การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำและพันธุ์ไม้น้ำ

สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ

กลุ่มวิจัยและพัฒนาธนาคารเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำและพรรณไม้น้ำ
สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ
กรมประมง

สารบาญ

	หน้า
สารบาญ	(1)
คำนำ	1
ประโยชน์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำโดยวิธีแช่แข็ง	1
การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา	2
วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำชนิดต่างๆ โดยวิธีแช่แข็ง	3
1.กลุ่มปลามีเกล็ดFamily Cyprinidae	6
1.1 ปลาตะเพียนขาว	6
1.2 ปลาไน	6
1.3 ปลายี่สก	7
2.กลุ่มปลามีเกล็ดFamily Cichlidae	7
2.1 ปลานิล	7
3. กลุ่มปลาไม่มีเกล็ดFamily Pangasiidae	8
3.1 ปลาเทพา	8
4. กลุ่มปลาไม่มีเกล็ดFamily Clariidae	8
4.1 ปลาดุกยักษ์	8
5. กลุ่มปลาไม่มีเกล็ดFamily Bagridae	9
5.1 ปลากดแก้ว	9
6. สัตว์น้ำชนิดอื่นๆ Family Palaemonidae	9
6.1กุ้งก้ามกราม	9
การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ไม้น้ำ	11
1. การเก็บระยะสั้น	11
2.การเก็บระยะยาว	12
1. หอมน้ำ	12
2. ใบพายเขาใหญ่	13
3. การเก็บรักษาโดยลดการเจริญเติบโตให้ช้าลง	15
เอกสารอ้างอิง	16

สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ

การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำและพันธุ์ไม้น้ำ
สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ

คำนำ

สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ จัดตั้งธนาคารเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำและพันธุ์ไม้น้ำ เพื่อรวบรวมเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำเศรษฐกิจจัดเก็บรักษาไว้ในสภาพมีชีวิตและในรูปแบบน้ำเชื้อแช่แข็ง ทั้งพันธุ์ดั้งเดิมและพันธุ์ปรับปรุงใหม่ การเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำโดยวิธีแช่แข็ง จัดเป็นเทคนิคทางเทคโนโลยีชีวภาพที่สำคัญและมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ชีววิทยา

ประมง การจัดการประมง และการอนุรักษ์ทรัพยากรประมงในอนาคต เชื้อพันธุ์สัตว์น้ำที่เก็บรักษาไว้ยังสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ในอนาคต เพราะการเก็บรักษาแบบแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ –196 องศาเซลเซียสและมีการเติมไนโตรเจนเหลวอย่างสม่ำเสมอ จะสามารถเก็บรักษาไว้ได้ตลอดไป ด้วยเหตุนี้การเก็บรักษาแบบนี้จึงเรียกว่าเป็น “ธนาคารเชื้อพันธุ์ (sperm bank)” และเมื่อผนวกกับเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ อาจแยกยีนที่ต้องการออกจากสเปริม์เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ ซึ่งเรียกว่าเป็น “ธนาคารยีน (gene bank)” ต่อไป

ปัจจุบันธนาคารเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำและพันธุ์ไม้น้ำอยู่ในความรับผิดชอบของกลุ่มธนาคารเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำและพรรณไม้น้ำ ได้ดำเนินการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำโดยเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง (spermatozoa cryopreservation) สัตว์น้ำรวมทั้งสิ้น 29 ชนิด 52สายพันธุ์ เพื่อให้มีความพร้อมสำหรับการใช้งานที่เอื้อประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การปรับปรุงพันธุ์และการอนุรักษ์พันธุ์

ประโยชน์ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำโดยวิธีแช่แข็ง (ดัดแปลงจาก กฤษณ์, 2536)

1. ประหยัดค่าใช้จ่ายและพื้นที่ในการเลี้ยงพ่อพันธุ์
2. สามารถคัดหรือปรับปรุงพันธุ์ได้สะดวกขึ้น หากมีน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ที่มีลักษณะตามความต้องการเก็บแช่แข็งไว้ก่อน
3. ใช้ในการผสมข้ามชนิดหรือข้ามสกุล ตัวอย่างที่เห็นชัดเจนคือ ปลาดุกบิ๊กอุย ซึ่งเป็นปลาลูกผสมระหว่างปลาดุกยักษ์เพศผู้กับปลาดุกอุยเพศเมีย และจำเป็นต้องผ่าท้องปลาดุกยักษ์เพื่อเก็บถุงอัณฑะมาใช้ผสมเทียม หากมีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกยักษ์ไว้จำนวนมากพอ จะทำให้สามารถนำไปใช้ผสมเทียมเพื่อผลิตปลาบิ๊กอุยในคราวต่อไปได้โดยไม่ต้องฆ่าพ่อปลาอีก
4. น้ำเชื้อแช่แข็ง มีความจำเป็นในการผสมเทียมสัตว์น้ำที่มีข้อจำกัดบางประการซึ่งทำให้ไม่สามารถผสมพันธุ์ตามธรรมชาติได้ เช่นปลาที่เป็นกระเทยแบบเป็นเพศเมียในช่วงแรกของชีวิต แต่เมื่อโตขึ้นจะกลายเป็นเพศผู้ เช่น ปลากะรังและปลาไหลนา และปลาที่เป็นเพศผู้ในระยะแรกของชีวิต เช่นปลา gilthead seabream (*Sparusauratus*)
5. เป็นประโยชน์ในการเพาะพันธุ์ปลาที่ใกล้สูญพันธุ์ เช่นปลาบึก ปลาเทพา ปลายี่สก ซึ่งจำเป็นต้องจับพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติมาเพาะพันธุ์ แต่มักจับได้ปลาทั้งสองเพศไม่พร้อมกัน ถ้าหากมีน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ จะสามารถนำมาผสมเทียมได้ทันเวลา เมื่อจับปลาเพศเมียท้องแก่ได้
6. สะดวกในการขนส่ง การศึกษาวิจัยที่เป็นโครงการระหว่างประเทศ โดยใช้การขนส่งน้ำเชื้อแช่แข็งแทนการส่งตัวปลา

สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ

เนื่องจากในประเทศไทยมีชนิดพันธุ์สัตว์น้ำและพันธุ์ไม้น้ำที่มีความหลากหลาย ทั้งพันธุ์สัตว์น้ำ การเก็บรักษาพันธุ์ของสัตว์น้ำ แต่ละชนิดนั้นจะมีความแตกต่างกัน ทั้งวิธีการ สารเคมี และระยะเวลาที่ใช้ จึงจำเป็นต้องจัดทำคู่มือการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำและพันธุ์ไม้น้ำ เพื่อเป็นแนวทางให้ผู้ปฏิบัติงานสามารถปฏิบัติงานได้อย่างถูกต้อง

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

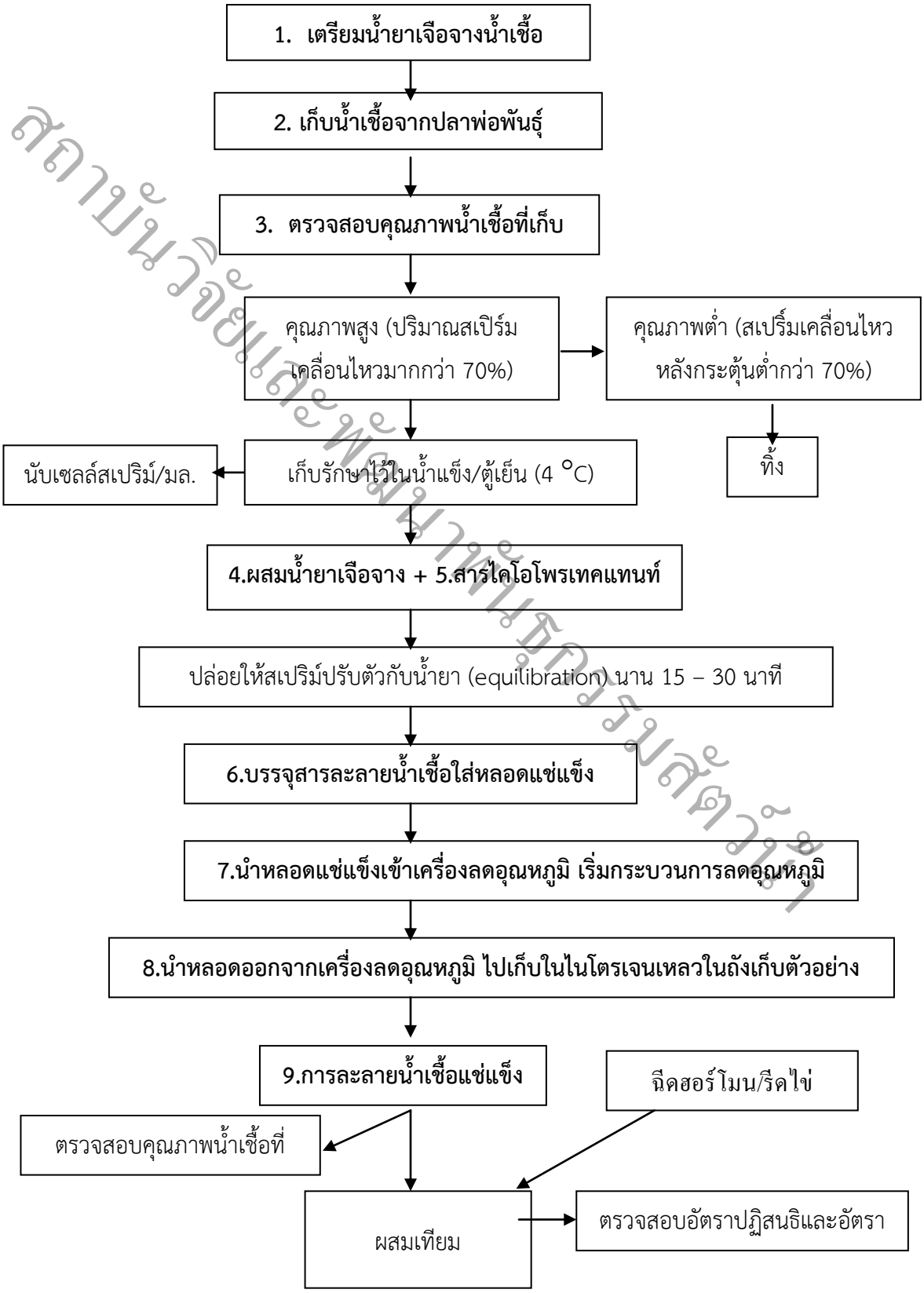
1.<u>การเก็บระยะสั้น (Short Chilled storage)</u>เป็นการเก็บน้ำเชื้อในตู้เย็นหรือถังน้ำแข็ง ในอุณหภูมิสูงกว่า 0 องศาเซลเซียสเล็กน้อย สามารถเก็บได้ในสภาพน้ำเชื้อเข้มข้นหรือเจือจางด้วยสารละลายที่เหมาะสมกับปลาแต่ละชนิด การเก็บรักษาน้ำเชื้อในลักษณะนี้สามารถเก็บได้หรือไม่ขึ้นอยู่กับสารละลายที่ใช้ ชนิดปลา คุณภาพน้ำเชื้อ และเทคนิคในการเก็บรักษา

2.<u>การเก็บระยะยาวโดยวิธีแช่แข็ง (cryopreservation)</u>เป็นการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ –196 องศาเซลเซียสการเก็บโดยวิธีนี้ต้องใช้น้ำยา (extender) เจือจางน้ำเชื้อซึ่งผสมสารที่ช่วยป้องกันความเสียหายให้กับเซลล์ระหว่างกระบวนการลดอุณหภูมิ สารเหล่านี้เรียกว่า “ไคโอโพรเทแทนท์” (cryoprotectant) ได้แก่ กลีเซอรอลไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) อัลกอฮอล์และน้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นต้น สารเหล่านี้จะช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ ป้องกันเซลล์เหี่ยว ป้องกันความเสียหายที่เกิดจากการเสียสมดุลย์ของเกลือแร่และอิเล็คโตรไลท์ และยังสามารถช่วยคงคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ และเยื่อหุ้ม ออการ์แนลล์ การเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งต้องกำหนดระยะเวลาให้เซลล์ปรับตัวกับสารละลาย (equilibration) กำหนดอัตราการลดอุณหภูมิ ลักษณะหลอดแช่แข็ง ซึ่งถ้ามีการปฏิบัติถูกต้องและเหมาะสมกับสัตว์น้ำแต่ละชนิด จะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานหลายปี (กฤษณ์, 2536; นิศา, 2539)

กรมประมง

วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็ง

วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็งนั้น มีขั้นตอนการปฏิบัติตามแผนภูมิดังต่อไปนี้



สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรมประมง

1. การเตรียมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ

น้ำยาเจือจางหรือสารละลายน้ำเชื้อ (extender) คือน้ำยาที่ประกอบไปด้วยสารที่มีคุณสมบัติช่วยยืดอายุสเปริม์ให้คงไว้ในสภาพไม่เคลื่อนไหวได้นานขึ้น มีคุณสมบัติในการคงความเป็นกรดเป็นด่าง (พีเอช) และอาจเป็นแหล่งพลังงานให้กับสเปริม์ ส่วนใหญ่น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อจะมีคุณสมบัติและองค์ประกอบคล้ายคลึงกับน้ำหล่อเลี้ยงสเปริม์ของปลาแต่ละชนิด (การเลือกใช้น้ำยาเจือจางสูตรที่เหมาะสมกับปลาชนิดนั้นๆ ได้มาจากการทดลองวิจัยและศึกษาจากเอกสารวิชาการ) น้ำยาเจือจางน้ำเชื้ออาจเตรียมไว้ล่วงหน้าโดยเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสแต่ไม่ควรเก็บไว้นานสารที่ใช้เป็นส่วนผสมในน้ำยาเจือจางได้แก่ โซเดียมโปตัสเซียม แคลเซียมแมกนีเซียมคลอไรด์ น้ำตาลกลูโคส ซูโครส เป็นต้น นอกจากนี้อาจเติมยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการเกิดเชื้อแบคทีเรียหรือสารให้พลังงานแก่น้ำเชื้อลงในน้ำยาด้วย

2. เก็บน้ำเชื้อจากปลาพ่อพันธุ์

เก็บน้ำเชื้อจากปลาโดยวิธีรีดโดยตรงโดยใช้มือรีดใส่หลอดเก็บน้ำเชื้อ ได้แก่ปลาตะเพียน ปลาไน ปลาสวายซึ่งจะมีน้ำเชื้อสมบรูณ์ดีในช่วงฤดูเพาะพันธุ์ หรืออาจมีการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นให้ปลาผลิตน้ำเชื้อก่อนจะรีด หรือจำเป็นต้องผ่าท้องเพื่อเก็บถุงอัณฑะในปลาบางชนิด เช่นปลาดุก ปลากด เป็นต้น เก็บน้ำเชื้อโดยใช้ผ้าซับบริเวณท้องและช่องเพศจนแห้งสนิท รีดน้ำเชื้อโดยอย่าให้เลือด ปัสสาวะ อุจจาระ และน้ำ ปนมากับน้ำเชื้อ น้ำเชื้อที่รีดได้ควรมีสีขาว

3. ตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อที่เก็บ

นำน้ำเชื้อที่เก็บได้จากปลาแต่ละตัวมาตรวจสอบคุณภาพสเปริม์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยหยดน้ำเชื้อลงบนกระสไลด์ และหยดน้ำจืดลงผสม เมื่อน้ำเชื้อผสมกับน้ำจืดจะไปกระตุ้นให้สเปริม์ปลาน้ำจืดเคลื่อนไหวหรือวิ่ง (น้ำเชื้อเข้มข้นของปลาน้ำจืดที่รีดมานั้นสเปริม์จะไม่เคลื่อนไหว แต่เมื่อผสมกับน้ำจืดจะกระตุ้นให้สเปริม์เคลื่อนไหว) ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อโดยตรวจสอบจำนวนสเปริม์ที่เคลื่อนไหว หากส่องกล้องแล้วพบว่ามีสเปริม์เคลื่อนไหว 90-100% แสดงว่าน้ำเชื้อมีคุณภาพดีมากเหมาะสำหรับใช้ในการแช่แข็ง ส่วนน้ำเชื้อที่สเปริม์เคลื่อนไหวน้อยกว่านี้จะทิ้ง

<u>การนับสเปริม์ต่อหน่วยปริมาตร (sperm count)</u> (ดัดแปลงจากวิธีการของกฤษณ์, 2536)

เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจางที่เหมาะสมกับปลาแต่ละชนิดในอัตราส่วน 1 : 200 หรือ 1 : 400 (ตามความหนาแน่นของสเปริม์ปลาแต่ละชนิด) เขย่าหลอดให้ส่วนผสมเข้ากัน ดูดน้ำเชื้อที่เจือจางประมาณ 20 μl หยดลงบนสไลด์นับเม็ดโลหิต (haemocytometer) ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ออกแบบเป็นพิเศษ กดกระจกโดยเลื่อนไปมาเบาๆ เพื่อให้น้ำเชื้อเจือจางส่วนเกินไหลออกจากช่องที่จะนับ ทิ้งไว้นานอย่างน้อย 10 นาที เพื่อให้สเปริม์จมตัวลงบนพื้นกระจก นับจำนวนสเปริม์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่าโดยนับจำนวนสเปริม์ในช่องใหญ่ทั้ง 4 มุม (ช่องนับช่องใหญ่ประกอบด้วยช่องเล็ก 16 ช่อง) และนับช่องตรงกลาง 1 ช่อง รวมทั้งสิ้น 5 ช่องใหญ่ (80 ช่องเล็ก) นำมาคำนวณหาจำนวนสเปริม์ต่อมิลลิลิตรจากสูตร

จำนวนสเปริม์/มิลลิลิตร = จำนวนสเปริม์รวมจาก 5 ช่องใหญ่ที่นับ ×จำนวนเท่าที่น้ำเชื้อถูกเจือจาง × 10,000

<u>เปอร์เซ็นต์สเปริม์เคลื่อนไหว เวลา และระดับการเคลื่อนไหวของสเปริม์</u> (ดัดแปลงจากวิธีการของกฤษณ์, 2536)

สถาบันวิจัยและพัฒนาพื้นที่สูง (องค์การมหาชน)

วางสไลด์บนกล้องจุลทรรศน์ หยดน้ำประปา 20 μl ลงบนสไลด์ ใช้เข็มเขี่ยแตะตัวอย่างน้ำเชื้อสดประมาณ 1 μl แตะลงบนสไลด์ใกล้หยดน้ำ จากนั้นลากหยดน้ำมาผสมกับหยดน้ำเชื้อเพื่อกระตุ้นให้สเปริม์เคลื่อนไหวแล้วมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ทันที พร้อมทั้งเริ่มจับเวลา (หน่วยเป็นวินาที) ประเมินสเปริม์เคลื่อนไหวภายในพื้นที่ที่มองเห็นเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยให้ 100 % สำหรับน้ำเชื้อที่สเปริม์เคลื่อนไหวทั้งหมดจนถึง 0 % สำหรับน้ำเชื้อที่สเปริม์ทุกตัวไม่เคลื่อนไหว โดยนับเวลาตั้งแต่สเปริม์เริ่มเคลื่อนไหวจนกระทั่งหยุดนิ่ง ประเมินระดับการเคลื่อนไหวของสเปริม์โดยให้คะแนน 1 สำหรับน้ำเชื้อที่สเปริม์เคลื่อนไหวช้าที่สุด จนถึง 5 สำหรับน้ำเชื้อที่สเปริม์เคลื่อนไหวเร็วที่สุด

4. เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาเจือจาง

ดูดน้ำยาเจือจางที่เตรียมไว้ผสมกับน้ำเชื้อปลาอัตราการเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยา มีตั้งแต่ 1 ต่อ 1 จนถึง 1 ต่อ 9 ขึ้นอยู่กับชนิดของปลา ส่วนใหญ่ปลาที่สเปริม์มีความหนาแน่นมากจะเจือจางมากและปลาที่สเปริม์หนาแน่นต่ำจะเจือจางน้อย(อัตราเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะกับปลาแต่ละชนิดได้มาจากการทดลองวิจัยและศึกษาจากเอกสารวิชาการ)

5. ผสมสารปกป้องสเปริม์จากการแช่แข็ง หรือสารไคโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant)

เติมสารไคโอโพรเทคแทนท์ลงในสารละลายน้ำเชื้อ สารไคโอโพรเทคแทนท์เป็นสารที่ช่วยป้องกันความเสียหายให้กับเซลล์สเปริม์ในระหว่างการลดอุณหภูมิ สารเหล่านี้ได้แก่ กลีเซอรอล, ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (DMSO), เมธานอล และน้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นต้น ส่วนใหญ่จะเติมสารไคโอโพรเทคแทนท์ลงไปในสารละลายน้ำเชื้อให้มีความเข้มข้นประมาณ 10% สารไคโอโพรเทคแทนท์แม้ว่าจะช่วยป้องกันความเสียหายให้กับสเปริม์ในการแช่แข็ง แต่ตัวมันเองก็เป็นพิษต่อสเปริม์ (การเลือกใช้สารโคโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมและเป็นพิษน้อยต่อสเปริม์ปลาชนิดนั้นๆได้มาจากการทดลองวิจัยและศึกษาจากเอกสารวิชาการ)

6. บรรจุสารละลายน้ำเชื้อใส่หลอดสำหรับแช่แข็ง และปล่อยให้สเปริม์ปรับตัวกับสารละลาย

ดูดสารละลายน้ำเชื้อที่ผสมน้ำยาเจือจางและสารไคโอโพรเทคแทนท์ใส่ลงในหลอดสำหรับนำไปแช่แข็ง ใช้หลอดสองชนิดคือ หลอดแช่แข็ง (cryotube) และหลอดฟาง (straw tube) ตั้งหลอดทิ้งไว้ให้สเปริม์ปรับตัวกับสารละลายและให้สารไคโอโพรเทคแทนท์แพร่เข้าสู่เซลล์สเปริม์ นานประมาณ 10-20 นาที ที่อุณหภูมิ 0 – 25 องศาเซลเซียสขึ้นอยู่กับชนิดของปลา

7. นำหลอดใส่ลงในเครื่องลดอุณหภูมิแบบอัตโนมัติ เริ่มกระบวนการลดอุณหภูมิ

นำหลอดใส่ในเครื่องลดอุณหภูมิที่ต่อกับถังเก็บไนโตรเจนเหลว ตั้งอัตราการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อปลาแต่ละชนิดจะใช้อัตราลดอุณหภูมิไม่เหมือนกัน ปลาบางชนิดใช้อัตราการลดอุณหภูมิเร็ว (10-20 องศาเซลเซียส/นาที) ปลาบางชนิดใช้อัตราลดอุณหภูมิช้าๆ (1-5 องศาเซลเซียส /นาที) หรือต้องใช้สองอัตราผสมกันอัตราลดอุณหภูมิที่เหมาะสมได้มาจากการทดลองวิจัยและค้นคว้าจากเอกสารวิชาการ

8. นำหลอดออกจากเครื่องลดอุณหภูมิไปเก็บในไนโตรเจนเหลว

กระบวนการลดอุณหภูมิสารละลายน้ำเชื้อจะสิ้นสุดลงเมื่อลดอุณหภูมิลงจนถึงประมาณ –60 ถึง –80 องศาเซลเซียสนำหลอดออกจากเครื่องแล้วรีบนำไปแช่ลงในถังบรรจุไนโตรเจนเหลว ซึ่งไนโตรเจนเหลวจะมีอุณหภูมิ –196 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นการสิ้นสุดการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา

สถาบันวิจัยและพัฒนาการเกษตรภาคใต้

9. การละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

นำน้ำเชื้อแช่แข็งออกมาใช้ในการผสมกับไข่ หรือตรวจสอบคุณภาพสเปริม์ที่เก็บรักษา โดยนำหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งออกจากถังบรรจุไนโตรเจนเหลว นำไปละลายโดยแช่หลอดในน้ำที่ปรับอุณหภูมิประมาณ 37 องศาเซลเซียสนานจนกว่าน้ำเชื้อจะละลายหมด (หลอดแช่แข็งใช้เวลาประมาณ 1 นาที หลอดฟางใช้เวลาประมาณ 8-10 วินาที) ดูดน้ำเชื้อที่ละลายไปผสมกับน้ำเปล่าเพื่อตรวจสอบเปอร์เซนต์สเปริม์เคลื่อนไหว หรือนำไปผสมกับไข่และดูเปอร์เซนต์ฟักต่อ

สถาบันวิจัยและพัฒนาการเลี้ยงสัตว์น้ำ

วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำชนิดต่างๆ โดยวิธีแช่แข็ง

1.กลุ่มปลามีเกล็ดFamily Cyprinidae(ปลาตะเพียนขาวปลาไนปลายี่สก**)**

1.1 <u>ปลาตะเพียนขาว</u> *Barbodes gonionotus*(Bleeker, 1850)

ปลาตะเพียนขาวมีลักษณะลำตัวแบนข้าง ขอบหลังยกโค้งสูงขึ้น หัวและปากเล็ก มีหนวดเส้นเล็กๆ 2 คู่ ลำตัวมีสีขาวเงิน ก้านครีบแข็งที่หลังเป็นหยัก ครีบหลังและครีบหางมีสีเทาปนเหลือง ครีบก้นและครีบท้องมีสีส้มอ่อนตอนปลายมีสีแดง ครีบหูมีสีชีดจางหรือเหลืองอ่อน มีถิ่นอาศัยในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ แถบลุ่มน้ำโขง แม่น้ำเจ้าพระยา แหลมมาลายู สุมาตราและชวา อาศัยอยู่ตั้งแต่ช่วงกลางน้ำจนถึงพื้นท้องน้ำ (benthopelagic) พบอาศัยในแหล่งน้ำจืด ตามแม่น้ำ ลำคลอง อ่างเก็บน้ำ เป็นปลาที่อพยพเข้ามาอาศัยและผสมพันธุ์วางไข่ในที่ลุ่มน้ำท่วมถึงในฤดูน้ำหลาก อุปนิสัยกินทั้งพืชและสัตว์ โดยกินอาหารจำพวกพืชและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Kottelat*et al*., 1993)

พลชาติและพนม (2546)ได้ทำการทดลองเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งปลาตะเพียนขาว โดยวิธีแช่แข็ง พบว่า modified Cortland โดยใช้สาร 10%DMSO เป็นสารไคโอโพรเทคแทนท์ อัตราเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยา 1:3 ปล่อยให้น้ำเชื้อปรับตัวกับสารละลายที่ 0 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที แล้วนำไปลดอุณหภูมิ 2 ขั้นตอน คือ 5 องศาเซลเซียส/นาที จาก 4ถึง –4องศาเซลเซียสและ 10 องศาเซลเซียส/นาที จาก -4 ถึง –80 องศาเซลเซียสแล้วนำตัวอย่างไปแช่ในไนโตรเจนเหลว (–196 องศาเซลเซียส)มีความเหมาะสมต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวเมื่อจะละลายนำมาแช่ในน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนานจนกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งจะละลายหมด

1.2 <u>ปลาไน</u> *Cyprinu scarpio* (Linnaeus, 1758)

ปลาไนมีลักษณะคล้ายปลาตะเพียน ปากเล็กไม่มีฟัน ริมฝีปากหนา มีหนวด 4 เส้น ครีบหลังเป็นครีบเดี่ยวยาวติดกัน ลำตัวมีสีเงินปนเทาหรือเหลืองอ่อนจนถึงทอง เกล็ดมีลักษณะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ เป็นปลาชนิดแรกที่มีการนำเข้าไปเลี้ยงในประเทศต่างๆ ทั่วโลก ปัจจุบันปลาไนมีการแพร่กระจายจากยุโรปตะวันตกไปจนถึงจีน เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และจากไซบีเรียจนถึงแถบเมดิเตอเรเนียนและอินเดีย ปลาไนที่เลี้ยงมีการปรับปรุงพันธุ์จนเป็นสายพันธุ์ต่างๆ และมีการเพาะเลี้ยงกันมาเป็นเวลายาวนานเป็นพันๆ ปี ตามธรรมชาติปลาไนอาศัยในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 14 – 35 องศาเซลเซียสมีความทนทานต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปในช่วงกว้าง แต่มักชอบอาศัยในแหล่งน้ำขนาดใหญ่ที่มีกระแสน้ำไหลช้าๆ หรือน้ำนิ่งพื้นท้องน้ำเป็นโคลนตม (benthopelagic) มีอุปนิสัยกินทั้งพืชและสัตว์ กินอาหารจำพวกแมลงน้ำ กุ้ง ปู หนอนน้ำ หอยสาหร่ายและพืชน้ำ มีนิสัยคุ้ยหาอาหารตามพื้นท้องน้ำ ผสมพันธุ์วางไข่ในฤดูใบไม้ผลิและฤดูร้อน โดยวางไข่

ตามไม้น้ำริมตลิ่ง ไข่เป็นไข่จมติด ปลาเพศเมียความยาว 47 ซม. จะวางไข่ประมาณ 300,000 ฟอง เป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจสูง (กรมประมง, 2530; Kottelat, 1977)

พลชาติและพนม (2546)ได้ทำการทดลองเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งปลาไนโดยวิธีแช่แข็ง พบว่า น้ำยา Modified Kurokuraและ modified Cortland โดยใช้สาร 10%DMSO เป็นสารไคโอโพรเทคแทนท์ อัตราเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยา 1:9 ปล่อยให้น้ำเชื้อปรับตัวกับสารละลายที่ 0 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที แล้วนำไปลดอุณหภูมิ 1 ขั้นตอน คือ 5 องศาเซลเซียส/นาที จาก 0 ถึง –80 องศาเซลเซียสแล้วนำตัวอย่างไปแช่ในไนโตรเจนเหลว (–196 องศาเซลเซียส) มีความเหมาะสมต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไน เมื่อจะละลายนำมาแช่ในน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนานจนกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งจะละลายหมด

1.3 <u>ปลายี่สก</u> *Probarbus jullieni* (Sauvage, 1880)

ปลายี่สก (*Probarbus jullieni* Sauvage,1880) (Roberts, 1992) เป็นปลาพื้นเมืองของไทย มีลักษณะภายนอกคล้ายปลากะโห้ (Catlacarprio siamensis) แต่ปลายี่สกมีลำตัวเพรียวยาวกว่า หัวและเกล็ดเล็กกว่าบริเวณข้างลำตัวมีแถบสีดำพาดไปตลอดความยาวลำตัวจำนวน 7 แถบ ปลายี่สกในธรรมชาติอาศัยในแม่น้ำลักษณะเป็นท้องคุ้งหรือวังน้ำลึกพื้นเป็นดินทรายหรือกรวดหิน ในอดีตเป็นปลาที่นิยมบริโภคเนื่องจากเนื้อมีรสชาติดี (เฉิดฉัน และคณะ, 2538)

พลชาติและคณะ (2552)ได้ทำการทดลองเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งปลายี่สกโดยวิธีแช่แข็ง พบว่า น้ำยา MZL โดยใช้สาร 10% เมธานอลเป็นสารไคโอโพรเทคแทนท์ อัตราเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยา 1:3 ปล่อยให้น้ำเชื้อปรับตัวกับสารละลายที่ 0 องศาเซลเซียสนาน 20นาที แล้วนำไปลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาที จนน้ำเชื้ออยู่ในช่วง –60 องศาเซลเซียส ถึง –80 องศาเซลเซียสแล้วนำตัวอย่างไปแช่ในไนโตรเจนเหลว (–196 องศาเซลเซียส)

2.กลุ่มปลามีเกล็ดFamily <u>Cichlidae</u> (ปลานิล**)**

2.1 <u>ปลานิล</u> *Oreochromis niloticus* (Linneaus, 1758)

ปลานิลมีรูปร่างคล้ายปลาหมอเทศ มีริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถว ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล มีลายพาดขวาง 9-10 แถบ ครีบหลัง ครีบก้น และครีบหางมีจุดขาวและเส้นสีดำตัดขวาง ครีบหลังเป็นครีบเดี่ยวประกอบด้วยก้านครีบแข็ง 15-18 อัน ก้านครีบอ่อน 12-14 อัน ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง 3 อัน ก้านครีบอ่อน 9-10 อัน มีเกล็ดที่เส้นข้างลำตัว 33 เกล็ด ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล สีที่เกล็ดตรงกลางมีสีเข้ม ที่กระดูกแก้มมีจุดสีเข้มหนึ่งจุด บริเวณปลายครีบหลัง ครีบก้น และครีบหางมีจุดสีขาวและเส้นสีดำตัดขวางอยู่ทั่วไป ปลานิลในสกุล *Oreochromis* มีลักษณะเด่นคือ ปลาเพศเมียเท่านั้นที่อมไข่และอนุบาลลูกปลา เหงือกมีซี่กรอง 15 –27 อัน ฟันบริเวณขากรรไกรและคอหอยมีหลายขนาด มีลักษณะตั้งแต่ค่อนข้างหยาบไปจนถึงละเอียด

พลชาติและพนม (2546)ได้ทำการทดลองเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งปลานิลโดยวิธีแช่แข็ง พบว่า น้ำยา modified Cortland โดยใช้สาร 10%DMSO เป็นสารไคโอโพรเทคแทนท์ อัตราเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยา 1:5ปล่อยให้น้ำเชื้อปรับตัวกับสารละลายที่ 20 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที แล้วนำไปลดอุณหภูมิ 1 ขั้นตอน คือ 5 องศาเซลเซียส/นาที จาก 20 ถึง –60 องศาเซลเซียสและไว้คงที่ -60องศาเซลเซียส นาน 2 นาที แล้วนำตัวอย่างไปแช่ในไนโตรเจนเหลว (–196 องศาเซลเซียส) มีความเหมาะสมต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อ

สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมกัลฐิยา

ปลานิลเมื่อจะละลายนำมาแช่ในน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนานจนกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งจะละลายหมด เมื่อนำมาผสมเทียมพบว่ามีคุณภาพต่ำกว่าน้ำเชื้อสด

พลชาติและคณะ (2547) ได้ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานิลโดยวิธีแช่แข็ง พบว่า น้ำยา modified Cortland โดยใช้สารเมธานอลเข้มข้น 10%เป็นสารไคโอโพรเทคแทนท์ อัตราเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยา 1:5 ปล่อยให้น้ำเชื้อปรับตัวกับสารละลายที่ 20 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที แล้วนำไปลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาที หรือ 10 องศาเซลเซียส/นาที จาก 25 ถึง –60 องศาเซลเซียส แล้วนำตัวอย่างไปแช่ในไนโตรเจนเหลว (–196 องศาเซลเซียส) มีความเหมาะสมต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานิลเมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้อัตราลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาที ที่เก็บนาน 36, 41, 86, 415 และ 426 วัน มาทำการผสมเทียมพบว่ามีอัตราปฏิสนธิและอัตราฟักไม่แตกต่างกัน แต่น้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บนาน 55 และ 62 วัน พบว่ามีอัตราปฏิสนธิและอัตราฟักต่ำกว่าน้ำเชื้อสด

3. กลุ่มปลาไม่มีเกล็ดFamily Pangasiidae (ปลาเทพา)

3.1 <u>ปลาเทพา</u> *Pangasius sanitwongsei* (Smith, 1931)

ปลาเทพาเป็นปลาพื้นเมืองของประเทศไทย ปลาเทพามีลักษณะเด่นคือเป็นปลาขนาดใหญ่ที่ส่วนปลายของครีบหลัง ครีบอก และครีบท้องยื่นเป็นเส้นยาว ทำให้ดูสง่างามเมื่อว่ายน้ำ จัดเป็นปลาที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในแม่น้ำเจ้าพระยาจึงมีชื่อสามัญว่า Chao- Phraya Giant Catfish ปัจจุบันมีการเพาะพันธุ์ปลาเทพาเพื่อขายในรูปปลาสวยงามและมีราคาแพง ปลาเทพาจึงจัดเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งในแง่ของปลาสวยงาม อย่างไรก็ตาม สถานภาพและแหล่งพันธุกรรมของปลาเทพานั้นอยู่ในสภาพวิกฤติ ปลาเทพาได้สูญหายไปจากลุ่มน้ำเจ้าพระยา และพบน้อยมากในแม่น้ำโขง (Mekong River Commission, 2011)

พลชาติและคณะ (2555) ได้ทำการศึกษาผลของฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานต่อพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ปลาเทพาและการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเทพา พบว่าน้ำยา 5% กลูโคส เป็นโดยใช้สารเมธานอลเข้มข้น 10%เป็นสารไคโอโพรเทคแทนท์ อัตราลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาที หรือ 10 องศาเซลเซียส/นาที และได้มีการทดอสอบประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งในการผสมเทียม พบว่ามีอัตราปฏิสนธิของน้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อปลาที่เก็บรักษานาน 365 วัน ทั้งปลาที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานและปลาชุดควบคุม ให้อัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน

4. กลุ่มปลาไม่มีเกล็ดFamily Clariidae (ปลาดุก)

4.1 <u>ปลาดุกยักษ์</u> *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822)

ปลาดุกยักษ์มีหัวใหญ่และแบน กระโหลกเป็นตุ่มมีรอยบุ๋มตรงกลาง หนวดมี 8 เส้น โคนหนวดใหญ่ ปากป้านแบนหนา มีแถบสีขาวคาดบริเวณคอดหาง เมื่อโตเต็มวัยจะมีลายคล้ายหินอ่อนปรากฏอยู่ทั่วตัว ครีบหูมีก้านครีบเป็นเงี่ยงใหญ่แต่สั้นนิ่ม เป็นปลาที่มีการนำเข้าไปเลี้ยงแพร่กระจายทั่วโลก โดยมีการนำเข้ามาในประเทศไทยผ่านทางประเทศลาวในปี 1987 (Tevarutmaneegul*et al*., 1992) ซึ่งในเวลาต่อมามีการผสมปลาดุกลูกผสมโดยใช้ปลาดุกยักษ์เพศผู้ผสมกับปลาดุกอุย (*C.macrocephalus*) เพศเมียได้ปลาลูกผสมซึ่งชื่อ ปลาดุกบิ๊กอุย หรือดุกอุยเทศ ซึ่งเป็นปลาที่นิยมเลี้ยงกันทั่วไปในประเทศไทย ปลาดุกยักษ์เป็นปลาที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมได้ในช่วงกว้าง เนื่องจากมีอวัยวะช่วยหายใจ (dendrite) จึงสามารถรับออกซิเจน

สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตร

ได้โดยตรงจากอากาศเมื่ออยู่ในสภาพน้ำแห้ง มีอุปนิสัยหากินตามพื้นท้องน้ำ (bottom feeder) แต่อาจขึ้นมาหากินตามผิวน้ำได้ในบางครั้ง เป็นปลาที่กินทั้งพืชและสัตว์ กินอาหารจำพวกแมลง ปู แพลงก์ตอน หอย ปลา และซากอินทรีย์ (กรมประมง, 2530; Teugels, 1986)

พลชาติและพนม (2546)ได้ทำการทดลองเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งปลาดุกยักษ์โดยวิธีแช่แข็ง พบว่าน้ำยาฟรุกโตส 5% โดยใช้สาร 10%DMSO เป็นสารไคโอโพรเทคแทนท์ อัตราเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำยา 1:1 ปล่อยให้น้ำเชื้อปรับตัวกับสารละลายที่ 0 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที แล้วนำไปลดอุณหภูมิ 2 ขั้นตอน คือ 4 องศาเซลเซียส/นาที จาก 3 ถึง –4 องศาเซลเซียสและ 11 องศาเซลเซียส/นาที จาก -4 ถึง –80 องศาเซลเซียส แล้วนำตัวอย่างไปแช่ในไนโตรเจนเหลว (–196 องศาเซลเซียส) มีความเหมาะสมต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกยักษ์ หลังจากเก็บในไนโตรเจนเหลวนาน 7 วัน เมื่อจะละลายนำมาแช่ในน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนานจนกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งจะละลายหมด พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว 67% ภายในเวลา 22 วินาที ตามลำดับ

5. กลุ่มปลาไม่มีเกล็ดFamily Bagridae (ปลากด)

5.1 <u>ปลากดแก้ว</u>*Hemibagruswyckioides* (Scotcat, 2004)

ปลากดแก้ว มีลักษณะเด่นคือเป็นปลาไม่มีเกล็ด (catfish) หัวกว้างและแบน มีหนวด 4 คู่ ผิวหนังมีสีม่วงคล้ำออกดำ ด้านบนและด้านล่างของครีบหาง ส่วนหน้าของครีบก้นและครีบท้องมีสีเหลืองครีม ส่วนครีบท้องและครีบหางมีสีแดงเข้ม ปลากดแก้วพบอาศัยในแม่น้ำสายใหญ่และอ่างเก็บน้ำเขื่อนต่างๆ ทั่วประเทศ มีอุปนิสัยเป็นปลากินเนื้อ แต่สามารถกินอาหารสำเร็จรูปได้เมื่อนำมาเลี้ยงในที่กักขัง ปลาที่สมบูรณ์พันธุ์จะมีความยาวและน้ำหนักตั้งแต่ 69 ซม. และ 2,400 กรัม ขึ้นไป มีฤดูผสมพันธุ์วางไข่ในระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงเดือนสิงหาคม (วิศณุพร และคณะ, 2537)

Ratanatrivong*at al.* (2011) ทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากดแก้ว (*Hemibagrus wyckioides*) โดยวิธีแช่แข็ง พบว่าการใช้สารละลาย 6% fructose และ 5% glucose เป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ใช้เมธานอลเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ และแช่แข็งน้ำเชื้อที่อัตราลดอุณหภูมิ 2 และ 5 องศาเซลเซียส/นาทีส่งผลให้น้ำเชื้อที่ละลายมีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวสูงกว่าสารละลาย GFR ที่ใช้อัตราลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาทีและน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษานาน 1 ปี นำมาละลายแล้วนำไปผสมเทียมให้อัตราปฏิสนธิและฟักไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด

6. สัตว์น้ำชนิดอื่นๆ Family Palaemonidae(กุ้งก้ามกราม)

6.1<u>กุ้งก้ามกราม</u> *Macrobrachium rosenbergii* (Bloch, 1972)

กุ้งก้ามกราม เป็นกุ้งน้ำจืดขนาดใหญ่ มีการกระจายอย่างกว้างขวาง พบทั้งบริเวณแหล่งน้ำกร่อยและแหล่งน้ำจืด กุ้งก้ามกรามวัยรุ่น จะเดินทางไปหากินในแหล่งน้ำจืดตามแม่น้ำ ลำคลองทั่วๆ ไป เมื่อถึงฤดูผสมพันธุ์ พ่อแม่พันธุ์กุ้งจะเดินทางมายังแหล่งน้ำกร่อย ซึ่งเป็นบริเวณปากแม่น้ำหรือทะเลสาบ เพื่อผสมพันธุ์วางไข่และเลี้ยงตัวอ่อนจนเป็นกุ้งวัยรุ่น แล้วเดินทางเข้าไปบริเวณน้ำจืดเพื่อเลี้ยงตัวจนเป็นกุ้งใหญ่ต่อไป กุ้งก้ามกรามจัดเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่ง เนื่องจากเนื้อมีรสชาติดี ราคาแพง ในอดีตกุ้งก้ามกรามพบชุกชุมบริเวณแม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำท่าจีน และแม่น้ำบางปะกง ทางภาคใต้พบในแม่น้ำปากพนัง แม่น้ำตาปี และแม่น้ำปัตตานี โดยเฉพาะในทะเลสาบสงขลาในเขตจังหวัดสงขลาและพัทลุงซึ่งมีกุ้งก้ามกรามชุกชุมมาก ปัจจุบันกุ้งก้ามกรามในธรรมชาติลดลงอย่างมาก เนื่องจากการทำประมงเกินขนาดและ

กรมวิชาการเกษตร

ผิดวิธี ปัจจุบันกุ้งก้ามกรามส่วนใหญ่เป็นกุ้งเลี้ยงในบ่อดินและกุ้งที่ปล่อยลงแหล่งน้ำธรรมชาติโดยกรมประมง (กรมประมง, ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์)

พลชาติและพนม (2546)ได้ทำการทดลองเก็บรักษาถุงน้ำเชื้อกุ้งก้ามกรามโดยให้กุ้งเพศผู้และเพศเมียผสมพันธุ์เสร็จสมบูรณ์ จากนั้นนำกุ้งเพศเมียมาเก็บถุงน้ำเชื้อ โดยค่อยๆ คีบถุงน้ำเชื้อซึ่งเป็นถุง 2 ถุง มีลักษณะคล้ายเมล็ดถั่วครึ่งซีกสีขาวใส นำถุงน้ำเชื้อที่ได้มาแช่ในน้ำประปานาน 15 นาที แล้วจึงนำไปแช่ในน้ำประปาที่ผสมด้วยกลีเซอรอลเข้มข้น 10 % นาน 15 นาที จากนั้นจึงค่อยนำถุงน้ำเชื้อออกจากน้ำยา นำไปใส่ในหลอดแช่แข็งขนาด 1 มล. นำไปลดอุณหภูมิด้วยเครื่องลดอุณหภูมิ 5องศาเซลเซียส/นาที จาก 20 องศาเซลเซียสถึง –80องศาเซลเซียสแล้วนำตัวอย่างไปแช่ในไนโตรเจนเหลว (–196 องศาเซลเซียส) จากนั้นทดลองโดยการนำถุงน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งมาผสมเทียม ในกุ้งทั้งสิ้น 4 ตัว พบว่า แม่กุ้ง 2 ตัวไม่วางไข่ แม่กุ้ง 2 ตัววางไข่แต่ไม่ปฏิสนธิทั้ง 2 ตัวถือว่าไม่ประสพความสำเร็จเนื่องจากยังปรับใช้วิธีการที่ไม่เหมาะสม พบว่าถุงน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งมีความบอบบางมาก หากไม่ระมัดระวังจะทำให้ถุงน้ำเชื้อแตกได้ง่าย และแม่กุ้งบางตัวมักคีบถุงน้ำเชื้อที่ทำการผสมเทียมออกจากตัวหลังจากปล่อยกลับลงตู้

กรมวิชาการเกษตร

การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ไม้น้ำ

คำนำ

การเก็บรักษาพันธุ์หรือสายพันธุ์พืช มีความสำคัญอย่างยิ่งต่องานด้านการปรับปรุงพันธุ์พืช ซึ่งโดยปกติแล้วส่วนใหญ่จะต้องเก็บไว้ในรูปของเมล็ดพันธุ์ และจำเป็นต้องมีการปลูกอย่างต่อเนื่องเพื่อให้ได้เมล็ดใหม่ที่ยังคงมีชีวิตเพื่อเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลานานๆ ทำให้ประสบปัญหาในพืชบางชนิดที่ติดเมล็ดได้น้อยหรือไม่ติดเมล็ดเลย บางชนิดเมล็ดมีอายุสั้นไม่สามารถเก็บไว้ได้นานถึงแม้จะเก็บไว้ในที่มีอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ต่ำแล้วก็ตาม ขณะเดียวกันอาจเกิดการสูญหายของพันธุกรรมพืช เสี่ยงต่อการกลายพันธุ์หรือการผสมข้ามพันธุ์และภัยธรรมชาติ รวมทั้งยังเป็นการสิ้นเปลืองทั้งเนื้อที่ ค่าใช้จ่าย และแรงงานในการปลูกและเก็บรักษาอีกด้วย ดังนั้น การพัฒนาวิธีการเก็บรักษาพันธุ์พืชในสภาพการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ซึ่งสามารถรักษาสภาพความมีชีวิตไว้ได้นาน และเก็บรักษาได้จากส่วนต่างๆ ของต้นพืชไม่ว่าจะเป็น เมล็ด ยอด ราก คัพภะ แคลลัส เซลล์ หรือ โปรโตพลาส จะเป็นประโยชน์อย่างสูงต่อพรรณไม้น้ำชนิดที่ง่ายต่อการสูญพันธุ์หายากหรือขยายพันธุ์ยากรวมทั้งพรรณไม้น้ำที่เป็นสายพันธุ์ประจำถิ่นโดยสามารถเก็บรักษาพันธุกรรมของพรรณไม้น้ำเหล่านี้ไว้ใช้ประโยชน์ในการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปดังนั้นจึงจำเป็นต้องจัดทำคู่มือการเก็บรักษาพันธุ์พรรณไม้น้ำเพื่อเป็นแนวทางให้ผู้ปฏิบัติงานสามารถปฏิบัติงานได้อย่างถูกต้องการเก็บรักษาพันธุ์พืชให้คงลักษณะเดิม มีความสำคัญต่อการนำมาใช้เพาะปลูก หรือเพาะเลี้ยงในฤดูกาลต่อไป หรือเก็บไว้ใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้พืชที่มีคุณลักษณะที่ดียิ่งขึ้น การเก็บรักษาพันธุ์หรือเชื้อพันธุ์ ตามปกติมักมีปัญหาการคงความมีชีวิตที่ลดลงและใช้พื้นที่ในการจัดเก็บมาก จึงได้นำวิธีการเก็บรักษาพันธุ์พืชในหลอดทดลอง เพื่อลดข้อจำกัดของวิธีการเก็บรักษาพันธุ์แบบเดิม ทำให้สามารถคงความมีชีวิตนานและเก็บรักษาได้ในหลายชนิดของเนื้อเยื่อไม่ว่าจะเป็นเมล็ด ยอด ราก แคลลัสหรือแม้แต่เซลล์สืบพันธุ์ จึงทำให้เก็บรักษาพันธุ์ของพืชไว้ได้เป็นเวลานานเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนางานด้านการเกษตรต่อไปในอนาคต ซึ่งวิธีการเก็บรักษาพันธุ์พืชในสภาพการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง

การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ไม้น้ำแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. การเก็บระยะสั้น แบ่งออกเป็น

1.1 <u>การเก็บในรูปเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Tissue culture)</u> เป็นการนำเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อมาใช้ในงานด้านการเก็บรักษาพันธุกรรมพืชเป็นวิธีที่นิยมเนื่องจากสามารถเก็บรักษาเนื้อเยื่อจากส่วนต่างๆได้เกือบทุกส่วนของพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งส่วนปลายยอด (shoot tip) และเนื้อเยื่อเจริญ (meristems) ซึ่งเป็นส่วนที่มีพื้นฐานทางพันธุกรรมตรงตามสายพันธุ์สูง

1.2 <u>การเก็บในแปลงดินหรือบ่อซีเมนต์</u> เป็นวิธีการขยายพันธุ์สำหรับพรรณไม้น้ำประเภทครึ่งบกครึ่งน้ำและประเภทชายน้ำ ที่ในธรรมชาติจะเจริญเติบโตได้ดีในลุ่มน้ำขังหรือที่ชื้นแฉะ และสามารถปรับตัวอยู่ใต้น้ำได้เมื่อมีน้ำท่วมขังขั้นตอนการปลูกมีดังนี้

1.2.1 การเตรียมแปลงเพาะพันธุ์ ใช้แปลงดินหรือบ่อซีเมนต์ ด้านบนคลุมด้วยตาข่ายพรางแสง 40-60 % อาจติดตั้งระบบน้ำหยดหรือใช้ระบบสเปรย์น้ำเป็นเวลา ปูพื้นด้วยวัสดุปลูกประเภทดินร่วนปนดินเหนียว

กรมวิชาการเกษตร

1.2.2 การปลูกพรรณไม้น้ำ นำพรรณไม้น้ำที่ได้จาธรรมชาติหรือจากแปลงพันธุ์ โดยการตัดยอดแล้วเด็ดใบข้อที่ 1-2 ออก เพื่อให้เกิดรากใหม่ขึ้นที่ข้อ หรือ บางชนิดอาจจะใช้การตัดลำต้นมาปักชำ จากนั้นไปปลูกบนวัสดุปลูก ซึ่งการปลูกพรรณไม้น้ำควรทำในช่วงเย็นเพื่อไม่ให้พรรณไม้น้ำสูญเสียน้ำมาก และระยะแรกควรรดน้ำหรือสเปรย์น้ำวันละหลายครั้ง

1.2.3 การดูแลรักษา หลังจากพรรณไม้น้ำตั้งตัวได้แล้วควรใช้ปุ๋ยเคมี NPK ชนิดละลายน้ำ คือสูตร 15-15-15 เพื่อเร่งอัตราการเจริญเติบโตและความสมบูรณ์ของลำต้น สลับกับสูตร 3๐-2๐-1๐ หรือ 25-5-5 เพื่อบำรุงส่วนใบ โดยใส่ปุ๋ยในอัตราส่วน 1๐-25 กรัม : น้ำ 2๐ ลิตร แล้วฉีดพ่นให้ทั่วสัปดาห์ละครั้ง

1.3 <u>การเก็บในโรงเรือนระบบไฮโดรโปนิกส์ (hydroponics)</u>ในการปลูกพืชโดยปกติทั่วๆไปมักจะมีปัญหาเรื่องโรคและแมลงต่างๆ มากมาย ซึ่งปัญหาส่วนหนึ่งมาจากดินที่เราใช้ปลูก การปลูกพืชโดยไม่ใช้ดินช่วยให้เราหลีกเลี่ยงปัญหาเรื่องโรคต่างๆ ทำให้ได้ผลผลิตสูง มีคุณภาพ ผลผลิตมีความสม่ำเสมอ สามารถวางแผนการปลูกได้ กำหนดปริมาณการผลิตให้เป็นไปตามเป้าหมาย หรือความต้องการของตลาดได้ดีกว่า เนื่องจากการปลูกพืชแบบไฮโดรโปนิกส์มีการจัดปัจจัยต่างๆ เช่น น้ำ แร่ธาตุ แสง อุณหภูมิให้แก่พืชอย่างเหมาะสม พืชจึงเจริญเติบโตเร็ว และให้ผลผลิตมากสม่ำเสมอ สะอาด มีคุณภาพดี ปลูกได้ต่อเนื่องตลอดปี สามารถปลูกพืชได้ในพื้นที่ไม่มีดิน หรือมีดินไม่เหมาะสมต่อการปลูกพืช การใช้น้ำใช้ปุ๋ยเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ ใช้แรงงานน้อย การควบคุมโรค แมลงศัตรูพืชทำให้ง่ายกว่า

2.การเก็บระยะยาวโดยเก็บเนื้อเยื่อในสภาพเยือกแข็งในไนโตรเจนเหลว (Cryopreservation) วิธีการนี้เกี่ยวข้องกับการทำให้แข็งตัวในไนโตรเจนเหลว เป็นที่นิยมใช้กันมากที่สุดโดยเฉพาะอย่างยิ่งในการเก็บรักษาเซลล์แขวนลอย อย่างไรก็ตาม สำหรับระบบการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อส่วนอื่นๆ ของพืช ก็สามารถทำได้เช่นกัน คือ แคลลัส โปรโตพลาส ปลายยอด คัพภะ เซลล์อับเกสรและละอองเกสรตัวผู้การเก็บรักษาโดยวิธีแช่เป็นการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ไว้ในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ที่อุณหภูมิ –196องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่สามารถคงสภาพเซลล์สิ่งมีชีวิตไว้ได้ เนื่องจากที่อุณหภูมินี้ทำให้กลไกการทำงานของเซลล์มีอัตราเกือบเป็นศูนย์ หากเซลล์ไม่เสียหายขึ้นก่อนในระหว่างขั้นตอนการลดอุณหภูมิ ผลจากการแช่แข็งที่ก่อความเสียหายให้กับเซลล์พืชระหว่างการลดอุณหภูมิ ได้แก่ การสูญเสียสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นระหว่างสารละลายภายในและภายนอกเซลล์ที่ทำให้ขนาดของเซลล์เปลี่ยนแปลง การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดเป็นด่างที่มีผลกระทบต่อโปรตีนภายในเซลล์ การเกิดผลึกน้ำแข็งภายในและภายนอกเซลล์ซึ่งจะทำลายเซลล์ทางภายภาพ เป็นต้น (Sakai, 2000; Benson, 2008) ดังนั้นการแช่แข็งเซลล์พืชให้สำเร็จจะต้องมีวิธีการลดผลเสียเหล่านี้ โดยการให้พืชปรับตัวให้เข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำยาสำหรับแช่แข็งที่ระยะเวลาหนึ่งๆ การใช้น้ำยาและสารปกป้องเซลล์จากการแช่แข็ง (cryoprotectant) ในความเข้มข้นที่เหมาะสม วิธีการแช่แช่แข็งและอัตราลดอุณหภูมิที่เหมาะสม การละลายและการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อชักนำให้เกิดเป็นต้นใหม่ ซึ่งหากปฏิบัติได้อย่างเหมาะสมกับพืชชนิดนั้น ก็จะสามารถเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งได้นานตลอดไปและสามารถนำมาเพาะเลี้ยงให้เกิดเป็นต้นใหม่ได้อย่างไรก็ตาม การแช่แข็งพืชแต่ละชนิดให้ประสบความสำเร็จนั้นมีวิธีการที่แตกต่างกันไปตัวอย่างไม้น้ำที่สถาบันได้ทำการทดลองแช่แข็ง คือ

<u>1. หอมน้ำ</u> (*Crinum thainum*)

ทำการตัดเนื้อเยื่อเจริญจากส่วนหัวของต้นหอมน้ำที่เลี้ยงนาน 4 สัปดาห์ให้มีขนาดยาว 3–4 มม. หนา 1–2 มม. นำเนื้อเยื่อไปบ่มบนกระดาษกรองที่ชุบด้วยสารละลาย MS medium ที่วางอยู่ในจานเพาะเชื้อปิดผนึกด้วยแผ่น paraffin นาน 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องบ่มเนื้อเยื่อหอมน้ำบนกระดาษกรองที่ชุบด้วยอาหาร

สถาบันวิจัยและพัฒนาการเกษตรภาคใต้

สังเคราะห์ MS สูตรน้ำที่ผสมน้ำตาล sucrose เข้มข้น 0.5 โมลาร์ที่วางอยู่ในจานเพาะเชื้อปิดผนึกด้วยแผ่น paraffin นาน 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้องจากนั้นนำไปเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งแตกต่างกัน 3 วิธีคือ

วิธีที่ 1 controlled-rate-freezing (ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Reed and Uchendu (2008)) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำเนื้อเยื่อหอมน้ำใส่หลอดcryotubeเติมอาหารสังเคราะห์ MS สูตรน้ำ (MS ที่ไม่เติมผงวุ้น) และผสมสาร DMSO เข้มข้น 10% ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชม.

2. นำหลอดใส่ในเครื่องลดอุณหภูมิ (programmable freezer) ลดอุณหภูมิในอัตรา 0.25 องศาเซลเซียส/นาทีจากอุณหูมิ 25 องศาเซลเซียสจนถึงอุณหภูมิ –40 องศาเซลเซียส

3. นำหลอดออกจากเครื่องลดอุณหภูมิน้าไปแช่ในไนโตรเจนเหลว (–196 องศาเซลเซียส)

4. ละลายตัวอย่างในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสนาน 1 นาที

วิธีที่ 2 Ultra rapid freezing ตามวิธีการที่รายงานไว้ใน Halmagyi*et al*. (2004) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำเนื้อเยื่อหอมน้ำไปบ่มบนกระดาษที่ชุ่มด้วยอาหารสังเคราะห์ MS สูตรน้ำที่ผสมสาร DMSO เข้มข้น 7.5% บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 2 ชม. แล้วนำไปวางบนน้ำแข็ง (อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส) นาน 15 นาที

2. นำหลอด cryotube วางบนไอไนโตรเจนเหลวให้เย็นจัดแล้วเติมไนโตรเจนเหลวลงในหลอดให้มีปริมาตรประมาณครึ่งหลอด

3. คีบเนื้อเยื่อหอมน้ำใส่ลงไปในหลอดแช่แข็งแล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว

4. ละลายตัวอย่างโดยนำหลอดออกมาเปิดฝาคีบเนื้อเยื่อหอมน้ำแช่ในอาหารสังเคราะห์ MS สูตรน้ำที่มีอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที

วิธีที่ 3 Vitrification method ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Sakai *et al*. (2008) มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1. นำเนื้อเยื่อหอมน้ำใส่ลงในหลอด cryotube เติมน้ำยา loading solution (อาหารสังเคราะห์ MS สูตรน้ำที่ผสม glycerol เข้มข้น 2 โมลาร์และผสมน้ำตาล sucrose เข้มข้น 0.4 โมลาร์) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสนาน 20 นาที

2. ดูดน้ำยา loading solution ออกเติมน้ำยา PVS2 solution ปริมาตร 1 มล. (30% glycerol, 15% DMSO, 15% ethylene glycol, 0.4 M sucrose ในน้ำยา hormone-free MS medium) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสนาน 40 นาทีโดยทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำยา PVS2 ใหม่ในปริมาตร 0.5 มล. เมื่อบ่มนาน 5 นาที

3. นำหลอดแช่ลงในไนโตรเจนเหลว

4. ละลายตัวอย่างในน้ำอุ่นอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสนาน 1 นาที

2. <u>ใบพายเขาใหญ่</u> *(Cryptocoryne balansae)*ทำการทดลองแช่แข็งใบพายด้วยวิธีการ 2 วิธี คือ

วิธีที่ 1 encapsulation-dehydration

<u>วิธีการ</u>

สำนักวิจัยและพัฒนาการเกษตรเขตร้อน

1. บ่มเนื้อเยื่อบนกระดาษกรองที่ชุ่มด้วยน้ำยา MS medium+agar (30 g/l sucrose) วางใน petridish ปิดผนึกด้วยแผ่น paraffin นาน 24 ชม.แล้วย้ายไปบ่มบนกระดาษกรองที่ชุ่มด้วยน้ำยา MS medium+agar (0.25M sucrose)นาน 24 ชม.

2. ทำเม็ด bead หุ้มเนื้อเยื่อ จำนวน 20 เม็ด

2.1 คีบเนื้อเยื่อใส่ลงในน้ำยาMSสูตรน้ำที่ผสมสาร sodium alginate เข้มข้น 3% (w/v)

2.2 ใช้ micropipette ใส่ tip ที่ตัดปลาย ดูดน้ำยาและเนื้อเยื่อเข้าไปใน tip ทีละ 1 ชิ้น

2.3 ค่อยๆ ปล่อยน้ำยาโดยให้เนื้อเยื่ออยู่ในหยดน้ำยา หยดลงในน้ำยา MS สูตรน้ำที่ผสมสาร มี $CaCl_2$เข้มข้น 0.1 M

2.4 กวน (stirring) นาน 30 นาที บนเครื่องกวนสาร แล้วรินน้ำยาทิ้ง ซึ่งในขั้นตอนนี้จะเกิดปฏิกริยาทำให้เกิดเม็ด bead หุ้มเนื้อเยื่อพืชขึ้น

2.5 ล้างเม็ด bead โดยเติมน้ำยา MSสูตรน้ำแล้วล้างซ้ำอีก 2 ครั้ง

3. บ่มเม็ด bead ในน้ำยาเบอร์ MS สูตรน้ำที่ผสม sucrose เข้มข้น 7.5 โมลาร์บนเครื่อง rotary shaker นาน 20 นาที

4. รินน้ำยาทิ้ง คีบเม็ด bead ซับน้ำยาออกบนกระดาษกรองปลอดเชื้อ

5. ลดความชื้นเม็ด bead โดยนำไปวางบน petri-dish ที่เปิดเผยอฝาไว้ ใน laminar flow ที่ 25 องศาเซลเซียสนาน 6 ชม.และ 8 ชม. อย่างละ 10 เม็ด

6. คีบเม็ด bead ใส่หลอด cryotubeนำไปแช่ลงในไนโตรเจนเหลว

7. ละลายเม็ด bead โดยนำหลอดที่แช่แข็งออกมา คีบเม็ด bead วางบน petri disc ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้นาน 5 นาที แล้วนำเม็ด bead ไปแช่ในน้ำยา MSสูตรน้ำนาน 20 นาที

8. นำไปชักนำให้เกิดต้นอ่อน บนอาหารกึ่งแข็ง MS + กระดาษกรอง

วิธีที่ 2encapsulation-vitrification

<u>วิธีการ</u>

1. Precultureเนื้อเยื่อพืชบนอาหาร MS ที่ผสม sucrose เข้มข้น 0.25 M นาน 1 วัน และทำเม็ด bead เช่นเดียวกับวิธีการที่ 1

2. บ่มเม็ด bead ในน้ำยา PVS2 นาน 30 นาที

3. บ่มเม็ด bead ในน้ำยา PVS2 บน shaker อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 60 นาที โดยเปลี่ยนถ่ายน้ำยาใหม่เมื่อเวลาผ่านไป 5 นาที

4. เติมน้ำยา 2 ลงในหลอด cryotube0.5 มล. แล้วคีบเม็ด bead ใส่ลงในหลอด ปิดฝาให้แน่น

5. แช่หลอดลงในไนโตรเจนเหลว

6.ละลายเม็ด bead โดยนำหลอดแช่แข็งออกมาละลายในน้ำอุ่น อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสนาน 2-3 นาที ดูดน้ำยา 2 ในหลอดทิ้ง

7. ล้างเม็ด bead โดยเติมน้ำยา 3 ปริมาตร 1 มล. (เติมไปซักครู่แล้วดูดน้ำยา 3 ทิ้ง แล้วเติมใหม่อีกครั้ง) ทิ้งไว้นาน 20 นาที

8. นำไปเลี้ยงบนอาหาร MS กึ่งแข็ง (+กระดาษกรอง)

<u>การละลายเนื้อเยื่อที่แข็งตัว (thawing)</u>

หลังจากเก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ในไนโตรเจนเหลงเป็นระยะเวลาหนึ่งแล้ว เมื่อต้องการนำมาใช้เพาะเลี้ยงต่อไปจะต้องละลายน้ำแข็งที่ตกผลึก โดยมีวิธีการดังนี้

สถาบันวิจัยและพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

- นำเนื้อเยื่อที่แข็งตัวใส่ในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิประมาณ 37-40 องศาเซลเซียส
- ย้ายไปเลี้ยงในอาหารกึ่งแข็ง

<u>การตรวจสอบความมีชีวิตของเนื้อเยื่อพืชหลังเก็บรักษา</u>มีวิธีการตรวจสอบ 3 วิธี ดังนี้

1. เทคนิคการย้อมสี Fluorescein diacetate staining (FDA-test)

- เตรียมสต๊อกสารละลายใช้ย้อมสี โดยละลาย 0.5% (w/v) FDA ในอะซีโตน แล้วเก็บไว้ในตู้เย็น
- เจือจาง stock สารละลายนี้ ในอัตราส่วน 0.1 มล. ต่ออาหารที่ใช้ 5 มล. แล้วแช่ในน้ำแข็ง แต่ควรใช้ภายใน 1 ชั่วโมง
- หยดสารละลายเจือจาง 1 หยด ผสมกับเซลล์แขวนลอย 1 หยด ลงบนสไลด์และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์
- หลังจากนั้น 2-5 นาที ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ด้วยแสงสีขาวเพื่อดูเซลล์ทั้งหมด และใช้แสงอุลตราไวโอเลท (UV) ดูเซลล์ที่ยังมีชีวิตจะเรืองแสงชัด

วิธีนี้เหมาะต่อเซลล์แขวนลอย โปรโตพลาส และแคลลัส

2. เทคนิคการย้อมสี dye exclusion test

- ละลายสีย้อม Evans' blue 0.025% (w/v) กับ Phenasaffranine0.1% (w/v) ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยง
- หยดส่วนผสมของสีย้อม 1 หยด กับเซลล์แขวนลอย 1 หยด ลงบนสไลด์แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์
- หลังจากย้อมสีนาน 5 นาที ล้างด้วยอาหารเพาะเลี้ยง 2 ครั้ง แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสีย้อม ส่วนเซลล์ที่ตายไปแล้วจะมีการสะสมของเม็ดสี

3. เทคนิคการย้อมสี Evans' blue ร่วมกับสีย้อม Feulgen

วิธีนี้เหมาะต่อเซลล์ที่ยังคงมีชีวิต และนิวเคลียสจะไม่ติดสีย้อม ส่วนเซลล์ที่ไม่มีชีวิตแล้วติดสีย้อมเป็นสีน้ำเงิน โดยมีวิธีการดังนี้

- เตรียมสีย้อม Evans' blue ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น
- แช่เนื้อเยื่อพืชนานอย่างน้อย 3 ชั่วโมงในกรด formic acid 50%

3. การเก็บรักษาโดยลดการเจริญเติบโตให้ช้าลง (Slow growth)

เนื้อเยื่อพืชบางชนิดมีอัตราการเจริญเติบโตอย่างช้าๆ แม้ได้รับสภาพหรือเงื่อนไขต่างๆ ในการเพาะเลี้ยงอย่างเต็มที่ อย่างไรก็ตามเนื้อเยื่อพืชที่เพาะเลี้ยงส่วนใหญ่ต้องการเงื่อนไขพิเศษทั้งด้านธาตุอาหารและปัจจัยสภาพแวดล้อม เพื่อให้มีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้าลง วิธีการที่นิยมใช้กันมากคือ การลดอุณหภูมิขณะเพาะเลี้ยงร่วมกับการใส่สารบางชนิดที่ไปจำกัดการเจริญเติบโต หรือไปยับยั้งกระบวนการออสโมซิสของเนื้อเยื่อ และในบางกรณีอาจใช้วิธีลด หรือไม่ใส่ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตบางชนิด เช่นเดียวกับการลดปริมาณก๊าซออกซิเจน วิธีการนี้เหมาะสำหรับเก็บรักษาส่วนของยอด (shoot culture) และต้นที่ชักนำได้ แต่ไม่เหมาะสำหรับแคลลัส อาหารที่ใช้ควรเป็นอาหารกึ่งแข็งเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาธาตุอาหารจำกัด (ในกรณีที่เป็นอาหารแข็ง) หรือมีธาตุอาหารมากเกินไป (กรณีอาหารเหลว) ซึ่งจะมีผลต่อ osmotic ของเนื้อเยื่อพืช สำหรับวิธีที่มีการพัฒนาใช้นั้นมีด้วยกันหลายวิธี คือ

3.1 การลดอุณหภูมิ (reduced temperature) เหมาะสำหรับการเก็บรักษาแคลลัสและยอด

3.2 การใช้สารยับยั้งออสโมซิส (osmotic inhibitor) เหมาะสำหรับการเก็บรักษายอด

สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ

3.3 การใช้สารยับยั้งการเจริญเติบโต (growth inhibitor) เหมาะสำหรับการเก็บรักษายอด

3.4 การใช้ปัจจัยหลายๆ อย่างร่วมกัน (combination) ใช้ในกรณีที่การเก็บรักษาวิธีใดวิธีหนึ่งที่ได้กล่าวมาข้างต้นก่อให้เกิดผลเสีย อาจจำเป็นต้องใช้ปัจจัยจำกัดการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อร่วมกัน 2 ปัจจัย

เอกสารอ้างอิง

กรมประมง. 2530. ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย. กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 215 หน้า.

กรมประมง. 2535. ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย. กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ. 325 หน้า.

กรมประมง. (ไม่ปรากฏปีที่พิมพ์).การเลี้ยงกุ้งก้ามกราม. เอกสารเผยแพร่. กองส่งเสริมประมง, กรมประมง. 26 หน้า.

กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง หลักการ/วิธีการ/ประโยชน์. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 127 หน้า.

เฉิดฉัน อมาตยกุล, คีรี กออนันตกูล, ชาญชัย แสนศรีมหาชัย, สุรางค์ สุมโนจิตราภรณ์, ประดิษฐ์ ศรีภัทรประสิทธิ์, เรณู ว่องส่งสาร, ชุติพงศ์ ว่องส่งสาร, จิรชัย จันทนะ, เดชา รอดระวัง และ นพนันท์ อยู่รอง. 2538. ปลายีสก.กองประมงน้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 51 หน้า.

นิศา ไชยรักษ์. 2539. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยโดยวิธีแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ). ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 142 หน้า.

พลชาติ ผิวเณรและ พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข. 2546. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำในรูปน้ำเชื้อแช่แข็ง. เอกสารวิชาการฉบับที่ 1, สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 75 หน้า.

พลชาติ ผิวเณร, คงภพ อำพลศักดิ์, ถาวร จีนหมิก และ ชมพูนุช มรรคทรัพย์. 2547. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานิลโดยวิธีแช่แข็ง. เอกสารวิชาการฉบับที่6, สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 39 หน้า.

พลชาติ ผิวเณร, สมนึก คงทรัตน์, พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข และ ศรีรัตน์ สอดศุข. 2552. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกโดยวิธีแช่แข็ง. เอกสารวิชาการฉบับที่ 1, สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ, กรมประมง, กรุงเทพฯ. 31 หน้า

พลชาติ ผิวเณร, พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข, วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์ และ ถาวร จีนหมิก. 2555. ศึกษาผลของฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานต่อพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ปลาเทพาและการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเทพา

วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์, ยงยุทธ ทักษิณ และสุภาพ แก้วละเอียด. 2537. การเพาะพันธุ์ปลากดแก้ว. เอกสารวิชาการฉบับที่ 27/2537. กองประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 31 หน้า.

Kottelat, M. 1977. European freshwater fishes.www.fishbase.org.

Kottelat, M., A. J. Whitten, S. N. Kartikasari and S. Wirjoatmodjo. 1993. Freshwater fishes of Western Indonesia and Sulawesi. www.fishbase.org.

Mekong River Commission. 2011. Key Mekong fish species-migration paths. http://www.mrcmekong.org/programes/fisheries/mig_pangasius_s.htm

สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ

Roberts, T. R., 1992. revision of the southeast Asian cyprinid fish genus *Probarbus*, with two new species threatened by proposed construction of dams on the Mekong river. Ichtyol.Explor.Freshwat.3 : 37-48.

Ratanatrivong, W., W. Teparhudee, R. Yoonpundh and P. Srisapoome. 2011. Cryopreservation of bagrid catfish *Hemibagrus wyckioides* spermatozoa. KU.Fish. Res. Bull 35 (2): 33-43.

Scotcat. 2004. *Hemibagrus wyckioides*: Factsheet 100. http://www.scotcat.com/factsheets/hemibagrus_wyckioides.htm.

Tavarutmaneegul, P., S.Nukwan and K. Lawonyawut. 1992. Induced spawning of some economics freshwater fish species of Thailand. National Inland Fisheries Institute, Department of Fisheries, Thailand. 32 p.

Teugels, G. G. 1986. A systematic revision of the African species of the genus *Clarias* (Pisces; Clariidae).www.fishbase.org.

สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ