บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชีววิทยาและอนุกรมวิธานของปลายี่สกเทศ

ปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) หรือปลาโรฮู่ เป็นปลาที่นำมาจากประเทศอินเดีย (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538) พบทั่วไปในแม่น้ำลำคลอง หรือแหล่งน้ำจืดของประเทศอินเดีย ปากีสถาน และพม่า ขนาดของปลายี่สกเทศที่เคยพบในประเทศอินเดียมีความยาว 6 ฟุต น้ำหนักมากกว่า 100 ปอนด์ ถูกนำเข้ามาประเทศไทยครั้งแรกเมื่อวันที่ 23 พฤษภาคม พ.ศ. 2511 (ศักดิ์ชัย ชูโชติ, 2536) เนื่องจากแต่เดิมยังไม่มีชื่อเรียกไทย ดร. บุญ อินทรัมพรรย์ ผู้เชี่ยวชาญด้านการประมงของไทย จึงได้ตั้งชื่อว่าโรฮู่ เป็นปลาที่อยู่ในตระกูลเดียวกันกับปลายี่สกไทย และนำเข้ามาจากต่างประเทศเช่นเดียวกัน (วิฑูรย์ ปัญญากุล, 2547) ปลายี่สกเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว อดทน (สันต์ นาตะสุวรรณ, 2548) กินพืชและสิ่งเน่าเปื่อยเป็นอาหาร ลูกปลาขนาดเล็กกินพวกสาหร่ายและแพลงก์ตอน เมื่อปลามีขนาด 25 เซนติเมตร จะเริ่มนิสัยมากินอาหารจำพวกเศษพืชที่เน่าเปื่อยมากขึ้น ในกระเพาะอาหารปลาขนาดใหญ่ พบว่า มีส่วนประกอบของอาหารจำพวกเน่าเปื่อยเกินกว่าครึ่งหนึ่งของอาหารทั้งหมด (ศักดิ์ชัย ชูโชติ, 2536)

ในฤดูกาลผสมพันธุ์วางไข่ปลาของยี่สกเทศอยู่ในช่วงเดือนมิถุนายน-กันยายน ซึ่งจะคลาดเคลื่อนกันบางในแต่ละปีขึ้นอยู่กับว่าในปีนั้น ๆ ฝนมาเร็วหรือช้า (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2531) ลักษณะของปลายี่สกเทศตัวผู้เมื่อสมบูรณ์เพศ ครีบหูมีปุ่มจะสิว (Pearl organ) เมื่อลูบดูจะรู้สึกสากมือชัดเจน ลักษณะนี้ปรากฏระหว่างฤดูสืบพันธุ์ รูปร่างเพรียวกว่าปลาเพศเมีย เมื่อรีดเบาๆ บริเวณช่องเพศจะมีน้ำเชื้อสีขาวขุ่นไหลออกมา แสดงว่าปลาตัวผู้มีความสมบูรณ์ทางเพศ สามารถนำไปผสมพันธุ์ได้ ตัวเมียที่มีไข่แก่เต็มที่ ท้องจะอูมเป่ง เมื่อจับดูจะนิ่มมาก ถ้าเอามือลูบบริเวณท้องจากส่วนหัวไปส่วนหาง จะมีความรู้สึกว่าไข่จะแยกเป็น 2 พู ชัดเจน และถ้าดูที่อวัยวะเพศ จะมีลักษณะอูมเป่งและมีสีชมพูเรื่อ ๆ แสดงว่ามีความสมบูรณ์ทางเพศสามารถนำไปผสมพันธุ์ได้ (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538) ในประเทศไทยพบว่าปลายีสกเทศไม่วางไข่ในบ่อ จึงต้องใช้วิธีการฉีดฮอร์โมนและผสมเทียม (สันต์ นาตะสุวรรณ, 2548)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปราโมทย์ สำราญกิจดำรง (2549) ได้การจำแนกอนุกรมวิธานทางวิชาการดั้งนี้ ปลายี่สกเทศมีชื่อสามัญว่า Rohu มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Labeo rohita*

Phylum Chordata

Class Actinopterygii

Order Cypriniformes

Suborder Cyprinoidei

Family Cyprinidae

Subfamily Cyprininea

Genus Labeo

Species rohita

ปลายี่สกเทศเป็นปลาน้ำจืดมีลักษณะคล้ายปลานวลจันทร์ของไทย บนเกล็ดมีจุดสีส้มจาง ๆ ปลายครีบค่าง ๆ รวมทั้งครีบหางมีสีส้มอ่อน ๆ (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2531) รูปร่างเพรียวยาว ลำตัวค่อนข้างแบน ข้างสันหลังโค้งมากกว่าส่วนท้อง หัวมนค่อนข้างโตริมฝีปากหนา (ปราโมทย์ สำราญกิจดำรง, 2549) ปากแคบจะงอยปากยื่นยาวลึก บนขากรรไกรบนและล่างมีหนวดแห่งละคู่ ครีบหลังมีก้านครีบ 15- 7 ก้าน ที่ครีบหูมี 17 ก้าน และครีบท้องมี 7 ก้าน มีเกล็ดบนเส้นข้างตัว 40-42 เกล็ด หางเป็นแฉกเว้าลึก (วิฑูรย์ ปัญญากุล, 2547)

อวัยวะสืบพันธุ์และการสร้างเซลล์อสุจิ

ในปลากระดูกแข็งส่วนใหญ่ อัณฑะจะมีลักษณะเป็นพูยาว 2 พู อยู่ภายในช่องท้องติดกับผนังช่องท้องด้านบนโดยมีเยื่อบาง ๆ ยึดไว้ (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2531) และมีเยื่อยึดที่เรียกว่า มีซอร์เชียม (mesorchium) ช่วยยึดอัณฑะให้ติดผนังช่องท้องด้านบนบริเวณปลายอัณฑะด้านท้าย (posterior) ทั้ง 2 พู ของปลากระดูกแข็งส่วนมากจะมีท่อนำน้ำเชื้อ (sperm duct) เป็นท่อสั้น ๆ ไปตามแนวกึ่งกลางตัวไปเปิดออกบริเวณช่องเพศ (urogenital pore) ทำให้สเปิร์มที่สร้างจากอัณฑะถูกลำเลียงผ่านท่อน้ำเชื้อออกสู่ภายนอกร่างกายกับปัสสาวะ สำหรับปลาบางชนิด เช่น ปลาแซลมอนหรือปลาเทร้าจะไม่มีท่อนำน้ำเชื้อ ทำให้พบว่าขนาดและน้ำหนักของอัณฑะเปลี่ยนไปตามอายุของปลาหรือฤดูอัณฑะมีหน้าที่ในการผลิตสเปิร์มและฮอร์โมนเพศในระบบสืบพันธุ์ โครง สร้างของอัณฑะของปลากระดูกแข็งประกอบด้วยเยื่อหุ้มอัณฑะเรียกว่า ทูนิคาอัลบูจิเนีย (tunica albuginea) เช่นเดียวกับที่พบในรังไข่ (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การสร้างเซลล์อสุจิของปลามี 2 ขั้นตอน

1. สเปิร์มมาโตเจนีซิส (spermatogenesis) ระยะนี้เริ่มจากสเปอร์มาโตโกเนียเปลี่ยนไปเป็นสเปิร์มมาโตไซต์ ขั้นที่ 1 (primary sermatocyte) จากนั้นจะเกิดการแบ่งเซลล์แบบ ไมโอซิส ระยะที่ 1 ได้สเปิร์มมาโตไซต์ ขั้นที่ 2 (sccondary spermatocyte) จากนั้นก็จะแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ระยะที่ 2 ได้สเปิร์มมาติด รวม 4 เซลล์ มีไมโครโซมเพียงชุดเดียว แต่ยังไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้

2. สเปิร์มมิโอเจนิซิส (spermiogenesis) ในระยะนี้สเปิร์มมาติดจะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจนเหมือนเชื้อตัวผู้เรียกว่า สเปิร์มมาโตซัว โดยส่วนของเซ็นตริโอล (centriole) จะยื่นยาวออกมาเป็นหาง จากนั้นนิวเคลียส (nucleus) จะผนึกตัวแน่นขึ้นล้อมรอบไซโตพลาสซึม เซ็นตริโอล และไซโตพลาสซึมส่วนหนึ่งจะกลายเป็นส่วนกลาง (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2531)

ตัวอสุจิ (Fish spermatozoa)

เชื้อตัวผู้ของปลาต่างจากสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่น ๆ เพราะไม่มีอะโครโซม (acrosome) ทั้งนี้เป็นเพราะไข่ปลามีไมโครไพล์ซึ่งเป็นทางผ่านของเชื้อตัวผู้อยู่แล้ว อะโครโซมจึงไม่จำเป็นสำหรับปลา ยกเว้นในปลาบางชนิดมีอะโครโซม เช่น ปลา herring สเปิร์มของปลามีส่วนประกอบสำคัญ 3 ส่วน คือ ส่วนหัว (head) กลาง (mid piece) และหาง (tail) (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538)

1. ส่วนหัว (head) มีความแตกต่างกันไปตามชนิดของปลาโดยในส่วนหัวจะมีนิวเคลียสที่มีดีเอ็นเอ (DNA) เป็นสารพันธุกรรมเพื่อปฏิสนธิกับนิวเคลียสของไข่

2. ส่วนกลาง (middle piece) เป็นส่วนที่ติดอยู่กับส่วนหัวโดยจะมีไมโทคอนเตรีย (mitochondria) จำนวนมากที่ให้พลังงานแก่สเปิร์มในการเคลื่อนไหวและมีแอกเซียลฟิลาเมนท์ (axial filament)

3. ส่วนหาง (tail) เป็นส่วนที่มีลักษณะยาวโดยพัฒนามาจากแอกเซียลฟิลาเมนท์ และในส่วนของหางจะมีไฟบริล อยู่ทั้งหมด 11 คู่ อยู่ตรงกลาง 9 คู่ และอยู่โดยรอบ 2 คู่

ปลากระดูกแข็งส่วนมากจะมีสเปิร์มที่มีส่วนหัวเป็นรูปทรงกลม (spherical) หรือทรงรี (ovate) โดยส่วนหัวมีขนาดประมาณ 2-3 ไมโครเมตร และความยาวของสเปิร์มจากหัวจนถึงปลายหางประมาณ 40-60 ไมโครเมตร ส่วนกลางมีขนาดเล็กและส่วนใหญ่มีหางจำนวน 1 หาง (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

Routray et al. (2006) ได้ศึกษาส่วนหัวสเปิร์มของปลายี่สกเทศ พบว่ามีขนาดประมาณ 2-3 ไมโครเมตรและความยาวของสเปิร์มจากหัวจนถึงปลายหางประมาณ 25-30 ไมโครเมตร มีส่วนประกอบ 3 ส่วน คือ ส่วนหัว (head) กลาง (mid piece) และหาง (tail)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ของเหลวในน้ำเชื้อปลา

น้ำเชื้อปลาถ้านำมาปั่นแยก (centrifuge) จะได้ 2 ส่วนคือ ส่วนที่เป็นเซลล์อสุจิ (spermatozoa) และส่วนที่เป็นของเหลว (seminal plasma) เช่นเดียวกันกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น โค กระบือ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) ในส่วนประกอบของ seminal plasma ซึ่งเป็นองค์ประกอบทางเคมีและฟิสิกส์ของของเหลวในน้ำเชื้อนี้เอง ที่มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาสูตรน้ำยาสำหรับแช่แข็งปลา องค์ประกอบทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำเชื้อปลาแต่ละกลุ่ม สารเคมีที่ใช้เมื่อเจือจางแล้วให้อิออนที่เหมาะสม มีออสโมลาริตี (osmolality) ใกล้เคียงกับของเหลวน้ำเชื้อปลา เพื่อป้องกันการเคลื่อนที่ของอสุจิก่อนถูกกระตุ้น

พลชาติ ผิวเณร, คงภพ อำพลศักดิ์, ถาวร จีนหมึก และชมพูนุช มรรคทรัพย์ (2550) ทดสอบระดับการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลานิลในสารละลายบัฟเฟอร์ 3 สูตร คือ กลูโคส, 0.85% NaCl และ MC ที่เจือจาง 11 ระดับ (0-100) ที่ระดับออสโมลาริตีต่ำพบว่ามีจำนวนสเปิร์มเคลื่อนที่มาก และลดจำนวนลงเมื่อระดับออสโมราลิตีเพิ่มขึ้นจนถึงจุด ๆ หนึ่งที่สเปิร์มทุกตัวไม่มีการเคลื่อนที่

การเก็บรวบรวมและการเก็บรักษาน้ำเชื้อ

การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อตัวผู้ พอสรุปได้ 3 วิธี

1. รีดโดยตรงจากตัวปลา โดยกดเบา ๆ ตรงส่วนท้อง น้ำเชื้อจะไหลออกมา เช่น ปลาตะเพียน ปลาสวาย เป็นต้น

2. โดยใช้เข็มฉีดยาดูดจากช่องเปิดของน้ำเชื้อ (urogenital pore) เช่น ปลาบึก

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

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลามี 2 แบบ เช่นเดียวกับวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ เก็บน้ำเชื้อสดไว้ในระยะเวลาสั้นในตู้เย็นอุณหภูมิ 0-4°C กับอีกวิธีหนึ่งเป็นการแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C

1. การเก็บระยะสั้น (chilled storage) เป็นการเก็บน้ำเชื้อในตู้เย็นหรือถังน้ำแข็ง ในอุณหภูมิสูงกว่า 0-4°C สามารถเก็บได้ในน้ำเชื้อสภาพเข้มข้นหรือเจือจางด้วยสารละลายที่เหมาะสมกับน้ำเชื้อแต่ละชนิด การเก็บน้ำเชื้อระยะสั้นสามารถเก็บได้หรือไม่ขึ้นอยู่กับสารละลายที่ใช้ คุณภาพของน้ำเชื้อหรือเทคนิคในการรักษา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ศิริพร คชรัตน์, จุฑามาศ พบสุข, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธ์ชัย (2549) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกเทศ (*Clarias gariepinus*) แบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4°C โดยนำน้ำเชื้อปลาดุกเทศมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ 5 ชนิด (Extender 7, Extender 13, Hank's balanced salt solution (HBSS), Calcium Free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) และ Modified Cortland) ภายใน tissue culture flasks ในอัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:3 ปรากฏว่าสารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 และ Ca-F HBSS มีความเหมาะสมมากที่สุดในการแช่เย็นน้ำเชื้อปลาดุกเทศ เนื่องจากสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด 144 ชั่วโมง ก่อนที่สเปิร์มจะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl

Viveiros, So, and Komen (2000) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกเทศระยะสั้นที่อุณหภูมิ 4-6 องศาเซลเซียส โดยเปรียบเทียบสารละลายบัฟเฟอร์ 4 สูตร คือ ฟรุกโตส 6%, กลูโคส 5%, modified Cortland และ 0.85% NaCl นำสารละลายบัฟเฟอร์แต่ละสูตรมาเจือจางของน้ำเชื้อในอัตราส่วน 1:1 และ 1:5 ที่ระยะเวลาการเก็บ 0, 2, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่าสารละลายบัฟเฟอร์กลุ่มน้ำตาล คือ ฟรุกโตส 6% และ กลูโคส 5% มีความเหมาะสมมากที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกเทศแช่เย็น

Lubzen et al. (1997) ศึกษาการเก็บน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) ปลาไน (*Cyprinus carpio*) และปลาสวาย (*Pangasius sutchi*) โดยบรรจุน้ำเชื้อในหลอดฟาง เก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-9°C เมื่อนำน้ำเชื้อปลายี่สกเทศหลังเก็บรักษาแบบแช่เย็น 23 นาที มาปฏิสนธิ พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิ 92% น้ำเชื้อปลาไนมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 100% ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 70, 100 และ 210 นาที และในน้ำเชื้อปลาสวายหลังการเก็บรักษา 10, 50 และ 80 นาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 100% แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไป 18 ชั่วโมง สเปิร์มเคลื่อนที่ 10% และไม่มีการเคลื่อนที่ เมื่อเก็บรักษานาน 3-5 วัน

Maria, Viveiros, Freiros, and Oliveira (2006) ได้ทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา *Brycon orbignyanus* โดยเปรียบเทียบสารละลายบัฟเฟอร์ 6 สูตร คือ NaCl 154 mM, NaCl 200 mM, Saad, Kurokura, Coconut water and Ginsburg fish Ringer อัตราเจือจางน้ำเชื้อต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 1:5 ระยะเวลาเก็บ 4 ระยะ คือ 0, 1, 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4-6°C หลังจากการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เย็นที่ 24 ชั่วโมง พบว่าสารละลายบัฟเฟอร์ Saad มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดที่ 80%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. การเก็บระยะยาวโดยวิธีการแช่แข็ง (cryopreservation) เป็นการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C การเก็บวิธีนี้ต้องใช้สารละลายบัฟเฟอร์เจือจางน้ำเชื้อ ซึ่งผสมสารที่ช่วยป้องกันความเสียหายให้กับเซลล์ในระหว่างการลดอุณหภูมิ ขั้นตอนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลามี ดังนี้

2.1. การเก็บรวบรวมเซลล์สืบพันธุ์ ควรเช็ดตัวปลาให้แห้ง โดยเฉพาะบริเวณท้องปลาเพื่อป้องกันไม่ให้น้ำที่เกาะตามตัวปลาหยดลงปนเปื้อนกับน้ำเชื้อที่รีด การรีดน้ำเชื้อปลาโดยทั่วไปนิยมรีดด้วยมือ โดยใช้มือบีบหรือกดรีดส่วนท้องของปลา ซึ่งถ้าพ่อพันธุ์ที่มีความพร้อมดีจะปล่อยน้ำเชื้อสีขาวขุ่นเหมือนน้ำนมเหนียวไหลออกทางช่องเพศ สำหรับภาชนะที่จะใช้รองรับน้ำเชื้อปลาจะต้องสะอาดและเช็ดให้แห้ง น้ำเชื้อจะต้องไม่มีการปนเปื้อนกับน้ำเลือด ปัสสาวะ หรือของเสียอื่น ๆ

2.2. สูตรสารละลายบัฟเฟอร์บัฟเฟอร์ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อ หากพิจารณาจากส่วนประกอบทางเคมีของสูตรสารละลายบัฟเฟอร์เหล่านี้จะพบว่ามีคุณสมบัติดังนี้ คือ

2.2.1. สูตรสารละลายบัฟเฟอร์เหล่านี้ประกอบด้วยอิออนต่าง ๆ ใกล้เคียงกับที่ปรากฏในน้ำเลือด และสารละลายบัฟเฟอร์นั้นมีแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ใกล้เคียงที่สุดกับแรงดันออสโมติกของน้ำเลือดปลา

2.2.2. สารละลายบัฟเฟอร์ดังกล่าวจะประกอบด้วยสารเคมีที่ทำหน้าที่ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง เป็นแหล่งพลังงาน และสารเคมีบางตัวทำหน้าที่ด้านหรือทำลายพิษจากของเสียที่ขับถ่ายออกมาจากเซลล์ หรือมีส่วนประกอบที่เป็นยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

2.2.3. เป็นบัฟเฟอร์ที่ปรับปรุงและพัฒนาจากสูตรบัฟเฟอร์ที่ใช้อาบหรือหล่อเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดปลา

นอกจากนั้นสูตรสารละลายบัฟเฟอร์เหล่านี้ ยังประกอบด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดใดชนิดหนึ่ง หรือหลายชนิดรวมกัน ในกรณีที่ต้องการเจือจางเพื่อการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

2.3. สารไครโอโพรเทคแทนท์ เป็นสารเคมีที่ป้องกันมิให้เนื้อเยื่อเสียหายในระหว่างการแช่แข็งและทำการละลาย (freezing and thawing) เนื่องจากการแข็งตัวของน้ำภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ ทำให้เสียคุณสมบัติ (permeability) ของเยื่อหุ้มเซลล์ และความเป็นกรด-ด่างจะเปลี่ยนแปลงไป สารไครโอโพรเทคแทนท์จำแนกได้ 2 พวก คือ ออกฤทธิ์ภายในเซลล์และออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.3.1. ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ (intracellular cryoprotectant) สารเคมีเหล่านี้จำเป็นต้องซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายไม่ให้เกิดขึ้นขณะแช่แข็งและละลาย ตัวอย่างสารเคมีกลุ่มนี้ได้แก่ Glycerol, DMSO และแอลกอฮอล์อีกหลายตัว เช่น Methanol, Ethanol และ Propanediol เป็นต้น สารเคมีกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายได้ดีเมื่อในระดับที่มีความเข้มข้นค่อนข้างสูง (1-4 M) ถ้าจะพิจารณาถึงความสามารถที่จะกระจายเข้าสู่เซลล์ แอลกอฮอล์มีอัตราการแพร่กระจายสูงสุด รองลงมา ได้แก่ DMSO และ Glycerol ตามลำดับ สารเคมีกลุ่มนี้มีข้อเสียอยู่ประการหนึ่งคือเป็นพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ

2.3.2. ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ (extracellular cryoprotectant) สารเคมีกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่นอกเซลล์ และใช้ได้ดีที่ความเข้มข้นต่ำกว่าพวกแรก (0.01-0.2M) และเป็นพิษน้อยกว่าด้วย ตัวอย่างสารเคมีกลุ่มนี้ได้แก่ Polyvinylpyrrolidon (PVP) และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น sucrose, glucose, menitol เป็นต้น

ในกระบวนการแช่แข็งต้องนำน้ำเชื้อที่ผสมสารละลายบัฟเฟอร์มาละลายในสารไครโอโพรเทคแทนท์ ก่อน แล้วจึงค่อยนำไปผสมกับน้ำเชื้อหรือไข่หรือตัวอ่อน โดยการใส่สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ลงไปในน้ำเชื้อควรใส่อย่างช้า ๆ และที่อุณหภูมิต่ำ (Wayman and Tiersch, 2000) เพื่อช่วยให้เซลล์ค่อย ๆ ปรับสภาพตัวเอง สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่จะใช้ในการแช่แข็งครั้งนี้ควรเป็นน้ำยาที่เตรียมขึ้นใหม่หรือถ้าจะเตรียมไว้ล่วงหน้าควรเติมยาปฏิชีวนะและเก็บไว้ในตู้เย็น อย่างไรก็ตามไม่ควรเตรียมล่วงหน้านานกว่า 1-2 วัน และเมื่อใส่สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ในน้ำเชื้อแล้วต้องทิ้งระยะให้สารนี้ซึมเข้าไปอยู่ในเซลล์ (equilibration time) ซึ่ง equilibration time เป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการแช่แข็ง ฉะนั้นในการแช่แข็งต้องมีการทดลองหา equilibration time ที่เหมาะสมด้วย เพราะถ้าปล่อยให้สารไครโอโพรเทคแทนท์ผสมอยู่กับน้ำเชื้อนานเกินไปจะมีผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2545) ได้เปรียบเทียบการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพและปลาสวายแบบแช่แข็ง เพื่อการผสมเทียมน้ำเชื้อ น้ำเชื้อปลาเทโพถูกเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ Calcium-free Hank`s balanced salt solution (Ca-F HBSS) น้ำเชื้อปลาสวายมาถูกเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 ในอัตราส่วน 1:1 แล้วจึงนำมาผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่างชนิดกันใส่ในหลอดฟาง 0.25 ml พบว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเทโพและปลาสวายแบบแช่แข็งในสารละลาย DMSO มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่หลังการละลาย (thawing) ของสเปิร์มดีที่สุดเท่ากับ 40%

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และมานพ กาญจนบุรางกูล (2547) ศึกษาการประยุกต์ใช้เทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็ง ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด พบว่าการใช้ DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์มีความเหมาะสมในการนำมาแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย

พัชรี มงคลวัย (2546) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็ง ในสารละลายบัฟเฟอร์ 7 สูตร สารไครโอโพรเทคแทนท์ 4 ชนิด จากการทดลองพบว่า สารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายได้ระยะเวลานานที่สุด มีการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิสูงที่สุด และมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ย 53.47± 6.75%

Lanes et al. (2008) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา *Paralichthys orbignyanus* สารละลายบัฟเฟอร์ Extender 7 ในอัตราส่วน 1 : 3 แล้วจึงนำมาผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ DMSO และ glycerol พบว่าการใช้ DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์มีความเหมาะสมที่สุด มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายเท่ากับ 60% และมีความสามารถในการปฏิสนธิไม่ต่างจากน้ำเชื้อสด

Fabbrocini, Lavadera, Rispoli, and Sansone (2000) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา seabream (*Sparus aurata*) ทำการทดสอบความเป็นพิษโดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 5 ชนิด คือ DMSO, Ethylene Glycol, Propylene Glycol, Glycerol และ Methanol ที่ระดับความเข้มข้น 5%, 7%, 10% และ 15% โดยผสมกับน้ำเชื้อปล่อยไว้ในภาวะสมดุล 2, 10, 20 และ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 26 °C พบว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษน้อย คือ 5% DMSO, 10% Ethylene Glycol และ 10% Propylene Glycol

Sansone et al. (2002) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อของปลากะพงขาว (*Dicentrarchus labrax*) แบบแช่แข็ง โดยทำการทดสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 5 ชนิดคือ DMSO, Ethylene Glycol, Propylene Glycol และ Glycerol ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 5%, 7%, 10%, 15% และ 20% อีกตัวหนึ่งคือ Methanol ศึกษาที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 4% 6% 8% และ 10% ทุกตัวอย่างถูกปล่อยไว้ในภาวะสมดุล 2, 10, 20 และ 30 นาที พบว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษน้อยที่สุด คือ 5% DMSO, 5% Ethylene Glycol และ 5% Propylene Glycol

Basavaraja and Hegde (2004) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา mahseer (*Tor khudree*) ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Extender 4 สูตร ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่างชนิดกัน และเจือจางน้ำเชื้อในอัตราต่างกัน เก็บในถังไนโตรเจนเหลวนาน 50 วัน พบว่า สารละลายบัฟเฟอร์ Extender 1 มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด รองลงมาเป็นสารละลายบัฟเฟอร์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Extender 2 และไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในสารละลายบัฟเฟอร์ Extender 3 และสารละลายบัฟเฟอร์ Extender 4 สารไครโอโพรเทคแทนท์ (DMSO) มีความเหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ รองลงมาคือ Methanol และ Propylene Glycol เมื่อใช้คู่กับสาร extender ทุกสูตร ยกเว้นสารละลายบัฟเฟอร์ Extender 3 ที่มีส่วนผสมของไข่แดง อัตราการส่วนการเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสมอยู่ที่ 1:10, 1:15 และ 1:20 มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อไม่แตกต่างกัน

Pan et al. (2008) ทำการเก็บการเก็บรักษาน้ำเชื้อ *Pelteobagrus fulvidraco* แบบแช่แข็งด้วยสารละลายบัปเฟอร์ Extender 4 สูตร ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด พบว่า สารละลายบัฟเฟอร์ Extender A เมื่อใช้คู่กับ Methanol มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด และมีความสามารถในการปฏิสนธิไม่ต่างจากน้ำเชื้อสด

Kenneth et al. (2004) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงแดง (red snapper) แบบแช่แข็งโดยมีสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS และใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด คือ Dimethyl Acetamide (DMA), DMSO และ MeOH ที่ความเข้มข้น 5% และ 10% พบว่า 10% DMSO ให้ผลดีที่สุดในการป้องกันเซลล์ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 71%

Muchlisin, Hashim, and Chong (2004) ทำการศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากดเหลือง (*Mystus nemurus*) โดยทำการทดสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 4 ชนิดคือ DMSO, Ethanol, Glycerol และ Methanol นำมาผสมกับน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Ringer ทิ้งไว้ที่เวลา 5 นาที พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ผสมด้วย 10% Methanol ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่มากกว่า 50% ส่วนน้ำเชื้อในตัวอย่างอื่นให้อัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มน้อยกว่า 50%

Ji et al. (2004) ทำการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea perch (*Lateolabrax japonicus*) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 3 ชนิด คือ Modified Plaice Ringer Solution (MPRS), D-5 และ Modified Mounid' s medium (MMM) และใช้ DMSO ความเข้มข้น 6%, 10% และ 14% จากผลการทดลองปรากฏว่าการแช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO 10% ที่ระดับความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงที่สุดเท่ากับ 73.33±5.7%

2.4. อัตราการลดอุณหภูมิ (Freezing) หลังจากผสมน้ำเชื้อกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ Extender แล้วทิ้งไว้ equilibration time แล้วจึงทำการแช่แข็งเซลล์โดยอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม เมื่อลดอุณหภูมิแล้วนำมาเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว เพื่อหยุดกระบวนการทางชีวเคมีของเซลล์ เป็นการป้องกันการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์ระหว่างการเก็บรักษา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

พลชาติ ผิวเณร และคณะ (2550) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานิลแช่แข็ง โดยเปรียบเทียบอัตราการลดอุณหภูมิ 3 อัตรา (-1, -5 และ -10°C/min) ใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 3 สูตร (BCB, MC และ 0.85% NaCl) ใช้ Methanol ที่ความเข้มข้น 10% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ และเจือจางน้ำเชื้อในอัตราส่วน 1:5 เก็บในถังไนโตรเจนเหลวนาน 7 วัน พบว่าอัตราการลดอุณหภูมิที่ -10°C/min ส่งผลให้สเปิร์มมีอัตราการรอดตายสูงสุด รองลงมาคืออัตราการลดอุณหภูมิ -5°C/min และต่ำสุดที่อัตราการลดอุณหภูมิ -1°C/min

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์ (2552) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็งในสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS โดยใช้ DMSO ที่มีความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 ระดับ ได้แก่ การลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (-10°C/min), ระดับการลดอุณหภูมิอย่างปานกลาง (-5°C/min) และระดับการลดอุณหภูมิอย่างช้า (-3°C/min) พบว่าการใช้ 10% DMSO ที่ระดับอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (-10°C/min) มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายดีที่สุด และสามารถปฏิสนธิกับไข่ปลาตะเพียนขาวไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด

2.5. การละลาย (Thawing) เป็นการนำเซลล์ที่แช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวออกมาละลายโดยสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะใช้เวลาและอุณหภูมิในการละลายที่แตกต่างกัน (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

Lanes et al. (2008) นำตัวอย่างน้ำเชื้อปลา *Paralichthys orbignyanus* แช่แข็ง ใส่หลอดฟาง 0.25 ml และนำตัวอย่างมาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 วินาที

Sarvi et al. (2006) ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา *Salmo trutta caspius* ใส่หลอดฟางปริมาตร 0.5 ml โดยเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง 3 อุณหภูมิ คือ 5°C นาน 90 วินาที, 15°C นาน 45 วินาที และ 25°C นาน 30 วินาที พบว่าเมื่อนำน้ำเชื้อปลาแช่แข็งมาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 25°C นาน 30 วินาที ให้ผลดีที่สุดเมื่อนำไปผสมเทียมมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ 66.6%

Ding et al. (2008) ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Mandarin (*Siniperca chuatsi*) ใส่หลอด cryotube ปริมาตร 2 ml โดยนำตัวอย่างแช่แข็งมาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 60 วินาที

Daly, Galloway, Bravington, Holland, and Ingram (2008).ละลายตัวอย่างน้ำเชื้อปลา Murray cod (*Maccullochella peelii peelii*) ที่แช่แข็งใส่หลอดฟาง 0.25 ml ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 20°C นาน 10 วินาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Routray et al. (2006) ได้ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) ใส่หลอด visotube ปริมาตร 0.5 ml แล้วนำตัวอย่างแช่แข็งมาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 50 วินาที

การประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อ

เป็นการประเมินปริมาณเชื้อตัวผู้ที่ยังมีชีวิตอยู่และสามารถผสมเข้ากับไข่ได้ ตลอดจนความแข็งแรงของเชื้อตัวผู้นั้น ทำได้ดังนี้ คือ

การประเมินการเคลื่อนที่ (motility estimation) สามารถประเมินได้หลายวิธี โดยการนำน้ำเชื้อไปหยดลงสไลด์ที่มีน้ำแล้วปิดด้วย cover glass กระจายน้ำเชื้อ นำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ในการประเมินพิจารณาได้พิจารณาว่ามีสเปิร์มกี่เปอร์เซ็นต์ที่มีการเคลื่อนที่ จากนั้นเลื่อนสไลด์แล้วสุ่มนับจนกว่าจะครบ 3 บริเวณ ก็จะทราบว่ามีตัวเคลื่อนที่เท่าไหร่ แต่วิธีนี้ต้องทำการนับอย่างรวดเร็วก่อนสเปิร์มนั้นจะหยุดเคลื่อนที่ และการประเมินโดยแบ่งระดับในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเป็นระดับ คือ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% ตามลำดับ 0 หมายถึง สเปิร์มอ่อนแอหรือไม่มีการเคลื่อนที่ ส่วน 100 หมายถึง สเปิร์มแข็งแรงที่สุด (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536 ; Vuthiphandchai & Zohar, 1999)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University