เทคโนโลยีการแช่แข็งตัวอ่อนปลา อุปสรรคและแนวทางการพัฒนางานวิจัยของไทย

Fish Embryo Cryopreservation Technology : its Obstacles and Research Development in Thailand

อานุภาพ วรรณคนาพล*

Arnuparp Wankanapol*

คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, Maejo University

Received : 27 December 2018

Revised : 10 March 2019

Accepted : 17 April 2019

บทคัดย่อ

การศึกษาวิจัยการแช่แข็งตัวอ่อนปลาในประเทศไทยเป็นเทคโนโลยีทางชีวภาพที่มีรายงานการศึกษาวิจัยน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับการแช่แข็งน้ำเชื้อและการศึกษาของต่างประเทศ ซึ่งในปัจจุบันการแช่แข็งตัวอ่อนปลายังไม่ประสบผลสำเร็จอย่างชัดเจน เนื่องจากความแตกต่างและความสลับซับซ้อนของตัวอ่อนกับน้ำเชื้อปลา ซึ่งกลายเป็นอุปสรรคของการแช่แข็งดังนี้ ขนาดของตัวอ่อนและปริมาณถุงไข่แดงที่มีปริมาณมากซึ่งเป็นปัญหาหลักในการแช่แข็งตัวอ่อน จำนวนและความหนาของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ล้อมรอบตัวอ่อน ประสิทธิภาพการซึมผ่านของน้ำเข้าและออกภายในและนอกเซลล์ รวมทั้งชนิดของไข่ปลาเป็นต้น อุปสรรคดังกล่าวนี้มีความสำคัญส่งผลให้ตัวอ่อนปลาเกิดการบาดเจ็บจากการแช่แข็ง เช่น การเกิดผลึกน้ำแข็ง การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่าง การช็อคจากความเย็นและความร้อน แรงดันออสโมติกและความเป็นพิษของสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งที่ส่งผลต่อความสมบูรณ์และอัตราการรอดตายภายหลังจากการแช่แข็ง บทความนี้จึงได้รวบรวมปัจจัยและแนวทางการศึกษาที่เกี่ยวข้องเพื่อใช้ประโยชน์จากการแช่แข็งตัวอ่อนปลาในการวิจัยทางการอนุรักษ์พันธุกรรม เศรษฐกิจและสังคมและการปรับปรุงสายพันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ : การแช่แข็ง, ตัวอ่อนปลา, อุปสรรค, การพัฒนางานวิจัย, ไทย

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

ABSTRACT

At present, a few biotechnology research involved fish embryo cryopreservation in Thailand was reported while international journals had many publications related with fish embryo cryopreservation being reported. However, there are waiting for the success. There are a number of obstacles for cryopreservation of fish embryo including size of embryo and egg yolk quantity (the main problem in embryo cryopreservation), membrane structure, permeability of compartment barriers and type of the egg, chilling injuries phenomena during cooling and thawing process. The important concepts to support the success were demonstrated including type of cryoprotectants and their concentration, egg yolk volume, space and membrane permeability, embryonic development stage, cooling, thawing rate and equilibration time. These factors should be studied for further development of fish embryo cryopreservation.

Keywords: cryopreservation, fish embryo, obstacles, research development, Thailand

บทนำ

ประเทศไทยมีความสัมพันธ์กับแหล่งน้ำและพรรณปลาน้ำจืดมาตั้งแต่อดีตกาล โดยมีสำนวนไทยที่ได้ยินกันมายาวนานว่า “ในน้ำมีปลา ในนามีข้าว” ซึ่งหมายความว่าดินแดนที่มีความอุดมสมบูรณ์ทั้งในดินและน้ำ โดยเฉพาะปลา สัตว์น้ำหลักที่มีประโยชน์ด้านอาหารและนิเวศวิทยาแหล่งน้ำ สำหรับปลาน้ำจืดในไทยมีรายงานความหลากหลายไม่ต่ำกว่า 570 ชนิด (Wittayanon *et al*., 2012) ส่วนปลาน้ำกร่อยและน้ำเค็มที่นำมาใช้ประโยชน์ทางการประมงมีรายงานว่าพบไม่ต่ำกว่า 36 ชนิด (Department of Fisheries, 2016) เป็นต้น แต่ปัญหาจากความเสื่อมโทรมของแหล่งน้ำจากการขยายตัวของชุมชนเมืองอย่างรวดเร็ว การปล่อยน้ำเสียของชุมชนและโรงงานอุตสาหกรรม การใช้เครื่องมือประมงทำการประมงทะเลที่ส่งผลกระทบต่อแหล่งเพาะฟักและอนุบาลปลา รวมทั้งการปล่อยพันธุ์สัตว์น้ำต่างถิ่น (alien species) ลงในแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งมีผลกระทบต่อประชากรปลาทั้งทางด้านคุณภาพและปริมาณทั้งสิ้น ดังนั้นเทคโนโลยีทางชีวภาพทางด้านเก็บรักษาเซลล์ภายใต้อุณหภูมิที่ต่ำมาก ๆ โดยการแช่แข็งภายใต้ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen, LN_2) ที่อุณหภูมิ – 196 องศาเซลเซียส ที่เรียกว่าการเก็บรักษาแช่แข็งแบบไครโอพรีเซอเวชั่น (cryopreservation) จึงถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการเก็บน้ำเชื้อปลา (fish spermatozoa) ซึ่งถูกพัฒนาก้าวหน้าขึ้นมากกับปลาหลายชนิดของไทย สามารถนำมาใช้กับการอนุรักษ์พันธุกรรม (genetic materials) การเพิ่มมูลค่าผลผลิตปลานอกฤดูผสมพันธุ์และการปรับปรุงสายพันธุ์ทางเศรษฐกิจ (selection) ได้ แต่ในทางตรงกันข้ามการเก็บตัวอ่อนปลา (fish embryo) ยังไม่มีการศึกษาแพร่หลายแตกต่างกับต่างประเทศมาก ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของระดับของเทคโนโลยีการแช่แข็ง ประกอบกับองค์ประกอบของน้ำเชื้อและตัวอ่อนปลาที่แตกต่างกันอย่างสิ้นเชิง โดยเฉพาะปริมาณของถุงไข่แดง (yolk) ที่เป็นแหล่งอาหารและพลังงานหลักที่พบในตัวอ่อนที่มีปริมาณมาก ส่งผลให้กลไกการซึมผ่านแลกเปลี่ยนน้ำและสารรักษาเซลล์ที่เป็นหัวใจหลักในการแช่แข็งไม่สมดุล ซึ่งปัญหานี้แม้แต่ในต่างประเทศยังคงมีการศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องแต่ยังไม่มีรายงานความสำเร็จเกิดขึ้น อย่างไรก็ตามยังมีปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องอีกมาก ทำให้การพัฒนางานวิจัยด้านตัวอ่อนปลานี้อาจเป็นเรื่องยุ่งยากและประสบปัญหามากมาย จึงจำเป็นต้องมีการทบทวนข้อมูลใช้ประโยชน์จากการแช่แข็งตัวอ่อนปลาในการวิจัยทางการอนุรักษ์พันธุกรรม เศรษฐกิจและสังคมและการปรับปรุงสายพันธุ์ต่อไป

การวิจัยด้านตัวอ่อนปลาแช่แข็งของไทย (fish embryonic cryopreservation in Thailand)

ในปัจจุบันมีรายงานการศึกษาวิจัยด้านตัวอ่อนปลาแช่แข็งในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เพียงชนิดเดียวเท่านั้น (Wankanapol, 2012) หากเทียบกับต่างประเทศที่มีมากกว่า 17 ชนิด (Wankanapol, 2018) เช่น ปลาม้าลาย (*Danio rerio*) (Zhang *et al*., 1993; Kimmel *et al*., 1995; Zhang and Rawson, 1996; Lahnsteiner, 2008; Lin *et al*., 2009; Higaki *et al*., 2009; Zampolla *et al*., 2009; Silakes and Bart, 2010; Riesco *et al*., 2012; Higaki *et al*., 2013) ที่มีรายงานการศึกษาที่หลากหลายเนื่องจากเพาะเลี้ยงง่าย ไข่มีขนาดเล็กซึ่งนิยมนำมาใช้เป็นสัตว์น้ำทดลองทางวิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์การแพทย์อย่างกว้างขวาง นอกจากนี้ยังพบในปลา gilthead seabream (*Sparus aurata*) (Cabrita *et al*., 2006) turbot (*Scophthalmus maximus*) (Cabrita *et al*., 2003) rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Calvi and Maisse, 1998) flounder (*Paralichthys olivaceaus*) (Chen and Tian, 2005) Japanese whiting (*Sillago japonica*) (Rahman *et al*., 2011) sea perch (*Lateolabrax japonicas*) (Tian *et al*., 2003) และ red seabream (*Pagrus major*) (Xiao *et al*., 2008) เป็นต้น ซึ่งสาเหตุที่มีการศึกษาน้อยอาจเนื่องมาจากขาดแคลนบุคลากรที่มีความสนใจ บุคลากรขาดประสบการณ์และความชำนาญและที่สำคัญขาดแคลนงบประมาณอุปกรณ์และเทคโนโลยีขั้นสูงในการดำเนินการอย่างต่อเนื่องและที่สำคัญแม้แต่ในการศึกษาของต่างประเทศก็ยังไม่พบว่ามีรายงานที่ประสบผลสำเร็จในการเก็บตัวอ่อนปลาแช่แข็งเลย ซึ่งอาจส่งผลให้มีผู้สนใจจำนวนน้อยเนื่องจากประเมินความเป็นไปได้ว่ายากหากจะดำเนินการให้ประสบความสำเร็จได้ นอกจากนี้จากความแตกต่างของคุณสมบัติหลาย ๆ ประการของตัวอ่อนและน้ำเชื้อปลานี้ทำให้เห็นว่าข้อมูลการศึกษาวิจัยยังคงจำเป็นต้องศึกษาอีกจำนวนมากเพื่อหาวิธีการที่เหมาะสมที่จะเป็นคำตอบให้การเก็บตัวอ่อนปลาประสบผลสำเร็จ ซึ่งแม้ว่าจะนำหลักการของการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาซึ่งประสบผลสำเร็จกับปลาหลาย ๆ ชนิดก่อนหน้านี้แล้ว เช่น ปลาตะเพียนขาว (*Barbonymus gonionotus*) (Ounkwanmuang *et al*., 2008) ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) (Pewnane *et al*., 2004) ปลาดุกเทศ (*Clarias gariepinus*) (Pomsema *et al*., 2009) ปลานวลจันทร์น้ำจืด *(Cirrhinus microlepis) (*Ponchunchoovong *et al*., 2011) ปลาสวาย (*Pangasianodon hypopthalmus*) (Hambananda & Mongkonpunya, 1996) ปลาเผาะ (*Pangasius bocourti*) (Ponchunchoovong & Khunnumthiang, 2010) ปลากะพงแดง (*Lutjanus argentinaculatus)* (Chompoothawat , 2007) ปลาเทโพ *(Pangasius larnaudii)* (Chodcharat *et al*., 2005) ปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum)* (Sean-in *et al*., 2012) ปลาบึก (*Pangasianodon gigas*) (Polprasit & Tawarutmaneegul,1997) ปลาเทพา (*Pangasius sanitwongsei*) (Pewnane *et al*., 2012) ปลากระโห้ (*Catlocarpio siamensis*) (Ponchunchoovong *et al*., 2013) และปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) (Vuthiphandchai, 2009) เป็นต้น มาประยุกต์ใช้ แต่ก็ต้องปรับปรุงบางส่วนของกระบวนการให้เหมาะสมกับคุณสมบัติของเซลล์ของตัวอ่อนปลาชนิดต่าง ๆ อีกมาก

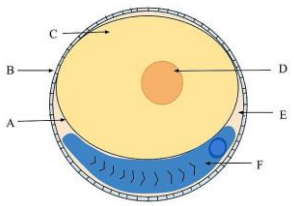
ความแตกต่างของน้ำเชื้อและตัวอ่อนปลา (comparisons between fish sperm and embryo)

ตัวอ่อนปลามีความสลับซับซ้อนกว่าน้ำเชื้ออสุจิในทุก ๆ ด้าน (Bart, 2000) ความแตกต่างประการแรกที่ชัดเจน คือ ขนาด (size) ตัวอ่อนของปลาทุกชนิดและทุกประเภทของไข่จะมีขนาดใหญ่กว่าเชื้ออสุจิมาก โดยทั่วไปขนาดของส่วนหัวของเชื้ออสุจิ (spermatozoa) จะมีขนาดเล็กกว่ารูไมโครไพล์ (micropyle) ของไข่ปลา เพื่อให้สามารถว่ายเข้าไปปฏิสนธิกับไข่ได้ ตัวอย่างขนาดของน้ำเชื้อของปลา Atlantic Cod พบว่าความยาวหัวอสุจิมีขนาดเฉลี่ย 1.8 – 3.6 ไมโครเมตร ความกว้างเฉลี่ย 1.5 – 2.3 ไมโครเมตร (Tuset *et al*., 2008) สำหรับ Islam and Akhter (2011) พบว่า หัวของเชื้ออสุจิปลามีขนาดประมาณ

2 – 4 ไมโครเมตร เป็นต้น สำหรับขนาดของไข่ปลา (egg) ที่แบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ ไข่ลอย (pelagic egg) จะมีขนาดเล็กที่สุด รองลงมาคือไข่ครึ่งจมครึ่งลอย (semi buoyant egg) และไข่จม (demersal egg) ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ตามลำดับ ในปลาหมอไทยที่มีไข่ลอยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.7 มิลลิเมตร (Chesoh, 2004) ในปลาตะเพียนขาวที่มีไข่ประเภทครึ่งจมครึ่งลอยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5 – 0.8 มิลลิเมตร และเมื่อพองจากการดูดน้ำเข้าไปจะมีขนาด 2.5 – 3.5 มิลลิเมตร (Department of Fisheries, 2005) สำหรับไข่ปลานิลซึ่งมีไข่ประเภทจมพบว่ามีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.8 – 2.0 มิลลิเมตร (Department of Fisheries, 2010) เป็นต้น ซึ่งหากเปรียบเทียบขนาดของเชื้ออสุจิกับไข่ของปลาจะพบว่ามีขนาดแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัด โดยไข่ปลาจะมีขนาดใหญ่กว่าเชื้ออสุจิประมาณ 860 – 875 เท่า (ขึ้นอยู่กับชนิดปลา) จากสาเหตุนี้ทำให้เป็นอุปสรรคอย่างมากในการซึมผ่านของน้ำ (osmosis) ที่ไม่สมดุล (imbalance) ทั้งภายในและภายนอกตัวอ่อน จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาความสมดุลของสารละลายที่นำตัวอ่อนไปแช่ให้เหมาะสม

นอกจากนี้เชื้ออสุจิต้องแขวนลอยอยู่ในน้ำเลี้ยงน้ำเชื้อ (seminal fluid หรือ seminal plasma) เพื่อรักษาความสมบูรณ์และการมีชีวิต ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาสารเจือจางน้ำเชื้อ (extender) จากการคัดเลือกสารประกอบต่าง ๆ มาผสมกันให้เกิดสูตรต่าง ๆ ที่เหมาะสมกับปลาชนิดนั้น ๆ และที่สำคัญสูตรสารเจือจางน้ำเชื้อจะต้องมีค่าความเข้มข้นของสารที่อยู่ในสารละลาย (osmolality) และค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ใกล้เคียงกับความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงน้ำเชื้อหรือเลือดของปลานั้น ๆ แต่สำหรับตัวอ่อนปลามีน้ำเลี้ยงไข่ (ovarian fluid หรือ ovarian plasma) ประกอบอยู่เช่นกันแต่มีปริมาณน้อยกว่าน้ำเลี้ยงน้ำเชื้ออสุจิมาก ซึ่งคาดว่ามีปริมาณ 10 - 30 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณไข่ทั้งหมด ซึ่งส่วนใหญ่จะมีสารอินทรีย์ประเภทโปรตีนในปริมาณที่สูง รวมทั้งมี Na^+ ในปริมาณที่สูงด้วยเช่นกัน (Lahnsteiner *et al*., 1995) จากกรณีนี้ทำให้การแช่แข็งไข่หรือตัวอ่อนปลา ไม่จำเป็นต้องคัดเลือกสารประกอบต่าง ๆ มาผสมให้เป็นสารเจือจางเหมือนกับน้ำเชื้อแต่ยังคงต้องศึกษาความเข้มข้นของสารที่อยู่ในสารละลายและความเป็นกรดด่างของสารประกอบนั้น ๆ เช่นเดียวกับน้ำเชื้อเพื่อวิเคราะห์ระดับความเป็นพิษที่จะเกิดขึ้นกับตัวอ่อนปลาที่ทำการศึกษา

ความแตกต่างอีกประการหนึ่งคือในตัวเชื้ออสุจิปลามีเยื่อหุ้มเซลล์ซึมผ่านน้อยและไม่ซับซ้อน ทำให้การแลกเปลี่ยนน้ำและสารต่าง ๆ ระหว่างภายในและภายนอก (osmosis) เป็นไปได้ง่าย แต่ในตัวอ่อนปลาจะมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีหลายชั้นและองค์ประกอบซับซ้อนกว่า เรียกว่า multiple compartment barriers ที่ประกอบด้วย เปลือกไข่ (chorion) ช่องว่างเพอริวิเทลลีน (perivitelline space) เยื่อหุ้มไข่แดง (vitelline membrane) ไข่แดง (yolk) และหยดน้ำมัน (oil globule หรือ oil granule) (ภาพที่ 1) ซึ่งความหนาของเปลือกไข่และช่องว่างเพอริวิเทลลีนจะขึ้นอยู่กับชนิดและประเภทของไข่ปลา และที่สำคัญไข่ปลาเป็นไข่ที่มีไข่แดงปริมาณมาก (telolecithal egg) ซึ่งเยื่อหุ้มเซลล์และไข่แดงดังกล่าวข้างต้นนี้เป็นอุปสรรคอย่างมากในการแลกเปลี่ยนน้ำและสารละลายต่าง ๆ เข้าออกตัวอ่อนเนื่องจากแต่ละเยื่อหุ้มมีคุณสมบัติ ความหนาและองค์ประกอบที่น้ำและสารละลายสามารถซึมผ่านได้ไม่เท่ากัน



ภาพที่ 1 เยื่อหุ้มเซลล์ที่ซับซ้อนหลายชั้น (multiple compartment barriers) A-vitelline membrane, B-chorion, C-yolk, D-oil droplet or granule, E-perivitelline space and F-germinal disc (animal pole) (Flowerchild207, 2013)

นอกจากนี้ไข่ปลายังสามารถจำแนกได้ 3 ประเภท ได้แก่ ไข่ลอย (pelagic egg) ครึ่งจมครึ่งลอย (semi buoyant egg) และจม (demersal egg) ซึ่งแต่ละประเภทมีขนาดของไข่ ความหนาของเปลือกไข่ ช่องว่างภายใน เยื่อหุ้มเซลล์ภายในและที่สำคัญที่สุดปริมาณของถุงไข่แดง (egg yolk) ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยเฉพาะไข่ลอยจะมีขนาดเล็กที่สุด เปลือกบาง ช่องว่างภายในกว้างและถุงไข่แดงน้อยที่สุด รองลงมาคือ ไข่ครึ่งจมครึ่งลอยและจมตามลำดับ ดังนั้นการศึกษาตัวอ่อนปลาแช่แข็งจึงควรเริ่มต้นจากการคัดเลือกตัวอ่อนที่มาจากไข่ประเภทไข่ลอยซึ่งมีขนาดเล็กที่สุดก่อนเพื่อให้มีโอกาสประสบผลสำเร็จแล้วจึงพัฒนาต่อยอดไปสู่ไข่ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเป็นต้น อีกประเด็นหนึ่งการพัฒนาของตัวอ่อนหลังจากได้รับการปฏิสนธิ (fertilized) จะแบ่งได้ประมาณ 7 ระยะ ตามการแบ่งระยะของ Kimmel *et al*. (1995) ซึ่งแต่ละระยะความซับซ้อนขององค์ประกอบของไข่ที่พัฒนาเป็นตัวอ่อนก็จะลดลงตามระยะเวลาการพัฒนาที่เพิ่มขึ้น เช่น ขนาดของถุงไข่แดงก็จะลดลงตามระยะการพัฒนา จนกระทั่งหมดไปหลังจากฟักเป็นตัวแล้ว เป็นต้น จากข้อมูลเหล่านี้ยังส่งผลต่อการแลกเปลี่ยนน้ำภายในและภายนอกเซลล์อีกด้วย ดังนั้นการคัดเลือกระยะการพัฒนาของตัวอ่อนปลาในช่วงที่ใกล้ที่จะฟักเป็นตัว (hatching) มาแช่แข็งจะมีโอกาสที่จะประสบผลสำเร็จมากกว่าตัวอ่อนที่กำลังพัฒนาในระยะต้น ๆ เป็นต้น

ปรากฏการณ์ที่พึงระวังในการแช่แข็งตัวอ่อนปลาหรือการบาดเจ็บจากการแช่แข็ง (chilling injuries)

ปรากฏการณ์เหล่านี้เป็นปรากฏการณ์ที่ไม่ควรให้เกิดขึ้นในขณะที่กำลังทำการลดอุณหภูมิในการแช่แข็งตัวอ่อนและการนำตัวอ่อนมาทำการละลายภายหลังจากที่แช่แข็งไปแล้วเพื่อประเมินการอยู่รอด ซึ่ง Chao and Liao (2001) ได้จำแนกปรากฏการณ์ต่าง ๆ ไว้ดังต่อไปนี้

1. **การเกิดผลึกน้ำแข็งในเซลล์** (ice crystal formation) เกิดในช่วงระหว่างการลดอุณหภูมิ เนื่องมาจากน้ำไม่สามารถถูกดึงออกจากเซลล์ตัวอ่อนได้ทั้งหมดและยังคงหลงเหลืออยู่ภายในเซลล์ น้ำส่วนนี้จะกลายเป็นผลึกน้ำแข็งและทิ่มแทงเซลล์ให้เสียหายเหมือนกับมีด ดังนั้นจึงไม่ควรให้มีน้ำเหลือในเซลล์จึงจะลดการเกิดปรากฏการณ์นี้ได้

2. **การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง** (pH fluctuation) เกิดขึ้นในช่วงของการแช่แข็ง (การลดอุณหภูมิ) และการละลายตัวอ่อน ในช่วงนี้สมดุลของเกลือภายในเซลล์จะถูกรบกวน เนื่องจากน้ำถูกดึงออกจากเซลล์ส่งผลให้เซลล์สูญเสียน้ำมีโอกาสทำให้เซลล์แห้งและค่าความเป็นกรดด่างจะเปลี่ยนแปลงโดยมีค่าลดต่ำลงจากปกติ ซึ่งเหตุการณ์นี้จะเกิดขึ้นขณะทำการ

ลดอุณหภูมิ ในทางกลับกันในช่วงของการละลายซึ่งเป็นช่วงที่ตัวอ่อนถูกแช่แข็งแล้วถูกนำมาละลาย น้ำจะซึมกลับเข้าสู่ตัวอ่อน ส่งผลให้เซลล์ตัวอ่อนปลามีปริมาณน้ำเพิ่มมากขึ้นทำให้สมดุลของเกลือภายในเซลล์จะถูกรบกวนอีกครั้ง เซลล์ตัวอ่อนอาจจะขยายใหญ่ขึ้นจากน้ำที่ซึมเข้ามามากขึ้น ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างเปลี่ยนแปลงโดยมีค่าสูงขึ้นกว่าในช่วงลดอุณหภูมิ

3. **การช็อคด้วยความเย็น** (cold shock) **และการช็อคด้วยความร้อน** (hot shock) เกิดจากไขมันในตัวอ่อนที่เปลี่ยนสภาพจากไขมันที่มีความนิ่มจนกลายสภาพเป็นแข็งตัวในขณะลดอุณหภูมิ ส่งผลให้เนื้อเยื่อตึงเครียดเพิ่มขึ้นเรียกว่าการช็อคด้วยความเย็น ในทางกลับกันไขมันที่เปลี่ยนจากสภาพจากไขมันที่แข็งตัวกลายสภาพเป็นไขมันนิ่มดังเดิมในขณะทำการละลาย ส่งผลให้เนื้อเยื่อตึงเครียดเพิ่มขึ้น เรียกว่าการช็อคด้วยความร้อน

4. **แรงดันออสโมติก** (osmotic pressure) เมื่อสารละลายภายนอกและน้ำภายในเซลล์มีแรงดันออสโมติกไม่สมดุล การซึมผ่านของน้ำโดยแรงดันออสโมซิสจึงมีผลทำให้เซลล์เสียหาย เช่น ในช่วงการลดอุณหภูมิ (cooling) ก่อนการแช่แข็งจะเกิดปรากฏการณ์ไฮเปอร์โทนิค (hypertonic) สารละลายภายนอกเซลล์จะเข้มข้นกว่าภายในเซลล์น้ำจะซึมออกสู่ภายนอกเซลล์ทำให้เซลล์แห้งและเหี่ยวลง ในทางกลับกันในช่วงการละลาย (thawing) จะเกิดปรากฏการณ์ไฮโปโทนิค (hypotonic) สารละลายภายนอกเซลล์มีความเข้มข้นน้อยกว่าภายใน น้ำจากภายนอกจะซึมเข้าทำให้เซลล์ขยายใหญ่ขึ้นจนอาจแตกได้

5. **ความเป็นพิษของสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็ง** (cryoprotectant toxicity) สารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งมีหน้าที่เข้าไปแทนที่น้ำในเซลล์ป้องกันไม่ให้เกิดผลึกน้ำแข็ง สารชนิดนี้จำเพาะกับชนิดของตัวอ่อนปลาไม่เหมือนกัน ต้องมีการทดสอบชนิดสารที่เหมาะสมกับชนิดตัวอ่อนปลาเป็นรายชนิด แต่ข้อควรระวังคือสารชนิดนี้จะเป็นพิษเมื่อมีความเข้มข้นสูงนั่นเอง สารนี้มีมากมายหลายชนิดแต่ที่นิยมใช้ในการศึกษาวิจัยบ่อยครั้ง ได้แก่ Dimethyl sulfoxide (DMSO), Ethylene glycol (EG), Glycerol (GLY), Methanol (MeOH) และ Propylene glycol (PG) เป็นต้น

ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จของการแช่แข็งตัวอ่อนปลา (factors effecting the success of fish embryo cryopreservation)

ปัจจัยที่หลัก ๆ ที่อาจส่งผลต่อความสำเร็จในการแช่แข็งตัวอ่อนปลาสามารถพิจารณา (Boonkuson, 2008 และ Hegadorn *et al*., 1997) ได้ดังต่อไปนี้

1. **ปริมาตรและขนาดของเซลล์ภายในตัวอ่อน** เนื่องจากตัวอ่อนปลามีพื้นที่ผิวมากกว่าเชื้ออสุจิ รวมทั้งถุงไข่แดง (yolk egg) ที่มีขนาดและปริมาณมากกว่า ทำให้การเคลื่อนที่ผ่านเข้าออกของน้ำระหว่างภายในและภายนอกต้องใช้เวลามากขึ้นกว่าปกติ

2. **ช่องว่างและคุณสมบัติในการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ของตัวอ่อนปลาแต่ละชนิด** ในตัวอ่อนของปลาแต่ละชนิดจะประกอบด้วยช่องว่างและเยื่อหุ้มเซลล์ภายในหลายชั้น ซึ่งเยื่อหุ้มเหล่านี้จะเปลี่ยนแปลงไปภายหลังจากการปฏิสนธิ มีผลให้เซลล์ตัวอ่อนมีขนาดแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีผลให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความแข็งแรงและทนต่อแรงดันออสโมติกในการซึมผ่านของน้ำและสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งได้สูงแตกต่างกัน

3. **ระยะการพัฒนาของตัวอ่อน** ระยะการเจริญของตัวอ่อนที่แตกต่างกันจะมีผลให้ความทนทานต่อการแช่แข็งแตกต่างกัน โดยส่วนใหญ่ตัวอ่อนระยะก่อนการฟักจะมีความอดทนต่ออุณหภูมิต่ำมากกว่าระยะเริ่มต้นพัฒนา

4. **อัตราการลดอุณหภูมิในการแช่แข็ง** เป็นช่วงที่สำคัญต่ออัตราการรอดของตัวอ่อนมาก หากลดอุณหภูมิด้วยความเร็วมากเกินไป จะมีผลให้น้ำภายในเซลล์มีเวลาซึมออกจากเซลล์ได้น้อยและหลงเหลืออยู่ในเซลล์มากและในที่สุดจะกลายเป็นผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ในทางตรงกันข้ามหากลดอุณหภูมิช้าเกินไปจะทำให้น้ำภายเซลล์มีโอกาสซึมออกได้มาก เกิดความเสียหายจากความเข้มข้นของอิเลกโทรไลท์ภายในเซลล์มีความเข้มข้นสูงเกินไป (Liebermann *et al*., 2002)

5. **การละลาย** เป็นช่วงที่มีความสำคัญเท่า ๆ กับการลดอุณหภูมิในกรณีที่ตัวอ่อนมีถุงไข่แดงปริมาณมากหรือเป็นไข่ประเภทไข่จมโอกาสที่น้ำจะเหลือภายในเซลล์ขณะลดอุณหภูมิมีสูง ดังนั้นสามารถใช้อุณหภูมิสูงมากเพื่อให้เกิดการรวดเร็วในการละลายเพื่อลดการเกิดผลึกน้ำแข็งประมาณ 40 – 45 องศาเซลเซียส หากในกรณีตัวอ่อนมีถุงไข่แดงเล็กหรือเป็นไข่ประเภทไข่ครึ่งจมครึ่งลอยมีโอกาสที่น้ำจะเหลือในเซลล์น้อย ดังนั้นจะต้องใช้อุณหภูมิไม่สูงมากเพื่อละลายตัวอ่อนอย่างช้า ๆ โดยใช้อุณหภูมิระหว่าง 35 – 40 องศาเซลเซียส เป็นต้น

6. **ชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็ง** สารชนิดนี้มีหน้าที่สำคัญในการป้องกันเซลล์ถูกทำลายในระหว่างการแช่แข็งและการละลาย โดยมีความจำเพาะต่อชนิดปลา ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ความเหมาะสมของสารชนิดนี้ขึ้นอยู่กับชนิดปลา และความเข้มข้นของสารนี้ต้องมีระดับที่เหมาะสมไม่สูงเกินไป (50 เปอร์เซ็นต์) เพื่อไม่ให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ นอกจากนี้อุณหภูมิขณะแช่ตัวอ่อนในสารชนิดนี้ก็มีผลต่อความเป็นพิษเช่นกัน โดยที่ความเป็นพิษจะสูงขึ้นแปรผันตามอุณหภูมิที่สูงขึ้น

แนวทางการพัฒนางานวิจัยด้านการแช่แข็งตัวอ่อนปลา (research development in fish embryonic cryopreservation)

เนื่องจากความซับซ้อนและพลวัตรของกระบวนการทางสรีระเคมีของอุณหภูมิและการซึมผ่านของน้ำระหว่างตัวอ่อนกับสารละลายภายนอกแนวทางการศึกษาจึงควรนำสิ่งเหล่านี้มาพิจารณา ประกอบด้วย

1.**ชนิดของปลา (fish species) และชนิดของไข่ปลา (type of fish egg)** เนื่องจากตัวอ่อนปลาแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกัน (species specific) ทั้งด้านชีววิทยา ประเภทและขนาดของไข่ ความไวต่อปฏิกิริยาเคมีและความเปราะบางจากการแช่แข็ง (cyoinjuries หรือ chilling injuries) ดังนั้นหากเปลี่ยนชนิดตัวอ่อนปลาที่ใช้ในการศึกษาจึงจำเป็นต้องเริ่มศึกษาใหม่ตั้งแต่กระบวนการแรกใหม่อีกครั้งเป็นต้น โดยส่วนใหญ่ตัวอย่างตัวอ่อนปลาที่ใช้ศึกษาจะคัดเลือกปลาที่มีขนาดเล็กเพาะเลี้ยงง่าย มีไข่ขนาดเล็กเช่นไข่ที่จัดอยู่ในประเภทลอยน้ำหรือครึ่งจมครึ่งลอยที่มีปริมาณไข่แดงน้อยและหาได้ง่ายตามท้องตลาดเป็นต้น ซึ่งในงานวิจัยที่ได้มีการศึกษาแล้วส่วนใหญ่นิยมใช้ปลาม้าลาย (zebra fish, *Danio rerio*) เป็นต้นแบบในการศึกษาด้านตัวอ่อน เช่น การศึกษาของ Lahnsteiner (2008); Lin *et al*. (2009); Zampolla *et al*. (2009) และ Higaki *et al*. (2013) เป็นต้น

2. การคัดเลือกระยะการพัฒนาของตัวอ่อนปลา (fish embryonic development) เป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญของการแช่แข็ง (Hegadorn and Kleinhans, 2000) ซึ่งแต่ละระยะการพัฒนาก็มีความเปราะบางต่อการแช่แข็งแตกต่างกัน (Urbanyi *et al*., 1997 และ Lahnsteiner, 2008) โดยเฉพาะการพัฒนาในระยะเริ่มต้นจะมีความเปราะบางกว่าระยะตอนปลายหรือก่อนที่จะฟัก (hatching) เนื่องจากตัวอ่อนระยะนี้มีขนาดและปริมาณของไข่แดงมากซึ่งจะทำให้เกิดปัญหามีการแลกเปลี่ยนน้ำและสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งไม่เพียงพอ ซึ่งปรากฏการณ์นี้จะเกิดในช่วงการลดอุณหภูมิทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งทำลายเซลล์ได้ แต่อย่างไรก็ตามบางรายงานให้ข้อเสนอแนะว่าเยื่อหุ้มเซลล์ของตัวอ่อนระยะต้นนี้ยังไม่มีความซับซ้อนเกินไป ซึ่งอาจทำให้น้ำซึมผ่านเยื่อหุ้มได้ง่ายกว่าหากเทียบกับระยะใกล้ฟักออกเป็นตัว ซึ่ง Zhang *et al*. (1993); Bart (2000) และ Higaki *et al*. (2009) ศึกษา พบว่า ตัวอ่อนของปลาม้าลาย (*Danio rerio*) ในช่วงที่หัวใจเริ่มทำงานและช่วงระยะพัฒนาข้อปล้องจะทนทานต่อความเป็นพิษของสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งและการบาดเจ็บจากการแช่แข็งมากกว่าในช่วงระยะ blastula ขณะที่ Strüssmann *et al*. (1999) ก็พบว่าตัวอ่อนของปลา whiting (*Sillago japonica);* pejerrey (*Odontesthes bonariensis)* และ medaka (*Oryzias latipes)* ระยะที่มีการแบ่งเซลล์ 512 - 1024 สามารถทนพิษของสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งดีกว่าระยะก่อนหน้านี้ นอกจากนี้ตัวอ่อนของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ระยะก่อนไข่แดงยุบก็มีความทนต่อการแช่แข็งมากกว่าระยะ blastula และ gastrula ตามลำดับ (Wankanapol, 2012) จากการศึกษาข้างต้นนี้ชี้ให้เห็นว่าตัวอ่อนของปลาระยะก่อนการฟักส่วนใหญ่ซึ่งเป็นระยะการพัฒนาขั้นสุดท้ายจะมีความอดทนต่อพิษจากสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งสูง ทำให้เป็นระยะที่เหมาะสมในการคัดเลือกมาเก็บรักษาแบบแช่แข็ง cryopreservation เนื่องจากมีโอกาสรอดตายสูงและมีโอกาสประสบผลสำเร็จมากกว่าตัวอ่อนในระยะต้น ๆ ของการพัฒนา เป็นต้น

3.สารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็ง (cryoprotectants) คือสารเคมีที่ใช้ในอุตสาหกรรมความเย็นที่ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการป้องกันเนื้อเยื่อชีวภาพจากการถูกทำลายจากการแช่แข็ง ซึ่ง Fletcher *et al*. (2001) กล่าวว่าสารเคมีนี้สามารถป้องกันเซลล์จากการลดอุณหภูมิลงอย่างช้า ๆ โดยอาศัยกลไกหนึ่งหรือมากกว่านั้นตามปรากฏการณ์ต่อไปนี้ (1) ระงับความเข้มข้นของเกลือภายในเซลล์ไม่ให้สูง (2) ลดการหดตัวของเซลล์ ณ อุณหภูมิแช่แข็งที่กำหนดในระหว่างการแช่แข็ง (freezing) (3) ลดการแตกตัวเป็นชิ้นเล็ก ๆ ของสารละลายสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งในขณะลดอุณหภูมิแช่แข็ง (4) ลดการเกิดผลึกน้ำแข็ง (ice crystal formation) ภายในเซลล์

สารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งนี้แบ่งตามความสามารถในการซึมผ่านได้ 2 ประเภท คือ ประเภทซึมผ่านเข้าในเซลล์ได้ (permeable cryoprotectant) ซึ่งมีกลไกช่วยให้ซึมผ่านเข้าสู่เซลล์และปกป้องเซลล์จากภายใน และประเภทซึมผ่านไม่ได้ (non permeable cryoprotectant) ซึ่งไม่สามารถซึมผ่านเซลล์ได้และจะปกป้องเซลล์อยู่ภายนอก โดยกลไกสำคัญที่สุดคือ การลดการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ โดยสารนี้จะเข้าไปแทนที่น้ำภายในเซลล์ในขณะการปรับสมดุลสารละลายและการลดอุณหภูมิเข้าสู่การแช่แข็ง ซึ่งหากสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งสามารถเข้าแทนที่น้ำได้หมดก็ลดความเสี่ยงต่อการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ในทางกลับกันในขณะทำการละลายหลังจากการแช่แข็งสารนี้จะซึมกลับออกมาแล้วน้ำจะซึมกลับเข้าเซลล์ดังเดิมซึ่งก็เป็นช่วงสำคัญของการแช่แข็งเช่นเดียวกัน

3.1. การคัดเลือกชนิดของสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็ง มีหลักการคือ มีความจำเพาะกับชนิดของตัวอ่อนปลา (species specific) โดยส่วนใหญ่ในขั้นตอนเริ่มต้นจะคัดเลือกสารประเภทที่ซึมผ่านเข้าภายในเซลล์เพียงชนิดเดียวมาศึกษาว่าชนิดใดไม่ส่งผลเสียต่อความสมบูรณ์ของตัวอ่อนหรือส่งผลให้อัตราการรอดตายต่ำ ซึ่งหมายถึงสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งนั้นต้องมีความเป็นพิษต่ำ เช่น การศึกษาของ Zhang *et al*. (2005), Tian *et al*. (2003) และ Chen and Tian (2005) พบว่า propylene glycol (PG) เป็นพิษต่อตัวอ่อนปลา flounder embryos (*Paralichthys olivaceus*) ต่ำ ขณะที่ Cabrita *et al*. (2006) พบว่า ethylene glycol (EG) เหมาะสมกับตัวอ่อนของปลา gilthead seabream เนื่องจากมีความเป็นพิษต่ำ ส่วนการศึกษาของ Rahman *et al*. (2008) พบว่า PG เหมาะสมกับ Japanese whiting (*Sillago japonica*) สำหรับ Zhang and Rawson (1996) พบว่า PG และ methanol (MeOH) มีความเหมาะสมกับปลาม้าลาย (*Danio rerio*) และ PG เหมาะสมกับตัวอ่อนปลานิล (Wankanapol, 2012) เป็นต้น แต่มีบางรายงานอธิบายว่าการผสมสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็ง 2 ชนิดขึ้นไปสามารถลดความเป็นพิษลงได้ (Muchlisin, 2005) ซึ่งจากการศึกษาของ Zhang *et al*. (2005), Rahman *et al*. (2008) และ Chen และ Tian (2005) พบว่าสามารถลดระดับความเป็นพิษโดยช่วยเพิ่มอัตราการรอดได้ดียิ่งขึ้น แต่อย่างไรก็ตามตัวอ่อนก็ยังไม่สามารถรอดตายหลังจากนำไปแช่แข็ง นอกจากนี้บางรายงานพบว่าการเพิ่มสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งประเภทที่ซึมผ่านไม่ได้ร่วมกับประเภทซึมผ่านได้จะช่วยให้ตัวอ่อนมีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น เช่น การศึกษาในตัวอ่อนของปลา red seabream (*Pagrus major*) (Xiao *et al*., 2008)

3.2. ความเข้มข้นของสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็ง เป็นปัจจัยสำคัญหลักอีกประการหนึ่ง เนื่องจากมีรายงานว่า สารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งนี้ยิ่งมีความเข้มข้นสูงขึ้นก็จะมีความเป็นพิษมากยิ่งขึ้น (Cabrita *et al*., 2003) ซึ่งสัมพันธ์กับค่า osmolality และความเป็นกรดด่าง (pH) โดยที่ความเข้มข้นของสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งไม่ควรเกิน 50 เปอร์เซ็นต์ โดยในการศึกษาของ Chen and Tian (2005) พบว่าความเข้มข้นของสัดส่วน PG ต่อ MeOH ที่ต่ำสุด (20 :13 เปอร์เซ็นต์) มีผลต่ออัตราการรอดของตัวอ่อนปลา flounder (*Paralichthys olivaceus)* สูงที่สุด ขณะที่ Zhang *et al*. (2005) พบว่า PG และ MeOH ที่ 20 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสมกับตัวอ่อนปลา flounder (*Paralichthys olivaceus*) สำหรับ Vuthiphandchai *et al*. (2005) พบว่าความเข้มข้นของ dimethyl sulfoxide (DMSO) และ glycerol (GLY) ที่ต่ำ (5 – 10 เปอร์เซ็นต์) เหมาะสมกับอัตราการฟักของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) สำหรับ Edashige *et al*. (2006) พบว่า MeOH และ PG ที่ 5 - 20 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้ตัวอ่อน Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus)* รอดตายสูง ขณะที่ Xiao *et al*. (2008) พบว่า PG ที่ความเข้มข้น 15 เปอร์เซ็นต์ ทำให้อัตราการฟักของตัวอ่อนปลา red seabream (*Pagrus major*) ดีที่สุด

4. ระยะเวลาการแช่ตัวอ่อนปลาในสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็ง เป็นช่วงเวลาการแลกเปลี่ยนน้ำที่ซึมผ่านออกนอกเซลล์และสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งซึมเข้าแทนที่น้ำภายในเซลล์จนถึงจุดสมดุลที่เรียกว่า equilibration time (Simione, 1998) จุดสมดุลนี้จะเกิดขึ้นจากการนำตัวอ่อนมาแช่ในสารละลายสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งที่ความเข้มข้นที่เตรียมไว้ในช่วงระยะเวลาหนึ่งร่วมกับในช่วงการลดความเย็นหรือลดอุณหภูมิ (cooling) ซึ่งระยะเวลาที่เหมาะสมนี้ใช้เวลาไม่ต่ำกว่า 15 นาที แต่ไม่ควรเกิน 45 – 60 นาที หากนานกว่านี้จะเกิดผลเสียจากการเป็นพิษต่อตัวอ่อนปลา เช่น การศึกษาของ

Cabrita *et al*. (2006) พบว่า ระยะเวลา 10 นาที มีความเหมะสมสำหรับการแช่ตัวอ่อนปลา gilthead seabream (*Sparus aurata*) ใน DMSO โดยหากแช่นานขึ้นก็จะเป็นพิษมากขึ้น (30 นาที) นอกจากนี้การเพิ่มประสิทธิภาพการซึมผ่านสามารถทำได้อีกวิธีหนึ่งโดยการแบ่งการเติมสารละลายสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งออกเป็นหลาย ๆ ขั้นตอน (multi-step หรือ impregnation) เช่น หากเตรียมสารไว้ที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ปริมาณทั้งหมด 100 มิลลิลิตร โดยต้องการแบ่งเป็น 4 ขั้นตอน ขั้นตอนละ 5 นาที จะดำเนินการโดย แบ่งปริมาณสารละลายออกเป็นสี่ส่วนเท่า ๆ กันคือ 25 มิลลิลิตร (การแบ่งนี้จึงคล้ายกับเป็นการค่อย ๆ เพิ่มทั้งความเข้มข้นและปริมาณจนถึงความเข้มข้นและปริมาณที่กำหนดไว้) จากนั้นนำตัวอ่อนแช่ลงในสารละลายส่วนแรกนี้ 5 นาที จากนั้นเติมส่วนที่สองลงไปรวมกับส่วนแรกที่ 25 มิลลิลิตร เวลา 5 นาที จากนั้นจึงเติมส่วนที่สามอีก 25 มิลลิลิตร เวลา 5 นาที จากนั้นเติมส่วนสุดท้ายแล้วแช่อีก 5 นาที รวมสารละลายทั้งหมดที่แช่ 100 มิลลิลิตร รวมระยะเวลาทั้งสิ้น 20 นาที เป็นต้น การทำแบบนี้จะทำให้มีการกระตุ้นการซึมผ่านของน้ำและสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งให้ดียิ่งขึ้น ดังเช่นการศึกษาของ Lahnsteiner (2008) พบว่าการแช่ตัวอ่อนปลาม้าลาย (*Danio rerio*) แบบ 2 ขั้นตอน (two step) สามารถเพิ่มความเข้มข้นของสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งได้มากกว่าหลายขั้นตอน และ Rahmann *et al*. (2008) พบว่าการแช่ 4 ขั้นตอน ช่วยให้ตัวอ่อนปลา Japanese whiting (*Sillago japonica)* การซึมผ่านของสารละลายดียิ่งขึ้น เป็นต้น

5. **การวัดการซึมผ่านของสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็ง** (cryoprotectant permeability) การประเมินการซึมผ่านของสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งชนิดที่ซึมเข้าภายในได้นั้น มีส่วนสำคัญในขั้นตอนการลดอุณหภูมิ เนื่องจากช่วยลดการหลงเหลือของน้ำภายในเซลล์ที่จะทำให้เกิดปรากฏการณ์การเกิดผลึกน้ำแข็ง หากสารนี้ซึมเข้าไปแทนที่น้ำได้มากที่สุดก็จะมีโอกาสประสบผลสำเร็จมากที่สุด ในส่วนของเทคนิคการวิเคราะห์ในขั้นแรกควรที่จะศึกษาปริมาณของของเหลว (น้ำ) ในเซลล์ก่อนเช่น การศึกษาของ Zhang *et al*. (2005) การวัดการเปลี่ยนแปลงปริมาตรของไข่ โดยใช้คอมพิวเตอร์ (computer aided real time video microscopy) หลังจากแช่ในสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็ง และมีการวัดการซึมผ่านเยื่อหุ้มไข่โดยวิธีของ Runge–Kutta method in Berekley Madonna 8.0 โมเดล นอกจากนี้ Rahman *et al*. (2011) ใช้เทคนิคไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโตกราฟี (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ในการวัดการซึมผ่านของ DMSO ในตัวอ่อนปลา Japanese whiting (*Sillago japonica*) ในขณะที่ Wankanapol (2012) ได้ใช้เทคนิคในการวัดการซึมผ่านสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งในตัวอ่อนปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography, GC) เป็นต้น

6. **การลอกเปลือกไข่ออกและการฉีดไมโครอินเจคชั่น** (dechorion and microinjection) เป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อลดเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกที่หนาที่สุดของตัวอ่อนปลาออก และเพิ่มการซึมผ่านของสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งดีขึ้นผ่านการฉีดโดยตรงไม่ต้องรอเวลาปรับสมดุล โดยใช้เข็มขนาดเล็กแทงเข้าในถุงไข่แดงแล้วค่อย ๆ ปล่อยสารออกไป การลอกเปลือกออกนี้ต้องใช้ความชำนาญและเครื่องมือที่เหมาะสม มิฉะนั้นจะทำให้ถุงไข่แดงฉีกขาดได้นอกจากนี้การฉีดนี้จำเป็นต้องทราบปริมาตรน้ำในเซลล์ให้ใกล้เคียงที่สุดรวมทั้งประสบการณ์ในการฉีดร่วมด้วย ซึ่ง Beirão *et al*. (2006) ได้ทดลองฉีดสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งเข้าตัวอ่อนปลา gilthead seabream (*Sparus aurata*) ในระยะที่หางปรากฏแล้ว พบว่าการฉีดสารละลายปริมาตร 2.35 นาโนลิตร dimethyl sulfoxide (DMSO), methanol (MeOH), ethylene glycol (EG) (5 โมลาร์, 10 โมลาร์ and

pure) หรือ sucrose (10 and 15 เปอร์เซ็นต์) ไม่มีผลต่อความสมบูรณ์ของตัวอ่อนปลา อัตราการฟักและอัตราการรอด ชี้ให้เห็นว่าวิธีการนี้ก็สามารถเพิ่มปริมาณสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งในเซลล์ได้ แม่นยำมากขึ้นเช่นกัน นอกจากนี้ในขณะที่แช่ตัวอ่อนปลาในสารละลายอาจจะสร้างสภาวะกระตุ้นให้มีการซึมผ่านมากยิ่งขึ้น ซึ่งคลื่นอัลตร้าโซนิก (ultrasound) ถูกนำมาช่วยเพื่อให้อัตราการซึมผ่านมีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น ซึ่ง Silakes และ Bart (2010) พบว่าคลื่นอัลตร้าซาวด์สามารถเพิ่มปริมาณ MeOH ซึมผ่านเข้าไปในตัวอ่อนปลาม้าลาย (*Danio rerio*) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยเฉพาะตัวอ่อนที่ถูกลอกเปลือกออก (dechorion) และยังมีผลต่ออัตราการรอดของตัวอ่อนอีกด้วย

7. **อัตราการลดอุณหภูมิ** (cooling rate) เป็นหัวใจสำคัญที่สุดของการแช่แข็ง เนื่องจากตัวอ่อนปลามีขนาดที่ใหญ่ เพื่อให้การดึงน้ำออกจากเซลล์และแทนที่ด้วยสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็ง ในขั้นตอนนี้เพื่อให้เหลือน้ำน้อยที่สุดและป้องกันการช็อคจากความเย็นจึงควรมีอัตราการลดอุณภูมิที่ต่ำหรือลดอุณหภูมิลงอย่างช้า ๆ เช่น 0.1 – 0.5 องศาเซลเซียสต่อนาที เป็นต้น ซึ่ง Strussmann *et al*. (1999) พบว่าอัตราการลดอุณภูมิอย่างช้า ๆ เหมาะสมในการรักษาความสมบูรณ์ของตัวอ่อนปลา whiting (*Sillago japonica*), medaka (*Oryziaz latipes*) และ perjerry (*Odontesthes bonariensis*) เป็นต้น

8. **การแช่แข็งแบบผลึกแก้ว** (vitrification) เป็นเรื่องยากที่จะใช้เทคนิคการแช่แข็งแบบไครโอพรีเซอเวชั่นปกติที่ต้องการความเข้มข้นของสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งที่ต่ำและระยะเวลาการปรับสมดุลที่ใช้ระยะเวลานาน ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้การแช่แข็งตัวอ่อนปลายังไม่ประสบผลสำเร็จ ดังนั้นการทำตัวอ่อนปลาให้เป็นผลึกแก้วที่เรียกว่าวิตริฟิเคชั่น (vitrification) จึงถูกนำมาใช้ทดลองกับตัวอ่อนปลาโดยการประยุกต์จากการเก็บตัวอ่อนมนุษย์ (Boonkuson, 2008) การทำให้เป็นผลึกแก้วนี้จะใช้สารละลายสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็ง (cryoprotectant) ที่เข้มข้นสูงกว่าปกติ ร่วมกับการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ใช้เวลาดำเนินการน้อยและที่สำคัญไม่จำเป็นต้องใช้เครื่องมือราคาแพงในการลดอุณหภูมิทำให้สามารถลดต้นทุนการศึกษาได้ นอกจากนี้ยังสามารถลดการเกิดปัญหาผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ได้ดี (Chao and Liao, 2001) ซึ่งสิ่งเหล่านี้แตกต่างกับการแช่แข็งแบบปกติ การศึกษาของ Chen and Tian (2005) พบว่าความเข้มข้นของสาร PG ผสมกับ MeOH ในน้ำเกลือที่สัดส่วนต่ำสุดเป็นสารวิตริฟิเคชั่นที่มีความเป็นพิษน้อยที่สุด ร่วมกับการแช่ 5 ขั้นตอน จะมีผลให้เกิดอัตราการฟักของตัวอ่อนปลา flounder (*Paralichthys olivaceus*) ดีที่สุด นอกจากนี้ Robles *et al*. (2005) พบว่าสารละลายวิตริฟิเคชั่นมีผลทำให้ตัวอ่อนปลาอยู่ในสภาพสมบูรณ์หลังจากการละลาย แต่อย่างไรก็ตามก็ส่งผลให้อัตรารอดต่ำมาก สำหรับ Cabrita *et al*. (2006) พบว่า DMSO คือสารละลายวิตริไฟด์ที่เหมาะสมกับตัวอ่อนปลา gilthead seabream แต่ก็ยังไม่สามารถทำให้ตัวอ่อนมีชีวิตรอดหลังจากนำมาละลายเช่นกัน ขณะที่ Edashige *et al*. (2006) พบว่า ตัวอ่อนของปลา Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus)* ยากที่สำเร็จโดยวิธีวิตริฟิเคชั่นเนื่องจากไม่มีการรอดตายหลังจากการละลาย จากผลการศึกษาข้างต้นยังพบว่ายังมีความเป็นไปได้ในการพัฒนาการแช่แข็งตัวอ่อนโดยวิธีวิตริฟิเคชั่นเนื่องจากรายงานส่วนใหญ่พบว่าส่งผลดีในด้านความสมบูรณ์ของตัวอ่อนปลาหลาย ๆ ชนิดภายหลังจากการละลาย แม้ว่าจะไม่มีรายงานการรอดชีวิตเลย ดังนั้นการประยุกต์ โดยอาศัยอุปกรณ์ที่ใช้แช่แข็งไข่และตัวอ่อนมนุษย์แบบวิตริฟิเคชั่น จึงมีโอกาสที่จะนำมาประยุกต์ใช้กับตัวอ่อนปลาได้ ซึ่ง Boonkuson (2008) อธิบายไว้ดังต่อไปนี้

1. Electron microscope grid vitrification (EM) ใช้หลักการพยายามแช่แข็งด้วยความเร็วสูงเนื่องจากโลหะจะเย็นจัดได้เร็วกว่าหลอดพลาสติก 0.25 มิลลิลิตร หลักการนี้เพิ่มความเร็วจากการแช่แข็งดั้งเดิม (conventional straw

vitrification) ที่ 2,500 องศาเซลเซียสต่อนาที เป็น 24,000 องศาเซลเซียสต่อนาที ข้อดีของ EM นี้คือ ความเร็วในการแช่แข็งสูงมาก

2. Open pulled straw (OPS) เป็นวิธีการที่พยายามให้ไข่หรือตัวอ่อนแขวนลอยในน้ำยาที่มีสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งน้อยที่สุดเท่าที่จะทำได้และใช้วิธีการแช่แข็งด้วยวิธีวิตริฟิเคชั่น วิธีการนี้เพิ่มอัตราความเร็วในการแช่แข็งจาก 2,500 องศาเซลเซียสต่อนาที เป็น 16,700 องศาเซลเซียสต่อนาที โดยใช้หลอดพลาสติกขนาด 0.25 มิลลิลิตรในการแช่แข็ง แต่ทำการดึงเส้นผ่านศูนย์กลางและจากความหนาของผนังหลอดลดลงประมาณครึ่งหนึ่งจากเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.7 มิลลิเมตร เป็น 0.8 มิลลิเมตร และความหนาจาก 0.15 มิลลิลิตรเป็น 0.07 มิลลิเมตร แล้วดูดไข่เข้าไป เมื่อปลายหลอดสัมผัสกับของเหลว ทำให้ปริมาตรเหลือเพียง 2 - 3 ไมโครลิตร ไม่ต้องปิดปลายหลอดแล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลวทันที ข้อดีคือหลอดเป็นฉนวนความร้อนลดลง ปริมาตรของของเหลวลดลง ใช้เวลาแช่แข็งน้อย

3. Cryoloop vitrification (CLV) เป็นวิธีพัฒนาหลังจากการใช้ OPS เพื่อพยายามให้ไข่แขวนลอยในน้ำยาที่มีสารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งน้อยกว่าซึ่งส่วนใหญ่จะนำมาใช้กับเซลล์ที่ไวต่อการแช่แข็งมาก เช่นไข่และตัวอ่อนระยะต้น ๆ ข้อดีของวิธีการนี้คือ ไม่มีฉนวนความร้อนระหว่างไนโตรเจนเหลวกับสารละลายและไข่ ปริมาตรของของเหลวที่ไข่แช่อยู่ลดลง ใช้เวลาในการแช่แข็งน้อย

9. การประเมินความสมบูรณ์ของตัวอ่อนปลาหลังจากการแช่แข็ง (embryo viability) วิธีการประเมินความสมบูรณ์ของไข่หรือตัวอ่อนปลาภายหลังจากแช่ตัวอ่อนในไนโตรเจนเหลวแล้วมีหลากหลายวิธี โดยสามารถเลือกไปทำการประเมินให้เหมาะสมกับขนาดของตัวอ่อนและความพร้อมของนักวิจัยเองโดยสามารถจำแนกได้ดังต่อไปนี้

1. วิธีการโดยใช้เทคนิคดั้งเดิม (traditional cryobiological techniques) ประกอบด้วย 1) การวัดการเปียก/แห้ง (wet/dry measurements) และ 2) อิเลคตรอน สปิน เรโซแนนซ์ (electron spin resonance ,ESR) และ 3) แมกเนติก เรโซแนนซ์ ไมโครสโคปี (magnetic resonance (MR) microscopy) (Hegadorn *et al*., 1997)

2. วิธีการประเมินสัณฐานวิทยา (morphological integrity) ภายใต้ light microscopy และการบันทึกวิดีโอ (video recording) (Calvi *et al*., 1998)

3. วิธีการพัฒนาจากวิธีดั้งเดิม ได้ใช้วิธีโปรตอน นิวเครียส์ แมกเนติก เรโซแนนซ์ สเป็กโทรสโคปี (proton nuclear magnetic resonance spectroscopy, H-NMR) (Rahman *et al*., 2008) และอิมพีแดนสเปกโทรสโคปี (impedance spectroscopy) (Zhang *et al*., 2006) เป็นต้น

4. วิธีการย้อมสีเซลล์ (dyeing หรือ staining) มีรายงานวิธีการศึกษาอยู่ 3 วิธี โดยวิธีแรกคือ 1) การย้อมสี ทริปฟันบลู (trypan blue staining) (Riesco *et al*., 2012 และ Tsai *et al*., 2009) 2) การย้อมสีฟลูโอเรสเซนน์ ไดอะซีเทต (fluorescein diacetate (FDA) + propidium iodide (PI) staining) และ 3) ADP/ATP ratio assay (Tsai *et al*., 2009) เป็นต้น

บทสรุป

การแช่แข็งตัวอ่อนปลาแบบไครโอพรีเซอเวชั่นเป็นเทคโนโลยีชีวภาพที่ใช้ในการเก็บสงวนรักษาตัวอ่อนปลาเพื่อประโยชน์ด้านการอนุรักษ์พันธุกรรมปลา การเพิ่มมูลค่าของผลผลิตพันธุ์ปลานอกฤดูผสมพันธุ์และการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อประโยชน์ทางเศรษฐกิจ ซึ่งในปัจจุบันในประเทศไทยยังมีการศึกษาวิจัยน้อยมากหากเทียบกับต่างประเทศที่มีการศึกษาวิจัยมากกว่า ปัญหาและอุปสรรคที่เกิดขึ้นอาจเนื่องจากคุณสมบัติที่แตกต่างกันของตัวอ่อนปลากับสัตว์บกชนิดอื่นรวมทั้งกับน้ำเชื้อของปลาเอง เช่น ขนาด องค์ประกอบของไข่เช่น เยื่อซึมผ่าน ประเภทของไข่ปลาและกลไกการความสมดุลของน้ำภายในตัวอ่อนและความเปราะบางจากการบาดเจ็บจากการแช่แข็งยังคงต้องการข้อมูลในการอธิบายและแก้ปัญหาเพิ่มเติมอีกมาก แม้ว่าในปัจจุบันการเก็บตัวอ่อนปลายังไม่มีรายงานความสำเร็จ ดังนั้นการรวบรวมปัจจัยที่สามารถนำมาพิจารณาควบคู่กับแนวทางการพัฒนางานวิจัยจากต่างประเทศ จึงเป็นจุดเริ่มต้นในการต่อยอดการศึกษาวิจัยด้านตัวอ่อนแช่แข็งปลาของไทยให้ก้าวหน้าต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Bart, A.N. (2000). New approaches in cryopreservation of fish embryo. *World Aquaculture Society*, *22*, 179 - 187.

Beirão, J., Robles, V., Herraez, M.P., Sarasquete, M.C., Dinis, M.T. & Cabrita, E. (2006). Cryoprotectant microinjection toxicity and chilling sensitivity in gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryo. *Aquaculture*, *261*, 897 – 903.

Boonkuson, D. (2008). Oocyte Cryopreservation for Medical Application. *Journal of Health Science Research*, *2* (1), 1 - 8. (in Thai)

Cabrita, E., Chereguini, O., Luna, M., Paz, P.D. & Herraez, M.P. (2003). Effect of different treatments on the chorion permeability to DMSO of turbot embryos (*Scophthalmus maximus*). *Aquaculture*, *221*, 593 - 604.

Cabrita, E., Robles, V., Wallace, J.C., Sarasquete, M.C. & Herraez, M.P. (2006). Preliminary studies on the cryopreservation of gilthead seabream (*Sparus aurata*) embryos. *Aquaculture*, *251*, 245 - 255.

Calvi, S.L. & Maisse, G. (1998). Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) blastomeres: influence of embryo stage on postthaw survival rate. *Cryobiology*, *36*, 255 – 262.

Chao, N.H. & Liao, I.C. (2001). Cryopreservation of finfish and shellfish gametes and embryos. *Aquaculture*, *197*, 161 – 189.

Chen, S.L. & Tian, Y.S. (2005). Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos by vitrification. *Theriogenology*, *63*, 1207 – 1219.

Chesoh, S., Dumjutii, A., Jul-adung, S., Gomenprairin, K., Thipbunpot, M. & Sitikasemkit, N. (2004). Climbing Perch Culture, Biology and Technique for Commercial Aquaculture. Aquatic Animal Research Center Office Chum Pon and Thai Luxe Enterprise Company Limited. 32 p. (in Thai)

Chodcharat, S., Nimrat, S. & Vuthiphandchai, V. (2005). Cryopreservation of Common Black Ear Catfish (*Pangasius larnaudii*). *Proceeding of 43rd Kasetsart University Annual Conference*. Kasetsart University Bang Khen, Bangkok. 82 - 89. (in Thai)

Chompoothawat, S. (2007). Sperm Cryopreservation of Red Snapper (*Lutjanus argentimaculatus)*. Thesis, Master of Science, *Burapha University*, Chon Buri. 78 p. (in Thai)

Department of Fisheries. (2005). Common Silver Barb Culture. Instruct manual. *Inland Fisheries Development and Researh Office*. 20 p. (in Thai)

Department of Fisheries. (2010). Nile Tilapia Culture. Instruct manual. *Inland Fisheries Development and Research Office*. 36 p. (in Thai)

Department of Fisheries. (2016). Fisheries Statistic of Thailand 2016. *Fisheries Development Policy and Strategy Division*. 92 p. (in Thai)

Edashige, K., Valdez, D.M. Jr., Hara, T., Saida, N., Seki, S. & Kasai, M. (2006). Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos are difficult to cryopreserve by vitrification. *Cryobiology*, *53*, 96 - 106.

Fletcher, G.L., Hew, C.L. & Davies, P.L. (2001). Antifreeze proteins of teleost fishes. *Annual Review of Physiology, 63*, 359 - 390.

Flowerchild207 (2013). Diagram of fish egg. Wikimedia Commons, the free media repository.

Hambananda, A. & Mongkonpunya, K. (1996). Cryopreservation of Milt of striped Catfish (*Pangasius suchi*). *Proceeding of 34th Kasetsart University Annual Conference*. Kasetsart University Bang Khen, Bangkok, 320 - 328. (in Thai)

Hegadorn, M., Kleinhans, F.W., Wildt, D.E. & Rall, W.F. (1997). Chilling sensitivity and cryoprotectant permeability of dechorionated zebrafish embryos, *Brachydanio rerio*. *Cryobiology, 34,* 251 – 263.

Hegadorn, M. & Kleinhans, F.W. (2000). Problems and prospects in cryopreservation of fish embryos. *World Aquaculture Society*, Baton Rouge, LA, pp. 161 - 178.

Higaki, S., Mochizuki, K., Baba, H., Akashi, Y., Yamana, E., Katagiri, S. & Takahashi, Y. (2009). Feasibility of cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by whole embryo freezing. *Japanese Journal of Veterinary Research*, *57*(2), 119 – 128.

Higaki, S., Kawakami, Y. ,Eto, Y., Yamaha, E., Nagano, M., Katagiri, S., Takada, T. & Takahashi, Y. (2013). Cryopreservation of zebrafish (*Danio rerio*) primordial germ cells by vitrification of yolk-intact and yolk-depleted embryos using various cryoprotectant solutions. *Cryobiology*, *67*(3), 374 – 382.

Islam, M.S. & Akhter, T. (2011). Tale of Fish Sperm and Factors Affecting Sperm Motility: A Review. *Advances in Life Sciences*, *1*(1), 11 - 19.

Kimmel, C.B., Ballard, W.W., Kimmel, S.R., Ullmann, B. & Schilling, T.F. (1995). Stages of Embryonic Development of the Zebrafish. *Wiley-Liss, Inc. Developmental Dynamics*, *203*, 253 - 310.

Lahnsteiner, F., Weismann, T.R. & Patzner, A. (1995). A uniform method for cryopreservation of semen of salmonid fish (*Oncorhynchus mykiss, Salmo trutta fario, Salmo trutta lacustris, Coregonus* sp.). *Aquaculture Research*, *26*, 801 – 807.

Lahnsteiner, F. (2008). The effect of internal and external cryoprotectants on zebrafish (*Danio rerio*) embryos. *Theriogenology, 69*, 384 - 396.

Liebermann, J. & Tucker, M.J. (2002). Effect of carrier system on the yield of human oocytes and embryos as assessed by survival and developmental potential after vitrification. *Reproduction, 124*, 483 - 489.

Lin, C., Zhang, T. & Dawson, D.M. (2009). Cryopreservation of zebra fish (*Danio rerio*) blastomeres by controlled slow cooling. *Cryo- Lett*, *30*, 132 – 141.

Muchlisin, Z.A. (2005). Review current status of extenders on fish spermatozoa cryopreservation. *Biodiversitas, 6*(1), 12 - 15.

Ounkwanmuang, P., Nimrat, S. & Vuthiphandchai, V. (2008). Simple Cryopreservation of Common Silver Barb (*Barbodes gonionotus*). *Proceeding of 46th Kasetsart University Annual Conference*. The Thailand Research Fund. 7 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. 45 p. (in Thai)

Pewnane, P., Sodsook, P.G., Ratanatriwong, W. & Jeunmic, T. (2012). Effect of Hormone Inducing Gametes Maturation of *Pangasius sanitwongsei* and Cryopreservation of *Pangasius sanitwongsei* spermatozoa. (in Thai)

Polprasit, S. & Tawarutmaneegul, P. (1997). Some Aspects on the Biology of the Mekong Giant Catfish (*Pangasianodon gigas*). *Thai Fisheries Gazettes, 51*(11), 11 - 25. (in Thai)

Pomsema, W. (2009). Effect of Cryoprotectants on Quality of African Catfish (*Clarias gariepinus*). *Journal of Rajamangkalatawan ook Research, 2* (1), 67 – 74. (in Thai)

Ponchunchoovong, S. & Khunnumthiang, S. (2010). Effect of Combination Cryoprotectants and Freezing Rates on the Cryopreservation of *Pangasius lamaudii* sperm. *Journal of Fisheries Technology Research*, *6* (2), 1 - 13. (in Thai)

Ponchunchoovong, S., Imsil, A. & Singsee, S. (2010). Cryopreservation of Mekong catfish (*Pangasius bocourti*) Sperm. Full Research Report, *Suranaree University of Technology*, Nakornratchasema. 72 p. (in Thai)

Ponchunchoovong, S., Imsil, A. & Singsee, S. (2011). Preservation of Small Scale Mud Carp, *Cirrhinus microlepis* Sperm and the Suitable of Sperm : Egg Ratio of Fresh or Cryopreserved Sperm. Reserch Report, Division of Animal Production Technology, Institute of Agricultural Technology, *Suranaree University of Technology*, Nakornratchasema. 101 p. (in Thai)

Ponchunchoovong, S., Rodrarung, D. & Chumti, A. (2013). Cryopreservation of Giant Barb, *Catlocarpio siamensis* Sperm Reserch Report, Division of Animal Production Technology, Institute of Agricultural Technology, *Suranaree University of Technology*, Nakornratchasema. 54 p. (in Thai)

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.

Rahman, S.M., Strüssmann, C.A., Majhi, S.K., Suzuki, T. & Watanabe, M. (2011). Efficiency of osmotic and chemical treatments to improve the permeation of the cryoprotectant dimethyl sulfoxide to Japanese whiting (*Sillago japonica*) embryos. *Theriogenology, 75*(2), 248 - 255.

Riesco, M.F., Martínez-Pastor, F., Chereguini, O. & Robles, V. (2012). Evaluation of Zebrafish *(Danio rerio)* PGCs viability and DNA damage using different cryopreservation protocols. *Theriogenology*, *77*(1), 122 - 130.

Robles, V., Cabrita, E., Fletcher, G.L., Shears, M.A., King, M.J. & Herraez, M.P. (2005). Vitrification assays with embryos from a cold tolerant sub-arctic fish species. *Theriogenology, 64*, 1633 - 1646.

Sean-in, N., Jaritngam, T. & Yashiro, R. (2012). Sperm Cryopreservation of Cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766). Technical Paper no.35. *Coastal Fisheries Research and Development Bureau Department of Fisheries*. 20 p. (in Thai)

Silakes, S. & Bart, A.N. (2010). Ultrasound enhanced permeation of methanol into zebrafish, *Danio rerio*, embryo. *Aquaculture, 303*, 71 - 76.

Simione, F.P. (1998). Cryopreservation manual. *Nalge nune international corporation*. 15 p.

Strüssmann, C.A., Nakatsugawa, H., Takashima, F., Hasobe, M., Suzuki, M.T. & Takai, R. (1999). Cryopreservation of isolated fish blastomeres: effect of cell stage, cryoprotectant concentration, and cooling rate on postthawing survival. *Cryobiology*, *39*, 252 - 261.

Tian, Y.S., Chen, S.L., Yan, A.S., Ji, X.S. & Yu, G.C. (2003). Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicas*) embryos by vitrification. *Acta Zool Sin*, *49*: 843 – 850.

Tsai, S., Rawson, D.M. & Zhang, T. (2009). Development of cryopreservation protocols for early stage zebrafish (*Danio rerio*) ovarian follicles using controlled slow cooling. *Theriogenology*, *71*, 1226 – 1233.

Tuset, V.M., Trippel, E. A. & Monserrat, J. de. (2008). Sperm morphology and its influence on swimming speed in Atlantic cod. *J. Appl. Ichthyol*, *24*, 398 – 405.

Urbanyi B., Baranyai, B., Magyary, I. & Dinnyes, A. (1997). Toxicity of methanol, DMSO and glycerol on carp (*Cyprinus carpio*) embryos in different development stage. *Theriogenology*, *47*, 408.

Vuthiphandchai, V., Pengpuna, B. & Nimrat, S. (2005). Effects of cryoprotectant toxicity and temperature sensitivity on the embryos of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Aquaculture*, *246*, 275 – 284.

Vuthiphandchai, V. (2009). Development of Low Temperature Preservation Technology of Thai Walking Catfish (*Clarias macrocephalus*) Semen for Conservation and Aquaculture: Completed Report Bangkok: *Thailand Research Fund*. 66 p. (in Thai)

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.

Wankanapol, A. (2018). Cryopreservation of Fish Gametes. Teaching Document, Faculty of Fisheries Technology and Aquatic Resources, *Maejo University*. (in Thai)

Wittayanon, C., Kannasoot, C. & Nabhitabhata, J. (2012). Diversity of Freshwater Fish in Thailand. (in Thai)

Xiao, Z.Z., Zhang, L.L., Xu, X.Z., Liu, Q.H., Li, J., Ma, D.Y., Xu, S.H., Xue, Y.P. & Xue, Q.Z. (2008). Effect of cryoprotectants on hatching rate of red seabream (*Pagrus major*) embryos. *Theriogenology, 70*, 1086 –1092.

Zampolla, T, Spiking, E.S., Zhang, T. & Rawson, D.M. (2009). Effect of methanol and Me_2SO exposure on mitochondrial activity and distribution in stage III ovarian follicles of zebrafish (*Danio rerio*). *Cryobiology*, *59*(2), 188 - 194.

Zhang, T., Rawson, D.M. & Morris, G.J. (1993). Cryopreservation of pre hatch embryos of zebrafish (*Brachydanio rerio*). *Aquatic Living Resources, 6*(2), 145 - 153.

Zhang, T. & Rawson, D.M. (1996). Feasibility on vitrification of intact zebra fish (*Brachydanio rerio*) embryos. *Cryobiology, 33*, 1 – 13.

Zhang, Y.Z., Zhang, S.C., Liu, X.Z., Xu, Y.J., Hu, J.H., Xu, Y.Y., Li, J. & Chen, S.L. (2005). Toxicity and protective efficiency of cryoprotectants to flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. *Theriogenology*, *63*, 763 – 773.

Zhang, T., Wang, R.Y., Bao, Q.Y. & Rawson, D.M. (2006). Development of a new rapid measurement technique for fish embryo membrane permeability studies using impedance spectroscopy. *Theriogenology*, *66*, 982 - 988.