟาง สำหรับกลุ่มทดลอง นำน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่เจือจางด้วย Ca-F HBSS ที่มี 10% DMSO ปริมาณ 1.0 มิลลิลิตร มาใส่ในหลอด cryovial ขนาด 1.25 มิลลิลิตร ปล่อยให้น้ำเชื้อในทุกชุดการทดลองอยู่ในสภาวะสมดุล (equilibration time) นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) จึงนำหลอดฟางและหลอด cryovial มาลดอุณหภูมิด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิสามระดับ (3, 5, 8 องศาเซลเซียส/นาที) โดยลดอุณหภูมิจนมาถึงที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียสที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ จึงนำหลอดฟางและหลอด cryovial เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว 7 วัน หลังจากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลาย โดยแช่หลอดฟางทั้งสองขนาดและหลอด cryovial ในน้ำอุ่นที่มีอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำเชื้อละลายจึงนำมาประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด โดยทดลอง 9 ซ้ำ ในเวลาเดียวกันน้ำเชื้อปลาดุกอุยได้ถูกนำมาแช่แข็งในไอไนโตรเจนเหลวภายในกล่องโฟมด้วยการแช่แข็งในหลอด 3 ขนาดเช่นกัน คือหลอดฟางขนาด 0.25 และ 0.5 มิลลิลิตรและหลอด cryovial ขนาด 1.25 มิลลิลิตร โดยขั้นตอนการเจือจางน้ำเชื้อ การบรรจุน้ำเชื้อ และการปล่อยให้น้ำเชื้ออยู่ในระยะเวลาสมดุล ทำเหมือนกัน เพียงแต่นำน้ำเชื้อมาถูกนำมาแช่แข็งในกล่องโฟมขนาด 17×32×20 เซนติเมตร ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2, 4 และ 6 เซนติเมตร เป็นเวลานาน 10 นาที หลังจากทำการลดอุณหภูมิเสร็จ นำหลอดฟางและหลอด cryovial ไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) 7 วันและนำออกมาละลายที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเพื่อประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด โดยทดลอง 9 ซ้ำ

6. <u>การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ</u>

ข้อมูลถูกนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเฉลี่ยความแปรปรวน (standard error of the mean) โดยข้อมูลเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ในแต่ละชุดการทดลอง จะถูกนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีการ Analysis of variance (two-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองด้วย Duncan’s new multiple range test โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS



รูปที่ 1 พ่อพันธุ์ปลาดุกอุย



รูปที่ 2 หลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรที่ใช้ในการทดลอง

รูปที่ 3 เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ

รูปที่ 4 หลอด Cryovial ขนาด 1.8 มิลลิลิตรที่ใช้ในการทดลอง

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การทดลองสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ตอนดังนี้

1. การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย
2. การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่บรรจุในหลอด cryovial ด้วยไอไนโตรเจนเหลว
3. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่บรรจุในหลอด cryovial ด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ เปรียบเทียบกับการแช่แข็งในกล่องโฟม

ผลการทดลอง

1. การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย

การศึกษาผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (*C. microcephalus*) ที่แช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer) ขนาด 0.25 มิลลิลิตรโดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 6 ชนิดคือ DMSO, Methanol, Glycerol, Sucrose, Ethylene glycol และ Propylene glycol อัตราส่วน 1:1 ที่ระดับความเข้มข้นสุดท้าย (Final concentrations) 5, 10 และ 15 % บรรจุในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยพบว่าน้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 80% การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่อัตราการลดอุณหภูมิ -8 องศาเซลเซียส/นาที และอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้สาร DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 10% ให้ผลการทดลองดีที่สุดโดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายเท่ากับ 64.44 ± 4.44 รองลงมาคือสาร Methanol ที่ระดับความเข้มข้น 15% และ 10% โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 48.89 ± 3.51 และ 31.11 ± 3.51 ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนในชุดการทดลองที่เหลือของสาร DMSO และ Methanol นั้นมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่า 30% (11.11-28.89%) ส่วนการทดลองโดยใช้สาร Ethylene glycol พบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายที่ระดับความเข้มข้น 5% เพียงระดับเดียว โดยมีการเคลื่อนที่ต่ำเพียง 11.11± 4.01% เท่านั้น และไม่พบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายเมื่อแช่แข็งด้วย Propylene glycol, Glycerol และ Sucrose ที่ทุกระดับความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการทดลอง (ตารางที่ 1)

การแช่แข็งสเปิร์มปลาดุกอุยด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส/นาที และอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส พบว่าสาร Methanol ที่ระดับความเข้มข้น 15% และสาร DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 10% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายดีที่สุดเท่ากับ 44.44 ± 2.94% และ 40.00 ± 4.71% ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และไม่พบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่แข็งด้วยการใช้สาร Glycerol และ Sucrose ที่ทุกระดับความเข้มข้นของสาร ส่วนในชุดการทดลองอื่นที่เหลือมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่า 30% (ตารางที่ 2)

การแช่แข็งสเปิร์มปลาดุกอุยด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3 องศาเซลเซียส/นาที และอุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้สาร Methanol ที่ระดับความเข้มข้น 15% และสาร DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 10% มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของ

สเปิร์มหลังการละลายดีที่สุดเท่ากับ 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 % ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายเท่ากับ 40.00 ± 4.71% และไม่พบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายในน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยสาร Glycerol ที่ทุกระดับความเข้มข้นของสารและน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยสาร Sucrose ที่ระดับความเข้มข้นของสาร 5% ส่วนในชุดการทดลองที่เหลือจะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ต่ำกว่า 30% (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยที่แช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -8 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส

ชนิดสารไครโอโพรเทคแทนท์	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	$0^{a,3}$	$0^{a,3}$	$0^{a,3}$

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยที่แช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส

ชนิดสารไครโอโพรเทคแทนท์	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	$0^{a,3}$	$0^{a,3}$	$0^{a,4}$

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยที่แช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียส

ชนิดสารไครโอโพรเทคแทนท์	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	$0^{a,3}$	$6.67 \pm 3.33^{a,4}$	$8.89 \pm 3.51^{a,4}$

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

2. การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่บรรจุในหลอด cryovial ด้วยไอไนโตรเจนเหลว

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่บรรจุอยู่ภายในหลอด cryovial ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ในไอไนโตรเจนเหลวภายในกล่องโฟม ภายหลังเจือจางน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ชนิดที่ผสม 10%DMSO แล้วนำไปแช่แข็งที่เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2, 4 และ 6 เซนติเมตรนาน 5, 10 และ 15 นาที เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวแล้วนำมาละลายละลายที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พบว่าน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่แช่แข็งด้วย Ca-F HBSS มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายดีกว่าน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วย 0.9% หรือ Extender 7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4) นอกจากนี้ระยะเวลาการแช่แข็งและความสูงที่ใช้แช่แข็งน้ำเชื้อต่างก็มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4)

การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งที่ความสูง 2 เซนติเมตรนาน 10 นาทีด้วยการใช้ Ca-F HBSS มีค่าสูงสุดหลังการละลาย (44.44±4.44%) ในขณะที่การแช่แข็งด้วยการใช้ Extender 7 นาน 5, 10, 15 นาทีมีผลทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ต่ำมาก (0-8.89%) (ตารางที่ 4) ในทำนองเดียวกันสเปิร์มที่แช่แข็งที่ความสูง 4 เซนติเมตรด้วยการใช้ Ca-F HBSS นาน 10 นาทียังคงมีการเคลื่อนที่สูงสุดหลังการละลาย (48.89±3.51%) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆที่มีการเคลื่อนที่เฉลี่ยระหว่าง 13.33-42.78% สอดคล้องกับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่ความสูง 6 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวที่พบว่าสเปิร์มที่แช่แข็งด้วยการใช้ Ca-F HBSS นาน 10 นาทีมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูงสุด (75.56±2.94%) เปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆที่มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 0-35.67% (ตารางที่ 4)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวต่างกันมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย โดยการแช่แข็งน้ำเชื้อที่ระยะ 2 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายระหว่าง 0-44.4% ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการแช่แข็งที่ระยะ 4 หรือ 6 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวที่ให้ค่าเฉลี่ยระหว่าง 13.33-48.89% และ 0-75.56% ตามลำดับ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยที่แช่แข็งในไอไนโตรเจนเหลวที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวในระยะเวลาต่างๆกันเมื่อใช้ 10% DMSO และสารละลายบัฟเฟอร์ต่างชนิดกัน

ชนิดสารละลาย	ระยะเวลา (นาที)	ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว		
		2 เซนติเมตร	4 เซนติเมตร	6 เซนติเมตร
Ca-F HBSS	5	$8.89 \pm 2.61^{c,3}$	$24.44 \pm 2.94^{b,3}$	$35.67 \pm 4.1^{a,2}$
	10	$44.44 \pm 4.44^{a,1}$	$48.89 \pm 3.51^{b,1}$	$75.56 \pm 2.94^{a,1}$
	15	$28.89 \pm 3.51^{c,2}$	$42.78 \pm 2.9^{a,2}$	$26.67 \pm 3.89^{b,23}$
0.9% NaCl	5	$7.78 \pm 2.78^{c,2}$	$13.33 \pm 2.36^{b,4}$	$35.56 \pm 2.94^{a,2}$
	10	$31.11 \pm 3.51^{a,2}$	$22.22 \pm 2.22^{b,3}$	$16.7 \pm 4.2^{b,3}$
	15	$13.33 \pm 2.36^{a,3}$	$17.78 \pm 1.47^{a,4}$	$6.7 \pm 1.7^{b,4}$
Extender 7	5	$8.89 \pm 3.51^{b,3}$	$27.78 \pm 3.09^{a,3}$	$13.33 \pm 1.92^{b,3}$
	10	$6.67 \pm 3.33^{b,3}$	$36.56 \pm 2.94^{a,23}$	$6.67 \pm 3.33^{b,4}$
	15	$0^{b,4}$	$16.67 \pm 1.92^{a,4}$	$0^{b,2}$

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

3. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่บรรจุในหลอด cryovial ด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติเปรียบเทียบกับการแช่แข็งในกล่องโฟม

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยโดยหลอดบรรจุน้ำเชื้อ 3 ขนาดคือ หลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร และ 0.5 มิลลิลิตร และ cryovial ขนาด 1.25 มิลลิลิตร แช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติอัตโนมัติ และมีการปรับใช้การลดอุณหภูมิน้ำเชื้อด้วยการลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลวที่เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว (above liquid nitrogen surface) ในกล่องโฟมเพื่อศึกษาเปรียบเทียบถึงการแช่แข็งน้ำเชื้อในปริมาณมากของสองวิธีดังกล่าว จากการทดลองโดยใช้เครื่องแช่แข็งอัตโนมัติอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -8, -5 และ -3 องศาเซลเซียส/นาที พบว่าการลดอุณหภูมิที่ระดับการลดอุณหภูมิ -8 องศาเซลเซียส/นาทีในหลอดบรรจุน้ำเชื้อทั้งสามขนาดคือ 0.25, 0.5 และ 1.25 มิลลิลิตร และการลดอุณหภูมิที่ระดับการลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาทีในหลอดขนาด 0.25 มิลลิลิตร ได้ผลดีไม่ต่างกัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 35.56 ± 2.94, 26.67 ± 3.33, 31.11 ± 3.51 และ 28.89 ± 3.51% ตามลำดับ (ตารางที่ 5) โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างขนาดของหลอด ($P>0.05$) ส่วนชุดการทดลองที่เหลือนั้นจะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ต่ำกว่า 20% ทั้งหมดและมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น ในขณะที่ที่น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเฉลี่ยเท่ากับ 71.11%

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย โดยการลดอุณหภูมิด้วยไอไนโตรเจนเหลว ภายในกล่องโฟมที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวที่ระดับ 2, 4 และ6 เซนติเมตร เป็นเวลา 10 นาทีในกล่องโฟมที่ปิดฝา โดยใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อทั้งสาม 3 ขนาด คือ 0.25, 0.5 และ 1.25 มิลลิลิตร พบว่า การแช่แข็งที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร ในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.25 และ 1.25 มิลลิลิตร ได้ผลดีที่สุดโดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายเท่ากับ 48.89 ± 3.51 และ 44.44 ± 2.94% ตามลำดับ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับชุดการทดลองอื่นที่แช่แข็งที่ความสูง 2 หรือ 4 เซนติเมตร รองลงมาคือการแช่แข็งที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร ในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.5 มิลลิลิตร ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายเท่ากับ 24.44 ± 2.94% ส่วนทุกชุดการทดลองที่เหลือจะมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ต่ำกว่า 20% (ตารางที่ 6) โดยที่น้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 77.78%

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยที่แช่แข็งด้วยเครื่องแช่แข็งอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -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	$8.89 \pm 2.61^{b,2}$	$7.78 \pm 2.78^{b,2}$	$16.67 \pm 1.67^{a,2}$

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยที่แช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลวที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2, 4 หรือ 6 เซนติเมตร 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	$0^{a,2}$	$0^{a,2}$	$7.78 \pm 1.47^{a,2}$

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

5.1 การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย

ผลที่ได้จากการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยเมื่อใช้สารไครโอโพรเทตแทนท์ต่างๆชนิดในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร แสดงให้เห็นว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -8 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียสแล้วนำไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว พบว่าการใช้สาร DMSO ระดับความเข้มข้น 10% ให้ผลดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายเท่ากับ 64.44 ± 4.44% โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับทุกชุดการทดลอง จึงนำไปใช้ในการทดลองต่อไป สารไครโอโพรเทคแทนท์ DMSO สามารถนำมาแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยได้ผลดี สาเหตุหนึ่งเป็นเพราะ DMSO สามารถขัดขวางการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของน้ำ (Rao and Singh, 1992) และยังมีความสามารถในการแพร่ซึมผ่านเนื้อเยื่อได้ดี เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดผลึกน้ำแข็ง (ice crystal) ขณะลดอุณหภูมิแช่แข็ง เนื่องจาก DMSO มีมวลโมเลกุลต่ำ จึงแพร่ซึมผ่านเซลล์ได้ง่าย อย่างไรก็ตามความสำเร็จในการใช้สาร DMSO ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา ยังขึ้นอยู่กับตัวแปรที่เกี่ยวข้องอื่นๆ เช่นความเข้มข้น ระยะเวลา และอุณหภูมิ (Vuthipandchai et al., 2009a) เช่น ถ้าความเข้มข้นของสาร DMSO ที่ใช้ในการแช่แข็งมีค่าต่ำเกินไป อาจปกป้องเซลล์ได้ไม่ดี หรือเมื่อใช้ความเข้มข้นที่สูงเกินไป อาจทำให้เซลล์ได้รับอันตราย (cell injury) เป็นต้น นอกจากนี้ความสำเร็จในการลดอุณหภูมิเพื่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วยการใช้ 10% DMSO ยังขึ้นอยู่กับการเลือกใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม (-8 องศาเซลเซียส/นาที) เนื่องจากเป็นปฏิกริยาร่วมของตัวแปรทั้งสอง (interaction) โดยการลดอุณหภูมิที่ช้าเกินไป (slow freezing rate) ในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง จะทำให้น้ำแพร่ออกจากเซลล์มาก เพราะใช้เวลานานมากกว่าเซลล์แข็งตัว (frozen) จนทำให้เซลล์มีขนาดเล็กลงมากเกินไปแม้ว่าจะใช้ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งแล้วก็ตาม ผลที่ตามมายังทำให้ความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์ หรือมีค่าออสโมลารตี้ (osmolality) มีค่าสูงขึ้น (solute effect) ในทางตรงกันข้ามถ้าแช่แข็งด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่เร็วเกินไป (high freezing rate) น้ำจะแพร่ออกจากเซลล์ได้น้อย ซึ่งเมื่อเซลล์แข็งตัวอันเนื่องจากการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว โอกาสที่จะเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์จะมีมากขึ้น เกิดอันตรายต่อเซลล์ได้ง่ายแม้ว่าจะใช้ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งแล้วก็ตาม (Cabrita et al., 2010; Irawan et al., 2010)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วย methanol ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 15 เปอร์เซ็นต์ ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3 องศาเซลเซียส/นาทีมาที่อุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 องศาเซลเซียสก่อนการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว ให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายอยู่ในเกณฑ์ที่ดีรองลงมาเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ 10% DMSO โดยทั่วไป methanol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดหนึ่งที่นิยมนำมาใช้แช่แข็งในปลาตระกูล catfish เช่น African catfish *Clarias gariepinus* (Viveiros et. Al., 2000), Yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) (Pan et al., 2008), Blue catfish (*Ictalurus furcatus*) (Hu, Yang, & Tiersch, 2011) เป็นต้น โดยในการศึกษาครั้งนี้เห็นได้ว่าสาร methanol ที่ความเข้มข้นต่ำจะได้ผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายไม่ดีเท่าที่ความเข้มข้นสูงกว่า แต่การใช้ความเข้มข้นที่สูงเกินไป ก็อาจจะเสี่ยงต่ออันตรายของเซลล์จากความเข้มข้นของ

สารละลายได้ถ้าการจัดการระหว่างการแช่แข็งไม่ดีพอ ส่วนสารไครโอโพรเทคแทนท์อื่นๆอีกสี่ชนิดที่ใช้ในการทดลองไม่มีสารตัวใดที่ได้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยหลังการละลายสูงเกินกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ โดยเฉพาะในสาร glycerol ที่ไม่พบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเลยถึงแม้ว่าจะเป็นสารที่มีความสามารถในการลดความแข็งแรงของ Hydrogen bone ในการจับตัวกันระหว่างโมเลกุลของน้ำ (Dashnau et al., 2006) สาร glycerol เมื่อนำมาทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาจะได้ผลดีในปลา Summer whiting (*Sillago ciliata*) (Young et al., 1992) แต่เมื่อนำมาใช้ในปลา Yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) มีผลทำให้มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าไม่ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ (Pan et al., 2008) สำหรับสาร propylene glycol ได้มีรายงานถึงความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์เพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน (Horváth and Urbanyi, 2000) แต่การศึกษาในน้ำเชื้อปลาตาเดียว พบว่าสาร propylene glycol มีความเหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตาเดียว มากกว่าสาร DMSO และ glycerol (Rideout et al., 2003)

5.2 การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่บรรจุในหลอด cryovial ด้วยไอไนโตรเจนเหลว

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในหลอด cryovial ขนาด 1.8 มิลลิลิตรในไอไนโตรเจนเหลวภายในกล่องโฟม ให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูงสุด ได้มาจากชุดการทดลองที่ทำการเจือจางน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วยสารละลาย Ca-F HBSS แล้วนำไปแช่แข็งที่ระดับ 6 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวนาน 10 นาที สาเหตุที่น้ำเชื้อปลาดุกอุยเมื่อแช่แข็งด้วย Ca-F HBSS มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายดีกว่าน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วย 0.9% หรือ Extender 7 อาจมีความเกี่ยวข้องกับปฏิกริยาร่วมระหว่างชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์และอัตราการลดอุณหภูมิที่ใช้ไอไนโตรเจนเหลวในการแช่แข็งน้ำเชื้อ เนื่องจากในการทดลองนี้ ทุกชุดการทดลองได้ใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 10% DMSO เหมือนกัน แสดงให้เห็นว่าสารละลาย Ca-F HBSS มีความเหมาะสมในการนำมาแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย ซึ่งปฏิกริยาร่วมของสารละลายบัฟเฟอร์และอัตราการลดอุณหภูมิที่มีต่อความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อได้มีรายงานในการศึกษาจำนวนมาก เช่น

Irawan et al. (2010) ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนด้วยการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 6 ชนิด และสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด ด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาทีก่อนเก็บในไนโตนเจนเหลว พบว่าน้ำเชื้อปลาไนที่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ common carp sperm extender (CCSE2) ที่มีสารละลาย DMSO มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด และยังพบว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนอย่างง่าย โดยนำน้ำเชื้อปลาไนมาแช่แข็งเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2 เซนติเมตร นาน 10 นาที มีผลทำให้สเปิร์มยังคงมีการเคลื่อนที่สูงกว่า 90%หลังการละลาย

Gwo et al. (1991) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Atlantic croaker ด้วยการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ พบว่า sperm extender ที่ประกอบด้วย เกลือแกง กลูโคส และ ซูโครส สามารถใช้เจือจางน้ำเชื้อขณะทำการแช่แข็ง ได้มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ sperm extender ชนิดอื่นๆ ที่มีความสลับซับซ้อน หรือมีสารเคมีหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ

Ji et al. (2004) แช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea perch (*Lateolabrax japonicus*) ด้วยการใช้สารละลาย Extender 3 ชนิดคือ modified plaice Ringer solution (MPRS), D-15 และ modified Mounib's medium (MMM) ในการเจือจางน้ำเชื้อปลา แล้วใส่สารไครโอโพรแทคแทนท์

DMSO ความเข้มข้น 6%, 10% และ 14% ทำการแช่แข็งที่ระดับความสูง 2, 6 และ 13 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 10 นาที จึงนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่า การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea perch ด้วย 10% DMSO ที่ความสูงเหนือผิวหน้าสารไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่หลังการละลายสูงที่สุด ในขณะที่การแช่แข็งที่ระดับความสูง 2 เซนติเมตร มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าต่ำสุด

ความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยอย่างง่ายด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟมในการแช่แข็งงน้ำเชื้อปริมาณมากในหลอด cryovial ทำได้ง่าย ไม่สลับซับซ้อน และยังลดการพึ่งพาการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติที่มีราคาแพงในการแช่แข็งน้ำเชื้อ ซึ่งการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยไอไนโตรเจนเหลวภายในกล่องโฟม จัดเป็นเทคโนโลยีการแช่แข็งที่มีราคาถูก เหมาะสำหรับผู้ประกอบการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำที่ต้องการนำเอาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลามาใช้เพื่อการเพาะพันธุ์ปลา และยังช่วยลดภาระค่าใช้จ่ายในการซื้อเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อปลา เพราะการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยอย่างง่ายในถังโฟมมีประสิทธิภาพการแช่แข็งที่ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูง อย่างไรก็ตามการพัฒนาเทคนิคงานวิจัยให้สามารถแช่แข็งน้ำเชื้อปลาให้ได้ในปริมาณมากขึ้นสำหรับการแช่แข็งภายในแต่ละหลอด เช่นแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในหลอด cryovial ขนาด 4 มิลลิลิตรแล้วทำให้คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลายไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด ไม่ว่าจะเป็นการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย หรือความสามารถในการปฏิสนธิไข่ของน้ำเชื้อแช่แข็ง ก็ควรจะได้มีการวิจัยต่อยอดอย่างเป็นระบบในอนาคต เพื่อให้มีธนาคารน้ำเชื้อสัตว์น้ำสำหรับการใช้ประโยชน์ด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และ/หรือการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์น้ำที่เริ่มหาได้ยากหรือสัตว์น้ำที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจสูง เนื่องจากสัตว์น้ำมีไข่จำนวนมาก จึงต้องใช้น้ำเชื้อปริมาณมากในการผสมเทียมเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์บกหรือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่มีไข่ปริมาณน้อย

5.3 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่บรรจุในหลอด cryovial ด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติเปรียบเทียบกับการแช่แข็งในกล่องโฟม

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในหลอดทั้ง 3 ขนาดด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติอัตโนมัติ และการแช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลวที่เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม ต่างก็สามารถแช่แข็งน้ำเชื้อได้ โดยวิธีที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยเพื่อให้ได้น้ำเชื้อหลังการละลายมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่มีค่าสูงนั้น ได้มาจากการเจือจางน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วย Ca-F HBSS ที่ประกอบด้วย 10% DMSO แล้วแช่แข็งน้ำเชื้อในหลอดทั้ง 3 ขนาดด้วยการลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลวที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร เป็นระยะเวลานาน 10 นาที หรือแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ -8 องศาเซลเซียส/นาทีมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส ก่อนเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว

โดยทั่วไปการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาให้ประสบผลสำเร็จ มีความเกี่ยวข้องกับตัวแปรที่เกี่ยวข้องอื่นๆจำนวนมาก เริ่มตั้งแต่ คุณภาพสเปิร์ม ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ อัตราการลดอุณหภูมิ อัตราการละลาย และขนาดของหลอดแช่แข็ง เป็นต้น ในการทดลองนี้ น้ำเชื้อปลาดุกอุยเมื่อแช่แข็งภายในหลอดทดสอบทั้ง 3 ขนาดด้วยวิธีการแช่แข็งที่เหมาะสม ไม่ว่าจะเป็นการแช่แข็งในไอไนโตรเจนเหลวที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร เป็นระยะเวลานาน 10 นาที หรือแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ -8 องศาเซลเซียส/นาทีมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียสก่อนเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว ต่างก็มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยหลัง

การละลายมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า protocols การแช่แข็งที่ได้พัฒนาขึ้นมาทั้งการแช่แข็งอย่างง่ายในกล่องโฟม และการแช่แข็งด้วยเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ มีความเหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยเมื่อใช้หลอดฟางขนาด 0.25 และ 0.5 มิลลิลิตร และหลอด cryovial ขนาด 1.25 มิลลิลิตร การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วยการลดอุณหภูมิที่เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวที่ความสูง 2 และ 4 เซนติเมตร น่าจะเป็นระดับความสูงที่มีผลทำให้อัตราการลดอุณหภูมิมีค่าลดลงรวดเร็วเกินไป โดย Irawan et al. (2010) รายงานว่าอัตราการลดอุณหภูมิเมื่อใช้ไอไนโตรเจนเหลวที่ระดับความสูง 2 และ 4 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟมเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน มีค่า -110.9 และ -92.2 องศาเซลเซียส/นาที ตามลำดับ ซึ่งอัตราการลดอุณหภูมิที่สูงดังกล่าวอาจไม่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย

การศึกษาผลของขนาดของหลอดแช่แข็งน้ำเชื้อที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลาหลังการแช่แข็งในปลาชนิดอื่นๆมีผลการศึกษาแตกต่างกันไป เช่น Linhart et. al. (2005) แช่แข็งน้ำเชื้อปลา European catfish (*Silurus glanis*) ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ -4 องศาเซลเซียส/นาที เริ่มตั้งแต่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิ -9 องศาเซลเซียส และ ต่อมาใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -11 องศาเซลเซียส/นาที ตั้งแต่อุณหภูมิ -9 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิสุดท้ายที่ -80 องศาเซลเซียส โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งที่ปริมาณ 1, 2 และ 4 มิลลิลิตร ปรากฏว่า ไม่พบความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย (46.7, 36.5 และ 51.1% ตามลำดับ) แต่การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ปรากฏว่า น้ำเชื้อที่แช่แข็งในหลอดขนาดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.25 มิลลิลิตร ได้ผลดีกว่าการแช่แข็งในหลอดขนาด 0.5 มิลลิลิตร (Christensen & Tiersch, 2005) สาเหตุที่ทำให้ผลการศึกษาเหล่านี้แตกต่างกัน ส่วนหนึ่งน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับปริมาณน้ำเชื้อที่ใช้ และความหนาของหลอดฟาง หรือหลอด cryovial ที่อาจมีแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับ specification ของผู้ผลิต ซึ่งการใช้อัตราการลดอุณหภูมิเดียวกันในการแช่แข็งน้ำเชื้อปริมาณเท่ากันในหลอดขนาดเดียวกันแต่ถ้าหลอดมีความหนาต่างกัน ก็จะส่งผลต่อการแพร่ความเย็นเพื่อลดอุณหภูมิแช่แข็งได้แตกต่างกัน (Lahnsteiner et al. 1997)

สรุปผลการทดลอง

การใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาดใหญ่สำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย สามารถทำได้ด้วยการใช้หลอด cryovial ขนาด 1.25 มิลลิลิตร ซึ่งมีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกับการใช้หลอดฟางขนาด 0.25 และ 0.5 มิลลิลิตร เมื่อทำการแช่แข็งลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลวภายในกล่องโฟมที่ความสูง 6 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวนาน 10 นาที หรือแช่แข็งด้วยการใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติในอัตรา -8 องศาเซลเซียส/นาที ด้วยการเจือจางน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วย Ca-F HBSS ที่มี 10% DMSO นาน 10 นาทีก่อนการแช่แข็ง การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยอย่างง่ายภายในกล่องโฟมช่วยลดต้นทุนการแช่แข็ง ทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน ใช้ระยะเวลาไม่นานก็สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ในปริมาณมาก อย่างไรก็ตามการพัฒนาศักยภาพในการแช่แข็งน้ำเชื้อในปริมาณมากขึ้น (เช่นการใช้หลอดขนาด 4 มิลลิลิตร หรือขนาดใหญ่กว่านี้) ควรมีการพัฒนาต่อยอดวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อเพื่อนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ต้องการใช้น้ำเชื้อปลาแช่แข็งปริมาณมากขึ้นในระหว่างการจัดการเพาะพันธุ์ปลา

เอกสารอ้างอิง

กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง. 2554. สถิติผลผลิตการเลี้ยงสัตว์น้ำจืดประจำปี 2552. ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ เอกสารฉบับที่ 5/2554 จำนวน 65 หน้า

กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง หลักการ/วิธีการ/ประโยชน์. กรุงเทพ:มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไชยา อุ้ยสูงเนิน. 2532. การเลี้ยงปลาดุก. กรุงเทพฯ: พรสาสน์.

พลชาติ ผิวเณร และ พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข. 2546. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำในรูปน้ำเชื้อแช่แข็ง. ปทุมธานี: สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง.

ทัศนีย์ ภูพิพัฒน์, บุญนำ สุขทิศ, สุริยา ทานสุทัศน์ และเพียงใจ แก้วจรูญ. 2529. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพาและปลาบึก.เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 66. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ

นลินี มารคแมน, กฤษณ์ มงคลปัญญา, อุทัยรัตน์ ณ นคร, และ ประวิทย์ สุรนีรนาถ. 2526. ความล้มเหลวในการพยายามเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพื่อประโยชน์ในการผสมเทียม. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 21 สาขาประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิพนธ อุปการัตน, สมพร โกศล, นิภา กาลศรี และ วรัณยู ขุนเจริญรักษใ 2556. การเลี้ยงปลาดุกอุยในกระชังโดยการใหอาหารในเวลาที่ตางกัน. เอกสารวิชาการฉบับที่ 4/2556. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด. กรมประมง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 20 หน้า

เสน่ห์ ผลประสิทธิ์, ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล และ กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเพาะขยายพันธุ์ปลาบึก. วารสารการประมง 46(5): 399-415.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2535. การเพาะพันธุ์ปลา. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. 194 หน้า.

Alavi, S.M.H. and Cosson, J. 2005. Sperm motility in fish. Effect of temperature and pH. Cell Biology International 29: 101-110.

Alavi, S.H.M., Rodina, M., Policar, T., Kozak, P., Psenicka, M, O. and Linhart, O. 2007. Semen of *Perca fluviatilis* Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilute ratio,ions and osmolality on sperm motility. Theriogenology 68: 276-283.

Bates, M.C., Wayman, W.R. and Tiersch, T.R. 1996. Effect of osmotic pressure on the activation and storage of channel catfish sperm. Transactions of the American Fisheries Society 125: 798-802.

Bolla, S., Holmeljord, I. and Refstie, T. 1987. Cryologic preservation of Atlantic salmon sperm. Aquaculture 65: 371-374.

Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Sooksawat, T., Vuthiphandchai, V. and Nimrat, N. 2014. Evaluation of the potential source of bacterial contamination during cryopreservation process of silver barb (*Barbodes gonionotus*) sperm. Aquaculture Research 1-13 doi:10.1111/are.12664.

Cabrita, E., Sarasquete, C., Martinez-Paramo, S., Robles, V., Beirao, J., Perez-Cerezales, S. and Herraez, M.P. 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. Journal of Applied Ichthyology 26:623-635.

Casselman, S.J., Schulte-Hostedde, A.I. and Montgomerie, R., 2006. Sperm quality influences male fertilization success in walleye (*Sander vitreus*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Science 63: 2119-2125.

Christensen, J.M. and 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.

Conget, P., Fernandez, M., Herrera, G. and Minguell, J.J. 1996. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. Aquaculture 143: 319-329.

Dashnau, J.L., Nucci, N.V., Sharp, K.A. and Vanderkooi, J.M. 2006. Hydrogen bonding and the cryoprotective properties of glycerol/water mixtures. Journal of Physical Chemistry B, 110: 13670-13677.

Department of Fisheries. 2011. Freshwater aquaculture production survey 2009. Fishery Statistic Analysis and Research Group, Information Technology Center. No. 5/2011. Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand 65pp.

Ding, S., Ge, J., Hao, C., Zhang, M., Yan, W., Xu, Z., Pan, J., Chen, S., Tian, Y. and Huang, Y. 2009. Long-term cryopreservation of sperm from Mandarin fish *Siniperca chuatsi*. Animal Reproduction Science 113: 229-235.

Fauvel, C. Suquet, M., Dreanno, C., Zonno, V. and Menu, B. 1998. Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production simtiting conditions. Aquatic Living Resources 11(6): 387-394.

Fribourgh, J.H. 1966. The application of a differential staining method to low-temperature studies on goldfish spermatozoa. The Progressive Fish-Culturist 28: 227-230.

Gwo, J.H., Strawn, K., Longnecker, M.T. and Arnold, C.R. 1991. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. Aquaculture 94: 355-375.

Horváth, A. and Urbanyi, B. 2000. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved of African catfish sperm, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). Aquaculture Research 31: 317-324.

Horváth, A., Urbanyi, B., Wang, C., Onders, R.J. and Mims, S. D. 2010. Cryopreservation of paddlefish sperm in 5-mL straws. Journal of Applied Ichthyology 26: 715-719.

Hu, E., Yang, H. and 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.

Irawan, H., Vuthiphandchai, V. and Nimrat, S. 2010. The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. Animal Reproduction science 122: 236-243.

Jamieson, B.G.M. 1991. In: Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa. Edited by B.G.M. Jamieson. New York. Cambridge University Press. pp. 215-230.

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

Kurokura, H., Hirano, R., Tomita, M., and Iwahashi, M. 1984. Cryopreservation of carp sperm. Aquaculture 37: 267-273.

Lahnsteiner, F., Weismann, T. and Patzner. R.A. 1997. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. Aquaculture Research 28: 471-479.

Lahnsteiner, F. Berger, B. and Weismann, T. 2003. Effects of media, fertilization technique, extender, straw volume, and sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen. Theriogenology 60: 829–841.

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

Liu, Q.H., Chen, Y.K., Xiao, Z.Z., Li, J., Xu, S.H. and Shi, X.H. 2010. Effect of storage time and cryoprotectant concentrations on the fertilization rate and hatching rate of cryopreserved sperm in red seabream (*Pagrus major* Temminck & Schlegel, 1843). Aquaculture Research 41: e89-e95.

Liu, Q., Li, J., Zhang, S., Ding, F., Xu, X., Xiao, Z. and Xu, S. 2006. An efficient methodology for cryopreservation of spermatozoa of red seabream, *Pagrus major*, with 2-mL cryovials. Journal of the World Aquaculture Society 37(3): 289-297.

Mansour, N., Ramoun, A. and Lahnsteiner, F. 2005. Quality of testicular semen of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) and its relationship with fertilization and hatching success. Aquaculture Research 36: 1422-1428.

Mongkonpunya, K., Chairak, N., Pupipat, T. and Tiersch, T.R. 1995. Cryopreservation of mekhong giant catfish sperm. Asian Fisheries Science 8: 211-221.

Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S. and Yasuda, K. 1983. Effects of osmolarity and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes. Journal of Experimental Biology 107: 95-103.

Muchlisin, Z.A. 2005. Review: current status of extenders and cryoprotectants on fish spermatozoa cryopreservatiom. Biodiversitas Volume 6, Nomor 1 Halaman: 66-69.

Na-Nakorn, U. and Wongpathom. K., and Thawatchai. N. 2004. Genetic diversity of walking catfish, *Clarias macrocephalus*, in Thailand and evidence of genetic introgression from introduced farmed *C. gariepinus*. Aquaculture 240: 145-163.

Nahiduzzaman, M., Hassan, M.M., Khanam, U.H., Mamuna, S.N.A., Hossain M.A.R. and Tiersch, T.R. 2011. Sperm cryopreservation of the critically endangered olive barb (Sarpunti) *Puntius sarana* (Hasemenon, 1822). Cryobiology 62: 62-67.

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

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

Rana, K.J. and McAndrew, B.J. 1989. The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. Aquaculture 76: 335-345.

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

Richardson, G.F., Miller, T.L. and McNiven, M.A. 2000. Cryopreservation of Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.), semen in various extender and in three sizes of straw. Aquaculture Research 31: 307-315.

Rideout, R.M., Litvak, M.K. and Trippel, E.A. 2003. The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents. Aquaculture Research 34: 653-659.

Saad. A, Billard, R., Theron, M.C. and Hollebecq, M.G. 1988. Short–term preservation of carp *Cyprinus carpio* semen. Aquaculture 71: 133–150.

Sarvi, K., Niksirat, H., Amir, B.M., Mirtorabi, S.M., Rafiee, G.R. and Bakhtiyari, M. 2006. Cryopreservation of semen from the endangered Caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*). Aquaculture 256: 564-569.

Scott, A.P. and Baynes, S.M. 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. Journal of Fish Biology 17: 707-739.

Srisuvantach, V. and Thangtrongpiros, M. 1985. Induced breeding and larval rearing of *Clarias macrocephalus* In: FAO Aquaculture Practices. Planing and Extension in Thailand.

Suquet, M., Dreanno, C., Petton, B., Normant, Y., Omnes, M.H. and Billard, R. 1998. Long-time effects of the cryopreservation of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa. Aquatic Living Resources 11: 45-48.

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

Tian, Y., Qi, W., Jiang, J., Wang, N., Wang, D., Zhai, J., Chen, C. and Chen, S. 2013. Sperm cryopreservation of sex-reversed seven-band grouper. Animal Reproduction Science 137: 230-236.

Tiersch, T.R., Goudie, C.A. and Carmichael, G.I. 1994. Cryopreservation of channel catfish sperm: storage in cryoprotectants, fertilization trials, and growth of channel catfish produced with cryopreserved sperm. Transactions of the American Fisheries Society 123: 580-586.

Tiersch, T.R. 2000. Introduction. In: Cryopreservation in Aquatic Species (ed. by T.R. Tiersch & P.M. Mazik), pp. xix–xxvi. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA.

Tiersch, T.R. 2008. Strategies for commercialization of cryopreserved fish semen. Revista Brasileira de Zootecnia. v.37, suplemento especial p.15-19.

Vidthayanon, C. 2005. Thailand Red data: Fishes. Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning, Bangkok, Thailand. 108 p.

Vidthayanon, C. and Allen, D.J. 2013. *Clarias macrocephalus*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013: e.T166020A6170044. http://dx.doi.org/10.2305/ IUCN.UK.2011-1.RLTS.T166020 A6170044.en

Viveiros, A. T. M., So, N. and Koman, J. 2000. Sperm cryopreservation of African catfish *Clarias garieninus*: cryoprotectants, freezing rate and sperm: egg dilution ratio. Theriogenology 54: 1395-1408.

Vuthiphandchai, V. and Zohar, Y. 1999. Age-related sperm quality of captive striped bass, *Morone saxatilis*. Journal of the World Aquaculture Society. 30: 65-72.

Vuthipandchai, V., Chomphuthawach, S. and Nimrat, S. 2009a. Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. Theriogenology 72: 129-138.

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

Vuthiphandchai, V., Wilairattanadilok, K., Chomphuthawach, S., Sooksawat, T. and Nimrat, S. 2014. Sperm cryopreservation of silver barb (*Barbodes gonionotus*): cryoprotectants, cooling rate and storage time on sperm quality. Aquaculture Research doi:10.1111/are.12396.

Warnecke, D. and Pluta, H-J. 2003. Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm using dimethyl-acetamide as the main cryoprotectant. Aquaculture 215: 167–185.

Yavas, I. and Bozkurt, Y. 2011. Effect of different thawing rates on motility and fertilizing capacity of cryopreserved grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) sperm. Biotechnology and Biotechnological Equipment. doi: 10.5504/BBEQ. 2011.0018.

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

ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่และหน้า)

1. ปฏิญญา อ้นขวัญเมือง, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2560. การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยปริมาณมาก. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม. หน้า 600-606.

2. การจดสิทธิบัตร

-

3. ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำเสนอไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป)

-

4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

-