รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์

Development of low temperature preservation technology of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophores for aquaculture and conservation

โดย

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[1]

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์[2]

[1]**ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์**

[2]**ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์**

มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๗

มหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่อุณหภูมิต่ำเพื่อการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์ ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มของพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำ การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่เย็นถุงน้ำเชื้อ ผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ การแช่แข็งถุงน้ำเชื้อ และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสเปิร์มขณะเก็บแช่เย็นและแช่แข็ง เพื่อพัฒนาวิธีการที่เหมาะสมในการแช่เย็นและการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงขุนขึ้นมาภายในฟาร์มเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการผสมเทียมและพัฒนาแนวทางการจัดเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ การศึกษาคุณภาพสเปิร์มกุ้ง ทำโดยสุ่มกุ้งกุลาดำจากบ่อดินที่เลี้ยงขุนทุกๆเดือนตั้งแต่กุ้งมีอายุ 7 เดือน ถึง 18 เดือน พบว่า กุ้งมีถุงน้ำเชื้อมีสีขาวชัดเจนเมื่อกุ้งมีอายุ 9 เดือนขึ้นไปแม้ว่าเปอร์เซนต์กุ้งที่สามารถรีดถุงน้ำเชื้อออกมาได้ยังมีค่าไม่มาก และกุ้งอายุ 10-17 เดือนมีเปอร์เซนต์ที่สามารถรีดถุงน้ำเชื้อออกมาได้เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนจาก 50% เป็น 95% การแช่เย็นถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ ทำโดยนำถุงน้ำเชื้อมาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ 4 ชนิดได้แก่ mineral oil, Ringer solution, phosphate buffer และ 0.85% NaCl ที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส แล้วทำการประเมินคุณภาพสเปิร์มทุก 7 วัน พบว่า ถุงน้ำเชื้อที่แช่ในสารละลาย mineral oil นาน 35 วันยังคงมีลักษณะภายนอกของถุงที่คงรูป และมีเปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิตสูง การศึกษาผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 5 ชนิด (dimethylsulfoxide, ethylene glycol, propylene glycol, formamide และ methanol) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5%, 10%, 15% และ 20% นานเป็นระยะเวลานานต่างๆกัน (10, 20, 30 และ 60 นาที) พบว่า DMSO เป็นสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษต่ำต่อสเปิร์มกุ้งกุลาดำ การพัฒนาวิธีการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ ทำการแช่แข็งด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับแตกต่างกัน (2, 4, 6 และ 8 องศาเซลเซียส/นาที) ด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -30 และ -80 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว ปรากฏว่า การแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียสด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 4-6 องศาเซลเซียส/นาที ทำให้สเปิร์มมีชีวิตสูงหลังการละลาย การศึกษาโครงสร้างสเปิร์มที่แช่เย็น หรือแช่แข็งด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่าถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่แช่เย็นยังคงมีสเปิร์มที่มีรูปร่างปกติ แต่ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่แช่แข็ง มีสเปิร์มรูปร่างผิดปกติเมื่อระยะเวลาเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวนานขึ้น การผสมเทียมแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำด้วยถุงน้ำเชื้อแช่เย็น หรือถุงน้ำเชื้อแช่แข็ง สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ไม่แตกต่างกับถุงน้ำเชื้อสด แสดงถึง ศักยภาพในการนำเทคโนโลยีการแช่เย็นหรือการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อมาใช้ประโยชน์ทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์ โดยควรศึกษาวิจัยการพัฒนาเพิ่มประสิทธิภาพการเก็บรักษาต่อไป

Abstract

Development of low temperature preservation technology of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophores for aquaculture and conservation was investigated. Attempts were focused on assessment of sperm quality, development of chilled storage technique for spermatophore, effect of cryoprotectant toxicity, cryopreservation of spermatophores and morphological structure of chilled-stored and cryopreserved sperm in order to determine suitable method about chilled storage and freezing of *P. monodon* spermatophores for artificial fertilization and preliminary development of sperm bank. Male shrimp were monthly sampling at the ages of 7-18 months for determination of sperm quality. Shrimp older than 9 months had opaque of spermatophores despite lower percentage of stripped spermatophores. Shrimp at 10-17 months exhibited higher percentage of striped spermatophores (50-95%). Spermatophores were randomly preserved in mineral oil, Ringer solution, phosphate buffer or 0.85% NaCl at 2-4°C and sperm quality was evaluated every 7 days. Mineral oil was the appropriate buffer for chilled storage of spermatophores due to the presence of high sperm viability and stability of spermatophores. In order to evaluate the effect of five cryoprotectants (dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, propylene glycol, formamide and methanol) on sperm viability, spermatophores were immersed in cryoprotectants at 5, 10, 15 and 20% for 10, 20, 30 and 60 min. Results showed that DMSO was the least toxic cryoprotectant on viability of sperm. Development of cryopreservation of spermatophores was evaluated based on freezing spermatophores at various cooling rates (2, 4, 6 and 8° C/min.) using controlled-rate programmable freezer to final temperatures of -30 or -80°C prior to plunging in liquid nitrogen. Spermatophores frozen at the rate of 4-6° C/min to a final temperature of -80°C had the highest post-thaw sperm viability compared to other treatments. Morphological study of chilled-stored and cryopreserved sperm using electron microscopy revealed that chilled-stored spermatophores had normal sperm structure while cryopreserved spermatophores started to have abnormal sperm structure at longer cryostorage period. Fertization capacity of *P. monodon* eggs with chilled-stored and post-thawed spermatophores was not different with that of freshly collected spermatophores, indicating the effectiveness of chilled storage and cryopreservation technologies for use in aquaculture and conservation despite further study about improvement of storage efficacy is required.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่อุณหภูมิต่ำเพื่อการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์ สำเร็จเรียบร้อยลงได้ โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๕-๒๕๕๗ จากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา โดยรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ฉบับนี้ เป็นผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาคุณภาพสเปิร์มกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงขุนภายในฟาร์ม การแช่เย็นถุงน้ำเชื้อ การศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ การแช่แข็งถุงน้ำเชื้อ และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสเปิร์มขณะเก็บแช่เย็นและแช่แข็ง ข้าพเจ้าขอขอบคุณ คุณสุเมธ ชมภูธวัช และคุณจุฬาลักษณ์ จันทบาล ที่ช่วยในการทดลอง การรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์สถิติ และ ภาควิชาวาริชศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือวิจัยต่างๆเพื่อการวิจัย รวมทั้งศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำระหว่างการศึกษาวิจัย และตรีเพชรฟาร์ม จ.ภูเก็ต ที่ให้ความอนุเคราะห์พ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำในการผสมเทียม ทำให้การวิจัยดำเนินการไปได้ตามวัตถุประสงค์ของโครงการ

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์

มีนาคม ๒๕๕๘

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ii

บทคัดย่อ..... iii

Abstract..... iv

สารบัญ..... v

สารบัญตาราง..... vi

สารบัญรูป..... vii

บทที่

1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย..... 1

2 การสำรวจเอกสาร..... 7

3 วิธีดำเนินการทดลอง..... 12

4 ผลการทดลอง..... 18

5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง..... 42

เอกสารอ้างอิง 49

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักและความยาวกุ้งกุลาดำ เปอร์เซ็นต์กุ้งกุลาดำที่สามารถรีดถุงน้ำเชื้อออกมาได้ และลักษณะของถุงน้ำเชื้อ.....	23
2	ความหนาแน่นของสเปิร์ม และเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งกุลาดำที่อายุต่างๆกัน.....	24
3	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เก็บแช่เย็นในสารละลายชนิดต่างๆ.....	26
4	การเปลี่ยนแปลงลักษณะถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เก็บแช่เย็นในสารละลายชนิดต่างๆ.....	26
5	การเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่แช่ในสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่เวลาต่างๆกัน.....	30
6	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่แช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิต่างๆกัน.....	33

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะของกุ้งกุลาดำเพศผู้อายุระหว่าง 8-12 เดือนที่เลี้ยงขุนภายในบ่อพ่อพันธุ์	19
2	ลักษณะของกุ้งกุลาดำเพศผู้อายุระหว่าง 13-17 เดือนที่เลี้ยงขุนภายในบ่อพ่อพันธุ์	20
3	ลักษณะของถุงน้ำเชื้อรวบรวมจากกุ้งกุลาดำเพศผู้อายุระหว่าง 8-12 เดือนที่เลี้ยงขุนภายในบ่อ	21
4	ลักษณะของถุงน้ำเชื้อรวบรวมจากกุ้งกุลาดำเพศผู้อายุระหว่าง 13-17 เดือนที่เลี้ยงขุนภายในบ่อ	22
5	ลักษณะถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่รวบรวมออกมาจากกุ้งกุลาดำ	27
6	ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เก็บแช่เย็นใน mineral oil ผ่านไป 7 วัน	28
7	ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เก็บแช่เย็นใน phosphate buffer ผ่านไป 7 วัน	28
8	ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เก็บแช่เย็นใน Ringer solution ผ่านไป 7 วัน	28
9	แม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ใช้ในการผสมเทียม	36
10	ถุงน้ำเชื้อที่รวบรวมออกมาจากพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำ	36
11	การเตรียมการตัดก้านตากุ้งกุลาดำ	37
12	แม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ stage IV ที่พร้อมจะวางไข่	37
13	ลักษณะตัวอ่อนกุ้งกุลาดำระยะ gastrula	38
14	ลักษณะนอเพลียสกุ้งกุลาดำ	38
15	ลักษณะรูปร่างสเปิร์มกุ้งกุลาดำที่รวบรวมออกมาจากถุงน้ำเชื้อสด	40
16	ลักษณะรูปร่างสเปิร์มกุ้งกุลาดำที่รวบรวมออกมาจากถุงน้ำเชื้อที่แช่เย็น	40
17	การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสเปิร์มกุ้งกุลาดำที่แช่แข็งและเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวระยะเวลาต่างๆกัน	41

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย

การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลจึงนับเป็นอาชีพที่มีบทบาทสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย เพราะผลผลิตกุ้งที่มีอยู่ในประเทศสามารถสร้างมูลค่าในการส่งออก และยังก่อให้เกิดอุตสาหกรรมต่อเนื่องมากมาย อีกทั้งความต้องการบริโภคกุ้งทะเลเศรษฐกิจในตลาดโลกที่สูงขึ้นเป็นผลให้เกิดการขยายตัวของอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลอย่างรวดเร็ว (Nimrat et al., 2005; 2008; Vuthiphandchai et al., 2007) ส่งผลทำให้การเลี้ยงกุ้งทะเลต้องเลี้ยงในระบบปิดที่มีการปล่อยลูกกุ้งจำนวนมากร่วมกับให้อาหารกุ้งอย่างเต็มที่เพื่อเร่งเพิ่มผลผลิต ดังนั้นยุทธศาสตร์กุ้ง ซึ่งเป็นยุทธศาสตร์ที่ถูกจัดสร้างขึ้นมาเพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมสินค้ากุ้งของประเทศไทยให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ด้วยการกำหนดวิธีการ หรือนโยบายต่างๆของรัฐบาลที่ผลักดันการส่งออกของกุ้งไทยไปตลาดโลกได้อย่างมีประสิทธิภาพจึงได้มีการกำหนดยุทธศาสตร์ออกมา โดยในปีพ.ศ. 2550 ประเทศไทยมีผลิตกุ้งทะเลจากการเพาะเลี้ยงประมาณ 480,000 ตัน คิดเป็นประมาณ 85% ของผลผลิตกุ้งทะเลทั้งหมดของประเทศ ซึ่งความพร้อมของอุตสาหกรรมกุ้งไทยมีการสนับสนุนตลอดห่วงโซ่อุปทาน โดยที่สินค้ากุ้งอยู่ในกลุ่มสินค้าที่มีศักยภาพในการแข่งขัน (cash cow) แต่อย่างไรก็ตามอุปสรรค/ข้อจำกัดประการหนึ่งของอุตสาหกรรมกุ้ง คือความหลากหลายพันธุ์กุ้งยังมีน้อย เพราะส่วนใหญ่ยังเป็นกุ้งขาวและมีกุ้งกุลาดำบางส่วนเล็กน้อย ด้วยเหตุที่กุ้งกุลาดำเป็นกุ้งท้องถิ่นของประเทศไทย รสชาตอร่อย สามารถเพาะขยายพันธุ์ผลิตนอเพลียส (nauplius) เชิงพาณิชย์ได้มานานแล้ว และสามารถทำรายได้ให้ประเทศไทยปีละประมาณ 1 แสนล้านบาทเมื่อประมาณ 10 ปีที่ผ่านมา แต่พื้นที่การเลี้ยงกุ้งกุลาดำในประเทศไทยกลับมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วในระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมานี้จนในขณะนี้เหลือเพียงประมาณ 5% เท่านั้น เนื่องจากปัญหาการแพร่ระบาดของโรคกุ้งโดยเฉพาะเชื้อไวรัสที่ติดมากับพ่อแม่พันธุ์กุ้งที่จับจากธรรมชาติ พันธุกรรมกุ้ง และสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ รวมทั้งกระบวนการผลิตพ่อแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพปลอดจากเชื้อไวรัสยังไม่เพียงพอกับความต้องการของเกษตรกร และที่สำคัญกุ้งกุลาดำมีต้นทุนการผลิตที่สูงกว่าทั้งในเรื่องของระยะเวลาในการเลี้ยง และค่าอาหาร (Browdy, 1998; Coman et al., 2005) ทำให้การเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีความยากลำบากทั้งโตช้า เป็นโรคง่าย ประกอบกับมีการนำเข้าพ่อแม่พันธุ์กุ้งขาวแวนนาไมจากต่างประเทศที่ได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์มาเพาะพันธุ์ได้ลูกกุ้งขาวแวนนาไมที่โตเร็ว ทนทานโรค และมีราคาสูงเทียบเท่ากุ้งกุลาดำ จึงทำให้การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในประเทศไทยได้รับความนิยมอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามแม้ว่ารายได้การส่งออกกุ้งขาวแวนนาไมไปยังต่างประเทศจะมีมูลค่ามหาศาลปีละหลายหมื่นล้านบาท/ปี การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมก็ส่งผลกระทบทางอ้อมต่อระบบนิเวศวิทยาบริเวณชายฝั่งทะเล เพราะกุ้งขาวแวนนาไม ซึ่งเป็นกุ้งที่ไม่ได้มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย (alien species) เมื่อหลุดรอดไปในแหล่งน้ำธรรมชาติก็สามารถไปแย่งอาหารและที่อยู่อาศัยของสัตว์น้ำบางชนิด ดังนั้นการวิจัยเพื่อสร้างศักยภาพในการทำให้กุ้งกุลาดำสามารถได้รับความนิยมในการเลี้ยงอีกครั้งจึงเป็นการวิจัยเชิงรุกเพื่อแก้ไขปัญหาอุปสรรคในการผลิตกุ้งกุลาดำ และสามารถพัฒนางานวิจัยเพื่อให้ได้องค์ความรู้พื้นฐานไปประยุกต์ใช้ในการส่งเสริมการเลี้ยงกุ้งกุลาดำของรัฐบาลต่อไป

ในปัจจุบันประเทศไทยได้เสียสถานภาพประเทศผู้ส่งออกกุ้งอันดับ 1 ของโลกไปแล้ว หลังจากในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาเกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำจำนวนมากได้หันไปเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไม

เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้สัดส่วนการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ : กุ้งขาวแวนนาไมปรับลดลง จาก 20 : 80 เหลือเพียง 5 : 95 เท่านั้น ผลที่ตามมาทำให้ ประเทศอินเดียและเวียดนามสามารถเจาะตลาดกุ้งกุลาดำของไทย ซึ่งส่วนใหญ่เป็นตลาดที่มีกำลังซื้อสูง เช่น ญี่ปุ่น จีน ขณะที่การเลี้ยงกุ้งขาวแวนนาไมในสัดส่วนที่สูงขึ้น ทำให้ประเทศไทยต้องเผชิญกับภาวะการแข่งขันที่รุนแรงจากประเทศผู้ผลิตรายอื่น ส่งผลให้เกิดปัญหาราคากุ้งตกต่ำในขณะนี้ ดังนั้น การผลักดันเพื่อให้เกิดผลิตกุ้งกุลาดำเพื่อการส่งออกทั้งระบบจึงเป็นนโยบายเร่งด่วนของประเทศในการทำให้มีความชัดเจนเป็นรูปธรรม ตั้งแต่แผนการวิจัย การผลิต การตลาดและมาตรการสร้างแรงจูงใจให้กับเกษตรกร โดยรัฐบาลได้ตั้งเป้าที่จะเพิ่มสัดส่วนการผลิตกุ้งกุลาดำทั่วประเทศเป็นร้อยละ 30 จากกำลังการผลิตกุ้งทั้งหมด ดังนั้นการพัฒนาพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่มีคุณภาพให้เพียงพอกับกำลังการผลิตของเกษตรกรในอนาคตจึงเป็นสิ่งจำเป็น ซึ่งได้มีหลายหน่วยงานมาบูรณาการวิจัยในประเด็นดังกล่าว เช่น ศูนย์วิจัยแห่งความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง (Centex Shrimp) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ศูนย์วิจัยและพัฒนาสายพันธุ์กุ้ง (Nucleus breeding center) อำเภอไชยา จังหวัดสุราษฎร์ธานี หน่วยขยายพ่อแม่พันธุ์ (Broodstock multiplication center) มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี สถานีวิจัยเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี และฟาร์มเอกชนบางฟาร์ม เป็นต้น

ด้วยเหตุที่ตลาดกุ้งกุลาดำเป็นตลาดเฉพาะ ซึ่งผู้บริโภคส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มประเทศที่มีกำลังซื้อสูง และมีแนวโน้มการแข่งขันที่ไม่รุนแรงเหมือนกุ้งขาวแวนนาไม เนื่องจากมีประเทศผู้ผลิตน้อยรายกว่า ดังนั้นถ้าสามารถพัฒนามาตรฐานการผลิตพ่อแม่พันธุ์คุณภาพ และสร้างแรงจูงใจที่ดีพอให้กับเกษตรกรผู้เลี้ยง โดยเฉพาะเรื่องผลตอบแทน เพื่อเพิ่มสัดส่วนการผลิตกุ้งกุลาดำทั่วประเทศเป็นร้อยละ 30 ตามเป้าหมายได้ ก็น่าจะช่วยผลักดันปริมาณการส่งออกกุ้งกุลาดำให้เพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะในตลาดของประเทศญี่ปุ่น นอกจากนี้ยังจะนำไปสู่การแก้ไขปัญหาราคากุ้งตกต่ำในระยะยาวอีกด้วย อย่างไรก็ตามการวิจัยพัฒนาเลี้ยงขุนพ่อแม่พันธ์กุ้งกุลาดำภายในฟาร์มเพื่อทดแทนพ่อแม่พันธุ์ที่จับจากธรรมชาติในประเทศไทยก็ได้มีการวิจัยอย่างเป็นรูปธรรมมากขึ้น ทั้งในประเด็นการมีพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่มีคุณภาพและปลอดโรค และมีเทคโนโลยีที่สามารถนำมาใช้ได้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิต และการป้องกันโรค เนื่องจากการใช้ประชากรของพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำในธรรมชาติมาผลิตลูกพันธุ์กุ้งกุลาดำนอกจากจะประสบปัญหาโรคที่ติดมากับพ่อแม่พันธุ์แล้ว พ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่รวบรวมมาจากทะเลก็มีจำนวนในธรรมชาติลดน้อยลง และบางช่วงฤดูกาลก็หายาก มีราคาแพง และปริมาณที่จับได้ก็มีความไม่แน่นอน และคุณภาพสเปิร์มไม่คงที่ ทำให้มีผลกระทบต่อการผลิตเชิงพาณิชย์ การวิจัยเพื่อการพัฒนารูปแบบการเลี้ยงขุนพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำภายในฟาร์ม (domestication of black tiger shrimp broodstock) ในขณะนี้ก็มีการถ่ายทอดเทคโนโลยีให้แก่ผู้ประกอบการในหลายพื้นที่เพื่อลดการพึ่งพาการใช้พ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่รวบรวมจากธรรมชาติ เช่นพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำบางส่วนก็มีการเลี้ยงขุนไว้ที่มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี เป็นต้น อย่างไรก็ตามปัญหาความสมบูรณ์เพศของพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงขุนขึ้นมาภายในฟาร์มก็ยังมีการพัฒนาการสร้างไข่และสเปิร์มไม่พร้อมกันในบางครั้ง (asynchronous final reproduction) ซึ่งยังคงเป็นปัญหาหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตลูกกุ้งกุลาดำเชิงพาณิชย์ที่จำเป็นต้องได้รับการแก้ไข โดยทั่วไปพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำในบ่อเลี้ยงจะมีลักษณะทางกายภาพและระบบสืบพันธุ์ใกล้เคียงกับกุ้งที่จับจากธรรมชาติ มีอัตราการรอดจากตัวอ่อนจนถึงพ่อแม่พันธุ์ประมาณร้อยละ 30 เมื่อนำแม่กุ้งไปผสมพันธุ์และออกไข่พบว่ามีอัตราการผสมพันธุ์ร้อยละ 60 อัตราการฟักร้อยละ 80 และลูกกุ้งมีอัตรารอดประมาณร้อยละ 70 (Anchordoguy et al., 1988) ดังนั้นการเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ให้สูงขึ้นจะทำให้การ

ผลิตลูกกุ้งได้มากขึ้น ซึ่งการผสมเทียมแม่กุ้งด้วยถุงน้ำเชื้อ หรือถุงน้ำเชื้อ (spermatophore) ที่ได้เก็บแช่เย็น หรือเก็บแช่แข็งเอาไว้จะช่วยทำให้การใช้พ่อแม่พันธุ์กุ้งมีประสิทธิภาพมากขึ้น และควบคุมผลผลิตได้ตามต้องการ อย่างไรก็ตามแม้ว่างานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษาภูมิคุ้มกัน การพัฒนาสายพันธุ์หรือปรับปรุงพันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงขุนขึ้นมาในฟาร์มให้โตเร็ว ปลอดโรค หรือทนต่อโรคจะมีผู้ศึกษาวิจัยอย่างแพร่หลาย แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่เย็น และการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงขุนภายในฟาร์มเพื่อนำมาใช้ในการแก้ไขปัญหาความสมบูรณ์เพศของพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เกิดขึ้นไม่พร้อมกันในบางครั้งขณะเลี้ยงขุน เนื่องจากถุงน้ำเชื้อที่เก็บแช่เย็นสามารถยืดระยะเวลาที่สเปิร์มมีชีวิตออกไปได้หลายสัปดาห์ ด้วยเหตุที่ถุงน้ำเชื้อที่เก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวก็สามารถเก็บรักษาได้นานหลายปีโดยที่คุณภาพสเปิร์มไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งเมื่อใดที่ตัวเมียมีความพร้อมก็สามารถนำเอาถุงน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้มาผสมเทียมกับแม่กุ้งที่เพิ่งลอกคราบได้เลย แม้ว่าในขณะนั้นไม่มีถุงน้ำเชื้อสดก็ตาม เพราะเป็นที่ทราบโดยทั่วไปแล้วว่ามีหลายปัจจัยทีส่งผลต่อคุณภาพสเปิร์ม/คุณภาพถุงน้ำเชื้อของกุ้งกุลาดำ เช่น อุณหภูมิน้ำที่กุ้งอาศัยอยู่ (Aiken and Waddy, 1980) หรือคุณภาพอาหารพ่อแม่พันธุ์เป็นต้น ซึ่งสิ่งเหล่านี้ล้วนส่งผลต่อการสร้างสเปิร์มในถุงน้ำเชื้อ ซึ่งเมื่อพ่อพันธุ์กุ้งมีคุณภาพสเปิร์มที่ดี ก็ควรรวบรวมถุงน้ำเชื้อออกมา เพื่อนำมาเก็บรักษาและใช้ผสมเทียมกับแม่พันธุ์กุ้งในภายหลัง

การเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำแบบแช่เย็น (chilled storage of spermatophores) ทำโดยนำเอาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่มีคุณภาพดีมาเก็บรักษาในสารละลายบัฟเฟอร์ และยาปฏิชีวนะที่เหมาะสมด้วยการเก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียสเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ซึ่งสามารถนำมาช่วยในการเพิ่มผลผลิตของการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำได้ด้วยการผสมเทียมกับแม่กุ้ง ทำให้สามารถแก้ไขปัญหาการขาดแคลนพ่อพันธุ์กุ้งที่มีคุณภาพได้ เพราะถุงน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีจะถูกเก็บรักษาไว้และนำมาผสมเทียมเมื่อแม่พันธุ์มีความพร้อม อย่างไรก็ตามปัญหาหนึ่งที่อาจเกิดในระหว่างเก็บเซลล์แบบแช่เย็นคือการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดต่างๆที่อาจปนเปื้อนมาในระหว่างขั้นตอนการรวบรวมถุงน้ำเชื้อ หรือน้ำเชื้อ เนื่องจากอาจปนเปื้อนกับแบคทีเรียที่อยู่บนผิวตัวกุ้ง หรือติดมาจากสภาพแวดล้อมภายนอก และมีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ (Chow, 1982) ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อแช่เย็นจึงต้องควบคุมไม่ให้แบคทีเรียเจริญเติบโตในระหว่างเก็บถุงน้ำเชื้อแช่เย็นด้วย พร้อมทั้งประเมินการเปลี่ยนแปลงของถุงน้ำเชื้อ และประสิทธิภาพการปฏิสนธิกับไข่

การเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำแบบแช่แข็ง (cryopreservation of spermatophores) กล่าวโดยสรุปทำโดยการนำเอาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่มีคุณภาพดีมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (sperm extender) พร้อมกับใส่สารที่ป้องกันไม่ให้เซลล์เป็นอันตรายในระหว่างการแช่แข็งซึ่งเรียกว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) แล้วจึงเอาไปบรรจุในหลอดบรรจุถุงน้ำเชื้อพร้อมกับลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ก่อนที่จะเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ซึ่งสามารถรักษาคุณภาพของถุงน้ำเชื้อ/สเปิร์มได้เป็นเวลานานเป็นปี แต่อย่างไรก็ตามยังมีหลายปัจจัยที่ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ที่ทำการแช่แข็ง ซึ่งสามารถพบได้ในทุกขั้นตอนของกระบวนการแช่แข็ง นับตั้งแต่การคัดเลือกถุงน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ที่ดี (gamete collection) สารละลายที่ใช้เจือจางถุงน้ำเชื้อ (extenders) สารไครโอโพรเทคแทนท์ เวลาสมดุลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (equilibration time) อัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) การเก็บรักษาและการละลาย (thawing) ซึ่งการที่จะประสบความสำเร็จในการแช่แข็งจำเป็นต้องทราบสภาพที่เหมาะสม

(optimize) ของปัจจัยเหล่านั้นว่าควรเป็นเช่นไร หากพิจารณาดูแล้วทุกขบวนการที่ทำการแช่แข็งต่างก็มีความสำคัญต่อการมีชีวิตของเซลล์ที่ทำการแช่แข็ง เช่น อัตราการมีชีวิตของเซลล์ภายหลังการแช่แข็งและการละลายนั้นยังขึ้นอยู่กับขนาดของเซลล์ อัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการแพร่ของน้ำยาผ่านผนังเซลล์ เป็นต้น ในประเทศไทยการศึกษาเกี่ยวกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อ (milt) หรือถุงน้ำเชื้อ (spermatophores) ของสัตว์น้ำที่อุณหภูมิต่ำยังมีอยู่น้อยมากเมื่อเทียบกับการศึกษาในต่างประเทศ เนื่องจากสัตว์น้ำส่วนใหญ่ที่พบในประเทศไทยมักจะมีน้ำเชื้อ หรือถุงน้ำเชื้อที่สมบูรณ์ดีตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และหาได้ง่ายจึงทำให้ผู้เพาะพันธุ์สัตว์น้ำในประเทศไทยไม่นิยมเก็บน้ำเชื้อ หรือถุงน้ำเชื้อสัตว์น้ำเอาไว้ใช้ในอนาคต โดยทั่วไปผู้เพาะพันธุ์สัตว์น้ำนิยมที่จะใช้น้ำเชื้อ หรือถุงน้ำเชื้อที่รีดออกมาใหม่ๆผสมกับไข่ เพราะเชื่อว่าคุณภาพน้ำเชื้อ หรือถุงน้ำเชื้อขณะรีดออกมาใหม่ๆจะดีกว่าเมื่อเก็บรักษาเอาไว้ระยะหนึ่ง อย่างไรก็ตามในบางครั้งในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (spawning season) พ่อพันธุ์สัตว์น้ำหลายชนิดจะมีปริมาณน้ำเชื้อ หรือสเปิร์มลดลง ซึ่งแม้ว่าจะสามารถกระตุ้นได้โดยการฉีดฮอร์โมน หรือจัดการสิ่งแวดล้อมให้สัตว์น้ำสร้างน้ำเชื้อหรือถุงน้ำเชื้อมากขึ้นแต่กลับพบว่า แม่พันธุ์มีไข่แก่น้อยมาก หรือขาดแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพในบางครั้ง ทำให้การเพาะพันธุ์ไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร หรือในบางครั้งในการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำหลายๆชนิดโดยเฉพาะการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำต่างชนิดกัน (hybridization) ก็มักพบว่าช่วงระยะเวลาที่สามารถรีดน้ำเชื้อ หรือถุงน้ำเชื้อ (sperm availability) ได้ก็ไม่สัมพันธ์กับช่วงระยะเวลาที่แม่พันธุ์ตกไข่ (egg availability) ทำให้ยุ่งยากในการจัดการระหว่างการเพาะพันธุ์ นอกจากนี้พ่อพันธุ์สัตว์น้ำที่ถูกรีดน้ำเชื้อ หรือถุงน้ำเชื้อบ่อยครั้งก็ไม่สามารถผลิตน้ำเชื้อ หรือถุงน้ำเชื้อได้ทันในการใช้เพาะพันธุ์ครั้งต่อไป เพราะต้องใช้เวลาสร้างเซลล์สเปิร์มช่วงหนึ่ง รวมทั้งความแปรปรวนของสัตว์น้ำแต่ละตัว (individual variation) ที่ผลิตน้ำเชื้อ หรือถุงน้ำเชื้อได้ต่างกัน ทำให้ยุ่งยากในการจัดการในระหว่างการผสมเทียมของไข่และน้ำเชื้อ/ถุงน้ำเชื้อในโรงเพาะฟักเป็นอย่างมาก

การเพาะพันธุ์กุ้งกุลาดำในอดีตนั้นก็นิยมใช้พ่อแม่พันธุ์ที่จับจากธรรมชาติ ก็มักพบว่าปัญหาโรคต่างๆจากพ่อแม่พันธุ์ที่ถ่ายทอดไปยังลูกขณะทำการเพาะพันธุ์ ซึ่งแม้ว่าจะมีการเลี้ยงขุนพ่อแม่กุ้งขึ้นมาในบ่อดินด้วยการคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์อยู่ตลอดเวลาก็ยังประสบปัญหาความสมบูรณ์ของพ่อพันธุ์กุ้ง เพราะบ่อยครั้งพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำที่สมบูรณ์เพศก็ไม่มีถุงน้ำเชื้อ หรือมีถุงน้ำเชื้อที่มีคุณภาพต่ำในบางครั้งในบางช่วงของฤดูกาล ซึ่งยังคงเป็นปัญหาหลักที่ต้องแก้ไขเพื่อให้สามารถควบคุมผลผลิตลูกกุ้งกุลาดำได้ตามระยะเวลาที่ต้องการ อย่างไรก็ตามในระหว่างการเพาะพันธุ์กุ้งกุลาดำในโรงเพาะฟักบ่อยครั้งที่พบว่า พ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำที่ใช้ในระยะแรกมีถุงน้ำเชื้อสีขาวขุ่นตามปกติ แต่ต่อมาจะเริ่มมีสีเป็นสีดำบริเวณขอบถุงน้ำเชื้อ (melanization) เมื่อระยะเวลาเลี้ยงนานขึ้น หรือเมื่ออุณหภูมิน้ำสูงขึ้น ทำให้เมื่อนำไปเพาะพันธุ์ก็มักให้อัตราการปฏิสนธิที่ต่ำ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำให้ถุงน้ำเชื้อของกุ้งกุลาดำมีคุณภาพดีอยู่ตลอดเวลาในขณะที่ตัวเมียยังไม่พร้อมที่จะผสมเทียมเพื่อที่จะสามารถควบคุมผลผลิตให้ได้ตามที่ต้องการ ซึ่งก็สามารถนำเอาถุงน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีมาเก็บแช่เย็น หรือเก็บแช่แข็งเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการผสมเทียมกับแม่กุ้งทันที

ในธรรมชาติการผสมพันธุ์วางไข่ของกุ้งทะเลเกิดขึ้นหลังจากตัวเมียลอกคราบใหม่ ๆ ตัวผู้ก็จะเข้าผสมพันธุ์ โดยตัวผู้จะปล่อยถุงน้ำเชื้อ (spermatophores) เข้าไปในช่อง thelycum ของตัวเมีย ซึ่งเมื่อตัวเมียปล่อยไข่ออกมาก็จะได้รับการปฏิสนธิจากสเปิร์มในถุงน้ำเชื้อ และพัฒนาการเป็นตัวอ่อนและฟักเป็นลูกกุ้งวัยอ่อนต่อไป (AQUACOP, 1979) สำหรับการเพาะพันธุ์กุ้งกุลาดำในโรงเพาะฟักก็เหมือนกับการเพาะพันธุ์กุ้งทะเลชนิดอื่น ๆ ที่ต้องมีการตัดก้านตาแม่พันธุ์เพื่อกระตุ้นการลอกคราบ

และการสร้างไข่ ซึ่งเมื่อแม่พันธุ์กุ้งมีไข่แก่ก็จะวางไข่ออกมาปฏิสนธิกับสเปิร์มและพัฒนาการต่อไปจนได้เป็นนอเพลียส การเพาะพันธุ์กุ้งกุลาดำนิยมที่จะมีการนำถุงน้ำเชื้อมาผสมเทียมกับแม่พันธุ์กุ้งโดยสอดถุงน้ำเชื้อเข้าไปใน thelycum ของแม่พันธุ์กุ้งทะเลหลังลอกคราบใหม่ ๆ เมื่อพบว่าไม่มีการผสมกันเองตามธรรมชาติเกิดขึ้นในบ่อ อย่างไรก็ตามแม้ว่าปัญหาที่เกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ของกุ้งทะเลจะพบปัญหาทั้งในพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ แต่ในปัจจุบันนี้กลับพบว่าปัญหาคุณภาพสเปิร์มของพ่อพันธุ์กุ้งทะเลเริ่มมีมากขึ้นเรื่อย ๆ ดังเช่นพบในกุ้งกุลาดำ (Nimrat et al., 2005) และกุ้งขาว (Parnes et al., 2004) เป็นต้น ซึ่งปัญหาดังกล่าวเป็นปัญหาหลักที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตลูกกุ้งทะเลที่มีคุณภาพที่ไม่สามารถควบคุมผลผลิตได้ตามที่ต้องการ สำหรับกุ้งทะเลปัญหาหลักที่พบบ่อยในระหว่างการเพาะพันธุ์ได้แก่ พ่อพันธุ์มักไม่สมบูรณ์เพศเมื่อเลี้ยงในที่ความเค็มต่ำ (Ogle, 1992) คุณภาพสเปิร์มที่ลดต่ำลงอย่างรวดเร็วเมื่อพ่อพันธุ์ถูกเลี้ยงอยู่ในน้ำที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น (Perez-Valazquez et al., 2001) และการที่ถุงน้ำเชื้อมีสีดำบางส่วน (melanized spermatophores) ซึ่งแสดงว่ามีคุณภาพไม่เหมาะสมในการนำมาผสมเทียมดังเช่นพบในแม่พันธุ์กุ้งแชบ๊วย (Wyban and Sweeney, 1991) ปัญหาเหล่านี้มักเกิดขึ้นบ่อยในโรงเพาะฟักถ้าปัจจัยสภาพแวดล้อมต่างๆ ที่เกี่ยวข้องไม่สามารถควบคุมให้อยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมก็จะไปส่งผลต่อคุณภาพสเปิร์มในถุงน้ำเชื้อ ทำให้การเพาะพันธุ์กุ้งทะเลไม่ได้ผลเท่าที่ควร พ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำที่สมบูรณ์เพศและมีคุณภาพดีจะมีถุงน้ำเชื้อที่มีลักษณะขาวขุ่น ซึ่งมักจะมีสเปิร์มจำนวนมากอยู่ภายใน และมีสเปิร์มหางสั้นๆ จำนวนมาก ซึ่งเป็นลักษณะของพ่อพันธุ์ที่ดีที่ควรนำมาใช้ในการเพาะพันธุ์กุ้ง โดยที่ภายหลังจากพ่อพันธุ์ปล่อยถุงน้ำเชื้อออกไปนอกตัวก็สามารถสร้างถุงน้ำเชื้อขึ้นมาทดแทนได้ใหม่ (regenerated spermatophores) (Leung-Trujillo and Lawrence, 1987) ด้วยเหตุที่การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงขุนขึ้นมาภายในฟาร์มก็ยังมีการศึกษาค่อนข้างจำกัด ซึ่งปัญหานี้ส่งผลกระทบต่อการผลิตลูกกุ้งกุลาดำที่ต้องได้รับการแก้ไข รวมทั้งความต้องการที่จะพยายามรักษาคุณภาพสเปิร์มกุ้งกุลาดำให้มีคุณภาพที่ดีระยะเวลาหนึ่งก่อนการนำไปใช้ผสมเทียม ดังนั้นโครงการวิจัยเรื่องนี้จึงได้มุ่งเน้นศึกษาคุณภาพสเปิร์มกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงขุนภายในฟาร์มและพัฒนาวิธีการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่ำด้วยการใช้เทคโนโลยีชีวภาพที่เหมาะสม

วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

1. พัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการแช่เย็นและการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงขุนขึ้นมาภายในฟาร์มเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการผสมเทียม

2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มกุ้งกุลาดำระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส และ -196 องศาเซลเซียส

3. พัฒนาแนวทางการจัดเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำเพื่อประโยชน์ทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และการอนุรักษ์สายพันธุ์

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ทราบวิธีการที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงในการพัฒนาเทคโนโลยีแช่เย็นและการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อให้มีชีวิตรอด

2. สามารถนำถุงน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ไปใช้ผสมเทียมกับแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงขุนขึ้นมาในฟาร์ม เพื่อให้สามารถควบคุมการผลิตลูกพันธุ์กุ้งกุลาดำได้โดยไม่ต้องพึ่งพาการใช้พ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ

ที่รวบรวมมาจากธรรมชาติเพื่อนำมาเพาะพันธุ์ ซึ่งจะมีความเสี่ยงจากโรคและความไม่แน่นอนในการได้จำนวนพ่อแม่พันธุ์ตามที่ต้องการ

3. เทคโนโลยีการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่ได้พัฒนาขึ้นมานี้สามารถนำไปใช้เก็บรักษาถุงน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำที่ได้พัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์ให้โตเร็ว หรือทนทานโรคเพื่อประโยชน์ทั้งการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์สายพันธุ์กุ้งที่ดีในลักษณะธนาคารอสุจิ (sperm bank) ซึ่งจะทำให้ประเทศไทยมีเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงขุนภายในฟาร์มเพื่อสนับสนุนให้ธุรกิจการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำของประเทศไทยได้มีความยั่งยืนต่อไป

บทที่ 2
การสำรวจเอกสาร

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ลักษณะกุ้งกุลาดำ

กุ้งกลาดำ หรือ black tiger shrimp มีชื่อวิทยาศาสตร์ ว่า *Penaeus monodon* Fabricus (1798) เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในกลุ่มครัสตาเชีย (crustacea) มีเปลือกหุ้มลำตัวเป็นสารไคติน (chitin) มีลำตัวเป็นข้อปล้อง ทั้งหมด 19 ปล้อง แต่ละปล้องมีรยางค์ 1 คู่ รยางค์แต่ละคู่ทำหน้าที่ต่างกัน โดยทั่วไปลำตัวของกุ้งทะเลแบ่งออกได้ 3 ส่วนใหญ่ๆ คือ หัว อก และลำตัว ส่วนหัวของกุ้งติดกับอก รวมกันเป็นส่วนหัว-อก (cephalothorax) มีเปลือกคลุมส่วนหัว เรียกว่า carapace ซึ่งบริเวณส่วนปลายยื่นเป็นฟันแหลม เรียกว่า กรี (rostrum) กุ้งมีตาหนึ่งคู่ เป็นลักษณะตารวม มีก้านตา (eyestalk) ยื่นยาวออกมาจากเบ้าตา เคลื่อนที่ได้เล็กน้อย เป็นที่รวมของระบบประสาทและฮอร์โมนหลายอย่าง ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการลอกคราบ การเจริญเติบโต และการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ ส่วนอกของกุ้งมีรยางค์ส่วนอก (thoracic appendages) รวม 8 คู่ โดยรยางค์ 3 คู่แรก เรียกว่า maxillipeds ทำหน้าที่ช่วยในการกินอาหาร รยางค์ 5 คู่ถัดมา (pereiopods) เป็นขาเดิน โดย 3 คู่แรกมีลักษณะเป็นก้าม (chelate) หรือคล้ายก้าม (sub chelate) ส่วนขาเดิน 2 คู่สุดท้าย จะมีปลายแหลมตามปกติ ส่วนท้องของกุ้งมีรยางค์ท้อง (abdominal appendages) 6 คู่ โดยรยางค์ 5 คู่แรก (pleopods) มีลักษณะคล้ายใบพาย ทำหน้าที่ว่ายน้ำ แต่รยางค์คู่สุดท้ายเป็นแผ่นบางๆ ทำหน้าที่เป็นแพนหาง (uropod) หรือใบพาย และขยายเป็นแผ่นใหญ่ 2 แฉก อยู่ทั้งสองข้างของปลายหาง (telson) ช่วยในการเคลื่อนที่ (ประจวบ, 2525; บุญรัตน์, 2544)

กุ้งกุลาดำก็เหมือนกุ้งทะเลทั่วไปที่มีสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยในการผสมพันธุ์ของกุ้งกุลาดำจะเกิดขึ้นหลังจากกุ้งเพศเมียลอกคราบ (molting) ใหม่ๆเท่านั้น โดยกุ้งเพศผู้จะปล่อยถุงน้ำเชื้อ (spermatophores หรือ sperm sac) เข้าไปใน thelycum ของกุ้งเพศเมีย หลังจากนั้นการวางไข่ของแม่กุ้งกุลาดำจะเกิดขึ้นในภายหลังเมื่อรังไข่พัฒนามาถึง stage 4 โดยแม่กุ้งจะปล่อยไข่ออกมาผสมกับสเปิร์มที่ถูกบีบออกจากถุงน้ำเชื้อขณะแม่พันธุ์ทำการวางไข่ อย่างไรก็ตามถ้ากุ้งเพศเมียไม่พร้อมที่จะวางไข่ เนื่องจากรังไข่ยังเจริญไม่เต็มที่ ถุงน้ำเชื้อนี้ก็จะถูกสลัดออกมาพร้อมกับเปลือกเก่าระหว่างการลอกคราบ และถุงน้ำเชื้อใหม่ก็จะถูกสอดเข้าไปถ้ามีการผสมพันธุ์กันใหม่อีกครั้ง (Subramoniam, 1994)

2. ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของกุ้งทะเล

กุ้งกุลาดำมีอายุ (life span) ประมาณ 18-24 เดือน โดยแม่กุ้งวางไข่ในทะเลที่มีน้ำลึกตั้งแต่ 10 เมตรขึ้นไป ไข่ของกุ้งกุลาดำมีลักษณะเป็นไข่จม ใช้เวลาตั้งแต่ฟักออกเป็นนอเพลียส (nauplius) จนกระทั่งโตเป็นกุ้งวัยรุ่นประมาณ 2 สัปดาห์ กุ้งกุลาดำมีเพศแยก เพศผู้มีอวัยวะเพศที่เรียกว่า ปีแตสมา (petasma) ส่วนอวัยวะเพศเมียเรียกว่า ทีไลคัม (thelycum)

ระบบสืบพันธุ์เพศผู้กุ้งกุลาดำมีอัณฑะ (testis) เป็นพูคู่ อยู่ทางด้านหลังของลำตัว อัณฑะแต่ละอันประกอบด้วยลอนเล็กๆซ้อนทับกันไปมา พูเป็นสีขาวหรือขาวขุ่น ทำหน้าที่สร้างสเปิร์ม ซึ่งจะลำเลียงผ่านท่อนำอสุจิ (vas deferens) มาเก็บไว้ในกระเปาะเก็บอสุจิ (terminal ampoule) ลักษณะเป็นกระเปาะเล็กๆ พองตัวออก ซึ่งต่อจากท่ออสุจิส่วนปลาย มีอยู่สองอัน ลักษณะสีขาวขุ่น

และจะเห็นได้ชัดเจน เมื่อกุ้งมีความสมบูรณ์เพศมากขึ้น ตรงบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 ทั้งสองข้าง ใต้เยื่อบางๆ ภายในแบ่งเป็น 2 ห้อง ห้องแรกเป็นถุงน้ำเชื้อ หรือถุงน้ำเชื้อ (spermatophore) ซึ่งมีสเปิร์มจำนวนมากบรรจุอยู่ภายในถุง และภายในถุงน้ำเชื้อนี้จะมีจำนวนสเปิร์มที่มีความสมบูรณ์มากกว่าในท่อนำอสุจิ ส่วนห้องที่เหลือเป็นสารแคลเซียม สีเทาอ่อน (บุญรัตน์, 2544; นงนุช, 2544)

สเปิร์ม (spermatozoa) ของกุ้งกุลาดำมีลักษณะเหมือนสเปิร์มสัตว์จำพวกครัสเตเชีย (crustacea) ที่สเปิร์มไม่มีการเคลื่อนที่เมื่อปล่อยออกมานอกตัว สเปิร์มถูกสร้างโดยเซลล์ภายในอัณฑะ (interstitial cell) และพัฒนาอย่างเต็มที่ จนกระทั่งเข้ามาอยู่ภายในถุงน้ำเชื้อ พ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำที่สมบูรณ์เพศมีถุงน้ำเชื้อ 1 คู่ ลักษณะขาวขุ่นชัดเจน อยู่ที่ช่องท้อง บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 (ขาเดินคู่สุดท้าย) หรือ บริเวณตำแหน่งที่เรียกว่า petasma สเปิร์มของกุ้งทะเลส่วนมากมีรูปร่างกลม (minute globular) ประกอบด้วย 2 ส่วนคือ ส่วนหัว มีขนาดใหญ่ ค่อนข้างกลม มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 ไมโครเมตร และส่วนหางมีลักษณะค่อนข้างสั้นและหนา สำหรับสเปิร์มในกุ้ง *Penaeus monodon*, *P. japonicus*, *P. indicus* และ *P. duorarum* นั้น สเปิร์มจะมีรูปร่างคล้ายกันคือ ประกอบด้วย ส่วนหัว และส่วนหางที่สั้น (Motoh, 1982) การศึกษาคุณภาพถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ โดยวิธีการกระตุ้นด้วยไฟฟ้า พบว่า ถุงน้ำเชื้อทั้งสองข้าง มีน้ำหนักรวม 11.5 มิลลิกรัม และมีปริมาณสเปิร์มเท่ากับ 3.11×10^6 ตัว (Sampath and Ramachandran, 1999)

ระบบสืบพันธุ์เพศเมียกุ้งกุลาดำมีรังไข่ (ovary) มีลักษณะเป็นท่อคู่ อยู่ที่บริเณส่วนหัวและลำตัวกุ้ง โดยรังไข่เมื่อพัฒนามากขึ้น มีขนาดใหญ่ขึ้น (stage IV) ซึ่งจะพร้อมวางไข่ออกมา รังไข่จะต่อกับท่อนำไข่ (oviduct) ที่ไปเปิดออกที่โคนขาว่ายน้ำคู่ที่ 3 บริเวณ thelycum ซึ่งมีลักษณะเป็นทีไลกัมแบบปิด (closed thelycum) พัฒนามาจากส่วนของ sternal plate ของขาเดินคู่ที่ 4-5 มีลักษณะคล้ายลอนหรือพูเล็กๆ หลายอันเรียงกัน ด้านในมีถุงสำหรับเก็บสเปิร์มทั้งสองถุงไว้ในเวลาที่มีการผสมพันธุ์ ซึ่งบริเวณนี้มีขนอ่อนๆ ช่วยพัดโบกให้เซลล์สเปิร์มเข้าไปสู่ถุงน้ำเชื้อได้ดีขึ้น (Motoh, 1982)

3. การประเมินคุณภาพสเปิร์มกุ้งทะเล

สเปิร์มกุ้งทะเล ประกอบด้วยส่วนหัว ส่วนกลาง และส่วนหางเหมือนสเปิร์มที่พบในปลา แต่สเปิร์มของกุ้งทะเลที่บริเวณส่วนหัวมีอะโครโซม (acrosome) มีหางที่สั้นมาก และไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ซึ่งมีความแตกต่างกับสเปิร์มของปลาทั่วไป ที่ส่วนหัวไม่มีอะโครโซม (สเปิร์มของปลาบางชนิดเท่านั้นมีอะโครโซม) มีหางที่ยาวมาก และเคลื่อนที่ได้เมื่อถูกกระตุ้นขณะปล่อยออกมาในน้ำ

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม นิยมใช้ในการพิจารณาถึงคุณภาพน้ำเชื้อปลา เนื่องจากทำได้รวดเร็ว และสะท้อนถึงคุณภาพสเปิร์มได้ดี แม้ว่าการประเมินด้วยการคาดคะเน เป็นระดับการเคลื่อนที่แตกต่างกัน (subjective estimation) จะให้ความเที่ยงตรงต่ำกว่าการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มด้วยการใช้เครื่องมือวัดการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (computer-assisted sperm analysis; CASA) ซึ่งมีความถูกต้องและเที่ยงตรงสูง (objective estimation) อย่างไรก็ตามด้วยเหตุที่สเปิร์มกุ้งทะเลไม่เคลื่อนที่ ดังนั้นจึงไม่สามารถประเมินด้วยวิธีนี้ได้ ทำให้การประเมินคุณภาพสเปิร์มกุ้งทะเลจึงนิยมประเมินจาก รูปร่างของสเปิร์ม (sperm morphology) จำนวนสเปิร์ม (sperm number) การมีชีวิตของสเปิร์ม (sperm viability) และ ความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่ (fertilization capacity)

การตัดก้านตากุ้งตัวผู้ อาจมีผลต่อคุณภาพสเปิร์มกุ้งทะเล เช่น ในกุ้งขาวแวนนาไม (*Penaeus vannamei*) ที่ตัดก้านตา 1 ข้าง พบว่า มีจำนวนสเปิร์มมากกว่ากุ้งที่ไม่มีการตัดก้านตา แม้ว่าคุณภาพของสเปิร์มมีความเท่าเทียมกัน (คเชนทร, 2538) การศึกษาคุณภาพสเปิร์มกุ้งกุลาดำในเพศผู้ที่มีการตัดก้านตา พบว่ามีจำนวนสเปิร์มเท่ากับ $153.6x10^6$ ตัว โดยสเปิร์มมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนหัว และความยาวหางเท่ากับ 6.682 ไมโครเมตร และ 5.096 ไมโครเมตร ตามลำดับ ในขณะที่กุ้งที่ไม่ได้ตัดก้านตามีจำนวนสเปิร์ม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางส่วนหัว และความยาวหางของสเปิร์ม เท่ากับ $77.5x10^6$ ตัว, 5.568 ไมโครเมตร และ 4.360 ไมโครเมตร ตามลำดับ แต่ผลของน้ำหนักถุงน้ำเชื้อ และเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต ไม่มีความแตกต่างกัน (Gomes and Primavera, 1993)

การศึกษาเกี่ยวกับคุณภาพสเปิร์มกุ้งด้วยการผสมเทียมได้มีการทดลองพอสมควรในกุ้งทะเลหลายชนิด โดยนำเอาถุงน้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ๆมาผสมเทียมกับแม่พันธุ์ หรือนำเอาถุงน้ำเชื้อออกมาเก็บรักษาไว้ในน้ำยาบัฟเฟอร์ระยะเวลาหนึ่งด้วยการแช่เย็นแล้วนำมาผสมเทียมในภายหลัง (Nimrat et al., 2005; 2006; Vuthiphandchai et al., 2007) การรวบรวมถุงน้ำเชื้อ หรือถุงน้ำเชื้อสามารถทำได้ด้วยการรีดถุงน้ำเชื้อจากกุ้งเพศผู้ หรือด้วยการใช้ไฟฟ้ากระตุ้น ซึ่งจะทำให้ถุงน้ำเชื้อโผล่มาจากช่องเปิดเล็กน้อย จากนั้นใช้ปากคีบที่สะอาดปราศจากเชื้อ หนีบถุงน้ำเชื้อขึ้นมา ถุงน้ำเชื้อที่ได้จะถูกนำไปสอดใส่ในอวัยวะเพศเมีย โดยใส่ถุงน้ำเชื้อจมลงไปในทีไลคัมของแม่พันธุ์ที่เพิ่งลอกคราบ มีลำตัวนิ่ม จากนั้นปล่อยแม่กุ้งลงถังที่เตรียมไว้ให้วางไข่ ให้อากาศ ซึ่งถ้าถุงน้ำเชื้อมีสเปิร์มที่มีคุณภาพดี ก็สามารถปฏิสนธิไข่ได้มาก โดยทำการประเมินอัตราการปฏิสนธิ (fertilization rate) ขณะตัวอ่อน (embryo) พัฒนามาถึงระยะแกสตรูลา (gastrula stage)

4. การแช่เย็น และการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งทะเล

งานวิจัยการแช่เย็นน้ำเชื้อ ถุงน้ำเชื้อ หรือถุงน้ำเชื้อสัตว์น้ำได้มีการศึกษาอย่างแพร่หลายในต่างประเทศทั้งในยุโรปและสหรัฐอเมริกา โดยนิยมศึกษาในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ หรือปลาที่ใกล้จะสูญพันธุ์บางชนิดเป็นส่วนใหญ่ เช่น Rainbow trout (Billard,1981), Channel catfish (Christensen and Tiersch, 1996), Atlantic sturgeon (DiLauro et al, 1994) และ Paddle fish (Brown และ Mims,1995) เป็นต้น แต่ในประเทศไทยยังมีรายงานเกี่ยวกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อ/ถุงน้ำเชื้อเพื่อการผสมเทียมน้อยมาก เช่น การแช่เย็นน้ำเชื้อปลาดุกอุย (Vuthiphandchai et al., 2009b) การแช่เย็นถุงน้ำเชื้อกุ้งขาว (Nimrat et al., 2006) เป็นต้น แม้ว่าการพัฒนาด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้มีการใช้เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างต่อเนื่องตลอดเวลา การแช่เย็นถุงน้ำเชื้อกุ้งทะเลได้มีการศึกษาครั้งแรกในกุ้งมังกร (Tamako et al., 1986) และในขณะนี้การศึกษาวิจัยด้านนี้ยังมีจำกัดในกุ้งทะเล

Nimrat et al. (2005) ได้แช่เย็นถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่รวบรวมมาจากทะเลอันดามันและรายงานว่าถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำสามารถเก็บรักษาภายใต้สภาวะที่เหมาะสมได้นาน 42 วันโดยที่คุณภาพยังคงที่ แต่ยังไม่ได้มีการศึกษาทราบแน่ชัดว่าเทคนิคการแช่แย็นถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำดังกล่าวสามารถนำมาใช้แช่เย็นถุงน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ที่เลี้ยงขุนภายในฟาร์มได้มีประสิทธิภาพดีเหมือนกันหรือไม่ อย่างไรก็ตามระยะเวลาที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อ/ถุงน้ำเชื้อได้นั้นมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับเทคนิคการเก็บรักษา และชนิดของสัตว์น้ำซึ่งอาจจะเก็บได้ตั้งแต่ 2-3 ชั่วโมง จนถึง 2-3 เดือน (Scott and Baynes,1980) ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ/ถุงน้ำเชื้อแบบแช่

เย็นเท่าที่มีรายงานมา ได้แก่ ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม การให้ออกซิเจนสมทบ และสภาพแวดล้อมขณะเก็บรักษาในภาชนะ (Stoss et al., 1987)

งานวิจัยการแช่แข็งน้ำเชื้อ หรือถุงน้ำเชื้อสัตว์น้ำที่มีการศึกษาในต่างประเทศนิยมทำในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ หรือใกล้สูญพันธุ์ทั้งปลาน้ำจืด และปลาทะเล เช่น ปลากระพงขาว ปลา salmon ปลา channel catfish ปลา sea bream และปลา Atlantic croaker เป็นต้น การเก็บรักษาน้ำเชื้อ/ถุงน้ำเชื้อแบบแช่แข็งสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อ/ถุงน้ำเชื้อได้นานเป็นปี เมื่อต้องการใช้น้ำเชื้อ/ถุงน้ำเชื้อที่เก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวเพื่อการผสมเทียมก็นำหลอดบรรจุน้ำเชื้อ/ถุงน้ำเชื้อมาละลายโดยการเพิ่มอุณหภูมิ ดังนั้นความสำเร็จของการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อ/ถุงน้ำเชื้อของสัตว์น้ำขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่างเช่น ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ และชนิดสาร cryoprotectants ที่เหมาะสม (Rana and McAndrew, 1989) อัตราการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็ง (freezing) และอัตราการเพิ่มอุณหภูมิขณะละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (Scott and Baynes, 1980) นอกจากนี้ความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อ/ถุงน้ำเชื้อที่เกิดขึ้นในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และ เทคนิคของการแช่แข็งเซลล์ ก็มีผลทำให้ความสำเร็จของการแช่แข็งน้ำเชื้อแต่ละครั้งแตกต่างกันไป (Vuthiphandchai et al., 2009a) การแช่แข็งน้ำเชื้อ/ถุงน้ำเชื้อของสัตว์น้ำจำพวกสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrate) ที่มีรายงานการศึกษาในต่างประเทศ เช่น ในเม่นทะเล sea urchin (Asahina and Takahashi, 1978) แมงดาทะเล (Behlmer and Brown, 1894) กุ้งก้ามกราม (Chow et al., 1985) กุ้งขาว (Lezcano et al., 2004) ปูทะเล (Bhavanishankar and Subramoniam, 1997) หอยเป๋าฮื้อ (Gwo et al., 2002) หอยนางรม (Paniague-Chavez and Tiersch, 2001) เป็นต้น

Vuthiphandchai et al. (2007) ได้ทำการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่รวบรวมมาจากทะเลอันดามันมาทำการแช่แข็งด้วยการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ สารไครโอโพรเทคแทนท์ อัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลายต่างๆกันปรากฏว่า ชุดการทดลองที่ใช้สารละลาย Calcium-free saline ร่วมกับ 5% dimethylsulfoxide โดยลดอุณหภูมิในอัตรา 2 องศาเซลเซียส/นาที จนถึงอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสแล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวให้ผลดีที่สุด โดยที่สเปิร์มยังคงมีชีวิตเมื่อเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวนาน 210 วัน อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นยังไม่ได้ศึกษาการนำเทคโนโลยีดังกล่าวมาแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงขุนขึ้นมาภายในฟาร์มว่าจำเป็นต้องมีการปรับปรุง protocol การแช่แข็งหรือไม่อย่างไร เนื่องจากการตอบสนองของเซลล์สเปิร์มพ่อพันธุ์ในสภาพที่รวบรวมจากธรรมชาติ หรือเลี้ยงภายในฟาร์มที่มีต่อขั้นตอนและวิธีการแช่แข็งอาจมีความแตกต่างกัน ซึ่งมีความจำเป็นที่ต้องศึกษาวิจัยต่อยอด เพื่อทำให้การเพาะพันธุ์กุ้งกุลาดำเชิงพาณิชย์ที่ใช้พ่อแม่พันธุ์จากการเลี้ยงภายในฟาร์มมีความแน่นอนและยั่งยืนต่อไป

Simon et al. (1994) ได้นำเอาตัวอ่อนระยะต่างๆของกุ้ง *Penaeus indicus* ได้แก่ 4-cell, 16-cell, morula, gastrula และ 5-h embryo มาทำการศึกษาหาระยะตัวอ่อนที่เหมาะสมสำหรับการแช่แข็ง พบว่า ตัวอ่อนในระยะ gastrula และ 5-h embryo เป็นระยะที่เหมาะสมในการนำไปแช่แข็ง เนื่องจากสามารถทนต่อความเป็นพิษของสาร cryoprotectant ชนิดต่างๆที่นำมาทดสอบได้ดีกว่าตัวอ่อนระยะอื่นๆ และยังพบว่าการนำตัวอ่อนใน 2 ระยะนี้ไปแช่ในสารละลาย methanol ใช้ร่วมกับสารละลาย ethylene glycol หรือ propylene glycol หรือ dimethylsulfoxide เป็นเวลา 20 นาที ก็สามารถฟักเป็นตัวได้ มีอัตราการฟักที่ไม่แตกต่างทางสถิติกับกลุ่มควบคุม

Preston and Coman (1998) ได้นำเอาสาร cryoprotectant ต่างๆชนิด (methanol, ethylene glycol, propylene glycol, dimethyl sulfoxide, glycerol, acetamide, L-proline,

galactose, sucrose, trehalose, polyethylene glycol และ polyvinylpyrrolidone) มาทดสอบความเป็นพิษที่มีต่อตัวอ่อน และนอเพลียส ของกุ้ง *Penaeus esculentus* พบว่า สาร cryoprotectant ที่ใช้ทดสอบไม่มีความเป็นพิษต่อ ตัวอ่อน และนอเพลียส เมื่อใช้ในความเข้มข้นที่ต่ำ แต่อย่างไรก็ตาม การแช่แข็งตัวอ่อน และนอเพลียสของกุ้ง *Penaeus esculentus* ก็ไม่ประสบความสำเร็จในทุกๆ protocols ที่ใช้แช่แข็ง เนื่องจากเกิดเกล็ดน้ำแข็ง (ice crystal) ภายในเซลล์

Alfaro *et al*. (2001) ศึกษาผลของความเย็น ความเค็ม และสาร cryoprotectant ที่มีต่อการพัฒนาการของตัวอ่อน และนอเพลียส ของกุ้ง *Trachypenaeus byrdi* เพื่อทราบถึงข้อมูลพื้นฐานที่จำเป็นเพื่อการประยุกต์ใช้ในการแช่แข็งต่อไป พบว่า ตัวอ่อนในระยะท้ายของการพัฒนา (setae development stage) สามารถทนต่อความเย็นที่อุณหภูมิ 10°C ได้ดี แต่ไม่สามารถทนต่อความเย็นที่ อุณหภูมิ 0°C การทดสอบความเป็นพิษพบว่า sucrose และ glycerol มีความเป็นพิษต่อตัวอ่อนในระยะท้ายของการพัฒนาอยู่ในเกณฑ์ที่มาก ในขณะที่ DMSO มีความเป็นพิษปานกลาง และ methanol มีความเป็นพิษต่ำ นอกจากนี้ตัวอ่อนระยะ morula สามารถทนต่อความเค็มที่ 55 ppt ได้ดีกว่า advanced embryo และยังพบว่า นอเพลียส มีความสามารถที่จะทนต่อความเย็นและสาร DMSO ได้ดีกว่า ตัวอ่อน

Gwo and Lin (1998) ได้ทดลองนำ embryos, nauplii และ zoea ของกุ้ง *Penaeus japonicus* มาทำการแช่แข็งพบว่า การแช่แข็ง embryos และ nauplii สามารถทำได้เมื่อลดอุณหภูมิมาถึงอุณหภูมิสุดท้ายที่ -15°C เท่านั้นเมื่อใช้ 10% methanol เป็นสาร cryoprotectant โดยมีอัตรารอด 85% เนื่องจากการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่านี้ทำให้ embryos และ nauplii ตายหมด ในขณะที่ การแช่แข็ง zoea ที่อุณหภูมิสุดท้าย -25°C พบมีชีวิตบ้างเพียงเล็กน้อย

การเก็บรักษาสเปิร์ม หรือน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง เป็นการเก็บเซลล์สเปิร์ม หรือน้ำเชื้อแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีนี้มีความเกี่ยวข้องกับตัวแปรต่อไปนี้ได้แก่ การเลือกใช้สูตรน้ำยาที่เหมาะสมที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อ (sperm extender) ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไคโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant; สารที่ช่วยป้องกันการเสียหายของเซลล์ในกระบวนการแช่แข็ง) ระยะสมดุล (equilibration time; ช่วงเวลาหลังจากผสมน้ำเชื้อกับสารไคโอโพรเทคแทนท์ก่อนทำการแช่แข็ง) และอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum freezing rate) ซึ่งถ้ามีการปฏิบัติและเลือกใช้ตัวแปรอย่างถูกต้องเหมาะสมกับน้ำเชื้อปลาแต่ละชนิด ก็สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาได้นานหลายสิบปี เมื่อจะนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวมาใช้ก็นำน้ำเชื้อแช่แข็งออกมาละลายด้วยอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum thawing rate) การนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ทำได้โดยนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาผสมเทียมกับไข่ ช่วยทำให้การเพาะฟักผสมเทียมที่มีประสิทธิภาพสูงไม่ต่างจากน้ำเชื้อสด ดังนั้นตลอดเวลาที่ผ่านมาประมาณ 30 กว่าปี จึงมีผู้ศึกษาทดลองพัฒนาวิธีการเก็บน้ำเชื้อสัตว์น้ำหลายๆ ชนิดให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด แม้ว่างานวิจัยส่วนมากได้ศึกษาในสัตว์น้ำจืด โดยมีการศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อในสัตว์ทะเลมีน้อย และงานวิจัยด้านนี้จัดเป็นเทคโนโลยีชีวภาพแขนงหนึ่งที่สามารถใช้กับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

บีกเกอร์ขนาดต่างๆ
ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 250 และ 500 มิลลิลิตร
ไมโครปิเปตขนาดต่างๆ
กระดาษกรอง
เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer)
เครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (Controlled-rate programmable freezer)
กล้องจุลทรรศน์
Hemacytometer
ถังเก็บไนโตรเจนเหลวขนาดใหญ่ (dewar)
ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ
ตู้ autoclave
ตู้อบเครื่องแก้ว (hot air oven)
Glass micropipette ขนาด 5,10 และ 100 ไมโครลิตร
Cryovial 1.8 มิลลิลิตร
Canister
canes
Vial tubes
rack
Tissue culture flasks
Thermocouple probe thermometer (K-type, HI 91530K, Hanna Instruments Inc.)
ไนโตรเจนเหลว
พ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ
สารเคมีประเภทต่างๆที่ใช้ในการแช่เย็น การแช่แข็ง และการย้อมสีสเปิร์ม

วิธีดำเนินการทดลอง

1. <u>การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มของพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำ</u>

พ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำที่เริ่มสมบูรณ์เพศที่เลี้ยงขุนด้วยอาหารเม็ดภายในบ่อดินที่ศูนย์วิจัยเทคโนโลยีทางทะเล คณะเทคโนโลยีทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตจันทบุรี ได้ถูกรวบรวมเพื่อกระตุ้นเอาถุงน้ำเชื้อ หรือถุงน้ำเชื้อ (spermatophore) (6 ตัว/ครั้ง) ที่อยู่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 ของพ่อพันธุ์กุ้งออกมาด้วยวิธีการปลอดเชื้อ (aseptic technique) เพื่อศึกษาดูการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มในระยะเวลาต่างๆกันในรอบปี การสุ่มกุ้งกุลาดำจากบ่อดินที่เลี้ยงขุนนี้เริ่มทำการเหวี่ยงแหสุ่มกุ้งกุลาดำเมื่อกุ้งเริ่มมีอายุ 7 เดือน และทำการสุ่มตัวอย่างกุ้งกุลาดำทุกๆเดือนเป็นเวลา 12 เดือนจนกระทั่งกุ้งกุลาดำในบ่อมีอายุ 18 เดือน โดยการสุ่มแต่ละครั้งได้เลือกเฉพาะเพศผู้ออกมาแล้วประเมินว่ามีกุ้งกี่ตัวที่มีหรือไม่มีถุงน้ำเชื้อ (spermatophore) และประเมินสภาพลักษณะของถุงน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำที่มีอายุต่างๆกันว่ามีสีขาวขุ่นเล็กน้อย มีสีขาวขุ่นปานกลาง จนกระทั่งมีสีขาวขุ่นเต็มที่ในช่วงใด หรือไม่มีการพัฒนาของถุงน้ำเชื้อเลย เพื่อทราบพัฒนาการความสมบูรณ์เพศของพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงภายในบ่อดินว่าเกิดเมื่อไรและอย่างไร

กุ้งกุลาดำอายุ 7 เดือนที่มีขนาดใกล้เคียงกันถูกเลี้ยงในบ่อดินขนาดประมาณ 2,100 ตารางเมตร (1.31 ไร่) ที่มีการปูผ้าสีดำเฉพาะบริเวณรอบๆขอบบ่อ กุ้งกุลาดำถูกเลี้ยงที่ความหนาแน่นประมาณ 6-10 ตัวต่อตารางเมตรด้วยอาหารเม็ดโปรตีนสูง (38%) วันละ 4 ครั้ง (7.30, 11.30, 16.30 และ 21.30 น) โดยหว่านอาหารรอบบ่อในบ่อเลี้ยงที่ใช้น้ำทะเลธรรมชาติ (ความเค็ม 20-30 ppt) ที่สูบเข้ามา และถูกพักให้ตกตะกอนภายในฟาร์มก่อนนำมาใช้ โดยเปลี่ยนน้ำในบ่อเล็กน้อยเมื่อคุณภาพน้ำในบ่อลดลง ตัวอย่างกุ้งทั้งหมดถูกรวบรวมออกมาชั่งน้ำหนัก และวัดความยาว ซึ่งเมื่อกุ้งเพศผู้ตัวใดที่เริ่มมีการฟอร์ม หรือสร้างถุงน้ำเชื้อก็ถูกรวบรวมถุงน้ำเชื้อทั้ง 2 ข้างออกมาด้วยการกดเบาๆ บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 แล้วใช้ forcep ดึงเอาถุงน้ำเชื้อออกมา และประเมินความหนาแน่นของสเปิร์ม (sperm concentration) ลักษณะความสมบูรณ์รูปร่างของสเปิร์ม (sperm morphology) และการมีชีวิตของสเปิร์ม (sperm viability) ที่อยู่ภายในถุงน้ำเชื้อเพื่อทราบความสมบูรณ์ของถุงน้ำเชื้อ และสามารถประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่รูปร่างปกติ และเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต รวมทั้งการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนเพื่อได้ข้อมูลที่สำคัญก่อนการนำถุงน้ำเชื้อมาแช่เย็น หรือแช่แข็งต่อไป การประเมินคุณภาพสเปิร์มกุ้งกุลาดำทำโดยสุ่มออกจากบ่อด้วยการยกยอในช่วงเวลาประมาณ 9.00-9.30 น ทำคัดแยกเพศผู้และเพศเมีย แล้วสุ่มเลือกเฉพาะกุ้งเพศผู้จำนวนประมาณ 15-20 ตัวออกมาประเมินดูความสมบูรณ์ของถุงน้ำเชื้อ หรือถุงน้ำเชื้อ (spermatophore) ที่อยู่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 (petasma) ว่ามีลักษณะอย่างไร มีสีขาวขุ่น หรือมีสีใส ทำการบันทึกภาพแล้วทำการรวบรวมถุงน้ำเชื้อออกมาจากกุ้งเพศผู้ โดยจับกุ้งให้แน่นแล้วกดบริเวณด้านข้าง petasma เบาๆ เพื่อรีดเอาถุงน้ำเชื้อออกมา แล้วทำการบันทึกลักษณะของถุงน้ำเชื้อ

2. <u>การประเมินคุณภาพสเปิร์มกุ้งกุลาดำ</u>

ถุงน้ำเชื้อถูกนำออกมาชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาดัชนีความสมบูรณ์เพศ (gonadosomatic index) การประเมินคุณภาพสเปิร์มทำโดยนำถุงน้ำเชื้อมาบดเบาๆให้ละเอียดด้วย glass homogenizer ใส่ NaCl 0.85% ลงไปแล้วทำการสุ่มนับจำนวนสเปิร์มเพื่อคำนวณหาความหนาแน่นของสเปิร์ม (sperm concentration) และเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (percentage of sperm viability) ตามวิธีการของ Wang et al. (1995) นอกจากนี้ตัวอย่างถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่ได้รวบรวม

ได้ถูกนำมาศึกษาดูการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างละเอียดของสเปิร์มด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน

ความหนาแน่นของสเปิร์ม ประเมินโดยการบดถุงน้ำเชื้อเบาๆให้แตกด้วย calcium-free saline (Ca-F saline) เขย่าให้เข้ากันด้วย vortexer แล้วหยดสารละลายที่ได้ลงใน hemacytometer เพื่อนับจำนวนสเปิร์มที่พบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า จึงคำนวณกลับหาความหนาแน่นของสเปิร์มก่อนการเจือจางโดยประเมิน 3 ซ้ำ โดยใช้วิธีการของ Leung-Trujillo and Lawrence (1987) และ Pratoomchat et al. (1993)

การประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตทำโดย นำถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำมาบดให้ละเอียดด้วยโกร่งบดยา (glass homogenizer) ทำการใส่ Ca-F saline ลงไปแล้วประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (percentage of viable sperm) โดยการนำเอาสารละลายสเปิร์มที่ถูกเจือจาง (5 ไมโครลิตร) มาย้อมสีด้วยสารละลาย eosin-nigrosin โดยหยด eosin ปริมาตรเท่ากับสารละลายสเปิร์ม ส่วน nigrosin หยดสองเท่าลงไปในภายหลัง ผสมให้เข้ากันแล้วนำ cover slide มาเกลี่ยบางๆ บน slide ทำการ fix ด้วยความร้อนโดยระวังไม่ให้ร้อนเกินไป ทำการสุ่มนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า (Fribourgh, 1966; Nimrat et al., 2005) สเปิร์มที่มีชีวิต (viable sperm) จะไม่มีการดูดซึมสีหรือติดสีย้อม และ ตัวสเปิร์มที่ไม่มีชีวิต (dead sperm) จะดูดซับสี หรือติดสีย้อมสีม่วงแดง โดยสุ่มนับสเปิร์ม 200 ตัว และทำ 3 ซ้ำเพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต

3. <u>การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่เย็นถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ</u>

3.1 <u>การศึกษาการแช่เย็นถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำด้วยสารละลายบัฟเฟอร์</u>

ทำการรวบรวมถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำจากพ่อพันธุ์ที่สมบูรณ์เพศที่เลี้ยงขุนภายในบ่อดิน ซึ่งทราบจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มของพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำ ด้วยวิธี aseptic technique ตั้งแต่ล้างตัวกุ้งให้สะอาด แล้วใช้คีมคีบที่สะอาดปราศจากเชื้อรวบรวมถุงน้ำเชื้อมาใส่ใน cryovial ที่ได้ทำการฆ่าเชื้อและมีสารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆชนิดกันอยู่ภายใน cryovial ในการทดลองใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 4 ชนิดได้แก่ mineral oil, Ringer solution, phosphate buffer และ 0.85% NaCl ใส่ลงในหลอดเก็บรักษา (cryovial) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หลอดละ 1.5 มิลลิลิตร โดยในแต่ละสูตรน้ำยา ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำแบบแช่เย็นใส่ถุงน้ำเชื้อ 1 ถุงต่อหลอดเก็บรักษา 1 หลอด ปิดฝาให้สนิท แล้วนำหลอดไปทำการเก็บรักษาในตู้เย็น ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 2-4 องศาเซลเซียส โดยทำการประเมินคุณภาพถุงน้ำเชื้อ ได้แก่ เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (ประเมินด้วยการย้อมสีสเปิร์มด้วย eosin-nigrosin) พร้อมทั้งสังเกตการเปลี่ยนแปลงภายนอก (สี ความหนืดและความขุ่น) ของน้ำยาในหลอดเก็บรักษา รวมทั้งการบวมของถุงน้ำเชื้อ และสีและรูปร่างของถุงน้ำเชื้อขณะเก็บรักษาว่ามีลักษณะเปลี่ยนแปลงอย่างไรหรือไม่ และประเมินการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตระหว่างการเก็บรักษา จากนั้นบันทึกผลที่ได้ แล้ววิเคราะห์หาสูตรน้ำยาที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษามากที่สุดว่าสารละลายบัฟเฟอร์สูตรใดให้สเปิร์มมีชีวิตรอดสูงสุด ถุงน้ำเชื้อจากชุดการทดลองที่ให้ผลการทดลองที่ดี ได้ถูกนำมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะรูปร่างสเปิร์มเมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน หลังการเก็บรักษาแช่เย็น เปรียบเทียบกับถุงน้ำเชื้อสด ด้วยการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy; SEM)

4. การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ

4.1 การศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ต่อสเปิร์มกุ้ง

ถุงน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงภายในฟาร์มถูกรวบรวมออกมาแล้วนำมาแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ (Ca-F saline) แล้วใส่สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆได้แก่ dimethylsulfoxide (DMSO), ethylene glycol, propylene glycol, formamide และ methanol ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5%, 10%, 15% และ 20% นานเป็นระยะเวลานานต่างๆกัน (10, 20, 30 และ 60 นาที) แล้วประเมินการรอดชีวิตของสเปิร์ม โดยในการทดลองมีทำการทดลอง 3 ซ้ำ ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส)

การทดสอบความเป็นพิษเริ่มจากนำเอาถุงน้ำเชื้อมาใส่ในโกร่งบดยา (glass homogenizer) แล้วเติมสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่าง ๆ ที่ต้องการทดสอบ ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วจึงทำการบดถุงน้ำเชื้อเบา ๆ ให้ละเอียด จากนั้นประเมินการมีชีวิตของสเปิร์มในทุกชุดการทดลองที่ระยะเวลาต่าง ๆแล้วย้อมสีประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว สำหรับกลุ่มควบคุมจะใช้ถุงน้ำเชื้อที่รวบรวมออกมาจากพ่อพันธุ์ใหม่ ๆ (freshly collected spermatophore) มาทดสอบแล้วใส่สารละลายบัฟเฟอร์เท่านั้น การทดลองในขั้นตอนนี้ทำให้ทราบว่าชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการนำมาแช่แข็งถุงน้ำเชื้อควรเป็นสารชนิดอะไรและควรใช้ในปริมาณเท่าไร โดยเลือกเฉพาะสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เป็นพิษน้อยมาใช้ในการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อต่อไป

4.2 การแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ

การศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มกุ้งกุลาดำที่มีพิษน้อยที่สุดได้ถูกคัดเลือกเพื่อนำมาใช้ในขั้นตอนการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ โดยขั้นตอนนี้ตัวอย่างถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่รวบรวมออกจากโคนขาเดินคู่ที่ 5 ของพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำถูกนำมาใส่ใน cryovial ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ (Ca-F saline) และสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสม (DMSO) ที่ความเข้มข้น 5% หรือ 10% ปล่อยทิ้งไว้ให้อยู่ในสภาวะสมดุล (equilibration) นาน 60 นาทีแล้วนำมาแช่แข็งโดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) และอุณหภูมิสุดท้าย (final temperature) ที่แตกต่างกัน โดยเริ่มต้นลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 25 องศาเซลเซียส ด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับแตกต่างกัน (2, 4, 6 และ 8 องศาเซลเซียส/นาที) ด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer) มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -30 และ -80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำถุงน้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้ลดอุณหภูมิมายังแณหภูมิสุดท้ายถูกนำเข้าไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว แล้วทำการละลายเพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต 3 ซ้ำ

ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่ได้ถูกแช่แข็งไว้ใน cryovial ถูกนำมาเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวเป็นเวลาต่างๆกันเพื่อประเมินผลของระยะเวลาเก็บรักษาที่มีต่อคุณภาพสเปิร์มหลังการละลาย (post-thaw sperm motility) ถุงน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีจำนวนมากที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ถูกรวบรวมมาจากพ่อพันธุ์หลายตัว (pooled spermatophores) เมื่อนำมาแช่แข็งด้วย protocol การแช่แข็งรูปที่มีการพัฒนาแบบต่างๆกันและเก็บรักษาไว้ในเวลาต่างๆกันในลักษณะการประเมินผลแบบ two-way ANOVA เพื่อประเมินคุณภาพสเปิร์มหลังการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ก็จะทราบว่า protocol ไหนมีความเหมาะสมในการประยุกต์ใช้ ถุงน้ำเชื้อแช่แข็งถูกนำมาละลายด้วยการใช้อัตรา

การละลายที่เหมาะสม และประเมินคุณภาพของสเปิร์มตามระยะเวลาที่กำหนดไว้เพื่อประเมินถึงผลของระยะเวลาการเก็บรักษาที่อาจมีต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มในถุงน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็ง โดยประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต โดยทดลอง 3 ซ้ำ

การละลายถุงน้ำเชื้อแช่แข็ง ทำโดยนำหลอด cryovial ที่บรรจุถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวในระยะเวลาต่างๆกันมาละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเมื่อถุงน้ำเชื้อละลายกลับสู่สภาพเดิม นำเอาสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ (DMSO) ออกจากหลอด cryovial แล้วเติม Ca-F saline เพื่อล้างสารไครโอโพรเทคแทนท์ โดยแช่ไว้นาน 1 นาที จากนั้นทำการบดถุงน้ำเชื้อ โดยเอาถุงน้ำเชื้อมาใส่ในโกร่งบดยาแล้วทำการบดถุงน้ำเชื้อเบา ๆ ให้ละเอียด ทำการประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตตามวิธีที่กล่าวมาแล้วโดยการย้อมสีสเปิร์ม 3 ซ้ำ

5. <u>การศึกษาการผสมเทียมแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำด้วยถุงน้ำเชื้อที่แช่เย็น และแช่แข็ง</u>

การประเมินความสามารถของถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เก็บรักษาแช่เย็น และเก็บรักษาแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว ได้ถูกนำมาใช้ในการผสมเทียมกับแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำเพื่อประเมินประสิทธิภาพการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่เย็นและการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อ โดยนำแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงขุนภายในฟาร์มมาตัดก้านตา 1 ข้างเพื่อเร่งให้แม่พันธุ์กุ้งสร้างไข่ การผสมเทียมทำโดยนำถุงน้ำเชื้อที่ได้แช่เย็น หรือถุงน้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้ละลายจากการทดลองมาใส่เข้าไปในช่อง thelycum ของแม่พันธุ์ที่ลอกคราบใหม่ๆ ซึ่งการผสมเทียมแต่ละครั้งใช้ถุงน้ำเชื้อ 2 ถุงในการผสมเทียมแม่พันธุ์กุ้ง 1 ตัว แล้วปล่อยให้แม่พันธุ์กุ้งวางไข่ออกมาในถังไฟเบอร์กลาส ดำขนาด 500 ลิตร โดยปล่อยแม่พันธุ์กุ้ง 1 ตัว/ถัง สำหรับกลุ่มควบคุม ใช้ถุงน้ำเชื้อที่รวบรวมออกมาใหม่ๆ (freshly collected spermatophore) จากพ่อพันธุ์ที่เลี้ยงขุนภายในฟาร์มในการผสมเทียม ถุงน้ำเชื้อถูกแช่แข็งด้วย 2 protocols ก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว ได้แก่ การแช่แข็งถุงน้ำเชื้อมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -30 องศาเซลเซียสด้วยการใช้ 10% DMSO ในอัตราการลดอุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส/นาที และการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียสด้วยการใช้ 10% DMSO ในอัตราการลดอุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส/นาที ถุงน้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้จาก 2 protocols ได้ถูกนำมาเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวประมาณ 6 ชั่วโมงก่อนทำการละลายและนำไปผสมเทียมแม่พันธุ์กุ้ง สำหรับถุงน้ำเชื้อที่ได้แช่เย็นเก็บรักษาด้วย mineral oil ที่อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส นาน 3 วันได้นำมาผสมเทียมกับแม่พันธุ์กุ้งที่ลอกคราบใหม่ๆในช่วงเวลาเดียวกับการผสมเทียมกุ้งด้วยถุงน้ำเชื้อแช่แข็ง

แม่พันธุ์กุ้งที่วางไข่ถูกเอาออกจากถังไฟเบอร์กลาสหลังวางไข่ในตอนเช้าของวันรุ่งขึ้น จากนั้นปล่อยให้ไข่กุ้งกุลาดำฟักเป็นตัวอ่อน และพัฒนามาถึงระยะ gastrula เพื่อประเมินอัตราการปฏิสนธิ (fertilization rate) และเมื่อลูกกุ้งพัฒนาเข้าสู่ระยะนอเพลียส (nauplius) เรียบร้อยแล้ว ทำการประเมินอัตราการฟัก (hatching rate) และอัตรารอด (survival rate) เพื่อประเมินความสำเร็จของการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยทดลอง 6 ซ้ำ

6. <u>การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสเปิร์มกุ้งกุลาดำขณะเก็บแช่เย็นและแช่แข็ง</u>

นำถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่ได้แช่เย็น หรือแช่แข็งในชุดการทดลองต่างๆ รวมทั้งถุงน้ำเชื้อสดที่รวบรวมมาใหม่ๆจากการสุ่มตัวอย่าง (freshly collected spermatophore) ในระหว่างศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์ม มาศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเซลล์ที่อาจเกิดขึ้นจากการแช่เย็นหรือแช่แข็ง โดยนำเอาถุงน้ำเชื้อไป fix ด้วย 2% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffer

solution pH 7.8 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้ว rinse ด้วย phosphate buffer จึงนำมาแช่ใน 1% osmium tetroxide ใน 0.1 M phosphate buffer solution pH 7.8 นาน 2 ชั่วโมง ก่อนทำการดึงน้ำออกด้วยการแช่ใน ethanol ความเข้มข้นต่างๆกัน แล้วทำให้แห้งณ จุดวิกฤต จากนั้นนำตัวอย่างมาติด stub และเข้าเครื่อง coat ด้วยทอง (Pongtippatee-Taweepreda et al., 2004) แล้วนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงในรายละเอียดของขนาดหัวสเปิร์ม การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ หรือความเสียหายของออร์แกเนลต่างๆ ที่เกิดขึ้นภายในตัวสเปิร์มด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนที่ศูนย์กล้องจุลทรรศน์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยประเมินการบาดเจ็บของเซลล์สเปิร์ม (damage) ว่ามีเล็กน้อย หรือมีมาก หรือเซลล์สเปิร์มยังคงปกติหลังการแช่เย็น หรือแช่แข็งเพื่อการเปลี่ยนแปลงระดับเซลล์ สำหรับกลุ่มควบคุมใช้ถุงน้ำเชื้อสดที่ทำการบีบกดออกมาใหม่ๆจากพ่อพันธุ์กุ้งที่เลี้ยงขุนภายในฟาร์ม แล้วทำการ fix ตัวอย่างทันทีตามวิธีการที่กล่าวมาแล้ว

7. <u>การวิเคราะห์ทางสถิติ</u>

ข้อมูลเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การฟัก ในแต่ละชุดการทดลอง และระยะเวลานานที่สุดที่สเปิร์มในถุงน้ำเชื้อยังมีชีวิตอยู่ ถูกนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีการ analysis of variance (two-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองด้วย Duncan’s new multiple range test โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การทดลองสามารถแบ่งออกได้เป็น 6 ตอน คือ

1. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มของพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำ
2. การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่เย็นถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ
3. การศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อสเปิร์มกุ้งกุลาดำ
4. การแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ
5. การผสมเทียมกุ้งกุลาดำ
6. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสเปิร์มกุ้งกุลาดำขณะเก็บแช่เย็นและแช่แข็ง

1. <u>การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มของพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำ</u>

การศึกษาคุณภาพสเปิร์มกุ้งกุลาดำทำโดยสุ่มกุ้งกุลาดำออกมาจากบ่อดินเดือนละครั้ง เริ่มตั้งแต่กุ้งกุลาดำอายุ 7 เดือน โดยสุ่มเฉพาะเพศผู้จำนวน 15-20 ตัวต่อครั้งในแต่ละเดือน จนกระทั่งกุ้งกุลาดำเพศมีผู้อายุ 18 เดือน (รูปที่ 1 และรูปที่ 2) แล้วทำการประเมินการเปลี่ยนแปลงถุงน้ำเชื้อโดยดูลักษณะภายนอกของถุงน้ำเชื้อว่ามีลักษณะใส หรือขาวขุ่นมากน้อยเพียงไร (รูปที่ 3 และรูปที่ 4)

ผลการทดลองพบว่า กุ้งกุลาดำอายุ 7 เดือนมีน้ำหนักเฉลี่ย 16.7 กรัม และความยาวเฉลี่ย 12.2 เซนติเมตร โดยมีกุ้งกุลาดำเพียง 6.7 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่สามารถรีดเอาถุงน้ำเชื้อออกมาจากบริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 ได้ อย่างไรก็ตามเมื่อกุ้งกุลาดำมีอายุมากขึ้น ก็มีแนวโน้มที่สามารถรวบรวมเอาถุงน้ำเชื้อออกมาได้มากขึ้น โดยเมื่อกุ้งมีอายุ 12 เดือน พบว่ามีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเป็น 29.8 กรัม มีความยาวเฉลี่ยเป็น 14.1 เซนติเมตร และมีกุ้งมากถึง 55 เปอร์เซ็นต์ที่สามารถรีดถุงน้ำเชื้อออกมาได้ (ตารางที่ 1) พ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำอายุระหว่าง 13-18 เดือน มีน้ำหนักเฉลี่ยเพิ่มขึ้นจาก 32.7 กรัม เป็น 65 กรัม ความยาวเฉลี่ยจาก 14.5 เซนติเมตร เป็น 18.7 กรัม และมีกุ้งที่สามารถรีดถุงน้ำเชื้อออกมาได้จาก 60 เปอร์เซ็นต์ เป็น 95 เปอร์เซ็นต์ในเดือนที่ 17 แต่ลดลงเหลือ 85 เปอร์เซ็นต์ในเดือนที่ 18 (ตารางที่ 1)

การศึกษาการพัฒนาของถุงน้ำเชื้ออายุต่างๆกันพบว่า กุ้งอายุ 7 เดือน และ 8 เดือนมีถุงน้ำเชื้อขนาดเล็ก และถุงน้ำเชื้อมีส่วนที่เป็นสีใสมากกว่าสีขาว (ตารางที่ 1 และรูปที่ 3) กุ้งอายุ 9 เดือน และ 10 เดือนเริ่มมีถุงน้ำเชื้อที่มีสีขาวมากขึ้น และเริ่มมี vas deferences หลุดออกมาพร้อมกับถุงน้ำเชื้อที่รีดได้ ในขณะที่กุ้งอายุ 11 เดือนมีถุงน้ำเชื้อมีสีขาวขุ่นชัดเจน และมีขนาดใหญ่ และสามารถรีดถุงน้ำเชื้อออกมาได้ง่ายพร้อม vas deferens ที่ติดออกมา (ตารางที่ 1 และรูปที่ 3) กุ้งอายุ 12 เดือนมีถุงน้ำเชื้อมีสีขาวขุ่นชัดเจน มีขนาดใหญ่ แต่มีส่วนที่เป็นสีใสบริเวณรอบถุงน้ำเชื้อเพียงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับถุงน้ำเชื้อที่ได้จากกุ้งอายุต่ำกว่า 11 เดือนลงไป โดยยังคงรีดถุงน้ำเชื้อออกมาได้ง่ายมาก (ตารางที่ 1 และรูปที่ 3) ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำอายุระหว่าง 13-18 เดือนยังคงมีสีขาวขุ่นเต็มถุงเป็นส่วนใหญ่ (ตารางที่ 1 และรูปที่ 4)

การประเมินคุณภาพสเปิร์มพบว่า กุ้งอายุ 7 และ 8 เดือนยังไม่มีการสร้างสเปิร์ม และการศึกษาความหนาแน่นสเปิร์มในถุงน้ำเชื้อพบว่ากุ้งอายุ 17 เดือนมีปริมาณสเปิร์มสูงสุด 8.12±0.21 ($x10^7$)/ถุง (ตารางที่ 2) ในขณะที่การประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต พบว่าถุงน้ำเชื้อที่รวบรวมมาจากพ่อกุ้งอายุ 9-17 เดือนมีสเปิร์มที่มีชีวิตมากกว่า 96.33% (ตารางที่ 2)

กุ้งกุลาดำอายุ 8 เดือน

กุ้งกุลาดำอายุ 9 เดือน

กุ้งกุลาดำอายุ 10 เดือน

กุ้งกุลาดำอายุ 11 เดือน

กุ้งกุลาดำอายุ 12 เดือน

รูปที่ 1 ลักษณะของกุ้งกุลาดำเพศผู้อายุระหว่าง 8-12 เดือนที่เลี้ยงขุนภายในบ่อพ่อพันธุ์

กุ้งกุลาดำอายุ 13 เดือน

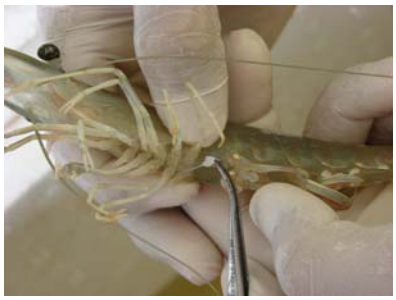
กุ้งกุลาดำอายุ 14 เดือน

กุ้งกุลาดำอายุ 15 เดือน

กุ้งกุลาดำอายุ 16 เดือน

กุ้งกุลาดำอายุ 17 เดือน

รูปที่ 2 ลักษณะของกุ้งกุลาดำเพศผู้อายุระหว่าง 13-17 เดือนที่เลี้ยงขุนภายในบ่อพ่อพันธุ์



ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำอายุ 8 เดือน

ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำอายุ 9 เดือน

ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำอายุ 10 เดือน

ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำอายุ 11 เดือน

ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำอายุ 12 เดือน

รูปที่ 3 ลักษณะของถุงน้ำเชื้อรวบรวมจากกุ้งกุลาดำเพศผู้อายุระหว่าง 8-12 เดือนที่เลี้ยงขุนภายในบ่อ

ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำอายุ 13 เดือน

ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำอายุ 14 เดือน

ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำอายุ 15 เดือน

ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำอายุ 16 เดือน

ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำอายุ 17 เดือน

รูปที่ 4 ลักษณะของถุงน้ำเชื้อรวบรวมจากกุ้งกุลาดำเพศผู้อายุระหว่าง 13-17 เดือนที่เลี้ยงขุนภายในบ่อ

ตารางที่ 1 การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักและความยาวกุ้งกุลาดำ เปอร์เซ็นต์กุ้งกุลาดำที่สามารถรีดถุงน้ำเชื้อออกมาได้ และลักษณะของถุงน้ำเชื้อ

อายุ (เดือน)	น้ำหนักตัว (กรัม)	ความยาวตัว (เซนติเมตร)	กุ้งที่รีดถุงน้ำเชื้อได้ (%)	ลักษณะถุงน้ำเชื้อที่รีดได้
7	16.7±1.9	12.2±0.5	6.7	มีส่วนที่เป็นสีใสมากกว่าสีขาว และมีขนาดเล็กมาก
8	22.7±2.2	13.5±0.7	7.1	มีส่วนที่เป็นสีใสมากกว่าสีขาว และมีขนาดเล็กมาก
9	25.0±3.1	13.4±0.7	26.3	ถุงน้ำเชื้อมีสีขาวมากขึ้นและเริ่มมี vas deferens ติดออกมากับถุงน้ำเชื้อที่ได้
10	29.7±2.9	14.5±0.6	50	ถุงน้ำเชื้อมีสีขาวขุ่น มีขนาดใหญ่ และถูกรีดถุงน้ำเชื้อออกมาได้ง่ายพร้อม vas deferens ติดออกมา
11	29.9±3.3	14.0±0.8	47.4	ถุงน้ำเชื้อมีสีขาวขุ่น มีขนาดใหญ่ และถูกรีดถุงน้ำเชื้อออกมาได้ง่ายพร้อม vas deferens ติดออกมา
12	29.8±2.4	14.1±0.5	55	ถุงน้ำเชื้อมีสีขาวขุ่นชัดเจน มีขนาดใหญ่ มีส่วนที่เป็นสีใสบริเวณรอบถุงน้ำเชื้อเพียงเล็กน้อย และรีดออกมาได้ง่ายมากเมื่อกดบริเวณโคนขาเดิน
13	32.7±4.6	14.5±0.8	60	ถุงน้ำเชื้อมีสีขาวขุ่นเต็มถุง และผิวถุงมีลักษณะตึง
14	38.2±7.7	15.2±1.2	70	ถุงน้ำเชื้อมีสีขาวขุ่นเต็มถุง และผิวถุงมีลักษณะตึง
15	43.7±3.4	16.1±0.9	75	ถุงน้ำเชื้อมีขนาดใหญ่พบสีขาวขุ่นกระจายเต็ม sac
16	47.4±3.5	17.4±0.7	80	ถุงน้ำเชื้อมีสีขาวขุ่นและสีใสปนอยู่ด้วยเล็กน้อย
17	55.3±4.4	17.8±0.6	95	ถุงน้ำเชื้อมีสีขุ่น และ Vas deferent มีสีขาวขุ่นและสีใสปนอยู่
18	65.0±3.5	18.7±0.4	85	ถุงน้ำเชื้อมีขาวขุ่น และ Vas deferent บางส่วนเริ่มพบสีเหลืองอ่อน

ตารางที่ 2 ความหนาแน่นของสเปิร์ม และเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งกุลาดำที่อายุต่างๆกัน

อายุ (เดือน)	ความหนาแน่นของสเปิร์ม ($x10^7$)/ถุง	เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (%)
7	-	-
8	-	-
9	4.49 ± 0.38^{e}	96.87 ± 0.63^{a}
10	4.56 ± 0.19^{e}	98.31 ± 0.37^{a}
11	4.59 ± 0.54^{e}	97.73 ± 0.47^{a}
12	6.08 ± 0.61^{cd}	98.69 ± 0.27^{a}
13	6.50 ± 0.73^{bcd}	99.07 ± 0.12^{a}
14	7.63 ± 0.68^{ab}	98.31 ± 0.45^{a}
15	6.76 ± 0.19^{abc}	96.33 ± 0.60^{a}
16	6.90 ± 0.19^{abc}	98.71 ± 0.23^{a}
17	8.12 ± 0.21^{a}	97.78 ± 0.84^{a}
18	6.19 ± 0.52^{bcd}	97.96 ± 0.81^{a}

ตัวอักษร superscript ที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

2. <u>การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่เย็นถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ</u>

กุ้งกุลาดำถูกรวบรวมออกมาจากบ่อดิน แล้วทำการรวบรวมถุงน้ำเชื้อออกมาเพื่อนำมาแช่ในสารละลายสูตรต่างๆแล้วเก็บรักษาในสภาพแช่เย็นเพื่อประเมินวิธีการที่เหมาะสมในการแช่เย็นถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ การแช่เย็นถุงน้ำเชื้อทำโดยใช้ถุงน้ำเชื้อ 1 ถุงแช่ในหลอด cryotube 1 หลอด (ขนาด 1.8 มิลลิลิตร) ที่บรรจุสารละลาย 1.5 มิลลิลิตรแล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส สารละลายที่ใช้ได้แก่ mineral oil, phosphate buffer, 0.85% NaCl และ Ringer solution ซึ่งในทุกสูตรใส่ penicillin-streptomycin ความเข้มข้น 0.1% ลงไป

ถุงน้ำเชื้อที่เก็บแช่เย็นเมื่อเวลาผ่านไป 7, 14, 21, 28 และ 35 วันได้ถูกนำมาประเมินคุณภาพสเปิร์มเปรียบเทียบกับถุงน้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ๆ (กลุ่มควบคุม) การประเมินคุณภาพสเปิร์มทำโดยนำถุงน้ำเชื้อที่เก็บแช่เย็นที่เวลาต่างๆกันมาบดเบาๆให้แตกใน homogenizer แล้วนำ sperm suspension มาย้อมสีด้วย eosin และ nigrosin เพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตในแต่ละชุดการทดลอง สำหรับกลุ่มควบคุมใช้น้ำเชื้อสดที่รวบรวมออกมาใหม่ๆมาประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ผลการทดลองพบว่าถุงน้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ๆมีลักษณะสีขาวขุ่น และไม่ยุ่ย (รูปที่ 5) ถุงน้ำเชื้อที่แช่เย็นใน Mineral oil เมื่อเวลาผ่านไป 7 วันยังคงมีลักษณะปกติ (รูปที่ 6) แต่ถุงน้ำเชื้อที่แช่เย็นใน Phosphate buffer และ Ringer solution เริ่มมีลักษณะไม่คงรูปเมื่อนำออกมาวางบนกระจกสไลด์ (รูปที่ 7 และ รูปที่ 8) ถุงน้ำเชื้อที่แช่ในสารละลาย Mineral oil นาน 35 วันยังคงมีลักษณะภายนอกที่คงรูป ไม่ยุ่ย โดยเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตมีค่าสูงประมาณ 90% หลังการเก็บรักษาแช่เย็นผ่านไป 120 ชั่วโมง (5 วัน) แม้ว่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (68.22%) มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเก็บรักษาผ่านไป 336 ชัวโมง (14 วัน) (ตารางที่ 3) ถุงน้ำเชื้อที่แช่เย็นใน 0.85% NaCl เมื่อเก็บรักษาแช่เย็นผ่านไปเพียง 24 ชั่วโมง พบว่ามีสเปิร์มที่มีชีวิตเหลือต่ำมากเพียง 1% อย่างไรก็ตามถุงน้ำเชื้อที่แช่อยู่ในสารละลาย Phosphate buffer และ Ringer solution มีลักษณะยุ่ย และสารละลายในหลอด cryotube มีสีเปลี่ยนไป ไม่ใสเหมือนช่วงแรก โดยถุงน้ำเชื้อที่แช่เย็นใน Phosphate buffer เมื่อแช่เย็นผ่านไปเพียง 9 ชั่วโมงไม่พบสเปิร์มที่มีชีวิต ในขณะที่ถุงน้ำเชื้อที่แช่เย็นใน Ringer solution เมื่อเวลาผ่านไป 120 ชั่วโมง (5 วัน) มีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตเหลือเพียง 5.19% (ตารางที่ 3)

การประเมินลักษณะภายนอกของถุงน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ในสารละลายชนิดต่างๆพบว่า ถุงน้ำเชื้อที่เก็บรักษาด้วย mimeral oil มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายนอกถุงน้ำเชื้อน้อยที่สุด โดยเมื่อเก็บแช่เย็นนาน 168 ชั่วโมง (7 วัน) จะมีการบวมถุงน้ำเชื้อเพียงเล็กน้อย ในขณะที่การใช้สารละลายอื่นๆอีก 3 ชนิด ทำให้ถุงน้ำเชื้อยุ่ยและไม่คงรูป (ตารางที่ 4) นอกจากนี้การเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อนาน 35 วันพบว่า เฉพาะชุดการทดลองที่ใช้ mineral oil เท่านั้นที่ยังพบสเปิร์มที่มีชีวิต

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เก็บแช่เย็นในสารละลายชนิดต่างๆ

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ชนิดสารละลายบัฟเฟอร์			
	Mineral oil	0.85% NaCl	Phosphate buffer	Ringer solution
3	99.48±1.39^{a,1}	97.48±4.91^{a,1}	83.67±8.65^{a,2}	99.52±0.96^{a,1}
6	99.78±0.50^{a,1}	66.15±2.42^{b,2}	26.96±0.58^{b,3}	95.11±8.42^{a,1}
9	96.56±6.12^{a,1}	37.33±7.29^{c,3}	-	79.74±9.80^{b,2}
12	91.56±0.59^{ab,1}	7.56±1.72^{d,3}	-	68.11±2.68^{c,2}
24	90.07±2.69^{ab,1}	1.07±3.45^{de,3}	-	64.52±5.55^{c,2}
72	90.22±6.82^{ab,1}	-	-	14.11±7.93^{d,2}
120	90.04±2.18^{ab,1}	-	-	5.19±7.77^{e,3}
168	70.26±6.81^{c,1}	-	-	-
336	68.22±3.21^{c,1}	-	-	-

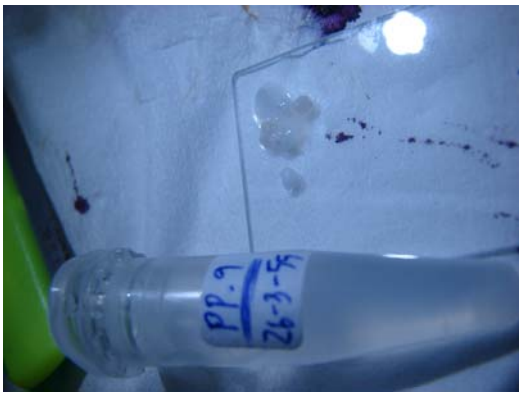
ตัวอักษร superscript ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลข superscript ที่แตกต่างกันในแนวนอน มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 4 การเปลี่ยนแปลงลักษณะถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เก็บแช่เย็นในสารละลายชนิดต่างๆ

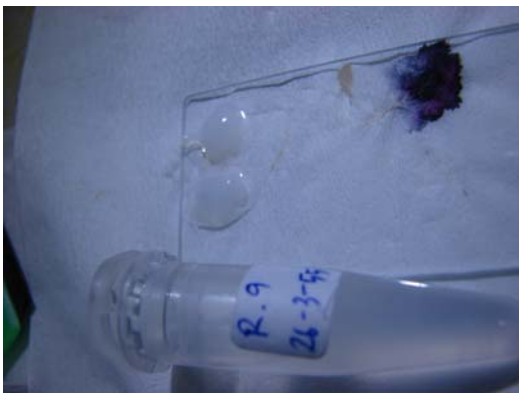
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ชนิดสารละลายบัฟเฟอร์			
	Mineral oil	0.85% NaCl	Phosphate buffer	Ringer solution
3	สีขาวขุ่นปกติ	สีขาวขุ่นปกติ	สีขาวขุ่นปกติ	สีขาวขุ่นปกติ
6	สีขาวขุ่นปกติ	ถุงน้ำเชื้อเริ่มบวม	ถุงน้ำเชื้อเริ่มบวม	สีขาวขุ่นปกติ
9	สีขาวขุ่นปกติ	ถุงน้ำเชื้อบวมมากขึ้น	ถุงน้ำเชื้อบวมมากขึ้น	ถุงน้ำเชื้อเริ่มบวม
12	สีขาวขุ่นปกติ	ถุงน้ำเชื้อบวมมากขึ้น	ถุงน้ำเชื้อบวมมากขึ้น	ถุงน้ำเชื้อบวมมากขึ้น
24	สีขาวขุ่นปกติ	ผนังถุงน้ำเชื้อยุ่ยและแตก	ผนังถุงน้ำเชื้อยุ่ยและแตก	ผนังถุงน้ำเชื้อยุ่ยและแตก
72	ถุงน้ำเชื้อเริ่มบวมเล็กน้อย	สารละลายเริ่มมีกลิ่น	สารละลายเริ่มมีกลิ่นและมีสีเหลือง	สารละลายเริ่มมีกลิ่นและมีสีขาว
120	ถุงน้ำเชื้อเริ่มบวมเล็กน้อยแต่คงรูป	ถุงน้ำเชื้อยุ่ยและสารละลายเริ่มมีสีเหลืองอ่อน	ถุงน้ำเชื้อยุ่ยและสารละลายมีสีเหลืองอ่อน	ถุงน้ำเชื้อยุ่ย
168	ถุงน้ำเชื้อบวมเล็กน้อยแต่คงรูป	ถุงน้ำเชื้อยุ่ยและสารละลายมีสีเหลือง	ถุงน้ำเชื้อยุ่ยและสารละลายมีสีเหลือง	ถุงน้ำเชื้อยุ่ยและสารละลายมีสีเหลือง
336	ถุงน้ำเชื้อบวมเล็กน้อยแต่คงรูป	ถุงน้ำเชื้อไม่คงรูปและสารละลายมีสีเหลือง	ถุงน้ำเชื้อไม่คงรูปและสารละลายมีสีเหลือง	ถุงน้ำเชื้อไม่คงรูปฉีกขาดและสารละลายมีสีเหลือง

รูปที่ 5 ลักษณะถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่รวบรวมออกมาจากกุ้งกุลาดำ

รูปที่ 6 ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เก็บแช่เย็นใน mineral oil ผ่านไป 7 วัน



รูปที่ 7 ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เก็บแช่เย็นใน phosphate buffer ผ่านไป 7 วัน



รูปที่ 8 ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เก็บแช่เย็นใน Ringer solution ผ่านไป 7 วัน

3. <u>การศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อสเปิร์มกุ้งกุลาดำ</u>

ถุงน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงภายในฟาร์มถูกรวบรวมออกมาแล้วนำมาแช่ในสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ ได้แก่ dimethylsulfoxide (DMSO), ethylene glycol, propylene glycol, formamide และ methanol ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5%, 10%, 15% และ 20% ในระยะต่างๆกัน (10, 20, 30 และ 60 นาที) แล้วประเมินการรอดชีวิตของสเปิร์ม

การประเมินความเป็นพิษของสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการมีชีวิตของสเปิร์มกุ้งกุลาดำ พบว่า ความเป็นพิษของสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการมีชีวิตของสเปิร์มกุ้งกุลาดำขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ทดสอบ และระยะเวลาที่ถุงน้ำเชื้อแช่อยู่ในสารละลาย ตามผลการทดลองดังนี้

การแช่ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำในสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 5 ชนิด ที่เวลา 10 นาทีใน 4 ความเข้มข้น พบว่า เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตในชุดการทดลองที่ใช้ DMSO, propylene glycol, formamide และ methanol มีค่าสูงอยู่ระหว่างประมาณ 99% ในขณะที่เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตใน ethylene glycol มีค่าลดลงเหลืออยู่ระหว่าง 39.26-60.63% (ตารางที่ 5)

การแช่ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำในสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่เวลา 20 นาทีใน 4 ความเข้มข้น ยังคงให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับเวลา 10 นาที โดยเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตในชุดการทดลองที่ใช้ DMSO, propylene glycol, formamide และ methanol มีค่าสูงอยู่ระหว่าง 96.85-99.81% ในขณะที่เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตใน ethylene glycol มีค่าลดลงอยู่ระหว่าง 23.74-47.44% (ตารางที่ 5)

การแช่ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำในสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่เวลา 30 นาทีใน 4 ความเข้มข้น พบว่าสารละลาย DMSO ยังคงมีความเป็นพิษต่อสเปิร์มกุ้งกุลาดำไม่มาก โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตในสารละลายเหล่านั้นยังคงมีค่าเฉลี่ยสูงกว่า 95.41% ขึ้นไป ในขณะที่เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตเมื่อใช้ formamide, ethylene glycol, propylene glycol และ methanol ที่เวลา 30 นาทีมีค่าต่ำอยู่ระหว่าง 0-59.85%, 12.52-26.74%, 0-95.37% และ 17-49.52% ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

การแช่ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำในสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่เวลา 60 นาทีใน 4 ความเข้มข้น แสดงให้เห็นชัดเจนว่า ethylene glycol และ methanol มีความเป็นพิษสูง โดย methanol ทำให้สเปิร์มตายหมด และ ethylene glycol ทำให้สเปิร์มที่มีชีวิตมีค่าต่ำกว่า 3% สารละลาย DMSO ทำให้สเปิร์มมีชีวิตมีค่าเหลืออยู่ระหว่าง 26.93-54.89% ในขณะที่สารละลาย propylene glycol ทำให้สเปิร์มที่มีชีวิตมีค่าเฉลี่ยระหว่าง 0-21.03% และ formamide ทำให้สเปิร์มตายหมด (ตารางที่ 5)

การศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ตั้งแต่ 5-20% พบว่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของกุ้งกุลาดำในช่วงเวลา 20 นาทีแรกเมื่อใช้สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 5 ชนิดที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจาก 5% ไปเป็น 20% มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ยกเว้น propylene glycol ที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) ระหว่างความเข้มข้น 5-20% ที่เวลา 30 และ 60 นาที (ตารางที่ 5)

การศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้เวลาที่แช่ถุงน้ำเชื้อตั้งแต่ 10-60 นาที พบว่าเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 5 การเปลี่ยนแปลงเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่แช่ในสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่เวลาต่างๆกัน

ตัวอักษร superscript เหมือนกันตามแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ความเข้มข้น (%)	สารไครโอโพรเทคแทนท์	เวลา (นาที)			
		10	20	30	60
5	DMSO	99.89±0.41^{a,1}	99.59±0.95^{a,1}	89.41±1.34^{ab,2}	39.89±3.15^{b,3}
	Ethylene glycol	54.81±6.79^{bc,1}	43.26±7.61^{b,2}	26.74±9.54^{e,3}	2.48±4.50^{de,4}
	Propylene glycol	99.89±0.41^{a,1}	96.85±9.11^{a,1}	55.03±15.81^{bc,2}	21.03±14.94^{c,3}
	Formamide	99.93±0.25^{a,1}	98.78±3.23^{a,1}	32.85±8.64^{d,2}	-
	Methanol	99.74±0.81^{a,1}	99.44±1.22^{a,1}	49.52±9.39^{c,2}	-
10	DMSO	99.78±0.82^{a,1}	99.63±0.73^{a,1}	95.41±4.14^{a,1}	54.89±1.35^{a,2}
	Ethylene glycol	60.63±7.16^{b,1}	47.44±4.55^{b,2}	20.15±3.27^{f,3}	2.30±5.49^{de,4}
	Propylene glycol	99.89±0.41^{a,1}	98.89±2.86^{a,1}	62.03±11.66^{b,2}	11.07±9.54^{d,3}
	Formamide	99.63±1.72^{a,1}	98.89±3.54^{a,1}	59.85±7.80^{b,2}	-
	Methanol	99.81±0.77^{a,1}	99.41±1.82^{a,1}	25.63±9.71^{e,2}	-
15	DMSO	99.48±1.78^{a,1}	99.30±1.72^{a,1}	97.04±0.72^{a,1}	33.81±4.79^{bc,2}
	Ethylene glycol	39.26±4.96^{d,1}	27.78±6.30^{c,2}	20.48±6.08^{f,23}	-
	Propylene glycol	99.78±0.50^{a,1}	98.78±2.72^{a,1}	95.37±0.31^{a,1}	8.25±7.57^{d,2}
	Formamide	99.85±0.42^{a,1}	99.48±1.92^{a,1}	27.0±12.15^{e,2}	-
	Methanol	99.48±1.45^{a,1}	99.33±1.26^{a,1}	17.00±5.38^{f,2}	-
20	DMSO	99.48±1.87^{a,1}	99.81±0.51^{a,1}	98.96±2.01^{a,1}	26.93±7.11^{c,2}
	Ethylene glycol	48.52±9.55^{c,1}	23.74±4.51^{c,2}	12.52±1.60^{g,3}	-
	Propylene glycol	99.63±0.67^{a,1}	98.85±2.33^{a,1}	-	-
	Formamide	99.93±0.25^{a,1}	98.93±3.30^{a,1}	-	-
	Methanol	99.89±0.41^{a,1}	99.67±0.96^{a,1}	21.89±2.17^{f,2}	-

ตัวเลข superscript เหมือนกันตามแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

4. <u>การแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ</u>

การแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ ทำโดยนำเอาถุงน้ำเชื้อที่รวบรวมออกมาแช่ในสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสม (DMSO) โดยขั้นตอนนี้ตัวอย่างถุงน้ำเชื้อถูกทดสอบโดยนำมาใส่ใน cryovial ที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ (Ca-F saline) และสารละลาย DMSO ความเข้มข้น 5% และ 10% แล้วปล่อยให้อยู่ในระยะสมดุลนาน 60 นาที นำมาแช่แข็งด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่แตกต่างกันด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ตั้งแต่ -2, -4, -6 และ -8 องศาเซลเซียส/นาที โดยเริ่มต้นลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้นที่ 25 องศาเซลเซียส มาถึงที่อุณหภูมิสุดท้าย (final temperature) -30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำถุงน้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้ไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว แล้วทำการละลาย (thawing) ถุงน้ำเชื้อในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ถุงน้ำเชื้อที่ละลายได้ถูกนำออกมาแล้วบดให้แตก แล้วนำสเปิร์มมาย้อมสีด้วย Eosin-nigrosin บนกระจกสไลด์เพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต

หลอด cryovial ที่มีถุงน้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้เก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวที่เวลาต่างๆกันตั้งแต่ 0, 30 และ 60 นาที และ 1, 3, 5 และ 7 วัน ได้ถูกนำออกมาละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเปิดหลอด cryovial นำเอาถุงน้ำเชื้อที่ถูกละลายออกมาประเมินการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์ม โดยทำการบดถุงน้ำเชื้อให้ละลาย แล้วย้อมสีด้วยสารละลาย eosin และ nigrosin บนกระจกสไลด์ และทำการประเมินเปอร์เซนต์สเปิร์มที่มีชีวิต (percentage of sperm viability) โดยทดลอง 3 ซ้ำได้ผลการทดลองดังนี้

ผลการทดลองเมื่อแช่แข็งถุงน้ำเชื้อมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -30 องศาเซลเซียสก่อนเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวในตารางที่ 6 พบว่า ถุงน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วย 5% DMSO แล้วเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวเมื่อนำออกมาละลายทันที (0 นาที) มีเปอร์เซนต์การมีชีวิตของสเปิร์มเฉลี่ยระหว่าง 53.24-76.18% โดยเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที เปอร์เซนต์การมีชีวิตของสเปิร์มลดลงเหลือ 31.91-47.07% ถุงน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส/นาทีเมื่อเก็บรักษาไว้ 1 วัน มีเปอร์เซนต์การมีชีวิตของสเปิร์มเหลืออยู่ 0.6% ในขณะที่ชุดการทดลองอื่นๆสเปิร์มตายหมดหลังการละลาย

ในทำนองเดียวกันถุงน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วย 10% DMSO มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -30 องศาเซลเซียสก่อนเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่เวลา 0 นาทีมีเปอร์เซนต์การมีชีวิตของสเปิร์มเฉลี่ยระหว่าง 64.96-86.16% และเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที เปอร์เซนต์การมีชีวิตของสเปิร์มลดลงเหลือ 45.47-54.8% ถุงน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส/นาทีเมื่อเก็บรักษาไว้ 3 วันยังคงมีเปอร์เซนต์การมีชีวิตของสเปิร์มประมาณ 20.29% (ตารางที่ 6)

ถุงน้ำเชื้อที่แช่แข็งมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียสก่อนเก็บรักษาในถังในไนโตรเจนเหลวเมื่อนำออกมาละลายที่เวลาต่างๆกันในตารางที่ 6 พบว่า เปอร์เซนต์การมีชีวิตของสเปิร์มที่แช่แข็งด้วย 5% DMSO และละลายทันที (0 นาที) มีค่าเฉลี่ยระหว่าง 39.62-76.33% โดยเมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที เปอร์เซนต์การมีชีวิตของสเปิร์มลดลงเหลือ 30.33-58.53% ถุงน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส/นาทีเมื่อเก็บรักษาไว้ 1 วันมีเปอร์เซนต์การมีชีวิตของสเปิร์มเหลืออยู่ 1.73% (ตารางที่ 6)

ในทำนองเดียวกันถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่แช่แข็งด้วย 10% DMSO มาที่ -80 องศาเซลเซียส ที่เวลา 0 นาที มีเปอร์เซนต์การมีชีวิตของสเปิร์มเฉลี่ยระหว่าง 58.16-94.78% และเมื่อเวลาผ่านไป 30

การแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำเมื่อลดอุณหภูมิมาถึง -30 องศาเซลเซียส ด้วยการใช้สารละลาย 10% DMSO ให้ผลการแช่แข็งที่ดีกว่า 5% DMSO เช่น การใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส/นาที เมื่อใช้สารละลาย 10% DMSO และ 5% DMSO มีสเปิร์มที่มีชีวิตเท่ากับ 54.80±38.01% และ 31.98±26.02% ตามลำดับ หรือ การใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส/นาที เมื่อใช้สารละลาย 10% DMSO และ 5% DMSO มีสเปิร์มที่มีชีวิตเท่ากับ 45.47±31.18% และ 31.91±34.48% ตามลำดับ (ตารางที่ 6) การแช่แข็งถุงน้ำเชื้อด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิต่างๆกันเมื่อใช้ 5% DMSO พบว่าการแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 4 และ 6 องศาเซลเซียส/นาที ทำให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตมีค่าระหว่าง 43.60-47.07% ซึ่งมีค่าทางสถิติสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 2 และ 8 องศาเซลเซียส/นาทีอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) สำหรับการแช่แข็งด้วย 10% DMSO พบว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 2-6 องศาเซลเซียส/นาที ทำให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตมีค่าระหว่าง 49.9-54.80% ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 6)

ถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่แช่แข็งที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส ด้วยการใช้สารละลาย 10% DMSO ให้ผลการแช่แข็งที่ดีกว่า 5% DMSO เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตที่มีค่าสูงสุด (73.67±34.09%) ได้มาจากชุดการทดลองที่ใช้ 10% DMSO และอัตราการลดอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส/นาที ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) จากชุดการทดลองที่ใช้ 10% DMSO และอัตราการลดอุณหภูมิ 6 องศาเซลเซียส/นาที (69.98±37.44%) (ตารางที่ 6)

การแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส ให้ผลการทดลองที่ดีกว่าการแช่แข็งมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -30 องศาเซลเซียส โดยการแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 4 และ 6 องศาเซลเซียส/นาทีที่อุณหภูมิสุดท้าย -30 องศาเซลเซียส ให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตประมาณ 49 % แต่การแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 4 และ 6 องศาเซลเซียส/นาทีที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส ให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตเฉลี่ยระหว่าง 73.67 - 69.98% (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 เปอร์เซนต์การมีชีวิตของสเปิร์มกุ้งกุลาดำที่แช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิต่างๆกันมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -30 และ -80 องศาเซลเซียสก่อนการเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวระยะเวลาต่างกัน

อุณหภูมิสุดท้าย	ความเข้มข้น (%)	อัตราลดอุณหภูมิ (°C/min)	ระยะเวลาเก็บรักษา						
			0	30 นาที	60 นาที	1 วัน	3 วัน	5 วัน	7 วัน
-30	5	2	73.69±7.36^{c,1}	31.98±6.02^{d,2}	8.33±9.03^{e,3}	0.6±1.65^{c,4}	-	-	-
		4	53.24±2.60^{de,1}	43.60±0.38^{c,2}	-	-	-	-	-
		6	76.18±1.07^{bc,1}	47.07±1.48^{c,2}	-	-	-	-	-
		8	58.20±1.04^{d,1}	31.91±4.48^{d,2}	-	-	-	-	-
	10	2	72.96±1.74^{c,1}	54.80±8.01^{b,2}	54.29±1.00^{c,2}	38.80±3.55^{b,3}	20.29±2.10^{b,4}	-	-
		4	86.16±2.98^{b,1}	49.96±4.80^{bc,2}	-	-	-	-	-
		6	64.96±4.82^{cd,1}	49.09±6.92^{bc,2}	-	-	-	-	-
		8	74.20±3.85^{c,1}	45.47±1.18^{c,2}	-	-	-	-	-
-80	5	2	76.42±0.88^{bc,1}	57.40±2.71^{b,2}	-	-	-	-	-
		4	39.62±8.03^{f,1}	30.33±9.48^{d,2}	18.18±8.21^{d,3}	1.73±4.30^{c,4}	-	-	-
		6	66.20±0.22^{cd,1}	53.53±7.74^{bc,2}	2.58±3.86^{ef,3}	-	-	-	-
		8	76.33±0.48^{bc,1}	58.53±5.33^{b,2}	-	-	-	-	-
	10	2	84.38±9.30^{b,1}	43.29±8.84^{c,2}	-	-	-	-	-
		4	80.89±9.77^{bc,1}	73.67±4.09^{a1,2}	46.47±6.80^{b,3}	0.87±2.54^{c,4}	-	-	-
		6	94.78±5.84^{a,1}	69.98±7.44^{a,2}	69.4±2.47^{a,2}	64.42±7.26^{a,23}	62.73±6.19^{a,23}	33.11±9.25^{a,4}	5.56±8.89^{a,5}
		8	58.16±8.29^{d,1}	45.31±5.51^{c,2}	-	-	-	-	-

ตัวอักษร superscript ที่ต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

ตัวเลข superscript ที่ต่างกันตามแนวนอน หมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

5. การผสมเทียมกุ้งกุลาดำ

พ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงในบ่อดินได้ถูกรวบรวมมาทำการปรับสภาพในโรงเพาะฟักที่ควบคุมสภาพแวดล้อมไม่ให้มีการปนเปื้อนของเชื้อโรค โดยนำพ่อแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำอย่างละ 10 ตัว รวม 20 ตัวมาเลี้ยงในบ่อซิเมนต์ที่มีน้ำทะเลที่สะอาด ความเค็ม 30 ppt โดยแยกเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์แยกบ่อกันในบ่อขนาด 20 ตัน (รูปที่ 9) ให้อาหารพ่อแม่พันธุ์วันละ 4 ครั้ง โดยให้เพรียงทราย และหอยนางรม เปลี่ยนถ่ายน้ำในบ่อพ่อแม่พันธุ์ และดูดตะกอนก้นบ่อทุกๆวัน ประมาณ 50% ของปริมาตรน้ำในบ่อ เวลา 15.00-16.00น.

การแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ ทำโดยรวบรวมถุงน้ำเชื้อออกจากโคนขาเดินคู่ที่ 5 ของพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำ (รูปที่ 10) แล้วนำมาใส่ในสารละลายบัฟเฟอร์ (Ca-F saline) ที่มี dimethylsulfoxide (DMSO) ความเข้มข้น 10% ปล่อยทิ้งไว้ให้อยู่ในสภาวะสมดุล (equilibration) นำถุงน้ำเชื้อบรรจุในหลอด cryovial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปลดอุณหภูมิในเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer) จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ไปถึงอุณหภูมิสุดท้ายที่ -30 หรือ -80 องศาเซลเซียสก่อนนำหลอด cryovial ไปเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) ตาม 2 protocols ที่กำหนดไว้ การลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของถุงน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีต่ออัตราการปฏิสนธิไข่ ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ (cooling rate) 2 หรือ 6 องศาเซลเซียส/นาทีตามที่กำหนดไว้ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

การประเมินความสามารถของถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เก็บรักษาแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวได้ถูกนำมาใช้ในการผสมเทียมกับแม่กุ้งกุลาดำ โดยนำแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่เพิ่งลอกคราบใหม่ๆ (newly molt female broodsctock) มาผสมเทียมด้วยถุงน้ำเชื้อที่ได้แช่แข็งที่ได้ละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที โดยใช้ฟอร์เซบ (forcep) ที่สะอาดคีบถุงน้ำเชื้อที่ละลายจากทั้ง 2 ชุดการทดลองใส่เข้าไปในช่อง thelycum ของแม่พันธุ์ ซึ่งการผสมเทียมแต่ละครั้งใช้ถุงน้ำเชื้อที่ละลายจำนวน 2 ถุงในการผสมเทียมแม่พันธุ์กุ้ง 1 ตัว แล้วปล่อยให้แม่พันธุ์กุ้งเหล่านั้นไว้ในบ่อคอนกรีตเป็นระยะเวลา 2 วัน จึงทำการตัดก้านตาแม่กุ้ง 1 ข้าง (eyestalk ablation; รูปที่ 11) เพื่อกระตุ้นการสร้างไข่ (oogenesis) สำหรับกลุ่มควบคุม (control) ใช้ถุงน้ำเชื้อที่รวบรวมออกมาใหม่ๆ (freshly collected spermatophore) จากพ่อพันธุ์ในการผสมเทียม

แม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ได้รับการผสมเทียมได้ถูกเช็คการพัฒนาของรังไข่ว่าพัฒนามาถึงระยะใด โดยเช็คการพัฒนาของรังไข่ทุกวันในเวลา 16.00 น. ด้วยการใช้แสงไฟฉายส่องดูแนวรังไข่ด้านหลังของแม่กุ้ง ถ้าพบแม่พันธุ์ที่มีไข่ในระยะที่ 4 (รูปที่ 12) ก็ทำการย้ายแม่พันธุ์ออกจากบ่อคอนกรีตแล้วย้ายมาในถังไฟเบอร์กลาสสีดำขนาด 500 ลิตรเพื่อให้แม่พันธุ์วางไข่ (spawning) โดยปล่อยแม่พันธุ์กุ้ง 1 ตัว/ถัง จากนั้นปล่อยให้แม่กุ้งวางไข่ ซึ่งมักจะเกิดขึ้นในเวลา 03.00-04.00. แล้วเอาแม่พันธุ์กุ้งออกจากถังไฟเบอร์กลาสหลังวางไข่ในตอนเช้าเวลา 07.00-08.00น. จากนั้นปล่อยให้ไข่ฟักเป็นตัวอ่อนและพัฒนามาถึงระยะ gastrula (รูปที่ 13) เพื่อประเมินอัตราการปฏิสนธิ (fertilization rate) และเมื่อลูกกุ้งพัฒนาเข้าสู่ระยะนอเพลียส (รูปที่ 14) เรียบร้อย ทำการประเมินอัตราการฟัก (hatching rate) เพื่อเป็นการประเมินความสำเร็จของการผสมเทียมด้วยถุงน้ำเชื้อแช่แข็งเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยทดลอง 3 ซ้ำ

ผลการศึกษาพบว่า ถุงน้ำเชื้อที่แช่แข็งมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -30 องศาเซลเซียสแล้วนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ แต่ถุงน้ำเชื้อที่แช่แข็งมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส แล้วเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวเมื่อนำมาผสมเทียมให้ค่าอัตราการปฏิสนธิเฉลี่ย

ตารางที่ 7 อัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักของไข่กุ้งกุลาดำที่ผสมเทียมด้วยถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่แช่แข็งมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -30 และ -80 องศาเซลเซียส และถุงน้ำเชื้อที่แช่เย็นด้วย mineral oil

ชุดการทดลอง	อัตราการปฏิสนธิ (%)	อัตราการฟัก (%)
ถุงน้ำเชื้อแช่แข็งมาที่ -30 องศาเซลเซียส	-	-
ถุงน้ำเชื้อแช่แข็งมาที่ -80 องศาเซลเซียส	92.06±1.85[a]	46.15±1.44[b]
ถุงน้ำเชื้อแช่เย็น	79.15±4.26[a]	61.32±3.68[a]
ถุงน้ำเชื้อสด	86.70±2.79[a]	71.74±2.41[a]

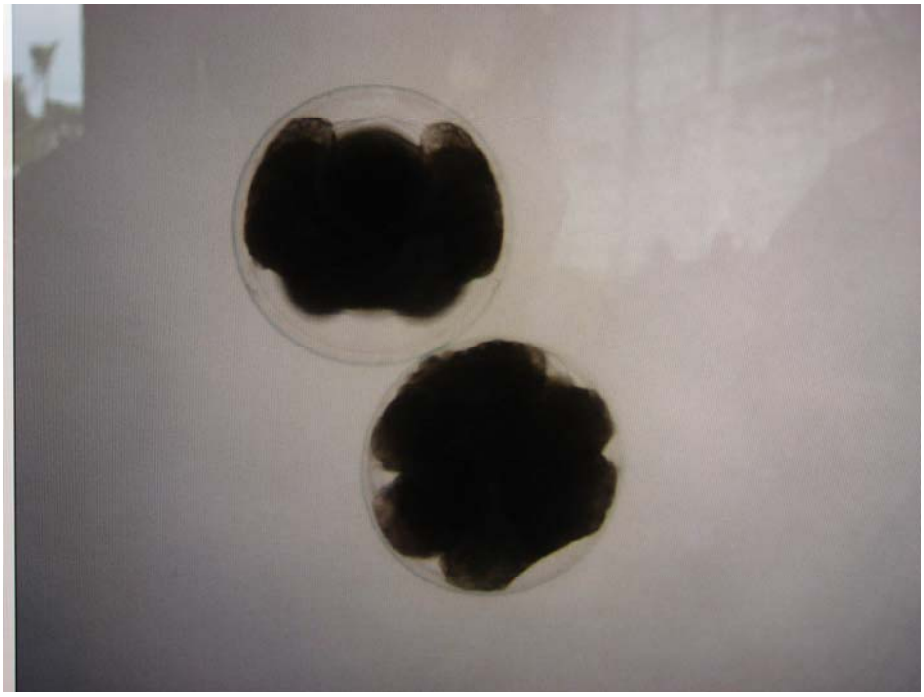
ตัวอักษร superscript ที่ต่างกันตามแนวตั้ง หมายถึงมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$)

รูปที่ 9 แม่พันธุ์กุ้งกุลาดำที่ใช้ในการผสมเทียม

รูปที่ 10 ถุงน้ำเชื้อที่รวบรวมออกมาจากพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำ

รูปที่ 11 การเตรียมการตัดก้านตากุ้งกุลาดำ

รูปที่ 12 แม่พันธุ์กุ้งกุลาดำ stage IV ที่พร้อมจะวางไข่



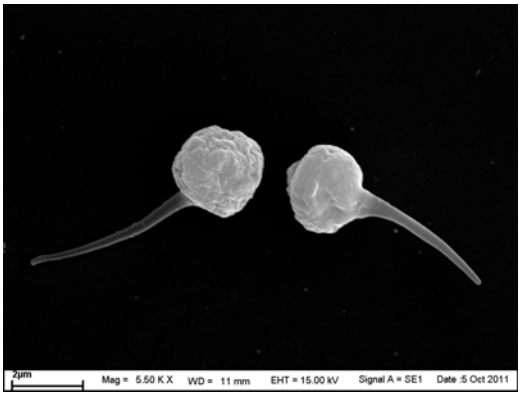
รูปที่ 13 ลักษณะตัวอ่อนกุ้งกุลาดำระยะ gastrula

รูปที่ 14 ลักษณะนอเพลียสกุ้งกุลาดำ

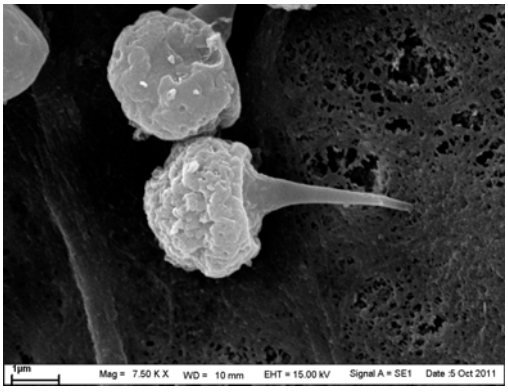
6. <u>การศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสเปิร์มกุ้งกุลาดำขณะเก็บแช่เย็นและแช่แข็ง</u>

การศึกษาลักษณะสเปิร์มด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy; SEM) ในถุงน้ำเชื้อสด (กลุ่มควบคุม) พบว่าสเปิร์มกุ้งกุลาดำมีรูปร่างปกติ มีส่วนหัวกลม และมีส่วนหางสั้น (รูปที่ 15) สำหรับถุงน้ำเชื้อที่แช่เย็นใน mineral oil เมื่อนำมาดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ขณะเก็บรักษาไว้ 3 วัน ก็พบว่า เซลล์สเปิร์มยังคงมีลักษณะภายนอกของสเปิร์มมีลักษณะปกติเหมือนในกลุ่มควบคุม (รูปที่ 16)

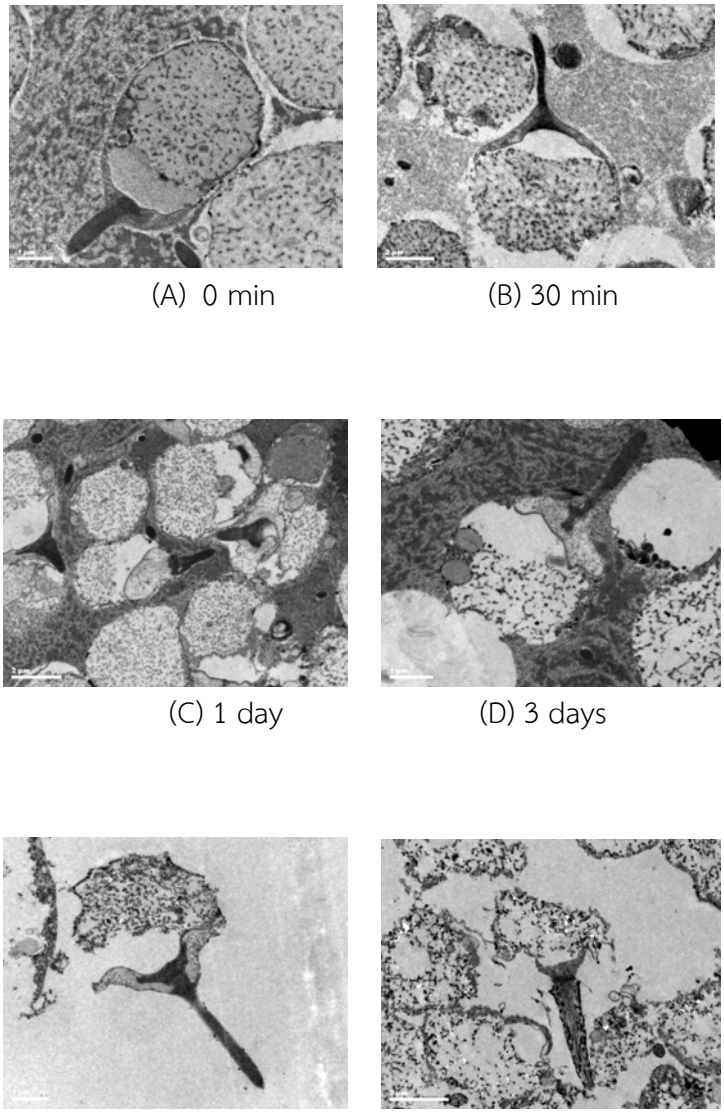
การศึกษาลักษณะสเปิร์มด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscopy; TEM) ในถุงน้ำเชื้อแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวแล้วนำออกมาดูลักษณะโครงสร้างสเปิร์มทันที (0 นาที) พบว่าผนังเซลล์ (plasma membrane) มีลักษณะปกติ มี electron material อยู่ภายในเซลล์ และมีการกระจายของโครมาติน (chromatin condensation) ตลอดเซลล์ (รูปที่ 17A) สำหรับการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 30 นาที พบว่าสเปิร์มยังมีรูปร่างปกติ แม้ว่า main body เริ่มมีความผิดปกติที่ผนังเซลล์ และมี electron material หนาแน่นในบริเวณหาง (spike) (รูปที่ 17B) อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อในไนโตรเจนเหลว 24 ชั่วโมง ทำให้สเปิร์มมีรูปร่างผิดปกติชัดเจนมากขึ้น และออร์กาเนลเคลื่อนไปบริเวณกลางเซลล์ (รูปที่ 17C) และเมื่อเก็บรักษาผ่านไป 3 วันพบว่า chromatin condensation ในบริเวณ main body มีปริมาณลดลง ไมโทคอนเดรียใหญ่ขึ้น (swollen mitochondria) และบริเวณฐานของ spike เสื่อมสภาพ รวมทั้งผนังเซลล์บางส่วนเริ่มหายไป (รูปที่ 17D) การเปลี่ยนแปลงของถุงน้ำเชื้อที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว 5 และ 7 วันพบว่า ผนังเซลล์ของ main body หายไปส่วนใหญ่ และ heterochromatin และ granule ออกไปนอกเซลล์แม้ว่าบริเวณฐานของ spike ไม่เปลี่ยนแปลง (รูปที่ 17E และ 17F)



รูปที่ 15 ลักษณะรูปร่างสเปิร์มกุ้งกุลาดำที่รวบรวมออกมาจากถุงน้ำเชื้อสด



รูปที่ 16 ลักษณะรูปร่างสเปิร์มกุ้งกุลาดำที่รวบรวมออกมาจากถุงน้ำเชื้อที่แช่เย็น



(A) 0 min (B) 30 min

(C) 1 day (D) 3 days

(E) 5 days (F) 7 days

รูปที่ 17 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสเปิร์มกุ้งกุลาดำที่แช่แข็งและเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวระยะเวลาต่างๆกัน

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

อภิปรายผลการทดลอง

5.1 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มของพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงขุนภายในฟาร์มเมื่ออายุมากขึ้น มีการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ที่สมบูรณ์เพศมากขึ้น โดยสังเกตุได้จากถุงน้ำเชื้อที่มีขนาดใหญ่ขึ้น และสีขาวขุ่นมากขึ้นตามพัฒนาการ ซึ่งเหมือนกับผลการศึกษาวิจัยในกุ้งทะเลชนิดอื่นๆ กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงขุนภายในฟาร์มอายุ 9 เดือนขึ้นไปของการศึกษาครั้งนี้เริ่มมีถุงน้ำเชื้อสีขาวขุ่นชัดเจน แต่เมื่อพิจารณาถึงเปอร์เซ็นต์กุ้งกุลาดำที่สามารถรีดถุงน้ำเชื้อออกมาได้กลับมีเพียง 26.3% แสดงให้เห็นว่ากุ้งเพศผู้ที่สุ่มออกมายังมีความสมบูรณ์เพศต่ำโดยภาพรวม เพราะว่ากุ้งเพศผู้อายุ 10-17 เดือนมีเปอร์เซ็นต์ที่สามารถรีดถุงน้ำเชื้อออกมาได้เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนจาก 50% เป็น 95% การเปลี่ยนแปลงในลักษณะเช่นนี้แสดงว่ากุ้งเพศผู้ระหว่างอายุ 9-17 เดือนมีความแปรปรวนมากระหว่างกุ้งแต่ละตัว (individual variation) ของการพัฒนาการสร้างสเปิร์มแม้ว่ากุ้งเหล่านี้ต่างก็มีถุงน้ำเชื้อสีขาวขุ่นชัดเจน ซึ่งในประเด็นนี้ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการกระตุ้นความสมบูรณ์เพศกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงขุนในฟาร์มเพื่อให้มีเปอร์เซ็นต์กุ้งที่สามารถรีดถุงน้ำเชื้อออกมาได้มากขึ้นเพื่อการนำไปใช้ผสมเทียม

คุณภาพสเปิร์มของกุ้งทะเลที่เลี้ยงขุนในฟาร์ม พบว่ามีปัจจัยหลายประการที่ส่งผลกระทบต่อคุณภาพสเปิร์มในถุงน้ำเชื้อ เช่น อายุ ขนาด อุณหภูมิน้ำ คุณภาพอาหาร และชนิดของกุ้ง เป็นต้น ดังเช่นที่ปรากฏในผลงานวิจัยต่อไปนี้

Huang et al. (2002) ศึกษาผลของอายุ ขนาด และความเข้มแสงที่มีต่อการผสมพันธุ์วางไข่ในกุ้งแชบ๊วย *Penaeus merguiensis* ที่เลี้ยงขุนภายในฟาร์ม พบว่า ความเข้มแสง (2 หรือ 1,100 lux) ไม่มีผลต่อการผสมพันธุ์วางไข่ของกุ้งที่อายุ หรือขนาดแตกต่างกัน แต่อายุของกุ้งมีผลโดยตรงต่อการผสมพันธุ์วางไข่ โดยกุ้งอายุเพิ่มขึ้นจาก 7 เดือน เป็น 10 เดือนมีประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ดีขึ้น แต่จะลดลงเมื่อกุ้งอายุเพิ่มขึ้นเป็น 13 เดือน ทำให้ผู้วิจัยเสนอแนะว่าการเพาะขยายพันธุ์กุ้งแชบ๊วยจึงควรทำระหว่างกุ้งมีอายุระหว่าง 10-12 เดือน

Peixoto et al. (2004) ศึกษาผลของอายุและขนาดที่มีต่อประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ในกุ้ง *Farfantepenaeus paulensis* อายุ 10 เดือน และ 16 เดือน โดยนำพ่อพันธุ์มาผสมพันธุ์กับแม่กุ้งที่ก้านตา 1 ข้าง โดยพบว่า พ่อพันธุ์กุ้งอายุ 16 เดือนมีถุงน้ำเชื้อที่หนักกว่า (spermatophore weight) พ่อพันธุ์กุ้งอายุ 10 เดือน แต่จำนวนสเปิร์มในถุงน้ำเชื้อ (sperm number) ไม่แตกต่างกัน โดยผลของขนาดของกุ้งเป็นตัวกำหนดจำนวนสเปิร์มที่มีในถุงน้ำเชื้อมากกว่าผลของอายุ และอัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักไม่มีความแตกต่างระหว่างกุ้ง 2 กลุ่มอายุนี้ การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแม่กุ้ง *F. paulensis* อายุ 10 เดือนที่เลี้ยงขุนภายในฟาร์ม และมีน้ำหนักมากกว่า 25 กรัมสามารถใช้เพาะพันธุ์ได้ แม้ว่าประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์จะดีขึ้นเมื่อใช้แม่พันธุ์อายุมากขึ้น (16 เดือน) และมีขนาดใหญ่ขึ้น (มากกว่า 45 กรัมขึ้นไป)

Ceballos-Vazquez et al. (2003) ศึกษาผลของอายุและน้ำหนักที่มีต่อคุณภาพสเปิร์มกุ้งขาว *Litopenaeus vannamei* อายุ 6, 8, 10 และ 12 เดือน โดยพบว่า น้ำหนักถุงน้ำเชื้อ จำนวนสเปิร์ม และเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีรูปร่างปกติมีความสัมพันธ์ทางบวกกับน้ำหนักตัวกุ้งขาว และจำนวนสเปิร์มมีความสัมพันธ์ทางบวกกับน้ำหนักถุงน้ำเชื้อและเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีรูปร่างปกติ นอกจากนี้

Coman et al. (2007) ศึกษาผลของความหนาแน่นในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำในบ่อที่มีต่อการเจริญเติบโต อัตรารอดและการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ โดยนำกุ้งอายุ 5.5 เดือนมาเลี้ยงในบ่อ 10 ตันที่มีระบบกรองทราย (เลี้ยงในอัตรา 3 ตัวต่อตารางเมตร และ 1 ตัวต่อตารางเมตร) นานอีก 5.5 เดือนจนกุ้งมีอายุ 10.5 เดือน พบว่า แม่กุ้งอายุ 10.5 เดือนที่เลี้ยงในความหนาแน่น 1 ตัวต่อตารางเมตร มีน้ำหนัก (131.2±4.9 กรัม) ที่มากกว่าแม่กุ้งที่เลี้ยงในความหนาแน่น 3 ตัวต่อตารางเมตร (120.3±2.5 กรัม) อย่างไรก็ตามพ่อพันธุ์กุ้งที่เลี้ยงที่ 2 ความหนาแน่นนี้ มีน้ำหนักตัวไม่แตกต่างกัน โดยพ่อพันธุ์ที่เลี้ยงในอัตรา 1 และ 3 ตัวต่อตารางเมตร มีน้ำหนักตัว 90.9±2.2 กรัม และ 87.4±1.5 กรัม ตามลำดับ มีถุงน้ำเชื้อหนักเท่ากับ 0.19±0.02 กรัม และ 0.20±0.01 กรัม ตามลำดับ และมีจำนวนสเปิร์ม/ถุง เท่ากับ 6.25±0.77x10^6 ตัว/ถุง และ 8.44±1.15 x10^6 ตัว/ถุง ตามลำดับ

5.2 การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่เย็นถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ

การใช้ mineral oil เพื่อแช่เย็นถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำให้ผลการทดลองดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายชนิดอื่นๆ เนื่องจาก mineral oil สามารถช่วยคงสภาพคุณภาพของสเปิร์มที่อยู่ในถุงน้ำเชื้อ (spermatophore) ระหว่างการเก็บแช่เย็น ซึ่งให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับกับการแช่เย็น epididymis ของหนู ซึ่งเป็นอวัยวะชนิดหนึ่งที่สำคัญในระบบสืบพันธุ์ของเพศผู้มาแช่เย็นด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆชนิดกันที่อุณหภูมิ 5-20 องศาเซลเซียส ก็พบว่า epididymis ที่นำออกมาจากหนูเมื่อนำมาแช่ใน mineral oil ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 8 วัน มีสเปิร์มที่มีคุณภาพดี เนื่องจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าสูงไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ผ่านำเอา epididymis ออกมาประเมิน (Sankai et al., 2001) การนำเอา mineral oil มาแช่เย็นเซลล์สืบพันธุ์โดยที่คุณภาพสเปิร์มไม่เปลี่ยนแปลง เชื่อว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับคุณสมบัติของ mineral oil ที่สามารถป้องกันการสูญเสียความชื้นจากเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เซลล์ตายได้ ดังนั้นการนำเอาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำมาแช่เย็นก็สามารถนำมาใช้ประยุกต์ใช้ในการลำเลียงถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำไปต่างถิ่นได้เพื่อการผสมเทียม โดยไม่ต้องลำเลียงพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำ เช่นเดียวกับการนำถุงน้ำเชื้อกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) มาแช่เย็นใน mimeral oil พร้อมกับใส่ 0.1% penicillin-streptomycin เมื่อเวลาเก็บรักษาแช่เย็นผ่านไป 35 วัน พบว่าถุงน้ำเชื้อยังคงมีรูปร่างปกติ และมีเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตสูงประมาณ 69.5% โดยไม่พบมีการปนเปื้อนแบคทีเรียในถุงน้ำเชื้อระหว่างเก็บแช่เย็น (Nimrat et al., 2006)

ข้อดีของการเก็บถุงน้ำเชื้อแบบแช่เย็นจะทำให้ง่ายแก่การจัดการฟาร์มขณะผสมเทียม เพราะถุงน้ำเชื้อจะถูกเตรียมและเก็บรักษาไว้ก่อนซึ่งจะนำมาใช้ได้ทันทีเมื่อตัวเมียพร้อม ทำให้การผสมเทียมทำได้สะดวกและรวดเร็วขึ้น นอกจากนี้พ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำก็ไม่จำเป็นที่จะต้องเก็บไว้ในโรงเพาะพักเช่นเดียวกับแม่พันธุ์กุ้งกุลาดำขณะผสมเทียม เนื่องจากถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงขุนภายในฟาร์มสามารถเก็บรักษาไว้ในลักษณะธนาคารอสุจิ (sperm bank) ซึ่งใช้พื้นที่เก็บรักษาน้อยกว่าการเลี้ยงพ่อพันธุ์ในโรงเพาะฟักหรือในบ่อดิน อีกทั้งการลำเลียงถุงน้ำเชื้อก็ยังทำได้สะดวกกว่าการลำเลียงพ่อพันธุ์ และยังช่วยลดต้นทุนการขนส่งและระยะเวลาในการจัดหาพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำจากธรรมชาติที่มี

5.3 การศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อสเปิร์มกุ้งกุลาดำ

การทดสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการมีชีวิตของสเปิร์มกุ้งกุลาดำในระยะเวลา 30 นาทีแรกทำให้ทราบว่า DMSO มีความเป็นพิษต่อถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำต่ำกว่า ethylene glycol, propylene glycol, methanol และ formamide และเมื่อทดสอบต่อไปที่เวลา 60 นาทีก็พบว่า ethylene glycol และ methanol มีความเป็นพิษสูง ในขณะที่ DMSO ยังมีความเป็นพิษไม่มาก ดังนั้น DMSO จึงมีความเหมาะสมในนำมาแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่ความเข้มข้นในระยะเวลาสมดุลนาน (equilibration time) ไม่เกิน 60 นาที เพราะทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มอยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ ซึ่งข้อมูล database ของความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ได้นี้ สามารถนำไปเลือกใช้ในกระบวนการแช่แข็งได้ต่อไป โดยแม้ว่า DMSO มีความเป็นพิษต่ำสุดแต่การใช้สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์อื่นๆที่กล่าวมานี้ในเวลาหรือความเข้มข้นที่ต่างกัน ก็สามารถนำมาแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำต่อไป ซึ่งประสิทธิภาพในการแช่แข็งก็อาจมีได้แตกต่างกันไประหว่างการลดอุณหภูมิ (freezing) (Jeyalectumie and Subramoniam, 1989)

โดยทั่วไปแล้วชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งสเปิร์มของสัตว์น้ำมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์น้ำ แต่ DMSO มักพบว่าเป็นสารที่เหมาะสมที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลายชนิด เช่น ปลากะพงแดง (Vuthiphandchai et al., 2009a) ปลา turbot (Dreanno et al., 1997) และกุ้งกุลาดำ (Vuthiphandchai et al., 2007) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม Rideout et al. (2003) ได้รายงานการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตาเดียว (winter flounder) ว่า propylene glycol ให้ผลการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดีกว่าการใช้ DMSO และ glycerol

Gwo et al. (2002) ทำการทดสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 8 ชนิด (dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethyl acetamide (DMA), ethylene glycol (EG), propylene glycol (PG), butylenes glycol (BG), polyethylene glycol, glycerol และ methanol) ที่ความเข้มข้นระหว่าง 5-25% ที่มีต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มหอยเป๋าฮื้อเล็ก (*Haliotis diversicolor supertexta*) พบว่า สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เป็นพิษน้อยที่สุดคือ 10% DMSO ที่ผสมกับ artificial seawater (ASW)

Newton and Subramoniam (1989) ทำการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่มีต่อตัวอ่อนกุ้ง *Penaeus indicus* โดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 7 ชนิดได้แก่ glycerol, formamide, acetamide, methanol, propylene glycol, DMSO และ ethylene glycol ทำการทดสอบกับตัวอ่อนที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส นาน 15 นาทีพบว่า ตัวอ่อนกุ้งระยะการพัฒนา

Vuthiphandchai et al. (2005) ศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 9 ชนิด (methanol, ethanol, ethylene glycol, propylene glycol, dimethyl sulfoxide; DMSO, acetamide, formamide, glycerol และ sucrose) ที่มีต่อตัวอ่อนระยะ early-, mid- and late-stage gastrula ของกุ้งกุลาดำ พบว่า ความเป็นพิษของสารสารไครโอโพรเทคแทนท์ขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ระยะเวลาสมดุล และระยะการพัฒนาของตัวอ่อน โดยตัวอ่อนกุ้งกุลาดำระยะท้ายของการพัฒนามีความทนต่อสารไครโอโพรเทคแทนท์ได้ดีกว่าตัวอ่อนระยะแรกของการพัฒนา และ acetamide, DMSO, glycerol และ sucrose มีความเหมาะสมในการนำมาพัฒนาวิธีการแช่แข็งตัวอ่อนกุ้งกุลาดำระยะท้ายต่อไป

5.4 การแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสเปิร์มกุ้งกุลาดำขณะเก็บแช่แข็ง

การแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำด้วยการลดอุณหภูมิมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส ทำให้สเปิร์มมีชีวิตรอดหลังการละลายสูงกว่าการลดอุณหภูมิมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -30 องศาเซลเซียส สาเหตุที่เป็นเช่นนี้ เนื่องจากถุงน้ำเชื้อกุ้งมีลักษณะเป็นชิ้นเนื้อขนาดเล็ก เมื่อลดอุณหภูมิมาที่ -30 องศาเซลเซียส อาจมีผลทำให้ถุงน้ำเชื้อยังไม่แข็งตัวเต็มที่ ทำให้เมื่อนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอย่างมากจาก -30 ไปเป็น -196 องศาเซลเซียส ทำให้สเปิร์มบางส่วนตายไป ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลการผสมเทียมเมื่อนำถุงน้ำเชื้อที่แช่แข็งมาที่ -30 องศาเซลเซียสไปผสมเทียมก็ไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ แต่การลดอุณหภูมิถุงน้ำเชื้อมาที่ -80 องศาเซลเซียส แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว จะทำให้ถุงน้ำเชื้อแข็งตัวอย่างเหมาะสม อันเนื่องจากอุณหภูมิที่ต่ำมากพอทำให้เซลล์แข็งตัวและปรับสภาพได้ก่อนนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว ดังนั้นเมื่อถุงน้ำเชื้อที่ลดอุณหภูมิมาที่ -80 องศาเซลเซียส แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว จะทำให้การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิไม่มาก ทำให้สเปิร์มมีชีวิตรอดสูงกว่า และปฏิสนธิกับไข่ได้ (Irawan et al. 2010)

การใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 4-6 องศาเซลเซียส/นาที ทำให้เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตมีค่าสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิอื่นๆ แสดงว่า การใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 4-6 องศาเซลเซียส/นาทีมีความเหมาะสมในการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำ การใช้อัตราการลดอุณหภูมิช้าหรือเร็ว มีผลต่อการแพร่กระจายของน้ำออกจากเซลล์ โดยการลดอุณหภูมิช้าๆ ทำให้น้ำออกจากเซลล์มาก อันเนื่องจากใช้เวลานานกว่าเซลล์จะแข็งตัว ทำให้เซลล์เหี่ยว (shrinkage) เพราะไม่มีน้ำในเซลล์ ในขณะที่การลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว อาจทำให้มีน้ำบางส่วนเหลืออยู่ในเซลล์ขณะที่เซลล์แข็งตัว โดยที่เซลล์มีขนาดปกติหรือลดลงเล็กน้อย ดังนั้นถ้าใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างเหมาะสมจะทำให้เซลล์แข็งตัวไม่มีน้ำในเซลล์ และเซลล์มีขนาดเปลี่ยนแปลงน้อยมากหลังการแช่แข็ง ทำให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตสูงหลังการละลาย (thawing) (Tiersch, 2000)

ปัจจัยหลักที่ส่งผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์หลังการแช่แข็ง เกี่ยวข้องกับ การเกิดเกล็ดน้ำแข็ง (ice crystal) เนื่องจาก การเกิดเกล็ดน้ำแข็งในระหว่างการแช่แข็งภายในหรือภายนอกเซลล์ ย่อม

Jeyalectumie and Subramoniam (1989) ได้แช่แข็งถุงน้ำเชื้อปูทะเล (*Scylla serrata*) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -4, -79 และ -196 องศาเซลเซียสนาน 30 วัน โดยพบว่า การเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อปูทะเลไว้ที่ -79 และ -196 องศาเซลเซียส ทำให้สเปิร์มมีชีวิตสูงกว่าการเก็บรักษาที่ -4 องศาเซลเซียส และการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อปูทะเลด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ 4 ชนิดได้แก่ glycerol, dimethyl sulfoxide (DMSO), trehalose และ DMSO + trehalose ด้วยการใช้สารละลาย phosphate พบว่า glycerol ให้ผลดีที่สุดในการแช่แข็งเพราะสเปิร์มมีชีวิตสูงสุด และ trehalose ให้ผลต่ำที่สุด แต่เมื่อนำ trehalose ร่วมกับ DMSO มาแช่แข็ง กลับปรากฏว่าให้ผลดีไม่แตกต่างจากการใช้ glycerol อย่างเดียว แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ของตัวแปรต่างๆที่มีต่อการรอดชีวิตของสเปิร์มขณะแช่แข็ง

Huang et al. (2004) ได้ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Green Swordtail (*Xiphophorus helleri*) โดยใช้อุณหภูมิเริ่มต้นที่ 15 องศาเซลเซียส และใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 35 องศาเซลเซียสต่อนาที และใช้อุณหภูมิสุดท้ายที่ -80 องศาเซลเซียส แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มประมาณ 79 เปอร์เซ็นต์

Anchordoguy et al. (1988) ได้แช่แข็งสเปิร์มกุ้ง *Sicyonia ingentis* โดยประเมินผลของอัตราการลดอุณหภูมิรูปแบบต่างๆกันต่อการมีชีวิตรอดของสเปิร์มกุ้ง โดยนำเอาสเปิร์มกุ้งที่ได้แช่แข็งแล้วนำมาเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว พบว่า อัตราการลดอุณหภูมิ (cooling rate) ที่ 1 องศาเซลเซียส/นาที เป็นอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการแช่แข็งสเปิร์มกุ้ง *S. ingentis* เพราะมีผลทำให้เซลล์แตกหรือบาดเจ็บน้อยที่สุด และ ยังพบว่า DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมที่สุดในการนำมาแช่แข็งสเปิร์มกุ้ง *S. ingentis*

Dreanno et al. (1997) ได้ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา turbot (*Scophthalmus maximus*) ด้วย extender 4 สูตร คือ MMM, ASL1, ASL2 และ MRM และใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 4 ชนิด (DMSO, glycerol, ethylene glycol และ methanol) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ พบว่า MMM เป็น extender ที่เหมาะสมที่สุด โดยการแช่แข็งด้วยการใช้อุณหภูมิสุดท้ายที่ -46, -99 และ -148 องศาเซลเซียส นำไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว แล้วนำมาละลายที่อุณหภูมิ 40, 20 และ 30 องศาเซลเซียส ตามลำดับ พบว่าสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ดีที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา turbot คือ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 10%

Gwo et al. (2002) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อเล็ก (*Haliotis diversicolor supertexta*) ด้วยการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เป็นพิษน้อยที่สุดคือ 10% DMSO ที่ผสมกับ artificial seawater (ASW) ทำการเจือจางน้ำเชื้อ 1:1 กับ extender ใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml ทำการแช่แข็งโดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ ระหว่าง 3.5 ถึง -200 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิสุดท้ายแตกต่างกัน (0, -30, -60, -90 และ -120 องศาเซลเซียส) และนำมาเก็บในถังไนโตรเจนเหลว (-196

การแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำของการศึกษาครั้งนี้ได้นำ DMSO มาแช่แข็งแต่การมีชีวิตของสเปิร์มหลังการละลาย (post-thawed sperm viability) มีค่าไม่สูงและมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วขณะเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว สาเหตุที่เป็นเช่นนี้น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับระยะเวลาสมดุลที่ใช้ในการแช่แข็งที่อาจนานเกินไป (60 นาที) ทำให้อาจมีผลต่อการมีชีวิตรอดของสเปิร์มหลังการแช่แข็ง ซึ่งเมื่อประเมินการมีชีวิตของสเปิร์มที่แช่แข็งด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน เห็นได้ว่าการเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อในไนโตรเจนเหลว 24 ชั่วโมง ทำให้สเปิร์มเริ่มมีรูปร่างผิดปกติ และเมื่อเก็บรักษาผ่านไป 3 วันพบว่า ความผิดปกติของสเปิร์มโดยรวมมีมากขึ้น และการมีชีวิตของสเปิร์มจึงมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วขณะเก็บแช่แข็ง เพราะเซลล์สเปิร์มเริ่มบาดเจ็บ (cryoinjury) ทำให้คุณภาพสเปิร์มจึงลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเวลาเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวนานขึ้น อย่างไรก็ตามการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำในทุกชุดการทดลองเมื่อเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที ยังคงมีสเปิร์มที่มีชีวิตไม่ต่ำกว่า 30% ดังนั้นงานวิจัยในอนาคตในการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่ได้จากการเลี้ยงขุนในบ่อดินจึงควรศึกษาผลของระยะเวลาเก็บรักษาที่มีต่อคุณภาพสเปิร์มหลังการแช่แข็ง Vuthiphandchai et al. (2007) ได้แช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่รวบรวมมาจากแหล่งธรรมชาติในทะเล โดยการแช่แข็งด้วยการใช้ Ca-F saline ร่วมกับ 5% DMSO ด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -2 องศาเซลเซียส/นาที จาก 25 องศาเซลเซียส ถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส แล้วจึงเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว ก่อนนำมาละลายที่อุณหภูมิเหมาะสม ปรากฏว่า การใช้ protocol แช่แข็งดังกล่าว มีผลทำให้การมีชีวิตของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ อีกทั้งเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มในถุงน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 60 วันก็ยังมีค่าไม่แตกต่างทางสถิติเปรียบเทียบกับถุงน้ำเชื้อสดที่รวบรวมออกมาใหม่ๆ แต่เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นถึง 210 วัน การมีชีวิตของสเปิร์มที่แช่แข็งจึงมีค่าลดลง แสดงให้เห็นว่าการพัฒนาการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำที่รวบรวมจากธรรมชาติสามารถทำได้ อีกทั้งยังสามารถนำถุงน้ำเชื้อแช่แข็งไปผสมเทียมกับแม่กุ้งได้ค่าอัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักที่ดี ความแตกต่างของการมีชีวิตของสเปิร์มที่แช่แข็งระหว่างถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำจากธรรมชาติและถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำจากบ่อเลี้ยงของการศึกษาครั้งนี้ที่ใช้วิธีการแช่แข็งที่คล้ายกัน แต่ผลที่ได้แตกต่างกันมาก สะท้อนให้เห็นว่า คุณภาพสเปิร์มของกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงขุนภายในบ่อน่าจะมีความแตกต่างจากกุ้งกุลาดำที่อยู่ในทะเลหรือมหาสมุทร อาจเป็นไปได้ว่าคุณภาพอาหารที่พ่อพันธุ์กุ้งได้รับส่งผลโดยตรงต่อคุณภาพสเปิร์ม ที่อาจส่งผลต่อความสามารถของสาร DMSO ที่ต้องแพร่ซึมผ่านผนังเซลล์ (cell membrane) เข้าไปเพื่อทำหน้าที่ลดหรือป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์สเปิร์มกุ้งกุลาดำขณะแช่แข็ง ในประเด็นนี้ข้อมูลงานวิจัยเกี่ยวกับชนิดและปริมาณกรดไขมันหรือสารอื่นๆ ของถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำจากบ่อเลี้ยงและจากธรรมชาติ น่าจะได้มีการศึกษาวิจัยเชิงลึกต่อไปเพื่อสามารถแช่แข็งและเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำจากบ่อเลี้ยง ให้นานได้เหมือนกับกุ้งกุลาดำจากธรรมชาติได้ต่อไปเพื่อทำให้การนำถุงน้ำเชื้อแช่แข็งไปใช้ประโยชน์ได้ต่อไปในลักษณะของธนาคารน้ำเชื้อ เพราะความสามารถของสารไครโอโพรเทคแทนท์ในการแพร่ผ่านผนังเซลล์ที่แช่แข็ง และคุณภาพของเซลล์ รวมทั้งอัตราการลดอุณหภูมิและอัตราการละลายที่เหมาะสม ต่างก็เป็นปัจจัยที่ส่งผลโดยตรงต่อการประสบผลสำเร็จในการแช่แข็ง

อย่างไรก็ตามผลการศึกษาความสามารถในการปฏิสนธิของถุงน้ำเชื้อแช่แข็งที่รวบรวมจากพ่อพันธุ์ในบ่อเลี้ยงของการศึกษาครั้งนี้เมื่อลดอุณหภูมิมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส แล้วเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวนานประมาณ 6 ชั่วโมง เมื่อนำมาผสมเทียมให้ค่าอัตราการปฏิสนธิสูงมีค่าไม่แตกต่างกับการผสมเทียมด้วยถุงน้ำเชื้อสด แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของการนำถุงน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์กุ้งกุลาดำที่ได้จากการเลี้ยงขุนภายในฟาร์มที่สามารถนำไปเพาะพันธุ์ลูกกุ้งได้ สอดคล้องกับผลการศึกษาโครงสร้างสเปิร์มแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ไม่นาน ซึ่งมีรูปร่างสเปิร์มปกติจึงสามารถปฏิสนธิได้ แม้ว่าการเก็บรักษาในระยะเวลาที่นานขึ้นมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสเปิร์มโดยละเอียดตามที่ได้กล่าวมาแล้ว อย่างไรก็ตามการลดลงของอัตราการฟักไข่ของชุดการทดลองที่ผสมเทียมด้วยถุงน้ำเชื้อที่แช่แข็งที่มีค่าต่ำกว่าถุงน้ำเชื้อสด อาจเป็นผลมาจากสภาพแวดล้อมภายในบ่อฟักไข่ ที่อาจมีแตกต่างกัน ส่งผลต่อการฟักของไข่ เนื่องจากการฟักไข่ของแต่ละชุดการทดลองใช้ระบบบ่อ ระบบน้ำทะเล และระบบลมแยกออกจากกัน อย่างไรก็ตามโดยทั่วไปแล้วการศึกษาความสามารถของสเปิร์มในการปฏิสนธิไข่สัตว์น้ำหลายๆชนิด นิยมที่ประเมินตัวอ่อนในระยะ gastrula ซึ่งมีการพัฒนาของตัวอ่อนที่สามารถประเมินประสิทธิภาพในการปฏิสนธิของสเปิร์มได้ดี และเป็นที่ยอมรับทั่วไปมากกว่าการประเมินตัวอ่อนในระยะแรก เช่น 4-cell stage หรือ blastula เป็นต้น ซึ่งเมื่อตัวอ่อนเข้าสู่ระยะ gastrula จะมีการพัฒนาสร้างอวัยวะต่างๆ (organogenesis) และฟักออกมาเป็นลูกสัตว์น้ำวัยอ่อนได้ดี

สรุปผลการทดลอง

1. กุ้งกุลาดำที่เลี้ยงขุนภายในฟาร์มเริ่มมีถุงน้ำเชื้อสีขาวขุ่นชัดเจนเมื่อกุ้งอายุ 9 เดือนขึ้นไป
2. เปอร์เซ็นต์กุ้งกุลาดำที่สามารถรีดถุงน้ำเชื้อออกมานอกตัวได้ มีค่าเพิ่มขึ้นตามอายุกุ้ง
3. การแช่เย็นถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำให้ได้ผลดีควรใช้ mineral oil ในการแช่เย็นถุงน้ำเชื้อโดยที่โครงสร้างสเปิร์มยังมีลักษณะปกติ
4. DMSO เป็นสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษต่ำต่อสเปิร์มกุ้งกุลาดำ
5. การแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำควรแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียสด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 4-6 องศาเซลเซียส/นาที ก่อนนำไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว
6. การพัฒนาวิธีการแช่เย็นและการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำที่เลี้ยงขุนขึ้นมาภายในฟาร์มสามารถทำได้เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการผสมเทียม และใช้เป็นแนวทางการจัดเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำเพื่อประโยชน์ทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และการอนุรักษ์สายพันธุ์

เอกสารอ้างอิง

คเชนทร เฉลิมวัฒน์. 2538. การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.

นงนุช ตั้งเกริกโอฬาร. 2544. วิชา 309423 คาร์ซิโนโลยี. เอกสารประกอบการสอน ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.

บุญรัตน์ ประทุมชาติ. 2544. Aquaculture: กุ้งกุลาดำ. เอกสารประกอบการสอน ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.

ประจวบ หลำอุบล. 2525. กุ้ง. พิมพ์ครั้งที่ 3 สำนักพิมพ์นลิน. กรุงเทพ

Aiken, D and Waddy, S. 1980. Reproductive biology. In: Cobb S, Phillips B, editors. The biology and management of the American Lobster, vol. 1. New York: Academic Press. p. 215-276.

Alfaro, J., Komen, J. and Huisman, E.A. 2001. Cooling, cryoprotectant and hypersaline sensitivity of penaeid shrimp embryos and nauplius larvae. Aquaculture 195: 353-366.

Anchordoguy, T., Crowe, J.H., Griffin, F.J. and Clark, W.H.Jr. 1988. Cryopreservation of sperm from the marine shrimp *Sicyonia ingentis*. Cryobiology 25:238-243.

Asahina, E. and Takahashi, T. 1978. Freezing tolerance in embryos and spermatozoa of the sea urchin. Cryobiology 5:122-127.

AQUACOP. 1979. Penaeid reared brood stock: closing the cycle of *P. monodon*, *P. stylirostris* and *P. vannamei*. Proceedings of the World Mariculture Society 10: 445-452.

Behlmer, S.D. and Brown, G. 1984. Viability of cryopreserved spermatozoa of the horseshoe crab, *Limulus polyphemus* L. J. Invertebr. Rep. Dev. 7:193-199.

Bhavanishankar, S. and Subramoniam, T. 1997. Cryopreservation of spermatozoa of the edible mud crab *Scylla serrata* (Forskal). J Exp Zoo 277: 326-336.

Browdy, C.L. 1998. Recent developments in penaeid broodstock and seed production technologies: improving the outlook for superior captive stocks. Aquaculture 164: 3-21.

Ceballos-Vazquez, B.P., Rosas, C. and Racotta, I.S. 2003. Sperm quality in relation to age and weight of white shrimp *Litopenaeus vannamei*. Aquaculture 228: 141-151.

Chow, S., Taki, Y. and Ogasawara, Y. 1985. Cryopreservation of spermatophore of the fresh water shrimp, *Macrobrachium rosenbergii*. Biological Bulletin 168: 471-475.

Coman, G.J., Crocos, P.J., Arnold, S.J., Keys, S.J, Murphy, B. and Preston, N.P. 2005. Growth, survival and reproductive performance of Australian stocks of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon*, reared in tanks and raceways. Journal of the World Aquaculture Society 36: 464-479.

Coman, G.J., Arnold, S.J., Jones, M.J. and Preston, N.P. 2007. Effect of rearing density on growth, survival and reproductive performance of domesticated *Penaeus monodon*. Aquaculture 264: 175-183.

Dreanno, C., Suquet, M., Quemener, L., Cosson, J., Fierville, F., Normant, Y. and Billard, R. 1997. Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. Theriogenology 48:589-603.

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

Gomes, L.A.O. and Primavera, J.H. 1993. Reproductive quality of male *Penaeus monodon.* Aquaculture 112: 157-164.

Gwo, J.C., Chen, C.W. and Cheng, H.Y. 2002. Semen cryopreservation of small abalone (*Haliotis diversicolor supertexa*). Theriogenology 58:1563-1578.

Gwo, J.C. and Lin, C.H. 1998. Preliminary experiments on the cryopreservation of penaeid shrimp (*Penaeus japonicus*) embryos, nauplii and zoea. Theriogenology 49: 1289-1299.

Gwo, J.C. 2000. Cryopreservation of sperm of some marine fishes. In: Tiersch, T.R., Mazik, P.M. (Eds.), Cryopreservation in Aquatic Species. World Aquaculture Society, Baton Rouge, LA, pp. 138-160.

Huang, T. Lee, S.Y., Keenan, C.P. and Marsden, G.E. 2002. Effects of age, size, and light intensity on spawning performance of pond-reared *Penaeus merguiensis*. Aquaculture 212: 373-382.

Huang, C., Dong, Q., Walter, R.B. and Tiersch, T.R. 2004. Sperm cryopreservation of green swordtail *Xiphophorus helleri*, a fish with internal fertilization. Cryobiology. 48:295-308.

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.

Jeyalectumie, C. and Subramoniam, T. 1989. Cryopreservation of spermatophores and seminal plasma of the edible crab Scylla serrata. Biological Bulletin 177: 247-253.

Leung-Trujillo, J.R. and Lawrence, A.L. 1987. Observations on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. Aquaculture 65: 363-370.

Lezcano, M., Granja, C. and Salazar, M. 2004. The use of flowcytometry in the evaluation of cell viability of cryopreserved sperm of the marine shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Cryobiology 48:349-356.

Leung-Trujillo, J.R. and Lawrence, A.L. 1987. Observations on the decline in sperm quality of *Penaeus setiferus* under laboratory conditions. Aquaculture 65: 363-370.

Motoh, H. 1982. Studies on the fisheries biology of the giant tiger prawn, *Penaeus monodon* in the Philippines. Southeast Asian Fisheries Development Center, Tigbauan, Lloilo, Philippines, 128 pp.

Newton, S.S. and Subramoniam, T. 1996. Cryoprotectant toxicity in penaeid prawn embryos. Cryobiology 33: 172-177.

Nimrat, S., Sangnawakij, T, and Vuthiphandchai, V. 2005. Preservation of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophores by chilled storage. Journal of the World Aquaculture Society 36: 76-86.

Nimrat, S., Siriboonlamom, S., Zhang, S., Xu, Y. and Vuthiphandchai, V. 2006. Chilled Storage of White Shrimp (*Litopenaeus vannamei*) Spermatophores. Aquaculture 261: 944-951.

Ogle, J.T. 1992. A review of the current state of our knowledge concerning reproduction in open thelycum penaeid shrimp with emphasis on *Penaeus vannamei*. Invertebrate Reproduction and Development 22: 267-274.

Paniague-Chavez, C.G. and Tiersch, T.R. 2001. Laboratory studies of cryopreservation of sperm and trochophore larvae of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. Cryobiology 43:211-223.

Parnes, S., Millsa, E., Segall, C., Raviv, S., Davis, C. and Sagi, A. 2004. Reproductive readiness of the shrimp *Litopenaeus vannamei* grown in a brackish water system. Aquaculture 236: 593-606.

Peixoto, S., Cavalli, R.O., Wasielesky, W., D'Incao, F., Krummenauer, D. and Milach, A.N. 2004. Effects of age and size on reproductive performance of captive *Farfantepenaeus paulensis* broodstock. Aquaculture 238: 173–182

Perez-Velazquez, M., Bray, W.A., Lawrence, A.L., Gatlin III, D.M. and Gonzalez-Felix, M.L. 2001. Effect of temperature on sperm quality of captive *Litopenaeus vannamei* broodstock. Aquaculture 198: 209-218.

Pongtippatee-Taweepreda, P., Chavadeja, J., Plodpai, P., Pratoomchart, B., Sobhon, P., Weerachatyanukul, W. and Withyachumnarnkul, B. 2004. Egg activation in the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. Aquaculture 234: 183-198.

Pratoomchat, B., Piyatiratitivorakul, S. and Menasveta, P. 1993. Sperm quality of pond-reared and wild-caught *Penaeus monodon* in Thailand. Journal of the World Aquaculture Society 24: 530-541.

Preston, N.P. and Coman, F.E. 1998. The effects of cryoprotectants, chilling and freezing on *Penaeus esculentus* embryos and nauplii. In: Flegel TW (ed),

Advances in shrimp biotechnology. National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok. Pp 37-43.

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

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

Sampath, K. and Ramachandran, T. 1999. Spermatophore collection In *Penaeus monodon* by electrical stimulation. Journal of Aquaculture in the Tropics 14(3): 193-199.

Sankai, T., Tsuchiya, H. and Ogonuki, N. 2001. Short-term nonfrozen storage of mouse epididymal spermatozoa. Theriogenology 55: 1759-1768.

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.

Simon, C., Dumont, P., Cuende, F.X., Diter, A. and AQUACOP. 1994. Determination of suitable freezing media for cryopreservation of *Penaeus indicus* embryos. Cryobiology 31: 245-253.

Stoss, J., Geries, L. and Holtz, W. 1987. The role of spermatozoa depth in storing chilled rainbow trout (*Salmo gairdneri*) semen under oxygen. Aquaculture 61: 275-279.

Subramoniam, T. 1994. Cryopreservation of crustacean gametes and embryos. Proceeding Indian National Science Academic 60: 229-236.

Tamako, Ishida, Talbot, P. and Kooda-Cisco, M. 1986. Technique for the long-term storage of lobster (*Homarus*) spermatophores. Gamete Research 14: 183-195.

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

Vuthiphandchai, V., Pengpun, B. and Nimrat, S. 2005. Effect of cryoprotectant toxicity and temperature sensitivity on the embryos of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture 246: 275-284.

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., Nimrat, S., Kotcharat, S. and Bart, A.N. 2007. Development of a cryopreservation protocol for long-term storage of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophores. Theriogenology 68: 1192-1199.

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. Aquac. Res. doi:10.1111/are.12396.

Wang, Q., Misamore, M., Jiang, C.Q. and Browdy, C.L. 1995. Egg water induced reaction and biostain assay of sperm from marine shrimp *Penaeus vannamei*: dietary effects on sperm quality. Journal of the World Aquaculture Society 26: 261-271.

Wyban, J.A. and Sweeney, J.N. 1991. Intensive production technology. The Oceanic Institute Shrimp Manual Oceanic Institute, Honolulu, HI, USA, 158 pp.