บทที่ 2

สำรวจเอกสาร

อนุกรมวิธาน และชีววิทยาของปลากะพงแดง

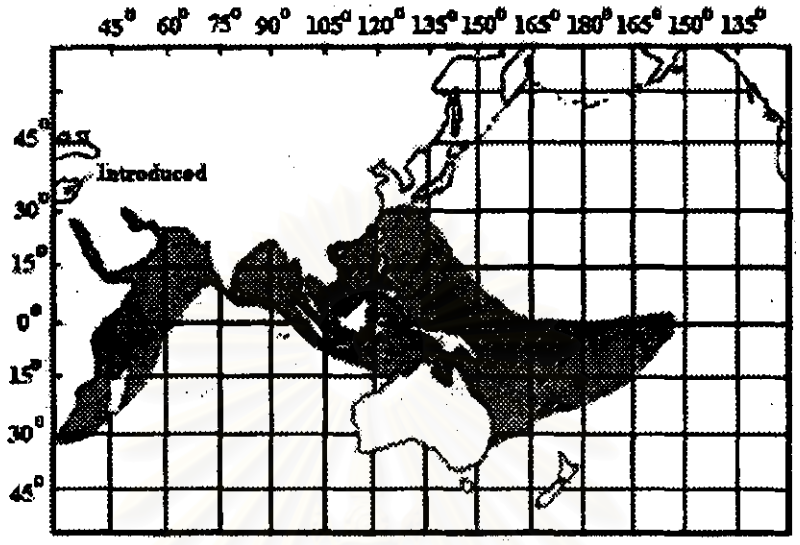
Phylum	Chordata
Class	Teleostomi
Order	Perciformes
Suborder	Percoidai
Family	Lutjanidae
Genus	Lutjanus
	Lutjanus argentimaculatus (Forsskål, 1775)

ปลากะพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*, Forsskål 1775) เป็นปลาที่มีการแพร่กระจายอย่างกว้างขวางในทะเลแถบ อินโด-แปซิฟิกใต้ โดยมีขอบเขตการแพร่กระจายจาก หมู่เกาะซามวล จนถึง ฝั่งตะวันออกของแอฟริกา และจากตอนเหนือของทวีปออสเตรเลียไปจนถึงเกาะริวกิว ประเทศญี่ปุ่น (รูปที่ 1.) Allen (1985) รายงานไว้ถึงแหล่งที่จะสามารถพบปลาชนิดนี้ได้ตั้งแต่ เขตน้ำกร่อยของป่าชายเลน จนกระทั่งตอนปลายของแม่น้ำที่อยู่ในอิทธิพลของน้ำทะเล โดยปลากะพงแดงที่เติบโตเต็มที่จะอพยพจากเขตน้ำตื้นชายฝั่งไปยังบริเวณแนวปะการังน้ำลึก ในบางครั้งอาจสามารถพบปลาชนิดนี้ในเขตที่มีความลึกกว่า 100 เมตร

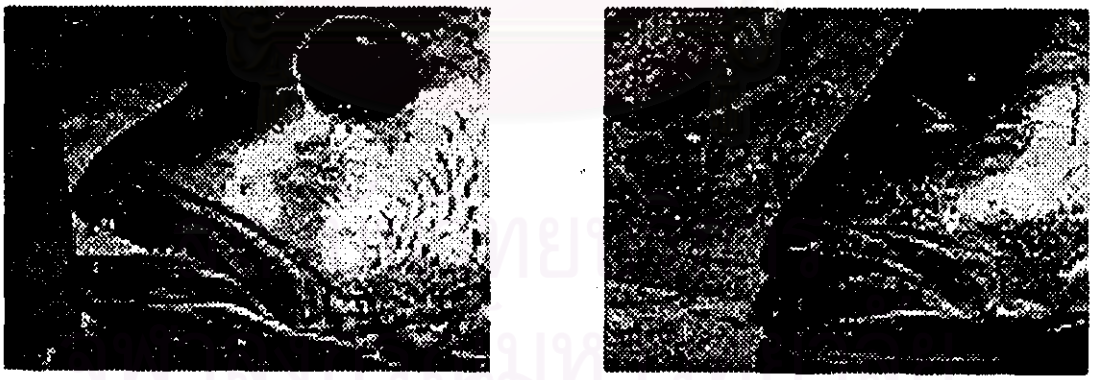
โดยทั่วไปแล้วลูกปลากะพงแดงวัยอ่อนจะอาศัยอยู่ในเขตแนวประการังชายฝั่ง และเขตป่าชายเลนปากแม่น้ำ เมื่อเติบโตขึ้นก็จะอพยพลงไปสู่เขตน้ำลึกต่อไป ลักษณะเฉพาะของปลากะพงแดงที่โตเต็มที่จะพบเขี้ยวที่บริเวณกรามด้านบน ลักษณะนี้จะไม่สามารถพบได้ในปลากะพงแดงเกล็ดห่าง (John's Snapper, *L. johnii*) (รูปที่ 2)

ในการศึกษาทางด้านการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีแช่เยือกแข็งพบว่ามีรายงานการวิจัยหลายฉบับที่ศึกษาในเรื่องการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งของปลา เช่น Horton *et al.* (1976) แสดงถึงรายงานของ Mitchum (1963); Hodgins และ Ridgway (1964); Horton, Graybill และ Wu (1967); Truscott, Hoyle และ Freeman (1968); Hoyle และ Idler (1968);

หอสมุดกลาง
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 แสดงขอบเขตการแพร่กระจายของปลากะพงแดง
(ที่มา : Allen, 1985)



ก.) ข.)

รูปที่ 2 ก.) แสดงคู่ของเขี้ยวบริเวณกรามด้านบนของปลากะพงแดง (*L. argentimaculatus*)
ข.) แสดงภาพกรามของปลากะพงแดงเกล็ดห่าง (*L. johnii*) ที่ไม่มีเขี้ยว
(ที่มา : Doi and Singhagraiwan, 1993)

Mounib, Hwang และ Idler (1968); Graybill และ Horton (1969); Ott และ Horton (1971) ซึ่งเป็นรายงานความเป็นไปได้ในการพัฒนางานวิจัยที่เกี่ยวกับการแช่เยือกแข็งของอวัยวะสืบพันธุ์ในปลา โดยอาศัยข้อมูลทางด้านเทคโนโลยีการแช่เยือกแข็งแข็งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม และชีววิทยาเบื้องต้นของปลา

ความสำเร็จครั้งแรกในการฟิสนธิไข่ กับอสุจิที่ได้จากการแช่เยือกแข็ง ได้ถูกรายงานไว้โดย Horton *et al.* (1967) และ Graybill และ Horton (1969) ได้ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อของปลา Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) โดยใช้สารละลาย Cortland salt solution เป็นสารในการเจือจางน้ำเชื้อในอัตราส่วน 1:4 และใช้ DMSO 5 และ 12% ในช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกัน Hoyle และ Idler (1968) ได้ตีพิมพ์รายงานผลสำเร็จในการปฏิสนธิไข่ปลา Atlantic salmon (*Samo sala*) กับน้ำเชื้อที่ได้รับการแช่เยือกแข็ง พบว่าอัตราปฏิสนธิที่ได้เท่ากับ 0-12% โดยเก็บน้ำเชื้อในสารละลายผสมของ 5% ethylene glycol กับ Cortland salt solution ที่ปรับปรุงโดยการลด NaCl จาก 725 เหลือ 188 mg/ น้ำ 100 ml และเพิ่ม KCl จาก 38 ไปเป็น 720 mg/น้ำ 100 ml จากนั้นลดอุณหภูมิจาก 2 ถึง -10 °C ใช้เวลาประมาณ 8 นาที และจาก -10 ถึง -25 °C ใช้เวลาประมาณ 4 นาที จากนั้นทิ้งไว้ที่อุณหภูมิสุดท้ายเป็นเวลา 30 นาที จึงทำการละลายที่อุณหภูมิ 3 °C

Horton (1976) รายงานถึงกรรมวิธีพื้นฐานในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งของปลาในครอบครัวแซลมอนโดยอ้างตาม Graybill และ Horton (1969); Ott และ Horton (1971a,b); และ Ott (1975) ดังนี้

1.) โดยทั่วไปแล้วการคัดเลือกปลาเพศผู้ที่จะคัดจากลักษณะภายนอกที่พบ ในช่วงฤดูผสมพันธุ์ซึ่งเป็นเวลาที่เหมาะแก่การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ

2.) ในการที่จะทำการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อนั้นจำเป็นที่จะต้องทำให้พ่อปลาที่จะทำการเก็บสลบเสียก่อน เพื่อป้องกันความบอบช้ำที่จะเกิดกับตัวปลา และเป็นการง่ายที่จะเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดี น้ำเชื้อจะถูกรีดจากช่องเพศที่ทำความสะอาดแล้วด้วยการเช็ดเมือกที่ติดอยู่โดยรอบออกจนแห้ง การสังเกตคุณภาพเบื้องต้นของตัวอย่างน้ำเชื้อทำได้โดยการดูสีของน้ำเชื้อที่เก็บได้ซึ่งน้ำเชื้อที่ดีนั้นควรจะมีสีขาวครีม และไม่มีการปนเปื้อนของเลือดหรือน้ำเมือกที่อยู่บริเวณช่องเพศ

3.) ตัวอย่างน้ำเชื้อที่ได้จะถูกเก็บลงในหลอดเก็บตัวอย่างซึ่งควรจะมีปริมาตรของอากาศต่อปริมาตรของน้ำเชื้อเป็น 10:1 ตามรายงานของ Truscott *et al.* (1968) และ Withler และ Morley (1968) ซึ่งกล่าวถึงความสำคัญของอัตราการแลกเปลี่ยนก๊าซ

ระหว่างน้ำเชื้อกับอากาศ ตัวอย่างน้ำเชื้อในหลอดเก็บจะถูกเก็บลงในถังน้ำแข็งเพื่อรอการเคลื่อนย้ายต่อไป

4.) น้ำยาที่ใช้ในการเก็บรักษาสภาพควรมีการทดสอบแล้วว่าไม่มีการเสื่อมสภาพของสารตัวใด โดยทั่วไปแล้วน้ำยาที่ใช้จะได้แก่ สารละลายผสมของ Cortland salt solution จากผลการศึกษาของ Graybill (1968) พบว่า Sodium choride ประมาณ 800 mg/L และ Sodium bicarbonate ประมาณ 400-500 mg/L มีความสามารถในการช่วยรักษาค่าแรงดันออสโมติกในเซลล์อสุจิให้คงที่ นอกจากนี้ Lecithin ประมาณ 750 mg/L จะช่วยในการปกป้องเยื่อบุเซลล์ รวมทั้งช่วยในการควบคุมอัตราการแพร่ผ่านของสารละลายทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ในการเก็บรักษาน้ำยารักษาสภาพควรจะเก็บไว้ในอุณหภูมิเดียวกับตัวอย่างน้ำเชื้อที่เก็บได้

5.) DMSO (Dimethyl sulfoxide) ที่ความเข้มข้น 10% (vol/vol) สามารถที่จะใช้เป็นน้ำยาป้องกันการเสื่อมสภาพของน้ำเชื้อจากการแช่แข็งได้เป็นอย่างดี ซึ่งโดยปกติแล้ว Glycerol, Polyvinyl pyrolidone (MW=40,000), Sucrose และ Ethanol ก็สามารถที่จะใช้เป็นสารป้องกันได้แต่มีประสิทธิภาพไม่ดีเท่า DMSO (Ott, 1970)

6.) จากรายงานของ Ott (1970) รายงานไว้ถึงอัตราส่วนในการผสมระหว่างน้ำเชื้อกับน้ำยาเจือจางไว้ที่ 1:9 ซึ่งโดยทั่วไปแล้วอัตราส่วนของการผสมไม่ว่าจะเป็น 1:4, 1:9, หรือ 1:19 ให้ผลที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยเท่านั้น อย่างไรก็ตามอัตราส่วนที่ใช้ได้ผลดีที่สุดคือ 1:4

7.) หลังจากการละลายน้ำเชื้อเข้ากับน้ำยาเจือจางผสมกับสารรักษาสภาพในหลอดขนาด 1 ml แล้วควรนำไปบ่มในไอของไนโตรเจนเหลวทันที ระยะเวลาในการบ่มมีความสำคัญ เพราะมีผลต่ออัตราการแพร่ผ่านของ DMSO เข้าสู่ผิวของอสุจิ (Lovelock และ Bishop, 1959) หลังจากบ่มในไอไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 2 นาที จึงนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้ไปเก็บในถังบรรจุไนโตรเจนเหลวเพื่อเก็บรักษาเป็นเวลานานต่อไป

8.) ในการนำน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งออกมาใช้งานจะนำออกการถังไนโตรเจนเหลวมาละลาย แล้วนำไปผสมกับไข่อย่างรวดเร็วเท่าที่จะสามารถทำได้ การละลายน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งสามารถทำได้โดยนำมาแกว่งในอ่างน้ำที่อุณหภูมิ 50-60 °C เป็นเวลา 8 นาที จึงนำน้ำเชื้อที่ได้ไปผสมกับไข่ตามวิธีการผสมเทียมต่อไป

Scott และ Baynes (1980) ได้กล่าวถึงวิธีศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งของปลาในสกุลแซลมอน อาทิเช่น

1.) โดยทั่วไปแล้วขบวนการเมตาบอลิซึมของน้ำเชื้อปลาจะมีการดำเนินไปได้สองลักษณะคือ ขบวนการที่ใช้ออกซิเจน และไม่ใช้ออกซิเจน อสุจิในสัตว์ที่มีการปฏิสนธิภายในนั้นจะไม่มีความแตกต่างกันมากนักในขบวนการทางด้านการใช้ออกซิเจน และไม่ใช้ออกซิเจน ซึ่งแตกต่างจากสัตว์ที่มีการปฏิสนธิภายนอกที่ขบวนการเมตาบอลิซึมจะค่อนไปทางด้านการใช้ออกซิเจนมากกว่าขบวนการที่ไม่ใช้ออกซิเจน (Mann, 1964)

2.) กรรมวิธีในการผสมเทียมปลาในครอบครัวแซลมอน Scott และ Baynes (1980) อ้างอิงถึง Ginsberg (1963) ว่าโดยปกติแล้วสามารถที่จะแบ่งออกได้เป็น 2 วิธีด้วยกัน คือ การผสมเทียมด้วยกรรมวิธีแบบแห้ง (Dry Method) จากการริเริ่มของ Russian V.P. Vrasski (Soudakevicz, 1974) โดยการนำน้ำเชื้อมาผสมกับไข่สดที่รีดได้จากแม่ปลาจากนั้นจึงนำไปโรยลงในน้ำเพื่อให้ไข่มีการพัฒนาและฝักเป็นตัวต่อไป นอกจากการผสมแบบแห้งแล้ว Petit, Jalabert, Chevassus และคณะ (1973) และ Billard, Petit, Jalabert และคณะ (1974) ยังได้รายงานถึงกรรมวิธีผสมเทียมแบบเปียก (Wet Method) โดยการรีดไข่ และน้ำเชื้อจากปลาผสมกันในสารละลาย Buffered saline จากนั้นจึงนำไปเทลงในน้ำเพื่อทำการฝักต่อไป

3.) อัตราการเจือจางน้ำเชื้อนั้นจะส่งผลกับอายุ และประสิทธิภาพในการเคลื่อนไหวของอสุจิ โดยทั่วไปแล้วสารที่จะใช้ในการเจือจางส่วนมากจะใช้ น้ำสะอาด, สารละลายน้ำเกลือ และ ovarian fluid จากการอ้างอิงถึง Nomura (1964) ซึ่งได้ทำการทดลองในปลา rainbow trout พบว่าสารละลายทั้งสามให้ผลในการกระตุ้นอสุจิให้มีการเคลื่อนไหวทั้งหมดในอัตราการละลายที่แตกต่างกัน ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงอัตราส่วนในการละลายของน้ำยาเจือจาง : น้ำเชื้อที่ส่งผลต่ออัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิ rainbow trout (Nomura, 1964)

Dilulent	All sperm vibrating	All sperm swimming
Fresh water	2.0-2.5	3.0
Isotonic saline	1.0	2.0
ovarian fluid	0.5	1.0

4.) การเคลื่อนไหวของอสุจิ จะมีความสัมพันธ์ที่บอกได้ถึงอัตราการปฏิสนธิเมื่ออสุจิอยู่ในสารละลายชนิดเดียวกันทั้งนี้เนื่องจาก flagella จะมีการเคลื่อนไหวจากการกระตุ้นด้วยผลจากอัตราการละลาย (Bishop, 1962) อย่างไรก็ตามอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิเพียงอย่างเดียวก็อาจจะไม่สามารถที่จะบ่งบอกได้อย่างแน่นอนถึงอัตราการปฏิสนธิเสมอไปจากรายงานของ Kossmann (1973) ในปลาคาร์พ และ Mounib *et al.* (1968) ในปลา ค็อด แสดงให้เห็นว่าน้ำเชื้อที่ได้จากการแช่เยือกแข็งแม้ว่าจะมีอัตราการเคลื่อนไหวที่ดี แต่กลับส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิต่ำ นอกจากนี้จากรายงานของ Okada และ Ito (1995), Stoss, Buyukhatipoglu และ Holtz (1978) และ Truscott และ Idler (1969) พบว่าน้ำเชื้อที่เก็บจากปลาที่ตายแล้วในบางครั้งยังมีความสามารถในการที่จะปฏิสนธิ แม้ว่าจะมีอัตราการปฏิสนธิที่ต่ำกว่าน้ำเชื้อสดก็ตาม

5.) เทคนิคในการเก็บน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งนั้นพบว่ามีเพียงไม่กี่วิธีเท่านั้นที่ประสบผลสำเร็จในการเก็บน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งในปลา เทคนิคที่ใช้กันโดยทั่วไปได้แก่

5.1) Vial: เป็นการเก็บน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งในหลอดแก้วหรือหลอด polypropylene ที่มีปริมาตรสุทธิประมาณ 2 มล. เทคนิคนี้ใช้กันโดยทั่วไปในการเก็บรักษาตัวอย่างแช่เยือกแข็งที่ -196 °C นอกจากนี้ยังมีกระบอกเก็บที่ออกแบบไว้เฉพาะทำให้ง่ายในการที่จะเก็บและนำตัวอย่างออกจากถังไนโตรเจนเหลว

5.2) Pellet: เป็นการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งโดยการทำให้เป็นเกล็ด ซึ่งสามารถทำได้โดยการหยดน้ำเชื้อที่ทำการผสมแล้วลงในแท่งน้ำแข็งแห้ง (Dry Ice) จากนั้นจึงเก็บเกล็ดน้ำเชื้อในขวดเก็บเพื่อที่จะย้ายลงเก็บในถังไนโตรเจนเหลวต่อไป

5.3) French straw: กรรมวิธีนี้ถูกออกแบบเพื่อให้สะดวกรวดเร็วในการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ การแช่เยือกแข็ง และการแบ่งส่วนการใช้ตัวอย่างน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งในวัว (I.V.M., 1976) ตัวอย่างน้ำเชื้อที่ผสมน้ำยารักษาสภาพจะถูกเก็บในหลอดฟาง (straw) โดยใช้สัญลักษณะสีเป็นเครื่องบ่งบอกตัวอย่าง จากนั้นทำการปิดผนึกหัว และท้ายของหลอดฟาง เพื่อย้ายไปเก็บลงสู่ถังไนโตรเจนเหลวต่อไป

ในรายงานการทดลองหลายฉบับใช้เทคนิคในการเก็บนี้เป็นเครื่องบ่งบอกถึงอัตราการลดอุณหภูมิ โดยพบว่า ในการควบคุมอัตราการลดอุณหภูมินั้นการใช้หลอดฟางจะสามารถควบคุมอัตราการลดอุณหภูมิได้ง่ายกว่า และมีผลกระทบต่ออสุจิน้อยกว่าการใช้หลอด vial ส่วนการเก็บโดยวิธีทำเป็นเกล็ดนั้นพบว่ามีอัตราการลดลงของอุณหภูมิโดยเฉลี่ยประมาณ 30 °C/*min.* อัตราการลดอุณหภูมิโดยการเก็บด้วยวิธีต่างๆ นั้นแสดงไว้ในตารางที่ 2

6.) โดยปกติแล้วปริมาตรที่ใช้ในการเก็บน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งด้วยวิธีการทำให้เป็นเกล็ดจะใช้ปริมาตรประมาณ 40 ถึง 200 µl. และหลอดฟางจะใช้ปริมาตรประมาณ 250 ถึง 1500 µl.

ตารางที่ 2 แสดงอัตราเฉลี่ยในการลดของอุณหภูมิจากการเก็บน้ำเชื้อด้วยเทคนิคการใช้หลอด vial, หลอดฟาง และการทำเป็นเกล็ด (Scott และ Bayne, 1980)

Technique	Rate (°C/min.)	Measued from
Pellet	30	0° to -50°C
Plunged directly into liquid nitrogen:		
Polypropylene vial	170	0° to -70°C
Glass vial	300	
Straw	1800	
Plunged directly in acetone/dry ice slush:		
Polypropylene vial	50	0° to -50°C
Glass vial	170	
Straw	500	

7.) สารละลายน้ำยาเจือจางโดยส่วนมากแล้วจะอยู่ในกลุ่มสารประกอบของสารละลายเกลือ ซึ่งในบางขณะอาจมีการเพิ่มสารประกอบอินทรีย์ เพื่อช่วยรักษาประสิทธิสภาพของอสุจิในอยู่ในสภาพที่คงที่ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา (Graybill และ Horton, 1969) ตามทฤษฎีแล้วน้ำยาเจือจางที่ดีควรที่จะทำให้อสุจิอยู่ในสภาพที่ไม่มีการเคลื่อนไหวหรือมีการเคลื่อนไหวน้อยที่สุด เนื่องจากโดยปกติแล้วอสุจิจะมีการเคลื่อนไหวได้เพียงครั้งเดียวเท่านั้น ไม่สามารถที่จะกลับมาเคลื่อนไหวได้อีกเป็นครั้งที่สอง (Truscott และ Idler, 1969) ในตารางที่ 3 แสดงให้เห็นถึงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำยารักษาสภาพ ซึ่งสังเกตได้ว่าน้ำยารักษาสภาพส่วนใหญ่มีองค์ประกอบของ NaCl เพื่อควบคุมระดับความเข้มข้นของสารละลาย, $NaHCO_3$ เพื่อควบคุมความเป็นกรด-ด่าง และ Lecithin เพื่อปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์

8.) สารรักษาสภาพ (Cryoprotectant) จะช่วยป้องกันเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายจากการลดอุณหภูมิซึ่งปกติแล้วเซลล์สามารถที่จะมีชีวิตรอดจากการแช่เยือกแข็งได้ถ้ามีการลดอุณหภูมิอย่างเหมาะสม แต่โดยทั่วไปแล้วช่วงของอัตราการลดอุณหภูมิที่ไม่ทำให้ภายในเซลล์เกิดเกล็ดน้ำแข็งจะอยู่ในช่วงอุณหภูมิที่แคบมาก สารป้องกันการแช่เยือกแข็งโดยทั่วไปได้แก่ Glycerol และ Dimethyl sulphoxide (DMSO) การใช้กรีเซอรอลนั้นมีการใช้กันอย่างกว้างขวางในการใช้เป็นสารป้องกันการแช่เยือกแข็งในอสุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม และถูกนำมาพัฒนาจนประสบผลสำเร็จในปลาทะเลบางชนิด ส่วน DMSO นั้นได้ถูกนำมาใช้ในการเป็นสารป้องกันการแช่เยือกแข็งในปลาครอบครัวแซลมอนเป็นส่วนใหญ่ นอกจากสารที่กล่าวมาแล้วยังอาจใช้สารอื่นเป็นสารป้องกันการแช่เยือกแข็งได้อีก เช่น Ethylene glycol และ Propylene glycol ได้ถูกใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งของปลาCod, แซลมอน และCarp

ตารางที่ 3 แสดงองค์ประกอบของสารละลายน้ำยาเจือจาง ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีแช่เยือกแข็ง (Scott และ Baynes, 1980)

Author	Buffer Design	NaCl	KCl	$CaCl_2$	$NaHCO_3$	$MgSO_4$ ($7H_2O$)	NaH_2PO_4 (H_2O)	TRIS	Lactose	Fructose	Glycine	Glucose	Egg yiok	Bovine serum albumen	Promine D	Lecithin	Mannitol	pH
Truscott & Idler (1969)	Htx#10	6.04	1.64	0.14		0.22				0.60	6.00							6.4
	Htx#17	5.16	1.64	0.14	1.00	0.22	0.41		2.5	1.00				0.50				7.3
Graybill & Horton (1969)	Ext48	7.3	0.38	0.23 ($2H_2O$)	1.00	0.23	0.4 1			1.00						5.0		
Hoyle & Idler (1968)	Modified Cotland	1.88	7.20	0.23	1.00	0.23	0.41		2.5									
Ott & Horton (1971a)	129	7.3	0.38	0.23 ($2H_2O$)	5.00	0.23	0.41			1.00						5.0		
	134	7.3	0.38	0.23 ($2H_2O$)	5.00	0.23	0.41			1.00						7.5		
	141	7.3	0.38	0.23 ($2H_2O$)	5.00	0.23	0.41			1.00						7.5	1.0	
	146	7.3	0.38	0.23 ($2H_2O$)	5.00	0.23	0.41			1.00	2.50					7.5	1.0	
(1971b)	164	7.3	0.38	0.23 ($2H_2O$)	7.50	0.23	0.41			1.00						7.5	2.5	
Buyukhatipoglu & Holtz (1978)		5.92	1.72	0.68		0.15		24.2						4.0	0.10			7.25 with citric acid
Stain & Bayrle (1978)	V2	7.5	0.38	0.46 ($2H_2O$)	2.00	0.23	Na_2HPO_4 0.53				5.00	1.0	20 ml					
	V2e	7.5	0.38		2.00							1.0	20 ml					
Ott (1975)	235	8.5			5.00											5.0		
	251	8.5			5.00											15.0		
	275	8.5			3.75											7.5		

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9.) ระยะเวลาในการบ่มน้ำเชื้อก่อนการแช่เยือกแข็งโดยปกติแล้วจะใช้เวลา 1/2-1 ชม. เพื่อให้สารรักษาสภาพแพร่เข้าสู่ภายในเซลล์ แต่ในบางรายงานก็พบว่าไม่ได้มีการแสดงถึงเวลาในการบ่มน้ำเชื้อก่อนการแช่เยือกแข็ง

10.) จากรายงานส่วนมากอัตราการลดอุณหภูมิจะส่งผลต่ออัตราการรอดของอสุจิที่ถูกแช่เยือกแข็ง อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้นจะส่งผลให้อสุจิมีอัตราการรอดที่สูงที่สุด แต่โดยทั่วไปแล้วค่าอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิจะมีค่ากว้าง และเปลี่ยนแปลงตามชนิดของเซลล์ที่ทำการแช่เยือกแข็ง ตัวอย่างเช่น เซลล์ไขกระดูกจะใช้อัตราเร็วในการลดอุณหภูมิประมาณ 1.6°C/min. ในขณะที่เซลล์เม็ดเลือดของมนุษย์ใช้อัตราเร็วในการลดอุณหภูมิ 300°C/min. ในปลาแซลมอนนั้นพบว่าอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิประมาณ 30-60 °C/min. เป็นอัตราเร็วในการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด (Scott และ Baynes, 1980)

11.) ข้อมูลวิธีในการละลายน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งเพื่อนำมาใช้นั้น พบว่ายังไม่เป็นที่เข้าใจกันมากนัก แต่โดยทั่วไปแล้วพบว่าผลจากการแช่แข็ง และการละลายจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายจึงส่งผลให้คุณภาพของอสุจิลดลงอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังส่งผลให้ระยะเวลาในการมีชีวิตอยู่ของอสุจิลดลงด้วยเช่นกัน

Stoss และ Holtz (1981) ได้ศึกษาผลของน้ำยาที่ใช้ในการละลาย, ความหนาแน่นของอสุจิที่ทำการละลายและความสามารถในการปฏิสนธิจากน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งของปลา Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) ในการทดลองน้ำเชื้อจะถูกผสมกับน้ำยารักษาสภาพชนิดเดียวกันทั้งหมด และทำให้เป็นเกล็ดโดยการหยดลงบนก้อนน้ำแข็งแห้ง จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งมาละลายโดยน้ำยาละลายสูตรต่างๆพบว่าน้ำยาที่ใช้ในการละลายที่ดีที่สุดคือ coelomic fluid ซึ่งมีส่วนผสมของ $NaHCO_3$ 119 mM และ NaCl 120 mM ให้ผลในการปฏิสนธิเป็น 78.9, 75.3และ 69.1% เทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีอัตราการปฏิสนธิเป็น 97.1% นอกจากนี้ความหนาแน่นที่ต่ำที่สุด ที่จะทำให้น้ำเชื้อแช่เยือกแข็งสามารถปฏิสนธิได้ผล คือ 3×10^6 เซลล์ต่อไข่ 1 ใบ โดยระยะเวลาจากการละลายจนถึงการผสมน้ำเชื้อกับไข่เป็นเวลา 30 วินาที ผลการศึกษาของ Stoss และ Holtz (1983) ซึ่งได้รายงานถึงการศึกษาผลกระทบจากความเข้มข้นของ DMSO และระยะเวลาในการบ่มโดยใช้ sucrose และ KCl เป็นน้ำยารักษาสภาพ และน้ำยาในการละลาย โดยความเข้มข้นของ DMSO ที่ใช้คือ 5 ถึง 10 ml/100ml, ใช้ระยะเวลาในการบ่มที่อุณหภูมิ 0°C เป็น 1, 2, 4 และ 60 นาทีตามลำดับ สำหรับความเข้มข้นของน้ำยารักษาสภาพที่ใช้คือ sucrose 0, 100, 200 หรือ 300 mmol และ KCl ความเข้มข้น 0, 6.7, 13.4, 20.2, 26.9, หรือ 33.6 mmol จากการละลายน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งด้วยน้ำยาละลายต่างๆ พบว่า DMSO ความเข้มข้นระหว่าง 10 ถึง 20% ให้ผลในการปฏิสนธิที่สูงเมื่อใช้ระยะเวลาในการบ่มที่สั้น แต่หากว่ามีการเพิ่มความเข้มข้นของ DMSO ผลของระยะเวลาที่ใช้ใน

การบ่มก็จะยิ่งเด่นชัดมากขึ้น ส่วน sucrose ไม่ส่งผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งที่ผสม KCl และน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งที่ผสม KCl 6.7 mmol จะแสดงผลที่เด่นชัดมากเมื่อเทียบกับน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งที่ไม่มี KCl นอกจากนี้การละลายน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งที่สารละลายไอออนิคที่แตกต่างกันจะส่งผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งกับไข่โดยค่าออสโมลาลิตี้ (osmolality) ที่ 249 mOsm ซึ่งเป็นค่าที่ต่ำที่สุดในการทดลองให้อัตราการปฏิสนธิที่สูงถึง 85% และอัตราการปฏิสนธิจะลดลงเหลือ 61% เมื่อเพิ่มค่าออสโมลาลิตี้ให้สูงขึ้นเป็น 365 mOsm

Erdahl, Erdahl และ Graham (1984) ศึกษาถึงปัจจัยที่ส่งผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งของปลาในครอบครัวแซลมอน โดยทำการศึกษาในปลา Chinook salmon (*Oncorhynchus tschawytscha*), Rainbow trout (*Salmo gairdneri*), Brown trout (*S. trutta fario*) และ Brook trout (*Salvelinus fontinalis*) ตัวอย่างน้ำเชื้อสดจะถูกผสมด้วยน้ำยารักษาสภาพของ Erdahl และ Graham (1980) พบว่าอัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อน้ำยารักษาสภาพที่ 1:2 พบว่าอัตราปฏิสนธิสูงขึ้นแต่เมื่อเพิ่มอัตราส่วนเป็น 1:10 กลับเป็นการเร่งให้คุณภาพของน้ำเชื้อในการปฏิสนธิลดลง เมื่อเก็บน้ำเชื้อไว้ที่ 5°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในการใช้สารป้องกันการแช่เยือกแข็ง 3 ชนิด คือ DMSO, Ethylene Glycerol และ Glycerol พบว่าความเข้มข้นของ DMSO 7% หรือต่ำกว่านั้นให้อัตราการปฏิสนธิที่สูงกว่าสารป้องกันการแช่เยือกแข็งชนิดอื่น เมื่อทำการแช่เยือกแข็งน้ำเชื้อปลา Rainbow trout และ Brook trout ที่อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยารักษาสภาพ เป็น 1:2 และใช้ DMSO 7% เป็นสารป้องกันการแช่เยือกแข็ง พบว่าให้อัตราการปฏิสนธิ 54% เมื่อเก็บในหลอดฟางขนาด 0.25 ml ให้อัตราการปฏิสนธิ 66% และเมื่อเก็บน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งในลักษณะเกล็ดซึ่งมีขนาด 0.10 ml พบว่าอัตราปฏิสนธิเท่ากับ 10% นอกจากนี้เมื่อแช่น้ำเชื้อที่อุณหภูมิ -79°C และ -196°C ให้ผลของการปฏิสนธิที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

Baynes และ Scott (1987) รายงานถึงการใช้ 5 ถึง 20% ไข่แดงสดในสารละลาย sucrose-based เป็นน้ำยารักษาสภาพ เพื่อเพิ่มอัตราปฏิสนธิหลังจากการละลายในปลา Rainbow trout (*S. gairdneri*) พบว่าน้ำเชื้อที่แช่เยือกแข็งด้วยการใช้ 10% ไข่แดงสดให้ผลการปฏิสนธิหลังจากการละลายที่สูงโดยให้อัตราการปฏิสนธิเท่ากับ 67.3±3.0%

Chao, Chen และ Liao (1975) ได้ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีการแช่เยือกแข็งในปลากระบอกสีน้ำตาล (*Mugil cephalus*) เป็นเวลา 23 วัน ที่อุณหภูมิ -196 °C ในการทดลองน้ำเชื้อจะถูกผสมกับสารละลาย Ringer solution for marine fish ซึ่งใช้เป็นน้ำยาเจือจาง

ด้วยอัตราส่วน 6, 10, 15, และ30% (vol/vol) เก็บในหลอดฟางขนาด 0.5 ml ทำการลดอุณหภูมิด้วยการผ่านไอไนโตรเจนซึ่งมีอุณหภูมิ -80 °C จากนั้นนำไปเก็บในถังบรรจุไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C ผลการทดลองพบว่าสารที่ใช้ในการรักษาสภาพที่เหมาะสมในการทดลอง คือ 5-10% Glycerol และ DMSO ที่อัตราส่วน 1:1, 1:5 และ 1:10 ส่งผลให้อสุจิมีอัตราการเคลื่อนไหว และอัตราการปฏิสนธิที่ดีที่สุดโดยอัตราปฏิสนธิที่ดีที่สุดเท่ากับ 2.7% หลังการเก็บน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งเป็นเวลา 1 ปี กับ 4 วัน

Chao, Chao และ Liu (1987) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งในปลานิล 6 ชนิด ได้แก่ *Oreochromis aureaus, O. mossambicus, O. niloticus, Tilapia zillii, O. sp.* และ ปลานิลแดงลูกผสมระหว่าง *O. niloticus x O.aureaus* โดยใช้ 15% นมผง และ 5% methanol เป็นน้ำยารักษาสภาพ ทำการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วจนถึง -35°C จากนั้นลดอุณหภูมิด้วยอัตรา 5°C/min. จนถึง -75°C และเก็บน้ำเชื้อในไนโตรเจนเหลว จากการทดสอบอัตราปฏิสนธิพบว่าอัตราการปฏิสนธิเท่ากับ 72.7% เมื่อเทียบกับกลุ่มทดลองที่มีอัตราการปฏิสนธิเท่ากับ 85.7% หลังการเก็บน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งเป็นเวลา 22 วัน ส่วนในการทดลองกับลูกผสมระหว่าง *O. miloticus x O.aureus* ใช้ไข่ของ *O. honorum* เป็นตัวทดสอบพบว่ามีอัตราการปฏิสนธิเท่ากับ 93.4% เมื่อกลุ่มควบคุมมีอัตราการปฏิสนธิเป็น 90% ภายหลังการเก็บน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งเป็นเวลา 304 วัน

Rana และ McAndrew (1989) ใช้น้ำเชื้อของปลานิล (*O. spp.*) เป็นตัวอย่างในการทดลองการแช่เยือกแข็งโดยผสมกับ methanol และสารละลาย Fish Ringer เป็นน้ำยารักษาเจือจาง จากนั้นเก็บไว้ในหลอดแช่เยือกแข็งขนาด 1.5 ml ลดอุณหภูมิโดยการผ่านไอของไนโตรเจนเหลว และแช่ที่อุณหภูมิ -196 °C เป็นเวลาอย่างน้อย 13 เดือน พบว่าในตัวอย่างน้ำเชื้อ 16 ตัวอย่างอสุจิยังแสดงการสั่นของหางให้เห็นได้หลังจากการละลายในอัตราส่วน 16% และมีอัตราการปฏิสนธิเฉลี่ยเท่ากับ 38.7-93.4% และพบว่าสารละลาย methanol 10% สามารถที่จะใช้เป็นสารป้องกันการแช่เยือกแข็งได้ดีที่สุด โดยมีอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 5 และ 30°C/min. นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการผสมระหว่างน้ำเชื้อกับน้ำยารักษาสภาพที่ 1:2 และ 1:20 อัตราการปฏิสนธิไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

Piironen และ Hyvarinen (1983) ทำการศึกษาเทคนิคในการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งในปลา whitefish (*Coregonus muksum*) ด้วยการผสมน้ำเชื้อกับน้ำยารักษาสภาพ 6 ชนิด และเก็บที่อุณหภูมิ -40°C และ -196°C โดยในปี 1980 น้ำเชื้อที่เก็บได้จะถูกผสมกับสารละลายเบส และใช้ 20% Glycerol เป็นสารป้องกันการแช่เยือกแข็ง ทำการเก็บในหลอด vial

จากนั้นแช่แข็งในน้ำแข็งแห้ง เก็บที่อุณหภูมิ -40°C ผลปรากฏว่าน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งที่ละลายไม่สามารถที่จะปฏิสนธิได้ หลังจากนั้นในปี 1981 ได้ทำการเก็บน้ำเชื้ออีกครั้งโดยทำให้เป็นเกล็ด และเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว จากนั้นทำการละลายน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งโดยใช้ 0.119M $NaHCO_3$ พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิเฉลี่ยเท่ากับ 29.6-87.7% น้ำยารักษาสภาพที่ส่งผลให้มีการปฏิสนธิที่สูงที่สุดได้แก่ สารละลายของ 0.3M glucrose ผสมกับ 20% Glycerol โดยให้อัตราการปฏิสนธิเท่ากับ 87.7% เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีอัตราการปฏิสนธิเท่ากับ 98.6% และจากรายงานของ Piironen (1987) ผลการปฏิสนธิจากน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งของปลา whitefish ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ -196°C พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิเป็น 41-109% เมื่อกลุ่มควบคุมมีอัตราการปฏิสนธิเท่ากับ 100% ในการทดลองนี้น้ำเชื้อถูกทำให้เป็นเกล็ดโดยการหยดน้ำเชื้อที่ผสมกับน้ำยารักษาสภาพลงบนก้อนน้ำแข็งแห้ง น้ำยารักษาสภาพที่ใช้คือ สารละลายของ 0.3M glucose และ 20% Glycerol และทำการละลายโดยใช้สารละลายของ $NaHCO_3$ 10 หรือ 20 ml ที่อุณหภูมิ 30°C

Bolla, Holmefijord และ Refstie (1987) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งในปลา Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*) ด้วย saline เป็นน้ำยาเจือจางในอัตราส่วน 1:3 ทำการเก็บโดยการทำให้เป็นเกล็ด หรือบรรจุในหลอดฟาง จากนั้นทำการละลายด้วยสารละลายของ Ringer for marine fish ผลการศึกษาอัตราการปฏิสนธิพบว่าเมื่อทำการผสมไข่กับเกล็ดน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 10-40°C อัตราการปฏิสนธิระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

Leung (1987) ศึกษาเทคนิคการแช่เยือกแข็งของน้ำเชื้อปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) โดยใช้ DMSO, Glycerol และ methanol ในการทดสอบสารรักษาสภาพ ในการทดลองน้ำเชื้อจะถูกผสมด้วยน้ำยาเจือจางได้แก่ สารละลายของ 15% นมผง และ 20% ไข่แดงสด ในอัตราส่วน 1:4 (V/V) ใช้อัตราการลดอุณหภูมิเท่ากับ 31°C/min. จากการทดลองพบว่า DMSO ที่ความเข้มข้น 5% ให้ผลการทดลองที่ดีที่สุดโดยมีอัตราความเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิเท่า 70-100% หลังการละลาย ส่วน Glycerol ให้ผลดีเมื่อใช้ในปริมาณที่สูงถึง 20% และ methanol มีความสามารถในการปกป้องเซลล์จากการทำลายด้วยการลดอุณหภูมิเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

ในด้านของการใช้ประโยชน์จากน้ำเชื้อที่ได้จากการแช่เยือกแข็งได้มีรายงานไว้โดย Scheerer และ Thorgaard (1983) โดยการใช้น้ำเชื้อแช่เยือกแข็งจากปลาในสกุลแซลมอน 3 ชนิด คือ Brook trout (*Salvelinus fontinalis*), Brown trout (*Salmo trutta*), และ Rainbow

trout (*S. gairdneri*) ที่เป็น Triploi มาทำการผสมข้ามพันธุ์กับไข่ปลาปกติ เพื่อนช่วยในการเพิ่มผลผลิตของปลาลูกผสม พบว่าการใช้น้ำเชื้อจากปลาที่เป็น Triploid สามารถที่ช่วยในการเพิ่มอัตราการรอดของลูกผสมที่เกิดขึ้น ถึงแม้จะมีอัตราการรอดต่ำกว่าลูกปลาที่เกิดจากการผสมภายในชนิดเดียวกันก็ตาม

Alderson และ Macneil (1984) ได้ทำการทดลองเบื้องต้นหาความเป็นไปได้ในการนำน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งของปลา Atlantic Salmon (*Salmo salar*) และประโยชน์จากการใช้น้ำเชื้อแช่เยือกแข็งมาใช้ในการเพาะเลี้ยง เชิงพาณิชย์ พบว่ามีความเป็นไปได้ในการที่จะนำน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งมาใช้ในการปฏิสนธิกับไข่เพื่อให้ได้ลูกพันธุ์นอกฤดู และน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งมีความสำคัญในการที่จะนำมาใช้กับการเพาะเลี้ยงปลา Atlantis Salmon ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

Thorgaard *et al.* (1990) ได้รายงานถึงการเพิ่มอัตรารอดของลูกปลา Rainbow trout (*S. gairdneri*) ที่เป็น Androgenetic ซึ่งได้จากการผสมน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งของปลาที่เป็น Tetraploid กับไข่ที่ผ่านรังสี แกมมา หรือ X-ray และถึงแม้อัตราการรอดของลูกปลาจะมีปริมาณน้อย แต่ก็สามารถที่จะใช้เป็นแนวทางในการศึกษาต่อไปได้เช่นกัน

จะเห็นได้ว่าการศึกษาในด้านการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งนอกจากจะมีประโยชน์ในด้านของการเก็บรักษาลักษณะพันธุกรรมแล้วยังสามารถที่จะปรับมาใช้ในด้านของการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ได้อีกด้วย ซึ่งจะพบได้จากรายงานการวิจัยข้างต้นที่กล่าวมาแล้ว โดยเฉพาะการทำน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งในปลาสกุลแซลมอน ซึ่งได้มีการพัฒนาจนสามารถใช้เป็นตัวอย่างในการทดลอง และบางส่วนในการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ ในขณะที่ประเทศไทยจัดได้ว่ามีจำนวน และชนิดของปลาอยู่เป็นจำนวนมากทั้งที่เป็นปลาเศรษฐกิจ และปลาที่ใกล้จะสูญพันธุ์ ดังนั้นการพัฒนาวิธีในการแช่เยือกแข็งน้ำเชื้อจึงน่าจะเข้ามามีบทบาทช่วยในการเพิ่มผลผลิตของทรัพยากรปลาที่มีอยู่ในประเทศ จากรายงานการวิจัยทางด้านการศึกษาเทคนิคในการแช่เยือกแข็งน้ำเชื้อปลาในประเทศไทยที่พบ เช่น

ทัศนีย์ ภูพิพัฒน์ และคณะ (2529) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพา (*Pangasius sanithwongsei* Simth) และปลาบึก (*Pangasianodon gigas* Chevy) ในน้ำยา 5 สูตร โดยเก็บไว้ในหลอดฟางที่อุณหภูมิ -196°C นาน 5 วัน พบว่าอัตราการเคลื่อนไหวของน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งในน้ำยาสูตรที่ 1 ซึ่งประกอบด้วย 125 mmol $KHCO_3$, 250 mmol glutathion และ DMSO 8% มีอัตราการเคลื่อนไหว และเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตสูงกว่าน้ำยาสูตรอื่น และพบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาเทพามีอัตราการปฏิสนธิเท่ากับ 92% เมื่อเทียบกับน้ำเชื้อสดซึ่งมีอัตรา

การปฏิสนธิเท่ากับ 23.5% สำหรับเทคนิคในการลดอุณหภูมิ พบว่าการลดอุณหภูมิโดยการบรรจุน้ำเชื้อลงในหลอดฟาง แล้วผ่านไอของไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -120°C กับการบรรจุน้ำเชื้อในหลอดฟางจากนั้นบรรจุลงในหลอดทดลองอีกชั้น แล้วจึงไอไนโตรเจนเหลวที่ -120 °C เช่นกัน เมื่อเก็บน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งไว้เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า อัตราการปฏิสนธิที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

นอกจากนี้จากรายงานของ กฤษณ์ มงคลปัญญา (2536) ได้รายงานถึงผู้ที่ทำการทดลองเก็บน้ำเชื้อปลาแช่เยือกแข็งในประเทศไทยอีกหลายท่าน เช่น นลินี มารคแมน (2527) ประสบผลสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งของปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus Bleeker*) นอกจากนี้ยังได้กล่าวถึงการนำน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งของปลาบึกทดลองผสมข้ามพันธุ์กับปลาดุกอุย และกำลังทำศึกษาอัตราการเจริญเติบโตอยู่ในขณะนี้ (เอกสารยังไม่ดีพิมพ์)

ปลากะพงแดงซึ่งเป็นปลาที่มีแนวโน้มที่จะมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ และถ้าหากไม่วางแผนในการจัดที่ดีอาจจะส่งผลต่อทรัพยากรที่เหลืออยู่ในธรรมชาติ โดยเฉพาะลักษณะความหลากหลายทางพันธุกรรม ดังเช่นจากรายงานของ Douglas (1993) รายงานการปล่อยปลาลูกผสมของ Striped bass X White bass ส่งผลให้ปลาลูกผสมแย่งแหล่งอาหารของปลาพันธุ์พื้นเมือง และทำให้ประชากรของปลาพันธุ์พื้นเมืองลดลง ซึ่งการที่นำลักษณะทางพันธุกรรมที่สูญหายกลับมานั้นนับเป็นเรื่องยากหากไม่มีการเก็บรักษาพันธุกรรมของปลาชนิดนั้นๆ ไว้ การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งนับเป็นวิธีหนึ่งที่สะดวกในการเก็บรักษาพันธุกรรมของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจึงควรที่จะมีการศึกษาควบคู่ไปกับการพัฒนาการเพาะเลี้ยงเพื่อใช้เป็นหลักประกันในการรักษาพันธุ์แท้ตามธรรมชาติไม่ให้สูญหายไปในอนาคต

สำหรับการศึกษาการเก็บน้ำเชื้อในปลาทะเลยังไม่พบรายงานว่าได้มีผู้ทำการทดลองในประเทศไทยดังนั้นจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในปลาทะเล เพราะเนื่องจากในประเทศไทยมีปลาทะเลที่เป็นปลาเศรษฐกิจอยู่เป็นจำนวนมาก เช่น ปลาเก๋า ปลากะพง เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งในปลากะพงแดง โดยศึกษาถึงลักษณะทั่วไปของน้ำเชื้อ ความหนาแน่นของอสุจิ ผลของสารละลายน้ำยาเจือจางที่เหมาะสม ผลของสารรักษาสภาพ และผลที่เกิดขึ้นจากการลดและเพิ่มอุณหภูมิ การวัดคุณภาพของน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งจะวัดได้จากระดับการเคลื่อนที่ อัตราการเคลื่อนไหว และเปอร์เซ็นต์ของอสุจิที่มีชีวิต ซึ่งรายละเอียดการทดลอง และผลจะได้กล่าวถึงในบทต่อไป