วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา ปีที่ 25 (ฉบับที่ 2) พฤษภาคม – สิงหาคม พ.ศ. 2563
BURAPHA SCIENCE JOURNAL Volume 25 (No.2) May – August 2020
บทความวิชาการ

การเก็บน้ำเชื้อปลานิล (*Oreochromis niloticus*) แช่แข็ง : เทคนิคและการจัดการ

Cryopreservation of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Spermatozoa : Technique and Management

อานุภาพ วรรณคนาพล*
Arnuparp Wankanapol*
คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้
Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University

Received : 22 July 2019
Revised : 4 January 2019
Accepted : 6 January 2019

บทคัดย่อ

การเก็บน้ำเชื้อปลานิลแช่แข็งเป็นเทคโนโลยีชีวภาพที่ใช้เพื่อเก็บรักษาเชื้อพันธุกรรมในการนำมาใช้ประโยชน์ทางการอนุรักษ์ การผลิตลูกปลาในช่วงฤดูหนาวและการปรับปรุงสายพันธุ์ทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำให้ได้ผลผลิตดีขึ้น ซึ่งนับวันจะมีบทบาทมากยิ่งขึ้น ความสำเร็จของการเก็บน้ำเชื้อปลานิลขึ้นอยู่กับปัจจัยหลัก 2 ประการคือ 1) การจัดการการผลิตน้ำเชื้อเพื่อให้น้ำเชื้อที่ได้มีปริมาณและคุณภาพที่เหมาะสมในการนำไปเก็บรักษา เช่น ความสมบูรณ์ ความหนาแน่นและการเคลื่อนที่ เป็นต้น จำเป็นต้องทำความเข้าใจตั้งแต่อวัยวะสืบพันธุ์ องค์ประกอบของน้ำเชื้อ ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพและปริมาณของน้ำเชื้อปลานิล ปัจจุบันมีเทคโนโลยีทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสมัยใหม่ที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตน้ำเชื้อปลานิลอยู่มากมายในการนำไปประยุกต์เลี้ยงพ่อพันธุ์ให้ได้น้ำเชื้อที่มีคุณภาพมากยิ่งขึ้น และ 2) เทคนิคในการเก็บน้ำเชื้อปลานิลแช่แข็ง โดยเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (LN_2) ที่ -196 องศาเซลเซียส เป็นกระบวนการต่อเนื่องจากการจัดการการผลิตน้ำเชื้อ ซึ่งต้องอาศัยน้ำเชื้อที่มีคุณภาพ การคัดเลือกน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งที่เหมาะสมกับน้ำเชื้อปลานิล อัตราส่วนของน้ำเชื้อและน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสม รวมทั้งระยะเวลาการแช่ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อเพื่อลดการบาดเจ็บจากการแช่แข็ง ในขั้นตอนนี้หัวใจสำคัญที่สุดของการแช่แข็งคืออัตราการลดอุณหภูมิ (cooling) และการละลาย (thawing) น้ำเชื้อปลานิล เพื่อให้คุณภาพน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งแล้วมีคุณภาพใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสดมากที่สุด บทความนี้จึงได้รวบรวมวิธีการจัดการการผลิตน้ำเชื้อและเทคนิคการนำน้ำเชื้อปลานิลมาทำการแช่แข็งเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในด้านต่าง ๆ ต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ: น้ำเชื้อ ปลานิล การแช่แข็ง เทคนิค การจัดการ

*Corresponding author. E-mail : doii36@yahoo.com

Abstract

Nile tilapia spermatozoa cryopreservation is one of the most promising biotechnologies used for germplasm collection to promote conservation, produce fingerlings in winter season and improve new aquaculture strain traits by selection breeding to get better production that are more important roles. The success of fish sperm storage depends on two major factors include 1) the management of milt collection consists of spermatozoa morphology, viability, density and motility must be understood. Moreover, the testis, sperm components and the factors related to enhance their quality should be known too. Currently, the advanced technologies relating to broodstock improvement have been applied to make tilapia male get better for sperm production and 2) The cryostorage technique of tilapia sperm in -196 Degree Celsius liquid nitrogen (LN_2) is the next procedure after sperm management. This requires the use of high-quality sperm, selection of suitable extender and cryoprotectant used for freezing of sperm, a suitable ratio of sperm and extender and an optimal equilibration time to minimize cryoinjuries. However, the cooling rate and thawing are the most important process to be concerned. This review article has gathered data from many reported papers to accomplish the procedure for tilapia sperm cryopreservation for future aquaculture utilization

Keywords: spermatozoa, Nile tilapia, cryopreservation, technique and management

บทนำ

ในปัจจุบันการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดโดยเฉพาะปลานิล (*Oreochromis niloticus*) มีบทบาทต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างกว้างขวางไปทั่วโลก ทำให้ปลานิลสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มีต้นกำเนิดจากทวีปแอฟริกาแพร่กระจายไปในแต่ละประเทศทั่วโลกส่งผลให้เกิดสายพันธุ์ใหม่ ๆ มากขึ้นเนื่องจากอิทธิพลและความแตกต่างของสภาพแวดล้อมนั้น ๆ การพัฒนาคุณภาพและปริมาณของเซลล์สืบพันธุ์ทั้งน้ำเชื้อและไข่จัดเป็นเป้าหมายหนึ่งในการปรับปรุงสายพันธุ์ปลานิล ซึ่งเทคโนโลยีทางชีวภาพด้านการเก็บเซลล์สืบพันธุ์แช่แข็งไครโอพรีเซอเวชั่น (cryopreservation) ในไนโตรเจนเหลว (LN_2) ที่อุณหภูมิต่ำมาก ๆ (- 196 องศาเซลเซียส) สามารถนำมาสนับสนุนการดำเนินการนี้ได้ โดยการช่วยลดพื้นที่การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ ลดต้นทุนด้านการจัดการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์เช่น การให้อาหาร การเก็บเกี่ยวและแรงงานให้ลดลงเนื่องจากใช้พื้นที่น้อยและสามารถ**เก็บน้ำเชื้อและไข่ได้**เป็นระยะเวลานานตราบเท่าที่ยังมีไนโตรเจนเหลว ที่สำคัญหากมีความจำเป็นในการใช้ประโยชน์สามารถนำออกมาใช้ได้ทันที โดยมีรายงานการวิจัยมากมายที่ประสบผลสำเร็จในการนำเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้หรือน้ำเชื้อปลานิลมาเก็บรักษาโดยวิธีการนี้ แต่ยังมีการนำเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียเช่น ไข่หรือตัวอ่อนปลานิลมาเก็บรักษาน้อยมาก (Wankanapol, 2012) เนื่องจากยังไม่มีรายงานความสำเร็จ จากเหตุผลเบื้องต้นนี้ชี้ให้เห็นว่าในปัจจุบันการเก็บน้ำเชื้อปลานิลแช่แข็งมีความเป็นไปได้มากกว่าการเก็บเซลล์สืบพันธุ์ชนิดอื่น ๆ แม้ว่าการเพาะขยายพันธุ์ปลานิลสามารถทำได้ง่าย สามารถเพาะขยายได้ตลอดปีแต่อย่างไรก็ตามในช่วงอุณหภูมิต่ำหรือในฤดูหนาวที่มีระยะเวลา 3 - 4 เดือน ส่งผลให้ผลผลิตลดลงเช่นเดียวกัน ทำให้ในช่วงเวลานี้การเก็บน้ำเชื้อปลานิลแช่แข็งซึ่งประสบผลสำเร็จแล้วมีโอกาสสนับสนุนผลผลิตในช่วงเวลานี้เพื่อให้มีผลผลิตต่อเนื่องได้ โดยสามารถนำ

น้ำเชื้อแช่แข็งของสายพันธุ์ต่าง ๆ จำหน่ายแก่ผู้ที่ต้องการเพื่อเอาไปผสมกับไข่ต่อไปเช่นเดียวกับน้ำเชื้อสัตว์บกเช่น วัวและหมู เป็นต้น ดังนั้นการทำความเข้าใจเกี่ยวกับเซลล์สืบพันธุ์ปลานิลเพศผู้หรือน้ำเชื้อนี้จึงเป็นสิ่งจำเป็นร่วมกันกับการจัดการเซลล์สืบพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพทั้งด้านคุณภาพและปริมาณ เพื่อให้ได้น้ำเชื้อที่มีคุณลักษณะที่ดีในด้านโครงสร้าง องค์ประกอบ โดยอาศัยปัจจัยที่อาจส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลานิล ร่วมกันกับการประมวลเทคนิคในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลานิลจากหลากหลายงานวิจัยเพื่อที่จะเป็นแนวทางจัดการที่เหมาะสมกับการเก็บสงวนรักษาน้ำเชื้อปลานิลไว้ในรูปของการแช่แข็งไครโอพรีเซอเวชั่นเพื่อใช้ในการอนุรักษ์ ร่วมกับผลิตนอกฤดูกาลและปรับปรุงพันธุกรรมของปลานิลทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไป

อวัยวะสืบพันธุ์และองค์ประกอบของน้ำเชื้อปลานิล (Tilapia gonad and sperm components)

1. <u>อวัยวะสืบพันธุ์ของปลานิลเพศผู้ (testis)</u>

อวัยวะสืบพันธุ์ของปลานิลเพศผู้ เรียกว่า ถุงอัณฑะ (testis) แบบ tubular อยู่ภายในตัวปลา โดยอยู่ต่ำกว่าไตและกระดูกสันหลังตามลำดับ มีลักษณะเป็นเส้นยาว 2 พู พื้นผิวเรียบ สีขาวครีม ทอดยาวจากส่วนหัวไปหางและไปเปิดที่ติ่งเพศ (urogenital papilla) ตรงส่วนปลายที่เรียกว่าช่องเพศ (urogenital pore) ที่มีลักษณะเรียวแหลม โดยส่วนใหญ่ปลานิลเพศผู้มีค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศต่ำ (gonado somatic index, GSI) ระหว่าง 0.07 – 2.38 % ของน้ำหนักตัว (Jarimopas *et al*., 1994) ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อปริมาณน้ำเชื้อที่ต่ำด้วยเช่นกัน

2. <u>องค์ประกอบของน้ำเชื้อปลานิล (tilapia sperm components)</u>

ปลานิล (*O. niloticus*) เพศผู้สามารถผลิตน้ำเชื้อต่อตัวได้เฉลี่ยเพียง 0.3 มล./กก. ซึ่งจัดว่ามีปริมาณที่ต่ำ จากรายงานของ Chao *et al*. (1987) พบว่าหากต้องการเพิ่มปริมาณน้ำเชื้อต่อตัวสามารถทำได้โดยผสมข้ามระหว่าง *O. niloticus* และ *O. aureus* สามารถเพิ่มปริมาณน้ำเชื้อต่อตัวสูงสุดถึง 3 มล./กก. ทั้งนี้สืบเนื่องจากพฤติกรรมเฉพาะตัวด้านการสืบพันธุ์ที่สามารถผสมพันธุ์ได้ตลอดทั้งปี (year round) อัณฑะจึงผลิตน้ำเชื้อครั้งละน้อย ๆ แต่มีความถี่ในการผลิตน้ำเชื้อบ่อยครั้งยิ่งขึ้น ซึ่งเหมาะสมกับความดกไข่ของปลานิลเพศเมียที่มีปริมาณน้อย (300 – 1,500 ฟอง/แม่ปลาหนึ่งตัว)

2.1. สัณฐานวิทยาของอสุจิปลานิล (spermatozoa morphology) สัณฐานลักษณะของเชื้ออสุจิปลานิลโดยภาพรวมมีความยาวทั้งหมดเฉลี่ยประมาณ 23.7 µm ซึ่งหากเปรียบเทียบกับขนาดของอสุจิปลาไน (*Cyprinus carpio*) จะมีความยาวน้อยกว่า (Psenicka *et al*., 2009) โดยสามารถแบ่งส่วนประกอบออกเป็นสามส่วนหลัก ๆ ดังนี้ 1) ส่วนหัว (head) มีรูปร่างค่อนข้างกลม (round head) ภายในประกอบด้วยนิวเคลียส ส่วนหัวนี้มีขนาดยาวและกว้างเฉลี่ยประมาณ 1.66 - 2.18 µm และ 1.5 – 1.89 µm ตามลำดับ 2) ส่วนกลาง (middle piece) มีลักษณะเป็นทรงกระบอก (cylindrical) สั้น มีความยาวและกว้างเฉลี่ยประมาณ 0.77 µm และ 0.98 µm ตามลำดับ ภายในประกอบด้วย centriole และ mitochondria ที่ใช้เป็นแหล่งพลังงานในการเคลื่อนที่ของหาง และ 3) ส่วนหาง (tail) มีลักษณะเป็นเส้นยาว (flagellum) อยู่หนึ่งเส้น ความยาวเฉลี่ยประมาณ 16.92 - 20 µm ซึ่งจากสัณฐานนี้ชี้ให้เห็นว่าอสุจิปลานิลมีขนาดเล็กซึ่งทำให้มีการเคลื่อนที่ (motility) และความเร็วในการเคลื่อนที่ (velocity) เหมาะกับปริมาณความดกไข่ (fecundity) เฉลี่ยต่อตัวที่ต่ำ (300 – 1,500 ฟอง/แม่ปลาหนึ่งตัว) และขนาดของช่องเปิดของไข่ที่เรียกว่าไมโครไพล์ (micropyle) (บริเวณที่น้ำเชื้อเข้าไปปฏิสนธิกับไข่) ของปลานิลที่มีลักษณะเป็นรูปทรงกรวย (funnel shape depression) ซึ่งแตกต่างกับปลาไนที่มีความดกไข่สูงเนื่องจากไม่มีพฤติกรรมดูแลไข่ ซึ่งชี้ให้เห็นว่า

ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อขนาดของอสุจิขึ้นอยู่กับชนิดของปลา ลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์และพฤติกรรมการผสมพันธุ์และการดูแลไข่

2.2. น้ำเลี้ยงน้ำเชื้อ (seminal fluid หรือ seminal plasma) ในน้ำเชื้อปลานิลประกอบไปด้วยน้ำเลี้ยงน้ำเชื้อที่ใสไม่มีสี ซึ่งมีเชื้ออสุจิแขวนลอย (suspended) อยู่ทำให้มีสีขาวครีมหรือเทาและมีความเหนียว มีกลิ่นคาว หากพบว่าอสุจิมีสีขาวครีมมักพบว่ามีความหนาแน่น (density) และมีค่าความเข้มข้น (osmolality) ของน้ำเชื้อสูงกว่าสีเทา โดยทั่วไปน้ำเชื้อปลานิลมีค่าความเข้มข้นต่ำเฉลี่ยประมาณ 300 mOsmol kg^{-1} ซึ่งใกล้เคียงกับปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) (269 – 289 mOsmol kg^{-1}) (Verma *et al*., 2009) และปลาหมอไทย (*Anabas testudineus*) (390 - 405 mOsmol kg^{-1}) ซึ่งเชื้ออสุจิที่ความเข้มข้นนี้จะยังไม่เคลื่อนที่ (immotile) จนกว่าจะถูกเจือจางในสารละลาย hypotonic ให้มีความเข้มข้นน้อยกว่า 200 mOsmol kg^{-1} มากระตุ้น สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีค่าเฉลี่ยที่ประมาณ 6.2 - 8.4 (Chao *et al*., 1987) มีผลมาจากปริมาณ CO_2 ในถุงอัณฑะ ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับปลาไน (Nahiduzzaman *et al*., 2014) และปลายี่สกเทศ ซึ่งจากข้อมูลนี้ชี้ให้เห็นว่าค่าความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงน้ำเชื้อของปลาน้ำจืดในกลุ่มเดียวกันโดยทั่วไปจะมีค่าใกล้เคียงกัน หากต้องการเก็บรักษาน้ำเชื้อภายหลังจากรีดออกมาแล้วในรูปที่อสุจิยังไม่เคลื่อนที่ต้องปรับสภาพแวดล้อม โดยคัดเลือกน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ (extender) ให้มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับค่าความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงน้ำเชื้อปลานิลแต่หากต้องการให้เชื้ออสุจิเคลื่อนที่ควรต้องปรับสภาพแวดล้อมหรือความเข้มข้นของน้ำเชื้อให้เปลี่ยนไปจากความเข้มข้นเดิมโดยใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อให้มีความเข้มข้น (osmolality) ต่ำลง

2.3. องค์ประกอบอิออน (ionic composition) ภายในน้ำเลี้ยงน้ำเชื้อปลานิลพบว่ามีปริมาณโซเดียมอิออน (Na^+) (167.2 mM) เข้มข้นมากที่สุด รองลงมาคือ โปแตสเซียมอิออน (K^+) (64.3 mM) แคลเซียมอิออน (Ca^{2+}) (2.4 mM) และแมกนีเซียมอิออน (Mg^{2+}) (2.0 mM) ตามลำดับ โดยเฉพาะ Na^+ จัดว่ามีความเข้มข้นใกล้เคียงกับปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) สูงกว่าปลาไน (*Cyprinus carpio*) แต่ต่ำกว่าปลาตะเพียนขาว (*Barbonymus gonionotus*) สำหรับ K^+ สูงกว่าปลาดุกอุยและปลาตะเพียนขาว (Rashid *et al*., 2019) สำหรับ Ca^{2+} และ Mg^{2+} มีค่าใกล้เคียงกับปลาดุกอุยและตะเพียนขาว โดยเฉพาะความเข้มข้นของ Na^+, K^+ หากมีความเข้มข้นสูงเชื่อว่าเป็นปัจจัยสำคัญร่วมกับแรงดันออสโมติกในการควบคุมการเคลื่อนที่และความเร็วของการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อแต่อาจสำคัญน้อยกว่าค่าความเข้มข้น (osmolality) นอกจากนี้ Ca^{2+} มีความจำเป็นมากเนื่องจากสามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลานิลให้ยาวนานขึ้นได้ (Linhart *et al*., 1999) ในขณะที่ Mg^{2+} มีบทบาทรองในการเป็นกลไกของการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลา (Cosson, 1999) น้ำเลี้ยงน้ำเชื้อนี้หากมีการปนเปื้อนของเลือด แบคทีเรีย ปัสสาวะหรือสิ่งสกปรกอื่น ๆ สูงจะทำให้ Na^+ และ K^+ ในน้ำเลี้ยงน้ำเชื้อต่ำลง ส่งผลให้คุณภาพของน้ำเลี้ยงน้ำเชื้อต่ำลง สามารถแก้ไขได้โดยการผสมเกลือแกง (NaCl) 0.8 – 0.9 % ลงไป ปริมาณของอิออนนี้สามารถนำมาพัฒนาเทคนิคในการผสมเทียมที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อ (motility) ให้ว่ายน้ำได้รวดเร็วและมีชีวิตได้นานยิ่งขึ้น จนสามารถเข้าปฏิสนธิกับไข่เพิ่มอัตราการปฏิสนธิได้เพิ่มขึ้นได้ (Ciereszko *et al*., 2000)

<u>ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพและปริมาณของน้ำเชื้อปลานิล (Factors influencing sperm volume and concentration)</u>

ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อปลาประกอบด้วย ปัจจัยภายใน เช่น อายุและขนาดของพ่อแม่พันธุ์ และปัจจัยภายนอก เช่น อุณหภูมิ สารอาหาร ความเครียดและปฏิสัมพันธ์ทางสังคม เป็นต้น ซึ่งสามารถอธิบายได้ดังนี้

1. อายุ (age) สำหรับปลานิลสามารถผลิตน้ำเชื้อได้ตั้งแต่อายุประมาณ 3 - 4 เดือนขึ้นไป โดยช่วงอายุของการใช้พ่อพันธุ์ในการผลิตลูกปลานิลไม่ควรเกิน 3 ปีก็ควรปลดระวาง สอดคล้องกับ Jamenez & Bolivar (2018) ที่พบว่าผลผลิตและคุณภาพของลูกปลานิลจากพ่อแม่พันธุ์ที่มีอายุ 8 เดือน, 1 และ 2 ปีไม่แตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพ่อปลาที่มีอายุมากขึ้นย่อมมีแนวโน้มต่อคุณภาพของน้ำเชื้อลดลงอาทิเช่น ความผิดปกติของน้ำเชื้อมากขึ้น (Cosson, 1999) ซึ่งส่งผลโดยตรงกับอัตราการเคลื่อนที่ (motility) ของเชื้ออสุจิที่ลดลง

2. ขนาดหรือน้ำหนัก (weight) ปลานิลเพศผู้ขนาดความยาวเริ่มต้นเฉลี่ย 6.5 ซม. หรือน้ำหนักมากกว่า 100 ก. ก็สามารถผลิตน้ำเชื้อได้แล้ว (Department of Fisheries, 2010) นอกจากนี้ขนาดน้ำหนักที่แตกต่างกันของพ่อพันธุ์ปลานิลไม่ได้มีผลต่อปริมาณของน้ำเชื้อ (sperm volume) โดยปลานิลจะมีปริมาณน้ำเชื้อต่ำเฉลี่ยประมาณ 0.30 – 0.40 มล./กก. ซึ่งมีปริมาณน้อยกว่าปลายี่สกเทศที่มีปริมาณเฉลี่ย 6.6 - 8.9 มล./กก. (Verma *et al*., 2009) แต่จะมีผลต่อความเข้มข้นหรือความหนาแน่นของน้ำเชื้อ (sperm concentration) โดยเฉลี่ยในปลาขนาดใหญ่ (600 – 1,000 ก.) มีปริมาณ 2.44 – 3.59 x 10^9 เซลล์/มล. ส่วนในปลาขนาดเล็ก (250 - 500 ก.) มีปริมาณ 1.66 x 10^9 เซลล์/มล. (Paulino *et al*., 2016) ซึ่งมีความหนาแน่นต่ำกว่าปลาไนและปลายี่สกเทศ (*Cyprinus carpio* และ *Labeo rohita*) (Verma *et al*., 2009 และ Nahiduzzaman *et al*., 2014) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากพฤติกรรมการผสมพันธุ์กับค่าความดกไข่ โดยปลามีความดกไข่สูงควรที่จะมีความหนาแน่นของเชื้ออสุจิสูง ในขณะเดียวกันปลาที่มีความดกไข่ต่ำควรมีความหนาแน่นต่ำเช่นกัน การที่เชื้ออสุจิปลานิลมีความหนาแน่นน้อยเนื่องมาจากปริมาณความดกไข่ของปลานิลน้อยกว่าปลาไนและยี่สกเทศ (Piironen & Hyvarinen, 1983) นั่นเอง

3. อุณหภูมิ (temperature) มีอิทธิพลต่อความหนาแน่นของน้ำเชื้อด้วยเช่นกัน (Godinho, 2007) ซึ่งช่วงอุณหภูมิในการเลี้ยงที่เหมาะสมสำหรับพ่อพันธุ์ปลานิลคือ 28 – 32 องศาเซลเซียส แต่มีรายงานว่าที่อุณหภูมิ 20 - 50 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ต่ำสุดและสูงสุดของการเคลื่อนที่ของเชื้ออสุจิปลานิล (Dzyuba *et al*., 2019) อุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลานิลจึงควรพิจารณาปัจจัยความสมบูรณ์ของตัวปลาแต่ละตัว ลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์ วิธีการเก็บและฤดูกาลเก็บประกอบด้วย ปัจจัยเหล่านี้เป็นตัวแปรสำคัญในการควบคุมคุณภาพเชื้ออสุจิได้ (Borges *et al*., 2005) ในขณะที่อุณหภูมิสูงขึ้นจะส่งผลให้เชื้ออสุจิ เคลื่อนที่ได้รวดเร็วยิ่งขึ้น (Dzyuba *et al*., 2019) แต่จะลดระยะเวลาการเคลื่อนที่ของเชื้ออสุจิลง นอกจากนี้ยังช่วยกระตุ้นให้ปลานิลกินอาหารได้ดียิ่งขึ้นซึ่งส่งผลต่อความสมบูรณ์ของเซลล์สืบพันธุ์ทางอ้อม แต่ในทางตรงกันข้ามอุณหภูมิที่ต่ำลงส่งผลให้เชื้ออสุจิเคลื่อนที่ลดลงรวมกับการกินอาหารลดลงด้วยเช่นกัน

4. สารอาหาร (nutritions) ปลานิลเป็นปลากินพืชและเนื้อ (omnivorous) มีความต้องการโปรตีนสูงในการเจริญเติบโต ซึ่งปริมาณโปรตีนที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและสร้างเซลล์สืบพันธุ์ควรพิจารณาอายุและขนาดประกอบด้วย โดยปลาขนาดเล็กมีความต้องการโปรตีนสูงกว่าปลาขนาดใหญ่ โดยทั่วไปปริมาณโปรตีนควรอยู่ที่ระดับ 25 – 45 % ไขมัน 5 - 12 % คาร์โบไฮเดรต 20 - 50 % ใยอาหาร $\leq$ 6 % กรดไขมันกลุ่มไลโนเลอิก (n-6) และไลโนเลนิก (n-3) 0.5 -1.0 % แคลเซียม 0.3 % และฟอสฟอรัส 0.7 % (Plaipetch, 2016) นอกจากนี้ปริมาณการให้อาหารตามร้อยละของน้ำหนักตัว (% BW) และความถี่ (frequency) ในการให้อาหารต่อวันมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตเช่นกัน โดยในปลาขนาดเล็กควรให้อาหารร้อยละต่อน้ำหนักตัว และความถี่ในการให้อาหารมากกว่าปลาขนาดใหญ่

5. ความเครียดและปฏิสัมพันธ์ทางสังคม (stress and social interaction) ความเครียดของปลานิลเกิดขึ้นจากการจัดการที่ไม่เหมาะสม เช่น การกำหนดความหนาแน่นต่อพื้นที่ (stocking density) ร่วมกับคุณภาพน้ำที่ไม่เหมาะสม โดยทั่วไป

หากเลี้ยงเพื่อเป็นปลาเนื้อในบ่อดินควรใช้ความหนาแน่นที่ 1 - 3 ตัว/ตารางเมตร ในกระชัง 50 – 100 ตัว/ตารางเมตร แต่หากต้องการเลี้ยงเพื่อเป็นพ่อพันธุ์ควรลดความหนาแน่นลงเช่น 1 ตัว/ 4 ตารางเมตร ในส่วนของปฏิสัมพันธ์ทางสังคม ปลานิลเพศผู้มีพฤติกรรมก้าวร้าวในช่วงการผสมพันธุ์จึงไม่ควรนำมาปล่อยจำนวนมากในช่วงเวลานี้ นอกจากนี้การนำปลานิลเพศเมียมากระตุ้นมีส่วนช่วยกระตุ้นให้ปลานิลเพศผู้ผลิตน้ำเชื้อมีความสมบูรณ์พร้อมผสมพันธุ์ได้

เทคโนโลยีทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสมัยใหม่ที่มีอิทธิพลต่อน้ำเชื้อปลานิล (Influence of advance aquaculture technology effected tilapia sperm)

1. *ระบบการเลี้ยง (cultural system)* ในปัจจุบันระบบการเลี้ยงเป็นส่วนหนึ่งในการสร้างพ่อพันธุ์ปลานิลที่ดี ระบบไบโอฟล็อค (biofloc, BFT) เป็นระบบปิดที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม ใช้พื้นที่น้อยแต่ได้ผลผลิตต่อหน่วยสูงกว่าการเลี้ยงปกติ (ในบ่อดิน) 30 – 40 เท่า โดยการหมุนเวียนธาตุอาหารต่าง ๆ ในบ่อเลี้ยงปลาโดยเฉพาะไนโตรเจน ทำให้เกิดตะกอนจุลินทรีย์ชีวภาพขนาดประมาณ 0.1 – 2 มม. (Avnimelech, 2009) ที่สามารถเป็นอาหารปลาได้ซึ่งมีรายงานว่ามีโปรตีนสูงถึง 25 % แต่ระบบนี้เป็นระบบที่ใช้ความหนาแน่นต่อพื้นที่สูงกว่าปกติ 10 – 17 เท่า ซึ่งหากต้องการเลี้ยงเพื่อเป็นพ่อพันธุ์อาจต้องลดปริมาณความหนาแน่นต่อพื้นที่ลดลงเล็กน้อย ส่วนอีกระบบหนึ่งคือระบบหมุนเวียนน้ำ (recirculation aquaculture system, RAS) เป็นระบบปิดที่มีการบำบัดน้ำให้เหมาะสมก่อนนำมาใช้ใหม่ มีความแตกต่างกับ BFT คือไม่มีการสร้างอาหารธรรมชาติในระบบเพียงแต่มีระบบบำบัดน้ำให้มีคุณภาพที่เหมาะสมแล้วนำกลับมาใช้ใหม่ ระบบนี้มีการเลี้ยงที่หนาแน่นเช่นกัน ดังนั้นหากต้องการนำมาผลิตพ่อพันธุ์อาจต้องลดปริมาณความหนาแน่นต่อพื้นที่ลงเช่นกัน หากเปรียบเทียบสองระบบข้างต้นนี้กับการเลี้ยงปลานิลมีรายงานพบว่าระบบ BFT มีผลผลิตต่อหน่วย น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว อัตราการเจริญเติบโต อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราการแลกเนื้อ ดีกว่าระบบ RAS (Luo *et al*., 2014)

2. *สารเสริมอาหาร (feed additives)* ควรเน้นสารอาหารโดยเฉพาะโปรตีน (protein) และไขมัน (lipid) ที่มีความสำคัญต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของปลานิลมาก หากปลานิลได้รับพลังงานจากกระบวนการเมตาโบลิสซึมทางชีวเคมีจากกรดอะมิโน (amino acid) และกรดไขมัน (fatty acid) ที่เป็นหน่วยย่อยของโปรตีนและไขมันในการสร้างส่วนต่าง ๆ ฮอร์โมนและซ่อมแซมส่วนต่าง ๆ ของร่างกายโดยเฉพาะระบบสืบพันธุ์เพียงพอกับขนาดและอายุ นอกจากการเจริญเติบโตจะดีแล้วอวัยวะสืบพันธุ์ก็จะพัฒนาขึ้นเช่นกัน โดยเฉพาะกรดอะมิโนที่จำเป็น (essential amino acid) และกรดไขมันที่จำเป็น (essential fatty acids) ชนิดไม่อิ่มตัว ปลาไม่สามารถสังเคราะห์ได้เอง ต้องได้รับจากอาหารเท่านั้นเป็นต้นกำเนิดของ prostaglandin ที่ช่วยตกไข่และสร้างน้ำเชื้อ (Hemchun, 2013) และ cholesterol ในการสร้างฮอร์โมนเพศ นอกจากนี้ยังมีรงควัตถุ (pigment) ต่าง ๆ เช่น Beta-carotene, Chlorophyll-a และวิตามิน โดยเฉพาะวิตามิน E ซึ่งช่วยให้ระบบสืบพันธุ์ปกติและการฟักไข่เป็นต้น มีรายงานการใช้สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินแห้ง *Spirulina platensis* สามารถช่วยในการเจริญเติบโตและเพิ่มขนาดของอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) ของปลานิล คาร์ฟและดุกเทศสูงขึ้น (Promya *et al*., 2012) เนื่องจากมีโปรตีนได้แก่ Phycocyanin, Allophycocyanin และรงควัตถุสีเหลืองและสีเขียว Beta-carotene, Chlorophyll-a และกรดไขมันจำเป็นไม่อิ่มตัว (Promya & Saetun, 2005) ซึ่งเป็นต้นกำเนิดของ Gamma linolenic acid (GLA) ที่เป็นอนุพันธ์ของกรดไขมันที่มีหน้าที่ในการควบคุมระบบสืบพันธุ์ นอกจากนี้ Sermwattanakul & Bamrungtham (2000) ก็พบว่าการเสริมสาหร่ายสไปรูลินาในอาหารเลี้ยงปลาน้ำจืดมีผลต่อการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์และการเจริญพันธุ์เช่นกัน สำหรับการผสมสาหร่ายสีเขียว แห้ง

Cladophora glomerata มีผลให้ระดับโปรตีนในเนื้อปลานิลสูงขึ้นกว่าปกติ (Ruangsomboon & Choochote, 2014) การเสริม *Schizochytrium* sp. ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการใช้อาหารและเพิ่มกรดไขมันที่จำเป็นในปลา channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ได้ (Li *et al.*, 2010) ในส่วนของการเพิ่ม glycerine ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในอาหารปลานิลที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการเผาผลาญอาหารทำให้พบปริมาณโปรตีนในเนื้อปลานิลและอัณฑะในระดับที่สูง (Mewe *et al.*, 2016) สำหรับการเสริม Polyunsaturated fatty acid (PUFAs) จะเพิ่มคุณค่าของอาหารสำเร็จรูปทำให้เพิ่มศักยภาพของระบบสืบพันธุ์โดยเฉพาะเพศผู้ให้ดียิ่งขึ้น (Astuarino *et al.*, 2001) นอกจากนี้การเพิ่มน้ำมัน (oil) เช่น linseed oil, soybean oil, fish oil และ corn oil พบว่าไม่ทำให้การเคลื่อนที่และระยะเวลาการเคลื่อนที่ของอสุจิปลานิลสดแตกต่างกัน (Navarro *et al.*, 2014) จากรายงานข้างต้นชี้ให้เห็นว่าสารเสริมอาหารจากวัตถุดิบจากธรรมชาติหรือจากแหล่งอื่น ๆ ยังมีหลายชนิด แต่ละชนิดมีคุณสมบัติจำเพาะในการปรับปรุงคุณภาพน้ำเชื้อปลานิลแตกต่างกันออกไป ซึ่งสามารถเลือกนำมาผสมในสูตรอาหารเพื่อเพิ่มคุณภาพของน้ำเชื้อปลานิลให้ดียิ่งขึ้นต่อไปได้

*3. การพัฒนาสายพันธุ์และการแปลงเพศ (strain development and sex reversal) เป็น*อีกปัจจัยที่อาจส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลานิลได้ Fauvel *et al.* (2010) ชี้ให้เห็นว่าปลาที่ผ่านการคัดเลือกสายพันธุ์หรือถูกนำมาเลี้ยงในบ่อเลี้ยงจนกลายเป็นปลาที่ถูกเปลี่ยนสภาพจากปลาธรรมชาติเป็นปลาเลี้ยงอาจมีผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อ ดังที่พบในปลา Salmon และ *Heterobranchus longifilis* เป็นต้น (Zohar, 1996 และ Agnese, 1995) ในขณะที่ปลา *Poecilia reticulate* เพศผู้ที่สวยงามมีน้ำเชื้อปริมาณน้อยกว่าตัวที่มีความสวยงามน้อยกว่าและมีน้ำเชื้อที่เคลื่อนที่ได้ดีกว่า (Evans, 2010) ซึ่งชี้ให้เห็นความสวยงามทางเพศกับคุณภาพของน้ำเชื้อมีพื้นฐานมาจากความแปรปรวนทางพันธุกรรม สำหรับการเหนี่ยวนำโครโมโซม (ploidies) ส่งผลต่อความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อด้วยเช่นกัน เช่น ในปลา tench (*Tinca tinca*) เพศผู้ และ Prussian carp (*Carassius gibelio*) ที่มีโครโมโซมแบบ triploid (3n) ทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับ diploid (2n) ปกติ นอกจากนี้ในปลา Atlantic cod มีรายงานพบว่าความเร็วในการเคลื่อนที่ของเชื้ออสุจิปลา triploid ต่ำกว่า diploid ปกติ (Peruzzi *et al.*, 2009) เช่นกัน สำหรับการปรับปรุงสายพันธุ์ Almeida *et al.* (2016) พบว่าปลานิลที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ส่งผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อแตกต่างกัน เช่น สายพันธุ์ Chitralada มีอัตราการเคลื่อนที่ของเชื้ออสุจิและความเร็วในการเคลื่อนที่มากกว่าสายพันธุ์ Premium aquabel และ Supreme (67, 63 และ 48 μm s^{-1}) ตามลำดับ แต่ สายพันธุ์ Supreme มีความหนาแน่นของน้ำเชื้อมากที่สุดตามมาด้วย Chitralada และ Premium aquabel (7.76 x 10^9, 3.82 x 10^9 และ 3.29 x 10^9 เซลล์/มล.) ตามลำดับ นอกจากนี้ความสมบูรณ์ของน้ำเชื้อแต่ละสายพันธุ์หลังจากแช่แข็งแล้วพบว่าน้ำเชื้อของสายพันธุ์ Supreme มีความสมบูรณ์มากที่สุดตามด้วย Chitralada และ Premium aquabel ตามลำดับ แต่สำหรับความสมบูรณ์ของเยื่อบุเซลล์ ฟังก์ชั่นการทำงานของไมโตคอนเดรียและความสมบูรณ์ของดีเอนเอสายพันธุ์ Supreme มีค่าสูงที่สุด ตามด้วย Premium aquabel และ Chitralada ตามลำดับ ผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าปลานิลที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์จากหลากหลายสายพันธุ์มีส่วนช่วยให้ปริมาณและคุณภาพของเชื้ออสุจิแตกต่างกันได้เนื่องจากได้รับลักษณะเด่นที่ถ่ายทอดมาหลากหลาย แต่ในกรณีปลานิลที่มีการเหนี่ยวนำโครโมโซมจากการแปลงเพศ (sex reversal) ให้เป็นเพศผู้ที่มีโครโมโซมแบบ XX โครโมโซมเพศผู้ปกติแบบ XY และโครโมโซมแบบ YY ที่เรียกว่าซูเปอร์เมล (supermale) Gennotte *et al.* (2012) รายงานว่าขนาดของเชื้ออสุจิของทั้ง 3 รูปแบบมีขนาดไม่แตกต่างกัน โดยค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (gonadosomatic index, GSI) ความหนาแน่นของเชื้ออสุจิและระยะเวลาของการเคลื่อนที่ของอสุจิมีค่าไม่ต่างกัน ชี้ให้เห็นว่าค่า GSI และความหนาแน่นของเชื้ออสุจิมีค่า

ใกล้เคียงกับปลานิลเพศผู้ปกติ ในกรณีนี้เป็นไปได้ว่าการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมไม่ได้เกิดมาจากการคัดเลือกลักษณะเด่นของหลากหลายสายพันธุ์ให้แสดงออกแต่เกิดจากการแปลงเพศโดยการใช้ฮอร์โมนซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะตัว (individual) แล้วจึงมาจับคู่ผสมพันธุ์เพื่อให้การจับคู่โครโมโซมเป็นไปตามที่ต้องการทำให้ส่งผลต่อคุณภาพเซลล์สืบพันธุ์ปลานิลน้อย

เทคนิคในการเก็บน้ำเชื้อปลานิลแช่แข็ง (Nile tilapia sperm cryopreservation techniques)

ปลานิลเพศผู้สามารถผลิตน้ำเชื้อได้ตลอดทั้งปี (year round) เนื่องจากการเพาะปลานิลสามารถทำได้ตลอดทั้งปี ดังนั้นเทคนิคการคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่สมบูรณ์มาเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งสามารถทำได้ดังนี้

1. *การคัดเลือกพ่อพันธุ์ (male breeder selection)* พ่อพันธุ์ปลานิลที่ดีควรผ่านการจัดการด้านการเลี้ยงให้สมบูรณ์เพศ มีดัชนีความสมบูรณ์เพศ (GSI) สูง มีลักษณะภายนอกที่สมบูรณ์ปราศจากบาดแผลหรือความผิดปกติของร่างกาย สีตามตัวเข้มสดใส มีความแข็งแรงสังเกตได้จากพฤติกรรมการว่ายน้ำที่ปราดเปรียว หากพิจารณาที่ติ่งเพศ (urogenital papilla) จะขยายตัวขึ้น มีสีแดงอมชมพูและมีเมือกมากขึ้นเล็กน้อย ที่สำคัญก่อนการคัดมาเก็บน้ำเชื้อควรวางแผนงดให้อาหารไม่ต่ำกว่า 8 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของอุจจาระ ในกรณีที่พ่อปลายังมีความพร้อมไม่เต็มที่อาจทำการกระตุ้นการสร้างน้ำเชื้อโดยใช้การฉีดฮอร์โมนกระตุ้นซึ่งสามารถใช้ต่อมใต้สมอง (Pituitary gland, PG) หรือฮอร์โมนสังเคราะห์ (LHRHa) ร่วมกับ domperidone กระตุ้นได้

2. *การรีดน้ำเชื้อปลานิล (stripping)* การจับพ่อพันธุ์ควรลดการสร้างความเครียดแก่ปลา โดยไม่นำปลามาขังรวมกันจำนวนมาก ๆ จากนั้นใช้สวิงตักปลาที่ทำมาจากวัสดุที่นิ่มไม่ทำให้เกิดบาดแผลบริเวณผิวหนังหรือครีบของปลา แล้วใช้ผ้าสะอาดและแห้งปิดตา เช็ดตัวปลาให้แห้งและสะอาดเพื่อป้องกันการปนเปื้อน (contamination) ของน้ำ ปัสสาวะ เลือดและสิ่งสกปรกอื่น ๆ จากนั้นรีดบริเวณท้องใต้เส้นข้างลำตัวเบา ๆ เพื่อกำจัดปัสสาวะที่อาจปนเปื้อนลงในน้ำเชื้อออกไปให้หมดก่อน จากนั้นทำความสะอาดติ่งเพศด้วยเอธิลแอลกอฮอล์ (ethylalcohol) และเตรียมภาชนะในการเก็บน้ำเชื้อ วิธีการเก็บมีหลายวิธี แต่หลักการคือ เวลารีดน้ำเชื้อแล้วควรให้น้ำเชื้อไหลเข้าสู่ภาชนะให้หมดไม่สูญเสียจากการหกหรือรีดออกนอกภาชนะบรรจุ โดยวิธีแรกสามารถทำได้โดยค่อย ๆ รีดท้องพ่อปลาช่วงเส้นข้างลำตัวหรือสูงกว่าเล็กน้อย โดยให้น้ำเชื้อไหลผ่านหลอดฟาง (straw) หรือแท่งแก้วแห้งที่นำไปเชื่อมต่อกับปลายติ่งเพศเพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำเชื้อ จนน้ำเชื้อไหลมาใส่หลอด Eppendorf tubes จนหมดจึงปิดฝาแล้วนำไปเก็บในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งไว้เพื่อรักษาคุณภาพน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ (10 – 20 องศาเซลเซียส) นอกจากนี้วิธีที่สองสามารถใช้หลอดฉีดยาไม่ใส่เข็ม (syringe) ดูดน้ำเชื้อที่ถูกรีดออกมา (Bozkurt & Yava**ş**, 2016) หรือวิธีที่สามใช้เครื่องมือที่เรียกว่า electroejaculation โดยใช้ rectal probe ในการเก็บน้ำเชื้อ (Shivaji *et al.*, 1998 และ Navarro *et al*., 2014) วิธีการเหล่านี้ช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำเชื้อปลานิลที่มีปริมาณน้อยอยู่แล้วจากการหกเลอะเทอะและป้องกันการปนเปื้อนได้ดี ในกรณีที่พ่อปลาค่อนข้างก้าวร้าวหรือดิ้นอยู่ตลอดเวลาอาจจำเป็นต้องใช้การสลบ (anaesthetic) แต่วิธีการสลบอาจมีผลต่อกระทบต่อคุณภาพของเชื้ออสุจิทำให้การเคลื่อนที่ของเชื้ออสุจิลดลงหากใช้ชนิดยาสลบและความเข้มข้นที่สูงเกินไป (Wagner *et al*., 2002)

3. การประเมินปริมาณและคุณภาพน้ำเชื้อ (sperm quantity and quality evaluation) สามารถใช้วิธีมาตรฐานได้ 2 แบบ คือ

3.1. แบบดั้งเดิม (convention) เป็นการประเมินภายใต้กล้องไมโครสโคป (microscope) โดยใช้ในการประเมินด้านปริมาณ (quantity) ผ่านสไลด์นับเม็ดเลือด (heamocytometer) ในการวิเคราะห์ความหนาแน่น (เซลล์/มล.) ของเชื้ออสุจิ สำหรับด้านคุณภาพ (quality) ที่ประกอบไปด้วย 1) การประเมินการมีชีวิต (viability) ของเชื้ออสุจิผ่านการย้อมสี eosin – nigrosin หากเชื้ออสุจิติดสีแดง ชมพูแดงหรือสีม่วงเข้มแสดงว่าเป็นเชื้อที่ตายแล้วส่วนที่ไม่ติดสีคือมีชีวิตอยู่ ซึ่งหากมีร้อยละของการมีชีวิตต่ำกว่า 70 % (Guest, 1973) แสดงว่าเชื้ออสุจินี้ไม่เหมาะนำมาเก็บรักษาแบบแช่แข็ง นอกจากนี้ยังต้องประเมิน 2) อัตราการเคลื่อนที่ (motility) ซึ่งเชื้ออสุจิควรมีอัตราการเคลื่อนที่สามในสี่ส่วนหรือไม่ต่ำกว่า 75 % เช่นกัน และ 3) การประเมินระยะเวลาการเคลื่อนที่ (duration of motility) โดยการใช้สารละลายเจือจางหรือน้ำในการกระตุ้นการเคลื่อนที่แล้วจับเวลาจนกระทั่งเชื้ออสุจิหยุดการเคลื่อนที่ มีรายงานว่าเชื้ออสุจิปลานิลสามารถเคลื่อนที่ได้ในระยะเวลา 4 – 40 นาที (Chao *et al*., 1987; Mochida *et al*., 1999; Pinheiro *et al*., 2003) โดยสามารถคัดเลือกพ่อปลานิลที่พร้อมแต่มีขนาดและน้ำหนักแตกต่างกันได้เนื่องจากไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่และระยะเวลาการเคลื่อนที่ (Paulinno *et al*., 2016) แต่วิธีการประเมินแบบดั้งเดิมนี้ไม่สามารถวัดความเร็วในการเคลื่อนที่ (velocity) ที่เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญของการประเมินคุณภาพเชื้ออสุจิปลานิลได้ ทั้งนี้พบเทคนิคนี้ในการศึกษาน้ำเชื้อปลานิลของ Pewnane & Sodsuk (2003) และ Pewnane *et al*. (2004), Navarro *et al*. (2014) และ Bozkurt & Yavaş (2016) เป็นต้น

*3.2. แบบคอมพิวเตอร์หรือวิดีโอประมวลผล (**computer or video recorder**)* สามารถใช้วิเคราะห์ได้ทั้งด้านปริมาณและคุณภาพของน้ำเชื้อ มีข้อได้เปรียบเมื่อเทียบกับวิธีแบบดั้งเดิมคือ สามารถวัดตัวแปรต่าง ๆ ในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อได้ครบถ้วน รวมทั้งสามารถบันทึกข้อมูลไว้ตรวจสอบภายหลังได้ ตลอดจนมีความแม่นยำน่าเชื่อถือกว่าแบบแรก สามารถประเมินจำแนกทิศทางการเคลื่อนที่ (directions) รวมทั้งความเร็วในการเคลื่อนที่ (velocity) ของเชื้ออสุจิได้ซึ่งแบบดั้งเดิมไม่สามารถทำได้ แต่มีข้อเสียเปรียบคือมีราคาที่สูง ซึ่งพบในวิธีการศึกษาตามรายงานของ Asmad *et al.* (2011), Gennotte *et al*. (2012) และ Dzyuba *et al*. (2019) โดยใช้ computer assisted sperm analysis (CASA) ในการประเมินผลน้ำเชื้อปลานิล

4. การเตรียมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็ง (extenders และ cryoprotectants) น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อหรือ extender เป็นสารละลายที่ใช้สำหรับเจือจางน้ำเชื้อปลาเพื่อเพิ่มปริมาณและลดความหนาแน่นของน้ำเชื้อสด ไม่ควรมีคุณสมบัติกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเชื้ออสุจิ สารนี้ต้องมีค่าความเข้มข้น (osmolality) สารอาหาร (nutritional) และความเป็นกรดด่าง (pH) เหมาะสมใกล้เคียงกับน้ำเลี้ยงน้ำเชื้อของปลานิล โดยต้องประกอบไปด้วย NaCl และ KCl เป็นสารประกอบหลักและสารอื่น ๆ เป็นสารประกอบรองขึ้นอยู่กับสูตรที่คิดค้นขึ้นมา สำหรับสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งหรือ cryoprotectant เป็นสารที่ใช้ในการแลกเปลี่ยนกับน้ำภายในเซลล์ มีคุณสมบัติป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (ice crystal formation) และลดจุดเยือกแข็งให้ต่ำลงกว่าปกติ ซึ่งใน extender ต้องมีส่วนประกอบของ cryoprotectant นี้อยู่หนึ่งชนิดหรือมากกว่า ซึ่งสารนี้มีความจำเพาะกับชนิดของปลา (species specific)

มีรายงานการศึกษาสูตรน้ำยา extender ที่เหมาะสมกับน้ำเชื้อปลานิลหลายชนิด อาทิเช่น สารละลาย fish ringers (Chao *et al.*, 1987; Chao, 1991 และ Rana & Mcandrew, 1987) สารละลาย modified Cortland (Pewnane &

Sodsuk, 2003 และ Pewnane *et al*., 2004) และ tris citric acid yolk extender (TCAYE) (Asmad *et al*, 2011) (ตารางที่ 1) เป็นต้น สารเหล่านี้ใช้น้ำกลั่น (distilled water) เป็นตัวทำละลายเป็นหลัก แต่ปัจจุบันมีการใช้ Hank balance salt solution (HBSS) เป็นตัวทำละลายแทน ในการเจือจางน้ำเชื้อปลาหลายชนิด เช่น ปลานวลจันทร์เทศ (*Cirrhinus cirrhosis*) ซึ่งอาจนำมาประยุกต์ใช้กับปลานิลได้ (Ponchunchoovong *et al*., 2011)

ในส่วนของ cryoprotectant แบ่งได้ 2 รูปแบบคือ 1) แบบซึมผ่านได้ (permeable cryoprotectant) และ 2) แบบซึมผ่านไม่ได้ (non permeable cryoprotectant) ซึ่งรายงานส่วนใหญ่เลือกใช้แบบซึมผ่านได้มาทำการผสมกับ extender เป็นอันดับแรก เพื่อป้องกันการบาดเจ็บจากการแช่แข็ง (cryoinjuries หรือ chilling injury) จากการเกิดผลึกน้ำแข็ง (ice crystal formation) ภายในเซลล์น้ำเชื้อปลานิล ซึ่งรายงานส่วนใหญ่พบว่า methylalcohol (MeOH) เป็น cryoprotectant ที่มีความเหมาะสมกับน้ำเชื้อปลานิลมากที่สุด (Chao *et al.,* 1987; Chao, 1991; Pewnane *et al*., 2004; Rana & Mcandrew, 1987 และ Altunok *et al*., 2004) แต่สำหรับ dimethylsulfoxide (DMSO) (Pewnane & Sodsuk, 2003) และ dimethylacetamide (DMA) (Bozkurt & Yavaş, 2016) สามารถนำมาใช้ทดแทน MeOH ได้เช่นกัน (ตารางที่ 1) สำหรับความเข้มข้นของ cryoprotectant ควรใช้ที่ความเข้มข้นไม่เกิน 50 % (Mongkolpunya, 1993) เนื่องจากจะทำให้เกิดความเป็นพิษแทน (cryoprotectant toxicity) โดยเฉพาะ MeOH มีรายงานการใช้ความเข้มข้นต่ำในช่วง 5 – 15 % ขณะที่ DMSO และ DMA จะใช้ความเข้มข้นที่ต่ำเช่นกันคือ 10 % ซึ่งความเข้มข้นเหล่านี้เหมาะสมกับน้ำเชื้อปลานิลมากที่สุด นอกจากนี้ในบางรายงานมีการเพิ่ม cryoprotectant ชนิดที่ซึมผ่านไม่ได้เพื่อป้องกันเชื้ออสุจิจากภายนอก (ตารางที่ 2) เช่น ไข่แดง (yolk), glucose (Bozkurt & Yavaş, 2016), sucrose (Altunok *et al*., 2004) น้ำผึ้ง (honey) หรือน้ำนม (milk) ที่ความเข้มข้นต่ำด้วยเช่นกัน ในขณะที่ Navarro *et al*. (2014) พบว่า MeOH ผสมกับน้ำมันปลา (fish oil) ช่วยในการเคลื่อนที่และระยะเวลาการเคลื่อนที่ของอสุจิปลานิลได้ดียิ่งขึ้น

จากรายงานการศึกษาส่วนใหญ่ข้างต้นพบว่า MeOH, DMSO และ DMA เป็น cryoprotectant ชนิดที่ซึมผ่านเซลล์ได้เพียงชนิดเดียวที่ใช้ผสมกับ extender ดังนั้นการเพิ่มสาร cryoprotectant เป็นสองหรือสามชนิดสามารถลดความเป็นพิษของ cryoprotectant ได้ (Rahmann *et al*., 2008) เช่น การผสม MeOH + DMSO, MeOH + DMA, DMSO + DMA หรือ MeOH + DMSO + DMA เป็นต้น ในสัดส่วนที่ต่างกัน โดยเมื่อผสมกันแล้วไม่ควรเกิน 15 % ซึ่งผลที่ได้อาจส่งผลให้ความสมบูรณ์ ของน้ำเชื้อปลานิลมีผลดียิ่งขึ้นกว่าเดิมได้

ตารางที่ 1 สูตรสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งที่เหมาะสมกับน้ำเชื้อปลานิล

นักวิจัย	**ชนิดของ** Extender	Cryoprotectant (concentration)
Chao *et al*. (1987)	fish ringers + Milk 15 %	MeOH (15 %)
Chao (1991)	fish ringers + Honey 15 %	MeOH (15 %)
Rana & Mcandrew (1989)	fish ringers	MeOH (12.5 %)
Pewnane & Sodsuk (2003)	modified Cortland	DMSO (10 %)
Pewnane *et al*. (2004)	modified Cortland	MeOH (10 %)
Bozkurt & Yavaş (2016)	Tris (30 mM)	Glucose (350 mM) + DMA (10 %)
Altunok *et al*. (2004)	น้ำนม 15 % (3.5 % ไขมัน)	MeOH (5 %) + Sucrose 0.6 M
Asmad *et al*. (2011)	tris citric acid yolk extender (TCAYE)	ไม่ระบุ

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อในปลาหลายชนิด (Muchlisin, 2005)

วัตถุดิบ	NaCl	KCl	$CaCl_2$	$MgCl_2$	$NaHCO_3$	Taps	Caps	Glucose	Yolk	Honey	Milk	ชนิดปลาที่
(g/L)	(g/l)					(mmol)			(ml)			แนะนำ
MFR*	13.5	0.6	0.25	0.35	0.2	-	-	-	-	-	-	ปลาทะเล
FFR**	7.5	0.2	0.20	-	0.2	-	-	-	-	-	-	ปลาน้ำจืด
Taps	2.9	3.2	0.07	0.03	-	15	-	-	-	-	-	ปลานิล
Caps	2.9	3.2	0.07	0.03	-	-	15	-	-	-	-	ปลานิล
Milk in ringer	7.5	0.2	0.20	-	0.2	-	-	-	-	-	150	ปลานิล
V_2e	7.5	0.38	-	-	2.0	-	-	1.0	0.2	-	-	ปลานิล
V_2f	7.5	-	-	-	2.0	-	-	1.0	0.2	-	-	ปลานิล
HR***	7.5	0.6	0.60	0.35	0.2	-	-	-	-	1	-	Black porgy, milkfish

หมายเหตุ *Marine fish ringer, **Freshwater fish ringer, ***Honey in ringer

5. อัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ (diluted ratio) อัตราส่วนนี้แปรผันอยู่กับชนิดปลา โดยทั่วไปนิยมใช้อัตราส่วนตั้งแต่ 1 : 1 ถึง 1 : 9 สำหรับการเจือจางน้ำเชื้อปลานิลมีรายงานการใช้อัตราส่วนอยู่ที่ 1 : 1 (Muchlisin, 2005), 1 : 3 (Bozkurt & Yavaş, 2016), 1 : 4 (Navarro *et al*., 2014), 1 : 5 (Pewnane & Sodsuk, 2003 และ Pewnane *et al*., 2004; Altunok *et al*., 2004) และ 1 : 9 (Asmad *et al*., 2011) ตามลำดับ แต่มีการศึกษาของ Rana & Mcandrew (1987) ที่ใช้อัตราส่วนถึง 1 : 20 จากอัตราการเจือจางที่มีหลายระดับนี้ ชี้ให้เห็นว่าต้องใช้ปัจจัยอื่น ๆ ในการพิจารณาเช่น ความสะดวกในการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อ พื้นที่การจัดเก็บในถังไนโตรเจนเหลว ความหนาแน่นของน้ำเชื้อปลานิลต่อหนึ่งหลอดฟาง (0.25 หรือ 0.5 มล.) เพื่อให้เหมาะสมกับการนำไปใช้กับการปฏิสนธิ (fertilization) กับไข่ เป็นต้น เนื่องจากปลานิลเป็นปลาที่มีปริมาณน้ำเชื้อต่ำแต่มีความเข้มข้นหรือความหนาแน่นต่อหน่วยที่สูงทำให้รายงานส่วนใหญ่นิยมใช้อัตราการเจือจางที่ต่ำระหว่าง 1 : 1 – 1 : 5

6. ระยะเวลาการแช่ในน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ (equilibration time) มีรายงานว่าระยะเวลาการแช่น้ำเชื้อปลานิลกับสารเจือจางน้ำเชื้อไม่ควรใช้เวลานานเกิน 45 - 60 นาที เนื่องจากจะทำให้เกิดความเป็นพิษของ cryoprotectant ขึ้นได้ Bozkurt & Yavaş (2016) ใช้เวลาแช่ 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ขณะที่ Asmad *et al.* (2011) ทำการแช่ในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 นาที สำหรับ Pewnane & Sodsuk (2003) และ Pewnane *et al*. (2004) ใช้ระยะเวลาแช่ 15 นาที ที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นต้น จากรายงานข้างต้นการปรับสมดุล osmotic pressure ของน้ำเชื้อปลานิลและ extender ใช้ระยะเวลาอยู่ระหว่าง 10 – 60 นาที ภายใต้อุณหภูมิต่ำระหว่าง 4 – 20 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมกับกระบวนการแลกเปลี่ยนน้ำ โดยน้ำภายในเซื้ออสุจิปลานิลจะซึมออกและถูกแทนที่ด้วยสาร cryoprotectant จากภายนอกจนหมดทำให้เกิดภาวะสมดุลของแรงดันออสโมติก นอกจากนี้กระบวนการนี้ช่วยลดการช็อคจากความเย็น (cold

shock) ของน้ำเชื้อปลานิลเนื่องจากมีการปรับสภาพแวดล้อมจากการค่อย ๆ ลดอุณหภูมิแล้ว ซึ่งหากใช้เวลาปรับสมดุลน้อยกว่านี้น้ำเชื้อปลานิลอาจยังไม่สามารถปรับสภาพได้ทัน มีผลต่อความสมบูรณ์ของเชื้ออสุจิได้

7. การลดอุณหภูมิ (cooling and freezing rate) เป็นกระบวนการที่สำคัญที่สุดของการแช่แข็งแบบ cryopreservation สามารถทำได้ 3 แบบ ดังนี้

7.1. การใช้น้ำแข็งแห้ง (dry ice) น้ำแข็งแห้งมีคุณสมบัติคงที่ที่อุณหภูมิ -79 องศาเซลเซียส มีรายงานถึงการลดอุณหภูมิแบบนี้ในน้ำเชื้อปลาบางชนิด เช่น ปลา loach ปลาม้าลาย (*Danio rerio*) ปลาตะเพียนขาว (*Barbonymus gonionotus*) (Kilavanit *et al*., 2017) ปลาสวายและปลาบึก (*Pangasianodon gigas*) (Mengamphan, 1998) แต่ยังไม่มีรายงานกับน้ำเชื้อปลานิล วิธีการนี้สามารถทำได้โดยนำน้ำเชื้อที่ผสมกับน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ แล้วหยอดลงไปในหลุมที่ผ่านการใช้สว่านเจาะให้เป็นหลุมตามขนาดที่ต้องการ แต่ไม่ควรให้มีขนาดใหญ่หรือลึกเกินไป และรอให้น้ำเชื้อนั้นแข็งตัวเป็นเม็ดจึงนำไปแช่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว Kilavanit *et al.* (2017) ได้ทดลองเก็บน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในน้ำแข็งแห้งพบว่าให้ผลต่อคุณภาพอสุจิไม่ต่างกับน้ำเชื้อสด และไม่ต่างกับน้ำเชื้อที่เก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 28 วัน

7.2. การใช้ไอของไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapor) ทำได้โดยนำตัวอย่างน้ำเชื้อที่บรรจุในภาชนะเรียบร้อยแล้ว จุ่มลงไปในถังเก็บตัวอย่าง (dewar) ที่บรรจุไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส โดยให้ตัวอย่างน้ำเชื้ออยู่ในไอเหนือผิวหน้าของไนโตรเจนเหลว (Vuthiphandchai *et al*., 2010) ตามระยะเวลาที่ต้องการ เช่น อุณหภูมิของไอไนโตรเจนเหลวหากอยู่เหนือผิวหน้า 3 ซม. จะอยู่ที่ประมาณ -140 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที (Bozkurt & Yava**ş**, 2016) นอกจากนี้ Altunok *et al*. (2004) ได้แช่น้ำเชื้อปลานิลเหนือผิวหน้า 5 ซม. ส่วน Asmad *et al.* (2011) ลดอุณหภูมิในไอไนโตรเจนเหลวที่ – 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงจุ่มตัวอย่างลงในไนโตรเจนเหลว ขณะที่ Navarro *et al*. (2014) ได้เก็บน้ำเชื้อปลานิลในหลอดฟางแล้วแขวนไว้ในถังที่มีไอไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 24 ชม. ก่อนจะนำไปแช่ลงในไนโตรเจนเหลว ซึ่งกระบวนการลดอุณหภูมิโดยการแช่ตัวอย่างไว้ในไอของไนโตรเจนเหลวนี้ Asmad *et al*. (2011) อธิบายว่ามีบทบาทสำคัญกับการเคลื่อนที่และการรอดตายของเชื้ออสุจิปลานิลแดงมาก

7.3. การใช้เครื่องลดอุณหภูมิ (cryologic device) เป็นเครื่องมือที่แบ่งได้ 2 รูปแบบ คือ

-แบบประจำที่ (stationary) เป็นเครื่องมือที่มีขนาดค่อนข้างใหญ่สำหรับไว้ใช้ประจำที่ มีช่องสำหรับใส่ตัวอย่างน้ำเชื้อทางด้านบนของเครื่อง มีการเชื่อมต่อกับถังไนโตรเจนเหลวเพื่อช่วยในการลดอุณหภูมิจนตัวอย่างแข็งตัว และมีอุปกรณ์อิเลกทรอนิกส์ในการออกคำสั่งควบคุมการลดอุณหภูมิด้านหน้าที่มีลักษณะเป็นจอแสดงผลของอุณหภูมิ เครื่องมือที่นิยมใช้เรียก Kryo – 10 ซึ่ง Rana & Mcandrew (1987) พบว่า การลดอุณหภูมิระหว่าง 5 – 50 องศาเซลเซียส/นาที ไม่มีผลต่อต่ออัตราการปฏิสนธิปลานิล

-แบบเคลื่อนที่ได้ (portable) สามารถนำออกไปทำงานภาคสนามได้ อุปกรณ์นี้ประกอบด้วย 1) คอมพิวเตอร์แบบพกพา (laptop) ที่ติดตั้งโปรแกรมการลดอุณหภูมิ เช่น cryogenesis version 5 เพื่อควบคุมอัตราการลดอุณหภูมิตามที่ต้องการ มีหน่วยเป็น องศาเซลเซียส/นาที 2) อ่างควบคุมอุณหภูมิ (cryobath) สำหรับเติมไนโตรเจนเหลวเพื่อช่วยลดอุณหภูมิให้ต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง 3) ช่องเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ (cryochamber) สำหรับใส่ตัวอย่างน้ำเชื้อแล้วนำไปใส่ไว้ในอ่างควบคุมอุณหภูมิอีกทีหนึ่งและ 4) อุปกรณ์ควบคุมอุณหภูมิ (temperature controllers) ใช้สำหรับแสดงอุณหภูมิ ณ เวลานั้น ๆ ซึ่งจาก

รายงานของ Pewnane & Sodsuk (2003) พบว่าการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับน้ำเชื้อปลานิล คือ 5 จนถึง – 60 องศาเซลเซียส/นาที จากนั้นจึงนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวต่อไป

8. การเก็บรักษาและการตรวจสอบคุณภาพ (storage and quality examination) หลังจากลดอุณหภูมิน้ำเชื้อลงจนเปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นของแข็งที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสแล้ว ตัวอย่างน้ำเชื้อถูกแช่แข็งและนำไปเก็บไว้ในถังที่บรรจุไนโตรเจนเหลวทันที ซึ่งไนโตรเจนเหลวนี้มีอัตราการระเหยอยู่ต้องหมั่นตรวจสอบปริมาณของไนโตรเจนให้เพียงพออย่างต่อเนื่อง หากปริมาณลดลงต้องทำการเติมไม่ให้ระเหยจนหมดเนื่องจากทำให้ตัวอย่างน้ำเชื้อเสียหาย ตามหลักการแล้วน้ำเชื้อสามารถเก็บไว้ได้ตลอดไปหากแช่ไว้ในไนโตรเจนเหลวตลอดเวลา นอกจากนี้ควรมีการจัดการสถานที่ในการจัดเก็บ โดยควรเป็นห้องโถงที่สร้างไว้ใช้เก็บถังบรรจุน้ำเชื้อในไนโตรเจนเหลวเท่านั้น มีพื้นที่ว่างในการเคลื่อนที่ถัง ไม่นำวัสดุอุปกรณ์ใด ๆ มาในห้องนี้ ที่สำคัญควรเป็นห้องที่ระบายอากาศดี อุณหภูมิไม่สูงจนเกินไปเพื่อไม่ให้เกิดปฏิกิริยาเร่งการระเหย

8.1. การเก็บในรูปเม็ด (tablet) เหมาะสำหรับปลาที่มีปริมาณน้ำเชื้อต่อตัวมาก หรือปลาที่มีขนาดใหญ่มาก ๆ เช่น ในปลาบึกหรือปลาสวายการเก็บน้ำเชื้อในรูปเม็ดมีความเหมาะสมมาก (Mengamphan, 1998) แต่ในกรณีของปลานิลมีปริมาณน้ำเชื้อต่อตัวน้อยแม้จะมีการผสมกับน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแล้วไม่เหมาะกับการเก็บในรูปเม็ดเนื่องจากปริมาณไม่มากเพียงพอ

8.2. การเก็บในหลอดฟางและหลอดไครโอ (French straw และ cryotube) ในกรณีเก็บน้ำเชื้อปลานิลใช้หลอดพลาสติกที่มีการปิดผนึกไว้ด้านหนึ่ง มีปริมาตรตั้งแต่ 0.25 – 0.5 มล. ข้อดีของหลอดนี้คือ นิยมใช้กันแพร่หลายทั่วไปเนื่องจากขนาดไม่ใหญ่เกินไปทำให้น้ำเชื้อที่ได้รับการลดอุณหภูมิเท่า ๆ กันแข็งตัวพร้อม ๆ กัน แต่สำหรับหลอด cryovial หรือ cryotube ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่ามีปริมาตร 1.2 – 2 มล. มีข้อได้เปรียบคือ เก็บได้ในปริมาณมาก ใน 1 หลอด ไม่ใช้พื้นที่มาก แต่อาจมีข้อเสียอยู่อย่างหนึ่งคือ มีขนาดใหญ่อาจทำให้น้ำเชื้อที่อยู่แนวกลางของหลอดอาจแข็งตัวช้ากว่าด้านข้างที่ได้รับไอไนโตรเจนโดยตรงได้ โดย Bozkurt & Yavaş (2016) รายงานว่าหลังจากการละลายหลอดฟางที่มีขนาด 0.5 มล. มีผลให้การเคลื่อนที่ ระยะเวลาการเคลื่อนที่และอัตราการผสมดีกว่าขนาด 0.25 มล.

9. การละลาย (thawing) เป็นกระบวนการที่มีความสำคัญที่สุดเช่นเดียวกับกระบวนการลดอุณหภูมิ โดย มีรายงานการละลายน้ำเชื้อปลานิลจากการแช่แข็งพบว่า Asmad *et al.* (2011) ใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในการละลาย ระยะเวลา 30 วินาที ขณะที่ Navarro *et al*. (2014) ใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วินาที สำหรับ Pewnane & Sodsuk (2003) ใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Bozkurt & Yavaş (2016) ใช้อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 20 – 30 วินาที สำหรับ Almeida *et al*. (2016) ใช้อุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 10 วินาที ซึ่งจากรายงานข้างต้นการละลายน้ำเชื้อปลานิลที่ผ่านการแช่แข็งแล้วมีช่วงอุณหภูมิกว้างระหว่าง 30 – 60 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับปลาตะเพียนขาว (*Barbonymus gonionotus*) ที่พบว่าการละลายที่อุณหภูมิ 30 – 60 องศาเซลเซียส ไม่ส่งผลต่ออัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิต (Kilavanit *et al.,* 2017) หากเลือกใช้อุณหภูมิสูงเวลาที่ใช้ในการละลายมีน้อยกว่าอุณหภูมิที่ต่ำกว่า โดยการละลายน้ำเชื้อไม่ควรใช้เวลานานเกิน 10 นาที (Mengamphan, 1998)

10.คุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการละลาย (cryopreserved spermatozoa evaluation) หากเปรียบเทียบคุณภาพของน้ำเชื้อสด (fresh milt) กับน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งแล้ว (cryopreserved milt) คุณภาพด้านอัตราการเคลื่อนที่และความเร็วในการเคลื่อนที่อาจมีแนวโน้มลดลง แต่จะลดลงมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับการจัดการน้ำเชื้อของการแช่แข็ง เช่น การคัดเลือก

น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ การปรับสมดุลน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็ง อัตราการลดอุณหภูมิและการละลาย Asmad *et al.* (2011) พบว่า อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิปลานิลจะค่อย ๆ ลดลงตามกระบวนการแช่แข็งจนลดต่ำสุดภายหลังจากการแช่แข็งน้ำเชื้อแล้ว นอกจากนี้ความแตกต่างของปลานิลแต่ละตัว (individual) และความแตกต่างขององค์ประกอบไขมันของ sperm plasma membrane อาจเป็นปัจจัยสำคัญเช่นกัน การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อหรือการนำน้ำเชื้อปลานิลไปใช้ประโยชน์สามารถทำได้โดยทำได้โดยรีดไข่ของปลานิลที่ผ่านการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนใส่ในภาชนะที่แห้งและสะอาดจากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาทำการละลายในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปผสมกับไข่และใช้ขนไข่ผสม จากนั้นเติมน้ำสะอาดร่วมกับการผสมแล้วนำไปฟักในอุปกรณ์ฟักไข่ปลานิลต่อไป

บทสรุป

การจัดการพ่อพันธุ์ปลานิลให้มีผลผลิตน้ำเชื้อที่มีปริมาณและคุณภาพเหมาะสม ปลานิลเพศผู้นั้นควรมีค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (GSI) ของปลานิลเพศผู้ประมาณ 2.38 % โดยทั่วไปปลานิลเพศผู้ผลิตน้ำเชื้อในปริมาณน้อยแต่มีความถี่ในการผลิตสูง เชื้ออสุจิมีความยาวประมาณ 23.7 μm ความหนาแน่นไม่ต่ำกว่า 1.66 – 3.59 x 10^9 เซลล์/มล. มีค่าความเข้มข้น (osmolality) ของน้ำเลี้ยงน้ำเชื้อประมาณ 300 mOsmol kg^{-1} โดยมี Na^+ และ K^+ เป็นองค์ประกอบหลักมากที่สุด อายุของพ่อพันธุ์ที่เหมาะสมควรมีอายุตั้งแต่ 3 เดือน ถึง 3 ปี โดยมีขนาดตั้งแต่ 100 ก. ขึ้นไปถึง 1 กก. โดยเลี้ยงในช่วงอุณหภูมิ 28 – 32 องศาเซลเซียส ให้สารอาหารโปรตีน 25 – 45 % ไขมัน 5 - 12 % คาร์โบไฮเดรต 20 - 50 % ใยอาหาร ≤ 6 % กรดไขมันกลุ่มไลโนเลอิก (n-6) และไลโนเลนิก (n-3) 0.5 -1.0 % แคลเซียม 0.3 % และฟอสฟอรัส 0.7 % ความหนาแน่นการเลี้ยงควรอยู่ที่ 1 ตัว/ 4 ตารางเมตร ภายใต้ระบบการเลี้ยงที่สามารถสร้างพ่อพันธุ์ที่ดีได้แก่ ไบโอฟล็อค (BFT) ระบบน้ำหมุนเวียน (RAS) หรือเพิ่มสารเสริมในอาหารเช่น สาหร่าย *Spirulina platensis, Cladophora glomerata* หรือ Polyunsaturated fatty acid (PUFAs) รวมทั้งน้ำมัน (oil) ต่าง ๆ เป็นต้น สำหรับการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็ง ควรเลือกพ่อพันธุ์ที่แข็งแรง สมบูรณ์ และเมื่อเก็บน้ำเชื้อที่มีคุณภาพที่ดี เช่น มีสีขาว มีความสมบูรณ์ของเชื้ออสุจิ มีอัตราการเคลื่อนที่มากกว่า 75 % ปราศจากการปนเปื้อนต่าง ๆ ซึ่งเหมาะสมเพื่อที่จะนำมาแช่แข็ง สารเจือจางที่เหมาะสมมีหลากหลายสูตรโดยมี MeOH หรือ DMSO หรือ DMA เป็นสาร cryoprotectant ที่ความเข้มข้นต่ำ 5 – 15 % โดยแช่ปรับสมดุลไม่เกิน 60 นาที จากนั้นทำการลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ ภายในช่วง 5 – 50 องศาเซลเซียส/นาที และเก็บน้ำเชื้อที่แข็งตัวแล้วไว้ในไนโตรเจนเหลวทันที หมั่นตรวจระดับของไนโตรเจนเหลวไม่ให้ระเหยหมด หากต้องการนำมาใช้ผสมพันธุ์ให้นำน้ำเชื้อมาละลายในน้ำที่ช่วงอุณหภูมิ 30 – 60 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำมาผสมกับไข่ปลานิลแล้วนำไปฟักในระบบฟักไข่ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Agnese, J.F., Oteme, Z.J., & Gilles, S. (1995). Effects of domestication on genetic variability, fertility, survival and growth rate in a tropical siluriform: *Heterobranchus longifilis* Valenciennes 1840. *Aquaculture, 131*, 197–204.

Almeida, D.B., Bassini, L.N., Paldês da Costa, M.A., Calabuig, C.I.P., Moreira, C.G.Á., Rodrigues, M.D.N., Varela Junior, A.S., Corcini, C.D., Dode, M.E.B., & Moreira, H.L.M. (2016). Sperm evaluation in strains of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Journal of Advances in Agriculture*, *6* (2), 933 – 941.

Altunok, M., Muller-Belecke, A., & Horstgen-Schwark, G. (2004). Cryopreservation of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Sperm. *Conference Paper "Rural Poverty Reduction through Research for Development" Berlin*.

Asmad, K., Wan Khadijah, W.E., & Abdullah, R.B. (2011). Effects of Different Stages of Cryopreservation of Red Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Sperm and the Variability between Three Individual Fish in Response to Cryopreservation. *Journal of Agrobiotech, 2*, 25 - 33.

Astuarino, J.F., Sorbera, L.A., Carrillo, M., Zanuy, S., Ramos, J., Navarro, J.C., & Bromage, N. (2001). Reproductive performance in male European seabass fed two PUFA-enriched experimental diets: a comparison with males fed a wet diet. *Aquaculture*, *194,* 173-190.

Avnimelech, Y. (2009). Biofloc Technology A Practice Guide. *The World Aquaculture Society,* third edition.

Borges, A., Siqueira, D.R., Jurinitz, D.F., Zanini, R., Amaral, F., & Wassermann, G.F. (2005). Biochemical composition of seminal plasma and annual variations in semen characteristics of jundiá, *Rhamdiaquelen* (Quoy and Gaimard, Pimelodidae). *Fish Physiol Biochem*, *31*, 45 - 53.

Bozkurt, Y., & Yava**ş**, L. (2016). Cryopreservation of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Sperm. *Cryopreservation in Eukaryote*, 76 – 90.

Chao, N.H., Chao, W.C., Liu, K.C., & Liao, I.C. (1987). The properties of tilapia sperm and its cryopreservation. *Journal of Fisheries Biology, 30*, 107–118.

Chao, N.H. (1991). Fish sperm cryopreservation in Taiwan: Technology advancement and extention efforts. International Symposium on Reproductive Biology in Aquaculture. Taipei: *Department of Aquaculture, Taiwan Fisheries v Research Institute.*

Ciereszko, A., Glogowski, J., & Dabrowski, K. (2000). Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: Tiersch T.R., Mazik P.M. (eds.): *World Aquaculture Society*. Cryopreservation of Aquatic Species. Baton Rouge, LA, USA, 20–48.

Cosson, J. (1999). Frenetic activation of fish spermatozoa flagella entails short-term motility, portinding their precocious decadence. *Journal of Fisheries Biology*, *76*, 240 - 279.

Department of Fisheries. (2010). Nile Tilapia Culture. Extension document, *Fisheries technology research and transfer development office*. 32 p. (in Thai).

Dzyuba, B., Legendre, M., Baroiller, J.F., & Cosson, J. (2019). Sperm motility of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*): Effects of temperature on the swimming characteristics. *Animal Reproduction Science*, *202*, 65 – 72.

Evans, J.P. (2010). Quantitative genetic evidence that males trade attractiveness for ejaculate quality in guppies. *P Roy Soc B-Biol Sci* ,277, 3195 – 3201.

Fauvel, C., Suquet, M., & Cosson, J. (2010). Evaluation of fish sperm quality. *Journal Apply Ichthyology*, *26*, 636–643.

Gennotte, V., Francois, E., Rougeot, C., Ponthier, J., Deleuze, S., & Mélard, C. (2012). Sperm quality analysis in XX, XY and YY males of the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Theriogenology*, *78*, 210–217.

Godinho, H.P. (2007). Estratégiasreprodutivas de peixesaplicadas á aquicultura: bases para o desenvolvimento de tecnologias de produção. *Rev. Bras. Reprod. Animal*, *31*, 351-360.

Guest, W.C. (1973). Spermatology and sperm preservation of Channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Master thesis. School of Forestry and wildlife management. *Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College*. 92 pp.

Hemchun, W. (2013). Fish: Biology and Taxonomy. Chulalongkon University Press. 396 p. (in Thai).

Jamenez, E.B.T., & Bolivar, R.B. (2018). Effect of Age Broodstock on Seed Production and Sex Reversal of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) Fry in Hapas. The 7th international fisheries conference, Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, *Maejo University*, 32 p.

Jarimopas, P., Tavaratmaneekul, P., & Inkuan, A. (1994). Gonadal Development of Thai Red Tilapia. *Proceedings of the 32nd Kasetsart University Annual Conference: Animal Science, Veterinary Science and Fisheries, Bangkok*, 488 – 505. (in Thai).

Kilavanit, A., Nimrat, S., & Vuthiphandchai, V. (2017). Development of Cryopreservation Technique of Silver barb (*Barbonymus gonionotus*) Sperm Frozen in the Straw using Dry Ice. *Rajamangala University of Technology Tawan-ok Research Journal*, *10* (2), 84-91. (in Thai).

Li, M.H., Minchew, C.D., Oberle, D.F., & Robinson, E.H. (2010). Evaluation of glycerol from biodiesel production as a feed ingredient for channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Journal of World Aquaculture Society*, *41*, 130 – 136.

Linhart, O., Walford, J., Sivaloganathan, B., & Lam, T.J. (1999). Effects of osmolality and ions on the motility of stripped and testicular sperm of freshwater and seawater-acclimated tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Journal of Fisheries Biology, 55*, 1344 – 1358.

Luo, G., Gao, Q., Wang, C., Liu, W., Sun, D., & Li, L. (2014). Growth, digestive activity, welfare, and partial cost-effectiveness of genetically improved farmed tilapia (*Oreochromis niloticus*) cultured in a recirculating aquaculture system and an indoor biofloc system. *Aquaculture, 422*, 1–7.

Mengamphan, K. (1998). The spermatozoa cryopreservation for fish production and breeding. Final report, Department of Fisheries, Faculty of Agricultural Production, *Maejo University*. 82 p. (in Thai).

Mewe, J.K., Meurer, F., Tessaro, L., Buzzi, A.H., Syperreck, M.A., & Bombardelli, R.A. (2016). Diets containing crude glycerin damage the sperm characteristics and modify the testis histology of Nile tilapia broodstock. *Aquaculture*, *465*, 164 – 171.

Mochida, K., Kondo, T., Matsubara, T., Adachi, S., & Yamauchi, K. (1999). A high molecular weight glycoprotein in seminal plasma is a sperm immobilizing factor in the teleost Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Develop Growth Differ*, *41*, 503–522.

Mongkolpunya, K. (1993). Cryopreservation of fish spermatozoa: Principle, Method and Advantage. Faculty of Science, Kasetsart University. 128 p. (in Thai).

Muchlisin, Z.A. (2005). REVIEW: Current Status of Extenders and Cryoprotectants on Fish Spermatozoa Cryopreservation. *BIODIVERSITAS*, *6*, 66 – 69.

Nahiduzzaman, M., Akter, S., Hassan, M.M., Azad Shah, A.K.M., & Hossain, M.A.R. (2014). Sperm biology of artificially induced common carp, *Cyprinus carpio* (Linnaeus, 1758). *International Journal of Fisheries and Aquatic Studies, 1*(6), 27 – 31.

Navarro, R.D., Navarro, F.K.S.P., Felizardo, V.O., Murgas, L.D.S., & Pereira, M.M. (2014). Cryopreservation of semen of Thailand tilapia (*Oreochromis* spp.) fed diet with different oil sources. *Acta Scientiarum Technology, 36*, 399 – 404.

Paulino, M.S., Veras, G.C., Felizardo, V.O., Solis – Murgas, L.D., & Freitas, R. T. F. (2016). Assessment of Gametes in Tilapia *Oreochromis niloticus*: Effects of Body Weight in a New Lineage. *Journal of Fisheries Sciences*, *10* (2), 63 - 69.

Peruzzi, S., Rudolfsen, G., Primicerio, R., Frantzen, M., & Kaurić, G. (2009). Milt characteristics of diploid and triploid Atlantic cod (*Gadus morhua* L.). *Aquaculture research, 40* (10), 1160 – 1169.

Pewnane, P., & Sodsuk, P.K. (2003). Aquatic animal and Aquatic plant cryopreservation. Gene banking research and development group, Aquatic Animal Genetics Research and Development Institute, *Department of Fisheries, Bangkok*, 17 p. (in Thai).

Pewnane, P., Ampolsak, K., Jeenmik, T., & Makkasab, C. (2004). Cryopreservation of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Spermatozoa. Technical Paper no. 6, *Aquatic Animal Genetics Research and Development Institute, Department of Fisheries, Bangkok*. 39 p. (in Thai).

Piironen, J., & Hyvarinen, H. (1983). Composition of the milt of some teleost fishes. *Journal of Fisheries Biology*, *22*, 351– 361.

Pinheiro, M.F.M., Guimarães de Souza, S.M., & Gil Barcellos, L.J. (2003). Exposure to 17α,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one changes seminal characteristics in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Aquaculture Research, 34*, 1047 – 1052.

Ponchunchoovong, S., Imsilp, U., & Singsee, S. (2011). Preservation of Small scale mud carp, *Cirrhinus microlepis* sperm and a study on the suitable sperm: egg ratio of fresh or cryopreserved sperm. Final report, *Suranaree University of Technology*. 87 p. (in Thai).

Plaipetch, P. (2016). Nutritional Management for Culturing Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Science and Technology*, Thammasart University (Rangsit campus), *24*(1), 12 – 39. (in Thai).

Promya, J., & Saetun, K. (2005). Cultivation of Spirulina Alga for Health. Fisheries Technology, Department, Faculty of Agricultural Production, *Maejo University*, Thailand.

Promya, J., Thongmee, B., & Srinuansom, K. (2012). The effects of *Spirulina platensis* feeding on growth performance, gonadosomatic index and immunity stimulating capacity in fancy carps (*Cyprinus carpio* Linnaeus). *Journal of Fisheries Technology Research*, *6* (1), 11 – 22. (in Thai).

Psenicka, M., Rodina, M., Flajshans, M., Kaspar, V., & Linhart, O. (2009). Structural abnormalities of common carp *Cyprinus carpio* spermatozoa. *Fish Physiol Biochem*, *35*, 591 – 597.

Rahman, S.M., Majhi, S.K., Suzuki, T., Matsukawa, S., Strussmann, C.A., & Takai, R. (2008). Suitability of cryoprotectants and impregnation protocols for embryos of Japanese whiting *Sillago japonica*. *Cryobiology*, *57*, 170 - 174.

Rana, J.K., & Mcandrew, B.J. (1987). The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. *Aquaculture, 76,* 335 – 345.

Rashid, I., Hossain, M.S., Salam, M.A., & Rafiquzzaman, S.M. (2019). Evaluation of seminal plasma composition and spermatozoa quality parameters of silver barb, *Barbonymus gonionotus* Bleeker, 1850. *Fish Physiol Biochem*, *45*, 105–114.

Ruangsomboon, S., & Choochote, S. (2014). Chemical Composition and Growth Performance of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Fed Diets Supplemented with Green Alga, *Cladophora glomerata*. *King Mongkut's Agricultural Journal, 32* (2), 1 - 8. (in Thai).

Sermwattanakul, A., & Bamrungtham, B. (2000). Feed for Orimentral Fish. *Institute for Research of Orimentral l Water Animals and Exhibition Places, Bangkok, Thailand* pp: 16–19.

Shivaji, S., Jayaprakash, D., & Patil, S.B. (1998). Assessment of inbreeding depression in big cat: Testosterone levels and semen analysis. *Current science, 75* (9), 923 – 930.

Verma, D.K., Routray, P., Dash, C., Dasgupta, S., & Jena, J.K. (2009). Physical and Biochemical Characteristics of Semen and Ultrastructure of Spermatozoa in Six Carp Species. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Science, 9*, 67-76.

Vuthiphandchai, V., Irawana, H., & Nimrat, S. (2010). The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Animal Reproduction Science*, *122*, 236 – 243.

Wagner, E., Arndta, R., & Hilton, B. (2002). Physiological stress responses, egg survival and sperm motility for rainbow trout broodstock anesthetized with clove oil, tricaine methane sulfonate or carbon dioxide. *Aquaculture*, *211*, 353-366.

Wankanapol, A. (2012). Evaluation of different cryopreservation agents used in the cryopreservation of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) embryo. Ph.D. Dissertation. *Central Luzon State University*. Philippines. 154 p.

Zohar, Y. (1996). New approaches for the manipulation of ovulation and spawning in farmed fish. *Bull Natl Res Inst Aquac*, 43 – 48.