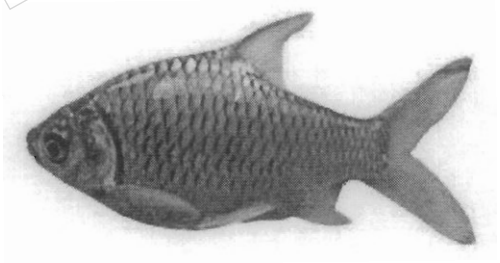
บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1 ปลาตะเพียนขาว

ปลาตะเพียนขาว มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Barbodes gonionotus* มีชื่อสามัญว่า Silver barb จัดอยู่ในครอบครัว Cyprinidae ถือเป็นปลาที่มีวงศ์สกุลใหญ่ที่สุดในปลาน้ำจืด ประกอบไปด้วยชนิดที่มากกว่า 2,000 ชนิดใน 200 สกุล ปลาตะเพียนขาวในวงศ์สกุลนี้จัดอยู่ในอันดับ Cypriniformes ซึ่งเป็นวงศ์สกุลที่มีชนิดและจำนวนปลามากที่สุดในปลาน้ำจืดของไทย และมีความหลากหลายเป็นอันดับสามของโลก ปัจจุบันพบแล้วอย่างน้อย 204 ชนิดที่มีในประเทศไทยและใน 204 ชนิดนี้ส่วนใหญ่จะเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและปลาในโครงการอนุรักษ์พันธุ์ปลาหายาก เช่น ปลาตะเพียนทอง ปลายี่สกไทย ปลากระโห้ เป็นต้นสำหรับสกุลของปลาตะเพียนขาว โดยการจำแนกความแตกต่างแบ่งออกเป็น 2 สกุล คือ สกุล *Barbodes* และสกุล *Puntius* ซึ่งลักษณะที่สำคัญของปลาใน 2 สกุลนี้ จะมีลักษณะที่คล้ายกันคือ รูปร่างค่อนข้างยาวรี ลำตัวแบนข้าง ปากยืดหดเฉียงลงมีหนวด 2-4 คู่ (เฉิดฉัน อมาตยกุล, 2538)

1.1 อนุกรมวิธานปลาตะเพียนขาว



ภาพที่ 1 ลักษณะของปลาตะเพียนขาว

ที่มา http: // www.coastalaqua.com

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การจัดลำดับอนุกรมวิธานของปลาตะเพียนขาวได้ดังนี้

Phylum Chordata

Subphylum Vertebrata

Class Osteichthys

Subclass Actinopterygii

Order Cypriniformes

Suborder Cyprinoidei

Family Cyprinidae

Genus *Barbodes*

Species *gonionotus*

1.2 รูปร่างลักษณะ

ปลาตะเพียนขาวมีลักษณะลำตัวแบนข้าง ขอบหลังโค้งยกสูงขึ้น จะงอยปากแหลม มีหนวดเส้นเล็ก ๆ 2 คู่ หัวเล็ก ปากเล็ก ริมฝีปากบาง ความยาวจากสุดหัวจรดปลายหางเป็น 2.5 เท่าของความสูง มีเกล็ดตามเส้นข้างตัว 29-31 เกล็ด ลำตัวมีสีเงิน ส่วนท้องเป็นสีขาวนวล ที่โคนของเกล็ดมีสีเทาจนเกือบดำ ครีบท้องและครีบก้นมีสีเหลืองปนส้มเล็กน้อย บริเวณส่วนหลังมีสีคล้ำเล็กน้อย ครีบหูมีสีจางหรือสีเหลืองอ่อนจาง ๆ ครีบหลังและครีบหางมีสีเทาปนเหลือง (สุทธิพงศ์ วุฒิเจริญวงศ์. 2552)

1.3 อาหารและนิสัยการกินอาหาร

ลูกปลาตะเพียนขาววัยอ่อนกินสาหร่ายเซลล์เดียวและแพลงก์ตอนขนาดเล็ก ส่วนปลาขนาด 3 - 5 นิ้ว กินพวกพืชน้ำ เช่น ผักบุ้ง สาหร่ายพุงชะโด แหนเป็ด สำหรับปลาขนาดใหญ่สามารถกินใบพืชบก เช่น หญ้าขน ใบมันสำปะหลัง ใบมันเทศ และพบว่าปลาตะเพียนขาวจะกินอาหารในเวลากลางวันมากกว่ากลางคืน (อภิชาต ศรีสอาด. 2547)

1.4 ความแตกต่างระหว่างเพศ

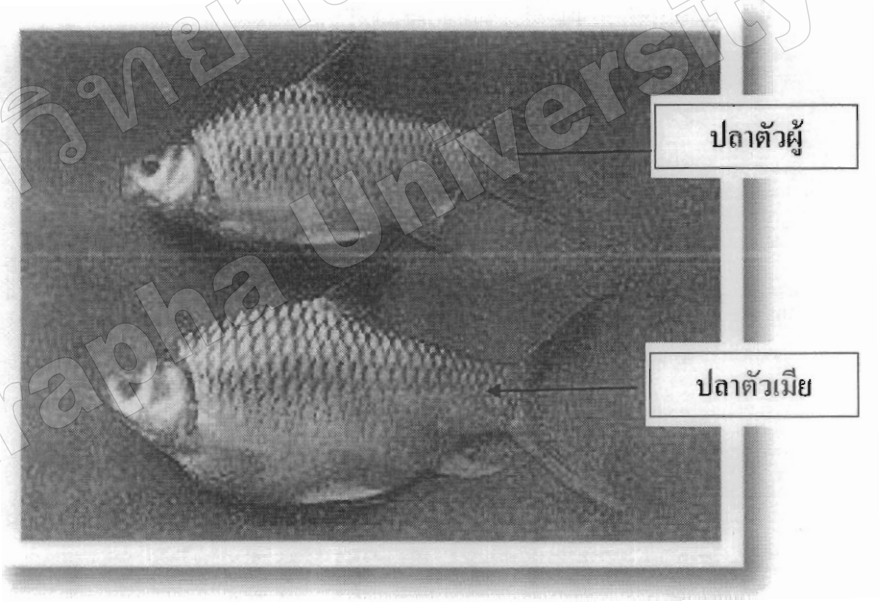
ปลาตะเพียนขาวเพศผู้กับเพศเมียจะคล้ายคลึงกันมาก แต่จะมีความแตกต่างที่สามารถนำมาแยกเพศปลาตะเพียนขาวได้ดังนี้

1. ปลาตะเพียนขาวที่มีอายุเท่ากันเมื่อโตเต็มวัยปลาตัวผู้จะมีขนาดเล็กกว่าตัวเมีย
2. ลักษณะลำตัวของปลาเพศผู้ยาวเรียว ส่วนตัวเมียลำตัวสั้นป้อม

3. พ่อแม่ปลาที่มีน้ำเชื้อและไข่แก่ เมื่อสัมผัสตัวผู้ตรงแก้ม ครีบหู และเกล็ดข้างตัวจะรู้สึกสากมือ ยิ่งมีความสากมากเท่าไรแสดงว่ามีความสมบูรณ์เพศมากขึ้น ส่วนในตัวเมียตรงส่วนแก้มและเกล็ดโดยทั่วไปลื่น

4. ในฤดูผสมพันธุ์ว่างไข่ปลาตัวเมียจะมีท้องอูมเป่งออกมาทั้ง 2 ข้าง พื้นท้องนิ่ม ช่องเพศเปิดกว้างกว่าปกติและมีสีชมพูอ่อน ๆ ส่วนตัวผู้ท้องแบนเรียบและพื้นท้องแข็งกว่าตัวเมีย ถ้าเอามือรีดท้องดูจะมีน้ำเชื้อสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนมไหลออกมาทางช่องเพศ

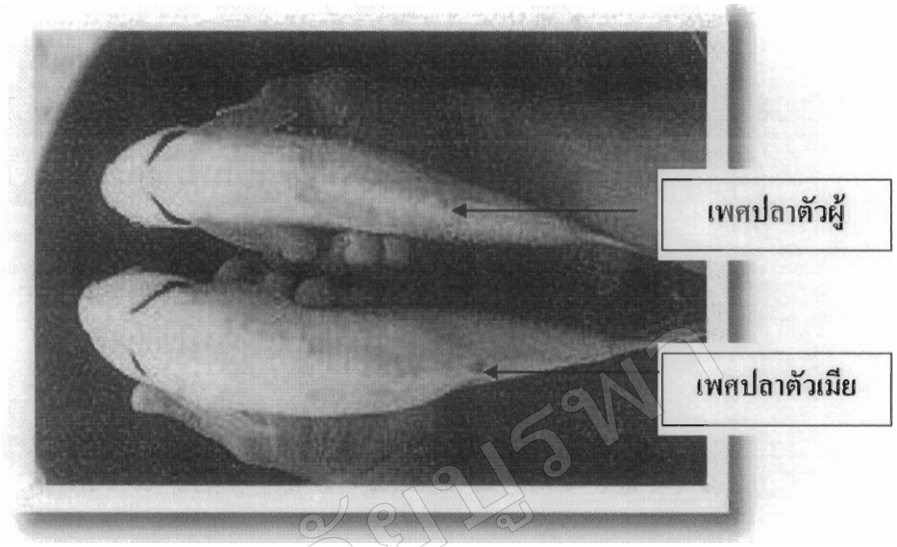
5. ครีบท้องของปลาตัวผู้เมื่อจับให้แนบขนานกับท้องไปทางครีบทวารจะยาวจรดถึงโคนฐานครีบก้นด้านหน้า ส่วนในตัวเมียครีบท้องยาวไปจรดถึงโคนฐานครีบทวาร และในตัวผู้ครีบอกจะยาวไปจรดโคนด้านหน้าของครีบท้องพอดี ส่วนของตัวเมียสั้นกว่า (สุทธิพงศ์ วุฒิเจริญวงศ์, 2552)



ภาพที่ 2 เปรียบเทียบลักษณะปลาตัวผู้และตัวเมียที่สมบูรณ์เพศ

ที่มา : http://www.doae.go.th

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 3 เปรียบเทียบลักษณะเพศปลาตัวผู้และตัวเมีย

ที่มา http://www.doae.go.th

2 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา

2.1 วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อมี 2 ลักษณะคือ

1) การเก็บรักษาน้ำเชื้อระยะเวลาสั้น

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไว้ในตู้เย็นหรือถังน้ำแข็งซึ่งอุณหภูมิต่ำเช่น 0 -8°C สามารถเก็บในสภาพเข้มข้นหรือเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (Extender) ที่เหมาะสมกับน้ำเชื้อปลาแต่ละชนิด ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อลักษณะนี้จะเก็บได้หรือไม่ จะต้องควบคุมไม่ให้สเปิร์มที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ขณะการเก็บรักษา เนื่องจากสเปิร์มของปลาน้ำจืดเมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำจะเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วและจะหยุดเคลื่อนที่ภายในเวลาประมาณ 1 นาที ดังนั้นต้องเลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีความเหมาะสมเพราะอาจมีผลไปกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ได้ ทำให้เกิดความล้มเหลวในการเก็บรักษาน้ำเชื้อเพราะสเปิร์มไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2536)

2) การเก็บรักษาน้ำเชื้อระยะเวลายาว

เป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อในถังไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196°C ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีนี้ถ้ามีการเลือกสูตรน้ำยาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (Cryoprotectant; สารที่ช่วยป้องกันการเสียหายของเซลล์ในกระบวนการแช่แข็ง) ระยะช่วงเวลาหลังจากการผสมน้ำเชื้อกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ก่อนทำการแช่แข็ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(Equilibium time) และอัตราการลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็ง รวมทั้งระดับไนโตรเจนเหลวในถังที่เก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง ถ้ามีการปฏิบัติและเลือกใช้อย่างเหมาะสมกับน้ำเชื้อปลาแต่ละชนิดสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาได้นานหลายสิบปี ซึ่งให้ผลการเพาะฟักผสมเทียมที่มีประสิทธิภาพสูงไม่ต่างจากน้ำเชื้อสด (จุฑามาศ พบสุข, 2546)

2.2 ประโยชน์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีแช่แข็ง

1) ในปลาบางชนิดเมื่อถึงฤดูสืบพันธุ์ปลาตัวเมียจะมีไข่แก่พร้อมผสมพันธุ์ แต่น้ำเชื้อของปลาตัวผู้ไม่พร้อม การเก็บน้ำเชื้อปลาที่มีน้ำเชื้อแก่เต็มที่ รอเพื่อนำมาผสมกับไข่จะช่วยให้การเพาะพันธุ์ได้ผลดีขึ้น

2) ลดความยุ่งยากในการเลี้ยงพ่อพันธุ์ การเพาะพันธุ์ก่อนหรือหลังการสืบพันธุ์ทำได้ง่ายขึ้น โดยเน้นการดูแลแม่ปลาให้สมบูรณ์อย่างเดียว

3) ช่วยให้น้ำเชื้อจากปลาตัวผู้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นโดยเฉพาะในปลาที่มีน้ำเชื้อน้อยหรือรีดออกได้ยาก เมื่อรีดน้ำเชื้อจากปลาตัวผู้ได้แล้วนำไปเก็บรักษาไว้แล้วนำมาผสมกับไข่ปลาที่รีดได้ในแต่ละครั้งในปริมาณที่เหมาะสม ส่วนที่เหลือนำไปเก็บรักษาไว้แล้วนำมาใช้ได้อีกในครั้งต่อไป

4) ช่วยรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อไว้โดยการรีดน้ำเชื้อจากพ่อปลาในช่วงที่มีความสมบูรณ์เพศสูงสุดเก็บรักษาไว้ใช้ในการเพาะพันธุ์ เนื่องจากคุณภาพน้ำเชื้อปลาจะเปลี่ยนแปลงตามเวลาที่ล่วงเลยไปในฤดูผสมพันธุ์

5) การผสมพันธุ์ระหว่างปลาตัวผู้และปลาตัวเมียที่อยู่คนละแหล่งก็สามารถทำได้สะดวกรวดเร็ว โดยการลำเลียงน้ำเชื้อที่รีดจากปลาตัวผู้ไปผสมกับไข่ปลาจากอีกแหล่ง (วัฒนะ ลีลาภัทร, 2551)

6) ปลาบางชนิดถึงเวลาผสมเทียมไม่สามารถรีดน้ำเชื้อได้จำเป็นต้องผ่าท้องพ่อพันธุ์ เพื่อเอาถุงน้ำเชื้อออกมาเพื่อให้ได้น้ำเชื้อ หากมีน้ำเชื้อเหลือสามารถเก็บรักษาไว้ได้โดยไม่เสื่อมสภาพและสามารถนำกลับมาใช้ได้อีกเมื่อต้องการก็ไม่จำเป็นที่จะต้องผ่าท้องพ่อพันธุ์ทุกครั้งเพื่อนำน้ำเชื้อไปใช้ทำให้ประหยัดพ่อพันธุ์และใช้น้ำเชื้อจากพ่อปลาได้อย่างคุ้มค่า

7) ปลาบางชนิดที่มีสองเพศในตัวเดียวกันแต่เพศจะเปลี่ยนแปลงไปตามอายุ เช่น ปลากะรัง ในช่วงระยะแรกจะเป็นเพศเมีย (Protogynous hermaphrodite) แต่เมื่ออายุตั้งแต่ 5 ปี ขึ้นไปจะกลายเป็นเพศผู้หรือในทางกลับกันในปลาบางชนิดเช่น ปลา Gilthead sea bream. ที่ช่วงชีวิตระยะแรกเป็นเพศผู้แล้วกลายเป็นเพศเมียเมื่ออายุมากขึ้น (Protandrous hermaphrodite) ปลาเหล่านี้จะสะดวกขึ้นถ้าสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ เมื่อได้ไข่จากแม่ปลาก็สามารถนำน้ำเชื้อมาผสมได้ทันที (วัฒนะ ลีลาภัทร, 2551)

8) การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งไว้ใช้ประโยชน์ในอนาคต ถ้าการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 °C และมีการดูแลคอยเติมไนโตรเจนเหลวอย่างสม่ำเสมอจะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งไว้ได้นานหลายปี

9) การคัดเลือกพันธุ์ เพื่อให้ได้ปลาที่เจริญเติบโตเร็วต้านทานโรคและเพื่อวัตถุประสงค์อื่นๆจะทำได้สะดวกขึ้นเมื่อมีน้ำเชื่อแช่แข็งเก็บรักษาไว้ใช้ประโยชน์ภายหลังที่พ่อพันธุ์นั้นอาจตายหรือสูญหาย

10) เพื่อใช้ประโยชน์ในการผสมพันธุ์และการผสมข้ามชนิด (interspecific hybridzation) ตลอดจนอาจใช้ผสมข้ามสกุล (intergeneric hybridzation) เพื่อให้ได้ปลาสายพันธุ์ใหม่หรือลูกผสมชนิดใหม่ที่มีประโยชน์เชิงเศรษฐกิจสูงขึ้นเช่น ปลาดุกบิ๊กอุย

11) ช่วยลดค่าใช้จ่ายและเวลาในการผสมเทียมในปลาบางชนิดที่หายากและใกล้สูญพันธุ์ (Endangered species) เช่นปลาบึก และปลาเทพา

12) ช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงพ่อพันธุ์ปลา เพราะสามารถลดจำนวนพ่อพันธุ์ปลาให้น้อยลงจึงสิ้นเปลืองค่าเลี้ยงดูและเนื้อที่เลี้ยงน้อยลง

13) การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่เก็บรักษาไว้จะอำนวยประโยชน์แก่การศึกษาวิจัยที่เป็นโครงการร่วมมือระหว่างชาติเพราะการขนส่งน้ำเชื้อปลาทำได้ง่ายและสะดวกกว่าขนส่งตัวปลา (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

3 ระบบสืบพันธุ์ และการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในปลา

3.1 การสร้างไข่ (Oogenesis)

ขบวนการในการสร้างไข่แบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ การเพิ่มจำนวนของโอโอโกเนีย การสร้างและสะสมโยล์ค (Yolk) และการเจริญขั้นสุดท้ายของไข่

1) การเพิ่มจำนวนของโอโอโกเนีย (Oogonial proliferation) โอโอโกเนียเจริญมาจากเซลล์สืบพันธุ์เบื้องต้น มีการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีส คือมีการเพิ่มจำนวนเพิ่มขนาดของเซลล์และขนาดของนิวเคลียสขึ้น โอโอโกเนียจะกลายเป็นไพรมารีโอโอไซท์ เมื่อนิวเคลียสแบ่งเซลล์ถึงระยะดิพโพลทีน ของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส ระยะที่ 1

2) การสร้างและสะสมโยล์คโอโอไซท์ในระยะต่อไปนี้มีการเพิ่มขนาดโดยการสะสมโยล์คภายในเซลล์ ฟอลลิเคิล 3 ชั้น ชั้นนอกสุด เรียกว่า ธิคาเซลล์ ชั้นแกรนูโลซาเรดิเอตาฟอลลิเคิลมีท่อเล็กๆทอดผ่านโซนาเรดิเอตาไปสู่ไซโตพลาสซึมของโอโอไซท์ ท่อนี้จะเป็นท่อสารอาหารต่างๆเข้าสู่เซลล์โอโอไซท์ ชั้นธิคาและแกนูโลซาซึ่งมีเบสเม็นท์ เม็มเบรน กั้นกลางมีหน้าที่ในกลาง

สร้างฮอร์โมนเพศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งฮอร์โมนเพศเมีย มีหน้าที่โดยตรงต่อขบวนการสร้างและสะสมโยล์ค

การสร้างและสะสมโยล์คแบ่งออกเป็น 2 ระยะคือ

(1) เอ็นโดยีนัส ไวเทลโลเจเนซิส (Endogenous vitellogenesis)

มีการสร้างที่เรียกว่าโยล์ค เวสสิเคิล ขึ้นภายในโอโอไซท์ สารที่สร้างขึ้นในระยะแรกนี้ไม่ใช่โยล์คที่แท้จริง มีลักษณะเป็นโพลีแซ็คคาไรท์

(2) เอ็กโซยีนัส ไวเทลเจเนซิส (Exogenous vitellogenesis)

ในระยะนี้ฮอร์โมนเพศจะถูกปล่อยสู่กระแสเลือดไปกระตุ้นให้สร้างตับสร้างสารไวเท็ลโลเจนิน ซึ่งมีคุณสมบัติ เป็นฟอสโฟลิโปโปรตีน ไวเท็ลโลเจนินจะถูกปล่อยสู่กระแสเลือด จากนั้นโอโอไซท์จะรับสารเหล่านี้และเปลี่ยนให้เป็นโยล์คโปรตีน ที่เรียกว่าโยล์คแกรนูลเข้าไปสะสมในโอโอไซท์ต่อไป การรับไวเท็ลโลเจนินเข้าสู่โอโอไซท์ถูกควบคุมโดยฮอร์โมนโกนาโดโทรปินในปลาบางชนิด เมื่อมีโอโอไซท์เจริญเต็มที่โยล์คแกรนูลจะรวมตัวกันทำให้ไข่มีลักษณะใสขึ้นกว่าเดิม โยล์คจะมีหยดน้ำมัน (Oil droplet) ซึ่งสร้างขึ้นภายในโอโอไซท์ รอบ ๆ นิวเคลียส โอโอไซท์ที่สิ้นสุดการสะสมโยล์คแล้วนี้จะอยู่ในระยะพักรอการกระตุ้นจากฮอร์โมน เพื่อให้เกิดการเจริญ ขั้นสุดท้ายและเกิดการตกไข่

3) การเจริญขั้นสุดท้ายของโอโอไซท์ (Final oocyte maturation)

เมื่อโอโอไซท์สิ้นสุดการสะสมโยล์ค มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสขั้นที่ 1 ในระยะนี้โอโอไซท์จะมีนิวเคลียสหรือเรียกว่าเยอร์มินัล เวสิเคิล ขนาดใหญ่อยู่กึ่งกลางเซลล์ หรืออยู่กึ่งกลางระหว่างจุดศูนย์กลางเซลล์กับขอบเซลล์ ระหว่างการเจริญขั้นสุดท้ายของโอโอไซท์ เยอร์มินัล เวสสิเคิลจะค่อย ๆ เคลื่อนที่ไปทางด้านแอนิมัลโพและในที่สุดเมื่อเคลื่อนที่มาถึงขอบโอโอไซท์ผนังของนิวเคลียสจะสลายไปเนื่องจากสิ้นสุด การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสระยะ 1 เรียกย่อ ๆ ว่า GVBD เป็นการสิ้นสุดการเจริญขั้นสุดท้ายของโอโอไซท์ ซึ่งขณะนั้นกลายเป็นไข่อย่างสมบูรณ์แล้วไข่ที่เจริญถึงขั้นสุดท้ายแล้วนี้หากสภาพของฮอร์โมนเหมาะสม ก็หลุดออกจากฟอลลิเคิลซึ่งเรียกว่า เกิดการตกไข่ หากไม่เกิดการตกไข่ และสิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสม โอโอไซท์เหล่านี้จะถูกทำลายและดูดซึมกลับเข้าสู่ตัวปลา

การเจริญขั้นสุดท้าย จะมีการดูดน้ำเข้าสู่เซลล์ไข่ มีผลให้ขนาดของไข่เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ในขั้นตอนการเจริญขั้นสุดท้ายของโอโอไซท์จะเกิดการเคลื่อนที่และการสลายของเยอร์นัลเวสิสเคิล แล้วยังตามด้วยการเคลื่อนที่ของไซโตพลาสซึมไปรวมกับส่วนประกอบของนิวเคลียสทางแอมินัลโพลเกิดเป็นลักษณะนูนเห็นได้ชัดเจนและในที่สุดจะเกิดแอทแทชเม็นท์ ดิชค์ ซึ่งสร้างโดยแกรนูโลซา (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538)

3.2 การสร้างอสุจิ

ในปลากระดูกแข็งลักษณะภายในอัณฑะจะมีระบบท่อการสร้างอสุจิ (Seminiferus tubule) และขบวนการสร้างตัวอสุจิ (Spermatogenesis pattern) ซึ่งมีความแตกต่างกันไปตามกลุ่มชนิดของปลา แต่ส่วนที่เป็นโครงสร้างหลักที่เหมือนกันคืออัณฑะแต่ละข้างประกอบด้วยท่อที่ทำหน้าที่สร้างอสุจิเป็นหน่วยเล็กที่สุด และเป็นท่อปลายตัน อสุจิที่สร้างจากท่อดังกล่าวนี้จะถูกขับเคลื่อนเข้าสู่ท่อน้ำเชื้อขนาดเล็กคือวาส เอฟเฟเรนส์ (Vas efferens) จำนวนมากมายแล้วมารวมกันเป็นท่อใหญ่ขึ้นเรียกว่า วาส เดเฟเรนส์ (Vas deferens) ซึ่งจะไปเชื่อมรวมกับวาส เดเฟเรนส์ของอัณฑะอีกข้างหนึ่งเป็นท่อสั้น ๆ เปิดออกสู่ช่องขับถ่ายน้ำเชื้อ และของเสียจากไต (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

อัณฑะ (Testis) เป็นอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาเพศผู้ มีลักษณะเป็นพูยาว 2 พูหรือถุงยาว 2 ถุงเรียงติดผนังช่องท้องด้านบนใกล้ไตและมีเยื่อยึดที่ เรียกว่ามีซอร์เชียม (Mesorchium) ช่วยยึดอัณฑะให้ติดผนังช่องท้อง ปลากระดูกแข็งส่วนมากจะมีท่อนำน้ำเชื้อ เป็นท่อขนาดเล็กสั้นๆไปตามแนวกึ่งกลางตัวไปเปิดออกบริเวณช่องเพศ ทำให้สเปิร์มที่สร้างจากอัณฑะถูกลำเลียงผ่านท่อนำน้ำเชื้อออกสู่ภายนอกร่างกาย ขนาด และน้ำหนักของอัณฑะเปลี่ยนแปลงไปตามอายุปลาหรือฤดูกาล

อัณฑะมีหน้าที่ในการผลิตสเปิร์มและฮอร์โมนเพศในระบบสืบพันธุ์ (Steroidhomone) โครงสร้างของอัณฑะของปลาประกอบด้วยเยื่อหุ้มอัณฑะเรียกว่า ทูนิคาอัลบูจิเนีย (Tunica albuginca) โครงสร้างอัณฑะของปลากระดูกแข็งแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่

1. แบบทูบูลา (Tubular type) ลักษณะอัณฑะไม่มีช่องว่าง (Lumen) โดยพบในปลาบางชนิด เช่น Cyprinodonts และ Guppy เป็นต้น ในระหว่างการพัฒนาการสร้างสเปิร์ม (Spermatogenesis) นั้นสเปิร์มจะค่อย ๆ พัฒนาจากด้านปลาย (Blind sac) มายังวาส เอฟเฟอเร้นซ์และปล่อยสเปิร์ม (Spermatozoa) ออกทางท่อนำน้ำเชื้อ (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

ท่อสร้างอสุจิมีลักษณะการเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ และสม่ำเสมอคือปลายท่อด้านหนึ่งตัน (Blind end) ยื่นไปสู่เยื่อหุ้มอัณฑะ (External tunica propria) ส่วนอีกด้านหนึ่ง ของท่อเชื่อมติดกับวาสเอฟเฟอเร้นซ์ และภายในท่อไม่มีช่องว่าง เต็มไปด้วยถุง (cyst) ที่สร้างตัวอสุจิในอัณฑะแบบทูบูลาร์จะพบเซลล์ที่จะให้กำเนิดแก่อสุจิ (Type A spermatogonia) เฉพาะส่วนปลายท่อปลายด้านปลายตัน และที่ปลายท่อด้านนี้เท่านั้นที่ให้กำเนิดถุงสำหรับสร้างตัวอสุจิ ในขณะที่ขบวนการสร้างตัวอสุจิก้าวหน้ายิ่งขึ้น ถุงที่เกิดขึ้นใหม่ก็จะขับดันเอาถุงที่เกิดก่อนให้เคลื่อนตัวไปสู่ท่อวาส เอฟเฟอเร้นซ์ และแล้วถุงนั้นก็แตกปล่อยตัวอสุจิเคลื่อนเข้าสู่วาส เอฟเฟอเร้นซ์และวาส เดเฟอร์เรนซ์ อัณฑะแบบทูบูลาร์ พบในปลากลุ่ม Atheriniform ได้แก่ ปลาในกลุ่มไซปรินิดส์หรือในครอบครัว

Cyprinidae เช่น ปลาทอง (Carassius auratus) ปลาไน (Cyprinus carpio) และปลากินยุงบางชนิด (Guppy, Poeciliia reticulata) (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

2. แบบโลบูล (Lobule lumen) ลักษณะอัณฑะจะมีช่องว่างอยู่ตรงกลาง (Central lumen) ทำหน้าที่ลำเลียงสเปิร์ม ที่ได้พัฒนาการสร้างสเปิร์มออกมายังท่อนำน้ำเชื้อและปล่อยออกนอกตัว

ภายในอัณฑะปลากระดูกแข็งประกอบด้วย เซมินิเฟอรัส ทูบูล ที่มีลักษณะขดไปขดมาทำหน้าที่สร้างสเปิร์มในระหว่างเซมินิเฟอรัส ทูบูลจะพบอินเตอร์สติเตียล เซลล์ (Interstitial) ทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนเพศ (Steroid) และพบหลอดเลือดฝอย (Blood vessels) ทำหน้าที่แลกเปลี่ยนแก๊ส และอาหาร ภายในเซมินัลเฟอรัส ทูบูลจะมีเซลล์ร่างกาย (Somatic cell) บุอยู่โดยรอบด้านในมีลักษณะคล้าย เซอร์โตไลเซลล์ (Sertoli cell) แต่ไม่ใช่เซอร์โตไลเซลล์ที่แท้จริง (True sertoli cell) จึงเรียกเซลล์ดังกล่าวว่าซีสต์เซลล์ (Cyst cell) ทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนและทำหน้าที่เป็น เซลล์บุผิวด้วย (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2536)

ลักษณะของอัณฑะแบบโลบูลคือมีรูกลางท่อ เซลล์ที่ให้กำเนิดแก่อสุจิมีกระจายทุกส่วนของผนังท่อในลักษณะเป็นเยื่อบุผิวรอบ ๆ รูกลางท่อ เซลล์ที่บรรจุถุงตัวอสุจิจะติดอยู่กับที่ๆ ผนังของท่อเมื่อขบวนการสร้างอสุจิถึงขั้นสุดท้ายเซลล์และถุงจะเปิดและปล่อยอสุจิเข้าสู่รูกลางท่อ อัณฑะแบบโลบูล พบในปลาสวาย (*Pangasiusnodon hypopthalmus*), ปลาดุก (*Clarias batrachus*) และปลาบึก (*Pangasianodon gigas*)

ขบวนการสร้างอสุจิในปลาเซลล์ที่ให้กำเนิดแก่อสุจิมีการแบ่งเซลล์ และพัฒนาอยู่ในถุงซึ่งบรรจุอยู่ในเซลล์พี่เลี้ยง (Cyst cell) หรือ Lobular boundary cell หรือ Sertoli ดังนั้น กลุ่มเซลล์ (Spermatocytes) ในถุงเดียวกันจะเจริญพัฒนาอยู่ในระยะเดียวกันพร้อมกัน (Synchronization) จนกระทั่งสิ้นสุดขบวนการจึงปล่อยลงสู่ท่อน้ำเชื้ออันได้แก่ วาส เอฟเฟอร์เร้นซ์ และวาส เดเฟอร์เรนซ์ ซึ่งเป็นทางผ่านและที่สะสมก่อนปล่อยออกนอกร่างกายเพื่อการผสมพันธุ์ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

3.2.1 วัฏจักรการเจริญของอัณฑะ

การเปลี่ยนแปลงของอัณฑะในฤดูกาลต่าง ๆ มีไม่มากนัก ภายในอัณฑะของปลาส่วนใหญ่มีการสร้างเชื้อตัวผู้ตลอดทั้งปี โดยการสร้างมากเป็นพิเศษในช่วงฤดูวางไข่ จึงมีผลให้อัณฑะขยายใหญ่มากในช่วงนั้น ซึ่งเป็นผลมาจากการขยายตัวของเซมินอลเฟอรัส ทูบูล ในปลาชันแนล แคทฟิช พบว่าหลังการผสมพันธุ์แล้วจะเห็นเซอร์โทไล เซลล์ชัดเจน และพบว่าเซอร์โทไล เซลล์นี้มีบทบาทในการทำลายเชื้อตัวผู้ที่ตกค้างอยู่ในซีสต์ (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538)

3.2.2 การสร้างน้ำเชื้อ (Spermatogenesis)

การสร้างน้ำเชื้อมี 2 ขั้นตอน คือ

1) สเปอร์มาโตเจเนซิส (Spermatogenesis) ระยะนี้เริ่มจากสเปอร์มาโตโกเนีย เปลี่ยนแปลงไปเป็นไพมารีสเปอร์มาโตไซท์ (Pimary spermatocyte) จากนั้นจะเกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ระยะที่ 1 ได้เซ็คคันดารีสเปอร์มาโตไซท์ (Secondary spermatocyte) ซึ่งมีขนาดของเซลล์เล็กลงกว่าเดิมจำนวน 2 เซลล์ จากนั้นก็เกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสระยะที่ 2 ได้สเปอร์มาติด (Spermatid) รวม 4 เซลล์ จากไพมารีสเปอร์มาโตไซท์ 1 เซลล์ สเปอร์มาติดนี้แม้ จะมีโครโมโซมเพียงชุดเดียวแล้วแต่ยังไม่มีคุณสมบัติในการปฏิสนธิเหมือนเชื้อตัวผู้

2) สเปอร์มิโอเจเนซีส (Spermiogenesis) ในระยะนี้ สเปอร์มาติดจะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจนเหมือนเชื้อตัวผู้ (Spermatozoa) สำหรับรายละเอียดขั้นตอนการเกิดสเปอร์มิโอเจเนซีสนี้ยังไม่สามารถสรุปได้แน่นอน แต่ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่าส่วนของเซ็นตริโอล (Centriole) ซึ่งโดยปกติจะทำหน้าที่เป็นขั้วของเซลล์ในการแบ่งเซลล์จะยื่นยาวออกมาเป็นหางจากนิวเคลียสจะผนึกตัวแน่นขึ้นล้อมรอบชั้นของไซโตพลาสซึมบาง ๆ ไซโตพลาสซึมส่วนใหญ่จะหายไปเซ็นตริโอลและไซโตพลาสซึมส่วนหนึ่งจะกลายเป็นส่วนมิดพิซ (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538) การพัฒนาการสร้างสเปิร์มถูกควบคุมด้วยฮอร์โมนโกนาโดโทปินจากต่อมใต้สมองไปกระตุ้นอัณฑะให้ผลิตฮอร์โมนเพศ (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

3.2.3 ลักษณะของสเปิร์ม (The shape of fish sperm)

สเปิร์มของปลาต่างจากสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่น ๆ เพราะมีส่วนของอะโครโซม (Acrosome) เนื่องจากไข่ปลามีไมโครไพล์ซึ่งเป็นทางผ่านของสเปิร์มอยู่แล้ว อะโครโซมจึงไม่จำเป็นสำหรับปลา สเปิร์มของปลามีส่วนประกอบ 3 ส่วนคือ

1. ส่วนหัว (Head) ส่วนหัวของสเปิร์มจะมีนิวเคลียส ซึ่งมีโครโมโซมเพียง 1 ชุด นิวเคลียสนี้มีไซโตพลาสซึมหุ้มอยู่เพียงบาง ๆ รูปร่างลักษณะ และขนาดของส่วนหัวนี้แตกต่างกันไปตามชนิดของปลา แต่พบว่าส่วนใหญ่มีลักษณะกลมหรือเป็นรูปไข่ เช่น สเปิร์มของปลาตะเพียนขาว ปลาดุก และปลาทองมีลักษณะกลม ส่วนของปลาไน และปลาสวายมีส่วนหัวรูปไข่ ส่วนหัวนี้จะผ่านวิเทล ลินเม็มเบรนเข้าไปในเซลล์ของไข่เพื่อปฏิสนธิกับไข่

2. มิดพีซ (Mid piece) เป็นส่วนที่อยู่ถัดจากส่วนหัว และมีรูปร่างแตกต่างกันไปตามชนิดของปลา ลักษณะทั่วไปประกอบด้วยไมโครทูบุล (Microtubule) ซึ่งเป็นแกนกลางของส่วนหาง ล้อมรอบด้วย ไซโตพลาสซึม ซึ่งในไมโตคอนเดรีย (Mitochodria) และเซ็นตริโอ (Centriole)

3. ส่วนหาง (Tail) ประกอบด้วยไมโครทูบุลที่เรียงกันเป็นวงรอบ ๆ แกนกลางซึ่งล้อมรอบด้วยพลาสมา เม็มเบรน (Plasma membrane) ส่วนใหญ่จะมีไมโครทูบุลเป็นแกนกลาง 1 คู่

และเรียงเป็นวงรอบแกนกลางอีก 9 คู่ ลักษณะนี้จะทำให้ส่วนหางสามารถเคลื่อนไหวได้ ซึ่งสเปิร์มของปลาส่วนใหญ่จะมีหางเพียงหางเดียว แต่ในปลาบางชนิด เช่น ปลา *Porictys notatus* สเปิร์มมี 2 หาง ซึ่งลักษณะเช่นนี้จะได้พบบ้างเป็นบางครั้งในปลาชันแนล แคทฟิช และปลากินยุงบางชนิดเช่น ปลาในครอบครัว Mormyriformes มีลักษณะสเปิร์มไม่มีหาง (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538)

ปลากระดูกแข็งส่วนมากจะมีสเปิร์มที่มีส่วนหัวเป็นรูปกลม (Spherical) หรือทรงรี (Ovate) โดยส่วนหัวมีขนาด 2-3 μm และความยาวของสเปิร์มจากหัวถึงปลายหางประมาณ 40 ถึง 60 μm ส่วนกลางมีขนาดเล็กและส่วนใหญ่มีหางจำนวน 1 หาง (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

3.2.4 การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

คุณลักษณะสำคัญอีกประการหนึ่งของสเปิร์มปลาหรือน้ำเชื้อปลาที่ยังไม่พัฒนาคือ เมื่อยังอยู่ในตัวปลาหรือเมื่อรีดน้ำเชื้อสดออกมาตรวจสอบดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ สเปิร์มของปลาโดยทั่วไปยังไม่มีการเคลื่อนไหว (Immotile) แต่เมื่อน้ำเชื้อผสมกับน้ำ จะพบสเปิร์มถูกกระตุ้นให้มีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว เนื่องจากการเจือจาง (Dilution effect) ซึ่งจะเคลื่อนที่ภายในเวลาประมาณไม่เกิน 1 นาที ดังนั้นการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อปลาโดยใช้อัตราการเคลื่อนที่ และเมื่อเจือจางน้ำเชื้อปลาด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ (Extender or diluent) ใด ๆ ก็ตาม น้ำยาชนิดนั้นจะต้องไม่กระตุ้นการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เพื่อเป็นการเก็บรักษาให้สเปิร์มมีชีวิต และสามารถในการผสมกับไข่ได้ผลใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสด (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

3.3 การผสมพันธุ์

การผสมพันธุ์ทำได้ 2 วิธี คือ

1) ปล่อยให้พ่อแม่ปลาผสมพันธุ์กันเอง วิธีการนี้เมื่อฉีดฮอร์โมนเสร็จ ก็จะปล่อยพ่อแม่ปลาในบ่อเพาะรวมกัน โดยใช้อัตราส่วนแม่ปลา 1 ตัวต่อปลาเพศผู้ 2 ตัว บ่อเพาะควรมีพื้นที่ไม่ต่ำกว่า 3 ตารางเมตร ลึกประมาณ 1 เมตร บ่อขนาดนี้จะปล่อยพ่อแม่ปลาได้ประมาณ 3 ตัว เพื่อความสะดวกในการแยกพ่อแม่ปลา ควรใช้อวนช่องตาห่าง ปูในบ่อไว้ชั้นหนึ่งก่อน แล้วจึงปล่อยพ่อแม่ปลาลงไป นอกจากนี้การปล่อยปลาควรปล่อยในตอนเย็นเพื่อปลาจะได้ผสมพันธุ์กันในตอนดึกหรือใกล้สว่าง ตอนเช้าก็ทำการจับพ่อแม่พันธุ์ขึ้นมา หลังจากฉีดฮอร์โมนประมาณ 4-6 ชั่วโมง ปลาจะเริ่มวางไข่ผสมพันธุ์กันเอง โดยปลาตัวผู้จะไล่รัดปลาตัวเมีย เมื่อสังเกตว่าแม่ปลาไข่หมดแล้วก็ยกอวนที่ปูไว้ออก พ่อแม่ปลาจะติดมาโดยไข่ปลาลอดตาอวนลงไปรวมกันในบ่อ จากนั้นก็รวบรวมไข่ปลาไปฟักในกระชังฟัก สำหรับความมดกของไข่นั้นจะขึ้นอยู่กับอายุ ขนาด วิธีการเลี้ยงแม่ปลาและความสมบูรณ์เพศ การผสมพันธุ์วิธีนี้มีข้อดีในเรื่องคุณภาพของไข่ที่ได้ มักจะเป็นไข่ที่สุกพอดี นอกจากนั้นผู้เพาะยังไม่ต้องเสียเวลารอด้วย แต่ในบางครั้งปลาตัวผู้อาจไม่ฉีดน้ำเชื้อเข้าผสม ทำให้ไข่ที่ได้ไม่ฟักเป็นตัว นอกจากนั้นไข่ที่รวบรวมได้มักจะไม่สะอาด

2. วิธีการผสมเทียม หลังจากฉีดประมาณ 4-6 ชั่วโมง จะสามารถรีดไข่ปลาได้ โดยปลาจะมีอาการกระวนกระวาย ว่ายน้ำไปมารุนแรงผิดปกติ บางตัวอาจจะขึ้นมาฮุบอากาศบริเวณผิวน้ำ เมื่อปลามีอาการดังกล่าวก็ควรตรวจดูความพร้อมของแม่ปลา โดยจับหงายท้องขึ้นโดยตัวปลายังอยู่ในน้ำและบีบบริเวณใกล้ช่องเพศเบา ๆ หากพบว่าไข่พุ่งออกมาอย่างง่ายดายก็นำแม่ปลาขึ้นมารีดได้ การผสมเทียมใช้วิธีแห้งแบบตัดแปลง โดยใช้ผ้าซับตัวปลาให้แห้ง แล้วรีดไข่ลงในภาชนะที่แห้งสนิท จากนั้นนำปลาตัวผู้มารีดน้ำเชื้อลงผสมในอัตราส่วนปลาตัวผู้ 1-2 ตัว ต่อไข่ปลาจากแม่ปลา 1 ตัว ใช้ขนไก่คนไข่กับน้ำเชื้อจนเข้ากันดีแล้วจึงเติมน้ำสะอาดเล็กน้อยพอท่วมไข่ คนเล็กน้อย ในขั้นตอนนี้เองน้ำเชื้อตัวผู้จะเข้าผสมกับไข่แล้ว จากนั้นจึงเติมน้ำจนเต็มภาชนะ ถ่ายน้ำเป็นระยะๆเพื่อล้างไข่ให้สะอาด ไข่จะค่อย ๆ พองน้ำและขยายขนาดขึ้นไข่จะพองเต็มที่ภายในเวลาประมาณ 20 min ระหว่างช่วงเวลาดังกล่าวต้องคอยถ่ายน้ำอยู่เสมอ เพื่อป้องกันไม่ให้ไข่บางส่วนเสีย เมื่อไข่พองเต็มที่แล้วก็สามารถนำไปฟักในกรวยฟักได้ (สุทธิพงศ์ วุฒิเจริญวงศ์, 2552)

3.4 การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อปลา

1. การเตรียมพ่อพันธุ์ปลา การเก็บน้ำเชื้อเพื่อใช้ในการผสมเทียมหรือเพื่อเก็บรักษาแบบแช่แข็งตามปกติปลาตัวผู้ที่โตเต็มวัยแล้ว จะให้น้ำเชื้อเกือบตลอดปี ถ้าต้องการเก็บน้ำเชื้อปริมาณมากจากปลาตัวผู้น้อยตัวการฉีดฮอร์โมนเพื่อเร่งการปล่อยน้ำเชื้อก็อาจจำเป็น ตามปกติในการผสมเทียมปลาที่ปฏิบัติกันทั่วไป ตัวเมียจะได้รับการฉีดฮอร์โมนเพื่อเหนี่ยวนำให้ตกไข่ประมาณ 2 โดส โดยฉีด 2 ครั้งห่างกันประมาณ 6–12 ชั่วโมง ดังนั้นถ้าต้องการเหนี่ยวนำให้ตัวผู้ปล่อยน้ำเชื้อมากขึ้น ควรฉีดฮอร์โมน จำนวน 1 โดส ในเวลาเดียวกันกับที่ฉีดฮอร์โมนเข็มที่ 2 ให้กับตัวเมีย ปลาตัวผู้จะให้น้ำเชื้อมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจนหลังจากฉีดฮอร์โมนแล้ว 12–14 ชั่วโมง ถ้าปล่อยเวลาให้ล่วงเลยยาวนานกว่านั้นน้ำเชื้อมีโอกาส หลั่งออกมาได้เอง ดังนั้นปริมาณน้ำเชื้อที่รีดได้จะลดลงสู่ระดับปกติ ประมาณ 48 ชั่งโมง หลังการฉีดฮอร์โมน

2. การรีดน้ำเชื้อ ควรเช็ดตัวปลาให้แห้ง โดยเฉพาะบริเวณท้องปลาเพื่อป้องกันไม่ให้น้ำที่เกาะตามตัวปลาหยดลงปนกับน้ำเชื้อที่รีดได้เพราะน้ำที่หยดลงไปปนกับน้ำเชื้อจะไปกระตุ้นให้สเปิร์มส่วนหนึ่งมีการเคลื่อนที่ทำให้คุณภาพเสื่อม การรีดน้ำเชื้อจะใช้มือรีดส่วนท้องของปลา ถ้าปลาพ่อพันธุ์ที่มีความพร้อมจะปล่อยน้ำเชื้อสีขาวขุ่นเหมือนน้ำนมเหนียวไหลออกมาทางช่องเพศ ภาชนะที่ใช้รองรับน้ำเชื้อปลาจะต้องแห้งสะอาด น้ำเชื้อที่จะใช้ในการเก็บรักษาทั้งแบบแช่แข็ง และการเก็บระยะสั้นในตู้เย็นจะต้องเป็นน้ำเชื้อที่ไม่มีการปนเปื้อนด้วยเลือด ปัสสาวะ และของเสียอื่น ๆ (กฤษณ์ มงคลาไพญญา และทัศนีย์ ภูพิพัฒน์, 2535) หากมีเลือดปนมากจะทำให้อายุการเก็บรักษาน้ำเชื้อสั้นลง ดังนั้นจึงควรพยายามให้เลือดปนน้อยที่สุด (วัฒนะ ลีลาภัทร, 2551)

ภาพที่ 4 การรีดน้ำเชื้อปลา
ที่มา : ภาพโดย รัชดาภรณ์ อินทเกษร

3.5 การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลา (Evaluation of sperm quality)

น้ำเชื้อที่เก็บจากปลาแต่ละตัวมักมีคุณภาพไม่เท่ากันซึ่งมีสาเหตุจากความผันแปรของปลาแต่ละตัวเช่น ฤดูกาล พันธุกรรม อายุ ความเครียด สุขภาพ และจากการเก็บน้ำเชื้อที่มีการปนเปื้อนปัสสาวะ, อุจจาระ, เลือด และน้ำยาเจือจาง จึงควรตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อก่อนที่จะนำไปเก็บรักษาโดยกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ในปลาน้ำจืดปัจจัยที่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่คือ การลดระดับค่าออสโมลาริตี้ (ปริมาณตัวถูกละลายทั้งหมดในตัวทำละลาย 1 กิโลกรัม หน่วยเป็น mOsmol/kg) หรือ การที่น้ำเชื้อถูกเจือจางด้วยน้ำเมื่อถูกปล่อยออกมาจากปลาในช่วงผสมพันธุ์วางไข่ (วัฒนะ ลีลาภัทร, 2551)

ส่วนน้ำเชื้อปลาทะเลนั้นแตกต่างจากปลาน้ำจืดเนื่องจากน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม มีระดับออสโมลาริตี้สูงกว่าน้ำทะเล (Hyperosmolarity) ดังนั้นการเก็บน้ำเชื้อปลาต้องเลือกสารละลายบัฟเฟอร์สูตรที่เหมาะสมกับระดับออสโมลาริตี้ของน้ำเชื้อ ถ้าใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่ไม่เหมาะสมอาจไปกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ก่อนผสมเทียม การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลานั้นช่วงแรกสเปิร์มจะเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเป็นเส้นตรงอย่างรวดเร็วหลังจากนั้นจะค่อย ๆ ลดความเร็วลงจนหยุดนิ่งหรือตาย (วัฒนะ ลีลาภัทร, 2551) สเปิร์มจะไม่เคลื่อนที่เมื่ออยู่ในน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม แต่จะเคลื่อนที่เมื่ออยู่ในน้ำโดยจะมีอัตราเร็วในการเคลื่อนที่แตกต่างกันอยู่ขึ้นกับชนิดของปลา สภาพแวดล้อม และอุณหภูมิ เช่น สเปิร์มปลาน้ำกร่อย และปลาทะเลจะเคลื่อนที่ได้นานกว่าปลาน้ำจืด และถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นทำให้สเปิร์มมีระยะเวลาการเคลื่อนที่ (Total motile period) ในน้ำน้อยกว่าอุณหภูมิต่ำกว่า

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลาสามารถบอกความสมบูรณ์เพศของพ่อพันธุ์ที่ จะนำมาเพาะพันธุ์ได้ดีโดยมีวิธีการประเมิน 4 วิธีคือ

1) ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ ควรสังเกตทันทีหลังจากทำการรีดน้ำเชื้อออกมาโดยสังเกต สี ความเข้มข้น ปริมาตร และสิ่งเจือปนอื่น ๆ น้ำเชื้อที่ดีควรมีสีขาวขุ่น และไม่ควรมีสิ่งเจือปนวิธีนี้เป็นการประเมินเบื้องต้น ควรทำการประเมินควบคู่กับวิธีที่ 2 หรือ 3 บางครั้งน้ำเชื้อที่ขาวขุ่นอาจมีคุณภาพไม่ดี

2) การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสามารถพิจารณาเป็นเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มทำโดยสุ่มนับจากกล้องจุลทรรศน์ เช่น สุ่มนับ 10 ตัวนับดูตัวที่เคลื่อนที่มีอย่างละเท่าไรแล้วทำจนครบ 100 ตัว ก็จะได้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มทำดังนี้

2.1 หยดน้ำเชื้อหนึ่งหยดลงบนสไลด์แล้วใช้ Cover glass ปิดน้ำเชื้อ

2.2 สังเกตน้ำเชื้อดูคลื่นที่เกิดจากการว่ายน้ำของสเปิร์ม และการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

2.3 กำหนดอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเป็นระบบตัวเลข 0-5 ดังนี้

0 = ไม่มีการเคลื่อนที่

1 = (Poor) สเปิร์ม มีการเคลื่อนที่น้อยกว่า 30 % และเคลื่อนที่ช้า

2 (Fair) สเปิร์ม 20-30 % เคลื่อนที่ แข็งแรง แต่ไม่สังเกตเห็นคลื่น

3 = (Good) สเปิร์ม 50-70 % เคลื่อนที่แข็งแรง สังเกตเห็นคลื่นชัด

4 = (Very good) สเปิร์ม 70-80 % เคลื่อนที่แข็งแรง และมีคลื่นให้เห็นน้อยกว่า 5

5 = (Excellent) สเปิร์ม 80 % เคลื่อนที่รวดเร็ว และมีคลื่นรวมชัดเจน

น้ำเชื้อปลาส่วนใหญ่จะเคลื่อนที่ในระยะเวลาไม่เกิน 1 min นอกจากนี้อาจใช้เกณฑ์คุณภาพน้ำเชื้ออื่น ๆ มาพิจารณาร่วมด้วย เช่น สี ความหนืดของน้ำเชื้อ สภาพของปลาที่เก็บ ลักษณะการจับตัวเป็นก้อนหรือวุ้นของน้ำเชื้อเมื่อผสมกับน้ำ

3) การย้อมดูตัวเป็นตัวตาย วิธีนี้ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดย สเปิร์มที่ตายจะติดสีย้อม วิธีนี้มีข้อดีที่สามารถรู้ความสมบูรณ์ของสเปิร์มที่มีชีวิตได้อย่างแน่นอน และสามารถทำควบคู่วิธีที่ 2 จะช่วยเสริมผลในการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อดีขึ้น เนื่องจากการเคลื่อนที่อย่างเดียวอาจพลาดได้ เช่น การที่สเปิร์มเคลื่อนที่อย่างปราดเปรียวอาจทำให้ตัวที่ตายอยู่ใกล้เคียงเคลื่อนที่ตามไปด้วย ขั้นตอนการย้อมสีมีดังนี้

3.1 หยดสีย้อม 1 หยดบนสไลด์

3.2 หยดน้ำเชื้อ 1 หยดผสมสีย้อมแล้วคนเข้ากันอย่างรวดเร็วแล้วใช้ Cover glass ปิด

3.3 นับสเปิร์มที่ติดสี และไม่ติดสีเพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์ตัวเป็นและตัวตาย (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

4) การประเมินความสามารถของน้ำเชื้อในการผสมกับไข่ การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อเป็นเพียงการประมาณการอย่างคร่าว ๆ ซึ่งอาจไม่สัมพันธ์กับความสามารถในการผสมกับไข่ ดังนั้นในปลาจะมีการผสมภายนอกร่างกาย การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อที่เชื่อถือได้ก็ต้องนำน้ำเชื้อปลาไปผสมกับไข่ที่รีดออกมาสด ๆ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

3.6 การผสมสารละลายบัฟเฟอร์ ยาปฏิชีวนะและสารไครโอโพรเทคแทนท์

หลังจากตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อแล้ว เลือกเฉพาะน้ำเชื้อคุณภาพดีคือสเปิร์มเคลื่อนไหวในระดับ 3 - 4 (70 - 100 %) ไปเจือจางด้วยน้ำยาที่เหมาะสมกับปลาชนิดนั้น วิธีเจือจางน้ำเชื้อมีดังนี้

1) ดูดน้ำเชื้อใส่หลอดหรือบีกเกอร์ที่สะอาด และแห้งที่แช่ในน้ำแข็ง วัดปริมาตรน้ำเชื้อรวมแล้วจึงเติมสารละลายบัฟเฟอร์สูตร และอัตราการเจือจาง (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่เหมาะสมกับน้ำเชื้อปลาที่จะเก็บรักษาส่วนใหญ่อัตราเจือจางน้ำเชื้อ: สารละลายบัฟเฟอร์ใช้อัตรา 1:1 ถึง 1:5 ถ้าเจือจางน้ำเชื้อในอัตราสูงเกินไปอาจส่งผลเสียต่อคุณภาพน้ำเชื้อที่เก็บรักษาได้ หลังจากนั้นเขย่าหลอดเบา ๆ ให้น้ำเชื้อและสารละลายบัฟเฟอร์ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน

2) ผสมยาปฏิชีวนะเพนโนเซบ (Penosep) ซึ่งประกอบด้วยยาเพนนิซิลิน และสเตรปโตมัยซินเติมลงในสารละลายน้ำเชื้อให้ความเข้มข้นของเพนนิซิลินและสเตรปโตมัยซินที่ 50 mg/ml และ 0.01 mg/ml ตามลำดับ เขย่าหลอดให้น้ำยาเข้ากับสารละลายน้ำเชื้อ

3) ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ ชนิด และความเข้มข้นที่เหมาะสมกับน้ำเชื้อปลาชนิดต่างๆ ส่วนใหญ่ใช้ความเข้มข้น 10 % (ปริมาตร/ปริมาตร) แต่สารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์นั้นมีพิษสูงต่อน้ำเชื้อ วิธีการลดพิษจากสารไครโอโพรเทคแทนท์ คือ ต้องผสมกับสารละลายน้ำเชื้อที่แช่เย็นไว้ตลอดเวลา และแบ่งเติมสารไครโอโพรเทคแทนท์ ลงในสารละลายน้ำเชื้อที่ละน้อยจนหมด (Serial diution)

4) การปล่อยให้สเปิร์มปรับสมดุลกับสารละลายบัฟเฟอร์ (Equilibration) และการบรรจุใส่หลอด แช่เย็น หลังจากผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์กลุ่มออกฤทธิ์ภายในเซลล์ลงในน้ำเชื้อแล้วจะต้องปล่อยให้โมเลกุลของสารไครโอโพรเทคแทนท์เข้าสู่ภายในเซลล์จนสมบูรณ์ ซึ่งส่วนใหญ่จะนำสารละลายน้ำเชื้อแช่ไว้ในน้ำแข็งประมาณ 15 - 30 min พร้อม ๆ กันไปกับการดูดสารละลายน้ำเชื้อใส่ลงในหลอดสำหรับเก็บแช่เย็น หลอดสำหรับบรรจุน้ำเชื้อแช่เย็นแบ่งเป็น 2 ประเภท คือหลอดฟาง (French straw) และหลอดแช่เย็น (Crytube) (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

4 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา

การพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว เป็นการช่วยพัฒนาและมีบทบาทที่สำคัญต่อการเพาะขยายพันธุ์ โดยการนำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวมาเก็บรักษาไว้ ใช้ในการผสมพันธุ์ได้นาน ซึ่งเป็นการพัฒนาขั้นตอนการแช่แข็งโดยการเก็บจากหลอดฟางที่มีขนาด 0.25 ml มาเป็นขนาด 0.5 ml และ 1.5 ml เพื่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อให้ได้ปริมาณมากขึ้นในการเก็บน้ำเชื้อแต่ละครั้ง เพราะต้องนำน้ำเชื้อผสมกับไข่ปลาจำนวนมากภายหลังการละลาย จึงต้องให้มีจำนวนน้ำเชื้อมากพอต่อการผสมในการทดลองแต่ละครั้ง เป็นการลดระยะเวลาในการเก็บน้ำเชื้อ และลดต้นทุนในเรื่องของอุปกรณ์ในการเก็บน้ำเชื้อได้ มีขั้นตอนดังนี้

4.1 วิธีการแช่แข็ง

ขั้นตอนการทำการแช่แข็ง และการละลายน้ำเชื้อเพื่อการผสมเทียมกับไข่สดของปลาควรปฏิบัติตาม กฤษณ์ มงคลปัญญา (2535) ดังต่อไปนี้

4.1.1. การรวบรวมน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว

ให้เลือกใช้เฉพาะน้ำเชื้อที่มีสีขาวนวลคล้ายนมข้นไม่มีสิ่งปนเปื้อนอื่น ๆ ดังนั้นการ รีดท้องพ่อพันธุ์ปลาควรออกแรงรีดให้พอเหมาะเพื่อป้องกันการปนเปื้อนด้วยปัสสาวะ และน้ำเลือดที่อาจไหลออกจากบาดแผลบริเวณช่องเปิดของท่อน้ำเชื้อ และรีดน้ำเชื้อใส่ภาชนะสะอาด แห้งไม่มีหยดน้ำแกาะ และระหว่างรอขั้นตอนต่อไป เมื่อรีดน้ำเชื้อบรรจุลงในภาชนะรองรับได้เพียงพอแล้วให้ปิดฝาภาชนะนั้นแล้วให้แช่ลงในถังโฟมที่บรรจุน้ำแข็งเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ และป้องกันอันตรายจากแสงแดด จากนั้นตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสด โดยตรวจอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดก่อนที่จะดำเนินการในขั้นต่อไปโดยเฉพาะการตรวจดูอัตราการเคลื่อนที่และความเข้มข้นของสเปิร์ม

4.1.2. การเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ (Extender)

ซึ่งสารละลายบัฟเฟอร์นี้เป็นสารละลายที่มีคุณสมบัติ และองค์ประกอบคล้ายคลึงกับน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์มเป็นสารที่เกิดจากการนำสารต่าง ๆ ที่มีคุณสมบัติช่วยในการมีชีวิตรอดของสเปิร์ม สารละลายบัฟเฟอร์ ที่ดีต่อน้ำเชื้อปลาชนิดใด ๆ ควรมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

1. ไม่เป็นพิษกับสเปิร์ม
2. สามารถเก็บรักษาสเปิร์มให้อยู่ในระยะหยุดนิ่งหรือไม่เคลื่อนที่
3. ช่วยยืดอายุให้สเปิร์มมีชีวิตนานขึ้น
4. มีคุณสมบัติที่จะคงความสามารถในการปฏิสนธิของสเปิร์มไว้ได้

5. อาจมีการผสมยาต้านทานจุลชีพ (ยาปฏิชีวนะ) และ/หรือสารที่มีคุณสมบัติป้องกันการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์มมอย่างฉับพลัน(Buffer) หรืออาจมีสารให้พลังงานกับสเปิร์ม

ดังนั้นในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาทั้งแบบระยะสั้น และแบบแช่แข็งระยะยาวนั้น จำเป็นต้องมีการเจือจางน้ำเชื้อปลาด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ สำหรับอัตราการเจือจางแม้ว่าจะไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มถ้าน้ำยานั้นเหมาะสมในส่วนประกอบของอิออน และแรงดันออสโมติก ซึ่งอัตราการเจือจาง (น้ำเชื้อ:น้ำยา) จึงควรเป็น 1:1 ถึง 1:9 เพื่อให้สารละลายบัฟเฟอร์ คงสภาพสเปิร์มให้มีชีวิตได้นานขึ้น และให้สเปิร์มปลาซึ่งมีความหนาแน่นสูง (พันล้านเซลล์/มิลลิลิตร) ถูกเจือจางลง เป็นการเพิ่มปริมาตรของน้ำเชื้อเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้การแช่แข็งน้ำเชื้อถ้าเติมสารไครโอโพรเทคแทนท์ลงในน้ำเชื้อสดโดยตรงจะมีพิษกับสเปิร์มสูงมาก จึงต้องมีการเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางก่อน

4.1.3 สารไครโอโพรเทคแทนท์ (Cryoprotectant)

สารไครโอโพรเทคแทนท์เป็นสารเคมีที่ป้องกันความเสียหายให้กับเซลล์ระหว่างการลดอุณหภูมิเพื่อป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์และนอกเซลล์และมีหลายชนิดที่นิยมใช้เป็นส่วนผสมของน้ำยาสำหรับการแช่แข็ง ได้แก่ ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (Dimethyl sulfoxide, DMSO) และกลีเซอรอล สารเคมีเหล่านี้จำเป็นอย่างยิ่งต่อการมีชีวิตของตัวอย่างที่เก็บแช่แข็ง

4.1.3.1 การจำแนกประเภทสารไครโอโพรเทคแทนท์

สามารถจำแนกออกเป็น 2 พวก คือ ที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์และออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ ดังนี้

1) ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ (Permeating cryoprotectant) ได้แก่ DMSO, Glycerol และ Alcohol เช่น Methanol, Ethanol, Propanediol เป็นต้น สารเคมีเหล่านี้จำเป็นต้องซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายไม่ให้เกิดขึ้นขณะแช่แข็ง และละลาย ซึ่งสารเคมีกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายได้ดีเมื่อใช้ในระดับที่มีความเข้มข้นค่อนข้างสูง (1-4 M) ขณะแช่แข็งหากพิจารณาถึงความสามารถในการแพร่เข้าสู่ภายในเซลล์ Alcohol มีอัตราการแพร่สูงสุด รองลงมาได้แก่ DMSO, Glycerol ตามลำดับ สารเหล่านี้มีข้อเสียคือเป็นพิษต่อเซลล์ และเนื้อเยื่อ

2) ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ (Nonpermeating cryoprotectant) สารเคมีกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่นอกเซลล์ และใช้ได้ผลดีที่ความเข้มข้นต่ำกว่าพวกแรก (0.01-0.2 M) และเป็นพิษน้อยกว่าด้วย ได้แก่ Polyvinyl pyrrolidone (PVP), Hydoxyethyl starch

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

(HES), Dextrans, Albumin, Polyethylene glycol และน้ำตาลต่าง ๆ ได้แก่ Sucrose, Glucose, Manitol

ซึ่งการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาโดยทั่วไปนิยมใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์กลุ่มออกฤทธิ์ภายในเซลล์ เช่น DMSO, Glycerol และ ethylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ คิดเป็น 98, 50 และ 29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Tiersch, 2000)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง พบว่า การใช้ DMSO ในระดับ 8 เปอร์เซ็นต์ ได้ผลดีที่สุดและดีกว่าการใช้ Glycerol เช่น การทดลองของ Riley, Holladay, Chesney, and Tiersh (2004) ในปลา red snapper พบว่า 10% DMSO มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีสุด เท่ากับ 71±16 %

ศิริพร คชรัตน์, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2548) ได้ทำการศึกษาการเก็บน้ำเชื้อปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) แบบแช่แข็ง ศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 6 ชนิด (DMSO, Glycerol, Propylene Glycol, Methanol, Ethanol และ Sucrose) ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่าการใช้ DMSO มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มน้อยที่สุด

เรณู ยาชิโร (2542) ได้ทำการศึกษาการเก็บน้ำเชื้อปลาหมอทะเล (*Epinephelus lanceolatus*) โดยวิธีแช่แข็ง ในภาวะในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) โดยใช้น้ำยาสูตรต่าง ๆ คือ น้ำยารินเกอร์สำหรับปลาทะเล (MFR) สารละลายโซเดียมซิเตรท 0.1 โมลา (CT) น้ำยาสูตร 251 (E251) และน้ำยาสูตร 891 (F891) ผลการทดลองแสดงว่าเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มเซลล์มีชีวิตในน้ำยาที่มีส่วนผสม MFR, CT 10% เติมกลูโคส 1 - 2 % และ DMSO 10 % มีเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตมากกว่า 90% ในเวลา 43 วัน พบว่า การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานาน

Ji et al. (2004) ได้ทำการทดลองการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Sea perch (*Lateolabrax japonicus*) โดยการใช้ 10% DMSO เป็นระยะเวลาในการเก็บ 1 ปี โดยวางเหนือระดับไนโตรเจนเหลว 6 cm หลังการทำละลายที่อุณหภูมิ 37°C พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 68.3±4.4%

Horvath et al. (2005) แช่แข็งน้ำเชื้อปลา sturgeon โดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ DMSO และ methanol พบว่า methanol 5% มีการปฏิสนธิ 40±15% และอัตราการเพาะฟัก 32±12% ดีสุด

Tian et al. (2008) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา spotted halibut (*Verasper variegates*) โดยใช้ extender TS-2 ร่วมกับ 13.3% DMSO หรือ 13.3% prophylene glycol พบว่า มีการปฏิสนธิ 34.52%±10.92% อัตราการเพาะฟัก 23.53±11.80% ไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด

340280

Christensen and Tiersch (2005) แช่แข็งสเปิร์ม channal catfish ใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ คือ methanol ที่ความเข้มข้น 5% และ 10% พบว่า 10% methanol มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีสุดเท่ากับ 67%

Suquet et al. (1998) ได้ทำการทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Turbot (*Psetta maxima*) แบบแช่แข็งระยะยาวโดยใช้ 10% DMSO พบว่าระยะเวลาการเก็บ 9 เดือน ในไนโตรเจนเหลว มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มระหว่าง 60-90% ภายหลังการกระตุ้นที่ 10 และ 60 sec

4.1.3.2 กลไกการออกฤทธิ์ของสารไครโอโพรเทคแทนท์

สารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติทางเคมี และฟิสิกส์แตกต่างกันเช่น กลีเซอรอล, ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) และ Alcohol เป็นตัวทำลาย และระเหยได้ ส่วนน้ำตาลซูโคสและกลูโคสเป็นผลึกน้ำแข็งละลายน้ำได้ดี พิจารณาถึงอัตราการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์จะพบว่าเช่น น้ำตาลซูโคสไม่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ แต่น้ำตาลกลูโคส แพร่ผ่านได้ ส่วน Alcohol มีอัตราการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ได้เร็วกว่า DMSO และกลีเซอรอลมีอัตราการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ช้ากว่า DMSO สารไครโอโพรเทคแทนท์จะมีผลกระทบต่อคุณสมบัติของของเหลวทั้งภายใน และภายนอกเซลล์ คือ มีผลต่อแรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) จุดเยือกแข็ง (Freezing point) และช่วยปรับแรงดันออสโมติกของของเหลวภายในเซลล์ และนอกเซลล์ จะช่วยให้เซลล์รอดชีวิตภายหลังการแช่แข็งได้เพราะ

1) ป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์โดยทำให้ของเหลวเข็งตัวช้าลงและน้ำในเซลล์มีน้อยลง

2) ป้องกันการลดขนาดของเซลล์สารไครโอโพรเทคแทนท์แพร่เข้าสู่เซลล์ไปแทนที่น้ำในเซลล์ที่แพร่ออกจากเซลล์เพราะความแตกต่างของแรงดันออสโมติกที่เปลี่ยนไปเนื่องจากการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายนอกเซลล์ก่อนที่ของเหลวภายในเซลล์จะแข็งตัว

3) ป้องกันอันตรายจากความไม่สมดุลของเกลือแร่และอิเล็กโตไลท์คือเมื่อมีการควบคุมการเกิดเกล็ดน้ำแข็งและลดขนาดของเซลล์ขณะทำการแช่แข็งทำให้เซลล์คงสภาพปกติมีชีวิตอยู่ได้

4) ช่วยคงไว้ซึ่งคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ และเยื่อหุ้มออแกร์เนลล์ (กฤษณ์ มงคล-ปัญญา, 2536)

ดังนั้นกระบวนการแช่แข็งต้องนำ Extender มาละลายในสารไครโอโพรเทคแทนท์ก่อนแล้วจึงนำไปผสมกับน้ำเชื้อ โดยใส่สารไครโอโพรเทคแทนท์ลงไปในน้ำเชื้ออย่างช้า ๆ ที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อช่วยให้เซลล์ค่อย ๆ ปรับสภาพ และต้องทิ้งระยะเวลาให้สารไครโอโพรเทคแทนท์ซึมเข้าไปในเซลล์ (Equilibium time) ซึ่งเป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการแช่แข็งให้ประสบความสำเร็จ

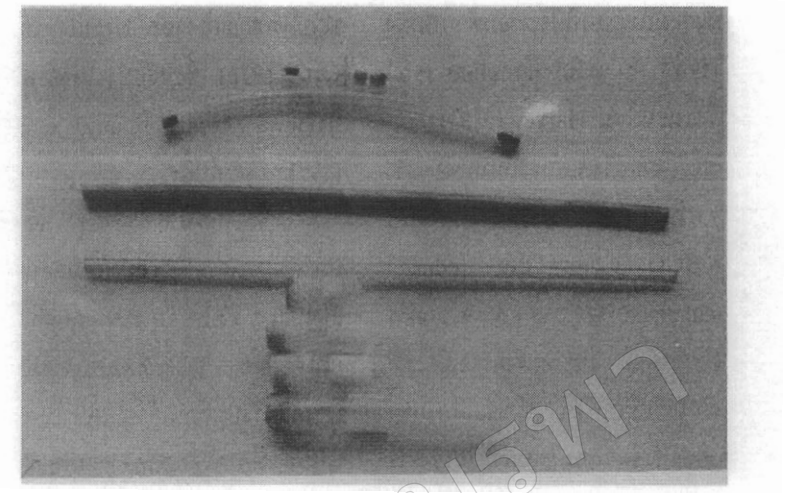
เช่นกัน โดยในสัตว์แต่ละชนิด สารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละตัว แต่ละความเข้มข้นจะมี Equilibium time ที่ต่างกัน ดังนั้นในการแช่แข็งต้องมีการทดลองหา Equilibium time ที่เหมาะสม ถ้าปล่อยให้สารไครโอโพรเทคแทนท์ผสมกับน้ำเชื้อนานเกินไปทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ แต่ถ้าน้ำเชื้อผสมอยู่ในสารไครโอโพรเทคแทนท์น้อยเกินไป อาจซึมเข้าสู่เซลล์ยังไม่ทั่วถึง เมื่อนำเซลล์ไปแช่แข็งจึงเกิดความล้มเหลวได้ และระหว่าง ช่วงระยะเวลา Equilibium time ที่ปล่อยให้น้ำเชื้อผสมกับ Extender และสารไครโอโพรเทคแทนท์ พร้อม ๆ กับดูดสารละลายน้ำเชื้อใส่ลงในหลอด สำหรับบรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งได้แก่ หลอดฟาง และหลอดไครโอ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

4.1.4. ชนิดและขนาดของหลอดบรรจุ

ชนิดและขนาดของหลอดบรรจุ มีหลายแบบได้แก่ หลอดฟาง (French straw) หลอดไครโอ (Cryotube) และมีหลายขนาดได้แก่ 0.25 ml, 0.5 ml, 1 ml สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวนี้ ควรใช้หลอดที่มีความจุอย่างน้อย 0.5 ml ขึ้นไปเพราะต้องผสมกับไข่ปลาจำนวนมากภายหลังการละลาย จึงต้องให้มีจำนวนน้ำเชื้อมากพอต่อการผสมในการทดลองแต่ละครั้ง เช่น ในการทดลองของ

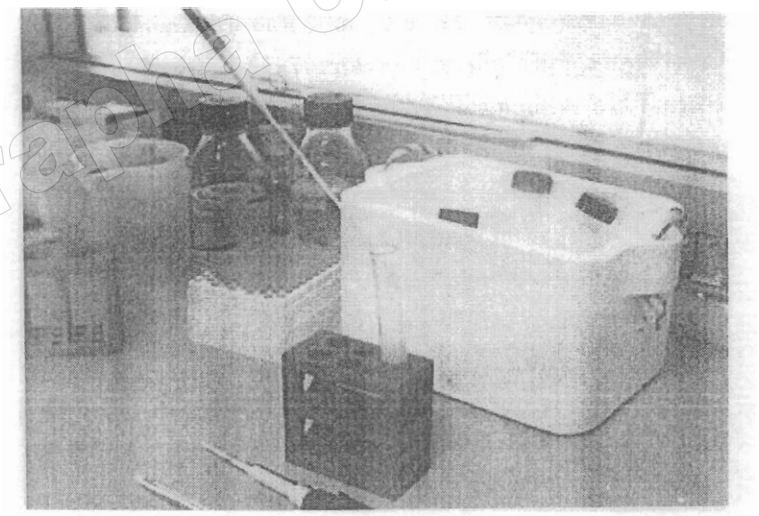
วีรพงศ์ วุฒิพันธ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์ (2548) ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว และปลาดุกอุย แบบแช่เย็นและแบบแช่แข็งเพื่อการผสม โดยใส่หลอดฟางขนาด 0.25 ml ที่ใช้ DMSO 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายดีที่สุด

Cabrita. Robles. Alvarez and Herracz. (2001) การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา rainbow trout โดยใช้หลอดฟางขนาดต่างกัน คือ 0.5, 1.8 และ 5 ml พบว่าในหลอดขนาด 1.8 ml และ 5 ml การมีชีวิตรอดของสเปิร์มและการปฏิสนธิเท่ากับ 61.9 % และ 73.2 % แต่ต่ำกว่าหลอด 0.5 ml ที่มีชีวิตรอดของสเปิร์มเท่ากับ 77.4 % และการปฏิสนธิเท่ากับ 84 %



ภาพที่ 5 อุปกรณ์สำหรับเก็บน้ำเชื้อ (หลอดฟาง หลอดฉีดยาและหลอดไครโอ)
ที่มา : กฤษณ์ มงคลปัญญา (2535)

เมื่อบรรจุน้ำเชื้อลงหลอด ควรจะนำไปตรวจดูอัตราการเคลื่อนที่หรือเปอร์เซ็นต์สเปิร์มมีชีวิตอีกครั้งเพื่อทดสอบว่าน้ำเชื้อยังมีคุณภาพดีใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสดก่อนทำการลดอุณหภูมิ



ภาพที่ 6 การบรรจุสารละลายน้ำเชื้อลงในหลอดฟางใช้ไมโครไปเปต
ที่มา : วัฒนะ ลีลาภัทร (2551)

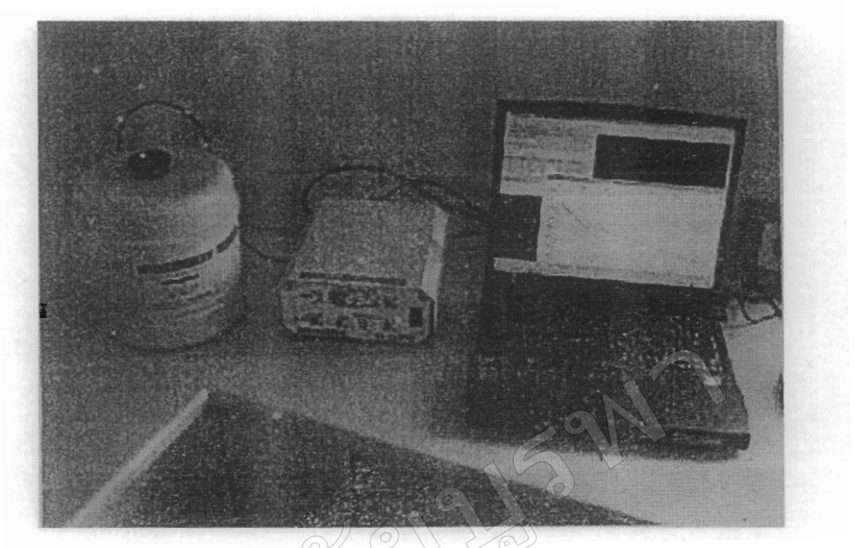
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.1.5 การลดอุณหภูมิ (Freezing)

การลดอุณหภูมิคือ การทำให้ของเหลวที่อยู่รอบ ๆ เซลล์ และภายนอกค่อย ๆ แข็งตัวในขณะที่ทำการลดอุณหภูมิของเหลวภายนอกเซลล์จะเป็นน้ำแข็งก่อนของเหลวภายในเซลล์ทำให้ความเข้มข้นของตัวถูกทำละลายภายนอกเซลล์สูงกว่าภายในเซลล์จึงทำให้น้ำแพร่ออกจากเซลล์เพื่อปรับสมดุล ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิช้าเกินไปจะทำให้เซลล์ต้องปรับตัวนานเกินไปซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อเซลล์เพราะมีการสูญเสียน้ำ และความเข้มข้นของสารละลายสูงเกินไปอาจทำให้ตกผลึกการเหนี่ยวนำให้เกิดผลึกน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำมากเกินไปทำได้โดยใช้ปากคีบที่เย็นจัดที่แช่ในไนโตรเจนเหลว (-196°C) มากรีดหลอดน้ำเชื้อที่ลดอุณหภูมิลงถึง -5 หรือ -7°C ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิเร็วเกินไปจะทำให้น้ำไหลออกจากเซลล์ เร็วเกินไปอาจทำให้เซลล์เหี่ยว และเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ทิ่มแทงเซลล์ และเยื่อหุ้มออการ์แนลล์ทำให้เซลล์ได้รับอันตรายได้ ดังนั้นอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้นมีความสำคัญต่อการรอดชีวิตของเซลล์ซึ่งการเปลี่ยนแปลงต่าง ๆ นี้ย่อมมีผลกระทบต่อการมีชีวิตของเซลล์ที่ผ่านการแข็งตัว ปัญหาที่เกี่ยวกับการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ และปัญหาเกี่ยวกับอันตรายเนื่องจากเซลล์สูญเสียน้ำจนทำให้ของเหลวภายในเซลล์มีความเข้มข้นสูงจนเป็นอันตรายต่อเซลล์ ดังนั้นจึงต้องมีการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ เพื่อช่วยป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

4.1.5.1 เครื่องมือที่ใช้ในการลดอุณหภูมิ

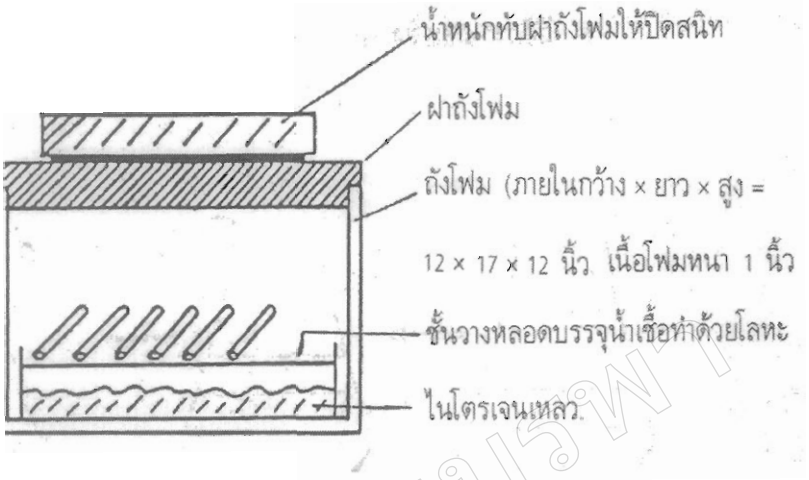
1) ใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (Programmable freezer) เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติใช้คอมพิวเตอร์หรือโปรเซสเซอร์เป็นตัวควบคุมการจ่ายไอไนโตรเจนเหลวจากถังเก็บเข้าสู่ช่องใส่ตัวอย่าง สามารถตั้งอัตราลดอุณหภูมิได้จากคอมพิวเตอร์หรือส่วนควบคุมได้โดยตรง และมีความแม่นยำสูง ข้อดีของเครื่องนี้คือ มีอัตราลดอุณหภูมิที่แม่นยำ และสามารถตั้งโปรแกรมให้ลดอุณหภูมิได้หลาย ๆ ขั้นตอน ส่วนข้อเสียคือ มีราคาสูงมาก และไม่เหมาะสำหรับนำออกภาคสนาม



ภาพที่ 7 เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ
ที่มา : วัฒนะ ลีลาภัทร (2551)

2) ใช้ไอไนโตรเจนเหลวจากกล่องโฟมหรือถังเก็บตัวอย่างแช่แข็ง (Liquid nitrogen vapor) เนื่องจากไนโตรเจนเหลวนั้น จะระเหยเป็นไอเย็นอยู่ตลอดเวลาดังนั้นหากวางตัวอย่างห่างจากผิวไนโตรเจนเหลวที่ระดับหนึ่งก็จะได้อัตราลดอุณหภูมิอัตราหนึ่งเช่นกัน โดยอัตราลดอุณหภูมิค่าผันแปรผกผันกับระยะระหว่างผิวไนโตรเจนเหลว และยังขึ้นกับขนาดของกล่องโฟม หรือถังเก็บด้วย การคำนวณหาอัตราลดอุณหภูมิจากอุปกรณ์เหล่านี้สามารถทำได้โดยใช้เครื่องวัดอุณหภูมิแบบบันทึกอัตโนมัติ (Data logger) บันทึกอุณหภูมิที่ลดลงทุก ๆ 2-4 วินาที แล้วนำไปสร้างกราฟเส้นตรงแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิด้วยวิธีนี้ข้อดีคือ สะดวก ถูก และเหมาะสมสำหรับงานภาคสนามมีข้อเสียคือ มีความเที่ยงตรงของอัตราลดอุณหภูมิต่ำกว่าเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ และจำเป็นต้องคำนวณอัตราลดอุณหภูมิ และระยะการวางตัวอย่างใหม่หากใช้กล่องโฟม และถังที่ขนาดไม่เหมือนเดิม (วัฒนะ ลีลาภัทร, 2551)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 8 อุปกรณ์สำหรับการลดอุณหภูมิแบบกล่องโฟม

ที่มา : กฤษณ์ มงคลปัญญา (2535)

Christensen and Tiersch (2005) ศึกษาการแช่แข็งของสเปิร์ม Chanel catfish ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 3°C/min ได้ผลดีสุดมีการเคลื่อนที่สเปิร์มเท่ากับ 83± 13%

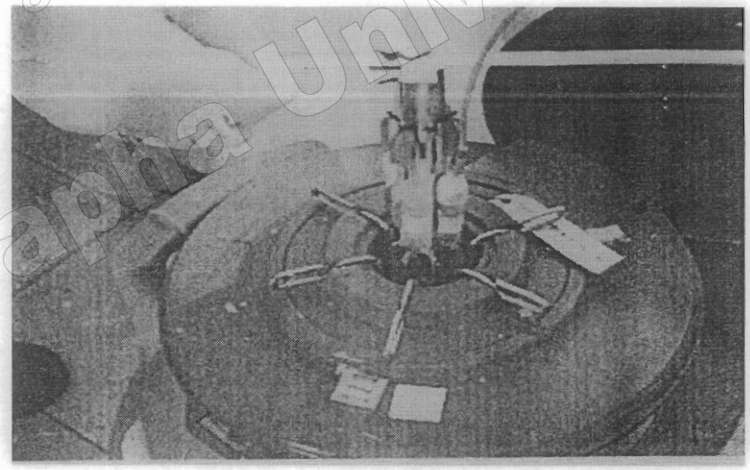
Thirumal,Campbell, Vicknair, Tiersch and Devireddy (2006) ได้ศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อ Striped bass ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 14-20°C/min ได้ผลดีที่สุด

Linhart, Rodina, and Cosson (2000) ได้ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน โดยการนำน้ำเชื้อมาเจือจางกับ Kurokura อัตราส่วน 1:5 และลดอุณหภูมิให้ได้ 4 °C แล้วนำ 10 % DMSO เติมลงไปแล้วนำหลอด Cryotube (2 ml) แล้วลดอุณหภูมิจาก 4 °C ถึง -9 °C โดยใช้อัตราการลด 4°C / min และ จาก -9 °C ถึง -80 ^{0}C โดยใช้อัตราการลด 11 ^{0}C /min พัก 6 min ก่อนนำไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวนาน 1 สัปดาห์ นำหลอด Cryotube มาละลายใน water bath นาน 110 วินาที ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อโดยดูการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง มีความแตกต่างกัน โดยน้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ 78±18% น้ำเชื้อแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ 69±14%

4.1.6 การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว

เป็นการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวหลังจากลดอุณหภูมิในช่วง -60°C ถึง -80°C ซึ่งเป็นการสิ้นสุดกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อ จะนำหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งไปเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวในถังเก็บตัวอย่าง (Storage dewar) ซึ่งเป็นถังที่ผลิต และออกแบบมาสำหรับใช้เก็บรักษาตัวอย่างในไนโตรเจนเหลวโดยเฉพาะมีช่องสำหรับแขวนกระบอกเก็บตัวอย่าง (Canister) ซึ่งอาจใส่กระบอกพลาสติกทนความเย็น (Goblet) 1 - 2 อัน สำหรับบรรจุหลอดน้ำเชื้อแช่แข็ง (วัฒนะ ลีลาภัทร, 2551)

ภาพที่ 9 ถังเก็บไนโตรเจนเหลว
ที่มา : วัฒนะ ลีลาภัทร (2551)



ภาพที่ 10 ถังเก็บตัวอย่างในไนโตรเจนเหลว
ที่มา : วัฒนะ ลีลาภัทร (2551)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งสามารถเก็บได้นานหลายปี โดยไม่ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อเสื่อมเสียหาย ถ้าควบคุมดูแลอย่างดีตามข้อแนะนำที่กล่าวมาแล้ว ทั้งนี้เพราะตามทฤษฎีแล้วการเก็บรักษาที่ -120°C ซึ่งเป็นอุณหภูมิของไอไนโตรเจนเหลวก็เก็บได้ดีเท่ากับที่ -196°C เพราะที่อุณหภูมิต่ำขนาดนี้ไม่มีปฏิกิริยาใด ๆ เกิดขึ้นอีกสิ่งที่อาจเป็นอันตรายต่อเซลล์สิ่งมีชีวิตได้เมื่อเก็บรักษาไว้ใน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ไอไนโตรเจนเหลวอาจเพราะเกิดการสะสมรังสีเอ็กซ์ (Ionizing x-radiation) แต่จากรายงานของ Ashwood-Smith and Friedmann (1979) แสดงให้เห็นว่าต้องใช้เวลาสะสมนาน 3,000-10,000 ปี จึงจะสามารถทำให้ครึ่งหนึ่งของเซลล์ที่เก็บไว้เป็นอันตราย พบว่าลูกปลาที่เจริญพัฒนามาจากการผสมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งมีลักษณะรูปร่างสี และการเจริญเติบโตเหมือนปลาปกติทุกประการเช่นเดียวกันกับที่พบในกรณีใช้น้ำเชื้อปลาบึกแช่แข็งผสมกับไข่สดของปลาบึกและปลาสวาย ลูกปลาที่ได้มีการเจริญเติบโตปกติ และปลาลูกผสมมีอัตราการเจริญเติบโตดีกว่าลูกปลาสวาย (กฤษณ์ มงคลปัญญา และทัศนีย์ ภูพิพัฒน์, 2535)

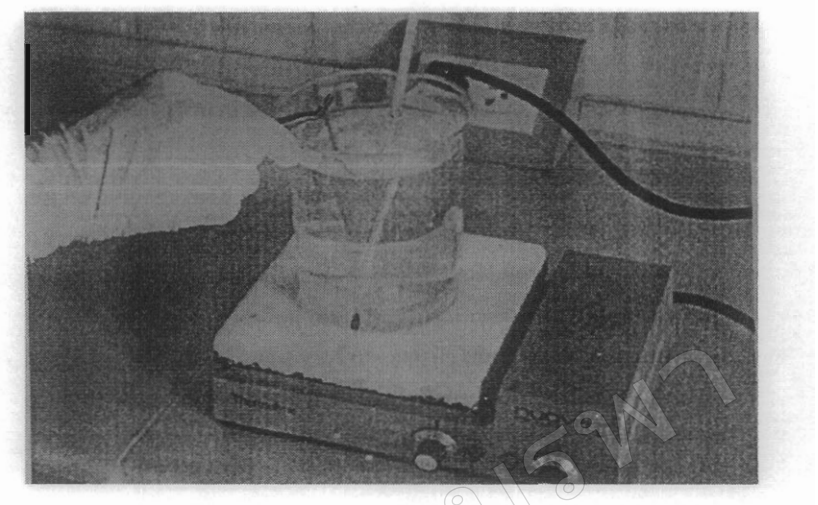
4.1.7 การละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

การละลายหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในการผสมเทียม ด้วยเครื่องละลายน้ำเชื้อโดยตั้งบีกเกอร์เติมน้ำบนเครื่องให้ความร้อนแบบตั้งอุณหภูมิได้ (Hot plate) หรือใช้อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (Water bath) ตั้งอุณหภูมิไว้ตามที่กำหนดซึ่งส่วนใหญ่อยู่ที่ 35-40°C ซึ่งหลอดฟางใช้เวลาประมาณ 8-10 วินาที ขณะที่หลอดแช่แข็งจะใช้เวลาประมาณ 1-2 min ในการทำให้น้ำเชื้อละลายหมดวางหลอดน้ำเชื้อที่ละลายบนน้ำแข็งเพื่อนำไปใช้ตรวจคุณภาพหรือผสมเทียมต่อไป (วัฒนะ ลีลากัทร, 2551)

Christensen and Tiersch (2005) ได้ทำการศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อ Channel catfish อุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อ 40°C นาน 5 วินาทีได้ผลดีที่สุด มีการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อเท่ากับ 59±11%

Sarvi et al. (2006) แช่แข็ง brown trout อุณหภูมิที่ใช้ที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อ 25°C นาน 30 min ได้ผลดีที่สุด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 11 การละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

ที่มา : วัฒนะ ลีลาภัทร (2551)

4.1.8 การเพิ่มอุณหภูมิ (Thawing)

การเพิ่มอุณหภูมิเป็นการละลายเซลล์ที่แข็งตัวไปใช้ประโยชน์ขณะทำการละลายเกล็ดน้ำแข็งที่อยู่นอกเซลล์จะละลายก่อนน้ำจากภายนอกเซลล์ย่อมแพร่เข้าสู่ภายในเซลล์ และขนาดของเซลล์จะเพิ่มขึ้นหลังการละลายถ้าอัตราการลดอุณหภูมิไม่เหมาะสมอาจทำให้เซลล์ปรับสภาพไม่ทัน หรือ อาจทำให้เซลล์แตกได้และประสบความล้มเหลวจากการแช่แข็ง

4.1.9 ปัจจัยที่มีผลกระทบต่ออัตราการมีชีวิตรอดหลังการแช่แข็ง

ปัจจัยที่ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์หรืออัตราการรอดชีวิตของเซลล์มีหลายประการเพราะการปฏิบัติงานทุกขั้นตอน นับตั้งแต่การเก็บตัวอย่างเซลล์ การปฏิบัติต่อตัวอย่างเซลล์ สูตรน้ำยาและการเตรียมน้ำยาสำหรับการเจือจาง หากพิจารณาอีกแง่หนึ่งพบว่าอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ภายหลังการแช่แข็ง และการละลายนั้นยังขึ้นอยู่กับ

1. ขนาดของเซลล์
2. อัตราการลดอุณหภูมิ
3. อัตราการแพร่ของผนังเซลล์

ปัจจัยทั้ง 3 ประการนี้มีความสัมพันธ์ กับปริมาณน้ำภายในเซลล์กล่าวคือ เราสามารถคำนวณหาปริมาณน้ำภายในเซลล์ได้ เพราะมีความผันแปรกับอุณหภูมิ ถ้าเราทราบพื้นที่ผิวของเซลล์อัตราการแพร่ของน้ำผ่านผนังเซลล์ และความผันแปรของอัตราการแพร่ของน้ำที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน และเป็นที่ยอมรับและยึดถือเป็นหลักปฏิบัติทั่วไปคือ

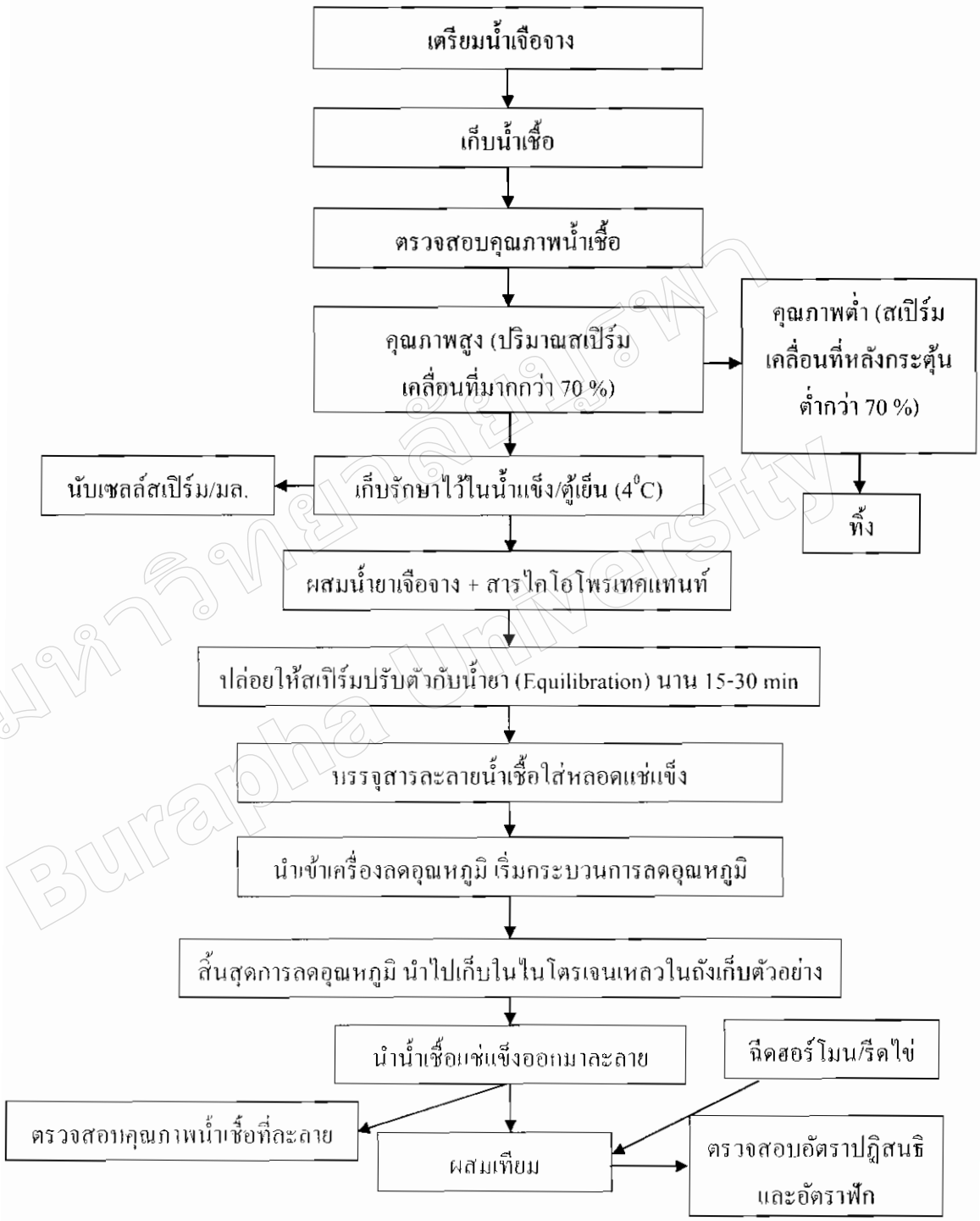
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1. เซลล์ที่มีขนาดใหญ่หรือ อัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวปริมาตรเซลล์มีค่าน้อยเมื่อนำมาแช่แข็งต้องลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ เพื่อเปิดโอกาสให้น้ำแพร่ออกนอกเซลล์ได้มากพอในขณะทำการแช่แข็งทั้งนี้เพื่อป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ถูกทำลาย

2. ถ้าธรรมชาติของผนังเซลล์เยื่อหุ้มเซลล์เป็นสาเหตุในการแพร่ของน้ำเข้าออกเซลล์ได้ยากอัตราการลดอุณหภูมิจึงจำเป็นต้องช้าลง เพื่อเปิดโอกาสให้น้ำแพร่ออกนอกเซลล์ได้มากพอตามที่กล่าวมาแล้วในข้อแรกสำหรับการเก็บรักษาแบบแช่แข็งสเปิร์มปลา นั้นไม่มีปัญหาเรื่องขนาดเซลล์ และอัตราการแพร่ของน้ำเข้าออกเซลล์ ทั้งนี้เพราะอสุจิมีขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10 ไมครอน (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง ปลาน้ำจืด และปลาทะเล มีขั้นตอนการปฏิบัติ ดังต่อไปนี้



ภาพที่ 12 วิธีปฏิบัติในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็ง

ที่มา : จัฑมณ ลีลาภัทร (2551)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University