

ผลของสารละลายบัฟเฟอร์ สารไครโอโพรเทคแทนท์ และอัตราการลดอุณหภูมิ ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุยหลังการแช่แข็ง

Effects of Extenders, Cryoprotectants and Freezing Rate on Post-Thaw Sperm Motility of Walking Catfish (*Clarias macrocephalus*)

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย^{1*} ปริญญญา อ้นขวัญเมือง¹ ตริรัตน์ สุขสวัสดิ์² และ สุนันจิต นิมรัตน์³

Verapong Vuthiphandchai^{1*}, Patinya Ounkwanmuang¹, Treerat Sooksawat² and Subuntith Nimrat³

Received: 22 June 2021, Revised: 1 January 2022, Accepted: 27 May 2022

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ สารไครโอโพรเทคแทนท์ และอัตราการลดอุณหภูมิ ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ที่แช่แข็งด้วยวิธีการใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ เปรียบเทียบกับวิธีการใช้กล่องโฟม การทดลองที่ 1 น้ำเชื้อสดปลาดุกอุยที่เจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Calcium-free Hank's Balanced Salt Solution (Ca-F HBSS) ผสมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ 6 ชนิด คือ Dimethyl sulfoxide (DMSO), Methanol, Glycerol, Sucrose, Ethylene glycol และ Propylene glycol ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5%, 10% และ 15 % และแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ -3, -5 และ -8 องศาเซลเซียส/นาที่ พบว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงสุด ($p < 0.05$) เมื่อแช่แข็งด้วย 10%DMSO และใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -8 องศาเซลเซียส/นาที่ เปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นที่ใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์และอัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน การทดลองที่ 2 ทำโดยเจือจางน้ำเชื้อสดปลาดุกอุยในสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ชนิด คือ Ca-F HBSS, 0.9% NaCl และ Extender 7 ที่มี 10% DMSO ก่อนแช่แข็งภายในกล่องโฟมที่ระดับความสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจนเหลว 2, 4 และ 6 เซนติเมตร เป็นเวลานาน 5, 10 และ 15 นาที พบว่า การแช่แข็งด้วย Ca-F HBSS และ 10%DMSO ที่ความสูง 6 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าในโตรเจนเหลวนาน 10 นาที ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงสุด ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ ที่ต่างกันทั้งหมด ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็น

¹ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131

¹ Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University, Saensuk, Muang, Chon Buri 20131, Thailand.

² โปรแกรมวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131

² Biological Science Program, Faculty of Science, Burapha University, Saensuk, Muang, Chon Buri 20131, Thailand.

³ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี 20131

³ Department of Microbiology, Faculty of Science, Burapha University, Saensuk, Muang, Chon Buri 20131, Thailand.

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): verapong@buu.ac.th Tel: 0 3810 3093

ว่าวิธีการแช่แข็งโดยใช้กล่องโฟมมีศักยภาพในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย และยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์สำหรับการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์น้ำชนิดอื่นต่อไป

คำสำคัญ: ปลาดุกอุย, น้ำเชื้อ, สเปิร์ม, สารละลายบัฟเฟอร์, สารโครีโอโพรเทคแทนท์

ABSTRACT

This research was aimed to study the effects of extenders, cryoprotectants, and freezing rate on post-thaw sperm motility of walking catfish (*Clarias macrocephalus*) based on the use of the controlled-rate programmable freezer compared with styrofoam box. In the first experiment, freshly collected semen was diluted in Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) containing six different cryoprotectants including Dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol, glycerol, sucrose, ethylene glycol, and propylene glycol at the final concentrations of 5%, 10% and 15% and the freezing rates of -3, -5, and -8°C/min. The highest post-thaw sperm motility ($p<0.05$) was obtained from the treatment using 10% DMSO and a freezing rate of -8°C/min, compared with other treatments using various combinations of cryoprotectants and freezing rate. The second experiment was performed by diluting fresh semen in one of the three extenders: Ca-F HBSS, 0.9% NaCl, and Extender 7 containing 10% DMSO before freezing within the styrofoam box at 2, 4, and 6 cm above the surface of liquid nitrogen (LN₂) for 5, 10, and 15 minutes. The use of Ca-F HBSS with 10% DMSO and freezing at 6 cm above LN₂ surface for 10 minutes had the highest post-thaw sperm motility ($p<0.05$) compared with other treatments. These results suggested that the styrofoam box method had a potential for cryopreservation of *C. macrocephalus* sperm, which could be applied for aquaculture and conservation of other aquatic animals.

Key words: catfish, semen, sperm, extenders, cryoprotectants

บทนำ

ปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) เป็นปลาน้ำจืดพื้นเมืองของไทย และมีราคาจำหน่ายสูงกว่าปลาดุกชนิดอื่นๆ เช่น ดูก้าน ดูกเทศ ดูกลำพัน เป็นต้น โดยในอดีตประมาณ 40 ปีที่ผ่านมา มีการเลี้ยงปลาดุกอุยมากบริเวณภาคกลางของประเทศ เช่น ปทุมธานี สมุทรปราการ ชลบุรี เป็นต้น แต่ในปัจจุบัน ปลาดุกอุยกลับเริ่มหาได้ยากมากในธรรมชาติ เนื่องจากแหล่งที่อยู่อาศัยที่เหมาะสมในธรรมชาติมีน้อยลงจากการขยายตัวของชุมชน และคุณภาพ

สิ่งแวดล้อมในน้ำ ทำให้ประชากรปลาดุกอุยในธรรมชาติหาได้ยากมาก อย่างไรก็ตาม ปลาดุกอุยแม้จะเป็นปลาที่มีรสชาติเป็นที่นิยมของผู้บริโภค แต่โตช้า และมีความต้านทานต่อโรคต่ำ ทำให้การเพาะเลี้ยงปลาดุกอุยเชิงพาณิชย์ในปัจจุบันมีค่อนข้างจำกัด โดยในภาคการผลิตของประเทศไทยนิยมเลี้ยงปลาดุกผสมเชิงพาณิชย์ โดยการผสมเทียมข้ามสายพันธุ์ระหว่างแม่ปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) กับพ่อปลาดุกเทศ (*Clarias gariepinus*) ได้ปลาดุกลูกผสม (Hybrid catfish) ที่เรียกว่า ปลาดุกบิ๊กอุย ซึ่งโตเร็ว

และมีความต้านทานโรคสูง ได้รับความนิยมน้อยลงอย่างแพร่หลายทั่วประเทศ โดยมากกว่า 90% ของผู้เพาะเลี้ยงปลาดุกในบ่อดินในประเทศไทยขณะนี้ เป็นปลาดุกบิ๊กอุย ซึ่งสถิติการประมงแห่งประเทศไทยในปี พ.ศ. 2561 ได้รายงานว่าเป็นปลาดุกจัดเป็นปลาน้ำจืดที่มีการเลี้ยงเป็นอันดับ 2 รองจากปลานิล โดยในปี พ.ศ. 2561 ผลผลิตปลาดุกจากการเพาะเลี้ยงมีปริมาณรวม 106,200 ตัน คิดเป็นประมาณ 24.9% ของผลผลิตสัตว์น้ำจืดที่เลี้ยงในประเทศไทย ซึ่งผลผลิตปลาดุกที่ได้นี้มีมูลค่ารวม 4,667.2 ล้านบาท (Fisheries Development Policy and Strategy Division, 2018)

ด้วยเหตุที่แม่ปลาดุกอุยได้ถูกนำไปผสมข้ามพันธุ์กับพ่อพันธุ์ปลาดุกเทศเพื่อผลิตปลาดุกบิ๊กอุยสำหรับการเลี้ยงปลาดุกเชิงการค้าเป็นหลัก ทำให้การพัฒนาสายพันธุ์ปลาดุกอุยถูกละเลย แม้ว่าจะยังมีการเลี้ยงปลาดุกอุยในเฉพาะบางพื้นที่ของประเทศ แต่ผลผลิตปลาดุกอุยยังมีน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับปลาดุกบิ๊กอุย อย่างไรก็ตาม การรักษาสายพันธุ์ปลาดุกอุยที่มีพันธุกรรมดีให้คงอยู่ ยังเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อประโยชน์การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์สัตว์น้ำ เพราะแม่ปลาดุกอุยที่มีพันธุกรรมที่ดียังคงมีความจำเป็นสำหรับการใช้ในการผลิตปลาดุกบิ๊กอุย แนวทางหนึ่งที่เหมาะสมในการบริหารจัดการสายพันธุ์ปลาดุกอุยให้คงอยู่ สามารถทำได้โดยการนำน้ำเชื้อของปลาดุกอุยมาแช่แข็งและเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen) ที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อ (Sperm bank) โดยเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อ (Semen cryopreservation) จัดเป็นเทคโนโลยีชีวภาพแขนงหนึ่งที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อให้มีคุณภาพดีได้นานเป็นปี (Gil *et al.*, 2017) จึงมีการนำมาเทคโนโลยีดังกล่าวมาประยุกต์ใช้การแช่แข็งน้ำเชื้อของมนุษย์ และน้ำเชื้อสัตว์น้ำเศรษฐกิจหลายชนิด รวมทั้งสัตว์น้ำที่หาได้ยากหรือใกล้สูญพันธุ์ เช่น ปลาสวาย (Kwantong and Bart, 2003) ปลา

red seabream (Liu *et al.*, 2006) ปลา brown trout (Rusco *et al.*, 2020) ปลากะรังเสือ (Yang *et al.*, 2020) เป็นต้น เพียงแต่ต้องพัฒนาเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำแต่ละชนิดให้มีความเหมาะสมแตกต่างกันไป ดังนั้น ถ้าสามารถพัฒนาเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่มีประสิทธิภาพได้ เมื่อต้องการนำน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งมาใช้ประโยชน์ก็สามารถทำได้โดยนำมาละลาย (Thawing) แล้วนำไปผสมเทียมกับไข่ปลาดุกอุย ซึ่งจะเป็นประโยชน์โดยตรงต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และการอนุรักษ์สายพันธุ์สัตว์น้ำที่ดีมิให้สูญพันธุ์ (Ji *et al.*, 2004; Rusco *et al.*, 2020)

การเพาะขยายพันธุ์ปลาดุกอุย หรือปลาดุกชนิดอื่นๆ ต่างก็ประสบปัญหาที่ไม่สามารถรีดน้ำเชื้อโดยการกดบริเวณส่วนท้องได้เหมือนปลาชนิดอื่นๆ เพราะอวัยวะ (Testis) ของปลาดุกอุยอยู่ลึกในช่องท้อง จึงจำเป็นต้องมีการผ่าตัดนำเอาอวัยวะปลาดุกอุยเพศผู้เพื่อเอามาขยายให้ได้น้ำเชื้อมาใช้ในการผสมเทียม ดังนั้นในการเพาะขยายพันธุ์ปลาดุกอุยแต่ละครั้งจึงควรใช้น้ำเชื้อให้คุ้มค่าที่สุด เนื่องจากน้ำเชื้อสดที่เหลือใช้จะมีคุณภาพลดลงอย่างรวดเร็วภายใน 1 ชั่วโมง ถ้าเก็บในตู้เย็นธรรมดา น้ำเชื้อสดของปลาดุกอุยอาจมีชีวิตรอดได้อย่างมากประมาณ 1 วันเท่านั้น (Vuthiphandchai *et al.*, 2009) ซึ่งการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาจะช่วยทำให้ลดความไม่แน่นอนในการขาดแคลนน้ำเชื้อปลาที่มีคุณภาพดี และยังสามารถนำน้ำเชื้อปลาแช่แข็งมาผสมเทียมกับไข่ปลาได้ตลอดเวลา โดยที่คุณภาพน้ำเชื้อปลาแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ ยังคงมีคุณภาพใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสด (Ratanatrivong *et al.*, 2011; Vuthiphandchai *et al.*, 2015) อีกทั้งการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยยังมีค่อนข้างจำกัด เนื่องจากปลาดุกอุยเป็นปลาประจำถิ่นในประเทศเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และการเพาะพันธุ์ปลาดุกอุยหรือปลาดุกชนิดอื่นๆ ของภาคการผลิตยังนิยมเพาะพันธุ์ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสด แต่การพัฒนาเทคนิควิธีการแช่แข็ง

น้ำเชื้อปลาคูอุยให้มีคุณภาพดี จำเป็นต้องทราบชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเจือจางน้ำเชื้อ และชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (Cryoprotectant) ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาคูอุย เนื่องจากสารไครโอโพรเทคแทนท์ ทำหน้าที่ในการป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (Ice crystal) ภายในเซลล์สเปิร์มขณะทำการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อให้ต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง นอกจากนี้ การแช่แข็งน้ำเชื้อยังสามารถทำได้ด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ (Controlled-rate programmable freezer) ซึ่งแม้จะสามารถลดอุณหภูมิของน้ำเชื้อได้อย่างเที่ยงตรงและมีประสิทธิภาพสูง แต่อาจมีข้อจำกัดในการประยุกต์ใช้สำหรับภาคการผลิตขนาดเล็ก เนื่องจากเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติมีราคาแพงหลายแสนบาท หรือหลายล้านบาท (ขึ้นอยู่กับ specification ของเครื่อง) ซึ่งการลดต้นทุนของเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่ทั่วโลกนิยมนำมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสามารถทำได้โดยการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในกล่องโฟม (Styrofoam box) ซึ่งเป็นวิธีการที่ไม่สลับซับซ้อนและมีความสะดวกในการบริหารจัดการในฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (Yang *et al.*, 2020; Irawan *et al.*, 2010) ดังนั้น วัตถุประสงค์ของการวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ สารไครโอโพรเทคแทนท์ และอัตราการลดอุณหภูมิ ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาคูอุยที่แช่แข็งด้วยวิธีการใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ เปรียบเทียบกับวิธีการแช่แข็งด้วยการใช้กล่องโฟม เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับการนำน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาคูอุยไปใช้ประโยชน์ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมปลาทดลอง

พ่อพันธุ์ปลาคูอุยที่สมบูรณ์เพศ (น้ำหนัก 280-360 กรัม) ถูกรวบรวมและลำเลียงจากบริเวณแหล่ง

เลี้ยงในจังหวัดฉะเชิงเทรา มายังโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยควบคุมอุณหภูมิน้ำ และใส่เกลือแกงและยาเหลือง 1.5% และ 1 ppm ตามลำดับ เพื่อป้องกันความเครียดและการติดเชื้อระหว่างการลำเลียง พ่อพันธุ์ปลาคูอุยถูกนำมาพักไว้ในบ่อเลี้ยงนาน 7 วัน ให้อาหารเม็ด 35% โปรตีน วันละ 1 ครั้ง ในอัตรา 2-3% น้ำหนักตัว/วัน พร้อมกับเปลี่ยนถ่ายน้ำในบ่อ 30-40% ทุกๆ 2-3 วัน โดยงดอาหาร 1 วันก่อนการทดลอง พ่อพันธุ์ปลาคูอุยทั้งหมดถูกฉีดกระตุ้นการสร้างน้ำเชื้อด้วยฮอร์โมน GnRH α (Gonadotropin-releasing hormone analogue; GnRH α) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักปลา และ Motillium (Dopamine antagonist) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม น้ำหนักปลา การนำน้ำเชื้อปลาคูอุยออกมาทดลอง ทำการรวบรวมน้ำเชื้อหลังการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นผ่านไปประมาณ 8 ชั่วโมง โดยสลับปลาด้วยน้ำแข็งและน้ำมันกานพลู (80 ppm) ล้างรอบบริเวณท้องให้สะอาดด้วยน้ำจืด เช็ดท้องให้แห้ง ทำการผ่าตัดบริเวณท้อง แล้วทำการรวบรวมอวัยวะเพื่อให้ได้น้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์หลายตัวสำหรับนำไปใช้ในการทดลองตามวิธีการของ Vuthiphandchai *et al.* (2009) น้ำเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่สูง (มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์) ถูกนำมารวมกันจนแก้ว (Petridish) ที่สะอาดในลักษณะน้ำเชื้อรวม (Pooled semen) เพื่อลดความแปรปรวนคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ (Individual variation) โดยวางจานแก้วที่มีน้ำเชื้อสดไว้บนน้ำแข็งไม่เกิน 30 นาทีก่อนการทดลอง งานวิจัยเรื่องนี้ได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในสัตว์มีกระดูกสันหลัง มหาวิทยาลัยบูรพา

2. การประเมินคุณภาพสเปิร์มของปลาคูอุย

น้ำเชื้อสดของปลาคูอุยที่มีคุณภาพทางกายภาพที่เหมาะสม ถูกนำมาประเมินความหนาแน่นของสเปิร์ม โดยการเจือจางน้ำเชื้อสดปริมาณ 10 ไมโครลิตร

ด้วย 0.9% NaCl โดยเจือจาง 5,000 เท่า ผสมให้เข้ากัน ใน Vial ด้วยการใช้ Vortexer จากนั้นนำน้ำเชื้อสดที่ถูกเจือจางไปหยดบน Haemocytometer และนับจำนวนสเปิร์มที่พบโดยการใช้อุปกรณ์จุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า และคำนวณหาความหนาแน่นของสเปิร์มเป็นจำนวนตัว/มิลลิลิตร โดยทำ 3 ซ้ำ

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาถูกอุย ทำโดยหยดน้ำเชื้อสดปริมาณ 1 ไมโครลิตรลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาดก่อนการหยดน้ำกลั่นลงไป 100 ไมโครลิตรพร้อมกับปิดด้วย Cover glass เบาๆ อย่างรวดเร็วเพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ ทำการประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มเคลื่อนที่ (Percentage of motile sperm) ด้วยการใช้อุปกรณ์จุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่าจากเกณฑ์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่กำหนดไว้ 6 ระดับ (Subjective estimation) คือ สเปิร์มที่เคลื่อนที่ได้ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% ตามวิธีการของ Vuthiphandchai *et al.* (2009, 2015) ทำการประเมิน 3 ซ้ำ โดยในแต่ละสไลด์ประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอีก 3 ซ้าย่อย ภายในเวลาไม่เกิน 15 วินาทีหลังจากสเปิร์มถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ (รวม 9 ซ้าย่อย) สำหรับการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็ง (Post-thaw sperm motility) ของทุกชุดการทดลอง ทำโดยนำหลอดฟางหรือหลอด Cryovial ที่บรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส หยดน้ำเชื้อแช่แข็งที่ละลายประมาณ 20 ไมโครลิตรลงบนกระจกสไลด์แล้วกระตุ้นสเปิร์มให้เคลื่อนที่ด้วยน้ำกลั่นปริมาณ 80 ไมโครลิตร และทำการประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มตามวิธีการที่กล่าวมาแล้ว

3. การวางแผนการทดลอง

การวิจัยได้ดำเนินการทดลอง 2 ช่วง โดยในช่วงแรกศึกษาพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาถูกอุย โดยทำการศึกษา 3 ปัจจัย (ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ และอัตราการลด

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาถูกอุย) โดยแบ่งเป็น 3 การทดลองย่อย เริ่มจากนำน้ำเชื้อปลาถูกอุยมาเจือจางด้วยสารละลาย Calcium-free Hank's Balanced Salt Solution (Ca-F HBSS; 0.8890 กรัม NaCl, 0.0440 กรัม KCl, 0.0130 กรัม $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.0390 กรัม NaHCO_3 , 0.0070 กรัม KH_2PO_4 , 0.0220 กรัม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1110 กรัม glucose ใน 100 มิลลิลิตรน้ำกลั่น, pH 7.6, (Vuthiphandchai *et al.*, 2009) โดยการทดลองย่อยที่ 1 ใช้อัตราส่วนเจือจางน้ำเชื้อปลาถูกอุยต่อ Ca-F HBSS ปริมาตรเท่ากับ 1:1 จากนั้นนำน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางผสมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ 6 ชนิด คือ Dimethyl sulfoxide (DMSO), Methanol, Glycerol, Sucrose, Ethylene glycol และ Propylene glycol ในอัตราส่วนปริมาตร 1:1 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของไครโอโพรเทคแทนท์ (Final concentrations) ที่ 3 ระดับ (5%, 10% และ 15%) ผสมสารละลายน้ำเชื้อปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร ใส่หลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ปิดหลอดฟางด้วยคีมคั้นไฟ ปลอ่ยให้น้ำเชื้ออยู่ในภาวะสมดุล (Equilibration time) ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที ก่อนทำการแช่แข็งด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (Cryologic Pty Ltd รุ่น CL3000) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ -8 องศาเซลเซียส/นาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส ถึง 0 องศาเซลเซียส พัก 0.5 นาที และลดอุณหภูมิต่อจากอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ถึง -40 องศาเซลเซียส พัก 0.5 นาที นำหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งของทุกชุดการทดลองไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว 1 วัน การทดลองย่อยที่ 2 และ 3 ทำการเจือจางน้ำเชื้อและลดอุณหภูมิตามที่กล่าวมาข้างต้นเพียงแต่แช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิที่ -5 และ -3 องศาเซลเซียส/นาทีตามลำดับ ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำน้ำเชื้อแช่แข็งของชุดการทดลองต่างๆ มาละลายในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที และทำการประเมิน

การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายของชุดการทดลองต่างๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (น้ำเชื้อสด)

การวิจัยในช่วงหลังพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอยู่ในกล่องโฟม โดยนำน้ำเชื้อปลาดุกออกมาเจือจางในชุดการทดลองที่เป็น Factorial design โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ มี 3 ตัวแปรที่สำคัญคือ 1) สารละลายบัฟเฟอร์ 3 ชนิดได้แก่ Ca-F HBSS), 0.9% NaCl และ Extender 7 (5.780 กรัม NaCl, 2.558 กรัม KCl, 0.103 กรัม $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.235 กรัม NaHCO_3 , 0.220 กรัม $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 6.0 กรัม Puruvate, 0.100 กรัม Citric acid, 2.380 กรัม HEPES buffer ใน 10 มิลลิลิตร KOH (1.27 กรัม/100 มิลลิลิตร), pH 7.6 (Vuthiphandchai *et al.*, 2009) และ 2) ระดับความสูง (2, 4 และ 6 เซนติเมตร) และ 3) เวลา (5, 10 และ 15 นาที) ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอยู่ในไอโนโตรเจนเหลว การแช่แข็งน้ำเชื้อในกล่องโฟมเริ่มจากเจือจางน้ำเชื้อปลาดุกอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์ทั้ง 3 ชนิดในอัตราส่วนปริมาตร 1:1 และใช้สารไครโอโพรเทคแทนที่ชนิดและความเข้มข้นสุดท้ายที่เหมาะสมจากการทดลองช่วงแรก (10% DMSO) ผสมลงไปในน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง จากนั้นรวบรวมน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางปริมาณ 1.5 มิลลิลิตรใส่ในหลอด Cryovial ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ปล่อยให้ห้อยในสถานะสมดุล นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และนำหลอด Cryovial ที่มีน้ำเชื้อบรรจุอยู่ไปทำการลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็ง โดยให้หลอด Cryovial สัมผัสกับไอโนโตรเจนเหลวที่ระดับความสูง 2, 4 และ 6 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าในไอโนโตรเจนเหลวที่อยู่ในกล่องโฟมขนาดยาว กว้าง สูง = $33.5 \times 22 \times 27$ เซนติเมตร พร้อมกับปิดฝากล่องโฟมให้สนิท เป็นเวลานาน 5, 10 และ 15 นาที นำ Cryovial ทั้งหมดที่ได้แช่แข็งไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว 7 วัน จึงนำมาประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย โดยนำหลอด Cryovial ออกจากถังไนโตรเจนเหลว

มาแช่ในอ่างน้ำอุ่นอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส จนน้ำเชื้อละลาย และทำการประเมินจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายของชุดการทดลอง เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด (ชุดควบคุม)

4. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ข้อมูลที่นำเสนอเป็น ค่าเฉลี่ย $\pm$ ค่าเฉลี่ยความแปรปรวน (Standard error of the mean) นำข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในแต่ละชุดการทดลอง มาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีการ Analysis of variance (Two- or Three-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเมื่อพบมีความแตกต่างระหว่างกลุ่ม ทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองด้วย Duncan's New Multiple Range Test และทำการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มระหว่างน้ำเชื้อสดกับชุดทดลองแต่ละชุดการทดลองทั้งหมด ด้วยวิธีการวิเคราะห์ Pair simple *t* - test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรมสถิติ GraphPad Version 8.0.1.244

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ

น้ำเชื้อสดของปลาดุกอยู่ที่รวบรวมมาใหม่ๆ มีความหนาแน่นของสเปิร์ม และการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเฉลี่ยเท่ากับ 4.35×10^9 ตัว/มิลลิลิตร และ $82.24 \pm 2.22\%$ การศึกษาผลของสารไครโอโพรเทคแทนที่และอัตราการลดอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอยู่ที่แช่แข็งภายในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ โดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนที่ 6 ชนิด ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 3 ระดับ ทำการแยกวิเคราะห์ทางสถิติของแต่ละอัตราการลดอุณหภูมิ โดยพบว่า การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอยู่ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -8 องศาเซลเซียส/นาาที เมื่อใช้สาร DMSO ที่

ระดับความเข้มข้น 10% ให้ผลการทดลองดีที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายเท่ากับ $64.44 \pm 4.44\%$ รองลงมาคือการใช้สาร Methanol ที่ระดับความเข้มข้น 15% และ 10% ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ $48.89 \pm 3.51\%$ และ $31.11 \pm 3.51\%$ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.01$ และ $p < 0.001$ ตามลำดับ (ภาพที่ 1 (a)) การใช้ Ethylene glycol พบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ระดับความเข้มข้น 5% โดยมีการเคลื่อนที่ต่ำประมาณ $11.11 \pm 4.01\%$ และ การใช้ Propylene glycol, Glycerol และ Sucrose ที่ทุกระดับความเข้มข้น ไม่ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ (ภาพที่ 1 (a))

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาอุกอุยเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส/นาท พบว่า การใช้ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 10% ยังคงทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่สูงเท่ากับ $40.00 \pm 4.71\%$ เช่นเดียวกับการใช้ Methanol ที่ระดับความเข้มข้น 15% ที่มีการเคลื่อนของสเปิร์มเท่ากับ $44.44 \pm 2.94\%$ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 1 (b) อย่างไรก็ตาม การใช้ Ethylene glycol และ Propylene glycol ทั้งสามความเข้มข้นทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่โดยรวมมีค่าเฉลี่ยต่ำกว่า 22% ในขณะที่การแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยสาร Glycerol และ Sucrose ทั้งสามความเข้มข้น ไม่พบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย (ภาพที่ 1 (b))

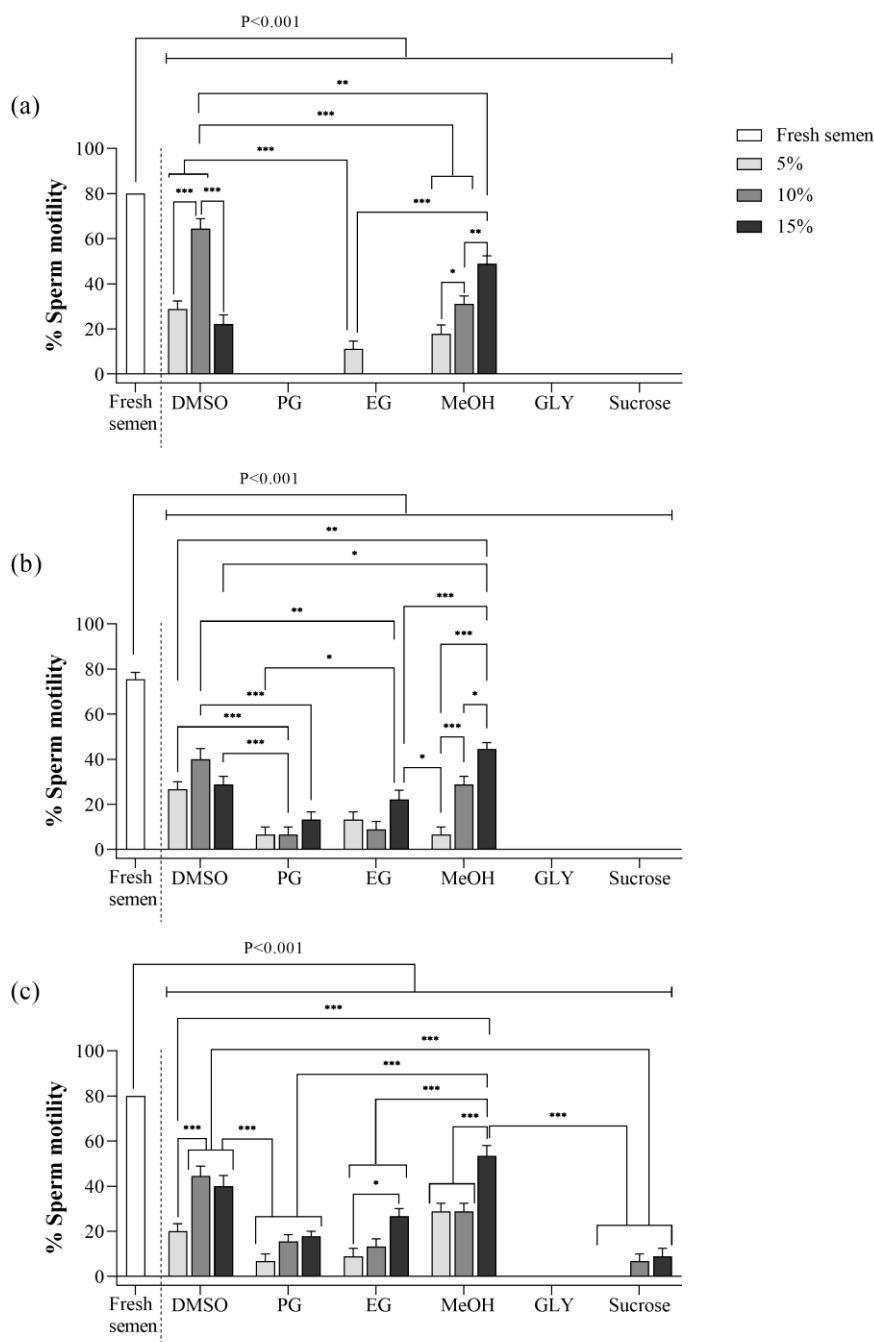
การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาอุกอุยที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3 องศาเซลเซียส/นาท เมื่อใช้ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 10% และ 15% ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่สูงเท่ากับ $44.44 \pm 4.44\%$ และ $40.00 \pm 4.71\%$ ตามลำดับซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) แสดงในภาพที่ 1 (c) การใช้ Methanol ที่ความเข้มข้น 15% ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่สูงประมาณ $53.33 \pm 4.71\%$ ซึ่งมีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับ การใช้ Methanol 5% และ 10% การใช้

Ethylene glycol และ Propylene glycol ทั้งสามความเข้มข้น ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่หลังการละลายระหว่าง $6.67 \pm 3.33\%$ และ $26.67 \pm 3.33\%$ ในขณะที่ Glycerol ไม่ทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่ และสาร Sucrose ที่ความเข้มข้น 10% และ 15% ทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่เล็กน้อยเพียง $6.67 \pm 3.33\%$ และ $8.89 \pm 3.51\%$ ตามลำดับ (ภาพที่ 1 (c))

โดยทั่วไปปัจจัยที่ส่งผลต่อความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่ทำให้สเปิร์มหลังการละลายมีการเคลื่อนที่สูงได้แก่ คุณภาพน้ำเชื้อที่ลักษณะรวบรวมชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ อัตราส่วนในการเจือจางน้ำเชื้อ ระยะเวลาสมดุล อัตราการลดอุณหภูมิ และอุณหภูมิที่ใช้ละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (Lim *et al.*, 2021; Irawan *et al.*, 2010) การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาอุกอุยที่เจือจางด้วย Ca-F HBSS ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ -8 องศาเซลเซียส/นาท ทำให้สเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับ การใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -5 องศาเซลเซียส/นาท และ -3 องศาเซลเซียส/นาท แสดงว่าอัตราการลดอุณหภูมิ -8 องศาเซลเซียส/นาท มีความเหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาอุกอุยแม้ว่าไม่ได้ทดลองในช่วงเวลาเดียวกัน การลดอุณหภูมิที่ช้าเกินไปในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง จะทำให้น้ำแพร่ออกจากเซลล์มาก เพราะใช้เวลานานขึ้นกว่าเซลล์แข็งตัว จึงทำให้เซลล์มีขนาดเล็กลงมากเกินไป และความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์มีค่าสูงขึ้น (Solute effect) ในทางตรงกันข้ามถ้าแช่แข็งเซลล์อัตราการลดอุณหภูมิที่เร็วเกินไป น้ำจะแพร่ออกจากเซลล์ได้น้อย ซึ่งเมื่อเซลล์แข็งตัว จะมีผลคือน้ำแข็งภายในเซลล์มากขึ้น เกิดอันตรายต่อเซลล์ได้ง่าย (Cabrita *et al.*, 2010; Irawan *et al.*, 2010) โดยทั่วไปอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาแต่ละชนิดแตกต่างกันไป เช่น -20 องศาเซลเซียส/นาท สำหรับปลา red seabream (Liu *et al.*, 2006), -

15 องศาเซลเซียส/นาที่ สำหรับปลากะพงขาวยุโรป (Sansone *et al.*, 2002), -10 องศาเซลเซียส/นาที่ สำหรับปลาซวาย (Kwantong and Bart, 2003) และ ปลาตะเพียน (Nahiduzzaman *et al.*, 2011), และ -5 องศาเซลเซียส/นาที่ สำหรับปลา blue catfish (Hu *et al.*, 2011) เป็นต้น

สาเหตุที่สารไครโอโพรเทคแทนท์ DMSO แช่แข็งน้ำเชื้อปลาคูกอยู่ได้ผลดี เนื่องจาก DMSO มีความเป็นพิษต่ำ มีมวลโมเลกุลต่ำ (78.13 กรัม/โมล) และมีความสามารถในการแพร่ซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ได้ดีเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดเล็ก อุณหภูมิแช่แข็ง ความสำเร็จในการใช้ DMSO แช่แข็งน้ำเชื้อปลาได้มีรายงานในปลาหลายชนิด



ภาพที่ 1 เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาอุกอุยหลังการแช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติที่อัตราการลดอุณหภูมิ -8 องศาเซลเซียส/นาที่ (a) -5 องศาเซลเซียส/นาที่ (b) และ -3 องศาเซลเซียส/นาที่ (c) มาที่อุณหภูมิต่ำสุดที่ -40 องศาเซลเซียส ก่อนเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว

DMSO, Dimethyl sulfoxide; PG, Propylene glycol; EG, Ethylene glycol; MeOH, Methanol; และ GLY, Glycerol

*, **, *** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$, $p < 0.01$ และ $p < 0.001$ ตามลำดับ ระหว่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในทุกชุดการทดลองทั้งหมดที่ใช้สารใดโพรเทคแทนที่แตกต่างกัน 6 ชนิด และใช้ระดับความเข้มข้นแตกต่างกัน 3 ระดับ ด้วยวิธีการวิเคราะห์ Two - way ANOVA ตามด้วยการทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยการทดสอบ Duncan's New Multiple Range Test $p < 0.001$ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มน้ำเชื้อสดกับชุดทดลองแต่ละชุดการทดลองทั้งหมด ด้วยวิธีการวิเคราะห์ Pair simple t - test

เช่น ปลากะรังเสือ (Yang *et al.*, 2020) ปลา Sea Perch (Ji *et al.*, 2004) ปลาไน (Irawan *et al.*, 2010) ปลาตะเพียน (Nahiduzzaman *et al.*, 2011) ปลาจืดและปลาดุกค่าน (Lal *et al.*, 2009) ปลาสาวย (Kwantong and Bart, 2003) เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้ 15% Methanol เพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่อัตราการลดอุณหภูมิ -3 องศาเซลเซียส/นาที ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายอยู่ในเกณฑ์ที่ดีเนื่องจาก Methanol มีมวลโมเลกุลขนาดเล็กที่สุด (32.04 กรัม/โมล) เมื่อเปรียบเทียบกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั่วไป จึงแพร่เข้าเซลล์ได้เร็วที่สุด เช่นเดียวกับการศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียน (*Puntius sarana*) ที่พบว่าการใช้ 10% DMSO แช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียน ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้ 10% หรือ 15% Methanol (Nahiduzzaman *et al.*, 2011) โดยทั่วไป Methanol นิยมนำมาใช้แช่แข็งในปลาตระกูล Catfish เช่น Bagrid catfish (Ratanatrivong *et al.*, 2011), ปลาดุกเทศ (Viveiros *et al.*, 2000), Yellow catfish (Pan *et al.*, 2008), Blue catfish (Hu *et al.*, 2011) รวมทั้งปลาชนิดอื่นเช่น ปลายี่สก (Pewnane *et al.*, 2010) ปลา Brown trout (Rusco *et al.*, 2020) เป็นต้น สำหรับ Propylene glycol ได้มีรายงานถึงความเหมาะสมในการนำมาใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Winter flounder (Rideout *et al.*, 2003) ในขณะที่ Ethylene glycol ให้ผลดีในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงขาวยุโรป (Sansone *et al.*, 2002) ปลา Far Eastern catfish (Gil *et al.*, 2017) ปลา Yellow croaker (Lim *et al.*, 2021) และปลา red seabream (Liu *et al.*, 2006) การใช้ Glycerol แช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในการศึกษาครั้งนี้ไม่ทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่หลังการละลาย แต่ได้ผลดีในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Summer whiting (Young *et al.*, 1992) ในขณะที่การใช้ Glycerol แช่แข็งน้ำเชื้อปลา Yellow catfish และปลา Sea Perch ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าไม่ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ (Pan *et al.*, 2008)

และไม่เคลื่อนที่ (Ji *et al.*, 2004) ตามลำดับ การใช้ Sucrose แช่แข็งน้ำเชื้อปลายังมีการศึกษาค่อนข้างน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดย Sucrose เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ (Non-permeating cryoprotectant) ที่สามารถนำมาแช่แข็งน้ำเชื้อปลาแรด (*Osphronemus goramy*) ให้มีคุณภาพดี (Abinawanto and Lestari, 2012)

2. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วยไอโซโพรเจนเหลวในกล่องโฟม

น้ำเชื้อสดปลาดุกอุยที่รวบรวมมามีค่าเฉลี่ยของความหนาแน่นสเปิร์ม และการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 3.85×10^9 ตัว/มิลลิลิตร และ $77.89 \pm 2.21\%$ ตามลำดับ การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในหลอด Cryovial ขนาด 1.8 มิลลิลิตรหลังการเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ชนิดที่มี 10% DMSO ที่ระดับความสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจนเหลว 2, 4 และ 6 เซนติเมตร นาน 5, 10 และ 15 นาที เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวแล้วนำมาละลาย พบว่าน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่แช่แข็งด้วย Ca-F HBSS มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูงกว่าน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วย 0.9% NaCl หรือ Extender 7 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 1) นอกจากนี้ระยะความสูงที่ใช้แช่แข็งน้ำเชื้อ และระยะเวลาที่ใช้แช่แข็งน้ำเชื้อในกล่องโฟม ต่างก็มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 1)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วย Ca-F HBSS ที่ระดับความสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจนเหลว 2, 4 หรือ 6 เซนติเมตรในกล่องโฟมนาน 10 นาที ทำให้สเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) มีค่าเท่ากับ $44.44 \pm 4.44\%$, $48.89 \pm 3.51\%$ และ $75.56 \pm 2.94\%$ ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับ การแช่แข็งนาน 5 หรือ 15 นาที โดยการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่แข็งที่ระดับความสูง 6 เซนติเมตร มีค่าสูง

กว่า ($p<0.05$) การแช่แข็งที่ระดับ 4 เซนติเมตร หรือ 2 เซนติเมตร (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตาม การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาถูกอุณหภูมิต่ำด้วย 0.9% NaCl โดยรวมทั้ง 3 ระดับความสูงและ 3 ระยะเวลาแช่แข็ง ทำให้สเปิร์มมีการ

เคลื่อนที่หลังการละลายมีค่าเฉลี่ยระหว่าง $6.7\pm 1.7\%$ และ $35.56 \pm 2.94\%$ และเมื่อใช้ Extender 7 สเปิร์มหลังการละลายมีการเคลื่อนที่เฉลี่ยระหว่าง 0% และ $36.56 \pm 2.94\%$

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาถูกอุณหภูมิต่ำที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ชนิดหลังการแช่แข็งในไอโนโตรเจนเหลวที่ระดับความสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจนเหลวในระยะเวลาต่างๆ กัน

ชนิดสารละลาย	ระยะเวลา (นาทีก)	ความสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจนเหลว		
		2 เซนติเมตร	4 เซนติเมตร	6 เซนติเมตร
Ca-F HBSS	5	$8.89 \pm 2.61^{c,3}$	$24.44 \pm 2.94^{b,45}$	$35.67 \pm 4.1^{a,2}$
	10	$44.44 \pm 4.44^{b,1}$	$48.89 \pm 3.51^{b,1}$	$75.56 \pm 2.94^{a,1}$
	15	$28.89 \pm 3.51^{b,2}$	$42.78 \pm 2.9^{a,12}$	$26.67 \pm 3.89^{b,23}$
0.9% NaCl	5	$7.78 \pm 2.78^{c,3}$	$13.33 \pm 2.36^{b,6}$	$35.56 \pm 2.94^{a,2}$
	10	$31.11 \pm 3.51^{a,2}$	$22.22 \pm 2.22^{b,45}$	$16.70 \pm 4.2^{b,4}$
	15	$13.33 \pm 2.36^{a,3}$	$17.78 \pm 1.47^{a,56}$	$6.70 \pm 1.7^{b,5}$
Extender 7	5	$8.89 \pm 3.51^{b,3}$	$27.78 \pm 3.09^{a,4}$	$13.33 \pm 1.92^{b,4}$
	10	$6.67 \pm 3.33^{b,3}$	$36.56 \pm 2.94^{a,23}$	$6.67 \pm 3.33^{b,5}$
	15	$0^{b,4}$	$16.67 \pm 1.92^{a,6}$	$0^{b,6}$

หมายเหตุ ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

การเลือกใช้นิพจน์ของสารละลายบัฟเฟอร์ระดับความสูง และระยะเวลาที่เหมาะสมในการแช่แข็งในไอโนโตรเจนเหลว จัดเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา เนื่องจากสารละลายบัฟเฟอร์ทำหน้าที่ในการควบคุมค่าแรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) และพีเอช (pH) น้ำเชื้อไม่ให้เปลี่ยนแปลง ทำให้สเปิร์มไม่ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ และองค์ประกอบต่างๆ ของน้ำเชื้อขณะถูกเจือจางไม่เปลี่ยนแปลง ในขณะที่การแช่แข็งน้ำเชื้อในไอโนโตรเจนเหลวอย่างเหมาะสมจะป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งในเซลล์สเปิร์ม (Lim *et al.*, 2021) การใช้ Ca-F HBSS แช่แข็งน้ำเชื้อปลาถูกอุณหภูมิต่ำที่ 2, 4 หรือ 6 เซนติเมตรนาน 10 นาทีทำให้สเปิร์มหลังการ

ละลายมีค่าสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นที่ใช้ 0.9% NaCl หรือ Extender 7 แช่แข็งนาน 5 หรือ 15 นาที แสดงว่า ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ และระดับความสูงในการแช่แข็งเหนือผิวหน้าในโตรเจนเหลวที่เวลาต่างกัน มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย

สาเหตุที่น้ำเชื้อปลาถูกอุณหภูมิต่ำแช่แข็งด้วย Ca-F HBSS ได้ผลดีกว่าการใช้ 0.9% NaCl หรือ Extender 7 อาจมีความเกี่ยวข้องกับอิทธิพลร่วมระหว่างชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ และอัตราการลดอุณหภูมิที่ใช้ไอโนโตรเจนเหลวที่แต่ละระดับความสูงในเวลาต่างกัน เนื่องจากในทุกชุดการทดลองนี้ใช้สารโครีโอโพรเทกแทนท์ 10% DMSO เหมือนกัน ซึ่งอิทธิพล

ร่วมของชนิดสารละลายบัฟเฟอร์ และอัตราการลดอุณหภูมิที่มีต่อความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา ได้มีรายงานในการศึกษาแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลายชนิด เช่น Ratanatrivong *et al.* (2011) แช่แข็งน้ำเชื้อปลากดกด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ชนิด (6% Fructose, 5% Glucose และ Ginsberg Fish's Ringer; GFR) ที่มี 10% Methanol โดยลดอุณหภูมิแช่แข็งในกล่องโฟมที่ 3 ระดับ (-2, -5 และ -10 องศาเซลเซียส/นาทิต) พบว่าการใช้ 6% Fructose และ 5% Glucose แช่แข็งน้ำเชื้อปลากดกทั้ง 3 ระดับ อัตราการลดอุณหภูมิ ทำให้สเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ การใช้ GFR ในทำนองเดียวกัน Pewnane *et al.* (2010) ได้แช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะกวด โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 3 สูตร (Milk powder glucose; MPG, Modified Zhang and Liu; MZL และ 5% glucose) ที่ผสม 10% Methanol ด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -4.55, -5.04 และ -5.76 องศาเซลเซียส/นาทิต พบว่า การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะกวดหลังการละลายในสารละลายบัฟเฟอร์ทั้ง 3 สูตรที่ใช้ อัตราการลดอุณหภูมิ -4.55 และ -5.76 องศาเซลเซียส/นาทิต มีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับ การใช้ อัตราการลดอุณหภูมิ -5.04 องศาเซลเซียส/นาทิต Kwantong and Bart (2003) แช่แข็งน้ำเชื้อปลาซิวด้วยการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 4 ชนิด (DMSO, methanol, Dimethylacetamide; DMA และ Ethylene glycol) เจือในสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ชนิด (Ca-F HBSS, HBSS และ 0.9% NaCl) ก่อนการแช่แข็งในอัตราการลดอุณหภูมิ -10 องศาเซลเซียส/นาทิต พบว่า น้ำเชื้อปลาซิวที่มีคุณภาพดีหลังการแช่แข็งได้มาจากการแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยการใช้ DMSO หรือ DMA ที่เจือจางใน 0.9% NaCl หรือ Ca-F HBSS เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ เนื่องจากน้ำเชื้อปลาซิวที่แช่แข็งด้วย 0.9% NaCl ร่วมกับ 12% DMSO หรือ 5% Methanol สามารถปฏิสนธิไข่ปลาซิวได้ประมาณ 41% และ 18% ตามลำดับ ในขณะที่น้ำเชื้อปลาซิวที่แช่แข็ง

ด้วย Ca-F HBSS ร่วมกับ 10% DMA และ 10% Ethylene glycol สามารถปฏิสนธิไข่ปลาซิวได้ประมาณ 30% และ 8% ตามลำดับแม้ว่าค่าเหล่านี้จะต่ำกว่าอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสด แสดงให้เห็นว่า การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลายชนิดให้มีคุณภาพที่ดีหลังการละลายมีความเกี่ยวข้องกับการเลือกใช้ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ และอัตราการลดอุณหภูมิ

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วยการสัมผัสไอน์โตรเจนเหลวที่ระดับความสูง 6 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าไอน์โตรเจนเหลว นาน 10 นาที ทำให้สเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงกว่าการแช่แข็งที่ระดับความสูง 2 หรือ 4 เซนติเมตรเมื่อใช้ Ca-F HBSS และ 10% DMSO อีกทั้งชุดการทดลองที่แช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยด้วย Ca-F HBSS และ 10% DMSO ที่ความสูง 6 เซนติเมตร เหนือผิวหน้าไอน์โตรเจนเหลว นาน 10 นาที ยังมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายยังมีค่าสูง ($75.56 \pm 2.94\%$) ใกล้เคียงกับการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อสด ($77.89 \pm 2.21\%$) แสดงว่า Protocol การแช่แข็งดังกล่าวมีความเหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยในหลอด Cryovial ขนาด 1.8 มิลลิลิตร การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยการใช้ไอน์โตรเจนเหลวภายในกล่องโฟมเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก มีราคาถูกเมื่อเปรียบเทียบกับแช่แข็งด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ โดยอาศัยหลักการปล่อยไอน์โตรเจนเหลว (ที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส) ระเหยออกมาเป็นไอน์โตรเจนเหลวในกล่องโฟมซึ่งเป็นภาชนะปิด ดังนั้น ถ้านำน้ำเชื้อปลามาให้สัมผัสไอน์โตรเจนเหลวที่ระดับความสูงเหนือผิวหน้าไอน์โตรเจนเหลวต่างกัน หรือใช้ระยะเวลาให้สัมผัสไอน์โตรเจนเหลวต่างกัน จะทำให้น้ำเชื้อปลาแข็งตัวในอัตราการลดอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความสูงและเวลาที่เลือกใช้ ซึ่งความสำเร็จในการพัฒนาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยไอน์โตรเจนเหลวภายในกล่องโฟมมีความแตกต่างกันไปในปลาแต่ละ

ชนิด เช่น Ji *et al.* (2004) แช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea perch ด้วยการใส่สารละลาย Extender 3 ชนิดคือ modified plaice Ringer solution (MPRS), D-15 และ modified Mounib's medium (MMM) ในการเจือจางน้ำเชื้อ แล้วใส่สารไครโอโพรเทกแทนท์ DMSO ความเข้มข้น 6%, 10% และ 14% ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่ระดับความสูง 2, 6 และ 13 เซนติเมตร เนื้อผิวหน้าในโตรเจนเหลว เป็นเวลา 10 นาที จึงนำน้ำเชื้อไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว พบว่า การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea perch ด้วย 10% DMSO ที่ความสูงเนื้อผิวหน้าในโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่หลังการละลายมีค่าสูงที่สุดในขณะที่การแช่แข็งน้ำเชื้อที่ระดับความสูง 2 เซนติเมตร มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าต่ำสุด Rusco *et al.* (2020) รายงานถึงความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Brown trout ด้วยไอไนโตรเจนเหลวที่ระดับความสูงเนื้อผิวหน้าในโตรเจนเหลว 3 เซนติเมตรนาน 5 นาที ความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาคูกอยู่ด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟมของการศึกษารุ่นนี้ ยังสามารถแช่แข็งน้ำเชื้อปลาคูกอยู่ได้ในปริมาณที่มากขึ้นภายในหลอด Cryovial ซึ่งการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาคูกอยู่ด้วยไอไนโตรเจนเหลวภายในกล่องโฟม เป็นเทคโนโลยีการแช่แข็งที่เหมาะสมสำหรับผู้ประกอบการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำที่ต้องการนำเอาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาคูกอยู่มาใช้ในการเพาะพันธุ์ปลาในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และยังช่วยทำให้การบริหารจัดการธนาคารน้ำเชื้อสัตว์น้ำ (Sperm bank) มีความสะดวกขึ้น (Ji *et al.*, 2004) อย่างไรก็ตาม การพัฒนาเทคนิคการวิจัยให้สามารถแช่แข็งน้ำเชื้อปลาคูกอยู่ให้ได้ในปริมาณมากขึ้นสำหรับการแช่แข็งภายในแต่ละหลอด เช่น แช่แข็งในหลอด cryovial ขนาด 4 มิลลิลิตรเป็นต้น แล้วทำให้คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลายไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสดไม่ว่าจะเป็นการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย หรือ

ความสามารถในการปฏิสนธิไข่น้ำเชื้อแช่แข็ง ควรจะมีการวิจัยต่อยอดในอนาคต เพื่อให้มีธนาคารน้ำเชื้อปลาคูกอยู่สำหรับการใช้ประโยชน์ด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเชิงพาณิชย์ และ/หรือการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์น้ำที่เริ่มหาได้ยากต่อไปแม้ว่าการนำเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำมาประยุกต์ใช้ในปัจจุบัน จะได้รับความนิยมน้อยกว่าการนำเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อมาใช้กับสัตว์บก (Hu *et al.*, 2011)

สรุป

การศึกษารุ่นนี้ได้พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาคูกอยู่ทั้งด้วยวิธีการใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ และวิธีการแช่แข็งในกล่องโฟม การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาคูกอยู่ที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS และ 10% DMSO ทั้งด้วยการใช้เครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติ และการใช้กล่องโฟม ต่างก็ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่หลังการละลายสูงสุด น้ำเชื้อปลาคูกอยู่ที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องมือแช่แข็งอัตโนมัติในอัตรา -8 องศาเซลเซียส/นาาที มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายที่มีค่าสูงใกล้เคียงกับน้ำเชื้อปลาคูกอยู่ในหลอด Cryovial ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่แช่แข็งภายในกล่องโฟม ที่ความสูง 6 เซนติเมตรเนื้อผิวหน้าในโตรเจนเหลว นาน 10 นาที ซึ่งมีความเหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์น้ำ

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่องนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 จากมหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ (สัญญาเลขที่ 38/2561) ขอขอบคุณ ภาควิชาวาริชศาสตร์และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย

บูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือและสถานที่ทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- Abinawanto, K.N. and Lestari R. 2012. The Effect of sucrose on sperm quality of *Osphronemus goramy* two days post-cryopreservation. **Journal of Agricultural Science and Technology** B2: 204-207.
- Cabrita, E., Sarasquete, C., Martinez-Paramo, S., Robles, V., Beirao, J., Perez-Cerezales, S. and Herraiz, M.P. 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives. **Journal of Applied Ichthyology** 26: 623-635.
- Fisheries Development Policy and Strategy Division. 2018. **Fisheries Statistics of Thailand 2018. No. 10/ 2020.** Published documents, Department of Fisheries, Bangkok. (in Thai)
- Gil, H.W., Lee, T.H. and Park, I.S. 2017. Effects of cryoprotectants and diluents on the cryopreservation of spermatozoa from Far Eastern Catfish, *Silurus asotus*. **Development & Reproduction** 21(1): 79-91.
- Hu, E., Yang, H. and Tiersch, T.R. 2011. High-throughput cryopreservation of spermatozoa of blue catfish (*Ictalurus furcatus*): establishment of an approach for commercial-scale processing. **Cryobiology** 62: 74-82.
- Irawan, H., Vuthiphandchai, V. and Nimrat, S. 2010. The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. **Animal Reproduction Science** 122: 236-243.
- Ji, X.S., Chen, S.L., Tian, Y.S., Yu, G.C., Sha, Z.X., Xu, M.Y. and Zhang, S.C. 2004. Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) spermatozoa and feasibility for production-scale fertilization. **Aquaculture** 241: 517-528.
- Kwantong, S. and Bart, A.N. 2003. Effect of cryoprotectants, extenders and freezing rates on the fertilization rate of frozen striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), sperm. **Aquaculture Research** 34: 887-893.
- Lal, K.K., Barman, A.S., Punia, P., Khare, P., Mohindra, V., Lal, B., Gopalakrishnan, A., Sah, R.S. and Lakra, W. 2009. Effect of extender composition on sperm cryopreservation of Asian catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch) and *Clarias batrachus* (Linnaeus). **Asian Fisheries Science** 22: 137-142.
- Lim, H.K., Irfan, Z., Lee, H.B., Song, J.H. and Lee, Y.H. 2021. Effect of diluent variation on cryopreservation of large yellow croaker *Larimichthys crocea*. **Fisheries and Aquatic Sciences** 24(2): 63-77.
- Liu, Q., Li, J., Zhang, S., Ding, F., Xu, X., Xiao, Z. and Xu, S. 2006. An efficient methodology for cryopreservation of spermatozoa of red seabream, *Pagrus major*, with 2-mL cryovials. **Journal of the World Aquaculture Society** 37(3): 289-297.
- Nahiduzzaman, M., Hassan, M.M., Khanam, U.H., Mamuna, S.N.A., Hossain M.A.R. and Tiersch, T.R. 2011. Sperm cryopreservation of the critically endangered olive barb (Sarpunti) *Puntius sarana* (Hasemenon, 1822). **Cryobiology** 62: 62-67.

- Pan, J., Ding, S., Ge, J., Yan, W., Hao, C., Chen, J. and Huang, Y. 2008. Development of cryopreservation for maintaining yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* sperm. **Aquaculture** 279: 173-176.
- Pewnane, P., Kongtarattana, S., Sodsuk, P.K. and Sodsuk, S. 2010. Cryopreservation of Julien's golden java carp (*Probarbus jullieni*) spermatozoa. **Journal of Fisheries Technology Research** 4(1): 1-14. (in Thai)
- Ratanatrivong, W., Taparhudee, W., Yoonpundh, R. and Srisapoome, P. 2011. Cryopreservation of bagrid catfish *Hemibagrus wyckioides* spermatozoa. **Kasetsart University Fisheries Research Bulletin** 35(2): 33-43.
- Rideout, R.M., Litvak, M.K. and Trippel, E.A. 2003. The development of sperm cryopreservation protocol for winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents. **Aquaculture Research** 34 (8):653-659.
- Rusco, G., Iorio, M.D., Iampietro, R., Esposito, S., Gibertoni, P.P., Penserini, M., Roncarati, A. and Iaffaldano, N. 2020. A simple and efficient semen cryopreservation method to increase the genetic variability of endangered Mediterranean brown trout inhabiting Molise Rivers. **Animals** 10(403): doi:10.3390/ani10030403.
- Sansone, G., Fabbrocini, A., Ieropoli, S., Langellotti, A.L., Occidente, M. and Matassino, D. 2002. Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L.) spermatozoa after thawing. **Cryobiology** 44(3): 229-239.
- Viveiros, A.T.M., So, N. and Koman, J. 2000. Sperm cryopreservation of African catfish *Clarias gariepinus*: cryoprotectants, freezing rate and sperm: egg dilution ratio. **Theriogenology** 54: 1395-1408.
- Vuthiphandchai, V., Thadsri, I. and Nimrat, S. 2009. Chilled storage of walking catfish (*Clarias macrocephalus*) semen. **Aquaculture** 296: 58-64.
- Vuthiphandchai, V., Wilairattanadilok, K., Chomphuthawach, S., Sooksawat, T. and Nimrat, S. 2015. Sperm cryopreservation of silver barb (*Barbodes gonionotus*): cryoprotectants, cooling rate and storage time on sperm quality. **Aquaculture Research** 46: 2443-2451.
- Yang, S., Fan, B., Chen, X. and Meng, Z. 2020. Cryopreservation of sperm in brown-marbled grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*). **Aquaculture International** 28: 1501-1516.
- Young, J.A., Capra, M.F. and Blackshaw, A.W. 1992. Cryopreservation of summer whiting (*Sillago ciliata*) spermatozoa. **Aquaculture** 102: 155-160.